



中华人民共和国国家标准

GB/T 36781—2018

瓜类种传病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of cucurbit seed transmitted viruses

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施



国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国宁夏出入境检验检疫局、中国农业科学院郑州果树研究所、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:陈红运、陈青、陈林、廖富荣、方志鹏、黄峰、古勤生、张永江、林石明。

瓜类种传病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了瓜类作物上 5 种常见种传病毒——黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、甜瓜坏死斑病毒(*Melon necrotic spot virus*, MNSV)、南瓜花叶病毒(*Squash mosaic virus*, SqMV)和小西葫芦黄花叶病毒(*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)的检测方法,规定了马铃薯 Y 病毒科(*Potyviridae*)、烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)和南方菜豆花叶病毒属(*Sobemovirus*)的分子鉴定方法。

本标准适用于西瓜(*Citrullus vulgaris*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、瓠瓜(*Lagenaria siceraria*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*)、笋瓜(*Cucurbita maxima*)、苦瓜(*Momordica charantia*)和丝瓜(*Luffa cylindrica*)等瓜类作物种子的检疫鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样方法

3 原理

血清学特性和基因组特征是检疫鉴定的主要依据。瓜类种传病毒的相关背景资料参见附录 A。

4 仪器、试剂及耗材

4.1 仪器与用具

酶标仪、洗板机、PCR 仪、凝胶成像系统、恒温水浴、低温冰箱、普通冰箱、离心机、电子天平、电泳仪、电泳槽、微量移液器、研钵等。

4.2 试剂与耗材

酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂见附录 B, RT-PCR 检测试剂见附录 C。各种规格的吸头、离心管、酶标版、PCR 管等。

5 检疫与鉴定

5.1 抽样

按照 SN/T 2122 的规定执行。

5.2 制样

将种子播于灭菌土中,待长出 3 片~4 片真叶后,将表现症状的植株单独编号,未表现症状的植株

分组(10 株为 1 组)编号。采集真叶,将采集的叶片分成 2 份,根据需要分别用于酶联免疫测定和分子检测。

注:也可直接检测种子。

5.3 检测

5.3.1 病毒种类

瓜类种子检测的病毒种类见表 1。

表 1 瓜类种子检测的病毒种类

瓜类寄主	病毒种类
苦瓜	黄瓜绿斑驳花叶病毒 黄瓜花叶病毒
南瓜属(南瓜、西葫芦、笋瓜)	黄瓜绿斑驳花叶病毒 黄瓜花叶病毒 南瓜花叶病毒 小西葫芦黄花叶病毒
瓠瓜	黄瓜绿斑驳花叶病毒 黄瓜花叶病毒
丝瓜	黄瓜绿斑驳花叶病毒 黄瓜花叶病毒
甜瓜属(甜瓜、黄瓜)	黄瓜绿斑驳花叶病毒 黄瓜花叶病毒 甜瓜坏死斑病毒 南瓜花叶病毒 小西葫芦黄花叶病毒
西瓜	黄瓜绿斑驳花叶病毒 黄瓜花叶病毒 甜瓜坏死斑病毒

5.3.2 ELISA 检测

ELISA 检测见附录 B。ELISA 测定结果为阳性的样品需进行 RT-PCR 验证。

注:也可不经过 ELISA 初筛检测,直接进行 RT-PCR 检测。

5.3.3 RT-PCR 检测

分别提取样品和对照的总 RNA,反转录合成 cDNA 后,进行 PCR 扩增。健康的植物样品作阴性对照,感染特定病毒的植物样品作阳性对照,用水作空白对照。

具体操作见附录 C。

5.3.4 病毒科/属的鉴定

如显症植株针对特定病毒(CMV,CGMMV,MNSV,SqMV,ZYMV)的检测结果为阴性,应对其进

行病毒科/属的分子鉴定。马铃薯 Y 病毒科、烟草花叶病毒属和南方菜豆花叶病毒属的分子鉴定方法见附录 D。

6 结果判定

6.1 特定病毒的结果判定

酶联测定和 RT-PCR 检测结果均为阳性,判定检出特定的病毒。

采用 RT-PCR 直接检测样品时,扩增出预期大小的条带时,判定检出特定的病毒。

注:必要时,可进一步测序验证。

6.2 病毒科/属的结果判定

样品扩增出预期大小的条带,且测定的序列为相应病毒科/属的序列时,判定检出相应病毒科/属成员。否则判定未检出。

注:必要时,可采用下一代测序技术(NGS)对病毒科/属鉴定结果为阴性的显症植株做进一步分析。

7 结果记录

记录包括:样品来源、种类、取样人员、原始记录和检测结果等。酶联测定应有酶联板反应的原始数据,RT-PCR 检测应有电泳图片,必要时需附上测序结果。

8 样品保存

经检验确定携带病毒的样品应在合适条件下保存,种子保存在 4℃,病株在-20℃或者-80℃冰箱中保存,做好标记和登记。

附录 A
(资料性附录)
瓜类种传病毒特性

A.1 病毒种类

瓜类作物上的种传病毒见表 A.1。

表 A.1 瓜类作物上的种传病毒

序号	病毒名称	科	属	分布地区
1	黄瓜绿斑驳花叶病毒(<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> , CGMMV)	植物杆状病毒科 <i>Virgaviridae</i>	烟草花叶病毒属 <i>Tobamovirus</i>	英国、希腊、罗马尼亚、匈牙利、印度、沙特阿拉伯、丹麦、德国、俄罗斯、保加利亚、捷克、巴西、爱尔兰、摩尔多瓦、瑞典、芬兰、韩国、朝鲜、以色列、波兰、日本、巴基斯坦、中国
2	黄瓜花叶病毒(<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV)	雀麦花叶病毒科 <i>Bromoviridae</i>	黄瓜花叶病毒属 <i>Cucumovirus</i>	广泛分布
3	甜瓜坏死斑病毒(<i>Melon necrotic spot virus</i> , MNSV)	番茄丛矮病毒科 <i>Tombusviridae</i>	麝香石竹斑驳病毒属 <i>Carmovirus</i>	日本、美国、希腊、瑞典、意大利、突尼斯、中国局部
4	南瓜花叶病毒(<i>Squash mosaic virus</i> , SqMV)	伴生豇豆病毒科 <i>Secoviridae</i>	豇豆花叶病毒属 <i>Comovirus</i>	广泛分布
5	小西葫芦黄花叶病毒(<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> , ZYMV)	马铃薯 Y 病毒科 <i>Potyviridae</i>	马铃薯 Y 病毒属 <i>Potyvirus</i>	广泛分布

A.2 基因组特征

A.2.1 马铃薯 Y 病毒科

马铃薯 Y 病毒科包括 8 个病毒属,除了大麦黄花叶病毒属为二分体粒子外,其他 7 个病毒属均为单分体粒子。马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)是马铃薯 Y 病毒科中最大的病毒属,有 146 种病毒。*Potyvirus* 病毒粒子为弯曲线状,长度为 650 nm~900 nm,直径 11 nm~15 nm。基因组为 1 条正义 ssRNA,长度 8.5 kb~12 kb。

A.2.2 烟草花叶病毒属

病毒粒子长直杆状,长度 300 nm~310 nm,直径 18 nm。基因组为 1 条正义 ssRNA,长约 6.4 kb。

A.2.3 豇豆花叶病毒属

病毒粒子为等轴对称二十面体,直径约 28 nm。二分体基因组,由 RNA1 和 RNA2 组成。RNA 的

5'端连接 VPg, 3'端为 Poly(A), 两端各有 1 段非编码区。RNA1 长 5.9 kb~7.2 kb, RNA2 长 3.5 kb~4.5 kb。

A.2.4 麝香石竹斑驳病毒属

病毒粒子为等轴对称二十面体, 直径约 32 nm~35 nm。单分体基因组, RNA 的 3'端无 Poly(A), 5'端可能有一个甲基化的核苷酸帽子结构。

A.2.5 黄瓜花叶病毒属

病毒粒子为等轴对称的二十面体, 直径约 29 nm。三分体基因组, 每个病毒粒子包裹有单分子的 RNA 1 或 RNA2, 或者包裹 RNA3 和 RNA4。每个 RNA 片段的 5'端为甲基化帽子结构, 所有 RNA 片段的 3'端有一个约 200 nt 的同源区, 3'端无 Poly(A), 但为 tRNA 状结构。

A.2.6 南方菜豆花叶病毒属

病毒粒子为等轴对称二十面体, 直径约 30 nm。基因组为 1 条正义 ssRNA。

A.3 症状

A.3.1 黄瓜绿斑驳花叶病毒

黄瓜: 叶片斑驳并凸起, 畸形, 植株矮化, 果实上可产生黄或银色条斑, 果实严重受损。

西瓜: 受侵染叶片轻型叶斑驳, 严重时出现疱斑, 植株矮化, 成熟期果实表面出现浓绿色圆斑, 果肉变色和腐烂。

甜瓜: 茎端新叶出现黄斑, 随叶片老化症状减轻。

瓠子: 叶片出现花叶, 有绿色突起, 脉间黄化, 叶脉呈绿带状。

A.3.2 黄瓜花叶病毒

苗期染病子叶变黄枯萎, 幼叶呈深绿与淡绿相间的花叶状, 同时发病叶片出现不同程度的皱缩、畸形。成株染病新叶呈黄绿相间的花叶状, 病叶小且皱缩, 叶片变厚, 严重时叶片反卷; 茎部节间缩短, 茎畸形, 严重时病株叶片枯萎; 瓜条呈现深绿及浅绿相间的花色, 表面凹凸不平, 瓜条畸形。

A.3.3 甜瓜坏死斑病毒

被感染的子叶上出现坏死斑, 3~5 天后扩展至 2 mm~3 mm。随着植株的生长, 叶片上出现系统性坏死斑点, 发病严重时斑点部位坏死。

A.3.4 南瓜花叶病毒

严重的系统花叶, 叶片和果实畸形; 系统明脉、黄色镶脉和黄色斑点。

A.3.5 小西葫芦黄花叶病毒

褪绿局部斑, 系统明脉, 黄化, 花叶, 叶片畸形, 矮化。

附 录 B
(规范性附录)
DAS-ELISA 检测

B.1 试剂及配制**B.1.1 包被抗体**

特异性的病毒抗体。

B.1.2 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的病毒抗体。

B.1.3 底物

对硝基苯磷酸二钠(ρ NPP)。

B.1.4 PBST 缓冲液(pH 7.4)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 mL

用水定容至 1 L。

B.1.5 样品抽提缓冲液(pH 7.4)

Na ₂ SO ₃	1.3 g
PVP (MW24 000~40 000)	20.0 g
NaN ₃	0.2 g

PBST 定容至 1 L。4 ℃ 储存。

B.1.6 包被缓冲液(pH 9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g

用水定容至 1 L, 4 ℃ 储存。

B.1.7 酶标抗体稀释缓冲液(pH 7.4)

BSA(牛血清白蛋白)或 脱脂奶粉	2.0 g
PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
NaN ₃	0.2 g

PBST 定容至 1 L。4 ℃ 储存。

B.1.8 底物(ρ NPP)缓冲液(pH 9.8)

MgCl ₂	0.1 g
NaN ₃	0.2 g
二乙醇胺	97 mL

溶于 800 mL 水中,用 HCl 调 pH 值至 9.8,用水定容至 1 L。4 ℃ 储存。

B.2 程序**B.2.1 包被抗体**

用包被缓冲液将抗体按要求稀释,在酶标板中每孔加 100 μ L,37 ℃ 孵育 2 h。清空孔中溶液,PBST 洗涤 3 次。

B.2.2 样品制备

待测样品按 1 : 10(质量 : 体积)加入抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,7 500 g 离心 10 min,上清即为制备好的检测样品。阴性对照、阳性对照作相应的处理或按照说明书进行;空白对照为样品抽提缓冲液。

B.2.3 加样

根据检测需要设计酶标板,包括 2 个阴性对照孔、2 个阳性对照孔、2 个空白对照孔和多个待测样品孔。每孔加 100 μ L,每个样品设 2 个重复,4 ℃ 冰箱孵育过夜。清空孔中溶液,PBST 洗涤 3 次。

B.2.4 加酶标抗体

用酶标抗体稀释缓冲液按要求稀释酶标抗体,每孔加 100 μ L,37 ℃ 孵育 4 h。清空孔中溶液,PBST 洗涤 3 次。

B.2.5 加底物

将底物 ρ NPP 加入到底物缓冲液中使终浓度为 1 mg/mL(现配现用),每孔加 100 μ L。室温避光放置 30 min~60 min。

B.2.6 吸光值测定

阳性对照孔明显变色时,用酶标仪在 405 nm 波长读取吸光值。

B.3 结果判定

B.3.1 对照孔的 OD₄₀₅ 值(缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔),应该在质量控制范围内,即:

缓冲液孔和阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值 < 0.15;

阳性对照 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 > 2;

同一样品的 OD₄₀₅ 值应基本一致。

B.3.2 在满足了 B.3.1 质量要求后,结果原则上可判定如下:

样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 > 2,判定为阳性;

样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值接近阈值,判定为可疑样品,需重做一次或用 RT-PCR 验证;

样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 < 2 , 判定为阴性。

B.3.3 若满足不了 B.3.1 质量要求, 则不能进行结果判定。

B.3.4 使用检测试剂盒时, 应根据试剂盒的说明进行结果判定。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测

C.1 试剂

C.1.1 Trizol 裂解液。

C.1.2 三氯甲烷。

C.1.3 异丙醇。

C.1.4 75%乙醇。

C.1.5 50×TAE:

Tris	242 g
冰醋酸	52.1 mL
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2 g
加水定容至 1 L。用时加水稀释至 1×TAE。	

C.2 实验步骤

C.2.1 总 RNA 提取

称取 0.1 g 植物组织加液氮研磨成粉末状,迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,剧烈振荡摇匀后室温保持 5 min;4 ℃,12 000 g 离心 10 min,取上清;加入 0.2 mL 三氯甲烷并剧烈振荡混匀;4 ℃,12 000 g 离心 10 min,取上清;加 0.6 倍体积的异丙醇,颠倒混匀,室温保持 5 min;4 ℃,12 000 g 离心 10 min,弃上清;用 75%的乙醇洗涤沉淀,4 ℃,7 500 g 离心 2 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后,溶于 30 μL 水(DEPC 处理)中,-20 ℃保存备用。

注:也可采用等效的试剂盒提取总 RNA。

C.2.2 RT-PCR 扩增

C.2.2.1 cDNA 合成

RT-PCR 检测引物见表 C.1。cDNA 合成体系 20 μL:在 0.2 mL 反应管中加入总 RNA 6 μL,1 μL 下游引物(20 μmol/L),水 4 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,65 ℃ 水浴 5 min,取出后立即放在冰上,加入 5×First Strand Buffer 4 μL,40 U/μL RNase Block Ribonuclease Inhibitor 1 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,42 ℃水浴 2 min,然后再加入 200 U/μL Reverse Transcriptase 1 μL,混匀后 42 ℃水浴 50 min,70 ℃水浴 15 min,合成 cDNA。First Strand Buffer 和 Reverse Transcriptase 的用量需要依据反转录酶的品牌进行调整。

注:也可采用一步法 RT-PCR 试剂盒扩增。

表 C.1 RT-PCR 检测用引物

病毒	引物名称	序列(5'-3')	片段/bp	参考文献
CGMMV	CGMMV-F	ATGGCTTACAATCCGATCAC	486	陈红运 等,2006
	CGMMV-R	CTAAGCTTTCGAGGTGGTAGC		
CMV	CMV I-F	CGACTTAATAAGACGTTAGCAGC	500/600	Yu et al.,2005
	CMV II-F	TCCCAATGCTAGTAGAACCTCC		
	CMV-R	TGCTCRA YGTCRACATGAAG		
MNSV	MNSV-F	GTGAAGCTCGCTAARCAGGC	711	Yakoubi et al., 2008a
	MNSV-R	ACRTARAGATCACCR TGGGC		
SqMV	SqMV-F	CATGGTACAGCAGCTTGGAAC	597	廖富荣 等,2013
	SqMV-R	GAAGCCACAACAAAACCCAGA		
ZYMV	ZYMV-F	GGTTCATGTCCCACCAAGC	605	Yakoubi et al.,2008b
	ZYMV-R	ATGTCGAGTATCACATTTCC		

注: CMV I -F 与 CMV-R 检测 CMV 亚组 I 的分离物,扩增产物为 500 bp;CMV II -F 与 CMV-R 检测 CMV 亚组 II 的分离物,扩增产物为 600 bp。

C.2.2.2 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 C.2。PCR 反应参数见表 C.3。

表 C.2 PCR 反应体系

组分	体积/ μ L
水	—
10 $\times$ PCR Buffer (MgCl ₂ plus)	2.5
dNTP(10 mmol/L)	1.0
上游引物(20 μ mol/L)	0.5
下游引物(20 μ mol/L)	0.5
Taq 酶(5 U/ μ L)	0.2
cDNA	2.0
反应体系	25

表 C.3 PCR 反应参数

病毒	参数
CGMMV	95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s,53 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min
CMV	95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s,46 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,5 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min

表 C.3 (续)

病毒	参数
MNSV	95 ℃ 3 min; 95 ℃ 30 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 35 个循环; 72 ℃ 7 min
SqMV	95 ℃ 3 min; 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 35 个循环; 72 ℃ 7 min
ZYMV	95 ℃ 3 min; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 35 个循环; 72 ℃ 7 min

C.2.3 电泳

C.2.3.1 制备凝胶

配制 1.5% (质量: 体积) 的琼脂糖凝胶。溴化乙锭可直接加入琼脂糖凝胶中 (浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$)，也可在电泳完成后使用溴化乙锭染色。

C.2.3.2 电泳

用 $1 \mu\text{L}$ $6\times$ 加样缓冲液与 $5 \mu\text{L}$ 样品混合，然后将其和适合的 DNA 分子量标准物分别加入到样品孔中。电泳结束后将琼脂糖凝胶置于紫外透射仪上观察，拍照并保留结果。

C.3 结果判定

在阴性对照和空白对照无特异性扩增、阳性对照出现预期大小条带的情况下：

——样品出现与阳性对照大小一致的条带，判定 RT-PCR 检测结果为阳性。

注：必要时，可进一步测序验证。

——样品未出现与阳性对照大小一致的条带，判定 RT-PCR 检测结果为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
病毒科/属鉴定方法

D.1 试剂

见 C.1。

D.2 实验步骤

D.2.1 总 RNA 提取

见 C.2.1。

D.2.2 RT-PCR 扩增

D.2.2.1 cDNA 合成

病毒科/属鉴定所用引物见表 D.1。cDNA 合成见 C.2.2.1。

表 D.1 病毒科/属鉴定用引物

科/属	引物名称	序列(5'-3')	片段/bp	参考文献
马铃薯 Y 病毒科 <i>Potyviridae</i>	Sprimer	GGNAAYAAAYAGYGGNCARCC	约 1 700	Chen & Adams,2001
	M4	GTTTTCCCAGTCACGAC		
	* M4T	GTTTTCCCAGTCACGAC(T) ₁₅		
烟草花叶病毒属 <i>Tobamovirus</i>	TobRT up1	GARTAYSCIGCIYTICARAC	第 1 轮 PCR	Dovas et al.,2004
	* TobRT do2	BGCYTCRAARTTCCA	568	
	TobN up3	GGCGYTGCARACIATHGTITAYCA	第 2 轮 PCR	
	TobN do4	GTRTTICCIATRAAIGTIGTIACRTC		
	TobN do4G	GCCGATRAAGGTGGTGACRTC		
南方菜豆花叶病毒属 <i>Sobemovirus</i>	Sobemo-RdRp-5'	CCNTCNAARCCNGGNATGGG	约 400	Lecoq et al.,2011
	* Sobemo-RdRp-3'	RTCNCCCATNGCDATRCACCA		
注: 标记 * 的引物(M4T,TobRT do2,Sobemo-RdRp-3')用于 cDNA 合成。				

D.2.2.2 PCR 扩增

用于鉴定马铃薯 Y 病毒科、烟草花叶病毒属、南方菜豆花叶病毒属的 PCR 反应体系与反应参数分别见表 D.2、表 D.3、表 D.4。

表 D.2 马铃薯 Y 病毒科 PCR 体系

组分	体积/ μL
水	38.5
10 $\times$ PCR Buffer (MgCl ₂ plus)	5
dNTP (10 mmol/L)	2
Primer (20 $\mu\text{mol/L}$)	1
M4 (20 $\mu\text{mol/L}$)	1
Taq 酶 (5 U/ μL)	0.5
cDNA	2
反应体系	50
95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 47 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。	

表 D.3 烟草花叶病毒属 PCR 体系

第 1 轮 PCR		第 2 轮 PCR	
组分	体积/ μL	组分	体积/ μL
水	35.5	水	34
10 $\times$ PCR Buffer (MgCl ₂ plus)	5	10 $\times$ PCR Buffer (MgCl ₂ plus)	5
dNTP (10 mmol/L)	2	dNTP (10 mmol/L)	2
TobRT up1 (20 $\mu\text{mol/L}$)	2.5	TobN up3 (20 $\mu\text{mol/L}$)	2.5
TobRT do2 (20 $\mu\text{mol/L}$)	2.5	TobN do4 (20 $\mu\text{mol/L}$)	2.5
Taq 酶 (5 U/ μL)	0.5	TobN do4G (20 $\mu\text{mol/L}$)	2.5
cDNA	2	Taq 酶 (5 U/ μL)	0.5
反应体系	50	第 1 轮 PCR 产物	1
95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 43 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 5 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 46 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。		反应体系	50
		95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 2 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 26 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min	

表 D.4 南方菜豆花叶病毒属 PCR 体系

组分	体积/ μL
水	38.5
$10\times$ PCR Buffer (MgCl_2 plus)	5
dNTP (10 mmol/L)	2
Sobemo-RdRp-5' (20 $\mu\text{mol/L}$)	1
Sobemo-RdRp-3' (20 $\mu\text{mol/L}$)	1
Taq 酶 (5 U/ μL)	0.5
cDNA	2
反应体系	50
95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。	

D.2.3 电泳

见 C.2.3。

D.2.4 测序

待检样品出现与阳性对照一致的扩增片段时,应对 PCR 产物进行序列测定和分析。

D.3 结果判定

阴性对照和空白对照无特异性扩增,相应科/属病毒的阳性对照出现预期大小的条带:

- 样品出现与阳性对照大小一致的条带,且测定的序列为相应病毒科/属的序列,判定检出相应科/属的病毒。
- 样品出现与阳性对照大小一致的条带,但测定的序列非相应病毒科/属的序列,判定未检出相应科/属的病毒。
- 样品未出现与阳性对照大小一致的条带,判定未检出相应科/属的病毒。

参 考 文 献

- [1] 陈红运,赵文军,程毅,等. 辽中地区西瓜花叶病病原的分子鉴定. 植物病理学报,2006,36(4):306-309.
- [2] 廖富荣,叶志红,陈青,等. 应用 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 方法检测南瓜花叶病毒. 植物检疫,2013,27(2):60-64.
- [3] Chen J, Adams M J. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. Archives of Virology,2001,146(4):757-766.
- [4] Dovas C I, Efthimiou K, Katis N I. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. Journal of virological methods,2004,117(2):137-144.
- [5] Lecoq H, Dafalla G, Delécolle B, et al. Snake melon asteroid mosaic virus, a tentative new member of the genus Sobemovirus infecting cucurbits. Plant Disease,2011,95(2):153-157.
- [6] Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, et al. First report of Melon necrotic spot virus on melon in Tunisia. Plant pathology,2008a,57(2):386-386.
- [7] Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, et al. Molecular, biological and serological variability of Zucchini yellow mosaic virus in Tunisia. Plant pathology,2008b,57(6):1146-1154.
- [8] Yu C, Wu J, Zhou X. Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. Journal of virological methods,2005,123(2):155-161.
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
瓜类种传病毒检疫鉴定方法
GB/T 36781—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 32 千字
2018年9月第一版 2018年9月第一次印刷

*

书号: 155066·1-61078 定价 21.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 36781—2018