



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4338—2015

热处理脱除马铃薯卷叶病毒技术规程

Rules of potato leaf roll virus elimination by thermotherapy

2015-09-02 发布

2016-04-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准负责起草单位：中国检验检疫科学研究院。

本标准起草人：王仁睿、李明福、牟海青、李桂芬、马洁。

热处理脱除马铃薯卷叶病毒技术规程

1 范围

本标准规定了热处理脱除马铃薯卷叶病毒的程序及再生苗的病毒检测方法。
本标准适用于对感染马铃薯卷叶病毒的马铃薯块茎、组培苗进行热处理。

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 2627—2010 马铃薯卷叶病毒检疫鉴定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

热处理 **thermotherapy**

将植物置于热水或热空气中(温度高于植物正常的生长温度)一段时间,剥取新梢或茎尖进行培养,得到新的再生植株,以达到脱除病毒目的的方法。

3.2

脱毒苗 **virus-free seedlings**

经过脱毒处理过程且病毒检测结果为阴性的再生苗。

4 原理

植物培养在高于正常生长的温度条件下,体内的病毒活性被钝化,病毒在植物体内增殖减缓或停止。热处理一段时间后,切取植物新梢或茎尖,因热处理增大了新梢或茎尖的无毒区域,因此取下这部分进行培养,可得到无毒的再生植株。

5 仪器、用具和试剂

5.1 仪器

恒温恒湿箱/植物光照培养箱、超净工作台/生物安全柜、天平(感量 1/10 000 g)、解剖镜、高压灭菌锅、酶标仪、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、恒温水浴锅、电镜。

5.2 用具

量筒、容量瓶、三角瓶、pH 计/pH 试纸、镊子、剪刀、接种针、酶联板、微量移液器(20 μL , 100 μL , 200 μL , 1 000 μL , 5 000 μL)、研钵。

5.3 试剂

5.3.1 组织培养

MS 培养基粉末或 MS 母液、琼脂、GA₃、KT。

5.3.2 DAS-ELISA

马铃薯卷叶酶联试剂盒、包被缓冲液(coating buffer, 2.93 g 碳酸氢钠、1.59 g 碳酸钠、0.2 g 叠氮化钠分别溶于 1 000 mL 蒸馏水, 调 pH 值到 9.6)、洗涤液(PBST Buffer, 1.15 g 无水碳酸氢二钠、0.2 g 氯化钾、0.2 g 无水碳酸二氢钾、8.0 g 氯化钠、0.5 g 吐温-20, 分别溶于 1 000 mL 蒸馏水, 调 pH 值到 7.4)、样品抽提液(GEB buffer, 1.3 g 无水硫酸钠、20.0 g 聚乙烯比咯烷酮、0.2 g 叠氮化钠、2.0 g II 级鸡蛋清白蛋白粉、20 g 吐温-20, 分别溶于 1 000 mL 蒸馏水, 调 pH 值到 7.4)、酶标抗体稀释缓冲液(ECI Buffer, 0.2 g 牛血清白蛋白或脱脂奶粉、2.0 g 聚乙烯比咯烷酮、0.02 g 叠氮化钠, 分别溶于 1 000 mL 蒸馏水, 调 pH 值到 7.4)底物缓冲液(PNP Buffer, 0.01 g 氯化镁、0.02 g 叠氮化钠、9.7 mL 二乙醇胺分别溶于 100 mL 蒸馏水, 调 pH 值到 9.8)、底物溶液(PNP substrate, 5 mg 对硝基苯磷酸盐溶于 5 mL 底物缓冲液)、终止液(12 g 氢氧化钠溶于 100 mL 蒸馏水)。

5.3.3 RT-PCR

莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶(MMLV, 100 U/ μ L)、1 $\times$ TAE 缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L 乙酸钠、2 mmol/L EDTA, 冰乙酸调 pH 至 8.0)、5 $\times$ RT 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L 氯化钠, 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L DTT, 0.01% NP-40, 50% 甘油)、10 $\times$ PCR 缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L 氯化钾)、25 mmol/L 氯化镁、RNA 酶抑制剂(10 U/ μ L)、RT 增强剂、无水乙醇、RL 裂解液、去蛋白液、Taq 酶(2.5 U/ μ L)、dNTP Mixture (10 mmol/L)、漂洗液、双蒸水、2-巯基乙醇、液氮、引物: 上游引物(P1)碱基序列: 5'-AGGCGCGCTA-ACAGAGTTCA-3', 下游引物(P2)碱基序列: 5'-CTTGAATGCCGGACAGTCTG-3', 用双蒸水稀释至 20 μ mol/L。

6 热处理脱除马铃薯卷叶病毒的操作流程

6.1 种薯

将带有马铃薯卷叶病毒的种薯打破休眠, 放进恒温恒湿箱/植物光照培养箱中, 温度调为 40 $^{\circ}$ C (4 h)/20 $^{\circ}$ C (16 h), 黑暗状态, 相对湿度调为 75%, 处理时间为 8 周, 将处理完的种薯种植到温室里, 温度为 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 待苗长出 4 周~6 周后开始进行病毒检测(见附录 A)。

6.2 组培苗

将带有马铃薯卷叶病毒的组培苗放进恒温恒湿箱/植物光照培养箱中, 温度调为 30 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C (8 h 黑暗)、37 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C (16 h 光照), 相对湿度调为 75%~85%, 处理时间为 4 周, 处理完的组培苗剥取 0.2 mm~0.5 mm 长的茎尖(分生组织带 1~2 片叶原基), 茎尖培养在 MS+GA₃ 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L, 使其萌发, 再生苗培养在 MS 上, 继代周期是 3 周, 继代两次后开始进行病毒检测(见附录 A)。

7 再生苗的病毒检测

7.1 免疫学检验(DAS-ELISA)

再生苗的第一次病毒检测采用免疫学检验法,即 DAS-ELISA。热处理后的种薯播种到温室,温室温度为 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。苗长出 4 周~6 周后开始进行。热处理后的组培苗继代两次(6 周)后开始进行。具体操作步骤参考 SN/T 2627—2010 附录 A 执行。在阴性对照 OD 值 ≤ 0.1 ,且阳性对照 OD 值大于阴性对照 OD 值 2 倍的前提下,样品孔 OD 值大于阴性对照 OD 值 2 倍时,判定为阳性反应,结果呈阳性的再生苗判定为带毒材料,予以销毁或再行脱毒处理;否则判定为阴性反应,结果呈阴性的再生苗标记好,继续培养,用以分子生物学检测。

7.2 分子生物学检测(RT-PCR)

再生苗的第二次病毒检测采用分子生物学检验。种薯继续生长 4 周后进行 RT-PCR 检测,组培苗继续继代两至三次(6 周~9 周)后进行 RT-PCR 检测。具体操作步骤按 SN/T 2627—2010 附录 B 执行。在阴性对照无扩增条带,且阳性对照出现 222 bp 目标条带的前提下,样品 RT-PCR 产物电泳结果在 222 bp 处出现目标条带,判定为阳性反应,结果呈阳性的再生苗判定为带毒材料,予以销毁或再行脱毒处理;否则判定为阴性反应,结果呈阴性的再生苗判定为脱毒苗,予以妥当标记和保存。

8 综合判定

经 DAS-ELISA 和 RT-PCR 检测均为阴性的再生苗判定为脱毒苗,予以妥当标记和保存,否则判定为非脱毒苗。

附录 A
(规范性附录)

热处理脱除马铃薯卷叶病毒流程图

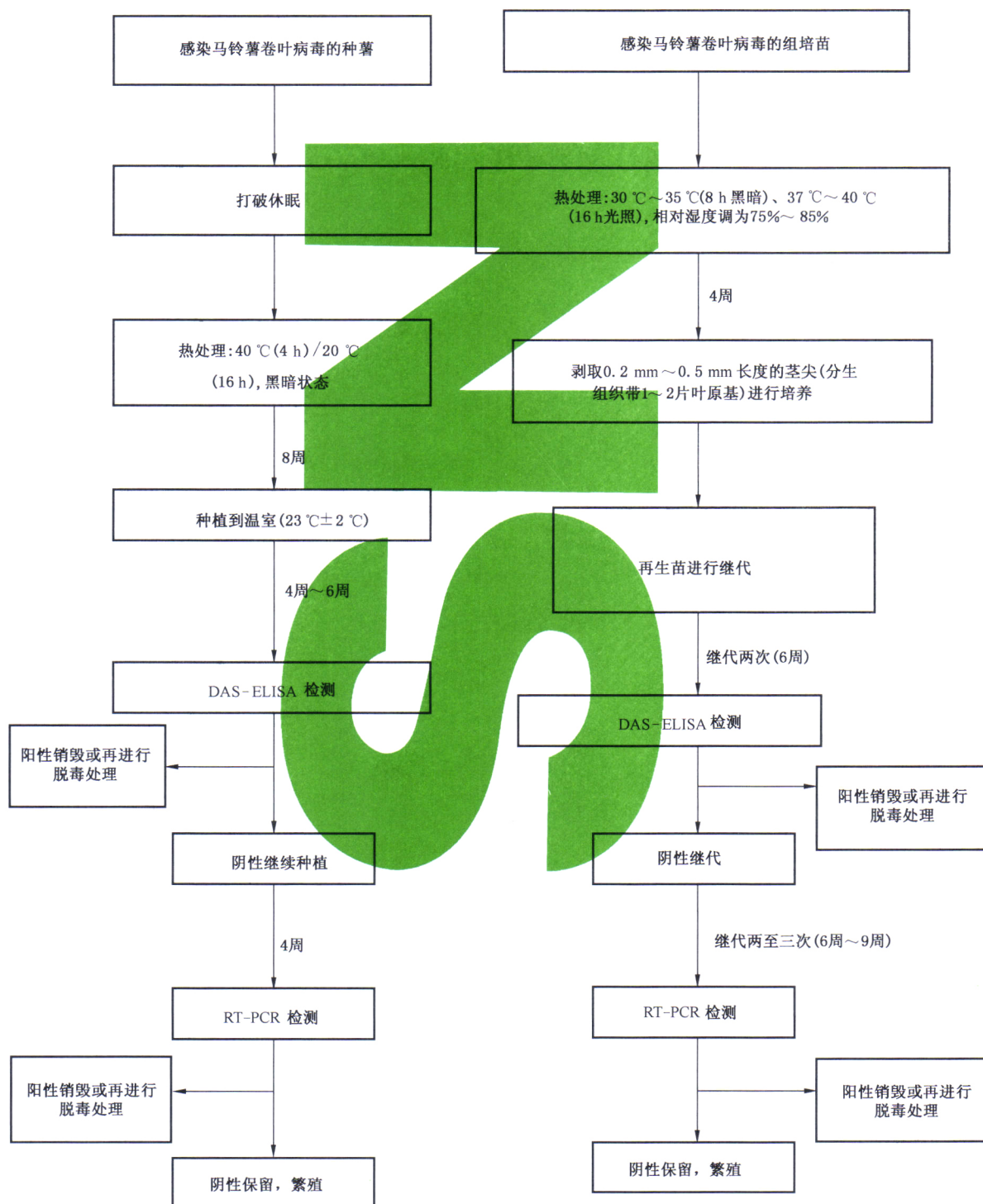


图 A.1 热处理脱除马铃薯卷叶病毒流程图

参 考 文 献

- [1] A.Hamid and S.B.Locke, Heat inactivation of leafroll virus in potato tuber tissues, American Potato Journal. 1961, 38(9): 304-310.
- [2] C.N.Paet and A.B.Zamora, Efficacy of thermotherapy and group culture of isolated potato meristems for the elimination of single and mixed infections of potato virus Y, potato virus S and potato leaf roll virus, Philipp Journal Crop Science. 1990, 15(2): 113-118.
-