

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1796—2009

甘 蔗 种 苗

Seedling of sugarcane

2009-12-22 发布

2010-02-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准的起草单位：农业部甘蔗及制品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：许莉萍、张华、陈如凯、高三基、罗俊、林彦铨。

甘蔗种苗

1 范围

本标准规定了甘蔗种苗的术语与定义、质量指标、检验方法、包装、标志、运输和贮存的方法。

本标准适用于甘蔗种茎以及通过腋芽或茎尖组织培养技术培育的不带甘蔗花叶病毒[Sugarcane Mosaic Virus, ScMV]和 Sugarcane Sorghum Mosaic Virus (SrMV)]和甘蔗宿根矮化病菌[*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*(Lxx)或 *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*(Cxx)]的甘蔗脱毒种苗的质量鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 12943 苹果无病毒苗木和苗木检疫规程

NY 357 香蕉 组培苗

3 术语和定义

下列术语与定义适用于本标准。

3.1

甘蔗种苗 sugarcane seedlings

甘蔗种茎和甘蔗脱毒种苗统称甘蔗种苗。

3.2

甘蔗脱毒种苗 virus-free and bacterium-free seedlings of sugarcane

指通过腋芽或茎尖组织培养技术培育的不带本标准规定的检测对象的组培瓶苗、袋栽苗及其无性繁殖后代。

3.3

品种纯度 variety purity

经确认的真实品种种茎数占种茎总数的百分率。

3.4

夹杂物 inclusion

种茎中夹带的蔗叶、已脱落的叶鞘、沙土、腐败茎及其他非蔗物。

3.5

发芽率 germination rate

在气温 20℃以上、土壤最大持水量 65%以上播种 10 d 内的萌芽率。

3.6

甘蔗组织培养技术 sugarcane tissue culture technique

指利用甘蔗的器官、组织细胞作为外植体,采用无菌操作接种于人工配制的培养基上,在一定的光照和温度条件下进行培养,使之生长、分化并发育成完整小植株的技术。

3.7

瓶苗 bottle seedlings

指在培养瓶中生长且已达假植标准的根、茎、叶俱全的完整甘蔗小植株。

3.8

袋栽苗 bag seedlings

指甘蔗瓶苗假植于盛有营养土的特定规格塑料袋或塑料盘中,并经精心管理长成的可供大田定植的种苗。

3.9

变异 variation

在组织培养过程中甘蔗植株的遗传特性发生了变化,其形态表现出有别于原品种植株的特征。主要表现为:白化、假茎和叶片畸形。

3.10

带毒允许率 virus or bacterium allowing rate

指瓶苗、袋栽苗及其无性繁殖后代允许带毒的比率。

3.11

带毒检出率 virus or bacterium detection rate

指甘蔗脱毒种苗中检出的带有检测对象的阳性植株数占总检测植株数的百分率。

3.12

其他主要病害率 rate of other major diseases

指甘蔗脱毒种苗中检出的带有其他主要病害(表3)的植株数占总检测植株数的百分率。

4 质量要求

4.1 甘蔗脱毒瓶苗和袋栽苗

4.1.1 脱毒瓶苗

要求根系有分枝,有主根和侧根,叶色绿,生长正常无变异。脱毒瓶苗按质量要求分为一级和二级两个级别,见表1。低于二级标准的脱毒瓶苗不得作为商品苗,并将结果记入附录A.2规定的记录表中。

表1 甘蔗脱毒瓶苗质量要求

项 目	指 标	
	一 级	二 级
品种纯度, %	100.0	100.0
假茎	有(+)	有(+)
株高, cm	≥ 5.0	$\geq 3.5, < 5.0$
1.0 cm 以上白色根, 条	≥ 4	≥ 2
完全展开叶, 片	> 4	> 3
带毒检出率, %	未检出	≤ 0.5
变异率, %	未检出	未检出

4.1.2 脱毒袋栽苗

要求叶色绿,根系生长良好,叶片无病虫害症状,无明显可辨的变异株,大田种植后变异率小于5%。脱毒袋栽苗按质量要求分为一级和二级两个级别,见表2,低于二级标准的袋栽苗不得作为商品苗,并将结果记入附录A.3规定的记录表中。

表2 脱毒甘蔗袋栽苗质量要求

项 目	指 标	
	一 级	二 级
品种纯度, %	100.0	100.0
新出叶, 片	>6	≥4
假茎高, cm	≥12.0	≥8.0
假茎粗, cm	>0.3	≥0.2
1.0 cm 以上白色根, 条	≥4	≥2
其他主要病害率, %	未发现	≤1.0
带毒检出率, %	未检出	≤1.0
注: 其他主要病害指其他为害甘蔗的重要病害甘蔗黄叶病、梢腐病、褐条病、黄斑病。		

4.2 甘蔗脱毒种茎

甘蔗种茎和甘蔗脱毒种茎按质量要求分为一级和二级两个级别, 见表3, 低于二级标准的种茎不得作为商品种茎。并将结果记入附录 A. 4 表中。

表3 甘蔗种茎和甘蔗脱毒种茎质量要求

项 目	指 标	
	一 级	二 级
品种纯度, %	100.0	100.0
夹杂物率, %	≤1.0	≤1.0
种茎茎径, cm	≥2.2	>1.8
含水量, %	60~75	60~75
发芽率, %	≥80.0	≥75.0
带毒检出率*, %	≤1.0	≤3.0
其他主要病害率*, %	≤3.0	≤5.0
注: 其他主要病害指其他为害甘蔗的重要病害甘蔗黄叶病、梢腐病、褐条病、黄斑病。表3中带*的项目仅对甘蔗脱毒种茎的要求。		

4.3 甘蔗种茎

非脱毒甘蔗种茎质量要求见表4。

表4 甘蔗种茎质量要求

项 目	指 标
品种纯度, %	100
夹杂物率, %	≤1.0
种茎茎径, cm	>1.8
含水量, %	60.0~75.0
发芽率, %	≥80.0
病虫害, %	≤5.0

5 检验方法

5.1 甘蔗种茎

5.1.1 品种纯度

通过茎色、节间形状、节间排列、蜡粉带、根点排列、根点行数、芽形、芽沟、芽位、叶鞘颜色、叶鞘 57 号毛群、叶舌形状、叶耳形状等性状的观察,依公式(1)计算品种纯度。

$$\text{品种纯度} = (\text{样本总数} - \text{误名种茎数}) / \text{样本总数} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

5.1.2 种茎含水量

种茎切段后劈成 4 份,采用常压烘箱干燥,于 105℃ 烘干至恒重,依公式(2)计算含水量。

$$\text{种茎含水量} = (\text{烘干前重量} - \text{烘干后重量}) / \text{烘干前重量} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

5.1.3 种茎发芽率

通过沙培促芽,依公式(3)计算发芽率。

$$\text{种茎发芽率} = \text{萌芽数} / \text{总芽数} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

5.1.4 茎径

用游标卡尺测量甘蔗节间中部的直径。

5.1.5 节间长度

用钢卷尺测量留种部分的下部节间长度。

5.1.6 夹杂物率

种茎称重后,随机采整捆种茎一捆,小心轻放,防止夹杂物脱落,附送检卡,依公式(4)计算夹杂物率。

$$\text{夹杂物率} = \text{夹杂物重量} / \text{种茎重量} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

5.2 甘蔗脱毒种苗

5.2.1 株高

用游标卡尺自基部(含长根部分)量至+1 叶(最新完全展开叶)最高可见肥厚带处。

5.2.2 白色根长

用游标卡尺量白色根的长度,记录大于或等于 1.0 cm 长的白色根条数。

5.2.3 完全展开叶

用感官检测已完全展开的叶片。

5.2.4 新出叶

用感官检测,自假茎基部往上检测瓶苗移栽后假植期间新长出的完全展开绿叶数。

5.2.5 假茎粗

用游标卡尺测量自袋面以上 2.0 cm 处的最粗直径。

5.2.6 假茎高

用游标卡尺自袋面量至+1 叶最高可见肥厚带处。

5.2.7 带毒检测与结果判定

瓶苗、袋栽苗和种茎苗的甘蔗花叶病毒(ScMV 或 SrMV)带毒检测,可采用叶片表型病害症状与硝酸纤维素膜酶偶联免疫(NCM-ELISA)检测方法(附录 D)相结合,也可采用表型与聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)检测方法(附录 E),或叶片表型与指示植物检测法(附录 F)相结合;瓶苗和袋栽苗的甘蔗宿根矮化病菌(Lxx 或 Cxx)带毒检测可采用 NCM-ELISA 或 PCR 检测方法,种茎苗可采用蔗茎纵剖表型病害症状和 NCM-ELISA 或 PCR 检测方法相结合。只要其中一种方法检出阳性,就可判定该样本带毒。

5.2.8 带毒检出率

采用表型病害症状或 NCM-ELISA 或 PCR 检测方法,判定为带毒的样本数占检测总样本数的百分率,即为带毒检出率。

5.2.9 病害率

检出的带有病害症状种茎的数量占检测总数的百分比。

6 检验规则

6.1 脱毒种苗

6.1.1 组批

同一时间,同一地点,取得同一品种不同单株的外植体经组织培养扩大繁殖后的脱毒苗(含瓶苗、袋栽苗和种茎苗)为同一组批。

6.1.2 抽样

各类脱毒种苗的抽样数量要求见表 5。其中:瓶苗或袋栽苗采用随机抽样,瓶苗以瓶为单位,在出厂前抽取;袋栽苗以株为单位,在出圃前抽取;种茎苗采用五点取样法,在生长过程中或砍种前抽取,以田块为单位进行抽样,如同一田块中品种数超过 1 个,还应该同时考虑不同品种的种植面积。单一田块面积或同一田块中特定品种面积不超过 0.4 hm² 的,抽 40 个样;超过 0.4 hm² 但不超过 1.0 hm² 的,抽 40 个~100 个样;1.0 hm² 以上的可采用二次抽样,先抽地块,再抽点取样。各取样点的抽样数量按五点平均的数量进行连续取样。取样数量按比例选择。

表 5 抽样数量要求

种苗种类	种苗或面积总量	抽样数量
瓶苗(瓶)或袋栽苗(株)	不超过 1 000	20
	不超过 5 000	40
	不超过 10 000	60
	超过 10 000	80
种茎苗	面积不超过 0.4 hm ²	40
	面积不超过 1.0 hm ²	40~100
	面积超过 1.0 hm ²	150

注:所有甘蔗脱毒种苗均应按本标准中的“检验规则”和“质量要求”进行抽样和带毒率检测。

6.1.3 检验

检验分带毒检验和出(厂)圃检验。

6.1.3.1 带毒率检验

由省(部)级有关部门批准认定具有资质的检测单位执行脱毒瓶苗、脱毒袋栽苗和脱毒种茎带毒率检测,并出具正规的甘蔗种苗带毒检测报告(附录 A)。

6.1.3.2 出(厂)圃检验

由供苗单位的质量检验室执行检验脱毒瓶苗、脱毒袋栽苗脱毒和种茎的出(厂)圃检验,按本标准“质量要求”中表 1、表 2 和表 3 所列的项目(除带毒检出率外)逐项进行,并出具检测报告(附录 A),附上甘蔗种苗质量检验证书。种茎苗检验限于种茎装运地或繁殖地进行。

6.1.4 判定规则

未进行带毒率检验或出(厂)圃检验以及检验结果带毒检出率达不到相应标准的,即判定该批产品不合格。带毒率超过 3%可申请复检,复检结果如合格率在允许范围视为合格,判定该批产品合格;如超过允许范围视为不合格,判定该批产品不合格。

6.2 种茎

有关检验规则同 6.1 中涉及种茎的内容,但不进行带毒率检测。

6.3 种苗销售或调运

必须附有质量检验证书和标签。

7 包装、标志、运输与贮存

7.1 脱毒种苗

7.1.1 包装

甘蔗瓶苗、袋栽苗均应妥善包装,保持正常生长状态。

7.1.2 标志

包装箱内附脱毒种苗出(厂)圃检验合格证、带毒检验报告复印件;外面应注明标准号、生产单位的地址及联系电话。

7.1.3 运输

汽车运输或办理托运至指定地点。瓶苗及时假植,袋装苗尽早定植。

7.2 种茎

7.2.1 包装

甘蔗种茎以 20 kg~25 kg 为一捆,用包装绳捆扎好,并挂上标签。

7.2.2 运输

甘蔗种茎在运输装卸过程中,应注意防止种芽的损伤。

7.2.3 贮存

砍收后的甘蔗种茎包装好后存放,上方可用覆盖物遮蔽,避免曝晒或霜冻害,同时应注意防虫鼠。

附 录 A
(规范性附录)
甘蔗种苗检测报告格式

A.1 甘蔗脱毒种苗带毒检测报告

甘蔗脱毒种苗带毒检测报告

No :

送样单位:

品种名称:

种苗采集地:

送样时间:

种苗数量:

抽检数量:

帶毒檢出率：

检验单位(盖章):

[illegible]

审核人(签字): 校核人(签字): 检测人(签字):

检测日期： 年 月 日

A.2 甘蔗瓶苗质量检测记录表

甘蔗瓶苗质量检测记录表

品种名称:

购苗单位:

供苗单位:

检验单位:

瓶苗总数:

抽检瓶数:

No: _____

样瓶号	品种纯度, %	假茎	株高, cm	1.0 cm 以上白色根, 条	完全展开叶, 片

注:假茎检验结果“+”表示有,“—”表示无。

审核人(签字):

校核人(签字):

检测人(签字):

检测日期: 年 月 日

A.3 甘蔗袋栽苗质量检测记录表

甘蔗袋栽苗质量检测记录表

品种名称:

购苗单位:

供苗单位:

检验单位:

总 苗 数:

抽检苗数:

No: _____

样株号	品种纯度, %	新出叶, 片	假茎高, cm	假茎粗, cm	其他主要病虫害, %

注:其他主要病害指为害甘蔗的重要病害黄叶病、梢腐病、褐条病、黄斑病。

审核人(签字):

校核人(签字):

检测人(签字):

检测日期: 年 月 日

A.4 甘蔗种茎质量检测记录表

甘蔗种茎质量检测记录表

品种名称:

购苗单位:

供苗单位:

检验单位:

总 苗 数:

抽检苗数:

No: _____

编号	品种纯度, %	夹杂物率, %	茎径, cm	含水量, %	发芽率, %	主要病害率, %

注: 主要病害指为害甘蔗的重要病害黄叶病、黑穗病、梢腐病、褐条病、黄斑病。

审核人(签字): 校核人(签字): 检测人(签字):

检测日期: 年 月 日

A.5 甘蔗种苗质量检验证书

甘蔗种苗质量检验证书

No: _____

育苗单位		购苗单位	
品种名称		种苗种类	
种苗数量		带毒检出率	
检验结果	其中, 一级: 二级:		
检验意见			
证书签发日期		出(厂)圃日期	

注: 本证一式三份, 育苗单位、购苗单位、检验单位各一份。

审核人(签字): 校核人(签字): 检测人(签字):

检测日期: 年 月 日

附 录 B
(规范性附录)
硝酸纤维素膜检测法

B.1 溶液配制

B.1.1 TBS(pH7.6)

Tris Base	4.84 g
NaCl	58.44 g
NaN ₃	0.40 g

溶于 1 990 mL 蒸馏水中,用 HCl(37%)调 pH 至 7.5,定容至 2 000 mL。

B.1.2 洗涤缓冲液(TTBS)

1.0 mL Tween-20 溶于 2 000 mL TBS 中。

B.1.3 抽提缓冲液

TBS 500 mL Na₂SO₃ 1.0 g TBS 缓冲液中加入 0.2%的 Na₂SO₃。

B.1.4 封闭缓冲液(现用现配)

脱脂奶粉	0.50 g
Triton X-100	0.5 mL
TBS	25 mL

先将脱脂奶粉溶解于少量 TBS 中,再用蒸馏水定容至 25 mL。加入 Triton X-100 混合均匀。

B.1.5 抗体缓冲液

脱脂奶粉	1.00 g
TBS	50 mL

B.1.6 底物缓冲液(pH9.5)

Tris Base	6.05 g
NaCl	2.92 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.51 g
NaN ₃	0.40 g

溶于 450 mL 蒸馏水中,用浓盐酸调 pH 至 9.5,用蒸馏水定容至 500 mL。

B.1.7 NBT 和 BCIP 储备液

B.1.7.1 NBT 储备液

硝基蓝四唑盐(NBT)	40 mg
70%二甲基甲酰胺	1.2 mL

混合均匀,4℃避光保存。

B.1.7.2 BCIP 储备液

5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸酯(BCIP)	20 mg
70%二甲基甲酰胺	1.2 mL

混合均匀,4℃避光保存。

B.1.8 底物溶液(现用现配)

底物缓冲液	25 mL
NBT 储备液	75 μ L
BCIP 储备液	75 μ L

先将 NBT 溶于 25 mL 底物缓冲液中,再逐滴中加入 BCIP 储备液,边加边振摇混匀。

B.2 样品制备

B.2.1 甘蔗花叶病毒带毒检测样品制备

所有待检样品(含瓶苗、袋栽苗和种茎)均取叶片,瓶苗以瓶为单位,每瓶取不同丛的 3 株,收集其叶片;袋栽苗以株为单位,取+1、+2 叶和+3 叶基部 1/3 叶片进行混合;田间种茎取+1 叶基部去中脉后的叶片 1 g,在液氮下研磨后转到无菌 1.5 mL 离心管中,加入 1.0 mL 抽提缓冲液(见 B.1.3),4℃下静置 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于点样。

B.2.2 甘蔗宿根矮化病原菌带毒检测样品制备

瓶苗以瓶为单位,每瓶取 3 株,整株取出后用自来水冲干净培养基,去叶片;袋栽苗以株为单位,取地上部,去叶片。按照 D2.1 的方法,获得上清液用于点样。田间种茎采用取地上部基部第三节的节间髓部 1 cm~2 cm 的方块压汁用于点样。

B.3 操作步骤

B.3.1 点样

将打好方格的硝酸纤维素膜放在干燥、洁净的滤纸上,用干净灭菌的微量移液器,每个样品吸取 17.0 μ L 上清液滴在膜上方格的正中,2 次重复。同时,设阳性、阴性和空白对照,干燥 15 min~30 min。

B.3.2 封闭

将干燥后的膜浸泡在封闭缓冲液中,室温下摇床振荡(50 r/min)1 h。

B.3.3 孵育第一抗体

将膜置于用抗体缓冲液稀释至工作浓度的抗血清中,室温下摇床振荡(50 r/min)过夜。

B.3.4 洗涤

用洗涤缓冲液洗膜 3 次,每次摇床振荡(100 r/min)3 min。

B.3.5 孵育第二抗体

将膜置于用抗体缓冲液稀释至工作浓度的酶标抗体中,室温下摇床振荡(50 r/min)1 h。

B.3.6 洗涤

洗涤 4 次,方法同 E3.4。

B.3.7 显色

将膜置于 NBT/BCIP 底物溶液中,室温下摇床振荡(50 r/min)孵育 30 min。

B.3.8 终止反应

弃去底物溶液,并用蒸馏水洗膜 3 次,每次摇床振荡(100 r/min)3 min。

B.3.9 阳性判断

晾干后观察颜色反应,出现蓝紫色后反应的样品为阳性。

附 录 C
(规范性附录)
聚合酶链式反应(PCR)检测法

C.1 甘蔗宿根矮化病菌(Lxx 或 Cxx)检测**C.1.1 引物**

Lxx1:5'CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC 3'

Lxx2:5'ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG 3'

C.1.2 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 C.1。

表 C.1 PCR 反应体系

试 剂	终浓度	单样品体积
ddH ₂ O		19.75 μ L
10 $\times$ PCR buffer(不含 MgCl ₂)	1 $\times$	5.0 μ L
MgCl ₂ (25 mol/L) *	2.5 mmol/L	5.0 μ L
1%BSA		5.0 μ L
0.8%(w/v)PVP		4.0 μ L
dNTPs	0.2 mmol/L	4.0 μ L
10 μ mol/L Primer 1	0.5 μ mol/L	2.5 μ L
10 μ mol/L Primer 2	0.5 μ mol/L	2.5 μ L
5 U/ μ L Taq 酶	0.025 U/ μ L	0.25 μ L
DNA 模板	0.5 ng/ μ L ~1.0 ng/ μ L	2.0 μ L
总体积		50 μ L
注: * 如 PCR 缓冲液中含有 Mg ²⁺ , 不应再加 MgCl ₂ , 而用 5.0 μ L ddH ₂ O 替代。		

C.1.3 DNA 扩增

在 PCR 反应管中按表 C.1 依次加入反应试剂,轻轻混匀,如 PCR 仪无热盖设备,需再加约 5 μ L 石蜡油防止蒸发,每个试样 2 次重复。离心 10 s 后,将 PCR 管插入 PCR 仪中进行 DNA 扩增。

采用如下 PCR 循环程序进行 DNA 扩增。95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;35 个循环的 PCR(94 $^{\circ}$ C,30 s; 56 $^{\circ}$ C,30 s; 72 $^{\circ}$ C,30 s);72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min 后;4 $^{\circ}$ C 保存待分析。

C.1.4 PCR 产物电泳检测

将适量的琼脂糖加入 1 $\times$ TAE 缓冲液中,加热溶解,配制成浓度为 2.0%(w/v)的琼脂糖溶液,然后按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μ L EB 溶液的比例加入 EB 溶液(EB 终浓度为 0.5 μ g/mL),混匀,稍冷却后,将其倒入制胶板上,插上梳板,室温下凝固成凝胶后,放入 1 $\times$ TAE 缓冲液中,轻轻垂直向上拨去梳板。吸取 5 μ L 的 PCR 产物与 1 μ L 6 $\times$ 加样缓冲液混合后加入点样孔中,在其中一个点样孔中加入 DNA 分子量标准,接通电源在 5 V/cm 条件下电泳。

C.1.5 凝胶成像分析

电泳结束后,取出琼脂糖凝胶,轻轻地置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小,将电泳结果采集后形成电子文件存档或用照相系统拍照。根据琼脂糖凝胶电泳结果,对 PCR 扩增结果进行分析。

C.1.6 阳性判断

试验应设阳性对照,采用甘蔗宿根矮化病菌纯培养物或经检测能扩增出 PCR 产物长度约 438 bp 的样品保存备用;试验还应设阴性对照,采用健康且已确认未能扩增出特异片段(约 438 bp)的样品保存备用。

结果判定:凡阳性对照有特异条带且阴性对照无特异条带,待检测样品可扩增出特异条带的,判定为阳性;凡阳性对照无特异条带或阴性对照扩增出特异条带,试验结果不能判定,应重新进行检测。

C.2 甘蔗花叶病毒(ScMV 或 SrMV)检测

C.2.1 引物

检测 ScMV 采用引物 ScF1 和 ScR1,检测 SrMV 采用引物 SrF1 和 SrR1。详细序列如下:

ScF1:5'TTT YCA CCA AGC TGG AA 3'

ScR1:5'AGC TGT GTG TCT CTC TGT ATT CTC T 3'

SrF1:5'AAG CAA CAG CAC AAG CAC

SrR1:5'TGA CTC TCA CCG ACA TTC C

C.2.2 样品与引物混合物

按如下反应体系处理样品。

R-引物 ScR1 或 SrR1(60 $\mu\text{mol/L}$)	0.25 μL
ddH ₂ O	0.25 μL
样品	1.0 μL
总体积	1.5 μL

混合后,置冰浴上,进行下面的操作。

C.2.3 反转录(RT)体系

按照如下比例进行大量混合,根据样品量多少进行放大。

MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.0 μL
10 $\times$ PCR buffer	1.0 μL
dNTP (each 10 mmol/L)	1.0 μL
H ₂ O	3.5 μL
RNase inhibitor (20 U/ μL)	0.5 μL
MuLV 反转录酶 (50 U/ml)	0.5 μL

混合后再加入 1.5 μL 样品与引物混合物(见 C.2.1.2),总体积 10 μL 。

(备选项:其中 dNTP 也可采用 dGTP, dCTP, dTTP 和 dATP 替代,各浓度均为 10 mmol/L,各 1.0 μL ,但 H₂O 的用量减少为 0.5 μL 。)

C.2.4 RT 程序

步骤 1:37 $^{\circ}\text{C}$,15 min;

步骤 2:99 $^{\circ}\text{C}$,5 min;

步骤 3:4 $^{\circ}\text{C}$,保存。

C.2.5 PCR 体系

按照如下比例在冰浴上进行混合,根据样品量多少进行缩小或放大。如为单管 PCR 反应,可在上步的基础上,直接加入如下各试剂,操作在冰浴上进行。

MgCl ₂ (25 mM)	4.0 μL
10×PCR buffer	4.0 μL
ddH ₂ O	31.5 μL
Taq (5 U/μL)	0.25 μL
F-引物 ScF1 或 SrF1 (60 pmol/μL)	0.25 μL 总体积 40 μL
该混合液与 C. 2. 3 反转录(RT)体系 10 μL 混合后,单管 PCR 反应体积为 50 μL。	

C. 2. 6 PCR 程序

PCR 程序如下。

- 步骤 1: 95℃, 5 min;
- 步骤 2: 60℃, 1 min ;
- 步骤 3: 72℃, 10 min;
- 步骤 4: 94℃, 1 min;
- 步骤 5: 94℃, 1 s;
- 步骤 6: 60℃, 1 s;
- 步骤 7: 72℃, 30 s;
- 步骤 8: 重复步骤 5~7, 重复 39 次, 完成 39 个 PCR 循环;
- 步骤 9: 72℃, 5 min; 取出置 4℃, 待分析。

C. 2. 7 PCR 产物电泳检测

将适量的琼脂糖加入 1×TAE 缓冲液中, 加热溶解, 配制成浓度为 2.0% (w/v) 的琼脂糖溶液, 然后按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μL EB 溶液的比例加入 EB 溶液 (EB 终浓度为 0.5 μg/mL), 混匀, 稍冷却后, 将其倒入电泳板上, 插上梳板, 室温下凝固成凝胶后, 放入 1×TAE 缓冲液中, 轻轻垂直向上拔去梳板。吸取 5 μL 的 PCR 产物与 1 μL 6×加样缓冲液混合后加入点样孔中, 在其中一个点样孔中加入 DNA 分子量标准, 接通电源在 5 V/cm 条件下电泳。

C. 2. 8 凝胶成像分析

电泳结束后, 取出琼脂糖凝胶, 轻轻地置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小, 将电泳结果采集后形成电子文件存档或用照相系统拍照。根据琼脂糖凝胶电泳结果, 对 PCR 扩增结果进行分析。

C. 2. 9 阳性判断

试验应设阳性对照, 采用甘蔗宿根矮化病菌纯培养物或经检测能扩增出 PCR 产物长度约 889 bp 的样品保存备用; 试验还应设阴性对照, 采用健康且已确认未能扩增出特异片段 (约 889 bp) 的样品保存备用。

结果判定: 凡阳性对照有特异条带且阴性对照无特异条带, 待检测样品可扩增出特异条带的, 判定为阳性; 凡阳性对照无特异条带或阴性对照扩增出特异条带, 试验结果不能判定, 应重新进行检测。

附 录 D
(规范性附录)
指示植物检测法

D.1 繁育指示植物

在 25℃ 左右, 防虫条件下种植甜高粱, 至 1 片~2 片完全展开叶时接种。

D.2 接种

以待测样品叶片提取液, 摩擦接种于甜高粱叶片上。方法是: 以手蘸提取液, 轻捏甜高粱叶片造成伤口, 保湿过夜, 每个样品重复接种 3 株, 同时设阳性对照、阴性对照。接种后置防虫室, 常规管理。

D.3 阳性判断

根据指示植物症状, 确定有无甘蔗花叶病毒。只要有一株指示植物表现系统症状, 即视为阳性。

D.4 缓冲液的配制及提取液的制备**D.4.1 0.01 mol/L PBS(pH 8.0)**

I 液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	35.8 g
加蒸馏水	1 000 mL
II 液: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13.9 g
加蒸馏水	1 000 mL

将 I 液 39 mL 与 II 液 61 mL 混合后, 再加蒸馏水至 1 000 mL, 然后用 NaOH 调至 pH8.0 即可。

D.4.2 提取缓冲液

0.01 mol/L PBS(pH8.0) 1 000 mL, Na_2SO_3 1.0 g

D.4.3 提取液制备

取待测样品新伸长叶片 10 g, 加提取缓冲液 10 mL, 经捣碎、榨汁后即成。

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
甘 蔗 种 苗

NY/T 1796—2009

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

北京昌平环球印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

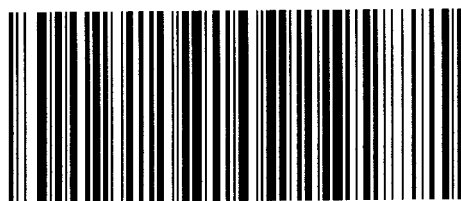
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1.25 字数 12 千字

2009 年 12 月第 1 版 2009 年 12 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·2021

定价: 30.00 元



NY/T 1796-2009

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 65005894