

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2724—2015

---

## 甘蔗脱毒种苗生产技术规程

Technique regulation for virus-free plantlet production of sugarcane

2015-05-21 发布

2015-08-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：浙江省农业科学院。

本标准主要起草人：陈剑平、陈志、汪一婷、牟豪杰、吕永平。

# 甘蔗脱毒种苗生产技术规程

## 1 范围

本标准规定了甘蔗脱毒种苗的术语和定义、脱毒种苗生产、甘蔗种苗病毒检测种类及方法、种苗包装、运输等要求。

本标准适用于甘蔗脱毒种苗生产。

## 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，仅所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。

NY/T 1798 甘蔗种苗

NY/T 2309 花卉种苗组培繁殖技术规程

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

甘蔗脱毒种苗 *sugarcane virus-free plantlet*  
经检测确定不携带甘蔗病毒病的甘蔗种苗。

### 3.2

组培种苗 *in-agar plantlet*  
生长在固体培养基(凝固剂一般为琼脂)上的组培甘蔗苗。

### 3.3

无琼脂苗 *ex-agar plantlet*  
从培养容器中取出并完全转移到组培生根苗。

### 3.4

穴盘苗 *plug plantlet*  
穴盘中移栽成活甘蔗组培苗。

## 4 脱毒种苗生产流程

### 4.1 无菌材料的获得

#### 4.1.1 外植体材料的选择

选择具有待生产品种典型性状、无明显病虫害、品种纯正的健壮植株，切取顶芽及饱满带节间腋芽。

#### 4.1.2 外植体处理、消毒及接种

##### 4.1.2.1 外植体处理

顶芽及带节间腋芽切成约 1 cm×1 cm×1 cm 大小的块状，剥去外面 2 层~3 层包被鳞(叶)片。

##### 4.1.2.2 清洗

预处理好的外植体，用洗洁精溶液浸泡并振荡 10 min~20 min，然后在自来水下流水冲洗 15 min~20 min。

##### 4.1.2.3 乙醇溶液处理

在准备好的超净台上,将清洗后的外植体转移到无菌锥形瓶中,倒入 70%~75%乙醇溶液没过外植体表面 1 cm,轻摇锥形瓶以除去植物材料表面气泡,30 s~60 s 后将酒精倒去,用无菌水冲洗外植体 3 次。

#### 4.1.2.4 次氯酸钠处理

用有效氯浓度 0.5%~1.0%的次氯酸钠溶液浸泡经乙醇溶液处理的植物材料,浸泡过程中不断轻摇锥形瓶以除去外植体表面气泡,10 min~15 min 后,倒出次氯酸钠溶液,植物材料用无菌水清洗 3 次~5 次后备用。

#### 4.1.2.5 氯化汞处理

经 70%~75%乙醇溶液处理的植物材料也可用 0.1%氯化汞溶液代替次氯酸钠溶液进行表面消毒,浸泡时间为 8 min~10 min,后续清洗同次氯酸钠处理。

#### 4.1.2.6 外植体接种

在超净工作台上取出灭过菌的接种盘,在接种盘内放置 1 张~2 张无菌滤纸,用冷却、无菌的接种器械将经过表面消毒的植物材料取出(每次取 3 个~5 个),放在无菌滤纸上吸干材料表面水分,然后将外植体接入外植体萌发培养基(参见附录 A),1 瓶接种 1 个外植体,封口。

#### 4.1.3 外植体培养

接种完成后统一贴上标签,注明品种、接种日期、接种培养基等信息,放在组培用托盘内,送入培养室进行培养,培养温度控制在 $(25\pm 3)^{\circ}\text{C}$ ,光照强度 $25\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\sim 40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光照时间每天不低于 12 h,培养期间及时去除被污染材料。

### 4.2 不定芽诱导和增殖

#### 4.2.1 不定芽诱导

由 4.1 得到的高约 1.5 cm~2.5 cm 的无菌、成活芽萌发材料,在无菌工作台上从芽基部与母体分离,然后接种在不定芽诱导培养基中,培养环境同 4.1.3。

#### 4.2.2 不定芽增殖

由 4.2.1 获得增殖良好的簇生甘蔗培养材料,在无菌工作台上以 3 个~4 个不定芽为接种单位从基部进行分离(芽高度控制在 2.0 cm~3.0 cm),然后接种在不定芽增殖培养基中,培养环境同 4.1.3。每 25 d~30 d 继代 1 次。

### 4.3 茎尖培养

#### 4.3.1 材料选择

选择经由 4.2.2 连续培养获得的健壮、无菌不定芽。

#### 4.3.2 茎尖剥离

在无菌条件下,将簇生不定芽从基部单个分离,并自芽基部以上 0.5 cm 左右处切断,选取芽基部分进行茎尖剥离。在体视镜下用无菌解剖刀小心逐层剥离外层叶鞘,直至露出长约 0.3 mm~0.5 mm 的茎尖,然后更换为无菌且未使用过的解剖刀将茎尖从母体材料切下,立即接种于茎尖伸长培养基中。

#### 4.3.3 茎尖伸长培养

将 4.3.2 接种好的甘蔗茎尖置于 $(23\pm 3)^{\circ}\text{C}$ ,光照强度 $10\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\sim 20\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光照时间每天不低于 12 h。

#### 4.3.4 不定芽诱导

茎尖伸长生长至 1.5 cm~2.0 cm 后即可接种到不定芽诱导培养基中,培养环境同 4.1.3。对每一个成活茎尖材料进行编号。

#### 4.3.5 再生材料增殖

将 4.3.4 获得的不定芽接种到不定芽增殖培养基中,培养环境同 4.1.3。每 25 d~30 d 继代 1 次。

### 4.4 茎尖培养再生植株病毒检测

#### 4.4.1 检测病毒种类

本标准检测病毒包括甘蔗花叶病毒(*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)、高粱花叶病毒(*Sorghum mosaic virus*, SrMV)、甘蔗黄叶病毒(*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV)和甘蔗杆状病毒(*Sugarcane bacilliform virus*, SCBV)。

#### 4.4.2 材料选择

茎尖培养再生材料增殖到 10 株~15 株后,按照 4.3.4 的要求对应编号,选取叶片为检测材料,对每个编号株系的茎尖再生材料进行病毒检测。

#### 4.4.3 检测方法

检测方法参见附录 B。检测所需仪器设备及试剂参见附录 C。

#### 4.4.4 脱毒材料确认

连续 3 代检测均同时不携带 4 种检测病毒的甘蔗组培材料即被确认为脱毒材料(不定芽)。

#### 4.4.5 不合格材料处理

不合格材料在未打开培养瓶情况下经 121℃、101 kPa 灭菌 30 min 后再废弃。

### 5 脱毒不定芽扩繁

#### 5.1 脱毒不定芽扩繁

经 4.4.4 确认的脱毒不定芽按照 4.2.2 的方法进行增殖。

#### 5.2 脱毒不定芽保存

脱毒不定芽扩繁材料可移至(18±2)℃,光照强度  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ~ $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光照时间 10 h~12 h 环境中进行长期保存。每 90 d 继代 1 次,可继代保存 12 代~15 代。

### 6 生根诱导

将株高≥3 cm 的簇生脱毒不定芽在无菌工作台上从基部进行单个分离,以单个不定芽为单位接种到生根诱导培养基中,培养环境同 4.1.3。

### 7 炼苗、移栽及管理

#### 7.1 炼苗时期

室外温度为 10℃~30℃之间均适合甘蔗组培苗移栽。

#### 7.2 基质准备及消毒

将不同基质按一定比例混配均匀,装入穴盘中并稍压紧,用 0.5 g/L 的多菌灵(80%可湿性粉剂)溶液浸透后捞出或喷透备用。

#### 7.3 组培苗炼苗

##### 7.3.1 炼苗标准

培养瓶内甘蔗组培苗高≥5 cm,基部长出 6 条~10 条 1 cm~1.5 cm 长的白色不定根,即可进行炼苗。

##### 7.3.2 炼苗

温室中,培养瓶在自然环境条件下培养 3 d~7 d。

#### 7.4 移栽

轻轻取出组培苗,放入清水中(水温 18℃~20℃),组培苗洗干净表面培养基后稍晾干,然后栽于装好基质的穴盘中,覆盖物或基质以刚盖过组培苗基部为宜,稍压实,以幼苗不倒即可,移栽好的穴盘分品种、移栽日期,在苗床上整齐摆放。

#### 7.5 管理

7.5.1 水肥管理

移栽 2 周~4 周内,相对湿度控制在 75%~90%,当第一片新叶完全张开后,逐渐降低湿度。4 周~6 周后,相对湿度保持在 60%~85%,光照强度控制在  $60\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。移栽第 4 周~8 周内,每隔 7 d 喷施液肥一次,移栽 8 周后,视植株生长情况酌情施肥。

7.5.2 病虫害防治

移栽 4 周后,每周喷施 75%百菌清可湿性粉剂或 80%多菌灵可湿性粉剂 1 000 倍~1 250 倍液 1 次;移栽 8 周后,追施 2.8%阿维菌素乳剂 2 000 倍液防治线虫。温室内宜均匀悬挂黄色诱虫板,悬挂高度应高于穴盘苗 15 cm,密度以每 20 m<sup>2</sup> 悬挂 1 张 25 cm×40 cm 大小的诱虫板为宜。

8 种苗质量要求和检查判断规则

8.1 种苗类型

种苗类型包括组培瓶苗、无琼脂苗和穴盘苗。

8.2 抽样方法及数量

据 NY/T 1796,不同种苗类型脱毒检测采取随机抽样,不同样品抽样数量见表 1,其中组培瓶苗以瓶为单位,无琼脂苗和穴盘苗以秧为单位。

| 种苗数量    | 抽检数量 |
|---------|------|
| 不超过 5   | 5    |
| 不超过 50  | 5    |
| 不超过 100 | 10   |
| 超过 100  | 10   |

8.3 判定规则

8.3.1 整体要求

据 NY/T 2700,种苗株形丰满、完整,根幅挺直,叶片舒展,叶色浓绿,无萎蔫、枯死、病斑,无污染及典型病毒病症状。

8.3.2 质量标准

据 NY/T 1796,脱毒种苗按标准要求分一级和二级,初生二级脱毒种苗不应作为商品苗,不同类型脱毒种苗等级规格划分见附录 A。

8.4 不合格苗处理

病毒检测不合格的,组培瓶苗处理方式按附录 A.4.5,无琼脂苗和穴盘苗一律采用焚烧方式处理。

9 包装、标签及运输

9.1 包装

9.1.1 一般情况下,种苗包装过程中需保湿,防挤压、倒置,包装盒内温度保持 10℃~25℃。

9.1.2 如客户或订单有明确要求,应按照客户或者订单要求进行包装。

9.2 标签

包装箱上应贴上标签,注明品种名称、等级、规格、数量、产地、出苗日期、目的地、联系人、联系方式、注意事项等。

9.3 运输

装车时包装箱切勿倒置,运输途中温度保持 10℃~25℃,应在 5 d 内到达目的地。

附录 A  
(资料性附录)  
甘蔗不同组培阶段参考培养基及配制方法

A.1 甘蔗不同组培阶段参考培养基

外植体萌发培养基:MS+2.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+200 mg/L AC;  
不定芽诱导培养基:MS+2.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+40 mg/L AC;  
不定芽增殖培养基:MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;  
茎尖伸长培养基:MS+0.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+50 mg/L AC;  
生根诱导培养基:MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA;  
不同阶段培养基蔗糖含量均为 30 g/L,分装前培养基 pH 调至 5.7~5.8,AC 为活性炭。  
注:不同甘蔗品种植物生长调节剂浓度不同。

A.2 MS 母液成分

见表 A.2  
表 A.2 MS 母液成分

| 母液种类 | 试剂名称                       | 分子式                                                     | 质量/g   | 培养基中质量/g | 保存方式            |
|------|----------------------------|---------------------------------------------------------|--------|----------|-----------------|
| 大量元素 | 硝酸钾                        | KNO <sub>3</sub>                                        | 38 000 | 50       | 冷藏(4℃),<br>避光保存 |
|      | 磷酸二氢钾                      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                         | 17 000 | 50       |                 |
|      | 硫酸镁                        | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                    | 4 660  | 50       |                 |
|      | 氯化钙                        | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                    | 1 800  | 50       |                 |
|      | 七水硫酸锌                      | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                    | 2 200  | 50       |                 |
| 微量元素 | 四水硼酸                       | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O       | 4 460  | 50       | 冷藏(4℃),<br>避光保存 |
|      | 硼酸                         | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                          | 610    | 50       |                 |
|      | 二水钼酸钠                      | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O     | 50     | 50       |                 |
|      | 六水氯化钴                      | CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                    | 5      | 50       |                 |
|      | 五水硫酸铜                      | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                    | 5      | 50       |                 |
| 有机成分 | 盐酸硫氨酸(维生素 B <sub>1</sub> ) | C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS·HCl | 10     | 10       | 冷藏(4℃),<br>避光保存 |
|      | 烟酸(维生素 B <sub>3</sub> )    | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>           | 50     | 10       |                 |
|      | 盐酸吡哆醇(维生素 B <sub>6</sub> ) | C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl     | 50     | 10       |                 |
|      | 甘氨酸                        | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>           | 200    | 10       |                 |
| 铁盐   | 肌醇                         | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>           | 10 000 | 10       | 冷藏(4℃),<br>避光保存 |
|      | 七水硫酸亚铁                     | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                    | 2 780  | 10       |                 |
|      | 二水乙二胺四乙酸二钠                 | Na <sub>2</sub> ·EDTA·2H <sub>2</sub> O                 | 3 730  | 10       |                 |

注 1:本表中所用药品纯度均为分析纯。  
注 2:本表中试剂称取质量均为配制 1 L 母液种类所需的质量。

A.3 植物生长调节剂配制

见表 A.2。

表 A.2 植物生长调节剂配制

| 名 称                               | 配制方法                                                                                                             | 存储方式           |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 6-苄基嘌呤(6-BA)                      | 称取 50 mg 6-BA 于烧杯中,先用适量 0.1 mol/L 的盐酸溶液充分溶解后加入适量去离子水,搅拌待溶液澄清后转入 500 mL 容量瓶中,用去离子水清洗烧杯 2 次~3 次,最后用去离子水定容至 500 mL  | 冷藏(4℃),密封,避光保存 |
| 吲哚丁酸(IBA)                         | 称取 50 mg IBA 或 NAA 于烧杯中,用适量 95%乙醇溶液或无水乙醇充分溶解后加入适量去离子水,搅拌待溶液澄清后转入 500 mL 容量瓶中,用去离子水清洗烧杯 2 次~3 次,最后用去离子水定容至 500 mL |                |
| 萘乙酸(NAA)                          |                                                                                                                  |                |
| 注 1:本表中所用药品纯度均为 BR 级。             |                                                                                                                  |                |
| 注 2:本表中所用容器均需在使用前用去离子水清洗 2 次~3 次。 |                                                                                                                  |                |

A.4 培养基配制

- A.4.1 根据培养基成分准备好各类容器、蒸馏水、琼脂、蔗糖和各种母液等。
- A.4.2 按需要准确量取各种母液并充分搅拌均匀。母液加入顺序为大量元素、微量元素、有机成分、铁盐、植物生长调节剂。
- A.4.3 在 A.4.2 配制溶液中加入蔗糖,加蒸馏水至溶液体积约为 400 mL,搅拌,使糖充分溶解。
- A.4.4 另取容器,加入蒸馏水约 500 mL,再加入琼脂 7 g~9 g,加热搅拌使琼脂溶化。
- A.4.5 将 A.4.3 和 A.4.4 配制溶液混合,搅拌均匀后加蒸馏水定容至 1 L。如有需要再加入活性炭。
- A.4.6 培养基定容、充分搅拌后,用 1 mol/L 的盐酸溶液或 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节培养基 pH 至 5.7~5.8。
- A.4.7 根据不同需要定量分装,然后封口。
- A.4.8 培养基封口后放入灭菌锅,121℃,101 kPa 环境中灭菌 20 min,培养基配制当天进行灭菌。
- A.4.9 灭菌后的培养基应及时从灭菌锅中取出,置于培养基储存室中自然冷却凝固及保存,并注明编号及配制日期。灭过菌的培养基放置 5 d 左右再用,但存储时间不应超过 10 d。

## 附 录 B

### (资料性附录)

### 甘蔗脱毒苗病毒检测方法

#### B.1 Trizol 法提取样品总 RNA

称取 50 mg 样品叶片投入液氮预冷的 1.5 mL 离心管,加液氮在离心管中将植物材料研磨成粉末,加入 600  $\mu$ L 水饱和酚与 600  $\mu$ L 2 $\times$ RNA 抽提缓冲液,混匀,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 20 min,上清转移至新的离心管,加入等体积 4 mol/L 氯化锂溶液,混合均匀后 4 $^{\circ}$ C 沉淀过夜,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 20 min,沉淀用 70%乙醇溶液漂洗数次,风干,用 30  $\mu$ L DEPC 处理过的水溶解,-70 $^{\circ}$ C 保存备用。若用试剂盒提取总 RNA,操作步骤参考产品说明书。

阳性样品为已知携带检测病毒材料或检测病毒提纯液,阴性对照为不携带检测病毒材料,按同样方法提取总 RNA。

#### B.2 cDNA 合成

以样品、阴性对照和阳性对照样品总 RNA 为模板,以检测病毒下游引物为反转录引物,参照反转录产品说明书合成 cDNA,合成 cDNA 可于-30 $^{\circ}$ C 长期保存。也可一步法 RT-PCR 试剂盒进行反转录和 PCR 扩增,具体步骤按照产品说明书进行。

#### B.3 CTAB 法提取样品总 DNA

称取 50 mg 样品叶片投入液氮预冷的 1.5 mL 离心管,加液氮在离心管中将植物材料研磨成粉末,加入 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 溶液 600  $\mu$ L(用前加入体积比为 0.2%的巯基乙醇)并于 65 $^{\circ}$ C 保温 1 h,然后加入 600  $\mu$ L 酚-氯仿-异戊醇溶液(25+24+1),混匀,12 000 r/min 离心 20 min,上清转移至新的离心管,加入 600  $\mu$ L 酚-氯仿溶液(24+1),12 000 r/min 离心 15 min,上清转移至新的离心管,加入 1/3 体积的 3 mol/L 乙酸钠溶液,再加入-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇 1 mL,混匀后于-20 $^{\circ}$ C 放置 3 h~4 h,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,向离心管中加入 75%乙醇溶液洗涤 2 次~3 次,将离心管倒置于吸水纸上晾干,最后加入 10  $\mu$ L~20  $\mu$ L 重蒸水溶解,-70 $^{\circ}$ C 保存备用。若用试剂盒提取总 DNA,操作步骤参考产品说明书。

用同样方法提取阳性样品和阴性对照总 DNA。

#### B.4 引物序列

##### B.4.1 甘蔗花叶病毒(SCMV)引物序列

上游引物:F5:5'-GAAGAWGTYTTCCAYCAAKCWGGAAC-3'(W=T/A,Y=C/T,K=G/T);

下游引物:R3:5'-AGCTGTGTGTCTCTCTGTATTCTC-3'。

预期扩增片段 906 bp。

##### B.4.2 高粱花叶病毒(SrMV)引物序列

上游引物:F5:5'-AAGCCACAGCACAAGCAC-3';

下游引物:R3:5'-TGACTCTCACCGACATTCC-3'。

预期扩增片段 828 bp。

#### B.4.3 甘蔗黄叶病毒(SCYLV)引物序列

上游引物:F5:5'-AGCGATAGTGAATGAATACGGG-3';

下游引物:R3:5'-GCCTACCTATTTGGGATTCTGG-3'。

预期扩增片段 608 bp。

#### B.4.4 甘蔗杆状病毒(SCBV)引物序列

上游引物:F5:5'-ACCAGATCCGAGATTACAGAAG-3';

下游引物:R3:5'-TCACCTTGCCAACCTTCATA-3'。

预期扩增片段 589 bp。

### B.5 PCR 反应

#### B.5.1 模板选择

甘蔗杆状病毒(SCBV)检测以样品总DNA为模板,其余三种病毒检测以病毒DNA为模板。

#### B.5.2 PCR 反应

在PCR管中依次加入10×PCR buffer 5 μL,10 mmol/L 四种脱氧核糖核苷酸(dATP,dCTP,dGTP和dTTP)混合液0.4 μL,上下游引物各0.4 μL,样品总DNA 20 ng~200 ng,DNA聚合酶0.25 μL,最后根据总DNA模板的用量加入蒸馏水,使反应体系达到25 μL,每个试样3次重复。

以4000 r/min离心10 s,将PCR管放入PCR仪中,反应程序为:94℃变性30 s,94℃~50℃快速扩增循环(94℃变性30 s,94℃退火30 s,94℃~50℃快速扩增循环),50℃~60℃快速扩增循环,对产物进行电泳检测或4℃下保存。

反应设置阳性对照、阴性对照和空白对照,阳性对照应能扩增出预期片段,进行PCR扩增反应。

### B.6 PCR 产物凝胶电泳

将适量的琼脂糖加入1×TAE缓冲液中,加热使其溶解,配制琼脂糖浓度为1%的溶液,然后按每100 mL琼脂糖溶液加入6 μL溴化乙锭溶液(例如加入5 μL 0.02%的溴化乙锭最终浓度为0.5 μg/mL),混匀、稍冷却后,将其倒入置于冰上的电泳板上,室温下凝固成凝胶,放入1×TAE缓冲液中。取5 μL PCR产物加1 μL 6×上样缓冲液混合,然后加到点样孔中,其余三个点样孔加入DNA分子量标记,接通电源在5 V/cm电压下电泳。

### B.7 凝胶成像

电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统成像仪上或紫外反射仪上成像,并将电泳结果形成文件存档或用照相系统拍照、保存。

### B.8 结果判定

根据DNA分子量标记判断扩增目的条带的大小。

若阳性对照和检测样品中同时出现目的扩增条带,而阴性对照和空白对照均不出现该条带,该样品判断为携带病毒。

若阳性对照中出现目的扩增条带,而检测样品、阴性对照和空白对照均不出现该条带,该样品判断为不携带病毒。

若阴性对照和空白对照出现目的条带,或阳性对照未出现目的条带,应重新进行RT-PCR检测。

**附 录 C**  
(资料性附录)  
病毒检测仪器设备及试剂

**C.1 仪器设备**

- C.1.1 高速台式冷冻离心机:转速 15 000 r/min 以上。
- C.1.2 PCR 仪。
- C.1.3 水平电泳装置。
- C.1.4 凝胶成像系统。
- C.1.5 紫外分光光度计。
- C.1.6 微量加样器。
- C.1.7 电子天平:感量 0.1 mg,0.01 g。

**C.2 试剂**

除另有说明,所用试剂均为分析纯。

**C.2.1 RNA 提取相关试剂**

**C.2.1.1 RNA 抽提缓冲液**

20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1%十二烷基硫酸钠溶液,200 mmol/L 氯化钠溶液,5 mmol/L EDTA 和 1%亚硫酸钠溶液。

**C.2.1.2 70%乙醇溶液**

无水乙醇和 DEPC 处理的水按照 7+3 的体积比混合均匀。

**C.2.2 DNA 提取相关试剂及配制**

**C.2.2.1 2×CTAB 提取液(pH 8.0)**

称取 CTAB 2 g 加蒸馏水 40 mL,加 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)10 mL,0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)4 mL 和 5 mol/L 氯化钠溶液 28 mL,待 CTAB 溶解后用蒸馏水定容到 100 mL(提取前加入 0.2 mL 巯基乙醇溶液)。

**C.2.2.2 酚—氯仿—异戊醇溶液(25+24+1)**

将酚、氯仿和异戊醇按照 25+24+1 的体积比混合均匀。

**C.2.2.3 酚—氯仿溶液(24+1)**

将酚和氯仿按照 24+1 的体积比混合均匀。

**C.2.2.4 3 mol/L 氯化钠溶液**

称取 2.46 g 氯化钠溶液,用重蒸水定容到 10 mL。

**C.2.2.5 75%乙醇溶液**

无水乙醇和重蒸水按照 3+1 的体积比混合均匀。

**C.2.3 电泳相关试剂及配制**

**C.2.3.1 50×TAE 缓冲液**

称取 Tris 242.2 g 加入到 800 mL 重蒸水中,充分溶解后加入 37.2 g 乙二胺四乙酸二钠,充分溶解

后加入 57.1 mL 冰乙酸,再用重蒸水定容至 100 mL。使用时稀释到 1×。

#### C.2.3.2 6×TAE 缓冲液

称取溴酚蓝 250 mg 加到 10 mL 重蒸水中,在室温下过夜溶解;再称取二甲苯腈蓝 250 mg 加到 10 mL 重蒸水中溶解;称取蔗糖 50 g 加入到 30 mL 重蒸水中溶解,充分混合 3 种溶液,用重蒸水定容至 100 mL,在 4℃中保存。

附 录 D  
(规范性附录)  
不同类型甘蔗脱毒种苗等级划分

D.1 组培瓶苗和无琼脂苗等级划分

甘蔗脱毒组培瓶苗和无琼脂苗等级划分见表 D.1。

表 D.1 甘蔗脱毒组培瓶苗和无琼脂苗等级划分

| 项 目             | 指 标        |                   |
|-----------------|------------|-------------------|
|                 | 一级         | 二级                |
| 品种纯度, %         | 100        | 100               |
| 假茎              | 有(+)       | 有(+)              |
| 株高, cm          | $\geq 5.0$ | $\geq 3.5, < 5.0$ |
| 1.0 cm 以上白色根, 条 | $\geq 4$   | $\geq 2$          |
| 完全展开叶, 片        | $> 4$      | $> 3$             |
| 带毒检出率, %        | 未检出        | $\leq 0.5$        |
| 变异率, %          | 未检出        | 未检出               |

D.2 穴盘苗等级划分

甘蔗脱毒穴盘苗等级划分见表 D.2。

表 D.2 甘蔗脱毒穴盘苗等级划分

| 项 目             | 指 标         |            |
|-----------------|-------------|------------|
|                 | 一级          | 二级         |
| 品种纯度, %         | 100         | 100        |
| 新出叶片, 片         | $> 6$       | $\geq 4$   |
| 假茎高, cm         | $\geq 12.0$ | $\geq 8.0$ |
| 假茎粗, cm         | $> 0.3$     | $\geq 0.2$ |
| 1.0 cm 以上白色根, 条 | $\geq 4$    | $\geq 2$   |
| 带毒检出率, %        | 未检出         | $\leq 1.0$ |