

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2485—2010



植物病毒脱除处理规程

Rules of plant virus elimination

2010-03-02 发布

2010-09-16 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

本标准附录 A 为资料性附录。

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。

本标准参与起草单位：中华人民共和国云南出入境检验检疫局，华中农业大学，天赐花卉公司。

本标准主要起草人：李明福、王仁睿、黄新、王国平、丁元明、潘利军、马洁。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

植物病毒脱除处理规程

1 范围

本标准规定了植物脱毒处理程序方法。

本标准适用于检验检疫行业、农林业对带有病毒的植物繁殖材料的无毒无害化处理。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

病毒 virus

病毒是肉眼不可见,依赖于寄主细胞复制,其基因组核酸外包裹着外壳蛋白的一类专性寄生的特殊微生物。

2.2

病毒脱除处理 virus elimination

应用物理、化学、生物学等方法,祛除植物所感染的病毒,使之无毒无害化的过程。

2.3

组织培养 plant tissue culture

在无菌条件下,将离体的植物器官、组织、细胞以及原生质体等繁殖材料,培养在人工培养基上,并在人工控制的环境下生长、分化、增殖至再生植株的过程。

2.4

茎尖培养 shoot apices culture

在无菌条件下剥取植物茎尖(顶端分生组织带1个~2个幼叶原基),在人工控制的条件下分化再生的方法。

2.5

热处理 thermotherapy

植物材料置于适当的隔离设施(如:恒温恒湿箱、日光温室)中,在不同的高温条件下,持续处理一定的时间(几周或数月),以钝化植物中的病毒或降低其浓度。

2.6

化学处理 chemotherapy

在植物培养基中添加一定浓度的化学物质,抑制或干扰植物组织中的病毒复制或繁殖。

3 原理

3.1 处理原则

针对检验检疫或生产中发现植物携带管制的病毒时,一般可进行销毁处理。如因植物珍贵或应客户需求,需针对管制的病毒实施脱除处理。

3.2 病毒脱除处理

针对植物病毒在植物体内分布不均匀、植物病毒复制过程需要特殊酶或物质参与,植物病毒外壳蛋白受热钝化等特点,设计茎尖组织培养、化学治疗和物理治疗,以脱去病毒。

4 仪器和用具

4.1 仪器

- 4.1.1 超净工作台。
- 4.1.2 天平(0.001 g)。
- 4.1.3 解剖镜。
- 4.1.4 光照培养箱。
- 4.1.5 恒温恒湿箱。
- 4.1.6 高温灭菌锅。

4.2 用具

- 4.2.1 量筒。
- 4.2.2 容量瓶。
- 4.2.3 接种针或解剖刀。
- 4.2.4 镊子。
- 4.2.5 pH计或pH试纸。

5 病毒检测方法

- 5.1 生物学检测(指示植物法)。
- 5.2 酶联免疫法。
- 5.3 RT-PCR方法。
- 5.4 核酸杂交方法。

6 植物病毒脱除处理程序

6.1 病毒脱除方法

6.1.1 材料剪取与灭菌

在超净工作台上剪取植株茎尖1 cm~2 cm,自来水冲洗30 min,剥去外面的叶片,将茎尖置于超净工作台上,无菌条件下进行消毒:75%的乙醇浸泡10 s,已灭菌的蒸馏水冲洗3次~5次,0.1%的升汞浸泡,加入1滴~2滴吐温,消毒5 min~15 min,已灭菌的蒸馏水冲洗3次~5次,每次2 min~3 min。

6.1.2 茎尖剥离与接种

把经过上一步消毒处理后的茎尖放在解剖镜下,用已灭菌的接种针或解剖刀逐层剥去幼叶,直至出现顶端分生组织,将顶端分生组织和毗邻的1个~2个叶原基切下,直立向上接种到适宜的固体培养基上。

6.1.3 热处理结合茎尖培养

将供试材料放入恒温恒湿箱(温度范围:30℃~40℃),日夜变温处理几天至几月。热处理后的材料按照上述茎尖剥离与接种步骤进行培养,参见附录A。

6.1.4 化学治疗结合茎尖培养

筛选对病毒有抑制作用的化学药剂,如病毒唑、硫脲嘧啶等,浓度常为10 mg/L~30 mg/L,添加到培养基中,培养一月至几月,然后再按照上述茎尖剥离与接种步骤进行培养,参见附录A。

6.2 试管苗的病毒检测

用上述病毒的检测方法检测试管苗,如果检测结果为阴性则初步定为脱病毒试管苗,进行后期的扩繁和生根移栽,如果检测结果为阳性则不是脱病毒试管苗,需要进一步进行病毒脱除处理。

6.3 试管苗的扩繁与生根培养

6.3.1 试管苗的扩繁

检测结果为阴性的试管苗可接种到扩繁培养基上进行增殖。

6.3.2 生根培养

试管苗长至 3 cm~5 cm 时转至生根培养基进行培养。

6.4 试管苗的驯化

将生长茁壮、有 3 片~5 片叶的试管苗移至温室进行炼苗。

6.5 移栽

6.5.1 过渡培养

取出试管苗,洗净根部培养基,移入适宜的栽培基质中,刚移栽的试管苗要避光,湿度:85%,温度:白天 25℃~28℃,夜间 15℃~18℃。避光保湿培养 2 d~3 d 后在正常的光照、温湿度条件下进行培养。

6.5.2 移入土壤

过渡培养 2 周后,将生长茁壮的植株移入土壤。

6.6 移栽后植株的病毒复检

移栽后的脱病毒植株长到一定大小需要进行病毒复检,若复检结果与第一次结果相同,均为阴性,则可认定为脱病毒苗;若复检结果与第一次结果不同,为阳性,则再生苗不是脱病毒苗,需要进一步进行病毒脱除处理。

6.7 扩大繁殖

经过上述过程,进行两次病毒检测的无病毒植株作为健康母株,进行扩大繁殖,完成整个病毒脱除处理过程。



附 录 A
(资料性附录)
常见病毒脱毒方法

表 A.1 常见病毒脱毒方法

病毒名	寄主	脱毒方法
百合潜隐病毒 LSV	百合	热处理结合茎尖培养:热处理:40℃处理5d后剥取茎尖,茎尖带1个~2个叶原基,即0.2mm~0.5mm,尽量少带邻近组织
黄瓜花叶病毒 CMV		
郁金香碎花病毒 TBV		
异名百合斑驳病毒 LMoV		
百合丛簇病毒 LRV		
菊花 B 病毒 CVB	菊花	(1) 热处理结合茎尖培养:盆栽苗在白天40℃、夜间30℃条件下处理10d~20d。再进行剥取茎尖,茎尖带1个~2个叶原基。 (2) 化学药剂结合茎尖培养:在培养基上添加8-氮鸟嘌呤、硫脲嘧啶、病毒唑,浓度范围为10mg/L~20mg/L,培养4周后剥取茎尖
番茄不孕病毒 TAV		
菊花花叶病毒 ChMV		
马铃薯 Y 病毒 PVY		
马铃薯 X 病毒 PVX		
烟草花叶病毒 TMV		
黄瓜花叶病毒 CMV	兰花	化学药剂结合茎尖培养:原球茎顶端分生组织先在病毒唑中浸泡15min,然后转接到添加病毒唑的培养基上,浓度范围为20mg/L~30mg/L,暗培养4周,转到不含病毒唑的培养基中进行原球茎增殖
建兰花叶病毒 CyMV		
齿兰环斑病毒 ORSV	马铃薯	(1) 热处理结合茎尖培养:将块茎放在25℃条件下发芽,当芽长到0.5cm~1cm后放置在光照培养箱内,进行热处理,白天36℃、16h,晚上30℃、8h,处理时间为3周~4周,剥取茎尖。 (2) 化学药剂结合茎尖培养:在培养基上添加8-氮鸟嘌呤、硫脲嘧啶、病毒唑,浓度范围为10mg/L~20mg/L,培养4周后剥取茎尖
马铃薯 X 病毒 PVX		
马铃薯 Y 病毒 PVY		
马铃薯 A 病毒 PVA		
马铃薯 M 病毒 PVM		
马铃薯 S 病毒 PVS		
马铃薯卷叶病毒 PLRV		
马铃薯帚顶病毒 PMTV	苹果	(1) 热处理结合茎尖培养:a)盆栽苗热处理:在白天温度20℃~23℃,夜间13℃培养,待接穗发芽长出3片~5片叶时移入热处理箱内,首先在25℃~30℃下处理14d,然后将温度调至37℃±1℃,恒温处理28d,处理后剥取茎尖;b)组培苗热处理:37℃,培养30d;置32℃恒温培养箱培养1周,然后升温至37℃热处理20d~50d后剥取茎尖; (2) 化学药剂结合茎尖培养:培养基中分别添加板蓝根和病毒唑,浓度范围为10mg/L~40mg/L,培养6周后剥取茎尖
苹果褪绿叶斑病毒 ACLSV		
苹果茎沟病毒 ASGV		
苹果茎痘病毒 ASPV		
苹果花叶病毒 ApMV		
苹果锈果类病毒 ASSVd		

表 A.1 (续)

病毒名	寄主	脱毒方法
葡萄扇叶病毒 GFLV	葡萄	(1) 热处理结合茎尖培养:a) 盆栽苗热处理:置于 25℃~28℃下促其抽枝快长,待新梢长出 2 片~3 片叶后,室温升至 37℃~40℃,经 30 d~35 d 后,切取新梢顶端 0.5 mm~1.0 mm;b) 组培苗热处理:先预热处理(32℃)7 d,昼 38℃夜 22℃处理 20 d~30 d。后剥取茎尖。 (2) 化学药剂结合茎尖培养:在培养基上添加 8-氮鸟嘌呤、硫脲嘧啶、病毒唑,浓度范围为 10 mg/L~20 mg/L,培养 4 周后剥取茎尖
葡萄卷叶相关病毒 GLRaVs		
葡萄病毒 A 病毒 GVA		
葡萄病毒 B 病毒 GVB		
番茄环斑病毒 ToRSV		
李属坏死环斑病毒 PNRSV	樱桃	(1) 热处理结合茎尖培养:通常是采用 38℃作为处理温度,在 37℃~38℃下处理 2 周~4 周后剥取茎尖。 (2) 化学药剂结合茎尖培养:在培养基上分别添加 2,4-二氧六氢三氮杂苯(DHT)和病毒唑,浓度范围为 10 mg/L~30 mg/L,培养四周后剥取茎尖
李矮缩病毒 PDV		
苹果褪绿叶斑病毒 ACLSV		
樱桃卷叶病毒 CLRV		
樱桃小果病毒 LChV		
樱桃 A 病毒 CVA		