

草莓脱毒种苗生产技术规程

Technical regulation for virus-free plantlets of strawberry

2017 - 02 - 10 发布

2017 - 03 - 10 实施

前 言

本标准依据GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准代替DB33/ 594.1-2005《草莓脱毒种苗 第1部分：脱毒种苗》和DB33/T 594.2-2005《草莓脱毒种苗 第2部分：生产技术规程》，本标准以DB33/ 594.1-2005为主，整合了DB33/T 594.2-2005的部分内容，与DB33/ 594.1-2005相比，除编辑性修改外主要变化如下：

- 修改了草莓脱毒苗、脱毒组培瓶苗、脱毒原种苗等术语和定义（见3，2005年版的3）；
- 增加了生产技术（见4）；
- 修改了脱毒种苗的脱毒检测方法（见附录A，2005年版的6）；
- 修改了脱毒组培瓶苗、脱毒种苗的质量要求、检测规则（见附录B，2005年版的5.1、5.2和7）。

本标准由浙江省农业厅提出。

本标准由浙江省种植业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江大学、建德市农业技术推广中心。

本标准主要起草人：毛碧增、张国芳、孔樟良、龚莺、张亚惠、赵玲玲、郑铭洁。

本标准第1次修订。

草莓脱毒种苗生产技术规程

1 范围

本标准规定了草莓脱毒苗的术语和定义、生产技术、分类与分级、检测方法、质量要求和包装、标志、运输与贮存。

本标准适用于通过组织培养技术培育的不携带草莓斑驳病毒 (*Strawberry mottle virus*, SMoV)、草莓轻型黄边病毒 (*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV)、草莓镶脉病毒 (*Strawberry vein banding virus*, SVBV) 和草莓皱缩病毒 (*Strawberry crinkle virus*, SCV) 的脱毒组培瓶苗、脱毒原原种苗、脱毒原种苗及脱毒生产用苗。

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。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/Z 26575 草莓生产技术规范

NY/T 401-2000 脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测技术规程

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

草莓脱毒苗

通过植物脱病毒方法获得或引进, 经检测后确认不携带本标准规定检测病毒的种苗。

3.2

脱毒组培瓶苗

通过植物脱病毒方法获得的不携带本标准规定检测病毒的组织培养瓶苗。

3.3

脱毒原原种苗

脱毒组培瓶苗移栽于无草莓病源、虫源的种苗圃内存活的植株。

3.4

脱毒原种苗

脱毒原原种苗定植于无草莓病源、虫源的种苗圃内，由匍匐茎繁殖的植株。

3.5

脱毒生产用苗

脱毒原种苗定植于无草莓病源、虫源的种苗圃内，由匍匐茎繁殖的植株。

3.6

脱毒率

不携带本标准规定检测病毒的植株数占所检测植株总数的百分比。

4 生产技术

4.1 脱毒组培瓶苗生产技术

4.1.1 外植体选择

采样最佳时间为3月~5月晴天的10:00~16:00，选择品种特性纯正、丰产性能好、品质优良、无病虫害的植株，切取带生长点的匍匐茎段5 cm~6 cm。

4.1.2 无菌苗繁育

匍匐茎段经无菌水清洗后置于超净工作台，切取带生长点的茎段1 cm~2 cm，用70%~75%的乙醇冲洗表面30 s，然后经次氯酸盐和Tween-20消毒8 min~10 min，并不断摇动，最后用无菌水冲洗5次~8次，用无菌滤纸吸干水分，剥取0.5 mm~1.0 mm的茎尖分生组织，接种于诱导不定芽培养基中。

4.1.3 脱毒苗培育

不定芽培养至1.0 cm~1.5 cm时，置于解剖镜下挑取0.2 mm~0.3 mm的茎尖分生组织，接种于诱导不定芽培养基中，不定芽长至1.5 cm~2.0 cm时分株，单株接种于生根培养基。

4.1.4 脱毒苗快繁

经病毒检测合格的试管苗，接种到增殖培养基中，增殖培养每20 d~30 d继代一次（总继代次数不超过6代）。

4.1.5 培养条件

培养条件白天温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，光照强度 $30\text{ }\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}\sim 60\text{ }\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；晚上温度 $18\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，黑暗培养。每天照光12 h~14 h。

4.2 脱毒原原种苗、脱毒原种苗和脱毒生产用苗生产技术

4.2.1 脱毒原原种苗生产

打开脱毒瓶苗的瓶盖，常温弱光照条件下驯化1 d~2 d后洗净琼脂，种植于营养钵或36孔穴盘中，栽后浇透水，第一周要遮荫，并保持湿度75%~90%，建议使用防虫网隔离，提倡消毒基质，以防再度感染病毒。

4.2.2 脱毒原种苗繁殖

4.2.2.1 苗床准备

草莓忌连作，选用前作为稻或休闲空地作专用种苗地繁育。定植前施足基肥，每667 m²（亩）施入腐熟的有机肥2 000 kg，氮、磷、钾（15%:15%:15%）三元复合肥20 kg。苗地按畦宽1.2 m~1.5 m（沟宽35 cm，深25 cm）整地作畦。

4.2.2.2 定植方式

种性纯正的脱毒原原种苗定植在畦中间，株距100 cm~150 cm，植株栽植的合理深度是苗心茎部与地面平齐，做到“深不埋心，浅不露根”。建议使用防虫网隔离，提倡消毒基质，以防再度感染病毒。

4.2.2.3 栽培管理

按照GB/Z 26575的规定执行。

4.2.3 脱毒生产用苗繁殖

4.2.3.1 苗床准备

草莓忌连作，选用前作为稻或休闲空地作专用种苗地繁育。定植前施足基肥，每667 m²（亩）施入腐熟的有机肥2 000 kg，氮、磷、钾（15%:15%:15%）三元复合肥20 kg。苗地按畦宽1.2 m~1.5 m（沟宽35 cm，深25 cm）整地作畦。

4.2.3.2 定植方式

种性纯正的脱毒原原种苗定植在畦中间，株距100 cm~150 cm，植株栽植的合理深度是苗心茎部与地面平齐，做到“深不埋心，浅不露根”。

4.2.3.3 栽培管理

按照GB/Z 26575的规定执行。

5 分类与分级

5.1 脱毒苗按繁育过程可分为脱毒组培瓶苗、脱毒原原种苗、脱毒原种苗和脱毒生产用苗四类。

5.2 脱毒组培瓶苗按质量要求分为优质苗和合格苗。

6 抽样与检测方法

6.1 抽样方法

按照SN/T 2122的规定执行。

6.2 抽样比例

按照SN/T 2122的规定执行。

6.3 检测方法

病毒检测方法见附录A。

7 质量要求

脱毒组培瓶苗、脱毒种苗的质量等级指标、检验方法、检验规则见附录B。

8 包装、标志、运输与贮存

8.1 包装

组培瓶苗和脱毒种苗宜用塑料箱或纸板箱包装。

8.2 标志

包装箱内附脱毒苗出厂（圃）合格证、病毒检测报告（见附录C）；外面应注明标准号、生产单位的地址和联系电话，其他按GB/T 191的规定执行。

8.3 运输

运输过程中注意保温保湿，温度以15℃~30℃为宜，湿度以60%~90%为宜。

8.4 贮存

组培瓶苗常温弱光照条件下可以贮存7 d，脱毒种苗出圃后3 d内定植。

附 录 A
(资料性附录)
草莓脱毒种苗病毒检测方法

A.1 双抗体夹心酶联免疫吸附检测法(DAS-ELISA)

检测方法按NY/T 401-2000中附录A的方法执行。

A.2 分子生物学聚合酶链检测法(PCR)

A.2.1 草莓斑驳病毒

草莓斑驳病毒是RNA病毒。取各编号株的叶片,提取总RNA,反转录为cDNA后进行PCR检测。利用引物(上游引物5' -TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG-3' 和下游引物5' -TCTTGGGCTTGGATCGTCACCTG-3'), 94℃预变性3 min后进入循环: 94℃变性30 s, 54℃退火40 s, 72℃延伸45 s, 35个循环,最后72℃延伸10 min,扩增得到219 bp的片段。

A.2.2 草莓轻型黄边病毒

草莓轻型黄边病毒是一种单链线形正义RNA病毒。取各编号株的叶片,提取总RNA,反转录为cDNA后进行PCR检测。利用引物(上游引物5' -GTGTGCTCAATCCAGCCAG-3' 和下游引物5' -CATGGCACTCATTGGAGCTGGG-3'), 94℃预变性3 min后进入循环: 94℃变性30 s, 54℃退火40 s, 72℃延伸45 s, 35个循环,最后72℃延伸10 min,扩增得到271 bp的片段。

A.2.3 草莓镶脉病毒

草莓镶脉病毒是一种DNA病毒。取各编号植株的叶片,提取基因组DNA,进行PCR检测。利用引物(上游引物5' -GAATGGGACAATGAAATGAG-3' 和下游引物5' -GTGAGGAGAACTTAGGACA-3'), 94℃预变性3 min后进入循环: 94℃变性30 s, 54℃退火40 s, 72℃延伸45 s, 35个循环,最后72℃延伸10 min,扩增得到574 bp的片段。

A.2.4 草莓皱缩病毒

草莓皱缩病毒是单链线形负义ssRNA病毒。取各编号株的叶片,提取总RNA,反转录为cDNA后进行PCR检测。利用引物(上游引物5' -CATTGGTGGCAGACCCATCA-3' 和下游引物5' -TTCAGGACCTATTGATGACA-3'), 94℃预变性3 min后进入循环: 94℃变性30 s, 54℃退火40 s, 72℃延伸45 s, 35个循环,最后72℃延伸10 min,扩增得到345 bp的片段。

A.3 电镜检测法

A.3.1 检测程序

电镜检测法主要用于检测草莓斑驳病毒、草莓轻型黄边病毒、草莓镶脉病毒和草莓皱缩病毒。

病叶浸蘸负染色法:用研钵将病叶组织充分研磨,组织汁液经2%的磷钨酸(pH值6.8)负染色,在透射电镜下观察病毒颗粒。

病叶组织超薄切片法观察：将病叶片切成 $1\text{ mm}^2\sim 2\text{ mm}^2$ 小块，用2.5%戊二醛及2%四氧化锇固定，乙醇系列脱水，Epon 812环氧树脂包埋，超薄切片，以2%醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色，在透射电镜下观察细胞内病毒颗粒及细胞病理变化。

A. 3. 2 病毒颗粒特性

A. 3. 2. 1 草莓斑驳病毒

为伴生豇豆病毒科 (*Secoviridae*) 的未归属病毒，为球状病毒颗粒，直径为 $25\text{ nm}\sim 30\text{ nm}$ ，在叶片的表皮和韧皮部的细胞质内有晶状球形颗粒。

A. 3. 2. 2 草莓轻型黄边病毒

属甲型线状病毒科 (*Alphaflexiviridae*)、马铃薯X病毒属 (*Potexvirus*)，为线状病毒颗粒，直径为 13 nm ，长度为 $470\text{ nm}\sim 580\text{ nm}$ ，分布在细胞质内。

A. 3. 2. 3 草莓皱缩病毒

属弹状病毒科 (*Rhabdoviridae*)、质型弹状病毒属 (*Cytorhabdovirus*)，为弹状病毒颗粒，直径为 $63\text{ nm}\sim 75\text{ nm}$ ，长度为 $190\text{ nm}\sim 380\text{ nm}$ ，在植株表皮、导管和筛管附近的薄壁组织细胞内均有分布。

A. 3. 2. 4 草莓镶脉病毒

属花椰菜花叶病毒科 (*Caulimoviridae*)、花椰菜花叶病毒属 (*Caulimovirus*)，为球形病毒颗粒，直径为 $40\text{ nm}\sim 50\text{ nm}$ ，主要在细胞质内复制，存在于叶片表皮与木质部相连的导管和细胞质内。

附 录 B

(资料性附录)

脱毒组培瓶苗、脱毒种苗的质量要求、检测方法、检测规则

B.1 质量要求

B.1.1 脱毒组培瓶苗质量等级指标

脱毒组培瓶苗质量等级指标见表B.1。

表B.1 脱毒组培瓶苗质量等级指标

项 目	指 标	
	优质苗	合格苗
株高, cm \geq	6.0	4.0
根茎粗, mm \geq	2.0	1.0
根条数, 条 \geq	8	5
根长, cm \geq	1	1
单株复叶片数, 张 \geq	4	2
病毒检测结果	不携带病毒	不携带病毒
外观要求	生长健壮、无污染、无病斑、无烂茎、无烂叶、无烂根	

B.1.2 脱毒种苗质量等级指标

脱毒种苗质量等级指标见表B.2。

表B.2 脱毒种苗质量等级指标

项 目	指 标		
	脱毒原原种苗	脱毒原种苗	脱毒生产用苗
脱毒率, %	100	≥ 97	≥ 90
外观要求	种苗生长健壮、三叶一心、根系发达、无外源病害、根茎粗 0.6 cm ~0.8 cm		

B.2 检验方法

根、叶片采用目测、计数方法进行, 株高用分度值1 mm的直尺测量, 茎粗用游标卡尺测量。

B.3 检验规则

B.3.1 组批规则

同一时间, 同一地点, 取得同一品种不同单株的外植体经过组织培养培育的脱毒苗为同一检验批次。

B.3.2 检验分类

B.3.2.1 出厂（圃）检验

由厂家执行检验组培瓶苗和脱毒种苗的株高、根茎粗、根条数、根长、单株复叶叶片数，并附有草莓脱毒苗出厂（圃）合格证。

B.3.2.2 型式检验

型式检验是对本标准所规定的全部要求进行检验。在正常生产时，每年进行一次。新建厂家和改变工艺流程时也应进行型式检验。

B.4 判定原则

检验结果全部符合本标准的，则判定该批次为合格种苗或优质苗。否则，则判定该批次种苗为不合格。

附 录 C

(资料性附录)

草莓脱毒苗出厂(圃)合格证、草莓脱毒苗病毒检验报告

C.1 草莓脱毒苗出厂(圃)合格证

草莓脱毒苗出厂(圃)合格证样式见表C.1。

表C.1 草莓脱毒苗出厂(圃)合格证

编号:

品种名称		等级	
原种采集地		病毒检测单位	
繁殖代数		种苗数量	
购苗单位		质检员	
生产单位		出厂(圃)日期	

C.2 草莓脱毒苗病毒检测报告

草莓脱毒苗病毒检测报告样式见表C.2。

表C.2 草莓脱毒苗病毒检验报告

送样单位:

品种名称:

原种采集地:

送样时间:

原种数量:

编 号:

编号	草莓斑驳病毒(SMoV)	草莓轻型黄边病毒(SMYEV)	草莓镶脉病毒(SVBV)	草莓皱缩病毒(SCV)