

ICS 65.020

CCS B 61

# JSHS

团 体 标 准

T/JSHS 004-2022

## 葡萄苗木成活率与生长势早期快速精准鉴定技术规程

A technical regulation for early, rapid and accurate identification of survival rate and growth vigor of grape seedling

2022-05-13 发布

2022-05-13 实施

江苏省园艺学会 发布



## 目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 葡萄苗木成活率与生长势鉴定.....	2
5 葡萄苗木成活率与生长势判断.....	3
附 录 A.....	5

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则编写。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由南京农业大学提出。

本文件由江苏省园艺学会归口。

本文件起草单位：南京农业大学、江苏省农业技术推广总站。

本文件主要起草人：房经贵、陆爱华、裴丹、郑婷、卢素文。

# 葡萄苗木成活率与生长势早期快速精准鉴定技术规程

## 1 范围

本文件规定了通过检测葡萄看家基因表达情况提早鉴定葡萄苗木成活率与生长势的快速技术。  
本文件适用于巨峰、夏黑、阳光玫瑰等葡萄苗木成活率与生长势的鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 469 葡萄苗木

DB15/T 24-2019 葡萄苗木质量

LY/T 2418-2015 苗木检测抽样方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 苗木成活率 seedling survival rate

苗木成活率是用于衡量苗木冬芽萌发的指标，具体指冬芽可以萌发的活树苗占总树苗的百分比。

### 3.2 苗木生长势 seedling growth vigor

苗木生长势是苗木生长发育的旺盛程度，如新梢生长长度、粗度和叶片大小等。

### 3.3 葡萄冬芽 grapevine winter bud

葡萄冬芽是落叶后的枝条上着生的/保留的继续活动的芽结构，其被冬芽鳞片包裹后可抵御外界寒冷、干燥等不利条件。冬芽能否安然度过寒冬季节以及冬季环境对于冬芽的影响，决定了葡萄苗木的成活率与生长势。这与冬芽的形态结构以及内部生理变化有着直接关系。

### 3.4 看家基因 house keeping gene, HKG

看家基因是维持细胞最低限度功能所必不可少的基因，如肌动蛋白（Actin）基因等。这类基因在所有类型的细胞中都进行表达，因为这些基因的产物对于维持细胞的基本结构和代谢功能是必不可少的。

### 3.5 半定量 PCR semi-quantitative PCR

半定量PCR，是指从传统的PCR定性分析方法基础上发展而来，在固定PCR循环数下进行，使总cDNA浓度保持在PCR指数期，能够测定目标产物相对扩增量的PCR技术。

## 4 葡萄苗木成活率与生长势鉴定

### 4.1 样品准备

4.1.1 从一批待测葡萄苗木中随机选取20株进行取样，具体样本量参照LY/T 2418-2015 苗木抽样方法。分别选取其由下至上的第1~4个冬芽作为葡萄苗木成活力检测的样品。



图1 幼苗保留节位及冬芽节位次序

4.1.2 用锋利的刀片将芽切下后，每个芽单独存放于1.5 ml离心管中，管盖及侧面均用马克笔标号并在记录本做记录，经液氮冷冻后储存于-80 °C冰箱。

### 4.2 鉴定前准备

4.2.1 引物合成：看家基因为包括肌动蛋白（ACT，GenBank登录号：EC969944），泛素（UBQ，GenBank登录号：EC929411），甘油醛3-磷酸脱氢酶（GAPDH，GenBank登录号：AT1G13440.1），具体信息见附录A；合成后的干粉用ddH<sub>2</sub>O稀释至10 μM。

4.2.2 药品准备：液氮、焦碳酸二乙酯（DEPC）、ddH<sub>2</sub>O、琼脂糖、溴化乙锭、10×TBE缓冲液、PCR Mix以及RNA提取、反转录试剂盒

4.2.3 仪器准备：高速离心机、微量分光光度计、电泳仪、PCR仪、凝胶成像系统

4.2.4 研磨芽样品的研钵清洗后用无水乙醇点燃去除RNase。

4.2.5 用于RNA提取及反转录的2 ml离心管、1.5 ml离心管、200 μL PCR管及蓝、黄、白枪头均用0.1 %的DEPC水溶液（ddH<sub>2</sub>O: DEPC=1000: 1）37 °C处理过夜，121 °C蒸汽灭菌20 min，50 °C烘箱烘干。鉴定开始前准备好口罩、手套，以及样品数×4的离心管并编号。

### 4.3 RNA 提取及反转录

4.3.1 将所取的1~4个芽位的样品分别在研钵中用液氮冷冻并迅速研磨混匀。每份样品称取20 mg置于离心管内；

4.3.2 使用RNA提取试剂盒并根据说明书步骤提取芽组织RNA；

4.3.3 使用微量分光光度计测定提取RNA浓度，且OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>在2.0左右，OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>在2.0~2.4之间；统一用DEPC水稀释至100 ng/μL，用于反转录。

4.4.4 将5 μL稀释后的RNA加入无RNase的200 μL PCR管中，使用反转录试剂盒并根据说明书反转录合成cDNA，合成后的cDNA用ddH<sub>2</sub>O稀释至100 ng/μL，用于PCR扩增。

#### 4.4 cDNA 质量检测

4.4.1 利用PCR仪扩增引物肌动蛋白（ACT，GenBank登录号：EC969944）；

4.4.2 PCR体系由5  $\mu$ L PCR Mix（with Dye）、0.4  $\mu$ L正向引物、0.4  $\mu$ L反向引物、1  $\mu$ L cDNA和3.2  $\mu$ LddH<sub>2</sub>O组成总体积为10  $\mu$ L的反应体系；

4.4.3 取4个PCR管编号并做记录，PCR程序为94  $^{\circ}$ C 10 min，94  $^{\circ}$ C 30 s，58  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 1 min，72  $^{\circ}$ C 8 min，16  $^{\circ}$ C 2 min，其中第2~4步循环35次；

4.4.4 PCR产物及2000 DNA Marker在1%琼脂糖凝胶（1 g琼脂糖凝胶，100 ml 1 $\times$ TBE溶液，50 ng/ml溴化乙锭），1 $\times$ TBE缓冲液中电泳分离，随后在凝胶成像系统下观察。

#### 4.5 看家基因的半定量 PCR 及其产物检测

4.5.1 利用PCR仪扩增ACT与GAPDH2个看家基因；

4.5.2 PCR体系配置同4.4.2；

4.5.3 PCR程序为94  $^{\circ}$ C 10 min，94  $^{\circ}$ C 30 s，58  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 1 min，72  $^{\circ}$ C 8 min，16  $^{\circ}$ C 2 min。其中，第2~4步循环27次；

产物检测同4.4.4；

可重复4.5一次以消除误差。

### 5 葡萄苗木成活率与生长势判断

#### 5.1 PCR 条带质量的分级

以葡萄冬芽cDNA扩增引物ACTIN为例，目的基因表达量如图2：左侧无扩增条带，ACT无表达；中间目的基因表达量低、扩增产物浓度低、条带模糊；右侧目的基因表达量高、扩增产物浓度高、条带清晰。看家基因的表达水平受环境因素影响较小，在不同的试验条件下持续稳定表达，可真实反映植物体的生命活力的特性，因此以看家基因扩增产物条带的质量作为衡量葡萄冬芽质量标准。

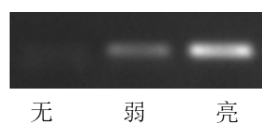


图2 PCR条带质量的分级

#### 5.2 成活率与生长势判断

5.2.1 待检测的苗木样品每株4个芽中ACTIN和GAPDH看家基因的半定量PCR扩增条带均清晰、亮度高（如图2右侧泳道），则苗木质量最佳，苗木成活率可达100%。萌芽后30日4个芽长成的新梢平均长度为37.6cm，新梢叶片数约为7片；

5.2.2 待检测的苗木样品每株基部3个冬芽能够检测到亮度高的看家基因的半定量PCR扩增条带时，而第4个芽扩增条带无或弱，则苗木状态较好，成活率接近100%，但苗木生长势较弱，萌芽后30日3个芽长成的新梢平均长度为19.3cm，新梢叶片数约为5片；

5.2.3 待检测的苗木样品每株基部2个冬芽能够检测到亮度高的看家基因的半定量PCR扩增条带时，而第3、4个芽基本无扩增产物或少数有模糊条带，苗木状态一般，成活率约为50%，萌芽后30日2个平均新梢长度为8.6cm，新梢叶片数约为3片（若用于建园则应适当增加定植密度并进行壮苗处理）；

5.2.4 待检测的苗木样品每株仅有1个冬芽能够检测到看家基因的半定量PCR扩增条带时，条带多为模糊的弱带，苗木状态较差，成活率很低约为2%，定植后新梢基本不萌发，不适于建园种植。

5.2.5 待检测的苗木样品均未检测到看家基因的半定量PCR扩增条带时，或极少有清晰条带时，苗木质量极差，基本不能成活。

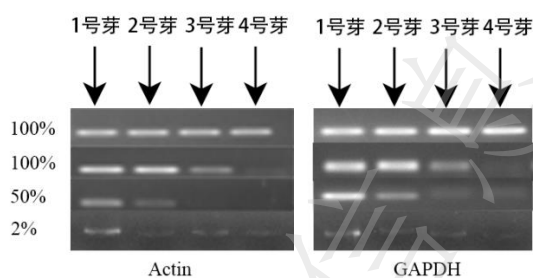


图3 2个看家基因的半定量PCR扩增结果

附录 A  
(资料性附录)

A.1 适用于看家基因表达水平检测的引物。

表 A1 用于 (Sq.) RT-PCR 的引物

名称	序列 (5'-3')	基因 ID	产物大小 (bp)
ACTIN-F	CTTGCATCCCTCAGCACCTT	XM_002282480.4	82
ACTIN-R	TCCTGTGGACAATGGATGGA		
GAPDH-F	TCCCGTGTTCCTACTGTTG	XM_002263109.3	106
GAPDH-R	CCTCTGACTCCTCCTTGAT		

全国团体标准信息平台

江苏省园艺学会团体标准

《葡萄苗木成活率与生长势早期快速精准鉴定技术规程》

版权专有 不得翻印