

T/GARIRPA

广西农业农村产业振兴促进会团体标准

T/GARIRPA XXXX—XXXX

永福罗汉果脱毒种苗繁育技术规程

Technical code of virus-free seedling propagation for Yongfu Luohanguo

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2025 – XX – XX 发布

2025 – XX – XX 实施

广西农业农村产业振兴促进会 发布

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》的规定起草。

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。

本文件由永福县农业农村局提出并宣贯。

本文件由广西农业农村产业振兴促进会归口。

本文件起草单位：永福县农业农村局、永福县市场监督管理局、广西壮族自治区农业科学院、永福县罗汉果协会。

本文件主要起草人：韦忠训、梁载林、彭斌、黄伟华、郑国龙、王卫平。

永福罗汉果脱毒种苗繁育技术规程

1 范围

本文件界定了永福罗汉果脱毒苗繁育技术的术语和定义，规定了脱毒原原种苗生产、脱毒原种苗生产、脱毒商品苗生产、贮存和运输等阶段的操作指示。

本文件适用于永福罗汉果脱毒种苗的繁育。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脱毒苗原原种苗 virus-free nucleus stock

通过茎尖组织培养、热处理等生物技术直接获得的，首次通过病毒检测确认脱毒的初始植株。

3.2

脱毒苗原种苗 virus-free registered stock

由脱毒苗原原种苗作为起始材料，在组培室、高标准网室等严格隔离条件下，扩繁而来的后代。

3.3

脱毒商品苗 virus-free certified stock

由脱毒苗原种苗经过一定程度的扩繁，达到市场销售标准，并确保其健康度和农艺性状仍保持在较高水平，直接用于农业生产的种苗。

4 脱毒原原种苗生产

4.1 培养基准备

4.1.1 诱导培养基

配方为MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L+蔗糖3%+琼脂0.35%~0.8%。

4.1.2 继代培养基

配方为MS+BA (0.5~1.0) mg/L+IAA 0.1 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

4.1.3 生根培养基

配方为1/2MS+IBA 1.0 mg/L+0.1%活性炭。

4.2 外植体选择与处理

4.2.1 材料选择

在生长健壮、来花及时、挂果容易、果大整齐的优良品种和单株上采集枝条。选择叶片完整、叶芽饱满、无病虫害且未现蕾的藤蔓上剪取约50 cm的嫩梢。

4.2.2 消毒处理

在超净工作台中用无菌水冲洗外植体，冲洗完成后放入75%酒精溶液浸泡5s~10s，随后放入0.1%升汞溶液或2%次氯酸钠溶液消毒8 min~10 min，最后用无菌水冲洗4~5次备用。

4.3 茎尖脱毒与培养

4.3.1 热处理

将试管苗置于38℃~39℃的光照培养箱中处理10 d~15 d。

4.3.2 茎尖剥离

在超净工作台上切取0.2 mm~0.5 mm的茎尖分生组织进行培养。

4.3.3 初代培养

将茎尖分生组织接种到诱导培养基，pH值5.8~6.0。培养条件为温度24℃~28℃，光照强度800 Lx~1 200 Lx，每天光照12 h~16 h。

4.4 病毒检测与鉴定

4.4.1 电镜观察法

参见附录A.1。

4.4.2 间接酶联免疫法

参见附录A.2。

4.5 脱毒原种苗保存

在无菌条件下，通过继代培养方式进行保存。保存环境温度为24℃~26℃，光照强度为1 000 Lx~2 000 Lx，每日光照12 h，相对湿度为70%~85%。

5 脱毒原种苗生产

5.1 扩繁培养

将脱毒原种苗转入继代培养基进行扩繁，温度控制在24℃~29℃，光照强度800 Lx~1 200 Lx，每天光照12 h。

5.2 生根培养

当继代苗长至5 cm~6 cm时，可转入生根培养基诱导生根。前期暗培养5 d，温度为25℃，湿度为85%；中后期逐渐增加光照至1 500 Lx~1 800 Lx，每日光照12 h，温度为25℃~28℃，湿度为85%。

6 脱毒商品苗生产

6.1 炼苗

当组培生根苗根系长至约0.5 cm，具3~4片叶，高5 cm~6 cm时，将组培瓶苗从培养室移至温室或大棚内，闭瓶炼苗7 d~10 d，遮光率50%~70%，让其逐渐适应外界环境。随后打开瓶盖，开瓶炼苗2 d~3 d，及时喷水保持湿度，防止萎蔫。

6.2 移栽与管理

6.2.1 基质准备

移栽基质需疏松、透气、排水良好且经过消毒。

6.2.2 洗苗与处理

取出组培苗，洗净根部培养基。用500倍多菌灵溶液浸泡5 s杀菌，再用800倍IBA溶液浸泡15 min。

6.2.3 移栽

将苗栽入口径6 cm~7 cm的营养杯中。栽后立即淋透定根水，并搭建小拱棚覆盖薄膜，湿度保持在85%以上。

6.2.4 苗期管理

6.2.4.1 棚内温度维持在 25℃~28℃，避免强光直射（初期遮阴>70%），后期逐渐增加光照。

6.2.4.2 成活后 7 d~10 d，可开始喷施稀薄的平衡型水肥。

6.2.4.3 定期喷洒杀菌剂和杀虫剂，预防病虫害。

6.3 出圃条件与种苗质量

符合以下要求的种苗可出圃供大田定植：

——健壮，经过充分炼苗；

——叶色浓绿，茎秆粗壮，无任何病虫害症状和病毒病症状；

——苗高≥6 cm；

——根系发达，白色或乳白色，充满营养土团，无烂根现象；

——随机抽样进行病毒检测，确保不带目标病毒。

7 贮存和运输

7.1 贮存

7.1.1 组培瓶苗

在专用组培库房或光照培养箱，光照强度500Lx~1000Lx，每日光照8h~10h，温度18℃~22℃，贮存2~4个月。

7.1.2 营养钵苗

7.1.2.1 在配备防虫网的温室或大棚内贮存，严防蚜虫等传毒媒介再感染，温度 20℃~28℃，贮存 1~2 个月。

7.1.2.2 夏季通过遮阳、风机、水帘等措施降温；冬季保温防冻。

7.2 运输

装车前1d停止浇水，使基质保持在手握成团，轻触即散的状态，并使苗圃环境温度逐渐降至22℃~25℃，避免高温高湿状态下装车，冷藏运输。

附录 A

(资料性)

病毒检测方法

A.1 电镜观察法

A.1.1 样品采集

A.1.1.1 待检测的罗汉果组培苗作为待测样品，已知感染病毒的罗汉果植株样品作为阳性对照，已知健康的罗汉果植株样品作为阴性对照。

A.1.1.2 选取幼嫩、展开不久的叶片，置于预冷的密封袋中送检。若不能立即处理，可暂存于4℃冰箱，暂存不应超过24 h。

A.1.2 样品制备

取约0.1 g叶片组织，置于预冷的研钵中，加入1 mL~2 mL预冷的磷酸缓冲液或蒸馏水充分研磨成匀浆，研磨充分后将研磨液转移至离心管中。

A.1.3 离心纯化

在4℃条件下，以3 000 rpm~5 000 rpm的转速离心10 min~15 min。离心结束后吸取上清液移至新的离心管中。

A.1.4 制样与负染

A.1.4.1 滴样

用移液器或毛细管吸取10 μL~20 μL离心后的上清液直接滴加到铜网的支持膜上，室温静置3 min~5 min。

A.1.4.2 染色

用滤纸从载网边缘吸掉多余的样品液，立即滴加1~2滴2%磷钨酸染液或2%醋酸铀酰染液，染色1 min~2 min，用滤纸从边缘彻底吸干染液。放在室温下自然干燥。

A.1.5 观察

将制备好的载网放入TEM样品杆，在20 000 x~80 000 x的放大倍数下系统性地搜索整个铜网孔洞周围区域，寻找是否具有规则形状、大小均一的颗粒。

A.1.6 结果判读

若在样品中观察到大量形态、大小一致的病毒颗粒，且与阳性对照组中观察到的颗粒形态一致，则为脱毒失败；若在整个观察视野中仅见背景杂质、细胞碎片或蛋白聚集物，未见任何规则、成形的病毒颗粒，且与阴性对照组表现一致，则为脱毒成功。

A.2 间接酶联免疫法

A.2.1 样品制备

从待测罗汉果植株上取0.5 g~1.0 g的幼嫩叶片组织置于研钵或研磨袋中，加入5~10倍体积的碳酸盐缓冲液或PBS缓冲液充分研磨成匀浆。将研磨液转移至离心管中，在4℃下以3 000 rpm~5 000 rpm离心10 min~15 min，离心完成后吸取上清液作为待测样品，若不能立即检测，应于-20℃冷冻保存。

A.2.2 包被

A.2.2.1 已知感染病毒的罗汉果植株样品作为阳性对照，已知健康的罗汉果植株样品作为阴性对照，仅加入包被缓冲液的作为空白对照。

A. 2. 2. 2 取适量上清液加入酶标板孔中，每孔加 100 μL ~200 μL 。将酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 1 h~4 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育 >12 h。

A. 2. 3 洗板

甩尽或吸尽板孔内的液体后用 PBST 缓冲液注满每孔，静置 3 min~5 min 后甩干，重复此过程 3~5 次。每次洗板后均在吸水纸上拍干。

A. 2. 4 加入一抗

用稀释液将一抗按说明书推荐比例稀释，稀释后每孔加入 100 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 1 h~2 h。
注：一抗为能够特异性识别并结合目标抗原的抗体。

A. 2. 5 洗板

同 A. 2. 3。

A. 2. 6 加入酶标二抗

用稀释液将酶标二抗按说明书稀释，稀释后每孔加入 100 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育 1 h~2 h。
注：酶标二抗为被过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的能够识别并结合一抗的抗体。

A. 2. 7 洗板

同 A. 2. 3。

A. 2. 8 显色

配制 TMB 显色底物溶液，每孔加入 100 μL TMB 底物液，避光条件下于 37 $^{\circ}\text{C}$ 或室温反应 15 min~30 min。

A. 2. 9 终止

当阳性对照孔出现明显蓝色，或阴性对照孔刚出现轻微颜色时，每孔加入 50 μL 终止液（2 mol/L H_2SO_4 ），溶液颜色立即由蓝变黄。

A. 2. 10 读数

A. 2. 10. 1 用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度值（OD 值）。

A. 2. 10. 2 实验成立需满足以下条件，若不满足，则本次实验无效，需重做：

- 阳性对照孔 OD 值 (P) 必须明显高于阴性对照孔 OD 值 (N)，通常要求 $P/N \geq 3$ 或 $P-N \geq 0.4$ ；
- 阴性对照孔 OD 值 (N) 应 < 0.3 ；
- 空白对照孔 OD 值应接近 0。

A. 2. 10. 3 若待测样品孔 OD 值 $\geq 2.1 \times$ 阴性对照孔平均 OD 值，则脱毒失败；若待测样品孔 OD 值 $< 2.1 \times$ 阴性对照孔平均 OD 值，则脱毒成功。
