

杭白菊脱毒种苗生产技术规程

Technical regulations for virus-free plantlets of *Chrysanthemum morifolium*

2020 - 08 - 26 发布

2020 - 09 - 26 实施

浙江省市场监督管理局 发布

前 言

本标准依据GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由浙江省农业农村厅提出。

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、浙江省农业技术推广中心、浙江省中药材产业协会、嘉兴市农业科学研究院桐乡农业科学研究所。

本标准主要起草人：毛碧增、颜克如、何伯伟、马常念、谢礼、张亚惠、冯明慧、陆中华、缪悦啸、朱卫东、周建松、戴德江、沈子尧、刘辉辉、杨传宝、何家浩。

杭白菊脱毒种苗生产技术规程

1 范围

本标准规定了杭白菊脱毒苗的定义、生产技术、分级与质量要求、检测方法和包装、标志、运输与贮存。

本标准适用于不携带菊花 B 病毒 (*Chrysanthemum virus B*, CVB)、番茄不孕病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV)、烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 等的脱毒组培瓶苗、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/T 18862 地理标志产品 杭白菊

NY/T 401 脱毒马铃薯种薯（苗）病毒检测技术规程

NY 525 有机肥料

SN/T 2122-2015 进出境植物及植物产品检疫抽样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

杭白菊

系菊科植物菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 产于浙江省的药用栽培杭菊，以干燥头状花序入药。

3.2

脱毒苗

经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

脱毒原种苗

脱毒组培瓶苗移栽于无病原、虫源的种苗圃内存活的植株。

3.4

脱毒生产用苗

由脱毒原种苗定植于无病原、虫源的种苗圃内通过扦插或压条繁殖的植株。

3.5

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

4.1.1 外植体选择

选择品种特性纯正、品质优良、丰产性能好、无病虫害的植株。采样最佳时间为10月~11月晴天的10:00~16:00，切取带生长点的2 cm~3 cm茎段。

4.1.2 无菌苗繁育

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1 min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0.3 mm~0.5 mm的茎尖分生组织，接种于生长培养基中。

4.1.3 脱毒苗培育

无菌植株培养至1.5 cm~2.0 cm时，置于解剖镜下挑取0.3 mm~0.5 mm的茎尖分生组织，接种于茎尖培养基中，植株长到3 cm~6 cm时接种于生根培养基。

4.1.4 脱毒苗快繁

经病毒检测合格的试管苗，植株长至6 cm~8 cm时，切取含有1个~2个节间的茎段进行扩繁。接种到增殖培养基中，每20 d~30 d继代1次。继代控制在4代~6代。

4.1.5 培养条件

光照强度 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ~ $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，白天温度 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ，晚上温度 $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ （黑暗培养）。每天照光12 h~14 h。

4.2 脱毒原种苗和脱毒生产用苗

4.2.1 脱毒原种苗生产

4.2.1.1 基质准备

建议基质栽培。基质配比为泥炭:珍珠岩:蛭石=3:1:1（体积比）。

4.2.1.2 定植方式

打开脱毒瓶苗的瓶盖，置于太阳光非直射处，常温驯化1 d~2 d后洗净琼脂，种植于苗床、营养钵或穴盘中，栽后浇透水，第1周用遮光率为50%的遮阳网遮荫，并保持相对湿度75%~90%。宜使用防虫网隔离。

4.2.2 脱毒生产用苗繁殖

4.2.2.1 苗床准备

定植前施足基肥，每667 m²（亩）施入有机肥200 kg~300 kg，有机肥应符合NY 525标准，高浓度三元复合肥15 kg。按畦宽1.2 m~1.5 m，沟宽30 cm~35 cm，沟深25 cm~35 cm，整地作畦。

4.2.2.2 繁殖方式

4.2.2.2.1 生产用苗的繁殖可以采用扦插繁殖或压条繁殖。

4.2.2.2.2 扦插繁殖：脱毒原种苗株高30 cm以上时，用消毒刀具剪取带有3个~5个节的8 cm~10 cm茎段，茎段基部扦插于苗床、营养钵或穴盘，栽后浇透水，用遮光率为50%的遮阳网遮荫，相对湿度保持75%~90%，等茎段基部发出根，掀开遮阳网。

4.2.2.2.3 压条繁殖：苗床上的脱毒原种苗株高40 cm~50 cm时，用土块进行“压条”，将枝条平放于畦面，每隔20 cm~25 cm用土块压住枝条，节间萌发不定根和不定芽。

4.2.2.2.4 脱毒种苗繁育脱毒生产用苗，繁殖年限控制在3年~4年。

5 分级与质量要求

5.1 脱毒苗按繁育过程可分为脱毒组培瓶苗、脱毒原种苗和脱毒生产用苗三类。

5.2 脱毒组培瓶苗按质量要求分为优质苗和合格苗。

5.3 脱毒组培瓶苗、脱毒种苗的质量等级指标、检验方法、检验规则参见附录A。

6 抽样与检测方法

6.1 抽样

脱毒组培瓶苗抽样按NY/T 401规定执行，脱毒原种苗和脱毒生产用苗的抽样按SN/T 2122-2015中的5.2执行。

6.2 检测方法

病毒检测方法参见附录B。

7 包装、标志、运输与贮存

7.1 包装

组培瓶苗和脱毒种苗宜用塑料箱或纸板箱包装。

7.2 标志

包装箱内附脱毒苗出厂（圃）合格证，病毒检测报告参见附录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。

7.3 运输

运输过程中应控温控湿，温度以15℃~25℃为宜，相对湿度以60%~90%为宜。

7.4 贮存

组培瓶苗常温弱光照条件下可以贮存7 d~10 d，脱毒种苗出圃后3 d内定植。

8 标准化生产模式图

杭白菊标准化生产模式图参见附录D。

附 录 A
(资料性附录)

脱毒组培瓶苗、脱毒种苗的质量要求、检验方法、检验规则

A.1 质量要求

A.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 A.1。

表 A.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	6.0~10.0	4.0~6.0
茎粗, mm	≥3.0	1.0~3.0
脱毒率, %	100	100
外观要求	生长健壮、根系发达、无污染、无病斑	

A.1.2 脱毒种苗质量等级指标

脱毒种苗质量等级指标见表 A.2。

表 A.2 脱毒种苗质量等级指标

项 目	指 标	
	脱毒原种苗	脱毒生产用苗
脱毒率, %	100	≥95
外观要求	种苗生长健壮、根系发达、无外源病害、茎粗 ≥3 mm	

A.2 检验方法

株高用分度值1 mm的直尺测量, 茎粗用游标卡尺测量。

A.3 检验规则

A.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。

A.3.2 检验分类

A.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和茎粗。并附有菊花脱毒苗出厂（圃）合格证。

A.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。

A.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 B

(资料性附录)

杭白菊脱毒种苗规定检测的病毒种类和检测方法

B.1 检测病毒种类

菊花 B 病毒 (*Chrysanthemum virus B*, CVB)、番茄不孕病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV)、烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY)。

B.2 病毒检测方法

采用双抗体夹心酶联免疫吸附 (DAS-ELISA)、聚合酶链反应 (PCR) 和电镜观察等方法检测, 在生产上只需采用其中一种。仲裁时采用聚合酶链反应 (PCR) 检测法。

B.2.1 双抗体夹心酶联免疫吸附 (DAS-ELISA) 检测法

检测方法按 NY/T 401-2000 中附录 A 的方法执行。

B.2.2 聚合酶链反应 (PCR) 检测法

B.2.2.1 菊花 B 病毒

菊花 B 病毒是单分体线形正义 ssRNA 病毒。取各编号植株的叶片, 提取总 RNA, 利用寡聚胸腺嘧啶 T 引物 oligo-dT 将 RNA 反转录为 cDNA, 用菊花 B 病毒的特异引物 (上游引物 5' -ACCGAATTCTTAGTCACAATGCCTCCC-3' 和下游引物 5' -TCCGAGCTCATAGAGACGGCATACTT-3') 进行聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR)。PCR 反应条件如下: 94 °C 预变性 5 min 后进入循环: 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 扩增得到 650 bp 的片段。扩增产物经回收纯化后, 用 T₄ DNA 连接酶与 pGEM-T 载体连接, 连接产物转化感受态细胞, 获得重组质粒, 阳性重组质粒测序, 序列与 CVB 一致的为阳性。

B.2.2.2 番茄不孕病毒

番茄不孕病毒是三分体线形正义 ssRNA 病毒。取各编号植株的叶片, 提取总 RNA, 利用寡聚胸腺嘧啶 T 引物 oligo-dT 将 RNA 反转录为 cDNA, 用番茄不孕病毒的特异引物 (上游引物 5' -CCATCCCTTCAACATCCGAC-3' 和下游引物 5' -GTTGAAGCGAAGGAATACG-3') 行 PCR 反应。PCR 反应条件如下: 94 °C 预变性 5 min 后进入循环: 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 扩增得到 494 bp 的片段。扩增产物经回收纯化后, 用 T₄ DNA 连接酶与 pGEM-T 载体连接, 连接产物转化感受态细胞, 获得重组质粒, 阳性重组质粒测序, 序列与 TAV 一致的为阳性。

B.2.2.3 烟草花叶病毒

烟草花叶病毒是单分体线形正义 ssRNA 病毒。取各编号植株的叶片, 提取总 RNA, 利用寡聚胸腺嘧啶 T 引物 oligo-dT 将 RNA 反转录为 cDNA, 用烟草花叶病毒的特异引物 (上游引物 5' -ACTCCATCTCAGTTCGTGTTCTTG-3' 和下游引物 5' -GAGCTCTCGAAAGAGCTCCGATTA-3') 进行 PCR 反应。

PCR 反应条件如下：94 ℃预变性 5 min 后进入循环：94 ℃变性 40 s，50 ℃退火 35 s，72 ℃延伸 40 s，30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min，扩增得到 425 bp 的片段。扩增产物经回收纯化后，用 T₄ DNA 连接酶与 pGEM-T 载体连接，连接产物转化感受态细胞，获得重组质粒，阳性重组质粒测序，序列与 TAV 一致的为阳性。

B. 2. 2. 4 黄瓜花叶病毒

黄瓜花叶病毒是三分体线形正义 ssRNA 病毒。取各编号植株的叶片，提取总 RNA，利用寡聚胸腺嘧啶 T 引物 oligo-dT 将 RNA 反转录为 cDNA，用黄瓜花叶病毒的特异引物（上游引物 5' -GCCACCAAAAATAGACCG-3' 和下游引物 5' -ATCTGCTGGCGTGGATTCT-3'）进行 PCR 反应。PCR 反应条件如下：94 ℃预变性 5 min，94 ℃ 45 s，54 ℃ 1 min，72 ℃ 45 s，35 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min，扩增得到 593 bp 的片段。扩增产物经回收纯化后，用 T₄ DNA 连接酶与 pGEM-T 载体连接，连接产物转化感受态细胞，获得重组质粒，阳性重组质粒测序，序列与 CMV 一致的为阳性。

B. 2. 2. 5 马铃薯 Y 病毒

马铃薯 Y 病毒是单分体线形正义 ssRNA 病毒。取各编号植株的叶片，提取总 RNA，利用寡聚胸腺嘧啶 T 引物 oligo-dT 将 RNA 反转录为 cDNA，用马铃薯 Y 病毒的特异引物（上游引物 5' -ACGTCCAAAATGAGAATGCC-3' 和下游引物 5' -TGG TGTCGTGATGTGACCT-3'）进行 PCR 反应。PCR 反应条件如下：94 ℃预变性 5 min 后进入循环：94 ℃变性 45 s，57 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 30 s，35 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min，扩增得到 480 bp 的片段。扩增产物经回收纯化后，用 T₄ DNA 连接酶与 pGEM-T 载体连接，连接产物转化感受态细胞，获得重组质粒，阳性重组质粒测序，序列与 PVY 一致的为阳性。

B. 3 电镜检测法

B. 3. 1 检测程序

电镜检测法主要用于检测菊花 B 病毒、番茄不孕病毒、烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒和马铃薯 Y 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 1% 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 mm²~2 mm² 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。

B. 3. 2 病毒颗粒特征

B. 3. 2. 1 菊花 B 病毒

属于乙型线状病毒科 (*Betaflexiviridae*)、麝香石竹潜隐病毒属 (*Carlavirus*)，病毒颗粒线状，略弯曲的，直径为 12 nm~15 nm，长度为 610 nm~700 nm，通常分散分布在寄主组织的细胞质中，或以膜包裹的束状或带状聚集体形式存在。

B. 3. 2. 2 番茄不孕病毒

属于雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*)、黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*)，病毒颗粒为等轴对称的二十面体，直径约29 nm，负染可见一个直径约12 nm的电子致密中心，呈“中心孔”样结构，主要分散在细胞质和液泡中。

B. 3. 2. 3 烟草花叶病毒

属于植物杆状病毒科 (*Virgaviridae*)、烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*)，病毒颗粒呈刚直的长杆状，直径约为18 nm，长度为300 nm~310 nm，主要分布在感病植株细胞质及液泡中。

B. 3. 2. 4 黄瓜花叶病毒

属于雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*)、黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*)，病毒颗粒为等轴对称的二十面体，直径约29 nm，负染可见一个直径约12 nm的电子致密中心，呈“中心孔”样结构，主要分散在感病植株的细胞质和液泡中。

B. 3. 2. 5 马铃薯Y病毒

属于马铃薯Y病毒科 (*Potyviridae*)、马铃薯Y病毒属 (*Potyvirus*)，为弯曲线状病毒颗粒，直径11 nm~13 nm，长度为680 nm~900 nm，分布在感病植株的细胞质内，产生细胞质柱状内含体。

附 录 C
(资料性附录)

杭白菊脱毒苗出厂(圃)合格证、杭白菊脱毒苗病毒检验报告

C.1 杭白菊脱毒苗出厂(圃)合格证

菊花脱毒苗出厂(圃)合格证样式见表 C.1。

表 C.1 菊花脱毒苗出厂(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 杭白菊脱毒苗病毒检测报告

菊花脱毒苗病毒检测报告样式见表 C.2。

表 C.2 杭白菊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	菊花 B 病毒(CVB)	番茄不孕病毒(TAV)	烟草花叶病毒(TMV)	黄瓜花叶病毒(CMV)	马铃薯 Y 病毒 (PVY)

附录 D
(资料性附录)
杭白菊脱毒种苗标准化生产模式图

杭白菊脱毒种苗标准化生产模式图见图D.1。


脱毒组培瓶苗				脱毒原种苗	脱毒生产用苗
外植体采样	无菌苗繁育	脱毒苗培育	脱毒苗快繁		
 <p>选择品种特性纯正、品质优良、丰产性能好、无病虫害的植株。采样最佳时间为10月~11月晴天的 10:00 ~ 16:00,切取带生长点的2 cm~3 cm茎段。</p>	 <p>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1 min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0.3 mm~0.5 mm的茎尖分生组织,接种于生长培养基中。</p>	 <p>无菌植株培养至1.5 cm~2.0 cm时,置于解剖镜下挑取0.3 mm~0.5 mm的茎尖分生组织,接种于茎尖培养基中,植株长到3 cm~6 cm时接种于生根培养基。</p>	 <p>经病毒检测合格的试管苗,植株长至6 cm~8 cm时,切取含有1个~2个节间的茎段进行扩繁。接种到增殖培养基中,每20 d~30 d继代1次。继代控制在4代~6代。</p>	 <p>基质准备:建议基质栽培。基质配比为泥炭:珍珠岩:蛭石=3:1:1(体积比)。定植方式:打开脱毒瓶苗的瓶盖,置于太阳光非直射处,常温驯化1 d~2 d后洗净琼脂,种植于苗床、营养钵或穴盘中,栽后浇透水,第1周用遮光率为50%的遮阳网遮荫,并保持相对湿度75%~90%。宜使用防虫网隔离。</p>	 <p>苗床准备:定植前施足基肥,每667 m²(亩)施入有机肥2 00 kg~3 00 kg,有机肥应符合NY 525标准,高浓度三元复合肥15 kg。按畦宽1.2 m~1.5 m,沟宽30 cm~35 cm,沟深25 cm~35 cm,整地作畦。繁殖方式:生产用苗的繁殖可以采用扦插繁殖或压条繁殖。 扦插繁殖:脱毒原种苗株高30 cm以上时,用消毒刀具剪取带有3个~5个节间的8 cm~10 cm茎段,茎段基部扦插于苗床、营养钵或穴盘,栽后浇透水,用遮光率为50%的遮阳网遮荫,相对湿度保持75%~90%,等茎段基部发出根,掀开遮阳网。压条繁殖:苗床上的脱毒原种苗株高40 cm~50 cm时,用土块进行“压条”,将枝条平放于畦面,每隔20 cm~25 cm用土块压住枝条,节间萌发不定根和不定芽。 脱毒种苗繁育脱毒生产用苗,繁殖年限控制在3年~4年。</p>

图 D.1 杭白菊脱毒种苗生产模式图