

附录 D  
(资料性附录)  
生物学测定

## D.1 嫁接

将具有肿枝症状的芽作为接穗,接于健康的砧木上,在出芽后的6周到2个月的时间内,叶部症状为褪绿。芽上的嫩叶萎蔫,只剩下具托叶的绿色枝条。茎上的腋芽常抽出2根~3根枝条,多数枯死,枝条基部肿大,最终症状为主茎肿大。上述症状在芽接后的5个月~8个月内出现,并常引起顶死。

## D.2 机械接种

由尼兰粉蚧接毒的猴面包树和 *Bombax brevicuspe* 幼苗分别在接种后2周~10周和20周~30周收获,在收获前将苗放在弱光下处理24 h~48 h,收获后的病叶,除去叶脉,用含有磷酸盐、半胱氨酸、乙二胺四乙酸溶液真空浸透,第一次浸透后将溶液倒掉,叶片在新鲜溶液中再浸透一次,取出叶片在预冷的研钵中研磨,所得的粘液涂于半粒可可豆的内表和胚部,冲洗后,次日种植。

## D.3 介体传播

## D.3.1 饲毒

出现症状的幼嫩病叶是给粉蚧饲毒的最好毒源。饲毒前的禁食有利于提高传毒效率,但不要超过10 h。最短饲毒时间为20 min,最适为50 min,或2 d~4 d。最短接毒时间为15 min,通常最大的传毒效率发生在2 h~10 h内。

## D.3.2 接毒

## D.3.2.1 测试植物

10个月龄~12个月龄的可可树、发芽可可幼苗或可可豆可作为测试植物。10个月龄~12个月龄的可可树接种后潜伏期为17 d~49 d。3周~5周的幼苗潜伏期平均为31 d,可可豆则为17 d~25 d。可可豆的子叶是测试接毒效果的最好材料,对可可树或幼苗来说,每株接5头粉蚧可望能获得30%的传毒率,而可可豆传毒效率能达100%。

## D.3.2.2 可可豆的接种方法

自成熟果荚中取出可可豆,去壳将其中一子叶解剖开,暴露出另一子叶的内面,将饲毒后的昆虫小心地刷到在玻璃罩内放置的可可豆上,用滤纸保湿,当接毒试验完成后用尼古丁溶液杀死昆虫。可可豆种于防虫的消毒沙子中。传毒试验常在29℃~36℃条件下进行。可可豆刚发芽时无症状,待第一、第二、第三对真叶出现时,就陆续显现症状。

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1617—2005

## 可可肿枝病毒检测方法

Detection of Cacao swollen shoot virus



SN/T 1617-2005

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·2-16463

定价: 8.00 元

2005-08-18 发布

2006-02-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

**附录 C**  
(规范性附录)  
**免疫电子显微镜观察**

**C.1 试剂**

- C.1.1 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH6.1)。  
C.1.2 5 mmol/L DIECA(二乙基二硫代氨基甲酸钠,也称铜试剂)。  
C.1.3 0.5%PEG 6 000。  
C.1.4 1% 果胶酶。

**C.2 实验步骤****C.2.1 Formvar 膜制作**

将聚乙烯醇缩甲醛(Formvar)溶于三氯甲烷,配成 0.2%~0.3%溶液,贮于冰箱内备用。制膜时取一块干净的玻璃片插入溶液中,取出倾斜待溶液挥发,用锋利的刀片沿玻璃边划痕,再将玻璃片以 45°角缓慢插入蒸馏水中,使薄膜从玻片上脱落下来漂浮于水面,将新的、规格为 230 目的铜网小心摆上,再用一块滤纸覆盖其上,捞起后置于培养皿中干燥备用。

**C.2.2 电镜样品制备****C.2.2.1 样品的制备**

取幼嫩的可可病叶 10 mg,加 20 mg 左右的金刚砂和 0.05 mol/L 的 PB 缓冲液(含 5 mmol/L 二硫苏糖醇或  $\beta$ -巯基乙醇,5 mmol/L DIECA,0.5%PEG 6 000,1%果胶酶,调 pH 6.1)0.32 mL 充分研磨,37℃孵育 2 h 后,室温 6 000 g 离心 2 min,上清留作电镜制片用。

**C.2.2.2 诱捕**

将一滴 1:1000 稀释的 CSSV 抗血清置于石蜡板上,用表面覆盖有 Formvar 膜的铜网放在上面室温孵育 10 min 后,用滤纸将铜网吸干,蒸馏水洗铜网,再吸干。然后放在制备好的样品上分别孵育 15 min、20 min、60 min,同时用未经抗血清孵育的铜网作对照。用滤纸将铜网吸干,蒸馏水洗铜网,再吸干。

**C.2.2.3 负染**

用 1%~2%醋酸双氧铀或 1%钨酸铵负染 2 min~3 min,晾干后即可在透射电镜下观察。

**C.3 结果判断**

和未经抗血清孵育的铜网相比,诱捕的铜网在相同的视野下,观察到数量较多的长度为 121 nm~130 nm,宽为 28 nm 的杆菌状病毒粒体,则结果是阳性。

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
可可肿枝病毒检测方法  
SN/T 1617—2005

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街 16 号  
邮政编码:100045

网址 www.bzcb.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 17 千字

2005 年 11 月第一版 2005 年 11 月第一次印刷

\*

书号: 155066·2-16463 定价 8.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533

PCR 产物大小为 670bp。

第 2 对序列为: P3:5'-GGATGAAGATGCCACCAG-3'

P4:5'-GTTGTGCTCCCATTTGGTG-3'

PCR 产物大小为 640bp。

第 3 对序列为: P9:5'-ACAGGATGGGGAAGTGAT-3'

P6:5'-CAGAAGTGGCAGTTGATG-3'

PCR 产物大小为 1 560bp。

### B.2.3 PCR 反应

10  $\mu$ L 的样品 DNA 抽提物加入到以下的 PCR 反应体系中(10 $\times$ 的反应液,20 mmol/L 引物 5  $\mu$ L,1.25 mmol/L dNTP 8  $\mu$ L,0.5 U*Taq* 酶),用灭菌水将反应体积调到 50  $\mu$ L。先 95 $^{\circ}$ C,变性 5 min;然后按 94 $^{\circ}$ C、90 s,52 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、90 s 进行循环;循环 30 次~40 次;最后在 72 $^{\circ}$ C,延伸 5 min。反应结束后,取 10  $\mu$ L PCR 产物进行琼脂糖电泳。

### B.2.4 琼脂糖电泳

#### B.2.4.1 制备凝胶

将 TAE 和电泳级琼脂糖按 1.0%(质量浓度)配好,在微波炉中熔化混匀,冷却至 55 $^{\circ}$ C 左右。

#### B.2.4.2 加溴化乙锭

加入溴化乙锭浓度为 0.5  $\mu$ g/mL,混匀,倒入已封好的凝胶平台上,插上样品梳。待凝胶凝固后,从制胶平台上除去封带,拔出梳子,加入足够量的 TAE(缓冲液没过凝胶表面约 1 mm)。

#### B.2.4.3 加样

用适量的(约 2  $\mu$ L~3  $\mu$ L)6 $\times$ 加样缓冲液分别与 10  $\mu$ L 样品混合,然后将其和适合的 DNA 分子量标准物分别加入到样品孔中。

#### B.2.4.4 电泳

接通电源使 DNA 向阳极移动。当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段时,关闭电源。将整个胶置于紫外透射仪上观察。

### B.3 结果判断

通过观察,若有相应大小的产物带出现,即可判定为阳性。

注:CSSV 各分离物血清学关系的远近将影响到 IC-PCR 的检测结果。

## 前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为规范性附录,附录 D 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。

本标准由中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所负责起草,中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局参加起草。

本标准主要起草人:魏梅生、相宁、李桂芬、吴翠萍、郭京泽。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。