

附件 3

《大豆非检疫性主要病原检测鉴定方法》

国家标准编制说明

（征求意见阶段）

承担单位：江苏省农业科学院

标准负责人：魏利辉

联系电话：13675109019

邮箱：weilihui@jaas.ac.cn

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、起草过程等；

（一）立项必要性和依据

2025 年 2 月 28 日《国家标准化管理委员会关于下达 2025 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发[2025] 7 号）立项下达推荐性国家标准《大豆非检疫性主要病原检测鉴定方法》的制定，项目编号：20250665-T-326，由农业农村部归口。

大豆【*Glycine max* (L.) Merr.】，又称黄豆，是豆科大豆属的一年生草本植物，原产于中国，古汉语中称为“菽”，在中国各地均有栽培。目前，大豆已广泛栽植于世界各地，产量排名前三的是巴西、美国和阿根廷，它们产量之和超过世界大豆总产量的 70%。中国是大豆的进口大国和消费大国，随着人们生活水平提高，对肉蛋奶需求增加，对于豆粕等饲料和食用油的需求持续提升。当前，我国大豆每年进口约 1 亿吨，国内产量远不能满足需求。当前国际环境充满动荡和不确定，为确保我国粮食安全，党中央、国务院高度重视大豆生产，习近平总书记多次做出重要指示，强调“要实打实

地调整结构，扩种大豆和油料，见到可考核的成效”。在 2022、2023、2024 连续三年的中央一号文件中均明确提出要加力扩种大豆油料，深入推进大豆和油料产能提升。

多年来，大豆根腐病、胞囊线虫病和病毒病等病害严重影响我国大豆产量和品质，通常情况下病害发生区域减产 10%~30%，严重发生区可导致减产 50%~70%，甚至绝收。相关病原菌常潜伏于土壤和种子中，侵染初期症状不明显，后期一旦显症即已错过最佳防控期。随着需求量增加和种植面积的扩大，商业化大豆调运量持续增高，为确保大豆的安全生产，监测病害发生情况，控制病原的传播扩散，大豆种植产业亟需高效的病原鉴定方法，实现病害发生前的病原判定和病害发生程度预警，为病害的快速、精准防控提供技术支撑。

目前国内针对大豆病原鉴定的标准主要包括：国家强制标准 1 项《GB 12743-2003 大豆种子产地检疫规程》；大豆疫病病原菌检测鉴定相关农业行业标准 2 项《NY/T 2115-2012 大豆疫霉病监测技术规范》、《NY/T 2114-2012 大豆疫霉病菌检疫检测与鉴定方法》；出入境检验检疫行业标准 3 项《SN/T 2474-2010 大豆疫霉病菌实时荧光 PCR 检测方法》、《SN/T 1131-2002 大豆疫霉病菌检疫鉴定方法》、《SN/T 4877.10-2017 基因条形码筛查方法 第 10 部分：检疫性疫霉》；地方标准 1 项《DB 35/T 1280-2012 大豆疫霉菌分子检测技术规程》。上述标准大部分在 10 年前制定，主要针对的是检疫性病原大豆疫霉，其它国内常见大豆病原，如根腐病菌（包括腐霉属、镰刀菌属、丝核菌属等），胞囊线虫和病毒等，缺少相关鉴定标准，特别是分子鉴定标准。此外，已颁布实施标准中的分子检测鉴定均

依赖标准实验室内传统的 PCR、荧光定量 PCR，部分鉴定过程还需要依靠病原形态学的细节来判定，鉴定过程复杂、耗时长，且需要一定专业背景的技术人员才能完成。

在 2023 年，大豆根腐病已被列入我国《一类农作物病虫害名录》。由于多种卵菌和真菌均可侵染大豆导致根腐病，且病害发生初期症状相似，导致在没有明确主要病原生物的前提下很难实现化学农药的精准防控。此外，面对当前大豆种植面积不断扩大、种子调运频繁的情况下，要求阻断病原扩散、满足病害防早、防准的需求，传统检测鉴定方法已明显不能胜任。近些年快速核酸检测技术已经有了跨越式的发展，特别是等温扩增领域，比如环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification, LAMP）技术以及重组酶介导扩增（recombinase aided amplification, RAA）或重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification, RPA）技术。与传统 PCR 检测技术相比，上述新技术具有靶向特异性好、灵敏度高、反应快、通量大、硬件需求低、操作简单、结果肉眼可判定等明显优势，因此不依赖标准实验室就可以实现病原物的快速分子检测，整个检测流程完成仅需要 30-90 分钟。本标准拟解决的主要问题是：确立标准化的大豆非检疫性主要病原的快速检测鉴定方法，为大豆根腐病、胞囊线虫病和病毒病的快速诊断、监测预警、抗病育种以及病害防治提供技术支撑，从而有效对大豆主要病害进行防控，保障大豆安全生产。

（二）国内外相关标准情况

截止 2024 年 3 月 20 日，无任何已备案标准或现行标准与本草案规定内容一致。

1. 经检索，除大豆疫霉菌外，国内尚无针对其它大豆根腐病菌分子检测鉴定相关标准。

2. 经检索，国内尚无针对大豆胞囊线虫分子检测鉴定相关标准。

3. 经检索，国内尚无针对重要大豆病毒病的病原分子检测鉴定标准。

4. 经检索，大豆有害生物种类鉴定的相关国家强制标准有 1 项：《GB 12743-2003 大豆种子产地检疫规程》，主要规定了大豆种子产地的限定性有害生物种类、健康种子生产、检验、检疫、签证等，利用田间危害症状以及形态学对病原物进行鉴定。大豆疫病病原菌检测鉴定相关农业行业标准 2 项：《NY/T 2115-2012 大豆疫霉病监测技术规范》，主要描述了在我国大豆疫病发生地区对其周边大豆种植区、加工场所以及相关病害可能发生的高风险地区的监控，通过观察植株生长以及采集土壤样本在实验室内完成病原鉴定；

《NY/T 2114-2012 大豆疫霉病菌检疫检测与鉴定方法》，主要通过植株症状、传统室内 PCR 技术、以及形态学进行大豆疫霉病菌的检测鉴定。出入境检验检疫行业标准 3 项：《SN/T 2474-2010 大豆疫霉病菌实时荧光 PCR 检测方法》，主要规定了室内进行大豆疫霉病菌的实时荧光定量 PCR 的检测鉴定方法；《SN/T 1131-2002 大豆疫霉病菌检疫鉴定方法》，主要规定了进出口岸通过形态学方法对大豆、土壤中携带的大豆疫霉病菌的鉴定方法；《SN/T 4877.10-2017 基因条形码筛查方法 第 10 部分：检疫性疫霉》，主要规定了基于保守基因序列，利用基因条码筛查法在实验室内，结合 PCR 产物测序序列以及 NCBI 网站序列比对分析，鉴定靶标疫霉菌。

本标准制定过程充分参考以上现行标准的定义、采样方式及判

别方法，且分子快速鉴定技术相关内容与现行标准无重叠。

（三）工作基础

申请人目前担任国家特色蔬菜产业技术体系病害防控岗位专家任务，具有扎实的植保工作基础。申请人及所在团队近五年来承担作物病害相关国家级及省部级以上科研项目 20 余项，发表论文 70 余篇，获得授权专利 7 件。此外，申请人承担制定了农业（行业）标准《NY/T 3619-2020 设施蔬菜根结线虫病防治技术规程》、《NY/T 4720-2025 莲藕腐败病抗性鉴定技术规程》、《NY/T 4719-2025 生姜茎基腐病抗性鉴定技术规程》和江苏省农业地方标准《DB32/T 2235-2012 设施农业根结线虫病防治规程》，熟悉标准制定的相关流程和关键节点。

申请人及所带领的团队长期从事作物卵菌病害、镰刀菌所致枯萎病以及作物病毒病方面的检测诊断、发生规律以及成灾机制研究，搭建了完整的植物病原检测技术平台，且经验丰富。在大豆病害研究工作方面，申请人主持了公益性行业（农业）科研专项课题：《作物疫病监测防控技术研究与示范》（编号：201303018），筛选并获得了防治大豆根腐病的芽孢杆菌和放线菌；在病原物检测方面，团队建立的病原物检测技术体系成熟，相关研究结果已发表多篇研究论文。

研究论文：

1. Deng, S., Ma, X., Chen, Y., Feng, H., Zhou, D., Wang, X., Zhang, Y., Zhao, M., Zhang, J., Daly, P., and Wei, L. 2022. LAMP Assay

for Distinguishing *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* in Lotus (*Nelumbo nucifera*) Rhizomes. Plant Dis 106:231-246.

2. 高晓晓, 涂丽琴, 孙 枫, 等. 江苏蚕豆三叶草黄脉病毒的分子鉴定及全基因组结构特征分析. 江苏农业学报, 2022, 38(5) : 1203-1210.
3. 季英华, 张晖, 赵文浩, 等. 江苏菜豆上分离的番茄黄化曲叶病毒基因组序列分析. 植物病理学报, 2016, 46(5): 591-597.
4. 吉颖, 吴淑华, 崔晓艳, 等. 江苏省大豆上一种新的粉虱传病毒的分子鉴定及系统进化分析. 江苏农业科学, 2022, 50(10): 30-36.
5. 吉颖, 孙枫, 吴淑华, 等. 江苏大豆上分离的豇豆轻斑驳病毒基因组序列克隆及特征分析. 华北农学报, 2022, 37 (3) : 200-205.
6. 陆辰晨. 基于环介导等温扩增技术快速诊断大豆根部主要病害的研究. 南京农业大学 (博士论文), 2015.
7. 涂丽琴, 吴淑华, 干射香, 等. 江苏省蚕豆上菜豆黄花叶病毒的分子鉴定. 江苏农业学报, 2019, 35(4) : 804-810.
8. 袁咏天, 叶文武, 曾丹丹, 等. 基于环介导等温扩增技术检测东北地区大豆主要品种(系)种子携带的病原菌. 大豆科学, 2017, 36(04):592-597
9. 朱宇翔, 秦嘉超, 季英华, 等. 菜豆黄花叶病毒 RPA-LFD 技术快速检测方法的建立与应用. 江苏农业科学, 2023, 51(14): 70-75.

(四) 进度安排

首先成立标准制定小组，明确分工；制定标准编制草案，列出标准制定的详细技术内容，严格按照计划进度安排；做好标准的验证工作，保证标准的科学性、可重复性和可操作性。

具体进度安排如下：

1.成立起草工作小组

2025 年 2 月项目任务下达后，为确保项目的顺利实施，成立了《大豆非检疫性主要病原检测鉴定方法》标准起草工作组，同时对标准起草工作进行了分工，明确了各自任务和职责。

2.召开标准起草组工作会，形成标准草案

标准起草工作组成立后，2025 年 2 月建立了起草工作组工作微信群，不定期地进行讨论，并召开了标准编制工作会，所有起草人学习了《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1-2020）、《标准编写规则 第 5 部分：规范标准》（GB/T 20001.6-2020）等有关标准编制技术要求的国家标准，形成了标准草案。

3.完成标准征求意见稿

起草工作组成员对标准草案进行多次讨论、修改、完善，2025 年 8 月末形成了《大豆非检疫性主要病原检测鉴定方法》标准文本定向征求意见稿。

4.定向征求意见

面向科研院校、种植企业和管理部门对标准草案定向征求专家的意见。国家标准化管理委员会在国家标准化管理委员会网，提交

公开征求意见稿

（五）主要起草单位

江苏省农业科学院、全国农业技术推广服务中心、南京农业大学、伊犁哈萨克自治州农业科学研究所、内蒙古自治区农牧业科学院。

（六）编写人员与分工

标准制定过程主要由江苏省农业科学院的人员参与资料收集、文本完成、生产调研、实验室验证比对、数据处理等工作。

表 1 主要起草人员信息及任务分工

姓名	单位	职称	专业特长及分工
魏利辉	江苏省农业科学院	研究员	植物保护学；标准负责人，主持编制
邓晟	江苏省农业科学院	副研究员	植物病原菌分子鉴定；标准起草、制定
周阳	全国农业技术推广服务中心	高级农艺师	植物保护学；协助标准起草、制定
叶文武	南京农业大学	教授	植物病理学；资料收集、数据处理
沈丹宇	南京农业大学	副教授	植物病理学；资料收集、分子检测技术研发
王杰花	伊犁哈萨克自治州农业科学研究所	助理研究员	植物保护学；田间调查和检测技术评估
席先梅	内蒙古自治区农牧业科学院	研究员	农学；资料收集、整理与试验评估
张金凤	江苏省农业科学院	助理研究员	植物病理学；病原分离鉴定与检测技术评估
陶小荣	南京农业大学	教授	植物病毒学；实验室比对、应用效果评价
季英华	江苏省农业科学院	研究员	植物病毒学；标准起草，协助调研和病原鉴定
孙枫	江苏省农业科学院	副研究员	植物病理学；标准起草、制定；病原鉴定
李硕	江苏省农业科学院	研究员	植物病理学；资料收集、生产调研

周冬梅	江苏省农业科学院	副研究员	植物病理学；资料收集、标准起草
王楠	江苏省农业科学院	副研究员	植物病理学；资料收集、生产调研
赵敏	江苏省农业科学院	助理研究员	植物病理学；病原分离鉴定与检测技术评估

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据，修订行业标准时，还包括修订前后技术内容的对比

（一）标准的编写原则

本标准按照 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。总体原则包括：

政策性：本标准的制定直接关系到粮食安全和广大人民群众的利益。因此，在制定过程中认真贯彻国家有关方针、政策、法规和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准，避免与正在制定或者已经制定的其它农业标准发生冲突。

先进性：本标准力求反应本研究领域的先进经验，使标准中所规定的技术内容有利于提高试验结果的可比性、可靠性和可重复性，尽可能地吸收了目前国际上基本认可或普遍采用的鉴定方法和评价标准。

实用性：制定的标准切合生产情况，方便大豆生产企业、种植主体以及教学、科研和推广等单位人员的实际操作和应用，为大豆根腐病、胞囊线虫病以及主要病毒病的早期监测预警和绿色防控提供技术支撑。

规范性：本标准是大豆非检疫性主要病原检测鉴定方法，是关系到生产、运输、种植等多个环节的规范性文件，因此，在标准的

征求意见稿和送审稿的编制过程中力求做到技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑。

国际性：在草案的编制过程中，参考了国内外同类研究的相关资料；既要与国际情况一致，也要与国内实际相符。草案中涉及的检测方法、评判标准等关键部分均可与国际接轨。

（二）提出本标准主要内容的依据

1. 主要病原和检测方法的确定

经过归纳和比较分析，我们将查阅的国内外相关文献资料以及针对国内大豆生产的主要问题和前期的相关工作基础作为本文件制定的参考依据，形成了《大豆非检疫性主要病原检测鉴定方法》文件。

大豆根腐病是当前我国大豆生产过程中最重要的病害，已被列入国家一类农作物病害名录【中华人民共和国农业农村部公告（第654号）】。该病害可由多种病原生物引起，如真菌类的镰刀菌（*Fusarium* spp.）、立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*），卵菌类的腐霉菌（*Pythium* spp.）、疫霉菌（*Phytophthora* spp.）等（Hosseini., 2023）。有研究表明，田间大豆根腐病，超过半数以上是镰刀菌所致（代玥 等，2021），而镰刀菌中，优势菌株为尖孢镰刀菌（*F. oxysporum*），分离频率超过46.80%，其次是腐皮镰刀菌，分离频率为19.38%（刘莹莹，2023）。

大豆胞囊线虫病在我国多个主要大豆种植区都有发生，在我国东北地区，其发生频率更是高达 82.67%(尤佳 等, 2024; 李沐慧 等, 2016)。且大量研究表明，胞囊线虫可以和镰刀菌协同作用，加剧根腐病的发生频率和严重程度(McLean and Lawrence 1993; Xing and Westphal 2006; Yan and Nelson 2021)。

此外，在各个生长阶段，大豆都易受病毒侵染，病害症状复杂，病毒种类多，且以复合侵染为主。我国大豆生产上重要病毒包括：大豆花叶病毒 (Soybean mosaic virus, SMV) 属于马铃薯 Y 病毒科、马铃薯 Y 病毒属，基因组为 1 条正义 ssRNA，长度为 9.6 kb (Liu et al., 2016)；菜豆普通花叶病毒 (Bean common mosaic virus, BCMV) 属于马铃薯 Y 病毒科、马铃薯 Y 病毒属，基因组为 1 条正义 ssRNA，长度为 10.0 kb (Wu et al., 2018)；以及最近几年出现的大豆症青相关病毒 (soybean stay-green associated virus, SoSGV) (Cheng et al., 2022)。在田间，大豆病毒病表现为花叶、叶片褪绿、卷曲或坏死、豆荚畸形、种子杂色且尺寸减小等症状，严重影响大豆的产量、外观品质和商品价值。前期对 35 份田间采样大豆样品进行病毒 RT-PCR 检测，其中 35 份样品检出菜豆普通花叶病毒 (BCMV)，检出率为 100%；33 份样品检出黄瓜花叶病毒 (CMV)，检出率为 94.29%；30 份样品检测大豆花叶病毒 (SMV) 带毒，检出率为 85.71%；29 份样品是 BCMV, CMV 和 SMV 复合侵染，复合侵染率为 82.86%。

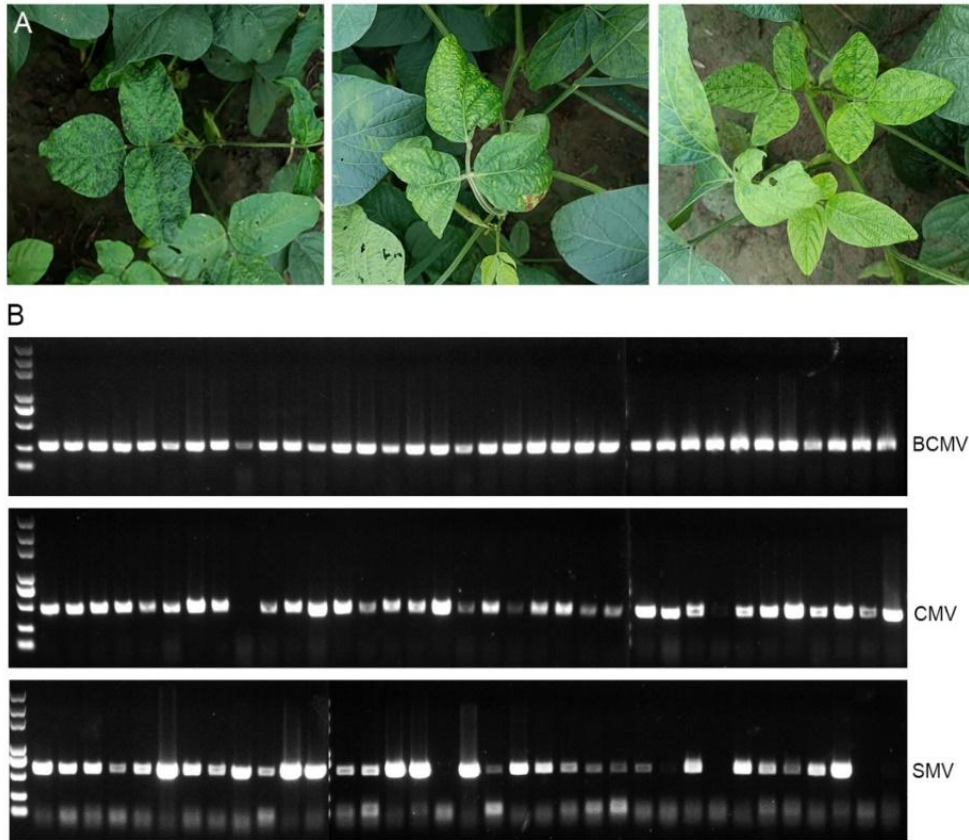


图 1 田间大豆病毒检测

A: 田间大豆病毒病症状; B: 田间大豆病毒 RT-PCR 检测

预防为主，综合、精准防治是控制作物病害发生的重要策略，其中最重要的前提是明确病原物。目前，大量可用于病原分子检测的新技术不断涌现，包括 PCR、实时荧光定量 PCR、等温核酸扩增、蛋白质免疫检测、生物传感器检测以及最近出现的三代测序技术等。这些技术的出现使得病原物检测技术在灵敏度、准确性、时效性和通量方面有了显著的提升，其中等温扩增技术中的 LAMP 和 RAA（或 RPA），由于其具有扩增特异性强、灵敏度高、反应速度快、设备要求低、简单易学的特点，已经被国内外学者和技术人员广泛应用于医疗检测、食品安全分析、环境微生物检测以及农业病原物检测领域（Venbrux et al., 2023）。

2. 分子检测技术体系的评估和建立

针对相关大豆病原，国内外研究团队已经开发出灵敏度非常高的基于等温扩增 LAMP 技术的引物和方法（Hosseini et al., 2023; Deng et al., 2022; Wang et al., 2022; 汪孝瑞, 2021; 袁咏天 等, 2017; 陆辰晨, 2015）。此外，根据大豆病毒特异性核酸序列，标准起草团队设计出了病毒特异性引物，结合 RAA（或 RPA）方法，可以快速检测大豆花叶病毒、菜豆普通花叶病毒和大豆症青相关病毒，检测灵敏度介于 10 pg/μL 至 10 fg/μL 之间。

（1）建立了基于 LAMP 技术的尖孢镰刀菌检测方法

尖孢镰刀菌可以侵染超过 100 种作物，其中包括大豆。运用 Clustal Omega 软件对镰刀菌属的线粒体基因组进行比较，发现了可特异性鉴定尖孢镰刀菌的 DNA 位点。基于上述位点，分别设计了 PCR、qPCR 和 LAMP 引物，其中 LAMP 引物的灵敏度达到 1 pg/μL，可检出含有 1×10^4 个孢子/mL 的被污染水体。

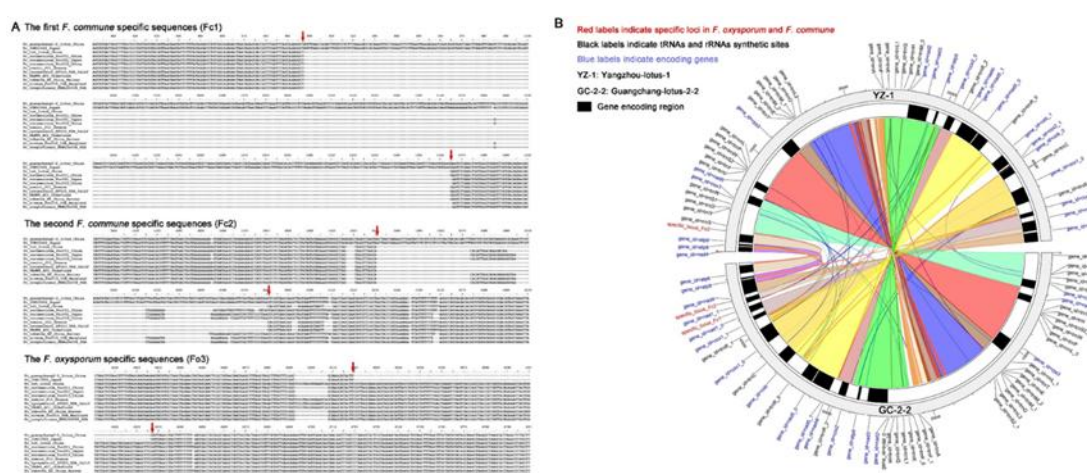


图 2 尖孢镰刀菌线粒体核酸特异性位点（Deng et al., 2022. Plant Disease）

A. 差异序列比对分析；B. 线粒体 circos 图分析

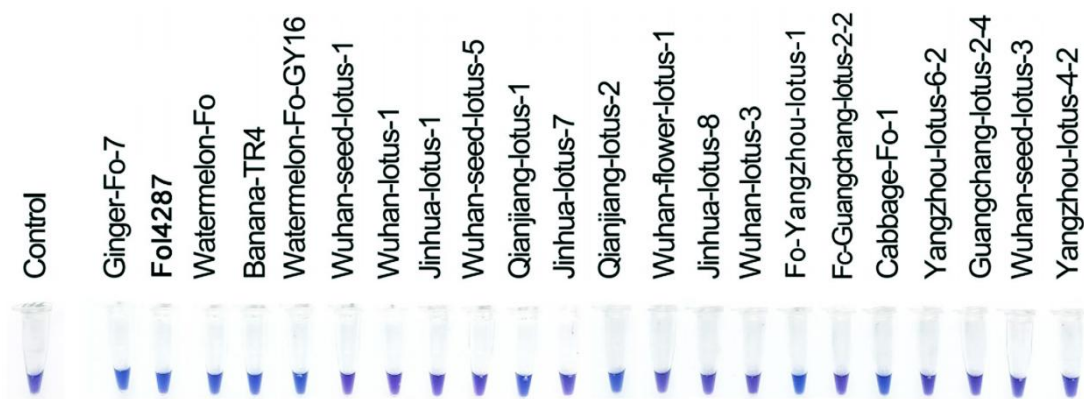


图3 不同来源的尖孢镰刀菌 LAMP 检测
包括来自生姜、西瓜、香蕉、番茄、莲藕等不同来源的尖孢镰刀菌

(2) 建立了基于 LAMP 技术的腐霉菌检测方法

对已公开的靶标腐霉菌基因组和其它腐霉菌、疫霉菌的比较基因组学分析，发现在靶标菌基因组的转座子重复片段区域，存在一段物种特异性核酸序列，针对该序列设计 LAMP 引物，优化反应条件，并通过了检测灵敏度和特异性的评估。该套引物对于靶标腐霉菌基因组的检测下限为 1 pg/ μ L 或 1×10^2 个游动孢子/mL 水体样本。

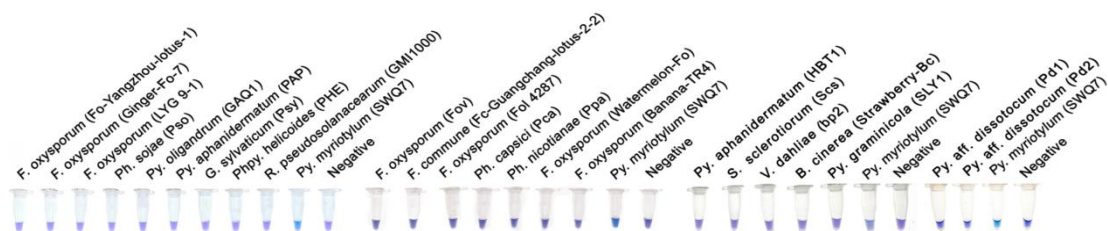


图4 腐霉菌 LAMP 检测引物的特异性评估
测试菌株包括不同寄主的尖孢镰刀菌、大豆疫霉菌、瓜果腐霉菌、辣椒疫霉菌、核盘菌、大丽轮枝菌、灰霉菌、青枯菌等。

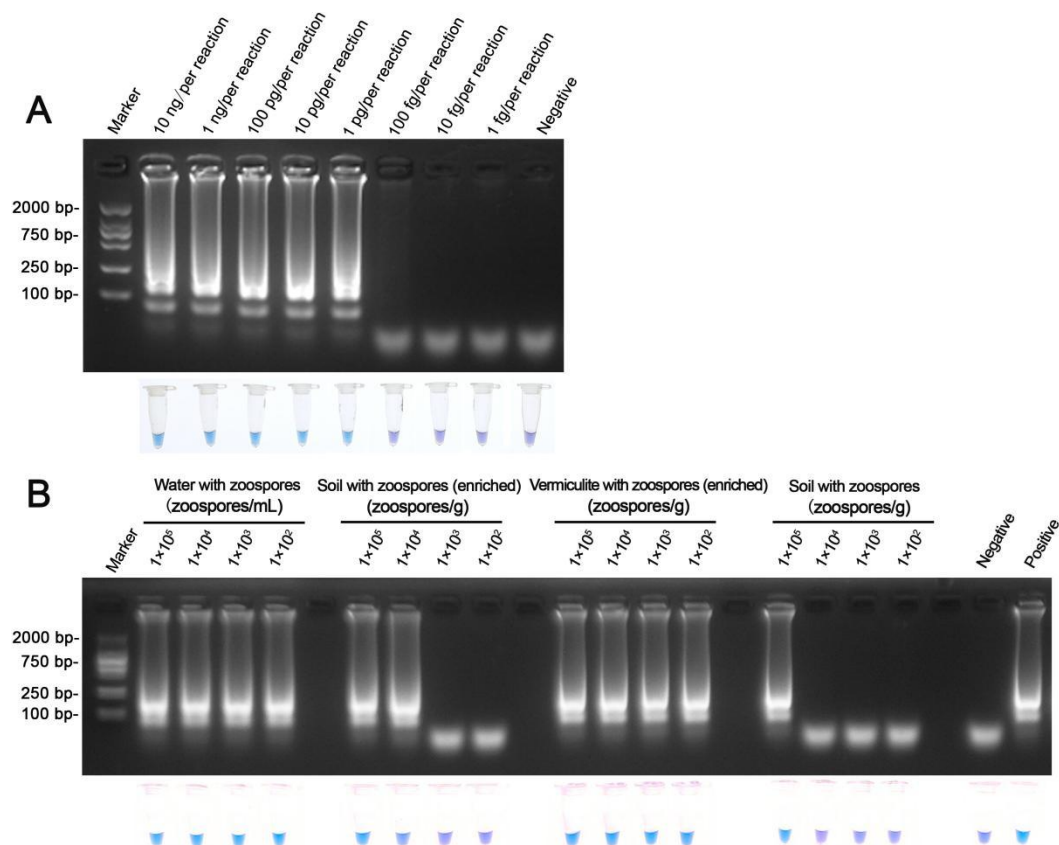


图 5 腐霉菌 LAMP 检测引物的灵敏度评估

A. DNA 溶液中检测下限评估；B. 游动孢子液、土壤、栽培基质检测下限评估。

(3) 建立了基于 LAMP 技术的立枯丝核菌检测方法

通过对比立枯丝核菌以及其它常见大豆病原生物的 ITS 序列，设计了一套特异性检测引物。经过对不同地区采集的立枯丝核菌的验证，发现该引物具有很好的通用性；通过不同 DNA 浓度的评估，该引物的检测下限为 10 pg/μL；测试大豆常见病原的基因组 DNA，未发现非特异性扩增。

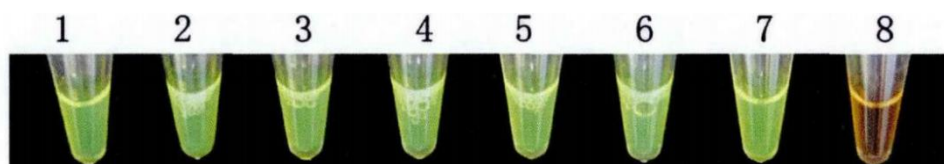


图 6 立枯丝核菌 LAMP 特异性引物的种内适用性验证

1-3: 江苏大豆分离立枯丝核菌；4-6: 安徽大豆分离立枯丝核菌；7: 福建大豆分离的立枯丝核菌；8: 阴性对照。

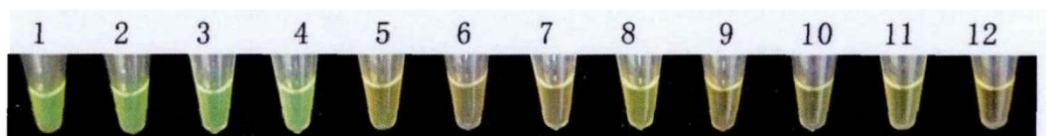


图 7 立枯丝核菌 LAMP 引物对大豆根部其他常见病原菌的特异性验证

1-4: 立枯丝核菌; 5-6: 菜豆球壳菌; 7-8: 大豆疫霉菌; 9: 禾谷镰刀菌; 10: 尖孢镰刀菌; 11: 木贼镰刀菌; 12: 阴性对照

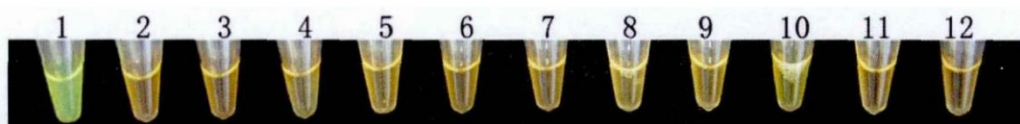


图 8 立枯丝核菌 LAMP 引物对其它真菌的特异性验证

1: 立枯丝核菌; 2: 大豆紫斑病菌; 3: 大豆拟茎点肿腐病菌; 4: 链格孢菌; 5: 米曲霉菌; 6: 油瓶霉菌; 7: 稻瘟菌; 8: 平头炭疽菌; 9: 大茎点霉菌; 10: 胶孢炭疽菌; 11: 球黑孢菌; 12: 阴性对照

(4) 建立了基于 LAMP 技术的腐皮镰刀菌检测方法

选择翻译延伸因子(TEF-1a)基因作为靶标基因, 从 GenBank 中下载所有镰刀菌 *TEF-1a* 区域相关基因序列。应用 BioEdit 软件对下载的序列进行分析比对, 在找出特异性的区域后, 设计了多套针对腐皮镰刀菌的检测引物。通过种内通用性验证、不同病原物种的特异性验证, 筛选到一套适合的特异性引物, 该引物的灵敏度为 10 pg/μL 基因组 DNA。

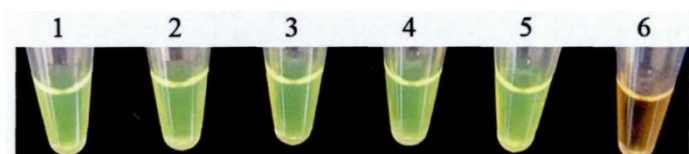


图 9 腐皮镰刀菌 LAMP 特异性引物的种内适用性验证

1-2: 江苏大豆分离腐皮镰刀菌; 3: 安徽大豆分离腐皮镰刀菌; 4: 湖北分离腐皮镰刀菌; 5: 云南分离腐皮镰刀菌; 6: 阴性对照。

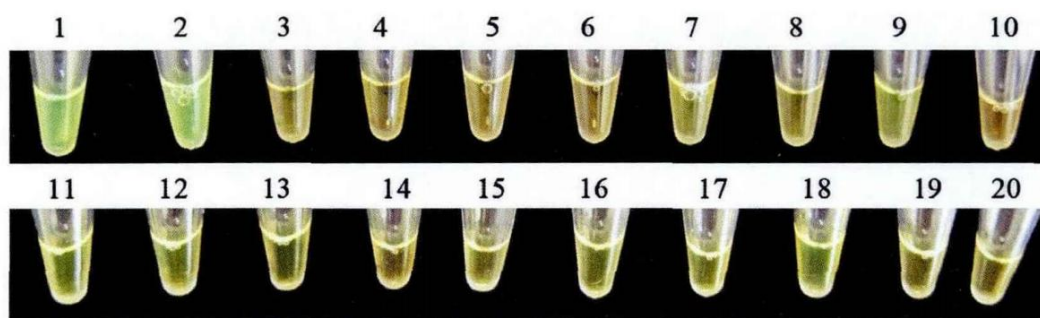


图 10 腐皮镰刀菌 LAMP 特异性引物对其它病原菌的物种特异性验证

1-2: 腐皮镰刀菌; 3: 尖孢镰刀菌; 4: 木贼镰刀菌; 5: 禾谷镰刀菌; 6: 层出镰刀菌; 7: 串珠镰刀菌; 8: 黄色镰刀菌; 9: 雪腐镰刀菌; 10: 燕麦镰刀菌; 11: 大豆疫霉菌; 12: 链格孢菌; 13: 米曲霉菌; 14: 大豆紫斑病菌; 15: 胶胞炭疽菌; 16: 平头炭疽菌; 17: 油瓶霉菌; 18: 稻瘟病菌; 19: 球黑孢菌; 20: 阴性对照。

(5) 建立了基于 RAA 技术的大豆花叶病毒 (soybean mosaic virus, SMV) 检测方法

通过对 NCBI 中公开的来自不同地区, 不同寄主的 SMV 的基因组全序列的多重比对分析, 选取 SMV 基因组序列保守区域设计一对特异性检测引物。

使用 SMV 引物组合分别对感染了对应病毒的样品核酸模板以及健康样品核酸模板进行扩增, 并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示设计的引物组合均能有效扩增出对应的目标片段, 且无引物二聚体等非特异扩增条带产生。分析了 SMV 检测引物的检测特异性, 分别对感染了 SMV、BCMV、豇豆轻斑驳病毒 (CpMMV) 和 SoSGV 的样品进行检测, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 设计的检测引物只能在含有对应病毒的样品中扩增到目标条带, 进一步, 对筛选的引物进行 FAM 和 Biotin 标记, 在 RAA-侧向流动试纸条 (RAA-LFD) 快速检测体系下也表现出良好的检测特异性。

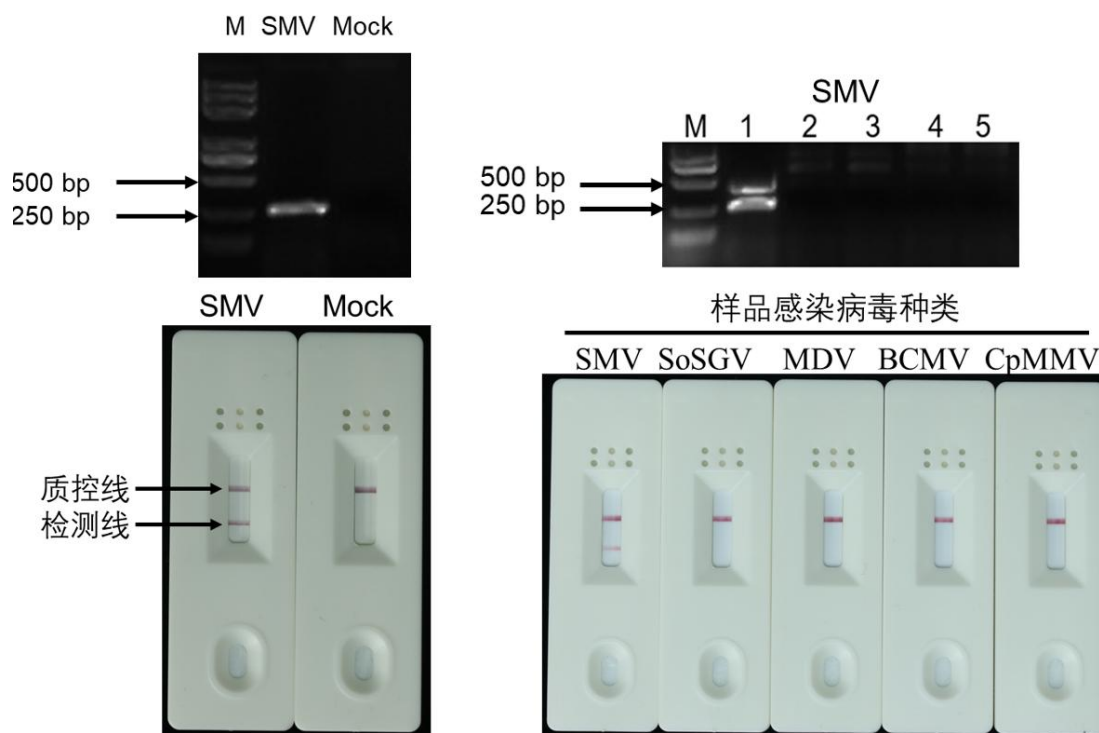


图 11 SMV RAA 检测引物的筛选

(6) 建立了基于 RAA 技术的菜豆普通花叶病毒 (bean common mosaic virus, BCMV) 检测方法

根据 BCMV 外壳蛋白基因序列的保守区设计特异性引物和探针, 建立大豆 BCMV 的重组酶聚合酶扩增检测方法。在此基础上, 进一步与侧向流动试纸条 (LFD) 检测方法相结合, 在不影响检测灵敏度和准确性的前提下, 实现对疑似病原的快速鉴定。

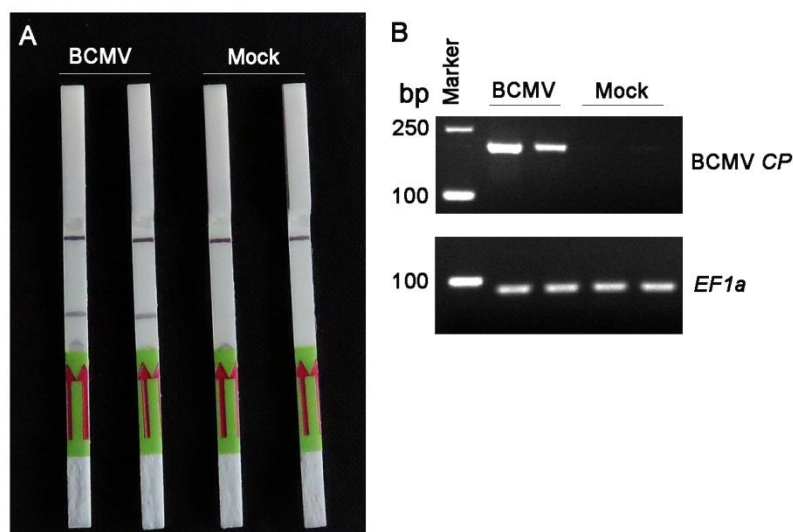


图 12 BCMV RAA 检测方法构建

A: BCMV 检测结果; B BCMV RT-PCR 检测结果

(7) 建立了基于 RAA 技术的大豆症青相关病毒 (soybean stay-green associated virus, SoSGV) 检测方法

与 SMV 鉴定引物的筛选类似,我们通过相关病毒的基因组分析,获得了 SoSGV 保守的核酸序列。并对设计引物的扩增产物进行了常规电泳评估、RAA-LFD 特异性评估和灵敏度评估。结果表明,相关引物可以有效区分并鉴定出 SoSGV,检测灵敏度可达到 20 fg/μL。

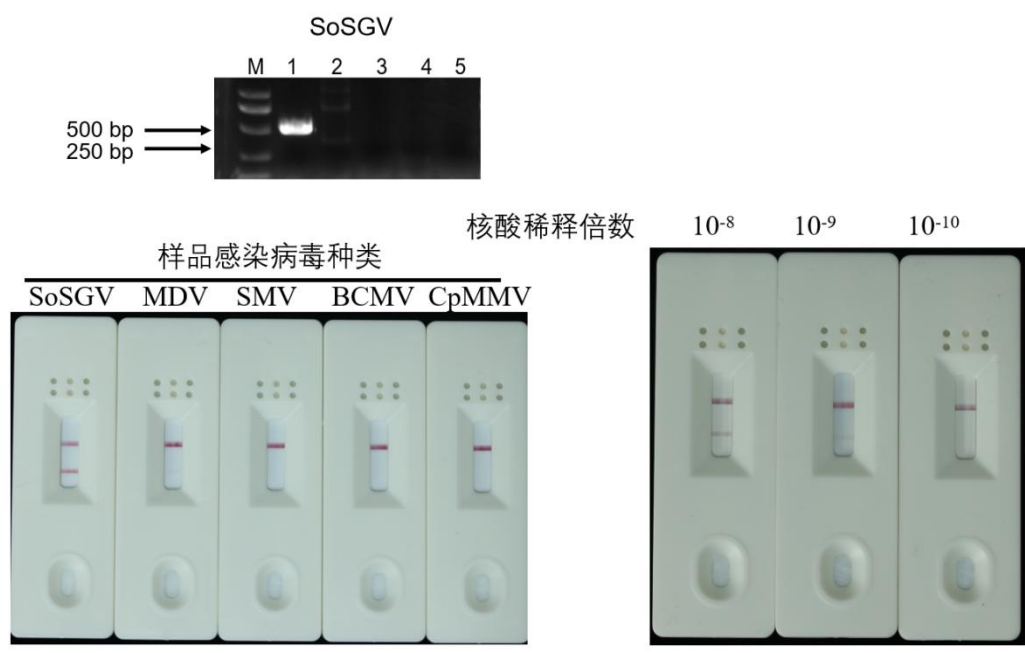


图 13 SMV RPA（或 RAA）检测引物的筛选

（三）新旧标准对比

未检索到有相关标准。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益；

本标准确定的原则是切合实际、措施具体、操作简便、科学规范、技术先进、逻辑严谨和文字简明。主要技术指标来源于标准起草人员工作积累以及国内外文献，并经提炼论证，具有科学性、实用性和指导性。同时，团队对本标准中涉及的关键技术进行了试验验证，明确了大豆病毒检测鉴定方法的应用效果。

（一）试验验证的分析

通过资料收集、实验室内和田间的相关工作，明确了大豆生产上重要病原种类，验证了规程中的相关技术方案的可靠性以及可行性。配合全国各级农技推广单位、联合高校、科研院所和企业，本

团队核心成员已连续多年在大豆疫霉等病原快速检测鉴定领域开展了大量的工作，具有深厚的技术和理论积累。

（二）综述报告

通过对病原物的核酸特异性序列分析，结合国内外其他研究团队的相关工作基础，我们设计并筛选到了针对尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌、群结腐霉菌、立枯丝核菌、终极腐霉菌、大豆花叶病毒、菜豆普通花叶病毒以及大豆症青相关病毒等的，基于 LAMP 或 RAA 技术的靶标病原特异性检测引物组。在此基础上，进一步研发和优化了不依赖实验室条件的、可在田间开展的病原物分子检测工作站。相关配套装备和技术的推广和应用将为大豆相关土传病害以及病毒病的快速诊断奠定基础，同时对监测病害的发生以及控制病害扩散具有重要意义。

（三）技术经济论证

本技术所涉及的检测所需试剂和耗材、储存条件及反应条件均为常规试验条件，该技术单靶标，单次单个样本检测的成本低，且方法简单易学，耗时短，适合在基层应用和推广。

（四）预期的经济效益、社会效益和生态效益

在本标准制定完成并广泛实施后，可以极大促进大豆生产种植过程中相关病害发生的检测诊断和监测预警工作，同时降低病原扩散和大面积传播的风险。此外，相关快速检测技术和方法的应用也可以促进大豆作物抗病毒育种，从而保障大豆产业健康发展，为国家粮食安全、生态环境安全和国家生物安全提供政策和技术支撑。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

尚未检索到国际上有相关标准。在标准的编制过程中，参考了国外同类研究的相关资料。标准中涉及的采样方法、试验原理、评价标准等关键部分均借鉴了国际上先进的、通用的方法，可与国际本领域的研究结果接轨和比较。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因；

无以上情况。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系；

在制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法规和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准，避免与正在制定或者已经制定的其它农业标准发生技术冲突。

七、重大分歧意见的处理经过和依据；

通过电子邮件等多种方式，向全国范围内栽培、农田灌溉、农技推广、检测、育种等专家广泛征集意见。认真听取各方面专家对标准主要内容（如参数、指标、试验方法）的意见和建议，如有重大分歧，将组织不同领域专家对该问题作充分讨论，寻求解决问题最佳方案。

八、涉及专利的有关说明；

本文件不涉及专利技术。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议；

标准发布后，申请单位将在标准实施日期之前在网页上开辟标准宣传专栏、召开会议等形式对技术内容进行贯彻与宣传。通过以上推广宣传方式，建议标准发布后 6 个月实施。

十、其他应当说明的事项。

无。