

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1212—2006

马铃薯脱毒种薯繁育技术规程

(马铃薯脱毒技术规程、脱毒马铃薯基础种薯生产技术规程)

Rules for multiplication of certified seed potatoes
(Rules for virus eradication of potatoes. Rules for production of
virus-free foundation seed potatoes)

2006-12-06 发布

2007-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F、附录 G、附录 H、附录 I、附录 J、附录 K、附录 L 是标准的规范性附件。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准的起草单位：农业部薯类产品质量监督检验测试中心（张家口）、河北省高寒作物研究所。

本标准主要起草人：尹江、张希近、姚瑞、马恢、高永龙。

马铃薯脱毒种薯繁育技术规程

1 范围

本标准规定了马铃薯脱毒技术、脱毒马铃薯基础种薯生产技术。

本标准适用于马铃薯脱毒技术和基础种薯生产。

2 引用标准

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款，凡注明日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误内容）或修订版均不适用本标准，凡不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB 7331—87 马铃薯种薯产地检疫规程

GB 3243—82 马铃薯种薯生产技术操作规程

GB 4406—84 种薯

GB 18133—2000 马铃薯脱毒种薯

NY/T 401—2000 脱毒马铃薯种薯（苗）病毒检测技术规程

3 术语和定义

3.1

脱毒

应用茎尖分生组织培养技术，脱去主要危害马铃薯的病毒病及类病毒病。

3.2

脱毒试管苗

经检测确认不带马铃薯 X 病毒（PVX）、马铃薯 Y 病毒（PVY）、马铃薯 S 病毒（PVS）、马铃薯卷叶病毒（PLRV）的试管苗。

3.3

脱毒种薯

脱毒试管苗生产的试管薯、微型薯、网室生产的原原种和继代生产供于大田用的种薯。

3.3.1

原原种 Pre-Elite

用试管苗在容器内生产的微型薯（Microtuber）和在防虫网室生产出符合质量标准的种薯。

3.3.2

原种 Elite

一级原种、二级原种。

3.3.2.1

一级原种 Elite I

用原原种生产出符合一级原种质量标准的种薯。

3.3.2.2

二级原种 Elite II

用一级原种生产出符合二级原种质量标准的种薯。

3.4

病毒株允许率

指马铃薯脱毒种薯田内病毒病株的允许比率。

3.5

细菌性病害病株允许率

指马铃薯脱毒种薯的繁殖田内细菌性病害病株的允许比率。

3.6

混杂植株允许率

指马铃薯脱毒种薯的繁殖田内混入不同品种植株比率。

3.7

有缺陷薯

指畸形、次生、串薯、龟裂、虫口、冻伤、草穿、黑心、空心和机械损伤的块茎。

4 病害

4.1 控制病害

4.1.1 病毒病

指马铃薯脱毒种薯繁殖田内具有花叶、卷叶、条斑坏死病毒病的植株。

4.1.2 马铃薯黑胫病 [*Erwinia* var. *atroseptica* (VanHall) Dye] 或 [*Erwinia* var. *carotovora* (Jones) Dye]。

4.1.3 马铃薯青枯病 (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith)。

4.2 汰除病害

4.2.1 马铃薯纺锤块茎类病毒 (Potato Spindle Tuber Viroid, PSTVd)。

4.2.2 马铃薯环腐病 (*Corynebacterium sepe-donicum*) (Sieck & Kott) (Skapt & Burkh)。

4.2.3 马铃薯癌肿病 [*Synchytrium endobaiticum* (Schilb.) Perc]。

5 脱毒技术

所用茎尖组织分生培养茎

5.1 培养基制备

5.1.1 培养基分装：培养基分装于试管中，加盖管塞。

5.1.2 消毒：试管置于 $0.8\text{ kg/cm}^2 \sim 1.1\text{ kg/cm}^2$ 消毒锅 120°C 高压灭菌 20 min。

5.2 取材

5.2.1 取材于经审(认)定品种的腋芽或休眠芽。

5.2.2 芽段用无菌水冲洗 20 min~30 min 后，再用 75% 酒精浸蘸一下，放入无菌杯内用 0.1% 升汞水浸泡 5 min，用无菌水冲洗 2 次~3 次。

5.3 组培室甲醛溶液熏蒸后，用紫外线灯照射 40 min。工作人员用肥皂水洗手，75% 酒精擦拭消毒，操作用具置烘箱 180°C 消毒。

5.4 30 倍~40 倍双筒解剖镜下，解剖针剥离生长点，用解剖针切下 $0.1\text{ mm} \sim 0.3\text{ mm}$ 的生长点，接菌针将生长点移至试管。

6 试管苗培养

温度 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ ，光照时间 16 h/d，强度 $2\,000\text{Lx} \sim 3\,000\text{Lx}$ ，培养 120 d~140 d 转接到 MS 培养

基的试管。

7 脱毒苗的病毒鉴定

试管苗按品种随机编号取样3管,采用酶联免疫吸附(ELISA)检验,无阳性反应再用指示植物鉴定;采用往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法(R-PRAGE)进行纺锤块茎类病毒复检,检出不带PVX、PVY、PVS、PLRV和PSTVd的脱毒苗。

8 脱毒试管苗的繁殖

8.1 将MS培养基配制成液,装入试管。

8.2 置于 $0.8\text{ kg/cm}^2\sim 1.1\text{ kg/cm}^2$ 消毒锅灭菌20 min。

8.3 将试管苗置于超净工作台上,试管表面和管塞用75%酒精擦拭消毒,取出脱毒苗,按单茎切段,每个切段带1片小叶摆放在培养基面上。

8.4 培养温度 $22^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$,光照18 h/d,强度 $2\,000\text{Lx}\sim 3\,000\text{Lx}$ 。

9 脱毒种薯生产

9.1 试管薯生产

设备、药品、试剂按附录L制备。

9.1.1 操作程序

9.1.2 在超净工作台上将试管苗切段置于MS液体培养基的容器中,每管8个茎段,温度 $22^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$,光照强度 $2\,000\text{Lx}\sim 3\,000\text{Lx}$ 培养25 d~30 d。

9.1.3 茎段腋芽处长成4片~6片叶的小苗在无菌操作的条件下转接到结薯诱导培养基上,MS+BA5 mg/L+CCC50 mg/L+0.5%活性炭+8%蔗糖配制成液体,置于 $18^{\circ}\text{C}\sim 20^{\circ}\text{C}$,16 h/d黑暗条件诱导结薯。

9.2 微型薯生产

基质是蛭石、珍珠岩、草炭土。

9.2.1 建造温室,温室下覆0.08 mm聚乙烯薄膜,上覆40目~45目尼龙网纱。

9.2.2 与土壤隔离,均匀铺设5 cm。

9.2.3 浇足水达饱和状态。

9.2.4 试管苗在温室内炼苗7 d,清洁水洗净培养基,按株行距 $6\text{ cm}\times 7\text{ cm}$ 栽入基质2 cm~2.5 cm深,栽后小水细喷。

9.2.5 栽植后遮阴网遮阴5 d~7 d,温度保持 $22^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$,相对湿度85%,缓苗后每7 d浇灌营养液一次,自栽植后15 d起,每隔7 d喷施杀虫剂和杀菌剂一次。

9.2.6 收获

60 d~80 d收获,按1 g以下、2 g~4 g、5 g~9 g、10 g以上四个规格分级包装,拴挂标签,注明品种名称,薯粒规格,数量。

9.2.7 收获后在通风干燥的种子库预贮15 d~20 d后入窖。

9.2.8 入窖后按品种、规格摆放,温度 $2^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$,湿度75%。

9.3 原原种生产

9.3.1 炼苗

温室地表洒水湿润,管与管之间相隔5 cm,温度 $18^{\circ}\text{C}\sim 20^{\circ}\text{C}$ 炼苗7 d。

9.3.2 假植

腐熟沃土装营养钵，钵高 10 cm、直径 5 cm，每 m^2 300 个，钵内浇足水，栽苗后小水细喷，遮阴 5 d~7 d。

9.3.3 管理

温度 25°C ~ 30°C ，相对湿度 70%，苗高 3 cm~4 cm 除尽杂草，松土，苗高 5 cm 根部培沃土一次，10 cm 出圃。

9.3.4 定植

苗龄 32 d~35 d，定植。

9.3.5 选地

1 500 m 之内无高代马铃薯和“十字”花科作物。

9.3.6 建立网室，以钢管为材，跨度 9.5 m，高度 2 m，40 目~45 目尼龙网纱覆盖。

9.3.7 施肥

按马铃薯需 N、P、K 配方施肥，并防地下害虫。

9.3.8 定植

早熟品种 667m^2 5 000 株~5 500 株，中、晚熟品种 4 000 株~4 500 株，随定植浇透水一次。

9.3.9 喷药

定植 30 d 后防治晚疫病，每隔 7 d 喷施杀虫剂和杀菌剂。

9.3.10 收获

成熟后立即收获，用通气良好清洁卫生韧性较好的材料包装，加标签、标明品种名称、生产单位、检验人。

9.3.11 预贮

收获后先在风干种子库预贮 7 d~10 d。

9.3.12 贮窖要甲醛熏蒸，撒生石灰，喷杀菌剂，防鼠害，不同品种单贮，贮量为窖容量的 2/3。

9.3.13 保管

贮藏温度 3°C ，湿度 70%，通风、窖内清洁卫生、防冻害。

10 一级原种和二级原种生产

10.1 种薯生产

10.1.1 500 m 之内不种高代马铃薯和“十字”花科作物。

10.1.2 播前种薯催芽。

10.1.3 30 g~50 g 小薯整薯直播，50 g 以上块茎切种，单块重 25 g~30 g，每块带 1~2 个芽眼，刀具用高锰酸钾溶液消毒。

10.1.4 播种，10 cm 地温稳定在 5°C 为适宜播期，深度为 9 cm~10 cm。

10.1.5 播种密度，早熟品种， 667m^2 5 000 株~5 500 株，中、晚熟品种 4 000 株~4 500 株。

10.1.6 施肥，按设计产量 N、P、K 配方施肥。

10.2 田间管理

10.2.1 全生育期中耕一次，培土两次。

10.2.2 浇水和追肥，田间土壤持水量 60%~70%，现蕾期 667m^2 追尿素 10 kg~15 kg。

10.2.3 去杂去劣

现蕾至盛花期，两次拔除混杂植株与块茎。

10.3 病虫害防治

10.3.1 晚疫病、蚜虫的综合防治

出苗后 40 d 每隔 7 d 喷杀虫剂和杀菌剂。

10.4 种薯田品种特征特性调查物候、植物、生物学特性及病虫害识别，目测按标准附录 H、标准附录 I、标准附录 K 执行。

10.5 种薯贮藏期间管理

收获按 9.3.11、9.3.12、9.3.13 执行。

11 种薯检验

11.1 检验方法

11.1.1 类病毒用往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (R-PAGE) 检验 (PSTVd) 类病毒

11.1.2 病毒病用酶联免疫吸附 (ELISA) 方法进行 (PVX、PVY、PVS、PLRV) 检验。

11.1.3 田间检验。

11.1.3.1 原原种的检验，10 000 株以下随机取样 2%，10 000 株～100 000 株 1%，100 000 株以上 0.5% 按表 1 取样方法设点，将检验结果记录于表 2 中。

表 1 不同繁种田面积的检验点数和检验植株数

面积 (hm ²)	检验点数和每点抽取植株数
≤0.1 hm ²	随机抽样检验 2 个点，每点 100 株
0.11～1 hm ²	随机抽样检验 5 个点，每点 100 株
1.1～5 hm ²	随机抽样检验 10 个点，每点 100 株
≥5 hm ²	随机抽样检验 10 个点，每点 100 株，超出 5 hm ² 的面积，划出另一个检验区，按本标准规定的不同面积的检验点，抽取株数进行检验。

11.1.3.2 一级原种和二级原种的检验，全生育期三次检验，现蕾期、盛花期，枯黄期前两周，允许率见表 3。

表 2 脱毒种薯田间检验带病植株及混杂植株允许率

种薯级别	第一次检验 (现蕾期)					第二次检验 (盛花期)					第三次检验 (枯黄期前两周)				
	病害及混杂株 (%)					病害及混杂株 (%)					病害及混杂株 (%)				
	类病毒植株	环腐病植株	病毒病植株	黑胫病青枯病植株	混杂植株	类病毒植株	环腐病植株	病毒病植株	黑胫病青枯病植株	混杂植株	类病毒植株	环腐病植株	病毒病植株	黑胫病青枯病植株	混杂植株
原原种	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
一级原种	0	0	≤0.25	≤0.5	≤0.25	0	0	≤0.1	≤0.25	0	0	0	≤0.1	≤0.25	0
二级原种	0	0	≤0.25	≤0.5	≤0.25	0	0	≤0.1	≤0.25	0	0	0	≤0.1	≤0.25	0

11.2 检验标准

11.2.1 执行 GB 18133

11.3 检验程序

表3 马铃薯脱毒种薯田间检验原始数据记录表

品种名称											品种编号										
受检单位											联系电话										
检验地点	省 县 乡 村										检验时间										
检验类别											检验依据										
样品数量											代表面积 A/hm ²										
种薯来源											有无摄像照片										
田间栽培管理经过：																					
检 验 项 目 检 验 点 数	每点 检验 株数		混杂 株数		病毒病株数						真、细菌病害病株数								类病 毒病 株数		
					花叶		卷叶		条斑 坏死		黑胫		青枯		环腐		癌肿				
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
总计																					
混杂及 病株百 分 率 (%)	两次 重复																				
	合计或 平均																				
备 注																					

审核人:

11.3.1 自繁自用种薯，由繁种单位自检，将检验记录报检验部门备案，需要复检时，由检验部门派人复核检验。出售种苗、种薯由专职机构和种子部门进行检验，签发检验报告。

11.4 判定规则

11.4.1 脱毒种薯分级以脱毒种薯繁殖田所播种的级别，带病植株比率和混杂植株比率为定级标准。

11.4.2 各级别脱毒种薯的带病毒病株率，黑胫病和青枯病株率以及混杂植株比率三项指标，任何一项不符合原来级别所定质量标准，但又高于下一级别质量标准者，判定结果按降低一个级别定级。

11.4.3 种薯检验合格证

马铃薯脱毒种薯检验合格证

马铃薯脱毒种薯质量检验合格证书			
年 月 日		编号:	
种薯生产单位全称:		省 县	村(单位) 联系方式:
种薯级别:	品种名称:	重量	kg
经按中华人民共和国马铃薯脱毒种薯 GB/T×××××质量标准检验合格。			
检 验 人: (签字)			
检验单位: (印章)			
联系方式:			

150mm

8mm

12 包装、标签

12.1 包装

- 12.1.1 用通气良好清洁卫生的材料。
- 12.1.2 标准袋净重 35 kg，内装标签。

13 标签

- 13.1 标签选择韧性大、防雨防潮，不易涂改的材料制作。
- 13.2 颜色
原原种为白色、一级原种为绿色、二级原种为黄色。
- 13.3 标签用蓝色圆珠笔填写，不得空项。
- 13.4 标签平展正面置于扎口处。
- 13.5 标签设计

80 mm

○	
马铃薯脱毒种薯	
种薯级别	
品种名称	
合格证书 编 号	
生产单位 地 址 联系方式	
验 收 人	

80 mm

110 mm

附 录 A
(规范性附录)
酶联免疫吸附试验法
(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

应用双抗体夹心法 (Double Antibody Sandwich Method) 检测马铃薯脱毒苗是否带有 PVX、PVY、PVS、PLRV 等主要马铃薯病毒。

A1 仪器和设备

A1.1 聚乙烯微量滴定板: 40 孔和 96 孔, 均可使用。

A1.2 微量可调进样器: 需 $2\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}\sim 50\ \mu\text{L}$ 和 $10\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 三种规格, 并附相应规格的塑料头。

A1.3 冰箱。

A1.4 保温箱: 温度设置为 37°C 。

A1.5 直径 8 cm 的瓷研钵及钵锤。

A1.6 酶联免疫检测仪: 检测辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记的酶标记抗体用 490 nm, 波长检测, 碱性磷酸 (Alkaline Phosphatase AKP) 标记的酶标抗体用 405 nm 波长检测。

A2 应用的化学试剂

所用为分析纯级规格、用水为蒸馏水。

A2.1 抗体免疫球蛋白 (r-globulin) 和酶标记抗体 (Conjugate): 从某一马铃薯病毒抗血清提取的免疫球蛋白, 将其浓度调为 $1\ \text{mg/mL}$, 做为包被微量滴定板的抗体。用辣根过氧化物酶标记的某一病毒的免疫球蛋白的酶标记抗体、浓度为 1:1 000 以上, 贮藏条件为 4°C 。

A2.2 碳酸盐包被缓冲液: $\text{pH}9.6$, $1.59\ \text{gNaCO}_3$ (碳酸钠), $2.93\ \text{gNaHCO}_3$ (碳酸氢钠) 加水至 1 L。

A2.3 PBS—Tween20 缓冲液, $\text{pH}7.4$, $8\ \text{gNaCl}$ (氯化钠) $0.2\ \text{gKH}_2\text{PO}_4$ (磷酸二氢钾)、 $2.2\ \text{gNa}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (磷酸氢二钠) 或 $2.9\ \text{gNa}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $0.2\ \text{gKCl}$ (氯化钾) 加水至 1 L, 然后加 $0.5\ \text{mL}$ Tween 20, 洗涤微量滴定板用。

A2.4 样品缓冲液: 取 PBSTween-20 缓冲液 100 mL, 加聚乙烯吡咯烧酮 (PVP) 2 g。

A2.5 底物缓冲液: 取 $0.2\ \text{mol/LNa}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液 $25.7\ \text{mL}$ 加 $0.1\ \text{mol/L}$ 柠檬酸溶液 $24.3\ \text{mL}$ 加水 $50\ \text{mL}$, pH 调至 5.0 (现用现配) 临用前加磷苯二胺 40 mg, 30% H_2O_2 (过氧化氢) $0.15\ \text{mL}$ 混匀, 避光放置。应为白色或微黄色溶液。

A2.6 终止液: 为 $0.2\ \text{mol/L}$ 硫酸溶液, 用 1 体积浓硫酸加 9 份水。

A3 操作步骤

A3.1 包被微量滴定板: 把免疫球蛋白用包被缓冲液按 1:1 000 稀释, 用微量进样器向微量滴定板的每一样品孔内加入稀释的免疫球蛋白 $200\ \mu\text{L}$ 。在 37°C 条件孵育 1 h (或在 4°C 条件下过夜)。

A3.2 洗涤包被的微量滴定板: 甩掉微量滴定板中的免疫球蛋白稀释液, 再在吸水纸上敲打微量滴定板, 除尽残留溶液。向微量滴定板的样品孔中加满洗涤缓冲液, 停留 30 min, 甩掉洗涤缓冲液, 共洗涤 3 次, 以除尽未吸附的免疫球蛋白。

A3.3 加被检测的样品

A3.3.1 取样：在无菌条件下，从瓶苗上剪下长 2 cm 茎段，放在小研钵内，把取样的试管苗放回原瓶内，封好瓶口，把样品编好号，以便检测结果决定取舍。

A3.3.2 向小研钵内加样品缓冲液，加入液量依每个样品上样的孔数而定，例如每个样品准备上样一个样品孔时，可加入 0.4 mL 样品缓冲液，研磨后可得 200 μ L 清液，够上一个样品孔用。

A3.3.3 加入检测样品：向编好号、洗涤完的微量滴定板的样品孔内，按样品编号、逐个加入提取的样品液 200 μ L，每一块微量滴定板上，可设两个阳性对照孔。两个阴性对照孔和两个空白对照孔。

A3.3.4 把加完样品的微量滴定板，在 37℃ 条件下孵育 4 h~6 h（或在 40℃ 条件下过夜），然后按 A 3.2 洗涤微量滴定板。

A3.3.5 加酶标记抗体：把酶标记抗体用样品缓冲液按 1:1 000 稀释，向每个样品孔中加入 200 μ L 稀释的酶标记抗体。

A3.3.6 洗涤微量滴定板：按 3:2 方法洗涤微量滴定板，以除掉未结合的酶标记抗体。

A3.3.7 加底物：使用国产酶标检测仪器测定光密度时，向每一样品孔内加底物缓冲液 100 μ L。如果用进口 Bio-Rad 550 型等进口酶标检测仪时则可加入 200 μ L 底物，当观察到阴性对照孔与阳性对照孔显现的颜色可以明确区分时（辣根过氧化物酶标记的酶标记抗体显现橘红色，碱性磷酸酶标记的抗体显现鲜黄色）；或未设对照样品孔的微量滴定板的一些样品孔之间显现的颜色可以明确区分时，每孔加入 30 μ L 终止液，如加入 200 μ L 底物缓冲液时则加入 50 μ L 终止液（碱性磷酸酶标记的抗体一般可不加终止液）。

A4 结果判定

A4.1 目测观察：显现颜色的深浅与病毒相对浓度呈正比。显现白色为阴性反应，记录为“-”；显现淡橘红色即为阳性反应，记录为“+”，依颜色的逐渐加深记录为“++”和“+++”。

A4.2 用酶联检测仪测定光密度值：样品孔的光密度值大于阴性对照孔光密度值的 2 倍、即判定为阳性反应（阴性对照孔的光密度值应 ≤ 0.1 ）。

A5 计算结果：

$$I = \frac{m}{n} \times 100\%$$

式中：

I ——马铃薯病毒检出率，%；

m ——呈阳性反应样品数量；

n ——实验室样品数量。

结果用两次重复的算术平均值表示，脱毒苗病毒检出率修约间隔为 1，并标明经舍进或未舍未进。

附 录 B
(规范性附录)
往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法
(Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

应用本法检测脱毒苗是否感染有马铃薯纺锤块茎类病毒。

B1 范围

规定了马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 的检测方法。
适于检测马铃薯纺锤块茎类病毒。

B2 引用标准

GB 18133—2000 马铃薯脱毒种薯

NY/T 401—2000 脱毒马铃薯种薯 (苗) 病毒检测技术规程 (检测方法引用 NY/T 401—2000)

B3 原理

类病毒分子在自然和变性条件下电泳迁移率不同, 变性所引起类病毒核酸的环状结构使其电泳迁移率明显慢于核分子量的其他线性 RNA 分子, 因而第二向电泳中类病毒核酸的环状结构明显滞后, 据此, 结合可靠灵敏的银染色技术测定类病毒。

B4 试剂

本方法所用化学试剂为分析纯规格, 用水为蒸馏水, 个别要求无菌水。

B4.1 盐酸溶液 [$\Psi(\text{HCl}) = 1 + 4$] 量取盐酸 10 mL, 加入 40 mL 水, 混匀。

B4.2 核酸提取缓冲液 [$\rho\{(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3\} = 12.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 3.72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{NaCl}) = 5.88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取三羟甲基氨基甲烷 $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3]$ 12.11 g, 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3.72 g, 氯化钠 (NaCl) 5.88 g 溶于 900 mL 水中, 用盐酸溶液 (4.1) 通过酸度计 (5.1) 调 pH 为 9.0~9.5, 定容至 1 000 mL。

B4.3 TAE 缓冲液贮液 [$\rho\{(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3\} = 48.46 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{CH}_3\text{COONa}) = 16.40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 7.44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取三羟甲基氨基甲烷 $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3]$ 48.46 g, 无水乙酸钠 (CH_3COONa) 16.40 g, 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 7.44 g, 溶于 900 mL 水中, 用冰乙酸通过酸度计 (5.4) 调 pH 为 8.1, 定容至 1 000 mL。

B4.4 TAE 缓冲液工作液 [$\rho\{(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3\} = 4.85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{CH}_3\text{COONa}) = 1.64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0.74 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 量取 TAE 缓冲液贮液 (4.3) 200 mL, 加水 1 800 mL。

B4.5 TBE 电泳缓冲液贮液 [$\rho\{(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3\} = 107.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{H}_3\text{BO}_3) = 55.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 9.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取三羟甲基氨基甲烷 $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3]$ 107.8 g, 硼酸 (H_3BO_3) 55.0 g, 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 9.3 g 溶于少量水中, 定容至 1 000 mL。

B4.6 TBE 电泳缓冲液工作液 [$\rho\{(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3\} = 10.78 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{H}_3\text{BO}_3) = 5.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 量取变性电泳缓冲液贮液 (4.5) 200 mL, 加水 1 800 mL。

B4.7 低盐溶液 [$\rho(\text{NaCl}) = 11.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取 9.35 g 氧化钠 (NaCl) 溶于 800 mL TAE 缓冲液工作液 (4.4) 中, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

B4.8 高盐溶液 [$\rho(\text{NaCl}) = 87.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取氧化钠 (NaCl) 70.13 g, 溶于 800 mL TAE 缓冲液工作液 (4.4) 中, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

B4.9 丙烯酰胺贮液 [$\rho(\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2) = 290.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2)_2\text{CH}_2 = 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取丙烯酰胺 ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) 29.0 g, 甲叉双丙烯酰胺 [$(\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2)_2\text{CH}_2$] 1 g, 37℃ 溶于 100 mL 水中。冰箱冷藏室 (5.13) 保存。

B4.10 过硫酸铵溶液 [$\rho\{(\text{NH}_2)_2\text{S}_2\text{O}_8\} = 222.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取过硫酸铵 $(\text{NH}_2)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1.0 g, 溶于 4.5 mL 灭菌水中, 冰箱冷藏室 (5.13) 保存。

B4.11 四甲基乙二胺 [$\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_3$]。

B4.12 核酸固定液 [$\Phi(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}) = 10\%$, $\Phi(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0.5\%$] 量取 50 mL 95% 乙醇 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$); 2.5 mL 冰乙酸 (CH_3COOH) 加水定容至 500 mL。

B4.13 染色液 [$\rho(\text{AgNO}_3) = 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取 1.0 g 硝酸银 (AgNO_3) 溶于水, 定容至 500 mL。

B4.14 核酸显影液 [$\rho(\text{NaOH}) = 16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$], $\Phi(\text{HCHO}) = 0.4\%$] 称取 8 g 氢氧化钠 (NaOH), 溶于 500 mL 水中, 用前加 2 mL 甲醛 (HCHO), 现用现配。

B4.15 增色液 [$\rho(\text{H}_2\text{CO}_3) = 7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 取 3 g 碳酸钠 (H_2CO_3), 溶于 400 mL 水中。

B4.16 指示剂 [$\rho(\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{S}_2) = 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Br}_4\text{S}) = 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}) = 0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$] 称取 100 mg 二甲苯兰 ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{S}_2$)、100 mg 溴酚蓝 ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Br}_4\text{S}$)、40 g 蔗糖 ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), 溶于 10 mL TBE 电泳缓冲液贮液 (4.5) 中, 然后加入 90 mL 水, 混匀。

B4.17 琼脂糖溶液 称取 1 g 琼脂糖, 量取 10 mL TBE 电泳缓冲液贮液 (4.5), 加入 90 mL 灭菌水中, 加热溶解。

B4.18 聚丙烯酰胺凝胶 量取丙烯酰胺贮液 (4.9) 8.3 mL, TBE 电泳缓冲液贮液 (4.5) 5 mL, 四甲基乙二胺 (4.11) 50 μL ~60 μL , 溶解并用无菌水定容至 50 mL 混匀, 灌胶前加过硫酸铵溶液 (4.10) 450 μL , 混匀, 立即灌胶, 此液应现配现用。

B5 仪器设备

B5.1 DYY-Ⅲ6B 电泳仪和 DYY-Ⅲ28C 电泳槽。

B5.2 TGL-16G 高速台式离心机 最高转速: 21 000 r/min。

B5.3 Sigma 3K30 高速冷冻离心机 控制范围: $(-20 \sim 40)^\circ\text{C}$, 最大转速: 30 000 r/min。

B5.4 PHS-3C 酸度计 量程: pH (0~14), 精度: $\pm 0.01 \text{ pH}$ 。

B5.5 DL-101-2S 电热鼓风干燥箱 量程: $R \cdot T + 20^\circ\text{C} \sim 300^\circ\text{C}$, 精度: $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

B5.6 移液器 20 μL , 40 μL , 200 μL , 1 000 μL 。

B5.7 752 w 紫外分光光度计 量程 220 nm~800 nm, 精度: $\pm 2 \text{ nm}$

B5.8 一次性注射器 5 mL, 50 mL。

B5.9 量筒 50 mL, 100 mL, 200 mL, 2 000 mL。

B5.10 容量瓶 50 mL, 100 mL, 500 mL。

B5.11 吸量管 5 mL, 10 mL, 20 mL。

B5.12 MDF-U332 低温保存箱。

B5.13 BCD-261 冰箱。

B6 试剂制备

B6.1 样品粗提液制备

取样品 (脱毒苗、薯块的薯肉) 3 g 左右放入干燥的研钵中, 加入液氮进行研磨。研碎后向小研钵中加入 10 mL 核酸提取缓冲液 (4.2), SBS 粉 (十二烷基磺酸钠) 约 0.1 g、皂土约 0.1 g, 再研磨 6 min~10 min。向小研钵中加入 120 μL β -巯基乙醇, 再研磨 6 min~10 min。加入 11 mL 苯酚。研磨

6 min~10 min。加入 12 mL 氯仿，再研磨 6 min~10 min。将研好的样倒入 50 mL 干净的离心管中，用氯仿平衡。高速冷冻离心机（5.3）4℃、9 000 r/min~10 000 r/min 离心 20 min~25 min，用移液器（5.6），将上层水相（样品粗提液）转移到另一清洁的离心管中，可用，也可冻存（-20℃）。

B6.2 核酸纯化

将 6.1 中有上清液的离心管拿出备用。在 100 mL 无菌水中加入一定量的可溶性纤维素，混匀备用。

装柱：用带孔的橡皮塞和细纱装入 5 mL 的一次性注射器（5.8），向注射器中加纤维素液，直至纤维素沉积至 3.5 mL 左右处，期间要不断加入无菌水。

上样：将上清液缓慢加入到柱中，直到加完为止。用低盐溶液（4.7）洗脱，每次加入 2 mL，共 20 次约 40 mL。待柱中低盐将流尽时，加入 1 mL 高盐溶液（4.8）进行清洗，然后将 50 mL 干净离心管置于柱下分 4 次（每次 2 mL）加入 8 mL 高盐溶液（4.8），待高盐洗液全部流入 50 mL 离心管为止。向装有高盐洗液的 50 mL 离心管中加入冻存的 95% 乙醇，加入量是离心管中液体的 3 倍左右，摇匀，放入低温保存箱（5.12）-20℃ 以下冷冻，时间不得少于 2 h。

B6.3 总核酸提取

将冻存的离心管拿出来，用 95% 的乙醇平衡，然后用高速冷冻离心机（5.3）1℃~4℃、10 000 r/min 离心 20 min，倒掉上清液，将离心管倒立放在铺好的干净滤纸上。待水分吸干后，向离心管中加 75% 的乙醇，加入量是离心管容积的 1/3，进行清洗，时间为 10 min~20 min。用 75% 乙醇平衡，用高速冷冻离心机（5.3）1℃~4℃、10 000 r/min 离心 10 min，倒掉乙醇，将剩余乙醇全部挥发掉。

B6.4 试样获得

将 TAE 缓冲液工作液（4.4）200 μL 加入到盛有总核酸的 50 mL 离心管中进行溶解，然后用移液器（5.6）将其移到 1.5 mL 干净的离心管中，再次用 200 μL TAE 缓冲液工作液（4.4）进行清洗，将清洗液全部转移到 1.5 mL 离心管中。

B7 测定步骤

B7.1 试料

将盛有试样（6.4）的离心管在漩涡混合器上振混匀，然后用高速台式离心机（5.2）4 000 r/min 离心 3 min~5 min。

然后量取 15 μL 样品，用 3 000 μL TAE 缓冲液工作液（4.4）稀释，以不加样品的 TAE 缓冲液工作液（4.4）为空白对照，紫外分光光度计（5.7）260 nm 处，测定各试样光吸收值。

$$\rho(\text{RNA})/\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1} = \frac{A_{260} \times 201}{0.025 \times 1\,000} = 8.04A_{260}$$

一般电泳加样试料的 RNA 质量（ m ）要求相对一致，据 $V = \frac{m}{\rho}$ ，计算试料体积（ V ）

B7.2 测定

B7.2.1 制板

取洁净电泳槽，琼脂糖溶液（4.17）封底，注入聚丙烯酰胺凝胶（4.18），反加样梳插入做成泳道。

B7.2.2 加样

按 7.1 中计算试料体积，混入指示剂（4.16）和 TBE 缓冲工作液（4.6），总量为 40 μL~60 μL。

B7.2.3 正向电泳

加入 TBE 电泳缓冲液工作液（4.6），进行从负极到正极电泳，电泳仪（5.1）电压调到 150 V。当示踪染料二甲苯兰迁移到距凝胶底部 1 cm~2 cm 时，停止正向电泳。将电泳槽中缓冲液倒掉，把电泳槽置入电热鼓风干燥箱（5.5）中 75℃ 预热 30 min，然后向电泳槽中加入 75℃ 的 TBE 缓冲液工作液（4.6）变性 15 min。

B7.2.4 反向电泳

在电热鼓风干燥箱（5.5）中进行从正极到负极的反向电泳，电泳仪（5.1）电压调至 200 V，当二甲苯蓝示踪染料带迁移到胶板上方刚跑出水面时停止电泳，取出凝胶片进行染色。

B7.2.5 固定

把凝胶片放在置有 400 mL 核酸固定液（4.12）的培养皿中，轻轻振荡 10 min，固定 0.5 h~1 h，然后用 50 mL 注射器（5.8）吸净固定液。

B7.2.6 染色

向培养皿中加入 400 mL 染色液（4.13），轻轻振荡 10 min，染色 30 min~40 min，然后吸出染色液（可重复使用）。

B7.2.7 漂洗

用蒸馏水清洗凝胶板，以除掉残留的染色体，共冲洗四次，每次用水 400 mL，每次冲洗 15 s。

B7.2.8 显影

加入核酸显影液（4.14）400 mL，轻轻摇荡，直到核酸带显现清楚为止。

B7.2.9 增色

吸出显影液，加入增色液（4.15）400 mL，增色 5 min。吸掉增色液拍照。

B8 计算结果

与阳性对照相同位置有谱带出现者为阳性。

$$g = \frac{k}{j} \times 100\%$$

式中：

g ——马铃薯纺锤块茎类病毒（PSTVd）检出率，%；

k ——呈阳性反应样品数量；

j ——实验室样品数量。

结果用两次重复的算术平均值表示，修约间隔为 1，并标明经舍进或未舍未进。

阳性对照（PSTVd 的 RNA）泳道下方约 1/4 处应有拖后的黑色核酸带。

B9 判定

采用全数值比较法，标准规定各级别种薯马铃薯纺锤块茎类病毒（PSTVd）允许率应为零，检出变大于零。或经舍弃为零者均不合格。

附 录 C
(规范性附录)
马铃薯环腐病检测方法

用格兰氏染色和茄子接种鉴定法结合起来鉴定马铃薯苗和脱毒种薯是否感染马铃薯环腐病。当用格兰氏染色鉴定为阳性结果时,再用茄苗接种鉴定法进行鉴定,也产生阳性结果时,才能确认是马铃薯环腐病菌。

C1 格兰氏染色 (Gran Stain)

C1.1 试验设备

C1.1.1 显微镜

C1.1.2 载玻片

C1.1.3 酒精灯

C1.2 试剂:所用试剂为分析纯级,用水为蒸馏水,个别为无菌水。

C1.2.1 龙胆紫染色液:2.5 g 龙胆紫加水到 1 L。

C1.2.2 碳酸氢钠溶液:12.5 g NaHCO_3 (碳酸氢钠)加水到 1 L。

C1.2.3 碘媒染液:2 g 碘溶解于 10 mL 1M NaOH (氢氧化钠)溶液中,加水定溶为 100 mL。

C1.2.4 脱色剂:75 mL 95% 乙醇加 25 mL 丙酮。

C1.2.5 碱性品红复染液:取 100 mL 碱性品红 95% 乙醇饱和液,加水到 1 L。

C1.3 取样制备涂片:所有试验用具都要用 70% 酒精擦拭灭菌。

C1.3.1 鉴定植株:从地表上方 2 cm 处割断,用镊子从切口挤出汁液,滴 1 滴于载玻片上,风干后,用酒精灯火焰烘烤 2 次~3 次固定。另一方法是,从切口一端切下 0.5 cm 厚茎片,在小研钵中研磨,吸取 1 滴汁液滴于载玻片上,风干,用酒精灯火焰烘烤 2 次~3 次固定。

C1.3.2 鉴定块茎:切开块茎,如维管束处有菌脓或渗出物,用镊子压挤,滴 1 滴于载玻片上,加 1 滴无菌水稀释,风干后,用火焰烘烤 2 次~3 次固定。如无渗出物,用镊子从维管束附近取出一些碎组织放在载玻片上,加 1 滴无菌水,移掉碎组织。风干后,用火焰烘烤 2 次~3 次固定。

C1.4 涂片染色

C1.4.1 滴 1 滴龙胆紫与碳酸氢钠的等量混合液(现用现配)于载玻片上,染色 20 s。

C1.4.2 滴 1 滴碘媒染液媒染 20 s,滴水洗涤。

C1.4.3 滴 1 滴脱色剂,脱色 5 s~10 s,滴水洗涤。

C1.4.4 滴 1 滴碱性品红溶液复染 2 s~3 s,滴水洗涤,风干。

C1.5 镜检和结果判定:用 1 000 倍~1 500 倍显微镜镜检,如见到呈蓝紫色的单个细菌或集聚为 2、3 或 4 个细菌,判定为阳性反应;染成粉红的判定为阴性反应。

C2 茄子接种鉴定法

C2.1 寄主植物准备:一般常用“黑美人”(Black Beauty)品种。先在大花盆中育苗,出苗后移植到装有营养土的花盆内,每盆 1 株。当茄子苗长到 2 周~3 周出现第三片真叶时即可用于接种鉴定。

C2.2 接种体制备:按 C1.3.1 与 C1.3.2 方法制备接种体,加适量无菌水稀释。

C2.3 接种方法:用 1 mL 卡介苗注射器吸入制备好的接种体,用 4 号针头,在茄苗真叶与子叶之间的茎部作针刺接种,每株茄苗针刺 3 个部位。接过种的茄苗放在 20℃~25℃ 的温室中,保持相对湿

度 70%以上，每日光照为 12 h。

C2.4 症状表现及结果判定：接种后 1 周，第一片真叶缘出现水渍状症状，12 d 后症状发展为叶缘或叶脉间失水萎蔫，褪绿，22 d 后发病部位坏死，叶片长成畸形。

茄子接种后产生上述症状的，说明接种体中带有马铃薯环腐细菌，制备接种体的样品为阳性反应；无症状的为阴性反应，证明接种体中不带环腐细菌。

附 录 D
(规范性附录)
马铃薯青枯病检测方法

D1 范围

本细则规定了马铃薯种薯块茎青枯病的检测方法。

本细则适于检测马铃薯青枯病。

D2 依据

NY/T 401 脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测技术规程。

国际马铃薯中心(CIP)方法

D3 原理

青枯假单孢菌与其特异性兔抗体结合为抗原抗体复合物,抗原抗体复合物与特异的酶标羊抗兔抗体结合后遇底物引起显色反应。青枯假单孢菌越多,则颜色越深,反之,则颜色越浅,据此检测青枯病。

D4 试剂

所用化学试剂均为分析纯级规格,用水为蒸馏水,个别为无菌水。

D4.1 次氯酸钠溶液 [$\omega(\text{NaClO}) = 1\%$] 称取 10 g 次氯酸钠,溶于 990 mL 水中。

D4.2 盐酸溶液 [$\psi(\text{HCl}) = 1+1$] 量取 37% 盐酸 50 mL,加水定容至 100 mL。

D4.3 TBS 缓冲液 [$\rho[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3] = 2.42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\rho(\text{NaCl}) = 29.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\rho(\text{NaN}_3) = 0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$] 称取三羟甲基氨基甲烷 $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3]$ 2.42 g,氯化钠(NaCl) 29.22 g,叠氮钠(NaN_3) 0.01 g,溶于无菌水充分摇匀,定容至 1 000 mL,并用盐酸溶液(4.2)通过酸度计(5.3)调 pH 至 7.5。

D4.4 Rs-IgG 青枯假单孢菌的特异性兔抗体。

D4.5 GAR-IgG 羊抗兔酶标抗体。

D4.6 封闭缓冲液

称取 0.43 g 脱脂奶粉溶于 30 mL TBS 缓冲液(4.3)中。

D4.7 抗体溶液

按抗体工作浓度,吸取抗体 Rs-IgG(4.4)溶于 30 mL 封闭缓冲液(4.6)中,现用现配。

D4.8 酶标抗体溶液

按酶标抗体(4.5)工作浓度,吸取酶标羊抗兔抗体 GAR-IG,加入到 30 mL 封闭缓冲液(4.6)中,混匀。

D4.9 洗涤缓冲液(T-TBS) 用移液器(5.4)吸取 250 μL Tween-20 加入到 500 mL TBS 缓冲液(4.3)中混匀。

D4.10 底物缓冲液 [$\rho[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3] = 12.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\rho(\text{NaCl}) = 5.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\rho(\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}) = 1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$] 称取三羟甲基氨基甲烷 $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3]$ 1.21 g,氯化钠(NaCl) 0.58 g,结晶氯化镁($\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.1 g,溶于 100 mL 水中充分摇匀,逐滴加入盐酸溶液(4.2),用酸度计(5.3),将 pH 调至 9.6。冰箱冷藏室(5.8)贮存,有效期 120 d。

D4.11 氮蓝4唑(NBT)溶液 用800 μL 70%二甲基甲酰胺水溶液溶解30 mg 氮蓝四唑(NBT), 振摇直到完全溶解。

D4.12 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐(BCIP)溶液 用800 μL 100%二甲基甲酰胺溶解15 mg 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐, 振摇直到完全溶解。贮存方法同4.10, 有效期30 d。

注: 二甲基甲酰胺(DMF)高毒性, 并能被皮肤吸收, 配制时应戴手套。

D4.13 提取缓冲液 [$\rho(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7) = 1.995 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\rho(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7\text{Na}) = 11.907 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$] 称取柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 1.995 g 溶于1 000 mL 蒸馏水中, 边搅拌边缓慢加入柠檬酸钠($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7\text{Na}$) 11.907 g, 用酸度计(5.3)调pH至5.6, 120℃下灭菌20 min, 贮存方法同4.10。

D4.14 NBT/BCIP底物溶液 在最后一次洗涤时临时配制, 每张膜25 mL。用带无菌吸头的移液器(5.4)吸取100 μL NBT溶液(4.11), 向装有25 mL 底物缓冲液(4.10)的避光瓶子中边摇瓶边滴加; 再用带无菌吸头的微量移液器(5.3)吸取100 μL BCIP溶液(4.12)边振摇边滴加到已加入NBT的瓶中。

注: 剩余底物缓冲液、NBT和BCIP溶液可分别冰箱冷藏备用, 但后两者最多贮存30 d。底物溶液应在一个包裹着铝铂纸的三角瓶中配制。

D4.15 基本培养基贮液 称取10.0 g 蛋白胨, 1.0 g 酪蛋白, 量取5.0 mL 甘油, 溶于水中并定容至1 000 mL。

D4.16 SMSA富集培养基贮液 基本培养基贮液(4.15) 0.1 MPa 灭菌后, 冷却至50℃, 无菌条件下每升加入过滤灭菌的硫酸多粘菌素B(100 mg/L) 10 mL, 放线菌酮(100 mg/L) 10 mL, 杆菌肽(25 mg/L) 2.5 mL, 青霉素G(0.5 mg/L) 500 μL , 氯霉素(5 mg/L) 500 μL , 结晶紫(5 mg/L) 500 μL , 2、3、4-三苯基唑氯(即TZC 50 mg/L) 5 mL, 混匀。

D4.17 SMSA富集培养基 量取20 mL SMSA富集培养基贮液(4.16), 用水定容至200 mL。

D5 仪器设备

D5.1 低温保存箱 控温范围: $-15^\circ\text{C} \sim -40^\circ\text{C}$ 。

D5.2 恒温培养箱 量程: $\text{R.T} + (5 \sim 60)^\circ\text{C}$, 精度: $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

D5.3 酸度计 量程: pH(0~14), 精度: $\pm 0.01 \text{ pH}$ 。

D5.4 移液器 200 μL , 1 000 μL 。

D5.5 量筒 100 mL, 200 mL, 1 000 mL。

D5.6 容量瓶 100 mL, 200 mL, 1 000 mL。

D5.7 水平摇床。

D5.8 冰箱。

D6 试样制备

被检块茎用流水冲洗后在次氯酸钠溶液(4.1)中浸泡5 min, 在干净滤纸上晾干。

用火焰消毒过的刀片从块茎顶部切薄片, 再挖取2 mm宽、1 mm深的维管束环(不超过0.5 g)装入样品袋并称重。

称重后的样品袋中加入提取缓冲液(4.13), 每克样品2 mL, 用试管或小锤捣碎块茎, 样品袋垂直放于碎冰之上(不超过1 h), 上清液即为样品提取液。

然后, 在1.5 mL 无菌微量离心管中加入500 μL SMSA富集培养基(4.17), 500 μL 样品提取液, 培养箱(5.2)中30℃下孵育48 h, 每天手摇两次。

阳性对照样品富集过程同上。

孵育结束后即成为试样, 若贮存应置于低温保存箱(5.1)内。

D7 测定步骤

D7.1 硝酸纤维素膜(NCM)处理

将硝酸纤维素膜放入 30 mL TBS 缓冲液 (4.3) 中浸泡 5 min。取硝酸纤维素膜时应用镊子或戴一次性手套, 不能用手直接接触硝酸纤维素膜, 以下同。

将两张滤纸 (3 mm) 在 TBS 缓冲液 (4.3) 中浸泡后, 放在两张干燥的滤纸上。

将浸湿的硝酸纤维素膜放在湿滤纸上, 等待数秒直到膜表面的液体被完全吸收, 在膜上滚动干净无菌的试管, 确保膜和滤纸很好的接触, 并用铅笔在膜左下角编号识别。

D7.2 点样 (加试料) 将微量离心管中试样振荡后数秒, 用移液器取上清液, 点于膜上, 每点加样 20 μ l, 每重复两次, 每点完 1 个样品, 换 1 个吸头。

D7.3 封闭 将膜缓慢放入盛有 30 mL 封闭缓冲液 (4.6) 的培养皿中, 水平摇床 (5.7) 上慢速振荡 1 h。

D7.4 与 Rs-IG 结合 弃去封闭缓冲液, 加抗体溶液 (4.7) 30 mL, 置于水平摇床 (5.7) 上慢速振荡 2 h。

D7.5 抗原抗体复合物与酶标羊抗兔抗体结合

洗涤: 孵育后的膜弃去抗体溶液, 在 30 mL T-TBS 缓冲液里洗涤 3 次, 每次水平摇床 (5.7) 快速振荡 3 min。

弃去最后一次洗涤缓冲液, 加入酶标抗体溶液 (4.8) 30 mL, 在水平摇床上慢速振荡 1 h。

D7.6 显色反应

弃去酶标抗体溶液, 洗涤, 方法按 7.5, 弃去最后一次洗涤液, 加入 NBT/BCIP 底物溶液 (4.14) 25 mL, 根据阳性对照所表现的紫色, 在 5 min~20 min 内终止反应。

D7.7 终止反应

弃去底物溶液并用流动水充分洗膜终止反应, 将膜置于滤纸上干燥, 用两张干净滤纸夹住保存。

D8 计算结果

$$a = \frac{b}{c} \times 100\%$$

式中:

a ——马铃薯青枯病检出率, %;

b ——呈阳性反应样品数量;

c ——实验室样品数量。

结果用两次重复算术的平均值表示, 修约间隔为 10^{-2} , 并标明经舍进或未舍进。

显色后 20 min 内, 阳性应呈紫色。

D9 判定

采用全数值比较法, 将青枯病检出率与合同规定指标相比较, 符合者合格, 否则不合格, 无合同规定指标者, 只作参数测定, 不作判定。

附 录 E

(规范性附录)

马铃薯晚疫病检测方法

E1 范围

方法规定了马铃薯种薯块茎晚疫病的检测方法。
本方法适用于马铃薯晚疫病的检测。

E2 依据

GB 18133 马铃薯脱毒种薯
NY/T401 脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测技术规程

E3 原理

保湿条件下在马铃薯晚疫病侵染处会长出晚疫病孢子囊和菌丝，而在较低温度下的无菌水中，会释放出游动孢子，据此进行检测。

E4 试剂

E4.1 菌种保存培养基 称取菜豆 30 g，加 500 mL 水(15℃~18℃)，浸泡 12 h，加热煮沸 2 h，4 层纱布过滤，用水补足至 1 000 mL，然后加葡萄糖 20 g，硫胺 5 mg，搅拌均匀，加琼脂 15 g，分装试管，0.1 MPa、121℃下灭菌 18 min，放置冷却，制成斜面。

E4.2 无菌水 蒸馏水分装在三角瓶中，121℃、0.1 MPa 灭菌 30 min，冷却，4℃贮存。

E5 仪器设备

E5.1 光照培养箱

量程：5℃~50℃(无光)，精度：±0.3℃。

E5.2 双目显微镜

E5.3 超净工作台

E5.4 培养皿，玻璃棒，高压灭菌(按 4.2)。

E6 试样制备

将薯块洗净，表面酒精火焰消毒，无菌条件下，将薯块切成片，培养皿中倒入少量无菌水(4.2)置于培养皿(5.4)玻璃棒(5.4)上，培养箱(5.1)15℃~18℃，暗培养 3 d 左右。切面上出现的白色霜状物，即为试样。

E7 测定步骤

用解剖针挑取少许试样，混入载玻片上的 1 滴无菌水中，加盖玻片，显微镜(5.2)下观察，晚疫病菌 *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary 形态为：菌丝无色、无隔、多核，孢囊梗无色，1~4 分枝，梗节状，各节基部膨大而顶端尖细，顶端产生孢子囊，孢子囊无色单胞，卵圆形，顶端有乳突。较低温度下释放出的肾形游动孢子，双鞭毛，在水中游动片刻后，即行停止，收回鞭毛，变为圆形。

显微镜检前，无菌条件下，从培养基(4.1)保存的菌种中，挑取少量病原物，制片同上，作为对照。

E8 计算结果

$$d = \frac{e}{f} \times 100\%$$

式中:

d ——晚疫病检出率, %;

e ——镜检带晚疫病病菌的样品数量;

f ——实验室样品数量。

结果用两次重复的算术平均值表示, 修约间隔为 0.1, 并标明经舍进或未舍进而得。

E9 判定

将一、二级种薯块茎的晚疫病检出率与委托检验的合同规定指标作全数值比较, 符合者为合格, 否则不合格。无合同规定者, 只作参数测定, 不作判定。

附 录 F
(规范性附录)

马铃薯主要病毒病、细菌病和真菌病症状目测鉴别表

病害名称	植株症状	块茎症状
马铃薯纺锤块茎类病毒 PSTVd	病株叶片与主茎间角度小,呈锐角,叶片上竖,上部叶片变小,有时植株矮化。	感病块茎变长,呈纺锤形,眼芽增多,芽眉凸起,有时块茎产生龟裂。
马铃薯卷叶病 PLRV	叶片卷曲,呈匙状或筒状,质地脆,小叶常有脉间失绿症状,有的品种顶部叶片边缘呈紫或黄色,有时植株矮化。	块茎变小,有的品种块茎切面上产生褐色网状坏死。
马铃薯花叶病 PVX、PVS	叶片有黄绿相间的斑驳或褪绿,有时叶肉凸起产生皱缩。有时叶背叶脉产生黑褐色条斑坏死。生育后期叶片干枯下垂,不脱落。	块茎变小。
马铃薯环腐病	一丛植株的一或一个以上主茎的叶片失水萎蔫,叶色灰绿并产生脉间失绿症状,不久叶缘干枯变为褐色,最后黄化枯死,枯叶不脱落。	感病块茎维管束软化,呈淡黄色,挤压时组织崩溃呈颗粒状,并有乳黄色菌脓排出,表皮维管束部分与薯肉分离,薯皮有红褐色网纹。
马铃薯黑胫病	病株矮小,叶片褪绿,叶缘上卷、质地硬,复叶与主茎角度开张,茎基部黑褐色,易从土中拔出。	感病块茎脐部黄色,凹陷,扩展到髓部形成黑色孔洞,严重时块茎内部腐烂。
马铃薯青枯病	病株叶片灰绿色,急剧萎蔫,维管束褐色,以后病部外皮褐色,茎断面乳白色,黏稠菌液外溢。	感病块茎维管束褐色,切开后乳白菌液外溢,严重时,维管束邻近组织腐烂,常由块茎芽眼流出菌脓。
马铃薯瘤肿病	一般植株生长正常;有时在与土壤接触的茎基部处长出绿色肉质瘤状物,以后变为褐色,最后脱落。	本病发生于植株的地下部位,但根部不受侵害。在地下茎、茎上幼芽、匍匐枝和块茎上均可形成瘤肿。典型的瘤肿是粗糙柔嫩肉质的球状体,并可长成一大团细胞增生组织。其色泽与块茎和匍匐枝相似,如露出地面并带有绿色、老化时为黑色。块茎上的症状很像花椰菜。
马铃薯晚疫病	植株叶尖或叶缘形成水渍状病斑,病斑周围有浅黄色晕圈,潮湿时,相对湿度100%,温度21℃在叶背产生白霉状的孢囊梗和孢子囊,在茎上、叶柄上呈黑色或黄色。	块茎表皮褐色病斑不规则,稍凹陷,褐色的坏死组织和健康组织分界不明显,病斑下薯肉呈现深度不同的褐色组织。

附 录 G
(规范性附录)

马铃薯脱毒种薯块茎病害目测鉴别表

块茎病害名称	块茎症状表现
腐 烂	在块茎伤口上或皮层上的切口周围出现水浸状变色区域，当病害发展时，块茎肿大，内部腐烂组织变黑，多水孔洞，病健组织被 1 个黑色分界线清晰地分开，几天内全部腐烂，稍加压力，即使皮层开裂并有大量液体溢出。
干 腐 病	块茎上形成浅褐色病斑，侵染扩展后形成较大的暗色同心环凹陷斑，病斑逐渐松软，干缩，表面上长出灰白色或玫瑰色菌丝和分子孢子座，有时整个块茎被侵染。
疮 痂 病	块茎的病斑通常呈圆形、多病斑愈合时，病斑的形状不规则，被病菌侵染的组织从淡棕色到褐色，病斑可能是肤浅或网状的，成为深的坑状的，或凸起块似疮疤。
黑 痣 病	块茎表面上形成各种大小和形状不规则的坚硬的，深褐色菌核，茎基部形成白色的菌丝体。

附 录 H
(规范性附录)
马铃薯种薯生产调查记载标准

H1 物候期

- H1.1** 出苗期：全田出苗数达 75% 的日期。
- H1.2** 现蕾期：全田现蕾植株达 75% 的日期。
- H1.3** 成熟期：全田有 75% 以上植株茎叶变黄或枯萎的日期。
- H1.4** 生育期：出苗到成熟期的日数。

H2 植物学特征

- H2.1** 茎色：分绿、绿带紫、紫带绿、紫、褐色。
- H2.2** 分枝：调查主茎下部，多：4 个分枝以上，中：2 个~4 个；少：2 个分枝以下。
- H2.3** 株高：开花期调查，地表至主茎花序生长点的长度，求 10 株平均值。
- H2.4** 株型：直立：与地面约成 90°角；扩散：与地面约成 45°角以上；匍匐：与地面约成 45°角以下。
- H2.5** 叶色：调查叶片及叶背颜色，分浓绿、绿、浅绿。
- H2.6** 花色：调查初开的花朵，分乳白、白、黄、浅紫、浅蓝紫、浅粉紫、紫蓝、蓝紫、红紫、紫红等。
- H2.7** 块茎形状：分扁圆、长圆、短椭圆、长椭圆、长筒形、卵形。
- H2.8** 块茎皮色：取新收获的块茎目测，分白、黄、粉红、红、浅紫、紫、相嵌。
- H2.9** 薯肉色：取新收获的块茎切开目测。分白、黄白、黄、紫和紫黄或白相嵌。
- H2.10** 芽眼色：无色（与表皮同色），有色（比皮色深或浅）：红、粉和紫色。
- H2.11** 芽眼深度：深：0.3 cm~0.5 cm 左右，中：0.1 cm~0.3 cm 左右，浅：眼窝与薯皮相平。
- H2.12** 芽眼多少：多：1 个块茎有 12 个芽眼以上；中：1 个块茎有 7 个~12 个芽眼；少：1 个块茎有 7 个芽眼以下。
- H2.13** 表皮光滑度：分光、网纹、麻。
- H2.14** 结薯集中性：收获时田间目测记载集中、分散。
- H2.15** 生长势：根据植株生长的健壮程度在花期调查，分强、中、弱 3 级。
- H2.16** 块茎整齐度：收获时目测记载。分整齐：大小一致的块茎占 85% 以上，大、中、小一致的块茎占 50%~85%；不整齐：大小一致的块茎占 50% 以下。

附 录 I
(规范性附录)

马铃薯主要虫害症状与防治方法

I 1 马铃薯瓢虫

I 1.1 症状

又名 28 星瓢虫，俗称花大姐，其成虫和幼虫均能危害马铃薯，咬食叶片背面叶肉，使被害部位只剩叶脉，形成有规则的平等透明网状细纹，植株逐渐枯黄。

I 1.2 防治措施

I 1.2.1 捕杀成虫

消灭成虫越冬场所。

I 1.2.2 药剂防治

发现成虫开始为害后，利用杀虫剂，参照使用标准进行防治。

I 2 马铃薯块茎蛾

I 2.1 症状

俗名马铃薯蛀虫、串皮虫等，幼虫蛀食马铃薯叶和块茎，当幼虫潜入马铃薯叶片内造成隧道为线形，幼虫孵化后在芽眼处吐丝结网蛀入内部，造成弯曲的隧道，严重的可被蛀空，外形皱缩，并能引起腐烂。

I 2.2 防治措施

I 2.2.1 严格检疫，杜绝有块茎蛾为害地区种薯外运。

I 2.2.2 种薯入窖前用杀虫剂熏蒸，消灭成虫。

I 2.2.3 种薯田进行高培土，防止块茎露出土面。

I 3 马铃薯蚜虫

I 3.1 症状

又名腻虫，以成、若蚜密集在幼苗、嫩茎、嫩叶和近地面的叶背，刺吸寄主汁液。由于繁殖量大，密集为害，故使受害株严重失去养分和水分，形成叶面皱缩、发黄。

I 3.2 防治措施

I 3.2.1 早春和晚秋清除残株，枯叶和杂草，消灭部分越冬蚜虫和卵。

I 3.2.2 在点片发生阶段，利用杀虫剂防治。

I 4 马铃薯金针虫

I 4.1 症状

以幼虫为害幼苗根茎，但不完全咬断，断口处不整齐，呈丝状，并可蛀入块茎中取食为害。

I 4.2 防治措施

I 4.2.1 春耕或春播前耙地时，药剂处理土壤。

I 4.2.2 苗期撒施毒饵诱杀。

I 4.2.3 及早秋耕，消灭即将入深土层越冬的幼虫或成虫。

I 5 地老虎

I 5.1 症状

1龄~2龄幼虫昼夜在植株上取食为害，咬食嫩叶的叶肉，残留表皮，造成针孔状花叶，3龄可将叶片咬成小孔或缺刻，4龄后则可咬断幼苗基部嫩茎。

I 5.2 防治措施

I 5.2.1 精耕细作，清除杂草，减少初龄幼虫食料来源。

I 5.2.2 利用黑光灯、糖醋液诱杀成虫。

I 5.2.3 苗期对于2龄幼虫盛期撒施毒土或喷雾，对于3龄以上幼虫可进行毒饵诱杀。

I 6 蛴螬

I 6.1 症状

有的种类以幼虫为害为主，咬断幼苗根茎，断口整齐，还可蛀入块茎内取食。有的种类以成虫为害为主，食马铃薯嫩芽及叶片。

I 6.2 防治措施

I 6.2.1 深耕细耙，适时浇水，中耕除草，合理施肥。

I 6.2.2 苗期利用毒饵诱杀。

I 6.2.3 在金龟甲大量出土活动到产卵之前，用药防治成虫。

I 7 蝼蛄

I 7.1 症状

成、若虫均为害严重。咬食幼苗根部或近地面的嫩茎，断口处呈乱麻状，造成幼苗枯死或生长不良。在表土层串行活动，掘成隧道，使苗根与土壤分离，导致幼苗失水枯死。

I 7.2 防治措施

I 7.2.1 苗期蝼蛄为害时，利用其趋向香甜气味及马粪的习性，用毒饵诱杀。

I 7.2.2 早春越冬蝼蛄苏醒后，据地表特征毒杀。

I 7.2.3 夏季在产卵期内，挖窝灭卵。

I 8 斑蝥

I 8.1 症状

以成虫为害马铃薯，有群聚取食习性，最喜食嫩叶，也可为害老叶及嫩茎，常吃完一株，再转株取食，一般田间呈点片被害状，发生严重时，可将叶片吃光，仅留叶脉。

I 8.2 防治措施

I 8.2.1 应以消灭成虫为重点，在成虫发生为害期用药，“敌克杀”或“斑蝥素”喷洒、辅人工围歼。

I 9 草地螟

I 9.1 症状

主要以幼虫为害。初孵幼虫群聚叶背，活动甚微，2龄~3龄多在叶背面吐丝结网，潜于网中取食叶肉，3龄后食量增大，并出网咬食叶片，严重时常将植株上叶片吃光，仅留粗大叶脉和叶柄。

I 9.2 防治措施

I 9.2.1 彻底铲除田间、地埂杂草，减少初龄幼虫食料。

I 9.2.2 进行春、秋耕耙，破坏越冬环境，增加越冬代幼虫和蛹的死亡率。

I 9.2.3 利用黑光灯诱杀成虫。

I 9.2.4 药剂防治幼虫，40%乐果乳油 800 倍，加对 8 g 洗衣粉连续喷洒 2 次~3 次。

附 录 J
(规范性附录)
马铃薯病毒病指示植物检测方法

J1 材料

- J1.1 指示植物：普通烟、黄花烟、心叶烟、德伯尼烟、白花刺果蔓陀罗、洋酸浆、千日红、A₆。
J1.2 花盆、肥皂、刷子、洗衣盆、沃土、全钢砂（400 目）、研钵（内径为 8 cm）、小型喷粉器、喷壶、杀虫剂。

J2 方法

J2.1 PVX、PVY 和 PVS 用常规汁液磨擦接种法，而 PLRV 用蚜虫（桃蚜）接种。

J2.2 指示植物培养

A₆4 月 10 日切繁，6 月 15 日前出苗，晒苗 5 d~7 d。5 月中旬播种普通烟、心叶烟、德伯尼烟，隔 5 d 播洋酸浆，再隔 5 d 播白花刺果蔓陀罗、黄花烟，最后播千日红。
花盆用肥皂水洗涤，所用的沃土过筛后混匀，160℃~180℃干热灭菌两小时，装在大、中、小花盆中，距盆顶要有一定的距离，花盆内的土要先灌透水，然后将种子撒播于盆内湿土上，覆土厚度 0.5 cm~1.0 cm。6 月上旬整棚、遮荫、棚内喷药、台上、地面灌水。6 月中旬分栽各种指示植物，包括定植 A₆，在荫凉处育苗。

J2.3 病组织的收集

利用指示植物检验生长季节中马铃薯植株的带毒情况，分两个时期到田间采集植株叶片，即现蕾期和开花期。一般情况以整个植株的中部叶片为检验材料，也可检验块茎及脱毒苗的带毒情况。

J2.4 指示植物接种检验病毒

用肥皂水洗涤研钵、研锤，同时也将手洗净，把采回的病叶放于洗过的研钵内，研磨成匀浆。用小型喷粉器将 400 目的金钢砂喷洒在指示植物叶片上，将病叶匀浆磨擦接种在不同的指示植物上，重复 2 次~3 次。接种后用清水洗掉接叶上的杂物，再用无菌水冲洗，挂牌，棚温保持 20℃~25℃，湿度 85%~90%。接种后 3 d~7 d 开始记录温、湿度，并加大湿度逐日观察发病症状。适时清除花盆中的杂草，每隔 5 d~7 d 喷施一次防蚜虫的药。

根据病毒与指示植物协同作用发病时间、部位及症状，调查 3 次，与空白比较，记录结果。标准见表 1。

表 J.1 四种常见马铃薯病毒在主要指示植物上症状

病毒	指示植物	感染方式	症 状
PVX	千日红	局部	3 d~5 d 或 8 d~10 d 接种叶出现圆形紫环黄枯斑。
	白花刺果蔓陀罗	系统	18 d~23 d，接种叶上部叶出现明显斑驳花叶，心叶明显，有时形成枯斑。12 d 出现黄色小点。
	普通烟	系统	18 d~23 d，系统花叶斑驳或环斑，个别株系引起典型环斑或大理石花纹。
	心叶烟	系统	20 d~24 d，系统清晰斑驳花叶，与 PVX 混合感染时，表现皱缩。
	黄花烟	系统	黄色斑驳花叶，褐斑系，24℃，14 d 形成褐色枯斑。

表 J.1 (续)

病毒	指示植物	感染方式	症 状
PVY	普通烟	系统	普通株系, 17 d~24 d, 幼叶呈清晰明脉细微点状花叶, 老叶沿脉绿带状。Y ^N 系 11 d~14 d 明脉花叶, 主脉变褐, 叶片坏死。
	洋酸浆	系统	Y ^O 株系, 9 d~10 d 系统褐色圆枯斑, 落叶死亡, 症状鲜明强烈, Y ^N 株系系统褐绿斑花叶, 叶片后卷无枯斑。
	心叶烟	系统	Y ^O 株系, 23 d~27 d 花叶明脉, 皱缩 Y ^N 株系 21 d 左右, 花叶明脉皱缩, 叶脉不坏死。
	黄花烟	系统	Y ^N 株系, 14 d~24 d, 接叶呈皱圆形斑, 周围褪绿, 后转为系统褪绿斑。
	A ₆	局部	叶脉系统变褐坏死。
PVS	千日红	局部	14 d~25 d, 接叶出现红色略微凸出的圆环小斑点。
	德伯尼烟	系统	初期明脉, 以后是暗绿块斑花叶。
PLRV	洋酸浆	系统	用桃蚜接种 15 d~30 d, 出现褪绿脉带, 向下卷叶生长受阻。在 24℃, 6 d~8 d 便可出现症状。
	心叶烟	系统	5 d 后, 系统黄色斑驳花叶, 进一步形成暗绿色脉带。

附 录 K

(规范性附录)

国内马铃薯主栽品种生物学特征特性描述

表 K.1

特 征 描 述 品 种 名 称	茎、叶、花形态特征										块茎形态特征				生 育 期
	株 型	分 枝	茎 色	复 叶	叶 色	叶 形	叶 茸 毛	自然 结实	花 冠 色	雄 蕊	薯 形	薯 皮 色	薯 肉 色	芽 眼 深 浅	
冀张薯2号	直立	中等	绿	中等	浅绿	椭圆	少	弱	白	橙黄	椭圆	淡黄	淡黄	中等	108
虎 头	直立	多	绿	较大	浓绿	椭圆	中	弱	白	橙黄	椭圆	白黄	淡黄	深	110
冀张薯3号	直立	中等	绿	中等	浓绿	椭圆	少	无	白	黄	圆	黄	黄	浅	85
冀张薯4号	直立	中等	绿	中等	绿	椭圆	无	弱	白	黄	长椭圆	白	白	浅	95
冀张薯5号	直立	中等	绿紫	中等	绿	椭圆	多	多	粉	橙黄	长椭圆	粉红	黄	浅	95
坝薯9号	半直立	较多	绿	较大	绿	椭圆	中等	无	白	黄	长椭圆	白	白	深	85
金 冠	直立	少	绿	中等	绿	椭圆	中等	中等	白	黄	长椭圆	黄	黄	浅	80
费乌瑞它	直立	少	紫	大	绿	椭圆	中等	强	蓝紫	橙黄	长椭圆	黄	黄	浅	65
中薯2号	半直立	较多	褐紫	中等	绿	椭圆	中等	强	紫红	橙黄	圆	淡黄	淡黄	中等	60
中薯3号	半直立	中等	绿	中等	绿	椭圆	少	弱	白	橙黄	椭圆	黄	黄	浅	65
大西洋	半直立	中等	绿	中等	绿	椭圆	少	弱	粉白	黄	圆	褐粗麻	白	浅	85
夏波蒂	直立	中等	绿	大	绿	椭圆	少	无	浅粉	黄	长椭圆	白	白	浅	95
中心24	直立	中等	绿	大	绿	椭圆	中等	弱	蓝紫	橙黄	椭圆	白	白	浅	105
丰收白	直立	中等	绿	大	绿	椭圆	中等	中	白	橙黄	长椭圆	白	白	较浅	60
东农303	直立	中等	绿	较大	淡绿	椭圆	少	弱	白	淡绿	扁卵	黄	黄	浅	60
克新1号	开展	中等	绿	大	绿	椭圆	中等	无	淡紫	黄绿	椭圆	白	白	中等	95
克新4号	开展	少	绿	中等	淡绿	椭圆	中等	无	白	黄绿	椭圆	黄	淡黄	浅	70
坝薯8号	直立	较多	绿	大	浓绿	椭圆	少	弱	白	黄	椭圆	白	白	浅	110
内薯1号	直立	多	绿	中等	绿	椭圆	少	中等	淡紫	黄	长椭圆	淡黄	淡黄	浅	104
米 拉	半直立	中等	绿带紫	中等	绿	椭圆	中等	弱	白	橙黄	长椭	淡黄	淡黄	浅	115
乌盟601	半直立	多	绿	中等	绿	椭圆	中等	弱	白	橙黄	椭圆	白	白	浅	85
郑薯5号	半直立	中等	绿带紫	中等	绿	椭圆	少	中等	淡白	黄	圆	淡黄	淡黄	浅	70
春薯2号	半直立	中等	绿	大	绿	椭圆	中等	无	白	橙黄	圆	白	白	中等	75
泰山1号	直立	少	绿	中等	绿	椭圆	少	无	白	黄	椭圆	淡黄	淡黄	浅	65
高原8号	直立	少	绿带紫	大	绿	椭圆	多	中等	浅紫	橙黄	圆	白	白	深	120
晋薯6号	直立	多	淡绿	大	淡绿	椭圆	少	弱	白	黄	圆	白	白	深	114
凉薯3号	直立	中等	绿	中等	绿	椭圆	中等	强	浅紫	橙黄	椭长	黄	淡黄	中等	110
陇薯7号	半直立	中等	绿	中等	绿	椭圆	多	弱	白	橙黄	扁圆	淡黄	淡黄	中等	85
早大白	直立	中等	绿	中等	绿	椭圆	中等	弱	白	黄	扁圆	白	白	浅	60

附 录 L
(规范性附录)
设备药品试剂

L1 设备

- L1.1 手提式高压灭菌锅
- L1.2 超净工作台
- L1.3 电热蒸馏水器一台
- L1.4 紫外线灭菌灯 1 支
- L1.5 长柄手术镊 2 个
- L1.6 医用剪刀 3 把~4 把
- L1.7 温湿度计 3 个~5 个
- L1.8 40 W 日光灯管 14 支
- L1.9 培养架 2 组, 5 层, 层与层之间高度 40 cm
- L1.10 无菌培养室 30 m²
- L1.11 冰箱一台
- L1.12 10 mL、50 mL 量筒各 2 个
- L1.13 培养瓶 800 只~1 000 只
- L1.14 光照培养箱
- L1.15 营养钵 6 000 只
- L1.16 空调器一台
- L1.17 酸度计
- L1.18 解剖针 8~10 个
- L1.19 聚乙烯薄膜上覆 40 目尼龙纱温室 50 m²
- L1.20 解剖刀 10 把
- L1.21 烧杯 4 个~5 个
- L1.22 10 倍~40 倍双筒解剖镜一台

L2 药品和试剂

- L2.1 甲醛 5 瓶
- L2.2 升汞 5 瓶
- L2.3 高锰酸钾 3 瓶
- L2.4 漂白粉饱和溶液
- L2.5 70% 酒精 5 瓶
- L2.6 激动素、B9、吲哚乙酸
- L2.7 pH 试纸

表 L.1 MS 培养基母液配制表

母 液	化 合 物	数 量 (g)	加蒸馏水 (mL)	配制培养基需加母液 (mL)
A	NH ₄ NO ₃	16.5		100
	KNO ₃	19.0		100
	KH ₂ PO ₄	1.7	1 000	100
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7	1 000	100
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4	1 000	100
B	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.557	100	5
	Na ₂ -EDTA	0.745	100	5
C	KI	0.083	100	1
	Na ₂ MO ₄ ·4H ₂ O	0.025	100	1
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.002 5	100	1
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002 5	100	1
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.23	100	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86	100	1
	H ₃ BO ₃	0.62	100	1
D	盐酸硫胺素 (B1)	0.004	100	10
E	盐酸素 (B2)	0.005	100	10
F	甘氨酸	0.02	100	10
G	烟酸	0.005	100	10
H	肌醇	1.0	100	10
	蔗糖	30.0		直接加入
	琼脂	7.0		直接加入
	pH			调至 5.8

注：配制母液 A 时最后加氯化钙