



中华人民共和国国家标准

GB/T 29375—2012

马铃薯脱毒试管苗繁育技术规程

Code of practice for in-vitro virus free seed potatoes plantlets breeding

2012-12-31 发布

2013-06-20 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国蔬菜标准化技术委员会(SAC/TC 467)归口。

本标准起草单位:内蒙古大学内蒙古马铃薯工程技术研究中心、中国标准化研究院、甘肃爱兰马铃薯种业有限公司、定西马铃薯研究所、重庆市薯类脱毒种苗快繁中心、秘鲁国际马铃薯中心北京联络处、四川省凉山州良圆马铃薯种业有限公司、内蒙古希森马铃薯种业有限公司、成都科欣农业生物工程有限公司、北京辛普劳食品加工有限公司、湖南农业大学园艺学院、东北农业大学农学院、华南农业大学园艺学院、云南省宣威市马铃薯种薯研发中心、福建省农业科学院作物研究所、河北省郑州市蔬菜研究所、云南省丽江市农业科学研究所、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、内蒙古铃田生物技术有限公司。

本标准主要起草人:张若芳、杨丽、周爱兰、孙清华、吴蕾、杜密茹、巩秀峰、王义、宋荣庆、李进福、黄振霖、谢开云、严欣、王官茂、陈涛、曲仁山、熊兴耀、王凤义、曹先维、展康、汤浩、吴焕章、王绍林、罗其友、李文刚。

马铃薯脱毒试管苗繁育技术规程

1 范围

本标准规定了马铃薯茎尖脱毒与组织培养、脱毒试管苗扩繁的技术要求和操作规程。
本标准适用于马铃薯脱毒试管苗的培育、扩繁。

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 18133—2000 马铃薯脱毒种薯

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

叶原基 leaf primordium

在茎尖生长点的基部形成的突起。

3.2

茎尖 stem tip

芽顶端部分(0.1 mm~10 mm)其中包括分生组织(0.05 mm~0.1 mm)及芽原基和正在发育的叶原基。

3.3

茎尖分生组织 meristem

茎部位具有持续或周期性分裂能力的细胞群。

3.4

离体培养 in-vitro propagation

从植物体分离出符合需要的器官、组织、细胞、原生质体等,通过无菌操作,在人工控制条件下进行培养以获得再生的完整植株或生产具有经济价值的其他产品的技术。

3.5

脱毒苗 in-vitro virus free plantlet

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)、马铃薯 M 病毒(PVM)、马铃薯 A 病毒(PVA)和马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的试管苗。

3.6

核心苗 core plantlet

通过茎尖分生组织培养技术获得的经检测无病毒,经试种观察具有原品种典型性状的脱毒苗。

3.7

基础苗 basic plantlet

由核心苗繁殖的、经检测无病毒的脱毒苗。

4 试管苗生产车间

4.1 布局原则

脱毒苗生产车间布局应遵循方便消毒、减少污染的原则,遵守操作流程。周围应无污染源,与大田生产隔离。要具备更衣室、清洗室、配制室、灭菌室、无菌贮存室、接种室、培养室等,各房间应隔离。生产环境应清洁、干燥,具有可提供充足自然和人工光源的组培室、车间或生产线。

4.2 布局平面示意图

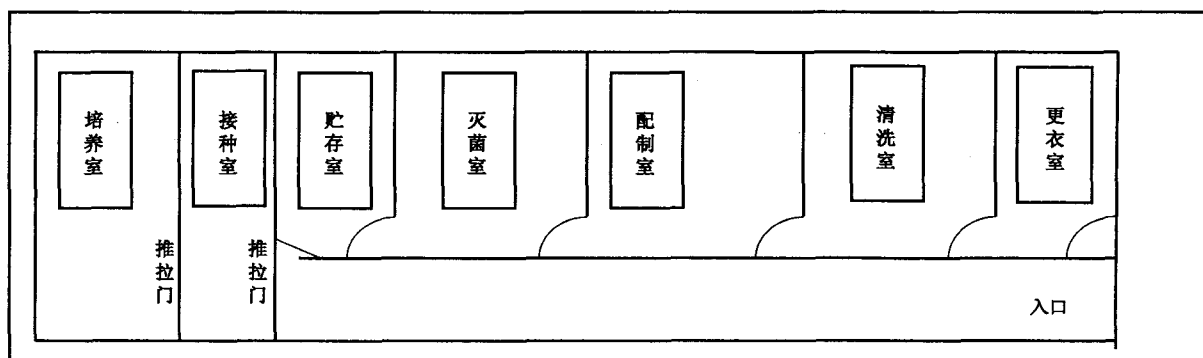


图 1 试管苗生产车间布局平面示意图

4.3 设备、试剂

试管苗生产的组培设备、试剂参见附录 A。

4.4 卫生要求

4.4.1 接种室、培养室应保持卫生,定期消毒,每周至少消毒一次。按照 40% 的甲醛和高锰酸钾 2 : 1 的比例,40% 的甲醛溶液 10 mL 倒入 5 g 高锰酸钾容器内(每立方米空间用量),进行熏蒸。密闭 1 d 后,通风。

4.4.2 接种前接种室应强制过滤通风。

4.4.3 每次使用超净工作台前,应提前 20 min 打开紫外灯。接种时关闭紫外灯打开风机,超净工作台面及内壁用 75% 乙醇擦拭消毒。

4.4.4 操作使用的所有工具,使用前应灭菌。操作过程中镊子、剪刀、解剖刀等工具,每次使用前接触植物材料的部分应灼烧消毒或插入高温灭菌器中灭菌,冷却后使用,避免交叉污染。

4.4.5 工作人员应穿消毒工作服,用肥皂洗净双手,操作过程中,手和工作台面要经常用 75% 的乙醇清擦。

4.4.6 若将温室作为培养室,在温室配备有降温水帘和风机,水帘外进风方向应加孔径 0.247 mm (60 目)网纱。温室内门口有缓冲间,在缓冲间应有消毒装置,可放入生石灰或其他消毒剂,工作人员进入时鞋底消毒。

4.4.7 发现污染及时清除。

5 茎尖脱毒与培养

5.1 脱毒材料的选取

5.1.1 田间选择

5.1.1.1 在土壤肥力中等的地块,于现蕾期至开花期选择生长势强、具备原品种典型性状的健康植株,做好标记。

5.1.1.2 生育后期到收获期,在已做标记的植株中进行薯块复选。选择无病斑、虫蛀、机械损伤而且皮色、肉色、薯形、芽眼等性状符合品种特征的幼龄薯,清洗泥土后催芽作为脱毒材料;或选取健康且具备品种典型性状植株的中、下部短枝茎尖或腋芽进行茎尖剥离。

5.1.2 病毒检测筛选

入选的块茎或植株,按照 GB 18133—2000 中附录 B 的方法检测类病毒(PSTVd);按照 GB 18133—2000 中附录 A 的方法检测病毒。筛选无类病毒(PSTVd)的块茎或植株作为茎尖脱毒基础材料;若检测到没有带病毒的块茎或植株,可直接剥较大的茎尖。其后可不经试种观察直接进行扩繁培养。

5.1.3 催芽处理和病毒钝化

5.1.3.1 块茎可通过自然方法出芽或通过人工方法(用 1%硫脲+5 mg/L 赤霉素的溶液浸种 5 min)打破休眠催芽。

5.1.3.2 自然出芽的情况下,块茎长出 2 cm~3 cm 的新芽。对含有 S 病毒、X 病毒的块茎需置于 37℃±1℃培养箱中处理 3 周~4 周,钝化病毒。

5.1.3.3 人工打破休眠催芽的情况下,可采用 0.1%多菌灵溶液浸泡 30 min 或 75%乙醇喷湿进行表面消毒,置于 25℃黑暗条件下催芽;或播种于含水量 20%灭菌细沙中发芽(水中含 5 mg/L 多菌灵),块茎长出 2 cm~3 cm 的新芽。对含有 S 病毒、X 病毒的块茎需置于 37℃±1℃培养箱中处理 3 周~4 周,钝化病毒。

5.2 茎尖培养

5.2.1 茎尖培养基的制备

5.2.1.1 茎尖培养基配方参见附录 B。

5.2.1.2 将制备好的茎尖培养基快速分装于容器中,用封口膜封口。

5.2.1.3 将盛有培养基的容器整齐排列于灭菌锅内,1.1 kg/cm²、121℃高压灭菌 20 min,冷却后在无菌贮存室放置 3 d~5 d,无污染的培养基放到超净工作台备用。

5.2.2 材料消毒

取经催芽处理和病毒钝化处理的块茎的顶芽、2 cm~3 cm 的侧芽,剪去外叶,用自来水冲洗 30 min 后,移入接种室进行严格消毒。先用 75%乙醇浸泡 30 s,再用 50 g/L 的漂白粉液浸泡 7 min~10 min 或 0.1%的氯化汞溶液浸泡 5 min~10 min,然后用无菌水冲洗 4 次~5 次。

5.2.3 茎尖剥离与接种

接种在超净工作台上操作。剥去外叶,借助 40×双目解剖镜,剥离茎尖直至露出半圆形光滑生长点,用解剖刀或解剖针从 0.1 mm~0.3 mm 处切,带 1 个~2 个叶原基。迅速接种于盛有茎尖培养基的容器中,进行离体培养。用酒精灯烤干容器口并封口,在容器上注明编号、品种名称、接种时间。

待看到明显伸长的小茎、叶原基形成可见的小叶时,转移到盛有 MS 培养基(配方参见附录 C)的容器内培养,培养成带 4 个~5 个叶片的试管苗。

5.2.4 培养条件

试管苗在温度 20℃~25℃、相对湿度 70%、光照强度 2 000 lx~3 000 lx 的条件下培养,光照时数 16 h/d。

6 病毒检测

6.1 将试管苗按瓶上的编号,在超净工作台内将每株的上部 1/3~1/2 茎段转入新的培养瓶中,编号不变。

6.2 同时再将植株下部 1/3~1/2 的茎段装入病毒检测的样品袋中。取样时样品不能粘有培养基。

6.3 检测方法按照 GB 18133—2000 的附录 A 执行。筛选出不含 PVX、PVY、PVS、PLRV、PVM、PVA 病毒的脱毒苗。

7 试种观察

经检测不带病毒的试管苗进行试种观察。将每个试管苗取出一部分移栽到防虫网棚,结出的小薯种植到田间试种观察,检验其是否发生变异,符合原品种的典型性状的脱毒苗即为核心苗。

8 基础苗培养

8.1 在超净工作台上对核心苗切段扩繁。将培养容器置于超净工作台上,瓶口用 75%乙醇擦拭消毒,用镊子取出核心苗,按单茎节切段,每个切段至少带 1 个叶片。

8.2 操作时将剪下的切段腋芽朝上插入 MS 培养基(配方参见附录 C)或其他脱毒苗扩繁培养基上(配方参见附录 D),用酒精灯烘烤瓶口,用封口膜封好,注明编号、品种名称和接种时间。

8.3 培养条件:置于温度 22℃、相对湿度 70%、光照强度 2 000 lx~3 000 lx、光照时数 16 h/d 的条件下培养。

9 基础苗保存

9.1 选择保存培养基(配方参见附录 E)保存基础苗。

9.2 将基础苗置于温度 13℃~16℃、相对湿度 70%、光照强度 3 000 lx、光照时数 10 h/d~14 h/d 的条件下使其缓慢生长,继代培养出一定数量的脱毒苗保存。

10 扩繁

10.1 常规扩繁

10.1.1 扩繁前检测基础苗是否带病毒(PVX、PVY、PVS、PLRV、PVM、PVA)和类病毒(PSTVd)。检测方法参照第 6 章执行。

10.1.2 选择用 MS 固体培养基(配方参见附录 C)或其他扩繁培养基(配方参见附录 D)。

10.1.3 将配制好的培养基装入容器中,每瓶加入 1/5 容量的培养基,用封口膜封口;置于 1.1 kg/cm² 灭菌锅 121℃ 高压灭菌消毒 20 min,取出后放置 3 d~5 d 待用。

10.1.4 检测合格的基础苗在超净工作台上切段扩繁。将培养容器置于超净工作台上,瓶口用75%乙醇擦拭消毒,用长把镊子取出脱毒苗,按单茎节切段,每个切段至少带1个叶片。

10.1.5 操作时将剪下的切段腋芽朝上插入培养基上,用酒精灯烘烤瓶口,用封口膜封好,注明编号、品种名称、接种时间。

10.1.6 培养条件为:白天23℃~25℃,夜间16℃~20℃,光照强度2 000 lx~3 000 lx,光照时数16 h/d,培养21 d~25 d。

10.1.7 待长出7片~8片叶片后可再次切段繁殖。脱毒苗一般间隔25 d左右继代繁殖一次。

10.2 水培扩繁

10.2.1 在温室中培育。培养基为1/4 MS液体培养基。

10.2.2 使用1 cm厚的泡沫板做支撑物。密度按3 cm×3 cm打孔,孔径为0.7 mm。

10.2.3 在切转操作时,将小苗的顶芽及基部剪掉,剪成带4个~5个叶片的茎段插入泡沫板中培养。

11 壮苗培养

11.1 扩繁的脱毒苗移植前,最后一次扩繁需接种到壮苗培养基(配方参见附录F)上培养。

11.2 置于温度22℃~25℃,光照2 000 lx~3 000 lx,光照时数18 h/d的条件下,培养至株高6 cm~7 cm准备定植。

附 录 A
(资料性附录)
组培设备、试剂

A.1 配制室

- A.1.1 防酸碱台面的试验台。
- A.1.2 冰箱。
- A.1.3 药品柜。
- A.1.4 器械柜。
- A.1.5 分析天平、0.1 g 感量天平、电子天平。
- A.1.6 酸度计。
- A.1.7 蒸馏水器。
- A.1.8 各种规格的容量瓶、细口瓶(包括棕色)、广口瓶、移液管、烧杯、量筒、玻璃棒、吸管、吸耳球、试剂勺等。
- A.1.9 大量的试管、锥形瓶及罐头瓶。
- A.1.10 不锈钢锅。
- A.1.11 电磁炉。

A.2 清洗室及灭菌室

- A.2.1 浸泡洗涤水槽和冲洗水槽。
- A.2.2 培养瓶控水架。
- A.2.3 300 ℃烘箱。
- A.2.4 高压灭菌锅。
- A.2.5 封口膜、线绳或橡皮筋。

A.3 接种室

- A.3.1 超净工作台。
- A.3.2 空调。
- A.3.3 培养基存放架。
- A.3.4 紫外灯。
- A.3.5 酒精灯。
- A.3.6 镊子、剪刀、手术刀、解剖针、解剖刀。

A.4 培养室

- A.4.1 有日光灯光源的培养架。
- A.4.2 紫外灯若干。
- A.4.3 空调。

A.4.4 加湿机。

A.4.5 温、湿度仪。

A.5 药品

A.5.1 甲醛。

A.5.2 氯化汞。

A.5.3 高锰酸钾。

A.5.4 漂白粉饱和溶液。

A.5.5 75% 乙醇。

A.5.6 激动素、吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA3)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、D-泛酸钙、奈乙酸(NAA)。

A.5.7 pH 试纸。

A.5.8 卡拉胶、琼脂、倍立凝。

A.5.9 蔗糖、食用白糖。

A.5.10 附录 B~附录 F 中的所有试剂。

附 录 B
(资料性附录)
茎尖培养基配方

表 B.1

母液成分	化学试剂	质量浓度		
		MS(1962) ^a	FAO(1986) ^b	CIP ^c
大量元素	硝酸钾(KNO ₃)	1 900 mg/L	1 900 mg/L	1 900 mg/L
	硝酸铵(NH ₄ NO ₃)	1 650 mg/L	1 650 mg/L	1 650 mg/L
	氯化钙(CaCl ₂ · 2H ₂ O)	440 mg/L	440 mg/L	440 mg/L
	硫酸镁(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	370 mg/L	500 mg/L	370 mg/L
	磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	170 mg/L	170 mg/L	170 mg/L
铁盐	硫酸亚铁(FeSO ₄ · 7H ₂ O)	27.8 mg/L	27.8 mg/L	27.8 mg/L
	乙二胺四乙酸二钠(Na ₂ · EDTA)	37.3 mg/L	37.3 mg/L	37.3 mg/L
微量元素	硫酸锰(MnSO ₄ · 4H ₂ O)	22.3 mg/L	0.5 mg/L	22.3 mg/L
	硼酸(H ₃ BO ₃)	6.2 mg/L	1.0 mg/L	6.2 mg/L
	硫酸锌(ZnSO ₄ · 4H ₂ O)	8.6 mg/L	1.0 mg/L	8.6 mg/L
	碘化钾(KI)	0.83 mg/L	0.01 mg/L	0.83 mg/L
	硫酸铜(CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.025 mg/L	0.03 mg/L	0.025 mg/L
	氯化钴(CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025 mg/L		0.025 mg/L
	钼酸钠(Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25 mg/L		0.25 mg/L
有机成分	烟酸	0.5 mg/L	1.0 mg/L	0.5 mg/L
	肌醇	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
	硫酸盐腺嘌呤		80 mg/L	0.25 mg/L
	泛酸钙		0.5 mg/L	2.0 mg/L
	甘氨酸	2.0 mg/L		2.0 mg/L
	盐酸硫胺素(维生素 B ₁)	0.5 mg/L	1.0 mg/L	0.5 mg/L
	盐酸吡哆素(维生素 B ₆)	0.5 mg/L	1.0 mg/L	0.5 mg/L
激素	生物素		0.2 mg/L	
	激动素	0.04 mg/L~ 1.0 mg/L		
	吲哚乙酸	1 mg/L~3.0 mg/L		
糖	蔗糖	30 g	20 g	30 g
其他	琼脂	6 g	8 g	6 g

^a 茎尖培养基为 MS 培养基加激素。

^b 联合国粮农组织推荐的茎尖培养基配方。

^c 国际马铃薯中心的茎尖培养基配方。

附 录 C
(资料性附录)
MS 培养基配方

表 C.1

母液成分	化学试剂	质量浓度/(mg/L)
大量元素	硝酸铵(NH_4NO_3)	1 650
	硝酸钾(KNO_3)	1 900
	氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440
	硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370
	磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	170
微量元素	碘化钾(KI)	0.83
	硼酸(H_3BO_3)	6.2
	硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.3
	硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6
	钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25
	硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
	氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
铁盐	硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8
	乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.3
有机成分	肌醇	100
	烟酸	0.5
	盐酸吡哆素(维生素 B_6)	0.5
	盐酸硫胺素(维生素 B_1)	0.1
	甘氨酸	2.0

注 1: MS 固体培养基为 MS 培养基+30 g/L 蔗糖+琼脂 6 g/L(卡拉胶 4.5 g/L), pH 为 5.6~5.8。

注 2: 铁盐母液的配制: 两种试剂分别称量并分别加热溶解, 待两种试剂均溶解后混合, 混合后的溶液继续加热使其充分整合, 冷却后定容备用。

附 录 D
(资料性附录)
扩繁培养基配方

表 D.1

母液成分	化学试剂	质量浓度
大量元素	硝酸钾(KNO_3)	1 900 mg/L
	硝酸铵(NH_4NO_3)	1 650 mg/L
	磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	170 mg/L
	氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440 mg/L
	硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370 mg/L
微量元素	硼酸(H_3BO_3)	6.2 mg/L
	硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.3 mg/L
	钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25 mg/L
	硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	8.6 mg/L
	碘化钾(KI)	0.83 mg/L
	硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025 mg/L
	氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025 mg/L
铁盐 [*]	硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8 mg/L
	乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.3 mg/L
其他	蔗糖	25 g/L
	倍力凝	4.5 g/L~5 g/L
注 1: 本配方 pH 为 5.6~5.8。 注 2: 可用卡拉胶或琼脂替代倍力凝。		
[*] 铁盐母液的配制: 两种试剂分别称量并分别加热溶解, 待两种试剂均溶解后混合, 混合后的溶液继续加热使其充分螯合, 冷却后定容备用。		

附 录 E
(资料性附录)
保存培养基配方

表 E.1

母液成分	化学试剂	质量浓度
大量元素	硝酸钾(KNO_3)	1 900 mg/L
	硝酸铵(NH_4NO_3)	1 650 mg/L
	磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	170 mg/L
	氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440 mg/L
	硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370 mg/L
微量元素	硼酸(H_3BO_3)	6.2 mg/L
	硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.3 mg/L
	钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25 mg/L
	硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	8.6 mg/L
	碘化钾(KI)	0.83 mg/L
	硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025 mg/L
	氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025 mg/L
铁盐	硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8 mg/L
	乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.3 mg/L
有机成分	盐酸吡哆素(维生素 B_6)	0.5 mg/L
	盐酸硫胺素(维生素 B_1)	0.4 mg/L
	甘氨酸	2.0 mg/L
	烟酸	0.5 mg/L
其他	生长抑制剂	6.0 mg/L~8.0 mg/L
	倍力凝	4.5 g/L~5 g/L
	蔗糖	25 g/L
注 1: 本配方 pH 为 5.6~5.8。		
注 2: 可用卡拉胶或琼脂替代倍力凝。		

附 录 F
(资料性附录)
壮苗培养基配方

F.1 MS+30 g/L 食用白糖,液体培养,pH 5.8。

F.2 MS 双倍大量元素+微量元素+30 g/L 食用白糖,液体培养,pH 5.8。

F.3 MS 无机成分+0.4 mg/L 维生素 B₁+30 g/L 食用白糖+4.2 g/L 卡拉胶+5.0 mg/L~8.0 mg/L 维生素 B₉,pH 5.8。
