|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.20 |
| CCS | B05 |

|  |
| --- |
| 4107 |

新乡市地方标准

DB 4107/T XXXX—2025

甘薯茎尖组织培养及脱毒试管苗继代扩繁技术规程

点击此处添加标准名称的英文译名

2024 - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

       发布

1. 前言

本文件按照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。

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专利的责任。

本文件由新乡市农业农村局提出并归口。

本文件起草单位：新乡市农业科学院、河南亿博种苗现代农业科技有限公司

本文件主要起草人：胡晓强、刘学圣、李军利、霍建中、赵治军、金玉蔓、许昕、张梦娟

甘薯茎尖组织培养及脱毒试管苗继代扩繁技术规程

* 1. 范围

本标准规定了甘薯茎尖脱毒、脱毒苗的继代扩繁、试管苗的抽样检测的内容和技术要求。

本标准适用于新乡地区甘薯茎尖组织培养及脱毒试管苗的继代扩繁。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

NY/T 1200--2006 甘薯脱毒种薯

NY/T 402--2016 脱毒甘薯种薯（苗）病毒检测技术规程

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

外植体

外植体是指由活体植物上切取下来，用以进行离体培养的器官、组织、细胞。在本标准中，特指在生产上具有推广应用价值甘薯品种的藤蔓茎段。

脱毒试管苗

采用茎尖剥离技术获取的，符合NY/T 1200--2006规定的试管苗。

* 1. 甘薯茎尖脱毒技术
     1. 外植体选择

选取符合原品种特征特性的单株作为脱毒外植体。

* + 1. 外植体消毒

消毒前外植体茎段先用自来水冲洗30 min，在无菌条件下，用75%酒精消毒30 s，再将芽段置入1%次氯酸钠溶液消毒3～5 min，无菌水冲洗3～5遍，备用。

* + 1. 茎尖的剥离
       1. 操作前准备

在剥离茎尖前，所有器具用75%酒精均匀擦拭消毒，打开超净工作台紫外灯30 min，工作人员用肥皂清洗手臂，更换已消毒的工作服、工作鞋，戴无菌手套，关闭紫外灯，用75%酒精严格擦拭双手后进行操作。

* + - 1. 茎尖的剥离

在超净工作台上，将茎段在40倍解剖镜下，用解剖针剥取长度0.2 mm～0.5 mm，带1～2个叶原基的生长点。

* + 1. 茎尖组织培养
       1. 茎尖分生组织培养基

MS培养基（配置方法见附录A）每升添加6-苄基腺嘌呤（6-BA）1.2 mg、萘乙酸（NAA）0.1 mg，蔗糖30 g，琼脂7 g。

* + - 1. 接种

将剥离的生长点接种于茎尖分生组织培养基中。

* + - 1. 培养条件

在温度25℃～28℃条件下暗培养7 d，然后在光强2000 Lx光照16 h/d条件下进行茎尖组织培养，40 d～50 d后，茎尖成苗。

* + - 1. 病毒检测

每个茎尖分生组织培养系应开展病毒检测，检测程序符合NY/T 402--2016。

* 1. 脱毒试管苗的继代扩繁

经试种证明未发生变异的脱毒试管株系可用于扩繁。

* + 1. 试管苗的转接

在超净工作台上，将培养30 d～40 d已形成5-8片展开叶的甘薯脱毒试管苗进行切段，每段保留一叶一节，按照植物生长方向扦插在固体MS培养基上，置于培养室或培养箱内培养。

* + 1. 试管苗培养条件

培养室（培养箱）温度为25℃±2℃，光照强度为2000 Lx～3000 Lx。每日光照12 h～16 h，相对空气湿度70%～80%，并做好培养室内环境的日常消毒工作。

* 1. 试管苗的抽样检测
     1. 抽样方法

保护地扩繁前，按NY/T 402--2016中的方法抽样检测病毒。

* + 1. 病毒检测

方法同4.4.4。

2. （资料性）  
   培养基配制方法
   1. 仪器和设备

高压灭菌锅、冰箱、双目实体解剖镜、天平、酸度计、电热炉、不锈钢锅、量筒、移液器、烧杯、玻璃棒和滴管、组培瓶、耐高温封口膜或瓶盖、手术剪、手术刀、解剖针、镊子

* 1. 试剂

茎尖组织培养所用试剂为分析纯级别，试管苗增殖阶段所用试剂为分析或化学纯级别，培养基用水为蒸馏水。

MS培养基母液成分及含量（mg/L）:

大量元素：硝酸钾1900，硝酸铵1650，硫酸镁370，磷酸二氢钾170，；氯化钙440；

微量元素：硫酸锰22.3，硫酸锌8.6，硼酸6.2，碘化钾0.83，钼酸钠0.25，硫酸铜0.025，氯化钴0.025；

铁盐：乙二胺四乙酸二钠37.3，硫酸亚铁27.8

有机物：甘氨酸2.0，盐酸硫胺素（VB1）0.4，盐酸吡哆醇（VB6）0.5，烟酸0.5，肌醇100

酒精、次氯酸钠、盐酸、氢氧化钠、6-苄氨基腺嘌呤（6-BA）、萘乙酸（NAA）、赤霉素）（GA3）

蔗糖、白糖、琼脂

* 1. 培养基类型
     1. 茎尖诱导培养基

MS+6-BA 0.10 mg/L+NAA 0.05 mg/L，蔗糖30 g/L，琼脂7 g/L。

* + 1. 固体MS培养基

MS，白糖/蔗糖30 g/L，琼脂7 g/L。

* 1. 培养基及配制操作步骤
     1. MS培养基母液配制

配制MS培养基母液使用的水质为蒸馏水。

大量元素母液配制：按100倍的用量分别城区各大量元素，先单独定容配制成母液。每升培养基取各种母液10 mL。

微量元素母液配制：按100倍的用量分别称取各微量元素，单独溶解，再混合、定容。每升培养基取此母液10 mL。

铁盐配制：按100倍用量分别称取两种试剂，单独加热煮沸、再混合，混合后的溶液继续加热使之充分螯合，冷却后定容备用。每升培养基用铁盐母液10 mL。

有机物配制：以100倍用量分别称量，分别溶解，再混合定容。每升培养基取此母液10 mL。

* + 1. 植物激素母液配制
       1. 萘乙酸NAA配制

按0.1 mg/L浓度适量称取萘乙酸，先用少许95%酒精使之溶解，再用蒸馏水定容，置于4℃冰箱贮藏备用。

* + - 1. 6-苄氨基腺嘌呤6-BA配制

按1.2 mg/L浓度适量称取6-苄氨基腺嘌呤，用少许HCL使之溶解，再用蒸馏水定容，置于4℃冰箱贮藏备用。

* + 1. MS培养基配制方法
       1. 溶化琼脂

按需量称取琼脂入不锈钢锅内，加入所需配制培养基体积一半的水，加热溶化琼脂备用。

* + - 1. 加母液

将制备好的各种母液、糖加到溶解好的琼脂液中，继续加热并搅拌，待糖溶解，加水至所需配制培养基体积，搅拌均匀。

* + - 1. 调pH值

用酸度计或精密pH试纸测量所配制培养基的pH值，加0.1 mol/L的HCL或NaOH溶液调节培养基pH值在5.8-6.0之间。

* + - 1. 分装

趁热将培养基分装于培养瓶内，用耐高温封口膜或瓶盖封口，灭菌。

* + - 1. 高压灭菌

排出冷空气后，用高压灭菌锅加热至121℃，0.11 MPa，灭菌20 min～30 min，待灭菌锅气压降至0 MPa后，将培养基转移至接种室，平置冷凝，备用。

