|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.20 |
| CCS | B 05 |

|  |
| --- |
| 14 |

山西省地方标准

DB14/T XXXX—2023

代替 DB14/T 1515-2017

食用百合脱毒试管苗繁育技术规程

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

山西省市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc161993057)

[1 范围 1](#_Toc161993058)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc161993059)

[3 术语和定义 1](#_Toc161993060)

[4 生产设施和仪器设备 1](#_Toc161993061)

[5 培养基 2](#_Toc161993062)

[6 环境消毒和无菌操作 2](#_Toc161993063)

[7 脱毒母株的获取 3](#_Toc161993064)

[8 脱毒试管苗鳞茎的诱导和增殖 3](#_Toc161993065)

[9 脱毒试管鳞茎生根 4](#_Toc161993066)

[10 脱毒试管鳞茎的移栽 4](#_Toc161993067)

[11 生产档案 4](#_Toc161993068)

[附录A（资料性） 生产档案记录表 5](#_Toc161993069)

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。

本文件代替DB14/T 1515—2017《食用百合脱毒试管苗繁育技术规程》，与DB14/T 1515—2017相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下:

——增加了规范性引用文件“GB/T 8321.10-2018 农药合理使用准则”（见2，2017版的2）

——增加了茎尖脱毒培养定义（见3.1）

——更改了本文件的适用范围，将适用于食用百合脱毒试管苗的繁育更加明确为适用于茎尖脱毒培养方法生产食用百合脱毒试管苗的繁育（见1，2017版的1）

——更改了茎尖组织培养为茎尖脱毒培养（见3.2，2017版的3.1）

——更改了肉质叶鞘膨大为鳞片抱合（见3.4，2017版的3.3）

——增加了所用植物生长调节剂6-BA、ZT、NAA、IBA的具体名称、成分、剂型（见5.2，2017版的5.2）

——增加了使用商品MS培养基时，培养基的制备方法（见5.3）

——增加了6.1中多菌灵的剂型和用量（见6.1，2017版的6.1）

——增加了11生产档案（见11）

——增加了附录（见附录A）

本文件由山西省农业农村厅提出、组织实施和监督检查。

本文件由山西省市场监督管理局对标准的组织实施情况进行监督检查。

本文件由山西省农业标准化技术委员会（SXS/TC19）归口。

本文件起草单位：山西农业大学。

本文件主要起草人：赵娟、温银元、尹美强、张彬、宋喜娥、董淑琦、原向阳、王玉国、郭平毅。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2017年首次发布为DB14/T 1515—2017；

——本次为第一次修订。

食用百合脱毒试管苗繁育技术规程

* 1. 范围

本文件规定了食用百合脱毒试管苗（鳞茎）繁育的生产设施和仪器设备、培养基、环境消毒和无菌操作、脱毒母株的获取、脱毒试管苗鳞茎的诱导和增殖、脱毒试管鳞茎生根及脱毒试管鳞茎的移栽。

本文件适用于茎尖培养脱毒方法生产食用百合脱毒试管苗的繁育。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中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。

GB/T 8321 农药合理使用准则

NY/T 1491-2007 花卉植物病毒检测规程

NY/T 1744-2009 切花百合脱毒种球

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

茎尖培养脱毒

用植株茎尖组织培养获得脱病毒植株的过程。

脱毒试管苗

在无菌条件下，应用茎尖脱毒培养技术获得，不带LSV（百合无症病毒）、CMV（黄瓜花叶病毒）、LMoV（百合斑驳病毒）病毒，在封闭容器内繁殖的种苗。

鳞片

着生在鳞茎盘上的叶基或者叶鞘膨大而成的变态叶。

鳞茎

在短缩茎盘上由鳞片抱合而成的变态器官。

脱毒试管鳞茎

无菌条件下，在封闭培育容器内由脱毒试管苗诱导形成的鳞茎。

籽球

通过组培苗或鳞片繁殖形成的周长小于3 cm的小鳞茎。

* 1. 生产设施和仪器设备
     1. 生产设施

准备室、无菌室、培养室、检测室、温室等。

* + 1. 主要仪器设备

超净工作台、压力蒸汽灭菌锅、鼓风干燥箱、光照培养箱、冰箱、体式显微镜（双筒解剖镜）、自动控时器、温湿度计、酶标仪、高速冷冻离心机、PCR仪、电子天平、磁力搅拌器、移液枪、各种培养容器等。

* 1. 培养基
     1. MS 培养基母液的配制

MS培养基为基本培养基，母液按照MS培养基标准成分配制（如使用商品MS培养基粉则可省略此步骤）。配制时，大量元素、微量元素、铁盐各成分依次加热溶解后混合，冷却后定容（铁盐需装入棕色试剂瓶），4 ℃冰箱保存。

* + 1. 植物生长调节剂的配制

培养基中所用植物生长调节剂符合GB/T 8321.10-2018的规定，包括 6-BA(6-苄基腺嘌呤，C12H11N5，纯粉剂)、KT(玉米素，C10H13N5O，纯粉剂)、NAA（萘乙酸，C12H10O2，纯粉剂）、IBA（3-吲哚丁酸，C12H13NO2，纯粉剂）。配制时，用1 mL～2 mL 95%乙醇溶解IBA和NAA，用0.1 mol/L的HCl溶解6-BA和KT，配制成浓度为0.5 mg/mL或1 mg/mL的容液，贮于棕色试剂瓶中，4 ℃冰箱保存。

* + 1. 培养基的制备

将MS培养基母液按量加入量筒中，再依据不同培养阶段要求加入不同的植物生长调节剂（见7、8、9），定容后加入糖和琼脂加热溶解，用0.1 mol/L的HCl或NaOH调节pH值至5.6～5.8，分装于容器中封口，高压蒸汽灭菌锅灭菌。灭菌工作压力稳定在1.1 kg/cm2 （0.105 MPa），温度为121 ℃，灭菌时间20 min，灭菌后冷却备用。

使用商品MS培养基粉时，依据不同产品标注用法，称取指定量MS培养基粉，定容于蒸馏水中，加入上述植物生长调节剂、蔗糖和琼脂，溶解和灭菌方法同上。

* 1. 环境消毒和无菌操作
     1. 环境消毒

接种前无菌室和超净工作台紫外灯照射消毒30 min，75%乙醇喷雾降尘。日常地面消毒可用有效氯含量5%～6%的次氯酸钠溶液 500 mg/L～1 000 mg/L，或将27 g/L～33 g/L苯扎溴铵溶液稀释10倍，或用50%多菌灵可湿性粉剂400倍液等交替使用。

接种服、工作帽、口罩、拖鞋等在消毒柜中消毒或用紫外灯照射消毒。操作所用镊子、解剖刀、解剖针、培养皿等均需用纱布或牛皮纸包裹后高压蒸汽灭菌。

* + 1. 无菌操作

工作人员进入无菌室前需用肥皂清洗手臂，穿好消毒过的接种服、工作帽、口罩和拖鞋（鞋套）。操作时用75%乙醇仔细擦拭双手、超净工作台台面。在操作过程中镊子、接种刀等接种工具要重复进行灭菌。

* 1. 脱毒母株的获取
     1. 外植体

选择外观无病毒症状的植株，以其饱满、无病虫害、无损伤的健康鳞茎为脱毒培养材料，取中心茎尖为外植体。

* + 1. 鳞茎灭菌

用自来水冲洗鳞茎表面泥土，剥离鳞茎外层鳞片，以周长小于1 cm的鳞茎为外植体，放入烧杯中，移至超净工作台上，先用75%乙醇（酒精）浸泡10 s～30 s，再用10% NaClO灭菌处理12 min，用无菌水冲洗4～5次，再用无菌滤纸吸去表面水分，置于无菌培养皿中备用。

* + 1. 茎尖剥离

将灭过菌的鳞茎置于40倍体式显微镜（双筒显微镜）下，用解剖针由外向内剥去鳞片，露出光滑茎尖，用解剖刀切取0.5 mm～1 mm的茎尖，接种于 MS+6-BA 0.5 mg/L～1.5 mg/L+NAA 0.1mg/L+3%蔗糖培养基中，封口后在培养瓶壁上标注编号、接种日期等。

* + 1. 茎尖培养

接种后将培养瓶置于培养室内光照培养架上培养。培养条件为温度(25±2)℃，光照强度2 000 Lx～3 000 Lx，光照时间 14 h/d～16 h/d。培养 30 d～40 d ，茎尖明显伸长呈绿色，继续培养茎尖萌动成苗。

* + 1. 试管苗病毒检测

随机挑选百合茎尖脱毒苗，按照NY/T 1491-2007中5.10的规定对LSV、CMV和LMoV 3种病毒进行检测，检测方法可用DAS-ELISA或者RT-PCR法，按照NY/T 1491-2007中6和NY/T 1744-2009中的5.1、5.2、6.1、6.2和6.3的规定执行。

* 1. 脱毒试管苗鳞茎的诱导和增殖
     1. 脱毒试管苗鳞茎的诱导

病毒检测后获得的脱毒百合试管苗培养30 d后，将增殖的芽丛切下，转入鳞茎诱导培养基。培养基成分为1/2MS基本培养基，附加NAA0.5 mg/L～1.0 mg/L，蔗糖浓度为60 g/L～100 g/L，pH5.6～5.8。30 d～40 d后分化出小鳞茎。培养条件为培养温度（25±2）℃，光照强度2 000 Lx～3 000Lx，光照时间14 h/d～16 h/d。

* + 1. 脱毒试管鳞茎扩繁

将诱导产生的试管鳞茎接种于MS+6-BA 0.2 mg/L～1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L～0.5 mg/ L+6%～10%蔗糖培养基中，诱导小鳞茎增殖。培养30 d～40 d后，再转接于MS+ZT 1.0 mg/L～3.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L～1.0 mg/L+8%～10%蔗糖培养基中，诱导鳞茎增殖膨大，获得健壮鳞茎，用于生根培养。培养条件同8.1。

* 1. 脱毒试管鳞茎生根
     1. 试管鳞茎生根

将增殖培养获得的脱毒鳞茎接种于1/2MS+NAA 0.1 mg/L～0.5 mg/L+6%～10%蔗糖培养基中，诱导鳞茎生根。培养条件为温度（22±2）℃，光照强度2000 lx～3000 lx，光照时间14 h/d～16 h/d。

* + 1. 试管鳞茎出瓶标准

试管内生根鳞茎直径达到0.5 cm～1 cm。

* + 1. 病毒检测

脱毒试管鳞茎的抽样和病毒检测同7.5。

* 1. 脱毒试管鳞茎的移栽
     1. 炼苗

移栽前将达到出瓶标准的试管鳞茎放置于培养室黑暗处10 d～15 d，移栽前1周置于温室闭瓶炼苗，移栽前2 d～3 d温室开瓶炼苗。

* + 1. 移栽基质

移栽基质用蛭石、沙、土1：2：3比例混合均匀，或用腐叶土、蛭石1：1比例混合基质，基质厚度10 cm～15 cm。

* + 1. 移栽技术

温室移栽时，用清水将试管鳞茎根部培养基洗净，植入移栽基质中，种植密度为100 粒/m2 ～140 粒/m2 。移栽后，移栽基质浇透水，并在其上搭建小拱棚，覆盖塑料薄膜和遮阳网，4周后去遮阳网，有新叶长出后去塑料薄膜。移栽成活后，可作为脱毒籽球进行田间繁育或直接定植于大田栽培。5月～8月移栽可直接在大田进行，移栽步骤同温室移栽。

* 1. 生产档案

建立并保存相关记录，详细记录母液配制时间、培养基制备时间、接种时间、接种人及污染情况等，并归档保存2年以上，生产档案记录表见附录A。

2. （资料性附录）  
   生产档案记录表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 内容 | 母液配制时间 | 培养基时间 | 接种时间 | 接种人 | 污染统计 |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

