

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY393-2023

香芋脱毒种苗生产技术规程

Technical regulations for production of virus-free taro seedlings

2023-06-28 发布

2023-06-28 实施

湖南省农业农村厅发布

目 次

前 言.....	1
1 范围.....	2
2 规范性引用文件.....	2
3 术语和定义.....	2
4 材料选择与处理.....	2
5 培养基的配制.....	3
6 培养.....	3
7 培养室环境调控.....	5
8 无毒苗繁育.....	5
9 生产档案.....	6
附录 A（规范性附录）MS 培养基母液配制.....	7
附录 B（资料性附录）PCR 法检测病毒病.....	8
附录 C（规范性附录）香芋病虫害防治.....	9
附录 D（资料性附录）病虫害防治档案.....	10

前 言

本文件按照《湖南省农业技术规程制修订与发布管理规范》相关规定起草。

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这些专利的责任。

本文件由湖南省农业农村厅提出，省农业农村标准化技术委员会技术归口。

本文件主要起草单位：湖南省蔬菜研究所，株洲市农业科学研究所，江永县农业农村局，广西壮族自治区农业科学院生物技术研究所。

本文件起草人：杨建国，李倩，汪端华，吴双花，王鑫，宋志伟，周运文，江文，高美萍，
蒋慧萍。

香芋脱毒种苗生产技术规程

1 范围

本文件规定了香芋脱毒种苗生产过程中的术语和定义、材料选择与处理、培养基的配制、培养、培养室环境调控、无毒苗繁育、生产档案等技术要求。

本文件适用于香芋脱毒种苗生产。

2 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 4285 农药安全使用标准

GB/T 8321 农药合理使用准则

NY/T496 肥料合理使用准则通则

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分：实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 2964 植物病毒检测规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 外植体 explant

外植体是生长健壮的无病虫的香芋块茎上的茎尖。

3.2 接种 inoculation

在无菌条件下将表面灭菌后的外植体或继代、生根组培材料接入培养基的过程。

4 材料选择与处理

4.1 材料选择

选择健壮、生长旺盛、无病毒危害症状的母芋为茎尖脱毒材料。

4.2 母芋催芽

母芋用 50%多菌灵 800 倍液处理 7 d~10 d，在细沙或珍珠岩中催芽。

5 培养基的配制

5.1 MS 培养基的配制

5.1.1 母液的配制

直接用合成 MS 培养基或按照附录 A 的成分表配制 MS 大量元素母液、微量元素母液、有机母液、铁盐母液，应符合 SN/T 1538.1 的规定。

5.1.2 MS 培养基配制方法

先在烧杯中放入适量蒸馏水，加入琼脂粉 6 g~7 g 搅拌均匀，置于电炉上加热；依次加入上述母液或 MS 培养基，其中大量元素 20 mL，其他母液各 5 mL，蔗糖 30 g；边加热边搅拌至完全溶解；加蒸馏水定容至 1 L；调节 pH 至 5.7~5.9；根据不同需要定量分装，盖好瓶盖；分装好的培养基置于灭菌锅内 120℃ 高压灭菌 20 min；放置 5 d~7 d，检验培养基灭菌效果。培养基贮存时间不超过 30 d。

5.2 初代培养基的配制

在 MS 培养基的基础上，加入激素 NAA 0.15 mg/L、6-BA 4.0 mg/L 和山农 1 号 1 mL/L，再灭菌，其操作同 5.1.2。

5.3 增殖培养基的配制

在 MS 培养基的基础上，加入激素 NAA 0.4 mg/L、6-BA 4.0 mg/L 和山农 1 号 1 mL/L，再灭菌，其操作同 5.1.2。

6 培养

6.1 茎尖接种

6.1.1 材料器械准备

接种前准备酒精灯、75%酒精、NaClO、无菌滤纸或接种盘以及接种器械、培养基、体视显微镜、外植体、无菌水等。

6.1.2 灭菌

提前 30 min 打开超净工作台紫外灯，紫外灭菌完后，打开风机和照明灯。

6.1.3 接种人员准备

接种人员在准备室消毒后在更衣室更换拖鞋、穿白大褂、戴上帽、口罩后方可进入接种室。

6.1.4 接种前准备

操作人员用 75%酒精喷或擦手，在操作台内自然吹干后点酒精灯，全程操作须带手套。

6.1.5 外植体的消毒灭菌

用解剖刀切下外植体，用 75%酒精表面消毒后转入超净工作台。将芽段放入灭菌后的烧杯内，用 75%酒精浸泡 30 s~45 s，无菌水冲洗 2 次~3 次，10% NaClO 溶液浸泡 8 min~10 min，用无菌水冲洗 3 次~4 次。

6.1.6 茎尖剥离及接种

用无菌滤纸吸干消毒的香芋芽段水分，在 30 倍~40 倍体视显微镜下用无菌的解剖针剥取带一个叶原基的茎尖，大小 0.2 mm~0.5 mm，将茎尖迅速接入初代培养基中，每瓶接入 1 个，分别编号登记。

6.2 继代培养

60 d~80 d 后成苗，待苗长至 2 cm~3 cm 时，整株取出转接继代培养，每瓶接种 3 株。

6.3 病毒检测

6.3.1 主要检测对象

烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV)和芋花叶病毒(Dasheen mosaic virus, DsMV)，引物见表 1。

表 1 病毒病检测引物序列

病害	正向引物	反向引物	目的片段
CMV	CCCCTCTTAACCACCCAACC	GACGCAGCATACTGATAAACCAA	323
TMV	TAGACCCGCTAGTCACAG	CAGAGGTCCAAACCAAAC	237
DsMV	GGGCTTGGGTGATGATGGA	GCCTTTCAGTGTTCTCGCCTTG	357

6.3.2 检测方法

采用 PCR 法对脱毒的香芋组培苗进行病毒检测，确认不带病毒的株系，进一步继代培养，符合 SN/T 2964 的规定。

6.4 无毒苗增殖培养

无毒苗培养 40 d~50 d，长出 3 个~6 个丛生芽，取丛生芽进行增殖培养，增殖培养周期为 25 d~35 d，增殖 3~6 倍，连续继代不超过 10 次。

6.5 病毒检测

病毒检测见附录 B。

7 培养室环境调控

温度控制在 $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ；相对湿度为 40%~60%；光照强度为 800 lx ~1200 lx，光照培养周期为 12 h/12 h。

8 无毒苗繁育

8.1 生根培养

无毒苗生长到 3.0 cm~5.0 cm 时，切繁并保持每株至少有一个不定芽，用生根培养基在温度为 $28\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，湿度为 70%~85%，光照时间为 14 h/d，光照强度为 800 lx ~1200 lx，生根培养 15 d~20 d，获得生根的无毒幼苗。

8.2 炼苗

移栽前 7 d ~10 d，将无毒苗带瓶放入常温环境中，使其适应外界环境条件，移栽前 1 d 打开瓶盖。炼苗宜于 4 月中下旬~5 月上旬进行。

8.3 苗床准备

选用 2 年~3 年内未种过香芋、土壤肥沃、耕层深厚、排灌方便的无病田块。

8.4 移栽

取出无毒苗，冲洗多余的培养基。移栽株行距宜为 30 cm×50 cm，种于苗床中，用 50%多菌灵 800 倍液浇透根部土壤，搭小拱棚盖上遮阳网。1 周~2 周后揭开遮阳网，苗期保持棚温 $15^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ，基质含水量 80%~90%。

8.5 苗床管理

8.5.1 温度管理

生长前期温度控制在 25°C 以下，后期温度控制在 $25^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ 。温度高于 30°C 时，应覆盖遮阳网或采取喷水降温。

8.5.2 水分管理

晴天早晚可轻浇小水，阴天根据土壤温度、水分情况 3 d~4 d 浇水 1 次，水分控制在 60%。

8.5.3 养分管理

7 月下旬，每 667m² 苗床撒施 45% 硫酸钾复合肥 30kg。施肥应符合 NY/T 496 的规定

8.6 收获与留种

8.6.1 收获

11 月上中旬收获。收获前 20 d 不浇水，保持土壤干爽。

8.6.2 留种

采收健康子芋，分类储藏，翌年做种。也可在母芋收获后，将健壮子芋留田越冬，翌年采收播种育苗或培育自生苗。

9 生产档案

参见附录 D。

附录 A

(规范性)

表 A1 MS 培养基母液配制

母液种类	成分	称取量(mg/L)	扩大倍数	母液体积 (L)	吸取量 (mL/L)
大量元素	KNO ₃	1900	50×	1	20
	NH ₄ NO ₃	1650			
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370			
	KH ₂ PO ₄	170			
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	50×	1	20
微量元素	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.23	200×	1	5
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860			
	H ₃ BO ₃	6.2			
	KI	0.83			
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.25			
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025			
	CoCl · 6H ₂ O	0.025			
铁盐	Na ₂ -EDTA	37.3	200×	1	5
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8			
维生素	甘氨酸	2	200×	1	5
	盐酸吡哆醇 (B1)	0.1			
	盐酸硫胺素 (B6)	0.5			
	烟酸	0.5			
	肌醇	100			
	IBA	0.005			
	MET	0.005			

附录 B (资料性)

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法检测病毒病

B1 香芋病毒病检测

应用 PCR 法检测香芋脱毒苗是否带有烟草花叶病毒(TMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)和芋花叶病毒(DsMV)等主要香芋病毒。

B2 仪器和设备

病毒病检测主要仪器设备包括电泳仪、电泳槽、转数为 3 000r/min 以上的离心机、1.5mL~2mL, 50 μ L 离心管、冰箱、高温水浴、微量可调进样器, 需要 2 μ L~10 μ L, 10 μ L~50 μ L, 10 μ L~200 μ L 三种规格, 并附有相应规格的塑料头、玻璃或白瓷制造的小研钵、PCR 扩增仪、凝胶成像系统等。

B3 试剂

主要试剂包括植物 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、5 \times PrimeScript II Buffer、dNTP、2.5units/ μ L Taq DNA 聚合酶、10 \times Buffer、TAE 缓冲液等。

B4 RNA 提取

取 1g~2g 香芋脱毒组培苗, 放入液氮预冷的研钵中, 加入液氮迅速研磨成粉末, 放入备好的离心管中, RNA 提取参照试剂盒说明书进行, 提取 RNA 后马上进行反转录或放于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

B5 cDNA 合成

参照说明书, 利用反转录试剂盒合成 cDNA。

B6 PCR 扩增

B6.1 反应体系 (总体积 20L)

PCR 反应体系为: 10 \times Buffer 2.0 μ L; dNTP (2mmol/L) 1.5 μ L; Primer (2 μ mol/L) 1.5 μ L; 模板 DNA 4.0 μ L; Taq (2.5units/ μ L) 1U; 加 ddH₂O 至 20 μ L。

B6.2 扩增反应程序

PCR 扩增反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s 运行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

B7 电泳检测与分析

PCR 反应完毕, 短暂离心 10s, 取 6-8 μ L 反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选择 DNA Marker 500-1000 作参照。

附录 C
(规范性)
香芋病虫害防治

表 C1 病虫害防治一览表

防治对象	防治农药	施用方法	防治时期	安全间隔期(d)
疫病	75%代森锰锌800倍液或10%甲霜灵200倍液	喷雾	发病前期或初期	7~10
软腐病	20%噻唑锌悬浮剂400~500倍液或50%氯溴异氰尿酸3000~4000倍液	浸种	下种前	7
污斑病	50%多菌灵可湿性粉剂800倍液或75%百菌清可湿性粉剂600倍液	喷雾	初期	10
蚜虫	25%抗蚜威水分散粒剂20克/亩~36克/亩或5%啉虫脒可湿性粉剂2000~3000倍液	喷雾	初期	7~10
斜纹夜蛾	25g/升高效氯氟氰菊酯乳油20毫升/亩~30毫升/亩或4%甲氨基阿维菌素苯甲酸盐10毫升/亩~15毫升/亩	喷雾	幼虫3龄前	5~7
蛴螬	敌百虫毒饵	容器诱杀	危害期	

附录 D
(资料性)
病虫害防治档案

表 D1 防治档案记录表格

日期	前茬作物	病虫害发生情况	曾使用过防治病虫害的方法	当茬作物	当前使用防治方法	病情指数	发病率或有虫率(%)