

DB1408

山西省运城市地方标准

DB1408/T 048—2023

苹果脱毒组培苗繁育技术规程

地方标准信息服务平台

2023-07-15 发布

2023-08-15 实施

运城市市场监督管理局

发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
3.1 脱毒.....	1
3.2 叶原基.....	1
3.3 茎尖.....	1
3.4 茎尖分生组织.....	1
3.5 离体培养.....	1
3.6 外植体.....	2
3.7 无菌苗.....	2
4 脱毒材料的选取.....	2
4.1 植株初选.....	2
4.2 材料选择.....	2
5 脱毒与培养.....	2
5.1 外植体消毒.....	2
5.2 离体培养无菌苗.....	2
5.3 茎尖剥离与接种.....	3
5.4 茎尖培养.....	3
6 病毒检测.....	3
7 组培苗扩繁.....	3
7.1 培养基制备.....	3
7.2 灭菌.....	3
7.3 扩繁.....	4
7.4 瓶苗培养.....	4
7.5 生根培养.....	4

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。

本文件由运城市果业发展中心提出、组织实施和监督检查。

运城市市场监督管理局对标准的组织实施情况进行监督检查。

本文件由运城市果业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：山西农业大学棉花研究所、运城市果业发展中心、太原市农业技术推广服务中心、临猗县果业发展中心。

本文件主要起草人：张健、王璐、潘琪、梁哲军、袁嘉玮、田时敏、李花、孙建春、景香平、畅元生。

地方标准信息服务平台

苹果脱毒组培苗繁育技术规程

1 范围

本文件规定了脱毒材料的选取、脱毒与培养、病毒检测及组培苗扩繁等技术要求。
本文件适用于苹果苗木的脱毒和脱毒苗的组培快繁。

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。

NY/T2281 苹果病毒检测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脱毒

应用茎尖分生组织培养技术，脱去潜隐性病毒，种类包括：苹果茎沟病毒（ASGV）、苹果茎痘病毒（ASPV）和苹果褪绿叶斑病毒（ACLSV）。

3.2

叶原基

在茎尖生长点的基部形成的突起。

3.3

茎尖

芽顶端部分（0.1 mm~1.0 mm），包括分生组织及芽原基和正在生长发育的叶原基。

3.4

茎尖分生组织

茎部位具有持续或周期性分裂能力的细胞群。

3.5

离体培养

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。

3.6

外植体

从生长健壮、无病虫害的植株上取下作离体培养材料的器官或组织的片段。

3.7

无菌苗

在无菌条件下，将苹果枝条茎段按照外植体消毒流程进行严格消毒后，接种在MS培养基上，在人工控制条件下培养获得无菌完整植株。

4 脱毒材料的选取

4.1 植株初选

苹果生育期内，于现蕾至开花期选择生长势强、具有该品种典型性状的健壮植株，做好标记。

4.2 材料选择

在初选植株中，选取带2~3个腋芽的嫩茎。

5 脱毒与培养

5.1 外植体消毒

5.1.1 取材

待春梢生长到10 cm~20 cm时，在连续5个以上晴天的上午在大田中剪取带2~3个腋芽的嫩茎，剪取前做好工具消毒。

5.1.2 清洗

将外植体置于稀释200倍的洗洁精溶液中浸泡15 min，并用清水冲洗干净。

5.1.3 消毒

在超净工作台上，将外植体浸于75%酒精中30 s，期间不断震荡；置于0.1% HgCl₂溶液中浸泡5 min；再用无菌水冲洗5~7次，并用无菌滤纸吸干表面水分。

5.2 离体培养无菌苗

5.2.1 接种

在超净工作台上，对消毒后的外植体进行剪切，在无菌滤纸上将表面水分吸干，切除下端1 cm部分，接种在MS培养基上。

5.2.2 培养方法

在培养容器上注明品种名称和接种时间，放入培养间培养21 d~25 d，待其膨大基部分化出5~7个新梢，切成单独小苗，转接于同样的培养基上，培养成苗。同样方法扩繁2个周期，待苗达到一定数量后，从无菌苗上剥离茎尖。

5.2.3 培养条件

温度(26±2)℃,采用人工光源,光照强度2000 Lux~3000Lux,光照时数12 h/d。

5.3 茎尖剥离与接种

茎尖剥离与接种在超净工作台上进行。在解剖镜的载物台上放一张灭菌滤纸,将剪取的无菌苗茎尖置于滤纸上。在40X双目解剖镜下,剥离茎尖直至露出半圆形光滑生长点。用无菌解剖针切取0.25 mm带1~2个叶原基的茎尖,立即接种于MS培养基上,每瓶培养基接种1个茎尖。接种后封口,暗培养20 d转光照培养,在容器上注明编号、品种名称、接种时间。

5.4 茎尖培养

5.4.1 暗培养

接种好的茎尖放入培养间进行暗培养,温度(26±2)℃。

5.4.2 光培养

暗培养20 d后选取变大转绿的茎尖进行光培养,培养条件同 5.2.3。

5.4.3 成苗

培养30 d选择茎尖分化出带有2~3片叶的嫩梢,转入MS培养基,培养成苗

6 病毒检测

病毒检测方法执行NY/T 2281的规定,通过检测确认是否脱除了本标准规定的所检病毒,筛选出不带有病毒的植株。

7 组培苗扩繁

7.1 培养基制备

7.1.1 培养基配制

选择用MS培养基,根据培养品种不同添加吡啶乙酸0.1 mg/L~0.3 mg/L,6-苄基嘌呤0.4 mg/L~0.8 mg/L。

7.1.2 培养基分装

选择250 ml培养瓶,将配制好的培养基装入培养瓶中,每瓶加入50 ml的培养基,用带透气膜的盖子封口。

7.2 灭菌

7.2.1 培养基灭菌

培养基分装好后置于高压蒸汽灭菌锅,在压力为1.1 kg/cm²、温度为121℃条件下灭菌25 min,取出后在洁净的室内放置5 d~7 d待用。

7.2.2 接种器具灭菌

将镊子、手术刀、解剖针、培养皿和滤纸分别用纱布包裹好置于高压蒸汽灭菌锅，在压力为 1.1 kg/cm^2 、温度为 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 30 min ，取出后置于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干备用。

7.3 扩繁

7.3.1 扩繁程序

检测合格的脱毒苗在超净工作台上分株。用75%酒精擦拭脱毒苗瓶和备用培养基瓶，放置于超净工作台上备用。打开脱毒苗母瓶，用镊子取出脱毒苗，置于事先准备好的无菌滤纸上。切除膨大的基部，用手术刀将新梢切下。用镊子将剪好的新梢芽尖朝上插入培养基中，每瓶10株。封口后，用记号笔注明编号、品种名称、接种时间。

7.3.2 注意事项

每个操作人员配两套接种工具，交替灭菌使用。每接种完一瓶母瓶后，将镊子、手术刀在75%酒精中浸蘸后插入工具消毒器中消毒。

7.4 瓶苗培养

7.4.1 培养条件

接种好的瓶苗放入培养间，培养条件同5.2.3。

7.4.2 继代培养

脱毒苗（ 30 ± 2 ）d继代繁殖一次，待组培苗长到 2 cm 可再次继代扩繁或转入生根培养。

7.5 生根培养

7.5.1 生根培养

在超净工作台上向装有 350 g 蛭石的培养盒子（ $25\text{ cm}\times 20\text{ cm}\times 5\text{ cm}$ ）内加入 500 mL 的 $\frac{1}{2}\text{ MS}$ 溶液。选取苗高 2 cm 以上的脱毒苗，接入培养盒。暗培养 2 d 后转入光培养。 30 d 后转入大田移栽。

7.5.2 培养条件

暗培养条件同5.4.1；光培养条件：温度（ 26 ± 2 ） $^\circ\text{C}$ ，采用人工光源，光照强度 2000 Lux – 3000 Lux ，光照时数 16 h/d ， CO_2 浓度为 1964 mg/m^3 。