

DB5301

昆 明 市 地 方 标 准

DB5301/T 84—2023

人参果脱毒种苗生产技术规程

2023 - 04 - 15 发布

2023 - 05 - 01 实施

昆明市市场监督管理局 发布

目 次

前 言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 脱毒种苗生产设施、设备及化学试剂 2

 4.1 组培实验室 2

 4.2 温室 2

 4.3 仪器设备、玻璃器皿及试剂 2

5 常用溶液的配制 3

 5.1 MS 培养基母液 3

 5.2 生长激素母液 3

6 无菌苗的培养 3

 6.1 无菌苗培养基的制备 3

 6.2 田间株选和外植体材料的采集 3

 6.3 外植体的处理和消毒 3

 6.4 离体培养无菌苗 4

7 茎尖培养脱毒 4

 7.1 钝化病毒 4

 7.2 茎尖培养基的制备 4

 7.3 茎尖剥离与接种 4

 7.4 茎尖分生组织培养 4

 7.5 筛选脱毒核心苗 4

8 基础苗扩繁和保存 5

 8.1 基础苗扩繁 5

 8.2 基础苗保存 5

9 脱毒组培苗快繁 5

 9.1 无菌操作要求 5

 9.2 脱毒组培苗接种 5

 9.3 脱毒组培苗培养 6

 9.4 脱毒组培苗继代或出瓶炼苗 6

10 脱毒组培苗炼苗 6

 10.1 炼苗设施 6

 10.2 基质配制 6

 10.3 炼苗移栽 6

10.4 移栽后管理 7

10.5 脱毒组培苗炼苗后质量标准 7

11 脱毒种苗扩繁 7

11.1 设施 7

11.2 基质 7

11.3 扦插时间 7

11.4 扦插材料来源与剪材要求 8

11.5 扦插 8

11.6 扦插后管理 8

11.7 脱毒扦插种苗 8

12 档案管理 8

附录 A （资料性） 组培室规划 10

附录 B （资料性） 组培设备、试剂 11

附录 C （资料性） MS 培养基母液与相关培养基的配制 13

附录 D （资料性） 无菌操作注意事项 16

附录 E （资料性） 人参果脱毒种苗繁育主要病虫害防治方法 17

附录 F （资料性） 人参果脱毒种苗主要质量指标 18

前 言

本文件按照GB/T1.1-2020《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。

本文件由昆明市农业农村局提出并归口。

本文件起草单位：昆明市农业科学研究院

本文件主要起草人：张丽芳、蒋瑜、杨春利、王薇、李荣琼、张力、朱维贤、李昌远、施林、刘平江、杨永东。

人参果脱毒种苗生产技术规程

1 范围

本文件规定了人参果无菌苗的培养、茎尖培养脱毒、脱毒组培苗快繁及人参果脱毒种苗扩繁的技术要求和操作规程。

本文件适用于人参果脱毒技术应用与脱毒种苗繁育。

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/T 29375—2012 马铃薯脱毒试管苗繁育技术规程

NY/T 401—2000 脱毒马铃薯种薯（苗）病毒检测技术规程

3 术语和定义

GB/T 29375—2012 界定的和下列术语和定义适用于本文件，为了便于使用，以下重复列出了GB/T 29375—2012的部分术语和定义。

3.1

外植体 explant

指植物组织培养中作为离体培养材料的器官或组织的片段，本标准中是指用于无菌苗培养的人参果植株顶芽、腋芽及茎段等不同部位的材料。

3.2

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它产品的技术。

[来源：GB/T 29375—2012，3.4]

3.3

无菌苗 aseptic seedlings

指在无菌条件下，将从大田人参果健康植株上获得的顶芽、腋芽及茎段严格按外植体的消毒流程进行消毒后，接种到MS培养基（可添加或不添加激素）上，在人工控制条件下，通过无菌培养获得的完整植株。

3.4

茎尖 stem apex

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

[来源：GB/T 29375—2012，3.2]

3.5

茎尖分生组织 stem-apex meristem

茎部位具有持续或周期性分裂能力的细胞群。

[来源: GB/T 29375—2012, 3.3]

3.6

叶原基 leaf primordium

在茎尖生长点的侧面由表面的几层细胞分裂形成的突起。

3.7

脱毒核心苗 virus-free core plantlets

通过茎尖分生组织培养技术获得的经检测不带危害该种植物的主要病毒, 不带任何细菌和真菌、品种纯正的再生试管苗。

3.8

基础苗 basic plantlets

由脱毒核心苗繁殖的、经检测无病毒的脱毒苗。

[来源: GB/T 29375—2012, 3.7]

3.9

炼苗 acclimatization

组培苗在培养瓶中长成完整的植株后, 从培养瓶中取出移植到基质中, 使其适应外界温度、湿度及光照等自然环境条件的锻炼过程。

3.10

脱毒种苗 virus free seedlings

本标准中脱毒种苗指由基础苗快繁培育出的脱毒组培苗并经隔离温室炼苗后直接应用于大田生产的种苗或脱毒组培苗炼苗后作为母苗, 剪取顶芽、茎段在隔离温室进行二次扦插繁育生产的经检测合格的扦插种苗。

4 脱毒种苗生产设施、设备及化学试剂

4.1 组培实验室

组培实验室应建设在向阳、通风、干燥、清洁的环境, 周围应无污染源, 与大田生产隔离。组培实验室要具备清洗室、配制室、灭菌室、无菌贮存室、缓冲间、更衣室、接种室、培养室等, 各房间应隔离, 各房间面积根据生产实际需要而定。各功能区布局应遵守操作流程, 遵循方便消毒、减少污染的原则。组培实验室布局平面示意图参见附录A。

4.2 温室

脱毒组培苗炼苗和扦插繁育设施可采用智能温室或钢架大棚, 周围 200 m~500 m 范围内没有茄科作物病虫害浸染源或蚜虫、蓟马等寄主植株种植, 设施四周通风口应安装 40 目~60 目防虫网, 温室或大棚的面积可根据生产实际和条件而定。

4.3 仪器设备、玻璃器皿及试剂

4.3.1 仪器设备、玻璃器皿

仪器设备包括用于药品称量、培养基配制、灭菌、接种、温度控制等，玻璃器皿包括盛装器皿（烧杯、试剂瓶等）、培养容器（培养瓶）、计量器皿（量筒、容量瓶等）以及其他常用玻璃消耗品等。仪器设备和玻璃器皿参见附录B。

4.3.2 试剂

植物组培中常用的试剂包括无机盐类、有机物、植物生长调节剂、消毒剂等。试剂参见附录B和附录C。

5 常用溶液的配制

5.1 MS 培养基母液

MS 培养基母液配制参见附录C表C.1~C.4。

5.2 生长激素母液

激素类母液配制方法参见附录C表C.5。

6 无菌苗的培养

6.1 无菌苗培养基的制备

无菌苗培养基制备方法参见附录C。

6.2 田间株选和外植体材料的采集

6.2.1 田间株选

在第一台果基本成熟时，选择具有该品种典型特性、植株长势好、结果率高、抗病性强、无病斑的单株作为无菌苗培养的基础材料。

6.2.2 采集外植体

剪取优选单株中间部位新萌发的枝条约20 cm，装入干净的塑料自封袋，并标记。

6.3 外植体的处理和消毒

6.3.1 修剪

用75%酒精消毒过的剪刀剪取外植体枝条上3 cm~4 cm长的顶芽和腋芽及枝条中部带1~2个节的茎段。

6.3.2 清洗

将修剪好的外植体在流水下用软毛刷轻轻逐个刷洗后放于烧杯中，用纱布封口，放于自来水下冲洗10 min~20 min。

6.3.3 消毒

在超净工作台上，先用75%的酒精浸泡外植体15 s，无菌水冲洗2次，再用0.1%的升汞浸泡10 min~12 min，浸泡时不间断摇荡瓶子，以确保外植体得到较彻底的消毒，最后用无菌水冲洗5~6次。

6.4 离体培养无菌苗

6.4.1 接种

无菌接种操作按附录D的规定执行。在超净工作台上，对处理好的外植体进行剪切，切除被药剂伤害的部分，接种至已备好的无菌苗培养基上，每个培养基上接一个外植体，在培养容器上注明品种名称和接种时间。

6.4.2 培养

将接种好的外植体置于培养室，培养20 d~28 d，待长成含4~5片叶子的小苗时，剪切成单节段，转接于同样的新培养基上，培养成完整无菌小植株。同样方法扩繁1个~2个周期，增加无菌苗的数量。培养条件：白天温度22℃~25℃、夜间16℃~20℃，相对湿度70%、光照强度2 000 lx~3 000 lx、光照时数12 h/d。

7 茎尖培养脱毒

7.1 钝化病毒

将无菌苗放置于37℃±1℃光照培养箱中，光照强度2 000 lx，每天光照时间12 h，处理10 d。

7.2 茎尖培养基的制备

茎尖培养基的制备方法参见附录C。

7.3 茎尖剥离与接种

7.3.1 茎尖剥离与接种在超净工作台上按以下步骤进行：

- 在解剖镜的载物台放一张灭菌滤纸，将剪取的无菌苗茎尖放置于无菌滤纸上；
- 借助40X双目解剖镜，剥离茎尖直至露出半圆形光滑的生长点；
- 用锋利的无菌解剖针小心切取带1~2个叶原基的茎尖（≤0.2 mm），迅速接种于茎尖培养基上，每瓶培养基内接种一个茎尖；
- 已接种的培养基封好口后，在容器上注明品种名称、编号、接种时间，每一个茎尖对应一个编号。

7.3.2 在剥离过程中，尽量轻柔迅速，缩短茎尖暴露时间，减少失水。每剥一个茎尖后，换一张无菌滤纸。避免切下的茎尖与已剥去部分、解剖镜台或持芽的镊子接触。

7.4 茎尖分生组织培养

7.4.1 培养条件

接种好的茎尖放在培养室内培养，培养条件参见6.4.2。

7.4.2 成苗

茎尖培养14 d后，成活的茎尖生长点明显变大变绿，50 d~60 d左右茎尖长成带1~2片小叶的无根小苗，转入新鲜的茎尖培养基中继续培养，30 d左右长成根系发达并带4~5片的完整试管苗。

7.5 筛选脱毒核心苗

对茎尖培养获得的试管苗逐一进行病毒检测，根据检测结果，筛选不含ToMV、TMV、CMV、PVY、PVM、TVBMV及ChiVMV等病毒的脱毒核心苗，方可用于组培苗快繁。病毒检测参照NY/T 401—2000的附录A规定的双抗夹心酶联免疫吸附法（DAS-ELISA）或附录C规定的反转录-聚合酶链反应检测法（RT-PCR）。

8 基础苗扩繁和保存

8.1 基础苗扩繁

8.1.1 扩繁步骤

在超净工作台上用脱毒核心苗进行基础苗的扩繁，按以下步骤进行：

- 用 75%酒精对核心苗瓶和待用的新培养基进行表面消毒，并置于超净工作台上；
- 用经灼烧消毒并冷却好的镊子取出脱毒核心苗置于无菌牛皮纸上；
- 按茎节切段，每个切段带 1~2 个叶片；
- 将剪下的切段腋芽朝上插入已备好的 MS 培养基上，封好口，注明品种名称、编号及接种时间。

8.1.2 培养条件

白天温度 22℃~25℃、夜间 16℃~20℃，相对湿度 70%、光照强度 2 000 lx~3 000 lx、光照时数 12 h/d~14 h/d。

8.2 基础苗保存

8.2.1 接种

选生长健壮的基础苗，剪取其顶尖接入保存培养基（配方参见附录 C 的 C.5），每支试管接种一个顶尖，每个品种保存 10 支试管。封好口，注明品种名称、编号及接种时间，放入种质资源保存室，使其缓慢生长保存。每 12 M~18 M 转接一次。

8.2.2 保存条件

温度 10℃~12℃、相对湿度 70%、光照强度 1 000 lx~1 500 lx、光照时数 10 h/d~12 h/d。

9 脱毒组培苗快繁

9.1 无菌操作要求

无菌操作要求如下：

- 脱毒组培苗快繁过程中无菌接种操作注意事项按本规程附录 D 的规定执行；
- 每个操作人员配备两套接种用具，交替灭菌使用；
- 每剪取和接种完一瓶基础母瓶后，把镊子、剪刀等工具插入 75%酒精浸蘸，并在酒精灯上灼烧数秒至酒精干透或插入接种工具消毒器消毒。转接下一个母瓶苗时，使用另一套消毒好的接种工具，同时换一张无菌牛皮纸。

9.2 脱毒组培苗接种

脱毒组培苗接种按以下操作：

- 用 75%酒精对基础瓶苗和快繁培养基（配方见附录 C 的 C.4）进行表面消毒，并置于超净工作台上备用；

- b) 用消毒后剪刀把基础苗从基部剪断，用消毒后镊子取出置于事先准备好的无菌牛皮纸上；
- c) 按节剪成茎段，每个茎段带 1~2 个叶片；
- d) 用消毒后镊子将剪好的茎段插到快繁培养基上，腋芽朝上，每瓶插 15~20 个茎段；
- e) 封口后，用记号笔注明品种名称、编号及接种时间。

9.3 脱毒组培苗培养

接种好的瓶苗放入培养室，培养条件参见 8.1.2。

9.4 脱毒组培苗继代或出瓶炼苗

待苗长出 6 片~8 片叶片，植株高 5 cm~8 cm，可出瓶炼苗或再次切段继代快繁。脱毒苗组培苗培养 25 d 左右为最适宜的炼苗移栽期，而继代周期为 25 d~35 d。

10 脱毒组培苗炼苗

10.1 炼苗设施

10.1.1 炼苗温室

脱毒组培苗炼苗温室要求符合 4.2 的规定。

10.1.2 苗床和漂浮池

脱毒组培苗的炼苗采用苗床或漂浮池两种方式：

- a) 苗床：苗床可根据实际条件来选择，简易苗床是在大棚内整理出宽 100 cm~120 cm，深 12 cm~15 cm，长度根据育苗数量和大棚长短而定的苗床若干条，两条苗床之间留 50 cm 宽的走道；
- b) 漂浮池：漂浮池可以是长久固定的池子，也可以是临时搭建的池子，池底平整，宽度 120 cm，深度 15 cm~20 cm，长度根据育苗的数量和温室的长度来定。漂浮池中须放清水，水深保持在 8 cm~10 cm。

10.1.3 育苗盘

10.1.3.1 穴盘：用于苗床炼苗，选用 72 孔或 100 孔的黑色聚苯乙烯或聚氯乙烯育苗穴盘均可。

10.1.3.2 白色泡沫漂浮盘：用于漂浮炼苗，选用 162 孔或 200 孔的均可。

10.1.3.3 全新的育苗盘，不用消毒，直接装已备好的基质即可用。用过的育苗盘，装基质前要消毒处理，用 0.1% 高锰酸钾溶液浸泡 8 h~10 h，晾干后方可使用。

10.2 基质配制

基质用过筛的腐殖土和园土按 2:1（体积比）混合，使用前须经消毒。也可以直接使用商品草炭土。

10.3 炼苗移栽

10.3.1 取苗和洗苗

从培养瓶中取出脱毒苗，用清水洗去根部的培养基，清洗过程不要损伤根系和茎叶。

10.3.2 移栽过程

苗盘内的基质保持润湿，一般含水在50%左右为宜，在基质中打2 cm左右的小孔，然后插入小苗，深度1.5 cm~2 cm，要保持苗挺立、不倒伏。移栽后压紧压实植株周围的基质，用喷雾器浇透苗盘，再置于苗床或漂浮池。

10.4 移栽后管理

10.4.1 湿度

移栽后3 d~4 d 内，空气相对湿度控制在85%~90%；5 d~7 d后，逐渐降低空气湿度，控制湿度在70%~80%；移栽10 d后，适当控制水分，以防徒长和高湿引起的病害。

10.4.2 光照

移栽后7 d内，遮光率70%；7 d~10 d，遮光率50%；移栽15 d后，逐步增加光照，25 d左右，可拆除遮阳网。

10.4.3 温度

移栽后，白天温度控制在22 ℃~28 ℃，晚上10 ℃~15 ℃，最低温不低于8 ℃。

10.4.4 施肥

移栽10 d~15 d后，可喷施2%磷酸二氢钾。待长出新根后，浇施1~2%的复合肥液（N:P:K=15:15:15），以后根据苗情，勤施薄施。

10.4.5 病虫害防控

移栽后应注意病虫害的防控，防控方法见附录E。不同药剂应交叉使用，避免病菌产生抗药性。也可在炼苗温室挂黄蓝板诱杀害虫。

10.5 脱毒组培苗炼苗后质量标准

脱毒组培苗出瓶炼苗45 d~60 d后即为大田生产用的种苗，也可作为扦插用的母苗。脱毒组培苗炼苗后的质量指标参见附录F。

11 脱毒种苗扩繁

11.1 设施

11.1.1 温室

人参果脱毒种苗扦插繁育温室要求符合4.2的要求。

11.1.2 苗床和育苗盘

人参果脱毒种苗扦插繁育苗床和育苗盘要求参见第10章第1节。

11.2 基质

人参果脱毒种苗扦插繁育基质要求参见第10章第2节。

11.3 扦插时间

根据大田生产要求选择扦插时间，一般在大田定植前40 d~45 d。

11.4 扦插材料来源与剪材要求

11.4.1 材料来源

脱毒组培苗经炼苗后，直接从育苗盘剪取5cm长的主茎顶端扦插；剪顶端后的苗盘继续按正常管理，15 d~20 d后侧枝长至5 cm以上时，剪取侧枝扦插；重复剪取2次~3次，扩繁系数可达8倍~10倍。剪材次数不超过3次。

11.4.2 剪材要求

剪材工作人员操作前应清洗双手，每个剪材人员配备两把剪刀，插入装有75%酒精的瓶中浸泡消毒，两把剪刀交替使用。

11.5 扦插

剪取的枝条可直接扦插，或蘸10 ppm~20 ppmNAA生根水扦插。扦插深度为2 cm左右，育苗盘每孔插一个枝条，扦插完后放入苗床或漂浮池，用喷雾器均匀浇水，使基质达到饱和持水量。

11.6 扦插后管理

11.6.1 湿度

扦插后7 d内，空气相对湿度控制在70%~80%；扦插苗生根以后，空气相对湿度控制在50%~60%。20d后，保持正常育苗温室环境相对湿度即可。

11.6.2 光照

扦插后7 d内，遮光率60%左右；7d~10d后，根据生根和新叶出现情况，逐步增强光照，遮光率40%；15 d后，插条生根率100%，新叶长出2片~3片，可拆除遮阳网。

11.6.3 温度

人参果扦插育苗的最适温度为15℃~25℃。白天温度尽量控制在22℃~28℃，晚上10℃~15℃，最低温不低于8℃，最高温不超过30℃。

11.6.4 施肥

扦插10 d~15 d后，喷施2%磷酸二氢钾，每周1次~2次，促进壮苗和根系发达。扦插20 d后，浇施2%的复合肥液（N:P:K=15:15:15），以后根据苗情，再施1次~2次。施肥时间选择晴天，避免高温时段。

11.6.5 病虫害防控

扦插后立即用百菌清75%可湿性粉剂1 000倍或多菌灵50%可湿性粉剂800倍对插条和基质喷淋。苗期病虫害防控参见附录E。

11.7 脱毒扦插种苗

扦插40 d左右，即为大田生产用的种苗。脱毒扦插种苗的主要质量指标参见附录F。

12 档案管理

生产者应建立生产档案，记录扦插、施肥、病虫害防治、出苗、包装储运和生产废弃物处理等运营管理措施；所有记录应真实、准确、规范，并具有可追溯性；生产档案应有专人专柜保管，至少保存 3 年。

附 录 A
(资料性)
组培室规划

A. 1 组培室布局规划

脱毒组培苗生产车间布局平面示意图如图A.1所示。

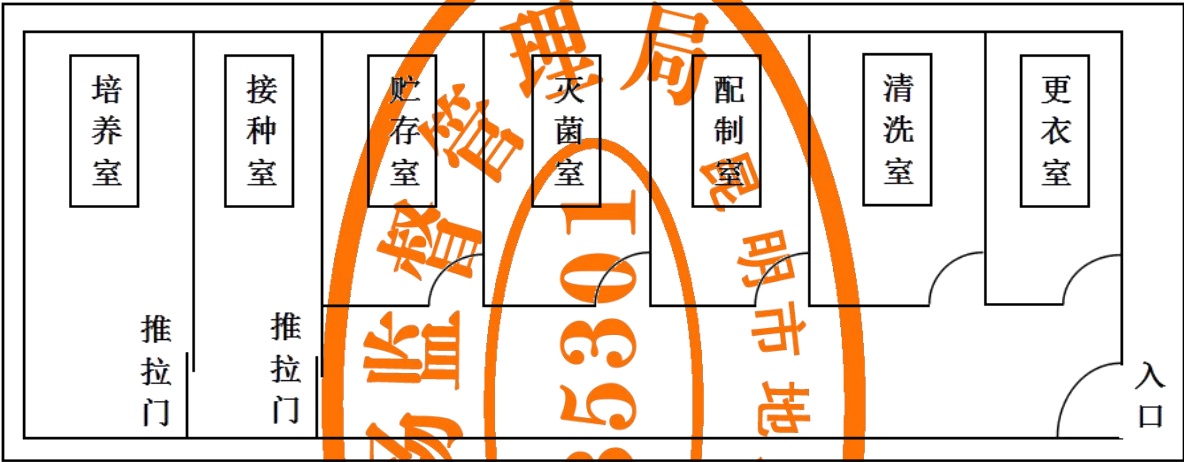


图 A. 1 脱毒组培苗生产车间布局平面示意图

A. 2 组培室各功能室面积和设计要求

功能室面积和设计要求见表A.1。

表 A. 1 功能室面积和设计要求表

功能室名称	面积 (m ²)	设计要求或说明
更衣室	10	清洁、干燥、光线充足；配备挂衣架、鞋架等。
清洗室	20	室内要有进排水设施；室内墙壁要防潮、地面要防水防滑，便于清洗；做大水槽若干个。
配制室	20	清洁、干燥、通风，避免阳光直射；实验台要平整稳固；配备电子天平、药品柜、冰箱、计量器皿晾挂架等。
灭菌室	25	室内要有进排水设施；室内墙壁要防潮、地面要防水防滑，便于清洗；配备大容量用电线路。
贮存室	15	清洁、干燥、相对避光，用于贮存制备好的培养基；配备储物柜，用于摆放备用的接种工具、已灭菌的接种垫纸等。
接种室	20	清洁、干燥、光线充足；配备空调、除湿设备及摆放培养瓶的小推车；超净工作台若干台。
培养室	60	地面防滑、便于清洁消毒；控温、控湿及控光设备；培养架若干个。

附 录 B
(资料性)
组培设备、试剂

B.1 配制室

- 配制室设备和器具包括：
- 防酸碱台面的试验台；
 - 冰箱；
 - 药瓶柜；
 - 器械柜；
 - 0.1 g 电子天平、0.000 1 g 电子天平；
 - 酸度计；
 - 蒸馏水器；
 - 各种规格的容量瓶、棕色细口瓶、棕色广口瓶、移液管、烧杯、量筒、玻璃棒、吸管、洗耳球、试剂勺等；
 - 大量的试管、三角瓶、培养瓶；
 - 不锈钢锅；
 - 电磁炉，

B.2 清洗室及灭菌室

- 清洗室及灭菌室设备和器具包括：
- 浸泡洗涤水槽和冲洗水槽；
 - 培养瓶控水架；
 - 装培养瓶（或培养基）的塑料周转筐若干个；
 - 干燥箱；
 - 高压灭菌锅；
 - 瓶盖、封口膜、线绳。

B.3 接种室

- 接种室设备和器具包括：
- 超净工作台；
 - 空调；
 - 紫外灯；
 - 酒精灯；
 - 镊子、剪刀、手术刀、解剖针、解剖刀。

B.4 培养室

培养室设备和器具包括：
——有日光灯光源的培养架；
——紫外灯若干；
——空调；
——温、湿度仪。

B.5 药品

药品包括：
——氯化汞；
——高锰酸钾；
——次氯酸钠；
——75%乙醇、95%乙醇；6-苄氨基腺嘌呤（6-BA）、萘乙酸（NAA）、吲哚乙酸（IAA）、赤霉素（GA3）、激动素（KT）、D-泛酸钙；
——pH 试纸；
——琼脂；
——食用白糖、蔗糖；
——附录 C 中的所有试剂。



附 录 C
(资料性)

MS 培养基母液与相关培养基的配制

C.1 MS培养基母液的配制

C.1.1 大量元素母液的配制

大量元素母液的配制按表 C.1 的规定执行。

表 C.1 大量元素母液的配制

化合物名称	MS 培养基 用量 (mg/L)	扩大倍数	称取量 (g)	母液体积 (mL)	配制 1 L 培养基 应取量 (mL)	母液名称
硝酸钾 (KNO ₃)	1 900	在 MS 基础培养基中, 硝酸钾 (KNO ₃) 和硝酸铵 (NH ₄ NO ₃) 两种大量元素用量相对较大, 不必配制成母液, 制备培养基时按量称取, 现称现用。				
硝酸铵 (NH ₄ NO ₃)	1 650					
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	170	100	17	1 000	10	溶液 1
硫酸镁 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	370	100	37	1 000	10	溶液 2
氯化钙 (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	440	100	44	1 000	10	溶液 3
注: 分别称取磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄) 17 g、硫酸镁 (MgSO ₄ · 7H ₂ O) 37 g、氯化钙 (CaCl ₂ · 2H ₂ O) 44 g, 并置于三个不同烧杯中, 每个烧杯中均加入蒸馏水 800 mL, 充分搅拌至完全溶解, 最后分别定容为 1 000 mL, 倒入棕色试剂瓶, 标注好母液名称, 放入冰箱冷藏备用。						

C.1.2 铁盐母液的配制

铁盐母液的配制按表 C.2 的规定执行。

表 C.2 铁盐母液的配制

化合物名称	MS 培养基 用量 (mg/L)	扩大倍数	称取量 (g)	母液体积 (mL)	配制 1 L 培养基 应取量 (mL)	母液名称
硫酸亚铁 (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	27.8	100	2.78	500	5	溶液 4
乙二胺四乙酸二钠 (Na ₂ · EDTA · 2H ₂ O)	37.3	100	3.73			
注：分别称取两种试剂并置于不同烧杯中，每个烧杯中加入200 mL蒸馏水并分别加热溶解，待两种试剂完全溶解后混合，继续加热混合后的溶液使其充分螯合，冷却后定容至500 mL，倒入棕色试剂瓶，标注好母液名称，放入冰箱冷藏备用。						

C.1.3 微量元素母液的配制

微量元素母液的配制按表 C.3 的规定执行。

表 C.3 微量元素母液的配制

化合物名称	MS 培养基 用量 (mg/L)	扩大倍数	称取量 (g)	母液体积 (mL)	配制 1 L 培养基 应取量 (mL)	母液名称
硫酸锰 (MnSO ₄ · 4H ₂ O)	22.3	100	2.23	500	5	溶液 5
硫酸锌 (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	8.6	100	0.86			
硼酸 (H ₃ BO ₃)	6.2	100	0.62			
碘化钾 (KI)	0.83	100	0.083			
钼酸钠 (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25	100	0.025			
硫酸铜 (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.025	100	0.0025			

表 C.3 (续)

化合物名称	MS 培养基 用量 (mg/L)	扩大倍数	称取量 (g)	母液体积 (mL)	配制 1 L 培养基 应取量 (mL)	母液名称
氯化钴 (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025	100	0.0025			
注：将上述7种化学试剂按顺序称量，逐一溶解于400 mL蒸馏水中，最后定容为500 mL，倒入棕色试剂瓶，标注好母液名称，放入冰箱冷藏备用。						

C.1.4 有机物质母液的配制

有机物质母液的配制按表 C.4 的规定执行。

表 C.4 有机物质母液的配制

有机物质名称	MS 培养基 用量 (mg/L)	扩大倍数	称取量 (g)	母液体积 (mL)	配制 1 L 培养基 应取量 (mL)	母液名称
甘氨酸	2	100	0.2	500	5	溶液 6
盐酸硫胺素 (B ₁)	0.1	100	0.01			
盐酸吡哆醇 (B ₆)	0.5	100	0.05			
烟酸	0.5	100	0.05			
注：将上述4种有机物质按顺序称量，逐一溶解于400 mL蒸馏水中，最后定容为500 mL，倒入棕色试剂瓶，标注好母液名称，放入冰箱冷藏备用。						

C.1.5 激素类母液的配制

激素类母液的配制按表 C.5 的规定执行。

表 C.5 激素类母液的配制

激素名称	浓度 (mg/mL)	配制体积 (mL)	配制方法	备注
6-苄基氨基腺嘌呤 (6-BA)	0.1	200	称量 20 mg 药品溶解于少量稀盐酸，溶解后加蒸馏水定容为 200 mL 备用	普通冰箱 冷藏保存 (4 ℃)
萘乙酸 (NAA)	0.1	200	称量 20 mg 药品溶解于少量 95%酒精，溶解后加蒸馏水定容为 200 mL 备用	
吲哚丁酸 (IBA)	0.1	100	称量 10 mg 药品溶解于少量 95%酒精，溶解后加蒸馏水定容为 100 mL 备用	
赤霉素 (GA ₃)	0.1	100	称量 10 mg 药品溶解于少量 95%酒精，溶解后加蒸馏水定容为 100 mL 备用	
比久 (B ₉)	1	100	称量 100 mg 药品溶解于少量蒸馏水中，溶解后加蒸馏水定容为 100 mL 备用	

C.2 无菌苗培养基的配制

无菌苗培养基采用MS+6-BA0.5 mg/L+ NAA0.05 mg/L+琼脂粉6.5 g/L+食用白糖30 g/L。按所配制的培养基的量称取琼脂、食用白砂糖，放入10 L医用陶瓷桶或不锈钢桶，加入将要配制培养基量2/3的水；打开电动搅拌机，高速搅拌10 min~15 min，使糖和琼脂粉搅拌均匀；称取硝酸钾和硝酸铵，从已备的MS母液中依次量取大量元素、微量元素、铁盐、有机物质及植物激素等的所需量，放入烧杯中，然后再倒入糖和琼脂的混合液中，用水定容至所要配制培养基的总量，继续高速搅拌数分钟，混合均匀后调pH值为5.8；将制备好的培养基分装于培养容器中，盖好盖子，装入高压灭菌锅中，在1.1kg/cm²、121 ℃条件下进行高压灭菌25 min~30 min，冷却后在洁净贮存室放置3 d~5 d，无污染的培养基即可备用。

C.3 茎尖培养基的配制

人参果茎尖分化培养基为：MS+6-BA 0.05 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L+琼脂 6.5 g/L+食用白糖 30 g/L。配制和灭菌方法同以上 C. 2。

C. 4 快繁培养基的配制

人参果脱毒苗快繁培养基选择用MS固体培养基（不加任何激素）或MS+IBA 0.01 mg/L~0.02 mg/L+琼脂 6.5 g/L+食用白糖 30 g/L。配制和灭菌方法同以上 C. 2。

C. 5 保存培养基的配制

人参果基础苗保存培养基选用MS培养基，每1L的MS培养基中加入甘露醇20 g、食用白糖30 g及琼脂粉6.5 g或加入B₉ 10 mg、食用白糖30 g及琼脂粉6.5 g，pH值均为5.8，每支试管装培养基10 mL~15 mL，试管封口后用试管架或不锈钢丝圆篮装入高压灭菌锅灭菌，灭菌方法同以上 C. 2。

附 录 D
(资料性)
无菌操作注意事项

D.1 接种室消毒

每周进行 2 次彻底的卫生打扫和消毒，用 0.25%~1%新吉尔灭擦拭窗台、摆放培养瓶的小推车等，用 0.1%的优氯净消毒液拖地面。隔天开启紫外灯，每次 40 min~60 min，开紫外灯时，人员避开。

D.2 培养室消毒

每周进行 1 次彻底的卫生打扫和消毒，用 0.25%~1%新吉尔灭擦拭培养架、灯座、灯管及窗台，用 0.1%的优氯净消毒液拖地面。每周开紫外灯 1~2 次，每次 40 min~60 min，开紫外灯时，人员避开。

D.3 超净工作台表面消毒

每次使用前，应提前打开风机和紫外灯 30 min。接种时关闭紫外灯，用 75%酒精擦拭工作台面和内壁。每周 1 次~2 次用 0.25%~1%新吉尔灭擦拭超净工作台的外表面。

D.4 接种工具

每台超净工作台上应备两套接种工具轮流使用。接种前对使用的镊子、剪刀、解剖刀等工具进行灼烧或插入高温灭菌器中灭菌，冷却后使用。

D.5 工作人员

进入接种室前，用肥皂或洗手液洗净双手，换上消毒工作服和专用鞋，戴好口罩和帽子。操作过程中，手和工作台面要经常用 75%的消毒酒精棉球清擦。

D.6 接种操作

接种工具按 D.4 进行灭菌处理，接种用的垫纸提前跟培养基一起高压灭菌。无菌垫纸放在离风窗 10 cm~20 cm 处，剪取瓶苗放置于无菌垫纸上，为达到组培瓶苗的长势整齐度一致，将每棵苗按茎顶、中间节段、最下部茎段相对分开剪断，不同株苗的相同部位节段尽量接在同一培养瓶内。接种时培养瓶尽量 45° 倾斜，操作时动作要轻、快，接苗的镊子不要碰到培养瓶外壁或瓶口。

D.7 污染控制

培养基灭菌过程的污染控制在 0；接种和培养过程的污染控制在 3%以内。通过环境消毒、严格的挑选母瓶苗及规范的无菌接种操作来控制污染率。

附 录 E
(资料性)
人参果脱毒种苗繁育主要病虫害防治方法

人参果脱毒种苗繁育主要病虫害化学防治方法见表E. 1。

表 E. 1 人参果脱毒种苗繁育主要病虫害化学防治方法

防治对象	防治时期	农药名称	使用剂量	施药方法	安全间隔期 (d)
软腐病	发病前或发病初期	38%恶霜嘧菌酯	800 倍	喷雾	7
		农用链霉素	200mg /L	靠近基质的茎基部喷施	7~10
灰霉病	发病初期	50%甲基托布津	500 倍	喷雾	7~10
疫病	发病前或发病初期	65%代森锌	500 倍~700 倍	喷雾	7~10
		60%唑醚·代森联	1000 倍~1200 倍	喷雾	7~10
	发病初期	64%杀毒矾（恶霜·锰锌）	400 倍~500 倍	喷雾	3
		18.7%烯酰·吡唑酯	1000 倍~1500 倍	喷雾	7
红（黄）蜘蛛	发生早期	20%三氯杀螨醇乳油	1500 倍~2000 倍	喷雾	7
		5%噻螨酮乳油	1500 倍~2000 倍	喷雾	7
		5%吡虫啉乳油	2000 倍~3000 倍	喷雾	20
蚜虫	发生早期	4.5%高效氯氰菊酯	1500 倍~2000 倍	喷雾	10
		1%阿维菌素	4000 倍~6000 倍	喷雾	/
白粉虱	发生早期	10%烯啶虫胺可溶性液剂	2000 倍	喷雾	7~14

附 录 F
(资料性)
人参果脱毒种苗主要质量指标

人参果脱毒种苗主要质量指标见表F. 1。

表F. 1 人参果脱毒种苗主要质量指标

种苗类别	外观	株高 (cm)	叶片数 (片)	根系 (条)	品种纯度 (%)	整齐度 (%)	7种病毒 检测结果	病害	虫害
炼苗后的 脱毒组培 苗	形态完整、健 壮、挺拔，叶片 大小均匀，叶色 深绿、有光泽	15~20	≥10	≥15	100	95	—	无	无
脱毒扦插 种苗	形态完整、健 壮、挺拔，叶片 大，叶色深绿、 有光泽	15~20	≥8	≥10	100	98	—	无	无

注：“—”代表植株样品未检测出病毒；“+”代表植株样品检测出病毒。