

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1200—2006

甘薯脱毒种薯

Certified virus-free seed
sweet potatoes

2006-12-06 发布

2007-02-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 为规范性附录,附录 E 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位:农业部薯类产品质量监督检验测试中心(张家口)、中国农业大学。

本标准主要起草人:尹江、刘庆昌、王晓明、姚瑞、马恢。

甘薯脱毒种薯

1 范围

本标准规定了甘薯脱毒种薯(苗)的要求、试验方法、判定规则、收获、包装、标签、运输、贮藏。
本标准适用于甘薯脱毒试管苗及脱毒种薯(苗)繁育、生产、销售过程中的质量鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 4406 种薯

GB 7413 甘薯种苗产地检疫规程

NY/T 402 脱毒甘薯种薯(苗)病毒检测技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

脱毒试管苗 virus-free tube seedling

应用茎尖分生组织培养技术获得,经检测确认不带甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)、甘薯潜隐病毒(SPLV)、甘薯褪绿斑病毒(SPCFV)的试管苗。

3.2

脱毒种薯(苗) virus-free seed (seedling)

从育种家种子繁殖脱毒试管苗开始,经逐代繁殖增加种薯(苗)数量的种薯生产体系生产出来的种薯(苗)。

注:分为育种家种子、原原种、原种、生产用种四个级别。

3.2.1

育种家种子 breeder's seed

由育种者直接生产和掌握的原始种子,具有该品种的典型性和遗传稳定性,纯度 100%,不带病毒和其他病虫害,产量及其他主要性状符合推广时的原有水平。

3.2.2

原原种 pre-elite

用育种家种子或典型品种的脱毒试管苗在防虫网室、温室条件下生产的符合质量标准的种薯(苗)。

3.2.3

原种 elite

用原原种作种薯,在良好隔离条件下生产的符合质量标准的种薯(苗)。

3.2.4

生产用种 certified seed

用原种作种薯,在良好隔离条件下生产的符合质量标准的种薯(苗)。

3.3

病毒病株允许率

脱毒种薯(苗)繁殖田中病毒病株的比率。

3.4

真菌、细菌病株允许率

脱毒种薯(苗)繁殖田中真菌、细菌病株的比率。

3.5

虫害株允许率

脱毒种薯(苗)繁殖田中虫害株的比率。

3.6

混杂植株允许率

脱毒种薯(苗)繁殖田中混杂的其他甘薯品种植株的比率。

3.7

脱毒种薯块根整齐度

单块质量在 100 g~500 g 的甘薯种薯块根质量占块根总质量的比率。

3.8

有缺陷薯

机械损伤、虫鼠伤、畸形块根质量占块根总质量的比率。

3.9

杂质

一批块根中除具有种用价值的块根外,其他物质称为杂质。包含浮土、块根上所沾的泥土、无种用价值的块根,以及其他有机、无机物质质量。

3.10

腐烂

本标准中指因根腐病、软腐病、镰刀菌干腐病造成的腐烂外,其他原因造成的腐烂。

4 控制和汰除的病害

4.1 控制的病害

可以通过控制病害的发生程度以达到脱毒种薯(苗)质量要求的病害。

4.1.1 甘薯病毒病

甘薯羽状斑驳病毒(sweet potato feathery mottle virus,SPFMV)。

甘薯潜隐病毒(sweet potato latent virus ,SPLV)。

甘薯褪绿斑病毒(sweet potato chlorotic flecks virus,SPCFV)。

4.1.2 黑斑病(Black rot,病原 *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst.)。

4.1.3 疮痂病(Scab,病原 *Sphaceloma batatas* Sawada)。

4.1.4 蔓割病[Stem rot,Fusarium wilt;病原 *Fusarium oxysporum* f.sp.*batatas* (Wollenweber) Snyderet Hansen]。

4.1.5 茎线虫病(Stem nematode,Brown ring;病原 *Ditylenchus destructor* Thorne)。

4.2 汰除病虫害

不能在达到质量要求的脱毒种薯(苗)上发生的病虫害。

4.2.1 根结线虫病[Root-knot nematode,病原 *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood]。

4.2.2 细菌性萎蔫病(甘薯瘟)(Bacterial wilt,病原 *Pseudomonas solanacearum* E.F.Sm.)。

4.2.3 根腐病[Root rot,病原 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *batatas* Mc Clure]。

4.2.4 甘薯蚁象[Weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius)]。

5 要求

5.1 各级别脱毒种薯(苗)繁殖田中带病植株允许率应符合表1要求。

表1 各级别脱毒种薯(苗)繁殖田中带病植株的允许率

检验时期	种薯级别	病害及混杂株(%)									
		病毒病	甘薯瘟	根腐病	根结线虫病	茎线虫病	甘薯蚁象	蔓割病	黑斑病	疮痂病	混杂植株
分枝期检验	育种家种子	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	原原种	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	原种	≤ 5.0	0	0	0	0	0	≤ 1.0	≤ 5.0	0	≤ 1.0
	生产用种	≤ 10.0	0	0	0	≤ 1.0	0	≤ 2.0	≤ 8.0	≤ 5.0	≤ 4.0
封垄前检验	育种家种子	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	原原种	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	原种	≤ 3.0	0	0	0	0	0	≤ 1.0	≤ 3.0	0	≤ 0.5
	生产用种	≤ 10.0	0	0	0	≤ 1.0	0	≤ 2.0	≤ 5.0	≤ 3.0	≤ 2.0
收获前2周检验	育种家种子	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	原原种	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	原种	≤ 2.0	0	0	0	0	0	≤ 1.0	≤ 1.0	0	≤ 0.5
	生产用种	≤ 10.0	0	0	0	≤ 1.0	0	≤ 2.0	≤ 2.0	≤ 1.0	≤ 2.0

注:种苗质量应符合第一次检验质量指标。

5.2 各级别脱毒种薯块根质量指标应符合表2要求。

表2 各级别脱毒种薯(苗)块根质量指标

项 目	允许率(%)			
	育种家种子	原原种	原种	生产用种
纯度	100.0	100.0	>99.5	>98.0
薯块整齐度	≥90.0	≥90.0	≥85.0	≥85.0
有缺陷薯	≤1.0	≤1.0	≤3.0	≤5.0
杂质	≤1.0	<2.0	<2.0	<2.0
软腐病	0	0	0	<1.0
镰刀菌干腐病和腐烂	0	0	0	<1.0
茎线虫病	0	0	0	≤1.0
根结线虫病	0	0	0	0
甘薯蚁象	0	0	0	0
根腐病	0	0	0	0
黑斑病	0	0	≤1.0	≤2.0

6 试验方法

6.1 脱毒试管苗的检验

6.1.1 酶联免疫检测法

目测淘汰弱苗和显症苗。当单株的试管苗展开叶达6片以上时进行检测,按株取其上、中、下部叶片用于酶联免疫检测,剩余植株部分继代培养。用酶联免疫检测法初检后,淘汰显阳性反应的单株。检测方法见附录A。

6.1.2 指示植物检测确认

通过酶联免疫检测法检测的健康株继续扩繁,经指示植物检测,指示植物不显症的才能确认为脱毒试管苗。检测方法见附录B。经检测确认健康脱毒试管苗继续扩繁。

6.1.3 脱毒试管苗的种性鉴定

将脱毒试管苗种植于防虫网室内,每株系3株,对照原品种的特征特性,剔除变异株系和混杂株系,收获时检验块根质量,与原品种性状一致的株系进行扩大繁殖。

6.1.4 扩繁苗的检验

随机抽取1%~2%脱毒试管苗再次检测,经酶联免疫检测法检测淘汰阳性反应株后,再经指示植物检测确无症状后,方可用于扩大繁殖。检测方法应符合附录A和附录B的要求。

6.2 脱毒种薯(苗)的检验

6.2.1 脱毒种薯(苗)植株的检验

6.2.1.1 真细菌病害和线虫病害、甘薯蚁象的检测 在种植脱毒种薯(苗)的田间进行质量检验。检测方法应符合附录C的要求。

6.2.1.2 病毒病的检测 经过真细菌病害和线虫病害、甘薯蚁象检测后的田块,采用酶联免疫检测法或指示植物检测法进行病毒检测。检测方法应符合附录A和附录B的要求。

6.2.2 田间抽样方法

6.2.2.1 育种家种子、原原种和原种抽样 于分枝期、封垄前、收获前2周,在目测全田基础上,采用随机取样法,抽样数量为:0.1 hm²以下检验2点,每点100株;0.11 hm²~1 hm²检验5点,每点100株;超过1 hm²面积,划出另一检验区,按本标准规定面积取样。病毒检测每株取茎蔓上、中、下部叶片各1片,24 h内检测。

6.2.2.2 生产用种抽样 于封垄前、收获前2周,在目测全田的基础上,采用随机取样法,0.1 hm²以下检验2点,每点100株;0.11 hm²~1 hm²检验5点,每点100株;1.1 hm²~5 hm²检验10点,每点100株;超出5 hm²面积,划出另一检验区,按本标准规定面积取样,取样方法同原种。

6.2.2.3 病毒检测 进行病毒检测时,原原种每5株混样;原种或生产用种混合后二次抽样,随机抽取10%~50%的混合样品检测,抽取样品最低数量为100株。

6.2.3 脱毒种薯(苗)的块根质量检验

6.2.3.1 经过植株检验的种薯(苗)必须进行块根质量检验。检测方法应符合附录D的要求。

6.2.3.2 块根质量检验抽样方法 根据脱毒种薯块根的不同存放方式,采用分层设点取样或随机取样,抽样数量见表3。

表3 脱毒种薯块根抽样数量标准表

种类	总量	抽样百分率(%)	抽样最低数量
种薯	≤10 000 kg	6~10	100 kg
	>10 000 kg	3~5	

注:不足抽样最低数量的全部作为混合样品。

将第一次抽取的样品混合后进行二次抽样,随机抽取 10% 的混合样品检测。

7 判定规则

- 7.1 脱毒种薯(苗)分级以繁殖田播种的种薯级别、带病植株比率、混杂植株比率为定级标准。
- 7.2 病毒病、蔓割病、黑斑病、茎线虫病、疮痂病以及混杂植株比率六项质量指标,任何一项不符合原来级别质量标准但又高于下一级别质量标准者,判定结果均按降低一级定级别。只要检出根腐病、根结线虫病、甘薯瘟、甘薯蚁象,即不能作为种薯。
- 7.3 经田间植株质量检验合格后,其块根质量还应符合各级别脱毒种薯块根质量指标。

8 收获

当地温稳定在 15℃ 左右时,适时收获。剔除病、烂和无种用价值的块根。不同品种单收单放,严禁混杂。

9 包装、标签

9.1 包装

- 9.1.1 用清洁的、通气性好的、装卸和运输中不易破损的材料包装。
- 9.1.2 每包装的质量以适宜装卸和运输为宜。

9.2 甘薯脱毒种薯标签

- 9.2.1 标签用材为具韧性、不易破损的材料制造,不同级别种薯标签可用不同颜色区分。
- 9.2.2 标签要印刷有品种、级别、质量、生产单位、联系方式等信息。
- 9.2.3 将标签正面朝外固定于包装上。

10 运输

- 10.1 不同品种、不同级别的种薯一同运输时严防混杂,包装外无法确认的种薯一律作杂薯处理。
- 10.2 防止机械碰伤,防雨,防 10℃ 以下冷害。

11 贮藏

- 11.1 贮藏前剔除病、烂薯。
- 11.2 标准质量包装以品种单独存放,堆放高度以能通风透气和不致压坏种薯为宜,单窖贮藏量较大时,可在薯堆中留出巷道或放置风筒。
- 11.3 入窖 20 d 内要通风排湿、降温,温度降至 13℃~15℃,相对湿度 95% 以下。可以在刚入窖时实行高温愈合处理,防治软腐病和黑斑病。
- 11.4 入窖 20 d 后,保持窖温 12℃~14℃,不低于 10℃,相对湿度保持 85%~90%。可以在薯堆上盖草帘等吸湿物。
- 11.5 贮藏期间防治鼠害。

附录 A

(规范性附录)

斑点酶联免疫检测法(DOT-ELISA)

A1 试剂

所用化学试剂为分析纯级规格,用水为蒸馏水。

A1.1 三羟甲基氨基甲烷(TBS)(pH7.5)

Tris Base	4.84 g
氯化钠(NaCl)	58.44 g
叠氮钠(NaN_3)	0.40 g

溶于 1 990 mL 蒸馏水中,用盐酸(37%)调 pH 至 7.5,定容至 2 000 mL。

A1.2 洗涤缓冲液(T-TBS)

1.0 mL 吐温-20(Tween-20)溶于 2 000 mL TBS 中。

A1.3 抽提缓冲液

亚硫酸钠(Na_2SO_3)0.2 g 溶于 TBS 中,定容至 100 mL。

A1.4 封闭缓冲液(现用现配)

脱脂奶粉	0.50 g
粹通 X-100(Triton X-100)	0.5 mL
TBS	25 mL

先将脱脂奶粉溶于少量 TBS 中,再用 TBS 定容至 25 mL。加入 Triton X-100 混合均匀。

A1.5 抗体稀释缓冲液

脱脂奶粉	1.00 g
TBS	50 mL

先将脱脂奶粉溶于少量 TBS 中,再用 TBS 定容至 50 mL。

A1.6 底物缓冲液(pH9.5)

Tris Base	6.05 g
氯化钠(NaCl)	2.92 g
氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.51 g
叠氮钠(NaN_3)	0.05 g

溶于 450 mL 蒸馏水中,用浓盐酸调 pH 至 9.5,定容至 500 mL。

A1.7 硝基蓝四唑盐(NBT)和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯(BCIP)储备液

NBT 储备液:

NBT	0.04 g
70% N,N-二甲基甲酰胺	1.2 mL

混合均匀,4 ℃ 避光保存。

BCIP 储备液:

BCIP	0.02 g
70% N,N-二甲基甲酰胺	1.2 mL

混合均匀,4 ℃ 避光保存。

A1.8 底物溶液(现用现配)

底物缓冲液	25 mL
NBT 储备液	75 μ L
BCIP 储备液	75 μ L

先将 NBT 储备液溶于 25 mL 底物缓冲液中,再逐滴加入 BCIP 储备液,边加边振摇混匀。

A2 样品制备

将待测叶片用清水清洗干净,从每一样品叶片上各取一直径约 1 cm 圆片,放入样品袋中,加入 3 mL 抽提缓冲液充分研磨,4 $^{\circ}$ C 静置 30 min~40 min,取澄清汁液点样。样品为块根时,催芽处理后取幼芽、叶制样。

A3 操作步骤**A3.1 点样**

将打好方格的硝化纤维素膜用 TBS 缓冲液处理后放在洁净的滤纸上,每个样品各吸取 17 μ L 上清液滴在膜上方格的正中,干燥 15 min~30 min。同时设阳性、阴性和空白对照,可根据需要设置重复。

A3.2 封闭

将干燥后的膜浸泡在封闭缓冲液中,室温下摇床振荡(50 r/min)1 h。

A3.3 孵育第一抗体

将膜置于用抗体缓冲液稀释至工作浓度的抗血清中,室温下摇床振荡(50 r/min)过夜。

A3.4 洗涤

用洗涤缓冲液洗膜 3 次,每次摇床振荡(100 r/min)3 min。

A3.5 孵育第二抗体

将膜置于用抗体缓冲液稀释至工作浓度的酶标抗体中,室温下摇床振荡(50 r/min)1 h。

A3.6 洗涤

洗涤 4 次,方法同 A3.4。

A3.7 显色

将膜置于 NBT/BCIP 底物溶液中,室温下摇床振荡(50 r/min)孵育 30 min。

A3.8 终止反应

弃去底物溶液并用蒸馏水洗膜 3 次,每次摇床振荡(100 r/min)3 min。

A3.9 阳性判断

晾干后观察颜色反应,出现蓝紫色颜色反应的样品为阳性。

附 录 B
(规范性附录)
指示植物检测法

B1 材料准备

B1.1 将待检脱毒苗或种苗盆栽于防虫措施良好的温室中。

B1.2 盆播指示植物——巴西牵牛(*Ipomoea setosa*),花盆直径不小于10 cm,每待检样品及阳性对照各需生长健壮巴西牵牛5株。

B2 嫁接

B2.1 巴西牵牛生长出1~2片真叶时嫁接,以待检样品茎蔓为接穗,巴西牵牛为砧木。将待检样品茎蔓中下部茎段切成3段~5段,每个接穗带一个单芽及叶片,去叶后将底端削成楔形,插入巴西牵牛砧木切口内,封口膜扎紧。嫁接后白天保持气温26℃~32℃,相对湿度80%~90%,适当遮荫,嫁接成活后,给予充足光照。

B2.2 阳性判断

嫁接后2周~3周显症,在所有嫁接指示植物中只要有一株表现典型症状即为阳性。症状为:

SPFMV	羽状斑驳
SPLV	叶脉变黄
SPCF	叶片褪绿斑

附录 C
(规范性附录)

表 C.1 甘薯种薯(苗)田间带病植株症状

病害名称	植 株	块 根
细菌性萎蔫病(甘薯瘟)	从育苗到结薯均能发病。晴天中午, 病苗顶部叶片萎垂, 茎基呈现黑褐色水烂状, 维管束从下而上黄褐色条纹状, 严重时, 茎内全部腐烂, 仅残留纤维。成株发病, 叶色暗淡, 无光泽, 蔓出现水渍状斑点, 呈黑褐色, 剖视维管束, 褐色条纹用手拉易脱皮, 留下纤维	轻病薯块乳汁明显减少, 有苦臭味, 煮后不烂, 外表症状常不明显, 仅薯蒂附近呈黑褐色或尾根呈不同程度病变, 剖开横切面为分散的褐色小斑点或黄褐至深褐色斑块, 纵切面从藤头或自尾根始, 维管束呈黄褐色条纹状; 可挤出乳状菌脓。重症薯块, 整块呈黑褐色腐烂或一端腐烂, 有脓液状或淡黄色菌液, 臭味很甚
甘薯黑斑病	茎基部形成黑褐色梭形或椭圆形病斑, 稍凹陷, 病斑初期有灰色霉层, 后变为黑色粉状物, 病斑逐渐扩大, 重者基部全部变黑, 枯死	薯块上形成黑色近圆形病斑, 病部稍凹陷, 轮廓清晰, 组织坚实, 如用刀横割病斑部, 可见薯皮下的薯肉呈青褐色或黑褐色, 深 0.5 cm~2 cm, 有苦味和强烈的臭味。病部木栓化, 坚硬, 干腐, 在适当条件下, 病斑中央会长出黑色刺毛状物——子囊壳
甘薯疮痂病	叶片卷皱呈木耳形; 嫩芽僵缩; 茎蔓和叶柄生出无数凹凸粗糙的病斑, 病蔓先端硬化僵直不再伏地蜿蜒; 顶芽受害病斑初为透明深红色, 扩大后逐渐变黑褐色而枯死; 新梢和幼叶不能长大, 整个顶梢收缩僵硬而直立, 表现粗糙成麻脸状	不表现症状
甘薯蔓割病	幼苗、叶脉间叶肉变黄, 茎内维管束变褐色。潮湿时, 病部产生白色至淡红色的霉层。轻者分枝增生和节间缩短, 茎基膨大, 出现青晕, 表皮似裂呈丝状。罹病植株发生全株性枯萎、死亡, 地上部叶片自下而上变黄脱落, 茎最后开裂	维管束变褐, 横切薯块蒂部, 可见褐色圆环斑, 严重时, 上部茎蔓枯死, 而薯块并不腐烂, 且在土表抽出很多幼蔓
根腐病	根系腐烂, 多从不定根的尖端或中部开始变黑, 逐渐向上蔓延至根茎部位 1~2 个叶节, 形成黑褐色病斑。病斑表皮纵裂, 重病株地下根茎大部分变黑, 地上部茎蔓缩短, 分枝少或无分枝, 形成独杆苗, 叶片发黄、反卷、叶变小, 组织硬化, 并且发脆, 叶片自下而上干枯脱落, 植株大量现蕾开花, 常造成大片死苗, 重者全部死亡	一般不结薯, 轻病株结薯畸形, 呈大肠状或葫芦状, 表皮松软, 表面小病斑, 用手一拉就下来, 未向薯肉深入
根结线虫病	根系形成绳结状, 使地下部多牛蒡状, 毛根纵生, 细根上有米粒大小的根结, 有的成串, 剥开根结, 可见一至数个雌虫	龟裂型: 块根畸形, 褐色纵裂口 棒根型: 粗 1 cm~2 cm, 棒状块根 线根型: 只有线状牛蒡根, 不膨大成薯块
茎线虫病	苗期: 发病重的出苗稀、矮小、发黄, 剖视茎基部, 内有褐色空隙, 剪断后不流或很少流白浆。后期侵入部位表皮裂成小口, 髓部呈褐色干腐状, 剪断后无白浆。茎蔓症状: 主蔓基部髓部先白色干腐, 后渐变褐色, 严重时基部蔓短、叶黄, 甚至主蔓枯死。根部症状: 根部表皮坏裂	糠心型: 薯苗、种薯带病, 先块根纵剖面内部呈稀絮状白色糠道, 后期由于伴随其他杂菌形成褐色相间的褐色糠道。有时内部虽毁坏, 但外表接近健者 裂皮型: 轻病肉眼不易看出, 开始外皮褪色, 不久变青, 有的稍凹陷, 有的有小裂口, 皮下组织变褐, 最后皮色呈暗紫色, 并多龟裂, 内呈褐白相间的干腐

表 C.1 (续)

病害名称	植 株	块 根
软腐病		开始时仅薯块变软,水渍状,发黏,以后薯块表现长出茂盛的菌丝和孢子囊,用手指一触,即流出草黄色汁液,具芳香酒味,如被次生寄生物入侵则变成霉酸或臭味,以后干缩成硬块。病菌侵入时由一点或多点横向发展
镰刀菌干腐病		薯块上先产生黑褐色凹陷小斑点,后扩展成圆形凹陷斑,表面有粉红色或白色霉状物,最后薯块干腐成褐色僵块
甘薯蚁象	外露的块根和茎叶被啃食,常使植株变黄,重者死亡,造成田间缺苗	块根变褐、黑褐色,木质化,钻成伤口和孔道,伴有臭味

附录 D
(规范性附录)
块根质量检测方法

D1 杂质

D1.1 挑选出无种用价值的块根,以及其他有机、无机物质,去掉块根上的泥土,并用毛刷刷去块根上的浮土,对这些杂质进行称重(m_0)。

D1.2 称重所有的块根(m_1)。

D1.3
$$n_1 = \frac{m_0}{m_0 + m_1} \times 100\%$$

式中: n_1 为杂质。

D2 薯块整齐度

D2.1 称重 100 g~500 g 块根(m_2)。

D2.2
$$n_2 = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%$$

式中: n_2 为薯块整齐度。

D3 有缺陷薯

D3.1 目测块根,挑选出有机械损伤、虫鼠伤、畸形薯块称重(m_3)。

D3.2
$$n_3 = \frac{m_3}{m_1} \times 100\%$$

式中: n_3 为有缺陷薯。

D4 软腐病

D4.1 根据附录 C 中软腐病症状对块根进行判断,挑选出软腐病薯称重(m_4)。

D4.2
$$n_4 = \frac{m_4}{m_1} \times 100\%$$

式中: n_4 为软腐病。

D5 镰刀菌干腐病和腐烂

D5.1 根据附录 C 中镰刀菌干腐病症状对块根进行判断,挑选出镰刀菌干腐病薯称重(m_5)。

D5.2 挑选出除因软腐病、根腐病和镰刀菌干腐造成的腐烂外,其他原因造成的腐烂薯称重(m_6)。

D5.3
$$n_5 = \frac{(m_5 + m_6)}{m_1} \times 100\%$$

式中: n_5 为镰刀菌干腐病和腐烂。

D6 茎线虫病

D6.1 根据附录 C 中茎线虫病症状对块根进行判断,挑选出茎线虫病薯称重(m_7)。

D6.2
$$n_6 = \frac{m_7}{m_1} \times 100\%$$

式中： n_6 为茎线虫病。

D7 根结线虫病

D7.1 根据附录 C 中根结线虫病症状对块根进行判断,挑选出根结线虫病病薯称重(m_8)。

D7.2
$$n_7 = \frac{m_8}{m_1} \times 100\%$$

式中： n_7 为根结线虫病。

D8 甘薯蚁象

D8.1 根据附录 C 中甘薯蚁象症状对块根进行判断,挑选出甘薯蚁象病薯称重(m_9)。

D8.2
$$n_8 = \frac{m_9}{m_1} \times 100\%$$

式中： n_8 为甘薯蚁象。

D9 黑斑病

D9.1 根据附录 C 中黑斑病症状对块根进行判断,挑选出黑斑病薯称重(m_{10})。

D9.2
$$n_9 = \frac{m_{10}}{m_1} \times 100\%$$

式中： n_9 为黑斑病。

D10 根腐病

D10.1 根据附录 C 中根腐病症状对块根进行判断,挑选出根腐病薯称重(m_{11})。

D10.2
$$n_{10} = \frac{m_{11}}{m_1} \times 100\%$$

式中： n_{10} 为根腐病。

D11 纯度

D11.1 根据品种特性对块根进行判断,挑选出混杂薯称重(m_{12})。

D11.2
$$n_{11} = \frac{(m_1 - m_{12})}{m_1} \times 100\%$$

式中： n_{11} 为纯度。

附录 E

(资料性附录)

甘薯瘟病室内检验方法

E1 细菌溢检验法

在检验可疑病苗时,选发病未腐烂的部位,将表皮剥开,用刀片纵切一小块(大约长 5 mm、宽 3 mm、厚 1 mm)黄褐色维管束组织放在载玻片上,滴一滴清水,如果 1 min 后有乳白色的细菌溢在切口处出现,十几分钟后病组织四周布满细菌液(肉眼或放大镜可看到)就证明有薯瘟病细菌。

在检验可疑薯块时,选发病未腐烂的部位,取一小块变色的维管束组织,制成玻片,在显微镜下检查,若有细菌液出现,即为薯瘟病菌。

E2 番茄苗接种测定法

选感病品种的番茄(如沈阳番茄)为接种材料,先把番茄种在小钵中,每钵 4 株,等长出 2~3 片真叶时备用。可疑病株按上述方法制成 1 mL 的病菌组织液,随即把组织液装入 4 号针头的注射器中,从番茄叶背叶脉把病菌组织液注入叶脉渗到叶肉组织,使叶片呈水渍状,每次接种 5 株 10 片,然后置于调温调湿箱中,保持 28℃~30℃和 90%左右的湿度(没有调温调湿箱,可用尼龙袋保湿)。如果接种用的薯苗液带有薯瘟病细菌,经过 24 h~36 h,接种的番茄叶片呈暗灰色水渍状,后病部扩大,叶片萎垂。湿度大时接种部位有白色的细菌脓溢出,检查接种叶片的叶脉和叶柄,有细菌溢出。

E3 水育薯苗白根测定法

第一步:育根。按常规剪取无病薯苗 20 株~30 株,每株分别插入无菌的大号试管中,每管灌满无菌清水(自来水),装上试管架,在甘薯生长季节室温下,经 7 d~10 d,水下各节萌发苗根,需常补足试管水,使苗根雪白幼嫩。

第二步:剪根。用无菌剪刀取第一步培育的白根 20 段(每段 3 cm~4 cm)。

第三步:接种测定。①备灭菌培养皿 4 副,内垫无菌吸水纸加灭菌水滋润保湿。②将待测定的薯苗或薯块等可疑病部组织浸出液(或直接取菌脓),用上备白根 10 段浸渍接种后,移入保湿灭菌皿中各 5 段,另二皿 10 段用无菌清水接种为对照。③所有培养皿均放 30℃恒温下,经 12 h~24 h,即可诱致白根段呈淡黄而腐烂,对照白根则雪白无病。

E4 红四氮唑(TTC)平板检验法

选维管束变黄褐色未腐烂的病苗一段,先用肥皂水洗净,再用 70%酒精擦洗表皮和手指,然后用灭菌的小刀将表皮剥开,置于灭菌的培养皿中,用灭菌的手术剪将病组织剪碎,加 10 倍无菌水浸渍,使病组织中的细菌泳入水中,30 min 后用灭菌的移植环抽取菌液,在预先备好的红四氮唑琼脂平板上划线分离,划线后将培养皿翻转置于 30℃温箱中培养 24 h~48 h,如果出现白色中央带血红色的菌落,就证明是薯瘟病的细菌菌落。

红四氮唑培养基的制备方法为:称取葡萄糖 10 g(或甘油 5 mL),蛋白胨 10 g,水解物酪素(酪蛋白的水解物)1 g,琼脂 18 g,量取蒸馏水 100 mL。大约用四分之三的水加热琼脂,其他溶于剩下的水中。当琼脂溶解时,加入其他配料的水溶液,搅拌均匀,调节 pH=7 左右,经纱布过滤后每个三角瓶装 100 mL,高压消毒 20 min,分离前每 100 mL 培养基加 1%红四氮唑溶液 0.5 mL。

E5 间接血凝抑制方法

第一步:取可疑病组织的维管束切片若干克于生理盐水(NaCl 含量 0.85%)的试管中,静置 30 min,制成浓缩的浸出液。

第二步:取抗血清以 1:2 为基数进行倍比稀释,稀释到 1:5120(第 11 支试管 1:5 稀释),在 8×12V 型血凝板上依次排列,第十二列安排生理盐水做对照。用标准滴管每种浓度滴一列,每穴一滴(每滴 0.025 mL)。

第三步:每行安排一个样本,设生理盐水对照一个,待检材料六个,纯菌对照一个。每穴一滴,然后用微型混合器振摇 2 min。盖玻璃板,置 37℃ 温箱 40 min。

第四步:每穴滴加抗原致敏血球一滴,再振荡 2 min,盖玻璃板,置 37℃ 温箱 90 min。

第五步:结果判定。血球凝集程度的分级按常规标准记载,在血凝抑制试验中++ 以上的抑制凝集即记载为阳性。发生抑制作用的孔数比生理盐水对照行多 2 孔以上的为明显阳性反应,定为有病。比对照行多 1 孔的为可疑阳性反应,怀疑有病;与对照孔相同的无病。

注:室内检验必备仪器设备:

显微镜	一台	恒温箱	一台
高压灭菌锅	一台	调温调湿箱	一台
注射器	一只	4 号针头	一只
培养皿	4 个	8×12V 型血凝板	一个

制备抗血清必备仪器、材料。

抗血清凝集效价必备仪器。

致敏血球制备必备仪器、材料。