|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.20 |
| CCS | B 61 |

|  |
| --- |
| 54 |

     地方标准

DB 54/T XXXX—XXXX

巨柏无性繁殖技术规程

第3部分：组培

点击此处添加标准名称的英文译名

（本草案完成时间：2025年1月7日）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

       发布

目次

[前言 III](#_Toc187855895)

[1 范围 1](#_Toc187855896)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc187855897)

[3 术语和定义 1](#_Toc187855898)

[4 场地要求 2](#_Toc187855906)

[4.1 组培室 2](#_Toc187855907)

[4.2 炼苗区 2](#_Toc187855908)

[4.3 苗圃 2](#_Toc187855909)

[5 培养基配制 2](#_Toc187855910)

[5.1 培养容器和接种器械的清洗 2](#_Toc187855911)

[5.2 培养基配制 3](#_Toc187855912)

[5.3 培养基灭菌 3](#_Toc187855913)

[6 组织培养 3](#_Toc187855914)

[6.1 外植体来源 3](#_Toc187855915)

[6.2 外植体准备 3](#_Toc187855916)

[6.3 初代培养 4](#_Toc187855917)

[6.4 继代培养 4](#_Toc187855918)

[6.5 生根培养 4](#_Toc187855919)

[7 炼苗移栽 4](#_Toc187855920)

[7.1 炼苗 4](#_Toc187855921)

[7.2 移栽 4](#_Toc187855922)

[7.3 后期管理 4](#_Toc187855923)

[8 出圃 5](#_Toc187855924)

[8.1 出圃要求 5](#_Toc187855925)

[8.2 出圃苗质量分级 5](#_Toc187855926)

[9 建档 5](#_Toc187855927)

[9.1 档案内容 5](#_Toc187855928)

[9.2 档案记载和保存 5](#_Toc187855929)

[附录A （资料性） MS培养基配制表 6](#_Toc187855930)

[附录B （规范性） 组培瓶苗质量分级表 7](#_Toc187855931)

[附录C （规范性） 巨柏常见病虫害防治 8](#_Toc187855932)

[附录D （规范性） 巨柏组培出圃苗质量分级表 9](#_Toc187855933)

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。

请注意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专利的责任。

本文件由西藏自治区林业和草原标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：中国电建集团成都勘测设计研究院有限公司、四川省林业科学研究院、拉萨市林业和草原局林业勘察设计所

本文件主要起草人：马建华、栾丽、姜跃良、左有璐、刘盛赟、胡雪柳、程海燕、唐宇轩、何建良、李丕军、汪诗平

1. 引言

巨柏（学名：*Cupressus gigantea Cheng et L. K. Fu*）是国家一级保护野生植物，已被列入《中国植物红皮书》、《中国生物多样性红色名录-高等植物卷》、《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》（IUCN）——易危（VU）种。巨柏同时也是雅江特有种,根据巨柏年龄情况分析研究，现有雅江分布的巨柏多为100年以上的古树。近年来，巨柏的野生资源不断遭受人类活动的威胁，开展巨柏无性繁殖技术研究并形成技术标准，能针对性得对每株巨柏古树基因进行定点保护。本文件旨在通过建立巨柏无性繁殖技术规程，为巨柏的人工繁殖提供技术支撑，保护巨柏自然资源，拟由三个部分组成。

1. 第1部分：嫁接。目的在于确定巨柏嫁接繁殖的相关技术操作规程。
2. 第2部分：扦插。目的在于确定巨柏扦插繁殖的相关技术操作规程。
3. 第3部分：组培。目的在于确定巨柏组培繁殖的相关技术操作规程。

巨柏的嫁接、扦插、组培三种方式同为无性繁殖技术方式，在巨柏的人工繁殖上根据材料来源、季节、成本、成品苗要求等可以选择不同的繁殖方式。三种方式即为互补又协同，共同服务于巨柏的资源保护和种苗的产业化生产。

巨柏无性繁殖技术规程

第3部分：组培

* 1. 范围

本文件规定了巨柏组培快繁的场地要求、培养基配制、组织培养、炼苗移栽及出圃、建档等。

本文件适用于西藏自治区海拔500m～3000m的巨柏组培快繁育苗。

* 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 5749 生活饮用水卫生标准

GB/T 6001 育苗技术规程

LY/T 1882 林木组织培养育苗技术规程

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

巨柏

乔木，高30～45米，胸径1～3米，稀达6米；树皮纵裂成条状；生鳞叶的枝排列紧密，粗壮，不排成平面，常呈四棱形，稀呈圆柱形，常被蜡粉，末端的鳞叶枝径粗1～2毫米，不下垂；二年生枝淡紫褐色或灰紫褐色，老枝黑灰色，枝皮裂成鳞状块片。鳞叶斜方形，交叉对生，紧密排成整齐的四列，背部有钝纵脊或拱圆，具条槽。球果矩圆状球形，长1.6～2厘米，径1.3～1.6厘米；种鳞6对，木质，盾形，顶部平，多呈五角形或六角形，或上部种鳞呈四角形，中央有明显而凸起的尖头，能育种鳞具多数种子；种子两侧具窄翅。产于西藏雅鲁藏布江流域的郎县、米林等地，甲格以西分布较多，常在海拔3000m～3400m地带生于沿江地段的慢滩和有灰石露头的阶地阳坡的中下部，组成稀疏的纯林。

[来源：中国植物志,有修改]

外植体

用于植物组织培养的离体植物器官、组织、细胞以及原生质体。

[来源：LY/T 1882]

培养基

根据植物营养原理和植物组织培养的要求人工配制的营养基质。

[来源：LY/T 1882]

接种

在无菌条件下将经体表灭菌后的外植体置入培养基的过程。

[来源：LY/T 1882]

继代培养

外植体经初代培养后，再次以及以后各次接种于新培养基继续培养的过程。

* 1. 场地要求
     1. 组培室
        1. 操作间

操作间主要进行培养基和培养母液的配制及培养基灭菌工作。可细分为储藏室，称量室，操作室，灭菌室，培养基储藏室。配制培养基所需化学试剂为附录A所列及氢氧化钠（Sodium hydroxide，NaOH），盐酸（Hydrochloric acid，HCl），蔗糖，琼脂等化学试剂。

* + - 1. 缓冲间

是从外部环境到内部洁净环境的过度空间。包括风淋室和操作人员的清洗、换衣设备。所需的仪器设备为风淋室。

* + - 1. 接种室

组培材料的灭菌、接种和继代工作。要求无菌环境。

* + - 1. 培养间

主要进行巨柏材料的培养。要求能控温控湿，并控制光培养和暗培养的时间，为无菌洁净空间。

* + 1. 炼苗区

是巨柏组培苗材料移栽前的过度空间。搭建荫棚，有遮荫喷水设施。保持温度25 ℃～30 ℃，湿度85%以上。

* + 1. 苗圃

栽植床排水良好，栽植床采用深沟高畦，畦宽1.6 m～2.0 m，沟深20 cm～30 cm，宽20 cm，沟与沟之间相连，利于排水。应有定时喷灌设施，排水设施，降温设施，增温设施，补光设施。大田苗床须搭建小拱棚，保持温度25 ℃～30 ℃，湿度85%以上。苗圃的建设按照GB/T 6001的相关标准执行。

* 1. 培养基配制
     1. 培养容器和接种器械的清洗

培养容器和接种器械洗涤干净，干燥后备用。

* + 1. 培养基配制
       1. 培养基母液的配制

培养基采用Murashige和Skoog（Murashig and Skoog Medium，MS）基本培养基，所需各元素见附录A。配制方法按照LY/T 1882的相关标准执行。

* + - 1. 激素母液配制

激素采用萘乙酸（1-Naphthaleneacetic acid，NAA）和吲哚-3-乙酸（Indole-3-acetic acid，IAA）。NAA和IAA激素母液配制方法为：使用电子天平称取100 mg 激素原装粉末，使用95%酒精预溶，在100 ml容量瓶中加入超纯水定容，盖上盖子后上下摇晃15次以上，配制成1 mg/ml的激素母液放置于100 ml避光玻璃容器中备用。

* + - 1. 初代培养基的配制

初代培养基配方为MS培养基。用1 mol/L氢氧化钠调节PH值为6.5.分装至240 ml组培瓶中。配制方法按照LY/T 1882的4.2.1培养基配制的相关标准执行。

* + - 1. 继代培养基的配制

继代培养基配方为MS+0.3 mg/L NAA+0.05 mg/L IAA。用氢氧化钠调节PH值为6.5，分装至240 ml组培瓶中。配制方法按照LY/T 1882的4.2.1培养基配制的相关标准执行。

* + - 1. 生根培养基的配制

生根培养基配方为MS+0.3 mg/L NAA+0.05 mg/L IAA。用1mol/L氢氧化钠调节PH值为6.5.分装至240ml组培瓶中。配制方法按照LY/T 1882的4.2.1培养基配制的相关标准执行。

* + 1. 培养基灭菌

将分装好的培养基放入灭菌锅中，在121 ℃，0.5 MPa的环境中灭菌25 min后，冷却凝固后，保存在无菌环境中备用。

* 1. 组织培养
     1. 外植体来源

选用巨柏健康植株上的种子。

* + 1. 外植体准备
       1. 采集

1. 巨柏为国家一级保护野生植物，外植体的采集应按程序办理并获得“采集证”。
2. 外植体的采集时间为晴天。选用生长健壮、无病虫害母株的果实，晾晒脱壳后获得巨柏种子。
3. 以生活饮用水标准浸泡种子，去掉水面漂浮种子，下沉种子晾干备用。
   * + 1. 预处理

将种子用纱布包裹，在流水下冲洗30 min～120 min。用干纱布吸水滤干备用。

* + - 1. 表面消毒

将处理好的种子在超净工作台上，用75%的酒精处理60 s，无菌后的超纯水清洗两遍，再用30%次氯酸钠处理10 min，无菌水清洗5遍后，用无菌滤纸吸干多余水分备用。

* + 1. 初代培养

在超净工作台上，将灭菌好的种子平放于初代培养基中，使种子平铺于培养基之上。选用240 ml的组培瓶进行初代培养，每瓶培养基20 ml～30 ml，接种密度为5株/瓶。在光照2000 Lux，光培养/暗培养为14 h/10 h，温度24 ℃±2 ℃，湿度70%±10%的培养室中培养，培养周期40 d。

* + 1. 继代培养

待萌发的无菌苗长至8 cm以上，在超净工作台上将无菌苗剪成2 cm左右的带芽茎段，接种到增殖培养基上。选用240 ml的组培瓶进行继代增殖，每瓶培养基20 ml～30 ml，接种密度为5株/瓶，增殖周期40 d。培养条件同5.3的规定。

* + 1. 生根培养

待增殖后的丛生芽单芽长至3 cm～5 cm时，在超净工作台上切割单芽或茎段转接于生根培养基上，切割长度3 cm以上。培养条件同5.3的规定，培养20 d～30 d。

* 1. 炼苗移栽
     1. 炼苗

选取高度7cm左右生根组培苗，单株根系数和叶片数均为5以上的组培苗进行炼苗。组培瓶苗的质量分级见附录B。在炼苗区先闭瓶炼苗7 d，再开瓶炼苗5 d。

* + 1. 移栽

1. 取出组培苗，用生活饮用水洗去基部培养基，用1 g/L多菌灵浸泡3 s～5 s后移栽至苗床或育苗容器中，移栽基质为V泥炭土：V珍珠岩=2：1的轻基质。温室内温度控制在22 ℃～30 ℃之间，湿度控制在80%左右。
2. 移栽后喷足定根水，遮荫保湿，防止前期高温灼伤，后期逐渐放宽温光条件，使其与外界环境一致。每隔5 d～7 d用1 g/L的多菌灵或0.8 g/L代森铵或0.6 g/L百菌清等喷洒防病。
   * 1. 后期管理
        1. 水分管理

移栽前期保持土壤湿润，不可偏干。夏季应在早晚浇水，入秋后土壤稍干为宜，冬季尽量减少水分。

* + - 1. 施肥管理

移栽前期避免施肥，移栽一月后可视苗木情况适当施肥。夏季以氮肥为主，秋季以磷、钾混合肥为主。每隔30 d～45 d淋施一次。

* + - 1. 病虫害管理

按照附录C的相关规定执行。

* 1. 出圃
     1. 出圃要求

1. 苗高12 cm以上，具10条以上完整根，根长3 cm以上。
2. 要求苗生长健壮，无病虫害，无黄叶、烂叶。
3. 出圃苗移栽时须保护好根系。
   * 1. 出圃苗质量分级

出圃苗的质量分级见附录C。

* 1. 建档
     1. 档案内容

1. 组培室基本情况
2. 组培育苗技术及管理措施、苗木产量质量、苗木成本。
3. 各项试验设计、病虫害调查。
   * 1. 档案记载和保存

应指定专人记录并保存，积累数据，及时分析，为提高组培育苗技术和经营管理水平提供依据。

2. （资料性）  
   MS培养基配制
   1. MS培养基配制

| 基本元素 | 名称 | 工作液浓度（mg/L） | 母液浓度  （g/L） | 1L培养基取用量 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 大量元素（10倍） | NH4NO3 | 1 650 | 16.5 | 100ml |
| KNO3 | 1900 | 19 |
| MgSO4·7H2O | 370 | 3.7 |
| CaCl２·2H2O | 440 | 4.4 |
| KH2PO4 | 170 | 1.7 |
| 微量元素（100倍） | KI | 0.83 | 0.083 | 10ml |
| H3BO3 | 6.2 | 0.62 |
| MnSO4·4H2O | 22.3 | 2.23 |
| ZnSO4·7H2O | 8.6 | 0.86 |
| Na2MnO4·2H2O | 0.25 | 0.025 |
| CuSO4·5H2O | 0.025 | 0.0025 |
| CoCl2·6H2O | 0.025 | 0.0025 |
| 铁盐（100倍） | FeSO4·7H2O | 27.8 | 2.78 | 10ml |
| Na2-EDTA·2H2O | 37.3 | 3.73 |
| 有机成分（100倍） | 肌醇 | 100 | 10 | 10ml |
| 烟酸 | 0.5 | 0.05 |
| 盐酸吡哆醇（维生素B6） | 0.5 | 0.05 |
| 盐酸硫胺素（维生素B1） | 0.1 | 0.01 |
| 甘氨酸 | 2 | 0.2 |

1. （规范性）  
   瓶苗质量分级表
   1. 瓶苗质量分级表

| 指标 | I级 | II级 | III级 |
| --- | --- | --- | --- |
| 根数（条） | >9 | >7 | >5 |
| 苗高（ cm） | >9 | >8 | >7 |
| 叶片数（片） | >11 | >7 | >5 |
| 主茎粗（mm） | >1.2 | >0.8 | >0.5 |
| 污染情况 | 无污染 | 无污染 | 无污染 |
| 整体感 | 全株健壮，色泽翠绿，根部无愈伤组织附着 | 全株健壮，少量黄叶片，根部无愈伤组织附着 | 全株健壮，少量黄叶，根部少量愈伤组织附着 |

1. （规范性）  
   病虫害防治表
   1. 病虫害防治表

| 病虫害名称 | 发病部位 | 危害方式 | 防治方法 |
| --- | --- | --- | --- |
| 薄翅蜂虎 | 叶片 | 吸食叶片汁液。 | 1%阿维菌素2000倍液或5%吡虫啉3000倍液喷施防治 |
| 枯干病 | 树干 | 常见的真菌病害，通过巨柏伤口侵入。 | 及时修剪柏树枝条，保持枝条干燥通风，使用70%甲基硫菌灵可湿性粉剂800倍液喷雾。 |
| 柏木虱 | 叶片 | 吸食巨柏叶片汁液。 | 及时修剪患病枝叶，喷施25%扑虱灵可湿性粉剂6000倍;或40%乐果划氧化乐果1000倍液防治。 |
| 柏树粉蚧 | 叶片 | 吸食巨柏汁液为食，使巨柏叶片发黄脱落。 | 1%阿维菌素2000倍液或5%吡虫啉3000倍液喷施防治，也可以用软毛刷清除叶片上的虫害。 |
| 柏蛾 | 树干、叶片 | 寄生在巨柏树上，造成叶片萎黄，呈现蛾蚀状。 | 使用对25%灭幼喷洒防治，清除叶片上的虫卵。 |
| 柏树锈病 | 叶片 | 常见的真菌病害，主要通过孢子传播。 | 及时清除感染的叶片，保持叶片干燥通风，70%甲基硫菌灵可湿性粉剂800倍液喷雾。 |

1. （规范性）  
   出圃苗质量分级表
   1. 出圃苗质量分级表

| 指标 | I级 | II级 | III级 |
| --- | --- | --- | --- |
| 根数（条） | >15 | >13 | >10 |
| 株高（cm） | >30 | >20 | >12 |
| 地径（mm） | >4 | >2 | >1 |

参考文献

[1]中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1993.

