

ICS 65.020
B 64

LY

中华人民共和国林业行业标准

LY/T 1770—2008

桉树无性系组培快繁技术规程

Tissue culture of eucalyptus clones

2008-09-03 发布

2008-12-01 实施

国家林业局 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 繁殖材料来源	2
5 外植体的采集、消毒与接种	2
6 培养基的配制	3
7 接种	3
8 增殖培养、生根培养与炼苗	4
9 田间移栽与苗木管理	5
10 苗木出圃	6
11 组培厂管理	6
附录 A(资料性附录) 尾巨桉组培快繁培养基配方	7
附录 B(资料性附录) 桉树组培苗病虫害主要特征	8
附录 C(资料性附录) 作业设计用表	9
附录 D(资料性附录) 外植体采集与繁殖材料更新表	12
参考文献	13

前 言

本标准附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 均为资料性附录。

本标准由中国林业科学研究院提出。

本标准由全国林木种子标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位：中国林业科学研究院热带林业研究所。

本标准参加起草单位：广东省湛江万泉林业生物技术研究所。

本标准主要起草人：曾炳山、徐大平、裘珍飞、刘英、李湘阳、周宪生。

桉树无性系组培快繁技术规程

1 范围

本标准规定了热带、亚热带桉树无性系组织培养快繁种苗的一般原则,包括母树的选取、外植体采集与处理、培养基配制、无菌操作、组培苗移植、苗木管理与出圃、废弃培养基处理等方面的原则。

本标准适用于组培工厂的桉树无性系苗木生产,苗木用于造林和建立采穗圃。

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 6000 主要造林树种苗木质量分级

GB/T 6001 育苗技术规程

LY/T 1000 容器育苗技术

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

褐变 browning

外植体或培养材料释放出酚类物质,经氧化产生醌类物质的现象。褐变对外植体或培养材料具有一定的毒害作用。

3.2

污染 contamination

培养基或培养材料生长有真菌或细菌等微生物的现象。

3.3

母液 stock solution

为称量准确和方便,将培养基的成分配制成一定浓度和比例的溶液或混合溶液。

3.4

光培养 light culture

有光照的培养。通常的植物组织培养,每天均需要 12 h~16 h 的光照。

3.5

暗培养 dark culture

全天无光照的培养。外植体培养初期或愈伤组织再生时,有些植物需要暗培养。

3.6

增殖培养 proliferation culture

继代培养 subculture

离体芽苗、愈伤组织或悬浮培养细胞不断倍增的培养过程。

3.7

生根培养 rooting culture

诱导无根离体芽苗产生根的培养过程。

3.8

瓶苗 tube seedling

试管苗

通过植物组织培养产生的离体小植株。

3.9

丛芽 shoot clump

由多个基部相连的离体小芽组成的一团芽。

3.10

瓶苗炼苗 acclimatization

将组培苗连培养容器一起移至室外近自然环境中培养,提高苗木的木质化程度,增强苗木对自然光照和温差变化适应能力的过程。

3.11

移栽 outplanting

移植

将组培苗种植到苗圃,并使苗木逐渐适宜自然条件的过程。

3.12

采穗母苗 hedge seedling

用于建采穗圃的苗木。

4 繁殖材料来源

采集外植体的母树应是省级以上良种审(认)定的无性系原株和早期无性系分株。

5 外植体的采集、消毒与接种

5.1 外植体的采集与处理

5.1.1 将母树环割或伐倒,采集萌芽条做外植体。或采集母树的枝条,嫁接到同种桉树或父母本桉树的小苗砧木上,采集接穗上萌发的枝条做外植体。

5.1.2 宜在生长旺盛的季节,选择连续晴天3天以上的天气,采集半木质化、生长旺盛和无病虫害的枝段做外植体。

5.1.3 采集外植体时,应对每个无性系或优树的外植体加标签,标明无性系、采集地点、采集时间等。

5.1.4 宜当天采集,当天消毒。若需要长途运输或储藏2日~3日,宜用保湿材料包扎,以免外植体失水。不宜向外植体或包扎材料喷水,否则容易污染。

5.2 外植体表面消毒

5.2.1 消毒前用洗洁剂将外植体洗净,并用自来水冲洗15 min~20 min。

5.2.2 在超净工作台中,用75%酒精消毒8 s~10 s,无菌水冲洗1次。

5.2.3 用0.1%氯化汞加4滴~5滴吐温-20的消毒液浸没材料,轻微摇动,嫩枝段消毒2 min~5 min,老枝段消毒6 min~10 min,后用无菌水冲洗4次~5次,每次8 min~10 min。

5.2.4 使用后的氯化汞消毒液应按照国家有关剧毒化学药物使用的法规进行处理。

5.2.5 采自干净少菌环境的外植体或已用杀菌剂控制杂菌的外植体,可用10%的次氯酸钙消毒液消毒,嫩枝段10 min~15 min,老枝段15 min~20 min。消毒后用无菌水冲洗2次~3次,每次8 min~10 min。

5.3 外植体接种

5.3.1 将消毒后的外植体切成含有1个~2个腋芽的枝段,垂直或略倾斜接种到丛芽诱导培养基上。

5.3.2 为了防止褐变,有些无性系的外植体接种后宜暗培养5天~7天后再转入光培养。

6 培养基的配制

6.1 培养基成分

6.1.1 培养基宜含有氮、磷、钾、钙、镁等大量元素，铁、锌、锰、铜、钼、钴、碘、硼等微量元素，肌醇、甘氨酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、生物素等有机营养成分，维生素 C、半胱氨酸和聚乙烯吡咯烷酮等抗褐变剂，细胞分裂素和生长素等植物生长调节剂，糖以及凝固剂琼脂或卡拉胶。

6.1.2 培养基应分为丛芽诱导培养基、增殖培养基和生根培养基。三种培养基的主要差别是大量元素和植物生长调节剂的组成与含量。

6.1.3 不同无性系的培养基配方有所不同，需要调整主要成分铵态氮的含量、激素的含量、大量元素的总含量等。以尾巨桉为例，丛芽诱导培养基、增殖培养基和生根培养基三种培养基的配方参见附录 A。

6.2 母液配制

6.2.1 母液宜分为大量元素母液、微量元素母液、有机营养成分母液和植物生长调节剂母液。蔗糖、琼脂或卡拉胶和聚乙烯吡咯烷酮不宜配成母液，需要时直接称样。

6.2.2 大量元素母液和有机营养成分母液的各组分浓度应与培养基的组分浓度成 50~100 的倍数关系，微量元素母液成 200~500 的倍数关系，而植物生长调节剂母液宜配成 0.5 mg/mL 或 1.0 mg/mL。

6.2.3 母液宜用无菌的蒸馏水、去离子水或超纯水配制。

6.2.4 配制大量元素母液时，每个组分应单独溶解，后按氮、磷、钙、镁的顺序逐个混合，否则容易引起沉淀。

6.2.5 微量元素母液应用棕色瓶保存，植物生长调节剂母液和有机物母液应置于冰箱中保存。

6.2.6 母液配制后应及时使用，贮存时间不宜超过 1 个月。母液如有沉淀，或有微生物和藻类生长，应废弃不用。

6.3 培养基配制

6.3.1 依照培养基配方，按比例吸取母液放入容量瓶，加水定容后转至不锈钢锅等容器内。

6.3.2 加入适量凝固剂和糖，并搅拌使凝固剂充分分散，糖充分溶解。

6.3.3 加热至刚沸腾，使凝固剂完全溶解。若采用边分装边搅拌的自动化仪器配制培养基时，可省去加热使凝固剂溶解的过程。

6.3.4 用 1.0 mol/L 盐酸或 1.0 mol/L 氢氧化钠调整至适当的酸碱度。

6.3.5 尽快将培养基分装到培养器皿内，以免培养基凝固或变稠而难以分装。

6.3.6 分装培养基时应避免培养基粘到瓶口，一旦粘上，应擦除干净，否则容易引起污染。

6.4 培养基消毒

6.4.1 将分装好的培养基放入高压消毒锅内消毒。

6.4.2 加热初期，当消毒锅消毒室的气压达 0.05 MPa 时，打开冷凝阀，排尽消毒室内冷空气。

6.4.3 当消毒室内气压达到 0.11 MPa、温度达 121 °C 时，开始计时，保持温度与压力消毒 15 min~20 min。

6.4.4 关闭加热电源开关，按慢排方式排放热气，待消毒室内的气压降至大气压时才取出培养基。

6.4.5 培养基应置于无风和干净的环境中冷却，或用高压高温消毒过的厚布包裹培养基进行冷却。

6.4.6 消毒锅的使用和检测应按照劳动部门的法规执行。

6.5 培养基储藏

培养基应尽量现配现用，也可在干净无风的环境中储藏培养基，但储藏时间不应超过 1 个月。

7 接种

7.1 准备工作

7.1.1 接种人员宜着干净的工作服、拖鞋和口罩，接种前还应用洗洁剂洗手。

- 7.1.2 接种器皿应先用消毒锅消毒后备用。
- 7.1.3 长时间未用的超净工作台,应用 75%酒精将其台面、两侧挡板、紫外灯和接种工具的灰尘擦干净。
- 7.1.4 开启工作台的紫外灯,利用紫外线杀菌 25 min~30 min。
- 7.1.5 开启超净工作台的风机通风 15 min。
- 7.1.6 超净工作台连续使用 4 h 后应重新进行清洁、紫外灯杀菌和开风机通风等处理。
- 7.1.7 开关紫外灯时,工作人员应注意避免紫外线损伤皮肤和眼睛。
- 7.1.8 工作人员应在关闭紫外灯 15 min 后进行接种操作,以免臭氧损伤呼吸道。
- 7.2 接种
 - 7.2.1 用酒精灯或电热消毒器将剪刀、镊子、刀片等接种工具消毒,消毒后应适当冷却,避免烫伤培养材料。
 - 7.2.2 在无茵的接种器皿中,将丛芽切分成小芽丛或单个芽,后将小芽丛接种到新鲜的增殖培养基上继续增殖,将单个芽接种到生根培养基上诱导生根。
 - 7.2.3 每个培养器皿中接种小芽丛或芽的数量适中,深浅适中,分布均匀。
 - 7.2.4 每转接完一个培养器皿中的培养材料,均应擦净接种工具上的培养基,按 7.2.1 的方法将接种工具重新消毒一次,同时更换接种器皿,避免交叉污染。
 - 7.2.5 转接完成后,应在培养器皿上标注接种日期、无性系编号或名称。
 - 7.2.6 接种过程中,接种人员宜避免说话,避免动作幅度过大过猛,以减少污染培养材料的机率。
 - 7.2.7 每次接种完毕,应用 75%酒精将工作台上的接种工具、台面和两边挡板等擦拭干净。
- 7.3 接种环境
 - 7.3.1 定期打扫、清洁接种间,并每月用 40%甲醛加少量高锰酸钾熏蒸消毒 1 次。
 - 7.3.2 定期清洁超净工作台的初级过滤膜。

8 增殖培养、生根培养与炼苗

8.1 增殖培养

- 8.1.1 培养室的温度宜为 24 ℃~28 ℃,培养器皿上部的光照强度宜为 1 500 lx~3 000 lx,光照时间宜为每天 10 h~16 h。
- 8.1.2 及时清除污染的培养材料,并定期打扫、清洁培养室。
- 8.1.3 定期将培养材料转接至新鲜培养基,达到增殖扩繁的目的。
- 8.1.4 从外植体开始,培养时间超过 4 年,继代培养超过 60 代,应重新采集外植体更新培养材料。

8.2 生根培养

- 8.2.1 选择粗壮的增殖芽苗进行生根培养,且应切分为单个芽,避免两个以上的芽连在一起生根。
- 8.2.2 生根培养的温度、光照强度和光照时间可与增殖培养相同。
- 8.2.3 部分无性系初期 4 天~5 天可能需要暗培养。
- 8.2.4 污染的生根芽苗应废弃。

8.3 瓶苗炼苗

- 8.3.1 生根培养后期至田间移植前,应于温室或不淋雨的大棚内炼苗,使芽苗适应自然光照和昼夜温差。光照弱、温度低的冬春季节,炼苗时间宜为 15 天~25 天。温度高、光照强的夏秋季节,炼苗时间宜为 10 天~15 天。
- 8.3.2 适宜炼苗的光照强度为 5 000 lx~8 000 lx 和环境温度为 10 ℃~30 ℃,避免强光和高温灼伤芽苗。
- 8.3.3 移植前 2 天~3 天可适当松开或打开培养器皿,使芽苗逐步适应湿度小的自然环境。
- 8.3.4 炼苗过程中污染的生根芽苗宜废弃。

8.4 瓶苗质量要求

8.4.1 瓶苗可供应给扦插苗圃或造林客户进行田间移植。

8.4.2 合格的瓶苗要求达到：

- a) 苗高 2.5 cm~4.5 cm。
- b) 芽苗茎基部皮部生根 1 条以上,总根长大于 1.5 cm。
- c) 茎基部的愈伤组织小于茎直径的 2 倍,叶片和顶芽无愈伤组织。
- d) 经过室外自然光炼苗,叶色正常。
- e) 无微生物污染。

8.4.3 瓶苗苗高的测量方法:将苗木自然平放,最上部生根处至顶芽的垂直距离为苗高。

8.4.4 瓶苗总根长的测量方法:苗木茎至根尖的长度为根长,逐条根测定根长,累计为总根长。

8.5 瓶苗的清洗、包装和运输

8.5.1 炼苗结束后,从培养器皿中取出组培苗,并用清水洗去粘附于苗上的培养基。取苗和洗苗动作要轻,避免折断和损伤芽苗。

8.5.2 用保鲜盒或塑料泡沫箱包装瓶苗,并加胶带密封。包装容器的内空高度大于苗木高度 5 倍以上。

8.5.3 包装过程中应尽量避免挤压苗木。

8.5.4 运输过程中避免剧烈颠簸或翻转包装容器。

8.5.5 运输和储藏过程中,环境温度应在 10℃~30℃之间,阳光照射和车辆马达等导致的高温易使苗木失去活力。

8.5.6 从出瓶至种植完毕,高温季节不超过 3 天,冬季不超过 5 天。

8.6 废弃培养基的处理

废弃的培养基应收集晒干,作垃圾丢弃。或堆沤半个月至一个月,作为有机肥料使用。不应直接排入水体,导致水体富养分化。

9 田间移栽与苗木管理

9.1 基质与容器

9.1.1 移苗基质应少菌、通气和保水,可为轻型基质、黄心土、细沙等,或多种材料混合而成。

9.1.2 基质中宜添加 1/2 000 含磷 12% 的磷肥,过多肥料会降低移栽成活率。

9.1.3 移栽前 1 至 2 天,应用 0.1%~0.2% 高锰酸钾等消毒液将基质淋透消毒。

9.1.4 宜用容器培育组培苗。采用营养袋育苗时,规格宜为 7 cm×11 cm 或 8 cm×12 cm。采用育苗管、蜂窝育苗筐、纤维网袋等容器育苗时,宜采用相适应的轻型基质。

9.2 移栽

9.2.1 移栽可在林地简易苗圃、常规苗圃或温室进行,对苗圃的要求见 GB/T 6001 和 LY/T 1000。

9.2.2 选择林地简易苗圃和常规苗圃时,避免选用 3 年内种植过易发青枯病作物的地块。

9.2.3 春季、初夏、晚秋和冬季适宜于移植组培苗,高温的 7 月至 8 月则宜避开。

9.2.4 在露天苗圃移栽,宜选择风小、阳光弱的天气或时段进行。

9.2.5 移栽动作要轻,避免折断和损伤芽苗。

9.3 苗木管理

9.3.1 移栽初期宜用薄膜等覆盖保湿,并适时喷雾或淋水,保持湿度 80%~95% 为宜。

9.3.2 育苗水源应干净少菌,避免使用可能被作物青枯菌污染的水源育苗。

9.3.3 移栽初期应控制光照强度,遮阳 85%~90% 为宜,中后期逐渐加强光照。

9.3.4 苗木长出新叶后,每星期喷施或淋施 0.05%~0.1% 的复合肥溶液 1 次。

9.3.5 露天苗圃移植,苗木高度小于 8 cm 时,雨天应加盖薄膜避雨。

- 9.3.6 定期喷施多菌灵、百菌清、甲基托布津等杀菌剂,防止小苗腐烂和发生病害。
- 9.3.7 定期检查白蚁、地老虎、蟋蟀、金龟子、桉小卷蛾等虫害的发生情况,及时防治。
- 9.3.8 苗木出圃后,应清除杂物,并用生石灰等消毒剂对圃地进行消毒。
- 9.3.9 当苗木青枯病的发病率超过3%时,宜更换或轮作苗圃地,或在苗圃地覆盖10 cm以上的无菌黄心土,并用压路机等机械压实。

9.4 袋苗炼苗

- 9.4.1 袋苗出圃前,宜通过搬动、减少水分供应、加强光照等措施进行炼苗,提高造林成活率。
- 9.4.2 温度低、雨水多的春季出圃,炼苗强度宜小。高温强光照的夏季出圃,炼苗强度宜大。
- 9.4.3 不应使用生长抑制来控制苗木高度,否则苗木造林后长时间不能恢复生长。

10 苗木出圃

10.1 质量要求

- 10.1.1 采穗母苗:苗高10 cm~20 cm,地径大于0.10 cm,叶色与生长正常,无青枯病、焦枯病、大袋蛾、桉小卷蛾、葛氏长蚧盾蚧等检疫病虫害。冬季培育的苗木,苗龄不宜超过6个月,其他季节不宜超过5个月。
- 10.1.2 造林苗:苗高15 cm~35 cm,地径大于0.13 cm,叶色与生长正常,无青枯病、焦枯病、大袋蛾、桉小卷蛾、葛氏长蚧盾蚧等检疫病虫害。冬季培育的苗木,苗龄不宜超过6个月,其他季节不宜超过5个月。
- 10.1.3 病虫害的主要特征参见附录B。

10.2 分级

按照GB 6000进行分级。

10.3 包装与运输

- 10.3.1 起苗前宜淋足水分。
- 10.3.2 营养袋苗宜先装入塑料筐等容器后再装车,不宜直接堆放于车上运输,避免过多的损耗和损伤。
- 10.3.3 常规车辆的运输时间不宜超过2天,避免失水或腐烂。

11 组培厂管理

11.1 生产计划与作业设计

应制定包括瓶苗生产计划、袋苗生产计划、作业方法、产量质量、劳动定额、材料消耗、育苗成本等内容的作业设计。作业设计的部分用表可参照附录C。

11.2 技术档案

应建立组培工厂设计施工图、消毒锅检测、外植体采集与繁殖材料更新、作业设计任务书、苗木产量质量、苗木成本、消耗定额、科学实验设计与结果、田间病虫害和灾害调查等档案。外植体采集与繁殖材料更新表可参照附录D。

11.3 科学实验

宜针对苗木生产中关键问题,开展新无性系组培配方研制、操作新方法、生产机具改良和革新、新技术、新容器、新基质等实验活动。

11.4 效益考核

宜分别瓶苗和袋苗核算苗木生产成本,发现和挖掘苗木生产中的问题与潜力,提高效率和经济效益。

附 录 A
(资料性附录)
尾巨桉组培快繁培养基配方

表 A. 1

药品类别	药品名称	丛芽诱导培养基/(mg/L)	增殖培养基/(mg/L)	生根培养基/(mg/L)
a) 大量元素	KNO ₃	1 800	1 800	250
	NH ₄ NO ₃	720	720	200
	KH ₂ PO ₄	270	270	335
	Ca(NO ₃) ₂	500	500	250
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	100	100	75
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	370	250
b) 微量元素	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	22.3	22.3
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10	10	10
	H ₃ BO ₃	10	10	10
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
	NaEDTA	37.3	37.3	37.3
	KI	0.83	0.83	0.83
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025
c) 有机质	氨基乙酸	3	3	2
	盐酸硫胺素	7	7	3
	盐酸吡哆醇	2	2	1.5
	烟酸	4	4	3
	肌醇	100	100	100
	生物素	0.3	0.3	0.1
d) 糖	蔗糖	30 000	30 000	20 000
e) 防褐变剂	维生素 C	10	10	10
	L-半胱氨酸	5	5	1
	聚乙烯吡咯烷酮	400	400	
	活性炭			0.1
f) 激素	6-BA	1	0.5	
	NAA	0.3	0.2	
	IBA			0.5
	ABT1			0.5
g) 凝固剂	卡拉胶	9 200	9 200	9 200

注：FeSO₄ · 7H₂O 应先与 NaEDTA 配制成络合物，而后才与其他溶液混合。

附 录 B
(资料性附录)

桉树组培苗病虫害主要特征

表 B. 1

病虫害名称	病原菌或害虫学名	主要特征
青枯病	<i>Ralstonia solanacearum</i>	a) 苗木萎蔫或枯死,叶子枯而不脱落。 b) 苗茎木质部变黑或绿色表皮有黑色菌斑。 c) 根部腐烂坏死,有臭味。 d) 腐烂根系和病茎横切并泡于清水中可溢出黄色或黄白色菌脓。
焦枯病	<i>Cylindrocladium quinque-septatum</i> 或 <i>C. scoparium</i>	a) 叶片病斑淡黄褐色,边缘水渍状。 b) 苗茎病斑褐色,稍显缢缩有纵裂。 c) 病茎和病叶背面在潮湿情况下产生明显白色霉状物。
大袋蛾	<i>Clania variegata</i>	褐色幼虫吐丝制成袋囊,并背袋囊移动。
桉小卷蛾	<i>Strepsicrates holotephras</i>	幼虫浅绿色,将顶芽嫩叶缀合成苞。
葛氏长蛎盾蚧	<i>Mytilaspis gloverii</i>	蚧壳黄褐色,长 1 mm~3 mm。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16620—1996 林木育种及种子管理术语
 - [2] 祁述雄. 中国桉树. 北京:中国林业出版社,2002.
 - [3] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术. 北京:中国林业出版社,1991.
 - [4] 崔德材,徐培文,李红双,等. 植物组织培养与工厂化育苗. 北京:化学工业出版社,2003.
 - [5] 李浚明. 植物组织培养教程. 北京:北京农业大学出版社,2002.
 - [6] 施仲美,奚福生,何贵整,等. 桉树品系对青枯病抗性及其稳定性的研究. 广西林业科学, 2000(12): 1-6.
-

中华人民共和国林业
行业标准
桉树无性系组培快繁技术规程
LY/T 1770—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

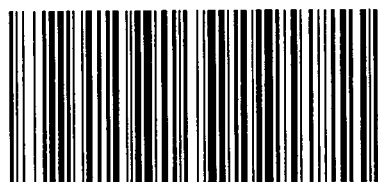
*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 26 千字
2008年12月第一版 2008年12月第一次印刷

*

书号: 155066·2-19418 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



LY/T 1770-2008