**浙江省杭州市地方标准**

DB 3301/T ××××—2021

**杂交兰种苗标准化组培快繁技术规程**

**（征求意见稿）**

**DB3301**

ICS ××××

B ××××

××××-××-×× **实施**

××××-××-×× **发布**

**杭州市市场监督管理局** 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

4 组培苗室内生产............................................................................................................................2

5 组培苗室外培养............................................................................................................................3

6 质量分级........................................................................................................................................3

7 包装和标志....................................................................................................................................3

8 贮运................................................................................................................................................3

附录 A（资料性附录）

杂交兰组培常用培养基配方........................................................................................................... 4

附录 B（资料性附录）

杂交兰组培苗栽后管理措施........................................................................................................... 4

附录 C（资料性附录）

杂交兰组培苗产品质量等级............................................................................................................4

附录 D（资料性附录）

杂交兰种苗标准化生产模式图....................................................................................................... 5

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020给出的规则起草。

本文件由杭州市市场监督管理局提出。

本文件由杭州市农业农村局归口。

本文件起草单位：杭州市农业科学研究院。

本文件主要起草人：李春楠，傅巧娟，张晓莹，赵福康，钱丽华，阮若昕，沈国正。

**杂交兰种苗标准化组培快繁技术规程**

1 范围

本标准规定了杂交兰种苗组培扩繁的术语与定义、组培苗室内生产、组培苗室外培养、质量分级、包装和标志、贮运等内容。

本标准适用于杂交兰种苗组培扩繁至驯化栽培的生产过程。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。

凡是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 8321（所有部分） 农药合理使用准则

NY/T 496 肥料合理使用准则 通则

NY/T 1276 农药安全使用规范 总则

3 术语及定义

下列术语和定义适用于本标准，部分参照DB33/T 752—2009。

3.1 中国兰

指原产于中国的兰科兰属中若干种地生兰植物，如春兰、蕙兰、建兰、墨兰、寒兰、莲瓣兰和春剑等，称为中国兰，又称国兰。

3.2 杂交兰

本标准所定义的杂交兰是指由国兰和大花蕙兰经种间杂交选育的一类兰花品种。

3.3 外植体

在离体组织培养中，用于无菌培养的植物器官或组织。

3.4 类原球茎

兰花外植体诱导培养时，茎尖生长点组织逐渐膨大形成的扁形球状物。

3.5 初代培养

又称为诱导培养，是指从外植体接种培养到形成类原球茎的过程。

3.6 继代培养

将类原球茎切割或分离后，转移到新的培养基上进行连续多代的培养获得几何倍数增长的数量，称为继代培养。

3.7 分化培养

将继代后的类原球茎切割或分离后，培养获得不定芽的过程。

3.8 生根培养

将不定芽培养为具备完整根系、长势健壮的幼苗的过程。

4 组培苗室内生产

4.1 生产流程

母株的预处理——外植体选取——外植体消毒——茎尖和侧芽切取——初代培养——增殖培养——分化培养——生根培养——幼苗出瓶

4.2 外植体的选择和处理

4.2.1 母株的预处理

将带有新生芽的母株提前进行药剂灌根处理。于晴天使用稀释倍数为800倍的多菌灵对其彻底灌根，每隔3天浇灌一次，连续处理2-3次，放置于通风性好、清洁的干燥环境。

4.2.2 外植体的选取

待预处理后的母株基质干透后，于晴天的上午选择叶片尚未展开、露出基质表面的2 cm-6 cm新生芽从基部切断取下，置于无菌样品袋中带回室内。

4.2.3 外植体消毒

预先准备好75%酒精、0.1% HgCl2、10% NaClO、无菌水和无菌空瓶若干。用洁净的软毛刷轻轻刷洗外植体表面，去除老叶和表面污垢，浸入浓肥皂水中震荡清洗1 h，再流水冲洗1小时，置于超净工作台上，采用多种消毒剂联合灭菌处理。灭菌方法为：75%酒精浸泡消毒90 s，无菌水清洗2-3次；剥去1-2片外苞叶，浸入10% NaClO处理10 min，无菌水清洗3-4次；再浸入0.1% HgCl2溶液中，根据芽的大小灭菌15 min-17 min（4 cm-6 cm的大芽处理17 min，4 cm以下的小芽处理15 min），无菌水清洗5-6次；剥离的茎尖和小侧芽再浸入0.05% HgCl2溶液中消毒60 s，无菌水清洗5-6次。

4.3 初代培养

灭菌后的新芽剥去苞叶，在茎尖位置露出叶基部分生组织，切取茎尖接种于初代培养基诱导类原球茎。

4.4 继代培养

经过2个月左右的初代培养，在茎尖上诱导出类原球茎，将类原球茎轻轻分割为体积约0.4 cm × 0.4 cm × 0.4 cm的均匀小块，接种于继代增殖培养基，每隔1.5-2个月继代一次，更换新的培养基，连续继代多次即可获得大量增殖的类原球茎，达到种苗扩繁的目的，但一般继代次数不宜超过12代。

4.5 分化培养

将增殖的类原球茎轻轻分割为体积约0.4 cm × 0.4 cm × 0.4 cm的均匀小块，转接到分化培养基，类原球茎之间的距离应不少于1.0 cm，有利于类原球茎分化产生不定芽。

4.6 生根培养

待不定芽长至3 cm-5 cm时，将其切下接种于生根培养基培养50 d-70 d，当苗高长至8 cm-12 cm，生根数达到3-5条，根长3 cm-5 cm，可将瓶苗转移至室外驯化移栽。

杂交兰组培快繁过程推荐使用的初代、继代、分化和生根阶段培养基组分参见附录A。

4.7 培养条件控制

初代培养阶段：培养条件为每日光照12 h，温度25±1 ℃，光照强度500 lux-1000 lux；暗培养时温度为20±1 ℃。

继代培养阶段：培养条件为每日光照12 h，温度26±1 ℃，光照强度500 lux-1000 lux；暗培养时温度20±1 ℃。

分化培养阶段：培养条件为每日光照16 h，温度26±1 ℃，光照强度1200 lux-2000 lux；暗培养时温度20±1 ℃。

生根培养阶段：培养条件为每日光照16 h，温度26±1 ℃，光照强度2000 lux-2500 lux；暗培养时温度为20±1 ℃。

上述光照和暗培养交替进行。

5 组培苗室外培养

5.1 瓶苗驯化

将瓶苗置于室外条件下炼苗，以提高其适应外界栽培环境的能力，而后移植至室外培养。炼苗要求4000 lux-5000 lux的较强散射光，白天温度控制在20 ℃-30 ℃之间，夜间温度不低于15 ℃。炼苗12 d以上，打开瓶口放置2 d-3 d。

5.2 瓶苗移植

将幼苗从培养瓶中小心取出，洗净根部培养基，用1000倍多菌灵浸泡15 min；晾干至白，移栽至树皮、鹿沼土与仙土配比为1:1:1的基质中。配好的基质预先高温蒸汽灭菌30 min，晾凉后使用。

5.3 幼苗田间管理

加强通风，前期注意遮荫保湿，幼苗移栽后的15 d内保持空气湿度80%左右，栽后具体管理措施详见附录B。

6 质量分级

杂交兰组培苗质量等级见附录C。

7 包装和标志

7.1 包装

将符合质量标准的组培瓶苗用封口膜封住瓶口，整齐排列装于纸箱中，瓶与纸箱之间用海绵等缓冲物隔离填充。

7.2 标志

每箱应贴上标签，标明品种名称、等级、数量、产地、出苗日期等，并在纸箱上做好“请勿倒置”的明显标志。

8 贮运

运输时选择有蓬车辆，车厢内温度保持在15 ℃-25 ℃之间，车辆行驶过程中避免剧烈颠簸以防组培瓶破碎，并应在5 h以内到达目的地。此外，不宜在严寒、酷热天气运输组培瓶苗。

**附录A**

**（资料性附录）**

**杂交兰组培常用培养基配方**

|  |  |
| --- | --- |
| 培养阶段 | 配方 |
| 初代培养 | 1/2MS + 1 mg/L 6-BA + 1 mg/L IBA+ 1 g/L活性炭+ 30 g/L蔗糖+ 5 g/L琼脂，pH 5.6-5.8。 |
| 增殖培养 | Hyponex 1 + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 50 g/L香蕉泥+ 2 g/L水解酪蛋白+ 1 g/L活性炭+ 30 g/L蔗糖+ 5 g/L琼脂，pH 5.6-5.8。 |
| 分化培养 | 1/2MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 10% 椰汁+ 0.2 g/L活性炭+ 20 g/L蔗糖+ 6 g/L琼脂，pH 5.6-5.8。 |
| 生根培养 | Hyponex 1 + 0.1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 100g/L香蕉泥+ 2 g/L水解酪蛋白+ 1 g/L活性炭+ 30 g/L蔗糖+ 7 g/L琼脂，pH 5.6-5.8。 |

注：1/2MS培养基是MS培养基大量元素减半。

**附录B**

**（资料性附录）**

**杂交兰组培苗栽后管理措施**

|  |  |
| --- | --- |
| 光照 | 根据实际环境调节光照，栽后15 d内弱光照，遮阴70%-80%，15 d-30 d可适当增加光照强度，一般不超过5000 lux，30 d后进一步增加光照，但不宜超过8000 lux。 |
| 温度 | 幼苗最适温度为15 ℃-30 ℃，早晚温差5 ℃-15 ℃。 |
| 浇水 | 幼苗移栽后第一次浇水浇透，之后视天气情况，基质见干即浇。一般春秋季每5 d-7 d浇一次，夏季每2 d-4 d浇一次，冬季每7 d-10 d浇一次。 |
| 施肥 | 幼苗定植缓苗15 d后，施一次时效180 d的颗粒缓释肥1 g-3 g，或每周施一次1500倍N：P：K比例为20：20：20的水溶性肥料。 |
| 病虫害预防 | 缓苗15 d-30 d后，每隔15 d喷施杀菌剂，杀菌剂可选择稀释1000倍的戊唑醇、多菌灵、可杀得3000或咪鲜胺；根据虫害发生情况，杀虫剂可选用稀释1500倍的阿维菌素、爱卡螨或哒螨灵防治红蜘蛛，稀释500倍的速勒马与盈辉优玛复配剂防治蓟马，稀释1500倍的吡虫噻嗪酮防治蚧壳虫，稀释3000倍的吡虫啉防治蚜虫。 |

**附录C**

**（资料性附录）**

**杂交兰组培苗产品质量等级**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 评级项目 | 等级 | |
| 一级 | 二级 |
| 整体效果 | 幼苗生长旺盛，粗壮，挺拔，有活力，色泽正常，与原品种保持一致。 | 幼苗生长正常，符合原品种特征。 |
| 苗高 | 8 cm-12 cm。 | 低于8cm或高于12cm。 |
| 根系 | 根系粗壮结实，具有4~8条根，最长根长5 cm-8cm。 | 具有2~4条或>8条根，最长根长<5cm或>8cm。 |
| 整齐度 | 整齐一致，同一批次90%以上的苗高达标。 | 整齐一致，同一批次80%以上的苗高达标。 |
| 有无污染 | 无污染。 | 无污染或有轻微污染。 |

**附 录 D**

（资料性附录）

杂交兰种苗标准化生产模式图

杂交兰种苗标准化生产模式图见图D.1

图 D.1 杂交兰种苗标准化生产模式图

