

ICS 65.020
B62
备案号: 25092-2009

DB46

海南省地方标准

DB46/T 146—2009

石斛兰、文心兰组培苗繁育技术规程

The Propagation Technological Regulation for Tissue Culture Seedling of
Dendrobium & Oncidium

2009-04-15 发布

2009-04-15 实施

海南省质量技术监督局 发布

前 言

本标准由海南省质量技术监督局提出。

本标准由海南省林业局归口。

本标准主要起草单位：乐东生态农业开发有限公司、三亚柏盈热带兰花产业有限公司。

本标准参与起草单位：海南省林业总公司。

本标准主要起草人：邢孔惠、陈运烁、黎冠孝、莫宏奎、刘春梅、莫光武。

石斛兰、文心兰组培苗繁育技术规程

1 范围

本标准规定了海南省石斛兰、文心兰组培苗有关的术语和定义、繁育工厂、组织培养快繁技术、检疫等要求。

本标准适合用于石斛兰、文心兰种苗繁育。

2 术语与定义

2.1 组织培养 tissue culture

是指在无菌条件下,创造植物生长最适的环境条件,采用人工配制的培养基对离体的植物器官、组织、细胞和原生质体进行培养,最后形成完整植株的过程。

2.2 外植体 explant

用于离体培养的初始材料称为外植体。

2.3 愈伤组织 callus

指植物在受伤后或在组织培养过程中通过脱分化而形成的一类薄壁组织。

2.4 原球茎 protocorm

在某些植物组织培养中,通常不能直接诱导分化出芽苗,而是诱导形成一些扁形球状物,这些球状物在形态上与种子萌发时由胚形成的原球茎相似,因而称为原球茎。

2.5 丛生芽 cluster buds

由植物器官和愈伤组织发育出来的群体丛生芽苗。

2.6 初代培养 primary culture

又称诱导培养,指组织培养过程中,将直接从母株采取的最初的外植体在无菌条件下进行培养以期产生不定芽、愈伤组织、原球茎,从而建立无菌培养物的培养阶段。

2.7 继代培养 subculture

将培养物转移到新的培养基上继续培养的过程。

2.8 实生苗 seedling plant

将兰科等植物的无胚乳种子,播种于人工培养基上使之发芽成为一个植物体。

2.9 组培苗 tissue culture seedling

根据植物细胞的全能性,通过组织培养技术,将植物的体细胞、组织或器官进行离体培养,经过不同的细胞分化途径重建形成不同的器官,诱导培育出的完整植株。

2.10 玻璃化 vitrification

试管繁殖材料不断地进行扩繁时,培养物的嫩茎、叶片往往呈半透明、水渍状,这种现象称为玻璃化。

3 种苗繁育工厂

3.1 接种室

主要用于植物材料的消毒和接种、培养物的继代转移等的场所。

3.1.1 要求

无尘、无对流空气的洁净环境。进入室内的工作人员应换上洁净的工作服、工作帽和拖鞋,避免带入杂菌引起空气污染。

3.2 培养室

培养试管苗的场所,卫生保持清洁干净,内置多层培养架。

3.2.1 培养条件

温度根据种苗品种、培养目的进行调控，一般保持在 $25 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ ；光照强度根据种苗品种、培养目的进行调控，一般在 $1500\sim 3000\text{l x}$ ，每天光照时间 $12\sim 14\text{h}$ 。

3.3 培养仪器设备

主要有高压灭菌锅、超净工作台、药品柜、冰箱、电炉、电子天平、台秤、搅拌器、pH 计、摇床以及烧杯、培养皿、三角瓶、量筒、容量瓶、磨扣试剂瓶、滴管、手术刀、镊子、剪刀、接种针、酒精灯等设备。

4 组织培养快繁技术

4.1 母本园的选择

母本园必须是无病虫害的正常管理兰花园。

4.2 母株的确定

选择品种纯正、农艺性状优良、生长健壮、无病虫害的植株作为母株，并逐株编号及跟踪观察。

4.3 种子无菌播种技术

4.3.1 材料准备及处理

蒴果从兰圃取回来后，先用洗洁精溶液刷洗表面，用自来水冲洗干净，移至超净工作台上。先用 75% 的酒精消毒数秒，再用 0.1% 氯化汞溶液，添加两滴 Tween-20 灭菌 10~15 分钟后将材料取出，用无菌水彻底冲洗 4~5 次。将冲洗好的外植体置于无菌的牛皮纸或培养皿中，用锐利的解剖刀切开蒴果，然后将种子均匀分布于培养基表面。

4.3.2 初代培养

种子在诱导培养基上培养 20 天后开始萌发，胚逐渐膨大，过 45 天左右，胀大的胚显现黄绿色，再继续培养，胚表面形成类似原球茎状体的小圆锥体。

诱导培养基一般选用 KC 为基本培养基，附加蔗糖 $15\sim 20\text{g/L}$ ，以适量的琼脂固化。

4.3.3 继代培养

将诱导阶段形成的原球茎状体转入继代培养基（可用诱导培养基，另外添加适量的有机添加物）中继续培养。

4.3.4 成苗培养

将继代过程形成的细弱小苗转入壮苗培养基中培养，另外添加适量的有机添加物；培养基可用 KC 为基本培养基。

4.3.5 生根培养

将壮苗阶段形成的小苗分级接入生根培养基进行培养；培养基可选用改良 MS、KC 为基本培养基，添加适量的 IBA 或 NAA 及有机添加物进行培养。

4.4 石斛兰的组织培养

4.4.1 材料准备及处理

石斛兰一般都采用新芽作为外植体，采取的新芽最好是叶片尚未展开的幼苗，先用洗洁精溶液刷洗表面，用自来水冲洗干净，剥去最外 1~2 张叶子，露出侧芽，再用 70%~75% 的酒精表面消毒数秒，然后用 0.1% 氯化汞溶液或 10% 次氯酸钠溶液添加两滴 Tween-20 灭菌 10~15 分钟，用无菌水冲洗 2~3 次，再剥去 2 片苞叶，放入 0.1% 氯化汞溶液中 3~5 分钟，无菌水彻底冲洗 4~5 次，然后在无菌条件下进行剥离与切割，取包括生长点在内的约 0.5 cm 左右长的茎尖顶端组织、休眠芽接种于事先准备好的诱导培养基上（固体或液体）。

4.4.2 初代培养

将处理好的外植体接种到初代培养基（固体培养）上一周后，不污染的茎尖顶端组织、侧芽都略有不同程度的拉长和增大，30 天左右茎尖顶端形成叶原基，切口基部形成愈伤组织，叶原基可直接长成小叶子，茎尖顶端逐渐发育形成小芽，继续培养 20 天左右，将分化形成不定芽、原球茎、愈伤组织交

错存在的团块。

初代培养基可选用改 KC、改良 MS、京都配方为基本培养基，可根据不同品种、培养目的及途径，添加不同种类的激素，及添加适量的椰子水，椰子水对于兰花原球茎的诱导、增殖及分化有良好的促进作用，其通常用量为 10%~15%左右。

4.4.3 继代培养

外植体诱导形成的幼芽、原球茎或小芽丛经过修整后转移到增殖培养基中培养，其中添加 10%~15%椰子水对丛生芽的形成具有明显的促进作用，1~2 个月后可以继续扩繁。

一般选用改良 KC、改良 MS 为基本培养基，可根据不同品种、培养目的及途径，另外添加不同种类的激素。特别注意的是在增殖培养过程中，随着增殖次数的增加，激素浓度也必须随之下降，否则很容易使培养物发生畸形，最后导致种苗发生变异。

4.4.4 成苗培养

将增殖阶段成芽的原球茎及分化出来的小芽转入不加任何激素的培养基中，可选用改良 KC、改良 MS 为基本培养基，另外根据种苗的长势情况添加适量的有机添加物进行培养。

4.4.5 生根培养

将成苗阶段形成的 3~5 cm 小苗分级接入生根培养基进行培养；可选用改良 KC、改良 MS 为基本培养基，另外根据种苗的长势情况添加适量的 IBA 或 NAA 及有机添加物进行培养，经过 60 天左右的培养，一般小苗可长成高度约为 5~10 cm 的健壮小植株，有 2~3 条 3 cm 以上健壮的白色小根。

4.4.6 出瓶移栽

出瓶前，将石斛兰瓶苗移到遮光率为 65~80% 的温棚或荫棚下，以便逐渐适应外面的环境，大约炼苗 10 天左右，使生根苗叶色更加浓绿。出瓶时，用清水将附在根系上的培养基冲洗干净，然后放进稀释 2000 倍的多菌灵、百菌清等杀菌剂溶液中消毒 1~2 分钟，再从药液中捞出来放进小塑料筐中，并在苗床上整齐排放，往后根据天气情况每天给小苗浇一定的水，但必须防止小苗带水过夜，造成积水烂苗；苗床周围保持 60%~70% 的湿度，1~2 周后可以酌情施肥促进小苗健壮，等到小苗的假鳞茎较壮些而且长出新根时，用水苔包住根部穴植在穴盘中。

4.5 文心兰的组织培养

4.5.1 材料准备及处理

文心兰一般都采用新芽作为外植体，采取的新芽最好是叶片尚未展开的幼苗，先用洗洁精溶液刷洗表面，用自来水冲洗干净，剥去最外 1~2 张叶子，露出侧芽，用 0.1% 氯化汞溶液或 10% 次氯酸钠溶液添加两滴 Tween-20 灭菌 10~15 分钟，用无菌水冲洗 2~3 次，再剥去 2 片苞叶，放入 0.1% 氯化汞溶液中 3~6 分钟，无菌水彻底冲洗 4~5 次，然后在无菌条件下进行剥离与切割，取包括生长点在内的约 0.5 cm 左右长的茎尖顶端组织接种于事先准备好的诱导培养基上（固体或液体）。

4.5.2 初代培养

将处理好的外植体接种到初代培养基（固体培养）上一周后，不污染的茎尖顶端组织、侧芽都略有不同程度的拉长和膨大，25 天左右茎尖切口基部形成愈伤组织，茎尖顶端逐渐发育形成小芽，继续培养 20 天左右，将分化形成小芽丛、原球茎、愈伤组织交错存在的团块。可选用改良 MS、改良 KC 为基本培养基，根据不同品种、培养目的及途径，添加不同种类激素及有机添加物。

4.5.3 继代培养

将外植体诱导形成的原球茎、小芽丛经过修整后转移到增殖培养基中培养。可选用改良 KC、改良 MS 为基本培养基，可根据不同品种、培养目的及途径，添加适量的激素及有机添加物，随着增殖次数的增加，激素浓度也必须随之下降，否则会很容易使培养物出现畸形，最后导致种苗出现变异。

4.5.4 成苗培养

将增殖阶段成芽原球茎及分化出来的小芽转入不加任何激素的培养基中，可选用改良 KC、改良 MS 为基本培养基，另外根据种苗的长势情况添加适量的有机添加物进行培养，经过 45~60 天的培养可长成高度约 3~5 cm 的小植株。

4.5.5 生根培养

将成苗阶段形成的3~5cm小苗分级接入生根培养基中进行培养；培养基可用选用改良KC、改良MS为基本培养基，可根据种苗的实际生长情况添加适量IBA或NAA及有机添加物进行培养；经过60天左右的培养，一般小苗可长成高度约为8~12cm的健壮小植株，有3~4条3cm以上健壮的白色小根；在培养过程中，由于种种因素影响，有些小苗会长出小鳞茎，有些没有；带有饱满小鳞茎的小苗出瓶移栽成活率比较高。

4.5.6 出瓶移栽

出瓶前，将文心兰瓶苗移放到遮光率为70%~80%的温棚或荫棚下，以便逐渐适应外面的环境，大约炼苗10天左右，使生根苗叶色更加浓绿。出瓶时，用清水将附在根系上的培养基冲洗干净，整个过程尽量不要对小苗造成机械伤害。然后放进稀释2000倍的多菌灵、百菌清等杀菌剂溶液中消毒1~2分钟，再从药液中捞出来放进小的塑料筐中，并在苗床上整齐排放，待小苗晾干后方可用水苔包住根部穴植在穴盘中，往后根据天气情况每天给小苗浇一定的水，但必须防止小苗带水过夜，造成积水烂苗；苗床周围保持60%~70%的湿度，1~2个周后可以酌情施肥。

5 检疫

接种后的每个外植体第一代取一个增殖芽作好标记，送有关植检部门进行病毒抗血清检验(ELISA)。经验证无病株号的增殖芽方能继续增殖培养，用以生产大量试管苗；而有病株号的增殖芽则应全部销毁。
