

斑兰叶 组培快繁技术规程

Technical code of practice for tissue culture and rapid propagation of pandan

(征求意见稿)

(本草案完成时间: 2022 年 10 月)

在提交反馈意见时, 请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 组培工厂要求	2
5 接种前准备	2
5.1 试剂	2
5.2 消毒灭菌	2
6 外植体采集与灭菌	3
6.1 采集圃选择	3
6.2 外植体采集	3
6.3 外植体灭菌	3
7 培养	3
7.1 培养接种	4
7.2 愈伤组织	4
7.3 丛生芽	4
7.4 继代增殖	4
7.5 丛生芽循环再生	4
7.6 生根壮苗	4
7.7 试管苗炼苗	4
8 容器苗培育	4
8.1 苗圃地的条件与设施	5
8.2 育苗时期	5
8.3 育苗容器	5
8.4 育苗基质	5
8.5 移栽基质消毒	5
8.6 基质装填	5
8.7 移栽	5
8.8 育苗管理	5
9 出圃	6
9.1 容器苗炼苗	6
9.2 出圃标准	6
10 育苗档案	6
附录 A (资料性) 斑兰叶 (香露兜) 组培快繁培养基配方	7
附录 B (资料性) 斑兰叶 组培快繁技术档案记录表	8

参考文献..... 10

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。

本文件由海南省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院香料饮料研究所、海南兴科热带作物工程技术有限公司、海南热作高科技研究院有限公司。

本文件主要起草人：吉训志、张昂、鱼欢、秦晓威、宗迎、贺书珍、初众、郝朝运、唐冰、邓文明、廖子荣、苟亚峰、闫林。

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及7.2、7.3、8.1、8.2、8.4与《一种斑兰叶种苗的高通量繁育技术》（ZL202010100076.7）相关专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利权人已向本文件的发布机构承诺，愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利权人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利权人：中国热带农业科学院香料饮料研究所。

地址：海南省万宁市兴隆热带植物园。

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

斑兰叶 组培快繁技术规程

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件规定了斑兰叶 (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) 组培快繁的组培工厂要求、接种前准备、外植体采集与处理、培养、容器苗培育、出圃、育苗档案等技术要求。

本文件适用于斑兰叶组培苗繁育。

2 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- NY/T 357—2007 香蕉 组培苗
- NY/T 2306 花卉种苗组培快繁技术规程
- DB46/T AAA 斑兰叶 组培苗
- DB46/T 578 斑兰叶（香露兜） 种苗繁育技术规程
- DB46/T 579 林下间作斑兰叶（香露兜）技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

外植体 explant

从自然生长的斑兰叶植株上获取的用于建立植物组培快繁体系的起始材料。

3.2

培养材料 culture materials

包含外植体、愈伤组织及丛生芽等需要进行接种培养的材料。

3.3

斑兰叶试管苗 pandan in test-tube plantlet

利用斑兰叶老茎上的侧芽作为外植体，采用植物组织培养技术在培养容器中生长且已达到移栽标准的根、茎、叶俱全的完整无菌斑兰叶小植株。

[来源：NY/T 357—2007，3.2，有修改]

3.4

斑兰叶容器苗 *pandan in vessel plantlet*

斑兰叶试管苗分级装入有育苗基质的育苗容器中可出圃供大田定植的斑兰叶种苗。

[来源：NY/T 357—2007，3.3，有修改]

4 组培工厂要求

按照NY/T 2306的规定执行。

5 接种前准备

5.1 试剂

5.1.1 培养基配制试剂

培养基配制所需试剂见附录A，其中大量元素、微量元素、铁盐及碳源为分析纯（AR）试剂，有机元素、激素、植物凝胶为生物试剂（BR）。

5.1.2 酸碱度调节试剂

酸碱度调整所需氢氧化钠、氢氧化钾、盐酸为分析纯试剂。

5.1.3 消毒试剂

使用去离子水或蒸馏水稀释配制分析纯无水乙醇至体积分数为75%。使用去离子水或蒸馏水稀释配制分析纯氯化汞至质量分数为0.1%。

注：《危险化学品安全管理条例》给出了危险化学品的安全管理方法。

5.2 消毒灭菌

5.2.1 培养基、器皿、水的灭菌

培养基配制完后，分装至组培瓶中。121℃高压灭菌，培养基20 min，器皿、水灭菌30 min，取出冷却备用。灭菌操作人员应持有特种设备作业人员证。

5.2.2 接种器材灭菌

使用电热灭菌器进行灭菌。枪状镊与解剖刀先用75%酒精擦拭，待电热灭菌器温度升至250℃～300℃，再将枪状镊与解剖刀插入电热灭菌器中进行灭菌，第一次灭菌3 min～4 min，每次接种后灭菌≥15 s。

5.2.3 超净工作台灭菌

超净工作台（或洁净无菌接种室）灭菌30 min后关掉紫外灯，通风15 min～20 min，用75%酒精擦洗超净工作台台面。

5.2.4 接种人员准备

接种人员应在更衣室更换工作服、工作鞋、戴帽子和口罩后进入接种室（或经过风淋室后进入接种室），操作前双手应用75%酒精消毒。操作中如手部离开工作台，应再次用75%酒精消毒。

6 技术流程

斑兰叶组培快繁技术流程包括3个阶段，如图1所示。



图1 斑兰叶（香露兜）组培快繁技术流程

7 外植体采集与灭菌

7.1 采集圃选择

选择经济性状良好、植株健壮、无病虫害的种植园，去除变异株后作为外植体采集圃。

7.2 外植体采集

选择经济性状良好、植株健壮、无病虫害的优良母株老茎上2.0 cm~3.0 cm的幼嫩侧芽。采芽时用小刀将侧芽从芽基部切下，装入无菌袋，带回实验室备用。

7.3 外植体灭菌

7.3.1 采集的侧芽装入100 mL洗涤瓶，加入3~4滴70%百菌清乳状溶液浸泡10 min，用自来水冲洗干净，转到超净工作台中。

7.3.2 侧芽用无菌解剖刀和枪状镊子在接种盘上剥去外围的叶鞘，用75%酒精浸泡消毒30 s，倒出酒精，用无菌蒸馏水冲洗2次。

7.3.3 侧芽用0.1%氯化汞溶液消毒8 min，并不断摇动，消毒结束将升汞溶液倒入回收瓶，用无菌蒸馏水冲洗4~5次，用无菌滤纸吸干水分。

8 培养

8.1 接种方法

8.1.1 接种时一手拿组培瓶，一手轻轻取下盖子，用镊子将培养材料送入瓶中，轻轻一压与培养基紧密接触，并使培养材料在瓶内均匀分布。

8.1.2 接种完毕立即盖上瓶盖并做好标记，注明材料名称、接种日期、培养基类型、接种人等事项。

8.1.3 整个培养期间定期观察材料生长情况，并作好记载，如发现污染，应及时将污染瓶移出培养室，待高温灭菌后清洗或丢弃。

8.2 愈伤组织

外植体按8.1接种到培养基A（见附录A），温度22℃~25℃，暗培养诱导60 d~90 d，获得愈伤组织。

8.3 丛生芽

愈伤组织按8.1接种到培养基B（见附录A），温度26℃~28℃，光照强度1000 lx~2000 lx，光照12 h，黑暗12 h，诱导40 d~60 d，获得丛生芽。

8.4 继代增殖

8.4.1 选取母瓶

全面检查污染和诱导情况，及时剔除被污染的组培瓶。选择丛生芽状态良好的组培瓶作为母瓶。

8.4.2 取丛生芽

打开母瓶盖，瓶口不应斜向外，取出丛生芽放于无菌接种盘上。

8.4.3 切芽接种

用解剖刀将丛生芽切割成单株小芽或小芽团块，按8.1接种到培养基C（见附录A）中，宜4株（团）~5株（团）/瓶。温度26℃~28℃，光照强度1000 lx~2000 lx，光照12 h，黑暗12 h，30 d继代一次。

8.5 丛生芽循环再生

将带有愈伤组织的芽团再次按8.2、8.3和8.4操作。

8.6 生根壮苗

8.6.1 苗高 ≥ 6.0 cm的芽苗，取出放置于无菌的接种盘上，去除茎部处多余愈伤组织，分成单株接种到装有培养基D（见附录A）的组培袋中，宜接种10株/袋，封口。光照强度1500 lx~2500 lx，光照12 h，黑暗12 h，30 d后检查幼苗基部新根生长情况。

8.6.2 苗高 < 6.0 cm的芽苗，按8.1接种到培养基C（见附录A）中，宜4株~5株/瓶，培养条件按8.4.3执行。

8.7 试管苗炼苗

将生根后的试管苗，组培袋顶部剪开3.0 cm~4.0 cm，炼苗3 d~5 d，炼苗温度宜26℃~28℃，光照强度宜1000 lx~1500 lx，保持环境洁净。

9 容器苗培育

9.1 苗圃地的条件与设施

按DB46/T 578的规定执行。

9.2 育苗时期

按DB46/T 578的规定执行。

9.3 育苗容器

按DB46/T 578的规定执行。

9.4 育苗基质

按DB46/T 578的规定执行。

9.5 移栽基质消毒

按DB46/T 578的规定执行。

9.6 基质装填

容器装满基质，整齐摆放在苗床上，对苗床边上的育苗容器进行培土。

9.7 移栽

取出试管苗并洗净其根部培养基，用1 g吲哚丁酸（IBA）粉剂1000倍液浸泡5 min~8 min。浇湿育苗基质后在基质中挖2.0 cm~3.0 cm×0.5 cm~1.0 cm（深度×宽度）左右大小的苗坑，再将试管苗放进苗坑内，叶片及茎部全部露出，回填基质压实。淋足定根水，并用50%多菌灵可湿性粉剂500倍液喷淋消毒。

9.8 育苗管理

9.8.1 水肥管理

勤查看基质湿度，保持基质湿润。当种苗叶片长度 ≥ 5.0 cm时可喷施叶面肥。叶面肥推荐用量为3%（质量分数）速溶复合肥（15-15-15）配制的液态肥，喷施量以种苗叶片湿润为宜。30 d~60 d施肥1次。

9.8.2 温度管理

通过覆膜、水帘与冷热风机等方式调节温度，温度宜保持在20℃~35℃。

9.8.3 光照管理

移栽后用遮光度60%~80%的遮阳网遮盖，避免阳光直射。

9.8.4 查苗、补苗

育苗10 d后进行查苗、补苗。

9.8.5 除草

人工及时拔除育苗容器内及苗床的杂草。

9.8.6 病虫害防治

按DB46/T 579的规定执行。

10 出圃

10.1 容器苗炼苗

按DB46/T 578的规定执行。

10.2 出圃标准

按DB46/T AAA的规定执行。

11 育苗档案

参照附录B的规定执行。组培苗级别按DB46/T AAA的规定执行。

附录 A (资料性)

斑兰叶 组培快繁培养基配方

斑兰叶 组培快繁培养基配方见表A.1。

表 A.1 斑兰叶 组培快繁培养基配方

单位: mg/L

母液成分	试剂	培养基种类			
		培养基A	培养基B	培养基C	培养基D
大量元素	硝酸钾 (KNO ₃)	1900	1900	1900	950
	硝酸铵 (NH ₄ NO ₃)	1650	1650	1650	825
	硫酸镁 (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	350~450	350~450	350~450	175~225
	磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	150~200	150~200	150~200	70~100
	氯化钙 (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	400~500	400~500	400~500	200~250
微量元素	硫酸锰 (MnSO ₄ ·4H ₂ O)	20~24	20~24	20~24	20~24
	硫酸锌 (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8~10	8~10	8~10	8~10
	硼酸 (H ₃ BO ₃)	6~10	6~10	6~10	6~10
	碘化钾 (KI)	0.83	0.83	0.83	0.83
	钼酸钠 (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0.25	0.25	0.25	0.25
	硫酸铜 (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.025	0.025	0.025	0.025
	氯化钴 (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0.025	0.025	0.025	0.025
铁盐	乙二胺四乙酸二钠 (Na ₂ -EDTA)	35~40	35~40	35~40	35~40
	硫酸亚铁 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	27~30	27~30	27~30	27~30
有机元素	甘氨酸	2.0	2.0	2.0	2.0
	维生素B1	0.1	0.1	0.1	0.1
	维生素B6	0.5	0.5	0.5	0.5
	烟酸	0.5	0.5	0.5	0.5
	肌醇	100	100	100	100
激素	噻苯隆 (TDZ)	0.01~0.5	—	—	—
	6-苄氨基嘌呤 (6-BA)	0.5~2.0	1.0~2.5	0.1~0.5	—
	萘乙酸 (NAA)	—	0.1~0.5	0.01~0.05	—
	吲哚丁酸 (IBA)	—	—	—	0.05~0.1
碳源	蔗糖	30 000~35 000	30 000~35 000	30 000~35 000	15 000~20 000
凝固剂	植物凝胶 (Phytigel)	2 000~3 000	2 000~3 000	2 000~3 000	1 000~2 000
注: 配制培养基用水应不低于GB/T 6682规定的三级水, pH宜调整为5.8~6.2。					

附录 B（资料性）

斑兰叶 组培快繁技术档案记录表

B.1 试管苗

斑兰叶 试管苗组培快繁技术档案记录表见表B.1。

表 B.1 斑兰叶 试管苗组培快繁技术档案记录表

育苗单位				产地		
育苗时间				育苗责任人		
外植体来源				外植体种类		
消毒药剂种类				消毒时间		
生产管理						
培养基种类	培养配方	数量（株/团）	培养时间	培养温度	光照强度	生长状态
愈伤诱导						
芽诱导						
生根诱导						
移栽						
试管苗数量，株						
一级苗，%						
二级苗，%						
备注						

审核人（签字）：

日期： 年 月 日

B.2 容器苗

斑兰叶 容器苗组培快繁技术档案记录表见表B.2。

表 B.2 斑兰叶 容器苗组培快繁技术档案记录表

育苗单位		产地	
育苗时间		育苗责任人	
试管苗来源		移栽时间	
育苗基质（包括基质种类、用量及配比等）		育苗容器（种类与规格）	
施肥管理			
肥料种类		施肥次数	
施肥用量		施肥时间	
病虫害防治			
防治措施		防治药剂	
药剂用量		防治时间	
容器苗数量，株			
一级苗，%			
二级苗，%			
备注			

审核人（签字）：

日期： 年 月 日

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国国务院 《危险化学品安全管理条例》
-