ICS 65.020.01

B 40

|  |
| --- |
|  |

**DB23**

黑龙江省地方标准

DB23/T XXXX-XXXX

|  |
| --- |
|  |

水曲柳腋芽增殖微繁技术规程

（征求意见稿）

|  |
| --- |
|  |
| 主要起草单位：东北林业大学  联 系 人： 詹亚光  联系电话： 18686791233  邮 箱： yaguangzhan@126.com |

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX实施

黑龙江省市场监督管理局 发布

前  言

本标准依据GB/T 1.1-2009的编写规则起草。

本标准由黑龙江省林业和草原管理局提出。

本标准起草单位：东北林业大学。

本标准主要起草人：詹亚光、齐凤慧、于磊、曾凡锁、薛文辉、刘林、何利明。

水曲柳腋芽增殖微繁技术规程

1 范围

本标准规定了水曲柳（*Fraxinus mandshurica* Rupr.）腋芽增殖微繁的外植体采集与表面消毒、培养基选择及配制、组织培养程序、组培苗移栽、苗期管理和生产档案。

本标准适用于水曲柳腋芽增殖微繁。

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。

LY/T 1000-1991 容器育苗技术

LY/T 1671-2006 水曲柳林人工培育技术规程

LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程

3 外植体采集与表面消毒

3.1 外植体采集

选取水曲柳优树当年生穗条上带有顶芽或者腋芽的茎节作为组织培养的外植体。

3.2 外植体表面消毒

以优树穗条的茎节顶芽及腋芽作为组织培养外植体，在接种前用洗涤剂浸泡10min之后，流动水冲洗30min，然后转入超净工作台中，以75 %乙醇浸泡30s，边泡边摇，灭菌的蒸馏水冲洗3～4遍，每次5min，然后转入0.1%升汞中，边泡边摇2min，再用灭菌的蒸馏水洗4遍，每次5min，取灭菌（121℃灭菌20min）的刀具、镊子、培养皿，将消毒的茎段放入培养皿中，切去茎节两端变褐部分露出新鲜组织，接入初代培养基中培养。

4 培养基选择及配制

4.1 培养基母液的配制及保存

按照LY/T 1882-2010中4.1培养基母液配制及保存的规定进行。

4.2 培养基的灭菌

按照LY/T 1882-2010中4.2培养基的配制、灭菌及保存的规定进行。

4.3 初代培养基

WPM固体培养基，附加20g⋅L-1蔗糖、7g⋅L-1琼脂和1mg⋅L-1 6-BA，pH为5.8～6.0。

4.4 继代和分化培养基

继代培养基1为WPM液体培养基，附加30g⋅L-1蔗糖和0.6mg⋅L-1 TDZ（pH=5.8～6.0）；

继代培养基2为WPM固体培养基，附加30g⋅L-1蔗糖、0.05mg⋅L-1 TDZ、0.6mg⋅L-1 BA和7g⋅L-1琼脂（pH=5.8～6.0）；

芽分化增殖培养基为WPM固体培养基，附加30g⋅L-1蔗糖、1.0mg⋅L-1 ZT和7g⋅L-1琼脂（pH=6.0～6.5）。

4.5 生根培养基

生根培养为WPM固体培养基，附加20g⋅L-1蔗糖、1.4mg⋅L-1 IBA、0.7mg⋅L-1 NAA和7g⋅L-1琼脂（pH=5.8～6.0）。

5 组织培养程序

5.1 植物组培条件

温度25±2℃，湿度60%～70%，光周期为光16h/暗8h交替培养；黑暗条件下液体诱导腋芽萌发时摇床转速为60rpm⋅min-1；光照条件下光照强度为80μmol⋅m-2⋅s-1。

5.2 初代培养

顶芽和茎节外植体经初代培养基中诱导腋芽启动萌发和生长，光照条件下培养一个继代（20～30d）。

5.3 继代和分化增殖培养

将初代培养诱导形成新芽，接种到继代培养基1，在摇床上暗培养一个继代（20～30d），摇床转速为60rpm⋅min-1；转入继代培养基2上，光照条件下培养一个继代（20～30d），将长大的新芽连带基部愈伤组织一起转入芽分化增殖培养基继续在光照条件下培养25～35d，直至新芽分化。

5.4 壮苗生根培养

将增殖培养获得的新枝丛完整接种到生根培养基（WPM+1.4mg⋅L-1 IBA+0.7mg⋅L-1 NAA）中，培养20～30d后待枝高3～5cm，基部形成不定根；切下单枝转入生根培养基再次生根，根系长约1cm左右即可移栽。

6 组培苗移栽

6.1 移栽基质

参照LY/T 1000-1991中4.1基质成分及配置要求、4.2基质消毒等标准。

6.2 移栽环境

有喷雾装置和遮荫网的温室大棚内，温度25℃、湿度90%的环境条件下培养。

6.3 移栽程序

按照草炭土：蛭石（3：1）的基质混匀后灭菌，装入无纺布育苗袋（口径6～8cm），用不含蔗糖和琼脂的生根培养基（WPM+1.4mg⋅L-1 IBA+0.7mg⋅L-1 NAA）浇透。将3～5cm，带有3个以上主根的半木质化组培苗栽植于上述育苗袋基质中，将其摆放于育苗盒中。将育苗盒置于培养条件为有喷雾装置和遮荫网的温室大棚内，控制在温度25℃、湿度90 %的环境条件下培养，移栽7d后减少喷施水分，经常通风。

6.4 生根-移栽程序的简化

将生根与移栽两个环节合并，采用生根-移栽一步法。将健壮半木质化组培新枝在无菌条件下从枝丛上切下，转入装有移栽基质的育苗装置中，置于25℃，湿度90%，光照强度80μmol⋅m-2⋅s-1、光16h/暗8h的温室中培养，每隔3d浇一次不含蔗糖和琼脂的（WPM+1.4mg⋅L-1 IBA+0.7mg⋅L-1 NAA）生根培养基，7d后半打开育苗装置，14d后完全打开，保持通风通气，培养30d左右新根、新叶长出。

7 苗期管理

参照LY/T 1671-2006中4.4苗期管理标准。经常检查新叶情况，预防病虫害。

8 生产档案

应建立生产档案，内容包括：外植体采集与表面消毒、培养基选择及配制、组织培养程序、组培苗移栽和苗期管理。