团体标准《冬凤兰组培繁育技术规程》（征求意见稿）

编制说明

一、项目来源

根据“广西标准化协会关于下达2022年第四十一批团体标准制修订项目计划的通知”（桂标协〔2022〕91号）文件精神，由广西壮族自治区农业科学院提出，广西壮族自治区农业科学院花卉研究所、广西雅长兰科植物国家级自然保护区管理中心、广西亚热带园林植物研究中心有限责任公司共同起草的团体标准《冬凤兰组培繁育技术规程》(项目编号：编号：2022-4102)。

二、项目背景及目的意义

冬凤兰(Cymbidium dayanum)为兰科、兰属中的一种多年生附生植物，总状花序具 5～9 朵花；花葶侧生，下垂或外弯；萼片和花瓣白色至奶油黄色，中央有1条红褐色纵带，或偶见整个瓣片充满淡枣红色，唇瓣红褐色，褶片和中央裂片为白色。主要分布在我国福建南部、广东、广西、海南、台湾和云南西南部至东南部；在广西主要产自兴安、靖西、那坡、宁明、龙州等地，附生于树上或岩石上。由于栖息地的大面积破坏以及人为乱挖乱采，它的自然资源数量正在急剧减少，被列为国家二级保护野生植物，列入《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》，因此，利用组培繁育技术短时间内大量繁殖，既是顺应广西区特色资源产业发展的需要，对冬凤兰种质资源的保护与创新利用也有重要意义。

冬凤兰既有国兰的幽香典雅, 又有洋兰的富贵气。花期持久,株形优美 具有极高的观赏价值, 因其迷人的乳白色花瓣缀以红色条纹，成为日本及欧美鲜切花市场最受欢迎的观赏植物之一，而且还具有食用、药用和食品添加等方面的价值, 有极大的发展前景，在广东、福建、海南等地都有大量引种栽培，广西的桂林、玉林和百色等地也有一定数量的引种栽培。作为育种资源，冬凤兰还是培育垂花型大花蕙兰的主要亲本，截至2021年12月，英国皇家园艺协会登录的以冬凤兰为亲本之一的杂交品种共有40余个。目前，我区严重缺乏兰花自主品牌，大花蕙兰基本依赖进口和外省调货，外地大花蕙兰品种在本地适应性差，该标准的实施将为本土大花蕙兰的选育提供重要的资源保障，为冬凤兰的大规模生产和开发利用提供坚实的技术支撑。

三、标准编制过程

**（一）成立标准编制工作组**

团体标准《冬凤兰组培繁育技术规程》项目任务下达后，成立了标准编制工作组，制定了标准编写方案，明确任务职责，确定工作技术路线，开展标准研制工作，具体标准编制工作由广西壮族自治区农业科学院花卉研究所等单位相关人员配合。

**（二）收集整理文献资料**

目前国内无关于冬凤兰组培苗生产的相关国家标准、行业标准、地方标准。

冬凤兰无菌播种组培繁育相关的文献：

罗远华，冷青云，莫饶等.冬凤兰非共生萌发和低温离体保存.安徽农业科学.2008，36(19):8068-8069，8119.

董晓娜，徐佩玲，陈培等.冬凤兰组织培养与快繁技术研究.热带农业科学，2017，37（10）：50-53.

Potshangbam Nongdam and Nirmala Chongtham.In vitro seed germi

-nation and mass propagation of Cymbidium dayanum Reichb.:an importa

-nt ornamental Orchid of North-East India.Trends in Horticultural

Reserach 2(2):28-37,2012.

**（三）研讨确定标准主体内容**

标准编制工作组召开了标准编制工作会议，对收集的资料进行整理，对标准的整体框架进行了研究，并对标准的关键性问题进行了初步探讨。经过研究，确定标准的主体内容包括术语和定义、组织培养繁育技术、组培苗移栽、出圃要求。

1. **形成文本草案、征求意见稿**

2022年8月～12月，标准起草工作小组进行了广泛实地调研工作，查阅了大量的国内外文献资料，对冬凤兰组培繁育技术进行系统总结，经编制组反复讨论，形成了标准的基本构架，并对项目的工作进行了部署和安排。在前期工作的基础之上，整合已有的参考资料中有关冬凤兰组培繁育技术，并结合冬凤兰生产实际要求的基础上，按照简化、统一等原则编制完成团体标准《冬凤兰组培繁育技术规程》（草案）。

2023年2月～5月，编制组再次深入玉林市、百色市等冬凤兰产区进行分组调研，针对冬凤兰在栽培过程中出现的不同技术问题，本课题组对外植体选择与处理、组培苗培育、移栽等生产过程进行大量试验，以生根组培苗质量及移栽成活率为评价指标，取得阶段性进展，确立了冬凤兰组培繁育生产程序。根据反馈意见及试验成果，标准编制工作组多次召开会议，对标准草案进行反复修改和研究讨论，形成团体标准《冬凤兰组培繁育技术规程》（征求意见稿）和（征求意见稿）编制说明。

四、标准制定原则

1、实用性原则

本文件是在充分收集相关资料和文献，结合多年实践而总结起草的。符合当前冬凤兰组培繁育生产的要求，有利于行业的长远发展，具有较强的实用性和可操作性。

2、协调性原则

本文件编写过程中注意了与冬凤兰组培繁育生产相关法律法规的协调问题，在内容上与现行法律法规、标准协调一致。

3、规范性原则

本文件严格按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》的要求和规定编写本标准的内容，保证标准的编写质量。

4、前瞻性原则

本文件根据当前冬凤兰自然资源数量正在急剧减少而自然繁殖速度慢的现状，同时考虑冬凤兰组培繁育技术的需求，在标准中体现了个别特色性、前瞻性和先进性条款，作为对冬凤兰组培繁育的指导。

五、标准主要章节内容及确定依据

团体标准《冬凤兰组培繁育技术规程》主要内容包括外植体选择与处理、初代培养、继代增殖培养、根芽分化、生根壮苗培养、组培苗移栽。

**1术语和定义**

**变异率：**形态、遗传特性显著有别于原品种的变异株数与植株总数的比率。

**原球茎**：种子萌发过程中的形态学结构，种子的幼胚吸水膨胀，中部的胚细胞分裂增殖，突破合点端种皮形成球形或椭球形的芽状结构。

**2冬凤兰组织培养繁育技术**

（1）外植体的选择是组培瓶苗培育的重要步骤，外植体品质的优劣关系到组培瓶苗品质的优劣。在外植体选择时，需要选取品种纯正、农艺性状优良、生长健壮、无病虫害的植株作为母株，以确保外植体在培养基上的萌发率和组培苗的品质优良。应采集授粉后足8个月的果荚，采收时间太早，胚发育不完全，发芽率低；太迟采收，果荚开裂，种子消毒处理困难。

（2）外植体清洗灭菌是冬凤兰组培繁育技术体系建立关键的第一步。首先将授粉足8个月未开裂的冬凤兰蒴果用75%的酒精擦拭干净，擦拭干净的蒴果置于超净工作台内，将蒴果用浓度为 75％的酒精浸泡 30s，再用0.1%的升汞表面消毒15 min，无菌水冲洗4次，干净后用无菌滤纸吸干水分待用。

（3）种子预处理，用消毒刀片切掉蒴果两头，纵剖开蒴果，将种子取出置于4×6厘米环保茶袋中，将茶袋抽绳拉紧，整个泡进0.2mol/L NaClO中浸泡 15min 进行预处理。

（4）培养条件

培养室温度25±2 ℃，湿度40％～60％，种子播种后遮光培养，待萌发后光照强度500 Lx，生根壮苗光照强度2000LX，每d光照时间10 h～12 h。

（5）初代培养

冬凤兰原球茎诱导的基本培养基可采用MS,花宝1号，KC，这些培养基均有成功的先例，只是需要依据不同培养阶段附加不同浓度的植物激素、有机物添加等。决定冬凤兰外植体形成原球茎的主要因素是激素配比，通常需要细胞分裂素和生长素的同时存在。

（6）继代增殖培养

继代增殖培养是组培苗生产的关键步骤，增殖系数大小直接决定生产的成本高低，培养基中植物生长调节剂浓度配比和培养条件对组培苗增殖系数起着决定性的作用。在超净工作台上，切割初代或继代培养诱导的原球茎，转接至增殖培养基上，每瓶接种15-20个，培养3～4 周，可分化出多个原球茎成团生长。冬凤兰的原球茎增殖的同时，往往伴随着根和芽的分化。

（7）生根壮苗培养

生根壮苗培养是组培瓶苗培育的最后一个环节，也是组培瓶苗培育成功与否的关键步骤，冬凤兰经过壮苗后的芽在不同的培养基的根系大小、根的数量等指标和生长情况都受培养基中的植物生长调节剂影响。组培生根苗培养时间在30～40 d，符合标准后判定合格。

**3冬凤兰组培繁育筛选试验**

（1）初代培养：原球茎的诱导

①蒴果不同采集时间处理：采集授粉后5个月、8个月、12个月不同成熟度的蒴果开展试验；

②不同消毒处理方式：以0.1％ HgCl2为消毒剂，设置了10 min、12min、15min时间处理；0.2mol/L NaOH、0.2mol/L NaClO中浸泡 15min 进行预处理。

③不同初代培养基配方处理

经统计，试验过的培养基配方有11种，激素主要是6-BA、NAA；培养基包括：MS、KC、花宝1号、1/2MS ；糖25g/L、30g/L，以及添加水解乳蛋白、蛋白栋、椰汁、活性炭、琼脂或者卡拉胶等。

④试验效果

i授粉后5个月、8个月、12个月不同成熟度的蒴果，无菌播种萌发需要的时长分别是8-9周、10-12周、6-8周，在萌发率和萌发的原球茎增殖效果上差异不显著。因此，选择成熟度更高的未开裂果荚进行无菌播种可以适度缩短萌发周期，但从整个繁育周期来看，采用8个月蒴果用时较短。

ii目前外植体材料的处理效果最为理想的步骤为：将授粉足8个月未开裂的冬凤兰蒴果用75%的酒精擦拭干净，擦拭干净的蒴果置于超净工作台内，将蒴果用浓度为 75％的酒精浸泡 30s，再用0.1%的升汞表面消毒15 min，无菌水冲洗4次，干净后用无菌滤纸吸干水分待用。用消毒刀片切掉蒴果两头，纵剖开蒴果，将种子取出置于4×6厘米环保茶袋中，将茶袋抽绳拉紧，整个泡进0.2mol/L NaClO中浸泡 15min 进行预处理。

iii接种要求:将预处理过的种子用无菌水冲洗两遍，用接种勺播种于诱导培养基上，滴加1-2滴无菌水摇匀，让种子均匀分布在培养基表面。

用240ml带透气瓶盖的小广口瓶作为培养容器。

iv 不同初代培养基配方试验效果见表1。

表1 不同初代培养基配方试验效果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 培养基 | 萌发时间 | 萌发率 |
| ①MS+BA0.5mg/L+NAA0.1mg/L+CM(椰子汁）100ml/L+AC2g/L+蔗糖25g/L+琼脂4.8g/L | 90d | +++ |
| ②花宝1号+BA0.5mg/L+NAA0.1mg/L+CM(椰子汁）100ml/L+AC2g/L+蔗糖25g/L+LH（水解乳蛋白）1g/L+琼脂4.8g/L | 90d | +++ |
| ③KC+NAA 0.6mg/L+6-BA 1.5mg/L+椰汁100ml/L+活性炭1g/L+蔗糖20g/L+琼脂4.8g/L | 80d | ++ |
| ④花宝1号3g/L+蔗糖30g/L+蛋白胨4g/L+CM(椰子汁） 100ml/L+琼脂5g/L | 60d | +++ |
| ⑤1/2MS+6-BA2mg/L+NAA1mg/L+蔗糖30g/L+CM(椰子汁） 100ml/L+活性炭1g/L+琼脂3.8g/L | 95d | + |
| ⑥MS+6-BA1mg/L+NAA0.5mg/L+蔗糖20g/L+CM(椰子汁） 100ml/L+蛋白胨2g/L+琼脂5g/L | 100d | + |

说明：以“+”代表萌芽率，“+”越多代表萌芽率越高。

从表1可知，④培养基配方种子萌发周期最短，萌芽率最高。

重复试验得出：冬凤兰适宜的初代培养基为：花宝1号3g/L+蔗糖30g/L+蛋白胨4g/L+CM(椰子汁） 100ml/L+琼脂5g/L。

（2）继代增殖培养基筛选试验

通过初代培养形成的原球茎需要及时转移培养基才能正常增殖。转移时，将原球茎从培养基中取出，在无菌培养器中切分，切口朝上平放在增殖培养基上，每瓶接种10-20块，培养4-6周，在已分切的每块原球茎上又分别长出5-10个原球茎，初生的原球茎直径1-2mm，淡绿色，密布放射状白色细毛。

经试验多种不同配方后，筛选出5个继代增殖培养基配方进行连续多代观察。

试验效果：原球茎继代增殖存在类似于蝴蝶兰继代的群体效应，即原球茎切块小、稀疏的培养瓶内，群体生长较慢，而切块较大接种密集的瓶内，生长健壮。因此，转移继代时，原球茎切割不宜过小，直径要在半厘米以上，每瓶可接种15-20块。继代培养时间不宜过长，否则可能产生歧形植株。冬凤兰原球茎继代培养的同时，伴随着部分原球茎芽的分化(图2）。继代培养基中的大量元素、激素、糖的种类和浓度等对冬凤兰的原球茎增殖和生长有明显影响。大量元素的增加有利于形成更多的原球茎状体，但萌芽率低。糖的浓度对冬凤兰繁殖系数也有影响，20g/L时繁殖系数最高。

表2 不同继代培养基配方试验效果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 培养基 | 接入原球茎质量/g | 30d后原球茎总质量/g | 增殖率% |
| A1 | 2.68 | 5.02 | 87.31% |
| A2 | 2.91 | 6.33 | 117.52% |
| A3 | 3.20 | 9.35 | 192.18% |
| A4 | 2.55 | 5.06 | 98.43% |
| A5 | 2.45 | 6.42 | 162.04% |

表中培养基配方：

A1:VW+6-BA2mg/L+蔗糖22g/L+香蕉汁100g/L+琼脂4.5g/L

A2:MS+6-BA2mg/L+蔗糖22g/L+香蕉汁100g/L+琼脂4.5g/L

A3:MS+NAA0.2mg/L+6-BA1.2mg/L+椰汁 100ml/L+蔗糖20g/L+琼脂

A4:1/2MS+6-BA2mg/L+蔗糖22g/L+香蕉汁100g/L+琼脂4.5g/L

A5：1/2MS+NAA0.2mg/L+6-BA1.2mg/L+椰汁 100ml/L+蔗糖20g/L+琼脂

由表2可知，A3培养基配方原球茎增值倍数较高。

经重复试验得出：冬凤兰适宜的继代增殖培养基为：MS+NAA0.2mg/L+6-BA1.2mg/L+AC1g/L+椰汁 100ml/L+蔗糖20g/L+琼脂。

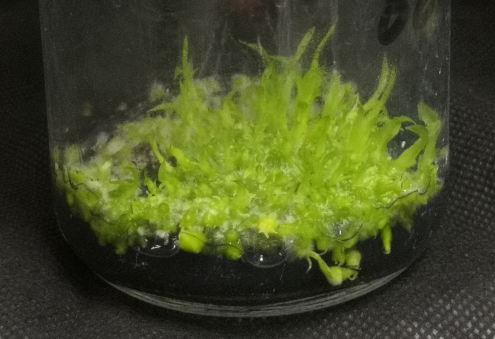


图2 原球茎增殖培养

（3）芽分化培养基筛选

分别采用MS和花宝1号基本培养基，添加不同的蔗糖浓度和激素浓度配比，对原球茎进行萌芽分化培养。总共试验了11种培养基，最终筛选出3种进行重复多代观察试验。每处理接种5瓶，3个重复，培养40天后统计原球茎的分化率。原球茎分化率=（分化出茎叶的原球茎数/接种的原球茎数）×100%。

试验效果：将原球茎转移至分化培养基上，慢慢发生极性分化。先在顶端分化出小芽，继而长出叶片，当叶芽长到2cm左右时，在其基部分化出根，原球茎在进行器官分化生成芽、根的同时仍在继续生成新的原球茎，可作为继代增殖的外植体，转移到增殖培养基中。在这个阶段一个培养瓶中既有原球茎也有已分化的、具根的小苗同时存在（图3）。



图3 冬凤兰原球茎根芽分化

表3 不同根芽分化培养基配方试验效果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 培养基种类 | 接种原球茎数（个） | 茎芽分化原球茎数（个） | 分化率% |
| B1 | 150 | 105 | 70 |
| B2 | 150 | 210 | 140 |
| B3 | 150 | 180 | 120 |

培养基配方：

B1:1/2MS+NAA0.2mg/L+6-BA2mg/L+AC1g/L+CM100ml/L+蔗糖20g/L+琼脂4.7g/L

B2：MS+NAA0.2mg/L+6-BA2mg/L+CM100ml/L+蔗糖20g/L+琼脂4.7g/L

B3：花宝2号2g/L+NAA1mg/L+6-BA0.1mg/L+蛋白栋2g/L+蔗糖30g/L+琼脂6.5g/L

由表3和图4可见：B1培养基分化出较多的根，但芽的分化率较低，长势较慢；B2和B3培养基原球茎分化率比较高，B3培养基也分化了少量的根，但无根苗长势没有B2好。B2培养基中无根苗的长势最好，分化率最高。

经重复试验得出，冬凤兰最佳芽分化培养基配方：MS+NAA0.2+6-BA2+Co 100+Sug20+琼脂4.7。



**B3**2

**B2**2

**B1**



图4 3种培养基冬凤兰芽分化培养

（4）生根壮苗培养基筛选

冬凤兰易生根，在分化培养中即伴随着根的生成，但伴生根较细，培养基中增加促生根的生长素NAA浓度可让根长势更好，苗更壮。以不同无机盐浓度的MS为基础培养基，添加NAA或6-BA及其中两者的组合开展生根试验，筛选出了3个配方做重复试验。每个配方接种3个重复，每个重复15个无根苗。

试验效果（表4，图5）：各处理的生根率在85%以上，C1处理生根率达100%。

表4 不同生根壮苗培养基配方试验效果

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 培养基 | 接入无根苗数（个） | 30d后生根苗数（个） | 生根率% | 平均根数（条） | 平均根长cm | 平均根粗cm | 苗长势 |
| C1 | 45 | 45 | 100 | 4.50 | 3.20 | 0.35 | 较细，叶偏黄 |
| C2 | 45 | 45 | 100 | 3.80 | 2.30 | 0.20 | 壮，叶较绿 |
| C3 | 45 | 43 | 95.55 | 2.80 | 2.20 | 0.19 | 较细，叶偏黄 |

表中培养基配方：

C1:1/2MS+NAA2mg/L+6-BA1mg/L+香蕉汁100ml/L+CM100ml/L+蔗糖20g/L+琼脂4.7g/L

C2:1/4MS+NAA2mg/L+6-BA1mg/L+活性炭2g/L+香蕉汁100ml/L+CM100ml/L+蔗糖20g/L+琼脂4.7g/L

C3:MS+NAA2mg/L+6-BA1mg/L+香蕉汁100ml/L+CM100ml/L+蔗糖20g/L+琼脂4.7g/L

由表4和图5可见，C1和C2培养基中冬凤兰生根率最高，达100%，C1培养基中根长且粗，根毛非常丰富，但苗的长势有点弱，苗纤细，叶片黄绿；C3培养基中苗的长势较好，但根的长势不如C2，部分根偏细且黄；C2培养基中苗壮，叶绿，根长得均匀。

经重复试验得出，冬凤兰最佳壮苗生根培养基配方为：

1/4MS+NAA2mg/L+6-BA1mg/L+活性炭2g/L+香蕉汁100ml/L+CM100ml/L+

蔗糖20g/L+琼脂4.7g/L



**C3**

**C2**

**C1**



图5 3种培养基冬凤兰壮苗生根培养

**4生根苗移栽**

移栽方法：待冬凤兰组培苗长至瓶颈口，约10cm高时，转移至大棚的自然光下炼苗1周，再开盖炼苗3-5天，从容器中取出组培苗，用清水洗去根部培养基，用多菌灵浸泡后凉干根部，先用浸泡过的水苔包裹根部并移栽至营养杯内，保持水苔湿润。待30天左右组培苗成活后，可移栽至混合基质中。冬凤兰试管苗对基质要求不严格，不同基质移栽成活率都可达90%以上，见表5。

表5 不同培养基质对移栽苗成活率的影响

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 基质 | 种植株数/株 | 存活数/株 | 成活率（%） |
| 树皮+珍珠岩 | 100 | 90 | 90 |
| 树皮+植金石 | 100 | 91 | 91 |
| 花生壳+植金石 | 100 | 96 | 96 |

**5 冬凤兰组培方面相关成果**

申请发明专利“一种冬凤兰无菌播种培养基配方及组织培养方法”。

六、国内外同类标准制修订情况及与法律法规、强制性标准关系

经查阅，国内目前没有与冬凤兰组培苗生产有关的行业及地方标准。

本标准的内容与现行的法律、法规及强制性标准无冲突，标准的编写符合GB/T 1.1-2020的要求。

七、重大分歧意见发处理经过和依据

本标准研制过程中无重大分歧意见。

八、自我承诺

本标准内容与各项指标不低于强制性标准要求。

团体标准 《冬凤兰组培繁育技术规程》

标准编制小组

2023年2月20日