|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 07.080 |
| CCS | A40 |

|  |
| --- |
| 31 |

上海市地方标准

DB31/TXXXX—XXXX

海三棱藨草组织培养育苗技术规程

Technical specification for tissue culture of Scirpus mariqueter

拟更名为：海三棱藨草种群生态恢复技术规程

Codeof practice for ecological restoration of Scirpus mariqueter

（本稿完成日期：2021年8月31日）

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

上海市市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc84944845)

[引言 III](#_Toc84944846)

[1 范围 1](#_Toc84944847)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc84944848)

[3 术语和定义 1](#_Toc84944849)

[4 恢复流程 1](#_Toc84944850)

[5 恢复场地选择 2](#_Toc84944851)

[6 恢复材料准备 2](#_Toc84944852)

[7 实施恢复 5](#_Toc84944853)

[8 监测与管理 7](#_Toc84944854)

[附录A（规范性） 海三棱藨草组培生产培养基及配方 9](#_Toc84944855)

1. 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。

本文件由上海市绿化和市容管理局提出并组织实施。

本文件由上海市林业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：上海市崇明东滩自然保护区管理事务中心、华东师范大学、上海市园林科学规划研究院、复旦大学。

本文件主要起草人：马强、袁琳、张群、李博、徐晓、张利权、朱义、崔心红、冯雪松。

1. 引言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到6.1、6.4、7.1、7.2、8与其对应内容相关的专利的使用。

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。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他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。该专利持有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：

* 1. 发明专利名称：一种潮间带海三棱藨草自然群落生态恢复方法

专利持有人名称：华东师范大学

地址：上海市闵行区东川路500号

* 1. 发明专利名称：一种海三棱藨草的快速繁育方法

专利持有人名称：上海市园林科学研究所

地址：上海市徐汇区龙吴路899号

* 1. 发明专利名称：一种海三棱藨草种子萌发的方法

专利持有人名称：复旦大学

地址：上海市杨浦区邯郸路220号

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。

海三棱藨草组织培养技术规程

* 1. 范围

本文件确立了海三棱藨草种群恢复程序，规定了恢复场地的选择、恢复材料的选择与培育、实施恢复的方法与要求，以及监测与管理的要求。

本文件适用于本市海三棱藨草种群生态恢复与重建。

* 1. 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/T24708 湿地分类

HY/T 214 红树林植被恢复技术指南

LY/T 1882 林木组织培养育苗技术规程

NY/T 2306 花卉种苗组培快繁技术规程

DB31/T 1243互花米草生态控制技术规范

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

层积处理 stratification

解除种子休眠的一种方法，即将种子埋在湿沙中置于1℃～10℃温度中，经1～3个月的低温处理解除休眠，促进种子萌发。

优化区 habitat regulation area

通过一系列生态治理方针去除入侵物种后营建及优化鸟类栖息地，并恢复土著植物的区域，该区域为非潮汐影响区，且具备一定调度管理基础。

球茎苗 rhizomatic seedling

由扁球状的地下球茎萌发或催芽形成的幼苗。

再生苗 regeneratedplantlet

通过植物组织培养方式获得的完整植株，具有根、茎、叶等植物器官。

人工辅助播种 artificial assisted seeding

将种子与潮滩沉积物混合后装入麻袋并固定在自然潮滩上的人工辅助播种方法。

* 1. 恢复流程

海三棱藨草种群恢复的流程如图1所示，包括恢复场地选择、恢复材料准备、实施恢复、监测与管理。



1. 海三棱藨草种群恢复流程
   1. 恢复场地
      1. 自然潮滩生境

自然潮滩恢复场地应符合以下要求：

1. 符合GB/T 24708的淤泥质海滩和潮间盐水沼泽的条件；
2. 潮滩滩面基础高程在吴淞高程2.2 m～3.0 m的范围内，4月～6月单月垂向泥沙淤积应小于10 cm；
3. 潮滩水动力的最大波能密度应小于250 J/m2，平均波能最高应为50 J/m2。
   * 1. 优化区生境

优化区恢复场地应符合以下要求：

1. 地块水分饱和，盐度应小于10‰，持续淹水水深应小于8cm；
2. 应清除原有植被，翻耕地块，去除原有植被根系；
3. 地势应平整，单个恢复斑块内的高程差异应小于5 cm。
   1. 恢复材料
      1. 种子
         1. 种子采集

应在每年10月～11月，海三棱藨草种子成熟且未脱落前，人工收割海三棱藨草成熟的果穗，晾晒3天后用工具碾压，风干剥落后采集饱满、无虫害的种子。

* + - 1. 种子层积处理

种子层积处理应按照以下步骤进行：

1. 将风干种子和洗净的湿润细沙按1:2的体积比混合均匀；
2. 置于1℃～10 ℃的条件下储藏至少30 d，期间适当补水保持湿润，细沙宜手握成团但不滴水；
3. 若发生霉变，应及时清洗，并置于同等条件下继续处理。
   * + 1. 催芽

种子催芽应按照以下步骤进行：

* + - * 1. 将层积处理的种子去沙或和细沙一起置于20 ℃～30 ℃的条件下催芽5d～10d；
        2. 催芽期间应及时补充水分,若有霉变，应及时清洗，并置于同等条件下继续催芽；
        3. 种子露白率超过50%后，即可使用。
    1. 球茎苗

应于每年3月～4月，在恢复场地附件就近采集生长健康、无病虫害、株高大于10 cm的球茎苗。

采集球茎苗步骤如下：

利用采集器挖取直径大于7 cm，深度约15 cm～20 cm的海三棱藨草植株柱状样；

应每隔10m设置1个取苗点，每个取苗点分散采集带土植株数量不应超过30个，保障对原有群落的生长不产生显著破坏。

* + 1. 实生苗

实生苗育苗方法及过程应按以下步骤进行：

1. 按6.1.1方法采集种子，并按6.1.2执行层积处理；
2. 将待恢复区的土壤装满直径为5 cm～10 cm，高度为5 cm的可降解育苗袋中；
3. 将按6.1.3方法处理的海三棱藨草种子放置在育苗袋底部后填充待修复区至与袋口齐平，每个育苗袋内播种50粒～100粒种子；
4. 将播种后的育苗袋置于25 ℃温室内培养，每天补充水分；
5. 培育1个月～2个月，待株高不低于10 cm时，竖直放置于周转箱内备用。
   * 1. 再生苗
        1. 外植体选取

应选取当年生且饱满的小坚果作为外植体，每隔30 m采集5粒～10粒饱满的小坚果，至少采集5000粒。

* + - 1. 外植体灭菌

外植体灭菌按照以下步骤进行：

1. 流水冲洗20 min；
2. 在乙醇浓度为72%的溶液中浸泡15s；
3. 在次氯酸钠浓度为0.1%的溶液中震荡消毒5 min～15 min；
4. 无菌水冲洗5次；
5. 使用无菌滤纸吸干水分。
   * + 1. 培养基配制、灭菌、保存
          1. 配方

培养基分为种子萌发培养基、丛生芽诱导增殖培养基、壮苗培养基、生根培养基。

应按附录A要求配制培养基。

* + - * 1. 配制、灭菌、保存

培养基配置、灭菌、保存按以下步骤进行：

1. 按LY/T 1882规定方法配制培养基；
2. 配制培养基当天按NY/T 2306规定方法进行灭菌；
3. 常温下灭菌后的培养基应在3 d内使用完毕。
   * + 1. 培养条件

除特别说明外，再生苗培养条件应符合以下要求：

1. 培养温度25 ℃～30 ℃,培养周期25 d～35 d；
2. 光培养时，光周期为12 h/d，光照强度为1500 lx～2500 lx。
   * + 1. 再生苗培养
          1. 前处理

在无菌条件下，用解剖刀划破种皮2处～3处，注意避免损伤种胚。

* + - * 1. 无菌苗获取

消毒后的外植体，接种于萌发培养基，培养30 d后，待幼芽高度达到3 cm时，转入诱导增殖培养基。

* + - * 1. 诱导及增值培养条件

培养温度30 ℃，光照强度2500 lx，光周期15 h。

* + - * 1. 丛生芽的诱导及增殖

丛生芽诱导及增值按以下步骤进行：

1. 将健壮幼芽转入诱导增殖培养基，30 d后，分化形成8芽/丛～15芽/丛的丛生芽；
2. 将丛生芽切分成以2个～3个幼芽为一丛的丛芽，转入诱导增殖培养基；
3. 每30 d继代培养一次，转接15代后，应重新获取实生无菌苗。
   * + - 1. 壮苗培养

壮苗培养，按照6.4.5.4要求分切丛生芽，转入壮苗培养基，培养30 d。

* + - * 1. 生根培养

将壮苗培养后的丛生芽切分为单芽，转入生根培养基。

* + - * 1. 炼苗

生根培养21 d后，当根长大于1 cm时，将瓶苗从培养室转移至大棚，时间为3 d～5 d。环境温度为15 ℃～30 ℃，采用散射光照，避免阳光直接照射。

* + - * 1. 再生苗要求

移栽前，再生苗应达到以下要求：

1. 植株深绿色，无污染、白化、褐化；
2. 苗高≥8 cm；
3. 根长≥1 cm，根数3条以上。
   * + 1. 移栽
          1. 移栽基质

珍珠岩:草炭:蛭石=1:1:1 (体积比)。

* + - * 1. 移栽管理

移栽应在4月～6月或10月～11月进行，应在移栽前1 d打开瓶苗封口，按以下步骤操作：

1. 从培养容器中取出再生苗，用清水洗净其基部的培养基；
2. 采用128孔穴盘，一孔一苗种植于移栽基质内；
3. 种植后基质及再生苗应进行雾状喷湿，至基质溢水为止，并放入苗床；
4. 移栽后，每天进行雾状喷湿，持续10 d，保持空气相对湿度在85%～95%；
5. 移栽15 d后，再生苗可出圃。
   1. 实施恢复
      1. 自然潮滩恢复
         1. 恢复方法

在符合5.1要求的场地范围内，按以下条件选择恢复方法：

1. 水动力相对较弱（最大波能密度小于150 J/m2）的修复场地，可采用球茎苗移栽或人工辅助播种的方法；
2. 水动力相对较强（最大波能密度大于150 J/m2，且小于250 J/m2）的修复场地，采用人工辅助播种方法。
   * + 1. 球茎苗移栽
          1. 时间

自然潮滩的移栽时间应满足以下要求：

1. 每年4月，日均气温高于15℃，日最低气温高于10℃；
2. 应选择在小潮的低潮期实施移栽，且移栽后至少6h内不被潮水淹没。
   * + - 1. 运输

将球茎苗柱状样竖直、紧密放置在周转箱内，遮荫运输至恢复场地。

* + - * 1. 移栽

球茎苗移栽按以下步骤及要求进行：

1. 在恢复场地内，挖15cm深的坑将球茎苗柱状样种植于坑内，移栽植物表层土壤应与潮滩表面齐平；
2. 移栽密度应不低于30株/m2。
   * + 1. 人工辅助播种
          1. 时间

人工辅助播种时间应满足以下要求：

1. 4月～5月；
2. 日均气温高于15℃；
3. 日最低气温高于10℃；
4. 小潮汛低潮期。
   * + - 1. 运输

将催芽种子与细沙一起放置于周转箱内，箱体表面覆盖通气的遮阴网，运输至恢复场地。

* + - * 1. 辅助播种

人工辅助播种按以下步骤进行：

1. 将6.1.3获得的催芽种子与潮滩沉积物混合后装入孔径大于1 mm且小于4mm、尺寸不小于100 cm×60 cm×10 cm的麻袋中，每个麻袋内种子数量应不少于1000粒/袋；
2. 用铁锨在潮滩上掘出与麻袋大小一致的坑位，将装有种子的麻袋埋入坑位中，使用竹竿或U形钉将麻袋固定于滩面，上覆少量潮滩沉积物，麻袋与滩面齐平；
3. 辅助播种的麻袋之间宜保持1～3m间距；
4. 若竹竿破损或U形钉丢失，应及时更新和加固。
   * + 1. 繁殖体保存

恢复备用的球茎苗和种子等繁殖体若无法及时种植，应遮阴保存，并适当喷水保湿。

* + 1. 优化区生境恢复
       1. 时间

应在4月～6月期间进行。

* + - 1. 场地准备

在符合5.2要求的场地四周设置围栏，控制人为干扰。

在场地内灌水，使土壤含水量达到饱和。

* + - 1. 繁殖体运输

将准备的繁殖体（球茎苗、种子、实生苗或再生苗）放置在周转箱内，遮荫保湿运输至恢复地块。

* + - 1. 种植方法
         1. 球茎苗移栽

在移栽点挖取深度为15 cm的小坑，放入带球茎苗的土块后压实。

宜保持50 cm的丛距和行距，密度宜为4丛/m2。

* + - * 1. 播种

播种密度宜为50粒～100粒/m2；宜在阴天直接撒播萌发后的种子。

* + - * 1. 实生苗移栽

在移栽点挖取比育苗袋更深的小坑，放入育苗袋后压实。

应以一个育苗袋为一丛进行移栽，宜保持50 cm的丛距与行距，密度宜为4丛/m2。

* + - * 1. 再生苗移栽

在移栽点挖取深度2 cm～3 cm的小坑，放入再生苗后压实。

应以3株～5株再生苗为一丛进行移栽，宜保持50 cm的丛距与行距，密度宜为4丛/m2。

* + - 1. 繁殖体保存

繁殖体运输至生态恢复区后，在6 h～8 h内完成种植。

无法及时种植的，应按HY/T 214的方法保存。

* + - 1. 养护要求
         1. 水位调控

种植1个月内，应保持土壤含水率＞80%，水深不应超过10 cm。

种植1个月后，水深不应超过20 cm。

* + - * 1. 盐度调控

定期测定水体盐度，保持水体盐度范围不高于10‰。

水体盐度大于10‰的，应及时灌水稀释。

* + - * 1. 蟹类控制

蟹类控制应按以下步骤进行：

1. 移栽前，应在地块四周搭建蟹类防护网，控制地块内蟹类的数量；
2. 移栽后，应设置捕蟹桶，每天将捕捉的蟹类清理至地块外。
   * + - 1. 管理周期

养护管理应按以下步骤进行：

1. 种植后2个月～3个月内，应进行水位调控、盐度调控、杂草清除、蟹类控制；
2. 种植2个月～3个月后，若海三棱藨草种群密度超过1000株/m2，可进行水位调控和盐度调控。
   1. 监测与管理
      1. 自然潮滩恢复监测与管理
         1. 监测

可根据恢复方法不同按如下要求实施监测：

1. 球茎苗移栽1个月后，应检测移栽成活率、盖度和密度，成活率低于70%，应及时补种；
2. 人工辅助播种1个月后，应检测每个麻袋辅助样方的出苗率、成活率、盖度、密度，辅助样方内出苗率低于10%，应及时补种。
   * + 1. 后期管理

恢复场地内有互花米草入侵，应按照DB31/T1243要求，采用人工拔出或药剂治理方法及时清除。

* + 1. 优化区恢复区监测与管理
       1. 监测

重建1个月后，应每月监测种群内海三棱藨草的成活率、密度和杂草发生情况,及时进行人工除草。

种子、球茎苗、组培苗成活率低于10%，应及时补种。

* + - 1. 后续管理

恢复区内出现加拿大一枝黄花、香蒲等杂草应及时清除，杂草盖度应控制在5%以内。

2. （规范性）  
   海三棱藨草组培生产培养基及配方

表A.1给出了海三棱藨草组培生产培养基及配方。

* 1. 海三棱藨草组培生产培养基及配方

| 培养基组成 | 培养基成分 | 种子萌发/（mg/L） | 诱导增殖/（mg/L） | 壮苗/（mg/L） | 生根/（mg/L） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 大量元素 | KNO3 | 1900 | 1900 | 950 | 950 |
| NH4NO3 | 1650 | 1650 | 825 | 825 |
| KH2PO4 | 170 | 170 | 85 | 85 |
| MgSO4·7H2O | 370 | 370 | 185 | 185 |
| CaCl2·2H2O | 440 | 440 | 220 | 220 |
| 微量元素 | KI | 0.83 | 0.83 | 0.415 | 0.415 |
| ZnSO4·7H2O | 8.60 | 8.60 | 4.30 | 4.30 |
| MnSO4·4H2O | 22.30 | 22.30 | 11.15 | 11.15 |
| H3BO3 | 6.20 | 6.20 | 3.10 | 3.10 |
| NaMoO2·2H2O | 0.25 | 0.25 | 0.125 | 0.125 |
| CoCl2·6H2O | 0.025 | 0.025 | 0.0125 | 0.0125 |
| CuSO4·5H2O | 0.025 | 0.025 | 0.0125 | 0.0125 |
| 有机成分 | 维生素B1 | 0.10 | 0.10 | 0.50 | 0.50 |
| 烟酸 | 0.50 | 0.50 | 0.025 | 0.025 |
| 维生素B6 | 0.50 | 0.50 | 0.025 | 0.025 |
| 甘氨酸 | 2.00 | 2.00 | 1.00 | 1.00 |
| 肌醇 | 100 | 100 | 50 | 50 |
| 铁盐 | FeSO4·7H2O | 27.80 | 27.80 | 13.90 | 13.90 |
| Na2·EDTA | 37.30 | 37.30 | 18.65 | 18.65 |
| 糖 | 蔗糖 | 25000～35000 | 25000～35000 | 12500～17500 | 12500～17500 |
| 凝固剂 | 琼脂 | 4000～6500 | 4000～6500 | 4000～6500 | 4000～6500 |
| 激素 | 6-BA | 0.50 | 2.00 | 0.05 |  |
| TDZ |  | 0.002 |  |  |
| IBA |  | 0.20 | 0.01 | 0.20 |

