

团 体 标 准

T/LCH XXXX-XXXX

柑橘砧木枳壳菌根种苗培育技术规范

Technical Specifications for the Cultivation of Citrus Rootstock
Aurantii Mycorrhizal Seedlings

（征求意见稿）

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国长城绿化促进会

发 布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 技术要求	1
5 培育流程	3
6 试验方法	5
7 检验规则	7
8 标志、包装、运输和贮存	9
9 资料管理与归档	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。

本文件由广西壮族自治区农业科学院提出。

本文件由中国长城绿化促进会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区农业科学院。

本文件主要起草人：×××

柑橘砧木枳壳菌根种苗培育技术规范

1 范围

本文件规定了柑橘砧木枳壳菌根种苗培育有关技术要求、培育流程、试验方法、检验规则、标志、包装、运输与贮存、资料管理与归档等方面的内容。

本文件适用于柑橘砧木枳壳菌根种苗的培育、生产和质量控制。

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 3543.2-2025 农作物种子检验规程 第2部分：扦样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

枳壳 *Fructus aurantii*

芸香科柑橘属植物，常用作柑橘类果树的砧木。

3.2

菌根种苗 *Mycorrhizal seedlings*

枳壳种子经丛枝菌根（AM）真菌接种后，根系形成共生菌根结构（菌丝、丛枝、泡囊）的健壮幼苗。

3.3

黄雷德克囊霉 FS-1-106 *Redeckera fulvum* FS-1-106

一种丛枝菌根真菌，分类命名为黄雷德克囊霉 FS-1-106。

3.4

菌剂 *Microbial inoculum*

含有黄雷德克囊霉 FS-1-106 菌丝、孢子及宿主根系等的混合物，用于接种枳壳种子。

4 技术要求

4.1 菌种要求

4.1.1 菌种鉴定

4.1.1.1 菌种为黄雷德克囊霉（*Redeckera fulvum*）FS-1-106，分类命名及分子序列应符合相应保藏信息。

4.1.1.2 菌种形态特征应符合包括但不限于下列各项：

a) 孢子近球形至球形，黄色至橙黄色，大小 $58.1\ \mu\text{m} \sim 138.3\ \mu\text{m}$ （平均 $87.2\ \mu\text{m}$ ）；

T/LCH XXX-XXXX

- b) 壁 3 层, L1 无色透明, L2 橙黄色, L3 层状;
- c) 连孢菌丝 $7\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$, 无色透明。

4.1.2 菌剂质量指标

4.1.2.1 孢子含量

菌剂中孢子量需达到每克 $80 \sim 120$ 个孢子, 且孢子活力 $\geq 90\%$ (通过染色法检测)。

4.1.2.2 杂菌污染

菌剂中不得检出病原微生物 (如真菌、细菌等), 需通过无菌检测验证。

4.1.2.3 制备要求

菌剂制备需以三叶草为宿主, 接种量为每盆三叶草 (50 株 $\sim$ 80 株每盆) 使用 $1\ 000 \sim 1\ 500$ 个孢子, 培养 $12 \sim 16$ 周, 培养基质为河沙: 沸石 = 3: 1 (体积比), 经 $121\ ^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 1 h。

4.2 种子要求

4.2.1 种子质量指标

4.2.1.1 纯度

枳壳种子纯度 $\geq 98\%$, 无混杂其他植物种子。

4.2.1.2 发芽率

4.2.1.2.1 种子发芽率 $\geq 85\%$, 发芽势 $\geq 70\%$ 。

4.2.1.2.2 应按 GB/T 3543.4-2025 中规定的进行测量。

4.2.1.3 净度

种子净度 $\geq 99\%$, 无杂质、虫蛀或霉变颗粒。

4.2.2 脱毒处理要求

4.2.2.1 种子需经温水脱毒处理: 先在 $40\ ^\circ\text{C}$ 水浴中预处理 10 min, 再用 $53\ ^\circ\text{C}$ 温水浸泡 50 min, 期间持续搅拌使温度均匀。

4.2.2.2 脱毒后种子表面需无菌落生长, 宜通过平板培养法验证脱毒效果。

4.3 基质要求

4.3.1 播种基质

4.3.1.1 组成: 新鲜土过 $20\ \text{mm} \times 20\ \text{mm}$ 筛后与河沙按体积比 1: 1 混合。

4.3.1.2 处理: 基质需经日光暴晒或 50% 多菌灵可湿性粉剂 500 倍液消毒, 避免土传病害。

4.3.2 菌剂制备基质

4.3.2.1 组成: 河沙与沸石按体积比 3: 1 混合。

4.3.2.2 灭菌: 混合后基质需在 $121\ ^\circ\text{C}$ 高压蒸汽下灭菌 1 h, 明确无杂菌污染。

4.3.3 育苗杯基质

- 4.3.3.1 配方：按体积份数比，新鲜土 2 份、谷壳 1 份、木糠 1 份、牛粪 0.5 份混合。
- 4.3.3.2 要求：牛粪需经腐熟处理，基质 pH 值需控制在 6.0 ~ 7.0，有机质含量 $\geq 5\%$ 。

4.3.4 覆盖基质

播种后覆盖的河沙需过 2 mm ~ 5 mm 筛，粒径均匀，无泥块杂质，厚度 1 cm ~ 2 cm。

5 培育流程

5.1 菌剂制备

5.1.1 宿主植物培养

5.1.1.1 宿主选择

宜采用三叶草作为黄雷德克囊霉 FS-1-106 的共生宿主植物，应选择籽粒饱满、无病虫害的三叶草种子。

5.1.1.2 盆栽规格

宜采用规格为 780 mm × 350 mm × 250 mm 的育苗盆，每盆种植三叶草 50 株 ~ 80 株，明确宿主密度适宜。

5.1.1.3 基质制备

培养基质为河沙：沸石 = 3: 1（体积比），混合后在 121 °C 高压蒸汽下灭菌 1 h，冷却后装入育苗盆。

5.1.2 接种与培养

5.1.2.1 接种量

每盆三叶草幼苗根系接种黄雷德克囊霉 FS-1-106 孢子 1 000 ~ 1 500 个，应采用毛细吸管将孢子悬液均匀滴于根系周围。

5.1.2.2 培养条件

置于温室或光照培养箱中，光照时间每天 12 h ~ 16 h，温度控制在 20 °C ~ 28 °C，培养 12 周 ~ 16 周，期间每 2 周浇注 50%浓度的 Hoagland 营养液 300 mL ~ 500 mL。

注：Hoagland 营养，一种植物营养液配方，包含大量元素和微量元素。

5.1.3 菌剂收获

5.1.3.1 停止浇水

培养至 12 周 ~ 16 周后，停止浇水至三叶草植株自然干枯。

5.1.3.2 菌剂收集

除去植株茎叶，保留根系，将培养基质中的菌丝、基质及三叶草根系一同收集，即为黄雷德克囊霉 FS-1-106 菌剂，菌剂中孢子量应达每克 80 个 ~ 120 个。

5.2 种子处理

T/LCH XXX-XXXX

5.2.1 脱毒处理

5.2.1.1 温水预处理

将枳壳种子置于 40 ℃ 恒温水浴中预处理 10 min，期间轻轻搅拌。

5.2.1.2 高温浸泡

随即转入 53 ℃ 温水浸泡 50 min，持续搅拌使种子受热均匀，明确脱毒彻底。

5.2.1.3 清洗与晾干

脱毒后采用无菌水冲洗 3 次 ~ 5 次，置于阴凉通风处晾干表面水分。

5.2.2 种子筛选

剔除瘪粒、虫蛀粒及杂质，选取饱满、色泽均匀的种子，种子纯度应 $\geq 98\%$ ，发芽率 $\geq 85\%$ 。

5.3 播种

5.3.1 基质准备

播种基质为新鲜土过 20 mm $\times$ 20 mm 筛后与河沙按 1:1 体积比混合，使用前应采用 50%多菌灵可湿性粉剂 500 倍液消毒。

5.3.2 菌剂与种子播种

5.3.2.1 菌剂撒施

在播种基质表面均匀撒施黄雷德克囊霉 FS-1-106 菌剂，用量为 10 粒枳壳种子接种 100 个 ~ 300 个孢子。

5.3.2.2 基质覆盖

撒施菌剂后覆盖 2 cm ~ 3 cm 厚的播种基质，将脱毒后的枳壳种子按间距 5 cm ~ 8 cm 播种于基质中。

5.3.2.3 河沙覆盖

播种后覆盖 1 cm ~ 2 cm 厚的河沙（过 2 mm ~ 5 mm 筛），保持基质表面平整。

5.3.3 环境控制

播种后保持温度 25 ℃ ~ 30 ℃，湿度 60% ~ 70%，遮光率 30% ~ 50%，直至种子萌芽。

5.4 苗期管理

5.4.1 生长指标监控

5.4.1.1 萌芽标准

播种后 15 d ~ 20 d 观察萌芽情况，当幼苗长出 8 片 ~ 10 片真叶、株高达到 10 cm ~ 15 cm 时，判定为合格菌根种苗。

5.4.1.2 菌根化检测

随机抽取 10% 幼苗，检测根系菌根侵染率，侵染率应 $\geq 70\%$ ，且可见明显菌丝、丛枝及泡囊结构。

5.4.2 水肥管理

萌芽后应每 7 d 喷施一次 0.2% 磷酸二氢钾溶液，保持基质湿润但不积水。

5.5 移栽

5.5.1 育苗杯基质制备

育苗杯基质按体积份数比为新鲜土 2 份、谷壳 1 份、木糠 1 份、牛粪 0.5 份混合，牛粪需经腐熟处理，基质 pH 值调节至 6.0 ~ 7.0。

5.5.2 移栽操作

5.5.2.1 起苗标准

应选择生长健壮、无病虫害的菌根种苗，起苗时保留完整根系，避免损伤。

5.5.2.2 定植方法

将种苗移栽至直径 15 cm ~ 20 cm 的育苗杯中，基质覆盖至幼苗根茎处，轻压基质使根系与基质紧密接触。

5.5.3 移栽后管理

5.5.3.1 遮荫处理

移栽后遮荫 15 d ~ 20 d，遮光率 70% ~ 80%，随后逐渐增加光照。

5.5.3.2 营养液管理

30 d 后按正常枳壳种苗管理，每 2 周喷施 50% Hoagland 营养液；90 d 后每 2 周 ~ 3 周喷施 1/1 000 高氮低磷复合肥（N：P：K=21：7：12）。

5.5.3.3 环境控制

保持温度 20 °C ~ 30 °C，湿度 60% ~ 70%，定期通风，预防病害发生。

6 试验方法

6.1 种子质量

6.1.1 发芽率检测

6.1.1.1 从脱毒处理后的枳壳种子中随机抽取 4 组，每组 100 粒，分别放入垫有湿润滤纸的培养皿中，置于 25 °C 恒温培养箱中避光培养。

6.1.1.2 每天记录发芽种子数（胚根突破种皮且长度 ≥ 2 mm 视为发芽），7 d 计算发芽势，14 d 计算发芽率。

6.1.1.3 发芽率应 $\geq 85\%$ ，发芽势应 $\geq 70\%$ 。

6.1.2 纯度检测

随机抽取 500 粒种子，逐粒观察形态特征，区分枳壳种子与其他植物种子或杂质。统计纯种子数量，计算纯度，纯度应 $\geq 98\%$ 。

注：计算公式：纯度（%）= 纯种子数/检测种子总数 $\times 100\%$

6.1.3 净度检测

称取 100 g 种子样品，去除空瘪粒、虫蛀粒、破碎粒及泥沙等杂质；称取纯净种子质量，计算净度，净度 $\geq 99\%$ 。

注：计算公式：净度（%）= 纯净种子质量/样品总质量 $\times 100\%$

6.2 菌剂孢子量

6.2.1 试剂与仪器

6.2.1.1 试剂：无菌水、10%甘油溶液。

6.2.1.2 仪器：体视显微镜（放大倍数 $10\times \sim 40\times$ ）、血细胞计数板、天平（精度 0.01 g）、无菌筛网（孔径 38 μm ）。

6.2.2 样品制备

称取 1.0 g 菌剂样品，置于 50 mL 无菌离心管中，加入 40 mL 无菌水，振荡 10 min 使孢子充分释放。

6.2.3 过滤纯化

将菌剂悬液通过 38 μm 无菌筛网过滤，去除菌丝及宿主根系残渣，收集滤液。

6.2.4 梯度稀释

取 10 mL 滤液，加入 90 mL 10%甘油溶液，充分混匀，制成 10 倍稀释液。

注：若孢子浓度过高，可进一步稀释至 100 倍或 1 000 倍。

6.2.5 计数操作

取 10 μL 稀释液滴于血细胞计数板上，覆盖盖玻片，在体视显微镜下计数 5 个中方格内的孢子数量，菌剂中孢子量需达到每克 80 $\sim$ 120 个。

注：计算公式：孢子量（个/g）= 5个中方格孢子总数 $\times$ 稀释倍数 $\times 10^4$ /样品质量（g）

6.3 菌根侵染率

6.3.1 试剂与仪器

6.3.1.1 试剂应包括但不限于下列各项：

- 20%氢氧化钾（KOH）溶液；
- 碱性过氧化氢溶液：10% H_2O_2 10 mL + 氨水 1 mL + 蒸馏水 189 mL；
- 5%冰乙酸溶液；
- 染色液：5%冰乙酸 95 mL + 纯黑墨水 5 mL；
- 乳酸（分析纯）。

6.3.1.2 仪器应包括但不限于下列各项：

- 显微镜（放大倍数 $10\times \sim 400\times$ ）；
- 水浴锅；

- c) 组织包埋盒;
- d) 离心管;
- e) 载玻片;
- f) 盖玻片。

6.3.2 根系取样

随机选取 5 株菌根种苗, 取直径 $\leq 1\text{ mm}$ 的细根, 剪成 1 cm 长的根段, 用自来水冲洗干净, 滤纸吸干表面水分。

6.3.3 透明处理

将根段放入组织包埋盒, 加入 20% KOH 溶液完全浸没根系, 90 °C 水浴处理 30 min, 清水冲洗 3 次, 每次 5 min。

6.3.4 脱色处理

加入碱性过氧化氢溶液, 室温脱色 2 h, 清水冲洗 3 次, 控干水分。

6.3.5 酸化处理

加入 5%冰乙酸溶液, 室温酸化 2 h, 倒掉溶液, 将根段转入离心管。

6.3.6 染色处理

加入黑墨水染色液, 66 °C 水浴染色 1 h, 倒去染液, 用清水漂洗 3 次, 然后用清水浸泡脱色 12 h 以上。

6.3.7 制片观察

挑取根段置于载玻片, 加 2 滴 ~ 3 滴乳酸, 盖上盖玻片, 轻轻压扁根段, 在显微镜下观察。

6.3.8 结果计算

采用“交叉法”计数, 在 10× 物镜下, 每个根段随机观察 10 条根, 记录含有菌丝、丛枝或泡囊结构的根段数; 菌根侵染率应 $\geq 70\%$, 且可见明显菌丝、丛枝及泡囊结构。

注: 计算公式: 菌根侵染率 (%) = 侵染根数段/观察总根数段 $\times 100\%$

7 检验规则

7.1 检验分类

种苗的检验应分为出厂检验和型式检验。

7.2 组批

应将同一生产周期、同一批次原料(种子、菌剂)及相同工艺生产的种苗划分为一个检验批次。

7.3 抽样

7.3.1 抽样依据

7.3.1.1 种子质量抽样应按 GB/T 3543.2-2025 中规定的进行。

7.3.1.2 菌剂及种苗抽样应采用随机抽样法，样本应具有代表性。

7.3.2 抽样数量

应符合表 1 中的规定。

表 1 抽样数量

序号	检验项目	抽样量	备注
1	种子质量	每批抽取 3 份，每份 500 粒	脱毒处理前后各抽样 1 次
2	菌剂孢子量	每批菌剂抽取 5 个样品，各 10 g	需从不同部位取样混合
3	菌根侵染率	每批种苗随机抽取 30 株	幼苗期和移栽后各抽样 1 次
4	种苗生长指标	每批随机抽取 50 株	测量株高、茎粗、叶片数等

7.4 出厂检验

7.4.1 出厂检验项目

应包括下列各项：

- a) 种子质量（纯度、发芽率、净度）；
- b) 菌剂孢子量；
- c) 菌根侵染率；
- d) 种苗生长指标（株高、叶片数）。

7.4.2 出厂检验抽样

应按本文件 7.3 中规定的进行。

7.4.3 指标检验

- 7.4.3.1 种子质量应按本文件 6.1 中规定的进行。
- 7.4.3.2 菌剂孢子量应按本文件 6.2 中规定的进行。
- 7.4.3.3 菌根侵染率应按本文件 6.3 中规定的进行。
- 7.4.3.4 种苗株高、叶片数等指标应采用直尺和计数法测量。

7.4.4 记录与判定

各项指标均应符合技术要求，若有一项不合格则进入复检程序。

7.5 型式检验

7.5.1 型式检验实施情形

种苗正常培育时应每年进行一次型式检验，有下列情况时也应进行：

- a) 新种苗培育或种苗转产时；
- b) 培育原料、工艺或设备有重大改变时；
- c) 停产 1 年以上恢复生产时；
- d) 国家质量监督机构提出检验要求时。

7.5.2 型式检验项目

应涵盖本文件技术要求、培育流程及检测方法中的全部指标，包括但不限于：

- a) 菌种鉴定及杂菌污染检测；
- b) 种子质量全项检测；
- c) 基质理化指标（pH 值、有机质含量）；
- d) 菌剂制备过程参数验证；
- e) 菌根侵染率及种苗生长性能全项检测。

7.5.3 型式检验抽样

应按本文件 7.3 中规定的扩大抽样量，种子、菌剂、基质及种苗应各抽取不少于 5 份样本。

7.5.4 深度检测

除出厂检验项目外，宜增加以下检测：

- a) 菌种分子序列验证；
- b) 基质 pH 值（采用 pH 计测定）及有机质含量（重铬酸钾氧化法）；
- c) 菌剂制备过程参数追溯（培养时间、温度、营养液施用记录）。

7.5.5 性能验证

选取 100 株种苗进行移栽适应性测试，观察 3 个月内成活率及生长势。

7.6 判定规则

7.6.1 单项判定标准

- 7.6.1.1 种子质量：纯度 $\geq 98\%$ 、发芽率 $\geq 85\%$ 、净度 $\geq 99\%$ ；
- 7.6.1.2 菌剂孢子量：每克 80 个 $\sim$ 120 个，杂菌污染检测阴性；
- 7.6.1.3 菌根侵染率： $\geq 70\%$ ，且可见典型丛枝、泡囊结构；
- 7.6.1.4 种苗生长指标：株高 10 cm $\sim$ 15 cm，叶片数 8 片 $\sim$ 10 片。

7.6.2 不合格处理

7.6.2.1 出厂检验不合格

- 7.6.2.1.1 若单项指标不合格，允许从同批次中加倍抽样复检。
- 7.6.2.1.2 复检仍不合格则判定该批种苗不合格，不得出厂。

7.6.2.2 型式检验不合格

- 7.6.2.2.1 若涉及菌种污染、菌根侵染率 $< 50\%$ 等关键指标不合格，判定该生产工艺失控，需暂停生产并整改。
- 7.6.2.2.2 一般指标不合格时，需分析原因并重新组批检验，直至合格方可恢复生产。

7.6.3 复检规则

- 7.6.3.1 复检样本需从原批次剩余种苗中重新抽取，抽样量为初次检验的 2 倍。
- 7.6.3.2 复检项目仅限初次检验不合格项，若复检合格则判定该批产品合格，否则判定不合格。

8 标志、包装、运输和贮存

8.1 标志

种苗包装上应标明包括但不限于下列各项信息：

- a) 品种名称；
- b) 种苗等级；
- c) 数量；
- d) 生产单位；
- e) 生产日期；
- f) 执行标准。

8.2 包装

种苗应采用专用育苗杯包装，包装材料应透气、保湿，防止种苗损伤。

8.3 运输

运输过程中应保持通风、阴凉，避免阳光直射和机械损伤，温度控制在 10℃ ~ 5℃，湿度保持在 60% ~ 80%。

8.4 贮存

暂时贮存的种苗应放置在通风、阴凉、干燥的场所，温度控制在 5℃ ~ 15℃，湿度保持在 60% ~ 70%，贮存时间不超过 15 d。

9 资料管理与归档

9.1 归档范围

9.1.1 技术资料

9.1.1.1 菌种相关：黄雷德克囊霉 FS-1-106 的分类鉴定报告、核苷酸序列、保藏证明、菌种活化与扩繁记录。

9.1.1.2 技术文件：培育技术规范文本、工艺流程图、基质配方记录、设备操作规程。

9.1.2 生产记录

9.1.2.1 菌剂制备：三叶草宿主培养记录、孢子接种量与培养周期数据、菌剂收获时间及孢子量检测报告。

9.1.2.2 种子处理：枳壳种子来源、脱毒处理时间与温度记录、发芽率检测原始数据。

9.1.2.3 播种与移栽：播种日期、基质配比、苗期管理日志（水肥施用、环境温湿度记录）、移栽时间及成活率统计。

9.1.3 检测报告

应包括但不限于下列各项：

- a) 种子质量检测（纯度、发芽率、净度）原始记录；
- b) 菌剂孢子量、杂菌污染检测报告；
- c) 菌根侵染率检测的显微照片、计数表格及分析报告。

9.2 归档要求

9.2.1 资料完整性

- 9.2.1.1 每份资料需包含文件编号、编制日期、责任人签字，明确可追溯性。
- 9.2.1.2 检测报告需附原始数据记录，如显微镜计数照片、培养基制备记录等。

9.2.2 分类与编号

- 9.2.2.1 分类原则：按“菌种 - 种子 - 基质 - 培育流程 - 检测”分类归档，建立电子目录索引。
- 9.2.2.2 编号规则：采用“年份 - 类别 - 流水号”格式。

示例：2025-JZ-001（菌种类资料）。

9.2.3 保存期限

- 9.2.3.1 永久保存：菌种保藏证明、专利文件、核心技术规范。
- 9.2.3.2 长期保存（ ≥ 5 年）：生产记录、检测报告、设备维护日志。
- 9.2.3.3 短期保存（ ≥ 2 年）：批次生产计划、临时技术变更记录。

9.3 存储与保管

9.3.1 物理存储

- 9.3.1.1 纸质资料应存放于防潮、防虫、防火的档案柜，温度控制在 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $40\% \sim 60\%$ 。
- 9.3.1.2 菌剂与种子样本需密封保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱，附标签注明编号、保存日期及责任人。

9.3.2 电子备份

- 9.3.2.1 检测数据、显微图像等电子文件需定期备份至专用服务器，异地存储至少 2 份。
- 9.3.2.2 核苷酸序列等核心数据需加密保存，访问权限仅限技术负责人。
