



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104094826 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201410318391. 1

(22) 申请日 2014. 07. 04

(73) 专利权人 芜湖欧标农业发展有限公司

地址 241000 安徽省芜湖市弋江区火龙岗农业高新技术开发区

(72) 发明人 戴勤 王冬梅 李慧珍

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

A01G 31/00(2006. 01)

G05G 3/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1762208 A, 2006. 04. 26,

林秀香等. 金粟兰水插技术研究. 《福建热作科技》. 2010, 第 35 卷(第 2 期),

王跃华等. 全缘金粟兰的组织培养和繁殖. 《植物生理学通讯》. 1999, 第 35 卷(第 2 期),

审查员 刘昶

权利要求书2页 说明书4页

(54) 发明名称

一种金粟兰快速繁殖的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种金粟兰的繁育方法,所述的方法包括:1) 外植体的选取,2) 外植体消毒,3) 初始诱导培养,4) 愈伤组织诱导,5) 增殖培养,6) 生根培养,7) 炼苗和移栽。采用本方法繁育金粟兰,可以降低生产成本,提高繁殖速度和成活率。

1. 一种金粟兰快速繁殖的方法,其特征在于所述的方法包括以下步骤:

1) 外植体的选取:取当年生直径2-5mm的金粟兰枝条为外植体,剪去叶片后剪成1-2cm的茎段;

2) 外植体消毒:将上述茎段放入盛有自来水的20-25KHz超声波清洗机中保持温度30-35℃处理30-45min,然后以自来水冲洗10-20min;随后在超净工作台上以70-75%的酒精消毒25-35秒,0.5%升汞溶液中处理6-8分钟,然后以无菌水冲洗4-5遍,置于无菌培养皿备用;

3) 初始诱导培养:将灭菌后外植体茎段各剪去2-3mm,茎段按末端向下插入初始诱导培养基中培养,培养条件为光强2500-3500Lx、光周期10-14h/d,温度25℃±2℃;培养4-6d后将其中未污染的外植体茎段转接到新的初始诱导培养基中,并继续培养12-18d至新芽长出;所述的初始诱导培养基组成为:WPM+6-BA0.1-0.2mg/L+NAA0.01-0.02mg/L+PVP5-10mg/L;

4) 愈伤组织诱导:取初始诱导培养中的芽,放入愈伤组织诱导培养基中培养15-20d,条件为暗培养,温度20℃±2℃;所述愈伤组织培养基为:WPM+6-BA0.5-2.0mg/L+NAA0.02-0.05mg/L+PVP5-10mg/L;

5) 分化和增殖培养:将透明无色的愈伤组织块放入分化培养基中培养20-25d,增殖产生大量丛生苗,培养条件为光强1800-2500Lx、光周期10-14h/d,温度25℃±2℃;所述分化和增殖培养用培养基为:

1/2MS+6-BA0.1-0.5mg/L+NAA0.1-0.5mg/L+PVP 5-10mg/L;

6) 生根培养:将5)步骤中的丛生苗切割成单个,转移至生根培养基中培养15-20d后生根,培养条件为光强1800-2500Lx、光周期10-14h/d,温度25℃±2℃;所述生根用培养基为:1/2MS+IBA0.1-0.5mg/L+PVP5-10mg/L;

7) 炼苗和移栽:将有生根的金粟兰幼苗的培养基瓶盖打开,室温下炼苗3-5d后,取出幼苗,洗去根部培养基,移栽装有河沙基质的苗床上,保持温度20-25℃,湿度85%-95%,适当遮荫即可;

所述的WPM培养基配方为:大量元素:硝酸铵 NH_4NO_3 400mg/L,硫酸钾 K_2SO_4 900mg/L,磷酸二氢钾 KH_2PO_3 170mg/L,硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370mg/L;钙盐:氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 96mg/L;四水合硝酸钙 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 556mg/L;微量元素:硼酸 H_3BO_3 6.2mg/L,硫酸锰 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.5mg/L,硫酸锌 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6mg/L,钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L,硫酸铜 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L;铁盐:乙二胺四乙酸二钠 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 37.3mg/L,硫酸亚铁 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8mg/L;有机酸:肌醇100mg/L,甘氨酸2mg/L,盐酸硫胺素1mg/L,盐酸吡哆醇0.5mg/L,烟酸0.5mg/L;

MS培养基配方为:大量元素:硝酸钾 KNO_3 1900mg/L,硝酸铵 NH_4NO_3 1650mg/L,磷酸二氢钾 KH_2PO_3 170mg/L,硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370mg/L;钙盐:氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440mg/L;微量元素:碘化钾KI0.83mg/L,硼酸 H_3BO_3 6.2mg/L,硫酸锰 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3mg/L,硫酸锌 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6mg/L,钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L,硫酸铜 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L,氯化钴 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L;铁盐:乙二胺四乙酸二钠 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 37.25mg/L,硫酸亚铁 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.85mg/L;有机酸:肌醇100mg/L,甘氨酸2mg/L,盐酸硫胺素0.5mg/L,盐酸吡哆醇0.5mg/L,烟酸0.5mg/L;蔗糖30g/L,琼脂粉7g/L,pH为5.7;

所述的 1/2MS 培养基配方为：大量元素：硝酸钾 KNO_3 950mg/L，硝酸铵 NH_4NO_3 825mg/L，磷酸二氢钾 KH_2PO_4 85mg/L，硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185mg/L；余同上述 MS 培养基；

所述的 6-BA 为 6-苄氨基嘌呤；

所述的 NAA 为 α -萘乙酸；

所述的 IBA 为吲哚-3-丁酸；

所述的 PVP 为聚乙烯吡咯烷酮。

2. 根据权利要求 1 所述一种金粟兰快速繁殖的方法，其特征在于所述步骤 3) 中初始诱导培养基组成为：WPM+6-BA 0.15mg/L+NAA 0.015mg/L+PVP 6mg/L。

3. 根据权利要求 1 所述一种金粟兰快速繁殖的方法，其特征在于所述步骤 4) 中愈伤组织培养基为：WPM+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.04mg/L+PVP 8mg/L。

4. 根据权利要求 1 所述一种金粟兰快速繁殖的方法，其特征在于所述步骤 5) 中分化和增殖培养用培养基为：1/2MS+6-BA 0.3mg/L+NAA 0.3mg/L+PVP 8mg/L。

5. 根据权利要求 1 所述一种金粟兰快速繁殖的方法，其特征在于所述步骤 6) 中生根用培养基为：1/2MS+IBA 0.3mg/L+PVP 8mg/L。

一种金粟兰快速繁殖的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物快速繁殖技术领域,尤其是金粟兰快速繁殖技术领域。

背景技术

[0002] 金粟兰 (*Chloranthus spicatus*) 又名珠兰、鱼子兰、茶兰等,为金粟兰科植物,原产我国南部,喜温暖、潮湿和通风的环境,多生于山坡、沟谷密林下。半灌木,直立或稍平卧,高 30-60 厘米。金粟兰生性强健,容易栽培,用分株、扦插和压条繁殖皆可。金粟兰花和根状茎可提取芳香油,鲜花极香,常用于熏茶叶。全株入药,治风湿疼痛、跌打损伤,根状茎捣烂可治疗疮。

[0003] 目前,金粟兰多采用分株、扦插和压条来进行生产栽培,这繁育技术提高品种的纯度,保持了品种特性,但成活率较低及繁殖速度较慢,制约了金粟兰产业的发展。而组织培养育苗技术既可以保持种的纯度和特性,也可以降低生产成本,提高繁殖速度和成活率。

[0004] 现有技术中尚无经愈伤组织途径获得金粟兰再生植株的报道。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种金粟兰快速繁殖的方法,经愈伤组织途径获得金粟兰丛生芽,诱导生根,可实现金粟兰组培苗的大量快速繁殖。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提出下列技术方案:

[0007] 一种金粟兰快速繁殖的方法,其特征在于所述的方法包括以下步骤:

[0008] 1) 外植体的选取:取当年生直径 2-5mm 的金粟兰枝条为外植体,剪去叶片后剪成 1-2cm 的茎段;

[0009] 2) 外植体消毒:将上述茎段放入盛有自来水的 20-25KHz 超声波清洗中保持温度 30-35℃ 处理 30-45min,然后以自来水冲洗 10-20min;随后在超净工作台上以 70-75% 的酒精消毒 25-35 秒,0.5% 升汞溶液中处理 6-8 分钟,然后以无菌水冲洗 4-5 遍,置于无菌培养皿备用;

[0010] 3) 初始诱导培养:将灭菌后外植体茎段各剪去 2-3mm,茎段按末端向下插入初始诱导培养基中培养,培养条件为光强 2500-3500Lx、光周期 10-14h/d, 温度 25℃ ± 2℃;培养 4-6d 后将其中未污染的外植体茎段转接到新的初始诱导培养基中,并继续培养 12-18d 至新芽长出;所述的初始诱导培养基组成为:WPM+6-BA0.1-0.2mg/L+NAA0.01-0.02mg/L+PVP5-10mg/L;

[0011] 4) 愈伤组织诱导:取初始诱导培养中的芽,放入愈伤组织诱导培养基中培养 15-20d,条件为暗培养,温度 20℃ ± 2℃;所述愈伤组织培养基为:WPM+6-BA0.5-2.0mg/L+NAA0.02-0.05mg/L+PVP5-10mg/L;

[0012] 5) 分化和增殖培养:将透明无色的愈伤组织块放入分化培养基中培养 20-25d,增殖产生大量丛生苗,培养条件为光强 1800-2500Lx、光周期 10-14h/d, 温度 25℃ ± 2℃;所述分化和增殖培养用培养基为:1/2MS+6-BA0.1-0.5mg/L+NAA0.1-0.5mg/L+PVP5-10mg/L;

[0013] 6) 生根培养:将5)步骤中的丛生苗切割成单个,转移至生根培养基中培养15-20d后生根,培养条件为光强1800-2500Lx、光周期10-14h/d,温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;所述生根用培养基为:1/2MS+IBA0.1-0.5mg/L+PVP5-10mg/L;

[0014] 7) 炼苗和移栽:将有生根的金粟兰幼苗的培养基瓶盖打开,室温下炼苗3-5d后,取出幼苗,洗去根部培养基,移栽装有河沙基质的苗床上,保持温度20-25 $^{\circ}\text{C}$,湿度85%-95%,适当遮荫即可;

[0015] 所述的WPM培养基配方为:大量元素:硝酸铵 NH_4NO_3 400mg/L,硫酸钾 K_2SO_4 900mg/L,磷酸二氢钾 KH_2PO_3 170mg/L,硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370mg/L;钙盐:氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 96mg/L;四水合硝酸钙 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 556mg/L;微量元素:硼酸 H_3BO_3 6.2mg/L,硫酸锰 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.5mg/L,硫酸锌 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6mg/L,钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L,硫酸铜 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L;铁盐:乙二胺四乙酸二钠Na2-EDTA37.3mg/L,硫酸亚铁 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8mg/L;有机酸:肌醇100mg/L,甘氨酸2mg/L,盐酸硫胺素1mg/L,盐酸吡哆醇0.5mg/L,烟酸0.5mg/L;

[0016] 所述的MS培养基配方为:大量元素:硝酸钾 KNO_3 1900mg/L,硝酸铵 NH_4NO_3 1650mg/L,磷酸二氢钾 KH_2PO_3 170mg/L,硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370mg/L;钙盐:氯化钙 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440mg/L;微量元素:碘化钾KI0.83mg/L,硼酸 H_3BO_3 6.2mg/L,硫酸锰 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3mg/L,硫酸锌 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6mg/L,钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L,硫酸铜 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L,氯化钴 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L;铁盐:乙二胺四乙酸二钠Na2-EDTA37.25mg/L,硫酸亚铁 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.85mg/L;有机酸:肌醇100mg/L,甘氨酸2mg/L,盐酸硫胺素0.5mg/L,盐酸吡哆醇0.5mg/L,烟酸0.5mg/L;蔗糖30g/L,琼脂粉7g/L,pH为5.7;

[0017] 所述的1/2MS培养基配方为:大量元素:硝酸钾 KNO_3 950mg/L,硝酸铵 NH_4NO_3 825mg/L,磷酸二氢钾 KH_2PO_3 85mg/L,硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185mg/L;余同上述MS培养基;

[0018] 所述的6-BA为6-苄氨基嘌呤;

[0019] 所述的NAA为 α -萘乙酸;

[0020] 所述的IBA为吲哚-3-丁酸;

[0021] 所述的PVP为聚乙烯吡咯烷酮。

[0022] 优选的,步骤3)中初始诱导培养基组成为:WPM+6-BA0.15mg/L+NAA0.015mg/L+PVP6mg/L。

[0023] 优选的,步骤4)中愈伤组织培养基为:WPM+6-BA1.0mg/L+NAA0.04mg/L+PVP8mg/L。

[0024] 优选的,步骤5)中分化和增殖培养用培养基为:1/2MS+6-BA0.3mg/L+NAA0.3mg/L+PVP8mg/L。

[0025] 优选的,步骤6)中生根用培养基为:1/2MS+IBA0.3mg/L+PVP8mg/L。

[0026] 采用本发明繁殖金粟兰,可实现金粟兰组培苗的大量快速繁殖,为金粟兰生产栽培和品种改良奠定基础。

[0027] 为了更好的阐述技术方案,下面结合具体实施方式对本发明作进一步的说明,但本发明所要求的保护范围不限于下列实施例。

具体实施方式

[0028] 实施例 1

[0029] 1) 外植体的选取:取当年生直径 2-5mm 的金粟兰枝条为外植体,剪去叶片后剪成 1-2cm 的茎段;

[0030] 2) 外植体消毒:将上述茎段放入盛有自来水的 20KHz 超声波清洗中保持温度 30℃处理 30min,然后以自来水冲洗 10min;随后在超净工作台上以 70%的酒精消毒 25 秒,0.5%升汞溶液中处理 6 分钟,然后以无菌水冲洗 4 遍,置于无菌培养皿备用;

[0031] 3) 初始诱导培养:将灭菌后外植体茎段各剪去 2-3mm,茎段按末端向下插入初始诱导培养基中培养,培养条件为光强 2500-3500Lx、光周期 10-14h/d,温度 25℃ ±2℃;培养 6d 后将其中未污染的外植体茎段转接到新的初始诱导培养基中,并继续培养 18d 至新芽长出;所述的初始诱导培养基组成为:WPM+6-BA0.1mg/L+NAA0.01mg/L+PVP5mg/L;

[0032] 4) 愈伤组织诱导:取初始诱导培养中的芽,放入愈伤组织诱导培养基中培养 20d,条件为暗培养,温度 20℃ ±2℃;所述愈伤组织培养基为:WPM+6-BA0.5mg/L+NAA0.02mg/L+PVP5mg/L;

[0033] 5) 分化和增殖培养:将透明无色的愈伤组织块放入分化培养基中培养 25d,增殖产生大量丛生苗,培养条件为光强 1800-2500Lx、光周期 10-14h/d,温度 25℃ ±2℃;所述分化和增殖培养用培养基为:1/2MS+6-BA0.1mg/L+NAA0.1mg/L+PVP5mg/L;

[0034] 6) 生根培养:将 5) 步骤中的丛生苗切割成单个,转移至生根培养基中培养 120d 后生根,培养条件为光强 1800-2500Lx、光周期 10-14h/d,温度 25℃ ±2℃;所述生根用培养基为:1/2MS+IBA0.1mg/L+PVP5mg/L;

[0035] 7) 炼苗和移栽:将有生根的金粟兰幼苗的培养基瓶盖打开,室温下炼苗 5d 后,取出幼苗,洗去根部培养基,移栽装有河沙基质的苗床上,保持温度 20-25℃,湿度 85%-95%,适当遮荫即可。

[0036] 经试验,采用本实施例所育试管苗的苗床移栽成活率为 85.2%。

[0037] 实施例 2

[0038] 1) 外植体的选取:取当年生直径 2-5mm 的金粟兰枝条为外植体,剪去叶片后剪成 1-2cm 的茎段;

[0039] 2) 外植体消毒:将上述茎段放入盛有自来水的 25KHz 超声波清洗中保持温度 30-35℃处理 45min,然后以自来水冲洗 20min;随后在超净工作台上以 75%的酒精消毒 25-35 秒,0.5%升汞溶液中处理 8 分钟,然后以无菌水冲洗 5 遍,置于无菌培养皿备用;

[0040] 3) 初始诱导培养:将灭菌后外植体茎段各剪去 2-3mm,茎段按末端向下插入初始诱导培养基中培养,培养条件为光强 2500-3500Lx、光周期 10-14h/d,温度 25℃ ±2℃;培养 4d 后将其中未污染的外植体茎段转接到新的初始诱导培养基中,并继续培养 12d 至新芽长出;所述的初始诱导培养基组成为:WPM+6-BA0.2mg/L+NAA0.02mg/L+PVP10mg/L;

[0041] 4) 愈伤组织诱导:取初始诱导培养中的芽,放入愈伤组织诱导培养基中培养 15d,条件为暗培养,温度 20℃ ±2℃;所述愈伤组织培养基为:WPM+6-BA2.0mg/L+NAA0.05mg/L+PVP10mg/L;

[0042] 5) 分化和增殖培养:将透明无色的愈伤组织块放入分化培养基中培养 20d,增殖产生大量丛生苗,培养条件为光强 1800-2500Lx、光周期 10-14h/d,温度 25℃ ±2℃;所述分化和增殖培养用培养基为:1/2MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.5mg/L+PVP10mg/L;

[0043] 6) 生根培养:将5)步骤中的丛生苗切割成单个,转移至生根培养基中培养15d后生根,培养条件为光强1800-2500Lx、光周期10-14h/d,温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;所述生根用培养基为:1/2MS+IBA0.5mg/L+PVP10mg/L;

[0044] 7) 炼苗和移栽:将有生根的金粟兰幼苗的培养基瓶盖打开,室温下炼苗5d后,取出幼苗,洗去根部培养基,移栽装有河沙基质的苗床上,保持温度20-25 $^{\circ}\text{C}$,湿度85%-95%,适当遮荫即可。

[0045] 经试验,采用本实施例所育试管苗的苗床移栽成活率为86.3%。

[0046] 实施例3

[0047] 1) 外植体的选取:取当年生直径2-5mm的金粟兰枝条为外植体,剪去叶片后剪成1-2cm的茎段;

[0048] 2) 外植体消毒:将上述茎段放入盛有自来水的25KHz超声波清洗中保持温度30-35 $^{\circ}\text{C}$ 处理45min,然后以自来水冲洗20min;随后在超净工作台上以75%的酒精消毒25-35秒,0.5%升汞溶液中处理8分钟,然后以无菌水冲洗5遍,置于无菌培养皿备用;

[0049] 3) 初始诱导培养:将灭菌后外植体茎段各剪去2-3mm,茎段按末端向下插入初始诱导培养基中培养,培养条件为光强2500-3500Lx、光周期10-14h/d,温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;培养5d后将其中未污染的外植体茎段转接到新的初始诱导培养基中,并继续培养16d至新芽长出;所述的初始诱导培养基组成为:WPM+6-BA0.15mg/L+NAA0.015mg/L+PVP6mg/L;

[0050] 4) 愈伤组织诱导:取初始诱导培养中的芽,放入愈伤组织诱导培养基中培养18d,条件为暗培养,温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;所述愈伤组织培养基为:WPM+6-BA1.0mg/L+NAA0.04mg/L+PVP8mg/L;

[0051] 5) 分化和增殖培养:将透明无色的愈伤组织块放入分化培养基中培养22d,增殖产生大量丛生苗,培养条件为光强1800-2500Lx、光周期10-14h/d,温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;所述分化和增殖培养用培养基为:1/2MS+6-BA0.3mg/L+NAA0.3mg/L+PVP8mg/L;

[0052] 6) 生根培养:将5)步骤中的丛生苗切割成单个,转移至生根培养基中培养18d后生根,培养条件为光强1800-2500Lx、光周期10-14h/d,温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;所述生根用培养基为:1/2MS+IBA0.3mg/L+PVP8mg/L;

[0053] 7) 炼苗和移栽:将有生根的金粟兰幼苗的培养基瓶盖打开,室温下炼苗5d后,取出幼苗,洗去根部培养基,移栽装有河沙基质的苗床上,保持温度20-25 $^{\circ}\text{C}$,湿度85%-95%,适当遮荫即可。

[0054] 经试验,采用本实施例所育试管苗的苗床移栽成活率为88.8%。