



(21) 申请号 202410096902.3

(22) 申请日 2024.01.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117598204 A

(43) 申请公布日 2024.02.27

(73) 专利权人 西南林业大学
地址 650224 云南省昆明市盘龙区白龙寺
300号

(72) 发明人 向建英 汪海龙 李卓蓉 罗微
葛屹立 巴桑央金

(74) 专利代理机构 昆明盈正知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 53208
专利代理师 徐洪刚

(51) Int. Cl.
A01H 4/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101695275 A, 2010.04.21
CN 103392601 A, 2013.11.20
CN 103718969 A, 2014.04.16
CN 104888075 A, 2015.09.09
CN 109618926 A, 2019.04.16
CN 114600772 A, 2022.06.10
CN 1887065 A, 2007.01.03
CN 1985578 A, 2007.06.27
WO 2019050522 A1, 2019.03.14
WO 2023144809 A1, 2023.08.03

审查员 胡佳

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

云南含笑组培快繁方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及植物组培技术领域,公开一种云南含笑组培快繁方法及应用,步骤包括:外植体消毒,消毒的外植体接种于丛生芽诱导培养基中培养,初代诱导出的丛生芽接种于继代增殖培养基中培养,继代增殖丛生芽接种于生根培养基中培养。在诱导培养基添加一定浓度的NAA、2-iP以及ZT,诱导率提高到60%以上;继代增殖培养基将NAA改成IBA,同时配合一定浓度的ZT和BR,可使增殖系数稳定在5以上,并不影响生根率,而增殖培养时添加一定浓度的GA₃,使节间抽出便于操作,继代增殖及生根培养时,添加一定浓度的苹果泥,使苗更加健壮,叶片更加鲜绿,特别是在生根培养时,苹果泥配合PPP₃₃₃,使根系更加粗壮,最终提高炼苗成活率。



1. 云南含笑组培快繁方法,其特征在于,步骤包括:

(1) 外植体消毒:取云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,依次用0.5%高锰酸钾消毒15~20min、无菌水涮洗4~5次;75%酒精消毒50~60s、无菌水涮洗2~3次;1%高锰酸钾消毒5~6min、无菌水涮洗4~5次,0.05%升汞消毒5~6min、无菌水涮洗5~7次;

(2) 初代丛生芽诱导:消毒的外植体接种于丛生芽诱导培养基中培养20~25天;

所述丛生芽诱导培养基的配方为:WPM+NAA 0.05~0.08mg/L +2-iP 0.1~0.15mg/L+ZT 2.0~3.0mg/L+活性炭0.4~0.6g/L;

(3) 继代增殖培养:初代诱导出的丛生芽接种于继代增殖培养基中培养25~35天;

所述继代增殖培养基的配方为:改良SH培养基+IBA 0.1~0.2mg/L+ZT 0.5~0.8mg/L+BR 0.05~0.08mg/L+GA₃ 0.2~0.3mg/L+苹果泥30~40g/L;

(4) 生根培养:继代增殖丛生芽接种于生根培养基中培养30~40天;

所述生根培养基的配方为:1/2改良SH培养基+IBA 0.3~0.5mg/L+IAA 1.5~2.0mg/L+PPP₃₃₃ 1.0~2.0mg/L+苹果泥 60~80g/L+活性炭0.2~0.4g/L;

所述改良SH培养基为:氯化钙用量改为150mg/L,EDTA-二钠用量改为37.3mg/L,硫酸亚铁用量改为27.8mg/L,肌醇用量改为100mg/L,其余成分不变。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:步骤(2)、(3)和(4)的培养条件为:温度25±2℃,每日照光10-14h,光强2000~3000lx的光暗交替培养。

3. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:所述丛生芽诱导培养基的配方为:WPM+NAA 0.06mg/L +2-iP 0.12mg/L+ZT 2.5mg/L+活性炭0.5g/L。

4. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:所述继代增殖培养基的配方为:改良SH培养基+IBA 0.15mg/L+ZT 0.7mg/L+BR 0.06mg/L+GA₃ 0.25mg/L+苹果泥35g/L。

5. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:所述生根培养基的配方为:1/2改良SH培养基+IBA 0.4mg/L+IAA 2.0mg/L+PPP₃₃₃ 1.5mg/L+苹果泥70g/L+活性炭0.3g/L。

6. 根据权利要求1-5任一项所述方法在云南含笑组培快繁中的应用。

云南含笑组培快繁方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物组培技术领域,具体来说是一种云南含笑组培快繁方法及应用。

背景技术

[0002] 云南含笑(*Michelia yunnanensis* Franch. ex Finet & Gagnep.)是木兰科含笑属植物,灌木,枝叶茂密,高可达4m;芽、嫩枝、嫩叶上面及叶柄、花梗密被深红色平伏毛。叶革质、倒卵形、狭倒卵形、狭倒卵状椭圆形,长4-10cm,宽1.5-3.5cm。花梗粗短,长3-7mm,有1苞片脱落痕;花白色,极芳香。聚合果通常仅5-9个蓇葖发育,蓇葖扁球形,宽5-8mm,顶端具短尖,残留有毛;种子1-2粒,花期3-4月,果期8-9月。

[0003] 分布于中国云南中部、南部。生长于海拔1100-2300m的山地灌丛中。花极芳香,可提取浸膏,为优良的观赏植物;叶有香气,可磨粉作香面。在云南丽江发现的一株云南含笑古树树龄已达200余年。与银杏树同属第四纪冰川后残留的中生代树种,有“活化石”之称。

[0004] 目前,主要繁殖方式是:播种和嫁接,扦插繁殖成活率低,而嫁接繁殖需要大量的原生树,很大程度的限制了嫁接数量,组培技术是一种快速的繁殖技术,可以快速的大量生产云南含笑种苗,但是其技术难度大,且目前没有针对云南含笑的组培快繁方法。现有技术公开了晚春含笑、台湾含笑、诗琳通含笑、壮丽含笑、深山含笑、中山含笑、紫花含笑、醉香含笑等相关组织培养方法,这些方法应用于云南含笑组培过程中仍然存在各种问题,并不适用于云南含笑的组培,因此急需开发一种适用于云南含笑的组培方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术没有适合云南含笑组培培养方法的技术问题,提供一种云南含笑组培快繁方法及应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:一种云南含笑组培快繁方法,步骤包括:

[0007] (1)外植体消毒:取云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,依次用0.5%高锰酸钾消毒15~20min、无菌水涮洗4~5次;75%酒精消毒50~60s、无菌水涮洗2~3次;1%高锰酸钾消毒5~6min、无菌水涮洗4~5次,0.05%升汞消毒5~6min、无菌水涮洗5~7次;

[0008] (2)初代丛生芽诱导:消毒的外植体接种于丛生芽诱导培养基中培养20~25天;

[0009] 所述丛生芽诱导培养基的配方为:WPM+NAA 0.05~0.08mg/L +2-iP 0.1~0.15mg/L+ZT 2.0~3.0mg/L+活性炭0.4~0.6g/L;

[0010] (3)继代增殖培养:初代诱导出的丛生芽接种于继代增殖培养基中培养25~35天;

[0011] 所述继代增殖培养基的配方为:改良SH培养基+IBA 0.1~0.2mg/L+ZT 0.5~0.8mg/L+BR 0.05~0.08mg/L+GA₃ 0.2~0.3mg/L+苹果泥30~40g/L;

[0012] (4)生根培养:继代增殖丛生芽接种于生根培养基中培养30~40天;

[0013] 所述生根培养基的配方为:1/2改良SH培养基+IBA 0.3~0.5mg/L+IAA 1.5~2.0mg/L+PPP₃₃₃ 1.0~2.0mg/L+苹果泥 60~80g/L+活性炭0.2~0.4g/L;

[0014] 所述改良SH培养基为:氯化钙用量改为150mg/L,EDTA-二钠用量改为37.3mg/L,硫酸亚铁用量改为27.8mg/L,肌醇用量改为100mg/L,其余成分不变。

[0015] 进一步的:步骤(2)、(3)和(4)的培养条件为:温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,每日照光10-14h,光强2000~3000lx的光暗交替培养。

[0016] 进一步的:所述丛生芽诱导培养基的配方为:WPM+NAA 0.06mg/L +2-iP 0.12mg/L +ZT 2.5mg/L+活性炭0.5g/L。

[0017] 进一步的:所述继代增殖培养基的配方为:改良SH培养基+IBA 0.15mg/L+ZT 0.7mg/L+BR 0.06mg/L+GA₃ 0.25mg/L+苹果泥35g/L。

[0018] 进一步的:所述生根培养基的配方为:1/2改良SH培养基+IBA 0.4mg/L+IAA 2.0mg/L+PPP₃₃₃ 1.5mg/L+苹果泥70g/L+活性炭0.3g/L。

[0019] 本发明的有益技术效果是:

[0020] 1.云南含笑在建立无菌体系时,采用常规的75%酒精与0.1%升汞消毒时,当时间过长,污染率可控制在合理范围内,但0.1%升汞对云南含笑外植体伤害较大,较大部分造成直接死亡,而剩余部分均褐化,且褐化极其严重并导致不能生长,而当时间过短时,虽然死亡率以及褐化能较大程度的降低,但污染率急剧上升,有时候甚至全军覆没。本发明在外植体消毒时,采用依次采用0.5%高锰酸钾、75%酒精、1%高锰酸钾以及0.05%升汞溶液消毒,可将污染率控制在32%以内,外植体死亡率控制在5%以内,同时在初代培养基中添加一定浓度活性炭,可将褐化率控制在10%以内且褐化以及活性炭均不影响丛生芽的诱导。

[0021] 2.本发明在初代丛生芽诱导培养基中,添加一定浓度的NAA、2-iP以及ZT,可使诱导率提高到70%以上。

[0022] 3.在继代增殖培养过程中,高浓度的2-iP可引起玻化的发生,而当降低浓度时,无论配合ZT浓度怎么调配,其均会使增殖系数大幅下降,而就云南含笑而言,NAA有抑制云南含笑的生根,而当采用NAA作继代增殖培养基继代2代以上时,在生根培养时其生根率大幅下降,同时随着继代次数的增加,生根率继续下降,本发明在继代增殖培养基中,将初代的NAA改成一定浓度的IBA,同时配合一定浓度的ZT和BR,可使增殖系数稳定在5以上,且并不影响后续生根培养时的生根率,而增殖培养时添加一定浓度的GA₃,可使节间抽出,便于生产过程中的操作。

[0023] 4.本发明在继代增殖培养以及生根培养时,添加一定浓度的苹果泥,可使苗更加健壮,叶片更加鲜绿,特别是在生根培养时,苹果泥配合一定浓度的PPP₃₃₃,可使根系更加粗壮,最终提高炼苗成活率。

[0024] 5.采用母本植物常用的WPM为基本培养基时,云南含笑常表现为老叶黄化和脱落,同时有少量烧尖现象,严重影响了苗的增殖和质量,而当采用SH时能明显改善但不能完全杜绝(如图1所示),当在SH的基础上,将氯化钙、铁盐以及肌醇使用浓度改变时,可完全杜绝黄化脱落以及烧尖的发生(如图2所示)。

附图说明

[0025] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可

以根据这些附图获得其他的附图。

- [0026] 图1采用改良SH培养基时生根培养时叶片鲜绿;
- [0027] 图2未采用改良SH培养基时叶鞘及老叶黄化脱落;
- [0028] 图3是本发明实施例1初代诱导结果图;
- [0029] 图4是本发明对比例8初代诱导结果图。

具体实施方式

[0030] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0031] 实施例1

[0032] 一种云南含笑组培快繁方法,步骤包括:

[0033] (1) 外植体消毒:取云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,依次用0.5%高锰酸钾消毒15min、无菌水涮洗5次;75%酒精消毒50s、无菌水涮洗2次;1%高锰酸钾消毒5min、无菌水涮洗4次,0.05%升汞消毒5min、无菌水涮洗5次。

[0034] (2) 初代丛生芽诱导:消毒的外植体接种于WPM+NAA 0.05mg/L +2-iP 0.1mg/L+ZT 2.0mg/L+活性炭0.4g/L的丛生芽诱导培养基中,置于温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,每日照光10h,光强2000lx的光暗交替培养20天,结果如图3所示。

[0035] (3) 继代增殖培养:初代诱导出的丛生芽接种于改良SH培养基+IBA 0.1mg/L+ZT 0.5mg/L+BR 0.05mg/L+GA₃ 0.2mg/L+苹果泥30g/L的继代增殖培养基中,置于温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,每日照光10h,光强2000lx的光暗交替培养25天。

[0036] (4) 生根培养:继代增殖丛生芽接种于1/2改良SH培养基+IBA 0.3mg/L+IAA 1.5mg/L+PPP₃₃₃ 1.0mg/L+苹果泥60g/L+活性炭0.2g/L的生根培养基中,置于温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,每日照光10h,光强2000lx的光暗交替培养30天。

[0037] 其中,改良SH培养基为:氯化钙用量改为150mg/L,EDTA-二钠用量改为37.3mg/L,硫酸亚铁用量改为27.8mg/L,肌醇用量改为100mg/L,其余成分不变。

[0038] 实施例2

[0039] 一种云南含笑组培快繁方法,步骤包括:

[0040] (1) 外植体消毒:取云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,依次用0.5%高锰酸钾消毒20min、无菌水涮洗5次;75%酒精消毒60s、无菌水涮洗3次;1%高锰酸钾消毒6min、无菌水涮洗5次,0.05%升汞消毒6min、无菌水涮洗7次。

[0041] (2) 初代丛生芽诱导:消毒的外植体接种于WPM+NAA 0.08mg/L +2-iP 0.15mg/L+ZT 3.0mg/L+活性炭 0.6g/L的丛生芽诱导培养基中,置于温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,每日照光14h,光强3000lx的光暗交替培养25天。

[0042] (3) 继代增殖培养:初代诱导出的丛生芽接种于改良SH培养基+IBA 0.2mg/L+ZT 0.8mg/L+BR 0.08mg/L+GA₃ 0.3mg/L+苹果泥 40g/L的继代增殖培养基中,置于温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,每日照光14h,光强3000lx的光暗交替培养35天。

[0043] (4) 生根培养:继代增殖丛生芽接种于1/2改良SH培养基+IBA 0.5mg/L+IAA

2.0mg/L+PPP₃₃₃ 2.0mg/L+苹果泥80g/L+活性炭0.4g/L的生根培养基中,置于温度25±2℃,每日照光14h,光强3000lx的光暗交替培养40天。

[0044] 其中,改良SH培养基为:氯化钙用量改为150mg/L,EDTA-二钠用量改为37.3mg/L,硫酸亚铁用量改为27.8mg/L,肌醇用量改为100mg/L,其余成分不变。

[0045] 实施例3

[0046] 一种云南含笑组培快繁方法,步骤包括:

[0047] (1) 外植体消毒:取云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,依次用0.5%高锰酸钾消毒18min、无菌水涮洗4次;75%酒精消毒55s、无菌水涮洗3次;1%高锰酸钾消毒5.5min、无菌水涮洗4次,0.05%升汞消毒5.5min、无菌水涮洗6次。

[0048] (2) 初代丛生芽诱导:消毒的外植体接种于WPM+NAA 0.06mg/L + 2-iP 0.12mg/L+ZT 2.5mg/L+活性炭0.5g/L的丛生芽诱导培养基中,置于温度25±2℃,每日照光12h,光强2500lx的光暗交替培养23天。

[0049] (3) 继代增殖培养:初代诱导出的丛生芽接种于改良SH培养基+IBA 0.15mg/L+ZT 0.7mg/L+BR 0.06mg/L+GA₃ 0.25mg/L+苹果泥35g/L的继代增殖培养基中,置于温度25±2℃,每日照光12h,光强2500lx的光暗交替培养30天。

[0050] (4) 生根培养:继代增殖丛生芽接种于1/2改良SH培养基+IBA 0.4mg/L+IAA 2.0mg/L+PPP₃₃₃ 1.5mg/L+苹果泥 70g/L+活性炭0.3g/L的生根培养基中,置于温度25±2℃,每日照光12h,光强2500lx的光暗交替培养35天。

[0051] 其中,改良SH培养基为:氯化钙用量改为150mg/L,EDTA-二钠用量改为37.3mg/L,硫酸亚铁用量改为27.8mg/L,肌醇用量改为100mg/L,其余成分不变。

[0052] 对比例1

[0053] 取实施例1云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,按专利《晚春含笑的组织培养繁殖方法》(公开号:CN100429972 A)公开的方法实施例1对云南含笑进行消毒、然后进行诱导分化培养、续代增殖培养、生根培养。

[0054] 对比例2

[0055] 取实施例1云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,按专利《一种台湾含笑组织培养繁殖方法》(公开号:CN103392601A)公开的方法实施例对云南含笑进行组织培养,由于未能诱导出丛生芽,后续未进行增殖及生根培养。

[0056] 对比例3

[0057] 取实施例1云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,按专利《一种诗琳通含笑离体培养再生植株方法》(公开号:CN 103718969 A)公开的方法实施例1对云南含笑进行组织培养。

[0058] 对比例4

[0059] 取实施例1云南含笑端部未木质化茎段,按本发明实施例1的方法进行外植体消毒以及初代诱导培养,后按专利《一种壮丽含笑种子无菌萌发及快速繁殖方法》(公开号:CN 112106664 A)公开的方法实施例1对云南含笑进行组织培养。

[0060] 对比例5

[0061] 取实施例1云南含笑端部未木质化茎段,经清洗后,按照邱健《中山含笑扦插繁殖与组织培技术研究》[D].南京林业大学,2023.DOI:10.27242/d.cnki.gnjlu.2023.000286

公开的最佳方法对云南含笑进行外植体消毒、初代诱导培养、继代增殖培养以及生根培养。

[0062] 对比例6

[0063] 取实施例1云南含笑端部未木质化茎段,根据实施例1进行外植体的消毒以及初代诱导培养,后按照程强强《紫花含笑组培快繁体系建立》[J].林业工程学报,2014,28(01):118-121.DOI:10.13360/j.issn.1000-8101.2014.01.031.公开的最佳方法对云南含笑进行继代增殖培养以及生根培养。

[0064] 对比例7

[0065] 取实施例1云南含笑端部未木质化茎段,按照李雪发表的《醉香含笑的组织培养与植株再生》[J].植物生理学通讯,2005,41(6):1.DOI:CNKI:SUN:ZWSL.0.2005-06-027.公开的最佳方法对云南含笑进行外植体消毒、初代诱导培养、继代增殖培养以及生根培养。

[0066] 对比例8

[0067] 按照都婷等.“云南含笑组织培养快繁技术及愈伤组织诱导研究.”云南农业大学学报:自然科学版(2013).的最佳方法对云南含笑进行外植体消毒、初代诱导培养、继代增殖培养,并按照本发明实施例1进行生根培养,结果如图4所示。

[0068] 表1 对比结果

[0069]

	消毒污染率	消毒死亡率	褐化率	丛生芽诱导率	增殖系数	生根率	生根苗状态	炼苗成活率
实施例1	22.6%	12.2%	5.3%	76.8%	5.5	81.6%	健壮	96.7%
实施例2	20.1%	12.7%	3.9%	82.6%	6.1	82.9%	健壮	97.3%
实施例3	28.8%	13.6%	7.2%	84.7%	6.9	80.2%	健壮	95.2%
对比例1	21.3%	46.4%	69.0%	21.3%	2.1	41.2%	较弱	90.6%
对比例2	17.1%	49.3%	72.6%	0	——	——	——	——
对比例3	79.7%	10.3%	16.9%	19.6%	1.7	19.2%	较弱	87.6%
对比例4	28.6%	13.2%	4.1%	74.6%	2.9	40.6%	较健壮	97.4%
对比例5	74.9%	0	3.6%	19.4%	1.2	3.9%	发芽较困难	94.3%
对比例6	23.1%	11.6%	5.4%	81.4%	3.4	34.2%	较弱	84.2%
对比例7	10.4%	71.3%	83.0%	21.7%	2.6	35.7%	较弱	92.9%
对比例8	16.6%	54.9%	70.8%	24.4%	3.1	70.8%	较健壮	98.6%

[0070] 从表1可知,本申请实施例1-3中,大部分指标明显优于对比例1-8,虽然有些指标略低于对比例中的某些指标,但是综合指标明显优于对比例1-8。

[0071] 最后所应说明的是:以上实施例仅用以说明而非限制本发明的技术方案,尽管参照上述实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应该理解:依然可以对本发明进行修改或者等同替换,而不脱离本发明的精神和范围的任何修改或局部替换,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

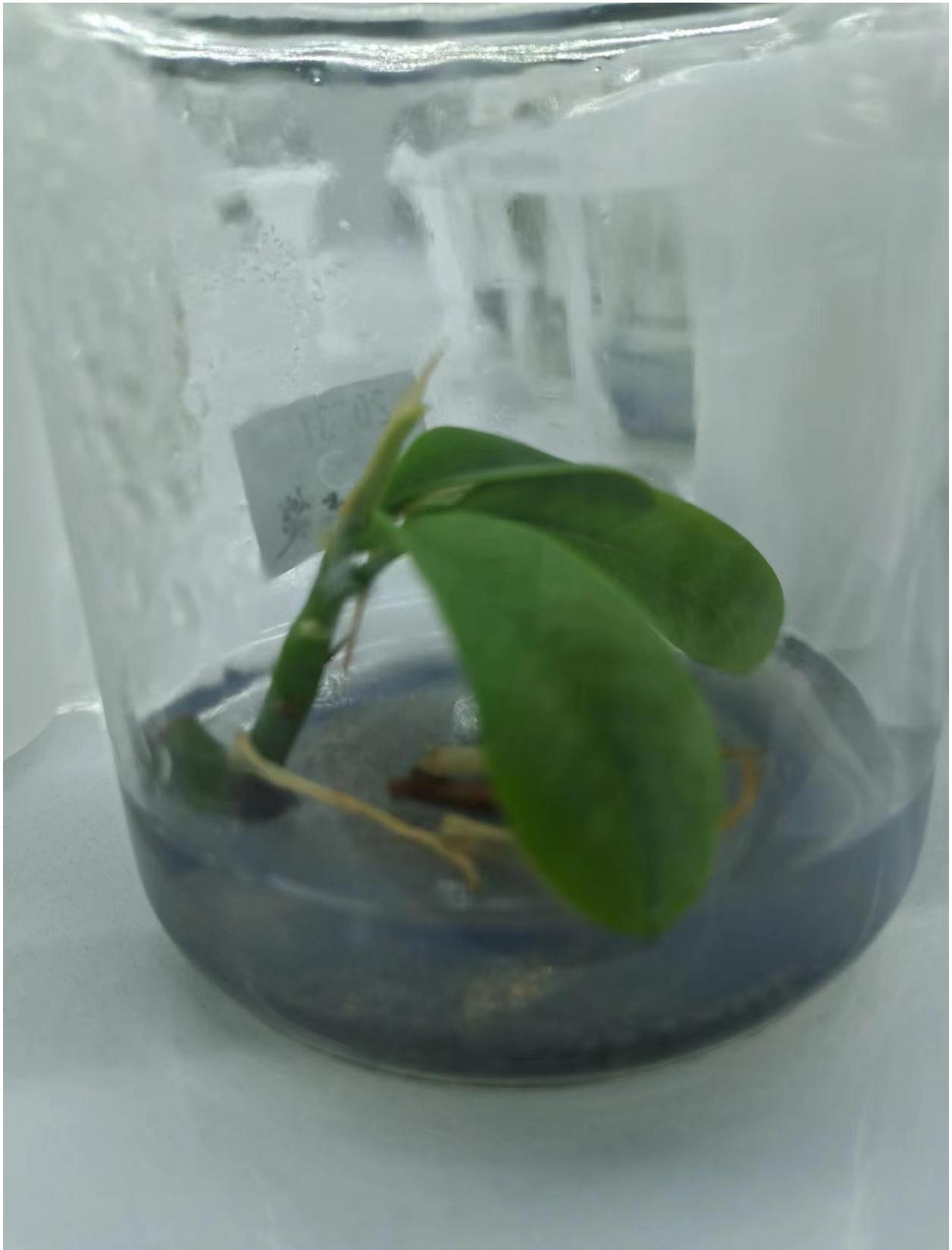


图 1

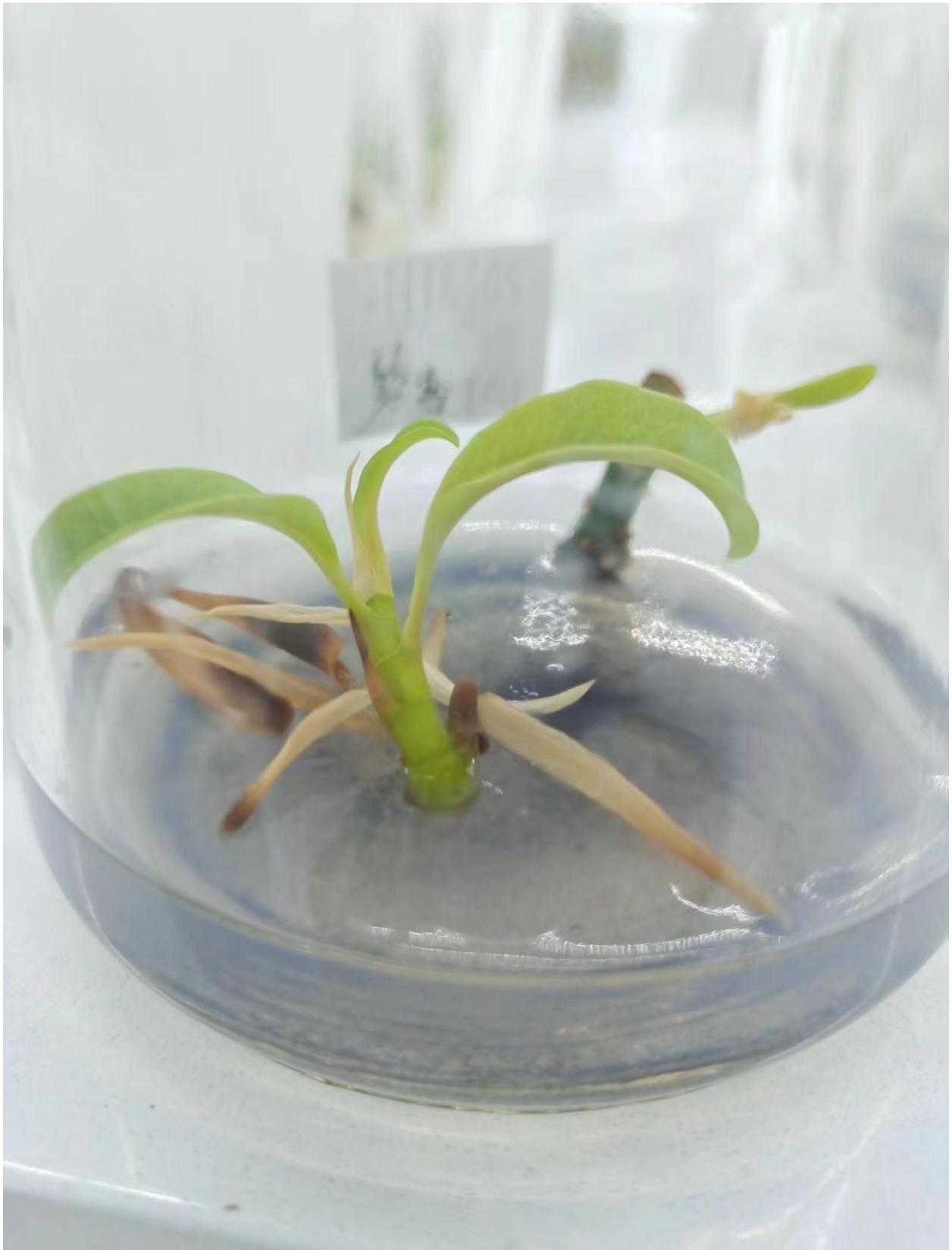


图 2



图 3



图 4