



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103380729 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201310306866. 0

展.《安徽农业科学》. 2010, 第 38 卷 (第 31 期),  
第 17387-17388.

(22) 申请日 2013. 07. 19

审查员 方晓云

(73) 专利权人 中国科学院华南植物园

地址 510650 广东省广州市天河区兴科路  
723 号

(72) 发明人 杨国 陈红锋 马国华

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限  
公司 44001

代理人 刘明星

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101965800 A, 2011. 02. 09,

CN 101116423 A, 2008. 02. 06,

CN 103141390 A, 2013. 06. 12,

CN 102144556 A, 2011. 08. 10,

李翠等. 苦苣苔科植物组织培养研究进

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种双片苣苔组织培养及快速繁殖的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种双片苣苔组织培养及快速繁殖的方法。本发明以双片苣苔叶片为外植体,通过筛选和优化初代诱导、继代增殖、生根和移栽培养基配方和培养条件,经过不定芽的初代诱导、继代增殖和生根培养以及试管苗的移栽阶段,实现珍稀观赏植物双片苣苔种苗的快速繁殖,一般只需 110 天就可以获得双片苣苔的幼苗,并且双片苣苔幼苗的成活率可达 95% 以上。因此本发明具有简单、快速和有效的特点,可以直接用于双片苣苔的繁育和保护,从而为该物种的遗传改良、种质资源保护和开发利用奠定基础。

1. 一种双片苜蓿组织培养及快速繁殖的方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、外植体消毒处理:以双片苜蓿 (*Didymostigma obtusum*(Clarke)W. T. Wang) 植株叶片为外植体,先用清水将外植体冲洗干净,消毒后再无菌水冲洗干净,得到消毒后的外植体;

b、不定芽的初代诱导:将消毒后的外植体接种到诱导培养基上,在温度  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光照强度  $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$  的条件下,叶片外植体诱导形成不定芽,所用的诱导培养基为:每升含有 N- 苯基 -N' -1,2,3- 噻二唑 -5- 脲  $2.0\sim 3.0\ \mu\text{mol}$ 、萘乙酸  $0.2\ \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g,其余为 MS 培养基, pH 为 5.6;

c、芽的继代增殖:将不定芽丛切成块,转入继代的培养基上,在温度  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光照强度  $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$  的条件下,从生芽生长健壮成芽苗,所用的继代的培养基为:每升含有苄氨基嘌呤  $0.5\ \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g、其余为 MS 培养基, pH 为 5.6;

d、生根培养:将高 3cm 的芽苗分切转入生根培养基上,在温度  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光照强度  $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$  的条件下,生根的试管苗形成,所述的生根培养基为:每升含有 3- 吲哚丁酸  $2.0\sim 4.0\ \mu\text{mol}$ 、萘乙酸  $2.0\ \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g、其余为 1/2MS 培养基, pH 为 5.8;

e、试管苗移栽:将长好根的试管苗移栽到移栽基质中,放置于遮荫温室中培养,浇水保湿,其他按常规条件进行培养,由此得到双片苜蓿幼苗,所用的移栽基质为:腐质土和黄泥土按质量比 1 : 1 混合均匀;

所述的消毒为使用质量分数 1% NaClO 溶液消毒 10 ~ 11 分钟。

2. 根据权利要求 1 所述的双片苜蓿组织培养及快速繁殖的方法,其特征在于,所述的双片苜蓿为野生的双片苜蓿。

## 一种双片苕苔组织培养及快速繁殖的方法

### 技术领域：

[0001] 本发明属于植物繁殖领域，具体涉及一种双片苕苔组织培养及快速繁殖的方法。

### 背景技术：

[0002] 双片苕苔(*Didymostigma obtusum* (Clarke) W. T. Wang)，是苦苕苔科双片苕苔属多年生草本，分布于福建、广东、广西和海南，喜欢生长在荫蔽的溪边，在野外不常见，居群数量较少，被《中国的珍稀植物》收录(邢福武，2005)，双片苕苔叶片两面有柔毛，叶背紫红色，开蓝紫色的花，有较高观赏价值，适合做地被观赏植物。

[0003] 双片苕苔组织培养和快速繁殖的技术，国内外均未见报道。

### 发明内容：

[0004] 本发明的目的是提供一种成活率高，能快速、简单、有效的繁殖并能大量得到双片苕苔幼苗的双片苕苔组织培养及快速繁殖的方法。

[0005] 本发明的双片苕苔组织培养及快速繁殖的方法，其特征在于，包括以下步骤：

[0006] a、外植体消毒处理：以双片苕苔(*Didymostigma obtusum* (Clarke) W. T. Wang)植株叶片为外植体，先用清水将外植体冲洗干净，消毒后再无菌水冲洗干净，得到消毒后的外植体；

[0007] b、不定芽的初代诱导：将消毒后的外植体接种到诱导培养基上，在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下，培养 30 天，叶片外植体诱导形成不定芽，所用的诱导培养基为：每升含有 TDZ (N- 苯基 -N' -1,2,3- 噁二唑 -5- 脒)  $2.0 \sim 3.0 \mu\text{mol}$ 、NAA (萘乙酸)  $0.2 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g，其余为 MS 培养基，pH 为 5.6，诱导系数为 44.6；

[0008] c、芽的继代增殖：将不定芽丛切成块，转入继代的培养基上，在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下，培养 30 天，从生芽生长健壮成芽苗，所用的继代的培养基为：每升含有 BAP (苄氨基嘌呤)  $0.5 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g、其余为 MS 培养基，pH 为 5.6；

[0009] d、生根培养：将高 3cm 的芽苗分切转入生根培养基上，在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下，培养 20 天后，生根的试管苗形成，所述的生根培养基为：每升含有 IBA (3- 吲哚丁酸)  $2.0 \sim 4.0 \mu\text{mol}$ 、NAA (萘乙酸)  $2.0 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g、其余为 1/2MS 培养基，pH 为 5.8；

[0010] e、试管苗移栽：将长好根的试管苗移栽到移栽基质中，放置于遮荫温室中培养，浇水保湿，其他按常规条件进行培养，由此得到双片苕苔幼苗，所用的移栽基质为：腐质土和黄泥土按质量比 1 : 1 混合均匀。

[0011] 所述的双片苕苔优选为野生的双片苕苔。

[0012] 所述的消毒优选为使用质量分数 1%NaClO 溶液消毒 10 ~ 11 分钟。

[0013] 所述的 MS 培养基为国际通用的培养基，其成份和配置方法可参考书籍(谭文澄、

戴策刚主编. 观赏植物组织培养技术. 北京: 中国林业出版社, 1991.), 所述的 1/2MS 是将 MS 中的大量元素浓度减半, 而其他成分浓度不变而形成的培养基。

[0014] 本发明以双片苜蓿叶片为外植体, 通过筛选和优化初代诱导、继代增殖、生根和移栽培养基配方和培养条件, 经过不定芽的初代诱导、继代增殖和生根培养以及试管苗的移栽阶段, 实现珍稀观赏植物双片苜蓿种苗的快速繁殖, 一般只需 110 天就可以获得双片苜蓿的幼苗, 并且双片苜蓿幼苗的成活率可达 95% 以上, 移栽后 90 天内可开花结果。因此本发明具有简单、快速和有效的特点, 可以直接用于双片苜蓿的繁育和保护, 从而为该物种的遗传改良、种质资源保护和开发利用奠定基础。

#### 具体实施方式:

[0015] 以下实施例是对本发明的进一步说明, 而不是对本发明的限制。

[0016] 实施例 1:

[0017] a、外植体消毒处理: 以广东省南昆山石河奇观景区的野生双片苜蓿 (*Didymostigma obtusum* (Clarke) W. T. Wang) 植株叶片为外植体, 先用清水将外植体冲洗干净, 再使用质量分数 1%NaClO 溶液消毒 10 分钟, 无菌水冲洗 5 遍冲洗干净, 得到消毒后的外植体;

[0018] b、不定芽的初代诱导: 将消毒后的外植体接种到诱导培养基上, 在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下, 培养 30 天, 叶片外植体诱导形成不定芽, 所用的诱导培养基为: 每升含有 TDZ $2.0 \mu\text{mol}$ 、NAA $0.2 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g, 其余为 MS 培养基, pH 为 5.6, 诱导系数为 44.6, 每升诱导培养基是这样配制的: 将 TDZ $2.0 \mu\text{mol}$ 、NAA $0.2 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g 溶于 1L MS 培养基中,  $121^\circ\text{C}$  灭菌 20min 后得到诱导培养基;

[0019] c、芽的继代增殖: 将大的不定芽丛切成小块, 转入继代的培养基上, 在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下, 培养 30 天, 从生芽生长健壮成芽苗, 所用的继代的培养基为: 每升含有 BAP $0.5 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g、其余为 MS 培养基, pH 为 5.6, 每升继代的培养基是这样配制的: 将 BAP $0.5 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g 溶于 1LMS 培养基中,  $121^\circ\text{C}$  灭菌 20min 后得到继代的培养基;

[0020] d、生根培养: 将高约 3cm 的芽苗分切转入生根培养基上, 在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下, 培养 20 天后, 生根的试管苗形成, 试管苗生根率达 100%, 根系生长较好, 所述的生根培养基为: 每升含有 IBA $2.0 \mu\text{mol}$ 、NAA $2.0 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g、其余为 1/2MS 培养基, pH 为 5.8, 每升生根培养基是这样配制的: 将 IBA $2.0 \mu\text{mol}$ 、NAA $2.0 \mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g 溶于 1L1/2MS 培养基中,  $121^\circ\text{C}$  灭菌 20min 后得到生根培养基;

[0021] e、试管苗移栽: 将长好根的试管苗移栽到移栽基质中, 放置于遮荫温室中培养, 浇水保湿, 每 3 天浇一次水, 其他按常规条件进行培养, 30 天后, 幼苗成活率达 95%, 由此得到双片苜蓿幼苗, 所用的移栽基质为: 腐质土和黄泥土按质量比 1 : 1 混合均匀。

[0022] 本实施例从取外植体到幼苗的获得, 总计需要 110 天左右, 大大的加快了双片苜蓿幼苗的获取, 并由于是组织培养的方法, 因此可以快速大量的获得双片苜蓿幼苗。

[0023] 实施例 2:

[0024] a、外植体消毒处理：以广东省南昆山石河奇观景区的野生双片苜苔 (*Didymostigma obtusum* (Clarke) W. T. Wang) 植株叶片为外植体,先用清水将外植体冲洗干净,再使用质量分数 1%NaClO 溶液消毒 11 分钟,无菌水冲洗 5 遍冲洗干净,得到消毒后的外植体;

[0025] b、不定芽的初代诱导：将消毒后的外植体接种到诱导培养基上,在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下,培养 30 天,叶片外植体诱导形成不定芽,所用的诱导培养基为：每升含有 TDZ3.0  $\mu\text{mol}$ 、NAA0.2  $\mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g,其余为 MS 培养基,pH 为 5.6,每升诱导培养基是这样配制的：将 TDZ2.0  $\mu\text{mol}$ 、NAA0.2  $\mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g 溶于 1L MS 培养基中,121 $^\circ\text{C}$  灭菌 20min 后得到诱导培养基;

[0026] c、芽的继代增殖：将大的不定芽丛切成小块,转入继代的培养基上,在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下,培养 30 天,从生芽生长健壮成芽苗,所用的继代的培养基为：每升含有 BAP0.5  $\mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g、其余为 MS 培养基,pH 为 5.6,每升继代的培养基是这样配制的：将 BAP0.5  $\mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g 溶于 1LMS 培养基中,121 $^\circ\text{C}$  灭菌 20min 后得到继代的培养基;

[0027] d、生根培养：将高约 3cm 的芽苗分切转入生根培养基上,在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间  $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  的条件下,培养 20 天后,生根的试管苗形成,试管苗生根率达 100%,根系生长较好,所述的生根培养基为：每升含有 IBA4.0  $\mu\text{mol}$ 、NAA2.0  $\mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g、其余为 1/2MS 培养基,pH 为 5.8,每升生根培养基是这样配制的：将 IBA2.0  $\mu\text{mol}$ 、NAA2.0  $\mu\text{mol}$ 、蔗糖 30g、琼脂 5.5g 溶于 1L1/2MS 培养基中,121 $^\circ\text{C}$  灭菌 20min 后得到生根培养基;

[0028] e、试管苗移栽：将长好根的试管苗移栽到移栽基质中,放置于遮荫温室中培养,浇水保湿,每 3 天浇一次水,其他按常规条件进行培养,30 天后,幼苗成活率达 95%,由此得到双片苜苔幼苗,所用的移栽基质为：腐质土和黄泥土按质量比 1 : 1 混合均匀。

[0029] 本实施例从取外植体到幼苗的获得,总计需要 110 天左右,大大的加快了双片苜苔幼苗的获取,并由于是组织培养的方法,因此可以快速大量的获得双片苜苔幼苗。