

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103329807 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 02

(21) 申请号 201310299505. 8

(22) 申请日 2013. 07. 16

(71) 申请人 上海市农业科学院

地址 201106 上海市闵行区北翟路 2901 号

(72) 发明人 张建军 周音 陈敏敏 谢纪红

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 牛山 陈少凌

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

利用根快速繁殖杂交兰的方法及培养基

(57) 摘要

本发明公开了一种植物组织培养技术领域的利用根快速繁殖杂交兰的方法及培养基。本发明的方法包括以下步骤:选取杂交兰的根段,接种在诱导培养基上暗培养,诱导原球茎;待原球茎大量增殖后转入光培养,原球茎发育成丛生苗;切割丛生苗成单苗转接到壮苗生根培养基上,培养得到生根植株。本发明以 MS 为基本培养基,诱导培养基需添加 6-BA、PIC 和水解酪蛋白,壮苗生根培养基为不加激素的 MS 培养基。本发明繁殖效率高,操作简便,根外植体的原球茎诱导率、植株生根率和移栽成活率均达 100%。



1. 一种利用根快速繁殖杂交兰的方法,其特征在于,包括如下步骤:  
步骤一,选取杂交兰的根段,接种在诱导培养基上暗培养,诱导、增殖原球茎;  
步骤二,将所述诱导培养基上的原球茎转入光培养,原球茎发育成丛生苗;  
步骤三,将所述丛生苗切割成单苗转接到壮苗生根培养基上,培养得到生根植株。
2. 如权利要求 1 所述的利用根快速繁殖杂交兰的方法,其特征在于,步骤一中的诱导培养基和步骤二中转入光培养所用的培养基为同一种诱导培养基,所述诱导培养基为 MS+6-BA0.5mg/L+PIC0.6mg/L+ 水解酪蛋白 200mg/L+ 蔗糖 30000mg/L+ 琼脂粉 5000mg/L。
3. 如权利要求 1 所述的利用根快速繁殖杂交兰的方法,其特征在于,步骤三中,所述壮苗生根培养基为 MS+AC100mg/L+ 水解酪蛋白 500mg/L+ 蔗糖 30000mg/L+ 琼脂粉 5000mg/L。
4. 如权利要求 1 所述的利用根快速繁殖杂交兰的方法,其特征在于,步骤一中,所述暗培养的温度为  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
5. 如权利要求 1 所述的利用根快速繁殖杂交兰的方法,其特征在于,步骤二中,所述光培养的温度为  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
6. 如权利要求 1 所述的利用根快速繁殖杂交兰的方法,其特征在于,步骤三中,所述培养为光培养,培养的温度为  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
7. 一种用于利用根快速繁殖杂交兰的方法的诱导培养基,其特征在于,所述诱导培养基能够诱导、增殖原球茎和使原球茎发育成丛生苗,所述诱导培养基为在 MS 基本培养基中,同时添加 6-BA 和 PIC。
8. 如权利要求 7 所述的诱导培养基,其特征在于,所述诱导培养基为 MS+6-BA0.5mg/L+PIC0.6mg/L+ 水解酪蛋白 200mg/L+ 蔗糖 30000mg/L+ 琼脂粉 5000mg/L。

## 利用根快速繁殖杂交兰的方法及培养基

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物组织培养技术领域,具体涉及一种利用根快速繁殖杂交兰的方法及培养基。

### 背景技术

[0002] 杂交兰是由中国兰与大花蕙兰杂交选育出来的新型兰花 [陆继亮. 初探云南杂交兰产销现状 [J]. 花木盆景 (花卉园艺), 2013, (2) :36-37 ;梁芳,崔波,马杰,叶永忠. 杂交兰原球茎增殖及分化研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (13) :5309-5310, 5353]。杂交兰花中型、色艳、清香、雅致,弥补了大花蕙兰无香味的缺点,它们集大花蕙兰的花大、色艳、花期长及中国兰的幽香、典雅和韵味为一体,具有很高的观赏价值和广阔的市场前景 [张先云,袁秀云,马杰. 杂交兰的组织培养与快速繁殖技术研究 [J]. 河南科学, 2009, 27 (4) :419-421 ;陆然. 云南杂交兰热销 [J]. 中国花卉园艺 2012, (1) :18]。杂交兰适应性强,一些早花品种能一年两次开花,弥补了大花蕙兰花期集中的不足。由于上述优点,杂交兰深受种植者和消费者欢迎,近年来一直呈产销两旺态势,发展迅猛 [陆继亮. 初探云南杂交兰产销现状 [J]. 花木盆景 (花卉园艺), 2013, (2) :36-37 ;陆然. 云南杂交兰热销 [J]. 中国花卉园艺 2012, (1) :18]。

[0003] 传统的分株繁殖周期长,速度慢,繁殖系数低,远不能满足杂交兰产业化生产要求 ;因此,应用组织培养快速繁殖杂交兰,对于杂交兰的产业化开发具有重要意义。

[0004] 杂交兰携带有国兰的遗传因子,与大花蕙兰、蝴蝶兰等洋兰相比组织培养难度较大,目前仅查到 3 篇关于杂交兰组织培养快速繁殖的经典论文 [梁芳,崔波,马杰,叶永忠. 杂交兰原球茎增殖及分化研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (13) :5309-5310, 5353 ;张先云,袁秀云,马杰. 杂交兰的组织培养与快速繁殖技术研究 [J]. 河南科学, 2009, 27 (4) :419-421 ;沈汉国,邓樱,杨镇明,蓝伟泉,罗丽霞. 杂交兰 ‘十八格格’ 组织培养研究. 张启翔. 中国观赏园艺研究进展 [M]. 北京 :中国林业出版社, 2012 :311-313]。

[0005] 外植体以茎尖、侧芽为主,对植株伤害大 ;外植体接种后易出现褐化,初始培养难度较大 ;培养过程复杂,繁殖系数低 ;是目前杂交兰组织培养快速繁殖存在的主要问题。

[0006] 用根作组织培养的外植体,具有取材量大、容易获得、对植株伤害小的独特优势,但在目前的杂交兰组织培养研究中未见用根作外植体的报道与发明专利。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服上述现有技术的不足,提供一种利用根快速繁殖杂交兰的方法及培养基。具体为以根为外植体,在诱导培养基上诱导、增殖原球茎并使原球茎发育成丛生苗,快速繁殖杂交兰 ;同时提出了各培养阶段所需的特定培养基与培养技术。本发明所提供的杂交兰根培养再生植株的方法,可一步完成原球茎的诱导、增殖和成苗过程 ;外植体的原球茎诱导率达 100%,植株生根率 100%,移栽成活率 100% ;具有繁殖系数高、成苗率高、移栽成活率高和成本低的特点。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的：

[0009] 第一方面，本发明涉及一种利用根快速繁殖杂交兰的方法，包括如下步骤：

[0010] 步骤一，选取杂交兰的根段，接种在诱导培养基上暗培养，诱导、增殖原球茎；

[0011] 步骤二，将所述诱导培养基上的原球茎转入光培养，原球茎发育成丛生苗；

[0012] 步骤三，将所述丛生苗切割成单苗转接到壮苗生根培养基上，培养得到生根植株。

[0013] 优选的，步骤一中的诱导培养基和步骤二转入光培养所用的培养基为同一种诱导培养基，所述诱导培养基为 MS+6-BA0.5mg/L+PIC0.6mg/L+ 水解酪蛋白 200mg/L+ 蔗糖 30000mg/L+ 琼脂粉 5000mg/L。所述培养为暗培养，培养的温度为  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0014] 优选的，步骤二中，所述诱导培养基为 MS+6-BA0.5mg/L+PIC0.6mg/L+ 水解酪蛋白 200mg/L+ 蔗糖 30000mg/L+ 琼脂粉 5000mg/L。所述培养为光培养，培养的温度为  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0015] 优选的，步骤三中，所述壮苗生根培养基为 MS+AC100mg/L+ 水解酪蛋白 500mg/L+ 蔗糖 30000mg/L+ 琼脂粉 5000mg/L。所述培养为光培养，培养的温度为  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0016] 本发明还涉及一种诱导培养基，该培养基能够诱导、增殖原球茎和使原球茎发育成丛生苗，所述诱导培养基为在 MS 基本培养基中同时添加 6-BA 和 PIC。

[0017] 优选的，所述诱导培养基为 MS+6-BA0.5mg/L+PIC0.6mg/L+ 水解酪蛋白 200mg/L+ 蔗糖 30000mg/L+ 琼脂粉 5000mg/L。

[0018] 本发明所使用培养基中的 MS 组分见文献《Murashige T, Skoog F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J].Physiol. Plant. 1962, 15, 473-497》，这属于本领域的公知常识。

[0019] 本发明在培养基中所使用的 PIC 化学名称为 4-氨基-3,5,6-三氯吡啶-2-酸，分子式为  $\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_2$ ，中文通用名为毒莠定或氨氯吡啶酸，英文名称为 Picloram。

[0020] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0021] 1. 首次以杂交兰的根为外植体获得再生植株，扩大了杂交兰组织培养的外植体来源。根作为外植体获得容易，与种子相比，以根为外植体能保持母株性状，与其它营养组织相比，取材量更大，对植株伤害小，本发明对于杂交兰的种苗生产与产业发展具有重要意义。

[0022] 2. 繁殖效率高，植株健壮，移栽成活率高。本发明的外植体原球茎诱导率达 100%，整个培养过程未见褐化、玻璃化现象，加快了培养进程，提高了种苗质量。得到的再生植株根系发达，不用生根剂就可产生许多粗壮的根，植株生根率 100%；植株生长健壮，移栽成活率 100%。

[0023] 3. 原球茎诱导与成苗只需两步培养过程，培养过程和所用培养基简单。第一步原球茎诱导培养只需加 6-BA, PIC 和水解酪蛋白，不需添加香蕉泥、椰汁等其它复杂有机物，且不需光照节省了能源。第二步仅需将原培养基转到光下，原球茎就能发育成丛生苗。第三步壮苗生根培养，不需任何生长调节剂，即可得到直接生根的完整植株，成本低廉。

[0024] 4. 首次将毒莠定 (PIC) 应用于杂交兰根的组织培养，原球茎诱导、分化效果好。

[0025] 5. 由根再生植株可获得更多的根外植体，进而大量、持续地诱导更多的原球茎，实现循环增殖，有利于工厂化生产。

附图说明

[0026] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0027] 图 1 杂交兰根段诱导形成原球茎的示意图;

[0028] 图 2 原球茎在无光条件下增殖与生长的示意图;

[0029] 图 3 原球茎转入光下后变绿并分化成丛生苗的示意图;

[0030] 图 4 转入壮苗生根培养基后形成的生根植株的示意图;

[0031] 图 5 在温室中移栽成活的杂交兰的示意图。

## 具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例及附图对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0033] 在本发明中所使用的术语,除非另有说明,一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。在以下的实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法,所用试剂以及有必要列出其组成成份者,均在首次出现时标明,其后所用相同试剂如无特殊说明,均与首次标明的内容相同。

### [0034] 实施例 1

[0035] 以杂交兰试管苗的根为材料,切成段后接种,暗培养,温度 25℃ 左右 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ),诱导原球茎,原球茎诱导培养基为 MS(Murashige and Skoog, 1962)+6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)0.5mg/L+PIC(4-氨基-3,5,6-三氯吡啶-2-酸)0.6mg/L+水解酪蛋白 200mg/L+蔗糖 30000mg/L+琼脂粉 5000mg/L。12 天后根段膨大,开始产生原球茎,如图 1 所示,随后原球茎大量增殖,并逐渐分化芽苗,如图 2 所示,原球茎诱导率 100%。

[0036] 将已诱导、增殖出大量原球茎、芽苗的原球茎诱导培养基转移至光下,温度 25℃ 左右 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ),3 天后原球茎和芽苗开始变绿,并逐渐发育成丛生苗,同时原球茎也继续增殖,如图 3 所示。

[0037] 把丛生苗切割成单苗转接到 MS+AC(活性炭)100mg/L+水解酪蛋白 500mg/L+蔗糖 30000mg/L+琼脂粉 5000mg/L 的壮苗生根培养基上,每天光照 16 小时,温度 25℃ 左右,无根小苗将逐渐发育成正常植株,同时生根,如图 4 所示,植株生根率 100%。经过约 65 天培养,每个根外植体可诱导出 60 ~ 80 棵生根植株。

[0038] 待生根植株长出 5 ~ 6 片叶后,打开瓶盖,在室温下炼苗 7 ~ 10 天,洗去琼脂后种植于温室,生长健壮,成活率 100%,如图 5 所示。

### [0039] 实施例 2

[0040] 以实施例 1 得到的试管苗的根为材料,切成段后接种,暗培养,温度 25℃ 左右 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ),诱导原球茎,原球茎诱导培养基为 MS+6-BA0.5mg/L+PIC0.6mg/L+水解酪蛋白 200mg/L+蔗糖 30000mg/L+琼脂粉 5000mg/L,原球茎诱导率为 100%。培养 30 天后,挑选分化的芽苗移至新的原球茎诱导培养基 MS+6-BA0.5mg/L+PIC0.6mg/L+水解酪蛋白 200mg/L+蔗糖 30000mg/L+琼脂粉 5000mg/L 上进行光培养,同时将未分化的原球茎留在原培养基上继续增殖、分化后再转入光培养,以后采用与实施例 1 相同的培养步骤,经过约 80 天培养,

每个根外植体平均可诱导生根植株 100 株以上。

[0041] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

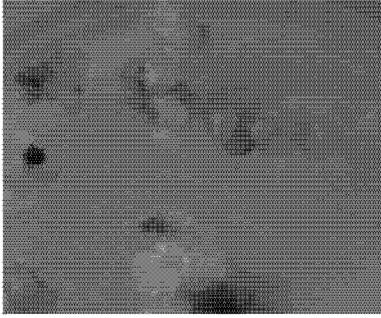


图 1

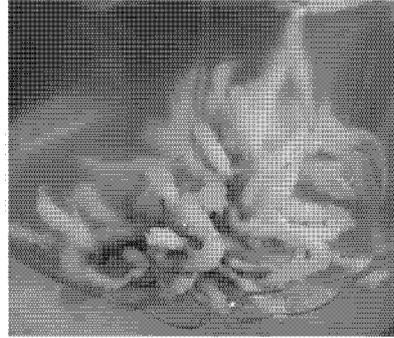


图 2



图 3



图 4



图 5