



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106489730 B

(45)授权公告日 2018.09.28

(21)申请号 201610875159.7

(22)申请日 2016.09.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106489730 A

(43)申请公布日 2017.03.15

(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 吴坤林 曾宋君 郑枫 张建霞 段俊

(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.

C12N 5/04(2006.01)

A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1586167 A,2005.03.02,说明书第2页.

CN 102144536 A,2011.08.10,全文.

CN 102283114 A,2011.12.21,全文.

CN 102845308 A,2013.01.02,全文.

CN 103999774 A,2014.08.27,全文.

CN 105104209 A,2015.12.02,全文.

罗剑飘等.火焰兰属植物研究进展.《广东农业科学》.2012,(第10期),第69-72页.

林丹妮等.云南火焰兰种子无菌萌发和试管育苗.《热带亚热带植物学报》.2008,第16卷(第1期),第83-88页.

Ashish Gupta.Regeneration of *Renanthera imschootiana* Rolfe using Synthetic Seeds.《International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology》.2016,第3卷(第6期),第285-289页.

Kunlin Wu et al..Efficient regeneration of *Renanthera Tom Thumb* 'Qilin' from leaf explants.《Scientia Horticulturae》.2012,第135卷第194-201页.

审查员 夏文静

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种火焰兰一次成苗快速繁殖方法及培养基

(57)摘要

本发明公开了一种火焰兰一次成苗快速繁殖方法及培养基。本发明的培养基：每升含花宝1号1~2g、花宝2号1~2g、蛋白胨0.5~2g、土豆泥40~80g、香蕉泥50~100g、苹果泥10~20g、活性炭500~1000mg、肌醇80~120mg、甘氨酸1.5~2.5mg、盐酸硫胺素0.05~0.2mg、盐酸吡哆醇0.4~0.8mg、烟酸0.4~0.8mg、6-苄基嘌呤0.05~0.1mg、萘乙酸0.2~2mg、蔗糖15~30g和琼脂6~7g,pH 5.4-5.6。利用该培养基在自然光下进行火焰兰种苗一次成苗大规模生产,具有低成本,高效率的特点,种苗具有品质好、抗性强、生长迅速、便于生产管理和降低生产成本等优势。

CN 106489730 B

1. 一种火焰兰一次成苗培养基,其特征在于,每升含花宝1号1~2g、花宝2号1~2g、蛋白胨0.5~2g、土豆泥40~80g、香蕉泥50~100g、苹果泥10~20g、活性炭500~1000mg、肌醇80~120mg、甘氨酸1.5~2.5mg、盐酸硫胺素0.05~0.2mg、盐酸吡哆醇0.4~0.8mg、烟酸0.4~0.8mg、6-苄基嘌呤0.05~0.1mg、萘乙酸0.2~2mg、蔗糖15~30g和琼脂6~7g, pH 5.4~5.6。

2. 根据权利要求1所述的火焰兰一次成苗培养基,其特征在于,每升含花宝1号1.5g、花宝2号1.5g、蛋白胨2g、土豆泥40g、香蕉泥80g、苹果泥10g、活性炭500mg、肌醇100mg、甘氨酸2.0mg、盐酸硫胺素0.2mg、盐酸吡哆醇0.5mg、烟酸0.5mg、6-苄基嘌呤0.05mg、萘乙酸0.5mg、蔗糖20g和琼脂6g, pH 5.5。

3. 一种火焰兰一次成苗快速繁殖方法,其特征在于,包括以下步骤:

a. 采收发育基本成熟而未开裂的火焰兰蒴果为外植体,消毒,将蒴果内的种子洗脱至无菌水中,制成种子悬浮液,然后取种子悬浮液均匀接种于权利要求1所述的火焰兰一次成苗培养基上;

b. 原球茎诱导培养:此阶段控制光照强度为100~1000Lux,待种子萌发形成原球茎,原球茎长出根和叶片后,进入下一培养阶段;

c. 小苗培养:此阶段控制光照强度为1000~3000Lux,待苗长至高3~5cm、3~5片叶片、3~5条根须、根长1~3厘米,苗基部萌发出1-2个新苗后,进入下一培养阶段;

d. 大苗培养:此阶段控制光照强度为3000~5000Lux,待苗长至每丛2~5苗,苗高5~8cm、有4-6节、4片以上叶片、3条以上根、茎粗3.0mm以上,进行出苗移栽;

e. 将苗清洗、消毒和晾干后,栽种于已经消毒处理的水苔基质中,进行栽培管理,得到栽培成活的火焰兰种苗。

4. 根据权利要求3所述的火焰兰一次成苗快速繁殖方法,其特征在于,所述的火焰兰为海南火焰兰。

5. 根据权利要求3所述的火焰兰一次成苗快速繁殖方法,其特征在于,所述的发育基本成熟而未开裂的火焰兰蒴果为授粉后120天以上的未开裂的火焰兰蒴果。

6. 根据权利要求3所述的火焰兰一次成苗快速繁殖方法,其特征在于,所述的步骤a的消毒是将蒴果在体积分数70%乙醇溶液中浸泡30s,再用质量分数0.1%升汞溶液消毒15~20min,无菌水冲洗4~5次,无菌条件下用无菌滤纸吸干蒴果表面的水分;所述的步骤e的消毒是用质量分数0.1%的高锰酸钾溶液浸泡5min。

7. 根据权利要求3所述的火焰兰一次成苗快速繁殖方法,其特征在于,所述的种子悬浮液的浓度为10-15粒种子/mL无菌水,所述的种子悬浮液的接种量为20-30粒种子/150mL火焰兰一次成苗培养基。

8. 根据权利要求3所述的火焰兰一次成苗快速繁殖方法,其特征在于,所述的步骤b、c和d的培养温度均为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

9. 根据权利要求3所述的火焰兰一次成苗快速繁殖方法,其特征在于,所述的步骤b、c和d中的不同光照强度的控制是通过将火焰兰组培苗置于全自然光培养室中培养架的不同层来实现的。

10. 根据权利要求9所述的火焰兰一次成苗快速繁殖方法,其特征在于,所述的培养架宽为60厘米,高为200厘米,共4层,每层层距60厘米,由上至下第一层光照强度为3000~

5000Lux,第二、三层光照强度为1000~3000Lux,第四层光照强度为100~1000Lux,第四层离地面10厘米。

一种火焰兰一次成苗快速繁殖方法及培养基

技术领域

[0001] 本发明属于植物组织培养技术领域,具体涉及一种火焰兰一次成苗快速繁殖方法及培养基。

背景技术

[0002] 火焰兰属(*Reanathera*)植物全世界约有21种,为附生或半附生植物,分布于东南亚至喜马拉雅地区,包括华南地区,我国原产3种。我国产的3中火焰兰其中1种 *Ren. Coccinea* 产广东,海南地区,植株高大生长健旺,2种 (*Ren. imschootiana* 和 *Ren. sinica*) 产云南。火焰兰生长健旺,花色艳丽,花数众多,远观如火焰般绚丽,具有很高的园艺应用价值和育种价值;是国际花卉市场上十分流行的高档花卉,在世界上具有大量的爱好者。而且其生长环境为热带亚热带,适合在华南地区栽培,未来有希望在华南地区建立其育种和生产基地,形成类似蝴蝶兰、石斛兰的产业。火焰兰已成为世界上濒危的植物物种之一,所有野生种类均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录中而被禁止贸易。

[0003] 火焰兰杂交种比原生种花型花姿更为优美,生长势和抗逆性强,在花色上比原生种更为艳丽多彩,也能在国际市场上进行交易,现已成为世界火焰兰产业的主流产品,但我国火焰兰的杂交育种工作还刚刚起步,火焰兰产业具有广阔的市场前景。

[0004] 火焰兰具有很高的杂交亲和性,但在与其他兰科植物杂交时存在花期不遇问题,同时由于花期不遇而无法进行一些远缘杂交,此外已报道的其他植物的花粉低温保存时常发生霉变问题而导致花粉保存失败。

[0005] 火焰兰杂交种子由于其种胚发育不完全,自然状态下萌发率极低。火焰兰种苗生产已有的报道,普遍存在培养周期长、操作复杂、生产成本较高的问题。因此,需要开发一种操作简单、成本低且能获得较高的种子萌发率和培育出大量的试管苗的火焰兰快速繁殖方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种火焰兰一次成苗快速繁殖方法及培养基,以克服现有技术中火焰兰种苗生产存在的种子萌发率、培养周期长、操作复杂、生产成本较高的问题。

[0007] 本发明的火焰兰一次成苗培养基:每升含花宝1号1~2g、花宝2号1~2g、蛋白胨0.5~2g、土豆泥40~80g、香蕉泥50~100g、苹果泥10~20g、活性炭500~1000mg、肌醇80~120mg、甘氨酸1.5~2.5mg、盐酸硫胺素(VB1)0.05~0.2mg、盐酸吡哆醇(VB6)0.4~0.8mg、烟酸0.4~0.8mg、6-苄基嘌呤0.05~0.1mg、萘乙酸(NAA)0.2~2mg、蔗糖15~30g和琼脂6~7g, pH 5.4-5.6。

[0008] 优选,每升含花宝1号1.5g、花宝2号1.5g、蛋白胨2g、土豆泥40g、香蕉泥80g、苹果泥10g、活性炭500mg、肌醇100mg、甘氨酸2.0mg、盐酸硫胺素(VB1)0.2mg、盐酸吡哆醇(VB6)0.5mg、烟酸0.5mg、6-苄基嘌呤0.05mg、萘乙酸(NAA)0.5mg、蔗糖20g和琼脂6g, pH 5.5。

[0009] 本发明的火焰兰一次成苗快速繁殖方法,包括以下步骤:

[0010] a.采收发育基本成熟而未开裂的火焰兰蒴果为外植体,消毒,将蒴果内的种子洗脱至无菌水中,制成种子悬浮液,然后取种子悬浮液均匀接种于所述的火焰兰一次成苗培养基上;

[0011] b.原球茎诱导培养:此阶段控制光照强度为100~1000Lux,待种子萌发形成原球茎,原球茎长出根和叶片后,进入下一培养阶段;

[0012] c.小苗培养:此阶段控制光照强度为1000~3000Lux,待苗长至高3~5cm、3~5片叶片、3~5条根须、根长1~3厘米,苗基部萌发出1-2个新苗后,进入下一培养阶段;

[0013] d.大苗培养:此阶段控制光照强度为3000~5000Lux,待苗长至每丛2~5苗,苗高5~8cm、有4-6节、4片以上叶片、3条以上根、茎粗3.0mm以上,进行出苗移栽;

[0014] e.将苗清洗、消毒和晾干后,栽种于已经消毒处理的水苔基质中,进行栽培管理,得到栽培成活的火焰兰种苗。

[0015] 优选,所述的火焰兰为海南火焰兰(*Reanathera Coccinea*)。

[0016] 优选,所述的发育基本成熟而未开裂的火焰兰蒴果为授粉后120天以上的未开裂的火焰兰蒴果。

[0017] 优选,所述的步骤a的消毒是将蒴果在体积分数70%乙醇溶液中浸泡30s,再用质量分数0.1%升汞溶液消毒15~20min,无菌水冲洗4~5次,无菌条件下用无菌滤纸吸干蒴果表面的水分;所述的步骤e的消毒是用质量分数0.1%的高锰酸钾溶液浸泡5min。

[0018] 优选,所述的种子悬浮液的浓度为10-15粒种子/mL无菌水,所述的种子悬浮液的接种量为20-30粒种子/150mL火焰兰一次成苗培养基。为保证火焰兰在长达7-8个月的培养时间中有足够的营养供应,除了培养基中有丰富的有机成分外,加入的培养基的量比通常的量多50%。

[0019] 优选,所述的步骤b、c和d的培养温度均为 (26 ± 2) ℃。

[0020] 优选,所述的步骤b、c和d中的不同光照强度的控制是通过将火焰兰组培苗置于全自然光培养室中培养架的不同层来实现的。

[0021] 进一步优选,所述的培养架宽为60厘米,高为200厘米,共4层,每层层距60厘米,由上至下第一层光照强度为3000~5000Lux,第二、三层光照强度为1000~3000Lux,第四层光照强度为100~1000Lux,第四层离地面10厘米。本发明采用的全自然光的培养室中培养架的层距比普通的大一倍左右,目的是保证每层的培养架受光更好。利用该培养架可以实现一次成苗,不需转接人工,加上采用全自然光培养室,根据不同生长阶段对光的需求不同而移动培养的位置,生产出来的种苗健壮易成活,移栽前不需要经过专门的炼苗处理,可直接出瓶移栽,能显著降低生产成本。

[0022] 本发明成功地利用高萌发率的种子、营养丰富的培养基、全自然光培养室进行火焰兰种苗一次成苗大规模生产,具有低成本,高效率的特点,可定时、定质、定量提供规格划一整齐一致的优质火焰兰试管苗满足市场需求,试管苗无病虫害生长健壮,种苗具有品质好、抗性强、生长迅速、便于生产管理和降低生产成本等优势。本发明是种苗的规模化生产的高新生物技术,技术独特且简单实惠,应用价值高。

具体实施方式

[0023] 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。

[0024] 以下实施例中的火焰兰为海南火焰兰(*Reanathera Coccinea*)。

[0025] 以下实施例中使用的花宝1号、花宝2号为美国HYPONeX化学公司生产、台湾台和园艺企业股份有限公司分装产品。

[0026] 实施例1

[0027] 1.全自然光培养室建造:使用钢化玻璃建成透光的培养室,配备遮阳系统、降温设备、培养架。遮阳系统包括内外遮阳网,通过调控内外遮阳网使培养室内顶层(第一层)培养架的光照强度为3000~5000Lux,顶层往下的第二、三层培养架光照强度为1000~3000Lux,底层即顶层下第四层培养架光照强度为100~1000Lux。降温设备采用冷暖两用空调,可将玻璃培养室的温度控制在20~30℃。培养架宽为60厘米,高为200厘米,离地面10厘米为第四层,层距60厘米,共四层,培养架长度可根据培养室的大小而定。

[0028] 2.种子悬浮液的制作:于火焰兰种质圃中,选取生长健壮、萌芽率高、抗逆性、抗病虫害强的健康株系,并从中选择具明显特性、观赏价值高的开花的火焰兰植株作为授粉亲本,确认花粉有活力后将其授于母本的柱头上。授粉后套袋,约1星期后去袋,挂上标签,标签上具有父、母本名称、杂交日期和授粉人等信息。注意观察杂交蒴果的发育情况。选取果龄为120天(授粉后120天,此时火焰兰蒴果发育基本成熟而未开裂)的蒴果为外植体,在体积分数70%乙醇溶液中浸泡30s,再用质量分数0.1%升汞溶液消毒15~20min,无菌水冲洗4~5次,于超净工作台上无菌条件下用无菌滤纸吸干蒴果表面的水分。接着用无菌手术刀切开蒴果,将蒴果内的种子全部洗脱至一个装有200mL无菌水的三角瓶中,每个蒴果的种子分别对应洗脱至一个装有200mL无菌水的三角瓶,制成种子悬浮液。对每个蒴果种子悬浮液进行种子密度的检测,在摇匀情况下用无菌移液枪吸取20 μ L于生物显微镜下计算其种子数量,每瓶种子悬浮液重复取10次计算其平均每mL种子数。根据每瓶悬浮液种子浓度用无菌水进一步稀释成种子浓度为10~15粒/mL的接种用的种子悬浮液。

[0029] 3.无菌播种:无菌条件下用移液枪吸取接种用的种子悬浮液2mL至一次成苗培养基上,每个兰花培养瓶中装有150mL该培养基,每瓶中火焰兰的种子数量20~30粒。所使用的一次成苗培养基:每升含花宝1号1.5g,花宝2号1.5g,蛋白胨2g,土豆泥40g,香蕉泥80g,苹果泥10g,活性炭500mg,肌醇100mg,甘氨酸2.0mg,盐酸硫胺素(VB1)0.2mg,盐酸吡哆醇(VB6)0.5mg,烟酸0.5mg,6-苄基嘌呤0.05mg,萘乙酸(NAA)0.5mg,蔗糖20g,琼脂6g,pH 5.5;其配制方法是:将上述各组分混合均匀后,于1.06kg/cm²(121℃)条件下灭菌20min,待培养基冷却前进行无菌分装。

[0030] 4.一次成苗培养:

[0031] 原球茎诱导培养:将种子悬浮液均匀分布在一次成苗培养基上,将此培养瓶放置全自然光培养室中的第四层培养架上,保持其光照强度在100~1000Lux,保持培养室温度在(26 \pm 2)℃。此条件下培养60~90天,种子萌发形成原球茎,原球茎长出根和叶片,成为小苗。

[0032] 小苗培养:将小苗移动至培养架的第二或第三层,加强其自然光照培养,培养温度为(26 \pm 2)℃,促进小苗生长,此时期培养时间为90天,小苗长成大苗,大苗高3~5cm、3~5片叶片、3~5条根须、根长1~3厘米;大苗基部萌发出1~2个新苗,形成丛生状。

[0033] 大苗培养:将大苗移动至培养架的第一层,在高自然光光强下进行培养,培养温度

为(26±2)℃,既可以促进大苗的生长,又可以达到炼苗的效果。此时期培养60天,形成生根苗,此时火焰兰生根苗每丛2—5苗,生根苗高5~8cm、有4-6节、4片以上叶片、3条以上根、茎粗3.0mm以上,达到出苗的标准。

[0034] 5. 试管苗的移栽:移栽时,从培养瓶中取出生根苗,洗净附着的培养基后,用质量分数0.1%的高锰酸钾溶液浸泡5min,然后将生根苗晾干至根变白后进行栽种,种植基质采用已经消毒处理的水苔,注意保持适宜湿度和温度,置于阴凉通风处栽培管理,得到的火焰兰种苗成活率可达98%以上。栽种30d左右成活后的植株能产生新的根系,此时可移入大棚进行正常水、肥、药管理。

[0035] 实施例2

[0036] 实施例2与实施1中的步骤基本相同,不同之处在于:

[0037] 实施例2中所使用的一次成苗培养基:每升含花宝1号1g,花宝2号1g,蛋白胨0.5g,土豆泥60g,香蕉泥50g,苹果泥15g,活性炭800mg,肌醇80mg,甘氨酸1.5mg,盐酸硫胺素(VB1)0.05mg,盐酸吡哆醇(VB6)0.4mg,烟酸0.4mg,6-苄基嘌呤0.08mg,萘乙酸(NAA)0.2mg,蔗糖15g,琼脂6g,pH 5.4。

[0038] 本实施例中得到的火焰兰种苗成活率也可达98%以上,而且品质好、抗性强、生长迅速。

[0039] 实施例3

[0040] 实施例3与实施1中的步骤基本相同,不同之处在于:

[0041] 实施例3中所使用的一次成苗培养基:每升含花宝1号2g,花宝2号2g,蛋白胨1.5g,土豆泥80g,香蕉泥100g,苹果泥20g,活性炭1000mg,肌醇120mg,甘氨酸2.5mg,盐酸硫胺素(VB1)0.2mg,盐酸吡哆醇(VB6)0.8mg,烟酸0.8mg,6-苄基嘌呤0.1mg,萘乙酸(NAA)2mg,蔗糖30g,琼脂7g,pH 5.6。

[0042] 本实施例中得到的火焰兰种苗成活率也可达98%以上,而且品质好、抗性强、生长迅速。