(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106900552 B
(45)授权公告日 2020.05.12

(21)申请号 201710133857.4
(22)申请日 2017.03.08
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106900552 A
(43)申请公布日 2017.06.30
(73)专利权人 仲恺农业工程学院
地址 510225 广东省广州市海珠区东沙街24号
(72)发明人 胡秀 梁韩枝 吴永清 邓莎
(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
代理人 宋静娜 郝传鑫
(51)Int.Cl.
A01H 4/00(2006.01)
A01G 31/00(2018.01)

审查员 荆丹丹

权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54)发明名称

一种促进鱼木离体快速繁殖的培养基套盒及方法

(57)摘要

本发明公开了一种鱼木离体快速繁殖的培养基套盒,包括:(1)用于初代培养的培养基1:以MS培养基为基础培养基,添加0.5～2mg/L的BA、0.1mg/L的NAA、0～0.1mg/L的TDZ、25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂;(2)用于继代培养的培养基2:以MS培养基为基础培养基,添加0.5mg/L的BA、0～0.1的NAA、0～0.5mg/L的GA_3、25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂;(3)用于壮苗的培养基3:以MS培养基为基础培养基,添加25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂;(4)用于生根的培养基4:以1/2MS培养基为基础培养基,添加0.5～1.5mg/L的IBA、25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂。此外,本发明还公开了一种采用所述培养基套盒促进鱼木离体快速繁殖的方法。在优化的条件下,通过所述方法进行鱼木的培养,可获得较理想的繁殖倍率、生根率以及移栽成活率。



CN 106900552 B

1.一种促进鱼木Crateva religiosa G.Forster离体快速繁殖的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1)选取鱼木母株的根,在温室里经沙埋后长出半木质化幼苗,以所述幼苗的带腋芽茎段为外植体;

(2)在无菌条件下,将外植体用升汞消毒后接种于用于初代培养的培养基1上,获得初代无菌苗;

(3)将步骤(2)中获得的非玻璃化的初代无菌苗剪切为带1个节的带芽茎段,接种于用于继代培养的培养基2上,获得丛生芽;

(4)将步骤(3)中获得的丛生芽,接种于用于壮苗的培养基3上进行壮苗培养;

(5)将步骤(4)中获得的健壮苗,接种于用于生根的培养基4上,进行生根培养;

(6)将步骤(5)中获得的植株根部的培养基清洗干净,移栽于体积比为2:1的泥炭土和沙子混合而成的基质上;

其中,所述用于初代培养的培养基1中,以MS培养基为基础培养基,6-苄基腺嘌呤为0.5mg/L,萘乙酸为0.1mg/L,噻苯隆为0.1mg/L,蔗糖为30g/L以及琼脂为7g/L;

所述用于继代培养的培养基2中,以MS培养基为基础培养基,6-苄基腺嘌呤为0.5mg/L,萘乙酸为0.1mg/L,赤霉素为0mg/L,蔗糖为30g/L以及琼脂为7g/L;

所述用于壮苗的培养基3中,以MS培养基为基础培养基,还添加有蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L;

所述用于生根的培养基4中,以1/2MS培养基为基础培养基,吲哚丁酸为1.0mg/L,蔗糖为30g/L以及琼脂为7g/L。

2.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)～(5)中的培养条件均为:24～26℃、光照10～14h/d、光照强度2500～3500lx。

一种促进鱼木离体快速繁殖的培养基套盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物组织培养的培养基套盒及方法，尤其涉及一种鱼木丛生芽途径的离体快速繁殖的培养基套盒及方法。

背景技术

[0002] 鱼木(Crateva religiosa G.Forster)为白花菜科(Capparidacea)鱼木属(Crateva)落叶小乔木，其树形美观，花姿美丽，盛花时节犹如群蝶纷飞，适合观赏。其木材可作乐器和细工用材;果含生物碱，可作胶粘剂，果皮可作染料。

[0003] 鱼木通常采用种子繁殖与根埋繁殖，但在自然条件下种子的萌发率很低，根埋繁殖速度有限使其在大量推广种植受到限制(Tyagi，2010)。离体培养快速繁殖具有非季节依赖性、基因一致性以及植株无病原性的优点(Husain，2007;Vengadesan，2007)。目前尚未有鱼木离体培养快速繁殖的报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足之处而提供一种促进鱼木离体快速繁殖的培养基套盒;

[0005] 本发明的另一目的在于提供一种促进鱼木离体快速繁殖的方法。

[0006] 为实现上述目的，本发明采取的技术方案为:一种促进鱼木离体快速繁殖的培养基套盒，所述培养基套盒包括:

[0007] (1)用于初代培养的培养基1:以MS培养基为基础培养基，还添加有BA(6-苄基腺嘌呤)0.5～2mg/L、NAA(萘乙酸)0.1mg/L、TDZ(噻苯隆)0～0.1mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L;

[0008] (2)用于继代培养的培养基2:以MS培养基为基础培养基，还添加有BA(6-苄基腺嘌呤)0.5mg/L、NAA(萘乙酸)0～0.1mg/L、GA(赤霉素)0～0.5mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L;

[0009] (3)用于壮苗的培养基3:以MS培养基为基础培养基，还添加有蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L;

[0010] (4)用于生根的培养基4:以1/2～1MS培养基为基础培养基，还添加有IBA(吲哚丁酸)0.5～1.5mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L;

[0011] BA，即6-苄基腺嘌呤，是一种广泛使用的添加于植物生长培养基的细胞分裂素，具有抑制植物叶内叶绿素、核酸、蛋白质的分解，保绿防老;将氨基酸、生长素、无机盐等向处理部位调运等多种效能，广泛用在农业、果树和园艺作物从发芽到收获的各个阶段;在植物的离体快繁中可促进细胞分裂和由愈伤组织或器官上分化不定芽，同时有助于使腋芽由顶端优势的抑制下解放出来。

[0012] NAA，即萘乙酸，是一种广谱型植物生长调节剂，在植物离体培养过程中用于诱导细胞的分裂和根的分化，同时可影响茎和节的伸长、向性、顶端优势、叶片脱落等现象。

[0013] TDZ,即噻苯隆,是一种植物生长调节剂促进剂,在植物离体快繁中可用于促进愈伤组织生长、侧芽以及不定芽的发生,促进胚状体的形成。

[0014] GA,即赤霉素,是广泛存在的一类植物激素,其化学结构属于二萜类酸,由四环骨架衍生而得。在植物离体快繁中可用于促进矮生小植株茎节伸长,刺激不定胚正常发育成小植株。作为本发明培养基套盒的优选实施方式,所述用于继代培养的培养基2中,所述赤霉素为GA_3。

[0015] IBA,即吲哚丁酸,是植物内源生长素,在植物离体快繁过程中用于促进细胞分裂与细胞生长,诱导形成不定根,农业生产上可增加座果,防止落果,改变雌、雄花比率等。

[0016] 本发明所述的培养基套盒中,各培养基互相配合,各培养基中的激素种类及含量很好地配合了鱼木植株的具体生长需要,显著提高了鱼木的繁殖倍率、生根率以及移栽成活率。

[0017] 作为本发明培养基套盒的优选实施方式,所述培养基套盒还包括体积比为2:1的泥炭土和沙子混合而成的基质。

[0018] 作为本发明培养基套盒的优选实施方式,所述用于初代培养的培养基1中,BA为0.5mg/L,NAA为0.1mg/L,TDZ为0.1mg/L,蔗糖为30g/L以及琼脂为7g/L。

[0019] 作为本发明培养基套盒的优选实施方式,所述用于继代培养的培养基2中,BA为0.5mg/L,NAA为0.1mg/L,GA_3为0mg/L,蔗糖为30g/L以及琼脂为7g/L。

[0020] 作为本发明培养基套盒的优选实施方式,所述用于生根的培养基4中,以1/2MS培养基为基础培养基,IBA为1.0mg/L,蔗糖为30g/L以及琼脂为7g/L。

[0021] 本发明培养基套盒的配制方法没有特别限定,优选地但不限于,本发明培养基套盒采用如下方法配制而成:

[0022] (1)配制MS培养基;

[0023] (2)配制用于初代培养的培养基1:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上添加BA、NAA、TDZ、蔗糖以及琼脂;

[0024] (3)配制用于继代培养的培养基2:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上添加BA、TDZ、GA_3、蔗糖以及琼脂;

[0025] (4)配制用于壮苗的培养基3:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上添加蔗糖以及琼脂;

[0026] (5)配制用于生根的培养基4:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上添加IBA、蔗糖以及琼脂;

[0027] (6)配制基质:按照泥炭土:沙子=2:1(体积比)的比例进行混合。

[0028] 本发明还提供了一种采用所述培养基套盒促进鱼木离体快速繁殖的方法。

[0029] 作为本发明所述促进鱼木离体快速繁殖的方法的优选实施方式,所述方法包括以下步骤:

[0030] (1)选取鱼木母株的根,在温室里经沙埋后长出半木质化幼苗,以所述幼苗的带腋芽茎段为外植体;

[0031] (2)在无菌条件下,将外植体用升汞消毒后接种于所述用于初代培养的培养基1上,获得初代无菌苗;

[0032] (3)将步骤(2)中获得的非玻璃化的初代无菌苗剪切为带1个节的带芽茎段,接种

于所述用于继代培养的培养基2上，获得丛生芽并获得最适的继代次数；

[0033] (4)将步骤(3)中获得的丛生芽，接种于所述用于壮苗的培养基3上进行壮苗培养；

[0034] (5)将步骤(4)中获得的健壮苗，接种于所述用于生根的培养基4上，进行生根培养；

[0035] (6)将步骤(5)中获得的植株根部的培养基清洗干净，移栽于所述基质1上。

[0036] 本发明所述促进鱼木离体快速繁殖的方法具体是：以鱼木母株根埋后新长出的半木质化幼苗的茎段为外植体，经过表面消毒处理后，接种在初代培养基上，以芽萌发率、增殖系数以及生长状态等指标确定了最适的初代培养基；取在最优初代培养基上形成的长势良好的植株，用刀片切取大小相近的侧芽，接种于继代培养基上，通过同配方的多次继代，以增殖系数与玻璃化为参考，确定了最适的继代次数与继代配方，该步骤避免了生产过程中继代处理时的盲目性。在生根培养时发现，玻璃化的植株是无法诱导根的形成的，对于玻璃化的植株经过不含任何植物生长调节剂的MS空白培养基上进行壮苗培养后即可进行生根诱导培养，该步骤显著地降低了玻璃化苗的比例，大大地提高了组培植株的可利用率。本试验首次建立了鱼木的丛生芽离体快繁体系，经过初代、继代与壮苗交替处理、生根、移栽后获得完整的数量可观的鱼木组培苗。

[0037] 作为促进鱼木离体快速繁殖的方法的更优选的实施方式，其中，所述步骤(1)中，所述鱼木母株的根为健壮母株的粗度为0.5～2厘米的侧根。

[0038] 作为促进鱼木离体快速繁殖的方法的更优选的实施方式，其中，所述步骤(2)～(5)中的培养条件均为：24～26℃、光照10～14h/d、光照强度2500～3500lx。

[0039] 作为促进鱼木离体快速繁殖的方法的更优选的实施方式，其中，在所述步骤(2)中，所述消毒处理过程包括：加入体积百分比为70～75％的酒精浸泡30～60s；用无菌水清洗后，用质量百分比浓度为0.08～0.12％的升汞溶液浸泡10～15min；用无菌水清洗后，用无菌滤纸吸干表面水分。

[0040] 与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下有益效果：

[0041] 1、本发明先以加入BA、NAA以及TDZ的用于初代培养的培养基1上进行初代培养，以芽增殖倍率与玻璃化为指标，筛选适宜初代培养基；在初代培养基的基础上，去除了TDZ，加入GA_3并降低了NAA浓度的用于继代培养的培养基2上进行多次继代的丛生芽诱导培养，以芽增殖倍率以及玻璃化为指标，筛选适宜继代培养基与继代次数；在生根之前采用不加任何植物生长调节剂的壮苗的培养基3进行壮苗，将生长健壮的植株于含有IBA的用于生根的培养基4上进行生根培养，最后进行驯化移栽。该方法首次建立了鱼木丛生芽途径的组织培养快繁体系，产生了具有基因一致性，可保持母株优良性状的组培苗，并解决了在鱼木组织培养过程中玻璃化率高，愈伤化严重以及不易生根的问题。以30天为培养周期，利用本发明的培养基可以使鱼木的繁殖倍率达到3～12倍，生根率为92％，移栽成活率为100％。

[0042] 2、用于初代培养的培养基1中采用不同浓度的BA和NAA以及TDZ的配合，初代诱导外植体腋芽萌发，确定不同培养基上培养的无菌苗生长状态以及繁殖倍率，以30天为培养周期，繁殖倍数为3.88～6.35倍，植株高度约为4～6cm。

[0043] 3、用于继代培养的培养基2中采用不同浓度的BA和NAA以及GA_3的配合，切取初代所得植株的带一个腋芽的茎段进行继代培养以及进行3次继代处理。以芽增殖倍率以及玻璃化为指标，确定适宜继代培养基与继代次数。以30天为培养周期，繁殖倍数为3～12倍，植

株高度约为4～6cm。

[0044] 4、在壮苗阶段，用于壮苗的培养基3中(在MS培养基的基础上添加25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂)，可使玻璃化程度减弱，叶色深绿、生长健壮、叶柄处带有芽点，符合生根和成苗要求。

[0045] 5、在生根阶段，将用于壮苗的培养基3中所得的生长健壮植株接种于生根的培养基4(在1/2～1MS培养基的基础上添加0.5～1.5mg/L的IBA、30g/L蔗糖以及7g/L琼脂)中进行生根培养，培养30d后生根率达92％，生根系数达6.3。

[0046] 6、本发明的外植体来源是母株根在温室里经沙埋后新长出半木质化幼苗，避免了外界雨水的浇淋，所带的细菌较少，污染率低且生长旺盛，芽萌发率高，几乎为100％。经初代培养以及一定次数的继代培养，以30天为计数周期，可获得高达9～12倍繁殖倍数的健壮无菌苗，生根率和移栽成活率均为分别为92％与100％。

附图说明

[0047] 图1为鱼木初代培养效果图；

[0048] 图2为第一次继代的出现大量丛生芽效果图；

[0049] 图3为壮苗培养时的玻璃化效果图；

[0050] 图4为壮苗培养后的鱼木植株；

[0051] 图5为生根的植株；

[0052] 图6为移栽成活的植株。

具体实施方式

[0053] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点，下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0054] 在本文中，英文缩略词的含义如下：

[0055] BA:6-苄基氨基嘌呤；

[0056] TDZ:噻苯隆；

[0057] NAA:萘乙酸；

[0058] IBA:为吲哚丁酸；

[0059] GA_3:为赤霉素；

[0060] 术语：

[0061] 术语“离体”是指为了各种研究目的而把生物体的一部分摘出和游离于生物体外的状态。

[0062] 术语“外植体”是指在继代培养时，移入新的培养基的培养的组织切段。在本发明中，“外植体”具体是指鱼木母株根在温室里经砂埋后长出的当年生半木质化幼苗。

[0063] 在本发明中，术语“玻璃化现象”是指植物组织培养中出现的，植株呈半透明状，组织结构畸形发育的现象。出现玻璃化现象的植株在试管外不能移栽成活。与正常组织相比，玻璃化组织内的叶绿素含量、蛋白质含量、一些酶的活力、乙烯合成能力等都有较大变化。

[0064] 1/2～1MS培养基是指把MS培养基中的大量元素的量都减少到原来的1/2～1所制备的培养基。例如，1/2MS培养基是指把MS培养基中的各种微量元素的量都减少到原来的1/

2所制备的培养基。

[0065] 在本发明实施例中,MS培养基的成分如下表1所示:

[0066] 表1

[0067]

MS培养基的成分	成分	含量（mg/L）
大量元素母液成分	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$CaCl_2·2H_2O$	440
	$MgSO_4·7H_2O$	370
	KH_2PO_4	170
微量元素母液成分	KI	0.83
	H_3BO_3	6.2
	$MnSO_4·4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4·7H_2O$	8.6
	$Na_2·MoO_4·2H_2O$	0.25
	$CuSO_4·5H_2O$	0.025
	$CoCl_2·6H_2O$	0.025
铁盐母液成分	$FeSO_4·7H_2O$	27.8
	$Na_2·EDTA·2H_2O$	37.3
有机物母液成分	肌醇	100
	烟酸	0.55
	盐酸吡哆醇（B_6）	0.5
	盐酸硫胺素(B_1)	0.1
	甘氨酸	2

[0068] 如无特殊说明,本发明实施例中促进鱼木离体快速繁殖的方法中所涉及的培养基及基质分别按照下述方法进行制备:

[0069] (1)配制1L MS培养基:准确称取表1中所述的各种化合物,加适量蒸馏水溶解,用玻璃棒搅拌促溶,用NaOH调pH至6.0,最后定容到1L。

[0070] (2)配制用于初代培养的培养基1:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上还添加0.5～2mg/L的BA、0.1mg/L的NAA、0～0.1mg/L的TDZ、25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂;

[0071] (3)配制用于继代培养的培养基2:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上添加0.5mg/L的BA、0～0.1的NAA、0～0.5mg/L的GA_3、25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂;

[0072] (4)配制用于壮苗的培养基3:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上添加25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂;

[0073] (5)配制用于生根的培养基4:在1/2～1MS培养基的基础上添加0.5～1.5mg/L的IBA、25～35g/L蔗糖以及6.5～7.5g/L琼脂;

[0074] (6)配制基质1:按照泥炭土:沙子＝2:1(体积比)的比例进行混合。

[0075] 如无特殊说明,以下实施例中无菌苗的诱导以及继代培养条件均为24～26℃、光

照12h/d、光照强度2500～3500lx。

[0076] 实施例1

[0077] 用于初代培养的培养基1中BA、NAA以及TDZ含量对鱼木初代培养的影响试验

[0078] 试验设置试验组1～6，试验组1～6中，所述用于继代培养的培养基2为：以MS培养基为基础培养基，还添加有6-苄基腺嘌呤0.5mg/L、萘乙酸0～0.1mg/L、赤霉素0～0.5mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述用于壮苗的培养基3为：以MS培养基为基础培养基，还添加有蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述用于生根的培养基4为：以1/2～1MS培养基为基础培养基，还添加有吲哚丁酸0.5～1.5mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述基质为：体积比为2:1的泥炭土和沙子混合而成的基质；所述用于初代培养的培养基1中，蔗糖的含量为25～35g/L，琼脂的含量为：6.5～7.5g/L。

[0079] 试验组1～6中所用培养基套盒中，所述用于继代培养的培养基2、用于壮苗的培养基3、用于生根的培养基4和基质均相同，所述用于初代培养的培养基1中蔗糖和琼脂的含量也均相同。试验组1～6中所用培养基套盒的唯一区别在于用于初代培养的培养基1中BA、NAA和TDZ含量不同，分别如下：

[0080]

组别	BA 含量（mg/L）	NAA 含量(mg/L)	TDZ 含量（mg/L）
试验组 1	0.5	0.1	0
试验组 2	0.5	0.1	0.1
试验组 3	1.0	0.1	0
试验组 4	1.0	0.1	0.1

[0081]

试验组 5	2.0	0.1	0
试验组 6	2.0	0.1	0.1

[0082] 试验组1～6均采用以下方法(备注：如无特殊说明，以下实施例中所述的鱼木离体繁殖的方法均采用此方法)：

[0083] 2015年10月取鱼木的地下根经沙埋后长出的当年生半木质化幼苗为外植体，外植体腋芽经离体初代萌发、继代、壮苗、生根和移栽，具体步骤如下：

[0084] (1)外植体的选取：2015年10月28号，取鱼木母株的地下根(优选鱼木健壮母株的粗度为0.5～2厘米的侧根)在温室里进行沙埋处理，并浇灌足够的水。7天后可见幼芽萌发。45天后可获得半木质化的幼苗。

[0085] (2)外植体无菌处理及初代培养：在2015年12月15日，用剪刀剪取半木质化幼苗的茎枝，去掉其叶片，切成1～2cm的带1个腋芽的茎段为外植体。在超净工作台上，用75％酒精浸泡30～60s，无菌水清洗干净，再用质量百分比浓度为0.08～0.12％的升汞溶液浸泡10～15min，无菌水清洗6～8次，无菌滤纸吸干表面水分。直接接种于用于初代培养的培养基1上诱导腋芽萌发。30天后腋芽萌发率接近100％，芽增殖倍率为3.8～6.35，植株高约3-4厘米(见图1)。

[0086] (3)第一次继代培养：将初代培养的非玻璃化植株剪切为带1个节的茎段，高度约

为2cm，接种于用于继代培养的培养基2上，一共培养了30个茎段。培养30天后芽增殖倍率为9.95～12、玻璃化率为54.9%～74.23%。

[0087] (4)第二次继代培养：将第一次继代的植株剪切为带1个节的茎段，高度约为2cm，接种于用于继代培养的培养基2上，一共培养了30个茎段。培养30天后芽增殖倍率为6.80～9.75、玻璃化率为68%～77.25%。

[0088] (5)第三次继代培养：将第二次继代的植株剪切为带1个节的茎段，高度约为2cm，接种于用于继代培养的培养基2上，一共培养了30个茎段。培养30天后芽增殖倍率为2.51～3.02、玻璃化率为77.93%～86.15%。

[0089] (6)壮苗：玻璃化植株用于壮苗的培养基3，上培养可玻璃化程度减轻为20%，茎段伸长、叶色深绿、生长健壮、叶柄处带有芽点，符合生根和成苗要求。

[0090] (7)生根：切取长约3-4cm，生长健壮的茎段，接种于用于生根的培养基4上，30天后生根率92%，生根系数为6.33，植株叶色深绿，根粗壮，长达1-3cm，符合移栽要求。

[0091] (8)移栽：将生根诱导后的植株经过炼苗驯化后从培养瓶中取出，用自来水小心冲洗其根附着的培养基，然后移栽于基质1中。移栽40天后统计成活率为100%。

[0092] 采用如上所述方法分别使用试验组1～6所述用于初代培养的培养基1进行鱼木初代培养试验，试验结果如下表2所示。

[0093] 表2：不同浓度的BA、NAA以及TDZ对鱼木初代培养的影响

[0094]

处理	茎段数量（个）	无菌苗量	侧芽萌发率/%	培养30天后的增殖倍率	生长状况
试验组1	30	30	100	3.88	植株翠绿，细弱，叶片舒展
试验组2	30	30	100	4.11	植株粗壮，翠绿，叶片舒展
试验组3	30	30	100	5.29	植株较多芽点，密黄，少数叶片舒展
试验组4	30	30	100	6.35	植株较多芽点，密黄，未见舒展叶片
试验组5	30	30	100	5.57	植株较多芽点，密黄，未见舒展叶片
试验组6	30	30	100	4.38	植株较多芽点，密黄，未见舒展叶片

[0095] 由表2可知，在培养30d后处理的各外植体侧芽均可萌发，且萌发率均为100%，然而增殖系数却有显著差异。在BA浓度范围为0.5～2.0mg/L时，芽增殖系数随着BA浓度的升高而增加，但当BA浓度为1.0mg/L以上时(例如，试验组5和试验组6)，芽增殖系数将不再显著增加。最高的芽增殖系数配方为：BA 1.0mg/L+NAA 0.1mg/L+TDZ 0.1mg/L(试验组4)，可达6.35，但叶片皱缩，部分出现玻璃化的现象。虽然在BA 0.5mg/L+NAA 0.1mg/L+TDZ 0.1mg/L(试验组2)的培养基上培养外植体其芽增殖系数最低，仅为4.11，但叶片翠绿舒展，长势较好，可以用于进一步的继代增殖。

[0096] 实施例2

[0097] 用于继代培养的培养基2中BA、NAA以及GA_3含量对鱼木继代培养，以及继代次数对鱼木丛生芽繁殖的影响试验

[0098] 试验设置试验组1～4，试验组1～4中，所述用于初代培养的培养基1为：以MS培养基为基础培养基，还添加有6-苄基腺嘌呤0.5～2mg/L、萘乙酸0.1mg/L、噻苯隆0～0.1mg/L、

蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基;所述用于壮苗的培养基3为:以MS培养基为基础培养基,还添加有蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基;所述用于生根的培养基4为:以1/2～1MS培养基为基础培养基,还添加有吲哚丁酸0.5～1.5mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基;所述基质为:体积比为2:1的泥炭土和沙子混合而成的基质;所述用于继代培养的培养基2中,蔗糖的含量为25～35g/L,琼脂的含量为:6.5～7.5g/L。

[0099] 试验组1～4中所用培养基套盒中,所述用于初代培养的培养基1、用于壮苗的培养基3、用于生根的培养基4和基质均相同,所述用于继代培养的培养基2中蔗糖和琼脂的含量也均相同。试验组1～4中所用培养基套盒的唯一区别在于用于初代培养的培养基1中BA、NAA和GA_3含量不同,分别如下

[0100]

组别	BA含量(mg/L)	NAA含量(mg/L)	GA_3含量(mg/L)
试验组1	0.5	0	0
试验组2	0.5	0.01	0
试验组3	0.5	0.1	0
试验组4	0.5	0.1	0.5

[0101] 试验组1～4均采用实施例1中所述的方法进行鱼木离体繁殖:

[0102] 采用如上所述方法分别使用试验组1～4所述用于继代培养的培养基2进行鱼木继代培养试验,试验结果如下表3所示。

[0103] 表3

[0104]

处理	接种的芽体数(个)	第一次继代		第二次继代		第三次继代	
		芽增殖系数	玻璃化率(%)	芽增殖系数	玻璃化率(%)	芽增殖系数	玻璃化率(%)
试验组1	60	9.95	67.44	7.55	68.75	2.55	77.93
试验组2	60	12.09	74.23	9.75	77.25	3.02	85.57

[0105]

试验组3	60	11.10	59.67	7.90	77.25	2.91	83.88
试验组4	60	11.83	54.90	6.80	74.25	2.51	86.15

[0106] 由表3可知,将初代的无菌腋芽转接于继代培养基培养5天后便可见所有芽均可萌发,萌发率为100%。在培养20天左右可见大量丛生芽(图2)。在第一次继代处理时,在含有BA与NAA配比的培养基中培养的外植体芽增殖系数显著高于单一含BA培养基(试验组1)的,可达12.09,且BA与NAA配比为5时的玻璃化率显著低于其他处理组的,最低54.9%,然而BA 0.5mg/L+NAA 0.1mg/L(试验组3)与BA 0.5mg/L+NAA 0.01mg/L(试验组2)处理的芽增殖系数的差异不显著,前者仅略高于后者。且添加GA_3(试验组4)对芽增殖系数与玻璃化率无显著作用。与第一次继代不同,在第二次继代时,BA 0.5mg/L+NAA 0.01mg/L(试验组2)处理的芽增殖系数最高,达9.75,但显著低于第一次继代培养的,且玻璃化率在各个处理中无显著差异,并均高于第一次继代的。当培养继代到第三代后的植株茎枝黄弱,芽增殖系数显著降低,而玻璃化率显著高于前几次继代。可知植物激素在芽体内的积累对芽增殖系数与玻璃化率具有影响,随着继代次数的增加,芽增殖系数呈先增加后降低的趋势,玻璃化率则明显

增加。综合考虑芽增殖系数与玻璃化率等因素，外植体应在含有BA 0.5mg/L+NAA 0.1mg/L的培养基中继代培养1～2次即可。

[0107] 实施例3

[0108] 用于壮苗的培养基3对鱼木的玻璃化苗的影响试验

[0109] 采用实施例1中所述的方法进行鱼木离体繁殖，其中，所述用于初代培养的培养基1为：以MS培养基为基础培养基，还添加有6-苄基腺嘌呤0.5～2mg/L、萘乙酸0.1mg/L、噻苯隆0～0.1mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述用于继代培养的培养基2为：以MS培养基为基础培养基，还添加有6-苄基腺嘌呤0.5mg/L、萘乙酸0～0.1mg/L、赤霉素0～0.5mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述用于壮苗的培养基3为：以MS培养基为基础培养基，还添加有蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述用于生根的培养基4为：以1/2～1MS培养基为基础培养基，还添加有吲哚丁酸0.5～1.5mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述基质为：体积比为2:1的泥炭土和沙子混合而成的基质。用于壮苗的培养基3的壮苗结果如下表4所示。

[0110] 表4

[0111]

处理	接种时的玻璃化率/%	接种个数	培养 30 天后的玻璃化率/%	植株生长情况
MS+琼脂+蔗糖（用于壮苗的培养基 3）	100	100	20	茎段伸长、叶色深绿、茎杆粗壮植株生长健壮、

[0112] 由表4可知，相比较接种时100％的玻璃化率，经过壮苗培养30天后，植株的玻璃化程度得到了显著的降低，所得到的植株茎段伸长、叶色深绿、茎杆粗壮叶柄处带有芽点，符合生根和成苗要求(图4)。

[0113] 实施例4

[0114] 用于生根的培养基4对鱼木的生根诱导的影响试验

[0115] 试验设置试验组1～6，试验组1～6中，所述用于初代培养的培养基1为：以MS培养基为基础培养基，还添加有6-苄基腺嘌呤0.5～2mg/L、萘乙酸0.1mg/L、噻苯隆0～0.1mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述用于继代培养的培养基2为：以MS培养基为基础培养基，还添加有6-苄基腺嘌呤0.5mg/L、萘乙酸0～0.1mg/L、赤霉素0～0.5mg/L、蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述用于壮苗的培养基3为：以MS培养基为基础培养基，还添加有蔗糖25～35g/L以及琼脂6.5～7.5g/L的培养基；所述基质为：重量比为2:1的泥炭土和沙子混合而成的基质；所述用于生根的培养基4中，蔗糖为25～35g/L，琼脂为6.5～7.5g/L。

[0116] 试验组1～6中所用培养基套盒中，所述用于初代培养的培养基1、用于继代培养的培养基2、用于壮苗的培养基3和基质均相同，所述用于生根的培养基4中蔗糖和琼脂的含量也均相同。试验组1～6中所用培养基套盒的唯一区别在于用于生根的培养基4中基本培养基大量元素成分、IBA含量不同，分别如下

[0117]

组别	MS 种类	IBA 含量（mg/L）
试验组 1	1/2MS	0.5

[0118]

试验组 2	MS	0.5
试验组 3	1/2MS	1.0
试验组 4	MS	1.0
试验组 5	1/2MS	1.5
试验组 6	MS	1.5

[0119] 试验组1～6均采用实施例1中所述的方法进行鱼木离体繁殖：

[0120] 采用如上所述方法分别使用试验组1～6所述用于生根的培养基4进行鱼木生根诱导试验，试验结果如下表5所示。

[0121] 表5

[0122]

组别	生根率/%		生根系数/条·株-1		根生长状况
	玻璃化植株	半木质化植株	玻璃化植株	半木质化植株	半木质化植株
试验组 1	0	76.10	0	2.62	根短小，侧根较多
试验组 2	0	73.67	0	2.00	根细长，侧根较少
试验组 3	0	87	0	5.55	根短小，侧根都较多
试验组 4	0	85.15	0	3.39	根粗长，侧根较少
试验组 5	0	92	0	6.33	根粗长，侧根较多
试验组 6	0	86.5	0	4.00	根粗长，侧根较多

[0123] 此生根培养分为玻璃化苗与半木质化苗的生根培养。由表5可知，玻璃化苗无论在哪个生根培养基内均未出现生根现象，并且在培养10d之后植株均出现叶片黄花脱落的现象，在培养30d后整个植株黄化死亡，说明玻璃化苗不适合用于生根培养。对于半木质化苗，在培养7d之后，含有1.5mg/L IBA浓度处理组的小苗最先出现生根现象(以根长0.1cm为标准)，而在培养9～12d的时候，其它的处理组小苗才开始陆续的生根。在开始生根的过程中，各个处理组都出现不同程度的落叶现象。在培养40d后观察可知，当IBA浓度在0.5～1.5mg/L的范围时，生根率与生根系数与IBA浓度呈正比关系，IBA浓度越高则生根率与生根系数越高。在1/2MS+IBA1.5 mg/L(试验组5)的处理中生根率与生根系最高，分别可达92％与6.33。值得注意的是，在IBA浓度相同时，生根状态在1/2MS培养基与MS培养基培养中相比，前者根短小而密，后者根比较粗长，但生根系数较小。可知生根率主要取决于IBA浓度，而生根系数受IBA浓度和培养基中大量元素浓度的共同作用。

[0124] 最后所应当说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制，尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

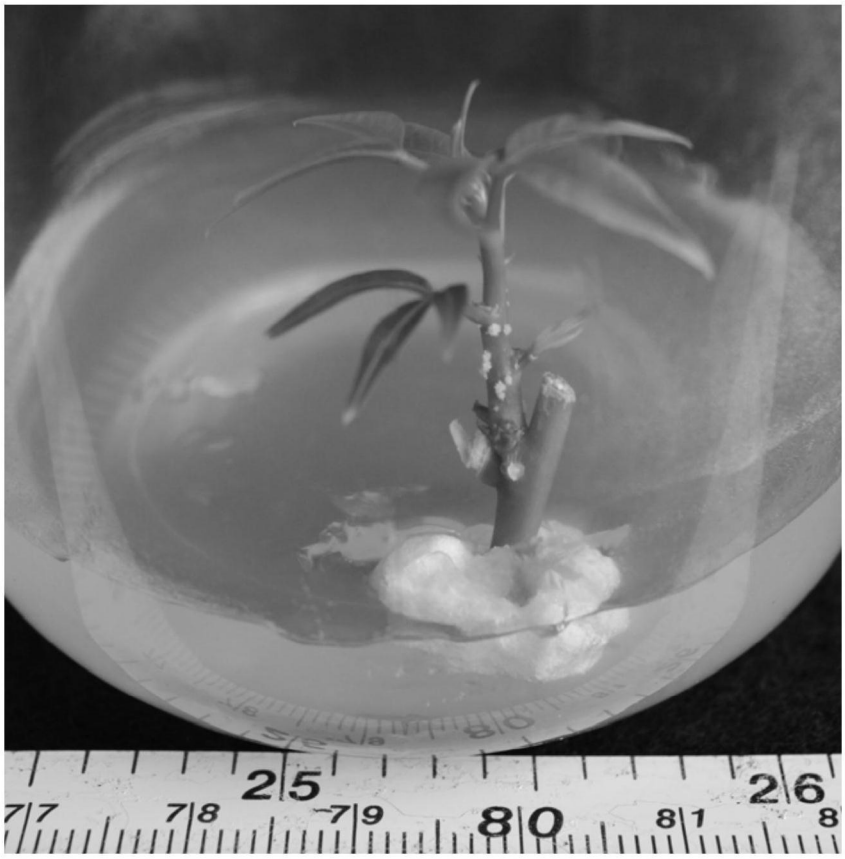

图1



图2

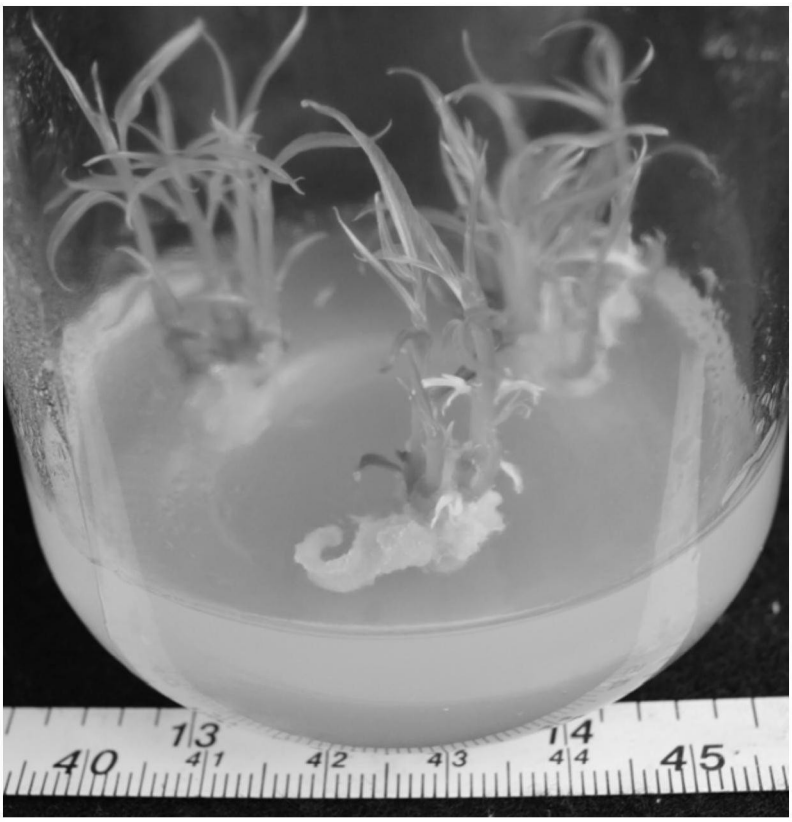

图3

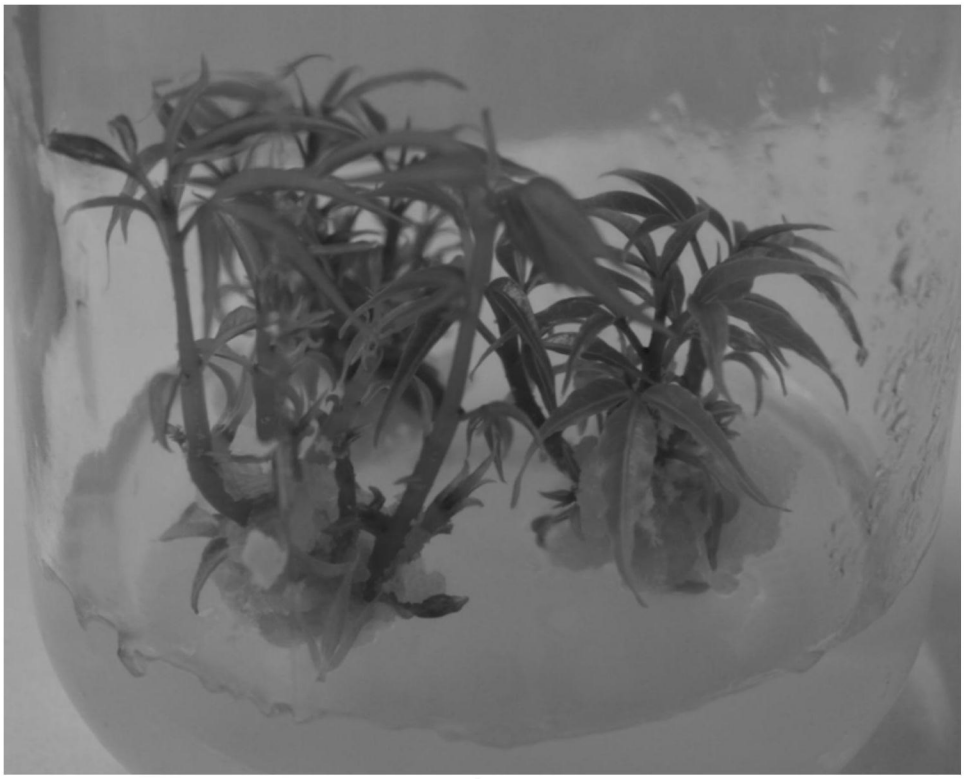

图4

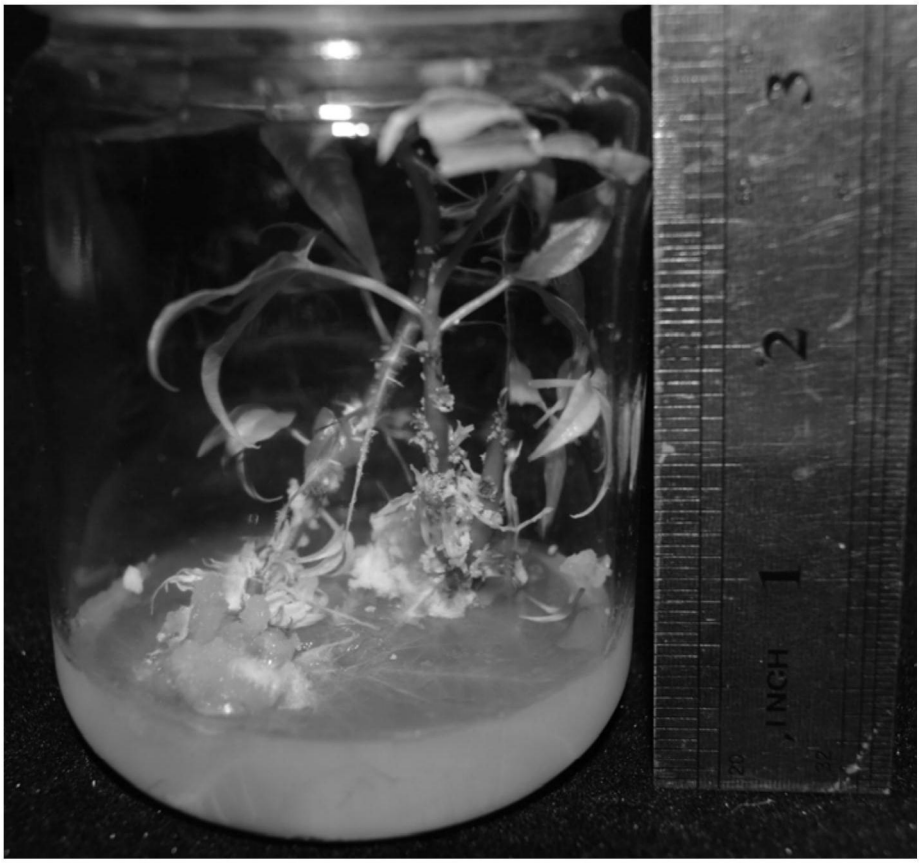

图5



图6