



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108668892 A

(43)申请公布日 2018.10.19

(21)申请号 201810343582.1

(22)申请日 2018.04.17

(71)申请人 北华大学

地址 132013 吉林省吉林市滨江东路3999号

(72)发明人 程广有 唐晓杰 林蔚

(74)专利代理机构 北京国坤专利代理事务所  
(普通合伙) 11491

代理人 郭伟红

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

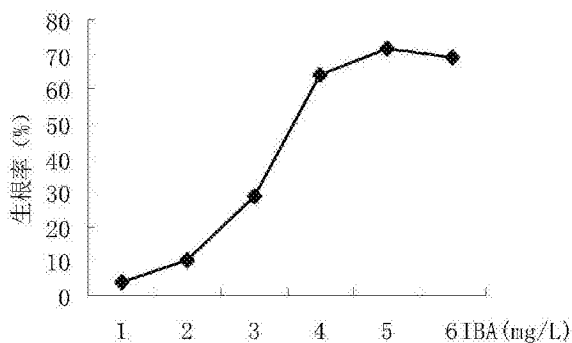
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

## (54)发明名称

东北红豆杉组培苗生根方法

## (57)摘要

本发明公开了一种东北红豆杉组培苗生根方法,包括以下步骤:取东北红豆杉组培苗,无菌条件下用无菌水清洗后接种到一号培养基中培养一周,然后将组培苗转移到二号培养基;组培苗在二号培养基中培养一周后转移到三号培养基;组培苗在三号培养基中培养一周后转移到四号培养基;组培苗在四号培养基中培养两周后陆续生根。本发明先通过液体培养基振荡培养,促进组培苗中的生根抑制物质释放排出,然后再使用固体培养基静置培养,培养基中添加促进生根物质,使组培苗内激素平衡改变,促进生根的生长调节物质含量增加,不定根诱导被启动。生根时间短,生根率高,解决了东北红豆杉诱导生根困难的问题。



1. 一种东北红豆杉组培苗生根方法,其特征在于,包括以下步骤:取东北红豆杉组培苗,无菌条件下用无菌水清洗后接种到一号培养基中培养一周,然后将所述组培苗转移到二号培养基;所述组培苗在所述二号培养基中培养一周后转移到三号培养基;所述组培苗在所述三号培养基中培养一周后转移到四号培养基;所述组培苗在所述四号培养基中培养两周后陆续生根;

所述一号培养基包括:无菌水和0.1mg/LIBA;

所述二号培养基包括:不含琼脂的1/4MS培养基和0.1mg/LIBA;

所述三号培养基包括:不含琼脂的1/4MS培养基和0.2mg/LIBA;

所述四号培养基包括:含琼脂的1/4MS培养基、0.2mg/LIBA、2%蔗糖和活性炭粉末5g/L。

2. 如权利要求1所述的一种东北红豆杉组培苗生根方法,其特征在于,所述一号培养基、所述二号培养基、所述三号培养基和所述四号培养基pH值均为5.8。

3. 如权利要求2所述的一种东北红豆杉组培苗生根方法,其特征在于,所述一号培养基、所述二号培养基和所述三号培养基均置于振荡培养箱内振荡培养。

4. 如权利要求3所述的一种东北红豆杉组培苗生根方法,其特征在于,所述四号培养基置于培养室培养架上培养。

5. 如权利要求4所述的一种东北红豆杉组培苗生根方法,其特征在于,在所述一号培养基、所述二号培养基和所述三号培养基中的培养条件相同,均为:培养温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照强度3000-4000lx,光照时间14h。

6. 如权利要求5所述的一种东北红豆杉组培苗生根方法,其特征在于,在所述培养室培养架上的培养条件为:培养温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照强度3000-4000lx,光照时间14h。

7. 如权利要求1所述的一种东北红豆杉组培苗生根方法,其特征在于,取高度2cm以上的组培苗,无菌条件下用无菌水清洗组培苗,然后接种到一号培养基中。

## 东北红豆杉组培苗生根方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物组培领域,特别涉及一种东北红豆杉组培苗生根方法。

### 背景技术

[0002] 东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)属红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)常绿针叶乔木。东北红豆杉天然种群数量的稀少,被列为国家一级重点保护的野生珍稀濒危植物。

[0003] 选择具有初生分生能力的红豆杉组织(嫩枝、顶芽、腋芽、茎尖、离体胚等),经体外培养可直接诱导发芽或生根,可以形成完整植株。影响外植体芽诱导效率的因素主要有种属、取材季节、部位、培养基配比、外源激素浓度,常选用WPM、B5、MS、DCR等作基本培养基,为防止褐变,可添加0.2%-0.5%的活性炭粉(AC)。以枝条为外植体时,多选用处于生长旺盛期或长有营养芽的嫩枝,这样有利于茎芽的诱导增殖。激素对比对诱导结果影响较大,但遵循愈伤组织诱导及有利于生根。目前尚未见系统的诱导红豆杉外植体生根发芽最佳条件的报道,研究结果主要集中于芽的诱导,如用TIBA(2,3,5-三碘苯甲酸)诱导南方红豆杉新梢,3.0mg/L时诱导率可达100%,另外单独添加0.1mg/LZT和0.01mg/L6-BA时效果也十分理想;而关于红豆杉外植体诱导生根方面的研究则不如芽诱导那么丰富,当前技术只能保证可以诱导出不定根,如喜马拉雅红豆杉的枝条在添加3.5mg/LIBA的MS和8mg/LIBA的1/2MS培养基上培养,60-80d后可诱导生根。总的来说,分裂素浓度控制在1-4mg/L利于出芽,而生根则受外植体树龄和IBA影响较大,且诱导生根困难。红豆杉组培苗的生根还有待进一步研究。

### 发明内容

[0004] 为了解决现有技术的问题,本发明实施例提供了一种东北红豆杉组培苗生根方法。所述技术方案如下:

[0005] 一方面,一种东北红豆杉组培苗生根方法,包括以下步骤:取东北红豆杉组培苗,无菌条件下用无菌水清洗后接种到一号培养基中培养一周,然后将组培苗转移到二号培养基;组培苗在二号培养基中培养一周后转移到三号培养基;组培苗在三号培养基中培养一周后转移到四号培养基;组培苗在四号培养基中培养两周后陆续生根;

[0006] 一号培养基包括:无菌水和0.1mg/L IBA(吲哚丁酸);

[0007] 二号培养基包括:不含琼脂的1/4MS培养基和0.1mg/LIBA;

[0008] 三号培养基包括:不含琼脂的1/4MS培养基和0.2mg/LIBA;

[0009] 四号培养基包括:含琼脂的1/4MS培养基、0.2mg/LIBA、2%蔗糖和活性炭粉末5g/L。

[0010] 进一步的,一号培养基、二号培养基、三号培养基和四号培养基pH值均为5.8。

[0011] 进一步的,一号培养基、二号培养基和三号培养基均置于振荡培养箱内振荡培养。

[0012] 进一步的,四号培养基置于培养室培养架上培养。

[0013] 进一步的,在一号培养基、二号培养基和三号培养基中的培养条件相同,均为:培

养温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照强度3000-4000lx,光照时间14h。

[0014] 进一步的,在培养室培养架上的培养条件为:培养温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照强度 3000-4000lx,光照时间14h。

[0015] 进一步的,取高度2cm以上的组培苗,无菌条件下用无菌水清洗后接种到一号培养基中。

[0016] 本发明实施例提供的技术方案带来的有益效果是:本发明的东北红豆杉组培苗生根方法,先通过液体培养基振荡培养,促进组培苗中的生根抑制物质释放排出,然后再使用固体培养基静置培养,培养基中添加促进生根物质,使组培苗内激素平衡改变,促进生根的生长调节物质含量增加,不定根诱导被启动。本发明的方法生根时间短,生根率高,解决了东北红豆杉诱导生根困难的问题,为东北红豆杉繁育工作的研究提供了基础。

## 附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例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的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0018] 图1是本发明实施例1中IBA浓度对生根率的影响结果图。

## 具体实施方式

[0019] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明实施方式作进一步地详细描述。

[0020] 实施例1

[0021] 一、培养基种类与东北红豆杉组培苗生根

[0022] 分别用MS培养基、White培养基和改良的MS培养基为基本培养基,各培养基中均添加 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吲哚丁酸, $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖,调整培养基 $\text{pH}=5.5$ 。用上述三种培养基诱导东北红豆杉组培苗生根,培养3周均未见不定根发生。

[0023] 二、营养物质与东北红豆杉组培苗生根

[0024] MS培养基中营养物质含量分别为:MS(正常营养物质含量)、1/2MS(MS 营养物质50%)和1/4MS(MS培养基营养物质25%),在各培养基中分别加入  $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖,调整培养基 $\text{pH}=5.5$ 。用上述三种培养基诱导东北红豆杉组培苗生根,培养4周时,MS和1/2MS中的组培苗均未生根,1/4MS培养基有少量东北红豆杉组培苗生根。

[0025] 三、生长调节物质与东北红豆杉生根

[0026] 东北红豆杉芽体伸长生长时,未见不定根发生。芽体停止伸长生长,部分木质化以后,才从芽体基部发生不定根。因此,常常是将芽体转移到生根培养基上,培养2个月后,甚至更长时间才开始发生不定根。

[0027] 不定根发生的形式有两种,一种是皮层直接生根,另一种是愈伤组织生根。以愈伤组织生根型居多。

[0028] 不定根发生率与激素种类和浓度有着密切的关系。诱导不定根实验设计: 1/2MS 分别加入吲哚丁酸IBA (0、1、2、3、4、5、6mg/L)、奈乙酸NAA (0、1、2、3、4、5、6mg/L) 和生根粉

ABT1<sup>#</sup> (0、1、2、3、4、5、6mg/L), 加入 2% 蔗糖, 培养基酸碱度为 pH5.8, 每瓶接种东北红豆杉组培芽苗 5 株, 每个处理 30 瓶。接种后至于培养室内培养, 温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 光照强度 2000-3000lx, 光照时间 12h。培养 6 周后调查不定根发生状况, 结果见表 1。

[0029] 表 1 生长调节剂诱导东北红豆杉不定根调查表

[0030]

生长调节剂用量//mg/L	生根率/%		
	IBA	NAA	ABT1 <sup>#</sup>
0	0	0	0
1	0	0	0
2	10.3	0	8.3
3	29.7	0	16.7
4	63.3	3.3	21.3
5	72.3	6.7	33.3
6	69.7	12.3	37.7

[0031] 通过表 1 可以看出, 在吲哚丁酸 (IBA)、奈乙酸 (NAA)、生根粉 ABT1<sup>#</sup> 的对比试验中, IBA 促进生根的效果好于 NAA 和 ABT1<sup>#</sup>。并且在一定浓度范围内, 芽体生根率与 IBA 浓度呈正相关, 即 IBA 含量较高时, 不定根发生率也较高。如图 1 所示, IBA 浓度在  $3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以下时, 生根率很低; IBA 质量浓度为  $4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 生根率迅速增大, 在  $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时达最大 (72.3%)。

[0032] 由于生根所需要的时间较长, 培养物褐变现象很普遍, 芽体轻度褐变并未影响不定根的发生。将培养物不断转移到新鲜培养基中, 或者在培养基中加入适量的活性炭 (0.5%), 可在一定程度上减少褐色分泌物含量, 促进生根。

[0033] 综上, 东北红豆杉幼嫩芽体, 不定根发生较缓慢, 通常是先在基部形成大量愈伤组织, 并且随着培养时间的延长, 大部分愈伤组织发生褐变。产生褐变的原因主要是培养物分泌大量酚类物质的原故, 这些酚类物质抑制不定根的发生。从本试验结果看, 愈伤组织生根型较多, 可能是生长素用量较高的缘故。愈伤组织生根型移栽成活率较皮层生根型低。从树龄较小的母树上剪取的芽体, 不定根发生率较高。从 1 年生的植株上剪取的外植体生根率高达 83%, 而母树年龄为 30a 时, 外植体生根率仅为 41%。说明东北红豆杉个体发育状况影响外植体的生根, 即存在较强的年龄效应。在进行组织培养或扦插繁殖时, 从幼小的植株上剪取外植体, 可以提高不定根发生率。同时, 用来诱导不定根的芽体太幼嫩不利于生根, 需要部分木质化之后, 才能发生不定根。在生根培养基中加入适宜的激素可以促进不定根的发生。低浓度的 IBA 促进生根效果不明显, 这可能与芽体生根时间较长有关。

[0034] 实施例 2

[0035] 1、培养基准备

[0036] ①液体培养基

[0037] 一号培养基: 无菌水 + 0.1mg/LIBA。

[0038] 二号培养基: 1/4MS (无琼脂) + 0.1mg/LIBA。

[0039] 三号培养基:1/4MS(无琼脂)+0.2mg/LIBA。

[0040] ②固体培养基

[0041] 四号培养基:1/4MS(有琼脂)+0.2mg/LIBA+蔗糖2%+活性炭粉末5g/L。

[0042] 将上述一号至四号培养基的酸碱度均调节至pH5.8,并在121℃下灭菌 18min,冷却备用。

[0043] 2、不定根诱导

[0044] 选择较粗壮的无根东北红豆杉组培苗,高度2cm以上,在超净工作台上,取出选择的组培苗,利用无菌水洗净组培苗上黏附的培养基。然后将组培苗接种到一号培养基中,每瓶接种5-6株无根组培苗,盖上培育瓶盖,放在振荡培养箱内振荡培养,培养温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,光照强度3000-4000lx,光照时间14h。

[0045] 培养一周后,将组培苗转移到二号培养基中,置于振荡培养箱中,采用与一号培养基相同的培养条件振荡培养。

[0046] 在二号培养基中培养一周后,将组培苗转移到三号培养基中,置于振荡培养箱中,采用与一号培养基相同的培养条件振荡培养。

[0047] 在三号培养基中培养一周后,将组培苗转移到四号培养基中,放在培养室内培养架上培养,培养温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,光照强度3000-4000lx,光照时间14h。

[0048] 在四号培养基中培养二周后,组培苗陆续生根,四周后生根率达到96%。

[0049] 东北红豆杉组培苗生根率低的主要原因是植株内还有抑制生根物质,比如脱落酸、分类物质等,这些抑制生根的物质易溶于水。将东北红豆杉组培苗接种到液体培养基进行诱导不定根实验,接种后3天,培养基中开始出现褐色物质,说明东北红豆杉组培苗向培养基中释放了分泌物。其中一部分生根抑制物从组培苗中释放出来。震荡培养既可以加快这些物质的释放,又能够增加培养基中的氧含量,而氧气是植物生根所必须的。同时,培养基中的促进生根物质——吲哚丁酸被组培苗吸收。抑制生根物质排出与促进生根物质吸入,导致东北红豆杉组培苗内激素平衡改变,促进生根的生长调节物质含量增加,不定根诱导被启动。

[0050] 本发明的东北红豆杉组培苗生根方法,先通过液体培养基振荡培养,促进组培苗中的生根抑制物质释放排出,然后再使用固体培养基静置培养,培养基中添加促进生根物质,使组培苗内激素平衡改变,促进生根的生长调节物质含量增加,不定根诱导被启动。本发明的方法生根时间短,生根率高,解决了东北红豆杉诱导生根困难的问题,为东北红豆杉繁育工作的研究提供了基础。

[0051] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

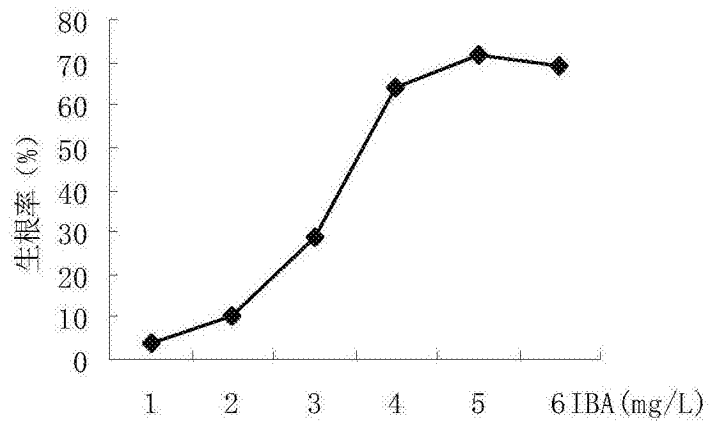


图1