



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101112174 B

(45) 授权公告日 2010.08.18

(21) 申请号 200710070993.X

(22) 申请日 2007.08.23

(73) 专利权人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市石桥路 198 号

(72) 发明人 徐刚 汪一婷 牟豪杰 吕永平
陈剑平

(74) 专利代理机构 杭州九洲专利事务所有限公
司 33101

代理人 陈继亮

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

C12N 5/04(2006.01)

A01G 31/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1541518 A, 2004.11.03, 全文.

EP 1070450 A1, 2001.01.24, 全文.

CN 1586167 A, 2005.03.02, 全文.

徐程等. 中国兰的组织培养. 植物生理学通

讯 38 2. 2002, 38(2), 第 172 页右栏第 11 行 - 第 14 行.

刘春等. 袋鼠花的组织培养. 园艺学报 30
1. 2003, 30(1), 第 113 页第 2.1 消毒试剂与消毒
时间.

乔保健等. 6-BA 和 NAA 对袋鼠花组织培
养特性的影响. 西北农林科技大学学报 32
8. 2004, 32(8), 第 57 页左栏倒数第 2 行 - 右栏第
18 行.

李红等. 袋鼠花的组织培养和快速繁殖. 植
物生理学通讯 39 4. 2003, 39(4), 第 340 页左栏
第 4 行 - 第 13 行, 第 15 行 - 右栏第 9 行.

审查员 王颖

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种袋鼠花组培快繁的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种袋鼠花组培快繁的方法,按如下步骤进行:1) 培养基的配制,包括基本培养基和组培各阶段培养基的各组分;2) 外植体的选取;3) 外植体预处理;4) 外植体灭菌;5) 诱导培养:接入诱导培养基上进行诱导培养,诱导出幼芽;6) 增殖培养:转接到增殖培养基上进行增殖培养,分化出丛芽;7) 壮苗培养;8) 生根培养:将从芽切成单株接种到生根培养基上;9) 组培苗的驯化与移栽。本发明的有益效果是:采用了适合袋鼠花组培快繁的诱导培养基、增殖培养基、壮苗培养基和生根培养基及快繁方法,芽的诱导率达 90% 以上,生根率达 100%;移栽成活率 90% 以上;有效地防止了外植体和组培苗的褐变现象,促进了组培苗的分化和生长。

CN 101112174 B

1. 一种袋鼠花组培快繁的方法,其特征在于:该方法按以下步骤进行:

1)、培养基的配制,包括基本培养基及分别适用于不同组培阶段的培养基,基本培养基与各阶段培养基添加物含量为:

(1) 基本培养基:MS 或 3/4MS 或 1/2MS,其中蔗糖或白糖 20 ~ 30g/L,琼脂 7 ~ 9g/L, pH5.8;

(2) 诱导培养基:MS+6-BA2 ~ 5mg/L+IAA0.1 ~ 0.5mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L;

(3) 增殖培养基:MS+6-BA1 ~ 3mg/L+IAA0.1 ~ 0.3mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L;

(4) 壮苗培养基:3/4MS+6-BA0.5 ~ 2mg/L+IAA0.05 ~ 0.2mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L;

(5) 生根培养基:1/2MS+NAA0.1 ~ 1.0mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L;

2)、外植体的选取:选择长势、开花性状均表现良好,具有繁育品种典型性状的袋鼠花植株作为外植体来源,在分蘖生长旺盛季节,晴天早晨的9点~10点取高10~20cm、健壮、无病虫害的幼嫩侧芽作为外植体材料;

3)、外植体预处理:将取得的幼嫩侧芽,剥去外叶,剪去上部叶片,整理成1.0~1.5cm长的外植体,在加有体积比为1%洗洁精的自来水中漂洗,然后再用自来水冲洗20~40min;

4)、外植体灭菌:将外植体预处理后洗净的幼芽,先在含有体积比为10%的柠檬酸和体积比为15%的抗坏血酸的混合溶液中浸泡0.5~1小时,再用体积比为75%的酒精浸泡0.5~1.0min,用无菌水冲洗1次,再用体积比为2%的次氯酸钠水溶液灭菌10~15min,最后用无菌水冲洗3~5次;

5)、诱导培养:将灭菌处理后的外植体放在灭菌过的滤纸上吸干水分,用解剖刀再剥去外叶,切去上部叶,留0.3~0.6cm长的外植体,接入诱导培养基上进行诱导培养,外植体诱导培养20~30天后,诱导出幼芽;

6)、增殖培养:待幼芽长到1~5cm时,转接到增殖培养基上进行增殖培养,培养30~45天分化出丛芽;每隔30~45天,将分化的丛芽切成单株再接种在增殖培养基上,再分化出丛芽;

7)、壮苗培养:将分化出的丛芽切成单株接种到壮苗培养基上,20~30天后,幼苗株高生长达2~5cm;

8)、生根培养:将生长达2~5cm丛芽切成单株接种到生根培养基上,20~30天后,幼苗基部长出数根根系;

9)、组培苗的驯化与移栽:当生根培养20~30天时,将生长达3~7cm以上的生根幼芽,移至常温下适应3~5天后,打开盖子再适应3~5天,洗清根部培养基后移栽入装有泥炭:珍珠岩:蛭石的体积比为4:2:1基质的穴盘中,最后浇一次透水;

所述的各组培阶段的培养条件是:在诱导培养阶段:温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、暗培养;在增殖培养、壮苗培养和生根培养阶段:温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、光照12h/d、光照强度为 $2000\text{l}\times \sim 3000\text{l}\times$ 。

2. 根据权利要求1所述的袋鼠花组培快繁的方法,其特征在于:所述的培养基,包括基本培养基和组培各阶段培养基的各组分与每升所含重量为:

(1) 基本培养基:MS 或 3/4MS 或 1/2MS,其中蔗糖或白糖 20 ~ 30g/L,琼脂 7 ~ 9g/L, pH5.8;

(2) 诱导培养基:MS+6-BA3mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 3g/L;

- (3) 增殖培养基 :MS+6-BA2mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 1g/L ;
- (4) 壮苗培养基 :3/4MS+6-BA1.0mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 1g/L ;
- (5) 生根培养基 :1/2MS+NAA0.3mg/L+ 活性炭 1g/L。

一种袋鼠花组培快繁的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物组织培养技术领域,主要是一种袋鼠花组培快繁的方法。

背景技术

[0002] 袋鼠花 (*Anigozanthos flavidus*) 是血皮草科 (*Haemodaceae*) 的温带多年生草本植物,为澳洲的特有种。其株高多为 1 米,花型独特,整朵花呈奇妙的爪形,红色(黄色)花茎上绽放亮绿色花瓣,如天鹅绒般美丽,是一种极佳的切花,也可园植或盆栽,是近年来才引进的新型花卉,具有较好的市场前景。但是,由于种源有限、种子寿命较短、分株繁殖系数不高,且易受季节等因素的影响,不利于种苗的大规模繁殖。

[0003] 浙江省农业科学院从澳大利亚引进袋鼠花新品种,拟通过植物组织培养技术大量繁殖种苗,然后出口欧美国家。同时还可以在国内试种后加以推广。采用植物组织培养方法可以在短期内快速繁殖多种植物,不仅繁殖率高,且因为其是无性繁殖,可以保持原繁殖母株的优良性状,近年来在生产上应用越来越广。但是不同的植物利用植物组织培养方法繁殖种苗的难易程度是不同的,在袋鼠花的前期组培试验中,出现外植体接种污染率高、外植体易褐化、组培苗易褐化、移栽成活率低等问题,使其无法实现大规模工厂化生产。

发明内容

[0004] 本发明要解决上述现有技术的缺陷,提供一种袋鼠花组培快繁的方法。

[0005] 本发明解决其技术问题采用的技术方案。这种袋鼠花组培快繁的方法,按如下步骤进行:

[0006] 1)、培养基的配制,包括基本培养基及分别适用于不同组培阶段的培养基组成,基本培养基与各阶段培养基添加物含量为:

[0007] (1) 基本培养基:MS 或 3/4MS 或 1/2MS,其中蔗糖或白糖 20 ~ 30g/L,琼脂 7 ~ 9g/L, pH5.8;

[0008] (2) 诱导培养基:MS+6-BA2 ~ 5mg/L+IAA0.1 ~ 0.5mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L;

[0009] (3) 增殖培养基:MS+6-BA1 ~ 3mg/L+IAA0.1 ~ 0.3mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L;

[0010] (4) 壮苗培养基:3/4MS+6-BA0.5 ~ 2mg/L+IAA0.05 ~ 0.2mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L;

[0011] (5) 生根培养基:1/2MS+NAA0.1 ~ 1.0mg/L+ 活性碳 1 ~ 3g/L;

[0012] 2)、外植体的选取:选择长势、开花性状均表现良好,具有繁育品种典型性状的袋鼠花植株作为外植体来源。在分蘖生长旺盛季节,晴天早晨的 9 点 ~ 10 点取高 10 ~ 20cm、健壮、无病虫害的幼嫩侧芽作为外植体材料;

[0013] 3)、外植体预处理:将取得的幼嫩侧芽,剥去外叶,剪去上部叶片,整理成 1.0 ~ 1.5cm 长的外植体,在加有体积比为 1%洗洁精的自来水中漂洗,然后再用自来水冲洗 20 ~ 40min;

[0014] 4)、外植体灭菌:将预处理过的材料,先用体积比为 75%的酒精浸泡 0.5 ~

1.0min,用无菌水冲洗 1 次,再用体积比为 2%的次氯酸钠水溶液灭菌 10 ~ 15min,最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次;

[0015] 5)、诱导培养:将灭菌处理后的外植体放在灭菌过的滤纸上吸干水分,用解剖刀再剥去外叶,切去上部叶,留 0.3 ~ 0.6cm 长的外植体,接入诱导培养基上进行诱导培养,外植体诱导培养 20 ~ 30 天后,诱导出幼芽。

[0016] 6)、增殖培养:待幼芽长到 1 ~ 5cm 时,转接到增殖培养基上进行增殖培养,培养 30 ~ 45 天分化出丛芽;每隔 30 ~ 45 天,将分化的丛芽切成单株再接种在增殖培养基上,再分化出丛芽;

[0017] 7)、壮苗培养:将分化出的丛芽切成单株接种到壮苗培养基上,20 ~ 30 天后,幼苗株高生长达 2 ~ 5cm;

[0018] 8)、生根培养:将生长达 2 ~ 5cm 丛芽切成单株接种到生根培养基上,20 ~ 30 天后,幼苗基部长出数根根系;

[0019] 9)、组培苗的驯化与移栽:当生根培养 20 ~ 30 天时,将生长达 3 ~ 7cm 以上的生根幼芽,移至常温下适应 3 ~ 5 天后,打开盖子再适应 3 ~ 5 天,洗清根部培养基后移栽入装有泥炭:珍珠岩:蛭石的体积比为 4 : 2 : 1 基质的穴盘中,最后浇一次透水。

[0020] 本发明采用的优化培养基,包括基本培养基及分别适用于不同组培阶段的培养基组成,基本培养基与各阶段培养基添加物含量为:

[0021] (1) 基本培养基:MS 或 3/4MS 或 1/2MS,其中蔗糖或白糖 20 ~ 30g/L,琼脂 7 ~ 9g/L, pH5.8;

[0022] (2) 诱导培养基:MS+6-BA3mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 3g/L;

[0023] (3) 增殖培养基:MS+6-BA2mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 1g/L;

[0024] (4) 壮苗培养基:3/4MS+6-BA1.0mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 1g/L;

[0025] (5) 生根培养基:1/2MS+NAA0.3mg/L+ 活性碳 1g/L。

[0026] 本发明采用的外植体灭菌是外植体预处理后洗净的幼芽,先在含有体积比为 10%的柠檬酸和体积比为 15%的抗坏血酸的混合溶液中浸泡 0.5 ~ 1 小时,再用体积比为 75%的酒精浸泡 0.5 ~ 1.0min,用无菌水冲洗 1 次,再用体积比为 2%的次氯酸钠水溶液灭菌 10 ~ 15min,最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次。

[0027] 本发明采用的各组培阶段的培养条件是:在诱导培养阶段:温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、暗培养;在增殖培养、壮苗培养和生根培养阶段:温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光照 12h/d、光照强度为 2000lx ~ 3000lx。

[0028] 本发明的有益效果是:

[0029] 1)、提出的袋鼠花组培快繁的方法,采用了适合袋鼠花组培快繁的诱导培养基、增殖培养基、壮苗培养基和生根培养基及快繁方法,芽的诱导率达 90%以上;芽的增殖率每个培养周期达 5 倍以上,年组培苗生产能力可达 100 万苗以上(一年为 8 个培养周期);经增设的壮苗培养基培养后成苗生长速度加快,20 ~ 30 天苗高可达 2 ~ 5 厘米,生根率达 100%;移栽成活率 90%以上。

[0030] 2)、该方法由于外植体采用了柠檬酸和抗坏血酸混合溶液中浸泡预处理,在诱导培养阶段采用暗培养,在培养的各个阶段在培养基中添加了活性炭,有效地防止了外植体和组培苗的褐变现象,促进了组培苗的分化和生长。

[0031] 3)、提出的组织培养快速繁殖方法得到的袋鼠花组培苗,遗传性状一致,克服了常规繁殖系数低的缺点。

具体实施方式

[0032] 通过以下实施例对本发明作进一步的详细说明,但本发明的内容并不局限于此。

[0033] 实施例 1:本实施例 1 中的这种袋鼠花组培快速繁殖方法,按如下步骤进行:

[0034] 1)、培养基的配制,包括基本培养基及分别适用于不同组培阶段的培养基组成,基本培养基与各阶段培养基添加物含量为:

[0035] (1) 基本培养基:MS 或 3/4MS 或 1/2MS,其中蔗糖或白糖 20 ~ 30g/L,琼脂 7 ~ 9g/L, pH5.8;

[0036] (2) 诱导培养基:MS+6-BA2 ~ 5mg/L+IAA0.1 ~ 0.5mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L

[0037] (3) 增殖培养基:MS+6-BA1 ~ 3mg/L+IAA0.1 ~ 0.3mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L

[0038] (4) 壮苗培养基:3/4MS+6-BA0.5 ~ 2mg/L+IAA0.05 ~ 0.2mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L

[0039] (5) 生根培养基:1/2MS+NAA0.1 ~ 1.0mg/L+ 活性炭 1 ~ 3g/L

[0040] 2)、外植体的选取:选择长势、开花性状均表现良好,具有繁育品种典型性状的袋鼠花植株作为外植体来源。在分蘖生长旺盛季节,晴天早晨的 9 点 ~ 10 点取高 10 ~ 20cm、健壮、无病虫害的幼嫩侧芽作为外植体材料。

[0041] 3)、外植体预处理:将取得的幼嫩侧芽,剥去外叶,剪去上部叶片,整理成 1.0 ~ 1.5cm 长的外植体,在加有体积比为 1%洗洁精的自来水中漂洗,然后再用自来水冲洗 20 ~ 40min;

[0042] 4)、外植体灭菌:将预处理过的材料,先用体积比为 75%的酒精浸泡 0.5 ~ 1.0min,用无菌水冲洗 1 次,再用体积比为 2%的次氯酸钠水溶液灭菌 10 ~ 15min,最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次;

[0043] 5)、诱导培养:将灭菌处理后的外植体放在灭菌过的滤纸上吸干水分,用解剖刀再剥去外叶,切去上部叶,留 0.3 ~ 0.6cm 长的外植体,接入诱导培养基上进行诱导培养,外植体诱导培养 20 ~ 30 天后,诱导出幼芽。

[0044] 6)、增殖培养:待幼芽长到 1 ~ 5cm 时,转接到增殖培养基上进行增殖培养,培养 30 ~ 45 天分化出丛芽;每隔 30 ~ 45 天,将分化的丛芽切成单株再接种在增殖培养基上,再分化出丛芽;

[0045] 7)、壮苗培养:将分化出的丛芽切成单株接种到壮苗培养基上,20 ~ 30 天后,幼苗株高生长达 2 ~ 5cm;

[0046] 8)、生根培养:将生长达 2 ~ 5cm 丛芽切成单株接种到生根培养基上,20 ~ 30 天后,幼苗基部长出数根根系;

[0047] 9)、组培苗的驯化与移栽:当生根培养 20 ~ 30 天时,将生长达 3 ~ 7cm 以上的生根幼芽,移至常温下适应 3 ~ 5 天后,打开盖子再适应 3 ~ 5 天,洗清根部培养基后移栽入装有泥炭:珍珠岩:蛭石的体积比为 4 : 2 : 1 基质的穴盘中,最后浇一次透水。

[0048] 采用的外植体灭菌是外植体预处理后洗净的幼芽,先在含有体积比 10%的柠檬酸和体积比 15%的抗坏血酸的混合溶液中浸泡 0.5 ~ 1 小时,再用体积比为 75%的酒精浸泡 0.5 ~ 1.0min,用无菌水冲洗 1 次,再用体积比为 2%的次氯酸钠水溶液灭菌 10 ~ 15min,

最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次。

[0049] 该实施例中各组培阶段的培养条件是：在诱导培养阶段：温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、暗培养；在增殖培养、壮苗培养和生根培养阶段：温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光照 12h/d、光照强度为 2000lx ~ 3000lx。

[0050] 实施例 2：本实施例 2 中的这种袋鼠花组培快速繁殖方法，按如下步骤进行：

[0051] 1)、培养基的配制，包括基本培养基及分别适用于不同组培阶段的培养基组成，基本培养基与各阶段培养基添加物含量为：

[0052] (1) 基本培养基：MS 或 3/4MS 或 1/2MS，其中蔗糖或白糖 20 ~ 30g/L，琼脂 7 ~ 9g/L，pH5.8；

[0053] (2) 诱导培养基：MS+6-BA3mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 3g/L

[0054] (3) 增殖培养基：MS+6-BA2mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 1g/L

[0055] (4) 壮苗培养基：3/4MS+6-BA1.0mg/L+IAA0.1mg/L+ 活性炭 1g/L

[0056] (5) 生根培养基：1/2MS+NAA0.3mg/L+ 活性碳 1g/L。

[0057] 2)、外植体的选取：选择长势、开花性状均表现良好，具有繁育品种典型性状的袋鼠花植株作为外植体来源。在分蘖生长旺盛季节，晴天早晨的 9 点 ~ 10 点取高 10 ~ 20cm、健壮、无病虫害的幼嫩侧芽作为外植体材料；

[0058] 3)、外植体预处理：将取得的幼嫩侧芽，剥去外叶，剪去上部叶片，整理成 1.0 ~ 1.5cm 长的外植体，在加有体积比为 1% 洗洁精的自来水中漂洗，然后再用自来水冲洗 20 ~ 40min；

[0059] 4)、外植体灭菌：将预处理过的材料，先用体积比为 75% 的酒精浸泡 0.5 ~ 1.0min，用无菌水冲洗 1 次，再用体积比为 2% 的次氯酸钠水溶液灭菌 10 ~ 15min，最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次；

[0060] 5)、诱导培养：将灭菌处理后的外植体放在灭菌过的滤纸上吸干水分，用解剖刀再剥去外叶，切去上部叶，留 0.3 ~ 0.6cm 长的外植体，接入诱导培养基上进行诱导培养，外植体诱导培养 20 ~ 30 天后，诱导出幼芽。

[0061] 6)、增殖培养：待幼芽长到 1 ~ 5cm 时，转接到增殖培养基上进行增殖培养，培养 30 ~ 45 天分化出丛芽；每隔 30 ~ 45 天，将分化的丛芽切成单株再接种在增殖培养基上，再分化出丛芽；

[0062] 7)、壮苗培养：将分化出的丛芽切成单株接种到壮苗培养基上，20 ~ 30 天后，幼苗株高生长达 2 ~ 5cm；

[0063] 8)、生根培养：将生长达 2 ~ 5cm 丛芽切成单株接种到生根培养基上，20 ~ 30 天后，幼苗基部长出数根根系；

[0064] 9)、组培苗的驯化与移栽：当生根培养 20 ~ 30 天时，将生长达 3 ~ 7cm 以上的生根幼芽，移至常温下适应 3 ~ 5 天后，打开盖子再适应 3 ~ 5 天，洗清根部培养基后移栽入装有泥炭：珍珠岩：蛭石的体积比为 3 : 1 : 1 基质的穴盘中，最后浇一次透水。

[0065] 采用的外植体灭菌是外植体预处理后洗净的幼芽，先在含有 10% 的柠檬酸和 15% 的抗坏血酸的混合溶液中浸泡 0.5 ~ 1 小时，再用体积比为 75% 的酒精浸泡 0.5 ~ 1.0min，用无菌水冲洗 1 次，再用体积比为 2% 的次氯酸钠水溶液灭菌 10 ~ 15min，最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次。

[0066] 该实施例中各组培阶段的培养条件是：在诱导培养阶段：温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、暗培养；在增殖培养、壮苗培养和生根培养阶段：温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、光照 12h/d、光照强度为 $20001\text{x} \sim 30001\text{x}$ 。

[0067] 除上述实施例外，本发明还可以有其他实施方式。凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案，均落在本发明要求的保护范围。