



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115039698 B

(45) 授权公告日 2023.05.12

(21) 申请号 202210668133.0

A01G 31/00 (2018.01)

(22) 申请日 2022.06.14

A01G 24/28 (2018.01)

A01G 24/15 (2018.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115039698 A

(56) 对比文件

CN 105850748 A, 2016.08.17

CN 1620855 A, 2005.06.01

(43) 申请公布日 2022.09.13

(73) 专利权人 广西生态工程职业技术学院

地址 545004 广西壮族自治区柳州市柳北区君武路168号

陈维伦;郭东红.银杉(*Cathaya argyrophylla*)的胚培养,愈伤组织诱导和愈伤组织上芽的分化.*Journal of Integrative Plant Biology*.1981,(第03期),第249-250页.

(72) 发明人 买凯乐 李荣珍 朱昌叁 冯立新

陆元昌 刘宪钊 苏杰南 兰健花

廖德宝 覃琨

孙敏,汤绍虎,陈安和,杨兰英,王必浓.银杉成熟胚离体培养及愈伤组织诱导的研究.西南林学院学报.1994,(第03期),第155页.

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 苏士莹

审查员 胡佳

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

(54) 发明名称

一种银杉的组培方法和繁殖方法

(57) 摘要

本发明涉及植物组培技术领域,特别是涉及一种银杉的组培方法和繁殖方法。本发明通过适宜的诱导培养基可以使银杉外植体诱导出不定芽,其诱导率达到69.22%~73.33%;再将诱导出的不定芽接种到适宜的增殖培养基中,可以使不定芽进行增殖和壮苗,其不定芽增殖率达到46.23%~55%;最后将增殖壮苗的不定芽接种到适宜的生根培养基中进行生根培养,可以得到完整的银杉组培苗。本发明提供的组培方法对于保护银杉,增加银杉植株数量,扩大银杉种群以防灭绝具有重要意义。

1. 一种银杉的组培方法,其特征在于,包括以下步骤:

将银杉的外植体接种到诱导培养基中进行诱导培养,得到银杉不定芽;所述外植体为合子胚;所述外植体的来源包括广西金秀瑶族自治县或桂林花坪镇的银杉外植体;

所述诱导培养基包括基本培养基和6-BA 1.5mg/L;所述诱导培养的基本培养基包括DCR培养基或P6培养基;

将所述银杉不定芽接种到增殖培养基中进行增殖培养,得到增殖的不定芽;

当所述外植体的来源为广西金秀瑶族自治县的银杉外植体时,所述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.5mg/L和NAA 0.2mg/L,或所述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA 1.5mg/L和NAA 0.6mg/L;

当所述外植体的来源为桂林花坪镇的银杉外植体时,所述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA 1mg/L和NAA 0.4mg/L;

将所述增殖的不定芽接种到生根培养基中进行生根培养,得到组培苗;

所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IBA 0.5mg/L和NAA 0.2mg/L。

2. 根据权利要求1所述的组培方法,其特征在于,所述诱导培养基、增殖培养基和生根培养基均还包括以下质量百分含量的组分:蔗糖3%和琼脂4.5%。

3. 根据权利要求1或2所述的组培方法,其特征在于,所述诱导培养基、增殖培养基和生根培养基的pH值分别为5.6~5.8。

4. 根据权利要求1或2所述的组培方法,其特征在于,所述诱导培养、增殖培养和生根培养的条件:培养温度为23~27℃,每日光照时间为12~14h,光照强度为2000~3000lx,相对湿度为60%~80%。

5. 根据权利要求1或2所述的组培方法,其特征在于,所述诱导培养的时间为10周;所述增殖培养的时间为12周;所述生根培养的时间为8周。

6. 一种繁殖银杉的方法,其特征在于,包括:采用权利要求1~5任一项所述组培方法得到组培苗;将所述组培苗进行移栽培养,得银杉苗。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,移栽时所用栽培基质包括泥炭和珍珠岩;所述栽培基质中泥炭和珍珠岩的体积比为4:1。

## 一种银杉的组培方法和繁殖方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物组培技术领域,特别是涉及一种银杉的组培方法和繁殖方法。

### 背景技术

[0002] 银杉(*Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang)为松科单属类植物,我国特有孑遗植物,为国家一级保护珍稀濒危植物,已被列入极小种群保护物种名录。银杉树体优美,树干挺拔雄伟,四季长青,叶背面的银带极富观赏性,是珍贵的观赏树种。

[0003] 银杉古老的起源,对松属植物的系统发育和进化、古生物、古气候、古地质和古生态方面的研究都有重要的科学参考价值。

[0004] 银杉种群更新困难,幼苗缺乏。与其它松科植物相比,尽管银杉幼胚数量在发育初期比松属的少且分裂较晚,但在胚发育的整个过程与松属的非常接近。因银杉结实量少,有生活力的种子比例低,且种子和幼苗均易染病。有性繁殖困难,且幼苗成活率低。天然银杉幼苗生长极其缓慢,幼苗、幼树死亡率高,严重制约了银杉种群的更新。以无性繁殖方式是获得银杉无性苗和进行种质资源建设的可行途径之一。

[0005] 银杉组织培养育苗的研究主要集中在直接器官发生方面,如学者利用银杉离体培养枝条、子叶、胚轴等在White、1/2MS、WPS培养基上添加6-BA、NAA、2,4-D等生长调节剂已诱导出愈伤组织。学者以银杉的成熟胚和胚轴在改良的 Monnier培养基上诱导出少量的不定芽,但不定芽无法伸长,无法进一步形成植株。无法建立银杉组织培养再生植株体系。

[0006] 当前以保护银杉,增加银杉植株数量,扩大银杉种群以防灭绝,亟待进行。而开展银杉离体培养,培养银杉无性系植株,培养银杉再生植株,建立银杉无性繁殖植株再生体系是解决该问题的重要途径之一。

### 发明内容

[0007] 为了解决上述问题,本发明提供了一种银杉的组培繁殖方法。本发明提供的组培方法不仅可以提高不定芽的诱导率,而且还可以使不定芽增殖并分化出不定根,得到银杉组培苗。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0009] 本发明提供了一种银杉的组培方法,包括以下步骤:

[0010] 将银杉的外植体接种到诱导培养基中进行诱导培养,得到银杉不定芽;

[0011] 所述诱导培养基包括基本培养基和6-BA 1.5mg/L;所述诱导培养的基本培养基包括DCR培养基或P6培养基;

[0012] 将所述银杉不定芽接种到增殖培养基中进行增殖培养,得到增殖的不定芽;

[0013] 所述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.5~1.5mg/L和NAA 0.2~0.6mg/L;

[0014] 将所述增殖的不定芽接种到生根培养基中进行生根培养,得到组培苗;

[0015] 所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IBA 0.5mg/L和NAA 0.2mg/L

L。

[0016] 优选的,所述外植体包括合子胚。

[0017] 优选的,所述外植体的来源包括广西金秀瑶族自治县或桂林花坪镇的银杉 外植体;

[0018] 当所述外植体的来源为广西金秀瑶族自治县的银杉外植体时,所述诱导培 养基的基本培养基为DCR培养基;

[0019] 当所述外植体的来源为桂林花坪镇的银杉外植体时,所述诱导培养基的基 本培养基为P6培养基。

[0020] 优选的,当所述外植体的来源为广西金秀瑶族自治县的银杉外植体时,所 述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.5mg/L和NAA 0.2mg/L,或所述增殖培养 基以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA 1.5mg/L 和NAA 0.6mg/L;

[0021] 当所述外植体的来源为桂林花坪镇的银杉外植体时,所述增殖培养基以 DCR培养 基为基本培养基,还包括6-BA 1mg/L和NAA 0.4mg/L。

[0022] 优选的,所述诱导培养基、增殖培养基和生根培养基均还包括以下质量百 分含量的 组分:蔗糖3%和琼脂4.5%。

[0023] 优选的,所述诱导培养基、增殖培养基和生根培养基的pH值分别为5.6~5.8。

[0024] 优选的,所述诱导培养、增殖培养和生根培养的条件分别包括:培养温度 为23~ 27℃,每日光照时间为12~14h,光照强度为2000~3000lx,相对湿度为 60%~80%。

[0025] 优选的,所述诱导培养的时间为10周;所述增殖培养的时间为12周;所 述生根培 养的时间为8周。

[0026] 本发明还提供了一种繁殖银杉的方法,包括:采用上述组培方法得到组培 苗;将 所述组培苗进行移栽培养,得银杉苗。

[0027] 优选的,所述移栽时所用栽培基质包括泥炭和珍珠岩;所述栽培基质中泥 炭和珍 珠岩的体积比为4:1。

[0028] 有益效果:

[0029] 本发明提供了一种银杉的组培方法,包括以下步骤:将银杉的外植体接种 到诱导 培养基中进行诱导培养,得到银杉不定芽;所述诱导培养基包括基本培 养基和6-BA 1.5mg/L;所述诱导培养的基本培养基包括DCR培养基或P6培养 基;将所述银杉不定芽接种 到增殖培养基中进行增殖培养,得到增殖细胞系; 所述增殖培养基以DCR培养基为基本培 养基,还包括6-BA 0.5~1.5mg/L和NAA 0.2~0.6mg/L;将所述增殖细胞系接种到生根培 养基中进行生根培养,得到组培 苗;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括 IBA 0.5mg/L和NAA 0.2mg/L。

[0030] 与现有技术相比,本发明具有如下优势:

[0031] (1)本发明采用适宜的诱导培养基能够使银杉外植体诱导出不定芽,并使 不定芽 增殖分化得到增殖细胞系,具有诱导率高,不定芽增殖率高,能够有效 得到完整的银杉组 培苗。

[0032] (2)本发明提供的组培方法,能够有效增加银杉植株数量,扩大银杉种群, 实现银 杉的防灭绝性保护。

## 具体实施方式

[0033] 本发明提供了一种银杉的组培方法,包括以下步骤:

[0034] 将银杉的外植体接种到诱导培养基中进行诱导培养,得到银杉不定芽;

[0035] 所述诱导培养基包括基本培养基和6-BA 1.5mg/L;所述诱导培养的基本培养基包括DCR培养基或P6培养基;

[0036] 将所述银杉不定芽接种到增殖培养基中进行增殖培养,得到增殖细胞系;

[0037] 所述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.5~1.5mg/L和 NAA 0.2~0.6mg/L;

[0038] 将所述增殖细胞系接种到生根培养基中进行生根培养,得到组培苗;

[0039] 所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IBA0.5mg/L和NAA 0.2mg/L。

[0040] 如无特殊说明,本发明对所述基本培养基的来源没有特殊要求,采用本领域技术人员所熟知的市售商品即可。

[0041] 本发明将银杉的外植体接种到诱导培养基中进行诱导培养,得到银杉不定芽。在本发明中,所述外植体优选包括合子胚,更优选为成熟合子胚。

[0042] 在本发明中,所述合子胚的制备方法优选包括以下步骤:

[0043] 第一步:剥出银杉球果中的种子,用水冲洗干净,用0.1%KMnO<sub>4</sub>溶液对种皮消毒,在超净工作台上剥去种皮,得到去皮种子;

[0044] 第二步:将去皮种子先与70%酒精混合30s,再用0.1%氯化汞进行消毒,最后用无菌水冲洗4~5次,得到消毒后的去皮种子;

[0045] 第三步:将消毒后的去皮种子在无菌条件下用解剖刀取出种胚,得到所述合子胚。

[0046] 在本发明中,所述种皮消毒的时间优选为20~30min,进一步优选为23~27min,更优选为25min;所述0.1%氯化汞消毒的时间优选为5~6min,更优选为6min。本发明先将种皮消毒,再将去皮种子进行消毒能够使得试验外植体消毒更加充分,达到减少外植体污染的目的,降低外植体污染率,且对外植体伤害小,可以达到提高外植体诱导生长率和成活率的效果。

[0047] 在本发明中,所述外植体的来源优选包括广西金秀瑶族自治县或桂林花坪镇的银杉外植体;

[0048] 当所述外植体的来源为广西金秀瑶族自治县的银杉外植体时,所述诱导培养基优选以DCR培养基为基本培养基,还包括以下组分:6-BA 1.5mg/L、蔗糖 3wt.%和琼脂 4.5wt.%;所述诱导培养基的pH值优选为5.6~5.8;

[0049] 当所述外植体的来源为桂林花坪镇的银杉外植体时,所述诱导培养基优选以P6培养基为基本培养基,还包括以下组分:6-BA 1.5mg/L、蔗糖3%和琼脂 4.5%;所述诱导培养基的pH值优选为5.6~5.8。

[0050] 在本发明中,所述诱导培养基在接种合子胚前优选进行高温灭菌处理;所述灭菌的温度优选为121℃。

[0051] 在本发明中,所述诱导培养的温度为优选23~27℃,更优选为25℃;所述诱导培养的每日光照时间优选为12~14h,更优选为13h;所述诱导培养的光照强度优选为2000~

30001x,进一步优选为2300~27001x,更优选为25001x;所述诱导培养的的相对湿度优选为60%~80%,进一步优选为65%~75%,更优选为70%。

[0052] 在本发明中,所述诱导培养的时间优选为10周。

[0053] 本发明通过将银杉外植体在适宜的诱导培养基中培养,可以使银杉外植体诱导出不定芽,其诱导率达到69.22%~73.33%。

[0054] 得到银杉不定芽后,本发明将所述银杉不定芽接种到增殖培养基中进行增殖培养,得到增殖细胞系;所述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA0.5~1.5mg/L和NAA 0.2~0.6mg/L。

[0055] 在本发明中,当所述外植体的来源为广西金秀瑶族自治县的银杉外植体时,所述增殖培养基优选以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA、NAA、蔗糖3wt.%和琼脂4.5wt.%;所述6-BA的浓度优选为0.5mg/L或1.5mg/L,更优选为0.5mg/L;所述NAA的浓度优选为0.2mg/L或0.6mg/L,更优选为0.2mg/L;所述增殖培养基的pH值优选为5.6~5.8。

[0056] 在本发明中,当所述外植体的来源为桂林花坪镇的银杉外植体时,所述增殖培养基优选以DCR培养基为基本培养基,还包括6-BA 1mg/L、NAA 0.4mg/L、蔗糖3wt.%和琼脂4.5wt.%;所述增殖培养基的pH值优选为5.6~5.8。

[0057] 在本发明中,所述增殖培养基在接种银杉不定芽前优选进行高温灭菌处理;所述灭菌的温度优选为121℃。

[0058] 在本发明中,所述增殖培养的温度为优选23~27℃,更优选为25℃;所述增殖培养的每日光照时间优选为12~14h,更优选为13h;所述增殖培养的光照强度优选为2000~30001x,进一步优选为2300~27001x,更优选为25001x;所述增殖培养的的相对湿度优选为60%~80%,进一步优选为65%~75%,更优选为70%。

[0059] 在本发明中,所述增殖培养的时间优选为12周。

[0060] 得到增殖细胞系后,本发明将所述增殖细胞系接种到生根培养基中进行生根培养,得到组培苗;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IBA0.5mg/L和NAA 0.2mg/L。

[0061] 在本发明中,所述增殖细胞系接种到生根培养基前优选进行预培养;所述预培养优选包括:将所述增殖细胞系接种到预培养基中培养3周,再转入1/2MS培养基中培养4周;所述预培养基优选以1/2MS培养基为基本培养基,还包括生物炭0.1wt.%。本发明通过预培养可以促进根原基发育,进而在生根培养基中生长为不定根。

[0062] 在本发明中,所述生根培养基除上述组分外,优选还包括蔗糖3wt.%和琼脂4.5wt.%;所述生根培养基的pH值优选为5.6~5.8。

[0063] 在本发明中,所述生根培养基在接种增殖细胞系前优选进行高温灭菌处理;所述灭菌的温度优选为121℃。

[0064] 在本发明中,所述生根培养或预培养的温度均为优选23~27℃,更优选为25℃;所述生根培养或预培养的每日光照时间均优选为12~14h,更优选为13h;所述生根培养或预培养的光照强度均优选为2000~30001x,进一步优选为2300~27001x,更优选为25001x;所述生根培养或预培养的相对湿度均优选为60%~80%,进一步优选为65%~75%,更优选为70%。

[0065] 在本发明中,所述生根培养的时间优选为8周。

[0066] 本发明还提供了一种繁殖银杉的方法,包括:采用上述组培方法得到组培苗;将所述组培苗进行移栽培养,得银杉苗。

[0067] 在本发明中,所述移栽培养前,优选包括对组培苗进行炼苗处理;所述炼苗的条件优选包括:温度为优选23~27℃,更优选为25℃;每日光照时间优选为12~14h,更优选为13h;光照强度优选为2000~3000lx,进一步优选为2300~2700lx,更优选为2500lx;相对湿度优选为60%~80%,进一步优选为65%~75%,更优选为70%。在本发明中,所述炼苗处理的时间优选为2周。

[0068] 在本发明中,所述移栽时所用栽培基质优选包括泥炭和珍珠岩;所述栽培基质中泥炭和珍珠岩的体积比优选为4:1。本发明通过适宜的栽培基质,可以使组培苗正常生长,避免烂根的问题。

[0069] 为了进一步说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的一种银杉的组培方法和繁殖方法进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0070] 实施例1

[0071] 一种银杉的组培方法,由以下步骤组成:

[0072] 1) 外植体的获取

[0073] 剥出银杉球果中的种子,用自来水冲洗干净,用0.1%KMnO<sub>4</sub>溶液对种皮消毒25min,在超净工作台上剥去种皮,先放入70%酒精30s,接着在0.1%氯化汞中消毒6min,无菌水冲洗5次,无菌条件下用解剖刀取出种胚,得到合子胚;

[0074] 2) 不定芽诱导培养

[0075] 将合子胚接种于诱导培养基中,在温度为25℃,每日光照时间为13h,光照强度为2500lx,相对湿度为70%的条件下进行诱导培养,诱导培养10周后,得到银杉不定芽;所述诱导培养基的以DCR培养基为基本培养基,还只含有以下组分:6-BA 1.5mg/L、蔗糖3%和琼脂4.5‰,诱导培养基的pH值为5.7;

[0076] 3) 增殖培养

[0077] 将所述银杉不定芽接种到增殖培养基中,在温度为23~27℃,每日光照时间为13h,光照强度为2500lx,相对湿度为70%的条件下进行增殖培养,增殖培养12周后得到增殖细胞系;所述增殖培养基的以DCR培养基为基本培养基,还只含有以下组分:6-BA 0.5mg/L、NAA 0.2mg/L、蔗糖3%和琼脂4.5‰,增殖培养基的pH值为5.7;

[0078] 4) 生根培养

[0079] 将所述增殖细胞系接种到预培养基中培养3周,再转入1/2MS培养基中培养4周,最后转接到生根培养基中,在进行生根培养,生根培养8周后得到组培苗;所述预培养与生根培养的条件均为:温度23~27℃,每日光照时间13h,光照强度2500lx,相对湿度70%;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还只含有以下组分:IBA 0.5mg/L、NAA 0.2mg/L、蔗糖3%和琼脂4.5‰,生根培养基的pH值为5.7。

[0080] 实施例2

[0081] 一种与实施例1相似的组培方法,唯一区别在于,所述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还只含有以下组分:6-BA 1.5mg/L、NAA 0.6mg/L、蔗糖3%和琼脂4.5‰。

[0082] 实施例3

[0083] 一种与实施例1相似的组培方法,区别在于:所述诱导培养基的基本培养基为P6

培养基;

[0084] 所述增殖培养基以DCR培养基为基本培养基,还只含有以下组分:6-BA 1mg/L、NAA 0.4mg/L、蔗糖3%和琼脂4.5%。

[0085] 实施例4

[0086] 一种繁殖银杉的方法,由以下步骤组成:将实施例1得到的组培苗在室内 炼苗2周,之后,从培养基中取出组培苗,用无菌水清洗,并栽植到栽培基质(泥炭和珍珠岩的体积比为4:1)中,得到银杉无性系组织培养苗。

[0087] 实施例5

[0088] 一种繁殖银杉的方法,由以下步骤组成:将实施例2得到的组培苗在室内 炼苗2周,之后,从培养基中取出组培苗,用无菌水清洗,并栽植到栽培基质(泥炭和珍珠岩的体积比为4:1)中,得到银杉无性系组织培养苗。

[0089] 实施例6

[0090] 一种繁殖银杉的方法,由以下步骤组成:将实施例3得到的组培苗在室内 炼苗2周,之后,从培养基中取出组培苗,用无菌水清洗,并栽植到栽培基质(泥炭和珍珠岩的体积比为4:1)中,得到银杉无性系组织培养苗。

[0091] 应用例1

[0092] 银杉组培各个阶段最适培养基的筛选

[0093] 试验材料

[0094] 银杉种子于2020年10月25日、10月27日分别采自广西金秀银杉保护站和花坪国家森林公园自然保护区。在5℃冰箱里密封冷藏4周。取银杉成熟合子胚为外植体。

[0095] 试验方法

[0096] 两个地点的种子试验方法相同,具体如下:

[0097] 外植体的清洗、表面消毒和接种

[0098] 剥出银杉球果中的种子,用自来水冲洗干净,用0.1%KMnO<sub>4</sub>溶液对种皮消毒20~30min,在超净工作台上剥去种皮,先放入70%酒精30s,接着在0.1%氯化汞中消毒5~6min,无菌水冲洗4~5次。无菌条件下用解剖刀取出种胚,水平接种于培养基中。每瓶中放1个种胚。每个处理接种60瓶,重复3次。

[0099] 愈伤组织和不定芽的诱导

[0100] 本试验培养基以1/2MS、P6、DCR为基本培养基,分别添加0.5、1.0、1.5 mg · L<sup>-1</sup>6-BA,以银杉成熟胚为外植体。该试验以完全随机设计进行试验。确定银杉成熟胚不定芽诱导的合适培养基和6-BA浓度。不定芽的诱导共培养10周。

[0101] 不定芽增殖和壮苗

[0102] 将上述1/2MS培养基诱导的银杉不定芽为外植体,再以1/2MS为基本培养基,并分别添加0.5mg · L<sup>-1</sup>6-BA,0.2、0.4、0.6mg · L<sup>-1</sup>NAA进行不定芽增殖和壮苗。

[0103] 将上述P6培养基诱导的银杉不定芽为外植体,再以P6为基本培养基,并分别添加0.5mg · L<sup>-1</sup>6-BA,0.2、0.4、0.6mg · L<sup>-1</sup>NAA进行不定芽增殖和壮苗。

[0104] 将上述DCR培养基诱导的银杉不定芽为外植体,再以DCR为基本培养基,并分别添加0.5mg · L<sup>-1</sup>6-BA,0.2、0.4、0.6mg · L<sup>-1</sup>NAA进行不定芽增殖和壮苗。

[0105] 不定芽的增殖及壮苗共培养12周时间。

[0106] 不定芽根的诱导

[0107] 将经过在1/2MS培养基上增殖壮苗的不定芽转入1/2MS+0.1%AC上培养3周,再转入1/2MS培养基上培养4周,最后转接在1/2MS培养基上,分别添加0.5、1.0、1.5IBA和 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,培养8周。

[0108] 将经过在P6培养基上增殖壮苗的不定芽转入P6+0.1%AC上培养3周,再转入P6培养基上培养4周,最后转接在P6培养基上,分别添加0.5、1.0、1.5IBA和 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,培养8周。

[0109] 将经过在DCR培养基上增殖壮苗的不定芽转入DCR+0.1%AC上培养3周,再转入DCR培养基上培养4周,最后转接在DCR培养基上,分别添加0.5、1.0、1.5IBA和 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,培养8周。

[0110] 培养基附加物及配制

[0111] 所有培养基附加 $30\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 蔗糖, $4.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 琼脂,PH5.6~5.8。植物激素在灭菌前加入培养基中,采用 $121^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌。

[0112] 培养条件

[0113] 培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,每日充分光照12~14h,光照强度为2000~3000lx。培养室相对湿度60%~80%。

[0114] 统计指标

[0115] 出愈数=产生愈伤组织的外植体个数

[0116] 出愈率=产生愈伤组织的外植体数/该处理外植体总数 $\times 100\%$

[0117] 芽诱导数=产生不定芽的外植体个数

[0118] 芽诱导率=产生不定芽的外植体数/该处理外植体总数 $\times 100\%$

[0119] 增殖数=发生增殖的外植体个数

[0120] 增殖率=发生增殖的外植体数/该处理外植体总数 $\times 100\%$

[0121] 生根数=产生不定根的外植体个数

[0122] 生根率=产生不定根的外植体数/该处理外植体总数 $\times 100\%$

[0123] 各项试验设计均采用SPSS 20.0软件进行统计分析。试验均采用方差分析及邓肯氏显著差数检验进行分析。

[0124] 基本培养基及生长调节剂对银杉成熟胚不定芽诱导的影响

[0125] 培养基对银杉成熟胚愈伤组织、不定芽诱导的影响

[0126] 表2金秀银杉种源种子不同培养及浓度诱导愈伤组织和不定芽诱导情况

指标	激素及浓度 (mg/L)	培养基		
	6-BA	1/2MS	DCR	P6
愈伤率	0.5	15.56±8.68ab	14.81±14.81ab	59.72±14.50c

[0128]		1.0	30.16±8.40abc	8.93±4.49a	36.62±16.14abc
		1.5	23.61±11.87abc	0.00±0.00a	50.07±17.71bc
	不定芽诱导率	0.5	37.78±6.19ab	42.96±12.92ab	28.24±16.44a
		1.0	30.16±8.40ab	48.21±5.74ab	29.08±15.90ab
		1.5	29.167±18.16ab	73.33±6.67b	32.15±18.91ab
	干枯率	0.5	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a
		1.0	0.00±0.00a	0.00±0.00a	5.80±2.90a
		1.5	11.11±11.11a	0.00±0.00a	5.93±1.58a
	未发育率	0.5	46.67±3.33c	42.22±8.89bc	12.04±6.48a
		1.0	39.68±3.18bc	42.86±7.14bc	28.50±2.41ab
		1.5	36.11±1.39bc	26.67±6.67ab	11.86±3.16a

[0129] 由表2可知,1/2MS、DCR、P6三种培养基,P6培养基上添加0.5mg/L6-BA 愈伤率显著最大,为59.72%,在1/2MS、DCR培养基上分别添加1.0mg/L、0.5 mg/L 6-BA,愈伤率最大,分别为30.16%和14.81%。

[0130] 1/2MS、DCR、P63种培养基在添加不同浓度6-BA生长调节剂,均有不定芽诱导出,不定芽诱导率差异显著,其中,DCR和P6培养基上添加1.5mg/L 6-BA 时,不定芽的诱导率最大,分别为73.33%和32.15%。而在1/2MS培养基上添加 0.5mg/L 6-BA时,不定芽诱导率最大为37.78%。

[0131] 出现干枯的情况主要为萌动种子的干枯、愈伤组织的局部干枯、不定芽的干枯等情况,金秀种源的银杉种子愈伤组织和不定芽在添加不同浓度6-BA浓度 时的干枯率最大为:1/2MS培养基上添加1.5mg/L的6-BA时,为11.11%,在添加0.5mg/L的6-BA及1.0mg/L的6-BA时,干枯率出现的情况均为0。DCR培养基上添加不同浓度6-BA出现的干枯率均为0。P6培养基上,添加0.5mg/L的 6-BA时,出现干枯率为0,在1.0mg/L和1.5mg/L的6-BA时,出现干枯率分别为5.80%和5.93%。但P6、DCR、1/2MS上添加不同浓度6-BA的出现的干枯率 无显著差异。

[0132] 出现未发育的情况主要为银杉种子萌动后,停滞发育,P6、DCR、1/2MS 3 种培养基在添加不同浓度6-BA时,种子停滞发育情况差异显著,其中,在P6 培养基上,0.5mg/L的6-BA和1.5mg/L的6-BA种子未发育率均显著较低,分 别为12.04%和11.86%。而1/2MS培养基在添加0.5mg/L的6-BA时,为46.67%, 显著最大。DCR培养基上添加不同浓度的6-BA时,种子未发育率介于P6和 1/2MS培养基之间。

[0133] 表3桂林银杉种源种子不同培养及浓度诱导愈伤组织和不定芽诱导情况

[0134]	指标	激素及浓度 (mg/L)	培养基
--------	----	-----------------	-----

	6-BA	1/2MS	DCR	P6
愈伤率	0.5	47.22±23.73a	66.48±11.11a	24.61±4.45a
	1.0	60.32±24.95a	20.83±4.17a	9.78±7.71a
	1.5	58.33±30.05a	43.33±23.33a	13.73±2.29a
不定芽诱导率	0.5	25.00±14.43ab	7.41±7.41a	39.89±10.63ab
	1.0	25.40±12.99ab	45.83±4.17ab	45.29±10.62ab
	1.5	20.83±20.83a	26.67±26.67ab	69.22±1.38b
干枯率	0.5	0.00±0.00a	0.00±0.00a	3.53±1.85ab
	1.0	0.00±0.00a	16.67±8.33b	2.90±2.90a
	1.5	8.33±8.33ab	0.00±0.00a	4.62±0.14ab
未发育率	0.5	27.78±14.70a	26.11±3.89a	30.93±12.69a
	1.0	14.29±14.29a	16.67±16.67a	42.03±7.97a
	1.5	12.50±12.50a	30.00±10.00a	7.66±4.16a

[0135] 由表3可知,桂林种源银杉种子在诱导愈伤组织和不定芽时的干枯率以 DCR培养基上添加1.0mg/L的6-BA时干枯率显著最大,为16.67%,在DCR培养基上添加0.5mg/L和1.5mg/L的6-BA,及在1/2MS培养基上添加0.5mg/L和1.0mg/L的6-BA时,干枯率均显著最小,为0。桂林种源银杉的种子在诱导愈伤组织和不定芽时,种子未发育率最大的为在P6培养基上添加1.0mg/L的6-BA时,为42.03%,最小的未发育率为在P6培养基上添加1.5mg/L的6-BA时,为7.66%。桂林种源的银杉种子在诱导愈伤组织和不定芽时候的未发育率,在P6、1/2MS、DCR3种培养基上添加不同浓度的6-BA时,差异均不显著。

[0137] P6培养基上愈伤组织的平均诱导率金秀种源为49%,桂林种源为16%。6-BA添加浓度为0.5时,愈伤组织的诱导率金秀种源最大为59.72%,桂林种源为24.61%,随着6-BA浓度的增加,银杉愈伤组织诱导逐渐降低。不定芽的平均诱导率金秀种源为30%,桂林种源为51%。6-BA添加浓度为1.5mg/L时,不定芽的诱导率金秀种源最大为32.15%,桂林种源为69.22%,随着6-BA浓度的增加,银杉不定芽诱导逐渐增加。

[0138] 1/2MS培养基上诱导出的愈伤组织的平均诱导率为:金秀种源23%,桂林种源为55%。6-BA添加浓度为1.0mg/L时,金秀种源诱导率最大为30.16%,桂林种源为60.32%,随着6-BA浓度的增加,银杉愈伤组织诱导率降低。不定芽的平均诱导率为:金秀种源32%,桂林种源为24%。6-BA添加浓度为0.5mg/L时,金秀种源诱导率最大为37.78%,桂林种源为25.00%(1.0mg/L时为25.40%),随着6-BA浓度的增加,银杉不定芽诱导率降低。

[0139] DCR培养基上不定芽的平均诱导率为:金秀种源为55%,桂林种源27%。6-BA添加浓度为1.5mg/L时,诱导率最大,金秀种源为73.33%,随着6-BA浓度的增加,银杉不定芽诱导率逐渐增加。6-BA添加浓度为1.0mg/L时,桂林种源诱导率最大为45.83%,随着6-BA浓度的增加,银杉不定芽诱导率逐渐降低。

[0140] 不同培养基和激素浓度对银杉成熟胚愈伤组织的诱导率具有差异显著,在1/2MS、DCR、P63种培养基中,DCR对愈伤组织的诱导率显著最低,P6培养基上的愈伤组织诱导率显著最高,1/2MS介于1/2MS培养基和P6培养基之间。

[0141] 在DCR培养基上,随着生长调节剂浓度的增加愈伤组织诱导率逐渐降低,甚至为0%;而在P6培养基上,添加了低浓度生长调节剂时,愈伤组织诱导率显著最大,为59.72%,而在添加了高浓度生长调节剂的P6培养基上也有较高的愈伤组织诱导率(50.7%);在1/2MS培养基上,添加不同浓度的生长调节剂均有愈伤组织诱导出来,愈伤组

织诱导率随着浓度的增大(0.5mg/L,1.0mg/L, 1.5mg/L)先增大后降低,愈伤组织诱导率在6-BA浓度为1.0mg/L最大,为 30.16%。愈伤组织干枯率或不定芽干枯率差异不显著。

[0142] 生长调节剂浓度组合对不定芽增殖壮苗的影响

[0143] 培养基、生长调节剂对银杉增殖壮苗的影响

[0144] 表4金秀银杉种源种子不同培养及浓度壮苗情况

指标	激素及浓度 (mg/L)		培养基		
	6-BA	NAA	1/2MS	DCR	P6
愈伤组织	0.5	0.2	100.00±0.00e	31.94±9.11ab	71.77±9.05de
	1.0	0.4	60.92±8.57bcd	57.77±11.28bcd	33.63±11.25abc
	1.5	0.6	66.67±16.67cd	12.26±6.57a	48.96±12.20bcd
增殖不定芽	0.5	0.2	0.00±0.00a	50.28±0.28e	12.33±2.26abc
	1.0	0.4	6.10±0.51ab	23.72±1.89bcd	14.13±1.30abc
	1.5	0.6	33.33±16.67de	46.23±2.07e	24.85±0.77cd
干枯	0.5	0.2	0.00±0.00a	17.78±8.94ab	15.90±8.25ab
	1.0	0.4	24.03±1.51b	12.90±7.23ab	8.86±4.44ab
	1.5	0.6	0.00±0.00a	21.15±3.44ab	21.03±14.30ab
未发育	0.5	0.2	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a
	1.0	0.4	0.00±0.00a	5.61±5.61ab	43.39±13.76b
	1.5	0.6	0.00±0.00a	20.36±6.51ab	5.16±2.60ab

[0146] 由表4可知,在增殖壮苗阶段,金秀银杉种源种子,在1/2MS、P6培养基上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA时,愈伤率显著较高,分别为100%和71.77%。而在DCR培养基上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA时,愈伤组织1/2MS培养基的愈伤率显著较低,为12.26%。在DCR培养基上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA与1.5mg/L的6-BA和0.6mg/L的NAA时,不定芽增殖率显著较多,分别为50.28%和46.23%,在1/2MS培养基上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA时,不定芽增殖率显著最低,为0.00%。在1/2MS培养基上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/LNAA,1.5mg/L6-BA和0.6 mg/LNAA时,干枯率显著最低,为0.00%,当在1/2MS培养基上添加1.0mg/L的6-BA和0.4mg/LNAA时,干枯率显著最大,为24.03%。在1/2MS、DCR、P6培养基上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA时,及在1/2MS培养基上添加1.0mg/L的6-BA和0.4mg/LNAA,及1.5mg/L6-BA和0.6mg/LNAA时,干枯率显著最低,为0.00%,在P6培养基上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA时时,未发育率均显著最低,在P6培养基上添加1.0mg/L的6-BA和0.4mg/LNAA时,未发育率均显著最高,为43.39%。

[0147] 表5桂林银杉种源种子不同培养及浓度壮苗情况

指标	激素及浓度 (mg/L)		培养基		
	6-BA	NAA	1/2MS	DCR	P6
愈伤组织	0.5	0.2	100.00±0.00c	25.00±0.00b	86.67±6.67c
	1.0	0.4	0.00±0.00a	10.00±0.00ab	25.00±0.00b
	1.5	0.6	0.00±0.00a	14.76±8.66ab	16.67±16.67ab
增殖不定芽	0.5	0.2	0.00±0.00a	35.00±0.00c	0.00±0.00a
	1.0	0.4	20.00±0.00b	55.00±0.00f	0.00±0.00a
	1.5	0.6	0.00±0.00a	44.84±2.60d	48.89±0.56e
干枯	0.5	0.2	0.00±0.00a	40.00±0.00abcd	13.33±6.67a
	1.0	0.4	80.00±0.00d	35.00±0.00abc	75.00±0.00cd
	1.5	0.6	66.67±33.33bcd	23.37±11.30ab	34.45±17.22abc
未发育	0.5	0.2	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a
	1.0	0.4	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a
	1.5	0.6	33.33±33.33a	17.02±5.82a	0.00±0.00a

[0148] 由表5可知,在增殖壮苗阶段,桂林银杉种源种子,在1/2MS、P6培养基上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA时,愈伤率显著较高,分别为100%和86.67%。而在1/2MS培养基上添加1.0mg/L的6-BA和0.4mg/LNAA,及1.5mg/L6-BA和0.6mg/LNAA时,愈伤组织出现率显著最低,均为0.00%。

[0149] 在DCR培养基上添加1.0mg/L的6-BA和0.4mg/LNAA时,不定芽增殖率显著最大,为55.00%;1/2MS 0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA,1.50mg/L的6-BA和0.64mg/LNAA,及在P6上添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA,1.0mg/L的6-BA和0.4mg/LNAA时不定芽诱导率显著最低,均为0.00%。

[0150] 在1/2MS培养基上添加1.0mg/L的6-BA和0.4mg/LNAA时,干枯率显著最大,为80.00%,而在添加0.5mg/L的6-BA和0.2mg/L的NAA时,显著最低,0.00%。

[0151] P6、DCR、1/2MS 3种培养基和不同浓度的6-BA、NAA对未发育率没有显著影响。

[0152] 生长调节剂浓度组合对不定根诱导的影响

[0153] 表6不同培养基及生长调节剂对金秀种源银杉不定芽生根的影响

激素及浓度 (mg/L)	培养基			
	IBA	NAA	DCR	1/2MS
0.50	0.2	0.00±0.00a	16.67±8.33b	1.04±1.04a
1.00	0.2	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a
1.50	0.2	0.00±0.00a	0.00±0.00a	4.76±4.76a

[0154] 由表6可知,金秀种源银杉不定芽的不定根诱导,在DCR培养基上的平均诱导率为0.00%,显著最低,添加不同浓度生长调节剂的IBA和NAA,在实验设计时间内,均未诱导出不定根。P6培养基上的平均诱导率为1.93%。在添加的NAA浓度为0.2mg/L时,银杉不定根的诱导率随着IBA添加浓度的增大先降低有升高,在IBA添加浓度为1.5mg/L时,诱导率最大为4.76%。1/2MS培养基上的平均诱导率为5.56%。在添加的NAA浓度为0.2mg/L时,IBA添加浓度为0.5mg/L时,不定根的诱导率显著最大为16.67%,随着IBA和NAA浓度的增加,银杉愈伤组织降低,无不定根诱导出,诱导率为0.00%。

[0155] 表7不同培养基及生长调节剂对桂林种源银杉不定芽生根的影响

	生长调节剂处理 (mg/L)		培养基		
	IBA	NAA	DCR	1/2MS	P6
[0158]	0.50	0.2	0.00±0.00a	21.43±3.57b	1.04±1.04a
	1.00	0.2	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a
	1.50	0.2	0.00±0.00a	0.00±0.00a	4.76±4.76a

[0159] 由表7可知,桂林种源银杉不定芽的不定根诱导,DCR培养基上的平均诱导率为0.00%,显著最低,添加不同浓度生长调节剂的IBA和NAA,在实验设计时间内,均未诱导出不定根。P6培养基上诱导愈伤组织的平均诱导率为1.93%。在添加的NAA浓度为0.2mg/L时,银杉不定根的诱导率随着IBA添加浓度的增大先降低有升高,在IBA添加浓度为1.5mg/L时,诱导率最大为4.76%。1/2MS培养基上诱导愈伤组织的平均诱导率为7.14%。在添加的NAA浓度为0.2mg/L时,IBA添加浓度为0.5mg/L时,不定根的诱导率显著最大为21.43%,随着IBA和NAA浓度的增加,银杉愈伤组织降低,无不定根诱导出,诱导率为0.00%。

[0160] 综上所述,种胚愈伤组织诱导在添加0.5mg/L 6-BA时,金秀(P6培养基)、桂林(DCR培养基)种源的愈伤组织的诱导率最大。在添加1.5mg/L 6-BA时,金秀(DCR)和桂林(P6)不定芽诱导率最大。在不定芽增殖阶段,金秀和桂林种源的不定芽诱导(均在DCR培养基上)在分别添加0.5mg/L 6-BA和0.2mg/LNAA,1.0mg/L 6-BA和0.4mg/LNAA时,不定芽增殖壮苗率最高。同样,金秀和桂林种源的经增殖壮苗后的不定芽在1/2MS培养基上添加低浓度的0.5mg/L IBA和0.2mg/LNAA的生长调节剂时,不定芽的不定根诱导率最高。

[0161] 虽然本发明已以较佳的实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可以做各种改动和修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。