



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101167441 B

(45) 授权公告日 2011.03.30

(21) 申请号 200710031781.0

A01G 31/00 (2006.01)

(22) 申请日 2007.11.28

C12N 5/04 (2006.01)

(73) 专利权人 中国林业科学研究院热带林业研究所

审查员 吴涛

地址 510520 广东省广州市龙洞热带林业研究所

(72) 发明人 曾炳山 尹光天 李湘阳 刘英  
裘珍飞

(74) 专利代理机构 广州广信知识产权代理有限公司 44261

代理人 张文雄

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

单叶省藤无性系组培快繁方法

(57) 摘要

本发明涉及一种单叶省藤无性系组培快繁方法，其特征是：利用单叶省藤萌蘖芽等无性器官进行组培快繁，具体步骤如下：1) 在晴天时用锯将萌蘖芽从母株上锯下来，防止芽体外伤和芽心震裂；2) 对萌蘖芽外植体的消毒；3) 对萌蘖芽外植体进行抗褐变处理，以防止褐变；4) 在丛芽诱导培养基上诱导形成丛芽，形成丛芽后，转接到增殖培养基上进行增殖和扩繁；5) 对高度达到要求的芽苗在生根培养基进行生根培养，对高度未达到要求的芽苗，先进行壮苗培养，让芽苗生长至高度达到要求后再进行生根培养；6) 将苗木进行田间移植，移植后用灭菌剂喷施和采用遮荫网遮荫，直到苗木出圃造林。本发明解决单叶省藤无性系组培快繁的技术难题，用于单叶省藤的无性系育种和良种苗木的快繁，既可促进棕榈人工种植业的发展，又可获取良好的经济效益。

B

CN 101167441

CN 101167441

1. 单叶省藤无性系组培快繁方法,其特征是:利用单叶省藤萌蘖芽无性器官进行组培快繁,具体步骤如下:

1) 采集萌蘖芽外植体,在晴天时用锯将萌蘖芽从母株上锯下来;在锯萌蘖芽外植体的过程中,必须防止芽体外伤和芽心震裂;

2) 外植体的消毒,采用两次消毒法,第一步,首先将外植体清洗干净,剥去外层叶鞘,用75%酒精消毒,然后用0.1%氯化汞消毒,再用无菌水漂洗;第二步,再剥去中层叶鞘并修剪至3~4cm长度,用0.1%氯化汞消毒,再用无菌水漂洗若干次;

3) 防止褐变,采用半胱氨酸或抗坏血酸或者二者结合对萌蘖芽外植体进行抗褐变处理,半胱氨酸和抗坏血酸的浓度分别为3mg/1和10mg/1;

4) 丛芽诱导与增殖培养,外植体采集并消毒后,首先在丛芽诱导培养基上诱导形成丛芽;其次在形成丛芽后,转接到增殖培养基上进行增殖培养,一次增殖培养后,将大的丛芽切分成3~4个芽组成的小芽丛,转接到新鲜增殖培养基上进行下一次增殖培养,经过多次增殖培养后将无性系苗木扩繁;

5) 生根培养,对高度达到3.0cm的芽苗在生根培养基进行第一次生根培养,对经过第一次生根培养后还未生根的芽苗,除去1~2层外层叶鞘和对基部进行修剪后,进行第二次生根培养;对高度未达3.0cm的芽苗,先在壮苗培养基进行壮苗培养,让芽苗生长至3.0cm后,再进行生根培养;

6) 田间移植,将生根培养后高度大于或等于8.0cm、根长度大于或等于4.0cm、具有至少3片叶片的苗木进行田间移植;进行田间移植的介质为细沙、泥炭土和黄心土;

7) 丛芽诱导培养基中,各组份的含量分别为:NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 825mg/L、KNO<sub>3</sub> 3800mg/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 340mg/L、MgSO<sub>4</sub> 740mg/L、CaCl<sub>2</sub> 664mg/L、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 22.3mg/L、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8.6mg/L、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6.2mg/L、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25mg/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 27.8mg/L、Na<sub>2</sub>·EDTA 37.3mg/L、KI 0.83mg/L、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.025mg/L、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.025mg/L,氨基乙酸 2mg/L、盐酸硫胺素 0.2mg/L、盐酸吡哆醇 0.75mg/L、烟酸 0.5mg/L、肌醇 100mg/L、维生素C 10mg/L 和半胱氨酸 2mg/L,6-BA 8mg/L、IBA 1mg/L、NAA 0.25mg/L、KT 0.5mg/L 和 2,4-D 0.4mg/L;蔗糖 40g/L,卡拉胶 8.5~9.2g/L;丛芽诱导培养基的 pH 值为 5.8;

增殖培养基中,各组份的含量分别为:NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 825mg/L、KNO<sub>3</sub> 3800mg/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 340mg/L、MgSO<sub>4</sub> 740mg/L 和 CaCl<sub>2</sub> 664mg/L, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 22.3mg/L、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8.6mg/L、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6.2mg/L、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25mg/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 27.8mg/L、Na<sub>2</sub>·EDTA 37.3mg/L、KI 0.83mg/L、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.025mg/L、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.025mg/L,氨基乙酸 2mg/L、盐酸硫胺素 0.2mg/L、盐酸吡哆醇 0.75mg/L、烟酸 0.5mg/L、肌醇 100mg/L、维生素C 10mg/L 和半胱氨酸 2mg/L,6-BA 4mg/L、IBA 0.5mg/L、NAA 0.125mg/L、KT 0.25mg/L 和 2,4-D 0.2mg/L;蔗糖 40g/L,卡拉胶 8.5~9.2g/L;增殖培养基的 pH 值为 5.8;

壮苗培养基中,各组份的含量分别为:NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 825mg/L、KNO<sub>3</sub> 3800mg/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 340mg/L、MgSO<sub>4</sub> 740mg/L 和 CaCl<sub>2</sub> 664mg/L, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 22.3mg/L、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8.6mg/L、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6.2mg/L、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25mg/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 27.8mg/L、Na<sub>2</sub>·EDTA 37.3mg/L、KI 0.83mg/L、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.025mg/L、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.025mg/L,氨基乙酸 2mg/L、盐酸硫胺素 0.2mg/L、盐酸吡哆醇 0.75mg/L、烟酸 0.5mg/L、肌醇 100mg/L、维生素C 10mg/L 和半胱氨酸 2mg/L;蔗糖 40g/L,卡拉胶 8.5~9.2g/L;壮苗培养基的 pH 值为 5.8;

生根培养基中,各组份的含量分别为 : $\text{NH}_4\text{NO}_3$  825mg/L、 $\text{KNO}_3$  950mg/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85mg/L、 $\text{MgSO}_4$  185mg/L 和  $\text{CaCl}_2$  166mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8mg/L,  $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$  37.3mg/L,  $\text{KI}$  0.83mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025mg/L, 氨基乙酸 2mg/L, 盐酸硫胺素 0.1mg/L, 盐酸吡哆醇 0.5mg/L, 烟酸 0.5mg/L 和肌醇 100mg/L, IBA 1 ~ 2mg/L, NAA 0.5 ~ 1.0mg/L; 蔗糖 40g/L, 卡拉胶 8.5 ~ 9.2g/L; 生根培养基的 pH 值为 5.8。

2. 如权利要求 1 所述的单叶省藤无性系组培快繁方法,其特征是 : 第 1) 步中,采集高度为 25 ~ 45cm 的萌蘖芽外植体 ; 第 2) 步中进行二次消毒的第一步时,剥去外层 2 ~ 3 层叶鞘,用 75% 酒精消毒 20 ~ 25 秒,然后用 0.1% 氯化汞消毒 10 ~ 12 分钟,再用无菌水漂洗 1 次 10 分钟 ; 第 2) 步中进行二次消毒的第二步时,剥去 1 ~ 2 层叶鞘并修剪至 3 ~ 4cm 长,用 0.1% 氯化汞消毒 1 ~ 2 分钟,再用无菌水漂洗 3 次,各次分别为 5 分钟,5 分钟,10 分钟。

3. 如权利要求 1 所述的单叶省藤无性系组培快繁方法,其特征是 : 在第 4) 步从芽诱导时,诱导周期为 3 ~ 5 个月,中途需要转接与更换新鲜培养基 2 ~ 3 次 ; 一次增殖培养的周期为 45 ~ 50 天 ; 在第 5) 步生根培养时,第一次生根培养的时间为 50 ~ 60 天 ; 在第 6) 步田间移植时,移植介质以 1/1000 的高锰酸钾溶液消毒,移植后每个星期用灭菌剂喷施,防止杂菌滋生 ; 移植后 15 天开始每 1 周施肥一次,移植后即需要遮荫,一直管理到苗木出圃造林。

4. 如权利要求 1 所述的单叶省藤无性系组培快繁方法,其特征是 : 在进行第 4) 步从芽诱导时,将芽倾斜或平放,使之整体接触培养基,以促进芽的生长,促进二级蘖芽的萌发,促进增殖。

5. 如权利要求 1 所述的单叶省藤无性系组培快繁方法,其特征是 : 在进行第 5) 步生根培养时,将芽苗高度和大小接近的 2 ~ 4 个芽切分在同一小芽丛,转接到生根培养基上进行生根培养,移植后即可培育成丛芽苗。

6. 如权利要求 1 所述的单叶省藤无性系组培快繁方法,其特征是 : 第 6) 步田间移植,移植后 15 天后开始施肥,采用 1/1000 的复合肥溶液每 1 周喷施一次,移植后 1 ~ 7 天,95% 的遮荫网遮荫,8 ~ 30 天,85% 的遮荫网遮荫,31 ~ 60 天,70% 的遮荫网遮荫,随后采用 50% 遮荫网遮荫。

## 单叶省藤无性系组培快繁方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种单叶省藤无性系组培快繁方法，适用于棕榈科省藤属植物组培快繁。属于无性系植物组培技术领域。

### 背景技术

[0002] 单叶省藤 (*Calamus simplicifolius* Wei.) 是棕榈科 (Palmae) 省藤亚科 (Calamoideae) 省藤族 (Calameae) 省藤属 (*Calamus*) 的具刺、攀缘、丛生藤本植物，是华南热带、南亚热带地区森林特有的伴生植物。藤茎具有良好的工艺特性，是制作家具和工艺品的优良原料。藤嫩梢富含人体所需的多种营养成分，可做蔬菜食用。种子质地坚硬，是制作“佛珠”的传统材料。因此，单叶省藤是具有较高经济价值和开发前景的多用途珍贵森林植物，也是华南地区广泛栽培的主要商品藤种。目前，海南、广东、广西、福建等省区已大面积栽培单叶省藤。

[0003] 现有技术中，单叶省藤主要采用种子繁殖，有关种子贮藏、播种、容器育苗、苗木病虫害的防治等均有详细的研究报道，育苗技术已成功用于造林苗木的培育。但是，单叶省藤种子在常规室温条件下不耐贮藏，即使在恒温 (15℃)、恒湿 (介质含水率保持在 50%~65%) 的最佳贮藏条件下贮藏六个月，发芽率也仅能维持在 65% 左右。单叶省藤的最适采种季节为每年的 10 月份~12 月份，由于该季节湿度小，室温条件下种子容易失水，从而迅速失去发芽能力，给种子繁殖增加了新的难度。

[0004] 而且，种子繁殖只能繁殖常规苗木，不能繁殖无性系苗木。由于单叶省藤为异花授粉植物，且驯化程度不高，所以天然林和现有人工林中的单叶省藤的杂合程度高，种子繁殖的苗木造林后，在生长、萌蘖、材性等方面分化大，既不利于平均产量的提高，也不利于藤林的集约化经营和藤条采收与销售。

[0005] 由于林木基因组杂合程度高，实生苗造林分化大，林木育种通常是走无性系育种的道路，即从育种群体中选出优树，然后通过无性繁殖的方法繁殖良种。现有只能以种胚为外植体的组培技术尚无法满足无性系育种和无性系推广的要求。如果不解决单叶省藤无性系组培快繁的技术问题，将严重制约单叶省藤无性系育种、良种的中试和良种的推广。

[0006] 上世纪九十年代开始，中国林业科学研究院热带林业研究所开始研究单叶省藤的组培快繁技术。但棕榈科植物组培技术研究难度大，经过两个五年计划的研究，也只能以种胚作外植体才能组培快繁成功，而用顶芽、萌蘖芽、根、叶等无性器官做外植体，则不能组培快繁成功。因而，原有的藤组培技术仅局限于种苗繁殖，即通过组织培养工厂化快繁苗木，但仍然不能繁殖无性系苗木。由于原有组培技术以种胚做外植体，繁殖材料的遗传基础无法完全控制，繁殖的苗木与种子繁殖的苗木相比没有品质差别，但组培繁育苗木的成本比种子繁育苗木要高，难以与种子繁育的苗木在市场上竞争，因而原有以种胚外植体的组培技术的应用前景不大。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的,是为了克服种子繁殖的苗木造林后,在生长、萌蘖、材性等方面分化大的缺点,提供一种单叶省藤无性系组培快繁方法。

[0008] 本发明的目的可以通过采取如下措施达到:

[0009] 一种单叶省藤无性系组培快繁方法,其特征是:利用单叶省藤萌蘖芽等无性器官进行组培快繁,具体步骤如下:

[0010] 1) 采集萌蘖芽外植体

[0011] 在连续晴天3~5天后用锯将萌蘖芽从母株上锯下来;在锯萌蘖芽外植体的过程中,必须防止芽体外伤和芽心震裂;

[0012] 2) 外植体的消毒

[0013] 采用两次消毒法,第一步,首先将外植体清洗干净,剥去2~3层叶鞘,用75%酒精消毒20~25秒,然后用0.1%氯化汞消毒10~12分钟,用无菌水漂洗1次10分钟;第二步,再剥去1~2层叶鞘并修剪至3~4cm长,用0.1%氯化汞消毒1~2分钟,再用无菌水漂洗3次,每次分别为5分钟,5分钟,10分钟;

[0014] 3) 防止褐变

[0015] 采用半胱氨酸或抗坏血酸或者二者结合对萌蘖芽外植体进行抗褐变处理,半胱氨酸和抗坏血酸的浓度分别为3mg/l和10mg/l;

[0016] 4) 丛芽诱导与增殖培养

[0017] 外植体采集并消毒后,首先在丛芽诱导培养基上诱导形成丛芽,诱导周期为3~5个月,中途需要转接与更换新鲜培养基2~3次;形成丛芽后,转接到增殖培养基上进行增殖培养,一次增殖培养的周期为45~50天;将大的丛芽切分成3~4个芽组成的小芽丛,转接到新鲜增殖培养基上进行下一次增殖培养,经过多次增殖培养即可将无性系苗木扩繁。

[0018] 5) 生根培养

[0019] 对高度大于或等于3.0cm的芽苗在生根培养基进行生根培养,生根培养的时间可以为50~60天,一次生根率可达85%以上;对未生根的芽苗在除去1~2层外层叶鞘和对基部进行修剪后,进行第二次生根培养,即可生根;对高度小于3.0cm的芽苗,先进行壮苗培养,让芽苗生长至3.0cm或以上高度,再进行生根培养;

[0020] 6) 田间移植

[0021] 高度大于8.0cm、根长度大于4.0cm、具有3片以上叶片的苗木最适合移植。适合单叶省藤组培苗移植的介质有细沙、泥炭土和黄心土,也可以将三者按1:1:2的比例混合,作为单叶省藤组培苗的移植介质。移植介质以1/1000的高锰酸钾溶液消毒,移植后每个星期用1/800的百菌清和多菌灵轮流喷施,防止杂菌滋生。移植后15天开始施肥,采用1/1000的复合肥溶液每1周喷施一次。移植后1~7天,95%的遮荫网遮荫,8~30天,85%的遮荫网遮荫,31~60天,70%的遮荫网遮荫,随后采用50%遮荫网遮荫,一直管理到苗木出圃造林。移植成活率大于85%。

[0022] 本发明的目的还可以通过采取如下措施达到:

[0023] 本发明的一种实施方式是:第1)步采集萌蘖芽外植体的高度可以为25~45cm。

[0024] 本发明的一种实施方式是:在第4)步丛芽诱导与增殖培养之后,当芽苗生长不到生根所需要的3.0cm高时,先在壮苗培养基进行壮苗培养,让芽苗生长到适合生根培养的

高度。

[0025] 本发明的一种实施方式是：在进行第4)步丛芽诱导时，将芽倾斜或平放，使之整体接触培养基，以促进芽的生长，促进二级蘖芽的萌发，促进增殖。

[0026] 本发明的一种实施方式是：在进行第5)步生根培养时，可以将芽苗高度和大小接近的2～4个芽切分在同一小芽丛，转接到生根培养基上进行生根培养，移植后即可培育成丛芽苗。

[0027] 本发明的一种实施方式是：可以在3～11月移植单叶省藤组培苗，其中3～6月份为单叶省藤组培苗的最佳移植季节，且温度、湿度均适合苗木的进一步培养，达到造林高度和要求。

[0028] 本发明的一种实施方式是：丛芽诱导培养基由大量元素、微量元素、有机成分、植物激素和蔗糖、卡拉胶组成，大量元素包括 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ ，微量元素包括 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 、 $\text{Kl}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，有机成分包括氨基乙酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、肌醇、维生素C和半胱氨酸，植物激素包括6-BA、IBA、NAA、KT和2,4-D；各组份的含量参见表1，丛芽诱导培养基的pH值为5.8。

[0029] 本发明的一种实施方式是：增殖培养基由大量元素、微量元素、有机成分、植物激素和蔗糖、卡拉胶组成，大量元素包括 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ ，微量元素包括 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 、 $\text{Kl}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，有机成分包括氨基乙酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、肌醇、维生素C和半胱氨酸，植物激素包括6-BA、IBA、NAA、KT和2,4-D；各组份的含量参见表1，增殖培养基的pH值为5.8。

[0030] 本发明的一种实施方式是：壮苗培养基由大量元素、微量元素、有机成分和蔗糖、卡拉胶组成，大量元素包括 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ ，微量元素包括 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 、 $\text{Kl}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，有机成分包括氨基乙酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、肌醇、维生素C和半胱氨酸；各组份的含量参见表1，壮苗培养基的pH值为5.8。

[0031] 本发明的一种实施方式是：生根培养基由大量元素、微量元素、有机成分、植物激素和蔗糖、卡拉胶组成，大量元素包括 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ ，微量元素包括 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 、 $\text{Kl}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，有机成分包括氨基乙酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸和肌醇，植物激素包括IBA和NAA；各组份的含量参见表1，生根培养基的pH值为5.8。

[0032] 本发明具有如下有益效果：

[0033] 1、本发明是利用萌蘖芽等无性器官进行组培快繁，解决单叶省藤无性系组培快繁的技术难题，扩大单叶省藤组培技术的应用范围，使它能用于单叶省藤的无性系育种和良种苗木的快繁，通过单叶省藤优良无性系苗木的快繁，既可促进棕榈藤人工种植业的发展，又可获取良好的经济效益。

[0034] 2、与原有种子育苗相比，本发明具有种苗繁殖速度快、种苗生产不易受到季节影响的优点。与已发表的以种胚为外植体的组培技术相比，本发明具有能够繁殖优良无性系的优点。本方法以萌蘖芽做外植体，可以繁殖经过选育和测定的优良无性系，生产的是良种

的苗木，具有强大的市场竞争力，因而本技术具有广阔的应用前景，可产生巨大的经济效益。

## 具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施例对本发明进行详细描述。

[0036] 本发明涉及的单叶省藤无性系组培快繁，具体方法可以按如下步骤进行：

[0037] 1) 萌蘖芽外植体的采集

[0038] 采集萌蘖芽外植体的关键在于防止芽体外伤和芽心的震裂。如果芽体有伤口，泥土容易进入芽体内部，无法消毒成功。芽心震裂后，伤口处即迅速褐变，易导致芽心的死亡。因而，不能用锄头将萌蘖芽挖离母株，也不能用刀砍，必须用锯将萌蘖芽从母株上锯下来。萌蘖芽处于土壤之中，必须尽量避免在雨天及雨后1～3天内采集。否则，污染率明显上升。

[0039] 适宜的萌蘖芽外植体的大小为25～45cm高。萌蘖芽过小，外植体消毒后易死亡，且没有形成足够的次级萌蘖芽原基，离体培养后容易出现持续的单芽高生长但不萌发次级萌蘖芽的现象。萌蘖芽过大，尤其是超60cm后，萌蘖芽已开始抽茎，茎尖不在基部。要保留茎尖，则外植体过大，养分吸收供应不上，茎尖无法生长，且露出在培养基外面的部分褐变严重，最终导致整个芽的死亡。不保留茎尖，外植体因缺乏茎尖，其次级蘖芽难以萌发。

[0040] 外植体的采集季节对消毒成功率、芽的生长和丛芽的诱导均有显著的影响。从2月至9月的各个月采集的外植体表明：2～3月初和9月份采集的外植体，因土壤干燥，容易消毒成功，4～8月份雨水较多，温度较高，雨后采集的外植体难以消毒成功。但2～3月份和9月份采集外植体在培养基上长时间不生长，难以诱导丛芽。尽管4～8月份采集的难以消毒成功，但外植体容易萌发，其基部的次级蘖芽也易萌发，从而容易增殖。因此，4～6月份适宜于采集萌蘖芽外植体。

[0041] 2) 外植体的消毒

[0042] 针对萌蘖芽外植体的芽心被多层叶鞘包裹的特点，采用两次消毒法。首先，用洗衣粉将外植体清洗干净，剥去2～3层叶鞘，75%酒精消毒20～25秒，0.1%氯化汞消毒10～12分钟，无菌水漂洗1次10分钟，再剥去1～2层叶鞘并修剪至适合于培养的3～4cm长，0.1%氯化汞消毒1～2分钟，无菌水漂洗3次，分别为5分钟，5分钟，10分钟。消毒成功率大于35%。

[0043] 3) 防止褐变

[0044] 棕榈藤萌蘖芽外植体消毒后褐变十分严重，不加处理会迅速死亡。经过系列研究发现，采用暗处理、附加活性碳等方法难以达到预期效果，使用聚乙烯吡咯烷酮则会导致外植体产生严重的白色分泌物，采用半胱氨酸和抗坏血酸可以有效地抑制芽外植体的褐变，二者结合效果更好。适宜于防止萌蘖芽外植体抗褐变的半胱氨酸和抗坏血酸的浓度分别为3mg/1和10mg/1。

[0045] 4) 丛芽诱导与增殖培养

[0046] 外植体采集并消毒后，首先在丛芽诱导培养基上诱导形成丛芽，诱导周期为3～5个月，中途需要转接与更换新鲜培养基2～3次，外植体的丛芽诱导率约15%。形成丛芽后，转接到增殖培养基上进行增殖培养，增殖培养的周期为45～50天，增殖倍数为3～4倍。将大的丛芽切分成3～4个芽组成的小芽丛，转接到新鲜增殖培养基上进行下一次增

殖培养,经过多次增殖培养即可将无性系苗木扩繁。丛芽诱导培养基的配方和增殖培养基的配方见表 1。

[0047] 从芽诱导时,接种与培养方法对萌蘖芽外植体的从芽诱导也有一定的影响。外植体消毒后,基部 0.2 ~ 0.5cm 因杀伤和褐变而死亡,死亡部分严重影响营养的吸收,必须将芽倾斜或平放,使之整体接触培养基,可显著促进芽的生长,促进二级蘖芽的萌发,从而促进增殖。

[0048] 5) 壮苗培养

[0049] 在增殖培养基上,大部分的芽苗生长不到生根所需要的 3.0cm 高,因此对于高度小于 3.0cm 的芽苗需要进行壮苗培养,让芽苗生长到适合生根培养的高度。壮苗培养基的配方见表 1。壮苗培养的时间需要 45 ~ 50 天,经过 1 次壮苗培养后 75% 以上的芽苗可达到生根培养所需要的高度。未达到生根培养高度的芽苗需要进行第二次壮苗培养。

[0050] 6) 生根培养

[0051] 高度大于 3.0cm 的芽苗最为适合生根培养,生根培养基的配方见表 1。生根培养的时间需要 50 ~ 60 天,生根率可达 85% 以上。未生根的芽苗在除去 1 ~ 2 层外层叶鞘和对基部进行修剪后,进行第二次生根培养,即可生根。

[0052] 如果想培育丛芽苗,可以将芽苗高度和大小接近的 2 ~ 4 个芽切分在同一小芽丛,转接到生根培养基上进行生根培养,移植后即可培育成丛芽苗。

[0053] 7) 田间移植

[0054] 高度大于 8.0cm、根长度大于 4.0cm、具有 3 片以上叶片的苗木最适合移植。适合单叶省藤组培苗移植的介质有细沙、泥炭土和黄心土,也可以将三者按 1 : 1 : 2 的比例混合,作为单叶省藤组培苗的移植介质。移植介质以 1/1000 的高锰酸钾溶液消毒,移植后每个星期用 1/800 的百菌清和多菌灵轮流喷施,防止杂菌滋生。移植后 15 天开始施肥,采用 1/1000 的复合肥溶液每 1 周喷施一次。移植后 1 ~ 7 天,95% 的遮荫网遮荫,8 ~ 30 天,85% 的遮荫网遮荫,31 ~ 60 天,70% 的遮荫网遮荫,随后采用 50% 遮荫网遮荫,一直管理到苗木出圃造林。移植成活率大于 85%。

[0055] 在田间移植时,在 3 ~ 11 月均可移植单叶省藤组培苗,其中 3 ~ 6 月份为单叶省藤组培苗的最佳移植季节,且温度、湿度均适合苗木的进一步培养,达到造林高度和要求。7 ~ 9 月份,温度过高,移植成活率略低,通过强度施肥,苗木可以达到造林高度。10 ~ 11 月份能够移植成活,但苗木生长季节已过,次年春季苗木尚无法达到造林高度。

[0056] 表 1 单叶省藤萌蘖芽组培快繁的培养基配方

[0057]

成分类别	配方 成分名称	丛芽诱导培养基的配方	增殖培养基的配方	壮苗培养基的配方	生根培养基的配方
大量元素	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825 mg/L	825 mg/L	825 mg/L	825 mg/L
	KNO <sub>3</sub>	3800 mg/L	3800 mg/L	3800 mg/L	950 mg/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340 mg/L	340 mg/L	340 mg/L	85 mg/L
	MgSO <sub>4</sub>	740 mg/L	740 mg/L	740 mg/L	185 mg/L
	CaCl <sub>2</sub>	664 mg/L	664 mg/L	664 mg/L	166 mg/L
微量元素	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3 mg/L	22.3 mg/L	22.3 mg/L	22.3 mg/L
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6 mg/L	8.6 mg/L	8.6 mg/L	8.6 mg/L
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg/L	6.2 mg/L	6.2 mg/L	6.2 mg/L
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25 mg/L	0.25 mg/L	0.25 mg/L	0.25 mg/L
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8 mg/L	27.8 mg/L	27.8 mg/L	27.8 mg/L
	Na <sub>2</sub> · EDTA	37.3 mg/L	37.3 mg/L	37.3 mg/L	37.3 mg/L
	KI	0.83 mg/L	0.83 mg/L	0.83 mg/L	0.83 mg/L
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L
有机成分	氨基乙酸	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L
	盐酸硫胺素	0.2 mg/L	0.2 mg/L	0.2 mg/L	0.1 mg/L
	盐酸吡哆醇	0.75 mg/L	0.75 mg/L	0.75 mg/L	0.5 mg/L
	烟 酸	0.5 mg/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L

[0058]

	肌 醇	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
	维 生 素 C	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L	
	半胱氨酸	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	
植物激素	6-BA	8 mg/L	4 mg/L		
	IBA	1 mg/L	0.5 mg/L		1.0—2.0 mg/L
	NAA	0.25 mg/L	0.125 mg/L		0.5—1.0 mg/L
	KT	0.5 mg/L	0.25 mg/L		
	2, 4-D	0.4 mg/L	0.2 mg/L		
其 它	蔗 糖	40g/L	40g/L	40g/L	40g/L
	卡拉胶	8.5~9.2g/L	8.5~9.2g/L	8.5~9.2g/L	8.5~9.2g/L
	pH	5.8	5.8	5.8	5.8

[0059] 本发明要求保护的快速繁殖还可包括其他实施例子。