



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101855995 B

(45) 授权公告日 2012. 01. 04

(21) 申请号 201010199342. 2

(22) 申请日 2010. 06. 12

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650204 云南省昆明市蓝黑路 132 号
专利权人 昆明虹之华园艺有限公司

(72) 发明人 张长芹 薛建平 孙育红

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108
代理人 马晓青

(51) Int. Cl.
A01H 4/00(2006. 01)

审查员 胡可

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

川东灯台报春的组培繁殖方法

(57) 摘要

提供濒危植物川东灯台报春 (*Primula mallophylla* Balf. f.) 的组培快繁方法。选取川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 的根状茎的茎尖为外植体, 经丛生芽诱导、继代并生根培养和试管苗移栽。使用该方法可达到一个茎尖诱导产生约 4 丛 50 个左右的新芽, 1. 5 个月后增殖系数为 2-3 倍, 生根率达 98%, 移栽成活率 96-100%, 极大地提高了川东灯台报春的繁殖能力, 为濒危物种 - 川东灯台报春的保存和规模化生产提供了技术支撑。

1. 川东灯台报春的组培繁殖方法,包括选择外植体、消毒、丛生芽诱导,继代并生根培养,试管苗移栽步骤,其特征在于外植体取川东灯台报春的茎尖,丛生芽诱导培养基为 $1/2MS+2.0mg/16BA+0.2mg/1\ NAA$, pH5.4-5.8;继代和生根培养基为 $1/2MS+1.5mg/16BA+0.5mg/1ZT+0.15mg/1NAA+0.5mg/1\ IAA$ 。

2. 根据权利要求1所述的组培繁殖方法,其特征在于所述外植体消毒先用洗洁精加自来水,浸泡2-3分钟,再用无菌水冲洗后晾2-3分钟,然后采用0.1%升汞溶液进行表面消毒8-10分钟。

3. 根据权利要求1所述的组培繁殖方法,其特征在于所述丛生芽诱导和继代及生根培养的温度为20-25℃,湿度30-45%。

4. 根据权利要求1所述的组培繁殖方法,其特征在于所述丛生芽诱导和继代及生根培养的光照条件为自然光150-200LUX+人工辅助光1500-2000LUX。

5. 根据权利要求1所述的组培繁殖方法,其特征在于移栽是生根组培苗在培养瓶内培养10天以后,炼苗3-4天,再移栽于温室大棚。

6. 根据权利要求1所述组培繁殖方法,其特征在于移栽基质为1份珍珠岩+1份腐殖土, pH为5.5-6.0。

7. 根据权利要求1所述的组培繁殖方法,其特征在于移栽在早上8-11点,温度为18-25℃下进行。

8. 根据权利要求书1-7中的任意一项所述的组培繁殖方法,其特征在于选取川东灯台报春的茎尖为外植体,用自来水加洗洁精进行浸泡和冲洗,然后用0.1%升汞溶液进行消毒8-10分钟,在无菌条件下用无菌水反复冲洗,接种至诱导培养基 $1/2MS+2.0mg/16BA+0.2mg/1\ NAA$, pH5.4-5.8,温度20-25℃,湿度30-45%,光照条件为自然光150-200LUX+人工辅助光1500-2000LUX下培养,长出丛生芽后转接入 $1/2MS+1.5mg/1\ 6BA+0.5mg/1\ ZT+0.15mg/1\ NAA+0.5mg/1IAA$ 中进行增殖、继代和生根,继代3-4次,每次10天;组培苗炼苗3-4天后,移栽于基质为1份珍珠岩+1份腐殖土, pH为5.5-6.0,湿度50-60%的大棚内,每天早晚各喷水一次。

川东灯台报春的组培繁殖方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及植物生物技术中植物组织培养方法，具体地说，涉及川东灯台报春的组织培养快繁方法。

[0002] 背景技术：川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 属于报春花科报春花属植物。川东灯台报春的花玫瑰紫色，花色艳丽，具有较高的观赏价值，据观察发现，虽然川东灯台报春在野外能够正常开花，但由于生境的丧失，生殖隔离严重，很少结果实。因此，种子的缺乏给本种的繁育带来了困难。迄今，川东灯台报春没有相关生物技术方法繁殖的研究与报道。为了使川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 在不能进行有性繁殖的基础上，能成功进行繁殖使之能够保存和可持续利用，需要研究该种的组织培养，并形成一套专门的组织培养繁殖技术体系。

发明内容：

[0003] 本发明的目的是提供濒危植物川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 的组织培养方法，使之在生殖败育的情况下能够繁衍，使该物种的保存能够得到保障，同时缩短离体培养时间，提高生根率和幼苗移栽率，为濒危川东灯台报春的可持续利用奠定组培种苗繁育基础。

[0004] 为了实现本发明的目的，本发明提供了如下的技术方案：

[0005] 川东灯台报春的组培繁殖方法，包括选择外植体、消毒、丛生芽诱导，继代并生根培养，试管苗移栽步骤，外植体取川东灯台报春的茎尖，丛生芽诱导培养基为 1/2MS+2.0mg/l 6BA+0.2mg/l NAA, pH5.4-5.8；继代和生根培养基为 1/2MS+1.5mg/l 6BA+0.5mg/l ZT+0.15mg/l NAA+0.5mg/l IAA。

[0006] 所述外植体消毒先用洗洁精加自来水，浸泡 2-3 分钟，再用无菌水冲洗后晾 2-3 分钟，然后采用 0.1% 升汞溶液进行表面消毒 8-10 分钟。

[0007] 所述丛生芽诱导和继代及生根培养的温度为 20-25℃，湿度 30-45%。

[0008] 所述丛生芽诱导和继代及生根培养的光照条件为自然光 150-200LUX+ 人工辅助光 1500-2000LUX。

[0009] 移栽是生根组培苗在培养瓶内培养 10 天以后，炼苗 3-4 天，再移栽于温室大棚。

[0010] 移栽基质为 1 份珍珠岩 +1 份腐殖土，pH 为 5.5-6.0。

[0011] 移栽在早上 8-11 点以前，温度为 18-25℃ 下进行。

[0012] 本发明方法可具体描述为：取川东灯台报春的茎尖为外植体，用自来水加洗洁精进行浸泡和冲洗，然后用 0.1% 升汞溶液消毒 8-10 分钟，无菌条件下用无菌水反复冲洗，接种至诱导培养基 1/2MS+2.0mg/l 6BA+0.2mg/l NAA, pH5.4-5.8, 温度 20-25℃, 湿度 30-45%，光照条件为自然光 150-200LUX+ 人工辅助光 1500-2000LUX 下培养，长出丛生芽后转接入 1/2MS+1.5.0mg/l 6BA+0.5mg/l ZT+0.15mg/l NAA+0.5mg/l IAA 中进行增殖、继代和生根，继代 3-4 次，每次 10 天；组培苗炼苗 3-4 天后，移栽于基质为 1 份珍珠岩 +1 份腐殖土，pH 为 5.5-6.0, 湿度 50-60% 的大棚内，每天早晚各喷水一次。

[0013] 本发明技术方案的提出是基于下述的研究基础：川东灯台报春的模式标本由法国传教士 R. P. Farges 于 19 世纪末期在川东城口区（今重庆市城口县）大巴山地区首次采集并存放于法国巴黎植物标本馆，其后被以不同的种名保存于英国邱园及爱丁堡植物园的标本馆，1916 年英国植物学家 I. B. Balfour 根据这些材料发表了此新种，之后再没有植物学家采集到该种植物。因此在 2004 年出版的中国红色名录中，该种植物被认为已灭绝。本发明人在对重庆市城口县大巴山地区进行野外考察时，采集到了中国特有濒危植物种川东灯台报春的标本。这是近百年来对该种除模式标本外的再度发现。通常以茎尖为外植体对报春花属植物的破坏较大，但由于川东灯台报春属于濒危植物又是百年以来在中国的再度发现，该种生殖隔离严重，在野外几乎采集不到种子，亟需扩繁、保存和可持续利用。组培扩繁不仅可以在短时间内获得大量的再生植株，而且通过茎尖再生的川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 试管苗生长健壮，移栽生长良好且能保持其优良性状不变。试管苗移栽的温度控制在 18-25℃，最好在早上 8-11 点进行移栽，组培苗虽然在生长过程中很少受病虫害的浸染，但为了预防病虫害的发生，在生长季内喷施多菌灵、氧化乐果 2-3 次为宜。夏季要注意通风。

[0014] 由于川东灯台报春在野外缺乏种子，长期以往可能会有灭绝的危险，本发明的组培方法其优点在于：

[0015] 1、通过建立川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 组培快繁方法，用于解决川东灯台报春缺乏种子不能繁育可能导致灭绝的危险，为该物种的繁殖提供保障。

[0016] 2、通过组培快繁得到的幼苗，成苗容易，一致性强，生长健壮，叶色浓绿，很少病虫害，易于管理。

[0017] 3、利用组培快繁方法繁殖的川东灯台报春 (*Primulamallophylla*) 不受季节限制，任何时候都可以进行组培。

[0018] 4、利用组培快繁的方法繁殖的川东灯台报春 (*Primulamallophylla*) 可以保持物种特性，使该物种能够延续和可持续利用。

[0019] 本发明的组培快繁方法繁育的川东灯台报春 (*Primulamallophylla*) 在 1 个月内增殖系数为 4，生根率几乎为 100%，移栽成活率也几乎为 100%，极大地提高了川东灯台报春 (*Primulamallophylla*) 的繁殖系数，阻止了由于生殖隔离缺乏种子导致该物种灭绝的危险，为该物种的保存和可持续利用提供了非常有效的繁殖方法。

具体实施方式：

[0020] 以下实施例用来进一步说明本发明的实质性内容。根据本发明技术方案和实施例的描述，也许同领域技术人员在本发明的基础上还可以对本发明技术方案进行一些修改和改进。因此，在不偏离本发明主要技术方案基础上所做的修改和改进，均应属于本发明所要求保护的范畴。

[0021] 对比实施例 1：

[0022] 以川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 的叶片为外植体探索丛芽诱导最适培养基。选用川东灯台报春的叶片为外植体探索最佳培养基配方。取川东灯台报春的叶片放入自来水加 2-3 滴洗洁精浸泡 5-10min，然后再用无菌水反复冲洗 5-6 次清除表面杂质。放在灭菌的培养皿中，然后再用 0.1% 升汞溶液进行表面消毒，消毒时间 3-4 分钟，取出放入钢

丝网内,再用无菌水冲洗 3-4 次,然后将消毒后的叶片放在消毒后的滤纸上,在超净工作台上将叶片切成 0.5-1cm 的小块,接种在丛芽诱导培养基上,每瓶接种 3-4 个,每种培养基接 5 瓶,放在培养基上。其中,6-BA 的浓度梯度为 1.0mg、1.5mg 和 2.0mg/l;NAA 的浓度梯度为 0.1,0.3 和 0.5mg/l,培养基 PH 为 5.4-5.8,采用完全随机设计。不同 6-BA 和 NAA 浓度影响川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 叶片的分化,接种 40 天后,叶片皱缩枯萎,但叶片切口处变肿胀肥厚,愈伤组织形成,45 天后,在 6-BA2.0mg/l 和 +0.2mg/lNAA 形成少量丛芽。

[0023] 实施例 1:

[0024] 以川东灯台报春 (*Primula mallophylla*) 的茎尖为外植体进行初培养、继代与生根培养,选取川东灯台报春的茎尖,放入自来水加 2-3 滴洗洁精浸泡 5-10min,然后再用无菌水反复冲洗 5-6 次清除表面杂质。放在灭菌的培养皿中,然后再用 0.1% 升汞溶液进行表面消毒,消毒时间 3-4 分钟,取出放入钢丝网内,再用无菌水冲洗 3-4 次,然后将消毒后的叶片放在消毒后的滤纸上,在超净工作台上将叶片切成 0.5-1cm 的小块,接种在丛芽诱导培养基 1/2MS+2.0mg/l6BA+0.2mg/l NAA, pH5.4-5.8 中进行启动培养,每瓶接种 3-4 个;7 天后长出愈伤组织后再转接在继代和生根等为一体的培养基 1/2MS+1.5mg/l 6BA+0.5mg/l ZT+0.15mg/l NAA+0.5mg/l IAA, pH5.4-5.8 上,每瓶转接 3-4 个,培养室的光照条件为自然光 150-200LUX+ 人工辅助光 1500-2000LUX,光照时间 12h/ 天。继代 3-4 次,每次 10 天。

[0025] 茎尖接种到一体培养基 5-7 天开始长愈伤组织,2 周后开始有丛芽分化,30 天后有从生芽长出,每个茎尖可以分化出大量的丛芽。

[0026] 统计结果显示;在一体培养基上接种 1 个月后,平均每个茎尖能分化出 50 个左右的丛芽,显著多于叶片诱导的丛芽的数量。而且继代和生根不用再转换培养基,达到了从启动、继代到生根为一体化培养的目的。同时,该培养基不仅提高了分化系数而且促进了生根。继代 30 天后,每个芽生长叶片 7-8 片,株高 4cm,株长出主根 5-7 条,绿色,直径 0.1-0.3mm,须根白色。另外,温度对丛芽的诱导和组培苗的生长和生根也起到了非常关键的作用,温度在 25-27℃,光照为自然光 150-200LUX+ 人工辅助光 1500-2000LUX,光照时间 12h/ 天。有利于丛芽分化,温度在 20-25℃,光照同上,则叶色浓绿,生长健壮,在这样的培养条件下,试管苗的增殖系数为 1 : 50,生根率为 100%,极大地提高了川东灯台报春的繁殖系数。

[0027] 当每株川东灯台报春在瓶内生根 7-8 条,根长为 1-3cm 时作移栽准备。先将瓶盖打开进行炼苗,同时在温室准备移栽准备,移栽基质为 1 份珍珠岩+1 份腐殖土, pH 为 5.5-6.0。将移栽基质装入移栽盘内,清水浸透,将炼苗 3-4 天后的组培苗移栽于温室内的移苗盘内,移栽时间在早上 8-11 点进行,温度在 18-25℃,覆薄膜并每天浇水 1-2 次,在早上 8-10 点以前打开薄膜以通气,湿度在 50-60%之间。10 天以后即可揭掉薄膜,进行正常管理。

[0028] 通过本发明的组培快繁方法,繁育的川东灯台报春在 1 个月内增殖系数为 4,生根率几乎为 100%,移栽成活率也几乎为 100%,极大地提高了川东灯台报春的繁殖系数,阻止了由于生殖隔离缺乏种子导致该物种灭绝的危险,为该物种的保存和可持续利用提供了非常有效的繁殖方法。