



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102715092 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201210239632. 4

(22) 申请日 2012. 07. 06

(71) 申请人 中国热带农业科学院热带作物品种
资源研究所

地址 571737 海南省儋州市宝岛新村

(72) 发明人 李志英 徐立 李腾敏

(74) 专利代理机构 海口翔翔专利事务有限公司
46001

代理人 莫臻

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

A01G 31/00 (2006. 01)

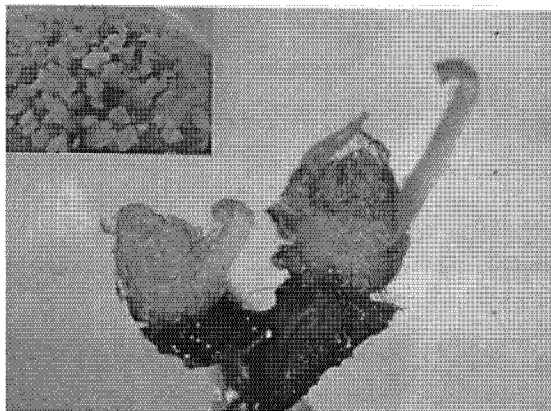
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

利用原叶体增殖途径快速繁育鸟巢蕨种苗的方法

(57) 摘要

本发明属于农业生物技术领域, 涉及一种利用原叶体增殖途径快速繁育鸟巢蕨种苗的方法, 包括原叶体培养过程、增殖培养过程、孢子体诱导过程、生根诱导过程、移栽和管理过程。本发明工艺流程简单, 以原叶体形式进行增殖, 可获得大量的原叶体, 通过增殖、孢子体诱导、孢子体生根、移栽等过程, 获得大量可用于生产栽培的种苗, 且获得的种苗生理年龄一致, 生长整齐, 适合工厂化育苗和规模化栽培。



1. 一种利用原叶体增殖途径快速繁育鸟巢蕨种苗的方法,其特征在于,包括原叶体培养过程、增殖培养过程、孢子体诱导过程、生根诱导过程、移栽和管理过程,其步骤如下:

1)、原叶体培养过程

取带未散开孢子的鸟巢蕨叶片,清洗消毒后用无菌纸吸干水分,取出孢子接种到孢子萌发培养基培养 40 ~ 60 d,待孢子萌发并长成绿色的原丝体;将孢子萌发后形成的原丝体接种于发育培养基上,25 ~ 30 d 后原丝体发育成原叶体;所述孢子萌发培养基是以 MS 培养基为基本培养基,并添加 BA 0.5 mg/L、蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8;所述发育培养基是以 MS 培养基为基本培养基,并添加 6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.02 mg/L、蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8;

2)、增殖培养过程

将原叶体团切割成 1 cm³ 的小块,接种到增殖培养基上进行继代增殖培养,每 40d 继代 1 次;所述增殖培养基是以 MS 培养基为基本培养基,并添加 6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.01 mg/L、蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8;

3)、孢子体诱导过程

将经过继代增殖培养的原叶体切成 0.5 cm³ 的小块,接种到孢子体诱导培养基上,20d 后,原叶体精子器和颈卵器发育成熟,再培养,直至在原叶体团中分化出大量孢子体;所述孢子体诱导培养基是以 MS 培养基为基本培养基,并添加 6-BA 3.0 mg/L、NAA 0.01 mg/L、蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8

4)、生根诱导过程

待孢子体的叶片伸长到 2 ~ 3 cm 时,将孢子体从原叶体团中单个分离出来,接种到生根培养基上,培养 30 d 后,在苗的基部形成棕色的根;所述生根培养基是以 1/2MS 培养基为基本培养基,并添加 NAA 0.5 mg/L、IBA 0.3 mg/L、蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8;

5)、移栽和管理过程

A. 出瓶:将株高在 4cm 以上的生根苗连瓶放置在室外炼苗,一周后将苗移出培养瓶外,洗净小苗根部的培养基,进行移栽;

B. 基质:分别取草炭土、椰糠和河沙,按重量比计:草炭土:椰糠:河沙=3:2:1 的比例配成基质,提前浇透水,并覆盖薄膜保湿;

C. 移栽:将已经湿透的基质进行浅翻,然后耙平,并用竹签打孔,孔深 0.5 cm,将小苗轻轻放到孔中,并用周围的基质填充,稍压实,并用喷雾的方法淋水;

D. 管理:移栽后 7 ~ 10 d,覆盖薄膜保湿,基质湿度保持 80% ~ 90% 左右,然后逐渐降低到 70%;空气湿度 90% 以上,然后逐渐降低到 60% ~ 70%;遮阴 60% ~ 70%,然后逐渐减少到 30%;

E. 施肥:15 ~ 20 d 后幼苗生新根,晴天上午采用 0.2% ~ 0.3% 尿素溶液喷雾后,并用清水淋洗,每 7 d 施肥 1 次;

F. 病虫害防治:利用 500 倍多菌灵、500 倍百菌清、800 倍甲霜灵复合防病,利用菊酯类杀虫剂除虫。

利用原叶体增殖途径快速繁育鸟巢蕨种苗的方法

技术领域

[0001] 本发明属于农业生物技术领域,具体涉及一种利用原叶体增殖途径快速繁育鸟巢蕨种苗的方法。该方法利用鸟巢蕨孢子诱导形成的原叶体,通过增殖、孢子体诱导、孢子体生根、移栽等过程,获得大量可用于生产栽培的种苗。

背景技术

[0002] 鸟巢蕨 (*Asplenium nidus*) 又名山苏花、雀巢蕨、雀巢养齿,属于铁角蕨类,是多年生常绿附生蕨类植物。产于亚洲、非洲和澳洲。鸟巢蕨具有四季常青、株形丰满、淡雅秀丽、叶色葱绿等特点,是布置厅堂、会场和制作花篮的良好观叶材料,切叶用量大,也是家庭园艺造景常用的材料。近年来又用作叶菜栽培,为地道的原生蔬菜,其嫩芽鲜绿,炒食质脆爽口,无苦涩味,颇受消费者的喜爱,未来的应用潜力大。

[0003] 在自然条件下,鸟巢蕨的繁殖方法通常用分株繁殖法,也可采用孢子繁殖法,但是孢子繁殖要求条件高,很难分化出苗。而利用组织培养进行鸟巢蕨的繁殖可以得到大规模的整齐瓶苗,且繁殖系数高,近年来关于鸟巢蕨的组织培养均通过小苗分化小苗的方式进行增殖,该方法增殖系数较低,分化出的小苗不整齐,先分化的小苗容易老化,不利于批量出苗。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种利用原叶体增殖途径快速繁育鸟巢蕨种苗的方法,以原叶体形式进行增殖,可获得大量的原叶体,通过增殖、孢子体诱导、孢子体生根、移栽等过程,获得大量可用于生产栽培的种苗。该方法获得的孢子体生理年龄一致,生长整齐,适合工厂化育苗和规模化栽培。

[0005] 本发明所采用的技术方案:

[0006] 一种利用原叶体增殖途径快速繁育鸟巢蕨种苗的方法,包括原叶体培养过程、增殖培养过程、孢子体诱导过程、生根诱导过程、移栽和管理过程,其步骤如下:

[0007] 1、原叶体培养过程

[0008] 取带未散开孢子的鸟巢蕨叶片,清洗消毒后用无菌纸吸干水分,取出孢子接种到孢子萌发培养基培养 40 ~ 60 d,待孢子萌发并长成绿色的原丝体(此时,在培养基的表面可以看到许多绿色的小点);将孢子萌发后形成的原丝体接种于发育培养基上,25 ~ 30 d 后原丝体发育成原叶体。所述孢子萌发培养基是以 MS 培养基为基本培养基,并添加 BA 0.5 mg/L、蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8。所述发育培养基是以 MS 培养基为基本培养基,并添加 6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.02 mg/L、蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8。

[0009] 2、增殖培养过程

[0010] 将原叶体团切割成 1 cm³ 的小块,接种到增殖培养基上进行继代增殖培养,每 40 d 继代 1 次,增殖系数可达 10 以上。所述增殖培养基是以 MS 培养基为基本培养基,并添加 6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.01 mg/L、蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8。

[0011] 3、孢子体诱导过程

[0012] 将经过继代增殖培养的原叶体切成 0.5 cm^3 的小块,接种到孢子体诱导培养基上,20 d 后,原叶体精子器和颈卵器发育成熟,再培养,直至在原叶体团中分化出大量孢子体。所述孢子体诱导培养基是以 MS 培养基为基本培养基,并添加 6-BA 3.0 mg/L 、NAA 0.01 mg/L 、蔗糖 30 g/L 、卡拉胶 6.5 g/L , pH 5.8。

[0013] 4、生根诱导过程

[0014] 待孢子体的叶片伸长到 $2\sim 3\text{ cm}$ 时,将孢子体从原叶体团中单个分离出来,接种到生根培养基上,培养 30 d 后,在苗的基部形成棕色的根,根上有根毛和叉根,生根率 95%。所述生根培养基是以 $1/2\text{MS}$ 培养基为基本培养基,并添加 NAA 0.5 mg/L 、IBA 0.3 mg/L 、蔗糖 30 g/L 、卡拉胶 6.5 g/L , pH 5.8。

[0015] 5、移栽和管理过程

[0016] A. 出瓶:将株高在 4cm 以上的生根苗连瓶放置在室外炼苗,一周后将苗移出培养瓶外,洗净小苗根部的培养基,进行移栽;

[0017] B. 基质:分别取草炭土、椰糠和河沙,按体积比计:草炭土:椰糠:河沙=3:2:1 的比例配成基质,提前浇透水,并覆盖薄膜保湿;

[0018] C. 移栽:将已经湿透的基质进行浅翻,然后耙平,并用竹签打孔,孔深 0.5 cm ,将小苗轻轻放到孔中,并用周围的基质填充,稍压实,并用喷雾的方法淋水;

[0019] D. 管理:移栽后 $7\sim 10\text{ d}$,覆盖薄膜保湿,基质湿度保持 $80\%\sim 90\%$ 左右,然后逐渐降低到 70% ;空气湿度 90% 以上,然后逐渐降低到 $60\%\sim 70\%$;遮阴 $60\%\sim 70\%$,然后逐渐减少到 30% ;

[0020] E. 施肥: $15\sim 20\text{ d}$ 后幼苗生新根,晴天上午采用 $0.2\%\sim 0.3\%$ 尿素溶液喷雾后,并用清水淋洗,每 7 d 施肥 1 次;

[0021] F. 病虫害防治:利用 500 倍多菌灵、500 倍百菌清、800 倍甲霜灵复合防病,利用菊酯类杀虫剂除虫。

[0022] 本发明工艺流程简单,以原叶体形式进行增殖,可获得大量的原叶体,通过增殖、孢子体诱导、孢子体生根、移栽等过程,获得大量可用于生产栽培的种苗,且获得的种苗生理年龄一致,生长整齐,适合工厂化育苗和规模化栽培。

附图说明

[0023] 图 1 是鸟巢蕨原叶体增殖效果图。

[0024] 图 2 是鸟巢蕨原叶体诱导出孢子体效果图。

[0025] 图 3 是鸟巢蕨孢子体生长效果图。

[0026] 图 4 是鸟巢蕨孢子体生根效果图。

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0028] 实施例一

[0029] 1、原叶体培养过程

[0030] 取带未散开孢子的鸟巢蕨叶片,用洗涤剂溶液浸泡 10 min,流失冲洗 10 min,在超净工作台用 0.1% HgCl_2 灭菌 8 min,无菌水冲洗 4 次后,用无菌纸吸干水分,用解剖刀将孢子刮出,接种到孢子萌发培养基(MS 基本培养基+BA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8),培养约 6~8 周后孢子萌发并长成绿色的原丝体,在培养基的表面可以看到许多绿色的小点;将孢子萌发后形成的原丝体接种于发育培养基(MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8),4 周后,原丝体发育成原叶体。

[0031] 2、增殖培养过程

[0032] 将原叶体团切割成 1 cm^3 的小块,接种到增殖培养基(MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8)上进行继代增殖培养,每 40 d 继代 1 次,原叶体在适当的培养基上可快速增殖,增殖系数可达 10 以上(图 1)。

[0033] 3、孢子体诱导过程

[0034] 将经过继代增殖培养的原叶体切成 0.5 cm^3 的小块,接种到孢子体诱导培养基(MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8)上,20d 后,原叶体精子器和颈卵器发育成熟,再培养 10 d,幼孢子体大量出现,随着培养进程的推进,在原叶体团中分化出大量孢子体(图 2)。将本发明所述孢子体诱导培养基为实验组,其他培养基(分别为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.02 mg/L、MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.02 mg/L、MS+6-BA 1.0 mg/L,其他条件与实验组相同)为对照组进行诱导实验对比,所得结果见表 1,实验组分化率最高,其分化率为 96%。

[0035] 表 1 鸟巢蕨原叶体分化孢子体的频率

[0036]

培养基(mg/L)	接种块数	诱导出芽孢	分化率(%)
MS+6-BA 1.0+NAA 0.02	50	48	96.00
MS+6-BA 1.0+IAA 0.02	50	35	70.00
MS+6-BA 1.0+IBA 0.02	50	38	76.00
MS+6-BA 1.0	50	26	52.00

[0037] 4、生根诱导过程

[0038] 待孢子体的叶片伸长到 2~3 cm 时(图 3),将孢子体从原叶体团中单个分离出来,接种到生根培养基(1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8)上,培养 30 d 后,在苗的基部形成棕色的根,根上有根毛和叉根(图 4)。将本发明所述生根培养基为实验组,其他培养基(分别为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L、1/2MS+NAA 1.0 mg/L、MS+NAA 0.5 mg/L、MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L、MS+NAA 1.0 mg/L,其他条件与实验组相同)为对照组进行生根实验对比,所得结果见表 2,实验组生根率最高,其生根率 95%。

[0039] 表 2 鸟巢蕨孢子体生根诱导效果

[0040]

培养基 (mg/L)	培养株数 (株)	生根总数 (根)	生根总株数 (株)	平均每株生根数 (根)	生根率 (%)
1/2MS+NAA0.5	50	142	43	2.84	86.00
1/2MS+NAA0.5+IBA0.3	50	187	47	3.75	95.00
1/2MS+NAA1.0	50	125	39	2.50	66.00
MS+NAA0.5	50	86	27	1.72	52.00
MS+NAA0.5+IBA0.3	50	98	30	1.98	60.00
MS+NAA1.0	50	82	28	1.64	56.00

[0041] 5、移栽和管理过程

[0042] A. 出瓶 : 将株高在 4cm 以上的生根苗连瓶放置在室外炼苗, 一周后将苗移出培养瓶外, 洗净小苗根部的培养基, 进行移栽 ;

[0043] B. 基质 : 草炭土 : 椰糠 : 河沙 (3:2:1) 配成的基质, 提前浇透水, 并覆盖薄膜保湿 ;

[0044] C. 移栽 : 将已经湿透的基质进行浅翻, 约 2 ~ 3 cm 深, 然后耙平, 并用竹签打孔, 孔深 0.5 cm, 将小苗轻轻放到孔中, 并用周围的基质填充, 稍压实, 并用喷雾的方法淋水。

[0045] D. 管理 : 移栽后 7 ~ 10 d, 覆盖薄膜保湿, 基质湿度保持 85% 左右, 然后逐渐降低到 70% ; 空气湿度 90% 以上, 然后逐渐降低到 60% ~ 70% ; 遮阴 60% ~ 70%, 然后逐渐减少到 30% 左右 ;

[0046] E. 施肥 : 15 ~ 20 d 后幼苗生新根, 晴天上午采用 0.2% ~ 0.3% 尿素溶液喷雾后, 并用清水淋洗, 每 7 d 施肥 1 次 ;

[0047] F. 病虫害防治 : 利用 500 倍多菌灵、500 倍百菌清、800 倍甲霜灵复合防病, 利用菊酯类杀虫剂除虫。

[0048] 以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明技术原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

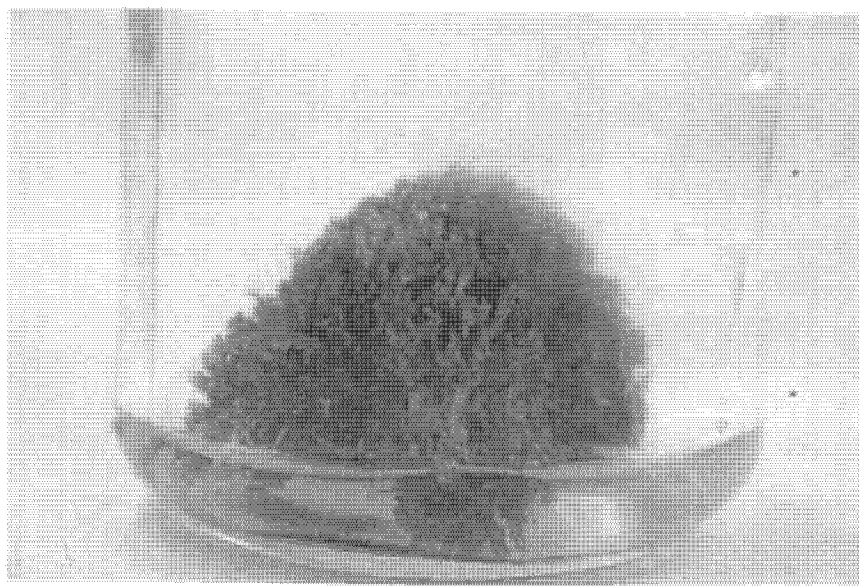


图 1

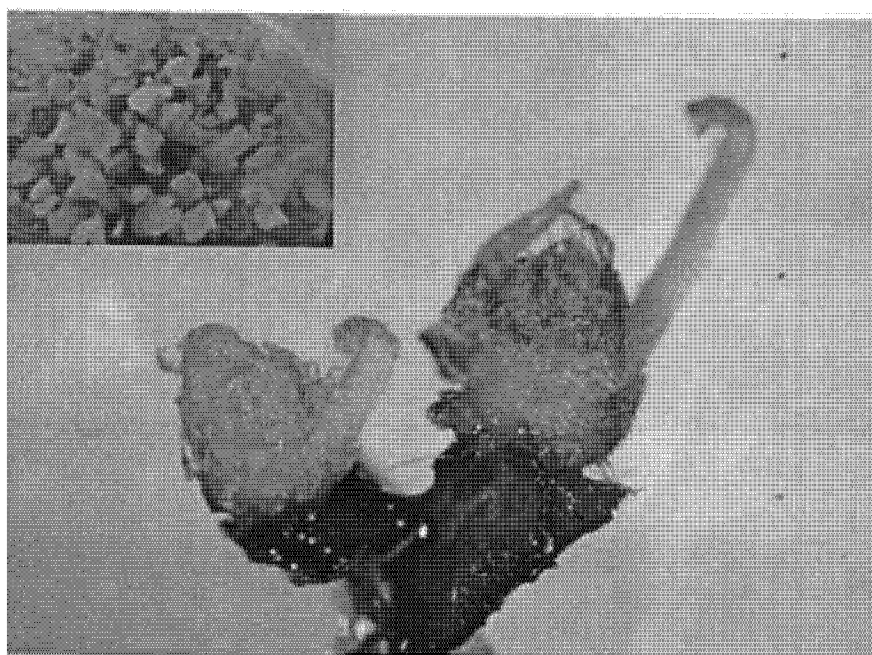


图 2



图 3

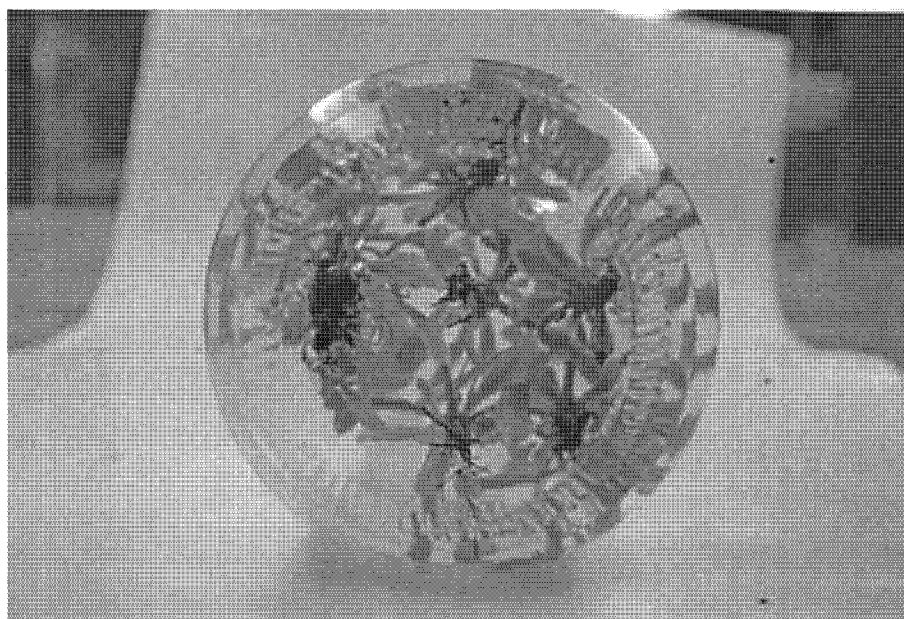


图 4