



(21) 申请号 201310344980. 2

(22) 申请日 2013. 08. 09

(73) 专利权人 南京金埔园林股份有限公司

地址 211103 江苏省南京市江宁区东山街道  
润麒路 70 号

(72) 发明人 王宜森 薛峰 窦逗 杨积卫

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1887065 A, 2007. 01. 03, 全文.

CN 1985578 A, 2007. 06. 27, 全文.

CN 102511399 A, 2012. 06. 27, 全文.

王碧琴等. 木兰科 7 种植物的组织培养技术研究. 《江西农业大学学报》. 2006, 第 28 卷 (第 2 期), 268-273.

审查员 李安

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种台湾含笑组织培养繁殖方法

(57) 摘要

本发明公开了一种台湾含笑组织培养繁殖方法,该方法包括以下步骤:外植体植株培养;选取外植体并进行消毒;采用改良的 WPW 培养基培养;将处理后的外植体切割后,进行腋芽初代诱导培养;高压静电场处理;继代增殖培养;生根诱导培养;采用本发明的组织培养繁殖方法,成功获得含根组培苗,增殖倍数为 86 倍,生根率为 82%,平均生根数为 3.1 条;炼苗成活率达到 90%,能够高效的得到台湾含笑种苗,大大满足了市场的需求。

1. 一种台湾含笑组织培养繁殖方法,包括如下步骤:

(1) 外植体的准备:3月份将台湾含笑植株进行平茬处理后放入温室培养;

(2) 外植体选取与消毒:6月份,选取当年生顶稍作为外植体,自来水冲洗干净后,进行消毒;

(3) 改良 WPM 培养基的制备:用  $\text{KNO}_3$  200mg/L 代替原 WPM 培养基中的  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,另外添加活性炭浓度为 1000mg/L,其他组分均无变化;

(4) 不定芽的诱导:取步骤(2)中经消毒后的外植体,切割为 0.8cm 长的茎段,每茎段带一腋芽,接种于不定芽诱导培养基中进行不定芽的诱导,培养温度为 20-26℃,首先在黑暗中培养 12 小时,然后光照培养 20-25 天,光照时间为 10-16 小时/天,光照强度为 1600-2000lx,所述不定芽诱导培养基为所述改良 WPM 培养基且添加的激素水平为:

KT-301mg/L+玉米素 0.8mg/L+6-BA0.1mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5mg/L;

(5) 高压静电场 HVEF 处理:利用高压静电场仪器,对不定芽进行静电场处理,强度为 10KV/cm,时间 0.5 小时;

(6) 继代增殖:将经高压静电场处理的不定芽接入继代增殖培养基,进行继代培养 20-30 天,培养温度为 20-26℃得到无根试管苗,光照时间为 10-16 小时/天,光照强度为 1600-2000lx,继代增殖培养基为所述改良 WPM 培养基并添加玉米素 0.2mg/L+KT-300.2mg/L+IBA0.1mg/L;

(7) 生根培养:将步骤(6)获得的台湾含笑无根试管苗接入生根培养基中进行生根培养 20-30 天,培养温度为 20-26℃,光照时间为 10-16 小时/天,光照强度为 1600-2000lx,生根培养基为所述改良 WPM 培养基并添加 IBA3.0mg/L;

(8) 无菌苗的驯化炼苗;

所述步骤(2)的消毒为:用毛刷蘸少许洗衣粉将外植体表面刷洗干净,接着用自来水冲洗 30 分钟,随后用稀释 50 倍的 84 消毒液摇床上振荡消毒 10 分钟,然后流水冲洗 3 分钟后,于无菌操作台上用 75%乙醇消毒 50-60 秒,立即倒入 0.1%的升汞消毒 10 分钟,最后用无菌水洗涤 3 次,每次振荡 3-5 分钟。

## 一种台湾含笑组织培养繁殖方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物生物技术领域,具体涉及一种台湾含笑 (*Michelia compressa*) 组织培养的繁殖方法。

### 背景技术

[0002] 台湾含笑 (*Michelia compressa*), 属木兰科 (*Magnoliaceae*) 含笑属 (*Michelia* L.) 植物。常绿大乔木, 树皮灰褐色, 略光滑。叶全缘或波状缘, 革质, 叶芽及花芽披有赤褐色绒毛。在常绿阔叶树种中, 台湾含笑的景观效果突出, 树形紧凑, 干性较强, 树冠近圆锥状, 侧枝皆向上斜伸、向主干靠拢, 浓绿而有光泽的叶片密集生于 1、2 年生枝条的顶端, 形成四季苍翠而浓密的树冠。花娇小淡雅, 微风轻拂, 散发出淡淡的香气。通过扩繁推广, 台湾含笑完全能够成为江苏地区乃至华东地区速生的、观赏价值较高的绿化观赏优良树种。

[0003] 台湾含笑原产台湾, 分布于台湾与日本。华中地区无野生资源发现, 栽培方面仅南京中山植物园一处引种保存 5 株。母本数量极其有限, 台湾含笑的原产地在气候、土壤和其他生物条件的巨大差异, 致使台湾含笑引种后结实量很少, 且其实生苗存在繁殖速度慢, 繁殖周期长, 种子发芽率较低, 幼苗不易存活等缺陷, 因此, 开展台湾含笑无性繁殖技术的研究, 不但能够有效增加树种资源存量, 为开发利用打下物质基础, 而且有利于台湾含笑树种的保护, 有关木兰科含笑属植物的组织培养, 国内外鲜有报道。刘芳等通过侧芽、叶片为外植体研究了云南含笑的组织培养, 得出了遇上途径繁殖云南含笑组培苗的方法 (云南含笑组织培养快繁技术, 云南农业科技, 2011 年第 2 期, 12-13 页)。朱碧华等采用成年树带芽茎段为外植体研究了紫花含笑不定芽途径的组织培养育苗技术 (紫花含笑的组织培养技术研究, 安徽农业科学, 2009 年第 29 期, 14024-14027 页)。李雪等以茎段茎尖为外植体, 进行了醉香含笑组织培养和植株再生的研究, 得出了诱导培养基、壮苗培养基和生根培养基 (醉香含笑的组织培养与植株再生, 植物生理通讯, 2005 年第 6 期, 783 页)。曾宋君、彭晓明利用休眠芽和种子萌发时实生苗的上胚轴及下胚轴为外植体诱导出了深山含笑的愈伤组织和不定芽 (深山含笑的组织培养与快速繁殖, 热带亚热带植物学报, 2000 年第 3 期, 264-268 页); 陈云霞论文对台湾含笑快繁技术进行研究初探, 然而, 其仅仅取得增殖系数为 2.906, 处于非常低的水平, 与其它木本植物组培效果相差甚远, 且其研究的所有生根处理都没有能够生根, 均没有诱导生根成功, 因此, 没有成功获得组培繁殖带根实生苗。

[0004] 目前对台湾含笑组织培养繁殖方法尚停留在较初级阶段, 本发明提供了一种台湾含笑组织培养的繁殖方法, 其操作简单快捷, 大大提高了增殖率和增殖速度, 获得含根无菌苗, 从而能够解决了台湾含笑在城市园林绿化、水源涵养、水土保持、绿色景观通道、生态建设等方面需求。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是公开了一种台湾含笑组织培养的繁殖方法, 为大量扩繁台湾含笑无性系植株提供技术支持。

[0006] 为了达到上述目的,本发明提供了一种台湾含笑组织培养的繁殖方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 外植体的准备:3月份将拟采集腋芽外植体的台湾含笑植株进行平茬处理后放入温室培养,外植体植株为2年生台湾含笑实生容器苗,3月份在近地面5cm处修剪掉主枝,并置入温室培养;

[0008] (2) 外植体选取与消毒:选取当年生顶梢作为外植体,自来水冲洗干净后,进行消毒,消毒方法为用毛刷蘸少许洗衣粉将其表面刷洗干净,接着用自来水流水冲洗30分钟,稀释50倍的84消毒液摇床上振荡消毒10分钟,流水冲洗3分钟后,于无菌操作台上用75%乙醇消毒50-60秒,立即倒入0.1%的升汞消毒10分钟,最后用无菌水洗涤3次,每次振荡3-5分钟;

[0009] (3) 改良WPM培养基的制备:用 $\text{KNO}_3$ 200mg/L代替原WPM培养基中的 $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,另外添加活性炭浓度为1000mg/L,其他组分均无变化。(注:本发明所用的所有改良WPM培养基均为该方法制备)

[0010] (4) 不定芽的诱导:取步骤(2)中经消毒后的外植体,切割为0.8cm长的茎段,每茎段带一腋芽,接种于诱导培养基中进行不定芽的诱导,培养温度为20-26℃,首先在黑暗中培养12小时,然后光照培养20-25天:光照时间为10-16小时/天,光照强度为1600-2000lx,所述不定芽诱导培养基为改良WPM培养基,添加的激素水平为:

[0011] KT-301mg/L+玉米素0.8mg/L+6-BA0.1mg/L+GA<sub>3</sub>0.5mg/L;

[0012] (5) 高压静电场HVEF处理,利用高压静电场仪器,进行静电场处理,强度为10KV/cm,时间0.5小时;

[0013] (6) 继代增殖:将经高压静电场处理的不定芽切割后接入继代增殖培养基,进行继代培养20-30天,培养温度为20-26℃,光照时间为10-16小时/天,光照强度为1600-2000lx,继代增殖培养基为改良WPM培养基并添加玉米素0.2mg/L+KT-300.2mg/L+IBA0.1mg/L;

[0014] (7) 生根培养:将步骤(6)获得的台湾含笑无根试管苗进行切割后,每株均有一个不定芽,接入生根培养基中进行生根培养20-30天,培养温度为20-26℃,光照时间为10-16小时/天,光照强度为1600-2000Lx,生根培养基改良WPM培养基并添加IBA3.0mg/L;

[0015] (8) 无菌苗的驯化炼苗:将步骤(7)所得台湾含笑带根无菌苗的培养瓶瓶盖打开,露天培养2-3天,然后移入采用多菌灵消毒的基质中,组培苗上方使用带孔PVC膜覆盖保湿,驯化容器采用50孔穴盘,放在通风阴凉处培养25-30天,培养到第15天将PVC膜移除,换用折光率75%的遮阳网;所述基质成分为重量比1:1的红壤土与珍珠岩;

[0016] 上述不定芽诱导培养基、继代增殖培养基、生根培养基中均含有琼脂6.0-7.0g/L、蔗糖20-35g/L,且pH值为5.2-6.0。

[0017] 本发明台湾含笑组织培养的繁殖方法具有以下优点:

[0018] 1、将提供外植体材料的植株“平茬”后移入温室培养:首先,由于外植体植株根部积累的养分多,“平茬”技术可以促进植株主干生长快速、高度增加明显,尤其是可以促使腋芽饱满,有利于组织培养中诱导腋芽萌发。

[0019] 2 外植体的消毒处理,本申请发明人经过大量创造性劳动及多因子实验,全面改进现有技术中的操作参数,发现,按照常规的消毒方式即单一次氯酸钠或者升汞消毒,存在一

定的污染率,存活率及褐化率并不理想,采用本申请的操作过程,不仅取得了理想的灭菌效果,

[0020] 还能够保证诱导培养所需的外植体数。

[0021]

组别	消毒方法	污染率	褐化率
1	0.1%升汞消毒 12 分钟	11%	10%
2	84 消毒液 5min ;0.1%升汞消毒 10 分钟	10%	8%
3	“安利” 30min ;84 消毒液 5min ;0.1%升汞消毒 10 分钟	9%	15%
4	84 消毒液 10min ;75%乙醇消毒 50-60 秒 ;0.1%升汞消毒 10 分钟	5%	0

[0022] 3 在 WPM 培养基上培养时,外植体不定芽不易分化出枝梢,外植体上只爆芽而不伸长,而在 MS 培养基上,不定芽分化为叶芽,对继代增值没有作用。在 B5 中生长缓慢,不定芽瘦弱,将 WPM 培养基改良后,改变了 NPK 比例,用  $\text{KNO}_3$ 200mg/L 代替原 WPM 培养基中的  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,另外添加活性炭浓度为 1000mg/L,其他组分均无变化,能够显著促进不定芽的分化及生长。

[0023] 以下为相同激素条件,不同培养基筛选部分方案:

[0024] 基本培养基的筛选

[0025]

基本培养基	25天诱导情况	继代生长情况	诱导率	叶柄/新稍长
MS	不定芽分化出1片叶片,无嫩枝,褐化	黄化,长势一般	61%	2-3mm
B5	不定芽分化出1片叶片,整体发黄,褐化	长势较弱	55%	1-2cm
WPM	茎段腋芽处分化出4-5个不定芽,但不伸长,呈豆状,大小不一,褐化,	顶稍1-2个腋芽不发育	72%	0
改良WPM	生长良好,较绿,分化出4-5条嫩梢茎段,基本不褐化,	生长良好	94%	4-5cm

[0026] 4 不定芽诱导生长周期中因受损伤、营养状况、环境因子的限制和影响呈 S 型生长曲线,但是静电场的处理影响了膜的通透性及其它极性分子的运动,改善了细胞的吸收和转运物质能力,从而能够促进组织的生长,使得继代延迟期缩短,很快进入对数生长期。利用静电场处理,不同的强度和组合会产生不同的效果,如果处理电场强度过大,或处理时间过长,会使得植物细胞受到伤害甚至死亡,而电场强度过小或时间过短,又会造成处理效果不明显,本申请发明人经过大量实验得出对台湾含笑采用强度为 10KV/cm,时间半小时的静电场处理可以显著改善生长状况,鲜重增加明显,生长速度为 110.7mg/d,大大促进了细胞的分裂和生长,缩短了离体培养的时间。

[0027] 5 对于植物组培领域研究如何利用植物组织分化再生植株,提高植物的繁殖数量,是科学家研究重要的技术重点也是技术难点,而激素种类及激素浓度使用范围,培养基类型更是重中之重,本申请发明人经过大量创造性劳动,筛选出台湾含笑的 不定芽诱导培养基、增殖培养基以及生根培养基分别为:

[0028] 改良 WPM 培养基 +KT-301mg/L+ 玉米素 0.8mg/L+6-BA0.1mg/L+GA<sub>3</sub>0.5mg/L;

[0029] 改良 WPM 培养基 + 玉米素 0.2mg/L+KT-300.2mg/L+IBA0.1mg/L；

[0030] 改良 WPM 培养基 +IBA3.0mg/L

[0031] 改良的 WPM 培养基,添加适量的活性炭,吸附植株分泌出的有毒次生代谢物,使植株生长活力保持旺盛,起到遏制褐化的作用；

	生根培养基类型	生根数	生根率	30 天后根长	根表现
[0032]	MS+IBA 3mg/L	1.1	21%	1cm	褐化严重,根瘦,偏黄
	改良 WPM+IBA 1mg/L	2.3	56%	3cm	根壮、白
	改良 WPM+NAA1mg/L	1.5	37%	3cm	根短、白、个别偏黄
	改良 WPM+IBA 3mg/L	3.1	82%	6cm	根粗、壮、白

[0033] 采用本发明的组织培养繁殖方法,最终增殖倍数为 81-86 倍;其中采用继代增殖培养基,增殖倍数为 8 倍;采用诱导培养基,不定芽诱导率为 94%,采用生根培养基,生根率为 82%,平均生根数为 3.1 条;炼苗成活率达到 90%。

### 具体实施方式

[0034] (1) 外植体的准备:2012 年 3 月份将拟采集腋芽外植体的台湾含笑植株进行平茬处理后放入温室培养,外植体植株为 2 年生台湾含笑实生容器苗,3 月份在近地面 5cm 处修剪掉主枝,并置入温室培养；

[0035] (2) 外植体选取与消毒:6 月下旬,选取当年生顶稍作为外植体,自来水冲洗干净后,进行消毒,消毒方法为用毛刷蘸少许洗衣粉将其表面刷洗干净,接着用自来水流水冲洗 30 分钟,稀释 50 倍的 84 消毒液摇床上振荡消毒 10 分钟,流水冲洗 3 分钟后,于无菌操作台上用 75%乙醇消毒 50-60 秒,立即倒入 0.1%的升汞消毒 10 分钟,最后用无菌水洗涤 3 次,每次振荡 3-5 分钟；

[0036] (3) 改良 WPM 培养基的制备:用  $\text{KNO}_3$ 200mg/L 代替原 WPM 培养基中的  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,另外添加活性炭浓度为 1000mg/L,其他组分均无变化。

[0037] (4) 不定芽的诱导:取步骤 (2) 中经消毒后的外植体,切割为 0.8cm 长的茎段,每茎段带一腋芽,接种于诱导培养基中进行不定芽的诱导,培养温度为 20-26℃,首先在黑暗中培养 12 小时,然后光照培养 20-25 天:光照时间为 10-16 小时/天,光照强度为 1600-2000lx,所述不定芽诱导培养基为改良 WPM 培养基,添加的激素水平为:

[0038] KT-301mg/L+ 玉米素 0.8mg/L+6-BA0.1mg/L+GA<sub>3</sub>0.5mg/L；

[0039] (5) 高压静电场 HVEF 处理,利用高压静电场仪器,进行静电场处理,强度为 10KV/cm,时间 0.5 小时；

[0040] (6) 继代增殖:将经高压静电场处理的不定芽切割后接入继代增殖培养基,进行继代培养 20-30 天,培养温度为 20-26℃,光照时间为 10-16 小时/天,光照强度为 1600-2000lx,继代增殖培养基为改良 WPM 培养基并添加玉米素 0.2mg/L+KT-300.2mg/L+IBA0.1mg/L；

[0041] (7) 生根培养:将步骤 (6) 获得的台湾含笑无根试管苗进行切割后,每株均有一个不定芽,接入生根培养基中进行生根培养 20-30 天,培养温度为 20-26℃,光照时间为 10-16 小时/天,光照强度为 1600-2000lx,生根培养基改良 WPM 培养基并添加 IBA3.0mg/L；

[0042] (8) 无菌苗的驯化炼苗 :将步骤 (7) 所得台湾含笑带根无菌苗的培养瓶瓶盖打开,露天培养 2-3 天,然后移入采用多菌灵消毒的基质中,组培苗上方使用带孔 PVC 膜覆盖保湿,驯化容器采用 50 孔穴盘,放在通风阴凉处培养 25-30 天,培养到第 15 天将 PVC 膜移除,换用折光率 75% 的遮阳网 ;所述基质成分为重量比 1 : 1 的红壤土与珍珠岩 ;

[0043] 上述不定芽诱导培养基、继代增殖培养基、生根培养基中均含有琼脂 6.0g/L、蔗糖 20g/L,且 pH 值为 5.2。

[0044] 采用上述台湾含笑的组织培养繁殖方法,成功获得含根组培苗,增殖倍数为 86 倍 ;其中采用继代增殖培养基,增殖倍数为 8 倍 ;采用诱导培养基,不定芽诱导率为 94%,采用生根培养基,生根率为 82%,平均生根数为 3.1 条 ;炼苗成活率达到 90%,能够高效的得到台湾含笑种苗,大大满足了市场的需求。

[0045] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,或在实施案例之外的树种实施本方法,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改,改进或范围的扩大,均属于本发明要求保护的范围。