



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107018905 B

(45)授权公告日 2018.11.09

(21)申请号 201710345525.2

CN 104904602 A, 2015.09.16,

(22)申请日 2017.05.17

CN 104585037 A, 2015.05.06,

(65)同一申请的已公布的文献号

高燕等. 酒瓶兰的组培快繁技术试验.《热带农业科技》. 2005, 第28卷(第1期), 第6-8页.

申请公布号 CN 107018905 A

审查员 王琼

(43)申请公布日 2017.08.08

(73)专利权人 天津润松生态科技发展有限公司

地址 300401 天津市青光镇红光龙凤里小区5号楼7门

(72)发明人 李晶瑶

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 105123526 A, 2015.12.09,

CN 105104202 A, 2015.12.02,

CN 105123524 A, 2015.12.09,

权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种酒瓶兰试管苗种质保存方法

(57)摘要

本发明公开了一种酒瓶兰试管苗种质保存方法,包括以下技术环节:1)酒瓶兰幼株预处理;2)外植体取材、消毒与接种;3)不定芽诱导;4)慢生长增殖保存种质;5)复壮;6)不定芽壮根后移栽。本发明提供的酒瓶兰试管苗种质保存方法可显著延长酒瓶兰种质的保存时间,同时大大节省保存所需的劳力、物力和空间,而且操作简便,稳定可靠,可重复性强,酒瓶兰试管苗经过复壮、壮根移栽到温室,成活率高,生长健壮,有效保持了酒瓶兰种质的优良性状,为酒瓶兰优良种质的保存提供了技术保障。



1. 一种酒瓶兰试管苗种质保存方法,其特征在于:该种质保存方法的详细步骤如下:

1) 酒瓶兰幼株预处理:

将生长健壮、无病虫害、基部带侧枝的盆栽酒瓶兰植株置于5-6℃低温培养箱中,低温黑暗处理4-6d,然后掰下侧枝,将侧枝基部浸入装有0.01g/L的多氯苯甲酸溶液中,5-6℃低温预处理3-4天;

2) 外植体取材、消毒与接种

将预处理后的酒瓶兰侧枝超纯水洗净后转入超净工作台进行无菌操作,剥去叶片,露出酒瓶兰嫩茎,将嫩茎先用浓度为75%酒精浸泡30s,然后投入加入了数滴吐温80的0.1%升汞溶液中,表面消毒12-15min后用灭菌水冲洗3-5次,滤纸吸干,将嫩茎用灭菌解剖刀分割成0.8-1.2cm的小茎段,然后将小茎段正向接种于装有诱导培养基的三角瓶中;

3) 不定芽诱导

培养室温度控制为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照强度控制为1200-1500Lx,光周期控制为光12h/暗12h,30-35天诱导出不定芽;

4) 慢生长增殖保存种质:

将不定芽接种至慢生长增殖培养基A或慢生长增殖培养基B中,然后将三角瓶转移到低温、弱光条件下缓慢生长,12个月继代接种一次,慢生长增殖培养基A和慢生长增殖培养基B继代接种交替使用,然后继续进行慢生长增殖步骤;

5) 复壮

当酒瓶兰种质保存期结束,需要进行酒瓶兰不定芽复壮,将慢生长增殖的不定芽转接入复壮培养基,然后转移到温度控制 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照强度控制为1200-1500Lx,光周期控制为光12h/暗12h,获得健壮的酒瓶兰不定芽;

6) 不定芽壮根后移栽:

将酒瓶兰不定芽转接到壮根培养基中,控制温度为23-25℃、光照强度为2000-2500 Lx培养条件下生长18-24天诱导生根,然后打开培养瓶炼苗7-10天后移栽入温室;

所述步骤2)中诱导培养基配方为:MS+2,4-D 2mg/L+NAA 0.2mg/L+蔗糖40g/L+氯化2-羟乙基三甲铵0.3g/L+水解蛋白0.6g/L+活性炭1.5g/L+琼脂6.5g/L,pH 5.8-6.0;

所述步骤4)中的慢生长增殖培养基A的配方为:KNO<sub>3</sub> 2200~2600mg/L,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1600~1800mg/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 160~180mg/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 430~450mg/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 360~380mg/L,Na<sub>2</sub>-EDTA 30~35mg/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22~26mg/L,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 21~24mg/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8~9mg/L,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1~0.2mg/L,KI 0.6~0.8mg/L,肌醇90~110mg/L,甘氨酸1.8~2.2mg/L,白喉霉素0.6~0.8mg/L,维生素B1 0.35~0.45mg/L,维生素B6 0.45~0.55mg/L,蔗糖23~27g/L,甘露醇27~33g/L,植物凝胶5.2~5.8g/L,NAA 0.15~0.25mg/L,2,4-D 0.8~1.2mg/L,调环酸钙0.9~1.1mg/L,山梨醇23~27g/L,水解蛋白0.9~1.1g/L,pH 5.8-6.0;

所述的慢生长增殖培养基B的配方为:KNO<sub>3</sub> 2200~2600mg/L,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1600~1800mg/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 160~180mg/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 20~30mg/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 360~380mg/L,Na<sub>2</sub>-EDTA 30~35mg/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22~26mg/L,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 21~24mg/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1~0.2mg/L,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5~6mg/L,KI 0.6~0.8mg/L,CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.04~0.06mg/L,Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15~0.2mg/L,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.15~0.2mg/L,肌醇90~110mg/L,甘氨酸1.8~2.2mg/L,白喉霉素0.6~0.8mg/L,维生素B1 0.35~0.45mg/L,维生素B6 0.45~0.55mg/L,蔗糖23~27g/L,甘露醇

27~33g/L,植物凝胶5.2~5.8g/L,NAA 0.15~0.25mg/L,2,4-D 0.8~1.2mg/L,调环酸钙0.9~1.1mg/L,山梨醇 23~27g/L,水解蛋白 0.9~1.1g/L,pH 5.8-6.0;

所述步骤4)中的低温、弱光条件为:培养温度控制为6-8℃,光照强度控制为500-600lx,光周期控制为光12h/暗12h;

所述步骤5)中的复壮培养基的配方为:MS+2.5mg/L6-BA+0.1mg/LNAA+3%蔗糖+0.8g/L水解蛋白+5.5g/L植物凝胶,pH 5.8-6.0;

所述步骤6)中的壮根培养基的配方为:1/2MS+多效唑0.1mg/L+蔗糖15g/L,pH为5.8。

2.根据权利要求1所述的酒瓶兰试管苗种质保存方法,其特征在于:所述步骤4)中的继代次数不超过4次。

## 一种酒瓶兰试管苗种质保存方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种酒瓶兰试管苗种质保存方法,属于园林科学技术领域。

### 背景技术

[0002] 酒瓶兰,学名*Beaucarnea recurvata* Lem.,又名象腿树,马尾巴树,因其茎干基部与酒瓶相像而得名,为龙舌兰科常绿植物,同时也是一种树状的多浆植物。酒瓶兰原产墨西哥及美国南部,为多肉植物,茎干直立,高可达2米以上,基部肥大形似酒瓶,直径可达30厘米,表面有厚厚的白色或褐色的小方块树皮层,像龟甲。线形叶子紧密地分布在茎干顶端,长可达1米以上,为软垂状,叶缘一般有细齿。花非常小,白色,成松散的圆锥花序,在我国少见开花。

[0003] 酒瓶兰为观茎赏叶花卉,观赏价值高,可以用其布置客厅、书室,装饰宾馆、会场,都给人以新颖别致的感受。它可以多种规格栽植作为室内装饰:以精美盆钵种植小型植株,置于案头、台面,显得优雅清秀;以中大型盆栽种植,用来布置厅堂、会议室、会客室等处,极富热带情趣,深受消费者欢迎。酒瓶兰不仅具有很好的美化作用,还可吸收室内的苯、甲醛等有害物质,净化家居。

[0004] 酒瓶兰为近十几年来才从外国引进的新的观赏植物。酒瓶兰常用种子繁殖,但国内栽培不易结籽,种子多由国外进口,价格昂贵,且繁殖速度极慢。通常酒瓶兰采用分株繁殖,但每株每年分株较少,无法满足产业化生产的要求。由于酒瓶兰一直采用分株繁殖,使其病毒逐代积累,从而造成酒瓶兰品种退化严重,优良种性严重退化甚至丧失,栽培利用价值大大降低,在生产中逐步淘汰。

[0005] 由于酒瓶兰在我国很难开花,所以育成的优良种质资源目前只能采用分枝繁殖,长期无性繁殖过程中易出现人为混杂和种性退化等。室内组培保存是将种质资源的外植体分离开母体进行组培,利用设备进行贮藏保存,其好处是所占空间小,所需的人力资源少,而又能较好地保护物种及其遗传的多样性。目前酒瓶兰的室内组培保存方法尚未建立,因此加强酒瓶兰生长特性的针对性研究,探索建立一种适宜的、保存时间久、稳定可靠的酒瓶兰种质资源保存方法对酒瓶兰的产业发展具有重要意义。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是针对目前我国酒瓶兰无法种子繁殖,酒瓶兰种质资源保存只能采用无性繁殖方式,而长期无性繁殖导致酒瓶兰种性退化严重的缺陷,提供了一种适宜的、保存时间久、稳定可靠的酒瓶兰试管苗种质保存方法。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案解决的:

[0008] 一种酒瓶兰试管苗种质保存方法,其特征在于,该种质保存方法包括以下技术环节:

[0009] 1)酒瓶兰幼株预处理;2)外植体取材、消毒与接种;3)不定芽诱导;4)慢生长增殖保存种质;5)复壮;6)不定芽壮根后移栽。

[0010] 该种质保存方法的详细步骤如下:

[0011] 1) 酒瓶兰幼株预处理:

[0012] 将生长健壮、无病虫害、基部带侧枝的盆栽酒瓶兰植株置于5-6℃低温培养箱中,低温黑暗处理4-6d,然后掰下侧枝,将侧枝基部浸入装有0.01g/L的多氯苯甲酸溶液中,5-6℃低温预处理3-4天;

[0013] 2) 外植体取材、消毒与接种

[0014] 将预处理后的酒瓶兰侧枝超纯净水洗净后转入超净工作台进行无菌操作,剥去叶片,露出酒瓶兰嫩茎,将嫩茎先用浓度为75%酒精浸泡30s,然后投入加入了数滴吐温80的0.1%升汞溶液中,表面消毒12-15min后用灭菌水冲洗3-5次,滤纸吸干,将嫩茎用灭菌解剖刀分割成0.8-1.2cm的小茎段,然后将小茎段正向接种于装有诱导培养基的三角瓶中;

[0015] 3) 不定芽诱导

[0016] 培养室温度控制为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照强度控制为1200-1500Lx,光周期控制为光12h/暗12h,30-35天诱导出不定芽;

[0017] 4) 慢生长增殖保存种质:

[0018] 将不定芽接种至慢生长增殖培养基A或慢生长增殖培养基B中,然后将三角瓶转移到低温、弱光条件下缓慢生长,12个月继代接种一次,慢生长增殖培养基A和慢生长增殖培养基B继代接种交替使用,然后继续进行慢生长增殖步骤;

[0019] 5) 复壮

[0020] 当酒瓶兰种质保存期结束,需要进行酒瓶兰不定芽复壮,将慢生长增殖的不定芽转接入复壮培养基,然后转移到温度控制 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照强度控制为1200-1500Lx,光周期控制为光12h/暗12h,获得健壮的酒瓶兰不定芽;

[0021] 6) 不定芽壮根后移栽:

[0022] 将酒瓶兰不定芽转接到壮根培养基中,控制温度为23-25℃、光照强度为2000-2500 Lx培养条件下生长18-24天诱导生根,然后打开培养瓶炼苗7-10天后移栽入温室。

[0023] 所述步骤2)中诱导培养基配方为:MS+2,4-D 2mg/L+NAA 0.2mg/L+蔗糖40g/L+氯化2-羟乙基三甲铵 0.3g/L+水解蛋白0.6g/L+活性炭1.5g/L+琼脂6.5g/L,pH 5.8-6.0。

[0024] 所述步骤4)中的慢生长增殖培养基A的配方为:KNO<sub>3</sub> 2200~2600mg/L,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1600~1800mg/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 160~180mg/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 430~450mg/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 360~380mg/L,Na<sub>2</sub>-EDTA 30~35mg/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22~26mg/L,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 21~24mg/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8~9mg/L,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1~0.2mg/L,KI 0.6~0.8mg/L,肌醇 90~110mg/L,甘氨酸 1.8~2.2mg/L,白喉霉素 0.6~0.8mg/L,维生素B1 0.35~0.45mg/L,维生素B6 0.45~0.55mg/L,蔗糖 23~27g/L,甘露醇27~33g/L,植物凝胶 5.2~5.8g/L,NAA 0.15~0.25mg/L,2,4-D 0.8~1.2mg/L,调环酸钙0.9~1.1mg/L,山梨醇 23~27g/L,水解蛋白 0.9~1.1g/L,pH 5.8-6.0;

[0025] 所述的慢生长增殖培养基B的配方为:KNO<sub>3</sub> 2200~2600mg/L,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1600~1800mg/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 160~180mg/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 20~30mg/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 360~380mg/L,Na<sub>2</sub>-EDTA 30~35mg/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22~26mg/L,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 21~24mg/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1~0.2mg/L,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5~6mg/L,KI 0.6~0.8mg/L,CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.04~0.06mg/L,Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15~0.2mg/L,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.15~0.2mg/L,肌醇 90~110mg/L,甘氨酸 1.8~2.2mg/L,

白喉霉素 0.6~0.8mg/L,维生素B1 0.35~0.45mg/L,维生素B6 0.45~0.55mg/L,蔗糖 23~27g/L,甘露醇27~33g/L,植物凝胶 5.2~5.8g/L,NAA 0.15~0.25mg/L,2,4-D 0.8~1.2mg/L,调环酸钙0.9~1.1mg/L,山梨醇 23~27g/L,水解蛋白 0.9~1.1g/L,pH 5.8-6.0。

[0026] 所述步骤4)中的低温、弱光条件为:培养温度控制为6-8℃,光照强度控制为500-600lx,光周期控制为光12h/暗12h。

[0027] 所述步骤4)中的继代次数不超过4次。

[0028] 所述步骤5)中的复壮培养基的配方为:MS+2.5mg/L6-BA+0.1mg/LNAA+3%蔗糖+0.8g/L水解蛋白+5.5g/L植物凝胶,pH 5.8-6.0。

[0029] 所述步骤6)中的壮根培养基的配方为:1/2MS+多效唑0.1mg/L+蔗糖15g/L,pH为5.8。

[0030] 本发明的有益效果:

[0031] (1)本发明首次建立了酒瓶兰试管苗种质保存方法,该方法稳定可靠,可重复性强,有效保持了酒瓶兰种质的优良性状,为酒瓶兰优良种质的保存提供了技术保障;

[0032] (2)本发明通过调控培养基组配和控制组织培养条件,有效地延缓了酒瓶兰试管苗的生长,试管苗保存周期可长达4年;

[0033] (3)本发明的酒瓶兰试管苗种质保存方法操作简便,保种成本低,大大节省了劳力、物力和空间,保种成本远远低于目前进口种子的生产成本;酒瓶兰试管苗经过复壮、壮根移栽到温室,生长健壮,成活率达90%以上,远远高于种子育苗的成活率水平,从而进一步节约了生产成本。

## 附图说明

[0034] 附图1为采用本发明技术路线,酒瓶兰种质选材青岚的照片;

[0035] 附图2为采用本发明技术路线,青岚外植体诱导出不定芽时的照片;

[0036] 附图3为采用本发明技术路线,青岚慢生长增殖保存种质继代接种4次后8个月时的照片;

[0037] 附图4为采用本发明技术路线,青岚移栽后生长3个月时的照片。

## 具体实施方式

[0038] 一种酒瓶兰试管苗种质保存方法,其特征在于,该种质保存方法的技术环节和详细步骤如下:

[0039] 1)酒瓶兰幼株预处理:

[0040] 将生长健壮、无病虫害、基部带侧枝的盆栽酒瓶兰植株置于5-6℃低温培养箱中,低温黑暗处理4-6d,然后掰下侧枝,将侧枝基部浸入装有0.01g/L的多氯苯甲酸溶液中,5-6℃低温预处理3-4天;

[0041] 2)外植体取材、消毒与接种

[0042] 将预处理后的酒瓶兰侧枝超纯水洗净后转入超净工作台进行无菌操作,剥去叶片,露出酒瓶兰嫩茎,将嫩茎先用浓度为75%酒精浸泡30s,然后投入加入了数滴吐温80的0.1%升汞溶液中,表面消毒12-15min后用灭菌水冲洗3-5次,滤纸吸干,将嫩茎用灭菌解剖刀

分割成0.8-1.2cm的小茎段,然后将小茎段正向接种于装有诱导培养基(诱导培养基配方为:MS+2,4-D 2mg/L+NAA 0.2mg/L+蔗糖40g/L+氯化2-羟乙基三甲铵 0.3g/L+水解蛋白0.6g/L+活性炭1.5g/L+琼脂6.5g/L,pH 5.8-6.0)的三角瓶中;

[0043] 3)不定芽诱导

[0044] 培养室温度控制为 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,光照强度控制为1200-1500Lx,光周期控制为光12h/暗12h,30-35天诱导出不定芽;

[0045] 4)慢生长增殖保存种质:

[0046] 将不定芽接种至慢生长增殖培养基A(慢生长增殖培养基A的配方为:KNO<sub>3</sub> 2200~2600mg/L,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1600~1800mg/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 160~180mg/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 430~450mg/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 360~380mg/L,Na<sub>2</sub>-EDTA 30~35mg/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22~26mg/L,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 21~24mg/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8~9mg/L,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1~0.2mg/L,KI 0.6~0.8mg/L,肌醇 90~110mg/L,甘氨酸 1.8~2.2mg/L,白喉霉素 0.6~0.8mg/L,维生素B1 0.35~0.45mg/L,维生素B6 0.45~0.55mg/L,蔗糖 23~27g/L,甘露醇27~33g/L,植物凝胶 5.2~5.8g/L,NAA 0.15~0.25mg/L,2,4-D 0.8~1.2mg/L,调环酸钙0.9~1.1mg/L,山梨醇 23~27g/L,水解蛋白 0.9~1.1g/L,pH 5.8-6.0)或慢生长增殖培养基B(慢生长增殖培养基B的配方为:KNO<sub>3</sub> 2200~2600mg/L,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1600~1800mg/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 160~180mg/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 20~30mg/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 360~380mg/L,Na<sub>2</sub>-EDTA 30~35mg/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22~26mg/L,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 21~24mg/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1~0.2mg/L,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5~6mg/L,KI 0.6~0.8mg/L,CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.04~0.06mg/L,Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15~0.2mg/L,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.15~0.2mg/L,肌醇 90~110mg/L,甘氨酸 1.8~2.2mg/L,白喉霉素 0.6~0.8mg/L,维生素B1 0.35~0.45mg/L,维生素B6 0.45~0.55mg/L,蔗糖 23~27g/L,甘露醇27~33g/L,植物凝胶 5.2~5.8g/L,NAA 0.15~0.25mg/L,2,4-D 0.8~1.2mg/L,调环酸钙0.9~1.1mg/L,山梨醇 23~27g/L,水解蛋白 0.9~1.1g/L,pH 5.8-6.0)中,然后将三角瓶转移到培养温度控制为6-8℃、光照强度控制为500-600lx、光周期控制为光12h/暗12h的低温、弱光条件下缓慢生长,12个月继代接种一次,继代次数不超过4次,慢生长增殖培养基A和慢生长增殖培养基B继代接种交替使用,然后继续进行慢生长增殖步骤;

[0047] 5)复壮

[0048] 当酒瓶兰种质保存期结束,需要进行酒瓶兰不定芽复壮,将慢生长增殖的不定芽转接入复壮培养基(复壮培养基的配方为:MS+2.5mg/L6-BA+0.1mg/LNAA+3%蔗糖+0.8g/L水解蛋白+5.5g/L植物凝胶,pH 5.8-6.0),然后转移到温度控制 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,光照强度控制为1200-1500Lx,光周期控制为光12h/暗12h,获得健壮的酒瓶兰不定芽;

[0049] 6)不定芽壮根后移栽:

[0050] 将酒瓶兰不定芽转接到壮根培养基中(壮根培养基的配方为:1/2MS+多效唑0.1mg/L+蔗糖15g/L,pH为5.8),控制温度为23-25℃、光照强度为2000-2500 Lx培养条件下生长18-24天诱导生根,然后打开培养瓶炼苗7-10天后移栽入温室。

[0051] 本发明提供的酒瓶兰试管苗种质保存方法可显著延长酒瓶兰种质的保存时间,同时大大节省保存所需的劳力、物力和空间,而且操作简便,稳定可靠,可重复性强,酒瓶兰试管苗经过复壮、壮根移栽到温室,成活率高,生长健壮,有效保持了酒瓶兰种质的优良性状,为酒瓶兰优良种质的保存提供了技术保障。

## 实施例

[0052] 2011年4月,在连云港市振兴花卉园选择酒瓶兰种质青岚,按照本发明的技术路线进行试管苗种质保存,种质保存试验在振兴花卉园组培试验室进行,其详细步骤如下:

[0053] 1) 酒瓶兰选材与预处理:

[0054] 2011年4月,在振兴花卉园温室大棚内选择生长健壮、无病虫害、基部带侧枝的盆栽酒瓶兰品种青岚的植株进行本发明的试管苗种质保存方法试验,如说明书附图1,将选材酒瓶兰置于组培试验室内的5.5℃低温培养箱中,低温黑暗处理5d,然后掰下侧枝,将侧枝基部浸入装有0.01g/L的多氯苯甲酸溶液中,5.5℃低温预处理4天;

[0055] 2) 外植体取材、消毒与接种

[0056] 将预处理后的青岚侧枝超纯水洗净后转入超净工作台进行无菌操作,剥去叶片,露出嫩茎,将嫩茎先用浓度为75%酒精浸泡30s,然后投入加入了数滴吐温80的0.1%升汞溶液中,表面消毒13m后用灭菌水冲洗4次,滤纸吸干,将嫩茎用灭菌解剖刀分割成1cm大小左右的小茎段,然后将小茎段正向接种于装有诱导培养基(诱导培养基配方为:MS+2,4-D 2mg/L+NAA 0.2mg/L+蔗糖40g/L+氯化2-羟乙基三甲铵 0.3g/L+水解蛋白0.6g/L+活性炭1.5g/L+琼脂6.5g/L,pH 5.8)的三角瓶中;

[0057] 3) 不定芽诱导

[0058] 培养室温度控制为26℃,光照强度控制为1300Lx,光周期控制为光12h/暗12h诱导不定芽,32天诱导出不定芽,青岚不定芽诱导如说明书附图2所示;

[0059] 4) 慢生长增殖保存种质:

[0060] 将不定芽接种至慢生长增殖培养基A(配方为:KNO<sub>3</sub> 2400mg/L,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1700mg/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 170mg/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 440mg/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 370mg/L,Na<sub>2</sub>-EDTA 32.5mg/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 24mg/L,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 22.5mg/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8.5mg/L,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.15mg/L,KI 0.7mg/L,肌醇 100mg/L,甘氨酸 2mg/L,白喉霉素 0.7mg/L,维生素B1 0.4mg/L,维生素B6 0.5mg/L,蔗糖 25g/L,甘露醇30g/L,植物凝胶 5.5g/L,NAA 0.2mg/L,2,4-D 1mg/L,调环酸钙1mg/L,山梨醇 25g/L,水解蛋白 1g/L,pH 5.9)中,继而转移到培养温度控制为7℃、光照强度控制为550lx、光周期控制为光12h/暗12h的低温、弱光条件下缓慢生长,12个月后继代接种,转移入慢生长增殖培养基B(配方为:KNO<sub>3</sub> 2400mg/L,NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1700mg/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 170mg/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 25mg/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 370mg/L,Na<sub>2</sub>-EDTA 32.5mg/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 24mg/L,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 22.5mg/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15mg/L,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5.5mg/L,KI 0.7mg/L,CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.05mg/L,Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.175mg/L,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.175mg/L,肌醇 100mg/L,甘氨酸 2mg/L,白喉霉素 0.7mg/L,维生素B1 0.4mg/L,维生素B6 0.5mg/L,蔗糖 25g/L,甘露醇30g/L,植物凝胶 5.5g/L,NAA 0.2mg/L,2,4-D 1mg/L,调环酸钙1mg/L,山梨醇 25g/L,水解蛋白 1g/L,pH 5.9)中,如此慢生长增殖培养基A和慢生长增殖培养基B继代接种交替使用,继代增值4次后青岚不定芽状态如说明书附图3所示,此时,酒瓶兰种质青岚的种质保存时间已达3年零8个月;

[0061] 5) 复壮

[0062] 2015年5月,将慢生长增殖的青岚不定芽转接入复壮培养基(复壮培养基的配方为:MS+2.5mg/L6-BA+0.1mg/LNAA+3%蔗糖+0.8g/L水解蛋白+5.5g/L植物凝胶,pH 5.9),然

后转移到温度控制26℃,光照强度控制为1300Lx,光周期控制为光12h/暗12h,15天后获得健壮的不定芽;

[0063] 6) 不定芽壮根后移栽:

[0064] 将青岚不定芽转接到壮根培养基中(壮根培养基的配方为:1/2MS+多效唑0.1mg/L+蔗糖15g/L,pH为5.8),控制温度为24℃、光照强度为2200 Lx培养条件下诱导生根,21天后打开培养瓶炼苗8天后移栽入振兴花卉园的温室内,然后统计青岚试管苗移栽成活率,达到93.3%,移栽后青岚长势健壮,抗性良好,青岚移栽后生长3个月转移入室外生长的图片如说明书附图4所示。

[0065] 本发明首次建立了酒瓶兰试管苗种质保存方法,该方法通过调控培养基组配和控制组织培养条件,不仅有效地延缓了酒瓶兰试管苗的生长,使得试管苗保存周期可长达4年,而且稳定可靠,可重复性强,有效保持了酒瓶兰种质的优良性状,为酒瓶兰优良种质的保存提供了技术保障。

[0066] 本发明的酒瓶兰试管苗种质保存方法操作简便,保种成本低,大大节省了劳力、物力和空间,保种成本远远低于目前进口种子的生产成本;酒瓶兰试管苗经过复壮、壮根移栽到温室,生长健壮,成活率达90%以上,远远高于种子育苗的成活率水平,从而进一步节约了生产成本。

[0067] 本领域技术人员可以根据本发明公开的内容和所掌握的本领域技术对本发明内容作出替换或变型,但是这些替换或变型都不应视为脱离本发明构思的,这些替换或变型均在本发明要求保护的权利要求范围内。



图1



图2

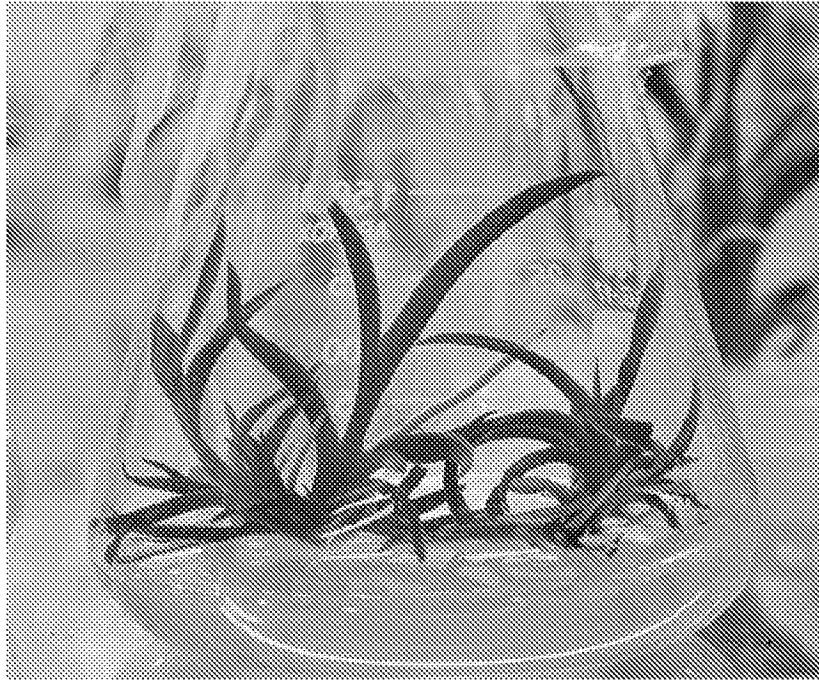


图3



图4