



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103651136 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201310660996. 4

(22) 申请日 2013. 12. 06

(71) 申请人 徐州生物工程职业技术学院
地址 221006 江苏省徐州市三环西路 65 路
车终点站

(72) 发明人 高宏秀 强承魁 张光琴 张莹

(74) 专利代理机构 徐州市三联专利事务所
32220

代理人 周爱芳

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

狐狸尾兰组织培养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种狐狸尾兰组织培养方法。本发明以狐狸尾兰未成熟种子作外植体,应用组织培养等生物技术对狐狸尾兰类原球茎体诱导、增殖和催根并获得狐狸尾兰组织培养所需培养基的最佳条件;(1)液体培养基有利于类原球茎体短期的快速增殖,长期继代培养及保存类原球茎体时选用固体 1/2MS 培养基适宜;(2)在培养过程中,施加 1mg/L 的 BA 的效果更优一些,及可以增加类原球茎体的数目,又不会引起玻璃化的产生;(3)在培养基中加入 1.0g/L 维生素 C 可以有效抑制外植体的褐化。

1. 一种狐狸尾兰组织培养方法,其特征在于:以狐狸尾兰未成熟种子作外植体,应用组织培养等生物技术对狐狸尾兰类原球茎体诱导、增殖和催根并获得狐狸尾兰组织培养所需培养基的最佳条件;具体步骤如下:

1) 无菌材料的获得

用去离子水冲洗狐狸尾兰果实表面,然后在超净工作台上用 80% 酒精表面消毒果实 2min, 无菌水冲洗 3 次,再用无菌滤纸吸干水分,然后用解剖刀切开荚果,取出细小种子,轻轻将种子均匀散落到固体培养基上,每平板接种量为 55 粒种子;

2) 类原球茎体诱导

把狐狸尾兰的种子分别接种于诱导培养基中,诱导原球茎(类原球茎体)的形成;培养基组成成分如下:VW+6-BA1.5mg/L+NAA0.1mg/L;

3) 培养方式的筛选

将诱导出的类原球茎体接种在 1/2MS 培养基上,分别采用固体培养和液体转动培养两种方式,4 次重复,每个处理接种 20 个三角瓶;四周后统计类原球茎体的增殖倍数;其增殖倍数 = 新长出的类原球茎体 / 接种类原球茎体数;

4) 植物生长调节剂浓度的筛选

以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的 BA, KT, IBA NAA 这四种生长调节剂,分别进行单因素试验,每处理 4 次重复,每个处理接种 20 个三角瓶;四周后统计类原球茎体的增殖倍数,计算方法同步骤 3);

5) 不同添加物对类原球茎体的褐化

以 1/2MS 为基本培养基,在培养基中分别添加不同浓度的维生素 C、活性炭 AC 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;分别进行单因素试验,每处理 3 次重复,每个处理接种 20 个三角瓶;50 天后观察并记录类原球茎体褐化和生长状况。

狐狸尾兰组织培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种狐狸尾兰组织培养方法。

背景技术

[0002] 狐狸尾兰 (*Rhynchos tylic gigantea*) 又名钻喙兰、海南钻喙兰、狐尾兰, 为兰科钻喙兰尾多年生附生草本, 其在野生环境下多附生于橡胶树、枫树或榕树上, 是我国海南野生名优兰品种之一。狐狸尾兰叶片肥厚、翠绿, 宽带状, 外弯, 多有数条浅色的纵条纹, 茎直立, 具数节, 不分枝。狐狸尾兰花序直立或呈下垂状, 且花序多而密集; 花瓣比萼片小; 其唇瓣呈浅 3 裂或不裂状; 距两侧压扁; 蕊柱短, 蕊柱足较短; 花粉块 2 个, 有不同程度的裂隙, 呈蜡质状; 具有狭长的蕊喙柄以及较小粘盘, 花期通常在 1-3 月。狐狸尾兰的花色也较为丰富, 有红、粉红、白、蓝、橘等颜色。由于其花型独特, 花色丰富, 花期长, 且花期为我国传统春节前后, 是极好的新春贺岁花卉, 因此受到人们的极度喜欢^[1]。

[0003] 然而, 由于我国海南地区热带森林过量采伐, 致使野生狐狸尾兰的自然生境受到严重破坏, 加上人为的过度采集出售, 致使野生狐狸尾兰数量锐减, 严重影响了狐狸尾兰生态群的构成。且由于狐狸尾兰的种子在自然条件下不易萌发, 采用种子繁殖很难获得后代, 虽然可以采取分株方法, 但是这种方法不仅繁殖系数低, 且繁殖速度非常慢, 远远不能满足市场的需求^[2]。

[0004] 目前, 通过组织培养的技术来快速繁殖已在很多兰科植物普遍应用, 比较常见的如蝴蝶兰、大花蕙兰等。

发明内容

[0005] 本发明提供一种狐狸尾兰组织培养方法, 为狐狸尾兰工厂化育苗提供科学依据。

[0006] 本发明是以如下技术方案实现的: 一种狐狸尾兰组织培养方法, 以狐狸尾兰未成熟种子作外植体, 应用组织培养等生物技术对狐狸尾兰类原球茎体诱导、增殖和催根并获得狐狸尾兰组织培养所需培养基的最佳条件; 具体步骤如下:

[0007] 1) 无菌材料的获得

[0008] 用去离子水冲洗狐狸尾兰果实表面, 然后在超净工作台上用 80% 酒精表面消毒果实 2min, 无菌水冲洗 3 次, 再用无菌滤纸吸干水分, 然后用解剖刀切开荚果, 取出细小种子, 轻轻将种子均匀散落到固体培养基上, 每平板接种量为 55 粒种子;

[0009] 2) 类原球茎体诱导

[0010] 把狐狸尾兰的种子分别接种于诱导培养基中, 诱导原球茎(类原球茎体)的形成。培养基组成成分如下: VW+6-BA1.5mg/L+NAA0.1mg/L;

[0011] 3) 培养方式的筛选

[0012] 将诱导出的类原球茎体接种在 1/2MS 培养基上, 分别采用固体培养和液体转动培养两种方式, 4 次重复, 每个处理接种 20 个三角瓶; 四周后统计类原球茎体的增殖倍数; 其增殖倍数 = 新长出的类原球茎体 / 接种类原球茎体数;

[0013] 4) 植物生长调节剂浓度的筛选

[0014] 以 1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 BA, KT, IBA NAA 这四种生长调节剂, 分别进行单因素试验, 每处理 4 次重复, 每个处理接种 20 个三角瓶; 四周后统计类原球茎体的增殖倍数, 计算方法同步骤 3);

[0015] 5) 不同添加物对类原球茎体的褐化

[0016] 以 1/2MS 为基本培养基, 在培养基中分别添加不同浓度的维生素 C、活性炭 AC 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 分别进行单因素试验, 每处理 3 次重复, 每个处理接种 20 个三角瓶; 50 天后观察并记录类原球茎体褐化和生长状况。

[0017] 本发明的有益效果是: 本发明通过对不同条件下类原球茎体增殖倍数的研究, 来明确培养基中各种成分的作用方式, 最终得出如下结论: (1) 液体培养基有利于类原球茎体短期的快速增殖, 长期继代培养及保存类原球茎体时选用固体 1/2MS 培养基适宜; (2) 在培养过程中, 施加 1mg/L 的 BA 的效果更优, 可以增加类原球茎体的数目, 又不会引起玻璃化的产生; (3) 在培养基中加入 1.0g/L 维生素 C 可以有效抑制外植体的褐化。

具体实施方式

[0018] 实施例 1

[0019] 1) 无菌材料的获得

[0020] 用去离子水冲洗狐狸尾兰果实表面, 然后在超净工作台上用 80% 酒精表面消毒果实 2min, 无菌水冲洗 3 次, 再用无菌滤纸吸干水分, 然后用解剖刀切开荚果, 取出细小种子, 轻轻将种子均匀散落到固体培养基上, 每平板接种量为 55 粒种子;

[0021] 2) 类原球茎体诱导

[0022] 把狐狸尾兰的种子分别接种于诱导培养基中, 诱导原球茎(类原球茎体)的形成。培养基组成成分如下: VW+6-BA1.5mg/L+NAA0.1mg/L;

[0023] 3) 培养方式的筛选

[0024] 将诱导出的类原球茎体接种在 1/2MS 培养基上, 分别采用固体培养和液体转动培养两种方式, 4 次重复, 每个处理接种 20 个三角瓶; 四周后统计类原球茎体的增殖倍数; 其增殖倍数 = 新长出的类原球茎体 / 接种类原球茎体数;

[0025] 4) 植物生长调节剂浓度的筛选

[0026] 以 1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 BA, KT, IBA NAA 这四种生长调节剂, 分别进行单因素试验, 每处理 4 次重复, 每个处理接种 20 个三角瓶; 四周后统计类原球茎体的增殖倍数, 计算方法同步骤 3);

[0027] 5) 不同添加物对类原球茎体的褐化

[0028] 以 1/2MS 为基本培养基, 在培养基中分别添加不同浓度的维生素 C、活性炭 AC 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 分别进行单因素试验, 每处理 3 次重复, 每个处理接种 20 个三角瓶; 50 天后观察并记录类原球茎体褐化和生长状况。

[0029] 实验结果分析

[0030] 1、培养条件对类原球茎体增殖的影响

[0031] 在两种培养模式下的类原球茎体增殖倍数统计见表 1。

[0032] 表 1. 原球茎体增殖在不同培养条件下的增殖情况

	培养条件	增殖倍数	外观表现
[0033]	固体 1/2 MS 培养基	4.52±0.07	类原球茎体生长较慢 呈嫩绿色
	液体 1/2 MS 培养基	6.54±0.05**	类原球茎体生长较快 呈黄白色 易产生玻璃化现象

[0034] 注:**表示差异达到极显著水平

[0035] 由表 1 看出,液体 1/2MS 培养基中培养的类型原球茎体的增殖倍数极显著的高于固体 1/2MS 培养基条件下的增殖速度。但同时也表现出固体 1/2MS 培养基上的类型原球茎体的外观表现较好,呈现出嫩绿色的外观,质地紧致。而在液体培养基中类型原球茎体粒数多,颗粒大但组织结构较疏松,且严重玻璃化,丧失了分化能力,这与陈春满(2002)在象牙白花兰种子的组织培养研究结果类似^[4]。因此,液体培养基有利于类型原球茎体短期的快速增殖,一旦时间过长,将丧失分化能力。如果要长期继代培养及保存类型原球茎体时选用固体 1/2MS 培养基适宜。

[0036] 3.2 植物生长调节浓度对类对圆球茎体增值的影响

[0037] 细胞分裂素种类和浓度的对类圆球茎体增值的影响结果见表 2

[0038] 表 2 类圆球茎体增值在不同细胞分裂素种类和浓度下的增值情况

[0039]

BA 浓度	增值倍数	生长特征	KT 浓度	增值倍数	生长特征
0.1	2.33±0.5	类圆球茎体绿色、分生少、生长慢	0.1	7.33±0.3	圆球茎体嫩绿色、生长慢
0.5	5.66±0.2	类圆球茎体绿色、分生少、生长慢	0.45	9.61±0.7	类圆球茎体簇生、嫩黄色且数目少
1	9.33±0.7	类圆球茎体较大、嫩绿色、分生多、增值型类圆球茎体形成较多	1	7.96±0.4	类圆球茎体簇生、部分玻璃化、暗绿色
3	7.63±0.6	类圆球茎体分生多、嫩绿色、形成伸长型类圆球茎体少	3	5.81±0.2	类圆球茎体严重玻璃化

[0041] 根据表 2 的结果,可以看出细胞分裂素 KT、BA 都对类圆球茎体的增值明显的促进作用。表上看,0.45mg/L 的 KT 相对于 BA 的增值效果更好一些,这样说明了狐狸尾兰类圆球茎体对 KT 反应较为敏感,超过一定浓度,如浓度达到 1mg/L 或高于这个浓度,则会增加类圆球茎体玻璃化的几率。因此,笔者认为 1.0mg/L 浓度的 KT 相对于 BA 效果更好,说明此狐狸尾兰的根状茎对 KT 更敏感。

[0042] 3.3 不同添加物对类圆球茎体褐化的影响

[0043] 前人的研究认为活性炭、维生素 C 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 可以减缓或抑制培养物褐化。在 1/2MS 培养基中添加不同附加物,并观察比较其对类圆球茎体生长状况的影响。施加不同浓度 Vc 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的培养基中类圆球茎体褐化程度表见表 3。

[0044] 表 3 不同添加物对类圆球茎体褐化的影响

	添加物 (g/L)	褐化程度
[0045]	Vc0.8	较轻
	Vc0.5	严重
	Vc10	较轻
	Vc5	较轻
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.2	严重

[0046] 从表 3 中我们可以看出 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 没有有效抑制狐狸尾兰褐化,为了确认这一结果,笔者又对外植体进行了暗培养、接种前用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浸泡外植体等处理,均没有抑制狐狸尾兰褐化。这可能是由于醌类化合物被外植体排到培养基中,从而抑制了植物体内的酶活性。不同浓度维生素 C 也有在一定程度上也能抑制褐化,不同浓度活性炭一定程度上也能抑制褐化,其原因可能是活性炭吸附了培养基中的有害物质时,也常常会吸附营养物质,因此,笔者推荐 0.8mg/L 维生素 C 作为外植体褐化的抑制剂。除此之外,长时间继代培养可使培养物逐渐脱除酚类物质。

[0047] 结论

[0048] 根据本发明并结合前人的研究结果,对狐狸尾兰组织培养条件进行了优化研究最终得出如下结论:(1)液体培养基有利于类原球茎体短期的快速增殖,一但时间过长,将丧失分化能力,如果要长期继代培养及保存类原球茎体时选用固体 1/2MS 培养基适宜;(2)在培养过程中,施加 1.0mg/L 的 BA 的效果会更优一些,及可以增加类原球茎体的数目,又不会引起玻璃化的产生;(3)在培养基中加入 1.0g/L 维生素 C 可以有效抑制外植体的褐化。