



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102405832 A

(43) 申请公布日 2012.04.11

(21) 申请号 201110237661.2

(22) 申请日 2011.08.18

(71) 申请人 普罗米绿色能源(深圳)有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区科智西路  
科技园工业区厂房 25 栋 2 段 3 层西

(72) 发明人 孙怀娟 孔晓香 李艳梅 陈小莲  
李耿光

(74) 专利代理机构 深圳市维邦知识产权事务所  
44269

代理人 黄莉

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

### (54) 发明名称

小桐子快速繁殖方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种小桐子快速繁殖方法,包括如下步骤:准备再生芽步骤,以小桐子成熟种子为材料,经培育获得无菌再生芽;增殖诱导步骤,将再生芽切下,接入增殖培养基进行增殖培养,从而获得增殖的丛芽;伸长培养步骤,将增殖后的丛芽切下,接入伸长培养基进而获得茎叶伸长的均匀的芽;壮苗培养步骤,将伸长后的芽接入壮苗培养基进行壮苗培养;生根移栽步骤,选取壮苗培养后茎叶生长均匀的芽切下接入生根培养基进行生根培养,生出符合移栽要求的根后进行炼苗移栽。本发明采用再生芽来诱导增殖,增殖倍数高,可用于小桐子遗传转化后优良品系增殖,为小桐子的人工繁殖、脱毒苗生产、大批量繁殖优良品种开辟高效途径。

1. 一种小桐子快速繁殖方法,其特征在于,包括如下步骤:  
准备再生芽步骤,以小桐子成熟种子为材料,经培育获得无菌再生芽;  
增殖诱导步骤,将再生芽切下,接入增殖培养基进行增殖培养,从而获得增殖的丛芽;  
伸长培养步骤,将增殖后的丛芽切下,接入伸长培养基进而获得茎叶伸长的均匀的芽;  
壮苗培养步骤,将伸长后的芽接入壮苗培养基进行壮苗培养;  
生根移栽步骤,选取壮苗培养后茎叶生长均匀的芽切下,用吲哚丁酸浸泡后再接入生根培养基进行生根培养,生出符合移栽要求的根后经炼苗后,进行移栽。
2. 根据权利要求1所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述增殖诱导步骤中,增殖培养基的成分为:MS+0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01~2 mg/L 吲哚丁酸+0~5 mg/L 的硝酸银,附加3%蔗糖和0.7%琼脂,pH5.8。
3. 根据权利要求1或2所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述增殖诱导步骤中,培养条件是:温度控制在24~26℃,光照时间为12 h/d 培养20~50天,光照强度为1600~2000 lx。
4. 根据权利要求1所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述伸长培养步骤中,伸长培养基成分为:MS +0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤和0~1 mg/L 的赤霉素,附加3%蔗糖和0.7%琼脂,pH5.8。
5. 根据权利要求1或4所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述伸长培养步骤中,培养条件是:温度控制在24~26℃,光照时间为12 h/d 培养10~30天,光照强度为1600~2000 lx。
6. 根据权利要求1所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述壮苗培养步骤中,壮苗培养基中含有:MS+0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01~2 mg/L 吲哚丁酸+0~5 mg/L 的硝酸银+0~10%椰汁。
7. 根据权利要求1或6所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述壮苗培养步骤中,培养条件为:温度控制在24~26℃,光照时间为12 h/d 培养10~30天,光照强度为1600~2000 lx。
8. 根据权利要求1所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述生根移栽步骤中,生根培养基为1/2 MS+0.1~2 mg/L 的吲哚丁酸,并附加1~2%的蔗糖和0.3~0.7%的琼脂,调pH值至5.8。
9. 根据权利要求1所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述生根移栽步骤中,壮苗培养后茎叶生长均匀的芽的切法为:选取生长均匀的芽在结下1~4 mm处平切。
10. 根据权利要求1或8或9所述的小桐子快速繁殖方法,其特征在于:所述生根移栽步骤中,切下的芽在接入生根培养基之前先在0.1~2 mg/L 的吲哚丁酸中浸泡5~120 min。

## 小桐子快速繁殖方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物组培育苗技术领域,尤其涉及一种小桐子快速繁殖方法。

### 背景技术

[0002] 小桐子(*Jatropha curcas* L.),又叫麻疯树、麻风树、膏桐、黑皂树、木花生、油芦子、亮桐、臭梧桐等,属大戟科(*Euphorbiaceae*)麻疯树属(*Jatropha* L.),落叶灌木或小乔木,是一种多年生木本油料植物。小桐子原产美洲,广泛分布于热带亚热带地区。

[0003] 小桐子可全株开发,其果实、枝、叶均能利用。小桐子种子含油率高,经过加工可制成生物柴油。小桐子种子、树皮、叶、根和乳汁中含有多种成分的生物药源,可提取制作生物医药和生物农药。小桐子种子加工后的油饼蛋白质含量较高,脱毒后可制作生物饲料,未脱毒的可制作优质的有机生物肥。另外,小桐子茎叶有毒,牲畜不吃,病虫害较少,不易燃烧,可作为田间地边的生物篱和防风防火屏障。培育小桐子能源林,利用其种子提炼生物柴油是小桐子产业发展的主要方向。

[0004] 我国现有栽培和半野生的小桐子,其繁殖主要靠种子繁殖和扦插繁殖,繁殖周期长、成本高。又因其为木本植物,采用常规育种来改变其遗传性状相当困难,因此采用现代生物技术如转基因技术等成为首选。一些国家和地区已经开始了对小桐子进行了分子水平的育种工作。选育的优良品种大量繁殖,通过组培方式快速繁殖小桐子将在小桐子选育种生产上有重要的应用价值。

[0005] 目前,关于小桐子的组织培养及快速繁殖的报道较多,例如:陆伟达、魏琴、唐琳等发表的《麻疯树愈伤组织的诱导及快速繁殖》(《应用与环境生物学报》,2003,9(2):127~130.)以及陈金洪、高敏、黄记生发表的《麻疯树茎段离体培养及快速繁殖研究》(《广西农业科学》,2006,37(3):221~223.)等论文均涉及小桐子的组织培养及快速繁殖技术。但是,现有技术存在以下不足:

1、均采用不同的激素浓度组合诱导愈伤组织和芽分化,未经过再生芽增殖,其增殖速率低;

2、均采用不同外植体诱导愈伤组织,其不同外植体诱导频率相差及大。

[0006] 采用上述方法不能达到工厂化生产的需要,另有研究者进行了腋芽快繁研究,例如:李化、曾妮、贾勇炯等人发表的《麻疯树的促腋芽分枝快繁及生根诱导》(《四川大学学报:自然科学版》,2006,43(5):1116~1120.),所用外植体为种子萌发的胚芽来诱导增殖。但尚未见公开采用再生芽来诱导增殖的繁殖技术。

### 发明内容

[0007] 本发明实施例所要解决的技术问题在于,提供一种小桐子快速繁殖方法,以通过组织培养大规模高效地生产小桐子。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供如下技术方案:一种小桐子快速繁殖方法,包括如下步骤:

准备再生芽步骤,以小桐子成熟种子为材料,经培育获得无菌再生芽;

增殖诱导步骤,将再生芽切下,接入增殖培养基进行增殖培养,从而获得增殖的丛芽;

伸长培养步骤,将增殖后的丛芽切下,接入伸长培养基进而获得茎叶伸长的均匀的芽;

壮苗培养步骤,将伸长后的芽接入壮苗培养基进行壮苗培养;

生根移栽步骤,选取壮苗培养后茎叶生长均匀的芽切下,用吲哚丁酸浸泡后再接入生根培养基进行生根培养,生出符合移栽要求的根后进行炼苗移栽。

[0009] 进一步地,所述诱导增殖步骤中,增殖培养基的成分为:MS+0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01~2 mg/L 吲哚丁酸+0~5 mg/L 的硝酸银,附加3%蔗糖和0.7%琼脂,pH5.8。

[0010] 进一步地,所述诱导增殖步骤中,培养条件是:温度控制在24~26℃,光照时间为12 h/d 培养20~50天,光照强度为1600~2000 lx。

[0011] 进一步地,所述伸长培养步骤中,伸长培养基成分为:MS+0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤和0~1 mg/L 的赤霉素,附加3%蔗糖和0.7%琼脂,pH5.8。

[0012] 进一步地,所述伸长培养步骤中,培养条件是:温度控制在24~26℃,光照时间为12 h/d 培养10~30天,光照强度为1600~2000 lx。

[0013] 进一步地,所述壮苗培养步骤中,壮苗培养基中含有:MS+0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01~2 mg/L 吲哚丁酸+0~5 mg/L 的硝酸银+0~10%椰汁。

[0014] 进一步地,所述壮苗培养步骤中,培养条件为:温度控制在24~26℃,光照时间为12 h/d 培养10~30天,光照强度为1600~2000 lx。

[0015] 进一步地,所述生根移栽步骤中,生根培养基为1/2 MS+0.1~2 mg/L 的吲哚丁酸,需附加1~2%的蔗糖、0.3~0.7%的琼脂,调pH值至5.8。

[0016] 进一步地,所述生根移栽步骤中,壮苗培养后茎叶生长均匀的芽的切法为:选取生长均匀的芽在结下1~4 mm处平切。

[0017] 进一步地,所述生根移栽步骤中,切下的芽在接入生根培养基之前先在0.1~2 mg/L 的吲哚丁酸中浸泡5~120 min。

[0018] 通过采用上述技术方案,本发明至少具有如下有益效果:本发明中采用再生芽来诱导增殖,可用于小桐子遗传转化后优良品系增殖,为小桐子的人工繁殖、脱毒苗生产、繁殖优良品种开辟高效途径。

[0019] 本发明所用的增殖培养基添加有细胞分裂素6-苄基嘌呤和生长素吲哚丁酸,增殖倍数多,平均可达3~5倍,因此,仅需少量的芽就可在短时间内得到大量的材料,为小桐子组培中选育的优良品种的大批量繁殖奠定了基础。

[0020] 本发明的方法中在得到增殖的芽后进行了茎叶伸长培养和壮苗培养,保证了增殖芽都能顺利发育为完整植株。

[0021] 本发明的方法是在无菌操作中完成,不受时间和地域的限制,可随时完成。

## 具体实施方式

[0022] 本发明提供一种小桐子快速繁殖方法,包括以下步骤:

准备再生芽步骤,以小桐子成熟种子为材料,经培育获得无菌再生芽;

增殖诱导步骤,将再生芽切下,接入增殖培养基进行增殖培养,从而获得增殖的丛芽;

伸长培养步骤,将增殖后的丛芽切下,接入伸长培养基进而获得茎叶伸长的均匀的芽;

壮苗培养步骤,将伸长后的芽接入壮苗培养基进行壮苗培养;

生根移栽步骤,选取壮苗培养后茎叶生长均匀的芽切下接入生根培养基进行生根培养,待培养出符合移栽要求的根后进行炼苗移栽。

[0023] 其中,准备再生芽步骤 S1 主要是为获得无菌再生芽以供后续增殖诱导步骤使用,采用现有的各种利用种子培育发芽技术均可实现本步骤的目的。

[0024] 增殖诱导步骤 S2 进一步包括以下工艺:

S2.1 将分化出的再生芽切下;

S2.2 将切下的再生芽接入增殖培养基,该增殖培养基是指:MS+0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01~2 mg/L 吲哚丁酸+0~5 mg/L 的硝酸银,需附加 3%蔗糖、0.7%琼脂,pH5.8。

[0025] S2.3 培养条件为温度 24~26℃,光照时间为 12 h/d 培养 20~50 天,光照强度为 1600~2000 lx。

[0026] 伸长培养步骤 S3 进一步包括以下工艺:

S3.1 将增殖后的丛芽切下接入伸长培养基,该伸长培养基为 MS +0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤和 0~1 mg/L 的赤霉素,需附加 3%蔗糖、0.7%琼脂,pH5.8。

[0027] S3.2 培养条件为温度 24~26℃,光照时间为 12 h/d 培养 20~50 天,光照强度为 1600~2000 lx。

[0028] 壮苗培养步骤 S4 进一步包括以下工艺:

S4.1 伸长后的芽切下接入壮苗培养基,该壮苗培养基成分包括:MS+0.1~2 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01~2 mg/L 吲哚丁酸+0~5 mg/L 的硝酸银+0~10%椰汁;

S4.2 培养温度控制在 24~26℃,光照时间为 12 h/d 培养 10~30 天,光照强度为 1600~2000 lx。

[0029] 生根移栽步骤 S5 中进一步包括以下工艺:

S5.1 选取茎叶生长均匀的芽切下,切法为:苗在结下 1~4 mm 处平切;

S5.2 并在 0.1~2 mg/L 的吲哚丁酸中浸泡 5~120 min,接入生根培养基;

S5.3 待培养出符合移栽要求的根后进行炼苗移栽,通常地,当培养出 3 条以上的根,且每条根长度为 3cm 长时即可进行炼苗移栽。

[0030] 下面结合几个具体的实施例详述本发明的实施方案。需要说明的是,下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实例来限定本发明的保护范围。此外,如前所述,采用现有的各种利用种子培育发芽技术均可实现准备再生芽步骤 S1 的目的,该准备再生芽步骤 S1 并非本发明创新的核心所在,因此,在以下各实施例中,将不再特别描述准备再生芽步骤 S1,而直接从增殖诱导步骤 S2 开始阐述。

[0031] 实施例 1

本实例以云南元谋野生小桐子种子为材料,样品的总数量及经各处理步骤后的存活数量请参考表 1。各主要工艺步骤具体如下:

增殖诱导步骤 S2:将分化出的再生芽切下,接入增殖培养基 MP8,即 MS+1.0 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01mg/L 吲哚丁酸+0.025 mg/L 的硝酸银,并附加 3%蔗糖和 0.7%琼脂,pH5.8,温度控制在 24℃,光照时间为 12 h/d 培养 30 天,光照强度为 1800 lx。

[0032] 伸长培养步骤 S3 :将增殖后的丛芽切下,接种到伸长培养基 SEB3,即 MS+0.3 mg/L 6-苄基嘌呤和 0.25 mg/L 的赤霉素,并附加 3 % 蔗糖和 0.7% 琼脂, pH5.8,诱导茎叶伸长,培养温度控制在 24~26℃,光照时间为 12 h/d 培养 30 天,光照强度为 1600~2000 lx。

[0033] 壮苗培养步骤 S4 :伸长后的芽切下接入壮苗培养基 MC1,即 MS+1.0 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01 mg/L 吲哚丁酸+0 mg/L 的硝酸银+5 % 椰汁,进行壮苗培养,培养温度控制在 26℃,光照时间为 12 h/d 培养 18 天,光照强度 2000 lx。

[0034] 生根移栽步骤 S5 :取灭菌的盘,垫上无菌滤纸,加入少量无菌水;挑取长势均匀(对于长势不均匀的芽要再经过壮苗培养后才能进行生根培养)的芽切下,切法为:在芽的结下 2 mm 处平切,并在 0.3 mg/L 的吲哚丁酸中浸泡 5 min,浸泡过程中尽量只让芽的切口处接触到液体;然后取出芽接种到生根培养基 R2 中诱导生根,该生根培养基 R2 成分为:1/2MS+0.3 mg/L 的吲哚丁酸,并附加 1% 的蔗糖和 0.35% 的琼脂,并调 pH 值至 5.8。培养条件是:温度控制在 24~26℃,光照时间为 12 h/d 培养 14 天,光照强度为 1600 lx。选取已生根至少 3 条的生根苗,在自然光条件下过度 1~3 星期,逐渐开盖炼苗并移栽至温室。

#### [0035] 实施例 2

本实例以云南元谋野生小桐子种子为材料,样品的总数量及经各处理步骤后的存活数量请参考表 1。各主要工艺步骤具体如下:

增殖诱导步骤:将分化出的再生芽切下,接入增殖培养基 MP16,即 MS+2.0 mg/L 6-苄基嘌呤+0.1 mg/L 吲哚丁酸+1 mg/L 的硝酸银,并附加 3% 蔗糖和 0.7% 琼脂, pH5.8,培养温度控制在 26℃,光照时间为 12 h/d 培养 35 天,光照强度为 2000 lx。

[0036] 伸长培养步骤:将增殖后的丛芽切下,接种到伸长培养基 SEB10,即 MS +2 mg/L 6-苄基嘌呤和 1 mg/L 的赤霉素,并附加 3 % 蔗糖和 0.7 % 琼脂, pH5.8,诱导茎叶伸长,培养温度控制在 26℃,光照时间为 12 h/d 培养 20 天,光照强度为 1800 lx。

[0037] 壮苗培养步骤:伸长后的芽切下接入壮苗培养基 MC2,即改良 MS+2.0 mg/L 6-苄基嘌呤+0.1 mg/L 吲哚丁酸+1 mg/L 的硝酸银+10 % 椰汁,进行壮苗培养;培养温度控制在 26℃,光照时间为 12 h/d 培养 14 天,光照强度 2000 lx。

[0038] 生根移栽步骤:取灭菌的盘,垫上无菌滤纸,加入少量无菌水;挑取长势均匀的芽切下,切法为:在芽的结下 1 mm 处平切,并在 1 mg/L 的吲哚丁酸中浸泡 120 min,浸泡过程中尽量只让芽的切口处接触到液体;然后取出芽接种到生根培养基 R2,即 1/2MS+1 mg/L 的吲哚丁酸,并附加 2% 的蔗糖和 0.7% 的琼脂,并调 pH 值至 5.8,诱导生根。培养条件是:温度控制在 24~26℃,光照时间为 12 h/d 培养 20 天,光照强度为 1600 lx。选取已生根至少 3 条的生根苗,在自然光条件下过度 1~3 星期,逐渐开盖炼苗并移栽至温室。

#### [0039] 实施例 3

本实例以云南元谋野生小桐子种子为材料,样品的总数量及经各处理步骤后的存活数量请参考表 1。各主要工艺步骤具体如下:

增殖诱导步骤:将分化出的再生芽切下,接入增殖培养基 MP0,即 MS+0.1 mg/L 6-苄基嘌呤+0.01 mg/L 吲哚丁酸+5 mg/L 的硝酸银,并附加 3% 蔗糖和 0.7% 琼脂, pH5.8,培养温度控制在 26℃,光照时间为 12 h/d 培养 40 天,光照强度为 2000 lx。

[0040] 伸长培养步骤:将增殖后的丛芽切下,接种到伸长培养基 SEB1,即 MS +0.1 mg/L 6-苄基嘌呤和 0.5 mg/L 的赤霉素,并附加 3 % 蔗糖和 0.7% 琼脂, pH5.8,诱导茎叶伸长,培

养温度控制在 24~26℃,光照时间为 12 h/d 培养 30 天,光照强度为 2000 lx。

[0041] 壮苗培养步骤:伸长后的芽切下接入壮苗培养基 MC1,即 MS+0.3 mg/L 6-苄基嘌呤+0.1 mg/L 吲哚丁酸+0.5 mg/L 的硝酸银+0 % 椰汁,进行壮苗培养;培养温度控制在 26℃,光照时间为 12 h/d 培养 20 天,光照强度 2000 lx。

[0042] 生根移栽步骤:取灭菌的盘,垫上无菌滤纸,加入少量无菌水;挑取长势均匀的芽切下,切法为:在芽的结下 4 mm 处平切,并在 2 mg/L 的吲哚丁酸中浸泡 60min,浸泡过程中尽量只让芽的切口处接触到液体;然后取出芽接种到生根培养基 R2,即 1/2 MS+2 mg/L 的吲哚丁酸,并附加 1.5% 的蔗糖和 7% 的琼脂,并调 pH 值至 5.8,诱导生根。其培养的条件是:温度控制在 24~26℃,光照时间为 12 h/d 培养 18 天,光照强度为 1600 lx。选取已生根至少 3 条的生根苗,在自然光条件下过度 1~3 星期,逐渐开盖炼苗并移栽至温室。

[0043] 表 1 本发明各实施例中的再生率及增值率

实施例编号	再生芽数量	增殖幼芽个数	平均增殖芽个数
实施例 1	23	153	6.65
实施例 2	22	109	4.95
实施例 3	23	72	3.13

从上表中可以看出,获得的增殖芽数量最低也能达到再生芽数量的 3 倍以上,仅需少量的芽就可在短时间内得到大量的材料,为小桐子组织培养选育的优良品种的大批量繁殖奠定了基础。