



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112841032 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(21) 申请号 202110138750.5

(22) 申请日 2021.02.01

(71) 申请人 中国科学院华南植物园

地址 510650 广东省广州市天河区兴科路
723号

(72) 发明人 马国华 于昕滕 熊玉萍 庞金辉
任海 简曙光 吴坤林 曾宋君

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 胡素丽 刘明星

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种海岸桐不定芽增殖培养基及海岸桐离体快速繁殖的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种海岸桐不定芽增殖培养基及海岸桐离体快速繁殖的方法。本发明以海岸桐(*Guettarda speciosa* L.)带有侧芽的茎段为外植体,探讨了不同浓度、种类的植物生长调节剂对海岸桐不定芽增殖的影响,探讨了不同基质对海岸桐不定芽生根诱导的影响,探讨了不同来源的海岸桐组培苗对其炼苗移栽后成活率的影响,建立了一套完整的海岸桐芽体繁殖与生根诱导同步化的植物组织培养方法,有效地缩短海岸桐组培苗的繁育周期,为海岸桐的大规模工业化生产提供技术支撑,以及为海岸桐的种质保存提供基础并填补了海岸桐在植物组织培养技术方面的空白。



1. 一种海岸桐不定芽增殖培养基,其特征在于,每升含有6-BA 0.2~2.0mg、NAA 0.01~0.1mg、蔗糖25~35g和适量琼脂,其余为MS培养基。

2. 根据权利要求1所述的海岸桐不定芽增殖培养基,其特征在于,每升含有6-BA 1.0mg、NAA 0.1mg、蔗糖30g以及琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

3. 一种海岸桐离体快速繁殖的方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、无菌芽体的获得:取海岸桐健康枝条的茎段,剪去多余的叶片,取带有侧芽的茎段为外植体,将外植体进行消毒处理后接种于无菌芽体诱导培养基上培养,获得无菌芽体;

b、不定芽诱导:将步骤a中的无菌芽体接种于不定芽诱导培养基上进行不定芽的诱导,获得海岸桐萌发的不定芽;

c、不定芽增殖:将步骤b中的不定芽切成单芽后接种于权利要求1或2所述的海岸桐不定芽增殖培养基上进行增殖培养,获得海岸桐的不定芽;

d、生根培养和移栽:将步骤c中的不定芽切成单芽后接种于生根培养基上进行生根培养,获得海岸桐生根的组培苗,将生根的组培苗炼苗后移栽到栽培基质中,由此得到海岸桐种苗。

4. 根据权利要求3所述的海岸桐离体快速繁殖的方法,其特征在于,所述的步骤a无菌芽体的获得的培养条件为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照时间12h/d,光照强度为2000lx;所述的无菌芽体诱导培养基每升含有:蔗糖30g和琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

5. 根据权利要求3所述的海岸桐离体快速繁殖的方法,其特征在于,所述的不定芽的诱导的培养条件为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照时间12h/d,光照强度为2000lx;所述的不定芽诱导培养基每升含有:6-BA 1.0mg、NAA 0.01mg、蔗糖30g和琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

6. 根据权利要求3所述的海岸桐离体快速繁殖的方法,其特征在于,所述的增殖培养的培养条件为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照时间12h/d,光照强度为2000lx。

7. 根据权利要求3所述的海岸桐离体快速繁殖的方法,其特征在于,所述的生根培养的培养条件为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照时间12h/d,光照强度为2000lx;所述的生根培养基包括液体培养基和蛭石,所述的液体培养基每升含有:IBA 0.5mg、NAA 0.1mg和蔗糖30g,其余为MS培养基,pH 6.0。

8. 根据权利要求3-7任一项所述的海岸桐离体快速繁殖的方法,其特征在于,所述的消毒处理具体为:将外植体放入质量分数0.1%升汞溶液浸泡消毒8min,无菌水漂洗4~5次,在无菌滤纸上晾干外植体表面的水分并切除两端。

9. 根据权利要求3-7任一项所述的海岸桐离体快速繁殖的方法,其特征在于,所述的栽培基质包括蛭石和河沙,所述的蛭石和河沙的体积比为1:1。

一种海岸桐不定芽增殖培养基及海岸桐离体快速繁殖的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物组织培养技术领域,具体涉及一种海岸桐不定芽增殖培养基及海岸桐离体快速繁殖的方法。

背景技术

[0002] 海岸桐(*Guettarda speciosa* L.)是茜草科(Rubiaceae)海岸桐属(*Guettarda*)常绿小乔木,别名黑皮树;海岸桐普遍分布于热带的海岸地区,尤以马来半岛东部和西部生长茂密。在中国主要分布于台湾、海南和南海诸岛等热带地区。海岸桐为常绿小乔木,高3~5m,罕有高达8m。南海诸岛气候条件基本特征为高温高湿,降水较多,干湿季分明,热带气旋、暴风雨、干旱等灾害性天气影响频繁。海岸桐是滨海潮汐的树种之一,是典型海岸植物。海岸桐常见于海岸沙地灌丛、礁石缝隙和砾石滩上。海岸桐性强健,耐盐、盐雾性好、耐高温、耐旱、喜钙、嗜肥,喜光不耐阴,耐贫瘠,适合用作热带珊瑚岛礁或类似环境的植被恢复工具种。另外,有研究表明海岸桐在非洲和印度是普遍的药用植物,药材基原为海岸桐的树皮和枝叶,主治溃疡、创伤和脓肿。海岸桐的木材为优良的家具用材,木材具深色斑纹。

发明内容:

[0003] 本发明的目的在于提供一种海岸桐不定芽增殖培养基及海岸桐离体快速繁殖的方法。

[0004] 为了实现上述目的,本发明是采取以下技术方案实现的:

[0005] 本发明的海岸桐不定芽增殖培养基,每升含有6-BA 0.2~2.0mg、NAA 0.01~0.1mg、蔗糖25~35g和适量琼脂,其余为MS培养基。

[0006] 优选,所述的海岸桐不定芽增殖培养基,每升含有6-BA 1.0mg、NAA 0.1mg、蔗糖30g以及琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

[0007] 本发明的另一个目的是提供一种海岸桐离体快速繁殖的方法,包括以下步骤:

[0008] a、无菌芽体的获得:取海岸桐健康枝条的茎段,剪去多余的叶片,取带有侧芽的茎段为外植体,将外植体进行消毒处理后接种于无菌芽体诱导培养基上培养,获得无菌芽体;

[0009] b、不定芽诱导:将步骤a中的无菌芽体接种于不定芽诱导培养基上进行不定芽的诱导,获得海岸桐萌发的不定芽;

[0010] c、不定芽增殖:将步骤b中的不定芽切成单芽后接种于权利要求1或2所述的海岸桐不定芽增殖培养基上进行增殖培养,获得海岸桐的不定芽;

[0011] d、生根培养和移栽:将步骤c中的不定芽切成单芽后接种于生根培养基上进行生根培养,获得海岸桐生根的组培苗,将生根的组培苗炼苗后移栽到栽培基质中,由此得到海岸桐种苗。

[0012] 优选,所述的步骤a无菌芽体的获得的培养条件为(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度为2000lx;所述的无菌芽体诱导培养基每升含有:蔗糖30g和琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

[0013] 优选,所述的不定芽的诱导的培养条件为(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度为2000lx;所述的不定芽诱导培养基每升含有:6-BA 1.0mg、NAA 0.01mg、蔗糖30g和琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

[0014] 优选,所述的增殖培养的培养条件为(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度为2000lx。

[0015] 优选,所述的生根培养的培养条件为(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度为2000lx;所述的生根培养基包括液体培养基和蛭石,所述的液体培养基每升含有:IBA 0.5mg、NAA 0.1mg和蔗糖30g,其余为MS培养基,pH 6.0。

[0016] 优选,所述的消毒处理具体为:将外植体放入质量分数0.1%升汞溶液浸泡消毒8min,无菌水漂洗4~5次,在无菌滤纸上晾干外植体表面的水分并切除两端。

[0017] 优选,所述的栽培基质包括蛭石和河沙,所述的蛭石和河沙的体积比为1:1。

[0018] 与现有技术相比,本发明的技术方案具有以下有益效果:

[0019] 1、为了探讨不同浓度、种类的植物生长调节剂对海岸桐不定芽增殖的影响,以MS培养基为基本培养基,还单独添加了KT、6-BA,或者同时添加6-BA和NAA,增殖培养60d后,以海岸桐的芽体增殖倍数为指标,确定了最适的不定芽增殖培养基配方。

[0020] 2、为了探讨不同基质对海岸桐不定芽生根诱导的影响,选用琼脂和蛭石为基质进行生根培养,结果表明:在以蛭石为基质的培养基中的生根率为100%,而在以琼脂为基质的培养基中的生根率为90%。确定了最适的基质为蛭石。

[0021] 3、为了探讨不同来源的海岸桐组培苗对其炼苗移栽后成活率的影响,选用以蛭石为基质的培养基、以琼脂为基质的培养基培养获得的海岸桐组培苗进行移栽,以蛭石为基质的培养基培养获得的海岸桐组培苗的移栽存活率为81.8%,以琼脂为基质的培养基培养获得的海岸桐组培苗的移栽存活率为63.6%。最终确定以蛭石为基质的培养基培养获得的海岸桐组培苗的移栽存活率最高。

[0022] 本发明以海岸桐(*Guettarda speciosa* L.)带有侧芽的茎段为外植体,探讨了不同浓度、种类的植物生长调节剂对海岸桐不定芽增殖的影响,探讨了不同基质对海岸桐不定芽生根诱导的影响,探讨了不同来源的海岸桐组培苗对其炼苗移栽后成活率的影响,建立了一套完整的海岸桐芽体繁殖与生根诱导同步化的植物组织培养方法,有效地缩短海岸桐组培苗的繁育周期,为海岸桐的大规模工业化生产提供技术支撑,以及为海岸桐的种质保存提供基础并填补了海岸桐在植物组织培养技术方面的空白。

附图说明

[0023] 图1是海岸桐不定芽诱导的效果图。

[0024] 图2是海岸桐不定芽增殖的效果图。

[0025] 图3是海岸桐在以蛭石为基质的培养基中诱导生根的效果图。

[0026] 图4是海岸桐移栽成活效果图。

具体实施方式

[0027] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面结合具体实施例对本发明作进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0028] 在本文中,英文缩略词的含义如下:

[0029] IBA:吲哚丁酸,是植物内源生长素,在植物离体快繁过程中用于促进细胞分裂与细胞生长,诱导形成不定根,农业生产上可增加座果,防止落果,改变雌、雄花比率等。

[0030] NAA:萘乙酸,是一种广谱型植物生长调节剂,在植物离体培养过程中用于诱导细胞的分裂和根的分化,同时可影响茎和节的伸长、向性、顶端优势、叶片脱落等现象。

[0031] KIN或KT:激动素,是人工合成的细胞分裂素。可以促进细胞分化、分裂、生长,促进细胞分裂,愈伤组织或器官上分化不定芽。

[0032] 6-BA:6-苄氨基嘌呤,是一种广泛使用的添加于植物生长培养基的细胞分裂素,具有抑制植物叶内叶绿素、核酸、蛋白质的分解,保绿防老;将氨基酸、生长素、无机盐等向处理部位调运等多种效能,广泛用在农业、果树和园艺作物从发芽到收获的各个阶段;在植物的离体快繁中可促进细胞分裂和由愈伤组织或器官上分化不定芽,同时有助于使腋芽由顶端优势的抑制下解放出来。

[0033] 术语“离体”是指为了各种研究目的生物体的一部分摘出和有利于生物体外的状态。

[0034] 术语“外植体”是指在继代培养时,移入新的培养基培养的组织切段。在本发明中,“外植体”具体是指海岸桐的带侧芽茎段。

[0035] 在本发明实施例中,MS培养基的成分如下表1所示:

[0036] 表1 MS培养基的成分

MS 培养基的成分	成分	含量(mg/L, 工作液浓度)
大量元素	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	KH_2PO_4	170
微量元素	KI	0.83
	H_3BO_3	6.2
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	$\text{Na}_2 \cdot \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
铁盐	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
有机物	肌醇	100
	烟酸	0.5
	盐酸吡哆醇 (B_6)	0.5
	盐酸硫胺素 (B_1)	0.1
	甘氨酸	2

[0037] [0038] 如无特殊说明,本发明实施例中海岸桐离体快速繁殖的方法中所涉及的培养基及基质分别按照下述方法进行制备:

[0039] (1) 配制1L MS培养基:准确称取表1中所述的各种化合物,加适量蒸馏水溶解,用玻璃棒搅拌促溶,用KOH调pH至6.0,最后定容到1L。

[0040] (2) 配制无菌芽体诱导培养基:是在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上还添加蔗糖30g/L以及琼脂7.0g/L,pH调为6.0;121℃高温灭菌20min备用。

[0041] (3) 配制不定芽诱导培养基:是在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上还添加6-BA 1.0mg/L、NAA 0.01mg/L、蔗糖30g/L以及琼脂7.0g/L,pH调为6.0;121℃高温灭菌20min备用。

[0042] (3) 配制不定芽增殖培养基:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上,还单独添加6-BA 0.2~2.0mg/L、KT 0.2~2.0mg/L或组合添加6-BA 0.2~2.0mg/L与NAA 0.01~

0.1mg/L、蔗糖30g/L以及琼脂7.0g/L,pH调为6.0;121℃高温灭菌20min备用。

[0043] (4) 配制生根培养基:以琼脂为基质时:在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上还添加IBA 0.5mg/L、NAA 0.1mg/L、蔗糖30g/L以及琼脂7.0g/L,pH调为6.0;121℃高温灭菌20min备用。以蛭石为基质时:先配制液体培养基,在步骤(1)所制备的MS培养基的基础上还添加IBA 0.5mg/L、NAA 0.1mg/L以及蔗糖30g/L,pH调为6.0,然后将液体培养基和蛭石按添加比为30mL:10g混合均匀;121℃高温灭菌20min备用。

[0044] (5) 配制备培养基按照蛭石:河沙体积比为1:1的比例进行混合。

[0045] 实施例1

[0046] (1) 无菌芽体的获得:

[0047] 取海岸桐(*Guettarda speciosa* L.)健康枝条的茎段,剪去多余的叶片,取长2~3cm并带有1个侧芽的茎段为外植体;在无菌条件下将外植体放入质量分数0.1%升汞溶液浸泡消毒8min,无菌水漂洗4~5次,在无菌滤纸上晾干外植体表面的水分并切除两端后,接种于无菌芽体诱导培养基上培养,培养条件为(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度为2000lx,培养60d后获得无菌芽体;无菌芽体诱导培养基每升含有:蔗糖30g和琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

[0048] (2) 不定芽诱导:

[0049] 将步骤(1)中的无菌芽体接种于不定芽诱导培养基上进行不定芽的诱导,培养条件为(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度为2000lx,培养60d后获得海岸桐萌发的不定芽;不定芽诱导培养基每升含有:6-BA 1.0mg、NAA 0.01mg、蔗糖30g以及琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

[0050] (3) 不定芽增殖:

[0051] 为了探讨不同植物生长调节剂对海岸桐不定芽增殖的影响,试验设置9组(试验组1-9),试验组1-9的不定芽增殖培养基的配方为:以MS培养基为基本培养基,还单独添加6-BA 0.2~2.0mg/L、KT 0.2~2.0mg/L或组合添加6-BA 0.2~2.0mg/L与NAA 0.01~0.1mg/L、蔗糖30g/L以及琼脂7.0g/L,pH 6.0(具体配比见表2)。具体试验步骤如下,取步骤(2)中的不定芽,在无菌条件下切成单芽,并分别接种到表2中的不定芽增殖培养基上进行增殖培养,每瓶接种单芽3个,每个处理10瓶,培养条件为(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度为2000lx,培养30d和60d后获得海岸桐的不定芽并统计其芽体增殖倍数。芽体增殖倍数=接种培养后的总芽数/接种时的总芽数。

[0052] 表2试验组1-9的不定芽增殖培养基的成分及芽体月增殖倍数

	基本培养基	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	NAA (mg/L)	蔗糖 (g/L)	琼脂 (g/L)	芽体增殖倍数 (培养 30 d)
[0053] 试验组 1	MS 培养基	0.1	0	0.01	30	7	3.11
试验组 2	MS 培养基	0.5	0	0.05	30	7	3.81
试验组 3	MS 培养基	1.0	0	0.1	30	7	5.47
试验组 4	MS 培养基	2.0	0	0.1	30	7	5.33
试验组 5	MS 培养基	0	0.1	0.01	30	7	1.53
试验组 6	MS 培养基	0	0.5	0.05	30	7	1.87
试验组 7	MS 培养基	0	1.0	0.1	30	7	2.33
试验组 8	MS 培养基	0	2.0	0.1	30	7	2.53
试验组 9	MS 培养基	1.0	1.0	0.1	30	7	5.23

[0054] 植物生长调节剂对海岸桐芽体增殖倍数有较大影响,当单独添加KT或6-BA时,芽体增殖倍数较低。虽然会随培养时间的延长而增加,但是提升幅度较小。当培养基中同时添加6-BA和NAA时,芽体增殖倍数显著提升,在添加KT和NAA的培养基中,一般月繁殖2.53,在单独添加6-BA的培养基中,月最高可繁育3.87,两个月繁殖4.56,而当6-BA和NAA混合使用时,一个月可繁殖5.47,两个月最高可达6.12。由此获得最适不定芽增殖培养基为:每升含有6-BA 1.0mg、NAA 0.1mg、蔗糖30g以及琼脂7g,其余为MS培养基,pH 6.0。

[0055] (4) 生根培养:

[0056] 为了探讨不同基质对海岸桐不定芽生根诱导的影响,试验设置2组(试验组10和11)。试验组10的生根培养基包括液体培养基和作为基质的蛭石,液体培养基每升含有:IBA 0.5mg、NAA 0.1mg和蔗糖30g,其余为MS培养基,pH 6.0,其中的液体培养基和蛭石的添加比为30mL:10g;试验组11的生根培养基每升含有:IBA 0.5mg、NAA 0.1mg、蔗糖30g和琼脂7.0g,其余为MS培养基,pH 6.0。具体试验步骤如下,在无菌条件下将步骤(3)试验组3培养60d后获得的海岸桐不定芽切成单芽,并分别接种到生根培养基上进行生根培养,每瓶接种芽体3个,每个处理10瓶,培养条件为(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度为2000lx,培养30d后获得海岸桐生根的组培苗并统计其生根数和生根率。

[0057] 试验结果显示:在以蛭石为基质的培养基中的生根率为100%,生根数为10.3。而在以琼脂为基质的培养基中的生根率为90%,生根数为6.7。显然海岸桐在以蛭石为基质的培养基中生长更加良好,生根数和生根率都高于以琼脂为基质的培养基。由此得到最适生根培养基为以蛭石为基质的培养基。

[0058] (5) 移栽:

[0059] 为了探讨不同来源的海岸桐组培苗对其炼苗移栽后成活率的影响,试验设置2组(试验组12和13),试验组12和13的栽培基质均为蛭石和河沙按照体积比为1:1混合而成的基质,试验组12移栽的组培苗为步骤(4)试验组10培养30d后获得的海岸桐组培苗,试验组13移栽的组培苗为步骤(4)试验组11培养30d后获得的海岸桐组培苗。具体试验步骤如下,将海岸桐组培苗的组培瓶盖拧松,放到自然光照下炼苗7d,之后将组培苗移栽到栽培基质中,注意浇水和遮荫,由此得到海岸桐种苗。移栽30d后观察记录生长情况并统计海岸桐组

育苗的移栽成活率, 试验组12的移栽成活率为81.8%, 试验组13的移栽成活率为63.6%。由结果可知, 在以蛭石为基质的培养基中生根培养获得的组培苗有更高的移栽成活率。

[0060] 最后应当说明的是, 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制, 尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明, 本领域的普通技术人员应当理解, 可以对本发明的而技术方案进行修改或者等同替换而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

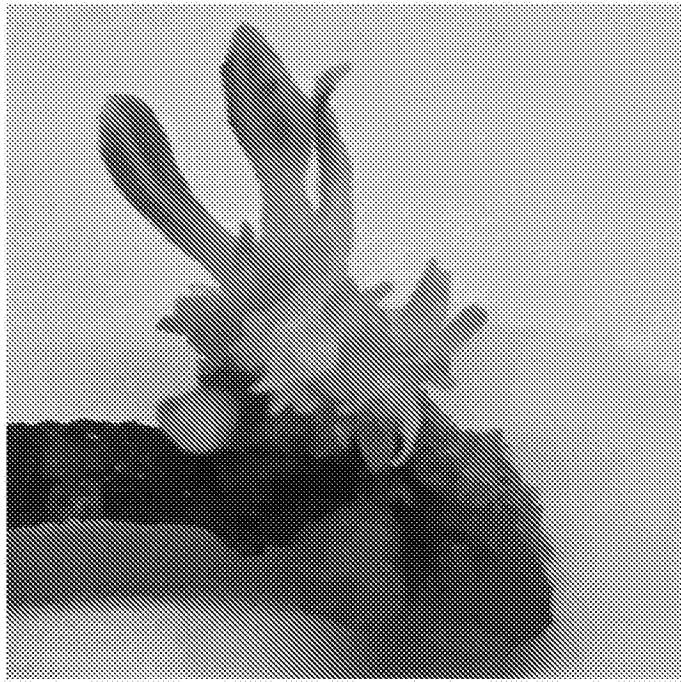


图1



图2



图3



图4