



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115885856 B

(45) 授权公告日 2023.07.07

(21) 申请号 202310054142.5

(22) 申请日 2023.02.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115885856 A

(43) 申请公布日 2023.04.04

(73) 专利权人 中国科学院华南植物园
地址 510000 广东省广州市天河区兴科路
723号

(72) 发明人 马国华 熊玉萍 魏振鹏 曾钰洁
陈晓宏 吴坤林 曾宋君 简曙光
任海

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限
公司 44001
专利代理师 陈洁娣

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

A01G 31/00 (2018.01)

A01G 24/28 (2018.01)

A01G 24/15 (2018.01)

审查员 杨柳

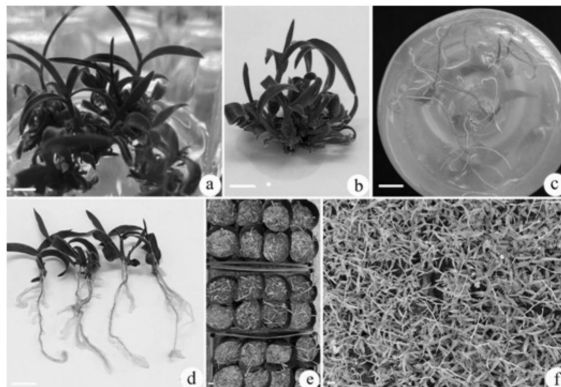
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种葛雷草组织培养繁育方法

(57) 摘要

本发明公开了一种葛雷草组织培养繁育方法,包括以下步骤:以葛雷草茎段为外植体,经消毒后置于诱导培养基中进行诱导培养,得到不定芽;将不定芽转移至增殖培养基中进行增殖培养获得丛生芽;将丛生芽转入生根培养基中进行生根培养,得到组培苗,组培苗经壮苗、炼苗后移栽至基质中获得葛雷草种苗。采用本发明技术能够短期内获得大量的葛雷草小苗,可以为热带珊瑚D绿化提高高品质,生长一致的苗木。



1. 一种葛雷草组织培养繁育方法,其特征在于,包括以下步骤:

以葛雷草茎段为外植体,经消毒后置于诱导培养基中进行诱导培养,得到不定芽;将不定芽转移至增殖培养基中进行增殖培养获得丛生芽;将丛生芽转入生根培养基中进行生根培养,得到组培苗,组培苗经壮苗、炼苗后移栽至基质中获得葛雷草种苗;

所述诱导培养基的组成为:MS培养基+30g/L蔗糖+3g/L植物凝胶+1.0mg/L 6-BA,pH为6.0;所述诱导培养的温度为 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD;

所述增殖培养基的组成为:MS培养基+1.0mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA,所述增殖培养的条件为:培养的温度为 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD;

所述生根培养基为添加或不添加植物生长调节剂的MS培养基,所述生根培养的条件为:培养的温度为 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD。

2. 根据权利要求1所述的葛雷草组织培养繁育方法,其特征在于,所述外植体的具体消毒步骤为:以葛雷草茎段为外植体,去除老叶,在清水中冲洗10min后,用75%乙醇消毒30s,随后在无菌水中清洗三次,再将茎段放入0.1%的升汞中消毒15min,最后再用无菌水清洗五次,每次3min。

3. 根据权利要求1所述的葛雷草组织培养繁育方法,其特征在于,所述基质的组成为:泥炭土:蛭石=1:1v/v。

一种葛雷草组织培养繁育方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物栽培技术领域,具体涉及一种葛雷草组织培养繁育方法。

背景技术

[0002] 葛雷草(*Thuarea involuta*)是禾本科黍亚科葛雷草属多年生草本植物,在日本、东南亚、大洋洲和马达加斯加,以及美国Mariana Islands有分布,在中国常见于海南、广东等省和日本、东南亚等地区的海滩沙地。秆匍匐地面,节处向下生根,向上抽出叶和花序。叶鞘松弛,产台湾、广东等省;生于海岸沙滩。葛雷草耐盐性较强,在中国南海诸岛上分布较广,也被用于构建热带珊瑚礁防护林使用。葛雷草可通过种子繁殖,但实际上很难收到其种子。我们也通过常规的分株方式可以进行繁殖,但繁殖效率比较低,大规模化繁育还存在繁育系数并不高的技术障碍。至今还没有报道通过组织培养技术进行繁育的报道。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对上述不足,提供一种葛雷草组织培养繁育方法。本发明技术简单实惠,切实可行,应用价值高,为葛雷草的大量繁殖打下了基础。

[0004] 本发明采取的技术方案如下:

[0005] 一种葛雷草组织培养繁育方法,包括以下步骤:

[0006] 以葛雷草茎段为外植体,经消毒后置于诱导培养基中进行诱导培养,得到不定芽;将不定芽转移至增殖培养基中进行增殖培养获得丛生芽;将丛生芽转入生根培养基中进行生根培养,得到组培苗,组培苗经壮苗、炼苗后移栽至基质中获得葛雷草种苗。

[0007] 优选的,所述外植体的具体消毒步骤为:以葛雷草茎段为外植体,去除老叶,在清水中冲洗10min后,用75%乙醇消毒30s,随后在无菌水中清洗三次,再将茎段放入0.1%的升汞中消毒15min,最后再用无菌水清洗五次,每次3min。

[0008] 优选的,所述诱导培养基的组成为:MS培养基+30g/L蔗糖+3g/L植物凝胶+1.0mg/L 6-BA,pH为6.0;所述诱导培养的温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD。

[0009] 优选的,所述增殖培养基的组成为:MS培养基+1.0mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA,所述增殖培养的条件为:培养的温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD。

[0010] 优选的,所述生根培养基为添加或不添加植物生长调节剂的MS培养基,所述生根培养的条件为:培养的温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD。

[0011] 优选的,所述基质的组成为:泥炭土:蛭石=1:1v/v。

[0012] 本发明的有益效果为:

[0013] 本发明以葛雷草的茎段为外植体,成功建立繁芽和再生体系。在用不同细胞分裂素繁育丛生芽的过程中,我们发现6-BA对不定芽诱导的效果比激动素(KIN)和噻苯隆(TDZ)的

都要好。葛雷草在MS培养基附加1.0mg/L 6-苄基嘌呤(6-BA)和0.1mg/L萘乙酸(NAA)的培养基上能够繁育大量的丛生小苗,每月繁殖系数可达9.64。将幼苗转移到不含植物生长调节剂的MS培养基中培养1至2月,可以诱导生根,生根苗再移栽到泥炭土和蛭石体积比为1:1的混合基质中,一个月后存活率可达96.67%。采用本发明技术能够短期内获得大量的葛雷草小苗,可以为热带珊瑚D绿化提高高品质,生长一致的苗木。

附图说明

[0014] 图1为葛雷草芽在不同增殖培养基培养30天的增殖情况。a:含有(从左到右)0、0.5、1.0、2.0和3.0mg/L 6-BA的MS培养基;b:含有(从左到右)0.5、1.0、2.0和3.0mg/L KIN的MS培养基;c:含有(从左到右)0.5、1.0、2.0和3.0mg/L TDZ的MS培养基。注:30个腋芽在所有培养基中增殖。标尺=1.0厘米。

[0015] 图2为葛雷草芽的增殖、植株再生和移植。a-b:在含有1.0mg/L 6-BA和0.1mg/L NAA的MS培养基上增殖;c-d:在含有0.5mg/L IBA的MS培养基上生根12天;e:将有根的幼苗移植到具有不同基质(体积比)的泥炭三个托盘中,依次为泥炭土:沙子=1:1(下)纯泥炭土(中)、泥炭土:蛭石=1:1(上)15天;f:移植后幼苗在含泥炭土和蛭石按1:1体积比混合的基质的塑料袋中生长60天。标尺=1.0厘米。

具体实施方式

[0016] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0017] 本发明下述实施例的数据统计与分析方法为:3次生物学重复,使用SPSS 20.0软件进行统计处理,采用Duncan法进行数据的显著性检验($P \leq 0.05$)。数据均用平均值 \pm 标准误差(Mean \pm S.E.)值表示。

[0018] 实施例1

[0019] 1. 外植体的获得和消毒:葛雷草材料来自中国西沙群岛,现保存在中国科学院华南植物园种苗繁育基地。以葛雷草茎段为外植体,去除老叶,在清水中冲洗10min后,用75%乙醇消毒30s,随后在无菌水中清洗三次,再将茎段放入0.1%的升汞中消毒15min,最后再用无菌水清洗五次,每次3min。

[0020] 2. 不定芽诱导:将消毒好的葛雷草茎段接种至诱导培养基中在温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD的条件下进行诱导培养30-50天,得到不定芽,所述诱导培养基的组成为:MS培养基+30g/L蔗糖+3g/L植物凝胶+1.0mg/L6-BA, pH为6.0。

[0021] 3. 植物生长调节剂对不定芽增殖效果的影响:

[0022] 将6-BA、激动素(KIN)和噻苯隆(TDZ)三种细胞分裂素设置0.5、1.0、2.0、3.0mg/L四个浓度梯度,添加至MS培养基中进行不定芽增殖实验,不定芽增殖培养的温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD。选择最合适的细胞分裂素种类和浓度并添加0.01或0.1mg/L NAA(萘乙酸)进行不定芽增殖实验。外植体选用2至3cm的不定芽,每个处理30个外植体,在培养30天后统计不定芽数量。结果见表1和图1。

[0023] 表1. 植物生长调节剂对葛雷草30天后不定芽增殖系数(SPC)及生根的影响

	植物生长调节剂 (mg/L)	繁殖系数	生根情况
	无生长调节剂	1.04 ± 0.03 h	+
	6-BA 0.5	6.60 ± 0.48 c	-
	6-BA 1.0	8.30 ± 0.44 b	-
	6-BA 2.0	8.09 ± 0.31 b	-
	6-BA 3.0	5.21 ± 0.26 d	-
[0024]	KIN 0.5	1.81 ± 0.12 g	+
	KIN 1.0	3.91 ± 0.21 e	+
	KIN 2.0	4.88 ± 0.22 d	+
	KIN 3.0	6.53 ± 0.32 c	+
	TDZ 0.5	8.78 ± 0.41 ab	-
	TDZ 1.0	6.88 ± 0.29 c	-
	TDZ 2.0	5.14 ± 0.25 d	-
	TDZ 3.0	4.80 ± 0.26 d	-
[0025]	6-BA 1.0 + NAA 0.01	8.88 ± 0.47 ab	-
	6-BA 1.0 + NAA 0.1	9.64 ± 0.74 a	-

[0026] 结果显示,6-BA诱导不定芽增殖的效果最好,整体大小均匀,不定芽健康(图1a)。KIN诱导不定芽增殖的效果次之但植株更强壮,且有大量不定根(图1b)。TDZ则会导致不定芽幼小且脆弱(图1c)。在1.0mg/L 6-BA的基础上添加少量NAA后,发现少量NAA能促进不定芽增殖。在众多实验组中,1.0mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA诱导不定芽增殖的效果最好,植株健康,月增殖系数可达9.64(表1,图2a-b)。

[0027] 4. 生根培养:将不定芽增殖培养30天后得到的从生芽分切为单个芽,然后接种到不同生根培养基中培养一个月,培养的温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照时间为12h/12h L/D,光照强度为 $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD。期间观察芽基部生根情况。结果见表2。

[0028] 表2.30天后从葛雷草诱导不定根

	生根培养基	生根率 (%)
[0029]	MS+无生长调节剂	100 a
	MS+0.2 mg/L NAA	100 a
	MS+0.5 mg/L IBA	100 a
	MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA	100 a
	MS+0.5 mg/L IBA+0.5%活性炭	100 a

[0030] 结果显示, 葛雷草比较容易长根, 不管是加低浓度的细胞分裂素或是生长素都能够诱导其生根, 半个月内它的生根率达100%以上(图2c-d)。为了移栽成活率高, 选择表2的培养基做生根培养基, 大概13天左右就可生根(表2)

[0031] 5. 壮苗、炼苗和移栽: 将刚分化的幼苗转移至不带植物生长调节剂的MS培养基中壮苗培养1-2月。选择生长至3-5cm的健壮的组培苗, 置于自然光照条件下, 炼苗2天。用自来水小心清洗根部的琼脂培养基, 剪去底部的老叶, 只保留顶部1至3片叶子, 分别种植于以下移栽基质中: (1) 泥炭土(100%); (2) 泥炭土: 蛭石=1:1 (v:v); (3) 泥炭土: 沙子=1:1 (v:v), 浇透水。每隔三天浇一次水, 保持土壤湿润。每种基质移栽40株, 30天后统计成活率。结果见表3和图2。

[0032] 表3. 不同基质对30天后对葛雷草移植存活的影响

	基质	移栽存活率 (%)
[0033]	泥炭土 (100%)	91.17 ± 2.12 b
	泥炭土: 蛭石=1: 1(v:v)	96.67 ± 2.65 a
	泥炭土: 沙子=1: 1(v:v)	90.69 ± 2.06 b

[0034] 结果显示, 刚分化的幼苗在无植物生长调节剂处理的MS培养基中壮苗培养1至2月后, 能够生长至3-5cm, 且能够生根。各种基质中存活的葛雷草没有明显的生长差异, 多为深绿色, 少数叶片发黄, 但从数据上可知, 葛雷草苗在泥炭土: 蛭石=1:1 (v:v) 中存活率最高(图2e), 继续管理两个月后, 小苗在基质上生长非常好, 并且已经生长蔓延(图2f)。但纯泥炭土基质以及泥炭土: 沙子=1:1 (v:v) 中的存活率相对最低(表3)。

[0035] 以上仅是本发明的优选实施方式, 应当指出的是, 上述优选实施方式不应视为对本发明的限制, 本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明的精神和范围内, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。



图1

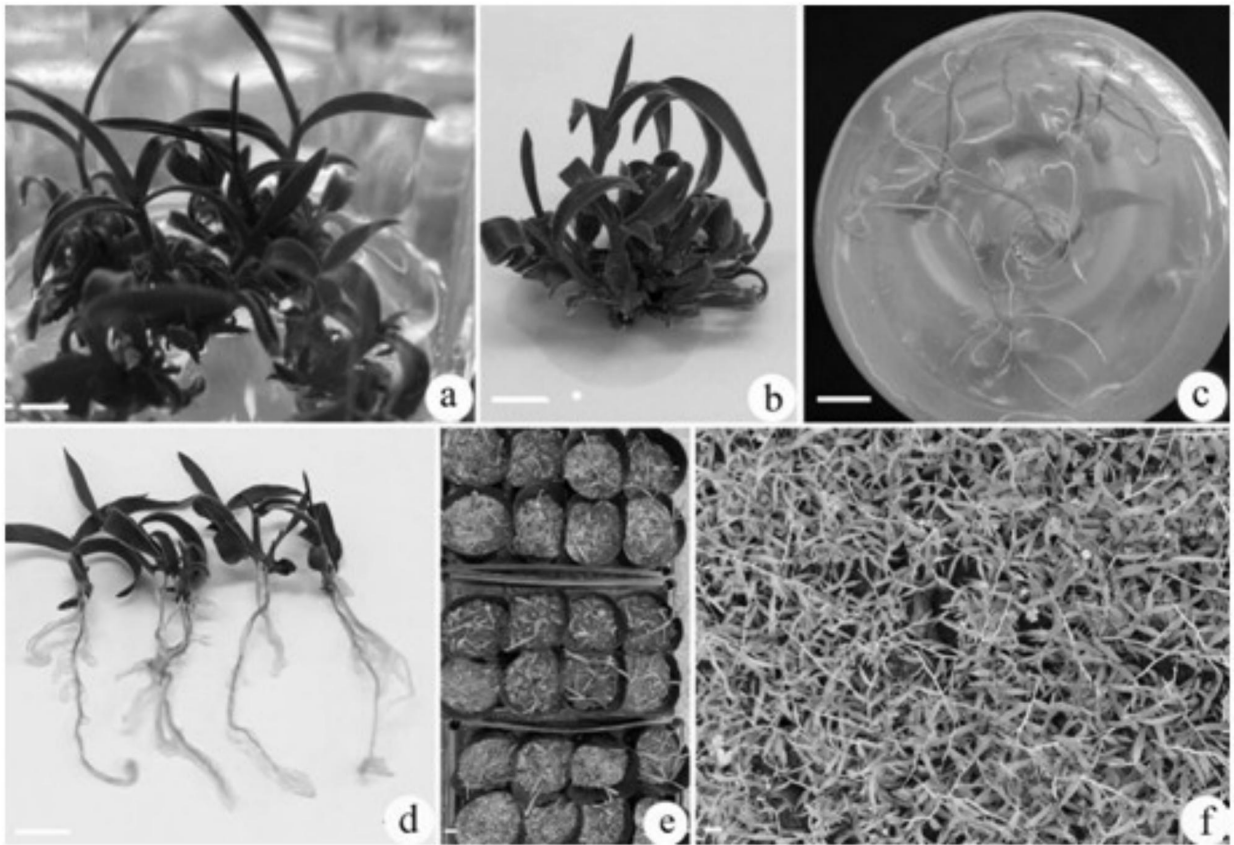


图2