



(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

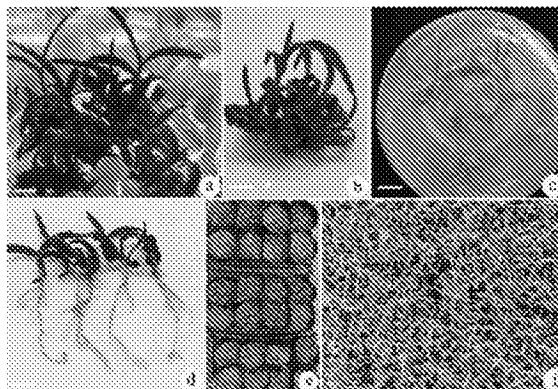
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(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。

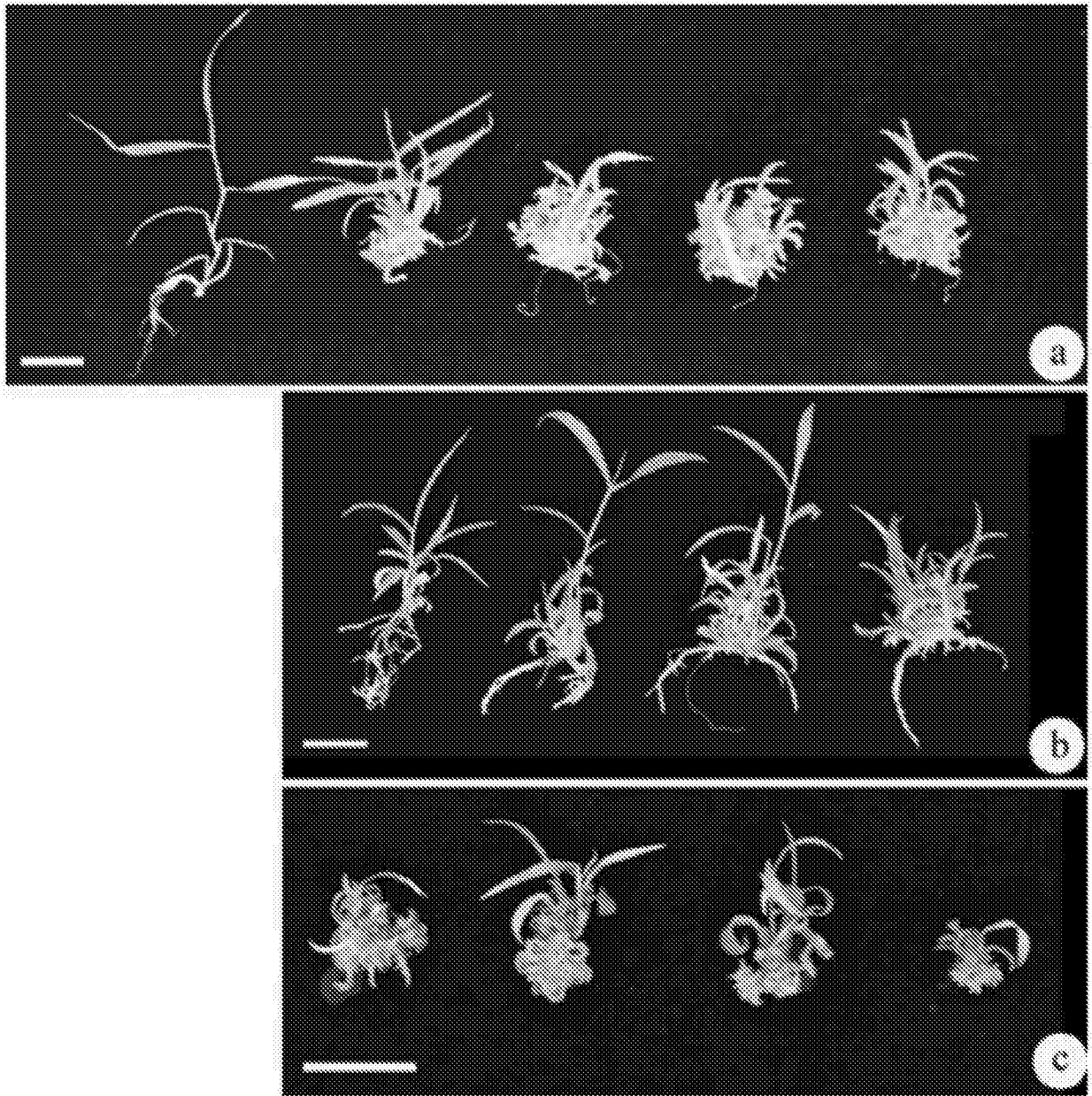


图1

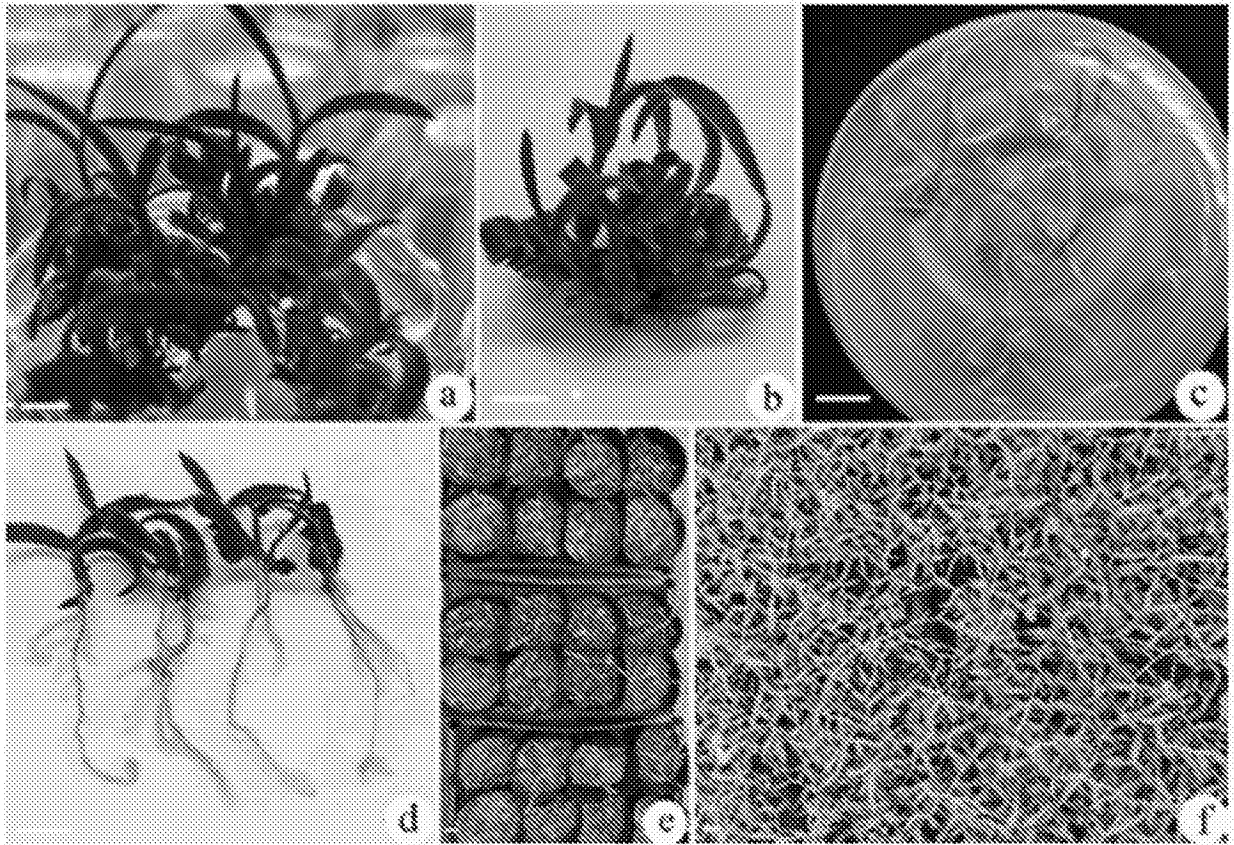


图2