



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107711514 B

(45)授权公告日 2020.02.21

(21)申请号 201711192038.3

审查员 张娜

(22)申请日 2017.11.24

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107711514 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(73)专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(72)发明人 罗桂芬 陈高 孙卫邦

(74)专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务

所(普通合伙) 53108

代理人 旃习涵

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

A01G 24/60(2018.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法

(57)摘要

本发明公开了一种旱地木槿Hibiscus aridicola Anthony紫色花系优良单株组培快繁方法。以旱地木槿紫色花系优良单株为外植体,通过外植体消毒、诱导、分化、增殖与生根一系列培养步骤,有效解决了旱地木槿组培快繁、引种驯化及其商业上的开发利用瓶颈问题,同时有效避免野生资源过度利用所造成的自然植株量减少与自然植被区遭受破坏,特别是在保持优良单株特殊形状的稳定性方面具有积极作用。开发利用前景极好。本方法诱导分化率80%,繁殖周期30天,增殖系数为4,生根率为95%,移栽成活率为92%,极大地提高了旱地木槿的繁殖数量与生长速率,为该物种的引种驯化、保存和规模化生产供了技术支撑。



1. 一种旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁的方法,其特征在于该方法包括外植体选择与消毒、诱导与分化培养、增殖与继代培养、壮苗与生根培养、瓶苗移栽步骤,

所述外植体选择与消毒是取旱地木槿紫色花系优良单株的幼嫩顶芽和侧芽为外植体,用1%肥皂水浸泡10分钟,经流水冲洗干净后,拿到超净台上,去叶,剪成1cm大小的带节小茎段,用75%的酒精消毒10s,无菌水冲洗3遍后,再用0.1%升汞溶液消毒8min,无菌水清洗3~5次,接种于准备好的诱导培养基中,每瓶插1芽;

所述诱导与分化培养是将消毒后的外植体在诱导与分化培养基中培养,诱导与分化培养基为MS培养基+0.8mg/L6-BA+0.5mg/LNAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期20天,光照强度为1000LUX,每天光照10小时,温度为23℃~30℃,诱导一周后,顶芽或侧芽开始萌发;

所述增殖与继代培养是诱导与分化培养后的材料在增殖与继代培养基中培养,增殖与继代培养基为MS培养基+0.5mg/L6-BA+0.5mg/LNAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期30天,光强度为1500LUX,温度为23℃~30℃;

所述壮苗与生根培养是经过增殖与继代培养的苗在壮苗与生根培养基中培养,壮苗与生根培养基为MS培养基+0.5mg/LNAA+0.5mg/LIAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期20天,光强度为1500LUX,温度为23℃~30℃;

所述瓶苗移栽是:培养20天后的生根瓶苗,需提前移至遮光率为75%~85%大棚炼苗一周,经生根后的生根瓶苗提前一周置放于大棚炼苗,准备基质,基质为体积比的珍珠岩:腐殖土:生红土=1:2:3,用800倍多菌灵进行喷施拌土,用塑料膜密封消毒7天,调节pH至5.8,开瓶取苗,洗净基部培养基,移栽至消毒过的基质中,及时喷水并覆盖塑料膜,大棚温度为20℃~30℃,遮光度在75%~85%,空气湿度50%~60%,基质湿度75%~85%。

2. 根据权利要求1所述的旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,其特征在于所述增殖是以节芽方式进行繁殖,生长迅速,30天生长高度达5.6cm,平均繁殖倍数为4。

3. 根据权利要求1所述的旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁的方法,其特征在于所述诱导与分化培养基合二为一,增殖与继代培养基合二为一,壮苗与生根培养基合二为一,培养方法简化。

4. 根据权利要求1所述的旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,其特征在于生根瓶苗移栽前置于大棚炼苗适应一周后移栽在准备好的基质中。

一种旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术中植物组培快繁方法,具体地说涉及到旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法。

背景技术

[0002] 旱地木槿 *Hibiscus aridicola* Anthony 隶属于锦葵科 Malvaceae 木槿属,美丽的多花灌木。旱地木槿是金沙江干热干暖河谷特有种,仅分布于云南丽江和四川盐边地区,海拔高600-2500米的干热干暖河谷丛中。花色以白色较为常见,紫色花和粉色花极为罕见。同时由于自然分布点少于5个,种群持续衰退,2004年被列入《中国物种红色名录》濒危种类 [EN B2ab(ii)]。近年来,由于兴建水库大坝,生境逐步丧失,加上受人类活动频繁影响,旱地木槿的生存环境受到更加严重的威胁。

[0003] 目前,生物技术中的无菌快速繁殖已成为中药材、花卉、濒危物种、经济林果等种苗生产的重要手段。

[0004] 迄今为止,现有技术没有关于旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁和相关的生物技术方面的报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁的方法,填补旱地木槿生物技术上的空白,同时解决旱地木槿在野外分布区域狭窄,引种驯化难度大的问题。本发明为旱地木槿全面的开发和持续利用、紫色花基因型的保存与扩大奠定了种苗繁育基础。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 一种旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁的方法,该方法包括外植体选择与消毒、诱导与分化培养、增殖与继代培养、壮苗与生根培养、瓶苗移栽步骤:

[0008] 所述外植体选择与消毒是取旱地木槿紫色花系优良单株幼嫩的顶芽和侧芽,用1%肥皂水浸泡10分钟,经流水冲洗干净后进行外植体消毒;

[0009] 所述诱导与分化培养是将消毒后的外植体在诱导与分化培养基中培养,诱导与分化培养基为MS培养基+1mg/L 6-BA+0.5mg/L IAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期20天;

[0010] 所述增殖与继代培养是诱导与化培养后的材料在增殖与继代培养基中培养,增殖与继代培养基为MS培养基+0.8mg/L 6-BA+0.5mg/L IAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期30天;

[0011] 所述壮苗与生根培养是经过增殖与继代培养的苗在壮苗与生根培养基中培养,壮苗与生根培养基为MS培养基+0.3mg/L NAA+0.3mg/L IAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期20天;

[0012] 所述瓶苗移栽是:经生根后的生根瓶苗提前一周置放于大棚炼苗,准备基质,基质为体积比的珍珠岩:腐殖土:生红土=1:2:3,用800倍多菌灵进行喷施拌土,用塑料膜密封

消毒7天,调节pH至5.8,开瓶取苗,轻轻洗净基部培养基,移栽,及时喷水并覆盖塑料膜,大棚温度为20~30℃,空气湿度50~60%,基质湿度75~85%。

[0013] 根据所述的旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,所述紫色花系优良单株幼嫩的顶芽和侧芽作为外植体,诱导与分化、增殖与继代、壮苗与生根培养的光照条件均为人工辅光1500LUX,温度为23~30℃。

[0014] 根据所述的旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,所述增殖是以节芽方式进行繁殖,生长迅速,30天生长高度达5.6cm,平均繁殖倍数4。

[0015] 根据所述的旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁的方法,诱导与分化培养基合二为一,增殖与继代培养基合二为一,壮苗与生根培养基合二为一,培养方法简化。

[0016] 根据所述旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,生根瓶苗移栽前置于大棚炼苗适应一周后移栽在准备好的基质中。

[0017] 根据所述旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,移栽基质为:体积比的珍珠岩:腐殖土:生红土=1:2:3,用800倍多菌灵进行喷施拌土,用塑料膜密封消毒7天,调节pH至5.8,开瓶取苗,轻轻洗净基部培养基,移栽,及时喷水并覆盖塑料膜,大棚温度为20~30℃,遮光率75~85%,空气湿度50~60%,基质湿度75~85%,30天后成活率92%。

[0018] 取旱地木槿紫色花系优良单株的幼嫩顶芽和侧芽为外植体,用1%肥皂水浸泡10分钟,经流水冲洗干净后,拿到超净台上,去叶,剪成1cm大小的带节小茎段,用75%的酒精消毒10s,无菌水冲洗3遍后,再用0.1%升汞溶液消毒8min,无菌水清洗3~5次,接种于准备好的诱导培养基中,每瓶插1芽。

[0019] 旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁培养基的制备:诱导与分化培养基为MS培养基+0.8mg/L 6-BA(6-苄基嘌呤)+0.5mg/L NAA(奈乙酸)+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,光照强度为1000LUX,每天光照10小时,温度为23~30℃。诱导一周后,顶芽或侧芽开始萌发。

[0020] 增殖与继代培养基为MS培养基+0.8mg/L 6-BA(6-苄基嘌呤)+0.5mg/L NAA(奈乙酸)+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期30天。光强度为1500LUX,温度为23~30℃。

[0021] 壮苗与生根培养基为MS培养基+0.5mg/LNAA(奈乙酸)+0.5mg/L IAA(吲哚乙酸)+糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,光强度为1500LUX,温度为23~30℃,培养周期20天。

[0022] 瓶苗移栽:培养20天后的生根瓶苗,需提前移至遮光率为75%~85%大棚炼苗一周。基质为珍珠岩:腐殖土:生红土(体积比)=1:2:3,用800倍多菌灵进行喷施拌土,用塑料膜密封消毒7天,调节pH至5.8。开瓶轻轻取出种苗,洗净根部的培养基,移栽至消毒过的基质中,及时喷水并覆盖塑料膜保湿。大棚温度为20~30℃,遮光度在75%~85%,空气湿度50~60%,基质湿度75~85%。30天后成活率92%。

[0023] 本发明技术方案的提出是基于下述的研究基础:

[0024] 旱地木槿分布区域狭窄,为金沙江干热干暖河谷特有物种,种群持续衰退,人工引种驯化难度大。其紫色花基因型更是稀缺。为解决其自然资源少,短时间内达到大量繁殖、保存和持续利用,填补旱地木槿在生物技术上的研究空白。故此发明了旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁技术,为旱地木槿全面的开发和可持续利用奠定了基础。

[0025] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0026] 1.本发明建立了有效的旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,解决了其分布狭窄、引种驯化困难、紫色花基因型稀缺,填补了旱地木槿在生物技术上的研发空白。

[0027] 2.本发明通过旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,成苗容易,繁殖步骤简化,有效繁殖速率高,为保存和扩大旱地木槿种群,意义重大。

[0028] 3.本发明通过旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法,高度保持了旱地木槿紫色花系优良单株的遗传稳定性和一致性,为旱地木槿全面的开发和持续利用奠定了基础。

[0029] 4.本发明的旱地木槿紫色花系优良单株组培快繁方法繁育的旱地木槿,20天诱导分化率87%,在30天内增殖系数为4,生根率为95%,移栽成活率为92%,极大地提高了旱地木槿的繁殖系数,为该物种的引种驯化、保存、园林园艺及其商业价值的发挥利用提供了非常有效的繁殖方法。

附图说明

[0030] 图1为本发明旱地木槿紫色花系优良单株组培繁殖情况。

[0031] 图2为本发明旱地木槿紫色花系优良单株组培生根情况。

具体实施方式

[0032] 下面结合附图,用本发明的具体实施例来进一步阐述本发明的技术特点和实质性内容,但并不以此来限定本发明。

[0033] 实施例1

[0034] 1.培养基及基质筛选:

[0035] 取旱地木槿紫色花系优良单株的幼嫩顶芽和侧芽为外植体,用1%肥皂水浸泡10分钟,经流水冲洗干净后,拿到超净台上,剪成带单个节的茎段,用75%的酒精消毒10s,无菌水冲洗3遍后,用0.1%升汞溶液进行表面消毒5min,无菌水清洗3~5次,接种于准备好的旱地木槿诱导培养基中,每瓶1个节。

[0036] 将茎段分别接种在MS+0.1mg/l 6-BA+0.5mg/L NAA,MS+0.5mg/l 6-BA+0.5mg/L NAA,MS+0.8mg/l 6-BA+0.5mg/LNAA,MS+1mg/l 6-BA+0.5mg/LNAA,MS+2mg/l 6-BA+0.5mg/L NAA培养基上,蔗糖30g/L,琼脂5g/L,pH5.8。光强度为1000LUX,温度为23~30℃,光照时间10小时。统计诱导率情况如下表:

[0037] 表1旱地木槿紫色花系优良单株茎段诱导培养基筛选

	培养基	侧芽或顶芽诱导率
[0038]	MS +0.1mg/l 6-BA +0.5mg/L NAA	65%
	MS +0.5mg/l 6-BA +0.5mg/L NAA	73%
	MS +0.8mg/l 6-BA +0.5mg/LNAA	86%
	MS +1mg/l 6-BA +0.5mg/LNAA	21%
	MS +2mg/l 6-BA +0.5mg/L NAA	6%

[0039] 对旱地木槿茎段诱导培养基进行筛选,结果表明,在MS+0.8mg/l 6-BA+0.5mg/LNAA培养基上,诱导率达到86%。

[0040] 表2继代培养基激素筛选

序号	均匀设计配方	株高 cm	茎粗 mm	愈伤组织	有效芽节
[0041] ①	MS +0.1mg/l 6-BA +0.1mg/L IAA	2.3	1	-	2.1
②	MS +0.5mg/l 6-BA +0.5mg/L IAA	5.6	2	++	4
③	MS +0.1mg/l 6-BA +0.1mg/L IBA	2	1	-	2
④	MS +0.5mg/l 6-BA +0.5mg/L IBA	5	2	++	3.8
⑤	MS +0.1mg/l 6-BA +0.1mg/L NAA	2.8	1	-	3
⑥	MS +0.5mg/l 6-BA +0.5mg/L NAA	6.4	3	+	5

[0042] 以MS培养基为增殖与继代激素筛选的基本培养基,细胞分裂素均为6-BA,浓度范围为(0.1mg/L,0.5mg/L,1mg/L,2mg/L,4个浓度梯度),生长素浓度分别为(0mg/L,0.1mg/L,0.5mg/L,1mg/L,4个浓度梯度),采用均匀设计法进行,结果如下:

[0043] MS培养基+0.5mg/L 6-BA(6-苄基嘌呤)+0.5mg/L NAA(奈乙酸)+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期30天,光强度为1500LUX,温度为23~30℃。芽节数量(包含顶芽)4~5,增值率4~5,植株叶片伸展,生长速度最快,株高5~6cm,茎粗2mm-3mm。

[0044] 表3生根培养基激素筛选结果

序号	均匀设计配方	株高 cm	愈伤组织	生根率 %
[0045] ①	MS +0.1mg/L IAA+0.1mg/l IBA	2.5	-	40
②	MS +0.5mg/l IAA +0.5mg/L IBA	2.8	-	82
③	MS +0.1mg/l IAA +0.1mg/L NAA	3.0	-	58
④	MS +0.5mg/l IAA +0.5mg/L NAA	3.0	-	95
⑤	MS +0.1mg/L NAA+0.1mg/l IBA	2.5	-	54
⑥	MS +0.5mg/L NAA+0.5mg/l IBA	2.8	+	80

[0046] MS培养基+0.5mg/LNAA(奈乙酸)+0.5mg/L IAA(吲哚乙酸)+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期20天,生根率达95%。

[0047] 表4栽培基质的筛选实验结果

序号	基质方案	成活率
①	生红土	75%
②	珍珠岩	83%
③	腐殖土：生红土 = 1:2	87%
④	珍珠岩：腐殖土：生红土（体积比）=1： 2：3	95%

[0049] 实验④中三种基质配合,增加了基质疏松度和根部透气性,也为根部提供足够的营养,同时红土为土层深部土壤,带菌量较少,有利于无菌苗的生长。30天后移栽成活率达到95%。

[0050] 以上的实施例形式对本发明的上述内容作了详细说明,但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以上的实施例,凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的保护范围。



图1



图2