



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107896990 B

(45)授权公告日 2020.04.21

(21)申请号 201711191986.5

A01G 24/15(2018.01)

(22)申请日 2017.11.24

A01G 24/12(2018.01)

A01G 17/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107896990 A

(56)对比文件

JP H02138129 A,1990.05.28,

CN 107258548 A,2017.10.20,

(43)申请公布日 2018.04.13

审查员 马彧博

(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)

A01C 1/00(2006.01)

A01C 1/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖方法

(57)摘要

一种旱地木槿 *Hibiscus aridicola* Anthony 种子无菌萌发与快速繁殖的方法。以旱地木槿成熟种子为外植体,通过外植体消毒、种子无菌萌发、增殖与生根一系列培养步骤,有效解决了旱地木槿人工繁殖、引种驯化及其在园林园艺景观上的开发利用,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的问题,在开发利用方面具有重要意义。本发明提供的方法,种子20天开始萌发,无菌萌发率60%,繁殖周期30天,增殖系数为5,生根率为98%,移栽成活率95%,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及园艺开发、保存和规模化生产提供了技术支持。



1. 一种旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,其特征在于该方法包括外植体选择与消毒、种子无菌萌发培养、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略泛黄的饱满果实,用1%肥皂水浸泡10分钟,经流水冲洗干净后进行组培常规外植体消毒;

所述种子无菌萌发培养是:在种子无菌萌发培养基中暗培养7天后进行光照,光照强度为1000LUX,温度为23~30℃,种子无菌萌发培养基为改良的MS培养基,将 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 由1650mg/L减少为400mg/L, $\text{KNO}_3$ 由1900mg/L减少为450mg/L,不加其他有机物,其余元素不变,20天后,种子开始萌发;

所述的增殖与继代培养是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/L 6-BA+0.5mg/L IAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期为30天;

所述的壮苗与生根培养是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;

所述的瓶苗移栽是:将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,及时喷水并覆盖塑料膜保湿,大棚温度为20~30℃,空气湿度50~60%,基质湿度75~85%。

2. 根据权利要求1所述的旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖方法,其特征在于所述外植体选择与消毒是取旱地木槿略泛黄的饱满果实为外植体,用1%肥皂水浸泡10min,经流水冲洗干净后,拿到超净台上,用75%的酒精消毒15min,无菌水冲洗3遍后,去掉果皮,取出种子,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种子萌发培养基中,每瓶5粒。

3. 根据权利要求1所述的旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖方法,其特征在于所述种子无菌萌发为全黑暗培养7天后进行人工辅助光诱导,光强度为1000LUX,温度为23~30℃;增殖与继代、壮苗与生根培养的光照条件为人工辅光1500LUX,温度为23~30℃。

4. 根据权利要求1所述旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,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。

5. 根据权利要求1所述旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,其特征在于移栽基质为: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,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95%以上。

## 一种旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术中植物种子无菌萌发与快速繁殖方法,具体地说涉及到旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖方法。

### 背景技术

[0002] 旱地木槿 *Hibiscus aridicola* Anthony 是隶属于锦葵科木槿属的美丽多花小灌木。旱地木槿是金沙江干热河谷特有种和地区标志种,仅分布于云南丽江和四川盐边地区,海拔高600-2500米的干热和干暖河谷中。由于分布点少于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,由于大坝建设,生境丧失,及人类活动的影响,该物种的生存环境受到严重威胁。

[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,现有技术中未见有旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖方面的报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,填补旱地木槿繁殖在生物技术上的空白,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] 一种旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,该方法包括外植体选择与消毒、种子无菌萌发培养、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略泛黄的饱满果实,用1%肥皂水浸泡10分钟,经流水冲洗干净后进行组培常规外植体消毒;

[0009] 所述种子无菌萌发培养是:在种子无菌萌发培养基中暗培养7天后进行光照,光照强度为1000LUX,温度为23~30℃,种子无菌萌发培养基为改良的MS培养基,将 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650mg/L减少为400mg/L, $\text{KNO}_3$ 由1900mg/L减少为450mg/L,不加其他有机物,其余元素不变,20天后,种子开始萌发;

[0010] 所述的增殖与继代培养是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/L 6-BA+0.5mg/L IAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期为30天;

[0011] 所述的壮苗与生根培养是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/LNAA+0.3mg/L IAA+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH5.8,培养周期20天;

[0012] 所述的瓶苗移栽是:将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,及时喷水并覆盖塑料膜保湿,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种子无菌萌发与快速繁殖方法,所述外植体选择与消毒是取

旱地木槿略泛黄的饱满果实为外植体,用1%肥皂水浸泡10min,经流水冲洗干净后,拿到超净台上,用75%的酒精消毒15min,无菌水冲洗3遍后,去掉果皮,取出种子,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种子萌发培养基中,每瓶5粒。

[0014] 根据所述的旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖方法,所述种子无菌萌发为全黑暗培养7天后进行人工辅助光诱导,光强度为1000LUX,温度为23~30℃;增殖与继代、壮苗与生根培养的光照条件为人工辅光1500LUX,温度为23~30℃。

[0015] 根据所述的旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,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] 根据所述旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,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] 根据所述旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,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,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95%以上。

[0018] 更具体地,本发明的方法可概括如下:

[0019] 旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖的方法,包括选择外植体、消毒、诱导种子萌发,快繁增殖、壮苗生根及移栽步骤:

[0020] 取旱地木槿略泛黄的饱满果实为外植体,用1%肥皂水浸泡10min,经流水冲洗干净后,拿到超净台上,用75%的酒精消毒15min,无菌水冲洗3遍后,去掉果皮,取出种子,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种子萌发培养基中,每瓶5粒。

[0021] 旱地木槿种子萌发培养基的制备:因旱地木槿生存环境为干热河谷,土质较为贫瘠,多为砂壤。种子在改良的MS培养基中萌发率高,萌发时间短。改良MS培养基,将 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650mg/L减少为400mg/L, $\text{KNO}_3$ 由1900mg/L减少为450mg/L,不加有机物,其余元素不变。暗培养7天后进行光照培养,光强度为1000LUX,温度为23~30℃。20天后,种子开始萌发。

[0022] 增殖与继代培养基为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℃。

[0023] 壮苗与生根培养基为MS培养基+0.3mg/LNAA(奈乙酸)+0.3mg/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。

[0024] 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95%。

[0025] 本发明技术方案的提出是基于下述的研究基础:

[0026] 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。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种子无菌萌发与快速繁殖技术,为旱

地木槿全面的开发和持续利用奠定了基础。

[0027] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0028] 1. 本发明通过改良基础培养基配方,使得材料成活率较其他常用培养基提高43%。

[0029] 2. 本发明建立了有效的旱地木槿种子无菌萌发与快速繁殖方法,解决了其分布狭窄、引种驯化困难的状况,填补了旱地木槿繁殖在生物技术上的研发空白。

[0030] 3. 本发明通过无菌快繁得到的同一幼苗单株系后代,成苗容易,繁殖步骤简化,有效繁殖速率高,同时又保持了不同旱地木槿植株的优良性状系列。

[0031] 4. 本发明采用种子作为繁殖材料,极大化地保存了其后代的遗传多样性,为恢复旱地木槿种群遗传多样性和旱地木槿小种群保护、保存与开发利用提供前期基础,意义重大。

[0032] 5. 本发明的种子无菌萌发与快速繁殖方法繁育的旱地木槿在30天内增殖系数为5,生根率为98%,移栽成活率为95%,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方法。

#### 附图说明:

[0033] 图1为旱地木槿种子苗繁殖情况。

[0034] 图2为旱地木槿旱地木槿种子苗生根情况。

#### 具体实施方式:

[0035] 下面结合附图,用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容和技术特点,但并不以此来限定本发明。

[0036] 实施例1:

[0037] 1. 培养基及基质筛选:

[0038] 取旱地木槿略泛黄的饱满果实为外植体,用1%肥皂水浸泡10min,经流水冲洗干净后,拿到超净台上,用75%的酒精消毒15min,无菌水冲洗3遍后,去掉果皮,取出种子,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种子萌发培养基中,每瓶5粒。

[0039] 将种子分别接种在MS、1/2MS、1/3MS、改良MS(接近1/4MS)培养基上,各培养基均不含有机物和激素,蔗糖30g/L,琼脂5g/L,pH5.8。暗培养基7天,光照培养13天后,统计种子萌发率。光强度为1000LUX,温度为23~30℃。

[0040] 表1种子无菌萌发培养基的筛选

	培养基	种子萌发率
	MS	17%
[0041]	1/2MS	28%
	1/3MS	36%
	改良MS(接近1/4MS)	60%

[0042] 对旱地木槿种子无菌萌发的培养基MS、1/2MS、1/3MS、改良MS(接近1/4MS)进行筛选,结果如表1,在改良MS(接近1/4MS)培养基上,萌发率达到60%,比常规的MS培养基萌发

率高43%，为旱地木槿种子无菌萌发的最佳培养基。

[0043] 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,2个浓度梯度)，生长素浓度分别为(0.1mg/L,0.5mg/L,2个浓度梯度)，采用均匀设计法进行，结果如表2：

[0044] 表2继代与增殖培养激素的筛选

序号	均匀设计配方	株高 cm	茎粗 mm	愈上组 织	有效 芽节
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
[0045] 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

[0046] 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)5,植株叶片伸展,生长速度最快,株高6.4cm,茎粗3mm,愈伤组织较小。

[0047] 表3生根培养基激素筛选结果

序号	均匀设计配方	株高 cm	愈上组 织	生根率 %
①	MS +0.1mg/L IAA+0.1mg/l IBA	2.8	-	47
②	MS +0.3mg/l IAA +0.3mg/L IBA	3.0	-	88
[0048] ③	MS +0.1mg/l IAA +0.1mg/L NAA	3.1	-	62
④	MS +0.3mg/l IAA +0.3mg/L NAA	3.2	-	98
⑤	MS 0.1mg/L NAA+0.1mg/l IBA	2.6	+	60
⑥	MS +0.3mg/L NAA+0.3mg/l IBA	2.8	+	81

[0049] MS培养基+0.3mg/LNAA(奈乙酸)+0.3mg/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98%。

[0050] 表4栽培基质的筛选实验结果

	序号	基质方案	成活率
[0051]	①	生红土	76%
	②	珍珠岩	88%
	③	腐殖土：生红土 = 1:2	90%
	④	珍珠岩：腐殖土：生红土（体积比）=1： 2：3	95%

[0052] 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,有利于无菌种苗的生长。30天后移栽成活率达到95%。

[0053] 以上通过实施例形式对本发明的上述内容再作了进一步的详细说明,但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于上面的实施例,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