



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112119915 B

(45) 授权公告日 2021.11.19

(21) 申请号 202011172234.6

CN 107318657 A, 2017.11.07

(22) 申请日 2020.10.28

CN 106879464 A, 2017.06.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 104304007 A, 2015.01.28

申请公布号 CN 112119915 A

CN 107667860 A, 2018.02.09

WO 2013086494 A1, 2013.06.13

(43) 申请公布日 2020.12.25

兰芹英等. 灯架树的组织培养与快速繁殖.

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

《植物生理学通讯》. 2004, 第40卷(第2期), 第203页.

地址 650201 云南省昆明市盘龙区青松路19号

Jeet, Amar等. Strategies for indole alkaloids enrichment through callus

(72) 发明人 李春芳 何俊 杨俊波

culture from *Alstonia scholaris* (L.) R.

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

Br.. 《PLANT GROWTH REGULATION》. 2020, 第90

代理人 苏士莹

卷(第2期), 第383-392页.

(51) Int. Cl.

郑光植等. 云南萝芙木的组织培养.

A01H 4/00 (2006.01)

《Journal of Integrative Plant Biology》

A01N 3/00 (2006.01)

. 1979, (第02期),

(56) 对比文件

审查员 胡佳

CN 110663552 A, 2020.01.10

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法

(57) 摘要

本发明提供了一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法, 涉及种质保存技术领域。本发明以鸡骨常山的带芽茎段为对象, 通过外植体消毒, 初代培养获得不定芽, 并对其进行增殖诱导、生根和离体保存等, 建立了鸡骨常山的组培快繁和离体保存体系, 月增殖系数达1:4, 离体保存继代周期达1年左右。利用本发明所述组培快繁和离体保存方法, 延长离体保存的时间, 可以降低组培苗转接工作量, 也避免了连续多次继代引起遗传性改变的可能, 为种质保存和可持续利用提供了保证。



1. 一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法,其特征在于,包括以下步骤:(1)将消毒后的幼嫩侧芽茎段为外植体,将所述外植体转移至初代培养基上进行初代培养,得无菌新芽;所述初代培养基由MS培养基、6-BA0.5mg/L、NAA0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8;

(2)将所述无菌新芽转到增殖培养基上继续培养,得丛生芽;所述增殖培养基由MS培养基、6-BA0.3~1.0mg/L、IAA0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8;

(3)将所述丛生芽切割成单芽后接种于生根培养基上进行生根培养,得生根组培苗;所述生根培养基由1/2MS培养基、IAA0.1~1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8;得到生根组培苗后,待所述生根组培苗生根2~4条、根长2~3cm时进行移栽,所述移栽前还包括炼苗,所述移栽的移栽基质为腐叶土和生红土的混合基质,所述腐叶土和生红土的体积比为1:1;

(4)将所述生根组培苗转移至离体保存培养基上进行离体保存;所述离体保存培养基由1/2MS培养基、IAA1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8;

步骤(1)所述初代培养、步骤(2)所述继续培养、步骤(3)所述生根培养和步骤(4)所述离体保存的温度均为 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,光照强度均为 $20\sim 40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,光照时间均为12h/d。

2. 根据权利要求1所述组培快繁和离体保存方法,其特征在于,步骤(1)所述消毒包括:将幼嫩的侧芽茎段浸泡在肥皂水中,经自来水冲洗1h后,于无菌环境中剪成带单个芽的茎段,用体积百分含量为75%的酒精消毒10s,无菌水冲洗3遍,用质量百分含量为0.1%的升汞溶液进行表面消毒6~8min,无菌水清洗3~5次。

## 一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于种质保存技术领域,具体涉及一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法。

### 背景技术

[0002] 鸡骨常山(*Alstonia yunnanensis*)为夹竹桃科鸡骨常山属植物,是我国的特有物种,分布在我国西南地区海拔1100~2400米的山坡或沟谷地带。其根和叶均作药用,根中所含的单萜吲哚生物碱具有降低血压作用,是开发天然降血压药物的重要野生植物种质资源;鸡骨常山花期较长,花紫红色有香气,高脚碟状的花朵多朵簇生于枝顶,极具观赏价值;植株株型为高在2米左右的直立灌木,并具多分枝,且分枝耐修剪,很适合丛植篱植美化环境,具有重要的园林绿化应用价值。目前,鸡骨常山多采用种子播种、分株或扦插繁殖,繁殖效率低,无法满足规模化种苗生产的要求。

### 发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法,有效地解决鸡骨常山的组培快繁问题,大大延长离体保存周期,有利于鸡骨常山种质资源的保存和开发利用,为今后的资源挖掘奠定基础。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明提供了一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法,包括以下步骤:(1)将消毒后的幼嫩侧芽茎段为外植体,将所述外植体转移至初代培养基上进行初代培养,得无菌新芽;所述初代培养及以MS培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.5mg/L、NAA 0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0006] (2)将所述无菌新芽转到增殖培养基上继续培养,得丛生芽;所述增殖培养基以MS培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.3~1.0mg/L、IAA 0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0007] (3)将所述丛生芽切割成单芽后接种于生根培养基上进行生根培养,得生根组培苗;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IAA 0.1~1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0008] (4)将所述生根组培苗转移至离体保存培养基上进行离体保存;所述离体保存培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IAA 1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。

[0009] 优选的,步骤(1)所述消毒包括:将幼嫩的侧芽茎段浸泡在肥皂水中,经自来水冲洗1h后,于无菌环境中剪成带单个芽的茎段,用体积百分含量为75%的酒精消毒10s,无菌水冲洗3遍,用质量百分含量为0.1%的升汞溶液进行表面消毒6~8min,无菌水清洗3~5次。

[0010] 优选的,步骤(3)得到生根组培苗后,待所述生根组培苗生根2~4条、根长2~3cm

时进行移栽。

[0011] 优选的,所述移栽前还包括炼苗。

[0012] 优选的,所述移栽的移栽基质为包括腐叶土和生红土的混合基质,所述腐叶土和生红土的体积比为1:1。

[0013] 优选的,步骤(1)所述初代培养、步骤(2)所述继续培养、步骤(3)所述生根培养和步骤(4)所述离体保存的温度均为 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,光照强度均为 $20\sim 40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,光照时间均为12h/d。

[0014] 本发明提供了一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法,以鸡骨常山的带芽茎段为对象,通过外植体消毒,初代培养获得不定芽,并对其进行增殖诱导、生根和离体保存等,建立了鸡骨常山的组培快繁和离体保存体系,月增殖系数达1:4,离体保存继代周期达1年左右。该方法有效地解决了鸡骨常山的组培快繁问题,大大延长了离体保存周期,有利于鸡骨常山种质资源的保存和开发利用,为今后的资源挖掘奠定基础。在本发明的实施例中,初代培养时诱导率达到85%,带芽茎段基部虽出现少量愈伤组织,但新生芽叶片绿色,生长较快;继续培养时增殖系数最高可达4.5;不定芽生根培养时的生根率可达88%;当鸡骨常山生根3条左右、长约2~3cm时进行移栽,移栽成苗率90%以上;完成生根形成完整植株后,在离体保存培养基上可以离体保存12个月左右,且苗绿叶片伸长。利用本发明所述组培快繁和离体保存方法,延长离体保存的时间,可以降低组培苗转接工作量,也避免了连续多次继代引起遗传性改变的可能,为种质保存和可持续利用提供了保证。

## 附图说明

[0015] 图1为本发明鸡骨常山组培丛生芽诱导情况;

[0016] 图2为本发明鸡骨常山组培苗生根情况。

## 具体实施方式

[0017] 本发明提供了一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法,包括以下步骤:(1)将消毒后的幼嫩侧芽茎段为外植体,将所述外植体转移至初代培养基上进行初代培养,得无菌新芽;所述初代培养及以MS培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.5mg/L、NAA 0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0018] (2)将所述无菌新芽转到增殖培养基上继续培养,得丛生芽;所述增殖培养基以MS培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.3~1.0mg/L、IAA 0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0019] (3)将所述丛生芽切割成单芽后接种于生根培养基上进行生根培养,得生根组培苗;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IAA0.1~1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0020] (4)将所述生根组培苗转移至离体保存培养基上进行离体保存;所述离体保存培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IAA 1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。

[0021] 将消毒后的幼嫩侧芽茎段为外植体,将所述外植体转移至初代培养基上进行初代培养,得无菌新芽;所述初代培养及以MS培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.5mg/L、NAA

0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。

[0022] 本发明将消毒后的幼嫩侧芽茎段为外植体,将所述外植体转移至初代培养基上进行初代培养,得无菌新芽;所述初代培养及以MS培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.5mg/L、NAA 0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明所述幼嫩侧芽茎段优选取自鸡骨常山健壮单株新抽出的侧芽茎段,对其进行消毒后作为外植体,所述消毒优选包括:将幼嫩的侧芽茎段浸泡在肥皂水中,经自来水冲洗1h后,于无菌环境中剪成带单个芽的茎段,用体积百分含量为75%的酒精消毒10s,无菌水冲洗3遍,用质量百分含量为0.1%的升汞溶液进行表面消毒6~8min,无菌水清洗3~5次。本发明所述肥皂水的质量浓度优选为1%,且在所述肥皂水中的浸泡时间优选为10min。本发明所述升汞溶液表面消毒的时间优选为8min。

[0023] 本发明将所述外植体转移至初代培养基上进行初代培养,所述初代培养基的侧芽诱导率可达85%,带芽茎段基部虽出现少量愈伤组织,但新生芽叶片绿色,生长较快。本发明所述初代培养的温度优选为 $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,光照强度优选为 $20 \sim 40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光照时间优选为12h/d。

[0024] 得无菌新芽后,本发明将所述无菌新芽转到增殖培养基上继续培养,得丛生芽;所述增殖培养基以MS培养基为基本培养基,还包括6-BA 0.3~1.0mg/L、IAA 0.2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明优选将生长良好的新芽转到增殖培养基上继续培养,所述继续培养的条件参数优选与初代培养相同,在此不再赘述。本发明所述增殖培养基中包含6-BA,所述6-BA的浓度优选为1.0mg/L,在此浓度下的增殖培养基,其增殖系数可达4.5,且植株生长旺盛,叶片浓绿,有根叶伸展。

[0025] 得丛生芽后,本发明将所述丛生芽切割成单芽后接种于生根培养基上进行生根培养,得生根组培苗;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IAA 0.1~1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明所述生根培养基中包含IAA,所述IAA的浓度优选为1.0mg/L,在此浓度下的生根培养基中,生根率可达88%,生根条数可达2~5条,根粗约0.2cm,植株生长健壮。本发明所述生根培养的条件参数优选与初代培养相同,在此不再赘述。

[0026] 在本发明中,当所述生根组培苗生根2~4条、根长2~3cm时优选可进行移栽,在所述移栽前优选还包括炼苗,所述炼苗优选为:将生根瓶苗从瓶内取出,用清水洗去根部附着的培养基,将小苗根部朝下放入育苗盆中,育苗盆预先装有3~4cm深的自来水,在育苗盆中炼苗1~2天后再打开育苗盆的盖炼苗2天,然后进行移栽。本发明所述移栽时的移栽基质优选为包括腐叶土和生红土的混合基质,所述腐叶土和生红土的体积比为1:1。本发明在所述移栽后,优选浇足定根水,可用塑料薄膜覆盖保湿,待试管苗长出新叶后去膜粗放管理,移栽成苗率90%以上。

[0027] 得生根组培苗后,本发明将所述生根组培苗转移至离体保存培养基上进行离体保存;所述离体保存培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IAA 1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明所述离体保存的条件参数优选与初代培养相同,在此不再赘述。本发明可在所述离体保存培养基上可以离体保存12个月左右。

[0028] 下面结合实施例对本发明提供的一种鸡骨常山种苗的组培快繁和离体保存方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0029] 实施例1

[0030] 1、外植体消毒

[0031] 取鸡骨常山健壮单株新抽出的侧芽茎段为外植体,用1%肥皂水浸泡10min,再经自来水冲洗1h后拿到超净台上,剪成带单个芽的茎段,用75%的酒精消毒10s,无菌水冲洗3遍,用0.1%升汞溶液进行表面消毒3~8min,无菌水清洗3~5次,先接种于不添加任何激素的基本培养MS上,为避免交叉污染,每瓶放置1个带芽茎段。所有培养基均添加蔗糖20g/L,琼脂5.6g/L固化(后文同理),调整pH值为5.8,培养温度均为 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ,光照强度 $20 \sim 40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光照12h/d。在不同的初代培养基中接入带芽茎段后即每天观察,3d后陆续出现污染,30d后以消毒处理8min的污染率最低,消毒效果最好,见表1。

[0032] 表1 鸡骨常山茎段不同消毒时间的污染情况

处理	消毒时间 (min)	接种外植体个数	外植体污染个数	污染率 (%)
1	3	20	8	40
2	6	20	2	10
3	8	20	1	5

[0034] 2、鸡骨常山带芽茎段初代培养

[0035] 以MS为基本培养基,添加不同浓度的细胞分裂素6-BA (0.3mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L、2.0mg/L、3.0mg/L) 和细胞生长素萘乙酸 (0.2mg/L) 对鸡骨常山茎段诱导培养基进行初代培养,以期获得无菌新芽。结果表明,在MS+0.5mg/L 6-BA+0.2mg/LNAA培养基上,诱导率达到85%,带芽茎段基部虽出现少量愈伤组织,但新生芽叶片绿色,生长较快。

[0036] 表2 鸡骨常山茎段初代培养培养基筛选

处理	6-BA	NAA	侧芽率 (%)	生长情况
1	0.3	0.2	10%	叶片颜色不均匀
2	0.5	0.2	85%	叶片绿, 生长较快, 有少量愈伤组织
3	1.0	0.2	60%	叶片畸形
4	1.5	0.2	67%	叶片畸形
5	2.0	0.2	57%	叶片玻璃化, 生长慢
6	3.0	0.2	55%	叶片玻璃化, 生长慢

[0038] 3、鸡骨常山丛生芽诱导培养基筛选

[0039] 将生长良好的芽转到增殖培养基上继续培养。培养基中添加IAA (0.2mg/L)、萘乙酸NAA (0.2mg/L) 和6-BA (0.3mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L), 共六个处理,每个处理接种20瓶,每

瓶5个外植体。一个月后统计增殖系数。从表3可以看出,在所试验的6个组合中,各培养基中都有芽增殖现象,其中以MS+6-BA1.0+IAA0.2处理增殖效果最好,增殖系数达4.5(图1),显著高于其他处理。

[0040] 表3 鸡骨常山丛生芽诱导培养基筛选

处理	培养基种类 (mg/L)	增殖系数	生长情况
1	MS+6-BA 0.3+NAA 0.2	1.2	叶片细弱, 有愈伤组织
[0041] 2	MS+6-BA 0.3+IAA 0.2	1.5	叶片细弱, 有愈伤组织, 部分有根
3	MS+6-BA 0.5+NAA 0.2	1.4	叶片浅绿, 苗细弱
4	MS+6-BA 0.5+IAA 0.2	2.1	苗细弱有根
[0042] 5	MS+6-BA 1.0+NAA 0.2	1.6	叶片淡绿, 有根
6	MS+6-BA 1.0+IAA 0.2	4.5	叶片浓绿, 有根叶伸展

#### [0043] 4、生根培养基筛选

[0044] 将诱导得到的丛生芽切割成单芽接种到不同生根培养基上进行培养。以1/2MS为基本培养基(仅大量元素减半),将不同浓度的IBA(0.1mg/L、0.3mg/L、0.5mg/L)、IAA(0.1mg/L、0.3mg/L、1.0mg/L)和NAA(0.1mg/L、0.2mg/L、0.3mg/L)进行组合处理,以期获得适合的生根培养基。选取芽条高度在3cm以上,每个处理接种20瓶,每瓶5个外植体,30d后统计生根率。在培养基1/2MS+IAA1.0上生根培养,生根率可达88%(图2),生根条数可达2~5条,根粗约0.2cm,植株生长健壮,见表4。

[0045] 表4 生根培养基筛选

培养基	激素组合 (mg/L)			生根率 (%)	生长情况
	IBA	IAA	NAA		
1	0.3	0.3	0	0	基部有愈伤, 无根, 茎上有白色愈伤, 叶片绿色, 伸展
2	0.3	0	0.3	0	基部有愈伤, 无根, 茎上有白色愈伤, 叶片绿色, 伸展
3	0.5	0	0.2	0	基部有愈伤, 无根, 茎上有白色愈伤, 叶片脱落
4	0	1.0	0	88	基部正常, 有根, 叶片伸展
5	0	0.1	0	65	基部有愈伤, 有根, 叶片脱落
6	0.1	0.1	0.1	0	无根, 叶片脱落

[0047] 5、组培苗生根

[0048] 当鸡骨常山生根3条左右、长约2~3cm时,即可作移栽准备。首先,将生根瓶苗从瓶内取出,用清水洗去根部附着的培养基,将小苗根部朝下放入育苗盆中,育苗盆预先装有3~4cm深的自来水,在育苗盆中炼苗1~2d后再打开育苗盆的盖炼苗2d,然后进行移栽。移栽基质为(体积比)腐叶土:生红土=1:1的混合基质,栽好后浇足定根水,可用塑料薄膜覆盖保湿,待试管苗长出新叶后去膜粗放管理,移栽成苗率90%以上。

[0049] 6、离体保存

[0050] 在培养基1/2MS+IAA 1.0上完成生根并形成完整植株后,可以离体保存12个月左右,且苗绿叶片伸长。

[0051] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,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

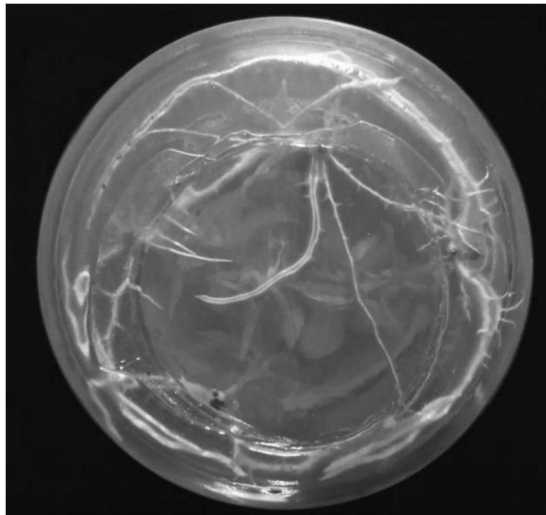


图2