



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114190277 B

(45) 授权公告日 2022.09.20

(21) 申请号 202111486243.7

审查员 荆丹丹

(22) 申请日 2021.12.07

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114190277 A

(43) 申请公布日 2022.03.18

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650201 云南省昆明市盘龙区青松路
19号

(72) 发明人 何俊 浦秀丽 李村富 杨俊波

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 吴波

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

A01H 1/02 (2006.01)

A01G 22/63 (2018.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种促进大根兰试管开花和结实的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种促进大根兰试管开花和结实的方法,属于植物快繁技术领域。本发明的技术方案包括以下步骤:以大根兰无菌苗的根状茎为外植体,进行增殖培养,取增殖根状茎转移至开花诱导培养基,诱导至花苞盛开,进行人工授粉培养至结实,即可得到大根兰种子。本发明可使大根兰的整个生活史由3-8年缩短至2年内完成,为腐生兰类野生种质资源的研究、开发和可持续利用等提供技术。



1. 一种促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,包括以下步骤:以大根兰无菌苗的根状茎为外植体,进行增殖培养,取增殖根状茎转移至开花诱导培养基,诱导至花苞盛开,进行人工授粉培养至结实;

所述增殖培养时,增殖培养基包括:花宝1号3.0g/L、维生素B6 0.5mg/L、维生素B1 0.1mg/L、烟酸0.5mg/L、甘氨酸2.0mg/L、肌醇100.0mg/L、6-BA 5.0-10.0mg/L、KT 2.0-5.0mg/L、椰子汁100-200mL/L、蔗糖20g/L、琼脂5.6g/L;

所述开花诱导培养基包括:花宝3号3.0g/L、维生素B6 0.5mg/L、维生素B1 0.1mg/L、烟酸0.5mg/L、甘氨酸2.0mg/L、肌醇100mg/L、NAA 1.0-2.0mg/L、椰子汁200-300mL/L、蔗糖30g/L、琼脂5.6g/L、活性炭1.0g/L。

2. 根据权利要求1所述的促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,根状茎外植体来源于大根兰种子萌发的无菌苗。

3. 根据权利要求1或2所述的促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,所述根状茎外植体长1.0-2.0cm。

4. 根据权利要求1所述的促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,所述增殖培养时暗培养,温度为 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

5. 根据权利要求1所述的促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,所述增殖培养时间为6个月以上,增殖倍数达到4倍以上后转移至开花诱导培养基。

6. 根据权利要求1所述的促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,开花诱导培养时光/暗周期为6h:18h,温度为 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

7. 根据权利要求1所述的促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,所述花苞盛开2-3d后,进行人工授粉。

8. 根据权利要求1或7所述的促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,所述人工授粉包括:用镊子取出花粉块,置于同一朵花的凹槽状柱头上。

9. 根据权利要求1或7所述的促进大根兰试管开花和结实的方法,其特征在于,所述人工授粉后,调整光/暗周期为12h:12h,温度为 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

一种促进大根兰试管开花和结实的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物快繁技术领域,尤其涉及一种促进大根兰试管开花和结实的方法。

背景技术

[0002] 腐生兰又称完全菌根异养型兰(Fully Mycoheterotrophic orchids),无绿叶,不能进行光合作用制造有机物,依靠与其共生的真菌提供营养。近年来,腐生兰独特的生活方式引起了生物学家的广泛关注。同时,腐生兰具有重要的药用价值,其观赏价值也被逐渐认识。

[0003] 大根兰(*Cymbidium macrorhizon*)为兰科兰属植物,是一种腐生兰,分布在我国四川、云南、贵州和广西的海拔400-2100米左右的海拔林下或林缘。在自然条件下,其种子萌发需要共生真菌参与,从萌发到开花结实通常需要4年以上,极为耗时,科技人员也很难跟踪研究植株的整个生活史。腐生兰试管开花结实体系的建立,将进一步促进腐生兰与其共生真菌、营养来源以及系统演化等热点问题的系统解决,并为腐生兰的资源保护及再生研究提供技术支撑,也为腐生兰试管花卉的开发提供更多可能。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种促进大根兰试管开花和结实的方法,使大根兰的整个生活史在2年内完成,为腐生兰类野生种质资源的研究、开发和可持续利用等提供技术。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0006] 一种促进大根兰试管开花和结实的方法,包括以下步骤:以大根兰无菌苗的根状茎为外植体,进行增殖培养,取增殖根状茎转移至开花诱导培养基,诱导至花苞盛开,进行人工授粉培养至结实;

[0007] 所述开花诱导培养基包括:花宝3号3.0g/L、维生素B6 0.5mg/L、维生素B1 0.1mg/L、烟酸0.5mg/L、甘氨酸2.0mg/L、肌醇100mg/L、NAA 1.0-2.0mg/L、椰子汁200-300mL/L、蔗糖30g/L、琼脂5.6g/L、活性炭1.0g/L。

[0008] 优选的是,所述根状茎外植体来源于大根兰种子萌发的无菌苗;更优选的是所述根状茎外植体长1.0-2.0cm。

[0009] 优选的是,所述增殖培养时,增殖培养基包括:花宝1号3.0g/L、维生素B6 0.5mg/L、维生素B1 0.1mg/L、烟酸0.5mg/L、甘氨酸2.0mg/L、肌醇100.0mg/L、6-BA 5.0-10.0mg/L、KT 2.0-5.0mg/L、椰子汁100-200mL/L、蔗糖20g/L、琼脂5.6g/L。

[0010] 更优选的是,所述增殖培养时暗培养,温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0011] 更优选的是,所述增殖培养时间为6个月以上,增殖倍数达到4倍以上后转移至开花诱导培养基。

[0012] 优选的是,所述开花诱导培养时光/暗周期为6h:18h,温度为 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

- [0013] 优选的是,所述花苞盛开2-3d后,进行人工授粉。
- [0014] 更优选的是,所述人工授粉包括:用镊子取出花粉块,置于同一朵花的凹槽状柱头上。
- [0015] 优选的是,所述人工授粉后,调整光/暗周期为12h:12h,温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- [0016] 相对于现有技术,本发明具有如下有益效果:
- [0017] 本发明提供了一种促进大根兰试管开花和结实的方法,通过对大根兰根状茎进行开花诱导培养,5个月左右即可见到根状茎向顶部伸长,向顶部伸长的根状茎过半个月可以明显看到花苞出现,花苞出现20d左右花朵盛开;花朵盛开后进行瓶内无菌人工授粉,3d后子房开始膨大,9个月左右,果荚膨大,产生的种子可直接播种。利用本发明的技术方案,可将大根兰的生活史由3-8年缩短至2年。

附图说明

- [0018] 图1:本发明诱导大根兰根状茎分化的试管开花;
- [0019] 图2:本发明人工授粉得到了大根兰试管内结实;
- [0020] 图3:试管结实种子TTC染色的种子活力情况;
- [0021] 图4:试管结实种子无菌萌发的种子活力情况。

具体实施方式

[0022] 本发明提供了一种促进大根兰试管开花和结实的方法,包括以下步骤:以大根兰无菌苗的根状茎为外植体,进行增殖培养,取增殖根状茎转移至开花诱导培养基,诱导至花苞盛开,进行人工授粉培养直至结实。

[0023] 本发明开花诱导培养基包括:花宝3号3.0g/L、维生素B6 0.5mg/L、维生素B1 0.1mg/L、烟酸0.5mg/L、甘氨酸2.0mg/L、肌醇100mg/L、NAA 1.0-2.0mg/L、椰子汁200-300mL/L、蔗糖30g/L、琼脂5.6g/L、活性炭1.0g/L;进一步优选开花诱导培养基中NAA 1.5mg/L,椰子汁250mL/L。花宝3号为开花肥,氮磷钾含量为10-30-20,作为诱导培养基成分之一,能够促进大根兰开花;NAA作为细胞生长素,亦能够诱导大根兰开花;添加活性炭,可为根状茎营造地下黑暗生长环境,保护根状茎的生长;在开花诱导培养基内添加高浓度的椰子汁和蔗糖,除促进大根兰开花外,还可进一步促进后期果荚发育,确保种子正常生长。

[0024] 本发明优选根状茎外植体来源于大根兰种子萌发的无菌苗。进一步优选,所述根状茎外植体长1.0-2.0cm;更优选长1.5cm。作为一种可实施方式,将大根兰种子直接撒播在无菌萌发培养基上培育成无菌苗,萌发培养基包括:花宝1号3.0g/L、维生素B6 0.5mg/L、维生素B1 0.1mg/L、烟酸0.5mg/L、甘氨酸2.0mg/L、肌醇100mg/L、NAA 0.1-0.5mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L;培养温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$,暗培养,获得1.0-2.0cm的根状茎外植体。

[0025] 本发明优选增殖培养时,增殖培养基包括:花宝1号3.0g/L、维生素B6 0.5mg/L、维生素B1 0.1mg/L、烟酸0.5mg/L、甘氨酸2.0mg/L、肌醇100.0mg/L、6-BA 5.0-10.0mg/L、KT 2.0-5.0mg/L、椰子汁100-200mL/L、蔗糖20g/L、琼脂5.6g/L;进一步优选增殖培养基中6-BA 7.5mg/L、KT 3.5mg/L、椰子汁150mL/L。花宝1号氮磷钾含量为7-6-19,可满足大根兰新生根状茎在生长和增殖过程中对相关元素的需求;6-BA、KT能够诱导根状茎增殖。

[0026] 本发明优选增殖培养时暗培养,温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。根状茎转入增殖培养基培养1个

月左右,即可观察到根状茎的明显伸长,并逐步出现分叉状增殖生长,进一步优选增殖培养时间为6个月以上,增殖倍数达到4倍以上后,获得的大量生长良好的根状茎转移至开花诱导培养基。

[0027] 本发明优选开花诱导培养时光/暗周期为6h:18h,温度为 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。大根兰为腐生兰,在根状茎的生长和增殖过程中对光的需求不高,但在开花时期,随着花葶伸出地面,花葶经光照之后会变绿,能发挥光合作用,故大根兰在花期实为半腐生植物,在诱导花开阶段时,增加光照,可促进开花。增殖根状茎转入开花诱导培养基5个月左右,即可观察到根状茎向顶部伸长,向顶部伸长的根状茎过半个月可以明显看到花苞出现,花苞出现20d左右花朵盛开(图1),花苞出现比例30%左右,同一根状茎偶尔出现2朵花。

[0028] 本发明优选诱导大根兰花苞盛开2-3d后,进行人工授粉;进一步优选人工授粉包括:用镊子取出花粉块,置于同一朵花的凹槽状柱头上,完成授粉后盖上瓶盖,3d后观察到子房开始膨大,表明自花授粉成功。更优选人工授粉在超净工作台内进行,镊子进行消毒杀菌。

[0029] 本发明优选人工授粉后,调整光/暗周期为12h:12h,温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。花朵经人工授粉子房膨大后,增加光照时间,可进一步延长绿色果荚的光合作用时间。授粉成功后9个月左右,果荚膨大,果荚表面光滑,具3条墨绿色棱,果荚全长5.0cm以上,其中果柄、宿存柱头长1.0cm左右,果荚中部宽1.0cm左右,单果鲜重达0.6g以上。

[0030] 本发明优选无菌萌发培养基、增殖培养基和开花诱导培养基pH为5.6-5.8,进一步优选pH为5.8。

[0031] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0032] 实施例1

[0033] 一种促进大根兰试管开花和结实的方法,包括以下步骤:

[0034] 1、外植体的获得

[0035] 将大根兰种子直接撒播在无菌萌发培养基上培育成无菌苗,得根状茎;选择长度为1.5cm的根状茎作外植体;

[0036] 2、根状茎增殖

[0037] 将大根兰根状茎转至根状茎增殖培养基(每升含花宝1号3.0g、维生素B6 0.5mg、维生素B1 0.1mg、烟酸0.5mg、甘氨酸2.0mg、肌醇100mg、6-BA 7.5mg、KT 3.5mg、椰子汁150mL、蔗糖20g、琼脂5.6g),灭菌前调整培养基pH至5.8,转入后1个月左右,即可观察到根状茎的明显伸长,并逐步出现分叉状增殖生长。当培养六个月时,根状茎增殖倍数可达4倍以上,此时获得的大量生长良好的根状茎可以作为后续花芽诱导的材料。培养条件为:温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$,暗培养。

[0038] 3、试管开花诱导

[0039] 将生长良好的根状茎转至开花诱导培养基(每升含花宝3号3.0g、维生素B6 0.5mg、维生素B1 0.1mg、烟酸0.5mg、甘氨酸2.0mg、肌醇100mg、NAA 1.5mg、椰子汁250mL、蔗糖30g、琼脂5.6g、活性炭1.0g),灭菌前调整培养基pH至5.8,接10瓶左右,每瓶3丛根状茎。转入后5个月左右,即可观察到根状茎向顶部伸长,向顶部伸长的根状茎过半个月可以明显看到花苞出现,花苞出现20d左右花朵盛开,如图1所示,花苞出现比例30%左右,同一根状

茎偶尔出现2朵花。培养条件为:温度为 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光周期6h:18h。

[0040] 4、人工授粉

[0041] 选取花朵已开放2-3天的大根兰瓶苗,在超净台内用已灭菌的镊子取出花粉块,置于同一朵花的凹槽状柱头上。完成授粉后盖上瓶盖,放置于组培室内培养观察,3d后观察到子房开始膨大,表明自花授粉成功。培养条件为:温度为 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光周期12h:12h。

[0042] 5、试管结实

[0043] 自花授粉成功后9个月左右,果荚膨大如图2所示,果荚表面光滑,具3条墨绿色棱,果荚全长约5.2cm,其中果柄长约1.2cm,宿存柱头长约0.8cm,果荚中部宽1.1cm,单果鲜重0.6471g。

[0044] 实施例2

[0045] 一种促进大根兰试管开花和结实的方法,包括以下步骤:

[0046] 1、外植体的获得

[0047] 将大根兰种子直接撒播在无菌萌发培养基上培育成无菌苗,得根状茎;选择长度为1.0cm的根状茎作外植体;

[0048] 2、根状茎增殖

[0049] 将大根兰根状茎转至根状茎增殖培养基(每升含花宝1号3.0g、维生素B6 0.5mg、维生素B1 0.1mg、烟酸0.5mg、甘氨酸2.0mg、肌醇100mg、6-BA 5.0mg、KT 2.0mg、椰子汁100mL、蔗糖20g、琼脂5.6g),灭菌前调整培养基pH至5.8。培养条件为:温度为 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,暗培养。

[0050] 3、试管开花诱导

[0051] 当培养六个月时,根状茎增殖倍数可达4倍以上,将生长良好的根状茎转至开花诱导培养基(每升含花宝3号3.0g、维生素B6 0.5mg、维生素B1 0.1mg、烟酸0.5mg、甘氨酸2.0mg、肌醇100mg、NAA 1.0mg、椰子汁200mL、蔗糖30g、琼脂5.6g、活性炭1.0g),灭菌前调整培养基pH至5.6。培养条件为:温度为 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光周期6h:18h。

[0052] 4、人工授粉

[0053] 选取花朵已开放2-3天的大根兰瓶苗,在超净台内用已灭菌的镊子取出花粉块,置于同一朵花的凹槽状柱头上,完成授粉后盖上瓶盖。培养条件为:温度为 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光周期12h:12h。

[0054] 实施例3

[0055] 一种促进大根兰试管开花和结实的方法,包括以下步骤:

[0056] 1、外植体的获得

[0057] 将大根兰种子直接撒播在无菌萌发培养基上培育成无菌苗,得根状茎;选择长度为2.0cm的根状茎作外植体;

[0058] 2、根状茎增殖

[0059] 将大根兰根状茎转至根状茎增殖培养基(每升含花宝1号3.0g、维生素B6 0.5mg、维生素B1 0.1mg、烟酸0.5mg、甘氨酸2.0mg、肌醇100mg、6-BA 10.0mg、KT 5.0mg、椰子汁200mL、蔗糖20g、琼脂5.6g),灭菌前调整培养基pH至5.7。培养条件为:温度为 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,暗培养。

[0060] 3、试管开花诱导

[0061] 当培养六个月时,根状茎增殖倍数可达4倍以上,将生长良好的根状茎转至开花诱导培养基(每升含花宝3号3.0g、维生素B6 0.5mg、维生素B1 0.1mg、烟酸0.5mg、甘氨酸2.0mg、肌醇100mg、NAA 2.0mg、椰子汁300mL、蔗糖30g、琼脂5.6g、活性炭1.0g),灭菌前调整培养基pH至5.7。培养条件为:温度为 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$,光周期6h:18h。

[0062] 4、人工授粉

[0063] 选取花朵已开放2-3天的大根兰瓶苗,在超净台内用已灭菌的镊子取出花粉块,置于同一朵花的凹槽状柱头上。完成授粉后盖上瓶盖,放置于组培室内培养观察,3d后观察到子房开始膨大,表明自花授粉成功。培养条件为:温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$,光周期12h:12h。

[0064] 实施例4

[0065] 试管结实种子的活力评估

[0066] (1) TTC染色评估法:将实施例1果荚中大根兰种子取出,混合均匀,装入1.5mL离心管中,用1%吐温80溶液浸种24h后,吸出溶液,加水清洗3次后再加入1%TTC染液,在室温($23\pm 2^{\circ}\text{C}$)下避光静置48h。吸取染色后的种子滴在载玻片上,置于体视显微镜下。随机挑选3个视野,有活力种胚被染成橙色或者粉红色,无活力种胚不着色。分别计数每个视野的种子总数和有活力种子总数,计算种子活力:种子活力=(有活力种子总数/统计种子总数) \times 100%。

[0067] 活力检测结果如下:大根兰的种子已具有较好的成熟度,饱满率达98.4%,种胚发育饱满,着色率为9.9%。图3为1%TTC染色24h后种子着色情况。

[0068] (2) 无菌播种法:在超净台内,将实施例1采集的无菌果荚的部分种子直接散播在无菌萌发培养基表面,跟踪观察种子无菌萌发情况,种胚突破种皮即视为萌发。所述无菌萌发培养基包括以下组分的水溶液:花宝1号3.0g/L、维生素B6 0.5mg/L、维生素B1 0.1mg/L、烟酸0.5mg/L、甘氨酸2.0mg/L、肌醇100mg/L、NAA 0.1-0.5mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,灭菌前调整培养基pH至5.8。培养温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$,暗培养。

[0069] 萌发结果:种子接种24d后种胚膨大开始萌发,33d种胚突破种皮,38d开始出现假根,100d左右出现增殖现象。接种80天后统计的萌发率为7.28%。图4表示种胚突破种皮。

[0070] 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

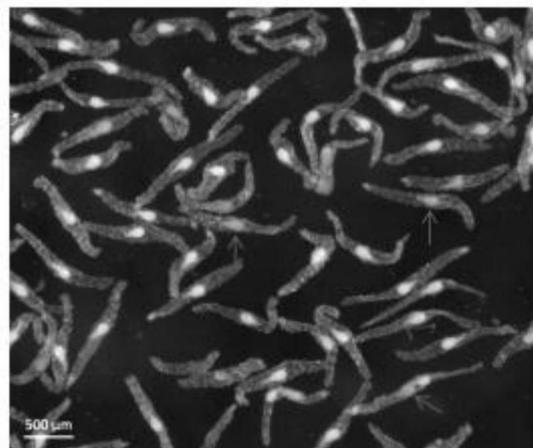


图3

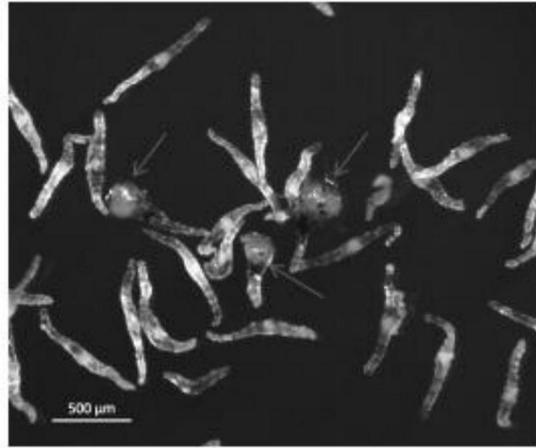


图4