



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117084175 B

(45) 授权公告日 2023.12.15

(21) 申请号 202311361026.4

审查员 杨柳

(22) 申请日 2023.10.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117084175 A

(43) 申请公布日 2023.11.21

(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茨坝街  
道蓝黑路132号

(72) 发明人 李村富 何俊 刘成 李春芳

(74) 专利代理机构 北京隆达恒晟知识产权代理

有限公司 11899

专利代理师 李中强

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

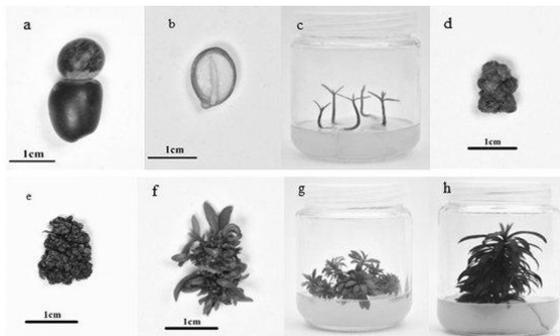
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种大理罗汉松的组培和离体保存方法

(57) 摘要

本发明涉及一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,属于植物组织培养技术领域,本发明具体包括以下步骤:1)以大理罗汉松种子为材料,将消毒后的种子剖开将种胚接种于萌发培养基上萌发培养,获得无菌小苗;2)将无菌小苗的茎段剪下并接种于诱导培养基上进行愈伤诱导;3)将诱导得到的愈伤组织继续继代培养后,有不定芽分化;4)将分化的愈伤组织转移到增殖培养基上进行不定芽增殖;5)将增殖后的不定芽接种到壮苗培养基上进行壮苗培养;6)将壮苗后的植株分成单株接种到离体保存培养基上进行离体保存。本发明建立了罗汉松的快繁及离体保存体系,继代周期可达3年以上,为罗汉松属植物的保护及开发利用提供理论基础和技术支持。



1. 一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:具体包括以下步骤:

1) 以大理罗汉松种子为材料,将消毒后的种子剖开将种胚接种于萌发培养基上萌发培养,获得无菌小苗,所述萌发培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括NAA0.5mg/L、蔗糖20g/L和琼脂7g/L,pH为5.8;

2) 将无菌小苗的茎段剪下并接种于诱导培养基上进行愈伤诱导,所述的诱导培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括BA1.0mg/L、IAA0.1mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L,pH为5.8;

3) 将诱导得到的愈伤组织继续继代培养后,有不定芽分化;

4) 将愈伤组织分化的不定芽转移到增殖培养基上进行不定芽增殖,所述的增殖培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括BA1.0mg/L、NAA0.5mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L,pH为5.8;

5) 将增殖后的不定芽接种到壮苗培养基上进行壮苗培养,所述壮苗培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括NAA0.5mg/L、GA<sub>3</sub> 0.1mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L,pH为5.8;

6) 将壮苗后的植株分成单株接种到离体保存培养基上进行离体保存,所述的离体保存培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IBA0.2mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L,pH为5.8。

2. 根据权利要求1所述的一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:步骤1)所述消毒包括将大理罗汉松种子在超净工作台上用75%乙醇浸泡20s,2%NaClO消毒20min,无菌水漂洗5-6次,并置于无菌滤纸上晾干。

3. 根据权利要求1所述的一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:步骤1)所述萌发培养的条件为光照强度1600-2000lx,光照时间12h/d,温度23±2℃。

4. 根据权利要求1所述的一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:步骤2)将无菌小苗的茎段剪成1cm种于诱导培养基上。

5. 根据权利要求1所述的一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:步骤3)所述继代培养的时间为60d,继代周期30d。

6. 根据权利要求1所述的一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:步骤4)所述不定芽增殖和步骤5)所述壮苗培养的条件均为光照强度2000lx,光照时间12h/d,温度25±2℃。

7. 根据权利要求1所述的一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:步骤4)所述不定芽增殖时间为90d。

8. 根据权利要求1所述的一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:步骤5)所述壮苗培养时间为90d。

9. 根据权利要求1所述的一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,其特征在于:步骤6)所述离体保存的条件为光照强度1600lx,光照时间12h/d,温度20±2℃。

## 一种大理罗汉松的组培和离体保存方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物组织培养技术领域,具体的说,涉及一种大理罗汉松的组培和离体保存方法。

### 背景技术

[0002] 大理罗汉松(*Podocarpus forrestii*),隶属于罗汉松科(*Podocarpaceae*)罗汉松属(*Podocarpus*),灌木,主要分布于云南大理苍山,为我国特有树种,国家二级保护植物。植株四季常绿、古朴苍劲、树型优美、枝条韧性好易于造型,种子椭圆形,果托肉质膨大,两者相连形似打坐罗汉,成熟时果托呈紫红色,具有较高的园艺观赏价值,常用于室内盆栽和园林造景。大理罗汉松种子成熟后常有在树上发芽现象,或落地后很快发芽,属于顽拗性种子,不易种子库长期保存。野外自然结实的大理罗汉松有大小年现象,有时甚至出现隔年结实的情况,加之植株雌雄异株,自然条件下不易结实或结实数量有限,以及动物和鸟类采食,对大理罗汉松的生存繁衍构成了一定的威胁。

[0003] 植物离体保存是基于植物组织培养技术基础上发展起来的一种新型植物资源保存手段,在人工控制条件下,通过对植物体的组织材料如原生质体、细胞、愈伤组织、分生组织、芽、花粉、胚等进行较长时间保存。具有环境影响小、适应性广、稳定性好、效率高等优势,对不能通过种子库保存、以及珍稀濒危的物种保存提供了一种有效途径。大理罗汉松组织快繁体系的建立,对裸子植物的器官形态建成、遗传改良和新基因型树种改造等研究具有重要意义,也为罗汉松属植物野生种质资源的保护、开发和利用提供技术支撑。目前,关于大理罗汉松通过组织培养技术进行离体保存研究方面未见报道。

### 发明内容

[0004] 为了克服背景技术中存在的问题,本发明提供了一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,通过种子萌发、愈伤诱导及分化、不定芽增殖、离体保存等步骤,建立了罗汉松的快繁及离体保存体系,继代周期可达3年以上,为罗汉松属植物的保护及开发利用提供理论基础和技术支持。

[0005] 为实现上述目的,本发明是通过如下技术方案实现的:

[0006] 所述的大理罗汉松的组培和离体保存方法具体包括以下步骤:

[0007] 1) 以大理罗汉松种子为材料,将消毒后的种子剖开将种胚接种于萌发培养基上萌发培养,获得无菌小苗,所述萌发培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括NAA0.5mg/L、蔗糖20g/L和琼脂7g/L,pH为5.8;

[0008] 2) 将无菌小苗的茎段剪下并接种于诱导培养基上进行愈伤诱导,所述的诱导培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括BA1.0mg/L、IAA0.1mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L,pH为5.8;

[0009] 3) 将诱导得到的愈伤组织继续继代培养后,有不定芽分化;

[0010] 4) 将分化的愈伤组织转移到增殖培养基上进行不定芽增殖,所述的增殖培养基以

WPM培养基为基本培养基,还包括BA1.0mg/L、NAA0.5mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L,pH为5.8;

[0011] 5)将增殖后的不定芽接种到壮苗培养基上进行壮苗培养,所述壮苗培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括NAA0.5mg/L、GA3 0.1mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L,pH为5.8;

[0012] 6)将壮苗后的植株分成单株接种到离体保存培养基上进行离体保存,所述的离体保存培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IBA0.2mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L,pH为5.8。

[0013] 作为优选,步骤1)所述消毒包括将大理罗汉松种子在超净工作台上用75%乙醇浸泡20s,2%NaClO消毒20min,无菌水漂洗5-6次,并置于无菌滤纸上晾干。

[0014] 作为优选,步骤1)所述萌发培养的条件为光照强度1600-2000lx,光照时间12h/d,温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0015] 作为优选,步骤2)将无菌小苗的茎段剪成1cm左右接种于诱导培养基上。

[0016] 作为优选,步骤3)所述继代培养的时间为60d,继代周期30d。

[0017] 作为优选,步骤4)所述不定芽增殖和步骤5)所述壮苗培养的条件均为光照强度2000lx,光照时间12h/d,温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0018] 作为优选,步骤4)所述不定芽增殖时间为90d。

[0019] 作为优选,步骤5)所述壮苗培养时间为90d。

[0020] 作为优选,步骤6)所述离体保存的条件为光照强度1600lx,光照时间12h/d,温度 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0021] 本发明的有益效果:

[0022] 本发明提供了一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,通过种子萌发后获得无菌小苗,并选用无菌小苗的茎段作为外植体进行愈伤诱导及分化,再通过不定芽增殖、壮苗培养、离体保存等步骤,建立了罗汉松的快繁及离体保存体系,八个月内繁殖系数高达7.8,继代周期可达3年以上,为罗汉松属植物的保护及开发利用提供理论基础和技术支持。

## 附图说明

[0023] 图1是本发明实施例1大理罗汉松的组培和离体保存过程;

[0024] 图中,a表示种子和种托;b表示种胚;c表示萌发后获得无菌小苗;d表示愈伤组织;e表示诱导分化;f表示不定芽增殖;g表示壮苗培养;h表示离体保存。

## 具体实施方式

[0025] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,下面将结合附图,对本发明的优选实施例进行详细的说明,以方便技术人员理解。

[0026] 本发明提供了一种大理罗汉松的组培和离体保存方法,具体包括以下步骤:

[0027] 1)以大理罗汉松种子为材料,将大理罗汉松种子在超净工作台上用75%乙醇浸泡20s,2%NaClO消毒20min,无菌水漂洗5-6次,置于无菌滤纸上晾干后将种子剖开,将种胚接种于萌发培养基上萌发培养,获得无菌小苗,萌发培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括NAA0.5mg/L、蔗糖20g/L和琼脂7g/L,pH为5.8。培养条件为光照强度1600-2000lx,光照时间12h/d,温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0028] 2)将无菌小苗的茎段剪下,剪成1cm长接种于诱导培养基上进行愈伤诱导90d,诱

导培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括BA1.0mg/L、IAA0.1mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L, pH为5.8。

[0029] 3) 将诱导得到的愈伤组织继续继代培养60d后,有不定芽分化,继代周期30d。

[0030] 4) 将分化的愈伤组织转移到增殖培养基上进行不定芽增殖90d,增殖培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括BA1.0mg/L、NAA0.5mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L, pH为5.8;培养条件为光照强度2000lx,光照时间12h/d,温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0031] 5) 将增殖后的不定芽接种到壮苗培养基上进行壮苗培养90d,壮苗培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括NAA0.5mg/L、GA30.1mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L, pH为5.8;培养条件为光照强度2000lx,光照时间12h/d,温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0032] 6) 将壮苗后的植株分成单株接种到离体保存培养基上进行离体保存,离体保存培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括IBA0.2mg/L、蔗糖30g/L和琼脂7g/L, pH为5.8;离体保存条件为光照强度1600lx,光照时间12h/d,温度 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,继代周期长达3年以上。

[0033] 实施例1

[0034] 以大理罗汉松(*Podocarpus forrestii*)种子为材料(图1中a),2020年9-10月采自云南大理。在超净工作台上用75%乙醇浸泡20s,2%NaClO消毒20min,无菌水漂洗5-6次,置于无菌滤纸上晾干后,将种子剖开把种胚(图1中b)接种于萌发培养基(1/2MS+ NAA0.5mg/L+蔗糖20g/L+琼脂7g/L, pH为5.8)上,培养5d后,获得无菌小苗(图1中c),萌发率达100%。培养条件为光照强度1600-2000lx,光照时间12h/d,温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0035] 将无菌小苗的茎段剪下,剪切成1cm接种到诱导培养基(WPM+BA1.0mg/L+IAA0.1mg/L+蔗糖30g/L+琼脂7g/L, pH为5.8)上进行愈伤诱导(图1中d),时间为90d,90d后诱导率达98.33%。

[0036] 将诱导得到的愈伤组织继续继代培养60d后有不定芽的分化(图1中e),继代周期30d,分化率达98.33%。

[0037] 将分化的愈伤组织转移到增殖培养基(WPM+BA1.0mg/L+NAA0.5mg/L+蔗糖30g/L+琼脂7g/L, pH为5.8)上进行不定芽的增殖(图1中f),时间为90d。培养条件为光照强度2000lx,光照时间12h/d,温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,90d后增殖系数达7.8。

[0038] 将增殖后的不定芽接种到壮苗培养基(WPM+NAA0.5mg/L+GA3 0.1mg/L+蔗糖30g/L+琼脂7g/L, pH为5.8)上进行壮苗培养90d(图1中g)。培养条件为光照强度2000lx,光照时间12h/d,温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0039] 将壮苗后的植株分成单株接种到离体保存培养基(1/2MS+IBA0.2mg/L+蔗糖30g/L+琼脂7g/L, pH为5.8)上进行离体保存(图1中h)。培养条件为光照强度1600lx,光照时间12h/d,温度 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,继代周期长达3年以上。

[0040] 对比例1

[0041] 以大理罗汉松(*Podocarpus forrestii*)种子为材料,2020年9-10月采自云南大理。在超净工作台上用75%乙醇浸泡20s,2%NaClO消毒20min,无菌水漂洗5-6次,置于无菌滤纸上晾干后,将种子剖开把种胚接种于萌发培养基(1/2MS+ NAA0.5mg/L+蔗糖20g/L+琼脂7g/L, pH为5.8)上,培养5d后,获得无菌小苗,萌发率达100%。培养条件为光照强度1600-2000lx,光照时间12h/d,温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0042] 将无菌小苗的叶片剪下,接种到诱导培养基(WPM+BA1.0mg/L+IAA0.1mg/L+蔗糖

30g/L+琼脂7g/L,pH为5.8)上进行愈伤诱导,时间为90d,90d后未见愈伤组织形成。

[0043] 对比例2

[0044] 以大理罗汉松(*Podocarpus forrestii*)种子为材料,2020年9-10月采自云南大理。在超净工作台上用75%乙醇浸泡20s,2%NaClO消毒20min,无菌水漂洗5-6次,置于无菌滤纸上晾干后,将种子剖开把种胚接种于萌发培养基(1/2MS+ NAA0.5mg/L+蔗糖20g/L+琼脂7g/L,pH为5.8)上,培养5d后,获得无菌小苗,萌发率达100%。培养条件为光照强度1600-2000lx,光照时间12h/d,温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0045] 将无菌小苗的茎段剪下,剪切成1cm接种到诱导培养基(WPM+BA2.0mg/L+IAA0.2mg/L+蔗糖30g/L+琼脂7g/L,pH为5.8)上进行愈伤诱导,时间为90d,90d后诱导率达96.67%。

[0046] 将诱导得到的愈伤组织继续继代培养60d后有不定芽的分化,继代周期30d,分化率达58.33%。

[0047] 对比例3

[0048] 以大理罗汉松(*Podocarpus forrestii*)种子为材料,2020年9-10月采自云南大理。在超净工作台上用75%乙醇浸泡20s,2%NaClO消毒20min,无菌水漂洗5-6次,置于无菌滤纸上晾干后,将种子剖开把种胚接种于萌发培养基(1/2MS+ NAA0.5mg/L+蔗糖20g/L+琼脂7g/L,pH为5.8)上,培养5d后,获得无菌小苗,萌发率达100%。培养条件为光照强度1600-2000lx,光照时间12h/d,温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0049] 将无菌小苗的茎段剪下,剪切成1cm接种到诱导培养基(MS+BA1.0mg/L+IAA0.1mg/L+蔗糖30g/L+琼脂7g/L,pH为5.8)上进行愈伤诱导,时间为90d,90d后诱导率达95%。

[0050] 将诱导得到的愈伤组织继续继代培养60d后有不定芽的分化,继代周期30d,分化率达81.67%。

[0051] 对比例4

[0052] 以大理罗汉松(*Podocarpus forrestii*)种子为材料,2020年9-10月采自云南大理。在超净工作台上用75%乙醇浸泡20s,2%NaClO消毒20min,无菌水漂洗5-6次,置于无菌滤纸上晾干后,将种子剖开把种胚接种于萌发培养基(1/2MS+ NAA0.5mg/L+蔗糖20g/L+琼脂7g/L,pH为5.8)上,培养5d后,获得无菌小苗,萌发率达100%。培养条件为光照强度1600-2000lx,光照时间12h/d,温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0053] 将无菌小苗的茎段剪下,剪切成1cm接种到诱导培养基(MS+BA2.0mg/L+IAA0.2mg/L+蔗糖30g/L+琼脂7g/L,pH为5.8)上进行愈伤诱导,时间为90d,90d后诱导率达91.67%。

[0054] 将诱导得到的愈伤组织继续继代培养60d后有不定芽的分化,继代周期30d,分化率达56.67%。

[0055] 实验分析

[0056] 表1 不同培养基对大理罗汉松愈伤组织诱导及分化的影响

序号	处理	愈伤诱导率 (%)	愈伤分化率 (%)
实施例 1	WPM+BA1.0mg/L+IAA0.1mg/L	98.33±2.89 <sup>a</sup>	98.33±2.89 <sup>Aa</sup>
[0057] 对比例 2	WPM+BA2.0mg/L+IAA0.2mg/L	96.67±2.89 <sup>a</sup>	58.33±16.07 <sup>Bc</sup>
对比例 3	MS+BA1.0mg/L+IAA0.1mg/L	95.00±5.00 <sup>a</sup>	81.67±2.89 <sup>ABb</sup>
对比例 4	MS+BA2.0mg/L+IAA0.2mg/L	91.67±5.77 <sup>a</sup>	56.67±5.77 <sup>Bc</sup>

[0058] 注：不同小写字母表示处理间同列在0.05水平差异显著，大写字母表示0.01水平差异极显著。

[0059] 由上表可看出，对比例2中愈伤诱导率与实施例1相比，没有显著差异，但分化率极显著降低；对比例3中愈伤诱导率与实施例1相比没有显著性差异，分化率显著降低；对比例4中愈伤诱导率与实施例1相比没有显著性差异，分化率极显著降低。采用实施例1的处理，愈伤分化率最好，可获得大量不定芽，便于大理罗汉松的组培快繁，也能为后期离体保存提供大量材料。

[0060] 最后说明的是，以上优选实施例仅用于说明本发明的技术方案而非限制，尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述，但本领域技术人员应当理解，可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变，而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

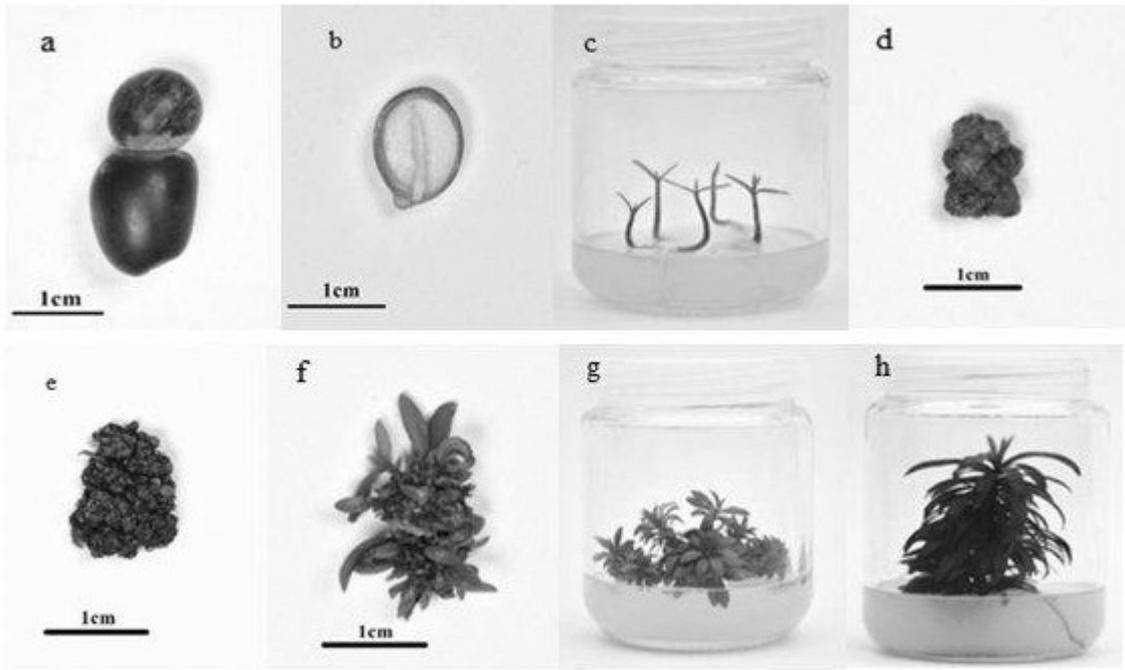


图 1