

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A01H 4/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410080358.6

[43] 公开日 2005年3月30日

[11] 公开号 CN 1600082A

[22] 申请日 2004.9.30

[21] 申请号 200410080358.6

[71] 申请人 北京林业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路35号

[72] 发明人 罗晓芳 王华芳

权利要求书2页 说明书5页

[54] 发明名称 牡丹组织培养技术

[57] 摘要

本发明公开了一种牡丹组织培养离体快速繁育苗木的方法。将牡丹外植体接种在一种特制的牡丹培养基上,人工调控环境因子的作用强度,培养物将以每28天为一个继代周期在人工培养室指数式连续繁育苗木,根据理论计算(苗木数量=周期增值系数 $(3)^{13}$,3为每周期不定芽最低增值芽数,13(周期数)=365天/28天),一个营养芽年繁殖165万株组培苗。本发明解决了牡丹组织培养繁育苗木的外植体消毒,基本培养基组成,不定芽诱导、扩繁、生根培养基配方;解决了组织培养苗移栽难以成活从而制约牡丹苗木产业化生产的技术关键。

ISSN 1008-4274

1. 一种牡丹组织培养方法，包括：

a) 将牡丹外植体进行无害化表面消毒处理；

b) 以培养基供给植物生长必需的最佳营养物质种类和浓度；水分；离子平衡；激素种类、浓度及其比例；

c) 在人工控制的光照、温度、湿度条件下无菌培养、移栽和驯化组培苗。

2. 按照权利要求 1 所述的方法，其特征为一种无害化的表面消毒剂，其成分为次氯酸钙 5%—15%或次氯酸钠 1%—5%或氯化汞 0.1%、乙醇 70%、吐温 20 或吐温 80、水。

3. 按照权利要求 1 或 2 的方法，其特征是乙醇与氯化物组成混合液，其比例为 1: 1-3，每 50 毫升混合液中滴加 0.2-1 毫升吐温 20 或吐温 80。

4. 按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于培养基包括基本培养基、植物激素、稳定剂和凝固剂。

5. 按照权利要求 1 或 4 所述的方法，其特征在于基本培养基含有 (1) 无机物，如氮、磷、钾、硫、钙、镁、铁、锰、锌、硼、铜、钼、氯，其含量分别为每升培养基含有 15-48、1-1.25、10-25、1300-1800、3-10、1.5-5、0.03-0.2、0.05-0.15、0.02-0.08、0.04-0.2、0.01-0.05、0.01-0.05、0.03-0.08 毫摩尔。(2) 有机物，如肌醇、烟酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、甘氨酸、蔗糖，其含量为每升培养基中含有 60-130、0.1-0.7、0.1-1.5、0.1-0.7、0-3、1000-4000 毫克。

6. 按照权利要求 1 和 4 所述的方法，其特征在于植物激素由其种类、浓度和比例组成，其浓度和比例随着培养物生长分化的进程适时调整。在不定芽发生阶段，细胞分裂素 6-苄氨基腺嘌呤，糠基腺嘌呤，玉米素，TIBA 之一的浓度

为每升培养基 0.1-3 毫克；生长素吲哚乙酸，萘乙酸, 2,4-二氯苯氧乙酸之一的浓度为每升培养基 0.1-5 毫克，而细胞分裂素与生长素之比大于 1。不定根发生阶段，细胞分裂素 6-苄氨基腺嘌呤，糠基腺嘌呤，玉米素，TIBA 之一的浓度为 0.1-5 毫克/升；生长素吲哚丁酸，吲哚乙酸，萘乙酸之一的浓度为 0.5-10 毫克/升，生长素与细胞分裂素之比大于 1。

7. 按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于牡丹生根试管苗向田间移栽的过程包括三个步骤，(1) 诱导植物顶芽休眠，脱落酸、高温处理诱导试管苗进入休眠状态；(2) 移植，将休眠状态的牡丹试管苗移植到无土基质的花盆里；(3) 诱导植物顶芽生长复苏，GA、低温处理诱导植株休眠芽抽枝展叶。

牡丹组织培养技术

技术领域

本发明涉及一种中国传统名花牡丹的组织培养繁育苗木的方法，具体而言，本发明涉及一种牡丹外植体表面消毒的表面消毒剂；建立牡丹无菌培养体系的起始培养基，不定芽扩繁的增殖培养基；不定芽生根成苗的生根培养基；试管苗从试管向田间条件移栽过渡的诱导剂；苗木无土栽培基质；以及利用表面消毒剂、培养基、移栽诱导剂、无土栽培基质繁育观赏牡丹的工艺、条件和步骤。

背景技术

牡丹是中国传统名花，以其雍容华贵被尊为“百花之王”，明清时已是国花，在国内外有极高盛誉。牡丹作为观赏植物栽培从南北朝开始至今，也传播到欧洲、日本、美国等世界上其他国家。牡丹已经形成一种国际贸易商品。国际间的贸易往来主要是牡丹种苗，而源于中国的牡丹在国际上的贸易份额的 80% 被日本占领。我国生产的牡丹种苗没有国际竞争力的主要原因是产品质量档次低，携带病原菌情况严重，特别是根腐病、根节线虫病等危害严重。我国牡丹产区的花农已经采取化学和物理的方法积极防治但是问题还是没有得到根本解决。为使牡丹种苗质量提高，商品价值大幅度提升，切实可行的方法是牡丹种苗生产应该实现组织培养——无土栽培一体化的生产工艺。

牡丹繁殖最成熟的技术是嫁接和分株。这种传统的繁殖方法受母株上可以利用的繁殖材料数量和质量的限制，种苗大小、长势等参差不齐，商品种苗质量难以标准化控制。组织培养技术快速繁育苗木已经在一些林木种苗生产上获

得成功。牡丹组织培养技术的论文于 1984 年首次在《科学通报》上公开发表，其后中国、英国、法国、美国、荷兰等国的科学家先后研究过牡丹的组织培养快速繁育苗木的技术，但都没有获得生产上可以应用的技术体系。该技术不成熟的关键点主要是：(1) 不定芽分化率低即扩增系数小以致不具备商业开发价值；(2) 试管苗生根困难，即使生根数量也非常少；(3) 生根的试管苗在移栽过程中容易死亡因此成苗率非常低。研究开发牡丹组织培养育苗新技术将在牡丹苗木的繁育产量和质量上保证国内外需求，产生生态、经济、政治和文化的多重效益。

发明内容

为了解决牡丹组织培养过程中存在的技术难题，本发明提供一种能在室内周年生产牡丹优质种苗的方法。其要点之一是提供一种适合牡丹外植体表面灭菌的消毒剂。以次氯酸钙 5%—15%或次氯酸钠 1%—5%或氯化汞 0.1%为基本消毒剂，复配乙醇 70%、吐温 20—80 和水，有效解决牡丹外植体不容易灭菌的难题。

本发明的要点之二是提供一种牡丹组织培养的基本培养基配方。该配方包括(1) 无机物氮、磷、钾、硫、钙、镁、铁、锰、锌、硼、铜、钼、氯，每升培养基分别含有 15-48、1-1.25、10-25、1300-1800、3-10、1.5-5、0.03-0.2、0.05-0.15、0.02-0.08、0.04-0.2、0.01-0.05、0.01-0.05、0.03-0.08 毫摩尔。(2) 有机物肌醇、烟酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、甘氨酸、蔗糖，其含量为每升培养基 60-130、0.1-0.7、0.1-1.5、0.1-0.7、0-3、1000-4000 毫克。

本发明的要点之三是提供牡丹组织培养不同阶段添加在基本培养基中的植物激素种类和剂量。在不定芽诱导培养阶段，细胞分裂素 6-苄氨基腺嘌呤，糠

基腺嘌呤，玉米素，TIBA 之一的浓度为培养基 0.1-3 毫克；生长素吲哚乙酸，萘乙酸，2,4-二氯苯氧乙酸的浓度为每升培养基 0.1-5 毫克，而细胞分裂素与生长素之比大于 1。不定根发生阶段，细胞分裂素 6-苄氨基腺嘌呤，糠基腺嘌呤，玉米素，TIBA 之一的浓度为 0.1-5 毫克/升；生长素吲哚丁酸，吲哚乙酸，萘乙酸之一的浓度为 0.5-10 毫克/升，生长素与细胞分裂素之比大于 1。

本发明的要点之四是提供一种使牡丹从试管向营养钵移栽的成活率提高的方法。该方法包括 3 个步骤，(1) 诱导牡丹试管苗顶芽休眠，以脱落酸和高温处理植株处理试管苗一定时间；(2) 移栽，将牡丹试管苗根部的琼脂在温水中融容，浸蘸促根剂，移植到无土基质的花盆里；(3) 诱导牡丹苗木顶芽恢复生长，以赤霉素和低温处理植株致使顶芽开绽恢复生长。

本发明的牡丹品种，可以是来自种子的实生苗、也可以是来自分株、嫁接、扦插繁殖的苗木。中原地区的牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andrews.)、西北地区的矮牡丹(*P. suffruticosa* subsp. *spontanea* (Rehder) S. G. Haw & L. A. Lauener)、紫斑牡丹(*P. rockii* T. Hong et J. J. Li) 和江南地区的杨山牡丹(*P. ostii* T. Hong et J. X. Zhang)，以及含有这些牡丹血统的品种如来自日本的牡丹品种也包括在内，其花色可以是紫、红、粉、黄、白、绿、兰、墨紫的品种。

具体实施方式

实施例一

杨山牡丹品种‘凤丹’的无菌培养体系的建立

凤丹 (*Paenoia ostti* T. Hong et J. X. Zhang var. *Lishizhenii* B. A. Shen in Acta Phytota. Sin. 35(4): 360-361. 1997)，在 10—3 月份，从生长健壮的植株上采集无病虫害、饱满的鳞芽作为外植体，洗涤剂清洁表面污着，置入

三角瓶中流水冲洗 30min，转移到超静工作台上，加入 70%乙醇与次氯酸钠 0.15%的混合液（1：3），滴加 10 滴土温 80，灭菌 3-11min，水冲洗 3-4 次，冲洗后的鳞芽置于培养皿中，吸水纸吸干表面水分，用剪刀、镊子、解剖刀剥掉芽外部鳞片，接种在预先制备的培养基上，在 23—28 摄氏度，光照 2000—3000 勒克斯条件下培养 3—10 天，将没有被污染的培养物转移到诱导培养基上在同样条件下培养，顶芽开绽生长，一个无菌培养体系已经建成。

实施例二

中原牡丹品种‘紫摇台’苗木的组织培养扩繁

中原牡丹品种 ‘紫摇台’ (*Paeonia suffruticosa* T. Hong et J. X. Zhang var. *lishizhenii* B. A. Shen) 在 11 月份采集休眠的鳞芽按实施例一所述方法建立无菌培养体系；将无菌的外植体转移到增值培养基上培养，增值培养基为基本培养基中添加细胞分裂素 6-BA 0.3-2 毫克/升，生长素 NAA 0-3.2 毫克/升，在 23—28 摄氏度，光照 2000—3000 勒克斯条件下培养 28 天，每个培养物将产生 3—6 个不定芽，根据组织培养增值率的计算方法，每个不定芽年产组培苗 670 万株。

实施例三

牡丹品种 ‘凤丹’生根试管苗从试管向田间盆钵的移栽

凤丹 (*Paenoia ostti* T. Hong et J. X. Zhang var. *Lishizhenii* B. A. Shen in *Acta Phytota. Sin.* 35(4): 360-361. 1997) 无根组培苗在生根培养基上培养 25 天产生不定根，形成牡丹生根试管苗。生根培养基的制作为在本说明书要点之二所述的基本培养基中添加细胞分裂素 6-苄氨基腺嘌呤 5 毫克/升；生长

素吲哚丁酸 10 毫克/升组成。生根试管苗向田间的移栽按以下 3 个步骤进行：

(1) 在植物顶芽附近滴加脱落酸 0.5-5mg/L 诱导鳞芽休眠，使植株整体进入休眠状态，该步骤也可以用 26—35 摄氏度的高温处理 10—25 天代替化学试剂处理；(2) 将已休眠的牡丹植株从试管移植到无土基质的花盆里，浇水保证空气相对湿度 80%左右；(3) 在植物顶芽附近滴加赤霉素 0.5-5mg/L 诱导鳞芽开绽，抽枝展叶，该步骤也可以用 4 摄氏度低温处理 25—35 天代替化学试剂处理鳞芽。

所有组培苗均在温室里进行从试管到田间的生态环境适应性驯化。待移植到盆里的牡丹苗的鳞芽开绽抽枝展叶，植株即已移栽成活。