



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103430843 B

(45) 授权公告日 2016.05.04

(21) 申请号 201310345570.X

(22) 申请日 2013.08.09

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市河区五山路 483 号

(72) 发明人 赵小兰 黄烈健 王渝余

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

代理人 王会龙

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101268737 A, 2008.09.24,

Pooja Goyal et al. Micropropagation of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth—a multipurpose leguminous tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using molecular markers.《Physiol Mol

Biol Plants》. 2012, 第 18 卷 (第 2 期), 169 - 176.

Lissette Valverde-Cerdas et al. In vitro Propagation of *Pithecellobium saman* (Raintree).《In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant》. 1997, 第 33 卷 “materials and methods” 部分.

审查员 王岩

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法

(57) 摘要

本发明提供了一种猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法,依次经过外植体的采集与表面消毒、丛生芽的诱导、丛生芽的增殖、丛生芽的继代培养以及生根培养后,得到完整植株,即可出瓶炼苗,并移栽。本发明的方法操作简单,生产成本低,不污染环境,可以实现规模化生产。通过本发明培养的猴耳环种苗,其遗传性状稳定,保持了亲本特性,具备包括稳定、投入少、产出高、周期短等诸多优势。

1. 一种猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法, 其特征在于该方法依次包括以下步骤:

1) 外植体的采集与表面消毒: 选取猴耳环实生种子苗一二年生幼嫩枝条, 采集后将洗净的枝条分段, 并对枝条进行预处理获取1.5-2cm长、带1-2个侧芽的茎段, 而后在超净工作台上先用无菌蒸馏水润洗两次, 再依次通过酒精和升汞溶液进行表面消毒处理, 在用升汞溶液进行处理期间不断的摇晃培养瓶, 使茎段与液体充分接触, 之后立即用无菌蒸馏水冲洗5-8次, 冲洗好后将茎段置于灭菌待用的碟子中, 切除叶柄、茎段两端受伤部位, 将茎段接种到芽诱导培养基中;

2) 丛生芽的诱导: 采用诱导培养基培养一周之后, 新芽长出, 30天后新芽长到1-2cm; 培养过程中, 温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为1500-2000 lx, 光照时间为12小时/天; 所述诱导培养基为MS基本培养基, 未添加任何激素, 培养基pH值为5.8-6.0;

3) 丛生芽的增殖: 将从生芽切割成2段, 每段1-2节, 转接到丛生芽增殖培养基, 培养45-60天, 获得大量丛生芽; 培养条件为: 温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为1500-2000 lx, 光照时间为12 小时/天; 所述丛生芽增殖培养基成分中含有MS + 6-苄氨基腺嘌呤0.50~1.50 mg/L + 吲哚丁酸0.10~0.20 mg/L + 萘乙酸0.00~0.10mg/L + 赤霉素0.50~1.00 mg/L;

4) 继代培养: 采用继代培养基进行继代培养, 每45天继代一次; 培养条件为: 温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为1500-2000 lx, 光照时间为12 小时/天; 所述继代培养基成分中含有MS + 6-苄氨基腺嘌呤0.20~1.50 mg/L + 萘乙酸0.05~0.10 mg/L + 吲哚丁酸0.10~0.20 mg/L + 赤霉素0.50 ~1.50 mg/L;

5) 生根培养: 继代苗达到合适数量后, 采用生根培养基进行生根培养, 培养30~50天得到生根苗; 培养条件为: 温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为1500-2000 lx, 光照时间为12 小时/天; 所述生根培养基为1/2MS基本培养基中添加吲哚丁酸0.50mg/L或者萘乙酸2.00 mg/L;

6) 试管苗移栽: 选择每年3-5月、7-11月为出瓶移栽的季节, 或者提供类似3~5、7-11月份自然条件的生长环境进行出瓶移栽; 移栽前, 试管苗放置于具自然光散射的温室中炼苗7-10天, 然后从瓶中取出小苗, 清洗根部的培养基, 取出后种植于新配制的培养土中, 温室须保持通风, 湿度在70~80%, 温度保持在 15°C 以上至室温范围内, 高于 30°C 必须用风机、水帘降温。

2. 如权利要求1所述的猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法, 其特征在于: 所述外植体的采集与表面消毒步骤中, 对枝条进行预处理是指用自来水冲洗外植体表面0.5-1 h, 剪去叶片, 并剪成1.5-2cm长、带1-2个侧芽的茎段, 接着用洗洁剂溶液浸泡6min后, 再用棉球蘸洗洁剂溶液仔细轻轻清洗腋芽及茎段, 再用清水冲洗0.5-1 h, 放入干净容器中待用。

3. 如权利要求1所述的猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法, 其特征在于: 所述外植体的采集与表面消毒步骤中, 依次通过酒精和升汞溶液进行处理是指接着转入75%的酒精中30 s, 用无菌蒸馏水冲洗2到3次, 然后用0.1%升汞6- 10 min对猴耳环茎段灭菌, 期间不断的摇晃培养瓶。

4. 如权利要求1所述的猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法, 其特征在于: 所述培养土中草炭土、珍珠岩、蛭石的配比3:1:1。

一种猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法

技术领域

[0001] 本发明属于组织培养快速繁殖技术领域,具体涉及一种猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法。

背景技术

[0002] 猴耳环(*Archidendron clypearia*)为含羞草科猴耳环属,别名围涎树、蛟龙木、落地金钱、鸡三树、尿桶公等,常绿乔木,高达十米。猴耳环分布于浙江、福建、广东、海南、四川、广西及云南,生于荒山坡树林中、路旁及河旁。猴耳环既是一种分布在亚热带沿海地区的优秀乡土植物,也是一种重要的园林观花观果植物。此外,猴耳环的茎干、叶片甚至整个植株体内含有多种化学成分,其生理活性广泛,具有细胞毒、抑菌、镇痛、抗病毒等作用。目前猴耳环的需求量、市场交易量逐年增加,猴耳环的利润额一直处于持续上涨趋势,受利益驱动,很多原生地的猴耳环都遭遇掠夺性的砍伐,使大量资源迅速减少和消失。国内外研究工作者大都对猴耳环的药性成分进行研究,对猴耳环的快速繁殖技术研究甚少。因此,建立猴耳环的组织培养快速繁殖技术体系,培育性状一致的植株,对保护猴耳环野生资源和满足药材市场的原材料需求,实现猴耳环的人工规模化育苗和生产显得十分迫切。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明所解决的技术问题在于提供了一种猴耳环实生苗茎段组织培养快速繁殖方法,通过丛生芽途径进行猴耳环组织培养能够获得大量遗传性状稳定的试管苗,保持良好的亲本特性,并且具备包括不变性、投入少、产出高、周期短在内的诸多优势。

[0004] 本发明通过以下技术方案来解决上述技术问题:

[0005] 一种猴耳环实生苗茎段组织培养快速繁殖方法,依次包括以下步骤:

[0006] 1)外植体的采集与表面消毒:选取猴耳环实生种子苗一二年生幼嫩枝条,采集后将洗净的枝条分段,并对枝条进行预处理获取1.5-2cm长、带1-2个侧芽的径段,而后在超净工作台上先用无菌蒸馏水润洗两次,再依次通过酒精和升汞溶液进行表面消毒处理,在用升汞溶液进行处理期间不断的摇晃培养瓶,使茎段与液体充分接触,之后立即用无菌蒸馏水冲洗5-8次,冲洗好后将茎段置于灭菌待用的碟子中,切除叶柄、茎段两端受伤部位,将茎段接种到芽诱导培养基中;

[0007] 2)丛生芽的诱导:采用诱导培养基培养一周之后,新芽长出,30天后新芽长到1-2cm;培养过程中,温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 小时/天;

[0008] 3)丛生芽的增殖:将丛生芽切割成2段,每段1-2节,转接到丛生芽增殖培养基,培养45-60天,获得大量丛生芽;培养条件为:温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 小时/天;

[0009] 4)继代培养:采用继代培养基进行继代培养,每45天继代一次;培养条件为:温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 小时/天;

[0010] 5)生根培养:继代苗达到合适数量后,采用生根培养基进行生根培养,培养30~50

天得到生根苗;培养条件为:温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 小时/天;

[0011] 6)试管苗移栽:选择每年3-5月、7-11月为出瓶移栽的季节,或者提供类似3~5、7-11月份自然条件的生长环境进行出瓶移栽;移栽前,试管苗放置于具自然光散射的温室中炼苗7-10天,然后从瓶中取出小苗,清洗根部的培养基,取出后种植于新配制的培养土中,温室须保持通风,湿度在70~80%,温度保持在 15°C 以上至室温范围内,高于 30°C 必须用风机、水帘降温。

[0012] 优选地,所述诱导培养基成为MS基本培养基,未添加任何激素,培养基pH值为5.8-6.0。

[0013] 优选地,所述丛生芽增殖培养基成分中含有MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)0.50~1.50 mg/L + IBA(吲哚丁酸)0.00~0.20 mg/L + NAA(萘乙酸)0.00~0.10mg/L + GA₃(赤霉素)0.10~1.00 mg/L。

[0014] 优选地,所述继代培养基成分中含有MS +6-BA (6-苄氨基腺嘌呤)0.20~1.50 mg/L + NAA(萘乙酸)0.00~0.10 mg/L + IBA(吲哚丁酸)0.00~0.20 mg/L + GA₃(赤霉素)0.10 ~1.50 mg/L。

[0015] 优选地,所述生根培养基成分中含有1/2MS + IBA(吲哚丁酸)0.00~1.00 mg/L+NAA(萘乙酸)0.00~2.00 mg/L。

[0016] 优选地,所述外植体的采集与表面消毒,所述外植体的采集与表面消毒步骤中,对枝条进行预处理是指用自来水冲洗外植体表面0.5-1 h,剪去叶片,并剪成1.5-2cm长、带1-2个侧芽的径段,接着用洗洁剂溶液浸泡6min后,再用棉球蘸洗洁剂溶液仔细轻轻清洗腋芽及茎段,再用清水冲洗0.5-1 h,放入干净容器中待用。

[0017] 优选地,所述外植体的采集与表面消毒步骤中,依次通过酒精和升汞溶液进行处理是指接着转入75%的酒精中30 s,用无菌蒸馏水冲洗2到3次,然后用0.1%升汞6- 10 min对猴耳环茎段灭菌,期间不断的摇晃培养瓶。

[0018] 优选地,所述培养土中草炭土、珍珠岩、蛭石的配比3:1:1。

[0019] 相比于现有技术,本发明的猴耳环实生苗茎段组织培养快速繁殖方法的有益效果在于:该方法操作容易,生产成本低,不污染环境,能够实现规模化生产。通过本发明培育出的猴耳环种苗,其遗传性状稳定,保持了亲本的特性,具备包括不变性、投入少、产出高、周期短在内的诸多优势。

具体实施方式

[0020] 本发明具体实施方式中提供一种猴耳环组织培养快速繁殖方法,具体包括以下依次进行的步骤:

[0021] 1)外植体的采集与表面消毒:选取猴耳环实生种子苗一二年生幼嫩枝条,采集后将洗净的枝条分段,并对枝条进行预处理获取1.5-2cm长、带1-2个侧芽的径段,而后在超净工作台上先用无菌蒸馏水润洗两次,再依次通过酒精和升汞溶液进行表面消毒处理,在用升汞溶液进行处理期间不断的摇晃培养瓶,使茎段与液体充分接触,之后立即用无菌蒸馏水冲洗5-8次,冲洗好后将茎段置于灭菌待用的碟子中,切除叶柄、茎段两端受伤部位,将茎段接种到芽诱导培养基中;

[0022] 2) 丛生芽的诱导: 采用诱导培养基培养一周之后, 新芽长出, 30天后新芽长到1-2cm; 培养过程中, 温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为1500-2000 lx, 光照时间为12 小时/天;

[0023] 3) 丛生芽的增殖: 将丛生芽切割成2段, 每段1-2节, 转接到丛生芽增殖培养基, 培养45-60天, 获得大量丛生芽; 培养条件为: 温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为1500-2000 lx, 光照时间为12 小时/天;

[0024] 4) 继代培养: 采用继代培养基进行继代培养, 每45天继代一次; 培养条件为: 温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为1500-2000 lx, 光照时间为12 小时/天;

[0025] 5) 生根培养: 继代苗达到合适数量后, 采用生根培养基进行生根培养, 培养30~50天得到生根苗; 培养条件为: 温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为1500-2000 lx, 光照时间为12 小时/天;

[0026] 6) 试管苗移栽: 选择每年3-5月、7-11月为出瓶移栽的季节, 或者提供类似3~5、7-11月份自然条件的生长环境进行出瓶移栽; 移栽前, 试管苗放置于具自然光散射的温室中炼苗7-10天, 然后从瓶中取出小苗, 清洗根部的培养基, 取出后种植于新配制的培养土中, 温室须保持通风, 湿度在70~80%, 温度保持在 15°C 以上至室温范围内, 高于 30°C 必须用风机、水帘降温。

[0027] 上述各个步骤中涉及到的处理方式、培养条件、培养时间和培养基的成分都会根据具体需要进行适当的调整。

[0028] 其中, 各培养在成分确定的情况下, 其中用到的各组分的含量可根据实际的培养情况进行调整, 上述方法中用到的培养基及培养土成分和各成分的含量范围如下:

[0029] 诱导培养基成分为MS基本培养基, 不添加任何激素, 培养基pH值为5.8-6.0。

[0030] 丛生芽增殖培养基为MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)0.50~1.50 mg/L + IBA(吲哚丁酸)0.00~0.20 mg/L + NAA(萘乙酸)0.00~0.10mg/L + GA₃(赤霉素)0.10~1.00 mg/L。

[0031] 继代培养基为MS + 6-BA (6-苄氨基腺嘌呤)0.20~1.50 mg/L + NAA(萘乙酸)0.00~0.10 mg/L + IBA(吲哚丁酸)0.00~0.20 mg/L + GA₃(赤霉素)0.10 ~1.50 mg/L。

[0032] 所述生根培养基成分中含有1/2MS + IBA(吲哚丁酸)0.00~1.00 mg/L+ NAA(萘乙酸)0.00~2.00 mg/L。

[0033] 所述培养土中草炭土、珍珠岩、蛭石的配比3:1:1。

[0034] 另外, 由于培养过程受诸如温度、光照、湿度等多种因素的影响, 因而, 在本发明的各步骤中, 处理方式、培养条件、培养时间都会根据具体需要进行适当的调整。其中, 外植体的采集与表面消毒步骤中, 所述外植体的采集与表面消毒步骤中, 对枝条进行预处理是指用自来水冲洗外植体表面0.5-1 h, 剪去叶片, 并剪成1.5-2cm长、带1-2个侧芽的径段, 接着用洗洁剂溶液浸泡6min后, 再用棉球蘸洗洁剂溶液仔细轻轻清洗腋芽及茎段, 再用清水冲洗0.5-1 h, 放入干净容器中待用。另外, 依次通过酒精和升汞溶液进行处理是指接着转入75%的酒精中30 s, 用无菌蒸馏水冲洗2到3次, 然后用0.1%升汞6- 10 min对猴耳环茎段灭菌, 期间不断的摇晃培养瓶。

[0035] 为使本发明更加容易理解, 下面将进一步阐述本发明的具体实施例。

[0036] 实施例1

[0037] 于4月份晴天上午10时以后采集猴耳环实生种子苗一二年生幼嫩枝条, 并把枝条下部立即浸入水中, 防止幼嫩枝条水分蒸发。对所采的枝条先进行预处理: 用自来水冲洗外

植体表面0.5-1 h,剪去叶片,并剪成1.5-2 cm长的茎段(带侧芽1-2个),接着用少量洗洁剂溶液浸泡6min后用棉球蘸洗洁剂溶液仔细轻轻清洗腋芽及茎段,再用清水冲洗0.5-1 h,放入干净容器中待用。在超净工作台上用75%酒精浸泡30 s,之后倒出酒精,立即用无菌水冲洗2-3次,接着用0.1%的升汞溶液消毒8 min,期间不断摇晃培养瓶,使茎段与液体充分接触,之后倒出升汞,用无菌水冲洗5-8次。冲洗完毕后将茎段置于灭菌待用的碟子中,切除叶柄、茎段两端受伤部位,将茎段接种到诱导培养基MS₀(未添加激素的MS培养基),光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃。培养一星期左右侧芽萌发并生长,诱导率为50.9%,污染率为22.8%,褐化率为26.3%。待其芽培养30 d时长至2-3 cm时,将其剪下把芽切成1 cm长的小段接到增殖培养基为MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)0.50 mg/L + IBA(吲哚丁酸)0.20 mg/L + NAA(萘乙酸)0.05 mg/L + GA₃(赤霉素)1.00 mg/L上,在光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃条件下,培养45-60 d有大量丛生芽长出,增殖系数可达到3.64,不定芽高度能达到1.46 cm,有效芽率为55.0%。每40~60天继代增殖1次,继代培养基为MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)0.20 mg/L + IBA(吲哚丁酸)0.20 mg/L + NAA(萘乙酸)0.05 mg/L + GA₃(赤霉素)1.00 mg/L,在光照强度1500~2000lx,光照10小时/天,温度25~28℃条件下培养。当继代苗达到一定数量后将其接入生根培养基1/2MS + IBA(吲哚丁酸)1.00 mg/L中,光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃,培养两星期左右组培苗开始生根,培养30 d时,生根率达到96.3%,平均根数为4.7,平均根长为1.54 cm,此时的根长、根数生长较一致,上部叶片绿色。将生根苗置于温室炼苗,先扭松盖子放置2-3d,再完全打开盖子3-4天,让组培苗慢慢适应温室环境,并在炼苗的过程中宜在苗的表面喷施适量水分,保持湿度。温室温度为25°左右,湿度为80%-90%,温室顶部用75%遮阳网减少光照。移栽前将苗从瓶中取出,在清水中轻轻漂洗猴耳环根上附着的培养基,洗净基部,随即把根浸泡在0.1%的多菌灵溶液中2min,接着把苗移栽至泥炭:黄土(1:1)基质中。并保持温室通风,高于30℃必须用风机、水帘降温,移栽成活率达95%以上。

[0038] 实施例2

[0039] 于7月份晴天上午10时以后采集猴耳环实生种子苗一二年生幼嫩枝条,并把枝条下部立即浸入水中,防止幼嫩枝条水分蒸发。对所采的枝条先进行预处理:用自来水冲洗外植体表面0.5-1 h,剪去叶片,并剪成1.5-2 cm长的茎段(带侧芽1-2个),接着用少量洗洁剂溶液浸泡5min后用棉球蘸洗洁剂溶液仔细轻轻清洗腋芽及茎段,再用清水冲洗0.5-1 h,放入干净容器中待用。在超净工作台上用75%酒精浸泡30 s,之后倒出酒精,立即用无菌水冲洗2-3次,接着用0.1%的升汞溶液消毒8 min,期间不断摇晃培养瓶,使茎段与液体充分接触,之后倒出升汞,用无菌水冲洗5-8次。冲洗完毕后将茎段置于灭菌待用的碟子中,切除叶柄、茎段两端受伤部位,将茎段接种到诱导培养基MS₀(未添加激素的MS培养基),光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃。培养一星期左右侧芽萌发并生长,诱导率为13.3%,污染率为71.1%,褐化率为15.6%。待其芽培养30 d时长至2-3 cm时,将其剪下把芽切成1 cm长的小段接到增殖培养基为MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)1.00 mg/L + IBA(吲哚丁酸)0.10 mg/L + GA₃(赤霉素)1.00 mg/L上,在光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃条件下,培养45-60 d有大量丛生芽长出,增殖系数可达到4.00,不定芽高度能达到1.37cm,有效芽率为52.7%。每40~60天继代增殖1次,继代培养基为MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)0.50 mg/L + IBA(吲哚丁酸)0.10 mg/L + NAA(萘乙

酸)0.05 mg/L + GA₃(赤霉素) 1.00 mg/L,在光照强度1500~2000lx,光照10小时/天,温度25~28℃条件下培养。当继代苗达到一定数量后将其接入生根培养基1/2MS + IBA(吲哚丁酸)0.50 mg/L中,光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃,培养两星期左右组培苗开始生根,培养30 d时,生根率达到80.5%,平均根数为3.3,平均根长为1.99cm,此时地上部苗的生长与根协调生长。将生根苗置于温室炼苗,先扭松盖子放置2-3 d,再完全打开盖子3-4 d,让组培苗慢慢适应温室环境,并在炼苗的过程中宜在苗的表面喷施适量水分,保持湿度。温室温度为25°左右,湿度为80%-90%,温室顶部用75%遮阳网减少光照。移栽前将苗从瓶中取出,在清水中轻轻漂洗猴耳环根上附着的培养基,洗净基部,随即把根浸泡在0.1%的多菌灵溶液中2min,接着把苗移栽至泥炭基质中。并保持温室通风,高于30℃必须用风机、水帘降温,移栽成活率可达90%以上。

[0040] 实施例3

[0041] 于10月份晴天上午10时以后采集猴耳环实生种子苗一二年生幼嫩枝条,并把枝条下部立即浸入水中,防止幼嫩枝条水分蒸发。对所采的枝条先进行预处理:用自来水冲洗外植体表面0.5-1 h,剪去叶片,并剪成1.5-2 cm长的茎段(带侧芽1-2个),接着用少量洗洁剂溶液浸泡5min后用棉球蘸洗洁剂溶液仔细轻轻清洗腋芽及茎段,再用清水冲洗0.5-1 h,放入干净容器中待用。在超净工作台上用75%酒精浸泡30 s,之后倒出酒精,立即用无菌水冲洗2-3次,接着用0.1%的升汞溶液对猴耳环嫩茎段消毒8 min,老茎段用0.1%升汞10min,期间不断摇晃培养瓶,使茎段与液体充分接触,之后倒出升汞,用无菌水冲洗5-8次。冲洗完毕后将茎段置于灭菌待用的碟子中,切除叶柄、茎段两端受伤部位,将茎段接种到诱导培养基MS₀(未添加激素的MS培养基),光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃。培养一星期左右侧芽萌发并生长,嫩茎段诱导率为55.8%,老茎段诱导率为56.0%。待其芽培养30 d时长至2-3 cm时,将其剪下把芽切成1 cm长的小段接到增殖培养基为MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤) 0.50 mg/L + IBA(吲哚丁酸) 0.10 mg/L + NAA(萘乙酸)0.10 mg/L + GA₃(赤霉素) 0.50 mg/L上,在光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃条件下,培养45-60 d有大量丛生芽长出,增殖系数可达到3.43,不定芽高度能达到1.14cm,有效芽率为50.0%。每40~50天继代增殖1次,继代培养基为MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤) 0.20 mg/L + IBA(吲哚丁酸) 0.10 mg/L + NAA(萘乙酸)0.10 mg/L + GA₃(赤霉素) 0.50 mg/L,在光照强度1500~2000lx,光照10小时/天,温度25~28℃条件下培养。当继代苗当增殖苗达到一定数量后将其接入生根培养基1/2MS + NAA(萘乙酸)2.00 mg/L中,光照强度为1500-2000 lx,光照时间为12 h/d,温度为25±2℃,培养两星期左右组培苗开始生根,培养30 d时,生根率达到80.5%,平均根数为5.3,平均根长为1.34 cm,此时苗长势较好。将生根苗置于温室炼苗,先扭松盖子放置2-3 d,再完全打开盖子3-4 d,让组培苗慢慢适应温室环境,并在炼苗的过程中宜在苗的表面喷施适量水分,保持湿度。温室温度为25°左右,湿度为80%-90%,温室顶部用75%遮阳网减少光照。移栽前将苗从瓶中取出,在清水中轻轻漂洗猴耳环根上附着的培养基,洗净基部,随即把根浸泡在0.1%的多菌灵溶液中2min,接着把苗移栽至黄土基质中。并保持温室通风,高于30℃必须用风机、水帘降温,移栽成活率达90%以上。

[0042] 相比于现有技术,上述方式中揭示的猴耳环种子苗茎段组织培养快速繁殖方法,操作容易,生产成本低,不污染环境,能够实现规模化生产。通过本发明培育出的鼓槌石斛

种苗,其遗传性状稳定,保持了亲本的特性,具备包括不变性、投入少、产出高、周期短在内的诸多优势。

[0043] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。