



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101785431 B

(45) 授权公告日 2011.12.28

(21) 申请号 201010146830.7

(22) 申请日 2010.03.12

(73) 专利权人 中国热带农业科学院椰子研究所  
地址 571339 海南省文昌市新市区

(72) 发明人 黄丽云 范海阔 周焕起 李杰  
覃伟权 马子龙

(74) 专利代理机构 海口翔翔专利事务有限公司  
46001

代理人 莫臻

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1092270 A, 1994.09.21, 全文.

CN 1631108 A, 2005.06.29, 全文.

Academia Sinica et al. Effects of  
auxins and cytokinins on direct somatic

embryogenesis on leaf explants of  
Oncidium 'Gower Ramsey'. 《Plant Growth  
Regulation》. 2001, 第 34 卷第 229 ~ 232 页.

姚丽娟等. 文心兰茎尖及花梗离体培养  
研究. 《福建热作科技》. 2004, 第 29 卷 (第 2  
期), 5 ~ 6 页.

赵丽等. 文心兰高效再生体系研究. 《安徽  
农业科学》. 2008, 第 36 卷 (第 20 期), 8502 ~  
8503, 8515.

审查员 冀敏

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

利用浓缩椰子水提高文心兰原球茎增殖及分  
化的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用浓缩椰子水提高文心  
兰原球茎增殖及分化的方法,是将椰子水置于旋  
转蒸发仪上进行浓缩得到浓缩椰子水,备用;取  
文心兰植株茎尖经灭菌后接种到添加浓缩椰子水  
的诱导培养基上进行诱导培养产生的原球茎,将  
原球茎转接到增殖培养基上进行增殖培养,再转  
入分化培养基上进行分化培养产生丛生芽,将从  
生芽接种在生根壮苗培养基上培养至成苗。本发  
明利用浓缩椰子水作为有机添加物可显著提高文  
心兰原球茎组织的增殖率,在提高原球茎组织增  
殖率的基础上,有效地提高组培苗繁殖率,为工厂  
化生产文心兰提供一条有效途径,实用性强,操作  
简单,推广性好。

1. 一种利用浓缩椰子水提高文心兰原球茎增殖及分化的方法,其特征在于,具体步骤如下:

1)、浓缩椰子水的制备

将椰子水置于旋转蒸发仪上浓缩 10 ~ 15 倍至椰子水的糖浓度为 40 ~ 60% 得到浓缩椰子水,备用;旋转蒸发仪温度控制在 50 ~ 80℃,真空度 -0.07MPa,转速为 30 ~ 40 转 / min;

2)、外植体材料的选择及原球茎的诱导

取文心兰植株茎尖洗净后,留长约 2 ~ 3cm 的幼芽,经无菌水冲洗、酒精浸泡后,加入 0.15% HgCl<sub>2</sub> 溶液进行灭菌,然后用无菌水冲洗,滤纸吸干,剥取茎尖接种到诱导培养基上进行诱导培养,培养温度 24 ~ 28℃,PH5.8,光照度 1500 ~ 2000lx,光照 12 小时 / 天;所述诱导培养基是以 MS 培养基为基础培养基,并添加 6-BA 4mg/L、NAA0.5mg/L、30g/L 蔗糖、5.0g/L 琼脂粉、1g/L 活性炭和 1% 体积的浓缩椰子水;

3)、原球茎增殖培养

将诱导产生的原球茎转接到增殖培养基上进行增殖培养,培养温度 24 ~ 28℃,光照度 1500 ~ 2000lx 下进行培养,光照 12 小时 / 天;所述增殖培养基是以 MS 培养基为基础培养基,并添加 6-BA 2mg/L、NAA 0.5mg/L、30g/L 蔗糖、5.0g/L 琼脂粉、1.0g/L 活性炭和 0.5 ~ 4% 体积的浓缩椰子水;

4)、分化培养

从继代的原球茎中选取生长良好、翠绿色、结构较为致密的原球茎转入分化培养基上进行分化培养;所述分化培养基是以 1/2MS 培养基为基础培养基,并添加 6-BA 0.5mg/L、30g/L 蔗糖、5.0g/L 琼脂粉、1.0g/L 活性炭和 1% 体积的浓缩椰子水;

5)、生根壮苗

将分化出的丛生芽切割成单个芽,接种在生根壮苗培养基上培养至成苗;所述生根壮苗培养基是以 1/2MS 培养基为基础培养基,并添加 IBA 0.5mg/L、30g/L 蔗糖、5.0g/L 琼脂粉和 1.0g/L 活性炭。

## 利用浓缩椰子水提高文心兰原球茎增殖及分化的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种文心兰原球茎增殖及分化方法,具体涉及一种通过添加浓缩椰子水可明显地提高文心兰原球茎增殖及分化方法。

### 背景技术

[0002] 兰花是一种以香著称的花卉,以其特有的叶、花、香独具四清(气清、色清、神清、韵清)给人以极高洁、清雅的优美形象,古今名人对它品价极高,被喻为花中君子。兰花种子发芽率低,时间长,而且不整齐,使兰花的培育生产不能更好地满足市场的需求。目前,兰花的种苗生产主要利用组织培养的技术方法,可有效地提高兰花良种的快速繁殖系数。采用组织培养的方法,可周年规模化生产性状整齐一致的种苗供生产上应用,但在组织培养过程中如何提高种苗的繁殖速率一直是研究人员和生产企业关心的问题。组织培养中常用的有机添加物如椰子水、香蕉和马铃薯等是一类含有氨基酸、激素和酶等有机成分较为复杂的天然复合物。研究证明,它们对细胞和组织的增殖与分化有明显的促进作用。在兰花的快速组织培养中曾多人尝试着通过添加不同的有机物以达到此目的,刘晓燕等人通过添加不同的有机物如椰乳、香蕉、马铃薯、苹果等对蝴蝶兰原球茎增殖效果进行了研究,通过实验比较分析发现以椰乳的增殖效果最好。陈发菊等通过活性碳和椰乳对文心兰离体芽尖培养的影响研究也表明对文心兰丛生芽的分化具明显的促进作用。由此可见,椰子水可以作为完善植物组织培养再生体系的添加剂使用。

[0003] 由于组培中所需椰子水添加量较大,而目前,我国椰子来源仅限于海南省,产地范围较小,且椰子果大,运输相当不便,因而组培工厂获取椰子水的成本较高,不利于组培中椰子水的应用,制约了文心兰组织培养的生产途径,而浓缩椰子水对植物组织培养过程的影响尚未见有报道。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种利用浓缩椰子水提高文心兰原球茎增殖及分化的方法,通过添加浓缩椰子水的方式显著提高文心兰原球茎的增殖率,有效提高文心兰组培再生体系。

[0005] 本发明所采用的技术方案:

[0006] 一种利用浓缩椰子水提高文心兰原球茎增殖及分化的方法,由以下步骤组成:

[0007] 1、浓缩椰子水的制备

[0008] 将椰子水置于旋转蒸发仪上浓缩 10 ~ 15 倍至椰子水的糖浓度为 40 ~ 60% 得到浓缩椰子水,备用;旋转蒸发仪温度控制在 50 ~ 80℃,真空度 -0.07 ~ 0.08MPa,转速为 30 ~ 40 转 /min。

[0009] 2、外植体材料的选择及原球茎的诱导

[0010] 取文心兰植株茎尖洗净后,留长约 2 ~ 3cm 的幼芽,经无菌水冲洗、酒精浸泡后,加入 0.15% HgCl<sub>2</sub> 溶液进行灭菌,然后用无菌水冲洗,滤纸吸干,剥取茎尖接种到诱导培养基

上进行诱导培养,培养温度 24 ~ 28℃, PH5.8,光照度 1500 ~ 2000lx,光照 12 小时 / 天。15 天后茎尖开始膨胀,23 天后在茎尖基部出现了类似愈伤组织样的乳状突起,一个月后可陆续产生原球茎。所述诱导培养基是以 MS 培养基为基础培养基,并添加 6-BA 4mg/L、NAA 0.5mg/L、30g/L 蔗糖、5.0g/L 琼脂粉、1g/L 活性炭和 1% 体积的浓缩椰子水。

### [0011] 3、原球茎增殖培养

[0012] 将诱导产生的原球茎转接到增殖培养基上进行增殖培养,培养温度 24 ~ 28℃,光照度 1500 ~ 2000lx 下进行培养,光照 12 小时 / 天。所述增殖培养基是以 MS 培养基为基础培养基,并添加 6-BA 2mg/L、NAA 0.5mg/L、30g/L 蔗糖、5.0g/L 琼脂粉、1.0g/L 活性炭和 0.5 ~ 4% 体积的浓缩椰子水。

### [0013] 4、分化培养

[0014] 从继代的原球茎中选取生长良好、翠绿色、结构较为致密的原球茎转入分化培养基上进行分化培养。所述分化培养基是以 1/2MS 培养基为基础培养基,并添加 6-BA 0.5mg/L、+30g/L 蔗糖、5.0g/L 琼脂粉、1.0g/L 活性炭和 1% 体积的浓缩椰子水。原球茎在增大的同时,也会发生少量增殖,4 周左右原球茎开始分化出芽。

### [0015] 5、生根壮苗

[0016] 将分化出的丛生芽切割成单个芽,接种在生根壮苗培养基上培养至成苗。所述生根壮苗培养基是以 1/2MS 培养基为基础培养基,并添加 IBA 0.5mg/L、30g/L 蔗糖、5.0g/L 琼脂粉和 1.0g/L 活性炭。

[0017] 发明人在增殖培养、分化培养阶段通过将浓缩椰子水添加至培养基中进行对比试验,实验结果见表 1。在增殖培养、分化培养阶段利用浓缩前后的椰子水添加至培养基中进行对比试验,实验结果见表 2。

[0018] 表 1 浓缩椰子水对原球茎增殖及分化的影响

[0019]

培养基中椰子水添加量 (%)	原球茎增殖倍数	分化率%	生长速度	原球茎生长性状描述
0	0.82	0	+	青色偏暗褐
0.5	1.13	0.10	++	青色、少许偏黄
1	1.36	0.83	+++	嫩绿色、圆形、致密
2	1.27	0.30	+++	嫩绿色、圆形、致密
3	1.50	0.21	+++	嫩绿色、圆形
4	1.41	0.23	+++	嫩绿色、圆形

[0020] 注:生长速度 + 号表示生长情况,+ 越多生长情况越好(椰子水浓缩前糖浓度为 5%,浓缩倍数为 10)

[0021] 表 2 椰子水、浓缩椰子水对原球茎增殖及分化的比较

	培养基中椰子水添加量 (%)	原球茎增殖倍数		分化率%	
		浓缩前	浓缩后	浓缩前	浓缩后
[0022]	0	0.81	0.82	0	0
	0.5	1.14	1.13	0.11	0.10
	1	1.16	1.36	0.56	0.83
	2	0.28	1.27	0.41	0.30
	3	0.24	1.50	0.13	0.21
	4	0.23	1.41	0.12	0.23

[0023] 由表 1 可见,在培养基中的添加 1 ~ 4% 体积的浓缩椰子水比不添加或少量添加,文心兰原球茎的增殖倍数有明显提高,生长情况良好,原球茎嫩绿色,圆形,结构致密。芽的分化率在添加 1% 浓缩椰子水时变化明显,达 0.83%,极显著高于其他处理。由表 2 可见,浓缩椰子水综合表现效果好。

[0024] 本发明利用浓缩椰子水作为有机添加物可显著提高文心兰原球茎组织的增殖率,在提高原球茎组织增殖率的基础上,有效地提高组培苗繁殖率,为工厂化生产文心兰提供一条有效途径,实用性强,操作简单,推广性好。

### 具体实施方式

[0025] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。

[0026] 实施例一

[0027] 1、取材:同色文心兰 (*Oncidium concolor*)

[0028] 2、外植体的消毒:晴朗天气早晨取文心兰茎尖包好,迅速带回实验室用自来水冲洗,留长约 2-3cm 的幼芽,在超净工作台上先用无菌水冲洗 2 遍,再用 70% 的酒精浸泡 1 分钟,倒去酒精加入 0.15%  $\text{HgCl}_2$  溶液灭菌 8 分钟,无菌水冲洗 5 次后,用灭过菌的滤纸吸干,剥取茎尖接种到诱导培养基上进行诱导培养,诱导培养基为 MS+6-BA 4mg/L+NAA 0.5mg/L+30g/L 蔗糖+5.0g/L 琼脂粉+1g/L 活性炭+1% 体积椰子水;培养条件为温度 26℃,PH5.8,光照度 1500 ~ 2000lx,光照 12 小时/天。待 15 天后茎尖开始膨胀,23 天后在茎尖基部出现了类似愈伤组织样的乳状突起,一个月后可陆续产生原球茎。

[0029] 3、原球茎的增殖:将诱导产生的原球茎进行增殖扩繁,将其转接到添加了浓缩椰子水的增殖培养基上进行增殖培养,增殖培养基为 MS+6-BA 2mg/L+NAA 0.5mg/L+30g/L 蔗糖+5.0g/L 琼脂粉+1.0g/L 活性炭+1% 体积浓缩椰子水,在光照下进行培养。

[0030] 4、分化培养:从继代的原球茎中选取生长良好、翠绿色、结构较为致密的原球茎转入分化培养基上分化培养。所述分化培养基为 1/2MS+6-BA 0.5mg/L++30g/L 蔗糖+5.0g/L 琼脂粉+1.0g/L 活性炭+1% 体积浓缩椰子水。原球茎在增大的同时,也会发生少量增殖,4 周左右原球茎开始分化出芽。

[0031] 5、壮苗生根:将丛生芽切割成单个芽,接种在生根壮苗培养基上,该阶段采用的培养基为 1/2MS+IBA 0.5mg/L+30g/L 蔗糖+5.0g/L 琼脂粉+1.0g/L 活性炭,生长状况良好。