



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112273232 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 202011197020.4

(22) 申请日 2020.10.31

(71) 申请人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市江干区石桥路  
198号

(72) 发明人 石丽敏 宋费玲 卢华兵 许巧贤  
朱正梅 吕学高 陈一波 吴志刚  
姜武 陶正明

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公  
司 33212

代理人 金祺

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图5页

(54) 发明名称

温郁金脱毒苗培养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种温郁金脱毒苗培养方法,包括以下步骤:选取温郁金的主根茎进行催芽,直至在主根茎上获得健壮芽;割取健壮芽后进行清洗,剥去外层芽鞘,挑取生长点接入诱导萌发分化培养基中进行培养;所得的脱毒幼苗转接于增殖培养基上进行增殖培养和重复培养;培养所得的单株小苗转移到生根壮苗培养基上进行培养,直至获得可出瓶种植的种苗。采用本发明的方法可以在相对较短周期内生产大量遗传背景相同、长势一致的优质种苗,尤其适用于温郁金脱毒苗工厂化育苗。



1. 温郁金脱毒苗培养方法,其特征是依次包括以下步骤:

1)、取材:

选取温郁金的主根茎进行催芽,直至在主根茎上获得长度为 $1\pm 0.1\text{cm}$ 的健壮芽;

割取健壮芽后进行清洗;

2)、种子的诱导萌发与分化:

将步骤1)所得的芽经消毒后,剥去外层芽鞘,挑取 $0.5\sim 1\text{mm}$ 大小的生长点接入诱导萌发分化培养基中进行培养;直至得 $1.5\sim 2\text{cm}$ 高的脱毒幼苗;

培养条件为:

每天14小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^\circ\text{C}$ ;10小时暗培养,温度为 $21\pm 1^\circ\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行;

3.1)、幼苗的增殖:

将步骤2)所得的脱毒幼苗转接于增殖培养基上进行增殖培养,培养条件为:16小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^\circ\text{C}$ ;8小时暗培养,温度为 $21\pm 1^\circ\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行;

当增殖培养40~45天后,分成以下两种情况:

情况一、将上述丛生苗从基部进行分割形成单株小苗,进行下述步骤3.2)的重复培养;

情况二、继续在增殖培养基上进行培养,直至丛生苗上的新苗高为 $\geq 3\text{cm}$ 、且每个丛生苗带有至少2个新苗时;将上述丛生苗从基部进行分割形成单株小苗;

3.2)、重复培养:

将步骤3.1)的情况一割取的单株小苗,替代步骤2)所得的脱毒幼苗,按照上述3.1)进行增殖的重复培养;

4)、生根壮苗:

将步骤3.1)情况二所得的单株小苗,转移到生根壮苗培养基上进行培养;

培养条件为:16小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^\circ\text{C}$ ;8小时暗培养,温度为 $21\pm 1^\circ\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行;

待生根壮苗培养基上的小苗长到 $\geq 5\text{cm}$ 高、且长出长度大于 $2\text{cm}$ 的根至少2条时,结束培养;得可出瓶种植的种苗。

2. 根据权利要求1所述的温郁金脱毒苗培养方法,其特征是:

所述步骤2)中的诱导萌发分化培养基为:MS+6-BA  $1.95\sim 2.05\text{mg/L}$ +NAA $0.05\sim 0.15\text{mg/L}$ +蔗糖 $25\sim 35\text{g/L}$ +琼脂 $5\sim 8\text{g/L}$ ,pH为 $5.5\sim 6$ 。

3. 根据权利要求2所述的温郁金脱毒苗培养方法,其特征是:

步骤3)中的增殖培养基为:MS+6-BA  $1.95\sim 2.05\text{mg/L}$ +蔗糖 $35\sim 45\text{g/L}$ +琼脂 $7\sim 9\text{g/L}$ ,pH为 $5.5\sim 6$ 。

4. 根据权利要求3所述的温郁金脱毒苗培养方法,其特征是:

步骤4)中的生根壮苗培养基为以下任何一种:

MS+6-BA $1.95\sim 2.05\text{mg/L}$ +NAA $0.45\sim 0.55\text{mg/L}$ +蔗糖 $35\sim 45\text{g/L}$ +琼脂 $7\sim 9\text{g/L}$ +活性炭 $0.3\sim 0.7\text{g/L}$ ,pH为 $5.5\sim 6$ ;

MS+6-BA $2.95\sim 3.05\text{mg/L}$ +蔗糖 $35\sim 45\text{g/L}$ +琼脂 $7\sim 9\text{g/L}$ + $0.3\sim 0.7\text{g/L}$ 活性炭,pH为 $5.5\sim 6$ 。

5. 根据权利要求1~4任一所述的铁皮石斛的组培快速繁殖方法,其特征是:还包括步骤5)的移栽:将种苗进行移栽。

6. 根据权利要求5所述的铁皮石斛的组培快速繁殖方法,其特征是:  
所述步骤5)为:

首先将所得可出瓶种植的种苗同培养容器转移至拟驯化移栽的遮阴大棚中炼苗5~7天;

然后打开瓶盖,在生根壮苗培养基表面浇水,水的用量为步骤4)起始所用生根壮苗培养基体积的9~11%,再于遮阴大棚中下放置2~3天后,将种苗基部的生根壮苗培养基洗净,浸入0.5%的多菌灵水溶液中1小时,取出晾干至根系发白;

最后将种苗移栽于混合基质中,于遮阴大棚中进行培养;

所述遮阴大棚的透光率为 $60 \pm 5\%$ ,遮阴大棚内温度为 $28 \sim 35^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为 $80 \pm 5\%$ ;

所述混合基质为泥炭土、育苗基质和珍珠岩按照1:1:1的体积比混合获得。

7. 根据权利要求6所述的铁皮石斛的组培快速繁殖方法,其特征是:  
所述步骤1)为:

选取温郁金主根茎,除去泥土和须根,埋入经0.5%多菌灵溶液浸泡至少8小时的细沙土中,置于 $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中催芽,直至在主根茎上获得长度为 $1 \pm 0.1\text{cm}$ 的健壮芽;

从主根茎上割取所述健壮芽,洗掉芽基部沙土,将其清洗。

## 温郁金脱毒苗培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种温郁金脱毒苗的培养方法。

### 背景技术

[0002] 温郁金(*Curcuma wenyujin* Y.H.Chen et C.Ling)是姜科姜黄属植物,是浙江省著名道地药材,是传统“浙八味”之一,为中国药典多版收载品种,根茎干燥后为温莪术,药用功能非常广泛。药理研究显示,其具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗早孕、抗菌、升高白细胞、保肝、抑制血小板聚集和抗血栓形成的功效,临床用于治疗癥瘕痞块、瘀血经闭、食积胀痛、早期宫颈癌等症,对心血管、胃肠平滑肌和急性肾功能衰竭等也发挥一系列药理作用。目前,温郁金作为一种抗肿瘤、抗病毒、抗炎的重要药材,临床用量和工业化生产用量十分巨大,市场上已经出现了供不应求的状况。

[0003] 随着我国传统道地药材GAP的广泛深入实施,生产、加工、制药、销售对植物药材品质要求更加严格,遗传纯合的高产、优质新品种是保证质量稳定的重要物质基础。但是实际生产上温郁金主要以根茎留种繁殖,病毒化严重,严重影响产量和品质,难以得到安全、有效、稳定、可控的温莪术药材,再加上温郁金的生育期长,用种量大,难以适应标准化和规模化生产的要求,已经严重影响到种植户积极性和总产量。

[0004] 《温郁金脱毒组织培养技术研究》告知了以下方案:为了建立温郁金脱毒组培苗的快繁体系,以温郁金主根茎为材料,采用高温预处理催芽结合茎尖培养技术获得脱毒苗。结果表明:茎尖培养的最适培养基为MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.5 mg/L+蔗糖3%+琼脂5.0g/L;不定芽增殖培养基为MS+6-BA3.0mg/L+蔗糖3%+琼脂5.0g/L;脱毒苗生根诱导最适培养基为MS+6-BA 1.5mg/L+NAA2.0 mg/L+蔗糖3%+琼脂5.0g/L,用超薄电镜切片法和RT-PCR法检测病毒率,该茎尖再生苗脱毒率达78.6%。试管苗移栽后植株的成活率达90%以上,植物生长健壮,抗性增强,为温郁金种苗进一步工厂化快速繁殖提供了重要参考价值。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种温郁金茎尖脱毒苗的培养方法,采用本发明的方法可以快速简便地获得大量温郁金脱毒苗。

[0006] 为了解决上述问题,本发明提供一种温郁金脱毒苗培养方法,依次包括以下步骤:

[0007] 1)、取材:

[0008] 选取温郁金的主根茎(生长健壮的温郁金主根茎)进行催芽,直至在主根茎上获得长度为 $1\pm 0.1$ cm的健壮芽;

[0009] 割取健壮芽后进行清洗;

[0010] 2)、种子的诱导萌发与分化:

[0011] 将步骤1)所得的芽经消毒(常规消毒)后,剥去外层芽鞘,挑取0.5~1mm大小的生长点接入诱导萌发分化培养基中进行培养;直至得1.5~2cm高的脱毒幼苗;

[0012] 培养条件为:

[0013] 每天14小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^\circ\text{C}$ ;10小时暗培养,温度为 $21\pm 1^\circ\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行;

[0014] 3.1)、幼苗的增殖:

[0015] 将步骤2)所得的脱毒幼苗转接于增殖培养基上进行增殖培养,培养条件为:16小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^\circ\text{C}$ ;8小时暗培养,温度为 $21\pm 1^\circ\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行;

[0016] 当增殖培养40~45天后(此时丛生苗上的新苗高达约2~2.5cm),分成以下两种情况:

[0017] 情况一、将上述丛生苗从基部进行分割形成单株小苗,进行下述步骤3.2)的重复培养;

[0018] 情况二、继续在增殖培养基上进行培养,直至丛生苗上的新苗高为 $\geq 3\text{cm}$ (约3~4cm)、且每个丛生苗带有至少2个新苗(一般为2~5个新苗)时;将上述丛生苗从基部进行分割形成单株小苗;

[0019] 情况二时,增殖培养基上总的培养时间约为55~60天;

[0020] 3.2)、重复培养:

[0021] 将步骤3.1)的情况一割取的单株小苗,替代步骤2)所得的脱毒幼苗,按照上述3.1)进行增殖的重复培养;

[0022] 4)、生根壮苗:

[0023] 将步骤3.1)情况二所得的单株小苗,转移到生根壮苗培养基上进行培养;

[0024] 培养条件为:16小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^\circ\text{C}$ ;8小时暗培养,温度为 $21\pm 1^\circ\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行;

[0025] 待生根壮苗培养基上的小苗长到 $\geq 5\text{cm}$ 高(约5~6cm)、且长出长度大于2cm的根至少2条时,结束培养;得可出瓶种植的种苗。

[0026] 作为本发明的温郁金脱毒苗培养方法的改进:

[0027] 所述步骤2)中的诱导萌发分化培养基为:MS+6-BA1.95~2.05mg/L+NAA0.05~0.15mg/L+蔗糖25~35g/L+琼脂5~8g/L,pH为5.5~6。

[0028] 步骤3)中的增殖培养基为:MS+6-BA 1.95~2.05mg/L+蔗糖35~45g/L+琼脂7~9g/L,pH为5.5~6。

[0029] 步骤4)中的生根壮苗培养基为以下任何一种:

[0030] MS+6-BA1.95~2.05mg/L+NAA0.45~0.55mg/L+蔗糖35~45g/L+琼脂7~9g/L+活性炭0.3~0.7g/L,pH为5.5~6;

[0031] MS+BA2.95~3.05mg/L+蔗糖35~45g/L+琼脂7~9g/L+0.3~0.7g/L活性炭,pH为5.5~6。

[0032] 作为本发明的温郁金脱毒苗培养方法的进一步改进:还包括步骤5)的移栽:将种苗进行移栽。

[0033] 所述步骤5)为:

[0034] 首先将所得可出瓶种植的种苗同培养容器转移至拟驯化移栽的遮阴大棚中炼苗5~7天;

[0035] 然后打开瓶盖,在生根壮苗培养基表面浇水,水的用量为步骤4)起始所用生根壮

苗培养基体积的9~11%，再于遮阴大棚中下放置2~3天后，将种苗基部的生根壮苗培养基（特指该生根壮苗培养基内的琼脂）洗净，浸入0.5%的多菌灵水溶液中1小时，取出晾干至根系发白；

[0036] 最后将种苗移栽于混合基质中，于遮阴大棚中进行培养；

[0037] 所述遮阴大棚的透光率为 $60 \pm 5\%$ ，遮阴大棚内温度为 $28 \sim 35^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度为 $80 \pm 5\%$ ；

[0038] 所述混合基质为泥炭土、育苗基质和珍珠岩按照1:1:1的体积比混合获得。

[0039] 作为本发明的温郁金脱毒苗培养方法的进一步改进：

[0040] 所述步骤1)为：

[0041] 选取温郁金主根茎（生长健壮的温郁金主根茎），除去泥土和须根，埋入经0.5%多菌灵溶液浸泡至少8小时的细沙土中，置于 $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中催芽，直至在主根茎上获得长度为 $1 \pm 0.1\text{cm}$ 的健壮芽；

[0042] 从主根茎上割取所述健壮芽，洗掉芽基部沙土，将其清洗。

[0043] 注：MS为MS培养基，NAA为萘乙酸，6-BA为6-苄氨基腺嘌呤。

[0044] 以步骤2)的培养基为例：

[0045] 步骤2)中的诱导萌发分化培养基为：MS+6-BA $1.95 \sim 2.05\text{mg/L}$ +NAA $0.05 \sim 0.15\text{mg/L}$ +蔗糖 $25 \sim 35\text{g/L}$ +琼脂 $5 \sim 8\text{g/L}$ ，pH为 $5.5 \sim 6$ 。

[0046] 诱导萌发分化培养基的制备方法为：在1L MS培养基中加入6-BA $1.95 \sim 2.05\text{mg}$ 、NAA $0.05 \sim 0.15\text{mg}$ 、蔗糖 $25 \sim 35\text{g}$ 、琼脂 $5 \sim 8\text{g}$ ；然后调节pH为 $5.5 \sim 6$ 。使用前进行常规的高温灭菌（为常规的高温灭菌，一般为在1.1个大气压， $121^{\circ}\text{C}$ 下灭菌20min）。

[0047] 本发明具有如下技术优势：

[0048] 1、本发明组培过程中所采用的各培养基中所加激素种类少且浓度低，培养基制作简单方便，组培苗生产成本低。

[0049] 2、本发明增殖和生根培养基中增加了蔗糖和琼脂粉的量，有效解决了组培苗玻璃化严重等问题。

[0050] 3、本发明利用温郁金新生芽的生长点诱导脱毒苗，诱导率高，诱导芽的同时也能增殖，繁殖速度快，操作简单简便，便于工厂化生产。

[0051] 4、本发明的温郁金脱毒苗培养方法，前期芽经过高温预处理脱毒，再通过在解剖镜下切取茎尖生长点进行培养，得到的温郁金脱毒苗脱毒效果好，用超薄电镜切片法和RT-PCR法检测病毒率，脱毒率可以达到80%以上。培养过程所需培养基制作简便，组培苗生产成本低，可以在相对较短周期内生产大量遗传背景相同、长势一致的优质种苗，尤其适用于温郁金脱毒苗工厂化育苗。

## 附图说明

[0052] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0053] 图1是生长点接种7天左右开始萌动变绿膨大；

[0054] 图2是实施例1中生长点诱导出的脱毒幼苗；

[0055] 图3是实施例1中生长点诱导出的脱毒幼苗进一步长大至可增殖前的状态；

[0056] 图4是实施例1中脱毒苗正在增殖。

- [0057] 图5是实施例1中进行生根的脱毒苗；  
[0058] 图6是实施例1中移栽在育苗盘中驯化的脱毒苗。

### 具体实施方式

[0059] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此。

[0060] 实施例1、一种温郁金脱毒苗培养方法,依次进行以下步骤:

[0061] 1)、取材:

[0062] 冬春季节,选取生长健壮的温郁金主根茎,除去泥土和须根,埋入经0.5%多菌灵溶液浸泡过8小时的细沙土中,置于 $38\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中催芽;直至获得长度约1cm的健壮芽;

[0063] 将上述长度约1cm的健壮芽从主根茎上切下,洗掉芽基部沙土,将其置于1% (体积%)洗洁精溶液中浸泡30min后,取出用自来水冲洗干净,沥干备用。

[0064] 说明:健壮的芽是指满足以下条件的芽:生长有力,长度1cm左右,直径 $\geq 0.5\text{cm}$ 的芽。

[0065] 2)、生长点的诱导萌发与分化:

[0066] 将步骤1)洗净、沥干的芽经常规消毒后,用镊子剥去外层芽鞘,在解剖镜下用解剖针挑取0.5~1mm大小的生长点接入诱导萌发分化培养基中进行培养。

[0067] 所述常规消毒为:先用75% (体积%)酒精浸泡处理1min,无菌水冲洗2次后,用0.1%升汞溶液灭菌10min,无菌水冲洗3~5次后,用无菌滤纸吸干水分。

[0068] 培养条件为:

[0069] 每天14小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;10小时暗培养,温度为 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行。

[0070] 诱导萌发分化培养基为:MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.1 mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH为5.8。

[0071] 约7天左右,白色生长点开始萌动变绿(如图1所示),再慢慢长大。约30天左右,生长点形成一团类似于愈伤组织的白绿色细胞团,再逐步分化形成幼苗(如图2所示)。生长点诱导萌发分化率可达70%左右。

[0072] 生长点诱导萌发分化率=分化成幼苗的生长点数/接种的生长点总数\*100%。

[0073] 生长点在诱导萌发分化培养基上培养约90~100天,此时,脱毒幼苗长大至1.5~2cm高(如图3所示)。

[0074] 3.1)、增殖:

[0075] 将步骤2)所得的脱毒幼苗转接于增殖培养基上进行增殖培养,从而获得丛生苗。

[0076] 培养条件为:16小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;8小时暗培养,温度为 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行;

[0077] 增殖培养基为:MS+6-BA2.0mg/L+蔗糖40g/L+琼脂8g/L,pH为5.8。

[0078] 增殖培养40~45天左右时,增殖倍数约为2.8,此时丛生苗上的新苗高达2~2.5cm。

[0079] 分成以下两种情况:

[0080] 情况一、将上述丛生苗从基部进行分割形成单株小苗,进行下述步骤3.2)的重复

培养;

[0081] 情况二、继续于增殖培养基上培养,当增殖培养的总时间约55~60天时,丛生苗上的新苗高达3~4cm、且每个丛生苗带有2~5个新苗;将上述丛生苗从基部进行分割形成单株小苗,按照步骤4)进行培养。

[0082] 说明:增殖倍数=增殖所得的所有芽数/转入增殖培养基的芽数。

[0083] 3.2)、重复培养:

[0084] 将步骤3.1)的情况一割取的单株小苗,替代“步骤2)所得的脱毒幼苗”,按照上述3.1)的进行增殖的重复培养;

[0085] 4)、生根壮苗:

[0086] 将步骤3.2)的情况二割取的单株小苗接种到生根壮苗培养基上进行培养(如图4所示);可保留基部的根(温郁金较易生根,增殖的过程中就可能会有部分根长出),

[0087] 培养条件为:16小时光照,光照强度 $30\sim 40\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,温度为 $26\pm 1^\circ\text{C}$ ;8小时暗培养,温度为 $21\pm 1^\circ\text{C}$ ;上述光照和暗培养交替进行;

[0088] 生根壮苗培养基为:MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.5mg/L+蔗糖40g/L+琼脂8g/L+0.5g/L活性炭,pH为5.8。

[0089] 约10天小苗开始生根,第45天统计生根率为100%;平均根数约2~3条。

[0090] 生根率=基部有2条及以上根的苗数/转入生根培养基的苗数\*100%。

[0091] 5)、移栽:

[0092] 生根培养时间总时间约50天后,生根壮苗培养基上培养获得的小苗的基部有长度大于2cm的根至少2条、且小苗长到5.0~6.0cm高,得可出瓶种植的种苗(如图5所示)。

[0093] 该种苗出瓶种植(移栽)的方法具体为:

[0094] 首先将所得的可出瓶种植的种苗同培养容器转移至拟驯化移栽的遮阴大棚(透光率为60%)中炼苗5~7天(温度为 $20\sim 28^\circ\text{C}$ );

[0095] 然后打开瓶盖,在生根壮苗培养基表面浇一层水(水的用量约为步骤4)起始所用生根壮苗培养基体积的10%),在遮阴大棚中(温度为 $20\sim 28^\circ\text{C}$ )放置2-3天后,将种苗基部的生根壮苗培养基(特指该生根壮苗培养基内的琼脂)洗净。再将种苗基部浸入浓度为0.5%的多菌灵水溶液中浸泡1小时,然后晾干至根系发白;

[0096] 最后将种苗移栽于泥炭土:育苗基质:珍珠岩为1:1:1(体积比)的混合基质中,于遮阴大棚(透光率为60%)中进行培养,培养温度为 $28\sim 35^\circ\text{C}$ 。在整个移栽过程中,控制遮阴大棚内相对湿度保持80%左右。

[0097] 本实施例移栽后生长一个月的种苗如图6所示,其移栽成活率可达95%以上。

[0098] 实施例2、将实施例1步骤3.1)增殖培养基改为:MS+6-BA1.0mg/L+蔗糖40g/L+琼脂8g/L,pH为5.8。其余等同于实施例1。

[0099] 步骤3.1)增殖培养40~45天左右时,增殖倍数约为2.6。

[0100] 实施例3、将实施例1步骤4)生根培养基改为:MS+6-BA3.0 mg/L+蔗糖40g/L+琼脂8g/L+0.5g/L活性炭,pH为5.8,其余等同于实施例1。

[0101] 步骤4)约培养45天,生根率可达100%,平均根数2-3条。

[0102] 经检测,本发明的实施例1~实施例3的脱毒率可以达到80%以上。

[0103] 对比例1、将实施例1步骤2)生长点的诱导萌发分化培养基改为:MS+6-BA2.0mg/L+

NAA0.5mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH为5.8。其余等同于实施例1。

[0104] 生长点诱导萌发分化率为50%，且诱导分化速度相对较慢，从生长点接种到分化出可转接增殖的小苗约需要100-110天。

[0105] 对比例2-1、将实施例1步骤3.1)中的增殖培养基改为：MS+6-BA3.0mg/L+蔗糖40g/L+琼脂8g/L,pH为5.8。其余等同于实施例1。

[0106] 增殖培养65-70天，幼苗增殖倍数约为2.3。

[0107] 对比例2-2、将实施例1步骤3.1)中的增殖培养基改为：MS+6-BA3.0mg/L+蔗糖30g/L+琼脂5g/L,pH为5.8。其余等同于实施例1。

[0108] 增殖培养50-55天，幼苗增殖倍数约为2.8左右。但是幼苗叶色发白，玻璃化严重，不利于进行后续步骤。

[0109] 对比例3-1、将实施例步骤4)中的生根壮苗培养基改为：MS+6-BA1.5mg/L+NAA2mg/L+蔗糖40g/L+琼脂8g/L+0.5g/L活性炭,pH为5.8。

[0110] 所得结果为：约培养50天，达到可以进行出瓶驯化移栽的脱毒苗，生根率可达100%，但是根细长，幼苗细弱，生长势弱。

[0111] 对比例3-2、将实施例步骤4)中的生根壮苗培养基改为：MS+6-BA1.5mg/L+NAA2mg/L+蔗糖30g/L+琼脂5g/L+0.5g/L活性炭,pH为5.8。

[0112] 所得结果为：步骤4)约培养50天，得到可以进行出瓶驯化移栽的脱毒苗，生根率不变，但是幼苗叶色发白，生长势弱，玻璃化严重。

[0113] 最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然，本发明不限于以上实施例，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。



图1



图2



图3



图4



图5



图6