



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105580737 B

(45)授权公告日 2018.05.01

(21)申请号 201610157666.7

审查员 王佳妹

(22)申请日 2016.03.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105580737 A

(43)申请公布日 2016.05.18

(73)专利权人 贵州师范学院

地址 550018 贵州省贵阳市乌当区高新路
115号贵州师范学院

(72)发明人 黄燕芬 何军 王自布 刘向阳
曹永高

(74)专利代理机构 贵阳东圣专利商标事务有限
公司 52002

代理人 袁庆云

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法

(57)摘要

本发明公开了一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,包括:取春季野生百蕊草植株幼嫩健壮枝条叶片作为外植体,接种在愈伤组织诱导培养基上培养诱导产生愈伤组织,3周后将诱导产生的愈伤组织转到新鲜培养基上继代培养。继代培养所获愈伤组织经光培养分化增殖至30d时,用MS固体培养基诱导培养15-20d后,分化出百蕊草无根苗。将诱导出的无根苗切成单苗,接种于增殖培养进行增殖培养,经26天培养增殖系数为8.5。快繁获得的百蕊草无根苗较纤细,需要作壮苗培养,壮苗培养15天后,叶片增厚、增宽,茎干增粗,幼苗健壮,色泽正常,洗去附着茎基部附着培养基,摊凉3天即可作为百蕊草素提取原料。本发明具有增殖速度快,生产周期短,不受季节限制,连续生产等优势,不占用耕地,能实现规模化生产。

1. 一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,包括以下步骤:

(1) 外植体的获得

取百蕊草幼嫩枝条在自来水下冲洗干净,接着用75% 酒精表面消毒30-40s,再在0.1% 升汞溶液中灭菌6-7min,用无菌水漂洗3-5 次,最后在无菌条件下将叶片剪成四周有伤口长约1cm的小段;

(2) 愈伤组织的诱导及继代培养

将剪切好的叶片接种于诱导愈伤组织培养基上,在温度为 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光照培养条件为1500-2000Lx 的条件下培养诱导,叶片周围迅速膨胀,诱导出愈伤组织,诱导率达100%,所诱导的愈伤组织绝大多数为质地疏松的淡黄色或淡绿色愈伤组织;3 周后将诱导出的具有稳定形态特征和生长速率的愈伤组织转到新鲜培养基上继代培养,每2周继代一次;

所述的诱导愈伤组织培养基的组成为:在常规的MS 培养基中加入30g/L 的蔗糖,0.7% 的琼脂,2mg/L 的谷氨酰胺,0.05-0.15mg/L 的NAA,0.1-0.3mg/L的2,4-D,0.5-2.0mg/L的6-BA,10mg/L的AgNO₃,pH 调为5.8-6.2;

在诱导愈伤组织的步骤中,2,4-D对百蕊草愈伤组织有强的诱导作用,以0.1- 0.3mg/L 的2,4-D诱导的出愈率较高,且生长状况好,0.05-0.15mg/L的NAA诱导的愈伤组织生长好,有光泽,培养基中6-BA的浓度为0.5-2.0mg/L时出愈率高,愈伤组织生长好;

(3) 无根苗诱导及快速繁殖

继代培养所获愈伤组织经光培养分化增殖至30d时,用MS固体培养基于温度23-25℃、光照时间12-16h/d、光照强度2000-3000Lx

诱导15-20d后,在愈伤组织表层或稍深层形成并分化出百蕊草无根苗,将诱导出的无根苗切成单苗,接种于增殖培养基于温度23-25℃、光照时间12-16h/d、光照强度2000-3000Lx进行增殖培养,经26天培养增殖系数为8.5;

所述MS固体培养基以MS为基本培养基,附加0.5-1.5mg/L的NAA,0.5-1.5mg/L的6-BA;增殖培养基以MS为基本培养基,附加0.8-1.7mg/L的NAA、0.4-1.0mg/L的6-BA,两种培养基均附加0.7% 的琼脂,质量分数为3% 的蔗糖,pH调至5.8-6.2 ;

(4) 壮苗培养

快繁获得的百蕊草无根苗较纤细,以MS + 0.5-1.5mg/LNAA + 0.7% 琼脂 + 3% 蔗糖,pH调至5.8-6.2 的壮苗培养基作壮苗培养,培养温度为23-25℃、光照时间为12-16h/d、光照强度为2000-3000Lx;壮苗培养15天后,叶片增厚、增宽,茎干增粗,幼苗健壮,色泽正常,洗去附着茎基部附着培养基,摊凉3天即可作为原料提取百蕊草素。

2. 如权利要求1所述的一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,其中:采用愈伤组织途径建立无性系,为防止产生变异增殖7-8代后需重新诱导建立无性系。

一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法。

背景技术

[0002] 百蕊草(*Thesium Chinense Turcz*)为檀香科植物,全草入药,具清热解毒、补肾涩精作用,治急性乳腺炎、肺炎、肺脓疡、扁桃体炎、上呼吸道感染、肾虚腰痛、头晕遗精、滑精,为目前急缺的广谱抗菌中草药。百蕊草中百蕊草素含量较高,且容易分离提取,所以是较好的百蕊草素生产原材料。百蕊草为半寄生植物,离开寄主植物不能独立生存,近年来,随着寄主植物的逐渐减少,百蕊草产量逐年减少,因此收购价格不断上涨,现有的野生资源已难以满足市场的需求。

[0003] 研究表明,组织培养生产的百蕊草和野生百蕊草具有相同的药效,使用组培苗完全可以替代野生苗。所以规模化生产组培苗是解决资源匮乏的有效途径。虽然利用组织培养技术进行快速繁殖方面的研究,如:袁艺(激光生物学报,2002年)等人通过对百蕊草组织培养的培养基种类、激素配比、添加物汁液、碳源的研究,得出适合百蕊草侧芽分化生长的最佳培养基为MS + 6-BA 2.0mg / L + NAA 0.5mg / L + 狗牙根汁液。诱导愈伤组织以2,4-D 浓度在0.5mg / L-2mg / L 之间最佳。碳源以蔗糖,浓度3%最佳。生根实验表明:较低浓度的生长素不利于生根,最佳生根培养基为MS + 6-BA 0.5mg / L + NAA 2mg / L + 狗牙根汁液或MS + 6-BA 0.5mg / L + IBA 2mg / L + 狗牙根汁液;江芹等人得出丛生芽的诱导最佳培养基为MS + 6-BA 1.5mg/L + NAA 0.01 mg/L + 2,4-D 0.3 mg/L。最适继代培养基以MS + 6-BA (0.5—1.0 mg/L) + NAA 0.01 mg/L,组织培养程序无需添加其他寄主植物的提取液,60 ml/kg的生根水诱导试管苗生根效果最好。

[0004] 但还存在移栽成活率低下的问题,并且人工栽培组培苗和实生苗都存在需要寄主植物寄生,百蕊草产量低(每年亩产约5-7公斤),只能广种薄收,与粮争地的问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种具有增殖速度快,生产周期短,不受季节限制,连续生产等优势,不占用耕地,能实现规模化生产的百蕊草组培瓶苗的育苗方法。

[0006] 本发明的一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 外植体的获得

[0008] 取春季野生百蕊草植株幼嫩健壮枝条在自来水下冲洗干净,作表面消毒后,在无菌条件下将叶片表面划伤,剪成长度约为1cm小段;

[0009] (2) 愈伤组织的诱导及继代培养

[0010] 将剪切好的叶片接种于诱导愈伤组织培养基上,在温度为 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光照培养条件为1500-2000Lx 的条件下培养诱导,叶片周围迅速膨胀,诱导出愈伤组织,诱导率可达100%,所诱导的愈伤组织绝大多数为质地疏松的淡黄色或淡绿色愈伤组织;3 周后将诱导出的具有稳定形态特征和生长速率的愈伤组织转到新鲜培养基上继代培养,每2周继代一

次;

[0011] (3) 无根苗诱导及快速繁殖

[0012] 继代培养所获愈伤组织经光培养分化增殖至30d时,用MS固体培养基于温度23-25℃、光照时间12-16h/d、光照强度2000-3000Lx诱导培养15-20d后,可在愈伤组织表层或稍深层形成并分化出百蕊草无根苗;将诱导出的无根苗切成单苗,接种于增殖培养基于温度23-25℃、光照时间12-16h/d、光照强度2000-3000Lx进行增殖培养,经26天培养增殖系数为8.5;

[0013] (4) 壮苗培养

[0014] 快繁获得的百蕊草无根苗较纤细,需经壮苗培养基作壮苗培养,培养温度为23-25℃、光照时间为12-16h/d、光照强度为2000-3000Lx;壮苗培养15天后,叶片增厚、增宽,茎干增粗,幼苗健壮,色泽正常,洗去附着茎基部附着培养基,摊凉3天即可作为原料提取百蕊草素。

[0015] 上述的一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,其中:所述的诱导愈伤组织培养基的组成为:在常规的MS培养基中加入30g/L的蔗糖,0.7%的琼脂,2mg/L的谷氨酰胺,0.05-0.15mg/L的NAA,0.1-0.3mg/L的2,4-D,0.5-2.0mg/L的6-BA,10mg/L的AgNO₃,pH调为5.8-6.2;

[0016] 上述的一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,其中:所述MS固体培养基由0.5-1.5mg/L的NAA,0.5-1.5mg/L的6-BA。

[0017] 上述的一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,其中:增殖培养基以MS为基本培养基,附加0.8-1.7mg/L的NAA、0.4-1.0mg/L的6-BA,两种培养基均附加0.7%的琼脂,质量分数为3%的蔗糖,pH调至5.8-6.2。

[0018] 上述的一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,其中:所述壮苗培养基以MS为基本培养基,附加0.5-1.5mg/LNAA + 0.7%琼脂 + 3%蔗糖,pH调至5.8-6.2。

[0019] 本发明与现有技术相比,具有明显的有益效果,从以上技术方案可知:本发明以百蕊草叶片为外植体,建立诱导愈伤组织-诱导丛生芽-壮苗生长的快速繁殖技术体系。在壮苗培养期间,减掉细胞分裂素和2,4-D,降低奈乙酸的浓度,通过实验找到最佳的配方,起到能控制苗的生长长度,保证壮苗率的作用;百蕊草的生产是于室内完成,不受季节限制,不占用耕地,完全避免了继续生根培养以及移栽等工序,诱导时间短,工艺过程简单,易于操作,成本低,效果和效益高。具有生产周期短,增殖速度快效率高的优点,适合于大规模工业化生产。可在较短时间内获得大量百蕊草组培无根苗,用于百蕊草素的提取,解决百蕊草资源需求问题。本方法生产的百蕊草组培瓶苗百蕊草素含量为5.3%,而野生型全草百蕊草含量为4.4%,高出0.9%。故直接用作百蕊草素提取原料,可解决大田大面积种,一年一次收获的限制,缓解市场需求,解决了百蕊草资源紧缺的问题。

[0020] 以下通过具体实施方式来进一步说明本发明的有益效果。

具体实施方式

[0021] 一种百蕊草组培瓶苗的育苗方法,包括以下步骤:

[0022] (1) 外植体的获得

[0023] 取百蕊草幼嫩枝条在自来水下冲洗干净,接着用75%酒精表面消毒30-40s,再在

0.1% 升汞溶液中灭菌6-7min,用无菌水漂洗3-5 次,最后在无菌条件下将叶片剪成四周有伤口长约1cm的小段;

[0024] (2)愈伤组织的诱导及继代培养

[0025] 将剪切好的叶片接种于诱导愈伤组织培养基上,在温度为 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光照培养条件为1500-2000Lx 的条件下培养诱导,叶片周围迅速膨胀,诱导出愈伤组织,诱导率可达100%,所诱导的愈伤组织绝大多数为质地疏松的淡黄色或淡绿色愈伤组织。3 周后将诱导出的具有稳定形态特征和生长速率的愈伤组织转到新鲜培养基上继代培养,每2周继代一次;所述的诱导愈伤组织培养基的组成为:在常规的MS 培养基中加入30g/L 的蔗糖,0.7%的琼脂,2mg/L 的谷氨酰胺,0.05-0.15mg/L 的NAA,0.1-0.3mg/L的2,4-D,0.5-2.0mg/L的6-BA,10mg/L的 AgNO_3 ,pH 调为5.8-6.2;

[0026] 在诱导愈伤组织的步骤中,植物生长调节物质的种类和使用浓度是影响百蕊草愈伤组织诱导与分化频率的关键因素。2,4-D对百蕊草愈伤组织有强的诱导作用,以0.1-0.3mg/L的2,4-D诱导的出愈率较高,且生长状况好。0.05-0.15mg/L的NAA诱导的愈伤组织生长好,有光泽。培养基中6-BA的浓度为0.5-2.0mg/L时出愈率高,愈伤组织生长好。如果浓度过低,容易形成多核体阻止细胞分化,加速细胞衰老,逐渐死亡。高浓度的6-BA使细胞体积因强烈的分裂活动而急剧缩小,已形成的愈伤组织不能正常生长,逐渐褐化。

[0027] (3)无根苗诱导及快速繁殖

[0028] 继代培养所获愈伤组织经光培养分化增殖至30d时,用附加6-BA的MS固体培养基于温度 $23-25^{\circ}\text{C}$ 、光照时间12-16h/d、光照强度2000-3000Lx

[0029] 诱导15-20d后,可在愈伤组织表层或稍深层形成并分化出百蕊草无根苗。将诱导出的无根苗切成单苗,接种于增殖培养基于温度 $23-25^{\circ}\text{C}$ 、光照时间12-16h/d、光照强度2000-3000Lx进行增殖培养,经26天培养增殖系数为8.5。所述MS固体培养基由0.5-1.5mg/L的NAA,0.5-1.5mg/L的6-BA;增殖培养基以MS为基本培养基,附加0.8-1.7mg/L的NAA、0.4-1.0mg/L的6-BA,两种培养基均附加0.7% 的琼脂,质量分数为3% 的蔗糖,pH调至5.8-6.2 。

[0030] 为避免激素累积造成的负面影响,采取逐代降低培养基中激素浓度的办法,尤其在百蕊草无根苗大规模快繁阶段,酌情不加或者少加激素,能有效防止百蕊草无根苗的异常生长,增加有效苗数量。本发明是采用愈伤组织途径建立无性系,为防止产生变异增殖7-8代后需重新诱导建立无性系。

[0031] (4)壮苗培养

[0032] 快繁获得的百蕊草无根苗较纤细,以MS + 0.5-1.5mg/LNAA + 0.7% 琼脂 + 3% 蔗糖,pH调至5.8-6.2 的壮苗培养基作壮苗培养,培养温度为 $23-25^{\circ}\text{C}$ 、光照时间为12-16h/d、光照强度为2000-3000Lx。壮苗培养15天后,叶片增厚、增宽,茎干增粗,幼苗健壮,色泽正常,洗去附着茎基部附着培养基,摊凉3天即可作为原料提取百蕊草素。

[0033] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,任何未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围。