



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104782499 B

(45)授权公告日 2017.03.29

(21)申请号 201510234281.1

审查员 姜岚

(22)申请日 2015.05.11

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104782499 A

(43)申请公布日 2015.07.22

(73)专利权人 南阳师范学院

地址 473061 河南省南阳市卧龙区卧龙路  
1638号

(72)发明人 陈吉宝 曹苑楠 张明琴 李玉英

(74)专利代理机构 北京国坤专利代理事务所

(普通合伙) 11491

代理人 姜彦

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

(54)发明名称

一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法

(57)摘要

本发明公开了一种香根草无菌芽培养基、香根草无菌芽增殖培养基和利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法,属于植物种植方法技术领域。本发明通过改进外植体选取部位、外植体消毒措施、无菌芽培养基配方,降低了污染率,提高了无菌腋芽发生率,将发生率从现有技术的72.9%提高到85%,芽健壮,缩短了腋芽发生时间,从现有技术最短的20天,缩短到15天;通过改进增殖培养基配方,降低了污染率,提高了芽增殖率,将芽增殖率从现有技术的1:11.7提高到1:45;通过增加后期移栽管理,提高了幼苗的成活率,成活率可以到达98.7%。

1. 一种香根草无菌腋芽培养基,其特征在于,培养基配方包括:

1×MS 营养元素

蔗糖 30000mg/L

琼脂 7000mg/L

6-苄氨基嘌呤 3.0mg/L

萘乙酸 0.2mg/L

青霉素 50mg/L

多菌灵 60mg/L

pH为6.0。

2. 一种香根草无菌腋芽增殖培养基,其特征在于,增殖培养基配方包括:

1×MS 营养元素

蔗糖 30000mg/L

琼脂 7000mg/L

6-苄氨基嘌呤 2.0mg/L

2,4-二氯苯氧乙酸 0.5mg/L

青霉素 50mg/L

多菌灵 60mg/L

pH为6.0。

3. 一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一:选择外植体:从生长健壮、无病虫害的香根草基部剪取具6个以上茎节的茎,放入蒸馏水中,取具4~5个茎节的茎段并修剪;

步骤二:外植体消毒:取所述步骤一得到的修剪后茎段,放入去污液并浸泡,后进行流水清洗,用酒精浸没茎段消毒,再用升汞溶液对茎段消毒,最后用无菌水冲洗,晾干,剪取并得到带完整腋芽的茎节;

步骤三:无菌腋芽培养:取权利要求1所述的香根草无菌腋芽培养基,进行灭菌处理后分装到无菌组培瓶内备用;取步骤二得到的带完整腋芽的茎节消毒后晾干,接种到无菌芽培养基上,培养并得到无菌芽;

步骤四:无菌腋芽增殖:取权利要求2所述的香根草无菌腋芽增殖培养基进行灭菌处理,取出所述步骤三培养的无菌腋芽,将无菌芽从茎节处切下,接种在无菌腋芽增殖培养基上并培养,得到丛生不定芽;

步骤五:不定芽生根:在超净工作台内将增殖的无菌丛芽从组培瓶中取出,将新芽从丛芽分离出来,接种在下述芽生根培养基上:

1×MS 营养元素

蔗糖 30g/L

琼脂 7g/L

IBA 0.2mg/L

用5mol/L的氢氧化钠调pH=5~6,高温湿热灭菌20~30分钟,后冷却至50℃时,

分装到无菌组配瓶内,自然冷却凝固后备用;温室下培养,并得到幼苗;

步骤六:幼苗移栽:A配置幼苗生长营养土:按照田土:细沙:花土=1:1:1的比例配置营

养土,分装到营养钵内;B炼苗:将所述步骤五得到的生根的幼苗从组培瓶内移栽到营养钵内,浇灌,培养1周;C生长培养:将锻炼1周的幼苗,改变光暗度和空气相对湿度培养60天,进行大田移栽;D大田移栽:穴深30cm,穴直径30cm,移栽前每穴底部铺施营养土0.1方,将C所得幼苗移栽至穴内,每穴浇水1.5L,用田土覆盖表面,2周后再浇一次水,既得到香根草移栽苗。

4.如权利要求3所述的一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法,其特征在于,包括如下步骤:

所述步骤二中外植体消毒:去污液浸泡时间为1~3h,流水清洗时间为1~3h,在超净工作台内或无菌室内将具4-5个茎节的茎段放在无菌托盘内,用75%酒精浸没茎段消毒30s后,再用0.6%升汞溶液浸没茎段消毒10min,最后用无菌水冲洗3-4次;晾干无菌茎段,剪取茎节上下1.5cm处,得到带完整腋芽的茎节;

所述步骤三中无菌腋芽培养:取权利要求1所述的香根草无菌芽培养基,进行灭菌处理后分装到无菌组培瓶内,自然冷却凝固后备用;取所述步骤二得到的带完整腋芽的茎节消毒后晾干,向下接种无菌芽培养基上,16/8光暗交替25℃培养15-20天后,腋芽的叶片将全部展开,进行光合作用,得到无菌芽;

所述步骤四中无菌腋芽增殖:取权利要求2所述的香根草无菌芽增殖培养基进行灭菌处理,取出所述步骤三培养的无菌芽,用无菌手术刀将无菌芽从茎节处切下,接种在无菌芽增殖培养基上并培养,16/8光暗交替25℃培养30-40天,生成丛生不定芽;

所述步骤五中不定芽生根:在超净工作台内将增殖的无菌丛芽从组培瓶中取出,用无菌镊子将每个新芽从丛芽分离出来,接种在所述芽生根培养基上;

用5mol/L的氢氧化钠调pH=5.6~5.7,121℃高温湿热灭菌20分钟,灭菌结束后在超净台内待培养基自然冷却至50℃时,分装到无菌组配瓶内,自然冷却凝固后备用;温室下培养,16/8光暗交替25℃培养20天,得到生根的幼苗;

步骤六:幼苗移栽:所述A中的营养钵体积为250mL;所述B炼苗:用自来水浇灌,在16/8光暗交替、空气相对湿度控制在70%、25℃培养1周;所述C生长培养:在16/8光暗交替、空气相对湿度控制在50%、25℃培养60天。

5.如权利要求3所述的一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法,其特征在于,所述去污液为1%洗衣粉的蒸馏水。

## 一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物种植方法技术领域,提供一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法。

### 背景技术

[0002] 香根草(*Vetiveria zizanioides* L.),又名培地茅、岩兰草,是一种禾本科多年丛生的草本植物,原产于印度等国,现主要分布于东南亚、印度和非洲等(亚)热带地区,我国主要分布在广东、云南等地。香根草极难结实或不结实,主要靠分蘖繁殖,即每年春季,上年留在田里的香根草根部分会萌发新的分蘖,一般情况下,每兜香根草根部分在春季可增生40株左右的分蘖。理论上讲,每个分蘖都可以长成独立的具有6-10节的茎,实际上,只有较大分蘖(平均有15株分蘖/兜)形成的茎节数可达6-10节。

[0003] 香根草具有适应能力强,生长繁殖快,根系发达,耐旱耐瘠等特性,在水土保持,改良生态环境、经济开发利用中有重要的应用,受到国内外的广泛重视并得到迅速的推广。目前国内对香根草的需求较大,种苗供不应求,而导致种苗缺乏的主要原因是繁殖速度过慢。

[0004] 目前生产上香根草种苗繁殖方式主要通过分离这种新生分蘖苗获得。由于香根草移植过程有一定的死亡率,为了提高香根草移植成活率,根据现有的文献报道和我们的实践经验,应以10株分蘖/穴移栽,成活最高可达95%以上。因此,按照这种方式移栽,香根草繁殖系数只有1:4,即一亩香根草苗圃,最多可移栽4-5亩,而且每年只能移栽一次。因此香根草种苗繁殖系数低,是限制香根草进一步开发利用的主要问题。

[0005] 为解决该问题,国外的一些研究者正通过组织培养技术来快速繁殖香根草,为香根草的大规模工厂化生产奠定了基础。其方法有二,一是应用香根草外植体(花序组织、叶鞘、茎段、蘖节等组织)诱导愈伤组织,然后分化出再生出新苗。一些研究者应用该方法已经在实验室获得完整香根草幼苗。其生产程序是,先选择外植体,在诱导愈伤组织细胞,在让愈伤组织细胞生芽,再让生芽的愈伤组织细胞生根,最后形成一个完整的植株。

[0006] 第二个方法是直接利用香根草外植体(如叶鞘、茎段、蘖节等),通过体细胞发育形成完整植株。其生产程序是,先选择外植体,然后让外植体直接形成无菌芽,接着通过改变培养基使无菌芽增殖,再让生芽外植体生根,最后通过形成一个完整的植株。2005年,上海市农业科学院作物育种栽培研究所的殷丽清等(2005)和广东省东莞市生物技术研究所的郑贵朝等(2005)应用该方法将腋芽(蘖节处着生)成功获得完整植株。殷丽清方法,用70%酒精消毒30s后,再用0.1%升汞溶液消毒15min,无菌水冲洗4-6次,将材料接种在MS加6-BA4.0mg/L的培养基上,30天后无菌芽发生率(=无菌芽数/腋芽)为72.9%;将无菌芽接种在MS+BA2.0mg/L+NAA0.2mg/L的芽增殖培养上基培养,25天后每个无菌芽的增殖系数(=新增殖芽数/无菌芽)是1:11.7;将新生芽接种在MS+IBA 0.2mg/L+NAA 0.2mg/L的培养基上,20d后新生芽生根率(=生根苗数/新芽)达99.1%。郑贵朝方法,用75%酒精消毒30s后,再用0.1%升汞溶液消毒12min,无菌水冲洗3-4次,将材料接种在MS加BA 2.0mg/L的培养基上,20天后无菌芽发生率为60%;将无菌芽接种在MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.2mg/L作为生芽

增殖培养基培养时,每个腋芽的增殖系数是1:5.4;将新生芽接MS加NAA 0.2mg/L和IBA 0.5mg/L的生根培养基上,25天后生根率为100%。

[0007] 目前,现有利用组织培养技术来快速繁殖香根草的方法虽然得到移动程度上的应用,但是仍然存在如下缺点:

[0008] 1、应用分蘖苗移栽来繁殖香根草,其繁殖系数只有1:4,存在繁殖系数低,而且每年只能移栽一次。

[0009] 2、应用香根草外植体诱导愈伤组织分化新苗的翻来来提高繁殖系数,存在技术难度大,愈伤组织细胞诱导困难、生芽率低、杂菌污染难以控制等问题,因此不适合大范围推广应用。

[0010] 3、殷丽清和郑贵朝直接利用香根草腋芽通过体细胞发育形成完整植株的方法,显著提高了芽的繁殖系数。但是,存在以下需要改进的地方:1)没有说明腋芽选取的部位,因为不同茎节位的腋芽形成无菌芽的发生率不同,太嫩的腋芽在升汞处理下会失绿死亡,影响无菌芽发生率;2)我们应用殷丽清和郑贵朝的方法对无菌芽消毒出处理,发现污染率在80%以上,且展芽慢,因此有必要优化该技术环节;3)无菌芽增殖系数偏低,有待提高。

## 发明内容

[0011] 本发明的主要目的之一在于提高香根草繁殖系数,提高无菌芽发生率和增殖系数,提供了一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法。

[0012] 为达到上述目的,采用的技术方案为:

[0013] 一种香根草无菌腋芽培养基,培养基配方包括:

[0014] 1×MS营养元素

蔗糖 30000mg/L

琼脂 7000mg/L

6-苄氨基嘌呤 6-BA 2.0~5.0mg/L

[0015] 萘乙酸 NAA 0.2~0.5mg/L

青霉素 40~60mg/L

多菌灵 50~70mg/L

pH 5~6。

[0016] 优选的,一种香根草无菌腋芽培养基,培养基配方包括:

[0017] 1×MS营养元素

蔗糖 30000mg/L

琼脂 7000mg/L

6-苄氨基嘌呤 6-BA 3.0mg/L

[0018] 萘乙酸 NAA 0.2mg/L

青霉素 50mg/L

多菌灵 60mg/L

pH 5.6~5.7。

[0019] 一种香根草无菌腋芽增殖培养基,增殖培养基配方包括:

[0020] 1×MS营养元素

蔗糖	30000mg/L
琼脂	7000mg/L
6-苄氨基嘌呤 6-BA	2.0~3.0mg/L

[0021] 2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D 0.4~1.0mg/L

青霉素	40~60mg/L
多菌灵	50~70mg/L
pH	5~6。

[0022] 优选的,一种香根草无菌腋芽增殖培养基,增殖培养基配方包括:

[0023] 1×MS营养元素

蔗糖	30000mg/L
琼脂	7000mg/L
6-苄氨基嘌呤 6-BA	2.0mg/L

[0024] 2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D 0.5 mg/L

青霉素	50mg/L
多菌灵	60mg/L
pH	5.6~5.7。

[0025] 一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法,包括如下步骤:

[0026] 步骤一:选择外植体:从生长健壮、无病虫害的香根草基部剪取具6个以上茎节的茎,放入蒸馏水中,取具4~5个茎节的茎段并修剪;

[0027] 步骤二:外植体消毒:取所述步骤一得到的修剪后茎段,放入去污液即1%洗衣粉的蒸馏水中并浸泡。后进行流水清洗,用酒精浸没茎段消毒,再用升汞溶液对茎段消,最后用无菌水冲洗,晾干,剪取并得到带完整腋芽的茎节;

[0028] 步骤三:无菌腋芽培养:取权利要求1所述的香根草无菌腋芽培养基,进行灭菌处理后分装到无菌组培瓶内备用;取步骤二得到的带完整腋芽的茎节消毒后晾干,接种到无菌芽培养基上,培养并得到无菌芽;

[0029] 步骤四:无菌腋芽增殖:取权利要求3所述的香根草无菌腋芽增殖培养基进行灭菌处理,取出所述步骤三培养的无菌腋芽,将无菌芽从茎节处切下,接种在无菌腋芽增殖培养基上并培养,得到丛生不定芽;

[0030] 步骤五:不定芽生根:在超净工作台内将增殖的无菌丛芽从组培瓶中取出,将新芽从丛芽分离出来,接种在下述芽生根培养基上:

[0031] 1×MS营养元素

[0032] 蔗糖 30g/L

[0033] 琼脂 7g/L

[0034] IBA 0.2mg/L

[0035] 用5mol/L的氢氧化钠调pH=5~6,高温湿热灭菌20~30分钟,后冷却至50℃时,分

装无菌组配瓶内,自然冷却凝固后备用;温室下培养,并得到幼苗;

[0036] 步骤六:幼苗移栽:A配置幼苗生长营养土:按照田土:细沙:花土=1:1:1的比例配置营养土,分装到营养钵内;B炼苗:将所述步骤五得到的生根的幼苗从组培瓶内移栽到营养钵内,浇灌,培养1周;C生长培养:将锻炼1周的幼苗,改变光暗度和空气相对湿度培养60天,进行大田移栽;D大田移栽:穴深30cm,穴直径30cm,移栽前每穴底部铺施营养土0.1方,将C所得幼苗移栽至穴内,每穴浇水1.5L,用田土覆盖表面,2周后再浇一次水,既得到香根草移栽苗。

[0037] 优选的,一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法,包括如下步骤:

[0038] 步骤一:选择外植体:从生长健壮、无病虫害的香根草基部剪取具6个以上茎节的茎,放入蒸馏水中,取具4~5个茎节的茎段并修剪;

[0039] 步骤二:外植体消毒:取所述步骤一得到的修剪后具4~5个茎节的茎段,放入去污液并浸泡1~3h,后进行流水清洗1~3h,在超净工作台内或无菌室内将具4~5个茎节的茎段放在无菌托盘内,用75%酒精浸没茎段消毒30s后,再用0.6%升汞溶液浸没茎段消毒10min,最后用无菌水冲洗3~4次;晾干无菌茎段,剪取茎节上下1.5cm处,得到带完整腋芽的茎节;

[0040] 步骤三:无菌腋芽培养:取权利要求1所述的香根草无菌芽培养基,进行灭菌处理后分装到无菌组培瓶内,自然冷却凝固后备用;取步骤二得到的带完整腋芽的茎节消毒后晾干,向下接种无菌芽培养基上,16/18光暗交替25℃培养15~20天后,腋芽的叶片将全部展开,进行光合作用,得到无菌芽;

[0041] 步骤四:无菌腋芽增殖:取权利要求3所述的香根草无菌芽增殖培养基进行灭菌处理,取出步骤三培养的无菌芽,用无菌手术刀将无菌芽从茎节处切下,接种在无菌芽增殖培养基上并培养,16/18光暗交替25℃培养30~40天,1个无菌腋芽可以增殖形成由32个高约6cm左右新芽组成的丛生不定芽;

[0042] 步骤五:不定芽生根:在超净工作台内将增殖的无菌丛芽从组培瓶中取出,用无菌镊子将每个新芽从丛芽分离出来,接种在下述芽生根培养基上:

[0043] 1×MS营养元素

[0044] 蔗糖 30g/L

[0045] 琼脂 7g/L

[0046] IBA 0.2mg/L

[0047] 用5mol/L的氢氧化钠调pH=5.7±0.1,121℃高温湿热灭菌20分钟,灭菌结束后在超净台内待培养基自然冷却至50℃时,分装到无菌组配瓶内,每瓶分装50mL培养基,自然冷却凝固后备用;温室下培养,16/18光暗交替25℃培养20天左右,每个芽基部可形成4~8条2cm长的根,生根率达96%;

[0048] 步骤六:幼苗移栽:A配置幼苗生长营养土:按照田土:细沙:花土=1:1:1的比例配置营养土,分装到250mL的营养钵内;B炼苗:将生根的幼苗从组培瓶内移栽到营养钵内,用自来水浇灌,在16/18光暗交替、空气相对湿度控制在70%左右、25℃培养1周;C生长培养:将锻炼1周的幼苗,在16/18光暗交替、空气相对湿度控制在50%左右、25℃培养60天,进行大田移栽;D大田移栽:穴深30cm,穴直径30cm,移栽前每穴底部铺施营养土0.1方,按照常规移栽技术将C所得幼苗移栽至穴内,每穴浇水1.5L,用田土覆盖表面,2周后再浇一次水,既

得到香根草移栽苗。

[0049] 一种利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的方法：

[0050] 1、选择外植体

[0051] 从生长健壮、无病虫害的香根草苗圃选择具6个以上茎节的茎，用剪刀从基部（靠近根部）剪取，立即将基部放入装有蒸馏水的烧杯中。在室内剪掉茎的上部，留下具4-5个茎节的茎段（约1米长），剥去叶鞘，露出并保留腋芽，每茎节着生一个腋芽。

[0052] 2、外植体消毒

[0053] 1) 将具4-5个茎节的茎段放在大托盘内，加入适量去污液（含1%洗衣粉的蒸馏水）浸没茎段，浸泡2小时；2) 然后倒掉去污液，用自来水流水冲洗2小时；3) 接着在超净工作台内或无菌室内，将具4-5个茎节的茎段放在无菌托盘内，用75%酒精浸没茎段消毒30s后，再用0.6%升汞溶液浸没茎段消毒10min，最后用无菌水冲洗3-4次；4) 让无菌茎段在超净台内或无菌室内晾干，用剪刀从茎节上下1.5cm处剪短，留下带完整腋芽的茎节作为下一步培养的不菌外植体。

[0054] 3、不菌腋芽培养

[0055] 1) 配置展芽培养基：培养基配方为1×MS营养元素+3%蔗糖+7g/L琼脂+3.0mg/L的6-BA+0.2mg/L的NAA，用5mol/L的氢氧化钠调pH=5.7±0.1，121℃高温湿热灭菌20分钟。灭菌结束后在超净台内待培养基自然冷却至50℃时，加入青霉素50mg/L和多菌灵60mg/L，混匀后分装在不菌组配瓶内，每瓶分装50mL培养基，自然冷却凝固后备用。2) 接种：将消毒后晾干的腋芽基部向下接种在展芽培养基上。3) 培养：温室内，16/18光暗交替25℃培养15-20天后，腋芽的叶片将全部展开，适宜进行光合作用，展芽率可达83%。

[0056] 4、不菌腋芽增殖

[0057] 1) 配置芽增殖培养基：培养基配方为1×MS营养元素+3%蔗糖+7g/L琼脂+2.0mg/L的6-BA+0.5mg/L的2,4-D，用5mol/L的氢氧化钠调pH=5.7±0.1，121℃高温湿热灭菌20分钟。灭菌结束后在超净台内待培养基自然冷却至50℃时，加入青霉素50mg/L和多菌灵60mg/L，混匀后分装在不菌组配瓶内，每瓶分装50mL培养基，自然冷却凝固后备用。2) 接种：在超净工作台内将培养的不菌芽从组培瓶中取出，用不菌手术刀将芽从茎节处切下，接种在芽增殖培养基上。3) 培养：温室内，16/18光暗交替25℃培养30-40天后，1个不菌腋芽可以增殖形成由32个高约6cm左右新生不定芽组成的丛芽。

[0058] 5、不定芽生根

[0059] 1) 配置芽生根培养基：培养基配方为1×MS营养元素+3%蔗糖+7g/L琼脂+0.2mg/L的IBA，用5mol/L的氢氧化钠调pH=5.7±0.1，121℃高温湿热灭菌20分钟。灭菌结束后在超净台内待培养基自然冷却至50℃时，分装在不菌组配瓶内，每瓶分装50mL培养基，自然冷却凝固后备用。2) 接种：在超净工作台内将增殖的不菌丛芽从组培瓶中取出，用不菌镊子将每个新芽从丛芽分离出来，接种在芽生根培养基上。3) 培养：温室内，16/18光暗交替25℃培养20天左右，每个芽基部可形成4-8条2cm长的根，生根率达96%。

[0060] 6、幼苗移栽

[0061] 1) 配置幼苗生长营养土：按照田土：细沙：花土=1:1:1的比例配置营养土，分装到250mL的营养钵内。2) 炼苗：将生根的幼苗从组培瓶内移栽到营养钵内，用自来水浇灌，在16/18光暗交替、空气相对湿度控制在70%左右、25℃培养1周。3) 生长培养：将锻炼1周的幼



苗,在16/18光暗交替、空气相对湿度控制在50%左右、25℃培养60天。此时幼苗可以生长至25-30cm高、新生10-15条根,根长平均为15cm,可以进行大田移栽。4) 大田移栽:穴深30cm,穴直径30cm,移栽前每穴底部铺施营养土0.1方,按照常规移栽技术将3) 所得幼苗移栽至穴内,每穴浇水1.5L,用田土覆盖表面,2周后再浇一次水,以后不用浇水,自然生长,移植成活率为98.7%。

[0062] 本发明的有益效果是:

[0063] 1、通过改进外植体选取部位、外植体消毒措施、无菌芽培养基配方,降低了污染率,提高了无菌腋芽发生率,将发生率从现有技术的72.9%提高到83%,芽健壮,缩短了腋芽发生时间,从现有技术最短的20天,缩短到15天。

[0064] 2、通过改进增殖培养基配方,降低了污染率,提高了芽增殖率,将芽增殖率从现有技术的1:11.7提高到1:32。

[0065] 3、通过增加后期移栽管理,提高了幼苗的成活率,成活率可以到达98.7%。

[0066] 4、按照本技术体系,香根草的繁殖系数=较大茎数/兜×茎节数/茎×无菌芽发生率×增殖系数×生根率×移植成活率=10(按平均数计)×4(按平均数计)×83%×32×96%×98.7%=1006.4,即只需1亩香根草种苗圃就可以满足982亩香根草种植种苗的需求,其繁殖系数比传统的分蘖繁殖法提高 $1006.4/4=251$ 倍。

### 具体实施方式

[0067] 下文将结合实施例详细描述本发明。应当注意的是,下述实施例中描述的技术特征或者技术特征的组合不应当被认为是孤立的,它们可以被相互组合从而达到更好的技术效果。

[0068] 实施例1香根草无菌腋芽生长培养基

[0069] 培养基配方包括:

[0070] 1×MS营养元素

蔗糖	30000mg/L
琼脂	7000mg/L
6-苄氨基嘌呤 6-BA	3.0mg/L
[0071] 萘乙酸 NAA	0.2mg/L
青霉素	50mg/L
多菌灵	60mg/L
pH	5.6。

[0072] 实施例2香根草无菌腋芽生长培养基

[0073] 培养基配方包括:

[0074] 1×MS营养元素

[0075] 蔗糖 30000mg/L

	琼脂	7000mg/L
	6-苄氨基嘌呤 6-BA	3.0mg/L
[0076]	萘乙酸 NAA	0.2mg/L
	青霉素	50mg/L
	多菌灵	60mg/L
	pH	5.8。
[0077]	实施例3香根草无菌腋芽生长培养基	
[0078]	培养基配方包括：	
[0079]	1×MS营养元素	
	蔗糖	30000mg/L
	琼脂	7000mg/L
	6-苄氨基嘌呤 6-BA	3.0mg/L
[0080]	萘乙酸 NAA	0.2mg/L
	青霉素	50mg/L
	多菌灵	60mg/L
	pH	5.7。
[0081]	实施例4一种香根草无菌腋芽培养基	
[0082]	培养基配方包括：	
[0083]	1×MS营养元素	
	蔗糖	30000mg/L
	琼脂	7000mg/L
	6-苄氨基嘌呤 6-BA	2.0mg/L
[0084]	萘乙酸 NAA	0.2mg/L
	青霉素	40mg/L
	多菌灵	50mg/L
	pH	5。
[0085]	实施例5一种香根草无菌腋芽培养基	
[0086]	培养基配方包括：	
[0087]	1×MS营养元素	
	蔗糖	30000mg/L
	琼脂	7000mg/L
[0088]	6-苄氨基嘌呤 6-BA	5.0mg/L
	萘乙酸 NAA	0.5mg/L
	青霉素	60mg/L

- |        |                               |           |
|--------|-------------------------------|-----------|
| [0089] | 多菌灵                           | 70mg/L    |
|        | pH                            | 6。        |
| [0090] | 实施例6一种香根草无菌腋芽增殖培养基,增殖培养基配方包括: |           |
| [0091] | 1×MS营养元素                      |           |
|        | 蔗糖                            | 30000mg/L |
|        | 琼脂                            | 7000mg/L  |
|        | 6-苄氨基嘌呤 6-BA                  | 2.0mg/L   |
| [0092] | 2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D              | 0.4mg/L   |
|        | 青霉素                           | 40mg/L    |
|        | 多菌灵                           | 50mg/L    |
|        | pH                            | 5。        |
| [0093] | 实施例7一种香根草无菌腋芽增殖培养基,增殖培养基配方包括: |           |
| [0094] | 1×MS营养元素                      |           |
|        | 蔗糖                            | 30000mg/L |
|        | 琼脂                            | 7000mg/L  |
|        | 6-苄氨基嘌呤 6-BA                  | 3.0mg/L   |
| [0095] | 2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D              | 1.0mg/L   |
|        | 青霉素                           | 60mg/L    |
|        | 多菌灵                           | 70mg/L    |
|        | pH                            | 6。        |
| [0096] | 实施例8一种香根草无菌腋芽增殖培养基,增殖培养基配方包括: |           |
| [0097] | 1×MS营养元素                      |           |
|        | 蔗糖                            | 30000mg/L |
|        | 琼脂                            | 7000mg/L  |
|        | 6-苄氨基嘌呤 6-BA                  | 2.0mg/L   |
| [0098] | 2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D              | 0.5 mg/L  |
|        | 青霉素                           | 50mg/L    |
|        | 多菌灵                           | 60mg/L    |
|        | pH                            | 5.6。      |
| [0099] | 实施例9一种香根草无菌腋芽增殖培养基,增殖培养基配方包括: |           |
| [0100] | 1×MS营养元素                      |           |
| [0101] | 蔗糖                            | 30000mg/L |
|        | 琼脂                            | 7000mg/L  |

	6-苄氨基嘌呤 6-BA	2.0mg/L
	2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D	0.5 mg/L
[0102]	青霉素	50mg/L
	多菌灵	60mg/L
	pH	5.7。

[0103] 实施例10一种香根草无菌腋芽增殖培养基,增殖培养基配方包括:

[0104] 1×MS营养元素

蔗糖 30000mg/L

琼脂 7000mg/L

6-苄氨基嘌呤 6-BA 2.0mg/L

[0105] 2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D 0.5 mg/L

青霉素 50mg/L

多菌灵 60mg/L

pH 5.8。

[0106] 实施例11利用腋芽繁殖香根草种苗

[0107] 1、选择外植体

[0108] 从生长健壮、无病虫害的香根草苗圃选择具6个以上茎节的茎,用剪刀从基部(靠近根部)剪取,立即将基部放入装有蒸馏水的烧杯中。在室内剪掉茎的上部,留下具4-5个茎节的茎段(约1米长),剥去叶鞘,露出并保留腋芽,每茎节着生一个腋芽。

[0109] 2、外植体消毒

[0110] 1) 将具4-5个茎节的茎段放在大托盘内,加入适量去污液(含1%洗衣粉的蒸馏水)浸没茎段,浸泡2小时;2) 然后倒掉去污液,用自来水流水冲洗2小时;3) 接着在超净工作台内或无菌室内,将具4-5个茎节的茎段放在无菌托盘内,用75%酒精浸没茎段消毒30s后,再用0.6%升汞溶液浸没茎段消毒10min,最后用无菌水冲洗3-4次;4) 让无菌茎段在超净台内或无菌室内晾干,用剪刀从茎节上下1.5cm处剪短,留下带完整腋芽的茎节作为下一步培养的无菌外植体。

[0111] 3、无菌芽培养

[0112] 1) 配置展芽培养基:培养基配方为1×MS营养元素+3%蔗糖+7g/L琼脂+3.0mg/L的6-BA+0.2mg/L的NAA,用5mol/L的氢氧化钠调pH=5.7±0.1,121℃高温湿热灭菌20分钟。灭菌结束后在超净台内待培养基自然冷却至50℃时,加入青霉素50mg/L和多菌灵60mg/L,混匀后分装在无菌组配瓶内,每瓶分装50mL培养基,自然冷却凝固后备用。2) 接种:将消毒后晾干的腋芽基部向下接种在展芽培养基上。3) 培养:温室内,16/18光暗交替25℃培养15-20天后,腋芽的叶片将全部展开,适宜进行光合作用,展芽率可达83%。

[0113] 4、无菌芽增殖

[0114] 1) 配置芽增殖培养基:培养基配方为1×MS营养元素+3%蔗糖+7g/L琼脂+2.0mg/L的6-BA+0.5mg/L的2,4-D,用5mol/L的氢氧化钠调pH=5.7±0.1,121℃高温湿热灭菌20分钟。灭菌结束后在超净台内待培养基自然冷却至50℃时,加入青霉素50mg/L和多菌灵60mg/L

L,混匀后分装在全菌组配瓶内,每瓶分装50mL培养基,自然冷却凝固后备用。2) 接种:在超净工作台内将培养的无茵芽从组培瓶中取出,用无茵手术刀将芽从茎节处切下,接种在芽增殖培养基上。3) 培养:温室内,16/18光暗交替25℃培养30-40天后,1个无茵腋芽可以增殖形成由32个高约6cm左右新生不定芽组成的丛芽。

#### [0115] 5、不定芽生根

[0116] 1) 配置芽生根培养基:培养基配方为1×MS营养元素+3%蔗糖+7g/L琼脂+0.2mg/L的IBA,用5mol/L的氢氧化钠调pH=5.7±0.1,121℃高温湿热灭菌20分钟。灭菌结束后在超净台内待培养基自然冷却至50℃时,分装在全菌组配瓶内,每瓶分装50mL培养基,自然冷却凝固后备用。2) 接种:在超净工作台内将增殖的无茵丛芽从组培瓶中取出,用无茵镊子将每个新芽从丛芽分离出来,接种在芽生根培养基上。3) 培养:温室内,16/18光暗交替25℃培养20天左右,每个芽基部可形成4-8条2cm长的根,生根率达96%。

#### [0117] 6、幼苗移栽

[0118] 1) 配置幼苗生长营养土:按照田土:细沙:花土=1:1:1的比例配置营养土,分装到250mL的营养钵内。2) 炼苗:将生根的幼苗从组培瓶内移栽到营养钵内,用自来水浇灌,在16/18光暗交替、空气相对湿度控制在70%左右、25℃培养1周。3) 生长培养:将锻炼1周的幼苗,在16/18光暗交替、空气相对湿度控制在50%左右、25℃培养60天。此时幼苗可以生长至25-30cm高、新生10-15条根,根长平均为15cm,可以进行大田移栽。4) 大田移栽:穴深30cm,穴直径30cm,移栽前每穴底部铺施营养土0.1方,按照常规移栽技术将3)所得幼苗移栽至穴内,每穴浇水1.5L,用田土覆盖表面,2周后再浇一次水,以后不用浇水,自然生长,移植成活率为98.7%。

#### [0119] 实施例12利用茎节腋芽繁殖香根草种苗的各因素的研究分析

[0120] 1、上述实施例11中的步骤2中外植体消毒的过程中,用升汞溶液对茎段进行消毒,其中不同浓度的升汞溶液以及不同的消毒时间,都会对消毒所取得的效果有一定的影响,如下表1所示为不同浓度升汞处理茎节对腋芽发生率的影响。

[0121] 表1 不同浓度升汞处理茎节对腋芽发生率的影响

[0122]

升汞	浸泡时间	真菌污染率(累计)			细菌污染率(累计)			展芽率(含污染芽)			无茵腋芽发生率
		第5天	第10天	第15天	第5天	第10天	第15天	第5天	第10天	第15天	第15天
0.10%	10分钟	6.7%	40.0%	93.3%	0.0%	3.3%	16.7%	0.0%	50.0%	90.0%	3.3%
	20分钟	0.0%	53.3%	80.0%	0.0%	0.0%	6.7%	0.0%	40.0%	70.0%	10.0%
	30分钟	0.0%	36.7%	76.7%	0.0%	3.3%	6.7%	0.0%	40.0%	76.7%	6.7%
0.60%	5分钟	0.0%	16.7%	26.7%	0.0%	0.0%	6.7%	36.7%	56.7%	90.0%	46.7%
	10分钟	0.0%	0.0%	16.7%	0.0%	0.0%	0.0%	40.0%	56.7%	93.3%	60.0%

[0123]

	15分钟	0.0%	6.7%	20.0%	0.0%	0.0%	10.0%	0.0%	13.3%	76.7%	50.0%
1%	3分钟	0.0%	3.3%	10.0%	0.0%	0.0%	23.3%	0.0%	3.3%	50.0%	20.0%
	5分钟	3.3%	13.3%	16.7%	0.0%	0.0%	3.3%	10.0%	33.3%	33.3%	26.7%
	10分钟	0.0%	10.0%	13.3%	0.0%	0.0%	10.0%	0.0%	6.7%	10.0%	10.0%

[0124] 由表1可知,当升汞溶液的浓度在0.10%~1%范围内,随着浓度的增加,真菌污染率逐渐下降;随着浓度的增加细菌污染率先降低后增加,当浓度为0.60%时,细菌污染率最低,达到0.0%;随着浓度的增加展芽率逐渐降低,当浓度为0.60%时,腋芽的展芽率最高,展芽率达到93.3%;随着浓度的增加无菌腋芽发生率呈现先增加后降低的趋势,当浓度为0.60%时,无菌腋芽发生率达到60.0%。综上所述,当升汞溶液为0.60%时,腋芽发生率最高,消毒效果最好。

[0125] 2、0.6%升汞处理茎节后在1×MS培养基中添加不同浓度多菌灵对腋芽发生率的影响

[0126] 表2为不同浓度下多菌灵对腋芽发生率的影响,随着浓度的增加,真菌污染率呈现先减小后增加的趋势,细菌污染率呈现先增加后减小的趋势,展芽率和无菌腋芽发生率呈现增加后见效的趋势,具体数据见下表2。

[0127] 表2 0.6%升汞处理茎节后在1×MS培养基中添加不同浓度多菌灵对腋芽发生率的影响

[0128]

多菌灵	真菌污染率(累计)			细菌污染率(累计)			展芽率(含污染芽)			无菌腋芽发生率
	第5天	第10天	第15天	第5天	第10天	第15天	第5天	第10天	第15天	第15天
40mg/L	0.0%	3.3%	10.0%	0.0%	3.3%	6.7%	0.0%	50.0%	96.7%	60.0%
60mg/L	0.0%	0.0%	3.3%	0.0%	0.0%	10.0%	0.0%	43.3%	100.0%	73.3%
90mg/L	0.0%	0.0%	13.3%	0.0%	6.7%	6.7%	0.0%	50.0%	93.3%	66.7%

[0129] 由表2可知,当多菌灵的浓度为60mg/L时,真菌污染率最小,达到3.3%,展芽率和无菌腋芽发生率最高,分别达到100.0%和73.3%,所以取浓度为60mg/L的多菌灵为最优实施方案。

[0130] 3、0.6%升汞处理茎节后在1×MS培养基中添加60mg/L多菌灵再添加不同浓度青霉素对腋芽发生率的影响

[0131] 不同浓度青霉素对腋芽发生率会产生不同的影响效果,随着浓度的增加,真菌污染率呈现逐渐减小的趋势,细菌污染率呈现先减小后增加的趋势,展芽率和无菌腋芽发生率较平稳,具体数据见下表3。

[0132] 表3 0.6%升汞处理茎节后在1×MS培养基中添加60mg/L多菌灵再添加不同浓度青霉素对腋芽发生率的影响

[0133]

青霉素	真菌污染率（累计）			细菌污染率（累计）			展芽率（含污染芽）			无菌腋芽发生率
	第5天	第10天	第15天	第5天	第10天	第15天	第5天	第10天	第15天	第15天
40mg/L	0.0%	3.3%	3.3%	0.0%	3.3%	3.3%	53.3%	100.0%	100.0%	70.0%
50mg/L	0.0%	0.0%	3.3%	0.0%	0.0%	0.0%	50.0%	96.7%	96.7%	83.3%
60mg/L	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%	63.3%	96.7%	96.7%	80.0%

[0134] 由表3可知,当青霉素的浓度为50mg/L时,综合效果最好,无菌腋芽发生率最高,达到83.3%。

[0135] 4、1×MS培养基中添加BA和NAA对腋芽发生的影响

[0136] 培养基中添加不同浓度的BA和NAA,对香根草腋芽的展芽率有显著影响(表4)。在相同的BA浓度下(除0mg/L外),随着NAA浓度从0mg/L增加到0.2mg/L,展芽率都显著( $P < 0.01$ )增加,在NAA浓度增加到0.5mg/L时,展芽率虽然有所下降,但与0.2mg/LNAA时的展芽率差异不显著;在相同的NAA浓度下,随着BA浓度的增加,展芽率也显著增加,在BA浓度为3mg/L时展芽率达到最高值,在BA浓度为5mg/L时展芽率虽然有所下降但是和3mg/L BA时展芽率差异不显著;无菌芽高和芽鲜重的变化趋势和展芽率类似。以上结果表明,1×MS培养基中添加3-4mg/L BA和0.2mg/L NAA可以将腋芽的展芽率提高到90%以上,且芽的质量较高。

[0137] 表4 1×MS培养基中添加BA和NAA对腋芽发生的影响

[0138]

BA(mg/L)	NAA(mg/L)	展芽率（含污染芽）			无菌腋芽发生率	无菌腋芽高 (cm)	无菌腋芽鲜重 (g)
		第10天	第15天	第20天	第20天	第20天	第20天
0	0	6.7%	40.0%	60.0%	76.7%	2.5	0.20
1	0	6.7%	50.0%	63.3%	3.3%	3.3	0.21
3	0	16.7%	40.0%	70.0%	10.0%	3.8	0.25
5	0	10.0%	40.0%	60.0%	6.7%	3.7	0.22
0	0.2	0.0%	33.3%	50.0%	46.7%	2.6	0.25
1	0.2	10.0%	56.7%	93.3%	60.0%	4.6	0.31
3	0.2	13.3%	46.7%	100.0%	50.0%	5.4	0.45
5	0.2	6.7%	36.7%	96.7%	20.0%	6.1	0.28
0	0.5	0.0%	20.0%	53.3%	26.7%	2.4	0.23
1	0.5	6.7%	30.0%	90.0%	10.0%	4.2	0.35
3	0.5	20.0%	40.0%	93.3%	0.0%	5.1	0.37
5	0.5	13.3%	50.0%	96.7%	60.0%	5.3	0.36

[0139] 5、1×MS培养基中添加0.5mg/L 2,4-D后再添加不同浓度BA腋芽增殖的影响

[0140] 1×MS培养基中添加0.5mg/L 2,4-D后再添加不同浓度BA对无菌腋芽的增殖效果有显著影响(表5)。不添加BA,腋芽不能增殖,在45天内,随着BA浓度的增加,新生不定芽数从0逐渐增加到48,表明BA浓度的增加有助于不定芽的增殖;在BA浓度从0.5mg/L增加到2mg/L时,新生不定芽高从2.6cm增加到6.0cm,芽鲜重从0.05g逐渐增加到0.35g,在BA浓度

为3mg/L时,芽高和芽鲜重开始下降,说明BA浓度为2mg/L能显著提高芽的质量。以上结果表明,在1×MS培养基中添加0.5mg/L 2,4-D后再添加2mg/L的BA能获得大量的高质量的新生不定芽。

[0141] 表5 1×MS培养基中添加0.5mg/L 2,4-D后再添加不同浓度BA腋芽增殖的影响

BA(mg/L)	第 30 天			第 45 天		
	新生不定芽数	新生不定芽高 (cm)	新生不定芽鲜重 (g)	新生不定芽数	新生不定芽高 (cm)	新生不定芽鲜重 (g)
0	0	0.0	0.00	0	0.0	0.00
0.5	5	1.6	0.05	14	2.6	0.05
1	21	2.6	0.11	25	4.6	0.16
2	26	3.8	0.35	32	6.0	0.35
3	30	2.1	0.08	48	2.5	0.11

[0143] 由上述表1~表5数据可知,本发明的香根草无菌腋芽增殖培养基以及香根草无菌腋芽增殖培养基的配方经过了科学的验证且取得很好的效果:降低了污染率,提高了无菌腋芽发生率,将发生率从现有技术的72.9%提高到83%,芽健壮,缩短了腋芽发生时间,从现有技术最短的20天,缩短到15天。通过改进增殖培养基配方,降低了污染率,提高了芽增殖率,将芽增殖率从现有技术的1:11.7提高到1:32。

[0144] 本文虽然已经给出了本发明的一些实施例,但是本领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明精神的情况下,可以对本文的实施例进行改变。上述实施例只是示例性的,不应以本文的实施例作为本发明权利范围的限定。