



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104488723 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201410825519. 3

(22) 申请日 2014. 12. 25

(71) 申请人 辽宁省农业科学院微生物工程中心

地址 110161 辽宁省沈阳市沈河区东陵路
84 号

(72) 发明人 杨镇 龚娜 李学龙 王娜 陈珣

刘国丽 肖军 曹君 肖伟
宋艳雨 李跃

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理

有限公司 12211

代理人 杨慧玲

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书4页

(54) 发明名称

一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法

(57) 摘要

本发明提供一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,包括如下步骤:外植体选择与消毒,培养基的配制,诱导培养,增殖培养,生根培养,组培苗的驯化与移栽。本发明不受地理环境和季节的限制、遗传背景一致,可在短期内形成大量优良试管苗,解决了目前朝鲜淫羊藿还处于野生状态,人工繁育栽培周期长、生长环境要求严格、大面积种植困难,为朝鲜淫羊藿的规模化生产种植提供可靠的技术途径。

1. 一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 外植体选择与消毒:春季4月下旬,取朝鲜淫羊藿野生根茎,带有完整越冬芽,且越冬芽饱满,以根部分蘖芽作为外植体,经表面消毒后备用;

(2) 培养基的配制:配制基本培养基、诱导分化培养基、继代增殖培养基、生根培养基1号、生根培养基2号;

(3) 诱导培养:在无菌条件下切下0.5-1cm的芽,将经表面消毒的根部分蘖芽茎段芽向上接种于诱导分化培养基中,培养30-45天后,诱导分蘖芽萌芽,然后分化出丛生芽;

(4) 增殖培养:当丛生芽长至2-3cm时,在无菌条件下将丛生芽切成单株,接入继代增殖培养基中,培养30-45天增殖出不定芽;根据对组培苗数量的要求,每隔30-45天按同样方法进行组培苗再增殖培养;

(5) 生根培养:将生长至3-5cm的组培苗,接种到生根培养基中进行生根培养;所述组培苗先在生根培养基1号培养条件下培养7天后,再转至生根培养基2号中,诱导其生根;

(6) 组培苗的驯化与移栽:当组培苗生长至5-8cm时,先进行组培苗的驯化,再移栽入草炭、珍珠岩、蛭石的混合基质中。

2. 根据权利要求1所述的一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,其特征在于:所述步骤(1)中的表面消毒包括如下处理步骤:首先在流水下冲洗3h,用洗衣粉清洗表面附属物,置于超净工作台中无菌水清洗2遍,75%乙醇表面消毒30s,然后用无菌水冲洗5遍;再用0.1%的氯化汞消毒2min,用无菌水冲洗3遍,用手术刀剥去外层保护层,再在0.1%氯化汞中浸泡2min,最后用无菌水冲洗3-5次。

3. 根据权利要求1或2所述的一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,其特征在于:所述培养基的组分和含量如下:

(1) 基本培养基:WPM培养基+蔗糖或白糖30g/L+琼脂4.5g/L,调节pH值为5.6-5.8;

(2) 诱导分化培养基:基本培养基+6-BA 0.5-1.5mg/L+IBA 0.1-0.5mg/L+GA30.3-1mg/L;

(3) 继代增殖培养基:基本培养基+6-BA 0.5-1.5mg/L+IBA 0.3-0.5mg/L;

(4) 生根培养基:

生根培养基1号:1/2WPM培养基+蔗糖或白糖15g/L+琼脂4.5g/L+IBA 0.3-0.5mg/L;

生根培养基2号:1/2WPM培养基+蔗糖或白糖15g/L+琼脂4.5g/L。

4. 根据权利要求3所述的一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,其特征在于:所述培养基的组分和含量如下:

(1) 基本培养基:WPM培养基+蔗糖或白糖30g/L+琼脂4.5g/L,调节pH值为5.8;

(2) 诱导分化培养基:基本培养基+6-BA 1.5mg/L+IBA 0.5mg/L+GA3 0.5mg/L;

(3) 继代增殖培养基:基本培养基+6-BA 1.5mg/L+IBA 0.5mg/L;

(4) 生根培养基:

生根培养基1号:1/2WPM培养基+蔗糖或白糖15g/L+琼脂4.5g/L+IBA 0.3mg/L;

生根培养基2号:1/2WPM培养基+蔗糖或白糖15g/L+琼脂4.5g/L。

5. 根据权利要求1或2所述的一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,其特征在于:所述方法的培养条件为:光照强度为1500-3000lx,光照时间为12h/d,培养室温度为22±2℃。

6. 根据权利要求1或2所述的一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,其特征在于:所述

混合基质由草炭 :珍珠岩 :蛭石按体积比 2:1:1 配制而成。

一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法

技术领域

[0001] 本发明涉及淫羊藿繁殖方法,特别涉及一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法。

背景技术

[0002] 朝鲜淫羊藿 (*Epimedium koreanum* Nakai) 为小檗科淫羊藿属植物,系多年生宿根性草本,是我国重要的药用资源。朝鲜淫羊藿主要分布在吉林省东部和辽宁省东部,黑龙江和吉林交界的地区也有少量分布,淫羊藿不仅可以补肾阳、强筋骨、祛风湿,而且还有抗衰老、提高免疫力、抑制肿瘤等功效,为最具开发潜力的中药之一。

[0003] 朝鲜淫羊藿以采集野生植物资源为主,随着需求量的增大,采集和消耗量已超过自然资源的再生能力,导致物种濒危。淫羊藿有有性繁殖和无性繁殖两种方式,我国朝鲜淫羊藿存在种子休眠现象,休眠期 8-10 个月,且发芽率低,实生苗生长缓慢。无性繁殖以移栽野生植株的分株繁殖的方法进行,该方法不仅需要有大量基础苗,而且容易造成病毒积累,影响优良种苗的遗传特性。朝鲜淫羊藿的人工栽培困难,有繁殖系数低、用种量大、易退化和变种等难题。采用植物组织培养方法可以在短期内快速繁殖多种植物,不仅繁殖率高,且因为其是无性繁殖,可以保持原繁殖母株的优良性状,近年来在生产上应用越来越广。关于辽宁产朝鲜淫羊藿的研究较少,朝鲜淫羊藿组培困难,由于朝鲜淫羊藿生长在林下荫湿的环境中,外植体地下隐芽受土壤及气候的影响携带的细菌和真菌较多,尤其是内生菌较多,外植体的污染率较高,这也是朝鲜淫羊藿组培快繁技术的难点之一,目前尚无朝鲜淫羊藿快速繁殖研究,因此,其快速繁殖迫在眉睫。实现朝鲜淫羊藿组织培养能提供大量的优质无病毒种苗,是提高其繁殖率的有效途径,且能严格控制药材质量,便于大规模工业化生产,对实现朝鲜淫羊藿的可持续利用具有重要意义。

发明内容

[0004] 为解决上述技术问题,本发明提供一种朝鲜淫羊藿的组培快速繁殖方法。

[0005] 本发明所采用的技术方案是:一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 外植体选择与消毒:春季 4 月下旬,取朝鲜淫羊藿野生根茎,带有完整越冬芽,且越冬芽饱满,以根部分蘖芽作为外植体,经表面消毒后备用;

[0007] (2) 培养基的配制:配制基本培养基、诱导分化培养基、继代增殖培养基、生根培养基 1 号、生根培养基 2 号;

[0008] (3) 诱导培养:在无菌条件下切下 0.5-1cm 的芽,将经表面消毒的根部分蘖芽茎段芽向上接种于诱导分化培养基中,培养 30-45 天后,诱导分蘖芽萌芽,然后分化出丛生芽;

[0009] (4) 增殖培养:当丛生芽长至 2-3cm 时,在无菌条件下将丛生芽切成单株,接入继代增殖培养基中,培养 30-45 天增殖出不定芽;根据对组培苗数量的要求,每隔 30-45 天按同样方法进行组培苗再增殖培养;

[0010] (5) 生根培养:将生长至 3-5cm 的组培苗,接种到生根培养基中进行生根培养;所

述组培苗先在生根培养基 1 号培养条件下培养 7 天后,再转至生根培养基 2 号中,诱导其生根;

[0011] (6) 组培苗的驯化与移栽:当组培苗生长至 5-8cm 时,先进行组培苗的驯化,再移栽入草炭、珍珠岩、蛭石的混合基质中。

[0012] 优选的,所述步骤(1)中的表面消毒包括如下处理步骤:首先在流水下冲洗 3h,用洗衣粉清洗表面附属物,置于超净工作台中无菌水清洗 2 遍,75%乙醇表面消毒 30s,然后用无菌水冲洗 5 遍;再用 0.1%的氯化汞消毒 2min,用无菌水冲洗 3 遍,用手术刀剥去外层保护层,再在 0.1%氯化汞中浸泡 2min,最后用无菌水冲洗 3-5 次。

[0013] 优选的,所述培养基的组分和含量如下:

[0014] (1) 基本培养基:WPM 培养基+蔗糖或白糖 30g/L+琼脂 4.5g/L,调节 pH 值为 5.6-5.8;

[0015] (2) 诱导分化培养基:基本培养基+6-BA 0.5-1.5mg/L+IBA 0.1-0.5mg/L+GA30.3-1mg/L;

[0016] (3) 继代增殖培养基:基本培养基+6-BA 0.5-1.5mg/L+IBA 0.3-0.5mg/L;

[0017] (4) 生根培养基:

[0018] 生根培养基 1 号:1/2WPM 培养基+蔗糖或白糖 15g/L+琼脂 4.5g/L+IBA 0.3-0.5mg/L;

[0019] 生根培养基 2 号:1/2WPM 培养基+蔗糖或白糖 15g/L+琼脂 4.5g/L。

[0020] 优选的,所述培养基的组分和含量如下:

[0021] (1) 基本培养基:WPM 培养基+蔗糖或白糖 30g/L+琼脂 4.5g/L,调节 pH 值为 5.8;

[0022] (2) 诱导分化培养基:基本培养基+6-BA 1.5mg/L+IBA 0.5mg/L+GA30.5mg/L;

[0023] (3) 继代增殖培养基:基本培养基+6-BA 1.5mg/L+IBA 0.5mg/L;

[0024] (4) 生根培养基:

[0025] 生根培养基 1 号:1/2WPM 培养基+蔗糖或白糖 15g/L+琼脂 4.5g/L+IBA 0.3mg/L;

[0026] 生根培养基 2 号:1/2WPM 培养基+蔗糖或白糖 15g/L+琼脂 4.5g/L。

[0027] 优选的,所述方法的培养条件为:光照强度为 1500-3000lx,光照时间为 12h/d,培养室温度为 22±2℃。

[0028] 优选的,所述混合基质由草炭:珍珠岩:蛭石按体积比 2:1:1 配制而成。

[0029] 本发明的有益效果是:

[0030] (1) 以芽为外植体,通过丛生芽途径建立朝鲜淫羊藿的快繁体系。

[0031] (2) 利用组织培养技术,生产朝鲜淫羊藿种苗,有不受地理环境和季节的限制、遗传背景一致、保存了母体的全部优良性状、且遗传性状稳定、生长周期短等优点。同时,结合茎尖培养方法可以去除植物病毒、提高药材质量和产量。

[0032] (3) 建立朝鲜淫羊藿组培快繁技术体系,可在短期内形成大量优良试管苗,解决了目前朝鲜淫羊藿还处于野生状态,人工繁育栽培周期长、生长环境要求严格、大面积种植困难,为朝鲜淫羊藿的规模化生产种植提供可靠的技术途径。

具体实施方式

[0033] 下面结合实施例对本发明作进一步说明,但不能作为本发明的限定。

[0034] 实施例 1

[0035] 一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,包括如下步骤:

[0036] (1) 外植体选择与消毒:春季 4 月下旬,取朝鲜淫羊藿野生根茎,带有完整越冬芽,且越冬芽饱满,以根部分蘖芽作为外植体,首先在流水下冲洗 3h,用洗衣粉清洗表面附属物,置于超净工作台中无菌水清洗 2 遍,75%乙醇表面消毒 30s,然后用无菌水冲洗 5 遍;再 0.1%的氯化汞消毒 2min,用无菌水冲洗 3 遍,用手术刀剥去外层保护层,再在 0.1%氯化汞中浸泡 2min,最后用无菌水冲洗 3 次,备用;

[0037] (2) 培养基的配制:

[0038] a、基本培养基:WPM 培养基 + 蔗糖 30g/L+ 琼脂 4.5g/L,调节 pH 值为 5.8;

[0039] b、诱导分化培养基:基本培养基 +6-BA 0.5mg/L+IBA 0.3mg/L+GA30.5mg/L;

[0040] c、继代增殖培养基:基本培养基 +6-BA 1.0mg/L+IBA 0.5mg/L;

[0041] d、生根培养基:

[0042] 生根培养基 1 号:1/2WPM 培养基 + 蔗糖 15g/L+ 琼脂 4.5g/L+IBA 0.5mg/L;

[0043] 生根培养基 2 号:1/2WPM 培养基 + 蔗糖 15g/L+ 琼脂 4.5g/L。

[0044] (3) 诱导培养:在无菌条件下切下 0.5-1cm 的芽,将经表面消毒的根部分蘖芽茎段芽向上接种于诱导分化培养基中,培养 40 天后,诱导分蘖芽萌芽,然后分化出丛生芽;培养条件为:温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照 12h/d,光照强度 3000lx。

[0045] (4) 增殖培养:当丛生芽长至 2-3cm 时,再在无菌条件下将丛生芽切成单株接入继代增殖培养基中进行增殖培养,在培养条件下培养 40 天增殖出不定芽;每隔 40 天按同样方法进行幼苗再增殖培养;培养条件为:温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照 12h/d,光照强度 3000lx。

[0046] (5) 生根培养:先将生长达 3-5cm 的组培苗接种到生根培养基 1 号中培养 7 天,再转入生根培养基 2 号中培养,诱导其生根;培养条件为:温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照 12h/d,光照强度 2000lx。

[0047] (6) 组培苗的驯化与移栽:当组培苗长到 5-8cm,苗基部长出 3-5 根细根后,先进行组培苗的驯化,再移栽入草炭:珍珠岩:蛭石的体积比为 2:1:1 基质的营养钵中。

[0048] 实施例 2

[0049] 一种朝鲜淫羊藿组培快速繁殖方法,包括如下步骤:

[0050] (1) 外植体选择与消毒:春季 4 月下旬,取朝鲜淫羊藿野生根茎,带有完整越冬芽,且越冬芽饱满,以根部分蘖芽作为外植体,首先在流水下冲洗 3h,用洗衣粉清洗表面附属物,置于超净工作台中无菌水清洗 2 遍,75%乙醇表面消毒 30s,然后用无菌水冲洗 5 遍;再 0.1%的氯化汞消毒 2min,用无菌水冲洗 3 遍,用手术刀剥去外层保护层,再在 0.1%氯化汞中浸泡 2min,最后用无菌水冲洗 3 次,备用;

[0051] (2) 培养基的配制:

[0052] a、基本培养基:WPM 培养基 + 蔗糖 30g/L+ 琼脂 4.5g/L,调节 pH 值为 5.8;

[0053] b、诱导分化培养基:基本培养基 +6-BA 1.5mg/L+IBA 0.5mg/L+GA30.5mg/L;

[0054] c、继代增殖培养基:基本培养基 +6-BA 1.5mg/L+IBA 0.5mg/L;

[0055] d、生根培养基:

[0056] 生根培养基 1 号:1/2WPM 培养基 + 蔗糖 15g/L+ 琼脂 4.5g/L+IBA 0.3mg/L;

[0057] 生根培养基 2 号:1/2WPM 培养基 + 蔗糖 15g/L+ 琼脂 4.5g/L。

[0058] (3) 诱导培养 :在无菌条件下切下 0.5-1cm 的芽,将经表面消毒的根部分蘖芽茎段芽向上接种于诱导分化培养基中,培养 40 天后,诱导分蘖芽萌芽,然后分化出丛生芽;培养条件为 :温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照 12h/d,光照强度 3000lx。

[0059] (4) 增殖培养 :当丛生芽长至 2-3cm 时,再在无菌条件下将丛生芽切成单株接入继代增殖培养基中进行增殖培养,在培养条件下培养 40 天增殖出不定芽;每隔 40 天按同样方法进行幼苗再增殖培养;培养条件为 :温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照 12h/d,光照强度 3000lx。

[0060] (5) 生根培养 :先将生长达 3-5cm 的组培苗接种到生根培养基 1 号中培养 7 天,再转入生根培养基 2 号中培养,诱导其生根;培养条件为 :温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照 12h/d,光照强度 2000lx。

[0061] (6) 组培苗的驯化与移栽 :当组培苗长到 5-8cm,苗基部长出 3-5 根细根后,先进行组培苗的驯化,再移栽入草炭 :珍珠岩 :蛭石的体积比为 2:1:1 基质的营养钵中。

[0062] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,不能被认为用于限定本发明的实施范围。凡依本发明申请范围所作的均等变化与改进等,均应仍归属于本发明的专利涵盖范围之内。