



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101473792 B

(45) 授权公告日 2011.04.06

(21) 申请号 200910094057.1

期),183-189.

(22) 申请日 2009.01.23

审查员 王颖

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650204 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 贺树珍 陈昌祥 刘海洋 倪伟

(74) 专利代理机构 云南协立专利事务所 53108
代理人 谢嘉

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

A01G 1/00 (2006.01)

A01G 31/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1537570 A,2004.10.20, 全文.

CN 1918973 A,2007.02.28, 全文.

赵桦. 丫蕊花 (*Ypsilandra thibetica* Franch.)
胚胎发育的研究 I. 大孢子, 雌配子体的发生以及
淀粉粒的动态. 《四川大学学报》.1980,(第 4

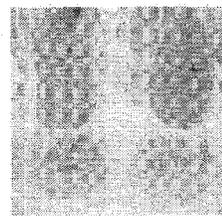
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 4 页

(54) 发明名称

丫蕊花组培及种植方法

(57) 摘要

本发明提供用丫蕊花的母体组织叶为外植体材料, 进行组织离体培养和无公害种植物的方法, 采用本方法可获得大批组培苗, 满足种植需要. 采用天然林区种植克服了农药及重金属污染, 成活率达 95.5%, 三年内可提供新药材, 单株重量高于同年野生和无繁种植药材 2 倍, 并且缩宫止血有效成分含量高于同年野生药材, 满足制药企业对原药材的需求. 既可成批培育又可大面积种植组培苗, 并且提早二年获得无公害药材, 具有推广的实用价值。



1. 丫蕊花组培及种植方法,包括取丫蕊花外植体,消毒清洗,在MS培养基加6-BA 0.25-0.5mg/L,NAA 0.2-0.3mg/L中进行愈伤组织诱导与分化,在MS培养基加6-BA 0.5mg/L,NAA 0.3-0.4mg/L中进行不定芽增殖,在1/2MS+IBA 0.2mg/L培养基中进行不定根诱导,炼苗,无公害种植即在天然条件下进行种植步骤。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述组培是用叶组织离体培养育苗,剪下叶片,消毒后接种在MS培养基加6-BA0.25-0.5mg/L,NAA 0.2-0.3mg/L中培养30天,形成愈伤组织并分化为丛芽,培养的不定芽单个切开转接在MS培养基加6-BA0.5mg/L,NAA 0.3-0.4mg/L中进行增殖培养,形成增殖体的幼苗,转接到1/2MS+IBA 0.2mg/L的培养基中,15-21天生根,炼苗后移栽。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征是丫蕊花外植体选用叶片,经水洗,70%的乙醇和升汞消毒,无菌水洗净后,剪成小块,进行愈伤组织诱导与分化。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于愈伤组织诱导与分化是在无菌条件下,从丫蕊花消毒后叶片上剪下1平方厘米小叶块,接种在MS培养基加含6-BA 0.25-0.5mg/L,NAA 0.2-0.3mg/L培养基上,在20-25℃,光照1000Lx,光照10-12小时,湿度大于70%条件下直接诱导产生丛芽,30-40天开始萌动;再经8-14天有丛芽出现;7-15天丛芽长叶。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于不定芽增殖是将愈伤组织诱导与分化出的丛芽单个切开,在MS培养基加含6-BA 0.5mg/L,NAA 0.3-0.4mg/L培养基上进行增殖培养;40-60天形成幼苗;增殖培养产生的新丛芽,叶变绿,2-3cm时,进一步转接进行增殖培养或继代培养。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于不定根诱导是取出增殖培养长出的高4-5cm的幼苗,单个切开,转接到1/2MS+IBA 0.2mg/L培养基中,转接后15-21天,开始生根;待40-60天根达3条以上,叶达6-10片,高达6-8cm的试管苗取出炼苗。

7. 如权利要求1或6所述的方法,其特征在于炼苗是将试管苗从组培室取出后置于温棚中,放置5-7天,取出幼苗洗净培养基后移植在装有腐质土和红土1:1并加少许腐质叶为基质的营养袋内,浇水,在1000-2000Lx中光照8-12小时,湿度大于70%条件下炼苗1个月,当叶达6-10片,高达6-8cm时移栽种植。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于无公害种植是在天然条件下进行种植,选择海拔800~2,500m;林下,沟边,瀑布两旁或有遮阴条件的荒土;满足日照年平均6小时/日,年平均最高温度18℃,月平均最高温度11~23℃及最低温0℃的条件;满足地下5cm土温年平均最高温度16℃,月平均最高温度9~20℃及最低9℃的条件;满足湿度最高达90%,最低70%,月平均湿度在70~90%之间的条件;建立隔离区,防牛马进入而踏坏。

丫蕊花组培及种植方法

技术领域：

[0001] 本发明属于植物组织培养和移栽种植技术领域，具体地，涉及百合科植物丫蕊花新药材的组织培养技术和无公害种植方法。

背景技术：

[0002] 丫蕊花植物在民间称石凤丹、随身丹，具有清热、解毒、散结、利小便，主治癆疔、水肿，该属植物有四种，分别为丫蕊花 (*Y. thibetica*)；云南丫蕊花 (*Y. yunnanensis* var. *micrantha* Hand-Mazz)；高山丫蕊花 (*Y. alpina* wang et Tang)；小丫蕊花 (*Y. cavaleriei* Levl et Vant)，均属于在国内市场未上市的中药，已被云南省食品药品监督管理局列入云南省中药材标准，2005年版彝药 (III) 于 2009 年发布。现为天然植物。中国专利 CN1081036C 公开了以丫蕊花全草为原料，提取获得呋甾类甾体皂苷具有抗癌活性，该发明专利亦被收载于美国化学文摘 (Kawabc. et. al. CS 1996, 124 :325368y)。中国专利为 03117694.1 公开了丫蕊花属植物中甾体皂苷具有治疗妇科出血性疾病的作用。

[0003] 制药企业用丫蕊花为原料生产治疗妇科血症的新药后，市场上供应丫蕊花中药材预计每年不低于 4000-5000 吨。仅依靠野生丫蕊花资源，无法解决和满足消耗的需要。急需种植，实现丫蕊花资源的再生和持续利用。

[0004] 由于丫蕊花花粉管由珠孔进入胚囊释放出两个精子属双受精过程，受精后的合子休眠期较长，胚胎发育较慢，种子成熟时胚尚未分化，胚仍需进一步缓慢发育，所以用种子繁殖没能成功，野外在丫蕊花周围也未发现幼小丫蕊花。为此中国专利申请“一种丫蕊花的人工繁育方法”专利申请号为 200610048655.1，公开了以丫蕊花叶为材料进行人工繁殖技术研究获得成功，出苗率最高达 67%。然而该技术由于出苗率最高仅达 67%，出苗率还是较低，而且该方法人工种植需要土地，遮荫费时且投入大，不能满足大面积种植和对药材的大量需求。

发明内容：

[0005] 针对现在技术的上述不足，本发明提供一种丫蕊花组织培育和无公害种植技术，采用本发明的方法，可获得大批组培苗满足种植需要；并采用天然林区种植克服农药及重金属污染，成活率达 95.5%，三年内可提供新药材，单株重量高于同年野生和无繁种植药材 2 倍，并且缩宫止血有效成分含量高于同年野生药材；并满足制药企业对原药材的需求，既可成批培育又可大面积种植组培苗，并且提早二年获得无公害药材，具有实用价值。

[0006] 为了实现本发明的目的，本发明提供了如下的技术方案：

[0007] 丫蕊花的组培及种植方法，包括取丫蕊花外植体，消毒清洗，愈伤组织诱导与分化，不定芽增殖，不定根诱导，炼苗，无公害种植步骤。

[0008] 所述组织培养育苗是用叶组织离体培养育苗，剪下叶片，消毒后接种在 MS 培养基上培养 30 天，形成愈伤组织并分化为丛芽，培养的不定芽单个切开转接在培养基上增殖培养，形成增殖体的幼苗转接到 1/2MS+IBA 0.2mg/L 的培养基中，15-21 天生根，练苗后移栽。

[0009] 丫蕊花外植体优选叶片,经水洗,70%的乙醇和升汞消毒,无菌水洗净后,剪成小块,进行愈伤组织诱导与分化。

[0010] 愈伤组织诱导与分化是在无菌条件下,从丫蕊花消毒后叶片上剪下1平方厘米小叶块,接种在MS培养基加含6-BA 0.25-0.5mg/L, NAA 0.2-0.3mg/L培养基上,在20-25℃,光照1000Lx,光照10-12小时,湿度大于70%条件下直接诱导产生丛芽,30-40天开始萌动;再经8-14天有丛芽出现;7-15天丛芽长叶。

[0011] 不定芽增殖是将愈伤组织诱导与分化出的丛芽单个切开,在MS培养基加含6-BA 0.5mg/L, NAA 0.3-0.4mg/L培养基上进行增殖培养;40-60天便可形成幼苗;增殖培养产生的新丛芽,叶变绿,2-3cm时,进一步转接进行增殖培养或继代培养。

[0012] 不定根诱导是取出增殖培养长出的高4-5cm的幼苗,单个切开,转接到1/2MS+IBA 0.2mg/L培养基中,转接后15-21天,开始生根;待40-60天根达3条以上,叶达6-10片,高达6-8cm的试管苗取出练苗。

[0013] 炼苗是将试管苗从组培室取出后置于温棚中,放置5-7天,取出幼苗洗净培养基后移植在装有腐质土和红土1:1并加少许腐质叶为基质的营养袋内,浇水,在1000-2000Lx中光照8-12小时,湿度大于70%条件下练苗1个月,当叶达6-10片,高达6-8cm时移栽种植。

[0014] 无公害种植是在天然条件下进行种植,选择海拔800~2,500m,林下,沟边,瀑布两旁或有遮阴条件的荒土;满足日照年平均6小时/日、年平均最高温度不高于18℃、月平均最高温度在11~23℃、最低可达0℃的条件;满足地下5cm土温年平均最高温度不高于16℃、月平均最高温度在9~20℃、最低可达9℃以下的条件;建立隔离区,防牛马进入而踏坏。

[0015] 具体地,本发明技术方案可描述为:

[0016] 1、材料:

[0017] 采集野生或家种丫蕊花全株移种在花盒中,以野生或家种丫蕊花母体叶为外植体的材料。

[0018] 2、方法:

[0019] 1). 外植体消毒:剪种于盒中的野生丫蕊花叶片,水冲洗丫蕊花的母体组织叶片,经70%的乙醇和升汞消毒,无菌水洗净后,剪成1cm²小方块,每瓶放4-6块外植体,盖紧瓶盖,用保鲜袋封好瓶口。

[0020] 2) 组培:

[0021] ①培养基配制:以MS为基本培养基,另加不同浓度的植物激素。由叶片外植体诱导产生愈伤组织,并诱导愈伤组织产生不定芽,使不定芽增殖,不定芽形成幼苗,进行生根培养,采用加含6-BA 0.25-0.5mg/L(6-苄基腺嘌呤), NAA 0.2-0.4mg/L(Naphthalene acetic acid,萘乙酸)和加含IBA 0.2mg/L培养基,配制过程按照常规方法,培养瓶为玻璃瓶或透明塑料瓶。灭菌采用121℃灭菌20分钟高压湿热灭菌。

[0022] ②组培条件:

[0023] 在20-25℃,光照1000Lx,光照10-12小时,湿度大于70%条件下:

[0024] 外植体诱导产生愈伤组织形成产生不定芽;30-40天。开始萌动后8-14天出现丛芽;再过7-15天丛芽长叶。

[0025] 不定芽增殖:取出已长叶丛芽单个切开进行增殖培养 40-60 天便可形成幼苗。取其高 4-5cm 的幼苗进行生根培养。增殖培养产生的新丛芽,叶变绿,2-3cm,可一进转接进行增殖培养或继代培养。

[0026] 生根培养:取出增殖培养长出高 4-5cm 的幼苗,单个切开,转接到含 IBA 0.2mg/L 培养剂中,转接后 15-21 天,开始生根。40-60 天根达 3 条以上,叶 6-10 片,高 6-8cm 的试营苗可取出练苗。

[0027] ③炼苗:将试营苗置于温棚中,控制光照和湿度下,放置 5-7 天,取出试营幼苗用清水洗净培养基移植在混有基质营养袋中,浇清水,保湿 1 月成活后移栽在大田中,二年可收割。

[0028] 3、种植:

[0029] 天然条件下的无公害种植。天然条件下的种植:选择海拔 800~2,500m,林下,沟边,瀑布两旁或有遮阴条件的荒土,满足日照要求:年平均 6 小时/日;年平均最高温度不高于 18℃,月平均最高温度在 11~23℃,最低可达 0℃。地下 5cm 土温:年平均最高温度不高于 16℃,月平均最高温度在 9~20℃,最低可达 9℃以下。

[0030] 天然条件下种植,建立隔离区,防牛马进入而踏坏。本发明天然条件下种植,4 年收获,鲜重 5-10 克/株/年,有效成分含量 1.3% (大于野生 1.07%);仿生态种植,3 年即可收获,鲜重 15-30 克/株/年,有效成分含量 1.6%。

[0031] 本发明的有益效果在于:

[0032] 采用本发明的方法,可获得大批组培苗满足种植需要;并采用天然林区种植克服农药及重金属污染,成活率达 95.5%,三年内可提供新药材,单株重量高于同年野生和无繁殖种植药材 2 倍,并且缩宫止血有效成分含量高于同年野生药材,具有推广的实用价值。可满足制药企业对原药材的需求,既可成批培育又可大面积种植组培苗,并且提早二年获得无公害药材,具有实用价值。

附图说明:

[0033] 图 1 表示本发明丫蕊花母株叶作外植体;

[0034] 图 2 表示本发明诱导愈伤组织图;

[0035] 图 3 表示本发明愈伤组织分化图;

[0036] 图 4 表示本发明生根;

[0037] 图 5 表示本发明炼苗;

[0038] 图 6 表示本发明盆栽种植;

[0039] 图 7 表示本发明天然无公害种植。

具体实施方式:

[0040] 以下结合附图,通过本发明的实施例,对本发明的上述内容再做进一步的详细说明,但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术方案均属于本发明的范围。

[0041] 实施例 1:

[0042] 1、外植体材料的采取和处理:

[0043] 选择丫蕊花 3-8 月生长茂盛无病的母株新发幼嫩叶片叶为外殖体材料。采集野生或家种丫蕊花全株移种在花盒中,用清水洗叶,待新叶长出。从母株上剪下活叶片用自来水冲洗 15 分钟,除去叶表面的尘土和绒毛,将叶片放入 70%的乙醇中翻转 20 秒钟,除去叶表面的蜡质物后用清水冲洗叶面除去乙醇,放入 0.1%升汞液中浸泡 15 分钟消毒,无菌水洗净后剪成 1cm² 小方块。叶背面平放于培养基中,每瓶放 4-6 块外植体。盖紧瓶盖,用保鲜袋封好瓶口。在无菌操作台上完成接种。

[0044] 2、愈伤组织诱导与分化,不定芽增殖和不定根诱导:

[0045] 2.1 愈伤组织诱导与分化:在无菌条件下,从消毒后叶片上剪下 1 平方厘米小叶块,接种在 MS 培养基加含 6-BA 0.25-0.5mg/L(6-苄基腺嘌呤),NAA 0.2-0.3mg/L(Naphthalene acetic acid,萘乙酸)培养基上,在 20-25℃,光照 1000Lx,光照 10-12 小时,湿度大于 70%条件下:直接诱导产生丛芽,30-40 天开始萌动;再经 8-14 天有丛芽出现;7-15 天丛芽长叶。

[0046] 2.2 不定芽增殖:取出已长叶丛芽单个切开,在 MS 培养基加含 6-BA0.5mg/L, NAA 0.3-0.4mg/L 培养基上,进行增殖培养。40-60 天便可形成幼苗。取其高 4-5cm 的幼苗进行生根培养。增殖培养产生的新丛芽,叶变绿,2-3cm,可一进转接进行增殖培养或继代培养。

[0047] 2.3 不定根诱导:取出增殖培养长出高 4-5cm 的幼苗,单个切开,转接到 1/2MS+IBA 0.2mg/L 培养中,转接后 15-21 天,开始生根。40-60 天根达 3 条以上,叶 6-10 片,高 6-8cm 的试管苗可取出练苗。

[0048] 3、炼苗:

[0049] 将试管苗从组培室取出后置于温棚中,放置 5-7 天,取出幼苗用清水洗净培养基移植在营养袋中,营养袋内装有腐质土和红土 1:1 混均,加少许腐质叶为基质,绕清水,保湿控制光照 1000-2000Lx,光照 8-12 小时,湿度大于 70%条件下,练苗 1 月成活达 92.5%,叶 6-10 片,高 6-8cm 移栽在大田中。二年可收割。练苗后按照实施例 2 的条件移栽,6 个月时鲜重 12 克/株,一年后,测定缩宫止血成分的含量达 1.6%,二年可收割地上部分药用。

[0050] 4、种植:

[0051] 天然条件下种植:

[0052] 选择海拔 800~2,500m,林下,沟边,瀑布两旁或有遮阴条件的成遍土地。满足日照要求:0~8 小时/日,年平均 6 小时/日,株行距依环境而定,可稀,可密。

[0053] 气候条件:气温:年平均最高温度不高于 18℃,月平均最高温度在 11~23℃,最低达 0℃。地下 5cm 土温:最高温度年平均不高于 16℃,月平均最高温度在 9~20℃,最低达 9℃ 以下。湿度:最高达 90%,最低不低于 70%,月平均湿度在 70~90%之间,天然树遮阴。天然条件下种植,建立隔离区,防牛马进入而踏坏。

[0054] 综上,本发明提供的栽培方法出苗率高,成活率高 90%,实现了野生丫蕊花家栽。为丫蕊花成为新中药材,大量使用提供了较实用的方法。

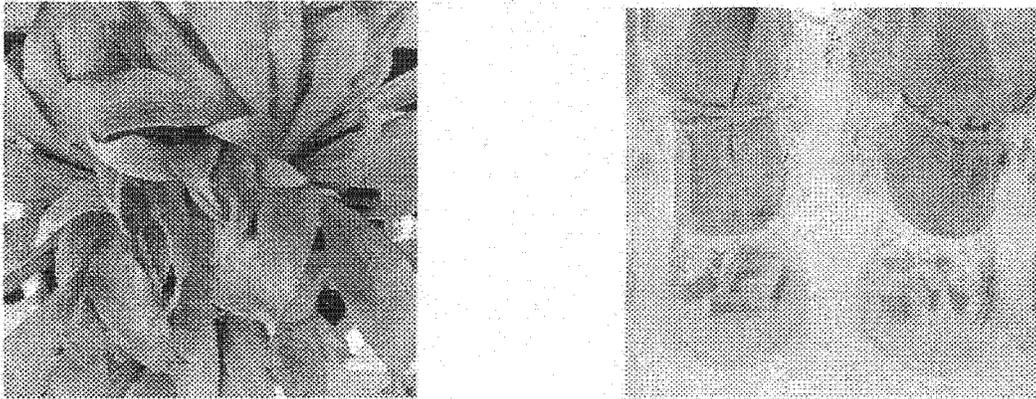


图 1

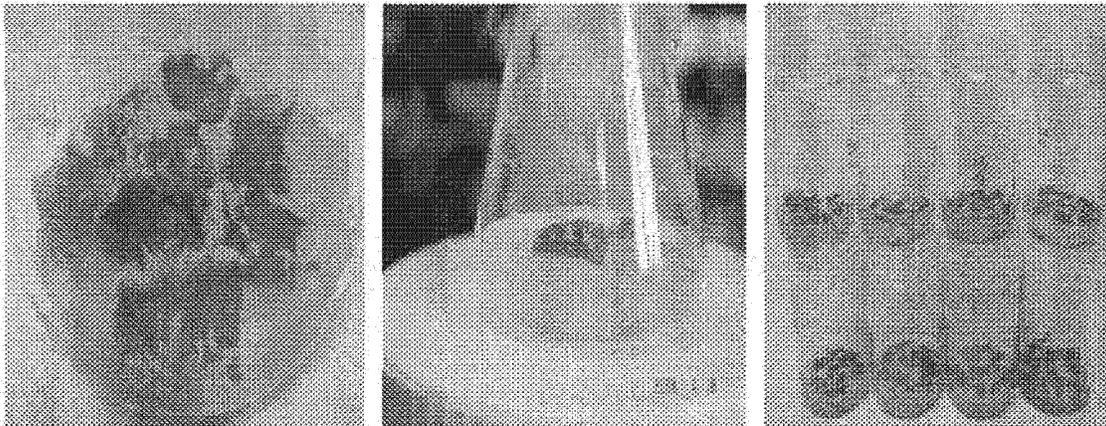


图 2

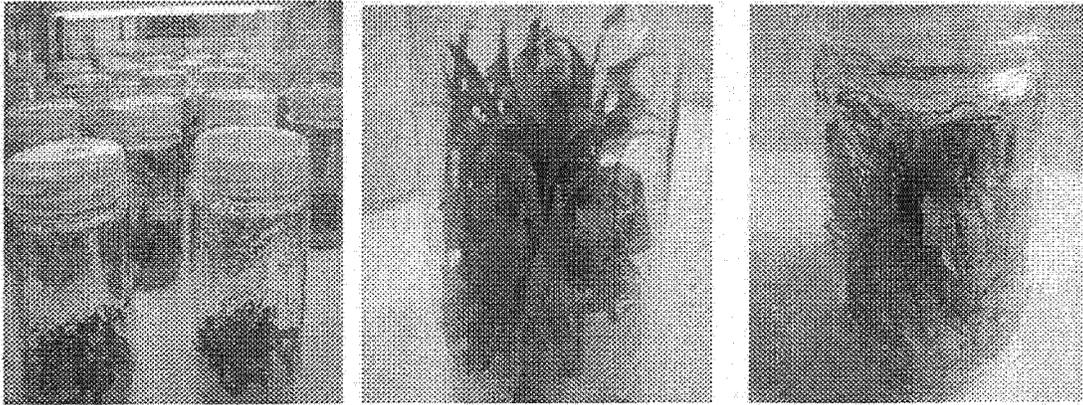


图 3



图 4

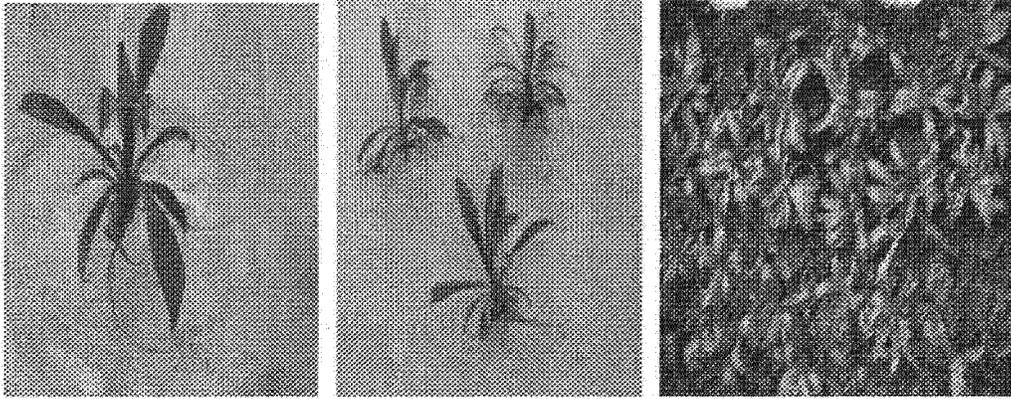


图 5

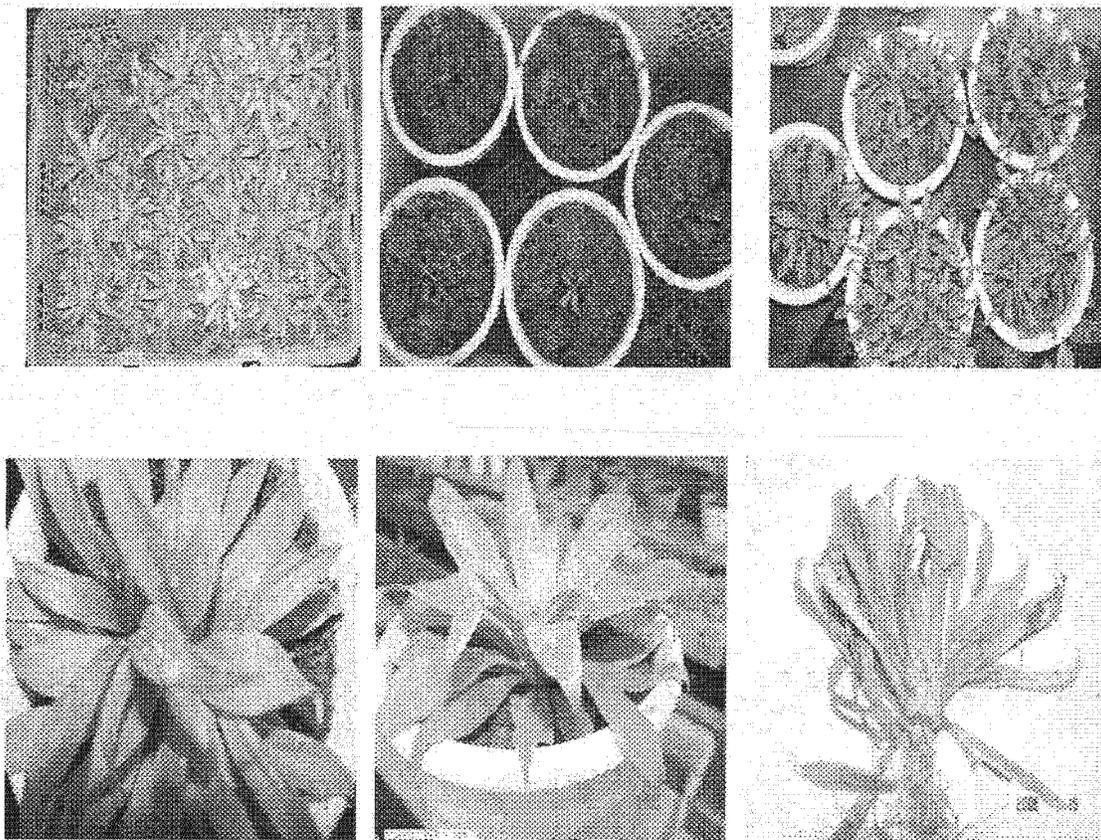


图 6

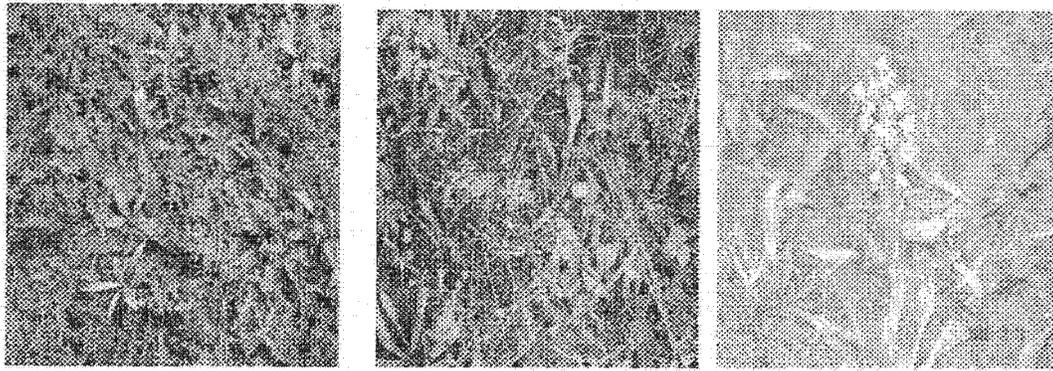


图 7