(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110604056 A
(43)申请公布日 2019.12.24

(21)申请号 201910940728.5

(22)申请日 2019.09.30

(71)申请人 海南大学
地址 570100 海南省海口市美兰区人民大道58号海南大学

(72)发明人 郑丽 谢昌平 周佳 徐刚 王渝华 仇芳 李希

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
代理人 文小花

(51)Int.Cl.
A01H 4/00(2006.01)

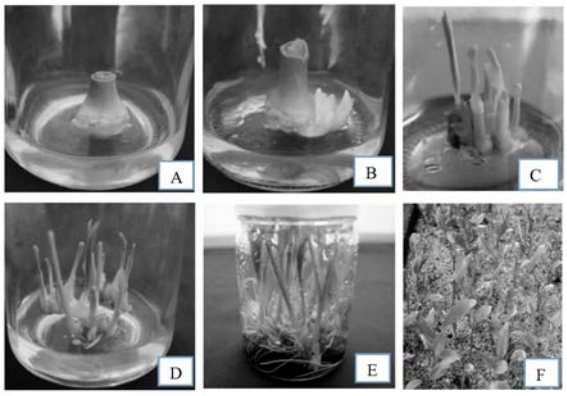
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种温郁金组织培养的方法

(57)摘要

本发明公开了一种温郁金组织培养的方法，主要包括块茎砂床催芽、不定芽诱导、继代增殖、生根培养和假植等步骤。采用本发明方法，培养过程中污染率小于5%，不定芽诱导率达到129%以上，芽增殖倍数达到7.5以上，成活率达到95%以上，挥发油含量达到5.4%以上。该方法操作简便，效果显著，可在短时间内大量提供优质的温郁金种苗，适合产业化推广使用。



CN 110604056 A

1.一种温郁金组织培养的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:块茎砂床催芽

取健康的块茎整齐平铺在干净新鲜河沙,保持砂床湿润,待1个月后,块茎上长出数根小苗;

S2:外植体获得

选取健康的小苗,切去根茎部分,用75%酒精消毒30s后,再用0.1%氯化汞消毒20min,用灭菌水清洗3～5次,接种在含4～5mg/L 6-BA的MS培养基,以获得无菌的外植体;

S3:不定芽的诱导

待芽长至3～5cm时,将芽接种于含有2～5mg/L 6-BA和0.5～1.0mg/L NAA的MS培养基中诱导培养;

S4:继代增殖

将诱导获得的新芽切成不多于5个侧芽的小块,接种于含2～5mg/L 6-BA和0.5～1.0mg/L NAA的培养基中进行增殖培养;

S5:试管苗生根培养

继代增殖培养后,将试管苗接种于含有0.5～1g/L活性炭和0.5～1.0mg/L NAA的MS培养基中培养;

S6:试管苗的假植

生根培养1个月后将瓶盖打开,使生根苗与空气充分接触,放置至少1个星期,取出试管苗,将试管苗移栽到河沙基质中培养;

各步骤光照条件为:光照强度1600～2400lx,光照时间10～12h/d,环境温度25～28℃,环境湿度40～90%。

2.根据权利要求1所述的温郁金组织培养的方法,其特征在于,步骤S2-S5所述MS培养基中还含有30～35g/L蔗糖和5～6g/L卡拉胶。

3.根据权利要求1所述的温郁金组织培养的方法,其特征在于,步骤S3中,6-BA含量为4～5mg/L,NAA含量为0.5mg/L。

4.根据权利要求1所述的温郁金组织培养的方法,其特征在于,步骤S3所述MS培养基中还含有3～5g/L褐藻寡糖、6.5～10.3mg/L水杨酸和11～18mg/L茉莉酸甲酯,更改培养基中氯化钙浓度为640～680mg/L。

5.根据权利要求1所述的温郁金组织培养的方法,其特征在于,步骤S4中,6-BA含量为5mg/L,NAA含量为0.5mg/L。

6.根据权利要求1所述的温郁金组织培养的方法,其特征在于,步骤S5中,NAA含量为0.5mg/L。

7.根据权利要求1所述的温郁金组织培养的方法,其特征在于,步骤S5所述MS培养基中还含有5～10mg/L茉莉酸甲酯,更改氯化钙的浓度为520～550mg/L。

8.根据权利要求1所述的温郁金组织培养的方法,其特征在于,步骤S1至步骤S4,在LED红蓝光条件下每天光照10～12h,红蓝光比例(4～5):1,光照强度为1600～2000lx,环境湿度40～60%,环境温度25～28℃;步骤S5,在白光条件下每天光照10～12h,光照强度为1800～2400lx,环境湿度40～60%,环境温度25～28℃;步骤S6在室外自然光照条件进行,环境湿度80～90%,环境温度25～28℃。

一种温郁金组织培养的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种温郁金组织培养的方法，属于植物组织培养技术领域。

背景技术

[0002] 温郁金(Curcuma wenyujin Y.H.Chen et C.Ling)，又名温莪术，属姜科姜黄属植物，多年生球根草本花卉，株高100～120cm，植株丛生，叶片长椭圆形，亮绿色，可作观叶植物观赏，适于庭园栽培或作大型盆栽。花期3～5月，圆柱形的穗状花序从根茎抽出，紫红色的苞片在花序上排列紧密，花期持续时间长，可作花镜、花坛布置。温郁金性状为类圆形或不规则薄片，直径1.5～4cm，表面灰黄色，切面黄棕色至棕褐色，常附有黄白色或黄棕色粉末，维管束痕多而明显。气香浓郁，味微苦而辛。温郁金是著名道地药材，它的药用部位主要是根茎和块根，主要含挥发油类和姜黄素类成分，此外还有树脂类和糖类等，为中国药典多版收载品种。已有研究表明温郁金挥发油具有抗植物病原菌活性，表明其在植物源杀菌剂方面具有一定的应用潜力。

[0003] 随着研究的深入，对温郁金资源的需求也越来越大。但在栽培生产上，温郁金主要通过根茎进行营养繁殖，耗种量大，繁殖系数低且病毒化较严重，速度慢，品质下降，资源供不应求。为了解决温郁金生产上存在的问题，亟需开发一种适用于温郁金的快繁技术。植物组织培养技术是利用植物的根、茎、叶、花、果等外植体实现快速繁殖的方法，可有效弥补传统培育方法的不足，但目前已公开的温郁金组培方法不够成熟，尚存在许多不足之处，例如，诱导和增殖效果不佳等，因此，亟需寻求一种更适用于温郁金组培的方法。

发明内容

[0004] 鉴于现有技术的不足，本发明提供一种更适用于温郁金组织培养的方法，本方法可在短期内获得大量种苗，复壮温郁金优良新品种，为温郁金大规模的批量繁殖提供一定的技术参考。

[0005] 本发明采取的技术方案如下：

[0006] 一种温郁金组织培养的方法，包括以下步骤：

[0007] S1:块茎砂床催芽

[0008] 取健康的块茎整齐平铺在干净新鲜河沙，保持砂床湿润，待1个月后，块茎上长出数根小苗；

[0009] S2:外植体获得

[0010] 选取健康的小苗，切去根茎部分，用75％酒精消毒30s后，再用0.1％氯化汞消毒20min，用灭菌水清洗3～5次，接种在含4～5mg/L 6-BA的MS培养基，以获得无菌的外植体；

[0011] S3:不定芽的诱导

[0012] 待芽长至3～5cm时，将芽接种于含有2～5mg/L 6-BA和0.5～1.0mg/L NAA的MS培养基中诱导培养；

[0013] S4:继代增殖

[0014] 将诱导获得的新芽切成不多于5个侧芽的小块，接种于含2～5mg/L 6-BA和0.5～1.0mg/L NAA的培养基中进行增殖培养；

[0015] S5：试管苗生根培养

[0016] 继代增殖培养后，将试管苗接种于含有0.5～1g/L活性炭和0.5～1.0mg/L NAA的MS培养基中培养；

[0017] S6：试管苗的假植

[0018] 生根培养1个月后将瓶盖打开，使生根苗与空气充分接触，放置至少1个星期，取出试管苗，将试管苗移栽到河沙基质中培养；

[0019] 各步骤光照条件为：光照强度1600～2400lx，光照时间10～12h/d，环境温度25～28℃，环境湿度40～90％。

[0020] 优选的，步骤S2-S5所述MS培养基中还含有30～35g/L蔗糖和5～6g/L卡拉胶。

[0021] 优选的，步骤S3中，6-BA含量为4～5mg/L，NAA含量为0.5mg/L。

[0022] 优选的，步骤S3所述MS培养基中还含有3～5g/L褐藻寡糖、6.5～10.3mg/L水杨酸和11～18mg/L茉莉酸甲酯，更改培养基中氯化钙浓度为640～680mg/L。

[0023] 优选的，步骤S4中，6-BA含量为5mg/L，NAA含量为0.5mg/L。

[0024] 优选的，步骤S5中，NAA含量为0.5mg/L。

[0025] 优选的，步骤S5所述MS培养基中还含有5～10mg/L茉莉酸甲酯，更改氯化钙的浓度为520～550mg/L。

[0026] 优选的，步骤S1至步骤S4，在LED红蓝光条件下每天光照10～12h，红蓝光比例(4～5):1，光照强度为1600～2000lx，环境湿度40～60％，环境温度25～28℃；步骤S5，在白光条件下每天光照10～12h，光照强度为1800～2400lx，环境湿度40～60％，环境温度25～28℃；步骤S6在室外自然光照条件进行，环境湿度80～90％，环境温度25～28℃。

[0027] 与现有技术相比，本发明的有益效果是：

[0028] 采用本发明方法进行温莪术组织培养，污染率小于5％，诱导率达到129％以上，芽增殖倍数达到7.5以上，成活率达到95％以上，挥发油含量达到5.4％以上，本发明方法满足产业化应用。

[0029] 本发明通过对培养条件和培养基的改良，不仅可降低污染率至2.1％，提高诱导率至158％，提高增殖倍数至11.37，更重要的是可同时提高挥发油含量至8.22％，满足人们对温郁金的实际需求，为温郁金的使用提供大量优质原材料。

附图说明

[0030] 图1：本发明实施例黑郁金的组织培养过程效果图；A.外植体接种；B.外植体分化芽；C.外植体分化丛生芽；D.丛生芽的增殖；E.生根苗；F.假植。

具体实施方式

[0031] 下面通过具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0032] 本发明实施例所用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0033] 本发明实施例所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0034] 实施例1

[0035] 一种温郁金组织培养的方法，包括以下步骤：

[0036] S1：块茎砂床催芽

[0037] 取健康的块茎整齐平铺在干净新鲜河沙，保持砂床湿润，待1个月后，块茎上长出数根小苗；

[0038] S2：外植体获得

[0039] 选取健康的小苗，切去根茎部分，用75％酒精消毒30s后，再用0.1％氯化汞消毒20min，用灭菌水清洗3～5次，接种在含30g/L蔗糖、5g/L卡拉胶、5mg/L6-BA的MS培养基，以获得无菌的外植体；

[0040] S3：不定芽的诱导

[0041] 待芽长至3～5cm时，将芽接种于含有30g/L蔗糖、5g/L卡拉胶、5mg/L6-BA和0.5mg/L NAA的MS培养基中诱导培养，每瓶接1个芽；培养基pH为5.5～5.8。4～5d后观察芽的生长情况，并将污染的细菌苗捡掉，统计好污染率，然后继续观察温郁金不定芽的诱导分化情况，30d后统计芽的诱导率。污染率(％)＝污染瓶数/总瓶数×100％，不定芽的诱导率(％)＝诱导的侧芽数/接种芽数×100％。

[0042] S4：继代增殖

[0043] 将诱导获得的新芽切成不多于5个侧芽的小块，接种于含30g/L蔗糖、5g/L卡拉胶、5mg/L 6-BA和0.5mg/L NAA的培养基中进行增殖培养，每瓶接种1～4个小块；每20d继代1次。观察芽的增殖和生长情况，统计温郁金的增殖芽数和增殖倍数。增殖芽数为接种的外植体所诱导出新芽的总数量。增殖倍数＝增殖芽数/接种的芽数。

[0044] S5：试管苗生根培养

[0045] 继代增殖培养后，将试管苗接种于含有30g/L蔗糖、5g/L卡拉胶、1g/L活性炭和0.5mg/L NAA的MS培养基中培养。

[0046] S6：试管苗的假植

[0047] 生根培养1个月后将瓶盖打开，使生根苗与空气充分接触，放置至少1个星期，取出试管苗，用清水冲洗根部培养基，将试管苗移栽到河沙基质中培养。30d后统计温郁金的移栽成活率。

[0048] 各步骤光照条件为：白光光源，光照强度2000～2200lx，L/D＝10:14，环境温度25～28℃，环境湿度80～90％。

[0049] 实施例2

[0050] 一种温郁金组织培养的方法，包括以下步骤：

[0051] S1：块茎砂床催芽

[0052] 取健康的块茎整齐平铺在干净新鲜河沙，保持砂床湿润，待1个月后，块茎上长出数根小苗；

[0053] S2：外植体获得

[0054] 选取健康的小苗，切去根茎部分，用75％酒精消毒30s后，再用0.1％氯化汞消毒20min，用灭菌水清洗3～5次，接种在含35g/L蔗糖、6g/L卡拉胶、4mg/L6-BA的MS培养基，以获得无菌的外植体；

[0055] S3：不定芽的诱导

[0056] 待芽长至3～5cm时，将芽接种于含有35g/L蔗糖、6g/L卡拉胶、2mg/L6-BA和1.0mg/

L NAA的MS培养基中诱导培养，每瓶接1个芽；培养基pH为5.5～5.8。4～5d后观察芽的生长情况，并将污染的细菌苗捡掉，统计好污染率，然后继续观察温郁金不定芽的诱导分化情况，30d后统计芽的诱导率。污染率(%)＝污染瓶数/总瓶数×100%，不定芽的诱导率(%)＝诱导的侧芽数/接种芽数×100%。

[0057] S4：继代增殖

[0058] 将诱导获得的新芽切成不多于5个侧芽的小块，接种于含35g/L蔗糖、6g/L卡拉胶、2mg/L 6-BA和1.0mg/L NAA的培养基中进行增殖培养，每瓶接种1～4个小块；每20d继代1次。观察芽的增殖和生长情况，统计温郁金的增殖芽数和增殖倍数。增殖芽数为接种的外植体所诱导出新芽的总数量。增殖倍数＝增殖芽数/接种的芽数。

[0059] S5：试管苗生根培养

[0060] 继代增殖培养后，将试管苗接种于含有35g/L蔗糖、6g/L卡拉胶、0.5g/L活性炭和1.0mg/L NAA的MS培养基中培养。

[0061] S6：试管苗的假植

[0062] 生根培养1个月后将瓶盖打开，使生根苗与空气充分接触，放置至少1个星期，取出试管苗，用清水冲洗根部培养基，将试管苗移栽到河沙基质中培养。30d后统计温郁金的移栽成活率。

[0063] 各步骤光照条件为：白光光源，光照强度2000～2200lx，L/D＝10:14，环境温度25～28℃，环境湿度40～50%。

[0064] 实施例3

[0065] 实施例3与实施例1的区别是：

[0066] 步骤S3所述MS培养基中还含有3g/L褐藻寡糖、6.5mg/L水杨酸和11mg/L茉莉酸甲酯，更改培养基中氯化钙浓度为640mg/L。

[0067] 步骤S5所述MS培养基中还含有5mg/L茉莉酸甲酯，更改培养基中氯化钙的浓度为520mg/L。

[0068] 步骤S1至步骤S4，在LED红蓝光条件下每天光照10h，红蓝光比例4:1，光照强度为1600～1800lx，环境湿度40～60%，环境温度25～28℃；步骤S5，在白光条件下每天光照10h，光照强度为1800～2200lx，环境湿度40～60%，环境温度25～28℃；步骤S6，在白光条件下每天光照10h，光照强度为1800～2200lx，环境湿度80～90%，环境温度25～28℃。

[0069] 实施例4

[0070] 实施例4与实施例1的区别是：

[0071] 步骤S3所述MS培养基中还含有5g/L褐藻寡糖、10.3mg/L水杨酸和18mg/L茉莉酸甲酯，更改培养基中氯化钙浓度为680mg/L。

[0072] 步骤S5所述MS培养基中还含有10mg/L茉莉酸甲酯，更改培养基中氯化钙的浓度为550mg/L。

[0073] 步骤S1至步骤S4，在LED红蓝光条件下每天光照12h，红蓝光比例5:1，光照强度为2000～2200lx，环境湿度40～60%，环境温度25～28℃；步骤S5，在白光条件下每天光照12h，光照强度为2200～2400lx，环境湿度40～60%，环境温度25～28℃；步骤S6，在白光条件下每天光照12h，光照强度为2200～2400lx，环境湿度80～90%，环境温度25～28℃。

[0074] 对比例1

[0075] 一种温郁金组织培养的方法，包括以下步骤：

[0076] S1：块茎砂床催芽

[0077] 取健康的块茎整齐平铺在干净新鲜河沙，保持砂床湿润，待1个月后，块茎上长出数根小苗；

[0078] S2：外植体获得

[0079] 选取健康的小苗，切去根茎部分，用75％酒精消毒20s后，再用0.2％氯化汞消毒20min，用灭菌水清洗3～5次，接种在含5mg/L 6-BA的MS培养基，以获得无菌的外植体；

[0080] S3：不定芽的诱导

[0081] 待芽长至3～5cm时，将芽接种于含有2.0mg/L 6-BA、0.5mg/L NAA的MS培养基中诱导培养，每瓶接1个芽；培养基pH为5.5～5.8。4～5d后观察芽的生长情况，并将污染的细菌苗捡掉，统计好污染率，然后继续观察温郁金不定芽的诱导分化情况，30d后统计芽的诱导率。污染率(％)＝污染瓶数/总瓶数×100％，不定芽的诱导率(％)＝诱导的侧芽数/接种芽数×100％。

[0082] S4：继代增殖

[0083] 将诱导获得的新芽切成不多于5个侧芽的小块，接种于含30g/L蔗糖、0.4mg/L TDZ、0.5mg/L NAA的培养基中进行增殖培养，每瓶接种1～4个小块；每20d继代1次。观察芽的增殖和生长情况，统计温郁金的增殖芽数和增殖倍数。增殖芽数为接种的外植体所诱导出新芽的总数量。增殖倍数＝增殖芽数/接种的芽数。

[0084] S5：试管苗生根培养

[0085] 继代增殖培养后，将试管苗接种于含有0.5g/L活性炭和0.5mg/L NAA的MS培养基中培养。

[0086] S6：试管苗的假植

[0087] 生根培养1个月后将瓶盖打开，使生根苗与空气充分接触，放置1个星期，取出试管苗，用清水冲洗根部培养基，将试管苗移栽到河沙基质中培养。30d后统计温郁金的移栽成活率。

[0088] 各步骤光照条件为：白光光源，光照强度1300～1500lx，光照时间8h/d；

[0089] 试验例：

[0090] (1)分别采用实施例与对比例的方法进行温郁金组织培养，并统计污染率、不定芽诱导率、不定芽增殖倍数和移栽成活率。结果见表1。

[0091] (2)将假植后的小苗移栽至大田中种植，6个月后取其根茎，按2015版《中华人民共和国药典》一部附录XD的方法测定挥发油含量。结果见表1。

[0092] 表1

[0093]

	污染率	芽诱导率	芽增殖倍数	成活率	挥发油含量％(mL/g)
实施例1	4.3％	137％	9.97	95％	5.57±0.03％
实施例2	4.5％	129％	7.50	97％	5.40±0.07％
实施例3	2.1％	158％	12.20	97％	7.89±0.05％
实施例4	3.4％	155％	11.37	96％	8.22±0.04％
对比例1	6.6％	107％	4.12	97％	5.49±0.03％

[0094] 结果表明，采用本发明方法进行温莪术组织培养，污染率小于5％，诱导率达到

129%以上，芽增殖倍数达到7.5以上，成活率达到95%以上，挥发油含量达到5.4%以上。

[0095] 此外，本发明发现，通过对培养条件和培养基的改良，不仅可降低污染率至2.1%，提高诱导率至158%，提高增殖倍数至11.37，更重要的是可同时提高挥发油含量至8.22%。

[0096] 以上内容是结合具体的实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换。

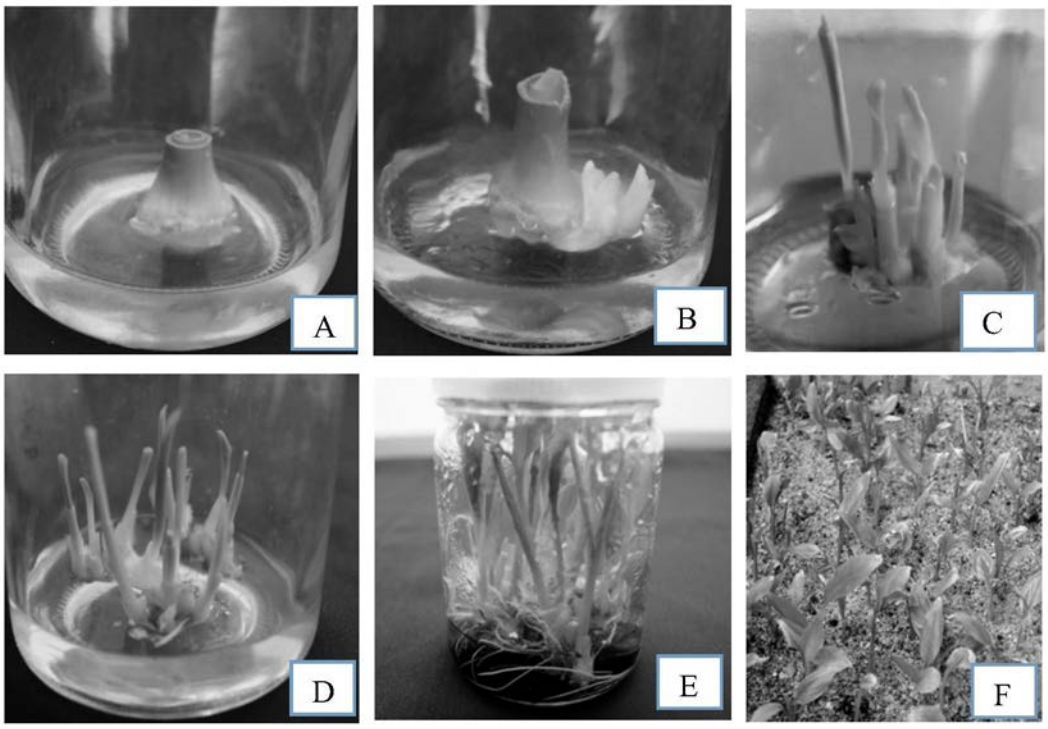


图1