



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119655170 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 21

(21) 申请号 202510079799.6

(22) 申请日 2025.01.18

(71) 申请人 海南大学

地址 570208 海南省海口市人民大道58号

(72) 发明人 陈健妙 王凯旋 郭佳忻

(74) 专利代理机构 海南翔翔专利代理有限公司

46001

专利代理师 吴玉环

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法

(57) 摘要

本发明属于农业生物技术领域,公开了一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,取常规组织培养获得的温郁金顶芽丛生增殖芽,接种至根茎诱导培养基中进行生根培养,培养30天后获得具有根茎的组培苗,所述根茎诱导培养基:1/2MS+NAA 0.1~1.0mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱1~3mg/L+复硝酚钠1~3mg/L,pH为5.8,其中按重量比计氯化胆碱:复硝酚钠=1:(0.3~2)。本发明通过离体诱导温郁金试管微根茎形成,利用无菌微根茎直接移栽、制造微根茎人工种子播种,省略绿苗炼苗假植环节以及减少因绿苗对湿度严苛要求而导致的种苗损失,且试管微根茎种苗利于存储和远距离运输,从而提高根茎植物种苗繁育效率。



1. 一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,取经常规组织培养得到的温郁金增殖丛芽,以单芽接种至根茎诱导培养基中进行生根培养,培养30天后获得具有根茎的组培苗;

所述根茎诱导培养基:1/2MS+NAA 0.1~1.0mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱1~3mg/L+复硝酚钠1~3mg/L,pH为5.8,其中按重量比计氯化胆碱:复硝酚钠=1:(0.3~2)。

2. 根据权利要求1所述的诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,所述氯化胆碱的浓度为3mg/L,复硝酚钠的浓度为1mg/L。

3. 根据权利要求1所述的诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,所述氯化胆碱的浓度为1mg/L,复硝酚钠的浓度为2mg/L。

4. 根据权利要求1所述的诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,所述氯化胆碱的浓度为2mg/L,复硝酚钠的浓度为3mg/L。

5. 根据权利要求1所述的诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,所述氯化胆碱的浓度为3mg/L,复硝酚钠的浓度为2mg/L。

6. 根据权利要求1所述的诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,所述温郁金不定芽的组织培养过程为:

1) 外植体的消毒灭菌

取温郁金优株的根茎,经消毒处理后置于25~27℃光照培养箱中进行催芽,待芽长到2~3cm时,切取萌芽进行消毒处理;

2) 诱导培养

把经消毒后的萌芽上半部叶片切除,留芽长0.8~1.2cm,将单芽纵切成两块,插接于诱导培养基中进行前期初代定芽萌发诱导培养,培养7~10天;培养条件:温度为24~26℃,光照强度为1000~2000lx,光照时间为10~12h/天,得到初代定芽;所述诱导培养基:MS+1.5~2.5g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8;

3) 增殖培养

将经过前期诱导得到的初代定芽接种于继代增殖培养基中进行增殖培养,培养条件:温度为24~26℃,光照强度为1500~2000lx,光照时间为6~8h/天;培养30天后获得大量的丛生芽,更换新的续代增殖培养基继续增殖培养,继代增殖培养3~4次后得到大量丛芽;所述继代增殖培养基:MS+4~5mg/L 6-BA+0.1~0.5mg/L NAA+2.1~2.5g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

7. 根据权利要求1所述的诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,所述生根培养的条件为:温度为25~27℃,先暗培养3~5天,再进行光照培养,光照强度为1500~2500lx,光照时间为8-12h/d,相对湿度为75%。

8. 根据权利要求6所述的诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,在步骤1)中,所述根茎的消毒处理方式是先用0.1%多菌灵溶液进行灭菌消毒,时间为10~15min;所述萌芽的消毒处理方式是先用70%酒精消毒45~60s,无菌水冲洗2次,再用2%次氯酸钠消毒15~20min,无菌水冲洗5次。

9. 根据权利要求6所述的诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,其特征在于,在步骤2)中,把经消毒后含有生长点的萌芽上半部叶片切除。

一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法

技术领域

[0001] 本发明属于组培快繁技术领域,具体涉及一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法。

背景技术

[0002] 温郁金(*Curcuma wenyujin*)是姜科(*Zingiberaceae*)姜黄属郁金的栽培品种,多年生药用植物,主产于浙江省温州市瑞安地区,植株中富含莪术挥发油、姜黄素类以及多糖等多种功能代谢成分,具有抗肿瘤、抗炎抑菌、抗病毒、抗血栓、保肝、保护神经和抗氧化等功效。其药用部位主要是根茎和块根,根据不同的部位和方法,可加工成3种不同中药材:主根茎煮熟晒干称“温莪术”、块根煮熟晒干称“温郁金”、鲜侧生根茎纵切厚片后晒干称“片姜黄”,其中,“温郁金”为著名的道地药材“浙八味”之一。

[0003] 莪术挥发油中的莪术醇(*curcumol*)、莪术双酮(*curclione*)、 β -榄香烯(β -elemene)等为抗癌有效成分,以莪术挥发油为原料研制开发出疗效好、副作用小的新型抗肿瘤、抗炎抑菌等的药物制剂日益增多,如妇科外用良药保妇康栓的主要成分即为莪术挥发油。温莪术在莪术商品中以挥发油含量高、质量好而倍受青睐,故温郁金不仅在原产地浙江温州瑞安原产区栽培,国内其他适栽的省份如海南、云南、贵州等异地也引种扩大种植。

[0004] 温郁金的传统种植材料是根茎,长期无性繁殖导致植株不同程度携带、累积病毒和感染土传病原体等,引起种性退化,根茎品质参差不齐;利用根茎作为种茎,繁殖系数低,耗费大量原本可作为商品的根茎,种苗成本高;根茎繁殖的种苗良莠不一,造成根茎品质不匀、产量降低,难以获得安全、有效、稳定和可控的中药材等,给温郁金产业可持续性发展带来严重挑战。

[0005] 当前,利用组培快繁进行温郁金组培苗繁育,不受季节限制,可周年生产,繁殖效率明显提高,是常规大田根茎繁殖种苗的有效补充手段,但是温郁金以组培苗种植时,主要以生根绿苗移栽为主,根细且长,炼苗移栽过程中根容易受伤、易受湿度影响造成死苗,若不经假植炼苗,其移栽成活率低或不够稳定,不利于大面积推广应用。

发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的问题,本发明的目的在于提供一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,通过离体诱导温郁金试管微根茎形成,利用无菌微根茎直接移栽、制造微根茎人工种子播种,省略绿苗炼苗假植环节以及减少因绿苗对湿度严苛要求而导致的种苗损失,且试管微根茎种苗利于存储和远距离运输,从而提高根茎植物种苗繁育效率。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0008] 一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,取经常规组织培养得到的温郁金增殖丛芽,以单芽接种至根茎诱导培养基中进行生根培养,培养30天后获得具有根茎的组培苗;所述根茎诱导培养基:1/2MS+NAA 0.1~1.0mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱1~3mg/L+复硝酚钠1~3mg/L,pH为5.8,其中按重量比计氯化胆碱:复硝酚钠=1:(0.3~2)。

[0009] 在一种可选地实施方式中,所述氯化胆碱的浓度为3mg/L,复硝酚钠的浓度为1mg/L。

[0010] 在一种可选地实施方式中,所述氯化胆碱的浓度为1mg/L,复硝酚钠的浓度为2mg/L。

[0011] 在一种可选地实施方式中,所述氯化胆碱的浓度为2mg/L,复硝酚钠的浓度为3mg/L。

[0012] 在一种可选地实施方式中,所述氯化胆碱的浓度为3mg/L,复硝酚钠的浓度为2mg/L。

[0013] 在一种可选地实施方式中,所述温郁金不定芽的组织培养过程为:

[0014] 1) 外植体的消毒灭菌

[0015] 取温郁金优株的根茎,经消毒处理后置于25~27°C光照培养箱中进行催芽,待芽长到2~3cm时,切取萌芽进行消毒处理;

[0016] 2) 诱导培养

[0017] 把经消毒后的萌芽上半部叶片切除,留芽长0.8~1.2cm,将单芽纵切成两块,插接于诱导培养基中进行前期初代定芽萌发诱导培养,培养7~10天;培养条件:温度为24~26°C,光照强度为1000~2000lx,光照时间为10~12h/天,得到初代定芽;所述诱导培养基:MS+1.5~2.5g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8;

[0018] 3) 增殖培养

[0019] 将经过前期诱导得到的初代定芽接种于继代增殖培养基中进行增殖培养,培养条件:温度为24~26°C,光照强度为1500~2000lx,光照时间为6~8h/天;培养30天后获得大量的丛生芽,更换新的续代增殖培养基继续增殖培养,继代增殖培养3~4次后得到大量丛芽;所述继代增殖培养基:MS+4~5mg/L 6-BA+0.1~0.5mg/L NAA+2.1~2.5g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0020] 在一种可选地实施方式中,所述生根培养的条件为:温度为25~27°C,先暗培养3~5天,再进行光照培养,光照强度为1500~2500lx,光照时间为8-12h/d,相对湿度为75%。

[0021] 在一种可选地实施方式中,在步骤1)中,所述根茎的消毒处理方式是先用0.1%多菌灵溶液进行灭菌消毒,时间为10~15min;所述萌芽的消毒处理方式是先用70%酒精消毒45~60s,无菌水冲洗2次,再用2%次氯酸钠消毒15~20min,无菌水冲洗5次。

[0022] 在一种可选地实施方式中,在步骤2)中,把经消毒后含有生长点的萌芽上半部叶片切除。

[0023] 本发明技术方案与现有技术相比,具有如下优点:

[0024] (1) 本发明通过在生根培养基中添加适度配比的氯化胆碱和复硝酚钠,两者能相辅相成地有效诱导温郁金试管微根茎的发生和膨大,利用具根茎的组培生根苗进行种植,不但能保持优良种质遗传稳定、提高生产效率,也提高了其药材质量,以组培苗种植收获的根茎中,主要成分莪术挥发油中的主要有效药用活性成分吉马酮、莪术二酮、姜黄素等均高于相应的普通温郁金。

[0025] (2) 利用本发明的无菌微根茎直接移栽、制造微根茎人工种子播种,可省略绿苗炼苗、假植环节以及减少因绿苗对湿度严苛要求而导致的种苗损失,且试管微根茎种苗利于存储和远距离运输,从而提高根茎植物种苗繁育效率。

[0026] (3) 本发明具根茎的组培生根苗在移栽后的存活率以及根茎和块根的产量上相对于常规组培生根苗均有所较高,能有效简化组培苗驯化移栽和促进生长。

附图说明

[0027] 图1是本发明实施例中温郁金根茎取材和催芽。A、温郁金新鲜根茎;B、根茎催芽;C、根茎萌芽外植体;D、无菌芽。

[0028] 图2是本发明实施例中不同生根培养基对温郁金根茎分化诱导的影响图。

[0029] 图3是本发明离体微根茎对温郁金组培苗生长势的影响。A为温郁金组培苗盆栽60天后的植株形态;B为组培苗盆栽90天后的地下部根和根茎生长和形态。

具体实施方式

[0030] 下面结合实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0031] 以下实施例和对照例中的组培芽的获取过程均相同,不同之处在于将组培芽进行根茎诱导培养时培养基的成分和浓度配比不同,组培芽的获取过程如图1所示,图1中的A图为取自海南地区的温郁金新鲜根茎;B图为根茎催芽的情况;C图为从根茎上切取下来的萌芽;D图为萌芽经增殖培养后获得的无菌芽;将得到的不定芽作为实施例和对照例的根茎诱导试验。

[0032] 一、温郁金种苗繁育

[0033] 实施例1

[0034] 本实施例提供了一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,包括以下步骤:

[0035] 一、外植体的消毒灭菌

[0036] 根茎外植体于2023年12月选取引种已适应海南地区生态环境、健康、丰产的优株为外植体母株,根茎采集时,尽量避免伤口并保持根茎的完整性,清洗干净后晾干,使用广谱杀菌剂多菌灵(有效含量50%可湿性粉剂)0.1%溶液进行初步表面消毒10min,然后将根茎置于(25±2)℃光照培养箱中进行催芽,待芽长到3cm时,切取萌芽进行表面消毒,表面消毒的方式为先用70%酒精消毒45s,无菌水冲洗2次,再用2%次氯酸钠消毒15min,无菌水冲洗5次。

[0037] 二、诱导培养

[0038] 把经消毒后含生长点的萌芽上半部叶片切除,留芽长1cm,将单芽纵切成两块,插接于诱导培养基中进行前期初代定芽萌发诱导培养,培养7天,培养条件:温度为26℃,光照强度为1500lx,光照时间为12h/天;得到初代定芽;所述诱导培养基:MS+2.3g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0039] 三、增殖培养

[0040] 将经过前期诱导得到的初代定芽接种于继代增殖培养基中进行增殖培养,培养条件:温度为26℃,光照强度为1500lx,光照时间为8h/天;培养30天后获得大量的丛生芽,更换新的续代增殖培养基,切分丛生芽继续增殖培养,继代增殖培养3次后得到大量丛芽;所述继代增殖培养基:MS+5mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+2.3g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为

5.8。

[0041] 四、生根培养

[0042] 将温郁金增殖丛芽剔切成单芽,并将每个芽苗基部多余的组织、不定根和上部鞘叶切除,修整成保留生长点、约3cm的单个芽苗,以单芽插接的方式转接至根茎诱导培养基上培养,培养的条件为:温度为25℃,先暗培养3天,再进行光照培养,光照强度为25001x,光照时间为8h/d,相对湿度为75%,培养30天后获得具有根茎的组培苗,所述根茎诱导培养基:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱3mg/L+复硝酚钠1mg/L,pH为5.8。

[0043] 五、移栽

[0044] 将具有根茎的组培苗直接移栽至盛有基质(蛭石:营养土=1:1)的小盆中,散射光下缓苗10d,然后将盆栽苗置于正常光照下培养,视天气情况每盆定量浇灌去离子水,每月用稀释1000倍的可溶性肥溶液定量浇灌1次。

[0045] 实施例2

[0046] 本实施例提供了一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,包括以下步骤:

[0047] 一、外植体的消毒灭菌

[0048] 根茎外植体于2023年12月选取引种已适应海南地区生态环境、健康、丰产的优株为外植体母株,根茎采集时,尽量避免伤口并保持根茎的完整性,清洗干净后晾干,使用广谱杀菌剂多菌灵(有效含量50%可湿性粉剂)0.1%溶液进行初步表面消毒10min,然后将根茎置于(25±2)℃光照培养箱中进行催芽,待芽长到3cm时,切取萌芽进行表面消毒,表面消毒的方式为先用70%酒精消毒45s,无菌水冲洗2次,再用2%次氯酸钠消毒15min,无菌水冲洗5次。

[0049] 二、诱导培养

[0050] 把经消毒后含生长点的萌芽上半部叶片切除,留芽长1cm,将单芽纵切成两块,插接于诱导培养基中进行前期初代定芽萌发诱导培养,培养7天;培养条件:温度为26℃,光照强度为15001x,光照时间为12h/天;得到初代定芽;所述诱导培养基:MS+2.3g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0051] 三、增殖培养

[0052] 将经过前期诱导得到的无菌初代定芽接种于继代增殖培养基中进行增殖培养,培养条件:温度为26℃,光照强度为15001x,光照时间为8h/天;培养30天后获得大量的丛生芽,更换新的续代增殖培养基,切分丛生芽继续增殖培养,继代增殖培养3次后得到大量丛生芽;所述继代增殖培养基:MS+5mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+2.3g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0053] 四、生根培养

[0054] 将温郁金增殖丛芽剔切成单芽,并将每个芽苗基部多余的组织、不定根和上部鞘叶切除,修整成保留生长点、约3cm的单个芽苗,以单芽插接的方式转接至根茎诱导培养基上培养,培养的条件为:温度为25℃,先暗培养3天,再进行光照培养,光照强度为20001x,光照时间为10h/d,相对湿度为75%,培养30天后获得具有根茎的组培苗,所述根茎诱导培养基:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱1mg/L+复硝酚钠2mg/L,pH为5.8。

[0055] 五、移栽

[0056] 将具有根茎的组培苗直接移栽至盛有基质(蛭石:营养土=1:1)的小盆中,散射光

下缓苗10d,然后将盆栽苗置于正常光照下培养,视天气情况每盆定量浇灌去离子水,每月用稀释1000倍的可溶性肥溶液定量浇灌1次。

[0057] 实施例3

[0058] 本实施例提供了一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,包括以下步骤:

[0059] 一、外植体的消毒灭菌

[0060] 根茎外植体于2023年12月选取引种已适应海南地区生态环境、健康、丰产的优株为外植体母株,根茎采集时,尽量避免伤口并保持根茎的完整性,清洗干净后晾干,使用广谱杀菌剂多菌灵(有效含量50%可湿性粉剂)0.1%溶液进行初步表面消毒10min,然后将根茎置于(25±2)℃光照培养箱中进行催芽,待芽长到3cm时,切取萌芽进行表面消毒,表面消毒的方式为先用70%酒精消毒45s,无菌水冲洗2次,再用2%次氯酸钠消毒15min,无菌水冲洗5次。

[0061] 二、诱导培养

[0062] 把经消毒后含生长点的萌芽上半部叶片切除,留芽长1cm,将单芽纵切成两块,插接于诱导培养基中进行前期初代定芽萌发诱导培养,培养7天;培养条件:温度为26℃,光照强度为1500lx,光照时间为12h/天;得到初代定芽;所述诱导培养基:MS+2.3g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0063] 三、增殖培养

[0064] 将经过前期诱导得到的无菌初代定芽接种于继代增殖培养基中进行增殖培养,培养条件:温度为26℃,光照强度为1500lx,光照时间为8h/天;培养30天后获得大量的丛生芽,更换新的续代增殖培养基,切分丛生芽继续增殖培养,继代增殖培养3次后得到大量丛芽;所述继代增殖培养基:MS+5mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+2.3g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0065] 四、生根培养

[0066] 将温郁金增殖丛芽剔切成单芽,并将每个芽苗基部多余的组织、不定根和上部鞘叶切除,修整成保留生长点、约3cm的单个芽苗,以单芽插接的方式转接至根茎诱导培养基上培养,培养的条件为:温度为25℃,先暗培养3天,再进行光照培养,光照强度为1500lx,光照时间为12h/d,相对湿度为75%,培养30天后获得具有根茎的组培苗,所述根茎诱导培养基:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱2mg/L+复硝酚钠3mg/L,pH为5.8。

[0067] 五、移栽

[0068] 将具有根茎的组培苗直接移栽至盛有基质(蛭石:营养土=1:1)的小盆中,散射光下缓苗10d,然后将盆栽苗置于正常光照下培养。视天气情况每盆定量浇灌去离子水,每月用稀释1000倍的可溶性肥溶液定量浇灌1次。

[0069] 实施例4

[0070] 本实施例提供了一种诱导温郁金组培苗试管微根茎的方法,包括以下步骤:

[0071] 一、外植体的消毒灭菌

[0072] 根茎外植体于2023年12月选取引种已适应海南地区生态环境、健康、丰产的优株为外植体母株,根茎采集时,尽量避免伤口并保持根茎的完整性,清洗干净后晾干,使用广谱杀菌剂多菌灵(有效含量50%可湿性粉剂)0.1%溶液进行初步表面消毒10min,然后将根茎置于(25±2)℃光照培养箱中进行催芽,待芽长到3cm时,切取萌芽进行表面消毒,表面消

毒的方式为先用70%酒精消毒45s,无菌水冲洗2次,再用2%次氯酸钠消毒15min,无菌水冲洗5次。

[0073] 二、诱导培养

[0074] 把经消毒后含生长点的萌芽上半部叶片切除,留芽长1cm,将单芽纵切成两块,插接于诱导培养基中进行前期初代定芽萌发诱导培养,培养7天;培养条件:温度为26℃,光照强度为1500lx,光照时间为12h/天;得到初代定芽;所述诱导培养基:MS+2.3g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0075] 三、增殖培养

[0076] 将经过前期诱导得到的无菌初代定芽接种于继代增殖培养基中进行增殖培养,培养条件:温度为26℃,光照强度为1500lx,光照时间为8h/天;培养30天后获得大量的丛生芽,更换新的续代增殖培养基,切分丛生芽继续增殖培养,继代增殖培养3次得到大量丛芽;所述继代增殖培养基:MS+5mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+2.3g/L植物凝胶+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0077] 四、生根培养

[0078] 将温郁金增殖丛芽剔切成单芽,并将每个芽苗基部多余的组织、不定根和上部鞘叶切除,修整成保留生长点、约3cm的单个芽苗,以单芽插接的方式转接至根茎诱导培养基上培养,培养的条件为:温度为25℃,先暗培养3天,再进行光照培养,光照强度为1500lx,光照时间为12h/d,相对湿度为75%,培养30天后获得具有根茎的组培苗,所述根茎诱导培养基:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱3mg/L+复硝酚钠2mg/L,pH为5.8。

[0079] 五、移栽

[0080] 将具有根茎的组培苗直接移栽至盛有基质(蛭石:营养土=1:1)的小盆中,散射光下缓苗10d,然后将盆栽苗置于正常光照下培养,视天气情况每盆定量浇灌去离子水,每月用稀释1000倍的可溶性肥溶液定量浇灌1次。

[0081] 对比试验

[0082] 对照例1

[0083] 本对照例组培苗的获取过程同上述实施例1,不同之处在于本对比例在生根培养的步骤中,根茎诱导培养基中不添加有氯化胆碱和复硝酚钠这两种植物调节剂,根茎诱导培养基的成分为:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L。

[0084] 对照例2

[0085] 本对照例组培苗的获取过程同上述实施例1,不同之处在于本对比例在生根培养的步骤中,根茎诱导培养基中氯化胆碱和复硝酚钠之间的浓度配比不同,根茎诱导培养基的成分为:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱3mg/L+复硝酚钠0.6mg/L。

[0086] 对照例3

[0087] 本对照例组培苗的获取过程同上述实施例1,不同之处在于本对比例在生根培养的步骤中,根茎诱导培养基中氯化胆碱和复硝酚钠之间的浓度配比不同,根茎诱导培养基的成分为:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱1mg/L+复硝酚钠3mg/L。

[0088] 对照例4

[0089] 本对照例组培苗的获取过程同上述实施例1,不同之处在于本对比例在生根培养的步骤中,根茎诱导培养基中氯化胆碱和复硝酚钠之间的浓度配比不同,根茎诱导培养基

的成分为:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱2mg/L+复硝酚钠0.2mg/L。

[0090] 对照例5

[0091] 本对照例组培苗的获取过程同上述实施例1,不同之处在于本对比例在生根培养的步骤中,根茎诱导培养基中氯化胆碱和复硝酚钠之间的浓度配比不同,根茎诱导培养基的成分为:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱2mg/L+复硝酚钠0.3mg/L。

[0092] 对照例6

[0093] 本对照例组培苗的获取过程同上述实施例1,不同之处在于本对比例在生根培养的步骤中,根茎诱导培养基中氯化胆碱和复硝酚钠之间的浓度配比不同,根茎诱导培养基的成分为:1/2MS+NAA 0.5mg/L+蔗糖30g/L+氯化胆碱1mg/L+复硝酚钠4mg/L。

[0094] 二、组织培养效果鉴定

[0095] 1.温郁金组培芽微根茎诱导分化效果鉴定

[0096] 为鉴定根茎诱导培养基对温郁金组培芽微根茎诱导分化的效果,对上述实施例、对照例中温郁金组培芽在进行生根培养时微根茎的诱导率、长度和粗度进行观察和计算。其中,微根茎诱导率(%)=(诱导出微根茎的芽数/原始接种芽数)×100%;根茎长(cm)、根长(cm)、根茎粗(mm)以游标卡尺测量;结果见表1和图2。

[0097] 表1不同生根培养基对温郁金组培芽微根茎分化的影响

[0098]

项目	根茎诱导率(%)	根茎长(cm)	根茎粗(mm)	根长(cm)	根粗(mm)
实施例1	46±2.6b	1.7±0.2a	6.8±0.1a	2.8±0.2e	4.5±0.2a
实施例2	62±1.0a	1.8±0.2a	4.5±0.3b	4.3±0.3a	2.1±0.0b
实施例3	20±2.0d	0.9±0.6b	3.1±0.2c	3.5±0.1cd	1.8±0.2c
实施例4	28±0.6c	0.5±0.3c	2.8±0.2c	3.6±0.0cd	1.6±0.0cd
对照例1	/	/	/	3.5±0.1d	0.4±0.1g
对照例2	/	/	/	3.2±0.1de	1.1±0.1ef
对照例3	/	/	/	3.4±0.4d	1.3±0.1ef
对照例4	/	/	/	4.3±0.1b	0.7±0.2g
对照例5	/	/	/	4.1±0.2bc	1.1±0.2f
对照例6	/	/	/	3.4±0.0de	1.4±0.1de

[0099] *注:表中同一列数字不同小写字母表示差异达到显著水平(P<0.05)。

[0100] 上述温郁金组培芽微根茎诱导分化效果表明,采用本发明的根茎诱导培养基(实施例1、实施例2、实施例3、实施例4、对照例2、对照例3、对照例4、对照例5、对照例6)和常规的生根培养基(对照例1)都能诱导生根,无明显主根,但能诱导分化形成长于0.5 cm(根茎长度小于0.5cm的不计)的根茎仅有实施例1、实施例2、实施例3和实施例4,且相互间诱导率差异显著,以实施例2的诱导率最高,达62%,其次是实施例1,达到46%,这四个实施例中,能诱导出根茎发生的依次为:实施例2>实施例1>实施例4>实施例3。

[0101] 其中,在图2中,A为实施例1的根茎诱导情况;B为实施例2根茎诱导情况;C为实施例3根茎诱导情况;D为实施例4根茎诱导情况;E为对照例1根茎诱导情况;F为对照例2根茎诱导情况;G为对照例3根茎诱导情况;H为对照例4根茎诱导情况;I为对照例5根茎诱导情况;J为对照例6根茎诱导情况。

[0102] 微根茎的长度和粗度是衡量微根茎生长及产量的关键指标,结合表1和图2可知,

实施例2的根茎诱导培养基对促进微根茎伸长依然明显(如图2中的B图所示),与实施例1无显著差异(如图2中的A图所示),但是两者明显强于实施例3(如图2中的C图所示)和实施例4(如图2中的D图所示),而促进根茎增粗则以实施例1最明显,根茎最大处直径为6.8mm,其次为实施例2,两者均显著高于实施例3和实施例4。综合根茎诱导率、根茎长和根茎粗,四个实施例诱导的效果依大到小依次为:实施例1>实施例2>实施例3>实施例4。

[0103] 相对于实施例2-6,本发明实施例1-4在提高诱导率的同时又能保持根茎的生长,表明氯化胆碱和复硝酚钠这两种植物调节剂添加的浓度配比在合理的范围之内时才能在利于温郁金微根茎的诱导分化同时,并促进根茎的生长,超过这个合理的范围之内时将无法诱导根茎的形成。

[0104] 2.温郁金组培芽生长形态效果鉴定

[0105] 为鉴定根茎诱导培养基对温郁金组培芽生长形态的影响,对上述实施例、对照例中温郁金组培芽在进行根茎诱导培养时组培芽的生长状态进行观察。结果见表2。

[0106] 表2不同生根培养基对温郁金组培芽生长状态的影响

项目	芽生长状态
实施例 1	芽生长旺盛,粗壮;叶浓绿
实施例 2	芽生长旺盛,粗壮;叶浓绿
实施例 3	芽正常,生长良好;叶绿色
实施例 4	芽多,生长一般;叶浓绿
[0107] 对照例 1	芽小,长势差;叶淡绿
对照例 2	芽生长正常,叶绿色
对照例 3	芽小,长势差;叶淡绿
对照例 4	芽正常,生长良好;叶绿色
对照例 5	芽小,生长良好;叶绿色
[0108] 对照例 6	芽细弱;叶淡绿

[0109] 上述温郁金组培芽生长状态表明,采用普通的生根培养基对温郁金组培芽进行生根诱导时,其芽小,长势差,叶淡绿;而采用本发明的根茎诱导培养基(实施例1、实施例2、实施例3、实施例4)时,芽的生长状态均较好,以实施例1和实施例2的最好,其芽生长旺盛、粗壮、叶浓绿;但是当根茎诱导培养基中氯化胆碱和复硝酚钠这两者超过合适的范围之外(对照例2、对照例3、对照例4、对照例5以及对照例6)时,只有对照例2和对照例4的芽生长状态为正常、生长良好、叶绿色,其余的芽生长状态均较差。

[0110] 3.温郁金组培苗生长势效果鉴定

[0111] 为鉴定具有根茎的温郁金组培苗移栽后的生长效果,将上述实施例1和对照例1中的温郁金组培苗移栽至盆中进行栽培,第30天后统计存活率(%),第31至第40天间测定绝对生长速率AGR(mm/d),第60天观测统计组培苗的植株萌发叶数和分蘖(片或个/株)以及称量地下部重量(g,含根茎和块根)等生长情况。其中,移栽成活率(%)=(成活植株数/移栽总植株数)×100%,AGR为10天的平均值;地下根茎和块根的生长(g)以天平称重测量。结果如表3和图3所示。

[0112] 表3温郁金香组培苗移栽生长情况

	项目	存活率 (%)	生长速率 (mm/d)	分蘖数 (个)	新增叶片 (片)	90 d 地下根茎及块根 (g/株)
[0113]	实施例 1	100±0.0 a	1.7±0.3 a	9.7±1.5 a	21.0±3.6 a	33.7±1.3 a
	对照例 1	73.3±5.8 b	0.8±0.1 b	5.3±0.6 b	10.3±0.6 b	18.4±0.8 b

[0114] 上述温郁金香组培苗移栽生长情况表明,与温郁金香常规生根组培苗(对照例1)相比,具根茎的组培生根苗(实施例1)能明显提高其移栽效率以及不同时期的生长势,与对照例1(采用常规组培生根苗进行盆栽)相比,实施例1(具根茎组培苗进行盆栽)的存活率为100%,生长速率为(1.7±0.3)mm/d,分蘖数为(9.7±1.5)个、新增叶片数为(21.0±3.6)片,地下根及根茎重量为(33.7±1.3)g/株,分别显著提高36.4%、112.5%、83.0%、103.9%和83.2%。综上,具根茎的组培生根苗能有效简化组培苗驯化移栽和促进生长。

[0115] 将温郁金香组培苗进行盆栽60天后对植株的形态进行观察,结果如图3中的A图所示(左侧图为对照例1中的植株生长形态图;右侧图为实施例1中的植株生长形态图),从A图可知,对照例1中的植株其生长速率较慢、分蘖数和新增叶片较少,表明采用本发明得到的组培苗进行种植时能提高植株的生长速率;温郁金香组培苗进行盆栽90天后将植株的地下部根和根茎取出对其生长形态进行观察,结果如图3中的B图所示(左侧图为对照例1中的植株生长形态图;右侧图为实施例1中的植株生长形态图),从B图可知,对照例1中的根茎及块根的数量和重量均小于实施例1,表明采用本发明的组培苗进行种植时其根茎的数量较多且较粗。

[0116] 虽然本发明已利用上述较佳实施例进行说明,但其并非用以限定本发明的保护范围,任何本领域技术人员在不脱离本发明的精神和范围之内,相对上述实施例进行各种变动与修改仍属于本发明所保护的范围。



图1

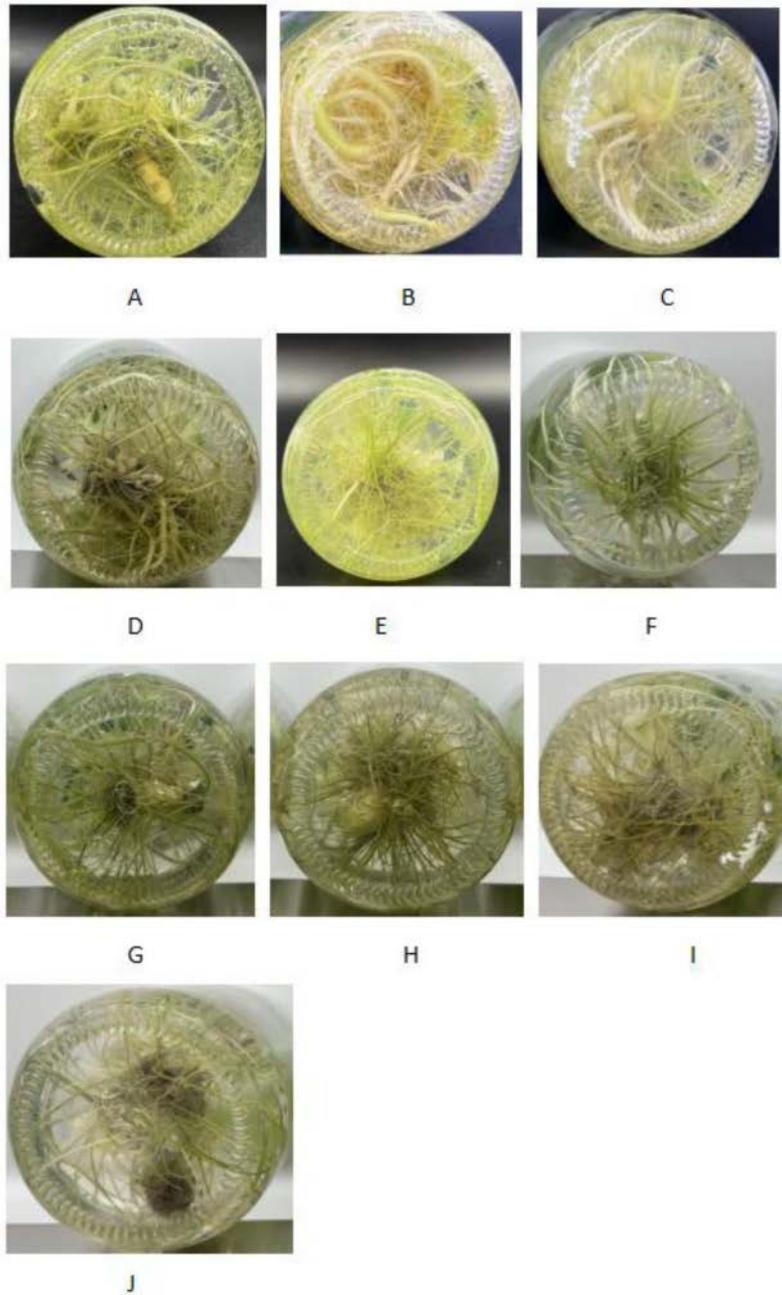


图2



图3