



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116034871 A

(43) 申请公布日 2023.05.02

(21) 申请号 202211445662.0

(22) 申请日 2022.11.18

(71) 申请人 上海纳米技术及应用国家工程研究中心有限公司

地址 201109 上海市闵行区剑川路468号

(72) 发明人 崔大祥 周园园

(74) 专利代理机构 上海东亚专利商标代理有限公司 31208

专利代理师 董梅

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

A01G 24/28 (2018.01)

A01G 24/15 (2018.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种贺兰山女蒿的组培快繁方法

(57) 摘要

本发明提供了一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,首先选择生长健壮,无病虫害的贺兰山女蒿枝条水培,取枝条上新生长出的腋芽和茎段为外植体,将其表面灭菌消毒后接种于初代培养基中诱导丛生芽后,转接到继代增殖培养基中诱导丛生芽大量繁殖,接着将从生芽接种于生根培养基中进行生根培养,最后对获得的生根苗进行炼苗,移栽培育。本发明方法简单,易操作,能有效降低贺兰山女蒿初代培养污染率,缩短生长周期,为今后贺兰山女蒿的开发利用和野生种质资源保护提供技术支撑和保障。

1. 一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,其特征在于,选择生长健壮,无病虫害的贺兰山女蒿枝条进行水培,取枝条上新生长出的腋芽和茎段为外植体,对其依序进行外植体的灭菌消毒、初代培养、继代培养、生根培养以及移栽炼苗,最终获得再生植株;其中,所述初代培养基、继代增殖培养基以及生根培养基的pH为5.80~6.00,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照时间12 h/d,光强为1500~2000 lx,培养时间为30 d。

2. 根据权利要求1所述的一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,其特征在于,外植体的消毒灭菌方法为:将贺兰山女蒿新生茎段和腋芽放入盛有洗洁精溶液的玻璃瓶中,瓶口用纱布包住,置于流水下冲洗30~40 min;然后,将洗干净后的外植体移至超净工作台中,用75%的酒精浸泡30s,无菌水冲洗3~4次,再用4%的次氯酸钠溶液震荡消毒10分钟,无菌水冲洗3~4次。

3. 根据权利要求1所述的一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,其特征在于,所述初代培养采用的丛生芽诱导无菌苗培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂。

4. 根据权利要求1所述的一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,其特征在于,所述继代培养采用的增殖培养基为:MS+0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂。

5. 根据权利要求1所述的一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,其特征在于,所述生根培养采用的生根培养基为:1/2 MS+0.3 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂。

6. 根据权利要求1所述的一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,其特征在于,移栽炼苗所用基质是用高锰酸钾灭菌消毒过的,各类基质比为草炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1。

7. 根据权利要求1至6任一项所述的一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,其特征在于,按下述步骤培养:

1)、外植体选择:选择生长健壮,无病虫害的贺兰山女蒿枝条水培,之后,以枝条上生长出的腋芽和茎段为外植体,去掉部分叶片,放入盛有洗洁精溶液的玻璃瓶中,瓶口用纱布包住,置于自来水下冲洗30~40 min;

2)、外植体的消毒:将洗干净后的外植体移至超净工作台中,用75%的酒精浸泡30 s,无菌水浸洗3~4次,然后再用4%的次氯酸钠溶液震荡消毒10分钟,无菌水冲洗3~4次,最后将清洗好的外植体放到无菌接种盘中用无菌纸把水分吸干,接种到初代培养基中;

3)、初代丛生芽诱导:将消毒灭菌后的外植体,移至无菌滤纸上吸干表面水分,剪去两端伤口,接种于以MS为基本培养基,植物生长调节剂为1.0 mg/L的 6 BA、0.01 mg/L 的NAA的培养基中进行丛生芽诱导,每个处理接种30个外植体,重复3次,最后,将其放置于光强为1500~2000 lx,光周期为12 h/d,温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,湿度60%的组培室中培养,30天后统计启动率和出芽指数;

4)、继代增殖培养:以初代培养中生长良好的贺兰山女蒿丛生芽作为外植体,将其无菌苗腋芽剪切成1.5~2 cm左右,转接到以MS为基础培养基,植物生长调节剂为0.3mg/L的 6BA和0.1mg/L 的NAA的增殖培养基中诱导丛生芽大量繁殖;每个处理接种30个外植体,重复3次,30天后统计增殖系数并观察丛生芽的生长状态;最后将其放置在光强为1500~2000 lx,光周期为12 h/d,温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,湿度60%的组培室中培养,30天后计算腋芽和茎段的增殖系数;

5)、生根培养:选择大小一致,生长健壮的贺兰山女蒿无菌苗转接至以1/2MS为基本培

培养基,0.3 mg/L NAA生根培养基中,每个处理接种30个外植体,重复3次;一个月后统计不同培养基贺兰山女蒿的生根率、平均根数,观察其根系生长状况;

6)、炼苗移栽:在组培室内将已生根的贺兰山女蒿组培瓶盖打开,炼苗3天,接着转移到温室内炼苗2天,之后用自来水冲洗干净根系上的培养基,移栽至轻基质中培养,所用基质按照草炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1的比例混合拌均,之后采用高锰酸钾对基质进行灭菌消毒;移栽后浇透水,喷施绿亨2号,防止烂根,最后,将移栽好的苗子放置于阴凉处,盖上保湿罩,每天喷水2-3次,待其生长稳定后放置于阳光下生长。

## 一种贺兰山女蒿的组培快繁方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于组织培养技术领域,特别涉及一种贺兰山女蒿的组培快繁方法。

### 背景技术

[0002] 贺兰女蒿(*Hippolytia alashanensis*)是菊科女蒿属的植物,具有较强的耐旱、耐寒、耐瘠薄性,为我国特有植物,主要分布在甘肃、内蒙古、宁夏等地,生长于海拔1900米至2250米的地区,多生长于石缝、草原、山坡或荒漠草原。其茎、叶青鲜时羊和骆驼喜食,马乐食,牛稍食,结实后羊最喜食,骆驼、马也喜食。贺兰山女蒿有抓膘作用,属于中等饲用植物,冬季枝条保留良好,是冬季荒漠草原放牧场上的重要饲用植物,其在开花期的粗蛋白质含量较高,粗纤维含量较低,无氟浸出物亦较高。目前贺兰山女蒿还未由人工引种栽培,缺乏规模化的繁殖与栽培,有关其市场开发在国内还属于空白阶段。因此,有必要开展其繁殖技术研究,有效保护我国贺兰山女蒿野生种质资源,同时促进其野生居群的扩大和可持续开发利用。

### 发明内容

[0003] 本发明主要目的是提供一种贺兰山女蒿的组培快繁育苗方法。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的:

#### 1、外植体选择

选择生长健壮,无病虫害的贺兰山女蒿枝条进行水培,取枝条上新生长出的腋芽和茎段为外植体,去除部分叶片。

#### [0005] 2、外植体消毒

将贺兰山女蒿腋芽和茎段放入盛有洗洁精溶液的玻璃瓶中,瓶口用纱布包住,在流水下冲洗30~40 min。然后将洗干净后的外植体移至超净工作台中,用75%的酒精浸泡30 s,无菌水冲洗3~4次,接着再用4%的次氯酸钠溶液震荡消毒10分钟,无菌水冲洗3~4次。

#### [0006] 3、初代培养

用无菌纸吸干外植体表面水分,之后置于无菌盘中,使用高温灭菌后的镊子和剪刀将接触药液的切口切除,接种于初代培养基中,pH调整为5.8~6.0,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照时间12 h/d,光强为1500~2000 lx,培养周期为30 d。

#### [0007] 4、继代增殖培养

将初代培养中获得的贺兰山女蒿无菌苗茎段剪切成1.5-2 cm左右,转接到继代增殖培养基中进行增殖培养,pH调整为5.8~6.0,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照时间12 h/d,光强为1500~2000 lx,培养周期为30 d。

#### [0008] 5、生根培养

选择大小一致,生长健壮的贺兰山女蒿丛生芽植株,接种到生根培养基中生根培养,pH调整为5.80~6.00,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照时间12 h/d,光强为1500~2000 lx,培养周期为30 d。

### [0009] 6、炼苗移栽

在组培室内将已生根的组培瓶盖打开,在组培室内炼苗3天,接着转移到温室内炼苗2天,之后用自来水冲洗干净根系上的培养基,移栽至草炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1的育苗基质中进行栽培。

[0010] 一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,其特征在于,选择生长健壮,无病虫害的贺兰山女蒿枝条进行水培,取枝条上新生长出的腋芽和茎段为外植体,对其进行灭菌消毒、初代培养、继代培养、生根培养以及炼苗移栽,最终获得再生植株。其中所述初代培养基、继代增殖培养基以及生根培养基的pH为5.80~6.00,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照时间12 h/d,光强为1500~2000 lx,培养时间为30 d。

[0011] 外植体的灭菌消毒,具体方法为:将贺兰山女蒿新生茎段和腋芽放入盛有洗洁精溶液的玻璃瓶中,瓶口用纱布包住,置于流水下冲洗30~40 min。然后将洗干净后的外植体移至超净工作台中,用75%的酒精浸泡30 s,无菌水冲洗3~4次,再用4%的次氯酸钠溶液震荡消毒10分钟,无菌水冲洗3~4次。

[0012] 所述初代丛生芽诱导无菌苗培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂。

[0013] 所述继代增殖培养基为:MS+0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂。

[0014] 所述生根培养基为:1/2 MS+0.3 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂。

[0015] 移栽所用基质是用高锰酸钾灭菌消毒过的,各类基质比为草炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1。

[0016] 本发明的有益效果在于:本发明提供了一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,通过采集新生嫩芽和茎段为外植体诱导无菌苗,不经过愈伤组织途径,直接诱导外植体的芽分化,通过初代培养,继代培养、生根培养以及轻基质育苗,在短期内快速获得大量的再生植株。使用该方法得到的再生植株,结果稳定,组培苗成活率高,遗传性状稳定,能够保持母本的优良遗传性状,不易发生变异。本发明对于保护我国野生贺兰山女蒿种质资源,促进其野生居群的扩大和可持续开发利用等方面具有重要的作用。本发明方法简单,易操作,能有效降低贺兰山女蒿初代培养的污染率,缩短生长周期,为今后贺兰山女蒿的开发利用和野生种质资源保护提供技术支撑和保障。

### 附图说明

[0017] 图1实施例1技术方案中初代培养的状态图;

图2、图3、图4是实施例1技术方案中丛生芽增殖生长的状态图;

图5是实施例1技术方案中生根植株的生长状态图;

图6是实施例1技术方案中移栽植株的生长状态图。

### 具体实施方式

[0018] 为了更好地理解本发明技术内容,下面提供具体实施例,对本发明做进一步说明。本发明所涉及的术语:6-BA为6-苄基腺嘌呤;NAA为萘乙酸;MS基本培养基为4.43 g/L;1/2MS培养基是在MS培养基的基础上,将其中大量元素和钙盐减少为全量的1/2;本发明实施例所

用的试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0019] 实施例1:

一种贺兰山女蒿的组培快繁方法,选择生长健壮,无病虫害的贺兰山女蒿枝条进行水培,取枝条上新生长出的腋芽和茎段为外植体,对其依序进行外植体的灭菌消毒、初代培养、继代培养、生根培养以及移栽炼苗,最终获得再生植株;其中,所述初代培养基、继代增殖培养基以及生根培养基的pH为5.80~6.00,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照时间12 h/d,光强为1500~2000 lx,培养时间为30 d。

[0020] 1)、外植体选择:选择生长健壮,无病虫害的贺兰山女蒿枝条水培,之后,以枝条上新生长出的腋芽和茎段为外植体,去掉部分叶片,放入盛有洗洁精溶液的玻璃瓶中,瓶口用纱布包住,置于自来水下冲洗30~40 min;

2)、外植体的消毒:将洗干净后的外植体移至超净工作台中,用75%的酒精浸泡30 s,无菌水浸洗3~4次,然后再用4%的次氯酸钠溶液震荡消毒10分钟,无菌水冲洗3~4次,最后将清洗好的外植体放到无菌接种盘中用无菌纸把水分吸干,接种到初代培养基中;

3)、初代丛生芽诱导:将消毒灭菌后的外植体,移至无菌滤纸上吸干表面水分,剪去两端伤口,接种于以MS为基本培养基,植物生长调节剂为6-BA(0.25、0.5、1.0 mg/L)、NAA(0.01 mg/L)的培养基中进行丛生芽诱导,每个处理接种30个外植体,重复3次,最后,将其放置于光强为1500~2000 lx,光周期为12 h/d,温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,湿度60%的组培室中培养,30天后统计启动率和出芽指数,同时,观察不同培养基对出芽以及生长状况的影响。从表1中可以看出,贺兰山女蒿在培养基为A1(MS+0.25 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA)时,启动率最高,为80%;但是,出芽指数最低,且基部分化出的芽出现了玻璃化现象;而在A3(MS+1.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA)培养基时,启动率最低,为57.14%,但是出芽指数最高为4.00,分化出的芽玻璃化程度相对较轻;因此在这三种初代培养基中A3(MS+1.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA)的效果相对较好,初代培养的状态图如图1所示。

[0021] 4)、继代增殖培养:以初代培养中生长良好的贺兰山女蒿丛生芽作为外植体,将其无菌苗腋芽剪切成1.5~2 cm左右,转接到以MS为基础培养基,植物生长调节剂为6BA(0.3、0.5、1.0 mg/L)、NAA(0.1、0.2 mg/L)的增殖培养基中诱导丛生芽大量繁殖;每个处理接种30个外植体,重复3次,30天后统计增殖系数并观察丛生芽的生长状态。最后将其放置在光强为1500~2000 lx,光周期为12 h/d,温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,湿度60%的组培室中培养,30天后计算腋芽和茎段的增殖系数,观察记录不同培养基对增殖芽生长发育的影响;根据表2增殖结果显示,贺兰山女蒿在B5(MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA)的培养基下增殖效果最好,增殖系数为9,基部诱导出较多愈伤组织,但愈伤分化出的芽出现了较为严重的玻璃化现象;在B2(MS+0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA)的培养基中,增殖系数较低,基部诱导的愈伤组织较少,分化出的芽也较少,玻璃化程度较轻,相比于其他几种增殖培养基芽的生长状态最好,因此更适合作为贺兰山女蒿的继代增殖培养基。增殖情况如图2、图3、图4所示。

[0022] 5)、生根培养:选择大小一致,生长健壮的贺兰山女蒿无菌苗转接至以1/2MS为基本培养基,NAA(0.1、0.2、0.3 mg/L)生根培养基中,每个处理接种30个外植体,重复3次;一个月后统计不同培养基贺兰山女蒿的生根率、平均根数,观察其根系生长状况;从表3可以看出,贺兰山女蒿在C2(1/2 MS+0.2 mg/L NAA)培养基中生根率和平均根数最多,分别为81.81%和6.36,根系生长状态良好且较为粗壮,适合作为贺兰山女蒿的生根培养基。同时可

以看出在C1(1/2 MS+0.1 mg/L NAA)培养基中其生根率较高,但生根数较少,平均根数为4.91,根系生长较为细弱;在C3(1/2 MS+0.3 mg/L NAA)培养基中贺兰山女蒿的生根率为70%,产生较多根系,根系较为粗壮,且生长状态也良好,生根情况如图5所示。

[0023] 6)、炼苗移栽:在组培室内将已生根的贺兰山女蒿组培瓶盖打开,炼苗3天,接着转移到温室内炼苗2天,之后用自来水冲洗干净根系上的培养基,移栽至轻基质中培养,所用基质按照草炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1的比例混合拌均,之后采用高锰酸钾对基质进行灭菌消毒;移栽后浇透水,喷施绿亨2号,防止烂根,最后,将移栽好的苗子放置于阴凉处,盖上保湿罩,每天喷水2-3次,待其生长稳定后放置于阳光下生长,移栽后生长情况如图6所示。

[0024] 贺兰山女蒿试验数据如下表所示:

表 1 贺兰山女蒿初代培养试验结果

编号	基本培养基	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	启动率	出芽指数	出芽情况
A1	MS	0.25	0.01	80.00	2.00	基部有愈伤产生,芽长势不好,易玻璃化
A2	MS	0.5	0.01	66.67	2.16	基部有愈伤产生,芽长势不好,易玻璃化
A3	MS	1.0	0.01	57.14	4.00	基部有愈伤产生,芽长势较好,易玻璃化

表 2 贺兰山女蒿增殖培养试验结果

编号	基本培养基	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	增殖系数	增殖芽生长状况
B1	MS	0.3	0.05	5.80	基部诱导出较多愈伤和芽,但基部芽多玻璃化
B2	MS	0.3	0.1	4.80	基部诱导愈伤较少,分化芽较少,玻璃化程度较轻
B3	MS	0.5	0.05	6.40	基部诱导出愈伤较多,分化出的芽玻璃化较严重
B4	MS	0.5	0.1	4.80	基部诱导出较多愈伤,分化出的芽玻璃化
B5	MS	1.0	0.05	9.00	基部诱导愈伤较多且基部分化芽玻璃化
B6	MS	1.0	0.1	4.40	基部诱导愈伤较少紧致,但分化芽较少

表 3 贺兰山女蒿生根培养试验结果

编号	基本培养基	NAA (mg/L)	生根率 (%)	平均根数	根系生长状态
C1	1/2MS	0.1	72.27	4.91	根数较少, 长势细弱, 生长状态一般
C2	1/2MS	0.2	81.81	6.36	根数较多, 长势粗壮, 生长状态良好
C3	1/2MS	0.3	70.00	5.40	根数较多, 长势粗壮, 生长状态良好



图1

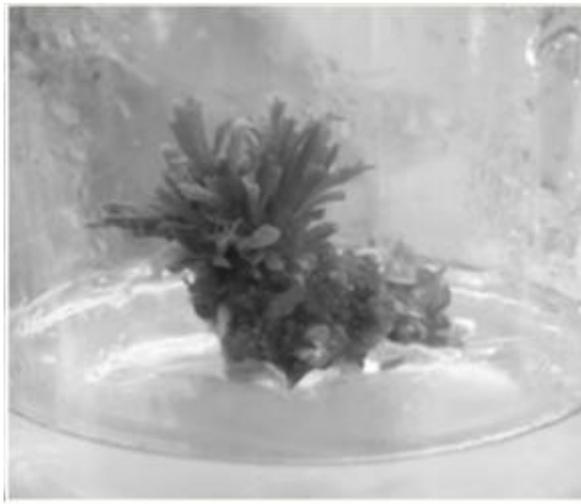


图2

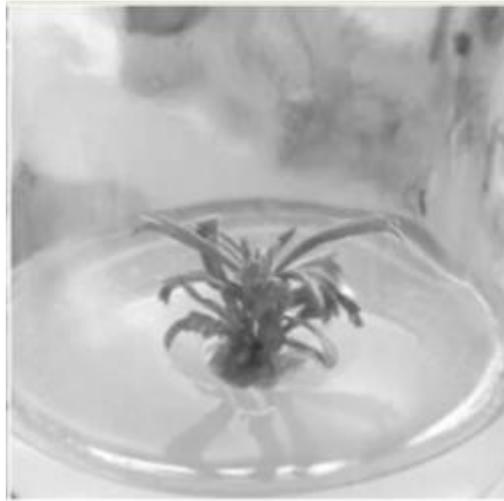


图3



图4

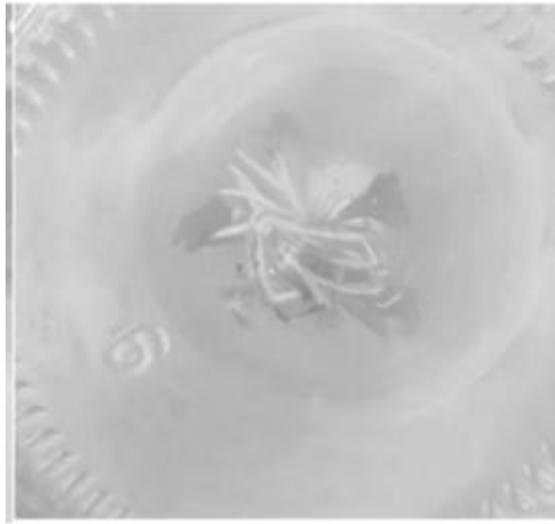


图5



图6