



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103651141 B

(45)授权公告日 2016.09.07

(21)申请号 201310671379.4

审查员 胡可

(22)申请日 2013.12.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103651141 A

(43)申请公布日 2014.03.26

(73)专利权人 安徽省农业科学院园艺研究所

地址 230031 安徽省合肥市农科南路40号

(72)发明人 江芹 董玲 廖华俊 宁志怨

李卫文 陈静娴 汤婷婷

(74)专利代理机构 安徽合肥华信知识产权代理

有限公司 34112

代理人 余成俊

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

A01G 31/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

亳菊工厂化试管苗快繁的方法

(57)摘要

本发明公开了亳菊工厂化试管苗快繁的方法,包括以亳菊花蕾为外植体,对其进行脱分化及再分化的诱导,利用组织培养技术得到的试管苗,通过蛭石基质或泥炭:蛭石:珍珠岩为33%:33%:33%的比例作基质,过渡30d左右,可得到3-5片叶,株高15-20cm的幼株,移栽到大田后,当年即可收药。采用本发明技术方案后:种苗完全来源同一植株,资源与遗传性状一致,减少病毒积累,周期短见效快,便于地道药材亳菊传统资源的保存和迅速推广,是一种适宜于工厂化生产亳菊试管苗的有效方法。



1. 亳菊工厂化试管苗快繁的方法,其特征在于包括亳菊组织培养试管苗的快繁过程和试管苗过渡培养过程;

所述的亳菊组织培养试管苗的快繁过程包括:

1) 亳菊外植体的采集和预处理:取生长健壮且无病虫害的亳菊,在秋季开花时选择有萼片包裹未开放的花蕾作为接种材料,采摘带有直径范围为0.2-0.3cm花蕾的枝条,放置于无菌环境下,紫外灯照射15-20min,再将花蕾用饱和洗衣粉浸泡15min左右,流水冲洗30min左右;

2) 外植体的消毒、接种:外植体的消毒:用75%左右的酒精浸泡30s左右,再用0.1%左右的升汞消毒8-10min,无菌水冲洗3-4次,无菌条件下将花蕾萼片及花蕊剥除露出花托,将花托切成0.1-0.3mm小块,得消毒后的外植体;

3) 外植体的脱分化:消毒后的外植体接种在脱分化培养基上,脱分化培养基为MS+6-BA 1.0-1.5mg/L+0.1-0.5mg/L IBA,置于光照培养箱26℃左右恒温培养,光照强度1500-2000Lx/12hd,培养45d左右后,产生愈伤组织;

4) 愈伤组织再分化:愈伤组织接种在再分化培养基:MS+6-BA 0.5-1.0mg/L + IBA 0.1-0.3mg/L+GA₃ 0.1-0.3mg/L上,培养30d左右,在绿色愈伤组织上可见突起的生长点;

5) 试管苗的继代:将出现可见突起的生长点的愈伤组织转接到继代培养基:MS+6-BA 0.5-1.0mg/L+IBA 0.1-0.3mg/L上,生成丛生芽,当丛生芽高达1-3cm时,将丛生芽切分或节间切段用上述继代培养基进行培养;

6) 试管苗生根:将株高3-5cm试管苗从继代培养基转接至1/2MS或1/2MS+ IBA 0.1-0.3mg/L生根培养基中进行生根培养,1-2周后,植株基部即可生出3-5条0.3-0.5cm白色的根系。

2. 根据权利要求1所述的亳菊工厂化试管苗快繁的方法,其特征在于,试管苗过渡培养过程采用无土培养方法,包括下述步骤:

1) 无菌苗过渡:将生根瓶苗移下培养架,松开瓶盖不完全打开,放置于室温下、自然光照,适应自然环境,保持湿度在70-90%,过渡3d-5d;

2) 过渡移栽:完全打开瓶盖清洗根部琼脂,移栽入穴盘或苗床蛭石基质中,浇透定根水,喷雾保湿3-4d,湿度保持在80-90%,7-15d长出新根,待亳菊幼苗成活后,保持湿度65-70%,解开覆盖物,保持通风和温度在18-25℃,每周喷施一次MS培养基的无机成分营养液,过渡30天左右,得到3-5片叶,株高15-20cm时,移栽到大田,当年即可收药。

3. 根据权利要求2所述的亳菊工厂化试管苗快繁的方法,其特征在于:过渡培养过程中,过渡成活后的试管苗定植于泥炭:蛭石:珍珠岩为:33%:33%:33%的营养土中,进行常规管理。

亳菊工厂化试管苗快繁的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及亳菊工厂化试管苗快繁的方法,属于农业生物技术及药用植物组织培养快繁领域。

背景技术

[0002] 亳菊[Dendranthem a morifolium(Rama.t)Tzve.l-Boju.cv.nov.]为菊科植物,主产于安徽亳州、涡阳一带,有200~300年的栽培历史,与滁菊、杭菊、贡菊并称四大药用菊花。《中药大辞典》载:“白菊产安徽亳州,称亳菊,品质最佳”。《中药志》亦如是说。20世纪中药巨著《中华本草》,也称亳菊和滁菊入药品质最优。近年来亳菊由于种性退化严重、效益低下以及市场的原因,真正的亳菊种植面积逐年减少,亳菊正面临着濒临灭绝的境况。经检索国内外未见申报涉及亳菊工厂化育苗技术的专利。常规的育苗方法有分茺繁殖,扦插繁殖,易病毒积累和传播,且受季节限制,该方法具有繁殖速度快适用于大面积生产,种苗完全来源同一植株,遗传性状一致等特点。

发明内容

[0003] 本发明目的在于提供一种适于亳菊工厂化试管苗快繁的方法,

[0004] 上述目的通过以下方案实现:

[0005] 亳菊工厂化试管苗快繁的方法,其特征在于包括亳菊组织培养试管苗的快繁过程和试管苗过渡培养过程。

[0006] 所述的亳菊工厂化试管快繁方法,其特征在于所述的亳菊组织培养试管苗的快繁过程包括亳菊外植体的采集和预处理,外植体的消毒、接种,外植体的脱分化、愈伤组织再分化、试管苗的继代及试管苗的生根过程。

[0007] 所述的亳菊工厂化试管快繁方法,其特征在于所述的亳菊组织培养试管苗的快繁过程包括:

[0008] 1)亳菊外植体的采集和预处理:取生长健壮且无病虫侵害的亳菊,在秋季开花时选择有萼片包裹未开放的花蕾作为接种材料,采摘带有直径范围为0.2-0.3cm花蕾的枝条,放置于无菌环境下,紫外灯照射15-20min,再将花蕾用饱和洗衣粉浸泡15min左右,流水冲洗30min左右;

[0009] 2)外植体的消毒、接种:外植体的消毒:用75%左右的酒精浸泡30s左右,再用0.1%左右的升汞消毒8-10min,无菌水冲洗3-4次,无菌条件下将花蕾萼片及花蕊剥除露出花托,将花托切成0.1-0.3mm小块,得消毒后的外植体;

[0010] 3)外植体的脱分化:消毒后的外植体接种在脱分化培养基上,脱分化培养基为MS+6-BA1.0-1.5mg/L+0.1-0.5mg/L IBA,置于光照培养箱26℃左右恒温培养,光照强度1500-2000Lx/12h.d,培养45d左右后,可产生愈伤组织;

[0011] 4)愈伤组织再分化:愈伤组织接种在再分化培养基:MS+6-BA0.5-1.0mg/L+IBA0.1-0.3mg/L+GA₃0.1-0.3mg/L上,培养30d左右,在绿色愈伤组织上可见突起的生长点;

[0012] 5) 试管苗的继代: 将出现可见突起的生长点的愈伤组织转接到继代培养基: MS+6-BA 0.5-1.0mg/L+IBA 0.1-0.3mg/L 上, 生成丛生芽, 当丛生芽高达 1-3cm 时, 可将丛生芽切分或节间切段用上述培养基进行培养;

[0013] 6) 试管苗生根: 将株高 3-5cm 试管苗从继代培养基转接至 1/2MS 或 1/2MS+IBA 0.1-0.3mg/L 生根培养基中进行生根培养, 1-2 周后, 植株基部即可生出 3-5 条 0.3-0.5cm 白色的根系。

[0014] 所述的毫菊工厂化试管苗快繁方法, 其特征在于所述的试管苗快繁过程中作为外植体采集的花蕾的直径最适为 0.2-0.3cm。

[0015] 所述的毫菊工厂化试管苗快繁的方法, 其特征在于, 试管苗过渡培养过程采用无土培养方法, 包括下述步骤:

[0016] 1) 无菌苗过渡: 将生根瓶苗移下培养架, 松开瓶盖不完全打开, 放置于室温、自然光照, 适应自然环境, 保持湿度在 70-90%, 过渡 3d-5d;

[0017] 2) 过渡移栽, 完全打开瓶盖清洗根部琼脂, 移栽入穴盘或苗床蛭石基质中, 浇透定根水, 喷雾保湿 3-4d, 湿度保持在 80-90%, 7-15d 可长出新根, 待毫菊幼苗成活后, 保持湿度 65-70%, 解开覆盖物, 保持通风和温度在 18-25℃ 之间, 每周喷施一次 MS 培养基的无机成分营养液, 过渡 30 天左右, 可得到 3-5 片叶, 株高 15-20cm 时, 即可移栽到大田, 当年即可收药。

[0018] 所述的毫菊工厂化试管苗快繁的方法, 其特征在于: 过渡培养过程中, 过渡成活后的试管苗也可定植于泥炭: 蛭石: 珍珠岩为: 33%: 33%: 33% 的营养土中, 进行常规管理。

[0019] 所述的毫菊工厂化试管苗快繁的方法, 其特征在于: 所述的 MS 培养基的无机成分营养液由 MS 培养基母液 I、母液 II、母液 III 混合配制而成。

[0020] 所述的毫菊工厂化试管苗快繁的方法, 其特征在于: 每升 MS 培养基的无机成分营养液中含有 MS 培养基母液 I 100ml、母液 II 10ml、母液 III 10ml, 再加入 10 升水稀释, 浇施于过渡苗上。

[0021] MS 培养基母液配制无机盐成分

母液种类	成分	称取量 (g/L)	1L 吸取量/ml
大量元素 (母液 I)	KNO_3	19	100
	NH_4NO_3	16.9	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7	
	KH_2PO_4	1.7	
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4	
微量元素 (母液 II)	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.23	10
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	
	H_3BO_3	0.62	
	KI	0.083	
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	
铁盐 (母液 III)	Na-EDTA	3.73	10
	$\text{FeSO}_4\text{H}_2\text{O}$	2.78	

[0023] 本发明的有益效果为：

[0024] 1. 本发明提供了一套适于亳菊种苗生产的工艺流程，可大规模开发种苗生产，简便易行，方法适用。

[0025] 2. 采用组培快繁技术与无土栽培技术相结合，可以在温室内周年生产，节约土地。

[0026] 3. 繁殖速度快、效率高，“一个月一周期，繁殖系数在10-20”，是常规繁殖年产量的几万乃至几十万倍。

[0027] 4. 进行的组培快繁，可完全继承亳菊的优良遗传性状，无病毒积累，安全可靠。

附图说明：

[0028] 图1试管苗炼苗移栽情况；

[0029] 图2为过渡期试管苗移栽后情况；

[0030] 图3为试管苗当年开花情况。

具体实施方式

[0031] 实例1：

[0032] (1) 毫菊外植体的采集和预处理:

[0033] 田间生长健壮且无病虫害的毫菊植株,在秋季开花时选择有萼片直径范围为0.2-0.3cm包裹的花蕾作为接种材料,采摘带有花蕾的枝条,放置于无菌环境下,紫外灯照射15-20min,再将花蕾用饱和洗衣粉浸泡15min,流水冲洗30min。另外,在采摘前可加适当的袋罩保持花蕾的清洁。

[0034] (2) 菊外植体的消毒:

[0035] 外植体的消毒、接种:预处理后的花蕾用75%的酒精浸泡30s,再用0.1%的升汞消毒8-10min,无菌水冲洗3-4遍,无菌滤纸吸干表面水分。无菌条件下将花蕾萼片及花蕊剥除露出花托,将花托切成0.1-0.3mm小块,接种于培养基上诱导培养。

[0036] (3) 毫菊外植体的脱分化:脱分化培养基为MS+6-BA1.0-1.5mg/L+0.1-0.5mg/LIBA。置于光照培养箱26℃恒温培养,光照强度1500~2000Lx/12h.d,培养45d后,可产生白色或乳白色半透明疏松的愈伤组织,并慢慢转绿。

[0037] (4) 毫菊愈伤组织再分化:将转绿的愈伤组织块接种在MS+6-BA0.5-1.0mg/L+IBA0.1-0.3mg/L+GA30.1-0.3mg/L培养基上,培养25-30d,在绿色愈伤组织上可见突起的生长点。

[0038] (5) 毫菊试管苗继代:将出现可见的生长点的愈伤组织转接到MS+6-BA0.5-1.0mg/L+IBA0.1-0.3mg/L培养基上,生成丛生芽,当丛生芽高达1-3cm时,可将丛生芽切分或节间切段用上述培养基进行继代培养,30d为一个周期,增值倍数在10-20。

[0039] (6) 毫菊试管苗生根:

[0040] 将株高3-5cm健壮试管苗从继代培养基转接至1/2MS或1/2MS+IBA0.1-0.3mg/L培养基中进行生根培养,1-2周后基部即可生出3-5条0.3-0.5cm白色的根系,当根长达到3-5cm具有7-8片时可以进行过渡移栽。(见图1)

[0041] (7) 毫菊无菌苗过渡、移栽:将生根瓶苗移下培养架,松开不完全打开瓶盖,放置于室温、自然光照,适应自然环境,保持湿度在70-90%,过渡3d-5d。然后完全打开瓶盖清洗根部琼脂,移栽入穴盘或苗床蛭石基质中,或定植于泥炭:蛭石:珍珠岩为:33%:33%:33%的营养土中,浇透定根水,喷雾保湿3-4d,湿度保持在80-90%。7-15d可长出新根,待毫菊幼苗成活后,减少喷雾,加强光照,保持通风和温度在20-25℃之间,每周施一次MS培养基的无机成分营养液。过渡30天左右,可得到3-5片新叶,株高15-20cm的幼株(见图2),即可移栽到大田,成活率达到96%。当年即可收药(见图3)。

[0042] 实施例2:毫菊工厂化试管苗快繁的方法,包括毫菊组织培养试管苗的快繁过程和试管苗过渡培养过程。

[0043] 所述的毫菊组织培养试管苗的快繁过程包括:

[0044] 1) 毫菊外植体的采集和预处理:取生长健壮且无病虫害的毫菊,在秋季开花时选择有萼片包裹未开放的花蕾作为接种材料,采摘带有直径范围为0.3cm花蕾的枝条,放置于无菌环境下,紫外灯照射20min,再将花蕾用饱和洗衣粉浸泡15min,流水冲洗30min;

[0045] 2) 外植体的消毒、接种:外植体的消毒:用75%左右的酒精浸泡30s,再用0.1%的升汞消毒10min,无菌水冲洗4次,无菌条件下将花蕾萼片及花蕊剥除露出花托,将花托切成0.3mm小块,得消毒后的外植体;

[0046] 3) 外植体的脱分化:消毒后的外植体接种在脱分化培养基上,脱分化培养基为MS+

6-BA1.0-1.5mg/L+0.1-0.5mg/L IBA,置于光照培养箱26℃恒温培养,光照强度1500-2000Lx/12h.d,培养45d后,可产生愈伤组织;

[0047] 4)愈伤组织再分化:愈伤组织接种在再分化培养基:MS+6-BA0.5-1.0mg/L+IBA0.1-0.3mg/L+GA₃0.1-0.3mg/L上,培养30d,在绿色愈伤组织上可见突起的生长点;

[0048] 5)试管苗的继代:将出现可见突起的生长点的愈伤组织转接到继代培养基:MS+6-BA0.5-1.0mg/L+IBA0.1-0.3mg/L上,生成丛生芽,当丛生芽高达2cm时,可将丛生芽切分或节间切段用上述培养基进行培养;

[0049] 6)试管苗生根:将株高4cm试管苗从继代培养基转接至1/2MS或1/2MS+IBA0.1-0.3mg/L生根培养基中进行生根培养,2周后,植株基部即可生出5条0.5cm白色的根系。

[0050] 所述的试管苗快繁过程中作为外植体采集的花蕾的直径为0.3cm。

[0051] 试管苗过渡培养过程采用无土培养方法,包括下述步骤:

[0052] 1)无菌苗过渡:将生根瓶苗移下培养架,松开瓶盖不完全打开,放置于室温、自然光照,适应自然环境,保持湿度在90%,过渡5d;

[0053] 2)过渡移栽,完全打开瓶盖清洗根部琼脂,移栽入穴盘或苗床蛭石基质中,浇透定根水,喷雾保湿4d,湿度保持在90%,12d长出新根,待亳菊幼苗成活后,保持湿度65-70%,解开覆盖物,保持通风和温度在18-25℃之间,每周喷施一次MS培养基的无机成分营养液,过渡30天,得到4片叶,株高20cm时,即可移栽到大田,当年即可收药。成活率达到96.3%。

[0054] 所述的MS培养基的无机成分营养液由MS培养基母液I、母液II、母液III混合配制而成,具体配置成分见表1。

[0055] 表1,MS培养基母液配制无机盐成分

[0056]

母液种类	成分	称取量(g/L)	1L吸取量/ml
大量元素(母液I)	KNO ₃	19	100
	NH ₄ NO ₃	16.9	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7	
	KH ₂ PO ₄	1.7	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4	

[0057]	微量元素 (母液 II)	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2.23	10
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.86	
		H_3BO_3	0.62	
		KI	0.083	
		$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.025	
		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0025	
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0025	
铁盐 (母液 III)		Na-EDTA	3.73	10
		$FeSO_4 \cdot H_2O$	2.78	

[0058] 表2为不同基质的亳菊移栽成活率试验

[0059]

基质成分	比例	移栽苗数	成活率%	生根情况	生长速度
泥炭	100%	200	95.55	根系中等	较快
蛭石	100%	200	96.21	根系一般	慢
珍珠岩	100%	200	95.14	根系一般	慢
泥炭: 蛭石: 珍珠岩	33%: 33%: 33%	200	99.72	根系发达	很快

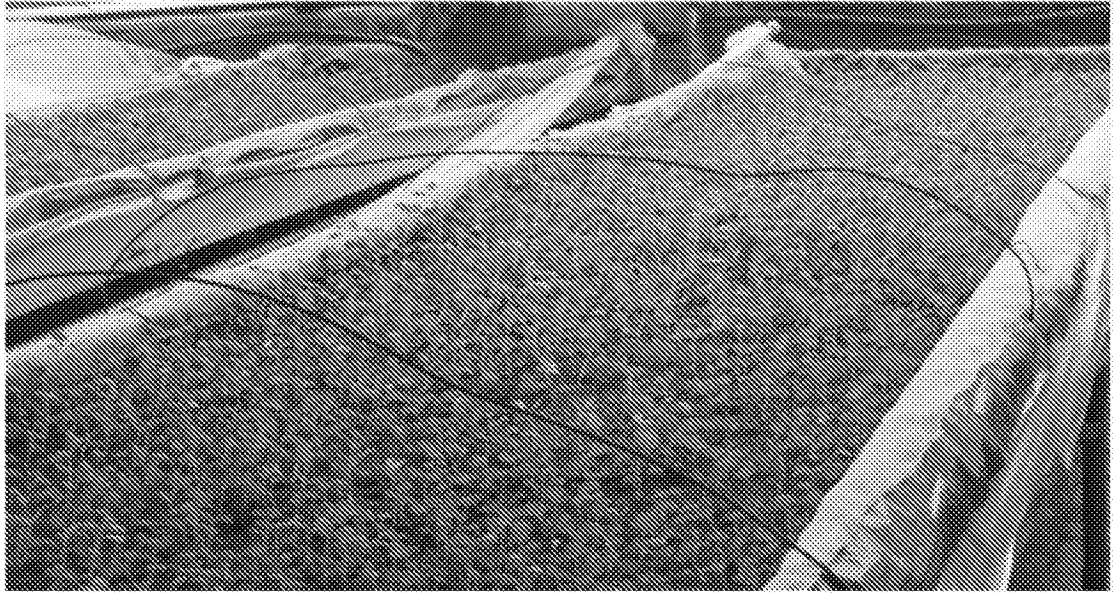


图1



图2



图3