



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 119453071 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 01

(21) 申请号 202510053541.9

(22) 申请日 2025.01.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 119453071 A

(43) 申请公布日 2025.02.18

(73) 专利权人 云南农业职业技术学院
地址 650031 云南省昆明市五华区茭菱路
128号

(72) 发明人 刘琴 谭宽映 杨云福 刘丽
杨小黎 谭棱孝 杨艳丽 陈德云
赵燚 王庆华

(74) 专利代理机构 北京挺立专利事务所(普通
合伙) 11265
专利代理师 高福勇

(51) Int.Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 110463608 A, 2019.11.19

CN 110786244 A, 2020.02.14

CN 114431145 A, 2022.05.06

余春香, 郑晓峰, 邓燕红. 毛慈菇种苗组织培
养研究. 种子. 2004, (12), 第65页摘要、第1.2-
1.3节、第66页第1.3、2.2节、表1-2、第67页第
2.3-2.7节、表4.

审查员 杨柳

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种毛慈菇种苗组织培养方法

(57) 摘要

本发明提供一种毛慈菇种苗组织培养方法, 涉及毛慈菇培育技术领域。所述毛慈菇种苗组织培养方法为采用毛慈菇假球茎上的不定芽为外植体, 依次采用根状茎诱导培养基、根状茎诱导培养基、分化培养基、生根培养基诱导出具有较高移栽成活率的试管苗, 并且通过改良White培养基、忍冬苷、槲皮素、茶皂素、红没药醇在各个培养基中的侍郎添加, 能够有效保证每个环节培养的效率, 综合减少毛慈菇种苗组织培养的损耗。本发明克服了现有技术的不足, 通过组织培养的方法获取健壮毛慈菇种苗, 降低毛慈菇人工种植的成本, 提高种苗种植的成活率, 便于实现规模化人工种植。



1. 一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于,所述组织培养方法包括以下步骤:

S1、外植体获取:切下毛慈菇假球茎上的不定芽,消毒后作为外植体备用;

S2、根状茎诱导培养:将上述外植体接种于根状茎诱导培养基中培养,诱导芽分化形成根状茎;其中根状茎诱导培养基的配方由以下含量的物质组成:改良White培养基+NAA 1.0-1.5mg/L+花宝1号5-8mL/L+忍冬苷20-40mg/L+琼脂粉3-5g/L;其中改良White培养基中各成分的组成为:KNO₃ 40mg/L+柠檬酸2.5mg/L+Ca(NO₃)₂·4H₂O 165mg/L+MgSO₄ 1120mg/L+KCl 50mg/L+NaH₂PO₄ 20mg/L+盐酸硫胺素0.1mg/L+盐酸吡哆素0.1mg/L+烟酸0.5mg/L+甘氨酸 5mg/L+MnSO₄·4H₂O 11mg/L+ZnSO₄·7H₂O 4mg/L+KI 0.75mg/L+H₃BO₃ 1.5mg/L+蔗糖 20g/L;

S3、根状茎增殖培养:取上述根状茎诱导培养基中形成的根状茎,切下根状茎再接种至根状茎增殖培养基中进行增殖培养,培养得到丛生根状茎,且所述根状茎增殖培养基由以下含量的物质组成:MS培养基+6-BA 4.5-5.5mg/L+NAA 0.12-0.15mg/L+槲皮素6-8mg/L+茶皂素20-30mg/L+蔗糖15-20g/L+琼脂粉3-5g/L;

S4、分化培养:取上述丛生根状茎,切下后接种至分化培养基中进行分化培养,获得毛慈菇小苗;所述分化培养基的配方由以下含量的物质组成:MS培养基+NAA 0.12-0.15mg/L+6-BA 2.0-2.5mg/L+忍冬苷60-80mg/L+蔗糖15-20g/L+琼脂粉3-5g/L;

S5、生根培养:将上述毛慈菇小苗接种至生根培养基中,生根培养至产生不定根,得试管苗;所述生根培养基的配方由以下含量的物质组成:1/2MS培养基+6-BA 2.0-3.0mg/L+阿司匹林10-20mg/L+忍冬苷10-20mg/L+红没药醇10-15mg/L+蔗糖15-20g/L+琼脂粉3-5g/L;

S6、移栽:将试管苗炼苗后移栽至基质中进行培养。

2. 根据权利要求1所述的一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于:所述步骤S1中消毒的方式为将不定芽采用无菌水冲洗后吸干水分,再采用75%的乙醇溶液漂洗2-3次,后采用20g/L的次氯酸钠溶液浸泡处理15min,再采用无菌水漂洗3-4次,吸干表面水分后完成消毒。

3. 根据权利要求1所述的一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于:所述步骤S2中培养的方式为将接种后的根状茎诱导培养基在25±5℃暗培养48h,后控制每日10h的光照时间,且光照强度为1000lx。

4. 根据权利要求1所述的一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于:所述步骤S3中控制切下的根状茎的长度为0.6-0.8cm。

5. 根据权利要求1所述的一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于:所述步骤S3中增殖培养的条件为在25±5℃温度下进行暗培养。

6. 根据权利要求1所述的一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于:所述步骤S4中分化培养的条件为在25±5℃温度下按照光照10h/d进行培养,且光照强度为1000lx。

7. 根据权利要求1所述的一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于:所述步骤S5中生根培养的条件为在25±5℃温度下按照光照10h/d进行培养,且光照强度为1000lx。

8. 根据权利要求1所述的一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于:所述步骤S6中炼苗的方式为将试管苗带生根培养基于室外放置培养2-3d。

9. 根据权利要求1所述的一种毛慈菇种苗组织培养方法,其特征在于:所述步骤S6中移栽的方式为将试管苗取出并去除培养基,后栽种至消毒后的基质中。

一种毛慈菇种苗组织培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及毛慈菇培育技术领域,具体涉及一种毛慈菇种苗组织培养方法。

背景技术

[0002] 毛慈菇为兰科属多年生草本植物,别名山慈菇,冰球子。是一种常用的中药材,耐寒性极强。多生长于海拔600-1200m的高山地带,适于生长在林下、深山的山腰或有遮阳只有星散漏光的地方。分布于我国的东北、西北各地。以假球茎入药,味甘微辛,性寒,有小毒,归肝、脾经,具有清热解毒、化痰散结的作用,用于治疗痈肿疔毒、瘰癧痰核、淋巴结核、喉痹肿痛、蛇虫咬伤及狂犬伤等。据现代医学研究证明,毛慈菇对癌肿具有一定的防治作用,并且一定程度上可增强人体免疫力。

[0003] 由于毛慈菇药效好,炮制简单,在中药和保健品领域市场较为广阔,但是毛慈菇整体野生资源有限,近些年野生资源被过度开采,导致资源匮乏,市场价格较高,所以毛慈菇的人工种植是现阶段的一大重要方向。

[0004] 由于毛慈菇种子非常小且胚发育不完全,很难采用播种的方式进行人工种植,现有的种植方式主要包括球茎繁殖和组培繁殖,但是球茎繁殖受季节和温度限制较大,且不利于产业化种植,而组培繁殖则能够很好实现规模化产业种植,一般可采用蒴果或球茎进行组织培养获得试管苗,但是现有组织培养获取的生根苗后续移栽成活率较低,一定程度上提升了人工种植的成本。

发明内容

[0005] 针对现有技术不足,本发明提供一种毛慈菇种苗组织培养方法,通过组织培养的方法获取健壮毛慈菇种苗,降低毛慈菇人工种植的成本,提高种苗种植的成活率,便于实现规模化人工种植。

[0006] 为实现以上目的,本发明的技术方案通过以下技术方案予以实现:

[0007] 一种毛慈菇种苗组织培养方法,所述组织培养方法包括以下步骤:

[0008] S1、外植体获取:切下毛慈菇假球茎上的不定芽,消毒后作为外植体备用;

[0009] S2、根状茎诱导培养:将上述外植体接种于根状茎诱导培养基中培养,诱导芽分化形成根状茎;其中根状茎诱导培养基的配方由以下含量的物质组成:改良White培养基+NAA 1.0-1.5mg/L+花宝1号5-8mL/L+忍冬苷20-40mg/L+琼脂粉3-5g/L;其中改良White培养基中各成分的组成为:KNO₃ 40mg/L+柠檬酸2.5mg/L+Ca(NO₃)₂·4H₂O 165mg/L+MgSO₄ 1120mg/L+KCl 50mg/L+NaH₂PO₄ 20mg/L+盐酸硫胺素0.1mg/L+盐酸吡哆素0.1mg/L+烟酸0.5mg/L+甘氨酸 5mg/L+MnSO₄·4H₂O 11mg/L+ZnSO₄·7H₂O 4mg/L+KI 0.75mg/L+H₃BO₃ 1.5mg/L+蔗糖 20g/L;

[0010] S3、根状茎增殖培养:取上述根状茎诱导培养基中形成的根状茎,切下根状茎再接种至根状茎增殖培养基中进行增殖培养,培养得到丛生根状茎,且所述根状茎增殖培养基由以下含量的物质组成:MS培养基+6-BA 4.5-5.5mg/L+NAA 0.12-0.15mg/L+槲皮素6-8mg/

L+茶皂素20-30mg/L+蔗糖15-20g/L+琼脂粉3-5g/L;

[0011] S4、分化培养:取上述从生根状茎,切下后接种至分化培养基中进行分化培养,获得毛慈菇小苗;所述分化培养基的配方由以下含量的物质组成:MS培养基+NAA 0.12-0.15mg/L+6-BA 2.0-2.5mg/L+忍冬苷60-80mg/L+蔗糖15-20g/L+琼脂粉3-5g/L;

[0012] S5、生根培养:将上述毛慈菇小苗接种至生根培养基中,生根培养至产生不定根,得试管苗;所述生根培养基的配方由以下含量的物质组成:1/2MS培养基+6-BA 2.0-3.0mg/L+阿司匹林10-20mg/L+忍冬苷10-20mg/L+红没药醇10-15mg/L+蔗糖15-20g/L+琼脂粉3-5g/L;

[0013] S6、移栽:将试管苗炼苗后移栽至基质中进行培养。

[0014] 优选的,所述步骤S1中消毒的方式为将不定芽采用无菌水冲洗后吸干水分,再采用75%的乙醇溶液漂洗2-3次,后采用20g/L的次氯酸钠溶液浸泡处理15min,再采用无菌水漂洗3-4次,吸干表面水分后完成消毒。

[0015] 优选的,所述步骤S2中培养的方式为将接种后的根状茎诱导培养基在 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 暗培养48h,后控制每日10h的光照时间,且光照强度为1000lx。

[0016] 优选的,所述步骤S3中控制切下的根状茎的长度为0.6-0.8cm。

[0017] 优选的,所述步骤S3中增殖培养的条件为在 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 温度下进行暗培养。

[0018] 优选的,所述步骤S4中分化培养的条件为在 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 温度下按照光照10h/d进行培养,且光照强度为1000lx。

[0019] 优选的,所述步骤S5中生根培养的条件为在 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 温度下按照光照10h/d进行培养,且光照强度为1000lx。

[0020] 优选的,所述步骤S6中炼苗的方式为将试管苗带生根培养基于室外放置培养2-3d。

[0021] 优选的,所述步骤S6中移栽的方式为将试管苗取出并去除培养基,后栽种至消毒后的基质中。

[0022] 本发明提供一种毛慈菇种苗组织培养方法,与现有技术相比优点在于:

[0023] 本发明采用毛慈菇假球茎上的不定芽作为外植体,通过改良White培养基、忍冬苷、花宝1号等成分配置根状茎诱导培养基能够在较短时间内使外植体诱导出根状茎,后续采用MS培养基、6-BA、NAA、槲皮素、茶皂素等成分作为根状茎增殖培养基,能够有效促进根状茎的增殖倍数;后续采用MS培养基、NAA、6-BA、忍冬苷等制备分化培养基能够有效快速使根状茎分化出芽并生长成小苗,最后采用1/2MS培养基、6-BA、阿司匹林、忍冬苷、红没药醇配置的生根培养基进行培养,可以获得较为健壮的试管苗,有效保证后期移栽的成活率。

附图说明

[0024] 图1为本发明实施例1中外植体采用根状茎诱导培养基1培养40d的根状茎生长情况示意图;

[0025] 图2为本发明实施例1中外植体采用根状茎诱导培养基1培养20d的芽分化情况示意图;

[0026] 图3为本发明实施例1中外植体采用根状茎诱导培养基4培养20d的芽分化情况示意图;

- [0027] 图4为本发明实施例2中采用根状茎增殖培养基1培养40d的生长示意图;
 [0028] 图5为本发明实施例3中采用分化培养基1培养35d的生长示意图;
 [0029] 图6为本发明实施例4中采用生根培养基1培养20d的种苗生长示意图。

具体实施方式

[0030] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面结合本发明实施例对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0031] 以下实施例中White培养基的配方为: KNO_3 80mg/L+柠檬酸2mg/L+ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 287mg/L+ MgSO_4 720mg/L+KCl 65mg/L+ NaH_2PO_4 16.6mg/L+盐酸硫胺素 0.1mg/L+盐酸吡哆素 0.1mg/L+烟酸 0.5mg/L+甘氨酸 3mg/L+ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.6mg/L+ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.7mg/L+KI 0.75mg/L+ H_3BO_3 1.5mg/L+蔗糖20g/L;改良White培养基的配方为: KNO_3 40mg/L+柠檬酸 2.5mg/L+ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 165mg/L+ MgSO_4 1120mg/L+KCl 50mg/L+ NaH_2PO_4 20mg/L+盐酸硫胺素0.1mg/L+盐酸吡哆素0.1mg/L+烟酸0.5mg/L+甘氨酸 5mg/L+ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 11mg/L+ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg/L+KI 0.75mg/L+ H_3BO_3 1.5mg/L+蔗糖20g/L。

[0032] 实施例1

[0033] 毛慈菇根状茎诱导培养:

[0034] 1、从同一批毛慈菇假球茎上切下不定芽,采用无菌水冲洗后吸干水分,再采用75%的乙醇溶液漂洗3次,后采用20g/L的次氯酸钠溶液浸泡处理15min,再采用无菌水漂洗4次,吸干表面水分后完成消毒,得外植体备用;

[0035] 2、根状茎诱导培养基的设置,根据下表1的配方设置不同的根状茎诱导培养基:

[0036] 表1

根状茎诱导培养基	配方
根状茎诱导培养基 1	改良 White 培养基+NAA 1.0mg/L+花宝 1 号 5mL/L+忍冬苷 20mg/L+琼脂粉 3g/L
根状茎诱导培养基 2	改良 White 培养基+NAA 1.5mg/L+花宝 1 号 8mL/L+忍冬苷 40mg/L+琼脂粉 5g/L
根状茎诱导培养基 3	White 培养基+NAA 1.0mg/L+花宝 1 号 5mL/L+ 忍冬苷 20mg/L+琼脂粉 3g/L
根状茎诱导培养基 4	改良 White 培养基+NAA 1.0mg/L+花宝 1 号 5mL/L+琼脂粉 3g/L

[0037] 3、将上述外植体分别接种至上表1中不同配方的根状茎诱导培养基中,每组培养基接种20个外植体,在 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 暗培养48h,后控制每日10h的光照时间,且光照强度为1000lx,观察并记录各组在30d、40d、50d、60d根状茎的诱导率,具体结果如下表2所示:

[0038] 表2

组别	培养基	根状茎诱导率 (%)			
		30d	40d	50d	60d
1	根状茎诱导培养基 1	10%	85%	100%	100%
2	根状茎诱导培养基 2	10%	90%	100%	100%
3	根状茎诱导培养基 3	0	45%	100%	100%
4	根状茎诱导培养基 4	0	30%	80%	100%

[0039] 由上表2可知根状茎诱导培养基1、根状茎诱导培养基2在培养40d左右就能达到较高的根状茎诱导率,其中采用根状茎诱导培养基1培养40d的生长情况如图1所示,并且由图2-3可知,在培养20d时根状茎诱导培养基1培养的外植体芽已经开始分化(图2),而根状茎诱导培养基4培养的外植体在20d时芽的分化较差(图3)。

[0040] 即上述培养基中根状茎诱导培养基1和根状茎诱导培养基2的根状茎诱导培养效果最佳。

[0041] 实施例2

[0042] 根状茎增殖培养:

[0043] 1、按照下表3的配方配置不同的根状茎增殖培养基:

[0044] 表3

根状茎增殖培养基	配方
根状茎增殖培养基 1	MS 培养基+6-BA 4.5mg/L+NAA 0.12mg/L+槲皮素 6mg/L+茶皂素 20mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L
根状茎增殖培养基 2	MS 培养基+6-BA 5.5mg/L+NAA 0.15mg/L+槲皮素 8mg/L+茶皂素 30mg/L+蔗糖 20g/L+琼脂粉 5g/L
根状茎增殖培养基 3	MS 培养基+6-BA 4.5mg/L+NAA 0.12mg/L+茶皂素 20mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L
根状茎增殖培养基 4	MS 培养基+6-BA 4.5mg/L+NAA 0.12mg/L+槲皮素 6mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L
根状茎增殖培养基 5	MS 培养基+6-BA 4.5mg/L+NAA 0.12mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L

[0045] 2、取上述实施例1中根状茎诱导培养基1培养50d且长势相同的根状茎,切成0.6-0.8cm的长度,分别接种至上述各个根状茎增殖培养基中,每种培养基接种20个,在 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$

温度下进行暗培养40d,记录各种培养基中丛生根状茎分化数和根状茎的增殖倍数,具体结果如下表4所示:

[0046] 表4

组别	培养基	丛生根状茎分化数	增殖倍数
5	根状茎增殖培养基 1	128	6.4
6	根状茎增殖培养基 2	124	6.2
7	根状茎增殖培养基 3	116	5.8
8	根状茎增殖培养基 4	110	5.5
9	根状茎增殖培养基 5	104	5.2

[0047] 由上表可知根状茎增殖培养基1、根状茎增殖培养基2培养的根状茎能够提高诱导丛生根状茎分化的数量,提升增殖倍数。

[0048] 实施例3

[0049] 丛生根状茎的分化培养:

[0050] 1、按照下表5的配方配置不同的分化培养基:

[0051] 表5

分化培养基	配方
分化培养基 1	MS 培养基+NAA 0.12mg/L+6-BA 2.0mg/L+忍冬苷 60mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L
分化培养基 2	MS 培养基+NAA 0.15mg/L+6-BA 2.5mg/L+忍冬苷 80mg/L+蔗糖 20g/L+琼脂粉 5g/L
分化培养基 3	MS 培养基+NAA 0.12mg/L+6-BA 2.0mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L

[0052] 2、取上述实施例2中根状茎增殖培养基1培养40d生长一致的丛生根状茎,切下后分别接种至各种分化培养基中(每种培养基接种20个)进行分化培养35d($25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 温度下按照光照10h/d进行培养,且光照强度为1000lx),获得毛慈菇小苗,观察各种培养基培养25d的分化芽率(分化出芽的根状茎占总根状茎的比例)以及培养35d下叶片舒展率(舒展叶片占总叶片的比例),具体结果如下表6所示:

[0053] 表6

组别	培养基	25d 分化芽率 (%)	35d 叶片舒展率 (%)
10	分化培养基 1	90%	90%
11	分化培养基 2	95%	92%
12	分化培养基 3	60%	45%

[0054] 由上表可知,分化培养基1和分化培养基2进行培养的分化情况和小苗生长情况更佳。

[0055] 实施例4

[0056] 毛慈菇小苗生根培养及移栽:

[0057] 1、参照下表7设计生根培养基:

[0058] 表7

生根培养基	配方
生根培养基 1	1/2MS 培养基+6-BA 2.0mg/L+阿司匹林 10mg/L+忍冬苷 10mg/L+红没药醇 10mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L
生根培养基 2	1/2MS 培养基+6-BA 3.0mg/L+阿司匹林 20mg/L+忍冬苷 20mg/L+红没药醇 15mg/L+蔗糖 20g/L+琼脂粉 5g/L
生根培养基 3	1/2MS 培养基+6-BA 2.0mg/L+阿司匹林 10mg/L+红没药醇 10mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L
生根培养基 4	1/2MS 培养基+6-BA 2.0mg/L+阿司匹林 10mg/L+忍冬苷 10mg/L+蔗糖 15g/L+琼脂粉 3g/L

[0059] 2、将上述实施例3中分化培养基1培养40d生长一致的毛慈菇小苗接种至上述各种生根培养基中(每种接种20株毛慈菇小苗),在 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 温度下按照光照10h/d进行培养,且光照强度为1000lx,培养20d,观察记录各组培养基中的毛慈菇小苗生根率,具体结果如下表8所示:

[0060] 表8

组别	培养基	生根率 (%)
13	生根培养基 1	95%
14	生根培养基 2	95%
15	生根培养基 3	85%
16	生根培养基 4	80%

[0061] 3、采用上述组别13-16的方式培养20d获得的种苗置于室外炼苗处理2d,后取出种

苗清洗干净根部的培养基,后分别将生根的种苗移栽至消毒后的基质中(质量比为椰糠:珍珠岩:园土:有机肥=2:1:3:2),每组移栽种苗100株,控制移栽温度在 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$,移栽后浇透定根水,后控制基质湿度在40%-60%,记录移栽7d、15d、25d的成活率,具体结果如下表9所示:

[0062] 表9

组别	成活率 (%)		
	7d	15d	25d
13	100%	97%	95%
14	99%	96%	96%
15	92%	85%	80%
16	88%	80%	71%

[0063] 由上表9所示,采用生根培养基1、生根培养基2培养的种苗在移栽后具有更高的成活率。

[0064] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。



图 1



图 2



图 3



图 4



图 5



图 6