



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104255502 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201410526530. X

(22) 申请日 2014. 10. 08

(71) 申请人 成都市三禾田生物技术有限公司

地址 610041 四川省成都市高新区科园南路
88号9栋2层201号

(72) 发明人 洪汉君 熊小灿

(74) 专利代理机构 成都九鼎天元知识产权代理
有限公司 51214

代理人 吕玲

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

一种虎杖组织培养快速繁殖方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,涉及通过植物组织培养技术的植物再生,具体为一种虎杖组织培养快速繁殖的方法。该方法包括以下步骤:(1)外植体的选取与灭菌,选取健壮、无病虫害的野生虎杖带腋芽幼嫩枝条作为外植体,并对其进行消毒处理;(2)不定芽的诱导,将步骤(1)中的外植体切成长2-3cm的单芽茎段,分别接种于诱导培养基中进行诱导培养,培养条件:温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度1500-2000lux,光照时间14-16h;(3)不定芽的继代培养等步骤。本发明中所述的方法快速、高效、成本低,移栽成活率高,便于推广,遗传稳定性好,缩短了虎杖的育苗周期,为今后进行工业化生产提供了可靠地来源和物质基础。

1. 一种虎杖组织培养快速繁殖方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

(1) 外植体的选取与灭菌

选取健壮、无病虫害的野生虎杖带腋芽幼嫩枝条作为外植体,并对其进行消毒处理;

(2) 不定芽的诱导

将步骤(1)中的外植体切成长 2-3cm 的单芽茎段,分别接种于诱导培养基中进行诱导培养为不定芽,培养条件为:温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度 1500-2000lux,光照时间 14-16h;

(3) 不定芽的继代培养

经过步骤(2)诱导的不定芽接种于继代培养基中,继续继代培养,培养条件同步骤(2);

(4) 诱导生根

经过继代培养后的虎杖不定芽长至 4-6cm 后,将其直接诱导生根,将步骤(3)中的不定芽剪切成含有 2-3 个节且带顶芽的茎段接种于生根培养基中,培养条件:温度为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度 1600-2000 lux,光照时间 14-16h;

(5) 驯化

带步骤(4)中生根苗植株长至 4-6cm、生根条数达 5-6 条,且根长度为 3-4cm 时,将其移至自然条件下炼苗 2d,2d 后将其盖打开继续炼苗 4-5d,备用;

(6) 试管苗的移栽

将步骤(5)中驯化好的虎杖植株将其从培养瓶中取出,洗净根部的培养基;用 800 倍质量百分含量为 50% 的多菌灵可湿性粉剂浸泡 2-3h,稍晾干根部水分即可进行移栽,移栽入经高温消毒过的营养土、自然土壤和蛭石体积比 0.1-1:1-2:0.5-1 的混合基质的营养钵并置于温室中,并随时注意保湿,20d 后将其直接移栽至大田中。

2. 根据权利要求 1 中所述的虎杖组织培养快速繁殖的方法,其特征在于:所述的步骤(1)中其消毒处理的具体步骤如下:

(1) 对材料进行流水冲洗,洗净杂质后,用流水冲洗 2-3h;

(2) 在超净工作台中先用 75% 酒精浸泡 30s,无菌水清洗 3-5 遍;

(3) 用 0.1% HgCl_2 处理 5-6min,无菌水洗冲 5-6 次;

(4) 用无菌滤纸吸干水分备用。

3. 根据权利要求 1 中所述的虎杖组织培养快速繁殖的方法,其特征在于:所述的步骤(2)中其不定芽的诱导培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA}0.2\text{-}2.5\text{mg/L}+\text{NAA}0.1\text{-}0.5\text{mg/L}+\text{VC} 1.0\text{-}5.0 \text{ mg/L}$,另加 6-7g 琼脂粉,30g 蔗糖, pH 值为 5.8-6.2,其中 VC 添加的作用是防止虎杖不定芽的褐化。

4. 根据权利要求 1 中所述的虎杖组织培养快速繁殖的方法,其特征在于:所述的步骤(3)中其不定芽的继代增殖培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA}0.1\text{-}1.0\text{mg/L}+\text{IAA}0.1\text{-}0.5\text{mg/L}+\text{KT}0.1\text{-}0.5\text{mg/L}$,另加 6-7g 琼脂粉,30g 蔗糖, pH 值为 5.8-6.2。

5. 根据权利要求 1 中所述的虎杖组织培养快速繁殖的方法,其特征在于:所述的步骤(4)中其生根培养基为 $1/2\text{MS}+\text{IBA}0.3\text{-}0.5\text{mg/L}+\text{NAA}0.2\text{-}0.6\text{mg/L}$,另加 6-7g 琼脂粉,30g 蔗糖, pH 值为 5.8-6.2。

6. 根据权利要求 1 中所述的虎杖组织培养快速繁殖的方法,其特征在于:所述步骤(5)中揭盖驯化时要随时注意保湿,以免其缺水死亡。

7. 根据权利要求1中所述的虎杖组织培养快速繁殖的方法,其特征在于:所述步骤(6)中其混合基质中营养土、自然土壤和蛭石体积比为0.1-1:1-2:0.5-1。

一种虎杖组织培养快速繁殖方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及通过植物组织培养技术的植物再生,具体为一种虎杖组织培养快速繁殖的方法。

背景技术

[0002] 虎杖为蓼科虎杖属多年生草本植物根状茎粗壮,横走。茎直立,高1-2米,粗壮,空心,具明显的纵棱,具小突起,无毛,散生红色或紫红斑点。叶宽卵形或卵状椭圆形,长5-12厘米,宽4-9厘米,近革质,顶端渐尖,基部宽楔形、截形或近圆形,边缘全缘,疏生小突起,两面无毛,沿叶脉具小突起;叶柄长1-2厘米,具小突起;托叶鞘膜质,偏斜,长3-5毫米,褐色,具纵脉,无毛,顶端截形,无缘毛,常破裂,早落。花单性,雌雄异株,花序圆锥状,长3-8厘米,腋生;苞片漏斗状,长1.5-2毫米,顶端渐尖,无缘毛,每苞内具2-4花;花梗长2-4毫米,中下部具关节;花被5深裂,淡绿色,雄花花被片具绿色中脉,无翅,雄蕊8,比花被长;雌花花被片外面3片背部具翅,果时增大,翅扩展下延,花柱3,柱头流苏状。瘦果卵形,具3棱,长4-5毫米,黑褐色,有光泽,包于宿存花被内。花期8-9月,果期9-10月。产陕西南部、甘肃南部、华东、华中、华南、四川、云南及贵州;生山坡灌丛、山谷、路旁、田边湿地,海拔140-2000米。朝鲜、日本也有。根状茎供药用,有活血、散瘀、通经、镇咳等功效。

[0003] 虎杖根茎富含虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄酚、大黄酸鞣皮素、鞣皮素-3-阿拉伯糖甙、鞣皮素-3-半乳糖甙等,其提取物广泛用于医药、保健品、化妆品等黄页,国际市场需求空间很大。而据统计提取1吨白藜芦醇需要消耗500吨虎杖原料,但白藜芦醇在植物体内含量普遍较低。

[0004] 多年来,虎杖主要靠野外采挖。据统计,虎杖再生量为 $9.8 \times 10^6 \text{kg/年}$,其可持续采挖量为 $4.95 \times 10^6 \text{kg/年}$,市场需求量为 $6.0 \times 10^6 \text{kg/年}$ 。因此,虎杖的野生资源已面临过度采挖的局面。长期的掠夺式地采挖还会加快野生资源的灭绝速度。虎杖以根状茎入药,目前虽有人工种植,但虎杖主要靠根茎繁殖和种子繁殖,而根茎繁殖,易造成根的生长量和采挖量降低;种子繁殖,据野外观察虎杖种子很少成熟发芽成苗。因此,为保证药用植物的可持续利用,利用植物组织培养技术,能迅速缓解我国传统医学当今中草药虎杖资源短缺问题,且占用空间小。采用植物组织培养技术,可以有效快速提高虎杖的繁殖速度和质量,实现虎杖优质种苗的工厂化育苗,以满足生产上的需要。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种虎杖组织培养快速繁殖的方法,它能够快速繁殖出大量适合移栽的优质虎杖种苗,以满足生产需要,为虎杖人工种植提供一条新的途径。

[0006] 为实现上述发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种虎杖组织培养快速繁殖的方法,该方法包括以下步骤:

[0008] (1) 外植体的选取与灭菌

[0009] 选取健壮、无病虫害的野生虎杖带腋芽幼嫩枝条作为外植体,并对其进行消毒处

理,消毒步骤如下:

[0010] 1) 对材料进行流水冲洗,洗净杂质后,用流水冲洗 2-3h;

[0011] 2) 在超净工作台中先用质量浓度为 75%的酒精浸泡 30s,然后用无菌水清洗 3-5 遍;

[0012] 3) 用质量百分含量为 0.1%的 HgCl₂ 处理 5-6min,然后用无菌水洗冲 5-6 次;

[0013] 4) 用无菌滤纸吸干水分备用。

[0014] (2) 不定芽的诱导

[0015] 将步骤 (1) 中外植体切成带芽茎段 (长 2-3cm),分别接种于诱导培养基中进行诱导培养,培养条件:温度为 25±2℃,光照强度 1500-2000lux,光照时间 14-16h。7 天后长出白色芽点,25d 后形成不定芽。其中诱导培养基为 MS 培养基中含 0.2-2.5mg/L 的 6-BA、0.1-0.5mg/L 的 NAA 及 1.0-5.0mg/L 的 VC,30g/L 蔗糖,6-7g/L 琼脂粉,pH 值为 5.8-6.2。

[0016] (3) 不定芽的继代培养

[0017] 将步骤 (2) 中培养出的不定芽接种于继代培养基继续继代培养,培养条件:温度为 25±2℃,光照强度 1500-2000lux,光照时间 14-16h。7 天后长出白色芽点,25d 后形成不定芽。其中诱导培养基为 MS 培养基中含 0.1-1.0mg/L 的 6-BA、0.1-0.5mg/L 的 IAA 及 0.1-0.5mg/L 的 KT,30g/L 蔗糖,6-7g/L 琼脂粉,pH 值为 5.8-6.2。

[0018] (4) 生根培养

[0019] 将步骤 (3) 中的不定芽剪切成含有 2-3 个节且带顶芽的茎段接种于生根培养基中。培养条件:温度为 25±2℃,光照强度 1500-2000lux,光照时间 14-16h。10d 后开始长根,30d 后长出大量根。其中生根培养基为 MS 培养基,该培养基中含 0.3-0.5mg/L 的 IBA 和 0.2-0.6mg/L 的 NAA,30g/L 蔗糖,6-7g/L 琼脂粉,pH 值为 5.8-6.2。

[0020] (5) 驯化炼苗

[0021] 带步骤 (4) 中生根苗植株长至约 4-6cm、生根条数达 5-6 条,且长度为 3-4cm 时,将其移至自然条件下炼苗 2d,2d 后将其盖打开继续炼苗 4-5d,备用;

[0022] (6) 试管苗的移栽

[0023] 将步骤 (5) 中驯化好的虎杖植株将其从培养瓶中取出,洗净根部的培养基。用 800 倍 50%的多菌灵可湿性粉剂浸泡 2-3h,稍晾干根部水分即可进行移栽,移栽入经高温消毒过的营养土、自然土壤和蛭石体积比 0.1-1:1-2:0.5-1 的混合基质的营养钵并置于温室中。并随时注意保湿,20d 后将其直接移栽至大田中。本发明中所述培养基及专业术语:

[0024] (1)MS 基本培养基为 (单位为 mg/L):MS (Murashige and Skoog,1962) 包括大量元素 (硝酸铵 1650,硝酸钾 1900,二水氯化钙 440,七水硫酸镁 370,磷酸二氢 170) 可配成 20 倍母液,取母液 50ml/L;微量元素 (一水硫酸锰 22.3,七水硫酸锌 8.6,六水氯化钴 0.025,无水硫酸铜 0.025,硼酸 6.2,二水钼酸钠 0.25,碘化钾 0.83) 配成母液 200 倍,取母液 5ml/L;铁盐 (七水硫酸亚铁 28.7,乙二胺四乙酸二钠 37.3) 配成母液 200 倍,取母液 5ml/L;有机 (烟酸 0.5,烟酸吡哆醇 0.5,盐酸硫胺素 0.1,甘氨酸 2.0) 配成母液 200 倍,取母液 5ml/L,另加肌醇 0.1g,蔗糖 30g,固体培养基加琼脂粉 6.5g,本发明中 1/2MS 固体培养基是大量元素减半,其余不变,pH 值为 5.8-6.5。

[0025] (2) 本发明中所述激素为 6-BA (6-苄基氨基腺嘌呤),NAA (萘乙酸),IAA (吲哚乙酸),KT (激动素),IBA (吲哚丁酸)。

[0026] (3) 本发明所涉及公式的测定方法：

[0027] 1) 不定芽诱导率(%) = 不定芽发芽数 / 接种外植体数 * 100%；

[0028] 2) 不定芽增值率(%) = (分化的不定芽数 - 接种数) / 接种数 * 100%；

[0029] 3) 不定芽增值倍数 = 不定芽发芽数 / 接种不定芽数；

[0030] 4) 生根率(%) = 出根条数 / 接种外植体数 * 100%；

[0031] 5) 移栽成活率(%) = (移栽试管苗数 - 死亡试管苗数) / 移栽试管苗数 * 100%。

[0032] 本发明的积极效果体现在：

[0033] (1) 本发明中所述的方法快速、高效、成本低，移栽成活率高，便于推广，遗传稳定性好，缩短了虎杖的育苗周期，为今后进行工业化生产提供了可靠地来源和物质基础。

[0034] (2) 通过芽的繁殖进行快速繁殖，保证了遗传的稳定性，有利于虎杖优良品种的选育。

[0035] (3) 本发明中通过芽的繁殖，不需要经过愈伤组织组织阶段，且诱导出的不定芽不需要经过壮苗阶段，大大缩短了虎杖的育苗周期，节约了人力，物力，财力等。

[0036] (4) 采用本发明所述的培养方法，不定芽的诱导率可达 98.5% 以上，增值率为 99% 以上，增值倍数可达 6-9 倍，生根率为 99.5%，平均长度可达 3-4cm，生根条数为 5-6 条，移栽成活率可达 98% 以上。

具体实施例

[0037] 实施例 1：

[0038] (1) 外植体的选取与灭菌

[0039] 选取健壮、无病虫害的野生虎杖带腋芽幼嫩枝条作为外植体，并对其进行消毒处理，消毒步骤如下：对材料进行流水冲洗，洗净杂质后，用流水冲洗 2-3h；在超净工作台中先用 75% 酒精浸泡 30s，无菌水清洗 3-5 遍；用质量百分含量为 0.1% HgCl_2 处理 5-6min，无菌水洗冲 5-6 次；用无菌滤纸吸干水分备用。

[0040] (2) 不定芽的诱导

[0041] 将步骤 (1) 中外植体切成带芽茎段（长 2-3cm），分别接种于诱导培养基中进行诱导培养，培养条件：温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照强度 1500-2000lux，光照时间 14-16h。7 天后长出白色芽点，25d 后形成不定芽。其中诱导培养基为 MS 基本培养基 +6-BA 2.0mg/L+NAA 0.5mg/L+VC 3.0g/L+ 蔗糖 30g/L+ 琼脂粉 7g/L，pH 值为 5.8-6.2。

[0042] (3) 不定芽的继代培养

[0043] 将步骤 (2) 中培养出的不定芽接种于继代培养基继续继代培养，培养条件：温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照强度 1500-2000lux，光照时间 14-16h。7 天后长出白色芽点，25d 后形成不定芽。其中诱导培养基为 MS 基本培养基 +6-BA0.8g/L+IAA0.4mg/L+KT0.5mg/L+ 蔗糖 30g/L+ 琼脂粉 7g/L，pH 值为 5.8-6.2。

[0044] (4) 生根培养

[0045] 将步骤 (3) 中的不定芽剪切成含有 2-3 个节且带顶芽的茎段接种于生根培养基中。培养条件：温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照强度 1500-2000lux，光照时间 14-16h。10d 后开始生根，30d 后长出大量根。其中生根培养基为 1/2MS 培养基中 +IBA0.4mg/L+NAA0.4mg/L+30g/L 蔗糖 +7g/L 琼脂粉，pH 值为 5.8-6.2。

[0046] (5) 驯化炼苗

[0047] 将步骤(4)中生根苗植株长至约4-6cm、生根条数达5-6条,且长度为3-4cm时,将其移至自然条件下炼苗2d,2d后将其盖打开继续炼苗4-5d,备用;

[0048] (6) 试管苗的移栽

[0049] 将步骤(5)中驯化好的虎杖植株将其从培养瓶中取出,洗净根部的培养基。用800倍50%的多菌灵可湿性粉剂浸泡2-3h,稍晾干根部水分即可进行移栽,移栽入经高温消毒过的营养土、自然土壤和蛭石体积比1:2:0.5的混合基质的营养钵并置于温室中。并随时注意保湿,20d后将其直接移栽至大田中。

[0050] 实施例2:

[0051] (1) 外植体的选取与灭菌

[0052] 选取健壮、无病虫害的野生虎杖带腋芽幼嫩枝条作为外植体,并对其进行消毒处理,消毒步骤如下:对材料进行流水冲洗,洗净杂质后,用流水冲洗2-3h;在超净工作台中先用75%酒精浸泡30s,无菌水清洗3-5遍;用0.1% HgCl₂处理5-6min,无菌水洗冲5-6次;用无菌滤纸吸干水分备用。

[0053] (2) 不定芽的诱导

[0054] 将步骤(1)中外植体切成带芽茎段(长2-3cm),分别接种于诱导培养基中进行诱导培养,培养条件:温度为25±2℃,光照强度1500-2000lux,光照时间14-16h。7天后长出白色芽点,25d后形成不定芽。其中诱导培养基为MS基本培养基+6-BA2.5mg/L+NAA 0.5mg/L+VC 3.0g/L+蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,pH值为5.8-6.2。

[0055] (3) 不定芽的继代培养

[0056] 将步骤(2)中培养出的不定芽接种于继代培养基继续继代培养,培养条件:温度为25±2℃,光照强度1500-2000lux,光照时间14-16h。7天后长出白色芽点,25d后形成不定芽。其中诱导培养基为MS基本培养基+6-BA0.8g/L+IAA0.5mg/L+KT0.5mg/L+蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,pH值为5.8-6.2。

[0057] (4) 生根培养

[0058] 将步骤(3)中的不定芽剪切成含有2-3个节且带顶芽的茎段接种于生根培养基中。培养条件:温度为25±2℃,光照强度1500-2000lux,光照时间14-16h。10d后开始长根,30d后长出大量根。其中生根培养基为1/2MS培养基中+IBA0.3mg/L+NAA0.3mg/L+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,pH值为5.8-6.2。

[0059] (5) 驯化炼苗

[0060] 将步骤(4)中生根苗植株长至约4-6cm、生根条数达5-6条,且长度为3-4cm时,将其移至自然条件下炼苗2d,2d后将其盖打开继续炼苗4-5d,备用;

[0061] (6) 试管苗的移栽

[0062] 将步骤(5)中驯化好的虎杖植株将其从培养瓶中取出,洗净根部的培养基。用800倍50%的多菌灵可湿性粉剂浸泡2-3h,稍晾干根部水分即可进行移栽,移栽入经高温消毒过的营养土、自然土壤和蛭石体积比0.5:1:0.5的混合基质的营养钵并置于温室中。并随时注意保湿,20d后将其直接移栽至大田中。

[0063] 实施例3:

[0064] (1) 外植体的选取与灭菌

[0065] 选取健壮、无病虫害的野生虎杖带腋芽幼嫩枝条作为外植体,并对其进行消毒处理,消毒步骤如下:对材料进行流水冲洗,洗净杂质后,用流水冲洗 2-3h;在超净工作台中先用 75%酒精浸泡 30s,无菌水清洗 3-5 遍;用 0.1% HgCl_2 处理 5-6min,无菌水洗冲 5-6 次;用无菌滤纸吸干水分备用。

[0066] (2) 不定芽的诱导

[0067] 将步骤 (1) 中外植体切成带芽茎段(长 2-3cm),分别接种于诱导培养基中进行诱导培养,培养条件:温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,光照强度 1500-2000lux,光照时间 14-16h。7 天后长出白色芽点,25d 后形成不定芽。其中诱导培养基为 MS 基本培养基 +6-BA 1.5mg/L+NAA 0.5mg/L+VC 3.0g/L+蔗糖 30g/L+琼脂粉 7g/L,PH 值为 5.8-6.2。

[0068] (3) 不定芽的继代培养

[0069] 将步骤 (2) 中培养出的不定芽接种于继代培养基继续继代培养,培养条件:温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,光照强度 1500-2000lux,光照时间 14-16h。7 天后长出白色芽点,25d 后形成不定芽。其中诱导培养基为 MS 基本培养基 +6-BA0.5g/L+IAA0.3mg/L+KT0.3mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂粉 7g/L,PH 值为 5.8-6.2。

[0070] (4) 生根培养

[0071] 将步骤 (3) 中的不定芽剪切成含有 2-3 个节且带顶芽的茎段接种于生根培养基中。培养条件:温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,光照强度 1500-2000lux,光照时间 14-16h。10d 后开始长根,30d 后长出大量根。其中生根培养基为 1/2MS 培养基中 +IBA0.5mg/L+NAA0.5mg/L+30g/L 蔗糖 +7g/L 琼脂粉,PH 值为 5.8-6.2。

[0072] (5) 驯化炼苗

[0073] 带步骤 (4) 中生根苗植株长至约 4-6cm、生根条数达 5-6 条,且长度为 3-4cm 时,将其移至自然条件下炼苗 2d,2d 后将其盖打开继续炼苗 4-5d,备用;

[0074] (6) 试管苗的移栽

[0075] 将步骤 (5) 中驯化好的虎杖植株将其从培养瓶中取出,洗净根部的培养基。用 800 倍 50%的多菌灵可湿性粉剂浸泡 2-3h,稍晾干根部水分即可进行移栽,移栽入经高温消毒过的营养土、自然土壤和蛭石体积比 1:2:1 的混合基质的营养钵并置于温室中。并随时注意保湿,20d 后将其直接移栽至大田中。

[0076] 采用本发明中实施例 1 至实施例 3 中培养方法培养的虎杖组培苗,不定芽的诱导率可达 98.5%以上,增值率为 99%以上,增值倍数可达 6-9 倍,生根率为 99.5%,平均长度可达 3-4cm,生根条数为 5-6 条,移栽成活率可达 98%以上。

[0077] 对比例 1:

[0078] 虎杖组织培养快速繁殖的方法步骤同实施例 1-3 中的培养步骤及其培养条件,仅改变步骤 (2) 中各激素及 VC 的含量中所添加的物质,测定其不同激素水平对虎杖外植体的诱导不定芽的诱导率。测定结果如下表:

[0079]

试验编号	A (6-BA) mg/L	B (NAA) mg/L	C (VC) g/L	D(误差项)	诱导率 (%)
1	1 (2.5)	1 (0.5)	1 (3.5)	1	96.9
2	1	2 (0.4)	2 (3.0)	2	96.3
3	1	3 (0.3)	3 (2.0)	3	95.1
4	2 (2.0)	1	2	3	98.5

[0080]

5	2	2	3	1	98.2
6	2	3	1	2	97.6
7	3 (1.5)	1	3	2	97.2
8	3	2	1	3	96.4
9	3	3	2	1	95.8
K1	96.1	97.533	96.967	96.967	
K2	98.1	96.967	96.867	97.033	
K3	96.467	96.167	96.833	96.677	
R	2	1.366	0.134	0.366	
优水平	A>B>C A2B1C2				

[0081] 备注：上述实验设计的基本培养基均为 MS 基本固体培养基。

[0082] 由上表可知：各因素对虎杖外植体诱导不定芽的影响由大到小为 6-BA、NAA、VC，其中 6-BA 和 NAA 对其虎杖外植体诱导不定芽有显著影响。此实验确定了该条件下的最佳激素配比：MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.5mg/L+VC3.0g/L。

[0083] 对比例 2：

[0084] 虎杖组织培养快速繁殖的方法步骤同实施例 1-3 中的培养步骤及其培养条件，仅改变步骤 (3) 中各激素中添加的物质，测定其不同激素水平对虎杖不定芽增值效果的影响。测定结果如下：

[0085]

表二：不同激素水平条件下对虎杖不定芽增值的影响

试验编号	A (6-BA) mg/L	B (IAA) mg/L	C (KT) g/L	D (误差项)	增值倍数
1	1 (0.4)	1 (0.40)	1 (0.3)	1	6.65
2	1	2 (0.45)	2 (0.4)	2	7.13
3	1	3 (0.50)	3 (0.5)	3	7.52
4	2 (0.6)	1	2	3	7.28
5	2	2	3	1	7.82
6	2	3	1	2	8.14
7	3 (0.8)	1	3	2	9.87
8	3	2	1	3	8.36
9	3	3	2	1	8.99
K1	7.1	7.933	7.82	7.82	
K2	7.747	7.77	8.38	8.38	

[0086]

K3	9.073	8.217	7.72	7.72	
R	1.973	0.477	0.66	0.66	
优水平	A>C>B A3B1C3				

[0087] 备注：上述实验设计的基本培养基均为 MS 基本固体培养基。

[0088] 由上表可知：各因素对虎杖不定芽增值效果的影响由大到小依次为：6-BA、KT、IAA，其中 6-BA 和 KT 对其虎杖不定芽增值效果有显著影响。此实验确定了该实验条件下的最佳激素配比为 MS+6-BA 0.8mg/L+IAA0.4mg/L+KT0.5mg/L。

[0089] 对比例 3：

[0090] 虎杖组织培养快速繁殖的方法步骤同实施例 1-3 中的培养步骤及培养条件，仅改变步骤 (4) 中各激素中添加的物质，测定其不同激素水平对虎杖组培苗生根的影响。测定结果如下：

[0091]

表三：不同激素水对虎杖组培苗生根效果的影响

试验编号	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	生根率 (%)	生根平均条数 (条)	根平均长度 (cm)
1	0.5	0.5	99.62	6.87	4.36
2	0.4	0.4	98.57	6.31	4.15
3	0.3	0.3	96.65	5.94	3.84

[0092] 备注：(1) 上述实验设计的基本培养基均为 1/2MS 基本固体培养基。

[0093] (2) 表中数据为五个重复的平均数。

[0094] 由上表可知：各因素对虎杖组培苗生根率的影响，在以上两种激素对虎杖组培苗

生根都有一定的影响,这两种激素水平下最优激素配比为 1/2MS+IBA0.5mg/L+NAA0.5mg/L。在此条件下生根率可达 99.62%,生根条数可达 6.87 条,根平均长度可达 4.36cm。

[0095] 对比例 4

[0096] 虎杖组织培养快速繁殖的方法步骤同实施例 1-3 中培养步骤及其培养条件,仅改变步骤 (6) 中移栽基质中添加的物质,测定其不同激素水平对虎杖组培苗生根的影响。测定结果如下:

[0097]

试验编号	A(营养土)	B(自然土壤)	C(蛭石)	D(误差项)	移栽成活率(%)
1	1(0.3)	1(0.5)	1(1)	1	90.16
2	1	2(2)	2(0.5)	2	92.17
3	1	3(1)	3(0)	3	94.36
4	2(0.5)	1	2	3	95.14
5	2	2	3	1	93.25
6	2	3	1	2	96.45
7	3(1)	1	3	2	94.35
8	3	2	1	3	98.72
9	3	3	2	1	97.35
k1	92.23	93.217	95.11	93.587	
k2	94.947	94.713	94.887	94.323	
k3	96.807	96.053	93.987	96.073	
R	4.577	2.836	1.123	2.486	
优水平	A>B>C A3B2C1				

[0098] 由以上表可知:通过正交数据分析,以上各因素对虎杖组培苗移栽成活率都有影响,其影响由大到小依次为营养土、自然土壤、蛭石,其中营养土和自然土壤对其虎杖组培苗移栽成活率有显著影响,其最佳配比为营养土:自然土壤:蛭石=1:2:1,此条件下其移栽成活率可达 98%以上。