



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105309314 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201510817201. 5

(22) 申请日 2015. 11. 23

(71) 申请人 内蒙古科技大学

地址 014010 内蒙古自治区包头市昆区阿尔丁大街7号

(72) 发明人 李雅丽 邹广平 孟婷婷 郭小强  
杨修 许智伟

(74) 专利代理机构 包头市专利事务所 15101

代理人 庄英菊

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

### (54) 发明名称

一种蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种蒙药香青兰无菌苗子叶愈伤组织的诱导及再生体系建立的方法,属于生物技术领域植物组织培养范畴。包括以下几个步骤:(1) 香青兰无菌苗的获取;(2) 子叶愈伤组织的诱导与继代培养;(3) 不定芽的诱导分化培养;(4) 再生植株的生根诱导培养;(5) 香青兰再生植株的驯化与移栽。本方法选用香青兰无菌苗的子叶为外植体,通过调整添加特定激素的种类与浓度,对MS培养基进行不同方法的改良,最终通过诱导得到蒙药香青兰的愈伤组织进而建立了再生体系,获得外植体容易,操作方法相对简单,培养周期短,繁殖系数高,为进一步扩大栽培香青兰提供良好的种苗或可作为优秀的科研材料进行该物种的遗传转化等研究。



1. 一种蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法,其特征在於,包括以下步骤:

1) 种子表面消毒及无菌苗培养

挑选籽粒饱满的香青兰种子,经流水冲洗 4-7min 去除表面尘土杂物,无菌水冲洗 4-7 次后置于超净工作台上,用体积浓度为 70% 乙醇浸泡 30-40s,无菌水冲洗 2-4 次;再用体积浓度 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 4-6 min,无菌水震荡冲洗 4-6 次,接种在含有 100 mL 的  $\text{MS}_0$  固体培养基三角瓶中,将三角瓶瓶身用牛皮纸包裹,  $28 \pm 2$  °C 条件下培养,待种子萌发后去除牛皮纸光照培养,光照 12-14 h/d,光照强度 1800-2200 lux;

2) 愈伤组织的诱导:取生长健壮的香青兰无菌苗,切取幼嫩子叶接种于诱导培养基  $\text{MS}_1$  上,每瓶接种 3-4 块,无光照下培养 9-12 d 后转入正常光照下培养,13-16d 后观察并统计愈伤组织诱导率,诱导光照培养条件为:光照 12-14 h/d,光照强度 1800-2200 lux,温度  $28 \pm 2$  °C;

3) 愈伤组织的继代培养:将诱导得到的黄绿色愈伤组织接种在继代培养基  $\text{MS}_2$  中进行继代培养;继代培养条件为:光照 12-14 h/d,光照强度 1800-2200 lux,温度  $28 \pm 2$  °C;

4) 不定芽的诱导分化:将经过连续继代培养 3-4 次后得到的黄绿色愈伤组织转到不定芽分化培养基  $\text{MS}_3$  中进行诱导,培养条件为:光照 12-14 h/d,光照强度 1800-2200lux,温度  $28 \pm 2$  °C;

5) 所述诱导生根:经过不定芽诱导得到再生芽 2-3 片左右时转入诱导生根培养基  $\text{MS}_4$  进行生根诱导,培养条件为:光照 12-14 h/d,光照强度 1800-2200 lux,温度  $28 \pm 2$  °C;

6) 再生植株移栽:再生植株长出 4-6 条根后,将三角瓶瓶口打开,置于阴凉、空气流通处炼苗,7-8 天后将再生苗取出,经流水冲洗掉根基部的培养基残留物,再用蒸馏水冲洗几次,用体积浓度为 0.08-0.13% 多菌灵浸泡 6-8 min,转至移栽基质中,基质为松树皮、泥炭土、活苔藓与陶粒,按质量比 1:1:1:1 混合,外扣遮光塑料,每天浇透水 1-3 次,培育温度  $28 \pm 2$  °C,最低温度不低于 20 °C,待幼苗长出 3-4 片新叶,苗高 8-12cm 左右移栽到正常土壤下在自然环境中继续培育。

2. 根据权利要求 1 所述的一种蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法,其特征在於:

所述  $\text{MS}_0$  固体培养基为基本 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培养基,含有以下浓度的物质:1.65 g/L  $\text{LNH}_4\text{NO}_3$ 、1.90 g/L  $\text{KNO}_3$ 、0.17 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1807 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.332 g/L  $\text{CaCl}_2$ ;微量元素:22.3 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、6.2 mg/L  $\text{N}_3\text{BO}_3$ 、8.6 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.83 mg/L KI、0.25 g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mg/L  $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、27.8 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、37.3 mg/L  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ;维生素:肌醇 100 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、L-甘氨酸 2 mg/L、VB6 0.5 mg/L、VB1 0.1 mg/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 8-10 g/L, pH 5.8-6.0;

所述诱导培养基  $\text{MS}_1$  为以 MS 为基本培养基,添加 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0;

所述继代培养基  $\text{MS}_2$  为以 MS 为基本培养基,添加 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 0.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0;

所述不定芽分化培养基  $\text{MS}_3$  为以 MS 为基本培养基,添加外源激素 6-BA 0.8 mg/L、NAA 0.1 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0;

所述生根培养基  $\text{MS}_4$  为以 1/2MS 为基本培养基,添加外源激素 IBA 0.2 mg/L、蔗糖 30

mg/L、琼脂 6 mg/L, pH 5.8-6.0 ;

所述 1/2MS 培养基组分包括大量元素 :0.825 g/LNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、0.95 g/L KNO<sub>3</sub>、0.085 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.09035 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.166 g/L CaCl<sub>2</sub>;微量元素 :22.3 mg/L MgSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O、6.2 mg/L N<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、8.6 mg/L ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.83 mg/L KI、0.25 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O、0.025 mg/L CuSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.025 mg/L CoCl · 6H<sub>2</sub>O、27.8 mg/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、37.3 mg/L Na<sub>2</sub>-EDTA ;维生素,肌醇 100 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、L-甘氨酸 2 mg/L、VB6 0.5 mg/L、VB1 0.1 mg/L。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法,其特征在于在五种培养基 MS0、MS1、MS2、MS3、MS4 上的培养条件均为 :光照 12-14 h/d,光照强度 1800-2200 lux,温度 28 ± 2 °C。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法,其特征在于所述正常土壤为室外随机所取得种植土壤。

## 一种蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法

### [0001] 技术领域:

本发明属于生物技术领域植物组织培养方法,具体涉及蒙药香青兰组织培养再生体系的建立方法。

### [0002] 背景技术:

香青兰 (*Dracocephalum moldavica* L.), 别名摩眼子, 山薄荷, 蓝秋花、玉米草、香花子, 等。其质量标准分别收载于内蒙古蒙药材标准、卫生部药品标准维药分册, 还曾收载于 1977 年版中国药典, 唇型科青兰属一年生草本植物, 药用部位为地上全草, 主要分布于我国华北、东北、西北大部分地区, 特别是内蒙古和新疆。蒙古名为毕日阳古, 是极具开发潜力和民族特色的天然药用植物, 具有缓解心绞痛、改善心肌缺血、降低血粘度和血小板聚集率等功效作用。除作为中草药外, 香青兰因含有大量的挥发油, 是制备柠檬香系香料的重要原料。此外, 香青兰幼嫩的茎叶可作为特菜食用, 干的茎叶和种子可制作茶、调味料或制作香料。香青兰以其蕴藏的多功能医疗保健作用和独具特色的香味成为一种极具开发潜力的天然药用植物资源和芳香植物资源。

[0003] 近年来, 随着国家“中药现代化与产业化开发”行动的推进, 对香青兰的开发利用得到了迅猛发展, 而原材料的获取主要靠野外采挖, 野生香青兰的资源保护与抚育、引种与驯化正在全面展开。香青兰主要靠种子繁殖, 但它的种子非常小, 且不宜保存易丧失活力。植物组织培养与再生体系的建立是快速繁殖植物优良品种脱毒苗的重要途径, 而对香青兰进行组织培养获得再生植株的研究至今未见报道。为及时有效的保护与开发蒙药香青兰, 保证其可持续利用, 本发明以香青兰无菌苗的下胚轴为外植体, 通过愈伤组织诱导、分化、增殖、生根、炼苗、移栽等系列过程成功获得了香青兰再生植株, 建立了组培快繁体系, 为香青兰无性系育种及遗传转化、工厂化生产育苗满足市场需求提供理论基础和实践依据。

### [0004] 发明内容:

本发明提供一种蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法。

### [0005] 技术解决方案

所述的香青兰子叶愈伤组织再生体系的建立方法, 包括以下步骤:

#### (1) 种子表面消毒及无菌苗培养:

挑选籽粒饱满、大小一致的香青兰种子, 经流水冲洗 4-7 min 去除表面尘土杂物, 无菌水冲洗 4-7 次后放置超净工作台上, 用体积浓度 70% 乙醇浸泡 30-40 s, 无菌水冲洗 2-4 次; 再用体积浓度 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 4-6 min, 无菌水震荡冲洗 4-6 次, 接种在含有 100 mL  $\text{MS}_0$  固体培养基的三角瓶中, 将三角瓶瓶身用牛皮纸包裹,  $28 \pm 2$  °C 条件下培养。每天观察种子的污染与萌发状况。待种子萌发后去除牛皮纸光照培养, 光照 12-14 h/d, 光照强度 1800-2200 lux。

#### [0006] (2) 愈伤组织的诱导

取步骤 (1) 培养的生长健壮的香青兰无菌苗, 切取无菌幼苗的子叶接种于诱导培养基  $\text{MS}_1$  上, 每瓶接种 3-4 块, 暗培养 9-12 d 后转入正常光照下培养。诱导培养基  $\text{MS}_1$  以  $\text{MS}$  为基本培养基, 添加 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L

L, pH 5.8-6.0, 13-16 d 后观察并统计愈伤组织诱导率。诱导光照培养条件为:光照 12-14 h/d, 光照强度 1800-2200 lux, 温度 28 ± 2 °C。

### [0007] (3) 愈伤组织的继代培养

将经过步骤 (2) 诱导得到的黄绿色愈伤组织接种在继代培养基 MS<sub>2</sub> 中进行继代培养。继代培养基 MS<sub>2</sub> 以 MS 为基本培养基, 添加 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 0.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0, 继代培养条件为:光照 12-14 h/d, 光照强度 1800-2200 lux, 温度 28 ± 2 °C。

### [0008] (4) 不定芽的诱导分化

将经过步骤 (3) 连续继代培养 3-4 次后得到的黄绿色愈伤组织转到不定芽分化培养基 MS<sub>3</sub> 中进行诱导, 不定芽分化培养基以 MS 为基本培养基, 添加外源激素 6-BA 0.8 mg/L、NAA 0.1 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0, 培养条件为:光照 12-14 h/d, 光照强度 1800-2200 lux, 温度 28 ± 2 °C。

### [0009] (5) 诱导生根

待经过步骤 (4) 不定芽诱导得到再生芽 2-3 片左右时转入诱导生根培养基 MS<sub>4</sub> 进行生根诱导, 生根诱导培养基以 1/2MS 为基本培养基, 添加外源激素 IBA 0.2 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 6 mg/L, pH 5.8-6.0, 培养条件为:光照 12-14 h/d, 光照强度 1800-2200 lux, 温度 28 ± 2 °C。

### [0010] (6) 再生植株移栽

经过 12-15d 左右步骤 (5) 的生根诱导, 再生植株长出 4-6 条根后, 将三角瓶瓶口打开, 置于自然条件下(阴凉、空气流通处) 炼苗, 7-8 天后将再生苗从三角瓶中取出, 经流水冲洗掉根基部的培养基残留物, 再用蒸馏水冲洗几次, 用体积浓度 0.08-0.13% 多菌灵浸泡 6-8 min, 转至移栽基质中, 基质为松树皮、泥炭土、活苔藓与陶粒(按 1:1:1:1 混合), 外扣遮光塑料, 每天浇透水 1-3 次, 培育温度 28 ± 2 °C, 晚上最低温度不低于 20 °C。待幼苗长出 3-4 片新叶, 苗高 8-12cm 左右移栽到正常土壤下在自然环境中继续培育。

[0011] 本发明还具有如下附加技术特征:

所述 MS<sub>0</sub> 固体培养基为基本 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培养基, 含有以下浓度的物质: 1.65 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、1.90 g/L KNO<sub>3</sub>、0.17 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1807 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.332 g/L CaCl<sub>2</sub>; 微量元素: 22.3 mg/L MgSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O、6.2 mg/L N<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、8.6 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.83 mg/L KI、0.25 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.025 mg/L CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.025 mg/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、27.8 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、37.3 mg/L Na<sub>2</sub>-EDTA; 维生素: 肌醇 100 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、L-甘氨酸 2 mg/L、VB<sub>6</sub> 0.5 mg/L、VB<sub>1</sub> 0.1 mg/L, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 8-10 g/L。

[0012] 所述诱导培养基 MS<sub>1</sub> 为以 MS 为基本培养基, 添加 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0。

[0013] 所述继代培养基 MS<sub>2</sub> 为以 MS 为基本培养基, 添加 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 0.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0。

[0014] 所述不定芽分化培养基 MS<sub>3</sub> 为以 MS 为基本培养基, 添加外源激素 6-BA 0.8 mg/L、NAA 0.1 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0。

[0015] 所述生根培养基 MS<sub>4</sub> 为以 1/2MS 为基本培养基, 添加外源激素 IBA 0.2 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 6 mg/L, pH 5.8-6.0。所述 1/2MS 培养基组分包括大量元素: 0.825 g/L

$\text{LNH}_4\text{NO}_3$ 、0.95 g/L  $\text{KNO}_3$ 、0.085 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.09035 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.166 g/L  $\text{CaCl}_2$ ；微量元素：22.3 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、6.2 mg/L  $\text{N}_3\text{BO}_3$ 、8.6 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.83 mg/L  $\text{KI}$ 、0.25 g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mg/L  $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、27.8 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、37.3 mg/L  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ；维生素，肌醇 100 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、L-甘氨酸 2 mg/L、VB6 0.5 mg/L、VB1 0.1 mg/L。

[0016] 所述移栽基质为松树皮、泥炭土、活苔藓与陶粒按 1 : 1 : 1 : 1 混合所得。

[0017] 所述正常土壤为室外随机所取得种植土壤。

[0018] 香青兰作为一种典型的蒙、维常用民族药，对其进行的研究主要集中在化学成分分析与临床应用上，通过组织培养建立香青兰再生体系方面至今未见报道。采用本发明的有益效果是提供一种操作简单的蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法。采用香青兰无菌苗的子叶做为外植体进行愈伤组织诱导，愈伤组织继代培养后增值较快，分化程度高，经生根培养后得到的再生植物移栽后成活率高，利用该方法可在短期内获得大量香青兰再生植株，为进一步扩大栽培香青兰提供良好的种苗或可作为优秀的科研材料进行该物种的遗传转化等研究。

[0019] 附图说明：

图 1 为本发明培养的香青兰无菌苗；

图 2 为本发明香青兰无菌苗子叶培养培养 5 天的情形；

图 3 为本发明香青兰子叶愈伤诱导 20 天的情形；

图 4 为香青兰愈伤组织分化不定芽；

图 5 为香青兰不定根的分化；

图 6 为香青兰再生植株移栽。

[0020] 具体实施案例：

下面对本发明的实施做进一步的详细描述：

一种蒙药香青兰组织培养再生体系建立的方法，种植香青兰无菌苗的种子采自内蒙古锡林郭勒盟草原，它采用如下步骤：

步骤一：挑选籽粒饱满、大小一致的香青兰种子，经流水冲洗 4-7 min 去除表面尘土杂物，无菌水冲洗 4-7 次后放置超净工作台上，用体积浓度 70% 乙醇浸泡 30-40 s，无菌水冲洗 2-4 次；再用体积浓度 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 4-6 min，无菌水震荡冲洗 4-6 次，接种在含有 100 mL  $\text{MS}_0$  固体培养基（MS 基本培养基，pH5.8）的三角瓶中，将三角瓶瓶身用牛皮纸包裹， $28 \pm 2$  °C 条件下培养。每天观察种子的污染与萌发状况。萌发率 = (萌发种子数 / 接种种子数)  $\times 100\%$ ，待种子萌发后去除牛皮纸光照培养，光照 12-14 h/d，光照强度 1800-2200 lux。

[0021] 所述  $\text{MS}_0$  固体培养基以基本 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培养基为基础含有以下质量体积浓度的物质：蔗糖 30 g/L，琼脂 8-10 g/L，灭菌前将 pH 调至 5.8-6.0。

[0022] 所述基本 MS 培养基组分包括大量元素：1.65 g/L  $\text{LNH}_4\text{NO}_3$ 、1.90 g/L  $\text{KNO}_3$ 、0.17 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1807 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.332 g/L  $\text{CaCl}_2$ ；微量元素：22.3 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、6.2 mg/L  $\text{N}_3\text{BO}_3$ 、8.6 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.83 mg/L  $\text{KI}$ 、0.25 g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mg/L  $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、27.8 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、37.3 mg/L  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ；维生素，肌醇 100 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、L-甘氨酸 2 mg/L、VB6 0.5 mg/L、VB1 0.1 mg/L。

[0023] 步骤二:取步骤(1)培养的生长健壮的香青兰无菌苗,切取无菌幼苗的子叶接种于诱导培养基 MS<sub>1</sub>上,每瓶接种 3-4 块,暗培养 8-10 d 后转入正常光照下培养。12-15 d 后观察并统计愈伤组织诱导率。诱导培养条件为:光照 12-14 h/d,光照强度 2000 lux,温度 28 ± 2 °C。所述诱导培养基 MS<sub>1</sub>为以 MS 为基本培养基,添加 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0。诱导率 = 生成愈伤组织外植体数 / 接种外植体数,3 批次试验平均诱导率为 91.2%,见表 1:

表 1 愈伤组织诱导率

诱导批次	接种外植体数 (块)	生成愈伤外植体数 (块)	诱导率 (%)
1	35	32	91.4
2	38	36	94.7
3	32	28	87.5

步骤三:将经过步骤(2)诱导得到的淡黄色愈伤组织接种在继代培养基 MS<sub>2</sub>中进行继代培养。培养条件为:光照 12-14 h/d,光照强度 2000 lux,温度 28 ± 2 °C。所述继代培养基 MS<sub>2</sub>为以 MS 为基本培养基,添加 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 0.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0。

[0024] 步骤四:将经过步骤(3)连续继代培养 3-5 次后得到的淡黄色愈伤组织转到不定芽分化培养基 MS<sub>3</sub>中进行不定芽的诱导,培养条件为:光照 12-14 h/d,光照强度 2000 lux,温度 28 ± 2 °C。所述不定芽分化培养基 MS<sub>3</sub>为以 MS 为基本培养基,添加外源激素 6-BA 0.8 mg/L、NAA 0.1 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 10 mg/L, pH 5.8-6.0。分化率 = 分化出再生芽的愈伤 / 诱导分化的愈伤总数。3 批次试验不定芽平均分化率为 84.2%,见表 2:

表 2 再生芽的分化率

诱导批次	接种愈伤数(块)	分化出不定芽愈伤数(块)	诱导率(%)
1	27	23	85.2
2	19	16	84.2
3	24	20	83.3

步骤五:经过不定芽诱导得到再生芽 2-4 片左右时转入诱导生根培养基 MS<sub>4</sub>进行生根诱导,培养条件为:光照 12-14 h/d,光照强度 2000 lux,温度 28 ± 2 °C。所述生根诱导培养基 MS<sub>4</sub>为以 1/2MS 为基本培养基,添加外源激素 IBA 0.2 mg/L、蔗糖 30 mg/L、琼脂 6 mg/L, pH 5.8-6.0。

[0025] 所述基本 1/2MS 培养基组分包括大量元素:0.825 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、0.95 g/L KNO<sub>3</sub>、0.085 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.09035 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.166 g/L CaCl<sub>2</sub>;微量元素:22.3 mg/L MgSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O、6.2 mg/L N<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、8.6 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.83 mg/L KI、0.25 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.025 mg/L CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.025 mg/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、27.8 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、37.3 mg/L Na<sub>2</sub>-EDTA;维生素,肌醇 100 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、L-甘氨酸 2 mg/L、VB<sub>6</sub> 0.5 mg/L、VB<sub>1</sub> 0.1 mg/L。

[0026] 步骤六:经过 12-15d 左右步骤(5)的生根诱导,再生植株长出 4-6 条根后,将三角瓶瓶口打开,置于自然条件下(阴凉、空气流通处)炼苗,7-8 天后将再生苗从三角瓶中取出,经流水冲洗掉根基部的培养基残留物,再用蒸馏水冲洗几次,用体积浓度 0.1% 多菌灵浸泡 6-8 min,转至移栽基质中,外扣遮光塑料,每天浇透水 1-3 次,培育温度 28 ± 2 °C,晚上最低温度不低于 20 °C。待幼苗长出 3-4 片新叶,苗高 8-12cm 左右移栽到正常土壤下在自然环境中继续培育。所述移栽基质为松树皮、泥炭土、活苔藓与陶粒按 1:1:1:1 混合所得。所述正常土壤为室外随机所取得种植土壤。成活率 = 成活的移栽苗 / 全部移栽苗。3 批次试验平均移栽成活率为 86.3%,见表 3:

表 3 移栽苗的成活率

移栽批次	移栽苗(棵)	成活苗(棵)	成活率(%)
1	32	27	84.4
2	28	24	85.7
3	36	32	88.9

采用本发明提供的一种可在短期内获得大量香青兰再生植株的方法,以香青兰无菌苗的子叶做为外植体进行愈伤组织诱导,诱导率为 91.2%,愈伤组织继代培养后增值较快,分化程度高,分化率为 84.2%,经生根培养后得到的再生植物移栽后成活率达到 86.3%,利用该方法可在短期内获得大量香青兰再生植株,为进一步扩大栽培香青兰提供良好的种苗或可作为优秀的科研材料进行该物种的遗传转化等研究。

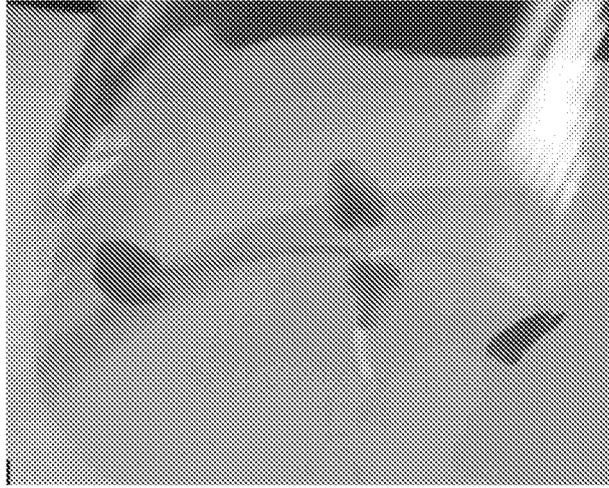


图 1

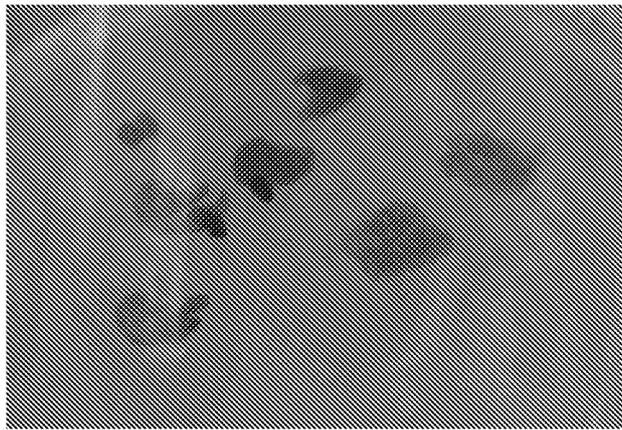


图 2

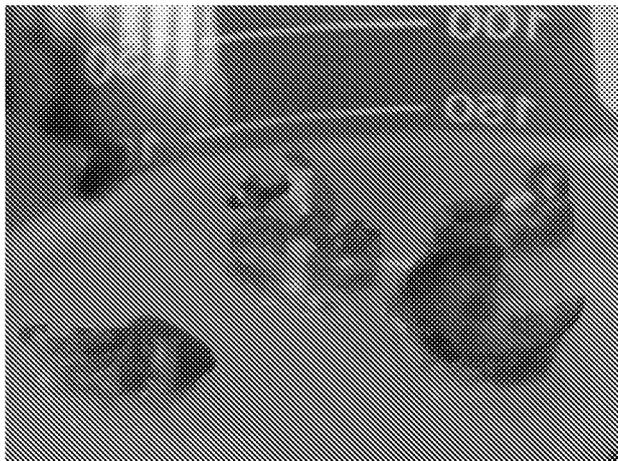


图 3



图 4



图 5



图 6