



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105230493 B

(45)授权公告日 2018.03.13

(21)申请号 201510739826.4

(22)申请日 2015.11.04

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105230493 A

(43)申请公布日 2016.01.13

(73)专利权人 恩施土家族苗族自治州农业科学院

地址 445000 湖北省恩施土家族苗族自治州恩施市施州大道517号

专利权人 恩施清江生物工程有限公司

(72)发明人 李红英 覃大吉 王应玲 向极轩
杨永康 陈菲菲 殷红清 程群
马进 叶紫云

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 李进

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

A01G 9/00(2006.01)

审查员 王涛

权利要求书2页 说明书11页

(54)发明名称

一种白术种苗的繁殖方法及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种白术种苗的繁殖方法,所述方法包括以下步骤:1)选择白术外植体并对外植体进行无菌处理;2)对外植体进行初代培养;3)诱导培养愈伤组织;4)对愈伤组织进行增殖培养;5)对愈伤组织进行丛生芽诱导培养;6)对丛生芽进行生根培养;7)进行炼苗移栽。本发明的方法能够白术品种选育中的优势类型的典型单株进行快速繁殖,通过组织培养的方式稳定其遗传性状,扩大群体数量,有利于对育种过程中出现的优质中间材料的保存和评价与利用。本发明还提供了所述方法在温室大棚白术载苗中的应用,该应用可以在保持成活率的同时扩大繁殖量,可以根据需要安排繁殖面积。

1. 一种白术种苗的繁殖方法,所述方法包括以下步骤:

- 1) 选择白术外植体并对外植体进行无菌处理;
- 2) 对外植体进行初代培养;
- 3) 诱导培养愈伤组织;
- 4) 对愈伤组织进行增殖培养;
- 5) 对愈伤组织进行丛生芽诱导培养;
- 6) 对丛生芽进行生根培养;
- 7) 进行炼苗移栽;

其中,所述步骤1)中选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体;并且,所述无菌处理的具体步骤如下:取腋芽外植体茎上的幼芽使用质量浓度0.01-0.2%的氯化汞溶液浸泡30-120秒,用无菌水冲洗后,用质量分数1-10%的次氯酸钠溶液浸泡5-15分钟,期间不断搅拌;

所述步骤2)中的初代培养,具体步骤如下:剪去无菌处理过的白术腋芽受伤的部位,将其接种于初代培养基中,并于光照时间10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 的培养室中培养15-20d;其中,所述初代培养基是1/2MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:25-35g/L蔗糖、6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0;

所述步骤3)中诱导培养愈伤组织的具体步骤如下:对经过初代培养的外植体进行紫外灭菌20-40分钟后,修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中,并于光照时间10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 的培养室中培养4-15d,形成愈伤组织;所述愈伤组织诱导培养基是1/2MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:0.5-1.0mg/L 6-BA、0.1-0.5mg/L NAA、25-35g/L蔗糖以及6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0;

所述步骤4)中的增殖培养,具体步骤如下:将步骤3)中诱导培养形成的愈伤组织置于培养皿中,除去表面的培养基后接种到增殖培养基中,并于光照时间10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 的培养室中培养30-45d;其中,所述增殖培养基是MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:0.5-1.5mg/L 6-BA、0.5-1.5mg/L NAA、25-35g/L蔗糖以及6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0;

所述步骤5)中的丛生芽诱导培养,具体步骤如下:将增殖培养后的愈伤组织切成小块,所述小块的直径为0.3-1.0cm;按4-6块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中,并于光照12-18h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 的培养室中培养6-10d,生成丛生芽;所述愈伤组织丛生芽诱导培养基是1/2MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:1.5-2.0mg/L 6-BA、0.1-0.5mg/L NAA、25-35g/L蔗糖以及6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0;

所述步骤6)中的生根培养,具体步骤如下:将步骤5)中培养的白术丛生芽剪切后按1-5芽/瓶转接到生根培养基中,并于光照10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 的培养室中培养30d;所述生根培养基是1/4MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:0.5-1mg/L NAA、蔗糖25-35g/L以及琼脂粉6-8g/L,pH为5.8-6.0;

所述步骤7)中的炼苗为:在步骤6)中的生根培养完成后,将生根培养基置于炼苗室常温密闭瓶炼苗1-5d,旋松所述生根培养基的培养瓶盖1-3d,全开所述瓶盖1-3d;在步骤7)完成炼苗后将白术苗置于清水中,洗去根部琼脂,捞出,移栽至苗圃中,每天早晚清水喷洒叶面保湿,4-6d后减少喷水次数,然后每4-6天浇灌一次低浓度营养液,浇灌周期为12-18d。

2. 根据权利要求1所述的繁殖方法,其特征在于,所述无菌处理的具体步骤如下:使用75%的酒精浸泡所述外植体,后使用无菌水冲洗,然后换用质量浓度0.1%的氯化汞溶液浸泡60秒,再用无菌水冲洗3-4次,最后用质量分数5%的次氯酸钠溶液浸泡10分钟,期间不断搅拌。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤3)中对经过初代培养的外植体进行紫外灭菌的时间为30分钟,其中,所述愈伤组织诱导培养基是1/2MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:0.5-1.0mg/L 6-BA、0.1-0.5mg/L NAA、25-35g/L蔗糖以及6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤5)中所述丛生芽诱导培养的具体步骤如下:将增殖培养后的愈伤组织切成0.3cm的小块,按5块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中,并于光照12-18h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养6-10d,生成丛生芽。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤6)中的生根培养,具体步骤如下:将步骤5)中培养的白术丛生芽剪切后按3芽/瓶“品字形”排列转接到生根培养基中并于光照10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养30d。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤7)中的炼苗为:在步骤6)中的生根培养完成后,将生根培养基置于炼苗室常温闭瓶炼苗3d,旋松所述生根培养基的培养瓶盖2d,全开所述瓶盖2d。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述低浓度营养液的组分为1/2MS营养液。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,在步骤7)完成炼苗后将白术苗置于清水盆中,洗去根部琼脂,捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,5d后减少喷水次数,然后每5天浇灌一次低浓度营养液,浇灌周期为15d。

9. 权利要求1-8中任意一项所述方法在温室大棚白术栽苗中的应用。

一种白术种苗的繁殖方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物领域,具体而言,涉及一种白术种苗的繁殖方法。

背景技术

[0002] 白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)为菊科多年生草本植物,又名于术、浙术、冬术等。为中国传统药用植物,具有健脾益气、燥湿利水、止汗安胎等功效。近年来的研究表明,白术有利尿、抗肿瘤、抗菌消炎、抗糖尿病、抗衰老等作用。由于白术用途广泛,市场需求量大,推广种植方面全国各地皆有。

[0003] 目前白术生产中存在着严重的品种混杂现象,植株性状分离。白术属于异花授粉作物,自花授粉不结实或瘪粒种子,异花授粉的种子连续多代出现植株性状分离,不利于后代植株性状纯合,加大了品种选育难度,延长了品种选育年限。在进行品种选育的同时,通过无性繁殖的方式稳定其性状并提供优质种苗供白术药材生产是一种现实的有效途径。采用腋芽组织培养的方法对白术品种选育过程中出现的优势类型典型单株进行快速繁殖,加快其在药材生产中的推广应用。此外,建立白术优势类型典型单株的组织培养繁殖技术,也有利于生物工程技术进行白术药用次生代谢产物的开发与研究。

[0004] 有鉴于此,提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明的第一目的在于提供一种白术繁殖技术,所述方法能够白术品种选育中的优势类型的典型单株进行快速繁殖,整个繁殖过程仅需要85-95天,通过组织培养的方式稳定其遗传性状,扩大群体数量,有利于对育种过程中出现的优质中间材料的保存和评价与利用。

[0006] 本发明的第二目的在于提供一种所述方法在温室大棚白术载苗中的应用,该应用可以在保持成活率的同时扩大繁殖量,可以根据需要安排繁殖面积。

[0007] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0008] 本发明的一个方面涉及一种白术种苗的繁殖方法,所述方法包括以下步骤:

[0009] 1) 选择白术外植体并对外植体进行无菌处理;

[0010] 2) 对外植体进行初代培养;

[0011] 3) 诱导培养愈伤组织;

[0012] 4) 对愈伤组织进行增殖培养;

[0013] 5) 对愈伤组织进行丛生芽诱导培养;

[0014] 6) 对丛生芽进行生根培养;

[0015] 7) 进行炼苗移栽。

[0016] 采用本发明的方法可以对白术进行快速的无性繁殖,高效地提供优势类型典型单株的白术种苗,克服白术生产的现有技术中,品种混杂、植株性状分离的缺陷。此外,本发明的方法能够快速繁殖,整个过程仅需85-95天。

[0017] 优选地,所述步骤1)中选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体;并且,所述无菌处理的具体步骤如下:取腋芽外植体茎上的幼芽使用质量浓度0.01-0.2%的氯化汞溶液浸泡30-120秒,用无菌水冲洗后,用质量分数1-10%的次氯酸钠溶液浸泡5-15分钟,期间不断搅拌;

[0018] 更优选地,所述无菌处理的具体步骤如下:使用75%的酒精浸泡所述外植体,后使用无菌水冲洗,然后换用质量浓度0.1%的氯化汞溶液浸泡60秒,再用无菌水冲洗3-4次,最后用质量分数5%的次氯酸钠溶液浸泡10分钟,期间不断搅拌。

[0019] 优选地,所述步骤2)中的初代培养,具体步骤如下:剪去无菌处理过的白术腋芽受伤的部位,将其接种于初代培养基中,并于光照时间10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养15-20d;

[0020] 其中,所述初代培养基是1/2MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:25-35g/L蔗糖、6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0。

[0021] 初代培养4-7d后,可以观察到腋芽开始生长,继续培养15-20d后,其可以长到3-5cm。

[0022] 优选地,所述步骤3)中诱导培养愈伤组织的具体步骤如下:对经过初代培养的外植体进行紫外灭菌20-40分钟后,修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中,并于光照时间10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养4-15d,形成愈伤组织;

[0023] 更优选地,对经过初代培养的外植体进行紫外灭菌30分钟后,修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中;

[0024] 其中,所述愈伤组织诱导培养基1/2MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:0.5-1.0mg/L 6-BA、0.1-0.5mg/L NAA、25-35g/L蔗糖以及6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0。

[0025] 培养4-15天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0026] 优选地,所述步骤4)中的增殖培养,具体步骤如下:将步骤3)中诱导培养形成的愈伤组织置于培养皿中,除去表面的培养基后接种到增殖培养基中,并于光照时间10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养30-45d;

[0027] 其中,所述增殖培养基是MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:0.5-1.5mg/L 6-BA、0.5-1.5mg/L NAA、25-35g/L蔗糖以及6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0。

[0028] 增殖培养3-7d后,可以观察到白术愈伤组织开始生长,每30-45d为一个培养周期,一个周期内,愈伤组织直径平均增大6.0-13.5倍。

[0029] 优选地,步骤5)中的丛生芽诱导培养,具体步骤如下:将增殖培养后的愈伤组织切成小块,小块的直径为0.3-1.0cm;按4-6块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中,并于光照12-18h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养6-10d,生成丛生芽;

[0030] 更优选地,丛生芽诱导培养的具体步骤如下:将增殖培养后的愈伤组织切成0.3cm的小块,按5块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中,并于光照12-18h/d,光强1500-2000lx,温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养6-10d,生成丛生芽;

[0031] 其中,所述愈伤组织丛生芽诱导培养基是1/2MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:1.5-2.0mg/L 6-BA、0.1-0.5mg/L NAA+、25-35g/L蔗糖以及6-8g/L琼脂粉,pH为5.8-6.0。

[0032] 优选地,步骤6)中的生根培养,具体步骤如下:将步骤5)中培养的白术丛生芽剪切

后按1-5芽/瓶转接到生根培养基中,并于光照10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养30d;

[0033] 更优选地,所述生根培养的具体步骤如下:将步骤5)中培养的白术从生芽剪切后按3芽/瓶“品字形”排列转接到生根培养基中并于光照10-20h/d,光强1500-2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养30d;

[0034] 其中,所述生根培养基是1/4MS培养基,其组分按质量体积浓度计包括:0.5-1mg/L NAA、蔗糖25-35g/L以及琼脂粉6-8g/L,pH为5.8-6.0。

[0035] 生根培养5-14d后可以观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为4-6根/芽,12-18根/瓶。

[0036] 优选地,所述步骤7)中的炼苗为:在步骤6)中的生根培养完成后,将生根培养基置于炼苗室常温闭瓶炼苗1-5d,旋松所述生根培养基的培养瓶盖1-3d,全开所述瓶盖1-3d;

[0037] 更优选地,所述炼苗为:在步骤6)中的生根培养完成后,将生根培养基置于炼苗室常温闭瓶炼苗3d,旋松所述生根培养基的培养瓶盖2d,全开所述瓶盖2d。

[0038] 优选地,在步骤7)完成炼苗后将白术苗置于清水中,洗去根部琼脂,捞出,移栽至苗圃中,每天早晚清水喷洒叶面保湿,4-6d后减少喷水次数,然后每4-6天浇灌一次低浓度营养液,浇灌周期为12-18d;

[0039] 更优选的,所述低浓度营养液的组分为1/2MS营养液,其组分包括:大量元素、微量元素、铁盐;

[0040] 更优选地,在步骤7)完成炼苗后将白术苗置于清水盆中,洗去根部琼脂,捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,5d后减少喷水次数,然后每5天浇灌一次低浓度营养液,浇灌周期为15d。

[0041] 本发明的另一方面涉及所述方法在温室大棚白术载苗中的应用。

[0042] 本发明的方法可以周年在温室大棚进行生产,愈伤组织增殖周期为45天,增殖6-13.5倍/周期,每年繁殖8个周期,年繁殖系数稳定在1:1000-2000,术栽苗成活率达到90%,得苗率为1:900-1800。可以根据需要安排繁殖面积。

[0043] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0044] (1)通过本方法进行白术种苗繁殖,可以周年在室内(组培苗)和温室大棚进行(术栽苗)的生产,可以根据需要安排繁殖面积;

[0045] (2)通过本方法进行白术种苗繁殖,对白术品种选育中的优势类型的典型单株进行快速繁殖,通过组织培养的方式稳定其遗传性状,扩大群体数量,有利于对育种过程中出现的优质中间材料的保存和评价与利用;

[0046] (3)通过本方法进行白术种苗繁殖,在品种选育工作进行的同时,为区域试验提供足够的优质种苗,便于对其丰产性、抗逆性、区域适应性进行系统性鉴定;

[0047] (4)通过本方法进行白术种苗繁殖,在品种选育工作进行的同时,为高产栽培技术的研究与示范提供足够的优质种苗;

[0048] (5)通过本方法进行白术种苗繁殖,在优良品种推广期间,可以长期保持品种的种性,不会出现品种退化的风险;

[0049] (6)通过本方法进行白术种苗繁殖,克服了种子繁殖后代性状严重分离的现象,缩短白术品种选育年限;

[0050] (7)通过本方法进行白术种苗繁殖,有利于采用生物工程技术进行白术药用次生代谢产物的开发与研究;

[0051] (8)通过本方法进行白术种苗繁殖,有利于向国家作物种质资源库输送优质种质资源材料,丰富白术种质基因库,便于白术优质种质资源的交流与共享,提高育种水平与药材生产水平。

具体实施方式

[0052] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0053] 实施例1

[0054] 选取选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体,对其进行无菌处理:取茎上的幼芽,修剪多余的叶片,表面灰尘颗粒用软毛刷除去;自来水冲洗干净(60分钟),吸干芽体表面的水分,在灭菌后的超净工作台上用75%的酒精浸泡15秒,无菌水冲洗3次,然后换用0.01%氯化汞溶液浸泡30秒,无菌水冲洗3次,最后用1%次氯酸钠溶液浸泡5分钟,期间不断搅拌,无菌水冲洗4次,倒出多余的无菌水,将腋芽放置培养皿中待用。

[0055] 按照以下步骤繁殖白术种苗:

[0056] 1.白术种苗的初代培养:使用经过高压灭菌的医用镊子、医用剪刀、将消毒过的白术腋芽置于无菌培养皿中剪去腋芽受伤的部位,接种于初代培养基中:1/2MS+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,pH=5.8,培养于光照时间10h/d,光强1500x,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,接种6-7d后,观察到腋芽开始生长。

[0057] 2.愈伤组织诱导培养:培养20d待苗长到3-5cm左右,在紫外灭菌30分钟后的超净工作台上将苗从培养瓶中取出,置于无菌培养皿中,用高压灭菌后的医用镊子和医用剪刀修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中:1/2MS+0.5mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,pH=5.8,培养于光照时间10h/d,光强1500lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养10-15天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0058] 3.愈伤组织增殖培养:在超净工作台上,将形成的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀除去表面的培养基接种到增殖培养基中:MS+0.5mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,pH=5.8,培养于光照时间10h/d,光强1500lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养5-7d后,观察到白术愈伤组织开始生长,每个培养周期45d,愈伤组织直径平均增大6.0-8.5倍。

[0059] 4.愈伤组织丛生芽诱导培养:在超净工作台上,将培养到2.5-4cm的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀切成直径0.3cm的小块,按5块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中:1/2MS+1.5mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,pH=5.8,培养于光照12h/d,光强1500x,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养6-10d后,观察到白术愈伤组织开始生长芽。平均生芽数为3-4个/块,15-20个/瓶。

[0060] 5.丛生芽生根培养:在灭菌超净工作台上,将培养到2cm左右的白术丛生芽剪切后按3芽/瓶“品字形”排列转接到生根培养基中:1/4MS+0.5mg/L NAA蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,

PH=5.8,培养于光照10h/d,光强1500lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,12-14d后观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为4-5根/芽,12-15根/瓶。

[0061] 6. 炼苗移栽:当白术组培苗根长2cm左右时,将培养瓶从组培室移除,置于炼苗室常温闭瓶炼苗3d,旋松盖子2d,全开盖2d;炼苗完成后,将白术苗从培养瓶中移出,放入清水盆中,小心洗去根部琼脂,然后捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,5d后减少喷水次数;然后每5天浇灌一次低浓度营养液,营养液为1/2MS大量元素、微量元素、铁盐,15d后,统计成活率,成活率为91.5-93%。

[0062] 实施例2

[0063] 选取选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体,对其进行无菌处理:取茎上的幼芽,修剪多余的叶片,表面灰尘颗粒用软毛刷除去;自来水冲洗干净(60分钟),吸干芽体表面的水分,在灭菌后的超净工作台上用75%的酒精浸泡45秒,无菌水冲洗4次,然后换用0.2%氯化汞溶液浸泡120秒,无菌水冲洗4次,最后用10%次氯酸钠溶液浸泡15分钟,期间不断搅拌,无菌水冲洗5次,倒出多余的无菌水,将腋芽放置培养皿中待用。

[0064] 按照以下步骤繁殖白术种苗:

[0065] 1. 白术种苗的初代培养:使用经过高压灭菌的医用镊子、医用剪刀、将消毒过的白术腋芽置于无菌培养皿中剪去腋芽受伤的部位,接种于初代培养基中:1/2MS+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照时间15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养5-7d后,观察到腋芽开始生长。

[0066] 2. 愈伤组织诱导培养:培养18d待苗长到3-5cm左右,在紫外灭菌30分钟后的超净工作台上将苗从培养瓶中取出,置于无菌培养皿中,用高压灭菌后的医用镊子和医用剪刀修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中:1/2MS+0.7mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照时间15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养8-12天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0067] 3. 愈伤组织增殖培养:在超净工作台上,将形成的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀除去表面的培养基接种到增殖培养基中:MS+1.0mg/L 6-BA+1.0mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.8,培养于光照时间15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养4-6d后,观察到白术愈伤组织开始生长,每个培养周期38d,愈伤组织直径平均增大8-12倍。

[0068] 4. 愈伤组织丛生芽诱导培养:在超净工作台上,将培养到2.5~4cm的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀切成直径0.3cm的小块,按5块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中:1/2MS+1.75mg/L 6-BA+0.35mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养7-9d后,观察到白术愈伤组织开始生长芽。平均生芽数为4-5个/块,20-25个/瓶。

[0069] 5. 丛生芽生根培养:在灭菌超净工作台上,将培养到2cm左右的白术丛生芽剪切后按3芽/瓶“品字形”排列转接到生根培养基中:1/4MS+0.75mg/L NAA蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,PH=5.9,培养于光照15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,7-12d后观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为4-5根/芽,12-15根/瓶。

[0070] 6. 炼苗移栽:当白术组培苗根长2cm左右时,将培养瓶从组培室移除,置于炼苗室常温闭瓶炼苗3d,旋松盖子2d,全开盖2d;炼苗完成后,将白术苗从培养瓶中移出,放入清水

盆中,小心洗去根部琼脂,然后捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,5d后减少喷水次数;然后每5天浇灌一次低浓度营养液,营养液为1/2MS大量元素、微量元素、铁盐,15d后,统计成活率,成活率为91.5-94.6%。

[0071] 实施例3

[0072] 选取选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体,对其进行无菌处理:取茎上的幼芽,修剪多余的叶片,表面灰尘颗粒用软毛刷除去;自来水冲洗干净(60分钟),吸干芽体表面的水分,在灭菌后的超净工作台上用75%的酒精浸泡30秒,无菌水冲洗3次,然后换用0.1%氯化汞溶液浸泡60秒,无菌水冲洗3次,最后用5%次氯酸钠溶液浸泡10分钟,期间不断搅拌,无菌水冲洗4次,倒出多余的无菌水,将腋芽放置培养皿中待用。

[0073] 按照以下步骤繁殖白术种苗:

[0074] 1.白术种苗的初代培养:使用经过高压灭菌的医用镊子、医用剪刀、将消毒过的白术腋芽置于无菌培养皿中剪去腋芽受伤的部位,接种于初代培养基中:1/2MS+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=6.0,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养4-5d后,观察到腋芽开始生长。

[0075] 2.愈伤组织诱导培养:培养15d待苗长到3-5cm左右,在紫外灭菌30分钟后的超净工作台上将苗从培养瓶中取出,置于无菌培养皿中,用高压灭菌后的医用镊子和医用剪刀修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中:1/2MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=6.0,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养4-8天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0076] 3.愈伤组织增殖培养:在超净工作台上,将形成的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀除去表面的培养基接种到增殖培养基中:MS+1.5mg/L 6-BA+1.5mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=6.0,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养3-5d后,观察到白术愈伤组织开始生长,每个培养周期45d,愈伤组织直径平均增大10.0-13.5倍。

[0077] 4.愈伤组织丛生芽诱导培养:在超净工作台上,将培养到2.5-4cm的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀切成直径0.3cm的小块,按5块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中:1/2MS+2.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=6.0,培养于光照18h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养6-8d后,观察到白术愈伤组织开始生长芽。平均生芽数为4-6个/块,20-30个/瓶。

[0078] 5.丛生芽生根培养:在灭菌超净工作台上,将培养到2cm左右的白术丛生芽剪切后按3芽/瓶“品字形”排列转接到生根培养基中:1/4MS+1mg/L NAA蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,PH=6.0,培养于光照20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,5-7d后观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为5-6根/芽,15-18根/瓶。

[0079] 6.炼苗移栽:当白术组培苗根长2cm左右时,将培养瓶从组培室移除,置于炼苗室常温闭瓶炼苗3d,旋松盖子2d,全开盖2d;炼苗完成后,将白术苗从培养瓶中移出,放入清水盆中,小心洗去根部琼脂,然后捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,5d后减少喷水次数;然后每5天浇灌一次低浓度营养液,营养液为1/2MS大量元素、微量元素、铁盐,15d后,统计成活率,成活率为94-96.8%。

[0080] 实施例4

[0081] 选取选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体,对其进行无菌处理:取茎上的幼芽,修剪多余的叶片,表面灰尘颗粒用软毛刷除去;自来水冲洗干净(60分钟),吸干芽体表面的水分,在灭菌后的超净工作台上用75%的酒精浸泡30秒,无菌水冲洗3次,然后换用0.1%氯化汞溶液浸泡60秒,无菌水冲洗3次,最后用5%次氯酸钠溶液浸泡10分钟,期间不断搅拌,无菌水冲洗4次,倒出多余的无菌水,将腋芽放置培养皿中待用。

[0082] 按照以下步骤繁殖白术种苗:

[0083] 1.白术种苗的初代培养:使用经过高压灭菌的医用镊子、医用剪刀、将消毒过的白术腋芽置于无菌培养皿中剪去腋芽受伤的部位,接种于初代培养基中:1/2MS+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.8,培养于光照时间10h/d,光强1500x,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养6-7d后,观察到腋芽开始生长。

[0084] 2.愈伤组织诱导培养:培养20d待苗长到3-5cm左右,在紫外灭菌30分钟后的超净工作台上将苗从培养瓶中取出,置于无菌培养皿中,用高压灭菌后的医用镊子和医用剪刀修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中:1/2MS+0.8mg/L 6-BA+0.3mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.8,培养于光照时间17h/d,光强19001x,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养8-12天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0085] 3.愈伤组织增殖培养:在超净工作台上,将形成的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀除去表面的培养基接种到增殖培养基中:MS+0.5mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.8,培养于光照时间10h/d,光强15001x,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养5-7d后,观察到白术愈伤组织开始生长,每个培养周期45d,愈伤组织直径平均增大8.2-10.5倍。

[0086] 4.愈伤组织丛生芽诱导培养:在超净工作台上,将培养到2.5-4cm的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀切成直径0.3cm的小块,按5块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中:1/2MS+1.5mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.8,培养于光照12h/d,光强1500x,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养6-10d后,观察到白术愈伤组织开始生长芽。平均生芽数为4-5个/块,20-25个/瓶。

[0087] 5.丛生芽生根培养:在灭菌超净工作台上,将培养到2cm左右的白术丛生芽剪切后按3芽/瓶“品字形”排列转接到生根培养基中:1/4MS+0.5mg/L NAA蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,PH=5.8,培养于光照10h/d,光强15001x,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,10-13d后观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为4-5根/芽,12-15根/瓶。

[0088] 6.炼苗移栽:当白术组培苗根长2cm左右时,将培养瓶从组培室移除,置于炼苗室常温闭瓶炼苗3d,旋松盖子2d,全开盖2d;炼苗完成后,将白术苗从培养瓶中移出,放入清水盆中,小心洗去根部琼脂,然后捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,5d后减少喷水次数;然后每5天浇灌一次低浓度营养液,营养液为1/2MS大量元素、微量元素、铁盐,15d后,统计成活率,成活率为91.9-93.3%。

[0089] 实施例5

[0090] 选取选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体,对其进行无菌处理:取茎上的幼芽,修剪多余的叶片,表面灰尘颗粒用软毛刷除去;自来水冲洗干净(60分钟),吸干芽体表面的水分,在灭菌后的超净工作台上用75%的酒精浸泡30秒,无菌水冲洗3次,然后换用0.1%氯化汞溶液浸泡60秒,无菌水冲洗3次,最后用5%次氯酸钠溶液浸泡10

分钟,期间不断搅拌,无菌水冲洗4次,倒出多余的无菌水,将腋芽放置培养皿中待用。

[0091] 按照以下步骤繁殖白术种苗:

[0092] 1.白术种苗的初代培养:使用经过高压灭菌的医用镊子、医用剪刀、将消毒过的白术腋芽置于无菌培养皿中剪去腋芽受伤的部位,接种于初代培养基中:1/2MS+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照时间15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养5-7d后,观察到腋芽开始生长。

[0093] 2.愈伤组织诱导培养:培养18d待苗长到3-5cm左右,在紫外灭菌30分钟后的超净工作台上将苗从培养瓶中取出,置于无菌培养皿中,用高压灭菌后的医用镊子和医用剪刀修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中:1/2MS+0.7mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照时间15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养8-12天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0094] 3.愈伤组织增殖培养:在超净工作台上,将形成的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀除去表面的培养基接种到增殖培养基中:MS+1.25mg/L 6-BA+0.75mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.8,培养于光照时间18h/d,光强1900lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养4-6d后,观察到白术愈伤组织开始生长,每个培养周期35d,愈伤组织直径平均增大8.5-12.8倍。

[0095] 4.愈伤组织丛生芽诱导培养:在超净工作台上,将培养到2.5-4cm的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀切成直径1.0cm的小块,按5块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中:1/2MS+1.75mg/L 6-BA+0.35mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养7-8d后,观察到白术愈伤组织开始生长芽。平均生芽数为4-6个/块,20-30个/瓶。

[0096] 5.丛生芽生根培养:在灭菌超净工作台上,将培养到2cm左右的白术丛生芽剪切后按3芽/瓶“品字形”排列转接到生根培养基中:1/4MS+0.75mg/L NAA蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,PH=5.9,培养于光照15h/d,光强1800lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,7-12d后观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为4-6根/芽,14-17根/瓶。

[0097] 6.炼苗移栽:当白术组培苗根长2cm左右时,将培养瓶从组培室移除,置于炼苗室常温闭瓶炼苗3d,旋松盖子2d,全开盖2d;炼苗完成后,将白术苗从培养瓶中移出,放入清水盆中,小心洗去根部琼脂,然后捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,5d后减少喷水次数;然后每5天浇灌一次低浓度营养液,营养液为1/2MS大量元素、微量元素、铁盐,15d后,统计成活率,成活率为92.2-95.2%。

[0098] 实施例6

[0099] 选取选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体,对其进行无菌处理:取茎上的幼芽,修剪多余的叶片,表面灰尘颗粒用软毛刷除去;自来水冲洗干净(60分钟),吸干芽体表面的水分,在灭菌后的超净工作台上用75%的酒精浸泡30秒,无菌水冲洗3次,然后换用0.1%氯化汞溶液浸泡60秒,无菌水冲洗3次,最后用5%次氯酸钠溶液浸泡10分钟,期间不断搅拌,无菌水冲洗4次,倒出多余的无菌水,将腋芽放置培养皿中待用。

[0100] 按照以下步骤繁殖白术种苗:

[0101] 1.白术种苗的初代培养:使用经过高压灭菌的医用镊子、医用剪刀、将消毒过的白术腋芽置于无菌培养皿中剪去腋芽受伤的部位,接种于初代培养基中:1/2MS+30g/L蔗糖+

7g/L琼脂粉,PH=6.0,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养4-5d后,观察到腋芽开始生长。

[0102] 2.愈伤组织诱导培养:培养15d待苗长到3-5cm左右,在紫外灭菌30分钟后的超净工作台上将苗从培养瓶中取出,置于无菌培养皿中,用高压灭菌后的医用镊子和医用剪刀修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中:1/2MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=6.0,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养4-8天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0103] 3.愈伤组织增殖培养:在超净工作台上,将形成的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀除去表面的培养基接种到增殖培养基中:MS+1.5mg/L 6-BA+1.5mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=6.0,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养3-5d后,观察到白术愈伤组织开始生长,每个培养周期45d,愈伤组织直径平均增大10.0-13.5倍。

[0104] 4.愈伤组织丛生芽诱导培养:在超净工作台上,将培养到2.5-4cm的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀切成0.3cm左右的小块,按5块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中:1/2MS+1.85mg/L 6-BA+0.30mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=6.0,培养于光照16h/d,光强1600lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养7-9d后,观察到白术愈伤组织开始生长芽。平均生芽数为3-5个/块,15-25个/瓶。

[0105] 5.丛生芽生根培养:在灭菌超净工作台上,将培养到2cm左右的白术丛生芽剪切后按3芽/瓶“品字形”排列转接到生根培养基中:1/4MS+1mg/L NAA蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,PH=6.0,培养于光照20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,5-7d后观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为4-6根/芽,13-16根/瓶。

[0106] 6.炼苗移栽:当白术组培苗根长2cm左右时,将培养瓶从组培室移除,置于炼苗室常温密闭炼苗3d,旋松盖子2d,全开盖2d;炼苗完成后,将白术苗从培养瓶中移出,放入清水盆中,小心洗去根部琼脂,然后捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,5d后减少喷水次数;然后每5天浇灌一次低浓度营养液,营养液为1/2MS大量元素、微量元素、铁盐,15d后,统计成活率,成活率为93.3-96.2%。

[0107] 实施例7

[0108] 选取选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体,对其进行无菌处理:取茎上的幼芽,修剪多余的叶片,表面灰尘颗粒用软毛刷除去;自来水冲洗干净(60分钟),吸干芽体表面的水分,在灭菌后的超净工作台上用75%的酒精浸泡30秒,无菌水冲洗3次,然后换用0.1%氯化汞溶液浸泡60秒,无菌水冲洗3次,最后用5%次氯酸钠溶液浸泡10分钟,期间不断搅拌,无菌水冲洗4次,倒出多余的无菌水,将腋芽放置培养皿中待用。

[0109] 按照以下步骤繁殖白术种苗:

[0110] 1.白术种苗的初代培养:使用经过高压灭菌的医用镊子、医用剪刀、将消毒过的白术腋芽置于无菌培养皿中剪去腋芽受伤的部位,接种于初代培养基中:1/2MS+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照时间10h/d,光强1500lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养5-7d后,观察到腋芽开始生长。

[0111] 2.愈伤组织诱导培养:培养15d待苗长到3-5cm左右,在紫外灭菌20分钟后的超净工作台上将苗从培养瓶中取出,置于无菌培养皿中,用高压灭菌后的医用镊子和医用剪刀

修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中:1/2MS+0.7mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照时间10h/d,光强1500lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养12天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0112] 3.愈伤组织增殖培养:在超净工作台上,将形成的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀除去表面的培养基接种到增殖培养基中:MS+1.25mg/L 6-BA+0.75mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.8,培养于光照时间10h/d,光强1500lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养4-6d后,观察到白术愈伤组织开始生长,每个培养周期30d,愈伤组织直径平均增大8.5倍。

[0113] 4.愈伤组织丛生芽诱导培养:在超净工作台上,将培养到2.5-4cm的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀切成0.1cm的小块,按4块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中:1/2MS+1.75mg/L 6-BA+0.35mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照12h/d,光强1500lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养6d后,观察到白术愈伤组织开始生长芽。平均生芽数为4-6个/块,20-30个/瓶。

[0114] 5.丛生芽生根培养:在灭菌超净工作台上,将培养到2cm左右的白术丛生芽剪切后按2芽/瓶排列转接到生根培养基中:1/4MS+0.75mg/L NAA蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,PH=5.9,培养于光照10h/d,光强1500lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,7-12d后观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为4-6根/芽,14-17根/瓶。

[0115] 6.炼苗移栽:当白术组培苗根长2cm左右时,将培养瓶从组培室移除,置于炼苗室常温闭瓶炼苗1d,旋松盖子1d,全开盖1d;炼苗完成后,将白术苗从培养瓶中移出,放入清水盆中,小心洗去根部琼脂,然后捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,4d后减少喷水次数;然后每4天浇灌一次低浓度营养液,营养液为1/2MS大量元素、微量元素、铁盐,12d后,统计成活率,成活率为90.2-91.1%。

[0116] 实施例8

[0117] 选取选择优势类型、优良单株、健壮、幼嫩的白术腋芽作为外植体,对其进行无菌处理:取茎上的幼芽,修剪多余的叶片,表面灰尘颗粒用软毛刷除去;自来水冲洗干净(60分钟),吸干芽体表面的水分,在灭菌后的超净工作台上用75%的酒精浸泡30秒,无菌水冲洗3次,然后换用0.1%氯化汞溶液浸泡60秒,无菌水冲洗3次,最后用5%次氯酸钠溶液浸泡10分钟,期间不断搅拌,无菌水冲洗4次,倒出多余的无菌水,将腋芽放置培养皿中待用。

[0118] 按照以下步骤繁殖白术种苗:

[0119] 1.白术种苗的初代培养:使用经过高压灭菌的医用镊子、医用剪刀、将消毒过的白术腋芽置于无菌培养皿中剪去腋芽受伤的部位,接种于初代培养基中:1/2MS+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养5-7d后,观察到腋芽开始生长。

[0120] 2.愈伤组织诱导培养:培养20d待苗长到3-5cm左右,在紫外灭菌40分钟后的超净工作台上将苗从培养瓶中取出,置于无菌培养皿中,用高压灭菌后的医用镊子和医用剪刀修剪其腋芽后转接到愈伤组织诱导培养基中:1/2MS+0.7mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养15天后,观察到腋芽开始有愈伤组织形成。

[0121] 3.愈伤组织增殖培养:在超净工作台上,将形成的愈伤组织用灭菌后的医用镊子

拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀除去表面的培养基接种到增殖培养基中:MS+1.25mg/L 6-BA+0.75mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.8,培养于光照时间20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养4-6d后,观察到白术愈伤组织开始生长,每个培养周期45d,愈伤组织直径平均增大9.5倍。

[0122] 4.愈伤组织丛生芽诱导培养:在超净工作台上,将培养到2.5-4cm的愈伤组织用灭菌后的医用镊子拿出放到无菌培养皿中,用医用剪刀切成0.5cm左右的小块,按6块/瓶接种于愈伤组织丛生芽诱导培养基中:1/2MS+1.75mg/L 6-BA+0.35mg/L NAA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉,PH=5.9,培养于光照18h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,培养10d后,观察到白术愈伤组织开始生长芽。平均生芽数为4-6个/块,20-30个/瓶。

[0123] 5.丛生芽生根培养:在灭菌超净工作台上,将培养到2cm左右的白术丛生芽剪切后按2芽/瓶排列转按到生根培养基中:1/4MS+0.75mg/L NAA蔗糖30g/L+琼脂粉7g/L,PH=5.9,培养于光照20h/d,光强2000lx,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,7-12d后观察到有根和芽生长,培养30d以后,平均生根数为4-6根/芽,14-17根/瓶。

[0124] 6.炼苗移栽:当白术组培苗根长2cm左右时,将培养瓶从组培室移除,置于炼苗室常温闭瓶炼苗5d,旋松盖子3d,全开盖3d;炼苗完成后,将白术苗从培养瓶中移出,放入清水盆中,小心洗去根部琼脂,然后捞出,移栽至泥炭土苗圃中,浇透水,每天早晚清水喷洒叶面保湿,6d后减少喷水次数;然后每6天浇灌一次低浓度营养液,营养液为1/2MS大量元素、微量元素、铁盐,19d后,统计成活率,成活率为92.3-95.1%。

[0125] 由此可见,采用本发明进行白术种苗的繁殖,可以很高的成活率(90%以上),快速高效地繁育白术。

[0126] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。