



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103798145 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201410071760. 1

(22) 申请日 2014. 02. 28

(71) 申请人 钦州市林业科学研究所

地址 535000 广西壮族自治区钦州市钦南区
西环南路 118 号

(72) 发明人 王华宇 陈乃明 陈丽文 梁刚

蔡林 杨利平 时群 何贵整

邓月梅 吴红英 赖崇健

(74) 专利代理机构 桂林市持衡专利商标事务所

有限公司 45107

代理人 汤凌志

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

扁桃斑鸠菊组织培养培养基

(57) 摘要

本发明公开了一种扁桃斑鸠菊的组织培养培养基。首先以在生长季节选取生长旺盛的扁桃斑鸠菊 (*Vernonia amygdalina* Del.) 的幼嫩顶芽为外植体,经消毒后接种到每升含有 6- 苄基嘌呤 0. 2-0. 8mg, 吲哚乙酸 0. 02-0. 08mg 的改良 MS 培养基中至形成不定芽,然后将诱导出的不定芽切割后再继代培养于与上述相同的培养基中进行不定芽的增殖。当芽高约 2-3cm 时,切下接种到每升含有萘乙酸 0. 05-0. 15g 的 1/2MS 生根培养基中至正常生根,最后当生根试管苗长至 3-4cm 时,在自然光照下炼苗后移栽。本发明方法能快速大量繁殖试管种苗,生根率可达 95% 以上,而且种苗生长健壮、品质高、一致性好,便于进行标准化生产。

1. 一种扁桃斑鸠菊组织培养的培养基配方,该培养基包括继代培养基和生根培养基,其特征在于:

每升(L)继代培养基的组分及各组分的含量如下:

(1)大量元素:硝酸钾 1800mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 350mg/L、七水硫酸镁 320mg/L、磷酸二氢钾 150mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L、;

(2)微量元素:四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6.0mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、碘化钾 0.83mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L;

(3)有机物:肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、VB₂6.0mg/L、盐酸吡哆醇(VB₆)0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L、盐酸硫胺素(VB₁)0.1mg/L;

(4)植物生长调节剂:6-苄基腺嘌呤 0.2-0.8mg/L、萘乙酸 0.02-0.08mg/L;

余量为蒸馏水;

每升(L)生根培养基的组分及各组分的含量如下:

(1)大量元素:硝酸钾 900mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 175mg/L、七水硫酸镁 160mg/L、磷酸二氢钾 75mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L;

(2)微量元素:四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6mg/L、碘化钾 0.83mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L;

(3)有机物:肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、VB₂0.1mg/L、盐酸吡哆醇(VB₆)0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L;

(4)植物生长调节剂:萘乙酸 0.05-0.15mg/L;

余量为蒸馏水。

扁桃斑鸠菊组织培养培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及组织培养基,尤其涉及一种扁桃斑鸠菊组织培养培养基。

背景技术

[0002] 扁桃斑鸠菊 (*Vernonia amygdalina* Del.),又名桃叶斑鸠菊、杏叶斑鸠菊、神奇树、苦树、南非树、南非叶,为菊科斑鸠菊属植物,原产于非洲,最多见于西非。目前已知的菊科斑鸠菊属植物约 1000 种,多属于草本、木质藤本或乔木,主要生长于热带地区。我国已发现约 30 种,有糙叶斑鸠菊、柳叶斑鸠菊、驱虫斑鸠菊、夜香牛等,主要方分布于西南至东南、台湾、新疆等地。扁桃斑鸠菊多为 2-5cm 高的小灌木,喜光,宜在潮湿环境中生长,也耐干旱,适应所有土壤类型。扁桃斑鸠菊叶子可以安全食用,在尼日利亚等地被当作一种蔬菜。其叶片具有独特的气味和苦涩感,因而常被称为苦叶,可入药。

[0003] 扁桃斑鸠菊应用较广泛,已在药品、食品级工业等领域得到广泛应用。在治疗肿瘤尤其是防治乳腺癌、降血压方面极具潜力。目前研究主要集中在抗肿瘤活性、对免疫系统影响、皮肤病治疗和抗感染等方面。此外,还广泛应用于抗疟、抗血栓、调理肠胃、治疗发烧、杀菌消毒等方面。其主要活性成分有皂苷、生物碱、萜类、类固醇、香豆素类、黄酮类、酚酸类、木酚素、萜醌类和倍半萜等。目前已从中分离 5 类共 32 种化合物。

[0004] 扁桃斑鸠菊,在东南亚及台湾等地民间应用较多,而中国大陆则相对比较陌生,近年来两广地区陆续有引进。作为抗癌草药的扁桃斑鸠菊在药用成分提取、保健品开发和食疗方面具有极大的开发潜力。采用组织培养技术建立其无性快繁技术体系,相对常规扦插技术,可以提高其繁殖系数、实现周年生产、保障种苗的品质,并且有利于种植资源保存,加快推进其产业化和标准化生产,也为更深层次的研究提供了新的技术平台。同属植物驱虫斑鸠菊的组培快繁体系已有报道,而扁桃斑鸠菊的组培快繁技术研究尚未见报道。发明内容

[0005] 本发明的目的是建立一套扁桃斑鸠菊高效的组织培养快速繁殖技术体系,提供一种扁桃斑鸠菊组织培养培养基,该培养基包括继代培养基和生根培养基,其中:

[0006] 每升(L)继代培养基的组分及各组分的含量如下:

[0007] (1)大量元素:硝酸钾 1800mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 350mg/L、七水硫酸镁 320mg/L、磷酸二氢钾 150mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L;

[0008] (2)微量元素:四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6.0mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、碘化钾 0.83mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L;

[0009] (3)有机物:肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、VB₆6.0mg/L、盐酸吡哆醇(VB₆)0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L、盐酸硫胺素(VB₁)0.1mg/L;

[0010] (4)植物生长调节剂:6-苄基腺嘌呤 0.2-0.8mg/L、萘乙酸 0.02-0.08mg/L;

[0011] 余量为蒸馏水。

[0012] 每升(L)生根培养基的组分及各组分的含量如下:

[0013] (1)大量元素:硝酸钾 900mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 175mg/L、七水硫酸镁

160mg/L、磷酸二氢钾 75mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L；

[0014] (2) 微量元素：四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6mg/L、碘化钾 0.83mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L；

[0015] (3) 有机物：肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、VB₂0.1mg/L、盐酸吡哆醇(VB₆) 0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L；

[0016] (4) 植物生长调节剂：萘乙酸 0.05-0.15mg/L；

[0017] 余量为蒸馏水。

[0018] 本发明扁桃斑鸠菊的组织培养繁殖方法的继代、生根培养基的配制方法为：

[0019] 1 母液的配制与保存

[0020] 1.1 为便于取样，宜先配制各种母液，分为大量元素母液、微量元素母液、有机物母液和各种植物生长调节剂母液。蔗糖、琼脂不宜配成母液，需要时直接称样；

[0021] 1.2 大量元素母液浓度成 100 倍溶液，有机物、微量元素母液配成 200 倍溶液，植物生长调节剂母液的浓度配成 1mg/ml；

[0022] 1.3 母液选用无菌的蒸馏水、去离子水或超纯水配制，大量生产时用煮沸过的水；

[0023] 1.4 配制大量元素母液时，每个组分应单独溶解，后按氮、钙、镁、磷的顺序逐个混合，否则容易引起沉淀；

[0024] 1.5 微量元素、有机物、植物生长调节剂母液应用棕色瓶装好并置于冰箱中保存；

[0025] 1.6 母液配制后应及时使用，贮存时间不宜超过 1 个月；

[0026] 1.7 发现母液有沉淀，或有微生物生长，或有藻类生长，应废弃不用。

[0027] 2 培养基的配制

[0028] 2.1 依照培养基配方，按比例量取各种母液；

[0029] 2.2 在定量容器内放入准备配制培养基总量的约 1/2 以上的纯净水，并加入适量的糖，然后边搅拌边逐一加入所需量的母液；

[0030] 2.3 琼脂可加热融化后加入，如有搅拌设备时也可直接加入琼脂粉，然后用纯净水补足所需配制培养基的总量，搅拌均匀即可；

[0031] 2.4 培养基中的糖，在大量组培苗生产中，一般可用市售白砂糖；

[0032] 2.5 用 1.0 摩尔 / 升的盐酸或 1.0 摩尔 / 升的氢氧化钠调节培养基的 pH 值至 5.8；

[0033] 2.6 配制好的培养基要尽快分装到培养容器中，以免培养基凝固或变稠而难以分装；

[0034] 2.7 分装培养基时应注意避免培养基粘在瓶口上，如果粘有培养基，在盖瓶盖或瓶塞前必须用干净纱布擦净瓶口。

[0035] 3 培养基消毒灭菌

[0036] 3.1 将分装好的培养基装于高压灭菌锅内消毒；

[0037] 3.2 加热初期，当消毒锅消毒室的气压达 0.05MPa 时，打开冷凝阀，排尽消毒室内冷空气；

[0038] 3.3 当消毒室内气压达到 0.11MPa、温度达 121℃时，开始计时，保持温度与压力消毒 15-20 分钟；

[0039] 3.4 关闭加热电源开关，按慢排气方式排放热气，待消毒室内的气压降至大气压时打开消毒锅盖或门，取出培养基；

[0040] 3.5 培养基应置于空气少流动和少灰尘的干净环境冷却,否则在降温进气过程中导致霉菌孢子进入培养器皿,产生霉菌污染。

[0041] 4 培养基储藏

[0042] 4.1 培养基应尽量现配现用;

[0043] 4.2 可在空气干净且不流动的环境短时间储藏培养基,但储藏超过 1 个月的培养基应废弃不用。

[0044] 本发明扁桃斑鸠菊的组织培养繁殖方法为:

[0045] 1. 芽的诱导

[0046] 于晴天剪取生长旺盛的幼嫩顶芽为外植体,剪去部分叶片,自来水冲洗约 20min,然后在超净工作台上将茎段用 75% 酒精消毒 30s, 无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% 升汞消毒 10min, 无菌水冲洗 5-6 次。将已经消毒好的材料剪切成带有 1-2 个侧芽的节段,然后基部向下接种于诱导芽的培养基中,放于培养室内培养。培养室内温度为 22-25℃,光照强度 1500-2500Lx,光照时间为每天 12h。

[0047] 2. 芽的增殖培养

[0048] 将诱导获得的新芽接种至继代培养基上进行继代培养,继代周期约 25-30d。当芽高约 2-3cm 时,取其顶芽和茎段,接种于继代培养基中,进行下次继代。继代材料均放在培养室内,培养条件同上。

[0049] 3. 生根的诱导

[0050] 芽条长至 3-4cm 时,将较健壮的芽苗单个切下转至生根培养基上诱导生根,其余芽苗转至继代培养基上继续进行增殖培养。生根培养光照强度应控制在 2500-3000Lx,以提高试管苗的健壮程度和叶色。培养温度和光照时间同上,约 15 天后便可形成良好的根系。

[0051] 4. 生根苗的移栽

[0052] 生根完成后,试管苗叶片高约 4-6cm,叶色浓绿,植株健壮,根系良好,应立即进行洗苗和移栽。洗苗时,先从培养容器内取出小苗,洗净基部的培养基后,移栽于经 0.1% 高锰酸钾消毒过的用育苗托装好的育苗基质上,每托移植约 100-120 株小苗,浇透定根水,保持一定的温度和湿度,温度控制在 25℃ ±5℃,湿度 70% 左右。光照、水分、病虫害防治无特殊要求,按照常规的温室大棚管理方式进行管理即可。

[0053] 本发明的优点:

[0054] 1、首次采用组织培养技术进行扁桃斑鸠菊的种苗繁殖,建立了一套高效的组培快繁技术体系。该技术能快速大量繁殖试管种苗,而且种苗生长健壮、品质高、一致性好,便于进行标准化生产,也有利于种质资源的保存。

[0055] 2、以继代培养基进行扁桃斑鸠菊的增殖培养,增殖系数可以达到 3.5 倍,且继代苗生长旺盛、芽点多、叶色浓绿,能够实现稳定增殖。

[0056] 3、用生根培养基进行生根苗培养生根率达 95%,且植株健壮。培养室内温度设定为 22-25℃、光照强度设定为 2500-3000Lx 时,15 天左右便可出根,且根系发达,根须洁白,平均出根量有 8-15 条。移栽成活率可达 98%。

具体实施方式

[0057] 下面以实施例对本发明作进一步说明,但本发明并不局限于这些实施例。实施例

1:

[0058] 扁桃斑鸠菊的组织培养繁殖方法培养基配方包括继代培养基和生根培养基,其中:

[0059] 每升(L)继代培养基的组分及各组分的含量如下:

[0060] (1)大量元素:硝酸钾 1800mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 350mg/L、七水硫酸镁 320mg/L、磷酸二氢钾 150mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L;

[0061] (2)微量元素:四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6.0mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、碘化钾 0.83mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L;

[0062] (3)有机物:肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、核黄素(VB2) 6.0mg/L、盐酸吡哆醇(VB6) 0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L、盐酸硫胺素(VB1) 0.1mg/L;

[0063] (4)植物生长调节剂:6-苄基腺嘌呤 0.5mg/L、萘乙酸 0.05mg/L;

[0064] 余量为蒸馏水。

[0065] 每升(L)生根培养基的组分及各组分的含量如下:

[0066] (1)大量元素:硝酸钾 900mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 175mg/L、七水硫酸镁 160mg/L、磷酸二氢钾 75mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L;

[0067] (2)微量元素:四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6mg/L、碘化钾 0.83mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L;

[0068] (3)有机物:肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、盐酸硫胺素(VB1)0.1mg/L、盐酸吡哆醇(VB6) 0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L;

[0069] (4)植物生长调节剂:萘乙酸 0.10mg/L;

[0070] 余量为蒸馏水。

[0071] 实施例 2:

[0072] 扁桃斑鸠菊的组织培养繁殖方法培养基配方包括继代培养基和生根培养基,其中:

[0073] 每升(L)继代培养基的组分及各组分的含量如下:

[0074] (1)大量元素:硝酸钾 1800mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 350mg/L、七水硫酸镁 320mg/L、磷酸二氢钾 150mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L;

[0075] (2)微量元素:四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6.0mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、碘化钾 0.83mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L;

[0076] (3)有机物:肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、核黄素(VB2) 6.0mg/L、盐酸吡哆醇(VB6) 0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L、盐酸硫胺素(VB1) 0.1mg/L;

[0077] (4)植物生长调节剂:6-苄基腺嘌呤 0.2mg/L、萘乙酸 0.02mg/L;

[0078] 余量为蒸馏水。

[0079] 每升(L)生根培养基的组分及各组分的含量如下:

[0080] (1)大量元素:硝酸钾 900mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 175mg/L、七水硫酸镁 160mg/L、磷酸二氢钾 75mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L;

[0081] (2)微量元素:四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6mg/L、碘化钾 0.83mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L;

[0082] (3)有机物:肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、盐酸硫胺素(VB1)0.1mg/L、盐酸吡哆醇

醇(VB6) 0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L ;

[0083] (4) 植物生长调节剂 : 萘乙酸 0.05mg/L ;

[0084] 余量为蒸馏水。

[0085] 实施例 3 :

[0086] 扁桃斑鸠菊的组织培养繁殖方法培养基配方包括继代培养基和生根培养基, 其中 :

[0087] 每升(L) 继代培养基的组分及各组分的含量如下 :

[0088] (1) 大量元素 : 硝酸钾 1800mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 350mg/L、七水硫酸镁 320mg/L、磷酸二氢钾 150mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L ;

[0089] (2) 微量元素 : 四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6.0mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、碘化钾 0.83mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L ;

[0090] (3) 有机物 : 肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、核黄素(VB2) 6.0mg/L、盐酸吡哆醇(VB6) 0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L、盐酸硫胺素(VB1) 0.1mg/L ;

[0091] (4) 植物生长调节剂 : 6- 苄基腺嘌呤 0.8mg/L、萘乙酸 0.08mg/L ;

[0092] 余量为蒸馏水。

[0093] 每升(L) 生根培养基的组分及各组分的含量如下 :

[0094] (1) 大量元素 : 硝酸钾 900mg/L、硝酸铵 675mg/L、二水氯化钙 175mg/L、七水硫酸镁 160mg/L、磷酸二氢钾 75mg/L、乙二胺四乙酸二钠 37.3mg/L、七水硫酸亚铁 27.5mg/L ;

[0095] (2) 微量元素 : 四水硫酸锰 21.5mg/L、七水硫酸锌 8.3mg/L、硼酸 6mg/L、碘化钾 0.83mg/L、二水钼酸钠 0.2mg/L、五水硫酸铜 0.02mg/L、六水氯化钴 0.02mg/L ;

[0096] (3) 有机物 : 肌醇 80.0mg/L、甘氨酸 2.5mg/L、盐酸硫胺素(VB1) 0.1mg/L、盐酸吡哆醇(VB6) 0.45mg/L、烟酸 0.45mg/L ;

[0097] (4) 植物生长调节剂 : 萘乙酸 0.15mg/L ;

[0098] 余量为蒸馏水。

[0099] 利用上述实施例可以看出 : 本发明以继代培养基进行扁桃斑鸠菊的增殖培养, 繁殖系数高(可达 3.5 倍), 且继代苗生长旺盛, 能够实现稳定增殖 ; 用生根培养基进行生根培养, 试管苗生根率高(达 95%), 且根系发达, 植株健壮, 移栽成活率可达 98%。采用本发明的方法能快速大量繁殖试管种苗, 而且种苗生长健壮、品质高、一致性好, 便于进行标准化生产, 也有利于种质资源的保存。