



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109156344 A

(43)申请公布日 2019.01.08

(21)申请号 201810969410.5

(22)申请日 2018.08.24

(71)申请人 云南省农业科学院药用植物研究所

地址 650000 云南省昆明市五华区莲华办事处学云路9号

申请人 云南澈川生物科技有限公司

(72)发明人 张金渝 邓清 杨绍兵 曾祥飞  
杨维泽 左应梅 沈晓明 杨天梅  
曾芸

(74)专利代理机构 上海诺衣知识产权代理事务  
所(普通合伙) 31298

代理人 衣然

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法

(57)摘要

本发明公开了一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,包括外植体的选择、外植体的清洁与消毒、丛生芽诱导、丛生芽增殖与生根等步骤。本发明成功建立了低成本仙茅的组培快繁体系,为对仙茅野生资源的保护、人工栽培、种苗培植以及基因库的建立奠定了技术基础,解决仙茅野生资源过度开发、药材供应少和种植不成规模、种植受种苗供应限制、药材质量不稳定等问题。

1. 一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,其特征在於,包含以下步骤:外植体的选择、外植体的清洁与消毒、丛生芽诱导、丛生芽增殖与生根。

2. 根据权利要求1所述的一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,其特征在於:

(1) 外植体的选择:将健壮植株栽植于室内,每隔3天用75%多菌灵500倍液喷施5次以上,选取幼嫩叶片;

(2) 外植体的清洁与消毒:将选取的外植体用饱和肥皂水溶液涮洗后冲淋,在超净工作台上依次用酒精、漂白粉溶液及升汞溶液消毒;

(3) 丛生芽诱导:将消毒好的外植体,剪去基部伤口,长度切至0.5-1.0cm,在叶片正面将表皮划伤,接种在丛生芽诱导培养基上,在一定温度、光照强度和光周期环境下培养;

(4) 丛生芽的增殖与生根:将诱导出的丛生芽叶片剪成0.2-0.5cm长度,接种在增殖生根培养基上,在一定温度、光照强度和光周期环境下培养。

3. 根据权利要求2所述的一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,其特征在於,步骤(1)所述的幼嫩叶片为无病虫害植株2-3片心叶。

4. 根据权利要求2所述的一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,其特征在於,步骤(2)所述的外植体的消毒方法为75%酒精消毒10-15s,饱和漂白粉溶液消毒20-30min,0.05%升汞溶液消毒10-15min。

5. 根据权利要求2所述的一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,其特征在於,步骤(3)所述的丛生芽诱导培养基为MS+2,4-D 0.1-0.5mg/L+6-BA 1.0-3.0mg/L+活性炭0.5g/L;培养温度为23-27℃,前15天为暗培养,后45天以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养。

6. 根据权利要求2所述的一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,其特征在於,步骤(4)所述的增殖生根培养基为MS+TDZ 0.1-0.7mg/L+NAA 0.05-0.3mg/L+硝酸银1.0μg/L+活性炭0.5g/L;培养温度为23-27℃,前15天为暗培养,后45天以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养。

## 一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及中药材的组培快繁方法,属于植物组织培养及中药材种植领域,特别涉及一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法。

### 背景技术

[0002] 仙茅(*Curculigo orchioides* Gaertn.)为石蒜科仙茅属草本植物,以根状茎入药,有补肾阳,强筋骨,祛寒湿的功效,主要用于阳痿精冷,筋骨痿软,腰膝冷痛,阳虚冷泻等症。

[0003] 仙茅主要分布于云南、贵州、四川、广西、广东、湖南、福建、台湾、江西、浙江等地,生于海拔1600m以下的林中、草地或荒坡上。也分布于东南亚各国至日本。

[0004] 目前仙茅作为药材的来源基本为野生资源,几乎无人工种植。随着市场需求量的激增,其市场价格近十年来增长近10倍。同时有限的野生资源不但不能满足市场需求,仙茅可能将出现资源濒临灭绝的危险。部分个人及单位已逐渐开始开展仙茅的人工种植试验,人工进行根状茎切芽繁殖、种子繁殖研究,发现其存在根状茎切芽繁殖时繁殖率低,根腐病严重,种子繁殖时种子采收难度大(种子在茎基部地表部)、种子量少、种子发芽率低等缺点,难以采用传统的繁殖方式进行规模化、规范化人工种植。近年来,国内外企事业单位开展了仙茅的组培技术研究,但均采用地下根状茎作为外植体进行繁殖,存在污染率高,诱导率低等缺点,同时,在增殖过程中褐化情况严重,需扩增后需再次接种于生根培养基中,存在苗长势较弱、生产成本相对较高等缺点。

### 发明内容

[0005] 本发明针对以上所述现有技术的不足,发明了一种组分简单、操作简便、生产周期短、经诱导出芽后可一步成苗的仙茅组培技术,可为规模化种植短期内快速提供优质种苗的繁育方法。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0007] 一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,包含以下步骤:外植体的选择、外植体的清洁与消毒、丛生芽诱导、丛生芽增殖与生根;优选地,所述的外植体的选择包含以下步骤:将健壮植株栽植于室内,每隔3天用75%多菌灵500倍液喷施5次以上,选取健壮无病虫害心叶作为外植体;

[0008] 优选地,所述的外植体的清洁与消毒包含以下步骤:将选取的外植体用饱和肥皂水溶液涮洗10-15min,用自来水涮洗至无肥皂水残留,后加适量水,滴3-4滴吐温-80,振摇10-15min,在自来水下冲淋50-70min,转移至超净工作台上,先用75%酒精消毒10-15s,无菌水涮洗3-4次,饱和漂白粉溶液消毒20-30min,无菌水涮洗3-4次,0.05%升汞溶液消毒10-15min,无菌水涮洗6-8次;

[0009] 优选地,所述的丛生芽诱导包含以下步骤:将消毒好的外植体,剪去接触消毒液的伤口,并将其切成长度0.5-1.0cm的小段,并在小段叶片正面用手术刀将表皮交叉划伤,造

成人为性伤口,接种于MS+2,4-D 0.1-0.5mg/L+6-BA 1.0-3.0mg/L+活性炭0.5g/L的丛生芽诱导培养基上,培养温度为23-27℃,培养光照为前15天暗培养,15天后以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养35-45天;

[0010] 优选地,所述的丛生芽的增殖与生根包含以下步骤:初代诱导出的丛生芽沿叶鞘基部及以下切除,保留叶片,并将保留的叶片剪成0.2-0.5cm长度的小段,接种于MS+TDZ 0.1-0.7mg/L+NAA 0.05-0.3mg/L+硝酸银1.0μg/L+活性炭0.5g/L的增殖生根培养基上,培养温度为23-27℃,前15天为暗培养,15天后以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养35-45天。

[0011] 本发明的有益效果在于:

[0012] (1) 本发明所述的一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,外植体的采集时间为4月至10月,可采集周期长,经采集后可继续生长,到收获季节亦可同其他未采集的植株同时收获且几乎不影响产量及品质;

[0013] (2) 本发明从消毒方成本低廉,操作简便,有效地降低了组培过程中的污染率,降低了组培成本,保证了效率。

[0014] (3) 本发明所述的一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,繁殖速度快、繁殖率高,一株植株一年可采集4-6片心叶,经初代诱导,增殖与生根培养,约5-6个月,即可获得生根苗约20万株。

[0015] (4) 本发明丛生芽诱导培养基、增殖生根培养基成本低,配制方便,极大地提高了诱导率、增值系数、生根率。

[0016] (5) 本发明所述的一种仙茅叶片离体培养与植株再生方法,属于用体细胞繁殖的无性繁殖范畴,能最大程度的保持亲本性状,相比传统的种子繁殖存在杂交变异的情况,更有利于药材优良性状的保存。

## 具体实施方式

[0017] 实施例1

[0018] 1. 选择健康无病虫害的仙茅心叶为外植体,用饱和肥皂水溶液涮洗10min,用自来水冲洗3次至无肥皂液残留,加适量水,再加3滴吐温-80,振摇10min,用自来水冲淋50min;

[0019] 2. 将清洗好的外植体转至超净工作台内的无菌瓶中,加入75%酒精振摇10s,无菌水涮洗3次,再加入饱和漂白粉溶液振摇20min,无菌水涮洗3次,最后加入0.05%升汞溶液振摇10min,无菌水涮洗6次;

[0020] 3. 用无菌纸吸去外植体表面水分,剪去解除消毒剂伤口,并将其切成0.5cm小段,平铺于MS+2,4-D 0.1mg/L+6-BA 1.0mg/L+活性炭0.5g/L的诱导培养基上,培养温度为25℃,培养光照为前15天暗培养,15后以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养38天。此条件下初代诱导培养53天,污染率为3.6%,诱导率为98.7%。

[0021] 4. 仙茅叶片经诱导产生丛生芽后,将其丛生芽剪除叶鞘基部及以下愈伤,保留叶片并将叶片且成0.2cm长度的小段,接种于MS+TDZ 0.1mg/L+NAA 0.05mg/L+硝酸银1.0μg/L+活性炭0.5g/L的增殖生根培养基上,培养温度为25℃,前15天为暗培养,15天后以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养,培养40天。增殖系数为26.4,55天生根率为100%,根系粗壮发达,苗健壮鲜绿。

**[0022] 实施例2**

[0023] 1. 选择健康无病虫害的仙茅心叶为外植体,用饱和肥皂水溶液涮洗15min,用自来水冲洗3次至无肥皂液残留,加适量水,再加4滴吐温-80,振摇15min,用自来水冲淋60min;

[0024] 2. 将清洗好的外植体转至超净工作台内的无菌瓶中,加入75%酒精振摇15s,无菌水涮洗4次,再加入饱和漂白粉溶液振摇30min,无菌水涮洗4次,最后加入0.05%升汞溶液振摇15min,无菌水涮洗8次;

[0025] 3. 用无菌纸吸去外植体表面水分,剪去解除消毒剂伤口,并将其切成1cm小段,平铺于MS+2,4-D 0.5mg/L+6-BA 3.0mg/L+活性炭0.5g/L的诱导培养基上,培养温度为25℃,培养光照为前15天暗培养,15后以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养40天。此条件下初代诱导培养55天,污染率为3.4%,诱导率为98.5%。

[0026] 4. 仙茅叶片经诱导产生丛生芽后,将其丛生芽剪除叶鞘基部及以下愈伤,保留叶片并将叶片切成0.4cm长度的小段,接种于MS+TDZ 0.6mg/L+NAA 0.2mg/L+硝酸银1.0μg/L+活性炭0.5g/L的增殖生根培养基上,培养温度为25℃,前15天为暗培养,15天后以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养,培养40天。增殖系数为26.9,55天生根率为99.5%,根系粗壮发达,苗健壮鲜绿。

**[0027] 实施例3**

[0028] 1. 选择健康无病虫害的仙茅根状茎为外植体,用自来水冲洗5次,牙刷刷掉表层泥土,并用手术刀刮掉凹陷处表层,后用饱和肥皂水溶液涮洗15min,用自来水冲洗3次至无肥皂液残留,加适量水,再加3滴吐温-80,振摇10min,用自来水冲淋50min;

[0029] 2. 将清洗好的外植体转至超净工作台内的无菌瓶中,加入75%酒精振摇30s,无菌水涮洗3次,再加入饱和漂白粉溶液振摇40min,无菌水涮洗3次,最后加入0.1%升汞溶液+3滴吐温-80振摇10min,无菌水涮洗6次;

[0030] 3. 用无菌纸吸去外植体表面水分,剪去解除消毒剂伤口,并将其切成1.0cm左右小段,平铺于MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 0.2mg/L的诱导培养基上,培养温度为25℃,培养光照为前15天暗培养,15天后以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养40天。此条件下初代诱导培养55天,污染率为67.1%,诱导率为69.5%,褐化较为严重。

[0031] 4. 仙茅根状茎经诱导产生丛生芽后,将其丛生芽从基部切成单株,去除叶片,接种于MS+NAA 0.5mg/L+6-BA 0.2mg/L的增殖生根培养基上,培养温度为25℃,前15天为暗培养,15天后以光照强度1000-2000lx,单日光照时间10h进行光暗交替培养,培养40天。增殖系数为增殖系数为5.4,褐化严重,对生根影响较大,55天生根率仅为82%,且根与茎连接部带愈伤,易脱落。

[0032] 通过比较实施例1-3,本发明的仙茅叶片具有较高的消毒灭菌率和丛生芽诱导率,本发明的仙茅叶片离体培养与植株再生方法,具有污染率低,丛生芽诱导率高,增殖系数和生根率高的优点,可显著地降低仙茅种植成本,缩短组培时间。