

说明书

一种丹参控根育苗方法

技术领域

本发明属于人工育苗技术领域，更具体地，涉及一种丹参控根育苗方法。

背景技术

丹参为唇形科鼠尾草属植物 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根及根茎，是我国传统大宗药材之一，具有活血化瘀、清心除烦等功效。由于其临床疗效显著，中成药品种繁多，副作用小，可长期服用，因此越来越广泛地被应用于医疗和保健领域，市场需求量和价格持续上涨。多项科学研究表明：丹参根的主要有效成分为丹参酮类和酚酸类化合物，丹参酮类化合物主要定位于周皮木栓形成层细胞，而酚酸类化合物主要分布在根周皮木栓形成层、栓内层和韧皮细胞的细胞质膜及液泡中，其中隐丹参酮在根表皮部的含量是皮层或中柱部分的 10~40 倍以上。因此丹参的细根的活性成分含量常常比粗根的更高，特别是丹参酮类成分。由于丹参的这种活性成分的根组织空间特异性分布特征，在根系质量相同时，分根数越多，则活性成分的含量和总积累量就越高。现有技术中，一般用丹参种子大田育苗，再进行种苗移栽，从播种至种苗移栽需要约 220-250 天。种苗的主根相对粗壮，直径约 0.4-0.7cm，生长优势明显，侧根稀少，随生长发育侧根逐渐增多，至 9 月分根数基本稳定达 10-20 条，生长第 2 年时，根系的分根数没有明显增加。因此，在丹参种子育苗期如何提高丹参种子分根数就是本领域技术人员所要解决的技术问题。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种丹参控根育苗方法的新技术方案。

根据本发明的第一方面，提供了一种丹参控根育苗方法，所述方法包

括以下步骤：

(1) 将去除杂质后的丹参成熟种子装入网兜，用自来水流水冲洗，去掉种子表面黏液；

(2) 用升汞溶液消毒清洗后的丹参成熟种子，放入超净工作台内，备用；

(3) 配制 1/2MS 培养基，其中磷元素浓度为 0.313~1.25mM/L；

(4) 对配制好的 1/2MS 培养基进行高温灭菌；

(5) 在超净台中将准备好的丹参种子接入到已灭菌的 1/2MS 培养基中，将其放入人工气候培养箱中培养 40~60 天；

(6) 人工气候培养箱设置参数：第一阶段：白天，温度 25~28℃，湿度 65%~70%，光照 18000Lx，时间 14h；第二阶段：夜晚，温度 20~25℃，湿度 60~65%，光照 0，时间 10h。

可选地，步骤 (1) 中，用自来水流水冲洗 1~2h。

可选地，在自来水冲洗过程中，用纱布搓去种子表面黏液。

可选地，步骤 (2) 中，所述升汞溶液的浓度为 0.5%~1.0%，消毒时间 15~20min。

可选地，步骤 (3) 中，所述 1/2MS 培养基中包括磷酸盐，所述磷由所述磷酸盐提供。

可选地，所述磷酸盐为磷酸二氢钾。

可选地，步骤 (4) 中，将 1/2MS 培养基装入组培瓶，进行高温灭菌。

可选地，步骤 (4) 中，灭菌后的 1/2MS 培养基 pH 控制在 5.8~6.0。

可选地，所述 1/2MS 培养基中磷浓度为 0.313~0.625mM/L。

可选地，步骤 (5) 中，在人工气候培养箱中培养 45~50 天。

根据本发明的一个方面，本发明能够使得丹参根系分根数显著增加。

通过以下参照附图对本发明的示例性实施例的详细描述，本发明的其它特征及其优点将会变得清楚。

附图说明

被结合在说明书中并构成说明书的一部分的附图示出了本发明的实

施例，并且连同其说明一起用于解释本发明的原理。

图 1 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 45 天平均株高比较；
图 2 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 60 天平均株高比较；
图 3 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 45 天平均根长比较；
图 4 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 60 天平均根长比较；
图 5 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 45 天平均分根数比较；

图 6 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 60 天平均分根数比较；

图 7 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 45 天茎叶干重比较；
图 8 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 60 天茎叶干重比较；
图 9 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 45 天平均根干重比较；

图 10 是本发明中不同供磷水平的组培丹参苗培养 60 天平均根干重比较。

具体实施方式

现在将参照附图来详细描述本发明的各种示例性实施例。应注意到：除非另外具体说明，否则在这些实施例中阐述的部件和步骤的相对布置、数字表达式和数值不限制本发明的范围。

以下对至少一个示例性实施例的描述实际上仅仅是说明性的，决不作为对本发明及其应用或使用的任何限制。

对于相关领域普通技术人员已知的技术、方法和设备可能不作详细讨论，但在适当情况下，所述技术、方法和设备应当被视为说明书的一部分。

在这里示出和讨论的所有例子中，任何具体值应被解释为仅仅是示例性的，而不是作为限制。因此，示例性实施例的其它例子可以具有不同的值。

应注意到：相似的标号和字母在下面的附图中表示类似项，因此，一旦某一项在一个附图中被定义，则在随后的附图中不需要对其进行进一步

讨论。

根据本发明的一个方面，本发明提供一种丹参控根育苗方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 将去除杂质后的丹参成熟种子装入网兜，用自来水流水冲洗，并用纱布轻轻揉搓去掉种子表面黏液。丹参种子吸水之后在种子外会形成一层黏膜，该黏膜具有抑制萌发作用，因此，本发明先采用流水使得丹参种子充分吸水，利用流水能够冲洗去除部分抑制萌发物质，降低该黏膜对丹参种子造成的污染。进一步的，流水冲洗过程持续时间 1-2h，以保证丹参种子充分吸水。进一步的，在流水冲洗的过程中，可以用纱布轻轻揉搓去除该黏膜，以尽可能全部去除黏膜，防止黏膜抑制丹参种子的萌发。轻轻揉搓以力度不破坏丹参种子的种皮为宜，能够去除掉黏膜即可。

(2) 用升汞溶液消毒清洗后的丹参成熟种子，放入超净工作台内，备用。进一步的，所述升汞溶液的浓度为 0.5%~1.0%，消毒时间 15~20min 升汞溶液现配现用，保证消毒彻底，以减少丹参种子和流水中所携带的细菌对丹参种子分根造成的影响。

(3) 按照表 1 中的配方配制 1/2MS 培养基。1/2MS 培养基中还包括磷酸盐，磷酸盐具体为磷酸二氢钾，磷酸二氢钾易购买且价格相对经济。另外磷酸二氢钾 KH_2PO_4 的水溶液呈酸性，便于调节培养基的 pH。磷酸盐用于提供磷元素，制备得到的 1/2MS 培养基中磷元素浓度为 0.313~1.25mM/L。

表 1 1/2MS 培养基配置表

母液		成分	规定量 (mg/L)	浓缩倍数	称取量 (mg)	母液体积 (mL)	配制 1 L 培养基吸取量定容
1	大量元素	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	10	4400	1000	50
		NH_4NO_3	1650	10	16500		
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	10	3700		
		KNO_3	1900	10	19000		
		$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	100	2230		
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	100	860		
		H_3BO_3	6.2	100	620		
2	微量元素	KI	0.83	100	83	1000	5
		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25	100	25		
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	100	2.5		

母液		成分	规定量 (mg/L)	浓缩倍数	称取量 (mg)	母液体积 (mL)	配制 1 L 培养基吸取量定容
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	100	2.5		
3	铁盐	Na ₂ -EDTA	37.3	100	3730	1000	5
		FeSO ₄ ·4H ₂ O	27.8	100	2780		
4	有机物	甘氨酸	2.0	50	100	500	5
		盐酸吡哆醇	0.5	50	25		
		盐酸硫胺素	0.1	50	5		
		烟酸	0.5	50	25		
		肌醇	100	50	5000		

(4) 对配制好的 1/2MS 培养基进行高温灭菌，以保证丹参种子的分根环境安全。可以是将 1/2MS 培养基装入组培瓶，进行高温灭菌。进一步的，控制灭菌后培养基 pH 为 5.8-6.0。

(5) 在超净台中将准备好的丹参种子接入到已灭菌的 1/2MS 培养基中，将其放入人工气候培养箱中培养 40-60 天；

(6) 对人工气候培养箱进行参数设置，设置参数：第一阶段：白天，温度 25~28℃，湿度 65%~70%，光照 18000Lx，时间 14h；第二阶段：夜晚，温度 20~25℃，湿度 60~65%，光照 0，时间 10h。

与现有技术相比，本发明的丹参控根育苗方法能够使得丹参根系分根数显著增加，在 45 天时，分根数量达到 35 条左右，分根效率高。在种苗阶段增加分根数有利于丹参后期生长过程中根系侧根的进一步分化发育和生长膨大，可促进丹参根的产量提高和活性成分积累。本发明缩短了育苗时间，仅需大田育苗 1/5 时间，大大提高了育苗效率。此外，便于实现环境因子对丹参苗根系形态建成的有效调控。

实施例 1

(1) 将去除杂质后的丹参成熟种子装入网兜，用自来水流水冲洗 1-2h，用纱布搓去种子表面黏液；

(2) 用浓度 0.5%~1.0% 的升汞溶液消毒清洗后的丹参成熟种子 15~20min，将消毒后的丹参成熟种子放入超净工作台内，备用；

(3) 配制 1/2MS 培养基，磷元素由磷酸二氢钾提供，其中磷浓度为 0.313mM/L；

(4) 对配制好的 1/2MS 培养基进行高温灭菌，灭菌后培养基 pH 为 5.8-6.0;

(5) 在超净台中将准备好的丹参种子接入到已灭菌的 1/2MS 培养基中，将其放入人工气候培养箱中分别培养 45 天和 60 天;

(6) 人工气候培养箱设置参数：第一阶段：白天，温度 25~28℃，湿度 65%~70%，光照 18000Lx，时间 14h；第二阶段：夜晚，温度 20~25℃，湿度 60~65%，光照 0，时间 10h。

实施例 2

(1) 将去除杂质后的丹参成熟种子装入网兜，用自来水流水冲洗 1-2h，用纱布搓去种子表面黏液;

(2) 用浓度 0.5%~1.0%的升汞溶液消毒清洗后的丹参成熟种子 15~20min，将消毒后的丹参成熟种子放入超净工作台内，备用;

(3) 配制 1/2MS 培养基，磷元素由磷酸二氢钾提供，其中磷浓度为 0.625mM/L;

(4) 对配制好的 1/2MS 培养基进行高温灭菌，灭菌后培养基 pH 为 5.8-6.0;

(5) 在超净台中将准备好的丹参种子接入到已灭菌的 1/2MS 培养基中，将其放入人工气候培养箱中分别培养 45 天和 60 天;

(6) 人工气候培养箱设置参数：第一阶段：白天，温度 25~28℃，湿度 65%~70%，光照 18000Lx，时间 14h；第二阶段：夜晚，温度 20~25℃，湿度 60~65%，光照 0，时间 10h。

实施例 3

(1) 将去除杂质后的丹参成熟种子装入网兜，用自来水流水冲洗 1-2h，用纱布搓去种子表面黏液;

(2) 用浓度 0.5%~1.0%的升汞溶液消毒清洗后的丹参成熟种子 15~20min，将消毒后的丹参成熟种子放入超净工作台内，备用;

(3) 配制 1/2MS 培养基，磷元素由磷酸二氢钾提供，其中磷浓度为 1.25mM/L;

(4) 对配制好的 1/2MS 培养基进行高温灭菌，灭菌后培养基 pH 为

5.8-6.0;

(5) 在超净台中将准备好的丹参种子接入到已灭菌的 1/2MS 培养基中, 将其放入人工气候培养箱中分别培养 45 天和 60 天;

(6) 人工气候培养箱设置参数: 第一阶段: 白天, 温度 25~28℃, 湿度 65%~70%, 光照 18000Lx, 时间 14h; 第二阶段: 夜晚, 温度 20~25℃, 湿度 60~65%, 光照 0, 时间 10h。

对比例 1

(1) 将去除杂质后的丹参成熟种子装入网兜, 用自来水流水冲洗 1-2h, 用纱布搓去种子表面黏液;

(2) 用浓度 0.5%~1.0%的升汞溶液消毒清洗后的丹参成熟种子 15~20min, 将消毒后的丹参成熟种子放入超净工作台内, 备用;

(3) 配制 1/2MS 培养基, 磷元素由磷酸二氢钾提供, 其中磷浓度为 0mM/L;

(4) 对配制好的 1/2MS 培养基进行高温灭菌, 灭菌后培养基 pH 为 5.8-6.0;

(5) 在超净台中将准备好的丹参种子接入到已灭菌的 1/2MS 培养基中, 将其放入人工气候培养箱中分别培养 45 天和 60 天;

(6) 人工气候培养箱设置参数: 第一阶段: 白天, 温度 25~28℃, 湿度 65%~70%, 光照 18000Lx, 时间 14h; 第二阶段: 夜晚, 温度 20~25℃, 湿度 60~65%, 光照 0, 时间 10h。

对比例 2

(1) 将去除杂质后的丹参成熟种子装入网兜, 用自来水流水冲洗 1-2h, 用纱布搓去种子表面黏液;

(2) 用浓度 0.5%~1.0%的升汞溶液消毒清洗后的丹参成熟种子 15~20min, 将消毒后的丹参成熟种子放入超净工作台内, 备用;

(3) 配制 1/2MS 培养基, 磷元素由磷酸二氢钾提供, 其中磷浓度为 0.0313mM/L;

(4) 对配制好的 1/2MS 培养基进行高温灭菌, 灭菌后培养基 pH 为 5.8-6.0;

(5) 在超净台中将准备好的丹参种子接入到已灭菌的 1/2MS 培养基中，将其放入人工气候培养箱中分别培养 45 天和 60 天；

(6) 人工气候培养箱设置参数：第一阶段：白天，温度 25~28℃，湿度 65%~70%，光照 18000Lx，时间 14h；第二阶段：夜晚，温度 20~25℃，湿度 60~65%，光照 0，时间 10h。

对比比例 3

(1) 将去除杂质后的丹参成熟种子装入网兜，用自来水流水冲洗 1-2h，用纱布搓去种子表面黏液；

(2) 用浓度 0.5%~1.0%的升汞溶液消毒清洗后的丹参成熟种子 15~20min，将消毒后的丹参成熟种子放入超净工作台内，备用；

(3) 配制 1/2MS 培养基，磷元素由磷酸二氢钾提供，其中磷浓度为 2.5mM/L；

(4) 对配制好的 1/2MS 培养基进行高温灭菌，灭菌后培养基 pH 为 5.8-6.0；

(5) 在超净台中将准备好的丹参种子接入到已灭菌的 1/2MS 培养基中，将其放入人工气候培养箱中分别培养 45 天和 60 天；

(6) 人工气候培养箱设置参数：第一阶段：白天，温度 25~28℃，湿度 65%~70%，光照 18000Lx，时间 14h；第二阶段：夜晚，温度 20~25℃，湿度 60~65%，光照 0，时间 10h。

参考图 1 和图 2 所示，无论在培养 45 天还是 60 天时，采用磷浓度处理为 0.625 mM/L 和 1.25 mM/L 处理的丹参苗的平均株高明显高于 0.313mM/L 处理，45 天~60 天丹参苗的平均株高呈现一定增长，但与其生长前期相比变化明显趋缓。

参考图 3 和图 4 所示，无论在培养 45 天还是 60 天时，采用磷浓度处理为 1.25 mM/L 的丹参苗的平均根长最长，其次为 0.625 mM/L 和 0.313mM/L 处理，但显著大于其他 3 个处理，45 天~60 天丹参苗的平均根长呈现一定增加，但与其生长前期相比变化明显趋缓。

参考图 5 和图 6 所示，无论在培养 45 天还是 60 天时，采用磷浓度处

理为 0.313 mM/L 和 0.625 mM/L 的丹参苗的平均分根数最多，其次为 1.25 mM/L 处理，但显著大于其他 3 个对比例，45 天~60 天丹参苗的平均分根数呈现一定增加，但与其生长前期相比变化明显趋缓。

参考图 7 和图 8 所示，无论在培养 45 天还是 60 天时，采用磷浓度处理为 1.25 mM/L 时丹参苗的平均茎叶干重最大，其次为 0.625 mM/L 和 0.313 mM/L 处理，显著大于其他 3 个对比例，45 天~60 天丹参苗的平均茎叶干重呈现一定增加，但与其生长前期相比变化较小。

参考图 9 和图 10 所示，无论在培养 45 天还是 60 天时，采用磷浓度处理为 0.625 mM/L 时丹参苗的平均根干重最大，其次为 0.313 mM/L 和 0.625 mM/L 处理，显著大于其他 3 个对比例，45 天~60 天丹参苗的平均根干重变化较小，与其生长前期相比根干重变化明显趋缓，根干重趋于稳定。

本发明通过人工气候培养箱的参数设置以及低磷信号影响植物根中细胞伸长及分生组织的生长，进而抑制主根生长增加侧根生长，增加根毛密度，通过控制磷元素的供应水平而实现对丹参苗根系分根数的有效控制。考虑到设置了低水平磷浓度，为了保证培养基整体营养元素供应水平的均衡性，为避免过低磷供应在相对高的其他元素培养条件下可能对植物造成其他不良影响，本发明的培养基调整为 1/2MS 培养基。

综上所述，组培苗生长至 45 天时各个供磷浓度处理的丹参苗的根系生长情况已经基本趋于稳定，可以安全转入炼苗阶段，因此，可以将丹参控根育苗的培养时间确定为 45 天~50 天。

虽然已经通过例子对本发明的一些特定实施例进行了详细说明，但是本领域的技术人员应该理解，以上例子仅是为了进行说明，而不是为了限制本发明的范围。本领域的技术人员应该理解，可在不脱离本发明的范围和精神的情况下，对以上实施例进行修改。本发明的范围由所附权利要求来限定。