ICS
CCS

DB 15

内 蒙 古 自 治 区 地 方 标 准

DB 15/T XXXX—XXXX

荒漠肉苁蓉组织培养技术规程

Technology Regulation of Tissue Culture for Cistanche deserticola Ma

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

（征求意见稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

内蒙古自治区市场监督管理局　　发 布

前　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由内蒙古自治区卫生健康委员会提出。

本文件由内蒙古自治区中药材（蒙药材）种植标准化技术委员会（SAM/TC 54）归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院、内蒙古医科大学附属医院。

本文件主要起草人：何江峰、王力伟、赵杰、安江红、房永雨、赵小庆、孙华、赵梦然、刘红葵。

荒漠肉苁蓉组织培养技术规程

1 范围

本文件规定了肉苁蓉的外植体采集、培养基配制和愈伤组织培养的方法。
本文件适用于肉苁蓉组织培养。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6628 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 603 化学试剂试验方法中所用制剂及制品的制备

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 22278 良好实验室规范原则

DB15/T 1940 西部沙樱组织培养技术规程

3 术语和定义

文件没有需要界定的术语和定义。

4 外植体准备

4.1 外植体选择

外植体为梭梭（*Haloxylon ammodendron*（C. A. Mey.）Bunge）寄生的无病害、健壮的（荒漠）肉苁蓉（*Cistanche deserticola* Y. C. Ma）。

4.2 外植体采集

4.2.1 采集时间

鲜肉苁蓉的采集时期为10～12月份。

4.2.2 采集地点

鲜肉苁蓉的采集地点在我国内蒙古阿拉善盟、新疆北部和甘肃（河西走廊）的梭梭林。

4.2.3 采集部位

鲜肉苁蓉整株采集，采集到的样品外观要求表皮及鳞片状叶呈乳白色，无病虫害。

4.2.4 保藏方法

将鲜肉苁蓉埋进原沙土中或放进保鲜袋，在4 ℃条件下保存，保持表面干燥，1个月内处理。

5 仪器与设备

实验室安全使用应符合GB 19489和GB/T 22278。

5.1 分析天平

感量0.0001 g。

5.2 高压蒸汽灭菌锅

适用于培养基、蒸馏水、接种器具等进行湿热灭菌的立式或卧式高压蒸汽灭菌锅。

5.3 超净工作台

6 试剂配制

6.1 器皿灭菌

参照DB15/T 1940执行。

6.2 培养基配方

MS培养基为基础培养基，添加2，4-二氯苯氧乙酸（2,4-D）2.0 mg/L，赤霉素（GA3）1.0 mg/L，聚乙烯吡咯烷酮（PVP）2.0 g/L，6-糖氨基嘌呤（KT）0.5 mg/L，蔗糖30.0 g/L，琼脂7.0 g/L。

6.3 培养基配制

试剂配制严格按照GB/T 603规定方法配制，所用水执行GB/T 6628。

6.3.1 1 M KOH 溶液的配制

精确称取28.0 g KOH粉末，用蒸馏水溶解，冷却至室温后，定容至500 mL。

6.3.2 1 M HCl 溶液的配制

精确量取43.86 mL的市售38%盐酸，加蒸馏水，定容至500 mL。

6.3.3 2,4-D 母液（2.0 mg/mL）的配制

精确称取2,4-D粉末0.2 g，加1.0 mL 1 M KOH溶液（6.3.1），于90 ℃水浴加热溶解，冷却至室温后，用蒸馏水定容至100 mL。将配制好的母液经0.22 μm过滤灭菌器灭菌至100 mL无菌试剂瓶中，放4 ℃冰

箱，3个月之内使用。

6.3.4 GA_3母液（1.0 mg/mL）的配制

精确称取0.1 g GA_3粉末，加300 μL无水乙醇溶解，用蒸馏水定容至100 mL。将配制好的母液经0.22 μm过滤灭菌器灭菌至100 mL无菌试剂瓶中，放4 ℃冰箱，3个月之内使用。

6.3.5 1%次氯酸钠溶液的配制

精确量取100 mL次氯酸钠溶液（分析纯，有效氯10%），用蒸馏水定容至1 L。

6.3.6 培养基配制

精确称取4.74 g MS培养基粉末，30 g蔗糖，7.0 g琼脂粉，2.0 g PVP粉末，0.5 mg KT粉末，于800 mL蒸馏水中进行溶解，用1 M的KOH（6.3.1）或HCl（6.3.2）将pH值调至5.8，定容至1 L。在压力1.1 kg/cm2，温度121 ℃条件下，灭菌30 min。待温度降至50 ℃左右，添加2 mL 2,4-D溶液（6.3.3）和1 mL GA3溶液（6.3.4）。

6.3.7 培养基分装

在超净工作台里将配制好的培养基分装在150 mL的无菌三角瓶中，分装量是三角瓶容量的1/5～1/4，分装后用无菌封口膜密封。

6.3.8 培养基保存

分装后的培养基保存于干燥、洁净的储藏室或超净工作台内。

6.4 组织培养流程

6.4.1 外植体消毒

先用自来水冲洗肉苁蓉，置于体积适宜的玻璃器皿中。用蒸馏水浸泡30 min，放置于超净工作台上，用75%酒精浸泡消毒20 s后无菌水冲洗3次，再用1%的次氯酸钠溶液（6.3.5）充分浸泡5 min，无菌水冲洗5次，用无菌滤纸吸干表面水分。

6.4.2 诱导培养

6.4.2.1 接种

在超净工作台内将肉苁蓉中部肉质茎从外到内剥离获取3个部分：鳞片状叶、维管组织和髓组织。将维管组织切成0.3 cm×0.3 cm×0.3 cm的小方块，斜插接种到培养基上（6.3.7），每个接种瓶接种5-6块，深浅适中，分布均匀，封好瓶口。标注接种明细。定期记录生长情况，检查污染情况。

6.4.2.2 培养条件

将接种好的培养瓶放置在条件适宜的培养架上，培养温度为25±1 ℃，暗培养。

6.4.2.3 培养管理

培养20 d左右肉质茎开始膨大，35 d左右形成愈伤组织。培养过程中如有污染，及时处理。

6.4.3 继代培养

6.4.3.1 接种

将外植体诱导的愈伤组织切成0.3 cm×0.3 cm×0.3 cm的小块，接种到培养基上（6.3.7），每个接种瓶接种5～6块，深浅适中，分布均匀，封好瓶口。标注接种明细。定期记录生长情况，检查污染情况。

6.4.3.2 培养条件

培养温度为25±1 ℃，光照强度为1500～2000 Lx，光照时间为10 h光照/14 h黑暗。

6.4.3.3 继代周期

15 d左右可继代一次，继代培养2～3次，直至获得颗粒状、淡黄色、生长旺盛的愈伤组织。