



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104106468 B

(45) 授权公告日 2015.09.16

(21) 申请号 201410298080.3

CN 102599065 A, 2012.07.25, 全文.

(22) 申请日 2014.06.26

CN 103518625 A, 2014.01.22, 全文.

(73) 专利权人 广西壮族自治区药用植物园  
地址 530023 广西壮族自治区南宁市兴宁区  
长堽路 189 号

蒋林等. 五指毛桃组织培养研究. 《中药材》. 2004, (第 8 期), 第 547-549 页.

审查员 冀敏

(72) 发明人 李林轩 韦坤华 吴庆华 王晓峰  
李翠 韦莹 王一诺 缪剑华  
林伟

(74) 专利代理机构 广西南宁公平专利事务所有  
限责任公司 45104  
代理人 黄永校

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

(56) 对比文件

EP 1229111 A2, 2002.08.07, 全文.

CN 102232360 A, 2011.11.09, 全文.

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种五指毛桃的组织培养快速繁殖方法

(57) 摘要

一种五指毛桃的组织培养快速繁殖方法, 包括如下步骤: (1) 取五指毛桃叶片作为外植体进行消毒; (2) 将消毒后的外植体置于 MS 基本培养基中诱导得到丛生芽; (3) 将所述丛生芽置于 MS 繁殖培养基中进行繁殖; (4) 将丛生芽切成单芽置于 1/2MS 生根培养基中培养得到完整的带根苗; (5) 取完整的带根苗进行炼苗后移植到按质量比为泥炭土: 珍珠岩 = 1:1 的基质中, 在该基质中生长一个月后移栽大田。采用本发明所述方法得到的种苗健壮、成活率高, 可在短期内提供大量五指毛桃的优质种苗, 有效解决了五指毛桃的规模化育苗问题。

1. 一种五指毛桃组织培养快速繁殖方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

(1) 外植体的选择与消毒:取五指毛桃叶片作为外植体,依次用5%洗洁精水溶液浸泡5-10min、线状自来水冲洗10-15min、添加了2-3滴吐温-20的100毫升0.1%升汞消毒8-10min、无菌水冲洗3-5次,最后用消毒滤纸吸去表面水分,得到消毒后的外植体,所述无菌水为经高压灭菌的蒸馏水,

(2) 叶片分化获得丛生芽诱导培养:将步骤(1)得到消毒后的外植体接种到MS培养基中,在培养温度为23-26℃,光照强度1400-2000lux,光照时间为10-12小时/天的条件下培养30天,叶片分化后获得丛生芽,其中MS培养基中添加0.5-1.5mg/L的6-BA、0.1-0.5mg/L的NAA、0.1-0.5mg/L的2,4-D、25-30g/L蔗糖和3.8-4.8g/L的琼脂,培养基的pH值为5.8,

(3) 丛生芽繁殖培养:将步骤(2)中得到的丛生芽置于MS繁殖培养基中,在培养温度23-26℃,光照强度1400-2000lux,光照时间为10-12小时/天的条件下培养40天得到健壮植株,其中MS繁殖培养基中添加0.1-0.5mg/L的IAA、0.1-0.5mg/L的KT、25-30g/L蔗糖和3.8-4.8g/L的琼脂,培养基的pH值为5.8,

(4) 无菌苗生根培养:将步骤(3)中得到的丛生芽切成单芽置于1/2MS生根培养基中,在培养温度23-26℃,光照强度1400-2000lux,光照时间为10-12小时/天的条件下培养40天得到带根的完整植株,其中1/2MS生根培养基中添加0.5-1.5mg/L的IBA、0.1-0.5mg/L的NAA、25-30g/L蔗糖和3.8-4.8g/L的琼脂,培养基的pH值为5.8,

(5) 炼苗与移栽:步骤(4)获得带根的完整植株后,在室温为25℃的室内打开瓶盖,在瓶中加入少量自来水,炼苗2-4天,表面角质形成后将苗取出,洗净根部培养基,立即移栽到按质量比为泥炭土:珍珠岩=1:1的基质中,在该基质中生长一个月后移栽大田。

## 一种五指毛桃的组织培养快速繁殖方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物繁殖方法,特别是一种五指毛桃的组织培养快速繁殖方法。

### 背景技术

[0002] 五指毛桃,又名五爪龙、五指牛奶、土北芪等,来源于桑科植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl. 的干燥根,为华南地区习用的中药材。五指毛桃味辛、甘,性平,有健脾补肺、利湿舒筋之功,用于脾虚浮肿、食少无力、肺癆咳嗽、盗汗、风湿痹痛、产后无乳等症,是抗癆丸、喘息丸、复方川贝止咳糖浆、滋肾宁神丸、脑萎缩丸、胃炎平胶囊、胃炎平分散片、妇炎净片等多种中成药的重要原料。

[0003] 五指毛桃随着市场需求量的不断增加,自然繁殖缓慢,加上滥采乱挖,致使野生资源面临枯竭。为确保五指毛桃资源的可持续利用,发展家种是唯一途径。据此,通过现代生物技术对其进行组织培养快繁技术进行了研究,试图获得大量优质的种苗,为五指毛桃生产提供种源,以满足生产上的需要。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种五指毛桃的组织培养快速繁殖方法,它能够快速繁殖出大量适合移栽的优良五指毛桃种苗。

[0005] 本发明通过以下技术方案达到上述目的:一种五指毛桃的组织培养快速繁殖方法,包括以下步骤:

[0006] (1) 外植体的选择与消毒:取五指毛桃叶片作为外植体,依次用 5%洗洁精水溶液浸泡 5-10min、线状自来水冲洗 10-15min、添加了 2-3 滴吐温 -20 的 100 毫升 0.1%升汞消毒 8-10min、无菌水冲洗 3-5 次,最后用消毒滤纸吸去表面水分,得到外植体,所述无菌水为经高压灭菌的蒸馏水,

[0007] (2) 叶片分化获得丛生芽诱导培养:将步骤 (1) 得到的外植体接种到 MS 培养基中,在培养温度为 23-26℃,光照强度 1400-2000lux,光照时间为 10-12 小时/天的条件下培养 30 天,叶片分化后获得丛生芽,其中 MS 培养基中含 0.5-1.5mg/L 的 6-BA、0.1-0.5mg/L 的 NAA、0.1-0.5mg/L 的 2,4-D、25-30g/L 蔗糖和 3.8-4.8g/L 的琼脂,培养基的 pH 值为 5.8,

[0008] (3) 丛生芽繁殖培养:将步骤 (2) 中得到的丛生芽置于 MS 繁殖培养基中,在培养温度 23-26℃,光照强度 1400-2000lux,光照时间为 10-12 小时/天的条件下培养 40 天得到健壮植株,其中 MS 繁殖培养基中含 0.1-0.5mg/L 的 IAA、0.1-0.5mg/L 的 KT、25-30g/L 蔗糖和 3.8-4.8g/L 的琼脂,培养基的 pH 值为 5.8,

[0009] (4) 无菌苗生根培养:将步骤 (2) 中得到的丛生芽切成单芽置于 1/2MS 生根培养基中,在培养温度 23-26℃,光照强度 1400-2000lux,光照时间为 10-12 小时/天的条件下培养 40 天得到带根的完整植株,其中 1/2MS 生根培养基中含 0.5-1.5mg/L 的 IBA、0.1-0.5mg/L 的 NAA、25-30g/L 蔗糖和 3.8-4.8g/L 的琼脂,培养基的 pH 值为 5.8,

[0010] (5) 炼苗与移栽:步骤 (4) 获得带根的完整植株后,在室温为 25℃的室内打开瓶

盖,在瓶中加入少量自来水,炼苗 2-4 天,表面角质形成后将苗取出,洗净根部培养基,立即移栽到按质量比为泥炭土:珍珠岩=1:1 的基质中,在该基质中生长一个月后移栽大田。移栽后一个星期内,每天早 8 点到晚 6 点喷雾 3-5 次,每次 10min,此后每天早 8 点、晚 6 点各喷雾 1 次,每次 10min;移栽时的温度条件为 20-28℃,相对湿度 75-80%,遮阳率为 75%。

[0011] 本发明的突出优点在于:

[0012] (1) 通过生物技术对五指毛桃进行组织培养快速繁殖,在短时间内培育出大量可供大田栽培的五指毛桃幼苗,显著提高了五指毛桃种苗的繁殖系数和种苗质量,实现规模化生产,满足生产上的需要。

[0013] (2) 在 MS 繁殖培养基中添加 0.1-0.5mg/L 的激动素 KT 可促进丛生芽的分化;添加浓度为 0.1-0.5mg/L 的生长激素吲哚-3-乙酸 IAA 可促进丛生芽的生长;

[0014] 在 1/2MS 生根培养基上组合使用浓度为 0.5-1.5mg/L 的吲哚丁酸 IBA 和 0.1-0.5mg/L 的生长素萘乙酸 NAA,可获得带根的完整植株,这些植株经炼苗后可直接移栽到泥炭土+珍珠岩(1:1)的基质。

[0015] (3) 采用本发明所述的培养方法,得到的单芽增殖系数达到 5-8 倍,获得的组培苗生根率达到 100%,每株平均带 6-8 个根,移栽泥炭土+珍珠岩(1:1)的基质中活率在 94%以上;快速、便捷、高效地进行五指毛桃组织培养,实现五指毛桃组培种苗的规模化生产。

### 具体实施方式

[0016] 下面结合实施例对本发明的技术方案进一步说明。

[0017] 一种五指毛桃的组织培养快速繁殖方法,包括以下步骤:

[0018] (1) 外植体的选择与消毒:取五指毛桃叶片作为外植体,依次用 5%洗洁精水溶液浸泡 5-15min、线状自来水冲洗 10-20min、添加了 2-3 滴吐温-20 的 100 毫升 0.1%升汞消毒 8-10min、无菌水冲洗 3-5 次,最后用消毒滤纸吸去表面水分,得到外植体,其中无菌水为经高压灭菌的蒸馏水,

[0019] (2) 叶片分化获得丛生芽诱导培养:将步骤(1)得到的外植体接种到 MS 培养基中,在培养温度为 23-26℃,光照强度 1400-2000lux,光照时间为 10-12 小时/天的条件下培养 30 天,叶片分化后获得丛生芽,其中 MS 培养基中添加不同浓度的 6-BA、NAA 和 2,4-D(表 1),30g/L 蔗糖和 4.0g/L 的琼脂,培养基的 pH 值为 5.8,数据分析发现,6-BA 对五指毛桃丛生芽诱导具有极显著影响,NAA 对五指毛桃丛生芽诱导具有显著影响,2,4-D 对丛生芽的诱导影响不显著。根据丛生芽数确定的最适培养基激素浓度为 1.0mg/L 的 6-BA、0.3mg/L 的 NAA 和 0.5mg/L 的 2,4-D。

[0020] 表 1 五指毛桃初代诱导培养基筛选结果

[0021]

试验编号	A(6-BA) (mg/L)	B(NAA) (mg/L)	C(2, 4-D) (mg/L)	丛芽数 (个)
1	0.5	0.1	0.1	33
2	0.5	0.3	0.3	48
3	0.5	0.5	0.5	43
4	1.0	0.1	0.3	68
5	1.0	0.3	0.5	72
6	1.0	0.5	0.1	63
7	1.5	0.1	0.5	45
8	1.5	0.3	0.1	53
9	1.5	0.5	0.3	56
K1	41.33	48.67	49.67	
K2	67.67	57.67	57.33	A>B>C
K3	51.33	54	53.33	A2B2C3
R	26.33	9	7.67	

[0022] 表 2 初代诱导培养基筛选方差分析

[0023]

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P	显著性
A (6-BA)	1060.22	2	530.11	97.37	0.01<P<0.05	极显著
B (NAA)	122.89	2	61.44	11.29	0.05<P<0.1	显著
C (2, 4-D)	88.22	2	44.11	8.10	0.1<P	不显著

[0024] Note:  $F_{1-0.01}(2, 2) = 99.0$   $F_{1-0.05}(2, 2) = 19.0$   $F_{1-0.1}(2, 2) = 9.0$

[0025] (3) 丛生芽繁殖培养:将步骤(2)中得到的丛生芽置于 MS 壮苗培养基中,在培养温度 23-26℃,光照强度 1400-2000lux,光照时间为 10-12 小时/天的条件下培养 40 天得到健壮植株,其中 MS 繁殖培养基中分别含 1.0mg/L 的 6-BA 和不同浓度的 IAA 和 KT(表 3)、30g/L 蔗糖和 3.4g/L 的琼脂,培养基的 pH 值为 5.8。观察发现,对苗的质量有影响,当 IAA 浓度为 0.3mg/L 时芽苗为翠绿色,长势快,质量最好,有利于后期诱导生根。KT 对五指毛桃试管苗丛生芽的影响显著,根据芽增殖倍数和生长情况确定的最适培养基激素浓度为 1.0mg/L 的 6-BA、0.3mg/L 的 IAA 和 0.3mg/L 的 KT。

[0026] 表 3 不同激素水平对五指毛桃丛生芽壮苗效果的影响

[0027]

试验编号	6-BA	IAA	KT	芽增殖倍数	生长情况
1	1.0	0.1	0.1	5	绿色, 长势慢
2	1.0	0.1	0.3	6.8	绿色, 长势慢
3	1.0	0.3	0.3	7.2	绿色, 长势快
4	1.0	0.3	0.5	6.5	绿色, 长势快
5	1.0	0.5	0.3	6.3	翠绿色, 长势快
8	1.0	0.5	0.5	6.0	翠绿色, 长势快

[0028] 注:芽增殖倍数 = (40 天后芽数 - 接种时芽数) / 接种时芽数

[0029] (4) 无菌苗生根培养:将步骤(2)中得到的丛生芽切成单芽置于 1/2MS 生根培养基中,在培养温度 23-26℃,光照强度 1400-2000lux,光照时间为 10-12 小时/天的条件下培养 20 天,其中 1/2MS 生根培养基中分别含不同浓度的 IBA 和 IAA(表 3)、30g/L 蔗糖和

3. 4g/L 的琼脂, 培养基的 pH 值为 5.8; 观察发现, 生根率和平均生根数都主要受 IBA 浓度的影响, 添加低浓度的 NAA 有利于提高生根率和平均生根数。培养基中添加 1.0mg/L 的 IBA 和 0.3mg/L 的 NAA 效果最好, 生根率为 100%, 生根数达到 7 根以上。

[0030] 表 4 不同激素水平对五指毛桃组培苗生根效果的影响

[0031]

组合	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	生根率 (%)	平均生根数
1	0.5	0.1	87	6
2	0.5	0.3	90	6.3
3	0.5	0.5	75	5.8
4	1.0	0.1	96	6.8
5	1.0	0.3	100	7.8
6	1.0	0.5	92	6.1
7	1.5	0.1	77	5.4
8	1.5	0.3	80	5.8
9	1.5	0.5	70	4.9
生根率				
$K_1$	84	86.67		
$K_2$	96	90		
$K_3$	75.67	79		
$R$	20.33	11		
生根数				
$K_1$	6.03	6.07		
$K_2$	6.9	6.63		
$K_3$	5.37	5.6		
$R$	1.53	1.03		

[0032] (5) 炼苗与移栽: 步骤 (4) 获得带根的完整植株后, 在室温为 25℃ 的室内打开瓶盖, 在瓶中加入少量自来水, 炼苗 2-4 天, 表面角质形成后将苗取出, 洗净根部培养基, 立即移栽到按质量比为泥炭土: 珍珠岩 = 1:1 的基质中, 在该基质中生长一个月后移栽大田。移栽后一个星期内, 每天早 8 点到晚 6 点喷雾 3-5 次, 每次 10min, 此后每天早 8 点、晚 6 点各喷雾 1 次, 每次 10min; 移栽时的温度条件为 20-28℃, 相对湿度 75-80%, 遮阳率为 75%。