



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104082147 B

(45) 授权公告日 2016.03.02

(21) 申请号 201410341385.8

(22) 申请日 2014.07.16

(73) 专利权人 江苏省中国科学院植物研究所

地址 211225 江苏省南京市溧水县白马镇国家农业科技园江苏省中国科学院植物研究所基地

专利权人 南京五岳生物医药科技开发有限公司

(72) 发明人 郑生智 韦敏 汪琼 吕晔

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

审查员 胡可

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

细柱五加的离体快速繁殖方法

(57) 摘要

本发明提供一种细柱五加快速繁殖方法,进行规模化生产和繁殖以满足市场需要细柱五加组织培养步骤包括:A. 外殖体消毒,B. 无菌苗获得,C. 腋芽生长培养,D. 丛生芽诱导,E. 生根培养,F 炼苗与移栽。采用植物组织培养的方法繁殖细柱五加,不仅不受外界条件的影响,四季皆可进行,节约苗木占地,降低生产成本,而且可以保存母体的全部优良性状,遗传性状稳定。这种方法可在短时间内形成大量的优良试管苗,进行规模化、工厂化生产,为观赏园艺、制药等产业提供大量的原材料。

1. 细柱五加的离体快速繁殖方法,其特征在于:

A 外植体消毒:选取腋芽饱满且尚未萌发的嫩枝,摘去叶片,然后将枝条剪为约 2cm 的小段,每段带一对腋芽,采用多方式消毒漂洗后,用无菌水冲洗 4~6 遍,最后用无菌滤纸吸干表面水分;

B 腋芽诱导:将消毒好的细柱五加茎段切成 1.0-1.5cm 的带芽节段,接种到以下培养基中:WPM 基本培养基,蔗糖 20~40g/L,吲哚丁酸 (IBA) 1.0~2.0mg/L,6-苄基腺嘌呤 (6-BA) 0.1~0.5mg/L,萘乙酸 (NAA) 0.1~0.2mg/L,适当 pH 值下进行光照培养;

C 腋芽培养:将腋芽萌发后培养 20 天左右的无菌苗茎尖用剪刀剪下,接种到以下培养基中:WPM 基本培养基,蔗糖 20~40g/L,吲哚丁酸 (IBA) 1.0~2.0mg/L,6-苄基腺嘌呤 (6-BA) 0.1~0.5mg/L,萘乙酸 (NAA) 0.1~0.2mg/L,适当 pH 值下进行光照培养;

D 丛生芽诱导:将生长至 8cm 左右的芽苗切下,分成带有一对腋芽的小段,接种到以下培养基中:WPM 基本培养基,反玉米素 (ZT) 0.5~1.0mg/L,吲哚丁酸 (IBA) 0.1~0.5mg/L,进行光照培养 30~40 天;

E 生根培养:选取健壮的试管苗,经过修剪后,在灭过菌的含萘乙酸 (NAA) 0.1~0.2mg/L,多效唑 5.0~10.0mg/L 的溶液中浸泡 10-15min 后接种到如下培养基中:1/2WPM 或 WPM 基本培养基,蔗糖 20~40g/L,进行光照培养 50~60 天;

F 炼苗移栽:将组培瓶盖打开,并添加一定量蒸馏水进行有菌条件驯化一段时间;用镊子将组培苗从瓶中取出,移栽到已经灭菌的栽培基质中,进行遮阴驯化 3 周,期间不定期的喷施 1/2WPM 营养液。

2. 根据权利要求 1 所述细柱五加的离体快速繁殖方法,其特征在于步骤 A 中的多方式消毒漂洗为:用 0.1% 的安利洗涤液在摇床上震荡洗涤 15~20min,流水冲洗 30~60min 后,再在超净工作台上用 75% 的酒精漂洗 30s,无菌水清洗 4 遍后,用含 0.1% 升汞的水溶液灭菌 50~60min。

3. 如权利要求 1 所述细柱五加的离体快速繁殖方法,其特征在于步骤 B、C、D、E 中细柱五加快速繁殖的培养条件为:光照周期 10~16h/d,光照强度 1000~3000Lux,培养温度 22~26℃。

4. 根据权利要求 1 所述的细柱五加的离体快速繁殖方法,其特征在于步骤 B、C 中所涉及到的 pH 值范围为 5.7~7.0。

5. 根据权利要求 1 所述的细柱五加的离体快速繁殖方法,其特征在于步骤 F 中添加蒸馏水 5~10ml,进行有菌驯化 2-3 天。

细柱五加的离体快速繁殖方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细柱五加快速繁殖方法,属于植物的人工繁殖和栽培方法技术领域。

背景技术

[0002] 五加始载于本草学著作《神农本草经》,称之为“五加皮”,列为上品。“气味辛,温。主心腹疝气腹痛,益气疗瘕,小儿不能行,疽疮阴蚀。”此后在《名医别录》、《东华真人煮石经》等历代医药著作中均有五加的记载和描述。但是由于古代文献对五加原植物的描述不甚详细,而且五加属植物形态较为相似,经前人考证,五加皮来源于五加科 (Araliaceae) 五加属 (Acanthopanax Miq.) 植物。

[0003] 经中国药典确定细柱五加 (*Acanthopanax gracilistylus* W.W.Smith) 的干燥根皮是中国药典中“五加皮”的唯一正品来源。五加皮为一味名贵滋补强壮药,具祛风湿,补肝肾,强筋骨的特异功效,目前国内外均未见大面积人工种植报道,市场供应主要以采集野生资源为主,由于自然繁殖困难和采挖根皮的严重破坏,五加皮在国内中医药市场上已脱销几十年之久,即使在细柱五加的主产地华东、华中等地药材市场,五加皮也严重供不应求长期脱销。

[0004] 由于细柱五加种子萌发率低,在生产应用中都是通过扦插育苗进行繁殖的。但是,长期的扦插繁殖是导致植物活力的减弱和带病毒的重要原因,并严重影响五加对逆境的抵抗能力及质量,且制约了五加的育种进程。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种细柱五加快速繁殖方法,进行规模化生产以及以细柱五加组培为基础的其他学科的研究工作的需要。

[0006] 本发明的技术方案如下,该种细柱五加快速繁殖方法的主要特点是:

[0007] A 外殖体消毒:选取腋芽饱满且尚未萌发的嫩枝,摘去叶片,然后将枝条剪为约 2cm 的小段,每段带一对腋芽,采用多方式消毒漂洗后,用无菌水冲洗 4~6 遍,最后用无菌滤纸吸干表面水分;

[0008] B 腋芽诱导:将消毒好的细柱五加茎段切成 1.0-1.5cm 的带芽节段,接种到以下培养基中:WPM 基本培养基,蔗糖 20~40g/L,植物生长激素 0.2~2.0mg/L,适当 pH 值下进行光照培养;

[0009] C 腋芽培养:将腋芽萌发后培养 20 天左右的无菌苗茎尖用剪刀剪下,接种到以下培养基中:WPM 基本培养基,蔗糖 20~40g/L,植物生长激素 0.2~2.0mg/L,适当 pH 值下进行光照培养;

[0010] D 丛生芽诱导:将生长至 8cm 左右的芽苗切下,分成带有一对腋芽的小段:WPM 基本培养基,植物生长激素 0.5~1.0mg/L,进行光照培养 30~40 天;

[0011] E 生根培养:选取健壮的试管苗,经过修剪后,在含植物生长激素 400~500mg/L 浸泡 10-15min 后接种到如下培养基中:1/2WPM 或 WPM 基本培养基,蔗糖 20~40g/L,进行

光照培养 50 ~ 60 天。

[0012] F 炼苗移栽 : 将组培瓶盖打开, 并添加一定量蒸馏水进行有菌条件驯化一段时间; 用镊子将组培苗从瓶中取出, 移栽到已经灭菌的栽培基质中, 进行遮阴驯化 3 周, 期间不定期的喷施 1/2WPM 营养液。

[0013] 所述的细柱五加快速繁殖方法的延伸技术方案包括 : 步骤 A 中的多方式消毒漂洗为 : 用 0.1% 的安利洗涤液在摇床上震荡洗涤 15 ~ 20min, 流水冲洗 30 ~ 60min 后, 再在超净工作台上用 75% 的酒精漂洗 30s, 无菌水清洗 4 遍后, 用含 0.1% 升汞灭菌 50 ~ 60min。

[0014] 所述的细柱五加快速繁殖方法的延伸技术方案包括 : 步骤 B、C、D、E 中细柱五加快速繁殖所述的培养基中涉及的植物生长激素, 包括 6- 苄基腺嘌呤 (6-BA)、吲哚丁酸 (IBA)、萘乙酸 (NAA)、赤霉素 (GA₃)、反玉米素 (ZT)、3- 吲哚乙酸 (IAA)、多效唑其中一种或几种。

[0015] 所述的细柱五加快速繁殖方法的延伸技术方案包括 : 步骤 B、C、D、E 中细柱五加快速繁殖所述的培养条件为 : 光照周期 10 ~ 16h/d, 光照强度 1000 ~ 3000Lux, 培养温度 22 ~ 26℃。

[0016] 所述的细柱五加快速繁殖方法的延伸技术方案包括 : 步骤 B、C 中所涉及到的 pH 值范围为 5.7 ~ 7.0。

[0017] 所述的细柱五加快速繁殖方法的延伸技术方案包括 : 步骤 F 中添加蒸馏水 5 ~ 10ml, 进行有菌驯化 2-3 天。

[0018] 所述的细柱五加快速繁殖方法的延伸技术方案包括 : 步骤 B、C 中所涉及到的植物生长激素包括吲哚丁酸 (IBA) 1.0 ~ 2.0mg/L, 6- 苄基腺嘌呤 (6-BA) 0.5 ~ 5.0mg/L, 萘乙酸 (NAA) 0.1 ~ 0.2mg/L。

[0019] 所述的细柱五加快速繁殖方法的延伸技术方案包括 : 步骤 D 中所涉及到的植物生长激素包括反玉米素 (ZT) 0.5 ~ 1.0mg/L, 吲哚丁酸 (IBA) 0.1 ~ 0.5mg/L。

[0020] 所述的细柱五加快速繁殖方法的延伸技术方案包括 : 步骤 E 中所涉及到的植物生长激素包括萘乙酸 (NAA) 0.1 ~ 0.2mg/L, 多效唑 5.0 ~ 10.0mg/L。

[0021] 采用植物组织培养的方法繁殖细柱五加, 不仅可以摆脱外界条件的影响, 四季都能进行生产, 而且可以节约育苗占地, 降低生产成本。植物组织培养技术是利用细胞的全能性, 采取植物体上的细胞团块组织, 通过人为条件的控制, 使这些组织形成千百万植株, 并且保存了母体的全部优良性状, 且遗传性状稳定。这种方法保留了细柱五加的植株活性, 可在短期内形成大量优良试管苗, 缩短生长周期, 适宜规模化、工厂化生产。

[0022] 以下便结合实施例并附图, 对本发明的具体实施方式作进一步的详述。

附图说明

[0023] 图 1 是取材用的细柱五加植株图 ;

[0024] 图 2 是诱导 2-3 周后萌发的腋芽图 (培养条件 : WPM+IBA 2.0mg/L+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.2mg/L+ 食用糖 30g/L, 16h/d 光照培养) ;

[0025] 图 3 是在最佳生长培养基中培养腋芽苗图 (培养条件 : WPM+IBA 2.0mg/L+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.2mg/L+ 食用糖 30g/L, 16h/d 光照培养) ;

[0026] 图 4 是丛生芽诱导图 (培养条件 : WPM+ZT 1mg/L+IBA 0.5mg/L+ 食用糖 30g/L, 16h/d 光照培养) ;

[0027] 图 5 是组培苗在步骤 E 中处理后的生根情况图（培养条件：1/2 WPM+NAA 0.2mg/L+ 多效唑 10.0mg/L+ 食用糖 15g/L, 16h/d 光照培养）；

[0028] 图 6 是经炼苗驯化的移栽组培苗图。

具体实施方式

[0029] 下面结合细柱五加快速繁殖的实例说明本发明的具体实施方式。

[0030] 实施例 1 腋芽的诱导和培养

[0031] 1、取细柱五加的幼嫩茎段，用 0.1% 的安利洗涤液在摇床上震荡洗涤 15～20min，流水冲洗 60min 后，再在超净工作台上用 75% 的酒精漂洗 30s，无菌水清洗 4 遍后，用含 0.1% HgCl₂ 消毒 50～60min（在升汞中加入几滴吐温 80），无菌水冲洗 4～6 次，最后用无菌滤纸吸干种子表面水分。

[0032] 2、将消毒好的细柱五加茎段直接接种到腋芽诱导培养基中：WPM 基本培养基中添加，蔗糖（食用糖）30g/L，适当 pH 值；培养温度 25℃，光照强度 3000Lux，光照时间 16h，进行光照培养。

[0033] 3、将腋芽萌发后培养 20 天无菌苗茎尖用剪刀剪下，接种到本发明的腋芽生长培养基中，具体配方为在 WPM 基本培养基中添加植物激素 IBA 2.0mg/L、BA 0.5mg/L 和 NAA 0.2mg/L，蔗糖 30g/L，进行光照培养。

[0034] 实施例 2 丛生芽的诱导和试管苗的生根、移栽

[0035] 1、培养 30 天后，待芽苗生长至 6-8cm，将芽苗重新接种到本发明的丛生芽诱导培养基中，进行增殖培养。丛生芽诱导培养基是以 WPM 培养基为基本培养基，并添加植物生长激素 ZT 1mg/L 和 IBA 0.5mg/L，蔗糖（食用糖）30g/L，进行增殖培养。培养 30 天以上，诱导率达到 98%，大部分芽苗可诱导出丛生芽数达到 3～5 条。

[0036] 2、选取生长健壮的试管苗，将其浸泡在已经灭过菌的含 NAA 0.2mg/L 和多效唑 10.0mg/L 的溶液中 10min，然后接种到 1/2 WPM 基本培养基上，蔗糖（食用糖）15g/L，进行生根诱导。培养 40 天后，生根率达 86%，平均根数目达 18.5 根。

[0037] 3、将细柱五加组培苗生根培养 1.5～2 个月后开始进行炼苗移栽，首先将组培瓶移入光照培养箱，进行变温变光驯化 5～7 天，再将组培瓶盖打开，并添加 10ml 蒸馏水，进行有菌条件驯化 2～3 天。然后将组培苗移栽到已经灭菌的栽培基质（泥潭：珍珠岩：园土 = 1：1：5）中，放置无加温加光的温室中，进行遮阴驯化 3 周，期间不定期的喷施 1/2WPM 营养液，移栽后成活率达 78%。

[0038] 实施例 3 腋芽的诱导和培养培养基的选择

[0039] 将消毒好的茎段接种于 6 种培养基上，每瓶接种 1～2 株，培养基组成见表 1。每隔 10d 继代并统计外植体生长情况。培养条件为温度 25℃，光照强度 3000Lux，光照时间 16h。

[0040] 表 1 腋芽的诱导和培养培养基组成

[0041]

编号	MS	WPM	6-BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	IBA/ mg · L ⁻¹	蔗糖 /g · L ⁻¹	琼脂 /g · L ⁻¹	pH
M1	全	-	0.5	0.1	2.0	30	8.0	5.8
M2	全	-	1.0	0.2	2.0	30	8.0	5.8
M3	全	-	2.0	0.2	1.0	30	8.0	5.8
M4	-	全	0.5	0.1	2.0	30	8.0	5.8
M5	-	全	1.0	0.2	2.0	30	8.0	5.8
M6	-	全	2.0	0.2	1.0	30	8.0	5.8

[0042] 接种后 30d 统计产生丛生芽苗数、不定芽发生率及不定芽生长状况 (表 2), 可见在 WPM 基本培养基中添加植物激素 IBA 2.0mg/L、BA 0.5mg/L 和 NAA 0.2mg/L, 蔗糖 30g/L, 进行光照培养为最佳培养条件。

[0043] 表 2 不同培养基对细柱五加增殖培养的影响

[0044]

编号	接种数/ 株	产生丛生 芽苗数/株	不定芽发 生率/%	不定芽生长状况
M1	20	2	10.0	丛生芽粗壮且绿, 分枝少
M2	20	2	10.0	矮小、长势弱, 颜色偏白绿色
M3	20	10	50.0	矮小、长势中, 颜色绿
M4	30	14	46.7	丛生芽粗壮且绿, 分枝少
M5	30	22	73.3	较健壮且绿、分枝多
M6	30	18	60.0	长势中且绿、分枝多



图 1

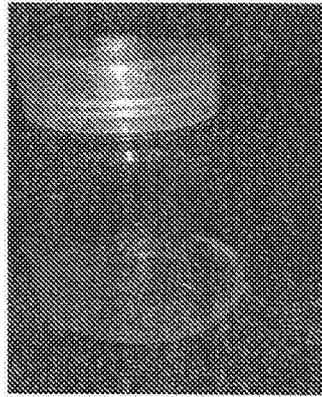


图 2

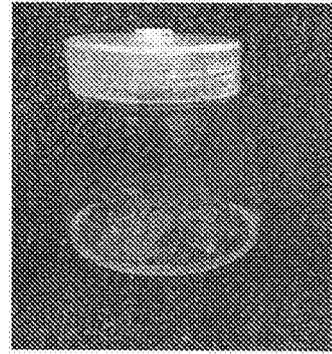


图 3

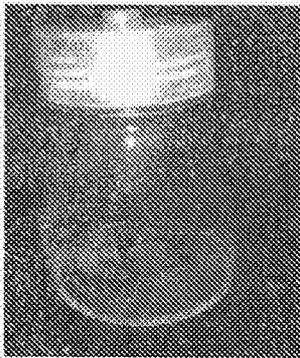


图 4



图 5

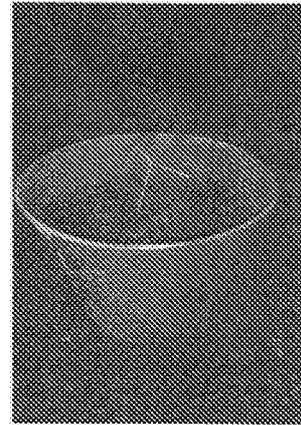


图 6