(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106718926 B
(45)授权公告日 2019.06.21

(21)申请号 201710009965.0

(22)申请日 2017.01.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106718926 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(73)专利权人 中国科学院华南植物园
地址 510650 广东省广州市天河区兴科路723号

(72)发明人 公绪云 蔡锡安 周丽霞 曾宋君 吴坤林 刘占锋 王晓玲

(74)专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001
代理人 刘明星

(51)Int.Cl.
A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 104255491 A,2015.01.07,全文.
CN 101336597 A,2009.01.07,全文.
蔡时可等.岗梅的组织培养和快速繁殖.《植物生理学通讯》.2006,第42卷(第6期),第1137页.

审查员 姜岚

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种梅叶冬青组织培养快速繁殖方法

(57)摘要

本发明公开了一种梅叶冬青组织培养快速繁殖方法。本发明实现了野生梅叶冬青组织培养快速繁殖,为野生梅叶冬青组织培养技术开辟新道路。本发明的方法操作简单,易于实施,可一次性培育出大量的梅叶冬青生长幼苗。本发明能够有效的缩短育苗时间,且本发明所用的培养基和试剂易配置,成本低,易大范围推广。

CN 106718926 B

1.一种梅叶冬青组织培养快速繁殖方法，其特征在于，包括以下步骤：

a、选取健康无病虫害8-12cm的梅叶冬青当年新抽带芽枝条，去除枝条的叶，用酒精棉拭去枝条表面的灰尘并剪成3-5段，每段带有1-2个休眠芽点的枝段作为外植体；

b、将外植体灭菌，然后将灭菌后的外植体插入初代诱芽培养基中培养诱导出腋芽或顶芽，培养条件为：1500-2000Lx，24℃-28℃，光照时间12h-14h，黑暗时间12h-10h，所述的初代诱芽培养基每升由以下成分组成：1mg ZT、0.05mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、30g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0；

c、将腋芽或顶芽切下，接入不定芽增殖培养基中进行增殖培养获得不定芽，培养条件为：1500-2000Lx，24℃-28℃，光照时间12h-14h，黑暗时间12h-10h，所述的不定芽增殖培养基每升由以下成分组成：1mg 6-BA、0.05mgNAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0；

d、将不定芽接入壮苗培养基进行壮苗培养得到无根壮苗，培养条件为：1500-2000Lx，24℃-28℃，光照时间12h-14h，黑暗时间12h-10h，所述的壮苗培养基每升由以下成分组成：0.1mg 6-BA、0.1mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0；

e、将2-3cm高带有3-5个叶片的无根壮苗接入生根诱导培养基中培养得到组培苗，培养条件为：1500-2000Lx，24℃-28℃，光照时间12h-14h，黑暗时间12h-10h，所述的生根诱导培养基每升由以下成分组成：1mg IBA、0.02g AC、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为1/2MS培养基，pH 5.8-6.0；

f、将组培苗进行移栽培养。

2.根据权利要求1所述的梅叶冬青组织培养快速繁殖方法，其特征在于，所述的步骤b的将外植体灭菌是在无菌操作台上，将外植体置于体积分数75％酒精溶液中浸泡30s；移到无菌工作台上，将酒精消毒的外植体放入锥形瓶中，加入质量分数0.1％的升汞水溶液，滴加1滴吐温，浸泡10-15min，中间晃动数次，最后用无菌水冲洗3次，得到灭菌处理的外植体。

3.根据权利要求1所述的梅叶冬青组织培养快速繁殖方法，其特征在于，所述的步骤f的移栽培养是待组培苗生根5-10条，根长1-2cm时，将组培苗移到温度湿度与外界相一致的培养室中，4天后打开瓶盖，使生出根的组培苗与外界保持较高的接触，7天后加水取出生根苗，洗净基质，用质量分数0.1％高锰酸钾水溶液浸泡1-3min，移入珍珠岩：蛭石体积比＝3:2的培养基中。

一种梅叶冬青组织培养快速繁殖方法

技术领域：

[0001] 本发明属于植物繁殖领域，具体涉及一种梅叶冬青组织培养快速繁殖方法。

背景技术：

[0002] 梅叶冬青(Ilex asprella Champ.ex Benth)属于冬青科冬青属，落叶灌木，株高可达3米。主要分布于我国浙江、江西、福建、台湾、湖南、广东、广西、香港等地；在菲律宾群岛也有分布。多生于海拔400-1000米的山地疏林中或路旁灌丛中。其根、茎、叶均可入药，味苦、甘、性凉，清热解毒、生津止渴。为广东、广西等岭南地区常用中药，用于感冒、高热烦渴、扁桃体炎、咽喉炎、气管炎、百日咳等。梅叶冬青根为王老吉凉茶、沙溪凉茶等的主要原料，岭南民间也广泛用梅叶冬青自制凉茶。根据研究梅叶冬青的叶片含有熊果酸，具有镇静、消炎，抗糖尿病、冠心病及心绞痛等效应。随着现代医学对梅叶冬青活性成分和药理成分的研究深入，其临床应用逐年扩大，梅叶冬青具有广阔的市场前景和经济效益。

[0003] 目前，梅叶冬青原料主要来源于野生资源，随着市场的需求扩大，梅叶冬青自然资源日益枯竭，无法满足当前的市场需求。人工栽培是以后的重要发展方向。常见的梅叶冬青繁殖技术主要为种子有性繁殖和枝条扦插繁殖。梅叶冬青种子具有深度休眠、隔年发芽的特性，其种子发芽繁殖受到季节明显影响。另外，梅叶冬青种子小，其采集费时耗力，且不易储存。梅叶冬青扦插繁殖，需采集大量当年生木质化枝条，对梅叶冬青生长存在较大破坏，且在大规模种植时，易受到材料量的限制。

发明内容：

[0004] 本发明的目的是提供一种育苗繁殖不受时间和原材料数量的影响，繁殖系数高，培育时间短，为大规模的培育梅叶冬青种苗提供技术保障的梅叶冬青组织培养快速繁殖方法。

[0005] 本发明的梅叶冬青组织培养快速繁殖方法，其特征在于，包括以下步骤：

[0006] a、选取健康无病虫害8-12cm的梅叶冬青当年新抽带芽枝条，去除枝条的叶，用酒精棉拭去枝条表面的灰尘并剪成3-5段，每段带有1-2个休眠芽点的枝段作为外植体；

[0007] b、将外植体灭菌，然后将灭菌后的外植体插入初代诱芽培养基中培养诱导出腋芽或顶芽，培养条件为：1500-2000Lx，24℃-28℃，光照时间12h-14h，黑暗时间12h-10h，培养20-30天，外植体的休眠芽生发成腋芽或顶芽，萌发率可达到80％以上，所述的初代诱芽培养基每升含有：1mg ZT(玉米素)、0.05mg NAA(萘乙酸)、6.2g琼脂、0.1g肌醇、30g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0；

[0008] c、将腋芽或顶芽切下，接入不定芽增殖培养基中进行增殖培养获得不定芽，培养条件为：1500-2000Lx，24℃-28℃，光照时间12h-14h，黑暗时间12h-10h，所述的不定芽增殖培养基每升含有：1mg 6-BA(6-苄氨基基嘌呤)、0.05mgNAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0；增殖培养周期为35-45天，增殖系数可达到5；

[0009] d、将不定芽接入壮苗培养基进行壮苗培养得到无根壮苗，培养条件为：1500-

2000Lx，24℃-28℃，光照时间12h-14h，黑暗时间12h-10h，所述的壮苗培养基每升含有：0.1mg 6-BA、0.1mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0；

[0010] e、将2-3cm高带有3-5个叶片的无根壮苗接入生根诱导培养基中培养得到组培苗，培养条件为：1500-2000Lx，24℃-28℃，光照时间12h-14h，黑暗时间12h-10h，所述的生根诱导培养基每升含有：1mg IBA(吲哚乙酸)、0.02g AC(活性炭)、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为1/2MS培养基，pH 5.8-6.0；培养30-45天，生根率可达到85％以上；

[0011] f、将组培苗进行移栽培养；

[0012] 所述的步骤b的将外植体灭菌优选是在无菌操作台上，将外植体置于体积分数75％酒精溶液中浸泡30s；移到无菌工作台上，将酒精消毒的外植体放入锥形瓶中，加入质量分数0.1％的升汞水溶液，滴加1滴吐温，浸泡10-15min，中间晃动数次，最后用无菌水冲洗3次，得到灭菌处理的外植体。

[0013] 所述的移栽培养是待组培苗生根5-10条，根长1-2cm时，将组培苗移到温度湿度与外界相一致的培养室中，4天后打开瓶盖，使生出根的组培苗与外界保持较高的接触，7天后加水取出生根苗，洗净培养基，用质量分数0.1％高锰酸钾水溶液浸泡1-3min，移入珍珠岩：蛭石体积比＝3:2的基质中。移栽成活率可达到95％以上。

[0014] 本发明中的MS培养基是指没有加琼脂的液体培养基，其配方属于本领域的公知常识，所述的1/2MS培养基是MS培养基中大量元素减半，而其他不变的培养基。

[0015] 与现有的技术相比，本发明的具有以下优点：

[0016] 本发明实现了野生梅叶冬青组织培养快速繁殖，为野生梅叶冬青组织培养技术开辟新道路。本发明的方法操作简单，易于实施，可一次性培育出大量的梅叶冬青生长幼苗。本发明能够有效的缩短育苗时间，且本发明所用的培养基和试剂易配置，成本低，易大范围推广。

具体实施方式：

[0017] 以下实施例是对本发明的进一步说明，而不是对本发明的限制。

[0018] 实施例1：

[0019] a、选取健康无病虫害8－12cm左右的野生梅叶冬青新抽带芽枝条；去除枝条的杂叶，使用体积分数75％的酒精棉拭去枝条表面的灰尘并剪成3－5段，每段3cm左右，带有1-2个休眠芽点，以此枝茎段作为外植体；

[0020] b、外植体灭菌：在无菌操作台上，将上述初步消毒得到的茎段(外植体)置于体积分数75％酒精溶液中浸泡30s；移到无菌工作台上，将酒精消毒的茎段放入锥形瓶中，加入质量分数0.1％的升汞水溶液，滴加1滴吐温，浸泡10-15min，中间晃动数次，最后用无菌水冲洗3次，得到灭菌处理的外植体；

[0021] c、外植体诱导培养：将经灭菌处理的外植体插入初代诱芽培养基中培养，培养条件为：1500Lx，24℃-28℃，光照时间14h，黑暗时间10h，培养20-30天，外植体的休眠芽生发成腋芽或顶芽，萌发率可达到80％以上。所述的初代不定芽诱导培养基为：MS+1mg/L ZT+0.05mg/L NAA+6.2g/L琼脂粉+0.1g/L肌醇+3％蔗糖，pH 5.8-6.0，即所述的初代诱芽培养基每升含有：1mg ZT、0.05mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、30g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0，其每升配制方法是将1mg ZT、0.05mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、30g蔗糖加入到少量液

体MS培养基中，然后再用液体MS培养基定容到1L，调pH值至5.8-6.0，灭菌备用。

[0022] d、不定芽增殖培养：将上述所得到的长为1cm左右的腋芽或顶芽切下，接入不定芽增殖培养基中培养获得不定芽，培养条件为：1500Lx，24℃-28℃，光照时间14h，黑暗时间10h，培养35-45天为一个周期，增殖系数可达到5。所述的不定芽增殖培养基成份为：MS+1mg/L6-BA+0.05mg/LNAA+6.2g/L琼脂粉+0.1g/L肌醇+2％蔗糖，pH 5.8-6.0，即所述的不定芽增殖培养基每升含有：1mg 6-BA、0.05mgNAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0，其每升配制方法是将1mg 6-BA、0.05mgNAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖加入到少量液体MS培养基中，然后用液体MS培养基定容到1L，调pH值至5.8-6.0，灭菌备用。

[0023] e、壮苗培养：将增殖获得的不定芽放入壮苗培养基中培养30-45天得到无根壮苗，培养条件为：1500Lx，24℃-28℃，光照时间14h，黑暗时间10h。所述的壮苗培养基成份为：MS+0.1mg/L6-BA+0.1mg/LNAA+6.2g/L琼脂粉+0.1g/L肌醇+2％蔗糖，pH 5.8-6.0，即所述的壮苗培养基每升含有：0.1mg 6-BA、0.1mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为MS培养基，pH 5.8-6.0，其每升配制方法是将0.1mg 6-BA、0.1mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖加入到少量液体MS培养基中，然后用液体MS培养基定容到1L，调pH值至5.8-6.0，灭菌备用。

[0024] f、分化生根培养：将上述所得到2-3cm高带有3-5个叶片的无根壮苗接入生根诱导培养基中培养30-45天得到组培苗，生根率可达到85％以上。培养条件为：1500Lx，24℃-28℃，光照时间14h，黑暗时间10h。所述的生根诱导培养基成份为：1/2MS+1mg/L IBA+0.02g/L AC+6.2g/L琼脂粉+0.1g/L肌醇+2％蔗糖，pH 5.8-6.0，即所述的生根诱导培养基每升含有：1mg IBA、0.02gAC、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖，余量为1/2MS培养基，pH 5.8-6.0，其每升配制方法是将1mg IBA、0.02gAC、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖加入到液体1/2MS培养基中，然后用液体MS培养基定容到1L，调pH值至5.8-6.0，灭菌备用。

[0025] g、移栽培养：待组培苗生根5-10条，根长1-2cm时，将组培苗移到温度湿度与外界相一致的培养室中，4天后打开瓶盖，使生根组培苗与外界保持较高的接触，7天后加水取出生根苗，洗净培养基；用质量分数0.1％高锰酸钾水溶液浸泡1-3min，移入珍珠岩：蛭石体积比为3:2的基质中培养，由此获得梅叶冬青小苗。

[0026] 实施例2：

[0027] a、选取健康无病虫害8－12cm左右的野生梅叶冬青新抽带芽枝条；去除枝条的杂叶，使用体积分数75％的酒精棉拭去枝条表面的灰尘并剪成3－5段，每段3cm左右，带有1-2个休眠芽点，以此处理的枝条作为外植体；

[0028] b、外植体灭菌：在无菌操作台上，将上述初步消毒得到的茎段(外植体)置于体积分数75％酒精溶液中浸泡30s；移到无菌工作台上，将酒精消毒的茎段放入锥形瓶中，加入质量分数0.1％的升汞水溶液，滴加1滴吐温，浸泡10-15min，中间晃动数次，最后用无菌水冲洗3次，得到灭菌处理的外植体；

[0029] c、外植体诱导培养：将经灭菌处理的外植体插入初代诱芽培养基中培养，培养条件为：2000Lx，24℃-28℃，光照时间12hh，黑暗时间12h，培养20-30天，外植体的休眠芽生发成腋芽或顶芽，萌发率可达到80％以上。所述的初代不定芽诱导培养基为：MS+1mg/L ZT+0.05mg/L NAA+6.2g/L琼脂粉+0.1g/L肌醇+3％蔗糖，pH 5.8-6.0，即所述的初代诱芽培养

基每升含有:1mg ZT、0.05mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、30g蔗糖,余量为MS培养基,pH 5.8-6.0,其每升配制方法是将1mg ZT、0.05mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、30g蔗糖加入到少量液体MS培养基中,然后再用液体MS培养基定容到1L,调pH值至5.8-6.0,灭菌备用。

[0030] d、不定芽增殖培养:将上述所得到的长为1cm左右的腋芽或顶芽切下,接入不定芽增殖培养基中培养获得不定芽,培养条件为:2000Lx,24℃-28℃,光照时间12hh,黑暗时间12h,培养35-45天为一个周期,增殖系数可达到5。所述的不定芽增殖培养基成份为:MS+1mg/L6-BA+0.05mg/LNAA+6.2g/L琼脂粉+0.1g/L肌醇+2%蔗糖,pH 5.8-6.0,即所述的不定芽增殖培养基每升含有:1mg 6-BA、0.05mgNAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖,余量为MS培养基,pH 5.8-6.0,其每升配制方法是将1mg 6-BA、0.05mgNAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖加入到少量液体MS培养基中,然后用液体MS培养基定容到1L,调pH值至5.8-6.0,灭菌备用。

[0031] e、壮苗培养:将增殖获得的不定芽放入壮苗培养基中培养30-45天得到无根壮苗,培养条件为:2000Lx,24℃-28℃,光照时间12hh,黑暗时间12h。所述的壮苗培养基成份为:MS+0.1mg/L6-BA+0.1mg/LNAA+6.2g/L琼脂粉+0.1g/L肌醇+2%蔗糖,pH 5.8-6.0,即所述的壮苗培养基每升含有:0.1mg 6-BA、0.1mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖,余量为MS培养基,pH 5.8-6.0,其每升配制方法是将0.1mg 6-BA、0.1mg NAA、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖加入到少量液体MS培养基中,然后用液体MS培养基定容到1L,调pH值至5.8-6.0,灭菌备用。

[0032] f、分化生根培养:将上述所得到2-3cm高带有3-5个叶片的无根壮苗接入生根诱导培养基中培养30-45天得到组培苗,生根率可达到85%以上。培养条件为:2000Lx,24℃-28℃,光照时间12hh,黑暗时间12h。所述的生根诱导培养基成份为:1/2MS+1mg/L IBA+0.02g/L AC+6.2g/L琼脂粉+0.1g/L肌醇+2%蔗糖,pH 5.8-6.0,即所述的生根诱导培养基每升含有:1mg IBA、0.02gAC、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖,余量为1/2MS培养基,pH 5.8-6.0,其每升配制方法是将1mg IBA、0.02gAC、6.2g琼脂、0.1g肌醇、20g蔗糖加入到液体1/2MS培养基中,然后用液体MS培养基定容到1L,调pH值至5.8-6.0,灭菌备用。

[0033] g、移栽培养:待组培苗生根5-10条,根长1-2cm时,将组培苗移到温度湿度与外界相一致的培养室中,4天后打开瓶盖,使生根组培苗与外界保持较高的接触,7天后加水取出生根苗,洗净培养基;用质量分数0.1%高锰酸钾水溶液浸泡1-3min,移入珍珠岩:蛭石为3:2的基质中,由此获得梅叶冬青小苗。