

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/04 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610172193.4

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 1999720A

[22] 申请日 2006.12.30

[21] 申请号 200610172193.4

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 魏春华 杨宇明

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司
代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物及制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物及制备方法。其组成成分及配比为：蜂胶包合物重量(克)：植物培养基本培养基体积(毫升)为 1-3：100；所述的蜂胶包合物是由蜂胶乙醇胶状物和 β -环状糊精组成，蜂胶乙醇胶状物与 β -环状糊精的重量比为 1：2.7。该蜂胶抑菌剂植物培养基组合物能有效减少或防止该植物组织培养基的微生物污染，使植物组织正常生长发育；能较全面地保存蜂胶的有效成份，且 β -环状糊精对蜂胶抗菌有效成份有增加水溶性的作用。本发明简单易行，无需复杂操作，即可有效降低植物组织培养的染菌率，对提高植物组织培养的经济效益，具有重要的实际意义。

1、一种含蜂胶抑菌剂植物培养基的组合物，其特征在于，其组成成分及配比为：蜂胶包合物重量（克）：植物培养基本培养基体积（毫升）为1—3：100；所述的蜂胶包合物是由蜂胶乙醇胶状物和 β -环状糊精组成，蜂胶乙醇胶状物与 β -环状糊精的重量比为1：2.7。

2、如权利要求1所述的一种含蜂胶抑菌剂植物培养基的制备方法，其特征是其步骤和条件如下：

(1) 把蜂胶在80℃水浴加热除蜡，用除蜡蜂胶的质量3倍的浓度（v/v）为95%乙醇溶解除蜡蜂胶，过滤，取上清液，弃去残渣，得到蜂胶乙醇胶状物；

(2) 按配比把蜂胶乙醇胶状物和 β -环状糊精充分混合，强力碾压包合、干燥、粉碎、过筛得到蜂胶包合物；按配比将蜂胶包合物与植物培养基本培养基充分混合，即可获得一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物。

一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物及制备方法

技术领域

本发明属于植物组织培养技术领域，具体涉及一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物及制备方法。

背景技术

关于植物培养基的专利很多，例如：中国专利 CN1422948 植物细胞培养基及使用培养基培养植物细胞的方法，向培养基中加入一定量的过氧化物，达到促进植物的生长发育。中国专利 CN1193344 防止植物组织培养基微生物污染的组合物和方法，在植物组织培养基中加入甲基氯异噻唑啉酮、甲基异噻唑啉酮、氯化镁和硝酸镁，这些物质可以有效减少或防止该植物组织培养基的微生物污染，保证植物组织正常生长或发育。

关于水溶性蜂胶制备的发明专利很多，例如：中国专利 CN94118328.9 水溶性蜂胶的制备方法，采用甘油浸泡，得到水溶性蜂胶。中国专利 CN03141394.3 水溶性蜂胶及其制备方法，它有蜂胶、聚乙二醇和蒸馏水组成。中国专利 CN200380104801.2 包含蜂胶作为活性物质的四元组合物，采用蜂胶活性物质，亲水载体和一种是氨基酸，另一种是甘草酸盐甜味剂的共研磨以制备的细碎粉末形式的四元组合物。中国专利 CN03150648.8 一种水溶性蜂胶及其提取方法，利用增溶、超声技术和控制分离的温度、加热时间，对蜂胶中的活性成分进行提取。中国专利 CN200510049326.4 蜂胶水溶液的制备工艺及应用，用乙醇—水溶解后，蒸馏出乙醇，制成水溶性蜂胶。

发明内容

本发明是为了解决现有的植物培养基抗菌力较差的缺点，利用蜂胶天然无毒无害抗菌特性，增加蜂胶的水溶性。

发明的原理：植物组织培养是指在无菌条件下，利用人工培养基对植物的器官、组织、细胞和原生质体进行培养的技术，是现代生物技术的核心技术之一。植物组织培养技术始于 20 世纪初，90 多年

来, 经许多研究者的辛勤探索, 该技术日趋完善, 并在科学研究与现代化农业生产中充分显示出其优越性。它具有可以快速繁殖优良品种、改良品质、节省劳力、充分利用空间、全年试验生产、不受自然条件限制等特点。其培养的组培苗体积小, 便于携带和资源交流。目前世界上, 植物组织培养技术在不少国家和地区已由实验室研究阶段一跃而成为大规模成批量的工厂化生产方法。该项技术在推动农业现代化方面已经取得巨大的经济、社会和生态效益, 被认为是一项很有潜力的高新技术。“优良无性繁殖系的快速繁殖和试管品种的商品化, 是目前植物组织培养和细胞培养在应用上的主流之一”。工厂化生产中急需解决的问题之一是组培苗是在全封闭的无菌环境中培养, 操作程序繁杂, 培养时间较长, 而且每个环节都有可能增加杂菌的污染机会, 耗费大量的人力、物力、财力。

天然蜂胶是一种十分珍贵的动物自然资源, 蜂胶及其活性成分几乎不溶于水, 大部分溶于乙醇, 也溶于松节油, 极易溶于乙醚、氯仿以及丙酮、苯, 但是, 这些有机溶剂对植物生长是有害的, 在植物组织培养中不能使用有机溶剂, 因此, 使用乙醇作为有机溶剂提取蜂胶有效成分, 再用 β -环状糊精包合, 烘干去处乙醇溶剂, 即可得到无有机溶剂的完全溶于沸水的蜂胶。蜂胶具有抗病原微生物的作用, 蜜蜂可以在阴暗、暖湿的蜂箱内生活, 免受自然界各种病菌的感染, 主要原因就是由于蜂胶中的多酚类化合物含量高, 有明显的抗菌活性, 对众多细菌、真菌、病毒同时具有抑制作用, 可谓一种天然的广谱抗菌物质。

β -环状糊精可以增加药物的水溶解度, 机理是利用 β -环状糊精特殊的结构和性质, 将不溶于水的蜂胶有效成分包和, 从而使蜂胶有效成分随 β -环状糊精的溶解而溶解, 增加蜂胶有效成分的水溶解度。

本发明目的之一是提供一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物。其组成成分及配比为: 蜂胶包合物重量(克): 植物培养基本培养基体积(毫升)为 1—3: 100; 所述的蜂胶包合物是由蜂胶乙醇胶状物和 β -环状糊精组成, 蜂胶乙醇胶状物与 β -环状糊精的重量比为 1: 2.7。

所述的植物培养基本培养基(MS 培养基), 是 Murashige 和 Skoog 于 1962 年为烟草细胞培养设计的, 其特点是无机盐和离子浓度较高,

是较稳定的离子平衡溶液，它的硝酸盐含量高，其养分的数量和比例合适，能满足植物细胞的营养和生理需要，因而适用范围比较广，多数植物组织培养快速繁殖用它作为基本培养基。

本发明目的之二是提供一种含蜂胶抑菌剂植物培养基制备方法，其步骤和条件如下：

(1) 把蜂胶在 80℃ 水浴加热除蜡，用除蜡的蜂胶的质量 3 倍的浓度 (v/v) 为 95% 乙醇溶解除蜡的蜂胶原料，过滤，取上清液，弃去残渣，得到蜂胶乙醇胶状物。

(2) 按配比把蜂胶乙醇胶状物和 β -环状糊精充分混合，强力碾压包合、干燥、粉碎、过筛得到蜂胶包合物；按配比将蜂胶包合物与植物培养基充分混合，即可获得一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物。

一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物抑菌效果持续时间较长，在二星期内多倍体萱草红运染菌苗的成活率达 45% 以上。它能有效减少或防止植物组织培养过程中培养基的微生物污染，使植物组织正常生长发育。本发明的方法制得的含蜂胶抑菌剂植物培养基的组合物，它既保存蜂胶的有效抗菌成份，又增加 β -环状糊精对蜂胶抗菌成分水溶性。此蜂胶包合物可以完全溶解于沸水。

具体实施方式：

实施例 1

(1) 除蜡蜂胶原料 (毛胶) 100g，水浴加热除去蜂蜡，用 200ml 浓度为 95% 乙醇 (v/v) 溶解，过滤，取上清液，再用 1 倍蜂胶沉淀物体积的 95 % 乙醇 (v/v) 提取上清液，合并上清液，弃去残渣，蒸发回收 100ml 乙醇溶剂，得到提纯的 200g 蜂胶乙醇胶状物。

(2) 用得到的蜂胶乙醇胶状物与 β -环状糊精，按重量比为 1:2.7 充分混合，即 200g 蜂胶乙醇胶状物与 540 克 β -环状糊精强力搅拌或碾压包合，热风烘干、粉碎、过筛 (目数为 70—100 目)，即可得到蜂胶包合物干粉 60 克。此蜂胶包合物可以完全溶解于沸水。

实施例 2

(1) 蜂胶乙醇胶状物的制备同实施例 1；

(2)把 2 克的蜂胶包合物与 100 毫升的植物培养基本培养基充分混合, 其余条件同实施例 1, 即可获得一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物。此蜂胶包合物可以完全溶解于沸水。

实施例 3

(1)蜂胶乙醇胶状物的制备同实施例 1;

(2)把 3 克的蜂胶包合物与 100 毫升的植物培养基本培养基充分混合, 其余条件同实施例 1, 即可获得一种含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物。此蜂胶包合物可以完全溶解于沸水。

实施例 4 不同种类抑菌剂和含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物抑菌对比

萱草(*Hemerocallis fulva* L.)是百合科萱草属植物。现代萱草是多倍体的杂交种, 它融合 15 个原生种的性状, 使花色花形极为丰富, 色彩除纯白、纯蓝色外, 几乎包括了太阳光的七彩之色。且现代萱草具耐寒、适应性强、叶丛姿态优美、花期长等优点, 是庭园、花坛的理想花卉。但又因其高度的杂合性, 种子播种繁殖难以保持优良性状。用分株繁殖, 又因萌蘖能力不强, 繁殖系数较低, 也不易推广。如果用组织培养方法来快速繁殖, 则可达到既保持优良性状又大批繁殖之目的, 为多倍体杂种萱草的推广开辟道路。在多倍体红运组织快繁体系中, 有些试管苗的培养基表面有云雾状污染菌生长, 污染菌种类有 2 种为革兰氏阴性杆菌, 1 种为革兰氏阳性杆菌, 这种污染菌降低了组织培养的成苗率。将污染苗用 2%次氯酸钠消毒后接种再不含抑菌剂的培养基上仍有染菌现象, 常用苯甲酸钠和山梨酸钾作为植物培养基的抑菌剂效果较好。本实验处理方法: 采用不同浓度化学抑菌剂和蜂胶包合物配置培养基, 用于栽植用 2%次氯酸钠消毒 5 分钟后的污染苗, 药物实验设计为水空白+MS 为对照、1%—3%蜂胶包合物+MS、2%山梨酸钾+MS 和 1%苯甲酸钠+MS 进行抑菌实验。在超净工作台内, 将染菌苗用无菌水冲洗三遍, 2%次氯酸钠消毒 5 分钟, 再用无菌水从洗三遍, 无菌滤纸吸干水分, 将材料接种在实验用的各种培养基中。2 周后观察结果, 记录, 计算试管苗的成活率。

表 1 不同种类抑菌剂和含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物抑菌对比

种类及浓度 (MS+处理)	接种试管的数量 (1 株苗/试管)	2 周时成活数量 (1 株苗/试管)	成活率 (%)
水空白对照	30	8	27
1%蜂胶包合物	30	14	47
2%蜂胶包合物	30	15	50
3%蜂胶包合物	30	13	43
2‰山梨酸钾	30	18	60
1‰苯甲酸钠	30	15	50

结果表明：2‰山梨酸钾+MS 效果最好，成活率达 60%；1‰苯甲酸钠+MS 次之，成活率达 50%；2%含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物成活率达 50%；1%含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物和 3%含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物的成活率分别为 47%和 43%；水空白对照 MS 成活率仅为 27%；说明蜂胶包合物、山梨酸钾和苯甲酸钠都有明显抑制培养基细菌的作用。实验中未见 1%—3%含蜂胶抑菌剂植物培养基组合物对组培苗生长有不良影响。