

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103125387 A

(43) 申请公布日 2013.06.05

(21) 申请号 201310043169.0

(22) 申请日 2013.02.04

(71) 申请人 南京工业大学大丰海洋产业研究院
地址 224100 江苏省盐城市大丰市大丰港经
济区海融广场西侧研究院过渡大楼
申请人 南京工业大学

(72) 发明人 陈集双 张本厚 贾明亮 胡燕花
金磊磊 丁爱军

(74) 专利代理机构 南京正联知识产权代理有限
公司 32243
代理人 王素琴

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

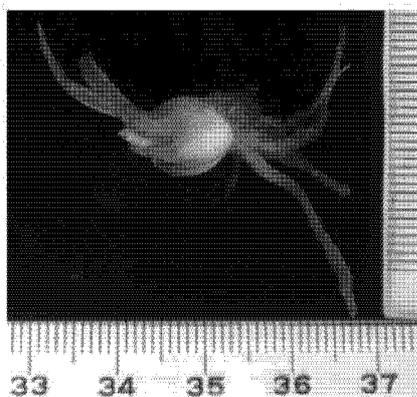
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法

(57) 摘要

本发明提供一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,通过外植体制备、增殖培养、鳞茎形成三个生产步骤完成周期短、成本低、操作简单的百合鳞茎生产。其中,使用间歇浸没植物生物反应器进行增殖培养,在同一个植物生物反应器中完成增殖培养和鳞茎形成两个步骤,培养过程中无需对组培苗进行转移操作,避免了组培苗转移到一个新的环境而出现的调整期,缩短了生产周期。整个培养过程只需要一次接种,不需对组培苗进行转移操作而采用更换培养液,省去了频繁转接和大批量组培瓶的灌装清洗等操作,大大减少了劳动量,降低了生产成本。同传统的固体培养相比减少了继代次数,降低了变异率,且在无菌环境中培养,避免了病毒的交叉感染,鳞茎质量较好。



1. 一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,其特征在于,包括以下生产步骤,
外植体制备:将消毒后的百合鳞片切成大小为 $0.25\sim 4.0\text{cm}^2$ 的小块,将所得百合鳞片的小块接种到固体培养基中,在配方为 $\text{MS}+0.1\sim 0.5\text{mg/L NAA}+0.5\sim 1.5\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的固体培养基中经过 $20\sim 40\text{d}$ 组织培养获得无菌的百合组培苗,作为植物生物反应器培养的外植体;

增殖培养:使用间歇浸没植物生物反应器进行培养,设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 $3\sim 20\text{ min}/1\sim 12\text{h}$,将上一步骤所得外植体以 $10\sim 90$ 个外植体/L的接种密度接种到间歇浸没系统中,在间歇浸没植物生物反应器中倒入增殖培养液,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照时间 14 h/d 、培养温度 $25\pm 3^\circ\text{C}$ 的培养条件进行增殖培养 $25\sim 80\text{d}$;

鳞茎形成:增殖培养结束后,在与增殖培养使用的同一间歇浸没系统中更换为鳞茎诱导培养液,设定间歇浸没系统的浸没频率为 $1\sim 10\text{ min}/1\sim 12\text{h}$ 后,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照 10 h/d 、温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 的培养条件下继续进行培养 $30\sim 80\text{d}$,形成百合鳞茎,完成百合鳞茎的培养。

2. 如权利要求1所述的一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,其特征在于,在所述外置体制备步骤中,将百合鳞片切成大小为 $1.0\sim 2.0\text{cm}^2$ 的小块。

3. 如权利要求1所述的一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,其特征在于,在所述增殖培养步骤中,增殖培养液的配方为 $\text{Ms}+0.01\sim 0.2\text{mg/LNAA}+0.5\sim 2.0\text{mg/L 6-BA}+20\%$ 蔗糖。

4. 如权利要求1-3任一项所述的一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,其特征在于:在所述鳞茎形成步骤中,鳞茎诱导培养液的配方为 $\text{Ms}+0.5\sim 1.5\text{mg/LGA3}+0.1\sim 1.0\text{ mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖。

5. 如权利要求1-3任一项所述的一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,其特征在于:在所述鳞茎形成步骤中,设定浸没频率为 $3\sim 6\text{ min}/6\sim 10\text{h}$ 。

一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物生物技术领域,具体涉及一种利用植物生物反应器进行百合组织培养直接获得百合鳞茎的方法。

背景技术

[0002] 百合(*Lilium spp.*)为百合科百合属多年生球根类花卉,是目前世界上最受欢迎的高档切花之一。除观赏价值外,百合还具有丰富的营养价值与重要的药用价值。其常规繁殖方式为分植小鳞茎,有的种类可用鳞片扦插,但年繁殖率低,数量有限,且百合易受病毒侵染。国内自然繁殖的种球质量普遍不佳,进口的和脱毒种球也不能连年使用,造成百合的国内外市场空缺很大,在鲜切花市场不断走俏。应用植物组培快繁方法在一定程度上解决了百合优质鳞茎短缺的现象,有关百合的快速繁殖技术国内多有报道。但是,应用植物组培的方法生产百合鳞茎,将消耗大量的人力、物力,生产成本居高不下,而且由于传代次数的增多,导致百合的品质严重下降。

[0003] 应用植物生物反应器液体培养系统进行百合鳞茎的生产可以弥补传统方法生产的缺陷,为低成本的生产高质量的百合鳞茎提供了有效的方法。

[0004] 利用间歇浸没培养反应器成功进行其它植物培养的研究已有报道。如专利号为 ZL 200910114406.1 的“利用间歇浸没式间歇浸没培养系统进行甘蔗组织培养快繁”的研究,其对利用间歇浸没培养反应器对三个品种的甘蔗培养进行了介绍,获得了显著效果。但是,上述专利文献中甘蔗培养只产生种苗,不生产甘蔗茎秆和其他产品,且上述文献专利中提及的步骤以及其中涉及到的具体的培养方式和培养条件不能用于百合的培育,而利用植物生物反应器培养方法进行百合鳞茎的生产未见报道和公开应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法解决现有技术中存在的百合鳞茎的生产成本高、年繁殖率低且数量有限、易受病毒侵染的问题。

[0006] 本发明的技术解决方案是:

一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,包括以下生产步骤,

外植体制备:将消毒后的百合鳞片切成大小为 $0.25 \sim 4.0 \text{cm}^2$ 的小块,将所得百合鳞片的小块接种到固体培养基中,在配方为 $\text{MS}+0.1 \sim 0.5 \text{mg/L NAA}+0.5 \sim 1.5 \text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的固体培养基中经过 $20 \sim 40 \text{d}$ 组织培养获得无菌的百合组培苗,作为植物生物反应器培养的外植体;

增殖培养:使用间歇浸没植物生物反应器进行培养,设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 $3 \sim 20 \text{ min}/1 \sim 12 \text{h}$,将上一步骤所得外植体以 $10 \sim 90$ 个外植体/L 的接种密度接种到间歇浸没系统中,在间歇浸没植物生物反应器中倒入增殖培养液,在光照强度 $1500 \sim 1800 \text{ lux}$ 、光照时间 14 h/d 、培养温度 $25 \pm 3^\circ \text{C}$ 的培养条件进行增殖培养 $25 \sim 80 \text{d}$;

鳞茎形成:增殖培养结束后,在与增殖培养使用的同一间歇浸没系统中更换为鳞茎诱

导培养液,设定间歇浸没系统的浸没频率为1~10 min/1~12h后,在光照强度1500~1800 lux、光照10 h/d、温度22±2℃的培养条件下继续进行培养30~80d,形成百合鳞茎,完成百合鳞茎的培养。

[0007] 进一步改进在于:在所述外置体制备步骤中,将百合鳞片切成大小为1.0~2.0cm²的小块。

[0008] 进一步改进在于:在所述增殖培养步骤中,增殖培养液的配方为Ms+0.01~0.2mg/LNAA+0.5~2.0mg/L 6-BA+20%蔗糖。

[0009] 进一步改进在于:在所述鳞茎形成步骤中,鳞茎诱导培养液的配方为Ms+0.5~1.5mg/LGA3+0.1~1.0 mg/L 6-BA+30%蔗糖。

[0010] 进一步改进在于:在所述鳞茎形成步骤中,设定浸没频率为3~6 min/6~10h。

[0011] 本发明一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,通过依次进行的外植体制备、增殖培养、鳞茎形成三个生产步骤完成周期短、成本低、操作简单的百合鳞茎生产。与ZL 200910114406.1的“利用间歇浸没式间歇浸没培养系统进行甘蔗组织培养快繁”相比,本发明是在形成种苗的基础上延伸获得鳞茎,而且在形成鳞茎过程中只需要更换培养液而不需要对组培苗进行转移操作,即一次接种产生鳞茎,因而不仅是培养的参数不同,且培养的效果也完全不一样,且上述专利文献中操作的增殖培养、生根培养和生根苗驯化移栽的步骤也与本发明中涉及到的百合鳞茎的培养具有完全不同的培养思路,上述专利文献中提及的步骤以及其中涉及到的具体的培养方式和培养条件不能用于百合的培育。

[0012] 本发明的有益效果是:本发明一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,具有生产周期短、自动化程度高、一次接种即可获得鳞茎之特点,为百合种苗的生产提供了一种低成本、高效率的新方法。该方法通过外植体制备、增殖培养、鳞茎形成三个生产步骤完成百合鳞茎生产。其中,使用间歇浸没植物生物反应器进行增殖培养。

[0013] (1) 间歇浸没液体培养系统是利用无菌空气产生的压力将液体培养基与植物组培苗间歇的接触,结合了固体培养最大化气体交换和液体培养营养充分利用的优点,百合培养的增殖率是普通固体培养的10~15倍,是液体培养的4~7倍。

[0014] (2) 在同一个植物生物反应器中完成增殖和鳞茎形成培养,整个培养过程无需对组培苗进行转移操作,避免了组培苗转移到一个新的环境而出现的调整期,组培苗缩短生产周期。

[0015] (3) 自动化程度高、劳动量小。由于间歇浸没液体培养系统是半自动化控制,整个培养过程只需要一次接种,不需对组培苗进行转移操作而采用更换培养液,省去了频繁转接和大批量组培瓶的灌装清洗等的操作,大大的减少了劳动量,降低了生产成本。

[0016] (4) 鳞茎质量好,适应性强。同传统的固体培养相比减少了继代次数,降低了变异率。并且在无菌环境中培养,避免了病毒的交叉感染,鳞茎质量较好。

附图说明

[0017] 图1为间歇浸没培养方式增殖得到的百合组培苗。

[0018] 图2为本发明的间歇浸没系统培养获得的百合鳞茎示意图。

[0019] 图3为现有技术中普通固体培养方式增殖得到的百合组培苗。

具体实施方式

[0020] 下面详细说明本发明的优选实施例。

[0021] 一种利用植物组织培养技术生产百合鳞茎的方法,包括以下生产步骤,

外植体制备:将消毒后的百合鳞片切成大小为 $0.25\sim 4.0\text{cm}^2$ 的小块,将所得百合鳞片的小块接种到固体培养基中,在配方为 $\text{MS}+0.1\sim 0.5\text{mg/L NAA}+0.5\sim 1.5\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的固体培养基中经过 $20\sim 40\text{d}$ 组织培养获得无菌的百合组培苗,作为植物生物反应器培养的外植体;

增殖培养:使用间歇浸没植物生物反应器进行培养,设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 $3\sim 20\text{ min}/1\sim 12\text{h}$,将上一步骤所得外植体以 $10\sim 90$ 个外植体/L的接种密度接种到间歇浸没系统中,在间歇浸没植物生物反应器中倒入增殖培养液,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照时间 14 h/d 、培养温度 $25\pm 3^\circ\text{C}$ 的培养条件进行增殖培养 $25\sim 80\text{d}$;

鳞茎形成:增殖培养结束后,在与增殖培养使用的同一间歇浸没系统中更换为鳞茎诱导培养液,设定间歇浸没系统的浸没频率为 $1\sim 10\text{ min}/1\sim 12\text{h}$ 后,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照 10 h/d 、温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 的培养条件下继续进行培养 $30\sim 80\text{d}$,形成百合鳞茎,完成百合鳞茎的培养。

[0022] 实施例一

外植体制备:将百合鳞片用清水清洗后,先用75%的酒精浸泡15s,灭菌水洗掉酒精再用0.1%的升汞浸泡12min,灭菌水清洗升汞后将百合鳞片切成 $1.0\sim 2.0\text{cm}^2$ 小块;将上述百合鳞片的小块接种到配方为 $\text{Ms}+0.1\text{mg/L NAA}+0.5\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的固体培养基中培养25d得到百合组培苗,如图1所示。增殖培养:设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 $6\text{ min}/4\text{h}$,将上述百合组培苗按照40个外植体/L的接种密度接种到间歇浸没培养系统中,在间歇浸没植物生物反应器中倒入配方为 $\text{Ms}+0.02\text{mg/L NAA}+1.0\text{mg/L 6-BA}+20\%$ 蔗糖的增殖培养液,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$,光照 14 h/d ,温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 条件下,培养40d完成增殖培养。鳞茎形成:增殖培养结束后,在与增殖培养使用的同一间歇浸没系统中将增殖培养液更换成配方为 $\text{Ms}+0.5\text{mg/L GA3}+0.1\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的鳞茎形成培养液,重新设定间歇浸没系统的浸没频率为 $3\text{ min}/6\text{h}$,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照 10 h/d 、温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下培养50d,完成鳞茎形成培养,如图2所示。获得鳞茎数为1387个。

[0023] 实施例二

外植体制备:将百合鳞片用清水清洗后,先用75%的酒精浸泡15s,灭菌水洗掉酒精再用0.1%的升汞浸泡12min,灭菌水清洗升汞后将百合鳞片切成 $1.0\sim 2.0\text{cm}^2$ 小块;将上述百合鳞片的小块接种到配方为 $\text{Ms}+0.5\text{mg/L NAA}+1.5\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的固体培养基中培养30d得到百合组培苗。增殖培养:设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 $12\text{ min}/6\text{h}$,将上述百合组培苗按照50个外植体/L的接种密度接种到间歇浸没培养系统中,倒入配方为 $\text{Ms}+0.1\text{mg/L NAA}+1.0\text{mg/L 6-BA}+20\%$ 蔗糖的培养液,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$,光照 14 h/d ,温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 条件下,培养50d完成增殖培养。鳞茎形成:增殖培养结束后,在与增殖培养使用的同一个间歇浸没系统中将增殖培养液更换成配方为 $\text{Ms}+1.5\text{mg/L GA3}+1.0\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的鳞茎形成培养液,重新设定间歇浸没系统的浸没频率为 $6\text{ min}/10\text{h}$,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照 10 h/d 、温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下培养60d,完成鳞茎形成培养。获得鳞茎数为1512个。

[0024] 实施例三

外植体制备:将百合鳞片用清水清洗后,先用 75% 的酒精浸泡 15s,灭菌水洗掉酒精再用 0.1% 的升汞浸泡 12min,灭菌水清洗升汞后将百合鳞片切成 $1.0\sim 2.0\text{cm}^2$ 小块;将上述百合鳞片的小块接种到配方为 $\text{Ms}+0.3\text{mg/L NAA}+1.0\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的固体培养基中培养 27d 得到百合组培苗。增殖培养:设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 9 min/5h,将上述百合组培苗按照 45 个外植体 /L 的接种密度接种到间歇浸没培养系统中,倒入配方为 $\text{Ms}+0.02\text{mg/LNAA}+1.0\text{mg/L 6-BA}+20\%$ 蔗糖的培养液,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$,光照 14 h/d,温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 条件下,培养 45d 完成增殖培养。鳞茎形成:增殖培养结束后,在与增殖培养使用的同一个间歇浸没系统中将增殖培养液更换成配方为 $\text{Ms}+1.0\text{mg/LGA3}+0.5\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的鳞茎形成培养液,重新设定间歇浸没系统的浸没频率为 4 min/8h,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照 10 h/d、温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下培养 55d,完成鳞茎形成培养。获得百合鳞茎数为 1447 个。

[0025] 实施例四

外植体制备:外植体为固体培养继代三次切除较大的叶片的百合组培苗。增殖培养:设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 6 min/4h,将上述百合组培苗按照 40 个外植体 /L 的接种密度接种到间歇浸没培养系统中,倒入配方为 $\text{Ms}+0.02\text{mg/LNAA}+1.0\text{mg/L 6-BA}+20\%$ 蔗糖的培养液,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$,光照 14 h/d,温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 条件下,培养 30d 完成增殖培养。鳞茎形成:增殖培养结束后,在与增殖培养使用的同一个间歇浸没系统中将增殖培养液更换成配方为 $\text{Ms}+0.5\text{mg/LGA3}+0.1\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的鳞茎形成培养液,重新设定间歇浸没系统的浸没频率为 3 min/6h,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照 10 h/d、温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下培养 50d,完成鳞茎形成培养。获得鳞茎数为 1462 个。

[0026] 实施例五

外植体制备:植物反应器增殖培养 20 天后的百合组培苗。增殖培养:设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 6 min/4h,将上述百合组培苗按照 40 个外植体 /L 的接种密度接种到间歇浸没培养系统中,倒入配方为 $\text{Ms}+0.02\text{mg/LNAA}+1.0\text{mg/L 6-BA}+20\%$ 蔗糖的培养液,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$,光照 14 h/d,温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 条件下,培养 30d 完成增殖培养。鳞茎形成:增殖培养结束后,在与增殖培养使用的同一个间歇浸没系统中将增殖培养液更换成配方为 $\text{Ms}+0.5\text{mg/LGA3}+0.1\text{mg/L 6-BA}+30\%$ 蔗糖的鳞茎形成培养液,重新设定间歇浸没系统的浸没频率为 3 min/6h,在光照强度 $1500\sim 1800\text{ lux}$ 、光照 10 h/d、温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下培养 50d,完成鳞茎形成培养。获得鳞茎数为 1543 个。

[0027] 实施例六

外植体制备:同实施例一。

[0028] 增殖培养:间歇浸没培养系统的接种密度为 100 个外植体 /L,其他培养参数同实施例一。

[0029] 鳞茎形成:同实施例一。

[0030] 结果,获得鳞茎数为 1784 个,在培养过程中组培苗和鳞茎拥挤,大量鳞茎出现畸形生长,移栽后成活率不到 60%。

[0031] 实施例七

外植体制备:同实施例一。

[0032] 增殖培养:设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 30 min/1h,其他培养参数的设定同实施例一。

[0033] 结果,在增殖培养 12d 后组培苗出现玻璃化,无法正常生长产生鳞茎。

[0034] 实施例八

外植体制备:同实施例一。

[0035] 增殖培养:设定间歇浸没培养系统的浸没频率为 2 min/12h,其他培养参数的设定同实施例一。

[0036] 结果,培养 3d 后组培苗出现干枯,无法正常生长产生鳞茎。

[0037] 对照实施例

外植体制备:同实施例一。

[0038] 增殖培养:将制备的外植体接种到固体培养基中培养,培养基配方为 Ms+0.02mg/LNAA+1.0mg/L 6-BA+20%蔗糖 +5.5g/L 琼脂,每瓶的接种 5 个外植体。培养时间及环境条件同实施例一。

[0039] 鳞茎形成:将上述增殖培养的组培苗接种到诱导鳞茎形成的固体培养基中,培养基的配方为 Ms+0.5mg/LGA3+0.1mg/L 6-BA+30%蔗糖 +5.5g/L 琼脂。培养时间及环境条件同实施例一。获得鳞茎数为 15 个,如图 3 所示。

[0040] 表 1 实施例一和对照实施例的对比表

	培养方式	每个容器生物量(g)	每个容器鳞茎数(个)	增殖系数	鳞茎直径(mm)
实施例一	间歇浸没培养反应器	1115.62	1387.67	34.69	9.288
对照实施例	普通固体培养	10.47	15.00	3.00	7.965

在各项实施例中,实施例一、实施例二、实施例三、实施例四、实施例五设定的参数值均在本发明的范围内,实施例六、实施例七、实施例八设定的参数是在本发明的范围外,对照实施例为现有技术中的普通固体培养。由实验结果可以,在实施例一、实施例二、实施例三、实施例四、实施例五中百合鳞茎能够正常培养,且增殖率与对照实施例相比较,鳞茎质量与对照实施例相比好,而实施例六、实施例七、实施例八中的鳞茎不能正常生长或无法生

长。

[0041] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

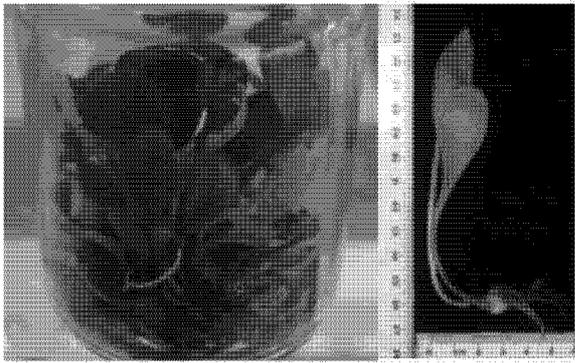


图 1

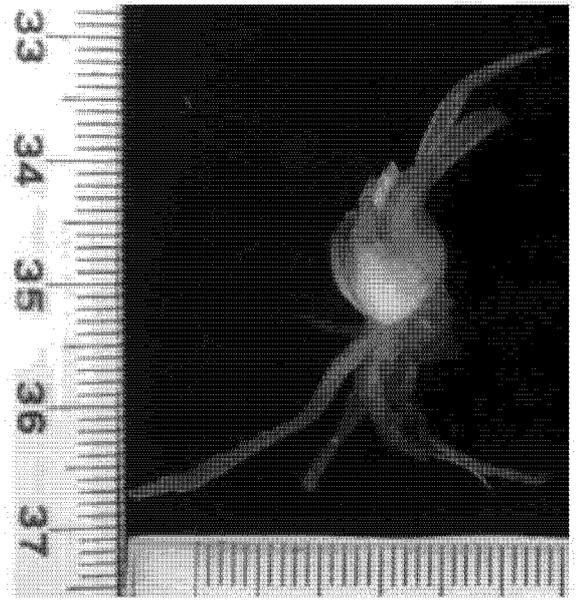


图 2

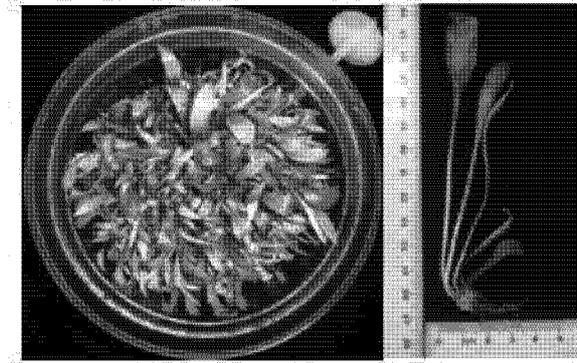


图 3