



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94112881.4

[51]Int.Cl⁶

A01H 4/00

[43]公开日 1995 年 10 月 11 日

[22]申请日 94.11.30

[30]优先权

[32]93.11.30[33]US[31]159,491

[71]申请人 日本烟草产业株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 冈一郎

C·施卢伊斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜 汪 洋

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 生产马铃薯微块茎的方法

[57]摘要

本发明提供了一种通过组织培养生产马铃薯微块茎的改进方法。其改进包含在为了生成微块茎而在黑暗中培养植株之前将马铃薯植株放在高含糖量,即 8%(W/V)的培养基中在光照下培养大约 1~约 4 周时间。

权利要求书

1. 一种生产马铃薯微块茎的方法，其特征在于，所述改进包含在为了形成所述微块茎而在黑暗中培养所述植株之前，将马铃薯植株放在高含糖量的培养基中在周期性光照状态下培养大约1～约4周。

2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所说的糖是选自蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖中的至少一种。

3. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，所说的糖是蔗糖。

4. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所说高含糖量是指含6～10%W/V的糖。

5. 如权利要求4所述的方法，其特征在于，所说高含糖量是指含8%W/V的蔗糖。

6. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述培养基为选自含8%W/V蔗糖，pH 5.8的Murashige 和 Skoog氏培养基，含8%W/V蔗糖的White 氏培养基和含8%W/V蔗糖的Linsmayer 和 Skoog 氏培养基中的一种。

7. 如权利要求6所述的方法，其特征在于，所述培养基是含8%W/V蔗糖，pH 5.8的Murashige 和Skoog 氏培养基。

8. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述周期性光照状态包含每日光照所述马铃薯植株达约6～约12小时。

9. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述周期性光照状态包含每日光照所述马铃薯植株达约12～约24小时。

10. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，将所述马铃薯植

株在所述周期性光照状态下培养约1周时间，以生成小微块茎。

1 1 . 如权利要求9所述的方法，其特征在于，将所述马铃薯植株在所述周期性光照状态下培养约2周，以生成大微块茎。

1 2 . 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述光照下的培养包含在 $18 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 和 $3,000 \sim 10,000$ 勒光照条件下，通气速度为 $0.02 \sim 0.5$ 升/升·分的液体通气培养。

1 3 . 如权利要求1 2所述的方法，其特征在于，所述光照下的培养包含在 $18 \sim 22^{\circ}\text{C}$ 和 $4,000 \sim 6,000$ 勒光照条件下，通气速度为 $0.2 \sim 0.4$ 升/升·分的液体通气培养。

1 4 . 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述在黑暗中培养所述马铃薯植株的步骤进行 $3 \sim 10$ 周时间。

1 5 . 如权利要求1 4所述的方法，其特征在于，所述培养包含在 $18 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 、通气速度为 $0.02 \sim 0.5$ 升/升·分条件下的液体通气培养。

1 6 . 如权利要求1 5所述的方法，其特征在于，所述培养包含在 $18 \sim 22^{\circ}\text{C}$ 、通气速度为 $0.2 \sim 0.4$ 升/升·分条件下的液体通气培养。

1 7 . 一种生产马铃薯微块茎的方法，该方法包含以下步骤：

在高含糖量的培养基中，在周期性光照状态下将马铃薯植株培养约1～约4周；和

将上述马铃薯植株在黑暗中培养，直至微块茎生成。

说明书

生产马铃薯微块茎的方法

本发明涉及一种生产马铃薯微块茎的方法，通过这种方法能有效地生产出可直接在大田中种植的大微块茎。

在实践中被普遍采用的第一种生产马铃薯微块茎的方法，包括生长无病毒植株，然后形成微块茎和生长微块茎等步骤。

在日本特许公开专利申请No. 3 - 35738 中描述了第二种方法。在这份公开的专利申请中公开的一种生产马铃薯微块茎的方法，包括以下三个步骤：

(A) 组织培养马铃薯植物，以生产出具有茎和叶的无病毒植株（光照：1,000—100,000勒，6—24小时/天，温度：20—30℃）；

(B) 上述植株在低温（10—30℃）、短日长（1,000—100,000勒，12小时或更短）条件下培养，从而诱导出顶芽或腋芽被转变为微块茎的状态；

(C) 在上一步骤中被诱导的顶芽或腋芽，在黑暗中的低温（10—30℃）条件下转变为微块茎。

在第二种方法中，将一个在低温和短日长条件下诱导出顶芽和腋芽被转变为微块茎的状态的步骤插在第一种方法的两个步骤之间。这一步骤的插入或许是考虑到了马铃薯微块茎的形成是在低温和短日长条件下诱导的这一马铃薯的普通特性，这一特性是公知的，而且在所述文献中有描述。

因此，采用第二种方法通过三个步骤即可有效地生产出微块茎，即，步骤A：无病毒植株的生长；步骤B：顶芽和腋芽被转变为微块茎的状态的诱导；以及步骤C：微块茎的形成和生长。

第二种方法的另一个特有特征是，步骤C是在低温下在黑暗中进行的。一般，微块茎的形成和生长是在黑暗中或在短日长条件下进行的。尽管低温条件是不可缺少的原因尚不清楚，不过也许是因为马铃薯微块茎的形成在低温下会受到促进。

似乎向微块茎的转化确实受到了促进，并且通过在茎和叶生长步骤之后的短日长处理，使形成的微块茎数增加了。然而，由于因为以下原因使生产可直接在大田里种植的大微块茎（不小于0.5 g）的效率低，所以该方法是不实用的。

在第二种方法中，在植株生长步骤之后，在低温和短日长条件下采用与植株生长步骤中所用相同的培养基诱导微块茎。这种培养基具有低含糖量，在用具有高含糖量的培养基换下该培养基之后，马上将马铃薯植株放在黑暗中培养，以形成微块茎。由于是在茎和叶生长活跃阶段把马铃薯植株在低温和短日长条件下放在低含糖量培养基上培养，因此，植株生长是不好的，而且，即使微块茎总数增加了，大微块茎数却极少。

因为植株生长和向微块茎转化的状态的诱导都是用琼脂培养基在小容器（0.3~0.6升）中进行的，植株的生长率要低于用大容器通过液体通气培养进行培养时的生长率。因此，用这种方法是无法实现大微块茎的实际生产的。

在日本特许公开专利申请No. 3 - 35738（第二种方法）中，步骤B和步骤C的条件分别为“在低温短日长条件下”和“在黑暗中低

温条件下”。因此，在这两步骤中，低温是不可缺少的。不过，在两个例子中所采用的温度条件，是马铃薯组织培养中普遍采用的普通温度条件。该温度条件还处于微块茎生产中所采用的已知范围之内。

本发明的一个目的是提供一种生产马铃薯微块茎的方法，通过这种方法可有效地生产出能直接在大田中种植的大微块茎。这一目的是通过将马铃薯植株放在含有高含糖量的培养基上，在光照条件下培养大约1—约4周，然后再在黑暗中培养上述植株以生产出所述微块茎而实现的。

从下面所提供的详细说明中可以明显看出本发明的其它适用范围。不过，应当明白，下面的详细说明以及在说明本发明的优选实施方案时所举具体例子只是用于说明的，因为对于本领域技术人员来说，通过下面的详细说明在本发明精神实质和范围之内的各种改变和改进是显而易见的。

提供下面的详细说明，有助于本领域技术人员实施本发明。尽管如此，也不能认为下面的详细说明是对本发明不适当的限定，因为在这里所要讨论的实施方案的改进和改变，可以由本领域普通技术人员在不违背本发明的发现的精神实质或范围的条件下实现。

下面将要用到的“日长”一词，包括短日长或长日长。

“短日长”优选指在24小时的生长周期内，光照时间约为6～约12小时，更优选约7～约10小时，最优选约8小时。

“长日长”优选指在24小时的生长周期内，光照时间约为12～约24小时，更优选约14～约20小时，最优选约16小时。

步骤(1)：生长植物

将基本上是通过Hussey等人的方法(1981, Ann. Bot. 48 : 787

- 796) 生长出的马铃薯无病毒小植株切成带节的切段，每一切段含有一个节（或切成含有2个或多个节的切段），每个切段上都有腋芽和叶子。所述腋芽长成植株。将所得到的带节的切段放入列于表1中的容器中，在 $18 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ，优选 $18 \sim 22^{\circ}\text{C}$ 的温度下，和以3,000—10,000勒，优选4,000—6,000勒的光照每天照射12—24小时（即：长日长）的条件下，通过液体通气培养生长植株。培养基可以是Murashige & Skoog氏培养基（Murashige等，1962, *Physiol. Plant.* 15 : 473 - 497，以下称之为“MS培养基”），它含有2%（W/V）的蔗糖，pH5.8。该培养基在下面被称作“植物生长培养基”。还可用“White氏培养基”（White, 1963, *The Cultivation of Animal and Plant Cells*）、“Linsmayer和Skoog氏培养基”（Linsmayer和Skoog, 1965, *Physiol. Plant.* 18）以及其它标准的植物组织培养基代替“MS培养基”。至于培养基中的糖（碳源），也可用葡萄糖、果糖和麦芽糖等代替蔗糖。糖的浓度可在0.5—5%范围之内，优选为2—3%，pH值可在4—8范围内，优选为5.5—6.5。

所培养的带节切段（外殖体）的数量、培养基的量以及每容器的通气速度因表1中所列容器的大小而异。每升培养基中外殖体的数量可以为1—30个，优选10—20个。每1升容器中培养基的体积可为0.1—0.5升，优选0.2—0.3升。通气速度可为0.02—0.5升/升·分，优选0.2—0.4升/升·分。

表 1

容器体积	放入一个容器里的 带节切段数	培养基量 (L)	通气速度 (L/ 分钟)	容器尺寸 直径 高度	供货商
2L 4L	8 14-16	0.6 - 0.7 1.0	0.35-0.4 0.7-0.8	13cm 15cm 18cm 22cm	* *

*: Carolina 生物用品公司

空气是从所述容器底部吹进液体培养基的。

从培养开始的 3 - 6 周内，植株通常生长至约占容器高度 80 % 的高度。

步骤（2）：其中芽转变为微块茎的状态的诱导

在上述步骤中，当植株高度达到容器高度的 80 % 左右时（如果植株高度至少为容器高度的约 50 % 就不会出问题），把残余的培养基弃掉，并按表 1 所列的量将含有 6 - 10 %（W/V）糖、优选 7 - 9 %（W/V）糖、特别是 8 %（W/V）糖的培养基（以下称为“微块茎形成培养基”）加入容器中。可在这一步骤中使用的糖类包括蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖。所述培养基可以是在上述步骤（1）中提到的培养基中的任一种。随后，在长日长或短日长条件下将植株培养 1 - 4 周。如果想获得一些小微块茎，将植株在短日长条件下培养约 1 周；如果想获得大微块茎，将植株在长日长条件下培养约 2 周。光照强度、温度、培养基体积以及通气速度与上述植株生长步骤（1）中的相同。

步骤（3）：微块茎的形成和生长

在上述步骤（2）之后，在与步骤（2）相同条件下把植株培养 3 - 10 周，优选 5 - 9 周，所不同的是植株是在黑暗中培养，并收获微块茎。

在采用短日长的方法中，从在黑暗中培养开始的几天前或几天后即可观察到微块茎的形成。在采用长日长的方法中，是从在黑暗中培养开始的 1 - 2 周后观察到微块茎的形成的。在从在黑暗中培养开始的 4 - 5 周内，每个微块茎都显著生长，随后生长缓慢。尽管在从在黑暗中培养开始约 5 周之后即可收获微块茎，但为了得到成熟的微块

茎，最好是在至少有一部分茎和叶，开始衰老之后再收获微块茎。

本发明方法的一个特有特征是，在光照条件下使植株有效地吸收具有高含糖量的培养基，以便充分吸取养分并将其储存于茎和叶中，从而在随后的黑暗步骤中有效地生产出微块茎。

在上述第二种常规方法中，仅考虑到微块茎的形成是受“低温条件和在短日长条件”的促进这一事实。其结果是，在生长植株的步骤之后，向微块茎的转变是“在低温和短日长条件下”诱导的，然后用具有高蔗糖含量的培养基取代所述培养基，接着通过在黑暗中培养植株形成并生长微块茎。因此，第二种常规方法只考虑到在短日长条件下诱导微块茎的形成，而没有想到促进植株生长的主意。

在第一和第二种常规方法中，在用用以形成微块茎的高含糖量的培养基取代前面所用培养基之后，立即将植株放在黑暗中培养，以形成微块茎。然而，在黑暗中，植株对培养基的吸收放慢，因此，富含营养素的培养基不能被植株有效地吸收。

本发明的方法克服了这些缺陷。尽管本发明的方法与第二种常规方法一样，也包括三个步骤，但其第二步不仅仅是在短日长条件下诱导微块茎的形成。在本发明方法的第二个步骤中，在用具有高含糖量培养基取代了前面的培养基之后将植株在光照条件下培养1—4周，以使植株有效地吸收具有高养分含量的培养基。当在第二个步骤中在茎和叶里充分地储存了养分之后，再把植株放在黑暗中培养，以形成微块茎。因为大量养分被储存在茎和叶中，所以可有效地形成微块茎。

也就是说，在于黑暗中（在此条件下养分的吸收缓慢）培养植株之前，在光照条件下尽可能使用于形成和生长微块茎的能量储存于茎和叶中，然后用所储存的能量于黑暗中使微块茎有效地形成并生长。

本发明的效果：提高每个容器中的微块茎总数和提高大微块茎数。

通过本发明方法生产微块茎的效率高于第一种和第二种常规方法的生产效率（见表 2），在常规方法中，是在短日长处理后用具有高蔗糖含量的培养基取代前面的培养基，然后再在黑暗中形成微块茎的。

尽管包括重量不超过 0.1 g 的小微块茎在内的微块茎总数在第二种常规方法中比在第一种常规方法中得到的多，但是在第二种常规方法中所得到的重量不低于 0.1 g 的微块茎数却与第一种常规方法中所得到的大体相同，而且第二种常规方法中所得到的重量不低于 0.5 g 的微块茎数明显少于第一种常规方法中所得到的。因此，第二种常规方法并不是有效的，因为需要的是重量不低于 0.5 g 的微块茎。如果微块茎的重量不低于 0.5 g，便可将其直接种植在大田里并在那里生长。如果把重量低于 0.5 g 的微块茎直接种植在大田中，其植株的生长是缓慢的。

根据本发明的一个实施方案，其特征在于，在更换培养基之后实施 8 小时的日长处理，重量不低于 0.1 g 的微块茎的生产效率远高于第一和第二种常规方法中所获得的，而且微块茎的总数也有所提高。此外，重量不低于 0.5 g 的微块茎数也较多。

根据本发明的一个实施方案，其特征在于，在更换培养基之后实施 16 小时的日长处理，所得重量不低于 0.5 g 或不低于 1 g 的大微块茎数远高于第一和第二种常规方法中所获得的。而且，重量不低于 0.1 g 的微块茎数也较多。

表 2：更换培养基之前和之后的光照效果；品种：Russet Burbank

方 法	微块茎数 (微块茎数 容器)			重量 (g/容器)	容器数
	0.1 g 或更重	0.5 g 或更重	1g 或更重		
更换培养基之后， 8 小时 / 天光照	84.4**	29.3	12.5	46.3	10
更换培养基之后， 1 6 小时 / 天光照	43.0	29.5*	19.5*	50.8	2
第二种常规方法	40.9	10.9	4.0	17.1	7
第一种常规方法 (对照)	41.6	17.8	8.8	28.8	8

*: 与对照组相比，差异的显著性不低于 5 %。

**：与对照组相比，差异的显著性不低于 1 %。

成熟微块茎的生产

在更换培养基之后，通过在光照（5,000勒）条件下培养植株，不仅能使茎和叶很好发育并提高生产的微块茎数，而且培养基也能被植株迅速吸收。因此，在微块茎生长步骤的后期阶段，叶和茎变黄并开始衰老的时间较早，这样，便获得了适于储存和在大田中种植的成熟的优质微块茎。

实施例 1

更换培养基之前和之后日长状况对微块茎生产的影响

将基本上是用Hussey等人的方法（1981, Ann. Bot. 48 : 787 - 796）生长的无病毒植株（品种：Russet Burbank, 生长保存在Tissue - Grown公司的植株）切成带节的切段，每个切段含有一个节，每一个内部体积为2升、直径1.3 cm、高1.8 cm、装有0.6升植物生长培养基的玻璃容器中放有8个带节的切段。这种玻璃容器是从Carolina生物用品公司购买的，以下称之为“2 L - 容器”。将植物在20℃，在5,000勒光照16小时/天，通气速度0.35-0.4升/分的条件下培养。

从开始培养起，大约4周以后植株长至平均长度为1.5 cm。

然后，实施下列步骤a)至d)中的一步：

a)在上述条件下将植物培养4周以后，除去残余的培养基并代之以0.7升微块茎形成培养基，并在20℃、以5,000勒的光每日照射8小时和通气速度为0.35-0.4升/分的条件下，再继续培养18天（本发明）。

b)在上述条件下将植物培养4周以后，象在上述步骤a)中一样更换培养基，并在20℃、以5,000勒的光每日照射16小时和通

气速度为0.35—0.4升/分的条件下，再继续培养2—5天（本发明）。

c)在上述条件下将植物培养4周以后，在相同条件下将培养再继续1—7天，只是日长被改变为8小时。此后，除去残余的培养基并加入0.7升微块茎形成培养基（第二种常规方法）。

d)在上述条件下将培养继续7周，然后更换培养基（第一种常规方法，对照）。

在经过步骤a)至d)中之一以后，将植株放在黑暗中，在20℃和通气速度为0.35—0.4升/分的条件下培养以形成微块茎。在从在黑暗中培养开始的第9周收获微块茎。

结果见上述表2。与第一种常规方法（对照）相比，采用步骤a)的方法（即：更换培养基以后光照为8小时/天）所获的重量不低于0.1g的微块茎数和重量不低于0.5g的微块茎数要多得多。

采用步骤b)的方法（即：更换培养基之后光照为16小时/天），尽管所获重量不低于0.1g的微块茎数与用第一种常规方法（对照）所获结果没有太大区别，但所获重量不低于0.5g和不低于1g的大微块茎数却比上述常规方法多得多。因此，在更换培养基之后在光照下培养能很有效地生产微块茎。

另一方面，通过采用了步骤c)的第二种常规方法（即：更换培养基之前光照为8小时/天），尽管产生了很多（未给出有关数据）重量低于0.1g的小微块茎，但重量不低于0.1g的微块茎数与用第一种常规方法的大致相同，而且，重量不低于0.5g的微块茎数则明显少于用第一种常规方法所得结果。因此，与第一种常规方法（对照）相比，第二种常规方法并没有更好的效果。

实施例 2

将来自马铃薯无病毒小植株（品种：Russet Burbank）的带节的切段放置在容器中并在与实施例 1 相同条件下使植物生长 4 周。然后用微块茎形成培养基更换前面的培养基。此后，实施下列步骤 a）至 d）中的一步：

a）将植株在 8 小时日长条件下培养 1 周，然后在黑暗中培养，以生成微块茎（本发明）。

b）将植株在 8 小时日长条件下培养 2 周，然后在黑暗中培养，以形成微块茎（本发明）。

c）将植株在 16 小时日长条件下培养 2 周，然后在黑暗中培养，以形成微块茎（本发明）。

d）在更换培养基以后，立即将植株放在黑暗中培养（第一种常规方法，对照）。

在从更换培养基起的第 9 周收获微块茎。

在该实施例中，除上述 2 L - 容器之外，还将内部体积为约 4 升、直径 15 cm、高 22 cm（从 Carolina 生物用品公司购买，以下称之为“4 L - 容器”）的玻璃容器用于某些实验组中。在 4 L - 容器里的培养条件与在 2 L - 容器中的相同，所不同的是放入 4 L - 容器里的切段数为 16 个，通气速度为 0.7 - 0.8 升/分，培养基（茎和叶生长培养基和微块茎形成培养基）的量为 1 升/容器。

结果列于表 3 中。与在实施例 1 中的情形一样，通过 8 小时的日长处理，重量不低于 0.1 g 的微块茎数得以增加；在 16 小时的日长处理中，重量不低于 0.5 g 和不低于 1 g 的微块茎数得以增加。

在本发明的方法中，在培养期间或收获以后观察到以下结果：

(i) 植株在于黑暗中培养之前有较多的茎和叶，每个叶片都较厚同时也略小，茎和叶的质量也比在第二种常规方法中长的大。

(ii) 在采用 8 小时日长的本发明的方法中，在开始在黑暗中培养以后，微块茎的形成比在第二种常规方法中快，而且在从在黑暗中培养开始起的几天之内就观察到了微块茎的形成。

表 3：在更换培养基之前和之后的光照效果；品种：Russet Burbank

容器体积	方 法	微块茎数 (微块茎数 / 容器) 0.1 g 或更重 0.5 g 或更重 1 g 或更重			重量 (g/ 容器)	容器数
2L	8 小时 - 1 周	80.3**	27.5	15.5	54.7	6
2L	8 小时 - 2 周	75.9**	32.4**	18.6	55.1	7
2L	1 6 小时 - 2 周	65.8**	40.8**	26.2**	65.8	6
2L	第一种常规方法 (对照)	45.1	23.3	16.1	51.3	7
4L	8 小时 - 1 周	121.4**	46.4	31.0	94.2	5
4L	第一种常规方法 (对照)	91.2	42.0	29.0	94.4	6

**：与对照组相比，差异的显著性不低于 1 %。

另一方面，在采用 16 小时日长的本发明的方法中，与在第一种常规方法（对照）中的情况一样，微块茎的形成是从开始在黑暗中培养后大约 1 周的时候观察到的。不过，随后的微块茎生长速度比在第一种常规方法中的快。

（iii）在采用 8 小时日长或 16 小时日长的方法中，在微块茎形成阶段的后期，茎和叶老化的进展比在第一种常规方法（对照）中的快，尽管事实上将植株转移到黑暗中的时间比在第一种常规方法中的晚，这样便得到了成熟的优质微块茎。这一点在采用 16 小时日长的方法中比在采用 8 小时日长的方法中表现得更为突出。

实施例 3

采用培养的马铃薯小植株（品种：Lemhi Russet, 生长保存在 Tissue - Grown 公司的植物），象在实施例 2 中一样检测更换培养基之后 8 小时日长的效果。

正如从表 4 中所示结果可以看出的那样，所生产出的微块茎数比第一种常规方法中的（对照）多。

表 4：更换培养基之前和之后的光照效果

容器体积	处 理	微块茎数 (微块茎数 / 容器)			重量 (g/ 容器)	容器数
		0.1 g 或更重	0.5 g 或更重	1 g 或更重		
2L	8 小时 - 1 周	32.3	24.2*	16.2*	56.5	6
2L	第一种常规方法 (对照)	24.8	16.6	12.2	53.6	5

*: 与对照组相比, 差异的显著性不低于 5 %。

对本发明的进行了以上描述，但是很明显，同样的方法可以有許多变化形式。这种变化是不能被视为超出了本发明的精神实质和范围的，所有此类改进只要在本领域技术人员看来是显而易见的，都应被视为包括在下面未决权利要求书的范围内。