



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105210866 B

(45)授权公告日 2017.09.26

(21)申请号 201510632873.9

审查员 荆丹丹

(22)申请日 2015.09.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105210866 A

(43)申请公布日 2016.01.06

(73)专利权人 中国科学院植物研究所

地址 100093 北京市海淀区香山南辛村20  
号中国科学院植物研究所

(72)发明人 石雷 李杨 柴敏

(74)专利代理机构 北京智为时代知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11498

代理人 王加岭

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种间歇浸没式兰科植物类原球茎增殖快  
繁方法

(57)摘要

本发明公开了一种间歇浸没式兰科植物类原球茎增殖快繁方法,其包括如下步骤:将外植体进行无菌培养,诱导获得兰科植物类原球茎(PLB);2)将步骤1)获得的PLB置于连通器式间歇式植物组织培养装置内进行间歇浸没式培养;本发明优点:培养空间利用率高且利于培养气体成分交换,从而提高培养物质量与繁殖系数,适宜大规模生产;培养装置及配件,易于整体消毒灭菌,培养过程全封闭,污染机率小;结构简单紧凑,耗能低,节约了培养空间,降低了组培成本;减化整体组织培养过程中组培苗的转移继代操作,节省了人工与生产成本。

1. 一种间歇浸没式兰科植物类原球茎增殖快繁方法,其包括如下步骤:

1) 将外植体进行无菌培养,诱导获得兰科植物类原球茎PLB;

2) 将步骤1)获得的PLB置于连通器式间歇式植物组织培养装置内进行间歇浸没式培养;

所述的连通器式间歇式植物组织培养装置包括培养容器装置、载物构件和运输配件,所述的培养容器装置包括容器主体以及通过螺纹啮合的密封盖体;所述密封盖体顶部设有气体交换的通孔;所述容器主体侧壁的一端其底部与顶部均各设一外伸开孔;所述载物构件包括载物筛盘以及固定框架,单个载物筛盘通过多个摞叠置于固定框架内,而固定框架再搁置于所述容器主体内;所述的运输配件包括硅胶软管、蠕动泵和储液容器,通过两条硅胶软管与所述的容器主体、蠕动泵、储液容器相连接,所述固定框架包括空心圆盘底座、垂直焊接于圆盘直径两边的固定杆和连接固定杆的提手;所述的空心圆盘底座包括空心圆环以及由空心圆环圆心辐射出三条两两角度为120度且与空心圆环相接的焊接杆,且焊接杆连接于空心圆环的位置再垂直向下延伸出支腿,

其中,所述连通器式间歇式植物组织培养装置使用前,整体或各个部件经高温高压灭菌,将兰科植物的无菌PLB平铺于灭菌后的载物筛盘上,每个载物筛盘放置100-150个PLB,将多个装有PLB的载物筛盘摞叠并置于固定框架内,再将其放入容器主体内,使用盖体密封。

2. 如权利要求1所述的兰科植物类原球茎增殖快繁方法,其特征在于,所述通孔的向下延伸管内装有杀菌纤维团和微孔滤膜,底部由不封口的螺纹塞固定。

3. 如权利要求1所述的兰科植物类原球茎增殖快繁方法,其特征在于,两条硅胶软管使所述的容器主体与储液容器相连接,其中,第一条硅胶软管一端与容器主体底部外伸开孔相连,另一端与储液容器下部开口相连;第二条硅胶软管一端与容器主体顶部外伸开孔相连,另一端与储液容器上部开口相连;所述第一条硅胶软管嵌入蠕动泵。

4. 如权利要求3所述的兰科植物类原球茎增殖快繁方法,其特征在于,所述储液容器还设置有液体培养基注入口。

5. 如权利要求1所述的兰科植物类原球茎增殖快繁方法,其特征在于,所述培养容器装置整体为透明可高压灭菌PC材质。

6. 如权利要求1所述的兰科植物类原球茎增殖快繁方法,其特征在于,每培养5-10天,更新储液容器内的液体培养基。

## 一种间歇浸没式兰科植物类原球茎增殖快繁方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物组织培养技术领域,涉及一种兰花类原球茎(Protocorm-like Body,PLB)的增殖和再生的方法。

### 背景技术

[0002] 植物组织培养技术,具有繁殖数量多且快速、实验条件易控制、可连续生产、生产效率高等优点,广泛应用于作物育种及种质资源保存以及花卉、果树、蔬菜、林木及中草药的脱毒苗生产与快繁无性繁殖等方面,例如百合脱毒籽球的无性快速繁殖。

[0003] 传统的固体或半固体组织培养方式需要耗费大量的琼脂,并且在灌装及清洗时需处理大量容器,故耗费大量劳动力,导致生产成本居高不下。

[0004] 目前国内外设计发明了一些植物组织间歇浸没式培养装置,其优势:一方面间歇式浸没培养方式使气体交换充分,氧气供应充足,降低了普通液体培养易产生畸形苗与玻璃化苗的机率,从而提高了培养质量与繁殖效率,另外,间歇式浸没培养方式利用自动化调控元件,辅助组织培养过程,减少了劳动密度,降低培养成本。但是,这类装置通常设备庞大,不易拆卸或移动,且控制元件复杂,维护成本较高,而且它们也不易于简便的无菌人工接种操作以及高效的装置整体清洗以及灭菌处理。

[0005] 目前国内关于间歇浸没培养兰花PLB的报道极少,文心兰组培体系的优化及其圆球茎在生物反应器内培养的研究(杨金凤,硕士论文)对比了固体培养,液体振荡培养,5L气球型生物反应器全浸没培养及间歇浸没培养对圆球茎干鲜重增加及增殖系数的作用,发现生物反应器效果最好,其次液体振荡培养,最后是固体培养。专利号为CN 101768566A公开了一种铁皮石斛的间歇式发酵培养方法,但是两项研究均未对最为重要的间歇浸没培养装置进行介绍和改进,而该装置的大小形状及植物材料的放置方式均会对外植体的增殖效率产生重大影响。

### 发明内容

[0006] 为了解决上述问题,本发明提供一种间歇浸没式兰科植物类原球茎增殖快繁方法。

[0007] 本发明提供一种间歇浸没式兰科植物类原球茎增殖快繁方法,其包括如下步骤:

[0008] 1) 将外植体进行无菌培养,诱导获得兰科植物类原球茎(PLB);

[0009] 2) 将步骤1)获得的PLB置于连通器式间歇式植物组织培养装置内进行间歇浸没式培养;

[0010] 所述的连通器式间歇式植物组织培养装置包括培养容器装置、载物构件和运输配件,所述的培养容器装置包括容器主体以及通过螺纹啮合的密封盖体;所述容器密封盖体顶部设有气体交换的通孔;所述容器主体侧壁的一端其底部与顶部均各设一外伸开孔;所述载物构件包括载物筛盘以及固定框架,单个载物筛盘通过多个摞叠置于固定框架内,而固定框架再搁置于所述培养容器内;所述的运输配件包括硅胶软管、蠕动泵和储液容器,通

过两条硅胶软管与所述的培养容器、蠕动泵、储液容器相连接。

[0011] 其中,所述通孔的向下延伸管内装有杀菌纤维团和微孔滤膜,底部由不封口的螺纹塞固定。

[0012] 其中,所述固定框架包括空心圆盘底座、垂直焊接于圆盘直径两边的固定杆和连接固定杆的提手;所述空心圆盘底座包括空心圆环以及由空心圆环圆心辐射出三条两两角度为120度且与空心圆环相接的焊接杆,且焊接杆连接于空心圆环的位置再垂直向下延伸出支腿。

[0013] 其中,两条硅胶软管使所述的容器主体与储液容器相连接,其中,第一条硅胶软管一端与容器主体底部外伸开孔相连,另一端与储液容器下部开口相连;第二条硅胶软管一端与容器主体顶部外伸开孔相连,另一端与储液容器上部开口相连;所述第一条硅胶软管嵌入蠕动泵。

[0014] 其中,所述储液容器还设置有液体培养基注入口。所述的主入口还设置有密封盖。

[0015] 其中,所述培养容器装置整体为透明可高压灭菌PC材质。

[0016] 其中,所述连通器式间歇式植物组织培养装置使用前,整体或各个部件经高温高压灭菌,将兰科植物的无菌PLB平铺于灭菌后的载物筛盘上,每个载物筛盘放置100-150个PLB,将多个装有PLB的载物筛盘摞叠并置于固定框架内,再将其放入培养容器内,使用盖体密封。

[0017] 在本发明一个实施方案中,设置间歇式培养的程序,分别设为早上9-10点,下午15-17点和晚上21-22点各1个小时,蠕动泵会在设定时间内将储液袋内的培养基推入与排出培养容器主体。

[0018] 其中,每培养5-10天,更新储液溶液内的液体培养基。

[0019] 在本发明一个实施方案中,所述的液体培养基为可将兰科植物PLB进行增殖的液体培养基。本领域技术人员可根据所培养的兰科植物的种类,选择适合该物种的增殖液体培养基。

[0020] 本发明优点:培养空间利用率高且利于培养气体成分交换,从而提高培养物质量与繁殖系数,适宜大规模生产;培养装置及配件,易于整体消毒灭菌,培养过程全封闭,污染机率小;结构简单紧凑,耗能低,节约了培养空间,降低了组培成本。兰科植物类原球茎为分化能力非常强的胚性组织,任意方向均有增殖和分化能力,于液体培养基中间歇浸没培养更有利于其各个表面的对培养基中营养成分的快速吸收,同时能保证氧气供给,因此该方法能大大提高PLB的培养效率。

[0021] 若按每个载物筛盘放置100-150个PLB进行培养,每隔4周进行一次切割,扣除损耗每个PLB能切割为3-4个PLB,即增殖3-4倍。此培养容器若摞叠9层载物筛盘,单个培养容器经过4周可使900-1350个GGB增殖到3000-5000个PLB,大大提高了PLB增殖效率。

## 附图说明

[0022] 图1所示为本发明连通器式间歇式植物组织培养装置示意图。

[0023] 图2所示为本发明连通器式间歇式植物组织培养装置中的载物构件示意图。

## 具体实施方式

[0024] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0025] 结合附图1-2对本发明的连通器式间歇式植物组织培养装置进行详细说明。

[0026] 本发明的连通器式间歇式植物组织培养装置包括培养容器装置、载物构件和运输配件。所述的培养容器装置整体为透明可灭菌PC材质,包括容器主体1以及通过螺纹啮合的密封盖体2;其中所述容器主体为圆柱形腔体,其侧壁的一端顶部与底部均各设一外伸开孔3和4;所述密封盖体其顶部设有气体交换的通孔5,其中通孔5的向下延伸管内装有杀菌纤维团和微孔滤膜,底部由不封口的螺纹塞固定。

[0027] 所述的载物构件放置于所述培养容器内,包括可摺叠的单个圆柱形不锈钢载物筛盘8以及承载载物筛盘的不锈钢固定框架9;所述的载物筛盘8底壁与侧壁均由筛网构成,可多个摺叠置于固定框架9内;所述固定框架包括空心圆盘底座、垂直焊接于圆盘直径两边的固定杆902和连接固定杆的提手903;所述空心圆盘底座包括空心圆环901以及由空心圆环901圆心辐射出三条两两角度为120度且与空心圆环901相接的焊接杆904,且焊接杆904连接于空心圆环901的位置再垂直向下延伸出支腿905。

[0028] 所述运输配件包括两条耐高温硅胶软管、蠕动泵以及非PVC复合膜圆柱形储液容器6;其中通过两条硅胶软管使所述的容器主体1与储液容器6相连接,所述的第一条硅胶软管7一端与容器主体1顶部外伸开孔4相连,另一端与储液容器开口10相连。此开口主要调节培养容器与储液容器之间气体的交换,保证培养过程气体的循环流通。所述第二条硅胶软管11一端与容器主体1底部外伸开孔3相连,另一端与储液容器开口14相连。此开口主要是控制培养容器与储液容器之间液体的交换,保证培养过程中培养基的循环流通。所述第二条硅胶软管11中部嵌入蠕动泵15;所述储液容器除连接硅胶软管的开口10与14外,还包括液体培养基注入口16,所述液体培养基注入口16也设置有密封盖17。

[0029] 在具体的实施例中,所述容器体主体1底部直径具体可为22cm,高度具体可为30cm。

[0030] 所述密封盖体2直径具体可为22cm,边缘高度具体可为2cm。

[0031] 所述通孔5直径具体可为1.5cm,螺纹塞6的直径可为2cm,高度可为1cm。

[0032] 所述固定框架内空心圆环901直径具体可为20cm,固定杆902高度具体可为28cm,支腿905高度具体可为1cm。

[0033] 所述单个载物筛盘8底部直径具体可为20cm,高度可为1.5—3cm,所有载物筛盘摺叠整体高度具体可为27cm,摺叠载物筛盘18—9层。载物筛盘孔径具体可为0.5mm—5mm;载物筛盘材质可为纱网、钢丝网等。

[0034] 所述储液容器6直径22cm,高度27cm,容积10L。

[0035] 依据灭菌锅大小或生产需求,可对所述培养装置数据进行同部缩小或放大;另外,根据具体实验材料培养的需求,可对所述单个载物筛盘底的材质、孔径大小和高度,进行不同类型组合。

[0036] 实施例1兰花PLB增殖快繁培养

[0037] 1、取兰科植物茎尖、叶片或茎段,流水冲洗2h,用75%酒精浸10-20s,HgCl<sub>2</sub>灭菌8min,无菌水冲洗4次,得到无菌PLB诱导材料。

[0038] 2、将外植体接入诱导培养基,大约3-4周,外植体上出现PLB。

[0039] 3、先将多个空载物筛盘摺叠置于固定框架内,再将此空载物构件放入培养容器主

体,随后通过螺纹啮合,使盖体与培养主体密封。此外,培养容器主体外伸开孔使用棉花团密封,此整体装置待高温高压灭菌;

[0040] 4、硅胶软管可用报纸密封,待高温高压灭菌;

[0041] 5、将装有液体培养基的储液袋各开口使用棉花团密封,待高温高压灭菌;

[0042] 6、上述培养容器装置、载物构件和运输配件经过高温高压灭菌后,置于超净工作台晾凉备用。

[0043] 7、在超净工作台上将外植体上诱导出来的PLB切下,并切割成2-3mm大小,铺于灭菌后的空载物筛盘,每个筛盘大约放置100-150个PLB。将多个装有PLB的载物筛盘摞叠并置于固定框架内,再将其放入培养容器内,使用盖体密封。

[0044] 8、在超净工作台上,通过硅胶软管,使密封好的培养容器与储液袋相连接。待组装完成,将其整体放置于培养室的组培架上,再将蠕动泵嵌入硅胶软管中,待启用。

[0045] 9、根据PLB生长需求,设置间歇式培养的程序,分别设为早上9-10点,下午15-17点和晚上21-22点各1个小时,蠕动泵会在设定时间内将储液袋内的培养基推入与排出培养容器主体,使培养容器内保持湿度合适,不会出现玻璃化和死亡,并充分光合。

[0046] 10、PLB每培养1周,在超净工作台上,无需打开培养容器,只需更新储液袋内的液体培养基即可,经组装后,再继续培养PLB。PLB经过4周培养,直径可达5-6mm,再次切割为2-3mm大小继续转入该培养容器增殖或者可转入带固体分化培养基的三角瓶使其分化出幼苗。

[0047] 11、若按每个载物筛盘放置100-150个PLB进行培养,每隔4周进行一次切割,扣除损耗每个PLB能切割为3-4个PLB,即增殖3-4倍。此培养容器若摞叠9层载物筛盘,单个培养容器经过4周可使900-1350个PLB增殖到3000-5000个PLB,大大提高了PLB增殖效率。

[0048] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

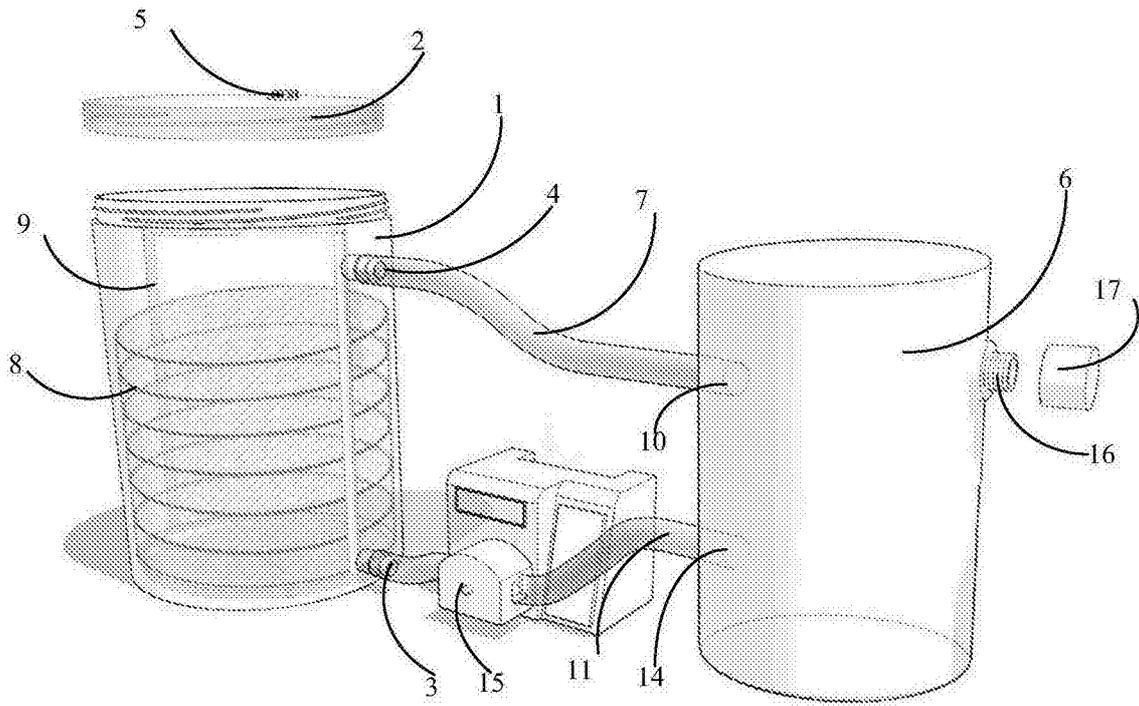


图1

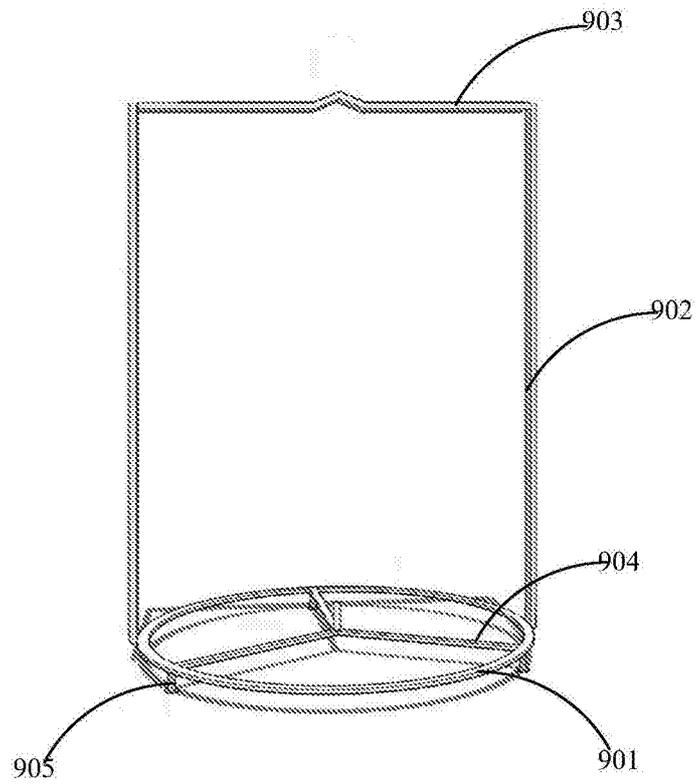


图2