



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101622959 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 30

(21) 申请号 200910094822. X

(22) 申请日 2009. 08. 10

(73) 专利权人 许继宏

地址 650222 云南省昆明市龙泉路云大小区  
32 幢 3 单元 402 号

(72) 发明人 许继宏

(74) 专利代理机构 昆明科阳知识产权代理事务  
所 53111

代理人 李行健

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

C12N 5/04 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1799340 A, 2006. 07. 12, 全文.

Sarika Shrivastava 等. In vitro clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. 《International

Journal of Integrative Biology》. 2008, 第 3 卷 (第 1 期), 73-79.

胡远等. 小油桐外植体分化及植株再生影响因素的初步研究. 《福建林业科技》. 2008, 第 35 卷 (第 1 期), 209-213, 221.

侯佩等. 麻疯树胚乳愈伤组织诱导及其污染消除. 《应用与环境生物学报》. 2006, 第 12 卷 (第 2 期), 264-268.

秦虹等. 小桐子的组织培养和植株再生. 《云南植物研究》. 2006, 第 28 卷 (第 6 期), 649-652.

审查员 吴涛

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

细胞 - 组织培养大规模生产膏桐植株的方法

(57) 摘要

细胞 - 组织培养大规模生产膏桐植株的方法, 属植物种苗的培养技术。步骤: 1、细胞悬浮培养: 将膏桐组织研磨后接种, 加入细胞悬浮液体培养基: MS+6-BA 0.2 ~ 0.5mg/L+NAA 1 ~ 6mg/L+LH 0.5 ~ 1.5mg/L+ 蔗糖 19 ~ 22g/L; 2、细胞生长测定; 3、丛芽增殖培养: 选生长进入静止期的细胞, 接入丛芽增殖培养基: MS+6-BA 0.1 ~ 1mg/L+NAA 0.1 ~ 1.5mg/L+ 蔗糖 20 ~ 30g/L; 4、生根培养: 选择生长良好的丛芽接入生根培养: MS+NAA 0.1 ~ 1mg/L; 5、出瓶栽培。有益效果: 本发明将膏桐细胞培养和组织培养有机的结合, 周期短、成本低, 为膏桐的人工繁殖、脱毒苗生产、培育优良品种提供了一种高效途径, 对膏桐的开发利用具有良好前景。

1. 一种细胞 - 组织培养大规模生产膏桐植株的方法,其特征是包括以下步骤:

(1)、膏桐外植体的选取及培养:选取膏桐茎段,用洗洁精洗干净后,在流水下冲洗10min,然后转到洁净工作台上,吸干水分,先用体积比70%酒精灭菌30秒,再转入0.1%的 $\text{HgCl}_2$ 溶液中灭菌5分钟,无菌蒸馏水冲洗5次,将茎段剪成1cm长的小段,接种于愈伤组织诱导培养基MS+6-BA 2mg/L+NAA1mg/L+蔗糖30g/L,用质量比0.8%琼脂固化,高温灭菌前PH调为5.8,培养温度25°C,外植体接种20天后可见明显芽;

(2)、膏桐细胞悬浮培养:将芽研磨后接种,加入1~3倍重量的细胞悬浮液体培养基,容器放入旋转式摇床,于温度 $25\pm 2^\circ\text{C}$ ,黑暗条件下进行膏桐细胞悬浮培养2~4天,摇床转速为80~130r/min,细胞悬浮液体培养基是:MS+6-BA 0.2~0.5mg/L+NAA 1~6mg/L+LH 0.5~1.5mg/L+蔗糖19~22g/L,PH值5.8~6;

(3)、对培养的膏桐细胞进行细胞生长测定;

(4)、丛芽增殖培养:选取生长进入静止期的膏桐细胞,接入固体的丛芽增殖培养基,光照强度1000~2000LX,丛芽增殖培养基是:MS+6-BA 0.1~1mg/L+NAA 0.1~1.5mg/L+蔗糖20~30g/L,用质量比为0.5%~0.8%琼脂固化,PH值5.8~6,培养时间为15~20天;

(5)、生根培养:选择生长良好的丛芽接入生根培养基进行生根培养,最后生产出膏桐苗,生根培养基是:MS+NAA 0.1~1mg/L;

(6)、出瓶栽培:出瓶栽培的苗先保湿15~20天,保持温度不低于17°C。

2. 如权利要求1所说的方法,其特征是膏桐芽的研磨使用砚体。

3. 如权利要求1所说的方法,其特征是将增殖的细胞悬浮液倒入有滤纸的布式漏斗,抽去培液,再用蒸馏水洗涤,然后进行细胞生长测定。

4. 如权利要求1所说的方法,其特征是丛芽增殖培养基为:MS+6-BA 0.9~1mg/L+NAA 0.4~0.6mg/L+蔗糖20~30g/L。

5. 如权利要求1所说的方法,其特征是生根培养基为:MS+NAA0.4~0.6mg/L。

## 细胞 - 组织培养大规模生产膏桐植株的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物种苗的培养技术,具体涉及通过细胞培养和组织培养大规模生产膏桐植株的方法。

### 背景技术

[0002] 膏桐 (*Jatropha curcas* L.) 又名麻疯树、小桐子,分布于热带、亚热带地区,我国有栽培或半野生。膏桐为灌木或小乔木,高 2-5m,多分枝,速生,喜沃土壤,酸性土或钙质土均宜生长,耐 0℃ 左右的低温及轻霜,抗风力强。以前膏桐多栽培作围篱及供观赏,种仁含油脂约 50%,可作润滑油、制皂等用,并可催吐下泻,但有毒,忌食。近年来,工业上用膏桐籽油或经改性的膏桐籽油作为生物柴油用于各种柴油发动机,因此大规模生产膏桐植株对生物能源的发展具有重要作用。

[0003] 现在栽培或半野生的膏桐繁殖方法,一般是通过种子繁殖或扦插繁殖,繁殖周期长,成本高。植物组织培养,就是分离植物体的一部分组织,如根、茎段、叶、花、幼胚等,在无菌试管中,配合一定的营养、激素、温度、光照等条件,使其产生完整植株。由于其条件可以严格控制,生长迅速,一个月左右即为一个周期,因此在植物的生产上有重要应用价值。专利号为 200510048718.9 的中国发明专利提供了一种通过组织培养大规模生产膏桐种苗的方法,可缩短周期降低成本,但其繁殖速度还有进一步提高的必要和可能。植物细胞大量培养技术是在植物组织培养快速繁殖的基础上发展起来的。具体做法就是把植物细胞从试管通过三角瓶转移到微生物发酵的大型发酵罐里,给予适当的条件进行培养,使植物细胞像微生物一样在发酵罐里大量繁殖,但细胞培养方法成本高。虽然申请号为 03135614.1 的中国专利文件公布了一种“细胞 - 组织的培养方法”,以求提高增殖率,降低培养成本,但其技术方案只能用于铁皮石斛。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种细胞 - 组织培养大规模生产膏桐植株的方法,既具有细胞培养和组织培养的优点,又能克服细胞培养和组织培养缺点,为膏桐的人工繁殖、脱毒苗生产、培育优良品种开辟高效的途径。

[0005] 本发明方法包括以下步骤:

[0006] 1、膏桐细胞悬浮培养:将膏桐组织研磨后接种,加入 1 ~ 3 倍重量的细胞悬浮液体培养基,容器放入旋转式摇床,于温度  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,黑暗条件下进行膏桐细胞悬浮培养 2 ~ 4 天,摇床转速为 80 ~ 130r/min,细胞悬浮液体培养基是:MS+6-BA 0.2 ~ 0.5mg/L+NAA 1 ~ 6mg/L+LH 0.5 ~ 1.5mg/L+蔗糖 19 ~ 22g/L,PH 值 5.8 ~ 6。膏桐组织的研磨最好使用砚体。

[0007] 2、对培养的膏桐细胞进行细胞生长测定。可将增殖的细胞悬浮液倒入有滤纸的布式漏斗,抽去培液,再用蒸馏水洗涤,然后进行细胞生长测定。

[0008] 3、丛芽增殖培养:选取生长进入静止期的膏桐细胞,接入固体的丛芽增殖培养基,

光照强度 1000 ~ 2000LX, 丛芽增殖培养基是 :MS+6-BA 0.1 ~ 1mg/L+NAA 0.1 ~ 1.5mg/L+蔗糖 20 ~ 30g/L, 用质量比为 0.5% ~ 0.8% 琼脂固化, PH 值 5.8 ~ 6, 培养时间为 15 ~ 20 天。最佳的丛芽增殖培养基是 :MS+6-BA 0.9 ~ 1mg/L+NAA 0.4 ~ 0.6mg/L+蔗糖 20 ~ 30g/L。

[0009] 4、生根培养 :选择生长良好的丛芽接入生根培养基进行生根培养, 最后生产出膏桐苗, 生根培养基是 :MS+NAA 0.1 ~ 1mg/L。最佳的生根培养基是 :MS+NAA 0.4 ~ 0.6mg/L。

[0010] 5、出瓶栽培 :出瓶栽培的苗先保湿 15 ~ 20 天, 保持温度不低于 17℃。

[0011] 本发明方法生成的膏桐组培苗可以直接移栽至苗圃地, 不需要在苗床上进行练苗。

[0012] 本发明的有益效果 :本发明将膏桐细胞培养和组织培养有机的结合起来, 充分发挥细胞培养和组织培养的优点, 周期短、成本低, 完全能满足膏桐大面积栽培需要, 为膏桐的人工繁殖、脱毒苗生产、培育优良品种提供了一种高效途径, 对膏桐的开发利用具有良好前景。

### 具体实施方式

[0013] 见如下实施例 :

[0014] 实施例 1 :

[0015] 1、膏桐外植体的选取及培养 :选取膏桐茎段, 用洗洁精洗干净后, 在流水下冲洗 10min, 日后转到洁净工作台上, 吸干水分, 先用 70% (体积比) 酒精灭菌 30 秒, 再转入 0.1% (体积比) 的 HgCl<sub>2</sub> 溶液中灭菌 5 分钟, 无菌蒸馏水冲洗 5 次, 将茎段剪成 1cm 长的小段, 接种于愈伤组织诱导培养基 MS+6-BA2mg/L+NAA1mg/L+蔗糖 30g/L, 用 0.8% (质量比) 琼脂固化, 高温灭菌前 pH 调为 5.8, 培养温度 25℃。外植体接种 20 天后可见明显芽。

[0016] 2、膏桐细胞悬浮培养 :取上述培养的芽, 先在研钵中加少许细胞悬液体培养基研磨接种。用三角瓶内盛研磨后的膏桐组织和 2 倍重量的细胞悬浮液体培养基, 放入旋转式摇床, 于温度 25℃, 黑暗条件下进行膏桐细胞悬浮培养 2 天, 摇床转速为 125r/min, 细胞悬浮液体培养基是 :MS+6-BA 0.2mg/L+NAA2mg/L+LH 0.5mg/L+蔗糖 20g/L, PH 值 6。

[0017] 3、将培养后的细胞悬浮液倒入有滤纸的布式漏斗, 抽去培养液, 再用蒸馏水洗涤若干次, 再抽干, 进行细胞生长测定, 备用。

[0018] 4、丛芽增殖培养 :选取生长进入静止期的膏桐细胞, 接入固体的丛芽增殖培养基, 光照强度 1000LX, 丛芽增殖培养基是 :MS+6-BA 1mg/L+NAA 0.5mg/L+蔗糖 25g/L, 用 0.8% 琼脂固化, PH 值 5.8。当植株生长到 2cm 左右将植株移至生根培养基中, 生根培养基是 :MS+NAA 0.5mg/L。

[0019] 5、出瓶移栽 :当根长 0.5cm 左右, 叶片长到 3 ~ 5 片时, 将生根苗直接移至苗圃地, 先保湿保温 15 天, 保持温度不低于 17℃, 随后苗木生长良好。

[0020] 实施例 2 :

[0021] 1、膏桐外植体的选取及培养同实施例 1。

[0022] 2、膏桐细胞悬浮培养 :取上述培养的芽, 先在研钵中加少许细胞悬液体培养基研磨接种。用三角瓶内盛研磨后的膏桐组织和 2 倍重量的细胞悬浮液体培养基, 放入旋转式摇床, 于温度 25℃, 黑暗条件下进行膏桐细胞悬浮培养 2 天, 摇床转速为 100r/min, 细胞悬

浮液体培养基是 :MS+6-BA 0.5mg/L+NAA 6mg/L+LH 1.5mg/L+ 蔗糖 2 2g/L, PH 值 5.8。

[0023] 3、将培养后的细胞悬浮液倒入有滤纸的布式漏斗,抽去培养液,再用蒸馏水洗涤若干次,再抽干,进行细胞生长测定,备用。

[0024] 4、丛芽增殖培养 :选取生长进入静止期的膏桐细胞,接入固体的丛芽增殖培养基,光照强度 1800LX,丛芽增殖培养基是 :MS+6-BA 0.2mg/L+NAA1.5mg/L+ 蔗糖 30g/L,用 0.6%琼脂固化,PH 值 5.8。当植株生长到 2cm 左右将植株移至生根培养基中,生根培养基是 :MS+NAA 0.2mg/L。

[0025] 5、出瓶移栽同实施例 1。苗木生长良好。

[0026] 实施例 3 :

[0027] 1、膏桐外植体的选取及培养同实施例 1。

[0028] 2、膏桐细胞悬浮培养 :取上述培养的芽,先在研体中加少许细胞悬液体培养基研磨接种。用三角瓶内盛研磨后的膏桐组织和倍重量的细胞悬浮液体培养基,放入旋转式摇床,于温度 27℃,黑暗条件下进行膏桐细胞悬浮培养 3 天,摇床转速为 130r/min,细胞悬浮液体培养基是 :MS+6-BA 0.2mg/L+NAA 1mg/L+LH 0.5mg/L+ 蔗糖 19g/L。

[0029] 3、将培养后的细胞悬浮液倒入有滤纸的布式漏斗,抽去培养液,再用蒸馏水洗涤若干次,再抽干,进行细胞生长测定,备用。

[0030] 4、丛芽增殖培养 :选取生长进入静止期的膏桐细胞,接入固体的丛芽增殖培养基,光照强度 1 200LX,丛芽增殖培养基是 :MS+6-BA 1mg/L+NAA0.2mg/L+ 蔗糖 20g/L,用 0.5%琼脂固化,PH 值 6。当植株生长到 2cm 左右将植株移至生根培养基中,生根培养基是 :MS+NAA 0.8mg/L。

[0031] 5、出瓶移栽同实施例 1。苗木生长良好。

[0032] 实施例 4 :

[0033] 1、膏桐外植体的选取及培养同实施例 1。

[0034] 2、膏桐细胞悬浮培养 :取上述培养的芽,先在研体中加少许细胞悬液体培养基研磨接种。用三角瓶内盛研磨后的膏桐组织和 1 倍重量的细胞悬浮液体培养基,放入旋转式摇床,于温度 23℃,黑暗条件下进行膏桐细胞悬浮培养 3 天,摇床转速为 80r/min,细胞悬浮液体培养基是 :MS+6-BA 0.5mg/L+NAA6mg/L+LH 1.5mg/L+ 蔗糖 2 2g/L。

[0035] 3、将培养后的细胞悬浮液倒入有滤纸的布式漏斗,抽去培养液,再用蒸馏水洗涤若干次,再抽干,进行细胞生长测定,备用。

[0036] 4、丛芽增殖培养 :选取生长进入静止期的膏桐细胞,接入固体的丛芽增殖培养基,光照强度 1 900LX,丛芽增殖培养基是 :MS+6-BA 0.2mg/L+NAA1.5mg/L+ 蔗糖 30g/L,用 0.8%琼脂固化,PH 值 6。当植株生长到 2cm 左右将植株移至生根培养基中,生根培养基是 :MS+NAA 0.5mg/L。

[0037] 5、出瓶移栽 :同实施例 1。苗木生长良好。

[0038] 以上实施例仅对发明做进一步的说明,而本发明的范围不受所举实施例的局限。