



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109673515 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201910113311.1

(22)申请日 2019.02.13

(71)申请人 广西壮族自治区药用植物园
地址 530023 广西壮族自治区南宁市兴宁
区长岗路189号

(72)发明人 缪剑华 李翠 张占江 韦坤华

(74)专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理
事务所(普通合伙) 11369

代理人 靳浩

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

A01N 3/00(2006.01)

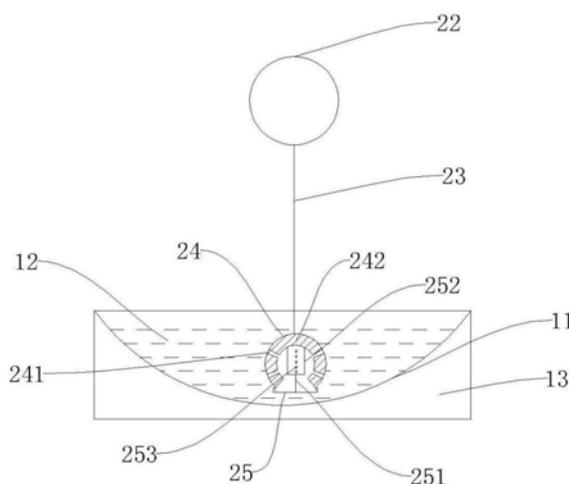
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

羊齿天门冬超低温培养方法

(57)摘要

本发明公开了一种羊齿天门冬超低温培养方法,包括:室温下将培养在预培养液中的长度为1-2mm的羊齿天门冬茎尖置于摇床振荡器中避光黑暗培养1-3d后,用装载液处理20-60min,取出羊齿天门冬茎尖转入温度为0℃的玻璃化溶液中脱水30-50min后放入冻存管中,再将冻存管存于液氮中进行超低温保存。通过本发明的方法,羊齿天门冬的复苏率和再生率均很高,为濒危的羊齿天门冬种质资源保存提供了技术保证,将对天门冬属以及利用植物多样性来培育新品种提供一条有效途径。



1. 羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,包括:室温下将培养在预培养液中的长度为1-2mm的羊齿天门冬茎尖置于摇床振荡器中避光黑暗培养1-3d后,用装载液处理20-60min,取出羊齿天门冬茎尖转入温度为0℃的玻璃化溶液中脱水30-50min后放入冻存管中,再将冻存管存于液氮中进行超低温保存。

2. 如权利要求1所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,还包括:将冻存管从液氮中取出,吸除玻璃化溶液,用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖1-3次后,转入恢复培养基进行复苏培养。

3. 如权利要求2所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,在吸除玻璃化溶剂后,先将羊齿天门冬茎尖置于35-45℃的水浴中浸泡1-5min,再用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖1-3次后,又用无菌水清洗羊齿天门冬茎尖的表面,最后转入恢复培养基进行复苏培养。

4. 如权利要求1所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,预培养液为MS培养液,其包括质量分数为5%的DMSO、1.0mg/mL的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

5. 如权利要求1所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,装载液包括以下成分:MS、2mol/L的丙三醇、0.4mol/L的蔗糖。

6. 如权利要求1所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,玻璃化溶液包括:MS、质量分数为30%的丙三醇、质量分数为15%的DMSO、质量分数为15%的乙二醇、0.4mol/L的蔗糖。

7. 如权利要求2或3所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,卸载液包括:MS、1.0mol/L的蔗糖;恢复培养基包括:1/2MS、1.0mg/L的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

8. 如权利要求2或3所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,复苏培养时先在黑暗条件下培养3d,然后转入光照培养7d,光照时间为12h/d,光照强度为1800lux,温度为25℃,湿度为40%。

9. 如权利要求1所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,脱水时在脱水装置中进行,所述脱水装置包括用于容纳0℃的玻璃化溶液的第一容器和用于容纳羊齿天门冬茎尖的第二容器,其中,

所述第一容器为顶部敞开的长方体形壳体,所述第一容器水平放置,所述第一容器的内部卡设凹面朝上的弧形隔板,所述弧形隔板的两条线性边分别与所述第一容器顶部的宽边密封以将所述第一容器分隔为位于上方的弧形槽和位于下方的密闭空腔,所述密闭空腔内填充超细玻璃棉;

所述第二容器包括支架、转轴、连接杆、容纳壳,所述支架位于所述第一容器外侧,所述转轴可转动的水平设置在所述支架上,所述转轴通过电机驱动,所述连接杆的一端固接在所述转轴上、另一端与所述容纳壳的顶部固接,所述容纳壳为底部具有进样口的球体结构,所述容纳壳上间隔设有四个进液孔,其中两个进液孔靠近所述容纳壳的顶部并关于所述转轴对称,剩余两个进液孔靠近所述进样口并关于所述转轴对称,所述容纳壳的内壁上贴附海绵,所述海绵不遮挡四个进液孔,所述容纳壳不与所述弧形隔板接触,所述进样口可拆卸地设有盖体,所述盖体上固设固定柱,所述固定柱的顶端固设顶部敞开的载物筒,所述固定柱和所述载物筒均位于所述容纳壳内,所述载物筒的顶部顶抵所述容纳壳内的海绵,所述载物筒的侧壁上间隔设有多个通孔,任意一个通孔的轴线均与任意一个进液孔的轴线垂

直;当所述容纳壳位于所述弧形槽的正中央时,所述连接杆、所述载物筒、所述固定柱在竖直方向同轴设置,

其中,所述弧形槽内盛装0℃的玻璃化溶液,所述载物筒内容纳羊齿天门冬茎尖,所述弧形槽内盛装的0℃的玻璃化溶液浸没所述容纳壳,当0℃的玻璃化溶液通过四个进液孔、多个通孔充满所述载物筒后,所述电机控制所述转轴先顺时针转动四分之一圈,再逆时针转动四分之一圈,以使所述容纳壳在弧形槽内摆动直到脱水结束,且所述容纳壳始终浸没在玻璃化溶液中。

10.如权利要求1所述的羊齿天门冬超低温保存培养方法,其特征在于,羊齿天门冬茎尖在用装载液处理前还进行了如下处理:先将羊齿天门冬茎尖从摇床振荡器中取出,置于蒸馏水中浸泡30s,再将羊齿天门冬茎尖置于吸水纸上,用两层纱布覆盖,正对纱布喷洒质量分数为0.5%的氯化钠水溶液0.5mL静置1min,再喷洒5ppm的脱落酸0.3mL静置1min,用蒸馏水冲洗羊齿天门冬茎尖的表面,然后用装载液处理。

羊齿天门冬超低温培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及种质资源保存技术领域,具体是一种羊齿天门冬超低温培养方法。

背景技术

[0002] 羊齿天门冬(*Asparagus officinalis*)为百合科天门冬属多年生草本植物,又名芦笋、龙须菜等,其味微甘,性平,具有清热利湿、活血散结等功效。据文献报道,羊齿天门冬中含有丰富的矿物质、氨基酸、芦笋皂苷、多糖和黄酮等类生物活性成分,具有抗氧化、抗肿瘤、抗真菌和降血脂的药理活性。羊齿天门冬能清热利湿,活血散结,主治肝炎、银屑病、高脂血症、乳腺增生,另对淋巴肉瘤、膀胱癌、乳腺癌、皮肤癌等有一定疗效。

[0003] 超低温保存(Cryopreservation)是上世纪70年代发展起来的一项现代种质资源离体保存技术。通常在液氮中保存,被保存材料细胞内的物质代谢和生长活动几乎完全停止,处在相对稳定的生物学状态,达到长期保存种质的目的,超低温保存是目前唯一不需要连续继代的中长期保存方式。玻璃化法(Vitrification)超低温保存是将细胞或组织置于由一定比例的渗透性和非渗透性保护剂组成的玻璃化溶液中,使材料及其玻璃化溶液在足够快的降温速率下固化成非结晶的玻璃化态,并以这种玻璃态在低温下保存。羊齿天门冬超低温保存技术在国内外尚未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是解决至少上述问题,并提供至少后面将说明的优点。

[0005] 本发明还有一个目的是提供一种羊齿天门冬超低温培养方法,羊齿天门冬的复苏率和再生率均很高,为濒危的羊齿天门冬种质资源保存提供了技术保证,将对天门冬属以及利用植物多样性来培育新品种提供一条有效途径。

[0006] 为了实现根据本发明的这些目的和其它优点,提供了一种羊齿天门冬超低温培养方法,包括:室温下将培养在预培养液中的长度为1-2mm的羊齿天门冬茎尖置于摇床振荡器中避光黑暗培养1-3d后,用装载液处理20-60min,取出羊齿天门冬茎尖转入温度为0℃的玻璃化溶液中脱水30-50min后放入冻存管中,再将冻存管存于液氮中进行超低温保存。

[0007] 优选的是,还包括:将冻存管从液氮中取出,吸除玻璃化溶液,用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖1-3次后,转入恢复培养基进行复苏培养。

[0008] 优选的是,在吸除玻璃化溶剂后,先将羊齿天门冬茎尖置于35-45℃的水浴中浸泡1-5min,再用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖1-3次后,又用无菌水清洗羊齿天门冬茎尖的表面,最后转入恢复培养基进行复苏培养。

[0009] 优选的是,预培养液为MS培养液,其包括质量分数为5%的DMSO、1.0mg/mL的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

[0010] 优选的是,装载液包括以下成分:MS、2mol/L的丙三醇、0.4mol/L的蔗糖。

[0011] 优选的是,玻璃化溶液包括:MS、质量分数为30%的丙三醇、质量分数为15%的DMSO、质量分数为15%的乙二醇、0.4mol/L的蔗糖。

[0012] 优选的是,卸载液包括:MS、1.0mol/L的蔗糖;恢复培养基包括:1/2MS、1.0mg/L的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

[0013] 优选的是,复苏培养时先在黑暗条件下培养3d,然后转入光照培养7d,光照时间为12h/d,光照强度为1800lux,温度为25℃,湿度为40%。

[0014] 优选的是,脱水时在脱水装置中进行,所述脱水装置包括用于容纳0℃的玻璃化溶液的第一容器和用于容纳羊齿天门冬茎尖的第二容器,其中,

[0015] 所述第一容器为顶部敞开的长方体形壳体,所述第一容器水平放置,所述第一容器的内部卡设凹面朝上的弧形隔板,所述弧形隔板的两条线性边分别与所述第一容器顶部的宽边密封以将所述第一容器分隔为位于上方的弧形槽和位于下方的密闭空腔,所述密闭空腔内填充超细玻璃棉;

[0016] 所述第二容器包括支架、转轴、连接杆、容纳壳,所述支架位于所述第一容器外侧,所述转轴可转动的水平设置在所述支架上,所述转轴通过电机驱动,所述连接杆的一端固接在所述转轴上、另一端与所述容纳壳的顶部固接,所述容纳壳为底部具有进样口的球体结构,所述容纳壳上间隔设有四个进液孔,其中两个进液孔靠近所述容纳壳的顶部并关于所述转轴对称,剩余两个进液孔靠近所述进样口并关于所述转轴对称,所述容纳壳的内壁上贴附海绵,所述海绵不遮挡四个进液孔,所述容纳壳不与所述弧形隔板接触,所述进样口可拆卸地设有盖体,所述盖体上固设固定柱,所述固定柱的顶端固设顶部敞开的载物筒,所述固定柱和所述载物筒均位于所述容纳壳内,所述载物筒的顶部顶抵所述容纳壳内的海绵,所述载物筒的侧壁上间隔设有多个通孔,任意一个通孔的轴线均与任意一个进液孔的轴线垂直;当所述容纳壳位于所述弧形槽的正中央时,所述连接杆、所述载物筒、所述固定柱在竖直方向同轴设置,

[0017] 其中,所述弧形槽内盛装0℃的玻璃化溶液,所述载物筒内容纳羊齿天门冬茎尖,所述弧形槽内盛装的0℃的玻璃化溶液浸没所述容纳壳,当0℃的玻璃化溶液通过四个进液孔、多个通孔充满所述载物筒后,所述电机控制所述转轴先顺时针转动四分之一圈,再逆时针转动四分之一圈,以使所述容纳壳在弧形槽内摆动直到脱水结束,且所述容纳壳始终浸没在玻璃化溶液中。

[0018] 优选的是,羊齿天门冬茎尖在用装载液处理前还进行了如下处理:先将羊齿天门冬茎尖从摇床振荡器中取出,置于蒸馏水中浸泡30s,再将羊齿天门冬茎尖置于吸水纸上,用两层纱布覆盖,正对纱布喷洒质量分数为0.5%的氯化钠水溶液0.5mL静置1min,再喷洒5ppm的脱落酸0.3mL静置1min,用蒸馏水冲洗羊齿天门冬茎尖的表面,然后用装载液处理。

[0019] 本发明至少包括以下有益效果:

[0020] 本发明的方法具有操作简便,成本低,适宜保存种类广泛,保存材料遗传性稳定等优点,是近十年来用于优良种质资源中长期保存的首选方法。

[0021] 本发明提供一种羊齿天门冬超低温保存培养方法,为濒危的羊齿天门冬种质资源保存提供了技术保证,将对天门冬属以及利用植物多样性来培育新品种提供一条有效途径。

[0022] 本发明的超低温保存方法进行培养的羊齿天门冬茎尖的复苏率均高于94%,再生率均高于90%,与直接从羊齿天门冬植株上切取的茎尖进行培养的复苏率和再生率相差无几。尤其是本发明将羊齿天门冬茎尖在脱水处理时采用了脱水装置,防止脱水时羊齿天门

冬茎尖内部形成晶核,促进羊齿天门冬茎尖形成均匀的玻璃化状态,利于后续在液氮中保存,当从液氮中取出进行复苏培养时,复苏率和再生率高,比直接从羊齿天门冬植株上切取的茎尖进行培养的发芽和成活情况还要好。

[0023] 本发明羊齿天门冬茎尖在放入预培养液之前进行了预处理,通过预处理激活了羊齿天门冬茎尖内的活性物质,整体细胞内各物质处于均匀的动态状态,在预培养之前,使得羊齿天门冬茎尖具有良好的活性能力,经过预培养后,利于充分脱水,最终使羊齿天门冬茎尖的复苏率和再生率提高。

[0024] 本发明的其它优点、目标和特征将部分通过下面的说明体现,部分还将通过对本发明的研究和实践而为本领域的技术人员所理解。

附图说明

[0025] 图1为本发明的其中一个实施例中所述脱水装置的结构示意图。

具体实施方式

[0026] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0027] 应当理解,本文所使用的诸如“具有”、“包含”以及“包括”术语并不配出一个或多个其它元件或其组合的存在或添加。需要说明的是,下述实施方案中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,所述试剂和材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得;在本发明的描述中,术语“横向”、“纵向”、“轴向”、“径向”、“上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”、“竖直”、“水平”、“顶”、“底”、“内”、“外”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本发明和简化描述,并不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本发明的限制。

[0028] <实施例1>

[0029] 本发明提供一种羊齿天门冬超低温保存培养方法,包括:室温下将培养在预培养液中的长度为1mm的羊齿天门冬茎尖置于摇床振荡器中避光黑暗培养1d后,用装载液处理20min,取出羊齿天门冬茎尖转入温度为0℃的玻璃化溶液中脱水25min后放入冻存管中,再将冻存管存于液氮中进行超低温保存。

[0030] 其中,预培养液为:1/2MS+0.8mol/L蔗糖+7g/L琼脂;

[0031] 装载液为:1/2MS+2mol/L丙三醇+0.5mol/L蔗糖

[0032] 玻璃化溶液为:PVS1

[0033] <实施例2>

[0034] 本发明提供一种羊齿天门冬超低温保存培养方法,包括:室温下将培养在预培养液中的长度为2mm的羊齿天门冬茎尖置于摇床振荡器中避光黑暗培养2d后,用装载液处理40min,取出羊齿天门冬茎尖转入温度为0℃的玻璃化溶液中脱水40min后放入冻存管中,再将冻存管存于液氮中进行超低温保存。

[0035] 其中,预培养液为:MS+1.2mol/L葡萄糖+0.2mg/mL的NAA;

[0036] 装载液为:1/2MS+2mol/L丙三醇+0.7mol/L蔗糖

[0037] 玻璃化溶液为:PVS3

[0038] <实施例3>

[0039] 本发明提供一种羊齿天门冬超低温保存培养方法,包括:室温下将培养在预培养液中的长度为2mm的羊齿天门冬茎尖置于摇床振荡器中避光黑暗培养3d后,用装载液处理460min,取出羊齿天门冬茎尖转入温度为0℃的玻璃化溶液中脱水60min后放入冻存管中,再将冻存管存于液氮中进行超低温保存。

[0040] 其中,预培养液为:MS+1.2mol/L葡萄糖+5%DMSO+1.0mg/mL6-BA

[0041] 装载液为:1/2MS+2mol/L丙三醇+0.7mol/L蔗糖

[0042] 玻璃化溶液为:PVS1

[0043] <实施例4>

[0044] 将实施例1中的冻存管从液氮中取出,吸除玻璃化溶液,用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖2次后,转入恢复培养基进行复苏培养。

[0045] 其中,恢复培养基为:1/2MS+0.1mg/L NAA+0.5mg/L 6-BA+10g/L香蕉+5g/L琼脂;

[0046] 卸载液为:1/2MS+1.2mol/L蔗糖

[0047] 复苏培养时先在黑暗条件下培养2d,然后转入光照培养5d,光照时间为8h/d,光照强度为1500lux,温度为25℃,湿度为40%。

[0048] <实施例5>

[0049] 将实施例2中的冻存管从液氮中取出,吸除玻璃化溶液,用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖2次后,转入恢复培养基进行复苏培养。

[0050] 其中,恢复培养基为:1/2MS+0.2mg/L NAA+5g/L南瓜粉+10g/L香蕉+5g/L琼脂;

[0051] 卸载液为:1/2MS+1.2mol/L蔗糖

[0052] 复苏培养时先在黑暗条件下培养3d,然后转入光照培养7d,光照时间为8h/d,光照强度为1200lux,温度为25℃,湿度为40%。

[0053] <实施例6>

[0054] 将实施例3中的冻存管从液氮中取出,吸除玻璃化溶液,用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖2次后,转入恢复培养基进行复苏培养。

[0055] 其中,恢复培养基为:1/2MS+0.5mg/L 6-BA+8g/L香蕉+3g/L琼脂;

[0056] 卸载液为:1/2MS+1.2mol/L蔗糖

[0057] 复苏培养时先在黑暗条件下培养3d,然后转入光照培养7d,光照时间为8h/d,光照强度为1800lux,温度为25℃,湿度为40%。

[0058] <实施例7>

[0059] 将实施例1中的冻存管从液氮中取出,在吸除玻璃化溶剂后,先将羊齿天门冬茎尖置于35℃的水浴中浸泡1min,再用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖3次后,又用无菌水清洗羊齿天门冬茎尖的表面,最后转入恢复培养基进行复苏培养。

[0060] 其中,恢复培养基为:1/2MS+0.1mg/L NAA+0.5mg/L 6-BA+10g/L香蕉+5g/L琼脂;

[0061] 卸载液为:1/2MS+1.2mol/L蔗糖

[0062] 复苏培养时先在黑暗条件下培养2d,然后转入光照培养5d,光照时间为8h/d,光照强度为1500lux,温度为25℃,湿度为40%。

[0063] <实施例8>

[0064] 将实施例2中的冻存管从液氮中取出,在吸除玻璃化溶剂后,先将羊齿天门冬茎尖

置于40℃的水浴中浸泡3min,再用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖3次后,又用无菌水清洗羊齿天门冬茎尖的表面,最后转入恢复培养基进行复苏培养。

[0065] 其中,恢复培养基为:1/2MS+0.2mg/L NAA+5g/L南瓜粉+10g/L香蕉+5g/L琼脂;

[0066] 卸载液为:1/2MS+1.2mol/L蔗糖

[0067] 复苏培养时先在黑暗条件下培养3d,然后转入光照培养7d,光照时间为8h/d,光照强度为1200lux,温度为25℃,湿度为40%。

[0068] <实施例9>

[0069] 将实施例3中的冻存管从液氮中取出,在吸除玻璃化溶剂后,先将羊齿天门冬茎尖置于45℃的水浴中浸泡5min,再用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖3次后,又用无菌水清洗羊齿天门冬茎尖的表面,最后转入恢复培养基进行复苏培养。

[0070] 其中,恢复培养基为:1/2MS+0.5mg/L 6-BA+8g/L香蕉+3g/L琼脂;

[0071] 卸载液为:1/2MS+1.2mol/L蔗糖

[0072] 复苏培养时先在黑暗条件下培养3d,然后转入光照培养7d,光照时间为8h/d,光照强度为1800lux,温度为25℃,湿度为40%。

[0073] <实施例10>

[0074] 本发明提供一种羊齿天门冬超低温保存培养方法,包括:室温下将培养在预培养液中的长度为2mm的羊齿天门冬茎尖置于摇床振荡器中避光黑暗培养1d后,用装载液处理30min,取出羊齿天门冬茎尖转入温度为0℃的玻璃化溶液中脱水40min后放入冻存管中,再将冻存管存于液氮中进行超低温保存。

[0075] 将冻存管从液氮中取出,吸除玻璃化溶液,用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖2次后,转入恢复培养基进行复苏培养。

[0076] 其中,

[0077] 预培养液为MS培养液,其包括质量分数为5%的DMSO、1.0mg/mL的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

[0078] 装载液包括以下成分:MS、2mol/L的丙三醇、0.4mol/L的蔗糖。

[0079] 玻璃化溶液包括:MS、质量分数为30%的丙三醇、质量分数为15%的DMSO、质量分数为15%的乙二醇、0.4mol/L的蔗糖。

[0080] 卸载液包括:MS、1.0mol/L的蔗糖;恢复培养基包括:1/2MS、1.0mg/L的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

[0081] 复苏培养时先在黑暗条件下培养3d,然后转入光照培养7d,光照时间为12h/d,光照强度为1800lux,温度为25℃,湿度为40%。

[0082] <实施例11>

[0083] 本发明提供一种羊齿天门冬超低温保存培养方法,包括:室温下将培养在预培养液中的长度为2mm的羊齿天门冬茎尖置于摇床振荡器中避光黑暗培养1d后,用装载液处理30min,取出羊齿天门冬茎尖转入温度为0℃的玻璃化溶液中脱水40min后放入冻存管中,再将冻存管存于液氮中进行超低温保存。

[0084] 将冻存管从液氮中取出,吸除玻璃化溶液,先将羊齿天门冬茎尖置于40℃的水浴中浸泡5min,再用卸载液洗涤羊齿天门冬茎尖2次后,又用无菌水清洗羊齿天门冬茎尖的表面,最后转入恢复培养基进行复苏培养。

[0085] 其中，

[0086] 预培养液为MS培养液，其包括质量分数为5%的DMSO、1.0mg/mL的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

[0087] 装载液包括以下成分：MS、2mol/L的丙三醇、0.4mol/L的蔗糖。

[0088] 玻璃化溶液包括：MS、质量分数为30%的丙三醇、质量分数为15%的DMSO、质量分数为15%的乙二醇、0.4mol/L的蔗糖。

[0089] 卸载液包括：MS、1.0mol/L的蔗糖；恢复培养基包括：1/2MS、1.0mg/L的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

[0090] 复苏培养时先在黑暗条件下培养3d，然后转入光照培养7d，光照时间为12h/d，光照强度为1800lux，温度为25℃，湿度为40%。

[0091] <实施例12>

[0092] 将实施例10中羊齿天门冬茎尖的脱水操作在脱水装置中进行，如图1所示，所述脱水装置包括用于容纳0℃的玻璃化溶液的第一容器和用于容纳羊齿天门冬茎尖的第二容器，其中，

[0093] 所述第一容器为顶部敞开的长方体形壳体，所述第一容器水平放置，所述第一容器的内部卡设凹面朝上的弧形隔板11，所述弧形隔板11的两条线性边分别与所述第一容器顶部的宽边密封以将所述第一容器分隔为位于上方的弧形槽12和位于下方的密闭空腔13，所述密闭空腔13内填充超细玻璃棉；所述第二容器包括支架、转轴22、连接杆23、容纳壳24，所述支架位于所述第一容器外侧，所述转轴22可转动的水平设置在所述支架上，所述转轴22通过电机驱动，所述连接杆23的一端固接在所述转轴22上、另一端与所述容纳壳24的顶部固接，所述容纳壳24为底部具有进样口的球体结构，所述容纳壳24上间隔设有四个进液孔241，其中两个进液孔241靠近所述容纳壳24的顶部并关于所述转轴22对称，剩余两个进液孔241靠近所述进样口并关于所述转轴22对称，所述容纳壳24的内壁上贴附海绵242，所述海绵242不遮挡四个进液孔241，所述容纳壳24不与所述弧形隔板11接触，所述进样口可拆卸地设有盖体25，所述盖体25上固设固定柱251，所述固定柱251的顶端固设顶部敞开的载物筒252，所述固定柱251和所述载物筒252均位于所述容纳壳24内，所述载物筒252的顶部顶抵所述容纳壳24内的海绵242，所述载物筒252的侧壁上间隔设有多个通孔253，任意一个通孔253的轴线均与任意一个进液孔241的轴线垂直；当所述容纳壳24位于所述弧形槽12的正中央时，所述连接杆23、所述载物筒252、所述固定柱251在竖直方向同轴设置；

[0094] 其中，所述弧形槽12内盛装0℃的玻璃化溶液，所述载物筒252内容纳羊齿天门冬茎尖，所述弧形槽12内盛装的0℃的玻璃化溶液浸没所述容纳壳24，当0℃的玻璃化溶液通过四个进液孔241、多个通孔253充满所述载物筒252后，所述电机控制所述转轴22先顺时针转动四分之一圈，再逆时针转动四分之一圈，以使所述容纳壳24在弧形槽12内摆动直到脱水结束，且所述容纳壳24始终浸没在玻璃化溶液中。

[0095] <实施例13>

[0096] 将实施例11中羊齿天门冬茎尖的脱水操作在脱水装置中进行，如图1所示，所述脱水装置包括用于容纳0℃的玻璃化溶液的第一容器和用于容纳羊齿天门冬茎尖的第二容器，其中，

[0097] 所述第一容器为顶部敞开的长方体形壳体，所述第一容器水平放置，所述第一容

器的内部卡设凹面朝上的弧形隔板11,所述弧形隔板11的两条线性边分别与所述第一容器顶部的宽边密封以将所述第一容器分隔为位于上方的弧形槽12和位于下方的密闭空腔13,所述密闭空腔13内填充超细玻璃棉;所述第二容器包括支架、转轴22、连接杆23、容纳壳24,所述支架位于所述第一容器外侧,所述转轴22可转动的水平设置在所述支架上,所述转轴22通过电机驱动,所述连接杆23的一端固接在所述转轴22上、另一端与所述容纳壳24的顶部固接,所述容纳壳24为底部具有进样口的球体结构,所述容纳壳24上间隔设有四个进液孔241,其中两个进液孔241靠近所述容纳壳24的顶部并关于所述转轴22对称,剩余两个进液孔241靠近所述进样口并关于所述转轴22对称,所述容纳壳24的内壁上贴附海绵242,所述海绵242不遮挡四个进液孔241,所述容纳壳24不与所述弧形隔板11接触,所述进样口可拆卸地设有盖体25,所述盖体25上固设固定柱251,所述固定柱251的顶端固设顶部敞开的载物筒252,所述固定柱251和所述载物筒252均位于所述容纳壳24内,所述载物筒252的顶部顶抵所述容纳壳24内的海绵242,所述载物筒252的侧壁上间隔设有多个通孔253,任意一个通孔253的轴线均与任意一个进液孔241的轴线垂直;当所述容纳壳24位于所述弧形槽12的正中央时,所述连接杆23、所述载物筒252、所述固定柱251在竖直方向同轴设置;

[0098] 其中,所述弧形槽12内盛装0℃的玻璃化溶液,所述载物筒252内容纳羊齿天门冬茎尖,所述弧形槽12内盛装的0℃的玻璃化溶液浸没所述容纳壳24,当0℃的玻璃化溶液通过四个进液孔241、多个通孔253充满所述载物筒252后,所述电机控制所述转轴22先顺时针转动四分之一圈,再逆时针转动四分之一圈,以使所述容纳壳24在弧形槽12内摆动直到脱水结束,且所述容纳壳24始终浸没在玻璃化溶液中。

[0099] <实施例14>

[0100] 实施例10中步骤一中羊齿天门冬茎尖在用装载液处理前还进行了如下处理:先将羊齿天门冬茎尖从摇床振荡器中取出,置于蒸馏水中浸泡30s,再将羊齿天门冬茎尖置于吸水纸上,用两层纱布覆盖,正对纱布喷洒质量分数为0.5%的氯化钠水溶液0.5mL静置1min,再喷洒5ppm的脱落酸0.3mL静置1min,用蒸馏水冲洗羊齿天门冬茎尖的表面,然后用装载液处理。

[0101] <实施例15>

[0102] 实施例11中步骤一中羊齿天门冬茎尖在用装载液处理前还进行了如下处理:先将羊齿天门冬茎尖从摇床振荡器中取出,置于蒸馏水中浸泡30s,再将羊齿天门冬茎尖置于吸水纸上,用两层纱布覆盖,正对纱布喷洒质量分数为0.5%的氯化钠水溶液0.5mL静置1min,再喷洒5ppm的脱落酸0.3mL静置1min,用蒸馏水冲洗羊齿天门冬茎尖的表面,然后用装载液处理。

[0103] <标准对照组>

[0104] 从羊齿天门冬植株上直接切取长度为2mm的羊齿天门冬茎尖直置于培养基中培养,培养基为:1/2MS、1.0mg/L的6-BA、0.5mg/mL的NAA。

[0105] <对比例1>

[0106] 现有技术中没有关于将羊齿天门冬进行超低温保存后进行培养的方法,选用已经熟知的超低温培养的方法对羊齿天门冬进行培养,具体方法为:将长度为2mm的羊齿天门冬茎尖在S101:将3.0~6.0cm香蕉苗,在含0.4mol/L蔗糖培养基中预培养2d;在室温条件下,剥取带1~2个叶原基的茎尖;将茎尖经装载液装载30~60min后,利用玻璃化溶液(PVS2)于

0℃下处理50min;将茎尖转入至滴有PVS2液滴的0.5cm宽,2cm长的铝箔条上,然后在液氮中蘸一下后,迅速装入盛满液氮的冷冻管中,然后浸入液氮保存;在液氮中保存至少1h后,在1.2mol/L蔗糖培养液中化冻;利用1.2mol/L蔗糖培养液洗涤2次,每次10min;将经过上述处理的茎尖,转入到含0.3mol/L蔗糖的MS培养基,暗室培养2d,转移到含0.5mg/L 6-BA的MS培养基中,恢复培养30~35d,将恢复正常生长的种源接种到新的恢复生长培养基中进行增殖快繁。

[0107] <试验对比>

[0108] 将实施例1、2、3的冻存管分别置于40℃的水浴中解冻10min,用无菌水冲洗3次后,放入恢复培养基进行复苏培养,恢复培养基包括现有技术中有助于羊齿天门冬进行生根发芽的组分,比如:1/2MS+0.6mg/L NAA+0.4mg/L 6-BA。

[0109] 分别取实施例1-13、标准对照组、对比例1中的羊齿天门冬茎尖各100个进行恢复培养,记录10天后的复苏率以及30天后的再生率,如下表1所示。

[0110] 表1

[0111]

	复苏率	再生率
实施例1	80%	76%
实施例2	82%	75%
实施例3	81%	76%
实施例4	83%	76%
实施例5	82%	75%
实施例6	82%	75%
实施例7	84%	76%
实施例8	84%	76%
实施例9	83%	75%
实施例10	85%	78%
实施例11	86%	77%
实施例12	88%	77%
实施例13	87%	79%
实施例14	85%	76%
实施例15	86%	77%
标准对照组	89%	79%
对比例1	51%	42%

[0112] 通过表1可知,本发明的超低温保存方法进行培养的羊齿天门冬茎尖的复苏率均高于90%,再生率均高于85%,与直接从羊齿天门冬植株上切取的茎尖进行培养的复苏率和再生率相差无几。尤其是本发明实施例12、13中将羊齿天门冬茎尖在脱水处理时采用了脱水装置,在脱水时容纳在载物筒252内的羊齿天门冬茎尖往复运动于弧形的容纳槽中,形成了单摆式的摆动,且摆动时,进液孔241和通孔253的设置方式使得羊齿天门冬茎尖不会受到较大的液流的影响,羊齿天门冬茎尖周围的玻璃化溶液形成微小的扰动,有助于从羊齿天门冬中析出的水分与玻璃化溶液相互流动,使更纯更多的玻璃化溶液包围羊齿天门冬

茎尖充分脱水,且摆动形成的微小的飘移与脱水过程配合,也促进了羊齿天门冬内部细胞的移动,防止羊齿天门冬茎尖内部形成晶核,促进羊齿天门冬茎尖形成均匀的玻璃化状态,利于后续在液氮中保存,当从液氮中取出进行复苏培养时,复苏率和再生率高(见表1)。

[0113] 此外,本发明中实施例14、15将羊齿天门冬茎尖在用装载液处理之前进行预脱水处理,让羊齿天门冬茎尖的进入脱水的状态,利于后期在脱水装置中进行脱水,脱水彻底,最终使羊齿天门冬茎尖的复苏率和再生率提高。

[0114] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的图例。

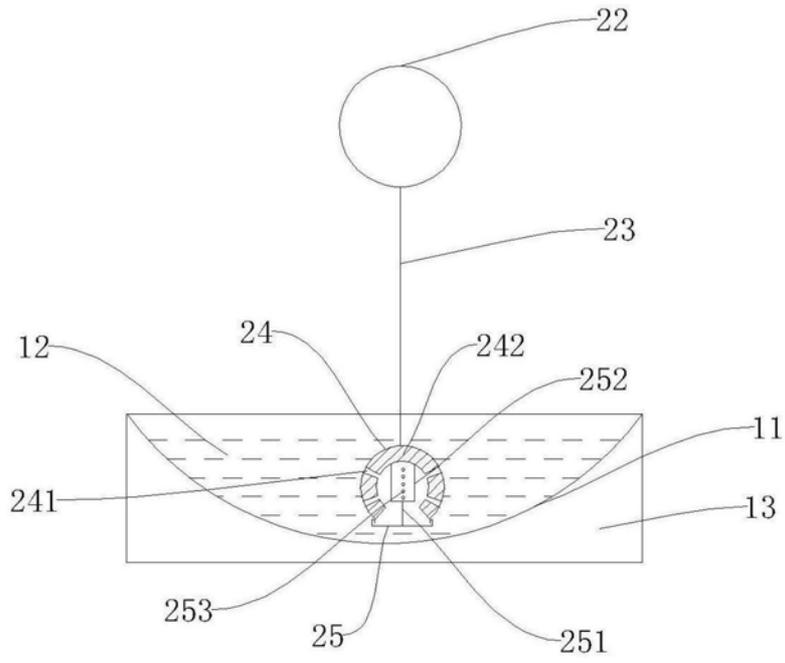


图1