



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104663437 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 201510064474.7

(22) 申请日 2015.02.06

(73) 专利权人 中国科学院合肥物质科学研究院
地址 230031 安徽省合肥市蜀山湖路 350 号
1138 信箱

(72) 发明人 吴丽芳 侯金艳 沈羊城 刘文博
赵薇薇 穆燕 吴影 毛颖基

(74) 专利代理机构 安徽汇朴律师事务所 34116
代理人 胡敏

(51) Int. Cl.
A01H 4/00(2006.01)

(56) 对比文件
CN 102301894 B, 2012.09.26, 全文.
N S Philomina 等. Micropropagation of
Sapindus mukorossi Gaertn. 《Indian Journal
of Experimental Biology》. 2000, 第 38 卷 (第
6 期), 621-624.

邢建宏等. 无患子优树叶片体细胞胚胎发生

及植株再生的研究. 《三明学院学报》. 2014, 第
31 卷 (第 6 期), 93-100.

N S Philomina. Somatic embryogenesis
from leaf explants of soapnut (*Sapindus
mukorossi* Gaertn.). 《Indian Journal
of Biotechnology》. 2010, 第 9 卷 (第 3
期), 336-337.

审查员 吴涛

权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54) 发明名称

一种无患子株系再生的培育方法

(57) 摘要

本发明公开了一种无患子株系再生的培育方法,包括如下步骤:选株、消毒、切段、胚状体诱导培养、胚状体增殖和继代培养、胚状体成熟培养、胚状体成苗培养和无菌苗的移栽。本发明相比现有技术具有以下优点:本发明的一种无患子株系再生的培育方法培育的胚状体再生效率高,诱导率达到 92.5%。胚状体再生速度快,繁殖系数高,平均每个外植体经历 15~17 周的培养后产生数百至数千个胚状体,且能保持无患子母本植株的优良特性,为优良无患子株系的快速繁殖和遗传改良提供了重要的技术支持。



1. 一种无患子株系再生的培育方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)、选株:选取无患子叶柄;

(2)、消毒:将选取的无患子叶柄经流水冲洗后,在无菌操作台内进行表面消毒;

(3)、切段:将消毒后的无患子叶柄切成0.4~0.8cm大小的切段;

(4)、胚状体诱导培养:将切断后的无患子叶柄接种于胚状体诱导培养基中,经过8~10周光照培养,获得大量的球形胚状体,胚状体诱导培养基包括MS培养基、0.1~5.0mg/L 6-BA、30g/L蔗糖和7.5g/L琼脂,该胚状体诱导培养基的PH=5.8;

(5)、胚状体增殖和继代培养:将步骤(4)获取的球形胚状体转接于胚状体诱导培养基中进行增殖和继代培养3~4周;

(6)、胚状体成熟培养:将经步骤(5)培养获取的球形胚状体转接于胚状体成熟培养基上进行胚状体的成熟培养2~3周,胚状体成熟培养基包括1/2MS培养基、30g/L蔗糖和7.5g/L琼脂,该胚状体成熟培养基的PH=5.8;

(7)、胚状体成苗培养:将经步骤(6)培养得到的成熟的胚状体转接于胚状体成苗培养基中培养3~4周,胚状体成苗培养基包括1/2MS培养基、0.1~2.0mg/L IBA、0.01~0.5mg/L NAA、30g/L蔗糖和7.5g/L琼脂,该胚状体成苗培养基的PH=5.8;

(8)、无菌苗的驯化与移栽:步骤(7)中的幼苗长至2~3cm,并带有2~4真叶时,进行炼苗并移栽,获得健壮的无患子再生植株。

2. 根据权利要求1所述的一种无患子株系再生的培育方法,其特征在于:选株步骤中,无患子叶柄取材于野外多年生无患子优良株系的当年生叶柄。

3. 根据权利要求1所述的一种无患子株系再生的培育方法,其特征在于:消毒步骤:将选取的无患子叶柄经70%的酒精擦拭后用75%酒精进行表面消毒30~40s,无菌水冲洗3~5遍,用0.1%的升汞消毒2~3min后,用无菌水冲洗5~6遍,消毒期间不停的摇动。

一种无患子株系再生的培育方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域,尤其涉及的是一种无患子株系再生的培育方法。

背景技术

[0002] 无患子(*Sapindus mukorossi* Gaertn.)又名油患子、肥皂树或洗手果,为无患子科无患子属落叶乔木,是一种广泛分布,集洗涤、药用、水土保持、绿化等多用途于一身的多用途树种。其果皮制成的纯天然洗涤产品在于多国家和地区深受欢迎,不仅去污力强,同时还具有抗菌、消炎、抗氧化等作用;无患子的种仁含油率高达40.7%,是生产生物柴油的理想原料;此外,无患子树形优美,入秋后满树金黄,故又名黄金树,是优良的园林绿化树种。无论作为园林树种还是经济树种,其栽培前景十分广阔,市场需求量大,但低效的种苗繁育技术是制约其产业化开发的瓶颈。

[0003] 长期以来,在生产上,无患子主要以播种繁殖为主。然而由于种子外被坚硬的种皮,同时在种子萌发过程中存在较高的虫蛀率,在自然条件下无患子种子发芽率不到10%;此外,由于种子为杂合体,通过种子育苗存在较大的遗传变异性,很难保持母本株系的优良性状。扦插、嫁接等无性繁殖技术虽在无患子育苗方面有报道,但普遍存在育苗过程繁琐,繁殖系数较低等问题,很难满足大规模生产的需求。近年来,随着生物技术的发展,植物组织培养技术因具有育苗周期短、繁殖系数大等而广泛应用于草本植物和部分木本植物的快速育苗。因此,利用植物组织培养技术对无患子植株进行快速和规模化育苗具有重要意义。目前有关无患子组织培养方面的研究主要集中在利用茎段或叶片作为外植体进行芽或愈伤组织的诱导,且普遍存在再生效率低,再生过程繁琐,可重复性差等问题。因此,针对当前无患子育苗所存在的诸多问题,急需开发一种无患子植株高效再生的方法,以满足无患子优良株系的快速繁殖和品种改良的需求。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供了一种无患子株系再生的培育方法。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种无患子株系再生的培育方法,包括如下步骤:

[0006] (1)、选株:选取无患子叶柄;

[0007] (2)、消毒:将选取的无患子叶柄经流水冲洗后,在无菌操作台内进行表面消毒;

[0008] (3)、切段:将消毒后的无患子叶柄切成0.4~0.8cm大小的切段;

[0009] (4)、胚状体诱导培养:将切断后的无患子叶柄接种于胚状体诱导培养基中,经过8~10周光照培养,获得大量的球形胚状体;

[0010] (5)、胚状体增殖和继代培养:将步骤(4)获取的球形胚状体转接于胚状体诱导培养基中进行增殖和继代培养3~4周;

[0011] (6)、胚状体成熟培养:将经步骤(5)培养获取的球形胚状体转接于胚状体成熟培

培养基上进行胚状体的成熟培养2~3周;

[0012] (7)、胚状体成苗培养:将经步骤(6)培养得到的成熟的胚状体转接于胚状体成苗培养基中培养3~4周;

[0013] (8)、无菌苗的驯化与移栽:步骤(7)中的幼苗长至2~3cm,并带有2~4真叶时,进行炼苗并移栽,获得健壮的无患子再生植株。

[0014] 作为上述方案的进一步优化,选株步骤中,无患子叶柄取材于野外多年生无患子优良株系的当年生叶柄。

[0015] 作为上述方案的进一步优化,消毒步骤:将选取的无患子叶柄经70%的酒精擦拭后用75%酒精进行表面消毒30~40s,无菌水冲洗3~5遍,用0.1%的升汞消毒2~3min后,用无菌水冲洗5~6遍,消毒期间不停的摇动。

[0016] 作为上述方案的进一步优化,步骤(4)中所述的胚状体诱导培养基包括MS培养基、0.1~5.0mg/L 6-BA、30g/L蔗糖和7.5g/L琼脂,该胚状体诱导培养基的PH=5.8。

[0017] 作为上述方案的进一步优化,步骤(6)所述的胚状体成熟培养基包括1/2MS培养基、30g/L蔗糖和7.5g/L琼脂,该胚状体成熟培养基的PH=5.8。

[0018] 作为上述方案的进一步优化,步骤(7)所述的胚状体成苗培养基为包括1/2MS培养基、0.1~2.0mg/L IBA、0.01~0.5mg/L NAA、30g/L蔗糖和7.5g/L琼脂,该胚状体成苗培养基的PH=5.8。

[0019] 本发明相比现有技术具有以下优点:本发明所提供的一种无患子株系再生的培育方法,具体涉及以无患子叶柄为外植体通过直接诱导体细胞胚胎发生途径对无患子株系进行高效、快速繁殖。其一,叶柄取材于野外多年生无患子优良株系的当年生叶柄,一方面能保持母本植株的种质特性;另一方面取材方便、材料丰富,可以实现对野外无患子优良单株的快繁,实现品种培育。其二,胚状体再生效率高,诱导率达到92.5%。其三,胚状体再生速度快,繁殖系数高,平均每个外植体经历15~17周的培养后即可产生数百至数千个胚状体,为优良无患子株系的快速繁殖和遗传改良提供了重要的技术支持。其四,胚状体的诱导和增殖仅需要在同一种培养基上进行,且整个胚状体诱导过程培养基成分简单,步骤简化,操作简单易行;因此,本发明所提供的一种无患子优良株系高效再生的培育方法,不仅为无患子优良株系的快速繁殖和规模化生产提供了技术支撑,同时也为后期无患子的品种改良奠定了基础。

附图说明

[0020] 图1为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的培育流程图。

[0021] 图2为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的优选实施例选取的接种于胚状体诱导培养基上的无患子叶柄切段。

[0022] 图3为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的优选实施例的球形胚状体的诱导状态图。

[0023] 图4为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的优选实施例的球形胚状体增殖培养状态图。

[0024] 图5为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的优选实施例的球形胚状体继代培养状态图。

[0025] 图6为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的优选实施例的胚状体的成熟状态参考图一。

[0026] 图7为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的优选实施例的胚状体的成熟状态参考图二。

[0027] 图8为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的优选实施例的胚状体成苗图。

[0028] 图9为本发明的一种无患子株系再生的培育方法的优选实施例的无患子再生植株的炼苗图。

具体实施方式

[0029] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0030] 优选实施例

[0031] 一种无患子株系再生的培育方法,参见图1,包括如下步骤:

[0032] (1)、选株:选取无患子叶柄;优选的无患子叶柄取材于野外多年生无患子优良株系的当年生叶柄。这样,一方面保持母本植株的种质特性;另一方面取材方便、材料丰富;实现对野外无患子优良单株的快繁,实现品种培育。

[0033] (2)、消毒:将选取的无患子叶柄经流水冲洗后,在无菌操作台内进行表面消毒。优化的,将选取的无患子叶柄经70%的酒精擦拭后用75%酒精进行表面消毒30~40s,无菌水冲洗3~5遍,用0.1%的升汞消毒2~3min后,用无菌水冲洗5~6遍,消毒期间不停的摇动。

[0034] (3)、切段:将消毒后的无患子叶柄切成0.4~0.8cm大小的切段。优化的,所述的无患子叶柄在切段前,切去两端消毒损伤部位。参见图2,为本优选实施例选取的接种于胚状体诱导培养基上的无患子叶柄切段。

[0035] (4)、胚状体诱导培养:将切断后的无患子叶柄接种于胚状体诱导培养基中诱导。胚状体诱导培养基包括MS培养基、0.1~5.0mg/L6-BA、30g/L蔗糖、和7.5g/L琼脂。该胚状体诱导培养基的PH=5.8。切断后的无患子叶柄接种于胚状体诱导培养基中经过8~10周光照培养,获得大量的球形胚状体。参见图3,为本优选实施例培育的球形胚状体的诱导状态图。通过本优选诱导培养,胚状体再生效率高,诱导率达到92.5%。

[0036] (5)、胚状体增殖和继代培养:将步骤(4)获取的球形胚状体在相应的胚状体诱导培养基中进行增殖和继代培养3~4周。参见图4和图5,分别为本发明优选实施例球的培育的胚状体增殖培养状态图和球形胚状体继代培养状态图。

[0037] (6)、胚状体成熟培养:将经步骤(5)培养获取的球形胚状体转接于胚状体成熟培养基上进行胚状体的成熟培养2~3周。其中,胚状体成熟培养基包括1/2MS培养基、30g/L蔗糖和7.5g/L琼脂。胚状体成熟培养基的PH=5.8。参见图6和图7为本优选实施例的培育的胚状体的成熟状态参考图一和胚状体的成熟状态参考图二。

[0038] (7)、胚状体成苗培养:将经步骤(6)培养得到的成熟的胚状体转接于胚状体成苗培养基中培养3~4周。其中,胚状体成苗培养基为包括1/2MS培养基、0.1~2.0mg/L IBA、0.01~0.5mg/L NAA、30g/L蔗糖和7.5g/L琼脂,该胚状体成苗培养基的PH=5.8。参见图8,为本优选实施例培育的胚状体成苗图。通过在胚状体成苗培养基中培养,成苗率有效提高。

[0039] (8)、无菌苗的驯化与移栽:步骤(7)中的幼苗长至2~3cm,并带有2~4真叶时,进行炼苗并移栽,获得健壮的无患子再生植株。参见图9,为本优选实施例培育的无患子再生植株的炼苗图。

[0040] 本发明的一种无患子株系再生的培育方法,无患子株系的胚状体再生速度快,繁殖系数高,平均每个外植体经历15~17周的培养后即可产生数百至数千个胚状体。保持无患子母本植株的优良特性,为无患子株系的快速繁殖和遗传改良提供了重要的技术支持。

[0041] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

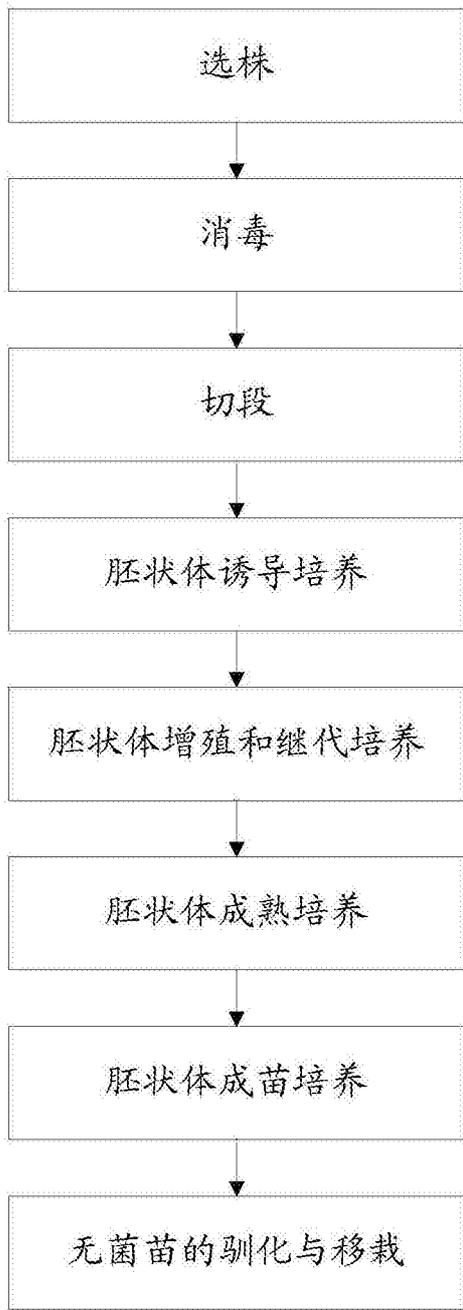


图1

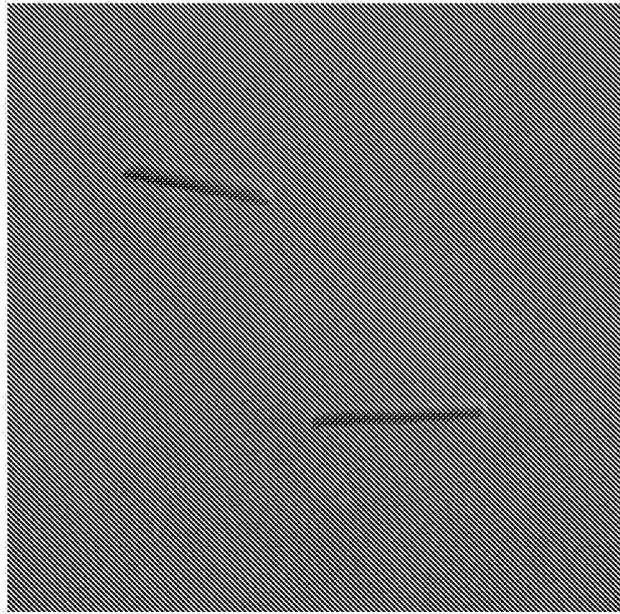


图2

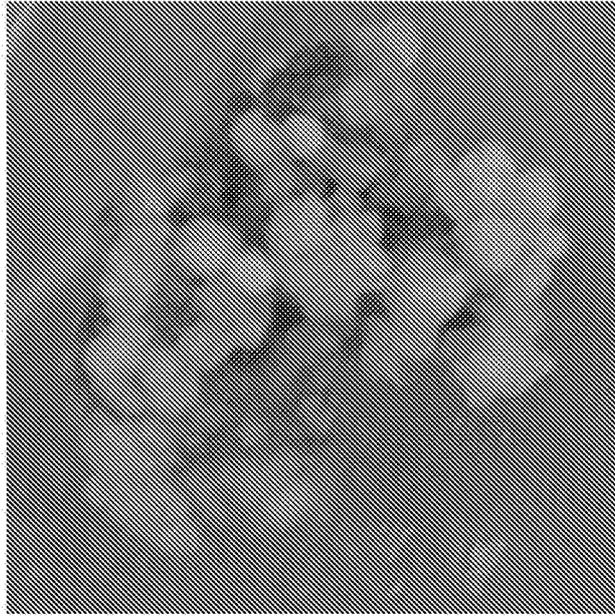


图3

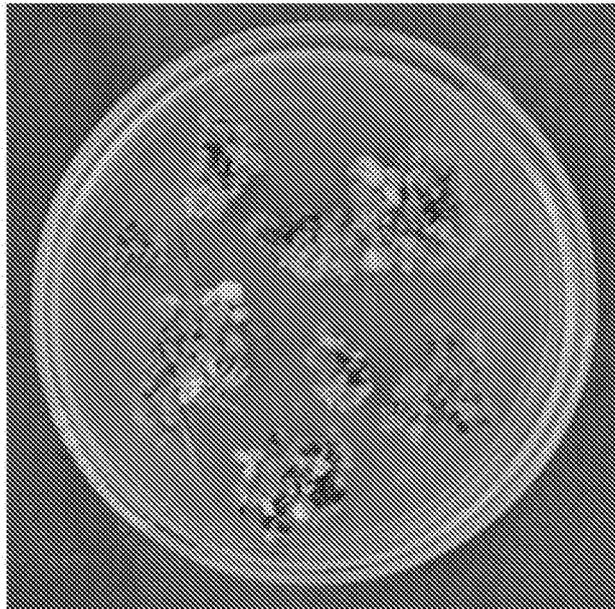


图4

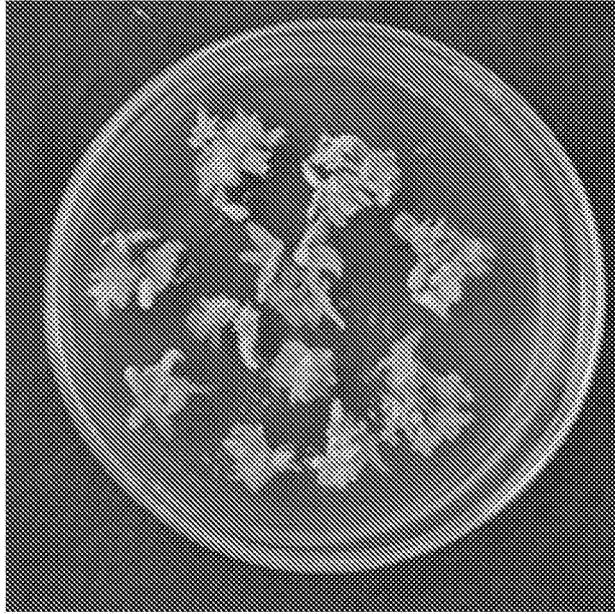


图5

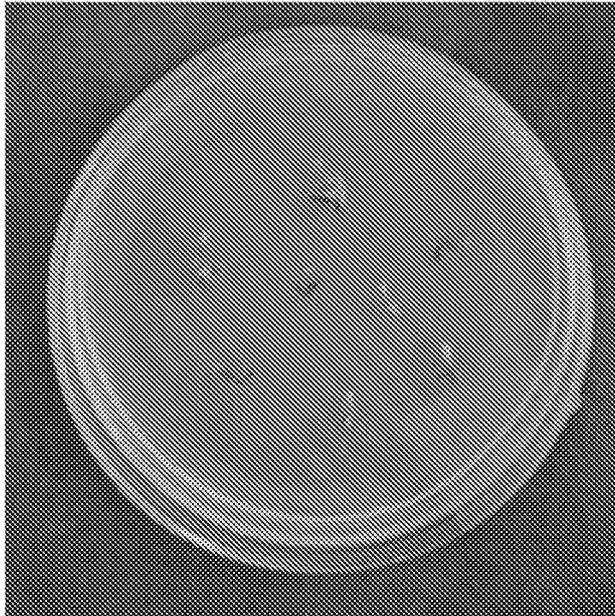


图6

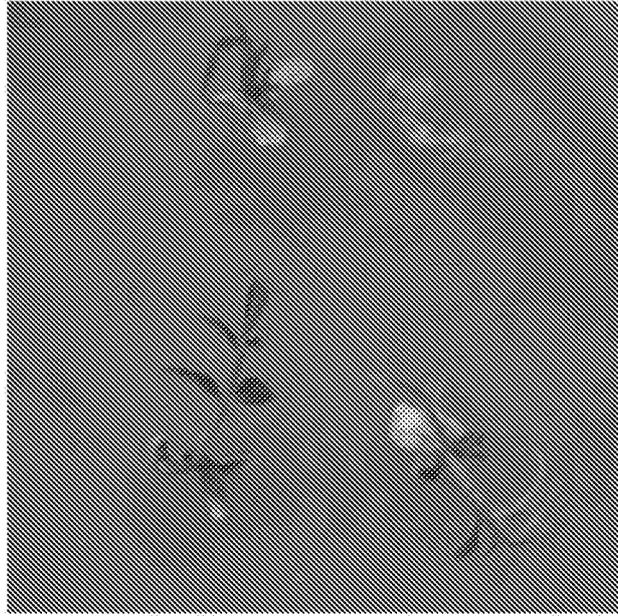


图7

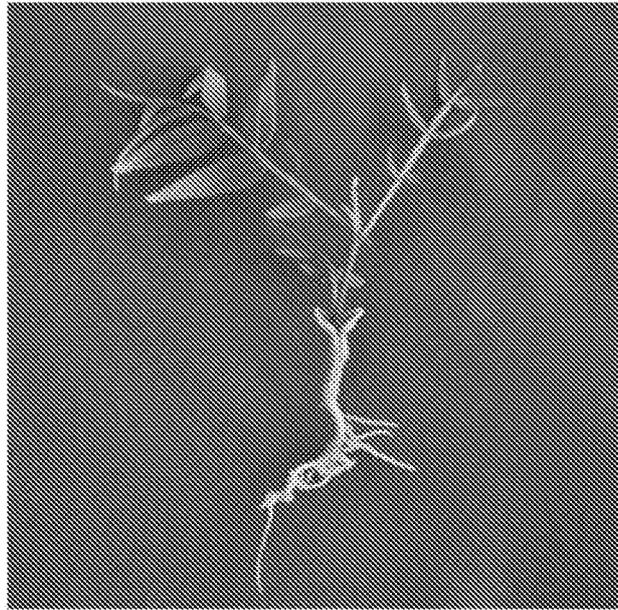


图8



图9