



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105123526 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201510572971.8

CN 104145818 A, 2014.11.19, 权利要求1.

(22)申请日 2015.09.10

曹彤彤等. 百日草组织培养技术的研究.《吉林林业科技》.2014,第43卷(第2期),第7-8、59页,尤其是摘要.

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105123526 A

审查员 王佳妹

(43)申请公布日 2015.12.09

(73)专利权人 广东百林园林股份有限公司

地址 523900 广东省东莞市南城区三元里路2号粤丰大厦1201AB

(72)发明人 胡萍 邹水平

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 104145818 A, 2014.11.19, 权利要求1.

CN 101861829 A, 2010.10.20, 全文.

EP 0660659 B1, 2001.05.02, 全文.

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种百日草组培繁殖的种质保存方法

(57)摘要

本发明公开了一种百日草组培繁殖的种质保存方法,包括以下技术环节:1)外植体的选材与低温预处理;2)接种;3)不定芽诱导并转接;4)慢生长保存种质;5)复壮;6)生根移栽。本发明提供的百日草组培繁殖的种质保存方法对百日草种质保存周期长达4年,同时还解决了种质保存占地面积大、费用高等问题,而且操作简便,技术稳定可靠,可重复性强,非常适合大规模百日草种质的保存,是一种优良的百日草种质资源保存方法。

1. 一种百日草组培繁殖的种质保存方法,其特征在于,它包括以下技术环节:

1) 外植体的选材与低温预处理;2) 接种;3) 不定芽诱导并转接;4) 慢生长保存种质;5) 复壮;6) 生根移栽;

该方法的详细步骤如下:

1) 外植体的选材与低温预处理:

选择生长至现蕾期的、健壮无病、种质与亲本一致的百日草整株,先用自来水冲洗掉根部泥土及其它表面杂物,然后用毛刷蘸取洗洁精洗一遍后接着用超纯水冲洗干净,将植株根部浸入装有8-10mg/L的KT溶液中,2℃低温预处理4-8天;

2) 接种:

将百日草用超纯水清洗后转移到超净工作台里,用70%酒精表面消毒15s,再用无菌水冲洗两次,然后置于加入了数滴吐温20的0.1%升汞中处理10 min,再用无菌水冲洗4-5次,滤纸吸干,用解剖刀切割茎段后用镊子接种至装有培养基①的三角瓶中;

3) 不定芽诱导并转接:培养室温度控制为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$,以荧光灯为光源,光照强度控制为1500-2000Lx,光周期控制为光14h/暗10h,25-30天诱导出不定芽,然后将不定芽接种至培养基②中,将接种好的三角瓶放入培养箱中培养,培养箱温度控制为23-25℃,光照强度控制为1500-2000Lx、光周期控制为光14h/暗10h,培养5-8天;

4) 慢生长保存种质:

将三角瓶转移到低温、弱光条件下缓慢生长,每培养10个月,继代接种一次,再低温培养;

5) 复壮:

当需要百日草恢复生长时,将三角瓶转移到温度控制为23-25℃、光照强度控制为1500-2000Lx、光周期控制为光14h/暗10h的培养箱中培养10-15天,获得健壮的百日草幼苗;

6) 生根移栽:

将百日草幼苗转移到培养基③中,控制温度为23-25℃、湿度 $\geq 85\%$ 、光照强度为2000-3000lx培养条件下生长10-15天诱导生根,然后炼苗移栽;

所述步骤2)中的培养基①的配方为:MS+0.5mg/L KT+1.5mg/L 6-BA+0.4mg/L GA+0.3g/L CH +3%蔗糖+6.5g/L琼脂,pH为5.8;

所述步骤3)中的培养基②的配方为:MS+0.5mg/L6-BA+0.5mg/LKT+3%蔗糖+6.5g/L琼脂,pH为5.8;

所述步骤4)中的低温、弱光条件为:培养温度控制为5-8℃,光照强度控制为400-600lx,光周期控制为光12h/暗12h;

所述步骤6)中的培养基③的配方为:1/2MS+0.1mg/L IBA+1.5%蔗糖+7.0g/L琼脂,pH为5.8。

2. 根据权利要求1所述的百日草组培繁殖的种质保存方法,其特征在于:所述步骤2)中切割下接种的茎段长度为0.5-0.8cm。

3. 根据权利要求1所述的百日草组培繁殖的种质保存方法,其特征在于:所述步骤4)中的继代次数不超过5次。

一种百日草组培繁殖的种质保存方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种百日草组培繁殖的种质保存方法,属于园艺科学技术领域。

背景技术

[0002] 百日草,菊科,百日草属,原产北美、墨西哥及南美等地,因节节升高,花越开越繁茂,获诸多美名,如状元红、火球花、百日菊、步步高。百日草喜温暖,不耐寒,耐干旱,宜阳光充足,在长日照条件下舌状花增多。百日草花期长,花量大,每株自初花至霜冻开30-40朵。优良品种多为千层瓣,花色极其丰富,为夏秋季花坛常用花卉,百日草花姿十分优美,色彩鲜艳多变,深受人们喜爱,为阿拉伯联合酋长国国花。墨西哥是百日草的原始产地,对百日草的育种研究也居世界之首,不断向各国推出新品种,成为墨西哥花卉出口的支柱产业。百日草在我国南北方也广泛栽培,有“庶民之花”的美称,为绿化主栽品种之一。

[0003] 目前,百日草种质资源的保存大多以室内组培和田间栽培保存,但田间栽培保存存在以下局限性:光、温、水及病虫害控制较难,造成种质资源丧失;占地面积多,耗费人力、物力、财力巨大;长期无性繁殖过程中易出现人为混杂和种性退化等。室内组培保存是将种质资源的外植体分离母体进行组培,利用设备进行贮藏保存,其好处是所占空间小,所需的人力资源少,而又能较好地保护物种及其遗传的多样性。目前百日草的室内组培保存主要以幼蕾花托作为百日草组织培养的外植体,但幼蕾花托作为外植体表面消毒较难,消耗试材量大,材料选择受时间限制;现有百日草组培保存还存在继代培养周期较短、保种花费较大的不足,因此建立一种适宜的、保存时间更久、更低成本的百日草种质资源保存方法对百日草的产业发展具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的是克服常规百日草种质保存方法的不足,提供了一种保存周期更长、保存成本更低、变异降低的百日草种质保存技术,解决了种质保存占地面积大、费用高等问题,大大节约了原料成本、劳力和培养保存空间,而且操作简便,技术稳定可靠,可重复性强,非常适合大规模百日草种质的保存。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案解决的:

[0006] 一种百日草组培繁殖的种质保存方法,其特征在于,它包括以下技术环节:

[0007] 1) 外植体的选材与低温预处理;2) 接种;3) 不定芽诱导并转接;4) 慢生长保存种质;5) 复壮;6) 生根移栽。

[0008] 该方法的详细步骤如下:

[0009] 1) 外植体的选材与低温预处理:

[0010] 选择生长至现蕾期的、健壮无病、种质与亲本一致的百日草整株,先用自来水冲洗掉根部泥土及其它表面杂物,然后用毛刷蘸取洗洁精洗一遍后接着用超纯水冲洗干净,将植株根部浸入装有8-10mg/L的KT溶液中,2℃低温预处理4-8天;

[0011] 2) 接种:

[0012] 将百日草用超纯水清洗后转移到超净工作台里,用70%酒精表面消毒15s,再用无菌水冲洗两次,然后置于加入了数滴吐温20的0.1%升汞中处理10 min,再用无菌水冲洗4-5次,滤纸吸干,用解剖刀切割茎段后用镊子接种至装有培养基①的三角瓶中;

[0013] 3)不定芽诱导并转接:培养室温度控制为 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$,以荧光灯为光源,光照强度控制为1500-2000Lx,光周期控制为光14h/暗10h,25-30天诱导出不定芽,然后将不定芽接种至培养基②中,将接种好的三角瓶放入培养箱中培养,培养箱温度控制为 $23-25^{\circ}\text{C}$,光照强度控制为1500-2000Lx、光周期控制为光14h/暗10h,培养5-8天;

[0014] 4)慢生长保存种质:

[0015] 将三角瓶转移到低温、弱光条件下缓慢生长,每培养10个月,继代接种一次,再低温培养;

[0016] 5)复壮:

[0017] 当需要百日草恢复生长时,将三角瓶转移到温度控制为 $23-25^{\circ}\text{C}$ 、光照强度控制为1500-2000Lx、光周期控制为光14h/暗10h的培养箱中培养10-15天,获得健壮的百日草幼苗;

[0018] 6)生根移栽:

[0019] 将百日草幼苗转移到培养基③中,控制温度为 $23-25^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $\geq 85\%$ 、光照强度为2000-3000lx培养条件下生长10-15天诱导生根,然后炼苗移栽。

[0020] 所述步骤2)中切割下接种的茎段长度为0.5-0.8cm。

[0021] 所述步骤2)中的培养基①的配方为:MS+0.5mg/L KT+1.5mg/L 6-BA+0.4mg/L GA+0.3g/L CH +3%蔗糖+6.5g/L琼脂,pH为5.8。

[0022] 所述步骤3)中的培养基②的配方为:MS+0.5mg/L6-BA+0.5mg/LKT+3%蔗糖+6.5g/L琼脂,pH为5.8。

[0023] 所述步骤4)中的低温、弱光条件为:培养温度控制为 $5-8^{\circ}\text{C}$,光照强度控制为400-600lx,光周期控制为光12h/暗12h。

[0024] 所述步骤6)中的培养基③的配方为:1/2MS+0.1mg/L IBA+1.5%蔗糖+7.0g/L琼脂,pH为5.8。

[0025] 所述步骤4)中的继代次数不超过5次。

[0026] 本发明的有益效果:

[0027] (1)本发明采用百日草茎段作为种质保存材料来源,取材更加容易,来源更加广阔,减小了生长季节限制,为育种工作中的种质引进和保存提供了捷径;

[0028] (2)本发明通过控制组织培养条件,有效地延缓了百日草种苗的生长,使得种质资源保存周期大大拉长,种质资源保存周期最长可达4年;

[0029] (3)与常规保种方法相比,本发明的原料成本降低、劳动力和培养保存空间减少,而且操作简便,从而大大降低了保种成本;

[0030] (4)与常规保种方法相比,本发明苗移栽成活率大大提高,可达95%以上。

附图说明

[0031] 附图1为常规组培条件下百日草种质芳菲2号生长1个月的示意图;

[0032] 附图2为采用本发明的百日草组培繁殖的种质保存方法,百日草种质芳菲2号继代

4次又生长8个月的示意图；

[0033] 附图3为采用本发明的百日草组培繁殖的种质保存方法,百日草种质芳菲2号继代4次又生长8个月(种质保存4年整)复壮并生根移栽时的状态示意图。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图与实施例对本发明作进一步的说明,实施例中无特殊说明的为常规方法。

实施例

[0035] 2010-2014年,选择百日草种质芳菲2号按照本发明的技术路线进行组培繁殖的种质保存,详细步骤如下:

[0036] 1) 外植体的选材与低温预处理:

[0037] 选择生长至现蕾期的、健壮无病、种质与亲本一致的百日草整株,先用自来水冲洗掉根部泥土及其它表面杂物,然后用毛刷蘸取洗洁精洗一遍后接着用超纯水冲洗干净,将植株根部浸入装有8mg/L的KT溶液中,2℃低温预处理5天;

[0038] 2) 接种:

[0039] 将百日草用超纯水清洗后转移到超净工作台里,用70%酒精表面消毒15s,再用无菌水冲洗两次,然后置于加入了数滴吐温20的0.1%升汞中处理10 min,再用无菌水冲洗4-5次,滤纸吸干,用解剖刀切割0.5-0.8cm长的茎段后用镊子接种至装有培养基①(培养基①的配方为:MS+0.5mg/L KT+1.5mg/L 6-BA+0.4mg/L GA+0.3g/L CH +3%蔗糖+6.5g/L琼脂,pH为5.8)的三角瓶中;

[0040] 3) 不定芽诱导并转接:培养室温度控制为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$,以荧光灯为光源,光照强度控制为1800Lx,光周期控制为光14h/暗10h,25-30天诱导出不定芽,然后将不定芽接种至培养基②(培养基②的配方为:MS+0.5mg/L 6-BA+0.5mg/LKT+3%蔗糖+6.5g/L琼脂,pH为5.8)中,将接种好的三角瓶放入培养箱中培养,培养箱温度控制为 24°C ,光照强度控制为1800Lx、光周期控制为光14h/暗10h,培养6天,同时设置对照组,对照组继外植体选材、低温预、接种方式、培养基种类均相同,对照组不转移到低温弱光条件下而维持本培养条件,持续生长1个月,芳菲2号种质生长状态如附图1;

[0041] 4) 慢生长保存种质:

[0042] 将三角瓶转移到低温、弱光条件下,培养温度控制为 6°C ,光照强度控制为500lx,光周期控制为光12h/暗12h,让其缓慢生长,每培养10个月,继代接种一次再低温培养,芳菲2号继代4次又生长8个月的状态如附图2;

[0043] 5) 复壮:

[0044] 当需要百日草恢复生长时,将三角瓶转移到温度控制为 24°C 、光照强度控制为1800Lx、光周期控制为光14h/暗10h的培养箱中培养12天,重新获得健壮的百日草幼苗;

[0045] 6) 生根移栽:

[0046] 将百日草幼苗转移到培养基③(培养基③的配方为:1/2MS+0.1mg/L IBA+1.5%蔗糖+7.0g/L琼脂,pH为5.8)中,控制温度为 24°C 、湿度 $\geq 85\%$ 、光照强度为2500lx培养条件下生长12天诱导生根,然后炼苗移栽,此时芳菲2号植株恢复健壮,发育状态良好,如附图3,再

移栽到装有基质的培养盆里,统计移栽成活率统计达96%。

[0047] 由以上实施例可以发现,采用本发明的百日草组培繁殖的种质保存方法,通过控制组织培养条件,有效地延缓了百日草种苗的生长,种质资源保存周期可长达4年,而且种质保存状态良好,材料经过复壮后植株鲜活,移栽成活率高达95%以上。本发明取材简单,来源便捷,劳动力和培养保存空间减少,而且操作简便,大大降低了保种成本,克服了常规百日草种质资源保存的不足,而且技术稳定可靠,可重复性强,非常适合大规模百日草种质的保存,是一种优良的百日草种质资源保存方法。

[0048] 本领域技术人员可以根据本发明公开的内容和所掌握的本领域技术对本发明内容作出替换或变型,但是这些替换或变型都不应视为脱离本发明构思的,这些替换或变型均在本发明要求保护的权利要求范围内。



图1



图2



图3