



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108055893 A

(43)申请公布日 2018.05.22

(21)申请号 201810146413.9

(22)申请日 2018.02.12

(71)申请人 湖南师范大学

地址 410006 湖南省长沙市岳麓区麓山南路36号

(72)发明人 姜孝成 孙亚蓉 曹丽娟 周诗琪
吴多 杜旭 周艳

(74)专利代理机构 长沙永星专利商标事务所
(普通合伙) 43001

代理人 周咏

(51)Int.Cl.

A01C 1/00(2006.01)

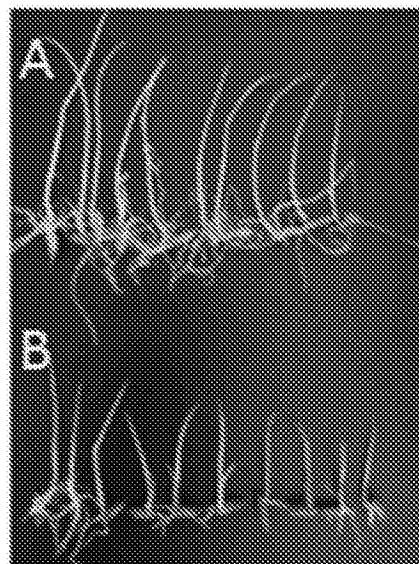
权利要求书1页 说明书11页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种提高种子活力的处理方法

(57)摘要

本发明公开了一种提高种子活力的处理方法,包括以下步骤:1)人工合成miR168a,其核苷酸序列如SEQ ID 1所示;接着将合成的miR168a溶解于无菌纯净水中,得到外源miR168a溶液;2)将种子采用miR168a溶液进行浸泡处理,提高种子的活力。本发明主要是采用了外源的miR168a对种子进行萌发前处理,提高种子的活力,促进低活力种子的萌发,提高种子的发芽率,促进种子的根和芽的生长。



1. 一种提高种子活力的处理方法,包括以下步骤:

1) 人工合成miR168a,其核苷酸序列如SEQ ID 1所示;接着将合成的miR168a溶解于无菌纯净水中,得到外源miR168a溶液;

2) 将种子采用miR168a溶液进行浸泡处理,提高种子的活力。

2. 根据权利要求1所述的提高种子活力的处理方法,其特征在于,所述步骤1)中,外源miR168a溶液的浓度为0.5-1.5 μ g/ml。

3. 根据权利要求1或2所述的提高种子活力的处理方法,其特征在于,所述步骤2)中,miR168a溶液浸泡处理种子的具体步骤为:将待萌发的种子灭菌消毒、清洗干净后,置于外源miR168a溶液浸泡处理1d,接着取出种子,然后以水为萌发基质,在设定温度下,对种子进行萌发。

4. 根据权利要求1或2所述的提高种子活力的处理方法,其特征在于,所述步骤2)中,miR168a溶液浸泡处理种子的具体步骤为:将种子完全浸泡于外源miR168a溶液中2~3h后,将种子风干至安全含水量后,密封包装进行贮藏;贮藏至种子待萌发处理时,将种子灭菌消毒、清洗干净后,置于外源miR168a溶液浸泡处理1d,接着取出种子,然后以水为萌发基质,在设定温度下,对种子进行萌发。

5. 根据权利要求3或4所述的提高种子活力的处理方法,其特征在于,所述的萌发时种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5-2。

6. 根据权利要求3或4所述的提高种子活力的处理方法,其特征在于,所述的萌发时,设定温度为27~30 $^{\circ}$ C。

7. 根据权利要求3或4所述的提高种子活力的处理方法,其特征在于,所述的萌发时,萌发处理时间为3-7d。

一种提高种子活力的处理方法

技术领域

[0001] 本发明属于农业技术领域,具体涉及一种提高种子活力的处理方法。

背景技术

[0002] 目前,大部分种子的萌发处理都是将种子灭菌消毒后,在适宜的温度下,将种子以水浸泡吸涨后,再进行萌发处理。但是种子在贮藏过程中,由于内外因素的影响,会导致种子的活力降低甚至失活,因而种子批中总会存在一些仍有一定活力但又不能发芽的种子。因此,如何促进低活力种子的发芽,是提高种子发芽率的关键。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种提高种子活力的处理方法,以解决低活力种子难以萌发的缺陷。

[0004] 本发明这种提高种子活力的处理方法,包括以下步骤:

[0005] 1) 人工合成miR168a,其核苷酸序列如SEQ ID 1所示;接着将合成的miR168a溶解于无菌纯净水中,得到外源miR168a溶液;

[0006] 2) 将种子采用miR168a溶液进行浸泡,提高种子的活力。

[0007] 所述步骤1)中,外源miR168a溶液的浓度为0.5-1.5 μ g/ml。

[0008] 所述步骤2)中,miR168a溶液浸泡处理种子的具体步骤为:将待萌发的种子灭菌消毒、清洗干净后,置于外源miR168a溶液浸泡处理1d,接着取出种子,然后以水为萌发基质,在设定温度下,对种子进行萌发。

[0009] 所述步骤2)中,miR168a溶液浸泡处理种子的具体步骤为:将种子完全浸泡于外源miR168a溶液中2~3h后,将种子风干,并密封包装进行贮藏;贮藏至种子待萌发处理时,将种子灭菌消毒、清洗干净后,置于外源miR168a溶液浸泡处理1d,接着取出种子,然后以水为萌发基质,在设定温度下,对种子进行萌发。

[0010] 所述的萌发时,种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:(1.5-2);设定温度为27~30 $^{\circ}$ C;萌发时间为3-7d。

[0011] miR168a属于miRNA中的一种。miRNA是一类非编码蛋白的单链短RNA序列;植物的miRNA可调控植物生长发育的整个生命过程。有研究表明,种子活力与miR168a的表达相关,miR168a表达上调,种子活力就越高。因此推测外源miR168a也能促进种子活力的提升。

[0012] 本发明的有益效果:本发明主要是采用了外源的miR168a对种子进行处理,提高种子的活力,促进低活力种子的萌发,提高种子的发芽率,促进种子的根和芽的生长。

附图说明

[0013] 图1实施例6(A,miR168a处理)与对比例6(B,水处理)的水稻五优308种子(2015年采收,贮藏2年)发芽后的幼苗形态比较。

[0014] 图2实施例7(A,miR168a处理)与对比例7(B,水处理)的水稻五优308种子(2016年

采收,贮藏1年)发芽后的幼苗形态比较。

[0015] 图3实施例8(A,miR168a处理)与对比例8(B,水处理)的水稻凤两优丝苗种子(2015年采收,贮藏2年)发芽后的幼苗形态比较。

[0016] 图4实施例9-13和对比例9-13中种子萌发后,以幼苗的DNA为模板,以ISSR UBC-808序列(5'-AGAGAGAGAGAGAGC-3')为引物的PCR产物的比较;1:H₂O处理;2:外源miR168a溶液处理。

具体实施方式

[0017] 实施例1

[0018] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0μg/ml的水溶液。

[0019] 将2013年采收、贮藏了4年的水稻凤两优丝苗种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min;倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于Φ11.0cm培养皿中,以外源miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验。萌发处理7d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表1所示。

[0020] 萌发率=(萌发种子数/试验种子总数)×100%;

[0021] 活力指数=萌发率(%)×根长(cm)。

[0022] 对比例1

[0023] 将实施例1中对水稻凤两优丝苗种子进行浸泡处理时的miR168a溶液用水取代,其他操作和条件不变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表1所示。

[0024] 表1外源miR168a对自然贮藏4年的水稻凤两优丝苗种子萌发的影响

[0025]

品种	处理	发芽率(%)	芽长(cm)	根长(cm)	活力指数
凤两优丝苗 (2013)*	实施例1	80.0±4.0	3.37±0.75	5.29±1.45	4.23±0.24
凤两优丝苗 (2013)	对比例1	74.0±2.0	3.13±1.71	5.18±0.90	3.83±0.26

[0026] *:括号中数字为种子采收年份,下同。

[0027] 由表1可知,与对比例1相比,实施例1中凤两优丝苗的发芽率由74%提高至80%,其根长、芽长和活力指数也大于对比例1,说明miR168a溶液浸泡可提高种子的活力水平,促进种子发芽,提高种子的发芽率,加快其根和芽的生长。

[0028] 实施例2

[0029] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0μg/ml的水溶液。

[0030] 将2013年采收、贮藏了4年的水稻凤两优丝苗种子完全浸泡于外源miR168a溶液中,浸泡2h后,将种子吹风凉干,使种子含水量降至安全贮藏含水量10~12%后,装入牛皮纸袋中;密封保存3个月。

[0031] 将保存了3个月后的种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min;倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于Φ11.0cm培养皿中,以外源miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验。萌发处理7d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表2所示。

[0032] 对比例2

[0033] 将2013年采收、贮藏了4年的水稻凤两优丝苗种子完全浸泡于水中2~3h后,吹风凉干,使种子含水量降至安全贮藏含水量10~12%后,装入牛皮纸袋中;密封保存3个月。

[0034] 保存了3个月后的种子的萌发试验按对比例1的方法进行,种子萌发的结果如表2所示。

[0035] 表2外源miR168a浸泡贮藏和萌发前浸泡处理对水稻凤两优丝苗种子萌发的影响

[0036]

品种	处理	萌芽率(%)	芽长(cm)	根长(cm)	活力指数
凤两优丝苗 (2013)	实施例2	97.0±1.0	3.51±0.66	5.29±1.65	5.13±0.02
凤两优丝苗 (2013)	对比例2	82.0±2.5	3.12±0.51	5.04±0.68	4.10±0.53

[0037] 由表2可知,与对比例2相比,实施例2中凤两优丝苗的萌芽率由82%提高至97%,其根长和芽长也长于对比例2,说明种子用miR168a溶液浸泡后贮藏,以及在萌发前再用miR168a溶液浸泡处理可进一步促进低活力种子的萌发(与实施例1相比较),提高种子的发芽率,也可加快其根和芽的生长。

[0038] 实施例3

[0039] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.5μg/ml的水溶液。

[0040] 将2015年采收、贮藏了2年的水稻凤两优丝苗的种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于Φ11.0cm培养皿中,以外源miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:2],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理6d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表3所示。

[0041] 对比例3

[0042] 将实施例3中对水稻凤两优丝苗种子进行浸泡处理时的miR168a溶液用水取代,其他操作和条件不变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表3所示。

[0043] 表3外源miR168a对自然贮藏2年的水稻凤两优丝苗种子萌发的影响

[0044]

品种	处理	发芽率 (%)	芽长 (cm)	根长(cm)	活力指数
凤两优丝苗 (2015)	实施例 3	95.0±3.0	3.65±0.71	5.78±1.10	5.49±0.46
凤两优丝苗 (2015)	对比例 3	93.0±2.0	3.55±0.69	5.36±1.40	4.98±0.47

[0045] 由对比例1和对比例3可知,水稻凤两优丝苗的2015年采收后贮藏2年的种子活力高于2013年采收后贮藏4年的种子活力,说明水稻种子的贮藏时间越长,种子活力越低。由表3可知,与对比例3相比,实施例3中凤两优丝苗的发芽率由93.0%提高至95.0%,其根长和芽长也优于对比例3,说明对于贮藏2年的高活力的凤两优丝苗种子,采用miR168a溶液进行浸泡处理(实施例3),仍可进一步提高种子活力水平。

[0046] 实施例4

[0047] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0μg/ml的水溶液。

[0048] 将2015年采收、贮藏了2年的水稻凤两优丝苗种子完全浸泡于外源miR168a溶液中,浸泡2~3h后,将种子吹风凉干,使种子含水量降至安全贮藏含水量10~12%后,装入牛皮纸袋中;密封保存4个月。

[0049] 将保存了4个月的水稻凤两优丝苗的种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于Φ11.0cm培养皿中,以外源miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:2],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理7d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表4所示。

[0050] 对比例4

[0051] 将2015年采收、贮藏了2年的水稻凤两优丝苗种子完全浸泡于水中,浸泡3h后,将种子吹风凉干,使种子含水量降至安全贮藏含水量10~12%后,装入牛皮纸袋中;密封保存4个月。

[0052] 保存了4个月的水稻凤两优丝苗种子萌发处理按对比例3的方法进行,种子萌发的结果如表4所示。

[0053] 表4外源miR168a浸泡贮藏和萌发前浸泡处理对水稻凤两优丝苗种子萌发的影响

[0054]

品种	处理	萌芽率 (%)	芽长 (cm)	根长(cm)	活力指数
凤两优丝苗 (2015)	实施例 4	97.5±2.2	3.64±1.12	5.78±0.90	5.61±0.45
凤两优丝苗 (2015)	对比例 4	93.5±1.2	3.50±0.67	5.45±0.69	5.07±0.49

[0055] 由表4可知,与对比例4相比,实施例4处理的2015年采收、贮藏了2年的水稻凤两优丝苗种子的发芽率由93.5%提高至97.5%,其芽长与根长也明显优于对比例4,说明外源miR168a浸泡后贮藏,以及在萌发前再用miR168a溶液浸泡处理,可维持高活力水稻种子的活力水平,确保种子的高发芽率和种子萌发后幼苗的芽和根的正常生长。

[0056] 实施例5

[0057] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0μg/ml的水溶液。

[0058] 将2016年采收、贮藏了1年的水稻中两优2727种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于Φ11.0cm培养皿中,以外源miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:2],浸泡完后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于27±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理6d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表5所示。

[0059] 对比例5

[0060] 将实施例5中对种子进行浸泡处理时的miR168a溶液用水取代,其他操作和条件不变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表5所示。

[0061] 表5外源miR168a对自然贮藏1年的水稻中两优2727种子萌发的影响

[0062]

品种	处理	发芽率 (%)	芽长 (cm)	根长(cm)	活力指数
中两优 2727 (2016)	实施例 5	80.0±3.5	2.79±1.50	3.06±1.93	2.45±0.31
中两优 2727 (2016)	对比例 5	68.0±2.1	2.64±1.16	2.90±2.02	1.97±0.12

[0063] 表5结果表明,水稻中两优2727的种子是典型的不耐贮藏的种子,2016年采收、贮藏1年后,种子的萌芽率降低至68%;但采用miR168a溶液(实施例5)对种子进行浸泡处理,可使种子的发芽率提高至80%,种子的根长和芽长也有明显的增长,种子的活力指数明显提高。

[0064] 实施例6

[0065] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成0.5 μ g/ml的水溶液。

[0066] 将2015年采收、贮藏了2年的水稻五优308种子,在42℃和100%RH的条件下,人工老化处理8d。将老化后的种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于 Φ 11.0cm培养皿中,以miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28 $\pm$ 1℃的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理6d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表6所示;发芽后的幼苗形态如图1-A所示。

[0067] 对比例6

[0068] 将实施例6中对种子进行浸泡处理时的miR168a溶液用水取代,其他条件和操作不变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表6所示;发芽后的幼苗形态如图1-B所示。

[0069] 表6外源miR168a对人工老化的水稻五优308种子萌发的影响

[0070]

品种	处理	发芽率(%)	根长(cm)	芽长(cm)	活力指数
五优 308 (2015)	实施例 6	40.0 $\pm$ 9.0	3.15 $\pm$ 1.40	2.98 $\pm$ 1.20	1.26 $\pm$ 0.21
五优 308 (2015)	对比例 6	10.0 $\pm$ 6.0	0.49 $\pm$ 0.42	1.89 $\pm$ 0.63	0.05 $\pm$ 0.01

[0071] 人工老化处理后,2015年采收、贮藏了2年的水稻五优308种子的活力大幅度降低,常规的萌发处理(对比例6)时发芽率仅为10%;采用miR168a溶液浸泡处理(实施例6),可使其发芽率大幅提高至40%,且芽长、根长和活力指数均显著高于对比例6(表6、图1)。

[0072] 实施例7

[0073] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0 μ g/ml的水溶液。

[0074] 将2016年采收、贮藏了1年的水稻五优308种子,在42℃和100%RH的条件下,人工老化处理8d。将老化后的种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于 Φ 11.0cm培养皿中,以miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:2],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于在28 $\pm$ 1℃的恒温培养箱中进行萌发试验。萌发处理7d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表7所示;发芽后幼苗的形态如图2-A所示。

[0075] 对比例7

[0076] 将实施例7中对种子进行浸泡处理的miR168a溶液用水取代,其他条件和操作不

变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表7所示;发芽后幼苗的形态如图2-B所示。

[0077] 表7外源miR168a对人工老化的水稻五优308种子萌发的影响

[0078]

品种	处理	发芽率 (%)	根长 (cm)	芽长(cm)	活力指数
五优 308 (2016)	实施例 7	32.0±1.4	1.08±0.82	2.13±0.96	0.34±0.05
五优 308 (2016)	对比例 7	22.0±4.2	1.03±0.66	1.92±1.02	0.23±0.03

[0080] 老化处理后,2016年采收、贮藏了1年的水稻五优308种子的活力大幅度降低,常规的萌发处理(对比例7)时发芽率仅为22%;采用miR168a溶液浸泡处理(实施例7),可使种子发芽率提高至32%;根长、芽长和活力指数也有所提高(表7、图2)。

[0081] 实施例8

[0082] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0μg/ml的水溶液。

[0083] 将2015年采收、贮藏了2年的水稻凤两优丝苗的种子,在42℃和100%RH的条件下,人工老化处理8d。将老化后的种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。种子置于Φ11.0cm培养皿中,以miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡完后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验。萌发处理7d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表8所示,种子发芽后幼苗的形态如图3-A所示。

[0084] 对比例8

[0085] 将实施例8中对种子进行浸泡处理的miR168a溶液用水取代,其他条件和操作不变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表8所示;种子发芽后幼苗的形态如图3-B所示。

[0086] 表8外源miR168a对人工老化的水稻凤两优丝苗的种子萌发的影响

[0087]

品种	处理	发芽率 (%)	根长 (cm)	芽长(cm)	活力指数
凤两优丝苗 (2015)	实施例 8	34.0±1.4	1.96±0.92	2.55±1.25	0.67±0.03

[0088]

凤两优丝苗 (2015)	对比例 8	18.0±0.9	1.08±1.43	1.07±0.70	0.19±0.05
-----------------	-------	----------	-----------	-----------	-----------

[0089] 种子老化处理后,2015年采收、贮藏了2年的水稻凤两优丝苗种子的活力大幅度降低,常规的萌发处理(对比例8)时发芽率仅为18%;采用miR168a溶液浸泡处理(实施例8)可使其发芽率提高至34%,芽长、根长和活力指数也明显提高(表8、图3)。

[0090] 实施例9

[0091] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0μg/ml的水溶液。

[0092] 将购自种子公司的番茄(厚皮早丰)种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于Φ11.0cm培养皿中,以miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理7d后,并计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表9所示。

[0093] 对比例9

[0094] 将实施例9中对番茄(厚皮早丰)种子进行浸泡处理的外源miR168a溶液替换成水,其他条件和操作不变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表9所示。

[0095] 表9外源miR168a对番茄(厚皮早丰)种子萌发的影响

[0096]

品种	处理	发芽率(%)	根长(cm)	芽长(cm)	活力指数
番茄 (厚皮早丰)	实施例 9	46.0±1.2	3.3±0.3	2.4±0.4	1.50±0.04
番茄 (厚皮早丰)	对比例 9	40.0±1.1	2.4±1.6	2.2±0.6	0.96±0.12

[0097] 由表9可知,与对比例9相比,实施例9中番茄种子的发芽率由40%提高至46%,种子的活力指数由0.95提升至1.50,说明miR168a溶液浸泡可提高番茄种子的活力水平。

[0098] 实施例10

[0099] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0μg/ml的水溶液。

[0100] 将购自种子公司的黄瓜(津优)种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于Φ11.0cm培养皿中,以miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于27±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理7d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表

10所示。

[0101] 对比例10

[0102] 将实施例10中对黄瓜(津优)种子进行浸泡处理的外源miR168a溶液替换成水,其他条件和操作不变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表10所示。

[0103] 表10外源miR168a对黄瓜(津优)种子萌发的影响

[0104]

品种	处理	发芽率 (%)	根长 (cm)	芽长(cm)	活力指数
黄瓜 (津优)	实施例 10	98.0±1.0	6.2±0.9	2.4±0.4	6.08±0.13
黄瓜 (津优)	对比例 10	97.0±1.0	5.9±0.2	2.4±0.4	5.15±0.12

[0105] 本试验中的黄瓜(津优)种子的发芽率相对较高,说明其种子活力原本就高;但是采用本发明miR168a溶液浸泡处理(实施例10),仍有提高其种子活力的效果。

[0106] 实施例11

[0107] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0μg/ml的水溶液。

[0108] 将购自种子公司的绿豆(绿宝)种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于Φ11.0cm培养皿中,以miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28±1℃的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理7d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表11所示。

[0109] 对比例11

[0110] 将实施例11中对绿豆(绿宝)种子进行浸泡处理的外源miR168a溶液替换成水,其他条件和操作不变。计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表11所示。

[0111] 表11外源miR168a对绿豆(绿宝)种子萌发的影响

[0112]

品种	处理	发芽率 (%)	根长 (cm)	芽长(cm)	活力指数
绿豆 (绿宝)	实施例 11	98.0±1.0	2.7±1.0	5.2±1.2	2.65±0.07
绿豆 (绿宝)	对比例 11	96.0±2.0	1.9±0.6	4.7±1.7	1.82±0.15

[0113] 本试验中的绿豆(绿宝)种子的发芽率相对较高,说明其种子活力原本就高;但是采用本发明miR168a溶液浸泡处理(实施例11),仍可提高绿豆种子的活力水平。

[0114] 实施例12

[0115] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0 μ g/ml的水溶液。

[0116] 将购自种子公司的小白菜(536)种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于 Φ 11.0cm培养皿中,以miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡完后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于28 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理7d后,计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表12所示。

[0117] 对比例12

[0118] 将实施例12中对小白菜(536)种子进行浸泡处理的外源miR168a溶液替换成水,其他条件和操作不变。种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数的结果如表12所示。

[0119] 表12外源miR168a对小白菜(536)种子萌发的影响

[0120]

品种	处理	发芽率(%)	根长(cm)	芽长(cm)	活力指数
小白菜 (536)	实施例 12	88.0 $\pm$ 2.6	2.1 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.8	1.85 $\pm$ 0.08
小白菜 (536)	对比例 12	84.0 $\pm$ 1.0	2.0 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.5	1.68 $\pm$ 0.07

[0121] 本试验中的小白菜(536)种子的发芽率相对较高,表明其种子活力水平较高;但是采用本发明miR168a溶液浸泡处理(实施例12)仍可提高小白菜种子的活力水平。

[0122] 实施例13

[0123] 人工合成miR168a的核苷酸序列(外源miR168a),接着将外源miR168a溶解于无菌纯净水中,配制成1.0 μ g/ml的水溶液。

[0124] 将本实验室2016年生产、贮藏1年的常规水稻(ZR02)种子先用无菌纯净水洗3~4遍,再用75%的酒精浸泡1min,倒干酒精后,用3%的次氯酸钠浸泡,180rpm振摇30min,弃溶液,种子用无菌纯净水清洗4~5遍,放滤纸上吸干表面水分。消毒后的种子置于 Φ 11.0cm培养皿中,以miR168a溶液浸泡种子1d[种子与外源miR168a溶液的质量体积比(W:V=g/ml)为1:1.5],浸泡后,倒掉残留的外源miR168a溶液,然后以纯净水为萌发基质,将其置于30 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C的恒温培养箱中进行萌发试验,萌发处理7d后,并计算种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数,结果如表13所示。

[0125] 对比例13

[0126] 将实施例13中对常规水稻ZR02种子进行浸泡处理的外源miR168a溶液替换成水,其他条件和操作不变。种子发芽率、幼苗根长和芽长、种子的活力指数的结果如表13所示。

[0127] 表13外源miR168a对常规水稻(ZR02)种子萌发的影响

[0128]

品种	处理	发芽率(%)	根长 (cm)	芽长(cm)	活力指数
水稻 ZR02 (2016)	实施例 13	98.0±1.7	1.5±0.7	1.5±0.6	1.47±0.07
水稻 ZR02 (2016)	对比例 13	96.0±1.0	1.2±0.4	1.4±0.3	1.15±0.14

[0129] ZR02是常规水稻,其种子贮藏1年后,发芽率仍有96%(对比例13),说明其活力水平高。因此,相比杂交水稻种子,常规水稻ZR02的种子有良好的耐贮藏性。但是采用本发明miR168a溶液浸泡处理(实施例13)仍可进一步提高ZR02种子的活力水平。

[0130] 外源miR168a与水处理的种子萌发后幼苗的DNA遗传多样性比较

[0131] 运用ISSR技术,对实施例9-13处理和对比例9-13处理的番茄、黄瓜、绿豆、小白菜和常规水稻种子萌发后幼苗的DNA进行遗传多态性比对分析,其结果如图4所示。由图4可知,不同作物种子采用miR168a溶液进行浸泡处理,萌发后幼苗的DNA序列与采用水进行萌发处理的萌发后幼苗的DNA序列是完全一致的,说明外源miR168a不会改变种子的遗传物质结构组成,不存转基因的风险。

序列表

<110> 湖南师范大学

<120> 一种提高种子活力的处理方法

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> miR168a

<400> 1

ucgcuuggug cagaucggga c 21

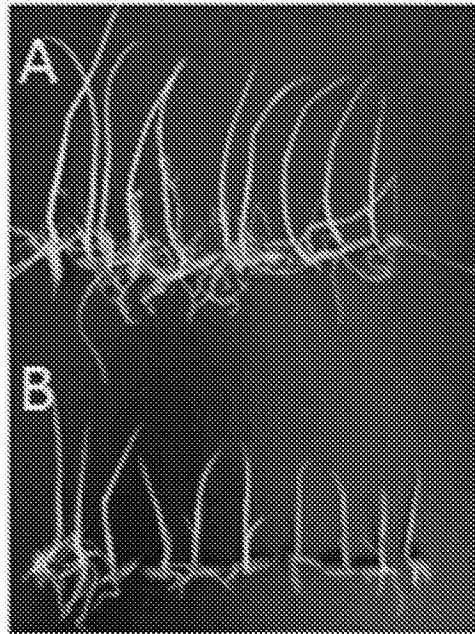


图1

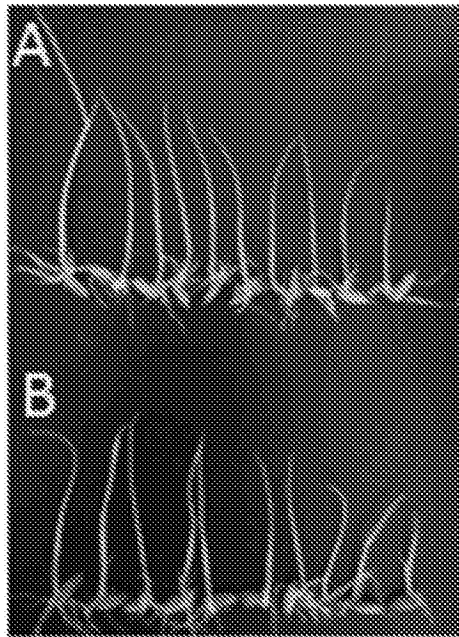


图2

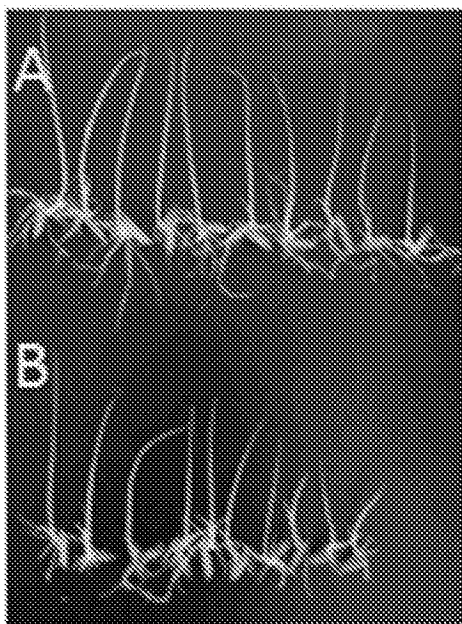


图3

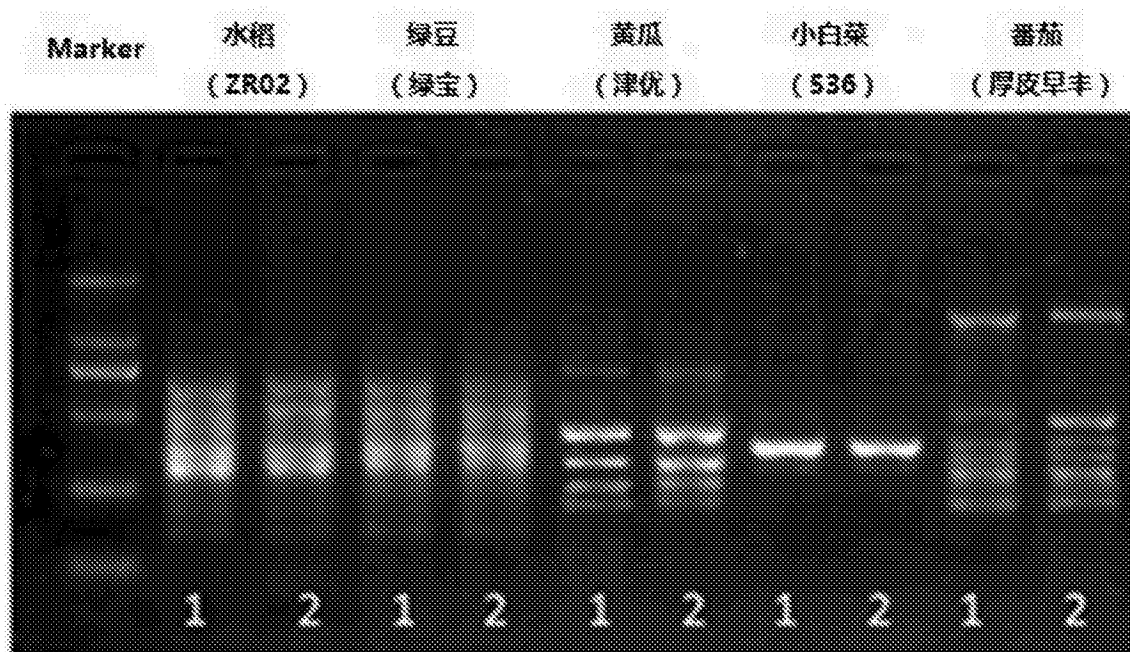


图4