(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105010123 B
(45)授权公告日 2017.06.09

(21)申请号 201410175221.2

(22)申请日 2014.04.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105010123 A

(43)申请公布日 2015.11.04

(73)专利权人 上海市农业科学院
地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号

(72)发明人 高清华 殷丽青 段可 叶正文 郑宏清 张丽勋

(74)专利代理机构 上海开祺知识产权代理有限公司 31114
代理人 费开逵 李兰英

(51)Int.Cl.
A01H 1/02(2006.01)
A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 103299906 A,2013.09.18,
CN 103299905 A,2013.09.18,
CN 102668987 A,2012.09.19,
CN 103430845 A,2013.12.11,
CN 101049090 A,2007.10.10,
US 4756922 A,1988.07.12,
高清化等.草莓生物技术育种研究进展.《分子植物育种》.2006,第4卷(第3(S)期),第123-129页.
马鸿翔等.黄毛草莓、东北草莓与凤梨草莓种间杂交种的胚拯救.《江苏农业学报》.2003,第19卷(第1期),第37-40页.
雷泽勇等.关于离体胚组织培养在植物育种中的应用进展.《防护林科技》.2001,(第3期),第57-59页.
洪燕萍等.草莓离体培养研究进展.《福建农业学报》.1999,第14卷(第2期),第37-44页.
Amjad M. Husaini,et al..A High-Efficiency Direct Somatic Embryogenesis System for Strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) Cultivar Chandler.《J. Crop Sci. Biotech.》.2008,第11卷(第2期),第107-110页.

审查员 方晓云

权利要求书2页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法及培养基

(57)摘要

本发明公开了一种通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法及培养基，该技术分别以栽培草莓品种久香、甜查理、丰香为母本或父本，野生黄毛草莓为父本或母本进行杂交，正交与反交同时进行。通过对杂交授粉后的未成熟胚进行离体培养，在胚败育前将其取出进行挽救培养，避免远缘杂种胚的衰亡，使大量远缘杂种胚继续发育成幼苗，并进入选育程序，缩短了育种周期；同时，获得了大量远缘杂交后代，实现了草莓属种间的远缘杂交，创制了一批新种质，有效地缩短了草莓杂交后代的培育周期，杂种胚成苗率可达到91.67%。

CN 105010123 B

1.通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法,包括以下步骤:

1)杂交授粉:以栽培草莓品种和野生草莓品种为杂交亲本进行杂交授粉;

2)果实消毒:将授粉后5～35天其种子未完全发育的果实取下,于4℃～7℃存放3～4小时,取大小为1～3厘米的果实,先用70%的酒精表面消毒10～30秒,再用0.1wt%的升汞溶液灭菌1～3分钟,之后用无菌水清洗3～5遍,吸干果实表面水分;

3)未成熟胚剥离:在无菌条件下,将灭菌的果实取下种子剥离其幼胚,立即接种于诱导培养基中离体培养,先暗培养7天,再进行光照培养,诱导培养21～28天后获得膨大的胚;

光照培养条件为:光照时间10小时/天,光照强度2000～3000Lx,培养温度24±1℃;

诱导培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,吲哚丁酸IBA0.3～0.5mg/L,pH5.5～5.8;

4)胚萌发培养:将膨大的胚剥除胚乳后置于胚萌发培养基中进行挽救培养,培养30～35天后幼胚萌发,光照培养条件同步骤3);

胚萌发培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,萘乙酸NAA0.2～0.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤6-BA1.2～1.5mg/L,pH5.5～5.8;

5)增殖培养:将萌发的幼胚接种至增殖培养基中,光照培养条件和培养基组成与步骤4)相同,每10～15天继代增殖1次,获得芽苗;

6)生根培养:将经过1～4次继代增殖培养的芽苗从芽丛中切下,转到生根培养基中促使其生根,生根培养45～60天,得到生根的草莓胚苗,培养温度24±1℃;

生根培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,吲哚丁酸IBA0.2～0.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤6-BA0.02～0.05mg/L,水解酪蛋白LH0.2～0.4g/L,腺嘌呤Ad4～6mg/L,pH5.5～5.8;

7)炼苗移栽:开瓶后在瓶底加水,炼苗3～4天,然后将生根苗从培养瓶中取出,清水洗净根系附带的培养基,然后移栽在栽培基质中遮光处理2～3天,在温室中保持相对湿度75%～85%进行炼苗,培养20～30天即可移入大田种植。

2.根据权利要求1所述的通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法,其特征在于,步骤7)所述的炼苗移栽过程为:将生根后的草莓胚苗,移栽前将瓶盖打开一条缝,注入10～15毫升无菌水进行自然驯化2～3天,接着完全揭开瓶盖并添加10～15毫升蒸馏水锻炼1天,将生根苗从培养瓶中取出,清水洗净根系附带的培养基,然后移栽在灭菌的栽培基质中遮光遮荫处理2～3天,在温室中保持相对湿度75%～85%进行炼苗,培养20～30天即可移入大田种植。

3.根据权利要求1或2所述的通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法,其特征在于,所述的栽培草莓品种为久香、甜查理或丰香,野生草莓品种为野生黄毛草莓。

4.用于离体挽救培养获得草莓远缘杂种的培养基,其包括,诱导培养基、胚萌发培养基和生根培养基,其特征在于,

所述的诱导培养基,其由以下组分组成:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,吲哚丁酸IBA0.3～0.5mg/L;

所述的胚萌发培养基,其由以下组分组成:1/2MS基本培养基,蔗糖30g～50g/L,琼脂6g～8g/L,萘乙酸NAA0.2～0.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤6-BA1.2～1.5mg/L;

所述的生根培养基,其由以下组分组成:1/2MS基本培养基,蔗糖30g～50g/L,琼脂6g～

8g/L,吲哚丁酸IBA0.2～0.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤6-BA0.02～0.05mg/L,水解酪蛋白LH0.2～0.4g/L,腺嘌呤Ad4～6mg/L。

通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法及培养基

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法及培养基。

背景技术

[0002] 草莓属于蔷薇科(Rosaceae)草莓属(Fragaria)多年生草本果树，在世界小浆果生产中居于首位，绝大部分国家均有栽培。种质资源是育种的物质基础，近代作物育种所取得的巨大成就主要得益于一批重要种质的发现和利用，以及育种技术的创新和应用。种质资源的收集、发掘和利用越来越受到各国政府和育种家的高度重视。一方面，由于人们对种质资源的重视，存在于植物本身的有利基因及性状越来越多地被发现，对其利用的速度也在加快。另一方面，种质资源的概念已经拓展，其研究利用的趋势是扩大亲缘距离进行远缘或超远缘杂交育种。

[0003] 中国是世界上野生草莓资源种类最丰富的国家，全世界草莓属植物约有20个种，在我国自然分布的野生草莓有11个种，约占世界草莓资源的一半以上。野生草莓具有广泛的适应性和多种优良性状，是品种改良的重要亲本。在野生草莓中存在着大量可利用的优良性状，如抗病、抗逆、果实品质(大果、香味、硬肉等)、光周期(四季结果和日中性)、直立性及可观赏性等，将其导入草莓栽培种对草莓种质创新和品种改良极为重要。我国分布的野生草莓资源多为倍性较低的2x、4x和5x，在与8x栽培草莓杂交时常出现不亲和或杂种不育等现象。中国在野生草莓的远缘杂交利用方面已经取得了重要进展，主要利用栽培种凤梨草莓与野生草莓常规杂交，通过染色体加倍获得了一批多倍性中间育种材料。但染色体加倍技术复杂，成本较高，果实发育迟缓，结实率偏低，不易获得目标性状材料，育种年限长。

[0004] 远缘杂交是利用外源基因获得优良种质的一条很好途径，但杂交常常会碰到很多障碍，其中胚胎发育中途夭折就是其一，即远缘杂交授粉、受精成功，受精卵也可分裂，早期胚胎可以发育，但胚胎发育到一定时间就停止、死亡。通过离体胚挽救技术在胚败育前，取杂种胚培养可以克服这种障碍。胚挽救技术是育种研究中克服胚败育或发育不良，提高萌发率以及提早萌发，缩短童期、培育远缘杂交优良种质的有效手段。Wang D等人报道了草莓幼胚培养的研究，但主要是针对幼胚培养的影响因素进行了研究，并未研究在育种技术中的具体应用(HortScience，1984，19:71-72)。由于远缘杂交育种过程中选择的亲本来源和遗传背景不同，在对未成熟胚进行离体培养过程中胚诱导、胚萌发、增殖、生根、成苗等状况会存在差异性，目前利用草莓的未成熟胚进行离体培养在远缘杂交育种中的成功应用尚未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法及培养基，采用离体胚挽救技术，将野生品种和栽培品种进行远缘杂交获得的幼胚取出并进行离体培养，使其在离体条件下发育成为正常植株，能够获得丰富的中间性育种材料，可以缩短

育种年限,节约人力物力,较快地获得优良种质。

[0006] 为了达到以上目的,本发明的技术方案如下:

[0007] 通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法,包括以下步骤:

[0008] 1)杂交授粉:以栽培草莓品种和野生草莓品种为杂交亲本进行杂交授粉;

[0009] 2)果实消毒:将授粉后5～35天的果实取下,4℃～7℃存放3～4小时,选取大小为1～3厘米的果实,先用70%的酒精表面消毒10秒,再在0.1wt%的升汞溶液中灭菌1～3分钟,用无菌水清洗3～5遍,吸干表面水分;

[0010] 3)未成熟胚剥离:在无菌条件下,将灭菌的果实取下种子剥离其幼胚,立即接种于诱导培养基中离体培养,先暗培养7天,再进行光照培养,诱导培养21～28天后获得膨大的胚;

[0011] 光照培养条件为:光照时间10小时/天,光照强度2000～3000Lx,培养温度24±1℃;

[0012] 诱导培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,吲哚丁酸IBA 0.3～0.5mg/L,pH5.5～5.8;

[0013] 4).胚萌发培养:将膨大的胚剥除胚乳后置于胚萌发培养基中进行挽救培养,培养30～35天后幼胚萌发,光照培养条件同步骤3);

[0014] 胚萌发培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,萘乙酸NAA 0.2～0.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤6-BA 1.2～1.5mg/L,pH5.5～5.8;

[0015] 5)增殖培养:将萌发的幼胚接种至增殖培养基中,光照培养条件与培养基组成同步骤4),每10-15天继代增殖1次,获得芽苗;

[0016] 6).生根培养:将经过1～4次继代增殖培养的芽苗从芽丛中切下,转到生根培养基中促使其生根,生根培养45～60天,得到生根的草莓胚苗,培养温度24±1℃;

[0017] 生根培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,吲哚丁酸IBA 0.2～0.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤6-BA 0.02～0.05mg/L,水解酪蛋白LH 0.2～0.4g/L,腺嘌呤Ad 4～6mg/L,pH5.8;

[0018] 7)炼苗移栽:开瓶后在瓶底加水,炼苗3～4天,然后将生根苗从培养瓶中取出,清水洗净根系附带的培养基,然后移栽在栽培基质中遮光处理2～3天,在温室中保持相对湿度75%～85%进行炼苗,培养20～30天即可移入大田种植。

[0019] 进一步地,所述的步骤7)炼苗移栽过程为,将生根的草莓胚苗在移栽前将瓶盖打一条缝,注入10～15毫升无菌水进行自然驯化2～3天,接着完全揭开瓶盖并添加10～15毫升蒸馏水锻炼1天,将生根苗从培养瓶中取出,清水洗净根系附带的培养基,然后移栽在灭菌的栽培基质中遮光遮荫处理2～3天,在温室中保持相对湿度75%～85%进行炼苗,培养20～30天即可移入大田种植。

[0020] 优选地,步骤1)中所述的栽培草莓品种为久香、甜查理或丰香,野生草莓品种为野生黄毛草莓。

[0021] 本发明还提供一种用于离体挽救培养获得草莓远缘杂种的诱导培养基,其组分包括:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,吲哚丁酸IBA0.3～0.5mg/L。

[0022] 本发明提供的用于离体挽救培养获得草莓远缘杂种的胚萌发培养基,其组分包括:1/2MS基本培养基,蔗糖30～50g/L,琼脂6～8g/L,萘乙酸NAA0.2～0.5mg/L,6-苄氨基腺

嘌呤6-BA1.2～1.5mg/L。

[0023] 本发明提供的用于离体挽救培养获得草莓远缘杂种的生根培养基，其组分包括：1/2MS基本培养基，蔗糖30～50g/L，琼脂6～8g/L，吲哚丁酸IBA0.2～0.5mg/L，6-苄氨基腺嘌呤6-BA0.02～0.05mg/L，水解酪蛋白LH0.2～0.4g/L，腺嘌呤Ad4～6mg/L

[0024] 本发明涉及到的培养基中所述的MS基本培养基配方如表1所示，mg/L表示每升MS培养基中含各成分的毫克数。

[0025] 表1

[0026]

成 分		用量 mg/L
无机盐	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	KH_2PO_4	170
	$MgSO_4.7H_2O$	370
	$CaCl_2$	440
	$FeSO_4.7H_2O$	37.3
	Na_2EDTA	27.8
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
	H_3BO_3	6.2
	KI	0.83
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
有机物	甘氨酸	2.0
	盐酸硫胺素	0.4
	盐酸吡哆素	0.5
	烟酸	0.5
	肌醇	100

[0027] 本发明的培养方法中，选取杂交授粉后长约1～3厘米，其种子未完全发育的果实，对此胚龄的幼胚进行离体胚诱导、萌发、增殖和生根培养，可以提高杂种胚的成苗率。

[0028] 本发明在对离体未成熟胚的萌发、诱导培养过程中，使用了适宜的培养基类型和培养条件，添加氨基酸和适当水平的激素促进未成熟胚在离体条件下的发育。在1/2MS基本培养基中添加蔗糖、琼脂、以及植物生长调节剂吲哚丁酸IBA，调整培养基的pH到5.5左右，

可有效地促进未成熟胚诱导;在对离体胚进行有效诱导基础上,在萌发培养基中添加1.2～1.5mg/L的6-苄氨基腺嘌呤和0.2～0.5mg/L的萘乙酸明显地促进了离体胚的萌发,萌发率达到85%以上。

[0029] 在远缘杂交过程中,胚的再生是远缘杂交获得成苗的关键环节,提高分化不完全的未成熟胚的再生能力是提高胚增殖的关键。本发明在离体幼胚的增殖及生根培养过程中,通过调整MS培养基为1/2MS基本培养基,辅之以适宜浓度的糖、激素水平、pH的优化,改善了培养条件,有效地提高了胚的再生能力。其中,添加适当配比的吲哚丁酸和6-苄氨基腺嘌呤,促进了芽苗生根;本发明的生根培养基中添加一定配比的水解酪蛋白和腺嘌呤可以促进根系的发育,并起到壮苗的作用,有效地提高了成苗率。

[0030] 本发明的有益效果:

[0031] 本发明在草莓育种研究中采用离体胚挽救技术,通过杂交授粉后未成熟胚的离体培养,可在胚败育前将其取出挽救培养,避免远缘杂种胚的衰亡,使大量远缘杂种胚继续发育成幼苗,并进入选育程序,缩短了育种周期;同时,获得了大量的远缘杂交后代,实现了草莓属种间的远缘杂交,创制了一批新种质,胚挽救技术有效地缩短了草莓杂交后代的培育周期,杂种胚成苗率可达到91.67%。

附图说明

[0032] 图1为本发明实施例的未成熟胚的诱导萌发。

[0033] 图2为本发明实施例的萌发胚的诱导增殖。

[0034] 图3为本发明实施例的胚苗诱导生根。

[0035] 图4为本发明实施例的开瓶炼苗。

[0036] 图5为本发明实施例的胚苗移栽。

[0037] 图6为本发明实施例的胚苗驯化。

[0038] 图7为本发明实施例的胚苗移入大田。

具体实施方式

[0039] 以下结合具体实施例和附图对本发明作进一步说明,但本发明并不限于以下实例。下述实例中,如无特别说明,均为常规方法。

[0040] 实施例以栽培草莓品种久香、甜查理、丰香和野生草莓品种黄毛草莓为杂交亲本通过离体挽救培养获得草莓远缘杂种的方法,步骤如下;

[0041] 1)杂交授粉:以栽培草莓品种久香、甜查理、丰香和野生草莓品种黄毛草莓为杂交亲本在3月中下旬选晴天,下午13:00至16:00在育种圃内进行杂交授粉,正交与反交同时进行;母本均进行人工去雄并套硫酸纸袋隔离,父本选盛花时花粉充分成熟的花朵,同一朵花重复授粉3次,同时,每朵花挂牌标记父母本和日期。

[0042] 2)自草莓种间人工授粉后第4天起,摘取果实在解剖镜下对幼胚形态观察,根据子房膨大和开始败育萎缩的镜检结果,将授粉后21天的果实取下,在4℃冰箱存放4小时,在超净工作台上取大小约1.5厘米的子房,先用70%的酒精表面消毒10秒,再在0.1wt%的升汞溶液中灭菌2分钟,之后用无菌水清洗5遍,用无菌滤纸吸干表面水分。

[0043] 3)在无菌条件和解剖显微镜下用解剖针和镊子剥去种皮,用解剖针挤出透明的幼

胚(长约0.2毫米),立即接种于胚诱导培养基上,暗培养7天,之后进行光照培养,进行诱导培养28天后得到膨大的胚;

[0044] 光照培养条件:光照时间10小时/天,光照强度2500Lx,培养温度24±1℃。

[0045] 诱导培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30g/L,琼脂8g/L,吲哚丁酸IBA 0.3-0.5mg/L,pH5.5。

[0046] 4)在解剖镜下剥除膨大的胚乳,在与步骤3)相同的光照培养条件下,对剥离的未成熟胚进行挽救培养,培养30天后幼胚萌发(见图1),幼胚萌发率100%;

[0047] 胚萌发培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30g/L,琼脂6g/L,萘乙酸NAA 0.2mg/L,6-苄基腺嘌呤6-BA1.5mg/L,pH5.8,培养温度24±1℃。

[0048] 5)将萌发的幼胚接种至增殖培养基中,培养条件和培养基组成与胚萌发培养相同,每15天继代增殖1次(见图2)。

[0049] 6)将经过4次继代增殖培养的芽苗由芽丛切下,转到生根培养基中促使其生根,生根培养45天,得到生根的草莓胚苗(见图3),培养温度24±1℃。

[0050] 生根培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖30g/L,琼脂6g/L,吲哚丁酸IBA 0.3mg/L,6-苄基腺嘌呤6-BA 0.02mg/L,水解酪蛋白LH 0.2g/L,腺嘌呤Ad 4mg/L,pH5.8。

[0051] 7)将生根的草莓胚苗置于待生长条件下炼苗7天,移栽时将瓶盖露缝,进行自然条件驯化2天(见图4),接着完全揭开瓶盖并添加15毫升的蒸馏水锻炼1天,然后用镊子将生根苗从瓶中取出,用水冲掉培养基,移栽到已经灭菌的栽培基质中(见图5),用黑色塑料遮光遮荫驯化3天(见图6),3天后将草莓苗移到玻璃温室保持相对湿度75%进行炼苗。在温室中培养20天即可移入大田种植(见图7),定植成活率可达97%以上。

[0052] 最后应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围中。

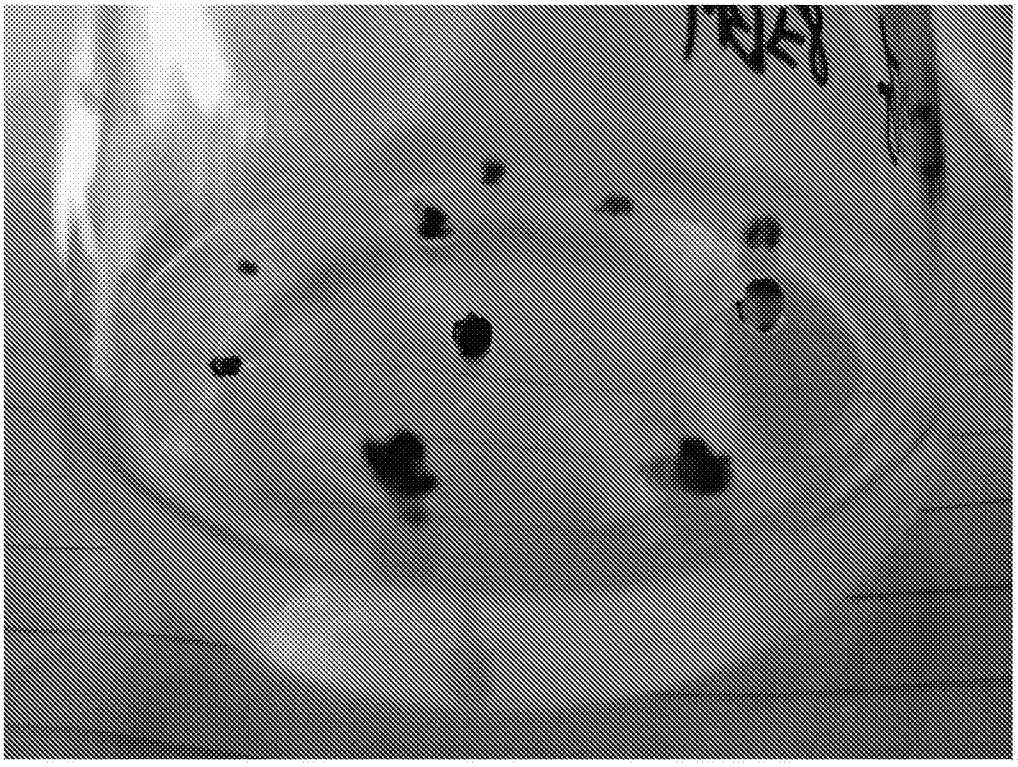


图1



图2



图3



图4



图5



图6



图7