



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111328713 B

(45) 授权公告日 2022. 05. 24

(21) 申请号 202010151839.0

(22) 申请日 2020.03.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111328713 A

(43) 申请公布日 2020.06.26

(73) 专利权人 贵州大学
地址 550025 贵州省贵阳市花溪区贵州大
学花溪北校区科技处

(72) 发明人 文晓鹏 邹思艳 田文杰 李孝绒

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所
52100
专利代理师 刘艳

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

(56) 对比文件

CN 110367124 A, 2019.10.25

CN 106332780 A, 2017.01.18

CN 106386491 A, 2017.02.15

CN 106879476 A, 2017.06.23

CN 108040885 A, 2018.05.18

EP 2397032 A1, 2011.12.21

蒋启林等.矮花红幼胚诱导成苗及组培快
繁.《四川果树》.1994, (第2期), 第10页.

An, Hyun-Joo等.Influence of plant
growth regulators and sucrose on
adventitious shoot formation from
cotyledonary explants of apple.《Han`guk
Wonye Hakhoechi》.2000, 第41卷第173页摘要.

审查员 倪潇

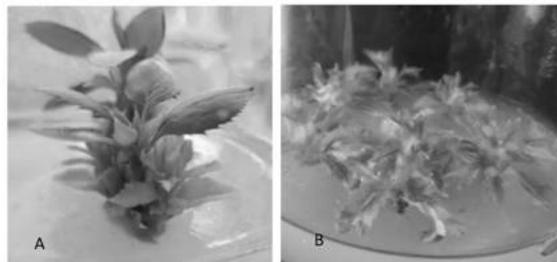
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种构建花红子叶再生体系的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种构建花红子叶再生体系的方法,包括以下步骤:一、预处理;二、灭菌;三、不定芽诱导;四、伸长壮芽培养;五、生根培养;六、移栽。本发明是以花红子叶为外植体,完成离体再生,利用本发明提供的技术方案对花红进行离体再生,提高了诱导发芽率和增值系数,试验证明,本发明所得的再生苗具有芽健壮、主根健康、幼苗移栽成活率高的优点,本发明提供的构建花红子叶再生体系的方法,为花红遗传转化及分子育种提供了新技术和方法。



1. 一种构建花红子叶再生体系的方法,其特征在于:是以所述花红子叶为外植体,完成离体再生,包括以下步骤:

(1) 预处理:选取成熟饱满的花红种子,用无菌水浸泡10-12min;

(2) 灭菌:将预处理后的种子用酒精浸泡30-35s后用无菌水冲洗2-3次,再用次氯酸钠溶液浸泡8-10min,最后用无菌水冲洗3-4次;所述酒精浓度为75%,所述次氯酸钠的质量分数为10%,将灭菌后的种子剥离胚芽,切掉近轴端和远轴端的部分子叶后备用;

(3) 不定芽诱导:将备用的材料接种于不定芽诱导培养基,暗培7d后转光下培养,所述不定芽诱导培养基的组分为:MS培养基添加有浓度为1mg/L的TDZ和浓度为 0.05mg/L 的NAA;

(4) 伸长壮芽培养:将步骤(3)培养材料转到伸长壮芽培养基,光下培养30-40d,所述伸长壮芽培养基组分为:MS培养基添加浓度为1.5mg/L 的6-BA和浓度为 0.3mg/L的NAA;

(5) 生根培养:将步骤(4)培养的茎高为1-2cm的材料转到生根培养基,光下培养30-40d,所述生根培养基组分为:MS培养基添加浓度为1mg/L 的IBA和浓度为 0.2mg/L 的NAA;

(6) 移栽:待步骤(5)诱导的根长为2-3cm时,冲洗干净根部培养基,移栽至灭菌的营养土中,置于25℃室内环境中自然生长。

2. 根据权利要求1所述的一种构建花红子叶再生体系的方法,其特征在于,所述光下培养条件为:温度保持24-26℃,光照时间16h/d,暗培养8h/d,光照强度3000-3500lux。

3. 根据权利要求1所述的一种构建花红子叶再生体系的方法,其特征在于,所述步骤(6)的生长条件为:光照时间16h/d,暗培养8h/d,光照强度4000-6000lux。

一种构建花红子叶再生体系的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物组培技术领域,具体涉及一种构建花红子叶再生体系的方法。

背景技术

[0002] 花红 (*Malus asiatica*), 蔷薇科 (*Rosaceae*), 苹果属 (*Malus*), 落叶小乔木。花红又名“沙果”、“林檎”, 性平, 味甘酸, 富含多种营养物质, 具有止渴生津、消食化滞的功效。果除鲜食外, 还可以加工制成果干、果丹皮或酿酒。花红不仅是花果并美的观赏树种, 因其与苹果嫁接亲和性良好, 还是苹果的优良砧木。然花红主要以嫁接繁殖为主, 加上大肆砍伐导致花红严重种质资源匮乏, 可通过建立再生体系解决这一问题。

[0003] 植物离体再生技术是花红种质保存、遗传改良等研究的基础。目前, 用于建立植物再生体系常用的外植体包括叶片、子叶、胚轴及茎段等器官, 有研究者以花红幼胚、茎段分别建立了再生体系, 但是再生效果均不是特别理想。以茎段离体再生, 最优培养基增殖系数为3.8, 未获得生根苗; 以幼胚作为外植体, 最优培养基30天平均形成6个长于1cm的壮梢和芽点, 但是, 由胚发育而来个体可能存在性状分离现象, 会影响品种的品质, 不适合作为再生体系的外植体。带芽茎段作为离体快繁体系的外植体, 于添加2.0mg/L 6-BA和0.25mg/L NAA的MS培养基上, 可有效促进花红无菌苗的增殖, 然花红为多年生木本植物, 茎段易木质化, 而子叶外植体具有肥厚, 营养物质丰富, 易取材, 易操作等优点, 可能是建立花红稳定再生体系的最佳选择。

[0004] 花红存在再生体系的建立尚不成熟、再生难度大、不同基因型间再生差异大、畸形苗多、再生速度慢、生根难等问题。因此, 花红的再生体系的建立亟待解决, 建立一种高效稳定的花红再生体系, 为遗传工程和分子育种提供技术支撑。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种以花红子叶为外植体, 诱导分化出根或芽, 构建花红子叶再生体系的方法, 克服原有再生体系的不足, 解决了再生难、生根难等问题。

[0006] 本发明所采用的技术方案是:

[0007] 一种构建花红子叶再生体系的方法, 是以所述花红子叶为外植体, 完成离体再生, 包括以下步骤:

[0008] (1) 预处理: 选取成熟饱满的花红种子, 用无菌水浸泡10-12min;

[0009] (2) 灭菌: 将预处理后的种子用酒精浸泡30-35s后用无菌水冲洗2-3次, 再用次氯酸钠溶液浸泡8-10min, 最后用无菌水冲洗3-4次;

[0010] (3) 不定芽诱导: 将灭菌后的种子剥离胚芽, 切掉近轴端和远轴端的部分子叶后, 接种于不定芽诱导培养基, 暗培7d后转光下培养;

[0011] (4) 伸长壮芽培养: 将步骤(3)培养材料转到伸长壮芽培养基, 光下培养30-40d;

[0012] (5) 生根培养: 将步骤(4)培养的茎高为1-2cm的材料转到生根培养基, 光下培养30-40d;

[0013] (6) 移栽:待步骤(5)诱导的根长为2-3cm时,冲洗干净根部培养基,移栽至灭菌的营养土中,置于25℃室内环境中自然生长。

[0014] 优选的,所述步骤(2)的酒精浓度为75%,所述次氯酸钠的质量分数为10%。

[0015] 进一步的,所述步骤(3)不定芽诱导培养基的组分为:MS培养基添加有浓度为1mg/L的TDZ和浓度为0.05mg/L的NAA。

[0016] 进一步的,所述步骤(4)伸长壮芽培养基组分为:MS培养基添加浓度为1.5mg/L的6-BA和浓度为0.3mg/L的NAA。

[0017] 进一步的,所述步骤(5)生根培养基组分为:MS培养基添加浓度为1mg/L的IBA和浓度为0.2mg/L的NAA。

[0018] 优选的,所述光下培养条件为:温度保持24-26℃,光照时间16h/d,暗培养8h/d,光照强度3000-3500lux。

[0019] 进一步的,所述步骤(6)的生长条件为:光照时间16h/d,暗培养8h/d,光照强度4000-6000lux。

[0020] 本发明的有益效果是:与现有方法相比,采用本发明的方案构建花红再生体系,是以花红子叶为外植体,子叶外植体具有肥厚,营养物质丰富,易取材,易操作等优点,能够高效完成离体再生,完整保留花红遗传性状,是建立花红稳定再生体系的最佳选择。使用诱导培养基MS+1mg/L TDZ+0.05mg/L NAA,花红子叶丛生芽诱导率达到38.89%,经过伸长壮芽培养,再生芽多且健壮,增殖系数达到 5.13 ± 0.96 ,高于以茎段为外植体的增殖系数;生根培养基的组分为MS+1mg/L IBA+0.2mg/LNAA,培养30-40天,生根率为60%,平均生根数 9.67 ± 3.04 根,随着继代培养时间的延长,生根率可以达到100%,且生出的根系较粗,有利于移栽成活,明显优于以幼胚作为外植体的生根情况。

[0021] 本发明提供了一种稳定高效的方法,解决了花红再生体系取材受限,外植体易褐化等问题。

[0022] 说明书附图

[0023] 图1为花红子叶剥离图;

[0024] 图2为20d花红子叶诱导出再生芽;

[0025] 图3为培养50d后芽生长状况;

[0026] 图4为伸长培养的再生芽;

[0027] 图5为增殖壮芽培养:A图为再生芽的增殖,B图为再生芽的壮芽;

[0028] 图6为生根培养。

具体实施方式

[0029] 下文将结合具体实施方式对本发明作进一步详尽解释,给出的实施例仅仅为了阐明本发明,而不限制本发明的范围。

[0030] 下述实施例中的实施方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0031] 下述实施例中所用的材料、试剂等,为一般商业途径获得。

[0032] 本发明实施例中所用的MS培养基购自杭州百思生物技术有限公司。

[0033] TDZ:噻苯隆,是一种细胞分裂素;

[0034] NAA:萘乙酸,是一种生长素;

[0035] 6-BA:6-苄氨基嘌呤,是一种细胞分裂素;

[0036] IBA:吲哚丁酸,是一种内源生长素。

[0037] 光下培养条件为:温度保持24-26℃,光照时间16h/d,暗培养8h/d,光照强度3000lux。

[0038] 实施例1

[0039] 一种构建花红子叶再生体系的方法,以花红子叶为外殖体,完成离体再生,包括以下步骤:

[0040] (1) 预处理:选取成熟饱满的花红种子先用无菌水浸泡10min;

[0041] (2) 灭菌:用浓度为75%的酒精浸泡上述种子30s,用无菌水冲洗2-3次,再用质量分数为10%的次氯酸钠溶液浸泡10min,无菌水冲洗3-4次;

[0042] (3) 不定芽诱导:灭菌后的种子剥离胚芽,切掉近轴端和远轴端的部分子叶后,接种于不定芽诱导培养基上,暗培7d后转光下培养;

[0043] 不定芽诱导培养基组分为:MS+1mg/LTDZ+0.05mg/LNAA;

[0044] (4) 伸长壮芽培养:将步骤(3)中培养材料转到伸长壮芽培养基,光下培养30-40d;

[0045] 伸长壮芽培养基组分为:MS+1.5mg/L 6-BA+0.3mg/LNAA;

[0046] (5) 生根培养:将步骤(4)培养的茎高为1-2cm的材料转到生根培养基,光下培养30-40d;

[0047] 生根培养基组分为:MS+1mg/L IBA+0.2mg/LNAA;

[0048] (6) 移栽:待步骤(5)诱导的根长为2-3cm时,冲洗干净根部培养基,移栽至灭菌的营养土中,在25℃、光照度4000lux条件下,每天光照16h、暗培养8h,培养14天后,在25℃光照度6000lux条件下自然生长。

[0049] 实施例2

[0050] 一种构建花红子叶再生体系的方法,以花红子叶为外殖体,完成离体再生,具体包括以下几个步骤:

[0051] (1) 预处理:选取饱满的花红种子用无菌水浸泡10min;

[0052] (2) 灭菌:用75%的酒精洗涤30s,无菌水洗2-3次,再用10%次氯酸钠溶液处理10min,无菌水洗3-4次;

[0053] (3) 不定芽诱导:灭菌后的种子剥离胚芽,切掉近轴端和远轴端部分子叶后接种于不定芽诱导培养基上,光下培养;

[0054] 不定芽诱导培养基组分为:MS+1mg/LTDZ+0.05mg/LNAA;

[0055] (4) 伸长壮芽培养:将步骤(3)培养材料转到伸长壮芽培养基,光下培养30-40天;

[0056] 伸长壮芽培养基组分为:MS+1.5mg/L 6-BA+0.3mg/LNAA;

[0057] (5) 生根培养:将步骤(4)培养的茎高为1-2cm的材料转到生根培养基,光下培养30-40天;

[0058] 生根培养基组分为:MS+1mg/L IBA+0.2mg/LNAA;

[0059] (6) 移栽:待步骤(5)诱导的根长为2-3cm时,冲洗干净根部培养基,移栽至灭菌的营养土中,在25℃、光照度4000lux条件下,每天光照16h、暗培养8h,培养14天后,在25℃光照度6000lux条件下自然生长。

[0060] 实施例3

[0061] 一种构建花红子叶再生体系的方法,以花红子叶为外殖体,完成离体再生,具体包括以下几个步骤:

[0062] (1) 预处理:选取饱满的花红种子用无菌水浸泡10min;

[0063] (2) 灭菌:用75%的酒精洗涤30s,无菌水洗2-3次,再用10%次氯酸钠溶液处理10min,无菌水洗3-4次;

[0064] (3) 不定芽诱导:灭菌后的种子剥离胚芽,切掉近轴端和远轴端部分子叶后接种于不定芽诱导培养基上,暗培14d后转光下培养;

[0065] 不定芽诱导培养基组分为:MS+1mg/LTDZ+0.05mg/LNAA;

[0066] (4) 伸长壮芽培养:将步骤(3)培养材料转到伸长壮芽培养基,光下培养30-40天;

[0067] 伸长壮芽培养基组分为:MS+1.5mg/L 6-BA+0.3mg/LNAA;

[0068] (5) 生根培养:将步骤(4)培养的茎高为1-2cm的材料转到生根培养基,光下培养30-40天;

[0069] 生根培养基组分为:MS+1mg/L IBA+0.2mg/LNAA;

[0070] (6) 移栽:待步骤(5)诱导的根长为2-3cm时,冲洗干净根部培养基,移栽至灭菌的营养土中,在25℃、光照度4000lux条件下,每天光照16h、暗培养8h,培养14天后,在25℃光照度6000lux条件下自然生长。

[0071] 针对实施例1-3,设置不同组分的培养基试验组,对实施例1-3的不定芽再生情况实时观察并记录:

[0072] 表1不同培养基和不同暗培时间对不定芽诱导的影响

试 验 号	TDZ /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	IBA /mg·L ⁻¹	不定芽再生率%			平均芽数/个		
				暗培 0d	暗培 7d	暗培 14d	暗培 0d	暗培 7d	暗培 14d
1	4.00	0.05	0.20	0	0	4.17	0	0	3.00
2	1.00	0.20	0.20	9.53	5.55	2.56	7.00	7.50	3.00
3	1.00	0.05	0.00	0	38.89	0	0	11.71	0
4	3.00	0.40	0.20	5.13	0	0	8.00	0	0
5	1.00	0.10	0.10	0	2.38	6.67	0	4.00	9.00
6	4.00	0.10	0.05	14.65	2.78	4.17	9.40	5.00	5.00
7	2.00	0.40	0.00	5.55	11.11	0	6.50	4.00	0
8	2.00	0.20	0.10	5.13	0	0	5.00	0	0

[0074] 根据实验结果可知,在不定芽诱导期间,采用MS+1mg/L TDZ+0.05mg/LNAA培养基,将子叶暗培7天后光下培养2周,即有芽从子叶上生长出来,继续培养相同时间平均芽数量最多,不定芽再生率最高,芽的生长质量最好,有利于后阶段继续培养。

[0075] 根据实施例1的培养方法(暗培7d),采用不同浓度的TDZ、NAA和IBA组合的培养基作不定芽诱导培养,在25℃下,每天光照16h、暗培养8h,培养40天,统计愈伤组织诱导率和

丛生芽诱导率,结果见表2:

[0076] 表2不同质量浓度的TDZ、NAA和IBA组合的培养基对花红子叶再生的影响

序号	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	不定芽诱导率 (%)	平均芽数 (个)
1	4.00	0.05	0.20	0	0
2	1.00	0.20	0.20	5.55	7.50
3	1.00	0.05	0.00	38.89	11.71
4	3.00	0.40	0.20	0	0
5	1.00	0.10	0.10	2.38	4.00
6	4.00	0.10	0.05	2.78	5.00
7	2.00	0.40	0.00	11.11	4.00
8	2.00	0.20	0.10	0	0

[0079] 通过实验可知:当TDZ浓度为1.0mg/L,NAA浓度为0.05mg/L,不定芽诱导率最高,为38.89%,平均芽数为11.71个。

[0080] 将不定芽诱导增殖培养材料转接到伸长壮芽培养基中培养,伸长壮芽培养基设置不同浓度的6-BA和NAA组合,在25℃、光照度3000lux条件下,每天光照16h、暗培养8h,培养40天,结果见表3。

[0081] 表3不同浓度6-BA和NAA组合的培养基对花红再生芽壮芽增殖影响

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种外植 体数	增殖后 芽数	增殖系数 (个/外植 体)	芽生长状 况	备注
CK	0	0	15	0	0	无	芽数 < 3, 芽少; 3 ≤ 芽数 <4, 芽较少; 4 ≤ 芽数 <5, 芽较多; 芽数 ≥ 5, 芽多
1	1.00	0.10	15	42	2.80±0.83	芽少, 较健 壮	
2	1.00	0.20	15	57	3.80±1.11	芽较少, 健 壮	
3	1.00	0.30	15	71	4.73±0.77	芽较多, 健 壮	
优化	1.50	0.3	15	77	5.13±0.96	芽多, 健壮	
4	2.00	0.10	15	58	3.87±0.96	芽较少, 健 壮	
5	2.00	0.20	15	62	4.13±1.31	芽较多, 健 壮	
6	2.00	0.30	15	65	4.33±0.94	芽较多, 健 壮	
7	4.00	0.10	15	74	4.93±0.93	芽较多, 不 健康	
8	4.00	0.20	15	116	7.73±1.24	芽多, 细	
						弱, 不健 康, 玻璃化	
9	4.00	0.30	15	68	4.57±0.81	芽较多, 不 健康	

[0084] 由表3可知,当6-BA浓度为1.5mg/L,NAA浓度为0.3mg/L时,再生芽生长状况健壮,且再生芽多,增殖系数达到5.13±0.96。

[0085] 将伸长壮芽培养的再生苗高为1-3cm的再生苗转接至生根培养基上诱导生根,采用不同浓度的IBA和NAA组合培养基,在25℃、光照度3000lux条件下,每天光照16h、暗培养8h,培养40天,统计生根率,结果见表5。

[0086] 表4不同浓度IBA和NAA组合的培养基中花红苗生根情况

[0087]

序号	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	生根率 (%)	平均生根数 (根/外植体)	生根情况
1	0.50	0.10	0	0	无
2	2.00	0.00	45ab	7.00±2.11ab	主根粗壮，几乎无须根
3	1.00	0.10	30bc	4.00±2.15bc	主根粗壮，几乎无须根
4	1.00	0.20	60a	9.67±3.04a	主根健康，须根极多
5	0.50	0.20	35b	3.71±1.03c	须根极少
6	1.00	0.00	10d	2.50±0.50c	主根粗壮但极少
7	0.50	0.00	0	0	无
8	2.00	0.10	0	0	无
9	2.00	0.20	25cd	2.67±0.94c	无须根

[0088] 由表4可知,当IBA浓度为1mg/L,NAA浓度为0.2mg/L时,再生苗生根率最高,为60%。

[0089] 参阅图2-图6,是本发明实施例1的子叶诱导再生芽及再生芽伸长壮芽和生根的图片,可见本方法能更高效地诱导出花红再生芽,用本方法构建花红再生体系比原方法更合适,效率更高。

[0090] 本发明选用贵州本地花红子叶作为外植体得到花红不定芽,筛选不定芽诱导培养基配方,构建了花红再生体系。

[0091] 以上所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

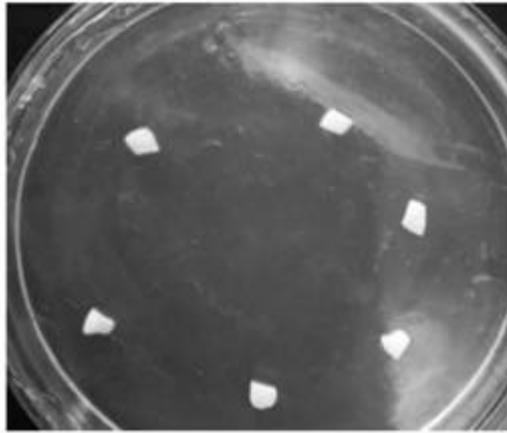


图1

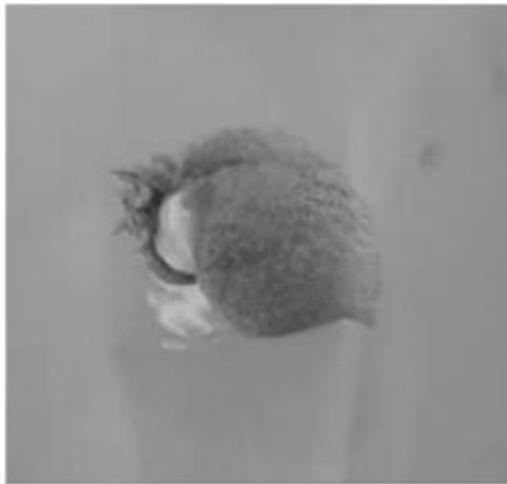


图2

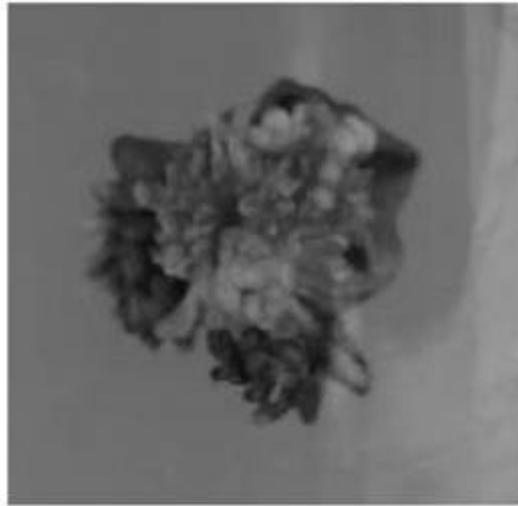


图3

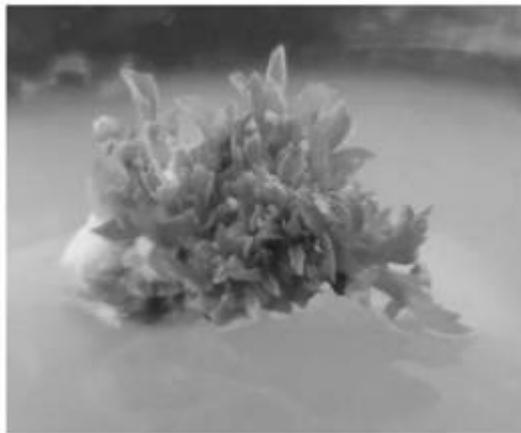


图4

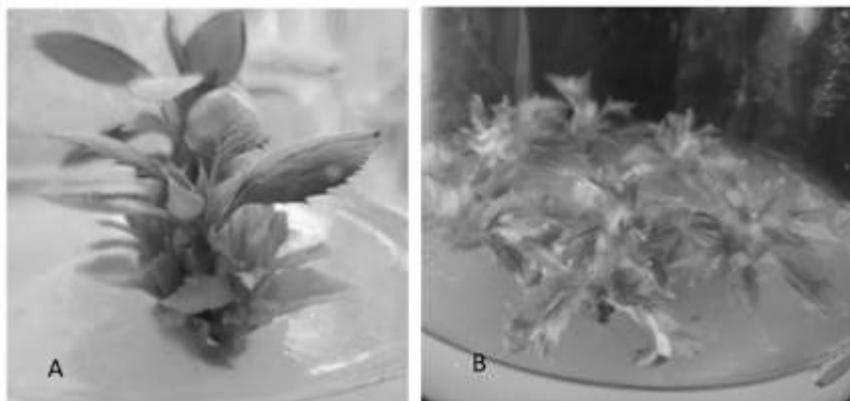


图5

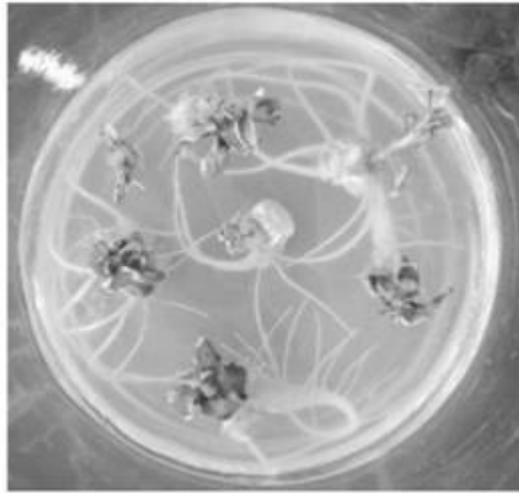


图6