

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019 年 7 月 11 日 (11.07.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/134331 A1

- (51) 国际专利分类号:
A01H 4/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/088620
- (22) 国际申请日: 2018 年 5 月 28 日 (28.05.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201810008078.6 2018 年 1 月 4 日 (04.01.2018) CN
- (71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。浙江凤阳山百山祖国家级自然保护区百山祖管理处 (BAISHANZU ADMINISTRATION OFFICE OF FENGYANGSHAN-BAISHANZU NATIONAL NATURE RESERVE, ZHEJIANG) [CN/CN]; 中国浙江省丽水市庆元县松源街道济川路 97 号, Zhejiang 323000 (CN)。
- (72) 发明人: 陈利萍 (CHEN, Liping); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。刘柯 (LIU, Ke); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。陈德良 (CHEN, Deliang); 中国浙江省丽水市庆元县松源街道济川路 97 号, Zhejiang 323000 (CN)。吴友贵 (WU, Yougui); 中国浙江省丽水市庆元县

松源街道济川路 97 号, Zhejiang 323000 (CN)。向珣 (XIANG, Xun); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。于明坚 (YU, Mingjian); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。曹丽雯 (CAO, Liwen); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。于宁宁 (YU, Ningning); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。许大明 (XU, Daming); 中国浙江省丽水市庆元县松源街道济川路 97 号, Zhejiang 323000 (CN)。周荣飞 (ZHOU, Rongfei); 中国浙江省丽水市庆元县松源街道济川路 97 号, Zhejiang 323000 (CN)。王挺进 (WANG, Tingjin); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司 (HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO., LTD.); 中国浙江省杭州市西湖区玉古路 147 号黄鸿年科技综合大楼 215 室 / 黄欢娣, Zhejiang 310013 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) Title: A METHOD FOR QUICK BREEDING OF *ABIES BESHANZUENSIS* EMPLOYING EMBRYO RESCUE TECHNOLOGY

(54) 发明名称: 一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法

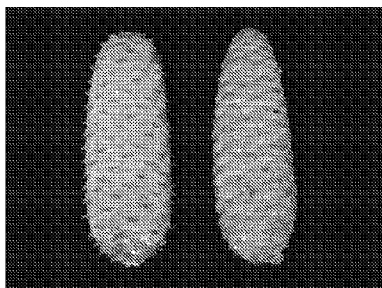


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a method for quick breeding of *Abies beshanzuensis* employing embryo rescue technology. The method comprises: taking an immature strobilus of a wild *Abies beshanzuensis* plant from the Baishanzu Nature Reserve as an initial material; after disinfecting the surface of the plant, extracting an immature embryo and an endosperm thereof, and inoculating the same into a culture medium and performing dark culturing, heterotrophic culturing, and autotrophic culturing. Embryo rescue technology enables quick breeding of several generations of *Abies beshanzuensis* plants, thereby ensuring the acquisition of a greater number of *Abies beshanzuensis* plants within a shorter time period.

(57) 摘要: 本发明公开了一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法, 以百山祖自然保护区中百山祖冷杉野生植株的未成熟球果为起始材料, 表面消毒后剥取其未成熟胚及胚乳, 接种到培养基上进行暗培养、异养期培养和自养期培养, 通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉野生植株后代, 短时间内获得数量较多的百山祖冷杉幼苗。

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法

技术领域

本发明涉及一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，从而达到扩大濒危物种数量的目的。

背景技术

百山祖冷杉 (*Abies beshanzuensis*) 是松科 (Pinaceae) 冷杉属 (*Abies*) 植物，常绿乔木，高 17 米，胸径达 80 厘米。秋果圆柱形，有短梗，长 7~12 厘米，直径 3.5~4 厘米，成熟时淡褐色或淡褐黄色。5 月开花，11 月球果成熟。是浙江省特有的古老孑遗植物。在苏、浙、皖、闽等省第三纪时广泛分布，第四纪冰期后在局部地段唯一生存至今的珍稀物种。百山祖冷杉为国家一级重点保护植物，1987 年被世界自然保护联盟物种生存委员会 (SSC) 公布列为世界最濒危的 12 种植物之一。百山祖冷杉自然分布于百山祖自然保护区海拔 1740 米左右的狭小避风谷地，是我国大陆东南部唯一的一种冷杉属植物，是第四纪冰川期保存下来的活化石，对于地理学和气候学等学科研究具有十分重要的意义。

自然条件下，百山祖冷杉球果发育时间长、结实率低。球果成熟时大量的胚存在败育的现象，导致正常发育的种子数量极少。同时，百山祖冷杉受到生态环境影响，造成天然更新困难、持续繁衍能力极弱等问题。因此，迫切需要建立一种简单的、快速的培育百山祖冷杉幼苗的方法。胚拯救技术是育种研究中克服胚败育或者发育不良，提高萌发率以及提早萌发，缩短植物发育时间的有效手段。运用胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗，可有效的防止濒危植物百山祖冷杉因在自然条件下繁殖困难而灭绝。

发明内容

本发明的目的是针对现有技术的不足，提供一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法。

本发明的目的是通过以下技术方案实现的：一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，包括如下步骤：

- (1) 采集百山祖冷杉植株上的未成熟球果；
- (2) 剥取未成熟种子并进行表面灭菌；

(3) 用解剖刀切开未成熟种子, 剥取未成熟胚并接种到培养基上, 将其水平放置。20±2℃黑暗条件下培养 3 d;

(4) 暗培养后, 在弱光条件下(光照强度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 12 h/d) 培养, 直到胚萌发;

(5) 胚萌发后, 在正常光照条件下(光照强度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 12 h/d) 培养 10 d 后, 将幼苗从胚乳中分离并接种到培养基上进行保存, 培养条件为温度 20±2℃、光照强度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 12 h/d。

进一步地, 在所述步骤(1)中, 所述未成熟球果形态特征为球果呈现绿色。

进一步地, 在所述步骤(2)中, 所述表面灭菌程序为: 将未成熟种子置于流水下冲洗 3 h, 冲洗后在超净工作台上用体积分数为 70%乙醇水溶液浸泡并振荡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 每次 1 min。再用质量分数为 0.1%的氯化汞的水溶液浸泡并振荡 10 min 后, 用无菌水冲洗 5 次, 每次 1 min。最后用无菌滤纸吸干种子表面多余的水分。

进一步地, 在所述步骤(3)中, 所述剥取未成熟胚的方法为左手用无菌镊子固定未成熟种子, 右手用无菌解剖刀在距种皮边缘 0.5 mm, 分别进行纵切和横切, 用镊子将种皮从未成熟胚及其胚乳上分离。

进一步地, 在所述步骤(3)和步骤(5)中, 培养基以 DCR (Gupta and Durzan medium) 为基本培养基, 另外添加蔗糖、琼脂、水解酪蛋白等, 蔗糖、琼脂、水解酪蛋白的浓度分别为 20 g/L、8g/L、500 mg/L, 培养基的 pH 为 5.8。

进一步地, 在所述步骤(4)中, 所述胚萌发形态特征为胚根或者子叶从胚乳中伸出。

进一步地, 在所述步骤(5)中, 所述分离幼苗的方法为用灭菌的解剖刀将胚乳纵向切开后, 将幼苗从胚乳中分离。

本发明的优点是: 本发明采用的外植体为未成熟胚, 利用胚拯救技术对其进行培养, 克服自然条件下种子胚败育的缺陷, 可在短期内快速获得较多的百山祖冷杉幼苗。该方法可操作性强, 简单高效, 污染率低, 对世界濒危植物幼苗的快速培育具有重要意义。

附图说明

图 1 是百山祖冷杉野生植株上的未成熟球果

图 2 是用于培养的百山祖冷杉外植体—未成熟胚及胚乳图;

图 3 是百山祖冷杉未成熟胚培养后萌发图;

图 4 是萌发幼苗生长图。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明进一步说明。

实施例 1:

材料: 本实例以百山祖冷杉未成熟胚及胚乳为培养外植体。

步骤 (1): 取材

7 月下旬至 8 月上旬于百山祖自然保护区收集百山祖冷杉未成熟球果, 颜色绿色, 这种绿色的未成熟果子表面种鳞、苞鳞排列紧密。可放于密封袋中, 4℃低温中贮藏备用。

步骤 (2): 种子表面灭菌

用镊子分离种鳞和种子, 将种子置于流水下冲洗 3 h, 在超净工作台上用 70% 乙醇处理 30 s, 无菌水冲洗 3~5 次。再用 0.1wt% 氯化汞处理 10 min 后, 用无菌水冲洗 3~5 次并用无菌滤纸吸干表面水分。

步骤 (3): 未成熟胚分离与接种

将冲洗后的种子置于铺有灭菌滤纸的培养皿中, 左手用无菌镊子固定未成熟种子, 右手用无菌解剖刀在距种皮边缘 0.5 mm, 分别进行纵切和横切, 用镊子将种皮从未成熟胚及其胚乳上分离 (图 1)。剥取未成熟胚及其胚乳并接种到培养基上, 将其水平放置。培养基以 DCR (Gupta and Durzan medium) 为基本培养基, 另外添加蔗糖、琼脂、水解酪蛋白等, 蔗糖、琼脂、水解酪蛋白的浓度分别为 20 g/L、8g/L、500 mg/L, 培养基的 pH 为 5.8。

步骤 (4): 暗培养与异养期培养

接种后的未成熟胚及其胚乳先于 20±2℃ 黑暗条件下培养 3 d, 再弱光光照条件下培养 10 天可见种子萌发, 所述弱光光照条件为: 光照强度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 12 h/d。

步骤 (5): 自养期培养

未成熟胚培养后, 萌发率可达 95% 以上 (图 2)。然后幼苗从胚乳中分离并接种到培养基上进行自养期培养与保存, 培养基以 DCR (Gupta and Durzan medium) 为基本培养基, 另外添加蔗糖、琼脂、水解酪蛋白等, 蔗糖、琼脂、水解酪蛋白的浓度分别为 20 g/L、8g/L、500 mg/L, 培养基的 pH 为 5.8。培养条件为温度 20±2℃、光照强度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 12 h/d。培养 15 天后的幼苗如图 3 所示, 由此可见, 通过本方法可在短期内获得数量比较多的百山祖冷杉无菌幼苗用于濒危植物百山祖冷杉的快速培育。

权利要求书

1.一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 采集百山祖冷杉植株上的未成熟球果；

(2) 剥取未成熟种子并进行表面灭菌；

(3) 用解剖刀切开未成熟种子，剥取未成熟胚并接种到培养基上，将其水平放置。20±2℃黑暗条件下培养 3 d；

(4) 暗培养后，在光照强度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 12 h/d 的弱光条件下培养，直到胚萌发；

(5) 胚萌发后，在光照强度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 12 h/d 的正常光照条件下培养 10 d 后，将幼苗从胚乳中分离并接种到培养基上进行保存，培养条件为温度 20±2℃、光照强度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 12 h/d。

2.根据权利要求 1 所述的一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，其特征在于：在所述步骤 (1) 中，所述未成熟球果形态特征为球果呈现绿色。

3.根据权利要求 1 所述的一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，其特征在于：在所述步骤 (2) 中，所述表面灭菌程序为：将未成熟种子置于流水下冲洗 3 h，冲洗后在超净工作台上用体积分数为 70%乙醇水溶液浸泡并振荡 30 s，无菌水冲洗 3 次，每次 1 min。再用质量分数为 0.1%的氯化汞的水溶液浸泡并振荡 10 min 后，用无菌水冲洗 5 次，每次 1 min。最后用无菌滤纸吸干种子表面多余的水分。

4.根据权利要求 1 所述的一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，其特征在于：在所述步骤 (3) 中，所述剥取未成熟胚的方法为左手用无菌镊子固定未成熟种子，右手用无菌解剖刀在距种皮边缘 0.5 mm，分别进行纵切和横切，用镊子将种皮从未成熟胚及其胚乳上分离。

5.根据权利要求 1 所述的一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，其特征在于：在所述步骤 (3) 和步骤 (5) 中，培养基以 DCR (Gupta and Durzan medium) 为基本培养基，另外添加蔗糖、琼脂、水解酪蛋白等，蔗糖、琼脂、水解酪蛋白的浓度分别为 20 g/L、8g/L、500 mg/L，培养基的 pH 为 5.8。

6.根据权利要求 1 所述的一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，其特征在于：在所述步骤 (4) 中，所述胚萌发形态特征为胚根或者子叶从胚乳中伸出。

7.根据权利要求 1 所述的一种通过胚拯救技术快速培育百山祖冷杉幼苗的方法，其特征在于：在所述步骤（5）中，所述分离幼苗的方法为用灭菌的解剖刀将胚乳纵向切开后，将幼苗从胚乳中分离。

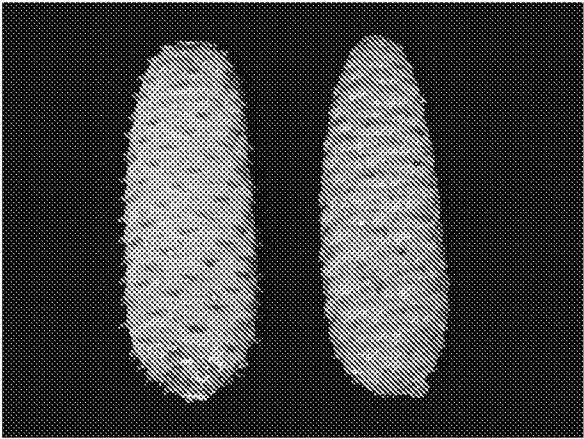


图 1

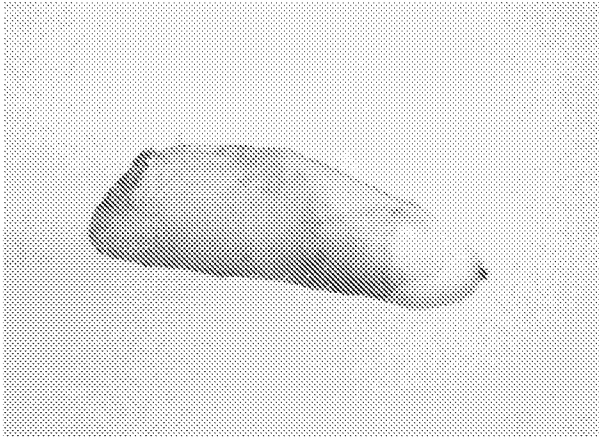


图 2

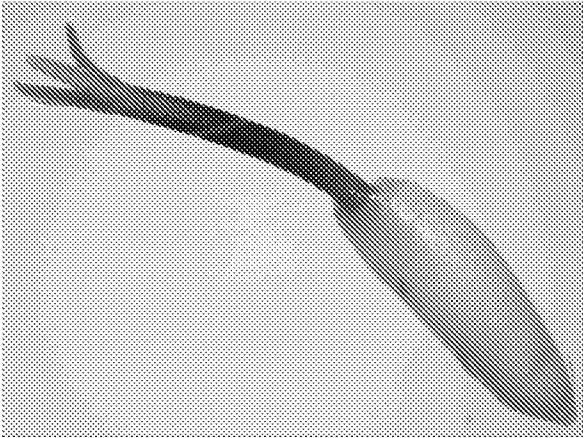


图 3

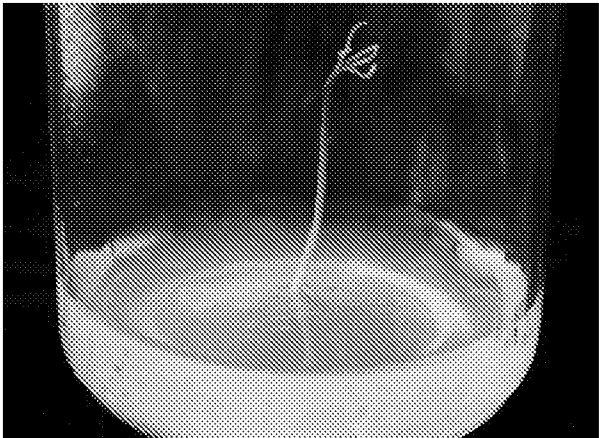


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/088620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 4/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNKI, ISI Web of Science: 百山祖冷杉, 胚, 救, 培, 育, 繁, Abies Beshanzuensis, embryo, rescue +, cult+, breed+, propagat+, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	袁建国 (AI, Jianguo). "百山祖冷杉濒危机制与保护对策研究 (Studies on the Endangerment Mechanism and Conservation Strategies for Abies Beshanzuensis)" 浙江工业大学硕士学位论文 (Master's Dissertation of Zhejiang University), 31 March 2006 (2006-03-31), entire document, particularly, pages 37-40	1-7
A	张倩云, 等 (ZHANG, Qianyun et al.). "植物胚拯救技术的影响因素及其应用 (Influence Factors And Application of Plant Embryo Rescue Techniques)" 南京林业大学学报(自然科学版) (Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)), Vol. 38, No. (5), 30 September 2014 (2014-09-30), pages 143-148, entire document, particularly conclusion	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 June 2018

Date of mailing of the international search report

20 July 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/088620

A. 主题的分类 A01H 4/00 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类											
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) A01H 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNKI, ISI Web of Science: 百山祖冷杉, 胚, 救, 培, 育, 繁, Abies Beshanzuensis, embryo, rescut+, cult+, breed+, propagat+, 等											
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>袁建国. "百山祖冷杉濒危机制与保护对策研究" 浙江大学硕士学位论文, 2006年 3月 31日 (2006 - 03 - 31), 全文, 尤其是第37-40页</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>张倩云, 等. "植物胚拯救技术的影响因素及其应用" 南京林业大学学报 (自然科学版), 第38卷, 第5期, 2014年 9月 30日 (2014 - 09 - 30), 第143-148页, 全文, 尤其是结语部分</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	袁建国. "百山祖冷杉濒危机制与保护对策研究" 浙江大学硕士学位论文, 2006年 3月 31日 (2006 - 03 - 31), 全文, 尤其是第37-40页	1-7	A	张倩云, 等. "植物胚拯救技术的影响因素及其应用" 南京林业大学学报 (自然科学版), 第38卷, 第5期, 2014年 9月 30日 (2014 - 09 - 30), 第143-148页, 全文, 尤其是结语部分	1-7
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
A	袁建国. "百山祖冷杉濒危机制与保护对策研究" 浙江大学硕士学位论文, 2006年 3月 31日 (2006 - 03 - 31), 全文, 尤其是第37-40页	1-7									
A	张倩云, 等. "植物胚拯救技术的影响因素及其应用" 南京林业大学学报 (自然科学版), 第38卷, 第5期, 2014年 9月 30日 (2014 - 09 - 30), 第143-148页, 全文, 尤其是结语部分	1-7									
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☐ 见同族专利附件。											
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件											
国际检索实际完成的日期 2018年 6月 12日		国际检索报告邮寄日期 2018年 7月 20日									
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 吴永庆 电话号码 +86-10-62089161									