[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910032680.4

[43] 公开日 2009 年 12 月 2 日

[11] 公开号 CN 101589690A

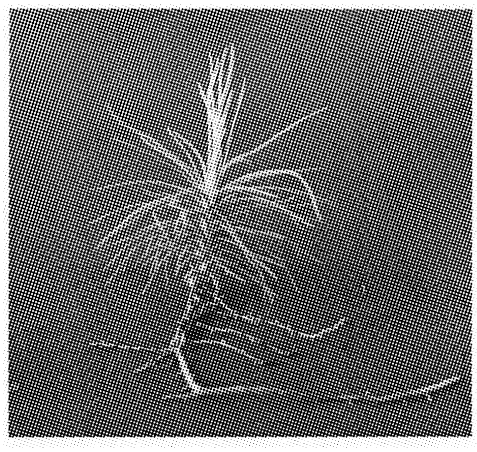
[22] 申请日 2009.6.30
[21] 申请号 200910032680.4
[71] 申请人 南京林业大学
地址 210037 江苏省南京市龙蟠路 159 号南京林业大学
[72] 发明人 吴小芹 朱丽华 叶建仁 张红岩 秦 莉
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种高效诱导赤松(Pinus densiflora)组培苗不定根发生的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种高效诱导赤松组培苗不定根发生的方法。该方法以生长幼嫩的赤松组培苗为外植体，采用“两步法”，即先在 1/2 ~ 1/4WPM + NAA0.1 ~ 0.2mg/L + IBA1.0 ~ 2.0mg/L + 蔗糖 0.5 ~ 1.5%培养基中诱导不定根原基发生，进而将外植体转入 1/2WPM + AC0.5 ~ 1.0g/L + 蔗糖 2.0%培养基中促进不定根表达与伸长，从而完成不定根发生过程。采用本发明，赤松组培苗不定根发生率高，且根系发育良好，移栽成活率高，为大量生产抗松材线虫病赤松组培再生植株奠定了坚实的基础，同时对其他松树种组培苗的培养也具有重要参考价值。



1、一种高效诱导赤松组培苗不定根发生的方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

（1）挑选生长幼嫩、针叶夹角小、高 1.0~1.5 cm 的赤松组培苗接种于含有萘乙酸（NAA）、吲哚丁酸（IBA）和蔗糖的 1/2~1/4WPM 培养基中诱导不定根原基；

（2）完成不定根原基诱导后，将材料转入含有活性炭（AC）和蔗糖的 1/2WPM 培养基中促进不定根的表达与伸长。

（3）将已生根的再生植株移栽于培养土中，喷水保湿。

2、根据权利要求 1 所述方法，其特征在于步骤（1）中所述诱导不定根原基的培养基中含有 NAA 0.1~0.2 mg/L、IBA 1.0~2.0 mg/L、蔗糖 0.5~1.5 %。

3、根据权利要求 1 所述方法，其特征在于步骤（1）中不定根原基诱导处理时间为 25-30 天。

4、根据权利要求 1 所述方法，其特征在于步骤（2）中所述促进不定根表达与伸长的培养基中含有 AC 0.5~1.0 g/L、蔗糖 2.0 %。

一种高效诱导赤松(*Pinus densiflora*)组培苗不定根发生的方法

一、技术领域

本发明属于生物技术领域，具体是指一种高效诱导赤松组培苗不定根发生的方法。

二、背景技术

松属（*Pinus*）植物大约有116个种以及变种和杂种，在世界上分布、种植极为广泛，尤其在温带地区，松属植物不仅种类多，而且往往形成浩瀚的林海，因此被誉为"北半球森林之母"。松属植物不仅在世界木材、松脂及造纸等方面有突出贡献，而且在生态系统中具有非常重要的地位。

赤松（*Pinus densiflora*）为松属的一个种，分布于我国华东及北部沿海地区以及日本、朝鲜、苏联。具有抗风力强、抗干旱耐脊薄等特点，为沿海造林和干旱山坡造林的先锋树种，亦栽培作观赏树种。木材可供建筑、木纤维工业原料等用。该树种是森林毁灭性病害——松材线虫病最容易感染的树种之一。由于受松材线虫危害，在日本广为栽植的赤松大量枯死，几近灭绝，对林业生产和生态环境造成了严重破坏。我国栽植的赤松同样受到松材线虫病的严重威胁。在过去的20多年里，日本通过抗病单株选择已培育出一批抗松材线虫病赤松优良家系，建立了抗病种子园。然而，抗病种子产量非常有限，难以满足大规模林业生产的需要。常规无性繁殖如扦插、嫁接等较为困难，获得的种苗数量有限，无法在生产上大面积推广。

植物组织培养作为一种可替代的无性繁殖方法为快速繁殖优良种苗提供了新的途径。鉴于松树在林业生产及生态系统中的重要的地位，各国学者对松属的60多个种或变种、杂种的组织培养进行了广泛研究。诸多研究结果表明，尽管大多数松属树种的芽繁殖可以通过胚性外植体来完成，但由此产生的小芽即使在有生长素存在时也很难生根（黄健秋等，1994），松属树种组培苗不定根发生已成为其组织培养的瓶颈之一，并极大地限制了该技术在生产中的应用。

有关赤松组织培养器官发生的文献报道较少。Isikawa（1987）在赤松下胚轴和幼苗根尖器官分化研究中观察到胚轴上有不定根的形成；Choi 等（1993）对赤松组培苗不定根发生进行了初步研究，在其所采用的LP + IBA 0.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L 生根培养基中，少量组培苗形成不定根，且组培苗基部产生大量愈伤组织，严重影响了不定根质量。本申请人于2004年从日本引进了27个抗松材线虫病赤松优良家系的成熟种子，通过组织培养增殖方法获得了大量可供生根的组培苗，为无性快速繁殖现有抗病材料奠定了基础。经研究发现，与大多数松属树种一样，赤松组培苗不定根发生十分困难，而只有在生根问题解决以后，离体再生的小植株才会成为人工造林的有用材料。为此，急需寻找一种高效诱导赤松组培苗不定根发生的方法。

三、发明内容

本发明主要针对赤松组织培养中不定根发生率较低的现状，寻找一种高效诱导赤松组培苗不定根发生的方法，旨在为实现赤松抗松材线虫病优良基因型的快速繁殖提供有效帮助。

技术方案：一种高效诱导赤松组培苗不定根发生的方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

（1）挑选生长幼嫩、针叶夹角小、高 1.0~1.5 cm 的赤松组培苗接种于含有萘乙酸（NAA）、吲哚丁酸（IBA）和蔗糖的 1/2~1/4WPM 培养基中诱导不定根原基；

（2）完成不定根原基诱导后，将外植体转入含有活性炭（AC）和蔗糖的 1/2WPM 培养基中促进不定根的表达与伸长。

（3）将已生根的再生植株移栽于培养土中，喷水保湿。

其中，步骤（1）中所述诱导不定根原基的培养基中含有 NAA 0.1~0.2 mg/L、IBA 1.0~2.0 mg/L 及蔗糖 0.5~1.5 %，诱导处理时间为 25-30 天。

步骤（2）中所述促进不定根表达与伸长的培养基中添加有 AC 0.5~1.0 g/L 和蔗糖 2.0%。

上述过程所采用的培养条件为：温度 24~26 ℃，光照 2000 Lux，每日光照 16 h。

有益效果：本发明以生长幼嫩、高度控制在一定范围内的赤松组培苗为外植体，采用两步生根法，于生长素诱导处理 25-30 天后及时转移至无生长素但添加活性炭的培养基中，极大地提高了生根率，并改善了不定根的质量。采用本发明，不定根发生率最高达 91.7%，且根茎之间愈伤组织较少，维管连接紧密，3 个月后移栽成活率达 79%以上。

四、附图说明

图 1 为大量生根的赤松组培苗

图 2 为根茎之间连接紧密的赤松组培再生植株

图 3 为温室里生长良好的赤松组培再生植株

五、具体实施方式

下面的实施例可以使本领域技术人员更全面地理解本发明，但不以任何方式限制本发明。

以抗松材线虫病赤松不同家系成熟种子（从日本引进）在无菌条件下萌发的幼苗子叶节为外植体，接种于 GD+6-BA3~5 mg/L+NAA0.1~0.3 mg/L 培养基中诱导产生初代芽，伸长的芽接种于 GD+6-BA1.5~2.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L 培养基中进行增殖培养，经过多次增殖培养获得大量丛生芽。在进行不定根诱导前 4~5 周将丛生芽接种于添加活性炭的培养基中培养，备用。

实施例 1

试验材料为抗松材线虫病赤松 1#-A 无性系

选取生长幼嫩、针叶夹角小、高 1.0~1.5 cm 的丛生芽分别单个切下，接种于 1/4WPM＋NAA 0.1 mg/L+IBA1.0 mg/L+蔗糖 0.5%培养基中诱导不定根原基，30 天后，将外植体转入 1/2WPM＋AC0.5 g/L+蔗糖 2.0%培养基中促进不定根表达与伸长，30 天后，统计不定根发生率，记录平均根数并观察根茎之间愈伤组织发生情况；将再生植株根部琼脂洗净，移栽于培养土中，喷水保湿，3 个月后统计移栽成活率。具体数据见表 1。

上述过程的培养条件：温度 24~26 ℃，光照 2000 Lux，每日光照 16 h。

实施例 2

试验材料为抗松材线虫病赤松 3#-5 无性系

除诱导不定根原基的培养基更换为 1/2WPM＋NAA 0.2 mg/L + IBA1.0 mg/L + 蔗糖 1.0 % 外，其余均与实施例 1 同。

实施例 3

试验材料为抗松材线虫病赤松 5#-3 无性系

除诱导不定根原基的培养基更换为 1/2WPM+NAA0.1 mg/L+IBA2.0 mg/L+蔗糖 0.5%外，其余均与实施例 1 同。

实施例 4

试验材料为抗松材线虫病赤松 6#-4 无性系

除诱导不定根原基的培养基更换为 1/4WPM+NAA0.1 mg/L+IBA1.0 mg/L+蔗糖 1.0%外，其余均与实施例 1 同。

实施例 5

试验材料为抗松材线虫病赤松 7#-13 无性系

除诱导不定根原基的培养基更换为 1/4WPM + NAA0.2 mg/L + IBA1.0 mg/L + 蔗糖 1.5%，并且于 25 天后将外植体转入 1/2WPM＋AC1.0 g/L+蔗糖 2.0%培养基中外，其余均与实施例 1 同。

表 1 为实施例 1 至 5 中赤松组培苗不定根发生及移栽成活情况。

表 1 赤松组培苗不定根发生及移栽成活情况

实施例	不定根原基诱导培养基	不定根发生率（%）	根数（条）	愈伤组织	成活率（%）
1	1/4WPM+NAA0.1 mg/L+IBA1.0 mg/L+蔗糖 0.5%	91.7	2~3	极少	79.4
2	1/2WPM+NAA0.2 mg/L+IBA1.0 mg/L+蔗糖 1.0%	87.5	2~3	极少	92.9
3	1/2WPM+NAA0.1 mg/L+IBA2.0 mg/L+蔗糖 0.5%	85.7	3~4	极少	90.0
4	1/4WPM+NAA0.1 mg/L+IBA1.0 mg/L+蔗糖 1.0%	85.7	3~4	极少	100
5	1/4WPM+NAA0.2 mg/L+IBA1.0 mg/L+蔗糖 1.5%	83.3	3~4	极少	83.3

表 1 结果表明，采用本发明使赤松各无性系组培苗不定根发生率达 80%以上，最高达 91.7%，每植株平均发根 2~4 条，且组培苗基部的愈伤组织极少，根茎之间连接紧密（图 1、图 2）。移栽至温室后，再生植株生长良好，3 个月后移栽成活率均在 79%以上（图 3）。本发明较好地解决了赤松组培苗不定根发生困难的问题，为工厂化生产抗病赤松组培再生植株奠定了基础，同时也为其他松属树种组培苗不定根发生研究提供了重要的参考依据。

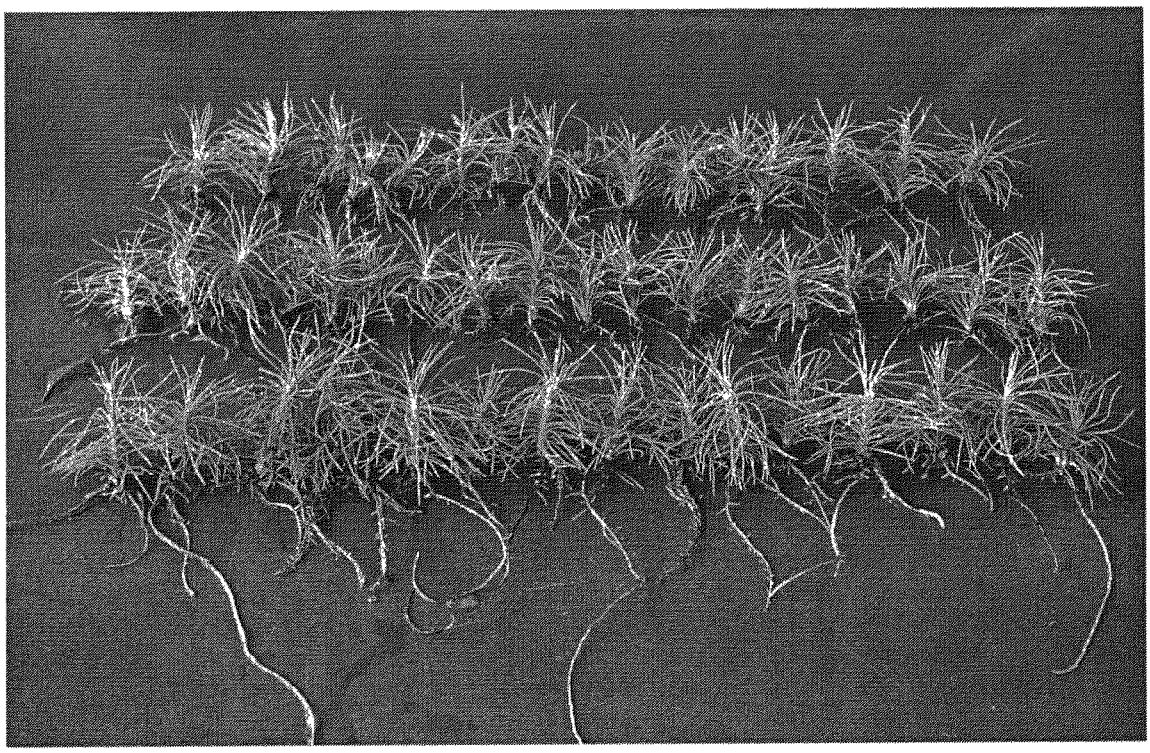


图 1

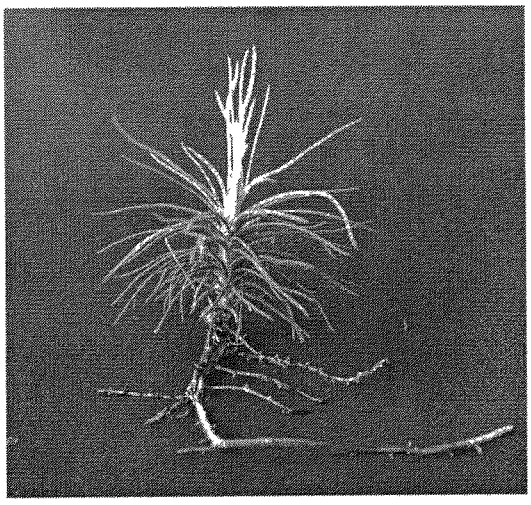


图 2



图 3