



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109105257 B

(45) 授权公告日 2021.03.26

(21) 申请号 201810902894.1

审查员 冀敏

(22) 申请日 2018.08.09

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109105257 A

(43) 申请公布日 2019.01.01

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72) 发明人 邓世媛 陈建军 王维 许冬梅

李淮源 常娟娟

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有

限公司 44245

代理人 崔红丽

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

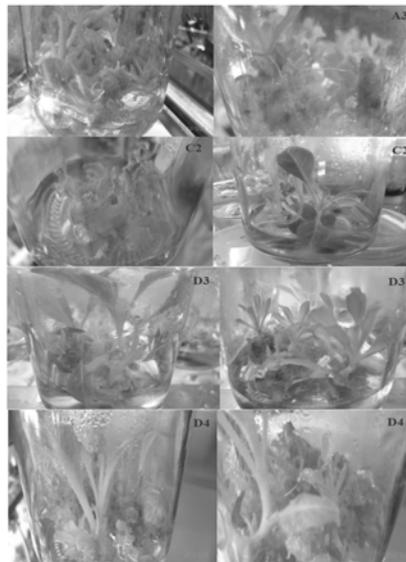
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种烤烟组培快繁育苗的方法

(57) 摘要

本发明公开一种烤烟组培快繁育苗的方法，涉及烟草生产技术领域。该方法包括愈伤组织的诱导、芽的分化继代、生根壮苗等步骤。本发明系统的进行了烤烟组培快繁育苗研究工作，组培苗从组培室到假植的过程中需要3~5天的炼苗时间，且假植时间应适当提早，较为适合的假植叶龄为3~4叶龄，假植45天左右可以起到培育壮苗的作用。组培苗大田生长期花叶病发病率比常规苗降低了80.04%、虫害发生率减少52.73%、中上等烟比例增加12.58%、烟叶产量增加了8.36%、产值增加17.41%，烤烟组培快繁育苗技术增加了烟农收入、繁荣了农村经济，体现了良好的社会效益。



1. 一种烤烟组培快繁育苗的方法,其特征在于主要包括以下步骤:

(1) 愈伤组织的诱导

取叶龄为2~4的烟草无菌苗,将其叶子切成(0.4~0.6) cm*(0.4~0.6) cm大小,接种于诱导培养基中,于(26±1) °C、黑暗条件培养至有愈伤出现,移至(26±1) °C、16h/d光照条件下培养,获得愈伤组织;

所述的烟草无菌苗的获取过程如下:

将烟草品种K326种子用纱布包紧,在流动水中冲洗10~15分钟后,在超净工作台上,将种子在浓度75%乙醇溶液中浸泡30s,无菌水冲洗3次;然后在浓度0.1% HgCl_2 溶液中消毒5~7min;无菌水冲洗5次;在培养基上播种及发芽培养、继代培养、生根壮苗培养成所需的无菌苗;

播种及发芽培养所用的培养基为1/2MS培养基;

继代培养所用的继代培养基为:MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.5mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA;

生根壮苗培养所用的生根壮苗培养基B为:1/2MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.2mg/L NAA+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.5g/L AC;

(2) 芽的分化继代

在芽分化时,取步骤(1)获得的愈伤组织在继代增殖培养基中再进行芽的继代增殖,获得不定芽;

(3) 生根壮苗

待不定芽长至2~3cm高时切下接种于生根壮苗培养基A中,于(26±1) °C,16h/d光照条件下培养;然后炼苗后假植42~48天,获得壮苗;

步骤(1)中所述的诱导培养基为:MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.2mg/L NAA+2.0mg/L KT;

步骤(2)中所述的继代增殖培养基为:MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.5mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA;

步骤(3)中所述的生根壮苗培养基A为:1/2MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.5g/L AC+0.2mg/L NAA。

一种烤烟组培快繁育苗的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及烟草生产技术领域,尤其涉及一种烤烟组培快繁育苗的方法。

背景技术

[0002] 组织培养是一种植物快速繁殖的手段,同时也是植物改良、种质保存和次生物质生产的理想途径,其优越性主要在于:遗传特性一致、周期短、繁殖速度快、效率高,可生产大量无病毒或去病毒植株,可连续运行、周年试验生产,节省土地和空间。

[0003] 烟草是我国重要的经济作物。目前,我国烟草生产上普遍采用的是有性繁殖方式,但繁殖的烟苗不均衡,易发生变异,而且容易感染病菌,造成生长发育中经常发生病害、品质退化,既降低了烟叶的可用性,也影响烟农的经济收入。同时,当前烟草生产存在品种单一、后备品种匮乏、良种种性退化、新品种更新缓慢等问题,而从国外引进优良烟草品种是一条简单易行、迅速见效的途径,不仅可以直接应用于生产,而且可以充实育种的遗传资源供育种科研使用。但是国外引种存在的一个严重问题是,引进的烤烟品种多为不育系,不利于育种研究利用及优良种质资源的保存。而通过组织培养技术结合高温脱毒处理,不仅可以保持烟草优良品种的优良性状,减少病虫害的发生,提高烟叶质量,还可以进行优良种质资源的保存。但将快繁技术用于烤烟育苗生产的工艺、培养基配方尚未发现,这在实际应用中又是非常需要的。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明的目的在于提供一种烤烟组培快繁育苗的方法。

[0005] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0006] 一种烤烟组培快繁育苗的方法,主要包括以下步骤:

[0007] (1) 愈伤组织的诱导

[0008] 取叶龄为2~4(优选为3)的烟草无菌苗,将其叶子切成(0.4~0.6)cm*(0.4~0.6)cm(优选为0.5cm*0.5cm)大小,接种于诱导培养基中,于(26±1)℃、黑暗条件培养至有愈伤出现,移至(26±1)℃、16h/d光照条件下培养,获得愈伤组织;

[0009] (2) 芽的分化继代

[0010] 在芽分化时,取步骤(1)获得的愈伤组织在继代增殖培养基中再进行芽的继代增殖,获得不定芽;

[0011] (3) 生根壮苗

[0012] 待不定芽长至2~3cm高时切下接种于生根壮苗培养基A中,于(26±1)℃,16h/d光照条件下培养;然后炼苗后假植42~48天(优选45天),获得壮苗。

[0013] 为了更好的实现本发明的目的,还包括:

[0014] (4) 组培苗从组培室到假植的过程中需要3~5天的炼苗时间,且假植时间应适当提早,较为适合的假植叶龄为3~4叶龄,假植45天左右可以起到培育壮苗的作用。

[0015] 优选的,步骤(1)中所述的烟草无菌苗的获取过程如下:

[0016] 将烟草品种K326种子用纱布包紧,在流动水中冲洗10~15分钟后,在超净工作台上,将种子在浓度75%乙醇溶液中浸泡30s,无菌水冲洗3次;然后在浓度0.1%HgCl₂溶液中消毒5~7min;无菌水冲洗5次;在培养基上播种及发芽培养、继代培养、生根壮苗培养成所需的无菌苗;

[0017] 其中,播种及发芽培养所用的培养基为1/2MS培养基;

[0018] 继代培养所用的继代培养基为:MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.5mg/L萘乙酸(NAA)+1.0mg/L6-苄氨基嘌呤(6-BA);

[0019] 生根壮苗培养所用的生根壮苗培养基B为:1/2MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.2mg/L萘乙酸(NAA)+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.5g/L活性炭(AC)。

[0020] 优选的,步骤(1)中所述的诱导培养基为:MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05~1.0g/L肌醇+20~30g/L蔗糖+(0.2±0.05)mg/L萘乙酸(NAA)+(2.0±0.1)mg/L激动素(KT)。

[0021] 更优选的,步骤(1)中所述的诱导培养基为:MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.2mg/L萘乙酸(NAA)+2.0mg/L激动素(KT)。

[0022] 优选的,步骤(2)中所述的继代增殖培养基为:MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05~1.0g/L肌醇+20~30g/L蔗糖+(0.5±0.1)mg/L萘乙酸(NAA)+(1.0±0.1)mg/L6-苄氨基嘌呤(6-BA)。

[0023] 更优选的,步骤(2)中所述的继代增殖培养基为:MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.5mg/L萘乙酸(NAA)+1.0mg/L6-苄氨基嘌呤(6-BA)。

[0024] 优选的,步骤(3)中所述的生根壮苗培养基A为:1/2MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05~1.0g/L肌醇+20~30g/L蔗糖+0.5~1.0g/L活性炭(AC)+(0.2±0.05)mg/L萘乙酸(NAA)。

[0025] 更优选的,步骤(3)中所述的生根壮苗培养基A为:1/2MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L蔗糖+0.5g/L活性炭(AC)+0.2mg/L萘乙酸(NAA)。

[0026] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0027] 本发明系统的进行了烤烟组培快繁育苗研究工作,组培苗从组培室到假植的过程中需要3~5天的炼苗时间,且假植时间应适当提早,较为适合的假植叶龄为3~4叶龄,假植45天左右可以起到培育壮苗的作用。组培苗大田生长期花叶病发病率比常规苗降低了80.04%、虫害发生率减少52.73%、中上等烟比例增加12.58%、烟叶产量增加了8.36%、产值增加17.41%,烤烟组培快繁育苗技术增加了烟农收入、繁荣了农村经济,体现了良好的社会效益。

附图说明

[0028] 图1是不同处理各芽点的形态特征。

具体实施方式

[0029] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0030] 实施例1烟苗获取

[0031] 将烟草品种K326种子(广东烟草清远市有限公司提供)用纱布包紧,在流动水中冲

洗10~15分钟然后在超净工作台上,将种子在浓度75%乙醇溶液中浸泡30s,无菌水冲洗3次;然后在浓度0.1%HgCl₂溶液中消毒5~7min;无菌水冲洗5次;播种于1/2MS培养基。(26±1)℃,16h/d光照条件下进行发芽培养。然后进行继代培养,在继代培养基:MS+0.5mg/L萘乙酸(NAA)+1.0mg/L6-苄氨基嘌呤(6-BA)+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.05g/L肌醇+30g/L的蔗糖上进行芽的分化;再在生根壮苗培养基B:1/2MS+7.5~8.0g/L卡拉粉+0.2mg/LNAA+0.05g/L肌醇+30g/L的蔗糖+0.5g/L活性炭(AC)上生根壮苗培养成所需的无菌苗。

[0032] 实施例2愈伤组织的诱导

[0033] 取叶龄为3左右的无菌苗,将其叶子切成0.5cm*0.5cm大小,播种于如下表1的16种培养基中每个处理接8瓶三个重复,每瓶内接种5片,于(26±1)℃、黑暗条件培养至有愈伤出现,移至(26±1)℃、16h/d光照条件下培养。每五天观察记录一次,对愈伤组织形态、生长速度、诱导率情况进行了研究,具体结果如表1所示。

[0034] 表1不同激素浓度对比对愈伤组织生长状况及诱导率的影响

编号	激素配方水平	生长速度	愈伤形态	膨大日期	启动时间	污染率	诱导率	
A1	0.2mg/L NAA+0.6mg/L 6-BA	较慢-较慢-较快	白色有根	98%	第六天	第十天	6.7%	98%
A2	0.2mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA	较慢-较快-较慢	白色有根且可长芽	100%	第六天	第十天	0	100%
A3	0.5mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA	较快-较快-较慢	直接生成绿芽	100%	第五天	第十天	2.3%	100%
A4	0.5mg/L NAA+1.5mg/L 6-BA	快-快-较快	灰白有根	100%	第六天	第十天	2.3%	100%
B1	0.2mg/L 2-4-D+0.6mg/L 6-BA	较慢-快-较慢	灰色无根无芽点	50%	第五天	第十天	2.3%	50%
B2	0.2mg/L 2-4-D+1.0mg/L 6-BA	较慢-较慢-较快	浅灰色无根无芽点	60%	第六天	第十天	0	60%
B3	0.5mg/L 2-4-D+1.0mg/L 6-BA	较快-较慢-较慢	灰色无根无芽点	100%	第五天	第十天	2.3%	100%
B4	0.5mg/L 2-4-D+1.5mg/L 6-BA	快-较慢-快	深灰色无根无芽点	100%	第五天	第十天	0	100%
C1	0.1mg/L NAA+2.0mg/L KT	较快-较慢-较慢	灰褐色有根可长芽	80%	第五天	第十天	2.3%	80%
C2	0.2mg/L NAA+2.0mg/L KT	快-快-快	绿色长芽且可长苗	100%	第六天	第十天	0	100%
C3	0.5mg/L NAA+2.0mg/L KT	较快-快-较快	灰色无根无芽点	75%	第五天	第十天	0	75%
C4	0.5mg/L NAA+5.0mg/L KT	慢-较慢-较快	白色带浅褐有根	100%	第四天	第九天	0	100%
D1	0.1mg/L 2-4-D+2.0mg/L KT	快-较快-较快	深灰色无根无芽点	80%	第四天	第九天	0	80%
D2	0.2mg/L 2-4-D+2.0mg/L KT	较快-较慢-较慢	白色且有白芽点	100%	第四天	第九天	0	100%
D3	0.5mg/L 2-4-D+2.0mg/L KT	较慢-较快-较慢	褐色有根有绿芽	100%	第四天	第九天	0	100%
D4	0.5mg/L 2-4-D+5.0mg/L KT	慢-较慢-较快	绿色长芽且长苗	100%	第四天	第九天	0	100%

[0035] 从表1的数据中可以看出,在本发明的培养条件下,诱导愈伤组织产生的培养基选用配方为MS+卡拉粉7.5~8.0g/L+肌醇0.05g/L+蔗糖30g/L+0.2mg/L萘乙酸(NAA)+2.0mg/L激动素(KT),烤烟组培快繁育苗愈伤组织诱导速度最快,愈伤形态显示为绿色长芽且可以长苗生根,诱导率高。

[0037] 实施例3芽的分化继代

[0038] 在芽分化时取在愈伤诱导时最好效果的4个配方再进行芽的继代增殖,每个处理接8瓶三个重复,每瓶内接种4个切割均匀的芽。

[0039] 芽分化继代配方采用了在愈伤诱导时表现较好的几个配方,不同浓度的激素配比对于芽的分化结果如下:

[0040] 由表2和图1可知,在所试的各组配方中,A3芽的增值率达到了100%,污染率低,分化继代效果良好,A3的芽点形态最好,芽点比较簇拥,并且都为绿色,可以长根、长苗。

[0041] 表2不同激素浓度对比对芽分化增值率和芽点颜色及形态的影响

编号	培养基配方		污染率 (%)	增殖率 (%)	芽点颜色与形态
[0042]	A3	MS+卡拉粉 0.5mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA	0.25	100	绿芽多可长苗和根
	C2	7.5~8.0g/L + 0.2mg/L NAA+2.0mg/L KT	0.65	98	绿芽多可长苗和根
	D3	肌醇 0.05g/L + 0.5mg/L 2-4-D+2.0mg/L KT	0.25	90	绿芽较多、较矮小
	D4	蔗糖 30g/L 0.5mg/L 2-4-D+5.0mg/L KT	0	100	绿芽可长苗和根

[0043] 实施例4生根壮苗

[0044] 待不定芽长至2~3cm高时切下接种于如下的7种培养基中每个处理接8瓶三个重复,每瓶内接种4棵于(26±1)℃,16h/d光照条件下培养。对不同激素浓度配比下生根情况进行了研究,具体结果如表3所示。

[0045] 表3不同激素浓度配比对对生根数及根形态的影响

编号	培养基配方		污染率(%)	生根数	生根形态	苗的形态
[0046]	A	0.5mg/L NAA+0.1mg/L 6-BA+AC 0.5g/L	0.3	较多	根多较长较细小	绿色大叶,株较矮
	B	0.5mg/L NAA+0.05mg/L 6-BA+AC 0.5g/L	0.6	不多	根短稍粗	叶多但多数小,株矮
	C	1/2MS+卡拉粉 0.2mg/L NAA+2.0mg/L KT+AC 0.5g/L	1	不多	根粗长,须根少	叶绿中等大,株稍矮
	D	7.5~8.0g/L+肌醇 0.5mg/L NAA+0.2mg/L 6-BA+AC 0.5g/L	0	多	根多较长、须根多	叶绿大且叶柄长,株矮
	E	0.05g/L+蔗糖 30g/L 0.2mg/L NAA+0.2mg/L KT+AC 0.5g/L	1	多	根细长、须根多	叶绿小,株稍高
	G	0.2mg/L NAA+AC 0.5g/L	0.6	多	根系长且多	株矮小,叶大,深绿色
	H	0.2mg/L NAA+AC 1.0g/L	0.3	较多	有根须较长	株矮小,叶较大,绿色

[0047] 由表3结果可以看出,G下的培养基配方加了浓度比较低的生长素NAA以及6-BA或者是KT,生根数多,当所加的激素浓度比较大时,如B、C,就会限制根系的生长,不能形成有利于假植的组培苗。在成苗时期,根数多、茎较粗、叶片大且呈绿色对成活率有重要影响,特别是根的多少及其粗细。粗根在移栽时不易折断,可以有效地提高成活率,茎小的会造成假植时徒长、叶子也会相对偏小。在G培养基下,根系比较多且粗长,植株比较矮壮,不易徒长,叶片较大且呈绿色,是生根壮苗中最好的培养基。

[0048] 表4K326组培苗与常规苗烤烟大田病虫害发生率及经济性状比较

品种(系)	处理	调查项目						
		气候斑 / (%)	花叶病 / (%)	虫害 / (%)	产量 (kg.hm ⁻²)	产值(万 元.hm ⁻²)	上等烟比 例 (%)	均价 (元.kg ⁻¹)
[0049] K326	常规	0±0a	15.38±1.59a	31.82±1.37a	2585.10±10.24b	6.03±0.06b	51.03±1.09b	23.33±0.03b
	组培	0±0a	3.07±0.03b	15.04±0.86b	2801.15±11.50a	7.08±0.04a	57.45±0.27a	25.29±0.02a

[0050] 注:表中同列数值后不同字母表示在0.05水平上达到显著差异。

[0051] 表4显示,在整个大田生育期内,品种K326表现出较好的抗性,K326组培苗的虫害

发生率比常规苗低52.73%。在产量方面,K326组培苗比常规苗每公顷增收8.36%,产值上,K326每公顷增收1.05万元,从上等烟比例来看,组培苗的比率显著提高,组培苗收购均价显著高于当地烟叶收购价约10.44%。

[0052] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

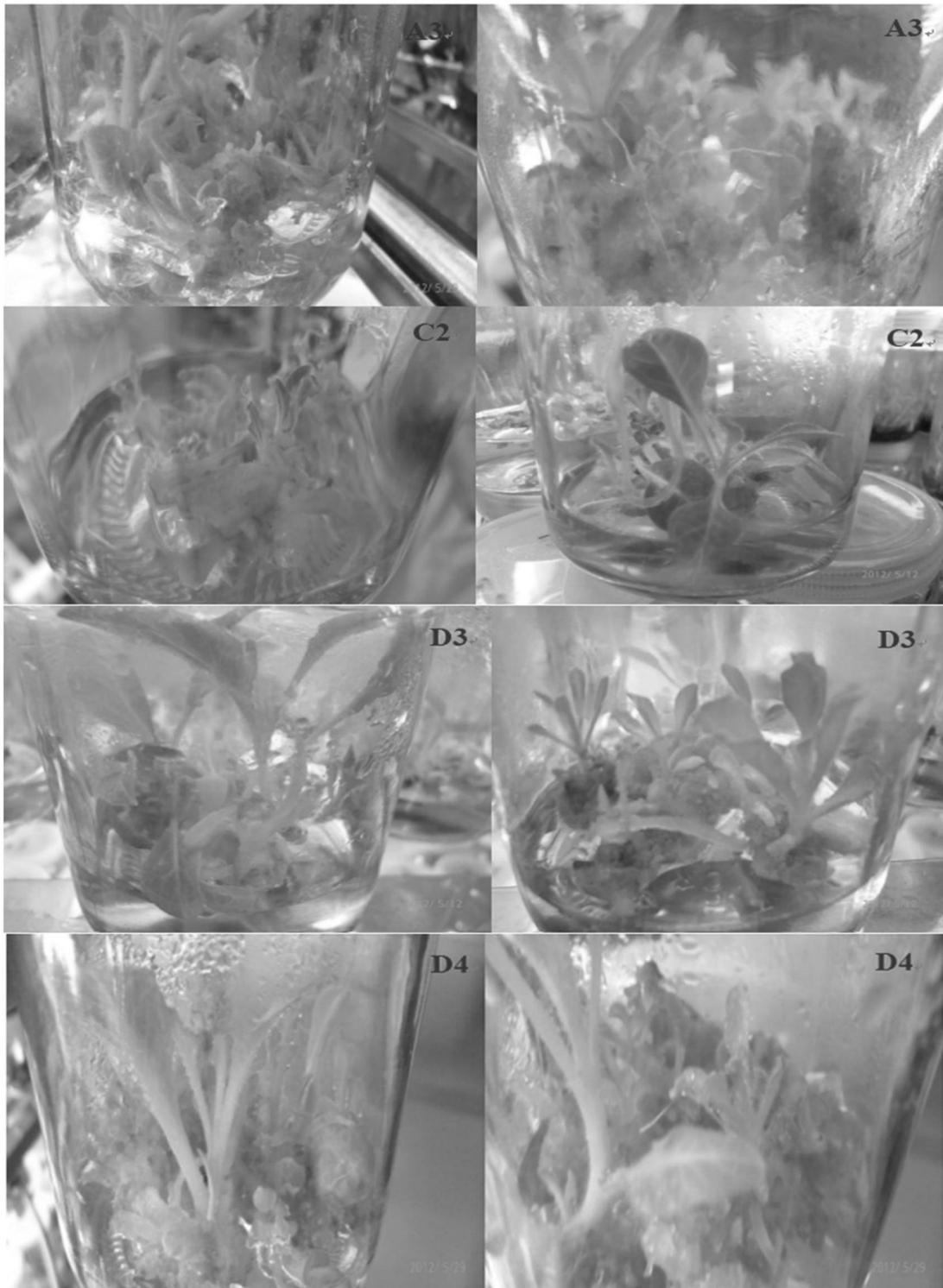


图1