



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112243862 A

(43) 申请公布日 2021.01.22

(21) 申请号 202011235970.1

(22) 申请日 2020.11.09

(71) 申请人 三明市农业科学研究院

地址 365500 福建省三明市沙县琅口镇柱元村

(72) 发明人 周建金 华树妹 叶炜 李丽红  
陈芝华 邓才生

(74) 专利代理机构 福州盈创知识产权代理事务所(普通合伙) 35226

代理人 徐小伍

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图8页

(54) 发明名称

一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法

(57) 摘要

一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法,它主要包括以下步骤:1)茎段消毒、2)愈伤组织诱导、3)分化培养、4)生根培养、5)根尖染色体数鉴定、6)生物学性状与染色体倍性稳定性复鉴。本方法设计理想,通过对混倍体(如四倍体和六倍体)参薯茎段为外植体进行组织培养,不仅能获得单一倍性和生物学性状稳定的再生植株,又能获得染色体倍性和生物学性状不同的株系,使得混倍体参薯在育种计划中得到使用。而且丰富了参薯的种质资源,缩短育种时间,为参薯育种开辟了新途径,又为后期的品种选育奠定基础。



1. 一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法,其特征在于,它包括以下步骤:

a) 茎段消毒:将同一株的混倍体参薯茎蔓剪成的带腋芽茎段,用水冲洗干净,装入瓶中,用流动的自来水冲洗1-2 h,待其晾干后在超净工作台上用75%的酒精浸泡15 s,无菌水冲洗2-4次后,再投入0.1%的升汞中,不停摇晃,持续8-10 min后取出,再用无菌水冲洗5-8次后备用;

b) 愈伤组织诱导:将消毒后的茎段接种至诱导愈伤培养基进行诱导处理,该诱导愈伤培养基为:1/2MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+椰子汁70 mL/L;

c) 分化培养:将诱导好的愈伤组织(不切割)转接到分化培养基进行培养处理,该分化培养基为:1/2MS +6-BA 2.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L;

d) 生根壮苗:愈伤组培分化的苗,待分化好的小苗长至3 cm高时,直接切下小苗接入生根培养基进行培养处理,该生根培养基为:1/2MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AC 0.5 g/L;

e) 根尖染色体数鉴定:选取有3条根以上的小苗,自来水冲去琼脂,取其根尖进行染色体观察进行染色体数鉴定处理,鉴定出单一倍性的组培苗;

f) 生物学性状与染色体倍性稳定性复鉴:将鉴定出是单一倍性的组培苗,栽种到基质中,驯化三个月后移栽大田种植,并且对单株进行稳定性鉴定处理。

2. 如权利要求1所述的一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法,其特征在于:所述步骤e)中所述染色体数鉴定处理的方法:A、根尖处理,采用压片法对小苗的根尖进行处理制作成片子;B、镜检:将制好的片子在显微镜下观察,选取染色体分散好的细胞拍照,统计染色体数目。

3. 如权利要求1所述的一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法,其特征在于:所述步骤f)中单株进行稳定性鉴定处理的方法为,抽取生物学性状有差异的3个单株作为供试材料,进行扩繁,供试材料经数年种植扩繁,每份分成60块,20块1组,重复3组,混倍体参薯为对照,观察或测定供试材料的生物学性状和根尖染色体倍数,分析子代的生物学性状和染色体数目的稳定性。

4. 如权利要求1所述的一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法,其特征在于:所述诱导愈伤培养基、所述分化培养基和所述生根培养基均加入蔗糖20 g/L和琼脂5 g/L,其pH值均控制在5.6-5.9,其培养环境温度均控制在23°C-27°C,光照强度均控制在1500-2000lx,光照时间均控制在11-13 h/d。

## 一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及混倍体植物分离纯化技术,具体地说是指一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法。

### 背景技术

[0002] 参薯,又名大薯,系薯蓣科,属于多年生藤质草本植物,其块茎富含淀粉和粗蛋白,可作粮食和蔬菜食用,并可制取淀粉和供药用。在中国主产于浙江、广东、广西、湖南、湖北、福建、四川、江西等省。除食用外,参薯还是药用植物,据《神农本草经》及《本草纲目》中记载,参薯具有健脾养胃、生津益肺、补肾益精和益脑养颜的功效,常用于抗衰老、治疗糖尿病、心血管疾病和消化不良等。

[0003] 在福建,参薯主要用于菜肴和制作特色小吃,种植历史悠久,发展前景广阔,因此进一步开展参薯育种研究,选育优良参薯新品种对推动参薯产业发展具有重要意义。2013年,三明市农科院淮山课题组对福建栽培的参薯进行倍性鉴定。结果表明,部分福建栽培的参薯是混倍体,田间种植此混倍体时,其植株叶片、藤蔓和地下块茎颜色绿紫相间、薯块白紫相间,生物学性状极不稳定,通过多次种植提纯,仍无法得到性状稳定的株系,致使混倍体参薯很难在育种计划中使用。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法,其目的在于克服现有参薯分离纯化的方法不够理想,得到株系的生物学性状极不稳定,难以作为育种推广使用等缺陷。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案如下:

一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法,它包括以下步骤:a) 茎段消毒:将同一株的混倍体参薯茎蔓剪成的带腋芽茎段,用水冲洗干净,装入瓶中,用流动的自来水冲洗1-2 h,待其晾干后在超净工作台上用75%的酒精浸泡15 s,无菌水冲洗2-4次后,再投入0.1%的升汞中,不停摇晃,持续8-10 min后取出,再用无菌水冲洗5-8次后备用;

b) 愈伤组织诱导:将消毒后的茎段接种至诱导愈伤培养基进行诱导处理,该诱导愈伤培养基为:1/2MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+椰子汁70 mL/L;

c) 分化培养:将诱导好的愈伤组织(不切割)转接到分化培养基进行培养处理,该分化培养基为:1/2MS +6-BA 2.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L;

d) 生根壮苗:愈伤组培分化的苗(未进行再增殖培养),待分化好的小苗长至3 cm高时,直接切下小苗接入生根培养基进行培养处理,该生根培养基为:1/2MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AC 0.5 g/L。

[0006] e) 根尖染色体数鉴定:选取有3条根以上的小苗,自来水冲去琼脂,取其根尖进行染色体观察进行染色体数鉴定处理,鉴定出单一倍性的组培苗;

f) 生物学性状与染色体倍性稳定性复鉴:将鉴定出是单一倍性的组培苗,栽种到基质

中,驯化三个月后移栽大田种植,并且对单株进行稳定性鉴定处理。

[0007] 进一步地说,所述步骤e)中所述染色体数鉴定处理的方法:A、根尖处理,采用压片法对小苗的根尖进行处理制作成片子;B、镜检:将制好的片子在显微镜下观察,选取染色体分散好的细胞拍照,统计染色体数目。

[0008] 进一步地说,所述步骤f)中单株进行稳定性鉴定处理的方法为,抽取生物学性状有差异的3个单株作为供试材料,进行扩繁,供试材料经数年种植扩繁,每份分成60块,20块1组,重复3组,混倍体参薯为对照,观察或测定供试材料的生物学性状和根尖染色体倍数,分析子代的生物学性状和染色体数目的稳定性。

[0009] 进一步地说,所述诱导愈伤培养基、所述分化培养基和所述生根培养基均加入蔗糖20 g/L和琼脂5 g/L,其pH值均控制在5.6-5.9,其培养环境温度均控制在23℃-27℃,光照强度均控制在1500-2000lx,光照时间均控制在11-13 h/d。

[0010] 由上述对本发明的描述可知,和现有技术相比,本发明的优点在于:本方法设计理想,通过对混倍体(如四倍体和六倍体)参薯茎段为外植体进行组织培养,不仅能获得单一倍性和生物学性状稳定的再生植株,又能获得染色体倍性和生物学性状不同的株系,使得混倍体参薯在育种计划中得到推广使用。而且丰富了参薯的种质资源,缩短育种时间,为参薯育种开辟了新途径,又为后期的品种选育奠定基础。

## 附图说明

[0011] 图1为本发明中愈伤组织分化出不同颜色的再生植株的生长效果图。

[0012] 图2为本发明中再生植株生根的生长效果图。

[0013] 图3为本发明中再生植株经驯化栽培后,新叶颜色有紫色、淡紫色和绿色的生长效果图。

[0014] 图4为对照的地上部分的生长效果图。

[0015] 图5为本发明中1号再生植株的地上部分的生长效果图。

[0016] 图6为本发明中2号再生植株的地上部分的生长效果图。

[0017] 图7为本发明中3号再生植株的地上部分的生长效果图。

[0018] 图8为对照的薯块生长的效果图。

[0019] 图9为本发明中1号再生植株的薯块生长的效果图。

[0020] 图10为本发明中2号再生植株的薯块生长的效果图。

[0021] 图11为本发明中3号再生植株的薯块生长的效果图。

[0022] 图12为对照的混倍体参薯染色体的示意图。

[0023] 图13为本发明中1号再生植株的染色体的示意图。

[0024] 图14为本发明中2号再生植株的染色体的示意图。

[0025] 图15为本发明中3号再生植株的染色体的示意图。

## 具体实施方式

[0026] 参考说明书附图1-15。一种从混倍体参薯分离纯化出倍性稳定再生植株的方法,它包括以下步骤:

a) 茎段消毒:6月中旬将同一株的混倍体参薯茎蔓剪成1cm左右的带腋芽茎段,用水冲

洗干净,装入瓶中,用流动的自来水冲洗1-2 h,待其晾干后在超净工作台上用75%的酒精浸泡15 s,无菌水冲洗2-4次后,再投入0.1%的升汞中,不停摇晃,持续8-10 min后取出,再用无菌水冲洗5-8次后备用;

b) 愈伤组织诱导:将消毒后的茎段接种至诱导愈伤培养基进行诱导处理,该诱导愈伤培养基为:1/2MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+椰子汁70 mL/L。

[0027] c) 分化培养:将诱导好的愈伤组织(不切割)转接到分化培养基进行培养处理,该分化培养基为:1/2MS +6-BA 2.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L。愈伤组织分化情况见说明书附图1。

[0028] d) 生根壮苗:愈伤组培分化的苗(未进行再增殖培养),待分化好的小苗长至3 cm高时,直接切下小苗接入生根培养基进行培养处理,该生根培养基为:1/2MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AC 0.5 g/L。生根情况见说明书附图2。

[0029] e) 根尖染色体数鉴定:选取有3条根以上的小苗,自来水冲去琼脂,取其根尖进行染色体观察进行鉴定处理,鉴定出单一倍性的组培苗;取处理过(采用压片法处理)的根尖进行染色体观察,并且统计倍体分离率,20株为一重复,重复3次。具体地说,根尖染色体数鉴定方法为:A、根尖处理,采用压片法对小苗的根尖进行处理制作成片子;B、镜检:将制好的片子在显微镜下观察,选取染色体分散好的细胞拍照,统计染色体数目。计数时,每个根尖至少统计20个细胞,取85%以上具有恒定一致的染色体数作为该植株的染色体数。

[0030] f) 生物学性状与染色体倍性稳定性复鉴:将鉴定出是单一倍性的组培苗,栽种到基质(泥炭土:沙子=2:1)中,每隔7d施用1次营养液,驯化三个月后移栽大田种植,再生植株经驯化栽培后的生长情况见说明书附图3;并且进行稳定性鉴定处理。另外,小苗自来水冲去琼脂,取其根尖进行染色体观察,统计倍体分离率,20株为一重复,重复3次,见表1所示。

重复 N	观察株数(棵) Plants	染色体倍数		
		2n=4x (%)	2n=6x (%)	混倍体 (%)
n=1	20	20.00	25.00	55.00
n=2		40.00	20.00	40.00
n=3		25.00	15.00	60.00
平均		28.33±10.41	20.00±5.00	56.67±10.41

[0031] 从表1中可以得出,四倍体和六倍体的混倍体参薯经愈伤组织分化生根后,可以获得单一倍性四倍体和六倍体的再生植株,获得率分别为28.33%和20.00%。分化后,出现倍性不稳定的混倍体概率为56.67%。

[0032] 上述诱导愈伤培养基、所述分化培养基和所述生根培养基均加入蔗糖20 g/L和琼脂5 g/L,其pH值均控制在5.6-5.9(最佳数值5.8),其培养环境温度均控制在23℃-27℃(最佳温度25℃),光照强度均控制在1500-2000lx,光照时间均控制在11-13 h/d(最佳温度12 h/d)。

[0033] 一、不同诱导愈伤培养基配方对愈伤组织生长诱导的影响

将本申请中上述诱导愈伤培养基作为①号培养基;将配方为2,4-D 0.5+6-BA 2.0+NAA 0.2的诱导愈伤培养基作为②号培养基;将配方为2,4-D 0.5+6-BA 2.0+NAA 0.2 mg/L+KT 0.5的诱导愈伤培养基作为③号培养基;将配方为6-BA 2.0+NAA 0.2+KT 0.5的诱导愈伤培

培养基作为④号培养基。本申请人采用上述四种不同诱导愈伤培养基对茎段的愈伤组织生长诱导的影响做以下实验,具体地实验方法:将上述四种不同诱导愈伤培养基分别处理20个茎段为一重复,一瓶接种茎段5根,重复3次,45天后统计愈伤组织诱导率和重量。再将四组诱导好的愈伤组织(不切割)分别转接到本申请中分化培养基进行培养处理,待45天后统计愈伤组织的分化率。见表2所示:

培养基 Media component	愈伤组织诱导率 Frequency of callus induction (%)	愈伤组织总重 Total callus weight (g)	愈伤组织分化率 Differentiation rate of callus (%)
① 2,4-D 0.5+6-BA 2.0+NAA 0.2+椰子汁 70 mL/L	50.00±5.00a	6.06±0.19a	46.67±5.77a
② 2,4-D 0.5+6-BA 2.0+NAA 0.2	51.67±10.41a	3.72±0.38b	30.00±10.00b
③ 2,4-D 0.5+6-BA 2.0+NAA 0.2 mg/L+KT 0.5	48.33±10.41a	3.78±0.21b	26.67±5.77b
④ 6-BA 2.0+NAA 0.2+KT 0.5	-----	-----	-----

表2中愈伤组织诱导率的算法如下:愈伤组织诱导率(%)=产生愈伤组织的茎段数/接入的茎段数\*100%;愈伤组织分化率(%)=分化出小苗的愈伤组织数/接入的愈伤组织数\*100%。

[0034] 从上述表2可以得出,①、②、③号培养基添加了2,4-D,其培养基均诱导出愈伤组织,添加KT而没有添加2,4-D的④号培养基,未能诱导出愈伤组织,说明KT对愈伤组织诱导没有显著影响,2,4-D对诱导出愈伤组织起关键作用,愈伤组织诱导率最高的是②号培养基,诱导率达51.67%。①号培养基比②、③多添加了椰子汁,其愈伤组织重量和分化率显著高于②、③号培养基,分别达6.06g和46.67%,说明椰子汁能有效促进茎段的愈伤组织的生长发育。另外,③培养基比②号多添加了KT,但②、③号培养基的愈伤组织重量和分化率差异不明显,说明KT对愈伤组织重量和分化率没有显著影响。

### [0035] 二、再生植株性状分离与倍性鉴定情况

从说明书附图1-3中可以看出,混倍体参薯经组培后,再生植株出现了性状分离。如附图1中可以看出,一块愈伤组培长出不同颜色叶片的分化苗。分化苗经生根和驯化后,产生更为明显差异的外观性状,如附图3,驯化三个月的组培苗,新叶的颜色有紫色、淡紫色、绿色。

### [0036] 三、再生植株生物学性状与倍性稳定性分析

将上述步骤f) 中进行稳定性鉴定处理,该稳定性鉴定处理的方法:抽取生物学性状有差异的3个单株作为供试材料(即1号、2号和3号),进行扩繁,供试材料经数年种植扩繁,每份分成60块,20块1组,重复3组,混倍体参薯为对照(即ck)。观察或测定供试材料的生物学性状和根尖染色体倍数,分析子代的生物学性状和染色体数目的稳定性。重点观测特异的生物学性状,包括:叶形、叶色、叶脉颜色、叶柄两端颜色、叶长、叶宽、薯皮颜色、薯肉颜色。植株地上部分的观察记录时间为6月,地下块茎部分的考察与记录时间为10月。详细见说明

书附图4-15以及表3所示。

**表 3 再生植株生物学性状和倍性**

编号 Number	世代 n	再生植株染色体倍数 Chromosome numbers of regenerated plants	扩增后染色体倍数 Chromosome numbers after reproduction	叶子颜色 Foliage Color	叶脉颜色 Vein color	叶形 leaf shape	叶柄两端颜色 Both sides of the leaf color	叶长宽比 Leaf length - width ratio	薯肉颜色 Potato flesh color
1	n=1	2n=4x=40	2n=4x=40	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.71 ± 0.11a	白紫相间
	n=2	2n=4x=40	2n=4x=40	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.74 ± 0.28a	白紫相间
	n=3	2n=4x=40	2n=4x=40	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.81 ± 0.33a	白紫相间
2	n=1	2n=4x=40	2n=4x=40	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.85 ± 0.23a	紫色
	n=2	2n=4x=40	2n=4x=40	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.71 ± 0.32a	紫色
	n=3	2n=4x=40	2n=4x=40	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.9 ± 0.26a	紫色
3	n=1	2n=6x=60	2n=6x=60	绿色	绿色	正三角 心形	淡紫色	1.04 ± 0.12b	白色
	n=2	2n=6x=60	2n=6x=60	绿色	绿色	正三角 心形	淡紫色	1.15 ± 0.23b	白色
	n=3	2n=6x=60	2n=6x=60	绿色	绿色	正三角 心形	淡紫色	1.12 ± 0.19b	白色
ck	n=1	2n=3x, 4x, 6x=30, 40, 60	2n=3x, 4x, 6x=30, 40, 60	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.75 ± 0.11a	白紫相间
	n=2	2n=3x, 4x, 6x=30, 40, 60	2n=3x, 4x, 6x=30, 40, 60	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.95 ± 0.21a	白紫相间
	n=3	2n=3x, 4x, 6x=30, 40, 60	2n=3x, 4x, 6x=30, 40, 60	黄绿色	淡紫色	长三角 心形	紫色	1.75 ± 0.23a	白紫相间

[0037] a、从表3、说明书附图4-15可以看出，再生植株经扩增后，子代染色体数目、倍性和质量性状均稳定一致，数量性状差异不显著。因此通过对混倍体参薯组织培养后，能获得倍性单一和生物学性状稳定的再生植株。

[0038] b、从表3和说明书附图4-11中可以得出，相比对照，再生植株之间生物学性状发生了改变，如1号再生植株，薯肉的颜色变成了紫色；3号再生植株的生物学性状几乎不同于对照，叶子、叶脉颜色变成了绿色，叶形变成正三角形、叶柄变成淡紫色，叶长和叶宽与对照、1和2号再生植株差异显著，薯肉的颜色也变成了白色。因此通过对混倍体参薯组织培养后，能获得生物学性状不同的再生植株。

[0039] c、从表3和说明书附图12-15中可以得出，相比对照，单株之间的染色数目也发生了重大改变，如1、2号再生植株染色体为40条，3号再生植株染色体为60条。因此通过对混倍体参薯组织培养后，能获得染色体倍性不同的再生植株。

[0040] 综上所述，通过对混倍体参薯进行组织培养，不仅能获得单一倍性和生物学性状稳定的再生植株，又能获得染色体倍性和生物学性状不同的株系，不仅丰富了参薯的种质资源，又为后期的品种选育奠定基础。

[0041] 上述仅为本发明的具体实施方式，但本发明的设计构思并不局限于此，凡利用此

构思对本发明进行非实质性的改动,均应属于侵犯本发明保护范围的行为。



图1



图2



图3



图4



图5



图6



图7



图8

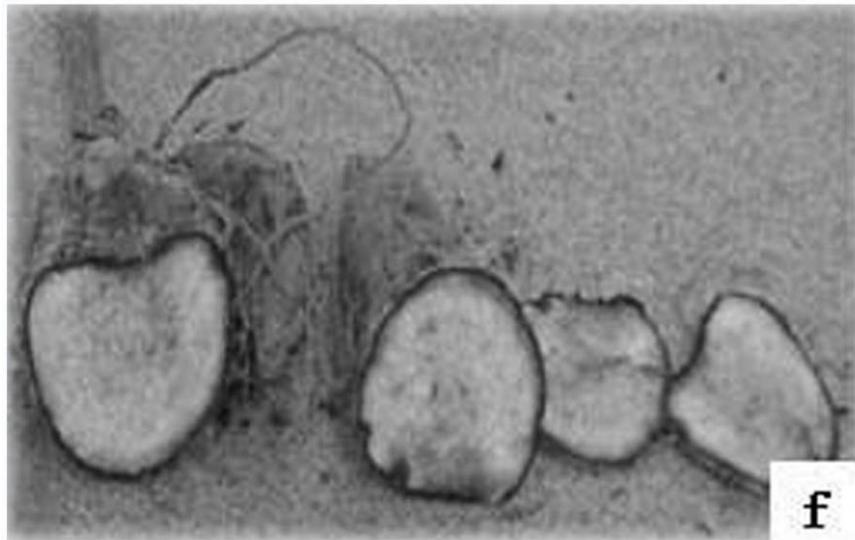


图9

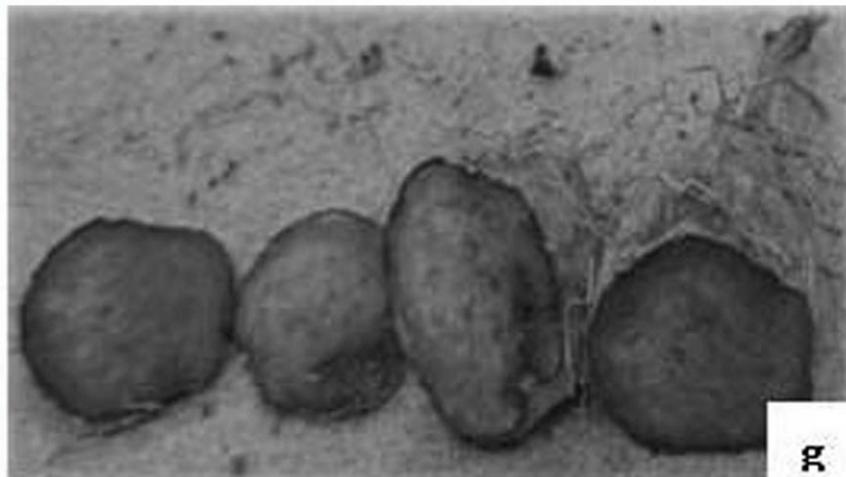


图10



图11

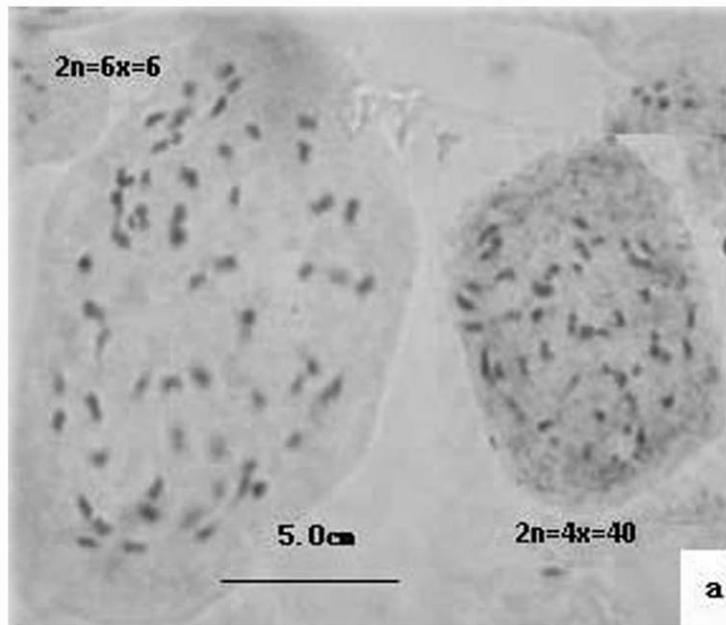


图12

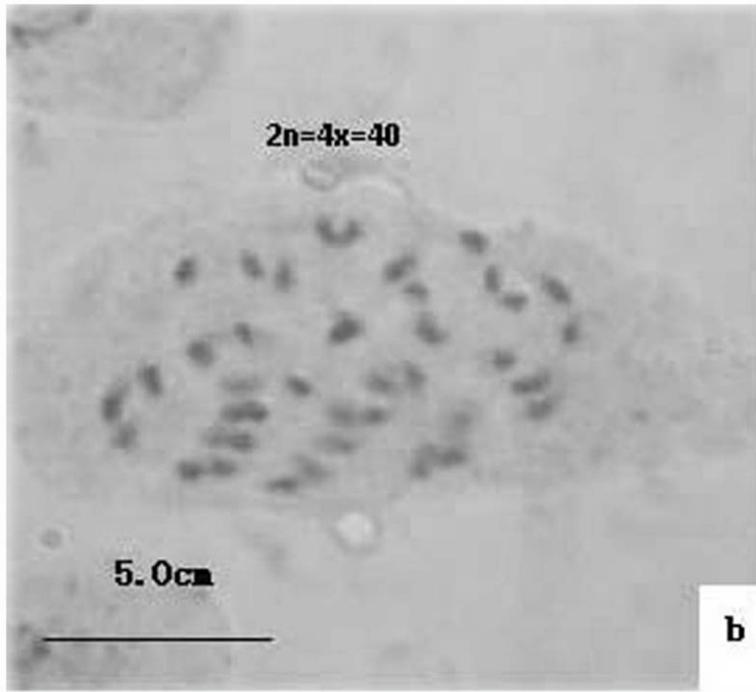


图13

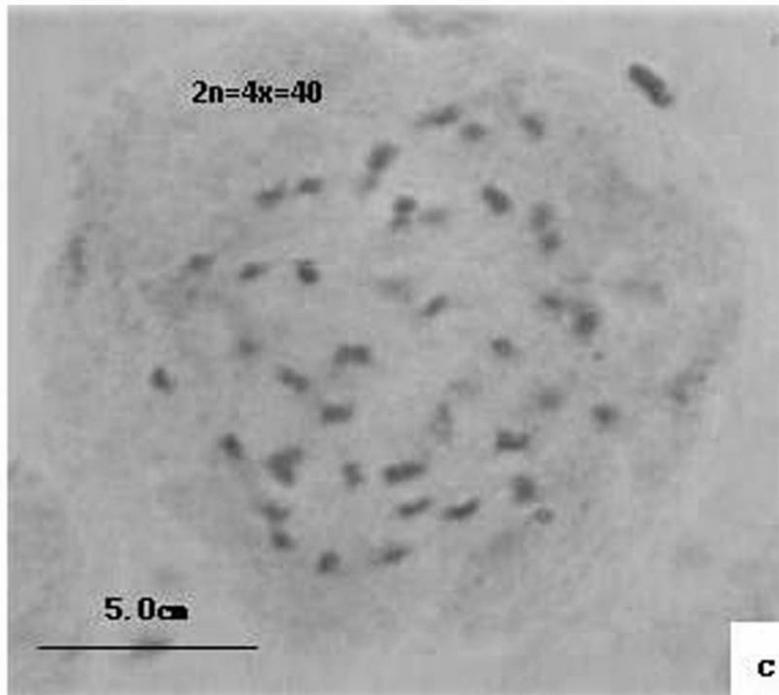


图14

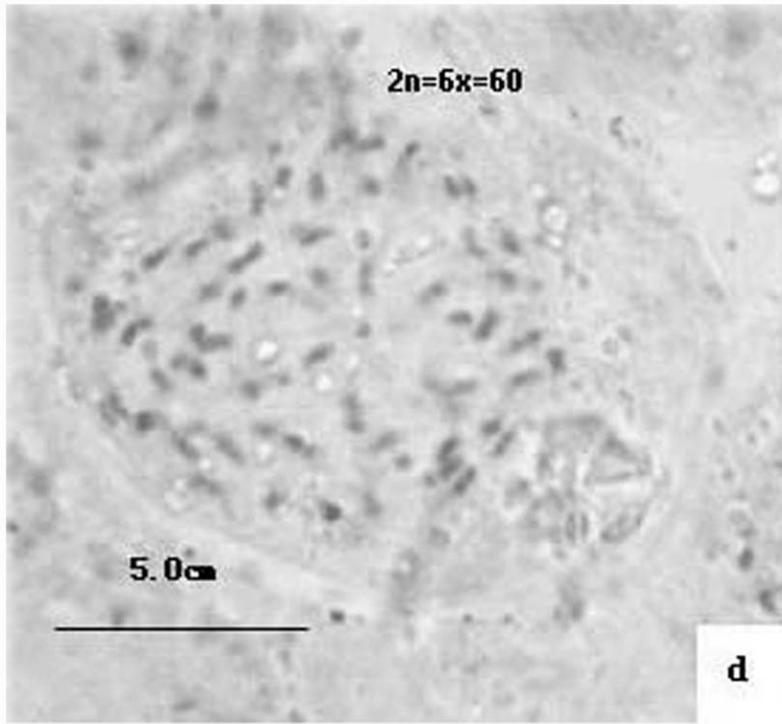


图15