



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115836645 B

(45) 授权公告日 2023.09.22

(21) 申请号 202211464571.1

(22) 申请日 2022.11.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115836645 A

(43) 申请公布日 2023.03.24

(73) 专利权人 江苏省中国科学院植物研究所
地址 210000 江苏省南京市玄武区中山门
外前湖后村1号

(72) 发明人 顾永华 李冬玲 全大治 高福洪
廖盼华

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 高辉

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

(56) 对比文件

CN 102550410 A, 2012.07.11

CN 105660407 A, 2016.06.15

CN 112042532 A, 2020.12.08

CN 114451304 A, 2022.05.10

JP H07135986 A, 1995.05.30

US 2004187177 A1, 2004.09.23

US 5965438 A, 1999.10.12

WO 2005012507 A1, 2005.02.10

刘建等. 羽扇豆的组织培养. 《福建农业科技》. 2001, (第6期), 第4页.

韩丹女; 安晓云; 吴侠; 佟少明; 姜长阳. 三色羽扇豆叶柄无性系建立的研究. 辽宁农业科学. 2007, (第02期), 第15-17页.

审查员 胡佳

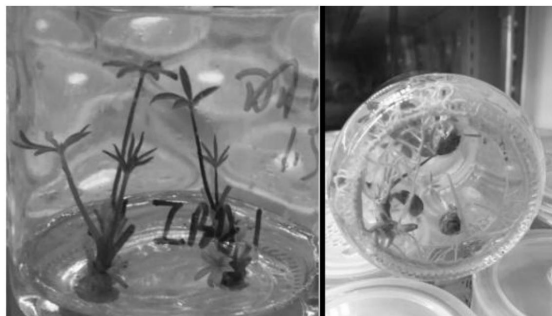
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

一种建立羽扇豆再生体系的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种建立羽扇豆再生体系的方法, 属于植物组织培养技术领域。本发明包括以下步骤: 以羽扇豆种子为外植体, 培育成无菌苗; 以无菌苗下胚轴、茎段或复叶叶柄为材料, 经愈伤组织诱导-增殖培养、分化培养、壮芽培养、生根培养获得再生种苗。本发明以羽扇豆成熟种子为外植体, 获得无菌苗; 以下胚轴、茎段或复叶叶柄为材料, 经由愈伤组织的诱导, 建立起再生技术体系, 获得健壮、一致的种苗, 为羽扇豆的规模化栽培奠定技术基础。



1. 一种建立羽扇豆再生体系的方法,其特征在于,包括以下步骤:

以羽扇豆种子为外植体,培育成无菌苗;以无菌苗下胚轴、茎段或复叶叶柄为材料,经愈伤组织诱导、愈伤组织增殖培养、分化培养、壮芽培养、生根培养获得再生种苗;

所述种子培育成无菌苗,以MS、1/2MS、1/3MS或1/4MS为基本培养基,添加琼脂6.5-7.0g/L,pH 5.75-5.85;

所述愈伤组织诱导,以B5为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,KT 1.0-2.0mg/L,2,4-D 0.5-1.0mg/L,碳纳米管1.0-2.0mg/L;

所述愈伤组织增殖培养,以B5为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,KT 1.0-2.0mg/L,2,4-D 0.5-1.0mg/L,碳纳米管1.0-2.0mg/L,活性炭1.0-3.0g/L,酪蛋白水解物0.5-1.5g/L,谷氨酰胺1.0-3.0mg/L;

所述分化培养,以B5为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,NAA 1.0-1.5mg/L,碳纳米管0.5-1.5mg/L;

所述壮芽培养,以B5为基本培养基,添加蔗糖38-42g/L,琼脂6.5-7.0g/L,6-BA 0.3-0.8mg/L,NAA0.1-0.5mg/L,碳纳米管2.0-5.0mg/L;

所述生根培养,以MS为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,IBA 1.5-2.5mg/L,碳纳米管0.1-1.0mg/L。

2. 根据权利要求1所述的建立羽扇豆再生体系的方法,其特征在于,所述种子进行消毒,包括75%的酒精消毒30-45s,无菌水冲洗2-3次;0.1% HgCl_2 消毒40-45min,无菌水冲洗4-5次。

3. 根据权利要求1所述的建立羽扇豆再生体系的方法,其特征在于,所述下胚轴、茎段或复叶叶柄切成1.0-2.0cm,进行愈伤组织诱导。

4. 根据权利要求1所述的建立羽扇豆再生体系的方法,其特征在于,所述愈伤组织诱导、愈伤组织增殖培养、分化培养、壮芽培养、生根培养阶段,温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100-300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照14-18h/d。

5. 根据权利要求1所述的建立羽扇豆再生体系的方法,其特征在于,还包括获得再生种苗后,进行室内炼苗、移栽。

一种建立羽扇豆再生体系的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物组织培养技术领域,尤其涉及一种建立羽扇豆再生体系的方法。

背景技术

[0002] 羽扇豆(*Lupinus micranthus* Guss.),蝶形花科羽扇豆属植物,一年生草本,原产地中海区域。羽扇豆具掌状复叶,小叶5-8枚;小叶倒卵形、倒披针形至匙形,总状花序顶生,花序挺拔、丰硕,花色艳丽多彩,有白、红、蓝、紫等多种花色,且花期长,可用于片植或在带状花坛群体配植,同时也是切花生产的好材料;因其根系具有固氮的功能,在茶园中广泛种植。同时,羽扇豆中所含的羽扇豆醇能抑制多种癌细胞的增殖,诱导其凋亡;其种子的提取物对慢性湿疹也具有良好的治疗效果。综上可知,羽扇豆是一种集观赏、药用、经济价值于一体的植物,在园林观赏、饲料加工、食品开发、绿肥应用和药用等方面均展现出较好的利用前景。

[0003] 羽扇豆作为一年生草本植物,通常以种子繁殖的方式进行种植、繁殖,长期的自花授粉必然会导致种质退化。在无性繁殖方式中,组织培养以其超高的繁殖系数和已获得高品质的种苗最受青睐。吕晋慧(2009)和王小玲等(2008)分别对羽扇豆属矮生羽扇豆(*L. polyphyllus*)品种‘Gallery’、‘Minaretie’、‘Russell Prize’的组培快繁技术进行了研究:以无菌种子苗的根茎和茎尖为外植体,以MS为基本培养基,添加一定浓度的6-BA和NAA,可诱导其产生丛生芽,增殖系数最高可达14.8倍;韩丹女等(2007)以三色羽扇豆(*L. hartwegii*)叶柄为外植体,以MS为基本培养基,添加一定浓度的6-BA和2,4-D,建立了其再生体系。

[0004] 而基于羽扇豆自身植物特性,已有的羽扇豆属组培快繁技术并不适用。因此,迅速建立羽扇豆再生体系,以获得大量丛生芽,进而获得一致性好、健壮的植株,为羽扇豆的规模化栽培和园林造景具有重要意义。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种建立羽扇豆(*Lupinus micranthus* Guss.)再生体系的方法,以羽扇豆种子作为外植体进行组织培养,并调控培养基成分,其诱导率、增殖率高,褐化率低,生根性状好,可获得大批量一致性好、健壮的种苗植株。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0007] 一种建立羽扇豆再生体系的方法,包括以下步骤:

[0008] 以羽扇豆种子为外植体,培育成无菌苗;以无菌苗下胚轴、茎段或复叶叶柄为材料,经愈伤组织诱导-增殖培养、分化培养、壮芽培养、生根培养获得再生种苗;

[0009] 所述愈伤组织诱导-增殖培养,以B5为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,KT 1.0-2.0mg/L,2,4-D 0.5-1.0mg/L,碳纳米管1.0-2.0mg/L;

[0010] 所述分化培养,以B5为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,NAA 1.0-1.5mg/L,碳纳米管0.5-1.5mg/L;

[0011] 所述壮芽培养,以B5为基本培养基,添加蔗糖38-42g/L,琼脂6.5-7.0g/L,6-BA0.3-0.8mg/L,NAA 0.1-0.5mg/L,碳纳米管2.0-5.0mg/L;

[0012] 所述生根培养,以MS为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,IBA 1.5-2.5mg/L,碳纳米管0.1-1.0mg/L。

[0013] 优选的是,所述种子培育成无菌苗,以MS、1/2MS、1/3MS或1/4MS为基本培养基,添加琼脂6.5-7.0g/L,pH 5.75-5.85。

[0014] 优选的是,所述种子进行消毒,包括75%的酒精消毒30-45s,无菌水冲洗2-3次;0.1%HgCl₂消毒40-45min,无菌水冲洗4-5次。

[0015] 优选的是,所述下胚轴、茎段或复叶叶柄切成1.0-2.0cm,进行愈伤组织诱导-增殖培养。

[0016] 优选的是,所述愈伤组织诱导-增殖培养,培养基中还添加有活性炭1.0-3.0g/L,酪蛋白水解物0.5-1.5g/L,谷氨酰胺1.0-3.0mg/L。

[0017] 优选的是,所述愈伤组织诱导-增殖培养、分化培养、壮芽培养、生根培养阶段,温度25±1℃,光照强度100-300μmol·m⁻²·s⁻¹,光照14-18h/d。

[0018] 优选的是,还包括获得再生种苗后,进行室内炼苗、移栽。

[0019] 相对于现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0020] 本发明提供了一种建立羽扇豆再生体系的方法,以羽扇豆种子作为外植体,容易无菌化,避免了成株羽扇豆密被绒毛诱导率低、易污染的问题,也利于种质保存及新品种的推广应用。

[0021] 以培育得到的无菌苗的下胚轴、茎段或复叶叶柄作为繁殖材料进行诱导培养,诱导率高,接近100%。

[0022] 在愈伤组织诱导-增殖培养、分化培养、壮芽培养阶段以B5作为基本培养基,降低了组织培养过程中的褐化率。

[0023] 通过调整愈伤组织诱导-增殖培养、分化培养、壮芽培养、生根培养阶段培养基添加的外源激素种类与浓度,提升了诱导率、分化率,可获得大量丛生芽,生根率达到85%以上。

[0024] 本发明通过羽扇豆再生体系的建立,获得大量丛生芽,进而获得一致性好、健壮的植株,确保观赏效果、药材的质量和营养价值,为羽扇豆的规模化栽培提供技术支撑。

附图说明

[0025] 图1:种子接种及无菌苗的获取;

[0026] 图2:愈伤组织诱导培养阶段;

[0027] 图3:愈伤组织增殖培养阶段;

[0028] 图4:愈伤组织的褐化修复;

[0029] 图5:愈伤组织分化培养阶段;

[0030] 图6:生根培养阶段及种苗的获取。

具体实施方式

[0031] 本发明提供了一种建立羽扇豆再生体系的方法,包括以下步骤:

[0032] 外植体的获取:本发明以羽扇豆种子作为外植体,建立羽扇豆再生体系的方法。本发明中,新鲜和干燥的羽扇豆种子均可作为外植体。作为一种可实施方式,采集成熟的荚果,去掉果皮,获得新鲜的羽扇豆种子,进行后续培养。优选获得种子后,将种子在液体洗涤剂溶液中震荡洗涤20-30min后,进一步优选25min,再用流水冲洗1.5-2.0h。备用。

[0033] 羽扇豆整株都密被绒毛,以成株器官或组织作为外植体,如叶柄等,存在诱导率较低、污染率较高的问题。羽扇豆种子不大,种皮光滑,无菌化较容易,通过种子培育获得无菌苗,可避免上述问题的发生。其次,如果通过杂交的方式获得羽扇豆新品种,基于种子萌发无菌苗的方式建立快繁体系,可以迅速获得大量的杂交后代,这对于一年生的羽扇豆来说,既有利于种质保存,也有利于新品种的推广应用。

[0034] 外植体的消毒:本发明优选消毒方式包括75%的酒精消毒30-45s,进一步优选40s;无菌水冲洗2-3次,进一步优选3次;0.1% HgCl_2 消毒40-45min,进一步优选43min;无菌水冲洗4-5次,进一步优选5次。备用。

[0035] 无菌苗的获取:将消毒后的种子直接接种到种子萌发培养基上,培育无菌苗。本发明优选种子萌发培养基以MS、1/2MS、1/3MS或1/4MS为基本培养基;添加琼脂6.5-7.0g/L,进一步优选6.8g/L;pH 5.75-5.85,进一步优选pH 5.8。本发明种子萌发培养基可使种子萌发率在85%以上。更优选种子发芽前无需光照,发芽后,打开光源,光照强度为 $100-300\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。本发明优选无菌苗生长25-30天、高度5.0-8.0cm时,进行后续培养。

[0036] 繁殖材料的获取:本发明以无菌苗的下胚轴、茎段或复叶叶柄作为繁殖材料,进行愈伤组织诱导;进一步优选下胚轴、茎段或复叶叶柄切成1.0-2.0cm;更优选1.5cm。作为一种可实施方式,本发明繁殖材料的采集方法为:将无菌苗取出,保留下胚轴,切除所有的根、与根部相连的长度4/5的茎及叶片,保留剩余茎段和复叶叶柄。

[0037] 愈伤组织的诱导-增殖:将繁殖材料接种到愈伤组织的诱导-增殖培养基进行诱导、增殖培养。本发明愈伤组织的诱导-增殖培养基,以B5为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,KT 1.0-2.0mg/L,2,4-D 0.5-1.0mg/L,碳纳米管1.0-2.0mg/L;进一步优选KT 1.8mg/L,2,4-D 0.5mg/L,碳纳米管1.5mg/L。培养温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100-300\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间14-18h/d;进一步优选光照强度 $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间16h/d。接种15-20d后,在切口的周围会产生淡黄色或淡绿色的愈伤组织;30-35d后,按照原配方继续继代增殖培养,愈伤组织继续膨大、增殖。

[0038] 防止愈伤组织褐化:羽扇豆愈伤组织在增殖的过程中,极易褐化。为防止褐化,在愈伤组织增殖培养的培养基中添加活性炭1.0-3.0g/L,进一步优选2.0g/L;酪蛋白水解物0.5-1.5g/L,进一步优选1.0g/L;谷氨酰胺1.0-3.0mg/L,进一步优选1.5g/L。活性炭能够吸附非极性物质及色素,对褐化有积极作用;酪蛋白水解物和谷氨酰胺作为抗氧化剂,防止愈伤组织新陈代谢中产生的酚类氧化成醌类进而造成褐化,甚至死亡。另外,酪蛋白水解物中的一些小肽,也容易被愈伤组织吸收,从而促进愈伤组织的增殖。将轻、中度褐化的愈伤组织接种到添加有活性炭、酪蛋白水解物、酪蛋白的培养基上,15-20天后,可增殖产生淡绿色或淡黄色的愈伤组织。

[0039] 愈伤组织的分化:将诱导、增殖后的愈伤组织切分成体积 $0.5-1.0\text{cm}^3$ 的小块,接种到愈伤组织的分化培养基上,进行分化培养,诱导丛生芽的产生。本发明愈伤组织分化培养基,以B5为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,NAA 1.0-1.5mg/L,碳纳米管

0.5-1.5mg/L;进一步优选NAA 1.2mg/L,碳纳米管1.0mg/L。培养条件与愈伤组织诱导-增殖培养阶段相同。经过20-25d的培养,在深绿色的愈伤组培表面产生淡绿色的芽点;继续培养,芽点慢慢长大,直至成绿色的丛生芽。

[0040] 壮芽培养:将丛生芽从愈伤组织上切下,转接到壮芽培养基上进行壮芽培养。本发明壮芽培养基,以B5为基本培养基,添加蔗糖38-42g/L,琼脂6.5-7.0g/L,6-BA 0.3-0.8mg/L,NAA 0.1-0.5mg/L,碳纳米管2.0-5.0mg/L;进一步优选6-BA 0.4mg/L,NAA 0.4mg/L,碳纳米管2.0mg/L。培养条件与愈伤组织诱导-增殖培养阶段相同。经过60-90d的培养,小苗长成高度5.0-8.0cm、复叶4-5片的试管苗,在培养约30d及60d时,进行继代培养,培养基配方不变。

[0041] 生根培养:取壮芽培养后的试管苗,转移到生根培养基中进行生根培养。壮芽培养后,试管苗叶片萌发数量比较多,植株生长比较旺,瓶内空间有限,因此,本发明优选保留试管苗顶生叶片2-3片,将多余叶片切除。本发明生根培养基,以MS为基本培养基,添加蔗糖28-32g/L,琼脂6.5-7.0g/L,IBA 1.5-2.5mg/L,碳纳米管0.1-1.0mg/L;进一步优选IBA 2.0mg/L,碳纳米管0.5mg/L。约30-35d后,试管苗长成根数3-5条的无菌苗。

[0042] 炼苗及移栽:本发明优选生根培养获得种苗后,进行室内炼苗。本发明优选室内炼苗包括以下步骤:将组培瓶松盖后,置于组培室缓冲间,放置2-3d,之后移入室内房间,置于自然散射光下,再放置2-3d。本发明优选移栽包括以下步骤:炼苗完成后,用镊子将试管苗取出,洗去根部的培养基,移栽到穴盘。作为一种可实施方式,本发明移栽基质为泥炭土:珍珠岩:田园土=1:1:1(体积比),栽培基质须经800倍多菌灵消毒处理。之后进行正常的水肥管理。

[0043] 若无特殊说明,本发明所采用方法为本领域常规方法,所使用的试剂、材料均可通过商业途径获得。

[0044] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0045] 实施例1

[0046] 一种建立羽扇豆再生体系的方法,步骤如下:

[0047] (1) 外植体的获取:2021年10月,天气晴朗时,采集成熟的羽扇豆荚果,去掉果皮,获得新鲜的种子。将种子放入三角瓶中,加入100倍体积的水和5滴液体洗涤剂溶液中震荡洗涤25min后,再用流水冲洗100min,备用。

[0048] (2) 外植体的消毒:于超净台上用75%的酒精将洗涤干净的种子消毒40s,之后无菌水冲洗3次;再用0.1%的HgCl₂溶液消毒处理40min,无菌水清洗4次,备用。

[0049] (3) 无菌苗的获取:将消毒后的种子直接接种到种子萌发培养基上。羽扇豆种子在以1/2MS为基本培养基的培养基上萌发,培养基中添加6.8g/L琼脂;培养基pH 5.80。培养5d后,种子露白,7d后,种子开始陆续萌芽,28d后,发芽率达88%。种子发芽前无需光照,发芽后,打开光源,光照强度为200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

[0050] (4) 愈伤组织的诱导:待无菌苗生长30天、高度6.0cm时,将无菌苗取出,保留下胚轴,切除所有的根和与根部相连的长度约4/5茎部分、小叶叶片和小叶叶柄,保留掌壮复叶叶柄,下胚轴切成1.5cm的小段,叶柄亦切成1.5cm的小段,接种至愈伤组织诱导培养基上。培养基中添加蔗糖30g/L,琼脂6.8g/L,激动素KT 1.8mg/L,生长素2,4-D 0.5mg/L,碳纳米

管1.5mg/L,基本培养基B5。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $200\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间16h/d。接种18d后,在下胚轴切口的周围产生淡黄色或淡绿色的愈伤组织;16d后在叶柄的周围产生淡黄色或淡绿色的愈伤组织;30-35d后,按照原配方继续继代培养,愈伤组织继续膨大、增殖。

[0051] (5)愈伤组织的防褐化:羽扇豆愈伤组织在增殖的过程中,极易褐化。为防止褐化,可在愈伤组织增殖培养的培养基中添加2.0g/L的活性炭,1.0g/L酪蛋白水解物,1.5mg/谷氨酰胺。将轻、中度褐化的愈伤组织接种到上述培养基上,18d后,可增殖产生淡绿色或淡黄色的愈伤组织。

[0052] (6)愈伤组织的分化:将愈伤组织切分成体积 1.0cm^3 的小块,接种到愈伤组织的分化培养基上,进行分化培养,诱导丛生芽的产生。培养基中添加蔗糖30g/L,琼脂6.8g/L,生长素NAA 1.2mg/L,碳纳米管1.0mg/L,基本培养基B5。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $200\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间16h/d。经过23d的培养,在深绿色的愈伤组培表面产生淡绿色的芽点;继续培养,芽点慢慢长大,直至成绿色的丛生芽。

[0053] (7)壮芽培养:将丛生芽从愈伤组织上切下,转接到壮芽培养基上进行壮芽培养。基本培养基为B5,添加蔗糖40g/L,琼脂6.8g/L,细胞分裂素6-BA 0.4mg/L,生长素NAA 0.4mg/L,碳纳米管2.0mg/L。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $200\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间16h。经过90d的培养,小苗长成高度6.0cm、复叶5片的试管苗,在培养30d及60d时,进行继代培养,培养基配方不变。

[0054] (8)生根培养:仅保留顶生复叶片3片,将试管苗多余的叶片切除,转移到生根培养基中进行生根培养。培养基以MS为基本培养基,添加蔗糖30g/L,琼脂6.8g/L,生长素IBA 2.0mg/L,碳纳米管0.5mg/L。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $200\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间16h/d。约32d后,试管苗长成根数5条的无菌苗。

[0055] (9)炼苗和移栽:炼苗在室内进行。将组培瓶松盖后,置于组培室缓冲间,放置3d,之后移入室内房间,置于自然散射光下,在放置3d。炼苗完成后,用镊子将试管苗取出,洗去根部的培养基,移栽到 10×10 的穴盘中。栽培基质为泥炭土:珍珠岩:田园土=1:1:1,栽培基质须经800倍多菌灵消毒处理。之后进行正常的水肥管理。

[0056] 实施例2

[0057] 一种建立羽扇豆再生体系的方法,步骤如下:

[0058] (1)外植体的获取:2021年10月,天气晴朗时,采集成熟的羽扇豆荚果,去掉果皮,获得新鲜的种子。将种子放入三角瓶中,加入100倍体积的水和5滴液体洗涤剂溶液中震荡洗涤30min后,再用流水冲洗2h,备用。

[0059] (2)外植体的消毒:于超净台上用75%的酒精将洗涤干净的种子消毒45s,之后无菌水冲洗2次;再用0.1%的 HgCl_2 溶液消毒处理43min,无菌水清洗5次,备用。

[0060] (3)无菌苗的获取:将消毒后的种子直接接种到种子萌发培养基上。羽扇豆种子在以MS为基本培养基的培养基上萌发,培养基中添加7.0g/L琼脂;培养基pH 5.75。培养4d后,种子露白,6d后,种子开始陆续萌芽,25d后,发芽率达90%。种子发芽前无需光照,发芽后,打开光源,光照强度为 $300\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

[0061] (4)愈伤组织的诱导:待无菌苗生长30天、高度6.5cm时,将无菌苗取出,保留下胚轴,切除所有的根和与根部相连的长度约4/5茎部分、小叶叶片和小叶叶柄,保留掌壮复叶

叶柄,下胚轴切成1.0cm的小段,茎段、叶柄亦切成1.0cm的小段,接种至愈伤组织诱导培养基上。培养基中添加蔗糖32g/L,琼脂7.0g/L,激动素KT 2.0mg/L,生长素2,4-D 1.0mg/L,碳纳米管2.0mg/L,基本培养基B5。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $300\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间14h/d。接种17d后,在下胚轴切口的周围产生淡黄色或淡绿色的愈伤组织;16d后在叶柄的周围产生淡黄色或淡绿色的愈伤组织;33d后,按照原配方继续继代培养,愈伤组织继续膨大、增殖。

[0062] (5) 愈伤组织的防褐化:羽扇豆愈伤组织在增殖的过程中,极易褐化。为防止褐化,可在愈伤组织增殖培养的培养基中添加1.0g/L的活性炭,0.5g/L酪蛋白水解物,1.0mg/L谷氨酰胺。将轻、中度褐化的愈伤组织接种到上述培养基上,20d后,可增殖产生淡绿色或淡黄色的愈伤组织。

[0063] (6) 愈伤组织的分化:将愈伤组织切分成体积 0.8cm^3 的小块,接种到愈伤组织的分化培养基上,进行分化培养,诱导丛生芽的产生。培养基中添加蔗糖32g/L,琼脂7.0g/L,生长素NAA 1.5mg/L,碳纳米管1.5mg/L,基本培养基B5。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $300\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间14h/d。经过25d的培养,在深绿色的愈伤组培表面产生淡绿色的芽点;继续培养,芽点慢慢长大,直至成绿色的丛生芽。

[0064] (7) 壮芽培养:将丛生芽从愈伤组织上切下,转接到壮芽培养基上进行壮芽培养。基本培养基为B5,添加蔗糖42g/L,琼脂7.0g/L,细胞分裂素6-BA 0.8mg/L,生长素NAA 0.1mg/L,碳纳米管3.0mg/L。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $300\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间14h。经过90d的培养,小苗长成高度6.0cm、复叶5片的试管苗,在培养30d及60d时,进行继代培养,培养基配方不变。

[0065] (8) 生根培养:仅保留顶生复叶片3片,将试管苗多余的叶片切除,转移到生根培养基中进行生根培养。培养基以MS为基本培养基,添加蔗糖32g/L,琼脂7.0g/L,生长素IBA 2.5mg/L,碳纳米管0.1mg/L。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $300\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间14h/d。30d后,试管苗长成复叶5片、根数5条的无菌苗。

[0066] (9) 炼苗和移栽:炼苗在室内进行。将组培瓶松盖后,置于组培室缓冲间,放置2d,之后移入室内房间,置于自然散射光下,在放置2d。炼苗完成后,用镊子将试管苗取出,洗去根部的培养基,移栽到 10×10 的穴盘中。栽培基质为泥炭土:珍珠岩:田园土=1:1:1,栽培基质须经800倍多菌灵消毒处理。之后进行正常的水肥管理。

[0067] 实施例3

[0068] 一种建立羽扇豆再生体系的方法,步骤如下:

[0069] (1) 外植体的获取:2021年10月,天气晴朗时,采集成熟的羽扇豆荚果,去掉果皮,获得新鲜的种子。将种子放入三角瓶中,加入100倍体积的水和5滴液体洗涤剂溶液中震荡洗涤20min后,再用流水冲洗1.5h,备用。

[0070] (2) 外植体的消毒:于超净台上用75%的酒精将洗涤干净的种子消毒40s,之后无菌水冲洗3次;再用0.1%的 HgCl_2 溶液消毒处理40min,无菌水清洗4次,备用。

[0071] (3) 无菌苗的获取:将消毒后的种子直接接种到种子萌发培养基上。羽扇豆种子在以1/4MS为基本培养基的培养基上萌发,培养基中添加6.5g/L琼脂;培养基pH 5.85。经培养,种子露白,继续培养,种子开始陆续萌芽,25d后,发芽率达90%。种子发芽前无需光照,发芽后,打开光源,光照强度为 $100\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

[0072] (4) 愈伤组织的诱导:待无菌苗生长30天、高度6.5cm时,将无菌苗取出,保留下胚轴,切除所有的根和与根部相连的长度约4/5茎部分、小叶叶片和小叶叶柄,保留掌壮复叶叶柄,下胚轴切成2.0cm的小段,叶柄亦切成2.0cm的小段,接种至愈伤组织诱导培养基上。培养基中添加蔗糖28g/L,琼脂6.5g/L,激动素KT 1.0mg/L,生长素2,4-D 0.8mg/L,碳纳米管1.0mg/L,基本培养基B5。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间18h/d。接种培养后,在下胚轴切口的周围产生淡黄色或淡绿色的愈伤组织;在叶柄的周围产生淡黄色或淡绿色的愈伤组织;30d后,按照原配方继续继代培养,愈伤组织继续膨大、增殖。

[0073] (5) 愈伤组织的防褐化:羽扇豆愈伤组织在增殖的过程中,极易褐化。为防止褐化,可在愈伤组织增殖培养的培养基中添加3.0g/L的活性炭,1.5g/L酪蛋白水解物,3.0mg/L谷氨酰胺。将轻、中度褐化的愈伤组织接种到上述培养基上,经培养,可增殖产生淡绿色或淡黄色的愈伤组织。

[0074] (6) 愈伤组织的分化:将愈伤组织切分成体积 0.5cm^3 的小块,接种到愈伤组织的分化培养基上,进行分化培养,诱导丛生芽的产生。培养基中添加蔗糖28g/L,琼脂6.5g/L,生长素NAA 1.0mg/L,碳纳米管0.5mg/L,基本培养基B5。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间18h/d。经过培养,在深绿色的愈伤组培表面产生淡绿色的芽点;继续培养,芽点慢慢长大,直至成绿色的丛生芽。

[0075] (7) 壮芽培养:将丛生芽从愈伤组织上切下,转接到壮芽培养基上进行壮芽培养。基本培养基为B5,添加蔗糖38g/L,琼脂6.5g/L,细胞分裂素6-BA 0.3mg/L,生长素NAA 0.5mg/L,碳纳米管5.0mg/L。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间18h。经过培养,小苗长成高度6.0cm、复叶5片的试管苗,在培养30d及60d时,进行继代培养,培养基配方不变。

[0076] (8) 生根培养:仅保留顶生复叶片3片,将试管苗多余的叶片切除,转移到生根培养基中进行生根培养。培养基以MS为基本培养基,添加蔗糖28g/L,琼脂6.5g/L,生长素IBA 1.5mg/L,碳纳米管1.0mg/L。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间18h/d。最终,试管苗长成复叶5片、根数5条的无菌苗。

[0077] (9) 炼苗和移栽:炼苗在室内进行。将组培瓶松盖后,置于组培室缓冲间,放置3d,之后移入室内房间,置于自然散射光下,在放置3d。炼苗完成后,用镊子将试管苗取出,洗去根部的培养基,移栽到 10×10 的穴盘中。栽培基质为泥炭土:珍珠岩:田园土=1:1:1,栽培基质须经800倍多菌灵消毒处理。之后进行正常的水肥管理。

[0078] 实施例4

[0079] 不同外植体及繁殖材料愈伤组织诱导率

[0080] 选择两类外植体,(1)种子;(2)成株。种子消毒后,经种子萌发培养基1/2MS+琼脂6.8g/L培养成无菌苗,切取下胚轴、茎段、复叶叶柄和小叶作为繁殖材料;成株直接截取茎段、复叶叶柄和小叶叶片作为繁殖材料,进行消毒。以愈伤组织诱导培养基B5+蔗糖30g/L+琼脂6.8g/L+KT 1.8mg/L+2,4-D 0.5mg/L+碳纳米管1.5mg/L进行诱导培养,统计诱导率及出愈时间。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100-300\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间14h/d。每种繁殖材料接种30个。

[0081] 表1不同外植体及繁殖材料愈伤组织诱导率

外植体		接种数/个	诱导数/个	诱导率/%	出愈时间/d
[0082] 种子无菌苗	下胚轴	30	29	96.67	13
	茎段	30	29	96.67	14
	复叶叶柄	30	28	93.33	18
	小叶	30	10	33.33	25
成株	茎段	30	15	50.00	25
	复叶叶柄	30	13	43.33	29
	小叶叶片	30	6	20.00	35

[0083] 通过表1可以看出,以种子作为外植体,获得无菌苗后再截取繁殖材料进行组织培养,其愈伤组织诱导率高于成株外植体材料直接诱导培养,且出愈时间大幅提前。另外,无菌苗截取的不同繁殖材料愈伤组织诱导效果也不同,下胚轴、茎段和复叶叶柄的诱导效果明显优于小叶,以下胚轴和茎段最优。

[0084] 实施例5

[0085] 不同基本培养基对羽扇豆愈伤组织诱导效果的影响

[0086] 以无菌苗下胚轴(约1.5cm)为繁殖材料,设置不同基本培养基,分别为MS、1/2MS、B5、WPM、DKW和N6基本培养基,添加蔗糖30g/L、琼脂6.8g/L、激动素KT 1.8mg/L,生长素2,4-D 0.5mg/L,碳纳米管1.5mg/L,进行愈伤组织诱导试验,统计诱导率。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100-300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间14h/d。每种基本培养基接种下胚轴30个。

[0087] 表2不同基本培养基对羽扇豆愈伤组织诱导效果的影响

处理	接种数/个	诱导数/个	诱导率/%
MS	30	27	90.00
1/2MS	30	27	90.00
B5	30	29	96.67
WPM	30	26	86.67
DKW	30	26	86.67
N6	30	25	86.33

[0089] 根据表2可以看出,不同基本培养基对于羽扇豆组织培养诱导过程中的诱导率有不同影响。相较于其他基本培养基,B5更适宜羽扇豆愈伤组织诱导培养。

[0090] 实施例6

[0091] 不同外源添加物质对羽扇豆愈伤组织诱导效果的影响

[0092] 以无菌苗下胚轴(约1.5cm)为繁殖材料,以B5为基本培养基,添加不同浓度梯度的KT、2,4-D、碳纳米管,进行愈伤组织诱导培养。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100-300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间14h/d。每个配方接种下胚轴30个。

[0093] 表3不同外源添加物质对羽扇豆愈伤组织诱导效果的影响

处理	KT/mg/L	2,4-Dmg/L	碳纳米管mg/L	诱导率/%
1	——	0.5	1.5	10.00
2	0.5	——	1.5	13.33

3	0.5	0.5	——	16.67
4	0.5	0.5	1.5	20.00
5	1.8	——	1.5	40.00
6	1.8	0.5	——	90.00
7	1.8	0.5	1.5	96.67
8	2.5	——	1.5	30.00
9	2.5	0.5	——	40.00
10	2.5	0.5	1.5	43.33
11	——	0.2	1.5	0.00
12	1.8	0.2	——	20.00
13	1.8	0.2	1.5	26.67
14	——	1.5	1.5	6.67
15	1.8	1.5	——	33.33
16	1.8	1.5	1.5	40.00

[0095] 根据表3可以看出,外源激素的种类及浓度对比对羽扇豆愈伤组织诱导率影响显著。激动素KT是羽扇豆愈伤组织诱导培养基中的重要成分,将KT与2,4-D、碳纳米管联用,能够明显提升羽扇豆愈伤组织诱导率。在激动素KT 1.8mg/L,生长素2,4-D 0.5mg/L,碳纳米管1.5mg/L条件下,诱导率能够达到96.67%。

[0096] 实施例7

[0097] 不同外源添加剂对羽扇豆愈伤组织增殖培养褐化率的影响

[0098] 以无菌苗下胚轴(约1.5cm)为外植体,以B5为基本培养基,添加有蔗糖30g/L,琼脂6.5-7.0g/L,激动素KT 1.8mg/L,生长素2,4-D 0.5mg/L,碳纳米管1.5mg/L,进行愈伤组织培养,30d后,进行增殖培养。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度 $100-300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间14h/d。增殖培养阶段,在培养基中添加不同浓度梯度的活性炭、酪蛋白水解物、谷氨酰胺,统计愈伤组织增殖过程中的褐化率。每种培养基接种愈伤组织30块。

[0099] 表4不同外源添加剂对羽扇豆愈伤组织增殖培养褐化率的影响

处理	活性炭 g/L	酪蛋白水解物 g/L	谷氨酰胺 mg/L	褐化率 %
1	—	1.0	1.5	30.00
2	1.0	—	1.5	50.00
3	1.0	1.0	—	40.00
4	1.0	1.0	1.5	20.00
5	0.5	1.0	1.5	23.33
6	0.5	1.0	—	46.67
7	0.5	—	1.5	56.67
8	3.0	1.0	1.5	20.00
9	3.0	1.0	—	53.33
10	3.0	—	1.5	46.67
11	3.5	1.0	1.5	20.00
12	3.5	1.0	—	50.00
13	3.5	—	1.5	46.67
14	2.0	1.0	0.5	53.33
15	2.0	1.0	3.5	50.00
16	—	—	—	83.33

[0101] 根据表4可以看出,在羽扇豆愈伤组织增殖培养阶段,通过外源添加活性炭、酪蛋白水解物和谷氨酰胺,能够明显降低褐化率。活性炭能够吸附非极性物质及色素,对褐化有积极作用;酪蛋白水解物和谷氨酰胺作为抗氧化剂,防止愈伤组织新陈代谢中产生的酚类氧化成醌类进而造成褐化,甚至死亡。另外,酪蛋白水解物中的一些小肽,也容易被愈伤组织吸收,从而促进愈伤组织的增殖。以添加活性炭3.0g/L、酪蛋白水解物1.0g/L和谷氨酰胺1.5mg/L时最优,褐化率降低至20.0%。

[0102] 实施例8

[0103] 不同外源添加物质对羽扇豆愈伤组织分化培养的影响

[0104] 羽扇豆愈伤组织诱导-增殖培养完成后,将愈伤组织切分成体积0.5cm³的小块,接种到愈伤组织的分化培养基上,进行分化培养,诱导丛生芽的产生。分化培养基以B5为基本培养基,添加蔗糖30g/L,琼脂6.8g/L及不同浓度的生长素NAA和碳纳米管,进行分化培养。统计丛生芽分化率和繁殖系数(繁殖系数=愈伤组织分化出的总芽数/分化的愈伤组织数)。每种培养基接种愈伤组织30块。

[0105] 表5不同外源添加剂对羽扇豆愈伤组织分化培养的影响

处理	NAA/mg/L	碳纳米管/mg/L	分化率%	繁殖系数
1	—	0.25	6.67	3.00
2	—	0.5	16.67	4.00

3	——	1.0	26.67	4.25
4	——	1.5	30.00	5.00
5	——	2.0	23.33	2.90
6	0.5	——	40.00	5.42
7	1.0	——	86.67	15.39
8	1.5	——	90.00	18.81
9	2.0	——	83.33	12.40
10	1.0	0.5	90.00	20.37
11	1.0	1.0	93.33	21.48
12	1.5	1.5	93.33	19.63

[0107] 根据表5可以看出,NAA和碳纳米管联用能够明显提升羽扇豆愈伤组织分化率和繁殖系数,控制分化培养基NAA浓度为1.0-1.5mg/L,碳纳米管0.5-1.5mg/L,能够保证愈伤组织分化率达到90%以上,繁殖系数达到20倍左右。

[0108] 实施例9

[0109] 不同外源添加物质对羽扇豆生根培养的影响

[0110] 羽扇豆壮芽培养完成后,将试管苗多余的叶片切除,仅保留顶生复叶片3片,转移到生根培养基中进行生根培养。生根培养基以MS为基本培养基,添加蔗糖30g/L,琼脂6.8g/L,及不同浓度的生长素IBA和碳纳米管,进行生根培养。30d后,统计生根率、平均生根数。每种培养基接种试管苗30株。

[0111] 表6不同外源添加剂对羽扇豆生根培养的影响

[0112]

处理	IBA/mg/L	碳纳米管/mg/L	生根率%	平均生根数/条
1	1.0	——	33.33	1.5
2	1.5	——	80.00	3.25
3	2.0	——	90.00	3.33
4	2.5	——	86.67	3.65
5	——	0.1	36.67	1.82
6	——	0.5	43.33	2.31
7	——	1.0	50.00	3.00
8	——	1.5	53.33	2.69
9	1.5	0.1	90.00	3.52
10	2.0	0.5	96.67	3.45
11	2.5	1.0	93.33	3.32

[0113] 根据表6可以看出,IBA和碳纳米管联用能够明显提升羽扇豆幼苗生根率和生根数。控制生根培养基IBA浓度为1.5-2.5mg/L,碳纳米管0.1-1.0mg/L,能够保证幼苗生根率达到90%以上,生根数达到3.5条/株左右。

[0114] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

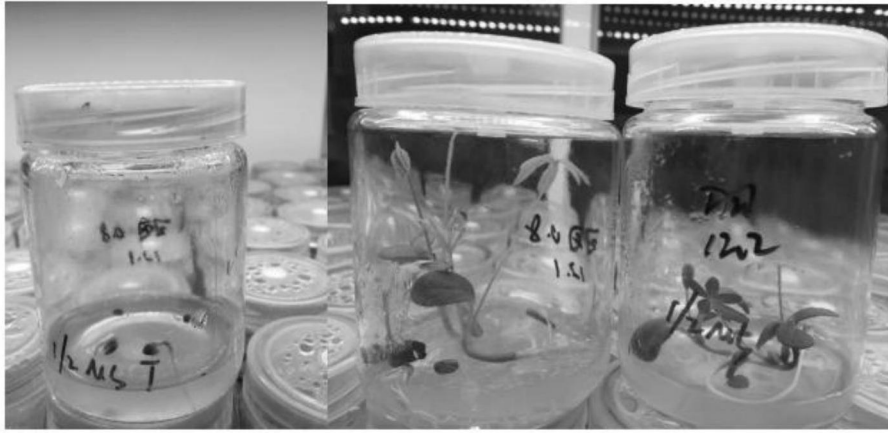


图1



图2



图3

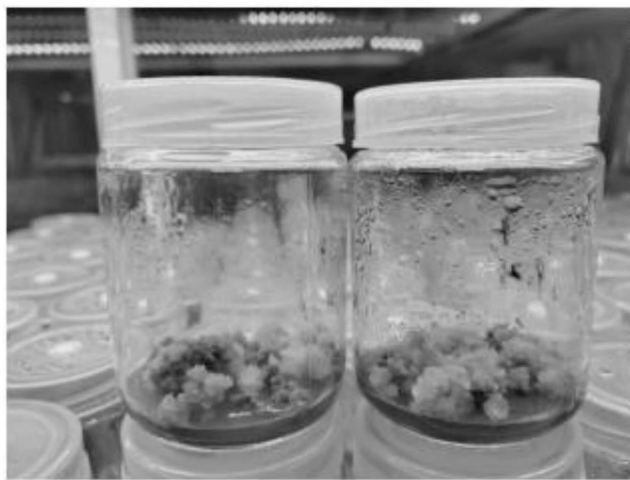


图4

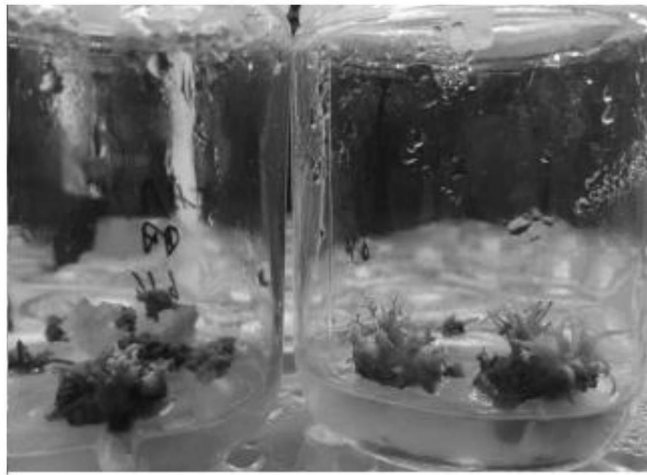


图5

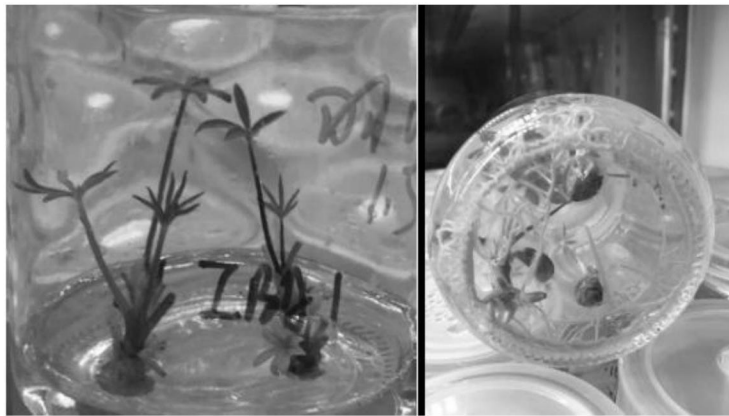


图6