



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110122328 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910354753.5

(22)申请日 2019.04.29

(71)申请人 牡丹江师范学院

地址 157011 黑龙江省牡丹江市爱民区文
化街191号

(72)发明人 李然红 刘丹 陈鑫 卢招娣
王立凤 柴军红 安玉婷 董世鹏

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 张立娜

(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

一种获得狗枣猕猴桃实生苗的方法

(57)摘要

本发明公开了一种获得狗枣猕猴桃实生苗的方法。本发明提供了一种获得狗枣猕猴桃实生苗的方法,包括如下步骤:(1)将狗枣猕猴桃的种子纵向切掉1/3,置于诱导培养基上培养,得到幼苗;所述诱导培养基为在基础培养中添加6-BA和NAA后所得;其中,6-BA在所述诱导培养基中的浓度为0.8-1.0mg/L,NAA在所述诱导培养基中的浓度为0.02mg/L;(2)将所述幼苗进行移栽,培养后获得实生苗。本发明方法使用当年生的种子,在3周内获得狗枣猕猴桃实生苗,发芽率可达63.33%,是一种快速、发芽率高的获得实生苗的方法。

1. 一种获得狗枣猕猴桃实生苗的方法,包括如下步骤:
 - (1) 将狗枣猕猴桃的种子纵向切掉1/3,置于诱导培养基上培养,得到幼苗;
所述诱导培养基为在基础培养中添加6-BA和NAA后所得;其中,6-BA在所述诱导培养基中的浓度为0.8-1.0mg/L,NAA在所述诱导培养基中的浓度为0.02mg/L;
 - (2) 将所述幼苗进行移栽,培养后获得实生苗。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,所述基础培养基为MS固体培养基或者WPM固体培养基。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,所述诱导培养基的配方为如下(A1)或(A2):
 - (A1) 溶剂为水,溶质及浓度为:MS粉末41.74g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8-1.0mg/L;NAA 0.02mg/L;
 - (A2) 溶剂为水,溶质及浓度为:WPM粉末2.14g/L;硝酸钙0.56g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8-1.0mg/L;NAA 0.02mg/L。
4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,所述诱导培养基的配方为如下(a1)-(a4)中任一:
 - (a1) 溶剂为水,溶质及浓度为:MS粉末41.74g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 1.0mg/L;NAA 0.02mg/L;
 - (a2) 溶剂为水,溶质及浓度为:WPM粉末2.14g/L;硝酸钙0.56g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 1.0mg/L;NAA 0.02mg/L;
 - (a3) 溶剂为水,溶质及浓度为:MS粉末41.74g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8mg/L;NAA 0.02mg/L;
 - (a4) 溶剂为水,溶质及浓度为:WPM粉末2.14g/L;硝酸钙0.56g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8mg/L;NAA 0.02mg/L。
5. 根据权利要求1-4中任一所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,所述培养的时间为14天以上;
进一步地,所述培养时间为14天。
6. 根据权利要求1-5中任一所述的方法,其特征在于:步骤(2)中,是将步骤(1)所得所述幼苗直接移栽到土壤中;和/或
步骤(2)中,所述培养的时间为1周;和/或
步骤(2)中,所述培养的条件为26℃,16h光照/8h黑暗。
7. 诱导培养基,为权利要求1-4任一中所述的诱导培养基。
8. 权利要求7所述诱导培养基在诱导狗枣猕猴桃种子萌发成苗中的应用。
9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于:所述狗枣猕猴桃种子为纵向切掉1/3后的狗枣猕猴桃的种子。
10. 权利要求7所述诱导培养基在获得狗枣猕猴桃实生苗中的应用。

一种获得狗枣猕猴桃实生苗的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物组织培养领域,具体涉及一种获得狗枣猕猴桃实生苗的方法。

背景技术

[0002] 狗枣猕猴桃 (*Actinidia kolomikta* (Maxim. et Rupr.) Maxim.), 别名狗枣子, 为猕猴桃科猕猴桃属藤本植物, 分布范围较窄, 主要分布于我国东北、华北、西北、华东各省区以及朝鲜半岛、日本、俄罗斯的东西伯利亚及远东地区, 是最为耐寒的猕猴桃种类之一, 是珍贵的抗寒育种基因资源。狗枣猕猴桃果实酸甜可口、气味芳香、柔软多汁, 富含多种人体必需的氨基酸、矿物质和维生素, 特别是维生素C的含量非常高, 具有很好的营养价值。研究表明, 狗枣猕猴桃具有抗氧化、延缓衰老、抗癌等多种医疗保健功能。狗枣猕猴桃叶片在生长季中呈白色、浅粉至红色的动态变化, 是非常好的观叶树种, 具有极大的开发利用潜力及科学研究价值。狗枣猕猴桃种子繁殖较困难, 通常需要经过较长时间的休眠, 自然情况下第3年才能萌发生长, 经过传统打破休眠的方法, 如沙擦、激素处理、低温处理等方法最快也需要在次年才能萌发, 并且萌发率较低。

发明内容

[0003] 在科学研究和实际生产中往往希望能快速得到实生苗, 本发明的目的是提供一种能够快速获得狗枣猕猴桃实生苗的方法, 期待以狗枣猕猴桃当年产种子为材料, 通过组织培养技术, 在种子收获当年即可获得苗木, 为狗枣猕猴桃繁育及科学研究提供了一条快速、高效的获得苗木的途径。

[0004] 第一方面, 本发明要求保护一种获得狗枣猕猴桃实生苗的方法。

[0005] 本发明所要求保护的获得狗枣猕猴桃实生苗的方法, 可包括如下步骤:

[0006] (1) 将狗枣猕猴桃的种子纵向切掉1/3 (保留2/3), 置于诱导培养基上培养, 得到幼苗;

[0007] 所述诱导培养基为在基础培养中添加6-BA和NAA后所得; 其中, 6-BA在所述诱导培养基中的浓度为0.8-1.0mg/L, NAA在所述诱导培养基中的浓度为0.02mg/L;

[0008] (2) 将所述幼苗进行移栽, 培养后获得实生苗。

[0009] 进一步地, 步骤(1)中, 所述基础培养基可为MS固体培养基或者WPM固体培养基。

[0010] 进一步地, 步骤(1)中, 所述诱导培养基的配方可为如下(A1)或(A2):

[0011] (A1) 溶剂为水, 溶质及浓度为: MS粉末41.74g/L; 琼脂7g/L, 蔗糖20g/L; 6-BA 0.8-1.0mg/L; NAA 0.02mg/L;

[0012] (A2) 溶剂为水, 溶质及浓度为: WPM粉末2.14g/L; 硝酸钙0.56g/L; 琼脂7g/L, 蔗糖20g/L; 6-BA 0.8-1.0mg/L; NAA 0.02mg/L。

[0013] 更进一步地, 在本发明的具体实施方式中, 步骤(1)中, 所述诱导培养基的配方具体为如下(a1)-(a4)中任一:

[0014] (a1) 溶剂为水, 溶质及浓度为: MS粉末41.74g/Lg/L; 琼脂7g/L, 蔗糖20g/L; 6-BA

1.0mg/L;NAA 0.02mg/L;

[0015] (a2) 溶剂为水,溶质及浓度为:WPM粉末2.14g/L;硝酸钙0.56g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 1.0mg/L;NAA 0.02mg/L;

[0016] (a3) 溶剂为水,溶质及浓度为:MS粉末41.74g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8mg/L;NAA 0.02mg/L;

[0017] (a4) 溶剂为水,溶质及浓度为:WPM粉末2.14g/L;硝酸钙0.56g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8mg/L;NAA 0.02mg/L。

[0018] 进一步地,步骤(1)中,所述培养的时间可为14天以上,如14天。

[0019] 进一步地,步骤(1)中,将狗枣猕猴桃种子置于所述诱导培养基中培养之前还包括对狗枣猕猴桃种子进行消毒的步骤。所述消毒可为:将狗枣猕猴桃种子于清水浸泡48h,30% (V/V) 过氧化氢消毒20min,无菌水清洗2次,70% (V/V) 乙醇浸泡40s。

[0020] 进一步地,步骤(2)中,可以将步骤(1)所得所述幼苗直接移栽到土壤(草炭:蛭石=1:1,V/V)中(移栽后,需覆膜1周,保持湿润)。

[0021] 进一步地,步骤(2)中,所述培养的时间可为1周。

[0022] 进一步地,步骤(2)中,所述培养的条件可为26℃,16h光照/8h黑暗。

[0023] 第二方面,本发明要求保护一种诱导培养基。

[0024] 本发明所要求保护的培养基为在基础培养中添加6-BA 和NAA后所得;其中,6-BA在所述诱导培养基中的浓度为0.8-1.0mg/L,NAA在所述诱导培养基中的浓度为0.02mg/L。

[0025] 进一步地,所述基础培养基可为MS固体培养基或者WPM固体培养基。

[0026] 更进一步地,所述诱导培养基的配方可为如下(A1)或(A2):

[0027] (A1) 溶剂为水,溶质及浓度为:MS粉末41.74g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8-1.0mg/L;NAA 0.02mg/L;

[0028] (A2) 溶剂为水,溶质及浓度为:WPM粉末2.14g/L;硝酸钙0.56g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8-1.0mg/L;NAA 0.02mg/L。

[0029] 在本发明的具体实施方式中,步骤(1)中,所述诱导培养基的配方具体为如下(a1)-(a4)中任一:

[0030] (a1) 溶剂为水,溶质及浓度为:MS粉末41.74g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 1.0mg/L;NAA 0.02mg/L;

[0031] (a2) 溶剂为水,溶质及浓度为:WPM粉末2.14g/L;硝酸钙0.56g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 1.0mg/L;NAA 0.02mg/L;

[0032] (a3) 溶剂为水,溶质及浓度为:MS粉末41.74g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8mg/L;NAA 0.02mg/L;

[0033] (a4) 溶剂为水,溶质及浓度为:WPM粉末2.14g/L;硝酸钙0.56g/L;琼脂7g/L,蔗糖20g/L;6-BA 0.8mg/L;NAA 0.02mg/L。

[0034] 第三方面,本发明要求保护前文第二方面中所述诱导培养基在诱导狗枣猕猴桃种子萌发成苗中的应用。

[0035] 在该应用中,所述狗枣猕猴桃种子为纵向切掉1/3后的狗枣猕猴桃的种子(保留2/3)。

[0036] 第四方面,本发明要求保护前文第二方面中所述诱导培养基在获得狗枣猕猴桃实

生苗中的应用。

[0037] 在本发明的具体实施方式中,所述MS粉末具体为青岛海博生物技术有限公司产品,其产品编号为HB8469。所述WPM粉末具体为青岛海博生物技术有限公司产品,其产品编号为HBZ0609。

[0038] 本发明提供了一种快速获得狗枣猕猴桃实生苗的方法,将种子切掉1/3,放在MS+琼脂7g/L+蔗糖20g/L+6-BA 1mg/L+NAA 0.02mg/L的培养基上培养14d,然后将萌发的幼苗直接移栽到草炭:蛭石=1:1的土壤中培养1周以后,即可获得实生苗,在自然条件下即可成活。通过本方法使用当年生的种子,在3周内获得狗枣猕猴桃实生苗,发芽率可达63.33%,是一种快速、发芽率高的获得实生苗的方法。

附图说明

[0039] 图1为狗枣猕猴桃种子萌发过程图。

具体实施方式

[0040] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0041] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0042] 实施例1、快速获得狗枣猕猴桃实生苗的方法的建立

[0043] 一、材料与amp;方法

[0044] 1、实验材料

[0045] 狗枣猕猴桃果实于2017年8月13日和2018年7月26日采摘于横道河子七里地,将采摘后的果实浸泡于清水中,将种子洗出,滤掉果皮果肉,在阳光下自然晾干后备用。

[0046] 2、实验方法

[0047] (1) 狗枣猕猴桃种子消毒

[0048] 将狗枣猕猴桃种子于清水浸泡48h,30% (V/V) 过氧化氢消毒20min,无菌水清洗2次,70% (V/V) 乙醇浸泡40s,无菌水清洗3次后备用。

[0049] (2) 狗枣猕猴桃实生苗诱导培养基的配制

[0050] 分别配制以下:

[0051] A:添加琼脂7g/L,蔗糖20g/L

[0052] B:添加MS(青岛海博生物技术有限公司,产品编号HB8469) 41.74g/L,琼脂7g/L,蔗糖20g/L

[0053] C:添加WPM(青岛海博生物技术有限公司,产品编号HBZ0609) 2.14g/L,硝酸钙0.56g/L,琼脂7g/L,蔗糖20g/L

[0054] ①:6-BA 0mg/L,NAA 0mg/L

[0055] ②:添加6-BA 0.8mg/L,NAA 0.02mg/L

[0056] ③:添加6-BA 1mg/L,NAA 0.02mg/L

[0057] ④:添加6-BA 1mg/L,NAA 0.2mg/L

[0058] ⑤:添加6-BA 2mg/L,NAA 0.2mg/L

[0059] 上述各物质的浓度为在诱导培养基中的终浓度。

[0060] 将以上进行组合,形成A①、A②、A③、A④、A⑤、B①、B②、B③、B④、B⑤、C①、C②、C

③、C④、C⑤共15种诱导培养基,每种诱导培养基设置6皿,其中3皿在种子1/3位置处纵向切割,留下2/3,放置在诱导培养基表面上,共30粒;另外3皿每皿放置30粒完整种子作为对照。

[0061] (3) 狗枣猕猴桃幼苗的练苗和移栽

[0062] 将草炭土用细筛筛好,与蛭石按照1:1的比例(V/V)配好,装入培养瓶中,用蒸馏水配成NAA 0.5mg/L的生长液,将该液体倒入培养瓶中,至土壤湿润,盖好培养瓶瓶盖,121℃灭菌30min,制备好土瓶。将幼苗移栽到土瓶中,培养2周后,打开土瓶瓶盖,练苗2d后进行移栽。同时,将获得的狗枣猕猴桃幼苗直接放入草炭:蛭石=1:1(V/V)的土壤中进行移栽,用透明塑料薄膜覆盖于培养钵上约1周左右,期间保持土壤湿润。以上培养条件均为26℃,16h光照/8h黑暗。观察两种方法的移栽成活率。

[0063] (4) 数据分析

[0064] 所得数据用SPSS19.0进行统计分析。

[0065] 二、结果与分析

[0066] 1、不同培养基对狗枣猕猴桃实生苗的诱导结果

[0067] 将切掉1/3及完整的狗枣猕猴桃种子分别播种于不同的培养基中,分别在第7d、14d、21d、28d观察狗枣猕猴桃种子在不同培养基中的萌发情况。结果表明,整个观察期内,完整种子在所有培养基中萌发率均为0,纵向切掉1/3的种子在所有培养基中均有萌发,其中第7d部分种子胚根有萌动,第14d至第28d种子萌发数目没有明显变化,确定第14d为种子萌发的计数日期。3种培养基中,MS培养基萌发率显著高于其他两种培养基,说明添加营养物质有利于种子萌发(表1)。与不添加任何激素相比,添加一定含量的6-BA和NAA均可诱导狗枣猕猴桃种子的萌发,其中③号效果最好,平均发芽率达 $52.96 \pm 13.59\%$ (表2)。

[0068] 表1基本培养基对狗枣猕猴桃种子萌发的影响

基本培养基	A (无营养素)	B (添加 MS)	C (添加 WPM)
[0069] 种子萌发率 (%)	0.29333 ± 0.075803 ^c	0.41556 ± 0.168968 ^a	0.36889 ± 0.150379 ^b

[0070] 显著性:P<0.05。表中不同小写字母之间差异显著。

[0071] 表2激素对狗枣猕猴桃种子萌发的影响

激素组合	①	②	③	④	⑤
[0072] 种子萌发率 (%)	0.21852 ± 0.044444 ^d	0.46667 ± 0.108012 ^b	0.52963 ± 0.135856 ^a	0.30370 ± 0.042310 ^c	0.27778 ± 0.033333 ^c

[0073] 显著性:P<0.05。表中不同小写字母之间差异显著。

[0074] 对15种培养进行方差分析和多重比较发现,B③、C③、B②培养基诱导狗枣猕猴桃种子萌发的效果最好,其中B③培养基诱导种子萌发率达63.33%。详细结果见表3。

[0075] 表3不同培养基对狗枣猕猴桃种子萌发的影响

[0076]

培养基*激素	发芽率 (%)	标准差	显著性
B③	0.63333	0.033333	a
C③	0.60000	0.033333	a
B②	0.57778	0.050918	a
C②	0.45556	0.096225	b
A②	0.36667	0.033333	c
A③	0.35556	0.050918	cd
B④	0.34444	0.019245	cd
B⑤	0.30000	0.033333	cde
A④	0.28889	0.019245	cde

[0077]

C④	0.27778	0.050918	de
A⑤	0.27778	0.038490	de
C①	0.25556	0.050918	e
C⑤	0.25556	0.019245	e
B①	0.22222	0.019245	ef
A①	0.17778	0.019245	f

[0078] 显著性: $P < 0.05$ 。表中不同小写字母之间差异显著。

[0079] 2、不同移栽方法对狗枣猕猴桃幼苗成活的影响

[0080] 采用两种不同的方法对狗枣猕猴桃幼苗进行移栽,一种是先移栽到无菌土瓶中,再移栽到土壤中,一种是直接移栽到土壤中,结果表明,两种方法在幼苗成活率上并没有显著差别,都达到百分之百成活,由于直接移栽较为方便,因此采用直接移栽的方法进行移栽。

[0081] 狗枣猕猴桃种子萌发过程图如图1所示。A:种子纵向1/3处切割 (bar = 1mm); B:完整种子的萌发情况 (播种后28d); C:纵向切割1/3种子萌发情况 (播种后28d); D:移入土瓶的生长状况; E:直接移入土壤中的生长状况; F:移栽后3周的生长状况。

[0082] 3、结论

[0083] 本发明得到了一种快速获得狗枣猕猴桃实生苗的方法,将种子纵向切掉1/3后,放在MS+琼脂7g/L+蔗糖20g/L+6-BA 1mg/L+NAA 0.02mg/L的培养基上培养14d,然后将萌发的幼苗直接移栽到草炭:蛭石=1:1的土壤中培养1周以后,即可获得实生苗,在自然条件下即可成活。通过本方法使用当年生的种子,在3周内获得狗枣猕猴桃实生苗,发芽率可达63.33%,是一种快速、发芽率高的获得实生苗的方法。

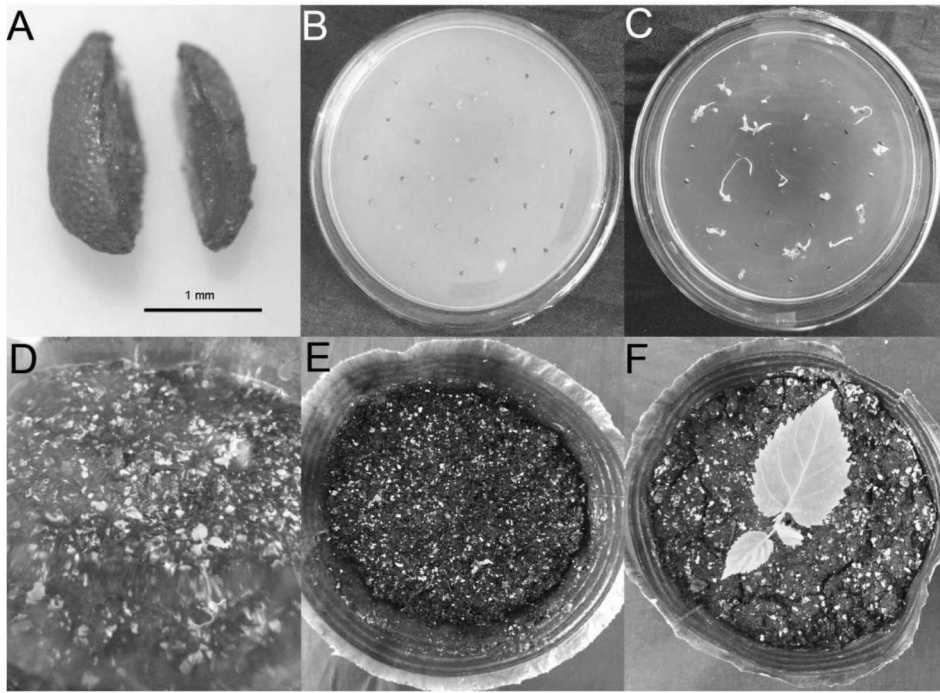


图1