



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102640704 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 22

(21) 申请号 201210161965. X

(22) 申请日 2012. 05. 23

(71) 申请人 贵州省油料研究所

地址 550006 贵州省贵阳市小河区金农社区
金农路 1 号贵州省农业科学院内

(72) 发明人 李超 林茂 李加纳 殷家明
杨斌 肖华贵 饶勇

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所
52100

代理人 李亮 程新敏

(51) Int. Cl.

A01H 1/08 (2006. 01)

A01G 1/00 (2006. 01)

A01C 21/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,将甘蓝型油菜的播种时间提前,比当地油菜正常播种季节提前 5~10 天,并在播种前先施加底肥;从田间播种到开花期间保持土壤水分充裕,在开花前 30~40 天重施追肥 1 次;在开花期时进行田间取蕾,选取植株长势旺、分枝多、主花序及一次分枝上的花蕾足够多的花蕾进行取蕾,取花蕾上从外到内第 3~4 环的花蕾;将取得的花蕾用 B₅-13 培养基分离出游离小孢子,经过培养后,即可获得诱导出来的胚状体。结果每个花蕾的产胚量都超过了 500 个胚。本发明的方法简单,容易实施,成本低廉,使用效果好。

1. 一种提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,其特征在于:将甘蓝型油菜的播种时间提前,比当地油菜正常播种季节提前3~10天,并在播种前先施加底肥;从田间播种到开花期期间保持土壤水分充裕,在开花前30~40天重施追肥1次;在开花期时进行田间取蕾,选取植株长势旺、分枝多、主花序及一次分枝上的花蕾足够多的花蕾进行取蕾,取花蕾上从外到内第3~4环的花蕾;将取得的花蕾用B₅-13培养基分离出游离小孢子,然后用含有200mg/L秋水仙素的NLN-13培养基将游离小孢子分装成15蕾/皿,首先在32℃下暗培养24小时,然后更换成不含秋水仙素的NLN-13培养基,继续在32℃暗培养48小时后转移到25℃暗培养10~15天,即可获得诱导出来的胚状体。

2. 根据权利要求1所述的提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,其特征在于:所述的底肥以有机肥为主,在有机肥中增施磷、钾、硼肥,施加量为有机肥2500~3500公斤/亩,过磷酸钙75~85公斤/亩,氯化钾或硫酸钾20~30公斤/亩及硼砂1~1.5公斤/亩。

3. 根据权利要求1所述的提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,其特征在于:所述的追肥为尿素为20公斤/亩、复合肥20公斤/亩、清粪水2500~3000公斤/亩及堆渣肥2000~2500公斤/亩。

4. 根据权利要求1所述的提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,其特征在于:将游离小孢子在培养皿中培养25~28天,将培养基更换为新的NLN-13培养基,然后在3℃的冰箱内保存15~150d。

提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及农业种植领域,尤其是一种提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法。

背景技术

[0002] 甘蓝型油菜 *Brassica napus* L 是三种油用油菜(白菜型油菜、芥菜型油菜、甘蓝型油菜)中籽粒产量最高的种类,目前我国长江流域大量种植,是我国最重要的油料作物。甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率是种质资源创新的一个关键,在甘蓝型油菜小孢子培养过程中,产胚率低的原因很多归咎与植株的基因型,在国内外甘蓝型油菜小孢子培养中,一般情况每个花蕾的产胚量只有几十个,有的甚至只有几个。

发明内容

[0003] 本发明的目的是:提供一种提高甘蓝型油菜花粉小孢子产胚率的方法,它能显著提高甘蓝型油菜花粉小孢子产胚率,以克服现有技术的不足。

[0004] 本发明是这样实现的:提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,将甘蓝型油菜的播种时间提前,比当地油菜正常播种季节提前 3~10 天,并在播种前先施加底肥;从田间播种到开花期期间保持土壤水分充裕,在开花前 30~40 天重施追肥 1 次;在开花期时进行田间取蕾,选取植株长势旺、分枝多、主花序及一次分枝上的花蕾足够多的花蕾进行取蕾,取花蕾上从外到内第 3~4 环的花蕾;将取得的花蕾用 B₅-13 培养基分离出游离小孢子,然后用含有 200mg/L 秋水仙素的 NLN-13 培养基将游离小孢子分装成 15 蕾/皿,首先在 32℃ 下暗培养 24 小时,然后更换成不含秋水仙素的 NLN-13 培养基,继续在 32℃ 暗培养 48 小时后转移到 25℃ 暗培养 10~15 天,即可获得诱导出来的胚状体。

[0005] 所述的底肥以有机肥为主,在有机肥中增施磷、钾、硼肥,施加量为有机肥 2500~3500 公斤/亩,过磷酸钙 75~85 公斤/亩,氯化钾或硫酸钾 20~30 公斤/亩及硼砂 1~1.5 公斤/亩。

[0006] 所述的追肥为尿素为 20 公斤/亩、复合肥 20 公斤/亩、清粪水 2500~3000 公斤/亩及堆渣肥 2000~2500 公斤/亩。

[0007] 将游离小孢子在培养皿中培养 25~28 天,将培养基更换为新的 NLN-13 培养基,然后在 3℃ 的冰箱内保存 15~150d,这样的方式可以解决现有技术中胚状体或苗越冬难的问题。该方式包括胚状体从保存时间到换液次数,以及最长保存时间全部技术,都极大减少人力、财力和物力,提高利用甘蓝型油菜小孢子培养创新种质资源的效率,对于创新种质资源、尤其是特优和特异种质资源具有重要作用。

[0008] 为了进一步验证本发明的实验效果,进行了如下实验:

1、材料与方法

1.1、试验时间及地点

试验设在地处重庆北碚地区,平均海拔 260m,年平均气温 14.5℃,无霜期平均 265d,年

平均降水量 1200mm。属岩盆地地貌, 试验地为西南大学校内农场, 位于重庆市北碚区天生路, 施肥、管理比较方便, 土壤为黄壤土。

[0009] 1.2 试验设计

试验设 4 个处理, 包括方案 1、方案 2、方案 3 及常规方案(对照), 每个处理面积 49.1m², 处理重复 2 次。方案 1、方案 2 及方案 3 中施肥、取蕾及培养的具体内容对应实施例 1、实施例 2 及实施例 3。

[0010] 表 1

内容	方案 1	方案 2	方案 3	对照
播种期	提前 3 天	提前 5 天	提前 10 天	常规播期
底肥施用量	以有机肥为主, 在有机肥中增施磷、钾、硼肥, 施用量为有机肥 2500-35000 公斤/亩, 过磷酸钙 75-85 公斤/亩, 氯化钾或硫酸钾 20-30 公斤/亩及硼砂 1-1.5 公斤/亩;			常规
追肥施用时间	开花前 30-40 天			常规
追肥施用量	尿素为 20 公斤/亩、复合肥 20 公斤/亩、清粪水 2500-3000 公斤/亩及堆渣肥 2000-2500 公斤/亩			常规
取蕾大小	花蕾从外到内 3-4 环			
培养密度	用含有 200mg/L 秋水仙素的 MLN-13 (含 13%的蔗糖) 培养基将游离小孢子分装成 15 蕾/皿, 用不含秋水仙素的 MLN-13 (含 13%的蔗糖) 培养基将游离小孢子分装成 6 蕾/皿			
培养方式	首先在 32℃下暗培养 24 小时, 然后更换成不含秋水仙素的 MLN-13 培养基, 继续在 32℃暗培养 48 小时后转移到 25℃暗培养			
统计方法	培养 28 天后统计			
结果	产胚 145~293 胚/ 蕾	产胚 501~562 胚/ 蕾	产胚 515-552 胚/ 蕾	产胚 5-11 胚/ 蕾

1.3 试验材料

供试土壤的农化性状: 酸性黄壤土。

[0011] 供试肥料: 尿素(N 46%, 赤水天然气化工厂生产), 普通过磷酸钙(P₂O₅ 18%, 开磷集团息烽磷肥厂生产, 氯化钾(K₂O 60%, 俄罗斯生产)。

[0012] 供试品种: LCD17 (LCD10 × LCD01)。

[0013] 1.4 试验研究方法

所诱导出来的胚状体直接在肉眼下进行观察。

[0014] 2、结论

根据观察可以得知,通过该培养体系获得小孢子的产胚率可以达到 500 个胚 / 蕾以上。

[0015] 由于采用上述的技术方案,与现有技术相比,本发明采用对甘蓝型油菜的播种、田间管理、取蕾及培养等多个关键技术进行改进,甘蓝型油菜小使孢子培养产胚率极大提高,根据本发明随机统计了 10 皿(产胚量中等)的产胚量,结果每个花蕾的产胚量都超过了 500 个。本发明的方法简单,容易实施,成本低廉,使用效果好。

具体实施方式

[0016] 本发明的实施例 1:提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,将甘蓝型油菜的播种时间提前,比当地油菜正常播种季节提前 3 天,并在播种前先施加底肥;从田间播种到开花期期间保持土壤水分充裕,在开花前 35 天重施追肥 1 次;在开花期时进行田间取蕾,选取植株长势旺、分枝多、主花序及一次分枝上的花蕾足够多的花蕾进行取蕾,取花蕾上从外到内第 3 ~ 4 环的花蕾;将取得的花蕾用 B₅-13 (含 13% 的蔗糖)培养基分离出游离小孢子,然后用含有 200mg/L 秋水仙素的 NLN-13 (含 13% 的蔗糖)培养基将游离小孢子分装成 15 蕾 / 皿,首先在 32℃ 下暗培养 24 小时,然后更换成不含秋水仙素的 NLN-13 培养基,继续在 32℃ 暗培养 48 小时后转移到 25℃ 暗培养 12 天后,即可获得诱导出来的胚状体;其中所述的底肥以有机肥为主,在有机肥中增施磷、钾、硼肥,施加量为有机肥 3000 公斤 / 亩,过磷酸钙 50 公斤 / 亩,氯化钾或硫酸钾 25 公斤 / 亩及硼砂 1.2 公斤 / 亩;所述的追肥为尿素为 20 公斤 / 亩、复合肥 20 公斤 / 亩、清粪水 28 公斤 / 亩及堆渣肥 2200 公斤 / 亩;将游离小孢子在培养皿中培养 28 天,将培养基更换为新的 NLN-13 培养基,然后在 3℃ 的冰箱内保存 15 天 ~ 150 天。

[0017] 本发明的实施例 2:提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,将甘蓝型油菜的播种时间提前,比当地油菜正常播种季节提前 5 天,并在播种前先施加底肥;从田间播种到开花期期间保持土壤水分充裕,在开花前 30 天重施追肥 1 次;在开花期时进行田间取蕾,选取植株长势旺、分枝多、主花序及一次分枝上的花蕾足够多的花蕾进行取蕾,取花蕾上从外到内第 3 ~ 4 环的花蕾;将取得的花蕾用 B₅-13 培养基分离出游离小孢子,然后用含有 200mg/L 秋水仙素的 NLN-13 培养基将游离小孢子分装成 15 蕾 / 皿,首先在 32℃ 下暗培养 24 小时,然后更换成不含秋水仙素的 NLN-13 培养基,继续在 32℃ 暗培养 48 小时后转移到 25℃ 暗培养 12 天后,即可获得诱导出来的胚状体;其中所述的底肥以有机肥为主,在有机肥中增施磷、钾、硼肥,施加量为有机肥 2500 公斤 / 亩,过磷酸钙 75 公斤 / 亩,氯化钾或硫酸钾 20 公斤 / 亩及硼砂 1 公斤 / 亩;所述的追肥为尿素为 20 公斤 / 亩、复合肥 20 公斤 / 亩、清粪水 2500 公斤 / 亩及堆渣肥 2000 公斤 / 亩;将培养得到的小孢子在培养皿中培养 25 天后,再将培养基更换为新的 NLN-13 培养基,然后在 3℃ 的冰箱内保存 90d,见光培养 5 天后胚就完全转变成绿色。

[0018] 本发明的实施例 3:提高甘蓝型油菜花粉小孢子培养产胚率的方法,将甘蓝型油菜的播种时间提前,比当地油菜正常播种季节提前 10 天,并在播种前先施加底肥;从田间播种到开花期期间保持土壤水分充裕,在开花前 40 天重施追肥 1 次;在开花期时进行田间取蕾,选取植株长势旺、分枝多、主花序及一次分枝上的花蕾足够多的花蕾进行取蕾,取花蕾上从外到内第 3 ~ 4 环的花蕾;将取得的花蕾用 B₅-13 培养基分离出游离小孢子,然后用

含有 200mg/L 秋水仙素的 NLN-13 培养基将游离小孢子分装成 15 蕾 / 皿, 首先在 32℃ 下暗培养 24 小时, 然后更换成不含秋水仙素的 NLN-13 培养基, 继续在 32℃ 暗培养 48 小时后转移到 25℃ 暗培养 12 天后, 即可获得诱导出来的胚状体; 其中所述的底肥以有机肥为主, 在有机肥中增施磷、钾、硼肥, 施加量为有机肥 3500 公斤 / 亩, 过磷酸钙 85 公斤 / 亩, 氯化钾或硫酸钾 30 公斤 / 亩及硼砂 1.5 公斤 / 亩; 所述的追肥为尿素为 20 公斤 / 亩、复合肥 20 公斤 / 亩、清粪水 3000 公斤 / 亩及堆渣肥 2500 公斤 / 亩; 将游离小孢子在培养皿中培养 28 天, 将培养基更换为新的 NLN-13 培养基, 然后在 3℃ 的冰箱内保存 150d。