



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102696463 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201210185028. 8

(22) 申请日 2012. 06. 07

(71) 申请人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术产业开发区高创园 D 座 1012 室

(72) 发明人 王学 刘东武 徐恒骥

(51) Int. Cl.

A01G 31/00 (2006. 01)

A01H 4/00 (2006. 01)

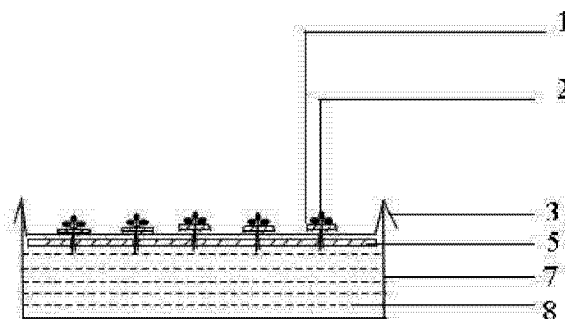
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法

(57) 摘要

本发明提供一种有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法。该方法包括以下步骤：1) 育苗：将消毒、春化的种子播种于组培瓶内的 1/2MS 固体培养基上，培养 12~18 天得幼苗；2) 转苗：将 1) 所得幼苗转至打有一孔的 3~5 平方厘米的小 KT 板上，使根穿过孔进入培养液，驯化培养 5~7 天；3) 自制培养装置，将其消毒，并用锡箔纸封住培养装置；4) 幼苗培养：将 2) 所得带小 KT 板的幼苗转到 3) 自制培养装置上，并使拟南芥根通过锡箔纸和培养装置浸入培养液中，每隔 6~9 天更换一次培养液，每 2~3 天为培养液通气一次，以保证根部有充足的氧气。上述培养方法简单易行，拟南芥生长良好，可有效防止绿藻污染。



1. 一种有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,包括以下步骤:1)育苗:将消毒、春化的种子播种于组培瓶内的1/2 MS固体培养基上,培养12~18天得幼苗;2)转苗:将1)所得幼苗转至打有一孔的3~5平方厘米的小KT板上,使根穿过孔进入培养液,驯化培养5~7天;3)自制培养装置,将培养盘用5%~10%次氯酸钠消毒1~2小时,剪取比培养盘略小的KT板,在KT板上挖宽约1.5厘米,两端约短于KT板各2厘米的长方形小槽,根据KT板大小,每隔5~8厘米挖一小槽,在培养盘内装入适量的1/2 Hoagland培养液,再把上述KT板放入培养盘内,用锡箔纸封住培养装置;4)幼苗培养:将2)所得带小KT板的苗转到3)自制培养装置上,并使拟南芥根通过锡箔纸和培养装置浸入培养液中。

2. 根据权利要求1所述的有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,其特征是:所述步骤2)小KT板上的孔采用打孔器制作。

3. 根据权利要求1所述的有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,其特征是:所述步骤2)利用洗瓶挤压出的水流带动根穿过孔,从而有效防止根损伤。

4. 根据权利要求1所述的有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,其特征是:所述步骤2)和3)的KT板质轻,可使小苗始终浮于培养液之上。

5. 根据权利要求1所述的有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,其特征是:所述步骤3)的培养盘为不透光、高约5~10厘米的方形或长方形水果盘。

6. 根据权利要求1所述的有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,其特征是:所述步骤3)和4)用不透光的培养盘与锡箔纸组成一个黑暗的空间,使该空间中的培养液和根接触不到光照,从而有效防止需光才能生长的绿藻在培养液和根上滋生。

7. 根据权利要求1所述的有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,其特征是:所述步骤4)每隔6~9天更换一次培养液,每2~3天给培养液充空气一次,以保证根部有充足的氧气。

8. 根据权利要求1所述的有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,其特征是:所述步骤4)可根据研究的内容,适当调整培养液中的组分,如研究重金属对拟南芥的影响,可在培养液中添加不同浓度的重金属。

一种有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种拟南芥的水培方法,特别是涉及一种在培养室或人工气候箱内有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法。

背景技术

[0002] 拟南芥具有生活史短、种子多、形态结构简单、全部基因组已测序、遗传转化体系成熟等优点,作为模式植物广泛应用于遗传学、植物营养学、逆境生物学等研究中。拟南芥幼苗脆弱,易受外界环境,特别是培养基组分的影响,致使实验的重复性较差、影响实验的进度。另外,由于拟南芥植株小、生物量相对较少,致使许多生理生化方面的实验难以开展。因此,在研究过程中,提高拟南芥的生长速度,提供一种良好且一致的生长环境,培养出健壮而整齐一致的植株,不但是实验成功的关键,而且是实验顺利进行的必要条件。

[0003] 土培和琼脂固体培养法是目前拟南芥培养的两种最主要的方法,土培难以精确控制培养基质中的营养成分,且很难获取完整的根系;而琼脂固体培养法难以繁殖种子,且植株小,不易获得大量的实验材料,尤其是根系。水培不但可以提供一致且可重复的培养系统,而且可以根据实验要求精确控制水溶液中的营养成分,各部分实验材料(尤其是根系)容易观察和收集,可极大的提高拟南芥生长速度,获取更多的实验材料。但目前大部分水培方法,易被绿藻污染,致使植株瘦弱,提取拟南芥根系 RNA、DNA、蛋白质等组分时,常被绿藻所污染,影响实验结果,甚至因实验材料达不到要求而无法开展实验。因此,目前迫切需要一种在培养室或人工气候箱内严格控制实验条件的无绿藻污染、根系发达且简单易行的拟南芥水培方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种可在培养室或人工气候箱内培育出健壮、大小基本一致、无绿藻污染、简单易行的拟南芥水培方法。

[0005] 本发明提供的拟南芥水培方法,包括以下步骤:

1)育苗:将消毒、春化的种子播于 1/2 MS 固体培养基上,培养 12~18 天。培养条件:光周期为 14 小时光照,10 小时黑暗;温度为白天 $22 \pm 2^\circ \text{C}$,夜间为 $18 \pm 2^\circ \text{C}$;相对湿度为 60%~80%;光照强度为 $100 \sim 400 \mu \text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$,经培育得拟南芥幼苗。

[0006] 2)转苗:将步骤 1)所得的幼苗转至打有一孔的 3~5 平方厘米的小 KT 板上,使根穿过孔进入培养液。然后将苗转入装有 1/2 Hoagland 营养液的盆中进行驯化,转苗前 2 天用玻璃板盖在盆上密封,以防幼苗干枯,而后每天打开一些,使苗逐渐适应外部的环境,直至完全移开玻璃板,驯化培养约需 5~7 天。培养条件与育苗相同。

[0007] 3)自制培养装置,并将其消毒:根据实验要求,选择适当大小的培养盘并消毒。剪取比培养盘略小的 KT 板,在 KT 板上挖宽约 1.5 厘米,两端约短于 KT 板各 2 厘米的长方形小槽,根据 KT 板大小,每隔 5~8 厘米挖一小槽,也可根据实验需要,适当的调整小槽间距,各小槽平行排列。在培养盘内装入适量的 1/2 Hoagland 培养液,再把上述改造的 KT 板放入

培养盘内。将锡箔纸置于 KT 板上方,并封住培养盘开口,KT 板质轻,因而会始终浮于培养液的上方,可防止其上的锡箔纸等物体浸入水中。锡箔纸可遮光,能防止培养液受到光的照射,从而有效防止绿藻滋生。

[0008] 4) 幼苗培养:将步骤 2) 所得的带小 KT 板的幼苗转至 3) 所述的自制培养装置上,根据锡箔纸下方大 KT 板上长方形小槽的位置种植拟南芥,每一小槽上方种植一排小苗。小苗种植时在锡箔纸上划一小口,让小苗的根通过锡箔纸及其下方大 KT 板上的小槽浸入水中,每隔 5~8 厘米转一棵小苗,也可根据实验需要,适当的调整小苗的间距。培养条件与育苗相同。每隔 6~9 天更换一次培养液,每 2~3 天给培养液充空气一次,以保证根部有充足的氧气。

[0009] 在上述培养方法中,步骤 1) 种子消毒、春化的方法为:用 75% 的酒精表面消毒 1 min,2% 的次氯酸钠浸泡 10 min,再经灭菌水洗涤 5~6 次后播种于 1/2 MS (0.52%~0.58% 琼脂,3% 蔗糖,0.05% 的 MES,pH 5.8) 培养基上。1/2 MS 培养基被装入组培瓶内,组培瓶上方空间较大,在同样的时间内,所得幼苗莲座叶要比培养皿内的大且健壮,撒在 MS 培养基上的种子要稀,过密相互拥挤会影响植株生长。将上述组培瓶放入 4℃ 冰箱内,使种子春化 2~3 天,然后再置于培养室或人工气候箱内里培养。

[0010] 步骤 2) 小 KT 板上的孔可用打孔器制作。为防止根损伤,可利用洗瓶挤压出的水流带动根穿过孔。拟南芥幼苗的根细弱,若用质地坚硬的镊子或其它工具使根穿过孔,会给根带来不可避免的伤害,引起幼苗干枯甚至死亡。而用细的水流带动根穿过孔不仅不易造成幼苗损伤,而且还可使柔软的根轻松穿越孔,大大加快转苗速度。所用 KT 板可从广告公司或装饰材料店购买。KT 板厚约 0.5 厘米。所用盆在使用前用 5%~10% 的次氯酸钠消毒 1~2 小时,再用蒸馏水冲洗 5~6 次。

[0011] 步骤 3) 中所述的培养盘可用不同颜色但不透光、高约 5~10 厘米的方形或长方形水果盘。培养盘每次使用前用 5%~10% 的次氯酸钠消毒 1~2 小时,再用蒸馏水冲洗干净。

[0012] 步骤 4) 中所述的锡箔纸上的小口,可用小刀在锡箔纸适当的位置垂直划一小口(形状如“L”形),并在根穿过小口后,用透明胶带将口封上。

[0013] 本发明简单易行、便于操作,所用材料价格低廉易得,实验重复性好,所得苗健壮、大小基本一致、无绿藻污染,所用培养液可根据实验需求而适当调整、并能精确控制其成份。上述方法可以培养任何生态型的野生型或突变体拟南芥植株。本发明可在培养室或人工气候箱内培育幼苗,也可用来繁殖种子,应用前景广阔。

附图说明

[0014] 下面结合附图以及具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0015] 图 1 为本发明的自制拟南芥培养装置结构示意图;1、打有一孔的 3~5 平方厘米的小 KT 板,2、转移到 1 所示小的 KT 板上的拟南芥幼苗,3、锡箔纸,4、锡箔纸上的“L”形小口,5、比培养盘略大的大 KT 板,6、大 KT 板上的长方形小槽,7、培养盘。

[0016] 图 2 为本发明的自制拟南芥培养装置剖视示意图;1~7 同图 1,8、培养盘中的培养液。

具体实施方式

[0017] 实施例 1、一种有效防止绿藻产生的拟南芥水培方法,依次进行以下步骤:

1) 育苗:将适量哥伦比亚野生型拟南芥种子置于 1.5 毫升离心管中,用 1 毫升 75% 的酒精表面消毒 1 分钟,倒出酒精,再加入 1 毫升 2% 的次氯酸钠灭菌 10 分钟,倒出次氯酸钠,然后用灭菌水洗涤 5 次后播于组培瓶内 1/2 MS (0.56% 琼脂,3% 蔗糖,0.05% 的 MES, pH 5.8) 培养基上。播种密度要稀,防止过于拥挤影响植株生长。将撒有种子的组培瓶放入 4℃ 冰箱内,春化 2 天,然后再置于培养室培养 15 天。培养条件:光周期为 14 小时光照,10 小时黑暗;温度为白天 $22 \pm 2^\circ \text{C}$,夜间为 $18 \pm 2^\circ \text{C}$;相对湿度为 70%;光照强度为 $120 \mu \text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$,经培育得拟南芥幼苗。

[0018] 2) 转苗:将步骤 1) 所得的幼苗转至打有一孔的约 4 平方厘米的小 KT 板上,用洗瓶挤压出的水流带动根穿越孔进入培养液。然后将苗转入内装 1/2 Hoagland 营养液的盆(用前已用 5% 次氯酸钠消毒 1 小时,并用蒸馏水冲洗 5 次)中进行驯化培养 5 天,转苗前 2 天用玻璃板盖在盆上密封,以防幼苗干枯,而后每天打开一些,使苗逐渐适应外部的环境,直至完全移开玻璃板。培养条件与育苗相同。

[0019] 3) 自制培养装置,并将其消毒:选择适当大小的培养盘并用 5% 次氯酸钠消毒 1 小时,用蒸馏水冲洗干净。根据所选培养盘大小,剪取比其略小的 KT 板,在 KT 板上挖宽约 1.5 厘米,两端约短于 KT 板各 2 厘米的长方形小槽,在 KT 板上每隔 5 厘米挖一小槽。在培养盘内装入适量的 1/2 Hoagland 培养液,再把上述改造的 KT 板放入培养盘内。将锡箔纸置于 KT 板之上,并封住培养盘开口。

[0020] 4) 幼苗培养:将步骤 2) 得的带小 KT 板的幼苗转至 3) 所述的自制培养装置上,将拟南芥种植于小槽上方,沿小槽平行排列。在锡箔纸上划一“L”形的小口,让小苗的根通过锡箔纸及其下方大 KT 板上的小槽浸入水中,每隔 5 厘米转一小苗,锡箔纸上的小口用透明胶带封上。每隔 8 天更换一次培养液,每 2 天给培养液充空气一次,以保证根部有充足的氧气。培养条件与育苗相同。

[0021] 从播种到植株开花大约需要 4~5 周,6 周后角果中种子开始成熟。由于培养液经常更换,拟南芥可不断从培养液中吸取丰富的营养,所以植株开花时间较长,所得种子量大约比土培多 20%。根在黑暗的环境中生长,可有效防止绿藻污染。

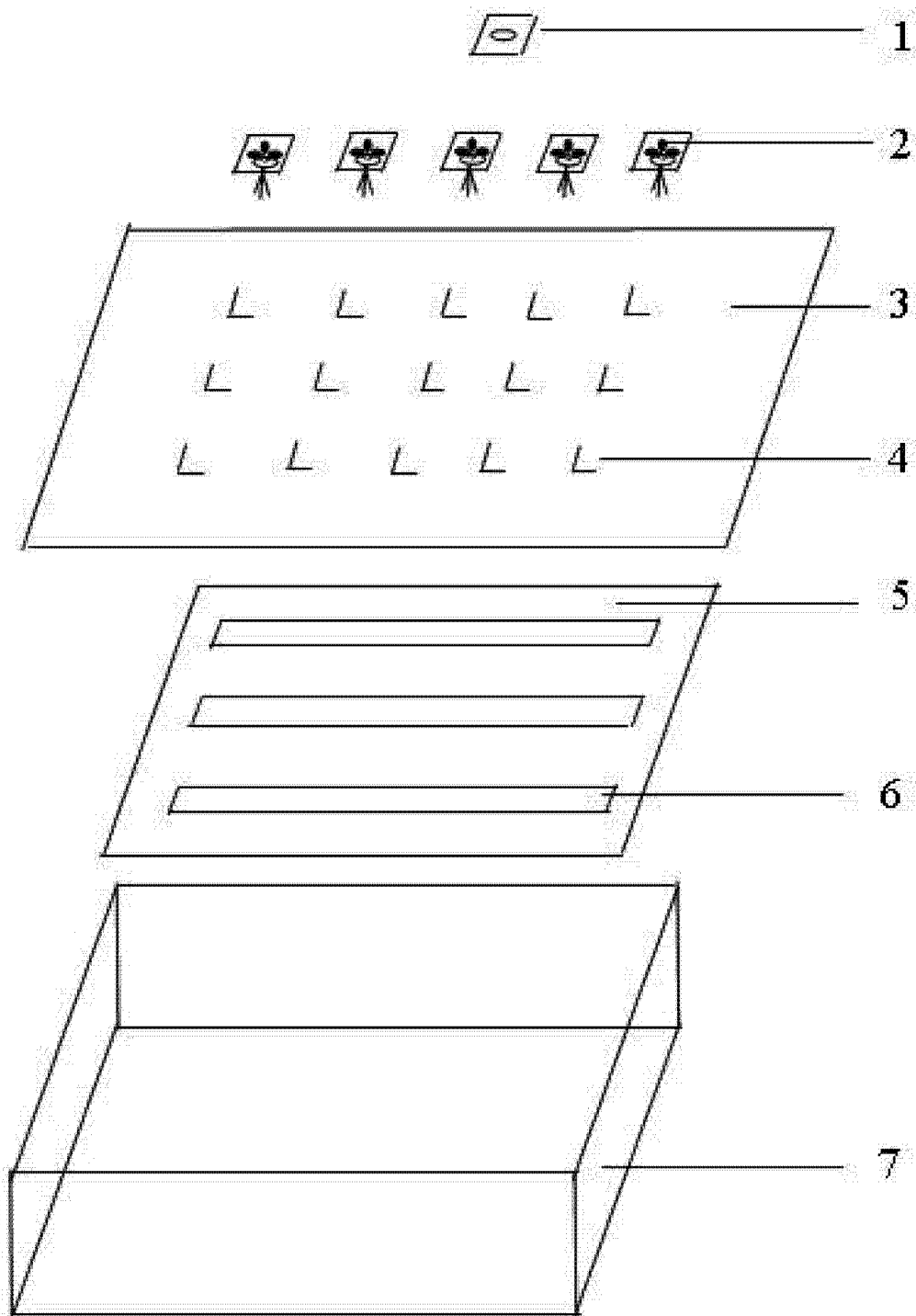


图 1

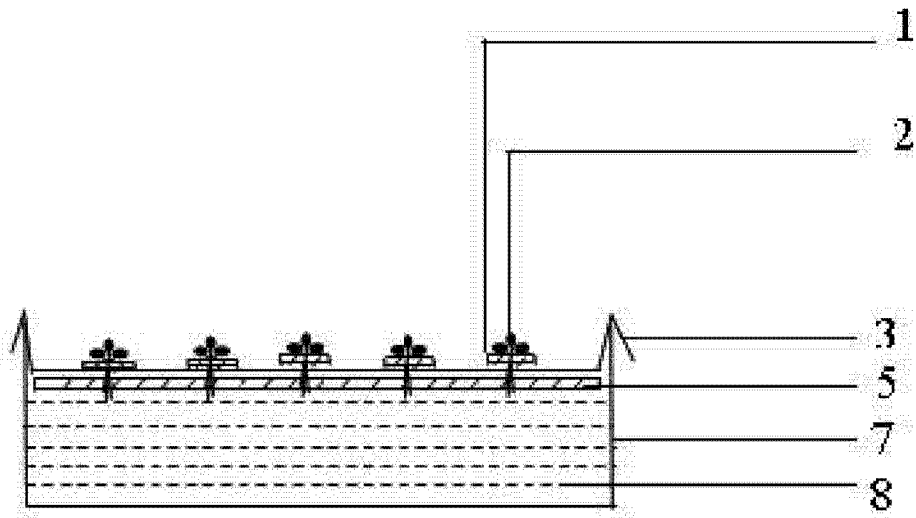


图 2