



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111492973 B

(45) 授权公告日 2022.06.07

(21) 申请号 202010397123.9

审查员 李永超

(22) 申请日 2020.05.12

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111492973 A

(43) 申请公布日 2020.08.07

(73) 专利权人 黄冈师范学院

地址 438000 湖北省黄冈市开发区新港二路146号

(72) 发明人 朱华国 胡孝明 汤欣欣

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 42222

专利代理师 胡甜甜

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

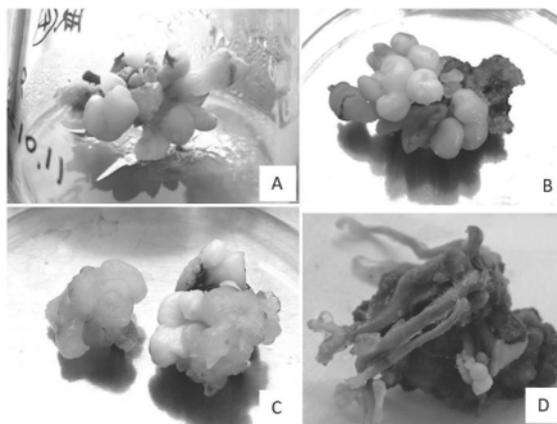
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

### (54) 发明名称

普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株的方法

### (57) 摘要

本发明提供一种普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株的方法,所述方法包括以下步骤:取7月中旬普通油茶幼胚于4℃保存,消毒后切块接种至愈伤组织诱导培养基进行愈伤组织诱导培养;挑选生长良好的愈伤组织继代至分化培养基进行胚状体分化;将出现胚状体的外植体转入胚状体发育及植株再生培养基,进行胚状体发育和植株再生;将具有明显子叶的胚状体转至生根培养基,进行生根培养;最后将获得的完整植株驯化移栽至营养钵内继续生长。通过本发明所提供的方法,普通油茶能够在6个月内通过体细胞胚胎发生方式获得再生植,为普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株提供了一种方便、快捷和有效的方法,具有较好的社会效益和经济效益。



1. 一种普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株的方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 取7月中旬普通油茶幼胚,于4℃保存;

(2) 将所述步骤(1)取得的普通油茶幼胚消毒并切块进行接种,每个幼胚切成3-5块后接种至愈伤组织诱导培养基,此过程于所述普通油茶幼胚取回后3天内完成;

(3) 将所述步骤(2)接种幼胚后的愈伤组织诱导培养基进行愈伤组织诱导培养,培养时间1个月;

(4) 将所述步骤(3)中生长良好的愈伤组织继代至分化培养基进行胚状体分化,此过程中继代两次,培养时间2个月;

(5) 将所述步骤(4)中出现胚状体的外植体转入胚状体发育及植株再生培养基,进行胚状体发育和植株再生,此过程中继代1次,培养时间2个月;

(6) 将所述步骤(5)中具有明显子叶的胚状体转至生根培养基,进行生根培养,此过程培养时间为1个月;

(7) 将所述步骤(6)中获得的完整植株驯化移栽至营养钵内继续生长;

其中,所述步骤(2)~(3)中,愈伤组织诱导培养基为含终浓度2.0mg/L 2,4-D和1.0mg/L KT的MSB培养基,或为含终浓度5.0mg/L NAA和1.0mg/L KT的MSB培养基;所述步骤(4)中,分化培养基为含终浓度1.0mg/L NAA和1.0mg/L KT的MSB培养基;所述步骤(5)中,胚状体发育及植株再生培养基为含终浓度1.0mg/L NAA和3.0mg/L 6-BA的MSB培养基;所述步骤(6)中,生根培养基为含终浓度3.0mg/L 6-BA的1/2MSB培养基;所述步骤(3)~(7)的培养条件均为28℃、光照16小时/天、光照强度2000lux以上的恒温培养箱培养;所述MSB培养基具体组成如下:硝酸钾1.9g/L、硫酸铵1.65g/L、磷酸二氢钾0.17g/L、七水硫酸镁0.37g/L、二水氯化钙0.44g/L、四水硫酸锰22.3mg/L、硼酸6.2mg/L、七水硫酸锌8.6mg/L、碘化钾0.83mg/L、二水钼酸钠0.25mg/L、五水硫酸铜0.025mg/L、六水氯化钴0.025mg/L、乙二胺四乙酸钠37.3mg/L、七水硫酸亚铁27.8mg/L、甘氨酸2mg/L、烟酸1mg/L、盐酸硫胺素10mg/L、盐酸吡哆醇1mg/L、肌醇100mg/L、蔗糖30g/L、琼脂9g/L,pH为5.8~6.0。

## 普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物细胞工程技术领域,具体涉及一种普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株的方法。

### 背景技术

[0002] 油茶是山茶属植物中种子含油率较高树种的统称,也是我国特有的木本油料树种,油茶与油橄榄、油棕、椰子并称为世界四大木本油料作物。茶油的不饱和脂肪酸含量高达90%,远远高于菜油、花生油和豆油。茶油的维生素E含量比橄榄油高一倍,并含有山茶甙等特定生理活性物质,具有极高的营养价值。同时,油茶林是良好的生态林,油茶也是农林业产业结构调整、精准扶贫的重要经济作物,发展油茶产业具有很高的经济效益、社会效益和生态效益。此外,我国食用油消费量巨大,但目前自给率不足40%,严重影响了我国的粮油安全。发展油茶产业,开发山地空间,不仅不会出现与粮食争地的问题,还能提高国土资源使用效率,使国家粮油安全得到保障。

[0003] 随着生产发展和社会需求的不断提高,生产上对油茶品种的产量、品质、抗性等方面提出越来越高的要求,这些问题的解决仅依靠传统育种手段已无法满足。截止目前,油茶组织培养方面取得了一定进展,但尚未建立以体细胞胚胎发生为基础的遗传转化技术体系,与油茶以体细胞胚胎发生方式获得植株再生效率低有关。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株的方法,成功的以幼胚为材料通过体细胞胚胎发生方式获得普通油茶再生植株,通过本发明所提供的方法,普通油茶能够在6个月内通过体细胞胚胎发生方式获得再生植,为普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株提供了一种方便、快捷和有效的方法,具有较好的社会效益和经济效益,可普遍推广使用。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 一种普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株的方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 取7月中旬普通油茶幼胚,于4℃保存;

[0008] (2) 将所述步骤(1)取得的普通油茶幼胚消毒并切块进行接种,每个幼胚切成3-5块后接种至愈伤组织诱导培养基,此过程于所述普通油茶幼胚取回后3天内完成;

[0009] (3) 将所述步骤(2)接种幼胚后的愈伤组织诱导培养基进行愈伤组织诱导培养,培养时间1个月;

[0010] (4) 将所述步骤(3)中生长良好的愈伤组织继代至分化培养基进行胚状体分化,此过程中继代两次,培养时间2个月;

[0011] (5) 将所述步骤(4)中出现胚状体的外植体转入胚状体发育及植株再生培养基,进行胚状体发育和植株再生,此过程中继代1次,培养时间2个月;

[0012] (6) 将所述步骤(5)中具有明显子叶的胚状体转至生根培养基,进行生根培养,此

过程培养时间为1个月；

[0013] (7) 将所述步骤(6)中获得的完整植株驯化移栽至至营养钵内继续生长；

[0014] 其中,所述步骤(3)~(7)的培养条件均为28℃、光照16小时/天、光照强度2000lux以上的恒温培养箱培养。

[0015] 进一步地,所述步骤(2)~(3)中,愈伤组织诱导培养基为含终浓度2.0mg/L 2,4-D和1.0mg/L KT的MSB培养基,或为含终浓度5.0mg/L NAA和1.0mg/L KT的MSB培养基。

[0016] 进一步地,所述步骤(4)中,分化培养基为含终浓度1.0mg/L NAA和1.0mg/L KT的MSB培养基。

[0017] 进一步地,所述步骤(5)中,胚状体发育及植株再生培养基为含终浓度1.0mg/L NAA和3.0mg/L 6-BA的MSB培养基。

[0018] 进一步地,所述步骤(6)中,生根培养基为含终浓度3.0mg/L 6-BA的1/2MSB培养基。

[0019] 进一步地,所述MSB培养基具体组成如下:硝酸钾1.9g/L、硫酸铵1.65g/L、磷酸二氢钾0.17g/L、七水硫酸镁0.37g/L、二水氯化钙0.44g/L、四水硫酸锰22.3mg/L、硼酸6.2mg/L、七水硫酸锌8.6mg/L、碘化钾0.83mg/L、二水钼酸钠0.25mg/L、五水硫酸铜0.025mg/L、六水氯化钴0.025mg/L、乙二胺四乙酸钠37.3mg/L、七水硫酸亚铁27.8mg/L、甘氨酸2mg/L、烟酸1mg/L、盐酸硫胺素10mg/L、盐酸吡哆醇1mg/L、肌醇100mg/L,蔗糖30g/L、琼脂9g/L,pH为5.8~6.0。

[0020] 本发明所提供的MSB培养基为改良后的MSB培养基,由MS的无机盐成分和B5培养基的有机成分组成,通过改善了有机物成分促进再生植株根的发育,有利于获得更多的正常再生植株。

[0021] 所述普通油茶为湖北麻城成熟油茶林中表现出优良性状的品种。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有以下优点和有益效果:

[0023] (1) 使用本发明提供的普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株的方法,从油茶北缘主要种植区域湖北麻城成熟油茶林中选取优良单株上茶果为材料,进行幼胚离体培养,建立以体细胞胚胎发生方式的再生体系,愈伤组织诱导率达到80%以上,出胚率达到15%以上,6个月内即可获得完整再生植株,为普通油茶通过体细胞胚胎发生方式获得再生植株提供了一种方便、快捷和有效的方法,具有较好的社会效益和经济效益;

[0024] (2) 本发明所提供的油茶幼胚培养的基本培养基为改良的MSB培养基,通过改善了有机物成分促进再生植株根的发育,有利于获得更多的正常再生植株。

## 附图说明

[0025] 图1为本发明实施例中油茶愈伤组织诱导结果图;

[0026] 图中,A为剥去外表皮的幼胚块;B-C为2,4-D+KT组合诱导出的结构疏松、颜色浅的愈伤组织;D-F为NAA+KT组合诱导出的结构紧密、绿色的愈伤组织;

[0027] 图2为本发明实施例中油茶愈伤组织分化及胚状体发生结果图;

[0028] 图中,A-C为胚状体,D为伴随着根状物发生的胚状体;

[0029] 图3为本发明实施例中油茶胚状体发育及植株再生结果图;

[0030] 图中,A为具有子叶的胚状体,B为进一步发育的具有明显子叶的胚状体,C为具有完成根和芽的植株,D为驯化移栽后的小苗。

## 具体实施方式

[0031] 为更好的理解本发明优点与特点,以下结合附图与具体实施例进一步对本发明进行说明,但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0032] 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。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。

[0033] 下述实施例中,无机盐购自国药集团化学试剂有限公司和北京化学试剂公司;2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)、激动素(KT)和维生素购自SIGMA公司;肌醇购自国药集团化学试剂有限公司;蔗糖购自北京北化精细化学品有限责任公司,琼脂粉购自北京振泰科技创新发展中心。

[0034] 实施例

[0035] 实验步骤如下:

[0036] 于7月中旬在湖北麻城顺河镇梅花山村成熟油茶林中选择优良单株茶果,放置4℃冰箱保存,3天内完成消毒接种。

[0037] 在超净工作台无菌条件下,徒手剥去油茶果实果皮,放在75%的酒精中表面消毒2分钟,再用0.1%的HgCl<sub>2</sub>种消毒10分钟,无菌水冲洗4次,剥掉内种皮。在无菌条件下将幼胚切块,每个幼胚切成3-5块,接种于90mm培养皿(愈伤组织诱导培养基)中,每皿接种7-9个外植体。

[0038] 用于诱导愈伤组织的培养基(愈伤组织诱导培养基)为改良的MSB培养基添加植物激素组成,MSB培养基组成为:硝酸钾1.9g/L、硫酸铵1.65g/L、磷酸二氢钾0.17g/L、七水硫酸镁0.37g/L、二水氯化钙0.44g/L、四水硫酸锰22.3mg/L、硼酸6.2mg/L、七水硫酸锌8.6mg/L、碘化钾0.83mg/L、二水钼酸钠0.25mg/L、五水硫酸铜0.025mg/L、六水氯化钴0.025mg/L、乙二胺四乙酸钠37.3mg/L、七水硫酸亚铁27.8mg/L、甘氨酸2mg/L、烟酸1mg/L、盐酸硫胺素10mg/L、盐酸吡哆醇1mg/L、肌醇100mg/L,附加3%(W/V)蔗糖,0.9%(W/V)琼脂,pH为5.8~6.0。此外,添加的两个植物激素组合分别为2,4-二氯苯氧乙酸2.0mg/L和激动素1.0mg/L(2,4-D+KT),以及萘乙酸5.0mg/L和激动素1.0mg/L(NAA+KT)。采用高压蒸汽灭菌、灭菌压力为1.2kg/cm<sup>2</sup>,温度为121℃,灭菌时间为15min。

[0039] 将接种了幼胚的培养皿(愈伤组织诱导培养基)放入28℃的恒温培养箱中进行培养,光照16小时/天,光照强度为2000lux,诱导培养30天后可见明显的愈伤组织形成(图1)。将生长良好的愈伤组织继代至分化培养基(MSB培养基添加1.0mg/LNAA+1.0mg/LKT,pH调至5.8)进行分化调控,继代两次,培养2个月后,可见明显子叶的成熟胚状体和胚性愈伤组织(图2),将出现其胚状体的外植体转入胚状体发育及植株再生培养基(MSB培养基1.0mg/LNAA+3.0mg/L6-BA,pH调至5.8)中继续培养,中间继代1次,培养2个月。直至获得具有明显子叶的胚状体后,转至生根培养基(1/2MS+3.0mg/L6-BA,pH调至5.8)培养1个月(图3)。长出发达根系后进行水培炼苗,驯化后移栽至营养土和蛭石(3:1)混拌的钵中。从取油茶幼胚开始6个月内可以获得完整再生植株,驯化并转移至营养钵内继续生长。以上每处理18皿,重复3次,30d继代一次。按照本方法进行了幼胚组织培养,2,4-D+KT和NAA+KT处理的愈伤组织诱导率分别为83.23%和45.34%;出胚率为15.25%。诱导培养30天后统计愈伤组织诱导率,分化调控培养60天后统计出胚率。本实施例中培养条件均为28℃的恒温培养箱中进行培养,光照16小时/天,光照强度为2000lux以上。

[0040] 愈伤组织诱导率(%) = 形成愈伤组织的花药数/接种花药数 × 100%。

[0041] 结果: 在2,4-D+KT和NAA+KT植物激素组合下的平均愈伤组织诱导率分别为83.23%和45.34%。

[0042] 出胚率(%) = 分化胚状体数/接种愈伤组织数 × 100%。

[0043] 结果: 出胚率为15.25%。

[0044] 正常苗率(%) = 正常苗数/子叶胚数 × 100%。

[0045] 结果: 4个品种在2,4-D+KT和NAA+KT植物激素组合下的平均正常苗率分别为52.18%和72.65%。

[0046] 以上所述, 仅为本发明的较佳实施例, 并非对本发明作任何形式上和实质上的限制, 凡熟悉本专业的技术人员, 在不脱离本发明技术方案范围内, 可利用以上所揭示的技术内容, 作出些许更动、修饰与演变的等同变化, 均为本发明的等效实施例; 同时, 凡依据本发明的实质技术对以上实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变, 均属于本发明的保护范围内。

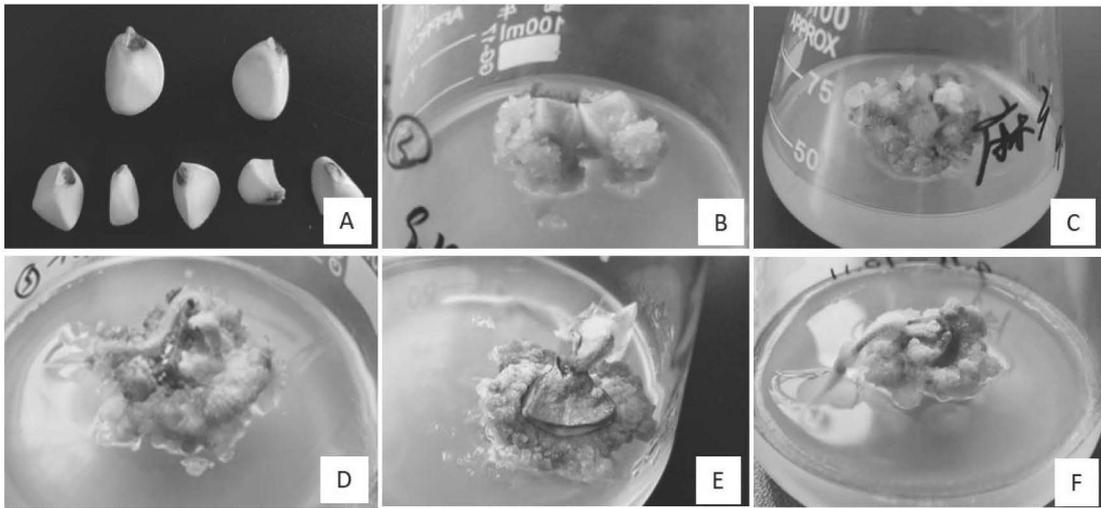


图1

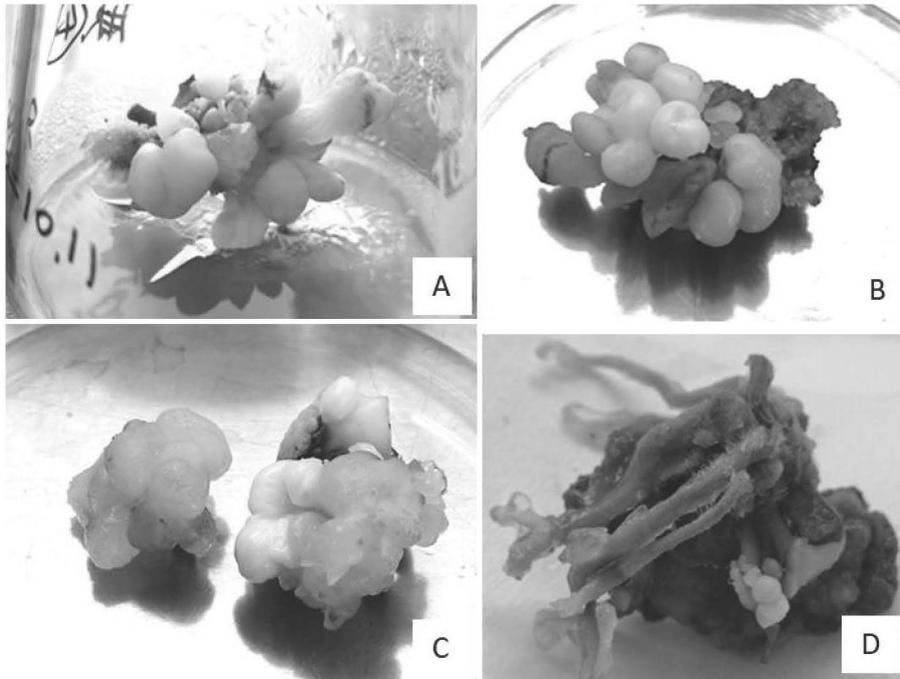


图2

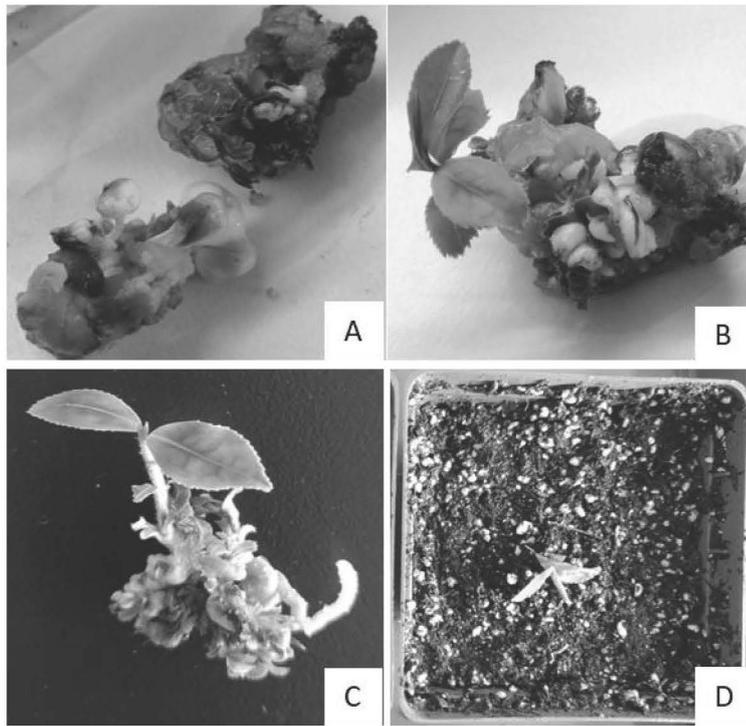


图3