

ICS 65.020
CCS B00/009

T/AHAASS

团 体 标 准

T/AHAASS 017—2025

秋水仙素诱导秋海棠多倍体植株技术规程

Technical code for polyploid plants induced by colchicine in *Begonia grandis* Dryand

2025 - 07 - 21 发布

2025 - 08 - 01 实施

安徽省农学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由安徽农业大学提出。

本文件由安徽省农学会归口。

本文件起草单位：安徽农业大学、合肥华绿种苗有限公司、安徽省农业科学院园艺研究所、安徽省兰君园艺有限公司、合肥璟澜园林绿化有限公司。

本文件主要起草人：高俊山、陈彩霞、曹传取、孟艳、郭宁、高怀军、谢治东、杨翠平、史志话、王吉升、谢光坤、张金云。

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到5.1、5.2、5.5、5.6、6.4、7.3等条款与一种大花海棠染色体加倍的诱导方法相关的专利的使用。

本文件的发布机构对与该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款或条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：安徽农业大学

地址：安徽省合肥市长江西路130号

除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

秋水仙素诱导秋海棠多倍体植株技术规程

1 范围

本文件规定了秋水仙素诱导秋海棠多倍体植株的组培设施和要求、愈伤组织培养、秋水仙素诱导处理、芽分化培养、壮苗培养、生根培养、炼苗和移栽管理、多倍体植株筛选与鉴定、多倍体植株留存、档案记录。

本文件适用于秋水仙素诱导秋海棠愈伤组织进行化学诱变产生多倍体植株。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB 5084 农田灌溉水质标准
- JB/T 10594 日光温室和塑料大棚结构与性能要求
- LY/T 1770 桉树无性系组培快繁技术规程
- LY/T 1882 林木组织培养育苗技术规程
- LY/T 2234 林业机械 林业工厂化育苗 育苗穴盘
- NY/T 496 肥料合理使用准则 通则
- NY/T 2118 蔬菜育苗基质
- NY/T 2306 花卉种苗组培快繁技术规程

3 组培设施和要求

3.1 组培室

包括准备室、储藏室、洗涤室、培养基配制室、灭菌室、接种室、培养室、检测室等。

3.2 温室

玻璃温室（大棚或联栋）或日光温室的结构与性能应符合 JB/T 10594 的规定。要求设施坚固，抗灾能力强，具备环境调控能力，能够调节温度、湿度、光照以及防虫防雨等。

3.3 设备

可按照NY/T 2306的规定配备设备。至少应配备超净工作台、接种器具消毒器、高压蒸汽灭菌锅等灭菌设备和光照培养箱、恒温摇床等培养设备，流式细胞仪、显微镜等实验设备。

3.4 灌溉水

水质要求应符合GB 5084。

3.5 空气环境

空气洁净度需达到万级净化（ISO 5级）以上，防止污染。需定期换气，保持通风，避免二氧化碳浓度过高影响培养效果。

3.6 肥料

肥料使用应符合 NY/T 496 的规定。

4 愈伤组织培养

4.1 培养基配制

4.1.1 基本培养基配制

选择MS基本培养基，其组分及含量参见附录A，表A.1。

4.1.2 诱导培养基配制

诱导培养基配制参见附录A，表A.2。其中MS、6-BA、NAA等母液配制参照NY/T 2306执行。另外，培养基中添加25 g/L蔗糖和7 g/L琼脂，调整pH=5.8。

4.2 培养基消毒

培养基消毒和存放按照LY/T 1770和LY/T 1882相关条款执行。

4.3 外植体选择

从栽种4个月左右的一代实生苗中，选取健康无病虫害的植株，剪取刚展开的嫩叶作为外植体。

4.4 外植体消毒

4.4.1 先用 0.1%的洗衣粉液洗涤后，再用蒸馏水清洗干净，放置于超净工作台上进行消毒处理。

4.4.2 具体消毒操作步骤是：先用无菌水清洗 1 遍，然后倒入含有 1 滴 tween-20 的有效氯浓度为 5%~6% 的消毒液（如 84 消毒液）消毒 8 min，倒掉消毒液，用无菌水漂洗 5 次~8 次，直至澄清无异味备用。

4.5 外植体接种与培养

在超净工作台上将消毒、灭菌好的外植体叶片切成约 1 cm²大小，叶正面朝上，接种到配制好的培养基上，培养25 d左右长出愈伤组织。

4.6 培养条件

保持培养室温度（24±2）℃，光照强度2000 Lx~3000 Lx，空气湿度70%，每天光照16 h，黑暗8 h。

5 秋水仙素诱导处理

5.1 秋水仙素溶液配置

称取0.05 g秋水仙素，用蒸馏水溶解，并定容至100 mL。

5.2 秋水仙素溶液除菌

使用滤膜孔径0.22 μm的过滤器过滤除菌备用。

5.3 秋水仙素废液处理

秋水仙素（剧毒）使用操作及废液处理应遵守安全操作规范，在通风橱中进行，并配戴防护装备，废液采用10%硫代硫酸钠中和处理。

5.4 秋水仙素溶液浸泡方法与时间

在超净工作台内将愈伤组织接入已除菌的秋水仙素溶液中浸泡，避光、置于24±2℃恒温摇床每分钟70转，浸泡处理时间设置4 h。待浸泡时间结束后将愈伤组织取出，用无菌水漂洗5遍，滤纸吸干表面水分。

6 芽分化培养

6.1 培养基

芽分化培养基配制参见附录A，表A.2。

6.2 培养条件

芽分化培养条件按照5.6的要求执行。

6.3 培养方法

秋水仙素诱导处理后的愈伤组织移入芽分化培养基中，每个培养瓶放置4块愈伤组织，观察并记录，40 d左右分化出部分小芽。

7 壮苗培养

7.1 培养基

壮苗培养基配制参见附录A，表A.2。

7.2 培养条件

壮苗培养条件按照5.6的要求执行。

7.3 培养方法

芽分化培养40 d左右，待芽长至0.5 cm~1.0 cm高，用手术刀切除基部大部分愈伤，团块转移。宜将同一块愈伤分化出的芽转入同一培养瓶中，作为同一个株系。培养20 d~25 d，苗高2.0 cm以上，壮苗完成。

8 生根培养

8.1 培养基

生根培养基配制参见附录A，表A.2。

8.2 培养条件

生根培养条件按照5.6的要求执行。

8.3 培养方法

将壮苗后的小苗单株转接到生根培养基中培养30 d~35 d左右，长出须根，做好标记。

9 炼苗和移栽管理

9.1 组培苗炼苗

选择根系发育良好、根系长0.5 cm~1.5 cm的瓶苗，连瓶子一起置于温室内环境中炼苗，并保持温度(25±2)℃、相对空气湿度70%、光照强度3000 Lx的环境条件。炼苗5 d~7 d后揭开瓶盖，继续炼苗3 d~5 d。

9.2 基质配制

育苗基质可参照NY/T 2118的要求配制。宜采用无菌并含有大量有机物的基质；泥炭粗细度宜不高于10 mm，pH值宜控制在5.5~6.5之间；蛭石片径不高于3 mm；珍珠岩宜采用2 mm~4 mm粒径。泥炭、珍珠岩和蛭石配制比例为10:4:3。

9.3 基质消毒

用25%的多菌灵可湿性粉剂500倍液喷施基质，堆积7 d以上再装盘。

9.4 洗苗与移植

将炼苗后的组培幼苗连同培养基一同取出，放在清水中轻轻振动，漂洗干净幼苗根上的培养基，再将幼苗移植于105孔穴盘中（穴盘质量应符合LY/T 2234的要求），并做好标记。

9.5 穴盘苗期管理

9.5.1 幼苗期管理

幼苗期管理具体操作如下：

- 每天宜轻雾喷洒水，每天通风2 h，湿度保持在90%以上；
- 当新叶长出来时，湿度宜逐渐降低至80%左右，此时可以薄施肥，用复合肥（N-P₂O₅-K₂O=15-15-15）水溶液稀释2000倍淋施，每隔7 d~10 d喷施一次；
- 维持25±1 ℃的最佳生长温度，保证植株生长速度；
- 幼苗期光照强度高于8000 Lx时使用遮阳网。

9.5.2 大苗期管理

大苗期管理具体操作如下：

- 加大干湿循环，遵循“干则干透，浇则浇透”的原则进行浇水。干透标准为盘重达到1.0 kg左右，浇透标准为盘重达到2.2 kg左右；
- 加大通风，增加光照。每天宜开启风机2 h~4 h，光照强度维持在8000 Lx~12000 Lx，生长温度宜控制在23 ℃~26 ℃；
- 大约每5 d~10 d施肥一次，采用氮-磷-钾均衡型水溶肥（20-20-20），稀释1600~2000倍；
- 每次施肥后宜喷洒一次1500倍的含噁菌酯的杀菌剂。

10 多倍体植株筛选与鉴定

10.1 形态初选

运用外部形态学进行多倍体植株的初步鉴定时，应按以下步骤操作：

- a) 植株生长期间以野生型植株作为对照样本；
- b) 观察多倍体植株的外部形态，通常表现出以下特征：叶片较宽、较大或有皱褶、叶片变厚变脆、叶片颜色更绿、茎较粗壮，节间变短；花冠明显变大；生长缓慢等。
- c) 对照观察后，淘汰未显现多倍体特征的植株。
- d) 对具有多倍体特征的植株，进行观察、记录、拍照、挂牌标记并接单株编号，准备细胞学鉴定确认。

10.2 多倍体气孔鉴定

运用气孔鉴定法进行多倍体植株鉴定时，应按以下步骤操作：

- a) 撕取待测植株最外层叶片的下表皮，制成临时装片；
- b) 在显微镜下观察气孔，分别测量四倍体和二倍体植株保卫细胞的长度和宽度；
- c) 鉴定特征通常表现为四倍体保卫细胞长度较二倍体增加44%以上，宽度较二倍体增加45%以上。

10.3 多倍体流式细胞仪鉴定

采用流式细胞仪法进行秋海棠染色体倍性鉴定的具体方法、步骤及结果见附录B。

11 多倍体植株留存

11.1 春季栽植在苗圃里，通过田间保存活体植株的方式来保存种质资源。

11.2 根据培育良种、新品种的需要，对留存的多倍体植株进行生物学、形态学观察。

12 档案记录

建立并保持记录2年以上，记录应清晰、完整、详细，至少包括但不限于以下内容：

- 试剂药品档案，包括药品名称、生产厂家、生产日期、购买、存放、出库及使用日期等记录；
- 培养操作管理档案，包括培养基配制、接种室和培养室的使用、外植体选取、灭菌消毒、培养方法、炼苗移栽管理等记录；
- 多倍体鉴定结果，包括形态初筛、气孔鉴定、流式细胞仪鉴定结果记录。

附录 A

(资料性)

MS 基本培养基及培养基配方

MS基本培养基的组分、含量及培养基配制见表A.1，培养基配方见表A.2。

表 A.1 MS 基本培养基的组分、含量及培养基配制

试剂名称	分子式	使用浓度/(mg·L ⁻¹)	母液浓度/(g·L ⁻¹)	配制 1L 培养基
硝酸钾	KNO ₃	1900	19	取 100 mL
硝酸铵	NH ₄ NO ₃	1650	16.5	
磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄	170	1.7	
硫酸镁	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	3.7	
氯化钙	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	4.4	
碘化钾	KI	0.83	0.083	
硼酸	H ₃ BO ₃	6.2	0.62	
硫酸锰	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	2.23	取 10 mL
硫酸锌	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	0.86	
钼酸钠	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.025	
硫酸铜	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.0025	
氯化钴	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0025	
乙二胺四乙酸二钠	Na ₂ ·EDTA	37.25	3.73	取 10 mL
硫酸亚铁	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	2.78	
肌醇	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	10	取 10 mL
甘氨酸	C ₂ H ₅ NO ₂	2	0.2	
盐酸硫胺素 (VB ₁)	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS	0.1	0.01	
盐酸吡哆醇 (VB ₆)	C ₈ H ₁₂ ClNO ₃	0.5	0.05	
烟酸	C ₆ H ₅ NO ₂	0.5	0.05	

表 A.2 培养基配方

试剂名称	分子式	诱导培养基 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	芽分化培养基 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	壮苗培养基 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	生根培养基 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
硝酸钾	KNO_3	1900	1900	1900	950
硝酸铵	NH_4NO_3	1650	1650	1650	825
磷酸二氢钾	KH_2PO_4	170	170	170	85
硫酸镁	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370	185
碘化钾	KI	0.83	0.83	0.83	0.83
硫酸锰	$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	22.3	22.3	22.3
硫酸锌	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6	8.6	8.6
钼酸钠	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25	0.25
硫酸铜	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
氯化钴	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
乙二胺四乙酸二钠	$\text{Na}_2\cdot\text{EDTA}$	37.25	37.25	37.25	37.25
硫酸亚铁	$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	27.85	27.85	27.85
肌醇	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100	100	100	100
甘氨酸	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2	2	2	2
盐酸硫胺素 (VB ₁)	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_8$	0.5	0.5	0.5	0.5
盐酸吡哆醇 (VB ₆)	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$	0.5	0.5	0.5	0.5
烟酸	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.5	0.5	0.5	0.5
6-苄基腺嘌呤 (6-BA)	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$	1.0	1.0	1.0	0
2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$	0.1	0.1	0	0
萘乙酸 (NAA)	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$	0.2	0.2	0.1	1.0

附录 B
(资料性)
流式细胞仪鉴定方法、步骤和结果

B.1 方法要点

用刀片取一定量的叶片，通过细胞解离、提取获得浓度质量较高的细胞核悬浮液。

B.2 操作步骤**B.2.1 解离液配制**

采用Kiwifruit buffer缓冲液解离液制备叶片细胞核悬液 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KCl}$ ， $3.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ HEPES}$ ， $0.3\%(V/V)\text{ Triton X-100}$ ， $1\%\text{ PVP-30}$ ，定容至 100 mL ，用NaOH溶液调制pH 7.5备用。

B.2.2 细胞悬浮液提取方法

B.2.2.1 取 0.1 g 嫩叶片，滴加 2 mL 解离液，快速切碎至糊状。

B.2.2.2 过滤处理，切好的材料分别用 400 目滤膜过滤到 2 mL 的离心管中，紧接着加入解离液至 1.5 mL ，然后置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中 5 min 。

B.2.2.3 取出解离液，置于离心机内， $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 $1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ， 5 min ，离心后弃上清液，加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 解离液与 $60\text{ }\mu\text{L}$ 预冷PI染色液，置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中避光染色 15 min 。

B.2.2.4 利用流式细胞仪检测，将样品移至上样管上机检测，仪器将实验数据传入电脑中。

B.3 结果记录

对照样品为二倍体，二倍体植株(CK)荧光通道在200左右出现峰值；三倍体植株荧光通道在300左右出现峰值；四倍体植株荧光通道在400左右出现峰值。
