



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103477987 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201310422701. X

(22) 申请日 2013. 09. 16

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483 号

(72) 发明人 刘颖 杨跃生 刘振兰 庄楚雄  
李静 惠文凯 彭昌操 陈晓阳

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102

代理人 任重

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

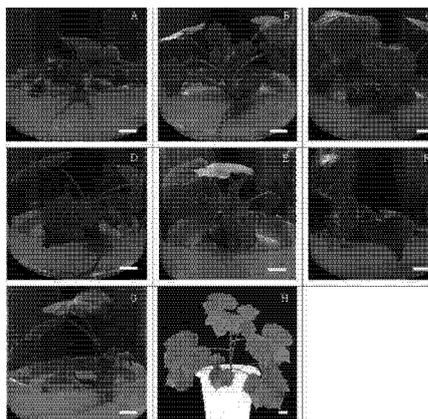
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法

(57) 摘要

本发明涉及植物生物技术领域,具体地,公开了一种促进麻疯树不定芽芽体生根的方法。本发明主要是在诱导再生不定芽芽条生根的培养基中添加一定浓度的 L- 谷氨酰胺,由此可以促进芽条生根。应用本发明可以显著提高再生不定芽芽条生根的效率和再生不定根的质量,快速获得生长状态良好的不定根,缩短生根培养的周期(最快只需 10 天),使麻疯树相关生物技术育种的工作效率得到相应的大幅度的提高。



1. 一种促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,其特征在于,将不定芽芽条接种在含有 4 ~ 32 mg/L L- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 10 ~ 40 天。

2. 根据权利要求 1 所述促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,其特征在于,将不定芽芽条接种在含有 8 ~ 32 mg/L L- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 10 ~ 40 天。

3. 根据权利要求 2 所述促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,其特征在于,将不定芽芽条接种在含有 16 mg/L L- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 10 天或将不定芽芽条接种在含有 8 ~ 32 mg/L L- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 20 ~ 40 天。

4. 根据权利要求 3 所述促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,其特征在于,将不定芽芽条接种在含有 16 mg/L L- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 10 ~ 40 天。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,其特征在于,所述接种的方式为竖插方式,即使芽条的中轴与培养基表面相垂直,芽条的形态学下端插入培养基中的深度为 0.2 ~ 0.4 cm。

6. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,其特征在于,所述培养的条件为光照强度为 2000 ~ 2500 lx,光照时间为 12 ~ 16 小时 / 天,培养温度为  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

7. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,其特征在于,所述不定芽芽条的获取方法为:选取长度大于 1 cm 且至少有 2 个伸展叶片的不定芽的外植体,将伸长的再生不定芽进行横向切割,切割的方向与伸长的再生不定芽的中轴相垂直,切口要平齐,切去其他部分,获取长度约为 1 cm 的不定芽芽条。

8. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,其特征在于,所述生根培养基还含有 0.3 mg/L 吲哚丁酸,30 g/L 蔗糖,100 mg/L 肌醇,5 g/L 琼脂和大量元素减半的 MS 培养基成分。

## 一种促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域,具体地,涉及一种促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法。

### 背景技术

[0002] 伴随着全球对化石燃料的需求日益增长,存储的化石燃料即将耗尽,人们越来越关注可再生的生物柴油。在可产生生物柴油的候选植物中,属于大戟科的麻疯树(*Jatropha curcas* L.)具有明显的优势,它的种子含油量高,种仁含油量可达40%~60%,同时,麻疯树油中含有活性成分多,如毒蛋白、麻疯酮等有着重要的农药和医药价值。

[0003] 然而,大力推广麻疯树的种植却面临一系列问题,虽然麻疯树种子中含油量高,但种子产量不高;种油中活性成分多,但仍需要改变油的成分才能直接替代化石燃料;麻疯树对环境要求较高,耐寒能力弱,分布区域较窄。麻疯树属包括175个种,可以通过种间杂交引入优良性状,但所需周期长,不能够获得特异的外源基因,故主要通过基因转化改变遗传背景。高频率的植株再生体系是基因转化的基础。

[0004] 利用组织培养技术对植物进行再生或再生克隆,通常包含两个关键步骤。第一步是从外植体诱导产生不定芽。第二步是促使不定芽芽条生根,以备移栽。对于麻疯树,现有技术中已有很多报道研究其外植体诱导产生不定芽;而至于如何促使这些不定芽芽条良好生根,则很少有人研究。

[0005] 现有技术中,迄今为止已建立起来的诱导麻疯树再生不定芽芽条生根的方法一般都是在生根培养基中不添加激素或者只添加一定浓度的生长素,现有方法存在生根效率低、再生不定根的质量较差、所获得再生植株生长状态不佳、整个培养周期较长等缺点,难以满足实际应用的需要。

[0006] L-谷氨酰胺是一种条件必需性氨基酸,在生命活动中起着重要作用。它是构成蛋白质的氨基酸,又是合成含氮生物物质的氮源,与组织生长和修补有着密切的关系。在不同组织中谷氨酰胺具有不同的代谢作用,起着重要的生理作用。目前仅有一篇论文报道称,L-谷氨酰胺对石斛兰的生根有负面影响,在培养基中添加16mg/L的谷氨酰胺对石斛兰的生根和生长起抑制作用。

### 发明内容

[0007] 本发明为了克服现有技术麻疯树不定芽芽条生根率低、生根质量差、培养周期长的缺陷,提供一种促进麻疯树不定芽芽条生根的方法。采用本方法可以在较短时间内就使得再生不定芽芽条的生根率达到较高值,因此可显著缩短再生培养周期;同时减少了生根过程中常见的再生植株叶片发黄现象,提高了所获得再生植株的质量,使麻疯树相关生物技术育种的工作效率得到相应的大幅度的提高。

[0008] 本发明通过以下技术方案予以实现上述目的:

[0009] 一种促进麻疯树再生不定芽芽条生根的方法,将不定芽芽条接种在含有4~

32mg/LL- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 10 ~ 40 天。

[0010] 所述 L- 谷氨酰胺母液的配制方法为 : 准确称取一定量的 L- 谷氨酰胺粉末, 用去离子水充分溶解后, 再用去离子水定容, 配制成 2mg/mL 的 L- 谷氨酰胺母液。使用前用 0.22 微米的水系滤膜对已配制好的 L- 谷氨酰胺母液进行过滤灭菌。使用时, 再通过加入无菌水将 L- 谷氨酰胺母液配置成 4、8、16、32、64、128mg/L 的 L- 谷氨酰胺工作液。

[0011] 所述不定芽芽条的获取方法为 : 从培养瓶中取出具有长度大于 1cm 且至少有 2 个伸展叶片的不定芽的外植体, 用灭过菌的手术刀对伸长的再生不定芽进行横向切割(切割的方向与伸长的再生不定芽的中轴相垂直, 切口要平齐), 切去其他部分, 获取长度约为 1cm 的不定芽芽条。

[0012] 优选地, 将不定芽芽条接种在含有 8 ~ 32mg/LL- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 10 ~ 40 天。

[0013] 更优选地, 将不定芽芽条接种在含有 16mg/LL- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 10 天或将不定芽芽条接种在含有 8 ~ 32mg/LL- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 20 ~ 40 天。

[0014] 最优选地, 将不定芽芽条接种在含有 16mg/LL- 谷氨酰胺的生根培养基上培养 10 ~ 40 天。

[0015] 优选地, 所述接种的方式为竖插方式, 即使芽条的中轴与培养基表面相垂直, 芽条的形态学下端插入培养基中的深度为 0.2 ~ 0.4cm。

[0016] 优选地, 所述培养的条件为光照强度为 2000 ~ 2500lx, 光照时间为 12 ~ 16 小时 / 天, 培养温度为 25 ± 1℃。

[0017] 优选地, 所述生根培养基还含有 0.3mg/L 吡啶丁酸, 30g/L 蔗糖, 100mg/L 肌醇, 5g/L 琼脂和大量元素减半的 MS 培养基成分。

[0018] 本发明的有益效果 :

[0019] 本发明主要是改变了传统诱导麻疯树再生不定芽芽条生根的方法, 即在诱导不定根再生的培养基中添加一定浓度的 L- 谷氨酰胺, 由此促使部分细胞以更高的效率直接再分化形成更多的不定根。此外, 采用本方法可以在较短时间内就使得再生不定芽芽条的生根率达到较高值, 因此可显著缩短再生培养周期 ; 同时减少了生根过程中常见的再生植株叶片发黄现象, 提高了所获得再生植株的质量, 使麻疯树相关生物技术育种的工作效率得到相应的大幅度的提高。

[0020] 说明书附图

[0021] 图 1. 麻疯树再生不定芽芽条在 6 种常见的传统生根培养基中进行不定根诱导培养 30 天后的效果 ; A: MS; B: 1/2MS; C: 1/2MS+1mg/LIBA+1mg/LIAA+2mg/LNAA; D: 1/2MS+1mg/LNAA; E: 1/2MS+1mg/LIAA; F: 1/2MS+1mg/LIBA (bar=1cm)。

[0022] 图 2. 不同浓度 L- 谷氨酰胺对麻疯树再生不定芽芽条生根的作用效果与再生植株生长的效果 ; A: 0mg/L; B: 4mg/L; C: 8mg/L; D: 16mg/L; E: 32mg/L; F: 64mg/L; G: 128mg/LL- 谷氨酰胺的生根培养基中培养 30d 后的生根效果图 ; H: 再生植株在土壤中继续生长的效果图 (bar=1cm)。

[0023] 图 3. 麻疯树再生不定芽芽条在添加 16mg/LL- 谷氨酰胺的生根培养基中不同培养时间下的生根效果与再生植株生长的效果 ; A 和 E: 10d; B: 20d; C: 30d; D, F 和 G: 40d 后的生根效果图 ; H: 再生植株在土壤中继续生长的效果图 (bar=1cm)。

[0024] 图 4. 麻疯树再生不定芽芽条在添加了 L- 谷氨酰胺的生根培养基中培养 10 天后的效果 ;A:8mg/LL- 谷氨酰胺 ;B:16mg/LL- 谷氨酰胺 ;C:32mg/LL- 谷氨酰胺 (bar=1cm)。

### 具体实施方式

[0025] 下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明。除非特别说明,实施例中采用的试剂和方法为本领域常规使用的试剂和方法。

[0026] 实施例 1

[0027] 采用传统方法诱导麻疯树再生不定芽芽条生根的效果

[0028] S1. 再生不定芽芽条的获取 :从培养瓶中取出具有长度大于 1cm 且至少有 2 个伸展叶片的不定芽的外植体,用灭过菌的手术刀对伸长的再生不定芽进行横向切割(切割的方向与伸长的再生不定芽的中轴相垂直,切口要平齐),切去其他部分,获取长度约为 1cm 的不定芽芽条。

[0029] S2. 将 S1 获取的芽条以竖插方式(使芽条的中轴与培养基表面相垂直,芽条的形态学下端插入培养基中的深度为 0.2 ~ 0.4cm。)接种至 6 种传统生根培养基上培养 30 天,所获得实验结果如表 1 和图 1 所示。

[0030] 表 1 采用传统方法诱导麻疯树再生不定芽芽条生根的效果

[0031]

培养基	生根率 (%)	平均每个芽条上的根数 (条)	平均根长 (cm)
MS	0c	0c	0c
1/2 MS	0c	0c	0c
1/2 MS+1 mg/l IBA+1 mg/l IAA+2 mg/l NAA	0c	0c	0c
1/2 MS +1 mg/l NAA	6.60±2.54b	1.50±0.50b	1.03±0.18b
1/2MS+1 mg/l IAA	8.51±3.05b	1.67±0.76ab	1.37±0.49b
1/2 MS +1 mg/l IBA	16.10±3.78a	2.58±0.38a	2.15±0.51a

[0032] 注 :数据采用 SPSSStatistics17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较 ( $P \leq 0.05$ ),数据后字母不同表示处理间差异显著。生根率 (%) = (再生出不定根的外植体数 / 总外植体数) × 100% ;平均每个外植体的根数 (条) = 再生不定根总数 / 再生出不定根的外植体数 ;平均根长 (cm) = 再生不定根长度的平均值。

[0033] 从表 1 可知,在 6 种诱导芽条生根培养基中,生根效果最好的是添加了 1mg/LIBA 的 1/2MS 培养基,芽条在这种培养基上培养 30 天后,其生根率为 16.10%,平均每个芽条上的根数为 2.58 条,平均根长为 2.51cm ;芽条在无激素培养基 (MS 和 1/2MS) 和添加三种不同生长素的培养基 (1/2MS+1mg/LIBA+1mg/LIAA+2mg/LNAA) 中都不能产生不定根,说明生长素可能是诱导芽条生根所必需的,但是添加的量过高也会显著抑制芽条的生根。在实验过程中还发现,采用传统方法诱导麻疯树再生不定芽芽条生根后所获得完整植株上的叶片容易发黄甚至脱落。总之,采用传统方法诱导麻疯树再生不定芽芽条生根的效果不佳,存在生根率较低,生根质量较差,难以获得生长状态良好的再生植株。

[0034] 实施例 2

[0035] 采用在培养基中添加 L- 谷氨酰胺的方法来促进麻疯树再生不定芽芽条生根的效果

[0036] S1. 再生不定芽芽条的获取 :从培养瓶中取出具有长度大于 1cm 且至少有 2 个伸展叶片的不定芽的外植体,用灭过菌的手术刀对伸长的再生不定芽进行横向切割(切割的方向与伸长的再生不定芽的中轴相垂直,切口要平齐),切去其他部分,获取长度约为 1cm 的不定芽芽条。

[0037] S2. 将 S1 获取的芽条以竖插方式(使芽条的中轴与培养基表面相垂直,芽条的形态学下端插入培养基中的深度为 0.2 ~ 0.4cm。)接种至添加了 0、4、8、16、32、64、128mg/L L- 谷氨酰胺的生根培养基(大量元素减半的 MS 配方成分 +30g/L 蔗糖 +100mg/L 肌醇 +0.3mg/L IBA+5g/L 琼脂;pH5.8 ~ 6.0。)上培养,在 10、20、30、40 天时分别统计再生不定芽芽条生根的情况,所获得实验结果如表 2、图 2、图 3 和图 4 所示。

[0038] 表 2 L- 谷氨酰胺诱导麻疯树再生不定芽芽条生根的效果

[0039]

时间(天)	L-谷氨酰胺浓度(mg/L)	生根率(%)	平均每个芽条上的根数(条)	平均根长(cm)
10	0	8.69±2.73d	1.33±0.28c	0.67±0.19b
	4	9.99±1.46d	1.50±0.50bc	0.70±0.14b
	8	25.36±1.76b	2.13±0.23a	0.93±0.26b
	16	30.93±3.49a	2.25±0.22a	1.36±0.18a
	32	23.52±1.65c	1.89±0.28ab	1.30±0.15a
	64	10.67±1.60d	1.11±0.19c	0.86±0.09b
	128	8.12±2.51d	1.17±0.29c	0.63±0.12b
20	0	17.49±2.22c	3.58±0.52cd	1.64±0.19c
	4	18.23±3.49c	3.47±0.21d	1.61±0.09c
	8	34.22±2.94ab	4.43±0.49b	2.43±0.24b
	16	38.38±2.10a	5.41±0.53a	2.90±0.34a

[0040]

	32	32.37±1.67b	4.33±0.36bc	2.48±0.17b
	64	16.90±2.03c	3.17±0.52d	2.37±0.21b
	128	11.54±3.08d	1.72±0.25e	1.62±0.23c
30	0	21.09±1.11d	4.33±0.52c	3.37±0.32b
	4	28.12±3.30c	4.51±0.31c	3.54±0.27b
	8	35.80±3.47b	5.50±0.13b	3.62±0.20b
	16	50.06±2.09a	6.41±0.44a	4.81±0.42a
	32	39.77±4.36b	5.59±0.69b	4.58±0.29a
	64	20.16±3.58d	3.94±0.34c	3.64±0.41b
	128	13.05±2.29e	1.89±0.19d	2.26±0.31c
40	0	22.76±2.03d	4.67±0.50cd	3.72±0.46c
	4	30.90±2.84c	5.14±0.24bc	3.78±0.39c
	8	38.53±1.31b	5.70±0.26b	4.21±0.33bc
	16	51.72±3.52a	6.61±0.48a	5.36±0.38a
	32	41.22±1.90b	5.92±0.63ab	4.75±0.31ab
	64	21.55±2.00d	4.17±0.49d	3.81±0.49c
	128	14.81±1.09e	2.11±0.38e	2.31±0.29d

[0041] 注:数据采用 SPSSStatistics17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较 ( $P \leq 0.05$ ),数据后字母不同表示处理间差异显著。生根率(%)=(再生出不定根的外植体数/总外植体数) $\times 100\%$ ;平均每个外植体的根数(条)=再生不定根总数/再生出不定根的外植体数;平均根长(cm)=再生不定根长度的平均值。

[0042] 从表 2 可知,在未添加 L-谷氨酰胺的生根培养基中,诱导芽条生根的效果较差,培养 40 天时生根率为最高,为 22.76%;而在添加 L-谷氨酰胺的生根培养基中,随着添加的 L-谷氨酰胺的浓度提高,芽条的生根率先增加,到 16mg/L 时,芽条的生根效果最佳,生根率最高为 51.72%,平均每个芽条上的根数最多为 6.61 条,平均根长最长为 5.36cm,继续提高 L-谷氨酰胺的浓度,芽条的生根效果变差,生根率降低,到 128mg/L 时,生根率最高仅为 14.81%,平均每个芽条上的根数最多为 2.11 条,平均根长最长为 2.31cm。总之,在培养基中添加 L-谷氨酰胺的浓度太低或者太高都将不利于芽条的不定根再生,适宜的浓度为 16mg/l。

[0043] 从表 2 还可知,培养时间为 10 天时,芽条在添加了 8~32mg/LL-谷氨酰胺的生根培养基中的生根率就已经达 23.52~30.93%,尤其是在添加了 16mg/LL-谷氨酰胺的生根培

培养基中芽条的生根效果最佳,生根率为最大值,为 30.93%,平均每个芽条上的根数为 2.25 条,平均根长为 1.36cm;而此时芽条在未添加的 L-谷氨酰胺的生根培养基中的生根效果不佳,生根率仅为 8.69%,平均每个芽条上的根数为 1.33 条,平均根长为 0.67cm。随着培养时间的延长,芽条的生根率也是增加的,虽然培养 40 天时芽条的生根率均达最大值,但是培养 30 天时芽条的生根率与 40 天时的生根率没有显著差异,因此培养时间以 30 天为宜。

[0044] 另外,对于那些没有生根的芽条,用灭过菌的手术刀对芽条进行横向切割(切割的方向与芽条的中轴相垂直,切口要平齐),切去其形态学下端一部分(0.1~0.2cm),将其重新接种至添加了 16mg/LL-谷氨酰胺的生根培养基上进行再次生根培养,这样可以提高芽条的利用效率,增加完整的再生植株的数量。

[0045] 从实施例 1 和实施例 2 可知:采用传统方法对麻疯树再生不定芽芽条进行不定根诱导时,对芽条的质量要求较高,一般是要求芽条的长度至少达到 2cm,且至少带有 4 个叶片,这在一定程度上减少了可以用于进行生根培养的芽条的数量,因而会减少获得完整再生植株的数量;而采用在生根培养基中添加适宜浓度的 L-谷氨酰胺的方法可以促使质量较差(如芽条长度约为 1cm,只带有 2~3 个叶片)的芽条生根,这在一定程度上提高了可以用于生根培养的再生不定芽芽条的利用效率,最终可以增加获得的完整再生植株的数量,如果将此方法应用于麻疯树的遗传转化,将可能会提高获得完整转化苗的效率。同时,在实验过程中可以发现,添加了适宜浓度 L-谷氨酰胺的实验组中的芽条培养 30 天后,不仅生根效果良好,所获得再生植株的生长状态也良好,叶片鲜绿,不易发黄。

[0046] 众所周知,诱导再生不定芽生根对于建立与完善一个好的再生体系有着至关重要的意义,因为如果仅仅可以获得再生不定芽,却不能诱导其生根,将不能获得独立生活的植株。

[0047] 综上所述,由表 1 和表 2 中的数据可知,麻疯树再生不定芽芽条在添加 16mg/LL 谷氨酰胺的培养基中的生根效果显著优于采用传统方法的生根效果,同时在较短时间内(10 天)就可以达到较好的生根效果(生根率最高为 30.93%),最后还可以获得生长状态也良好的完整再生植株。

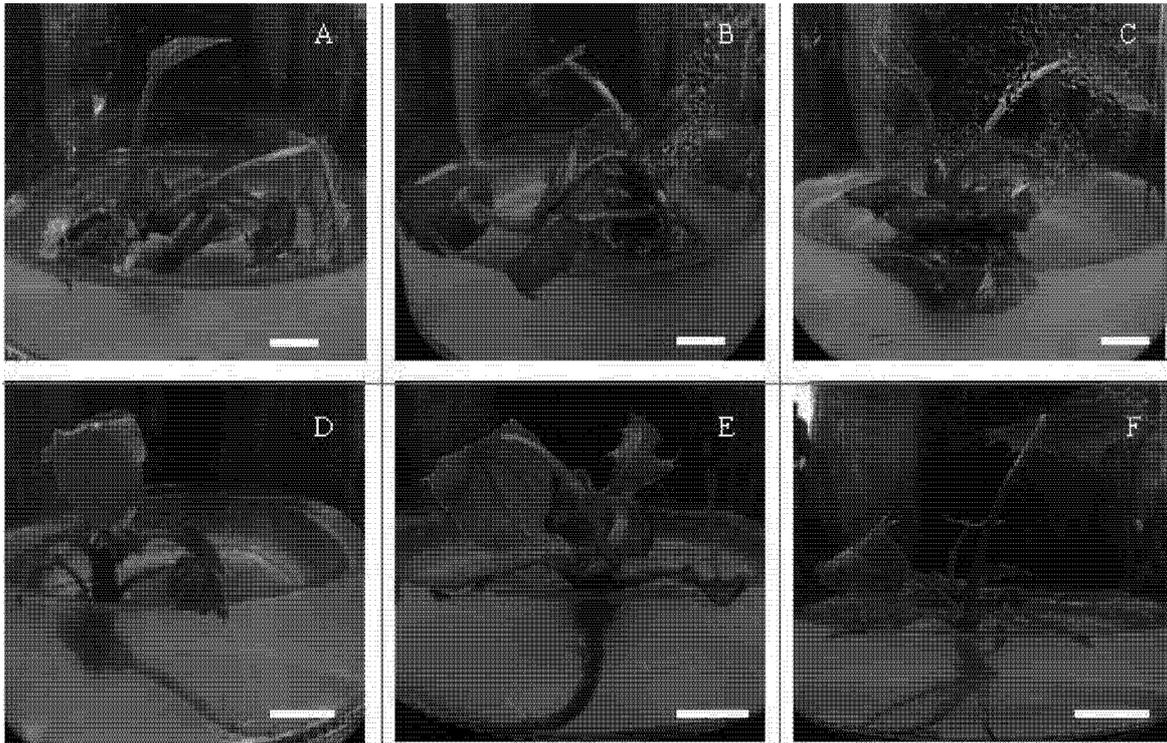


图 1

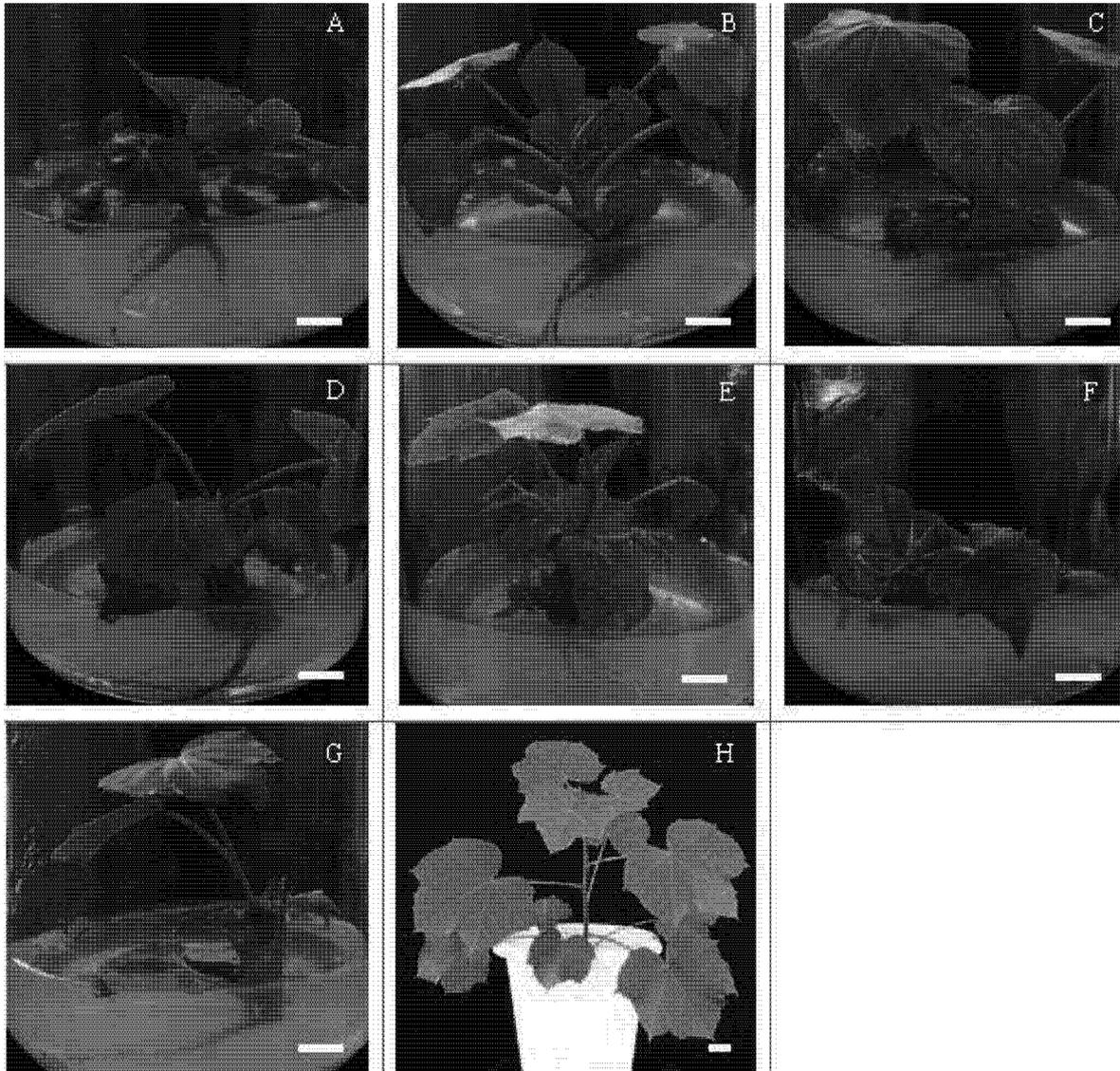


图 2

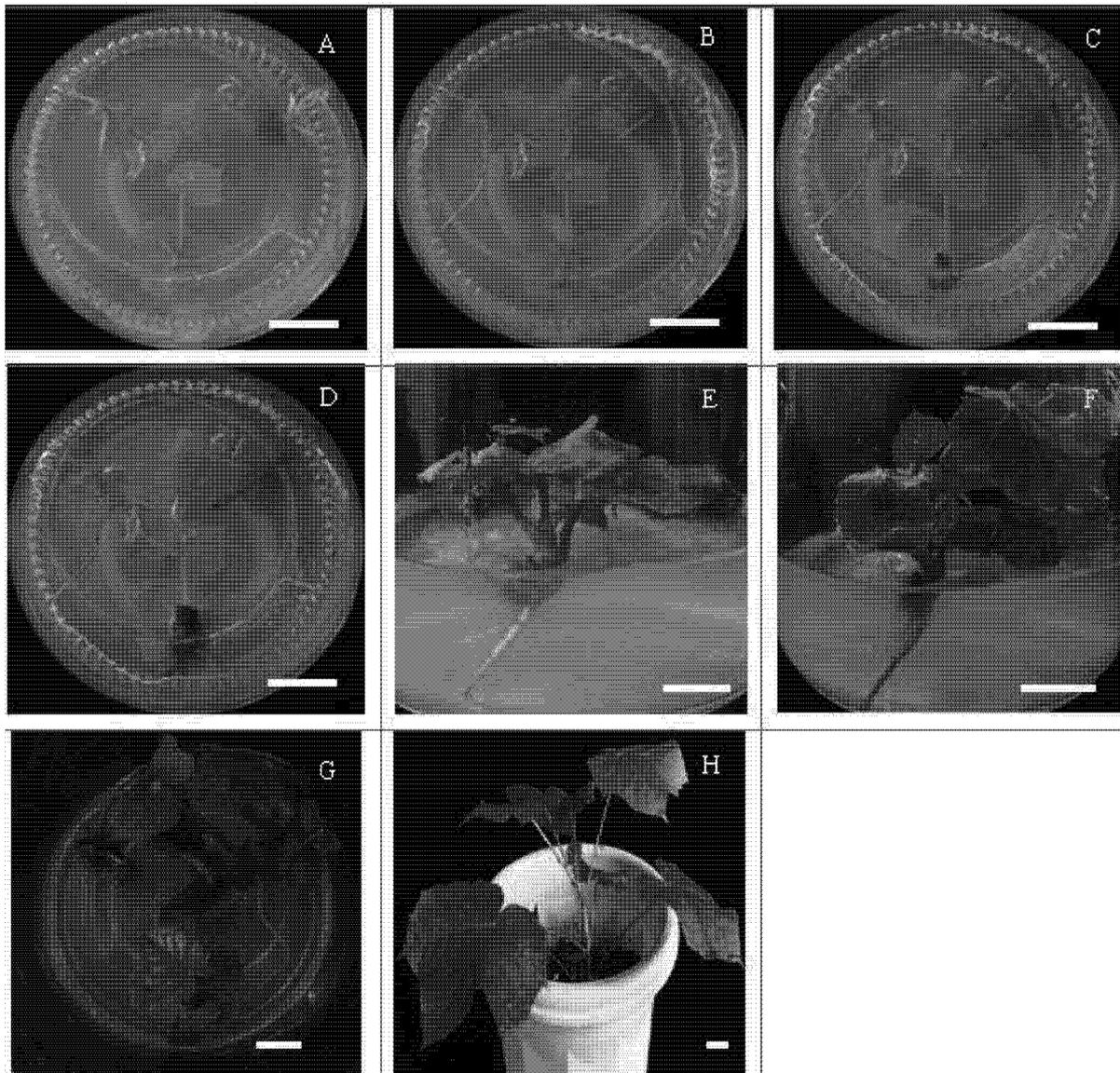


图 3

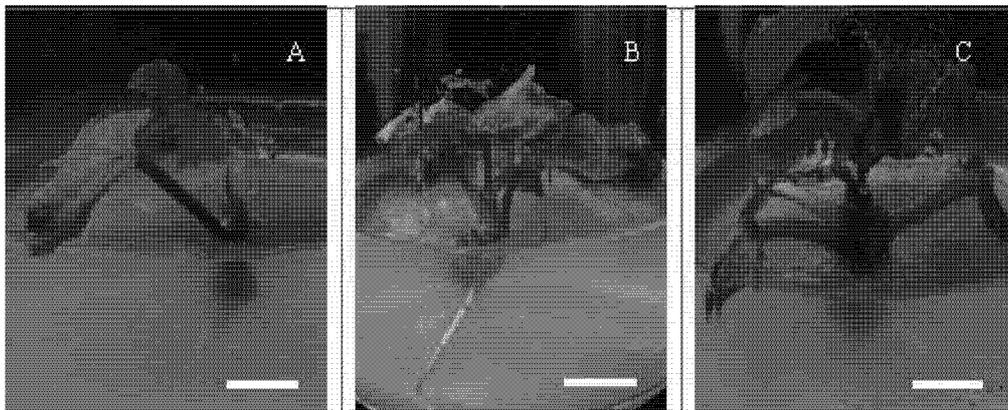


图 4