(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103283592 B
(45)授权公告日 2014.11.12

(21)申请号 201310133492.7

(22)申请日 2013.04.17

(73)专利权人 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 冯琪 郭丹丹 杨柳贤 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 谢敏楠

(51)Int.Cl.
A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 100407903 C,2008.08.06,
CN 101574058 A,2009.11.11,
CN 102524064 A,2012.07.04,
EP 1817956 A2,2007.08.15,
WO 2011021211 A2,2011.02.24,
N. Kumar & M.P. Reddy. "Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of Jatropha curcas: a biofuel plant".《Annals of Applied Biology》.2010,第156卷第367-375页.

审查员 杜玉娟

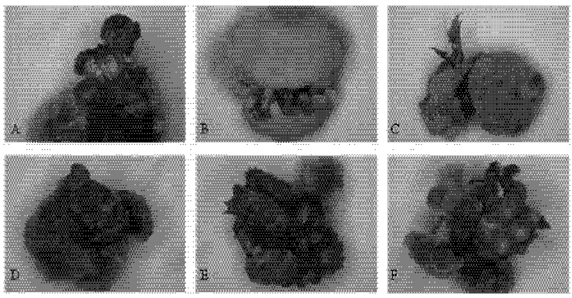
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法

(57)摘要

本发明属于植物生物技术领域,具体地,公开了一种麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法。所述方法改变了传统的麻疯树叶柄外植体再生不定芽的方法,即在诱导不定芽再生的培养基中不添加激素,而是利用高浓度的苯基噻二唑基脲溶液对麻疯树叶柄外植体进行短期浸泡处理,给予外植体细胞短期但高强度的激素刺激,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芽。应用本发明所述方法可以显著提高麻疯树叶柄外植体不定芽的再生效率和质量。此外,本方法外植体无需经过常规的愈伤组织形成和不定芽增殖阶段,因此可显著缩短再生培养周期,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. 一种麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法，其特征在于，包括如下步骤：S1. 取麻疯树叶柄进行切割获取叶柄外植体；S2. 将步骤 S1 中的叶柄外植体用苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理 3~80min；S3. 将步骤 S2 处理后的叶柄外植体接种至无激素的培养基上培养；S2 中所述苯基噻二唑基脲溶液浓度为 0.5~12 mg/L；

S3 所述的无激素的培养基以无激素的 MS 培养基为主要成分，还包括 25~35g/L 蔗糖、80~120mg/L 肌醇和 6~8g/L 琼脂；培养基 pH 为 5.8~6.0。

2. 根据权利要求 1 所述麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法，其特征在于，所述苯基噻二唑基脲溶液浓度为 2~6 mg/L。

3. 根据权利要求 2 所述麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法，其特征在于，所述苯基噻二唑基脲溶液浓度为 2 mg/L。

4. 根据权利要求 1 所述麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法，其特征在于，所述浸泡处理的时间为 4~20min。

5. 根据权利要求 1 所述麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法，其特征在于，S3 中所述接种的方式为横放方式，即使叶柄外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直。

6. 根据权利要求 1 所述麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法，其特征在于，S3 中所述培养的条件为：光照强度为 2000 ~2500lx，光照时间为 12~16 小时 / 天，培养温度为 25±1℃。

一种麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域，具体地，涉及一种麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法。

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（*Jatroha 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] 在以麻疯树叶柄作为外植体诱导不定芽再生时，通常是在麻疯树叶柄外植体不定芽再生培养基中添加细胞分裂素，而最常用的细胞分裂素为 6- 苄氨基腺嘌呤（6-BA），浓度为 1~2 mg/L；6- 糠氨基嘌呤（6-KT），浓度为 0.1~1.0 mg/L 或苯基噻二唑基脲（TDZ），浓度为 0.05~0.5mg/L。在这种条件下叶柄外植体的不定芽再生效率很低，芽体的质量也较差。同时，这些再生体系均存在周期长（80 天以上）、再生率不高的问题，严重制约了麻疯树遗传转化研究的开展。

发明内容

[0005] 本发明为了克服现有技术麻疯叶柄树外植体再生不定芽时再生率低、再生芽体质量差、再生周期长的缺陷，提供一种麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法。所述方法简便，可以显著缩短整个培养周期，而且通过所述的方法可以得到数量更多、质量更好的不定芽。

[0006] 本发明通过以下技术方案予以实现上述目的：

[0007] 一种麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法，包括如下步骤：

[0008] S1. 取麻疯树叶柄进行切割获取叶柄外植体；

[0009] S2. 将步骤 S1 中的叶柄外植体用苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理；

[0010] S3. 将步骤 S2 处理后的叶柄外植体接种至无激素的培养基上培养。

[0011] 优选地，步骤 S2 中所述苯基噻二唑基脲（TDZ）溶液浓度为 0.5~12 mg/L。

[0012] 更为优选地，所述苯基噻二唑基脲（TDZ）溶液浓度为 2~6 mg/L。

[0013] 最优选地，所述苯基噻二唑基脲（TDZ）溶液浓度为 2 mg/L。

[0014] 步骤 S2 的 TDZ 溶液采用一般方法配制成所需即可，具体地，可以采用如下方法配制：称取一定量的 TDZ 粉末，用 1N NaOH 充分溶解，再用去离子水定容，采用 1 N HCl 溶液

调整 TDZ 处理溶液的 pH 至 5.8~6.0；使用前用 0.22 微米的水系滤膜对已配制好的 TDZ 处理溶液进行过滤灭菌。

[0015] 优选地，S2 中所述浸泡处理的时间为 3~80 min。

[0016] 更为优选地，所述浸泡处理的时间为 4~20 min。

[0017] 最优选地，，所述浸泡处理的时间为 5 min。

[0018] 优选地，步骤 S3 中所述接种的方式为横放方式，即使叶柄外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直。

[0019] 优选地，步骤 S3 中所述培养的条件为：光照强度为 2000~2500 lx，光照时间为 12~16 小时 / 天，培养温度为 25±1℃。

[0020] 本发明的创造点在于先用高浓度的激素短暂处理，再用无激素的培养基培养再生不定芽，无激素培养基的种类对本发明来说不是着重点，只要是不含激素，而且能够为不定芽的再生提供充足营养成分的培养基都可以实现本发明。优选地，本发明步骤 S3 中所述无激素的培养基以无激素的 MS 培养基为主要成分。另外，所述无激素的培养基还含有 25~35 g/L 蔗糖、80~120 mg/L 肌醇和 6~8 g/L 琼脂；培养基 pH 为 5.8~6.0。所述培养基并不限定本发明的保护范围。

[0021] 传统麻疯树叶柄外植体不定芽再生培养方法之所以存在不定芽再生效率很低，芽体的质量差、周期长的缺陷，首先是因为长时间培养外植体不能够用高浓度的细胞分裂素，因为长期高浓度激素培养外植体将导致外植体受伤甚至死亡，而低浓度的细胞分裂素的刺激不定芽再生的作用又不够强。其次是在不定芽形成以后残存在培养基和外植体组织中的细胞分裂素对不定芽的进一步生长有十分不利的影响

[0022] 本发明对通常的麻疯树叶柄外植体不定芽再生培养方法进行了创新，即在诱导叶柄不定芽的再生培养基中都不添加 TDZ，取而代之的是利用高浓度的 TDZ 溶液对麻疯树叶柄外植体进行短期的浸泡处理，给予外植体具有分化能力的细胞相对于普通添加 TDZ 的培养基更强的刺激，诱导形成更多的不定芽。同时，由于仅是局部短时的浸泡处理，TDZ 在细胞中的浓度随后很快降低，减少了在培养后期对所形成的不定芽的发育的负面影响，可以达到一次培养操作就可以得到完整植株的高效目的。

[0023] 本发明的有益效果：

[0024] 本发明所述的麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法简便，可以显著缩短整个培养周期，传统方法的再生周期为 80 天以上，而本方法只需 70 天；通过本发明所述的麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的方法可以得到数量更多、质量更好的不定芽，现有方法的不定芽再生率一般为 16.08 %~55.11 %，而采用本发明的方法的不定芽再生率为 38.81 %~64.44 %。

[0025] 说明书附图

[0026] 图 1. 不同浓度的 TDZ 溶液处理叶柄外植体 5 分钟后不定芽再生的效果；A. 0.5 mg/L；B. 1 mg/L；C. 2 mg/L；D. 3 mg/L；E. 6 mg/L；F. 12 mg/L。

[0027] 图 2. 叶柄外植体两种接种方式的不定芽再生效果；A、C. 横放；B、D. 竖插。

具体实施方式

[0028] 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。

[0029] 实施例 1：

[0030] S1. 对外植体进行短期细胞分裂素溶液处理的容器的准备

[0031] 选取直径为 9 cm 的有盖培养皿，置于高压蒸汽灭菌锅中，在 121℃，0.1 MPa 的条件下灭菌 20 分钟。

[0032] S2. 苯基噻二唑基脲（TDZ）处理溶液的配制。

[0033] 准确称取一定量的 TDZ 粉末，用 1 N NaOH 溶液充分溶解，再用去离子水定容，配制成 0、0.5、1、2、3、6、12 mg/L 的 TDZ 处理溶液。采用 1 N HCl 溶液调整 TDZ 处理溶液的 pH 至 5.8~6.0；使用前用 0.22 微米的水系滤膜对已配制好的 TDZ 处理溶液进行过滤灭菌。

[0034] S3. 麻疯树叶柄的表面灭菌与叶柄外植体的获取

[0035] 用剪刀从一株成年树龄的麻疯树上剪取靠近茎顶端长度相似的叶柄若干个，自来水冲洗所采叶柄 30 分钟后，在超净工作台上把所有的叶柄置于一个容量为 1000 ml 的玻璃烧杯中，向该烧杯中加入 75 % 乙醇溶液至浸没所有的叶柄为止，1 分钟后，倒掉乙醇溶液，保留叶柄；再向该烧杯中加入 2 % 次氯酸钠溶液至浸没所有的叶柄为止，20 分钟后，倒掉次氯酸钠溶液，保留叶柄；再向该烧杯中加入无菌蒸馏水至浸没所有的叶柄为止，漂洗叶柄 2 分钟后，倒掉蒸馏水，保留叶柄。用无菌水漂洗叶柄 5 次后，用灭过菌的镊子把所有的叶柄放置在无菌吸水纸上，待叶柄表面干燥后，用灭过菌的手术刀对叶柄进行切割，获取长度为 0.5 cm 的叶柄切段作为外植体。

[0036] S4. 细胞分裂素（TDZ）溶液处理麻疯树叶柄外植体

[0037] 在超净工作台中，把切好的叶柄外植体分别置于上述步骤 S1 准备好的灭过菌的培养皿中，向各个培养皿中分别倒入上述步骤 S2 配置的各个浓度的 TDZ 处理溶液至浸没叶柄外植体为止，盖上培养皿盖，静置 5 分钟后，倒掉 TDZ 溶液，保留叶柄，用灭过菌的镊子从培养皿中取出所有的叶柄外植体，放置在无菌吸水纸上，吸去叶柄外植体表面多余的水分，每个浓度的 TDZ 溶液分别有 3 个平行处理。

[0038] S5. 麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的培养

[0039] 把经过细胞分裂素（TDZ）溶液处理后的叶柄外植体以横放方式（把叶柄外植体放置在培养基上，使叶柄外植体与培养基表面轻轻接触，并且使叶柄外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直。）接种至无激素的培养基上，无激素的培养基以无激素的 MS 培养基为主要成分，无激素培养基配方为：MS 培养基配方成分（1L）+30 g/L 蔗糖 +100 mg/L 肌醇 +7 g/L 琼脂；pH5.8~6.0，在光照强度为 2000 lx，光照时间为 12 小时 / 天，培养温度为 25±1℃的培养条件下培养 35 天。所获得实验结果如表 1 和图 1 所示。

[0040] 表 1. 不同浓度的 TDZ 溶液浸泡处理麻疯树叶柄外植体诱导不定芽直接再生的效果

[0041]

浓度（mg/L）	再生率（%）	平均芽数（颗）
0	0e	0d
0.5	28.89±3.85d	1.24±0.32c
1	43.33±5.78c	2.33±0.31bc
2	52.27±2.11b	2.22±0.42bc
3	65.56±5.09a	4.49±1.11a
6	55.00±2.89b	3.49±1.38ab
12	45.23±2.07c	1.94±0.66c

[0042] 注 1. 数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较（$P \leqq 0.05$），数据后字母不同表示显著差异。

[0043] 注 2. 再生率 =（再生出不定芽的外植体数 / 总外植体数）× 100%；平均芽数 = 再生不定芽总数 / 总外植体数。

[0044] 从表 1 的数据可知，随着 TDZ 溶液浓度的增大，所获得的麻疯树叶柄外植体的不定芽再生率、平均芽数都是增加后降低，当 TDZ 溶液的浓度为 3 mg/L 时，麻疯树叶柄外植体的再生率、平均芽数均达到最大值，分别为 65.56 % 和 4.49 颗；虽然当 TDZ 溶液的浓度为 3 mg/L 时，麻疯树叶柄外植体的再生率、平均芽数均达到最大值，但是，得到的不定芽的质量没有当 TDZ 溶液的浓度为 2 mg/L 时得到不定芽的质量好（见图 1）。因此，综合起来看，当 TDZ 溶液的浓度为 2mg/L 时，麻疯树叶柄外植体的再生率、平均芽数和芽质量是最好的。

[0045] S6. 最后将获得麻疯树叶柄外植体再生不定芽可以进行不定芽的伸长和生根培养，具体方法可参照如下步骤：

[0046] S61. 伸长培养

[0047] 用灭过菌的镊子把具有再生不定芽的叶柄外植体从培养瓶中取出，以横放方式接种至不定芽伸长培养基（MS 培养基配方成分 +30 g/L 蔗糖 +100 mg/L 肌醇 +0.5 mg/L 6-BA（6- 苄氨基腺嘌呤）+0.25 mg/L KT （激动素）+0.25 mg/L GA3 （赤霉素）+0.25 mg/L IAA（吲哚乙酸）+6 g/L 琼脂；pH5.8~6.0）上培养 15 天。培养条件：光照强度为 2000 lx，光照时间为 12 小时 / 天，培养温度为 25±1℃。

[0048] S62. 麻疯树叶柄外植体再生不定芽的生根培养

[0049] 用灭过菌的镊子把具有高度大于 3 cm 的不定芽的叶柄外植体从培养瓶中取出，用灭过菌的手术刀对其进行切割，切去其他部分，只保留长度大于 2 cm 的不定芽芽条，把芽条以竖插方式（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大约为 0.5 cm）接种至生根培养基（MS 培养基配方成分 +30 g/L 蔗糖 +100 mg/L 肌醇 +1 mg/L IBA（3- 吲哚丁酸）+6 g/L 琼脂；pH5.8~6.0）上培养 20 天，最后可获得完整的麻疯树小植株。培养条件：光照强度为 2000 lx，光照时间为 12 小时 / 天，培养温度为 25±1℃。

[0050] 实施例 2

[0051] S1. 对外植体进行短期细胞分裂素溶液处理的容器的准备：同实施例 1。

[0052] S2. 配置 3mg/L 的苯基噻二唑基脲（TDZ）溶液，具体配置方法同实施例 1。

[0053]　S3. 麻疯树叶柄的表面灭菌与叶柄外植体的获取：具体方法同实施例 1。

[0054]　S4. 细胞分裂素（TDZ）溶液处理麻疯树叶柄外植体

[0055]　在超净工作台中，把切好的叶柄外植体分别置于上述步骤 S1 准备好的灭过菌的培养皿中，向各个该培养皿中分别倒入上述步骤 S2 配置的 3 mg/L 的 TDZ 溶液至浸没叶柄外植体为止，盖上培养皿盖，分别静置 0、5、10、20、40、80 分钟后（对照组浸泡处理时间为 0 分钟是指对叶柄外植体不进行浸泡处理），倒掉 TDZ 溶液，保留叶柄，用灭过菌的镊子从培养皿中取出所有的叶柄外植体，放置在无菌吸水纸上，吸去叶柄外植体表面多余的水分。

[0056]　S5. 最后把处理后的叶柄外植体以横放方式接种至无激素的培养基上，无激素的培养基以无激素的 MS 培养基为主要成分，无激素培养基配方为：MS 培养基配方成分（1L）+30 g/L 蔗糖 +100 mg/L 肌醇 +7 g/L 琼脂；pH5.8~6.0，在光照强度为 2000 lx，光照时间为 12 小时 / 天，培养温度为 25±1℃的培养条件下培养 40 天，所获得实验结果如表 2 所示。

[0057]　表 2　不同浸泡处理时间下麻疯树叶柄外植体直接再生不定芽的效果

[0058]

浸泡处理时间（分钟）	再生率(%)	平均芽数（颗）
0	0d	0c
5	64.44±3.85a	2.36±0.50a
10	55.40±2.61b	2.35±0.36a
20	52.27±2.11b	2.22±0.42a
40	42.09±4.98c	1.22±0.27b
80	38.81±2.41c	1.26±0.49b

[0059]　注 1. 数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较（P ≦ 0.05），数据后字母不同表示显著差异。

[0060]　注 2. 再生率 =（再生出不定芽的外植体数 / 总外植体数）× 100%；平均芽数 = 再生不定芽总数 / 总外植体数。

[0061]　从表 2 的数据可知，随着 TDZ 溶液浸泡处理麻疯树叶柄外植体时间增加，所获得的麻疯树叶柄外植体的再生率、平均芽数均呈下降趋势，当 TDZ 溶液浸泡处理麻疯树叶柄时间为 5 分钟时，麻疯树叶柄外植体的再生率、平均芽数均达到最大值，分别为 64.44% 和 2.36 颗。

[0062]　S6. 最后将获得麻疯树叶柄外植体再生不定芽可以进行不定芽的伸长和生根培养，具体方法同实施例 1。

[0063]　实施例 3

[0064]　S1. 对外植体进行短期细胞分裂素溶液处理的容器的准备：同实施例 1。

[0065]　S2. 配置 3 mg/L 的苯基噻二唑基脲（TDZ）溶液，具体配置方法同实施例 1。

[0066]　S3. 麻疯树叶柄的表面灭菌与叶柄外植体的获取：具体方法同实施例 1。

[0067]　S4. 细胞分裂素（TDZ）溶液处理麻疯树叶柄外植体

[0068]　在超净工作台中，把切好的叶柄外植体分别置于上述步骤 S1 准备好的灭过菌的

培养皿中，向各个该培养皿中分别倒入上述步骤S2配置的3mg/L的TDZ溶液至浸没叶柄外植体为止，盖上培养皿盖，静置5分钟后，倒掉TDZ溶液，保留叶柄，用灭过菌的镊子从培养皿中取出所有的叶柄外植体，放置在无菌吸水纸上，吸去叶柄外植体表面多余的水分。

[0069]　S5. 最后把处理后的叶柄外植体以横放和竖插两种方式接种至无激素的培养基上，无激素的培养基以无激素的MS培养基为主要成分，无激素培养基配方为：MS培养基配方成分(1L)+30 g/L蔗糖+100 mg/L肌醇+7 g/L琼脂；pH5.8~6.0，在光照强度为2000 lx，光照时间为12小时/天，培养温度为25±1℃的培养条件下培养40天，所获得实验结果如表3和图2所示。

[0070]　表3　叶柄外植体的接种方式对不定芽再生效果的影响

[0071]

接种方式	再生率（%）	平均芽数（颗）
横放	52.27±2.11a	2.22±0.42a
竖插	24.38±0.54b	1.07±0.06b

[0072]　注1. 数据采用SPSS Statistics 17.0统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较($P \leqq 0.05$)，数据后字母不同表示显著差异。

[0073]　注2. 再生率=(再生出不定芽的外植体数/总外植体数)× 100%；平均芽数=再生不定芽总数/总外植体数。

[0074]　注3. 横放方式是把叶柄外植体放置在培养基上，使叶柄外植体与培养基表面轻轻接触，并且使叶柄外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直；竖插方式是叶柄外植体的横切面与培养基的水平表面相平行，并部分插入培养基中。

[0075]　从表3的数据可知，对麻疯树叶柄外植体进行再生培养时，采用横放方式接种的叶柄外植体再生不定芽的效果明显优于采用竖插方式接种的效果。

[0076]　S6. 最后将获得麻疯树叶柄外植体再生不定芽可以进行不定芽的伸长和生根培养，具体方法同实施例1。

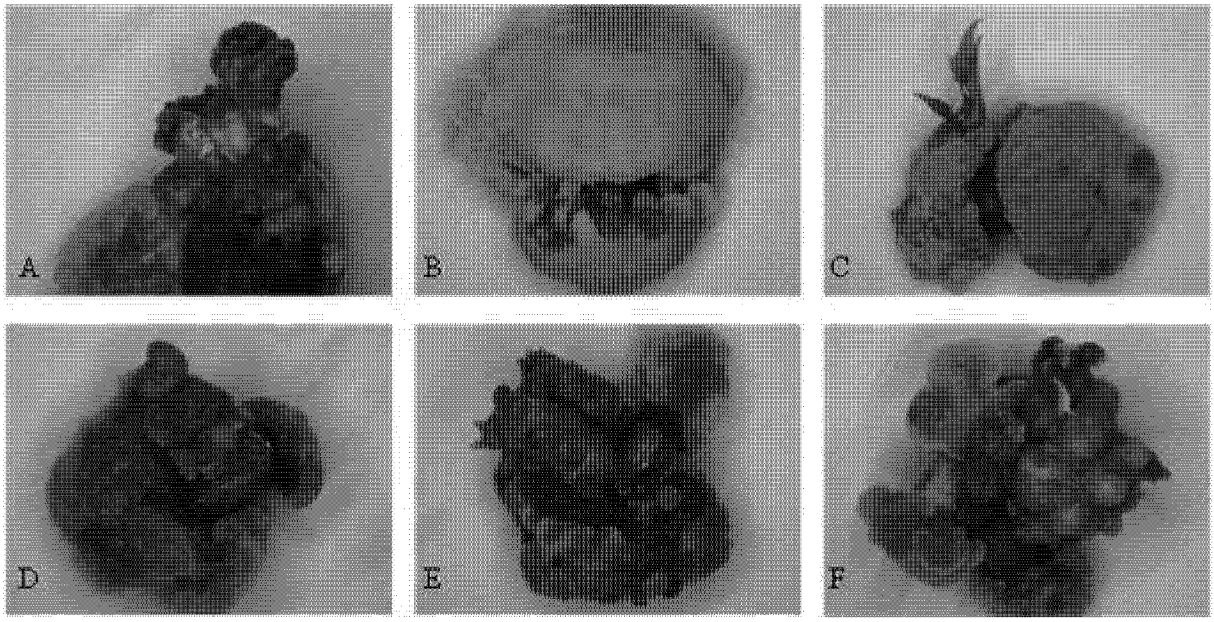


图 1

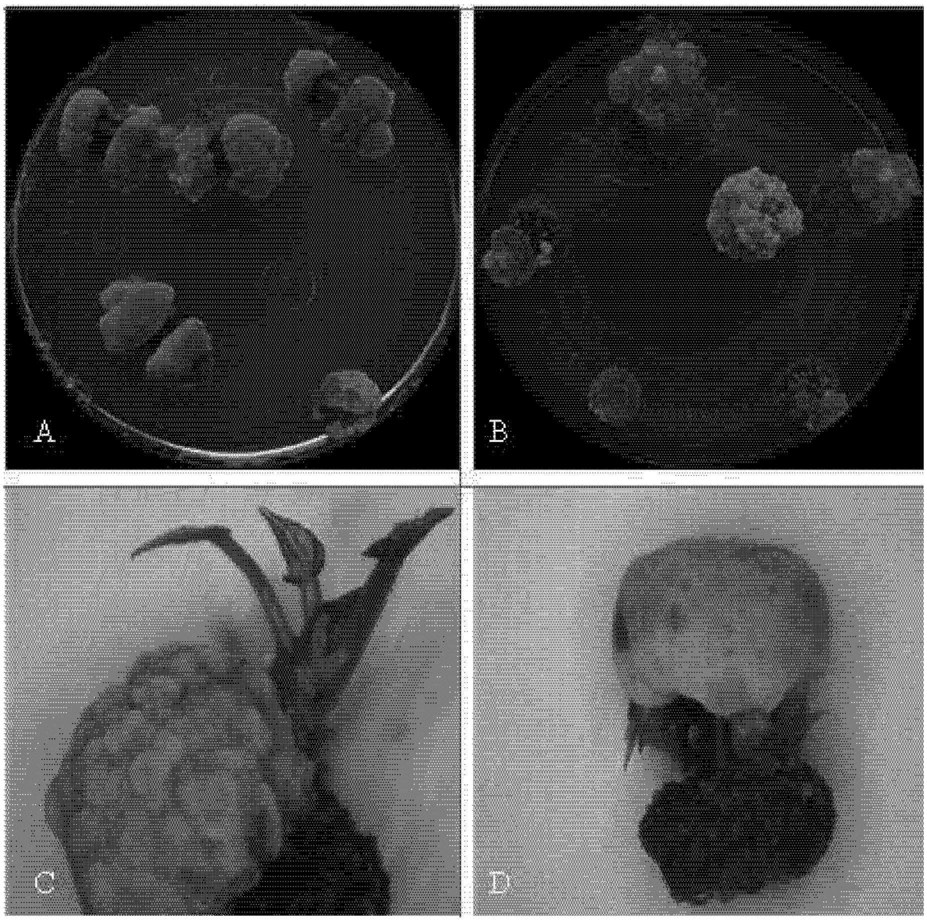


图 2