



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102524064 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201110426502. 7

(22) 申请日 2011. 12. 19

(71) 申请人 普罗米绿色能源(深圳)有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区高新技术
园朗山路 16 号华瀚创新园 C601

(72) 发明人 许文钊 孙怀娟 王梅珍 潘文欢
李艳梅 陈小莲 李耿光

(74) 专利代理机构 深圳市维邦知识产权事务所
44269

代理人 黄莉

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法

(57) 摘要

本发明涉及一种麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,包括:准备步骤,将外植体由根瘤农杆菌浸染处理后,再经抗性愈伤诱导及分化培养基培养后获得再生芽作为抗性芽备用;壮苗培养步骤,将抗性芽从抗性愈伤组织上切取下来,切去褐化部位,转接到壮苗培养基 P 中进行壮苗培养;生根培养步骤,挑取经过壮苗培养后高 2-3 厘米并有 4-6 片叶的抗性芽,切除基部愈伤组织,用 10-20mg/L 的生根粉溶液浸泡 8~15 分钟,转接至生根培养基 R 中进行生根培养,直至生根苗达到出罐炼苗的技术要求;炼苗步骤,对达到出罐炼苗的技术要求的生根苗开盖炼苗,移栽至温室。本发明方法可明显改善麻疯树遗传转化苗纤弱的生长状态,提高生根率,为麻疯树的分子育种奠定了良好基础。

1. 一种麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于,步骤如下:

准备步骤,选用合适的外植体由根癌农杆菌浸染处理后,再经抗性愈伤诱导及分化培养基培养后获得再生芽作为抗性芽备用;

壮苗培养步骤,将抗性芽从抗性愈伤组织上切取下来,切去褐化部位,转接到壮苗培养基 P 中进行壮苗培养;

生根培养步骤,挑取经过壮苗培养后高 2-3 厘米并有 4-6 片叶的抗性芽,切除基部愈伤组织,用 10-20mg/L 的生根粉溶液浸泡 8~15 分钟,转接至生根培养基 R 中进行生根培养,直至生根苗达到出罐炼苗的技术要求;

炼苗步骤,对达到出罐炼苗的技术要求的生根苗开盖炼苗,移栽至温室。

2. 根据权利要求 1 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:准备步骤中选用的外植体为带有 4-6 片真叶的茎段,其长度为 2-3cm。

3. 根据权利要求 1 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:所述准备步骤中使用的根癌农杆菌是如下携带含有目的基因载体的根癌农杆菌菌株中的任意一种: EHA105、LBA4404、GV3101、MP90。

4. 根据权利要求 1 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:所述准备步骤中使用的抗性愈伤诱导及分化培养基含有 1-3 mg/L 草胺膦或 20-50 mg/L 卡那霉素或 1-10 mg/L 潮霉素。

5. 根据权利要求 1 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:壮苗培养基 P 的配方为: MS 基本培养基 +10-30g/L 蔗糖 +0.2-1.5 mg/L 6- 苄氨基嘌呤 +0.005-0.1 mg/L 吲哚丁酸 +1-5 mg/L 硝酸银 +50-300 mL/L 椰汁 +5-10 g/L 琼脂 +1-3 mg/L 草胺膦或 20-50mg/L 卡那霉素或 1-10mg/L 潮霉素 +50-150 mg/L 特美汀, pH=5.6-6.0。

6. 根据权利要求 1 或 5 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:壮苗培养的培养条件是:温度 24-28℃,光照强度 1000-2000 lx,光照时间 12-18 小时/天,培养时间为 3-5 周,每两周继代一次。

7. 根据权利要求 1 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:生根培养基 R 配方为: 1/2MS 基本培养基 + 0.01-0.1 mg/L 吲哚 -3- 乙酸 + 0.01-0.1 mg/L 萘乙酸 + 0.05-0.25 mg/L 吲哚丁酸 + 10-15 g/L 蔗糖 + 4-8 g/L 琼脂 + 1-3 mg/L 草胺膦或 20-50 mg/L 卡那霉素或 1-10 mg/L 潮霉素 + 50-150 mg/L 特美汀。

8. 根据权利要求 1 或 7 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:生根培养步骤中,培养条件是:温度 24-28℃,光照强度 1000-2000 lx,光照时间 12-18 小时/天,每两周继代一次。

9. 根据权利要求 1 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:抗性芽在生根培养基 R 中培养 7-10 天开始生根,25-35 天左右达到出罐炼苗的技术要求。

10. 根据权利要求 1 或 9 所述的麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,其特征在于:生根苗的根长为 3-5 cm 即可进行炼苗。

麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及麻疯树植物遗传转化技术领域,尤其涉及一种麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法。

背景技术

[0002] 麻疯树(*Jatropha curcas*),多年生木本油料植物,大戟科麻疯树属,原产美洲,广泛分布于热带亚热带地区。麻疯树耐干旱贫瘠,种子含油量高达 60%,是目前重要的生物能源植物之一。

[0003] 然而,目前麻疯树存在种植区域狭窄,产量低等问题,而传统育种周期长,要获得一个优良性状且稳定遗传的品种需要 8-10 年。近年来,植物基因工程技术的快速发展,在许多粮食和经济作物的种质改良方面发挥了重要的作用。因此,成为改良麻疯树抗逆性、提高产量、改善油质等性状的重要手段。

[0004] 根癌农杆菌介导法是最常用的植物基因转化方法之一。根癌农杆菌含有 Ti 质粒,其上有一段 T-DNA 区。将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区,通过侵染植物伤口进入细胞后,可将目的基因插入到植物基因组中,通过减数分裂稳定地遗传给后代。

[0005] 麻疯树的研究工作起步较晚,关于麻疯树组织培养和遗传转化技术的报道还很少,且转化苗的生根率普遍较低。李美茹等研究人员以麻疯树子叶作为外植体,草胺膦作为筛选剂,建立了根癌农杆菌介导的遗传转化体系,转化苗生根率为 78% (Li M., Li H., Jiang H., et al. Transformation of an Agrobacterium-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2008, 92(2): 173-181)。而 Kumar 等研究人员以麻疯树叶片作为外植体,潮霉素作为筛选剂,建立的根癌农杆菌介导麻疯树的遗传转化中,转化苗的生根率只有 40% (Kumar N., Anand K.G.V., Pamidimarri D.V.N.S. et al. Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Industrial Crops and Products*, 32: 41 - 47)。Pan 等研究人员以麻疯树叶片作为外植体,卡那霉素作为筛选剂,利用农杆菌介导法对麻疯树进行转化中,获得的 120 株再生植株只有 1 株生根 (Pan J., Fu Q., Xu F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamycin selection. *African Journal of Biotechnology*, 9(39), 6477-6481)。

发明内容

[0006] 本发明实施例所要解决的技术问题在于,提供一种麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,以明显改善麻疯树遗传转化苗纤弱的生长状态,提高生根率。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供如下技术方案:一种麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,包括如下步骤:

准备步骤,选用合适的外植体由根癌农杆菌浸染处理后,再经抗性愈伤诱导及分化培

培养基培养后获得再生芽作为抗性芽备用；

壮苗培养步骤,将抗性芽从抗性愈伤组织上切取下来,切去褐化部位,转接到壮苗培养基 P 中进行壮苗培养；

生根培养步骤,挑取经过壮苗培养后高 2-3 厘米并有 4-6 片叶的抗性芽,切除基部愈伤组织,用 10-20mg/L 的生根粉溶液浸泡 8~15 分钟,转接至生根培养基 R 中进行生根培养,直至生根苗达到出罐炼苗的技术要求；

炼苗步骤,对达到出罐炼苗的技术要求的生根苗开盖炼苗,移栽至温室。

[0008] 进一步地,准备步骤中选用的外植体为带有 4-6 片真叶的茎段,其长度为 2-3cm。

[0009] 进一步地,所述准备步骤中使用的根癌农杆菌是如下携带含有目的基因载体的根癌农杆菌菌株中的任意一种 :EHA105、LBA4404、GV3101、MP90。

[0010] 进一步地,所述准备步骤中使用的抗性愈伤诱导及分化培养基含有 1-3 mg/L 草胺磷或 20-50 mg/L 卡那霉素或 1-10 mg/L 潮霉素。

[0011] 进一步地,壮苗培养基 P 的配方为 :MS 基本培养基 +30g/L 蔗糖 +0.2-1.5 mg/L 6- 苄氨基嘌呤 +0.005-0.1 mg/L 吲哚丁酸 +1-5 mg/L 硝酸银 +100-300 mL/L 椰汁 +5-10 g/L 琼脂 +1-3 mg/L 草胺磷或 20-50mg/L 卡那霉素或 1-10mg/L 潮霉素 +50-150 mg/L 特美汀, pH=5.6-6.0。

[0012] 进一步地,壮苗培养的培养条件是 :温度 24-28℃,光照强度 1000-2000 lx,光照时间 12-18 小时 / 天,培养时间为 3-5 周,每两周继代一次。

[0013] 进一步地,生根培养基 R 配方为 :1/2MS 基本培养基 + 0.01-0.1 mg/L 吲哚 -3- 乙酸 + 0.01-0.1 mg/L 萘乙酸 + 0.05-0.25 mg/L 吲哚丁酸 + 10-15 g/L 蔗糖 + 4-8 g/L 琼脂 + 1-3 mg/L 草胺磷或 20-50 mg/L 卡那霉素或 1-10 mg/L 潮霉素 + 50-150 mg/L 特美汀。

[0014] 进一步地,生根培养步骤中,培养条件是 :温度 24-28℃,光照强度 1000-2000 lx,光照时间 12-18 小时 / 天,每两周继代一次。

[0015] 进一步地,抗性芽在生根培养基 R 中培养 7-10 天开始生根,25-35 天达到出罐炼苗的技术要求。

[0016] 进一步地,生根苗的根长为 3-5 cm 即可进行炼苗。

[0017] 通过采用上述技术方案,本发明至少具有如下有益效果 :

1. 改善转化苗的生长状态。经过根癌农杆菌浸染后的转化苗通常会更加纤细瘦弱,生根率会更低,尤其是经卡那霉素和潮霉素筛选所获得转化苗,叶片较小,茎细弱,植株发黄,而本发明通过增加壮苗培养步骤,使转化苗叶片浓绿,茎段粗壮,生长旺盛,有利于后续的生根培养。

[0018] 2. 生根率高。麻风树组织培养中一直存在着生根困难的问题,生根率普遍较低。经过根癌农杆菌浸染后的转化苗状态较差,生根率更低,而本发明的方法中,不论经过草胺磷,卡那霉素还是潮霉素筛选得到的转化苗,经壮苗培养后,生根率均可达 80-90 %,为麻风树的转基因育种奠定了良好的基础。

[0019] 3. 有效筛选出转基因苗。现有技术都是在抗性愈伤组织阶段和分化阶段加入筛选剂,将得到的抗性芽转入不含筛选剂的生根培养基 ;本发明不仅在抗性愈伤组织阶段和分化阶段加入筛选剂,生根阶段也选择了合适的筛选剂浓度,这样有助于避免非转化苗的逃逸,有效筛选出转化苗,减少后期的鉴定工作。

具体实施方式

[0020] 下面结合实例详述描述本发明的实施方案。需要说明的是,下述实例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实例来限定本发明的保护范围。

[0021] 本发明提供一种麻疯树遗传转化苗的复壮及生根的培养方法,步骤如下:

准备步骤,选用合适的外植体由根癌农杆菌浸染处理后,再经抗性愈伤诱导及分化培养基培养后获得再生芽作为抗性芽备用;

壮苗培养步骤,将抗性芽从抗性愈伤组织上切取下来,切去褐化部位,转接到壮苗培养基 P 中进行壮苗培养;

生根培养步骤,挑取经过壮苗培养后高 2-3 厘米并有 4-6 片叶的抗性芽,切除基部愈伤组织,用 10-20mg/L 的生根粉溶液浸泡 8~15 分钟,转接至生根培养基 R 中进行生根培养,直至生根苗达到出罐炼苗的技术要求;

炼苗步骤,对达到出罐炼苗的技术要求的生根苗开盖炼苗,移栽至温室。

[0022] 其中,所述准备步骤中,使用的外植体优选为带有 4-6 片真叶的小桐子茎段,其长度为 2-3cm;而所用的根癌农杆菌是如下携带含有目的基因载体的根癌农杆菌菌株中的任意一种: EHA105、LBA4404、GV3101、MP90,而目的基因载体可以是 pBI121-FT 或 pCAMBIA1301 等。使用的抗性愈伤诱导及分化培养基中含有 1-3 mg/L 草胺磷或 20-50 mg/L 卡那霉素或 1-10 mg/L 潮霉素。

[0023] 在壮苗培养步骤中,壮苗培养基 P 的配方为: MS 基本培养基 +10-30g/L 蔗糖 +0.2-1.5 mg/L 6-苄氨基嘌呤 +0.005-0.1 mg/L 吲哚丁酸 +1-5 mg/L 硝酸银 +100-300 mL/L 椰汁 +5-10 g/L 琼脂 +1-3 mg/L 草胺磷或 20-50mg/L 卡那霉素或 1-10mg/L 潮霉素 +50-150 mg/L 特美汀, pH=5.6-6.0。壮苗培养条件是: 培养温度 24-28℃, 光照强度 1000-2000 lx, 光照时间 12-18 小时/天, 培养时间为 3-5 周, 每两周继代一次。

[0024] 而生根培养步骤中,生根培养基 R 配方为: 1/2MS 基本培养基 + 0.01-0.1 mg/L 吲哚-3-乙酸 + 0.01-0.1 mg/L 萘乙酸 + 0.05-0.25 mg/L 吲哚丁酸 + 10-15 g/L 蔗糖 + 4-8 g/L 琼脂 + 1-3 mg/L 草胺磷或 20-50 mg/L 卡那霉素或 1-10 mg/L 潮霉素 + 50-150 mg/L 特美汀。生根培养条件是: 培养温度 24-28℃, 光照强度 1000-2000 lx, 光照时间 12-18 小时/天, 每两周继代一次。一般地,抗性芽在生根培养基 R 中培养 7-10 天开始生根, 25-35 天达到出罐炼苗的技术要求。

[0025] 根据目前的技术水平状况,生根苗的根长为 3-5 cm 即可进行炼苗。

[0026] 下面结合实例详述描述本发明的实施方案。需要说明的是,下述实例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实例来限定本发明的保护范围。

[0027] 实例 1

本实例是以根癌农杆菌 GV3101 介导将 GUS 基因转入云南元谋野生麻风树进行培养,各工艺步骤具体如下:

准备步骤,将外植体经携带含有目的基因载体 pCAMBIA1301 的根癌农杆菌 GV3101 浸染后,再在含有 2 mg/L 草胺磷的抗性愈伤诱导及分化培养基上培养获得再生芽作为抗性芽备用;

壮苗培养步骤,将抗性芽从抗性愈伤组织上小心切取下来,切去褐化部位,转接到壮苗

培养基 P 中进行壮苗培养,所述壮苗培养基 P 配方为:MS 基本培养基+30g/L 蔗糖+ 0.2 mg/L 6- 苄氨基嘌呤+ 0.005 mg/L 吲哚丁酸+1 mg/L 硝酸银+200 mL/L 椰汁+ 7 g/L 琼脂+ 2 mg/L 草胺膦+ 50 mg/L 特美汀,pH=5.6-6.0,培养条件是:温度 24℃,光照强度 2000 lx,光照时间 16 小时/天。培养时间为四周,每两周继代一次;

生根培养步骤,挑取经过壮苗培养后高 2-3 厘米并有 4-6 片叶的抗性芽,切除基部愈伤组织,用由北京艾比蒂研究开发中心研制及销售的 ABT-1 号生根粉配制得到的 10 mg/L 的生根粉溶液浸泡 10 分钟,转接至生根培养基 R 中,生根培养基 R 配方为:1/2MS 基本培养基+ 0.01 mg/L 吲哚-3-乙酸+ 0.01 mg/L 萘乙酸+ 0.05 mg/L 吲哚丁酸+ 10 g/L 蔗糖+ 7 g/L 琼脂+ 2 mg/L 草胺膦+ 50 mg/L 特美汀,培养条件是:温度 24℃,光照强度 2000 lx,光照时间 16 小时/天,每两周继代一次,一般地,7-10 天开始生根,25-35 天可以达到出罐炼苗要求;

炼苗步骤,将生长 25-35 天,根长 3-5 cm 的生根苗开盖炼苗,移栽至温室。

[0028] 实例 2

本实例是以根癌农杆菌 EHA105 介导将 GUS 基因转入云南元谋野生麻风树进行培养,各工艺步骤具体如下:

准备步骤,选取合适的外植体经携带含有目的基因载体 pBI121-Hyg 的根癌农杆菌 EHA105 浸染后,在含有 5 mg/L 潮霉素的抗性愈伤诱导及分化培养基上培养获得再生芽作为抗性芽备用;

壮苗培养步骤,将抗性芽从抗性愈伤组织上小心切取下来,切去褐化部位,转接到壮苗培养基 P 中进行壮苗培养,壮苗培养基 P 配方为:MS 基本培养基+ 30g/L 蔗糖+ 1.5 mg/L 6- 苄氨基嘌呤+ 0.1 mg/L 吲哚丁酸+ 5 mg/L 硝酸银+200 mL/L 椰汁+ 7 g/L 琼脂+ 5 mg/L 潮霉素+ 150 mg/L 特美汀,pH=5.6-6.0,培养条件是:温度 24℃,光照强度 2000 lx,光照时间 16 小时/天,培养时间为四周,每两周继代一次;

生根培养步骤,挑取经过壮苗培养后高 2-3 厘米并有 4-6 片叶的抗性芽,切除基部愈伤组织,用由北京艾比蒂研究开发中心研制及销售的 ABT-1 号生根粉配制得到的 20 mg/L 的生根粉溶液浸泡 10 分钟,转接至生根培养基 R 中,生根培养基 R 配方为:1/2MS 基本培养基+ 0.1 mg/L 吲哚-3-乙酸+ 0.1 mg/L 萘乙酸+ 0.25 mg/L 吲哚丁酸+ 15 g/L 蔗糖+ 7 g/L 琼脂+ 5 mg/L 潮霉素+ 150 mg/L 特美汀,培养条件是:温度 26℃,光照强度 1800 lx,光照时间 16 小时/天,每两周继代一次,一般 7-10 天开始生根,25-35 天可以达到出罐炼苗要求;

炼苗步骤,将生长 25-35 天,根长 3-5 cm 的生根苗开盖炼苗,移栽至温室。

[0029] 实例 3

本实例是以根癌农杆菌 MP90 介导将 FT 基因转入云南元谋野生麻风树进行培养,各工艺步骤具体如下:

准备步骤,选取合适的外植体经携带含有目的基因载体 pBI121-FT 的根癌农杆菌 MP90 浸染后,在含有 20 mg/L 卡那霉素的抗性愈伤诱导及分化培养基上获得再生芽作为抗性芽备用;

壮苗培养步骤,将抗性芽从抗性愈伤组织上小心切取下来,切去褐化部位,转接到壮苗培养基 P 中进行壮苗培养,壮苗培养基 P 配方为:MS 基本培养基+ 30g/L 蔗糖+ 1.0 mg/L

6-苄氨基嘌呤 + 0.05 mg/L 吲哚丁酸 + 3 mg/L 硝酸银 + 200 mL/L 椰汁 + 7 g/L 琼脂 + 20 mg/L 卡那霉素 + 100 mg/L 特美汀, pH=5.6-6.0, 培养条件是: 温度 25℃, 光照强度 1500 lx, 光照时间 16 小时 / 天, 培养时间为四周, 每两周继代一次;

生根培养步骤, 挑取经过壮苗培养后高 2-3 厘米并有 4-6 片叶的抗性芽, 切除基部愈伤组织, 用由北京艾比蒂研究开发中心研制及销售的 ABT-1 号生根粉配制得到的 15 mg/L 的生根粉溶液浸泡 10 分钟, 转接至生根培养基 R 中, 生根培养基 R 配方为: 1/2MS 基本培养基 + 0.05 mg/L 吲哚-3-乙酸 + 0.05 mg/L 萘乙酸 + 0.1 mg/L 吲哚丁酸 + 12 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂 + 20 mg/L 卡那霉素 + 100 mg/L 特美汀, 培养条件是: 温度 28℃, 光照强度 2000 lx, 光照时间 16 小时 / 天, 每两周继代一次, 一般地, 7-10 天开始生根, 25-35 天可以达到出罐炼苗程度;

炼苗步骤, 将生长 25-35 天, 根长 3-5cm 的生根苗开盖炼苗, 移栽至温室。

[0030] 以上三个实例所得的抗性芽的生根率统计如下表:

实例序号	存活抗性芽数(棵)	生根苗(棵)	生根率(%)
实例 1	11	10	90.90
实例 2	12	10	83.33
实例 3	126	101	80.16

由上表可看出, 采用本发明的培养方法, 抗性芽的生根率能达到 80~90%, 远高于现有技术的生根率, 实用性强。