

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710168541.5

[51] Int. Cl.
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 8 月 27 日

[11] 公开号 CN 101250518A

[22] 申请日 2007.11.30
[21] 申请号 200710168541.5
[71] 申请人 华中农业大学
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街 1 号
[72] 发明人 汪 波 彭定祥 孙珍夏 高世梅
张 娜 邢秀龙 刘立军

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 4 页

[54] 发明名称
苎麻高效遗传转化的方法

[57] 摘要
本发明公开了一种构建苎麻遗传转化体系的方法，属于农业生物技术领域或植物基因工程领域。主要步骤包括取苎麻实生苗子叶作为转化外植体与农杆菌共培养，然后把经过共培养的子叶挑出，转入到选择培养基上进行脱菌和选择培养，将选择培养基中产生的抗性植株转入到选择伸长培养基和选择生根培养基中先后进行伸长培养、生根培养，直至抗性芽再生为完整的植株。对获得的抗性植株分别进行了 GUS 检测、PCR 检测和 Southern 杂交检测，结果表明外源基因已经整合到苎麻的基因组中。本发明具有操作简单、取材方便、转化效率高，可广泛用于苎麻的基因工程操作中。

1、一种适用于苎麻遗传转化的方法，包含农杆菌介导的转化步骤，其特征在于，取苎麻的实生苗的子叶与农杆菌共培养，然后将共培养后的子叶挑出，转入到选择培养基上脱菌和选择培养，将选择培养基中产生的抗性芽分别转入芽伸长培养基和生根培养基中进行芽伸长培养和诱导根的形成，直至抗性芽再生为完整的候选转化植株，采用 GUS、PCR 和 Southern 方法对获得的候选转化植株进行检测，得到苎麻转化植株，其具体步骤如下：

1) 将灭菌后的苎麻种子接种于 1/2MS 基本培养基上，在光照为 3000 lux 和 25~28℃ 条件下使种子萌发，取萌发 4 天后的实生苗的子叶作为转化用的外植体；

2) 将步骤 1) 的子叶浸泡在 OD 值为 0.25~1.5 的农杆菌菌液中 5~10 分钟，并将该子叶置于共培养培养基上培养，该共培养培养基的组分为 MS 基本培养基附加 0.5 mg/L 噻苯隆、0.01 mg/L 吲哚乙酸、0~200 mg/L 乙酰丁香酮、3%葡萄糖和 0.8%琼脂粉，pH 为 5.6~6.0，培养的温度为 15~28℃，培养时间为 1~4 天，在 3000 lux 下光照培养或暗培养；

3) 将步骤 2) 共培养 1~4 天后的子叶转入到选择培养基上培养，该选择培养基组分如下：MS 基本培养基附加 0.5 mg/L 噻苯隆、0.01 mg/L 吲哚乙酸、25 mg/L 卡那霉素、500 mg/L 头孢霉素、3%葡萄糖和 0.8%琼脂粉，pH 为 5.8；

4) 将步骤 3) 的子叶转移到步骤 3) 所述的选择培养基上培养，培养温度为 25±3℃，培养时间 6~8 周，至抗性再生芽产生；

5) 将步骤 4) 的抗性再生芽转入 MS 基本培养基附加 1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤、25 mg/L 乙酰丁香酮、250 mg/L 头孢霉素、3%葡萄糖和 0.8%琼脂粉的伸长培养基上，培养至芽伸长约 2 厘米时将其转入到生根培养基上诱导生根，生根培养基组分如下：1/2MS 基本培养基附加 0~0.5 mg/L 萘乙酸、3%葡萄糖和 0.8%琼脂粉，pH 为 5.8，培养约 2 周后得到候选转化植株；

6) 采用 GUS、PCR 和 Southern 方法对步骤 5) 的候选植株进行检测，得到苎麻转化植株。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤 2) 中的农杆菌菌液浓度 OD 值为 0.5，乙酰丁香酮的浓度为 50 mg/L，培养基 pH 值为 5.9，培养温度为 20℃，培养时间为 3 天，暗培养。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤 5) 中的萘乙酸浓度为 0.025 mg/L。

4、权利要求 1-3 任一项所述的方法在苎麻遗传转化中的应用。

苎麻高效遗传转化的方法

技术领域

本发明属于新植物和植物基因工程技术领域。具体涉及一种苎麻高效遗传转化方法及应用。

背景技术

经过 20 多年的研究,人们已经建立了多种植物遗传转化体系(方法),一般可以分为以下三类:(1)DNA 直接导入法。包括化学诱导 DNA 直接转化(PEG 介导法、脂质体介导法)和物理法诱导 DNA 直接转化(电激法、超声波介导、显微注射、激光微束介导、基因枪法介导)。(2)种质系统介导基因转化(germ line transformation)。包括花粉管通道法、生殖细胞浸泡法、胚囊、子房注射法。(3)载体介导基因转化。包括农杆菌介导法(根癌农杆菌 Ti 质粒和发根农杆菌 Ri 质粒介导)和植物病毒载体介导法(DNA 病毒转化载体介导和 RNA 病毒转化载体介导)(王关林和方宏筠,2002;闫新莆,2003)。在以上所有的转基因方法中,研究最清楚和应用最成功的是根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的遗传转化,自 1983 年人们第一次用这种方法获得转基因植物开始,在已获得的近 200 种转基因植物中约 80%是用这种方法完成的(王关林和方宏筠,2002)。

苎麻(*Boehmeria nivea* L.)为荨麻科(Urticaceae)苎麻属(*Boehmeria*)多年生韧皮纤维作物,起源于我国,被西方人称为“中国草”。在我国有着悠久的栽培和加工历史,很早就欧美和东南亚国家得到广泛利用,有“纤维之王”和“纤维至宝”的美称。苎麻作为我国重要的纺织工业原料作物,其纤维品质优良,在纺织上有重要地位,越来越多地引起政府和科技工作者的重视。

然而苎麻的遗传转化研究起步较晚,国内外的报道不多。在国内,陈德富等(1996)分别用根癌农杆菌 C₅₈₅₁(pBz6111)和发根农杆菌 A₄与苎麻试管苗上三叶共培养 48 小时,经过 C₅₈₅₁介导的叶片叶脉处在转入含 25 mg/L 卡那霉素的选择培养基中 12 天时,产生肉眼可见的愈伤组织;发根农杆菌 A₄转化的叶片在第 21 天时虽然无愈伤组织产生,但有少量根产生。而在与这两者相同的时间里,对照材料(没有与农杆菌共培养的叶片)既没有产生愈伤组织,也不发生不定根,且叶片黄化死亡明显。直到最近,苎麻遗传转化研究才取得了进一步的进展。蒋建雄(2000)以根癌农杆菌 AGL1、EHA105、LBA4404 对外植体进行敏感程度比较,结果 EHA105 对外植体的浸染能力最强,最后采用 EHA105 作为转化菌株,获得抗除草剂“basta”的转基因植株。而后,陈建荣等(2005a)构建了 CCoAOMT 基因反义表达载体,用农杆菌介导法进行了苎麻遗传转化研究,获得了转基因植株并进行了 PCR 检测。同年,陈建荣等(2005b)报道用农杆菌 LBA4404(pBI121—antiBNCCoAOMT)侵染苎麻试管苗叶

片,研究了不同的外植体预培养时间、农杆菌悬浮培养基、培养温度、农杆菌生长程度、侵染液配制浓度、浸泡的时间、洗菌溶液和抑菌抗生种类、浓度等多方面的影响,并获得了卡那霉素抗性植株(没有作进一步的分子检测)。而易自力等(2006)以“湘苎2号”下胚轴为受体,利用农杆菌介导法进行了苎麻转 Bt 基因研究,获得了一批转抗虫基因植株,并通过点杂交分析和 PCR-Southern 杂交分析证实了抗性植株为阳性。除了农杆菌介导的遗传转化外,张福泉等(2000)用超干胚浸渍法将棉花 DNA 导入苎麻种子,在 D1 代,发现了在叶片的缺刻、茸毛上存在差异的变异株;而在 D2 代,则发现了在株高上有明显不同的植株。经过 RAPD 验证,发现有的变异株中出现了棉花的特异带,有的则出现受体和供体均没有的新带,还有的出现了受体 DNA 带在变异株中消失的情况。

在国外,巴西人 Dusi 等(1993)利用子叶在 RR 培养基(B5 + 0.2 mg/L IAA + 2.0 mg/L 6-BA)中培养,获得了再生植株。然后利用根癌农杆菌 EHA101 菌株(pGV1040)侵染再生植株的叶片,将一个和蛋白质有关的基因导入苎麻基因组。经过选择培养等流程,获得了再生植株,经过 GUS 检测和 Southern 杂交检测证实已将该基因成功导入了苎麻基因组。

在以上已经发表的文献中,有 5 篇报道获得了转基因再生植株,其中仅 Dusi 等(1993)对转基因植株进行了 Southern 杂交检测。蒋建雄(2000)、陈建荣等(2005b)虽然报道了获得了转基因植株,但是没有对转基因植株进行任何检测。陈建荣等(2005a)对获得的转基因植株仅进行了 PCR 检测。易自力等(2006)获得了转 Bt 基因植株,但是只进行了点杂交和 PCR-Southern 检测。而这些证据还不足以能证明遗传转化取得了本质上的成功(Birch, 1997)。此外,以上报道中的转基因效率不明确或者较低,不能满足应用的需要,且都要经过愈伤组织阶段才能得到再生植株,大大增加了再生植株产生变异的风险。本发明旨在解决现有的转化效率低下的难题,并且能不经过愈伤组织阶段而是直接从外植体上再生出植株,大大加快了获得转基因植株的进程。此外,在检测手段上,使用了 GUS 染色、PCR 检测以及 Southern 杂交检测等三种方法,大大增加了转基因植株的可靠性和真实性。而且,目前也未见利用苎麻子叶进行遗传转化的报道。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,以苎麻的子叶为转基因的受体材料,采用农杆菌介导法将外源基因导入苎麻受体细胞中,经过选择再生获得转化植株,以缩短现有技术获得转基因植株的时间,提高现有苎麻遗传转化的效率。

本发明所使用的农杆菌菌株为 LBA4404,质粒载体为 pBI121(农杆菌菌株和质粒均由华中农业大学园艺林学学院谢从华教授惠赠,该质粒的物理图谱和 T-DNA 结构图分别参见说明书附图 1 和附图 2 所示)。将农杆菌菌株 LBA4404 侵染后的苎麻子叶,经共培养、选择性再生培养、选择性伸长培养和选择性生根培养后,多次反复实验表明转化后均能得到苎麻的再

生完整植株。对再生植株进行了 GUS 染色检测、PCR 检测和 Southern 杂交检测，分析结果表明外源基因已经整合到苧麻基因组中。依照本发明的思想，其他有用的外源基因也能应用本发明的转化和再生方法导入苧麻，从而拓宽苧麻育种途径。

本发明通过以下技术方案实现：

在以下的陈述中，除非特别说明，所采用的 MS 培养基来自于公开报道的 MS 基本培养基，该基本培养基包括其无机成分，有机成分，铁盐。按照常规的高压蒸汽灭菌方法灭菌（121℃，灭菌 20 分钟）。

一种适用于苧麻遗传转化的方法，包含农杆菌介导的转化步骤，方法是，取苧麻的实生苗的子叶与农杆菌共培养，然后将共培养后的子叶挑出，转入选择培养基上脱菌和选择培养，将选择培养基中产生的抗性芽分别转入芽伸长培养基和生根培养基中进行芽伸长培养和诱导根的形成，直至抗性芽再生为完整的候选转化植株，采用 GUS、PCR 和 Southern 方法对获得的候选转化植株进行检测，得到苧麻转化植株，其具体步骤如下：

1) 将灭菌后的苧麻种子接种于 1/2MS 基本培养基上，在光照为 3000 lux 和 25~28℃ 条件下使种子萌发，取萌发 4 天后的实生苗的子叶作为转化用的外植体；

2) 将步骤 1) 的子叶浸泡在 OD 值为 0.25~1.5 的农杆菌菌液中 5~10 分钟，并将该子叶置于共培养培养基上培养，该共培养培养基的组分为 MS 基本培养基附加 0.5 mg/L 噻苯隆、0.01 mg/L 吲哚乙酸、0~200 mg/L 乙酰丁香酮、3%葡萄糖和 0.8%琼脂粉，pH 为 5.6~6.0，培养的温度为 15~28℃，培养时间为 1~4 天，在 3000 lux 下光照培养或暗培养；

3) 将步骤 2) 共培养 1~4 天后的子叶转入到选择培养基上培养，该选择培养基组分如下：MS 基本培养基附加 0.5 mg/L 噻苯隆、0.01 mg/L 吲哚乙酸、25 mg/L 卡那霉素、500 mg/L 头孢霉素、3%葡萄糖和 0.8%琼脂粉，pH 为 5.8；

4) 将步骤 3) 的子叶转移到步骤 3) 所述的选择培养基上培养，培养温度为 25±3℃，培养时间 6~8 周，至抗性再生芽产生；

5) 将步骤 4) 的抗性再生芽转入 MS 基本培养基附加 1.0 mg/L 6-苳氨基嘌呤、25 mg/L 乙酰丁香酮、250 mg/L 头孢霉素、3%葡萄糖和 0.8%琼脂粉的伸长培养基上，培养至芽伸长约 2 厘米时将其转入到生根培养基上诱导生根，生根培养基组分如下：1/2MS 基本培养基附加 0~0.5 mg/L 萘乙酸、3%葡萄糖和 0.8%琼脂粉，pH 为 5.8，培养约 2 周后得到候选转化植株；

6) 采用 GUS、PCR 和 Southern 方法对步骤 5) 的候选植株进行检测，得到苧麻转化植株。

在本发明中，步骤 2) 中的农杆菌菌液浓度最适 OD 值为 0.5，乙酰丁香酮的浓度为 50 mg/L，培养基 pH 值为 5.9，培养温度为 20℃，培养时间为 3 天，暗培养。

在本发明中，步骤 5) 中的萘乙酸的最适宜的使用浓度为 0.025 mg/L。

附图说明

图 1 显示的是质粒 pBI121 的物理图谱。

图 2 显示的是质粒 pBI121 的 T-DNA 结构。

图 3 显示的是本发明的根癌农杆菌介导的苎麻子叶外植体的遗传转化流程。

图中：图 3A 是在 1/2MS 培养基上培养 4 d 的实生苗状况；图 3B 是农杆菌菌液浸泡苎麻子叶外植体状况；图 3C 是子叶外植体在铺有滤纸的共培养培养基上共培养状况；图 3D 是苎麻子叶外植体进行选择培养及再生状况；图 3DD 是未经侵染的苎麻子叶在选择培养基上死亡状况；图 3DDD 是未经侵染的苎麻子叶在不含卡那霉素的再生培养基上再生状况；图 3E 是抗性芽在伸长培养基上伸长生长状况；图 3F 是抗性芽在生根培养基中生根状况；图 3FF 是本发明的生根后的转化植株继续生长状况；图 3G 是转化植株在室内炼苗状况；图 3H 是移栽到钵中的转化植株的生长状况。

图 4 显示的是 GUS 基因的瞬时表达和稳定表达。

图中：图 4A 是苎麻子叶 GUS 瞬时表达；图 4AA 是未经转化的苎麻子叶（对照）；图 4B 是转化后的苎麻子叶上再生出的抗性芽；图 4BB 是未经转化的子叶再生芽（对照）；图 4C 是经过伸长生长后的抗性芽；图 4CC 是经过伸长生长后的未经转化的再生芽（对照）。

图 5 显示的是抗性植株 PCR 检测（Npt II 引物）结果。

图中：1 为阴性对照，2 为质粒，3-24 为抗性植株，25 为 Marker。

图 6 显示的是转基因苎麻植株的 Southern 杂交图。

图中：M：Marker；C：未转化植株（对照）；1-5：本发明的苎麻转基因植株。

具体实施方式

实施例 1

本发明采用苎麻子叶为外植体进行转化和再生的具体方法是：选用成熟的苎麻种子品种 5041-3 种子（Wang et al., 2007），种子收获自华中农业大学苎麻种质资源圃。用 75% 的酒精处理种子 30 秒，然后浸泡在 10% 次氯酸钠溶液中 12 分钟，再用无菌水冲洗 3~4 次后接种到 1/2MS 基本培养基上（所采用的 MS 培养基来自于公开报道的 MS 基本培养基，该培养基包括其无机成分和有机成分和铁盐。将制备好的培养基在 121℃，高压蒸汽灭菌 20 分钟）。在离体条件下将苎麻种子培养成无菌的实生苗。本发明选苗龄为 4~6 天的实生苗的子叶作为转化的材料（具体步骤及其培养基成分参见本说明书的《发明内容部分》）。

转化实验前一天按照常规方法培养农杆菌 LBA4404（由华中农业大学园艺林学学院谢从华教授惠赠）。具体步骤是：将保存在 -70℃ 的农杆菌 LBA4404 取出，在冰上缓慢融化，然后接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基（10 g/L 胰化蛋白胨 + 5 g/L 酵母提取物 + 10 g/L

NaCl + 12 g/L 琼脂粉, pH 值 7.0) 中, 28℃ 暗培养 2~3d 后挑取单菌落, 重新接种于含 50 mg/L Km 的 MGL 液体培养基 (5 g/L 胰化蛋白胨 + 5 g/L NaCl + 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O + 0.25 g/L KH₂PO₄ + 5 g/L 甘露醇 + 1.0 g/L 甘氨酸, pH 值 5.6) 中, 28℃, 220 r/min 培养至对数期, 转化前将农杆菌菌液用 pH7.0 的 MS 基本培养基的液体培养基稀释到 OD_{560nm} 为 0.25~1.5, 室温 (20~25℃) 放置备用。

在培养皿中切取 4~6 天苎麻实生苗的子叶, 然后加入 10~20 ml 稀释好的上述农杆菌菌液, 摇动培养皿, 使农杆菌充分接触子叶, 5~10 分钟后用滤纸吸尽菌液, 然后薄薄的平铺于共培培养基 (MS 基本培养基 + 0.5 mg/L 噻苯隆 + 0.01 mg/L 吲哚乙酸 + 3% 葡萄糖 + 0.8% 琼脂粉 + 0~200 mg/L 乙酰丁香酮, 补充水分至 1L, 调 pH 至 5.6~6.0) 上, 15~28℃ 条件黑暗或光照培养(3000 lux)1~4 天。

共培养 1~4 天后, 将所述的苎麻子叶转移到选择性再生培养基上 (MS 基本培养基 + 0.5 mg/L 噻苯隆 + 0.01 mg/L 吲哚乙酸 + 3% 葡萄糖 + 0.8% 琼脂粉 + 500 mg/L 孢霉素 + 20 mg/L 卡那霉素, 补充水分至 1L, 调 pH 至 5.8), 每个培养皿放置数十个, 置于 25±3℃ 条件下培养, 培养约 6~8 周后, 部分子叶产生抗性再生芽。

切下抗性再生芽转移到选择性伸长培养基 (MS 基本培养基 + 1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤 + 3% 葡萄糖 + 0.8% 琼脂粉 + 200 mg/L 头孢霉素 + 30 mg/L 卡那霉素, 补充水分至 1L, 调 pH 至 5.8), 置于 25±3℃ 条件下光照培养(3000 lux), 约 30 天更换一次新鲜培养基。

为了提高苎麻子叶的转化效率, 本发明比较并筛选了几种方案 (参见表 1 至表 6), 以观察对转化的效应。研究发现在本发明中, 农杆菌菌液浓度、预培养时间, 共培养培养基中乙酰丁香酮的浓度、共培养的光照条件、共培养温度、共培养时间、共培养培养基的 pH 值等因素都对农杆菌介导的苎麻遗传转化效率有显著影响。

表 1 不同农杆菌菌液浓度对苎麻子叶转化的影响

农杆菌浓度 (OD)	能再生及产生愈伤组织的外植体频率 (%)	抗性芽再生频率 (%)	平均抗性芽数
0.25	92.7 ± 3.5 ab	21.9 ± 8.1 a	1.3 ± 0.1 ab
0.5	96.4 ± 1.6 a	23.5 ± 8.6 a	1.5 ± 0.2 a
0.8	96.1 ± 1.1 a	22.7 ± 5.1 a	1.2 ± 0.2 b
1.5	90.9 ± 2.6 b	9.2 ± 1.7 b	1.2 ± 0.1 b

注: 表中的数值为平均值 ± 标准误, 在同一列中数值后的不同字母表示在 P<0.05 水平下差异显著。下同。试验所用的培养基组分如下: MS 基本培养基 + 0.5 mg/L 噻苯隆 + 0.01 mg/L 吲哚乙酸 + 3% 葡萄糖 + 0.8% 琼脂粉 + 50 mg/L 乙酰丁香酮, 补充水分至 1L, 调 pH 至 5.8。

表 1 所示的结果表明农杆菌侵染子叶时, 农杆菌的菌液浓度在 OD_{560nm} 为 0.5 为最佳。

表 2 的结果则说明苎麻子叶外植体在共培养培养基中添加 50 mg/L 乙酰丁香酮效果最佳 (见表 2)。

表 2 共培养培养基中乙酰丁香酮（AS）的浓度对苾麻子叶转化的影响

AS 浓度（mg/L）	能再生及产生愈伤组织的外植体频率（%）	抗性芽再生频率（%）	平均抗性芽数
0	95.2 ± 3.6 a	9.7 ± 2.3 c	1.4 ± 0.3 a
50	97.2 ± 1.9 a	20.9 ± 0.7 a	1.9 ± 0.3 a
100	96.0 ± 3.1 a	18.8 ± 1.0 a	1.6 ± 0.5 a
200	96.4 ± 2.5 a	14.7 ± 0.9 b	1.5 ± 0.4 a

注：试验所用的培养基组分如下：MS 基本培养基 + 0.5 mg/L 噻苯隆 + 0.01 mg/L 吲哚乙酸 + 3% 葡萄糖 + 0.8%琼脂粉 + 0~200 mg/L 乙酰丁香酮，补充水分至 1L，调 pH 至 5.8。

表 3 共培养培养基的 pH 值对苾麻子叶转化效率的影响

pH	能再生及产生愈伤组织的外植体频率（%）	抗性芽再生频率（%）	平均抗性芽数
5.5	91.6±4.2 ab	10.1±0.2 d	1.4±0.2 ab
5.6	87.6±4.0 ab	9.6±0.3 d	1.0±0.1 b
5.7	87.1±4.1 b	14.7±2.2 c	1.5±0.1 ab
5.8	92.9±2.2 ab	18.1±1.9 ab	1.5±0.2 ab
5.9	93.7±3.2 a	21.0±1.8 a	1.7±0.1 a
6.0	88.2±1.9 ab	16.5±1.8 bc	1.5±0.1 ab

注：试验所用的培养基组分如下：MS 基本培养基 + 0.5 mg/L 噻苯隆 + 0.01 mg/L 吲哚乙酸 + 3% 葡萄糖 + 0.8%琼脂粉 + 0~200 mg/L 乙酰丁香酮，补充水分至 1L，调 pH 至 5.5~6.0。

由表 3 的结果可以看出，共培养培养基的 pH 值为 5.9 时转化效率最佳。

表 4 共培养温度对苾麻子叶转化效率的影响

共培养温度	能再生及产生愈伤组织的外植体频率（%）	抗性芽再生频率（%）	平均抗性芽数
15	16.8±2.1 c	2.0±0.1 c	1.0±0.0 c
20	94.5±2.0 a	22.1±2.8 a	1.6±0.1 a
25	96.0±1.5 a	8.2±1.6 b	1.3±0.2 b
28	81.7±5.5 b	2.2±0.1 c	1.0±0.0 c

注：试验所用的培养基同表 1 所示。

由表 4 的结果可以看出，共培养在 20℃时效果最佳。表 5 的结果可以看出，共培养应在黑暗条件下进行。共培养的时间为 72h 最佳（见表 6）。

表5 共培养光照条件对苾麻子叶转化效率的影响

光照条件为3000 lux			
共培养光照时间/黑暗	能再生及产生愈伤组织的外植体频率（%）	抗性芽再生频率（%）	平均抗性芽数
16/8h	87.3±3.5 b	9.5±2.1 b	1.3±0.3 a
黑暗	100.0±0.0 a	19.5±1.4 a	1.8±0.4 a

注：试验所用的培养基同表 1 所示。

表6 共培养时间对苾麻子叶转化效率的影响

共培养时间 (h)	能再生及产生愈伤组织的外植体频率 (%)	抗性芽再生频率 (%)	平均抗性芽数
24	94.0±5.3 b	11.3±1.9 c	2.0±0.3 a
48	100.0±0.0 a	18.3±2.3 b	2.0±0.6 a
72	100.0±0.0 a	22.5±2.5 a	1.8±0.3 a
96	98.6±1.2 a	13.0±0.9 bc	1.1±0.1 b

注：试验所用的培养基同表 1 所示。

实施例 2

在实施例1的基础上，当实施例1的抗性芽生长至2厘米左右时将其切下，转移到选择性生根培养基（1/2 MS基本培养基 + 0~0.1 mg/L 萘乙酸 + 3%葡萄糖 + 0.8%琼脂粉 + 100 mg/L 头孢霉素 + 30 mg/L 卡那霉素，补充水分至1L，调pH 至 5.8）中进行生根培养，置于25±3℃条件下光照培养(3000 lux)。约2周后即可产生大量正常的根。由表7的结果可以看出，生根培养基中的萘乙酸最佳浓度为0.025 mg/L。

表 7 萘乙酸（NAA）浓度对苾麻子叶转化再生苗生根的影响

NAA 浓度 (mg/L)	生根率	生根条数	根的状态
0 (CK)	100%	6.4 ± 0.7 e	细
0.001	100%	9.7 ± 0.6 c	较细
0.005	100%	12.0 ± 1.0 b	较粗
0.025	100%	15.3 ± 0.6 a	粗
0.05	100%	8.0 ± 1.0 d	较粗
0.1	100%	4.3 ± 0.6 f	较粗

从三角瓶中取出完整植株，用自来水洗净根上的培养基后移栽到塑料杯（杯中装有土、蛭石和沙的混合物，比例按重量计：土：蛭石：沙=2：1：1）中，约 15 天左右即可将幼苗移栽到大田。

根据以上参数优化的结果，本发明建立了优化的苾麻遗传转化的操作程序如下(所有的程序是建立在实施例 1 的基础上)：

(1) 取苾麻无菌培养的 4d 苗龄的实生苗的子叶作为转化外植体（见图 3A）。

(2) 将保存在-70℃的农杆菌 LBA4404 取出，在冰上缓慢融化，然后接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基（10 g/L 胰化蛋白胨 + 5 g/L 酵母提取物 + 10 g/L NaCl + 12 g/L 琼脂粉，pH 值 7.0）中，28℃暗培养 2~3d 后挑取单菌落，重新接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 MGL 液体培养基(5 g/L 胰化蛋白胨 + 5 g/L NaCl + 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O + 0.25 g/L KH₂PO₄

+ 5 g/L 甘露醇 + 1.0 g/L 甘氨酸, pH 值 5.6) 中, 28℃, 220 r/min 培养至对数期。用分光光度计 560 nm 波长将菌株浓度调节至 0.5OD。

(3) 将从苎麻外植体上切下的子叶置于无菌培养皿上, 倒入调节好浓度的农杆菌菌液将子叶完全淹没, 轻轻摇动 5~10 min (见图 3 B)。

(4) 用移液器吸去菌液, 再用无菌滤纸吸干子叶表面的多余菌液, 然后薄薄的平铺于附加 50 mg/L 乙酰丁香酮, pH 为 5.9 的如实施例 1 所述的共培培养基上 (图 3C)。于 21℃, 黑暗条件下培养 72 h。

(5) 把经过共培养的子叶挑出, 转入到如实施例 1 所述的选择培养基上进行脱菌和选择培养, 大约 6-8 周后有抗性芽出现 (图 3D, 图 3DD、DDD 为对照)。

(6) 当抗性芽长至 1 cm 左右高时, 小心切取抗性芽转入到如实施例 1 所述的伸长培养基中进行伸长培养, 同时抗性芽会在这个过程中增殖 (图 3 E)。

(7) 将长至高为 2 cm 以上的抗性小苗转入到如实施例 1 所述的生根培养基中生根 (图 3F, FF)。

(8) 将符合移栽要求的生根苗的从瓶中取出, 依次炼苗 (图 3G) 和移栽 (图 3 H)。

实施例 3

为了验证实施例 2 所述的操作流程的有效性, 使用了 4 种不同基因型的苎麻品种或品系的苎麻子叶进行了遗传转化比较研究, 表 8 的结果表明: 利用本发明, 所测试的 4 个基因型苎麻品种(品系)都能够得到抗性植株, 虽然基因型间抗性芽再生频率差异显著, 但再生频率都在 10%以上, 从而证明了本发明转化方法的广泛有效性 (即本发明的方法适用于不同来源的苎麻品种或品系)。

表 8 本发明的转化方法对不同基因型苎麻的转化效率

基因型	能再生及产生愈伤组织的外植体频率 (%)	抗性芽再生频率 (%)	平均抗性芽数
芦竹青	92.8±3.1 b	10.5±1.9 b	1.3±0.3 b
年红丛茭麻	93.4±3.5 ab	12.9±2.8 b	1.5±0.2 ab
华苎 4 号	94.1±2.7 a	14.5±3.3 b	1.4±0.1 b
5041-3	94.5±2.1 a	24.7±1.2 a	1.6±0.1 ab

品种来源: 芦竹青 (来自湖南省地方品种)、年红丛茭麻 (来自湖南省地方品种)、华苎 4 号 (华中农业大学培育的苎麻新品种, 日前已经在生产上大面积推广应用, 且通过了湖北省农作物品种审定委员会审定的品种)、5041-3 (Wang et al., 2007), 以上品种均种植在华中农业大学苎麻种质资源圃。

实施例 4

对转化过程中 GUS 基因的表达进行了瞬时表达检测和稳定表达检测。在实施例 1、2 和 3 的基础上, 取与农杆菌共培养 48 h 后的苎麻子叶外植体, 利用常规的 GUS 染色方法 (Jefferson, 1987) 对所述的苎麻子叶外植体进行了检测, 瞬时表达检测的结果如图 4A、AA 所示。结果

显示苧麻子叶外植体的瞬时表达频率接近 100%，说明苧麻子叶对于农杆菌的 LBA4404 菌株具有良好的敏感性。

进一步，申请人对得到的苧麻抗性植株进行了 GUS 检测。结果显示，大部分的苧麻子叶外植体在经过农杆菌侵染后能在选择培养基上存活，而对照（没有经过农杆菌侵染的苧麻子叶外植体）在选择培养基上则全部死亡。为了更进一步验证，随机选取在选择培养基上产生 20 株抗性植株进行了 GUS 检测，其中 19 株抗性植株都检测到了 GUS 表达（见图 4B），说明外源基因的瞬时表达与稳定表达趋于一致。在本实施例中对伸长生长后的苧麻抗性芽也进行了 GUS 检测，结果表明，GUS 在苧麻抗性芽的不同组织、器官中都有较强的表达（见图 4C）。

对抗性植株进行 PCR 检测。用 Npt II 基因（Pridmore, 1987）设计引物，上游引物为 P₁: AGA CAA TCG GCT GCT CTG AT(forward)，下游引物为 P₂: TCA TTT CGA ACC CCA GAG TC(reverse)，扩增大约 700bp 的 Npt II 基因片断在所得到的 22 株转基因植株中，有 20 株扩增出了目的片断（图 5），PCR 阳性率达到了 90.9%，证明转化体系的筛选条件较严格，能够较好地控制假阳性植株的产生。

对部分抗性植株进行了 Southern 杂交检测。从 22 株苧麻转化的抗性植株中随机挑取 5 株作 PCR 检测呈阳性的抗性植株，利用 Npt II 基因的扩增片段作探针，对这 5 株 PCR 阳性单株进行单酶切分子杂交。图 6 的结果表明这些再生植株均被证实含有所转入的外源目的基因片段，说明外源基因已经整合进苧麻基因组。

参考文献

1. 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 第二版. 北京: 科学出版社, 2002
2. 闫新莆. 转基因植物. 北京: 科学出版社, 2003
3. 陈德富, 陈喜文. 苧麻外源基因导入研究简报, 见: 李宗道主编, 苧麻生物技术研究进展. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1996, 321-323
4. 蒋建雄. 苧麻分子育种研究. [博士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2000
5. 陈建荣, 张学文, 郭清泉, 唐香山, 杨友才. CCoAOMT 基因反义表达载体的构建及转化苧麻的研究. 湖南师范大学学报自然科学版, 2005, 28: 75-78
6. 陈建荣, 郭清泉, 张学文, 陈婕. 农杆菌介导苧麻叶片遗传转化体系的研究. 中国农学通报, 2005, 21: 63-66
7. 易自力, 李祥, 蒋建雄, 王志成, 刘清波. 苧麻再生体系的建立及抗虫转基因苧麻的获得. 中国麻业, 2006, 28: 61-66
8. 张福泉, 蒋建雄, 郑思乡, 李宗道, 周光宇. 棉花 DNA 导入苧麻引起变异的研究. 中国农业科学, 2000, 33: 103-106
9. Dusi D M A, Almeida M D E R P, Caldas L S, Gander E S. Transgenic plants of ramie (*Boehmeria nivea* Gaud.) obtained by Agrobacterium mediated transformation, *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 625-628
10. Birch R G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 297-326

-
11. Wang B, Peng D X, Liu L J, Sun Z X, Zhang N, Gao S M. An efficient adventitious shoot regeneration system for ramie (*Boehmeria nivea* Gaud) using thidiazuron. *Bot Studies*, 2007, 48: 173-180
 12. Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Bio Rep*, 1987, 6: 387-405
 13. Pridmore R D. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene*, 1987, 56: 309 - 312

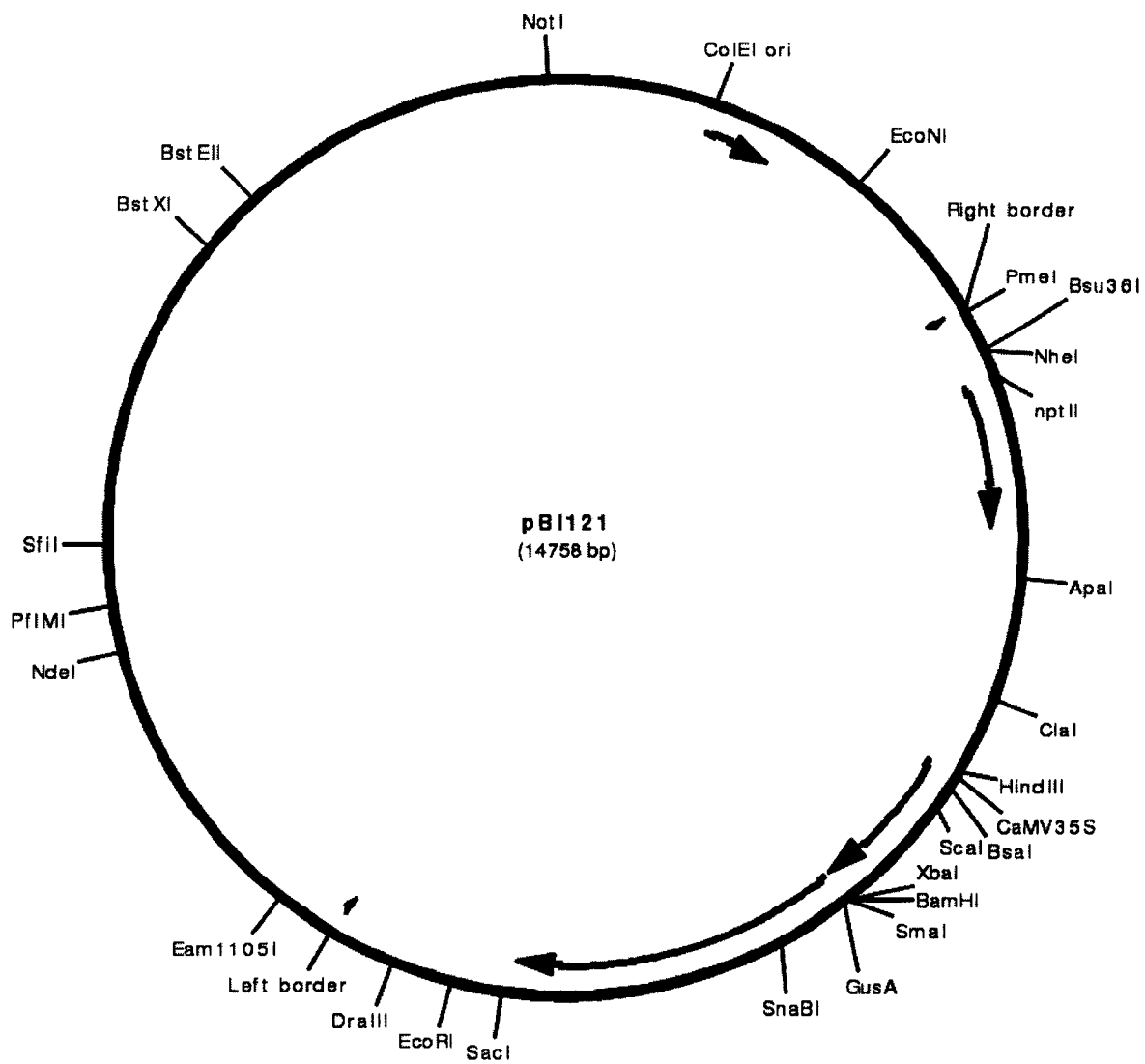


图 1

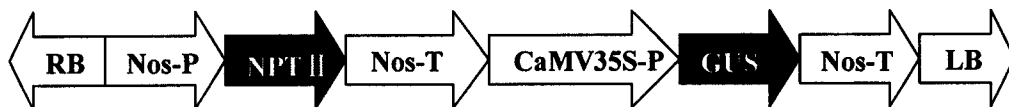


图 2

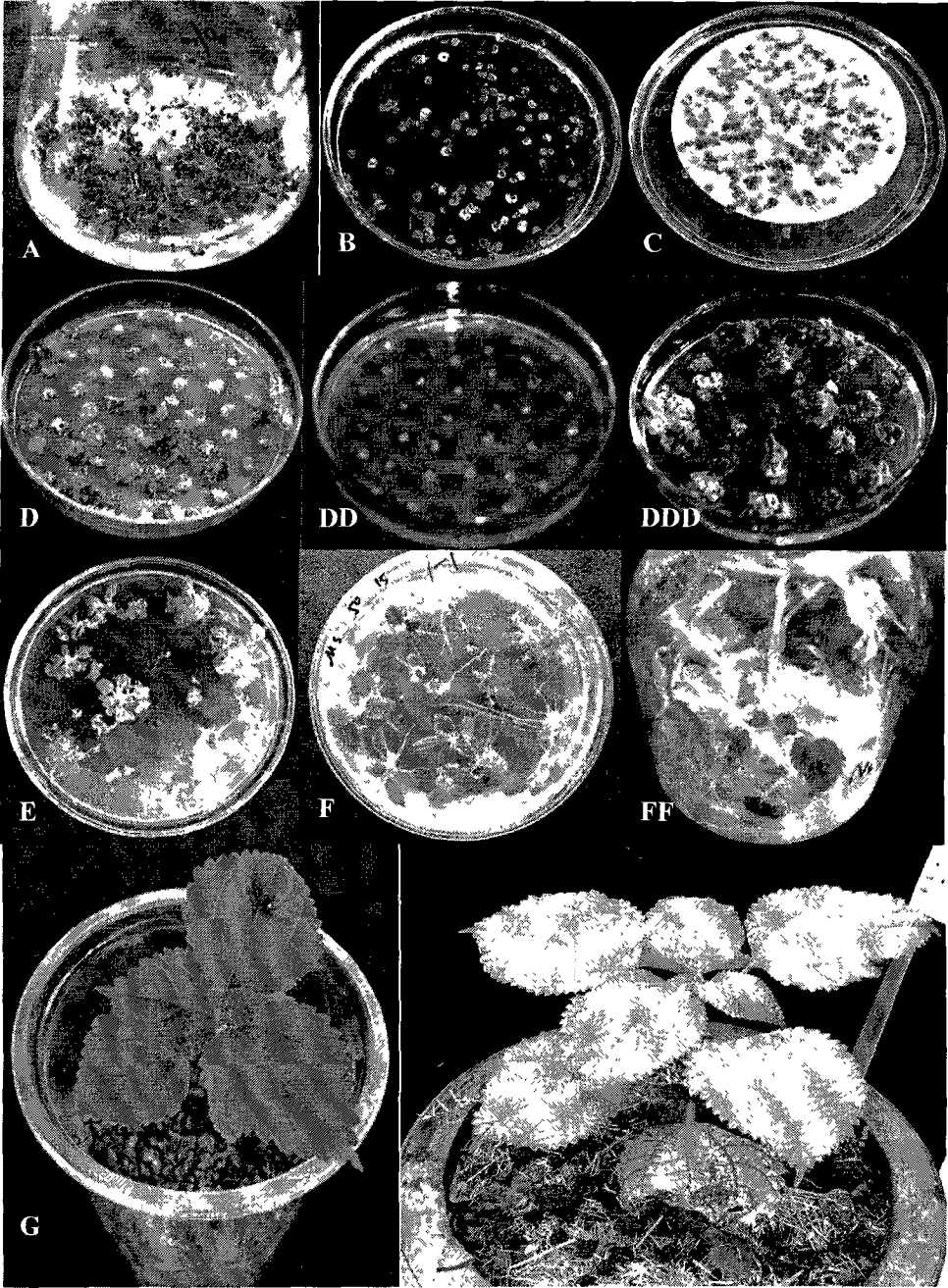


图 3

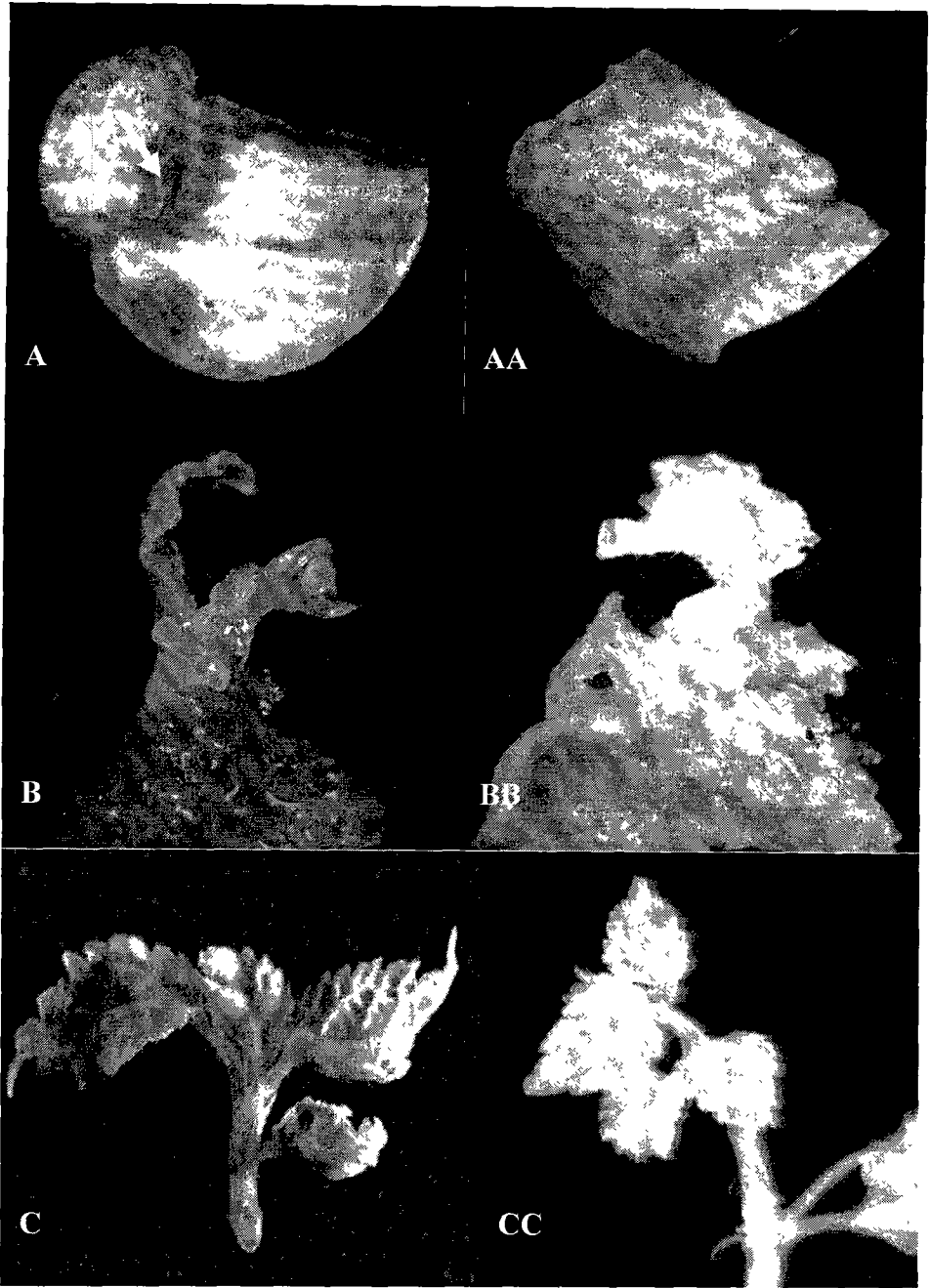


图 4

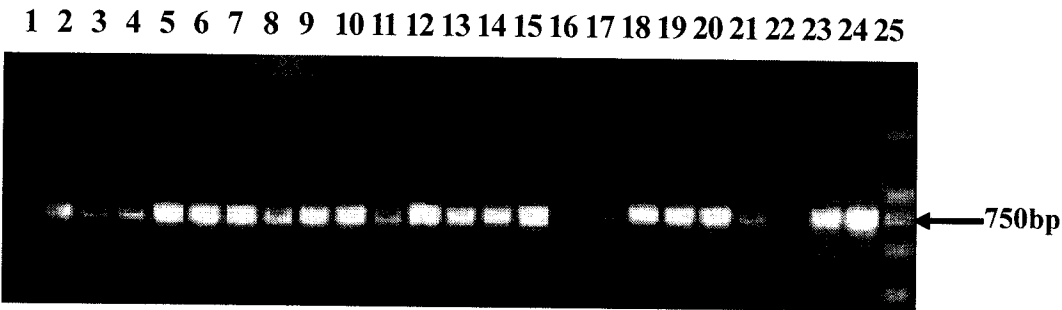


图 5

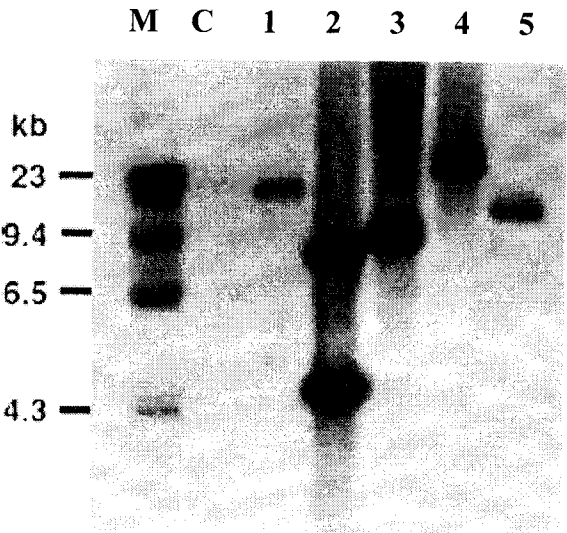


图 6