|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.20 |
| CCS | B 25 |

|  |
| --- |
| DB 42 |

湖北省地方标准

DB 42/T XXXX—XXXX

农杆菌介导黑麦草遗传转化技术规程

Technical code of practice for Agrobacterium-mediated Ryegrass Genetic Transformation

征求意见稿

（本修订稿完成时间：2024年10月10日）

2024 - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

湖北省市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc143267558)

[**1 范围** 1](#_Toc143267559)

[**2 规范性引用文件** 1](#_Toc143267560)

[**3 术语和定义** 1](#_Toc143267561)

[**4 培养基** 1](#_Toc143267562)

[**5 种子消毒** 2](#_Toc143267563)

[**6 愈伤组织准备** 3](#_Toc143267564)

[**7 侵染液制备与愈伤组织预培养** 3](#_Toc143267565)

[**8 遗传转化** 3](#_Toc143267566)

[**9 生根培养** 4](#_Toc143267567)

[**10 移栽** 4](#_Toc143267568)

[**11 阳性苗的鉴定** 5](#_Toc143267569)

1. 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国科学院武汉植物园提出。

本文件由湖北省农业农村厅归口。

本文件起草单位：中国科学院武汉植物园、湖南农业大学。

本文件主要起草人：陈良、谢燕、马光婧、曹丽雯、蒲军保、黄雪冰、胡龙兴、徐倩、卢蕊。

本文件实施应用中的疑问，可咨询湖北省农业农村厅，联系电话：027-87665821，邮箱：hbsnab@126.com；对本文件的有关修改意见建议请反馈至中国科学院武汉植物园，联系电话：13657249556，邮箱：[xieyan60b@126.com](mailto:xieyan60b@126.com)。

农杆菌介导黑麦草遗传转化技术规程

* 1. **范围**

本文件确立了黑麦草（*Lolium perenne L.*）遗传转化的培养基、种子消毒、愈伤组织准备、侵染液制备与愈伤组织预培养、遗传转化、生根培养、移栽、阳性苗鉴定等技术要求。

本文件适用于农杆菌介导黑麦草遗传转化技术操作的全过程。

* 1. **规范性引用文件**

本文件没有规范性引用文件。

* 1. **术语和定义**

下列术语和定义适用于本文件。

**3.1 植物遗传转化 Plant genetic transformation**

通过化学,物理以及生物途径将目的外源基因导入受体植物基因组中,使其在受体植物细胞内表达,以期改良植物的遗传性状。

**3.2 农杆菌侵染 Agrobacterium infection**

农杆菌侵入并感染植物外植体的过程。

**3.3 愈伤组织** **Callus**

原指植物体的局部受到创伤刺激后,在伤口表面新生的组织。在组织培养中则指人工培养基上由外植体长出来的一团无序生长的薄壁细胞

* 1. **培养基** 
     1. **诱导培养基**

用于黑麦草愈伤组织的诱导培养。成分为（1L）: N6培养基粉末（含有大量、微量、有机和铁盐）3.98 g，酸水解络蛋白 1 g，脯氨酸 1 g，麦芽糖 30 g， 2,4-D （2,4-二氯苯氧乙酸） 7 mg， 6-AB （6-苄氨基嘌呤） 0.05 mg，植物凝胶 3.5 g；pH=5.8。

* + 1. **继代培养基**

用于黑麦草愈伤组织的继代培养。成分为（1 L）: N6培养基粉末（含有大量、微量、有机和铁盐）3.98 g，酸水解络蛋白 1 g， 脯氨酸 1 g，麦芽糖 30 g，2,4-D 5 mg，6-AB 0.1 mg，植物凝胶 3.5 g，pH=5.8。

* + 1. **侵染液培养基**

用于加入农杆菌菌液配置侵染液。成分为（1 L）: N6培养基粉末（含有大量、微量、有机和铁盐）1.99 g，脯氨酸 1 g，葡萄糖 30 g，2,4-D 5 mg，6-AB 0.1 mg，As （乙酰丁香酮）200 μm，pH=5.4。

* + 1. **共培养培养基**

用于侵染后黑麦草愈伤组织与农杆菌的共培养。成分为（1L）: N6培养基粉末（大量、微量、有机和铁盐）3.98 g，酸水解络蛋白 1 g，脯氨酸 1 g，麦芽糖 60 g， 2,4-D 5 mg，6-AB 0.1 mg，植物凝胶 3.5 g，As 200 μm，pH=5.7。

* + 1. **筛选培养基**

用于黑麦草愈伤组织转化后的筛选培养。成分为（1 L）: N6培养基粉末（含有大量、微量、有机和铁盐）3.98 g， 酸水解络蛋白 1 g，脯氨酸 1g，麦芽糖 30 g，2,4-D 5 mg， 6-AB 0.1 mg，植物凝胶 3.5 g，TMT（特美汀）200 mg，潮霉素 50 mg，pH=5.7。

* + 1. **分化培养基**

用于黑麦草愈伤组织的分化培养。成分为（1 L）: MS培养基粉末（含有大量、微量、有机和铁盐）4 g，麦芽糖 30 g，6-AB 0.5 g，植物凝胶 3.5 g，TMT 150 mg, 潮霉素 25 mg，pH=5.7。

* + 1. **生根培养基：**

用于黑麦草分化苗的生根培养。成分为（1 L）: MS培养基粉末（含有大量、微量、有机和铁盐）4 g，麦芽糖 30 g，植物凝胶 3.5 g，TMT 150 mg, 潮霉素 25 mg，pH=5.7。

* 1. **种子消毒**
     1. **去皮**

将种子放入65 ℃烘箱热处理5天，之后将种子置于50 ml离心管中，加入50 %浓硫酸35 mL，将离心管放入30 ℃摇床上晃动30分钟，然后用清水冲洗5遍。

* + 1. **消毒**

将去皮后的种子用84消毒液消毒20分钟（期间放入30℃摇床上晃动），然后在超净工作台中，用无菌水冲洗种子6遍备用。一般消毒后的种子在24小时内使用。

* 1. **愈伤组织准备**
     1. **愈伤组织诱导**

在超净工作台中，将灭菌后的种子置于无菌滤纸上，用无菌的手术刀纵向将种子切成两半，露出种子胚乳，然后将切成两半的黑麦草种子均匀放置到诱导培养基上进行愈伤组织的诱导，每皿 40-50 粒种子。培养环境：温度24℃，黑暗条件，诱导时间为45天。

* + 1. **愈伤组织继代**

在超净工作台中，将诱导45天的愈伤组织用无菌镊子转移至继代培养基中，使愈伤组织继续生长。培养环境：温度24 ℃，黑暗条件，宜25天继代一次。

* 1. **侵染液制备与愈伤组织预培养**
     1. **菌液活化**

挑取含有目的基因的农杆菌EHA105单菌落（或是冻存于超低温冰箱中含有目的基因的农杆菌EHA105菌液），在含有载体相应抗性和利福平的液体LB培养基中过夜培养（28℃，220 rpm）；菌液PCR验证所挑菌落含有目标载体后，将菌液扩大培养至OD 600 = 1.6-1.8。

* + 1. **侵染液制备**

将培养好的菌液用离心机以5000 rpm的转速离心5分钟，去上清，加入侵染液将沉菌悬浮起来，重复两次；最后用侵染液将沉菌悬浮且OD600=0.6-0.8，放入28℃培养箱中培养1-2小时，待用。

* + 1. **愈伤组织预培养**

将愈伤组织提前移至含有200 μm As （乙酰丁香酮）的继代培养基中，培养2-3天。培养环境：温度24 ℃，黑暗条件。

* 1. **遗传转化**
     1. **愈伤组织的侵染**

将预培养好的愈伤组织加入放有侵染液的培养瓶中，6 kpa抽真空3-5 分钟，然后放入摇床（28 ℃、100 rpm）培养15 分钟，使愈伤组织完全浸入侵染液。

* + 1. **共培养**

将侵染过的愈伤组织转移至无菌的吸水纸上，吸干表面残留的侵染液，放入共培养培养基上，进行共培养。培养环境：温度24 ℃，黑暗条件，培养时间3天。

* + 1. **脱菌处理及筛选培养**

将共培养后的愈伤组织放入无菌培养瓶中，加入含有200 mg·L-1特美汀的无菌水晃动10秒，倒出无菌水，重复上述操作4-5遍后，将愈伤组织转移到无菌吸水纸上，吸干愈伤组织表面的液体，放入筛选培养基上进行筛选培养。培养环境：温度24 ℃，黑暗条件，培养时间30天。

* + 1. **分化培养**

将筛选培养后的愈伤组织转移到分化培养基上，进行愈伤组织的分化培养。培养环境：温度24 ℃，光照强度3000 Lux，光照时间14 小时，培养时间30天。

* 1. **生根培养**

将分化出的黑麦草幼苗（高度大概0.5-1 cm）转移到装有生根培养基的培养瓶中进行生根培养。培养环境：温度24 ℃，光照强度3000 Lux，光照时间14 小时，培养时间30-40天。

* 1. **移栽**
  2. **炼苗**

待幼苗根生长至2-3 cm时打开培养瓶盖子，在培养室炼苗1-2天。炼苗环境：温度24 ℃，光照强度3000 Lux，光照时间14 小时。

* 1. **移栽**

选择生长健康的组培苗从组培瓶中移出，洗净根部残留培养基，用自来水浸泡根系2-4小时，移栽至装有湿润育苗土的花盆中，定期浇水，室内培养14天。培养环境：温度24 ℃，光照强度6000 Lux，光照时间14 小时。

* 1. **阳性苗的鉴定**
  2. **阳性苗的PCR鉴定**

提取移栽后成活的组培苗基因组DNA ，以野生型植株DNA为阴性对照，质粒为阳性对照，采用潮霉素抗性基因特异性引物进行PCR扩增，扩增产物用1 %琼脂糖凝胶电泳进行检测。凝胶电泳检测扩增出与潮霉素抗性基因大小一致的片段，确定为阳性苗。

* + 1. 潮霉素抗性基因引物序列：5’-TACACAGGCCATCGGTCCAGA-3’, 5’- TAGGAGGGCGTGGATATGTC-3’。
    2. PCR反应体系（10 uL）：基因组DNA 5 ng，10 mM 潮霉素抗性基因上下游引物各0.25 uL, Green Taq 5 uL，ddH2O补齐10 uL反应体系。
    3. PCR反应条件：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，56 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 90 s，30个循环；72 ℃延伸 7 min。
  1. **阳性苗GUS检测**

转化质粒如带有GUS标签，可用GUS染色进行鉴定。剪取移栽后成活的组培苗叶片放入加有GUS染色液的棕色离心管中，6 kpa抽真空5分钟，然后37°C 染色 6-12 小时。用 70 %乙醇在 70°C 水浴锅中脱色 5-10 分钟，重复多次，直至叶片背景色素消失，阳性苗脱色后叶片呈现蓝色。





