

# 权 利 要 求 书

---

1. 一种根癌农杆菌介导的草莓高效稳定的遗传转化方法,其特征在于,包括:

5 草莓无菌苗的预培养:取草莓无菌苗,获得其叶盘或剪成小块,置于 M1 培养基中进行暗培养,获得预培养叶片;

农杆菌活化:取根癌农杆菌阳性单克隆于含抗生素的 YEB 液体培养基中,黑暗条件下振荡培养,获得菌液;取获得的菌液离心收菌,获得菌体沉淀;将获得的菌体沉淀重悬于 M2 培养基中,振荡培养,获得用于侵染的菌液;

10 侵染:将获得的所述预培养叶片置于所述用于侵染的菌液中,进行侵染处理;

共培养:吸干经侵染处理后的叶片表面的菌液,置于 M3 培养基中,进行暗培养;

延迟筛选:用 M4 洗涤液洗涤经共培养结束后的叶片,并吸干其表面的菌液,再接种于 M5 培养基上,进行暗培养;

15 筛选:将延迟筛选结束后的叶片转移至 M6 培养基中,光照和黑暗交替培养,培养结束后,切除坏死组织,将愈伤组织部分转接于 M7 培养基中,再光照和黑暗交替培养,直到分化出不定芽;

生根:待芽长长后,将其切下转移至 M8 培养基中再培养,得到完整植株;

20 所述 M6、M7 培养基的成分均包括 MS、B5 维生素、3%蔗糖、0.25%植物凝胶、2~3mg/L 激素及抗生素,且 M6、M7 培养基的 PH 值均为 5.8;其中所述 M6 中,所加入的抗生素的浓度为 500~510mg/L,所述 M7 中,所加入的抗生素的浓度为 510~535mg/L;

在延迟筛选培养中,接种于 M5 培养基上进行培养的条件是 22℃ 条件下

暗培养 6 天；在筛选培养中，所述光照和黑暗交替培养具体为 16 小时的光照培养和 8 小时的黑暗培养交替培养 15~20 天。

2. 根据权利要求 1 所述的根癌农杆菌介导的草莓高效稳定的遗传转化方法，其特征在于，所述根癌农杆菌为 LBA4404 农杆菌或 GV3101 农杆菌。

5        3. 根据权利要求 1 所述的根癌农杆菌介导的草莓高效稳定的遗传转化方法，其特征在于，所述 M3 培养基的成分包括 MS 无机盐、B5 维生素、3%蔗糖、0.25%植物凝胶、2~3mg/L 激素、100  $\mu\text{mol/L}$  乙酰丁香酮及 50~100  $\mu\text{mol/L}$  的  $\alpha$ -硫辛酸，且其 PH 值为 5.5。

10       4. 根据权利要求 3 所述的根癌农杆菌介导的草莓高效稳定的遗传转化方法，其特征在于，所述 M5 培养基的成分包括 MS、B5 维生素、3%蔗糖、0.25%植物凝胶、2~3mg/L 激素、480~500mg/L 抗生素及 50~100  $\mu\text{mol/L}$  井冈霉素 A，且其 PH 值为 5.8。

15       5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的根癌农杆菌介导的草莓高效稳定的遗传转化方法，其特征在于，所述 M1 培养基的成分包括 MS、B5 维生素、3%蔗糖、0.25%植物凝胶和 2~3mg/L 激素；且其 PH 值为 5.8。

6. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的根癌农杆菌介导的草莓高效稳定的遗传转化方法，其特征在于，所述 M2 培养基的成分包括 MS、B5 维生素、2%蔗糖及 100  $\mu\text{mol/L}$  的乙酰丁香酮，且其 PH 值为 5.5。

20       7. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的根癌农杆菌介导的草莓高效稳定的遗传转化方法，其特征在于，所述 M4 洗涤液的成分包括 MS、B5 维生素、3%蔗糖及 480~500mg/L 抗生素，且其 PH 值为 5.8。

8. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的根癌农杆菌介导的草莓高效稳定的遗传转化方法，其特征在于，所述 M8 培养基的成分包括 MS、0.5~0.8mg/L 激素和 0.5~7mg/L 抗生素，其 PH 为 5.8。