



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102919131 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 13

(21) 申请号 201210476803. 5

(22) 申请日 2012. 11. 21

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 闫军辉 钟云鹏 程琳静 王彪

武天龙

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限

公司 31220

代理人 刘万磊

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

大豆的组织培养方法

(57) 摘要

本发明公开通过大豆成熟种子子叶节作为外植体产生体细胞胚获得再生植株的方法, 涉及农作物组织培养方法领域。主要步骤包括: 成熟的大豆籽粒萌发得到子叶节外植体, 大豆愈伤组织的诱导, 大豆体细胞胚的诱导, 大豆体细胞胚的分化, 大豆幼胚的伸长与生根, 大豆再生苗炼苗及移栽大田。该方法简单, 易操作, 不受季节限制, 能有效的通过体细胞胚获得大豆再生苗。



1. 大豆的组织培养方法,其特征在于,所述组织培养方法包括将大豆成熟种子的子叶节作为外植体培养成再生植株。

2. 如权利要求 1 所述的组织培养方法,其中,所述组织培养方法包括如下步骤:

- 1) 获得大豆成熟种子的子叶节;
- 2) 将所述子叶节作为外植体诱导愈伤组织;
- 3) 将所述愈伤组织培养成体细胞胚;
- 4) 将所述体细胞胚培养成再生植株。

3. 如权利要求 2 所述的组织培养方法,其中,在第 1) 步中,所述子叶节为大豆成熟种子萌发 5 ~ 7 天后形成的子叶节。

4. 如权利要求 2 所述的组织培养方法,其中,在第 1) 步中,获得子叶节的方法为:挑选健康无病斑的成熟大豆籽粒,清水漂洗干净,75%酒精消毒 30 ~ 60 秒,0.1%的  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  消毒 20 ~ 30 分钟,期间摇晃 5 次左右,无菌水洗去  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  残留,冲洗 5 ~ 8 次,接种在萌发培养基中,无菌萌发 5 ~ 7 天,光照 16h/天,  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ;其中,所述萌发培养基的成分为:MSB+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH 值为 5.8。

5. 如权利要求 2 所述的组织培养方法,其中,在第 2) 步中,诱导愈伤组织的方法为:将子叶节的切面贴在诱导培养基上,暗培养 3-5 周,  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 。

6. 如权利要求 5 所述的组织培养方法,其中,所述诱导培养基的成分为:MSB+4 ~ 6mg/L 2,4-D+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH 值为 5.8。

7. 如权利要求 2 所述的组织培养方法,其中,在第 3) 步中,将所述愈伤组织培养成体细胞胚的方法为:将所述愈伤组织接种在体细胞胚培养基上,培养 3 ~ 5 周,每两周换一次培养基,光照 16h/天,  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 。

8. 如权利要求 2 所述的组织培养方法,其中,在第 4) 步中,将所述体细胞胚培养成再生植株的方法包括:将所述体细胞胚移到生根培养基中,光照 16h/天,  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ,培养 3 ~ 4 周,培养成再生苗。

9. 如权利要求 8 所述的组织培养方法,其中,将所述体细胞胚培养成再生植株的方法还包括:将所述再生苗洗干净,移栽到灭菌的蛭石 / 珍珠岩 = 3 : 1 的花盆中,浇灌无菌的 MSB 溶液,放到保湿盒中培养 2 周复壮,光照 16h/天,  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ,然后移栽到大田中。

10. 如权利要求 1-9 中任一所述的组织培养方法,其中,所述大豆选自:绥农 28、垦丰 16 或合丰 55。

## 大豆的组织培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物的组织培养方法,具体涉及一种通过大豆成熟种子的子叶节作为外植体产生体细胞胚获得再生植株的方法。

### 背景技术

[0002] 通过分子育种及转基因手段来改良大豆种质资源成为了大豆育种的趋势,转基因的主要手段有农杆菌介导转化和基因枪转化方法,组织培养是转基因工作的重要环节。大豆组织培养再生途径主要有两种:器官发生和体细胞胚发生,器官发生所用的外植体一般是无菌苗的子叶节、未成熟种子的子叶和茎尖和无菌苗上胚轴等,其中最为成熟的是大豆子叶节不定芽器官发生体系,但是这种方法存在嵌合体多,纯化和筛选难度大等缺点,而体细胞胚发生途径被认为是最有潜力适合遗传转化的再生体系之一。1983年 Christionson 等首次观测到大豆细胞悬浮培养时体细胞胚胎发生,1989年 Parrott 等使用该体系进行了农杆菌介导转化,但是转化效率低,并且嵌合体多;Finer 等对体细胞发生体系进行了改良,使用未成熟的幼胚作为外植体,成功的得到大豆体细胞转化体系,并且使用农杆菌和基因枪的方法进行了成功的转化,该方法得到很多研究者的青睐。但是未成熟的幼胚获得较为复杂,受季节和环境的限制,需要较大的人力。如何有效方便的得到大豆的体细胞胚,对于大豆的遗传转化具有重要的意义。

### 发明内容

[0003] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提供一种新的大豆的组织培养方法。本发明实施简便,利用本发明通过大豆成熟种子子叶节作为外植体,能够更加有效的、方便的产生体细胞胚获得再生植株。

[0004] 本发明所提供的大豆的组织培养方法包括将大豆成熟种子的子叶节作为外植体培养成再生植株。

[0005] 优选地,所述组织培养方法包括如下步骤:

[0006] 1) 获得大豆成熟种子的子叶节;

[0007] 2) 将所述子叶节作为外植体诱导愈伤组织;

[0008] 3) 将所述愈伤组织培养成体细胞胚;

[0009] 4) 将所述体细胞胚培养成再生植株。

[0010] 优选地,在第1)步中,所述子叶节为大豆成熟种子萌发5~7天后形成的子叶节。更优选地,在第1)步中,获得子叶节的方法为:挑选健康无病斑的成熟大豆籽粒,清水漂洗干净,75%酒精消毒30~60秒,0.1%的Ca(ClO)<sub>2</sub>消毒20~30分钟,期间摇晃5次左右,无菌水洗去Ca(ClO)<sub>2</sub>残留,冲洗5~8次,接种在萌发培养基中,无菌萌发5~7天,光照16h/天,25±3℃;其中,所述萌发培养基的成分为:MSB+7g/L琼脂+30g/L蔗糖,pH值为5.8。

[0011] 优选地,在第2)步中,诱导愈伤组织的方法为:将子叶节的切面贴在诱导培养基上,暗培养3~5周,25±3℃。更优选地,所述诱导培养基的成分为:MSB+4~6mg/L 2,

4-D+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH 值为 5.8。

[0012] 优选地, 在第 3) 步中, 将所述愈伤组织培养成体细胞胚的方法为: 将所述愈伤组织接种在体细胞胚培养基上, 培养 3~5 周, 每两周换一次培养基, 光照 16h/天, 25±3℃。更优选地, 所述体细胞胚诱导培养基的成分为: MSB+0.66g/L 天冬氨酸 +7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH 值为 5.8。

[0013] 优选地, 在第 4) 步中, 将所述体细胞胚培养成再生植株的方法包括: 将所述体细胞胚移到生根培养基中, 光照 16h/天, 25±3℃, 培养 3~4 周, 培养成再生苗。更优选地, 所述生根培养基的成分为: MSB+3%蔗糖 +6.5g/L 琼脂, pH 值为 5.8。

[0014] 优选地, 将所述体细胞胚培养成再生植株的方法还包括: 将所述再生苗洗干净, 移栽到灭菌的蛭石/珍珠岩=3:1 的花盆中, 浇灌无菌的 MSB 溶液, 放到保湿盒中培养 2 周复壮, 光照 16h/天, 25±3℃, 然后移栽到大田中。

[0015] 优选地, 本发明中的大豆选自: 绥农 28、垦丰 16 或合丰 55。

[0016] 在本发明所提供的大豆的组织培养方法中, 以大豆成熟的种子作为外植体, 经过体细胞胚的诱导得到再生苗, 愈伤组织的诱导率可以达到 95-98% (诱导率=生产愈伤组织的外植体数/接种外植体数×100%); 体细胞胚发生率可以达到 45-50% (体细胞胚发生率=出现体细胞胚的愈伤数/接种总愈伤数×100%); 体细胞胚分化率可以达到 50-55% (体细胞胚分化率=体细胞胚分化的愈伤数/含有体细胞胚的愈伤数×100%)。该方法不受季节的限制, 从而建立起一套易于掌握, 简便节约, 快速高效的再生体系。

#### 附图说明

[0017] 图 1 为本发明实施例 1 中的绥农 28 大豆种子在萌发培养基中培养 5 天后的照片。

[0018] 图 2 为本发明实施例 1 中的子叶节在愈伤组织诱导培养基中暗培养 3 周后的照片。

[0019] 图 3 为本发明实施例 1 中的愈伤组织在体细胞诱导培养基中培养的照片。

[0020] 图 4 为本发明实施例 1 中形成的体细胞胚的照片。

[0021] 图 5 为本发明实施例 1 中体细胞胚在分化培养基中分化出子叶期胚的照片。

#### 具体实施方式

[0022] 以下是结合附图和实施例, 对依据本发明提供的具体实施步骤详述如下:

[0023] 实施例 1

[0024] 参照图 1-5。

[0025] (1) 挑选健康无病斑的成熟大豆籽粒绥农 28, 清水漂洗干净, 75%酒精消毒 30 秒, 0.1%的 Ca(ClO)<sub>2</sub> 消毒 20 分钟 (期间摇晃 5 次左右), 无菌水洗去 Ca(ClO)<sub>2</sub> 残留, 冲洗 5 次, 接种在萌发培养基中: MSB+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8, 大豆种子无菌萌发 5 天, 光照 16h/天, 25℃。大豆种子萌发 5 天后的照片如图 1 所示。

[0026] (2) 大豆萌发 5 天后, 切下子叶节, 除净芽点, 将子叶节切面贴在诱导培养基上, 诱导培养基为: MSB+6mg/L 2,4-D+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8, 暗培养 3 周, 25℃。子叶节暗培养 3 周后的照片如图 2 所示。其中, 诱导率为 95% (诱导率=生产愈伤组织的外植体数/接种外植体数×100%)。

[0027] (3) 将暗培养后的愈伤组织接种在体细胞胚诱导培养基上,体细胞胚诱导培养基:MSB+0.66g 天冬氨酸 +7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8, 培养 3 周,每两周换一次培养基,光照 16h/天,25℃。愈伤组织在体细胞胚诱导培养基中培养及形成的体细胞胚的照片如图 3 和图 4 所示。其中,体细胞胚发生率 = 45% (体细胞胚发生率 = 出现体细胞胚的愈伤数 / 接种总愈伤数 × 100%)。

[0028] (4) 将有体细胞产生的愈伤组织移到体细胞胚分化培养基中,体细胞分化培养基:MSB+6% 麦芽糖 +0.5% 活性炭 +7g/L 琼脂, pH = 5.8, 培养 3 周,每隔两周换一次培养基,光照 16h/天,25℃。培养 3 周后的照片如图 5 所示。其中,体细胞胚分化率约为 50% (体细胞胚分化率 = 体细胞胚分化的愈伤数 / 含有体细胞胚的愈伤数 × 100%)。

[0029] (5) 将得到的幼胚移到生根培养基中,生根培养基为 MSB+3% 蔗糖 +6.5g/L 琼脂, pH = 5.8, 培养 3 周,光照 16h/天,25℃。

[0030] (6) 再生苗冲洗干净,除去上面的培养基,移栽到灭菌的蛭石 / 珍珠岩 = 3 : 1 的花盆中,浇灌无菌的 MSB 溶液,放到保湿盒中培养 2 周复壮,光照 16h/天,25℃,然后移栽到大田中。

#### [0031] 实施例 2

[0032] (1) 挑选健康无病斑的成熟大豆籽粒垦丰 16,清水漂洗干净,75% 酒精消毒 45 秒,0.1% 的 Ca(ClO)<sub>2</sub> 消毒 30 分钟 (期间摇晃 5 次左右),无菌水洗去 Ca(ClO)<sub>2</sub> 残留,冲洗 8 次,接种在萌发培养基中:MSB+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8,大豆种子无菌萌发 7 天,光照 16h/天,26℃。

[0033] (2) 大豆萌发 7 天后,切下子叶节,除净芽点,将子叶节切面贴在诱导培养基上,诱导培养基为:MSB+5mg/L 2,4-D+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8,暗培养 4 周,26℃。诱导率为 96%。(诱导率 = 生产愈伤组织的外植体数 / 接种外植体数 × 100%)

[0034] (3) 将暗培养后的愈伤组织接种在体细胞胚诱导培养基上,体细胞胚诱导培养基:MSB+0.66g 天冬氨酸 +7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8, 培养 4 周,每两周换一次培养基,光照 16h/天,26℃。体细胞胚发生率为 48% (体细胞胚发生率 = 出现体细胞胚的愈伤数 / 接种总愈伤数 × 100%)。

[0035] (4) 将有体细胞产生的愈伤移到体细胞胚分化培养基中,体细胞分化培养基:MSB+6% 麦芽糖 +0.5% 活性炭 +7g/L 琼脂, pH = 5.8, 培养 4 周,每隔两周换一次培养基,光照 16h/天,26℃。体细胞胚分化率为 52% (体细胞胚分化率 = 体细胞胚分化的愈伤数 / 含有体细胞胚的愈伤数 × 100%)。

[0036] (5) 将得到的幼胚移到生根培养基中,生根培养基为 MSB+3% 蔗糖 +6.5g/L 琼脂, pH = 5.8, 培养 3.5 周,光照 16h/天,26℃。

[0037] (6) 再生苗冲洗干净,除去上面的培养基,移栽到灭菌的蛭石 / 珍珠岩 = 3 : 1 的花盆中,浇灌无菌的 MSB 溶液,放到保湿盒中培养 2.5 周复壮,光照 16h,26℃,然后移栽到大田中。

#### [0038] 实施例 3

[0039] (1) 挑选健康无病斑的成熟大豆籽粒合丰 55,清水漂洗干净,75% 酒精消毒 60 秒,0.1% 的 Ca(ClO)<sub>2</sub> 消毒 25 分钟 (期间摇晃 5 次左右),无菌水洗去 Ca(ClO)<sub>2</sub> 残留,接种在萌发培养基中:MSB+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8,大豆种子无菌萌发 6 天左右,光照 16h/

天, 28℃。

[0040] (2) 大豆萌发 6 天后, 切下子叶节, 除净芽点, 将子叶节切面贴在诱导培养基上, 诱导培养基为: MSB+4mg/L 2,4-D+7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8, 暗培养 5 周, 28℃。诱导率为 98%。(诱导率 = 生产愈伤组织的外植体数 / 接种外植体数 × 100%)

[0041] (3) 将暗培养后的愈伤组织接种在体细胞胚诱导培养基上, 体细胞胚诱导培养基: MSB+0.66g 天冬氨酸 +7g/L 琼脂 +30g/L 蔗糖, pH = 5.8, 培养 5 周, 每两周换一次培养基, 光照 16h/天, 28℃。体细胞胚发生率为 50% (体细胞胚发生率 = 出现体细胞胚的愈伤数 / 接种总愈伤数 × 100%)。

[0042] (4) 将有体细胞产生的愈伤移到体细胞胚分化培养基中, 体细胞胚分化培养基: MSB+6% 麦芽糖 +0.5% 活性炭 +7g/L 琼脂, pH = 5.8, 培养 5 周, 每隔两周换一次培养基, 光照 16h/天, 28℃。体细胞胚分化率为 55% (体细胞胚分化率 = 体细胞胚分化的愈伤数 / 含有体细胞胚的愈伤数 × 100%)。

[0043] (5) 将得到的幼胚移到生根培养基中, 生根培养基为 MSB+3% 蔗糖 +6.5g/L 琼脂, pH = 5.8, 培养 4 周, 光照 16h/天, 28℃。

[0044] (6) 再生苗冲洗干净, 除去上面的培养基, 移栽到灭菌的蛭石 / 珍珠岩 = 3 : 1 的花盆中, 浇灌无菌的 MSB 溶液, 放到保湿盒中培养 3 周复壮, 光照 16h/天, 28℃, 然后移栽到大田中。

[0045] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解, 本领域的普通技术人员无需创造性劳动就可以根据本发明的构思做出诸多修改和变化。因此, 凡本技术领域的技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案, 皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。







