



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102172222 B

(45) 授权公告日 2012.09.19

(21) 申请号 201110055531.7

(22) 申请日 2011.03.09

(73) 专利权人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

专利权人 中国农业科学院作物科学研究所

from the immature embryonic shoot tip.

《In Vitro Cellular & Developmental

Biology-Plant》.2010, 第 46 卷第 265-273 页.

审查员 贺伊博

(72) 发明人 曹越平 虞薇 邱丽娟

(74) 专利代理机构 上海交达专利事务所 31201

代理人 王锡麟 王桂忠

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

(56) 对比文件

Hai-Kun Liu, et al..Efficient
Agrobacterium tumefaciens -mediated
transformation of soybeans using an
embryonic tip regeneration system.
《Planta》.2004, 第 219 卷第 1042-1049 页.

Murugan Loganathan, et al..Regeneration
of soybean (Glycine max L. Merrill)
through direct somatic embryogenesis

权利要求书 1 页 说明书 2 页

(54) 发明名称

利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法

(57) 摘要

一种农业技术领域的利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,通过将萌动的大豆种子的胚尖平铺于愈伤诱导培养基中暗培养生成愈伤组织,并将获得的愈伤组织平铺于体细胞胚诱导培养基中诱导体细胞胚的发生。本发明采用添加 2,4-D 的 MS 培养基诱导成熟大豆的胚尖获得愈伤组织后形成体细胞胚,通过培养再生出植株。解决了利用大豆未成熟子叶或幼胚等获得体细胞胚的外植体采集时间受季节限制的问题。

1. 一种利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,其特征在于,通过将萌动的大豆种子的胚尖平铺于添加有浓度为 1-5mg/L 的 2,4-D 的 MS 固体培养基的愈伤诱导培养基中暗培养生成愈伤组织,并将获得的愈伤组织平铺于添加有浓度为 4mg/L 以下 2,4-D 的 MS 固体培养基的体细胞胚诱导培养基中诱导体细胞胚的发生。

2. 根据权利要求 1 所述的利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,其特征是,所述的大豆种子经灭菌消毒处理。

3. 根据权利要求 2 所述的利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,其特征是,所述的灭菌消毒处理是指:用氯气进行大豆种子灭菌,而后将大豆种子置于无菌水中浸泡,获得萌动的大豆。

4. 根据权利要求 3 所述的利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,其特征是,所述的无菌水浸泡温度为 24℃ -26℃,浸泡 16-24 小时。

5. 根据上述任一权利要求所述的利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,其特征是,所述的胚尖通过以下方式获得:将萌动的大豆种子的种皮和子叶去除,用灭菌手术刀片切去胚根部分获得胚尖。

6. 根据权利要求 1 所述的利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,其特征是,所述的暗培养是指:在 24℃ -26℃ 的暗室内培养。

7. 根据权利要求 1 所述的利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,其特征是,所述的诱导是指:在 24℃ -26℃ 的环境下进行 8-16h 的光下培养。

利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种农业技术领域的方法,具体是一种利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法。

背景技术

[0002] 大豆是重要的粮油作物和饲料作物,是人类食用油和蛋白的主要来源。长期以来,一直通过传统的有性杂交方法来改良大豆,但由于传统育种手段的局限性,难以将其他物种的优良基因导入大豆,因此采用基因工程技术,将某一物种的优良基因引入大豆中,实现遗传改良,已成为大豆育种研究的一个重要方面。

[0003] 高频率的再生体系和转化体系是进行大豆高效转化的两个关键。目前,大豆的再生体系主要以器官发生途径为主,但该体系产生的嵌合体较多。体细胞胚发生途径是指体细胞在特定条件下,未经性细胞融合而通过与合子胚类似的发育途径形成新个体的形态发生过程,经体细胞胚发生过程形成的类似合子胚的结构成为体细胞胚或胚状体。由于体细胞胚是的来源可能是单细胞,被认为是解决嵌合体问题的有效途径。

[0004] 经过对现有技术的检索发现,中国专利申请号 02144578.8,公开了一种大豆未成熟子叶体细胞胚增殖、继代保存和植株再生方法。该发明是以栽培大豆未成熟子叶为外植体诱导体细胞胚胎发生,在固体培养基上诱导体细胞胚增殖,同时,在固体培养基上继代保存,增殖与保存的体细胞胚可正常萌发,进一步再生植株。此系统操作简单,适合于生产上主栽的大部分大豆品种的未成熟子叶体细胞胚增殖、继代保存和植株再生。但如王晓春,刘尚前等.《大豆再生体系和遗传转化研究进展》([J]. 大豆科学. 2009,28(4):731-735.)中记载,该系统所采用的外植体采集时间受季节限制,可增值球形胚诱导率较低,并且不能保证多次继代增殖后的体细胞胚的萌发率和再生率,不利于大豆的遗传转化。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提供一种利用成熟大豆胚尖获得体细胞胚的方法,采用添加 2,4-D 的 MS 培养基诱导成熟大豆的胚尖获得愈伤组织后形成体细胞胚,通过培养再生出植株。解决了利用大豆未成熟子叶或幼胚等获得体细胞胚的外植体采集时间受季节限制的问题。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的,本发明通过将萌动的大豆种子的胚尖平铺于愈伤诱导培养基中暗培养生成愈伤组织,并将获得的愈伤组织平铺于体细胞胚诱导培养基中诱导体细胞胚的发生。

[0007] 所述的大豆种子经灭菌消毒处理。

[0008] 所述的灭菌消毒处理是指:用氯气进行大豆种子灭菌,而后将大豆种子置于无菌水中浸泡得萌动的大豆。

[0009] 所述的无菌水浸泡温度为 24℃-26℃,浸泡 16-24 小时。

[0010] 所述的胚尖通过以下方式获得:将萌动的大豆种子的种皮和子叶去除,用灭菌手

术刀片切去胚根部分获得胚尖。

[0011] 所述的愈伤诱导培养基为添加有浓度为 1-5mg/L 的 2,4-D 的 MS 固体培养基。

[0012] 所述的暗培养是指：在 24℃ -26℃ 的暗室内培养。

[0013] 所述的体细胞胚诱导培养基为添加有浓度为 4mg/L 以下 2,4-D 的 MS 固体培养基。

[0014] 所述的诱导是指：在 24℃ -26℃ 的环境下进行 8-16h 的光下培养。

[0015] 本发明通过制备上述体细胞胚，使得外植体的采集不受季节限制，可广泛用于以大豆体细胞胚为受体材料的转基因大豆的生产。

具体实施方式

[0016] 下面对本发明的实施例作详细说明，本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0017] 实施例 1

[0018] 1. 选择大豆品种黑农 37，取健康、成熟的大豆种子，用氯气消毒 1-2 小时，将大豆浸泡于无菌水中 16-24 小时。取萌动的大豆，去掉种皮和子叶，用手术刀片切去胚根得到胚尖外植体。

[0019] 2. 将胚尖平铺于添加 1mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上，在 24℃ -26℃ 条件下避光培养 30 天得到愈伤组织。

[0020] 3. 将诱导出的愈伤组织转入 0mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上，24℃ -26℃，16h/8h 光下培养 15 天，得到体细胞胚。

[0021] 实施例 2

[0022] 1. 选择大豆品种黑农 37，取健康、成熟的大豆种子，用氯气消毒 1 小时 -2 小时，将大豆浸泡于无菌水中 16-24 小时。取萌动的大豆，去掉种皮和子叶，用手术刀片切去胚根得到胚尖外植体。

[0023] 2. 将胚尖平铺于添加 1mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上，在 24℃ -26℃ 条件下避光培养 30 天得到愈伤组织。

[0024] 3. 将诱导出的愈伤组织转入 1mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上，24℃ -26℃，16h/8h 光下培养 15 天，得到体细胞胚。

[0025] 实施例 3

[0026] 1. 选择大豆品种黑农 37，取健康、成熟的大豆种子，用氯气消毒 1 小时 -2 小时，将大豆浸泡于无菌水中 16-24 小时。取萌动的大豆，去掉种皮和子叶，用手术刀片切去胚根得到胚尖外植体。

[0027] 2. 将胚尖平铺于添加 4mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上，在 24℃ -26℃ 条件下避光培养 30 天得到愈伤组织。

[0028] 3. 将诱导出的愈伤组织转入 0mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上，24℃ -26℃，16h/8h 光下培养 15 天，得到体细胞胚。