

湘棉 18 茎尖培养条件初步研究

薛远超 刘大军*

(西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715)

摘要:以腺体突变型湘棉 18 为试验材料, 先将棉花种子在无菌的蛭石中培养 5-7d 后, 取棉花苗制备棉花苗茎尖, 培养在无激素 MSB 培养基或加入激素的 MSB 培养基上, 直接再生完整植株, 结果表明: 植株再生率主要与再生培养基中外源激素含量、活性炭浓度及茎尖分生组织的取材时间密切相关。

关键词:棉花; 转基因; 组织培养; 茎尖分生组织; 植株再生

中图分类号 S562 **文献标识码** B **文章编号** 1007-7731(2007)16-40-02

Intitll study on Tip Tissue Cultural Condition of Xiangmian 18 Cotton

XUE Yuanchao Liu Dajun (College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The present paper as tests the material take the gland mutant xiangmian 18 cotton and kapok, and carries on the stem point meristematic tissue raise. Transfers the gene by this material achievement the preparation material. The cotton seed were excised from the seedlings of 5~7 days and cultured on the MSB medium without/with hormone or active charcoal. The rate of regenerated plantlet attached little to the tested cotton varieties, but connected with the ingredients of regenerated medium, such as hormone or active charcoal.

Key words: cotton; particle bombardment; tissue culture; apical meristems; plant regeneration

在各种主要农作物通过体外培养而获得植株再生的研究中, 棉花的研究进展相对较慢。尽管早在 70 年代初就开始了棉花外植体培养的研究, 但直到 1983 年才由 Davidonis 等首次从体细胞胚再生植株。之后, 很多人利用不同品种对棉花的体外植株再生进行了研究^[1-15], 然而所得结果在不同研究者存在较大差异, 而且能够顺利获得再生植株的品种仅以珂字棉系统的几个品种较有效。其它获得再生植株的品种数量很有限, 尤其是现在推广栽培的优质丰产棉花品种更少。而体外培养的植株再生是植物遗传工程操作的基础, 那么要获得直接可用于推广的工程植物新品系, 建立以优质栽培种为材料的体外植株再生体系是非常关键的问题。因此, 进行体外植株再生的研究十分有必要^[17-19]。棉花细胞再生植株困难是转基因工作中的“瓶颈”。

1 材料与方 法

1.1 供试材料 棉属植物腺体突变型湘棉 18(种子无腺体而植株有腺体)。

1.2 茎尖组织的培养

1.2.1 无菌苗的培养 将陆地棉和海岛棉不同基因型的种子除去种子外壁棉花纤维, 先浸泡在 70% 以春种 30-60s, 然后浸泡在含 0.1% 的 HgCl 溶液中 6 min, 随后用无菌蒸馏水冲洗 4-5 次, 再浸泡在 2% NaClO 中 7min, 随后用无菌蒸馏水冲洗 4-5 次。然后在无菌的蛭石中培养 5-7d, 28℃ 下萌发, 待长出无菌苗备用。

1.2.2 茎尖分生组织的制备 在解剖镜下小心除去两片子叶, 充分暴露出半透明圆锥状分生组织, 并保留约 1 cm

的下胚轴。

1.2.3 培养基的制备 以 MS 无机盐、维生素 B1 为 0.5mg/L、维生素 B5 为 0.5mg/L、维生素 B6 为 0.5mg/L、肌醇 100 mg/L 为基本培养基, 即 MSB 培养基, 附加葡萄糖 20 g/L、1mol/L 活性炭、15g/L 琼脂固。

1.2.4 茎尖组织的培养 选取适宜时龄的幼苗, 制备为茎尖组织, 每组 10 个。然后转接于不同激素处理的供试培养基上。

1.3 试验方法 不同的激素浓度配比设 6 个处理: (1) MSB; (2) MSB + 0.1 mg/L IAA; (3) MSB + 0.4 mg/L IAA; (4) MSB + 0.1 mg/L 2,4-D; (5) MSB + 0.4 mg/L 2,4-D; (6) MSB + 0.1 mg/L IAA + 0.1 mg/L 2,4-D 培养后观察、记录。

1.4 活性炭对尖分生组织生长的影响 选取适宜时龄的幼苗, 制备为茎尖组织, 每组 10 个。设 3 个处理: (1) MSB; (2) MSB + 0.5mol/L 活性炭; (3) MSB + 1mol/L 活性炭。

1.5 培养条件 培养温度为 (22 ± 2)℃, 周期为 24h 红光 + 紫光, 培养 30d。

2 结果与分析

2.1 茎尖分生组织的取材时间 茎尖分生组织的制备是基因枪遗传转化的首要环节, 其制备质量直接影响后续的操作过程, 也与最终转化率密切相关。因此, 提高茎尖分生组织的制备质量是一个重要的环节。茎尖分生组织的剥取与操作者的技术水平和熟练程度有关, 但本研究还发现, 适宜的无菌苗取材时间也可以提高茎尖分生组织剥取

的质量与速度。研究发现,无菌苗时龄不同,茎尖分生组织的制备难易程度存在一定差异。一般最适时间为40-60 h,此时两片子叶半展开,植株直立,胚轴高约3 cm。剥取时,只需轻轻去掉茎尖分生组织外面的两片覆叶即可。若时间长于60 h,子叶全部展开,有的子叶甚至纤维化,很难剥;小于40 h,子叶基本处于闭合状态,稍碰即伤,说明茎尖发育还不完全。

表1 不同取材时间对茎尖的影响

取材时间(h)	子叶情况	胚轴颜色	茎尖成苗情况
<40 h	闭合	白色	难以成活
40-60 h	半展开	绿色	易于成活
>60 h	展开	绿色	易于成活

2.2 外源激素与茎尖分生组织生长的关系

表2 外源激素对茎尖分生组织生长的影响

培养基种类	存活数(个)	成苗数(个)
MSB	10	10
MSB + 0.1 mg/L IAA;	9	8
MSB + 0.4 mg/L IAA;	4	1
MSB + 0.1 mg/L 2,4-D	7	3
MSB + 0.4 mg/L 2,4-D	3	0
MSB + 0.1 mg/L IAA + 0.1 mg/L 2,4-D	7	4

试验表明,不添加外源激素的培养基更适合棉花茎尖分生组织的生长,而且越是高浓度的激素含量越是不利于棉花茎尖分生组织的生长。IAA在培养基中可以使茎尖伸长生长,2,4-D可以使茎尖变粗,并且容易出现玻璃化苗,以上两种情况均不利于棉花茎尖分生组织的生长。

2.3 外源激素与茎尖分生组织生长的关系

表3 外源激素对茎尖分生组织生长的影响

培养基种类	褐化数		成苗数	
	个	%	个	%
MSB	10	100	5	50
MSB + 0.5mol/L 活性炭	8	80	6	60
MSB + 1mol/L 活性炭	1	10	9	90

培养基中加入活性炭使茎尖迅速萌动,其作用可能是,一方面,活性炭能够吸收外植体切口渗出的酚类物质,从而减少褐化外植体的数量;另一方面,活性炭的加入在一定程度上降低了光照强度,使培养基成为一个相对黑暗的环境,接近自然环境条件,有利于根系发育,从而也提高了外植体的存活率。活性炭使用量以1 g/L为宜。

畸形苗指玻璃化苗。其玻璃化一般始于叶柄或下胚轴,表现为肿胀,半透明状。叶子内卷成狭长形,叶色也半透明。此类苗较脆,不易生长。我们发现,玻璃化程度与固化剂的类型及初始茎尖的幼嫩程度相关。茎尖制备时,尽管时间相同,但由于种仁本身或萌发环境不同等原因,长势总有差异,因此,茎尖的幼嫩程度不一,一般初始茎尖分生组织越幼嫩,玻璃化越严重。

3 结论和讨论

综合以上条件可以看出无菌苗取材最适时间为40-60 h,此时两片子叶半展开,植株直立,胚轴高约3cm。剥取时,只需轻轻去掉茎尖分生组织外面的两片覆叶即可;

活性炭显著地促进了茎尖成苗,选用1 g/L活性炭为宜;不同激素水平对成苗率和苗的发育有不同影响,使用不含外源激素的MSB培养基最适宜;在使用的碳源中,葡萄糖明显好于蔗糖,20g/L葡萄糖较适合茎尖成苗;光下萌发的幼苗茎尖易于培养成苗,陆地棉茎尖培养在供试品种间没表现出明显差异。

除了以上条件外试验过程中还必须特别注意所有试验场所及器具的消毒,试验过程中若发现有生霉的培养基应立即清除。本试验中霉菌感染是主要影响因素之一,在冬季气温低时试验较容易进行。培养基配置完成后还应该低温保存,否则会增加培养基感染率。

参考文献

- [1]张献龙,孙济中,刘金兰. 1991. 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生. 遗传学报,18(5):461-467
- [2]王清连,刘方,周云,等. 棉花组织培养直接胚胎发生和植株再生. 棉花学报,2002,14(6):340-343
- [3]张宝红,李秀兰,李付广,等. 棉花茎尖分生组织培养植株再生[J]. 中国棉花,1993,20(4):13
- [4]丁世萍. 激素对陆地棉和海岛棉茎尖培养的影响. 浙江文学学报(农业与生命科学版),2001,27(B):508-512
- [5]于娅,刘传亮,马峙英. 适于基因枪转化的棉花茎尖培养及筛选体系初探. 棉花学报. 2003,15(5):274-278
- [6]胡玉欣,李锁平. 优质栽培棉花的组织培养及其植株再生. 河南大学学报(自然科学版). 1996,26(4):77-80
- [7]王冬梅,孟庆玉. 有色棉茎尖培养初探. 中国棉花,2002,29(2):25-26
- [8]张献龙,林双龙,吕复兵. 陆地棉微茎尖培养影响因素的研究[J]. 华中农业大学学报,1996,15(3):210-214
- [9]吴敬音,朱卫民,系建明,等. 陆地棉茎尖与分生组织培养及其在基因导入上的应用[J]. 棉花学报,1994.6(2):89-92
- [10]王雨华,王隆华. 棉胚珠愈伤组织诱导纤维分化初探. 植物生理学报,1996,32(3):186-189
- [11]吴敬音,余建明. 棉属茎尖腋芽的离体培养. 江苏农业学报,1900,6(1):22-26
- [12]岳建雄,石跃进,张慧军,等. 农杆菌介导的棉花转基因过程中影响出愈率的因素[J]. 棉花学报,1998,10(5):276-277
- [13]陈妹幼,张献龙,聂以春,等. 陆地棉体细胞再生植株技术的改进研究[J]. 棉花学报,2002,14(6):344-347
- [14]董雁,赵继梅,别婉丽. 继代培养基再利用研究[J]. 辽宁林业科技,1998,4:131
- [15]陈志贤,李淑君, Trolinder NLetal. 棉花细胞悬浮培养胚胎发生和植株再生某些特性的研究. 中国农业科学,1987,20(5):6-11
- [16]方宣钧,贾士荣. 中国转基因抗虫棉产业化进展. 生物技术通报,1999,2:39-54
- [17]张献龙,孙济中,刘金兰. 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生. 遗传学报,1991,18(5):461-467
- [18]张宝红,李秀兰. 植物组织培养在棉花上的应用现状和前景. 生物技术农业应用,1995:53-57
- [19]Banks S W, Gossett D R, Lucas M C. Et al. Construction of a transformation vector for cotton containing glutathione reductase cDNA, in 1994 Beltwide Cotton Conferences:1318-1319