

陈天子,秦郁,张保龙. 转基因棉花再生幼苗简易移栽方法[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):87-89.

转基因棉花再生幼苗简易移栽方法

陈天子,秦郁,张保龙

(江苏省农业科学院农业生物技术研究所/江苏省农业生物学重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:对影响转基因棉花再生幼苗移栽的因素进行了研究,结果表明,在再生幼苗具有健壮根系的基础上,移栽基质是否无菌对移栽成活率无明显影响;5 mg/L NAA 水溶液蘸洗再生幼苗根系后移栽,可使移栽成活率提高 5 个百分点;移栽过程中对再生幼苗的温度和湿度控制是棉花再生幼苗移栽成活的关键,温度控制在 25~30 ℃ 的相对稳定范围有助于再生幼苗快速生长;幼苗移栽后保湿 14 d 左右再缓慢透气 7 d 可使再生幼苗从高湿环境向正常空气湿度环境过渡,保证移栽成活率。在此基础上,建立了转基因棉花再生幼苗移栽方法,利用该方法可使 80% 以上再生幼苗移栽成活。

关键词:转基因棉花;再生幼苗;移栽;成活率

中图分类号: S562.045 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0087-02

农杆菌介导的棉花遗传转化是目前创制棉花转基因材料的主要方法,主要以棉花体细胞胚胎发生途径的组织培养为基础,转化效率受外植体的分化频率和再生频率影响。目前,整个棉花遗传转化过程从农杆菌共培养开始,到获得完整再生幼苗需 8~12 个月,历时较长,因此获得的转基因棉花再生幼苗尤为珍贵。保证转基因棉花再生幼苗的高存活率,也是棉花遗传转化后续过程中极为重要的环节。与水稻、烟草等作物相比,棉花再生幼苗的根系弱,再生幼苗移栽前需驯化炼苗、移栽基质灭菌等繁琐过程,移栽方法不易掌握,移栽成活率仍不稳定,移栽成活率只有 50%~60%^[1-4]。本研究以农杆菌介导转化棉花下胚轴和子叶外植体产生的棉花再生幼苗为材料,对影响棉花再生幼苗移栽的多个因素进行研究,以期实现简化移栽操作、提高移栽成活率的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

以农杆菌介导转化陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.) 03298 品系^[5]和 WC 品系^[6]的下胚轴和子叶外植体通过体细胞胚发生获得的转基因棉花再生幼苗植株为材料。

1.2 移栽方法

选取根系发达、苗高 6 cm 左右的幼苗植株(图 1-a),从培养基取出,用 5 mg/L NAA 水溶液洗净残留在根系上的培养基后,将棉花幼苗直接移栽到有机栽培基质(有机质含量 >50%,氮、磷、钾含量 >2.5%,购于镇江兴农有机肥有限公司)。有机栽培基质事先盛放于 250~270 mL 纸杯中,并用自来水充分浸润。为便于排出多余水分,可在盛放基质的纸杯底部打数个孔。幼苗移栽后,罩上比纸杯小 1 号的透明塑料

杯(220~250 mL)保湿 14 d 左右(图 1-b),幼苗成活后把保湿塑料杯倾斜开小口透气 7 d 左右即可。

1.3 试验处理

试验设置 2 个基质处理(灭菌、不灭菌)、2 个 NAA 处理(有、无)和 3 个培养温度处理(夜晚温度 20 ℃ 左右,白天温度分别为 28、32、39 ℃),将棉花幼苗移栽到有机栽培基质后,观察不同处理对棉花再生植株移栽成活率的影响。幼苗长出新的真叶视为成活。

2 结果与分析

2.1 移栽基质无菌状态对移栽成活率的影响

张家明等认为棉花再生幼苗移栽是否成功不在于移栽基质是否无菌^[2],而王清连等则发现棉花再生幼苗必须移栽到无菌移栽基质才能成活^[3]。本研究使用的移栽基质为商品化的有机栽培基质,为考察移栽基质对棉花再生幼苗移栽成活的影响,本研究用灭菌有机栽培基质和非灭菌有机栽培基质进行移栽试验,发现棉花再生幼苗在灭菌基质和非灭菌基质上的平均移栽成活率分别为 73.21% 和 72.34%,两者无明显差异(表 1)。为便于简化操作,后续试验均直接将棉花再生幼苗移栽于非灭菌有机栽培基质。

2.2 NAA 对移栽成活率的影响

NAA 等生长素对扦插移栽植物有促进生根作用。本研究用于移栽的棉花再生幼苗均有一定量的须根(图 1-a),将棉花再生幼苗从培养基取出后,在 5 mg/L NAA 水溶液中洗根再移栽,结果发现 NAA 蘸根的棉花再生幼苗成活率比水洗根的幼苗成活率高出 5.3 个百分点(表 2),表明 5 mg/L NAA 水溶液对棉花再生幼苗的根系生长有一定促进作用。

2.3 培养温度对移栽成活率的影响

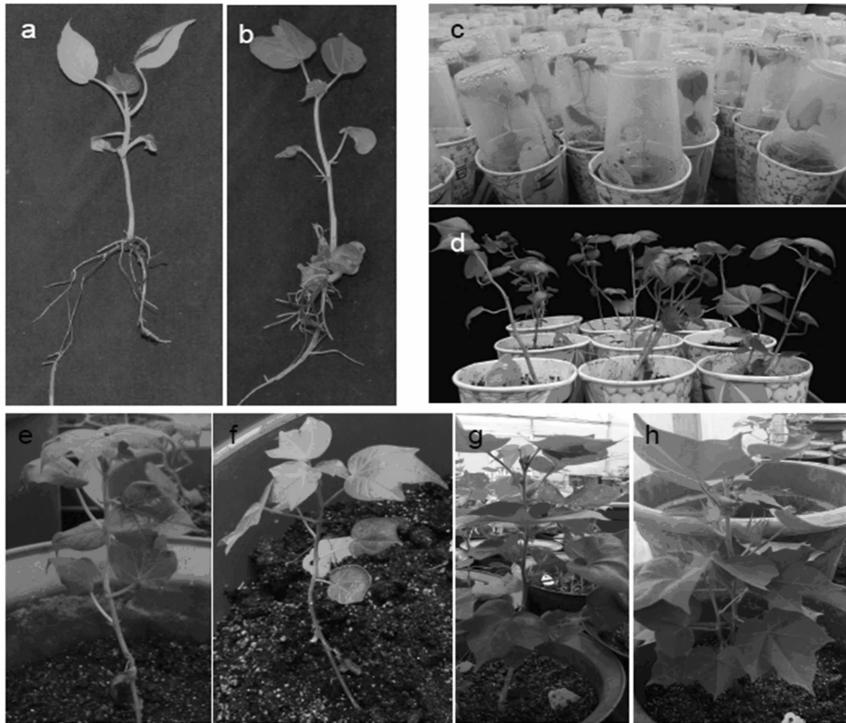
棉花再生幼苗对温度极为敏感,移栽后的培养温度过高可导致幼苗死亡。由于移栽幼苗数量较多,本研究将移栽幼苗置于玻璃温室培养,移栽时间为 2—4 月,在此期间,玻璃温室夜晚温度维持在 20 ℃ 左右,白天温度则随冬春季节推移而逐渐上升。如表 3 所示,随着玻璃温室白天温度的升高,移栽棉花再生幼苗成活率由 86.97% (28 ℃) 降低到 82.98% (32 ℃) 再降低到 40.93% (4 月中下旬晴天条件下温室温度

收稿日期:2013-08-16

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)2023]。

作者简介:陈天子(1981—),男,博士,助理研究员,主要从事作物分子育种研究。Tel:(025)84390292;E-mail:actzi0503@gmail.com。

通信作者:张保龙(1973—),男,安徽淮南人,博士,研究员,主要从事作物分子育种研究。Tel:(025)84390292;E-mail:zhbl2248@hotmail.com。



a、b—用于移栽的棉花再生幼苗植株；c—棉花再生幼苗植株移栽后保湿；d—保湿后移栽成活的棉花再生植株；e、f—移栽成活的棉花再生植株转移至大花盆；g、h—温室中移栽成功的棉花再生植株

图1 棉花再生幼苗移栽方法

表1 移栽基质对棉花再生幼苗移栽成活率的影响

基质处理	重复	移栽幼苗数 (株)	成活幼苗数 (株)	成活率 (%)
灭菌基质	I	16	10	62.50
	II	20	14	70.00
	III	20	17	85.00
	平均			73.21a
非灭菌基质	I	15	11	73.33
	II	16	12	75.00
	III	16	11	68.75
	平均			72.34a

注：a表示处理间无显著差异($P>0.05$)。表2同。

表2 NAA对棉花再生幼苗移栽成活率的影响

洗根处理	重复	移栽幼苗数 (株)	成活幼苗数 (株)	成活率 (%)
5 mg/L NAA	I	21	19	90.48
	II	25	15	60.00
	III	25	24	96.00
	平均			81.69a
H ₂ O	I	25	16	64.00
	II	22	20	90.91
	III	25	19	76.00
	平均			76.39a

达到39~42℃)。

2.4 湿度对移栽成活率的影响

在本移栽方法中,移栽幼苗保湿14d后,大多数幼苗都已成活(图1-b)。由于再生幼苗此前一直处于高湿环境,此时还不宜立刻移走保湿塑料杯,如果幼苗在连续保湿后立刻完全暴露在空气中,会导致植株脱水萎蔫而死亡,应把塑料杯

表3 培养温度对棉花再生幼苗移栽成活率的影响

白天温度 (℃)	移栽时间 (月-日)	移栽幼苗数 (株)	成活幼苗数 (株)	成活率 (%)
28	02-22	238	207	86.97
32	03-06	235	195	82.98
39	04-20	215	88	40.93

注:夜晚温度为20℃左右。

揭开1个小开口,让幼苗透气、接触空气7d左右,再完全揭开塑料杯,此时幼苗才能适应空气湿度成活下来。

2.5 棉花再生幼苗移栽方法的建立

在上述研究基础之上,我们建立了棉花再生幼苗植株的移栽方法(图1)。在该方法中,影响移栽成活率的几个关键因素为:有健壮根系的再生幼苗(图1-a)、移栽后保湿14d左右再缓慢透气7d左右(图1-b、c)、温度控制在25~30℃相对稳定的温度范围内。把握好以上几点,一般可使80%以上的再生幼苗植株移栽成活。

3 讨论

棉花再生幼苗植株采用直接移栽土钵的方法难以成活^[2],采用无菌营养钵、蛭石、沙土、营养液过渡培养后定植移栽可成活,但成活率不稳定^[1,3,7],并且必须将再生植株移栽到无菌土中才能使再生植株成活^[3]。本移栽方法采用商品化的有机栽培基质作为移栽基质,将棉花再生幼苗直接移栽于普通纸杯中的有机栽培基质后,罩以普通塑料杯保湿即可,幼苗成活后还是种植于商品化的有机栽培基质,整个移栽过程无需炼苗、无需基质灭菌、无需地膜或烧杯等大量容器保湿,简便易行,一次可以移栽大量幼苗,且移栽成活率保持在80%以上。

刘凌云,包丽仙,卢丽丽,等. 马铃薯脱毒原原种基质栽培研究概况[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):89-91.

马铃薯脱毒原原种基质栽培研究概况

刘凌云,包丽仙,卢丽丽,普红梅,王颖,杨琼芬

(云南省农业科学院经济作物研究所/云南省马铃薯工程技术研究中心,云南昆明 650205)

摘要:综述了基质筛选、移栽密度、营养配比以及生长调节剂使用4个方面对基质栽培生产马铃薯脱毒原原种的影响及所取得的研究结果。基质栽培中,基质选择要因地制宜,本着低成本、高效益的原则;移栽密度需与营养配比相结合,以保证植株光合作用,提高结薯粒数;生长调节剂的使用上,需注意基质残留等问题对原原种生产造成影响。未来研究要注意各因素之间的相互影响、相互作用机理,特别是其植物生理和分子生物学原理,以提高基质栽培生产马铃薯脱毒原原种的能力。

关键词:马铃薯;脱毒原原种;基质栽培

中图分类号: S532.04 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0089-03

马铃薯是世界第四大粮食作物。中国作为马铃薯生产的第一大国,马铃薯栽培正成为种植结构调整和增加农民收入的一项重要战略选择^[1]。传统生产中利用马铃薯块茎进行无性繁殖的方法,由于病毒侵染和植株衰老等因素,会造成种薯的退化,失去利用价值。因此,利用脱毒技术生产合格脱毒种薯,是保证马铃薯生产稳定高效的基础,而在脱毒种薯生产技术体系中,脱毒原原种生产是最为重要的核心环节。

马铃薯原原种是采用茎尖剥离培养所获得的脱毒试管苗进行生产,主要方式有基质栽培和气雾法栽培。其中,基质栽培与马铃薯生物工程结合紧密,将脱毒试管苗或扦插苗

定植于网室内的基质中,可以不受季节限制,光、温、水、肥均可实现人工调控,因此应用最为广泛。原原种的基质栽培试验研究比较多,主要集中于基质筛选、栽培密度以及营养调节等方面。

1 原原种栽培基质筛选

基质能起到固定和支持植株、为植株根系提供稳定协调的水、气、肥环境的作用^[2]。马铃薯原原种生产对基质的要求主要是疏松性和透气性,基质间的物理特性的差异对原原种的移栽和生产都有一定的影响。常见的基质主要是以蛭石或者蛭石添加草炭为主^[3]。研究显示,蛭石和草炭比例为1:1时,马铃薯单株结薯量为1.7个^[4]。蛭石珍珠岩混合的配比也较常见,董淑英等研究显示,蛭石与珍珠岩比例为1:1时,单株结薯数可达2.1个,大于1g的有效结薯数为426.2个/m²,产量达1372.2g/m²^[5]。蛭石、珍珠岩属于透气孔隙较大的基质,容易混合均匀,保水保肥性好,草炭透气性稍逊于以上2种,但有机质含量较高,因此这几种类型的基质配比都有益于原原种的结薯。在规模化的工厂生产中,出于经济成本以及环保价值的考虑,也有使用其他类型材料作

收稿日期:2013-04-17

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD06B00);云南省科技计划(编号:2011AB015);云南省马铃薯工程技术研究中心项目(编号:2011DH018);云南省马铃薯育种及种薯繁育技术创新团队项目(编号:2011CII33)。

作者简介:刘凌云(1985—),女,贵州毕节人,硕士,研究实习员,主要从事马铃薯脱毒原原种生产研究。E-mail:lingyun600@163.com。通信作者:杨琼芬,硕士,研究员,研究方向为马铃薯脱毒种薯繁育技术研究。E-mail:yqiongfen@yahoo.com.cn。

试验发现棉花再生幼苗移栽成活率与其大小和健壮程度关系密切,苗高超过6cm、根系发达的幼苗,移栽容易成活。苗高超过6cm的幼苗茎部木质化程度较高,在移栽的高湿环境中不易腐坏,移栽也较易成活。2个试验品系03298和WC的体细胞胚胎发生再生植株能力较强,再生幼苗植株在无激素培养基中培养即可产生健壮根系,也有利于移栽。张家明等也发现棉花再生幼苗移栽成功的关键在于幼苗具有健壮的根系^[2]。另外,棉花再生幼苗移栽后的培养环境对幼苗成活也极为关键。我们建议将移栽的棉花再生幼苗置于室内培养室培养,维持在25~30℃相对稳定的温度范围内,这样不仅移栽成活率高,而且幼苗生长快、生长健壮。

参考文献:

[1]郭余龙,李名扬,裴炎,等. 陆地棉体胚发生及再生植株移栽

[J]. 西南农业大学学报,1999,21(6):514-517.

[2]张家明,孙济中,刘金兰,等. 陆地棉体细胞植株再生及其移栽技术研究[J]. 作物学报,1994,20(2):210-216+259.

[3]王清连,张宝红,刘方. 棉花再生植株移栽方法的研究[J]. 河南职业技术学院学报:综合版,1999,27(1):4-6.

[4]李燕娥,焦改丽,吴霞,等. 转基因再生棉苗移植法探讨[J]. 中国棉花,1999(7):22.

[5]陈天子,吴慎杰,李飞飞,等. 新疆棉花4个主栽品种的体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 作物学报,2008,34(8):1374-1380.

[6]Zhang B L, Yang Y W, Chen T Z, et al. Island cotton *Gbvel* gene encoding a receptor-like protein confers resistance to both defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*[J]. PLoS One, 2012,7(12):e51091.

[7]王伟,陈宛新,朱祯,等. 转基因棉花高效定植方法的研究[J]. 植物学报,1999,41(10):1072-1075.