

棉花雄性不育材料的组织培养初探

汤月丰

(岳阳市农业科学研究所, 湖南 岳阳 414000)

摘要: 利用组织培养方法繁殖棉花不育系。通过优化培养基组合程序研究, 对污染较严重的棉花不育系单株材料, 先用 70% 酒精浸泡 10 ~ 15 s, 倒出后马上用无菌水冲洗, 加入 0.1% 升汞灭菌 8 min, 用无菌水冲洗 5 ~ 6 次。愈伤组织诱导培养基诱导效果最佳的是 MSB + 2, 4 - D 0.1 mg/L + IAA 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L, 最适合愈伤组织分化的培养基为 MSB + IAA 0.1 mg/L + 2 - IP 3.0 mg/L + CM 100 ml/L + AC 2.5 g/L。

关键词: 棉花雄性不育系; 组织培养; 繁殖

中图分类号: S562.015

文献标识码: B

文章编号: 1006 - 060X(2007)03 - 0026 - 02

棉花杂交种子的制种手段, 目前主要是采用“人工去雄授粉法”以及“两系”或“三系”配套育种法, 但存在用工多、制种产量低、成本高等缺陷。利用组织培养繁殖棉花不育系, 可以减化繁殖过程, 加快育种、制种进度, 所获得的种苗全部为不育株, 杂交制种时可以大大提高制种产量。同时也可以进行种质资源保存。因此, 笔者试图通过组织培养来繁殖棉花雄性不育材料, 为棉花杂交制种中的不育系繁育探索一条新途径。

1 材料与方法

1.1 无菌外殖体的获得与消毒灭菌的处理

供试材料为岳阳市农业科学研究所棉花育种室选育出的表现性状优良的雄性不育系单株。棉花组织和细胞培养, 一般情况下, 都是用种子在无菌条件下萌发后, 获得无菌外殖体。由于多种因素限制, 本研究所需材料只能从田间种植的不育单株上取得。而田间植株带有太多的病菌, 外殖体材料消毒灭菌时, 很难彻底灭菌。为此, 我们将棉株从田间挖取栽入盆中, 再移到温室内, 喷用杀菌剂, 养护一段时期。然后切取材料, 用洗衣粉充分洗净后, 用 5 种方法消毒灭菌。处理 A1: 2% 次氯酸钠附加 1 ~ 2 滴吐温 - 8 灭菌 30 min, 无菌水冲洗 3 ~ 4 次; 处理 A2: 70% 酒精浸泡 30 s, 倒出后用无菌水冲洗, 加入 2% 次氯酸钠附加 1 ~ 2 滴吐温 - 8 灭菌 20 ~ 30 min, 无菌水冲洗 3 ~ 4 次; 处理 A3: 70% 酒精浸泡 10 ~ 15 s, 倒出后无菌水冲洗, 加入 2% 次氯酸钠附加 1 ~ 2 滴吐温 - 8

灭菌 20 ~ 30 min, 无菌水冲洗 3 ~ 4 次; 处理 A4: 70% 酒精浸泡 10 s, 倒出后无菌水冲洗, 加入 0.1% 氯化汞附加 1 ~ 2 滴吐温 - 8 灭菌 8 min, 无菌水冲洗 5 ~ 6 次; 处理 A5: 0.1% 氯化汞灭菌 10 ~ 12 min, 附加 1 ~ 2 滴吐温 - 8, 无菌水冲洗 5 ~ 6 次。将处理好的材料, 包括茎尖、幼嫩叶片、叶柄、幼小花蕾, 吸干水后, 接种到培养基上培养。一段时期后, 进行统计比较。

培养条件为温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 每天光照时间 12 h, 光照强度 2 000 lx。

1.2 培养基与培养条件

基本培养基成分为 MS 无机盐、维生素 (10.0 mg/L VB₁、1.0 mg/L VB₅、1.0 mg/L VB₆、1.0 mg/L 烟酸)、肌醇 100 mg/L、葡萄糖 30 g/L、琼脂 7 g/L、AC 2.5 g/L, 简称为 MSB。pH 5.8。愈伤组织诱导、继代阶段附加不同浓度的 2, 4 - D、IAA、KT 及 IBA, IAA 采用过滤灭菌。增殖分化阶段附加 IAA、2 - IP、BA 及水解乳蛋白 (LH)、椰子乳 (CM), 详见表 1。每一处理重复 3 次。

表 1 培养基的组成

培养基	组成成分含量 (mg/L)	应用阶段
M1	MSB + IAA 2.0 + KT 1.0 + AC 2 500	诱导
M2	MSB + IAA 1.0 + KT 1.0 + AC 2 500	诱导
M3	MSB + 2, 4 - D 0.1 + IAA 0.1 + KT 0.1 + AC 2 500	诱导
M4	MSB + IBA 0.5 + KT 0.2 + AC 2 500	继代
M5	MSB + IAA 0.1 + 2 - IP 3.0 + LH 500 + AC 2 500	分化
M6	MSB + IAA 0.1 + BA 5.0 + LH 500 + AC 2 500	分化
M7	MSB + IAA 0.1 + 2 - IP 3.0 + CM 100 ml + AC 2 500	分化

收稿日期: 2007 - 01 - 23

作者简介: 汤月丰 (1965 -), 男, 湖南湘阴县人, 农艺师, 主要从事生物技术和农业技术推广工作。

2 结果与分析

2.1 外殖体灭菌方法的影响

从表2可以看出,处理A2酒精浸泡时间过长对外植体材料的损伤较大,造成外植体变褐死亡。对茎尖、幼叶等幼嫩组织的灭菌,酒精浸泡时间应掌握在10~15 s以内。升汞灭菌时间太长对外植体生长、分化也有很大的杀伤和抑制作用。对棉花幼嫩外植体灭菌,0.1%升汞灭菌时间以8 min为最佳,污染率低,生长分化情况良好。处理A1单独使用次氯酸钠灭菌,虽然对外植体损伤较小,但污染率非常高。而单独使用升汞的灭菌效果明显好于次氯酸钠。可能是材料污染太严重造成的。配合使用2种以上杀菌剂,可以做到既灭菌较彻底,又对外植体材料损伤较轻。综上所述,灭菌效果最佳方法是A4,先用70%酒精灭菌10~15 s,倒出酒精后马上用无菌水冲洗,然后加入0.1%升汞灭菌8 min,用无菌水冲洗5~6次。

表2 不同灭菌方法对外植体诱导的影响

处理	5 d外植体状况	污染率(%)	出愈率(%)
A1	87%正常,少量变褐	83	1
A2	大部分变褐死亡	16	0
A3	70%正常	27	32
A4	65%正常	22	38
A5	40%正常	28	17

2.2 植物生长调节剂对外植体诱导的影响

从表3可以看出,培养基M1中,IAA的浓度过高对愈伤组织诱导有一定的抑制作用,愈伤组织出愈率低,生长速度比较慢,愈伤组织松散。降低IAA浓度到1.0mg/L,愈伤组织出愈率和生长速度都明显变好。比较添加IAA和2,4-D的培养基培养结果,可以看出,添加2,4-D的培养基愈伤组织出愈率高,生长速度快,而且愈伤组织状态紧密适度,有利于后期愈伤组织分化成植株。综合来看,培养基M3(MSB+2,4-D 0.1 mg/L + IAA 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L + AC 2.5 g/L)最适合棉花愈伤组织的诱导。

表3 不同激素组合对外植体(茎尖)诱导的影响

培养基	30 d出愈率(%)	30 d愈伤组织生长量	愈伤组织状态
M1	56	+	白绿、松散
M2	75	+++	白绿、紧密、硬
M3	87	++++	灰绿、中密、软

注: + 表示愈伤组织的生长速度, + 越多表示生长越快。

2.3 附加物对茎尖愈伤组织分化的影响

在愈伤组织分化阶段,添加不同激素和各种附加物,结果(表4)表明,2-IP的分化效果要好于

BA,添加CM的分化率要高于添加LH的培养基。因此可以认为,棉花愈伤组织分化的最适培养基为M7:MSB+IAA 0.1 mg/L+2-IP 3.0 mg/L+CM 100 ml/L+AC 2.5 g/L。

表4 不同附加物对茎尖愈伤组织分化的影响

培养基	30 d分化率(%)	出芽状况
M5	68	芽较多、生长较慢
M6	30	芽少、弱小
M7	76	芽多、生长良好

3 小结与讨论

在本试验5种灭菌处理中,灭菌效果最佳的是:先用70%酒精灭菌10~15 s,倒出酒精后马上用无菌水冲洗,然后加入0.1%升汞灭菌8 min,用无菌水冲洗5~6次。在试验7种培养基条件下,以MSB+2,4-D 0.1 mg/L+IAA 0.1 mg/L+KT 0.1 mg/L+AC 2.5 g/L最适合棉花愈伤组织的诱导;以MSB+IAA 0.1 mg/L+2-IP 3.0 mg/L+CM 100 mg/L+AC 2.5 g/L,最适合愈伤组织的分化。

棉花属于植株再生最困难的植物之一。棉花组织和细胞培养工作起步比水稻、小麦、玉米等作物要晚。尽管如此,通过广大科研工作者的不断努力,已从多个棉种几十个品种的不同组织和器官培养中获得了体细胞胚和再生植株,并且初步建立和完善了棉花体细胞胚胎发生和植株再生的试验体系。但由于棉花体细胞胚胎发生和植株再生受多种因素的影响,形成了棉花细胞工程和基因工程的“瓶颈”。棉花雄性不育系材料利用组织培养体细胞胚发生和植株再生、快速繁殖的研究也鲜见报道。

岳阳市农业科学研究所对棉花不育系材料的组织培养、优化培养基组合、改变培养条件等进行了系统研究,获得了较好的效果,从而为棉花生物技术研究 and 棉花育种提供参考。

参考文献:

- [1] 迟吉娜,李喜焕,王省芬,等.棉花体细胞胚胎发生和植株再生的影响因素[J].棉花学报,2004,16(1):55-61.
- [2] 蔡小宁,吴敬音,余建明.陆地棉胚性愈伤组织诱导和植株再生[J].江苏农业学报,1997,13(4):225-230.
- [3] 张寒霜,李俊兰,高鹏,等.低酚陆地棉体细胞胚胎发生和植株再生[J].河北农业大学学报,1999,22(1):9-12.
- [4] 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.
- [5] 张献龙.陆地棉体细胞胚胎发生、植株再生及其机制研究[D].武汉:华中农业大学,1990.