

河北省质量信息协会团体标准
《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》

(征求意见稿) 编制说明

标准起草工作组

2025年6月

一、任务来源

依据《河北省质量信息协会团体标准管理办法》，团体标准《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》由河北省质量信息协会于2025年5月6日批准立项，项目编号为：T2025325。

本标准由河北省农林科学院棉花研究所提出，由河北省质量信息协会归口。本标准起草单位为：河北省农林科学院棉花研究所、河北农业大学、武汉天问生物科技有限公司。

二、重要意义

棉花是世界上最重要的经济作物之一，在全球经济中扮演重要角色，棉花纤维是纺织业的重要原料，棉秆和棉籽等都可以用作生物质能源原料。棉花属于锦葵科棉花属，该属有超过50个种，广泛栽培的有4个种，其中陆地棉的种植面积超过全球棉花种植面积的90%。在棉花的培育发展历程中，传统育种技术曾发挥了重要作用，在提高棉花产量、纤维品质、棉籽油品质以及增强高温耐受能力等方面取得了显著成果。但常规育种方法得到的棉花品种不同程度地存在种子活力低、易受虫害草害影响、生长发育偏慢、易发生茎枯病等问题。这些问题在一定程度上制约了棉花产业的进一步发展。

随着棉花基因工程技术发展，把有用的外源基因转入到棉花中，不仅可以有效地打破物种间的界限，拓宽基因资源，而且可以实现外源基因为可控的定向转入，大大加快育种进程。随着新的有用外源基因的不断发现以及转基因技术的日益完善，遗传转化技术在棉花新种质创制及新品种选育等方面将发挥越来越重要的作用。

棉花遗传转化技术的核心，在于能够通过基因工程手段实现目的性状的精准转移。例如，对棉花的抗虫性、抗病性、抗逆性、抗除草剂特性以及纤

维品质进行针对性的遗传改良，为棉花品种的改良提供了切实有效的途径。这不仅对棉花产业的发展具有重要意义，更对农业的可持续发展影响深远，能够产生巨大的社会效益。

然而，在大力发展棉花遗传转化技术的同时，制定与之相应的技术标准和规范显得极为必要。完善的技术标准和规范，一方面有助于推动棉花遗传转化技术的广泛应用，切实提高棉花品种的品质；另一方面，也能够进一步促进棉花基因的商业化应用，同时为棉花基础研究提供坚实的技术支持，从而全方位推动棉花产业的高质量发展。

三、编制原则

《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》团体标准的编制遵循规范性要求、一致性和可操作性的原则。首先，标准按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》、《河北省质量信息协会团体标准管理办法》等编制起草；此外，工作组在制定标准过程中遵循“面向市场、服务产业、自主制定、适时推出、及时修订、不断完善”原则，不断满足高校、研究所、企业实际生产中对组培技术的需求，推动棉花遗传转化技术发展。

四、主要工作过程

2025年2月，河北省农林科学院棉花研究所牵头，组织开展《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》编制工作。2025年5月，起草组进行了《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》立项申请书及征求意见稿草案的编制，明确了编制工作机制、目标、进度等主要要求。主要编制过程如下：

（1）2025年2月：河北省农林科学院棉花研究所联合其他参编单位召开标准编制预备会，会议组织各单位开展资料收集和编制准备等相关工作。

(2) 2025年3月上旬：召开第一次标准起草讨论会议，初步确定起草小组的成员，成立了标准起草工作组，明确了相关单位和负责人员的职责和任务分工。

(3) 2025年3月中旬-4月上旬：起草工作组积极开展调查研究，充分收集相关资料和文献，分析农杆菌介导棉花遗传转化技术当前研究现状，并调研其技术的市场研究情况，结合相关科研单位或企业研究的经验、试验而总结起草的，为标准草案的编写打下基础。

(4) 2025年4月中旬：分析研究调研材料，由标准起草工作组的技术人员编写标准草案，通过研讨会、电话会议等多种方式，对标准的主要内容进行了讨论，确定了本标准的名称为《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》。并听取了相关专家和领导的意见和建议，确定了标准的大纲的各条款和指标的调研方案，在各参编单位的积极配合下，调研数据陆续反馈回主编单位。

(5) 2025年5月初：本标准起草牵头单位河北省农林科学院棉花研究所向河北省质量信息协会归口提出立项申请，经归口审核，同意立项。

(6) 2025年5月6日：《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》团体标准正式立项。

(7) 2025年5月-6月：起草工作组通过讨论，对标准草案进行商讨。确定本标准的主要内容包括农杆菌介导棉花遗传转化技术的原理、设备和用具、试剂、培养基、无菌苗培养、侵染液制备、遗传转化、生根培养、炼苗移栽、目的基因检测，初步形成标准草案和编制说明。起草组将标准文件发给相关标准化专家进行初审，根据专家的初审意见和建议进行修改完善，形成征求意见稿。

五、主要内容及依据

《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》团体标准的制订，主要基于实际研究所开展的棉花遗传转化实验，将其实验成果与数据作为本标准起草制定的依据。

1. 范围

本文件规定了农杆菌介导棉花遗传转化技术的原理、设备和用具、试剂、培养基、无菌苗培养、侵染液制备、遗传转化、生根培养、炼苗移栽、目的基因检测。

本文件适用于农杆菌介导棉花遗传转化的操作过程。

2. 规范性引用文件

列出了本标准的规范性引用文件。

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

农杆菌介导 agrobacterium mediation

利用土壤中普遍存在的革兰氏阴性细菌-农杆菌，来实现外源基因向植物细胞的转移和整合的转基因技术。

3.2

遗传转化 genetic transformation

同源或异源的游离DNA分子（质粒和染色体DNA）被自然或人工感受态细胞摄取，并得到表达的水平方向的基因转移过程。

4. 原理

农杆菌介导法是通过诱导农杆菌侵染过的下胚轴产生转化的愈伤组织，再将转化的愈伤组织进行扩增，进一步诱导产生胚性愈伤并诱导植株再生。以棉花幼苗下胚轴为受体材料，利用农杆菌中Ti质粒或Ri质粒上的T-DNA可被转移并整合到棉花基因组的特性，通过棉花下胚轴受伤后释放的信号分子激活农杆菌的Vir基因，促使T-DNA携带目的基因进入棉花细胞并整合到基因组中，使棉花获得新性状。

5. 设备和用具

本标准规定的设备和用具主要依据实验室实际操作所需确定。不同的实验环节，如无菌苗培养、农杆菌菌液活化、遗传转化以及后续的成苗生根等，都需要特定的设备和用具。在无菌苗培养阶段，需要超净工作台来提供无菌操作环境，以避免杂菌污染棉花种子和幼苗；光照培养箱用于提供适宜的光照和温度条件，满足棉花幼苗生长需求。农杆菌菌液活化时，离心机用于收集和沉淀农杆菌菌体；恒温摇床用于在适宜温度下振荡培养农杆菌，使其快速繁殖。在遗传转化过程中，镊子、剪刀等用于处理棉花下胚轴受体材料；培养皿用于放置外植体、进行浸染及共培养等操作。这些设备和用具的选择是为了保证每个实验步骤能够顺利、准确地进行，满足实验过程中的无菌操作、培养条件控制以及材料处理等要求。

6. 试剂

试剂参考GB/T 6682的要求，给出了本标准所有用到的试剂，便于知晓所用的试剂和溶液，做到试验操作的统一和规范。GB/T 6682规定了分析实验室用水的规格和试验方法等内容。在棉花农杆菌介导转化实验中，所使用

的试剂如用于消毒棉花种子的次氯酸钠溶液，其浓度和使用方法需要遵循一定的标准，以确保既能有效消毒种子表面的微生物，又不影响种子的活力。在配制各种培养基时，所用到的无机盐、有机物、植物生长调节剂等试剂，其纯度、用量等也需严格按照标准执行。

7. 培养基

培养基准备主要依据棉花胚性愈伤组织诱导条件实验确定。通过大量的实验研究，发现不同成分和比例的培养基对棉花胚性愈伤组织的诱导效果差异显著。

本标准根据实际试验中的研究结果，精确配制含有特定成分和比例的培养基，以满足棉花胚性愈伤组织诱导的需求，提高诱导成功率和愈伤组织的质量，为后续的植株再生奠定良好基础。

8. 无菌苗培养

对棉花种子进行处理、培养。棉花种子表面可能携带各种微生物，这些微生物在种子萌发和幼苗生长过程中可能会污染培养基，影响实验结果。因此，需要对棉花种子进行消毒处理，通常使用氯化汞溶液等消毒剂，按照一定的时间和浓度进行浸泡消毒，以杀灭种子表面的微生物。消毒后的种子在无菌条件下接种到适宜的培养基上进行培养。选择合适的培养基和培养条件，如在光照培养箱中提供适宜的温度（一般为28℃左右）、光照强度和光照时间，是因为棉花种子萌发和幼苗生长需要特定的环境条件。适宜的温度有助于种子内部的生理生化反应顺利进行，促进种子萌发；合适的光照条件则对幼苗的光合作用和形态建成至关重要，能够保证幼苗健康生长，为后续的农杆菌侵染实验提供高质量的受体材料。

9. 侵染液制备

将农杆菌菌液划线接种到含抗生素的YEP固体培养基上，是因为YEP培养基能够为农杆菌提供丰富的营养物质，满足其生长需求。而添加相应的抗生素，如卡那霉素、头孢类抗生素（具体根据农杆菌所携带的抗性基因决定），可以抑制培养基中可能存在的杂菌生长，只有携带对应抗性基因的目标农杆菌能够在该培养基上生长形成单菌落。在28 °C的适宜温度下培养48 h左右，农杆菌能够充分复苏并生长繁殖，便于后续挑选单克隆进行扩大培养，获得足够数量且纯净的农杆菌菌液，用于棉花遗传转化实验，确保实验中使用的农杆菌具有较高的活性和纯度，提高遗传转化的成功率。

10. 遗传转化

以下胚轴为受体材料的遗传转化，主要是通过诱导农杆菌侵染过的下胚轴产生转化的愈伤组织，再将转化的愈伤组织进行扩增，进一步诱导产生胚性愈伤并诱导植株再生的转化体系，同时也是棉花遗传转化最经典的体系。

本标准依据遗传转化实际操作过程，对下胚轴预处理、农杆菌浸染、共培养、选择培养、分化诱导各个步骤的具体操作进行规定。

11. 生根培养

经过愈伤组织诱导和筛选后，将获得的胚性愈伤组织转移至分化培养基上，诱导芽的形成。分化培养基中细胞分裂素和生长素的比例与愈伤组织诱导培养基不同，通常细胞分裂素的比例相对较高，以促进细胞分化形成芽。当芽长到一定长度（一般为2 cm~3 cm）时，将其切下转移至生根培养基上诱导生根。适宜的温度（一般为25 °C~28 °C）和光照条件（适当的光照强度和光照时间）对于芽的分化和根的生长至关重要。在这样的条件下，经过一段时间的培养，幼苗能够形成较为发达的根系，具备移栽到土壤中的能力，为后续的炼苗移栽做准备。

12. 炼苗移栽

炼苗的目的是使在实验室无菌环境中培养的幼苗逐渐适应外界自然环境。将生根良好的幼苗从培养瓶中取出，洗净根部附着的培养基，避免培养基滋生杂菌影响幼苗生长。然后将幼苗移栽到装有适宜基质（如蛭石、珍珠岩和营养土按一定比例混合的基质）的营养钵中，放置在温室或大棚等环境中进行炼苗。

经过一段时间（一般为7天~10天）的炼苗后，幼苗适应了外界环境，即可移栽到大田或其他种植环境中进行正常的生长管理。这样可以提高幼苗移栽后的成活率，确保转基因棉花植株能够在自然环境中正常生长发育，为后续的目的基因检测和性状观察提供可靠的实验材料。

13. 目的基因检测

目的基因检测是确认遗传转化是否成功的关键步骤。PCR扩增检测属于分子生物学检测方法，是基于DNA扩增的原理，设计与目的基因特异性互补的引物，以棉花基因组DNA为模板进行PCR扩增。如果在转基因棉花植株中能够扩增出与目的基因大小相符的条带，则初步表明目的基因已整合到棉花基因组中。

抗生素抗性检测属于表型检测方法，通过涂抹卡那霉素等抗生素，观察转基因植株的抗药性表型（如药害程度），验证目的基因（通常为抗性标记基因）是否成功表达并赋予植株相应性状。

六、与有关现行法律、政策和标准的关系

本标准符合《中华人民共和国标准化法》等法律法规文件的规定，并在制定过程中参考了相关领域的国家标准、行业标准、团体标准和其他省市地方标准，在对原理、设备和用具、试剂、培养基、无菌苗培养、侵染液制备、遗传转化、生根培养、炼苗移栽、目的基因检测等内容的规范方面与现行标准保持兼容和一致，便于参考

实施。

七、重大意见分歧的处理结果和依据

无。

八、提出标准实施的建议

建立规范的标准化工作机制，制定系统的团体标准管理和知识产权处置等制度，严格履行标准制定的有关程序和要求，加强团体标准全生命周期管理。建立完整、高效的内部标准化工作部门，配备专职的标准化工作人员。

建议加强团体标准的推广实施，充分利用会议、论坛、新媒体等多种形式，开展标准宣传、解读、培训等工作，让更多的同行了解团体标准，不断提高行业内对团体标准的认知，促进团体标准推广和实施。

九、其他应予说明的事项

无。

《农杆菌介导棉花遗传转化技术规程》标准起草工作组

2025年6月