



陆地棉组织培养体细胞胚胎发生技术改进

迟吉娜, 马峙英*, 韩改英, 李喜焕, 王彦霞

(河北农业大学, 河北省作物种质资源重点实验室, 保定 071001)

摘要:以珂字 312 和冀无 2031 为材料,对陆地棉体细胞胚胎发生技术进行了改进,建立了一套培养程序。在悬浮培养中,加入 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PEG6000 的液体培养基可提高悬浮培养后正常胚的萌发率,对胚状体萌发有促进作用。悬浮培养后的胚性愈伤组织继代到含有 $80 \sim 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG6000 的胚性愈伤组织萌发培养基中,暗培养 1~2 周,胚性愈伤组织明显疏松;在光照条件下继续培养两周可形成大量绿色萌发胚。加入 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CH 及 NH_4NO_3 减半、 KNO_3 加倍的培养基利于胚状体的分化,且异常胚的比例低。

关键词:陆地棉;体细胞胚胎;PEG

中图分类号:S562.035.03 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2005)04-0195-06

Technical Improvement of Tissue Culture and Somatic Embryogenesis in Upland Cotton

CHI Ji-na, MA Zhi-ying*, HAN Gai-ying, LI Xi-huan, WANG Yan-xia

(Agricultural University of Hebei, Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: Two varieties of upland cotton, Coker 312 and Jiwu 2031, were studied on somatic embryogenesis. They produced different amount of embryogenic calli and regenerated plants. A better procedure of cotton embryogenic callus inducement was established. Special effects of PEG6000 on somatic embryogenesis in upland cotton were investigated. PEG6000 could raise ratio of embryoids germination remarkably, which got the highest rate of embryoids germination in the treatments of $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in suspension culture. It promoted embryogenic callus germination in normal light period in two weeks after one or two weeks in darkness with $80 \sim 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of PEG6000 in solid medium. This method was also applied to maintenance embryonic callus. MSB(MS inorganic salts and B_5 vitamin) with phytohormone free, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of CH, half amount of NH_4NO_3 and double amount of KNO_3 could stimulate formation and germination of embryoids, and reduce abnormal embryoids.

Key words: upland cotton; somatic embryoids; PEG

随着基因工程和分子生物学的发展,建立高效而稳定的遗传转化体系,是保证棉花转基因获得大量可供筛选群体的前提条件。棉花组织和细胞培养工作起步较晚,而且棉花一直是植株再生最困难的植物之一。1979年起 Price 和 Smith 首次报道从克劳茨基棉 (*Gossypium klotzschianum*) 细胞悬浮培养中获得胚状体^[1];继而 Fi-

ner^[2]得到大量的体细胞胚;Davidonis 第一次从继代保持两年多的珂字 310 子叶愈伤组织偶然获得了再生植株^[3];直到 1986 年,Shoemaker 才正式报道得到再生植株^[4]。近年来,已从多个棉种中几十个品种的不同组织和器官培养获得体细胞胚和再生植株,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。但棉花体细胞

胚胎发生和植株再生由于影响因素众多^[5],目前仍是棉花基因工程和细胞工程的“瓶颈”,限制了棉花遗传转化的发展。本研究以陆地棉品种的下胚轴为外植体,试图建立一种高效的陆地棉组织培养体细胞胚胎发生技术体系。

1 材料和方法

1.1 无菌苗的获得

供试品种为珂字 312 和冀无 2031。用两种方法处理种子获得无菌苗,并进行比较。处理 A1:将硫酸脱绒的种子用 0.1% HgCl₂ 消毒 30 min,用无菌水冲洗 5~6 次,浸泡于无菌水中至露白。处理 A2:将种子剥去种皮,不经浸泡,直接用 0.1% HgCl₂ 消毒 3~5 min,用无菌水冲洗 5~6 次。

将处理好的种子,种于无菌苗培养基上,暗处萌发。

1.2 培养条件

温度为(28±1)℃,光周期为光:暗=14:10,光照强度为 2000 lx,悬浮培养时摇床转速为 100~120 r·min⁻¹。

1.3 培养基

培养基成分为 MS 无机盐、B₅ 维生素(10.0 mg·L⁻¹ VB₁、1.00 mg·L⁻¹ VB₆、1.00 mg·L⁻¹ 烟酸)、肌醇 100 mg·L⁻¹、葡萄糖 30 g·L⁻¹、phytagel 2.5 g·L⁻¹,pH 5.85。在愈伤组织诱导、继代及分化不同阶段附加不同浓度的 2,4-D、KT、IAA 及 IBA。每一处理重复 3 次。

以珂字 312 下胚轴为外植体,按照已报道^[6-7]的培养方案(KI1:1.0 mg·L⁻¹ KT+1.0 mg·L⁻¹ IAA;KI2:0.5 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ IAA)诱导愈伤组织及胚性愈伤组织,并与本试验的诱导方法进行比较。

在胚性愈伤增殖阶段采用不加激素和凝固剂的基本培养基,选择外观均匀一致的冀无 2031 黄绿色胚性愈伤组织 2 g,分别在含有 0、50、100、

150 g·L⁻¹ PEG6000 的 0.05 L 液体培养基中悬浮培养继代 2 周后,过 0.25 mm 筛,选取大小均匀一致的球形胚接种到相同的胚萌发培养基中,观察胚萌发情况。选取悬浮培养后大小、色泽一致的胚性愈伤组织,继代到分别含有 80、160、240、480、640 mg·L⁻¹ PEG6000 的胚性愈伤组织萌发培养基中,暗培养 1~2 周。与不含 PEG 并一直在光照条件下培养、不含 PEG 暗培养 1~2 周及含 PEG 一直在光照条件下培养的胚性愈伤组织进行比较。

2 结果与分析

2.1 种子处理方式对愈伤组织诱导的影响

经 A1 处理后的种子萌发速度快,下胚轴粗壮,平均长度可达 11 cm,与 A2 处理后所得下胚轴平均长度相比差异显著(表 1)。主要原因可能是经硫酸脱绒的种子种皮较薄,浸泡时种子吸水,很快萌发,所以长势好,棉苗壮。处理 A2 容易将保护胚的种脐损伤,对种子萌发不利。

在诱导培养中,处理 A1 中的下胚轴全部能够正常地诱导出愈伤组织,而处理 A2 中的下胚轴由于细弱,出愈率低,易褐化死亡。所以,选用处理 A1 得到的种子播种无菌苗效果较好。

2.2 愈伤组织的诱导和继代

用 A1 处理得到下胚轴,接种 2 天后下胚轴切段切口处由绿色变为褐色;5 天后,切口处明显膨大;7 天后,切口处出现肉眼可见的愈伤组织,下胚轴伸长增粗。下胚轴诱导的愈伤组织在 15 天内有明显的极性现象,即形态学下端较形态学上端先脱分化,形成愈伤组织。小于 5 mm 的切段,第 15 天时已趋于褐化死亡;明显大于 8 mm 的切段伸长速度较快而出愈速度较慢,且切段两端易硬化;下胚轴长度在 5~8 mm 之间的切段无明显伸长现象,愈伤组织呈淡黄色。所以,下胚轴长度选取 5~8 mm 的切段较好。

表 1 两种种子处理方式效果比较

Table 1 Comparison of two kinds of seedling treatments

处理	播种方式	生长速度	下胚轴平均长度/cm	子叶状况	30 d 下胚轴出愈量
A1	浸泡至露白后接种	快	11a	厚实	++++
A2	干棉仁直接接种	慢	6b	薄且有烧伤痕	++

注:① + 表示愈伤组织的生长速度或细胞比例,+越多表示生长越快或所占比例越大;② a, b 表示二者在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。

2.3 胚性愈伤组织诱导程序

珂字 312 和冀无 2031 下胚轴在 B0 培养基

(0.1 g·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ IAA+0.1 mg·L⁻¹ KT)中形成愈伤组织后,继代到无 2,4-D,并

适当增加生长素的 C5 (0.3 mg · L⁻¹ IBA + 0.1 mg · L⁻¹ KT) 培养基中培养 2 个月左右,再继代到适当降低生长素和细胞分裂素比例的 C13 培养基 (0.5 mg · L⁻¹ IBA + 0.2 mg · L⁻¹ KT) 中培养 2 个月,出现胚性愈伤组织。此程序简称 BCC 培养程序。

以珂字 312 的下胚轴为外植体,除了用上述培养程序诱导出胚性愈伤组织以外,还可以在 KI1、KI2 中培养 3 个月出现胚性愈伤组织。对三种程序培养效果的比较(表 2)可以看出, KI1 培养程序不如 KI2 培养程序诱导出的胚性愈伤组织量多。KI2 中诱导的愈伤组织带有红色,生

根率高,在继代过程中需要拔除气生根,出现胚性愈伤时颗粒较大,需要经过继代才转为正常,且畸形胚发生率高。BCC 培养程序中珂字 312 出现胚性愈伤组织的时间比 KI 培养程序晚 1 个月左右,但 BCC 培养程序在后续培养中胚性愈伤组织状态较好,畸形胚较 KI 培养程序少。这可能是因为在 BCC 培养程序过程中愈伤组织的分化较慢,分化所需物质积累较好,在后续培养中所需物质供应充分。所以,珂字 312 的 BCC 培养程序要好于 KI1、KI2 培养程序。用 BCC 培养程序出现胚性愈伤组织时的愈伤组织状态见图 1-1, KI2 程序出现胚性愈伤组织时的愈伤组织状态见图 1-2。

表 2 三种培养程序对珂字 312 愈伤组织诱导的影响

Table 2 The impacts of three procedures on callus inducement of Coker 312

培养程序	30 d 出愈率 /%	30 d 生根率 /%	30 d 愈伤组织生长量	30 d 愈伤状态	150 d 胚性愈伤量	出现胚性愈伤时的愈伤状态	170 d 胚状体畸形情况
BCC	100	10.0	++++	灰绿、软	+++	较湿润	+
KI1	75	72.5	+	白绿、较硬	++	有硬块、有根 较干燥	+++
KI2	81	66.6	++	白绿、较硬	++++	有硬块、有根 较干燥	+++

注: + 表示愈伤组织的生长速度或细胞比例, + 越多表示生长越快或所占比例越大。

2.4 胚性愈伤组织的增殖和萌发

悬浮培养可以大大加快胚性愈伤组织的增殖速度。2 g 胚性愈伤组织在悬浮培养 1 周后可形成 3~4 g 的胚性愈伤组织,而在固体培养基上至少需要 2~3 周的时间。用黄绿色的胚性愈伤组织作为悬浮培养物,悬浮培养 1~2 周后,经 0.25

mm 筛网过滤,可获得发育一致的球形胚(图 1-3)。

含有 50 g · L⁻¹ 的 PEG6000 的液体培养基对胚状体萌发有促进作用,可提高悬浮培养后正常胚的萌发率。不同浓度 PEG6000 对胚状体萌发的作用比较见表 3。

表 3 不同浓度 PEG6000 对胚状体萌发的影响

Table 3 Effect of different concentration of PEG6000 on germination

PEG6000 的浓度/(g · L ⁻¹)	接种球胚数 / 个	20 d 正常发育的胚数 / 个	20 d 正常子叶胚率 / %	40 d 正常萌发胚数 / 个	40 d 正常胚萌发率 / %
0	312	48	15.38	0	0
50	324	48	14.81	8	16.7
100	384	48	12.50	0	0
150	372	48	12.90	0	0

在含有 PEG6000 的固体培养基中,胚性愈伤组织明显疏松。含 PEG6000 且暗培养的胚性愈伤组织比其它三种处理干燥疏松。经暗培养的胚性愈伤组织(图 1-4,右)比光培养的愈伤组织(图 1-4,左)干燥疏松。在含 PEG 的培养基中,经暗培养的胚性愈伤组织(图 1-5,左)比光培养的愈伤组织(图 1-5,右)增殖速度快,状态好。经暗培养后的胚性愈伤组织在光照条件下继续培养 2 周,继代到含 80~160 mg · L⁻¹ PEG6000 的培养基中,光照培养 2 周左右可形成大量绿色萌发胚

(图 1-6)。

2.5 胚性愈伤组织的继代和长期保持

在本试验中,对冀无 2031 和珂字 312 的胚性愈伤组织进行了为期 20 个月的胚性保持,主要采用三种方法:一种方法为在加 PEG 的液体与固体培养基中采用固、液、固黑暗方式;第二种方法即利用畸形胚能够再次愈伤化形成胚性愈伤组织,有的甚至在胚轴上部生长小植株,胚轴下部开裂,直接形成胚性愈伤组织(图 1-7);第三种方法,即在固体培养基中每隔 20 天继代一次,有利于胚性

愈伤的长期保持。继代时间间隔过长,胚性愈伤容易老化,继代间隔过短,则费工费时,增加成本。

2.6 胚状体的分化

在基本培养基中加入两倍的肌醇、 NH_4NO_3 减半、 KNO_3 加倍或每升加入 500 mg 的 CH 都可以促进胚性愈伤组织的萌发。每升基本培养基中同时加入 500 mg 的 CH 及 NH_4NO_3 减半、 KNO_3 加倍的培养基(简称 E5 培养基)中可获得大量正常子叶胚,降低异常胚的比例。

本研究发现,AC 不利于胚性愈伤组织的增殖和胚状体的萌发。在含有 $0.25 \sim 1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

AC 的培养基中再生小植株叶片由绿变黄、脱落(图 1-8,左),而不含 AC 的培养基中的植株依然健壮(图 1-8,右),这与许多研究者的研究结果不同^[6-9]。造成本试验得出结果与前人不同的原因,可能是因为本试验所采用的凝固剂 phytigel 本身就有减少愈伤组织褐化的作用,再加入 AC 时,AC 吸附了培养基中的有效营养成分,如铁离子、钙离子等,使得被培养物呈现养分缺乏状态。所以采用 phytigel 为固化剂的培养基中不适合添加 AC。

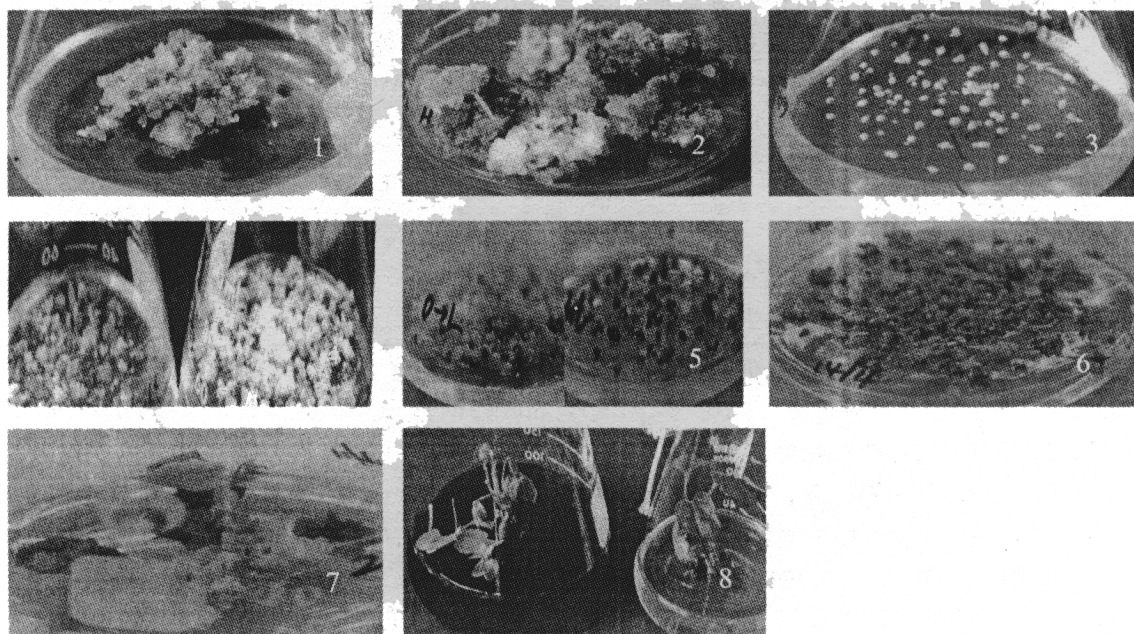


图 1 胚性愈伤组织继代及植株再生过程中各处理结果比较

Fig. 1 Comparison of treatments in subculture of somatic embryo callus and plant regeneration

3 讨论

张寒霜等^[10]、蔡小宁等^[11]都先后报道了冀无 2031 的体细胞胚胎发生和植株再生,但在本试验中按照其报道的方法均未能获得胚性愈伤组织,而是通过 BCC 培养程序获得了冀无 2031 胚性愈伤组织,并将整个再生植株程序称为 BCCE 培养程序,其程序流程总结为图 2。

应用液体悬浮培养是诱导体细胞胚胎发生并增加体细胞胚数量的有效方法^[2-3,12-14]。但悬浮培养产生的体细胞胚易产生畸形苗、玻璃化苗等,所以近年来用液体悬浮培养方法的人很少。PEG 在植物生理与组织培养研究中多应用于模拟干旱逆境进行细胞株(系)筛选、种子生理研究及高等植物体细胞杂交等方面^[15],尚无报道将 PEG 用

于减少玻璃化苗、提高胚状体正常萌发率的研究。

PEG6000 是一种高分子量的渗透势调节剂,对水分表现出强烈的亲和性,可以增加溶液的水势,不会被植物细胞吸收,并对植物细胞无毒性。PEG 的高渗透压引起水分胁迫,使细胞内正常的蛋白质合成受到抑制,相应地诱导一些胁迫蛋白合成,调节代谢,抑制愈伤组织细胞的分裂,加速胚的发育,使胚体早熟并抑制成熟胚的萌发^[16]。另外,高渗透压常常导致内源 ABA 的增加,也可能通过 ABA 的作用来影响胚的发育^[17]。一些研究表明,ABA 对植物体细胞胚的发生发育具有重要作用^[18]。已有一些试验证明,渗透调节剂(包括甘露醇、蔗糖、海藻糖、PEG)可取代 ABA 抑制体细胞胚早熟萌发,促进胚中贮藏物质的积累,从而提高体细胞胚的脱水耐受力^[19-22]。

本研究将 PEG6000 用于悬浮培养和其后的固体培养中,试图对棉花体细胞胚胎发生过程中的悬浮培养技术加以改进,使其既能利用悬浮培

养缩短培养时间、增加体细胞胚数量,又能够降低畸形苗、玻璃化苗的发生率。

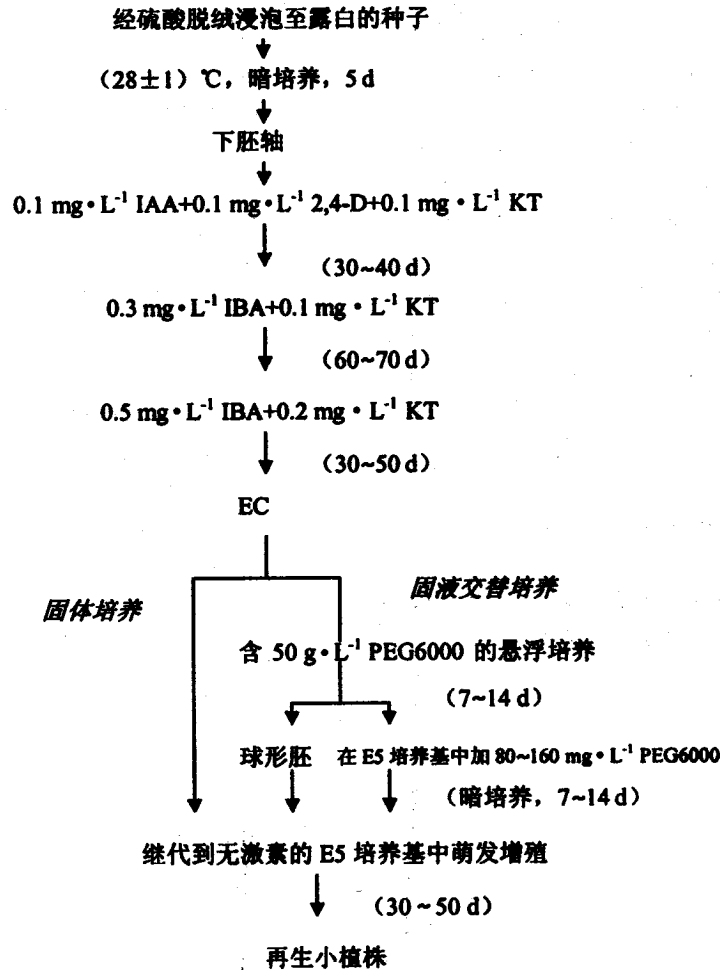


图 2 陆地棉体细胞胚胎发生及植株再生改进流程

Fig. 2 Improved process of somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton

参考文献:

- [1] PRICE H J, Smith R H. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *G. klotzschianum* Anderss [J]. *Planta*, 1979, 145: 305-307.
- [2] FINER J J, Smith R H. Initiation of callus and somatic embryos from explants of mature cotton (*G. klotzschianum* Anderss) [J]. *Plant cell rep*, 1984, 3: 41-43.
- [3] DAVIDONIS G H, Hamilton R H. Plant regeneration from callus of *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Plant sci lett*, 1983, 32: 89-93.
- [4] SHOEMAKER R C, Couche L J, Galbraith D W. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant cell rep*, 1986, 3: 178-181.
- [5] 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.
- [6] 张献龙. 陆地棉体细胞胚胎发生、植株再生及其机制的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 1990.
- [7] 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.
- [8] 李仁敬, 孟庆玉, 魏良民, 等. 新疆海岛棉体细胞胚状体的发生和芽的分化 [J]. *新疆农业科学*, 1993, 1: 9-11.
- [9] 于 娅, 李付广, 马峙英. 陆地棉中棉所 24 胚性愈伤组织诱导及植株再生 [J]. *西北植物学报*, 2004, 24 (2): 306-310.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 陈志贤,李淑君, Trolinder N L, 等. 棉花细胞悬浮培养的胚胎发生和植株再生的某些特性的研究[J]. 中国农业科学, 1987, 20(5):6-11.
- [13] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton. II. Requirements for embryo development and plant regeneration [J]. Plant cell tissue organ culture, 1988b, 12(1):43-53.
- [14] SAKHANOKHO H F, Zipf A, Rajasekaran K, et al. Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in upland(*Gossypium hirsutum* L.) and Pima(*Gossypium barbadense* L.) cottons[J]. Crop science, 2001, 41:1235-1240.
- [15] 张云贵,谢永红. PEG 在模拟植物干旱胁迫和组织培养中的应用[J]. 亚热带植物通讯, 1994, 23(2):61-64.
- [16] 高述民,李凤兰. ABA 对植物体细胞胚胎发育影响的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(4): 122-129.
- [17] 高述民. ABA 和 PEG 对胡萝卜体细胞胚诱导和调控的影响[J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29(2): 13-16.
- [18] 崔凯荣,戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京:科学出版社, 2000. 59-62.
- [19] CROUCH M L, Sussex I M. Development and storage protein synthesis in *Braddica napus* L. [J]. Embryos in *vivo* and in *vitro* Planta, 1981, 153: 64-74.
- [20] FINKELSTEIN R R, Somerville C. Abscisic acid or high osmoticum promote accumulation of long chain fatty acids in developing embryos of *Brassica napus* [J]. Plant science, 1989, 5:213-217.
- [21] GOFFNER D, This P, Delseny M. Effect of abscisic acid and osmotica on helianthin in gene expression in sunflower cotyledons in *vitro* [J]. Plant science, 1990, 66, 211-219.
- [22] WILEN R W, Mandel R M, Pharis R P, et al. Effects of abscisic acid and high osmoticum on storage protein gene expression in microsprore embryos of *Brassica napus* [J]. Plant physiol, 1990, 94: 875-881. ●