

## 陆地棉抗病品种中 521 植株再生的研究

韩改英, 马峙英\*, 王彦霞, 迟吉娜, 李秋伶

(河北农业大学作物遗传育种系, 保定 071000)

**摘 要:**以农艺性状优良且抗枯萎病的陆地棉品种中 521 的下胚轴为外植体, 采用固液结合的体细胞培养方法建立细胞悬浮系并进行植株再生的研究。结果表明, 愈伤组织的诱导以  $MS+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA}+0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT}+0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}+30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖的固体培养基为最佳; 体细胞胚的形成以  $MS+0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA}+0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT}+0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}+1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  谷氨酰胺的液体培养基为最佳, 悬浮 30 d 后可以发现体细胞胚的形成。之后转接入四种不同的 MSB 固体培养基上诱导再生植株形成, 发现  $MSB+2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  谷氨酰胺+ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  天冬酰胺+ $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖+ $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂为最佳培养基, 且发现此方法比全程固体培养缩短了体细胞再生的周期, 此品种在本研究建立的再生体系下植株再生周期为 6 个月左右。

**关键词:**棉花; 中 521; 下胚轴; 愈伤组织; 悬浮培养; 植株再生

**中图分类号:**S562.035.3 **文献标识码:**A

**文章编号:**1002-7807(2006)02-0104-05

## Study on the Establishment of Plant Regeneration Method in Upland Cotton CCRI 521

HAN Gai-ying, MA Zhi-ying\*, WANG Yan-xia, CHI Ji-na, LI Qiu-ling

(Department of Crop Genetics and Breeding, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

**Abstract:** At present, many regeneration plant systems have been established. But only a few model varieties were fit to those regenerative systems and the genetic types were the main restrictive factor in the process of cotton somatic culture and plant regeneration, and the upland cotton variety CCRI521 with better agronomic properties and tolerance to *Verticillium* wilt had not been studied. This study obtained cell suspending lines and regenerative plants from upland cotton CCRI521 by the approach of solid and liquid culturing. The results showed that the solid medium  $MS+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA}+0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT}+0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}+30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose was the best for callus induction from hypocotyls in our study. While the liquid medium  $MS+0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA}+0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT}+0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}+1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  glutamine was fit for somatic embryogenesis, somatic embryo could be seen after suspending for 30 days. Then these somatic embryo were transferred into four different MSB media for regenerative plants induction and found the medium  $MSB+2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  glutamine+ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  asparagines+ $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sucrose+ $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  agar was the best for regenerative plants induction in these four different MSB media. And the cycle of plant regeneration was about 6 months in this system.

**Key words:** CCRI 521; hypocotyls; callus; cell suspending culture; plant regeneration

收稿日期: 2005-07-18 作者简介: 韩改英(1979-), 女, 在读博士; \* 通讯作者, mzhy@mail.hebau.edu.cn

基金项目: 河北省自然科学基金(C2005000209)

棉花的体细胞胚胎发生和植株再生一直是棉花组织培养的研究热点,自 1983 年首次报道获得体细胞胚和再生植株后<sup>[1]</sup>,直到现在,这些研究只是集中在一些模式品种上,基因型限制仍是棉花体细胞培养的一个难题,生产上大面积推广的优良主栽品种还很难获得成功。中 521 是抗枯萎病、耐黄萎病、纤维品质和综合农艺性状表现优良的品种,且该品种来源于斯字棉系统。由于斯字棉系统很难获得再生植株<sup>[2]</sup>,因此对斯字棉系统胚胎发生能力的研究很少,目前还未曾见到有关中 521 体细胞胚胎发生和再生体系方面的报道。据此,本试验以中 521 的下胚轴为外植体进行了愈伤组织的诱导、继代和悬浮体系建立及再生植株的初步研究,建立了一套固液结合的再生体系,期望能为利用转基因技术培育优质、高产、抗病虫的棉花新品种提供物质基础和技术支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为陆地棉抗病品种中 521,由河北农业大学棉花遗传育种研究室提供。

1.2 培养方法

1.2.1 周体培养方法。种子用浓硫酸脱绒后晾干,用 0.1% 的升汞消毒 5 min,然后用无菌水冲

洗 3~4 次,经无菌水浸泡至露白,将处理好的种子接种于无菌苗培养基上,(25±2)℃,暗培养使其萌发。以 7 日龄的无菌苗下胚轴为外植体,剪成 0.5~1 cm 的切段接入诱导培养基上诱导产生愈伤组织。基本培养基为 MSB,附加外源激素 2,4-D、IBA、IAA、KT,葡萄糖 3%,Phytigel 2.5 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.85。培养温度 (28±2)℃,光照度 2000 lx,光周期为 14h 光/10h 暗。

1.2.2 液体培养方法。愈伤组织在固体培养基上继代 4 次后,选取生长旺盛、颗粒较小、状态疏松的愈伤组织约 5 g,依次继代到含有 IBA、KT、2,4-D 三种不同激素浓度的液体培养基中(表 3),用无菌镊子将愈伤组织压碎,放于摇床上摇散,转速为 120 r·min<sup>-1</sup>,培养温度 (28±2)℃,培养期间每隔 7~10 d 更换一次培养液。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导及继代培养

将无菌苗的下胚轴接种到含有 IAA、IBA、KT、2,4-D 四种激素不同浓度组合的培养基上(表 1),2 d 后下胚轴切段切口处由绿色变为褐色;5 d 后,切口处明显膨大;7 d 后,发现各组合下胚轴的表面均有黄色或绿色的愈伤组织形成,但诱导率有所不同。

表 1 激素对愈伤组织诱导及生长情况的影响

Table 1 Effect of hormones on cotton callus induction and growth

处理 代号	激素浓度/mg·L <sup>-1</sup>				7 d 愈伤组织诱导率/%				30 d 愈伤组织状态		
	IBA	IAA	KT	2,4-D	重复 I	重复 II	重复 III	平均值	颜色	质地	生长量
A1	1.0	0	0.05	0.1	85.2	86.0	85.6	85.6a	淡黄	松散	++++
A2	0	1.0	0.05	0.1	80.7	80.9	80.5	80.7b	乳白	脆散	++++
A3	1.0	0	0.1	0.1	78.4	78.5	78.9	78.6c	淡黄	松散	+++
A4	0	1.0	0.1	0.1	60.3	60.7	60.5	60.5d	黄绿	紧密	++

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。②a,b,c,d 表示四个处理在 α=0.05 水平上差异显著。

由表 1 还可看出,A1 组合的诱导率最高,达 85.6%,A4 组合的诱导率最低,为 60.5%,说明较高浓度的 IBA 和 2,4-D 配合有利于棉花下胚轴愈伤组织的诱导。此外,各个组合在 2,4-D 浓度不变的情况下,IAA/KT 或 IBA/KT 的值越大,愈伤组织生长量越大,质地越松散;在 KT 和 2,4-D 浓度相同的情况下,从愈伤组织的颜色、质地及生长量来看,IBA 的效果要比 IAA 好,并且愈伤组织的诱导率在不同的培养基间具有显著的

差异。

因此,从愈伤组织的诱导率和生长情况分析可知,诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+2.5 g·L<sup>-1</sup> Phytigel。

2.2 愈伤组织细胞状态调控

将中 521 在 A1 培养基上诱导产生的新鲜愈伤组织依次转接到 F1、F2、F3 培养基上,三种培养基的配方(表 2)。

表 2 不同激素浓度组合对愈伤组织调控的效果  
Table 2 Effect of hormones on callus ratio

处理	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			愈伤组织状态	生长量
	IBA	KT	2,4-D		
F1	0.1	0.1	0.01	浅黄色,湿润	+++
F2	0.1	0.05	0.01	黄色,松散	+++
F3	0.2	0.05	0.01	浅黄色,松散	++++

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。

由表 2 可以看出,转接到 F1 培养基上的愈伤组织可以形成少量的浅黄色愈伤组织,但生长较慢,继代 1 次后,转到 F2 培养基上,1 个月后可以形成状态松散的愈伤组织,之后转到 F3 培养

基上,愈伤组织分裂加快,结构松散,具有良好的分散性,是悬浮培养的理想材料(图 1)。另外,较高浓度的 IBA 和较低浓度的 KT,2,4-D 配合使用对愈伤组织的分化具有促进作用。



图 1 用于悬浮培养的愈伤组织  
Fig.1 Callus for suspension culture

2.3 细胞悬浮体系的建立

悬浮培养可以大大加快愈伤组织的增殖速度和胚性愈伤组织形成的速度。5 g 愈伤组织在悬浮培养一周后可形成 7~8 g 愈伤组织,部分愈伤组织还可以形成胚性愈伤组织(图 2),在固体培养基上这样的增殖速度至少需要 2~3 周的时间,胚性愈伤组织形成的时间会更长。从表 3 可以看

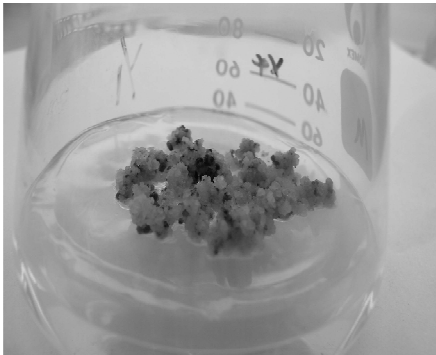


图 2 悬浮培养形成的胚性愈伤组织  
Fig.2 Embryogenesis callus after suspension culture

出,Y3 培养基为最佳的液体悬浮培养基。悬浮培养 30 天后,可以观察到经在 Y3 培养基中有大量胚性愈伤组织的形成,且无褐化现象,这说明谷氨酰胺的加入有利于棉花体细胞胚胎的发生,其最适浓度为  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而且在悬浮培养之初适当减少大量元素用量可以很好地防止愈伤组织褐化。

表 3 液体培养基对愈伤组织分化的影响  
Table 3 Effect of liquid media on callus proliferation

处理 代号	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			谷氨酰胺 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	大量元素 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	胚性愈伤组织 形成速度	褐化 程度
	IBA	KT	2,4-D				
Y1	0.1	0.01	0.01	0	50	+	严重
Y2	0.1	0.05	0.01	0	25	+	较轻
Y3	0.01	0.01	0.01	500	20	++++	无

注: +表示胚性愈伤组织的形成速度, +越多表示形成速度越快。

2.4 胚状体发育和植株再生的形成

将在 Y3 液体培养基中形成的胚性愈伤组织,转到附加  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA+ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  KT+ $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D+ $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  谷氨酰胺的液体培养基中,10 天后即可产生大量胚状体

(图 3)。将经过悬浮培养形成的体细胞胚转入无激素、附加  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  谷氨酰胺和  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  天冬酰胺的、但含有不同碳源和固化剂的 MSB 固体培养基上,即可获得再生植株(图 4),但不同的培养基其分化率不同(表 4)。

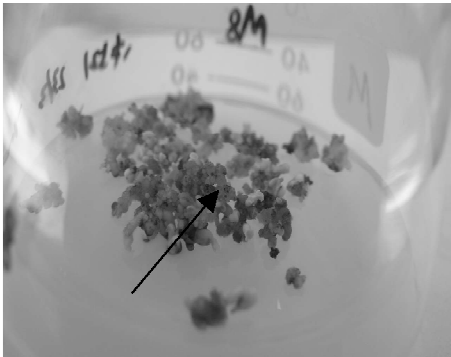


图 3 悬浮培养形成的体细胞胚

Fig. 3 Somatic embryos after suspension culture

从表 4 可以看出,胚状体在蔗糖和琼脂配合使用的培养基上萌发效果最好,达 19.6%。因此,蔗糖作为碳源对再生植株的诱导效果要好于



图 4 中 521 再生植株

Fig. 4 The regenerative plant of CCR1521

葡萄糖,琼脂作为固化剂对再生植株的诱导效果要好于 Phytigel。

表 4 不同培养基对植株再生的影响

Table 4 Effect of different media on plant regeneration

培养基	胚状体数	分化数	分化率/%
MSB+30 g·L <sup>-1</sup> 葡萄糖+2.5 g·L <sup>-1</sup> Phytigel	40	3	7.5
MSB +30 g·L <sup>-1</sup> 葡萄糖+6 g·L <sup>-1</sup> 琼脂	40	4	10.0
MSB +15 g·L <sup>-1</sup> 葡萄糖+15 g·L <sup>-1</sup> 蔗糖+6 g·L <sup>-1</sup> 琼脂	50	6	12.0
MSB +30 g·L <sup>-1</sup> 蔗糖+6 g·L <sup>-1</sup> 琼脂	56	11	19.6

3 讨论

悬浮培养前期很容易出现褐化现象,从而导致愈伤组织细胞死亡。前人曾报道在培养基中加入维生素 C、异抗坏血酸、活性炭、PVP 均可以防止愈伤组织褐化<sup>[13-15]</sup>。而本试验初步发现采用减少大量元素用量的方法,亦可以防止悬浮培养中出现的褐化问题,关于防止褐化问题的内容将进行更深入的研究。

对于由悬浮系再生植株的问题,由于本试验对棉花悬浮培养的研究尚处于初级阶段,所以再生植株的诱导率偏低并伴有畸形苗的出现,因此本试验还需要对提高再生植株诱导率、减少畸形苗发生率等内容进行更深入的研究。

对于如何避免再生苗变异的问题是通过在液体培养基中加入 PEG6000<sup>[18]</sup>来促进胚状体的萌发并防止畸形苗的出现,但本试验发现此方法不适合该品种,而且后期处理不当更容易导致畸形苗的出现。对于该品种再生植株的变异,本试验主要通过在液体培养基中加入谷氨酰胺和天门冬酰胺的办法来降低畸形苗率。

本试验通过对中 521 再生体系的研究,建立了一套固液结合的培养体系,为斯字棉系统的胚

胎发生提供了一套良好的再生体系。这将为以后的棉花体细胞再生方面的研究提供理论参考,对拓宽棉花体细胞胚胎发生和植株再生的基因型范围、建立优良棉花栽培品种高频胚胎发生体系具有重要的意义。

参考文献:

[1] DAVIDONI G H, Hamilton R H. Plant regeneration from Callus Tissue of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Plant Science Letters, 1983, 32:89-93.

[2] 迟吉娜,马峙英,张桂寅. 中国棉花体细胞植株再生的基因型分析[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1):75-82.

[3] 刘 方,张宝红. 棉花组织培养高效植株再生体系的建立[J]. 棉花学报, 2004, 16(2):117-122.

[4] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton II, requirements for embryo development and plant regeneration[J]. Plant Cell Tissue Organ Cul, 1998, 12(1):43-53.

[5] HAMIDOU F S, Allan Z, Kanniah R, et al. Induction of Highly Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Upland and Pima Cottons[J]. Crop Science, 2001, 41:1235-1240.

[6] KE Z S, Stewart J. Effects of silver nitrate on Callus Induction in Upland and Asiatic Cotton[C]. Beltwide

- Cotton Conference, 1995, 41.
- [7] 赖家业, 兰 健, 刘 凯, 等. 蒜头细胞悬浮培养的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 41(3): 656-660.
- [8] 李文雄, 曾寒冰, 胡尚连. 小麦单细胞培养与植株再生[J]. 东北农业大学学报, 1996, 27(4): 313-320.
- [9] 余舜武, 朱永生, 余毓君, 等. 快速建立胚性细胞悬浮系的培养程序初探[J]. 华中农业大学学报, 2001, 8(20): 325-328.
- [10] 李宗艳. 石竹细胞悬浮培养研究(英文)[J]. 广西植物, 2004, 24(3): 266-269.
- [11] 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.
- [12] 董云洲, 段胜军. 谷子胚性悬浮细胞系植株再生体系的建立及转基因技术研究[J]. Journal Of Basic Science And Engineering, 1999, 7(1): 34-40.
- [13] 缪耀梅, 李开彪, 叶添谋. 组织培养过程中污染和褐化的防治[J]. 韶关学院学报(自然科学版), 2003, 24(6): 101-104.
- [14] 汪秀峰. 植物组织培养“抗褐”之初探[J]. 安徽农业科学, 1999, 27(4): 325-326.
- [15] 王玖瑞, 刘孟军, 祁业凤, 等. 枣幼胚培养中褐化的研究[J]. 河北农业大学学报, 2004, 2: 45-47.
- [16] PRICE H J, Smith R H. Somatic embryogenesis in suspension culture of *G. klotzschianum* Anderss [J]. *Planta*, 1979, 145: 305-307.
- [17] 迟吉娜, 李喜焕, 马峙英, 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.
- [18] 迟吉娜, 马峙英, 韩改英, 等. 陆地棉组织培养体细胞胚胎发生技术改进[J]. 棉花学报, 2005, 17(4): 195-200. ●