



陆地棉原生质体培养与植株再生技术研究

汪静儿, 孙玉强, 燕树锋, 道 德, 沈晓佳, 祝水金*

(浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029)

摘要:分离培养陆地棉品种 ZDM-3(*Gossypium hirsutum* L cv ZDM-3)胚性细胞悬浮系的原生质体,通过体细胞胚胎发生成功获得再生植株。试验结果表明,植物生长调节剂组合和碳源对原生质体培养具有重要的影响,添加 2,4-D + KT + 1.5%(W/V)葡萄糖 + 1.5%(W/V)麦芽糖的 KM8P 培养基对于陆地棉原生质体培养的效果较好。激素组合 $0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 诱导的愈伤组织较松软,分化潜力高;胚性愈伤组织的增殖使用 $0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $2.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 的激素组合; $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $1.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 有利于体细胞胚胎发生,而 MSB_5 + $0.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $2.69 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的培养基适合体细胞胚胎萌发和植株再生。此外,愈伤组织诱导宜用葡萄糖作为碳源,而胚性愈伤组织增殖、保存和胚状体的萌发过程宜使用麦芽糖作碳源。

关键词:陆地棉;原生质体培养;体细胞胚胎;植株再生

中图分类号:S562.035.3 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2008)06-0403-05

Study on the Plant Regeneration from Protoplasts of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Via Somatic Embryogenesis

WANG Jing-er, SUN Yu-qiang, YAN Shu-feng, DAUD Muhammad-khan, SHEN Xiao-jia, ZHU Shui-jin*
(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China)

Abstract: Efficient plant regeneration from protoplast isolated from suspension culture cells via somatic embryogenesis was developed in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar ZDM-3. Microcalli were formed after being cultured in KM8P medium with $0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, 1.5% (W/V) glucose, 1.5% (W/V) maltose and 9.0% (W/V) mannitol for about two months. Calli with 2 mm in diameter were transferred to solid proliferated medium. A great deal of somatic embryos and regenerated plants were occurred in the medium of MSB_5 + $2.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + 3% (W/V) glucose + 0.25% (W/V) phytagel. The regenerated plants were grafted to transplant, survival percentage was above 95%. The results showed that A cotton protoplast culture system for ZDM-3 was highly improved by the three key steps namely, high proto-callus forming efficiency, high conversion rate of somatic embryo to plantlets and high survival probability of transplanting. The results showed further that there were great effects of the combinations of the plant growth regulators and sugar kinds on the upland cotton protoplast culture, the KM8P medium supplement with 2,4-D + KT + 1.5% (W/V) glucose + 1.5% (W/V) maltose had the best result of the protoplast culture. The hormone combination of $0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D could produce the best quality callus with watery texture, which had the high capability of plant regeneration. The embryogenic callus proliferated was better in the medium with $0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT and $2.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

收稿日期:2007-06-11 作者简介:汪静儿(1979-),女,博士研究生;*通讯作者, shjzhu@zju.edu.cn

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2004CB117305);国家自然科学基金项目(30471108、30671325)

while somatic embryo initiated when IBA concentration in the medium was decreased to $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA and KT was increased up to $1.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT. The medium of $\text{MSB}_5 + 0.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $2.69 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was suitable for the germination of somatic embryos and plant regeneration. In addition, the best sugar for callus inducing was glucose, while the maltose was even better for the proliferation of embryogenic callus and germination of somatic embryo.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; protoplast culture; somatic embryogenesis; plant regeneration

Abbreviation: 2,4-D: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; NAA: α -Naphthaleneacetic acid; IBA: Indole-3-Butyric Acid; KT: Kinetin; ZT: Zeatin

植物原生质体培养是外源基因遗传转化、体细胞融合和植物遗传改良等研究的重要基础技术。据报道,现已有49个科146个属的320个种的高等植物通过原生质体培养获得了再生植株。自1989年^[1-2]首次获得陆地棉(*G. hirsutum* L.)原生质体培养再生植株以来,陆地棉原生质体培养获得再生植株已有一些报道^[3-10],但多数是以珂字棉种质系为材料,存在植板率低、体细胞胚胎发生率低、再生困难等问题,棉花原生质体培养植株高效再生仍十分困难^[11-12]。

ZDM-3是由浙江大学农业与生物技术学院通过传统育种技术选育的具有鸡脚叶性状的陆地棉种质系,与珂字棉无遗传亲缘关系。经试验与观察,ZDM-3具有早熟、丰产、优质和多抗等特性,其体细胞培养胚胎发生和植株再生能力优于珂字棉系统的陆地棉种质系。本研究对ZDM-3的胚性细胞悬浮系进行原生质体分离和培养研究,研究其原生质体培养和植株再生的技术体系,为棉花体细胞杂交、遗传转化和种质创新提供良好的技术平台。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料陆地棉种质系ZDM-3(*Gossypium hirsutum* L. cv. ZDM-3)为本实验室保存的自交纯系。种子用浓硫酸脱绒后去种壳,用0.1%的升汞消毒6 min,无菌水冲洗3~4次后,接种于 $1/2 \text{MS} + 2\% (\text{W}/\text{V})$ 蔗糖的培养基中获得无菌苗。将8~10 mm的无菌苗下胚轴切段培养于 MSB_5 (MS培养基无机盐+B₅培养基维生素) + $0.09 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $0.25\% (\text{W}/\text{V})$ phytagel + $3\% (\text{W}/\text{V})$ 葡萄糖培养基上诱导愈伤组织,在 $\text{MSB}_5 + 2.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $0.465 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $6.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨

酰胺 + $3.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 天冬酰胺 + $0.25\% (\text{W}/\text{V})$ phytagel + $3.0\% (\text{W}/\text{V})$ 葡萄糖培养基上继代培养。胚性愈伤组织形成后,挑取新鲜、颗粒状胚性愈伤组织转移到100 mL三角瓶中,加入40 mL $\text{MSB}_5 + 3\% (\text{W}/\text{V})$ 葡萄糖液体培养基,在回旋摇床上($120 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)暗培养,光照强度 $< 50 \text{lx}$,温度为 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。每周更换新鲜培养液,连续继代培养30 d左右,得到均匀一致的细小颗粒状悬浮物用于分离原生质体。

1.2 原生质体分离、培养和植株再生

原生质体分离的酶液组成为: $3\% (\text{W}/\text{V})$ 纤维素酶(Onozuka R-10) + $1.5\% (\text{W}/\text{V})$ 果胶酶 + $0.5\% (\text{W}/\text{V})$ 半纤维素酶的CPW9溶液。纯化的原生质体悬浮培养在含有KM8P液体培养基的60 mm × 15 mm的培养皿上,并调整密度为每毫升 2×10^5 cell。该培养基添加有不同的植物生长调节剂组合($0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT; $5.37 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT; $2.69 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.23 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $2.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT)和不同的碳源类型和浓度。原生质体采用液体浅层培养,微愈伤组织形成后,将其转移到 $\text{MSB}_5 + 18.79 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO₃ + $6.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺 + $3.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 天冬酰胺 + $0.25\% (\text{W}/\text{V})$ phytagel + $3\% (\text{W}/\text{V})$ 葡萄糖培养基上增殖和体细胞胚诱导。在含有不同组合碳源的培养基上,形成体细胞胚,最后生长发育形成植株。根据同一视野下形成的愈伤组织数目与最初培养的原生质体数目之比计算出微愈伤组织形成率,体细胞胚胎发生和植株再生后,分别统计体细胞胚、畸形苗和正常植株数。

愈伤组织的诱导和原生质体培养均在温度为 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光周期为14/10 h(光/黑暗)、光照强

度约 2000 lx 等条件下进行。

1.3 原生质体活力检测

用二醋酸脂荧光素 (Fluorescein diacetate, FDA) 对原生质体活力进行染色鉴定。取浓度为 0.01% 的 FDA 的丙酮溶液 1 滴, 再滴加 1 滴原生质体悬液慢慢混合均匀, 室温中静止 5~10 min, 在荧光显微镜 (Leica DM IRB) 下检查, 活原生质体具有黄绿色荧光。用 Leica DFC300FX 进行图片采集。

1.4 原生质体产量测定

采用侯岁稳等^[18]的方法进行原生质体简单计数。

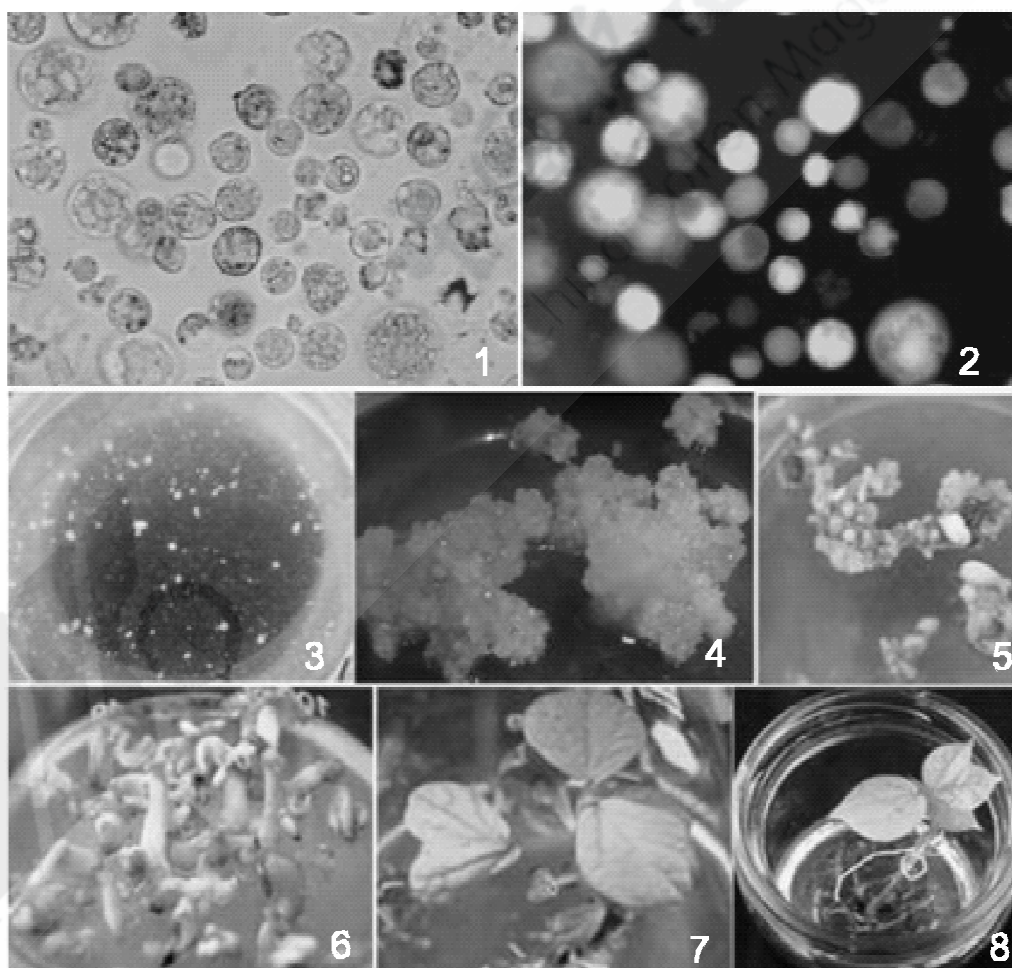
1.5 数据统计分析

每个处理 10 个培养皿, 重复 3 次。最后用 Windows Microsoft Office Excel 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 原生质分离、培养和植株再生

3% 纤维素酶 + 1.5% 果胶酶 + 0.5% 半纤维素酶的酶液组合酶解悬浮细胞系 20 h, 分离得到的原生质体产量高 (图 1-1), 同 Sun 等^[19] 原生质体分离的效果, FDA 染色活力 > 80% (图 1-2), 适合进一步培养。原生质体培养 6~7 周后, 可以肉眼观察到淡黄色的细胞团块 (图 1-3)。当微愈伤组织长至 2 mm 左右时, 用巴氏移液管转移到固体增殖培养基中培养, 培养方法同体细胞培养。继代 3 次后, 愈伤组织由白色或浅黄色的细胞团逐渐转变为鲜黄绿色疏松状颗粒 (图 1-4), 并出现淡绿色体细胞胚 (图 1-5)。将这些体细胞胚转移至相同的新鲜培养基中继代, 体细胞胚即成熟和萌发 (图 1-6), 并形成再生小植株 (图 1-7)。再生小植株根系发育不健全, 选取优良的砧木进行嫁接移栽, 成活率达 95% (图 1-8)。



1. 分离纯化后的 ZDM-3 原生质体; 2. FDA 染色后有活力的 ZDM-3 原生质体; 3. ZDM-3 原生质体培养 6~7 周后微愈伤组织形成; 4. ZDM-3 微愈伤组织转移到固体培养基中增殖; 5. ZDM-3 体细胞胚胎形成; 6. ZDM-3 体细胞胚胎萌发; 7. ZDM-3 原生质体培养植株再生; 8. ZDM-3 再生植株嫁接成活

图 1 陆地棉 ZDM-3 原生质体培养植株再生

Fig. 1 Plantlet regeneration from protoplast of *Gossypium hirsutum* L. cv ZDM-3

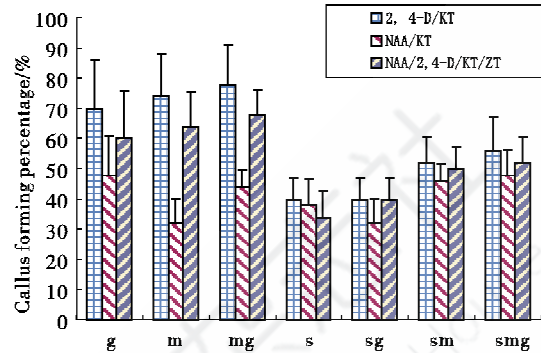
2.2 激素和碳源对陆地棉原生质体分裂启动和愈伤组织形成的影响

悬浮培养一个月后的 ZDM-3 胚性细胞系分离纯化的原生质体,在含有不同植物生长调节剂组合和不同碳源的 KM8P 培养基中进行培养。结果表明,植物生长调节剂和碳源对原生质体的分裂和愈伤组织形成具有显著的影响。由图 2 可见,2,4-D+KT 的激素组合诱导愈伤组织能力优于其它两个组合(NAA+KT 和 NAA+2,4-D+KT+ZT),愈伤组织诱导率达 70% 以上,NAA+KT 的愈伤组织诱导能力明显偏低。同一个激素组合中,葡萄糖+麦芽糖为碳源对愈伤诱导和增殖的效果优于单独使用的葡萄糖或麦芽糖。蔗糖对于原生质体培养效果最差。由此表明,植物生长调节剂组合和碳源对原生质体培养具有重要的影响,添加 2,4-D+KT+1.5% 葡萄糖+1.5% 麦芽糖的 KM8P 培养基适宜于陆地棉(ZDM-3)的原生质体培养。

2.3 激素和碳源对陆地棉体细胞胚胎发生和植株再生的影响

在 $MSB_5 + 2.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA} + 0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT} + 6.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 谷氨酰胺} + 3.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 天冬酰胺} + 0.25\% \text{ phytigel}$ 培养基中添加不同的碳源,研究碳源对 ZDM-3 原生质体培养过程中体细胞胚胎发生和植株再生的影响(表 1 和图 2)。结果表明,葡萄糖+麦芽糖组合对于愈伤组织诱导具有显著的促进作用,最高出愈率可达 78%。但在诱导体细胞胚胎发生和植株再生的过

程中,使用麦芽糖效果较佳,畸形胚频率低(54.7%),正常植株频率高(12.7%)。而在葡萄糖和蔗糖为碳源的培养基中,其正常再生率分别只有 8% 和 2%。



原生质体培养于 KM8P 培养基中,密度为 $2 \sim 10 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,数据统计为 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$, $n=4$ 。(g: 3% 葡萄糖;m: 3% 麦芽糖;s: 3% 蔗糖;mg: 1.5% 麦芽糖+1.5% 葡萄糖;sg: 1.5% 蔗糖+1.5% 葡萄糖;sm: 1.5% 蔗糖+1.5% 麦芽糖;smg: 1% 蔗糖+1% 麦芽糖+1% 葡萄糖)

图 2 不同激素和碳源组合对 ZDM-3 原生质体培养愈伤组织再生的影响

Fig. 2 Influence of 3 combinations of PGRs in the media with seven sugar sources to callus formation

在棉花原生质体培养过程中发现,ZDM-3 体细胞胚萌发后形成的畸形苗,在继续培养过程中大多会长出正常的叶片和根系,形成正常的再生植株。这也是 ZDM-3 易于原生质体培养的原因之一。

表 1 不同碳源对 ZDM-3 的原生质体培养体细胞胚胎发生的影响

Table 1 Effects of sugar source on germination of somatic embryo

碳源	畸形胚/%	畸形苗/%	正常植株/%
葡萄糖	62.7±5.03	27.3±5.03	8±2.0
麦芽糖	54.7±4.62	28.7±6.43	12.7±3.06
葡萄糖+麦芽糖	57.3±6.11	28±4	11.3±1.15
蔗糖	68.7±3.06	28±5.29	2±2.0
蔗糖+葡萄糖	54.7±5.03	32±5.29	8±0.0
蔗糖+麦芽糖	61.3±6.42	28±6	9.3±1.15
蔗糖+葡萄糖+麦芽糖	55.3±7.57	28.7±4.16	12.7±1.15

注:培养基为 $MSB_5 + 2.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA} + 0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT}$,数据统计为 $\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n=3$

3 讨论

棉花原生质体培养技术还不够完善,存在较多的困难,如分裂频率低,容易褐化死亡,体细胞胚胎发生发育较难等。Khasanoy 等^[14]认为这些

可能与原生质体生活力和棉花本身多酚类物质在培养过程中的毒害作用抑制了细胞的分裂有关。本实验对 ZDM-3 进行原生质体培养体系的研究,结果表明,ZDM-3 原生质体在 $KM8P + 0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D} + 0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT} + 1.5\%$

葡萄糖+1.5% 麦芽糖+9.0% 甘露醇的液体培养基中培养,具有较高的出愈率(78%),微愈伤组织转移到固体培养基上培养,2个月就能形成胚性愈伤组织,5个月可产生体细胞胚胎和正常的再生小植株。这一原生质体培养技术体系为棉花体细胞杂交和外源基因遗传转化提供了一个实用的技术平台。

Sun等^[9]研究表明,NAA+KT能有效促进珂字棉201各种原生质体微愈伤组织的形成。本实验中NAA+KT组合对于ZDM-3原生质体的愈伤组织诱导效果不如2,4-D+KT组合,这可能与ZDM-3遗传特性和体细胞内源激素含量水平有关。麦芽糖为碳源对ZDM-3原生质体培养体细胞胚胎的形成和生长发育的作用效果最佳。胚性细胞悬浮系分离的原生质体比活体器官组织更易再生细胞壁,并能持续分裂和形成细胞团和愈伤组织,是棉花原生质体培养比较适合的材料。其原因可能是胚性细胞经过悬浮培养后,其生活力得到筛选和提高,使胚性细胞得到同步发育,可以有效地避免细胞间的生理状态的差异对原生质体培养的影响^[15]。此外,悬浮培养过程中频繁更换培养基可以有效地减少酚类物质对细胞生长的影响,分离得到的原生质体活力高,利于原生质体分裂和植株再生。

参考文献:

- [1] CHEN Z X, Li S J, Yue J X, et al. Plantlet regeneration from protoplasts isolated from an embryogenic suspension culture of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Acta Botanica Sinica, 1989, 31(12): 966-969.
- [2] SHE J M, Wu J Y, Wang H B, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast culture of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 1989, 5(4): 54-60.
- [3] SHE J M, Wu J Y, Zhou H Y. High frequency of plating efficiency and plant regeneration from protoplasts of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Acta Agriculturae Sinica, 1991, (2): 109-113.
- [4] WANG Z Z, Zhang D L, Zhang S F. Plant regeneration from protoplasts of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Physiol Plant, 1991, 82: 17.
- [5] PEETERS M C, Willems K, Swennen R. Protoplast-to-plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker312) using feeder layers [J]. Plant Cell Rep, 1994, 13: 208-211.
- [6] 王■之, 张苏锋, 胡正海. 陆地棉胚性愈伤组织原生质体的制备、培养及植株再生 [J]. 植物学报, 1998, 40: 234-240.
- [7] 吕复兵, 张献龙, 刘金兰. 陆地棉原生质体培养与植株再生 [J]. 华北农学报, 1999, 14: 73-78.
- [8] LU F B, Zhang X L, Liu J L. Protoplast culture and plant regeneration in upland cotton [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1999, 14(1): 73-78.
- [9] SUN Y Q, Zhang X L, Huang C, et al. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six explants in Coker 201 (*Gossypium hirsutum*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 82: 309-315.
- [10] SUN Y Q, Zhang X L, Huang C, et al. Factors influencing in vitro regeneration from protoplasts of wild cotton (*G. klotzschianum* A) and RAPD analysis of regenerated plantlets [J]. Plant Growth Regulation, 2005, 46: 79-86.
- [11] 汪静儿, 孙玉强, 祝水金. 棉花原生质体培养与体细胞杂交研究进展 [J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 139-144.
- [12] 张献龙, 孙玉强, 吴家和, 等. 棉花细胞工程及新种质创造 [J]. 棉花学报, 2004, 16(6): 368-373.
- [13] 侯岁穗, 贾敬芬. 一种简易的植物原生质体计数方法 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(1): 57.
- [14] KHASNOY M M, Butenko R G. Cultivation of isolated protoplasts from cotyledons of cotton [J]. Soviet Plant Physiol, 1979, 26: 77-81.
- [15] SRINIYASAN C, Vasil I K. Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) [J]. Plant Physiol, 1986, 126: 41-48.