



不同凝固剂对陆地棉体细胞胚胎发生和植株再生的影响

张巧,汪静儿,林君,燕树峰,吴大鹏,秦利,陈进红,洪彩霞,祝水金*

(浙江大学农业与生物技术学院农学系,杭州 310029)

摘要:以陆地棉种质系珂字 312 和陆地棉标准系 TM-1 为材料,结合优化的陆地棉体细胞培养体系,系统地研究了琼脂、Gelrite 和 Phytigel 3 种培养基凝固剂对愈伤组织的诱导、胚性愈伤的增殖、体细胞胚状体的发生和植株再生的影响。结果表明,用 Phytigel 作为培养基的凝固剂,可显著改善陆地棉体细胞培养过程中的褐化问题,并具有提高胚性愈伤组织增殖速度、体细胞胚胎发生和植株再生频率等作用。Gelrite 虽也能改善棉花体细胞培养中的褐化问题,但因水化现象严重而影响胚性愈伤组织增殖和体细胞胚状体发生,其效果不如 Phytigel。因此,在陆地棉体细胞培养过程中的胚性愈伤组织诱导、体细胞胚状体发生和植株再生过程中,宜用 Phytigel 作为培养基的凝固剂,而无菌苗培养和愈伤组织诱导仍可以选用琼脂凝固剂。

关键词:陆地棉;体细胞培养;凝固剂;植株再生

中图分类号:Q813.1 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2010)01-0003-07

Effects of Different Gelling Agents on the Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Upland Cotton

ZHANG Qiao, WANG Jing-er, LIN Jun, YAN Shu-feng, WU Da-peng, QIN Li, CHEN Jin-hong, HONG Cai-xia, ZHU Shui-jin*
(Agronomy Department, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The effects of the three different gelling agents, agar, gelrite and Phytigel, on callus inducing, embryogenic callus amplification, the somatic embryogenesis and plant regeneration of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasms, Coker 312 and TM-1, were studied systematically, using the system of upland cotton somatic culture developed in our laboratory. The results showed that the phytigel which used as the gelling agent for the medium of somatic culture could improve the browning problem during the somatic culture, increase the amplification of embryogenic callus, and improve the quality of the callus and embryogenic callus, which led to significantly increasing in somatic embryogenesis and plant regeneration. So the phytigel is a good gelling agent for medium of somatic culture in upland cotton. Although the gelrite also can solve the problem of the browning during the somatic culture, due to its hydrating process during the culture which may affect the amplification of embryogenic callus and somatic embryogenesis seriously, the results of gelrite is not as good as phytigel. Combination with the method of somatic culture system optimized by our laboratory recently, the regeneration plants from 10 upland cotton genotypes, included the genotypes called the recalcitrant nature in plant regeneration, were obtained in a relative short period of culture, using the Phytigel as the gelling agent. Therefore, it is suggested that Phytigel should be used as the gelling agent in the media for inducing embryogenic callus, somatic embryogenesis, and plant regeneration during the somatic culture of upland cotton, especially for the genotypes with recalcitrant nature in plant regeneration. While for the culture of germ-free seedlings and callus inducing, the agar is still a good gelling agent because of the economic reason.

Key words: upland cotton; somatic culture; gelling agent; plant regeneration

收稿日期:2009-02-13

作者简介:张巧(1985-),女,硕士研究生;*通讯作者,shjzhu@zju.edu.cn.

基金项目:国家 973 计划项目(2004CB117305),公益性行业(农业)科研专项经费项目(3-19)和国家自然科学基金(30471108, 30671325)

棉花体细胞培养研究起步较晚,是被公认的难于进行体细胞植株再生的农作物之一。尽管四倍体陆地棉体细胞培养较易获得体细胞胚胎和再生植株^[1-2],但多数研究主要是应用珂字棉种质系及其它少数易于再生的基因型^[3-8]。有关陆地棉体细胞培养的胚胎发生和植株再生已有大量的报道,并从无机营养、有机添加物、激素配比、碳源种类等方面进行合理的优化,形成了优良的陆地棉体细胞胚胎发生及植株再生的培养体系^[9-15]。然而,到目前为止,棉花体细胞培养还存在着一些问题:一是不同棉种、不同基因型之间棉花组织培养胚胎发生与植株再生能力的差异;二是不同外植体之间愈伤组织诱导和胚胎发生能力的差异;三是棉花培养过程繁琐,时间过长,畸形苗频率高,体细胞胚胎发生和植株再生频率低等因素。体细胞培养和植株再生包括愈伤组织诱导、体细胞胚胎发生和体细胞胚萌发形成再生植株等不同过程,而培养基的物理状态对于棉花体细胞培养的植株再生密切相关。到目前为止,大多棉花体细胞培养的研究均沿用琼脂作为培养基的凝固剂,其它类型凝固剂的应用相对较少。有

关不同培养基凝固剂对植物体细胞培养体细胞胚发生和植株再生的影响等方面的系统研究还少见报道。本研究在本实验室已建立的陆地棉高效胚胎发生和植株再生体系的基础上,以珂字棉 312 和 TM-1 为材料,系统研究了不同凝固剂对陆地棉体细胞培养的影响,并用多个难于再生的陆地棉品种(系)对其验证,以建立培养周期短、再生频率高、适用基因型广的棉花体细胞培养体系,为棉花细胞工程、基因功能验证、基因工程和棉花育种提供技术平台。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本研究试验材料为陆地棉种质系珂字棉 312 和 TM-1。其中,珂字棉 312 为易再生的种质系, TM-1 为难以再生的陆地棉标准系。用于验证的材料包括来自黄河流域棉区和长江流域棉区的 9 个陆地棉品种(系),见表 1。

1.2 无菌苗培养

取材料成熟种子用浓硫酸脱绒,用 75% (W/V)酒精消毒 1 min,再用 0.1% (W/V)HgCl₂ 消

表 1 试验材料、主要特性和来源

Table 1 The material used in the experiment and their main characters

材料	主要特性	来源
珂字棉 312	易再生陆地棉种质系	中国农科院棉花研究所
珂字棉 201	易再生陆地棉种质系	中国农科院棉花研究所
ZDM-3	易再生陆地棉种质系,超鸡脚叶	浙江大学
TM-1	陆地棉标准系,难以再生	浙江大学
中棉所 12	推广陆地棉品种,抗(耐)枯萎病,难以再生	中国农科院棉花研究所
中棉所 19	推广陆地棉品种,抗(耐)枯萎病,难以再生	中国农科院棉花研究所
中棉所 18	推广陆地棉品种,无色腺体,难以再生	中国农科院棉花研究所
豫棉 19 号	推广陆地棉品种,抗枯萎病,难以再生	河南农科院经作所
豫棉 23 号	推广陆地棉品种,抗枯萎病,难以再生	河南农科院经作所
浙 905	推广陆地棉品种,转 <i>Bt+CpII</i> 基因抗虫棉	浙江大学
浙大 3 号	推广陆地棉品种,转 <i>Bt</i> 基因抗虫棉	浙江大学

毒 5 min,然后用无菌水清洗 3~4 次,置于 1/2 MS+20 g·L⁻¹蔗糖+8 g·L⁻¹琼脂粉的培养基上,暗培养至萌发后进行光培养,7 d 后获得无菌苗。

1.3 愈伤组织诱导

切取无菌苗的下胚轴切段(5~7 mm)、子叶(约 5 mm²)和根段(5~7 mm)接种到愈伤组织诱导培养基上诱导愈伤组织。愈伤组织诱导培养基为 MSB₅+0.5 mg·L⁻¹ IBA+0.1 mg·L⁻¹ KT+1.0 g·

L⁻¹ Gln+0.5 g·L⁻¹ Asn+3% (W/V)葡萄糖,并添加不同种类的凝固剂。培养条件:光照强度 2000 lx,光周期 14 h 光/10 h 暗,温度(28±1)℃。

1.4 胚性愈伤组织继代增殖

挑选新鲜、黄绿色、有光泽的、颗粒状愈伤组织继代于 MSB₅ (KNO₃ 加倍)+0.5 mg·L⁻¹ IBA+0.2 mg·L⁻¹ KT+1.0 g·L⁻¹ Gln+0.5 g·L⁻¹ Asn+3% (W/V)麦芽糖,并添加不同种类的凝固剂。培养

条件同愈伤组织诱导。

1.5 体细胞胚胎发生及植株再生

胚性愈伤组织培养 30 d 左右即可出现不同时期的胚状体,并萌发成再生小植株。再生小植株移至壮根培养基中诱根。壮根培养基为 MSB (KNO_3 加倍)+ $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Gln + $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Asn + 3% (W/V) 葡萄糖,并添加不同种类的凝固剂。

1.6 数据观察和统计

试验设 3 次重复,每处理设 10 个培养瓶。接种或继代 4 周后统计愈伤组织发生率、胚性愈伤组织的增殖量、体细胞胚胎发生率等。愈伤组织发生率为外植体接种到愈伤组织诱导培养基上培养 28 d 后诱导出愈伤组织的外植体占接种的外植体数的百分率;增殖量为平均每天增殖的愈伤组织的鲜重;体细胞胚胎发生频率为每克鲜重胚性愈伤组织中的体细胞胚胎数。所得数据用 Excel 进行统计分析和显著性测定。

2 结果与分析

2.1 凝固剂对于愈伤组织诱导的影响

尽管在 3 种凝固剂的出愈培养基上均能诱导出愈伤组织,但不同的凝固剂对不同品种和不

同外植体出愈率和愈伤组织的增殖具有不同的效应(表 2)。其中,植物凝胶(Phytigel)对于珂字棉 312 外植体的诱导出愈率达 100%,且愈伤组织生长量适中,质地疏松湿润、浅黄绿色。这类愈伤组织容易发育成胚性愈伤组织和体细胞胚,并易获得再生植株。脱乙酰吉兰糖胶(Gelrite)的愈伤组织诱导效果略差于植物凝胶,但优于对照琼脂粉(Agar)(图 1)。不同基因型品种之间的愈伤组织诱导效果有显著差异,但不同凝固剂对其影响具有相同的趋势(表 2)。

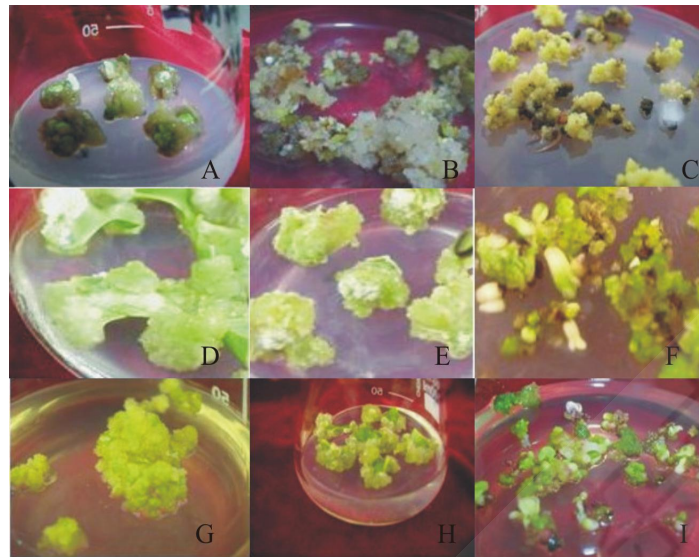
不同的外植体诱导出的愈伤组织质量有较大的差异。总的来讲,下胚轴最易诱导出优良的愈伤组织;其次是子叶,根系的诱导效果最差。在琼脂培养基上,由子叶诱导出的愈伤组织质量较坚硬,色泽深绿,之后又成灰白色,并有一部分子叶外植体直接诱导生根,难于形成适于分化的愈伤组织;根系诱导出的愈伤组织生长量少,成灰白色,难于形成胚性愈伤组织。Gelrite 的效果略优于琼脂,但 Gelrite 培养基上容易产生水化现象,容易造成愈伤组织的水渍化。然而,在 Phytigel 培养基上,愈伤组织生长优良,且根系、子叶和下胚轴之间的出愈率、愈伤组织生长量和质量

表 2 不同凝固剂对于愈伤组织的诱导效应(28 d)

Table 2 Effect of gelling agents on the callus inducing of upland cotton (28 days)

材料	凝固剂	外植体	出愈率 / %	出根率 / %	愈伤组织生长量	愈伤组织质量
珂 字 棉 312	Gelrite	子叶	97.7± 3.4a	0	++	疏松湿润,浅黄绿色
		下胚轴	100.0± 0.0	0	++	疏松湿润,浅绿色
		根系	87.2± 4.2b	0	++	疏松,淡绿色
	Phytigel	子叶	100.0± 0.0a	0	+++	疏松湿润,浅黄绿色
		下胚轴	100.0± 0.0a	0	+++	疏松湿润,浅黄绿色
		根系	100.0± 0.0a	0	+++	疏松湿润,浅黄绿色
	琼脂(CK)	子叶	91.3± 3.2b	1.5	+++	疏松,淡绿色
		下胚轴	100.0± 0.0a	0	+++	较疏松,浅绿色
		根系	90.5± 3.3b	0	++	疏松,灰白色
TM-1	Gelrite	子叶	87.7± 5.3b	0	+	疏松湿润,黄绿色
		下胚轴	100.0± 0.0a	0	++	疏松湿润,绿色
		根系	77.2± 6.2c	0	+	疏松,灰白色
	Phytigel	子叶	100.0± 0.0a	0	++	疏松湿润,黄绿色
		下胚轴	100.0± 0.0a	0	++	疏松湿润,浅黄绿色
		根系	98.3± 1.7a	0	++	疏松湿润,灰白
	琼脂(CK)	子叶	81.1± 4.5bc	1.5	++	疏松,淡绿色
		下胚轴	100.0± 0.0a	0	++	较疏松,浅绿色
		根系	76.5± 6.6c	0	+	疏松,灰白色

注:数值为平均数±标准差,同一品种相同字母为差异未达显著水平($P>0.05$)。



A:以琼脂作凝固剂时下胚轴诱导出的愈伤组织;B:以琼脂作凝固剂诱导的胚性愈伤组织;C:以琼脂作凝固剂诱导出的胚状体;D:以 Gelrite 为凝固剂诱导的愈伤组织;E:以 Gelrite 为凝固剂诱导的胚性愈伤组织;F:以 Gelrite 为凝固剂诱导出的胚状体;G:以植物凝胶为凝固剂诱导的愈伤组织;H:以植物凝胶为凝固剂诱导的胚性愈伤组织;I:以植物凝胶为凝固剂诱导的胚状体。

图 1 不同凝固剂对珂字棉 312 体细胞培养植株再生效果的影响

Fig. 1 Effect of gelling agents on the plant regeneration of somatic culture in Coker 312

无明显的差异(图 1)。

2.2 凝固剂胚性愈伤组织继代增殖的影响

在愈伤组织诱导培养基上,愈伤组织主要有三种形态:(1)质地疏松湿润、浅黄绿色、生长较缓慢,从这种愈伤中容易诱导出胚性愈伤和胚状体;(2)质地干燥坚硬,黄白色或绿白色,表被“白霜”,生长缓慢;(3)质地疏松、浅黄色,增殖速度快,无限疯长,培养基消耗快。尽管这三类愈伤组织经过继代培养,均可诱导出胚性愈伤组织,但为了试验的一致性,各材料均选第一种类型的愈伤组织继代于不同凝固剂的胚性愈伤组织增殖

培养基上,4 周后调查各处理胚性愈伤组织的增殖情况和体细胞胚胎发生情况(表 3)。

由表 3 可见,不同的凝固剂对陆地棉胚性愈伤组织的增殖和胚性愈伤组织的质量,以及体细胞胚的诱导率等均有显著的影响。珂字棉 312 胚性愈伤组织在 Phytigel 凝固培养基上的平均日增量达 0.24 g, Gelrite 凝固培养基上的日增量为 0.19 g, 对照琼脂粉凝固培养基为 0.13 g, 三种凝固剂之间的差异达到了显著水平。在胚性愈伤组织增殖培养基上培养 28 d 后,珂字棉 312 每克胚性愈伤组织在 Phytigel、Gelrite 和对照琼脂粉凝

表 3 不同凝固剂下胚性愈伤组织(鲜重)的生长和体细胞胚胎发生调查结果

Table 3 Effect of gelling agents on embryogenic callus (EC) proliferation and somatic embryogenesis of upland cotton

材料	凝固剂	胚性愈伤生长量 ¹ / (g · d ⁻¹)	体胚发生 ²	胚性愈伤质量
珂字棉 312	Gelrite	0.19± 0.009b ³	270.8± 15.22b ³	疏松水渍状,粒型,浅黄绿色
	Phytigel	0.24± 0.007a	342.6± 18.96a	疏松鲜亮,粒型,浅黄绿色
	琼脂(CK)	0.13± 0.009c	223.5± 18.96c	有褐化现象
TM-1	Gelrite	0.10± 0.011b	138.8± 18.04b	疏松水渍状,粒型,浅黄绿色
	Phytigel	0.23± 0.008a	167.0± 17.18a	疏松鲜亮,粒型,浅黄绿色
	琼脂(CK)	0.07± 0.010b	68.4± 16.58c	褐化现象严重

注: 1. 培养 28 d 后平均每天增加的鲜重; 2. 每克胚性愈伤组织鲜重的体细胞胚数; 3. 数值为 3 次重复的平均±标准差,同一品种相同字母为差异未达显著水平(P > 0.05)。

固培养基上的体细胞胚数分别为 342.6、270.8 和 223.5, 差异均达显著水平。此外, 在 Phytigel 培养基上, 胚性愈伤组织鲜亮, 粒型结构, 浅黄绿色。在 Gelrite 培养基上, 尽管胚性愈伤组织生长良好, 但由于培养基水化现象, 一些胚性愈伤组织呈水渍状, 难于诱导出体细胞胚。对照琼脂培养基上, 许多胚性愈伤组织 2 周后褐化甚至死亡。

不同品种间胚性愈伤组织增殖和体细胞胚胎的发生有很大的差异。然而, 即使是很难再生的陆地棉标准系 TM-1, 在 Phytigel 培养基上, 其胚性愈伤组织日增殖量也达 0.23 g, 与珂字棉 312 无显著差异, 而每克胚性愈伤组织产生的体细胞胚数达 167.0, 显著高于其它凝固剂。此外, TM-1 在琼脂培养基上褐化现象特别严重, 体细胞胚发生率低。可见, 在棉花体细胞培养胚性愈伤组织增殖和体细胞胚的发生过程中, Phytigel 作为凝固剂的效果特别明显。

2.3 凝固剂对体细胞胚胎萌发和植株再生的影响

胚性愈伤组织继代培养 60 d 后调查统计萌发体细胞频率, 将萌发的体细胞胚接种于新鲜培养基上, 30 d 后统计再生小植株频率, 结果见表 4。由表 4 可见, 珂字棉 312 和 TM-1 在不同的凝固剂的培养基上的体细胞胚状体的萌发率及再生植株的频率差异达到显著水平。在琼脂凝固培养基上, 珂字 312 和 TM-1 之间的体细胞胚的萌发率差异十分明显, 而在 Phytigel 凝固培养基上, 尽管珂字棉 312 与 TM-1 之间的差异也达显著水平, 但数值之间差异明显减少(表 4)。由于体细胞胚的萌发频率差异, 珂字棉 312 的再生小植株频率远高于 TM-1。然而, 在 Phytigel 凝固培养基上, 难以再生的 TM-1 的再生小植株频率也达到 1.0%。

表 4 不同凝固剂下体细胞胚萌发和再生频率调查结果

Table 4 Results of gelling agents on development of somatic embryos (SE) and plant regeneration

材料	凝固剂	体胚萌发频率 ¹ / %	再生频率 ² / %	正常再生苗率 / %
珂字棉 312	Gelrite	12.9±1.0b ³	2.1±0.23b ³	25.1
	Phytigel	27.4±2.37a	3.3±0.19a	28.3
	琼脂(CK)	10.1±1.49b	1.1±0.16c	18.4
TM-1	Gelrite	5.0±0.81b	0.4±0.24b	20.5
	Phytigel	7.1±1.3a	1.0±0.12a	25.1
	琼脂(CK)	0.2±0.2c	0.0±0.0c	0

注: 1. 胚性愈伤组织继代培养 60 d 后萌发的体细胞胚数占总体细胞胚的百分率; 2. 体细胞胚继代培养在新培养基上 30 d 后获得的再生小植株(包括畸形)占总接种体细胞胚的百分率; 3. 数值为 3 次重复的平均值±标准差, 同一品种相同字母为差异未达显著水平(P > 0.05)。

2.4 不同基因型体细胞胚胎发生和植株再生

以来源于不同棉区的 9 个推广品种(系)的无菌苗下胚轴为外植体, 采用本实验室优化的陆地棉愈伤组织诱导、胚性愈伤组织增殖、体细胞胚的诱导和植株再生技术体系进行体细胞培养和植株再生, 经愈伤组织诱导、胚性愈伤组织继代增殖、体细胞胚诱导和植株再生, 并在各个时间进行调查和统计(表 5)。

由表 5 可以看出, 采用 Phytigel 凝固剂结合本实验室的优化培养体系, 除中棉所 12 外, 所有参试品种均已获得了再生小植株, 其中一些品种是首次报道获得再生植株的难以再生的材料。因

此, 在陆地棉体细胞培养中, 采用 Phytigel 为培养基的凝固剂更能诱导体细胞胚的发生和植株再生。

根据体细胞胚的诱导频率和植株再生频率, 参试陆地棉材料可分为两类: 一类是易再生的种质材料, 包括珂字棉 312、珂字棉 201 和 ZDM-3; 另一类是较难再生的材料。这与以往的研究结果相一致, 即珂字棉系统材料是一类较易再生的种质资源。ZDM-3 是一个鸡脚叶陆地棉种质系, 是一个极易再生的陆地棉种质系^[6]。由于它的系谱不清楚, 它是否具有珂字棉系统品种的血缘还有待进一步的研究才能确定。难以再生的材料中,

表5 不同陆地棉基因型体细胞培养的效果

Table 5 Results of gelling agents on inducing of somatic embryos (SE) and plant regeneration

材料	出愈率 / %	胚性愈伤生长量 ¹ / (g · d ⁻¹)	体胚发生 ²	再生频率 ³ / %	再生苗数 ⁴
珂字棉 312	100	0.24±0.007c ⁵	342.6±18.96a	3.30±0.19a	33
珂字棉 201	100	0.25±0.013bc	333.1±19.67a	3.10±0.21a	32
ZDM-3	100	0.27±0.011b	346.1±19.01a	3.40±0.23a	45
TM-1	100	0.23±0.008	167.0±17.18b	0.40±0.24	3
中棉所 12	97	0.12±0.020e	156.4±16.34c	0.00±0.00e	0
中棉所 19	100	0.22±0.023c	176.7±22.21b	0.89±0.34d	8
中棉所 18	100	0.45±0.034a	177.2±16.38b	1.22±0.53c	11
豫棉 19 号	98	0.16±0.009d	178.2±19.44b	1.20±0.31c	8
豫棉 23 号	99	0.21±0.033c	156.0±21.10c	0.88±0.21d	7
浙 905	100	0.28±0.013b	145.3±15.55c	1.34±0.56c	10
浙大 3 号	97	0.29±0.011b	160.1±15.05bc	2.10±0.62b	11

注: 1. 培养 28 d 后平均每天增加的鲜重; 2. 每克胚性愈伤组织鲜重的体细胞胚数; 3. 体细胞胚继代于新培养基上 30 d 后获得的再生小植株(包括畸形)占总接种体细胞胚的百分率; 4. 胚性愈伤组织培养 90 d 后获得的再生小植株数; 5. 数值为 10 个瓶培养瓶的平均值±标准差, 相同字母为差异未达显著水平(P > 0.05)。

其胚性愈伤组织的生长与易再生材料相近, 但体细胞胚的发生频率仅为易再生材料的一半左右, 而由体细胞胚发育成再生植株的频率又仅为易再生材料的 1/3 以下。因此, 从这些材料所获得的再生小植株数目明显少于易再生的材料。中棉所 18 是一低酚棉品种, 它的胚性愈伤组织生长达 0.45 g · d⁻¹, 是所有参试材料中胚性愈伤组织生长最旺的品种, 但再生频率和获得再生苗数却显著低于易再生的材料。胚性愈伤组织的生长是否与其无色腺体和低棉酚含量有关还有待于进一步的分析研究。

3 讨论

长期以来, 植物组织培养中一直用琼脂作为凝固剂。琼脂往往含有许多杂质, 有时对培养物会产生不利的影响。Zimmerman 等^[17]研究表明, 用 Gelrite 固化的培养基优于琼脂。郑泗军等^[18]也建议在棉花组织培养中尽量用 Gelrite 作凝固剂。Phytigel (植物凝胶) 是一类新的凝固剂, 它与 Gelrite 一样在植物组织培养中具有通气性好、凝固温度低、含杂质少等优点, 但与 Gelrite 不同的是它不需外加二价阳离子, 不易发生水化现象。本试验中比较了琼脂、Gelrite 和 Phytigel 三种凝固剂对陆地棉体细胞培养过程中愈伤组织的诱导、体细胞胚的发生和植株再生的影响, 结果表明: 采用 Phytigel 显著降低了棉花体细胞胚胎发

生中的褐化现象, 在胚性愈伤组织的诱导和增殖, 体细胞胚的发生和植株再生过程中, 使用 Phytigel 作为凝固剂的效果显著优于 Gelrite, 更优于琼脂。利用 Phytigel 作为培养基的凝固剂, 结合本实验室优化的陆地棉体细胞培养体系, 我们已成功地获得了多个基因型的再生植株, 其中包括被公认的难以再生的基因型。

棉花体细胞诱导可分为以下几个步骤: 愈伤组织诱导、胚性愈伤组织的诱导与增殖、体细胞胚诱导和植株再生。尽管 Phytigel 对无菌苗的产生和愈伤组织的诱导均有良好作用, 但由于这些过程中的琼脂效果与 Phytigel 相近, 考虑到 Phytigel 的价格因素, 在无菌苗培养和愈伤组织诱导过程中可使用廉价的琼脂, 而在胚性愈伤组织诱导和增殖、体细胞胚状体诱导和植株再生过程中应使用 Phytigel。

参考文献:

- [1] RAJASEKARAN K. Regeneration of plants from cryopreserved embryogenic cell suspension and callus cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Plant Cell Rep, 1996, 15: 859-864.
- [2] SAKHANOKHO H, Peggy O A, May O, et al. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2005, 81: 91-95.
- [3] DAVIDONIS G H, Hamilton R H. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Plant Science Letters, 1983, 32: 89-93.

- [4] 张寒霜,李俊兰,高 鹏,等. 低酚陆地棉胚胎发生和植株再生[J]. 河北农业大学学报,1999,22(1):9-12.
ZHANG Han-shuang, Li Jun-lan, Gao Peng, et al. Embryogenesis and plant regeneration from somatic cells culture of glandless upland cotton [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 1999, 22(1): 9-12.
- [5] 郭余龙,李名扬,裴 炎,等. 陆地棉胚胎发生与再生植株的移栽[J]. 西南农业大学学报,1999,21(6): 514-517.
GUO Yu-long, Li Ming-yang, Pei Yan, et al. Somatic embryogenesis and regenerated plant transplantation in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1999, 21(6): 514-517.
- [6] 王喆之,李克勤,张大力,等. 陆地棉胚性愈伤组织的变异及高频胚胎发生[J]. 植物学报, 1994, 36(5): 331-338.
WANG Zhe-zhi, Li Ke-qin, Zhang Da-li, et al. Variation and high frequency somatic embryogenesis of embryogenic callus in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Acta Botanica Sinica, 1994, 36(5): 331-338.
- [7] 王喆之,张大力,李克勤,等. 陆地棉愈伤组织产生及胚胎发生的细胞学研究[J]. 西北植物学报, 1990, 10:77-83.
WANG Zhe-zhi, Zhang Da-li, Li Ke-qin, et al. Cytological observation on callus production and embryogenesis of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 1990, 10:77-83.
- [8] 张大力,王喆之. 陆地棉的组织培养和胚胎发生[J]. 植物学报, 1989, 31:161-163.
ZHANG Da-li, Wang Zhe-zhi. Tissue culture and embryogenesis in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Acta Botanica Sinica, 1989, 31: 161-163.
- [9] FINER J J. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton *Gossypium hirsutum* L. [J]. Plant Cell Rep, 1988, 7:399-402.
- [10] GAWEL N J, Rao A P, Robacker C D. Somatic embryogenesis from leaf and petiole callus cultures of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Plant Cell Rep, 1986, 5:457-459.
- [11] MITTEN D H. Somatic embryogenesis in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Proc Beltwide Cotton Prod Res Conf, 1985:57-58.
- [12] 蔡小宁,吴敬音,余建民. 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.
CAI Xiao-ning, Wu Jing-yin, She Jian-min. Embryogenic callus induction and plant regeneration in upland cotton [J]. Jiangsu J Agri Sci, 1997, 13(4):225-230.
- [13] 郭蜀光,李淑娟,胡玉欣,等. 优质棉花的组织培养及其植株再生[J]. 河南大学学报:自然科学版,1996,26(4):77-80.
GUO Shu-guang, Li Shu-juan, Hu Yu-xin, et al. Tissue culture and plant regeneration of elite cotton species [J]. Henan Univ: Nat Sci, 1996, 26(4):77-80.
- [14] 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.
LIU Fang, Zhang Bao-hong. Establishment of high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration system of cotton [J]. Cotton Science, 2004, 16(2):117-122.
- [15] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton II. Requirement for embryo development and plant regeneration [J]. Plant Cell Tissue Organ Cul, 1988, 12(1):43-53.
- [16] 汪静儿,孙玉强,燕树锋,等. 陆地棉原生质体培养与植株再生技术研究[J]. 棉花学报, 2008, 20(6):403-407.
WANG Jing-er, Sun Yu-qiang, Yan Shu-feng, et al. Study on the plant regeneration from protoplasts of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via somatic embryogenesis [J]. Cotton Science, 2008, 20(6):403-407.
- [17] ZIMMERMAN T W, Robacker C W. Media and gelling agent effect on cotton callus in initiation from excised seed hypocotyles [J]. Plant Cell Tissue Organ Cul, 1988, 15:269-274.
- [18] 郑泗军,季道藩,许复华. 光质和凝固剂对陆地棉愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 中国棉花,1995,22(5):8-9.
ZHENG Si-jun, Ji Dao-fan, Xu Fu-hua. Effect of light and gelling agents on callus inducing and growth of upland cotton [J]. China Cotton, 1995, 22(5):8-9. ●