

陆地棉体细胞植株再生及其移栽技术研究

张家明*

(华南热带作物研究院生物技术国家重点实验室, 海南儋州市 571737)

孙济中 刘金兰 张献龙

(华中农业大学农学系, 湖北武汉, 430070)

提 要

以 7 个陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 品种为材料, 对体细胞植株再生及移栽技术进行了研究。在含 IAA 和 KT 各 0.5ppm 的 MSB 培养基上, Coker 312、Coker 201、鲁棉 1024、冀合 3016 和河南 79 等 5 个品种能形成数量不等的胚性愈伤组织, 中棉 12 和邯郸 14 的愈伤组织继代后便褐化死亡。胚性愈伤组织振荡培养 1 个月以上转移到成熟培养基上获得大量直接萌发的胚状体。胚状体的发育不同步, 其萌发开始于接种后 20 天, 50-55 天达到萌发高峰, 70 天后仍有少量萌发。萌发胚在成苗培养基上培养 2 个月可以分化出 5-10 片真叶。活性炭能显著提高成苗率。0.5ppm IAA 和 0.5ppm KT 与活性炭并用时效果更好。水培能促进幼苗新根的产生和生长。水培后试管苗移栽成活率可达 100% 的 IBA 和 0.5ppm GA₃ 最有利于新根的诱导和生长。应用此项技术在不同季节移栽都获成功, 已将 Coker 201、Coker 312、河南 79 及鲁棉 1024 等 4 个品种近百株再生植株移栽成活。

关键词 陆地棉, 体细胞胚胎发生, 植株再生, 移栽

棉花体细胞培养起步较晚, 1971 年才由 Beasley 从胚珠珠孔端^[8]诱导出愈伤组织。1979 年 Price^[9]等首次从克劳茨基棉 (*G. clutzianum* Anderss) 悬浮培养物获得胚状体。近年来, 棉花体细胞培养发展很快, 国内外不少研究报道通过胚状体途径获得再生植株^[3-6,9,11,12]。但迄今能形成再生植株的品种很少, 植株再生的频率低, 再生植株移栽不易成活^[2,7]。这些都限制了细胞培养技术的实际应用。本文报道针对以上几个问题的研究结果。

1 材 料 和 方 法

供试品种包括 Coker 201、Coker 312、鲁棉 1024、河南 79、冀合 3016、中棉 12、邯郸 14 等 7 个品种 (均由中国农业科学院棉花研究所提供)。种子去壳, 0.1% HgCl₂ 消毒 7-8 分钟, 无菌水洗 4 次, 接种在琼脂固化的培养基上无菌萌发。5 天后将幼苗下胚轴切成 0.5-0.8cm 长的小段作外植体用。

培养温度 28±2°C, 每天光照 16 小时, 光照强度 2000Lx。

* 本文是第一作者硕士论文的一部分。

本文于 1991 年 11 月 21 日收到, 1992 年 8 月 18 日终审完毕。

MSB 基本培养基 MS 无基盐 + B5 维生素 + 肌醇 100mg/L + 葡萄糖 30mg/L + 琼脂 8g/L, pH5.8。

诱导和继代培养基 MSB + IAA 0.5ppm + KT 0.5ppm, pH5.8。

悬浮培养基 KNO₃ 加倍的 MSB 培养液, pH5.8。

胚状体成熟培养基 KNO₃ 加倍的 MSB 基本培养基附加 KT 0.1ppm。

成苗培养基 SH + 250mg/L 活性碳, pH7.0。

愈伤组织细胞形态观察 挑取少许愈伤组织于载玻片上, 加一滴改良的卡宝品红染色液, 压片, 在显微镜下观察。

无菌营养钵 细土和傲石以 1:1 混合拌匀, 浸透 SH 营养液 (不含糖), 然后装入塑料杯, 一并放入 500ml 烧杯, 用透明的聚丙烯塑料封口, 灭菌待用。

幼苗水培和移栽 150ml 烧杯, 外壁包上锡箔纸, 加入营养液后将洗净的幼苗 (具 4 片以上真叶) 浸入溶液中, 用锡箔纸将幼苗固定, 然后放入盛水的盘中, 罩一个大烧杯保湿。营养液为不含糖的 SH 培养液添加 1% 多菌灵及适量激素。10—20 天后幼苗长出很多新根, 即可栽入花盆。移栽后先放在遮阳环境中, 每天浇水, 以后逐步增加光照, 直到在自然阳光下生长。移栽后 2—3 周, 幼苗长出 1 片新叶即可认为成活。成活率 = 成活植株数 / 移栽总苗数 × 100%。

2 结果 和 分 析

2.1 愈伤组织的诱导和继代

7 个品种的下胚轴切段在诱导培养基上都能形成愈伤组织。每块愈伤组织都是两类愈伤组织的嵌合体。一类是淡绿色或灰色的疏松愈伤组织, 主要由体积大、胞壁薄、连结疏松的圆形、椭圆形或长形细胞组成。另一类是绿色或白色的坚硬愈伤组织, 主要由体积小、胞壁厚、连接紧密的多边形细胞组成。品种不同, 疏松愈伤所占的比例不同。Coker 201 及 Coker 312 疏松愈伤组织所占比例较大, 其次是鲁棉 1024, 中棉 12 和邯鄹 14 也形成了少量疏松愈伤组织。疏松愈伤组织中圆形或椭圆形细胞所占比例, 品种间也有差异, Coker 201 和 Coker 312 圆形和椭圆形细胞最多, 其次是鲁棉 1024、河南 79 和冀合 3016。中棉 12 和邯鄹 14 的疏松愈伤组织主要由长形细胞组成 (表 1)。

30 天后将各品种的疏松愈伤组织切下, 在 MSB 继代培养基上继代培养。几天后, 愈伤组织逐渐发褐, 两周左右在褐色背景上重新长出新鲜的米黄色愈伤组织。Coker 312 恢复最快, 愈伤组织的生长也最快, 其次是 Coker 201, 再次是鲁棉 1024, 河南 79 和冀合 3016 仅形成少量新鲜愈伤组织。邯鄹 14 和中棉 12 一直未能恢复生长。压片观察表明, 新长出的愈伤组织主要由体积小、染色深的圆形细胞组成, 长形细胞很少, 可能是继代培养后长形细胞大量死亡的缘故。不更换培养基继续培养 1 个月, 新生愈伤组织逐渐转化为米粒状胚性细胞团块。这些团块中已经有处于不同发育时期的胚状体 (图版 I-1,2)。

2.2 悬浮培养及胚状体成熟、萌发

胚性愈伤组织直接转移到成熟培养基上只能产生少量成熟胚状体, 植株再生的频率较低。先悬浮培养, 再转移到成熟培养基上, 可获得大量成熟胚。振荡培养 2 周左右就有大量球胚形成 (图版 I-3)。如果此时将愈伤组织转移到成熟培养基上, 虽然能形成很多胚状体, 但由于愈伤组织生长过快, 胚状体的进一步发育受到影响, 很多胚状体因此而愈伤

化, 畸形胚、玻璃化胚的频率增加, 不容易获得正常的萌发胚。继续振荡培养 3 周以上再转移, 愈伤组织的生长被明显抑制, 胚状体得到充分发育, 可以直接在成熟培养基上萌发。

表 1 7 个品种出愈情况比较 (培养 30 天)
Table 1 The Rate of Callus Induction in Cotton Varieties

品 种 Varieties	出愈率 Induction rate		单块愈伤重 (克) Weight of single callus (g)	愈伤质地 Character of callus		疏松愈伤细胞形态 Cell type of friable callus	
	外植体数 No. of explants	出愈率 (%) Induction rate (%)		疏松 Friable	坚硬 Hard	圆形 Globular	长形 Long
Coker 201	48	100.0	0.3641	+++*	+	+++	++
Coker 312	55	98.2	0.4564	+++	+	+++	++
鲁棉 1024 Lumian 1024	53	98.1	0.3561	++	++	++	+++
河南 79 Henan 79	39	76.9	0.4809	+	+++	++	+++
冀合 3016 Jihe 3016	31	67.7	0.3352	--	--	++	+++
中棉 12 Zhongmian 12	27	96.3	0.3338	+	+++	+	++++
邯郸 14 Handan 14	36	88.9	0.3456	+	+++	+	++++

注: “+” 表示被描述对象所占的比例

Note: “+” indicates the proportion of the described matter

胚状体的发育是不同步的。悬浮培养物转移到成熟培养基上 2 周左右, 形成 1—3mm 处于各个发育时期的胚状体, 20 天就有少数胚状体萌发, 以后逐渐增多, 40—50 天萌发的胚状体数占萌发胚总数的 13.3%, 45—50 天占 23.5%, 50—55 天达到萌发高峰, 31.4% 的胚状体在这一时期萌发。高峰过后, 萌发胚状体数迅速减少, 但直到 70 天后, 仍有胚状体萌发, 虽然胚状体的萌发不同步, 但仍有一定集中性, 54.9% 的胚状体在 45—55 的 10 天中萌发。80 天时萌发出许多下胚轴严重退化的胚状体, 但少数也能成苗。

胚状体萌发前 7—10 天一般失绿白化, 萌发后 2—3 天又恢复绿色。胚状体萌发过程中失绿的原因尚不清楚, 可能与贮藏物质的积累和转化有关。

经过一次振荡培养, Coker 201、Coker 312 每瓶悬浮培养物能产生一百多个萌发胚, 鲁棉 1024 也产生三十多个。河南 79 和冀合 3016 仅少数胚状体萌发, 多数愈伤化 (图版 I-4)。萌发的几个胚状体也未能成苗。将愈伤化的胚状体转移到含 250mg/L 活性碳的诱导培养基上培养 2 个月形成大量米黄色胚性愈伤组织, 振荡培养后再转移到成熟培养基上, 从河南 79 的几个胚状体愈伤系中获得大量萌发胚, 冀合 3016 也获得一些萌发胚。

2.3 成苗培养

萌发胚在成苗培养基上能 100% 生根。能否成苗, 关键在于能否分化出真叶。在不加活性碳的 SH 培养基上, 再生植株的根及培养基易发褐 (主要是根系分泌的酚类物质所致), 成苗率仅 19.2% (表 2)。加活性碳到培养基中能显著提高成苗率, 达到 26.9%。0.5ppm

IAA 和 0.5ppm KT 与活性碳并用效果更好, 成苗率达到 55.6%。而当 IAA 和 KT 单独使用时成苗率反而比对照低, 可见, 活性碳和激素存在明显的互作关系, 这种互作可能表现在活性碳对激素的吸附作用^[1]。

表 2 不同培养基对河南 79 萌发胚成苗率的影响 (培养 2 个月)
Table 2 Plant Formation Frequencies on Different Medium (2 months of culture)

	SH	SH+IAA0.5ppm +KT0.5ppm	SH+ 活性碳 SH+Active carbon	SH+ 活性碳 +IAA0.5+KT0.5 SH+active carbon + IAA0.5+KT0.5
接种萌发胚数 No.of germinated embryoids	26	20	108	27
成苗数 No.of plantlets	5	3	29	15
成苗率 (%) Plant formation rate (%)	19.2	15.0	26.9	55.6

在含 250mg/L 活性碳的 SH 培养基上培养 2 个月后, 再生植株可以长到 5—10 片真叶, 但也有很多仅具 1—3 片真叶的小植株, 因此再生植株平均真叶数不多 (表 3)。四个品种的成苗率和平均真叶数略有差异。鲁棉 1024 成苗率最高, 为 47.1%, 但平均真叶数最少, 仅 2.3 片。河南 79 成苗率最低, 但平均真叶数最多。

表 3 4 个品种的成苗比较 (培养 2 个月, 培养基: SH+250mg/L 活性碳)
Table 3 Comparison of Plant formation (2 months of culture,
Medium: SH+250mg/L active carbon)

品 种 Varieties	接种萌发胚数 No.of cultured germinated embryoids	成苗数 No.of formed plantlets	成苗率 (%) Plant-formation rate (%)	平均真叶数 Average number of true leaves
Coker 201	223	82	36.8	3.3
Coker 312	33	10	30.3	3.2
鲁棉 1024 Lumian 1024	17	8	47.1	2.3
河南 79 Henan 79	108	29	26.9	3.7

试验中还发现, 培养 2 个月未分化真叶的子叶苗并不都失去分化真叶的能力。将这些子叶苗的根系切除后接种在新鲜成苗培养基上, 再培养 2 个月, 60% 以上分化出真叶。仍未分化真叶的子叶苗继续培养 2 个月能分化真叶的不到 5%, 其余的愈伤化或从顶部到基部都形成根。

2.4 幼苗的水培和移栽

再生植株的第 1—2 片真叶一般较小, 质地厚, 多为畸形。仅具 2 片真叶的再生植株移栽很难成活, 长到 4 片以上真叶后移栽较好。

直接栽入土钵, 再生植株很难成活。本试验直接移栽 19 棵苗, 仅成活 2 棵。成活率低的原因是根系生活力差, 容易腐烂。用无菌营养钵移栽, 再生植株虽然能长期存活, 但生长却相当缓慢, 20 天时, 叶片开始衰老脱落 (图版 I-5), 2 个月后, 80% 的幼苗死亡, 仅

20% 成活。追踪实验记录表明,成活的植株都是在成苗培养基上就形成了强壮的根系。因此,移栽是否成功不在于土钵是否无菌,而在于再生植株的根系是否健壮。

为了获得健壮的根系特进行了水培试验(图版 I-6)。共设 5 个处理(表 4)。在不加激素的营养液中生根数量较少,加入适量的激素明显地促进新根的诱导和生长(图版 I-7)。所有 4 个处理移栽成活率都达 100%。激素种类和浓度不同对新根的诱导作用有一定差异(图版 I-8)。在含 NAA 0.1ppm 的 2 个处理中,新根较粗壮,但伸长较慢,色泽灰白,侧根少。GA₃0.5ppm 和 IBA 0.5ppm 配合效果最好,新根不仅生长快,数量多,而且侧根也多,水培到第 20 天时不更换培养基新根也保持洁白。其它处理水培到 20 天时都开始发灰。

表 4 不同处理对再生植株新根的诱导和生长的影响
Table 4 Effects of different treatment on the induction and the growth of new roots of the regenerated plants of Coker 201

处理 Treatments	直径(mm) Diameter	长度(cm) Length (cm)		数量 Amounts		色泽 Colour		侧根 Side roots	成活率(%) Surviving
	1周 A week	10天 10 days	20天 20 days	10天 10 days	20天 20 days	10天 10 days	20天 20 days	20天 20 days	rate(%)
I	0.90	2.6	4.4	11.6	21.5	洁白	洁白	较多	100
II	0.73	2.0	3.1	11.4	20.6	洁白	灰白	一般	100
III	1.10	0.61	1.4	11.0	15.7	灰白	灰白	很少	100
IV	1.10	0.53	1.4	15.6	20.3	洁白	灰白	很少	100
V	0.69	0.69	—	8.2	—	洁白	—	—	—

注 (Note): I, GA₃0.5ppm + IBA0.5ppm; II, GA₃0.25ppm + IBA0.5ppm; III, NAA0.1ppm + IAA0.5ppm; IV, NAA0.1ppm + IBA0.5ppm; V, Hormone free

水培 10—20 天后即可栽入土钵。应用水培技术在春、夏、秋三季移栽都获得 100% 的成活率。到目前为止,已移栽成活近百株再生植株,包括 Coker 201、Coker 312、鲁棉 1024 和河南 79 等 4 个品种(图版 I-9-13)。

3 讨 论

3.1 植株再生能力的早期预测

在培养初期可以观察的培养性状有出愈率、单块愈伤重、愈伤质地及细胞形态等。在这几个性状中,出愈率与植株再生能力关系不大,单块愈伤组织的重量与植株再生潜能呈正相关,但就本试验研究的 7 个品种来看,这种正相关没有达到显著水平。愈伤组织的质地及疏松愈伤的细胞形态与植株再生能力有较明显的相关关系。再生能力较强的品种如 Coker 201、Coker 312 疏松愈伤较多,疏松愈伤组织中含较多的圆形或椭圆形细胞。无再生能力的品种如中棉 12 和邯郸 14 疏松愈伤很少,坚硬愈伤较多,且其疏松愈伤组织主要由长形细胞组成。

陆地棉体细胞植株再生的周期一般很长,根据愈伤组织的质地及细胞形态早期预测植株再生潜能对于将来再生能力高的品种或单株的筛选很有实用价值。

3.2 品种间体细胞胚胎发生及植株再生能力的差异

陆地棉品种间体细胞胚胎发生及植株再生能力差异很大。陈志贤等^[3]通过对 20 多个品种的研究, 将陆地棉品种按胚胎发生能力的大小分为三类, 以后又分为四类, 即胚胎发生能力强的、中等的、差的及无胚胎发生能力的四类。我们所研究的 7 个品种, 分成四类较合理。第一类包括 Coker 201 和 Coker 312, 外植体诱导培养 30 天能产生较多的疏松易碎的愈伤组织, 其中含较多的圆形和椭圆形细胞, 继代后愈伤组织恢复生长较快, 产生新鲜愈伤组织较多, 只经过一次振荡培养即可产生大量再生植株。鲁棉 1024 属于第二类, 其胚胎发生能力中等, 经过一次振荡培养获得一定数量的再生植株。第三类包括河南 79 和冀合 3016, 其胚胎发生与植株再生能力较差, 但不是完全没有, 通过一次振荡培养较难获得再生植株。张献龙等^[5]通过 BR 和 2, 4-D 的调控获得河南 79 的再生植株。本试验利用其愈伤化的胚状体诱导出高质量的胚性愈伤组织, 从而获得大量再生植株, 已移栽成活十多棵。冀合 3016 通过这种方法也获得试管苗(图版 I-11)。

3.3 成苗和移栽

萌发胚存在各种类型的形态变异, 其子叶数在 0~5 之间变化, 正常的具 2 片子叶的萌发胚不到总数的 20%。有子叶的萌发胚一般能分化真叶, 只有少数不能分化。不能分化真叶的萌发胚在连续培养 4~5 个月后, 一般愈伤化或者从顶部到基部遍体生根。其原因尚不清楚。这些子叶苗具有特殊的形态特征, 或者子叶呈杯状, 或者下胚轴膨大呈萝卜状, 或者完全无子叶。具多裂片子叶(即莲座状子叶)的子叶苗, 据李淑君等报道不能分化真叶, 本研究从这类子叶苗获得很多再生植株。由于这类子叶苗没有明显子叶节, 常从几个部位同时分化出真叶, 从而形成双杆苗乃至多杆苗(图版 I-14)。

一般认为, 棉花再生植株移栽较困难^[2,7]。本试验针对棉花再生植株根系活力差的特点, 用水培技术促进新根的产生和生长, 使移栽成活率提高到 100%, 而且在不同季节移栽都获成功, 克服了棉花再生植株的移栽困难。利用这项技术移栽对土壤没有特殊要求。我们用粘重的黄土移栽, 成活率也在 90% 以上。

水培时盛营养液的烧杯用锡箔纸包裹, 是为了创造一个黑暗的环境, 一方面有利于根系的生长, 另一方面可以防止藻类在营养液中繁殖。选择锡箔纸是因为它不容易生霉菌而且使用方便。营养液中如果不加多菌灵必须经常更换新鲜营养液, 否则根系会腐烂。加入多菌灵以后只需定期补加铁盐即可, 大大减少了工作量, 对于大量移栽很有帮助。

参 考 文 献

- [1] 卜学贤、陈维伦, 1988, 植物生理学报, 14(4), 401—405。
- [2] 李秀兰、郭香墨、石朝民等, 1988, 中国农业科学, 21(3), 95—97。
- [3] 陈志贤、李淑君, N.L.Trolinder, J.R.Goodin, 1987, 中国农业科学, 20(5), 6—11。
- [4] 张大力、王埃之, 1989, 植物学报, 31(2), 161—163。
- [5] 张献龙、孙济中、刘金兰, 1991, 华中农业大学学报, 10(3), 247—251。
- [6] 张献龙、孙济中、刘金兰, 1991, 遗传学报, 18(5), 461—467。
- [7] 董合忠, 1990, 植物生理学通讯, 2, 8—12。
- [8] Beasley, C.A. et al., 1971, Bioscience, (2), 906—907。
- [9] Davidonis, G.H. et al., 1983, Plant Sci.Lett., 32, 89—93。
- [10] Price, H.J. et al., 1979, Planta., 145, 308—309。
- [11] Shoemaker, R.C. et al., 1986, Plant Cell Reports, (3), 178—181。

[12] Trolinder, N.L. et al., 1988, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 12, 43—53.

Studies on Plant Regeneration from Somatic Cells and Transferring Technique of Plantlets in Upland Cotton

Zhang Jia-ming

Sun Ji-zhong Liu Jin-lan Zhang Xian-long

(*Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070*)

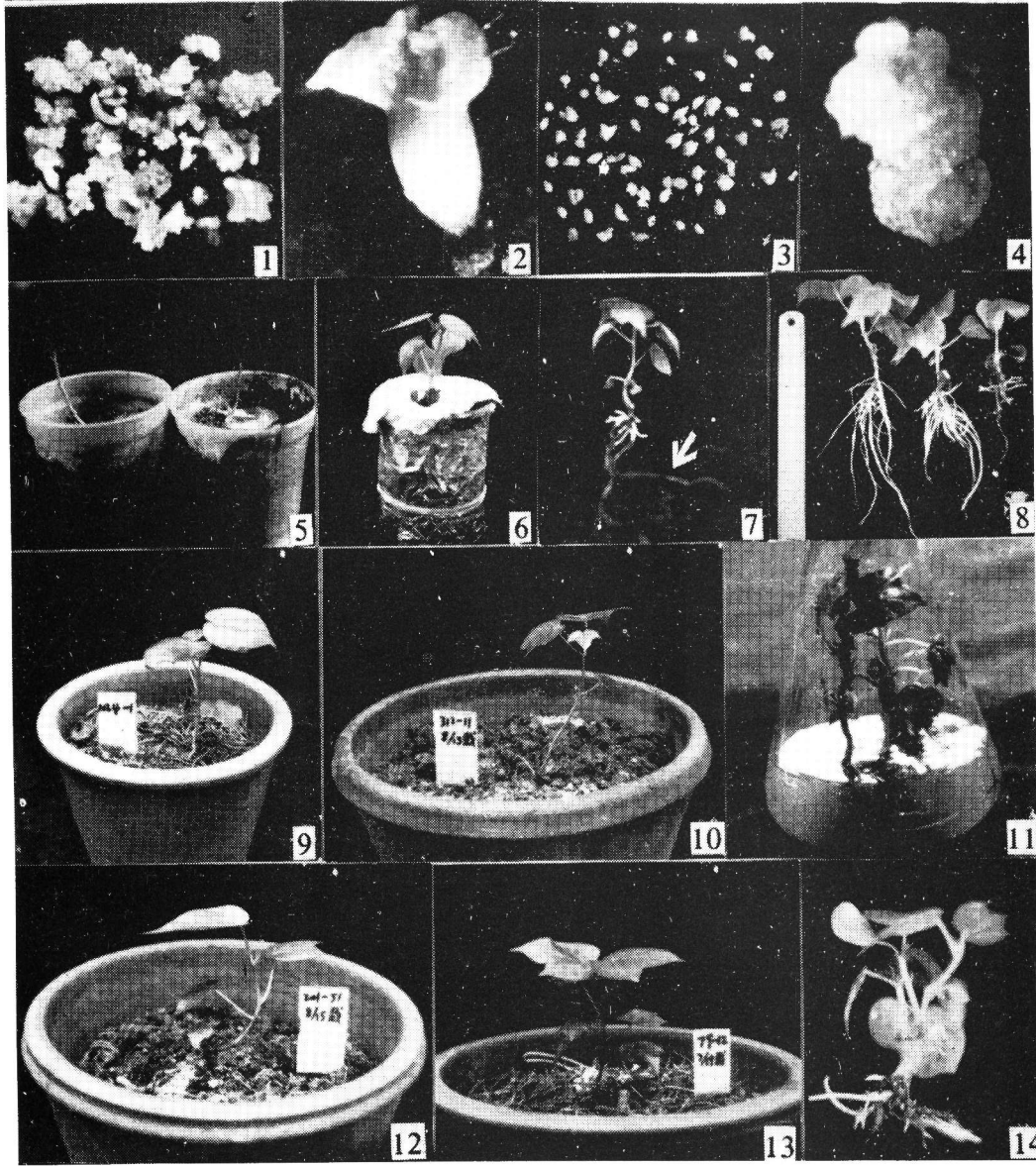
Abstract

Seven varieties of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) were cultured for plant regeneration from somatic cells. Coker 201, Coker 312, Lumian 1024, Henan 79, and Jihe 3016 produced different amounts of embryogenic callus after the first subculture, while Zhongmian 12 and Handan 14 failed in reproducing fresh callus. Direct Germination of embryoids on maturation medium was observed after more than one month of suspension culture of the embryogenic callus. The development of the embryoids was asynchronous. Some embryoids began to germinate 20 days after the suspensions transferred onto maturation medium. The germination reached the climax in 50–55 days and declined rapidly after the climax. There were still some embryoids germinating after 70 days, but 54.7% of the embryoids germinated in 45–55 days. The green embryoids turned white 7–10 days before germination and turned green again 2–3 days after germination.

The germinated embryoids grew up to 5–10 leaves after 2 months of culture on SH medium. Active carbon significantly raised the plant-forming rate. The plant-forming rate declined when 0.5ppm IAA and 0.5ppm KT were added to SH medium but increased greatly when active carbon was used together with IAA and KT. Different plant-forming rates were observed among different varieties.

Nutrient liquid culture was capable of promoting the growth of new roots of the young plants. The surviving rates of the plantlets transferred into soil in different seasons reached 100% after the liquid culture. Nearly one hundred regenerated plants including Coker 201, Coker 312, Lumian 1024 and Henan 79 were successfully transferred into soil.

Key words Upland cotton, Somatic embryogenesis, Plant regeneration transplantation



图版说明

1. 胚性愈伤组织，含处于各发育时期的胚状体 2. 鱼雷形胚状体 3. 振荡培养2周形成的球胚 4. 正在愈伤化的胚状体
 5. 无菌营养钵移栽2个月的再生植株 6. 水培 7. 水培10天形成的新根，箭头所示为老根 8. 水培20天形成的根系（左：
 IBA0.5ppm + GA₃0.25ppm 中：IBA0.5ppm + GA₃0.5ppm 右：IBA0.5ppm + NAA0.1ppm）9. 鲁棉1024的再生
 植株 10. Coker 312的再生植株 11. 冀合3016的试管苗 12. Coker 201的再生植株 13. 河南79的再生植株 14. 三杆苗

Explanation of Plate

1. Embryogenic callus, containing embryoids of various developmental stages 2. Torpedo embryoids 3. Globular embryoids developed after 2 weeks of suspension culture 4. Recalling embryoid 5. Regenerated plants having been grown in sterile pot for 2 months 6. Liquid culture 7. New roots formed after 10 days of liquid culture (arrow representing old roots) 8. Root system formed after 20 days of liquid culture (Left: IBA 0.5ppm + GA 0.25 ppm, Middle: IBA 0.5ppm + GA 0.5ppm, Right: IBA 0.5ppm + NAA 0.1ppm) 9. Regenerated plant of Lumian 1024 10. Regenerated plant of Coker 312 11. Test tube seedlings of Jihe 3016 12. Regenerated plant of Coker 201 13. Regenerated plant of Henan 79 14. Three-stem plant