

# 棉花优良品种中棉所19高频体细胞胚胎发生细胞系筛选与植株再生<sup>X</sup>

张宝红 刘方 刘志红 巩万奎 姚长兵

; 中国农业科学院棉花研究所K农业部棉花遗传改良重点开放实验室K河南安阳K455112G

**提 要** 选用我国优良棉花品种中棉所19进行组织培养K研究了该品种的体细胞胚胎发生和植株再生能力L中棉所19的体细胞胚胎发生有两种情况P一是由外植体直接诱导获得胚性愈伤组织和体细胞胚M二是先诱导获得愈伤组织K再经继代培养获得胚胎发生L单独使用ZT可在早期诱导胚胎发生K在该情况下K对子叶的诱导能力最强K胚根次之K下胚轴最差L刚诱导获得的胚性愈伤组织胚胎发生能力较差K通过在含有0.1 mg/L ZT或2 μg/L 2iP及2 g/L活性炭的培养基上连续培养K可获得具有高频胚胎发生和植株再生能力的细胞系L中棉所19诱导获得的体细胞胚中K畸形胚的比率较高L在较合适的培养基上培养K20%~30%的体细胞胚可萌发形成再生植株L

**关键词** 棉花M中棉所19M胚胎发生M植株再生

## High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Elite Cotton Variety CCR I 19

ZHANG BaoHong LU Fang LU ZhiHong GONG WanKui YAO ChangBing

①Cotton Research Institute of CAA SY Key Lab of Cotton Genetic Imp ra YA gri M inistry PRC YA nyang Henan 455112S

**Abstract** Chinese elite cotton variety CCR I 19 was chosen for tissue cultureKand obtained callus with high frequency embryogenesis and somatic embryos Embryogenic callus can produced directly from cotyledonKhypocotyle and radicalKor from callus producing from ex2 plants Embryogenic callus and somatic embryos could be directly obtained on the medium only with ZTKbut it was influenced by explant sources Cotyledon was easiest to be induced embryogenesisKand hypocotyl was the most difficult The initial embryogenic callus was difficult to produce somatic embryosKbut it could be improved by subculture on the medium with 0.1 mg/L ZT ;or 2 μg/L 2iP and 2 g/L active carbon Many abnormal embryos existed About 20%~30% somatic embryos can be converted into plantlets on suitable medium This paper suggested an efficient procedure for CCR I 19 somatic embryogenesis and plant regeneration

**Key words** *Gossypium hirsutum* L MCCR I 19 M Somatic embryogenesis M Plant regeneration

有关棉花体细胞胚胎发生与植株再生的报道已很多<sup>[1-10]</sup>K但这些研究大多集中在模式品种;如珂字201、珂字312等G上K而生产上大面积推广的优良主栽品种还很难获得成功K限制了生物技术棉花遗传改良中的应用<sup>[11]</sup>L针对这个问题K我们于1995年和1998年分别选用我国优良棉花品种中棉所19进行培养K均获得了胚胎发生和植株再生K并在此基础上对影响棉花胚胎发生的诸多因素进行了探讨K明确了影响棉花胚胎发生与植株再生的一些因素K筛选

X 本文系农业部重点科研项目——高新技术与基础研究专题资助项目L  
收稿日期P 1998206225K接收日期P 1998212216

获得了棉花优良品种中棉所19的高频胚胎发生细胞系K并建立了适合于中棉所19优良品种的棉花组织培养高效胚胎发生与植株再生体系L

### 1 材料与方法

按前文<sup>[12]</sup>描述的方法制备陆地棉; *Gossypium hirsutum* L. G优良品种中棉所19的无菌苗L取7日龄无菌苗的下胚轴、子叶和胚根K分别切割成3~ 5 mm 长的切段或3~ 5 mm 见方的叶块分别接种于附加有不同激素及其组合的改良MS培养基;MS无机盐+ B<sub>5</sub>维生素K简称MS + B<sub>5</sub>K下同G中L40天后将接种的培养物分为两部分K一部分继续培养K另一部分转入附加0.1 mg/L ZT 和0.1 mg/L IAA K或仅附加0.1 mg/L ZT 的改良MS培养基上培养K以后每20~ 30天继代培养一次L

所有培养基均用7 g/L 琼脂固化KpH 值5.8~ 6.0K在121 °C下高温灭菌12~ 15 minL

所有培养均在光照条件下进行K每天光照12~ 14 hK光照强度2000 lx 左右K培养温度28 ± 2 °C L

### 2 结果与讨论

与其它品种一样K中棉所19愈伤组织的诱导受激素的调控K单独使用 ZT 诱导获得愈伤组织的量较少K2K4D 的添加则使愈伤组织大量形成M不同外植体诱导形成愈伤组织的能力不同K其中下胚轴和子叶形成愈伤组织的能力较强K培养50天愈伤组织就已长满整个三角瓶K胚根较差;表1L 激素对愈伤组织诱导的差异还表现在出愈时间上K2K4D 的添加可使愈伤组织快速形成K在含有2K4D 的培养基上K接种后5~ 7天就可观测到明显的愈伤组织形成M而单独使用 ZT 或 ZT 与 IAA 配合使用愈伤组织的形成则较慢K一般10~ 15天才观察到少量愈伤组织的形成L

表1 中棉所19愈伤组织诱导和胚胎发生

Table 1 Callus and somatic embryogenesis induced from cotton cultivar CCRI 19

培养基 Medium ;mg/L G	外植体 Explant	接种数 No. of explant	出愈数 No of callus	出愈率 %; % G Callus %; G	胚性愈 伤形成 数 No of EC	胚性愈伤 组织形成率 %; % G EC; % G	胚性愈 伤组织 分化率; % G DEC; % G	愈伤量 <sup>3</sup> Growth of callus	分化 根数 No of rooted	根分化 率; % G Rooted %; G	根分化 量 <sup>3 3</sup> Growth of root
MS+ B <sub>5</sub> + 2K4D DQ 1+ ZTQ 1	下胚轴	56	56	100.0	0	0.00	0.00	+++++	0	0.00	-
	子叶	58	58	100.0	0	0.00	0.00	+++++	0	0.00	-
	根	48	48	100.0	0	0.00	0.00	+++++	-	-	-
MS+ B <sub>5</sub> + 2K4D DQ 1+ ZTQ 5	下胚轴	46	46	100.0	0	0.00	0.00	+++++	0	0.00	-
	子叶	58	58	100.0	0	0.00	0.00	+++++	0	0.00	-
	根	52	52	100.0	0	0.00	0.00	+++	-	-	-
MS+ B <sub>5</sub> + ZTQ 1	下胚轴	60	58	96.7	1	1.67	1.72	++	12	20.0	+
	子叶	59	26	44.1	4	6.78	15.38	++	30	50.6	+++++
	根	51	10	19.6	2	3.92	20.00	+	-	-	-
MS+ B <sub>5</sub> + IAA 0.1+ ZTQ 5	下胚轴	60	59	98.3	0	0.00	0.00	+++	4	6.67	+
	子叶	63	25	39.7	2	3.17	8.00	++	15	23.81	++
	根	48	7	14.6	0	0.00	0.00	+	-	-	-

注: No of EC = Embryogenic callus; DEC = Differentiation of embryogenic callus<sup>3 3</sup> - K+ + K+ + + K+ + + + K+ + + + + 表示愈伤组织形成的量逐渐增加 The growth of callus<sup>3 3</sup> - 表示没有根的形成 rootless M+ 仅分化出少数根 Little root M+ + 平均每个外植体分化根2~ 4条 2~ 4 roots/explant M+ + + + 分化根多于5条 5 roots/explant

经过连续培养或2~4次的继代培养可观察到胚性愈伤组织的形成。中棉所19的胚性愈伤组织的诱导和体细胞胚的形成有两种方式。一是直接从不外植体诱导获得胚性愈伤组织和体细胞胚。二是先诱导获得愈伤组织，然后由该愈伤组织再诱导获得胚性愈伤组织和体细胞胚。两者的培养方法和所需的激素调控不同。

中棉所19的下胚轴、子叶和胚根在诱导培养基上连续培养70天后，可观察到胚性愈伤组织开始形成，并能进一步分化发育而形成子叶胚。激素对胚性愈伤组织和胚胎发生的直接诱导起着关键性作用。0.1 mg/L ZT 的单独使用使子叶、下胚轴和胚根直接诱导获得胚性愈伤组织和体细胞胚。IAA 的添加削弱了 ZT 的诱导效果。2K4D 的添加没有观察到胚性愈伤组织和体细胞胚的直接形成。这与我们先前的研究结果相似<sup>[13]</sup>。我们在研究外源激素对棉花体细胞胚发生与发育的调控作用时发现，在棉花体细胞胚胎发生能力的调控中，细胞分裂素类物质的活性强于生长素类物质，且细胞分裂素类物质对棉花体细胞胚诱导能力不同。按 BA、KT、ZT、2iP 的次序递增<sup>[14]</sup>。因而在近期的试验中用 2iP 代替 ZT 进行了重复试验。诱导虽能获得直接胚胎发生，但效果远不如 ZT。这可能与两类激素的浓度效应有关。

外植体种类也是影响棉花直接诱导获得胚性愈伤组织和体细胞胚的重要因素。在本试验中，子叶虽然诱导获得愈伤组织的能力不如下胚轴，但诱导获得直接胚胎发生的能力则最强。在仅附加 0.1 mg/L ZT 的改良 MS 培养基上有 67.8% 的外植体直接诱导获得了胚性愈伤组织和体细胞胚，占诱导愈伤组织的 15.38%，胚根次之，下胚轴最差；表 1。

与其它报道一样，本实验中诱导获得的愈伤组织也可分为两类，即胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织。所不同的是我们直接从中棉所19的子叶、胚根和下胚轴等多种外植体直接诱导获得了胚性愈伤组织和体细胞胚。而前人的报道大多是先诱导获得愈伤组织，然后再诱导获得胚性愈伤组织和体细胞胚。这样既拓宽了棉花组织培养植株再生的基因型范围，也缩短了培养周期，简化了培养过程。

在本实验中，我们还观察到同一外植体往往只产生一类愈伤组织，即要么是胚性愈伤组织，要么是非胚性愈伤组织。非胚性愈伤组织往往产生时间较早，一般接种后 7~10 天就可产生，而胚性愈伤组织产生的时间则较晚，一般需要 70~80 天的连续培养才可产生。产生非胚性愈伤组织的外植体一般不再直接产生胚性愈伤组织，但胚性愈伤组织的产生往往与根的分化有一定的关系。在本实验中，凡直接产生胚性愈伤组织的子叶均有分化根的形成。

虽然在含有 2K4D 的培养基上，外植体不能即刻产生胚性愈伤组织，但其诱导产生的愈伤组织经过 2~4 次的继代培养，一般也可分化出胚性愈伤组织。只是开始时胚性愈伤组织的量较少，发现后应及时将其挑选出来，放在胚性愈伤组织增殖培养基：MS + B<sub>5</sub> + 0.1 mg/L 2K4D + 0.1 mg/L ZT 上增殖。先前有关诱导获得棉花胚胎发生的报道均是通过这种方法进行的。

初始诱导获得的胚性愈伤组织，其胚胎发生能力一般均较弱。此时可通过两种方法来提高其胚胎发生能力。一是在含有 2 g/L 活性炭的固体培养基上培养。二是在含有 0~0.1 mg/L ZT 或 2iP 的液体培养基上悬浮培养。通过这两种方法也可筛选出高频胚胎发生能力的细胞系。棉花高频胚胎发生能力的细胞系的典型特点是：愈伤组织呈金黄色，米粒状，在水中易分散成较小的颗粒体。我们就是利用这种方法诱导、筛选获得了中棉所19的高频胚胎发生细胞系。

将诱导获得的中棉所19的胚性愈伤组织转入附加 0.1 mg/L ZT 或 2iP 的液体或固体培养基

上培养K可产生大量的胚状体K但畸形胚的比率较高K主要表现为无子叶胚、生长点异常胚等多种K畸形胚的大量存在严重影响了棉花体细胞胚的萌发和植株再生K这与我们先前的报道相似<sup>[15]</sup>L将诱导获得的体细胞胚转入附加0.1 mg/L ZT和0.1 mg/L NAA的培养基上培养K有利于体细胞胚的萌发和植株再生K其大约有20%~30%左右的胚状体可萌发成苗L活性炭的添加也有利于部分体细胞胚的萌发和正常小植株的形成L

在上面研究的基础上K我们建立了中棉所19的高频胚胎发生与植株再生体系;图1K并利用该体系诱导获得了中棉所12、泗棉3号、抗虫双隐核不育系、珂字201、珂字312等10余个品种的胚胎发生和植株再生L该体系与先前的报道相比具有以下特点P拓宽了棉花组织培养体细胞胚胎发生和植株再生的基因型范围K该体系既适合于模式品种珂字201、珂字312等的组织培养K也适合于中棉所19、中棉所12、泗棉3号等优良品种的组织培养M简化了培养过程K缩短了培养时间K该体系可直接诱导大多数品种获得胚性愈伤组织和体细胞胚K而不需要繁琐的继代培养K因而培养程序大大简化K培养时间大大缩短L该体系的建立K有利于我国棉花生物技术的发展L

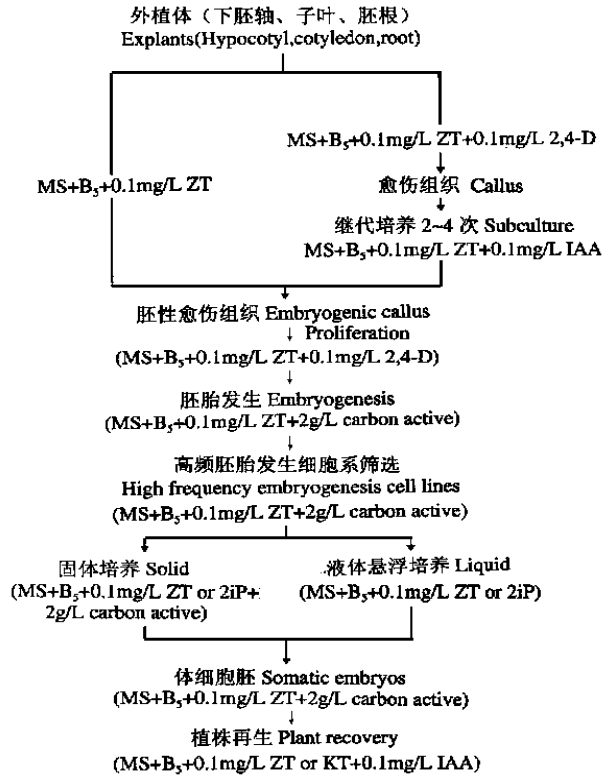


图1 棉花优良品种中棉所19组织培养胚胎发生与植株再生培养程序的建立

Fig 1 Culture procedure of somatic embryogenesis and plant regeneration for *Gossypium hirsutum* L. cultivar CCR I 19

参 考 文 献

- 1 Voo K SKC L Rugh KJ C Kamalay. *In vitro Cell Dav. Biol* K1991K27PP 117~ 124
- 2 Shoemaker R CK IJ Couche KD W Galbraith. *Plant Cell Reports* K1986K3; 3CP 178~ 181
- 3 Trölder N L KJ R Goodin. *Plant Cell Reports* K1986K6; 3CP 231~ 234
- 4 陈志贤 K 李淑君 KN L Trölder. *中国农业科学* K1987K20; 4CP 6~ 11
- 5 张宝红. *科学通报* K1994K39; 14CP 1340~ 1342
- 6 张大力 K 王喆之. *植物学报* K1989K31; 2CP 161~ 163
- 7 刘春明 K 姚敦义. *植物学报* K1991K33P 378~ 384
- 8 张宝红 K 丰 嵘. *农业生物技术学报* K1996K5; 2CP 44~ 50
- 9 张献龙 K 孙济中 K 刘金兰. *遗传学报* K1991K18P 461~ 467
- 10 Finer J JK. *Plant Cell Reports* K1988K7P 399~ 402
- 11 张宝红 K 赵宝升主编. *棉花生物技术及其应用*. 北京P 中国农业出版社K 1997
- 12 ZHANG BaoHong KL i Xiulan KL i Fenglian et al. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* K1995K4; 4CP 11~ 16
- 13 ZHANG BaoHong. *Chinese Science Bulletin* K1999K44; 8CP 766~ 767
- 14 张宝红 K 刘 方 K 姚长兵. *作物学报* K2000K26; 1CP 125~ 126
- 15 张宝红 K 李秀兰 K 李付广等. *作物学报* K1996K22; 1CP 107~ 111