

## 色素腺体和棉酚对陆地棉茎尖培养的影响\*

祝水金 季道藩

(浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029)

**提 要** 本研究以陆地棉三对色素腺体近等基因系为材料, 研究色素腺体和棉酚对棉花茎尖培养的影响。结果表明, 外植体的色素腺体和棉酚性状对于棉花茎尖培养有较大的影响, 有色素腺体棉的茎尖比对应的无色素腺体近等基因系更易诱导产生不定根和再生植株。无色素腺体棉根尖的不定根出生时间晚于对应的有色素腺体近等基因系 7 天左右。棉酚试验结果表明, 培养基中添加外源棉酚对于有色素腺体棉的茎尖培养无显著影响, 但能促进无色素腺体棉茎尖的培养效果, 其中加有  $0.1 \text{ mg/L}$  外源棉酚的培养基对于无色素腺体棉的茎尖培养效果最佳, 其不定根和再生植株的诱导率相当于或优于其对应的有色素腺体近等基因系。然而, 培养基中的棉酚含量过高不利于棉花茎尖培养, 当培养基中的棉酚含量超过  $0.20 \text{ mg/L}$  时, 有色素腺体棉和无色素腺体棉茎尖培养的不定根诱导和再生苗的生长发育均受到严重的抑制。

**关键词** 色素腺体 棉酚 陆地棉 茎尖培养

## The Effects of Pigment Glands and Gossypol on the Stem Tip Culture of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

ZHU Shui-Jin JIDao-Fan

(Department of Agronomy, Faculty of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** The effects of pigment glands and gossypol on the stem tip culture of upland cotton were studied, using three pairs of glanded and glandless upland cotton isogenic lines as materials. The results showed that the pigment glands and gossypol characters in the explants had great effect on the cotton stem tip culture, the inducing of adventitious roots and plant regeneration of the glanded cotton were much easier than that of their glandless cotton isogenic lines. The emergence time of adventitious roots for glandless cotton stem tip cultured *in vitro* was late about a week, comparing with their glanded isogenic lines. The extra gossypol in the medium had no significant effect on the stem tip culture of glanded cotton, but enhance effect on the glandless cotton isogenic lines. The medium with  $0.1 \text{ mg/L}$  of extra gossypol was the best one for glandless cotton stem tip culture, on which the inducing rate of adventitious roots and plant regeneration of the glandless cotton stem tip culture were same, or even better than that of their glanded cotton isogenic lines on the medium without extra gossypol. However, too much gossypol *in vitro* was unfavorable for the cotton stem tip culture, when the concentration of the *in vitro* gossypol in the medium was higher than  $0.20 \text{ mg/L}$ , the adventitious root inducing, as well as the growth and development of the plant regeneration from the stem tip culture of both glanded and

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970467; 39830240)

作者简介: 祝水金 (1962-), 男, 浙江海宁人, 教授, 博士, 从事棉花遗传育种和生物技术研究

收稿日期: 2000-02-13, 接受日期: 2001-06-23

Received on: 2000-02-13, Accepted on: 2001-06-23

glandless cotton were inhibited seriously.

**Key words** Pigment gland; Gossypol; *G. hirsutum*; Stem tip culture

在棉花茎尖培养方面,已建立了棉花的茎尖培养体系,用此方法成功地繁殖和保存了许多棉花珍稀种质资源及其种间杂种,并在珍稀材料抗性鉴定和棉花转基因等方面取得了极其重要的研究成果<sup>[1~8]</sup>。棉花茎尖培养成败的关键是提高茎尖不定根的再生率。为此,许多学者从无机盐成分和浓度、碳水化合物种类和浓度,以及激素种类和配比等方面作了大量的研究,取得了极有价值的研究结果,并提出了一些优良的培养体系。然而,很少有人从棉花外植体的内在因素来研究基因型对棉花茎尖培养的影响,而对于棉属植物所特有的次生物质——棉酚对棉花茎尖培养中的作用等方面的研究尚未见报道。

本研究以陆地棉三对有无色素腺体近等基因系( $G_2^+G_2^-G_3G_3-G_2G_2G_3G_3$ )为材料,研究色素腺体对棉花茎尖培养的影响;并采用在培养基中添加外源棉酚的方法,研究外源棉酚对棉花茎尖培养的作用,探索色素腺体和棉酚在棉花个体发育中的生物学意义,并阐明色素腺体和棉酚在棉花茎尖培养中的利用价值,为提高棉花茎尖培养效率提供新方法和新途径。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试材料为作者通过连续回交 11 代育成的 3 对陆地棉有无色素腺体近等基因系<sup>[9]</sup>,即中棉所 12 和中棉所 12 无色素腺体,中棉所 16 和中棉所 16 无色素腺体,以及中棉所 17 和中棉所 17 无色素腺体。

### 1.2 茎尖培养

**1.2.1 培养基配制** 参照吴敬音等(1990)<sup>[7]</sup>的方法配制含有 0.1 mg/L BA 的 MS 培养基,调节培养基的 pH 为 6.4,分装于三角瓶中(每瓶 50 mL),在 120 °C 下灭菌 20 分钟备用。含外源棉酚的培养剂配制方法同上,但灭菌后冷却至 60 °C 左右时加入经过滤灭菌的棉酚丙酮溶液,使培养基中的棉酚浓度分别为 0、0.01 mg/L、0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.15 mg/L、0.20 mg/L 和 0.25 mg/L。

**1.2.2 无菌苗培养** 供无菌苗生长的培养基中只含大量元素、微量元素、蔗糖和琼脂,不含有机物和激素。采用上述相同的方法,配制无菌苗培养基备用。供试种子脱绒去壳后,用 0.1% 的升汞消毒 30 min,无菌水冲洗 3~4 次后,接种于无菌苗培养基中培养,让其发芽和生长,产生棉花无菌苗。培养条件:30 °C,12h 光照,12h 黑暗。

**1.2.3 接种与培养** 待棉花无菌苗培养 5~7 天后(真叶出生前),在超净工作台上切下具有茎尖和部分下胚轴的茎尖组织,插入茎尖培养基上进行培养。每瓶接 3 个茎尖。培养条件:30 °C,12h 光照,12h 黑暗。

**1.3 棉酚含量测定** 采用 Smith 的苯胺比色法<sup>[10]</sup>进行棉酚含量测定。

**1.4 统计方法** 采用成对数据分析和新复级差分析法对试验结果进行显著性测定。

除醋酸棉酚购于 Sigma 公司外,其余试剂均为国产分析纯。

## 2 结果与分析

**2.1 色素腺体对棉花茎尖培养的影响** 以陆地棉 3 对色素腺体近等基因系的茎尖为外植体进行茎尖培养,每材料各接 20 瓶,共 60 个茎尖。培养 28 天后对各材料逐株进行幼苗性状

的考察作统计, 结果列于表 1。

表 1 三对陆地棉色素腺体近等基因系的茎尖培养效果(28 天)

Table 1 The results of stem tip culture for 3 pair of upland cotton gland isogenic lines(28days)

材料 Materials	茎尖数 No of Tip	不定根 A dventitious root			再生苗 Regenerative plant		
		再生率 Regenerative (%)	根数 Roots (No./plant)	根长 Length (cm)	叶片数 Leaves	苗高 Height (cm)	干重 Dry Weight (g)
中棉所 12 有腺体 glanded	60	100.0	4.8	3.45	2.50	8.84	0.3692
ZM S12 无腺体 glandless	60	80.0	4.5	3.12	2.10	8.12	0.3448
差异 different	0	20.0*	0.3*	0.33*	0.40*	0.72*	0.0244
中棉所 16 有腺体 glanded	60	93.3	5.6	4.10	3.21	8.98	0.3889
ZM S16 无腺体 glandless	60	70.0	5.4	3.51	3.14	7.35	0.3524
差异 different	0	23.3*	0.2	0.59*	0.07	1.63*	0.0365
中棉所 17 有腺体 glanded	60	96.7	5.8	4.02	3.35	8.05	0.4152
ZM S17 无腺体 glandless	60	63.3	5.1	3.88	3.17	7.11	0.4015
差异 different	0	33.4*	0.7*	0.14	0.18*	0.94*	0.0137
平均 Average	60	96.7	5.4	3.86	3.02	8.62	0.3911
有腺体 glanded	60	71.1	5.0	3.50	2.80	7.53	0.3662
无腺体 glandless	60	25.6	0.4	0.36	0.22	1.09	0.0249
差异 different	0	25.6	0.4	0.36	0.22	1.09	0.0249

\* 差异达显著水平

由表 1 可以看出, 有色素腺体棉茎尖培养的再生能力显著优于其对应的无色素腺体近等基因系。培养 28 天后, 有色素腺体棉茎尖的不定根再生率达 96.7%, 平均每个幼苗有 5.4 个不定根; 而对应的无色素腺体近等基因系的不定根再生率只有 71.1%, 平均每个幼苗有 5.0 个不定根, 差异达显著水平。其它所考查的性状如平均不定根长度、叶片数、幼苗高度和单株幼苗干物质重等指标也表明有色素腺体棉的茎尖培养再生能力优于对应的无色素腺体近等基因系。由此可见, 外植体的色素腺体对于棉花茎尖培养具有明显的促进作用。

棉花茎尖培养的动态调查结果表明, 有色素腺体棉与对应的无色素腺体近等基因系之间的不定根再生速度有明显差异, 二者至少相差一周。具有色素腺体的棉花茎尖, 在离体培养 7 天时已有 14% 左右的茎尖再生出不定根, 而此时的无色素腺体近等基因系的茎尖均未再生出不定根。直到培养 14 天时, 无色素腺体棉茎尖的再生根率才接近于有色素腺体棉培养 7 天时的再生根率。此后, 无色素腺体棉茎尖的不定根再生速度虽快于有色素腺体棉, 但因启动再生时间较慢, 加上个别茎尖在切口处诱导出愈伤组织, 失去再生不定根的能力, 最终导致无色素腺体棉的茎尖培养成苗率显著低于对应的有色素腺体近等基因系, 见表 2。从幼苗其

它性状来看,虽无色腺体棉茎尖的不定根启动再生时间较晚,但一旦再生出不定根,其不定根和幼苗的生长速度较快,培养28天后,有色腺体棉与对应的无色腺体近等基因系之间的幼苗生长情况已无显著差异,但已诱导出愈的茎尖除外。

表2 三对陆地棉色素腺体近等基因系茎尖培养的动态变化

Table 2 The dynamic studies of stem tip culture for 3 pair of upland cotton gland isogenic lines

调查项目 Items of investigation			培养效果 Results of culture					
			7d	14d	21d	28d	35d	42d
再生根率 Regeneration (%)	有腺体 glanded		14.5	34.6	79.5	85.5	91.5	91.5
	无腺体 glandless		0.0	13.7	64.2	71.1	81.4	86.8
	差异 different		14.5**	20.9**	15.3*	14.4*	10.1*	4.7*
再生根数 Roots (No/plant)	有腺体 glanded		1.2	3.1	4.7	5.4	6.3	6.4
	无腺体 glandless		0.0	1.1	3.8	5.0	5.8	6.0
	差异 different		1.2**	2.0*	0.9*	0.4*	0.5**	0.4*
再生根长度 Root length (cm)	有腺体 glanded		0.6	1.8	2.9	3.9	4.1	5.0
	无腺体 glandless		-	0.4	2.5	3.5	4.0	5.9
	差异 different		0.6**	1.4*	0.4*	0.4*	0.1	-0.9
幼苗长度 Plant high (cm)	有腺体 glanded		0.7	2.4	6.7	8.6	8.9	9.3
	无腺体 glandless		0.5	0.7	5.8	7.5	8.2	9.0
	差异 different		0.2**	1.7*	0.9*	1.1*	0.7*	0.3
幼苗重 Dry weight (g/plant)	有腺体 glanded		0.0571	0.1295	2.7506	0.3911	3.4210	3.8991
	无腺体 glandless		0.0515	0.0580	2.4516	0.3662	3.5750	4.0256
	差异 different		0.0056	0.0715*	0.2990*	0.0249	-0.1540	-0.1265

\* 差异达显著水平; \*\* 差异达极显著水平

除色素腺体及其棉酚外,有色腺体棉与其对应的无色腺体近等基因系之间的遗传基础几乎相同,因此,它们之间的茎尖培养效果,特别是不定根再生能力的差异可能与外植体的色素腺体性状或棉酚含量有某种关系。外植体棉酚含量测定结果表明,中棉所12、中棉所16和中棉所17三个有色腺体棉品种茎尖的棉酚含量分别为0.2105%、0.2213%和0.2210%,而对应的三个无色腺体近等基因系茎尖的棉酚含量分别为0.0125%、0.0086%和0.0211%,二者相差10倍以上,见表3。经培养产生的有色腺体再生幼苗中棉酚的含量较种子苗茎尖有较大幅度的降低(棉酚含量为0.0753%~0.0845%),用其进行继代培养,不定根的再生率比具有高棉酚含量的种子苗茎尖下降25%左右。外植体内的高棉酚含量是否会刺激其产生不定根仍需要更多的资料来证明,但本试验中的外植体棉酚含量与其茎尖培养不定根再生能力的高度相关性( $r=0.64^{**}$ )说明棉酚对于诱导其不定根的再生具有促进作用。

## 2.2 棉酚对棉花茎尖培养的影响

为了探索棉酚对棉花茎尖培养的影响,本研究以陆地棉3对色素腺体近等基因系无菌苗茎尖为外植体,接种于7种不同棉酚浓度的茎尖培养基上,观察其茎尖培养效果和幼苗生长情况。因材料数目的限制,在第7天调查时未将幼苗从三角瓶中取出。因此,此时只从三角瓶外观察计数茎尖的不定根再生情况,而未调查其它更详细的资料。结果表明,培养基中的外源棉酚对于有色腺体棉的茎尖培养无显著的影响,但外源棉酚含量超过0.25 mg/L时,其不定根再生率受到明显的抑制;而对于无色腺体近等基因系茎尖来讲,在加有外源棉酚的培养基上,其不定根再生率显著高于对照,其中在加有0.10 mg/L的外源棉酚的培养基上,无色腺体棉茎尖的培养效果最好,培养7天时已有17%的茎尖再生出不定根,每个茎尖有2~4条不定根,平均2.4根。即培养基中的外源棉酚对于无色腺体棉的茎尖培养具有

明显的促进作用, 其中含有  $0.1 \text{ mg/L}$  外源棉酚的培养基的培养效果最佳。

表 3 陆地棉外植体棉酚含量对茎尖培养的影响

Table 3 The effect of gossypol contents in the explant on the stem tip culture

外植体		棉酚含量	再生根率
Explant		Gossypol content (%)	Regenerative root (%)
中棉所 12	茎尖 Stem tip	0.2105	100.0
ZM S12	再生苗 Regenerative plant	0.0845	75.4
中棉所 12(无)	茎尖 Stem tip	0.0125	80.0
ZM S12 <sub>glandless</sub>	再生苗 Regenerative plant	0.0538	61.5
中棉所 16	茎尖 Stem tip	0.2213	93.3
ZM S16	再生苗 Regenerative plant	0.0753	70.4
中棉所 16(无)	茎尖 Stem tip	0.0086	70.0
ZM S16 <sub>glandless</sub>	再生苗 Regenerative plant	0.0468	34.8
中棉所 17	茎尖 Stem tip	0.2210	96.7
ZM S17	再生苗 Regenerative plant	0.0776	74.6
中棉所 17(无)	茎尖 Stem tip	0.0211	63.3
ZM S17 <sub>glandless</sub>	再生苗 Regenerative plant	0.0756	31.8
有腺体棉平均	茎尖 Stem tip	0.2176	96.7
A verage of glanded	再生苗 Regenerative plant	0.0791	73.5
无腺体棉平均	茎尖 Stem tip	0.0141	71.1
A verage of glandless	再生苗 Regenerative plant	0.0587	42.7

培养 28 天所调查的详细资料(表 4)表明, 无色素腺体棉茎尖在含有  $0.05 \text{ mg/L}$  以上外源棉酚的培养基上, 其不定根再生率达到或超过对应的有色素腺体近等基因系。在含有  $0.10 \text{ mg/L}$  外源棉酚的培养基上, 不定根再生率达到 97.5%, 每个幼苗有 4~8 个不定根。低浓度( $0.01 \text{ mg/L}$ )的外源棉酚对于无色素腺体棉不定根和幼苗的生长也有一定的促进作用, 但效果甚微; 而高浓度的外源棉酚对无色素腺体棉不定根的诱导和生长, 以及再生苗生长发

表 4 培养基中外源棉酚对棉花茎尖培养的影响(28 天)

Table 4 The effect of gossypol contents in the medium on cotton stem tip culture(28days)

考察项目		培养基中棉酚浓度 Gossypol concentration in the medium ( $\text{mg/L}$ )						
		0	0.01	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
再生根率 Regeneration (%)	有腺体 glanded	85.5	84.4	81.2	82.4	84.1	81.1	79.1
	无腺体 glandless	71.1	77.5	81.2	97.5	97.5	87.1	74.1
	平均 Average	78.3	81.0	81.2	90.0	90.8	84.1	76.6
再生根数 Roots (No./plant)	有腺体 glanded	5.40	5.20	5.60	5.40	5.10	4.30	4.00
	无腺体 glandless	5.00	5.20	5.20	5.70	5.80	5.20	5.10
	平均 Average	5.20	5.20	5.40	5.55	5.45	4.75	4.55
再生根长度 Root length (cm)	有腺体 glanded	3.86	3.84	3.86	3.74	3.21	3.24	3.02
	无腺体 glandless	3.50	3.85	3.77	4.15	4.05	4.01	3.88
	平均 Average	3.68	3.85	3.82	3.95	3.63	3.63	3.45
幼苗长度 Plant high (cm)	有腺体 glanded	8.62	8.21	8.12	8.09	8.08	7.12	7.02
	无腺体 glandless	7.53	8.51	8.12	8.43	7.79	7.12	7.03
	平均 Average	8.08	8.36	8.12	8.26	7.94	7.12	7.03
幼苗重 Dry weight (g/plant)	有腺体 glanded	0.3911	0.3915	0.3941	0.3125	0.3131	0.2501	0.2112
	无腺体 glandless	0.3662	0.3652	0.3712	0.4143	0.3948	0.3812	0.3571
	平均 Average	0.3787	0.3784	0.3827	0.3634	0.3540	0.3157	0.2842

育均有一定的抑制作用。对于有色素腺体棉来讲, 外源棉酚的促进作用和抑制作用均不如无色素腺体棉明显, 即有色素腺体棉对外源棉酚不如无色素腺体棉敏感。由此可见, 外源棉酚对于棉花茎尖培养, 特别是无色素腺体棉的茎尖培养具有一定的促进作用, 但培养基中的外源棉酚超过  $0.20 \text{ mg/L}$  时对于棉花根尖培养是不利的。

### 3 讨论

茎尖培养是植物组织培养中的一个重要方面, 它在保存种质资源的、固定杂种优势、扩大繁殖系数以及转基因方面具有十分重要的作用。棉花茎尖培养体系的优化主要集中于培养基类型、无机盐浓度、激素和碳源等培养基成分的研究上<sup>[7, 11~13]</sup>, 而对于棉属植物所特有的色素腺体和棉酚对棉花茎尖培养的作用还未见报道。本研究结果表明, 色素腺体对于棉花茎尖培养具有一定的促进作用, 有色素腺体棉茎尖的不定根再生能力显著强于无色素腺体近等基因系。外源棉酚对于无色素腺体棉根尖培养的不定根再生具有明显的诱导作用, 在一定的浓度下 ( $0.1 \text{ mg/L}$ ), 培养基中的外源棉酚可显著提高无色素腺体棉离体茎尖不定根再生率, 从而显著提高其茎尖培养的效果。这一研究结果为提高棉花茎尖培养不定根的诱导率和再生率提供了新的方法和途径。此外, 本试验采用回交 11 代育成的 3 对陆地棉有无色素腺体近等基因系为材料, 其色素腺体近等基因系之间除色素腺体差异外, 其余遗传特性几乎完全相同。用这些近等基因系进行茎尖培养, 可以克服陆地棉品种间的遗传背景差异所产生的影响, 试验结果更能说明棉花色素腺体和棉酚对棉花茎尖培养的真正作用和效果。

关于酚类物质对植物不定根的形成影响已有一些研究。Hess (1969) 证实邻苯三酚对 IAA 促进根生长有显著的增效作用。此外, 香豆酸、咖啡酸、绿原酸单独使用都能促进植株不定根的再生, 并有增加 IAA 和 BA 的促根作用。说明酚类物质对于植物不定根的形成影响主要是通过生长素类物质起作用。棉酚是一种酚类化合物, 它在组织培养中的特殊作用可能与棉花内源和外源激素的互动而起的增效作用有关。我们在无菌苗培养中, 单独加入外源棉酚会抑制棉花根系的生长, 使幼苗枯萎, 而在同时加有棉酚和  $0.1 \text{ mg/L}$  BA 的培养基上, 其幼苗生长发育完全正常(资料未在本文中列出), 间接说明了棉酚与生长素之间的互动和增效作用。然而, 有关棉酚在棉花组织培养中促进不定根再生的机理, 以及在其它植物组织培养中的价值等还有待于进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 张献龙, 孙济中, 刘金兰 遗传学报, 1991, 18(5): 461~467
- 2 李淑君, 董合忠, 焦改丽 棉花细胞原生质体培养胚胎发生与植株再生的细胞学和遗传学特性研究 见: 中国科学技术学会主编, 高新技术农业应用, 北京: 中国科学技术出版社, 1992
- 3 陈志贤, 李淑君, 岳建雄 植物学报, 1989, 12: 966~969
- 4 董合忠 植物生理通讯, 1990, 2: 8~12
- 5 Agrawal DC, Banerjee AK, Kolala RR. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 647~652
- 6 吴敬音, 朱卫民, 余建明 棉花学报, 1994, 6(2): 89~92
- 7 吴敬音, 余建明 江苏农业学报, 1990, 6(2): 22~26
- 8 奚元龄, 魏振承, 王月芳 江苏农业学报, 1987, 4: 1~6
- 9 祝水金, 汪若海, 王红梅等 中国棉花, 1995, 23(9): 14~15
- 10 Smith F H. *J Amer Oil Chem. Soc.*, 1971, 44: 267~269
- 11 张宝红, 李秀兰, 李付广 中国棉花, 1993, 20(4): 13
- 12 张献龙, 林双龙, 吕复兵等 华中农业大学学报, 1996, 15(3): 210~214
- 13 Gould J, Banister, S Hasegawa O et al *Plant Cell Reports*, 1991, 10(1): 12~16