棉 花 学 报　Cotton Science　2011,23(6):587~591

研究简报

# 大田棉花真叶叶柄组织培养特性研究

张朝军,王　晔,王玉芬,李凤莲,李付广*

(中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室,河南 安阳 455000)

**摘要:**利用已建立的叶柄组织培养体系,对大田棉株不同发育时期、不同部位的叶柄进行组织培养研究。叶柄和无菌苗下胚轴愈伤组织诱导培养基为 MSB+IAA 0.1 mg·L$^{-1}$+KT 0.1 mg·L$^{-1}$+2,4-D 0.1 mg·L$^{-1}$+Glucose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$ (pH 5.8);叶柄愈伤组织分化培养基为 MSB+IAA 0.05 mg·L$^{-1}$+KT 0.05 mg·L$^{-1}$+Glucose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$ (pH 6.5);无菌苗愈伤组织分化培养基为 MSB+IAA 0.02 mg·L$^{-1}$+KT 0.04 mg·L$^{-1}$+Glucose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5)。研究发现棉花主茎叶叶柄、果枝叶叶柄、营养枝叶叶柄在愈伤组织生长速度方面有一定差异,在愈伤组织诱导和分化方面,除严重衰老叶片的叶柄外,其它部位差异不显著。不同来源的胚性愈伤组织在 MSB+6-BA 0.05 mg·L$^{-1}$+KT 0.02 mg·L$^{-1}$+Sucrose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5)培养基上,均能得到胚状体,并获得再生植株。可见棉花叶柄是优良的组织培养外植体。

**关键词:**棉花;组织培养;叶柄;分化率;胚性愈伤组织

**中图分类号:**S562.01　　**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-7807(2011)06-0587-05

## Study on Traits of Embryogenesis Callus Differentiation Using Cotton Petioles as Explants

ZHANG Chao-jun[1], WANG Ye, WANG Yu-fen, LI Feng-lian, LI Fu-guang*

(*Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agriculture Sciences /State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang, Henan* 455000, *China*)

**Abstract:** This research focused on the tissue culturing of cotton petioles in different parts and different developing stages using the established system of tissue culture of cotton petioles. The callus induction medium was MSB +IAA 0.1 mg·L$^{-1}$+KT 0.1 mg·L$^{-1}$+2,4-D 0.1 mg·L$^{-1}$+Glucose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$ (pH 5.8), for both the petioles and aseptic seedling hypocotyls as explants. The embryogenesis callus differential medium was MSB +IAA 0.05 mg·L$^{-1}$+KT 0.05 mg·L$^{-1}$+Glucse 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5), for the calli of petioles. The embryogenesis callus differential medium was MSB +IAA 0.02 mg·L$^{-1}$+KT 0.04 mg·L$^{-1}$+Glucose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5), for the calli of the aseptic seedling hypocotyls. For the petioles from the stem, the fruit branch and the vegetative branch as explants, the results revealed no significant difference in the ratio of callus induction and callus differentiation. For the senescence petioles as explants, there was significant decrease in the ratio of callus induction and callus differentiation. Embryogenesis callus could develop into embryoid and then into plantlets in the medium containing MSB+6-BA 0.05 mg·L$^{-1}$+KT 0.02 mg·L$^{-1}$+Sucrose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5). The results indicated that like aseptic seedling hypocotyls, cotton petioles were good explants for tissue culture.

**Key words:** cotton; tissue culture; petiole; embryogenesis callus induction ratio; embryogenesis callus

自 1983 年 Davidonis 等[1]报道获得棉花再生植株至今,虽经过 30 多年的改良[2-6],仍然仅有少数棉花材料能够通过组织培养获得再生植株。在棉花组织培养中,从外植体诱导体细胞脱分化长出愈伤组织未见受基因型限制的报道[7];但仅有少数品种能够从愈伤组织诱导再分化出胚性愈伤组织,进而获得再生植株,这就是棉花组织培养体系中存在的严重基因型限制[7-9]。基因型限制主要表现在棉花品种间存在着差异,目前仅珂字棉系列[8]、中棉所系列、鲁棉系列等[9]少数品种获

**收稿日期:**2011-01-19　　**作者简介:**张朝军(1968-)男,博士,副研究员;* 通讯作者,lifug@cricaas.com.cn

**基金项目:**国家 973 计划:棉花纤维品质功能基因组研究及优质高产新品种的分子改良(2010CB126000)

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

得了体细胞胚和再生植株。我国长江流域和黄河流域棉花品种的植株再生潜力没有明显差别，但长江流域品种的体细胞胚胎发生所需的时间长[10]。不同外植体间也存在差异，Trolinder 等[3]认为棉花下胚轴比子叶或真叶作外植体较好；无菌苗下胚轴最易，中胚轴和上胚轴次之，子叶较差，叶片和茎段最差[11]，子叶节附近是最易形成愈伤组织的部分[11-12]。Finer 等[13]、谭晓连等[14]发现用成熟棉株的茎、叶、叶柄作外植体更难以诱导愈伤组织；焦改丽等[15]利用毛根获得再生植株，但难易程度缺少比较；张海等[16]报道了棉花子叶离体培养与植株再生，但再生频率不高。总的来说，幼嫩组织比成熟组织更易诱导棉花体细胞胚胎发生[17]。

棉花组织培养体系的改良与外植体的筛选，历来是组织培养工作者的注重点之一。本试验室采用棉花主茎倒2,3,4叶的叶柄建立了大田棉花植株叶柄组织培养体系[18]，并申请了专利(专利号：ZL200610089439.1)，但对其它部位的叶柄分化能力还没有进行系统的研究。本试验利用前述专利技术，首次系统地研究了棉花不同部位、不同生育时期的叶柄组织培养分化特性，并与无菌苗下胚轴的组织培养分化情况进行了比较，为全面了解棉花叶柄的组织培养特性及其应用价值进行探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

叶柄：CCRI 24 是中国农业科学院棉花研究所培育的早熟棉花品种，由中棉所早熟育种课题组提供。W10 是由本试验室 2004 年从 CCRI 24 中选育出的高分化率棉花材料，其无菌苗下胚轴分化率在 95%以上；2006 年 4 月 28 日播种，种植 10 行，行长 10 m，行宽 0.8 m；株距 25 cm；从中选取生长正常的 30 个单株进行取样。取样后先用灭菌水冲洗，再经 0.1% $HgCl_2$ 浸泡 4～5 min 进行灭菌处理，用灭菌水冲洗 3 次后，将叶柄横切成 0.5～0.8 cm 长的切段作为外植体进行组织培养。设计 3 个叶柄组织培养试验：1)盛蕾期取棉花主茎的倒 2,3,4,5 叶片的叶柄；2)初花期分别取主茎、营养枝上的倒 3,4 叶，果枝上的倒 2,3 叶的叶柄；3)苗期(5 片真叶)、现蕾期、花铃期取当天开花的果枝节位的叶柄，吐絮期取棉铃开裂露白节位的叶柄。

无菌苗下胚轴：无菌苗培养基采用 MS 培养基的大量元素 +Sucrose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5)，将无菌苗培养基分装到试管中，每个试管加 5 mL 培养基，经 121℃、14 min 的高压灭菌处理后备用。挑选成熟度良好的棉花种子，剥出完整的棉花种仁，将棉花种仁用 0.1% $HgCl_2$ 浸泡 4 min，然后用灭菌水冲洗 3～5 遍，接种在灭菌后的试管中。在无菌条件下培养 7 d 后，取出无菌苗下胚轴，横切成 0.5～0.8 cm 长的切段作为外植体。

### 1.2 组织培养条件

叶柄组织培养采用 MS 培养基的无机盐、B5 培养基的维生素部分组成 MSB 基本培养基，培养基固化剂均采用 Sigma 公司生产的 Gelrite gellan gum（简称为 Gel）。愈伤组织诱导培养基为 MSB+IAA 0.1 mg·L$^{-1}$+KT 0.1 mg·L$^{-1}$+2,4-D 0.1 mg·L$^{-1}$+Glucose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$ (pH 5.8)；分化培养基为 MSB+IAA 0.05 mg·L$^{-1}$+KT 0.05 mg·L$^{-1}$+Glucose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5)。

无菌苗下胚轴培养体系采用本试验室优化后的 CCRI 24 无菌苗下胚轴培养体系，即愈伤组织诱导培养基与叶柄愈伤组织诱导培养基相同，分化培养基为 MSB+IAA 0.02 mg·L$^{-1}$+KT 0.04 mg·L$^{-1}$+Glucose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5)。

胚性愈伤到再生植株培养基均为 MSB+6-BA 0.05 mg·L$^{-1}$+KT 0.02 mg·L$^{-1}$+Sucrose 30 g·L$^{-1}$+Gel 2 g·L$^{-1}$(pH 6.5)。

培养基分装到 100 mL 三角瓶中，每瓶 50 mL；经 121℃、14 min 的高压灭菌处理后备用。

组织培养条件为（28±2)℃、人工光照强度 2000～3000 lx、光暗周期为 14 h/10 h。

### 1.3 数据统计

每瓶接种 6 个切段，每处理接种 6 瓶共 36 个切段。同时以培养 7 d 的无菌苗的下胚轴作为对照。40 d 后诱导出的愈伤组织转接到分化培养基上。在分化培养阶段每 40 d 继代一次，共继代 3 次，每次均统计分化出胚性愈伤组织的外植体数，继代 3 次后仍没有分化的愈伤组织按不分化处理，每处理重复 3 次。数据统计分析用 SAS 8.0 软件。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

出愈率(Callus induction ratio)= 诱导出愈伤组织的外植体数 / 总外植体数×100%;

分化率(Embryogenesis callus induction ratio)= 分化出胚性愈伤组织的外植体数 / 获得愈伤组织的外植体数×100%。

## 2　结果与分析

### 2.1　棉花不同部位叶柄组织培养的差异

2.1.1　*棉花主茎叶叶柄的组织培养的差异*。从表1可以看出,各处理出愈率都高达95%,叶柄处理间差异也不显著,可见棉花主茎叶的叶柄均能够诱导出愈伤组织,叶柄与无菌苗下胚轴出愈率差异不显著，与前人报道的叶柄愈伤组织诱导困难[11-13]相反,可能与材料和组织培养体系有关。

从表1中各处理的愈伤组织重量看,倒3叶叶柄愈伤组织生长速度最快,与无菌苗下胚轴的愈伤组织生长速度达到差异极显著水平,但与倒2,4叶差异不显著。倒5叶叶柄愈伤组织的生长速度介于无菌苗下胚轴和倒4叶之间。

从分化率看,倒2,3,4,5叶片的叶柄和无菌苗下胚轴的愈伤组织分化率差异不显著,说明叶柄和无菌苗下胚轴一样，是组织培养的良好外植体。

**表1　主茎叶柄组织培养性状**

Table 1　Traits of tissue culture of petioles on cotton stems

| 处理 Treatment | 出愈率 Callus induction ratio /% | 愈伤组织重量 Callus weight /g | 分化率 Embryogenesis callus induction ratio /% |
|---|---|---|---|
| 无菌苗下胚轴 Hypocotyl of asepsis seedling | 95.7 | 1.420 | 100.0 |
| 倒2叶柄 Petioles of the 2nd backward leaves on main stem | 95.7 | 1.963** | 95.8 |
| 倒3叶柄 Petioles of the 3rd backward leaves on main stem | 97.0 | 2.097** | 97.3 |
| 倒4叶柄 Petioles of the 4th backward leaves on main stem | 95.3 | 1.957** | 96.6 |
| 倒5叶柄 Petioles of the 5th backward leaves on main stem | 94.7 | 1.687* | 92.6 |

注:* 表示在0.05水平上差异显著,** 表示在0.01水平上差异显著。

Note: * indicates significant difference at 0.05 probability level, ** indicates significant difference at 0.01 probability level compared to hypocotyl of sterile seedling.

2.1.2　*不同部位棉花叶柄的组织培养差异*。试验结果表明(表2),不同部位的叶柄与无菌苗下胚轴愈伤组织诱导率均在95%左右，差异不显著。愈伤组织重量统计结果显示,来自不同叶柄的愈伤组织重量差异不显著,但均极显著高于来自无菌苗下胚轴的愈伤组织重量，其生长速度为主茎＞营养枝＞果枝＞无菌苗下胚轴。

不同来源的愈伤组织分化率差异不显著。说明不同部位的叶柄,均可以用作棉花组织培养的外植体。

**表2　初花期不同部位叶柄组织培养性状**

Table 2　Traits of tissue culture of the different parts of petioles at the stage of flowering

| 处理 Treatment | 出愈率 Callus induction ratio /% | 愈伤组织重量 Callus weight/g | 分化率 Embryogenesis callus induction ratio /% |
|---|---|---|---|
| 无菌苗下胚轴 Hypocotyl of sterile seedling | 95.7 | 1.530 | 98.2 |
| 主茎叶柄 Petioles on main stem | 95.3 | 2.250** | 97.6 |
| 果枝叶柄 Petioles on fruit branch | 96.3 | 1.977** | 96.6 |
| 营养枝叶柄 Petioles on vegetative branch | 95.0 | 2.027** | 95.0 |

注:** 表示与无菌苗下胚轴相比在0.01水平上差异显著。

Note:** indicates significant difference at 0.01 probability level compared to hypocotyl of sterile seedling.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2.1.3 *不同时期棉花叶柄的愈伤组织生长与分化的能力*。棉花苗期到开花期,各处理间出愈率差异不显著;到吐絮期叶柄出愈率仅有无菌苗下胚轴的一半,差异达到极显著水平(表 3)。从棉花苗期到开花期叶柄的愈伤组织重量均极显著高于无菌苗下胚轴的愈伤重量,这 3 个时期的叶柄愈伤组织重量差异不显著,但以现蕾期生长速度最快;吐絮期的叶柄愈伤组织生长速度明显变慢,同时经组织培养观察,该阶段诱导出的愈伤组织基本为绿白相间、表面如霜、坚硬的愈伤组织。

**表 3 不同发育时期叶柄组织培养特性**

Table 3 Traits of tissue culture of the petioles at different stages of growth

| 发育时期 Growth stage | 组织 Tissue | 出愈率 Callus induction ratio /% | 愈伤组织重量 Callus weight /g | 分化率 Embryogenesis callus induction ratio /% |
|---|---|---|---|---|
| 苗期 Seedling stage | 叶柄 Petioles | 92.3 | 2.34** | 95.3 |
| | CK | 96.7 | 1.46 | 100.0 |
| 现蕾期 Squaring stage | 叶柄 Petioles | 95.3 | 2.39** | 92.7 |
| | CK | 94.7 | 1.87 | 94.3 |
| 花铃期 Anthesis | 叶柄 Petioles | 93.6 | 2.17** | 99.7 |
| | CK | 96.6 | 1.63 | 100.0 |
| 吐絮期 Boll opening | 叶柄 Petioles | 45.3 | 1.23 | 42.8 |
| | CK | 94.3** | 1.73 | 98.5** |

注:** 表示在 0.01 水平上差异显著;CK 为无菌苗下胚轴。

Note: **Indicates significant difference at 0.01probability level; CK is hypocotyl of sterile seedling.

从分化率看,从苗期到开花期,叶柄愈伤组织的分化率与无菌苗下胚轴差异不显著;到吐絮期后,叶柄愈伤组织的分化率显著下降,仅有 42.8%。说明过于衰老的叶柄再分化能力降低。

### 2.2 胚状体的萌发与再生苗的获得

不同来源的胚性愈伤组织,在外形和生长状态上没有发现差异。挑选黄绿色米粒状胚性愈伤组织转接到胚状体萌发成苗培养基中,经过 1～2 次继代培养,不同来源的胚性愈伤组织均能获得胚状体,胚状体继代培养 1～2 次,能够获得再生植株,在该阶段未发现明显差异。

## 3 结果与讨论

利用本实验室建立的棉花大田叶柄组织培养体系[18]首次比较了大田棉花植株不同生育时期、不同部位的叶柄在愈伤组织诱导和分化方面的差异。研究发现在愈伤组织生长速度方面表现出与叶柄的粗细成正相关的特性;不同部位的叶柄愈伤组织均能够顺利分化,分化率差异不显著。在棉花不同发育时期,叶柄均具有诱导愈伤组织、分化胚性愈伤组织、进而获得再生植株的能力。即使是吐絮期的叶柄,也有一定的再生能力,只是在叶片衰老到一定程度后,其能力降低。

国内外文献[2-5,8-11,15-17]报道均认为,将棉花成熟植株的营养器官作为外植体进行组织培养,其愈伤组织诱导和分化均比来自无菌苗的外植体困难。本研究结果显示,除吐絮期叶柄外,棉花大田植株的叶柄与无菌苗下胚轴相比无差异,这可能与试验材料有关。

**参考文献:**

[1] DAVIDONIS G H, Hamilton R H. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L.[J]. Plant Science Letters, 1983, 32: 89-93.

[2] NORMA L T, Goodin J R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1987, 6(3): 231-234.

[3] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) I. effects of explants and hormone regime[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1988, 12: 31-42.

[4] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton. II. requirements for embryo development and plant regeneration[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1988, 12: 43-53.

[5] 陈志贤,焦改丽,岳建雄,等. 通过体细胞培养获得再生棉株[J]. 中国棉花,1987,14(6):12-13.
CHEN Zhi-xian, Jiao Gao-li, Yue Jian-xiong, et al. Obtaining plantlets via tissue culture in cotton[J]. China Cotton,1987,14(6): 12-13.

[6] 于 娅,刘传亮,马峙英,等. 陆地棉中棉所 24 胚性愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 西北植物学报, 2004,24(2):306- 310.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

YU Ya, Liu Chuan-liang, Ma Zhi-ying, et al. Embryogenic callus induction and plant regeneration from CCRI 24[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2004, 24(2): 306-310.

[7] 张宝红,刘 方,刘志红,等. 外源激素对棉花体细胞胚胎发生及发育的调控作用[J]. 棉花学报,2000,12(1):17-21.

ZHANG Bao-hong, Liu Fang, Liu Zhi-hong, et al. Hormone regulation on cotton somatic embryogenesis[J]. Acta Gossypii Sinica, 2000,12(1):17-21.

[8] TROLINDER N L, Chen Xhixian. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton[J]. Plant Cell Rep, 1989, 8:133-136.

[9] 董合忠. 不同基因型棉花下胚轴离体培养胚状体发生的研究[J]. 莱阳农学院学报,1991,8(2):97-101.

DONG he-zhong. Cotton somatic embryogenesis of different genotypes[J]. Journal of Laiyang Agricultural College,1991,8(2): 97-101.

[10] 谢德意,金双侠,郭小平,等. 长江和黄河流域棉区棉花品种体细胞胚胎发生和植株再生比较研究[J]. 作物学报,2007, 33(3):394-400.

XIE De-yi, Jin Shuang-xia, Guo Xiao-ping, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton cultivars from Yellow and Yangtze river planting areas[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(3): 394-400.

[11] 张献龙,孙济中,刘金兰. 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生[J]. 遗传学报,1991,18(5):461-467.

ZHANG Xian-long Sun Ji-zhong, Liu Jin-lan. Somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton [J]. Acta Genetica Sinica, 1991, 18 (5): 461-467.

[12] 张献龙,张家明,姚明镜,等. 棉花体细胞培养及其应用基础研究[J]. 华中农业大学学报,1993,12(5):421-426.

ZHANG Xian-long, Zhang Jia-ming, Yiao Ming-jing et al. Studies on somatic cell culture and its application in cotton (*Gossypium arboreum* L.)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1993, 12(5): 421-426.

[13] FINER J J, Smith R H. Initiation of callus and somatic embryo from explants of mature cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss)[J]. Plant Cell Rep, 1984, 3: 41-43.

[14] 谭晓连,钱迎倩. 不同外植体来源和培养条件对拟似棉植株再生的影响[J]. 遗传学报,1988,15(2):81-85.

TAN Xiao-lian Qian Ying-qian. Effect of explant sources and cultural conditions on plant regeneration in *Gossypium gossypioides* (Ulbrich) stand ley[J]. Acta Genetica Sinica, 1988, 15(2): 81-85.

[15] 焦改丽,李俊峰,李燕娥,等. 利用新的外植体建立棉花高效转化系统的研究[J]. 棉花学报,2002,10(1):6-9.

JIAO Gai-li, Li Jun-feng, Li Yan-e, et al. Research on the utilization of new explants to establish a high efficiency transformation system in cotton[J]. Cotton Science, 2002, 10(1): 6-9.

[16] 张 海,易永华,高晓华,等. 棉花子叶离体培养与植株再生[J]. 西北农业学报,2002,11(1):84-86.

ZHANG Hai, Yi Yong-hua, Gao Xiao-hua, et al. *In vitro* plant regeneration from cotyledon explant of cotton(*Cossypiun hirsutum*)[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2002, 11 (1): 84-86.

[17] 迟吉娜,李喜焕,王省芬,等. 棉花体细胞胚胎发生和植株再生的影响因素[J]. 棉花学报,2004,16(1):55-61.

CHI Ji-na, Li Xi-huan, Wang Xing-fen, et al. The factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton[J]. Cotton Science, 2004, 16(1): 55-61.

[18] 张朝军,范术丽,武芝霞,等. 棉花大田植株叶柄组织培养体系的建立[J]. 西北植物学报,2011,31(6):1257-1263.

ZHANG Chao-jun, Fan Shu-li, Wu Zhi-xia, et al. Obtain plantlets from mature leaf's petiole of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31 (6): 1257-1263. ●

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn