

不同棉花愈伤组织状态与 胚胎发生及其植株再生的关系

李官德¹, 肖娟丽², 罗晓丽², 张安红², 吴家和²

(1. 山西运城农业职业技术学院, 山西 运城 044000; 2. 山西省农业科学院棉花研究所, 山西 运城 044000)

摘要: 研究结果表明, 能够分化出体细胞胚胎并再生植株的 4 种愈伤组织状态为: 直接产生胚性愈伤组织或体细胞胚胎簇状胚状体、淡黄色且疏松结构胚性愈伤组织、颗粒状疏松结构愈伤组织及褐化、生长缓慢的愈伤组织; 难以分化出体细胞胚胎的 4 种愈伤组织状态为: 易发生体细胞胚再愈伤化的愈伤组织、翠绿色表面有硬块状的愈伤组织、易诱导出胚性愈伤组织但不分化成苗的胚性愈伤组织、疯长型愈伤组织。

关键词: 棉花; 组织培养; 愈伤组织; 胚胎发生; 再生植株

中图分类号: S562.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2006)01-0029-03

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Calli Derived from Cotton (*Gossypium hirsutum* L) Depending on Their Quality

LI Guan-de¹, XIAO Juan-li², LUO Xiao-li², ZHANG An-hong², WU Jia-he²

(1. Agricultural Career Technology School in Yuncheng, Yuncheng 044000, China;

2. Institute of Cotton Research, Shanxi Academy of Agricultural Science, Yuncheng 044000, China)

Abstract: The results showed that there are four types of calli which own the ability of somatic embryogenesis and regeneration, they are direct somatic embryogenesis from explants, the pale-yellow loose embryogenesis calli directly from explants, granular loose calli, and brown calli with slowly growth; but the other four kinds of calli lose the ability of somatic embryogenesis and plant regeneration, they are easily re-differentiation calli from original calli, green hard surface of calli, calli never inducing embryos, and fast growth calli.

Key words: Cotton (*Gossypium hirsutum* L); Tissue culture; Calli; Embryogenesis; Plant regeneration

棉花是我国重要的经济作物, 常年栽培面积在 530 余万 hm^2 。通过常规的育种方法, 棉花在单产、品质上都有很大的提高。然而, 由于棉花种质资源的匮乏, 棉花育种水平徘徊不前。近年来, 基因工程成为一种改造植物的手段后, 棉花也不可避免地成为基因工程改造的目标。到目前为止, 在棉花基因工程中对不同的转化方法、外植体、筛选剂等研究已有很多报道, 如将抗虫^[1]、抗病^[2]、抗除草剂^[3,4]等一批有价值的外源基因导入棉花细胞, 获得了一批抗虫、抗病、抗除草剂的转基因棉花品种。目前棉花遗传转化最有效的方法是农杆菌介导法, 该方法是建立在棉花组织培

养植株再生基础之上, 因而棉花组织培养植株再生体系尤为重要。同时农杆菌介导法在今后一段时间内仍是棉花遗传转化最有效的方法。加速生物技术在棉花遗传改良上的应用, 建立一种适用于当前我国主栽棉花品种的高效胚胎发生与植株再生体系十分迫切。

在组织培养中, 主要目标是诱导愈伤组织形成和形态发生, 使一个离体的细胞、一块组织或一个器官的细胞通过脱分化形成愈伤组织, 并由愈伤组织再分化形成植物体。外植体诱导出愈伤组织以后, 经过继代培养, 可以在愈伤组织内部形成一类分生组织的小细胞团, 然后再分化成不同的

器官原基。但愈伤组织再分化为体细胞胚胎是有一定的难度的,不是每种愈伤组织都能分化为体细胞胚。愈伤组织的不同状态,包括颜色、质地等,决定是否能分化出体细胞胚胎和再生植株。本研究着重探讨棉花外植体诱导愈伤组织的几种状态与胚性愈伤组织分化和再生植株的关系。

1 材料和方法

1.1 供试材料

冀合 321、冀合 713、珂字 312 均是山西省农科院棉花所生物技术室多年自交保纯的材料。

1.2 无菌苗的培养

棉花种子用硫酸脱去短绒,再用自来水洗掉种子表面的硫酸,晾干。用 70% 乙醇对种子进行表面消毒 30s,倒去乙醇,用无菌水冲洗 2~3 次。接着用 10%~15% 过氧化氢消毒 2~4h,用无菌水冲洗 2~3 次。然后在无菌水中浸泡 18~24h,待种子露白。在无菌条件下剥去种皮,种入种苗培养基(1/2MS+琼脂 7g/L, pH6.8)中。为保证苗的幼嫩,无菌苗在 28℃ 温度下先暗培养 2d,再在光照条件下培养 3~5d 备用。

1.3 愈伤组织的诱导

选用培养 5~7d 的无菌苗,将下胚轴切成 5~7mm 的小段,平放入愈伤组织诱导培养基 MSB1 (MS 无机盐 + B₅ 维生素 + 葡萄糖 30g/L + 2,4-D 0.1mg/L + KT 0.1mg/L + Phytagel 2.5g/L, pH5.8) 中培养,7d 后下胚轴两端开始膨大,15d 左右可见到少量的愈伤组织,1 个月左右形成直径为 10mm 左右的愈伤组织块。

1.4 愈伤组织的增殖继代

将诱导出的愈伤组织接入增殖培养基 MSB2 (MS 无机盐 - NH₄NO₃ + 2 × KNO₃ + B₅ 维生素 + 葡萄糖 30g/L + 2,4-D 0.05mg/L + KT 0.05mg/L + Phytagel 2.5 g /L, pH5.8) 中,培养 4 周左右后,将愈伤组织转入分化培养基 MSB3 (MS 无机盐 - NH₄NO₃ + 2 × KNO₃ + B₅ 维生素 + 葡萄糖 30g/L + Phytagel 2.5 g /L, pH5.8) 中继代。

1.5 体细胞胚的成熟、萌发和植株再生

愈伤组织在分化培养基中分化形成胚性愈伤组织,接着胚性愈伤组织逐渐形成球形、心形、鱼雷形等的胚状体,再将体细胞胚继代入成苗培养基 (MS 无机盐 - NH₄NO₃ + 2 × KNO₃ + B₅ 维生素 + 葡萄糖 30g/L + 谷胺酰氨 1.0g/L + 天门冬酰氨 0.5g/L + Phytagel 2.5 g /L, pH6.2),体细

胞胚开始萌发长成根、叶完整的再生植株,再转入大的三角瓶中,适时嫁接或待根长好后移栽。在试管苗移栽过程中,由异养到自养,恒温到有温差,无菌到有菌,光弱到光强,湿度高到湿度低,应该保持水分平衡,采用加塑料薄膜或其他方法,选择适当的基质,注意光、温条件。

1.6 观察、计数和统计分析

棉花组织培养每 4 周继代一次,同时观察愈伤组织的质地、颜色和生长状况,统计愈伤组织的胚分化时间和数量。

2 结果与讨论

2.1 能分化出体细胞胚胎的 4 种愈伤组织状态

2.1.1 直接产生胚性愈伤组织或体细胞胚胎

有的外植体在加有 KT, 2,4-D 的诱导培养基中直接产生胚性愈伤甚至胚状体。仔细将胚状体挑出来,转入分化培养基中,经过继代培养可获得再生株,此类愈伤组织进行的是直接胚胎发生。这样,棉花组织培养周期缩短,减少了培养过程中变异的发生,这是一条转化效率最快的途径,但目前为止不具普遍性。刘方^[5]等报道,低浓度的 ZT 对棉花胚胎发生的诱导作用较明显,子叶最有利胚胎发生直接诱导,胚根次之,下胚轴较差;间接诱导则以下胚轴获得胚胎发生的效果好。

2.1.2 淡黄色且疏松结构胚性愈伤组织较易获得体细胞胚胎分化 有的愈伤组织一诱导出来即为胚性愈伤组织,通常会伴随产生根毛状类似物,呈透明状。此时愈伤组织为淡黄色,结构疏松,此类愈伤组织较易分化成体细胞胚胎。Wu^[6]等报道,凡直接产生胚性愈伤组织均与分化根的形成有关。2,4-D 一般不能诱导棉花外植体直接获得胚性愈伤组织,而是首先诱导产生非胚性愈伤组织,然后在此基础上再分化产生胚性愈伤,培养获得再生苗的周期长。在试验中,用 KT, 2,4-D 诱导的愈伤组织中偶而也有少量的愈伤组织产生根毛状类似物,这种愈伤组织是否也能直接转化为胚性愈伤组织,值得进一步研究。

2.1.3 颗粒状疏松结构愈伤组织成为获得体细胞胚胎分化主要途径 有的愈伤组织从筛选培养基中转入增殖培养基后,呈透明的、疏松状,用镊子易夹碎,这种状态先分化一部分,再扩展分化,将其分化的愈伤组织挑出,分化的愈伤组织逐渐形成球形、心形、鱼雷状等的胚状体,经过 2~3 次继代培养后获得根、子叶、真叶完整的再生植株。这种愈伤组织转化再生株的途径具有普遍性。

2.1.4 褐化、生长缓慢的愈伤组织也能分化出体细胞胚胎并再生植株 有的愈伤组织转入增殖培养基中后褐化,但还没有死,过一段时间边缘处出现一堆绿色胚状体,将其挑出,转入分化培养基

中继续培养,可产生再生植株。对于这种状态的愈伤组织,一般情况我们会过早地将其淘汰掉,在这里我们建议不要轻易仍掉,将其放一放,或许会有胚性愈伤发生。

表1 4种不同类型的愈伤组织状态和胚分化情况

愈伤组织类型	颜色	状态	愈伤生长情况	分化时间
I	淡黄色	稀泥状或有胚状体	++	2个月
II	淡黄色	透明疏松伴有根毛状类似物	+++	2~3个月
III	黄色或无色	颗粒疏松状	++	3~4个月
IV	褐色	褐色伴有透明疏松状	+	4~5个月

注: + 代表生长缓慢, +++ 代表生长很快。表2同。

以上这4种类型的愈伤组织分化为再生株时,转基因胚状体中的大多数为畸形胚,不能发育成正常的植株,只有小部分胚状体可以发育成根茎叶齐全的小植株,胚状体发育成植株的过程中,部分畸形株会逐渐转化为正常植株。

2.2 难分化出体细胞胚胎的4种愈伤组织状态

2.2.1 易发生体细胞胚再愈伤化的愈伤组织

有的愈伤组织转入增殖培养基中后分化为胚性愈伤,甚至有胚状体或再生株出现。但若转化不当,将部分未分化的愈伤组织转入增殖培养基中,因未分化的愈伤组织长得非常快,培养基中营养被未分化的愈伤组织吸收,遮掩了分化愈伤组织,将导致分化的愈伤组织胚状体消失。

2.2.2 翠绿色、表面有硬块状的愈伤组织 有的

愈伤组织转入增殖培养基中后,呈翠绿色,表面有硬块状,用镊子很难夹碎,这种愈伤结构致密,但中间有部分疏松状,将其挑出有可能分化,若转化不当也可以转化为疯长型的愈伤组织。

2.2.3 易诱导出胚性愈伤组织不分化成苗的愈伤组织 有的愈伤组织转入增殖培养基中后,很早分化,呈黄色的小米粒状,看似分化得特别好,但总不出现胚状体,一直呈这种状态,更没有再生株的出现。这种状态应观察后,看情况再淘汰。

2.2.4 疯长型愈伤 有的愈伤组织转入增殖培养基中后,呈白色或深黄色,疏松状如雪花,长得非常快,继代2周就可长满培养皿,不到3周就将培养基全部“吃”掉,故称疯长型愈伤组织,一直保持这种状态,从来不分化,应尽早淘汰。

表2 难以分化成苗的4种棉花愈伤组织的状态

愈伤组织类型	颜色	状态	愈伤生长情况	解决措施
V	淡黄或无色	疏松有胚状体	++	操作得当
VI	翠绿色	内疏松外硬块	+	将疏松状愈伤挑出
VII	黄色	小米粒状	++	观察后看情况淘汰
VIII	白色或深黄色	疏松	++++	尽早淘汰

综上所述,前4种愈伤组织应保留,并仔细进行继代转化,第5种和第6种与转化技术有关,转化技术应予以提高,避免转化不当的状况发生。后两种愈伤组织应看情况淘汰或尽早淘汰。

参考文献:

- [1] Perlak F, Deaton R, Armstrong T, *et al.* Insect resistant cotton plants [J]. *Biotechnology*, 1990, 8: 939-943.
- [2] 吴家和, 张献龙, 罗晓丽, 等. 转几丁质酶和葡聚糖酶基因棉花的获得及其对黄萎病的抗性[J]. *遗传学报*, 2004, 31(2): 183-189.
- [3] Bayley C, Trolinder N, Ray C, *et al.* Engineering 2,4-D resistance into cotton [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 83: 645-649.
- [4] Keller G, Spatola L, McCable D, *et al.* Transgenic cotton resistant to herbicide bialaphos [J]. *Transgen Res*, 1997, 6: 385-392.
- [5] 刘方, 张宝红. 棉花组织培养高效植株再生体的建立[J]. *棉花学报*, 2003, 16: 117-122.
- [6] WU J, Zhang X, Nie Y, *et al.* Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of Chinese cottons (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *In Vitro Cell and Develop Biol-Plant*, 2004, 40: 371-375.