

棉花体细胞无性系变异的研究进展

汤飞宇, 肖文俊

(江西农业大学农学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 体细胞无性系变异是一种重要的细胞工程育种技术, 其应用于棉花育种的前提是建立高效的组织培养诱导再生植株体系。本文简要综述了棉花离体诱导植株再生研究的现状, 重点讨论了棉花体细胞无性系变异的表现、利用方法及机理, 提出了当前研究存在的问题并对今后的研究进行了展望。

关键词: 棉花; 体细胞无性系变异; 组织培养

中图分类号: S562.024

文献标识码: A

文章编号: 1006-0499(2007)05-0003-05

体细胞无性系变异 (Somaclonal variation) 是指组织培养中再生植株中出现的变异。这是在植物中继有性杂交、理化诱变外可产生变异的第三条途径。对各种植物体细胞无性系变异株后代的遗传分析表明, 其中绝大多数变异是可以遗传的, 并且有些变异在作物改良上颇有价值, 从而引起了育种学家的广泛兴趣, 成为又一种细胞工程育种的新方法。体细胞无性系变异具有以下特点: 一是普遍性。再生植株发生一定频率的变异是一种普遍现象; 二是变异范围广。无性系变异是多种多样的, 在再生植株中可以找到在常规诱变育种和杂交育种中所观察到的各种变异或重组类型; 三是变异频率高。Skirvin (1994) 综合分析了所统计的研究报告后认为, 组织培养中的体细胞无性系变异的频率范围大致为 1% ~ 3%, 大大超过了 0.001% 的自然变异率^[1]; 四是具有稳定和育种周期快的特点。由于大多数变异是个别基因突变或很小的染色体片断改变, 通过一二次自交便可形成稳定的变异株系, 可以在保持优良品种基本特性不变的情况下改进个别的农艺性状和经济性状, 加速了育种进程, 这一优点是杂交育种, 甚至诱变育种都不具备的。如棉花常规杂交一般需要 5 ~ 6 年才能获得稳定的品种, 而棉花体细胞无性系变异一般仅需要 2 ~ 3 年即能获得纯合的品系。体细胞无性系变异应用于棉花育种的前提是要建立起高效的体细胞培养诱导再生植株体系, 这也是进行棉花转基因操作的基础。

1 棉花体细胞培养诱导植株再生

自 1983 年 Davidonis 等从继代两年多的 Coker 310 子叶愈伤获得第一株棉花再生植株以来^[2], 此类研究有了较大的进展, 建立了棉花体细胞胚胎发生和植株再生的研究体系。影响棉花胚状体诱导及再生植株频率的因素主要有以下几个方面。

1.1 基因型

不同棉种、同一棉种不同品种的胚胎发生和植株再生能力差异很大。在棉属 40 多个种中, 陆地棉、海岛棉、亚洲棉、克劳茨基棉、戴维逊氏棉、雷蒙德氏棉、夏威夷棉和非洲棉等 8 个种诱导获得了体细胞胚, 前 5 个棉种诱导获得了再生植株^[3]。在四大栽培种中, 陆地棉体细胞胚胎发生较易, 亚洲棉次之, 海岛棉和非洲棉较差^[4]。1971 年以来, 共有 100 余个品种用于棉花组织培养研究, 据统计, 在这些品种中约有 54% 的材料具有胚胎发生能力, 46% 的材料不能或极难分化出体细胞胚, 在美国品种中, 珂字棉系统的棉花品种胚胎发生能力

收稿日期: 2007-04-16

基金项目: 江西省农业科技攻关项目 (赣科发计字 [2006] 38 号)。

作者简介: 汤飞宇 (1970-), 男, 博士, 副教授, 从事棉花遗传育种研究。

较强,岱字棉系统次之,斯字棉较差,爱字棉最差^[3];而在我国黄河流域品种容易,长江流域品种困难^[5]。

1.2 外植体

Trolinder (1988) 等多种不同的外植体进行了比较,结果表明下胚轴最易诱导体细胞胚胎发生,中胚轴和上胚轴次之,子叶较差,叶片和茎段最差^[6]。王清连等 (2002) 发现子叶直接分化胚状体的能力最强,胚根次之,下胚轴较差^[7]。

1.3 培养基

1.3.1 外源激素 外源激素对胚性愈伤组织的诱导、增殖和分化的调控作用非常重要。2, 4-D 常用于棉花胚性愈伤组织的诱导,但进一步诱导胚状体需要将 2, 4-D 去除。2, 4-D (0.1 mg/L ~ 0.5 mg/L) 和 KT (0.1 mg/L ~ 0.5 mg/L) 或者 NAA (0.1 mg/L ~ 5.0 mg/L) 和 2ip (0.1 mg/L ~ 5.0 mg/L) 的激素组合可应用于陆地棉品种的植株再生^[6, 8, 9]。IBA (1.0 mg/L) 能直接诱导胚性愈伤组织,适当浓度的 KT (0.5 mg/L) 可促进 IBA 的效应^[10]。ZT 可诱导子叶直接产生胚状体,对于缩短培养周期具有重要的意义,但胚胎发生率尚不够理想^[7]。最近刘方和张宝红 (2004) 建立了 ZT 和 2, 4-D 诱导棉花高效胚胎发生和植株再生的激素模式。这一模式能够培养出包括中棉所 12、中棉所 19、中棉所 27、泗棉 3 号等优良棉花品种的再生植株,此外能诱导胚胎直接发生,使棉花组织培养的周期由 180 d 缩短到 120 d 左右^[11]。

1.3.2 碳源 蔗糖常作为棉花组织培养的碳源,也有用葡萄糖或麦芽糖用作碳源的报道。张文胜等 (1997) 报道葡萄糖诱导愈伤组织生长的效果要好于蔗糖^[12],而蔗糖促进胚状体发育的效果要优于葡萄糖。葡萄糖可以减轻外植体初始培养的褐变现象^[13, 14]。麦芽糖能够防止棉花体细胞在培养过程中发生褐化^[15]。

1.3.3 无机成分 将 MS 培养基中的 KNO_3 的用量加倍能促进棉花体细胞胚胎发生^[6, 9]; NH_4NO_3 减半或将浓度降为 0.3 g/L 后能大幅度提高胚性愈伤组织诱导频率^[16, 17]。低浓度无机盐 (1/2 MS 和 1/5 MS 无机盐) 虽然有助于体细胞胚胎的发生,但不利于胚胎成熟^[7]。

1.4 培养方式

与固体培养相比,液体悬浮培养可以促进胚胎早发生,增加单位质量愈伤组织的胚胎发生数^[2, 9, 18]。但悬浮培养产生的体细胞胚易产生畸形苗、玻璃化苗等非正常苗。

棉花的离体植株再生研究尽管取得了相当大的进展,但仍存在很多问题:其一是大多数研究局限于模式品系如 Coker 312, Coker 201 等,而当前我国棉花生产上推广的许多优良主栽品种组培还难以成功,基因型的差异仍然是限制棉花组织培养技术应用于育种的一个重要因素;其次是胚胎发生率低,畸形胚比率过高,影响了植株的再生率^[19];再次是棉花试管苗的移栽技术也需要进一步提高。

2 棉花体细胞无性系变异和突变体筛选

和其他植物一样,棉花组织培养植株再生过程中存在着广泛的变异。根据其变异性状能否遗传给后代,这些变异可分为两类,一类是遗传性变异,这类变异可通过有性过程遗传给后代,是由于培养过程中遗传物质的改变所引起的;另一类是生理性变异或外遗传变异 (epigenetic variant),这类变异不能遗传给后代,在田间种植一、二代后就自动恢复为原来的性状。这类变异仅是培养过程中的一种生理适应。在棉花体细胞无性系变异中,叶形、育性的变异大多是生理型变异,株型、熟期、产量性状和纤维品质的变异大多是遗传型变异^[20]。上述变异大多是不利的变异,但也有少量有利的变异。在育种应用上,可以通过两种方法来选择棉花无性系变异产生的有用细胞突变体。第一种方法是将棉花再生植株种植在田间,通过田间观察和考种来发现和选择早熟、抗病、抗逆和优质等农艺经济性状的株系。第二种方法是在棉花愈伤组织培养阶段向培养基中加入选择压,选择出有用的抗性细胞系,然后经过再生获得抗性突变植株。

2.1 在田间从再生植株中选择有用的细胞突变体

棉花组培当代再生植株在许多方面均表现出明显的差异,尤其在育性上变异十分明显。据统计,大约有 25% 的再生植株表现为不育,其中有些为雄性不育株,有些为雌雄全不育株^[21]。但这些不育株经过一段时间的栽培后,大部分可逐步恢复育性,说明是生理性变异,但其中也有少部分不育株仍保持不育,并能通过有性过

程传递给后代,说明是遗传性变异。除育性表现变异外,再生植株的农艺性状和经济性状也差别较大。其中变异较大的有株高、株型、铃型、铃重、衣分、纤维品质、果枝类型等方面^[4, 20, 21, 22],如丰嵘等(1996)在鲁棉6号和Coker 201再生植株后代中发现了大铃材料,铃重分别为4.98 g和5.42 g,比原始材料4.33 g和4.21 g高出15%和28%,还发现了高衣分(40%以上)、高纤维长度(>39 mm)、高纤维强度的新材料^[20]。张宝红等(1995)在鲁棉6号再生植株中,发现了棕色棉絮,并经过自交筛选提纯获得了棕絮种质,为彩色棉育种提供了材料^[22]。

2.2 在细胞水平上通过选择压定向选择抗性突变体

利用培养细胞的无性系变异现象可以在培养基中加入选择压力,筛选出特定的细胞突变体及其再生植株,这种突变体离体筛选技术具有不受时空限制、节约土地(在一个试管中可以操纵成千上万个细胞)、选择效率高、选择效率高等优点。棉花细胞及再生植株在抗逆性方面也有不少变异,主要表现在抗高温、耐盐性、抗病性等方面。

2.2.1 抗高温 Trolinder等[1991]将悬浮细胞于45℃每天3 h,总处理时间为0~105 h,筛选出抗高温且抗旱的细胞,再生株叶片在38℃条件下能形成愈伤,而对照叶片不能或死亡,再生株高度不育,没有获得种子^[23]。

2.2.2 抗病 张献龙等^[24],姚明镜等^[25]用枯、黄萎病菌毒素作为筛选剂,对诱变处理的细胞、下胚轴或愈伤组织进行筛选,获得了一批抗枯、黄萎病菌毒素的突变体,经田间鉴定表现出明显的抗病性,说明细胞水平上的筛选是有效的,但再生植株的抗性遗传在早代不稳定,需要进行多代的淘汰筛选,才能得到遗传上稳定的抗性材料。

2.2.3 耐盐 张宝红等(1995)从长期继代培养的Coker 201体细胞胚性愈伤组织中,筛选出了耐盐胚性细胞系,获得了耐质量浓度20 mg/L NaCl的体细胞胚和耐质量浓度10 mg/L NaCl的再生植株^[26]。

3 体细胞无性系变异的机理

随着棉花细胞和组织培养技术的迅速发展及广泛应用,不断发现在培养细胞和再生植株中存在着各种不同的变异,其中有些是可以遗传的,这种变异的发生有其遗传学基础。具体表现在细胞水平上的染色体数目和结构变异与分子水平上的DNA变化。

3.1 细胞水平上的变化

细胞水平上的变异包括染色体数目和结构变异两个方面。染色体数目变异又包括倍性变异和非整倍变异。棉花体细胞无性系变异中最常见的是染色体数目的变化。印度学者Bajaj(1985)曾报道过,在二倍体草棉、亚洲棉的下胚轴愈伤组织中,二倍体细胞数目仅占30%~40%,四倍体细胞占25%~40%,其它为单倍体、三倍体、六倍体和混倍体细胞^[27]。郭香墨和焦改丽(1988)发现一个细胞悬浮系中四倍体细胞占多数,达47.7%,单倍体、二倍体、三倍体和六倍体细胞分别占8.4%、27.8%、12.1%和2.0%,五倍体和少于13条染色体的细胞各占1%^[28]。组织培养中染色体结构的变化常表现为缺失、倒位、易位、断裂等方面。李克勤, Zheng报道了棉花愈伤组织分裂期出现的染色体环、染色体桥及双着丝粒,间或出现的多核和微核等异常现象^[29, 30]。

3.2 分子水平上的变化

现已发现,体细胞无性系在DNA分子水平上可发生基因突变、DNA甲基化变化、DNA总量变异(DNA扩增和缺失)、转座因子的激活、细胞器DNA的修饰,以及RFLP和RAPD多态性变异等现象。由于棉花体细胞培养技术难度较高,这方面的研究尚未见报道,但已引起棉花研究者的关注。

4 结语

体细胞无性系变异和突变体筛选在我国遗传育种学界比较受重视,特别是在稻麦体细胞无性系变异育种方面已经取得了令人十分鼓舞的进展,但在棉花育种上的应用研究还比较薄弱,主要表现为:(1)虽然人们已经观察到棉花组织培养中的变异,但对其选择、鉴定、利用还没引起足够的重视,迄今未见通过体细胞无性系变异技术选育出棉花新品种(系)的公开报道,所以棉花组织培养体细胞无性系变异的后期工作还需加强,并与

常规育种结合起来,才能发挥出植物组织培养技术在棉花育种上的应用潜力;(2)对棉花体细胞无性系变异的机理研究不够,如果能够将体细胞无性系变异的认识深入到分子水平,则有助于了解植物细胞在离体培养过程中的基因表达和调控,揭示棉花体细胞无性系变异的真实性质和调控技术;(3)分离筛选棉花突变体的方法少,而且普遍有嫌简单化,且大部分采用直接加某种目的因子于培养物的方法,如筛选抗盐的细胞突变体就在培养基中加盐,筛选抗病的则加某种病菌毒素于培养基,如此等等,但效果往往并不一定都很好,这与人们对表现某种变异性状所需的生理生化基础缺乏足够的认识有关,因而也就不能做到准确地应用某种关键性的生化变化环节作为设计筛选方法的依据。此外,某些抗性表现本身就很复杂,多数是一种程度轻重的线性表现,体现这种抗性实际上受很多性状的影响,也即受控于很多基因。不同基因的突变或某一基因重复序列的扩增和缩减,都将影响这种抗性的表现,因此,应该从不同角度或途径来探索更有效的筛选方法。

参考文献

- [1] Skirvin RM. Source and frequency of somaclonal variation [J]. Horti Science, 1994, 29 (11): 1232 ~ 1237.
- [2] Davidonis GH, Hamilton RH. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L [J]. Plant Sci Lett, 1983, 32: 89 ~ 93.
- [3] 丰嵘,王清连,张宝红,等.棉花组织培养植株再生的基因型分析 [J]. 西北农业学报, 1997, 6 (2): 27 ~ 30.
- [4] Altman DW, Stemly DM, Mitten DM. Quantitative trait variation in phenotypically normal regenerants of cotton [J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1991, 27: 132.
- [5] 张家明,孙雪飘,郑学勤,等.陆地棉愈伤诱导及胚胎发生能力的遗传分析 [J]. 中国农业科学, 1997, 30 (3): 36 ~ 43.
- [6] Trolinder NL, Goodin JR. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) I [J]. Effects of source of explant and hormone regime. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1988a, 12: 178 ~ 181.
- [7] 王清连,刘方,周云,等.棉花组织培养直接胚胎发生和植株再生 [J]. 棉花学报, 2002, 14 (6): 340 ~ 343.
- [8] Firoozabady E, Deboer DL. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1993, 29: 166 ~ 173.
- [9] Trolinder NL, Goodin JR. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) II [J]. Requirements for embryo development and plant regeneration. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1988b, 12: 43 ~ 53.
- [10] 陈妹幼,张献龙,聂以春,等.陆地棉体细胞再生植株技术的改进研究 [J]. 棉花学报, 2002, 14 (6): 344 ~ 347.
- [11] 刘方,张宝红.棉花组织培养高效植株再生体系的建立 [J]. 棉花学报, 2004, 16 (2): 117 ~ 122.
- [12] 张文胜,张宝红,李秀兰,等.糖源在棉花愈伤组织诱导、胚胎发生与发育中的作用 [J]. 江西农业大学学报, 1999, 19 (3): 34 ~ 39.
- [13] Beasley CA, Ting IP. The effects of plant growth substances on in vitro fiber development from fertilized cotton ovules [J]. Am J Bot, 1973, 60: 130 ~ 139.
- [14] Smith R, Price HJ, Thaxton JR. Defined conditions for the initiation and growth of cotton callus in vitro in *Gossypium arboreum* [J]. In vitro Cell Dev Biol, 1977, 13: 329 ~ 334.
- [15] Kumria R, Sunnichan VG, Das DK, et al. High - frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 635 ~ 639.
- [16] 张寒霜,李俊兰,高鹏,等.低酚陆地棉体细胞胚胎发生和植株再生 [J]. 河北农业大学学报, 1999, 22 (1): 9 ~ 12.
- [17] 蔡小宁,吴敬音,余建明.陆地棉胚性愈伤组织诱导和植株再生 [J]. 江苏农业学报, 1997, 13 (4): 225 ~ 230.
- [18] 陈志贤,李淑君, Trolinder NL等.棉花细胞悬浮培养的胚胎发生和植株再生的某些特性的研究 [J]. 中国农业科学, 1987, 20 (5): 6 ~ 11.
- [19] 张宝红,李秀兰,李付广,等.棉花组织培养中畸形胚的发生和转化 [J]. 作物学报, 1996, 22: 107 ~ 111.
- [20] 丰嵘,郭腾龙,张宝红,等.棉花再生植株后代变异及其在遗传育种上利用价值的研究 [J]. 农业生物技术学报, 1996, 4 (3): 230 ~ 237.
- [21] 丰嵘,王清连,张宝红,等.棉花体细胞无性系变异的研究 [J]. 江西农业大学学报, 1996, 18 (2): 200 ~ 205.
- [22] 张宝红,李秀兰,李凤莲,等.棉花组织培养中的表型变异 [J]. 安徽农业大学学报, 1995, 22 (1): 13 ~ 16.
- [23] Trolinder NL, Shang X. In vitro election and regeneration of cotton resistant to high temperature stress [J]. Plant Cell Rep, 1991, 10: 448 ~ 452.
- [24] 张献龙.陆地棉抗枯萎病细胞系再生植株后代的遗传与鉴定 [J]. 中国棉花, 1998, 25 (7): 8 ~ 9.
- [25] 姚明镜,张献龙,孙济中,等.陆地棉黄萎病体细胞抗性突变体的筛选 [J]. 棉花学报, 1995, 7 (1): 59 ~ 65.
- [26] 张宝红,李秀兰,李凤莲.棉花耐盐胚性细胞系筛选及其植株再生 [J]. 中国农业科学, 1995, 28 (4): 33 ~ 38.
- [27] Bajaj YPS, Gill MS. In vitro induction of genetic variability in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1985, 71: 363.
- [28] 郭香墨,焦改丽.陆地棉细胞培养中染色体的变异 [J]. 中国棉花, 1988, 15 (3): 12 ~ 13.
- [29] 李克勤.陆地棉组织细胞培养的研究 [J]. 西北植物学报, 1991, 11 (2): 144 ~ 153.
- [30] Zheng SJ. Chromosome variation in callus culture of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Genes, 1991, 3: 211 ~ 221.

苏北沿海棉区棉花产业发展思路探讨

周日明¹, 符广群², 孙天曙¹, 刘有兄¹

(1. 江苏省盐城市农业局经作站, 江苏 盐城 224002; 2. 江苏省建湖县农林局, 江苏 建湖 224700)

摘要: 本文分析了苏北沿海棉区棉花产业现状及棉花产业发展的有利因素; 提出了推动苏北沿海棉区棉花产业发展的思路: 科学定位产业方向; 研究应用新型技术; 借助政策优化品种; 突破高品质棉产业; 发展棉田高效种植; 努力争取项目支持。

关键词: 棉花; 产业现状; 政策因素; 发展思路; 苏北沿海

中图分类号: S562 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-0499 (2007) 05-0007-04

2003 年以来, 苏北沿海棉区频繁遭受自然灾害, 棉花生产在 4 年中有 3 年受到重创, 其产量下降到上世纪 90 年代中期水平, 棉区高产优势丧失, 加之棉花品种数量过多, 技术配套难度较大, 栽培水平提高不快, 导致棉花生产处于低潮, 产业竞争能力减弱, 本地棉纺企业纷纷调用外地棉、进口棉, 加剧了对当地产棉的挤压, 使棉区百亿元棉花产业面临挑战。

1 产业现状

1.1 竞争能力减弱

苏北沿海棉区棉花种植面积缩减, 单产徘徊, 总产下降, 工效较低, 效益不高。2006 年植棉面积 170 km² 左右, 年均递减 5%。单产 1 110 kg/hm², 比正常年景的 1 275 kg/hm² 低 13%, 比大丰收年景 1 551 kg/hm² 低 28%, 与前三年平均单产持平。总产 1 924 kt, 比最高年份的 2004 年 2 774 kt 下降 31%。种植棉花的工效为最低, 一个农民种植棉花的劳动力净产值 (一个工作日) 为 25.15 元, 和种水稻 43.52 元、种小麦 29.85 元、种油菜

收稿日期: 2007-04-28

作者简介: 周日明 (1962-), 江苏阜宁人, 推广研究员, 从事棉花栽培技术研究和推广工作。

(< 汤飞宇等: 棉花体细胞无性系变异的研究进展)

Advances in Somacolonl Variation in Cotton

TANG Fei-yu, XIAO Wen-jun

(Agronomy College, Jianxi Agricultural University., Nanchang 330045, China)

Abstract: Somacolonl variation is one of the important cell engineering technology for applied breeding. The embryo reduction and in vitro regeneration of cotton were reviewed briefly in the paper. The performance, methodology and mechanism of somacolonl variation were discussed elaborately. The paper has pointed out the existing questions and presented some suggestions on further research in cotton somacolonl variation.

Key words: Cotton; Somacolonl variation; tissue culture