

陆地棉花药愈伤组织的诱导和继代培养^X

董新国¹ 张献龙¹ 陈志贤² 聂以春¹ 吴家和²

(1 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 武汉 430070)

(2 山西省农业科学院棉花研究所 运城 044000)

CALLUS INDUCTION AND SUBCULTURE FROM ANTERS OF UPLAND COTTON (*GOSSYPIUM HIRSUTUM L.*)

Dong Xinguo¹ Zhang Xianlong¹ Chen Zhixian² Nie Yichun¹ Wu Jiahe²

(1 State Key Laboratory for Genetic Improvement of Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(2 Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000)

关键词 陆地棉, 花药培养, 愈伤组织诱导, 继代培养

Key words *Gossypium hirsutum L.*, Anther culture, Callus induction, Subculture

花药培养是自 60 年代以来发展起来的一项生物技术, 旨在诱导出单倍体花粉植株, 应用于育种实践和基础研究^[1]。以单倍体植株为基础的单倍体育种被认为在以下几个方面具有优越性: 第一, 缩短育种年限; 第二, 排除杂种优势对后代选择的干扰^[2,3]。此外, 花药培养在挽救一些常规育种无法得到的配子重组体、诱导和选择新变异等方面也具有特殊的用途^[4]。棉花花药培养研究始于 70 年代初, 但长期以来, 一直处于条件摸索和优化阶段。1978 年, Barrow 等培养陆地棉和海岛棉花药时曾获得大量愈伤组织, 但细胞学检查表明, 仅 2% ~ 3% 的细胞表现为单倍性, 且都包埋于双倍体愈伤组织中, 常随着愈伤组织的增殖而退化和消失^[5]; 愈伤组织的分化则十分困难, 在愈伤组织的继代培养过程中, 仅观察到原胚状体、前胚状体、根状体和茎状体等生成, 却未能再生出单倍体植株^[6]。直至近来, 张宝红等(1995)报道由花药愈伤组织分化出胚状体和不定芽, 并进而再生出单倍体植株^[7,8], 但未见其严格的细胞学和遗传学证据; 一般认为, 棉花花药离体培养时, 小孢子难以去分化启动分裂, 愈伤组织中仅偶有单倍体细胞被观察到, 但对其来源不清楚^[9]。看来, 由棉花花药培养获得单倍体依然十分困难。鉴于花药培养在植物育种中的重要用途, 有必要继续对棉花花药培养进行深入研究。本试验较系统地研究了基因型、激素和碳源等多种因素在花药愈伤组织诱导中的作用, 以及愈伤组织在继代培养过程中所表现出的规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用 31 份陆地棉品种(系), 研究基因型在花药愈伤组织诱导中的作用, 其余试验均以“珂字 201”为

收稿日: 1998-05-22, 修回日: 1998-09-28。第一作者: 男, 1973 年 1 月出生, 硕士, 从事作物遗传育种研究。

X 湖北省自然科学基金资助项目(编号: 93J04)。

XX 现工作单位: 湖北省种子管理站, 武汉 430070。

材料。所有供试材料均由华中农业大学农学系棉花育种研究室和山西省农业科学院棉花研究所两单位提供。

1.2 试验方法

(1) 小孢子发育时期的观察: 采用“三酸法”($15\% \text{ CrO}_3$ 、 $10\% \text{ HNO}_3$ 和 $5\% \text{ HCl}$ 按 2 1 1 混合)。蘸 $1\sim 2$ 滴三酸液于载玻片上, 置几枚花药于其中, 用镊子捣碎, 去除残渣, $1\sim 5 \text{ min}$ 后显微镜镜检。

(2) 花药消毒与培养方法: 采用 MS 基本培养基附加其它成分。花蕾取自田间植株, 去除花萼, 保留花冠, 用洗衣粉水液冲洗干净, 在 70% 酒精液中浸泡 1 min 后转至 0.1% 升汞液中消毒 10 min , 无菌冲洗 4 次, 用无菌滤纸吸干表面水分后, 剥出花药并接种于培养瓶中, 每瓶接种 1 颗花蕾的花药, 于 (28 ± 2) 暗培养 1 个月后转至光照培养。

2 结果与分析

2.1 几种因素在花药愈伤组织诱导中的作用

2.1.1 小孢子不同发育时期对花药愈伤组织诱导率的影响

取不同大小的花蕾镜检小孢子发育时期并进行愈伤组织诱导试验, 结果如表 1 所示。

由表 1 可知: $6.1\sim 7.0 \text{ mm}$ 长花蕾中的花药最易诱导产生愈伤组织, 且愈伤组织生长量最大, 此时对应的小孢子处于单核靠边晚期; 其次, $5.1\sim 6.0 \text{ mm}$ 长的花蕾中取出的花药也较易形成愈伤组织。因此认为, 棉花花药培养外植体应以小孢子处单核中晚期的花药为宜。

2.1.2 基因型在花药愈伤组织诱导中的作用

共对 31 份材料进行了比较实验, 诱导率的分布状况见表 2。

由表 2 可知: 在实验条件下, 31 份材料均诱导出愈伤组织, 但诱导率变幅较大。实验发现, 北方棉区品种(如冀棉)愈伤组织诱导较为容易, 诱导率最高为 57.1%; 南方品种略难, 最低诱导率仅 0.7%, 但经继代培养后都增殖形成了相当数量的愈伤组织。可以认为, 棉花花药愈伤组织的诱导相对容易, 2,4-D 是较为理想的生长激素, 高浓度的 2,4-D 配合适量的细胞分裂素能达到预期效果。

表 1 不同发育时期的花药愈伤组织诱导情况(培养天数: 77 天)

Table 1 Callus induction from anthers at different developmental stages (77 d)

花蕾长度 Bud length (mm)	对应的小孢子发育时期 Developmental stage of microspores	接种花药数 Number of inoculated anthers	诱导率 Induction rate (%)	愈伤组织 生长量 Amount of callus
4.0~4.5	四分体	167	16.8	+
4.6~5.0	四分体, 少数为单核中央期	204	28.4	6
5.1~5.5	单核靠边早期	184	33.7	7
5.6~6.0	单核靠边中期	208	32.2	6
6.1~6.5	单核靠边晚期	243	46.5	7
6.6~7.0	单核靠边晚期	181	52.5	8

注(Notes): + 表示愈伤组织极少(+ means little); 6 表示愈伤组织少许(6 means a little); 7 表示愈伤组织较多(7 means more); 8 表示愈伤组织量很大(8 means quantities)

2.1.3 激素在花药愈伤组织诱导中的作用

将 KT+2,4-D、KT+IAA 和 2,4-D+ZT 3 组不同激素组合实验的统计数据转换为图 1。

由图 1 可知: 激素在花药愈伤组织诱导中具有重要作用, 不同的激素组合和浓度水平导致迥然相异的结果。在 KT 水平相同的条件下, 2,4-D 诱导愈伤组织的效果要明显优于 IAA, 且在一定范围内随 2,4-D 浓度的增加, 诱导率明显上升, IAA 只有在较高水平(10 mg/L)时, 才表现出一定的效果; 反之, 较高水平的 KT 亦利于愈伤组织的生成。实验结果还表明: 2,4-D+ZT 激素组合对花药愈伤组织的诱导好

表 2 分布在不同诱导率范围内

的品种数(系)

Table 2 Distribution of induction rate of different varieties(lines)

诱导率 Induction rate (%)	品种(系)数 Number of varieties (lines)	占总品种 (系)数比例 Percent (%)
0.0~10.0	7	22.6
10.1~20.0	5	16.1
20.1~30.0	7	22.6
30.1~40.0	3	9.7
40.1~50.0	8	25.8
50.1~60.0	1	3.2

培养基成分(Media composition):
MS+2,4-D 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L

于2,4-D+KT,较高水平的2,4-D+ZT组合能在短时期内诱导花药生成大量愈伤组织;实验同时证明了不同激素之间的协同作用,单一的激素处理难以诱导愈伤组织形成。

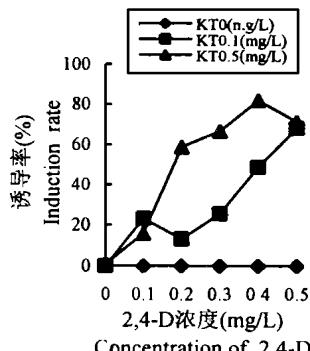


图1a KT+ 2,4-D组合
Fig. 1a Combination of KT with 2,4-D

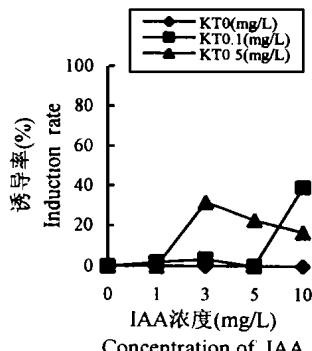


图1b KT+ IAA组合
Fig. 1b Combination of KT with IAA

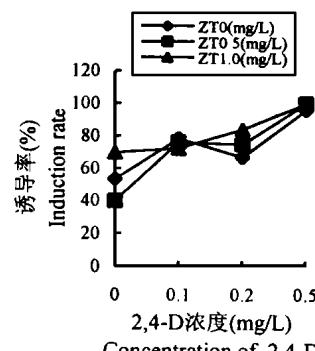


图1c ZT+ 2,4-D组合
Fig. 1c Combination of ZT with 2,4-D

图1 3组激素组合对花药愈伤组织诱导率的影响(培养天数: 70天)

Fig. 1 Effect of different hormone combinations on callus induction from anthers (70 d)

2.1.4 不同碳源及碳源浓度对花药愈伤组织诱导的影响

不同碳源及碳源浓度对花药愈伤组织诱导的结果见图2。

由图2可知: 不同碳源对花药愈伤组织诱导率有

较大影响。当蔗糖浓度为0时, 随葡萄糖浓度的增加, 诱导率呈明显上升趋势, 并达到实验最大值85%; 但在蔗糖存在的条件下, 则随葡萄糖的用量加大, 诱导率反而下降, 葡萄糖浓度越高, 诱导率越低; 反之, 在同一葡萄糖水平下, 随蔗糖浓度升高, 诱导率亦呈下降趋势(蔗糖浓度为0时除外)。这些结果显示, 同时加入蔗糖和葡萄糖作为碳源, 将产生一定的拮抗作用, 花药培养最好选用单一糖分作碳源, 最适条件为蔗糖10 g/L或葡萄糖30 g/L。

2.2 愈伤组织的继代培养

棉花花药愈伤组织的分化一直是困扰该项研究的难题, 本试验试图采用多种措施促进愈伤组织的分化, 但仅发现有少量根器官的分化。

2.2.1 不同KNO₃浓度对愈伤组织继代培养的效应

在继代培养中, 采用较MS基本培养基KNO₃用量增加多倍的培养基发现: 在一定浓度范围内,

表3 不同KNO₃浓度对愈伤组织继代培养的效应
(培养天数: 70天)

Table 3 Effect of KNO₃ concentration on callus subculture (70 d)

项目 Item	不同KNO ₃ 浓度(×MS基本培养基KNO ₃ 用量) Concentration of KNO ₃ (×Content of KNO ₃ in basic MS media)					
	1×	2×	3×	4×	5×	6×
愈伤组织增殖量 Amount of callus	6	7	7	7	6	—

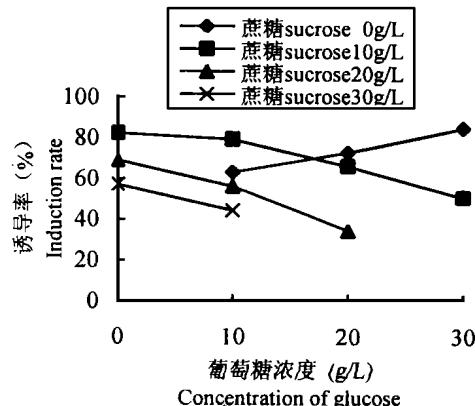


图2 不同糖浓度对花药愈伤组织诱导的影响
(培养天数: 70天)

Fig. 2 Effect of different sugar concentration on callus induction from anthers (70 d)

KNO₃用量的增加有利于愈伤组织的增殖, 但效果并不显著, 且当附加基本培养基6倍KNO₃用量时, 对愈伤组织增殖有明显的抑制作用(表3)。培养过程中, 愈伤组织颜色逐渐由最初

的淡黄色转为淡绿色或绿色。此外, 过高的 KNO_3 用量往往导致愈伤组织褐化, 质地松散。

2.2.2 ABA 和 AgNO_3 对愈伤组织继代培养的影响

ABA 和 AgNO_3 在适当浓度下被认为能促进愈伤组织的分化, 本实验结果表明: 在适量范围内 (ABA 0.1 mg/L, AgNO_3 不大于 2.0 mg/L), 这两种物质均有利于愈伤组织的增殖, 但过高的浓度 (ABA > 0.5 mg/L, AgNO_3 > 2.5 mg/L) 则明显地抑制愈伤组织的生长(表 4)。实验还发现, 过高的浓度导致愈伤组织颜色加深, 直至呈深褐色死亡。实验没有发现愈伤组织分化的迹象。

表 4 ABA 和 AgNO_3 对愈伤组织继代培养的效应

Table 4 Effect of ABA and AgNO_3 on callus subculture

项目 Item	ABA 浓度 (mg/L) Concentration of ABA					AgNO_3 浓度 (mg/L) Concentration of AgNO_3					
	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
愈伤组织增殖量 Amount of callus	8	6	+	—	—	7	6	7	8	7	—

2.2.3 BA NAA 和其它激素对愈伤组织继代培养的影响

实验设置 NAA 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L, BA 浓度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L, ZT 0.1 mg/L, TDZ 1.0 mg/L, 2-ip 0.5 mg/L 等多种处理。在继代培养中发现: NAA 和 BA 在实验所用浓度下均极大地促进了愈伤组织的增殖, 在短时期内增殖形成了大量的愈伤组织, 但愈伤组织质地大多较松散, 呈乳白色; 低于 0.8 mg/L 的 NAA 浓度促成了根的分化, 但数量极少, 实验没有发现有芽的分化; 而 ZT、TDZ 和 2-ip 在愈伤组织继代培养中没有表现出明显的有利作用。

2.2.4 脯氨酸和水解酪蛋白对愈伤组织继代培养的影响

相比而言, 脯氨酸并没有表现出明显的利于愈伤组织生长的作用, 且愈伤组织表面出现水渍现象, 严重地影响了愈伤组织的进一步正常生长; 水解酪蛋白对继代愈伤组织的增殖起到了较为积极的促进作用, 且愈伤组织质地紧密, 但没能进一步分化(表 5)。

表 5 脯氨酸和水解酪蛋白在愈伤组织继代培养中的作用

Table 5 Effect of proline and hydrolyzed casein on callus subculture

项目 Item	脯氨酸浓度 (mg/L) Concentration of proline					水解酪蛋白浓度 (mg/L) Concentration of hydrolyzed casein				
	100	200	300	400	500	200	400	600	800	1 000
愈伤组织增殖量 Amount of callus	7	6	7	7	7	8	大量	大量	大量	大量

2.2.5 不同碳源及碳源浓度对愈伤组织继代培养的影响

实验采用葡萄糖和蔗糖作为碳源, 其浓度设置分别为 20、30、40、50 g/L, 结果发现: 在继代培养中, 以葡萄糖为碳源, 愈伤组织生长状况较差, 蔗糖的效果要明显优于葡萄糖, 最佳浓度为 20 g/L。

2.2.6 愈伤组织脱水 低温预处理及渗透压调节对愈伤组织继代培养的影响

愈伤组织在继代培养前经无菌滤纸吸湿处理、4 预培养 1~7 d 和 90 g/L 山梨醇渗透压调节处理, 结果发现: 脱水处理极大地促进了愈伤组织的增殖, 高渗透压调节则使愈伤组织质地变得明显致密, 呈淡绿色, 但均未能促使愈伤组织进一步分化; 低温预处理未能起到积极作用, 并抑制了愈伤组织进一步的正常培养。

3 讨论

花药培养是指在无菌条件下利用人工培养基对植物花药进行离体培养, 最终再生出单倍体植株的技术。成功的花药培养是供体材料和合适的人工培养基相互作用的结果, 供体材料的基因型和内部生理生化状况是内部因素, 培养基则是重要的外部促进条件。国内外多年的研究结果表明, 虽然影响花药培

养的因素众多,但其中最为关键的两点是基因型和激素^[10, 11],在很多植物的花药培养中,能否再生出单倍体植株首先是由基因型决定,激素的作用是第二位的。本试验结果也支持了这一观点,棉花依然被认为是一种难以从花药培养诱导分化的作物。

棉花花药培养主要存在两个难点:一是单倍体愈伤组织的获得,二是愈伤组织分化,其中前者是基础。在适当的激素作用下,花药愈伤组织的诱导被认为相对容易,并已从包括陆地棉、海岛棉和野生棉等多个棉种(品种)获得大量愈伤组织。解剖学和细胞学研究表明,愈伤组织主要来源于药壁细胞的分裂,愈伤组织中单倍体细胞所占比率极低,且难以分化出再生植株,这方面的研究结果我们将另文发表。如何启动小孢子去分化分裂是解决棉花花药培养的关键所在,因此,在开展花药培养的同时,注重对小孢子的发育调控机理、特异基因诱导表达等因素的研究将有助于这一难题的解决。此外,看护培养技术的应用、棉花小孢子和四分体的原生质体培养等也可能成为新的研究途径。

参 考 文 献

- 1 宋振能. 我国花药培养和单倍体育种研究的成就. 中国科学院院刊, 1988(3): 268~270
- 2 杜鸣銮. 单倍体育种的进展. 农学文摘, 1977(2): 1~5
- 3 鲁黄均. 棉花单倍体育种的现状与展望. 棉花文摘, 1990, 5(2): 7~9
- 4 王海波, 陈奇. 植物细胞工程的回顾与展望. 科技导报, 1993(3): 21~24
- 5 Jerry Barrow, Frank Katternan, Dale Williams. Haploid and diploid callus from cotton anthers, Crop Sci, 1978, 18(4): 619~622
- 6 陈志贤, 李淑君, 焦改丽等. 棉花组织培养与基因工程展望, 山西棉花, 1988(2): 23~28
- 7 张宝红, 李秀兰, 李付广等. 棉属栽培种及其野生种花药愈伤组织诱导与器官分化. 江西农业大学学报, 1993, 15(4): 380~384
- 8 张宝红, 李秀兰, 李凤莲等. 棉花花药培养获得再生植株. 中国农业科学, 1995, 28(5): 95~96
- 9 李秀兰. 棉花花药培养小孢子发育的细胞学观察. 作物学报, 1987, 13(1): 87~89
- 10 吴夫安, 贺增勇, 宋秋玲. 棉花基因型在组织培养中的作用. 中国棉花, 1992, 19(4): 13~15
- 11 陆振鑫. 棉花组织培养和原生质体培养研究的进展. 植物生理学通讯, 1987(3): 7~11