

鲁棉6号体细胞胚胎发生过程及植株再生

张云超 杨细燕 何良荣 李乐斌 周婷 金芳燕 张献龙

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,武汉 430070

摘要 以黄河流域棉花品种鲁棉6号为试验材料,以易再生的棉花品系YZ1为对照,通过不同质量浓度的激素组合成功诱导鲁棉6号产生体细胞胚并发育成苗。结果表明:所用的12种激素组合均能有效诱导出愈伤组织,其中以1.0 mg/L IBA或0.1 mg/L 2,4-D和0.2 mg/L KT组合的诱导效果最佳;愈伤组织继代时培养基中生长素质量浓度减半,KNO₃质量浓度加倍;挑选黄绿色或灰绿色、质地疏松的颗粒状愈伤继代于0.01 mg/L 2,4-D和0.1 mg/L KT或0.1 mg/L IBA且KNO₃用量加倍的培养基中,可在1~2个月内产生胚性愈伤组织,胚性愈伤组织再转到分化培养基上可产生体细胞胚;体细胞胚在1/2 MS培养基中进一步发育成再生小苗。利用该组织培养再生系统,鲁棉6号和YZ1都能在6~8个月内成功获得再生植株。组织学观察表明,IBA处理下鲁棉6号胚性愈伤组织细胞主要来源于棉花下胚轴初生形成层的细胞。

关键词 棉花; 体细胞胚胎; 激素; 植株再生; 组织学观察

中图分类号 S 562.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0022-06

体细胞胚胎发生是指离体植物细胞在适宜的条件下培养,进行脱分化和再分化,产生胚性愈伤组织,经历球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚并发育成一个新个体的形态发生过程。体细胞胚发生是细胞全能性的重要体现,自从Steward等^[1]和Reinert^[2]分别从胡萝卜愈伤细胞中获得体细胞胚以来,目前已在许多作物中获得了体细胞胚胎发生。棉花是世界上主要的经济作物之一,在发展国民经济和改善人们生活中起着重要作用,以体胚发生为基础的棉花遗传转化在棉花生产中产生了巨大的经济效益,因此,棉花体细胞胚胎发生及相关研究将极大地推动棉花的遗传改良与转化,同时对于拓宽棉花种质资源和培育棉花品种具有重要意义^[3]。自1983年Dvidonis等^[4]首次在培养2年多的陆地棉“珂字310”愈伤中获得体细胞再生植株以来,虽然已在大量棉花品种中获得了体细胞胚和再生植株^[2~11],但仍限于珂字棉系列、中棉所系列、鲁棉等品种^[5]。棉花体细胞胚胎发生和植株再生过程受很多因素影响,张献龙等^[6]认为基因型是决定棉花体细胞胚胎发生及植株再生的重要因素,现有研究也表明棉花组织培养和体细胞胚胎发生体系中存在严重的基因

型限制^[7~8],即不同棉花品种间体细胞胚胎发生和植株再生能力存在差异。拓宽棉花体胚发生的基因型一直是研究者努力的方向,在大量的筛选工作中,也获得了少量高体胚发生能力的材料^[9~11];除基因型外,激素是成功诱导体细胞胚胎发生的决定因素,也是影响胚状体高频率诱导的主要因素^[10]。除此之外,外植体类型及生理状态、培养基种类、培养条件等^[12]都会影响棉花的再生。

虽然已有多个棉花品种再生成功,但对培养中愈伤组织的形成、来源等问题仍存在争议。通过对体细胞胚胎发生过程中愈伤组织的跟踪观察,可以为其来源提供线索。张献龙等^[6]利用愈伤组织活体压片、石蜡包埋切片、悬浮细胞系活体压片等多种方法追踪了陆地棉单个胚性细胞到成熟胚的整个过程,发现体细胞胚胎发生具有多种途径。既有单细胞途径,又有多细胞途径;既有内起源途径,又有外起源途径。张宝红等^[13]通过扫描电镜也得到类似的结果,此后大量报道都表明体细胞胚胎发生具有多种起源途径。本试验在前人研究的基础上以鲁棉6号为材料,优化鲁棉6号体细胞胚胎发生再生体系;同时利用组织切片观察追溯体细胞胚的起源,为

利用体细胞胚胎发生建立农杆菌介导的棉花高效遗传转化体系提供相应的技术和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

棉花品种鲁棉6号由中国农业科学院棉花研究所提供,经自交保纯3代后收获的种子用作试验材料。同时以笔者所在实验室提供的YZ1为品系对照。

1.2 试验方法

种子去壳后,种仁在0.1%的HgCl₂消毒8~10 min,无菌水洗4次,接种于无菌苗培养基(1/2 MS大量元素+15 g/L葡萄糖+2.5 g/LPhytogel),于(28±1)℃下暗培养6 d左右,获得无菌苗。取无菌苗下胚轴5~7 mm,平放于CIM(callus induction medium)愈伤组织诱导培养基。CIM培养基由MS无机盐+维生素B₅(以下简称MSB)+葡萄糖30 g/L+Phytogel 12.5 g/L组成,辅以不同组合的IBA、KT和2,4-D(表1),每种组合的培养基接种20份下胚轴切段。培养30 d后,称取愈伤组

织质量,并挑选黄绿色的愈伤组织转入MSBP培养基(基本组成与CIM相同,2,4-D和IBA质量浓度减半,KNO₃加倍)进行增殖培养,按照激素组合,此培养基可分为MSBP-D和MSBP-B两类。所有的愈伤组织在MSBP-D上继代培养1次,在MSBP-B上继代培养2次,而后挑选分化出黄绿色愈伤组织继代于ECM培养基(基本组成与MSBP培养基相同,附加IBA、KT和2,4-D,表2),每30 d继代1次,直至胚胎发生,并统计最早出现胚性愈伤时间,即最早分化时间。

挑选新鲜、黄绿色、颗粒状的胚性愈伤组织继代于分化培养基(与MSBP培养基相同,附加0.5 mg/LIBA和0.15 mg/LKT,及谷氨酰胺1.0 g/L和0.5 g/L天冬酰胺)完成体细胞胚的发生、发育和成熟。挑选成熟正常的体胚于1/2 MS培养基,即可萌发成苗。正常的再生苗高达5~7 cm,具有5片以上真叶,根系比较好的可以用于移栽。所用培养基pH均为5.85~5.95,并以121℃高压灭菌12 min。

表1 愈伤组织诱导培养基的组成

Table 1 Composition of callus induction medium

愈伤组织诱导培养基 Callus induction medium	2,4-D/(mg/L)	KT/(mg/L)	愈伤组织诱导培养基 Callus induction medium	IBA/(mg/L)	KT/(mg/L)
CIM-D1	0.10	0.00	CIM-B1	1.0	0.00
CIM-D2	0.10	0.05	CIM-B2	1.0	0.25
CIM-D3	0.10	0.10	CIM-B3	1.0	0.50
CIM-D4	0.10	0.15	CIM-B4	1.0	0.75
CIM-D5	0.10	0.20	CIM-B5	1.0	1.00
CIM-D6	0.00	0.10	CIM-B6	0.0	0.50

1.3 组织学观察

挑选在CIM-B1和MSBP-B1上培养了5、10、15、40和60 d的外植体进行组织学观察。室温条件下FAA固定液固定,常规石蜡切片程序切片(抽真空→逐级乙醇脱水→逐级乙醇透明→浸蜡→石蜡包埋)^[14],下胚轴横切,切片厚度9 μm;蛋清甘油粘片,二甲苯脱蜡,透明,甲苯胺蓝染色,加拿大树胶封片,显微镜(Axios cope A1, Zeiss, Germany)观察并照相。

表2 诱导体细胞胚胎发生的ECM培养基

Table 2 ECM medium for induction of embryogenic

calli and embryos

培养基 Medium	2,4-D/ (mg/L)	KT/ (mg/L)	IBA/ (mg/L)
ECM-D3	0.01	0.05	0.00
ECM-D5	0.01	0.10	0.00
ECM-B1	0.00	0.00	0.10
ECM-B5	0.00	1.00	0.10

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

下胚轴切段在CIM愈伤组织诱导培养基上培养5 d后,下胚轴外植体开始膨大并产生假根,1周后可以看到愈伤组织发生。结果表明12种激素组合均能诱导愈伤组织(图1A-C),但愈伤组织诱导率及须根率在不同激素组合及不同品种间有差别,最高诱导率可达100%,最低仅有65%(表3)。当使用单独添加KT的CIM培养基时,愈伤组织的质地比较坚硬,颜色呈绿色或白色粉末状(图1A);用添加仅含IBA或IBA和KT组合的CIM培养基诱导的愈伤组织都有假根发生,而2,4-D、KT组合的CIM培养基则没有(图1B、C)(表3)。不同激素组合诱导的愈伤组织状态有明显的表观差别(表3)。

产生的愈伤组织按颜色和质地可分为2种类型,类型一:颜色从灰绿色、黄绿色到黄褐色,质地比较疏松、颗粒状、无硬化;类型二:颜色绿色或灰白色,质地比较致密。综合考虑诱导率、颜色和质地结果,表明大多数激素组合都适于诱导愈伤组织。

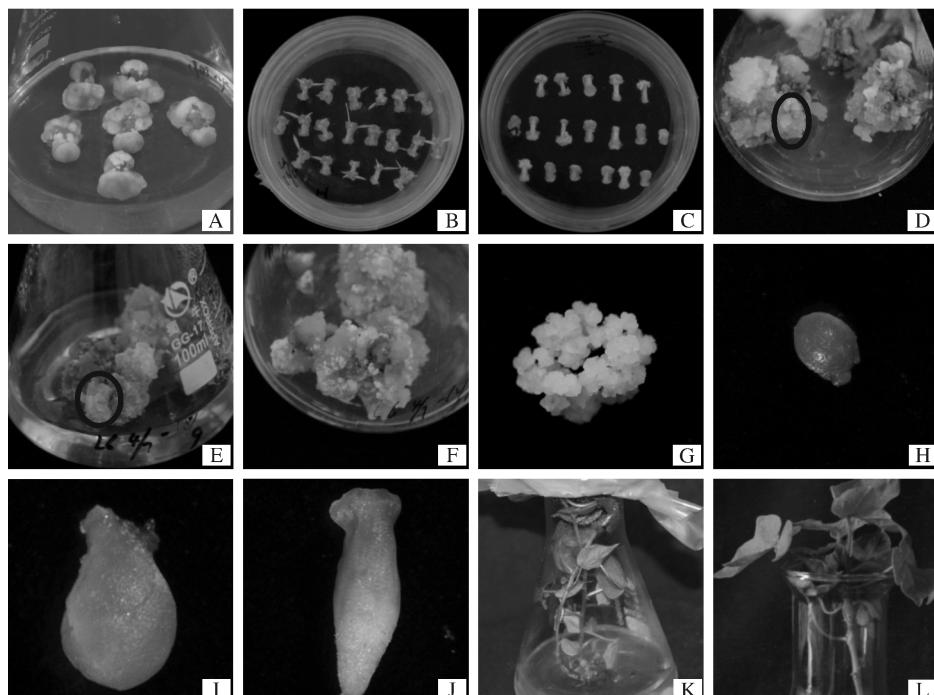
2.2 愈伤组织的增殖及胚胎发生的诱导

在愈伤组织生长30 d时,称取在CIM培养基上用不同激素组合诱导的愈伤质量,计算单块愈伤质量,并观察愈伤颜色和质地(表3)。愈伤组织的质地与增殖关系密切。质地致密、绿色或白色的愈伤组织增殖比较慢,在继代时应予以淘汰。挑选类型一愈伤组织继代培养于MSBP培养基,继代培养1~2次后,继续挑选黄绿色的愈伤组织于ECM培养基,观察愈伤组织的分化情况(表3),继代于MSBP培养基上的YZ1愈伤组织分化较快,最早分化时间为50 d。其他未分化的愈伤组织于ECM培养基上继代1~2次后,可获得不同状态的愈伤组织,其中培养于CIM-D5和CIM-B1上的愈伤组织,

经生长素减半的MSBP-D5、MSBP-B1上继代培养1~2次后,挑选类型一愈伤组织继代于ECM-D5和ECM-B1,分别在第82天和第97天可观察到体细胞胚胎发生(图1D、E)。而其他ECM培养基上的愈伤组织均出现不同程度的褐化或转化成绿色硬化的愈伤组织(图1F)。因此,适宜的激素质量浓度是诱导体细胞胚胎发生的关键。

2.3 体细胞胚的成熟和植株再生

挑选新鲜、黄绿色、颗粒状的胚性愈伤组织(图1G)至MSBF培养基,促进胚的成熟,经1~2次选择继代后,这些胚性愈伤组织逐渐形成球形、鱼雷型、子叶型等胚状体(图1H~J),挑选状态正常的体胚至1/2MS上,经1~2次继代后,可获得根、子叶、真叶等完整再生植株(图1K)。当再生植株长至5~7 cm、具有5片以上真叶时,解开套在封口膜上的橡皮筋,维持2~4 d后完全解开,让幼苗完全暴露于空气中3 d左右(图1L),取出幼苗,冲掉根部的培养基,移栽于温室。



A:在添加KT的CIM培养基上产生的深绿色、质地坚硬的愈伤组织 Dark green, hard calli on media with single KT hormone; B:在添加IBA和KT的CIM培养基上黄绿色、有假根出现的愈伤组织 Kelly green, with rhizoid calli with IBA/KT combination; C:在添加2,4-D和KT培养基上产生的的亮黄色愈伤组织 Pale yellow calli with 2,4-D/KT; D-E:MSBP或ECM培养基上愈伤组织局部发生胚胎(圆圈所示) Sporadic embryos present (ellipse showed) on MSBP or ECM medium; F:ECM培养基上产生的深绿色、质地坚硬的块状愈伤组织 Dark green, hard massive calli on ECM medium; G:ECM培养基上的胚性愈伤组织 Embryogenic calli on ECM medium; H-J:不同时期的胚 Different periods of embryo; K-L:1/2 MS培养基上的再生苗 Regenerated plants on 1/2 MS medium.

图1 鲁棉6号体细胞胚胎发生和植株再生

Fig. 1 Somatic embryogenesis and plant regeneration of Lumian 6

表3 不同激素组合对愈伤组织的诱导效应¹⁾

Table 3 Effect of the hormone combination on callus induction

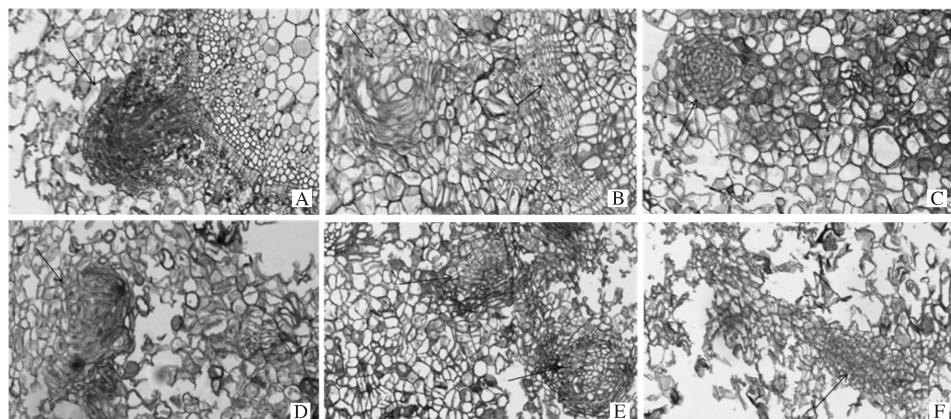
培养基 Medium	出愈率/% Calli	鲁棉6号 Lumian 6			YZ1		
		愈伤组织特征 Characteristics of calli	单块愈伤均质量/g Weight of single callus	最早分化时间/d The day regeneration	愈伤组织特征 Characteristics of calli	单块愈伤均质量/g Weight of single callus	最早分化时间/d The day regeneration
CIM-D1	100	浅黄色,颗粒	0.55±0.11	—	100	浅黄色,颗粒	0.51±0.10
CIM-D2	100	浅黄色,颗粒	0.54±0.09	—	100	浅黄色,颗粒	0.45±0.10
CIM-D3	100	浅黄色,颗粒	0.55±0.06	—	100	黄绿色,颗粒	0.47±0.09
CIM-D4	90	浅黄色,颗粒	0.50±0.12	—	100	浅黄色,颗粒	0.44±0.05
CIM-D5	100	浅黄色,颗粒	0.55±0.06	82	100	浅黄色,颗粒	0.38±0.05
CIM-D6	100	绿色,致密	0.31±0.08	—	100	绿色,致密	0.29±0.09
CIM-B1	100	黄绿色,颗粒	0.53±0.10	97	100	黄绿色,颗粒	0.40±0.12
CIM-B2	100	浅黄色,块状	0.47±0.11	—	100	黄绿色,颗粒	0.36±0.06
CIM-B3	100	灰色,疏松块状	0.46±0.10	—	100	黄绿色,颗粒	0.37±0.07
CIM-B4	100	绿色,致密	0.38±0.07	—	80	黄色,颗粒	0.32±0.08
CIM-B5	100	黄绿色,颗粒	0.52±0.09	—	100	黄色,颗粒	0.35±0.13
CIM-B6	65	灰白色,致密	0.27±0.06	—	65	灰白色,致密	0.28±0.07

1)“—”表示无胚状体 “—” shows no embryo.

2.4 IBA 处理下体细胞胚胎发生的组织学观察

为了观察鲁棉6号愈伤组织的来源,将下胚轴外植体横切培养于CIM-B1培养基上,30 d后继代培养于MSBP-B1培养基上。观察结果显示,外植体在诱导处理5 d后,鲁棉6号的表皮细胞和薄壁细胞开始降解,初生形成层的细胞在特定的部位进行分裂,有的在4个点形成两两对称辐射状的突起,此时仍然可以明显地观察到外植体的次生木质部、次生韧皮部及导管细胞(图2A),形成层处有细胞结构致密、细胞核比较大、体积较小、排列紧密的胚性细胞团形成(图2)。诱导培养15 d时,更多的次生

结构得到进一步发育,其中有一部分次生结构随细胞分裂被推挤到愈伤组织的表面,形成层处细胞呈现出排列致密、细胞核明显、体积较小的细胞群(图2),且可以观察到鲁棉6号外植体表面或内部出现零星的胚性细胞或细胞团(图2C、D)。诱导培养40 d时,可观察到较多胚性细胞团和一些网状次生结构同时存在于愈伤组织的表面(图2E),这些胚性细胞团是来源于形成层急剧分裂而成的细胞团被推挤到外的胚性细胞分裂产生的。随后,这些胚性愈伤组织细胞迅速扩增,扩大愈伤组织区域(图2F),最后推挤到愈伤组织表面形成肉眼可辨的胚性愈伤组织。



A:鲁棉6号诱导第5天下胚轴横切面 Transverse section of hypocotyls that Lumian 6 on the 5th day of induction respectively; B-C:鲁棉6号诱导第10天下胚轴横切面 Transverse section of hypocotyls that Lumian 6 on the 10th day of induction; D-E:分别为鲁棉6号诱导第15天和第40天时下胚轴横切面 Transverse section of hypocotyls that Lumian 6 on the 15th and 40th days of induction; F:第60天时鲁棉6号沿不同方向分裂形成的胚性愈伤组织 Embryogenic calli of Lumian 6 from embryonic cells dividing at different plates on the 60th day of induction.

图2 鲁棉6号体细胞胚胎发生过程的组织学观察

Fig. 2 Histological observation of somatic embryogenesis of Lumian 6

3 讨 论

12种激素组合的培养基均能诱导鲁棉6号早期脱分化产生非胚性愈伤组织,通过对鲁棉6号和对照YZ1愈伤分化诱导结果来看,不同基因型对激素质量浓度及激素组合的适应性有所不同。除CIM-B1和CIM-D5外,其他培养基组合均不能诱导鲁棉6号发育到胚性愈伤;对照YZ1在多种激素组合或单独使用生长素的培养条件下愈伤诱导较好,且胚胎发生较快,但在仅有KT的诱导培养基上愈伤容易硬化,胚胎发生停滞。鲁棉6号在0.05 mg/L 2,4-D和0.1 mg/L KT下分化速度比较快,但在后期这种愈伤组织增殖迅速,继代时应予以淘汰,从愈伤组织的颜色和质地来判断愈伤的质量和能否进行分化,这与前人的研究^[15]基本一致。

本试验从愈伤组织分化到植株再生过程均采用KNO₃用量加倍的策略促进胚胎发生^[16],在愈伤增殖的过程中降低外源激素的质量浓度,主要是为了减少对内源激素的影响从而造成体细胞胚胎发生延迟。在胚性愈伤组织出现后,添加IBA和KT可以促进胚萌发,同时还添加了谷氨酰胺和天冬酰胺,为胚萌发提供营养,促进胚成熟的同时减少畸形苗的产生^[17]。

2,4-D是体胚发生的重要激素^[18-20],高质量浓度KT与低质量浓度IBA也有利于诱导胚性愈伤组织^[19]。但本研究发现单独使用生长素IBA也可以诱导鲁棉6号胚胎发生,这在棉花中没有类似报道。0.01 mg/L 2,4-D和0.1 mg/L KT组合下可以诱导鲁棉6号的体胚发生,和张家明等^[20]报道类似,但是在愈伤组织诱导和增殖阶段的2次培养中,所用的激素组合不同,第3次继代时继续降低2,4-D质量浓度,能够有效地诱导胚胎发生,因此KT与2,4-D的适宜质量浓度比例有利于诱导棉花胚胎发生。当再生苗长到5片以上子叶时,采用逐步揭膜、最后敞口炼苗的方法,使再生苗逐步适应外界环境,然后移栽入土。应用此法,6~8个月内即可获得两份材料的再生植株。

植物离体体细胞胚的细胞起源是植物胚胎学、发育生物学和细胞遗传学等研究的重要内容。目前针对不同的作物有不同的观点,但主要有2种:一种认为发生于胚性愈伤组织的表面,另一种认为发生于胚性愈伤组织的内部^[6]。我们在研究中发现,鲁棉6号体细胞胚主要起源于愈伤组织内部形成层的细胞。

参 考 文 献

- [1] STEWARD F C, MAPES M O, MEARS K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells[J]. Am J Bot, 1958, 45: 705-708.
- [2] REINERT J. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten[J]. Naturwissenschaften, 1958, 43: 344-345.
- [3] 张献龙,孙玉强,吴家和,等.棉花细胞工程及新品种创造[J].棉花学报,2004,16(6):368-373.
- [4] DAVIDONIS G H, HAMILTON R H. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Plant Science Letters, 1983, 32: 89-93.
- [5] 谢德意,金双侠,郭小平,等.棉花胚性愈伤组织的转化及转基因胚状体的有效萌发与成苗技术研究[J].作物学报,2007,33(5):751-756.
- [6] 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.
- [7] 迟吉娜,马峙英,张桂寅.中国棉花体细胞植株再生的基因型分析[J].分子植物育种,2005,3(1):75-82.
- [8] 顾冉冉,薛金教,袁英歌,等.棉花高频体细胞胚胎发生及再生体系建立[J].生物技术通报,2010(8):145-149.
- [9] JIN S X, ZHANG X L, NIE Y C, et al. Identification of a novel elite genotype for *in vitro* culture and genetic transformation of cotton[J]. Biol Plantarum, 2006, 50(4): 519-524.
- [10] 张宝红,刘方,刘志红,等.棉花优良品种中棉所19高频体细胞胚胎发生细胞系筛选与植株再生[J].作物学报,2000,26(2):239-242.
- [11] 李雪林,王翠玲,孟超敏.高频体细胞胚胎发生的优异棉花种质材料筛选[J].分子植物育种,2012,10(6):683-688.
- [12] 武秀明,刘传亮,张朝军,等.棉花体细胞胚胎发生的研究进展[J].植物学通报,2008,25(4):469-475.
- [13] 张宝红,刘方,姚长兵,等.棉花组织培养体细胞胚胎发生的扫描电镜观察[J].作物学报,1999,22(1):9-12.
- [14] 刘春明,姚敦义.陆地棉体细胞胚胎发生及其细胞组织学研究[J].植物学报,1991,33(5):378-384.
- [15] TROLINDER N L, GOODIN J R. Somatic embryogenesis in cotton. II. Requirements for embryo development and plant regeneration[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1988, 12: 43-53.
- [16] KUMAR S, PENTAL D. Regeneration of Indian cotton variety MCU-5 through somatic embryogenesis[J]. Curr Sci, 1998, 74: 538-540.
- [17] TROLINDER N L, GOODIN J R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Plant Cell Rep, 1987, 6: 231-234.
- [18] ZHANG B H, LIU F, YAO C B. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2000, 60: 89-94.

- [19] WU J H, ZHANG X L, NIE Y C, 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 Dev Biol Plant*, 2004, 40: 371-375.
- [20] 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.

Histological analysis of somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gossypium hirsutum* Lumian 6

ZHANG Yun-chao YANG Xi-yan HE Liang-rong LI Le-bin
ZHOU Ting JIN Fang-yan ZHANG Xian-long

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract An efficient somatic embryogenesis system was developed to regenerate plantlets from hypocotyls of upland cotton cultivars Lumian 6 (*Gossypium hirsutum* L.). The cultivar Lumian 6 was cultivated in North China, the same cotton planting region as YZ1, an easy-going genotype somatic embryogenesis. Calli were produced on the medium with twelve different hormone regimes, the hormone regimes 1.0 mg/L IBA only or 0.1 mg/L 2,4-D together with 0.2 mg/L KT were the best for inducing calli from Lumian 6. After about 4 weeks, the peripheral cultures were separated from explants and transferred to fresh MS medium with half auxin and doubled KNO₃. After two to three subcultures (30 days intervals), friable, yellow-green or grey-green embryogenic cultures and somatic embryos was effectively observed in ECM media with low concentration of auxin (0.01 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L KT or 0.1 mg/L IBA only). After being transferred to the media for differentiation and embryo-germination, somatic embryos were produced and further developed. The two varieties can regenerate plantlets in 6-8 months using the protocols mentioned above. Histological observation demonstrated that the majority of embryogenic calli originated in a familiar way in the two genotypes and proved that the cells from primary cambium cells were the original cells for forming cotton embryogenic calli.

Key words cotton (*Gossypium hirsutum* L.); somatic embryo; hormone; plant regeneration; histological observation

(责任编辑:张志钰)