

陆地棉原生质体培养与植株再生

吕复兵 张献龙 刘金兰

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘 要 以陆地棉品种“珂字 201”为材料, 比较了 IAA + KT 和 2, 4-D + KT 在愈伤诱导和悬浮培养中的效应, 结果表明, 愈伤组织诱导中, IAA 和 2, 4-D 表现为正效应, 且 2, 4-D 的效应强于 IAA; KT 表现为负效应; 胚性愈伤悬浮培养中, 3 种激素都表现出负效应。以胚性细胞悬浮系为材料进行了原生质体的分离和培养试验, 分离原生质体的最佳酶组合为纤维素酶(Onozuka R10) 3% + 果胶酶(Pectinase) 1.5%, 原生质体培养的最佳激素组合为 IAA 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L, 适当提高原生质体密度有利于原生质体培养。光照, 温度等物理因素对原生质体培养也有明显影响。原生质体再生的愈伤组织直接在无激素的悬浮培养基中增殖, 很快获得了大量胚性愈伤组织, 经分化培养再生出植株。

关键词 陆地棉 原生质体培养 植株再生

细胞工程和基因工程在作物遗传改良中有重要潜在用途。作物改良方面的许多问题用有性杂交及常规育种方法已无法解决, 细胞工程和基因工程技术在某些方面可以克服传统手段的不足。很多遗传操作技术是借助原生质体实现的, 因此, 原生质体培养是细胞工程和基因工程的基础工作。棉花组织培养已有 20 多年的历史。愈伤组织诱导, 体细胞胚胎发生与植株再生在某些品种上相继取得成功^[1, 2]。最近, 棉花原生质体培养成株有几篇报道^[3, 4, 10], 与体细胞培养相比, 棉花原生质体培养方法尚不够成熟。为了进一步进行棉花原生质体融合及转基因等遗传操作研究, 原生质体培养程序化是很有必要的。本文报道了我们在这方面研究结果。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织诱导, 继代和细胞悬浮培养

选用陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.) 品种“珂字 201”, 种子剥去种皮, 种仁用 0.1% 升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 4 次, 在含 MS 大量元素和 2% 蔗糖的琼脂培养基上发芽 4~6 d, 取下胚轴剪成 0.5 cm 小段作外植体进行愈伤组织诱导。诱导出的愈伤组织继代培养 3 个月, 取胚性愈伤组织在无激素的 MS (MS 培养基 + 葡萄糖 30 g/L + 肌醇 100 mg/L, pH 5.8) 液体培养基上悬浮培养 7 d 后, 用 30 目网过滤, 网下物用来作悬浮培养试验。

愈伤诱导试验的基本培养基为 MS + 琼脂 7.5 g/L。

诱导出的愈伤组织的继代培养基为 MS + IAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + 琼脂 7.5 mg/L,

悬浮培养试验的基本培养基为 MS。

愈伤组织诱导和悬浮培养试验中附加激素的浓度水平见表 1,按二元一次回归正交设计进行组配^[5]。

在愈伤诱导试验中,每处理接种 5 个外植体,重复 3 次,诱导 1 个月后称愈伤鲜重。在悬浮培养试验中,每处理接种 2 ml 30 目网下物,培养 20 d 后称鲜重。

1.2 原生质体分离条件的探索

纤维素酶(Onozuka R10)和果胶酶(Pectinase)混合物用 CPW9 溶解,附加 MES3 mmol, pH5.8。取在无激素的 P1 培养基^[6]上继代后 7 d 的胚性悬浮物以 1 : 10(W : V)的量加入经过滤灭菌的混合酶液中,在 28 ℃ 的摇床上(30 ~ 50 r/min)黑暗消化 12 h 后在显微镜下用血球计数板检测原生质体产率,并用 FDA 染色后在荧光显微镜下检测原生质体活力。原生质体产率以每克愈伤所产生的原生质体个数表示。原生质体活力为发荧光原生质体数占总原生质体数的比率。

1.3 原生质体培养条件的探索

经酶解处理的原生质体用 140 和 400 目双层不锈钢网过滤除去残渣,再将滤液 1000 r/min 离心 5 ~ 10 min,沉淀物用 CPW9 溶液清洗一次后用 23% 的蔗糖漂浮纯化,再用原生质体培养基清洗一次即获得纯净的原生质体。在 28 ℃ 液体浅层暗培养,原生质体基本培养基为 K3 无机物+改良的 KM8P 有机物+葡萄糖 30 g/L+甘露醇 90 g/L^[3],培养 1 个月后统计肉眼可见的小愈伤块数。

1.4 原生质体再生的愈伤组织的增殖和分化

原生质体再生出肉眼可见的小愈伤块后,添加 1 次无甘露醇的原生质体培养基,培养一段时间后将原生质体再生的愈伤块吸出直接转入无激素的 P1 培养基悬浮扩增。然后按我们的方法^[1]促进大量胚的形成、胚成熟和植株再生。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导和胚性细胞悬浮培养中激素效应

2.1.1 愈伤组织诱导 接种后 10 d,在 IAA+KT 组合处理下,外植体产生了愈伤组织,出愈率几乎为 100%;而在 2,4-D+KT 组合处理下,出愈时间落后于 IAA+KT 组合。但一旦出愈后 2,4-D+KT 处理中愈伤生长速度明显快于 IAA+KT 处理。无论在 IAA+KT 还是在 2,4-D+KT 中,愈伤组织都是首先从下胚轴切段两端诱导出,然后向中部蔓延,并表现出形态学下端愈伤生长速度显著高于形态学上端的愈伤生长速度。在 IAA+KT 处理中外植体普遍表现生根现象,而 2,4-D+KT 处理中无生根现象。外植体生根受 IAA 控制,而与 KT 无关,且 IAA 为 0.5 mg/L 时根总量和出根率(生根的外植体占总外植体的比率)都为最大,在所试浓度中 IAA 浓度或高或低,根量都减少。

在 IAA+KT 组合处理中,愈伤鲜重 $y_{IK}(g)$ 和 IAA 浓度 $x_1(mg/L)$ 及 KT 浓度 $x_2(mg/L)$

表 1 愈伤诱导和胚性愈伤悬浮培养试验的激素水平

水平	IAA+KT 组合(mg/L)		2,4-D+KT 组合(mg/L)	
	IAA	KT	2,4-D	KT
1	0.1	0.05	0.005	0.05
2	2.0	1.0	0.05	1.0

之间的回归方程为 $y_{IK} = 0.905 + 0.2575x_1 - 0.1x_2$, 由此回归方程可看出 IAA 对愈伤诱导表现为正效应, 而 KT 表现为负效应。同样, 在 2, 4-D+KT 处理中, 也可得回归方程 $y_{DK} = 1.0075 + 0.4825x_1 - 0.245x_2$, 可看出 2, 4-D 对愈伤诱导表现为正效应且其作用效果强于 IAA, 而 KT 表现为负效应。因此愈伤诱导中起决定作用的是生长素 (IAA 或 2, 4-D), 这与我们以前的结论一致^[7]。

2.1.2 悬浮培养 选取 IAA+KT 组合中诱导的愈伤组织在附加 IAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 的培养基上继代培养 3 个月。这时愈伤组织由原来的稀泥状或硬块状形成大量的疏松颗粒状、米黄色的胚性愈伤组织。选取胚性愈伤组织在 MS 培养基上悬浮培养几代后 (每 10 d 继代一次), 黄色加深, 分散出大量细小颗粒。30 目网下的黄色胚性颗粒在 IAA+KT 和 2, 4-D+KT 两组合处理中表现出相同的颜色分离, 即在高浓度 KT (1 mg/L) 中为灰白色, 活力下降, 甚至丧失活力, 而在低浓度 KT (0.05 mg/L) 中黄色稍微变淡, 但仍保持胚性愈伤的活力。IAA 和 2, 4-D 对胚性愈伤的颜色影响不大。

在 IAA+KT 处理中, 悬浮物鲜重 $Z_{IK}(\text{g})$ 和 IAA 浓度 $x_1(\text{mg/L})$ 及 KT 浓度 $x_2(\text{mg/L})$ 之间的回归方程为 $Z_{IK} = 0.2375 - 0.0275x_1 - 0.1025x_2$, 由此回归方程可看出 IAA 和 KT 均不利于悬浮物生长, IAA 抑制作用微小, 而 KT 的抑制作用显著强于 IAA, 这与上述颜色变化一致。在 2, 4-D+KT 组合中, 回归方程为 $Z_{DK} = 0.2125 - 0.0125x_1 - 0.0925x_2$, 2, 4-D 和 KT 对悬浮培养物均有抑制作用, 2, 4-D 的作用微小, KT 的抑制作用显著强于 2, 4-D, 亦与上述悬浮培养物颜色变化一致。

2.2 原生质体分离的酶组合确定

2.2.1 纤维素酶的作用 由表 2 可知, 当果胶酶为 1% 时, 纤维素酶的浓度小于 3% 时, 随着浓度的增加原生质体产率升高且活力变化不大。当纤维素酶的浓度大于 3% 时原生质体产率减少, 活力下降很明显。只有果胶酶时尽管产率较低, 但仍得到了原生质体, 可能是由于果胶酶中含有少量纤维素酶的缘故。处

理 1 含有没去壁的细胞和细胞团, 不便统计原生质体活力; 处理 5 与处理 6 由于 FDA 染色后原生质体只发微弱荧光, 表明其活力受到了极大的影响, 统计活力也没意义。

2.2.2 果胶酶的作用 由表 3 看出, 当纤维素酶的浓度为 3% 时提高果胶酶的浓度可以大幅度提高原生质体产率, 但当果胶酶的浓度大于 1.5% 时原生质体产率和活力开始下降, 故最佳果胶酶浓度为 1.5%, 单独使用纤维素酶得不到单细胞。当果胶酶浓度为 0.5% 时有原生质体游离, 但含有没去壁的细胞, 故处理 1 和处理 2 测原生质体活力无意义。

综上所述, 最佳酶组合为 3% 纤维素酶+ 1.5% 果胶酶, 此组合就可以使细胞完全去壁并

表 2 纤维素酶对原生质体产率和活力的影响

处理	果胶酶 (%)	纤维素酶 (%)	原生质体产率 (个/g)	原生质体活力 (%)
1	1	0	4.82×10^5	—
2	1	1	4.71×10^6	86.4%
3	1	2	6.58×10^6	85.2%
4	1	3	7.0×10^6	84.0%
5	1	4	5.0×10^6	—
6	1	5	5.0×10^6	—

表 3 果胶酶对原生质体产率和活力的影响

处理	果胶酶 (%)	纤维素酶 (%)	原生质体产率 (个/g)	原生质体活力 (%)
1	0	3	0	—
2	0.5	3	3.16×10^6	—
3	1.5	3	1.66×10^7	85.7
4	3.0	3	1.08×10^7	78.6

得到较高质量的原生质体。在以往的棉花原生质体分离研究中都附加了半纤维素酶,而 Peeters 等没有用半纤维素酶^[10]。为了确保原生质体完全去壁我们在以下的原生质体培养中采用 3% 纤维素酶+ 1.5% 果胶酶+ 0.5% 半纤维素酶。

2.3 原生质体密度和激素等因素对愈伤再生的影响

2.3.1 原生质体培养密度的影响

培养基为原生质体基本培养基附加 2,4-D 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L, 设置不同的密度处理进行试验, 结果列于表 4。由表 4 可知在一定范围内, 高密度有利于原生质体培养。

2.3.2 激素的影响 原生质体密度均为 3.8×10^5 个/mL, 设置不同的激素组合进行试验, 结果列于表

5、表 6 和表 7。由表 5 可知最佳 IAA 浓度为 0.5 mg/L。

表 6 2,4-D 对小愈伤再生的影响			
激素	处 理		
	1	2	3
KT (mg/L)	0.05	0.05	0.05
2,4-D (mg/L)	0.01	0.05	0.25
小愈伤块数/皿	4	0	0
愈伤长势	+		

表 7 KT 对小愈伤再生的影响			
激素	处 理		
	1	2	3
KT (mg/L)	0.01	0.1	0.5
IAA (mg/L)	0.5	0.5	0.5
小愈伤块数/皿	35	83	52

结合表 6 和表 4 看出, 低密度($< 10^6$ 个/mL) 条件下, 2,4-D 难诱导棉花原生质体再生愈伤。在棉花原生质体培养中 2,4-D 的适用浓度范围比 IAA 的窄, 这与在体细胞培养中一致^[7]。

最佳 IAA 浓度不变, 研究了 KT 的作用, 结果见表 7。从中可知最佳 KT 浓度为 0.1 mg/L。

综上所述, 棉花原生质体培养的最佳激素组合为 IAA 0.5 mg/L + KT 0.1 mg/L。

2.3.3 光、温等因素对棉花原生质体培养的影响

28 时分别在光和暗处培养原生质体。在光下, 原生质体可多次分裂形成小细胞团, 但小细胞团没有进一步分裂生长成肉眼可见的愈伤块。而在黑暗下, 原生质体可再生小愈伤块。低温下(20), 原生质体可再生壁, 但分裂迟缓。而高温(35) 导致原生质体死亡。

2.4 壁再生、细胞分裂、增殖和植株再生

胚性悬浮物酶解 2 h 左右即有原生质体从边缘游离, 12 h 左右彻底酶解。新分离的原生质体呈球形, 大小之间有差异, 细胞质稠密, 呈黄褐色。液体浅层培养一段时间后发生粘连, 随后壁再生。再生壁的原生质体呈椭圆形或不规则形状, 4~5 d 后发生第一次分裂, 此后细胞便持续分裂, 培养 7 d 左右可观察到小细胞团。小细胞团继续分裂生长形成小愈伤组织, 并进一步形成结构紧实的小胚性愈伤组织, 甚至胚状体。一月后加入无甘露醇的新鲜培养基继续培养 14 d, 可产生大量肉眼可见的胚性细胞团, 经镜检可知, 这些细胞团中含有很多胚状体。此时, 将培养物转入无激素的液体培养基 P1 中, 在摇床上振荡培养, 散射光照, 原生质体再生的细

胞悬浮物生长非常迅速且由原来的乳白色变为黄色, 然后, 采用我们实验室已建立的技术程序获得了再生小植株(见图 1)。



图 1 陆地棉原生质体培养小植株再生

A 原生质体; B 一次分裂; C 多次分裂; D 小细胞团; E 胚状体; F 小植株

3 讨论

据试验结果和我们以前的工作, 愈伤组织诱导取决于生长素, 而胚性悬浮培养物培养不需任何激素, 诱导出的愈伤组织的进一步增殖和原生质体培养需要生长素与激动素的配合, 这可能是不同的材料所含的内源激素不同及不同状态的细胞所涉及的生理生化反应不同。愈伤组织诱导是原来分化了的细胞脱分化形成薄壁细胞的过程, 这一过程需要较高浓度的外源生长素。愈伤增殖过程中脱分化细胞增殖, 胚性中心及胚状体形成, 而这一过程中非胚性细胞含量很高, 故内源激素含量低^[8], 所以愈伤增殖过程需要外源生长素与激动素的配合。胚性悬浮培养物增殖之所以不需外源激素是因为其本身含有较高的内源激素^[8]。由胚性细胞得来的原生质体培养仍需要两类激素的配合, 可能是由于酶解破坏了胚性悬浮物的固有结构, 导致单个原生质体之间不能进行物质交流和激素互补, 故需外源激素。

原生质体培养起始材料的活力和胚性状态可能是原生质体培养的关键之一。本试验所用的胚性悬浮培养物是无菌苗幼嫩下胚轴在 IAA+KT 上诱导、增殖得到的胚性愈伤在 P1 培养基上悬浮选择出来的具有旺盛分裂力的胚性细胞系, 因此, 由它所分离的原生质体易于再生。

适当提高原生质体密度有利于原生质体培养。在原生质体培养过程中, 原生质体发生粘连是一种普遍现象, 很多作者指出粘连有助于原生质体分裂再生^[9], 这可能是由于粘连提高了原

生质体的局部密度,使得原生质体之间能相互进行物质和信息交流,从而促进了原生质体的生长和发育。

参 考 文 献

- 1 张献龙,孙济中,刘金兰. 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生. 遗传学报, 1991, 18(5): 461~467
- 2 张家明,孙济中,刘金兰. 陆地棉体细胞植株再生及其移栽技术研究. 作物学报, 1994, 20(2): 210~215
- 3 陈志贤,李淑君,岳建雄等. 从棉花胚性细胞原生质体培养获得植株再生. 作物学报, 1989, 31(12): 966~969
- 4 余建明,吴敬音,王海波等. 棉花原生质体培养和体细胞胚胎发生及植株再生. 江苏农业学报, 1989, 5(4): 54~60
- 5 余家林. 农业多元试验统计. 北京:北京农业大学出版社, 1993. 96~104
- 6 孙勇如,安锡培. 植物原生质体培养. 北京,科学出版社,1991. 162
- 7 吕复兵,张献龙,刘金兰. 棉花下胚轴愈伤组织诱导中生长素的作用. 华中农业大学学报, 1996, 22(增刊): 106~110
- 8 张献龙,孙济中,刘金兰. 陆地棉品种“珂字 201”胚性与非胚性愈伤组织生化代谢产物的比较研究. 作物学报, 1992, 18(3): 176~181
- 9 杨剑波,李莉,施俊等. 植物原生质体培养中的粘连现象与其质膜电性. 见:农业科学集刊(第二集), 1995. 152~155
- 10 Peeters, Willems, Rony. Protoplast-to-plant regeneration in cotton (*G. hirsutum* L. cv. coker 312) using feeder layers. Plant Cell Reports, 1994, 13: 208~211

Protoplast Culture and Plant Regeneration in Upland Cotton

Lü Fubing Zhang Xianlong Liu Jinlan

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

Abstract In callus induction of *Gossypium hirsutum* L. cv. coker 201, IAA and 2,4-D showed positive effect and KT showed negative effect, while negative effect was shown with the three hormones in suspensions. The best enzymatic combination in protoplast isolation from embryogenetic suspensions was 3% cellulase(Onozuka R10) + 1.5% pectinase, and the best hormone combination in protoplast culture was IAA 0.5mg/L + KT 0.1mg/L. Appropriately increasing protoplast density benefited protoplast culture. Light and temprature affected the protoplast culture. Protoplast-derived calli grewed rapidly in suspension culture medium without any hormone and regenerated plants through differentiation culture.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; Protoplast culture; Plant regeneration