



棉花译文集之二

棉花的组织培养

奚元龄等译

科学技术出版社

2631

12-3

棉花的组织培养

——棉花译文集之二

奚元龄 等译

上海科学技术出版社

棉花的組織培养

——译文集之二——

奚 三 龄 等译

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 江苏海门印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 5 字数 116,000

1982年8月第1版 1982年8月第1次印刷

印数: 1—3,000

统一书号: 16119·737 定价: (科四)0.49元

译 者 的 话

植物组织培养是一种人工培养植物活组织的方法,即将活组织移植在含有营养成分的固体或液体培养基上,以观察细胞和组织的生长繁殖和分化情况。在培养过程中,通常能长成愈伤组织,经有规律地转移到新鲜培养基上,可以长期保存。改变培养基的生长素和细胞分裂素的浓度,还可以诱导许多种的愈伤组织分化,产生根、地上部,最终形成完整的植株。

近年来,组织培养技术已应用于棉花的遗传和育种方面。大量的研究工作,包括愈伤组织培养,悬浮体培养,花药培养,器官建成,原生质体培养,体细胞杂交和细胞诱变等,已经着手进行,并已取得部分成就。可以预见,棉花组织培养技术,必将成为遗传和育种研究的重要手段。

本书编集了有关棉花组织培养的文章十七篇,从各个侧面来反映国外在这方面的科研动态、方法和成就,这些都是近年来的工作总结,且内容较新,可供我国棉花育种工作者阅读参考。

译 者

1981年10月

目 录

棉花的组织培养及其在棉花遗传、育种中的作用·····	1
胚珠内培养胚的方法与二倍体和四倍体棉花的杂交·····	12
用特定培养基培养棉花六个种的愈伤组织·····	23
离体培养棉花愈伤组织发生和生长需要的一定条件·····	29
棉属愈伤组织的根器官建成·····	37
棉花组织培养的最新进展·····	45
克劳茨基棉悬浮培养中体细胞胚胎发生·····	53
从棉花花药所得到的单倍体和双倍体·····	58
棉花愈伤组织原生质体的分离、培养和分裂·····	66
棉花子叶离体原生质体的培养·····	72
棉花组织培养的确定·····	80
胚珠培养: 棉业上的基础和实用研究·····	88
陆地棉胚珠的培养与幼苗发育·····	111
NH_4^+ 改变培养的棉花胚珠对吡啶乙酸的有赖于温度的 反应·····	121
棉属种间杂种的胚珠培养·····	130
棉花胚珠培养中纤维发育和硝酸盐还原的独立调节·····	132
植物生长物质对受精棉花胚珠体外纤维发育的影响·····	140

棉花的组织培养及其在棉花遗传、 育种中的作用

H. J. Price 和 R. H. Smith

过去二十年间,创制了规定化学成分的培养基,使得许多植物种的细胞和组织可以在人工培养条件下生长(Murashige 和 Skoog, 1962; Linsmaier 和 Skoog, 1965; Gamborg, Miller 和 Ojima, 1968; Schenk 和 Hildebrandt, 1972; Gamborg 等, 1976)。植物细胞或组织放在固体或液体培养基上,通常长成愈伤组织,经有规律的转移到新鲜培养基上,可以长期保存。改变培养基的生长素和细胞分裂素浓度,可以诱导许多种的愈伤组织分化产生根,地上部和终于形成完整植物体(Murashige 和 Skoog, 1962; Linsmaier 和 Skoog, 1965; Vasil 和 Hildebrandt, 1966; Gamborg, Constabel 和 Miller, 1970; 和 Gamborg 等, 1972)。单个游离细胞有分化成完整植株的能力(Vasil 和 Hildebrandt, 1965)。

从几个植物种的花药培养得到了单倍体植株,包括曼陀罗(Guha 和 Maheshwari, 1964)、烟草(Nitoch 和 Nitsch, 1969)、小麦(Craig, 1974)、水稻(Niizeki 和 Oono, 1968)和番茄(Sharpe, Dougall 和 Pacldock, 1971)。

六十年代后期,能分解植物细胞壁由此再游离出原生质体的酶,已有了商品供应。应用这些酶可以从叶或其他植物组织分离出大量质地良好的原生质体(Power 和 Cocking, 1969;

Eriksson和Jonasson, 1969; Otsuki 和 Takebe, 1969; 见 Cocking, 1972; Cocking 和 Evans, 1973 的评述)。在适宜培养基上,原生质体再生新细胞壁,继而进行几次细胞分裂 (Eriksson 和 Jonasson, 1960; Kao, Keller 和 Miller, 1970; Kao, Gamborg 和 Miller, 1971; Nagata 和 Takebe, 1970 和其他), 形成愈伤组织 (Pelcher, Gamborg 和 Kao, 1974; Beasley 等 1974), 在一些事例中,分化成植株 (Nagata 和 Takebe, 1971; Takebe, Labib 和 Melchers, 1971; Gamborg 等, 1972; Durand, Potrykus 和 Donn, 1973; Vasil 和 Vasil, 1974; Dorion, Chupeau 和 Bourgin, 1975)。

曾观察到原生质体融合形成异核体细胞, 在这种细胞里可能发生核融合。把原生质体放在高渗透压的硝酸钠溶液里 (见 Cocking, 1972) 或聚乙二醇溶液 (Eriksson等, 1974; Constabel 和 Kao, 1974; Kao 和 Michayluk, 1974) 里, 融合频率增高。有些学者报道了异属原生质体的融合 (Power, Cummins 和 Cocking, 1970; Kao 和 Michayluk, 1974; Kao 等 1974), 并获得了二个人工培养原生质融合体的杂种植株。Carlson, Smith 和 Dearing (1972) 把 *Nicotiana langsdorffii* 和 *N. glauca* 的融合的原生质体, 采用平板培养技术, 培养在适于上述种间有性杂种细胞生长的培养基上, 得到了无性杂种, 但是亲本细胞未能再生。由于在这些培养基上发生的选择作用, 导致杂种植株的分化。Schieder (1974) 用地衣 (*Sphaerocarpus donnellii*) 的两种互补性缺养突变体品系, 在人工培养原生质体融合体中, 选出了一种体细胞杂种。

体细胞杂交技术对作物育种很重要。从亲缘很近的种的原生质体融合, 可能得到杂种, 而在正常情况下, 它们是由于

生殖隔离障碍而分开。由此支配重要特性（如抗病或抗虫特性）的基因，可以从一个种渗入到另一个种中去。

Carlson (1970, 1973a) 指出，在培养条件下，可以诱导植物细胞和原生质体产生突变体。Carlson 从花药培养产生的经诱变处理的单倍体细胞，可以有选择性地得到缺养突变体，它们的生长需要供给生长物质，如氨基酸、维生素和嘌呤。研究从缺养型愈伤组织再生的植株，指出需要生长物质受单个基因的支配 (Chaleff 和 Carlson, 1974)。

植物细胞培养体的全能性和能在人工培养下进行操作，引起了体细胞遗传学应用于作物育种的极大兴趣 (Bajaj, 1974; Chaleff 和 Carlson, 1974; Smith, 1974; Bettino, 1975; Scowcroft, 1975)。Smith (1974) 指出在培养体中，从 10^7 或更多个体细胞中进行选择，比常规遗传研究从每英亩 10^3 - 10^4 植株中选择，要有利得多。细胞培养可应用于从人工培养的细胞间筛选抗病性。例如，Carlson (1973 a, b) 诱变处理烟草单倍体原生质体，采用平板培养法，培养在涂有野大病菌 (*Pseudomonas tabaci*) 产生的毒素的假想的类似物(亚砷蛋氨酸)的培养基上，将具有抗毒性愈伤组织的染色体加倍，并再生成植株，突变植株比其亲本具有较强抗病力。Carlson (1973 b) 的遗传分析指出突变体显然受单个基因位点的支配。其他特性的选择，如除草剂抗性、改进营养质量、耐热或耐冷和耐盐碱性等，是细胞培养的一种潜在应用价值 (Chaleff 和 Carlson, 1974; Smith, 1974; Bottino, 1975; Scowcroft, 1975)。

组织培养技术成为棉花遗传和育种的重要手段前，需要做大量研究工作。不幸，迄今棉属种的组织培养研究很少 (Schenk 和 Hilde brandt, 1972; Davis, Dusbabek 和

Hoerauf, 1974; Sandstedt, 1975; Hsu 和 Stewart, 1976)。我们开始了棉属的组织培养研究计划, 包括愈伤组织培养, 悬浮体培养, 花药培养, 器官建成, 原生质体培养, 体细胞杂交和细胞诱变。这些研究的结果, 最终将有助于建立体细胞遗传研究的必要技术, 这些技术目前棉花遗传学者和育种家还没有得到。计划的第一步, 建立棉属种在人工培养下的生长条件。Smith, Price 和 Thaxton (1977) 确立了亚洲棉 *G. arboreum* 的愈伤组织诱导和生长的条件。我们的研究指出, 下胚轴组织作为诱导产生愈伤组织的离体培养材料, 比子叶或叶组织好, 诱导培养基以 Murashige 和 Skoog (1962) 无机盐成分 (MS), 加肌醇 100 毫克/升 (下同), VB_1 HCl 0.4, IAA 2, Kn 1, 葡萄糖 3%, 用琼脂固化为最好。强光(8000~9000 米烛光), 温度 $29 \pm 1^\circ C$, 愈伤组织增殖快。虽然 MS+IAA+Kn 愈伤组织可以快速繁殖, 继代的愈伤组织需要 MS 中附加 NAA 2+BA 0.5-1 才能生长旺盛。MS+2 ip 5~10+NAA 1 也有利于亚洲棉的连续继代培养。

本文报道棉属 10 个种和陆地棉 (*G. hirsutum*) 7 个品种的愈伤组织诱导的特征的比较, 采用 Smith 等 (1977) 描述的培养基。此外还报道了 *G. hirsutum* 和 *G. anomalum* 继代培养取得旺盛生长的培养基。

材 料 和 方 法

1. 诱导愈伤组织

供试种、品种和它们的基因组符号列如表 1 和 2。用 Smith 等 (1977) 描述的方法, 从无菌条件发芽的种子取得无菌下胚轴。各半纵切长约 1 厘米, 接种在 MS 无机盐加肌醇

100, VB₁ 0.4, IAA 2, Kn 1, 葡萄糖 3% (W/V), 0.6% (W/V) Difco Bacto 琼脂, pH 5.7。每个种或品种至少接 10 个下胚轴切段, 放在含有 25 毫升培养基的 25×150 毫升培养试管里, 每管一个切段, 用 Kaputs 封盖。培养体放在人工气候室内, 温室 30°C, 光暗周期 15:9 小时, 光强 8000~9000 米烛光。这是 Smith 等(1977)认为最适于快速诱导亚洲棉产生愈伤组织的环境条件。

21 天后, 每个种或品种取出 5~8 个培养物测定鲜重, 保留 2~4 个培养体, 供以后观察色素、大小和衰老速度, 并用亚洲棉切段(各用 15 和 20 个培养体)作对照。

2. 愈伤组织的继代培养

陆地棉 TM-1 的愈伤组织继代转移到含有不同荷尔蒙组合和浓度的多种培养基上(每种 5 次重复), 包括生长素 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 和 10 毫克/升和细胞分裂素 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 和 10 毫克/升的全部组合。生长素: 细胞分裂素组合包括 NAA: BA, NAA: 2ip 和 IAA: 2ip。适于愈伤组织生长的各种培养基组合, 扩大到每处理重复 10 次。这些计有(1)BA 0.1 和 0.5 与 NAA 0.5, 1, 2, 5 相组合, (2)2ip 0.1, 0.5, 1 和 2 与 NAA 0.1 和 0.5 相组合, (3)IAA 5 与 2ip 1 相组合。选取观察到的最好的生长素: 细胞分裂素水平用于继代培养。

由于 *G. anomalum* 的生长需要较不严格, 用少数生长素与细胞分裂素组合就能确定愈伤组织继代培养的适宜培养基。供试生长素有 IAA 和 NAA, 细胞分裂素有 2 ip、BA 和 Kn。

结 果

1. 诱导愈伤组织

棉属种和品种下胚轴切段培养后 21 天的平均重列如表 1 和 2。变量分析指出种间的愈伤组织鲜重有显著差异。采用 Duncan 氏复变幅测验法测定那个种或品种的接种后 21 天的愈伤组织生长量有显著差异(表 1 和 2)。表 1 可见 *G. arboreum*, *G. anomalum*, *G. klotzschianum* 和 *G. herbaceum* 在规定条件下,愈伤组织形成最旺盛。其他种包括 *G. hirsutum* 要慢得多。种间色素也有可看出的差异(表 1)。在供试陆地棉品种中,都形成绿色愈伤组织。7 个品种的比较(表 2)指出,除品种 sp 37 培养 21 天时的愈伤组织显著较重外,其余都无显著差异。

2. 愈伤组织的继代培养

G. anomalum 的愈伤组织,可用原培养基继代培养。但是,2ip 10 与 IAA 1 相组合,愈伤组织生长很好,繁殖产生深绿色愈伤组织。在 8 个月内,用 *G. anomalum* 继代转移七次,愈伤组织长势和形态没有明显改变。

由于 *G. hirsutum* TM-1 是遗传研究的重要材料,我们测验了适于继代的荷尔蒙水平。用 2ip 1 与 IAA 5 或 NAA 0.1 培养基,在 6 个月内继代 5 次,生长旺盛。用 IAA 的培养基供继代转移的,愈伤组织绿色极深,瘤状;用 NAA 的,愈伤组织是淡绿色,光滑,很松脆。

讨 论

因为全部下胚轴都是用同样技术取得的,生长的环境条件也一样,结果指出愈伤组织诱导效果的差异,至少部分是遗传性的。表1资料提出,每个种的愈伤组织可能一定要生长在一系列荷尔蒙水平上,以建成有利于继代旺盛生长的条件。再者,每个种所需的荷尔蒙可能有差异。例如, *G. arboreum*, *G. hirsutum* 和 *G. anomalum* 的生长,都需要不同的荷尔蒙水平。在期望体细胞遗传学取得成就之前,一定要仔细测定棉属所有有价值种的生长要求。

另一个重要因素是实验室条件。Smith等(1977)讨论了适用于培养 *G. hirsutum* 的不同环境条件。很可能每个试验室的培养条件一定要有所改变,因为不同实验室是不可能强求一致的。

本文报道的内容,只能作为建立棉属组织培养技术的起点。要能应用于实践,还需要其他技术,包括可重复的单倍体花药培养,悬浮体培养,原生质体培养和高频率的器官建成。

组织培养应用于体细胞遗传的一个最有限制作用的因子是器官建成。目前,我们正从事于诱导愈伤组织培养体的再生成植株,迄今我们已得到根,但没有得到地上部。Sandstedt (1975) Ketterman (私人通讯)和 Barrow (私人通讯)得到同样进度。显然,简单地改变荷尔蒙平衡,不能像烟草和其他理想体系一样,得到器官建成。必需做艰苦仔细的工作,才能从培养体诱导出器官建成。当人工培养棉属细胞并从愈伤组织再生成植株取得成功时,将出现棉花遗传学方面有意义和有用的试验。兹设想几种可能的应用价值。

诱导单倍体原生质体或细胞悬浮体可产生缺养突变体。分离出突变体愈伤组织，对研究棉花的生化途径和发育遗传学都是有价值的。缺养突变体的实际应用之一，是取得体细胞杂种。不同缺养突变体的纯合的或半合的两个种或品种的原生质体，诱导融合，然后用最低培养基进行平板培养。只有杂种细胞能生长，可用杂种愈伤组织再生成植株。另一些途径，如选用互补性颜色突变体 (Melchers 和 Labib, 1974)，也能用于鉴别体细胞杂种。棉属异种间无性杂交，在理论和实用上都有高度重要意义。

一般认为陆地棉是异源四倍体 (AADD)，来源于 *G. arboreum* (A_2A_2) 或 *G. herbaceum* (A_1A_1) 与 *G. raimondii* (D_5D_5) 间杂交 (Hutchinson, Silow 和 Stephens, 1947; Phillips, 1963)。但是，基因组 D 可能不是从 *G. raimondii* 来的。根据形态特征，美洲棉种 *G. davidsonii* 和 *G. klotzschianum* 可能是提供 D 基因组的候补祖先 (Fryxell, 私人通讯)。因为这些种基本上在生殖上与 *G. arboreum*, *G. hirsutum* 和 *G. barbadense* 相隔离，无性杂种的研究，可为四倍体新世界棉种的起源提供新的证据。这类系统发育资料，对于棉花遗传学家和育种者一定是有价值的。

最近，着重注意于扩大农业重要植物种的遗传变异 (Smith, 1971; Samborg, 1975)。棉属野生种有许多特性，如果把它转移给栽培棉，是有价值的。例如，*G. arboreum* 和 *G. anomalum* 抗棉锈病 (*Puccinia stackmanii* Pres.)，*G. thurberi* 抗红铃虫 (Anonymous, 1968)。虽有一些基因从四倍体 *G. barbadense* 转移给 *G. hirsutum*，并已用于育种工作 (Bird, 1972)，还需要渗入二倍体种的基因。原生质体融合可超越强烈的生殖隔离障碍。*G. arboreum* (A 基因

组)品种带有抗病基因,可与带有D基因组的 *G. raimondii* 或其他二倍体种进行无性杂交,然后把这种 AADD 双二倍体的抗病性基因渗入到商业用陆地棉 (AADD) 品种中去。有性结合的四倍体 *G. arboreum* × *G. thurberi*, 无论在遗传上和细胞遗传上与 *G. hirsutum* 是亲和的,并已用于把纤维强度基因渗入到栽培品种中去 (Brown, 1947)。

棉花组织培养对筛选抗病植株可能也是重要的。例如,诱变产生的单倍体细胞或原生质体群体,可用 *Alternaria* 产生的毒素(tentoxin)处理。把存活的细胞二倍体化,分化成植株,于是这些植株可能表现对毒素不敏感的遗传性,对真菌的侵害发生抗性。虽然其他细菌和真菌病原菌可能不产生特殊植物毒素,把病原菌生长在经诱变处理的愈伤组织上,选择病原菌不能生长的愈伤组织,采用这种方法同样可以筛选抗性。如果愈伤组织水平上的抗性,也能在完整植株水平上表现出来,那么抗病性可以在培养体中进行选择。例如,烟草抗 *Phytophthora parasitica* 的愈伤组织,不能为这种真菌提供生长条件,而敏感性植株是可以的 (Helgeson 等, 1972)。

细胞培养水平上可能进行选择的其他特性,有抗线虫,耐盐,耐冷或耐热、抗杀虫剂和抗除草剂。

在细胞水平上选择突变体,可改变植物组织的生化组成。例如, Widholm (1976) 在烟草和胡萝卜细胞培养中选择抗氨基酸类生物氨基乙基-L-胱氨酸、delta-羟基赖氨酸和羧基脯氨酸的细胞系,各自增高赖氨酸、蛋氨酸和脯氨酸水平 10~1000 倍。这类研究指出有可能增高植株特种氨基酸的潜力,从而增高植株的营养品质。但是,存在着明显的困难,如把氨基酸渗入到需要组织的蛋白质中去。

组织培养技术应用于棉花遗传和育种的潜力是多方面

的。但是,只有掌握了人工培养棉花组织培养的技术,和从愈伤组织再生成植株,才能完成。目前要努力完善棉花组织培养技术,其他农作物种也是如此。

结 论

组织培养和体细胞遗传学对棉花遗传和育种有巨大潜力。这些技术能使遗传学者克服常规遗传方法中所遇到的难题。但是,为了建立这种技术,必须做许多研究。一定要创立完善的方法,使棉花愈伤组织、悬浮培养体和原生质体在人工

表 1 棉属种下胚轴离体培养 21 天愈伤组织的平均重和色素

种	基因组 ¹⁾	21天愈伤组织重 克±S.E.	色 素
<i>G. arboreum</i> L.	A ₂	3.01±0.29 a ²⁾	绿
<i>G. anomalum</i> Wawr. ex. Wawr. & Peyr.	B ₁	2.09±0.11 b	绿
<i>G. klotzschianum</i> Andress	D ₃	1.59±0.18 c	绿,少量花青素
<i>G. herbaceum</i> L.	A ₁	0.81±0.15 d	褐到金棕色
<i>G. hirsutum</i> L.(爱字棉)	(AD) ₁	0.44±0.08 ed	绿,多量花青素
<i>G. thurberi</i> Tod.	D ₁	0.36±0.08 ed	淡-深绿色,有花青素
<i>G. hirsutum</i> L.(爱字棉, 无油腺)	(AD) ₁	0.35±0.06 ed	绿有花青素
<i>G. barbadense</i> L.	(AD) ₂	0.24±0.05 e	金棕-绿有花青素 绿
<i>G. aridum</i> (Role & Standl.)Skov.	D ₄	0.23±0.08 e	淡绿
<i>G. armourianum</i> Kearn.	D ₂	0.21±0.05 e	淡绿
<i>G. gossypoides</i> (Ulbr.) Standl.	D ₆	0.09±0.04 e	

1) Anonymous(1968)提出的基因组符号

2) 用不同字母表示的种,表示有 5%显著平准,用 Duncan 复变幅测验法测定

表 2 *G. hirsutum* 的7个品种和 *G. raimondii* 下胚

轴培养21天愈伤组织的平均重

种	基因组	愈伤组织重(21天) 克±S.E.
<i>G. arboreum</i> L.	A ₂	2.72±0.16 a
<i>G. hirsutum</i> L. (SP37)	(AD) ₁	0.80±0.10 b
<i>G. raimondii</i> Ulbr.	D ₅	0.37±0.08 c
<i>G. hirsutum</i> L. (斯字棉 213)	(AD) ₁	0.34±0.04 c
<i>G. hirsutum</i> L. (CB 3217)	(AD) ₁	0.34±0.04 c
<i>G. hirsutum</i> L. (爱字棉 SE 1)	(AD) ₁	0.26±0.03 c
<i>G. hirsutum</i> L. (Lubbock 矮生棉)	(AD) ₁	0.24±0.03 c
<i>G. hirsutum</i> L. (岱字棉 16)	(AD) ₁	0.23±0.03 c
<i>G. hirsutum</i> L. (佩马斯特)	(AD) ₁	0.15±0.02 c

培养下能够生长,以及从花药培养得到单倍体组织和植株。限制体细胞遗传学应用于棉花育种的最重要因子是,目前还不能从组织培养取得大量可重复的器官建成。

本文报道诱导棉种下胚轴产生愈伤组织的条件和 *G. arboreum*, *G. hirsutum* 和 *G. anomalum* 继代培养所需的荷尔蒙浓度。棉属几个种间存在着愈伤组织繁殖率上的显著差异。这些差异可能是部分遗传的。在本实验室和采用的基础培养基条件下, *G. arboreum* 愈伤组织可在下列荷尔蒙组成中继代成功: NAA 2+BA 1 或 NAA 1+2ip 5-10。 *G. anomalum* 可用 IAA 1+2ip 10 继代培养, *G. hirsutum* TM-1 用 2ip 1+IAA 5 或 NAA 0.1 继代培养。

(译自 Beltwide Cotton Prod. Res. Conf. 1977.51~55)

译者: 奚元龄 马家璋

胚珠内培养胚的方法与二倍体和四倍体棉花的杂交

Stewart

徐李彬彬

(美国农业部科教局) (田纳西大学植物和土壤系)

前 言

世界上的栽培棉花包括棉属 *Gossypium* 的四个种。旧世界棉棉花, 即 *G. herbaceum* 和 *G. arboreum* 为二倍体 ($2n=26$), 其染色体组分别定名为 A_1 , A_2 。新世界棉棉花, 即 *G. hirsutum* 和 *G. barbadense* 为异源四倍体 ($2n=52$), 其染色体组分别定名为 AD_1 , AD_2 。四倍体棉花被认为起源于 A 种与一种美洲野生种的杂交。

由于世界上大部分商品生产的棉花都是四倍体, 大家对扩大现有的遗传基础都很感兴趣。 A 染色体组所拥有的对某些病原菌和害虫的抗性、以及一些农艺性状(如雄性不育)和植株形态特征, 这些在四倍体棉花生产上, 都有应用潜力(Jones, 私人通讯)。Phillips 指出, *G. hirsutum* 的 A 染色体 (AD_1) 与 *G. herbaceum* 的染色体之间有几乎完全的同源性, 因此, 减数分裂期的基因交换必然是容易发生的。然而, 由于在这两者之间很难得到杂种, 因此在 A 和 AD 染色体组间搞基因转移工作规模还很有限。

冯和 Amin 每个人都利用去雄阻止自交授粉方法, 在美