

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

NH_4NO_3

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

棉花生物技术及其应用

张宝红 赵宝升 主编

维生素B6

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$



KH_2PO_4 H_3BO_3

$\text{Fe} \cdot \text{EDTA}$ KI

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

氨基酸

KNO_3 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

维生素

中国农业出版社

烟酸

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Z138330

S563.035.3

ZBH

棉花生物技术及其应用

张宝红 赵宝升 主编

中国农业出版社

棉花生物技术及其应用

张宝红 赵宝升 主编

* * *

责任编辑 朱朝伟

中国农业出版社出版 (北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

新华书店北京发行所发行 北京市密云县印刷厂印刷

787mm×1092mm32 开本 6.625 印张 143 千字

1997 年 3 月第 1 版 1997 年 3 月北京第 1 次印刷

印数 1—1500 册 定价 17.50 元

ISBN 7-109-04597-8/S·2849

主 编 张宝红 赵宝升

副主编 郭建伟 丰 嵘 钮福新 王清连

编 委 (按姓氏笔画排列)

马俊荣 王端庄 尹崇海 田增军

代兰珍 刘江春 刘兴育 孙 勇

孙世珍 李付广 李振华 杨晓理

吴景忠 高福生 高增杰 郭泽新

郭淑英 郭腾龙 翁振连 耿秀玲

薛正平

内 容 提 要

本书是棉花生物技术领域的第一本专著。它从棉花体细胞胚胎发生和人工种子的制作、棉花原生质体培养及其应用、棉花组织培养中的异常现象、棉花体细胞无性系变异及其应用、利用胚珠培养技术培育棉属种间杂种、棉花花药培养和单倍体育种、人工棉纤维诱导和超级棉生产、棉花基因工程及其应用等八个方面,全面系统地论述了棉花生物技术及其应用的现状和前景。附录部分详细介绍了棉花组织培养研究以来的人多文献及其主要内容。

本书可供农学、遗传育种学、生物学、生物工程学等方面的科技人员以及大中专院校师生参考。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

序

以重组 DNA 为核心的现代生物技术的兴起，已被认为是本世纪生命科学领域最令人瞩目的事件，也是富有发展远景的前沿科学。农业是生物技术最重要的应用领域之一，经过几十年的发展，世界农业生物技术已有长足的进步。下一个世纪，生物技术将全面渗入到农业发展的各个领域，并将成为解决食物、环境和农业持续发展等重大问题，推动社会进步的重要手段。

棉花作为一种全球性的重要经济作物和纤维作物，世界各国都十分重视生物技术在这方面的应用和深入研究，先后从体细胞培养、原生质体培养、花药培养等中获得再生植株，通过人工合成基因并转育到优良棉花品种中的转基因抗虫棉、抗除草剂棉均已开始在生产中应用。除此之外，利用组织培养技术筛选棉花优异新种质（新品种）、利用胚珠培养技术克服杂种胚的败育、人工种子的研制等研究也均取得了突破性进展。我国先后有十余家单位开展了研究，率先在国际上获得棉花原生质体培养再生植株，首次用花药培养获得单倍体植株。在转基因棉花品种培育方面也取得了进展，如成功合成 Bt 抗棉花害虫的单价、双价基因，并转育到棉花推广品种上，使得我国在此方面达到国际同类研究先进水平，部分工作居国际领先水平。可以预料，随着技术的成熟和发展，生物技术在棉花上的应用和研究必将会有更大的发展，有可

能成为棉花育种和生产再上一个台阶的突破口。

张宝红同志是中国农业科学院的一名年轻科技工作者，在从事棉花生物技术研究工作和收集、参考 200 余篇国内外文献的基础上，主编了这本《棉花生物技术及其应用》一书。该书从棉花体细胞胚胎发生和人工种子的制作、棉花原生质体培养及其应用、棉花组织培养技术中的异常现象、棉花体细胞无性系变异及其应用、利用胚珠培养技术培育棉属种间杂种、棉花花药培养和单倍体育种、人工棉纤维诱导和超级棉生产、棉花基因工程及其应用等八个方面论述了生物技术在棉花上的应用和研究进展，存在问题及今后发展趋势。此外，在书的附录中还列举了自生物技术在棉花上应用研究以来的大部分文献，以便于国内外同行查阅。本书内容丰富，既有基本理论，又有实用技术，是从事生物技术研究工作者的一本重要的参考书。

作者勇于进取、勇于开拓的精神，值得大家鼓励和支持。相信这本书能给大家以启示，激起更多的年轻科技工作者，努力攀登农业科技高峰，为生物技术在农业上应用的进一步发展，进而为农业生产迈上新的台阶作出贡献。

中国农业科学院院长 吕飞杰

前 言

生物技术是当今科学研究的热点之一，这是因为它不仅可以探索物种发育、进化的过程和机制，而且还可以有效地保存和交换种质，创造自然界根本不存在的物种或种质资源。因此，近几十年来很受遗传学、育种学和发育生物学界的高度重视，并先后对植物生物技术的原理、方法和实践开展了研究，且取得了良好的进展。

本书内容依托于我们多年来的研究经验和国内外大量的文献，在介绍棉花生物技术研究历史的基础上，着重从棉花体细胞胚胎发生和人工种子的制作、棉花原生质体培养及其应用、棉花组织培养技术中的异常现象、棉花体细胞无性系变异及其应用、棉花花药培养和单倍体育种、人工棉纤维诱导和超级棉生产、棉花基因工程及其应用等八个方面论述了棉花生物技术研究进展，并对各个领域的成功经验和存在问题及将来发展方向进行了探讨；最后本书还附录了棉花生物技术研究以来国内外发表的大量文献，供读者查阅。

通过本书各章节的论述，作者希望能使读者明了下述几点：①棉花生物技术各研究领域的国内外概貌和进展；②各研究领域的成功经验、存在问题和将来的发展方向；③棉花生物技术和常规育种相结合以建立起新的棉花生物技术育种体系是棉花生物技术研究发展的最终目的。如果该书的出版，能对该领域的研究起到一定的推进作用，将是我们全

体作者的最大心愿。

在本书的写作和出版过程中多次得到中国农业科学院棉花研究所胡少安副研究员、郭金成副所长、刘金定副研究员、王春英女士、余学科先生、李剑峰先生，中国农业科学院科技局高新技术处李建萍女士，山西农科院棉花研究所陈志贤研究员，河北大学康明先生，复旦大学博士生张文胜等同志的帮助和支持，承蒙吕飞杰教授在百忙之中撰写序文，在此一并表示最衷心的感谢。另外，本书参阅了大量国内外文献，在此我们也向这些文章的作者致以最衷心的感谢。

由于编著者水平有限，书中难免会出现不妥之处，还敬请各位同仁批评指正。

张宝红

1996年教师节

目 录

序

前言

第一章 棉花体细胞胚胎发生和人工种子的制作	1
第一节 棉花体细胞胚胎发生及其影响因素	2
第二节 棉花组织培养体细胞胚发生的细胞组织学研究	14
第三节 棉花组织培养胚胎发生的生化基础研究	20
第四节 棉花体细胞胚的成熟、萌发和植株再生	24
第五节 棉花组织培养的器官发生途径和培养程序	30
第六节 再生植株的驯化和移栽	35
第七节 棉花人工种子的制作	37
第八节 问题与展望	39
第二章 棉花原生质体培养及其应用	42
第一节 棉花原生质体培养研究的历史与进展	42
第二节 棉花原生质体的分离和纯化	45
第三节 棉花原生质体的培养与植株再生	48
第四节 棉花原生质体培养成功的经验和培养程序的建立	52
第五节 棉花原生质体培养技术的应用	56
第三章 棉花组织培养中的异常现象	58
第一节 畸形胚的发生和转化	58
第二节 异常苗的发生和转化	63
第四章 棉花体细胞无性系变异及其应用	76
第一节 棉花组织培养再生植株的变异	76

第二节	棉花组织培养中染色体水平上的变异	82
第三节	影响棉花体细胞无性系变异的因素	88
第四节	棉花体细胞无性系变异的特点	89
第五节	获得棉花体细胞无性系变异的关键技术	93
第六节	体细胞无性系变异在棉花品种改良中的应用	94
第七节	问题与展望	100
第五章	利用胚珠培养技术培育棉属种间杂种	103
第一节	杂种胚败育的原因	103
第二节	利用胚珠培养技术克服棉属种间杂种胚的败育	105
第三节	胚珠培养成苗技术	108
第六章	棉花花药培养和单倍体育种	114
第一节	棉花单倍体育种的潜在价值	114
第二节	获得棉花单倍体植株的方法和进展	116
第三节	棉花花药培养的研究进展	121
第七章	人工棉纤维诱导和超级棉生产	126
第一节	棉纤维的离体发育	126
第二节	人工棉纤维的诱导和生产	136
第八章	棉花基因工程及其应用	140
第一节	历史与现状	140
第二节	棉花基因转化技术	142
第三节	转基因棉株的分子生物学研究	145
第四节	棉花抗虫基因工程	147
第五节	棉花抗除草剂基因工程	162
第六节	棉花基因工程在其它领域中的应用	169
附录		174
参考文献		185

第一章 棉花体细胞胚胎发生和 人工种子的制作

植物组织培养技术的发展为作物改良开辟了新的途径。近年来，这方面的研究非常活跃，并已在许多作物上应用成功。棉花是一种重要的经济作物，自从 Beasley (1971) 首次报道诱导陆地棉胚珠得到愈伤组织以来，有关棉花组织培养研究的报道日益增多，现已从棉花的许多品种或品系得到再生植株，并在许多方面正在逐步走向应用。其中棉花体细胞胚胎发生和人工种子的制作就具有深远的意义，它不仅能够固定棉花杂种优势，而且还可以有目的地向人工胚乳中加入杀虫剂、杀菌剂、除草剂等以减少病虫害的危害；另外，人们还可以利用体细胞胚胎发生途径，有目的地进行基因转育以改良棉种。正是由于这些优点，人们对此进行了深入的研究。

所谓人工种子，就是将植物离体培养产生的体细胞胚或其类似物，经过有机化合物的包埋，在其表面形成一层保护胚或其类似物并提供营养物质的种皮，从而获得一种能在适宜条件下发芽出苗的类似于天然种子的颗粒体。人工种子的制作可分为两大步骤：一是体细胞胚的诱导与形成；二是人工种皮的制作与装配。本章就围绕着这两个核心进行介绍。

第一节 棉花体细胞胚胎发生

及其影响因素

1979 年 Price 和 Smith 首次报道从克劳茨基棉细胞悬浮培养中获得体细胞胚, 这一研究为获得棉花再生植株奠定了基础。Finer 利用克劳茨基棉进一步研究, 从茎、叶和叶柄等器官的培养中得到了大量的体细胞胚, 但没能再生出植株。不久, Davidonis 在改良 LS 和 MS 培养基上, 经继代培养了两年后的陆地棉子叶愈伤组织中得到了体细胞胚并再生出植株。这是棉花体细胞培养植株再生的首次报道, 但其存在着培养周期长、重复实验不易成功等问题。此后, Mitten 和 Rangan 声称得到了再生植株, 但没有详细的报道。直到 1986 年, Shoemaker 才正式报道从陆地棉珂字 312 和珂字 201 中得到再生植株。近年来, 棉花体细胞胚胎发生的研究较为热门, 现已从多个棉种的几十个品种的胚轴、子叶、叶片、叶柄、茎段、幼胚、茎尖分生组织和花药等不同组织或器官培养中获得体细胞胚和再生植株, 且初步建立和完善了棉花体细胞胚胎发生和植株再生的研究实验体系。

影响棉花组织培养胚胎发生和植株再生的因素很多, 概括起来主要有以下几个方面:

一、基因型

基因型对棉花体细胞胚胎发生和植株再生具有决定性作用。首先表现在棉属中不同棉种之间体细胞胚胎发生和植株再生的能力不同。Лев 等对多个棉种进行了比较, 只有陆地棉、雷蒙德氏棉、夏威夷棉能形成体细胞胚。董合忠比较了棉花四个栽培种的体细胞胚胎发生能力, 结果表明陆地棉较

易诱导获得体细胞胚，亚洲棉次之，海岛棉和非洲棉较难。棉属共有 40 余个种，而到目前为止，仅克劳茨基棉、戴维逊氏棉、陆地棉、海岛棉、亚洲棉、雷蒙德氏棉、夏威夷棉、非洲棉等 8 个棉种诱导获得了体细胞胚，且仅有陆地棉、海岛棉、亚洲棉、克劳茨基棉和戴维逊氏棉等 5 个棉种诱导获得了再生植株。

另外，在体细胞胚胎发生和植株再生能力上，棉花品种间也存在着差异。自 1971 年以来，共有 100 余个品种用于棉花组织培养研究，在这些品种中有的能够再生出植株，有的则不能再生出植株，据统计，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。在具有胚胎发生能力的材料中，各品种的发生能力又不同，有的易形成体细胞胚，有的难形成体细胞胚。根据其胚胎发生频率的高低和成苗情况，棉花品种可分为以下四类：第一类为胚胎发生能力强、易成苗的品种，主要是珂字棉材料，如珂字 201、珂字 312 等，目前国内外许多实验室均从这些材料中得到了较多的再生植株，其已成为棉花组织培养植株再生的模式品种，广泛应用于棉花组织培养及其遗传转化等研究；第二类为具有一定的胚胎发生能力、成胚数量中等、经数次继代培养筛选后可得到较多的胚状体和部分再生植株的品种，这类基因型较多，主要有冀合 321、晋棉 7 号、108 夫、珂字 310、Siokral 1-4、珂字 315、珂字 5110、珂字 314、鲁棉 1 号和鲁棉 3 号等许多栽培品种；第三类为胚胎发生能力差、胚状体数量少、胚状体初期多为不正常，需经长时间的继代培养和筛选使胚性愈伤组织占优势后，方可得到较多的胚状体和个别试管苗，如中 31、TM-1、岱字 15、岱字 16 等品种均属于这一类；第四类为体细胞胚极难或不能产生的基因型，这类

材料也较多，约占参试品种的 46%，如爱字棉 44、斯字棉 215、斯字棉 453、斯字棉 506、佩马斯特 784 等品种均属于这一类。棉花种质资源丰富，但目前仅珂字棉系列、鲁棉系列等少数品种获得了体细胞胚和再生植株。

棉花体细胞胚胎发生和植株再生是一种受基因型控制的遗传性状，其证据主要有以下几点：①棉花不同品种的体细胞胚发生能力不同，有的发生能力强，有的发生能力弱，有的则不具有胚胎发生能力；②二个胚胎发生能力不同的亲本杂交，其杂交后代出现胚胎发生能力分离的现象，如用胚胎发生能力强的珂字棉 100W 与胚胎发生能力弱的岱字 15 杂交，其后代选育出的珂字 312 具有较强的胚胎发生能力，珂字 315、珂字 310 等具有中等程度的胚胎发生能力，而同样是其杂种后代的珂字 3131 则基本上无胚胎发生能力；③棉花是常异交作物，在大田中其异花授粉率达 5%，故同一品种不同单株间基因型存在着差别，由实验结果也可发现，同一品种的单株间胚胎发生能力也存在着差别；④体细胞胚胎发生能力可以世代相传，高频率胚胎发生的品种其再生植株后代也具有高的胚胎发生能力；⑤可以通过筛选的方法从胚胎发生能力较差的品种中筛选出胚胎发生能力较强的材料，如陈志贤等从具有中等胚胎发生能力的冀合 321 中筛选获得了胚胎发生能力较强的材料，并将其应用于棉花的原生质体培养和遗传转化研究。

由此可以推断，棉花体细胞胚胎发生能力是一种受基因控制的遗传行为，它可以通过杂交转育或选择的方法进行提高。我们认为棉花体细胞胚胎发生和植株再生不是由单基因控制的质量性状，而有可能是受多基因控制的数量性状，并有可能存在着基因之间的互补作用，如加性作用、上位作用

等。

由此可见，棉花体细胞胚胎发生和植株再生是一种遗传特性，可以通过杂交转育或选择的方法进行提高，这对棉花体细胞工程的深入开展十分有利。

正确地判断和预测某一品种的体细胞胚胎发生和植株再生能力有利于提高棉花组织培养的效率，加速植物组织培养技术在棉花育种和生产中的应用。由上述的分析结果可以看出，棉花组织培养胚胎发生和植株再生是一种受多基因控制的遗传性状，不同品种由于含有控制这一性状的基因数目不等而造成了植株再生能力的差异，其中珂字棉较易，岱字棉次之，斯字棉较难，金字棉最难。由此作亲本获得的新品种，根据其含有上述各个品种的遗传基础的不同也表现出胚胎发生和植株再生能力的差别。由此我们可以推断，珂字棉、岱字棉通过系统或直接杂交而选育出来的品种有可能具有较强的体细胞胚胎发生和植株再生能力。在我国自育的品种中，这样的品种除上面所提及的较易培育成功的几个品种外，还有冀棉 2 号、冀合 3016、鄂荆 92、石短 5 号、科选 61、华东 2 号、巴 11、丰产 1 号、华棉 5 号、北农 1 号、中棉所 7 号、中棉所 2 号、洞庭 1 号等，利用这些品种进行棉花组织培养，也很有可能容易获得再生植株。

二、外植体

少数植物如胡萝卜几乎所有的器官或组织均可诱导获得体细胞胚和再生植株，而棉花则与大多数植物一样，只有某些发育时期的某些器官才可产生体细胞胚。从野生种的形成而言，棉花子叶、叶片、胚珠、叶柄和茎段等均能诱导形成愈伤组织，但以下胚轴诱导效果最佳，故大多数研究者均采用下胚轴作为外植体。在体细胞胚发生能力方面，Trolinder

(1988) 对叶片、茎段、下胚轴、中胚轴、上胚轴、子叶等进行了比较研究,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(表 1—1)。但也有人认为子叶是诱导棉花体细胞胚胎发生的最佳外植体,如棉花组织培养获得的第一棵再生植株就来源于子叶细胞,我们在研究中也发现子叶愈伤组织分化出的体细胞胚的数目多,发育成熟度高,这可能是因为所用激素不同造成的。但是无论是下胚轴,还是子叶,这均为幼嫩组织;一般来说幼嫩组织比成熟组织易诱导棉花体细胞胚胎发生。

表 1—1 外植体来源对陆地棉体细胞胚胎发生的影响
(Trolinder, 1988)

外植体	来源	NAA				2, 4-D			
		3	4	≥5	总计	3	4	≥5	总计
未成熟组织	幼胚	21.0	8.5	0.0	29.5	6.2	2.2	3.7	13.1ab
	子叶	10.0	6.0	4.1	20.1	8.1	2.6	0.0	10.7ab
	上胚轴	15.2	4.1	5.6	24.9	12.2	3.7	4.4	20.3a
	中胚轴	10.0	9.6	4.8	25.4	10.1	4.8	8.9	24.8a
	下胚轴	10.7	7.4	5.2	23.3	11.9	10.8	5.0	27.7a
成熟组织	叶尖	11.9	4.1	1.0	17.0	1.1	1.9	0.0	3.0b
	叶基	18.9	3.7	0.0	22.7	0.04	0.0	0.0	0.04b
	茎段	15.9	4.4	0.4	20.0	0.07	0.0	0.0	0.07b

三、培养基

诱导棉花形成愈伤组织所采用的基本培养基有 SH、LS、MS 和 BT 等,但诱导体细胞胚胎发生所采用的培养基大多是固体或液体的改良 MS 培养基,虽然有人采用 LS 培养基,但效果不及改良 MS 培养基。一般用 SH 培养基诱导棉花体细胞胚萌发出苗。

液体悬浮培养是诱导体细胞胚胎发生并增加体细胞胚数