

## 亚麻品种‘双亚5号’的胚性愈伤组织诱导和体细胞胚胎发生

葛春辉, 计巧灵\*, 郭景霞, 姜丽, 王雪华, 朱国丽, 贾红丽, 张丕鸿

新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

**摘要:** 亚麻品种‘双亚5号’的种子在MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖培养基上可诱导出愈伤组织。将其转入MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA培养基上培养10周后诱导出大量胚性愈伤组织, 结构较致密, 浅黄色, 表面有成团的紧密粘附在一起的小颗粒形态。但其继代周期不宜太长, 继代次数不宜多, 否则易回到非胚性化状态。胚性愈伤组织转入MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> KT+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D分化培养基上培养40 d后可获得大量的球形胚状体。少量球形胚状体可萌发形成正常的子叶胚初期形态, 较多的球形胚状体形成次生体胚或仅有单极性的畸形胚状体。组织解剖学观察表明, 诱导出的是亚麻胚性愈伤组织和胚状体。

**关键词:** ‘双亚5号’亚麻; 胚性愈伤组织; 胚状体; 体胚萌芽; 组织解剖学

## Induction of Embryonic Callus and Regeneration of Somatic Embryogenesis in *Linum usitatissimum* L. ‘Shuangya No.5’

GE Chun-Hui, JI Qiao-Ling\*, GUO Jing-Xia, JIANG Li, WANG Xue-Hua, ZHU Guo-Li, JIA Hong-Li, ZHANG Pi-Hong  
College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

**Abstract:** Callus was initiated from seed explants of *Linum usitatissimum* ‘Shuangya No.5’ on MS medium supplemented with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D and 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose. A lot of embryonic calli emerged after transferred the callus to MS medium with combination of 0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA for 10 weeks, fine and close in texture, pale yellow, granular in shape adhered closely together. But it's no good prolonging time in subculture period and many times of subculture, otherwise it was easily returned to the non-embryonic status. A great deal of globular somatic embryos came out onto embryonic calli which were inoculated on MS differentiation medium supplemented with 1.5 mg·L<sup>-1</sup> KT+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D for 40 d. A small amount of globular-stage embryos could germinate and form cotyledon-stage embryos. More secondary somatic embryos and abnormal somatic embryos with single pole derived from globular-shape embryos. Histological anatomy proved that the embryonic callus and embryoid of flax were obtained after induction.

**Key words:** *Linum usitatissimum* ‘Shuangya No.5’; embryonic calli; embryoid; somatic embryo germination; histological anatomy

我国目前栽培的纤维亚麻品种主要是从原苏联引进的‘火炬’、‘乐-1120’等品种经人工诱变、种间有性杂交和回交得来(王殿奎 1997), 由于现有的亚麻品种遗传基础狭窄, 已有的野生、多胚、不育等特异资源的有利目标基因利用率偏低, 致使纤维亚麻育种工作进展缓慢(康庆华等 2006; 粟建光等 2004)。因此, 选择生态差异较大、亲缘关系较远、主要性状的优缺点可以互补的资源为亲本, 通过细胞工程(或基因工程)手段与传统方法相结合, 创造纤维亚麻新类型已势在必行(王殿奎 1997; 粟建光等 2004)。而现代育种手段的成功需要建立良好的纤维亚麻高效离体再生体系, 特别是通过体细胞胚的再生体系。亚麻体胚再生体系研究较多, Cunha 和 Fernandes-

Ferreira (1996, 1999)研究了亚麻体胚发生过程; Tejavathi 等(2000)研究的3个亚麻品种(‘Jeevan’、‘R552’、‘Gaurav’)的体细胞胚主要是次生胚; Dedičová 等(2000)也发现了类似情况; Salaj 等(2005)根据组织学方法得到结果, 认为这些类胚结构没有正常体胚特征, 不能正常发育。基于这些认识, 本文以新疆地区主栽亚麻品种‘双亚5号’为实验材料, 进行了体外诱导培养, 经过近2年的努力, 得到了大量的体细胞胚胎, 从而

收稿 2007-12-06 修定 2008-02-13

资助 国家自然科学基金(30660095)和新疆教育厅重点科研项目(XJEDU2006108)。

\* 通讯作者(E-mail: wjil118@yahoo.com.cn; Tel: 0991-8143743)。

为进一步探究亚麻体胚发育过程以及建立体胚再生体系,探索亚麻的远缘杂交或遗传转化育种建立了基础。

## 材料与amp;方法

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)品种‘双亚5号’由黑龙江省亚麻原料工业研究所培育,其种子由新疆农业科学院经济作物研究所提供。

亚麻种子放在0.1%升汞溶液(在溶液中加入1~2滴吐温)中灭菌5~6 min,用无菌水漂洗5~6次后,放在无菌滤纸上吸干表面水分,接入MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖培养基上,在(23±2)的培养室中暗培养40 d后,将诱导出的愈伤组织转入同种培养基上扩增,之后转入诱导培养基(表1)上,20~30 d继代一次,挑选长势较好的组织小块传代,待出现胚性愈伤组织后统计其诱导率,并将所有愈伤组织转入新配制的胚性愈伤组织诱导培养基上。经过5~7次继代培养后,挑选浅黄色、致密的小颗粒状的胚性愈伤组织转入系列分化培养基(表2),诱导亚麻体细胞胚。将分化培养40 d后的部分组织小团块投入纳瓦兴II固定液中固定,用石蜡包埋,按常规方法制备石蜡切片。切片厚5~7 μm,经番红-固绿染色,中性树胶封片,于Motic数码显微系统下观察并拍照。大部分组织小团块继续培养1个月后,取

出球形体胚转入系列萌发培养基(表3)上,诱使其萌发。除了特殊说明外,培养基均附加0.7%琼脂和3%蔗糖,pH(5.8±0.5),培养温度为(23±2),光照强度为30~50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间14 h·d<sup>-1</sup>。

## 结果与amp;讨论

### 1 亚麻种子愈伤组织的诱导

无菌亚麻种子在MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖培养基上暗培养12 d后,个别种子在胚根部脱分化,出现愈伤组织;20 d后,约有50%的种子出现愈伤组织;40 d后,大部分种子均形成愈伤组织。这种愈伤组织转瓶培养,很容易扩增。

### 2 亚麻胚性愈伤组织的诱导

不同种类和浓度的植物生长调节剂对亚麻胚性愈伤组织的诱导效应不同(表1)。实验中,IBA和6-BA的组合对亚麻胚性愈伤组织的诱导均无效,而KT和NAA组合的诱导效果较好,其中6号培养基(MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA)的诱导效果最好,胚性愈伤组织的诱导率达83.3%。形态学观察表明,6号培养基上的愈伤组织较致密,易碎,呈小颗粒状(图1-a),石蜡切片显示其结构中有小细胞团,这些细胞呈球形,细胞质浓。此种胚性愈伤组织不是由均一的细胞组成,其细胞团常为非胚性和体积较大的薄壁细胞包裹而

表1 胚性愈伤组织的诱导

Table 1 Induction of embryonic callus

编号	生长调节剂浓度/mg·L <sup>-1</sup>	胚性愈伤组织块数	诱导率/%	愈伤组织状态
1	KT 0.1+NAA 0.1	1	4.1	黄绿色,表面干燥,少许颗粒结构
2	KT 0.1+NAA 0.5	0	0	黄绿色,表面湿润,无瘤状突起,成块
3	KT 0.1+NAA 1.0	0	0	淡绿色,表面湿润,无瘤状突起,成块
4	KT 0.1+NAA 2.0	0	0	翠绿色,表面湿润,无瘤状突起,成块
5	KT 0.5+NAA 0.1	6	25.0	淡黄色,表面湿润,部分瘤状突起
6	KT 0.5+NAA 0.5	20	83.3	淡黄色,颗粒结构明显,较为致密
7	KT 0.5+NAA 1.0	12	50.0	浅绿色,表面较湿润,部分颗粒结构
8	KT 0.5+NAA 2.0	9	37.5	翠绿色,表面干燥,瘤状突起
9	IBA 0.1+6-BA 0.1	0	0	黄绿色,表面湿润,部分颗粒结构
10	IBA 0.1+6-BA 0.5	0	0	黄绿色,表面湿润,成块,无颗粒结构
11	IBA 0.1+6-BA 1.0	0	0	黄绿色,表面湿润,成块
12	IBA 0.1+6-BA 2.0	0	0	黄褐色,表面干燥,成块
13	IBA 0.5+6-BA 0.1	5	20.8	部分呈绿色,部分黄绿色,瘤状突起
14	IBA 0.5+6-BA 0.5	6	25.0	浅黄色,表面湿润,颗粒结构,质地较软
15	IBA 0.5+6-BA 1.0	5	20.8	黄绿色,表面干燥,有瘤状突起,质地硬
16	IBA 0.5+6-BA 2.0	3	12.5	浅绿色,表面干燥,有瘤状突起,结构密

基本培养基为MS。每种培养基上接入的愈伤组织均为24块。

表2 胚性愈伤组织的分化和体细胞胚的发生

Table 2 Differentiation of embryonic calli and formation of somatic embryos

编号	生长调节剂浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	最多的体胚数 / 块	体细胞胚的形态和色泽
F1	2,4-D 1.0+KT 2.0	8	浅黄色, 粒状
F2	2,4-D 1.0+KT 1.5	32	浅黄色或乳白色, 粒状
F3	2,4-D 1.0+KT 1.0	6	乳白色, 粒状
F4	2,4-D 1.0+KT 0	6	乳白色, 粒状
F5	2,4-D 0+KT 1.0	0	
F6	2,4-D 0+KT 0.5	0	
F7	2,4-D 0.1+ZT 0.4	0	
F8	2,4-D 0.2+ZT 1.6	0	
F9	2,4-D 0.4+ZT 1.6	0	
F10	6-BA 0.3+NAA 0.3	3	黄色, 粒状
F11	6-BA 0.3+NAA 0.5	0	
F12	6-BA 0.5+NAA 0.1	0	
F13	6-BA 0.5+NAA 0.3	0	
F14	6-BA 0.5+NAA 0.5	0	
F15	6-BA 0.7+NAA 0.1	0	
F16	6-BA 0.7+NAA 0.3	2	黄色, 粒状
F17	6-BA 0.7+NAA 0.5	0	
F18	6-BA 0.9+NAA 0.1	0	
F19	6-BA 0.9+NAA 0.3	0	
F20	6-BA 0.9+NAA 0.5	0	

基本培养基为 MS。

表3 体细胞胚在萌发培养基上的萌发

Table 3 Germination of somatic embryos on media

编号	培养基	最多的体胚萌发数 / 瓶	体细胞胚的形态和色泽
M1	MS	28	多鱼雷形、香蕉形、子叶形, 少量畸形胚, 乳白色
M2	1/2MS	11	球形多, 鱼雷形、香蕉形、子叶形少, 少量畸形, 乳白色
M3	MS+GA <sub>3</sub> 0.1 mg·L <sup>-1</sup>	0	土黄色, 逐渐死亡
M4	MS+GA <sub>3</sub> 0.5 mg·L <sup>-1</sup>	0	土黄色, 逐渐死亡
M5	MS+GA <sub>3</sub> 1.0 mg·L <sup>-1</sup>	0	土黄色, 逐渐死亡
M6	MS+GA <sub>3</sub> 2.0 mg·L <sup>-1</sup>	0	土黄色, 逐渐死亡
M7	MS+ABA 0.1 mg·L <sup>-1</sup>	0	土黄色, 逐渐死亡
M8	MS+ABA 0.5 mg·L <sup>-1</sup>	0	土黄色, 逐渐死亡
M9	MS+ABA 1.0 mg·L <sup>-1</sup>	0	土黄色, 逐渐死亡
M10	MS+ABA 2.0 mg·L <sup>-1</sup>	0	土黄色, 逐渐死亡

培养基中加入 Gln 200 mg·L<sup>-1</sup> 和 CH 500 mg·L<sup>-1</sup>。

嵌合在一起(图 1-b)。

此外, 结果还表明, 亚麻胚性愈伤组织的诱导需要较短的继代周期及较少的继代次数。在诱导亚麻胚性愈伤组织初期, 20~25 d 继代一次有利于愈伤组织的形态变化。3 次继代后, 在 4~7 号培养基上, 亚麻愈伤组织结构较致密, 浅黄色, 表面有紧密粘附在一起的小颗粒团出现, 但颗粒表面不光滑。从整瓶结果来看, 尽管培养条件一

致, 但不是每块愈伤组织都发生形态变化。随着继代周期的延长(30 d 左右), 这些培养基上的胚性愈伤组织结构有由较致密型向较疏松型转变的趋势, 转瓶 10 d 左右后, 愈伤组织块生长迅速, 体积膨大, 呈大块片状, 已退化为非胚性组织。继代 5 次后, 胚性愈伤组织的形态也逐渐变差, 并有小块褐变组织出现在其中。这些现象均说明亚麻胚性愈伤组织正逐渐衰老, 这种现象一经出现

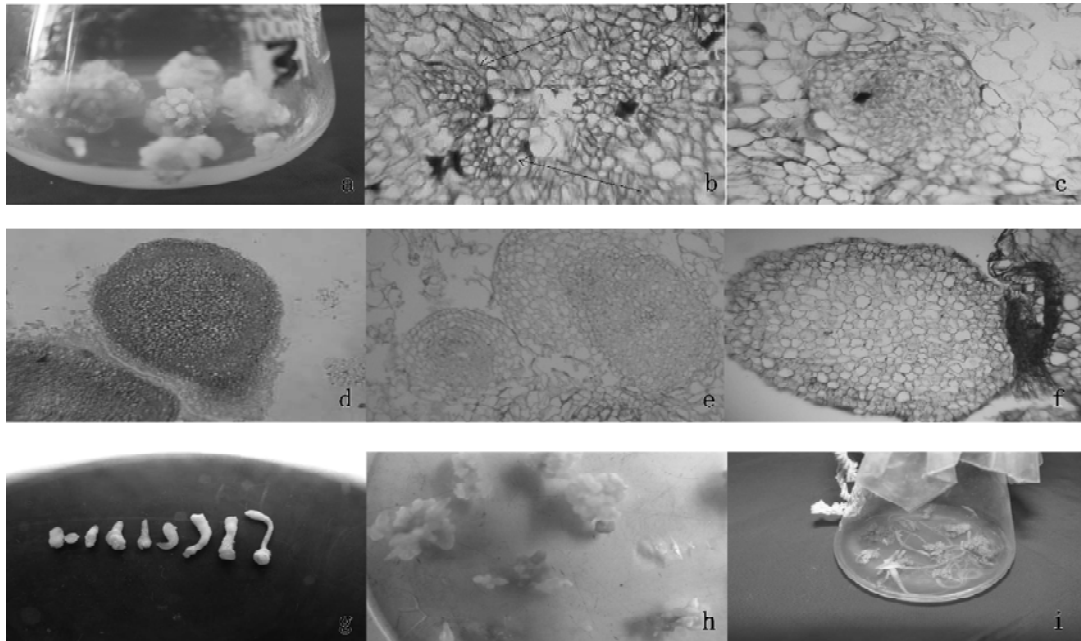


图1 亚麻品种‘双亚5号’的胚性愈伤组织和体细胞胚

Fig.1 Embryonic calli and somatic embryos of *L. usitatissimum* ‘Shuangya No.5’

a. 亚麻胚性愈伤组织。结构较致密，易碎，呈小颗粒状，浅黄色。b. 亚麻胚性愈伤组织石蜡切片。示薄壁细胞内的分生细胞团，呈鸟巢状结构。c. 亚麻胚状体石蜡切片。示内起源的球形胚，被大的薄壁细胞包裹着。d. 亚麻胚状体石蜡切片。示带有明显胚柄、正在发育的球形胚。e. 亚麻胚状体石蜡切片。示从球形的初级体胚内部产生的次生球形体胚。f. 亚麻胚状体石蜡切片。示鱼雷胚。g. 亚麻球形胚、鱼雷胚、香蕉胚和子叶胚。h. 亚麻畸形胚。仅具有芽端极性，芽明显伸长，但无根伸长。i. 亚麻畸形胚。仅具有根端极性，根明显伸长，但无芽伸长。

就很难逆转。

### 3 亚麻体细胞胚的发生

不同分化培养基上亚麻胚性愈伤组织发生体细胞胚的结果(表2)表明，胚性愈伤组织在分化培养基上诱导25 d后，F2号培养基上可以看到球形胚，呈浅黄色或乳白色，表面光滑，容易从愈伤组织块上剥离下来。35 d后，F1~F4号培养基上均出现球形胚，F2号培养基上出现得最多，肉眼可见到很多结构紧密的球形或近球形小颗粒，整块组织块变得很酥脆，用镊子夹时很容易散开。同一瓶材料的石蜡切片观察显示，有的愈伤组织团内部呈现鸟巢状(图1-b)结构，是分生细胞团，属胚性愈伤组织；有的内部已发育成球形胚，由大小基本一致、核大、核仁明显的细胞组成(图1-c)，体积较小，但仍被大的薄壁细胞紧紧包裹着；有些球形胚已突破薄壁细胞的束缚而游离出来，体积较大，表面不光滑；少数体积较大的球形胚带有明显的胚柄(图1-d)，正在进一步分化，少量鱼雷胚已经出现(图1-f)，这说明

在相同培养条件下，体细胞胚发生是不同步的。此外，在体细胞胚发生过程中，除了正常的各形态体胚外，还常见到从球形胚状体内部又产生次生胚的现象(图1-e)。

一般认为，生长素是体胚发生所必需的生长调节剂(Dedičová等2000；杨汉民等1992；郝建平 1995)，这已在多种植物体胚诱导中得到验证。本文结果表明，只有 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的培养条件下才能产生胚状体，但胚状体一经出现往往会很快脱分化；仅加KT的培养条件下未出现胚状体；而 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D+ $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  KT的培养基上则大量形成球形胚。这说明 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D是诱导亚麻胚状体发生所必需的，但需要适当浓度的KT协同作用，才能完成体胚发生过程，这与苜蓿的体胚发生情况类似(黄学林等1998)。总之，亚麻的胚状体以内起源为主。实验中除了得到大量正常的胚状体外，还有次生体胚出现，次生球形胚多是从球形的初级体胚内部产生，或从其表层产生的，它与初生体胚很难分离，剥

离后胚体即受损, 在培养过程中容易死亡, 不剥离也不能正常生长, 这与 Tejavathi 等(2000)的结果相似。无论怎样, 亚麻次生体胚产生的原因还有待深入研究。

#### 4 亚麻体细胞胚的萌发

将亚麻球形、鱼雷形胚状体转接到系列萌发的培养基上诱导 20 d 后, 在含有 GA<sub>3</sub> 或 ABA 培养基上的体胚不但没有萌发, 而且逐渐变成浅土黄色, 40 d 后逐渐死亡(表 3)。而在 M1、M2 号培养基上的部分球形胚已萌发, 并形成香蕉胚或子叶胚形态(图 1-g)。但一部分亚麻体胚呈畸形, 有些仅具有芽端极性, 茎伸长明显, 具有较完整的子叶原基, 但不形成正常的子叶, 也不发育出正常的根系(图 1-h); 有的仅具有根端极性, 可以发育出正常的长根, 但芽端极性不明显, 未见到芽端有明显发育(图 1-i)。这与 Cunha 和 Fernandes-Ferreira (1996) 认为赤霉素能促进亚麻体胚发育和不定芽再生的结果不同, 与 Tejavathi 等(2000)认为脱落酸不能防止亚麻次生体胚发生和促进体胚成熟的观点一致。‘双亚 5 号’亚麻胚状体在萌发阶段所用的最适生长调节物质的组合、剂量、处理时间等问题还需进一步探讨。

#### 参考文献

- 郝建平, 周小梅, 李绍清(1995). 茴香组织培养中体细胞胚胎发生的组织细胞学研究. 实验生物学报, 28 (3): 339~347
- 黄学林, 徐九龙, 高东微, 叶文红, 李筱菊(1998). MGBG 对茴香愈伤组织生长、体细胞胚胎诱导及其乙烯生物合成的影响. 植物学报, 40 (7): 635~641
- 康庆华, 关凤芝, 王玉富, 李建英, 焦洪双, 路颖, 吴广文, 宋宪友, 杨学(2006). 中国亚麻分子育种研究进展. 中国农业科学, 39 (12): 2428~2434
- 栗建光, 揭雨成, 龚友才, 关凤芝, 戴志刚, 路颖, 王玉富, 黎宇, 许英(2004). 麻类优质种质的创新与利用研究. 中国麻业, 26 (2): 56~59
- 王殿奎(1997). 纤维亚麻杂交育种的谱系分析. 中国麻作, 19 (2): 18~20
- 杨汉民, 高清祥, 张爱国, 黄峻(1992). 枸杞体细胞胚的诱导与形态发生. 兰州大学学报(自然科学版), 28 (1): 87~93
- Cunha A, Fernandes-Ferreira M (1996). Somatic embryogenesis organogenesis and callus growth kinetics of flax. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 47: 1~8
- Cunha A, Fernandes-Ferreira M (1999). Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J Plant Physiol*, 155: 591~597
- Dedičová B, Hricová A, Šamaj J, Obert B, Bobák M, Pret'ová A (2000). Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments. *J Plant Physiol*, 157: 327~334
- Millam S, Obert B, Pret'ová A (2005). Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* — a review. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 82: 93~103
- Salaj J, Petrovská B, Obret B, Pret'ová A (2005). Histological study of embryo-like structures initiated from hypocotyl segments of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Rep*, 24: 590~595
- Tejavathi DH, Sita GL, Sunita AT (2000). Somatic embryogenesis in flax. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 63: 155~159