

文章编号:1009-0002(2006)05-0834-03

综 述

亚麻生物技术研究进展

张志扬¹, 陈信波^{1,2}

1. 湖南农业大学 作物基因工程省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 中国农业科学院 麻类研究所, 湖南 长沙 410006

[摘要] 简要综述了近几年有关亚麻应用和基础研究的进展, 重点介绍了亚麻组织细胞的再生、体细胞发生、原生质体分离培养、细胞悬浮培养、花药培养, 以及亚麻转基因技术的研究成果, 讨论了目前在亚麻研究中出现的问题。

[关键词] 亚麻; 组织培养; 转基因植物; 体细胞胚胎发生

[中图分类号] Q942; Q944; Q949.9

[文献标识码] A

Progress in Flax Biotechnology

ZHANG Zhi-yang¹, CHEN Xin-bo^{1,2}

1. Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Hunan Agricultural University, Changsha 410128;

2. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410006; China

[Abstract] The species *Linum usitatissimum* (flax/linseed) has been the focus of both basic and applied research effort in plant cell and biotechnology studies in recent years. In this paper, recent advances in plant cell and tissue regeneration, somatic embryogenesis, protoplast isolation, cell suspension cultures, anther and microspore culture, embryo and ovary culture, gene transfer and expression by genetic transformation about flax were reviewed. Finally the exciting problem and future prospects for this ancient, but still highly relevant crop were discussed.

[Key words] *Linum usitatissimum* (flax/linseed); tissue culture; transgenic plant; somatic embryogenesis

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)是我国重要的经济作物, 亚麻纤维是高档的麻纺原料, 在各种麻类作物中, 它的品质仅次于苧麻。亚麻纤维强韧、柔细, 具有较好的色泽, 织物平滑整洁, 亚麻纺织品以其独特的优良品质受到广大消费者的青睐, 适于纺织高级衣着原料, 尤其用作夏衣原料非常凉爽。纤维用亚麻目前在全世界的种植面积高达 1.2 亿英亩, 大多数种植在欧洲和俄罗斯(www.jeffersoninstitute.org/pubs/flax.shtml)。同时, 亚麻也是重要的油料作物, 在全世界有广泛的种植, 平均每年的产量有 30 亿千克, 其主要的种植国家有阿根廷、印度、中国、加拿大、美国和俄罗斯(www.newcrop.uq.edu.au/newslett/ncn13-92.htm)。油用亚麻种子中富含 α -亚麻酸(十八碳三烯酸), α -亚麻酸是人体必需脂肪酸, 其代谢产物对人体具有降血压、降血脂、抑制变态反应、抗血栓、抗癌等重要作用, 最近几年对亚麻子中的 α -亚麻酸在医药方面的应用研究有了很大的进展。同时, 亚麻还作为植物组织再生、生物工艺学、植物-微生物互作的模式植物应用于基础研究。

1 细胞、组织和器官的培养

亚麻的组织培养研究已有很长的历史。1925 年, Laibach 进行了亚麻种间杂种幼胚培养的研究, 并成功地得到了杂种植株, 亚麻幼胚是最早在生物体外被培养的植物幼胚^[1,2]。Link 等于 1946 年首次报道了亚麻的离体下胚轴有再生成芽的能力^[3]。1976 年 Gamborg 等通过大量的实验, 筛选出更加高效的亚麻组织培养、原生质体发生的培养基, 此项工作对于后来的亚麻生物技术

的应用研究具有重要的指导意义^[4]。1983 年, 孙洪涛等以亚麻茎尖、子叶、下胚轴为材料, 通过组织培养获得再生植株, 系统研究了光温、培养基、激素及附加物对愈伤组织诱导率及再分化频率的影响, 建立了稳定的培养体系, 使绿苗分化达 90% 以上。尽管有许多研究者认为不同的亚麻品种在组织培养过程中要考虑到培养基的选择, 而且再生能力也不尽相同, 但总体来说亚麻可以比较容易地从茎、胚轴、根中诱导出再生芽^[5]。

植物的各种生理效应是不同种类生长调节物质之间相互作用的综合表现, 植物细胞离体培养、诱导脱分化和再分化过程更非某类物质单独作用的结果^[6,7]。Rutkowska-Krause 等研究了碳源对愈伤组织形成的影响, 他们认为 2 种碳源(2.5% 的蔗糖和 2.5% 的葡萄糖)对愈伤组织反应十分有效; 对于芽, 只有蔗糖在较低浓度(2%)时才有效, 而生根最生效的是 1% 的蔗糖^[8]。

2 体细胞胚胎发生

植物的体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis)是指单倍体或双倍体的体细胞在特定条件下, 未经性细胞融合, 而通过与合子胚胎发生类似的途径发育出新个体的形态发生过程。早期研究认为, 有意义和有潜在价值的体细胞胚胎发生的再生过程在很大程度上只限于伞状花科物种如胡萝卜, 但此现象在其他物种如大豆、苜蓿和最近应用较多的马铃薯中也有零星的报道^[9]。

[收稿日期] 2006-01-05

[作者简介] 张志扬(1981-), 男, 硕士研究生

[通讯作者] 陈信波, (E-mail) chenxinbo@hotmail.com

亚麻的体细胞胚最早来源于不成熟的受精卵胚,当使用体细胞成熟阶段的早期不成熟胚时,会有间接的体细胞胚胎形成^[10]。

Cunha 等详细研究了中间参数,包括碳源、总无机氮、离子形式的钙和玉米素的交互作用的平衡等对亚麻胚轴移植的体细胞胚胎形成的影响^[11,12]。他们还报道了在体细胞胚胎形成期间固醇含量的变化,后续并发现酯酶、过氧化物酶和酸性磷酸酶的同工酶谱有特异表现,可以作为体细胞胚发生的分子标志^[13,14]。Tejavathi 等用间接方法也从亚麻愈伤组织中诱导出体细胞胚,但是这样的体细胞胚不能完成根的发生^[15]。Dedicova 等发现从胚轴上能够再生出根和类似胚芽的结构(ELS)^[16]。Pretova 等回顾了亚麻胚胎形成的发展,尽管对亚麻体细胞胚胎发生做了一些广泛的研究,但对于影响和控制植物 ELS 形成因素的认识仍然不够,而且常常是矛盾的^[17,18]。

3 原生质体发生

亚麻原生质体培养已获得再生植株,这为亚麻体细胞杂交和研究奠定了基础。通过体细胞杂交,可以克服远缘杂交的不亲和性,为更广泛地利用各种有效基因培育优良品种开辟了一条新途径。亚麻原生质体可以从亚麻植株或亚麻种子的大部分组织中分离出来,但以幼嫩的子叶或 7~10 d 的胚轴组织为最好。利用标准的酶分离方法从叶和胚轴中得到原生质体的产量为每克鲜重有 10^7 枚原生质体颗粒(Millam,未发表数据)。

Ling 等在 1987 年第一个报道了亚麻组织原生质体的分离,随后在 1992 年公布了经由体细胞胚胎形成的再生路径^[19,20];1997 年他们又利用物理学电脉冲的方法,进行了亚麻不同品种原生质体的融合研究^[21]。David 等研究了亚麻纤维的原生质体的愈伤组织中细胞壁成分和形态发生的反应,发现从原生质体获得完整植株是十分困难的^[22]。Roger 等发现,亚麻原生质体发育过程中有 ELS 的形成^[23]。

通过原生质体再生完整的亚麻植株仍然存在很多问题,但是亚麻原生质体发生仍被广泛地应用于许多生物化学和生理学的研究中。可以预见,原生质体融合与体细胞杂交原生质体培养作为体细胞杂交和遗传转化的主要基础技术,将日益受到重视。

4 细胞悬浮培养

由于悬浮细胞的纯系本性和繁殖速度快等优点,在对植物做生物化学分析时,常常利用悬浮细胞进行研究。建立悬浮细胞系的前提是胚性愈伤组织的诱导,胚性愈伤组织结构松散、颜色新鲜、分裂能力强、增殖速度快,而且具有胚胎发生能力。由胚性愈伤组织建立的悬浮细胞系生长旺盛,细胞内含物充实,可以分离得到大量有活力的原生质体,并且易培养,试验重复性好。Schaumann 等在亚麻细胞的悬浮培养中,研究了微粒体中胶质转甲基酶(PMT)的活性和细胞壁中甲基酯酶(PME)的活性^[24]。Bourlard 等根据 Schaumann 的研究,从亚麻悬浮细胞的细胞膜中溶解出 3 个 PMT 亚基,随后 PMT 和 PME 被广泛地应用于其他物种的研究中^[25]。

亚麻悬浮细胞体系的建立,对生物化学和分子生物学研究,特别是对细胞壁形成机理的研究非常有利。由于物种的可控性理论,亚麻在植物细胞壁和木质素的研究中一直被当作模式,作

为研究其他植物的理论指导,这也完全归功于亚麻细胞悬浮培养的发展。

5 花药和花粉粒培养

亚麻花药和花粉粒培养可以得到大量的单倍体材料和纯合体,为植物育种提供了良好的途径,在分子标记的研究中也有应用。在田间实验中使用花药培养技术产生 F_1 代杂种,体现了双倍体线路的优越性。小孢子花粉粒再生单倍体和花药的胚胎发生是一个极其复杂的过程,受许多因素的调控。1991 年,Nichterlein 等从花药愈伤组织诱导获得了第 1 例亚麻单倍体植株,并研究了环境因素对亚麻花药培养再生能力获得单基因型的影响,通过对一例再生植株的细胞学实验验证了这株植株起源于花粉粒;1993 年通过一个分离的亚麻花粉粒培养研究,探索了亚麻胚胎形成和再生系统的条件,发现花粉粒在液体介质中被分割时会导致愈伤组织微小化或胚状体形成,有些胚状体和较小的愈伤组织会进一步发展为较大的愈伤组织或者被成功再生成为完整的植株^[26,27]。

Chen 等通过使用分子标记辨别在花药培养的再生植株中来源于花粉粒;后来扩展到研究耐锈基因的遗传性状和起源于花粉粒的亚麻花药培养的分子标记;2002 年又研究了在亚麻花药培养中某些参数的改变对芽延长的作用,尤其是蔗糖浓度的影响,并通过对几个不同基因型亚麻的预处理和培养基中的激素效应的不同的处理鉴别了这一系列反应^[28]。Obert 等于 2004 年第 1 次成功地通过栽植的未施肥的双单倍体亚麻子房获得了再生植株^[29-31]。

6 农杆菌介导的转基因技术

自从 1983 年第 1 株转基因植物诞生以来,迄今被成功转入外源基因的植物大约有 130 余种。根癌农杆菌介导法是植物基因转化中使用最普遍的一种方法,这种方法在亚麻的基因转化中也是最有效的,但是利用农杆菌介导研究转基因植物的首要条件是高效的再生体系的建立。Zhan 等于 1988 年报道了第 1 例农杆菌介导的亚麻转基因植株,验证了亚麻转基因技术的成功;同年,Basiranet 等又报道利用农杆菌介导法获得了亚麻转基因植株^[32]。自此开始了亚麻作物基因工程的育种研究,同时也为利用根癌农杆菌介导研究转基因亚麻提供了一个稳定的平台。1988 年 Jordan 等采用农杆菌介导法将抗除草剂“绿黄隆”的突变乙酰合成酶基因导入商业化的亚麻品种中,培育出了抗“绿黄隆”的转基因亚麻新品系^[33]。在转基因研究中,农杆菌浸染愈伤的效率是制约农杆菌介导技术的关键。例如,植物在转基因过程中,愈伤组织已经成功地在一定的抗生素或者除草剂浓度下成活,但是在接下来的分子生物学分析时,目的基因片段根本没有被转入^[34]。基于这个问题,McHughen 等发现在农杆菌介导的转基因过程中经过一段时间的预培养是非常有必要的,这可以大大的提高转基因的频率^[35]。Rakousky 等建立了潮霉素选择性抗性培养体系^[36];Ling 等报道了通过聚乙二醇直接转化和冠瘿病菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的原生质体的转基因再生植株^[21]。Wijayanto 等报道了利用粒子轰击的亚麻转化,这一方法对于不同种间特性瞬间表达的研究提供了一个很好的平台^[37]。亚麻转基因

因技术研究的不断进展,为进行亚麻抗性(抗病、抗虫、抗除草剂等)育种的研究开辟了一条崭新的途径,使亚麻育种进入了高新技术时代。

7 小结和展望

以上回顾描述了对亚麻的研究历史、种质多样性和在生物体外的应用研究,这些研究从根本上推动了其他许多基础研究和应用研究。对亚麻的研究虽然不能与对拟南芥和烟草的研究深度相比较,但上述研究对于今后深入研究亚麻及其他植物(作物)都有一定的指导意义。针对亚麻这一物种的基因沉默尚未见报道。亚麻作为重要的经济作物,其研究和应用前景将是光明的。

参考文献

- [1] Dietrich K. Über die Kulturen von Embryonen ausserhalb des Samens [J]. *Flora*, 1924,17:379
- [2] Laibach F. Das Taubwerden von Bastardsamen und die Kunstliche aufzucht von früh absterbenden Bastardembryonen[J]. *Z Bot*, 1925, 17: 417
- [3] Link GKK, Eggera V. Mode, site and time of initiation of hypocotyledonary bud primordium in *Linum usitatissimum* L.[J]. *Bot Gaz*, 1946,107:441
- [4] Gamborg OL, Shyluk JP. Tissue culture, protoplasts and morphogenesis in flax[J]. *Bot Gaz*, 1976,137:301
- [5] 孙洪涛,傅卫东,董丽辉,等. 亚麻茎尖、子叶、下胚轴诱导再生植株的研究[J]. *科学通报*, 1983,28(21):1332
- [6] Bretagne B, Chupeau MC, Chupeau Y, et al. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source [J]. *Plant Cell Rep*, 1994,14:120
- [7] Jain P, Rashid A. Stimulation of shoot regeneration on *Linum* hypocotyl segments by thidiazuron and its response to light and calcium[J]. *Biol Plantarum*, 2001,44:611
- [8] Rutkowska-Krause I, Mankowska G, Lukaszewicz M, et al. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum* [J]. *Plant Cell Rep*, 2003,22:110
- [9] Sharma SK, Millam S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages [J]. *Plant Cell Rep*, 2004,23:115
- [10] Pretova A, Williams EG. Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.)[J]. *Plant Physiol*, 1986,126:155
- [11] Cunha AC, Fernandes-Ferreira M. Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth kinetics of flax [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1996,47:1
- [12] Cunha AC, Fernandes-Ferreira M. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). Effect of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin[J]. *J Plant Physiol*, 1999,155:591
- [13] Cunha AC, Fernandes-Ferreira M. Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax[J]. *Plant Sci*, 1997,124:97
- [14] Cunha AC, Fernandes-Ferreira M. Ontogenic variations in free and esterified fatty acids during somatic embryogenesis of flax (*Linum usitatissimum* L.)[J]. *Plant Sci*, 2003,164:863
- [15] Tejavathi DH, Sita GL, Sunita AT. Somatic embryogenesis in flax [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2000,63:155
- [16] Dedicova B, Hricova A, Samaj J, et al. Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments[J]. *J Plant Physiol*, 2000,157:327
- [17] Pretova A, Hajduch M, Obert B. Some characteristics of flax embryo development *in situ* and *in vitro* [J]. *Acta Biol Cracov Bot*, 2000,42:45
- [18] Pretova A, Obert B. Flax (*Linum usitatissimum* L.) A plant system for study of embryogenesis[J]. *Acta Biol Cracov Bot*, 2003,45:15
- [19] Ling HQ, Binding H. Plant regeneration from protoplasts in *Linum* [J]. *Plant Breed*, 1987,98:312
- [20] Ling HQ, Binding H. Improvement of plant regeneration from *Linum* protoplasts by the induction of somatic embryogenesis [J]. *J Plant Physiol*, 1992,139:422
- [21] Ling HQ, Binding H. Transformation in protoplast cultures of *Linum usitatissimum* and *L. suffruticosum* mediated with PEG and with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *J Plant Physiol*, 1997,151:479
- [22] David H, David A, Bade P. Cell wall composition and morphogenic response in callus derived from protoplasts of 2 fiber flax (*Linum usitatissimum* L.) genotypes[J]. *J Plant Physiol*, 1994,143:379
- [23] Roger D, Gallusci P, Meyer Y. Basic chitinases are correlated with the morphogenic response of flax cells[J]. *Physiol Plantarum*, 1998, 103:271
- [24] Schaumann A, Bruyantvannier MP, Goubert F. Pectic metabolism in suspension cultured cells of flax (*Linum usitatissimum*) [J]. *Plant Cell Physiol*, 1993,34:891
- [25] Bourlard T, Bruyant-Vannier MP, Schaumann A, et al. Purification of several pectin methyltransferases from cell suspension cultures of flax (*Linum usitatissimum* L.) [J]. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie III Sciences De La Vie Life Sciences*, 2001, 324:335
- [26] Nichterlein K, Umbach H, Friedt W. Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.) [J]. *Euphytica*, 1991,58:157
- [27] Nichterlein K, Friedt W. Plant regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 1993,12:426
- [28] Chen Y, Kenaschuk E, Dribnenki P. High frequency of plant regeneration from anther culture in flax, *Linum usitatissimum* L [J]. *Plant Breeding*, 1998c,117:463
- [29] Chen Y, Hausner G, Kenaschuk E, et al. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers [J]. *Plant Cell Rep*, 1998a,18:44
- [30] Chen Y, Dribnenki P. Effect of genotype and medium composition on flax (*Linum usitatissimum* L.) anther culture [J]. *Plant Cell Rep*, 2002,21:204
- [31] Obert B, Dedicova B, Hricova A, et al. Plant regeneration from flax anther culture: genotype, pretreatment and media effect [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2004c,79:233
- [32] Basiran N, Armitage P, Scott RJ, et al. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens* regeneration of transformed shoots via a callus phase [J]. *Plant Cell Rep*, 1987,6:396
- [33] Jordan MC, McHughen A. Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium* mediated gene transfer [J]. *Plant Cell Rep*, 1988a,7:281
- [34] Jordan MC, McHughen A. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots [J]. *Plant Cell Rep*, 1988b,7:285
- [35] McHughen A, Jordan M, Feist G. A preculture period prior to *Agrobacterium tumefaciens* inoculation increases production of transgenic plants [J]. *J Plant Physiol*, 1989,135:245
- [36] Rakousky S, Tejklova E, Wiesner I, et al. Hygromycin B an alternative in flax transformant selection [J]. *Biol Plantarum*, 1999,42:361
- [37] Wijayanto T, McHughen A. Genetic transformation of *Linum* by particle bombardment [J]. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 1999,35:456