

英文缩略语

缩略名	英文名	中文名称
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-二氯苯氧乙酸
6-BA	6-Benzylaminopurine	6-苄基氨基嘌呤
IBA	Indole butyric acid	吲哚丁酸
KT	6-Furfuryl aminopurine (Kinetin)	6-糠基氨基嘌呤
NAA	α -Naphthalene acetic acid	α -萘乙酸
GA ₃	3- Gibberellic acid	赤霉素
ZT	Zeatin	玉米素
ABA	Absciscic acid	脱落酸
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
POD	Peroxidase	过氧化物酶
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
Pro	Proline	脯氨酸
EST	Esterase	酯酶
MS	Murashige & Skoog medium	MS培养基
POD	Peroxidase	过氧化物酶
CAT	Catalase	过氧化氢酶

学位论文独创性声明

本人声明，所呈交的学位论文系本人在导师指导下独立完成的研究成果。文中依法引用他人的成果，均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本人如违反上述声明，愿意承担由此引发的一切责任和后果。

论文作者签名： 日期：2007 年 6 月 4 日

学位论文知识产权权属声明

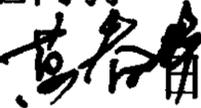
本人的学位论文是在学期间在导师指导下完成的，知识产权归属学校。学校享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为新疆大学。

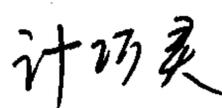
本学位论文属于：

保密 ，在 两 年解密后适用于本声明。

不保密 。

(请在以上方框内打“√”)

论文作者签名： 日期：2007 年 6 月 4 日

导师签名： 日期：2007 年 6 月 4 日

摘要

本研究的主要内容:(1)以亚麻(*Linum usitatissimum* L.) (双亚5号)为材料,以种子为外植体,通过组织培养技术,研究脱分化及愈伤组织再分化最佳条件,探究亚麻体细胞胚胎发生发育的完整过程,为以亚麻为亲本的体细胞杂交育种奠定良好的技术平台;(2)采用高盐一步筛选法,诱导亚麻耐盐突变细胞系,通过采用生理生化的指标来验证耐盐突变细胞系。

现将研究结果总结如下:

1. 用NAA0.5mg·L⁻¹+KT0.5mg·L⁻¹的MS培养基能够获得亚麻的胚性愈伤,亚麻胚性愈伤组织的生长状态良好,呈浅黄色,表面干燥,较为松散、增殖快。
2. 用KT1.5mg·L⁻¹+2.4-D1.0mg·L⁻¹的MS分化培养基能很好地诱导愈伤组织发生体细胞胚,并能进行体胚发育,亚麻体细胞胚经过球形胚、心形胚、鱼雷胚及子叶胚等过程,但在这过程中产生次生单极性畸形胚。
3. 获得了能够耐受250mmol·L⁻¹NaCl浓度的高耐盐亚麻愈伤组织。通过比较水分含量、相对增长率、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、脯氨酸含量、MDA含量、POD酶活、CAT酶活、SOD酶活、EST同工酶、POD同工酶及SOD同工酶多种生理生化指标,发现均较对照组有明显差异,可以确定该耐盐愈伤组织为亚麻耐盐突变细胞系。

关键词: 亚麻, 愈伤组织, 胚状体, 耐盐突变细胞系

Abstract

Contents of this paper are as follows: (1) Using flax (*Linum usitatissimum* L.) (shuangya-5) as explants, dedifferentiation of the seeds and differentiation of its callus through tissue culture technology, as well as proper conditions for a complete developmental process of flax somatic embryogenesis were studied. It would have laid a good platform for the somatic cell hybrid breeding of flax as a parent ; (2) Flax salt-induced mutation cell lines had been induced by high salt method, and it was proved with physiological and biochemical indicators.

Results are summarized as follows:

1. Embryonic callus of flax could be gained on the MS medium with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT, and grew in a better state: hazel, dry on surface and loose.

2. The callus were induced to yield somatic embryos on the differentiatonal MS medium with $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT and $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, development of embriod underwent globular embryo, heart-shape embryo, torpedo-shape embryo and cotyledon – shape embryo .But some secondary abnormal unipolar embryos were found in the process.

3. Salt-tolerant flax callus could suffer $250\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ LN₂ was gained. By comparing with moisture content, relative growth rate, soluble sugar content, soluble protein content, proline content, MDA content, POD, CAT and SOD activity, EST isozyme, POD and SOD isozymes, many obvious differences between salt-tolerant callus and ordinary callus were observed, and salt-tolerant mutant cell line of flax was gained.

Keywords : Flax seed, Callus, Embryoids, Salt-tolerant mutant cell line

第一部分 文献综述

1.体细胞胚胎发生途径研究进展

植物体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis SEM)是指在离体培养条件下,植物体细胞通过与合子胚发生相似的途径形成类似合子胚结构的过程。胚性细胞是一类具胚胎再生潜能的细胞,通常体积较小,近圆形,具有较大的核和明显核仁,细胞质浓厚,着色深。体细胞胚胎在形态上相似于合子胚,通过发育具有一定的极性和典型的胚性器官,如胚根、下胚轴、子叶等。在植物长期进化的过程中,许多物种通过了不同的无性胚胎发生方式来克服影响受精的环境和基因的影响。体细胞胚胎发生有两种方式:一种是不需要经过愈伤组织阶段,直接从外植体的细胞分化出体细胞胚胎;另一种是先形成愈伤组织,再从愈伤组织分化出体细胞胚胎。这两种发生方式所需的条件各不相同,前者需要诱导物的合成或抑制物的消除来使细胞恢复分裂形成分生细胞,最终形成完整的体胚;后者则需要诱导细胞脱分化重新进入细胞周期而进行发育的重决定,最后形成体胚。在这两种体细胞胚胎发生方式中,后者比较常见。自从Steward(1958)在胡萝卜细胞悬浮培养中发现体细胞胚胎发生以来,体细胞胚胎发生的潜力在多种的植物中被发现,可以说,只要有合适的外植体、培养基和环境条件,所有植物的大部分组织与器官都能诱导体细胞胚胎发生。由于植物体细胞胚胎在研究植物细胞的生长和分化机制、胚胎发生和基因表达调控、作物品种改良等方面的重要作用,所以一直受到很多学者的关注。植物体细胞胚胎的发生是一个起始于原胚团细胞(Primary Embryonic masses,PEMs)的复杂的再生过程,并伴随着体细胞胚胎的形成、发育、成熟、干燥和植株再生。通过体细胞胚胎发生途径再生植株一般包括四步:体细胞胚胎发生的起始、体细胞胚胎的增殖、体细胞胚胎的成熟、植株的再生和发育。

从1948年Curits等从兰属杂种胚的愈伤组织培养中首次发现和正常胚

相似的胚状体结构以来，迄今已有100多种植物能诱导体细胞胚胎发生^[1]。相对器官发生而言，体细胞胚胎发生具有形成完整植株速度快、数量大、结构完整且同步性易于控制等特点^[2]。完整的体细胞胚胎发生的过程需要以下步骤：

1.1 胚性愈伤组织诱导

胚性愈伤是指具备胚胎发生能力可直接用于体细胞胚发生的愈伤组织。胚性愈伤组织的产生是外植体重排细胞发育方向，由分化状态转化为脱分化状态的过程。胚性愈伤的成功诱导与长期保存是进行体胚发生研究的前提条件^[3]，同时胚性愈伤组织也是进行原生质体分离培养的良好材料。有关胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织在细胞学和形态学上的差别，前人也做过研究。邓秀新^[4]指出，胚性愈伤组织细胞的可溶性蛋白的含量明显高于非胚性愈伤组织；胚性愈伤组织中的胚性细胞的细胞质浓、核糖体多、淀粉粒也较多、液泡少而小、细胞核大，细胞排列较整齐，而非胚愈伤则相反^[5]。诱导过程中，就出现时间来说，非胚性愈伤早于胚性愈伤出现；从外观上，胚性愈伤组织为淡黄色或黄色且呈现出松散的颗粒状，非胚性愈伤则为白灰色紧密团块或松散泥状结构；在生长势方面，胚性愈伤组织长势快不易变褐且易分化出胚状体而非胚性愈伤则相反。在胚性愈伤组织诱导中，外植体的选取很重要，一般来说分化程度较高的组织和器官如叶片、叶柄、茎段等难诱导出胚性愈伤组织；而分化程度较低的生殖器官如花药、幼胚、花、种子等容易诱导出胚性愈伤组织。

1.2 胚性愈伤组织继代保存利用

良好的胚性愈伤组织是进行体细胞胚胎发生，实现植株再生、原生质体分离、进而体细胞杂交、种质资源离体保存等非常好的起始材料，同时也是进行遗传转化的良好受体。因此胚性愈伤组织的继代与保存对植物的离体培养和育种研究很重要。如果诱导出的胚性愈伤组织保存不好，胚胎发生能力就会丧失^[6]。长期继代的胚性愈伤组织形态发生能力常常逐渐下降，有时甚至完全丧失，其原因很复杂有可能是细胞或组织内激素不平衡

关系的改变造成的,或是由于细胞对外源的生长物质敏感造成的^[7]。因此合适的胚性愈伤组织继代保存方法是很重要的。胚性愈伤组织的继代保存较为成功的做法是采用交替继代培养法。薛美凤等^[8]在研究长期继代对棉花胚性愈伤组织体胚发生能力的影响时指出长期继代会导致胚性愈伤组织体胚发生能力降低和畸形胚的增多,但胚性愈伤组织在 $MS+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+1.9\text{g/L}\text{KNO}_3$ 和 $MS+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IAA}$ 两种培养基上交替培养并选择性继代,可长期保存。在影响胚性愈伤组织继代保存的诸多因素中,培养方法和继代周期也很重要。王家福等^[9]认为枇杷的胚性愈伤在 $10\text{--}15^\circ\text{C}$ 的低温下,在弱光或黑暗条件下能很好的保持胚性。薛美凤^[8]指出缩短继代时间有利于愈伤组织增殖,并且随着胚性愈伤组织选择培养时间的延长和继代次数的增多,体细胞胚变异频率逐渐升高,再生能力逐渐下降。

1.3 体细胞胚胎发生与植株再生

1.3.1 体细胞胚胎发生

体细胞胚胎发生作为离体培养条件下形态发生和植株再生的一条途径,因其遗传比较稳定,可以分化成完整植株,并可用于基础研究和应用研究而受到高度重视。体胚的诱导都需经历胚性细胞团的诱导、体胚的分化和发育这两个阶段^[10]。得到胚性愈伤是体胚发生的基础,因此,能否诱导胚性愈伤组织是体胚间接发生的关键。除了这些因素外,在胚性愈伤组织分化体胚和体胚再生植株的过程中,培养基的种类、培养基中植物生长调节剂的种类和浓度、内源激素、有机附加物的种类、培养方式等对体胚的发生和再生有很大的影响。PEM(Primary Embryogenic masses, PEMs)向体胚的转变,使PEM的扩繁和离体胚胎发育之间建立了一个至关重要的连接作用,并使这两个过程独立进行,这似乎意味着,许多胚性细胞系不能形成发育完全的体胚在很大程度上与PEM向体胚的转变障碍有关。一般来讲,体细胞胚胎在还没有达到合适的发育阶段时不应该进行成熟处理。体胚成熟是大部分体胚萌发的关键因素,而植物体胚的成熟受基因型、糖类、

ABA、PEG等多种因素的影响。

1.3.2 体胚植株再生

体胚再生植株是指成熟的体胚在合适的条件下萌发并形成完整植株的过程。

体细胞胚胎的成熟和萌发,虽然植物体细胞胚能够大量诱导形成,但是有些植物的体胚成熟存在诸多问题。无论是单子叶还是双子叶植物,其体细胞胚胎都要先经历鱼雷形胚向成熟阶段发育,然后再进入体细胞胚胎发芽阶段的过程。许多体细胞胚胎尽管可顺利地生长到鱼雷形胚阶段,但却不能正常萌发,其中一个重要原因可能是体细胞胚胎未充分成熟^[11]。畸形胚的存在和体胚发生和发育的不一致也是导致体胚成苗率低的原因^[12]。一些体细胞胚胎发育过程需要一些特殊的处理,如低温,脱水等^[13],才能成熟,进一步发育成完整植株。

2. 亚麻离体再生体系研究进展

2.1 亚麻的组织器官的培养

亚麻是我国优势经济作物,在五大麻纺工业原料作物中效果最佳。二十世纪50年代开始,经过几代人的努力,我国从国外引进了上千分不同亚麻种源资源,极大的丰富了亚麻遗传基因库,相继培育出山西晋亚号、甘肃甘亚号、内蒙古内纤号、黑龙江黑亚号等亚麻新品种系列,大大的促进了我国亚麻业的迅速发展。“七五”后,我国纤维亚麻生产规模不断扩大,1988年一跃成为世界第二大生产大国;1999年跃居世界第一位。目前我国现有亚麻种质资源在4000份以上。

亚麻的组织培养研究已有很长的历史。1924年,Laibach^[14]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。Link等^[15]首次报道了亚麻的离体下胚轴有再生成芽的能力。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。1983年,孙洪涛等^[16]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,使绿苗分化率达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对培养基的选择不同,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。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^[17]。Rutkowska-rause等^[18]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,只有蔗糖在较低的浓度(2%)时才有效,而生根最有效的是1%的蔗糖。

2.2 亚麻体细胞胚胎发生

亚麻的体细胞胚最早报道来源于不成熟的受精卵胚,在体细胞成熟阶段,早期不成熟胚会有间接的体细胞胚胎形成。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下胚轴为外植体的体细胞胚胎形成的影响^{[19][20]},形成具有双极性的子叶胚,发育成完整的植株。他们^{[21][22]}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标志。Tejavathi等^[23]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。Dedicova等^[24]发现从胚轴上能够再生出根和类似胚芽的结构(ELS embryo-like structures),但不能发育成正常的植株。pretova等^[25]回顾了亚麻体细胞胚胎形成的发展,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(embryo-like structures, ELS)形成因素的认识仍然不够,而这些研究结果研究且常常是相互矛盾的。总之,目前国

内外对亚麻体细胞胚胎发生发育研究的还不够全面,尚未形成完整的技术体系。就现有报道的研究来看,由于亚麻不同品种基因型鉴定的差异,这种差异同样表现在不同品种的体细胞胚胎发生和发育。

3. 植物耐盐变异体离体筛选的研究进展

自Nabors等^[26]首次报道从烟草细胞系成功地筛选出耐盐突变体再生植株之后,目前已有近百篇论文报道有关筛选耐盐细胞系与变异体或突变体。研究的植物种类已近40种^[27],其中包括许多重要的农作物和牧草,如谷子^[28]、小麦^[29]、大麦^[30]、玉米^[31]、红豆草^[32]等。土壤盐渍化是影响农业生产与生态环境的一个重要因素,过去几十年人们对如何开发利用盐碱地已做了大量工作。人们通过传统杂交育种,海水灌溉筛选育种,组织培养及细胞培养筛选抗盐品种,甚至基因工程培养抗盐作物品种的研究均取得了一定的进展。实践证明依赖工程措施改良土壤这一途径消耗人力、物力、财力很大,加上淡水资源的缺乏,因而受到很大限制^[33]。因此选育适应盐渍环境的新品种,就成为最有希望的途径。多年来培养作物耐盐新品种主要是利用常规育种技术,不仅时间长、难度大,而且短期内进展缓慢,不易见成效。随着植物细胞与组织培养技术的进展和细胞全能性,体细胞无性系变异存在的广泛性的证实^[34],显示用细胞培养技术从高等植物细胞中分离出耐盐变异体的可能性,为培养耐盐植物品系提供了新的途径和方法。

3.1 耐盐变异体的筛选

3.1.1 分离突变体的细胞材料的选择

植物耐盐变异体的筛选,主要是通过对固体培养的愈伤组织或液体悬浮培养的细胞系进行盐或海水等选择剂的胁迫培养,从而诱导产生耐盐突变体植株^[35]。利用固体培养愈伤组织分离筛选变异体,方法简便,目前被广泛采用。但具有许多缺点,如培养物相对生长速率较慢、物理和化学诱

变剂的选择压力不均一、未处于表面的大部分细胞可能逃避选择压力的作用、已死或将死的组织块中的个别抗性细胞可能由于周围组织的障碍失去分裂能力等。因此，用愈伤组织培养物进行筛选并不很理想，悬浮细胞培养系统具有能够提供比较均匀的选择压力和细胞增殖速率等主要优点。目前已在多种植物中建立了悬浮细胞系，但直接利用建立的悬浮细胞系定向筛选到变异体的例子不多^[39]，愈伤组织仍是目前普遍采用的分离突变体的材料。

3.1.2 耐盐变异体的筛选方法

选择压力筛选法是通过添加某些对不同的细胞有不同作用效果的物质，淘汰部分敏感细胞，而选择得到所需的细胞的选育方法。选择压力筛选法可以分为正选择法和负选择法两种。负选择法是用特定的培养基使发生遗传变异的细胞停止生长，而正常未发生突变的细胞可以生长，这时加入一种可以杀死正在生长的细胞而对不生长细胞无害的药物，然后再改变条件，使处于停止生长状态的未杀死的突变细胞重新恢复生长，这样就可以只保留期望得到的变异细胞。正选择法适用于对抗性突变体的选择，即把受选择的细胞群体置于一定的选择压力下，部分细胞在选择压力的作用下被淘汰，而有一些耐受抗选择压力的细胞可以生长，从而选择得到所需的细胞^[36]。二是多步正筛选法，一般是把愈伤组织(也有的直接用外植体)培养在盐浓度依次增高的培养基中，每级浓度培养一至数代不等，就可获得不同盐分水平下产生的愈伤组织变异系^[37]，所选的耐盐系都需培养在无盐压的培养基上进行恢复生长^{[38][39][40]}。此法的优点是可选出不同级别的耐盐系，而且不易漏掉本来就存在的一些变异，缺点是容易使生理适应性细胞存活下来。

3.1.3 选择剂的选择

耐盐变异体的筛选一般直接用NaCl作为选择剂，也有用Na₂SO₃或海水作选择剂的。Chalef^[41]认为还可以利用聚乙二醇(PEG-6000)，轻脯氨酸(HYP)等作为选择剂，通过对渗透调节能力的选择提高耐盐性。用这种方

法,人们分别从水稻^[42]和小麦^[43]等植物的培养细胞中得到了耐盐变异系,这些变异系均具有高脯氨酸含量,而且耐盐性增强。选择耐盐细胞系可以使用诱变剂提高变异频率,但考虑到在用大量细胞筛选的情况下,应用诱变剂有可能使材料原有的优良性状消失,一般不用诱变剂。通常认为,在盐胁迫下能否产生耐盐的突变体,与盐浓度及筛选的时间长短有关。在低水平的选择压力下有利于形成生理适应性细胞,而不利于突变细胞的产生。因此许多学者认为,选择压力必须达到足以抑制绝大多数细胞分裂与生长的程度,在含盐培养基中正常细胞几乎不能生长、分裂的情况下,有可能筛选出突变的细胞^[44]。长期选择(6-12个月以上)之所以重要,是借以获得耐盐性稳定的细胞系,并获得同质的突变体,而减少产生嵌合现象的可能性。

3.2 耐盐愈伤组织变异系的耐盐稳定性

筛选得到的耐盐愈伤组织变异系,必须进行在NaCl胁迫下的生长试验,以确定其耐盐性,只有那些能在一定的盐压下仍具有较高相对生长量的愈伤组织方可认为是耐盐性的愈伤组织^[45]。筛选出的变异系是否能遗传,而不是后生改变,一般有以下判断标准:

- (1) 离开选择剂后变异表型应保持稳定。
- (2) 发生变异的频率低。
- (3) 变异细胞中具有相应变化了的基因产物或生物化学机制。
- (4) 选择出的变异表型能够通过有性过程传递。

以上判断标准中,虽然通过变异性状的遗传方式来判断最有说服力,但由于不少筛选出的变异细胞系已丧失分化能力不能再生植株,而有些再生植株存在有性生殖障碍,因此,采用遗传方式来判断变异性状存在客观局限性,通常从生理生化指标上来判断较为常用。另外,体细胞突变体中,有些被挑选出来的变异特征仅在细胞水平上表达,而在植株水平上并不表达,所以仅愈伤组织耐盐还不能认为由其产生的再生植株也耐盐,仍需进一步筛选。

3.3 耐盐细胞系的植株再生及其耐盐性状的稳定性

耐盐突变体筛选的一个关键问题是,使具有耐盐性的细胞分化产生再生植株。周荣仁等^[46]在选择耐盐烟草细胞变异系的分化植株时发现,选择培养耐盐细胞系的耐盐水平越高,越加速其丧失器官发生的能力。一般而言,耐盐变异系的愈伤组织经过长期选择培养后,就会减弱或丧失植株再生能力,不易再生植株^[47]。即使获得再生的小植株,也往往因为发育畸形,或移入土壤后不能成活,或小植株长大开花后,雄、雌蕊畸形不孕而不能获得种子,因而无法测定其后代能否耐盐。由于组织培养技术的改进,已有水稻等十多种植物获得耐盐细胞系的再生植株^[48],这些再生植株有的具有耐盐性^[49],有的再生植株的后代仍具有耐盐性^[49]。而周荣仁等^[46]将能耐2%NaCl的愈伤组织在2%NaCl的培养基中继代29次后,再移入无盐培养基中11至20代后,发现它们不能保持提高了的耐盐性,分别退化到只能耐1.5%NaCl和1.0%NaCl的水平。而耐2%NaCl的愈伤组织产生的再生植株的自交后代,其萌发种子、幼苗及成长植株均未能表现出抗盐性,认为这种抗盐性的提高属于生理适应性。

3.4 耐盐变异体的检测

逆境下植物生理反应是多种多样的,不同基因型及其个体都存在显著差异。盐害抑制植物生长的现象是“生理干旱”与离子毒害造成的,其中破坏水分平衡是主导因素。在间接鉴定耐盐方法中,一般以生理生化特性为指标,鉴定供试材料的耐盐性^[50]。长期以来,人们主要在耐盐体细胞变异体的生化和生理代谢的一些研究基础上,利用这些变异体与非变异体生理生化功能上的差别,有意识地进行筛选和研究,为判断变异体提供了一些依据。目前对变异体耐盐性的研究主要集中在无机离子的积累、游离脯氨酸含量的变化和蛋白质(酶)的变化等研究方面。

3.4.1 无机离子的积累

Vose^[61]指出,在基本相同的遗传背景下产生的变异体其耐盐方面可能有很大的差异,利用不同变异体进行离子吸收差异的研究,将提供很有价

值的研究资料。Pilar等^[52]发现, 诱变筛选出的耐NaCl柑桔植株(PG-2128)叶中Cl⁻和Na⁺浓度较低, 生长好于初始无性系, 叶损伤较少。此外, 筛选出的植株在其苗和根中积累较多的Na⁺, 与此相伴的是K⁺浓度的降低。王鸣刚等^[53]对小麦的耐盐细胞检测发现随着盐浓度的提高, K⁺浓度下降, Na⁺浓度逐渐上升, 但耐盐系仍维持较高的K⁺/Na⁺比值。

3.4.2 游离脯氨酸含量的变化

植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性, 抗性强的品种往往积累较多的脯氨酸。增加脯氨酸是植物在水分胁迫或盐渍条件下最显著的代谢结果之一, 尽管脯氨酸是否能作为一种耐盐性的选择指标仍有待进一步研究, 但很多研究都显示出对渗透胁迫表现出抗性的变异系往往对盐胁迫也表现出抗性。李周崎等^[54]对河北杨体细胞抗盐性变异系做了氨基酸组分分析, 结果发现7个抗盐性变异系氨基酸代谢均发生了显著变化, 各变异系的变化程度和方式均有不同, 认为游离氨基酸中脯氨酸相对含量的增加可能与变异系抗盐性增加有关。贺道耀等^[49]获得高脯氨酸愈伤组织变异体总游离氨基酸含量比原型高45.5%, 其中脯氨酸增加最多。

3.4.3 丙二醛(MDA)含量

植物器官衰老或逆境下遭受伤害, 发生膜脂过氧化作用。MDA是膜脂过氧化最终分解产物, 它使膜中的膜蛋白发生交联、失活, 以致使膜产生空隙, 透性增强, 其含量可以用来衡量细胞膜结构破坏的程度, 从而反应植物遭受逆境伤害的程度。熊冬金等^[66]在试验中发现随着低温时间的加长, 植物体内自由基浓度不断增加, 加剧膜脂过氧化, 植物本身清除自由基能力下降, 导致MDA含量上升, 从而使膜结构与功能遭到破坏。

3.4.4 蛋白质(酶)的变化

测定无机离子的积累和脯氨酸含量的增加, 只是研究了其与耐盐性的关系, 尚不能说明这些变异表型变化的分子生物学背景。同工酶是指存在于同一物种、同一有机体或同一细胞中具有相同催化活性酶的多种分子形式。同工酶和蛋白质作为基因的产物, 其多样性在一定程度上反映了DNA

组成上的多样性。贺道耀等^[49]对高脯氨酸愈伤组织变异体进行蛋白质双向电泳,表明高脯氨酸变异体的蛋白组分发生变化,明显比原型多4个蛋白点。

3.4.7 保护酶活性

过氧化物酶(POD)及超氧化物歧化酶(SOD)是一类广泛存在于植物体内的氧化还原酶,它的主要生理功能是清除因各种原因(包括盐胁迫)产生的细胞内活性氧自由基的含量,抑制膜内不饱和脂肪酸的过氧化作用,维持细胞膜的稳定性和完整性,提高植物抗逆性。多酚氧化酶(PPO)是一类广泛存在于植物体内的含铜氧化还原酶,也是与植物抗性代谢关系较大的酶类。张士功的研究结果表明盐胁迫可使小麦幼苗POD活性升高^[67]。魏爱丽等^[68]在对大豆的研究中认为SOD活性的增强是植物对盐胁迫的一种适应性反应,为其度过不良环境起着重要作用。

3.4.6 分子遗传标记

陈受宜等^[66]对经甲基磺酸乙酯(EMS)诱变和盐胁迫、反复选择得到的已稳定了9代的水稻耐盐突变体进行了分子生物学鉴定,他们沿着每条染色体,按照水稻RFLP连锁图,用130个标记作探针,对对照和突变体进行了RFLP分析,结果表明,在耐盐突变体第七对染色体上两个连锁位点RG711和RG4发生了突变。秘彩莉等^[69]用生化标记(醇溶蛋白)及分子标记(RAPD)分析了小麦耐盐突变体及亲本间的差异,经用218个引物对5个突变体之间的多态性进行RAPD分析,发现它们之间的差异很小,其遗传背景相似,证明它们是一系列耐盐性不同的近似等位基因系。

3.5 筛选耐盐变异体研究中存在的问题和展望

耐盐突变体的筛选虽然已取得一些进展,但也存在许多问题,其中最主要的是愈伤组织水平上的耐盐性和再生植株的耐盐性并不完全一致,或只有部分相关,即在培养物中表达的基因有时在再生植株中并不表达,正如植物所具有的耐盐性并不能在细胞水平上全部表达一样。两种水平上的差异可能有诸多原因,最主要的是高等植物的耐盐性涉及到许多性状,如

根部吸收水分的能力、气孔开关、角质层厚度、输导系统对不同离子的吸收与运输特性、以及盐腺等特殊排盐结构等等，这些特征不仅是高度分化细胞的功能，也是植物器官之间相互作用在整株水平上表现出来的能力，而决非一个细胞的功能。正是由于植物耐盐性是多性状的综合表现，必然是受多基因控制，而基因表达的程度，在细胞与植株两种水平上可能不会完全相同，从而导致两种水平的耐盐性表现不一致。但也有的植物，如蕃茄、小麦等，植株与愈伤组织的耐盐性是一致的，那么这类作物就比较容易从细胞水平上筛选产生耐盐品系。此外，耐盐性也可表现为对渗透压的抗性、对专一离子导致毒性的抗性，如果只是某一方面的耐受性，这样也有可能两种水平上表现出一致性。由于经历了一段长时间的盐胁迫筛选，容易使耐盐愈伤组织或细胞系严重丧失分化能力，即使有少数细胞分化，也往往出现畸型植株，移入土壤后成活率及结实率极低。所以利用细胞或组织培养筛选耐盐变异体时，首先应建立能高频率分化的植株再生体系，掌握长期保持分化的条件和技术，同时要改进胁迫培养的程序，使培养物经长期筛选后，仍具有较高的分化形成再生植株的能力。

第二部分 实验部分

第一章 亚麻胚性愈伤的诱导及体细胞胚胎的发生

前言:

亚麻(*Linum usitatissimum* L.) 隶属亚麻科, 是北温带地区一种分布很广的重要的纺织纤维和工业油料作物, 其种子是食用油和蛋白质的重要来源^[59]。近两年亚麻在我国种植面积和加工能力已位居世界第二, 约占世界加工总量的 16%^[60]。随着全球经济一体化步伐的加快, 麻业种植业面临前所未有的发展机遇, 亚麻生产将成为我国农业的重要支柱产业之一, 因此, 培育优质的亚麻品种显得日趋紧迫^[61]。pretova^[62]认为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, 会有次生体细胞胚胎形成。1996年, Cunha 和 Ferreira^{[63][64]}对亚麻的体胚发生进行了详细的研究, 1999年, 他们又研究了不同的碳源对体细胞胚发生的影响。Tejavathi^[65]发现亚麻的体细胞胚是次生胚, 同年 Dedicovo^[66]与 Pretova^[67]也发现了类似的情况, 但他们认为这些胚胎结构都是无发育能力的类胚胎结构。而亚麻是否具有体细胞胚胎发育过程在国内外研究中尚未定论, 因此亚麻的体细胞胚胎发生途径是值得研究的。探究亚麻体细胞胚胎发生发育的完整过程, 将为以亚麻为亲本的体细胞杂交育种建立良好的技术平台。

1 材料与方法

1.1 材料:

亚麻(*Linum usitatissimum* L.) (双亚 5 号) 种子由新疆农业科学院经济作物研究所于 2005 年 5 月提供。双亚 5 号是新疆主要的纤维用亚麻种植品种。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导

第二部分 实验部分

第一章 亚麻胚性愈伤的诱导及体细胞胚胎的发生

前言:

亚麻(*Linum usitatissimum* L.) 隶属亚麻科, 是北温带地区一种分布很广的重要的纺织纤维和工业油料作物, 其种子是食用油和蛋白质的重要来源^[59]。近两年亚麻在我国种植面积和加工能力已位居世界第二, 约占世界加工总量的 16%^[60]。随着全球经济一体化步伐的加快, 麻业种植业面临前所未有的发展机遇, 亚麻生产将成为我国农业的重要支柱产业之一, 因此, 培育优质的亚麻品种显得日趋紧迫^[61]。pretova^[62]认为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, 会有次生体细胞胚胎形成。1996 年, Cunha 和 Ferreira^{[63][64]}对亚麻的体胚发生进行了详细的研究, 1999 年, 他们又研究了不同的碳源对体细胞胚发生的影响。Tejavathi^[65]发现亚麻的体细胞胚是次生胚, 同年 Dedicovo^[66]与 Pretova^[67]也发现了类似的情况, 但他们认为这些胚胎结构都是无发育能力的类胚胎结构。而亚麻是否具有体细胞胚胎发育过程在国内外研究中尚未定论, 因此亚麻的体细胞胚胎发生途径是值得研究的。探究亚麻体细胞胚胎发生发育的完整过程, 将为以亚麻为亲本的体细胞杂交育种建立良好的技术平台。

1 材料与amp;方法

1. 1 材料:

亚麻(*Linum usitatissimum* L.) (双亚 5 号) 种子由新疆农业科学院经济作物研究所于 2005 年 5 月提供。双亚 5 号是新疆主要的纤维用亚麻种植品种。

1. 2 方法

1. 2. 1 愈伤组织的诱导

将种子洗净，放入70%乙醇中浸泡2min，放入0.1%升汞溶液中轻摇5 min，用无菌水漂洗5~6次。放在无菌滤纸上吸干种子表面的水分，接入MS+ 30g蔗糖+ 2.4-D 1 mg/L 培养基上。培养条件为：温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光强度为1500- 2000Lx，光照周期12h光/12h暗。

1. 2. 2 愈伤组织的扩增及最佳培养条件的筛选

以上述条件下诱导产生的愈伤组织为材料，将组织切成体积大小类似的小块，进行扩增实验。所用培养基有下列组合： α -萘乙酸 (NAA)与激动素(KT)组合；NAA与6-苄基嘌呤(6-BA)组合；吲哚丁酸 (IBA)与6-BA组合；IBA与KT组合。

每种组合激素培养基接50块愈伤组织，培养条件同上述。30天统计褐化率。褐化率=(愈伤褐化数 / 接种总块数) \times 100%。筛选出最佳培养基，将生长状态较好的愈伤组织转入该培养基上继代。

1. 2. 3 体细胞胚的诱导

从生长状态较好的愈伤中挑取浅黄色、成颗粒状的胚性愈伤转入以下分化培养基（见表 1）上，在 25°C 下诱导体细胞胚胎发生。20天后将各种发育阶段的胚转入萌发培养基（见表2），观察萌发情况。

表 1 分化培养基

编号	2.4-D(mg)	KT(mg)	谷氨酰胺(mg)	氨基乙酸(mg)	水解酪蛋白(mg)	蔗糖(g)
1	1.0	2.0	200	2	500	30
2	1.0	1.5	200	2	500	30
3	1.0	1.0	200	2	500	30
4	0	1.0	200	2	500	30
5	0	0.5	200	2	500	30
6	0	0.1	200	2	500	30

表 2 萌发培养基

编号	
1	MS
2	1/2MS
3	MS+ GA 0.1mg/L
4	MS+ GA 0.5mg/L
5	MS+ GA 1.0mg/L
6	MS+ GA 2 mg/L
7	MS+ ABA 0.1mg/L
8	MS+ ABA 0.5mg/L
9	MS+ ABA 1.0mg/L
10	MS+ ABA 2.0mg/L

1.2.4 石蜡切片观察体胚形成及发育过程

将分化培养基上的培养 20 天的愈伤组织块用纳瓦兴 II 固定液固定, 系列酒精脱水、常规石蜡切片法制片。切片厚 5-7 微米, 分别进行番红-固绿染色重染。切片在数码显微系统下观察, 拍照。

主要过程如下: 固定—脱水 (30%、50%、70%、85%、95%、100%、100% 乙醇)—透明 (二甲苯两次)—渗蜡 (1/2 二甲苯+1/2 石蜡 (2h))—石蜡 I—石蜡 II—包埋—切片 (切片厚度 5-7 μ m)—展片—粘片—烤片—粘片—脱蜡—复水—染色—脱水—透明—封片—镜检—拍照。

2 结果与分析:

2.1 2.4-D对亚麻愈伤组织诱导的影响:

30天后观察发现, MS+2.4-D 1mg/L培养基能使亚麻无菌种子100%诱导出愈伤组织, 但呈深绿色, 瘤状突起, 脱分化不完全, 生长不旺盛。

2.2 不同植物激素组合对亚麻愈伤组织继代的影响

2.2.1 KT和NAA对亚麻愈伤组织继代培养的影响

试验表明: NAA 0.5 mg·L⁻¹ +KT 0.5 mg·L⁻¹ 时, 亚麻愈伤组织的生长状态较好, 呈浅黄色, 表面干燥, 较为松散, 质地较硬而褐化率最低, 生长速度最快。当NAA在2.0 mg·L⁻¹时, 所有的愈伤全部褐化 (见表3)。

2.2.2 6-BA和IBA对亚麻愈伤组织继代培养的影响

试验表明: IBA 1.0 mg·L⁻¹ 和6-BA 0.1 mg·L⁻¹组合时, 亚麻愈伤组织

的生长状态较好，呈黄绿色，表面干燥，米粒状结构，质地较硬而褐化率最低。但所得愈伤组织颜色、质地有差异。在IBA+6-BA 的组合中随着IBA浓度的增加，组织的颜色由浅绿色变深，结构较紧密，生长较快。从表4中我们可以清楚的看到，6-BA对愈伤的生长是很敏感的，当6-BA超过0.1 mg. L⁻¹时，随着其浓度的增加，褐化率是增加的。

表3 NAA和KT组合对愈伤组织生长及褐化率的影响

浓度 mg L ⁻¹	NAA + KT	生长势	愈伤色泽状态	褐化率 (%)
1	0.1 0.1	+	呈黄绿色，表面干燥，少许颗粒结构	36
2	0.1 0.5	++	呈黄绿色，表面湿润，无瘤状突起，成块	22
3	0.1 1.0	++	呈淡绿色，表面湿润，无瘤状突起，成块	40
4	0.1 2.0	+	呈翠绿色，表面湿润，无瘤状突起，成块	48
5	0.5 0.1	+++	呈浅黄色，表面湿润，部分瘤状突起，少许颗粒结构	10
6	0.5 0.5	+++	呈浅黄色，颗粒结构，较为松散	0
7	0.5 1.0	+++	呈淡绿色，表面较为湿润，部分颗粒结构	0
8	0.5 2.0	+	呈翠绿色，表面干燥，瘤状突起	72
9	1.0 0.1	++	呈浅绿色，表面湿润，颗粒结构	20
10	1.0 0.5	+++	呈黄绿色，表面湿润，瘤状突起，颗粒结构	16
11	1.0 1.0	++	呈黄绿色，表面干燥，瘤状突起，结构致密	34
12	1.0 2.0	++	呈黄绿色，表面干燥，结构致密	100
13	2.0 0.1	+	呈黄褐色，表面干燥，结构致密	100
14	2.0 0.5	+	呈黄褐色，表面干燥，结构致密	100
15	2.0 1.0	+	呈黄褐色，表面干燥，结构致密	100
16	2.0 2.0	+	呈黄褐色，表面干燥，结构致密	100

注：愈伤的生长量分等：0 没有生长；+ 生长量小；++ 生长量中等；+++ 生长量大。

表4 6-BA和IBA组合对愈伤组织生长及褐化率的影响

浓度 mg/L	IBA + 6-BA	生长势	愈伤色泽状态	褐化率 (%)
1	0.1 0.1	++	呈黄绿色，表面湿润，成块，部分颗粒结构	16
2	0.1 0.5	++	呈黄绿色，表面湿润，成块，无颗粒结构	22
3	0.1 1.0	++	呈黄绿色，表面湿润，成块	36
4	0.1 2.0	+	呈黄褐色，表面干燥，成块	100
5	0.5 0.1	+++	部分呈绿色，部分黄绿色，瘤状突起，部分颗粒结构	12
6	0.5 0.5	+++	呈浅黄色，表面湿润，颗粒结构，质地较软	36
7	0.5 1.0	+++	呈黄绿色，表面湿润，瘤状突起，少许颗粒结构	26
8	0.5 2.0	+	呈浅绿色，表面干燥，瘤状突起，结构致密	96
9	1.0 0.1	+++	呈黄白色，表面干燥，米粒状结构，质地较硬，少许绿色斑点	20
10	1.0 0.5	+++	呈浅黄色，表面干燥，部分米粒状结构，部分成块	14
11	1.0 1.0	++	呈黄绿色，表面干燥，瘤状突起，无颗粒结构，结构致密	56
12	1.0 2.0	++	呈黄绿色，表面干燥，瘤状突起，无颗粒结构	90
13	2.0 0.1	++	呈绿色，表面干燥，瘤状突起，结构致密	84
14	2.0 0.5	++	呈黄褐色，表面干燥，瘤状突起，结构致密	98
15	2.0 1.0	++	呈绿色，表面干燥，瘤状突起，结构致密	100
16	2.0 2.0	+	呈墨绿色，表面干燥，结构致密	100

2. 2.3 6-BA和NAA对亚麻愈伤组织继代培养的影响

6-BA和NAA激素组合培养后，愈伤组织大多成土黄色，生长较慢，愈伤有粘性，15天左右全部褐化。

2. 2.4 KT和IBA对亚麻愈伤组织继代培养的影响

KT和IBA激素组合培养后，愈伤组织大多成绿色，生长较慢，质地较硬，不适合亚麻愈伤组织的增殖。

2. 3 亚麻胚性愈伤组织的诱导

经过培养，我们得到了四种典型的愈伤状态。第一类呈成块、绿色，表面具有瘤状突起，质地紧密；第二类为糊状，淡黄或暗黄，质地松软，无定形，生长较快；第三类为颗粒状，淡黄或乳白色，质地较紧密；第四类雪花状，结构松散，无定形，生长较快（见图1、2、3、4）。

其中我们认为第三类愈伤为胚性愈伤组织，胚性愈伤组织并不是由均匀一致的细胞组成，而是由胚性细胞与非胚性细胞嵌合组成（见图18）。有一些细胞形态较小，细胞质浓厚，富含细胞器，为胚性细胞。NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的激素组合最适合胚性愈伤的生长。

2. 4 体细胞胚的发生

对其体细胞胚发生过程观察发现：胚性细胞在分化培养基上进一步分化，15 d左右时，形成大量球形胚，呈浅黄色，数量较多，也容易从愈伤组织块上分离下来；25 d时，除大量晚期球形胚外，还有少部分形成心形胚，鱼雷胚和子叶胚（见图5，图6）。

在2号分化培养基（其中以2号培养基上体胚分化最为明显）上，胚性细胞继续分裂，切片显示愈伤组织内部形成了不同大小的原胚，呈现鸟巢状（见图7），有些已发育成球形胚，少数球形胚带有发达的胚柄，具胚柄的胚状体可能是由胚性细胞经不均等分裂发育而成。此时期的球形胚由大小基本一致的、核大、核仁明显的细胞组成（见图8）。少数球形胚进一步分化，形成了心形胚（图9）；心形胚继续发育成鱼雷胚（图10）；最后形成子叶胚（图5）。在体细胞胚发生过程中，除了正常的各形态体胚外，常

见从球形胚状体表面不断产生次生胚(图11),产生的次生胚大多是连体胚。次生球形胚内部的细胞不均一,表层细胞细胞壁较厚,但很少见与初生球形胚一致的细胞形态(见图15)。一部分胚状体可能因为缺乏继续发育的激素,在2-3周内会逐渐褐化、死亡(图12)。

2.5 体细胞胚萌发

所得的体胚近在1、2号培养基上发生了萌发,接入含有GA与ABA培养基上的体胚两周后,全部褐化死亡。

而在1、2号培养基上获的绝大多数亚麻体胚发育为畸形,多为仅具根端极性,可以发育出完整的根系(见图16),少部分仅具有芽端极性,能长出较完整的叶原基,但未形成正常的子叶,也没有发育根系(见图17)。

3 讨论

关于体细胞胚是起源于单细胞还是多细胞的问题,起源于深层细胞还是表层细胞一直存在不同的看法^[66]。亚麻的愈伤组织培养中产生的胚状体多数起源于较深层的胚性细胞(见图7),也有少数起源于表层细胞或表层之下的几层细胞(见图15)。胚状体原始细胞不仅体积小、胞质稠密、细胞核大,且着色深、细胞质中几乎不含液胞,而且与周围细胞分界明显,随着体细胞胚的发育,体积变大,使其与周围大的薄壁细胞破裂,独立形成完整结构(见图10)。本研究并不能说明亚麻的体细胞胚胎发生于单细胞还是多细胞,但可以肯定的是亚麻的体胚发生属内、外起源方式共存。一种植物的体细胞胚可经两种发生途径和两种起源方式形成,在其它植物中也有报道^{[69][70][71]}。

亚麻胚状体的发育过程与合子胚大致相似,但形态不象合子胚那么规则,除了形成具有一个胚芽-胚根轴向分化的正常胚状体外,还有次生连体胚出现,表现出多态性。但次生胚绝大多数为畸形胚,所产生的胚体大多数与初生胚不能完全分离,具有明显的组织相连(见图14),剥离后,胚体受到损害,转接到萌发培养基上,很快死亡。这些畸形胚仅仅具有单端极性,大多为根端,少部分为芽端(发育成完整的子叶原基),但不能发

育成完整的植株。我们认为由胚性细胞直接发育而来的胚状体是能够完成发育过程的, 在试验过程中我们观察到了完整的胚胎发育过程, 既球形胚, 心型胚, 鱼雷胚及子叶胚, 并且具有明显的双极性。而次生胚是不能正常发育的, 出现这样的现象可能是因为胚状体发育的不同步化造成的, 如果能及时将体胚在球形胚时期, 迅速剥离, 转入的合适的分化培养基上, 将能够完成正常的体胚发育过程. 这样可以避免在初生胚上产生大量的次生畸形胚. 这恰恰说明由于离体培养条件与正常植物中的胚胎发育环境不同, 这种差异会影响胚状体的发育过程, 使胚状体呈现多态性^[72]。

一般认为, 生长素是体胚发生所必需的生长调节剂^[73]。这在胡萝卜^[74]、苜蓿^[75]、体胚诱导中已得到了验证。我们的试验结果表明, 仅有KT的培养条件下, 没有体胚发生; 仅有2.4-D的培养条件下, 能产生胚状体, 但胚状体往往会脱分化, 再次产生愈伤化现象。这说明2.4-D是诱导亚麻胚状体发生所必需的, 但需要KT的协同作用才能使诱导出的亚麻体胚完成体胚发育过程, 这一结果与苜蓿的体细胞胚胎发育的研究类似^{[76][77][78]}。Cunha^[82]将ZT与2.4-D配合使用, 获得了大量的亚麻胚状体, Tejavathi DH^[83]将NAA与6-BA配合使用也获得了亚麻胚状体。我们使用他们的配方培养, 没有获得肉眼可见的胚状体, 这可能是因为亚麻基因型的区别。体胚诱导过程对植物生长调节剂不同要求可能与植物的基因型有关, 也可能涉及内源激素间相互作用。

通过上述试验, 我们没有得到正常的试管苗, 可能是因为具有完整的双极性的正常体胚所占的比率很小, 而该部分需要外源的条件未得到满足。因此, 如何使亚麻体胚发生的同步化, 大量获取成熟体胚, 并获得正常试管苗, 尚需进一步的研究。

图板说明：

- 1、 亚麻瘤状、致密型绿色愈伤组织
- 2、 亚麻颗粒状、疏松型浅黄色愈伤组织
- 3、 亚麻粒状、致密型浅黄色愈伤组织
- 4、 亚麻湿润、疏松型白色愈伤组织
- 5、 球形胚、心形胚, 鱼雷胚、子叶胚
- 6、 各种体胚（包括连体胚等畸形胚）
- 7、 鸟巢状结构
- 8、 内起源的球形胚
- 9、 心形胚
- 10、 鱼雷胚
- 11、 丛生的次生胚
- 12、 部分次生胚褐化死亡
- 13、 从球形胚上产生次生胚
- 14、 几个连体胚横切
- 15、 次生球形胚
- 16、 畸形胚生根
- 17、 畸形胚长出叶原基
- 18、 胚性愈伤简单压片

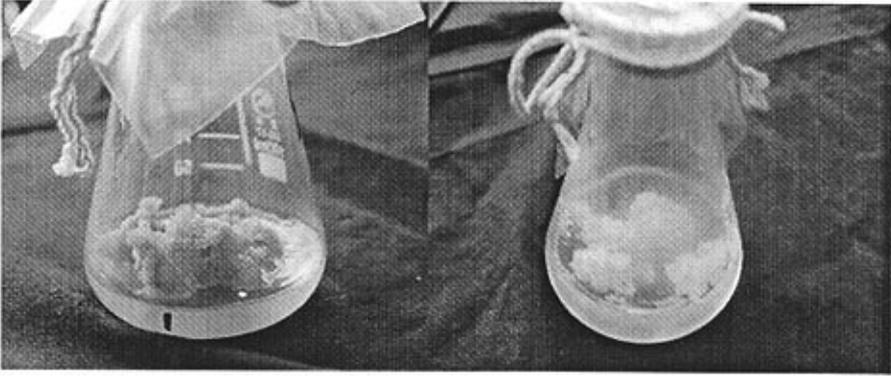


图 1

图 2

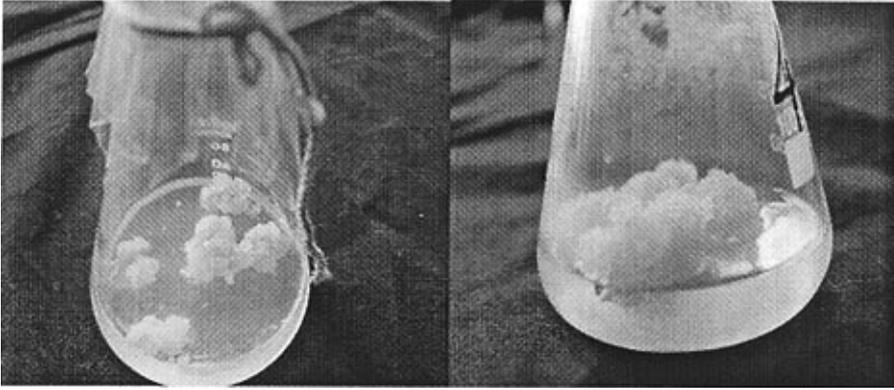


图 3

图 4

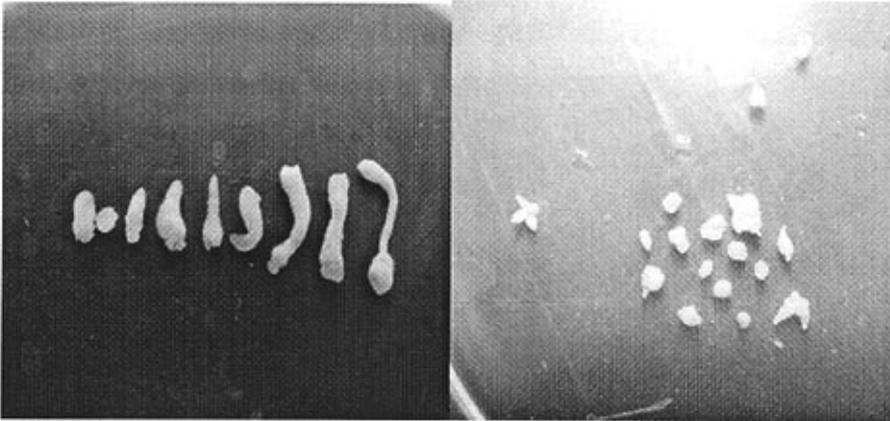


图 5

图 6

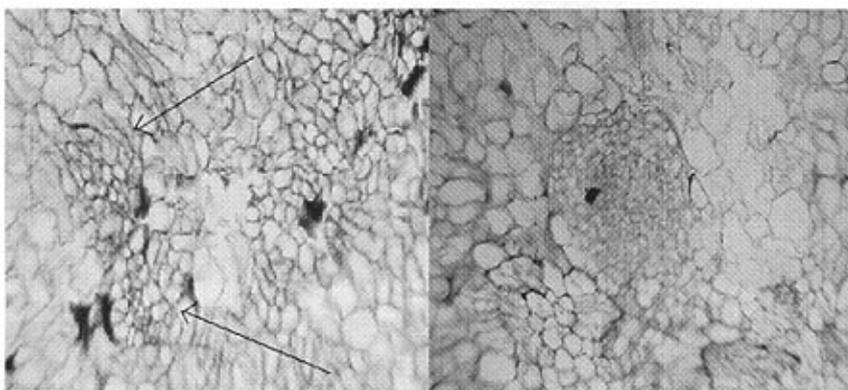


图 7

图 8

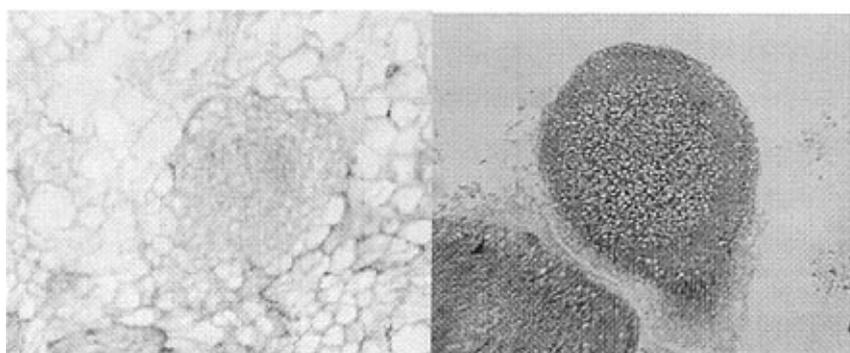


图 9

图 10

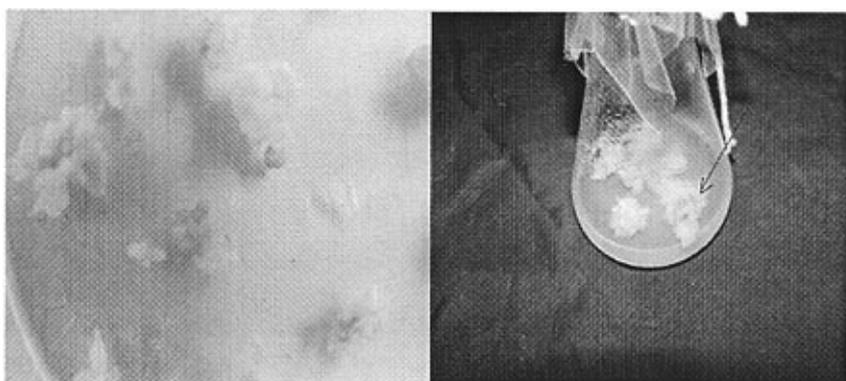


图 11

图 12

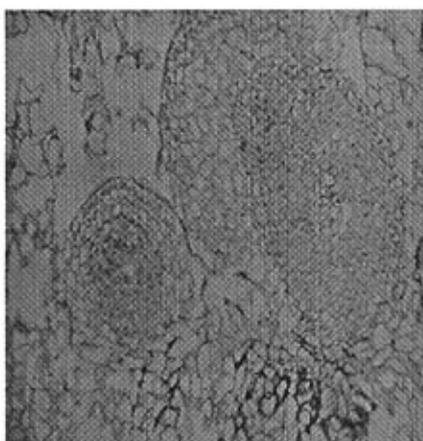


图 13

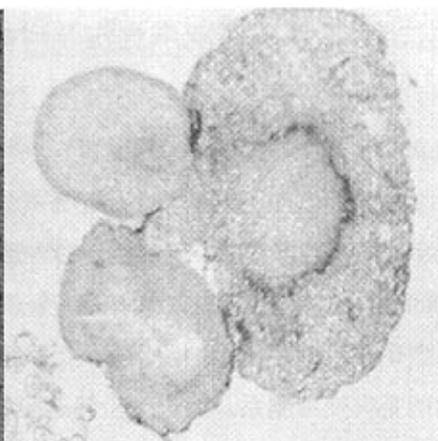


图 14

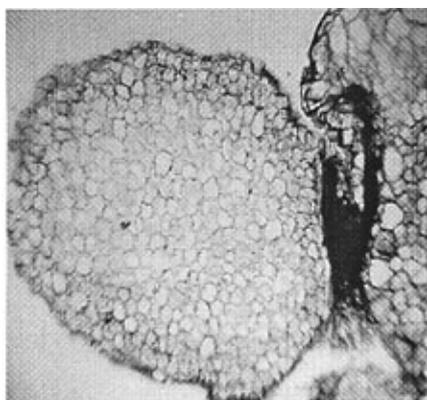


图 15



图 16



图 17

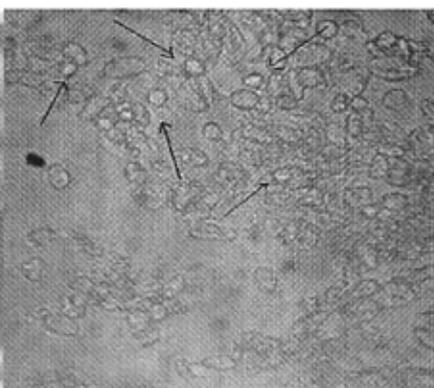


图 18

第二章 盐胁迫对亚麻愈伤及耐盐愈伤生理生化变化的影响

前言

本章通过对不同盐浓度胁迫下,分析两种愈伤的在水分含量、相对生长率、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、脯氨酸含量、MDA含量、POD酶活、SOD酶活、EST同工酶、POD同工酶及SOD同工酶的变化,探讨耐盐愈伤与普通愈伤在生理生化上的差别,从而从生理生化角度上来确定,该耐盐愈伤的确是突变细胞系。为进一步筛选耐盐亚麻育种工作提供理论基础。

1. 实验试剂、设备

实验试剂

均为国产分析纯试剂

主要仪器和设备

名称产地

SIGMA高速台式冷冻离心机	德国SIGMA公司
752型紫外可见分光光度计	上海精密仪器仪表公司
ECP3000电泳仪	北京六一
DY II型电泳槽	北京六一

2 实验方法

2.1 材料

试验材料:亚麻(双亚5号)种子于2005年3月由新疆农业科学院经济作物研究所惠赠。

亚麻愈伤组织通过常规组织培养方法获得:

亚麻耐盐细胞系的获得:将继代5次以上、生长旺盛的双亚5号愈伤组织接入含 $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的继代培养基诱导,培养2个多月后,其余愈伤全部死亡,获得一株生长较快的耐盐细胞系。将该耐盐系以20d为一周期继代,连续继代8次后,扩增出一定数量。其继代培养基为 $\text{MS}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}$ 。

试验方法:

在无菌条件下,分别挑取生长旺盛的亚麻普通愈伤组织(为对照)与耐盐性愈伤组织,切成小块(大小类似),分别接入含有6个盐浓度梯度(0、50、100、150、200、250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基(除盐以外的其它条件为 $\text{MS}+0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}$)中,使同一盐浓度下均有普通愈伤组织和耐盐性愈伤组织。培养条件为 26°C ,光强2000LX,光照 $16\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$,培养20d。从形态上看,耐盐系生长扩增良好,对照组在低浓度盐胁迫下有生长,高浓度盐下褐化,250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐胁迫下全部死亡。分别取出等量的愈伤组织做如下试验(重复3次):

2.2 方法

愈伤组织含水量的测定:恒重法^[79]。

愈伤相对生长率:恒重法^[79]

可溶性蛋白质含量测定:按测SOD的方法制备粗酶液,采用Bradford的方法测定^[80],以标准牛血清蛋白溶液为标准蛋白。

可溶性糖含量测定:采用葱酮法比色法^[81]

MDA的测定:参考文献方法^[82]。

脯氨酸含量测定:采用茚三酮比色法^[82]。

POD的测定:愈创木酚显色法^[83]。

CAT活性测定:按Kraus方法^[84]

SOD活性测定:按赵世杰等^[81]的方法测定。

酯酶(Esterase . EST)同工酶

分别取0.4 g愈伤组织,加1.5 ml 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 8.0的 Tris-HCL 缓冲液及少许石英砂,冰浴研磨,超速冷冻离心($10000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),10 min,上清液即为酶液。用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。分离胶、浓缩胶浓度分别为7.5%、3.0%,点样量为15 μl ,稳流电泳,电流强度为20-40 mA。染色方法按文献^[82]方法,经蒸馏水漂洗后,拍照。

过氧化物酶(Peroxidase, POD)同工酶

酶液提取方法同上,其中提取缓冲液用 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 8.5 的

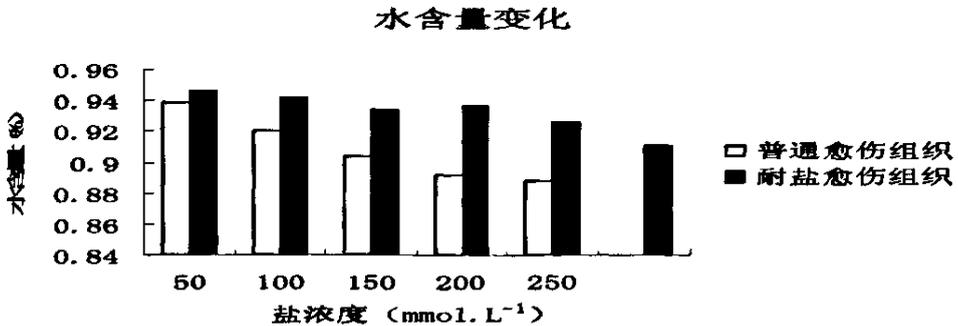
Tris-HCl 缓冲液, 冷冻离心($8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 15 min, 用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。分离胶、浓缩胶浓度分别为 7.5%、3.0%, 点样量为 15 μl , 染色方法按文献^[82]。经蒸馏水漂洗后, 拍照。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)同工酶

酶液提取方法同上, 其中提取缓冲液用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.8 的磷酸盐缓冲液, 冷冻离心($8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 20 min。浓缩胶、分离胶浓度分别为 3.0%、10.0%, 染色参照文献^[86]方法, 略加改进, 将电泳后的凝胶片按以下顺序浸入溶液中: (1) 在 $2.45 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氮蓝四唑(NBT) 溶液 100 ml 中黑暗浸泡 20 min; (2) $2.8 \times 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核黄素、 $3.6 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 的混合溶液 100 ml 中黑暗浸泡 15 min; (3) 在含 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、 $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.8) 的混合溶液 100 ml 中, 在 40 W 日光灯下 (距离 15cm) 照射 10min。经染色和光照后, 凝胶上出现蓝色背景下透明的谱带。经蒸馏水漂洗后, 拍照。

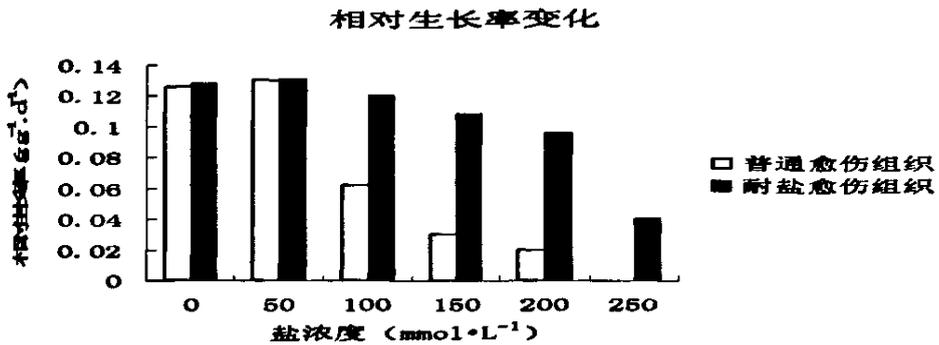
3. 实验结果

3.1 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织含水量的影响



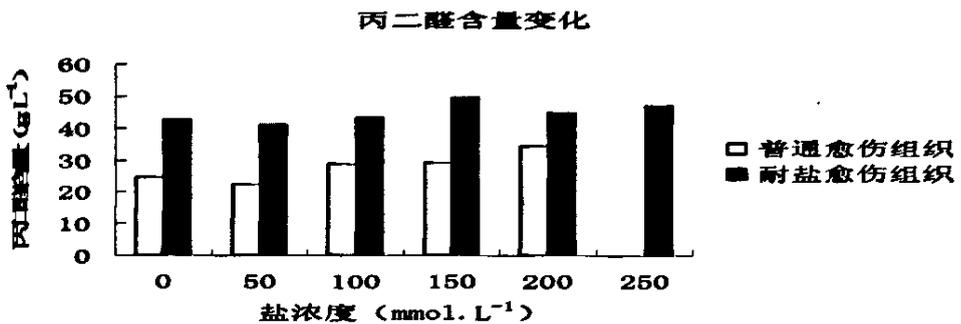
随着盐胁迫浓度增加, 对照愈伤组织整体上水分含量变化幅度较大, 水分含量逐渐降低, 范围由 93.8%—88.7%。而耐盐愈伤组织水分含量由 94.5% 降低到最低点 91.0%, 变化幅度不太大 (见上图)。

3.2 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤相对生长率的影响



盐胁迫处理后, 对照愈伤组织与耐盐愈伤组织随盐胁迫浓度增加, 相对生长率均下降, 只是普通愈伤在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 生长相对率骤然下降, 而耐盐愈伤的相对生长率变化幅度不大, 只有在 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 在所有浓度条件下, 出现大幅度降低。但在所有处理条件下, 耐盐愈伤的相对生长率均较普通愈伤高(见上图)。

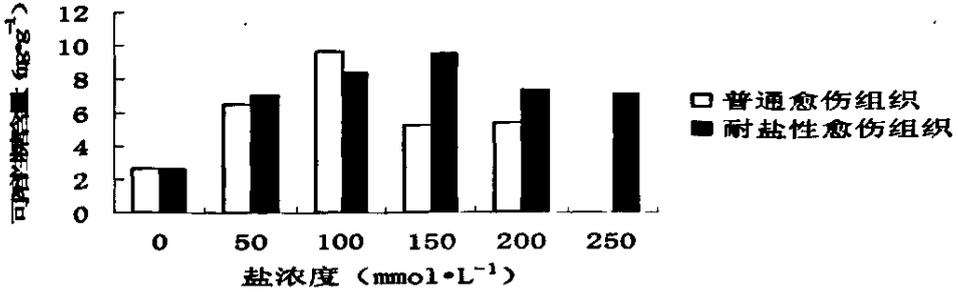
3.3 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织中丙二醛含量的影响



盐胁迫处理后, 对照愈伤组织随盐胁迫浓度增加, 丙二醛含量增加, 盐浓度在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最高点。而耐盐愈伤组织整体上丙二醛含量变化幅度不大, 只是盐浓度在 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最高, 盐浓度在 $150\text{--}250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 丙二醛含量维持在一定的水平上, 但均比相同盐浓度下的对照的含量高(见上图)。

3.4 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织中可溶性糖含量的影响

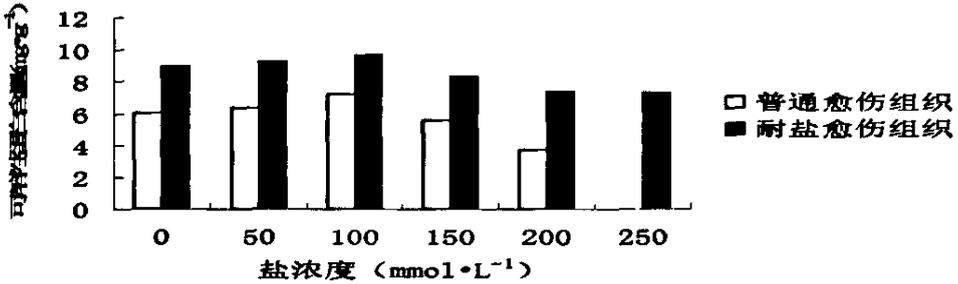
可溶性糖含量变化



盐胁迫处理后,对照愈伤组织随盐胁迫浓度增加,可溶性糖含量增加,盐浓度在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最高点,随着盐浓度的增加,可溶性糖的含量下降。而耐盐愈伤组织整体上也具有类似的变化规律,只是盐浓度在 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最高,盐浓度在 $150\text{--}250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,含量也下降,只是下降幅度较对照小(见上图)。

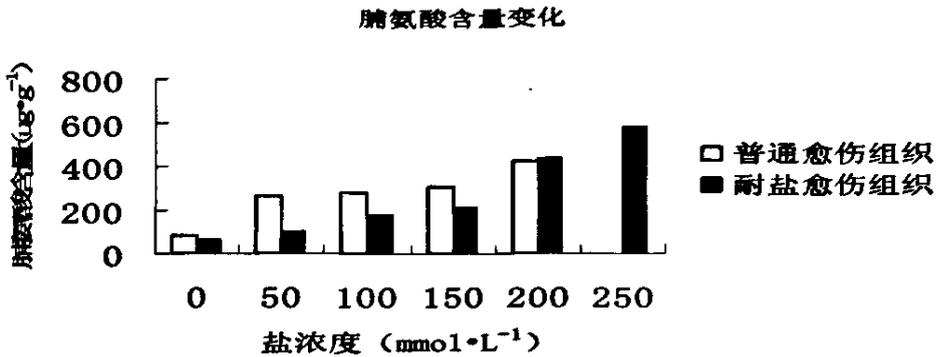
3.5 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织中可溶性蛋白含量的影响

可溶性蛋白含量变化



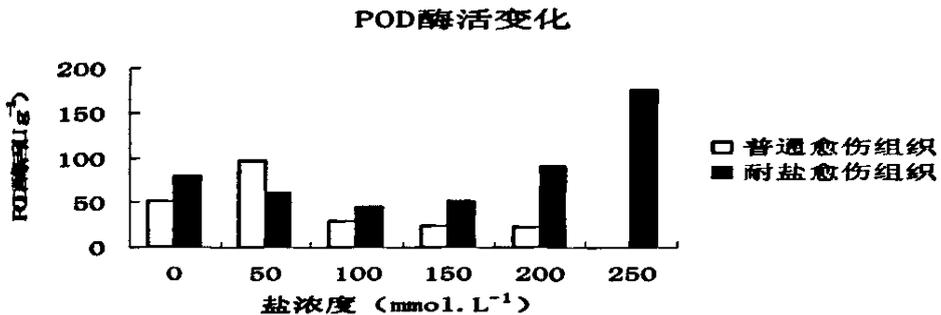
盐胁迫处理后,对照愈伤组织随盐胁迫浓度增加,可溶性蛋白在 $0\text{--}100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 先增加,后降低,到 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 最低。耐盐愈伤组织整体上变化趋势与普通愈伤组织一致,都是在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蛋白含量达到最高, $100\text{--}250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈现下降的趋势,但所有的处理,耐盐愈伤的蛋白含量均高于普通愈伤组织(见上图)。

3.6 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织中脯氨酸含量的影响



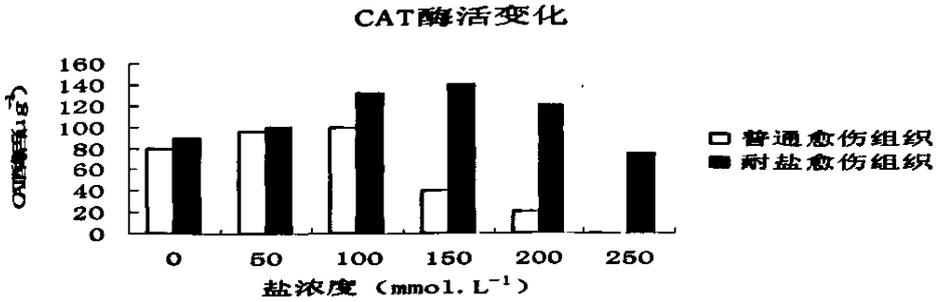
盐胁迫处理后, 对照愈伤组织随盐胁迫浓度增加, 脯氨酸含量由低增高, 在 $200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最高, 较 $0\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增加了5.29倍。耐盐愈伤变化趋势与对照一致, 也是由低到高, 而在 $0-150\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 脯氨酸含量均低于普通愈伤。耐盐愈伤在 $250\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最高, 较 $0\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增加了9.16倍(见上图)。

3.7 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织POD酶活的影响



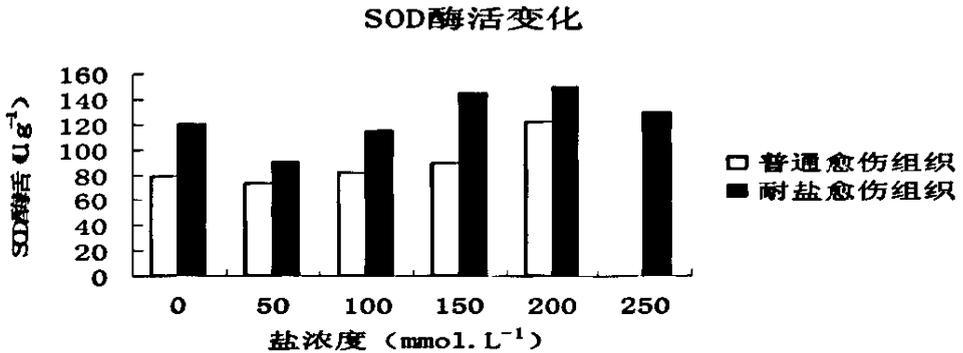
对照愈伤组织 POD 酶活呈现出先升高后下降的变化, 盐浓度在 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, POD 酶活升高, 在 $100-200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, POD 酶活性低于耐盐愈伤组织。随着 NaCl 浓度的增加耐盐愈伤组织 POD 活性先下降后升高, 在相同的盐浓度下, 除了盐浓度在 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 耐盐愈伤组织的 POD 活性稍低于对照外, 其余处理均是耐盐愈伤 POD 酶活性高于对照, 在盐浓度为 $250\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, POD 活性高达到了 $176.5\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (见上图)。

3.8 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织CAT酶活的影响



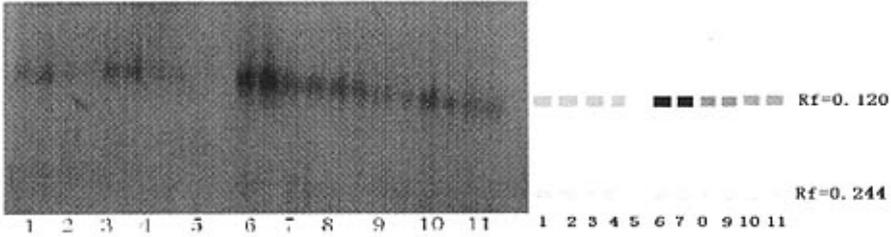
对照愈伤组织 CAT 酶活呈现出先升高后下降的变化, 盐浓度在 $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CAT 酶活达到最高, 接着骤然下降。CAT 酶活性低于耐盐愈伤组织。耐盐愈伤组织也有类似的变化。只是在 $150\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到最高, $200\text{--}250\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 酶活下降, 但变化幅度不大。在相同的盐浓度下, 耐盐愈伤组织的 CAT 活性均高于普通愈伤组织。(见上图)。

3.9 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织SOD酶活的影响



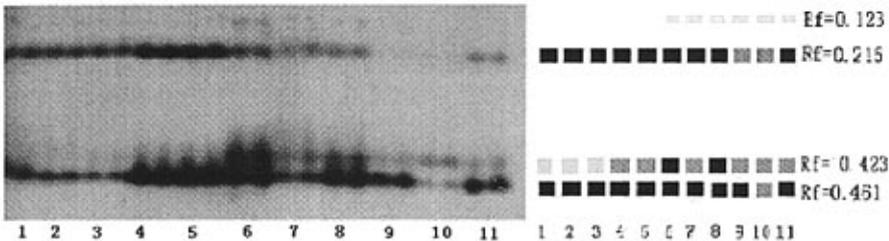
对照愈伤组织在盐浓度为 $0\text{--}150\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, SOD 酶活变化不大。盐浓度在 $200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, SOD 酶活明显升高, 其酶活变化范围在 $73.50\text{--}121.75\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。随着盐浓度的增加, 耐盐愈伤组织 SOD 酶活性先下降后升高, 变化趋势呈倒 ‘S’ 形, 酶活变化范围 $89.75\text{--}149.0\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 在 $200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到 $149\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 均较普通愈伤组织在相同盐浓度下的高。说明耐盐愈伤组织的 SOD 酶活与普通愈伤组织的相比具有明显差异(见上图)。

3.10 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织酯酶同工酶的变化



从上图可以看出,两种愈伤组织在不同的盐培养基上生长过程中,EST同工酶主要出现2条酶带,Rf分别为0.130、0.244。第2条酶带颜色深浅、大小基本一致,为共有酶带,只是盐浓度在 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对照组酶带消失。在第一条酶带,耐盐组的酶带颜色均比对照组的颜色深,说明耐盐组的酯酶酶活要比对照组的高。并且普通愈伤组织在盐浓度为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,该酶带已经消失。说明当盐高于 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酯酶失活。而耐盐性愈伤组织在 $200\text{--}250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,酯酶酶活依然很强。结果表明:在不同浓度的盐胁迫下,耐盐性愈伤组织的酯酶同工酶的表达明显不同于普通愈伤组织(见上图)。

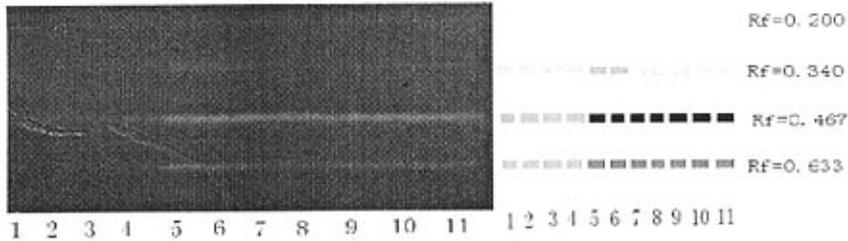
3.11 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织中过氧化物酶同工酶的变化



两种愈伤组织在不同盐浓度的培养基上生长过程中,POD同工酶主要出现了4条酶带。Rf分别为0.123、0.215、0.423、0.461。其中第2、3、4条酶带在两种愈伤组织中均出现了,第2、4条酶带宽而且颜色深,为主要酶带,只是耐盐性愈伤组织在盐浓度为 $150\text{--}200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酶活相对降低,在盐浓度为 $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酶活又升高。对于第3条酶带,普通愈伤组织酶活随盐浓度增加而逐渐升高,但耐盐性愈伤组织该酶带在 $0\text{--}50$

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐浓度时酶活量较高, 在 $100\text{--}250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐浓度时酶活量变化不大。从第1条酶带上看, 仅耐盐性愈伤组织中有该条带出现, 且随盐浓度增高酶活量逐渐降低(见上图)。

3.12 不同盐浓度处理对亚麻两种愈伤组织中超氧化物歧化酶同工酶的变化



两种愈伤组织在不同盐浓度培养基上生长过程中, SOD同工酶主要出现了4条酶带。Rf分别为: 0.200、0.340、0.467、0.633。其中第1条酶带为共有酶带, 且酶带宽, 颜色较其它酶带浅, 无明显差异。第3条带为主要酶带。在Rf为0.340、0.467、0.633的酶带上, 普通愈伤组织在不同盐浓度处理下酶活量较平稳, 仅在 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐浓度时, SOD同工酶酶活量升高, 且与耐盐性愈伤组织不加盐条件下是一致的(从带的宽度及色泽看), 这与前面测定的两者SOD酶活的结果相符。随着盐浓度的升高, 耐盐性愈伤组织SOD同工酶酶活量高且平稳(见上图)。

4. 讨论

王仑山等^[66]认为利用愈伤组织在盐压下筛选耐盐变异系一般有两种方法: 第一种方法: 直接选择法, 即将愈伤组织直接置于含有高于选择浓度NaCl的诱导培养基上, 这种方法的优点是可减少形成生理适应细胞, 迅速把耐盐系细胞选择出来, 但缺点是把一些本来存在的可筛选的变异淘汰了。第二种方法是间接选择法, 即逐级增加NaCl浓度, 每级浓度培养数代, 这样就可获得不同NaCl水平下产生的耐盐愈伤组织变异系。我们所得到的亚麻耐盐系采用的是第一种方式, 并且经过8代继代已经稳定。

盐胁迫会造成植物机体失水,对植物产生渗透胁迫,抑制其生长发育^[67]。我们可以看到对照随着盐胁迫的强度的加大,水分含量逐渐降低,并且变化幅度较大。而耐盐系也降低,但变化幅度不大,水分含量均高于对照。而相对生长率两者都发生了变化,只是耐盐愈伤的相对生长率均较普通愈伤高,变化幅度均不如普通愈伤。

可溶性糖是很多非盐生植物的主要渗透调节剂,它也是合成别的有机溶质的碳架和能量来源^[68],对细胞膜和原生质胶体亦有稳定作用,还可在细胞内无机离子浓度高时起保护酶类的作用。耐盐愈伤组织与普通愈伤具有明显的不同。

可溶性蛋白是细胞基质及各种细胞器基质的主要组成,在细胞生理代谢过程中有重要的催化功能,因而可溶性蛋白含量的多少,能在一定程度上反映植物内部代谢的活跃程度^[69],耐盐愈伤组织比普通愈伤的可溶性蛋白含量高,说明耐盐愈伤组织生长状况较好。

植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性,抗性强的品种往往积累较多的脯氨酸。增加脯氨酸是植物在水分胁迫或盐渍条件下最显著的代谢结果之一^[90]。尽管脯氨酸是否能作为一种耐盐性的选择指标仍有待进一步研究,但很多研究都显示出对渗透胁迫表现出抗性的变异系往往对盐胁迫也表现出抗性。李周崎等^[91]对河北杨体细胞抗盐性变异系做了氨基酸组分分析,结果发现7个抗盐性变异系氨基酸代谢均发生了显著变化,变化程度和方式各变异系均有不同,认为游离氨基酸中脯氨酸相对含量的增加可能与变异系抗盐性增加有关。但我们的到的试验结果与这相互矛盾,耐盐愈伤在 $0-200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 比普通愈伤底,可能是因为耐盐愈伤通过产生其他渗透调节物(糖类、蛋白类)来平衡盐压。

植物在盐胁迫下所受到的危害中,脂质过氧化作用是一个重要的方面,其破坏了内膜系统完整性,使其通透性变大,并破坏了许多细胞器功能,如线粒体呼吸作用和叶绿体的光合作用。同时膜脂过氧化中间产物(自由基)和最终产物(丙二醛 MDA)还可引起蛋白质变性,丙二醛作为脂质过

氧化水平的指标已为人们所接受, 脂质过氧化作用愈强, 丙二醛含量愈高^[92]。本试验结果表明, 在盐压下, 耐盐系的丙二醛含量高于不耐盐系, 其变化幅度不大, 而对照表现为: 随盐浓度的增加, 丙二醛含量增加. 这与肖雯等^[90]报道的情况一致, 可能是因为可以遗传的抗盐植物(包括盐诱导耐盐品系)可能受制于各自遗传性控制, 能够在高盐环境长期胁迫下或盐诱导下维持所形成的独特的生理代谢机制, 甚至在较为平稳的低盐胁迫下或没有盐胁迫下也表现出来, 即保持较高的MDA, 而膜透性却处在较低水平。

酯酶在植物体内广泛存在, 它参与酯代谢, 与内膜系统的发育有关, 也参与若干酶类的修饰、激活或钝化^[91]。由于盐胁迫的作用, 会导致一系列的生理状态的变化, 而这些变化都离不开细胞内膜系统(内质网等)的参与, 从而都可能直接或间接的与酯酶的代谢有关, 酯酶合成的增加则表明了细胞内在代谢体系的活跃。通过实验我们看到, 在不同浓度盐的胁迫下, 耐盐愈伤组织的酯酶同工酶的表达较普通愈伤组织有明显不同, 酯酶酶活力均高于对照, 说明耐盐愈伤组织酯酶合成活跃。

过氧化物酶同工酶与植物细胞多种代谢活动有关, 参与细胞分化, 影响一系列生理活性分子的合成与降解, 且是植物体内的保护酶之一, 能消除活性氧和超氧阴离子自由基对细胞造成的伤害, 以保护膜结构免受氧化损伤^[93]。本试验结果表明, 在盐压下, 耐盐系的过氧化物酶同工酶的酶带多于对照组, 耐盐细胞系的过氧化物酶同工酶4条带, 较对照多出了一条带并且所表现的酶活均高于对照. 说明盐压下耐盐系可通过增加过氧化物酶同工酶的含量和组分来适应盐环境。

超氧化物歧化酶是生物体内清除自由基的重要酶, 其生理功能和过氧化物酶类似, 也为保护酶, SOD活性的高低是机体抗逆能力的标志之一^[94]。我们试验结果表明, 在盐压下, 耐盐系的SOD同工酶的酶带与不耐盐系相同, 均为4条带, 但耐盐系表现的酶活均高于对照且平稳, 说明耐盐系较对照有较好的抗逆能力。

从结果看，我们所筛选的亚麻耐盐性愈伤组织在水分含量、相对生长率、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、脯氨酸含量、MDA含量、POD酶活、CAT酶活、SOD酶活、EST同工酶、POD同工酶及SOD同工酶多种生理生化指标上均较对照组有明显差异，说明我们筛选出的是亚麻耐盐突变细胞系。

耐盐能力的稳定性检验是一个长期的问题，我们筛选的亚麻突变细胞系需进一步得到再生植株，该植株是否耐盐要经过大田实际检验才能进一步验证，后面还有大量的工作要做。本实验的检验只是选择出的亚麻愈伤组织在一定的时间内其耐盐能力能够稳定保持。

结论

1. 以NAA0.5mg · L⁻¹+KTO.5mg · L⁻¹的MS培养基能够获得亚麻的胚性愈伤，亚麻胚性愈伤组织的生长状态良好，呈浅黄色，表面干燥，较为松散、增殖快。
2. 以KT1.5mg · L⁻¹+2.4-D1.0mg · L⁻¹的MS分化培养基能很好地诱导愈伤组织发生体细胞胚，并能进行体胚发育，亚麻体细胞胚经过球形胚、心型胚、鱼雷胚及子叶胚等过程，但在这过程中容易产生次生单极性畸形胚。
3. 获得了能够耐受250mmol · L⁻¹NaCl浓度的高耐盐亚麻愈伤组织。通过比较水分含量、相对生长率、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、脯氨酸含量、MDA含量、POD酶活、CAT酶活、SOD酶活、EST同工酶、POD同工酶及SOD同工酶多种生理生化指标，发现均较对照组有明显差异，可以确定该耐盐愈伤组织为亚麻耐盐突变细胞系。

参考文献:

- [1] 朱徽. 植物组织培养中的胚状体. 遗传学报. 1978, 5 (1): 79-88
- [2] 何永奇, 洪勇. 体细胞胚胎发生在柑桔生物技术中的应用. 亚热带植物通讯, 1997, 26 (2) 50-54
- [3] 桑庆亮, 赖钟雄. 荔枝体细胞胚胎发生的研究进展. 福建农业大学学报, 2000, 29 (3): 311-315
- [4] 邓秀新, 章文才, 万蜀渊. 柑桔原生质体分离及再生植株的研究. 园艺学报, 1988, 15 (2): 99-102
- [5] 邓占鳌, 章文才, 万蜀渊. 诱发柑桔“适应型”珠心愈伤组织体细胞胚胎的研究. 果树科学, 1991, 8 (4): 193-216
- [6] 霍合强, 邓秀新. 柑桔胚性愈伤组织的诱导. 保存和利用. 植物生理学通讯, 2000, 36 (2): 181-187
- [7] 刘华清, 陈蓉茂. 荔枝胚性愈伤组织的诱导与保持. 福建果树, 1997, (4): 1-3
- [8] 王家福, 刘月学, 宋刚, 林顺权. 枇杷胚性愈伤组织的诱导与保持. 福建农业大学学报, 2000, 29 (3): 305-310.
- [9] 薛美凤, 郭余龙, 李名扬, 裴炎. 长期继代对棉花胚性愈伤组织体胚发生能力及再生植株变异的影响. 西南农业学报, 2002, 15 (4): 19-21
- [10] 汤浩茹, 任正隆. 果树的体细胞胚发生. 四川农学报, 1999, 17 (1): 69-79
- [11] Tulecke W Mc Granahan G H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from crtyledons of walnut, *Juglans regia*. Plant Sci, 1985, (40): 57-63
- [12] 邝哲师, 周丽依, 马雪踢, 陈俊秋, 曹静. 荔枝体胚成苗的研究. 广东农业科学, 1997, (1): 14-15
- [13] Deng M D, Cron D. Maturation and germination of walnut somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Cult, 1992, 28(2): 195-202
- [14] Dietrich K. Über die Kuhuren von Embryonen ausserhalb des Samens[J]. Flora, 1924, 17: 379

- [15] Link GKK, Eggera V. Mode, site and time of initiation of hypocotyledonary bud primordia in *Linum usitatissimum* L. [J]. Bot Gaz, 1946. 107: 44
- [16] 孙洪涛, 傅卫东, 董丽辉. 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
- [17] Bretagne B, Chupeau MC, Chupeau Y, et al. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. Plant Cell Rep, 1994. 14: 120
- [18] 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*. Plant Cell Rep, 2003, 22: 110
- [19] Cunha AC, Fernandes-Ferreira M. Somatic embryogenesis organogenesis and callus growth kinetics of flax. Plant Cell Tiss Org, 1996, 47: 1
- [20] 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]. Plant Physiol, 1999. 155: 591
- [21] Cunha AC, Fernandes-Ferreira M. Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and callus growth of flax[J]. Plant Sci, 1997, 124:97
- [22] 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
- [23] Tejavathi DH, Sita GL, Sunita AT. Somatic embryogenesis in flax. Plant Cell Tiss Org, 2000,63: 155
- [24] Dedicova B, Hricova A, Samaj J, et al. Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyls segments[J]. J Plant Physiol, 2000, 157: 327
- [25] ANNA PRETOVA AND BOHUS OBERT FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.)--

A PLANT SYSTEM FOR STUDY OF EMBRYOGENESIS *ACTA BIOLOGICA
CRACOVENSIA Series Botanica* 2003 45/1: 15-18,

- [26] Nabor MW In current topic in plant biochemistry and physiology[J]. Randall D.C. Uni of Missouri Colu m bia.1 983(12):163-171
- [27] 周荣仁. 植物组织培养在选择耐盐植物方面的研究概况[J]. 曲阜师范学院学报, 植物生理专刊, 1 98 4(a):63-83
- [28] 陆卫, 贾敬芬. 谷子胚性愈伤组织耐盐系的选择及其生理生化特性分析[J]. 作物学报, 1994, 20(2):241 247
- [29] 王鸣刚, 贾敬芬. 小麦耐盐系筛选及稳定性研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版). 1999, 3 50):149-153
- [30] 张亚兰, 李彦舫, 杨柏明. 短芒大麦耐盐变异体的筛选与鉴定[J]. 草业学报, 1998, 15 (1) 30-32
- [31] 韦小敏, 季良越, 胡彦民. 玉米耐盐愈伤组织变异体的筛选初报[J]. 河南农业大学学报, 2 00 0, 34(4):324-328
- [32] 徐云远, 王鸣刚, 贾敬芬. 红豆草耐盐愈伤组织的筛选及植株再生[J]. 西北植物学报, 2000, 2 0(1): 15-21
- [33] 李金华, 苏晓华, 张绮纹等. 细胞工程育种-林木耐盐性细胞突变体育种研究进展[J]. 世界林业研究, 1997, (6):15- 20
- [34] 陈英. 植物体细胞无性系变异与育种[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1991
- [35] 李周岐. 高等植物体细胞突变体离体筛选技术及其在林木抗盐育种上的应用[J]. 陕西林业科技, 1994, 4:50-55
- [36] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2004
- [37] 王兴军, 姚敦义. 运用多步正选择系统筛选木模耐盐变异体(简报), 植物生理学通讯[J], 1994, 30 (1): 22-24
- [38] 王鸣刚, 贾敬芬. 小麦耐盐系筛选及稳定性研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版). 1999, 3 , 50:149-153

- [39] 张亚兰, 李彦舫, 杨柏明. 短芒大麦耐盐变异体的筛选与鉴定[J]. 草业学报
1998, 15 (1) 30-32
- [40] 韦小敏, 季良越, 胡彦民等. 玉米耐盐愈伤组织变异体的筛选初报[J]. 河南农
业大学学报, 2000, 34(4):324-328
- [41] Chalef R S. Isolation of agronomic useful mutants from plant cell culture [J].
Science. 1983, 219:676-682
- [42] 贺道耀, 余叔文. 水稻高脯氨酸愈伤组织变异系的筛选及其耐盐性[J]. 植物生
理学报, 1995, 21(1): 65-72
- [43] Tantau H, Drooling K. In vitro selection of hydroxyl proline resistant cell line of
Wheat (*Triticum aestivum*): accumulation of proline, decrease in osmotic potential,
and increase in frost tolerance[J]. *Physiol plant*. 1991, 80: 243-252
- [44] 莫元龄, 颜昌敬. 植物细胞培养手册[M]. 北京: 农业出版社, 1992
- [45] 王仓山, 王鸣刚, 王亚馥. 利用组织及细胞培养筛选作物耐盐变异体的研究[J]
植物学通报, 1996, 13(2):7-10
- [46] 周荣仁, 杨燮荣, 余叔文. 利用组织培养选择烟草耐盐愈伤组织变异体并分化
出再生植株[J]. 实验生物学报, 1986, 19(3):279-286
- [47] 周荣仁, 杨燮荣, 余叔文. 应用组织细胞培养研究植物耐盐机理与筛选耐盐突
变体的进展[J]. 植物生理学通讯, 1989(5):11-19
- [48] 张慧, 周骏马, 郭岩等. 水稻突变体M-20的耐盐生理特性[J]. 植物生理学报,
1997, 23(2):181-186
- [49] 贺道耀, 余叔文, 水稻高脯氨酸变异系高脯氨酸含量和耐盐性的遗传性[J].
植物生理学报, 1997, 23(4):357-362
- [50] 秦树才, 李刚, 李实等. 我国甜菜抗盐资源的鉴定[J]. 中国糖料, 2004(2)
:43-47
- [51] Vose P B. Induced mutations-a tool in plant research. Proc. of a symposium held in
Vienna. 1981:165-166
- [52] Pilar C A, Eduardo P M. Selection of a NaCl-tolerant Citrus Plant[J]. *Plant Cell*

- Reports, 1995,14 (5):314-318
- [53] 王鸣刚, 牛登科, 高清祥等. 小麦耐盐变异体的筛选I. 小麦耐盐细胞系的筛选及生理生化特性的分析[J]. 西北植物学报, 1995, 15 (5):15-20
- [54] 李周崎. 河北杨体细胞抗盐变异系氨基酸组分变异性分析[J]. 陕西林业科技, 1995, (3) :7-10
- [55] 陈受宜, 朱立煌. 水稻抗盐突变体的分子生物学鉴定[J]. 植物学报, 1991, 33(8) :569-572
- [56] 熊冬金, 林志红, 杨柏云. 玉米在涝渍和低温胁迫过程中四种酶同工酶分析及丙二醛的变化[J]. 南昌大学学报(理科版), 1996, 20(4) :314-319
- [57] 张士功, 高吉寅. 甜菜碱对小麦幼苗生长过程中盐害的缓解作用[J]. 北京农业科学. 1998年6月, (3) 13-17
- [58] 魏爱丽, 白桦, 陈云昭. 盐胁迫下大豆初生叶愈伤组织 SOD 活性及其同工酶变化的研究[J]. 大豆科学, 1999, 18(1) :85-88
- [59] GREEN A G, MARSHALL D R. Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum* L.) having reduced lino lenic acid content [J]. *Euphytica*, 1984; 33 (4) : 321-328.
- [60] 吕江南, 贺德意, 王朝云, 汤清明, 刘恩平, 谭石林. 全国麻类生产调查报告[J]. 中国麻业, 2004, 26(2) :95-102
- [61] 王玉富. 我国亚麻生物技术的现状及发展[J]. 中国麻业, 2005, 27(2) : 60-65
- [62] Pretova A, Willams EG. Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.) [J]. *Plant Physiol*, 1986, 126: 155
- [63] Cunha AC, Fernandes-Ferreira M. Somatic embryogenesis Organogenesis and callus growth kinetics of flax . *Plant Cell Tiss Org*, 1996, 47: 1
- [64] 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
- [65] Tejavathi DH, Sita GL, Sunita AT. Somatic embryogenesis in flax. Plant Cell Tiss Org, 2000,63: 155
- [66] Dedicova B, Hricova A, Samaj J, et al. Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments[J]. Plant Physiol, 2000, 157: 327
- [67] 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
- [68] 崔凯荣, 陈克明, 王晓哲等. 植物体细胞胚胎发生研究某些现状[J]. 植物学报, 1993, 10(36): 14-20
- [69] 杨汉民, 高清祥, 张爱国. 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), 1992, 28(1): 87-93
- [70] 王喆之, 李克勤, 刘全. 槐树子叶组织培养中的形态发生研究. 实验生物学报, 1993, 26(1): 39-49
- [71] 郝建平, 周小梅, 李绍清. 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, 1995, 28(3): 339-347
- [72] 李学红, 李冬玲, 苑金香, 王煦光, 尹小燕, 杨爱芳, 张举仁. 玉米茎尖培养研究(II)-体细胞胚胎发生的组织细胞学研究 潍坊学院学报2002第2卷第2期, 1-4
- [73] Dudits D, Bogre IA, Gyorgyer J(1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic embryogenesis. J Cell Sci, (9) :475
- [74] Satoch S, Kamada H, et al. Auxin controlled glycoprotein release into the medium of embryogenetic carrot cells[J]. Plant Physiol, 1986, 81: 991-993
- [75] Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Onckelen HA, Dudits D, Feher A(2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embry-

ogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol*,

129:1807-1819

[76] Meijer EGM, Brown DCW (1987). Somatic embryogenesis in a novel system for rapid high frequency *Medicago sativa*. *Physiol Plantarum* 69:591-596

[77] 黄学林等, 李筱菊, 傅家瑞, 劳彩玲(1994). Thidiazuron对苜蓿愈伤组织的乙烯生成及其体细胞胚胎发生的影响. *植物生理学报*, 1994, 20 (4):367-372

[78] 黄学林, 徐九龙, 高东微, 叶文红, 李筱菊. MGBG对苜蓿愈伤组织生长、体细胞胚胎诱导及其乙烯生物合成的影响. *植物学报*, 1998 40(7):635-641

[79] 赵可夫. 植物抗盐生理. 北京: 中国科学技术出版社 1993

[80] Bradford M M. A rapid sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-252

[81] 赵世杰. 植物生理学实验指导 北京: 中国农业出版社 1995

[82] 邹琦. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社 2000

[83] 张志良 植物生理学实验指导, 北京: 高等教育出版社 1998

[84] Kraus TE, Pletcher RA. Paclobul protects wheat seedlings from heal and paraqual injury. Is detoxification of active oxygen involved? [J] *Plant Cell Physiol*. 1994, 35; 45-52

[85] 罗广华, 王爱国. 植物的凝胶电泳及活性的显示. *植物生理学通讯*, 1983 19 (6): 44-45

[86] 王仓山, 王鸣刚, 王亚薇. 利用组织和细胞培养筛选作物耐盐系的研究. *植物学通报*, 1996, 13(2): 7-12

[87] 周卫, 马敬坤, 王志强, 叶雄, 张楚富. 等渗水分和盐胁迫对水稻幼苗叶片氮同化的影响. *武汉大学学报*, 2005 51(4): 521- 524

[88] 张海燕, 赵可夫. 盐分和水分胁迫对盐地碱蓬幼苗渗透调节感应的研究[J]. *植物学报*. 1998, 40(1):56-61

[89] 曹翠玲, 李生秀 氮素形态对玉米幼苗碳水化合物及养分累积的影响 *华中农业*

大学学报2003 No. 5 Vol 22 , 457-461

- [90] 肖雯, 贾恢先, 蒲陆梅. 几种盐生植物抗盐生理指标的研究. 西北植物学报, 2000, 20 (5) : 818-825
- [91] 李周崎. 河北杨体细胞抗盐变异系氨基酸组分变异性分析. 陕西林业科技, 1995 (3): 7-10
- [92] 王爱国, 邵从本, 罗广华. 丙二醛作为脂质过氧化指标的探. 植物生理学通讯, 1986, 22 (2) : 55-57
- [93] 徐根娣, 刘 鹏, 杨维丰. 铁胁迫对大豆POD和EST同工酶的影响. 浙江师范大学学报 2005, 28(2): 187-191
- [94] 陆卫, 贾敬芬. 盐胁迫下外源ABA对谷子耐盐愈伤组织生理生化特性的影响. 植物生理学报, 1997, 23(1): 61-66

致谢

衷心感谢我的恩师计巧灵教授!

三年的硕士学习阶段即将结束,在这三年的学习和生活中,我的恩师计巧灵教授给予了我精心的指导和关怀。恩师在科学思维、科研素质和职业道德等方面对我严格要求,在我学习生活中遇到困难时,又给予我帮助和鼓励并提出中肯建议,使我能够顺利完成学业。导师在科学实践中的严谨求实、精益求精的科学态度,以及在思考问题的开拓创新的思考方式和在生活中的言传身教,使我受益匪浅!计巧灵教授严谨的治学态度,孜孜不倦的工作作风是我学习的榜样。在实验中,导师不仅对我的论文给予指导,而且在生活中,也给予了我慈母般的关怀。我的论文能够顺利完成,同样倾注了她的点滴心血。衷心感谢恩师对我的无私指导和悉心帮助!

值此论文成稿之际,谨向恩师致以最诚挚的敬意和衷心的感谢!

本实验室梁云海、雅力坤、王永星副教授等老师在研究过程中给予的热情指导和帮助,本专业研究生李小飞等同学也给予了很大帮助,师兄周小云,师姐刘亚萍、师弟师妹:贾红丽、朱国丽、张丕鸿、王雪华、李文婷、姜丽、郭景霞、刘小锐等热情的帮助,向他们表示真诚的感谢!深深感谢我的父母及弟弟,在我上学期间是他们给予了精神上的支持,使我得以顺利地完成学业!最后,感谢三年来理解和关怀我的所有的人!

葛春辉 于新大生地楼417室

二零零七年五一劳动节

个人简介

姓名 葛春辉，汉族 1979.4

生于新疆巴楚50团

1998-2002, 就读于新疆大学生物系生物技术专业。

2002.7-2004.9 克拉玛依金塔集团工作

2004.9-2007.6 新疆大学生科院攻读硕士学位，植物学专业，植物生物技术研究方向

参与以下课题：

- 1、 亚麻与罗布麻体细胞杂交及其种质的耐盐性遗传研究(国家自然科学基金, 编号: 30660095)
- 2、 亚麻与罗布麻体细胞杂交育种研究(新疆维吾尔自治区教育厅重点科研项目 编号:XJEDU2006I08)
- 3、 速生杨与胡杨不对称体细胞杂交育种研究(新疆生物资源基因工程重点实验室项目, 编号: XJDX0201-2005-07)

发表(或待发表)以下文章：

- 1、 贮存过程中胡杨种子细胞蛋白体超微结构的变化
第一作者 《种子》已接收
- 2、 一株亚麻耐盐突变细胞系的部分生理生化特性
第一作者 正在审稿
- 3、 亚麻体胚发生发育过程研究
第一作者 正在审稿