

# 亚麻愈伤组织诱导最佳培养基的筛选

焦德志, 李波, 吕建伟, 李莉 (齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**摘要** 利用组织培养技术, 采用正交设计方法, 以“双亚6号”亚麻种子为材料, 对亚麻不同外植体、不同植物激素及不同浓度组合诱导愈伤组织的最佳培养基进行了筛选。结果表明, 以 B<sub>5</sub> 培养基加入 4 mg/L IAA、2 mg/L KT 和 200 mg/L LH 诱导子叶和下胚轴形成的愈伤组织最好, 诱导率可达 100%; 通过细胞学观察发现, 该愈伤组织的胚性细胞最多, 并可诱导产生再生植株。

**关键词** 亚麻; 愈伤组织; 组织培养; 最佳培养基

**中图分类号** Q945.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)06-1124-02

亚麻是重要经济作物, 主要育种目标是提高纤维产量和抗旱、抗病、抗倒伏能力。利用组织培养技术筛选亚麻愈伤组织诱导最佳培养基, 可为亚麻抗逆性研究提供理论基础。笔者选取亚麻子叶和下胚轴作为外植体, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计, 以 B<sub>5</sub> 为基本培养基, 激素分别选取吲哚乙酸 (IAA)、激动素 (KT) 和水解乳蛋白 (LH)。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 亚麻优良品种“双亚6号”, 由齐齐哈尔市种子公司提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 无菌苗培养。**选择籽粒饱满的亚麻种子 160 粒, 用纱布包好, 蒸馏水浸泡 4 h。配制 MS 培养基, 加入 10 g/L 琼脂和 30 g/L 蔗糖, 调 pH 至 5.8, 然后在 121~126 °C 下灭菌 20 min 后备用<sup>[1]</sup>。用 75% 酒精处理种子 30 s, 无菌水冲洗 3~4 次, 再以 0.1% 升汞消毒 8~10 min, 取出后用无菌水冲洗 3~4 次。在无菌条件下把消毒的亚麻种子接种在 MS 培养基上, 室温培养。大约 15 d 后种子已全部萌发成具有子叶和下胚轴的无菌苗。

**1.2.2 愈伤组织诱导。**选用 B<sub>5</sub> 培养基, 加入 5 g/L 琼脂、15 g/L 蔗糖和相应激素, 调 pH 至 5.8。供试外源激素为 IAA、KT 和 LH, 正交表选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>), 表头设计和各因子状况见表 1。

表 1 愈伤组织诱导培养基的 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计

试验代号	IAA	KT	LH
1	0	0	0
2	0	1	200
3	0	2	500
4	2	0	200
5	2	1	500
6	2	2	0
7	4	0	500
8	4	1	0
9	4	2	200

在无菌条件下, 用解剖刀将亚麻子叶(去掉基部)、下胚轴(长约 0.8 cm)切下, 分别接种于上述 B<sub>5</sub> 培养基上, 每个培养瓶中接种 6 块, 室温培养 30 d。

**1.2.3 石蜡包埋切片制作。**选择新鲜、老嫩适宜的有代表性的材料, 切割成 3~5 mm 长的小段或小片, 制备成石蜡切片, 具体操作和要求见参考文献[3]。镜检观察并拍摄照片。

## 2 结果与分析

**2.1 愈伤组织的形态学观察** 培养 5 d 后部分亚麻子叶的切口处膨大, 7 d 左右开始出现肉眼可见的愈伤组织。10 d

后大部分亚麻子叶周围均生成愈伤组织, 且培养基的接触部位愈伤组织生长较快。愈伤组织形成情况见表 2。培养 10 d 后, 部分亚麻下胚轴出现少量愈伤组织, 而且下胚轴通常在—端形成较多的愈伤组织, 另一端愈伤组织生长较少, 愈伤组织的生长表现出—定的极性和不平衡性<sup>[2]</sup>。培养 30 d 后, 亚麻子叶和下胚轴与培养基接触的一端或与培养基表面相接触的部位形成较多愈伤组织, 这时愈伤组织生长速度逐渐减慢乃至停止。愈伤组织的生长状况见图 1。

表 2 植物激素对亚麻子叶和下胚轴愈伤组织诱导的影响

试验代号	子叶愈伤组织	下胚轴愈伤组织
1	无	无
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	++	++
6	++	++
7	+	+
8	++	++
9	+++	+++

注: +++> ++> +。

对愈伤组织进行形态学观察, 发现有如下特点: 绿色不透明、致密硬实、质地光滑等。试验还发现, 子叶诱导愈伤组织比下胚轴快; 培养基中除长出愈伤组织外, 还长出少许不定苗和根。不定苗和根的生长情况见表 3。

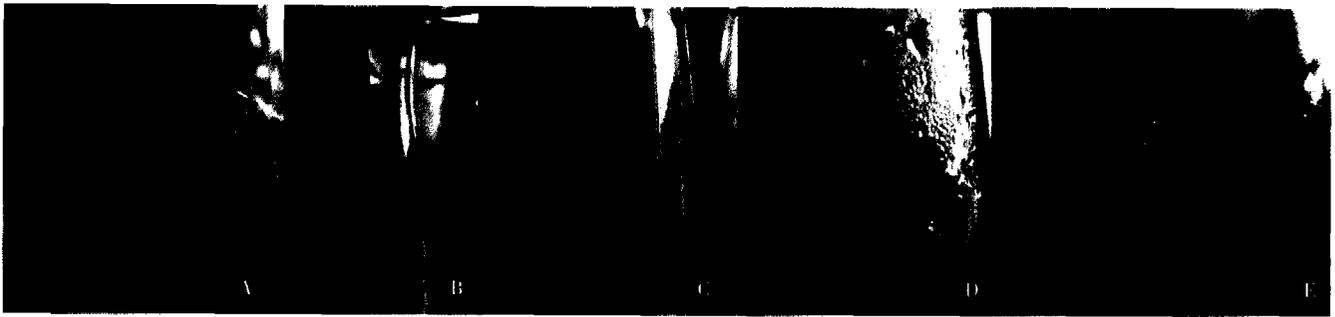
表 3 各培养基中不定苗和根的生长情况

试验代号	子叶	下胚轴
1	无不定苗和根	无不定苗和根
2	无不定苗和根	无不定苗和根
3	无不定苗和根	无不定苗和根
4	长根	长根
5	长不定苗和根	长不定苗和根
6	长不定苗和根	长不定苗和根
7	长根	长根
8	长根	长根
9	长不定苗和根	长不定苗和根

**2.2 愈伤组织的细胞学观察** 研究发现, 9 号子叶和下胚轴的愈伤组织致密, 细胞整齐一致, 可见大量球形胚, 细胞质浓, 具有细胞核。其他愈伤组织的细胞显著拉长呈畸形管状, 形态不规则, 细胞间缺少联系, 多数处于游离状态。愈伤组织在长期生长过程中, 有胚性与非胚性 2 类愈伤组织发生。胚性愈伤组织发生之前经历愈伤组织生长发育阶段。成熟胚诱导出愈伤组织, 经培养, 在愈伤组织外围形成胚性细胞, 随着胚性细胞不断分裂, 愈伤组织中胚性细胞团增多。随着进一步培养, 在组织内也有胚性细胞形成。细胞学观察显示, 胚性细胞细胞质浓, 有明显的细胞核, 细胞呈圆形。胚性细胞在发育过程中, 出现细胞壁加厚, 胞间连丝消失等变化。胚性细胞分裂形成的多细胞原胚始终被厚壁包围, 与周

**作者简介** 焦德志 (1970-), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 讲师, 从事细胞学和植物种群生态学。

**收稿日期** 2006-01-05

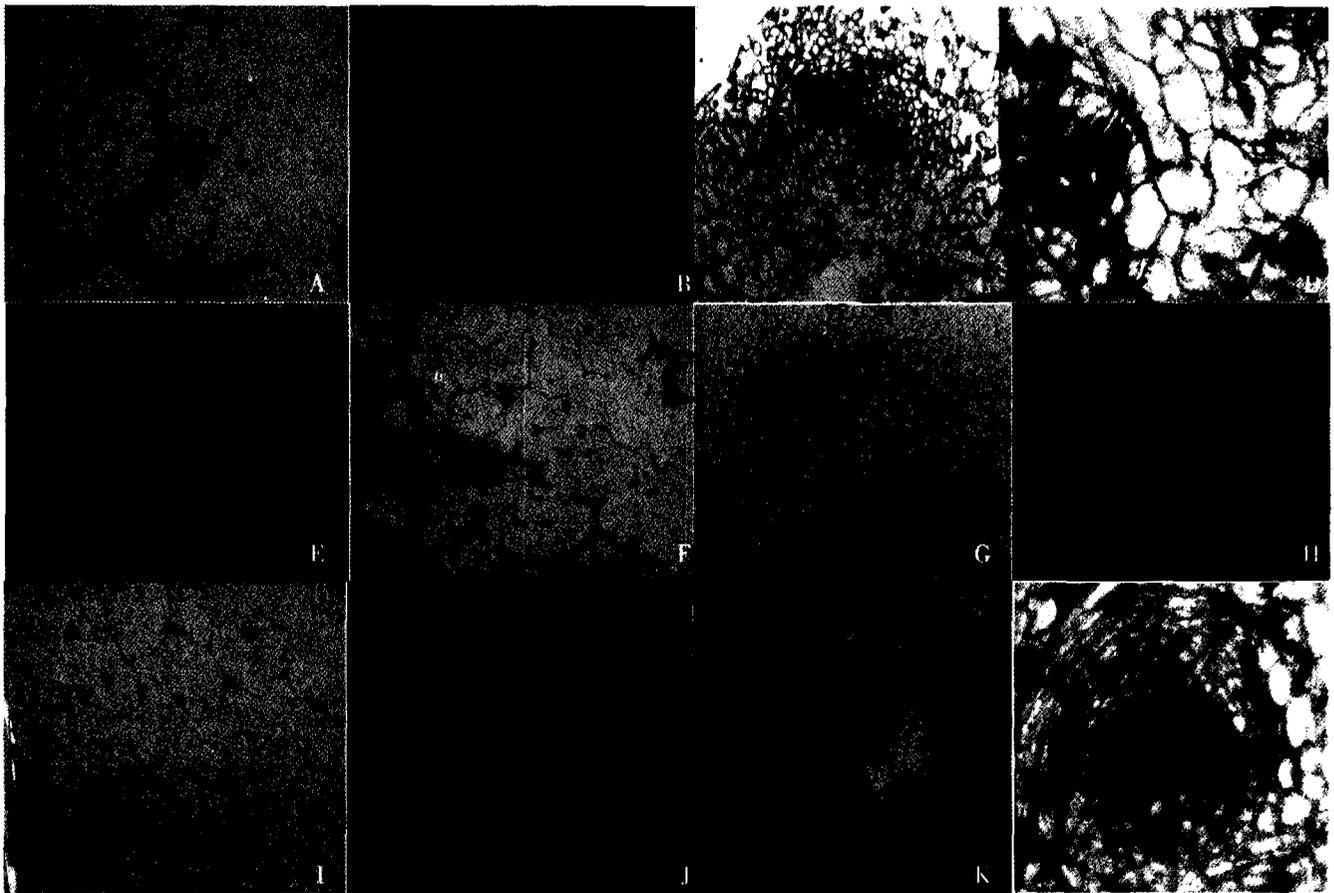


A 4号愈伤组织的根 B 5号愈伤组织的不定苗和根 C 6号愈伤组织的不定苗和根  
D 8号愈伤组织的不定苗和根 E 9号愈伤组织的不定苗和根

图1 不同处理后愈伤组织的生长状况

围细胞形成明显的界限,只通过胚柄类似物与外植体或愈伤组织相连。同时发现,有些愈伤组织中细胞多呈不规则形,染色浅,没有细胞团的形成,这些愈伤组织胚性发生能

力弱,多保持为非胚性愈伤组织,说明胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织在内部构造上有明显差异<sup>[4]</sup>(图2)。胚性与非胚性愈伤组织的比较见表4。



A 1号非胚性细胞 B 2号胚性细胞 C 3号胚性细胞 D 4号胚性细胞 F 5号胚性细胞  
E 7号非胚性细胞 G 6号胚性细胞 H 6号非胚性细胞 I 8号胚性细胞 J 8号非胚性细胞  
K 9号胚性细胞 L 9号非胚性细胞

图2 不同处理后细胞学观察结果

表4 胚性与非胚性愈伤组织形态及解剖构造的比较

指标	胚性愈伤组织	非胚性愈伤组织
颜色	鲜绿	白色
表面	光滑	粗糙
质地	坚硬但易碎	松散
胚性细胞多少	大量	极少或无
细胞形态	圆形	管状或不规则形
细胞质	浓厚,染色深	稀薄,染色浅
内含物	多	少
细胞核	核明显且大	核小或无核

2.3 胚性愈伤组织的鉴别 通过制作石蜡包埋切片观察

发现:1号愈伤组织的细胞呈不规则形,细胞核较少;2、3、4、7号愈伤组织的细胞少数聚集在一块,细胞核较少;5、6、8、9号的细胞聚集处较多,聚集处细胞呈圆形,细胞质浓厚,细胞核清晰可见,而且染色较深,此为胚性细胞,可诱发长成再生植株,比较发现,9号愈伤组织的胚性细胞最多,因此长势也最好。

2.4 愈伤组织诱导过程中植物激素的作用 在植物组织培养中,生长素和细胞分裂素是细胞离体培养必需的激素。

(下转第1129页)

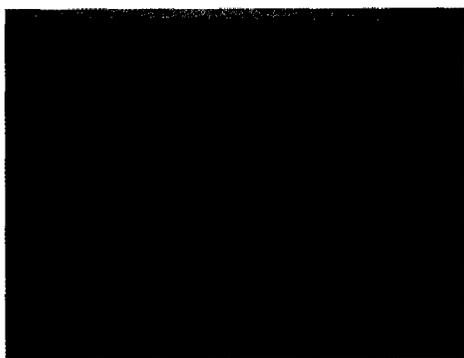


图5 栗绦蚧雌成虫危害板栗

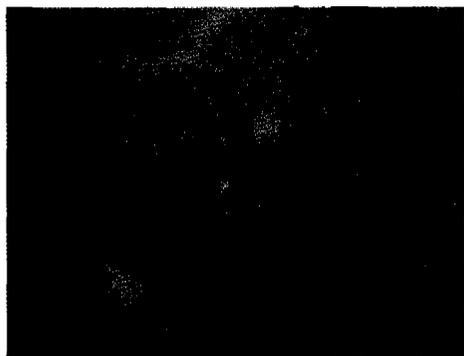


图6 双黑绦蚧雌成虫危害板栗

### 3 发生规律

双黑绦蚧在安徽省1年1代。3月中旬若虫开始膨大、危害,危害期3月中旬~4月中旬,危害盛期为3月下旬。4月上旬,雌若虫开始发育成雌成蚧,卵原基开始形成,显微镜下可以看到这一过程。在雌蚧体内,最早成熟的卵与最迟成熟的卵约相差10~15 d。雌蚧于4月下旬~5月中旬卵孵,一头雌蚧孕卵量约2000粒。雄蚧羽化期在3月下旬~4月中旬。少量初孵若虫向上爬行,通过两株树外围重叠枝条向相邻栗树传播扩散,大部分若虫在1~3年生枝条、枝干、主干的皮缝、树枝背阴处、伤疤、树丫、膏药病斑等处固定。但嫁接树龄在10年以下栗树,初孵若虫(包括雌雄虫)不但在树干固定,而且约60%初孵幼虫爬行到栗树基部及其附近土壤中,其中少量若虫可以沿地表爬行1.5~2 m。1龄若虫固定后约15 d,若虫前端体躯2侧分泌白色蜡粉,约再过

(上接第1125页)

两者不同浓度和比例组合,不但可诱导细胞分裂和生长,而且可诱导再生植株。

该试验所用激素是吲哚乙酸(IAA)、激动素(KT)、水解乳蛋白(LH)。吲哚乙酸的主要生理作用是促进细胞生长和细胞分裂,诱导受伤组织产生愈伤组织;在组织培养中可用于诱导根的形成。激动素有促进细胞分裂的作用,在生长素存在的条件下,激动素对愈伤组织细胞分裂具有明显的促进作用。水解乳蛋白能够增加愈伤组织的诱导率。因此,在加入IAA的4、5、6、7、8、9号培养基中均有愈伤组织和根的形成;在加入IAA和KT的5、6、8、9号培养基中除长出愈伤组织外,还长出不定苗和根;在加入IAA、KT和LH的5、

20 d,若虫分泌蜡丝形成1层薄茧越冬,1个月后蜕皮成2龄若虫。11月中下旬,随着栗树落叶,大部分若虫回迁到1~2年生枝条基部、芽内侧越冬。

### 4 防治方法

因蚧类体外被有蜡粉,一般化学药剂不易透入,所以防治效果不够理想。双黑绦蚧固着寄生,若虫虫体较小,极易随接穗、苗木、人类活动传播,故应加强植物检疫<sup>[4]</sup>。在防治过程中也不能忽视双黑绦蚧的天敌,另外还需辅助人工措施。

**4.1 加强植物检疫** 双黑绦蚧主要靠接穗进行远距离传播,所以,应对接穗采取严格的检疫措施,不采用携带有双黑绦蚧的接穗。如果确需从外地调入接穗,必须对外调接穗进行封蜡。

**4.2 提高营林技术** ①选用适合当地的抗虫品种;②因地制宜地进行垦复、施肥;③进行修剪、刮皮、涂白。对栗树进行修剪、垦复的目的是减少栗园的投影面积,阻隔双黑绦蚧若虫通过2树外围重叠枝条和地表爬行传播,提高栗园透光性,集中养分,增加产量。以丰产性能好、较抗虫的粘地板、大红袍等栗树品种为母穗,改接产量低、易感蚧虫品种,接穗均进行封蜡,可达到优质高产的目的。

**4.3 保护天敌** 调查发现,当年捕食和寄生率超过90%时,第2年双黑绦蚧发生急剧下降,达到防治指标以下,因此天敌是防治双黑绦蚧的重要一环。当枝条1~2年生虫口低于5头时,对产量影响较小,可以不防治,这也有利于保护天敌。

**4.4 化学防治** 当板栗双黑绦蚧偏重发生和大发生时,应抓住3月15~30日越冬若虫膨大期这一最佳时机,选择对人和环境都较友好的高效、低毒、低残留农药,喷药于1~2年生枝条背面。此时正好避开了寄生蜂羽化高峰期和黑缘红瓢虫卵孵化期,避免大量杀伤天敌。研究表明,10%高渗吡虫啉可湿性粉剂加少量菊酯类农药防效较好。

### 参考文献

- [1] 刘永杰,石毓亮.中国绦蚧科种类名录[J].森林病虫害通讯,1996,3:7-9.
- [2] 刘永杰.中国板栗上发生的绦蚧[J].昆虫知识,1997,34(2):93-94.
- [3] 杨平澜.中国蚧虫分类概要[M].上海:上海科学技术出版社,1982:114-118.
- [4] 王子清.常见蚧壳虫鉴定手册[M].北京:科学出版社,1985.

9号培养基中,以9号培养基的愈伤组织长势最好,故最佳培养基配方为B<sub>5</sub>+IAA 4 mg/L+KT 2 mg/L+LH 200 mg/L。

### 3 结论

细胞学观察发现,无论是利用子叶还是下胚轴诱导愈伤组织,9号(B<sub>5</sub>+IAA 4 mg/L+KT 2 mg/L+LH 200 mg/L)愈伤组织的长势都最好,胚性细胞最多,所以它为最佳培养基。

### 参考文献

- [1] 孙洪涛.亚麻花药培养研究初报[J].遗传学报,1979,24(20):948-950.
- [2] 孙洪涛,付卫东.亚麻花粉植株的诱导及其后代的初步观察[J].遗传学报,1981,8(4):369-375.
- [3] 蔡旭立.植物遗传育种科学[M].北京:科学出版社,1998.
- [4] 袁朝兴,白永延.亚麻下胚轴转化系统的建立[J].植物生理学报,1993,19(4):387-390.