

激素对百合植株再生的影响

刘明志, 林雪艳

(暨南大学生物工程学系, 广东广州 510632)

摘要: 本研究设计了15种不同配比的激素组合研究2,4-D和6-BA对百合鳞片叶器官发生和体细胞胚胎发生的影响。结果表明:在MS培养基上,BA可诱导外植体直接分化不定芽,其中1.0~2.0mg/L BA诱导不定芽的分化频率最高,6.0mg/L BA抑制不定芽分化;2,4-D可诱导直接体细胞胚胎发生,其中4.0mg/L 2,4-D诱导体细胞胚胎发生的频率最高,而6.0mg/L 2,4-D诱导体细胞胚胎发生的频率降低;当培养基中同时含有BA和2,4-D时,既出现不定芽,又出现体细胞胚。当再生苗移入无激素的MS培养基和含有1.0mg/L和2.0mg/L IAA的MS培养基上时,只有无激素的MS培养基有利于根的形成。此外,鳞片叶的大小和外植体的接种方向也影响外植体分化。

关键词: 百合; 体细胞胚胎发生; 器官发生

中图分类号: Q942.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)02-0167-04

Effects of hormone on plant regeneration of lily (*Lilium davianii* Duch)

LIU Ming-zhi LIN Xue-yan

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Somatic embryogenesis and organogenesis of scale leaf of lily on medium containing 15 kinds of different combination of BA and 2,4-D were obtained to study the effect of hormone on plant regeneration. Results show that BA in MS medium can induce direct adventitious bud formation, and when the concentration of BA is between 1.0 mg/L and 2.0 mg/L, the highest frequencies of adventitious bud differentiation can be acquired. 2,4-D owns the ability to induce direct somatic embryogenesis and 4.0 mg/L 2,4-D can induced the highest frequency of direct somatic embryogenesis, but 6.0 mg/L 2,4-D maybe cause somewhat inhibitory effects on direct somatic embryogenesis. Both of adventitious bud and direct somatic embryogenesis can be attained when BA and 2,4-D are utilized in culture medium simultaneously. Only root formation can be induced on hormone-free's MS medium when regenerative shoots are transferred to hormone-free's MS medium, MS medium of 1.0mg/L IAA and 2.0mg/L IAA respectively. On the other hand, the size and the orientation of the scale leaf being inoculated influence the differentiation of scale leaf.

Key words: *Lilium davianii*; organogenesis; somatic embryogenesis

百合具有优良的食用、药用和观赏价值。其无性系快速繁殖主要是通过组织培养其鳞茎实现

的^[1-4]。在百合组织培养及其形态建成过程中,植物激素起了很重要的作用^[5]。百合鳞茎的鳞片叶在其

收稿日期: 2000-10-17

作者简介: 刘明志(1963-),男,湖南岳阳人,博士,副教授,在暨南大学从事细胞生物学和细胞工程教学和科研工作。

离体培养过程中,有两种再生方式,一种为器官发生(organogenesis),一种为体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis)。在植物组织培养中两种再生方式一般均具有直接和间接两种方式,但在百合鳞片叶培养过程中,其再生方式均为直接再生,即鳞片叶不需经过愈伤组织而直接分化形成不定芽和胚状体。目前,在百合鳞片叶培养过程中,有关生长素和细胞分裂素对不定芽分化和体细胞胚形成的作用还不甚清楚或存在着争议。由于百合鳞片叶既能通过器官发生,又能通过体细胞胚胎发生再生植株,事实上它已成为研究激素在离体植株再生中的作用的良好材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验选用兰州地区栽培的百合品种(*Lilium davidi* Duch)的鳞茎作为实验材料。

1.2 实验方法

选取新鲜鳞茎,剥离鳞片,自来水洗净,用 75% 乙醇浸泡 2~3 min,然后用 0.1% 升汞灭菌 15~20

min,无菌水冲洗 4~5 次。将鳞片切成约 1 cm² 小块,以腹面朝上接种于含各种不同激素配比的 MS¹ 培养基上(见结果与分析部分的表 1)。以不加任何激素的 MS 培养基作为对照。此外,为了研究鳞片大小对分化的影响,将鳞片分成两组,一组将鳞片切成约 0.5 cm² 大小,一组将鳞片切成约 1 cm² 大小(表 1),以研究鳞片大小对分化的影响。在鳞片为 1 cm² 大小时,将一组鳞片的背面朝上,一组鳞片的腹片的腹面朝上,以研究鳞片接种的方向对分化的影响。培养条件为培养箱光照培养,光照强度为 1 500~2 000 lx,光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,培养温度为 25 ℃。4 周后观察外植体分化情况。

在本实验中,分化率指已分化形成不定芽或体细胞胚占接种外植体的百分比表示;由于分化率不能表示出每个外植体分化形成不定芽和体细胞胚的数目,因此引入分化量,分化量指每个外植体上分化形成不定芽或体细胞胚的平均数。

2 结果与分析

百合鳞片经培养 4 周后,统计直接不定芽形成

表 1 不同激素组合对百合鳞片器官发生和体细胞胚胎发生的影响

Table 1 Effect of different hormone combination on the somatic embryogenesis and organogenesis of scale leaf of lily

培养基 Media	激素 Hormone		外植体数 Number of explants	不定芽 Adventitious shoots			体细胞胚 Somatic embryos		
	BA	2,4-D		数目 Amounts	分化率 Ratios	分化量 Quantities	数目 Amounts	分化率 ratios	分化量 Quantities
1	0	0	24	—	—	—	17	70.8	1.76
2	0.1	0	12	—	—	—	9	75.0	2.44
3	0.5	0	25	—	—	—	16	64.0	2.19
4	1.0	0	18	10	55.6	3.20	8	44.4	1.60
5	2.0	0	25	20	80.0	1.65	16	64.0	1.89
6	4.0	0	22	12	54.5	1.71	9	40.9	2.00
7	6.0	0	54	26	48.1	1.34	20	37.0	1.60
8	0	0.1	24	—	—	—	23	95.8	2.61
9	0	0.5	12	—	—	—	12	100	2.41
10	0	1.0	36	—	—	—	33	91.7	2.55
11	0	2.0	13	—	—	—	10	76.9	2.50
12	0	4.0	36	—	—	—	25	69.4	2.20
13	0	6.0	44	—	—	—	9	20.5	3.56
14	1.0	0.5	39	16	41.3	1.25	24	61.5	1.67
15	1.0	0.2	18	12	66.7	2.00	6	33.3	1.30

(表中各单位为激素:mg/L;分化率:已分化外植体数/总外植体数×100%;分化量:每个外植体上形成不定芽或体细胞胚的数目)

和体细胞胚形成的百分率。结果见表 1。

2.1 BA 在器官发生和体细胞胚胎发生中的作用

从表 1 可以看出,无激素和或 BA 浓度较低时(小于 1.0 mg/L),没有不定芽的形成,只有当 BA 浓度过到 1.0 mg/L 时,才有不定芽的形成,说明

BA 对于不定芽的形成是必不可少的。当 BA 为 2.0 mg/L 时,分化率最高,而当 BA 为 1.0 mg/L 时分化量最高。当 BA 浓度继续升高,达到 4.0 mg/L 和 6.0 mg/L 时,不定芽的分化率和分化量均有不同程度的下降,且随浓度升高,下降的程度越多。因

此,BA与不定芽形成直接相关。

对于体细胞胚胎发生而言,在无激素的培养基上或当BA浓度低于1.0 mg/L时,无不定芽形成,只有体细胞胚胎发生。当BA浓度升高时,即当BA浓度大于1.0 mg/L时,既有不定芽形成,又出现体细胞胚胎发生。BA与体细胞胚胎发生的关系,从整体上来说表现为负相关,即随BA浓度升高,体细胞胚胎发生的分化率和分化量随之下降。但存在着例外情况,如当BA为1.0 mg/L时的分化率和BA浓度为4.0 mg/L时的分化量并不遵循这一规律。出现这种情况的原因可能是由于外植体材料的生理状态和人为的误差引起的。结果表明,与器官发生相比,BA对体细胞胚胎发生起明显的抑制作用,但体细胞胚胎发生并不是不需要BA,只有当BA浓度较低时,才对体细胞胚胎发生表现一定程度的促进作用。

2.2.2.4-D在器官发生和体细胞胚胎发生中的作用

与BA不同的是,在含有2,4-D的培养基中只有体细胞胚形成,而无不定芽形成。从胚状体的分化率上来看,在低浓度2,4-D的培养基上,胚状体的分化率最高,随着2,4-D浓度增加,胚状体分化率随之而下降,当2,4-D浓度达到6.0 mg/L时,胚状体的分化率下降最明显。但是从分化量上来看,在不同浓度的2,4-D培养基上,胚状体的分化量并没有明显差别,甚至在高浓度2,4-D培养基上的胚状体的分化量更高一些。此外,在低浓度的2,4-D培养在上,胚状体的分化率和分化量均比不含2,4-D的培养基上的胚状体的分化率和分化量高。这些事实表明低浓度的2,4-D促进体细胞胚形成,高浓度2,4-D抑制体细胞胚形成。另一方面,当培养基中同时含有2,4-D和BA时,除了出现胚状体,还出现不定芽。这表明2,4-D所诱导的胚胎发生和BA所诱导的器官发生可能是两个互不依赖的独立事件。因此,在只含有2,4-D的培养基上之所以不出现不定芽,不是由于2,4-D的抑制作用,而是由于在培养基中缺少不定芽的诱导物BA。

2.3 外植体大小和接种方向对分化的影响

在含6.0 mg/L BA和6.0 mg/L 2,4-D的MS培养基中,与鳞片为1 cm²时的不定芽和胚状体的分化率相比,当鳞片大小为0.5 cm²时,不定芽和胚状体的分化率分别下降23.1%和17.7%,这表明

鳞片大小对不定芽和胚状体的分化可能产生影响。另一方面,在上述培养基中,背面朝上的鳞片的不定芽和胚状体的分化率分别比腹面朝上的鳞片的分化率下降15.3%和12.7%,它表明外植体的接种方向对不定芽和胚状体的分化也可能产生影响。

2.4 根的诱导

当不定芽发育长成小苗后,将其转移到三种不同激素水平的MS培养基上以诱导其生根,这三种培养基分别是不含激素的MS培养基,含1.0 mg/L和2.0 mg/L IAA。在含IAA的培养基上小苗不能生根,但在无激素的培养基上小苗能生根。

3 讨论

3.1 关于百合鳞片离体培养的形态发生方式

植物离体组织培养中的形态发生包括器官发生和体细胞胚胎发生,两者的主要差别在于前者为多细胞起源,而后者为单细胞起源,且两者均具有直接和间接两种发生方式。在百合鳞片离体培养形态发生过程中,有许多报道表明其形态发生方式是以“小鳞茎”形式实现的^[1]。进一步研究表明小鳞茎为单细胞起源的,因而实际上它是一种体细胞胚胎发生⁵。体细胞胚胎发生在植物离体组织培养中实际上具有多种多样的形式,特别是对于单子叶植物,如兰科植物的“原球茎”,它实际上也是一种体细胞胚胎发生。百合离体培养是如何形成小鳞茎的?虽然有的报道认为在形成小鳞茎过程中有少量愈伤组织形成^[1],但是在许多研究中并没有观察到愈伤组织形成。在本实验中,即使当2,4-D浓度为6.0 mg/L时,也没有无定形的愈伤组织形成,而是直接形成小鳞茎,因而百合离体培养的“小鳞茎”发生方式是一种直接体细胞胚胎发生方式。

另一方面,百合鳞片在离体培养过程中是否具有器官发生报道得比较少^{5]}。根据器官发生和体细胞胚胎发生的发生方式和特点,我们在实验中观察到了器官发生,从发生过程来看,器官发生和体细胞胚胎发生也明显不同。体细胞胚胎发生是从外植体表面形成白色的小圆点,然后逐渐长大,中间为半透明状,外周为乳白色,它是未变绿的鳞片叶,长大后形成致密的梭状小鳞茎。而器官发生可见许多外植体细胞聚集形成的不定芽,其形态也和体细胞胚具有明显差异,由于没有愈伤组织形成,它属于

直接不定芽形态发生或直接器官发生。

3.2 2,4-D 和 BA 在体细胞胚胎发生和器官发生中的作用

激素无疑在体细胞胚胎发生中起了非常重要的作用。在体细胞胚胎发生中,以模式植物,如胡萝卜所做的研究表明,2,4-D 在体细胞胚胎的诱导中发挥重要作用,但对于体细胞胚的持续发育并不是必需的。在许多其它植物,如禾谷类植物等所做的研究也表明了这一点。这种观点已被许多研究者所公认。除 2,4-D 外,体细胞胚胎发生又受许多其它因素的影响,如供体材料的基因型,生理状态,培养基,细胞分裂素,其它生长素等。因此,在实践中,体细胞胚胎发生是一个难于掌握的操作。虽然如此,仍然在许多植物中实现了体细胞胚胎发生。但另一方面,有关体细胞胚胎发生的理论,即体细胞胚胎发生的机制仍然滞后于体细胞胚胎发生的实践。这使得在实践中体细胞胚胎发生难于有规律可循,增加了操作的难度。

在本实验中,证明了 2,4-D 在百合体细胞胚胎发生中的作用,且对于 2,4-D 而言,其有一个最适合诱导体细胞胚胎发生的浓度,其最适合浓度为 0.1 mg/L 到 1.0 mg/L,在这一浓度范围内,体细胞胚胎发生的频率最高,且变化不大,当 2,4-D 浓度继续升高时,体细胞胚胎发生频率均呈现不同程度的下降,且与 2,4-D 浓度呈反比关系,如 2,4-D 浓度为 6.0 mg/L 时,体细胞胚胎发生的频率降低最多。与 2,4-D 相比,BA 对于体细胞胚胎发生的影响,从分化率上来看,均表现出一定程度的抑制作用。当 BA 浓度为 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 时,只出现体细胞胚胎发生,但与无激素培养基相比,其分化率明显降低。当 BA 浓度达到 1.0 mg/L 时,既出现器官发生,又出现体细胞胚胎发生,从总的趋势上来看,随着 BA 浓度升高,体细胞胚胎发生频率降低。因此,从这些实验结果来看,不能因为在含 BA 的培养基上出现体细胞胚胎发生就认为 BA 具有促进体细胞胚胎发生的作用。如果考虑到体细胞胚胎

发生和器官发生两者具有不同的机制,那么,BA 显然就具有抑制体细胞胚胎发生的作用。在同时含有 2,4-D 和 BA 的培养基上,既出现体细胞胚胎发生,又出现不定芽器官发生,说明胚胎发生和器官发生是两个不同的过程,具有不同的发生机制。

由于器官发生和体细胞胚胎发生具有不同的机制,两者对培养条件具有不同的要求。在本实验中观察到 BA 对于器官发生是必需的,但是 BA 必须达到一定浓度才能启动器官发生,在本实验中启动器官发生的 BA 浓度必需达到 1.0 mg/L,当 BA 低于 1.0 mg/L 时仍然进行体细胞胚胎发生。在本实验中观察到最适合器官发生的 BA 浓度为 2.0 mg/L。随着 BA 浓度升高,不定芽分化频率呈现一定程度的下降。在含有 2,4-D 的培养基上,完全没有不定芽的形成,这说明 2,4-D 不具有促进不定芽形成的作用。在含有 BA 和 2,4-D 的培养基上,既出现器官发生又出现体细胞胚胎发生,它进一步表明 2,4-D 不能抑制 BA 诱导的器官发生。

参考文献:

- [1] 杨成德,王 辉,曾福礼,等. 百合鳞茎的快速繁殖法[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1983, 19(3): 151-155.
- [2] 杨成德,种 康,敬兰花,等. 百合鳞片不同部位的小鳞茎分化与激素调节研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1988, 24(3): 95-99.
- [3] 张丕方,等. 百合鳞片离体诱导小鳞茎发生的研究[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(2): 66-77.
- [4] 周一兵,冯 云,尤瑞麟. 百合鳞片离体形态发生过程中几种同工酶的变化[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1995, 31(4): 499-507.
- [5] 刘选明,周朴化,屈妹存,等. 百合鳞片叶离体诱导形成不定芽和体细胞胚[J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 353-358.
- [6] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497.