

植物激素对百合鳞片愈伤组织生长的影响

孙君社 方晓华

(中国农业大学食品学院)

摘要 在植物细胞全能性学说的基础上,采用单因子实验,分析比较了细胞分裂素 6-BA,生长素 2,4-D,生长素 NAA 等 3 种植物激素对路易圣特百合鳞茎愈伤组织生长的影响。实验结果表明,诱导愈伤的最佳培养基为 MS+ 6-BA ($0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+ 2,4-D ($1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+ NAA ($0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 6-BA 的质量浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有利于芽的形成, NAA 质量浓度为 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有利于形成小鳞茎。

关键词 植物激素; 百合鳞茎; 愈伤组织生长

中图分类号 S 682.39; Q 575.11

Influence of Hormone on Callus Growth of Nove Cento's Bulb

Sun Junshe Fang Xiaohua

(College of Food Science and Engineering, CAU)

Abstract On the basis of plant cell's totipotency theory, choose one-factor trial and analyze the influence of three hormone, which are cell mitogen (6-BA) auxin (2,4-D) and auxin (NAA) to the callus growth of Nove Cento's bulb. Meanwhile compare the 6-BA with the other two kinds of hormone, and get the best agar medium to callus induction: MS+ 6-BA ($0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+ 2,4-D ($1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+ NAA ($0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). When the concentration of 6-BA comes to $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, it's good for the germination of sprout and when the concentration of NAA is $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, it's good to form new little bulb.

Key words hormone; Nove Cento's bulb; callus growth

百合 (*S ternonajaponicas*) 为百合科百合属的多年生球根类花卉,除供观赏外还兼有药用、滋补食用等多种用途。由于百合种类多、花型花色各异,因而杂交育种的变异显著,新品种不断涌现,并以其花大、色艳、花型花色丰富而成为世界著名切花、盆花品种。百合中的麝香百合和鹿子百合等观赏价值极高,植株刚直挺秀,花大美丽且清雅脱俗、芳香宜人,常被人们视为纯洁、光明、自由和幸福的象征,是目前国际上十分畅销的花卉之一^[1]。

百合主要靠小鳞茎进行分株繁殖,一株百合每年只能得到 1~ 3 个小鳞茎,因而繁殖速度非常有限;虽然有些种类可用鳞茎扦插,但易腐烂,所以并不常用。另外,百合因长期营养繁殖,病毒积累日趋严重,影响品质,因此,在百合的引种栽培、优良品种快速繁殖、去毒复壮以及新品种培育上,组织培养都是很有用的方法^[2]。为了减少百合切花生产中的引种错误,降低盲目进口种球造成的经济损失,使百合种球走向国产化,本实验拟对百合鳞茎进行愈伤组织培养,

收稿日期: 2000-10-13

北京市教委资助项目

孙君社,北京清华东路 17 号 中国农业大学(东校区)398 信箱, 100083

分析 3 种植物激素对其生长、分化等的影响, 得出培养基的最佳配比, 为今后的生理生化研究和细胞培养打下基础。

1 材料与方 法

1) 主要试剂。萘乙酸(NAA, 诱导再分化素)溶液, 先用酒精溶解后, 加水定容至 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D, 生长素)溶液, 用浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液溶解后, 加水定容至 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 6-苄基氨基嘌呤(6-BA, 细胞分裂素)溶液, 先溶于浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的少量的盐酸中, 再加水定容至 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2) 百合。所用百合为亚洲百合杂种系列中的路易圣特(*Nove Cento*)。其特点是: 花蕾大, 花色为黄色, 株高 80~100 cm, 花朵数量为 5~8 朵, 生长期 14 周, 抗病性能强, 耐寒性较强, 保存性非常好。

3) 环境条件^[3]。百合属植物组织培养最适合的温度为 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 。光照度为 1 500~2 000 lx, 光照周期为 16 h $\cdot\text{d}^{-1}$ 。培养基 pH 值为 5.8。

4) 培养基及其制备。实验所用的基本培养基为 MS 培养基^[4]。

实验用培养基及添加剂的制备。本实验的主要目的是确定各植物激素及其配比对百合生长的影响, 为今后诱导生根、生芽做准备, 为此选取了 3 组单因子试验来进行。第 I 组: 6-BA 的用量分别为 0, 0.05, 0.5, 1.0, 3.0 mL; MS 和 2, 4-D 用量均为 1.0 mL; NAA 为 0.1 mL。培养基按 6-BA 用量由小到大依次编号为 I₁, I₂, ..., I₅。第 II 组: 2, 4-D 的用量分别为 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mL; MS 和 6-BA 用量均为 0.05 mL; NAA 为 0.1 mL。培养基编号为 II₁, II₂, ..., II₅。第 III 组: NAA 用量分别为 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mL; MS 和 6-BA 均为 0.05 mL; 2, 4-D 为 1.0 mL。培养基编号为 III₁, III₂, ..., III₅。

5) 接种。将初步洗涤好的百合鳞茎用体积分数为 70% 的酒精和无菌水清洗后, 用质量浓度为 $2.0 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ 的次氯酸钠溶液浸泡 10 min, 再把百合鳞茎一片一片用无菌水清洗 4 次; 然后, 用灼烧放凉后的镊子夹 1 片鳞茎放在滤纸上, 吸干水分, 切成小块, 放于培养皿中, 每个培养皿中放 4~8 块。最后用保鲜膜将整个培养皿包起来, 放入培养箱中培养。

6) 细胞生长量的计量方法。鲜质量, 从培养基中取出培养物时, 应尽可能少带出培养基, 用分析天平称其质量。干质量, 通常将培养物置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘 12 h, 在干燥器中冷却后称其质量。每 4 d 测 1 次鲜质量和干质量, 计算每 g 鲜植物材料培养的愈伤组织的质量。

2 结果与讨论

2.1 细胞分裂素 6-BA 对百合组织生长的影响

培养 5 d 后, I₄ 号培养基中的鳞片明显增厚变绿, I₁ 号中的鳞片几乎无变化, 其他几个也有变绿现象, 但不如 I₄ 号明显。

培养 10 d 后, I₃ 和 I₄ 号的切口部位出现淡黄绿色的愈伤组织, I₂ 号的愈伤组织颜色较浅, I₅ 号无生长迹象, I₁ 号开始变得暗淡, 切口部位发黑。

培养 20 d 后, I₃ 和 I₄ 号的愈伤组织块加大, 周边出现绿色芽点, I₄ 号比 I₃ 号明显, 但未做具体统计。I₂ 号长有大量浅色的愈伤组织, 但无芽点出现, I₁ 号萎缩、死亡。I₅ 号仍然无生长迹象。图 1 示出 6-BA 对百合鳞片愈伤组织生长的影响情况。

由实验结果可见,细胞分裂素的主要生理作用是促进细胞的分裂和扩大,诱导芽的分化,促进侧芽的萌发生长,抑制衰老。当组织内细胞分裂素/生长素的比值较高时,诱导芽的分化,这时细胞分裂素起着主导作用;相反,当比值很低时,则诱导愈伤组织较多地形成根;当这一比值适中时,则保持愈伤组织旺盛地生长,而没有器官的分化。如果开始时6-

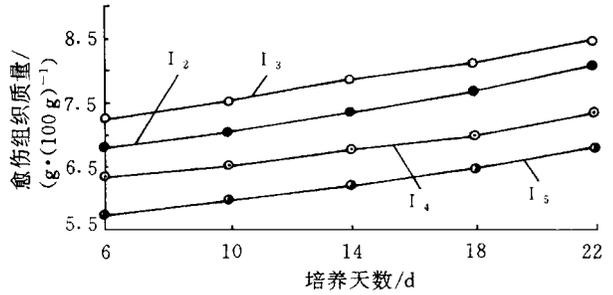


图1 6-BA对百合鳞叶愈伤组织生长的影响

BA用量就很高,那么将会造成外植体既不生长,也不分化。高质量浓度的细胞分裂素会抑制芽的发生,使细胞体积因强烈的分裂活动而急剧缩小,已形成的芽不能萌发。而当6-BA用量为0时,不可能诱导出苗,百合鳞叶就会因缺乏细胞分裂素而加速衰老,逐渐死亡。

2.2 生长素2,4-D对百合组织生长的影响

培养5d后,外植体切口处开始膨大;10d后,切口周围产生少量淡黄绿色愈伤组织,质地疏松;以后,愈伤组织逐渐长大。在不含2,4-D的II₁号培养基上,有少数外植体可产生少量愈伤组织,但也有一部分组织块几乎不能生长,切口变黑,显得干巴巴没有生机。除II₁外的其他培养基上,愈伤组织生长量与2,4-D的质量浓度正相关。其中,以II₄号,即2,4-D为1.0mL的诱导率为最高,且愈伤组织生长也最好。II₅号样品,外植体周围出现水浸状,甚至其中有一部分死亡。图2示出2,4-D对百合鳞叶愈伤组织生长的影响情况。

由实验结果可见,生长素的主要生理作用是,促进细胞伸长生长和细胞分裂,诱导受伤的组织表面1至数层细胞恢复分裂能力,形成愈伤组织,诱导生根。其最重要的作用是配合一定量的细胞分裂素共同诱导不定芽的分化。

生长素含量不足,表现为组织块几乎不生长,颜色渐变暗淡,有的组织块时间稍长还会死亡。有的培养物切口变黑,色素不易保持,显得干巴巴没有生机。生长素含量过高,培养物表现为产生旺盛生长的愈伤组织,细胞团比较松散,会出现水浸状,这样的细胞几乎不能分化成苗;尤其是当2,4-D用量太高时,会杀死植物,因此,在农业生产上它可以作为一种除草剂。生长素适宜时的表现是,培养物有较明显增粗、加厚的生长现象;切口断面有适宜的愈伤组织生长,一般愈伤组织较紧密,表面多突起,出现花椰菜状或粗粒状,多处出现半球形的光滑突起等,这是将来出苗的征兆。

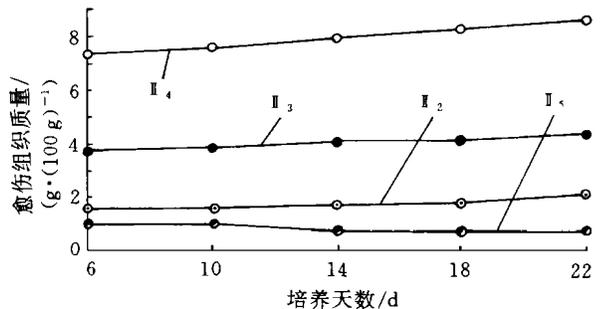


图2 2,4-D对百合鳞叶愈伤组织生长的影响

当2,4-D的质量浓度为 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时路易圣特百合的愈伤组织生长最好,而当质量浓度达到 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,会造成部分组织块死亡。

2.3 生长素NAA对百合组织生长的影响

培养5d后,可见外植体切口处增厚膨大。10d后,切口周围出现半透明白色愈伤组织,有

极少数植物块发绿, 这是发芽的迹象。III₁ 号生长缓慢, 但由于有 2, 4-D, 所以大多数存活。III₅ 号愈伤组织生长较旺盛, 细胞松散, 呈水浸状, 较易引起腐烂。

NAA 的生物活性不如 2, 4-D 强, 在相同含量条件下, 若 NAA 的活性为 1, 则 2, 4-D 的活性为 3~ 5, 所以, NAA 通常用于诱导再分化, 尤其有利于单子叶植物的分化。

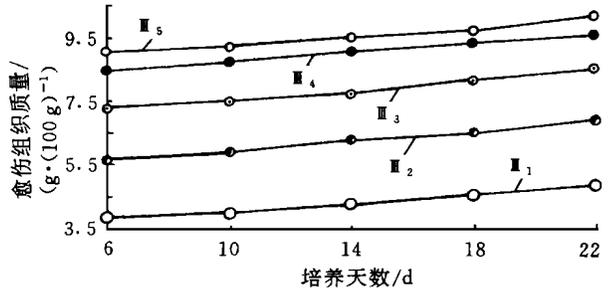


图 3 NAA 对百合鳞片愈伤组织生长的影响

3 结 论

分裂素 6-BA 与生长素 2, 4-D 的比值和绝对含量, 调控着植物组织的形态发生和细胞分化。当比值高时产生芽, 低时产生根, 比值适中时就可维持原组织生长而不分化。

6-BA 有强烈的诱导出芽作用。当 6-BA 含量不足时, 植物块会因缺乏细胞分裂素而死亡, 但若初代培养时 6-BA 的含量过高, 则会导致外植体既不生长, 也不分化。路易圣特百合在 6-BA 的质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时芽的诱导率最高。2, 4-D 能积极促进愈伤组织的生长, 所以在初代培养时可用高质量浓度的 2, 4-D 进行诱导。生长素含量不足会导致植物块切口变黑, 时间长了还会使培养物死亡; 而含量过高, 则会使植物块失去形态发生能力, 而只旺盛地生长愈伤组织。当 2, 4-D 质量浓度在 $0.2 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 愈伤组织生长量与质量浓度呈正比, 在质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最佳。生长素 NAA 有促进生根的作用, 它还能配合一定量的细胞分裂素共同诱导不定芽的分化, 其含量过高或过低都不利于植物块的生长和分化。实验中, NAA 质量浓度以 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳, 此时能诱导生根的白色愈伤组织。

虽然百合可以通过愈伤组织不定芽而增殖, 但这种方式在遗传稳定性方面并不长久。显然, 不通过愈伤组织而直接形成不定芽的途径要更优越些, 但这并不意味着这样形成的不定芽总能保持原品种的特性。所以找到一种既能使植物体快速繁殖, 又能保持原品种优良特性的方式, 是今后要探索的一个方向。

参 考 文 献

- 1 Hasegawa P M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured lily concolor shoot tips J Amer Soc Hort 1980, 105(2): 216~ 220
- 2 Breat T and Carle V. Development of an automated plant culture system. Plant Cell Tissue and Organ Culture 1985, 5(2): 107
- 3 黄济明 百合的组织培养和试管内诱发多倍体试验 园艺学报, 1983, 10(2): 125~ 128
- 4 马 惠 百合叶片愈伤组织的诱导和植株再生 植物生理学通讯, 1992, 28(4): 284