

亚洲百合花丝离体培养器官形成的细胞形态学研究

姚绍嫦¹, 艾素云², 杨美纯², 凌征柱^{1,2*}

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530023; 2. 广西大学 农学院, 南宁 530005)

摘要: 对亚洲百合的花丝进行离体培养, 并利用常规石蜡制片技术对诱导效果最好的材料进行细胞形态学观察, 研究花丝在离体培养过程中器官形成的细胞形态学变化。结果表明: 花丝在 MS+BA0.5 mg/L+NAA0.5 mg/L 的培养基上诱导效果最好。离体培养后其形态学下端切口内方的 1~3 层细胞首先启动脱分化, 然后是内方的 10~12 层细胞, 而其他部位的细胞自始至终未启动脱分化。亚洲百合的再生方式为器官发生型, 器官通过胚性愈伤组织间接产生, 在胚性愈伤组织团表面附近形成芽原基, 或在胚性愈伤组织团内部形成根原基, 有时同时分别在内外形成根原基和芽原基后再通过维管组织连接成完整的植株。本研究为亚洲百合的人工调控提供基础理论依据。

关键词: 亚洲百合; 花丝; 器官形成; 细胞形态学

中图分类号: Q942.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)06-0812-05

Cytomorphology of organogenesis in filament culture of *Lilium* Asiatic Hybrids

YAO Shao-Chang¹, AI Su-Yun², YANG Mei-Chun², LING Zheng-Zhu^{1,2*}

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China;

2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Filaments of *Lilium* Asiatic Hybrids were explanted on MS media supplemented with different combinations of BA and NAA to induce organogenesis and somatic embryogenesis, and the cytohistological changes of explants were studied using paraffin section technology. The main results were as follows: the best medium was MS+BA0.5 mg/L+NAA0.5 mg/L. Callus was initiated from 1—3 layers of cells on the cut surface of the morphological lower side of explants, and then 10—12 layers of cells returned to division; but cells from other positions were not initiated. The adventitious shoots and roots which originated from the embryogenic callus packs were formed by organogenesis on the surface or from inner cells. Vascular tissue was finally formed to connect adventitious shoots and roots. The research would provide the theoretical basis for artificial control on *Lilium* Asiatic Hybrids.

Key words: *Lilium* Asiatic Hybrids; filament; organogenesis; cytomorphology

亚洲百合(*Lilium* Asiatic Hybrids)是百合科百合属多年生草本植物。百合是著名的球根花卉, 其地下鳞茎还具食用和药用价值。目前大量生产的切花百合有三大类即亚洲型百合、东方型百合、铁炮型百合(陆鉴眉, 1994)。在欧美盛行的亚洲型百合群, 以其艳丽的色彩和优美的花型, 深受人们青睐,

成为花卉市场上的高档切花。

近年来对百合的研究日趋深入和广泛, 特别是百合的组织培养技术正逐步走向成熟化和工业化。百合组织培养大部分以鳞片作为外植体(刘选明等, 1997), 也有以花丝(蔡宣梅等, 2001)、花药(褚云霞等, 2001)、子房(陈善娜等, 1997)等作为外植体取得

收稿日期: 2009-06-11 修回日期: 2009-09-17

作者简介: 姚绍嫦(1980-), 女, 广西容县人, 助理研究员, 从事植物组织培养与形态解剖方面的研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: linzz1953@126.com)

成功的报道。在百合离体培养及其形态建成过程中,植物激素起很重要的作用(刘选明等,1997)。百合在其离体培养过程中,有两种再生方式:一种为器官发生(organogenesis),另一种为体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis)。它们一般均具直接和间接两种方式,而在百合花丝培养过程中,其再生方式一般均为间接再生,即花丝需经过愈伤组织而间接分化形成不定芽和胚状体。在百合离体培养过程中,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争议(刘明志等,2002)。由于百合花丝既能通过器官发生,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作用中的良好材料。20 世纪 80 年代后,在组织培养过程中外植体在植物激素的作用下器官如何形成已开始引起人们的重视,并首先在鳞片上取得成功(吴鹤鸣等,1989;刘选明等,1997)。但由于不同品种或同一品种不同部位作为外植体对激素的要求差异较大,在不同激素作用下外植体会发生不同的细胞形态学变化。对百合花丝离体培养过程中细胞形态学变化的研究报道目前极少,特别是在亚洲系列百合品种上未发现有研究报

道。本文利用常规石蜡制片技术通过研究亚洲百合花丝在激素作用下发生的变化,从微观上了解其生长发育过程,从而揭示激素对不定芽或体细胞胚形成的作用,为亚洲百合的人工调控提供基础理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试材料为亚洲百合杂种系(*Lilium Asiatic Hybrids*)的栽培品种“米丽拉(Mirella)”,取其生长健壮、饱满、无病害的花蕾为外植体。

1.2 方法

1.2.1 诱导培养 将花蕾放在 0.5%~1.0%洗衣粉水中漂洗 15 min,后用清水冲洗 30 min。然后在超净工作台上用 75%酒精拭擦其表面,用镊子和刀把花冠切开,取出里面的花丝,切成 1.0 cm 左右的小段,接种到培养基上,花丝的腹面向上。以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 BA 和 NAA;蔗糖 4%,琼脂 0.4%,pH5.8。培养温度(25±2)℃,光强 36 μmol·m⁻²·s⁻¹,每天连续光照 12 h。

表 1 不同激素组合对花丝器官发生和体细胞胚胎发生的影响
Table 1 Effect of different hormone combinations on organogenesis and somatic embryogenesis of filament

处理 Treatments	Hormone(mg/L)		外植体数 Number of explants	不定芽数 Adventitious shoots		胚状体数 Somatic embryos	
	BA	NAA		数目 Amounts	分化率(%) Differentiation rate	数目 Amounts	分化率(%) Differentiation rate
1	0.5	0.5	22	15	68.2	0	0
2	1.0	0.5	20	10	50.0	0	0
3	1.0	0.2	19	8	42.1	0	0

注:分化率为已分化的外植体数/总外植体数×100%。

1.2.2 细胞形态学观察 在培养的当天、7 d、10 d、15 d、20 d、25 d、30 d、35 d、40 d、45 d 分别取样,将材料切成 1 cm×1 cm 大小固定于 FAA 固定液中。常规石蜡制片法制片(李正理,1996),切片厚度 10 μm,TO 透明剂透明,铁钒一苏木精染色,中性树胶封片,采用 Leica-DMLB 型万能显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 不同激素对比对花丝诱导分化的影响

花丝节段在附加不同激素配比的 MS 培养基上培养,45 d 后统计结果。从表 1 看出,BA 浓度较低时,分化率较高,随着 BA 浓度升高分化率反而下降。

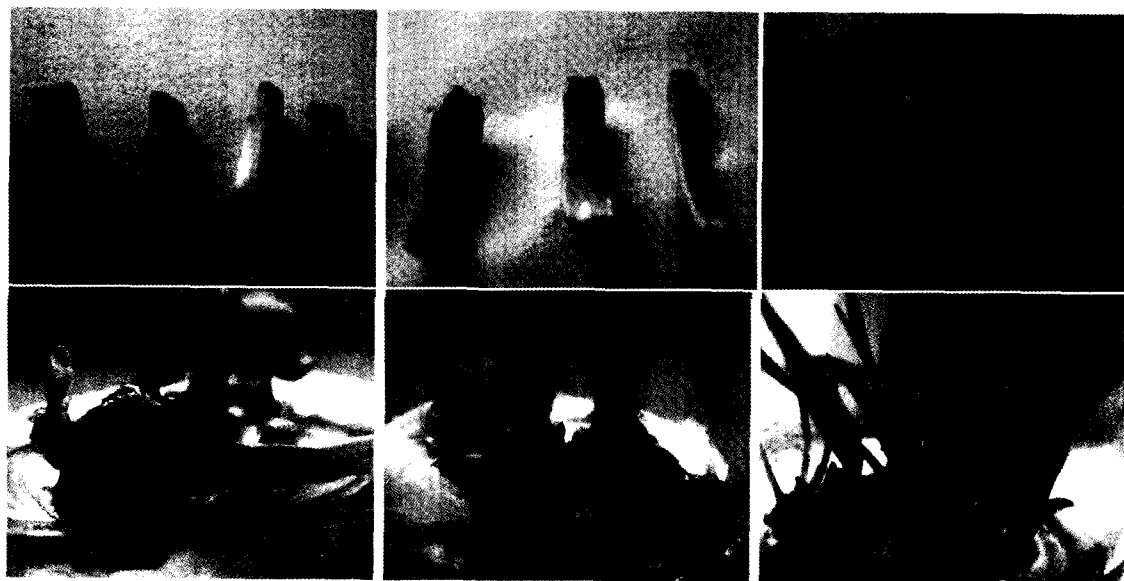
NAA 浓度较高时分化率较高。花丝在 MS+BA0.5 mg/L+NAA0.5 mg/L 的处理上诱导效果最好,分化率达到 68.2%。在这三种培养基中,外植体均经愈伤组织形成不定芽或根,但无胚状体产生。

2.2 器官形成的形态学观察

培养 10 d,花丝两端切口附近的颜色加深显黄色,同时其形态学下端的切口处稍有膨大,表明此时细胞已经启动了(图版 I:1);培养 10~15 d,花丝的颜色由原来的淡黄色或者白色转变为绿色,其形态学下端开始膨大,膨大部分颜色为黄绿色,两端向着远离培养基的方向翘起(图版 I:2);培养 15~20 d,随着细胞的进一步增殖,膨大部分更加明显;培养 20~25 d,形态学下端的切口周围形成了一团团外

突的淡黄色愈伤组织,由于突起的愈伤组织大小和形状不一致,使得表面出现凹凸不平现象;形态学上端和中部仍没有明显的变化。此时产生的多为淡黄色致密型的愈伤组织(图版 I:3);培养 30~35 d,愈伤组织团的突起迅速增多、增大,向外生长形成一个瘤状结构,颜色由淡黄色逐步转变为绿色;形态学

上端和中部开始变黄萎缩。此时产生的愈伤组织既有致密型的也有疏松型的(图版 I:4);培养 35~45 d,突起的愈伤组织更多,并在形成较早的愈伤组织团上产生了不定芽或者同时产生了不定芽与不定根(图版 I:5)。随着培养时间的延长,愈伤组织继续增殖,并且在愈伤组织团上形成更多的不定芽和不



图版 I 器官形成的形态学变化 1. 培养 10 d; 2. 培养 15~20 d; 3. 培养 20~25 d; 4. 培养 30~35 d; 5. 培养 35~45 d; 6. 培养 60 d。

Plate I Morphological changes of organogenesis 1. Cultivated for 10 d; 2. Cultivated for 15—20 d; 3. Cultivated for 20—25 d; 4. Cultivated for 30—35 d; 5. Cultivated for 35—45 d; 6. Cultivated for 60 d.

定根,把这些不定芽经过壮苗培养后转接到生根培养基上培养,很容易诱导出根而形成完整植株(图版 I:6)。

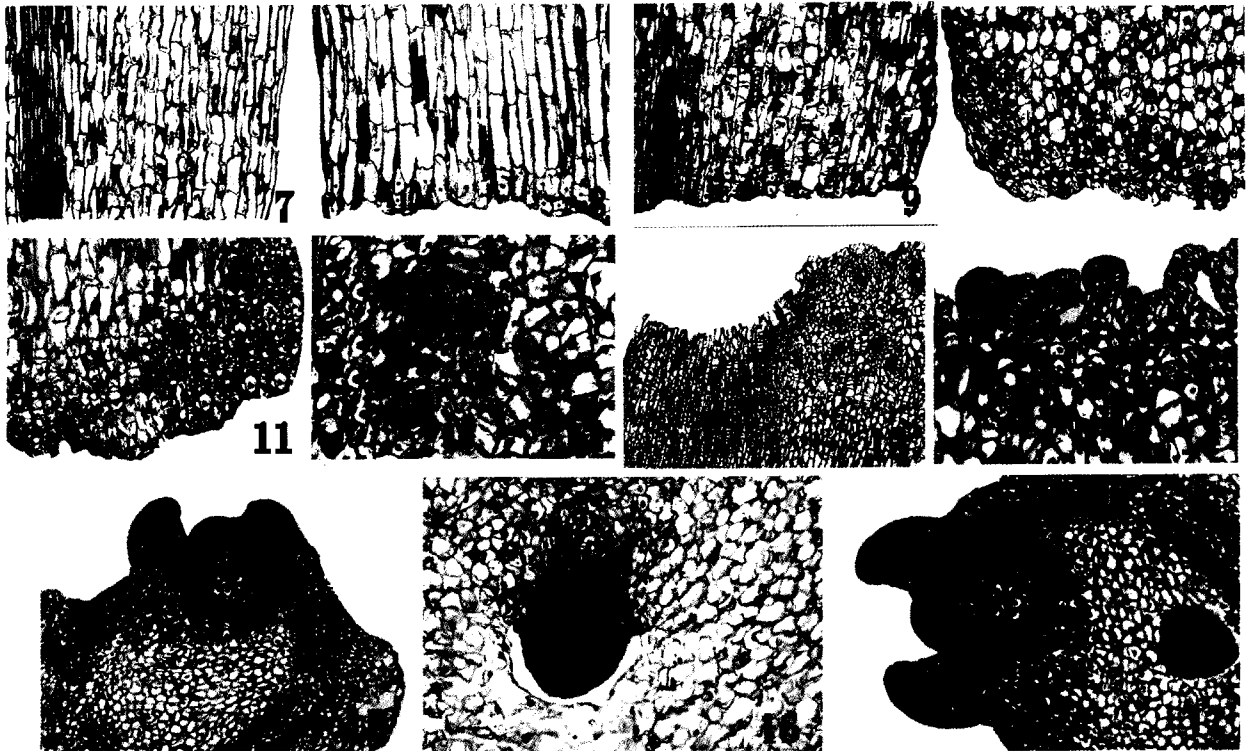
2.3 器官形成的组织细胞学观察

未培养的花丝节段的纵切面:表皮细胞 1 层,长矩形;表皮以内的薄壁细胞 20~25 层,矩形,较表皮细胞短且宽,排列十分规则;表皮细胞和薄壁细胞的共同特征是细胞内部均具有中央大液泡,细胞核很不明显,染色很浅。最中央是单个外韧维管束,为管状细胞构成的输导组织,染色较深(图版 II:7)。培养 7~10 d,形态学下端切口内方的 1~3 层细胞(包括表皮细胞与薄壁细胞)首先启动恢复分裂能力,此时细胞体积变小、细胞核明显、染色较深;其它部位的细胞未见变化(图版 II:8)。培养 10~15 d,已启动的细胞处于旺盛分裂期,恢复分裂能力的细胞增多,形态学下端切口内方的 10~12 层细胞均开始恢复了分裂能力;细胞变短且宽(图版 II:9)。培养 15~20 d,启动较早的表皮细胞和薄壁细胞同时进行平周分裂和垂周分裂形成愈伤组织,愈伤组织细胞

与周围细胞不同,其体积小、近圆形、排列无序但更紧密,细胞核明显,染色较深。由于愈伤组织的大量形成使得表皮结构不明显,难以区分表皮细胞和薄壁细胞(图版 II:10)。培养 20~25 d,形态学下端切口内方多层细胞继续分裂产生愈伤组织团,愈伤组织细胞分裂活跃、增殖快,使得向外突起明显(图版 II:11);此时愈伤组织内部已开始分化,形成了分生组织结节(图版 II:12)。培养 25~30 d,形态学下端切口内方的细胞分裂更为旺盛,细胞大量增殖,愈伤组织内部分化形成的分生组织结节也更多,膨大更明显(图版 II:13)。培养 30~35 d,形态学下端的愈伤组织细胞重新启动分裂,形成具有胚性细胞特点的胚性愈伤组织,这些细胞与愈伤组织细胞相比具有体积小、细胞质浓、细胞核大、染色深的特点。胚性愈伤组织的出现与增殖使得外植体边缘形成瘤状、条形、圆球形等形状的突起(图版 II:14)。培养 35~45 d,胚性愈伤组织团开始分化形成不定芽或者不定根等结构;而外植体形态学上端切口边缘与中部的细胞自始至终未启动。花丝的胚性愈伤组织

团的器官分化方式有 3 种: 在胚性愈伤组织团的表面附近几层细胞形成茎尖生长锥, 继而发育成不定芽(图版 II: 15); 在胚性愈伤组织团内部形成根原基

进一步发育成不定根(图版 II: 16); 在胚性愈伤组织团上同时分别在内、外形成根原基和芽原基, 再通过维管组织连接成完整的植株。(图版 II: 17)。



图版 II 器官形成的组织细胞学变化 7. 未培养的花丝纵切面($\times 100$); 8. 下端切口内方的 1~3 层细胞($\times 100$); 9. 下端切口内方的 10~12 层细胞($\times 100$); 10. 最初形成的愈伤组织($\times 100$); 11. 愈伤组织团($\times 100$); 12. 分生组织结节($\times 200$); 13. 愈伤组织团与分生组织结节($\times 50$); 14. 胚性愈伤组织团($\times 200$); 15. 胚性愈伤组织团的表面附近分化出芽原基($\times 50$); 16. 胚性愈伤组织团的内部分化出根原基($\times 50$); 17. 在胚性愈伤组织团上同时分别在内、外形成根原基和芽原基($\times 50$)。

Plate II Cytomorphology of organogenesis 7. Longitudinal section of uncultivated filament($\times 100$); 8. 1-3 layers of cells on the cut surface of the morphological lower side of explants returned to division after filament had been cultivated($\times 100$); 9. 10-12 layers of cells on the cut surface of the morphological lower side of explants returned to division after filament had been cultivated($\times 100$); 10. Callus after filament had been cultivated($\times 100$); 11. Callus packs after filament had been cultivated($\times 100$); 12. Meristematic nodules in parenchyma($\times 200$); 13. Embryogenic callus and meristematic nodules after filament had been cultivated($\times 50$); 14. Several kinds of embryogenic callus($\times 200$); 15. Adventive shoot was forming on the surface after filament had been cultivated($\times 50$); 16. Adventive root was forming in embryogenic callus($\times 100$); 17. Adventive root and bud were forming at the same time in embryogenic callus($\times 50$).

3 结论与讨论

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, 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, 宁云芬等(2003, 2008)、胡秉芬等(2003)的研究表明其形态发生方式是通过器官发生途径形成再生植株的; 刘明志等(2002)的研究表明既能通过器官发生, 又能通过体细胞胚胎发生途径形成再生植株。本研究表明, 亚洲百合花丝组织培养的形态

发生方式是通过器官发生途径形成再生植株的, 属于多细胞起源, 在不同的胚性愈伤组织团上器官分化的情况不一, 单独形成不定芽或根, 有时则同时分别从表层分化形成不定芽, 从内部分化形成根, 再通过维管组织连接成完整植株, 这与周祖富等(2006)在东方型百合‘Star Gazer’上的研究结果相似。

在百合体细胞胚胎发生过程中, 激素起非常重要的作用。刘选明等(1997)的研究表明, 铁氮和较低的 Fe^{2+} 盐浓度对胚状体的发生更为有利, GA_3 、BA 等物质会抑制胚状体的发生, 2, 4-D 等激素则对百合胚状体的发生发挥重要作用。刘明志等(2002)认为, 器官发生和体细胞胚胎发生具有不同机制, 两

者对培养条件有不同要求,BA 对器官发生是必须的,在只有 2,4-D 的培养基上完全没有不定芽形成的现象,这说明 2,4-D 不具有促进不定芽形成的作用。在实践中,体细胞胚胎发生是一个难以掌握的操作。本研究通过多次重复试验与常规石蜡制片也只观察到不定芽形成,未观察到体细胞胚胎发生的趋向,很可能是诱导过程中未使用对体细胞胚胎发生具有促进作用的 2,4-D 的缘故。至于亚洲百合在使用 2,4-D 时何种浓度能够诱导体细胞胚胎发生还有待进一步研究探讨。

研究还发现,花丝节段形态学的上下两端组织构成完全相同,培养时均为平放,两端接触培养基的机会基本一致。然而在培养过程中,细胞启动和愈伤组织的形成仅发生在形态学下端切口附近的数层细胞,之后器官再生也在该部位的愈伤组织表层或内部发生,而其他部位的细胞却始终未产生相应变化。这种现象可能是由于外植体内源激素及有机营养物质均由上往下运输,下端细胞中累积的激素及营养物质含量高,有利于细胞的启动和分化;或者是细胞、组织分化存在极性因素所致。此结论与周祖富等(2006)对东方型百合‘Star Gazer’的研究报道一致。吴鹤鸣等(1989)认为,外植体内部至少有两类细胞群,它们对诱导处理反应时间进程有差异。器官片段在再生过程中形成极性,表现每一片段一端形成根,另一端则有体细胞胚发生趋向。另外也有一些单极分化,只有芽原基或根原基。本实验研究发现只形成芽或根的单极分化,还发现同时形成芽和根的两极分化。在单极分化中,不定芽经再培养较易诱导出根而成完整植株,并且移栽成活率高;但是不定根未能诱导出不定芽。

参考文献:

- 李正理. 1996. 植物组织制片学[M]. 北京:北京大学出版社, 130—139
- 胡秉芬. 2003. 兰州百合鳞片繁殖及小鳞茎形成过程的研究[D]. 西北师范大学硕士学位论文, 1—2
- Cai XM(蔡宜梅), Zheng WW(郑伟文), Huang JH(黄建华), et al. 2001. Studies on filament tissue culture of lily(百合花丝组织培养试验)[J]. *Fujian Agric Sci Tech* (福建农业科技), 6: 13—14
- Chert SN(陈善娜), Gao JL(高建莉), Zhen ZY(郑志英). 1997. Tissue culture of *Lilium* ovary(百合子房的组织培养)[J]. *Yunnan Univ(Nat Sci)*(云南大学学报·自然科学版), 28(4): 284—287
- Chu YX(褚云霞), Chen LQ(陈龙清), Huang YW(黄燕文), et al. 2001. Studies on anther culture of lily(百合的花药培养研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 28(5): 472—474
- Liu MZ(刘明志), Lin XY(林雪艳). 2002. Effects of hormone on plant regeneration of lily(*Lilium davidi* Duch)(激素对百合植株再生的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), 22(2): 167—170
- Liu XM(刘选明), Zhou PH(周朴华), Ou SC(屈殊存), et al. 1997. In vitro induction of indefinite buds and somatic embryos from scale leave of tetraploid ‘Longya Lily’(百合鳞片叶离体诱导形成不定芽和体细胞胚)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 24(4): 353—358
- Lu LM(陆奎眉). 1994. Study on introduction and cultivation of Asian *Lilium*(亚洲型切花百合引种试种初报)[J]. *Fujian Trop Sc*(福建热作科技), 19(1): 31—33
- Ning YF(宁云芬), Zhou HG(周厚高), Huang YY(黄玉源), et al. 2003. The budlet morphogenesis of *Lilium formolongi* in scale propagation(新铁炮百合鳞片扦插繁殖的小鳞茎形态发生)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 30(2): 229—231
- Ning YF(宁云芬), Long MH(龙明华), Tao J(陶劲), et al. 2008. Budlet morphogenesis of oriental lily during scale propagation(东方百合鳞片繁殖小鳞茎发生的形态学观察)[J]. *Guihaia*(广西植物), 28(4): 437—439
- Wu HM(吴鹤鸣), Wang YF(王月芳), Xi YL(奚元龄). 1989. Anatomical observation of morphogenesis in scale culture of *Lilium* species(百合鳞片组织培养形态发生的解剖学观察)[J]. *Jiangsu J Agric Sci*(江苏农业学报), 5(1): 31—37
- Yao SC(姚绍嫦), Ai SY(艾素云), Yang MC(杨美纯). 2005. Cytohistological studies on morphogenesis adventitious buds in tissue culture of *Lilium longiflorum*(铁炮百合组培中不定芽形成的细胞学观察)[J]. *Subtrop Plant Sci*(亚热带植物科学), 34(2): 5—7
- Zhou ZF(周祖富), Ai SY(艾素云), Yang MC(杨美纯), et al. 2006. Cytohistological study on morphogenesis in filament culture of *Lilium* ‘Star Gazer’(火百合花丝组织培养器官形成的细胞组织学研究)[J]. *Subtrop Plant Sci*(亚热带植物科学), 41(3): 10—15