

百合鳞片离体培养诱导小鳞茎发生的研究

张丕方 倪德祥 王富民 王凯基

(复旦大学生物系)

提 要

百合鳞片离体培养诱导愈伤组织和小鳞茎可在MS+NAA0.2mg/l+6BA2mg/l (pH5.8—6.0)同一培养基上一次完成。接种后9天左右即可获得小鳞茎,一个月左右即可诱导形成完整植株。通过外部形态观察和细胞组织学研究表明小鳞茎的发生与不定芽的发生过程相类似,并讨论了小鳞茎发生过程中的极性现象,细胞起动形成愈伤组织的部位,诱导小鳞茎发生过程中淀粉消化的生理意义以及光对小鳞茎发生的作用等问题。

关键词: 百合; 小鳞茎; 形态发生

兰州地区生产的百合(*Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton)是一种名贵的蔬菜和药用植物。为了加速繁殖和育种,已有许多百合组织培养成功的报道^[1]。本文探讨百合鳞片培养中小鳞茎的形态发生,进行了鳞片培养分化形成再生植株与细胞组织学观察。

材料和方法

取百合鳞茎内部较幼嫩的鳞片,用清水漂洗3~4遍,经70%酒精处理1分钟,再用10%漂白粉溶液浸泡消毒30分钟。在无菌条件下,将消毒好的材料切成8×12mm²大小的片段,接种于MS+NAA0.2mg/l+6BA2mg/l, pH5.8—6.0的培养基上,每瓶接3~4段外植体。接种后放于25℃±1℃培养室中培养,每天照光9小时,光强1500勒克斯。培养10天左右取材FAA固定,石蜡包埋,切片厚度8μm,代氏苏木精单染。

结果和讨论

(一) 小鳞茎发生过程的形态学观察:

接种后5~6天,百合鳞片组织块由原来的奶白色变成淡绿色,以后组织块颜色逐

渐加深。在7天左右时,组织块近轴面出现皱褶,9~10天在皱褶上出现明显的突起(图版I—1),以后突起逐渐变大形成小鳞茎(图版I—2)。接种后20天左右,从小鳞茎中抽出叶片,一个月左右从小鳞茎基部长出根,形成完整植株(图版I—3,4)。培养在黑暗处的组织块,接种前后无颜色变化,诱导小鳞茎发生和再生植株过程与在光照下相同,只不过诱导出的小鳞茎和小植株均呈明显的白化现象。

(二) 小鳞茎发生的极性现象:

实验中发现小鳞茎全部发生于鳞片的近轴面,这与Robb(1975)^[7]报道的不论外植体与培养基的相对位置如何,小鳞茎总是从近轴面发生的结果是一致的。但Robb的研究发现同一鳞片不同部位进行培养,其再生能力存在着明显的差异(鳞片的顶部0%;中部3.8%;基部21.3%)。我们实验中的结果与他不同,无论什么部位,最后都能诱导出小鳞茎,只是因部位不同诱导小鳞茎发生的时间稍有先后。而且在每块外植体上小鳞茎的发生不是毫无次序的,而是靠鳞片切块形态学基部切口处形成一排,小鳞茎彼此之间排列整齐(图版I—5),这可能与细胞分化过程中的极性现象有一定联系。这一结果与Robb等所指出的极性现象一致,造成这种“极性”的内外条件有待进一步研究。

(三) 小鳞茎发生的细胞组织学研究:

以鳞片为外植体通过组织培养再生植株在百合属虽已有不少成功的报道^[8],但关于从鳞片外植体开始诱导分化到小鳞茎形成这一过程的细胞组织学研究,尚缺乏系统的资料。试验以兰州地区生产的百合鳞片为外植体进行培养,在获得大量试管苗的同时,对这一过程进行了详细的细胞组织学观察,结果如下:

未经培养的百合鳞片,其解剖结构很简单(图版II—7),远轴面和近轴面都有一表皮细胞层,内部则为相当于叶肉的薄壁组织。细胞排列整齐,层次分明,液泡化程度高,细胞内贮藏着大量的淀粉颗粒,这正反映鳞片内部细胞分化的特征。经培养后,愈伤组织的形成过程与王凯基^[11]等所报道的相同,即同样可划分为起动机,分裂期和形成期。实验中观察到诱导起动机进行细胞分裂形成愈伤组织,一般发生在近轴面的下皮细胞,也可以是表皮细胞(图版II—8,9)。细胞进行平周分裂和垂周分裂,增加细胞数目向外突起,形成一团愈伤组织(图版II—8—11)。由细胞分裂产生的细胞,体积小,细胞壁薄,细胞质浓厚,液泡化程度低,淀粉粒消化,这些均反映了细胞经脱分化后的特征。

Buvat^[6]很早就提出器官原基是由一个或一团分生组织分裂而形成。而芽的发生首先是在愈伤组织近表面分化苗端分生组织,而后从苗端发生叶原基^[11, 21]。在本实验中同样观察到这一过程,即由愈伤组织中的局部细胞再次脱分化,形成分生细胞团,进一步分化形成小鳞茎的芽原基(图版II—12, 13, 14)。小鳞茎的起源是于培养组织的表层细胞,即外起源,这与不定芽的一般起源和发生过程是类似的(王凯基等, 1981^[11]),由于以后的发育方式不同才变成了小鳞茎。

(四) 小鳞茎形成过程中的生理生化:

不可否认培养组织在出现形态上的变化之前,其内部已经发生了一系列生理生化变

化,并且随着形态上的变化这些变化将继续进行。有关这方面的研究已有很多,如离体培养条件下形态发生过程中RNA含量变化(Thorpe等,1970^[11];王凯基等,1979^[11]),酶活性的变化(Fosket等,1965^[6];Thorpe等,1970^[11])及淀粉粒含量的变化(Thorpe等,1968,1972,^[9,10];Zee等,1979^[12];桂耀林等,1982^[4])等。本文拟就小鳞茎形成过程中淀粉含量的变化作一些讨论。

未培养前鳞片细胞中含有大量的淀粉粒(图版Ⅱ—1),随着细胞的起动、分裂及愈伤组织的形成,淀粉粒由大变小,由多变少,最后完全消失。当小鳞茎原基形成后,由原基内到愈伤组织的薄壁细胞部分,又发现淀粉粒的存在及其含量由小到大,密度由稀到稠的梯度变化(图版Ⅱ—13)。这与桂耀林等^[4]在不定芽形成中的情况一致。Thorpe等^[9]早就观察到在芽原基形成前后,细胞内部的淀粉粒有明显的变化,指出“器官原基的形成是一个高度的需能过程,在这一过程中淀粉作为一种供能物质而被加以利用”。由此可见,在小鳞茎原基出现以前,细胞已经进行着旺盛的能量代谢过程,这一生理过程的最终结果导致了形态上的质变——器官原基的形态发生。鳞片培养前后细胞中淀粉粒含量的变化,充分说明了这一点。

(五) 从小鳞茎形成植株:

在组织培养中通过形成芽、根而再生植株的方式大致有三种:1.在芽产生后,于芽的基部长根形成小植株;2.在根上长出芽来;3.在愈伤组织上的不同部位分别形成芽和根,而后两者结合起来形成一株完整植株。本实验中百合的植株再生,相似于第一种方式,即先在鳞片近轴面发生小鳞茎,而后在其基部长根形成小植株(图版Ⅰ—6)。

关于由小鳞茎抽出小叶而形成植株,不存在Murashige(1974)^[7]提出的有个休眠过程,即在培养室的控制温度下,很易由小鳞茎抽叶生根形成完整植株。

参 考 文 献

- (1) 王凯基等,1979:油橄榄组织培养的细胞组织学研究, I, I, 植物学报, 21(2):127-132, 21(3):225-230.
- (2) 张丕方等,1982:非洲紫罗兰叶片培养中胚状体发生的形态学研究, 植物学报, 24(3):282-284.
- (3) 杨乃博,1982:试管植物名录, 植物生理学通讯, (5):64-66.
- (4) 桂耀林等,1982:猕猴桃离体茎段形态发生的组织学和组织化学研究, 植物学报, 24(4):301-306.
- (5) Buvat, E., 1945: Recherches sur la dedifferentiation des cellules vegetales, Annls Sci. Nat. (Bot. Bio. Veg.), 6:1-119.
- (6) Fosket, D. E. and L. W. Roberts, 1965: A histochemical study of callus initiation from carrot taproot phloem cultivated *in vitro*, Amer. J. Bot., 52: 929-937.
- (7) Murashige, T., 1974: Plant propagation through tissue culture, Ann. Rev. Plant Physiol., 25:135-166.
- (8) Robb, S. M., 1957: The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thun, J. exp. Bot., 8: 348-352.
- (9) Thorpe, T. A. and Murashige, T., 1968: Starch accumulation in shootforming tobacco callus culture, Science, Vol. 160:421-422.
- (10) Thorpe, T. A. and D. D. Meier, 1972: Starch metabolism, respiration, and shoot formation

- in tobacco callus culture. *Physiol. Plant*, 27: 365-369.
- (11) Thorpe, T.A. and Murashige, T., 1970: Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Can. J. Bot.*, 48:227-285.
- (12) Zee S. Y. and S. C. Wu, 1979: Embryogenesis in the petiole explants of Chinese Celery. *Zeitschrift für Pflanzen-physiologie*, 93:325-334.

STUDIES ON MORPHOGENESIS OF BULBLETS FROM BULB SCALES OF *LILIUM DAVIDII* VAR. UNICOLOR COTTON IN VITRO

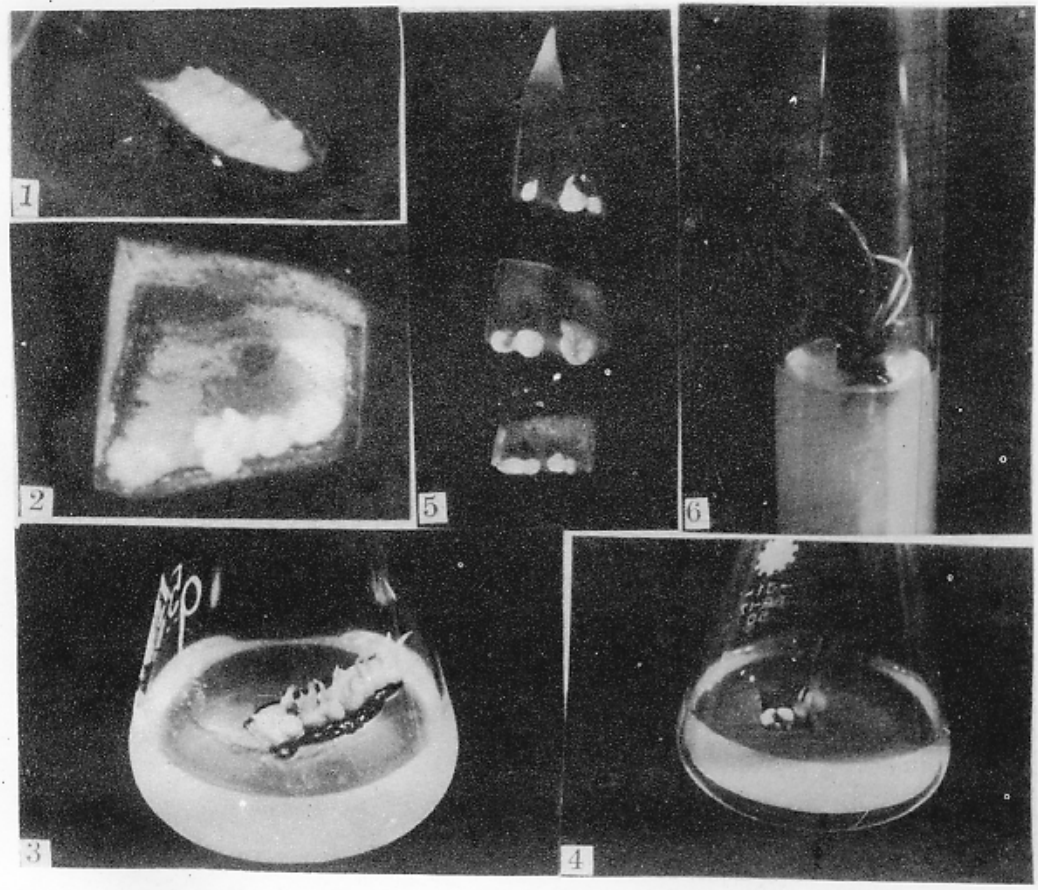
Zhang Pifang Ni Dexiang Wang Fumin and Wang Kaiji

(Department Biology of Fudan University)

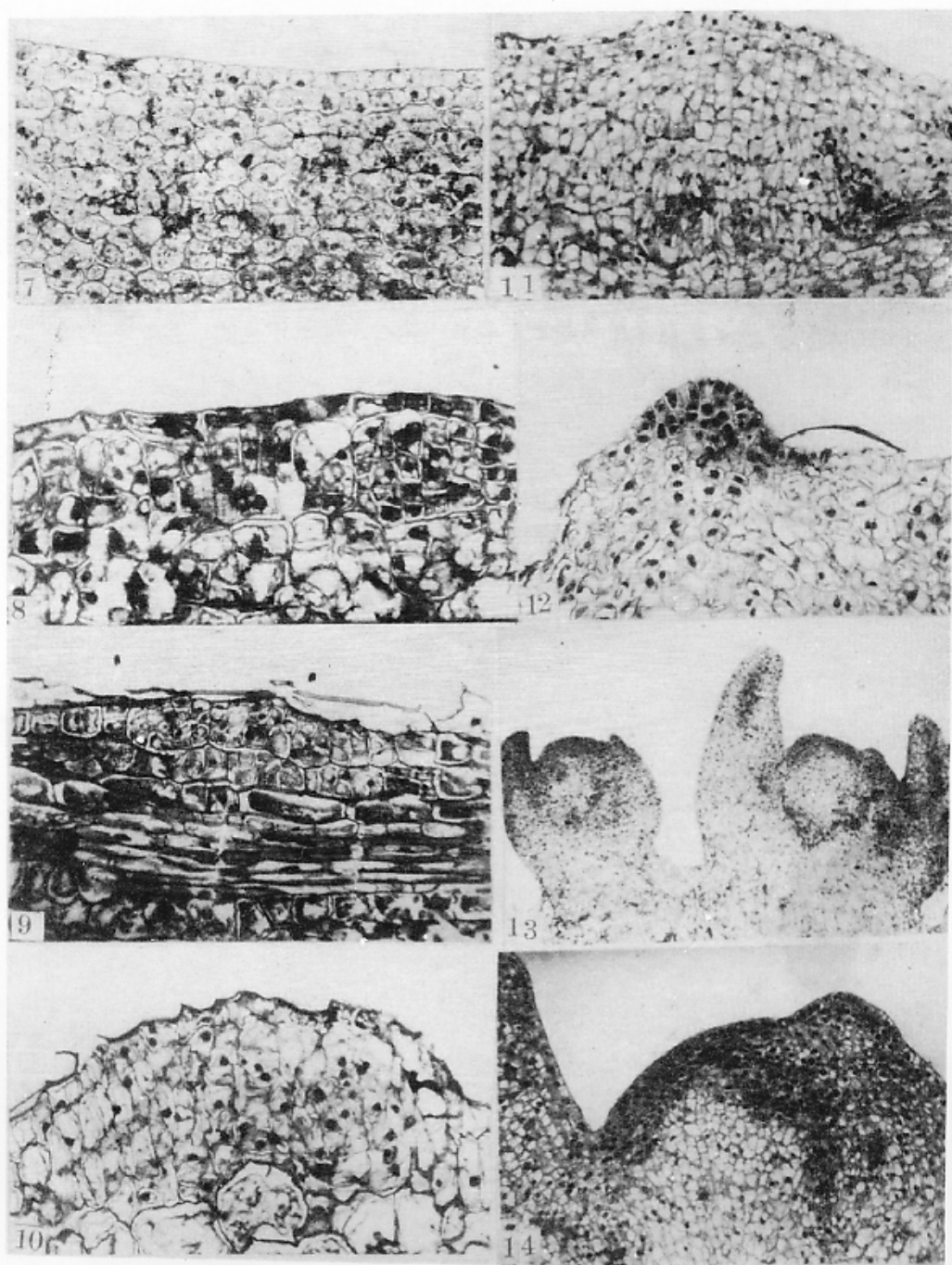
Abstract

The bulb-scales of *Lilium* used as explants were cultured on MS basic medium supplemented with NAA 0.2mg/l and 6-BA 2mg/l. At 9-10 days of culturing bulblets grew out from adaxial surface of the bulb-scales at the morphological lower end of the explants. It was also observed that the regenerative efficiency of the apical, middle or basal segment of a bulb-scale was similar. plantlets were obtained by induction of the roots on the same medium about after a month in culture. Under cytohistological observations on bulblet formation it was found that cell divisions began in the epidermal or subepidermal cells and the process of morphogenesis of bulblets was similar to that of adventitious buds. The starch grains in the tissue were utilized as available source of energy for the development of bulblets. Light may not be necessary for bulblet morphogenesis.

Key words: *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton; Bulblet; Morphogenesis



1. 接种后9—10天在鳞片近轴面出现明显的突起。 2. 鳞片近轴面靠基部切口诱导出的小鳞茎。
 3. 小鳞茎抽出小叶。 4. 在小鳞茎基部出现根原基。
 1. Apparent protuberances on the adaxial surface of the bulb-scales about 9-10 days after cultivation. 6. 完整植株。
 2. Bulblets induced from adaxial surface of the bulb-scales at the morphological lower end of the explants. 3. Leaflets growing out from induced bulblets.
 4. Root primordia produced at the base of bulblets.
 5. Bulb-scales of *Lilium* arranged according to the sequence of apex, middle, base. All bulblets formed at the cutting of the morphological lower end of the explants.
 6. Plantlets formed on the medium



7. 未经培养的鳞片解剖结构($\times 160$).

8. 近轴面下皮细胞起动、脱分化($\times 160$).

9. 近轴表皮细胞起动、脱分化($\times 180$).

10-11. 形成愈伤组织突起($\times 180, \times 160$).

12. 愈伤组织表面形成分生细胞团($\times 180$).

13-14. 由分生细胞团进一步分化形成小鳞茎的芽原基($\times 96, \times 160$).

7. The anatomic structure of bulb-scales uncultured, ($\times 160$)

8. Subepidermal cells on the adaxial surface activated and dedifferentiated, ($\times 160$)

9. Epidermal cells on the adaxial surface activated and dedifferentiated, ($\times 180$)

10-11. Callus protuberances formed on the adaxial surface, ($\times 180, \times 160$)

12. Meristematic cell mass produced at the surface layer of the callus, ($\times 180$)

13-14. Bud primordia of bulblets produced through redifferentiation of the meristematic cell mass, ($\times 96, \times 160$)