

应用细胞工程技术选育四倍体龙牙百合的研究

刘选明 周朴华 何立珍* 罗泽民

(湖南农业大学生物技术系 长沙 410128)

(湖南农业大学农学系 长沙 410128)*

摘要 用二倍体龙牙百合鳞片为外植体,培养在添加2,4-D,6-BA的MS培养基上,诱导愈伤组织、不定芽与小鳞茎分化,建立了二倍体的体细胞无性系。用浓度0.02%~0.05%的秋水仙碱或再加2%~4%的二甲基亚砷溶液处理二倍体小鳞茎、鳞片与愈伤组织均诱导出变异试管苗,通过多代筛选与增殖培养首次获得了变异苗无性系,选育出同源四倍体龙牙百合,其染色体数目为 $48(2n=4x=48)$ 。同源四倍体苗粗壮,叶片宽而厚,小鳞茎增殖速度快,小鳞茎所含核酸、蛋白质、氨基酸、淀粉、脂肪、ATP及维生素 B_2 的量均高于二倍体。

关键词 龙牙百合,同源四倍体,组织培养,染色体加倍

运用组织培养技术结合秋水仙碱诱变处理进行植物,特别是重要经济作物的多倍体选育是一条重要的育种新途径^[1-5]。我们近几年来先后也在黄花菜、南荻的染色体数目加倍及新品种选育上开展了研究,培育出同源四倍体黄花菜和南荻,并在生产上推广应用,产生了明显的经济效益与社会效益^[2]。百合属百合科百合属,龙牙百合是湖南省长期栽培的百合地方良种,具有养阴润肺,精心安神,治阴虚久咳,痰中带血,虚烦惊悸之功效,广泛用于食品与医药工业。目前种植遍及湖南全省,经济效益好,在有的县市百合生产已成为当地经济发展的支柱产业之一。然而,因种植年代长,龙牙百合的种性退化严重,产量与品质逐年下降。为了改变这种状况,自1992年开展了龙牙百合多倍体诱导与育种的研究,以期育成高产、优质的新种质资源。现将研究结果首次报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

龙牙百合(*Lilium brownii* F.E. Brown. var *viridum* Baker),属百合科百合属。

1.2 方 法

1.2.1 材料的采取与消毒:在正常收获季节选取饱满,无病斑的鳞茎,用自来水反复冲净鳞茎表面的泥土,晾干。接种前摘取鳞片,用0.1%的升汞溶液消毒5min,无菌水冲洗3~5次,放在超净工作台上备用。

1.2.2 二倍体体细胞无性系的建立:将消毒后的鳞片切成 1cm^2 的方块,分别接种到含

湖南省科委“八五”重点科研项目,高等学校博士点经费资助。

本文于1995年11月30日收到。

0~3mg/L 2, 4-D 与 0~2mg/L 6-BA 组合的 MS 培养基上培养, 培养基中蔗糖含量为 3%, 琼脂含量为 0.7%, pH5.8。形成的愈伤组织转移到改变 6-BA 或降低 2, 4-D 浓度分化培养基上培养, 或继续在含 2, 4-D 的培养基上继代增殖培养。

1.2.3 秋水仙碱加倍处理与培养: 在 25~30℃ 温度下分 3 组进行加倍处理: (1) 取小鳞茎分别放入 0.027%、0.05% 的秋水仙碱溶液中浸泡 24~72h, 对照用无菌水浸泡, 处理时间相同。(2) 将小鳞茎放入含有 2%、4% 二甲亚砜的 0.05% 的秋水仙碱液中浸泡处理 24~27h。(3) 用 0.05% 的秋水仙碱溶液浸泡处理小鳞茎、鳞片组织和愈伤组织 48h。

处理后的材料均先用无菌水洗涤 5 次, 随即转移到新鲜的含 2mg/L 6-BA 的 MS 培养基上, 用弱光照进行起始培养, 10~12d 后又转移新鲜培养基以防止褐化, 并逐步加大光照强度至 2000 lx。观察加倍效果。

1.2.4 试管苗的细胞学鉴定: 选用生长一致、植株正常的二倍体试管苗与变异试管苗转入生根培养基 MS+ 6-BA 0.2mg/L+ IAA1.0mg/L 上培养, 待根长至 1~3cm 长时切取洁白的根尖, 用 α -溴代萘处理 4h, 经 0.075mol/L KCl 溶液前低渗, 2.5% 的混合酶液(纤维素酶与果胶酶)酶解 3h, 再经后低渗、固定、装片、染色并显微观察摄影^[6]。取全展的试管苗叶片, 撕取下表皮, 临时装片, 用显微测微法测量保卫细胞的大小, 以生物统计法分析结果。

1.2.5 四倍体与二倍体的小鳞茎营养成分分析: 供分析材料均是在相同条件下获得的小鳞茎。(1) 蛋白质含量的测定: 用考马斯亮兰 G-250 法测定^[7]。(2) 核酸含量的测定: 按文献^[8]介绍的方法。(3) 氨基酸组分含量测定: 用氨基酸自动分析仪测定。(4) 淀粉与可溶性糖含量的测定: 按文献^[9]等介绍的方法。(5) 脂肪含量测定: 按湖南农业大学生化室介绍的方法^[10]。(6) ATP 含量的测定: 用生物发光法进行测定^[11]。荧光素酶购于第二军医大学, 标准 ATP 为美国 Sigma 产品。(7) 维生素 B₂ 含量的测定: 用文献^[12]介绍的荧光光度法测定。

1.2.6 四倍体小鳞茎液体振荡增殖培养: 将小鳞茎转入液体培养液中置于台式摇床振荡培养, 振荡速度 500 次/min, 开始 3~7d 添加或更换新鲜培养液, 以后可间隔 20d 加入新鲜培养液, 可实现小鳞茎的快速增殖。

2 结果与分析

2.1 二倍体体细胞无性系的建立

2, 4-D 用于百合组织培养的报道很少。我们进行了 2, 4-D、6-BA 的不同浓度组合诱导龙牙百合鳞片细胞脱分化与分化的试验, 结果表明不同浓度 2, 4-D 与 6-BA 组合对龙牙百合的愈伤组织诱导与不定芽或小鳞茎的分化有明显影响(表 1)。1), 在含有 2, 4-D 时, 鳞片培养 5~7d 膨大并在叶缘、叶表面与伤口处形成愈伤组织(图版 I-1)。2) 在仅含 6-BA 时, 外植体约 10d 出现膨大, 15~20d 后其表面或叶缘处形成少量致密愈伤组织, 进而分化为不定芽或小鳞茎。3), 在无激素培养基上, 外植体变化更为迟缓, 15d 后出现膨大, 30d 后陆续形成不定芽或小鳞茎。综合分析表 1 结果, 我们得出二倍体龙牙百合愈伤组织诱导以 2, 4-D 浓度 1~2mg/L 和 6-BA 0.5mg/L 组合的 MS 培养基为宜, 其愈伤组织诱导率高达 96.2%, 且生长状好; 不定芽分化较适激素组合浓度为 6-BA/2, 4-D \geq 1, 2, 4-

D 浓度应不大于 2mg/L;而鳞茎的分化则以无激素或仅添加低浓度 6-BA 的效果较为理想。

将上述试验中获得的愈伤组织、不定芽和小鳞茎转移到相应的培养基上继代培养,均获得快速增殖,从而建立了大量的二倍体龙牙百合体细胞无性系(图版 I-2),可供下一步加倍诱变试验使用。

表 1 不同激素浓度组合对鳞片外植体脱分化和分化的影响

Table 1 Effect of different hormone concentrations on the dedifferentiation and redifferentiation of the scale leaf of lily diploid

No.	Hormones		Numbers of explants	Callus Induction		Bud dedifferentiation		Bulb dedifferentiation	
	6-BA mg·L ⁻¹	2,4-D/ mg·L ⁻¹		Numbers	%	Numbers	%	Numbers	%
1	2	0	75	0	0	61	81.3	49	65.3
2	1	0	28	0	0	19	76.0	17	68.3
3	0.5	0	25	2	8.0	18	72.0	16	64.0
4	2	1	30	21	70.0	26	80.3	7	21.0
5	1	1	30	26	86.7	22	70.3	8	24.0
6	0.5	1	24	22	91.7	14	58.3	3	12.5
7	2	1	27	23	85.2	13	48.1	3	11.1
8	1	2	25	22	88.0	9	36.0	3	12.0
9	0.5	2	105	101	96.2	24	22.9	7	6.7
10	2	3	25	19	76.0	7	28.0	1	4.0
11	1	3	25	19	76.0	5	20.0	0	0
12	0.5	3	25	17	68.0	3	12.0	0	0
13	0	1	25	23	92.0	5	20.0	2	8.0
14	0	2	100	89	89.0	9	9.0	0	0
15	0	3	30	19	63.3	2	7.7	0	0
16	0	0	98	3	3.06	15	15.3	69	70.4

2.2 秋水仙碱对离体龙牙百合加倍效果观察

2.2.1 秋水仙碱浓度与处理时间对加倍效果的影响: 选用形态一致的小鳞茎用 0.02% 和 0.05% 两种浓度秋水仙碱分别浸泡 24、48、72h, 再用无菌水冲洗后转到新鲜培养基上培养 45d, 观察并统计其加倍结果(表 2)。

表 2 表明在同一秋水仙碱浓度下, 随处理时间延长, 鳞茎死亡率提高, 相对诱变率提高, 但在较高浓度时处理时间过长诱变的绝对数显著降低。以 0.05% 秋水仙碱处理 48h 或 0.02% 秋水仙碱处理 72h, 龙牙百合小鳞茎的加倍效果均较理想, 诱变率达 70% 以上。这与周朴华等^[2]对黄花菜诱变研究相比, 在相同浓度秋水仙碱下, 处理时间有所延长。说明不同材料要求的处理条件不同, 可看出秋水仙碱浓度高, 处理时间短, 浓度低, 处理时间长。

2.2.2 二甲基亚砜在加倍上的作用: 加入 2%、4% 的二甲基亚砜到秋水仙碱溶液中, 随着处理时间的不同, 诱变效果发生了明显的变化(表 3)。当加入的二甲基亚砜浓度为 2% 时, 处理 24h, 诱变率提高了 7.3%, 处理 48h, 诱变率提高了 1.9%, 处理 72h 则显著降低了 25%。当二甲基亚砜浓度为 4% 时, 各个处理时间中, 诱变率均比不加二甲基亚砜降低。表明在适当浓度下二甲基亚砜对龙牙百合小鳞茎的加倍效果有促进作用, 但浓度偏高或

浸泡时间过长则呈现出负的加倍效应。这与在黄花菜圆球体加倍时得出的结论不尽一致^[2]。

2.2.3 小鳞茎、鳞片与愈伤组织的加倍效果比较：选取小鳞茎鳞片和愈伤组织分别用 0.05% 的秋水仙碱溶液浸泡处理 48h, 然后用无菌水冲洗后转入新鲜培养基上培养 35d 统计观察结果(表 4)。从表 4 可知, 在成苗率上外植体鳞茎 > 愈伤组织 > 鳞片, 由 92.86% 下降到 45%。在死亡率上 3 种外植体的情况与上相反, 由 7.14% 升高到 55%。在诱变效果上, 效果最好的是小鳞茎, 诱变率达 62.1%, 其次是带芽点的愈伤组织, 最不理想的是鳞片, 其诱变率只有 35%。通过该试验得出进行龙牙百合染色体加倍以小鳞茎为诱变的理想外植体。

表 2 不同浓度秋水仙碱与处理时间处理龙牙百合小鳞茎的加倍效果

Table 2 Doubling effect on bulbs of lily diploid treated with different concentrations of colchicine for different time per iods *in vitro*

Treated with colchicine		Bulb numbers treated with colchicine	Shoot formation		Dead bulb		Variation shoots	
Conc./%	t/h		Numbers	%	Numbers	%	Numbers	%
0.05	24	36	36	100	0	0	7	19.4
	48	24	24	92.3	2	7.69	19	73.14
	72	25	17	68.0	8	32.0	15	60
0.02	24	30	30	100	0	0	5	16.7
	48	27	26	96.3	1	3.7	12	44.4
	72	23	20	86.9	3	13.1	18	78.3
CK	24	20	20	100	0	0	0	0
	48	20	20	100	0	0	0	0
	72	20	18	90	2	10	0	0

表 3 不同浓度二甲基亚砜对加倍效果的影响

Table 3 Effect on the doubling of bulbs of lily diploid treated with different concentrations of dimethyl sulfoxide.

Treating in soak way		Bulb numbers in treatment	Shoot formation		Dead bulb		Variation shoots	
Conc./%	t/h		Numbers	%	Numbers	%	Numbers	%
Colchicine 0.05	24	15	15	100	0	0	4	26.7
	48	20	17	85	3	15	15	75
dimethyl sulfoxide + 2	76	23	11	47.8	12	52.2	8	34.8
Colchicine 0.05	24	16	13	81.3	3	18.8	5	31.3
	48	24	10	41.7	14	58.3	4	16.7
dimethyl sulfoxide + 4	76	28	8	28.6	20	71.4	2	7.1

表 4 不同材料类型加倍效果的比较

Table 4 Comparison of doubling effect among different materials

Material	Treated number	Shoot formation		Dead material		Variation shoots	
		Numbers	%	Numbers	%	Numbers	%
Bulb	56	52	92.88	4	7.14	36	62.1
Scale leaf	20	9	45	11	55	7	35
Cullus with buds	16	9	56.3	7	43.7	7	43.7

Colchicine concentration was 0.05%. Treatment method was soaking.

Medium: MS + 6-BA 2mg/L + 3% Sugar + 0.7% Agar pH5.8

2.3 试管苗的形态学特性与细胞学鉴定

2.3.1 变异试管苗的形态学特征:经秋水仙碱处理的小鳞茎在培养过程中鳞茎膨大,外围鳞片叶肥大,然后部分外围鳞片叶褐化,少数鳞茎经膨大后死亡,多数鳞茎转化为叶宽而厚,生长迟缓的芽,进而长成变异苗(图版 I-4~6)。鳞片经诱变处理后,多数膨大变厚,其表面产生不光滑的泡状突起或形成愈伤组织,然后在愈伤组织上分化粗壮的不定芽,有些鳞片膨大后褐化死亡。带芽愈伤组织诱变处理后,大多分化出变异试管苗,但有的芽或褐化死亡或进一步愈伤组织化。形成的正常变异试管苗多数叶色浓绿,叶宽而厚,表面粗糙,叶脆易断(图版 I-6)。也有的变异株叶片细厚呈筒状形态,还有的变异株在部分叶尖上分成二叉或三叉状形态,试管苗形态上的这些丰富变异为选择提供了更多的机率。

2.3.2 变异试管苗的细胞学鉴定:二倍体龙牙百合鳞片形成的高世代试管苗,经其根尖染色体检查,其染色体数为 $24(2n=2x=24 \ x=12)$ (图版 I-3),仍为稳定的二倍体。经诱变获得的变异试管苗通过多次人工选择,建立起来的植株形态好,生长速度正常的株系,经观察其染色体数目为 $48(2n=4x=24 \ x=12)$ 。证实核类变异试管苗为同源四倍体(图版 I-7)。然后将该类的变异试管苗扩大快速繁殖,获得了同源四倍体龙牙百合新种质的无性系。

进一步观察发现同源四倍体气孔保卫细胞显著大于二倍体(表 5)。保卫细胞平均增长 $15.44\mu\text{m}$,增宽 $7.28\mu\text{m}$,面积约增大 $112.4\mu\text{m}^2$ 。这也说明该类变异试管苗确为稳定的同源多倍体。

表 5 同源四倍体与二倍体气孔保卫细胞大小的比较观察

Table 5 Comparative observations of guard cell of leaf stoma between autotetraploid and diploid

Material	Multiple	Selected position	Numbers of guard cell observed	Size of guard cell of stoma/ μm			
				length		Width	
				Range	$X \pm S$	Range	$X \pm S$
Diploid	2X	Leaf middle	45	37.33~69.33	47.41 ± 0.73	32.0~56.0	38.17 ± 0.91
Autotetraploid	4X	Leaf middle	45	44.0~91.47	62.85 ± 0.85	32.0~61.33	45.45 ± 0.98

2.4 同源四倍体与二倍体鳞茎的营养成分比较

取相同培养条件下的同源四倍体和二倍体龙牙百合的小鳞茎进行蛋白质、核酸、可溶性糖、淀粉、脂肪、ATP、维生素 B₂ 的含量测定以及氨基酸组分与含量的分析,结果见表 6、表 7。

表 6 同源四倍体与二倍体鳞茎营养成分比较

Table 6 Comparisons of nutrient components of bulbs between the autotetraploid and the diploid

Materials	Protein/%	Nucieic acid	Starch/%	Solble sugar/%	Fat/%	ATP	VB ₂
		$/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$				$/\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$	$/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Autotetraploid ($2n=4x=48$)	4.00	862	34.25	14.0	0.147	33.2	0.1098
Diploid ($2n=2x=24$)	3.64	785	19.5	16.05	0.130	26.4	0.0739

Number in table represent content in Fw. material

从表 6 可知,四倍体龙牙百合比二倍体除了鳞茎内可溶性糖含量降低外,其余所测营养成分均显著提高,而可溶性糖含量降低可能是其更多地转化成淀粉所致。表 7 表明:所测 14 种氨基酸总量四倍体比二倍体增加了 $11.45\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{DW}$,增加百分率 28.5%。测定

的7种必需氨基酸中, Lys、Met、Val和Leu4种含量增加, 另三种降低, 但必需氨基酸总量四倍体比二倍体仍增加了6.04%, 表明同源四倍体鳞茎的营养价值已显著高于二倍体。

表7 同源四倍体与二倍体鳞茎氨基酸组成比较
Tabel 7 Comparations on the components of amino acids of bulbs between the autotetraploid and the diploid

AA styles	Autotetraploid		Diploid		Difference between tetraploid and diploid	
	mg·g ⁻¹	%	mg·g ⁻¹	%	mg·g ⁻¹	Addition/%
Ala	0.988	1.948	0.723	1.796	+0.265	+36.65
CLu	7.876	15.232	7.356	18.270	+0.52	+7.70
His	0.332	0.064	0.268	0.66	+0.064	+23.88
Arg	39.410	76.216	29.270	72.698	+10.140	+34.60
Ser	0.736	1.423	0.374	0.929	+0.362	+96.79
GLy	0.625	1.209	0.474	1.177	+0.151	+31.86
* Lys	0.683	1.321	0.620	1.534	+0.063	+10.16
* Met	0.042	0.081	0.022	0.055	+0.020	+90.91
* Val	0.362	0.702	0.245	0.609	+0.118	+48.16
* Leu	0.194	0.375	0.193	0.479	+0.010	+5.18
* Pro	0.208	0.040	0.375	0.931	-0.167	-44.53
* Phe	0.137	0.265	0.254	0.631	-0.117	-46.06
* Thr	0.065	0.126	0.074	0.183	-0.009	-12.16
Cystine	0.049	0.094	0.014	0.035	+0.035	+250
total	51.708	100	40.262	100	+11.45	+28.50

* represent essential amino acid, Number in table represent content in DW material

2.5 同源四倍体小鳞茎的微繁生产

当不定芽长至2cm高时转入生根培养基培养15d可见根分化, 20d长成正常植株, 然后从培养瓶中取出移栽盆中获得了成活植株。

龙牙百合是食药兼用的无性繁殖作物, 用鳞茎播种可以缩短生产周期。我们选取小鳞茎在MS附加低浓度6-BA的液体培养基上振荡培养, 小鳞茎增殖速度显著高于固体培养基, 据测定鳞茎数目比固体培养基上增殖快3.1~5倍, 鲜重增加速度高20%以上。我们现已初步建立了小鳞茎工厂化生产程序, 并于今年10月播种了一批小鳞茎到大田。

3 讨论

3.1 百合生产上存在的问题与解决对策

百合集观赏、食用与药用等多种功效, 已成为了当今食品与医药等行业竞相开发的紧俏产品, 并使很多农民脱贫致富。然而, 经过长年的无性繁殖, 种质退化严重, 产量与品质深受影响, 严重阻碍了百合生产的持续发展。针对这些问题, 我们认为可以采用以下措施解决或予以缓和。(1)通过常规与杂交育种法选育出优良品种, 更新现有品种。但这项工作周期长, 工作量大。(2)用组织培养技术进行脱病毒苗生产研究, 建立无病毒百合苗生产基地。这可使种性恢复, 但很难有突破性的大幅度增产。(3)应用组织培养技术诱发多倍体进行品种选育。由于多倍体器官巨型化, 可使鳞茎食用器官显著增大, 大幅度增产,

并可同时改良品质,缩短选育周期,在一定程度上还可同时达到脱去病毒的目的。所以,最后一种措施将是克服目前百合生产问题的一条最有效途径。

3.2 龙牙百合同源四倍体的选育技术

关于百合组织培养报道很多,多倍体诱导曾也有较少文献报道^[1,8]。但以往多以花卉种类为材料,目的是为了增大花形。龙牙百合的多倍体选育研究尚未见报道。我们用组织培养与化学诱变技术相结合,着眼于提高食用鳞茎品质与产量,选育出了第一个食用龙牙百合同源四倍体新种质。在选育技术上进行外植体筛选,不同秋水仙碱浓度及二甲基亚砜的作用等多方面较为深入的研究,使诱变率提高到78.4%。建立了一个高诱变率的四倍体龙牙百合选育程序。四倍体龙牙百合表现出多倍体的倍性效应,即器官巨型化。植株粗大,叶片肥厚,鳞茎增大。同时鳞茎内营养成分比二倍体更为丰富,特别是品质得到了很大改善,因而具有广泛推广的应用前景。

参 考 文 献

- [1]张成合. 河北农业大学学报, 1988, 2: 136~139.
- [2]周朴华,何立珍,刘选明. 中国农业科学, 1995, 1: 49~55.
- [3]黄济明. 园艺学报, 1983, 2: 125~127.
- [4]Chen C H, Goeden Y C. Euphytica. 1979, 28: 705~709.
- [5]Iizuka M. Japan J Genetics. 1968, 43(2): 95~99.
- [6]孙敬三,钱迎倩. 植物细胞学研究方法, 北京: 科学技术出版社, 1987, pp. 60~70.
- [7]西北农业大学. 基础生物化学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986, pp. 7~75.
- [8]朱治平. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, pp. 44~46.
- [9]袁晓华. 植物生理生化实验. 北京: 高等教育出版社, 1983, pp. 1~5.
- [10]湖南农学院生化室. 基础生物化学实验指导. 长沙: 湖南农业大学(自编教材), 1982, pp. 38~40.
- [11]王维光. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, pp. 115~117.
- [12]王淑淳. 食品卫生检验技术. 北京: 化学工业出版社, 1988, pp. 188~190.

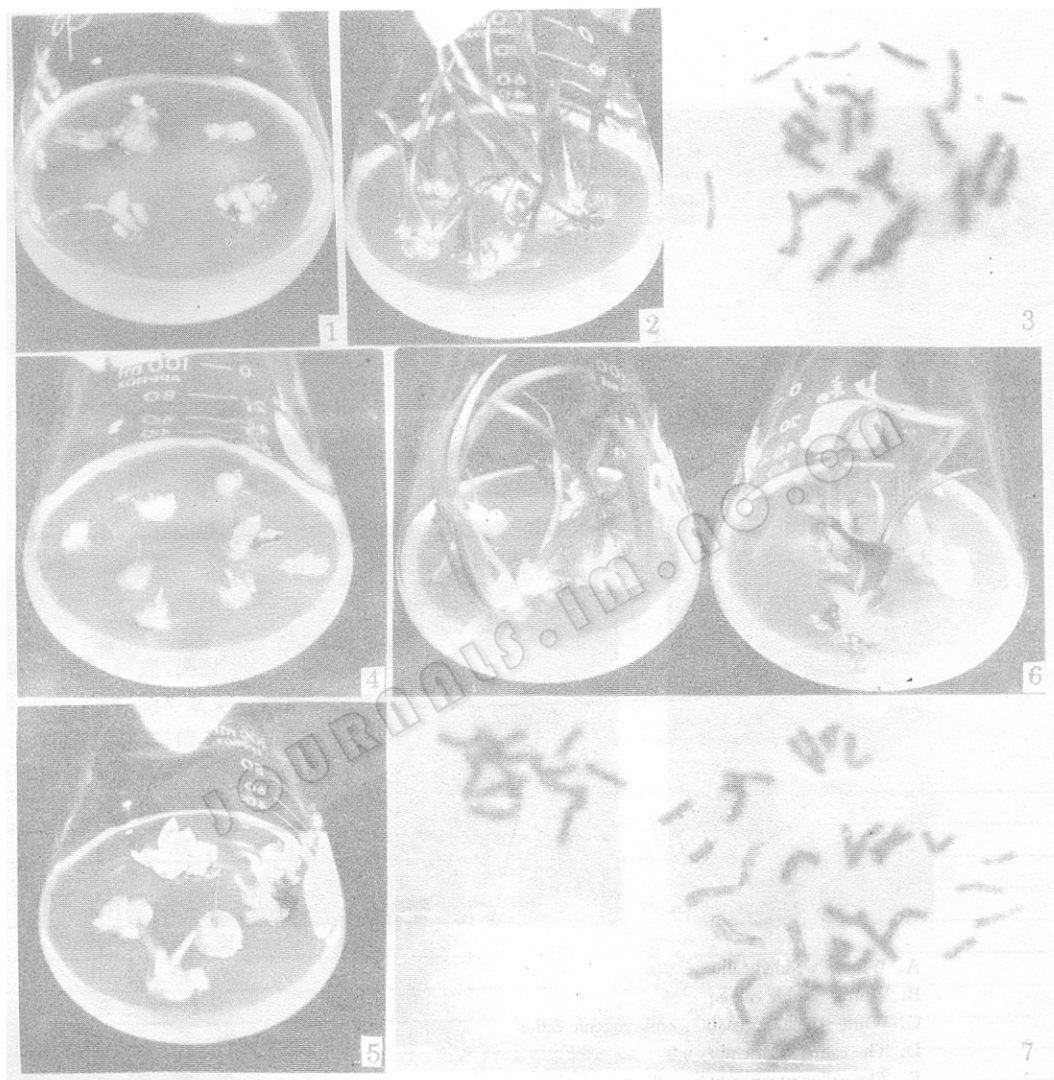
Studies on the Induction of Autotetraploid of Lily "Nongya Baihuo" by Cell Engineering Technique

Liu Xuanming Zhou Puhua He Lizhen* Luo Zemin

(Department of Biotechnology and Agronomy* Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract The somatic clone lines of diploid were established by culturing scale leaf sections on MS medium containing 2, 4-D, 6-BA. A new resource "autotetraploid of Nongya Baihuo" was first bred from various plantlets by culturing and selecting for many times. These plantlets were obtained from scale leaves, bulbs and calli treated with colchicine and dimethyl sulfoxide. Autotetraploid plantlets were larger in shoot, thicker in leaf than diploid, and they were also superior to diploid in nutrient quality of bulbs. The contents of protein, nucleic acid, fat, starch, amino acids, ATP and Vitamin B₂ were higher in autotetraploid than in diploid.

Key words Lily, autotetraploid, tissue culture, chromosome doubling



1. Calli from scale leaves of diploid.
2. Tube-shoots of diploid
3. Chromosome numbers of diploid ($2n = 2x = 24, x = 12$) $\times 450$
4. Small bulbs of diploid
5. Infate bulbs formation after treatment with colchicine
6. Normal plantlets of tetraploids
7. Chromosome numbers of tetraploid ($2n = 4x = 48, x = 12$) $\times 450$