

文章编号: 1000-5692(2003)03-0273-04

百合基因转化胚性愈伤组织受体系统的建立

唐东芹¹, 钱虹妹², 黄丹枫¹, 唐克轩²

(1. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 201101; 2. 复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心 上海 200030)

摘要: 为建立稳定高效的胚性愈伤组织基因转化受体系统, 以麝香百合 *Lilium longiflorum* 花丝为外植体进行了愈伤组织诱导、植株再生研究以及抗生素敏感性试验。结果表明: 愈伤组织诱导增殖培养基为 MS+NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 分化培养基为 MS+KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。抗生素敏感性试验表明, 百合基因转化胚性愈伤组织的卡那霉素选择压为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 潮霉素的选择压为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 头孢霉素选择压为 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。表 4 参 10

关键词: 组织培养; 麝香百合; 胚性愈伤组织; 抗生素

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A

百合 *Lilium* 是世界著名观赏花卉, 同时又能食用和药用, 应用相当广泛。长期以来其品质的改良都是依赖于传统的遗传育种方法。随着生物技术的不断发展, 通过分子育种进行植物种质改良成为传统育种方法的重要补充, 并且具有更加诱人的前景, 目前已应用于不少花卉的品质改良^[1~3]。对于百合而言, 导入花色调控基因、抗病基因和抗虫基因等外源基因来改良其品质无疑具有重要意义。本文以广泛应用的麝香百合 *Lilium longiflorum* 为对象, 建立了百合基因转化的胚性愈伤组织受体系统, 为基因转化改良百合品质培育, 新品种奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及消毒

以麝香百合花丝和花梗作为外植体进行离体诱导。自花托以下 3~4 cm 剪取带花托的整个花苞, 用清水冲洗干净, 洗衣粉液浸泡 30 min 后置无菌操作台消毒。方法如下: 首先将材料放入无菌容器中, 用 75% 的乙醇消毒 30 s 后用 20% 次氯酸钠溶液处理 10 min, 用无菌水冲洗 6~8 次; 最后用无菌吸水纸吸干水分, 剥开花苞, 将花丝分离, 并剪成 5~8 mm 小段, 花梗剪成 3~5 mm 小段作为外植体备用。

1.2 培养基与培养条件

所有培养基选用 MS (Murashige and Shoog) 为基本培养基, 附加不同种类和质量浓度的生长素与细胞分裂素。培养基都采用固体形式, 含植物凝胶 (Sigma 公司 phytigel) $2.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为 5.8。培养基的筛选以单因子对比试验进行。温度为 25°C , 光强 $1\,000 \sim 1\,200 \text{ lx}$, 光照时间为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.3 胚性愈伤组织的诱导与植株再生

将花丝和花梗接种于诱导培养基上诱导愈伤组织。挑取胚性愈伤组织至分化培养基诱导不定芽,

收稿日期: 2003-01-25; 修回日期: 2003-05-05

作者简介: 唐东芹(1971—), 女, 江西龙南县人, 讲师, 硕士, 从事园林植物生物技术等研究。E-mail: yxjkk@sjtu.edu.cn
©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

每 2 周继代 1 次。不定芽长至 1~2 cm 时将其转入生根培养基上诱导生根, 将长出 4~5 条根的壮苗练苗后移栽至基质中, 待恢复长出新叶后移至温室或大棚中培育。

1.4 抗生素敏感性试验

根据离体培养结果, 筛选出适宜的再生培养基附加不同的抗生素进行敏感性试验。将外植体置于附加不同质量浓度卡那霉素 (0, 25, 50, 75, 100 mg·L⁻¹)、潮霉素 (0, 10, 20, 30, 40 mg·L⁻¹) 以及不同质量浓度头孢霉素的培养基上。培养条件同上, 定期记录外植体褐变情况。

2 结果与分析

2.1 高频再生系统的建立

将花丝和花梗分别接种于激素组合不同的培养基上诱导愈伤组织。15 d 后, 花丝和花梗开始膨大, 20 d 左右出现白色或浅黄色愈伤组织, 主要集中在外植体基部。30 d 后统计愈伤组织诱导率 (表 1)。取致密初生愈伤组织转接到 MS+NAA 1.0 mg·L⁻¹+BA 0.5 mg·L⁻¹ 的培养基中增殖培养, 2 周继代 1 次。

从上表可知, 花丝与花梗在培养基 MS+NAA 1.0 mg·L⁻¹+BA 0.5 mg·L⁻¹ 和 MS+BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹ 中的愈伤组织诱导率都较高, 但后期在 MS+BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹ 中会导致分化, 不利于愈伤组织增殖。花丝和花梗形成愈伤组织的能力有着一定差异。花丝诱导出的愈伤组织大都表现为颜色新鲜, 色泽浅黄或黄色, 质地较紧密, 表面有颗粒状的小凸起, 即表现为胚性状态, 同是能多次继代且鲜质量增加较快, 并能顺利分化出再生小植株。

这对于麝香百合分子育种是非常有利的。花梗愈伤组织诱导率也较高, 但其增殖速度略慢。在继代过程, 部分愈伤组织颜色发白并逐渐呈透明状, 颗粒减少, 由紧密变得松散, 而且有相当一部分分化, 不能大量形成愈伤组织并维护胚性状态。因此, 从基因转化角度出发, 我们认为花丝作为外植体要优于花梗。

取部分胚性愈伤组织接种于分化培养基上考察其分化能力, 结果如表 2。

不少研究认为, 较低质量浓度的生长素与较高质量浓度的细胞分裂素有利于诱导出芽, 其中以 NAA 与 BA 组合应用于百合的组培效果较好^[4~9], 但质量浓度不当的 BA 易引起植物细胞突变。从我们的实验结果来看, 细胞分裂素 KT 对百合愈伤组织的分化效果明显, 不仅分化率较高而且小苗生长健壮, 可以取代 BA 应用于愈伤组织分化系统中。不同激素组合对愈伤组织分化效果存在差异, 其中以 KT 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹ 的激素组合时诱导分化率最高, 故确定以此组合附加不同质量浓度的抗生素进行下一步的抗生素敏感性试验。

当不定芽长到 1~2 cm 左右时切下转入附加 250 mg·L⁻¹ 头孢霉素的生根培养基, 20 d 左右开始生根, 30 d 后统计生根情况。结果表明, 低质量浓度生长素对小苗生根有促进作用, 不仅生根多, 而且小苗的长势也较不加生长素要好。试管苗长到 7~8 cm 左右时移栽。移栽之前需适当练苗。在室温条件下打开瓶口练苗 3~5 d 后, 小心取出, 用清水冲洗根部残留培养基, 然后栽入消毒过的 *m* 草炭:

表 1 麝香百合愈伤组织诱导能力的比较

Table 1 The comparison of ability to induce calli of *Lilium longiflorum*

外植体	外源激素/ (mg·L ⁻¹)		接种数	形成愈伤组织的 外植体数	诱导率/ %
	BA	NAA			
花丝	0.5	1.0	138	130	94.2
	1.0	0.5	126	107	84.9
	0.1	1.0	92	46	50.0
	2.0	0.2	59	15	25.4
花梗	0.5	1.0	120	101	84.2
	1.0	0.5	120	97	80.8
	0.1	1.0	45	6	13.3
	2.0	0.2	45	0	0

表 2 不同激素组合对愈伤组织分化的影响

Table 2 The effects of different hormone combinations on the bud differentiation

激素组合/ (mg·L ⁻¹)	愈伤组织接种数	不定芽分化数	分化率/ %
BA 1.0+NAA 0.5	150	93	62.0
BA 1.0+NAA 0.2	150	45	30.0
BA 0.5+NAA 0.5	150	90	60.0
BA 2.0+NAA 0.5	150	64	42.7
KT 2.0+NAA 0.5	150	54	36.0
KT 1.0+NAA 0.5	150	73	48.7
KT 1.0+NAA 0.2	150	116	77.3

m 蛭石 = 1 : 1 的基质中，浇透水后套袋，7 d 后去袋任其自然生长。待恢复长出新叶后转至温室或大棚中进行常规栽培，保持 75% 的空气湿度，50% 自然光照，晴天早晚各喷水 1 次。

2.2 抗生素敏感性试验

2.2.1 卡那霉素敏感性试验 将百合胚性愈伤组织接种在不同质量浓度卡那霉素的培养基上，30 d 后观察褐变情况。结果表明，卡那霉素质量浓度低于 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 愈伤组织褐变程度较低，当达到 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时褐变率大大增加，而到 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时愈伤组织生长完全受遏制（表 3）。由于高质量浓度的抗生素能迅速杀死细胞，而死细胞对周围细胞的生长有强烈的抑制作用，不利于转化细胞生长，因此在筛选质量浓度时一般应略低于全致死浓度。据此确定 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为百合胚性愈伤组织卡那霉素的筛选浓度。

2.2.2 潮霉素敏感性试验 潮霉素是一种很强的细胞生长抑制剂，普遍用于单子叶植株的选择标记。将百合部分胚性愈伤组织接种在附加不同质量浓度的潮霉素培养基上，30 d 观察愈伤组织褐变情况。结果表明，百合愈伤组织对潮霉素比较敏感，其质量浓度在 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，褐变率即高达 92.5%（表 4），可以此质量浓度作为百合愈伤组织基因转化时的潮霉素选择压。在实验中发现，同一质量浓度处理的不同培养皿之间也有较大的差别，说明同一愈伤组织在不同的生理状态下，对潮霉素的敏感程度也不同。

2.2.3 头孢霉素敏感性试验 头孢霉素可赋予广谱抗性，能有效抑制细菌生长，而且对植物细胞无明显毒性，目前被广泛应用于植物基因转化中。本实验选择头孢霉素作为抑菌性抗生素，设定质量浓度梯度为 0，100，250，500，750，1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行敏感性试验。结果显示，头孢霉素并不抑制植物细胞正常生长，能使外植体形成愈伤组织或分化出不定芽，其选择压在 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 即可达到较好抑菌效果。从前人研究来看，较多采用 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的头孢霉素为选择压^[10]。从经济角度出发，在百合的进一步基因转化中，头孢霉素选择压可设为 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

百合再生能力较强，有很多品种通过组织培养获得了再生植株^[4~9]，其中以鳞片为外植体的组织培养研究较多。由于鳞片污染严重，给百合的基因转化带来困难。而花部器官易于消毒，材料来源广泛，且再生能力强，是较为理想的分子育种材料。

植物组织培养形成再生植株的途径可分为 2 种：一是通过脱分化形成愈伤组织，再分化形成再生植株；另一条途径为直接分化出不定芽和不定根形成再生植株。以快速繁殖为目的的百合组织培养中，以第 2 种情况较为常见。而且为了避免愈伤组织阶段细胞的突变，有学者认为应以第 2 条途径为主^[9]。但以分子育种为最终目标的再生系统的建立则不同，胚性愈伤组织是基因转化的良好受体材料，有利于外源基因整合到植物基因组中。诱导愈伤组织并较长期维持其胚性状态对其基因转化有重要意义。本文通过实验表明以麝香百合花丝为外植体，可以大量诱导愈伤组织的产生且可长期维持其胚性状态，并能顺利分化出不定芽和不定根，借此建立的基因转化受体系统为麝香百合进一步基因

表 3 胚性愈伤组织卡那霉素敏感性试验

Table 3 The sensibility of the embryogenic calli to danmycin

卡那霉素质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	愈伤组织接种数	褐变愈伤组织数	褐变率/%
0	80	0	0
25	80	7	8.75
50	80	27	33.75
75	80	66	81.25
100	80	80	100

表 4 胚性愈伤组织潮霉素敏感性试验

Table 4 The sensibility of the embryogenic calli to hygromycin

潮霉素质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	愈伤组织接种数	褐变愈伤组织数	褐变率/%
0	80	1	1.25
10	80	29	36.25
20	80	74	92.50
20	80	80	100
40	80	80	100

转化奠定了良好基础。

在愈伤组织分化过程中, BA 作用较为明显, 但浓度不当的 BA 易引起植物细胞突变。同时, BA 浓度过高会抑制胚状体发育, 产生较多丛生苗和玻璃苗。为避免其不利影响, 我们以 KT 和 NAA 组合进行了相关实验, 结果表明, KT 对麝香百合愈伤组织的分化效果明显, 不仅分化率较高而且小苗生长健壮, 可以取代 BA 应用于愈伤组织分化系统中。

参考文献:

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程和原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 汪政科, 彭镇华. 观赏植物基因工程研究进展[J]. 林业科学研究, 2000, 13 (1): 97—102.
- [3] 邵莉, 李毅, 杨美珠, 等. 查耳酮合酶基因对转基因植物花色和育性的影响[J]. 植物学报, 1996, 28 (7): 517—524.
- [4] Panizza M, Sodi A M, Tognoni F. Effects of various factors on in vitro propagation of *Lilium speciosum* and *Lilium longiflorum* [J]. *Adv in Hort Sci*, 1990, 4 (2): 103—106.
- [5] 丁兰, 刘国安, 田卫东, 等. 新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2001, 37 (1): 80—82.
- [6] 罗凤霞, 徐桂华, 金丽丽, 等. 新铁炮百合微繁的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31 (3): 254—257.
- [7] 王俐, 李枝林, 赵燕. 百合的组织培养及快繁技术[J]. 云南农业大学学报, 2001, 16 (4): 304—307.
- [8] 孙君社, 方晓华. 植物激素对百合鳞片愈伤组织生长的影响[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6 (2): 58—61.
- [9] Duong T N, Bui V L, Michio T, *et al.* Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissues of *Lilium longiflorum* [J]. *Sci hortic*, 2001, 87 (1—2): 131—138.
- [10] Enomoto S, Itoh H, Ohshima M, *et al.* Induced expression of a chimeric gene construct in transgenic lettuce plants using tobacco pathogenesis-related protein gene promoter region. *Plant Cell Rep*, 1990, 9 (1): 6—9.

Establishment of gene transformation acceptor system of embryogenic callus in lily

TANG Dong-qin¹, QIAN Hong-mei², HUANG Dan-feng¹, TANG Ke-xuan²

(1. The Agricultural and Biology School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China;

2. FUDAN-SJTU-DOTTINGHAM Plant Biotechnology R & D Center, Shanghai 200030, China)

Abstract: To establish stable and efficient gene transformation acceptor systems of embryogenic callus in lily (*Lilium longiflorum*), experiments of the embryogenic callus induction, plant regeneration and the sensibility of embryogenic callus to several antibiotic are conducted with the flower filaments as explants. The optimum medium for induction and proliferation of embryogenic callus of lily is MS plus BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the optimum medium for bud differentiation is MS plus KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The findings of experiment of the sensitivity of antibiotic for embryogenic callus show that the selection concentrations of kanamycin, hygromycin and cefotaxime are $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. [Ch, 4 tab. 10 ref.]

Key words: tissue culture; *Lilium longiflorum*; embryogenic callus; antibiotics