

亚洲百合遗传转化受体系统的建立

李小玲, 刘雅莉, 王跃进, 华智锐, 陈 远

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 以亚洲百合“精粹”(*Lilium Asiatic 'Elite'*) 的鳞片、再生形成的叶片和鳞片叶为外植体, 进行了不定芽的诱导分化、试管苗小鳞茎诱导、卡那霉素抗性筛选等研究, 建立了亚洲百合遗传转化受体系统。结果表明: 鳞片诱导最佳分化培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 试管苗小鳞茎诱导培养基为 MS+IBA 0.5 mg/L+70 g/L 蔗糖, 试管苗叶片分化培养基为 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 试管苗鳞片叶分化培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L。抗生素敏感性试验表明, 百合叶片的卡那霉素选择压为 80 mg/L, 鳞片叶为 115 mg/L。

关键词: 亚洲百合; 遗传转化; 受体系统

中图分类号: S682.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2007)01-0219-06

建立高效稳定的基因转化离体再生系统即基因转化的受体系统, 是转基因育种的基础。对百合转基因受体系统的研究虽然已有报道, 但采用材料均为东方百合, 以亚洲百合合作受体材料目前尚未见报道。这主要是因为亚洲百合长势较弱, 叶片细长, 小鳞茎较少且小, 建立良好的受体系统更为复杂。本研究以亚洲百合为材料, 通过增加试管苗小鳞茎诱导、在激素组合中选用 TDZ 代替通常使用的 6-BA 等方法, 探索建立亚洲百合基因转化直接分化受体系统, 取得了理想效果, 为亚洲百合转基因育种奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 亚洲百合品种“精粹”(*Lilium Asiatic 'Elite'*), 来自西北农林科技大学园艺学院种质资源圃。

1.1.2 培养基与培养条件 所有培养基选用 MS (Murashige and shoo) 为基本培养基, 附加不同种类和浓度的生长素与细胞分裂素。pH 值为 5.8, 温度为 25℃, 光强 1 200~1 300 lx, 光照 12 h/d。

1.2 方 法

1.2.1 鳞片上不定芽的诱导 将剥除的鳞茎片用洗衣粉洗净后, 在流水中冲洗 30 min 以上, 随后放入无菌容器中, 用浓度为 70% 的酒精浸泡 30 s, 在超净工作台上用 0.1% 的升汞 (HgCl₂) 消毒 10 min 左右, 再用无菌水冲洗 6~8 次, 然后用解剖刀切成

0.5 cm² 的小块, 凹面朝上接种在 不定芽诱导培养基上。鳞片不定芽诱导培养基分为 6 种: 即 MS+6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L)+NAA(0.1、0.2 mg/L)+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L, 培养 45 d 左右统计不定芽分化情况。

1.2.2 试管苗小鳞茎诱导 将百合无菌苗接种在附加不同蔗糖浓度的小鳞茎诱导培养基上。小鳞茎诱导培养基为 MS+IBA 0.5 mg/L, 蔗糖浓度分别为 30、40、50、60、70、80 g/L, 光照强度为 1 500 lx, 30 d 左右观察小鳞茎的诱导情况。

1.2.3 叶片和鳞片叶离体再生 鳞片外植体接种后 2 个月左右将鳞片上分化的小植株的叶片切成长为 1 cm 的小段, 接种在叶片分化培养基上, 从除去叶片的试管苗的小鳞茎上剥取鳞片叶, 接种在鳞片叶分化培养基上。两种分化培养基均添加蔗糖 30 g/L、琼脂 7.0 g/L, pH 5.8, 30 d 左右统计叶片和鳞片叶的分化情况。

1.2.4 卡那霉素抗性筛选 根据以上结果, 在叶片再生培养基和鳞片叶再生培养基中分别添加 0、30、50、60、70、80、100、115、125、135、145、155、165、175 mg/L 等 14 种不同浓度的卡那霉素进行抗生素敏感性测定。30 d 统计外植体褐变及分化情况。

2 结果与分析

2.1 鳞片不定芽的分化

将百合鳞片接种到不定芽诱导培养基上以后, 约 2~3 周在一些外植体的边缘出现小突起, 基部开

收稿日期: 2006-09-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371013)

作者简介: 李小玲(1980-), 女, 陕西省蓝田县人, 硕士研究生, 研究方向为园林植物生物技术研究。

通讯作者: 刘雅莉(1960-), 女, 硕士, 主要从事鲜切花采后生理和育种研究。

始增厚变绿, 45 d 左右发育成为丛生芽。从表 1 可以看出, 亚洲百合“精粹”在 MS 培养基中添加 2.0

mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 最有利于不定芽的分化。

表 1 不同激素组合对百合鳞片不定芽分化的影响

Table 1 The effect of different hormone combinations on the differentiation of adventitious buds from the scales of lily

激素组合 Hormone combination (mg/L)	接种数 No. of inoculated scale	分化不定芽块数 No. of scale which formed adventitious bud	分化率 Differentiation rate (%)
6-BA1.0+NAA0.1	24	5	20.8
6-BA1.0+NAA0.2	24	6	25.0
6-BA2.0+NAA0.1	39	9	23.1
6-BA2.0+NAA0.2	24	15	62.5
6-BA3.0+NAA0.1	23	7	30.4
6-BA3.0+NAA0.2	21	8	38.1

2.2 亚洲百合小鳞茎的诱导

本实验将百合无菌苗接种在附加不同蔗糖浓度的小鳞茎诱导培养基上。结果表明:随着蔗糖浓度的升高, 诱导的小鳞茎个数增高, 且小鳞茎较厚实, 提高了转基因受体的质量。(见图 1)

2.3 叶片和鳞片叶不定芽的分化

将由鳞片离体再生的无菌苗小植株取出, 将叶片切成 1 cm 长的小段, 接种于附加不同激素的分化培养基上, 30 d 左右统计分化情况, 结果见表 2。



图 1 不同蔗糖浓度的小鳞茎诱导

Fig. 1 The effect of different sucrose concentration on the induction of small bulbils

由表 2 可以看出, 不同激素组合对百合小叶片诱导有不同的影响。在诱导叶片分化不定芽时, 以 TDZ 与 NAA 组合效果较好。当 TDZ 浓度为 1.0 mg/L 时, NAA 不同浓度之间或 2, 4-D 不同浓度之间的差异较显著, 且分化率比 TDZ 浓度为 2.0 mg/L 时高。结果表明, 诱导叶片分化率最高的激

素组合为 MS+TDZ 1.0+NAA 0.2 mg/L。实验还发现叶片的不同部位和切取的长度也影响再生率。

通过附加实验观察接种叶片部位、外植体大小对分化影响, 发现接种叶片基部的叶段 5 周左右开始分化子球, 繁殖系数高, 鳞茎再生率高, 易分化成苗, 且鳞茎的直径较大, 生长健壮; 叶片中部的叶段

分化子球较晚,成苗较难;叶片尖部基本不能分化子球。外植体的大小也影响分化率,在 MS+TDZ 1.0 +NAA 0.2 mg/L 的培养基中,与叶片切段为 1~2 cm 左右时的分化率 90.6%相比,当叶片切段为 5~8 mm 左右时,分化率仅为 29%且每个叶段分化的

子球数也随之减少,说明叶片切段的大小对分化率也有很大的影响。

将去除叶片的百合鳞茎剥取其鳞片叶分别接种在附加不同激素浓度的分化培养基中,30 d 左右统计分化情况,结果见表 3。

表 2 不同激素组合对叶片不定芽分化的影响

Table 2 The effect of different hormone combinations on the differentiation of adventitious buds from the leaves of lily

编号 Code	激素组合 Hormone combinations(mg/L)			接种数 No. of inoculated scale	分化芽的块数 No. of explants which formed buds	分化率 Differentiation rate (%)
	TDZ	NAA	2,4-D			
1		1.0	—	32	23	71.9
2		0.2	—	32	29	90.6
3	1.0	0.3	—	36	19	52.8
4		—	0.1	28	10	37.9
5		—	0.2	36	14	41.7
6		—	0.3	27	13	51.9
7		0.1	—	29	13	44.8
8		0.2	—	28	22	78.6
9	2.0	0.3	—	32	14	46.9
10		—	0.1	33	16	51.5
11		—	0.2	32	4	15.6
12		—	0.3	33	12	39.4

表 3 不同激素组合对鳞片叶不定芽分化的影响

Table 3 The effect of different hormone combinations on the differentiation of adventitious buds from the scales of lily

编号 Code	激素组合 Hormone combinations(mg/L)			接种数 No. of inoculated scale	分化芽的块数 No. of explants which formed buds	分化率 Differentiation rate (%)
	6-BA	NAA	2,4-D			
1		1.0	—	48	45	93.8
2		0.2	—	47	42	89.4
3	1.0	0.3	—	47	44	93.6
4		—	0.1	45	41	91.1
5		—	0.2	52	49	94.2
6		—	0.3	48	37	77.1
7		0.1	—	52	48	92.3
8		0.2	—	51	51	100
9	2.0	0.3	—	50	43	88.0
10		—	0.1	49	49	100
11		—	0.2	53	48	90.6
12		—	0.3	39	36	92.3

从表 3 看出,鳞片叶在 2.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的培养基上与 2.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L 2,4-D 的培养基上分化率相同,均为 100%,但是后者鳞片叶上分化的不定芽数显著多于前者,因此在供试培养基中,MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 培养基最有利于百合试管苗鳞片叶不定芽的分化。

2.4 卡那霉素抗性筛选

在遗传转化中,常将外源待转化基因与某一抗性筛选标记构建在同一转化质粒上,然后用相应的抗生素来进行筛选。合适的抗生素浓度要能抑制或杀死非转化细胞又不能抑制转化细胞的正常生长。本实验将百合外植体接种在不同浓度卡那霉素筛选培养基上,30 d 后观察褐变情况。

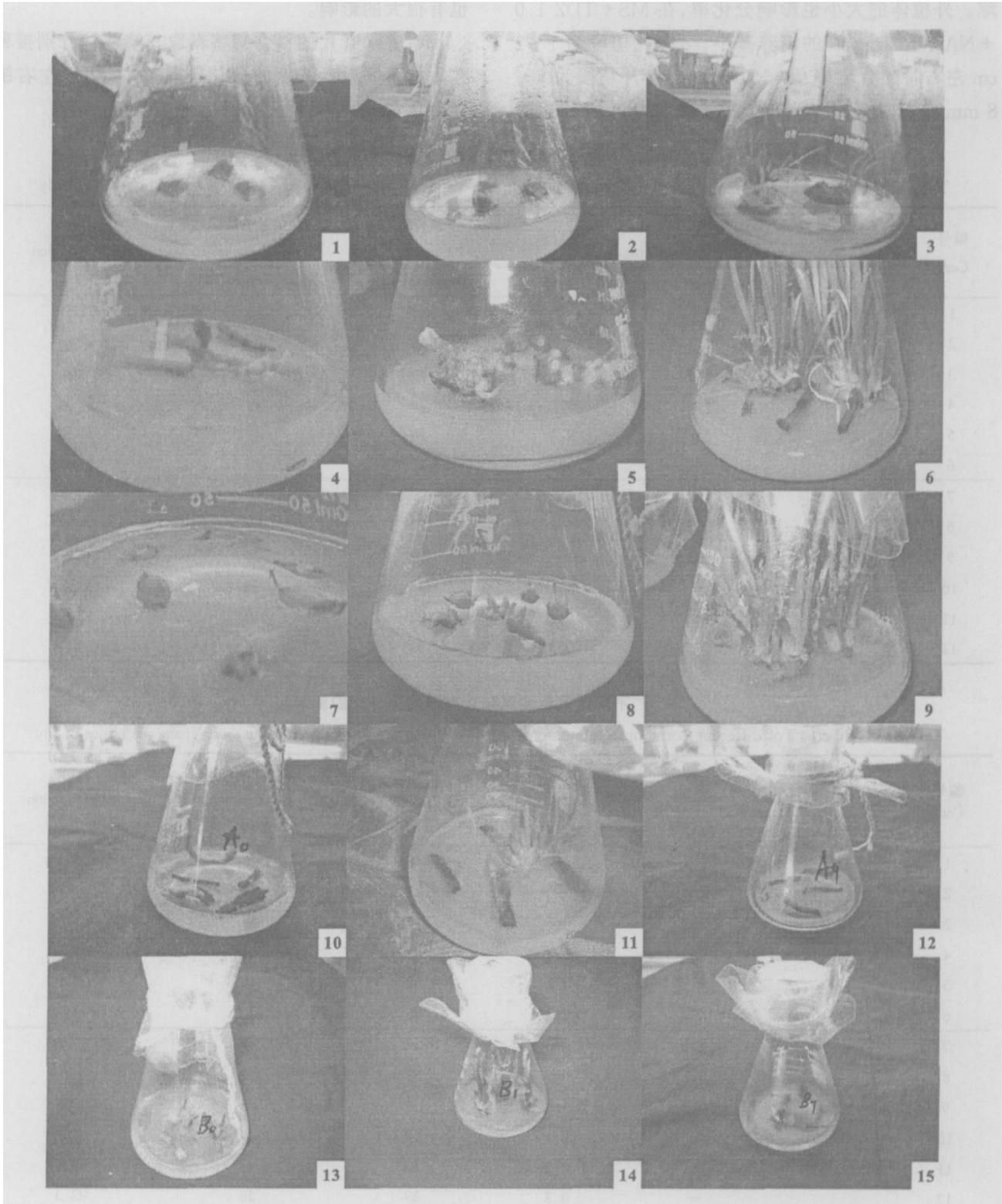


图 2 百合遗传转化受体系统建立

Fig. 2 Establishment of the acceptor system for the gene transformation of lily

1~3. 百合鳞片诱导不定芽; 4~6. 试管苗叶片分化不定芽; 7~9. 试管苗鳞片叶分化不定芽; 10~12. 试管苗叶片卡那霉素筛选结果: 0、30、80 mg/L 卡那霉素筛选结果; 13~15. 试管苗鳞片叶卡那霉素筛选结果: 0、30、115 mg/L 卡那霉素筛选结果。

1~3. The differentiation of adventitious buds from the scales of lily; 4~6. Cluster shoots differentiating from the leaves of the test-tube plantlets; 7~9. Cluster shoots differentiating from scales of the test-tube plantlets; 10~12. The results of kanamycin-resistant screen on petioles—0、30、80 mg/L; 13~15. The results of kanamycin-resistant screen on scales—0、30、115 mg/L.

表 4 亚洲百合叶片和鳞片叶对卡那霉素的抗性

Table 4 The resistance of the leaf piece and bulbil of lily to Kanamycin

卡那霉素浓度 Concentration of Kanamycin (mg/L)	叶片 Leaf				鳞片叶 Bulbil			
	接种数 No. of inoculated explants	褐变率 Rate of brown piece (%)	分化芽的块数 No. of explants which formed buds	分化率 Differentiation rate (%)	接种数 No. of inoculated explants	褐变率 Rate of brown piece (%)	分化芽的块数 No. of explants which formed buds	分化率 Differentiation rate (%)
0	40	0	35	87.5	36	0	36	100
30	39	68	10	25.6	40	5	38	95
50	40	71	7	17.5	40	15	30	75
60	40	73	6	15	40	23	21	53
70	40	73	4	10	36	25	15	42
80	40	78	1	2.5	36	69	4	11
100	40	85	0	0	36	83	1	2.8
115	40	100	0	0	39	90	1	2.6
125	40	100	0	0	40	100	0	0
135	40	100	0	0	40	100	0	0
145	32	100	0	0	36	100	0	0
155	40	100	0	0	40	100	0	0
165	40	100	0	0	40	100	0	0
175	40	100	0	0	40	100	0	0
185	40	100	0	0	36	100	0	0

由表 4 可以看出,在添加卡那霉素的培养基上,叶片和鳞片叶的分化率均低于对照,随着卡那霉素浓度的升高,叶片和鳞片叶均表现分化率降低和褐化率升高。在 30 mg/L 卡那霉素浓度下,叶片有 68% 的褐化,同时分化率由对照不加卡那霉素处理的 87.5% 下降为 25.6%,而鳞片叶在相同浓度下仅有 5% 发生褐变,且分化率为 95%;卡那浓度达到 100 mg/L 时,叶片 100% 褐变且分化率降为 0%,鳞片叶在相同浓度下仅有 83% 发生褐变,且分化率为 2.8%;在 80 mg/L 的浓度下,叶片分化率为 2.5%,说明叶片作为转基因的受体材料时,卡那霉素以 80 mg/L 作为其亚致死浓度。鳞片叶在 125 mg/L 的卡那浓度下分化率降为 0%,而在 115 mg/L 的浓度下,分化率为 2.6%,说明鳞片叶作为转基因的受体材料时,卡那霉素的亚致死浓度为 115 mg/L。通过对比可以看出,鳞片叶耐受卡那霉素的浓度高于叶片。

3 讨论

百合再生能力强,有很多品种通过组织培养获得了再生植株,为基因转化奠定了基础。但在百合基因转化受体系统的建立上,多以东方百合品种为材料,亚洲百合目前尚未见报道,且本实验发现:(1)亚洲百合鳞片离体再生能力比其它品系的百合品种较差,再生率较低。因此在建立高效稳定的再生体

系上有一定的难度。(2)亚洲百合长势较弱,叶片细长,小鳞茎较少,为了建立良好的基因转化受体系统,需要诱导试管苗形成较多而且鳞片叶厚大的小鳞茎,本研究解决了以上几个问题,为后面的基因转化奠定了基础。

目前报道的百合转基因研究,主要采用愈伤组织作为基因转化的受体材料^[1,2],愈伤组织在分化的过程中容易产生变异。也有学者采用室外生长的鳞茎的鳞片^[3],通过表面消毒作为受体材料,该方法的缺点是污染率高,并且表面消毒对材料有一定的伤害,造成外植体褐变,且取材受季节的限制。本实验采用试管内叶片和鳞片叶直接作为转化的受体材料,可避免愈伤组织分化过程中变异的发生,没有外植体污染的问题,且一年四季均可取材,可望提高转化效率。

在叶片不定芽分化激素组合的选择上,大多数研究认为细胞分裂素以 6-BA 为最佳^[4]。本研究选择 TDZ 代替 6-BA,发现 TDZ 与 NAA 组合下叶片的分化率都比较高,最高达 90.6%,比 6-BA 与 NAA 组合提高了 60% 左右,且小苗生长健壮。这可能是由于 TDZ 比 6-BA 有更高的细胞分裂素活性,有利于不定芽诱导。据此判断 TDZ 可以取代 6-BA 应用于叶片再生。

参 考 文 献:

- [1] Watad A A, Yun DJ, Matsuromoto T, et al. Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum* [J]. *Plant cell Rep*, 1998, 17: 209—214.
- [2] Lipsky A, Cohen A, Gaba V, et al. Transformation of *Lilium longiflorum* Plants for Cucumber Mosaic Virus resistance by particle bombardment [J]. *Acta Hort*, 2002, 568: 209—214.
- [3] Cohen A, Meredith C P. Agrobacterium-Mediated transformation of *Lilium* [J]. *Acta Hort*, 1992, 325: 611—618.
- [4] 王 燕. 百合基因转化直接分化受体系统的建立 [J]. *西北植物学报*, 2005, 25(11): 2183—2188
- [5] 孟 芮. 百合遗传转化受体系统的建立 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, 34(4): 32—38.
- [6] 唐东芹, 钱虹妹, 黄丹枫, 等. 百合基因转化胚性愈伤组织受体系统的建立 [J]. *浙江林学院学报*, 2003, 20(3): 273—276.
- [7] 余桂红, 周森平, 马鸿翔, 等. 百合农杆菌介导的遗传转化受体系统的建立 [J]. *江西农业学报*, 2004, 16(2): 15—19.

Establishment of the acceptor system for the gene transformation of *Lilium* Asiatic hybrids

LI Xiao-ling, LIU Ya-li^{*}, WANG Yue-jin, HUA Zhi-rui, CHEN Yuan

(College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yang ling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Using scales and petioles of *Lilium* Asiatic hybrid as the study subject, the acceptor system for the gene transformation of *Lilium* Asiatic hybrids was established. The results showed that the medium suitable for inducing the scales to differentiate Adventitious buds was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, the medium suitable for small bulb induction was MS+IBA 0.5 mg/L+Sucrose 70 g/L, the medium suitable for the leaves of the test-tube plantlets to differentiate adventitious buds was MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, and the medium suitable for the scale leaves of the test-tube plantlets to differentiate adventitious buds was MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L. The concentrations of the antibiotics for different parts of the test-tube plantlets in their cultures were determined, the concentration of Kanamycin for the petioles was 80 mg/L and for the scales 115 mg/L.

Keywords: *Lilium* Asiatic; gene transformation; acceptor system