

# 生物技术在百合育种上的应用

樊金萍, 王洪亮

(东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 生物技术在百合上的应用主要包括以下几个方面: 利用植物离体培养技术成功建立了百合快速繁殖体系和脱毒苗生产技术程序; 利用胚胎拯救技术克服了百合杂交前后障碍获得百合新品种; 蛋白质分子标记、DNA 分子标记在百合的初步应用; 通过农杆菌介导法、基因枪法、电激法等进行百合的遗传转化, 并通过基因枪法成功地获得了百合转基因的植株。

**关键词:** 百合; 快速繁殖; 胚胎拯救; 遗传转化; 分子标记

**中图分类号:** S682.2<sup>+</sup>9; S603.6 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1001-0009(2005)01-0073-03

百合(*Lilium* spp.)是世界著名的切花之一。具有很高的观赏价值, 自 Robb 离体培养百合鳞茎成功以来, 生物技术在百合上的应用已取得显著的进展。百合通常所采用的鳞茎繁殖技术, 不仅繁殖率低, 而且易受病虫害侵害, 应用植物组织离体培养技术可有效地进行百合的快速繁殖和脱毒苗生产, 从而促进了百合的商品化生产。在百合的传统育种中, 常存在受精前后障碍, 影响育种效率, 利用胚胎拯救技术可克服百合受精前后障碍, 已成功获得多个百合杂种, 其中东方杂种系×亚洲杂种系杂交种的获得是百合育种方面的重大突破。随着分子生物学技术的发展, 为百合的遗传改良提供了崭新的途径。利用分子标记技术可进行百合的分类、遗传图谱构建和居群结构分析。正在起步的百合遗传转化研究进展也十分迅速, 已进行了多种遗传转化方法的尝试, 其中通过基因枪法成功获得了百合转基因植株。本文就当前百合在快速繁殖、脱病毒、胚胎拯救、分子标记、遗传转化等方面的应用研究进展进行综述。

## 1 快速繁殖

离体培养技术是植物生物技术应用最广泛的一个方面。利用植物离体培养技术, 进行离体繁殖, 成功建立了百合的快速繁殖体系。

### 1.1 外植体

用于百合快速繁殖的外植体有鳞片、叶片、茎尖、珠芽、花梗、花丝、花瓣、花托、胚胎等, 其中以鳞片最常用。鳞片切块培养可增加单位鳞片产生的小鳞茎数量。鳞片沿纵轴横切,

基部的切块较顶部的切块诱导的小鳞茎数量多, 且重量大。近年来花丝、花托等花器官的离体培养区应用于百合的快速繁殖。Arzate 等以麝香百合(*L. longiflorum*)的花丝为外植体, 通过诱导愈伤组织再分化再生植株, 未发现遗传变异。Nhut 等用百合的花梗、花托、花瓣、花柱、子房、雌蕊等外植体进行离体培养, 结果花托最易成活, 芽诱导率最高, 并成功应用于麝香百合和天香百合(*L. auratum*)的快速繁殖。

### 1.2 再生植株途径

百合快速繁殖通过器官发生或体细胞胚胎发生途径再生植株。百合鳞片、茎尖、叶片、花梗、花托等外植体可直接诱导小鳞茎或不定芽再生植株。百合鳞片切块接种在含不同激素配比的 MS 培养基上, 鳞片基部近轴面或边缘直接形成带根的小鳞茎。外植体也可通过愈伤组织再分化小鳞茎或不定芽再生植株。Goto 等将百合茎尖接种在含 Picloram(1 mg/L(毫克/升))的 MS 培养基上, 建立了细胞悬浮培养。继代 4 年后, 细胞悬浮培养物仍有较高的不定芽发生能力, 1 g(克)培养物每年可产生约 45×1010 棵小植株, 再生的植株未发现遗传变异。鳞片、花梗、花丝、雌蕊等外植体诱导的愈伤组织还可通过体细胞胚胎发生途径再生植株。Tribulato 等培养百合的雌蕊、花托切段获得两种愈伤组织: 一种是紧实、易器官分化的; 另一种是疏松、器官分化较少的。由后一种愈伤组织建立了细胞悬浮培养, 6 个月后产生类似胚胎的结构, 转移至无激素的固体培养基上, 萌发为完整植株。在百合鳞片的切块培养中还发现了直接的体细胞胚胎发生, 鳞片经 2, 4-D 预培养后, 转入无激素的 MS 培养基上, 鳞片表面可直接产生体细胞胚胎。

### 1.3 培养基和激素

百合快速繁殖使用的基本培养基有 MS、LS、SH、N<sub>6</sub>、B<sub>5</sub>、Hypox 等, 其中最常用的是 MS 培养基。Joung 等研究了基本培养基对百合小鳞茎形成的影响, MS 培养基较 Hypox 培养基诱导的小鳞茎多, 且再生植株叶绿素含量较高。

Lim 等以 MS 为基本培养基, 探讨光照、糖浓度、总盐浓度对百合小鳞茎形成的影响。在 16 h(小时)光照、30 g/L(克/升)蔗糖的条件下, 1.5MS 促进小鳞茎的数量增加; 而在连续黑暗、90 g/L(克/升)蔗糖的条件下 1/4MS 则获得最大的鳞茎生长。Tanimoto 等研究了多胺对麝香百合鳞片培养的影响, 多胺显著促进小鳞茎的诱导, 其中效果最好的是精胺。

在百合的快速繁殖中, 应用的激素有: BA、KT、TDZ、IAA、NAA、IBA、BR、2, 4-D、Dicamba、Picloram 等。Haensch 等将不同基因型的百合接种在含 2, 4-D 或 Picloram 的 MS 培养基上, 在 23 个百合杂种中, 仅 4 种获得了体细胞胚胎, 2, 4-D 诱导体细胞胚胎的效果要比 Picloram 好。Han 等认为, 高浓度的 BA 抑制小鳞茎的形成, BA 配合 IAA 比单独使用 BA 诱导小鳞茎的效果好, BA(2 mg/L(毫克/升))配合 IAA(0.1 mg/L~1 mg/L(毫克/升))小鳞茎增殖最多。Ohkawa 等研究了 BR 和 NAA 对鳞片培养的影响, BR(0.1 mg/L(毫克/升))诱导的不定芽最多, 而 BR(0.01 mg/L(毫克/升))配合 NAA(0.1 mg/L(毫克/升))不仅有利于小鳞茎的诱导, 而且有利于小鳞茎的生根。

## 2 脱病毒

离体培养技术不仅可以促进百合快速繁殖, 而且可有效



**第一作者简介:** 樊金萍, 女, 1972 年生, 1995 年毕业于东北农业大学园艺学院, 后获硕士学位, 现工作于东北农业大学园艺学院园林系, 讲师, 主要从事花卉栽培及园林植物育种工作, 发表论文 6 篇, 出版编著 2 部。

收稿日期: 2004-10-18

地除去病毒,获得无毒百合苗。百合的病毒病主要由 CMV、LSV 和 TBV 等引起的,可采用茎尖培养、热处理、化学疗法等方法脱除病毒。通过离体培养技术,以色列成功建立了百合的脱毒程序。

百合通过茎尖培养, TBV、CMV、LSV 等病毒的检出率可降至 7% 以下,可有效地脱除病毒。在百合离体培养过程中采用化学疗法也可脱除病毒。Xu 等将感染了 CMV、LSV、TBV 的百合鳞片接种于含病毒唑或二硫脲嘧啶的培养基上,随培养时间的延长,病毒浓度降低,约 40% 再生的小鳞茎可脱除病毒。百合离体培养过程中加入抗病毒抑制剂 DHT,可有效的去除 CMV 和 LSV,并且对芽的分化影响很小。Xu 等比较了化学疗法和热处理配合脱除病毒的效果。鳞片培养在含病毒唑的培养基上,保持 35℃ 高温 4 周,脱毒效果比单独使用化学疗法或热处理的效果好。

### 3 杂种胚胎的拯救

自 1963 年 Emsweller 首次在东方百合上应用胚胎培养技术成功以来,许多百合的新品种通过胚胎培养技术获得成功。百合的远缘杂交常发生受精前或受精后障碍,影响了育种效率。目前采用柱头切割、柱头嫁接、子房切片培养、胚珠培养、胚培养等方法克服了百合远缘杂交授粉前后障碍。荷兰的植物育种与繁殖研究中心(CPRO-DLO)应用上述方法得到了一些百合杂种,如麝香百合×鳞茎百合(*L. bulbiferum*),麝香百合×白花百合(*L. candidum*),麝香百合×涅丹(*L. concolor*),麝香百合×毛百合(*L. dauricum*) 麝香百合×湖北百合(*L. henryi*),麝香百合×星叶百合(*L. martraon*),麝香百合×亚洲杂种系,麝香百合×东方杂种系,麝香百合×红花百合(*L. rubellum*),麝香百合×加拿大百合(*L. candense*),东方杂种系×亚洲杂种系,湖北百合×白花百合等。这些杂种为百合新品种的培育奠定了基础,特别是东方杂种系×亚洲杂种系杂交种的获得是百合育种方面的重大突破。

### 4 分子标记

随着分子生物学的发展,分子标记技术得到了迅速发展。与传统的形态标记相比,分子标记显示其独特的优越性。近年来,分子标记技术也开始应用于百合。

#### 4.1 蛋白质标记

在蛋白质多态性基础上发展的分子标记称为蛋白质标记,它包括酶蛋白标记和非酶蛋白质标记。酶作为分子标记是在同工酶的概念提出后发展起来的。Arzate 和 Okazaki 等把同工酶标记应用于鉴别百合离体培养再生植株的变异,同工酶的结果与 PCR 的分析一致。Jeong 等用酯酶、过氧化物酶的同工酶谱分析了百合的轮生叶的变异。周厚高等利用 9 个等位酶系统的 14 个基因位点资料对 8 个百合品种的亲缘关系进行了分析,等位酶数据聚类分析结果与形态学的分类结果基本一致。鳞片贮藏蛋白存在多态性,也可作为分子标记。Booy 等应用等电聚焦技术分析百合鳞片蛋白质的多态性,建立了鉴别百合栽培品种的程序。84% 的百合栽培品种显示了独特的谱带,谱带的特征不受鳞茎生长和贮藏的环境影响。

#### 4.2 DNA 分子标记

DNA 分子标记是在 DNA 水平上遗传多态性的直接反映。自 20 世纪 90 年代以后,由于 PCR 技术的广泛应用,

RAPD、RFLP 等 DNA 分子标记技术得到了迅速发展,在百合上也得到了初步的应用。

4.2.1 RAPD 标记 RAPD 标记是指随机扩增的多态性 DNA,它以一个 10 碱基任意序列的寡核苷酸片段引物在未知序列的基因组 DNA 上进行随机的 PCR 扩增。RAPD 标记能灵敏地揭示两个亲缘关系相近的个体之间的遗传变异,可应用于百合分类、居群遗传结构分析、基因定位和遗传图谱构建等。1993 年 Lee 等应用 RAPD 技术对百合进行分类,根据 15 个多态性的标记对韩国的百合进行了分组。1995 年 Yamagishi 等用 RAPD 标记对百合属植物进行了种和种间杂种的鉴定,分析了 13 个种、9 个组内杂种和 7 个组间杂种共 37 个样品。从 58 个随机引物和 18 个半随机引物中,筛选出 9 个随机引物和 9 个半随机引物,用 RAPD 标记可以很容易将这些百合区分开来。Persson 和 Wen 等用 RAPD 标记分析了星叶百合和麝香百合居群内和居群间的遗传变异。Muisers 等从 278 个 RAPD 标记中找到 1 个与百合花的寿命基因紧密连锁的 RAPD 标记。荷兰的植物育种与繁殖中心开发了 RAPD 分子标记系统,找到了与镰刀菌抗性基因连锁的 RAPD 分子标记,并构建百合的遗传图谱。

4.2.2 PCR-RFLP 标记 PCR-RFLP 标记是对 PCR 扩增的 DNA 片段进行限制性酶切位点分析。Haruki 等用 20 种限制性内切酶对 9 个百合品种的叶绿体 DNA 的 *rbcl* 基因和核 DNA 的 *rRNA* 基因进行 PCR-RFLP 分析,将这些百合分为 6 个组。PCR-RFLP 标记还可应用于百合种间杂种亲本的鉴定。

### 5 遗传转化

自 1983 年首次获得转基因植物以来,植物遗传转化研究发展十分迅速。百合的遗传转化工作起步较晚,仅有少数成功的报道,目前的研究工作主要集中在遗传转化技术和基因表达调控等方面。

#### 5.1 遗传转化技术

5.1.1 农杆菌介导法 农杆菌介导的遗传转化是通过感染将农杆菌所带的经过或未经过改造的 T-DNA 导入植物细胞,引起相应的植物细胞的可遗传变异。百合是单子叶植物,传统观念认为单子叶植物不是农杆菌的有效寄主。但近年的研究表明,农杆菌系统也可成功应用于单子叶植物的基因转化。1992 年 Cohen 等首次报道了利用农杆菌介导法对单子叶植物的百合进行遗传转化。鳞片切段与致癌农杆菌菌株 C58 共培养,得到瘤状突起,并在愈伤组织中检测到冠瘿碱基因的表达。Langeveld 等把几种农杆菌菌株接种到百合植株上,接种后百合的茎间产生肿瘤组织,GUS 标记基因得以表达,表明百合是农杆菌的寄主。

5.1.2 电激法 又称电激穿孔法。它利用高压放电产生的脉冲使细胞膜产生可逆的“微孔”从而使外源 DNA 等大分子通过这一通道进入细胞。电激法最早应用于原生质体的转化。Miyoshi 等以百合花粉原生质体为受体,用电激法导入 GUS 基因,得到了瞬时表达。但原生质体再生植株困难,近年来不少学者避开原生体再生途径,利用电激法直接转化带壁的植物组织或细胞。Wu 等将百合的鳞片组织质壁分离,通过电激法将 GUS 和 GFP 基因直接导入,在百合鳞片组织中得到 GUS 和 GFP 基因瞬时表达。

# 影响甘蓝型油菜下胚轴外植体芽高频再生因素

祁星华, 王 轶, 罗 勤, 李旭锋

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

**摘要:**以优质高产杂交油菜新品种“蜀杂九号”父本 84100-18 (*Brassica napus* L.) 油菜品系的下胚轴为外植体, 分析讨论了预培养、苗龄、激素浓度、 $\text{AgNO}_3$  等因素对下胚轴的再生条件的影响。试验表明: 7 d~9 d(天)的苗龄的外植体出愈率很高; MS+3 mg/L(毫克/升) 6-BA 时芽的分化率最高;  $\text{AgNO}_3$  可提高下胚轴芽的分化率; 提高琼脂浓度, 降低蔗糖含量可以减少玻璃化现象。

**关键词:**愈伤组织; 下胚轴; 预培养; 玻璃化; 再生植株

**中图分类号:** S635.903.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2005)01-0075-02

自 20 世纪 70 年代起对油菜的组织培养已经进行了较多研究, 已用多种外植体获得了再生植株<sup>[1]</sup>。进一步进行外源基因转化是以高频率的植株再生为基础, 因此影响植株再生频率的因素具有重要意义。很多研究发现, 激素组配和培养条件是影响油菜外植体再生频率的因素<sup>[2]</sup>, 而且许多研究结果存在着很大差异甚至是相互矛盾的。这就给油菜高频再生技术提出了更高的要求。本实验便以油菜下胚轴为外植体讨论芽再生的影响因素。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以甘蓝型油菜(*Brassica napus*)的优质高产杂交油菜新品种“蜀杂九号”的父本 84100-18 作为转化的受体材料, 其种子由四川大学赵云、王茂林老师惠赠。

### 1.2 培养基

以 MS(大量元素+微量元素+有机质+铁盐+3%蔗糖+0.8%琼脂)培养基为基本培养基, 预培养基、诱导愈伤培养基、分化培养基及生根培养基附加不同浓度的 6-BA (6-Benzylaminopurine); NAA(Naphthaleneacetic acid); 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)的激素组合。

### 1.3 方法

收稿日期: 2004-10-10

1.3.1 无菌苗的获得 将油菜种子用 70% 乙醇浸泡 30 s(秒), 0.1% 的升汞溶液浸泡 10 min(分钟), 无菌水冲洗 5~6 次, 接种于 MS 固体培养基上, 置培养室中 26℃~28℃下、光照 16 h/d(小时/天)萌发。

1.3.2 培养方法 切取无菌苗下胚轴(0.5 cm~1 cm(厘米))接入含有不同浓度的 6-BA、2,4-D、NAA 的预培养基, 诱导愈伤培养基和分化培养基中, 选择性加入 6 mg/L(毫克/升)  $\text{AgNO}_3$ , 在 16 h/d(小时/天)光照、26℃~28℃条件下培养, 观察结果。

### 1.4 生根和移栽

将分化培养基中诱导出的芽接种在 1/2MS+0.2 mg/L(毫克/升)NAA 培养基中诱导生根, 观察结果。然后将生根的小植株经过 3 d~5 d(天)的炼苗, 然后小心取出, 洗去根上附着的培养基, 将其移到装有腐殖土的花盆中。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 小苗的龄期对愈伤组织诱导的影响

分别取 4 d~11 d(天)龄无菌苗下胚轴, 接种于 MS+1 mg/L(毫克/升) 2,4-D+4 mg/L(毫克/升) 6-BA(激素浓度为本实验室实验数据)培养基上, 4 d(天)左右便有膨大现象; 3 周左右的愈伤情况结果见表 1。

由表可知, 7 d~9 d(天)苗龄的下胚轴出愈率最高, 且愈伤组织长势很好, 形成时间也较为提前。时间过长过短都不

5.1.3 基因枪法 又称微弹射击法, 是一种将载有外源 DNA 的金属(钨或金)经驱动后通过真空小室进入靶组织的一种遗传转化技术。1993 年 Nishihara 等用基因枪法轰击百合的花粉, 获得 CUS 基因的瞬时表达。Watad 等应用 Biolistics PDS1000/He 系统, 对百合愈伤组织进行轰击转化, 选择标记基因是 PAT, 选择剂是 bialaphos。PCR 分析和 southern 杂交证实得到了 3 株含 PAT 基因的百合转基因植株。荷兰的 Leiden 大学正应用基因枪法, 导入病毒的外壳蛋白基因, 以获得抗病毒的百合。

### 5.2 基因表达调控

启动子是转录所必需的调控序列, 外源基因的导入, 表达载体中启动子的选择是十分重要的。Leede 等采用不同的启动子(CaMV 35S、TR2<sup>+</sup>、Act1、LAT52、chiAPA2)驱动 GUS 基因

转化百合花粉, 仅 TR2<sup>+</sup>, 在百合花粉中显示活性。Miyoshi 和 Nishihara 等报道了番茄的 LAT52 启动子和玉米的 Zml3 启动子在百合花粉中的表达。Tsuchiya 等构建了 CaMV 35S、Act1、Adhl 启动子和蓖麻催化酶基因内含子驱动的 GUS 基因, 转化百合鳞片和未成熟的胚胎, 使用 Act1 启动子和修饰的 CaMV 35S 启动子得到了最大的 GUS 基因的瞬时表达。GUS 基因的瞬时表达受胚龄、培养时间和培养条件影响。

综上所述, 利用植物离体培养技术进行百合的脱病毒、快速繁殖和胚胎拯救已有较多的报道, 并建立了相应的技术程序。但分子生物学技术在百合上的应用才刚刚起步, 离实用化阶段仍有一定的距离, 尤其在遗传转化方面。如何从百合中克隆有用的基因, 建立高效、重复性好、无基因型依赖性的转化系统, 今后仍需进行大量深入的研究。