

# 百合愈伤组织的诱导及瞬时表达的研究

权永辉<sup>1,2</sup>, 刘雅莉<sup>1,2</sup>, 祁银燕<sup>1,3</sup>, 姜玲<sup>1,2</sup>, 田菲菲<sup>1,2</sup>, 杜灵娟<sup>1,2</sup>

(1. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室(西北农林科技大学), 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 3. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以百合品种‘罗宾娜’(Robina)鳞片、花丝和花梗分化的不定芽为试材, 诱导愈伤组织, 并通过固体、液体和经过液体预培养后在固体上培养的方式继代增殖。结果表明: 分化的不定芽在萘乙酸(NAA) 0.5 mg/L 的培养基上愈伤组织的诱导率最高; 从芽基部形成的愈伤组织以经过液体预培养后在固体上培养的方式继代, 繁殖速率最大, 再生率为 100%。使用农杆菌介导转化 pCambia1301 质粒后, 3 种不同方式培养的愈伤组织的 GUS 瞬时表达效率差异并不显著。

**关键词:**百合; 愈伤组织; 植株再生; GUS 基因瞬时表达

**中图分类号:**S 682.2+65 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0103-05

百合属百合科百合属多年生草本植物, 作为鲜切花和盆花是世界花卉产业中主要作物之一<sup>[1]</sup>。在百合育种中, 分子育种也成为一种重要技术手段, 因其能够克服百合传统育种中的种间杂交困难, 在百合品种性状的定向改良中具有广阔前景。

良好的遗传转化受体系统是分子育种的基础和前提, 而通过体细胞胚途径建立的再生体系能够为遗传转化提供理想的受体材料, 其具有繁殖率大、转化效率高、嵌合体少、无性系变异小等优点<sup>[2]</sup>。目前, 通过体细胞胚途径建立百合再生体系成功进行农杆菌介导遗传转化的研究报道较少, 主要集中于铁炮百合(*Lilium longiflorum*)、新铁炮百合(*Lilium × formolongi*)和东方百合品种, 自 2003 年 Mercuri 等<sup>[3]</sup>以花梗诱导的胚性愈伤组织为受体材料, 首次利用农杆菌菌株 LBA4404 成功转化铁炮百合后, Hoshi 等<sup>[4]</sup>使用花丝诱导的胚性愈伤组织作为转化受体材料, 使用 pIG121Hm 转化东方百合, Ogaki 等<sup>[5]</sup>在建立的悬浮再生体系基础上, 成功转化新铁炮百合悬浮物。但这些报道中, 胚性愈伤组织诱导所需条件较高, 外植体来源单一, 转化效率较低。

该试验在前期研究的基础上, 通过灰色关联度分析法选定适宜转蓝色基因的 OT(Oriental × Trumpet)百合品种‘罗宾娜’(Robina)为材料<sup>[6]</sup>。百合不同种系的受体

系统基因型依赖性强<sup>[7]</sup>, 而目前国内外尚鲜见关于在 OT 百合上一套完整的以遗传转化为目的的再生体系的报道。因此, 亟需建立该品种通过体细胞胚途径的遗传转化受体系统, 以期为后期的基因稳定整合奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验品种为 OT 系百合“罗宾娜”(Robina), 种球购于北京神州克劳沃园艺技术有限责任公司, 在西北农林科技大学园艺场内种植, 花蕾于 2011 年 11 月采摘。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料的处理 将百合田间种球鳞片剥离, 选择种球内层无病斑生长状况良好的鳞片浸泡于 0.1% 的多菌灵中 15 min, 再使用洗洁精水浸泡 15 min, 然后在流水下过夜冲洗, 之后拿入超净工作台, 70% 酒精浸洗 30 s, 0.1% 氯化汞浸洗 10 min, 最后使用无菌水冲洗 3 次, 沥干。横向切去鳞片端部 1/3, 将剩余部分切成 2~3 mm 厚的薄片作为接种材料。选取长约 8 cm 的百合花蕾在饱和洗洁精水中浸泡 10 min 后, 再用自来水冲洗 3~4 h。放入超净工作台, 用 70% 酒精浸洗 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 然后用 1.5% 次氯酸钠浸洗 15 min, 无菌水冲洗 5 次, 沥干。接种时, 将花蕾切开, 分别取出花丝和花梗, 切成长约 1.5 cm 的小段做接种材料。

1.2.2 不同外植体愈伤组织的诱导和增殖 将鳞片、花丝、花梗接种于 MS+蔗糖 30 g/L+植物凝胶 3 g/L+NAA 1.0 mg/L+2,4-D(0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L)+6-BA 0.1 mg/L; 60 d 后将获得的再生芽移至 MS+蔗糖 30 g/L+植物凝胶 3 g/L+NAA(0.1、0.5)mg/L, 愈伤组织会从鳞茎基部诱导发生。固体培养: 将得到的愈伤组

**第一作者简介:**权永辉(1987-), 男, 硕士研究生, 现主要从事园林植物分子育种的研究工作。E-mail:quanyong389@sohu.com.

**责任作者:**刘雅莉(1960-), 女, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为园林植物遗传育种。E-mail:lyl6151@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31170652)。

**收稿日期:**2013-04-09

织转接到筛选出的最合适培养基上,每6 d 称重1次测定其生长速率。液体培养:将得到愈伤组织按照其间隙切成直径0.8~1 cm的愈伤块接种至不含植物凝胶的诱导愈伤组织的最合适液体培养基中,在25℃,100 r/min 恒温摇床中黑暗环境下预培养30 d,之后每6 d 称重1次测定其生长速率。整个培养过程每30 d 继代1次,继代时,倒掉1/3的旧液体培养基加入等量的新培养液。固体和液体结合培养:将经过液体培养基预培养30 d的愈伤组织转移至相同激素的固体培养基中培养,每6 d 称重一次测定其生长速率。

1.2.3 扫描电子显微镜观察 分别将固体培养基诱导的愈伤组织和培养液继代的愈伤组织放入2.5%戊二醛中4℃固定6 h,再置于梯度乙醇、丙酮以及乙酸乙酯中进行干燥,之后使用液体二氧化碳进行临界点干燥,然后喷镀金属膜,最后把制好的样品材料放于扫描电子显微镜(JSM-6360LV)下观察。

1.2.4 愈伤组织的再生 将固体培养基诱导的愈伤组织和经过液体培养基继代的愈伤组织接种于再生培养基MS+蔗糖30 g/L+植物凝胶3 g/L上进行再生,期间每30 d 继代1次。整个再生过程培养条件(25±1)℃,光照时间昼/夜8 h/16 h,光照强度60 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。60 d后,将萌发的小苗移至2MS+蔗糖90 g/L+植物凝胶3 g/L+IBA 1.0 mg/L的鳞茎膨大培养基上让幼苗基部鳞茎膨大并且生根。

1.2.5 农杆菌转化 质粒pCambia1301含有内含子的GUS基因,其T-DNA区段的遗传结构见图1。将含质粒pCambia1301的农杆菌EHA105接种至含有50 mg/L Kan,50 mg/L Rif的YEB固体平板上,培养2 d后,挑取单菌落接种至含50 mg/L Kan,50 mg/L Rif液体YEB培养基中28℃、175 r/min 振荡培养15 h,将阳性克隆的菌液3 500 r/min 离心10 min,弃上清,菌体用重悬液(1/2MS)调整OD<sub>600</sub>为0.8~1.0后备用。将诱导的愈伤组织(每种愈伤块大约40个)放入三角瓶,加入含100 μM的乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS)的农杆菌

重悬液,分别侵染6、8、10 min。侵染之后,用无菌滤纸吸干侵染材料上的多余菌液,放入铺有滤纸的共培养基中,培养基为MS+蔗糖30 g/L+NAA 0.5 mg/L+生物缓冲液(MES)10 mM+乙酰丁香酮(AS)100 μM,黑暗培养3 d。

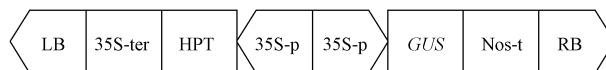


图1 二元载体pCambia1301 T-DNA区域示意图

Fig. 1 T-DNA region of binary vector pCambia1301

1.2.6 GUS基因的瞬时表达检测 经过共培养的愈伤组织,使用无菌水清洗3次,放入细胞培养板中,加入GUS染液于37℃恒温箱中染色6~8 h,同时设置未转化的愈伤组织进行GUS染色作为对照。染色后材料放入70%乙醇中脱色2~3次,脱色后在体式显微镜下观察,记录每100 mg愈伤组织样品上显示GUS活性蛋白即蓝色斑点的数量,来评价该愈伤组织的转化效率。

### 1.3 数据分析

所有试验数据采用Microsoft Excel 2007和SPSS软件进行分析处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外植体愈伤组织的诱导及再生

使用萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧基(2,4-D)和6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)对百合鳞片、花丝和花梗外植体进行处理,这些外植体接入培养基中30 d后开始出现分化,50 d后统计结果。从表1可以看出,3种外植体中以鳞片外植体的分化效果最佳,其在NAA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.1 mg/L的分化率最高,但在不同浓度间差异并不显著。在分化过程中观察发现鳞片外植体培养20 d后开始形成一些不定芽生长点,这些生长点逐渐分化出白色的丛生芽(图2A);而花丝外植体在切口处多长出一些增生组织(图2B),并且生长较慢,分化少;花梗外植体在切口处分化出少数芽和根(图2C)。

表1 NAA、2,4-D和6-BA组合对不同外植体分化的影响

Table 1 Effects of different combinations of NAA, 2,4-D and 6-BA on different explants of lily differentiation rate

激素组合 Combination of hormone	鳞片分化率 Differentiation rate of bulb scales/%	花丝分化率 Differentiation rate of filament/%	花梗分化率 Differentiation rate of stalk/%
NAA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.1 mg/L	50.86±2.05a	22.40±3.42a	29.77±3.31b
NAA 1.0 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+6-BA 0.1 mg/L	52.04±2.35a	26.35±5.72a	36.60±2.29b
NAA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.1 mg/L	54.54±2.49a	28.85±3.39a	34.69±3.33a
NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.1 mg/L	49.44±5.22a	26.57±4.82a	36.72±3.97ab

注:同一列中不同小写字母为0.05水平差异显著性。下同。

Note: Normal letters in the table indicate significant differences at 0.05 level. The same below.



培养 50 d 后,将 3 种外植体分化出的芽接种至 2 种浓度的愈伤组织诱导培养基上,培养 30 d 后统计结果。从表 2 可以看出,来源于不同外植体的不定芽在 NAA 0.5 mg/L 培养基上基部形成愈伤组织的诱导率稍高于在 NAA 0.1 mg/L 培养基上愈伤组织的诱导率,以鳞片产生的不定芽基部的愈伤组织诱导率最高。在愈伤组织诱导过程中发现,随着这些不定芽的生长膨大,在其基部会逐渐形成浅黄色、紧实的愈伤组织(图 2E)。该愈伤组织继代过程中,伴随有芽和少量根的分化,愈伤组织上也逐渐形成一些原胚(图 2I)。

表 2 NAA 对不同外植体形成的鳞茎诱导愈伤组织的影响

Table 2 Effects of NAA on callus induction of differentiate bulb from different explants lily

激素 Hormone	鳞片愈伤诱导率 Induction rate of bulb scales callus/ %	花丝愈伤诱导率 Induction rate of filament callus/ %	花梗愈伤诱导率 Induction rate of stalk callus/ %
NAA 0.1 mg/L	68.06±6.36a	53.44±7.92a	50.66±3.22a
NAA 0.5 mg/L	71.17±4.68a	60.28±2.10a	56.28±5.48a

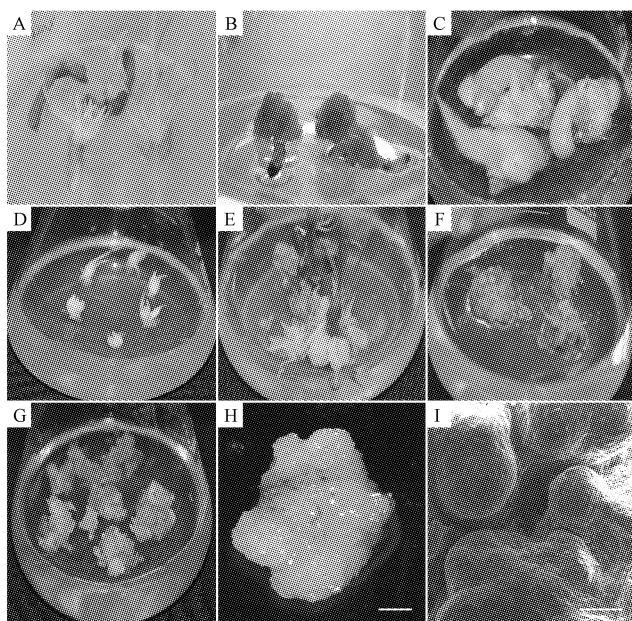


图 2 愈伤组织的诱导

注: A. 鳞片外植体在分化培养基上形成的芽; B. 花丝外植体在分化培养基上形成的增生组织; C. 分化出不定根和芽花梗外植体; D. 在愈伤组织诱导培养基上的芽; E. 在小鳞茎基部形成的愈伤组织; F. 从小鳞茎上剥离的愈伤组织; G. 继代 45 d 后的愈伤组织; H. 表面颗粒状的愈伤组织(标尺: 1 mm); I. 具有原胚的愈伤组织(标尺: 200 μm)。

Fig. 2 The induction of callus

Note: A. Differentiating shoot from bulb scale after cultured 40 days on differentiated medium; B. Hyperplastic tissue formed on filament explant; C. Differentiating shoot and root from stalk explant; D. Differentiated seedlings; E. Callus formed from the root of the sterile seedling; F. Callus separated from bulb; G. Proliferative callus; H. Granular callus (Bar = 1 mm); I. Callus with proembryo (Bar = 200 μm).

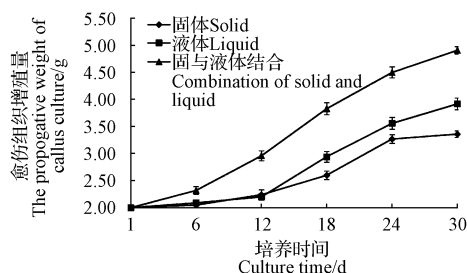


图 3 愈伤组织在不同状态培养基上的增殖曲线

Fig. 3 Relationship between medium condition and callus propagation

诱导的愈伤组织在 NAA 0.5 mg/L 液体培养基预培养 30 d 后,在相同激素的固体培养基和液体培养基培养。在培养过程中,对固体培养基中与经过预培养的液体培养基和固体培养基中的愈伤组织称重,结果见图 4,固体与液体培养基相结合轮换培养的愈伤组织增殖最快,经过预培养的液体培养基中的愈伤组织增殖速率高于固体培养基中的增殖速率,观察发现增殖过程中的愈伤组织伴随有芽和根的分化。

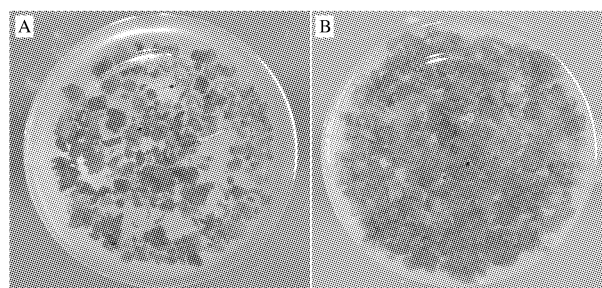


图 4 液体培养基培养的愈伤组织

注: A. 预培养后的愈伤组织; B. 培养 30 d 后的增殖的愈伤组织。

Fig. 4 Propagative callus in liquid medium

Note: A. Callus after initially cultured in liquid medium; B. Proliferative callus after cultured 30 days.

经过 3 种不同培养方式培养的愈伤组织置于 MS+蔗糖 30 g/L+植物凝胶 3 g/L 的再生培养基上,这些愈伤组织都能够再生并且表面都会产生新的愈伤组织,其通过体细胞胚途径发生分化,先慢慢萌发出芽,在芽伸长生长过程中,同时基部在膨大过程中也慢慢分化出根,这些根伴有白色绒毛;有少数会先萌发根,其不断伸长,并不长芽。再生 45 d 后,愈伤组织表面会形成有芽发育成的幼苗(图 5B),把这些幼苗从愈伤组织上剥离移至鳞茎膨大培养基 2MS+蔗糖 90 g/L+植物凝胶 3 g/L+IBA 1.0 mg/L 上进行再生鳞茎培养,鳞茎膨大 60 d 后,再生幼苗即可形成直径大于 1.2 cm 的鳞茎,并且其伴有白色粗壮的根(图 5D)。

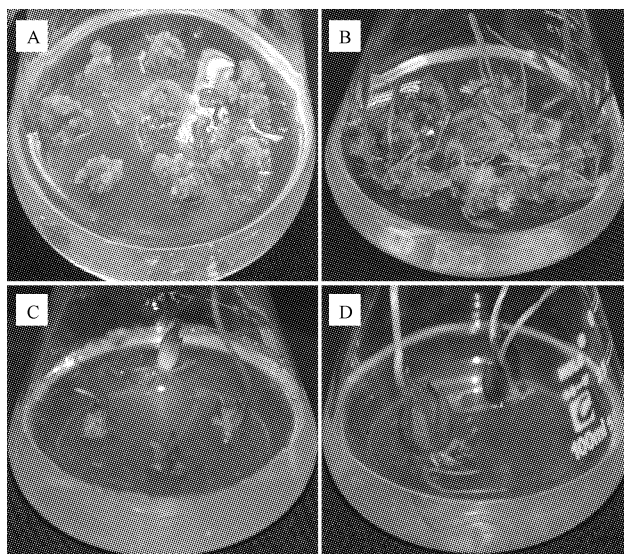


图5 愈伤组织的再生

注:A. 液体与固体培养基轮换培养的愈伤组织;B. 再生培养 45 d 后,愈伤组织表面形成的嫩苗;C. 在鳞茎膨大培养基培养的小鳞茎;D. 直径大于 1.2 cm 的带有白色根的小苗。

Fig. 5 The regeneration of callus

Note:A. The callus were cultured in combination of liquid medium and solid medium;B. Regenerating callus with differentiated shoot and root after cultured 45 days on regenerated medium;C. Regenerated bulbets;D. Regenerated plantlets with white root.

## 2.2 GUS 基因的瞬时表达检测

分别转化 pCambia1301 的经固体和液体培养的愈伤组织的 GUS 染色结果见图 6,这 2 种愈伤组织的 GUS 染色均较深,呈点状和片状分布,对照组材料未出现蓝色斑点及蓝色斑块,说明转化表达效果良好;由表 4 可知,3 种经不同方式培养的愈伤组织分别侵染 10 min 时,其表面蓝色斑点最多,但 3 种愈伤组织上的斑点数无显著性差异。

表 4 不同侵染时间对对不同培养方式愈伤组织的 GUS 基因瞬时表达量的影响

Table 4 Effect of infection time on the number of blue spots of different style of culturing callus resulting from transient expression of the GUS gene of *Lilium*

愈伤组织类型 The type of callus	侵染时间 Time of infection		
	6 min 蓝色斑点数 No. of GUS spots per callus in 6 min	8 min 蓝色斑点数 No. of GUS spots per callus in 8 min	10 min 蓝色斑点数 No. of GUS spots per callus in 10 min
固体培养 Solid culture	19.0 ± 4.9a	22.2 ± 4.5 a	27.0 ± 4.7 a
液体培养 Liquid culture	17.6 ± 4.5a	20.6 ± 3.8a	24.2 ± 3.7 a
固体和液体结合培养 The combination of solid and liquid culture	18.0 ± 4.3a	22.6 ± 4.3a	27.8 ± 6.0 a

## 3 讨论

使用低浓度的 NAA、2,4-D 和 6-BA 对鳞片、花丝和花梗分化的不定芽诱导愈伤组织,愈伤组织会从不定芽发育的小鳞茎基部产生,而使用相同外植体在其它激素

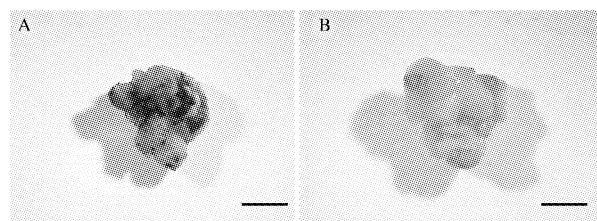


图 6 瞬时转化 pCambia1301 和未转化愈伤组织的 GUS 染色

注:A. GUS 染色的转化的愈伤组织;B. 对照,GUS 染色的未转化的愈伤组织(标尺:1 mm)。

Fig. 6 GUS staining of transformed callus with vector pCambia1301 and CK

Note:A. GUS staining of transformed callus with vector pCambia1301;B. Callus (as CK) without GUS staining.

组合作用下分化的不定芽诱导愈伤组织,它们膨大的鳞茎基部并不能产生愈伤组织。这可能是由于 NAA、2,4-D 和 6-BA 作用下分化的不定芽的生长发育状况、内源激素种类、生理生化特性以及细胞中特定基因活性及表达与其它激素组合条件下分化的不定芽的差异造成的。

Chin 等<sup>[8]</sup>对新铁炮百合体细胞胚进行悬浮培养过程中,使用的接种材料是小鳞茎基部产生松散的愈伤组织,而该试验获得的愈伤组织结构紧实,这可能是由于百合不同品质资源间基因型的差异造成<sup>[9]</sup>。在前人对百合愈伤组织的继代过程中<sup>[8,10-11]</sup>,培养基的状态会明显影响百合愈伤组织增殖和体细胞胚的发生,使用液体



培养与固体培养相结合的方法,测得的愈伤组织增殖速率是一直在固体培养基上培养的愈伤组织增殖速率的1.5倍。随着继代数的增加非胚性愈伤也逐渐减少,这与玉米愈伤组织的增殖过程中相同<sup>[12]</sup>,经2种方式培养获得的愈伤组织在再生过程中再生率都为100%,并且表观形态学上无明显差异,该结果比Chin等<sup>[8]</sup>获得的愈伤组织增殖和再生率都高。愈伤组织液体培养过程中,对培养液取样观察,其中并无细胞存在,因此,该试验液体的培养只是愈伤块的增殖,与起源于单细胞的悬浮培养有所差异。

在进行GUS基因瞬时表达研究过程中,筛选的该愈伤组织的最佳侵染时间为10 min,这与Ogaki<sup>[5]</sup>等使用新铁炮百合的悬浮物进行转化的侵染时间相同,而与Mercuri等<sup>[3]</sup>和Hoshi等<sup>[4]</sup>在铁炮百合和东方百合使用的愈伤组织侵染时间有差异,因此,侵染时间可能与百合的基因型和愈伤组织类型相关。同时,GUS基因瞬时表达的斑点数量是Ogaki等<sup>[5]</sup>结果的1.6倍,但这可能也受不同质粒载体的影响。

总之,该研究通过OT系百合‘罗宾娜’鳞片、花丝和子房外植体,建立了该品种体细胞胚途径的再生体系,其愈伤组织增殖较快,再生率高,同时使用该愈伤组织获得的GUS基因瞬时表达研究结果也高于前人在百合其它种系上的研究,但是,其遗传转化体系有待于进一步研究。

#### 参考文献

[1] Nhut D T, Le B V, Minh N T, et al. Somatic embryogenesis

through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum* [J]. Plant Growth Regul, 2002, 37: 193-198.

[2] 李筱帆. 几种百合组织培养及体细胞胚发生技术的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.

[3] Mercuri A, Benedetti L D, Bruna S, et al. Agrobacterium-mediated transformation with rol genes of *Lilium longiflorum* Thunb [J]. Acta Hort, 2003, 612: 129-136.

[4] Hoshi Y, Kondo M, Mori S, et al. Production of transgenic lily plants by Agrobacterium-mediated transformation [J]. Plant Cell Rep, 2004, 22: 359-364.

[5] Ogaki M, Furuichi Y, Kuroda K, et al. Importance of co-cultivation medium pH for successful Agrobacterium-mediated transformation of *Lilium × formolongi* [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 699-705.

[6] 张萍. 百合转蓝色基因品种的选择及其遗传转化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.

[7] 石晋芳, 孙明, 张启翔, 等. 百合体细胞胚胎发生研究进展[J]. 北方园艺, 2010(18): 215-219.

[8] Chin W H, Wei T J, Hui C L, et al. Plant regeneration via somatic embryogenesis from suspension cell cultures of *Lilium × formolongi* using a bioreactor system [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2006, 42: 240-246.

[9] Haensch K T. Plant regeneration through somatic embryogenesis in different genotypes of *Lilium*-hybrids [J]. Gartenbauwissenschaft, 1996, 61 (5): 214-218.

[10] Godo T, Kobayashi K. *In vitro* propagation utilizing suspension cultures of meristematic nodular cell clumps and chromosome stability of *Lilium × formolongi* Hort [J]. Scientia Horticulturae, 1998, 72: 193-202.

[11] Nhut D T, Minh Hanh N T, Tuan P Q, et al. Liquid culture as a positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of *Lilium longiflorum* [J]. Scientia Horticulturae, 2006, 110: 93-97.

[12] 王世玉, 郑用琰, 张方东, 等. 玉米成熟胚胚性愈伤组织的诱导、高频再生基转化的研究[J]. 作物学报, 2008, 34(3): 423-428.

## Studies on Callus Induction and Transient Expression of *Lilium tenuifolium* (Oriental × Trumpet)

QUAN Yong-hui<sup>1,2</sup>, LIU Ya-li<sup>1,2</sup>, QI Yin-yan<sup>1,3</sup>, JIANG Ling<sup>1,2</sup>, TIAN Fei-fei<sup>1,2</sup>, DU Ling-juan<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas (Northwest Agricultural and Forestry University), Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation in Northwest China, Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100; 2. College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 3. College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Taking *Lilium tenuifolium* Oriental × Trumpet ‘Robina’ as materials, and adventitious buds which differentiated from bulb scales, filaments and stalk of it were used to form embryogenic callus, multiplication was conducted via solid, liquid and liquid preculture then solid culture methods. The results showed that it produced the most embryogenic callus when explants were cultured on induction medium which contained 0.5 mg/L NAA. The best result of callus proliferation was made via a alternative culture method which callus was transferred on solid and liquid medium by turns. The GUS gene contained in vector pCambia1301 was introduced into the embryogenic cultures by Agrobacterium-mediated transient expression and then GUS chemical tissues staining was conducted to observe. The results showed that it was no significant transient expression efficiency variance among callus of three cultivation methods.

**Key words:** lily; callus; plant regeneration; GUS gene transient expression