

# 不同激素水平对百合愈伤组织诱导研究

林 海, 张 芳, 郝 慧 敏

(鹤壁职业技术学院, 河南 鹤壁 458030)

**摘 要:**以百合根状茎、幼茎、叶片、离体胚为外植体, 4 种激素 2, 4-D、NAA、6-BA、ZT 采用  $L_9(3^4)$  正交实验处理, 对愈伤组织诱导的条件进行研究。结果表明: 6-BA 和 2, 4-D 在诱导百合愈伤组织中作用极为显著, 4 种激素对愈伤组织的诱导作用大小依次为: 6-BA > 2, 4-D > NAA > ZT, 初步断定百合愈伤组织诱导的最佳激素配比是: 2, 4-D 0.2 mg/L + NAA 0.9 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + ZT 0.25 mg/L; 根茎和幼茎作为外植体更易诱导愈伤组织形成; 暗培养较光暗交替培养褐化率低。

**关键词:** 百合; 愈伤组织; 诱导; 条件

**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0142-04

百合 (*Lilium candidum* L.) 是百合科百合属多年生草本球根植物, 主要应用价值在于观赏, 其球根含丰富淀粉质, 有些品种可作为蔬菜食用和药用。百合花素有“云裳仙子”之称。由于其外表高雅纯洁, 天主教以百合花为玛利亚的象征。百合的鳞茎由鳞片抱合而成, 有“百年好合”、“百事合意”之意, 中国人自古将其视为婚礼必不可少的吉祥花卉。以食用价值著称于世的我国兰

州百合, 最早记载在甘肃省平凉县志中, 迄今已有 450 多年。兰州百合个大、味甜, 既可作点心, 又可作菜肴; 宜兴的卷丹制成百合汤是夏日消暑佳品。百合还可制作成百合干、百合粉, 在国际市场上价格很高。同时, 中医认为百合性微寒平, 具有清火、润肺、安神的功效, 其花、鳞状茎均可入药, 是一种药食兼用的花卉。到目前为止, 百合仍然是中药中的常用药材。由于百合需求的大幅增长, 目前人工种植的百合产量远远不能满足市场的需求, 且百合喜湿润、光照, 要求肥沃、富含腐殖质、土层深厚、排水性极为良好的砂质土壤, 多数品种宜在微酸性至中性土壤中生长, 对种植地的选择也颇为重要, 不

**第一作者简介:** 林海 (1970-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事森林动物研究与教学工作。E-mail: hnlinhai@163.com.

**收稿日期:** 2010-10-14

## Cloning, Sequence Structure and Expression of *HaProβ7* Gene with Proteasome

### *β7* Subunit Function in the *Helicoverpa armigera*

WANG Geng-xian<sup>1,2</sup>, SIMA Yang-hu<sup>1</sup>, ZHANG Sheng-xiang<sup>3</sup>, XU Shi-qing<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Modern Silk, Department of Applied Biology, Medical College Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215153; 2. Department of Biological Science Handan College, Handan, Hebei 056005; 3. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018)

**Abstract:** By using total RNA which was extracted from midgut of *Helicoverpa armigera* and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, the full-length cDNA encoding Proteasome *β7* Subunit was cloned, then further analyzed the gene sequence. The results showed that the full-length cDNA sequence was named as *HaProβ7* (GeneBank accession number: FJ378902). It was 1 007 bp nucleotide long, contained an ORF (846 bp) and encoded 281 amino acids with their predicted mass 30.07 KD and isoelectric point 8.04. The deduced amino acid showed that a proteasome *β7* subunit domain between 40 to 229 amino-acid residue. It had more than 63% identity to other insects such as *Drosophila melanogaster*. The proteasome *β7* subunit conservative regions were very similar with each other. Molecular evolution by Neighbor Joining method indicated that *HaProβ7* had homologous with other proteasome *β7* subunit of species. Sequence alignment analysis showed that the cloned gene was proteasome *β7* subunit gene. The results of gene expression profiling analysis showed that *Haproβ7* had high expression in body wall, midgut, gonad, but low expression in head.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; proteasome; cloning; *HaProβ7* gene; RACE

可人工大面积种植。因此,这也是在全国进行大面积百合 GAP 基地建设所面临的主要问题。虽然目前科技已较为发达,可以通过搭建塑料大棚、无土栽培等方式人工改良植物的生长对温度、湿度、土壤酸碱度等各项指标的限制,但是无形中增加了成本,限制了百合的种植量。

近年来,随着组织培养技术的广泛应用,大大增加了百合等经济植物的育种、育苗率以及栽培数量,有效减轻了种植成本等问题,使各类百合的种植量逐年上升。目前,我国已建立了众多百合等经济植物的商品化大规模生产基地,均依靠组织培养实现了快速繁殖,使繁殖率迅速提高。如福建省南平市百合花种植基地总投资 483.2 万美元;建立了百合花生产基地 66.7 hm<sup>2</sup>,百合花种球繁育基地 6.7 hm<sup>2</sup>,鲜切花和种球冷库 5 000 m<sup>2</sup>,年产值 540 万美元,年实现利润 121 万美元,年利润率 25%。在对百合愈伤组织的研究中,曾有专家报道了不同的激素组合对百合芽体体外发生过程中性状的影响,专家们各自提出了能使芽快速增殖的不同激素组合。但百合愈伤组织诱导的研究尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

外植体:百合的根状茎、叶及幼茎。百合离体胚:市场采购百合种子,清水浸泡 24 h,剥取离体胚。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 MS 基本培养基+3%蔗糖+0.8%琼脂,附加不同浓度的 2,4-D、NAA、6-BA、ZT, pH 5.8~6.0,每 150 mL 三角瓶中加入培养基 30~40 mL,灭菌时间 20 min,双层牛皮纸封口,灭菌后 1~2 d 备用。

1.2.2 外植体消毒 在超洁净工作台上进行操作,将百合芽的尖端部分,幼嫩的根状茎,新生叶片用清水冲洗干净后,再用蒸馏水冲洗 5 次,用 75%的酒精浸泡 30 s 在用无菌水冲洗 3 次,0.1%的 HgCl<sub>2</sub> 浸泡 8~10 min,再用无菌水冲洗 3 次,即完成消毒。

1.2.3 接种 消毒后的材料置于无菌滤纸上吸干水分,然后将材料切割成适量大小接种到加有不同浓度激素的培养基中。

1.3 试验处理

1.3.1 根状茎处理 基本培养基为 MS+3%蔗糖+0.8%琼脂,激素选取 2,4-D、6-BA,激素处理如表 1。每种激素处理接种 12 瓶,6 瓶于光暗交替下培养;6 瓶于暗处培养。光暗交替培养放在日光灯照明的培养架上,每天 8:00~18:00 照明,20℃恒温培养;暗处培养的放在 20℃培养箱中培养,湿度为 85%~90%。每隔 10 d 观察记录每种处理外植体的变化,并对发生变化的外植体进行数码拍照。

| 表 1   |                       | 根状茎激素处理        |                |                |                |                |                |                |                |                |
|-------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 激素    | /mg · L <sup>-1</sup> | 处理组            |                |                |                |                |                |                |                |                |
|       |                       | M <sub>1</sub> | M <sub>2</sub> | M <sub>3</sub> | M <sub>4</sub> | M <sub>5</sub> | M <sub>6</sub> | M <sub>7</sub> | M <sub>8</sub> | M <sub>9</sub> |
| 2,4-D | 0.5                   | 1.0            | 1.5            | 2.0            | 0.5            | 0.5            | 0.5            | 1.0            | 2.0            |                |
| 6-BA  | 0                     | 0              | 0              | 0              | 0.5            | 1.0            | 2.0            | 0.5            | 0.5            |                |

1.3.2 幼茎、叶片及离体胚处理 基本培养基为 MS+3%蔗糖+0.8%琼脂,选取 2,4-D、NAA、6-BA、ZT 4 种激素处理,每种激素取 3 个水平,利用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表(表 3),考察 4 种激素对百合愈伤组织诱导的影响,激素处理见表 2。幼茎、叶片每种处理接种 6 瓶,离体胚每种处理接种 2 瓶,暗处 20℃培养,湿度为 85%~90%。每隔 10 d 观察外植体变化并记录。

| 表 2 |       | 激素水平 |      |      |  | mg · L <sup>-1</sup> |
|-----|-------|------|------|------|--|----------------------|
| 因子  | 2,4-D | NAA  | 6-BA | KT   |  |                      |
| 水平一 | 0.2   | 0.1  | 0    | 0.25 |  |                      |
| 水平二 | 0.6   | 0.3  | 0.5  | 0.5  |  |                      |
| 水平三 | 1.2   | 0.9  | 1.0  | 1.0  |  |                      |

| 表 3 |       | 四因素三水平正交实验处理 |      |      |  | mg · L <sup>-1</sup> |
|-----|-------|--------------|------|------|--|----------------------|
| 处理组 | 2,4-D | NAA          | 6-BA | KT   |  |                      |
| 1   | 0.2   | 0.1          | 0    | 0.50 |  |                      |
| 2   | 0.2   | 0.3          | 0.5  | 1.0  |  |                      |
| 3   | 0.2   | 0.9          | 1.0  | 0.25 |  |                      |
| 4   | 0.6   | 0.1          | 0.5  | 0.25 |  |                      |
| 5   | 0.6   | 0.3          | 1.0  | 0.50 |  |                      |
| 6   | 0.6   | 0.9          | 0    | 1.0  |  |                      |
| 7   | 1.2   | 0.1          | 1.0  | 1.0  |  |                      |
| 8   | 1.2   | 0.3          | 0    | 0.25 |  |                      |
| 9   | 1.2   | 0.9          | 0.5  | 0.50 |  |                      |

2 结果与分析

2.1 对根状茎诱导愈伤组织结果进行观察并分期照相

光暗交替下的百合愈伤组织生长的较疏松,为绿色团块状,而暗处理下百合愈伤组织较紧密,白色或略带黄色。光暗交替培养的百合, M<sub>1</sub> 处理在第 60 天时有新的须根出现,70 d 时须根下面生成不规则突起,80 d 时变成类似芽状的组织,90 d 时生成花蕾样突起; M<sub>3</sub> 处理在 80 d 时才有新根出现,90 d 时须根变长; M<sub>4</sub> 处理外植体表面在 20 d 时有短细毛出现,90 d 时表皮开裂; M<sub>8</sub> 处理在 90 d 时下部生成一突起。其它处理则因染菌外植体全部死亡。

暗处培养的百合, M<sub>1</sub> 处理在 45 d 时有须根出现,55 d 时出现芽状体,65 d 时出现不规则突起; M<sub>4</sub> 处理直到 65 d 时都没有什么变化。其它处理则因染菌外植体全部死亡。

从百合根状茎诱导愈伤组织生长的基本情况可以看出,百合茎在 10 d 左右切口便可观察到白色致密的颗粒状愈伤组织,30 d 时愈伤组织生长达到最大速度。低浓度处理的百合外植体在暗处培养 45 d 时出现须根,65 d 出现芽状体,光暗交替培养的条件下 60 d 出现须

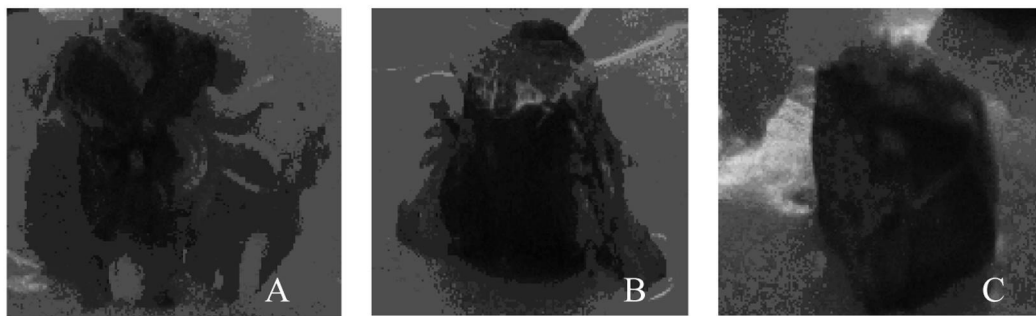


图 1 光暗交替下接种 70 d 后根状茎诱导愈伤组织的结果  
注: A 为 M<sub>1</sub> 处理; B 为 M<sub>3</sub> 处理; C 为 M<sub>4</sub> 处理 下同。



图 2 光暗交替下接种 100 d 后根状茎诱导愈伤组织的结果

根, 80 d 出现芽状体。因此百合根状茎在暗培养下诱导愈伤组织生长较光暗交替下好。

2.2 不同激素处理对百合叶片愈伤组织的诱导

在整个试验过程中, 对叶片进行愈伤组织诱导的培养基中, 部分叶片在 30 d 时没有明显出现愈伤组织, 大部分叶片外缘及脉线处变黑或已经死亡, 造成这种结果的原因可能是由于消毒时间过长或消毒液浓度过高, 叶片过于幼嫩造成死亡或培养基的急速配比不适合叶片愈伤组织的诱导。

2.3 不同激素处理对百合离体胚愈伤组织的诱导

接种 10 d 后离体胚看不出变化, 30 d 时可观察到部分处理中离体胚膨胀伸长, 但不明显。

表 4 各激素组合下百合茎愈伤组织诱导率

| 处理组 |       |     |      |      | mg · L <sup>-1</sup> |       |
|-----|-------|-----|------|------|----------------------|-------|
|     | 2,4-D | NAA | 6-BA | ZT   | 愈伤组织诱导率/%            | 褐化率/% |
| 1   | 0.2   | 0.1 | 0    | 0.25 | 50                   | 45.45 |
| 2   | 0.2   | 0.3 | 0.5  | 0.5  | 35                   | 25    |
| 3   | 0.2   | 0.9 | 1.0  | 1.0  | 76.5                 | 23.08 |
| 4   | 0.6   | 0.1 | 0.5  | 1.0  | 33.3                 | 25    |
| 5   | 0.6   | 0.3 | 1.0  | 0.25 | 69.2                 | 22.22 |
| 6   | 0.6   | 0.9 | 0    | 0.5  | 50                   | 18.18 |
| 7   | 1.2   | 0.1 | 1.0  | 0.5  | 57.9                 | 33.33 |
| 8   | 1.2   | 0.3 | 0    | 1.0  | 9.3                  | 16.67 |
| 9   | 1.2   | 0.9 | 0.5  | 0.25 | 21.1                 | 50    |
| CK  | 0     | 0   | 0    | 0    | 5.6                  | 42.86 |

表 5 各激素的极差分析

| 分组 | 愈伤组织诱导率/% |        |         |        |
|----|-----------|--------|---------|--------|
|    | 2,4-D     | NAA    | 6-BA    | ZT     |
| 1  | 161.5     | 141.2  | 109.3   | 140.3  |
| 2  | 152.5     | 113.5  | 89.4    | 142.9  |
| 3  | 88.3      | 147.6  | 203.6   | 119.1  |
| RT | 73.2/3    | 34.1/3 | 114.2/3 | 23.8/3 |

2.4 不同激素处理对百合茎愈伤组织的诱导

接种 10 d 后百合幼茎切口处出现白色点状物质, 20 d 后白色点状物质逐渐扩大, 形成一层薄愈伤组织, 30 d 后统计各处理诱导愈伤组织的数目(表 4)。

通过 6-BA、2,4-D、NAA、ZT 4 种激素 3 个水平 9 个浓度组合的正交实验发现, 各种组合对百合愈伤组织诱导的影响差异很大, 通过对试验结果进行极差分析<sup>[1]</sup>, 发现因子 6-BA 作用极为显著, 因子 2,4-D、NAA 作用显著, 因子 ZT 不显著。

由表 5 可以看出, 4 种激素对愈伤组织的诱导作用大小依次为: 6-BA>2,4-D>NAA>ZT。百合愈伤组织最佳激素配比可初步断定为 2,4-D 0.2 mg/L+NAA 0.9 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+ZT 0.25 mg/L, 且该结果和试验中第 3 组诱导率最大相吻合。

2.5 外植体大小对愈伤组织诱导的影响

以百合幼茎为外植体, 当茎直径小于 0.5 cm 时, 从接种第 7 天开始, 茎两端切口处渐渐变黄随着时间的延长, 色泽逐渐加深, 20 d 时变成深褐色, 且部分外植体切

口分泌出淡黄色液体, 30 d 时部分幼茎渐渐发黑死掉。外植体直径大于 0.5 cm 时, 接种 10 d 开始在切口处愈伤组织以点状出现, 15 d 时已能看到薄薄一层白色结晶状物质, 30 d 时, 形成白色较致密的愈伤组织。吕玉虎等<sup>[2]</sup> 研究认为外植体在培养基上的不同放置方式对百合鳞片愈伤组织诱导也有影响, 其诱导出芽能力从强到弱依次为: 鳞片内侧向上> 鳞片竖直插入> 鳞片内侧向下平放。在试验中, 百合茎水平放置和垂直放置(一切口接触培养基)二者的愈伤组织生长情况有明显的差别, 竖放置生成愈伤组织的量多且愈伤组织较致密生长旺盛, 水平放置愈伤组织生成量少, 疏松且生长较慢。

3 讨论

在该试验中, 因各处理的重复中愈伤组织诱导率差异较大, 故而试验的可行性较差, 最佳激素配比仍需进一步验证。由表 5 还可看出, 6-BA、2, 4-D 为百合愈伤组织诱导主要因素, 是否 6-BA、2, 4-D 二者的组合更适合诱导百合愈伤组织尚需进一步试验。在试验过程中外植体或愈伤组织发生褐化现象, 其原因是多酚化合物在多酚氧化酶的作用下氧化为活性酸化物 and 环形多聚体氧化蛋白时形成深色化合物, 这些物质很快又被氧化和形成复杂的醌类物质, 从而导致外植体组织或细胞逐渐变成褐色或黑色, 最后死亡<sup>[3-4]</sup>。据报道, 加入抗氧化剂或吸附剂对抑制褐化有明显的效果, 在试验中通常采用 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)和活性炭抑制褐变<sup>[5-6]</sup>。由表 4 可看出, 百合愈伤组织褐化率比较高, 这是因为培养基

中没有加入抑制剂。

根据细胞全能性理论, 植物任何器官都可以用作外植体, 但不同组织器官培养成功的难易程度是不同的, 同一种植物不同的组织和器官再生能力也有很大差异<sup>[7]</sup>。该试验中取根状茎、幼茎、叶、离体胚为外植体, 结果表明, 只有根状茎和幼茎易产生愈伤组织, 愈伤组织满布切口或外侧、质地紧密、时间相对短, 且诱导率较高。离体胚愈伤组织形成不明显。叶片在消毒时被杀死, 无愈伤组织生成。根状茎、幼茎和离体胚诱导愈伤组织能力不同证明不同器官和组织的再生能力不同。

参考文献

[ 1 ] 杜勤, 王振华, 张俊荣. 正交设计在何首乌组织培养中的应用[ J ]. 中草药, 1999, 33( 7 ): 537-539.  
[ 2 ] 吕玉虎, 李彬青, 吴淑平, 等. 百合的离体组织培养和快速繁殖[ J ]. 信阳农业高等专科学校学报, 2002, 12( 2 ): 19-20.  
[ 3 ] 张明文, 陈力耕. 银杏组织培养中控制褐化的研究[ J ]. 中国南方果树, 2003, 32( 3 ), 51-52.  
[ 4 ] 陈菲, 李黎, 宫伟. 植物组织培养的防褐化探讨[ J ]. 北方园艺, 2005 ( 2 ): 69.  
[ 5 ] 薛建平, 柳俊, 蒋细旺. 药用植物生物技术[ M ]. 合肥: 中国科学技术出版社, 2005.  
[ 6 ] 郭勇, 崔唐兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用[ M ]. 北京: 化学工业出版社, 2003.  
[ 7 ] 毛子成, 彭正松. 半夏快速繁殖体系的研究进展[ J ]. 中国中药杂志, 2003, 28( 3 ): 193-195.

Study on the Induction Conditions of Callus of *Lilium candidum* L.

LIN Hai ZHANG Fang HAO Hui-min  
(Hebi Vocational Technical College Hebi Henan 458030)

**Abstract:** The rhizome, leaf blade, stem and *in vitro* embryo of *Lilium candidum* L. were served explants. Four kinds of plant growth regulators; 2, 4-D, 6-BA, NAA, ZT were studied by  $L_9(3^4)$  orthogonal design, then compared the induction rate, callus browning of rate. The results showed that actions of 6-BA and 2, 4-D were extremely remarkable, that of NAA was remarkable, which ZT was least effective. The order of their efficiencies was 6-BA> 2, 4-D> NAA> ZT. The best medium for calli inducement was MS+2, 4-D 0.2 mg/ L+NAA 0.9 mg/ L+6-BA 1.0 mg/ L+ZT 0.25 mg/ L; The rhizome and the stem was easier culture callus; callus browning of rate in dark was lower than light-dark alternates.

**Key words:** *Lilium candidum* L.; callus; induction; conditions