



蝴蝶兰 *F3'5'H* 基因转化 OT 杂种 百合 Robina 的研究

刘爱玲, 刘雅莉*, 娄倩, 张海芹

(西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西杨陵, 712100)

摘要: 为了定向育种获得蓝色百合, 该研究以百合 Robina 为蓝色基因最佳受体, 以其花丝诱导产生的胚性愈伤组织和再生小植株小鳞片作为转化材料, 利用农杆菌介导法, 将蝴蝶兰 *F3'5'H* 基因导入百合 Robina 中。结果表明: 以小鳞片为转化材料, 预培养 3 d, OD_{600} 为 0.8, 侵染 10 min, 共培养 3 d, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ AS 稳定转化率最高为 12.78%; 而以胚性愈伤为转化材料, 预培养 2 d, OD_{600} 为 0.8, 侵染 10 min, 共培养 3 d, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ AS 稳定转化率最高为 12.22%。2 种转化材料的最适潮霉素筛选浓度均为 20 mg/L。对抗性植株分别进行 PCR 和反转录 PCR 检测, 获得 9 个阳性株系, Southern 印记分析进一步确定了 6 株转基因百合中携带蓝色基因 *F3'5'H*, 为后续进一步获得蓝色百合奠定了基础。

关键词: *F3'5'H*; Robina 百合; 胚性愈伤组织; 小鳞片; 遗传转化

中图分类号: Q785; Q789

文献标志码: A

Genetic Transformation of the *Phalaenopsis F3'5'H* to OT Lily Robina

LIU Ailing, LIU Yali*, LOU Qian, ZHANG Haiqin

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation in Northwest China, College of forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To obtain bluish *Lilium* spp. in direct breeding, we screened the suitable variety-OT lily Robina for genetic transformation. Here, both embryonic callus induced from filament and regenerated bulb scales of OT lily Robina were used as the transformation material. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis F3'5'H* was studied. The results showed: with the pre-culture 3 d, $OD_{600} = 0.8$, infection time 10 min, co-cultured for 3 d, 100 $\mu\text{mol/L}$ acetosyringone conditions, the stable transformation rate of regenerated bulb scales could reach to the highest 12.78%; however, embryogenic callus pre-culture 2 d, $OD_{600} = 0.8$, infection time 10 min, co-cultured 3 d, with 100 $\mu\text{mol/L}$ acetosyringone conditions, which the stable transformation rate was the highest 12.22%. In all the conditions, the best hygromycin-resistant screening concentrations always was 20 mg/L. PCR and reverse transcription PCR assay showed 9 putative transgenic plants were obtained. Southern hybridization analysis further proved 6 plants that the transgenic lily flowers carry blue gene *F3'5'H*. The results provided technical support and material basis for the continuing development of novel bluish *Lilium* flowers.

Key words: *F3'5'H*; lily Robina; embryonic callus; bulb scales; genetic transformation

收稿日期: 2016-01-31; 修改稿收到日期: 2016-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(31471905)

作者简介: 刘爱玲(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事园林分子植物育种方面的研究。E-mail: 1032239251@qq.com

* 通信作者: 刘雅莉, 硕士, 教授, 博士生导师, 主要从事园林遗传育种方面的研究。E-mail: ly16151@126.com

OT 杂种百合 Robina (*Lilium tenuifolium* oriental×trumpet)是东方百合杂交系(oriental hybrids)与喇叭型百合杂交系(trumpet hybrids)的杂交种^[1]。其茎秆粗壮,花大艳丽,香气浓郁,是百合中比较名贵的切花品种^[2]。百合 Robina 的花苞多为 3~5 个,花朵颜色为深粉红色,高度 120~135 cm,生长周期 100 d 左右,喜欢排水性好的微酸性土壤,适宜温度 15~28 ℃,需要经过低温春化过程后才能开花,无叶烧现象^[3]。如果生长环境适宜,Robina 百合的花朵直径可达 18~20 cm,为百合中花比较大的品种之一。近年来,随着其在百合切花中所占的比重越来越大,研究其花色具有重要的意义。

对于花卉的研究,花色改良一直是研究的热点,以前的研究中一般采用的是传统的育种方法,虽然也研究出许多新的花色,但是由于物种间存在种间隔离,传统育种技术很难打破种内基因资源的局限性^[4],所以大大制约了花色的创新。通过基因工程技术,可以克服传统育种方法的局限性,创造出更多的新花色^[5]。

飞燕草素(delphinidin)是存在于植物中的一种花青素,它可以使植物呈现蓝紫色。而 *F3'5'H*(类黄酮 3'5'羟基化酶)是形成飞燕草素并决定花青素结构和花色的关键酶^[6]。百合中由于缺乏 *F3'5'H* 基因而缺乏飞燕草素,所以自然界中没有紫色或蓝色的百合花^[7]。本实验室前期通过对 10 个百合品种的比较分析,利用灰色关联分析理论确定适宜转蓝色基因的受体品种,确定花瓣中矢车菊色素含量少、黄酮醇含量高、液泡 pH 值高的 OT 杂种百合 Robina 为适宜转蓝色基因的受体品种^[8]。前期实验室已经进行了携带 *F3'5'H* 基因表达载体的瞬时转化^[7],本研究主要是改良受体材料和实验方法,通过农杆菌介导法稳定转化 Robina 百合,并通过 PCR 等方法来检测,获得大量的百合转基因植株用于后续研究,为蓝色百合的获得奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

试验于 2014 年 7 月~2015 年 9 月,在农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点开放实验室和旱区作物逆境生物学国家重点实验室完成。以购于云南花卉市场的 Robina 百合为试验材料,诱导花苞的花丝产生胚性愈伤,再生植株,花丝诱导培养基为 MS+1.0 mg/L PIC(毒莠定)+30 g/L 蔗糖+3.0 g/L 植物凝胶。

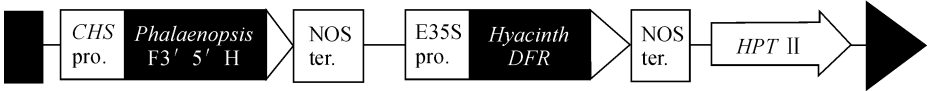
试验中使用的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株是 LBA4404,导入的质粒是 p1300-pPZP-F3'5'H-DFR,质粒的 T-DNA 区段上携带 *CHS* 花特异启动子驱动的蝴蝶兰 *F3'5'H* 基因, E35S Pro(增强型 *CaMV* 35S 启动子)驱动的风信子的 *DFR* 基因(蝴蝶兰 *F3'5'H* 基因表达的辅助基因),以及潮霉素磷酸转移酶基因 *HPT* II (选择标记基因),该载体由本实验室构建(图 1)。

1.2 方 法

1.2.1 胚性愈伤的悬浮培养 取 1.0 mg·L⁻¹ 毒莠定诱导产生的胚性愈伤组织 2.0 g(鲜重)切碎,接种至 100 mL 锥形瓶中,在瓶内加入 40 mL 含与该胚性愈伤继代相同激素和蔗糖的液体培养基,进行悬浮培养。然后将锥形瓶置于 (24±2)℃,100 r/min 恒温摇床中,暗培养。前 2 次每 3 d 继代 1 次,其后每 7 d 继代 1 次直到停止增长。继代时,要注意一定要静置至悬浮液中细胞团沉至锥形瓶底部后,倒去上部 1/2 旧的上清液,补充新鲜的培养液。每 6 d 称量各瓶悬浮培养物的鲜重,测定每个悬浮系的增殖量,直至停止增长,获得悬浮培养物。

1.2.2 农杆菌菌液的制备 吸取甘油冻存的含有植物表达载体的农杆菌菌株 100 μL 添加到含 50 mg·L⁻¹ kan 和 25 mg·L⁻¹ Rif 的 25 mL 液体 YEB 培养基中,28 ℃、180 r/min 摇菌 30 h 左右。

P1300-pPZP-F3'5'H-DFR



CHS pro. 花特异启动子; *Phalaenopsis F3'5'H*. 蝴蝶兰类黄酮 3'5'羟基化酶基因; *NOS ter.* *NOS* 终止子; *E35S pro.* 增强型 *CaMV* 35S 启动子; *Hyacinth DFR*. 风信子二氢黄酮醇 4-还原酶基因; *HPT* II. 潮霉素磷酸转移酶基因

图 1 质粒 p1300-pPZP-F3'5'H-DFR 的 T-DNA 示意图

CHS pro. Flower specific promoter; *Phalaenopsis F3'5'H*. *Phalaenopsis* flavonoid 3'5' hydroxylase gene; *NOS ter.* *NOS* terminator; *E35S pro.* Enhanced *CaMV* 35S promoter; *Hyacinth DFR*. *Hyacinth* dihydroflavonol 4-reductase gene; *HPT* II. Hygromycin phosphotransferase gene

Fig. 1 T-DNA schematic diagram of plasmid p1300-pPZP-F3'5'H-DFR

将摇好的菌液置于 50 mL 离心管中,封口后再将离心管置于 4 ℃、5 000 r/min 离心机中,离心 15 min,弃上清液,往下层沉淀中加入 30 mL 重悬液($MS+10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MES}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ PIC}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}$),重悬混匀后吸取 2 mL 用于菌液 OD_{600} 值测定,通过计算,向菌液中添加适量重悬液以调整其 OD_{600} 为 0.8。最后在 28 ℃、180 r/min 摇床中摇菌 2~3 h,摇完后以其作为浸染液。

1.2.3 转化受体的预培养 将悬浮培养后的胚性愈伤置于预培养基 $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ PIC}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 植物凝胶}$ 上;将大小一致的再生植株的小鳞片置于预培养基 $MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 植物凝胶}$ 上,在 $(25\pm2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下预培养,预培养时间为 0、1、2、3 和 4 d。

1.2.4 浸染及共培养 用预先制备好的浸染液对经过预培养的 2 种转化受体进行浸染,浸染时间为 10 min,浸染后将转化受体置于共培养基上共培养,共培养时间 0、1、2、3、4 和 5 d。胚性愈伤的共培养基为 $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ PIC}+10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MES}+(0、50、100、150、200)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ AS}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 植物凝胶}$;再生小鳞片的共培养基为 $MS+1.5\text{ mg/L NAA}+10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MES}+(0、50、100、150、200)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ AS}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 植物凝胶}$ 。

1.2.5 脱菌处理及筛选培养 将共培养后的转化受体置于含 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ cef}$ 的无菌水中脱菌处理 10 min,无菌水冲洗 2~3 次后置于吸水纸上沥干,接于筛选培养基上。胚性愈伤筛选培养基为: $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ PIC}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 植物凝胶}+200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ carb}+(0、5、10、15、20、25)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ hpt}$;再生小鳞片的筛选培养基为 $MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 植物凝胶}+200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ carb}+(0、5、10、15、20、25)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ hpt}$,每隔 2 周在各自培养基上继代 1 次。

表 1 用于本研究的引物

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>F3'5'H</i> -F	ATGTCCATCTTCTCATCGCAACCC
<i>F3'5'H</i> -R	AAACTCTCCTTTATC AAACAACCCC
<i>DFR</i> -F	GGATCCATGGAGATGGAGAAGGGGC
<i>DFR</i> -R	TCTAGACTAGCGC GAAGCAATGTGAACC
<i>HPT II</i> -F	TACACAGCCATCGGTCCAGA
<i>HPT II</i> -R	CGCAAGGAATCGGTCAATACAC

1.2.6 植株再生 筛选培养在 25 ℃、16 h 光照条件下进行,40 d 后,转化受体即可在各自的筛选培养基分化出小苗。在筛选培养基中长出的小苗,转接到生根培养基($1/2MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}+0.1\%\text{ AC}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 植物凝胶}$)。生根后的小苗继续培养,使其生长更加强壮。

以上各个处理均取转化受体 40~60 个,每个处理重复 3 次。每个处理在筛选培养 3 个月后进行统计,统计得到的潮霉素抗性苗数,计算稳定转化率(稳定转化率=潮霉素抗性苗数/转化受体数)。

1.2.7 转化植株的 PCR 检测 剪取抗性植株的细嫩叶片,采用 CTAB 法提取基因组 DNA。以提取的百合叶片的 DNA 为模板,根据载体中插入的 *F3'5'H*、*DFR* 和 *HPT II* 基因设计引物进行检测。其中 *F3'5'H* 扩增片段长度为 1 550 bp,*DFR* 扩增片段长度为 1 110 bp,*HPT II* 扩增片段长度为 554 bp。设计引物(见表 1)。将质粒 p1300-pPZP-*F3'5'H*-*DFR* 作为阳性对照,非转基因植株的 DNA 作为阴性对照。反应体系选取 25 μL 体系,反应程序为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;72 ℃再延伸 2 min。进行琼脂糖凝胶电泳实验,得到 PCR 结果。

1.2.8 转基因植株 RT-PCR 检测 使用 Omega 试剂盒提取百合 PCR 阳性植株和未转化植株总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 的纯度及浓度检测。使用 Preme Script RT reagent kit 试剂盒(TaKaRa 公司)进行反转录合成 cDNA 链。以 cDNA 为模板对 *F3'5'H* 基因进行 PCR 扩增分析。

1.2.9 转基因植株 Southern 印迹分析 选取 PCR 检测为阳性的转基因抗性植株提取足量 DNA,使用购买于罗氏的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒进行 Southern 印迹分析。以质粒 p1300-pPZP-*F3'5'H*-*DFR* 为模板,使用 *HPT II*-F 和 *HPT II*-R 为引物,合成的片段进行回收制备探针。选取 *EcoR I* 酶切过夜,然后进行琼脂糖凝胶电泳,再经变性,中和后用高盐转移法将胶上的样品转移到尼龙膜上,进行杂交,洗膜,显影。

2 结果与分析

2.1 Robina 百合遗传转化体系的优化

2.1.1 预培养时间对转化效率的影响 对百合的 2 种转化受体分别进行 0~4 d 预培养(图 2)。结果表明不经预培养直接进行浸染的胚性愈伤和小鳞片都比较容易发生褐化(图版 I,a),抗性芽诱导率

很低。小鳞片预培养 3 d 时稳定转化率最高,为 12.78%;预培养 4 d 后抗性芽诱导率又开始下降。而胚性愈伤预培养 2 d 稳定转化率最高,为 12.22%。可见不经过预培养的百合胚性愈伤和小鳞片直接与菌液接触会伤害到细胞,不利于抗性芽的产生,但时间过长,细胞则转化不敏感,也不利于农杆菌侵染。

2.1.2 共培养时间对转化效率的影响 预培养完后,对百合胚性愈伤和小鳞片进行共培养。由图 3 可以得出,胚性愈伤和小鳞片都是共培养 3 d 稳定转化率最高,分别是 12.23%和 11.94%。其中胚性愈伤共培养时间超过 3 d 转化率急速下降,而小鳞片的转化率下降缓慢。共培养时间越长,转化材料越不易脱菌,所以转化率也会降低。

2.1.3 AS 浓度对转化效率的影响 在侵染和共培养的过程中都需要加入一定量的 AS,加入 AS 有利于提高农杆菌 *Vir* 基因活性,*Vir* 基因(virulence genes)决定了农杆菌侵染能力^[9-10],从而可以提高转化效率。由图 4 可以看出,AS 为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,两者转化率最高,胚性愈伤为 11.67%,小鳞片为 11.11%。虽然愈伤组织和小鳞片的最适 AS 浓度相同,但是小鳞片在 $\text{AS}<100\ \mu\text{mol/L}$ 时,稳定转化率低于胚性愈伤,在 $\text{AS}>100\ \mu\text{mol/L}$ 时,稳定转化明显高于胚性愈伤。

2.1.4 潮霉素浓度筛选 在转化过程中选用潮霉素进行筛选实验,经过 2 个月的筛选,结果表明(表 2),当不加入潮霉素时,小鳞片和胚性愈伤的分化率分别是 88.89%和 91.33%,随着潮霉素浓度的的增加,分化率不断降低,当潮霉素浓度为 $20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,外植体几乎全部褐化,所以小鳞片和胚性愈伤的潮霉素的筛选浓度确定为 $20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 转基因植株的再生

2 种转化受体的获得(图版 I, b~i),经过筛选培养 45 d 后,未转化的胚性愈伤和小鳞片逐渐褐化死亡,而转化的会产生抗性芽(图版 I, j 和 k)。产生的抗性芽长度长到 3~5 cm 时,切下进行再培养,使用高糖培养基可以使其生长更加强壮(图版 I, l)。抗性苗长大后,就可以进行检测和移栽。

2.3 转化植株的 PCR 检测

获得 187 株百合潮霉素抗性苗,随机挑选生长强壮的小苗进行 PCR 检测,分别对 *F3'5'H*、*DFR* 和 *HPT II* 基因进行扩增,并进行琼脂糖凝胶电泳实验,最终有 15 株百合苗扩增得到目的条带,其中 9 株的 PCR 结果如下(图 5),说明外源基因整合到百合苗中(图 5)。

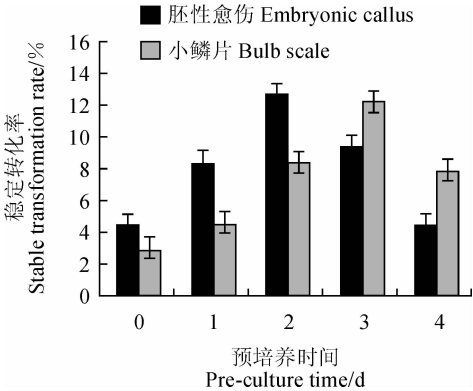


图 2 预培养时间对百合胚性愈伤和小鳞片稳定转化率的影响

Fig. 2 Stable transformation rate of lily embryonic callus and bulb scale in different pre-culture time

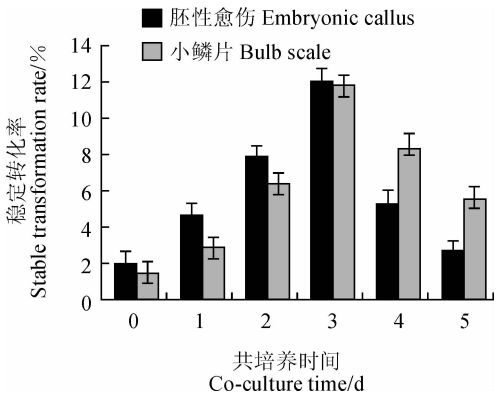


图 3 共培养时间对百合胚性愈伤和小鳞片稳定转化率的影响

Fig. 3 Stable transformation rate of lily embryonic callus and bulb scale in different co-culture time

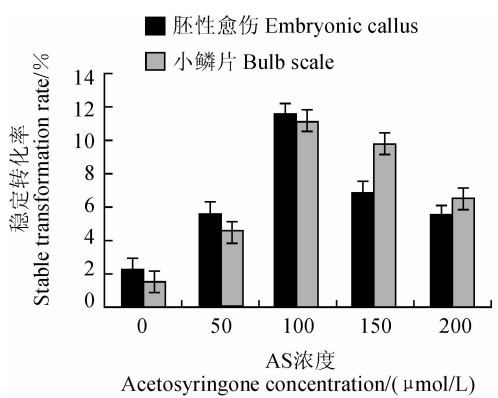


图 4 AS 浓度对百合胚性愈伤和小鳞片稳定转化率的影响

Fig. 4 Stable transformation rate of lily embryonic callus and bulb scale in different acetosyringone concentration

2.4 转化植株的 RT-PCR 检测

对 PCR 检测获得目的条带的 15 株百合苗再进行 RT-PCR 检测,最终有 9 株出现 *F3'5'H* 基因的目的条带(图 6),说明蓝色花基因 *F3'5'H* 在百合植株中进行了转录表达。

表 2 百合再生小鳞片和胚性愈伤组织的潮霉素敏感性实验

Table 2 The sensitivities of regenerated bulblets and embryonic callus from lily to hygromycin

潮霉素浓度 Concentration of hygromycin/(mg·L ⁻¹)	再生小鳞片 Regenerated bulblets		胚性愈伤 Embryonic callus	
	外植体数 No. of explants	不定芽分化率 Frequency of adventitious buds/%	外植体数 No. of explants	不定芽分化率 Frequency of adventitious buds/%
0	60	88.89±2.48a	50	91.33±2.33a
5	60	73.89±1.91b	50	75.33±5.14b
10	60	43.89±3.52c	50	44.67±3.09c
15	60	5.56±2.49d	50	8.00±1.98d
20	60	1.67±1.74de	50	0.67±1.12de
25	60	0±0.00e	50	0±0.00e

注:表中数据代表 3 次重复试验的“平均值±标准误”;同列数据后标不同小写字母者表示在 $P=0.05$ 水平差异显著。

Note:Data in the table are “average±standard error”of there repeat tests. Data in the same column with different lowercase letters have significant differences at $P=0.05$ level.

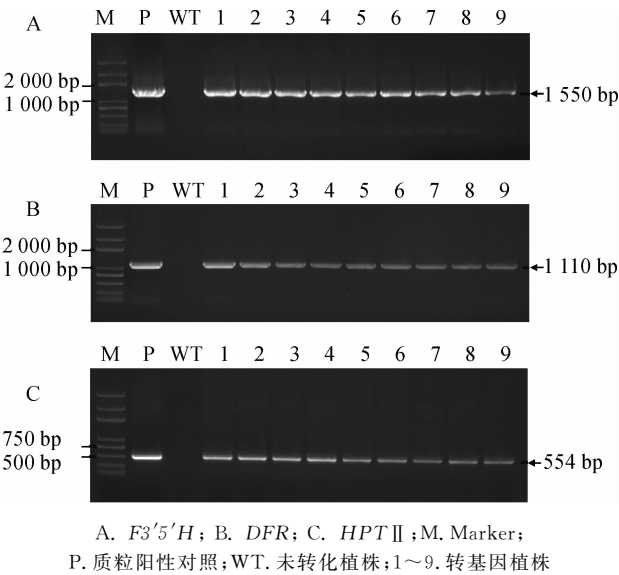


图 5 百合潮霉素抗性植株的 $F3'5'H$ 、 DFR 和 $HPT II$ 基因的 PCR 检测
A. $F3'5'H$; B. DFR ; C. $HPT II$; M. Marker; P. 质粒阳性对照; WT. 未转化植株; 1~9. 转基因植株
Fig. 5 PCR detection of transformed plantlets for presence of $F3'5'H$ gene, DFR gene and $HPT II$ gene

2.5 转化植株的 Southern 印迹分析

为了再进一步检测目的基因是否转入到百合基因组中,对经过 PCR 和 RT-PCR 的植株再进行 Southern 印迹分析。结果表明(图 7),有 6 株出现杂交带,分别为植株 1、2、3、4、5、9,其中植株 1、2、3、4、5 为单一杂交带,说明其为潮霉素磷酸转移酶基因的单拷贝;植株 9 有 2 条杂交带,说明其为潮霉素磷酸转移酶基因的 2 个拷贝,植株 6、7、8 和对照未出现杂交信号,说明潮霉素磷酸转移酶基因没有转入到百合基因组中。

3 讨论

农杆菌介导法是现代百合转基因研究中常用的

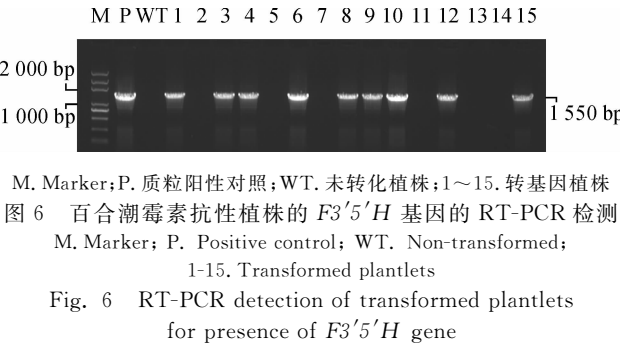


图 6 百合潮霉素抗性植株的 $F3'5'H$ 基因的 RT-PCR 检测
M. Marker; P. Positive control; WT. Non-transformed; 1-15. Transformed plantlets
Fig. 6 RT-PCR detection of transformed plantlets for presence of $F3'5'H$ gene

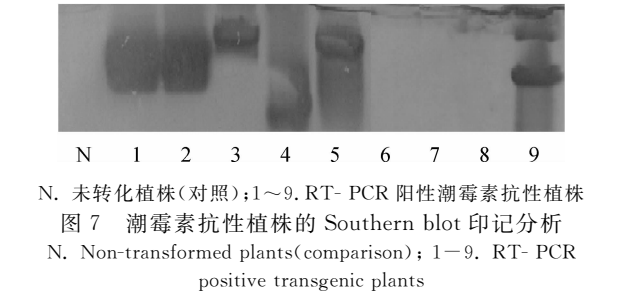


图 7 Southern blot analysis of putative transgenic lines
N. 未转化植株(对照); 1~9. RT-PCR 阳性潮霉素抗性植株
Fig. 7 Southern blot analysis of putative transgenic lines
N. Non-transformed plants(comparison); 1-9. RT-PCR positive transgenic plants

方法^[11],自 1992 年 Cohen 等^[12]首次通过农杆菌介导法获得转基因百合以来,百合转基因的研究取得了非常大的进步。其中转化材料对转化结果有很大的影响^[11],愈伤组织和小鳞茎是最常用的转化材料。张杰等^[13]使用不同浓度配比的激素 NAA 和 6-BA,对 LA 系列百合 Eyeliner 的花器官进行诱导,诱导出愈伤组织和不定芽。本实验室^[1-2]发现使用不同浓度的 PIC 激素对 OT 系列百合 Robina 花器官进行诱导,也可以诱导出愈伤组织和不定芽。本研究中使用 1.0 mg·L⁻¹PIC 诱导花丝同时获得了胚性愈伤和小植株。

胚性愈伤组织作为转基因受体材料具有很多的优点,例如繁殖速度比较快速,稳定转化的效率比较高,嵌合体比较少^[14]。2003 年时 Mercuri A 等^[15]就利用胚性愈伤组织作为转化受体,成功转化了百

合。本研究中对胚性愈伤组织进行了悬浮培养^[16-17],前期权永辉^[2]对 Robina 百合悬浮培养技术进行了研究,本研究在其基础上进行优化,加入 $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸降低百合褐化率,成功获得 Robina 百合的悬浮系,用作百合转基因的受体材料。

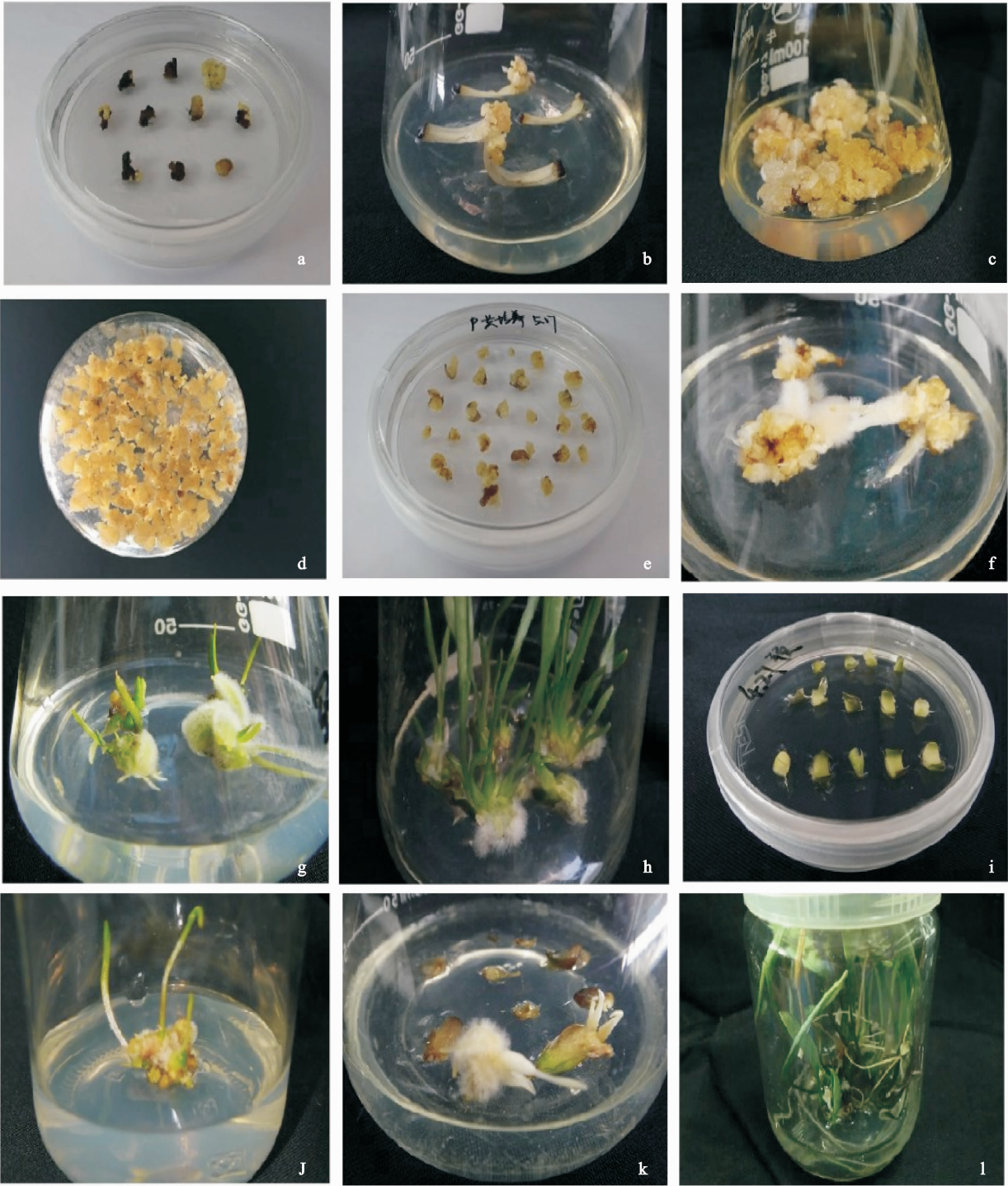
使用小鳞片作为百合转化的受体材料的研究有很多,因为用小鳞片不定芽分化率高,在器官发生过程中不易形成嵌合体^[18]。例如,2012 年袁霖等^[19]使用东方百合索邦的鳞片成功转化了花青素合成调节基因 *Roseal*;2014 年李云华等^[20]使用新铁炮百合鳞片成功转化了 *LfMADS1* 基因;2014 年张焕

等^[21]使用亚洲百合鳞片成功转化了 *GsZFP1* 基因。本研究使用的是再生植株的小鳞片,转化时污染率低,可以提高转化的成功率。同时本研究发现在 Robina 百合中,只使用 NAA 一种激素即可使小鳞片再生出小苗,节约了研究的成本。

在本研究中同时使用了 2 种转化材料,都获得了百合抗性植株,经过 PCR、RT-PCR 以及 Southern 印记分析最终得到了 6 株携带蓝色基因 *F3'5'H* 的转基因百合,为后续获得蓝色的百合花提供了技术支持和物质基础。

参考文献:

- QI Y Y, DU L J, QUAN Y H, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspension cultures and plant regeneration in *Lilium tenuifolium* oriental $\times$ trumpet 'Robina' [J]. *Acta Physiol. Plant.* 2014, **36**(8): 2 047-2 057.
- 权永辉. 百合体细胞胚的诱导及悬浮培养的研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2013.
- 张施君,周厚高,潘文华,等. 麝香百合的抗热生理指标初探[J]. 中国农学通报,2005, **21**(3): 240-242.
ZHANG S J, ZHOU H G, *et al.* Preliminary studies on the physiology of heat tolerance in *Lilium longiflorum* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, **21**(3): 240-242.
- 孟 丽. 蓝色花形成关键基因的分离及其表达分析[D]. 北京:北京林业大学,2006.
- FILIPPA BRUGLIERA, TAO G Q, URSULA TEMS, *et al.* Violet/blue chrysanthemums-metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors [J]. *Plant Cell Physiol.* 2013, **54**(10): 1 696-1 710.
- TANAK Y, BRUGLIERA F. Flower colour [C]. //Ainsworth, Blackwell, Flowering and its manipulation. Oxford. 2006;201-239.
- 祁银燕. 两种单子叶植物蓝色花相关基因的功能验证[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2013.
- 张 萍,刘雅莉,祁银燕,等. 利用灰色关联分析法选择适宜转蓝色基因的百合品种[J]. 中国农学通报,2010, **26**(20): 52-56.
ZHANG P, LIU Y L, QI Y Y, *et al.* The Selection of lily cultivars suitable for being transformed blue genes by using the grey correlation analysis [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, **26**(20): 52-56.
- 邹 智. 农杆菌 Vir 基因诱导因子研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2011, **31**(7): 126-132.
ZOU Z. Advances on factors influencing induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes [J]. *China Biotechnology*, 2011, **31**(7): 126-132.
- LEO S. MELCHERS, DAVE V. THOMPSON, KEN B. IDER, *et al.* Molecular characterization of the virulence gene *virA* of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid [J]. *Plant Molecular Biology*, 1988, **11**(2): 227-237.
- LIU X H, GU J H, JWANG J M, *et al.* Lily breeding by using molecular tools and transformation systems [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, **41**(10): 6 899-6 908.
- COHEN A, CAROLE A, MEREDITH P. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium* [J]. *Acta Horticulturae*, 1992, **325**(86): 611-618.
- 张 杰,李 洋,孙红梅. LA 系列百合花器官组培快繁技术研究[J]. 西北植物学报,2014, **34**(9): 1 894-1 899.
ZHANG J, LI Y, SUN H M. Floral organs tissue culture propagation technology of *Lilium longiflorum* $\times$ *L. asiaticum* Hybrid 'Eyeliner' [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*, 2014, **34**(9): 1 894-1 899.
- 王丽娜,廖卉荣,杨素丽,等. 百合遗传转化体系研究进展[J]. 贵州农业科学,2008, **36**(1): 127-133.
WANG L N, LIAO H R, YANG S L, *et al.* Research progress on genetic transformation system in lily [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2008, **36**(1): 127-133.
- MERCURI A, DE BENEDETTI L, BRUNA S, *et al.* *Agrobacterium*-Mediated transformation with *Rol* genes of *Lilium longiflorum* Thunb [C]//XXI International eucarpia symposium on classical versus molecular breeding of ornamentals-Part I. [S. 1]:[s. n.]. 2003:129-136.
- PS CHOUREY, DB ZURAWSKI. Callus formation from protoplasts of a maize cell culture [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1981, **59**(2): 341-344.
- A TRIBULATO, P C REMOTTI, LOFFLER H J M. Occurrence of embryo-like structures and plant regeneration from a cell suspension of *Lilium longiflorum* [J]. *Acta Hortic.*, 1997, **447**(1): 205-206.
- 狄翠霞,张满效,谢忠奎,等. 合组织培养和遗传转化的研究进展[J]. 西北植物学报,2006, **26**(4): 858-863.
DI C X, ZHANG M X, XIE Z K, *et al.* Research advances in lily tissue culture and genetic transformation [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*, 2006, **26**(4): 858-863.
- 袁 霖,魏 迟,贾桂霞. 花青素合成调节基因 *Roseal* 转化东方百合索邦的研究[J]. 广东农业科学,2012, **10**(3): 10-22.
YUAN L, WEI C, JIA G X. Study on transformation of *Lilium orientale* Sorbonne with an anthocyanin regulatory gene *Roseal* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, **10**(3): 10-22.
- 李云华,刘 青,刘青林. *LfMADS1* 基因对新铁炮百合 'Raizen No. 1' 的遗传转化[J]. 生物技术通报,2014, **26**(3): 86-93.
LI Y H, LIU Q, LIU Q L. Study on genetic transformation of *LfMADS1* gene into *Lilium* $\times$ *formosanum* 'Raizen No. 1' [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, **26**(3): 86-93.
- 张 焕,郑 佳,等. 农杆菌介导亚洲百合转化体系的建立及转 *GsZFP1* 基因研究[J]. 生物技术通报,2014, **26**(2): 91-96.
ZHANG H, ZHENG J, *et al.* Establishment of *Agrobacterium*-mediated Asiatic Lily 'Cedeazze' transformation system and transfer of *GsZFP1* genes [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, **26**(2): 91-96.



图版 I 百合胚性愈伤和小鳞片的产生及其转化成苗过程
a. 预培养褐化的外植体; b. 花丝产生胚性愈伤; c. 胚性愈伤组织; d. 百合悬浮培养系; e. 胚性愈伤的共培养; f. 花丝诱导产生的芽; g. 百合小芽; h. 长大的百合苗; i. 小鳞茎的共培养; j. 胚性愈伤产生的抗性芽; k. 小鳞片产生的抗性芽; l. 抗性植株
Plate I Production of lily embryonic callus and bulb scales and the transformation into seedling
a. Pre-cultured explants browning; b. Filaments produce embryogenic callus; c. Embryogenic callus; d. Suspension culture system of Lily; e. Co-culture of embryogenic callus; f. Filaments induced bud; g. Lily bud; h. Growing lily seedlings; i. Co-culture of small bulbs; j. Resistant buds produced from embryogenic callus; k. Resistant bud produced by bulb scale; l. Resistant plants

(编辑:宋亚珍)