

# 百合遗传转化受体系统的建立

孟 芮, 刘雅莉, 王跃进, 张剑侠

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以东方百合“索邦”(Lilium tenuifolium oriental 'Sorbonne')的鳞片、再生形成的小鳞片和叶柄为外植体,进行了愈伤组织诱导、不定芽分化、潮霉素抗性筛选及生根研究。结果表明,3种外植体均可在培养基MS+0.5 mg/L NAA+0.4 mg/L 6-BA+90 g/L Sucrose+4.0 mg/L VB<sub>1</sub>中形成大量的愈伤组织,愈伤组织分化不定芽的最适培养基为MS+0.5 mg/L 6-BA,筛选的潮霉素质量浓度为20 mg/L,生根培养基为1/2MS+0.2或0.4 mg/L BA+0.1%活性炭。

[关键词] 东方百合“索邦”;愈伤组织诱导;不定芽分化;抗性筛选

[中图分类号] S682.2+90.4+7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)04-0032-07

百合(Lilium spp.)是世界著名的鲜切花之一,其美好寓意更博得许多人的青睐。长期以来,百合的品种改良一直依赖于传统的遗传育种方法。但随着生物技术的不断发展,通过分子育种进行植物种质改良已成为传统育种的重要补充。向百合中导入抗衰老基因、花色调控基因、抗病基因、抗虫基因等外源基因以改良其品质、提高其观赏价值和经济效益,对百合品种改良具有重要意义。在植物遗传转化中,建立高效、稳定且再生能力强的植物受体系统是实现基因转化的先决条件。

利用百合野生种和栽培种的不同部位,如花器、地上茎、茎尖、叶片、鳞片叶、珠芽以及原生质体等作为外植体进行离体培养,均可通过不定芽再生出植株<sup>[1-6]</sup>。虽然百合鳞片<sup>[7]</sup>、花丝<sup>[8]</sup>可诱导愈伤组织,但国内外尚无采用再生形成的小鳞片和叶柄为外植体诱导愈伤组织的报道。W atad等<sup>[7]</sup>用微弹轰击法对百合进行了遗传转化并检测到了表达活性;Langeveld等<sup>[9]</sup>、Hoshi等<sup>[10]</sup>采用农杆菌介导法对百合进行了遗传转化并获得了转化植株;唐东芹等<sup>[11]</sup>通过根癌农杆菌介导半夏凝集素基因pB IXPTA 转化百合,初步检测已获得转基因植株。

通过植物组织培养再生植株的途径一般有2条:一是通过脱分化形成愈伤组织,再分化形成植株;二是直接分化出不定芽和不定根形成再生植株。以快速繁殖为目的的百合组织培养以采用第2条途

径较为常见。为了避免愈伤组织阶段细胞的突变,Hoshi等<sup>[10]</sup>也认为应以第2条途径为主。但王关林等<sup>[12]</sup>认为,以分子育种为最终目标的再生系统的建立则不同,应以愈伤组织作为基因转化的良好受体材料,这样才有利于外源基因整合到植物基因组中。本研究以东方百合“索邦”的鳞片、再生形成的小鳞片和叶柄为外植体,诱导形成愈伤组织,并分化出不定芽和根,建立遗传转化受体系统,以为东方百合“索邦”的基因转化和分子育种奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

试验于2004-07~2005-07在农业部西北园艺植物种质资源与遗传改良重点实验室进行。供试品种为东方百合“索邦”(Lilium tenuifolium oriental 'Sorbonne')。

### 1.2 愈伤组织诱导

1.2.1 鳞片的愈伤组织诱导 将鳞片叶剥下,剔除病残部分,先用自来水冲洗8 h,再用体积分数75%酒精灭菌30 s,然后用体积分数0.1%升汞消毒10 min,最后用无菌水冲洗3次。将鳞片叶切成1 cm<sup>2</sup>的小块,背面朝下放在培养基上。愈伤组织诱导采用MS基本培养基,并附加不同质量浓度的NAA(0.5, 1.0, 1.5 mg/L),6-BA(0.1, 0.2, 0.4 mg/L),SV(30 g/L 蔗糖,60 g/L 蔗糖+2.0 mg/L VB<sub>1</sub>,90

收稿日期 2005-11-21

基金项目 国家自然科学基金项目(30371013)

作者简介 孟 芮(1981-),女,河南安阳人,在读硕士,主要从事观赏植物生物技术研究。

通讯作者 刘雅莉(1960-),女,陕西西安人,副教授,主要从事鲜切花采后生理和育种研究。E-mail: ly16151@126.com

g/L 蔗糖+ 4.0 mg/L VB<sub>1</sub>), 及琼脂 6.5 g/L, 调pH 为5.8~6.0, 在25℃下暗培养。试验重复2次。不定期观察, 50 d时统计形成愈伤组织的外植体数。

1.2.2 再生形成的小鳞片的愈伤组织诱导 诱导再生形成的小鳞片的愈伤组织时, 以鳞片愈伤组织最适培养基为参考, 培养基中附加蔗糖 90 g/L, VB<sub>1</sub> 4.0 mg/L, 另附加不同质量浓度的NAA (0.5, 0.6, 0.7 mg/L) 和6-BA (0.3, 0.4, 0.5 mg/L)。培养条件与鳞片愈伤组织诱导相同。不定期观察, 50 d时统计形成愈伤组织的外植体数。

1.2.3 叶柄的愈伤组织诱导 把再生形成的叶柄切成1 cm的小段进行愈伤组织诱导。愈伤组织诱导以MS为基本培养基, 并附加不同质量浓度的NAA (1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 mg/L), 6-BA (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L), BA (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L), TDZ (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L), KT (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L) 和2,4-D (0.2, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L)。同时采用MS+ 0.5 mg/L NAA+ 0.4 mg/L 6-BA+ 90 g/L 蔗糖+ 4.0 mg/L VB<sub>1</sub>的培养基对叶柄进行愈伤组织诱导。培养条件与鳞片愈伤组织诱导相同。不定期观察, 50 d时统计形成愈伤组织的外植体数。

### 1.3 不定芽分化

将愈伤组织切成1 cm<sup>2</sup>的小块, 采用MS基本培养基附加不同质量浓度的6-BA (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L), NAA (0.1, 0.2, 0.5 mg/L), KT (0.5,

2.0, 3.0 mg/L) 进行不定芽诱导, 另加蔗糖 30 g/L, 琼脂 6.5 g/L, 调pH 值为5.8, 在25℃、光强1 000~1 200 lx、光照时间为12 h/d的条件下培养。不定期观察, 30 d时统计愈伤组织分化的不定芽数。

### 1.4 潮霉素抗性筛选

以选择出的愈伤组织不定芽分化培养基为基本培养基, 附加不同质量浓度的潮霉素 (5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L), 筛选百合愈伤组织对潮霉素的抗性浓度。不定期观察, 50 d时统计抗性筛选结果。

### 1.5 生根培养

生根培养基为1/2MS附加0.1%活性碳和不同质量浓度的BA (0.2, 0.4 mg/L)。培养条件与不定芽分化相同。不定期观察, 30 d时统计生根结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织诱导结果

2.1.1 鳞片愈伤组织诱导 由表1可见, 9种愈伤组织诱导培养基均能产生愈伤组织, 但愈伤组织诱导率存在差异, 其中A3培养基愈伤组织诱导率最高, 为81.1%; A2, A4, A7也可形成较多的愈伤组织, 愈伤组织诱导率约为50%。观察发现, 在愈伤组织诱导培养基上培养20 d时鳞片膨大, 30 d可产生愈伤组织, 培养50 d时以A3培养基中形成的愈伤组织最多, 且愈伤组织疏松, 偶尔在愈伤上还有不定芽产生(图1), 而A2和A7培养基上形成的愈伤组织紧密, 且膨大变态。

表1 不同培养基对东方百合‘索邦’鳞片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different media on inducing callus of scale leaf of *Lilium oriental* ‘Sorbonne’

培养基编号 No. of media	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	SV(蔗糖 (g·L <sup>-1</sup> )+VB <sub>1</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )) SV(sucrose+ VB <sub>1</sub> )	外植体总数 Total No. of explants	形成愈伤 组织数 No. of explants forming callus	愈伤组织 诱导率/% Frequency of callus induction	显著性 Notability
A1	0.5	0.1	30+0	50	15	30.0	bc BC
A2	0.5	0.2	60+2.0	58	29	50.0	b ABC
A3	0.5	0.4	90+4.0	53	43	81.1	a A
A4	1.0	0.1	60+2.0	130	67	51.5	ab AB
A5	1.0	0.2	90+4.0	55	10	18.2	c C
A6	1.0	0.4	30+0	52	17	32.7	bc BC
A7	1.5	0.1	90+4.0	60	30	50.0	b ABC
A8	1.5	0.2	30+0	63	28	44.4	bc BC
A9	1.5	0.4	60+2.0	75	21	28.0	bc BC

方差分析结果(表2)表明, NAA对愈伤组织诱导的影响极显著, 6-BA和蔗糖+VB<sub>1</sub>对愈伤组织诱导的影响显著。说明NAA是影响愈伤组织诱导的主要因素, 3种因素对愈伤组织的影响顺序为NAA > 蔗糖+VB<sub>1</sub> > 6-BA。

各因素间不同水平多重比较分析结果(表3)表明, 0.5 mg/L NAA与1.0和1.5 mg/L NAA间愈伤组织诱导率差异极显著, 1.0 mg/L NAA与1.5 mg/L NAA间差异不显著。6-BA在愈伤组织诱导中, 不同质量浓度间未达到极显著差异水平, 但0.1

和0.4 mg/L 6-BA 的愈伤组织诱导率显著高于0.2 mg/L 6-BA, 而0.1与0.4 mg/L 6-BA 间差异不显著。90 g/L 蔗糖+ 4.0 mg/L VB<sub>1</sub>的愈伤组织诱导率极显著高于30 g/L 蔗糖+ 0 mg/L VB<sub>1</sub>, 90 g/L 蔗糖+ 4.0 mg/L VB<sub>1</sub>和60 g/L 蔗糖+ 2.0 mg/L VB<sub>1</sub>的愈伤组织诱导率显著高于30 g/L 蔗糖+ 0 mg/L

VB<sub>1</sub>, 90 g/L 蔗糖+ 4.0 mg/L VB<sub>1</sub>与60 g/L 蔗糖+ 2.0 mg/L VB<sub>1</sub>间差异不显著。因此, 各因素最优处理组合为NAA 0.5 mg/L, 6-BA 0.1或0.4 mg/L, 蔗糖+ VB<sub>1</sub>为90 g/L + 4.0 mg/L 或60 g/L + 2.0 mg/L。

表2 不同培养基对东方百合‘索邦’鳞片愈伤组织诱导的正交方差分析结果

Table 2 Analysis of variance of orthogonal test of different media on inducing callus of scale leaf of *Lilium oriental* ‘Sorbonne’

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F 值 F value
NAA	2	471.023 1	234.511 5	13.712 4**
6-BA	2	240.355 1	120.177 6	6.997 2*
SV	2	339.729 3	169.864 7	9.890 2*
误差 Error	2	154.575 4	17.175 0	

表3 不同因素不同水平多重比较分析结果

Table 3 Multiple comparison of different factors and levels

处理 Treating	NAA		6-BA		SV				
	均值 A average	显著性 Notability		均值 A average	显著性 Notability		均值 A average	显著性 Notability	
		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
1	47.205	a	A	41.748	a	A	34.148	b	B
2	35.452	b	B	35.003	b	A	41.633	a	AB
3	37.567	b	B	43.472	a	A	44.442	a	A

不同因素间交互作用方差分析结果表明, A3培养基与A8、A6、A1、A9、A5之间差异极显著, 与A2、A7差异显著, 与A4培养基差异不显著。综合分析认为, 愈伤组织诱导最适培养基为A3培养基, 即MS + 0.5 mg/L NAA + 0.4 mg/L 6-BA + 90 g/L 蔗糖 + 4.0 mg/L VB<sub>1</sub>。

2.1.2 再生形成的小鳞片愈伤组织诱导 由表4可以看出, B2培养基形成的愈伤组织最多, 愈伤组织诱导率达81.0%。观察发现, 再生形成的小鳞片培养20 d有不定芽产生, 30 d有少量愈伤组织产生, 不定芽有的直接由小鳞片上分化, 有的由愈伤组织分化而来(图2)。

表4 不同培养基对东方百合‘索邦’再生形成的小鳞片愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of different media on inducing callus of regenerated scale leaf of *Lilium oriental* ‘Sorbonne’

培养基编号 No. of media	NAA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	6-BA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	外植体总数 Total No. of explants	形成愈伤组织数 No. of explants forming callus	形成不定芽数 No. of explants forming adventitious buds	愈伤组织诱导率/% Frequency of callus induction
B1	0.5	0.3	47	0	12	0
B2	0.5	0.4	58	47	34	81.0
B3	0.5	0.5	69	0	21	0
B4	0.6	0.3	48	0	17	0
B5	0.6	0.4	66	0	26	0
B6	0.6	0.5	51	4	20	7.8
B7	0.7	0.3	56	3	20	5.3
B8	0.7	0.4	58	0	16	0
B9	0.7	0.5	64	1	7	1.6

当蔗糖质量浓度为90 g/L, VB<sub>1</sub>质量浓度为4 mg/L时, 统计分析不同质量浓度NAA和6-BA对再生形成的小鳞片愈伤组织诱导的影响, 结果表明,

6-BA的极差(|R|=25.23)大于NAA(|R|=24.7), 但相差不大, 说明6-BA和NAA是影响愈伤组织分化的主要因素。对不同质量浓度的NAA和6-

BA 平均愈伤诱导率的分析表明, NAA 以  $0.5 \text{ mg/L}$  的平均愈伤组织诱导率最高, 6-BA 以  $0.4 \text{ mg/L}$  的平均愈伤组织诱导率最高, 说明激素 NAA 和 6-BA 的最佳质量浓度组合为  $0.5 \text{ mg/L} + 0.4 \text{ mg/L}$ 。因此, 再生形成的小鳞片愈伤组织诱导的最适培养基为  $\text{MS} + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 0.4 \text{ mg/L 6-BA} + 90 \text{ g/L 蔗糖} + 4.0 \text{ mg/L VB}_1$ , 与田间取材的鳞片愈伤组织诱导培养基一致。

2.1.3 叶柄愈伤组织诱导 叶柄愈伤组织诱导结果(表5, 图3)显示, 附加不同质量浓度 NAA, 6-BA, BA, TDZ 和 KT 的培养基中均无愈伤组织产生。附加不同质量浓度 2, 4-D 对叶柄进行愈伤组织诱导时, 大多数情况直接形成不定芽, 不定芽分化率可达

93.3%。在附加  $0.2 \text{ mg/L}$  2, 4-D 的 C1 培养基中可产生少量愈伤组织, 但其诱导率仅为 6.7%, 而采用鳞片愈伤组织诱导培养基 A3 对叶柄的愈伤组织诱导率可达 65.8%。

单独使用不同质量浓度的 NAA, 6-BA, BA, TDZ 和 KT 均不能在叶柄外植体上诱导出愈伤组织。尽管 2, 4-D 在  $0.2 \text{ mg/L}$  时可诱导出少量愈伤组织, 但其效果并不理想。因此, 叶柄愈伤组织诱导最适培养基与田间取材的鳞片和再生形成的小鳞片的愈伤组织诱导培养基一致, 即  $\text{MS} + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 0.4 \text{ mg/L 6-BA} + 90 \text{ mg/L 蔗糖} + 4.0 \text{ mg/L VB}_1$ , 但其愈伤组织诱导率低于后二者。



图1 鳞片形成的愈伤组织

Fig 1 Callus of scale leaf

图2 再生小鳞片形成的愈伤组织

Fig 2 Callus of regenerated scale leaf

图3 叶柄形成的愈伤组织

Fig 3 Callus of petiole

表5 不同培养基对东方百合‘索邦’叶柄愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effect of different media on inducing callus of petiole of *Lilium oriental* ‘Sorbonne’

培养基编号 No. of media	2, 4-D/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	外植体总数 Total No. of explants	形成愈伤组织数 No. of explants forming callus	形成不定芽数 No. of explants forming adventitious buds	愈伤组织诱导率/% Frequency of callus	不定芽分化率/% Frequency of adventitious
C1	0.2	135	9	126	6.7	93.3
C2	1.0	150	0	95	0	63.3
C3	2.0	145	0	110	0	75.9
C4	3.0	105	0	60	0	57.1
C5	4.0	85	0	50	0	58.8
A3	-	76	50	1	65.8	1.3

## 2.2 愈伤组织不定芽分化结果

培养 5 d 时, 可观察到培养基上的愈伤组织有小的不定芽突起, 10 d 时愈伤组织分化出不定芽, 20 d 分化出较多的不定芽, 30 d  $1 \text{ cm}^2$  的愈伤组织上分化出大量不定芽。在 D5 培养基上,  $1 \text{ cm}^2$  的愈伤组织不定芽分化数达 3.23 个, 为分化不定芽的最适培养基(表6, 图4)。

## 2.3 潮霉素抗性筛选结果

在遗传转化中, 对含潮霉素选择基因的载体来说, 进行潮霉素抗性质量浓度筛选是必不可少的步骤。采用 D5 培养基附加不同浓度的潮霉素, 对愈伤组织进行潮霉素抗性筛选, 结果见表7。观察发现, 在 20 d 内, 附加不同质量浓度潮霉素后, 愈伤组织无明显变化; 30 d 后则逐渐出现褐化现象, 且随潮霉素质量浓度的升高, 褐化愈加严重; 50 d 时, 附加 5

和10 mg/L 潮霉素的D5 培养基上产生了较多的不定芽, 附加15 mg/L 潮霉素的D5 培养基上有少量不定芽产生, 而当潮霉素质量浓度达到20 mg/L 时, 愈

伤组织全部褐化死亡(表7)。因此, 愈伤组织潮霉素抗性质量浓度以20 mg/L 为宜。

表6 不同培养基对东方百合‘索邦’愈伤组织不定芽分化的影响

Table 6 Effect of different media on inducing adventitious buds from callus of *Lilium oriental* ‘Sorbonne’

培养基编号 No. of media	6-BA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	KT/ (mg · L <sup>-1</sup> )	外植体数 No. of explants	分化不定芽数 No. of adventitious buds	每 cm <sup>2</sup> 不定芽数 No. of adventitious buds per cm <sup>2</sup>
D1	1.0	0.1	-	26	42	1.62
D2	1.0	0.2	-	30	18	0.6
D3	1.0	0.5	-	26	46	1.77
D4	1.0	-	-	28	32	1.14
D5	0.5	-	-	26	84	3.23
D6	2.0	-	-	26	14	0.54
D7	3.0	-	-	14	6	0.43
D8	4.0	-	-	20	6	0.3
D9	-	-	0.5	20	12	0.6
D10	-	-	2.0	20	18	0.9
D11	-	-	3.0	20	12	0.6
D12	-	0.2	2.0	20	0	0
D13	-	0.2	3.0	20	6	0.3

表7 不同质量浓度潮霉素对愈伤组织的抗性筛选结果

Table 7 Sensibility of callus to hygromycin of *Lilium oriental* ‘Sorbonne’

培养基编号 No. of media	潮霉素/ (mg · L <sup>-1</sup> ) Hygromycin	外植体数 No. of explants	分化不定芽数 No. of adventitious buds	褐变数 No. of browning	褐变率/% Frequency of browning	愈伤组织生长状况 Growth situation of callus
D5(1)	5	34	34	0	0	芽较多 More adventitious buds
D5(2)	10	26	24	4	15.4	芽较多 More adventitious buds
D5(3)	15	30	16	14	46.7	芽较少 Less adventitious buds
D5(4)	20	28	4	24	85.7	部分褐化, 无芽分化 Part of callus browning, no adventitious buds
D5(5)	25	26	1	25	96.2	褐化, 无芽分化 Browning, no adventitious buds
D5(6)	30	28	0	28	100	全部褐死 Die of browning

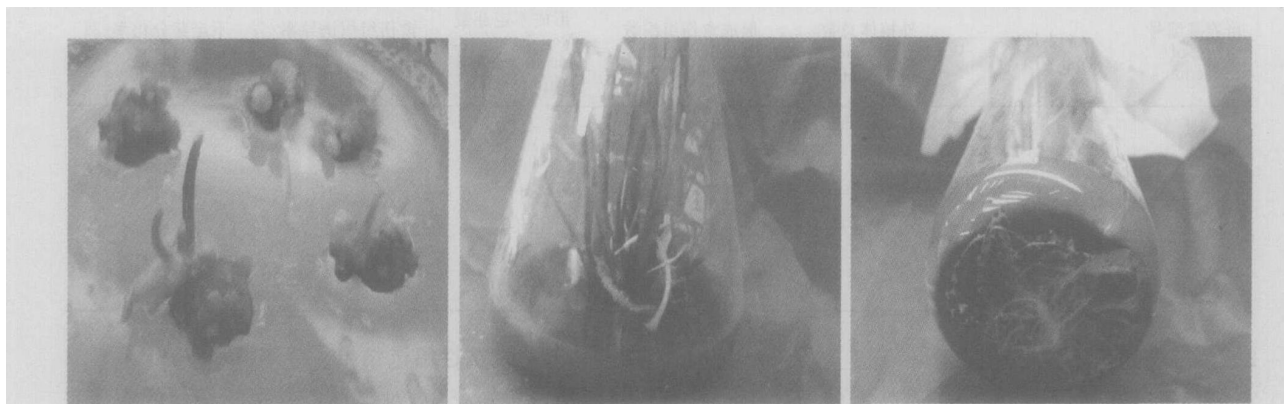


图4 愈伤组织分化不定芽

图5 生根培养

图6 生根培养形成的根系

Fig 4 Adventitious buds of callus

Fig 5 Rooting culture

Fig 6 Rootage of rooting culture

2.4 生根试验结果

以1/2MS 为基本培养基, 附加0.2 或0.4 mg/L BA 和0.1% 活性炭, 7 d 后即可生根(图5, 图6), 30 d 可形成大量的根系。2 种质量浓度的BA 生根结果

差异不大。

3 讨论

以愈伤组织再生系统建立的基因转化受体系统

与直接分化受体系统相比, 其外植体细胞经历了脱分化和再分化两个过程, 使已分化的细胞均回复到脱分化的分生细胞水平, 具有易于接受外源基因的能力, 因此转化率较高<sup>[12]</sup>。在百合离体培养过程中, 利用百合的各种外植体器官, 如花器官、地上茎、茎尖、叶片、鳞片叶、珠芽等很容易直接分化不定芽, 但愈伤组织的诱导一直是一个难以解决的问题, 国内外尚无采用再生形成的小鳞片和叶柄诱导出愈伤组织的报道。Loretta Bacchetta 等<sup>[13]</sup>以叶柄为外植体未诱导出愈伤组织; W atad 等<sup>[7]</sup>以百合品种 ' Snow Queen ' 的鳞片为外植体, 采用 MS+ 1.0 mg/L NAA+ 0.1 mg/L 6-BA 培养基诱导出了愈伤组织。本研究采用此培养基也诱导出了愈伤组织, 但其诱导率明显低于培养基 MS+ 0.5 mg/L NAA+ 0.4 mg/L 6-BA+ 90 g/L 蔗糖+ 4 mg/L VB<sub>1</sub> 的诱导率, 该培养基对再生形成的小鳞片和叶柄也可以诱导出大量的愈伤组织。

在植物组织培养中, 生长素的作用主要在于诱导愈伤组织的形成, 低质量浓度的 2, 4-D 有利于胚状体的分化, NAA 有利于单子叶植物的分化<sup>[14]</sup>。本研究结果也表明, 2, 4-D 对百合愈伤组织的诱导效果不如 NAA。刘选明等<sup>[15]</sup>研究认为, 2, 4-D 可以诱导龙牙百合鳞片叶形成愈伤组织和体细胞胚, 而本试验中 2, 4-D 在叶柄外植体愈伤组织诱导中直接分

化形成不定芽, 无愈伤组织产生。

不同激素质量浓度之间的配合使用对愈伤组织的诱导比较重要, 适宜的质量浓度配合可以诱导出高质量的愈伤组织, 以鳞片为外植体尽管在 A 2, A 4 和 A 7 培养基中也可诱导出较多的愈伤组织, 但形成的愈伤组织紧密, 膨大变态。温度也是愈伤组织诱导的一个关键因素, 温度恒定在 25 ℃ 时, 可形成疏松的愈伤组织; 而温度高于 25 ℃ 时, 形成的愈伤组织也会膨大变态。

糖类对愈伤组织的诱导也有重要作用。在菜豆和丁香的组织培养中, 增加蔗糖的使用浓度有利于愈伤组织形成<sup>[16]</sup>。董建新等<sup>[17]</sup>研究认为, 当蔗糖质量浓度为 10~ 40 g/L 时, 蔗糖的质量浓度与除虫菊的愈伤组织增长量成正比。本试验结果也表明, 增加蔗糖浓度有利于愈伤组织的形成, 且蔗糖质量浓度为 90 g/L 时, 最有利于百合愈伤组织的形成。

此外, 曹孜义等<sup>[14]</sup>研究认为, VB<sub>1</sub> 与愈伤组织的产生和生活力有密切关系, 其浓度如果低于 50 μg, 培养的组织不久就转为深褐色而死亡。本研究增加 VB<sub>1</sub> 的使用浓度, 在其浓度为 4.0 mg/L 时, 获得了良好的愈伤组织诱导效果。

在不定芽分化中, 疏松的愈伤组织 7 d 即可分化出不定芽, 在 1 cm<sup>2</sup> 愈伤组织上最高可分化出 7~ 8 个芽, 而紧凑的愈伤组织极难分化出不定芽。

### [参考文献]

- [1] Sheridan W F. Tissue culture of monocot *Lilium* [J]. *Planta*, 1968, 82: 189-192
- [2] Simmonds J A, Cummings B G. Propagation of *Lilium* hybrids II: Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates[J]. *Scientia Horticulture*, 1976, 5: 161-170
- [3] Gupta P P, Shama A K, Chaturvedi H C. Multiplication of *Lilium longiflorum* Thunb by aseptic culture of bulb scales and their Segments[J]. *Ind J Exp Biol*, 1978, 16: 940-942
- [4] Wickremesinha E R M, Holcomb E J, Artega R N. A practical method for production of flowering Easter lilies from callus cultures[J]. *Science Horticulture*, 1994, 60: 143-152
- [5] Arzate-Fernandez A M, Nakazaki T, Okumoto Y, et al Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb) [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16(12): 836-840
- [6] Van Tuyl J M, Van Dien M P, Van Creijl M G M, et al Application of *in vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses[J]. *Plant Science*, 1991, 74: 115-126
- [7] W atad A A, Yun D J, Mastsumoto T, et al Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum* [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17(4): 262-267.
- [8] Tribulato A, Remotti P C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 17: 113-118
- [9] Langeveld S A, Gerrits M M, Anton F L M, et al Transformation of Lily by agrobacterium [J]. *Euphytica*, 1995, 85: 97-100
- [10] 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
- [11] 唐东芹, 钱虹妹, 唐克轩, 等. 根癌农杆菌介导半夏凝集素基因 pB IXPTA 对百合的转化[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2004, 22(2): 135-137.
- [12] 王关林, 方宏筠. *植物基因工程* [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 347.

- [13] Loretta Bacchetta, Patrizio C, Remotti, et al Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 74(1): 37-44
- [14] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2003: 14-15
- [15] 刘选明, 周朴华, 屈妹存, 等. 百合鳞片叶离体诱导形成不定芽和体细胞胚[J]. *园艺学报*, 1997, 24(4): 353-358
- [16] 桂耀林, 马 诚. 植物组织培养[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 53-61.
- [17] 董建新, 马志卿, 李广泽, 等. 除虫菊愈伤组织的诱导和继代[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(3): 80-82

## Establishment of gene transformation acceptor system of callus in *Lilium*

MENG Rui, LIU Ya-li, WANG Yue-jin, ZHANG Jian-xia

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Experiments of the callus induction, regeneration of adventitious buds, the sensibility of callus to hygromycin and rooting were conducted with the scale leaf, the regenerated scale leaf and petioles as explants. The results showed abundant calluses could be induced from the three explants by the same media. The combination of MS + 0.5 mg/L NAA + 0.4 mg/L 6-BA + 90 g/L sucrose + 4.0 mg/L VB<sub>1</sub> was the optimum medium for the induction of calluses; the medium of MS + 0.5 mg/L 6-BA was the best medium for regeneration of adventitious buds from callus, and the medium of 1/2 MS + 0.4 mg/L BA + 0.1% active carbon was the best for rooting.

**Key words:** *Lilium* oriental 'Sorbonne'; callus induction; adventitious buds; sensibility screen of hygromycin

(上接第31页)

**Abstract ID:** 1671-9387(2006)04-0028-EA

## Effects of sarsa-saponine on enzyme activity and diet nutrient 48 h apparent digestibility on rumen

LIU Chun-long<sup>1,3</sup>, LI Zhong-qiu<sup>2</sup>, SUN Hai-xia<sup>1</sup>

(1 Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150040, China;

2 Animal Science Research Centre, Heilongjiang Academy of Agricultural Research, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

3 Animal Nutrition Institute, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**Abstract:** Twelve male adult local sheep with permanent rumen cannula were used to study the effect of four levels of Sarsa-saponine (0, 100, 200 and 300 mg/kg) on Enzyme Activity and Diet Nutrient 48 h Apparent Digestibility on Rumen. The experiment was a completely randomized block design. Enzymes activity of ruminal liquid were measured 2 h after feeding every seven days during the twenty-eight days. According to the results of the five days, the changing trends of activities of total dehydrogenase and cellulase were increased as the level of Sarsa-saponine increased. Cellulase activity was distinctly influenced at a level of 300 mg/kg compared with control and 100 mg/kg group. The effect of the three levels of Sarsa-saponine on the rumen degradability of DM, OM, NDF and ADF in 48 h were evaluated with nylon bags. The results showed that the trends of degradability of nutrient material increased as Sarsa-saponine supplement increased. Rumen degradability of OM, DM, NDF in 48 h for 300 mg/kg Sarsa-saponine was distinctly influenced compared with control and 100 mg/kg group ( $P < 0.05$ ), but the rumen degradabilities of ADF in 48 h in four groups were not distinctly influenced.

**Key words:** sarsa-saponine; sheep; cellulase; total dehydrogenase; 48 h apparent digestibility on rumen