



百合组织培养和遗传转化的研究进展

狄翠霞, 张满效, 谢忠奎, 陈 拓, 安黎哲*

(兰州大学 干旱与草地农业生态教育部重点实验室, 兰州 730000)

摘 要:百合是单子叶球茎类观赏花卉, 具有食用和药用的作用。本文综述了国内外百合组织培养和遗传转化研究进展。包括营养器官、生殖器官和原生质体再生系统的建立。详细介绍了基因转化的方法, 例如农杆菌、基因枪、电激穿孔等。浅析百合外源基因的表达, 例如 *GUS*、半夏凝集素基因、几丁质酶基因等。同时, 讨论了百合遗传转化中存在的问题, 以期百合基因工程方面的研究提供依据。

关键词:百合; 组织培养; 遗传转化

中图分类号: Q831.1; Q949.71-8.23

文献标识码: A

Research Advances in Lily Tissue Culture and Genetic Transformation

DI Cui-xia, ZHANG Man-xiao, XIE Zhong-kui, CHEN Tuo, AN Li-zhe*

(Key Laboratory of Arid and Pastoral Agroecology of Ministry of Education, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Lily is an ornamental corm monocotyledon of both table and officinal purposes. The paper summarizes research advances about lily tissue culture and genetic transformation achieved at home and abroad, including the construction of the regeneration systems of the vegetative and reproductive organs and protoplasts. Meanwhile, it introduces the methods of the genetic transformation such as *Agrobacterium* mediation, particle bombardment and electroporation in details. Furthermore, it briefly discusses the expressions of exogenous genes such as *GUS*, *pBIXPTA* gene and chitinase gene. In the meantime, it discusses the problems existing in lily genetic transformation in order to provide the basis for the research in lily genetic engineering.

Key words: lily; tissue culture; genetic transformation

百合 (*Lilium* spp.) 是百合科百合属的所有种的总称, 是世界著名三大切花之一, 同时还具有食用和药用功能。自 1957 年 Robb^[1] 发表了第一篇组织培养文章以来, 已经约有 40 多种方法建立了百合的遗传转化受体系统^[2]。百合是多年生球根类花卉, 通常采用分球、鳞茎等繁殖, 易造成种性退化, 品质下降, 甚至聚集病毒^[3]。百合组织培养能够解决脱毒和

商品化生产的问题。随着分子生物学的发展, 通过转基因方法, 能够培育具有抗逆性、抗病性和新园艺性状的百合新品种, 这对于百合育种具有重要意义。然而, 转基因百合育种并不尽人意。本文对国内外百合组织培养和遗传转化的研究状况进行了综述, 着重对百合遗传转化的方法以及影响转化的因素进行了分析、整合和评述, 同时展望了百合育种的前景。

收稿日期: 2005-09-27; 修改稿收到日期: 2006-03-13

基金项目: 甘肃省科技攻关项目 (GS022-A41-045); 甘肃省农业生物技术研究与应用专项; 国家转基因植物研究与产业化开发专项 (JY03A23)

作者简介: 狄翠霞 (1980—), 女 (汉族), 在读博士, 主要从事植物学研究。E-mail: dicx03@st.lzu.edu.cn

* 通讯联系人。Correspondence to: AN Li-zhe.

1 百合转化受体系统的建立

建立良好的基因转化的离体再生系统即基因转化的受体系统是植物基因工程的基础。而植物受体系统的建立依赖于植物的组织培养。在百合组织培养 50 a 的历史中,已经建立了完善的营养器官、生殖器官、原生质体等组织培养的方法。高效受体系统的建立对于百合基因工程具有重要的意义。

1.1 营养器官培养

百合营养器官的培养主要指鳞茎、叶片、叶柄、盘茎、茎干等的组织培养。在百合组织培养中,大部分都是以营养器官为外植体。如表 1 所示,国内外已经有很多文章报道百合营养器官的组织培养。有关

百合营养器官的培养中器官发生途径的报道比较少^[4],所谓的器官发生途径,即经过外植体直接或愈伤组织间接产生不定芽,由多细胞起源,不经过合子胚发育过程的途径。有许多报道表明百合形态发生方式是“小鳞茎”形式实现的^[5]。也有一些报道表明其形态发生方式是通过愈伤组织形成不定芽的形式实现的^[5,6]。进一步的研究表明它们都是一种体细胞胚胎发生,是单细胞起源,即植物组织培养中产生的非合子细胞,经过胚胎发生和发育过程形成胚状体结构^[4,6]。百合通过体细胞胚胎发生产生的不定芽分化率很高^[3,7],这解决了在器官发生中易形成嵌合体的问题。这对百合转基因植株的筛选具有重要的意义。

表 1 不同营养器官为外植体再生植株的研究

Table 1 Studies with vegetative organs of lily as the explants to regenerate the plants

种类 Species	外植体 Explants	参考文献 Reference
麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	鳞片、茎干、叶片、叶节段 Scale, stem, leaf, leaf segment	[9~13]
新铁炮百合 <i>L. × formolongi</i>	叶片、茎尖 Leaf, stem tine	[2, 14]
东方百合 <i>L. oriental hybrid</i>	鳞片、叶片、叶柄 Scale, leaf, petiole	[2, 15~18]
毛百合 <i>L. dahuricum</i>	鳞片 Scale	[19]
兰州百合 <i>L. davidii</i> var. <i>unicolor</i>	鳞片、叶片、根 Scale, leaf, root	[2, 20]
通江百合 <i>L. sargentiae</i>	鳞片 Scale	[2]
布鲁诺百合 <i>L. brunello</i>	鳞片 Scale	[2]
巴巴拉百合 <i>L. barbaresco</i>	鳞片、叶片 Scale, leaf	[21]
淡黄花百合 <i>L. sulphureum</i>	鳞片 Scale	[22]
龙牙百合 <i>Lilium</i> spp.	鳞茎、叶片、茎 Bulb, leaf, stem node	[2, 23]
野百合 <i>L. brownii</i>	鳞茎、叶片 Bulb, leaf	[2]
紫红花滇百合 <i>L. bakerianum</i> var. <i>rubrum</i>	鳞茎 Bulb	[2]
卡萨布蓝加百合 <i>L. casblanca</i>	鳞片、茎段、基盘 Scale, stem, basal plates	[2, 5, 24]
西藏野生卓巴百合 <i>L. wardii</i>	鳞茎 Bulb	[2]
黄百合 <i>L. cordel</i>	鳞茎 Bulb	[25]
晶体百合 <i>L. cv. Gelria</i>	盘茎、鳞茎 Stem node, bulb	[26]
紫斑百合 <i>L. nepalense</i>	鳞茎 Bulb	[27]
细叶百合 <i>L. pumilum</i>	鳞茎 Bulb	[2]

Robb 指出^[1],百合鳞片培养产生的细胞形态建成类型和频率,都依赖于发生外植体本来的部位。已有许多报道指出^[2],百合鳞茎的上部、中部、下部的分化率依次升高,其它器官中也存在着位置效应。狄翠霞等^[15]的试验结果也证明西伯利亚百合中存在着位置效应。不定芽分化率为:鳞片>叶柄>叶片,叶柄基部>中部>尖部,叶片基部>中部>尖部。龙春林^[8]指出,兰州百合根段和叶的基部分化能力最好,中部其次,下部最次,其位置效应可能是由内源激素的差异造成。

1.2 生殖器官培养

关于百合营养器官组织培养的报道很多,但关于生殖器官的报道比较少。百合生殖器官组织培养

主要包括花梗、花丝、花托、花粉、胚珠、胚、花柱等的组织培养。van Tuyl 等^[28]相继发现,花粉对于其它外植体,如花丝、胚珠等具有看护培养的作用。Arazte^[29]指出鳞茎不能适应大规模商业化生产,建立了在花药看护培养下花丝的组织培养体系,并证明其表形、同工酶和染色体无变异。随后百合生殖器官的组织培养取得了迅速发展,如表 2 所示,已在不同种和不同生殖器官部位建立了完善的受体系统。

1.3 原生质体培养

去掉细胞壁后剩余的植物细胞称为原生质体。原生质体易于摄入外源 DNA,避免形成嵌合体,为植物遗传转化提供条件。自 1960 年酶法获得原生质体以来,已从 40 多种植物的原生质体产生出再生植

株。Toshinari 等^[39]从新铁炮百合(*L. × formolongi*)的茎尖形成分生细胞小块制备原生质体,并建立了从原生质体到植株的再生体系。同时指出,糖的种类和浓度对于原生质体制备以及形成植株具有重要作用。Mitsugu 等^[40]从东方百合(*L. oriental hybrid*)

悬浮培养细胞中得到原生质体,采用看护培养方法形成大量愈伤组织,在无激素培养基上愈伤分化成小苗,并于 2 a 后开花;Mitsugu 等^[40]也通过原生质体杂交育种方法,产生了具有铁炮百合(*L. × formolongi*)和东方百合杂种优良性状的新杂种。

表 2 不同生殖器官为外植体再生植株的研究

Table 2 Studies with different reproductive organs of lily to regenerate the plants

种类 Species	外植体 Explants	参考文献 References
麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	花丝、花托、花粉 Filament, receptacle, pollen	[29~33]
东方百合 <i>Lilium oriental hybrid</i>	花丝、花梗、花托、花瓣、花粉 Filament, pedicel, receptacle, petal, pollen	[34, 35]
龙牙百合 <i>Lilium spp.</i>	胚珠、花粉 Ovule, pollen	[36]
卡萨布蓝加百合 <i>Lilium casablanca</i>	花丝、花梗、花托、花柱、柱头 Filament, pedicel, receptacle, style, stigma	[6]
亚洲百合 <i>Lilium Asiatic hybrid</i>	花托、花柱、花瓣、花粉 Receptacle, style, petal, pollen	[37, 38]

2 转化方法

自 1983 年首次获得转基因植物以来^[41],植物遗传转化系统发展十分迅速。但是百合的遗传转化起步比较晚,到目前为止,国内仅有几篇成功的报道。应用于百合基因转化的方法主要有农杆菌介导法、基因枪法和电激法。

2.1 农杆菌转化

农杆菌介导法是目前应用最广泛的基因转化方法,农杆菌中有 Ti 质体(tumor inducing plasmid),质体中有一段 T-DNA,会穿过受伤的植物细胞壁,

进入植物体并表达。传统的观念认为,百合是单子叶植物,不是农杆菌的天然寄主。Cohen^[42]于 1992 年首次用农杆菌介导法转化百合鳞茎,得到瘤状突起并在愈伤组织中检测到冠瘿碱基因的表达。1995 年, Langeveld 等^[43]把几种农杆菌株接种到百合植株上,接种后的百合茎间产生肿瘤组织,标记基因得以表达。2004 年, Hoshi 等^[44]通过农杆菌介导法转化了东方百合的花丝愈伤组织,标记基因表达。从表 3 中可以看出百合是农杆菌的有效寄主。近几年,采用农杆菌介导的方法,于 1999 年以免防御素 NP-1 转化了兰州百合鳞片^[45];2003 年,几丁质酶基因

表 3 百合转基因研究情况

Table 3 Research status of *Lilium* genetic transformation

种类 Species	转化方法 Transformation methods	载体构建 Vector constructor	表达情况 Gene expression	参考文献 Reference
麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	基因枪 Gene gun	PBI221(LAT52-gus)	基因表达 Gene expression	[49]
		CaMV35, Act1, LAT52, <i>et al</i> -gus	基因表达 Gene expression	[48]
		pB3221A gus cDNA	基因表达 Gene expression	[50]
		pPHP 6517(PAT) pPHP3959(gus)	得到转化植株 Get transgene plant	[51]
麝香百合 <i>L. longiflorum</i>	电激法 Electroporation	Zm13/LAT52 gus	基因表达 Gene expression	[52]
格鲁吉亚百合 <i>L. cv. Georgia</i>	基因枪 Gene gun	pB3221A gus cDNA	基因表达 Gene expression	[50, 54]
		pBI221(gus)	基因表达 Gene expression	[50, 54]
晶体百合 <i>L. cv. Gelria</i>	基因枪 Gene gun	pCALIGc(gus)	基因表达 Gene expression	[48, 54]
		pCPO1-2', GUS(TR2'-gus,)	基因表达 Gene expression	[51, 52]
		pLAT52-7(LAT52-gus)	基因表达 Gene expression	[48, 54]
		pMIP138(chiA PA2-gus)	基因表达 Gene expression	[50, 51]
新铁炮百合 <i>L. × formolongi</i>	根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EHA105, pBIXPTA(gus, kan)	得到转化植株 Get transgene plant	[47]
		LBA4404, pBI121(NP-1, npt II)	得到转化植株 Get transgene plant	[45]
兰州百合 <i>L. davidii</i> var. <i>unicolor</i>	根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404, pCG- II (chi, glc, npt II)	得到转化植株 Get transgene plant	[46]
龙牙百合 <i>Lilium spp.</i>	根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EHA101, pIG121Hm(gus, npt II)	得到转化植株 Get transgene plant	[44]

和 β -1,3 葡聚糖酶基因转化了龙牙百合鳞片叶^[16]; 2004 年,夏凝集素基因转化了铁炮百合花丝愈伤组织,都得到了转化植株^[47]。

2.2 基因枪法

基因枪法又叫微弹射击法是近年来兴起的一种新的基因转化的方法。1992 年,Plegt 等^[48]研究了不同的启动子(CaMV 35S、TR2'、Act1、LAT52、chiA PA2)驱动 *GUS* 基因转化百合花药,只有 TR2' 启动子驱动的 *GUS* 得以表达。1993 年,Nishihara 等^[49]用此法,*GUS* 标记基因由于有花药特异性启动子 LA152 而在花粉中表达。1995 年,Toshinori 等^[50]也用此法转化了百合,*GUS* 标记基因也表达了。1998 年,Watad 等^[51]用此法轰击百合愈伤组织,通过具有特异性玉米启动子的标记基因 *PAT* 和 *GUS* 筛选获得转化植株。通过基因枪法,主要是研究标记基因在受体系统中的表达情况,如表 3 所示,目前,还没有外源目的基因通过基因枪法转化到百合中,并进行深入的研究。

2.3 电激法

又称电激穿孔法,是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的方法。1995 年,Miyoshi 等^[52]以花粉原生质体为受体,用此法导入具有 Zm13 和 LAT52 启动子的 *GUS* 基因,在花药中得到表达。1999 年,WU 等^[53]通过此法将 *GUS* 和 *GFP* 基因直接导入百合鳞片组织,也得到 *GUS* 和 *GFP* 基因。但都未形成转化植株。

3 存在问题

百合转基因研究刚刚开始,在国内外研究中,主要存在以下几个问题:第一,百合转基因植株主要采用抗生素筛选,许多学者认为,抗生素筛选不是百分之百的。低浓度的抗生素假阳性比例比较高,后期 PCR、Southern、west-blot 检测工作量大,给操作造

成很大困难。高浓度的抗生素易造成转基因植株死亡。因此抗生素筛选压的确定对于转基因研究具有重要意义。在今后的研究中,抗生素筛选应该结合 *GUS* 或者绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)一起进行筛选,这有利用提高百合转化效率。第二,在百合转化方法的研究中,目前应用最广泛的是农杆菌介导法和基因枪法。农杆菌具有费用较低、拷贝数较少或是单拷贝、插入位点较为固定、后代遗传规律较简单等特点。而基因枪法费用高、拷贝数多、插入位点不确定、后代遗传规律复杂等缺点。如果这两种方法结合起来,对于提高百合的转化效率具有重要意义。第三,在百合转化过程中,加强对转化效率因素的研究是百合转基因研究的关键。Hoshi 等^[41]指出, NH_4NO_3 、乙酰丁香酮、共培养的时间等都对转化成功具有积极作用。探索提高转化效率因素的研究对于转化成功与否具有决定意义。

4 展 望

百合是一种集药用、食用和观赏为一体的单子叶植物。百合遗传转化的研究具有广阔的市场前景。目前百合的研究主要集中于探索不同启动子、不同百合种类、不同转化方法、不同标记基因等方面的转化研究,仅有几篇关于外源目基因转化的报告。一方面,可能是百合受体系统建立还不是很完善;另一方面,百合转化方法还有待于进一步探索。因此,今后百合遗传转化的研究应该致力于以下几个方面:(1)优化百合转基因受体系统,例如,在我们研究中发现,蔗糖对于百合转基因受体系统的建立具有重要作用^[15];(2)探索新的转化百合的方法,例如,基因枪和农杆菌相结合的方法;(3)致力于花色、花形、抗逆、抗病、抗除草剂等外远源基因转化百合的研究,这对于百合品种改良具有重要意义;(4)不仅要检测外源基因的整合,还要观察外源基因稳定、正常、高水平的表达。

参考文献:

- [1] ROBB S M. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum*[J]. *J. Exp. Bot.*, 1957, 8: 348—352.
- [2] JIANG X W(蒋细旺), SI H J(司怀军). Summary on technology of lily tissue culture[J]. *Hubei Agricultural Sciences*(湖北农业科学), 2004, 1: 78—82(in Chinese).
- [3] SHARMA A, MAHINGHARA B K, SINGH A K, KULSHRESTHA S, RAIKHY G, SINGH L, VERMA N, HALLAN V, RAM R, ZAIDI A A. Identification, detection and frequency of lily viruses in Northern India[J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 106(2): 213—227.
- [4] LIU M ZH(刘明志), ZHOU P H(周朴化), QU M C(屈妹存), LU X Y(卢向阳), LUO Z M(罗泽民). *In vitro* induction of indefinite buds and somatic embryos from scale leave of tetraploid 'Longya lily'[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 1997, 24(4): 353—358(in Chinese).

- [5] LIU M ZH(刘明志), LIN X Y(林雪艳). Effects of hormone on plant regeneration of lily (*Lilium daviaii* Duch.) [J]. *Guihaia* (广西植物), 2002, **22**(2): 167—170 (in Chinese).
- [6] WU R J(吴若菁), RUAN SH N(阮少宁). Studies on the embryogenesis and plant regeneration of improved variety of *Lilium* [J]. *Journal of Fujian College of Forestry* (福建林学院学报), 2003, **23**(4): 322—325 (in Chinese).
- [7] TRIBULATO A, REMOTTI P C, LOEFFLER H J M, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. [J]. *Plant Cell Rep.*, 1997, **17**(2): 113—118.
- [8] LONG CH L(龙春林), CHENG ZH Y(程治英), WANG L(王 俐), ZUO T CH(左太春). Position effect on the propagation *in vitro* of different explants from *Lilium davidii* var. *unicolor* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2004, **26**(2): 221—225 (in Chinese).
- [9] BUI Van LEA, DUONG T S N, K TRAN THANH VANA. Plant production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulblet explants of *Lilium longiflorum in vitro* [J]. *Plant Biology and Pathology*, 1999, 322: 303—310.
- [10] DUONG T N, BUI Van LEA, SEIICHI F, MICHIO T, K TRAN THANH VANA. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture [J]. *Plant Growth Regulation*, 2001, 33: 59—65.
- [11] ZHANG J(张 君), WU L M(武丽敏), WANG L(王 雷), WANG P W(王丕武). Primary research on rapid propagation technique of tissue culture in easter lily [J]. *Journal of Jilin Agricultural University* (吉林农业大学学报), 2002, **24**(1): 53—54 (in Chinese).
- [12] YAO SH CH(姚绍嫦), AI S Y(艾素云), YANG M CH(杨美纯). Cytohistological studies on morphogenesis adventitious buds in tissue culture of *Lilium longiflorum* [J]. *Subtropical Plant Science* (亚热带植物科学), 2005, **34**(2): 5—7 (in Chinese).
- [13] BONG H H, HEE J Y, BYEOUNG W Y, KEE Y P. *In vitro* micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Georgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium [J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, **103**(1): 39—49.
- [14] JIANG F Y(姜凤英), QI Q G(其其格), LANG L X(郎立新), ZHANG H H(张惠华). The tissue culture of *Lilium congiforum* [J]. *Liaoning Agricultural Sciences* (辽宁农业科学), 2004, 3: 38—39 (in Chinese).
- [15] DI C X(狄翠霞), AN L ZH(安黎哲), ZHANG M X(张满效), XIE ZH K(谢忠奎). Study on the propagation *in vitro* of different explants and bulblet formation of *Lilium* × *siberia* [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, **25**(10): 1 931—1 936 (in Chinese).
- [16] ZHANG Y L(张延龙), XU Y(徐 炎), WANG J CH(王洁纯), YANG ZH J(杨志娟). Tissue culture of oriental lily hybrids [J]. *Jour. of Northwest Sci-Tech Univ. of Agri. and For.* (西北农林科技大学学报), 2004, **32**(1): 47—50 (in Chinese).
- [17] BONG H H, BYEOUNG W Y, HEE J Y. Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates [J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 103: 351—359.
- [18] KE F(柯 昉), CHEN H(陈 华), HUANG Y X(黄宇翔), LI ZH T(李章汀). Study on floral organ culture and rapid propagation of oriental hybrid lily [J]. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Technology* (仲恺农业技术学院学报), 2005, **18**(1): 14—17 (in Chinese).
- [19] WU X H(吴旭红). Tissue culture and rapid propagation of lily [J]. *Journal of Biology* (生物学杂志), 2003, **20**(6): 47 (in Chinese).
- [20] WANG G(王 刚), DU J(杜 捷), LI G Y(李桂英), LIANG W F(梁万福), XING H T(幸亨泰). Study on tissue culture and clonal propagation of *Lilium davidii* var. *unicolor* (Hoog) Cotton and *Lilium brownii* F. E. Brown ex Mieliez [J]. *Journal of Northwest Normal University* (西北师范大学学报), 2002, **38**(1): 69—71 (in Chinese).
- [21] ZHENG CH M(郑春明), WEN L ZH(温立治), LUO L R(罗丽蓉). Tissue culture and rapid propagation of *Lilium barbaresco* [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理通讯), 2004, **40**(2): 205 (in Chinese).
- [22] QIU N H(邱宁宏), LUO L H(罗林会), WANG Q(王 勤), HAN L(韩 露). Tissue culture and rapid propagation of *Lilium sulphureum* Baker [J]. *Chinese Wild Plant Resources* (中国野生植物资源), 2004, **33**(3): 59 (in Chinese).
- [23] LORETTA BACCHETTA, PATRIZIO C R, CLAUDIA B, FRANCESCO S. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 74: 37—44.
- [24] BONG H H, BYEOUNG W Y, HEE J Y, KEE Y P. Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates [J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, **103**(3): 351—359.
- [25] WANG F L(王凤兰), ZHOU H G(周厚高), HUANG Z F(黄子锋), ZHANG SH J(张施君). Tissue culture and rapid propagation of *Lilium cordelia* [J]. *Subtropical Plant Science* (亚热带植物学), 2004, **33**(3): 59 (in Chinese).
- [26] ZHAO Q F(赵庆芳), ZENG X Y(曾小英), DING L(丁 兰), LI Y ZH(李玉忠). Study on tissue culture and clonal propagation of gelria [J]. *Journal of Gansu Sciences* (甘肃科学学报), 2003, **15**(1): 39—42 (in Chinese).
- [27] LI B(李 标), HU Q H(胡琼华), HE X J(何显静). Tissue culture of *Lilium nepalense* D. Don [J]. *Journal of Yunnan University* (云南大学学报), 2001, 23: 111—112 (in Chinese).
- [28] Van TUYL J M, Van DIEN M P, Van CREIJ M G M, Van KLEINWEE T C M, FRANKEN J, BINO R J. 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.
- [29] ARZATE-FERNÁNDEZ A M, NAKAZAKI T, OKUMOTO Y, TANISAKA T. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 836—840.
- [30] AMAURY-M, ARZATE-FERNÁNDEZ, TETSUYA NAKAZAKI, HIROTADA YAMAGATA, TAKATOSHI TANISAKA. Production of doubled-haploid plants from *Lilium longiflorum* Thunb. [J]. *Anther Culture*, 1997, 123: 179—187.

- [31] TANG D Q(唐东芹), QIAN H M(钱虹妹), HUANG D F(黄丹枫), TANG K X(唐克轩). Establishment of gene transformation acceptor system of embryogenic callus in lily[J]. *Journal of Zhejiang Forestry College* (浙江林学院学报), 2003, 20(3): 273—276 (in Chinese).
- [32] DUONG T N, BUI van LE, MICHIO TANAKA, K TRAN THANH Van. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissues of *Lilium longiflorum*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2001, 87: 131—138.
- [33] DUONG T N. The control of *in vitro* direct main stem formation of *Lilium longiflorum* derived from receptacle culture, and rapid propagation by using *in vitro* stem nodes[J]. *Plant Growth Regulation*, 2003, 40: 179—184.
- [34] LIU Y L(刘雅莉), ZHANG J X(张剑侠), PAN X J(潘学军). Floral organ culture and rapid propagation of *Lilium orientale* 'Sorbonne'[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2004, 24(12): 2 350—2 354 (in Chinese).
- [35] ZHAO Y P(赵银萍), ZHANG J D(张九东), CHEN J G(程建国). *In vitro* induction of adventitious buds from leaves and scales leaves of lily species[J]. *Journal of Xi'an University of Arts & Science* (西安文理学院学报), 2005, 8(1): 21—23 (in Chinese).
- [36] NORIKO I, YOSHIJI N, HAN D SH. Production of seedlings from ovules excised at the zygote stage in *Lilium* sp. plant cell[J]. *Tissue and Organ Culture*, 2003, 73: 159—166.
- [37] YANG W H(杨薇红), ZHANG Y L(张延龙), TONG B(童斌), DU H(杜慧), YANG R(杨蓉). Tissue culture and rapid propagation of asiatic lily from flower organs[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农业通报), 2004, 20(5): 193—195 (in Chinese).
- [38] HAN D SH, YOSHIJI N, MASARU N. Long term maintenance of an anther-derived haploid callus line of the Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 61: 215—219.
- [39] TOSHINARI G, KATSUNORI K, TOMOYUKI T, KAZUHIKO M, TAKAO 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.
- [40] MITSUGU H, HITOMI M, FUMINORI K. Regeneration of flowering plants from difficile lily protoplasts by means of a nurse culture[J]. *Planta*, 2002, 215: 880—884.
- [41] ZAMBRYSKY P. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regulation capacity[J]. *EMBO*, 1983, 2: 2 143—2 150.
- [42] COHEN A, MEREDITH C P, SANIEWSKI M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium*[J]. *Acta Hort.*, 1992, 325: 611—618.
- [43] LANGEVELD S A, GERRITS M M, DERKS A F L M, BOONEKAMP P M, BOL J F. Transformation of lily by *Agrobacterium*[J]. *Euphytica*, 1995, 85: 97—100.
- [44] HOSHI Y, KONDO M, MORI S, ADACHI Y, NAKANO M, KOBAYASHI H. Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Plant Cell Rep.*, 2004, 22: 359—364.
- [45] LI B P(李宝平), SU X R(苏仙荣), LI W B(李文斌), SUN Y R(孙勇如). Study on introducing rabbit defensin NP-1 gene into lily by *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Journal of Shanxi Teacher's University* (山西师范大学学报), 1999, 13(1): 49—52 (in Chinese).
- [46] LIU J H(刘菊华), JIN ZH Q(金志强), XU B Y(徐碧玉), ZHENG S X(郑思乡), LIU ZH M(刘志敏). The regeneration and transformation of *Longya Lilium*[J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), 2003, 1(4): 465—474 (in Chinese).
- [47] TANG D Q(唐东芹), QIAN H M(钱虹妹), TANG K X(唐克轩), HUANG D F(黄丹枫). Genetic transformation of lily with pBIXPTA gene by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University* (上海交通大学学报), 2004, 22(2): 134—137 (in Chinese).
- [48] PLEGT L M, Ven B C E, BINO R J, SALM T P M, TUNEN A J. Introduction and differential use of various promoters in pollen grains of *Nicotiana glutinosa* and *Lilium longiflorum*[J]. *Plant Cell Rep.*, 1992, 11: 20—24.
- [49] MASAHIRO N, MICHIO I, LCHIRO T, MASA HARU K, KANJI O, KOHEI I, HIROMICHI M. Expression of the glucuronidase gene in pollen of lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and peony (*Paeonia lactiflora*) by particle bombardment[J]. *Plant Physiol.*, 1993, 102: 357—361.
- [50] TOSHINORI T, MASAHIRO N, MOTOAKI S, ATSUSHI S, KUNISUKE T, KOHEI I, HIROMICHI M. Successful expression in pollen of various plant species of *in vitro* synthesized mRNA introduced by particle bombardment[J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28(2): 337—341.
- [51] WATAD A A, YUN D J, MATSUMOTO T, NIU X, WU Y, KONONOWICZ A K, BRESSAN R A, HASEGAWA P M. Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 262—267.
- [52] MIYOSHI H, USAMI T, TANAKA I. High level of *GUS* gene expression driven by pollen-specific promoters in electroporated lily pollen protoplasts[J]. *Sex Plant Rep.*, 1995, 8(4): 205—209.
- [53] WU F S, FENG T Y. Delivery of plasmid DNA into intact plant cells by electroporation of plasmolyzed cells[J]. *Plant Cell Rep.*, 1999, 18(5): 381—386.
- [54] RAJESH L V, RAJESH K D, ASHOK K S, SUSHIL K. Microprojectile mediated plant transformation; a bibliographic search[J]. *Euphytica*, 1997, 95: 269—294.