

# 地被菊不同基因型品种的再生研究

陆 苗<sup>1,2</sup>, 蒋细旺<sup>1,3</sup>, 张启翔<sup>1,2</sup>

(1. 北京林业大学 园林学院, 北京 100083; 2. 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083; 3. 江汉大学 医学与生命科学学院, 湖北 武汉 430066)

**摘 要:** 针对不同基因型的品种使用不同培养基组合进行再生研究。以 12 个地被菊品种为材料, 利用 3 种分化培养基, 以叶片、茎段为外植体进行培养, 研究不同基因型、激素组合对再生体系建立的影响。结果表明: ‘紫妍’、‘铺地金’、‘小黄星’、‘重瓣晚黄’、‘流金岁月’和‘金顶红心’最适分化培养基是: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; ‘玉人面’和‘新黄’最适分化培养基是: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; ‘北林黄’、‘新晚黄’、‘国庆紫’和‘落金钱’最适分化培养基是: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

**关键词:** 地被菊; 基因型; 品种; 再生

**中图分类号:** S 682.1<sup>+</sup> 1; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)01-0173-03

菊花 (*Dendrathera morifolium*) 原产于中国, 是世界重要盆栽、切花及地被花卉。多年来常规育种方法在菊花中取得了巨大的进展, 而现代基因工程的发展, 更为菊花育种提供了无限的可能。生物技术首先均依赖于良好的受体系统和高效的再生体系的建立, 要求具有较高再生频率和分化率, 且具稳定性、重复性<sup>[1]</sup>。

菊花再生体系的建立已经有很多报道。Tanaka 和 Kanno<sup>[2]</sup> 曾诱导菊花放射状小花外植体的体细胞胚状体发生, 从胚状体上分化出芽体。Roest 和 Bokelmann 报道了从菊花叶片和茎段上分化出不定芽<sup>[3]</sup>。Bush 用菊花的花瓣为外植体建立再生体系, 并通过体细胞变异获得新的变种<sup>[4]</sup>。高亦珂等以地被菊‘矮黄’、‘玉龙’和传统菊花‘金背大红’的叶盘和茎段为外植体建立菊花的再生体系, 并进行转基因的操作<sup>[5]</sup>。Urban 曾用叶盘为外植体获得转基因植株<sup>[6]</sup>。

在基因工程中, 品种对基因型的依赖严重, 要建立不同品种的受体系统, 费时又费力。因此不同品种基因型综合性的再生研究尤为重要。在前期试验基础上, 本研究筛选 3 个以 BA、NAA 为生长调节物、适合多种品种的培养基, 进行地被菊品种再生研究, 旨在建立高效稳定的再生体系, 为菊花的遗传改良奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

选抗性强、开花繁密的 12 个品种: ‘玉人面’、‘紫

妍’、‘铺地金’、‘北林黄’、‘国庆紫’、‘流金岁月’、‘新晚黄’、‘落金钱’、‘小黄星’、‘重瓣晚黄’、‘新黄’和‘金顶红心’均由北京林业大学陈俊愉院士提供。

### 1.2 培养基制备

以 MS 基本培养基 添加蔗糖 30 g/L 和琼脂 5.5 g/L, pH 值为 5.8~6.0 121℃ 高压灭菌 15~18 min。根据预备试验, 选用 1 号: MS+6-BA 2.0 mg/L (单位下同)+NAA 1.0、2 号: MS+6-BA 1.0+NAA 0.5 和 3 号: MS+6-BA 1.0+NAA 0.1 这 3 种培养基为分化、增殖培养基。

### 1.3 方 法

**1.3.1 无菌苗的获得** 取健康无病毒植株, 带有完全展开的叶片和带腋芽的茎段。用洗涤剂清洗, 流水冲洗 30 min, 70% 酒精先浸泡 30s, 然后用无菌水冲洗 2 遍, 再用 1% 的升汞溶液处理 8 min, 最后用无菌水冲洗 4 遍。接种到 MS 培养基上, 每 2 周继代 1 次, 5 周后分化形成芽丛。培养条件为 25℃, 16h/8h 光周期。

**1.3.2 不同的灭菌时间对外植体培养的影响** 正确选择接种季节和灭菌时间, 可以最大程度的减少污染率, 减少灭菌剂对外植体的伤害, 有利于在短时间内建立无菌苗培养体系。以‘玉人面’为例, 灭菌剂用 0.1% 的升汞, 灭菌时间设置为 6、8、10、12 min, 研究不同的灭菌时间对外植体培养的影响。2 周后观察试验结果。

**1.3.3 不定芽的分化** 将新增殖的幼苗叶片切成约 5 mm×5 mm 大小, 并以近轴面接触培养基; 茎段切成约 3 mm (不带腋芽), 横放在培养基上。每个培养皿中放入 20 片叶片或 20 个茎段, 重复 5 次。每周观察 1 次, 连续观察 8 周, 记录试验结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灭菌时间对地被菊组培的影响

第一作者简介: 陆苗 (1982-), 女, 硕士, 研究方向为园林植物遗传育种。

通讯作者: 张启翔 E-mail: zqx@bjfu.edu.cn.

基金项目: 科技部国家转基因专项基金资助项目 (JY03-B-28)。

收稿日期: 2007-09-21

利用消毒剂对外植体进行消毒灭菌时, 时间过短污染率高, 过长易伤害外植体。2 周后观察的结果表明, 随着灭菌时间的延长, 外植体污染率逐渐下降, 但外植体的伤害也逐渐加大, 无菌苗获得率低。当灭菌时间为 8 min 时, 外植体损伤较弱, 接种后 10~15 d 开始正常生长; 灭菌 10、12 min 时, 外植体严重褐化死亡。试验采用 0.1% 的升汞消毒 8 min 来获得地被菊无菌苗(见表 1)。

表 1 不同消毒时间对地被菊品种‘玉人面’叶片外植体的影响

灭菌时间 /min	接种数 /块	存活率 /%	污染率 /%	对外植体的影响
6	30	15	50	外植体无褐化现象
8	30	27	10	外植体边缘有少量褐化
10	30	20	6.7	27%的外植体出现褐化
12	30	14	3.3	50%的外植体出现褐化严重, 直至死亡

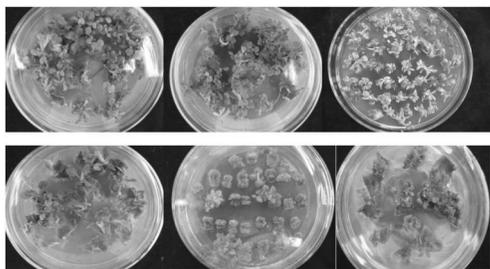


图 1 最适合在 1 号培养基中再生的地被菊品种  
注: 依次为紫妍、铺地金、小黄星、重瓣晚黄、流金岁月、金顶红心。

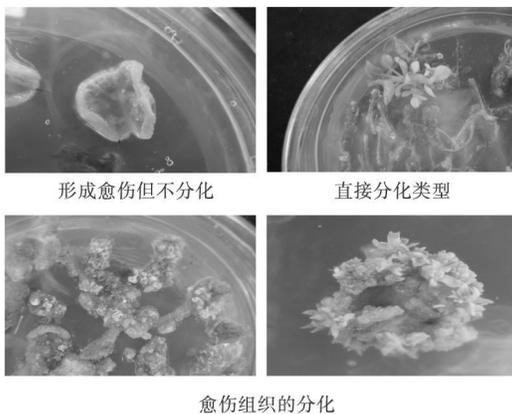


图 2 地被菊的再生情况

### 2.2 3 种培养基对地被菊品种再生的影响

在适宜的培养基上, 外植体接种 1 个星期后, 叶片逐渐增厚, 切口周围开始出现浅黄色薄层愈伤组织; 茎段的两端开始膨大。3 周后叶片开始从伤口边缘直接产生不定芽, 也有先形成愈伤组织, 5 周后再间接成芽; 而茎段全部是间接成芽(如表 2)。

结果表明, 地被菊品种再生受基因型的影响很大, 不同的培养基上分化率不一样, 最高的能达到 95%, 最低仅为 10%左右, 或完全不分化。某些品种在两种培养

基中的愈伤形成率和分化率都比较高, 如‘紫妍’在 1、2 号; ‘北林黄’在 2、3 号培养基上的分化率都在 50%以上; 品种‘新晚黄’在 1、3 号培养基上分化率很低, 在 20%以下; 而‘小黄星’在激素浓度比较低的情况下, 分化率非常低, 甚至完全不分化。

表 2 3 种培养基对地被菊品种茎段和叶片再生的影响

品种	外植体	诱导愈伤率/%			直接分化率/%			愈伤分化率/%		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
玉人面	L	75	75	95	20	55	95	10	25	70
	S	80	80	95	—	—	—	15	30	75
紫妍	L	95	85	80	90	65	35	80	50	40
	S	100	90	80	—	—	—	90	65	40
铺地金	L	90	75	60	90	65	45	85	45	50
	S	100	75	70	—	—	—	85	60	50
北林黄	L	85	85	90	40	65	75	30	40	75
	S	85	90	95	—	—	—	35	55	85
国庆紫	L	80	95	85	20	75	25	30	80	30
	S	90	100	90	—	—	—	35	85	45
流金岁月	L	100	90	85	95	60	15	85	45	25
	S	100	95	85	—	—	—	95	75	40
新晚黄	L	75	85	55	40	85	20	20	95	—
	S	85	90	75	—	—	—	25	85	15
落金钱	L	70	95	75	60	80	65	30	90	45
	S	85	90	85	—	—	—	35	10	50
小黄星	L	85	55	20	85	55	10	70	20	—
	S	95	50	30	—	—	—	70	35	10
重瓣晚黄	L	90	85	45	90	55	15	80	40	10
	S	95	90	50	—	—	—	80	45	20
新黄	L	70	85	90	20	55	75	15	45	65
	S	80	80	90	—	—	—	15	55	70
金顶红心	L	95	65	30	85	60	—	75	35	30
	S	100	75	40	—	—	—	80	35	30

注: (1)MS+6-BA 2.0+NAA 1.0; (2)MS+6-BA 1.0+NAA 0.5; (3)MS+6-BA 1.0+NAA 0.1; L: 叶片, S: 茎段。

相同的激素条件下, 使用茎段诱导愈伤组织的能力比叶片高, 但叶片可以不经愈伤组织就能直接分化出不定芽, 这比茎段诱导能更好地保持植物的遗传稳定性<sup>[5]</sup>。试验表明, 叶片的直接分化率最高能达到 95%, 而且多数在 60%~80%之间。

综合分析, ‘紫妍’、‘铺地金’、‘小黄星’、‘重瓣晚黄’、‘流金岁月’和‘金顶红心’最适合的培养基为: 6-BA 2.0+NAA 1.0; ‘玉人面’和‘新黄’为: 6-BA 1.0+NAA 0.1; ‘北林黄’、‘新晚黄’、‘国庆紫’和‘落金钱’为: 6-BA 1.0+NAA 0.5。

### 3 讨论

试验使用 70%乙醇配合 0.1% 升汞是较好的灭菌方法, 但升汞对菊花植株造成的伤害较大。因此正确选择消毒时间既可避免对外植体产生毒害又能获得较好的灭菌效果。

以菊花的叶片和茎段为外植体进行培养, 直接从叶片上诱导芽的再生, 或通过诱导愈伤组织的分化来建立起转基因的受体体系, 获得了较高的芽诱导率, 优选出 3 种诱导地被菊再生的最佳培养基。地被菊的再生体系可以通过叶片和茎段作为外植体来建立。通过对其进

行研究比较,可以看出在相同的激素条件下,使用茎段

为外植体诱导愈伤的能力要比叶片高。

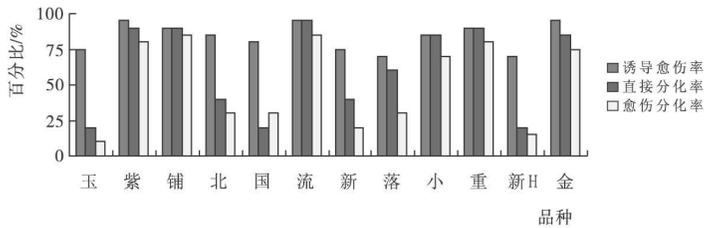


图3 培养基1号对各个品种叶片外植体的影响

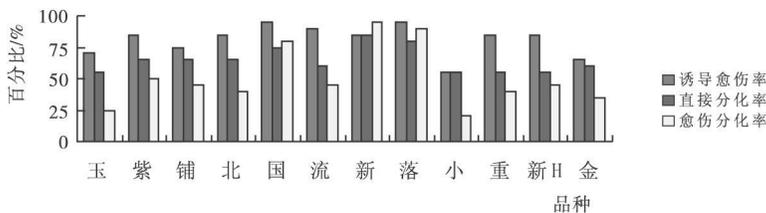


图4 培养基2号对各个品种叶片外植体的影响

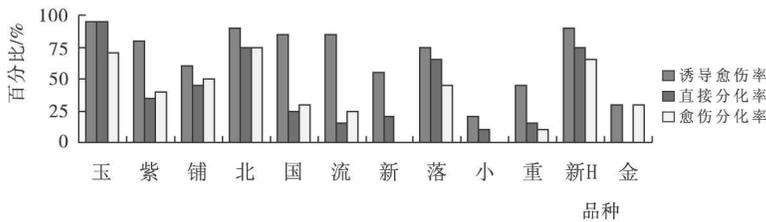


图5 培养基3号对各个品种叶片外植体的影响

参考文献

[1] 蒋细旺. 菊花9个叶片和茎段快速高效再生体系的建立[J]. 华中农业大学学报 2003, 22(1): 163-166.  
 [2] Roest S, Bokelmann G S V. vegetative propagation of chrysanthemum morifolium Ram in vitro[J]. Sci Hortico 1975, 3: 317-330.  
 [3] Bush S R, Earle E D. Plantlets from petal segments, petal epidermis and shoot tips of the periclinal chimera, chrysanthemum morifolium Indiana-poles [J]. Am J Bot. 1976, 63: 729-737.

[4] Tanaka K, Kanno Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum [J]. Plant Cell Rep. 2000, 19: 946-953.  
 [5] 高亦珂, 赵勃, 丁国勋等. 菊花茎叶外植体再生体系的研究[J]. 北京林业大学学报 2004, 23(1): 32-33.  
 [6] Urban L A, Sheman J M, Moyer J M. High frequency shoot regeneration and Agro bacterium mediated transformation of chrysanthemum [J]. Plant Sci. 1994, 98: 69.

Studies on Regeneration of Different Genotype Ground-cover Chrysanthemum Cultivars

LU Miao<sup>1, 2</sup>, JIANG Xi-wang<sup>1, 3</sup>, ZHANG Qi-xiang<sup>1, 2</sup>

(1. College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. National Flower Engineering Technology Research Center, Beijing 100083, China; 3. College of Medical and Life Science, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056, China)

**Abstract:** Adventitious shoots were regenerated from leaf and stem explants of 12 chrysanthemum cultivars by using 3 differentiation medium in the studies. How different genotypes and hormone combinations influenced the regeneration system was also discussed. The optimum medium for six cultivars; ‘Ziyan’, ‘Pudijin’, ‘Xiaohuangxing’, ‘Chongbanwanhuang’, ‘Liujiinsuiyue’ and ‘Jindinghongxin’ contained Murashige & Skoog basal medium supplemented with 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L, in ‘Yurenmian’, ‘Bailong’ and ‘Xinhuang’ contained Murashige & Skoog basal medium supplemented with 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, and in ‘Beilinhuang’, ‘Xinwanhuang’, ‘Guoqingzi’ and ‘Luojinqian’ contained Murashige & Skoog basal medium supplemented with 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L.

**Key words:** Ground-cover Chrysanthemum; Genotype; Cultivars; Regeneration