

# 菊花新品系叶片外植体不定芽再生体系的研究

冯君伟<sup>1</sup>, 佟友丽<sup>1</sup>, 赵 飞<sup>2</sup>, 李玉花<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040 2. 山东农业大学, 山东 青岛 266000)

**摘 要:**以‘东林4号’、‘东林6号’、‘东林9号’3个优良菊花品系叶片外植体为试材, 探讨了基因型、叶龄、潮霉素浓度等因素对菊花叶片不定芽再生的影响。结果表明: 基因型是影响不定芽再生的重要因素, 不同品系叶片不定芽再生的激素配比存在明显差异; 同一品系, 上层幼嫩叶片分化率明显高于中下部。‘东林9号’品系叶片不定芽分化率高达90%, ‘东林9号’叶片及不定芽在30 mg/L的潮霉素中表现为全部死亡。东林4号最适分化培养基为: MS+3 mg/L BA+0.1 mg/L 2, 4-D; 东林6号最适分化培养基为: MS+2 mg/L BA+1 mg/L NAA; 东林9号最适分化培养基为: MS+0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA。

**关键词:** 菊花; 叶片; 再生; 外植体

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(2009)02-0056-04

菊花(*Dendranthemax grandiflorum*)原产中国, 是秋季重要的观赏花卉, 但是在花开季节常常遭受低温的伤害而表现为观赏性状的降低甚至完全丧失。由于菊花的资源有限, 采用传统的杂交育种方法很难获得高抗或耐低温的优良品种; 远缘杂交育种存在着一定的生殖隔离。通过遗传转化途径可以单一的引进某一抗性基因, 大大提高菊花抵御低温的能力, 这方面的研究报道逐渐增多<sup>[1]</sup>。目前, 多采用基因枪或农杆菌介导法进行抗冻基因的遗传转化研究<sup>[2-4]</sup>。利用这些转基因技术进行遗传转化的前提是要建立稳定、高效的菊花再生体系。但是据文献报道, 菊花的再生受到基因型的限制, 再生体系没有普遍性, 有些品种再生不稳定<sup>[5]</sup>。目前的叶片不定芽再生体系研究多集中于对切花菊或者小菊而言, 而对于二者的杂交品系进行不定芽的再生研究鲜有报道。另外, 在农杆菌介导的遗传转化过程中, 外植体与农杆菌共培养后, 需在筛选培养基中添加一定浓度的选择抗生素筛选转化体。临界抗生素浓度的确定对于筛选阳性转化子尤为关键。试验以小菊为母本, 采用多父本(切花菊)天然杂交并结合高压静电场辐射处理选育的3个优良菊花品系的叶片为外植体, 探讨了基因型、植物生长调节剂、叶片着生部位以及潮霉素浓度等因素对菊花叶片不定芽再生的影响, 旨在建立高效稳定

的菊花叶片不定芽再生体系, 充实小菊与切花菊杂交新品系叶片不定芽发生的理论, 并为菊花基因工程育种奠定基础。

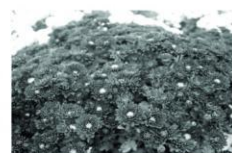
## 1 材料和方法

### 1.1 材料

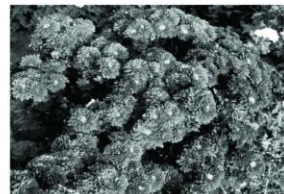
以小菊为母本, 采用多父本(切花菊)天然杂交并结合高压静电场辐射处理选育的3个优良菊花品系东林4号、东林6号、东林9号的叶片外植体为试材。



东林4号 Donglin No.4



东林6号 Donglin No.6



东林9号 Donglin No.9

图1 优良菊花品系

Fig. 1 Three lines of chrysanthemum

### 1.2 方法

**1.2.1 外植体消毒** 用流水冲洗采集的新鲜叶片30 min, 然后用0.1%~0.2%的Tween20浸泡5 min, 之后再流水冲洗30 min左右。采用75%乙醇表面杀菌1 min, 蒸馏水冲洗3~4遍, 之后用1%有效成分的次氯酸钠溶液消毒10 min, 无菌水冲洗3遍, 放入烧杯中备用。

**1.2.2 培养基配制** 组培苗诱导、扩繁试验以MS作为基本培养基, 生根试验以1/2 MS作为基本培养基, 培养

第一作者简介: 冯君伟(1982-), 男, 硕士, 研究方向为植物发育生物学。

通讯作者: 李玉花 E-mail: lyhshen@mail.hl.cn.

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA10Z129); 东北林业大学校立科研基金资助项目。

收稿日期: 2008-09-15

基中添加 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂粉及不同浓度配比的植物生长调节剂;以 NaOH (0.1 M 或 1 M)和 HCl (0.1 M或 1 M)溶液将液体培养基的 pH 值调至 5.75~5.78 左右后定容,添加琼脂粉,于 121 ℃高压灭菌 20 min 后分装灭菌烘干的培养皿或组培用瓶中。

1.2.3 培养条件 组织培养室的温度为(25±1)℃,日光灯光源,光照强度36 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,每天光照16 h,每个培养皿接种 7~10 个外植体,每处理重复 5~8 盘,确保每个处理的小样本数达 30 个以上。

1.2.4 不定芽的诱导 方法一:采集‘东林 4 号’、‘东林 6 号’、‘东林 9 号’品系叶片,适当调整 BA、NAA 及 2,4-D 的浓度配比,设计 3 因素完全随机试验(表 1)。方法二:分别采集‘东林 9 号’品系植株新展开嫩叶(上层)、新展开嫩叶下 3~5 片叶(中层)、新展开嫩叶下 8~10 片叶(下层)叶片,采用表 1 中筛选出的激素组合(处理 6),进行不定芽的诱导,观察不同叶位外植体的不定芽分化。

表 1 叶片直接诱导不定芽 3 因素完全随机设计

Table 1 Three factors of completely random experimental design of bud reduction directly from leaf explants			
	BA/mg·L <sup>-1</sup>	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	2,4-D/mg·L <sup>-1</sup>
处理 1	0.5	2	0
处理 2	0.5	0.5	0
处理 3	0.5	0.1	0.05
处理 4	0.5	0.1	0
处理 5	0.5	1	0
处理 6	0.5	1.5	0
处理 7	1	0.5	0
处理 8	2	1	0
处理 9	3	0	0.1
处理 10	0.5	2	0
处理 11	0.5	0.1	0
处理 12	0.23	2.0	0
处理 13	0.6	0.5	0
处理 14	0.2	0.1	0.05
处理 15	0.2	0.1	0
处理 16	0.2	1	0

1.2.5 抗生素筛选 方法一:采集‘东林 9 号’品系新展开嫩叶,切成 0.8~1 cm<sup>2</sup>大小,分别接种于含有不同浓度的潮霉素诱导培养基:MS+0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA,每天观察记录叶片变化。潮霉素设置为 10 梯度处理,其终浓度分别为:5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 mg/L。方法二:将‘东林 9 号’已分化的不定芽接种到含有不同浓度潮霉素的继代培养基中,潮霉素设置为 5 个梯度处理,其终浓度分别为:10、15、20、25、30 mg/L。

2 结果与分析

2.1 菊花再生体系的优化

通过 3 因素完全随机设计试验发现,诱导不同品系叶片分化的适宜激素浓度差异显著。在供试品系中,‘东林 4 号’、‘东林 6 号’和‘东林 9 号’在不同的培养基上均能诱导出不同生长量的愈伤组织,但是在不定芽的

诱导上出现了一个有趣的现象,愈伤组织越是晶莹剔透,越是很难分化出不定芽,反而愈伤组织较小,在伤口边缘,特别是叶片主脉的横切面处越容易分化出不定芽(图 2)。在适宜的培养基上,接种 15 d 左右,可见不定芽出现,接种 20 d 后,不定芽迅速增加。

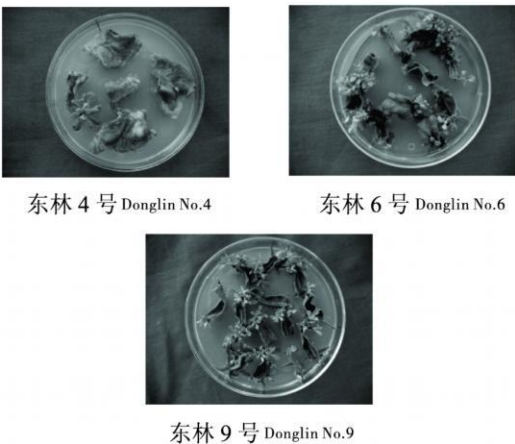


图 2 不同品系叶片主脉分化不定芽

Fig. 2 Optimal culture of buds regeneration from leaf explants of different lines of chrysanthemum

表 2 不同生长调节剂配比对菊花叶片再生的影响

Table 2 Effect of hormone combinations to reproductive rate of adventitious buds directly from leaf explants				
培养基 编号	东林 6 号 Donglin No. 6		东林 9 号 Donglin No. 9	
	分化率 Differentiation rate/ %	繁殖系数 Propagation coefficient	分化率 Differentiation rate/ %	繁殖系数 Propagation coefficient
处理 1	58.6±5.32c	1.98±0.079e	41±3.54d	3.45±0.076e
处理 2	59.8±3.11c	2.46±0.074d	21±3.16f	3±0.039f
处理 3	20±3.67e	1.01±0.063i	14.8±1.92g	2.3±0.058g
处理 4	10.2±2.77f	0.47±0.066j	22.2±4.21f	1.48±0.076i
处理 5	0g	0k	46±3.87c	4.49±0.2425c
处理 6	73.2±6.10b	4.01±0.079b	95±6.67a	10.5±0.358a
处理 7	80±1.41a	3.99±0.068c	10.6±2.97h	1.81±0.048h
处理 8	82.4±2.51a	4.18±0.097a	0i	0j
处理 9	0g	0k	0i	0j
处理 10	39.4±5.18d	1.43±0.081ef	30.8±4.27e	3.11±0.1531f
处理 11	7.7±3.51f	1.24±0.069h	20.6±2.7f	2.01±0.0594g
处理 12	0g	0k	0i	0j
处理 13	0g	0k	0i	0j
处理 14	0g	0k	0i	0j
处理 15	17.2±1.92e	1.32±0.084g	30.4±3.21e	3.85±0.324d
处理 16	0g	0k	63.6±5.41b	7.09±0.2677b

在接种后第 3 周发现东林 4 号品系仅在激素组合 9: MS+3 mg/L BA+0.1 mg/L 2,4-D 中有少量不定芽产生,到第 5 周叶片芽的分化率不断增加,总分化率为 10%。接种 6 周后,统计东林 6 号、东林 9 号品系不同生长调节剂配比下诱导叶片形成不定芽的分化率和繁殖系数(表 2)。由表 2 可见,东林 6 号最适分化培养基为处理 8:MS+2 mg/L BA+1 mg/L NAA,分化率达到 82%,繁殖系数最高达到 4.2。东林 9 号在 3 因素完全随机设计

实验中,大部分激素组合获得了不定芽。从表2可见,最适分化培养基为处理6:MS+0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA,总分化率95%,繁殖系数最高高达10.5。

## 2.2 叶龄对分化的影响

通过对‘东林9号’品系不同叶层取样,发现刚刚展开的幼嫩叶片容易脱分化并再分化出不定芽。统计接种后1~7周,不定芽分化率和繁殖系数,统计结果分别见图3

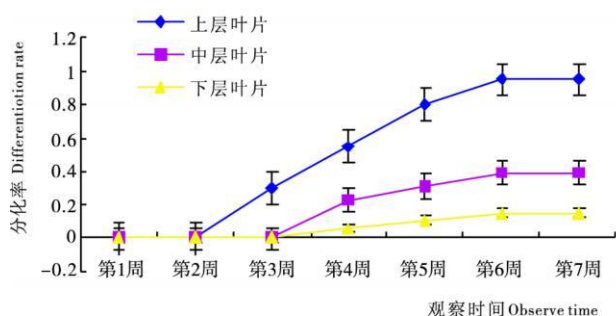


图3 东林9号不同叶层取样叶片外植体不定芽分化率

Fig.3 Comparison of adventitious buds regeneration rate from different levels of stems of Donglin 9

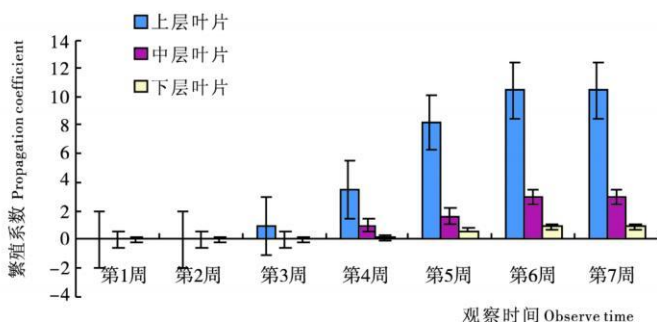


图4 东林9号不同叶层取样叶片外植体不定芽繁殖系数

Fig.4 Comparison of breed coefficient on adventitious buds from different levels of stems of Donglin 9

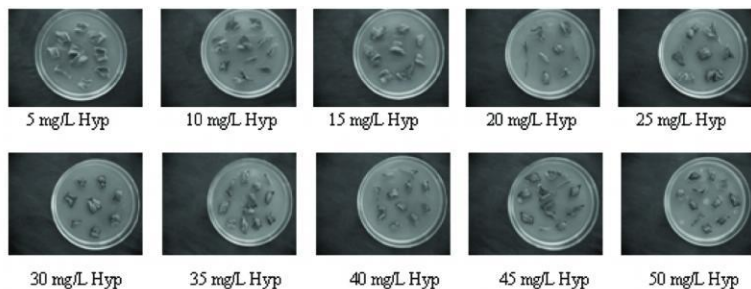


图5 东林9号叶片在不同潮霉素培养基分化(接种15 d)

Fig.5 Comparison of adding hygromycin with different concentration on culture medium of leaf explants

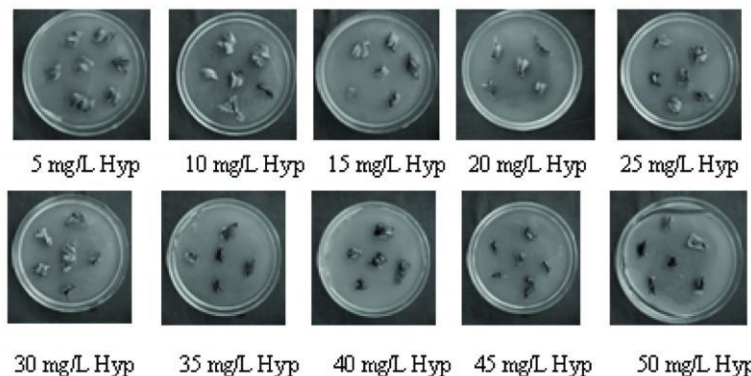


图6 东林9号叶片在不同潮霉素培养基分化(接种25 d)

Fig.6 Comparison of adding hygromycin with different concentration on culture medium of leaf explants of Donglin 9 (25 d after inoculation)

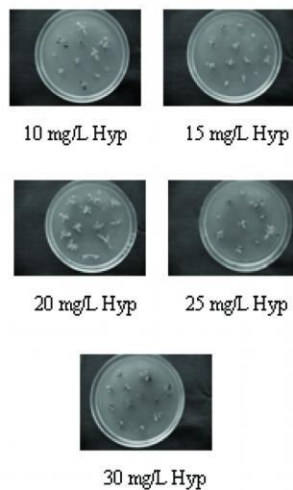


图7 东林9号不定芽在不同潮霉素培养基分化(接种15 d)

Fig.7 Comparison of adding hygromycin with different concentration on culture medium of adventitious buds of Donglin 9 (15 d after inoculation)

## 2.3 潮霉素临界浓度的筛选

在培养基上接种15 d后,东林9号叶片在5 mg/L的潮霉素培养基中叶片未出现褐化;在潮霉素浓度为

和图4。由图3可见,到第6周时,叶片分化趋于稳定。东林9号上层叶片外植体再生率可达95%,中部叶片外植体再生率较低,为39%,下层叶片外植体再生率最低为15%。试验结果表明,东林9号上层叶片外植体繁殖系数最大,为10.5;中部叶片外植体繁殖系数较低,为3;下层叶片外植体繁殖系数最低,为1。由此结果可判定植株幼嫩组织生理活性高,形态发生能力和分化能力高。

10 mg/L时,部分叶片即开始出现褐化现象(图5);随着潮霉素浓度梯度的提高,接种叶片边缘褐化程度逐渐加重。接种25 d后,东林9号叶片在添加5 mg/L的潮霉



素的诱导培养基中叶片膨大不明显, 未见有分化迹象而且叶片边缘出现部分褐化; 潮霉素浓度 10 mg/L 后, 接种叶片边缘褐化程度进一步加重, 潮霉素浓度 30 mg/L 的培养基中, 叶片已经开始死亡(图 6)。

已经分化的不定芽在不同潮霉素培养基接种 15 d 后, 潮霉素浓度 15 mg/L 的培养基中, 不定芽出现部分褐化现象; 当潮霉素浓度为 30 mg/L 时, 不定芽全部死亡(图 7)。

3 讨论

菊花再生体系的研究源于 20 世纪 70 年代。截止目前, 虽然在小菊、切花菊上大量报道已经建立了以叶片、茎段、花器官为外植体的再生体系, 但众多的研究也表明, 菊花的分化, 尤其是由叶片直接诱导不定芽发生时存在着分化率低、可重复性差、再生不稳定等现象。试验是以小菊为母本, 经多父本(切花菊)天然杂交结合高压静电场选育的 4 个优良菊花品系叶片为外植体进行不定芽诱导的研究, 探讨再生体系建立的诸多影响因素时发现, 不同基因型的再生能力存在显著差异。即使是同一基因型, 叶片生理状态的差异也对其再生产生显著的影响, 这一结果与 De Jong、吕晋慧<sup>[6]</sup> 报道一致。从研究结果来看, 在设定的 40 种培养基当中菊花的不同基因型分化率差异显著, 东林 13 号未获得以叶片为外植体的不定芽, 这可能是由于设定的外源激素组合与植物内源激素未达到某种平衡所致。东林 9 号的最适培养基中细胞分裂素的浓度很低, 而生长素的浓度是细胞分裂素的 3 倍, 这与蒋细旺等报道不同。由此可见, 针对新选育的菊花品种必须扩大生长调节剂的配比范围, 不能拘泥于已有报道, 这也是试验研究所得出的重要结论之一。研究发现, 同一基因型处于不同生理状态的叶片再生能力有显著差异。通过对东林 9 号品系新展开

嫩叶(上层)、新展开嫩叶下 3~5 片叶(中层)、新展开嫩叶下 8~10 片叶(下层)叶片取样, 发现刚刚展开的幼嫩叶片容易脱分化并再分化出不定芽, 而下层叶片分化率显著降低。由此可以推断, 即使是同一基因型, 植物体内的激素分配也存在着显著的差异, 这一研究结果与高亦珂<sup>[2]</sup> 等的报道一致。

在菊花遗传转化过程中, 经常利用潮霉素进行抗性筛选。从试验来看, 潮霉素对以叶片为外植体的分化起到很强的抑制作用, 叶片即使在 5 mg/L 的培养基中也失去了分化的能力。由此表明, 在以叶片为外植体进行遗传转化研究时, 只能在已经分化的不定芽中加入潮霉素进行抗性筛选。

参考文献

[ 1 ] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[ J ]. Science, 1985, 227: 1229-1231.  
[ 2 ] A Jaime Teixeira da S. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology[ J ]. Plant cell, tissue and organ culture, 2004, 79: 1-18.  
[ 3 ] Lemieux C. Transformation of chrysanthemum cultivars with Agrobacterium tumefaciens[ J ] // Horticulture Biotechnology Symposium, Davis: University of California, 1989: 21-23.  
[ 4 ] 傅荣昭, 刘敏, 梁红健. 通过根癌农杆菌介导法获得菊花转基因植株[ J ]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 72-76.  
[ 5 ] De Jong J, Rademaker W, van Wordragen M F, et al. Restoring adventitious shoot formation on Chrysanthemum leaf explants following cocultivation with Agrobacterium tumefaciens[ J ]. PlantCell, Tissue and Organ Culture, 1993, 32: 263-270.  
[ 6 ] 吕晋慧, 吴月亮, 孙磊等. 菊花叶片不定芽再生体系的研究[ J ]. 北京林业大学学报, 2005, 27(4): 98-100.  
[ 7 ] 高亦珂, 赵勃, 丁国勋. 菊花茎叶外植体再生体系的研究[ J ]. 北京林业大学学报, 2001, 23(1): 32-33.  
[ 8 ] 蒋细旺, 刘国锋, 包满珠. 菊花 9 个品种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(2): 162-166.

Establishment of Shoot Regeneration System from Leaves of New Variety of *Dendranthema grandiflora*

FENG Jun-wei<sup>1</sup>, TONG You-li<sup>1</sup>, ZHAO Fei<sup>2</sup>, LI Yu-hua<sup>1</sup>

(1. Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2. Shandong Agricultural University, Qingdao, Shandong 266000, China)

**Abstract:** Chrysanthemum of ‘Donglin 4’, ‘Donglin 6’ and ‘Donglin 9’ were used for tissue culture. The effect such as genotype, seedling age, density of hygromycin on shoot regenerate leaves from the lines of chrysanthemum was studied. The results were as followed: the genotype was the important factor in shoot regeneration, shoot regeneration in different hormone combination and different lines existed obvious discrimination. The bud differentiation rate of upper young leaf was higher than middle and lower parts of stem. The shoot regeneration of ‘Donglin 9’ was as high as 90% and the buds of their were died in 30 mg/L hygromycin. The optimum medium for ‘Donglin 4’ was MS+3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA. MS+2 mg/L BA+1 mg/L NAA was suitable for Donglin 6 and MS+0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA was suitable for ‘Donglin 9’.

**Key words:** Chrysanthemum; Leaf; Regeneration; Explant