

# 植物细胞工程在菊花育种中的应用

邝琦, 余倩花, 周厚高

(仲恺农业工程学院 花卉中心 广东 广州 510225)

**摘要:** 综述了近几年来细胞工程应用于菊花辐射诱变、化学诱变、体细胞杂交和转基因育种方面研究进展, 其中详细介绍了采用拯救性茎尖培养获得类病毒脱毒苗的研究, 和薄层细胞培养减少转基因植株的嵌合体、提高转化率方面的研究。

**关键词:** 植物细胞工程; 菊花育种; 拯救性茎尖培养; 薄层细胞

中图分类号: S 682.1<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)04-0220-05

植物细胞工程是应用植物细胞培养、细胞融合等细胞生物学方法, 达到改善品种, 生产生物制品及其组成的生物技术。它建立在现代生物科学和工程技术基础上, 其理论基础是细胞的全能性。植物细胞工程为育种提供性状稳定的材料, 与多种育种技术紧密结合, 成为获得新品种主要途径之一。

菊花是仅次于玫瑰的第二大切花品种, 为国际花卉市场最重要的商品之一, 同时盆栽品种和地栽品种也广

受欢迎。因其观赏价值大, 商业价值高, 业界对菊花新品种的选育备受重视。现在前人研究的基础上, 总结了近年来在菊花繁育研究中利用细胞工程结合育种技术在品种改良方面取得的新进展。

## 1 建立性状稳定的菊花再生体系

### 1.1 组织培养、脱毒苗和大规模繁殖技术

在品种改良过程中, 建立离体培养技术的目的是为了获得、扩大具有稳定性状和有效遗传的目标群体。菊花在适当的外源性激素诱导下, 易得到愈伤组织和再生苗。有关的研究很多, Teixeira da Silva<sup>[1]</sup>统计了100篇文献中不同部位的菊花外植体获得愈伤和再生苗的激素及其浓度配置。综合近几年来转基因试验和诱变育种试验的有关文献<sup>[2-7]</sup>, 激素浓度在 BA 0.5~2 mg/L+NAA 0.1~0.5 mg/L 范围内变动, 基本能达到从不同外植体诱导菊花产生愈伤组织和不定芽的目的。

**第一作者简介:** 邝琦(1974-), 女, 在读硕士, 研究方向园林植物遗传育种。E-mail: kuangqi11@yahoo.com.cn。

**通讯作者:** 周厚高(1962-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为花卉遗传育种。E-mail: zhouhougao@163.com。

**基金项目:** 广州市重大科技资助项目(2007001)。

**收稿日期:** 2009-09-20

## The Comparative Study of *Perilla*, *Salvia sclarea*, and *Elshdtzia bodinieri*

DENG Yun, GAI Qiong-hui

(Agriculture and Forest Institute, Longdong University, Longdong, Gansu 745000)

**Abstract:** The *Perilla*, *Salvia sclarea* and *Elshdtzia bodinieri* are all the subject plants of lip shape, and is a kind of important crude drugs, spices crop, its name is similar to use, therefore it had produced different kind of the same name, the same kind of different name phenomenon. The were compared and distinguished from botany classified, originated from the distribution, characteristic, developed utilizing etc. about the three plant. In the hope of providing the basis for development and utilization of this kind of plant resource.

**Key words:** *Perilla*; *Salvia sclarea*; *Elshdtzia bodinieri*; distinguish.

通常采用的培养愈伤组织的方式简单有效,但因外植体的细胞结构多样,导致在育种试验中尤其是转基因实验中的丛生苗出现转化率低、染色体嵌合、细胞遗传异质和基因型依赖等现象,而薄层细胞(Thin cell layer, TCL)培养可有效解决此类问题。它能有效地提高植株的再生率和再生时间,减少嵌合体的发生。薄层细胞系统是指从植物器官上切下的小外植体,包括纵向薄层和横向薄层。Teixeira 等<sup>[8]</sup>研究了在植物生长调节剂控制下的菊花品种‘Shuhou-no-chikara’茎尖横向薄层细胞(tTCL,厚度 0.5~1.0 mm,直径 0.5~1.0 mm)的器官发育,在 MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+40 mg/L 蔗糖的培养基中,芽诱导为 1.37/tTCL;经流式细胞仪检测,2C:4C:其它 C 值的比值显示没有细胞遗传和体细胞无性系的变化,细胞在绿色愈伤和再生植株中分裂旺盛。

对病毒和类病毒感染导致性状退化的品种,多采用茎尖脱毒获取无病毒和类病毒感染的再生苗。目前,经茎尖脱毒获取了脱西红柿不孕病毒(TAV)<sup>[9]</sup>、脱西红柿斑萎病毒(TSWV)<sup>[10]</sup>、脱黄瓜花叶病毒(CMV)<sup>[11]</sup>和脱菊花病毒 B(CVB)<sup>[12]</sup>的菊花苗。但常规的含两片叶原基的茎尖脱毒培养往往不易得到脱菊花矮化类病毒(chrysanthemum stunt viroid, CSVd)的植株,而更小的无叶原基的顶端分生组织(LP-free SAMs)体积小易干燥,难以存活。针对该问题,Hosokawa 等<sup>[13]</sup>首次报道了拯救性的茎尖培养技术培养 LP-free SAMs 获得脱类病毒的方法。将矮牵牛、白菜和康乃馨的根尖接种于修正的 Konp 培养基上,菊花 Piató 品种的 LP-free SAMs 置于根尖切面,茎尖在白菜根尖上的存活率和再生状况最好。接着,他又将该品种的 LP-free SAMs 接种于无 CSVd 的菊花和白菜的根尖上培养再生植株,经巢式-PCR 检测和斑点杂交鉴定,两种培养方式的再生植株中分别有 14%和 3%的无菊花矮化类病毒<sup>[14]</sup>。随后,又将接种于菊花根尖得到的 LP-free SAMs 再生苗、LP SAMs 再生苗和母本扦插苗作长日照处理后,前者的节间数远远多于后两者,现蕾期明显延长,侧芽生长旺盛<sup>[15]</sup>。显然,含有叶原基的脱毒苗并没有完全脱毒,RT-PCR 也得出同样结论。此外,被类病毒感染的再生植株可在长日照下开花,脱毒株长日照下只行营养生长,这些结果均表明类病毒可能影响植株的光周期。由此看来,利用脱毒苗技术和分子生物学技术相结合,不仅在商业生产上起作用,还有望在微观领域阐明病毒、类病毒影响植物的生长周期的作用机理,获得新的突破。

在商业化的要求下,菊花大规模快速繁殖获得再生植株的方式还可采用生物反应器生产<sup>[16]</sup>。生物反应器具有生产规模大、便于自动化控制等优点,通过对营养成分、空气流量、温度、光照时间和光量子流量、接种密

度等外在因素的调节与控制,可使培育的植株生理性状基本一致、无病虫害、提高观赏价值<sup>[17]</sup>。目前在多种植物上获得了成功。Hahn 等<sup>[18]</sup>对比了菊花节间在生物反应器中经液体培养基与凝胶培养腋芽的效果,发现液体培养基中的腋芽鲜重、干重和长度等性状均优于后者。

## 1.2 悬浮细胞培养和原生质体分离

悬浮培养是在受到不断搅动和摇动的液体培养基里培养单细胞及小细胞团的组织培养体系。获得的悬浮细胞是进行原生质体分离、体细胞杂交与遗传转化等研究的重要材料。陈发棣等<sup>[19]</sup>以小菊‘七月红’为试材,探讨细胞悬浮培养及再生诱导条件,以 MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA 适合从试管苗中诱导适于悬浮培养的疏松愈伤组织,细胞的悬浮培养系液体培养基配置为 MS+0.5 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA;在配置为 MS+0.2 mg/L KT+0.2 mg/L 2,4-D 的培养基上,以固液双层培养植板率最高,形成的愈伤组织在 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 培养基上继代 4 次出现不定芽。

植物原生质体是除去细胞壁的裸露植物细胞。陈发棣等<sup>[20]</sup>统计了 2005 年前菊科植物原生质体培养成功的种类,共计 20 多属 50 多种。这些植物集中在观赏种类、药用种类和经济作物。周菁等<sup>[21]</sup>以酶解法获得了较高产量的菊花叶肉原生质体,细胞活力在 64.5%左右,经悬浮培养形成肉眼可见的愈伤后植板,植板率与琼脂浓度和抗生素的浓度密切相关。

## 2 细胞工程在菊花育种中的应用

从育种处理方式看,辐射诱变、化学诱变、体细胞杂交以及转基因育种大多经细胞生物技术处理诱导出愈伤组织、悬浮细胞或原生质体后,筛选目的植株,最后经扩大繁殖得到遗传结构基本一致的再生苗。

### 2.1 辐射诱变

辐射试管苗或植株愈伤组织导致染色体变异多种多样,花色变异频率高,再加上观察容易、方法简单,目前经辐射诱导变异育种获得了很多品种。以辐射处理扦插苗获得变异株的方式简单,但为减少嵌合体的发生,缩短育种时间,通过辐射诱变愈伤组织的报道越来越多。陈发棣等<sup>[22]</sup>采用<sup>60</sup>Co $\gamma$ -射线辐照 3 个小菊品种的舌状花和管状花的愈伤组织,从愈伤组织分化和生长情况看,对其的最高辐射剂量宜 15Gy 为宜,个别的可以采用 20Gy。

有多篇文献探讨了辐射诱变的机制。在生理生化机制的研究显示,适当剂量的辐射导致菊花的叶绿素的含量增高,光合速率增高,过氧化物酶同工酶带数及带的浓度与对照有明显差异<sup>[23]</sup>。Lee 等<sup>[24]</sup>分析了 $\gamma$ -射线辐射后与花青素合成有关的基因和转录产物,结果支持辐射导致了花青素基因的变异。Yamaguchi 等<sup>[7]</sup>比较经

2Gy 碳离子、10Gy 氮离子和 80Gy $\gamma$ -射线辐射诱变后变异株的遗传稳定性,所有经 $\gamma$ -射线辐射的子代不定芽培育出的再生苗和变异母株花色不一致,而由离子束诱导的一半左右再生苗与变异母株花色相同。这说明 $\gamma$ -射线诱导植株产生了周缘嵌合体(Periclinal Chimeras),而经离子束辐射的植株除了有周缘嵌合体外,还产生了纯合突变(Solid Mutant),这种纯合突变性状能稳定地遗传给后代。因此,在辐射育种工作中尤其要注意因周缘嵌合体导致的遗传性状不稳定现象,同时也可利用这种现象筛选到更多的表型变异的新品种。

2.2 化学诱变

化学诱变技术结合体外试管培养,使再生植株被隐性或显性基因控制特征性状能有效表达,提高期望突变。化学诱变剂按诱变机制分为:碱基类似物诱变剂,如 5-溴尿嘧啶(5-BU)、2-氨基嘌呤(AP);直接诱变 DNA 结构的诱变剂,如烷化剂、亚硝酸;诱发移码突变的诱变剂,如吡啶类、抗生素。作物中常用的诱变剂为甲基磺酸乙酯(EMS)、平阳霉素(PYM)和叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )。Latado<sup>[25]</sup>将用 EMS 处理未成熟的菊花花托外植体接种于培养基上进行不定芽诱导,得到各种花色的变异株。王红等<sup>[26]</sup>用平阳霉素处理小菊‘意大利红’的叶片和茎段外植体,后代出现株高、冠型、叶色、叶型及花色和花型的变异,平阳霉素的最适诱变剂量为 2~4 mg/L。

其它的植物抗性诱导剂如农药、激素类物质、病毒或毒物的培养滤液和纯化毒素等用于体细胞无性系的抗性筛选育种的研究也非常活跃<sup>[27]</sup>。Kumar 等<sup>[28]</sup>用菊粗状壳针孢(*Septoria obesa* Syd)的滤出液筛选菊花品种‘Snow Ball’的愈伤组织,从抗性愈伤组织中得到了对菊花枯斑病显著抗性的再生苗。

2.3 体细胞杂交

制备原生质体的主要目的是获得体细胞杂交新种,但目前菊花体细胞杂交新的报道很少<sup>[29-31]</sup>(见表 1)。这些体细胞杂交种的不良性状很明显,如菊花与大籽蒿的杂交种除了能抗锈病外,还有明显的大籽蒿的其它性状,出现花色、花型、花径的改变,影响观赏品质。

表 1 菊花原生质体融合				
杂交组合	原生质体来源	融合方法	试验结果	参考文献
菊花×智利喇叭花	叶片	电融合	杂种植物	[29]
菊花×智利喇叭花	叶片	电融合	杂种植物	[30]
菊花×大籽蒿	叶肉细胞	电融合	抗锈病植物	[31]

2.4 转基因育种

转基因育种中的大部分途径都在试管内完成。作为植物基因工程的核心,转基因育种有 3 个步骤:将需要介导的基因转入植物细胞;选择转基因细胞;转基因植株的再生。关键的步骤是第 3 步,但在其它 2 个步骤中,部分细胞可能没被转化,特别是在选择水平低的情况下,未被转化的细胞不能剔除,而这种细胞又可能与

转化的细胞的再生能力一致,再加上再生培养时间长,可能形成嵌合体植株。经薄层细胞培养的愈伤组织体积小,细胞来源相对单一,有效地降低嵌合体的形成。鉴于抗性筛选广泛应用于转基因中,Teixeira da Silva<sup>[32]</sup>研究了抗生素筛选农杆菌感染外植体的效果,G418、庆大霉素、潮霉素 B、卡那霉素 A、新霉素和巴龙霉素等 6 种氨基糖苷类抗生素用于菊花和烟草的茎 tTCL 的抗性筛选,具抗性的不定芽或愈伤组织生长良好,流式细胞仪检测无嵌合体。此外,药理作用不同的药物对苗的再生率也有很大影响,其梯度药害如下:除草剂>氯霉素>利福平>链霉素>米诺环素>氨苄青霉素>青霉素青 G=青霉素 V<sup>[33]</sup>。

陆续有采用 TCL 培养获得转基因植株的报道,薄层细胞培养对减少转基因植株中嵌合体的发生有明显效果<sup>[34]</sup>。Teixeira da Silva 等<sup>[8, 35-37]</sup>用农杆菌法、基因枪法、超声波辅助根农杆菌法和基因枪配合农杆菌法等遗传转化方式处理菊花外植体,获得的转基因植株经检测,发现茎 tTCL 培养的外植体遗传转化效率最高<sup>[8]</sup>。

3 育种中的细胞遗传物质变异检测与分析

获得新品种的原因是不同的育种手段部分改变遗传物质。定量检测遗传物质的改变多用分子生物学技术。在细胞学层面上检测染色体变化的手段较少,常规的多采用压片染色处理检测染色体的断裂、倍性改变等,更多细胞水平的定量或半定量检测染色体变异的方式正在摸索中。单细胞凝胶电泳(Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE)又称为彗星试验,主要用于检测辐射和化学物质引起的 DNA 损伤,该方法具有灵敏、简便、快速、低耗、重复性好的独特优点,在遗传毒理和环境监测方面用途广泛,目前也逐渐在植物学和育种中应用。王静等<sup>[38]</sup>检测了辐射对细胞的损伤和修复,Gichner 等<sup>[39]</sup>对比了不同浓度的 EMS 处理的 8 种农作物的彗星图像,认为 DNA 的损伤可以通过图像的平均尾矩值表达,而核的直径与细胞对 EMS 的敏感性不相关。但目前尚未见到对菊花辐射诱变育种后新品种 DNA 损伤程度与诱变剂量的相关性报道。

利用流式细胞仪与荧光染色剂结合,可以分析多种植物的细胞中染色体含量和类型、蛋白质和其它代谢产物的含量,以及与 DNA 分子标记结合进行物理作图<sup>[40-43]</sup>。Teixeira da Silva 在所有已发表的与 TCL 培养方式有关文献中均使用流式细胞仪检测再生株的倍性和嵌合体<sup>[8, 32, 35-36, 44-45]</sup>。

4 细胞工程在菊花育种中的问题与展望

应用学科的发展离不开基础研究的支持。要使新品种的研发获得更多的成绩,需要加强植物学基础研究。通过植物细胞工程结合分子生物学理论,加快植物细胞工程和植物基因工程方面的整合,继续深入植物生

理生化机制、代谢机制、遗传转化及表观遗传现象的作用机理等领域的研究。利用分析化学方面研究成果,探讨植物的单细胞、亚细胞、分子乃至原子水平的结构。这些基础性的进展将大大推进育种学的前进速度。

随着学科间的交叉和彼此渗透,多学科的技术手段必将被更多的用于育种工作。此外,还需要进一步完善现有的细胞生物培育技术。例如菊花中体细胞育种、小孢子育种等受培养条件和物种的特异性限制,多年来进步不大;其它细胞工程问题如野生种质资源的保存,转基因育种的低转化率影响转基因品种的筛选等,制约了育种学方面的进展。

另外,还需要加快植物细胞工程在商业化生产中的应用。大规模的生物反应器应用于药用植物的次生代谢产物生产已经非常成功,但该技术 in 花卉的商业性快速繁殖方面应用仍较少。如何结合市场需求,缩短从实验室新品种的研发到大规模商业生产的距离,需要进一步研究。

### 参考文献

- [1] Teixeira da Silva J A. Ornamental chrysanthemum improvement by biotechnology[J]. Plant cell, Tissue and Organ culture 2004, 79: 1-18.
- [2] Shinozawa H, Komano M, Nomura Y, et al. Introduction of Delta-endorphin gene of *bacillus thuringiensis* to Chrysanthemum [ *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] for insect resistance[J]. Breeding sci. 2002, 52: 43-50.
- [3] Tsuru M, Kubo T, Shizukawa Y, et al. Agrobacterium rhizogenes is a useful transporter for introducing T-DNA of the binary plasmid into the chrysanthemum *Dendranthema grandiflorum* Kitamura genome[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2005 81: 175-181.
- [4] Misra P, Datta S K, Chakrabarty. Mutation in flower colour and shape of Chrysanthemum morifolium induced by  $\gamma$ -radiation[J]. Biologia Plantarum 2003 47(1): 153-156.
- [5] Aswath C R, Mo S Y, Kim S H et al. IbMADS4 regulates the vegetative shoot development in transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura) [J]. Plant Science, 2004 166: 847-854.
- [6] Seo J, Kim W S, Kim J, et al. Co-expression of flavonoid 3"-hydroxylase and flavonoid 3"ydroxylase Accelerates Decolorization in Transgenic Chrysanthemum Petals[J]. Journal of Plant Biology 2007, 50(6): 626-631.
- [7] Yamaguchi H, Shimizu A, Hase Y, et al. mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of dimeric structure of induced mutant[J]. Euphytica, 2009, 165: 97-103.
- [8] Teixeira da Silva J A, Fukai S. Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control[J]. Asian Journal of Plant Sci. 2003 2: 505-514.
- [9] Singh B P, Gupta R P. Control of Chrysanthemum aspeny virus by heat therapy[J]. Phytopathology, 1978 47: 909-910.
- [10] Balukiewicz A, Kryczynski S. Attempts to eliminate TWSV from Chrysanthemum plants by meristem tip culture. Phytopathol[J]. 2001, Pol. 21: 101-108.
- [11] Verma N, Ram R, Hallan, V et al. Production of CMV-free chrysanthemum by meristem tip culture[J]. Crop Prot. 2004, 23: 462-473.

- [12] Ram R, Verma N, Singh A, et al. Indexing and production of virus-free chrysanthemum[J]. Biol. Plantarum 2005 49: 149-152.
- [13] Hosokawa M, Otake A, Sugawara Y, et al. Rescue of shoot apical meristems of chrysanthemum by culturing on root tips[J]. Plant Cell Rep. 2004, 22: 443-448.
- [14] Hosokawa M., Otake A, Ohishi K, et al. Elimination of chrysanthemum stunt viroid from an infected chrysanthemum cultivar by shoot regeneration from a leaf primordium-free shoot apical meristem dome attached to a root tip[J]. Plant Cell Rep. 2004, 22: 859-863.
- [15] Hosokawa M, Ueda E, Ohishi K, et al. Chrysanthemum stunt viroid disturbs the photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants [J]. Planta 2004 220: 64-70.
- [16] Levin R, Vasil I K. An integrated and automated tissue culture system for mass propagation of plants[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1989, 25: 21-27.
- [17] Sivakumar G, Kim S J, Hahn E J et al. Optimizing environmental factor for large-scale multiplication on chrysanthemum (*Chrysanthemum grandiflorum*) in bloom-type bioreactor culture[J]. In vitro cell. Dev. Biol-Plant, 2005, 41: 822-825.
- [18] Hahn E J, Paek K Y. Multiplication of Chrysanthemum shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stem[J]. Plant cell, Tissue and Organ culture 2005 81: 301-306.
- [19] 陈发棣, 蒋甲福, 郭维明, 等. 小菊悬浮细胞培养与植株再生研究[J]. 园艺学报, 2006 33: 1021-1026.
- [20] 陈发棣, 赵宏波, 房伟民, 等. 菊科植物原生质体研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25: 1913-1920.
- [21] Zhou J, Wang B G, Zhu L Q et al. Conditioned culture for protoplasts isolated from chrysanthemum: an efficient approach. Colloids and Surfaces [J]. Colloids and Surfaces B. Biointerfaces. 2005, 45: 3-4.
- [22] 陈发棣, 滕年军, 房伟民, 等. 三个菊花品种花器官愈伤组织辐射效应的研究[J]. 中南林学院学报 2003 23: 49-52.
- [23] 胡超, 洪亚辉, 黄丽华, 等. 菊花辐射后代生理生化特性的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003 29: 471-473.
- [24] Lee G J, Chung S J, Park I S, et al. Variation in the phenotypic features and transcripts of color mutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) derived from gamma ray mutagenesis[J]. Journal of Plant biology, 2008 51: 418-423.
- [25] Latado R R, Adames A H, Neto A T. In vitro mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels [J]. Plant cell, Tissue and organ culture 2004, 77: 103-106.
- [26] 王红, 陈发棣, 赵宏波, 等. 平阳霉素对盆栽小菊意大利红的诱变效应[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30: 39-43.
- [27] Thakur M, Sharma D R, Shama S K. In vitro selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. Dianthi [J]. Plant Cell Rep. 2002 20: 825-828.
- [28] Kumar S. In vitro selection and regeneration of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzelev) plants resistant to culture filtrate of *Septoria obesa* Syd [J]. In vitro cell Biol-Plant, 2008 44: 474-479.
- [29] Khalid N, Lee C H, Power J B, et al. Plant regeneration from electrofused protoplasts of Chrysanthemum morifolium and *Salpigloss sinuate* [J]. Current Plant Science & Biotechnology in Agriculture, 1988 7: 269-270.
- [30] Lee C H, Paek K Y, Hwang J K. Somatic hybridization between *Dendranthema grandiflorum* and *Salpigloss sinuate* via protoplast fusion[J]. Korean Journal of Breeding (Korea Republic). 1995, 27: 290-297.

[31] Furuta H, Shinoyama H, Nomura Y, et al. Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat.) and wormwood (*Artemisia sieversiana* J.F. Ehrh. ex. Willd.) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts [J]. *Plant Science* 2004, 166(3): 695-702.

[32] Teixeira da Silva J A, Fukai S. The effect of aminoglycoside antibiotics on in vitro morphogenesis from cultured cells of chrysanthemum and tobacco [J]. *Journal of plant biology* 2003, 46: 71-82.

[33] Teixeira da Silva J A, Nhut D T, Tanaka M, et al. The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (TCLs) [J]. *Scientia Horticulturae* 2003, 97: 397-410.

[34] Teixeira da Silva, Thanh Van K T, Biondi S, et al. Thin cell layers: Developmental building blocks in ornamental biotechnology [J]. *Floriculture and ornamental Biotechnology*, 2007, 1: 1-13.

[35] Teixeira da Silva J A, Fukai S. Increasing transient and subsequent stable transgene expression in chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitamura) following optimization of particle bombardment and Agroinfection parameters [J]. *Plant Biotechnology* 2002, 19: 229-240.

[36] Teixeira da Silva J A, Fukai S. Change in transgene expression following transformation of chrysanthemum by four gene introduction methods [J]. *Propagation Ornamental Plants* 2002, 2: 28-37.

[37] Shinoyama H, Anderson N, Furuta H, et al. Chrysanthemum biotechnology. In: Teixeira da Silva J A (ed) *Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues* (1st edn, Vol II), Global Science

Books London UK, 2006: 140-163.

[38] 王静, 蒋磊, 王艳, 等. 紫外辐射诱导植物叶片 DNA 损伤敏感性差异 [J]. *植物学通报*, 2007, 24: 189-193.

[39] Gichner T, Mühlfeldová Z., Induced DNA damage measured by the Comet assay in 10 weeds species [J]. *Biologia Plantarum* 2002, 45: 509-516.

[40] Nail M, Robert S. Flowcytometric of protein content in *Taxus* protoplasts and single cells as compared to aggregated suspension cultures [J]. *Plant cell Rep.* 2005, 23: 528-533.

[41] Hirano T. & Hoshino Y. Detection of changes in the nuclear phase and evaluation of male germ units by flow cytometry during in vitro pollen tube growth in *Alstroemeria aurea* [J]. *J Plant Res.* 2009, 122: 225-234.

[42] Capparelli R, Viscardi M, Amorosa M G, et al. Inter-simple sequence repeat markers and low cytometry for the characterization of loselu related *Citrus limo* germplasm [J]. *Biotechnolog letters*, 2004, 26: 1295-1299.

[43] Orhovic V, Calovic M, Vilorio Z, et al. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry [J]. *Euphytica* 2008, 161: 329-335.

[44] Teixeira da Silva J A. Thin cell layer technology for induced response and control of rhizogenesis in chrysanthemum [J]. *Plant Growth Regul* 2003, 39: 67-76.

[45] Teixeira da Silva J A. Evaluation of carbon sources as positive selection agents for chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) transformation [J]. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 2004, 32: 55-67.

## Application of Plant Cell Engineering in Chrysanthemums' breeding

KUANG Qi, YU Qian-hua, ZHOU Hou-gao

(Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

**Abstract:** Plant cell engineering methods have close interaction with breeding for providing stable materials. As outlined in this review, the techniques such as irradiation mutagenesis, chemical mutagenesis, somatic cell hybridization, and transgenesis by using cell engineering methods in chrysanthemum breeding were introduced. Simultaneously, the important related progresses are highlighted, including research of rescue of leaf primordia-free shoot apical meristems by culturing on root tips to obtain viroid-free regeneration shoots, and reduction of chimera and elevation of transformation rate in transgenic plant by thin cell layer culturing.

**Key words:** plant cell engineering; chrysanthemum breeding; rescue of shoot apical meristem culturing; thin cell layer

# 欢迎订阅《北方园艺》期刊