

# 匍匐小菊遗传转化过程中选择压力的确定

高凤娟<sup>1,2</sup>, 黄丛林<sup>1</sup>, 马荣才<sup>1</sup>, 张秀海<sup>1</sup>

(1. 首都师范大学 北京 100097; 2. 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

**摘要:** 该试验以北京农科院生物中心新近培育的匍匐小菊品种“粉地毯”为材料, 以叶片为外植体, 建立“粉匍”的高效再生体系。试验共进行了 6 种不同培养基的筛选, 研究了 6-BA 对于再生频率的影响, 最终确立了 6-BA 的最佳浓度。在 MS+6-BA(0.5 mg/L)+NAA(0.1 mg/L)培养基上获得 91% 的再生率, 在 1/2 MS+NAA(0.1 mg/L)培养基上诱导生根。在获得高效叶盘再生体系的基础上, 又研究了植物遗传转化过程中常用的 2 种选择标记卡那霉素(Km)和除草剂(PPT)对菊花不定芽分化的影响。结果表明: 大于 8 mg/L 的 Km 和大于 0.4 mg/L 的 PPT 能够完全抑制试验材料的不定芽分化。试验最终确定了匍匐小菊对卡那霉素、草丁膦的适宜筛选浓度, 分别为 5 mg/L 和 0.2 mg/L, 为以后进行匍匐小菊的基因工程工作奠定了基础。

**关键词:** 菊花; 叶盘; 再生体系; 卡那霉素; 草丁膦

**中图分类号:** S 661.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)10-0147-03

菊花(*Dendranthema morifolium*)是世界重要的观赏花卉之一, 也是我国有着悠久历史的传统名花, 具有观赏、食用、药用等多种价值, 市场前景广阔。但目前市场上流行的商品菊花多为进口品种, 因此加强菊花育种具有很高的经济效益和社会效益。但菊花的遗传背景复杂, 传统的育种方法都受到物种自身基因的限制, 很难实现定向育种, 育种周期也比较长。生物技术在菊花育种中的应用, 可打破种间杂交的障碍, 扩展遗传物质交流的范围, 为种质创新提供坚实的物质和技术基础, 使品种改良方法更加现代化和高效化。生物技术, 无论细胞工程还是基因工程, 都需要建立一个良好的组织培养再生体系。

菊花的遗传转化工作国内开展的比较早, 受体材料多为绿化用的地被小菊品种或者生产上应用的切花菊品种, 主要目标是培育抗蚜虫新品种和增强菊花的抗逆性等。北京农业生物技术研究中心在进行菊花育种研究的过程中, 新培育了一系列匍匐小菊品种, 花色丰富, 株高小于 15 cm, 单株匍匐半径可以达到 1~2 m, 抗性强, 将来可以在园林绿化中广泛使用, 替代现有的地被小菊。但匍匐小菊的缺点是花期较晚, 这限制了它们的进一步推广应用。植物花期的调控途径已经在模式植

物拟南芥中得到充分研究, 控制花期的一些关键基因已经被克隆, 并且已经通过基因工程应用于其它植物的花期调控上。因此也可以通过基因工程技术改变匍匐小菊的花期, 从而培育出在生产上具有很强应用前景的小菊新品种。试验探讨了以菊花“粉地毯”无菌苗为材料, 叶片为外植体直接诱导不定芽分化的再生体系, 为菊花基因工程奠定了基础。在匍匐小菊“粉地毯”叶盘再生的基础上, 又进行了卡那霉素、草丁膦等筛选压力试验, 确定了匍匐小菊“粉地毯”对卡那霉素、草丁膦的筛选浓度, 对以后的转基因工作奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选用匍匐小菊品种“粉地毯”无菌苗为试验材料。

### 1.2 方法

1.2.1 材料的处理 选取匍匐小菊“粉地毯”无菌苗幼嫩的叶片, 选取近叶柄处部位, 将叶片切成大小为 0.5 cm×0.5 cm 的叶盘。正面向上接种到 5 种直接诱导芽分化的培养基上, 使叶片尽可能多地接触培养基。培养基配方见表 1。在 25℃、16 h 光照条件下进行培养。当再生芽长到 2 cm 左右时把茎段剪下来, 接种到生根培养基上 1/2 MS+NAA(0.1 mg/L), 生根的小苗经练苗后, 直接移栽到温室进行观察, 移栽后的小苗长势良好。

1.2.2 培养基的配制 以 MS 培养基为基本培养基, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 5.5 g/L, 根据文献中报道的生长素的浓度, 设计了多种不同的激素比例, pH 值为 5.8 121℃高压灭菌 20 min, 经过筛选获得了不定芽再生率较高的培养基, 确定匍匐小菊叶盘再生的适合体系。

**第一作者简介:** 高凤娟(1980-), 女, 硕士, 现从事遗传学方面的研究工作。

**通讯作者:** 张秀海。E-mail: zhangxiuhai@baafs.net.cn

**基金项目:** 北京市科技新星计划资助项目(2006A27); 北京市优秀人才资助项目(20061D200500041)。

**收稿日期:** 2008-05-03

1.2.3 数据统计 在进行菊花再生体系确立以及筛选压力确立的试验中, 每个试验共选取了100个叶盘作为外植体, 3次重复。小菊再生频率的统计是计算有不定芽分化的外植体占有外植体的比例。所得数据采用SAS软件进行方差分析和多重比较(Duncan法,  $P=0.05$ )。

2 结果与分析

2.1 叶盘再生体系的确立

将叶盘接种到5种培养基上, 6 d后叶盘开始膨大(图1), 12 d后看到有芽点冒出(图2), 25 d后, 新生芽长势良好(图3), 统计长度在2 cm以上的苗的数量, 并计算叶盘再生率。

通过统计可以看出, 匍匐小菊的叶盘在MS3培养基中再生率最高, 这个体系可以用来进行转基因。

表1 不定芽诱导培养基及“粉地毯”再生率

培养基	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再生率/%
MS1	0.10	0.10	32.58
MS2	0.10	0.25	62.32a
MS3	0.10	0.50	91.03a
MS4	0.10	0.75	49.00
MS5	0.10	1.00	36.67
MS6	0.10	1.20	43.34

2.2 对硫酸卡那霉素选择压力的确定

在获得较高叶盘再生率的基础上, 进一步确定匍匐小菊对卡那霉素的筛选压力。将匍匐小菊叶盘分别转入含有卡那霉素2.5、8、20、50、80  $\text{mg/L}$ 的叶盘再生培养基MS3上, 在25℃、16 h光照条件下进行培养。1个月后统计生长情况, 在MS3+Km 5  $\text{mg/L}$ , 获得了2.30%的再生率(图4)。在卡那霉素浓度超过5  $\text{mg/L}$ 的MS3培养基上, 没有再生芽诱导出来(图5)。



图1 叶盘培养6 d后

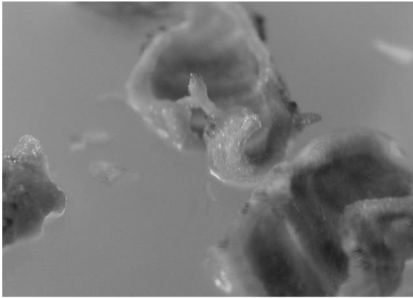


图2 叶盘培养12 d后

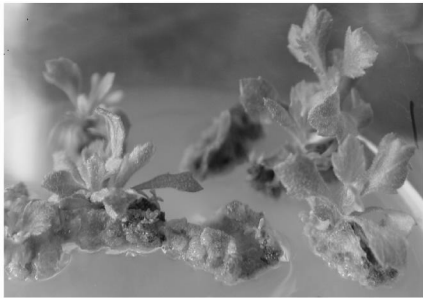


图3 叶盘培养25 d后



图4 MS3+Km5  $\text{mg/L}$



图5 MS3+Km10  $\text{mg/L}$



图6 MS3+草丁膦 0.2  $\text{mg/L}$

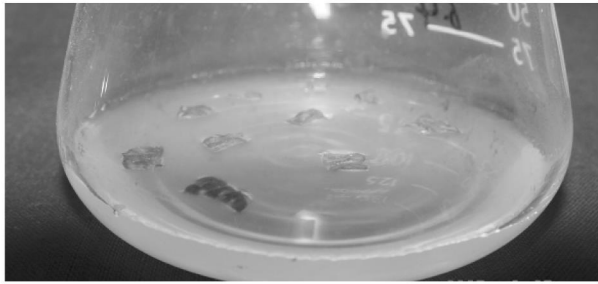


图7 MS3+草丁膦 1.0  $\text{mg/L}$

2.3 对草丁膦选择压力的确定

由于菊花的再生受抗生素的影响很大, 这给菊花的转基因育种工作带来了很大不便。为解决菊花转基因中选择标记的问题, 在获得较高叶盘再生率的基础上, 又进一步确定了草丁膦对匍匐小菊再生的筛选压力。将匍匐小菊叶盘分别转入含有草丁膦 0.2、0.4、0.6、1.0 mg/L 的叶盘再生培养基 MS3 上, 在 25℃、16 h 光照条件下进行培养。一个月后统计生长情况, 在 MS3+ 草丁膦 0.2 mg/L 获得了 5.0% 的再生率(图 6), 而在草丁膦浓度大于 1 mg/L 的培养基上无植株再生(图 7)。

3 讨论

试验中, 以匍匐小菊无菌苗叶盘为外植体进行培养, 直接从叶盘上诱导芽的再生, 建立起菊花再生体系, 获得了较高的芽诱导率, 优选出直接诱导芽再生的最佳培养基。从结果可以看出, 当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时, 6-BA 的浓度从 0.1 mg/L 增加到 0.5 mg/L 时, 繁殖系数呈现上升趋势, 在 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 培养基上的叶盘, 芽的再生频率高达 91.03%。在此基础上再提高 6-BA 的浓度, 叶盘得再生率反而下降。因此, 以菊花的叶盘为外植体, 获得了一套完整的、

系统的和高效的菊花再生体系, 为菊花基因工程研究提供了条件。在获得的高效的叶盘再生的基础上, 又确定了匍匐小菊叶盘对卡那霉素和草丁膦的压力筛选, 对进一步进行转基因工作奠定了坚实的基础。

参考文献

[ 1 ] 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, 2001, 23( 1 ): 32-33.  
[ 2 ] 傅荣昭 刘敏 梁红健 等. 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.  
[ 3 ] 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.  
[ 4 ] 林青萍 陈雄庭. 菊花离体叶片快繁体系的建立[ J ]. 热带农业科学, 2006, 26( 3 ): 25-28.  
[ 5 ] 李辛雷 陈发棣, 王 红, 等. 菊花外植体再生体系的研究[ J ]. 上海农业学报, 2004 20( 2 ): 13-16.  
[ 6 ] 刘军 赵兰勇 丰震, 等. 菊花叶片转基因再生体系的优化选择[ J ]. 植物学通报, 2004, 21( 5 ): 556-558.  
[ 7 ] 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 ): 97-100.  
[ 8 ] 刘军 赵兰勇 丰 震 等. 菊花叶片离体高效再生体系的建立[ J ]. 山东农业大学学报( 自然科学版 ), 2004 35( 2 ): 177-182.  
[ 9 ] 王春能 张启翔 高亦柯. 菊花转基因研究进展[ J ]. 河南林业科技, 2004, 20( 2 ): 13-16.

Determination of Selection Pressure on Genetic Transformation of *Dendranthema morifolium* cv. pink carpet

GAO Feng-juan<sup>1,2</sup>, HUANG Cong-lin<sup>1</sup>, MA Rong-cai<sup>1</sup>, ZHANG Xiur-hai<sup>1</sup>

(1. Capital Normal University, Beijing 100097, China; 2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing 100097, China)

**Abstract:** High regeneration efficiency system of sprawling *Dendranthema morifolium* new cultivar "pink carpet" bred recently by Beijing Agro-Biotechnology Research Center was set up with leaf discs as explants. Six different medium were tried to investigate the effects of 6-BA on the *Dendranthema regeneration* frequency. Proper concentration of 6-BA was determined. Shoots regenerated from 91% of the total explants in the medium MS+6-BA (0.5 mg/L)+NAA (0.1 mg/L). Roots were induced in the medium 1/2 MS+ NAA (0.1 mg/L). After the acquirement of high regeneration frequency system with leaf discs, effects of two commonly used selecting agents in plant genetic transformation, kanamycin (Km) and phosphinothricin (PPT), on the differentiation of adventitious shoots from in vitro leaf discs of *Dendranthema morifolium* were investigated. The results indicated both Km and PPT completely inhibited shoot induction when Km concentration was higher than 8 mg/L or PPT concentration was higher than 0.4 mg/L. In this paper proper concentration of Km and PPT for selection pressure of genetic transformation was determined as 5 mg/L and 0.2 mg/L individually. This research established a foundation for genetic engineering of sprawling *Dendranthema morifolium*.

**Key words:** *Dendranthema morifolium*; Leaf discs; Regeneration system; Kanamycin; Phosphinothricin