

文章编号: 1001-1498(2007)03-0328-06

# 地被菊间接体细胞胚发生途径的 转基因受体体系的研究

蒋细旺<sup>1,2</sup>, 张启翔<sup>1\*</sup>

(1. 北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083; 2. 江汉大学医学与生命科学学院, 湖北 武汉 430056)

**摘要:** 采用三步培养法建立了地被菊花品种‘玉人面’间接体细胞胚发生途径的转基因受体体系。试验以地被菊花品种‘玉人面’茎段(节间)为外植体, 研究了生长调节剂、光照强度等因子对其间接体细胞胚诱导和分化的影响, 同时进行了抗生素敏感性试验。结果表明: 胚性愈伤组织诱导培养基为 MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2, 4-D 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>, 诱导 15 d 后, 将获得的黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织转入胚性愈伤组织分化培养基 MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2, 4-D 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 中, 诱导 15 d 后再转入 MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 的分化培养基中培养 20 d, 光照强度为 1 000 ~ 2 000 lx, 胚性愈伤组织诱导率、分化率分别为 95.3%、92.7%, 平均每个外植体分化的芽数为 17.8 个, 获得的再生芽的稳定性为 99.5%。抗生素敏感性试验表明: 地被菊花品种‘玉人面’间接体细胞胚发生途径的转基因受体体系中, 卡那霉素选择压为 20 mg · L<sup>-1</sup>; 头孢霉素在胚性愈伤组织诱导时的选择压为 300 mg · L<sup>-1</sup>, 在胚性愈伤组织分化培养时选择压为 100 mg · L<sup>-1</sup>。

**关键词:** 地被菊; 间接体细胞胚发生; 受体体系; 抗生素

中图分类号: S682.1

文献标识码: A

## Studies on Transgenic Acceptor System of Ground-Cover Chrysanthemum Via Indirect Somatic Embryogenesis

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

(1. Department of Landscape Horticulture, National Floriculture Engineering Research Center, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. College of Medicine and Life Science, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

**Abstract:** In this paper transgenic acceptor systems of chrysanthemum cv ‘Yurenmian’ via indirect somatic embryogenesis were established by three steps cultivation. The authors studied the effects of hormones, illumination intensity on indirect somatic embryogenesis through stem segments (internodal segments) as explants. Results showed that embryogenic calli induction medium was MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2, 4-D 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>, 15 days later, yellow greenish, compact nodular calli were transferred embryogenic calli differentiation medium MS plus KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup>, 2, 4-D 1.0 mg · L<sup>-1</sup> and NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> for 15 days, and were transferred differentiation medium MS plus KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> and NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> for 20 days. Illumination intensity was 1 000 ~ 2 000 lx. The highest rate of embryogenic calli reached 95.3%, the highest rate of embryogenic calli differentiation reached 92.7%, average number of shoots per stem segment explant was 17.8, and stability of regeneration shoots reached 99.5%. Experiments of the sensitivity of antibiotics

收稿日期: 2007-01-31

基金项目: 中国博士后科学基金(20060390404)、北京市自然科学基金(6072019)、国家转基因植物研究与产业化专项(JY03-B-28)、武汉市科技攻关项目

作者简介: 蒋细旺(1964—),男,博士后,副教授,主要研究方向:园林植物遗传育种及生物技术。电话:13241438238; Email:xiwangjiang@163.com

\*通讯作者:张启翔(1956—),男,教授,博士生导师,主要研究方向:园林植物与观赏园艺。电话:62338305; Email:zqx@bjfu.edu.cn

for transgenic acceptor systems of chrysanthemum cv ' Yurenmian ' via indirect somatic embryogenesis showed: the selection concentrations of kanamycin was  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the selection concentrations of cefotaxime was  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  while embryogenic calli were induced and  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  while embryogenic calli differentiation

**Key words:** Ground-Cover Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*); indirect somatic embryogenesis; acceptor system; antibiotics

菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) 是人们喜爱的传统名花之一, 约占全世界花卉消费总量的 23%<sup>[1]</sup>; 它既可作盆栽花卉 (盆菊)、切花花卉 (切菊), 也是城市园林绿化的地被花卉 (地被菊), 还是重要的保健饮用花卉 (茶用菊)。地被菊是北京林业大学中国工程院院士陈俊愉教授研究 40 余年获得的植株低矮、花叶繁盛、适应性强的品种群<sup>[2]</sup>, 目前在我国已进行了大面积的繁殖、推广和应用<sup>[3, 4]</sup>。

植物体细胞胚发生 (somatic embryogenesis) 在植物组织培养中是一种非常普遍的现象<sup>[5]</sup>, 早在 1980 年, Sharp 等<sup>[6]</sup>就把体胚发生方式概括为 2 种: 一是从外植体上直接发生, 不经过愈伤组织, 即直接体细胞胚发生; 二是经过愈伤组织阶段再分化为体胚, 即间接体细胞胚发生。许多研究表明, 植物体细胞胚的形成多通过间接途径产生, 在愈伤组织中某些体细胞可转化为胚性细胞, 胚性细胞继续分裂形成多细胞原胚以及不同发育时期的体细胞胚, 从而获得数量更多、再生率更高的体细胞胚和再生植株<sup>[7, 8]</sup>。

体胚除了通过直接或间接方式诱导成苗和作为分子生物学研究的材料以外<sup>[9, 10]</sup>, 胚状体发育及其植株再生系统也是最理想的基因转化受体系统。体细胞胚是由类似合子胚特性的胚性细胞发育而来, 这些胚性细胞具有很强的接受外源 DNA 的能力, 是理想的基因转化感受态细胞; 而且胚性细胞繁殖量大, 同步性好, 转化后的胚性细胞可顺利发育成胚状体及完整的转基因植株。大量研究表明, 体胚发生多是单细胞起源, 转化获得的转基因植株嵌合体少<sup>[9, 10]</sup>, 因此, 植物体细胞胚发生可作为理想的遗传转化受体体系<sup>[7, 11]</sup>。

菊花体细胞胚发生的最早报道是 1991 年 May 等<sup>[12]</sup>利用菊花品种 ' Iridon ' 叶片, 在附加  $2, 4\text{-D } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $6\text{-BA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、9% ~ 18% 蔗糖的改良 MS 基本培养基上, 经过暗、光、暗的交替培养, 获得了直接体细胞胚发生植株; 并发现菊花体细胞胚的产生起源于单细胞, 获得的再生植株在表型上未产生变异; 同时也发现菊花体细胞胚发生有较强基因型依赖性, 在 23 个品种中有 12 个产生了体细胞

胚, 但只有 5 个品种获得了再生植株。Pavingerova 等<sup>[13]</sup>也从叶片中获得了单细胞起源的体细胞胚 (品种为 ' White Snowdon '), Shinoyama 等<sup>[9]</sup>建立了对基因型无依赖性的简洁而高效的菊花叶片体细胞胚发生的方法 (品种为 ' Shuho-no-chikara '), Tanaka 等<sup>[14]</sup>和 Mandal 等<sup>[10]</sup>均从菊花的管状花中诱导出体细胞胚, 洪波等<sup>[7]</sup>利用地被菊花品种 ' Fall Color ' 幼嫩叶片为外植体, 诱导出 96% 的胚性愈伤组织, 最终 93% 的供试外植体通过间接胚状体途径获得了芽的再生, 但关于再生芽的稳定性未作研究。

近年来, 本实验室通过器官发生途径筛选出地被菊花品种 ' 玉人面 ' 是再生率较高的品种之一<sup>[15]</sup>, 同时通过前期的转基因研究, 发现存在较强的基因型依赖性, 转化效率也较低<sup>[16]</sup>。因此, 希望建立高效的菊花体细胞胚发生再生体系和转基因受体体系, 从而克服菊花转基因较强的基因型依赖性, 提高转化效率。故本研究借鉴前人研究体胚发生成功的经验, 在前期建立了直接体细胞胚再生体系的基础上 (另文发表), 开展地被菊花体细胞胚间接发生诱导和调控技术的研究, 旨在建立稳定的地被菊花间接体细胞胚发生体系, 从而建立间接体细胞胚发生途径的转基因受体体系, 为下一步进行以体细胞胚为受体的转基因技术研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为地被菊花品种 ' 玉人面 ', 由北京林业大学陈俊愉院士提供; 以 MS 为基本培养基, 试验激素分别为  $2, 4\text{-D}$ 、 $6\text{-BA}$  (6-苄基腺嘌呤)、KT (激动素)、NAA (萘乙酸)、IAA (吲哚乙酸)、BA (吲哚丁酸), 单位均为  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.2 方法

1.2.1 茎段 (节间) 外植体的准备 将温室栽培的地被菊花品种 ' 玉人面 ' 的带腋芽茎段在自来水下冲洗干净后, 先用 70% 酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% 升汞消毒 3 min, 用无菌水冲洗 6 次, 升汞消毒重复 2 次, 接种到  $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

+NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上,5周后每外植体可增殖 4~6个无菌丛生芽,其间和其后用同样培养基继代。从增殖 20 d左右的幼苗上切取 3~5 mm的茎段(节间)为外植体,水平接种在培养基上。每培养皿 20~30个外植体,重复 3次。培养温度为  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ,日光灯光源,光照  $(2000 \text{ lx}) 12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$  [3]。

### 1.2.2 茎段外植体间接体细胞胚发生与分化

1.2.2.1 6-BA和 2,4-D以及 KT和 2,4-D对茎段胚性愈伤组织的诱导 以 MS为基本培养基,分别附加不同浓度的 2,4-D、KT和 6-BA组成胚性愈伤组织诱导培养基。2,4-D浓度分别为 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,KT和 6-BA浓度分别为 0.0、0.1、0.5、1.0、2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对茎段外植体进行诱导培养 15 d后,统计胚性愈伤组织的诱导率。

1.2.2.2 KT、2,4-D与 NAA或 IAA或 BA对茎段胚性愈伤组织的诱导 选择 MS+KT 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基分别附加浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA、IAA、BA,经 15 d的培养,研究三激素对茎段胚性愈伤组织诱导的影响,以适应转基因操作中,虽然去除了 2,4-D而仍需生长素存在的要求。

1.2.2.3 不同培养方式对茎段胚性愈伤组织分化的影响 外植体在 MS+KT 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上经 15 d的诱导培养,获得黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织,将该胚性愈伤组织按三种方式进行分化培养,分别是:一步培养法,即继续在该培养基上培养 35 d;二步培养法,即胚性愈伤组织转入去除 2,4-D的 MS+KT 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中培养 35 d;三步培养法,即胚性愈伤组织转入分化培养基 MS+KT 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中,诱导 15 d后再转入 MS+KT 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分化培养基中培养 20 d。分别计算胚性愈伤组织的分化率和平均每外植体分化的再生芽数,比较不同培养方式对茎段胚性愈伤组织分化、再生的影响,确定适宜的分化培养方式。

1.2.2.4 不同光照强度对茎段外植体间接体细胞胚发生与分化的影响 在光照强度分别为 0、500、1000、2000、3000、4000 lx时,利用三步培养法,比较不同光照强度对‘玉人面’间接体细胞胚发生与分化的影响。

1.2.3 间接体细胞胚再生植株的获得、移植及稳定性研究 当外植体培养 50 d后获得不定芽达 1~2 cm长时移至  $1/2\text{MS}+\text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生根培养

基中 [3],诱导生根后得到再生苗。将再生苗驯化后移植到直径 5~8 cm的小盆中,盆中培养基质为混合均匀的河砂 草炭土 珍珠岩 =1 1 1(体积比),进行正常的室外栽培,以扦插繁殖的‘玉人面’幼苗为对照,按常规栽培管理,6个月后比较株高、冠幅、叶片长度、花期、开花直径等的差异,研究再生植株的稳定性。

1.2.4 抗生素敏感性试验 根据体细胞胚诱导的结果,利用筛选出的适宜的诱导、分化培养基附加抗生素如卡那霉素、头孢霉素进行敏感性试验。将在生根培养基中生长 3周的幼苗的茎段外植体置于附加不同质量浓度卡那霉素 (0.5、10、15、20、40、80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、头孢霉素 (0、100、200、300、400、500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的培养基上。培养条件同 1.2.1节,50 d后观察并统计不同浓度的卡那霉素、头孢霉素对‘玉人面’间接体细胞胚诱导、发生的影响,确定抗生素的选择压。

## 2 结果与分析

### 2.1 地被菊花品种‘玉人面’间接体细胞发生的诱导和分化

2.1.1 KT和 2,4-D对茎段胚性愈伤组织诱导的影响 在分别附加不同浓度的 6-BA和 2,4-D的 MS培养基中培养 15 d后观察,胚性愈伤组织诱导率较低,最大仅为 12.6%,出现在 6-BA 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的组合中,其余的或只诱导出非胚性愈伤组织,或诱导出白色不定根,甚至部分外植体褐化,故‘玉人面’的茎段胚性愈伤组织诱导在 6-BA+2,4-D的组合中不予考虑(数据未显示)。从表 1可看出:在 KT+2,4-D的组合中,无 2,4-D、KT的第 1号培养基,无胚性愈伤组织产生;当仅有 2,4-D,而无 KT时,即在第 2、7、12、17号培养基中,会通过器官发生途径诱导大量白色毛状根形成,不会产生胚性愈伤组织;当 2,4-D与 KT比值较大,即在第 3、8、13、18、19培养基中,在切口处有极少量的黄绿色胚性愈伤组织产生,但被切口处产生的较多白色毛状根所覆盖;在第 4、5、6号培养基中,可形成绿色疏松水渍状胚性愈伤组织;在第 9、14、15、20、21号培养基中,形成黄白色松软胚性愈伤组织;在第 10、11、16号培养基中,形成黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织。结合胚性愈伤组织诱导率,发现地被菊花品种‘玉人面’茎段胚性愈伤组织诱导较适宜的培养基是 MS+KT 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,其胚性愈伤组织的诱导率为 84.6%。在该诱导培

培养基中,培养 5~7 d 后,茎段外植体两侧开始膨大呈哑铃形,形成浅黄绿色、较硬愈伤组织,15 d 后在体视显微镜下观察哑铃状愈伤组织形成颗粒状的胚性愈伤组织。另外,将绿色疏松水渍状胚性愈伤组

织、黄白色松软胚性愈伤组织、黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织进行比较,前 2 种细胞分裂快,生长量大,后期分化成体胚的比例低,故黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织是较好的胚性愈伤组织。

表 1 2,4-D 和 KT 对茎段胚性愈伤组织诱导的影响

培养基编号	2,4-D 浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	KT 浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	胚性愈伤组织诱导率 / %	愈伤组织颜色和特征
1 (CK)	0.0	0.0	0.0 ± 0.0	绿色,非胚性愈伤组织
2	0.5	0.0	0.0 ± 0.0	绿色,非胚性愈伤组织
3	0.5	0.1	3.1 ± 0.2	极少量黄绿色胚性愈伤组织,产生较多的白色毛状根
4	0.5	0.5	28.4 ± 2.3	绿色疏松水渍状胚性愈伤组织
5	0.5	1.0	44.7 ± 1.1 b	绿色疏松水渍状胚性愈伤组织
6	0.5	2.0	32.2 ± 3.5	绿色疏松水渍状胚性愈伤组织
7	1.0	0.0	0.0 ± 0.0	绿色,非胚性愈伤组织
8	1.0	0.1	6.2 ± 0.5	极少量黄绿色胚性愈伤组织,产生较多的白色毛状根
9	1.0	0.5	52.7 ± 5.3	黄白色松软胚性愈伤组织,形成少量白色毛状根
10	1.0	1.0	66.4 ± 6.2	黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织
11	1.0	2.0	69.5 ± 6.9	黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织
12	2.0	0.0	0.0 ± 0.0	绿色,非胚性愈伤组织
13	2.0	0.1	4.8 ± 0.4	极少量黄绿色胚性愈伤组织,产生较多的白色毛状根
14	2.0	0.5	31.3 ± 3.1	黄白色松软胚性愈伤组织,形成少量白色毛状根
15	2.0	1.0	51.6 ± 4.2	黄白色松软胚性愈伤组织
16	2.0	2.0	84.6 ± 7.7	黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织
17	4.0	0.0	0.0 ± 0.0	绿色,非胚性愈伤组织
18	4.0	0.1	3.3 ± 0.2	极少量黄绿色胚性愈伤组织,产生较多的白色毛状根
19	4.0	0.5	4.6 ± 0.4	极少量黄绿色胚性愈伤组织,产生较多的白色毛状根
20	4.0	1.0	24.6 ± 1.4	黄白色松软胚性愈伤组织
21	4.0	2.0	26.3 ± 2.6	黄白色松软胚性愈伤组织

2.1.2 MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 培养基中分别附加不同浓度的 NAA、IAA、BA 对茎段胚性愈伤组织诱导的影响 在 MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 的培养基中,分别附加不同浓度的 NAA、IAA、BA,培养 15 d 后发现 IAA、BA 诱导胚性愈伤组织的能力均低于 40% (数据未显示),因此不予考虑。对于 NAA,当浓度为 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 时,胚性愈伤组织诱导率最大 (表 2),达 95.3%,且产生的是黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织。可见,MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 是地被菊花品种‘玉人面’茎段胚性愈伤组织诱导的适宜培养基。

表 2 MS 培养基中 2,4-D、KT、NAA 对茎段胚性愈伤组织诱导的影响

代号	MS 培养基激素组成	胚性愈伤组织诱导率 / %
1	KT 2.0 + 2,4-D 2.0	84.6 ± 7.7 b
2	KT 2.0 + 2,4-D 2.0 + NAA 0.1	79.4 ± 6.4 b
3	KT 2.0 + 2,4-D 2.0 + NAA 0.5	95.3 ± 8.5 a
4	KT 2.0 + 2,4-D 2.0 + NAA 1.0	83.1 ± 6.2 b
5	KT 2.0 + 2,4-D 2.0 + NAA 2.0	49.8 ± 3.9 c
6	KT 2.0 + 2,4-D 2.0 + NAA 4.0	47.1 ± 2.9 c

注:表中数据为平均值 ± 标准误;同一栏中不同英文字母表示数据间差异显著 (P = 0.01)。各种激素的单位均为 mg · L<sup>-1</sup>

2.1.3 不同培养方式对菊花胚性愈伤组织分化的影响 从表 3 可看出:由 MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 培养基诱导的胚性愈伤组织,按三步培养法进行分化培养较好,这是因为胚性愈伤组织在 2,4-D 浓度减半的分化培养基中培养 15 d 后,诱导了体胚的形成,在体视显微镜下观察可清晰地分为球形胚、鱼雷形胚、心形胚、子叶胚,1 个茎段外植体诱导的体胚数最高的为 24 个 (数据未显示)。诱导出体胚的外植体转入无 2,4-D 的分化培养基 MS + KT 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 中培养 20 d 后,能顺利地获得再生芽,从而进一步验证了“诱导脱分化后必须及时降低或去掉 2,4-D,胚性细胞才能正常发育”的观点<sup>[8]</sup>。

表 3 不同培养方式对胚性愈伤组织分化的影响

培养类型	胚性愈伤组织分化率 / %	平均每外植体分化的芽数 / 个	茎段诱导的最多体胚数 / 个
一步培养法	57.5 ± 5.1 c	9.6 ± 0.8 c	11.8 ± 0.9 c
二步培养法	87.5 ± 7.2 b	13.1 ± 1.6 b	17.5 ± 1.8 b
三步培养法	92.7 ± 8.1 a	17.8 ± 1.9 a	24.0 ± 2.1 a

注:表中数据为平均值 ± 标准误;同一栏中不同英文字母表示数据间差异显著 (P = 0.01)。

## 2.1.4 不同光照强度对间接体细胞胚发生的影响

从表 4 可看出:不同光照强度导致分化率和再生芽数的差异极显著。当进行暗培养时,没有胚性愈伤组织和再生芽产生,即不能完成间接体细胞胚的发生和分化;当光照强度为 500 lx 时,胚性愈伤组织

表 4 不同光照强度对‘玉人面’间接体细胞胚发生与分化的影响

光照强度 /lx	胚性愈伤组织分化率 /%	平均每外植体分化的芽数 /个
0	0.0 ±0.0 d	0.0 ±0.0 d
500	73.5 ±7.2 b	12.1 ±1.6 b
1 000	91.3 ±7.6 a	16.1 ±1.6 a
2 000	92.7 ±8.1 a	17.8 ±1.9 a
3 000	57.5 ±5.1 c	9.6 ±0.8 c
4 000	46.3 ±4.2 c	8.1 ±0.7 c

注:表中数据为平均值 ±标准误;同一栏中不同英文字母表示数据间差异显著 ( $P=0.01$ )。

能正常分化,分化率为 73.5%,平均每外植体分化的芽数为 12.1 个;当光照强度为 1 000 ~ 2 000 lx 时,胚性愈伤组织能正常分化,且分化率最高为 92.7%,平均每外植体分化的芽数最高达 17.8 个,从而使茎段外植体能通过间接体细胞胚发生途径再生和成苗;当光照强度超过 3 000 lx 时,茎段外植体易褐化,不能顺利完成间接体细胞胚的发生和分化。

## 2.2 间接体细胞胚发生途径再生植株的稳定性

经过间接体细胞胚发生途径,共获得盆栽‘玉人面’826 株,其中有 4 株间接体细胞胚再生植株与对照(‘玉人面’扦插繁殖幼苗)相比,在株高、冠幅、叶片长度上存在显著差异,而在花期、开花直径上则无差异(表 5)。经过间接体细胞胚发生途径获得的‘玉人面’再生苗的稳定性为 99.5%。

表 5 间接体细胞胚发生获得的‘玉人面’再生植株的稳定性

类型	植株高度 /cm	冠幅 /cm	叶片长度 /cm	花期 /d	开花直径 /cm
对照	42.7 ±4.1 a	25.1 ±1.3 a	6.4 ±0.6 a	15.6 ±1.5 a	4.8 ±0.4 a
变异 1	47.5 ±4.2 b	29.8 ±1.3 b	8.5 ±0.6 b	16.4 ±1.3 a	4.6 ±0.3 a
变异 2	48.3 ±4.7 b	30.4 ±2.4 b	8.7 ±0.5 b	15.8 ±1.2 a	4.7 ±0.4 a
变异 3	47.8 ±3.6 b	29.6 ±1.2 b	8.9 ±0.7 b	15.7 ±1.1 a	4.9 ±0.5 a
变异 4	49.6 ±4.8 b	29.9 ±2.6 b	9.1 ±0.8 b	16.1 ±1.1 a	4.8 ±0.3 a

注:表中数据为平均值 ±标准误;同一栏中不同英文字母表示数据间差异显著 ( $P=0.05$ )。

## 2.3 抗生素敏感性测定

2.3.1 卡那霉素选择压的确定 由表 6 可看出:‘玉人面’间接体细胞胚发生对卡那霉素比较敏感,胚性愈伤组织的分化率在不同浓度的卡那霉素间存在极显著差异。卡那霉素浓度在  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对胚性愈伤组织的发生和分化有明显的影响,而在  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,则表现出显著的抑制作用,故以该浓度作为菊花间接体细胞胚发生途径的转基因受体体系的卡那霉素选择压力;同时观察到,以生根培养基中

生长 3 周的幼苗茎段为外植体的不同发育阶段影响到卡那霉素选择压的确定。

2.3.2 头孢霉素敏感性测定 由表 6 可看出:不同浓度的头孢霉素对胚性愈伤组织的诱导和分化有不同程度的影响。头孢霉素浓度在  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,即可达到较好的抑菌效果,虽能抑制农杆菌的生长,但又影响外植体的正常分化和生长,故在胚性愈伤组织分化培养时,头孢霉素的选择压降低为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 6 卡那霉素、头孢霉素对‘玉人面’间接体细胞胚发生的影响

卡那霉素			头孢霉素		
浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	胚性愈伤组织 分化率 /%	外植体生长情况	浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	体胚发 生率 /%	外植体生长情况
0(CK)	92.7 ±8.1 a	生长正常	0(CK)	92.7 ±8.1 a	生长正常
5	71.8 ±6.2 b	胚性愈伤组织生长受影响,呈黄褐色	100	86.8 ±6.8 b	滋生农杆菌几乎覆盖外植体,短期无影响
10	63.1 ±5.7 b	胚性愈伤组织生长受影响,部分外植体褐化	200	53.6 ±4.2 b	少数农杆菌滋生
15	33.6 ±2.7 c	生长停滞,表面湿润,呈褐色	300	15.3 ±0.9 c	无农杆菌滋生
20	13.8 ±1.6 d	绝大部分呈褐色、水渍状	400	7.5 ±0.5 d	无农杆菌滋生,但体胚发生率严重下降
40	5.8 ±0.8 e	褐色、水渍状,几乎全部褐色死亡	500	5.1 ±0.3 d	外植体褐化严重,难分化成苗
80	4.6 ±0.7 e	不生长,几乎全部褐色死亡			

注:表中数据为平均值 ±标准误;同列中不同英文字母表示数据间差异显著 ( $P=0.01$ )。

### 3 结论

以地被菊花品种‘玉人面’茎段为外植体,接种到胚性愈伤组织诱导培养基  $MS + KT 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4\text{-D } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  中诱导 15 d,获得黄绿色致密颗粒状胚性愈伤组织后转入分化培养基  $MS + KT 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4\text{-D } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  中,诱导 15 d 后再转入  $MS + KT 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的分化培养基中培养 20 d,即三步培养法,在光照强度为  $1\ 000 \sim 2\ 000 \text{ lx}$  时,成功地实现了间接体细胞胚的发生与植株再生,胚性愈伤组织诱导率为 95.3%,分化率为 92.7%,平均每外植体分化的芽数为 17.8 个,获得的再生芽的稳定性为 99.5%。抗生素敏感性测定表明,在地被菊花品种‘玉人面’间接体细胞胚发生途径的转基因受体体系中,卡那霉素选择压为  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;头孢霉素在胚性愈伤组织诱导时的选择压为  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,在胚性愈伤组织分化培养时的选择压为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 参考文献:

- [1] 陈俊愉. 菊花 [A]. 见: 园林植物品种分类学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 219 ~ 233
- [2] Chen J Y, Wang S Q, Wang X V, *et al* Thirty years studies on breeding ground-cover chrysanthemum new cultivars [J]. *Acta Hort*, 1995, 404: 124 ~ 135
- [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] 蒋细旺, 张萍. 武汉市地被菊花的引种试验综合评价 [J]. *山地农业生物学报*, 2005, 24 (2): 131 ~ 134
- [5] Jimenez V M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis [J]. *Plant Growth Regulation*, 2005, 47: 91 ~ 110
- [6] Shap W R, Sondahl M R, Caldas L S, *et al* The physiology of in vitro asexual embryogenesis [J]. *Hort Rev*, 1980, 2: 268 ~ 310
- [7] 洪波, 全征, 李邱华, 等. 地被菊花 Fall Color 体细胞胚途径再生、遗传转化及转基因植株的抗寒性检测 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39 (7): 1443 ~ 1450
- [8] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 13 ~ 62
- [9] Shinoyama H, Nomura Y, Tsuchiya T, *et al* A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) [J]. *Plant Biotechnology*, 2004, 21 (1): 25 ~ 33
- [10] Mandal A K A, Datta S K Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from ray florets of chrysanthemum [J]. *Biologia Plantarum*, 2005, 49 (1): 29 ~ 33
- [11] Blanc G, Baptiste C, Oliver G, *et al* Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Mull Arg plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 24: 724 ~ 733
- [12] May R A, Trigiano R N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora* [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1991, 116 (2): 366 ~ 371
- [13] Pavingerova D, Dostal J, Biskova R, *et al* Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum [J]. *Plant Science*, 1994, 97: 95 ~ 101
- [14] Tanaka K, Kanno Y, Kudo S, *et al* Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 946 ~ 953
- [15] 吕晋慧. 根癌农杆菌介导的 AP1 基因转化菊花的研究 [D]. 北京: 北京林业大学图书馆, 2005
- [16] 蒋细旺, 包满珠, 吴家和, 等. 农杆菌介导 *CryIAc* 基因转化菊花 [J]. *园艺学报*, 2005, 32 (1): 65 ~ 69