

谢 菲,陈茹阳,赵惠恩. 蒙菊(*Chrysanthemum mongolicum*)再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):76-78.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.022

# 蒙菊(*Chrysanthemum mongolicum*)再生体系的建立

谢 菲,陈茹阳,赵惠恩

(北京林业大学园林学院/国家花卉工程技术研究中心/花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室,北京 100083)

**摘要:**以蒙菊的叶片为试验材料,对蒙菊(*Chrysanthemum mongolicum*)再生体系建立技术进行了初步探索。结果表明,蒙菊叶片愈伤诱导培养以 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.3 mg/L 为最适培养基,出愈率 87.50%;愈伤组织分化培养以 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为最适培养基,分化率为 67.50%;生根培养以 1/2MS+NAA 0.3 mg/L+蔗糖 15 g/L 为最适培养基,生根率为 92.50%,平均根数 5.33 条,移栽成活率 77.50%。

**关键词:**蒙菊;组织培养;再生体系;叶片;培养基

**中图分类号:**S682.1<sup>+</sup>10.4<sup>+</sup>3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0076-02

蒙菊(*Chrysanthemum mongolicum*)是菊科春黄菊族菊属多年生草本植物。蒙菊从我国内蒙古地区分布至北极地区,耐寒性显著,冬季能耐-40℃的低温。蒙菊生于贫瘠的石质山坡和亚高山地带,海拔1500~2500 m<sup>[1]</sup>,耐旱性较好,可以应用于屋顶绿化、荒坡绿化、岩石园绿化等方面。但蒙菊在我国分布区狭小,较难采集,引种后越冬困难,不易成活。通过建立蒙菊的再生体系可实现大规模扩繁,保存种质资源,提高引种成功率。蒙菊的再生体系研究至今未见报道,因此,系统深入研究其再生能力及获得再生植株,建立专门针对蒙菊的高效稳定的再生体系,可为菊花耐寒基因工程和转基因育种工作提供理论基础和试验依据,将有效推进高等植物抗性生物技术育种进程。本试验研究目的在于探究蒙菊在组织培养过程中各因素的作用及相互影响,建立出蒙菊的再生体系,为蒙菊的分子生物学研究、细胞学特性和基因工程中遗传受体系统的建立奠定理论基础,同时有利于实现蒙菊组培苗大规模的工厂化生产。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验所用外植体为蒙菊组培无菌苗的叶片。

### 1.2 方法

**1.2.1 愈伤组织的诱导** 从生长健壮的蒙菊组培苗上剪取 0.5 cm<sup>2</sup> 的叶片(图 1-A),将叶片接入 MS 培养基中,植物生长调节剂选用 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L),2,4-D(0.1、0.2、0.3 mg/L),NAA 浓度为 0.01 mg/L<sup>[2]</sup>,采用 2 因素 3 水平完全随机试验设计<sup>[3]</sup>,每个处理重复 3 次。30 d 后观察愈伤组织形态(图 1-B),统计叶片的出愈率:出愈率=发生愈伤组织的外植体数/接种外植体总数×100%。

**1.2.2 愈伤组织分化培养** 将增殖后的愈伤组织接入分化培养基中,诱导其分化出芽点,形成幼小植株(图 1-C)。试验采用 2 因素 3 水平的完全试验设计,植物生长调节剂选用 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L),NAA(0.05、0.10、0.20 mg/L)。每个处理接种 20 个 0.5 cm<sup>3</sup> 的愈伤组织,重复 3 次。在 30 d 后统计分化率,分化率=已分化的愈伤组织/接种愈伤组织总数×100%。

**1.2.3 壮苗** 由于长期生长在含有植物激素的培养条件下,继代培养所得到的部分芽苗形态细弱,营养不足,为了提高组培苗的生根率,需要将这些组培苗进行壮苗培养(图 1-D)。将不足 3 cm 的芽苗移入 MS 培养基,含蔗糖 35 g/L,培养 30 d 后转入生根培养。

**1.2.4 生根** 选择长约 3 cm 健壮的组培无根苗接入生根培养基中,含 15 g/L 蔗糖,6 g/L 琼脂,每个处理接入 20 个组培苗,重复 3 次。试验采用 2 因素 3 水平完全试验设计,培养基分别设为 MS、1/2MS、1/4MS, NAA 分别为 0.1、0.2、0.3 mg/L,分别在 20 d 后观察生根情况(图 1-E),统计生根率和平均根数。生根率=生根的芽苗数/接种芽苗总数×100%;平均根数=总的根数/生根的苗数。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 和 DPS(data processing system)软件进行数据统计、方差分析与多重比较,对百分率等数据进行方差分析时,先将数据进行反正弦转换。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶片愈伤组织的诱导试验

在蒙菊叶片的初代培养试验中,接种 1 周后,叶片开始卷曲,在切口边缘处产生团状愈伤组织,随着时间延长,愈伤组织的体积逐渐增大。从表 1 可以看出,A8 处理 MS+6-BA 2.00 mg/L+2,4-D 0.30 mg/L 显著优于其他处理,出愈率 87.50%,出愈时间较短,产生的愈伤组织为绿色,较致密,表面有小突起。A5 处理的出愈率仅次于 A8,但产生的愈伤组织颜色较浅,产愈量少。愈伤诱导率较低的是 A1 处理,出愈率 42.50%,产生的愈伤组织呈透明状,含水量较高,质地较疏松,在接下来的试验中几乎不能分化。

收稿日期:2014-12-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:30970207)。

作者简介:谢 菲(1990—),女,硕士研究生,主要从事花卉资源育种研究。E-mail: shelly02@gmail.com。

通信作者:赵惠恩,博士,副教授,主要从事花卉资源育种研究。E-mail: zhaohuien@bjfu.edu.cn。

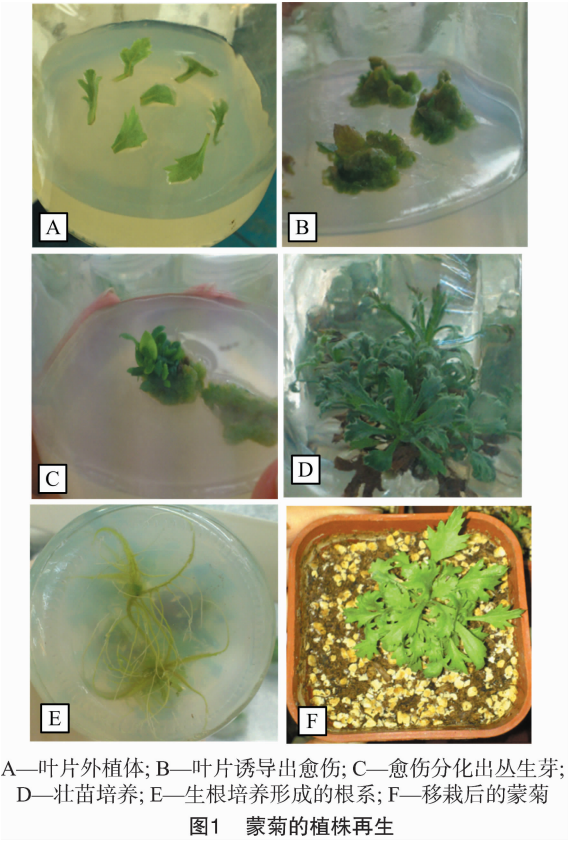


表 1 蒙菊叶片愈伤诱导培养试验结果

试验	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	出愈率 (%)	愈伤形态特征
A1	0.5	0.1	42.50e	浅绿,透明,组织松软,产愈伤少
A2	0.5	0.2	47.50de	浅绿,组织较软,突起不明显
A3	0.5	0.3	57.50d	深绿,致密,有突起,产愈伤少
A4	1.0	0.1	70.00b	浅绿,松软,产愈伤多
A5	1.0	0.2	82.50ab	黄绿,较致密,有突起
A6	1.0	0.3	52.50d	深绿,致密,产愈伤量大
A7	2.0	0.1	65.00cd	绿色,较致密,有突起
A8	2.0	0.2	87.50a	绿色,较致密,有突起,产愈伤多
A9	2.0	0.3	75.00c	深绿,致密,突起明显

2.2 愈伤组织分化试验

对蒙菊愈伤分化过程进行观察,发现愈伤组织上的突起会逐渐分化成很多绿色的不定芽。由表 2 可见,B8 处理 MS+6-BA 2.00 mg/L+NAA 0.10 mg/L 的分化效果最好,分化率为 67.50%,愈伤表面有丛生芽形成。分化效果最差的处理为 B6,分化率仅为 15.00%,愈伤组织褐化严重。由此可见,褐化现象的防治对愈伤的增殖和分化有着积极的促进作用。

2.3 生根培养

无根苗转入生根培养基中 1 周左右,多数处理中的蒙菊幼苗开始生根,根系呈辐射状,有白色、浅绿色、褐色几种不同类型。从表 3 可以看出,C6 处理 1/2MS+NAA 0.30 mg/L 显著优于其他处理,生根率为 92.50%,平均根数 5.33 条,根系健壮,白色,生长速度较快。生根情况较差的为 C1 处理,生根率为 32.5%,根系细弱,呈浅绿色,部分根尖变褐,可能是由于培养基中大量元素浓度较高,对根系发育产生抑制作用。

表 2 蒙菊愈伤组织分化培养的试验结果

试验	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	分化率 (%)	愈伤组织分化形态特征
B1	0.5	0.05	40.00d	部分褐化,愈伤绿色,有芽点
B2	0.5	0.1	35.00de	部分褐化,愈伤浅绿色,有芽点
B3	0.5	0.2	22.50e	褐化较多,有分化出根的现象
B4	1.0	0.05	27.50e	部分褐化,分化出芽
B5	1.0	0.1	52.50b	愈伤绿色,分化速度较快
B6	1.0	0.2	15.00g	褐化现象严重,分化较少
B7	2.0	0.05	47.50c	分化出的芽较多,愈伤深绿色
B8	2.0	0.1	67.50a	分化出的芽多,分化速度快
B9	2.0	0.2	57.50b	愈伤组织芽点较多,褐化少

表 3 蒙菊生根试验结果

试验	培养基	NAA (mg/L)	生根率 (%)	单苗根数 (条)
C1	MS	0.1	32.50f	4.48d
C2	MS	0.2	72.50c	4.18e
C3	MS	0.3	62.50d	5.85b
C4	1/2MS	0.1	65.00cd	4.90c
C5	1/2MS	0.2	85.00b	7.15 a
C6	1/2MS	0.3	92.50a	5.33bc
C7	1/4MS	0.1	77.50bc	5.68b
C8	1/4MS	0.2	47.50ef	5.08c
C9	1/4MS	0.3	52.50e	4.68d

在生根培养中观察到,当 NAA 浓度过高时,根部愈伤组织较多,形成的根短粗;当 NAA 浓度较高时,根部愈伤组织不多,形成的根辐射状,粗细适中,根毛较多;当 NAA 浓度较低时,愈伤组织较少,形成的根细长,数量较多,根毛较少。

2.4 炼苗与移栽

首先选择较为健壮、高 7 cm 左右、根长 1~3 cm 的组培苗进行驯化。在出瓶之前,将培养容器置于较强光下,打开瓶盖增加通气,同时在培养基上加入 1 层无菌水。在开口 3 d 后进行组培苗的出瓶移栽。先将试管苗在 40℃左右的温水中洗去黏附于组培苗根部的培养基,再放入 1% KMnO<sub>4</sub> 溶液中浸泡 5 min,冲洗干净,栽入经过高温灭菌的基质中,基质选用 1/2 珍珠岩+1/2 草炭。

将移栽后的苗置于人工气候箱 1 周,调节湿度保持在 70%以上、温度 20℃左右,待生长稳定后放到阳光下让其生长<sup>[4]</sup>。每次移栽 30 株苗,重复 3 次试验,30 d 后观察(图 1-F),统计移栽成活率为 87.50%。

在试验中发现形成新根的状态与炼苗的成活率有着密切的关系。当根健壮、根毛较多、整体呈白色、长度在 1~3 cm、直径 1 mm 左右时炼苗成活率最高。而根细长、根数较多、根毛很少、根末端呈褐色、长度大于 3 cm 的植株炼苗成活较低。所以,选择根系最适的幼苗进行炼苗可以提高成活率。

3 讨论与结论

研究表明,使用不同种类、不同浓度和不同比例关系的植物生长调节剂,可以调节培养物的生长发育进程、分化的方向和器官发生。当细胞分裂素/生长素的比值高时,利于芽的分化;而细胞分裂素/生长素的比值低时,有利于根的形成;当二者比值适中时,则愈伤组织处于旺盛的生长状态,没有器官分化<sup>[5]</sup>。在蒙菊的愈伤分化培养中采用 MS+NAA 0.20 mg/L+

符亚茹,李少珂,姚卫杰,等. 西藏砂生槐 EST-SSR 引物开发及多态性检测[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):78-81.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.023

# 西藏砂生槐 EST-SSR 引物开发及多态性检测

符亚茹,李少珂,姚卫杰,李慧娥

(西藏大学农牧学院,西藏林芝 860000)

**摘要:**砂生槐为青藏高原特有灌木种,具有重要生态价值。开发多态 EST-SSR 引物对其居群遗传多样性研究及保护策略的制定具有重要意义。利用 SciRoKo v3.4 软件对前期获得的砂生槐转录组中 146 943 个转录本进行扫描共发现 9 428 个 SSR 位点。转录本中的微卫星种类十分丰富,其中以三核苷酸和五核苷酸重复最多,分别占 SSR 总位点数的 33.32% 和 21.70%,重复次数主要集中在 3~9 次重复。其中 (AG/CT)<sub>n</sub>、(GA/TC)<sub>n</sub>、(GAA/TTC)<sub>n</sub>、(AAAAT/ATTTT)<sub>n</sub> 重复基序最多,占总重复基序的 4.50%、4.34%、3.13% 和 2.44%。本研究中设计 130 对 EST-SSR 引物,有 80 对扩增出预期大小条带,经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,最终有 11 对具有较高多态性,且对于 30 个模板得到的位点平均等位基因数为 2.9;观测杂合度 (HO) 和期望杂合度 (HE) 平均值分别为 0.423 9 和 0.336 4。

**关键词:**砂生槐;转录本;EST-SSR;多态性;引物

**中图分类号:** S718.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0078-04

砂生槐 [*Sophora moorcroftiana* (Benth.) Benth. ex Baker] 为青藏高原特有豆科槐属矮灌木。主要分布在青藏高原海拔 2 800~4 400 m 的西藏“两江两河”(雅鲁藏布江、拉萨河、年楚河)河谷宽谷段的沙质地上,在雅鲁藏布江宽河谷形成大片群落<sup>[1]</sup>。该树种为青藏高原干旱河谷半固定沙地上的先锋灌丛植物<sup>[2]</sup>。由于其极强的抗旱、防风固沙特点,目前已成

为青藏高原人工造林先锋树种,具有重要的生态价值。但由于砂生槐分布区的过度放牧及薪炭过度樵采等人干扰,导致青藏高原独有的砂生槐种群严重退化,甚至一些种群正逐步消失,为此对砂生槐的保护迫在眉睫。

基于遗传学与分子生物学的植物遗传多样性研究为资源保护提供了新的理论指导。分子标记是遗传多样性研究的重要手段之一,常用 DNA 分子标记中简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR)<sup>[3]</sup> 又称微卫星 (microsatellite)<sup>[4]</sup>,因其具有共显性分离、重复性强、DNA 样本用量少、位点专一且多态性高等优点<sup>[5]</sup>,已广泛运用于植物遗传多样性分析中<sup>[6-9]</sup>。本实验室前期已经获取了砂生槐的转录组数据 (GenBank 登录号: SRP041237)<sup>[10]</sup>,这为成功开发砂生槐多态 EST-SSR 引物提供了前提,本研究则基于此转录组数据开发用于分析

收稿日期:2014-12-19

基金项目:国家自然科学基金 (编号:31260189);西藏特色农牧资源研发协同创新中心建设——高原生态。

作者简介:符亚茹 (1988—),女,陕西西安人,硕士研究生,主要从事高原植物分子生态研究。E-mail: fuyaruxw@126.com。

通信作者:李慧娥,博士,副教授,主要从事高原植物分子生物学研究。E-mail: lihuiesha@126.com。

6-BA 0.50 mg/L 处理的培养基有少数愈伤组织出现先分化出根的现象,可能是由于 6-BA/NAA 的比值较低,促使根器官先发生。

本次试验采用的植物生长调节剂有 6-BA、NAA、2,4-D 3 种。试验结果表明,在初代培养中,适当添加 6-BA、NAA、2,4-D 可以有效促进芽的萌动和愈伤组织的诱导。其中 2,4-D 对愈伤组织的诱导有着明显的促进作用,但用量过高会产生毒害作用,使形态畸变,诱导率降低。在继代培养中 6-BA 对不定芽的增殖有较好的促进效果,但在试验观察中发现高浓度的 6-BA 培养基中长期培养会出现较多玻璃化现象。在生根培养中,NAA 的运用有利于植株根系萌动,当 NAA 浓度较高时,形成的根粗壮,根毛较多;当 NAA 浓度较低时,形成的根细长,数量较多、根毛较少。

在本试验中,出现了叶片诱导时出愈率较高,但愈伤组织增殖系数不高、分化较少的现象,即使愈伤组织能分化出少量芽,也会因培养时间过长无营养而生长缓慢甚至死掉。分析原因,一方面可能是初代培养使用的激素浓度不当,虽然出愈率较高,但所诱导的愈伤组织大多数是比较致密的愈伤组织,

很少有粗颗粒状突起,难以增殖分化成芽;另一方面可能是由于植物本身的生理状态和遗传特性等因素造成的愈伤组织生长情况不佳<sup>[6]</sup>;此外,光照、温度等培养条件不适宜都可能是造成愈伤组织难分化成芽及分化的芽不易成活的因素。具体的愈伤组织分化成苗较难的原因还有待于进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] 马毓泉. 内蒙古植物志 [M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社, 1989:568-571.
- [2] 刘占磊,黄丛林,张秀海,等. 甘菊遗传转化再生体系的建立 [J]. 安徽农业科学,2009,37(14):6328-6329,6334.
- [3] 续九如,黄智慧. 林业试验设计 [M]. 北京:中国林业出版社, 1995:8-9.
- [4] 陈鹏彦. 朝鲜野菊再生系统建立的研究 [D]. 大连:辽宁师范大学,2010:24-25.
- [5] 李永文,刘新波,黄海帆,等. 植物组织培养技术 [M]. 北京:北京大学出版社,2007:45-47.
- [6] 崔丽华. 植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用 [J]. 辽宁师专学报:自然科学版,2000(2):97-99.