

矮牵牛细胞的长期离体培养及再生植株的 ISSR 分析

宁国贵, 白三平, 包满珠, 黄文俊

(华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 【目的】实现矮牵牛细胞的长期离体培养和再生, 不但可以获得矮牵牛体细胞突变体, 从中选出优良株系, 而且可以为研究外源基因在矮牵牛细胞增殖与分化过程中的稳定性提供技术体系。【方法】以重瓣矮牵牛叶片为外植体, 使用不同浓度 BA 与 NAA 的组合在黑暗条件下诱导愈伤组织。在不同光条件下, 将愈伤组织在 MS+ BA 2.0 mg · L⁻¹+0.5 mg · L⁻¹ NAA+200 mg · L⁻¹ CH 与 MS+ BA 0.5 mg · L⁻¹+0.5 mg · L⁻¹ NAA+200 mg · L⁻¹ CH 两种培养基进行愈伤组织 3 年多的继代培养, 并利用筛选的 8 个引物对 20 个再生植株的总 DNA 进行 ISSR 分析。【结果】不同的生长素与分裂素配比诱导的愈伤组织状态明显不同, 继代后的愈伤组织在低激素培养基上分化出不定芽, 再生芽复壮后可得到正常植株。对再生植株的总 DNA 进行 ISSR 分析发现, 再生植株之间存在很大的遗传变异。【结论】矮牵牛愈伤组织在高 BA 浓度培养基上可长期继代保存; 在低激素培养基上可实现植株再生。长期离体培养矮牵牛是获得其突变体的有效方法。

关键词: 矮牵牛; 愈伤组织; 长期频繁继代; 植株再生; ISSR 分析

Long-Term *in vitro* Culture of *Petunia hybrida* Callus and ISSR Analysis of the Regenerated Plants

NING Guo-gui, BAI San-ping, BAO Man-zhu, HUANG Wen-jun

(College of Horticulture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: 【Objective】A Long-term *in vitro* culture plant regeneration system of *Petunia hybrida* is useful not only in obtaining somatic variants and thereafter to select superior lines, but also in analyzing the stability of foreign gene in the cells during long-term culture and plant regeneration. 【Method】Different callus were obtained by culturing the leave explants of one double flower *Petunia* plant on the media supplemented with different combinations of auxin and cytokinnins. Calli were sub-cultured on the media of MS+ BA 2.0 mg · L⁻¹+0.5 mg · L⁻¹ NAA+200 mg · L⁻¹ CH and MS+ BA 0.5 mg · L⁻¹+0.5 mg · L⁻¹ NAA+200 mg · L⁻¹ CH for more than three years under different light condition. The total DNA of 20 regenerated plants was analyzed by ISSR utilizing eight primers. 【Result】Plants were successfully regenerated from long-term cultured callus when transferred onto shoot induction media supplemented with low concentration of PGR. After continuous culture on the media for at least three times, all adventitious shoots developed into complete plants of normal morphological characteristics. ISSR analysis showed that there was dramatic genetic variation among somatic variants. 【Conclusion】After long-term subculture of the callus of *Petunia hybrida* in higher concentration BA media, plant regeneration could be successfully implemented when they were transferred onto shoot induction media supplemented with low concentration of PGR. The culture system presented here is effective in obtaining somatic variants for *Petunia hybrida*.

Key words: *Petunia hybrida*; Callus; long-term frequent subculture; Plant regeneration; ISSR analysis

收稿日期: 2006-04-20; 接受日期: 2006-06-15

基金项目: 农业部“948”项目资助(2003-z36)

作者简介: 宁国贵(1978-), 男, 广西陆川人, 博士, 研究方向为园林植物细胞与分子生物学。Tel: 027-87280285; E-mail: nobleman@webmail.hzau.edu.cn.
通讯作者包满珠(1963-), 男, 甘肃漳县人, 博士, 研究方向为园林植物遗传育种与生物技术。Tel: 027-87282435; Fax: 027-87282010; E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn

0 引言

【研究意义】植物组织培养过程中长期继代培养往往伴随着培养物再生能力的丧失和再生植株变异的发生^[1]。连续继代培养的愈伤组织或细胞系的成功再生, 不仅为研究植物产生各种变异的成因、离体培养的演变、嵌合体分离及植株产生途径的外界受控因子等提供材料与方法, 而且可以获得突变体、并利用突变体对植物的各形态形成和重要农艺性状进行遗传分析^[2~4]。通过对矮牵牛愈伤组织或细胞系的长时间连续频繁继代培养, 并且高效率的获得再生植株, 不仅可以研究矮牵牛在组织培养过程中的遗传稳定性, 而且可以为矮牵牛的细胞诱变育种奠定基础。【前人研究进展】矮牵牛是重要的模式植物之一, 其组织培养和遗传转化主要是通过外植体的器官直接发生途径来再生植株^[5~10], 通过愈伤组织的途径, 很难诱导芽的形成^[5]。根据 Yesodi 等报道^[11], 矮牵牛愈伤组织及细胞的长期继代, 植株的再生与基因型密切相关, 但未能从 *R13-138* 的细胞系中得到再生植株; 另外在一些可再生的基因型上, 其再生植株会引起细胞质体 DNA 序列的变化。近年来, 在植物细胞工程上, 国内外出现利用分子生物技术检测再生植株的遗传稳定性的报道^[12~15], 但其大多数是基于 RAPD 的基础上的研究。【本研究切入点】采用高分裂素长期频繁继代愈伤组织并诱导植株再生; 利用 ISSR 分析长期继代培养的矮牵牛细胞的再生植株遗传变异, 国内外尚未见报道。【拟解决的关键问题】建立矮牵牛细胞的长期离体培养及植株再生体系, 为分析矮牵牛离体培养的遗传稳定性, 研究外源基因在矮牵牛细胞增殖与分化过程中的稳定性及矮牵牛体细胞突变育种提供有效的技术体系。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

2002 年 4 月至 5 月, 从露地盆栽、分枝多、长势好的重瓣矮牵牛植株 (由荷兰进口的重瓣品种与单瓣自交系杂交所得的重瓣单株) 上取回幼叶, 用自来水冲洗干净, 用 70% 酒精消毒 30 s, 0.1% 升汞消毒 10~15 min, 再用无菌水冲洗 3 次。然后, 将无菌叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 接种到愈伤组织诱导培养基上, 于黑暗条件下进行愈伤组织诱导。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导 在预备试验的基础上, 确定矮牵牛的适宜诱导培养基为以 MS 分别添加 0.5

mg·L⁻¹BA+1.0 mg·L⁻¹NAA 或 BA (浓度分别为 1、2、4 mg·L⁻¹) + 0.1 mg·L⁻¹ NAA 组成的 5 种培养基。叶片愈伤组织的生长指数按 Gavinlertvatana 等^[16]报道的方法进行统计。叶片暗培养 7 周后, 调查褐化率及愈伤组织的生长指数 (按 Gavinlertvatana 等^[16]报道的方法统计: 1=无愈伤组织; 2=叶片切割处有少量愈伤组织; 3=叶切割处有大量愈伤组织; 4=叶切割处有大量愈伤组织并且布满叶表面)。

1.2.2 愈伤组织连续频繁继代 将初步形成的愈伤组织转接到一系列培养基上, 经过观察与生长测定后确定继代培养基为 MS 添加 0.5 mg·L⁻¹ NAA 与 200 mg·L⁻¹ CH 结合不同浓度 BA (0.5、2.0 mg·L⁻¹) 两种, 并将两种培养基依次记录为 MSI、MSII。在继代过程中, 每次继代选择颗粒较松散, 有活力的愈伤组织, 并分别在光、暗条件下培养, 继代频率为约 20 d 左右 1 次。在每次接种前, 观察统计各培养基上愈伤组织的特征和生长情况, 愈伤组织的增殖率按转接后愈伤组织体积增长的倍数进行表述。

1.2.3 愈伤组织的诱导分化 对不同光条件下的继代培养 37 个月的愈伤组织, 在 MS 培养基上以生长素 (NAA 分别为 0.01、0.1、0.5、1.0 mg·L⁻¹) 与细胞分裂素 (BA 分别为 0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg·L⁻¹) 的完全组合及未添加激素的 MS 在光下或暗培养进行芽分化试验。培养 1 个月后对愈伤组织的分化情况进行观察和统计。

整个试验所用的培养基, 均采用 0.8% 琼脂粉作为凝固剂, pH 约为 5.8, 光照培养 14 h·d⁻¹, 光强 2 000 lx, 培养温度 (25±1) °C。每次试验采用 20~40 个外植体 (6 皿, 每皿 6 个外植体或 20 个培养瓶, 重复 2 次)。

1.2.4 再生芽总 DNA 提取与 ISSR 扩增 采用 SDS 法提取基因组总 DNA。选用 20 株来源不同株系的再生芽 DNA 作模板, 从 50 个 ISSR 引物 (Invitrogen 公司合成) 中选出 8 个扩增出清晰、稳定条带的 ISSR 引物 (表 1)。扩增反应体系为: 1×扩增缓冲液, 每种 dNTP 0.2 mmol·L⁻¹, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.4 μmol·L⁻¹ 引物, 约 10 ng 模板 DNA, 1.0 U Taq 酶 (晶美公司)。扩增程序为: 95°C 预变性 2 min; 95°C 30 s, 58°C 45 s, 72°C 90 s, 进行复性梯度降温, 5 个循环后, 固定在 95°C 30 s, 53°C 45 s, 72°C 90 s 进行 35 个循环; 然后 72°C 延伸 6 min。扩增产物以 2 000 bp ladder 为分子量标记, 在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳 1.5~2.0 h, 电泳液为 1×TAE, 在凝胶中加入 0.5 μg·ml⁻¹ 的 EB。电泳后在紫外灯下观察照相。

表 1 引物序列及其 TM 值

Table 1 Sequence of primers used and TM value

引物编号 Primer code	引物序列 (5'-3') Primer sequence	TM 值 (°C) TM value
N14	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	50.3
N17	GAGAGAGAGAGAGAGARC	52.6
N18	GAGAGAGAGAGAGAGARG	52.6
N19	GAGAGAGAGAGAGAGART	50.3
N23	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	50.3
N24	GTGTGTGTGTGTGTGYC	52.6
N28	GTGTGTGTGTGTGTGTRA	50.3
N30	GTGTGTGTGTGTGTTRG	52.6

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

在不同的愈伤组织诱导培养基上黑暗培养 1 周后, 叶片在切口处不同程度地膨大, 露出可见的愈伤组织 (图 1-A)。1 个月后, 在不同的培养基上愈伤组织诱导率表现出明显差异 (表 2)。低浓度的分裂素 ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA) 结合 $1.0\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 和 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 结合 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 能诱导出高产量愈伤组织 (生长指数大于 3)。在 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的基础上, 添加 $1.0\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, 愈伤组织产量低, 并伴有较多的不定芽分化。在生长素相对较高的培养基上, 诱导的愈伤组织表面湿润、疏松、部分有水渍化现象。相反, 分裂素浓度高时, 愈伤组织相对坚硬。在愈伤组织形成的同时, 各种培养基上的部分外植体均出现褐化, 但其差异不明显。

A: 愈伤组织诱导培养基上的矮牵牛叶片; B1: 光照条件下继代的愈伤组织; B2: 光照条件下继代的愈伤组织分化不定芽; C1: 黑暗条件下继代的愈伤组织; C2: 黑暗条件下继代的愈伤组织分化不定芽; D: 不定芽复壮
A: Leaves cultured on callus induction media from petunia hybrid; B1: Calli sub-cultured under light; B2: Adventitious shoots formed from calli sub-cultured under light; C1: Calli sub-cultured in darkness; C2: Adventitious shoots formed from calli sub-cultured in darkness; D: Rejuvenation of adventitious shoots

图 1 矮牵牛长期继代培养及植株再生

Fig. 1 *In vitro* long-term subculture of petunia and plant regeneration

表 2 不同培养基对重瓣矮牵牛叶片愈伤形成的影响

Table 2 Effects of different media on the callus formation from leaves of double flower petunia

BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	褐化率 Browning (%)	生长指数 Growth index
0.5	1	9.0±1.4a	3.49±0.11b
0.5	2	12.5±3.5a	3.82±0.05a
1	0.1	10.5±2.8a	1.10±0.07d
2	0.1	11.6±2.3a	2.45±0.12c
4	0.1	15.5±6.3a	3.53±0.11b

同列不同字母表示差异显著 ($P=0.05$)。下同

Means followed by different letters are significantly different according to LSD-test ($P=0.05$). The same as below

2.2 愈伤组织连续频繁继代

将初步诱导的不同状态的愈伤组织, 分别接种到添加不同浓度 BA 与 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 组合的 MS 培养基上, 结果发现, 由高浓度生长素 ($1.0\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA) 及高浓度细胞分裂素 ($4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导的愈伤组织接种在 BA 为 $1.0\sim 3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上时, 在光照与黑暗培养条件下均出现不同程度的植株分化 (数据未列出)。为加快细胞的繁殖代数, 本试验在继代培养基中添加了一定量的细胞分裂素, 当使用 MS 添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 与 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CH 结合两种浓度 BA ($0.5, 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 2 种继代培养基时, 在第 1 次继代后, 每次继代挑选相对疏松、有一定颗粒性的愈伤组织进行光暗培养。无论最初的愈伤组织是何种状态, 在继代 3~4 个月后都表现出极强的颗粒性。愈伤组织继代 1.5 年左右时, 采用 MSII ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LBA) 培养基黑暗处理有利于愈伤组织的生长和增殖 (表 3)。在继代的一个周期里, 其愈伤组织的体积增长大约是转接前的 7 倍左右, 愈伤组织表现为淡黄绿色, 愈伤组织颗粒的球状化不如光培养下明显 (图 1-C1)。而在光条件下为颗粒性明显的深绿色愈伤组织, 生长旺盛 (图 1-B1)。当培养基采用 MSI (低细胞分裂素) 时, 光暗培养对愈伤组织的生长、增殖均无显著影响 (表 3), 而且暗培养继代的愈伤组织大多为表面湿润、黄白色、疏松状且水分含量偏高的可增殖愈伤组织。在愈伤组织继代过程中, 改变激素种类及其组合, 可以观察到一些愈伤组织有明显的体细胞胚的形成 (数据未列出)。总之, 要实现愈伤组织的快速增殖, 增加色泽鲜艳、结构疏松、具表面光滑、颗粒状明显的愈伤组织 (图 1-B1) 的形成, 需用 MS+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CH + $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 培养基, 并在光照条件下培养。

2.3 愈伤组织的分化与植株再生

继代 3 年左右以后, 将结构疏松、颗粒性强、直

径约 3~5 mm 的愈伤组织接种于不同的分化培养基上, 分别进行光照和黑暗培养。结果发现, 在 25 种分化培养基中, 在生长素与分裂素绝对含量大的分化培养基上没有芽的分化, 只有在较低激素的培养基上才能获得不同程度的芽分化 (表 4)。在光条件下, 对愈伤组织进行跟踪观察发现, 在部分分化培养基上, 颗粒性的愈伤组织逐渐膨大, 并逐渐变得致密, 培养 20~25 d 后部分愈伤组织出现深绿色小芽点。更新培养基后, 再生出丛生状的绿色植株 (图 1-B2)。在黑暗条件下, 部分培养基上的愈伤组织也逐渐膨大, 但比光培养的相对疏松, 出现的分化芽也表现为茎短、叶片浅绿色透明状 (图 1-C2)。试验结果还显示, 愈伤组织分化受分化培养基、愈伤组织状态的影响。在高细胞激动素的培养基上, 除偶然的分化外, 愈伤组织继续增殖并改变其状态。在出现分化的培养基上, 光暗条件对愈伤组织的分化率影响不大; 但对激素的组合来说, 低分裂素与低生长素组合比单独使用生长素的作用更好 (表 4)。暗培养中表现细胞松散、颜色黄白、水渍状的愈伤组织, 其后的分化率相对较低。相反, 光培养继代的愈伤组织在分化培养基上颜色鲜绿、质地致密、分化率也高。

2.4 再生芽的复壮

无论是暗培养还是光培养, 由愈伤组织长期频繁

表 3 不同光条件对不同培养基上重瓣矮牵牛愈伤组织增殖系数的影响

Table 3 Effects of light on the callus proliferation on different media in double flower petunia

培养条件	培养基	愈伤增殖系数
Condition	Media	Callus proliferation
光培养 Light	MSI	2.99±0.34c
	MSII	7.79±0.05a
暗培养 Darkness	MSI	3.46±0.26c
	MSII	7.0±0.32b

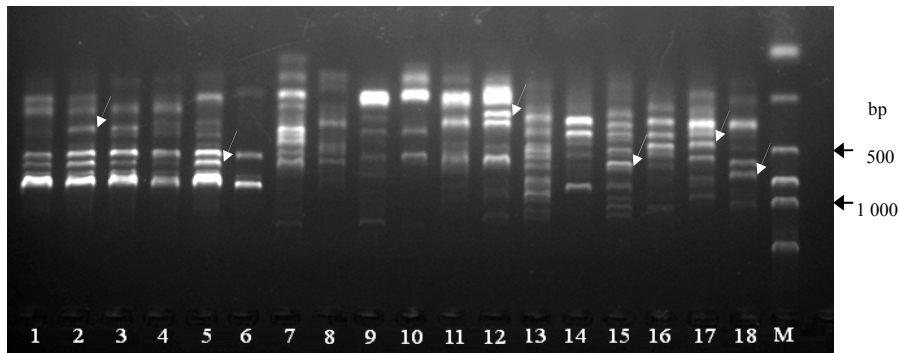
表 4 不同培养基与光条件下愈伤组织的再生率

Table 4 Regeneration frequency of callus under various light conditions on different media

植物生长调节剂		愈伤组织的再生率 Regeneration frequency of callus (%)			
Plant growth regulators ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		I		II	
BA	NAA	光培养 Light	暗培养 Darkness	光培养 Light	暗培养 Darkness
0	0	0	0	8.0±0.4	0
0	0.01	0	15.3±1.8	13.1±0.2	32.0±1.4
0	0.5	30.0±0.5	29.3±0.9	52.9±0.6	50.5±2.8
0.1	0.01	32.7±0.9	48.4±2.3	47.0±0.7	52.4±1.3
0.1	0.5	56.9±0.2	69.8±0.4	77.6±1.3	65.4±2.9

继代所得的再生芽均出现玻璃化(图 1-B2, C2), 生根也比较困难。将 50 个分化芽分别接到 1/2MS 或 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹NAA 上, 均未生根。但它们能在添加低含量激素(比分化培养基更低)的 MS 上缓慢增殖、变绿(图 1-D)。经过 3~5 次的转接光照培养(每次 20 d), 再生芽逐渐表现恢复正常, 而且大部分能在 1/2MS 上培养基生根。

2.5 再生植株的 ISSR 分析



1~6: 用 N14 引物获得的 6 个株系的 ISSR 图谱; 7~18: 引物 N17 获得的 12 个株系的 ISSR 图谱(箭头表示一些再生芽出现的特异带)。M: 2 000 bp 分子量标记

1-6: Polymorphic bands as revealed by gel electrophoresis of ISSR fragments generated with primer N14 in 6 regenerated lines; 7-18: ISSR pattern of 12 lines produced by primer N17 (arrow: the specific bands in some regenerated shoots). M: 2 000 bp molecular markers

图 2 矮牵牛再生芽的 ISSR 电泳分析图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of ISSR fragments of petunia regenerated shoots

3 讨论

在本试验中, 矮牵牛叶片在生长素与分裂素比率高或比率相对偏低的情况下, 均可以诱导愈伤组织的形成, 但形成的愈伤组织的结构、致密性等差异很大。经过有选择性的长期频繁继代, 其不同状态的愈伤组织均可转变为颗粒性强、结构疏松的状态。虽然在含有 BA 与 NAA 的继代培养基上, 没有发现胚形成, 但可以通过改变激素及其组合(使用 IBA 或 2, 4-D)可以诱导部分愈伤组织成胚, 这一点与在拟南芥上报道的相似^[17]。

Yesodi 等报道^[11], 部分矮牵牛在愈伤组织或细胞的长期继代后, 无法产生再生植株。本试验中频繁继代了 3 年的愈伤组织的成功再生, 说明愈伤组织的再生不仅受到因长期继代器官发生能力下降的影响, 而且跟材料的基因型显著相关。据报道^[18,19], 将长期在含有 2,4-D 的培养基上继代的培养物转移到含分裂素的培养基上, 未失去再生能力的愈伤组织便可以得到

对 20 棵再生植株用 8 个 ISSR 引物进行分析, 共扩增出 89 条较清晰带谱, 每个引物的平均带谱约 11.1 条, 所有带谱的分子量大小在 200~2 000 bp 之间。几乎每个引物在再生芽上都扩增出比较典型的特异性带谱(图 2), 而且出现了高频率变异的带谱。较为清晰、稳定性强的多态性带谱的比率为 20%左右, 说明其再生芽的遗传变异较大。

再生芽。在本试验中, 在相对较高的 BA 培养基上长期继代, 将其转接到低浓度的 NAA, 或者低浓度 NAA 和 BA 组合的培养基上, 部分愈伤组织获得再生植株。可见, BA 与 NAA 组合与 Ribeiro 报道的 2, 4-D 之作用相似。本试验中矮牵牛愈伤组织可以在较高浓度 BA 条件下实现继代, 其原因可能是在对初步诱导的愈伤组织开始的几次继代培养过程中, 愈伤组织体内就有了激素的积累, 它能够促使在以后相同的培养基上以愈伤组织的形式继续增殖, 而不出现芽分化。

与培养基成分作用不同, 光照对愈伤组织的继代及分化没有影响。在生长素与分裂素比率显著偏高或偏低, 或者绝对含量高的分化培养基上, 很难得到芽的再生。一般情况下, 黑暗条件下进行愈伤组织的继代、再生, 其再生芽的茎、叶往往呈淡黄白色, 且部分透明及玻璃化, 但是, 它们都可以在光照条件下叶片变绿, 恢复正常。

由 ISSR 分析再生芽的总 DNA 可知, 矮牵牛细胞的长期离体培养大大丰富了再生植株的遗传基础, 这

与 Plader 等在黄瓜上的报道相似^[20]。同时说明, 矮牵牛细胞在高速分裂的状态下, 发生变异的大多数体细胞没有因为遗传物质的变化而凋亡, 它们能适应每次继代的培养条件, 直到分化成苗。造成 DNA 变异大的原因, 除了染色体断裂后经过修复和重新连接所形成的易位、倒位、缺失和重复等原因外, 笔者认为在矮牵牛细胞的长期离体培养过程中发生的体细胞变异与转座子的激活可能相关, 因为笔者在其所用材料的家系发现与转座元类似的 DNA 片段 (数据未显示)。这一点与 Peschke 等^[21]在玉米上提到的转座因子的激活是导致体细胞无性系高频率变异的原因的结论相一致。

从试验结果看来, 一方面, DNA 的高频率变异的再生植株可以为研究矮牵牛遗传物质变异及其进化提供材料, 另一方面, 矮牵牛细胞的长期离体培养能获得体细胞无性系变异, 为矮牵牛的遗传改良提供了有效途径。

4 结 论

利用重瓣矮牵牛的叶片, 在含有一定浓度 BA 与 NAA 组合的培养基上进行暗培养, 可以诱导出来各种状态的愈伤组织; 在光、暗条件下分别使用 MS+2.0 mg·L⁻¹ BA +0.5 mg·L⁻¹ NAA+200 mg·L⁻¹ CH 与 MS+0.5 mg·L⁻¹ BA 0.5 mg·L⁻¹ NAA+200 mg·L⁻¹ CH 两种培养基, 可以进行愈伤组织长期频繁继代培养; 将经过 3 年继代培养的愈伤组织移到含有 0.01~0.5 mg·L⁻¹ NAA, 或 0.01~0.5 mg·L⁻¹ NAA 与 0.1 mg·L⁻¹ BA 相组合的 MS 培养基上, 可以获得不同程度的芽分化; 通过降低芽增殖培养基中的激素浓度, 可以对再生芽进行复壮; 对再生植株进行 ISSR 分析证实再生植株发生了广谱的遗传变异; 这一培养体系可用于矮牵牛体细胞突变育种。

References

- [1] Nakano M, Sakakibara T, Suzuki S, Saito H. Decrease in the regeneration potential of long-term cell suspension cultures of *Lilium formosanum* Wallace and its restoration by the auxin transport inhibitor, 2, 3, 5-triiodobenzoic acid. *Plant Science*, 2000, 158: 129-137.
- [2] Bozorgipour R, Snape J W. An assessment of somaclonal variation as a breeding tool for generating herbicide tolerant genotypes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 1997, 94: 335-340.
- [3] Bertin P, Bouharmont J. Use of somaclonal variation and *in vitro* selection for chilling tolerance improvement in rice. *Euphytica*, 1997, 96: 135-142.
- [4] Mohan J S. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 2001, 118: 153-166.
- [5] Economou A S, Read P E. Effect of NAA on shoot production *in vitro* from BA-pretreated *Petunia* leaf explants. *The Journal of American Society for Horticultural Science*, 1982, 107: 504-506.
- [6] Beck M J, Camper N D. Shoot regeneration from *petunia* leaf discs as a function of explant size, configuration and benzyladenine exposure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 26: 101-106.
- [7] Dimasi-Theriou K, Economou A S, Sfakiotakis E M. Promotion of *petunia* (*Petunia hybrida* L.) regeneration *in vitro* by ethylene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 32: 219-225.
- [8] Li Y, Xi Y W, Zhang Z K, Huang X Q, Li Y. Co-suppression in transgenic *Petunia hybrida* expressing chalcone synthase A(*chsA*). *Science in China (Series C)*, 2001, 44: 661-668.
- [9] Shaw J F, Chen H H, Tsai M F, Kuo C I, Huang L C. Extended flower longevity of *Petunia hybrida* plants transformed with *boers*, a mutated ERS gene of *Brassica oleracea*. *Molecular Breeding*, 2002, 9: 211-216.
- [10] 臧运祥, 张松, 郑伟尉, 陈美霞, 达克东, 吴禄平. 垂吊型矮牵牛叶片培养不定芽发生和微繁殖研究. *核农学报*, 2004, 18 (1): 18-21. Zang Y X, Zhang S, Zheng W W, Chen M X, Da K D, Wu L P. Adventitious shoot regeneration and micropropagation from leaves of trailing *petunia* (*Petunia hybrida*). *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2004, 18 (1): 18-21. (in Chinese)
- [11] Yesodi V, Izhar S, Hauschner H, Tabib Y, Firon N. Homologous recombination involving *cox2* is responsible for a mutation in the CMS-specific mitochondrial locus of *Petunia*. *Molecular General Genetic*, 1997, 255: 106-114.
- [12] Tang W. *In vitro* regeneration of loblolly pine and random amplified polymorphic DNA analyses of regenerated plantlets. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 163-168.
- [13] Martins M, Sarmiento D, Oliveira M M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports*, 2004, 23: 492-496.
- [14] Valladares S, Sánchez C, Martínez M T, Ballester A, Vieitez A M. Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis. *Plant Cell Reports*, 2005 23: 492-496.
- [15] Amzad Hossain Md, Konisho K, Minami M, Nemoto K. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica*, 2003, 130: 233-239.

- [16] Gavinlertvatana P, Read P E, Wilkins H F. Control of ethylene synthesis and action by silver nitrate and rhizobitoxine in petunia leaf section cultured *in vitro*. *The Journal of American Society for Horticultural Science*, 1980, 105(3): 304-307.
- [17] Gaj M D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 2004, 43: 27-47.
- [18] Eneva T, Tietz O, Luley E, Palme K. Loss of AtPIN1 does not influence the *in vitro* morphogenic potential of *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 79: 181-188.
- [19] Ribeiro R C S, Jekkel Z, Mulligan B J, Cocking E C, Power J B, Davey M R, Lynch P T. Regeneration of fertile plants from cryopreserved cell suspensions of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Science*, 1996, 115: 115-121.
- [20] Plader W, Malepszy S, Burza W, Rusinowski Z. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*, 1998, 103: 9-15.
- [21] Peschke V M, Phillips R L, Gengenbach B G. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture derived maize plants. *Science*, 1987, 238: 804-807.

(责任编辑 曲来娥)