

## 华北绣线菊(*Spiraea fritschiana* Schneid)再生及遗传转化体系建立的研究

张娇, 刘计璇, 李也, 王子骐, 王可新, 谭继升, 刘慧民\*

东北农业大学园艺园林学院, 哈尔滨150030

**摘要:** 以花灌木华北绣线菊(*Spiraea fritschiana*)幼嫩健康的离体叶片为外植体, 进行愈伤组织诱导、不定芽诱导及生根培养; 再以华北绣线菊愈伤组织为受体材料, 筛选选择抗生素和抑菌抗生素浓度, 探讨菌液稀释倍数和侵染时间对根癌农杆菌遗传转化华北绣线菊的影响。结果表明, 愈伤组织最佳诱导培养基为: MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-苄基腺嘌呤(6-BA)+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 萘乙酸(NAA)+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D), 诱导率为94.16%; 愈伤组织最佳增殖培养基为: MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.03 mg·L<sup>-1</sup> NAA; 不定芽最佳分化培养基为: MS+2 mg·L<sup>-1</sup> thidiazuron (TDZ)+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 分化率为96.11%; 生根壮苗最佳培养基为: 1/2MS+0.4 mg·L<sup>-1</sup> NAA; 以60 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素(kan)为选择压、150 mg·L<sup>-1</sup>头孢霉素(cef)为抑菌浓度, 菌体用液体MS稀释2倍(OD<sub>600</sub>=0.7), 侵染8 min, 为最优遗传转化体系, 诱导抗性芽8.7个, 遗传转化率为2%。本研究建立的华北绣线菊再生与遗传转化体系为其转基因研究及分子育种提供参考。

**关键词:** 华北绣线菊; 再生体系; 诱导率; 分化率; 遗传转化体系; 转化率

华北绣线菊(*Spiraea fritschiana*)是蔷薇科绣线菊属落叶灌木, 枝叶繁茂, 花朵繁多, 花期长, 具有良好的观赏价值和园林绿化应用前景。课题前期研究发现, 华北绣线菊半致死温度为-32.6°C, 抗旱生理指标隶属函数值为0.5672, 具有很强的抗寒及抗旱力(刘慧民等2014; 刘计璇等2015), 也是北方园林绿化中适应性良好的绿化素材。近年来, 有关绣线菊的研究主要集中在品种选育与推广、组培快繁与扩繁、逆境适应性与抗性、绣线菊抗性基因克隆及遗传转化和绣线菊差异蛋白质组学等方面。李云峰和王玉贤(1987)最早进行了日本绣线菊(*S. japonica*)的组织培养, 其后相继有人以幼嫩茎段为外植体进行了星花绣线菊(*S. japonica* var. *Stelleris*)、椭圆叶绣线菊(*S. japonica* var. *Ovalifolia*)、金焰绣线菊(*S. × bumalda* cv. *Gold Flame*)的离体快繁研究(胡益明等2001; 赵沛基等2004; 郭宇兰等2011); 瞿素萍等(2006)利用带叶柄的叶片建立了李叶绣线菊(*S. prunifolia*)的再生体系; 李晶等(2010)利用休眠后期的华北绣线菊茎段建立了稳定的离体培养体系。刘慧民等(2014)对18种绣线菊的抗寒力与抗旱力进行了筛选, 鉴定华北绣线菊为抗寒抗旱种类, 从蛋白水平探讨华北绣线菊的抗寒抗旱生理机制, 并在此基础上从华北绣线菊中克隆了抗性基因。课题拟对该基因进行遗传转化以深入探讨和研究其功能。目前只有吴萍等(2011)对金山绣线菊(*S. × bumalda* cv. *Gold Mound*)进行了遗传转化的研究。由于木本植物组织培养再生困难且周期长, 不定芽分化及伸长更为艰难, 加之影

响遗传转化的因素很多, 目前华北绣线菊建立再生及遗传转化体系尚未见报道。因此建立华北绣线菊高效再生体系, 摸索其遗传转化最佳体系, 不仅是课题继续深入研究的需要, 更为今后开展绣线菊基因工程研究和培育绣线菊新品种奠定基础。

### 材料与方法

#### 1 材料

##### 1.1 植物材料

供试华北绣线菊(*Spiraea fritschiana* Schneid)的材料选自东北农业大学园艺设施工程中心温室及室外露地培养的华北绣线菊两年生健壮植株。选择健康无病虫害的华北绣线菊植株, 剪取当年新生嫩枝顶部4~5片幼嫩叶片, 放于干净塑料袋内保湿封装后带回实验室。将叶片置于烧杯中流水冲洗30 min, 之后转到无菌操作台中对外植体消毒处理。首先在75% (V/V)乙醇中表面消毒30 s, 用无菌水充分冲洗3次, 然后在加有2滴吐温-20的2% (V/V) NaClO溶液中消毒10 min, 再用无菌水充分冲洗3次。在无菌条件下将叶片切割成0.5 cm×0.5 cm的方形小块待用。

##### 1.2 菌株与质粒

农杆菌菌株为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)

收稿 2016-05-23 修定 2016-11-25

资助 中国博士后科学基金(20100480957)和黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551040)。

\* 通讯作者(E-mail: liuhm0423@163.com)。

*faciens*) GV3101, 转化载体为pCAMBIA1302质粒, 启动子为组成型启动子*CaMV35S*, 具有卡那霉素(kanamycin, kan)抗性, T-DNA区含有*mGFP*标记基因。含质粒pCAMBIA1302的根癌农杆菌GV3101由东北农业大学园艺学院园林育种实验室保存, 质粒pCAMBIA1302由东北农业大学农学院陈庆山老师馈赠。

## 2 方法

### 2.1 华北绣线菊再生体系的建立

#### 2.1.1 培养基成分及培养条件

以MS培养基(王金刚和张兴2008)为基本培养基诱导愈伤组织和不定芽(蔗糖含量 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂粉 $7.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH值为5.81), 分别添加6-苄基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)  $0.5\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)  $0.1\sim 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)  $1.0\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和thidiazuron (TDZ)  $1.0\sim 3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。生根壮苗培养基设置含不同浓度NAA ( $0.2\sim 0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的MS和1/2MS (大量元素减半的MS)培养基。 $121^\circ\text{C}$ 高压灭菌20 min。培养条件 $25^\circ\text{C}$ , 光照强度 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照时间14 h, 夜间黑暗培养。

#### 2.1.2 愈伤组织诱导

将经过上述第2.1.1节处理后无菌状态的外植体接种于含不同浓度6-BA、NAA和2,4-D配比的MS培养基中, 诱导愈伤组织(表1)。每组浓度梯度接种20瓶, 每瓶接种4个外植体, 每组处理重复3次。接种后每7 d分别观察每组愈伤组织形成情况。3周后据愈伤组织诱导情况及愈伤组织状态, 计算愈伤组织诱导率, 筛选最佳愈伤组织诱导培养基。

表1 不同植物生长调节剂对华北绣线菊愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of plant growth regulators on callus induction of *S. fritschiana*

植物生长调节剂浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			外植体接种个数	生成愈伤组织个数	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织形态和质地
6-BA	NAA	2,4-D				
0.5	0.1	1.0	80	60.30	75.41 <sup>c</sup>	绿色, 质地松软
0.5	0.2	1.0	80	63.67	79.58 <sup>d</sup>	浅绿色, 质地松软
1.0	0.1	1.0	80	75.33	94.16 <sup>a</sup>	嫩绿色, 质地较疏松
1.0	0.2	1.0	80	69.00	86.25 <sup>bc</sup>	黄绿色, 质地较松软
0.5	0.1	2.0	80	65.00	81.25 <sup>d</sup>	黄褐色, 质地较疏松
0.5	0.2	2.0	80	66.33	82.91 <sup>cd</sup>	易褐化, 质地松软
1.0	0.1	2.0	80	69.67	87.08 <sup>b</sup>	黄褐色, 部分褐化, 质地较硬
1.0	0.2	2.0	80	66.67	83.33 <sup>bcd</sup>	黄褐色, 部分褐化, 质地较硬

表中数据是3次重复实验的平均值, 同列数据用不同小写字母标识表示差异显著( $P<0.05$ ); 表3同。

#### 2.1.3 愈伤组织增殖培养

将上述生长相对一致的愈伤组织去除褐化老化部分后, 切割成约 $0.3\text{ cm}\times 0.3\text{ cm}\times 0.3\text{ cm}$ 大小的愈伤块, 转入含不同浓度6-BA和NAA的继代培养基中进行愈伤组织增殖培养(表2)。每组接种30个愈伤组织, 重复3次, 每7 d进行一次继代培养, 3周后记录愈伤组织增殖速度、增殖倍数、颜色的变化并统计增值率, 筛选最佳愈伤组织增殖培养基。

#### 2.1.4 不定芽诱导

选择生长良好且一致的愈伤组织, 接种到以MS为基本培养基的添加不同浓度TDZ和NAA的分化培养基上(表3)。每组接种60个愈伤组织, 每组处

理重复3次, 30 d后统计每组不定芽分化数量, 计算不定芽分化率, 确定最适不定芽诱导培养基。

#### 2.1.5 生根及壮苗培养

将生长至2~3 cm高的不定芽分别转入含不同浓度NAA的MS和1/2MS培养基中, 进行生根与壮苗培养(表4), 20 d后测量茎的伸长高度、增粗变化及根的生长情况。计算生根率并确定最适生根与壮苗培养基。

#### 2.1.6 数据统计与计算

愈伤组织诱导率(%)=生成愈伤组织个数/接种外植体个数 $\times 100$ 。

愈伤组织增殖率(%)=增殖的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数 $\times 100$ 。

表2 不同植物生长调节剂对华北绣线菊愈伤组织增殖的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on callus proliferation of *S. fritschiana*

植物生长调节剂浓度/mg·L <sup>-1</sup>		愈伤组织接种个数	增殖率/%	增殖倍数	愈伤组织增殖速度及颜色变化
6-BA	NAA				
0.5	0.02	30	81.25	1.2	增殖不明显, 黄色
0.8	0.02	30	88.50	2.3	增殖速度较慢, 黄绿色
1.0	0.02	30	90.41	3.5	增殖速度快, 黄绿色
0.5	0.03	30	85.25	2.1	增殖速度慢, 黄色
0.8	0.03	30	87.20	2.2	增殖速度慢, 绿色
1.0	0.03	30	92.34	4.3	增殖速度快, 黄绿色
0.5	0.05	30	82.25	1.6	增殖速度慢, 黄褐色
0.8	0.05	30	84.33	1.8	增殖速度慢, 黄褐色
1.0	0.05	30	91.64	3.8	增殖速度较快, 绿色

表3 不同植物生长调节剂对华北绣线菊不定芽分化的影响

Table 3 Effects of plant growth regulators on adventitious bud differentiation of *S. fritschiana*

植物生长调节剂浓度/mg·L <sup>-1</sup>		愈伤组织个数	愈伤组织分化个数	不定芽分化率/%	不定芽分化状态
TDZ	NAA				
1.0	0.1	60	47.67	79.44 <sup>d</sup>	绿色, 生长良好
2.0	0.1	60	57.67	96.11 <sup>a</sup>	生长健壮, 能伸长和展叶
3.0	0.1	60	54.33	90.55 <sup>b</sup>	密集, 长势弱, 不易伸长
1.0	0.2	60	49.00	81.67 <sup>d</sup>	绿色, 长势柔弱
2.0	0.2	60	50.00	83.33 <sup>cd</sup>	绿色, 长势柔弱
3.0	0.2	60	52.33	87.22 <sup>bc</sup>	长势柔弱, 叶片淡黄色

表4 基本培养基和不同浓度NAA对华北绣线菊生根与壮苗培养的影响

Table 4 Effects of basic culture medium and NAA on rooting and strengthening of *S. fritschiana*

基本培养基	NAA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	生根率/%	生根情况	茎伸长高度/cm	增粗情况
MS	0.2	75.63	少量短根生成	8.2	增粗不明显
MS	0.4	78.21	少量短根生成	8.5	增粗不明显
MS	0.6	77.32	少量短根生成	8.7	增粗不明显
1/2MS	0.2	83.42	根较长较粗壮, 须根多	4.8	茎明显增粗
1/2MS	0.4	89.52	根较长较粗壮, 须根多	5.2	茎明显增粗
1/2MS	0.6	80.81	根较长较粗壮, 须根多	5.6	茎明显增粗

不定芽分化率(%)=愈伤组织分化个数/接种的愈伤组织个数×100。

生根率(%)=分化出根的不定芽个数/接种的不定芽个数×100。

数据方差分析采用SPSS 17.0软件计算。

## 2.2 华北绣线菊遗传转化体系的建立

### 2.2.1 选择抗生素浓度的筛选

根据转化载体的结构, 确定kan (Biotopped, 北京)为选择抗生素, 选取绿色健壮的愈伤组织(每组处理30个愈伤组织, 每组处理重复3次), 分别接种

到添加不同浓度kan (0、20、40、60、80、100 mg·L<sup>-1</sup>)的最适不定芽分化培养基上, 每1~2周继代一次, 连续观察愈伤组织分化情况, 依据愈伤组织不定芽分化率, 确定最佳选择抗生素浓度。

### 2.2.2 抑菌抗生素浓度的筛选

选取绿色健壮的愈伤组织, 放于活化的根癌农杆菌菌液中侵染5 min后, 用无菌水冲洗愈伤组织并用无菌滤纸吸干水分, 再分别接种到添加不同浓度头孢霉素(cefotaxime, cef) (Biotopped, 北京) (0、50、100、150、200、250、300、350、400

mg·L<sup>-1</sup>)的最适不定芽分化培养基上, 2周后观察不定芽分化情况和农杆菌生长状态, 依据不定芽分化率及抑菌效果确定最适抑菌抗生素浓度。

### 2.2.3 农杆菌介导的遗传转化体系

取华北绣线菊组培无菌苗叶片, 接种于愈伤组织诱导培养基中, 预培养15 d至愈伤组织形成。挑取活化的农杆菌单菌落接种于含50 mg·L<sup>-1</sup> kan和50 mg·L<sup>-1</sup>利福平(rifampicin, rif) (Sigma, 美国)的YEB培养基中, 于28°C、200 r·min<sup>-1</sup>震荡培养过夜, 然后按照YEB和菌液10:1的比例稀释菌液, 将稀释的菌液再次活化至菌液OD<sub>600</sub>为0.6。于10 000×g下

离心菌液10 min后收集菌体, 再用液体MS溶液将菌体分别稀释1、2、4倍, 重新悬浮菌液并活化至OD<sub>600</sub>分别为0.8、0.7、0.6备用。将上述愈伤组织分别在农杆菌菌液中侵染4、6、8 min后, 用无菌水充分冲洗, 用无菌滤纸吸干表面水分, 接种在共培养基中暗培养4 d至目视可见菌落。愈伤组织再转接至添加kan和cef的最佳不定芽分化培养基上, 进行抗性筛选及脱菌培养。每2周转接一次, 用cef溶液清洗并抑制农杆菌。当抗性芽长至2~3 cm时移入生根培养基进行生根培养。每组处理50块愈伤组织, 每组重复3次(表5)。

表5 根癌农杆菌菌液稀释倍数和侵染时间对遗传转化效率的影响

Table 5 Effects of dilution multiple and infection time of *A. tumefaciens* on genetic transformation efficiency

处理	菌液稀释倍数	侵染时间/min	农杆菌生长情况	愈伤组织分化数	阳性株数	转化率/%
1	1	4	少	2.0	0	0 (0/150)
2	1	6	多	3.5	1	0.67 (1/150)
3	1	8	较多	2.4	0	0 (0/150)
4	2	4	少	6.2	0	0 (0/150)
5	2	6	少	5.8	2	1.33 (2/150)
6	2	8	少	8.7	3	2 (3/150)
7	4	4	无	7.0	0	0 (0/150)
8	4	6	较少	5.7	1	0.67 (1/150)
9	4	8	较少	6.3	1	0.67 (1/150)

转化率(%)=每组处理得到的阳性株数/每组处理的愈伤组织个数×100, 在表中表示为“转化率(阳性株数/愈伤组织个数)”。

### 2.2.4 转化植株的PCR检测

用CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)法分别提取转化植株和非转化植株的叶片总DNA, 据pCAMBIA-1302载体上*mGFP*标记基因的序列设计特异引物, 引物序列为primer F: 5'-ATGGTAGATCTGACTAGT-AAAGGAGAAGA-3'; primer R: 5'-AGAACTTT-ATTGCCAAATGTTTGA-3'。以pCAMBIA1302质粒为阳性对照, 水为空白对照。反应体系为(25 μL): 2× *Es Taq* MasterMix 12.5 μL, primer F 1 μL, primer R 1 μL, DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR反应条件为: 94°C预变性2 min; 94°C变性30 s, 50°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 共35个循环; 72°C终延伸2 min; 4°C终止反应。据检测的阳性植株数量计算转化率, 转化率(%)=阳性株数/愈伤组织侵染个数×100。

## 实验结果

### 1 愈伤组织诱导

由表1看出, 叶片在3种生长调节剂不同浓度配

比下的培养基上均可形成愈伤组织, 但添加不同浓度生长调节剂的培养基上形成的愈伤组织的形态和质地有所差别。在6-BA浓度范围0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup>、NAA浓度范围0.1~0.2 mg·L<sup>-1</sup>、2,4-D浓度范围1.0~2.0 mg·L<sup>-1</sup>的不同组合下, 愈伤组织分化数量在60.30~75.33个之间, 愈伤组织分化率从75.41%到94.16%, 愈伤组织颜色由嫩绿、黄绿、黄褐到褐色变化, 愈伤组织形态由疏松到松软、部分质地较硬甚至褐化。当6-BA浓度为1.0 mg·L<sup>-1</sup>、NAA浓度0.1 mg·L<sup>-1</sup>、2,4-D浓度为1.0 mg·L<sup>-1</sup>时, 愈伤组织分化率最高达94.16%, 且愈伤组织呈现嫩绿色、质地较疏松饱满(图1-A)。

由表1看出, 当2,4-D浓度达2.0 mg·L<sup>-1</sup>时, 愈伤组织颜色逐渐变为黄褐色, 部分愈伤组织褐化不能分化, 当NAA浓度达0.2 mg·L<sup>-1</sup>时, 愈伤组织松散松软, 会导致分化困难。说明诱导华北绣线菊愈伤组织时, 2,4-D浓度不应超过2.0 mg·L<sup>-1</sup>, NAA浓度不应超过0.2 mg·L<sup>-1</sup>。



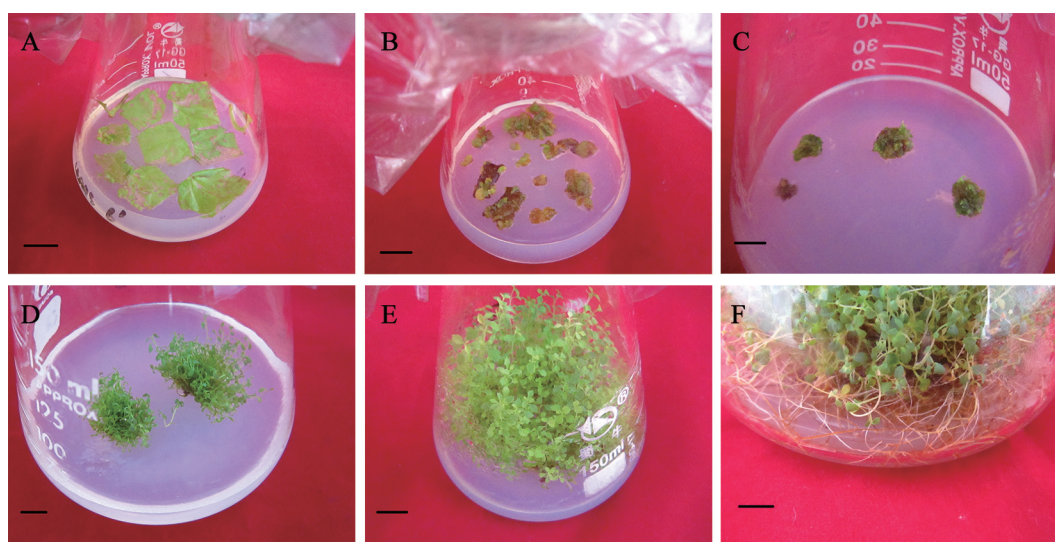


图1 华北绣线菊叶片诱导的植株再生过程

Fig.1 Plantlet regeneration of *S. fritschiana*

A: 愈伤组织形成; B: 愈伤组织增殖; C: 不定芽分化; D和E: 不定芽生长; F: 生根壮苗。图中标尺长度为5 mm。

试验找到华北绣线菊最适愈伤组织诱导培养基, 即MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D。叶片在该浓度下培养第10天开始皱缩, 开始萌发愈伤组织, 其后不断膨胀变大, 形成颗粒饱满透亮、质地疏松、状态饱满的嫩绿色愈伤组织。并可用于不定芽的分化培养。

## 2 愈伤组织增殖培养

愈伤组织培养20 d后转至含0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA和0.02~0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA的增殖培养基上, 培养10 d后愈伤组织开始膨大, 3周后统计愈伤组织增殖率和增殖倍数(表2)。

表2数据说明, 当6-BA浓度在0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup>、NAA浓度在0.02~0.05 mg·L<sup>-1</sup>的不同组合处理, 愈伤组织均有增殖表现, 但其增殖率、增殖倍数及愈伤组织的颜色不同, 当6-BA浓度达到1.0 mg·L<sup>-1</sup>时, 愈伤组织增殖速度快, 增殖倍数达3.5~4.3。当1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.03 mg·L<sup>-1</sup> NAA配比时愈伤组织增殖率达92.34%, 增殖速度最快, 增殖倍数最大, 愈伤组织表现状态最佳(图1-B)。

## 3 不定芽诱导

将长势良好的愈伤组织接入含不同浓度配比的TDZ和NAA培养基中, 进行不定芽诱导, 3~4周后愈伤组织表面开始萌发绿色芽点(图1-C), 统计不同浓度配比下诱导的不定芽数量(表3)。结果表

明, 在TDZ浓度为1.0~3.0 mg·L<sup>-1</sup>、NAA浓度为0.1~0.2 mg·L<sup>-1</sup>的不同组合下, 分化不定芽的愈伤组织数量在47.67~57.67个之间, 不定芽分化率从79.44%到96.11%。TDZ能明显促进不定芽分化, 当TDZ浓度达3.0 mg·L<sup>-1</sup>时, 诱导的不定芽特别密集, 长势较弱, 不利于芽的伸长和生根培养; 当NAA浓度达0.2 mg·L<sup>-1</sup>时, 分化的不定芽柔弱, 叶片淡黄色。当TDZ浓度为2.0 mg·L<sup>-1</sup>、NAA浓度为0.1 mg·L<sup>-1</sup>时, 不定芽分化率最高达96.11%, 不定芽生长健壮(图1-D和E)。愈伤组织的最适分化培养基为MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA。

## 4 生根培养

使用不同浓度NAA分别与MS、1/2MS基本培养基组合对华北绣线菊不定芽进行壮苗及生根培养。结果表明, 在相同培养时间内, 与在MS培养基中的生长高度、茎粗、生根状况相比, 不定芽在1/2MS培养基中的增长高度少, 茎相对粗壮, 生根效果明显, 根粗壮且须根较多(图1-F), 植株生长健壮。选择1/2MS培养基为生根及壮苗基本培养基。当NAA浓度为0.4 mg·L<sup>-1</sup>时, 生根率分别为78.21%和89.52%, 高于其他浓度的生根率; 当浓度达0.6 mg·L<sup>-1</sup>时发生茎徒长, 不利于壮苗培养。因此选择华北绣线菊最适生根及壮苗培养基为1/2MS+0.4 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 生根率达89.52%。

### 5 选择抗生素浓度的筛选

选择抗生素浓度筛选试验说明未添加选择抗生素的培养基上能正常分化不定芽(表6; 图2-A), 随着kan浓度升高, 不定芽分化明显下降, 当kan浓度为60 mg·L<sup>-1</sup>时, 不定芽分化率仅为16.67%, 但在此浓度的培养基上能分化不定芽, 不定芽还能正常生长(图2-B),

当kan浓度达80 mg·L<sup>-1</sup>时, 愈伤组织不能分化不定芽, 说明抗生素的浓度达到了上限, 在此浓度下分化率为0 (图2-C)。实验结果说明kan浓度为60 mg·L<sup>-1</sup>时分化并正常生长的不定芽即为抗性芽, 在其他浓度虽能分化不定芽, 但不能选择抗性植株。因此华北绣线菊遗传转化时选择抗生素的最适浓度为60 mg·L<sup>-1</sup>。

表6 不同浓度kan对华北绣线菊愈伤组织不定芽分化的影响

Table 6 Effects of kan concentrations on the adventitious bud differentiation of *S. fritschiana*

kan浓度/mg·L <sup>-1</sup>	愈伤组织个数	愈伤组织分化个数	愈伤组织分化率/%	不定芽分化状态
0	30	26	86.67	芽点较多, 不定芽生长健壮, 全部展叶
20	30	24	80.00	芽点较多, 不定芽能伸长, 部分展叶
40	30	15	50.00	芽点较少, 不定芽较弱, 少部分展叶
60	30	5	16.67	芽点少, 继代后愈伤褐化
80	30	0	0	未分化不定芽
100	30	0	0	未分化不定芽

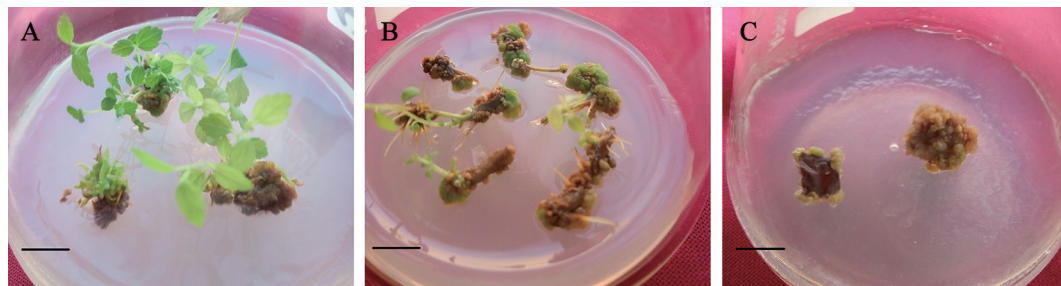


图2 不同浓度kan对华北绣线菊抗性芽分化的影响

Fig.2 Effects of different kan concentrations on the callus differentiation of *S. fritschiana*

A: kan浓度为0, 能正常分化不定芽; B: kan浓度为60 mg·L<sup>-1</sup>, 分化率低, 能分化不定芽; C: kan浓度为80 mg·L<sup>-1</sup>, 未分化不定芽。

### 6 抑菌抗生素浓度的筛选

由表7数据表明, 当cef浓度小于100 mg·L<sup>-1</sup>时, 不能对农杆菌产生抑制作用, 实验中发现叶片周围有大量农杆菌附着, 叶片感染菌落, 不能正常分化愈伤组织; 当cef浓度大于200 mg·L<sup>-1</sup>时虽能有效抑制农杆菌生长, 但高浓度的抗生素对愈伤组织分化产生影响, 使愈伤组织褐化死亡, 无法继续分化不定芽; 当cef浓度为150 mg·L<sup>-1</sup>时, 能有效抑制农杆菌生长, 并且叶片正常分化愈伤组织。因此华北绣线菊遗传转化最适抑菌抗生素浓度为150 mg·L<sup>-1</sup>。

### 7 农杆菌介导的遗传转化体系

农杆菌菌液浓度和侵染时间是影响遗传转化的两个重要因素, 实验设计了菌液不同稀释倍数和侵染时间梯度, 以选择最适的转化体系。在侵

染过程中, 高浓度菌液使农杆菌大量附着在愈伤组织周围及表面, 严重影响愈伤组织分化, 并使愈伤组织褐化死亡。当侵染时间过长, 愈伤组织受农杆菌毒害缺氧失去分化能力, 侵染时间过短则降低遗传转化率。

用稀释了不同倍数的菌液和不同时间侵染愈伤组织, 由表5数据分析, 与稀释2和4倍的处理相比, 用等体积的MS稀释菌体后侵染愈伤组织, 农杆菌生长量明显居多。经过几次除菌处理后, 愈伤组织褐化严重, 分化的抗性芽个数很少, 分别稀释2和4倍的菌液侵染愈伤组织后, 农杆菌生长量较少, 利用抑菌剂cef溶液可将农杆菌去除, 愈伤组织能保持良好的生长状态, 不定芽分化率较高。用稀释相同倍数菌液而侵染不同时间处理, 结果表明短

表7 不同浓度cef对农杆菌的抑制及愈伤组织分化的影响

Table 7 The inhibitory of cef concentrations on *Agrobacterium* and effects on callus induction

cef浓度/mg·L <sup>-1</sup>	愈伤组织分化率/%	愈伤组织生长状态	农杆菌抑制效果
0	35	无分化	有农杆菌生长
50	40	无分化	有农杆菌生长
100	45	无分化	抑菌效果不明显
150	53	愈伤组织分化	抑菌效果明显
200	20	愈伤组织分化率低	抑菌效果明显
250	15	愈伤组织分化率低, 褐化	抑菌效果明显
300	13	愈伤组织分化率低, 褐化	抑菌效果明显
350	0	愈伤组织褐化	抑菌效果明显
400	0	愈伤组织褐化	抑菌效果明显

时间侵染没有得到阳性植株, 说明T-DNA未整合入华北绣线菊基因组中, 因此需要较长的侵染时间。比较各组处理得到的抗性芽和阳性植株数量认为, 农杆菌侵染华北绣线菊愈伤组织的最适菌液浓度为OD<sub>600</sub>=0.7 (稀释2倍), 侵染时间为8 min。

### 8 转化植株PCR检测

实验共获得抗性苗104株, 通过对转化载体上*mGFP*标记基因的PCR检测, 共有8株植株扩增出与*mGFP*片段大小相同的目标条带(图3), 说明转化载体已整合到华北绣线菊基因组中, 该转化体系可用于华北绣线菊遗传转化, 以实现不同抗性基因的遗传转化; 该PCR反应体系和程序(见材料与方法中第2.2.4节)能用于检测华北绣线菊转化结果。后续实验将对检测结果进行测序, 进一步证明该载体上携带的基因是否成功转入华北绣线菊基因组中。

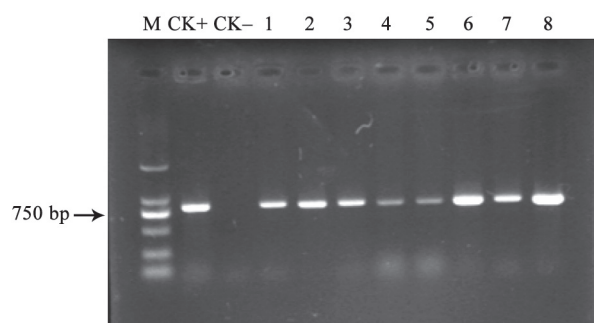


图3 华北绣线菊抗性基因转化pCambia1302载体中*mGFP*标记基因的PCR检测

Fig.3 PCR detection of *mGFP* maker gene in pCambia1302 of *S. Fritschiana*

M: DL2000 marker; CK+: 阳性对照; CK-: 阴性对照。

## 讨 论

### 1 华北绣线菊愈伤组织诱导的影响因素

愈伤组织的诱导是建立植物再生体系的基础与前提。外植体不同的部位、不同的发育时期及不同种类和浓度的生长调节剂对愈伤组织的诱导都有很显著的影响。本文选择了最幼嫩、分生能力最强时期的叶片作为外植体, 在此基础上着重探讨了多重生长调节剂对华北绣线菊愈伤组织诱导的影响, 并获得了华北绣线菊高效的愈伤组织诱导体系, 诱导率可达到94.16%。试验中各处理组配合使用不同浓度的6-BA、NAA和2,4-D三种生长调节剂, 均能够诱导愈伤组织形成, 愈伤组织诱导率从75.41%到94.16%。这与冯欢等(2014)对微型月季(*Rosa hybrida*)愈伤组织诱导的研究结果相一致: 研究发现单独使用6-BA、NAA或2,4-D仅表现较低的愈伤组织诱导率, 加入NAA和2,4-D比单独使用6-BA更容易获得愈伤组织, 因此采用多重生长调节剂诱导微型月季愈伤组织。确定最佳愈伤组织诱导培养基, 不仅需要多种生长调节剂配合使用以获得较高的愈伤组织诱导率, 其生长调节剂的浓度配比更决定着愈伤组织的质量和不定芽的分化能力, 生长素浓度越高, 愈伤组织颜色越偏向黄褐色, 质地越松散, 越不利于后续分化不定芽(林娅等2006)。李文静等(2012)对荠菜(*Capsella bursa-pastoris*)、王媛媛等(2010)对南方紫花苜蓿(*Medicago sativa*)的研究结果也发现高浓度2,4-D导致愈伤组织在后续培养时出现褐化, 并明显抑制不定芽的分化。在本实验中, 使用2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D比使用1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D诱导的愈伤组



组织褐化程度高,颜色黄绿甚至黄褐色;NAA浓度达到 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,形成的愈伤组织松散松软,不利于不定芽分化。因此诱导华北绣线菊愈伤组织时,生长素浓度不宜过高,2,4-D浓度不应超过 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,NAA浓度不应超过 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综合以上生长调节剂浓度因素,华北绣线菊愈伤组织诱导需要6-BA、NAA和2,4-D共同配合使用,并避免过高浓度的生长素,以免影响不定芽的分化,最终确定华北绣线菊愈伤组织诱导培养基为 $\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D,愈伤组织呈现嫩绿色、质地较疏松且饱满,不仅获得了94.16%的愈伤组织诱导率,亦使后续不定芽分化率高达96.11%,达到了建立高效再生体系的基本要求。

## 2 TDZ对华北绣线菊不定芽分化的影响

研究表明TDZ对木本植物的再生非常有效(Huetteman和Preece 1993; Baker和Bhatia 1993),尤其对分化困难、分化周期长的木本植物再生效果良好,而且需要较高浓度才能促进木本植物器官发生(秦静远2005;王成龙等2015;王兴翠等2015)。在诱导一些木本植物发生不定芽的过程中,很多研究者尝试利用TDZ诱导不定芽。诸葛强等(2003)将不同浓度的TDZ与6-BA、IAA配比使用,使新疆杨(*Populus alba* var. *pyramidalis*)叶盘不定芽分化率高达100%;国外学者Thinh和Katagiri (1994)利用TDZ诱导很难分化的桑树叶片并形成再生芽;在建立月季(*R. chinensis*) (冯欢等2014;武慧等2013)、杜鹃(*Rhododendron simsii*) (秦静远和黄玉敏2003)等木本植物的再生体系中,添加TDZ也产生了高效的不定芽诱导效果。

华北绣线菊是蔷薇科绣线菊属的落叶灌木,同属中的金山绣线菊不定芽诱导困难(程蕾洁等2009),本试验中尝试选择TDZ诱导不定芽,并设计3个较高的浓度梯度进行诱导试验。试验中将愈伤组织接入不同浓度配比的TDZ和NAA培养基中,3~4周后发现愈伤组织表面开始萌发出绿色芽点(图1-C),结果显示(表3),在TDZ浓度 $1.0\sim 3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NAA浓度 $0.1\sim 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的不同组合下,分化出不定芽的愈伤组织个数在48~58个之间,不定芽分化率为80%~96.67%,说明TDZ能明显促进华北绣线菊愈伤组织分化不定芽。

不同浓度TDZ对不定芽的诱导效应不同,含量过低效果不明显、过高对愈伤组织及不定芽生长产生抑制作用。TDZ的诱导能力虽强,但会带来一些负面作用,据报道苹果(*Malus × domestica*)叶片在附加较高浓度的TDZ时,再生的叶片圆钝肉质,不定芽伸长困难并呈莲座状(张志宏等1997)。实验中当TDZ浓度达 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,诱导的不定芽生长密集,长势较弱,不利于芽的伸长和生根。当TDZ浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NAA浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽分化率最高达96.67%,并且不定芽生长健壮(图1-D和E),这说明本试验的浓度配比 $\text{MS}+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA是一个适宜华北绣线菊愈伤组织分化不定芽的浓度组合,在此浓度愈伤组织分化效率高,不定芽生长良好。

## 3 华北绣线菊遗传转化体系的建立

在建立植物遗传转化体系的众多因素中,选择抗生素和抑菌抗生素浓度的筛选是实现选择和鉴定抗性苗的关键。本试验以载体上的标记抗生素kan为选择抗生素,当kan浓度为 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,试验结果表明,该浓度既能发挥选择压作用又不会抑制不定芽的生长;cef浓度为 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,既能很好的抑制农杆菌生长,愈伤组织又能分化出不定芽,这一试验结果与吴萍等(2011)对金山绣线菊抑菌抗生素浓度的筛选结果基本一致。

影响农杆菌转化的主要因素包括菌液浓度和侵染时间(Villemont等1997;刘石泉和余沛涛2003)。如菌液浓度过高,侵染时间过长,使农杆菌生长过度,可导致外植体死亡,若菌液浓度过低侵染时间过短,农杆菌则不能成功侵染,导致转化失败。试验中发现华北绣线菊愈伤组织对农杆菌较为敏感,容易产生过敏反应而褐化,当菌液被稀释2倍( $\text{OD}_{600}=0.7$ )时进行侵染愈伤组织褐化现象有所减少。研究发现遗传转化苹果时所需侵染时间一般为5~15 min (邵建柱和马宝焜2003)。在本试验中,与苹果同科的华北绣线菊侵染时间则不宜超过10 min,最适侵染时间为8 min。试验采用上述侵染浓度和侵染时间,共获得抗性苗104株,通过PCR技术检测转化载体上的*mGFP*标记基因,共获得8株携带目标基因的阳性植株,说明该遗传转化体系可用于华北绣线菊遗传转化,以实现不同抗性基因的遗传转化。



本试验建立的华北绣线菊再生体系和遗传转化体系, 可为今后绣线菊资源转基因研究奠定基础, 后续研究拟利用该体系进行绣线菊抗性基因的遗传转化, 开展绣线菊遗传改良和分子育种, 以期培育绣线菊抗寒抗旱新品种。

### 参考文献

- Baker BS, Bhatia SK (1993). Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). *Plant Cell Tiss Org*, 35 (3): 273–277
- Chen L, Wu X, Hong B (2009). Establishment of plantlet regeneration for *Spiraea × bumalda* Gold Mound. *J Northeast For Univ*, 37 (10): 32–34 (in Chinese with English abstract) [程蕾洁, 武晓娜, 洪波(2009). 金山绣线菊(*Spiraea × bumalda* Gold Mound)再生体系的建立. *东北林业大学学报*, 37 (10): 32–34]
- Feng H, Yi S, Xie J, Lei M, Huang X (2014). Callus induction and plant regeneration of *Rosa hybrida*. *Chin Bull Bot*, 49 (5): 595–602 (in Chinese with English abstract) [冯欢, 易姝利, 谢佳恒, 雷梦琦, 黄萱(2014). 微型月季愈伤组织诱导及植株再生. *植物学报*, 49 (5): 595–602]
- Guo YL, Yang Q, Diao YF, Liu G, Chen Y (2011). Establishment of efficient regeneration system of *Spiraea × bumalda* cv. Gold Flame. *For By-Prod Spec China*, (3): 40–41 (in Chinese) [郭宇兰, 杨琪, 刁云飞, 刘刚, 陈宇(2011). 金焰绣线菊高效再生体系的建立. *中国林副特产*, (3): 40–41]
- Hu YM, Gan FY, Peng LP, Zhao PJ, Hao XJ (2001). Tissue culture and rapid propagation of *Spiraea japonica* var. *stelleris*. *Plant Physiol Commun*, 37 (3): 235–236 (in Chinese) [胡益明, 甘烦远, 彭丽萍, 赵沛基, 郝小江(2001). 星花绣线菊的组织培养及快速繁殖. *植物生理学通讯*, 37 (3): 235–236]
- Huetteman CA, Preece JE (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss Org*, 33 (2): 105–119
- Li J, Sun H, Liu Q (2010). Influence of different factors on *Spiraea fritschiana* Schneid leaves to start of in vitro culture. *For By-Prod Spec China*, (5): 25–27 (in Chinese with English abstract) [李晶, 孙海滨, 刘强(2010). 不同因子对华北绣线菊离体培养启动的影响. *中国林副特产*, (5): 25–27]
- Li WJ, Li XQ, Jia MM, Tang HM, Song QJ, Lian SY (2012). Effects of 6-BA, NAA and 2,4-D on callus induction, growth and plantlet regeneration of shepherd's purse [*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic]. *Plant Physiol J*, 48 (2): 141–146 (in Chinese with English abstract) [李文静, 李学强, 贾毛毛, 唐洪梅, 宋乾江, 连少英(2012). 6-BA、NAA和2,4-D不同配比对荠菜愈伤组织诱导、生长及植株再生的影响. *植物生理学报*, 48 (2): 141–146]
- Li YF, Wang YX (1987). Tissue culture of *Spiraea japonica*. *Plant Physiol Commun*, (2): 51–52 (in Chinese) [李云峰, 王玉贤(1987). 日本绣线菊的组织培养. *植物生理学通讯*, (2): 51–52]
- Lin Y, Zheng Y, Liu Q (2006). Factors in callus induction and differentiation on *Rosa*. *Mol Plant Breeding*, 4 (2): 223–227 (in Chinese with English abstract) [林娅, 郑玉梅, 刘青林(2006). 影响月季愈伤组织诱导和分化的因素. *分子植物育种*, 4 (2): 223–227]
- Liu HM, Zhang Q, Su Q, Liu JX, Che DD (2014). Studies on evaluation and screening of cold resistance during seeding stage in eighteen species or varieties of *Spiraea*. *Acta Horticult Sin*, 41 (12): 2427–2436 (in Chinese with English abstract) [刘慧民, 仇茜, 苏青, 刘计璇, 车代弟(2014). 18种绣线菊苗期抗寒性评价与筛选. *园艺学报*, 41 (12): 2427–2436]
- Liu JX, Hu B, Zhang Q, Su Q, Zhang J, Liu HM (2015). Effects of drought stress treatments on photosynthesis and proteins related to photosynthesis of *Spiraea fritschiana* and *S. thichocarpa*. *Acta Horticult Sin*, 42 (5): 917–929 (in Chinese with English abstract) [刘计璇, 胡冰, 仇茜, 苏青, 张娇, 刘慧民(2015). 干旱处理对华北绣线菊和毛果绣线菊光合作用及相关蛋白表达的影响. *园艺学报*, 42 (5): 917–929]
- Liu SQ, Yu PT (2003). Influencing factors of *Agrobacterium*-mediated higher plants transformation. *Chin J Nat*, 25 (1): 16–21 (in Chinese) [刘石泉, 余沛涛(2003). 农杆菌介导高等植物基因转化的影响因素. *自然杂志*, 25 (1): 16–21]
- Qin JY (2005). The use of TDZ in plant tissue culture. *J Yangling Voc Tech Coll*, 4 (2): 19–22 (in Chinese with English abstract) [秦静远(2005). TDZ在植物组织培养中的应用. *杨凌职业技术学院学报*, 4 (2): 19–22]
- Qin JY, Huang YM (2003). Tissue culture and rapid propagation of *Rhododendron simsii*. *Plant Physiol Commun*, 39 (1): 38 (in Chinese) [秦静远, 黄玉敏(2003). 杜鹃的组织培养及快速繁殖. *植物生理学通讯*, 39 (1): 38]
- Qu SP, Li SF, Su Y, Tang KX (2006). Establishment of regeneration system from leaves and leafstalk of *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. *Plant Physiol Commun*, 42 (4): 691 (in Chinese) [瞿素萍, 李树发, 苏艳, 唐开学(2006). 李叶绣线菊叶片和叶柄再生体系的建立. *植物生理学通讯*, 42 (4): 691]
- Shao J, Ma B (2003). Advances in research of transgenic apples. *J Fruit Sci*, 20 (1): 49–53 (in Chinese with English abstract) [邵建柱, 马宝焜(2003). 转基因苹果研究进展. *果树学报*, 20 (1): 49–53]
- Thinh NT, Katagiri K (1994). Induction of adventitious buds in mulberry leaves by Thidiazuron. *J Seric Sci Jpn*, 63 (6): 514–516
- Villemont E, Dubois F, Sangwan RS, Vasseur G, Bourgeois Y, Sangwan-Norreel BS (1997). Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta*, 201 (2): 160–172
- Wang CL, Zhou ML, Dong XN, Tang YX, Shao JR, Wu YM (2015). Optimization and comparison of two regeneration system of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J Agric Sci Technol*, 17 (4): 53–61 (in Chinese with English abstract) [王成龙, 周美亮, 董雪妮, 唐益雄, 邵继荣, 吴燕民(2015). 紫花苜蓿两种再生体系的优化及比较. *中国农业科技导报*, 17 (4): 53–61]
- Wang J, Zhang X (2008). Tissue culture technology of garden plants. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 22–31 (in Chinese) [王金刚, 张兴(2008). 园林植物组织培养技术. 北京: 中国农业科学技术出版社, 22–31]
- Wang XC, Lyu JF, Xue QQ, Yang TH, Pei HL, Li MQ (2015). Establishment and optimization of the regeneration system for lettuce using TDZ. *Acta Agric Zhejiang*, 27 (8): 1381–1386 (in Chinese

- with English abstract) [王兴翠, 吕金浮, 薛其勤, 杨天慧, 裴华丽, 李美芹(2015). 应用TDZ优化生菜再生体系的建立. 浙江农业学报, 27 (8): 1381–1386]
- Wang YY, Liu XN, Bo DS (2010). Study on salt tolerance and establishment of regeneration system of three cultivars of alfalfa from the south of China. *J Gansu Agric Univ*, 45 (2): 127–133 (in Chinese with English abstract) [王媛媛, 柳小妮, 柏东山(2010). 三个南方紫花苜蓿品种的耐盐性及其再生体系的建立. 甘肃农业大学学报, 45 (2): 127–133]
- Wu H, Lü J, Fu ZK, Li HL, Xu HW, Zhou XF (2013). Effect of TDZ on adventitious bud growth of *Rosa chinensis minima*. *Hubei Agric Sci*, 52 (13): 3178–3179 (in Chinese with English abstract) [武慧, 吕杰, 付智坤, 李红柳, 徐洪伟, 周晓馥(2013). TDZ对微型月季不定芽生长的影响. 湖北农业科学, 52 (13): 3178–3179]
- Wu P, Cheng LJ, Yu Y, Hong B (2011). Establishment of genetic transformation system for *Spiraea × bumalda* 'Golden Mound'. *Plant Physiol J*, 47 (3): 305–310 (in Chinese with English abstract) [吴萍, 程蕾洁, 于洋, 洪波(2011). 金山绣线菊遗传转化体系的建立. 植物生理学报, 47 (3): 305–310]
- Zhang ZH, Jing SX, Wang GL (1997). Effects of TDZ on adventitious bud regeneration from leaf blade of apple *in vitro*. *Plant Physiol Commun*, 33 (6): 420–423 (in Chinese) [张志宏, 景士西, 王关林(1997). TDZ对苹果叶片离体再生不定芽的效应. 植物生理学通讯, 33 (6): 420–423]
- Zhao PJ, Gan FY, Shen YM (2004). Tissue culture of *Spiraea japonica* var. *ovalifolia*. *Plant Physiol Commun*, 40 (1): 71 (in Chinese) [赵沛基, 甘烦远, 沈月毛(2004). 椭圆叶绣线菊的组织培养. 植物生理学通讯, 40 (1): 71]
- ZhuGe Q, Wang JC, Huang MR, Wang MX (2003). Establishment of plant regeneration system of *Populus alba* var. *pyramidalis*. *J Nanjing For Univ-Nat Sci*, 27 (6): 1–4 (in Chinese with English abstract) [诸葛强, 王婕琛, 黄敏仁, 王明麻(2003). 新疆杨植株再生体系的建立. 南京林业大学学报(自然科学版), 27 (6): 1–4]

## Establishment of regeneration and genetic transformation systems for *Spiraea fritschiana* Schneid

ZHANG Jiao, LIU Ji-Xuan, Li Ye, WANG Zi-Qi, WANG Ke-Xin, TAN Ji-Sheng, LIU Hui-Min\*

College of Horticulture and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** Using young and healthy leaves as explants, the callus, adventitious buds and roots were induced of woody ornamental plant *Spiraea fritschiana*. Then the callus was used as receptor material to screen out the concentrations of selective antibiotic and bacteriostatic antibiotic, and the effects of genetic transformation on *S. fritschiana* by diluting the agrobacterium solution into different multiples and infecting them by different time were also discussed. The results show that the best medium for callus induction was MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (6-BA)+0.1 mg·L<sup>-1</sup> naphthylacetic acid (NAA)+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with the inductivity of 94.16%. The medium for callus proliferation was MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.03 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The medium for adventitious buds induction was MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> thidiazuron (TDZ)+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, and using this medium the differentiation rate reached 96.11%. The medium for rooting and strengthening was 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The selective antibiotic was kanamycin (kan) with the concentration of 60 mg·L<sup>-1</sup>, and the bacteriostatic antibiotic was cefotaxime (cef) with the concentration of 150 mg·L<sup>-1</sup>. When we diluted the *Agrobacterium tumefaciens* twice (OD<sub>600</sub>=0.7) by liquid MS and infected the callus for 8 minutes, the transformation efficiency was the highest with 8.7 resistant buds and transformation rate of 2%. This study provides a basis for gene engineering and molecular breeding by building efficient regeneration system and genetic transformation system of *S. fritschiana*.

**Key words:** *Spiraea fritschiana*; regeneration system; inductive rate; differentiation rate; genetic transformation system; transformation rate

Received 2016-05-23 Accepted 2016-11-25

This work was supported by the Postdoctoral Science Foundation of China (Grant No. 20100480957), and the Science and Technology Research Project of Heilongjiang Education Department (Grant No. 11551040).

\*Corresponding author (E-mail: liuhm0423@163.com).