

· 技术方法 ·

平潭野菊混合瓣型株系再生体系的建立

廖敏凌¹, 蒲娅¹, 武晓云¹, 马朝峰¹, 王文奎², 戴思兰^{1*}

¹北京市林木分子设计育种高精尖创新中心; 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, 城乡生态环境北京实验室, 北京 100083; ²福州市规划设计研究院集团有限公司, 福州 350108

摘要 菊科植物因其丰富的舌状花变异类型而具有很高的观赏价值。野菊(*Chrysanthemum indicum*)作为栽培菊花(*C. × morifolium*)的近缘野生种之一, 其自然群体中常具有典型的平瓣、匙瓣及管瓣的舌状花变异类型, 是研究菊科植物瓣型变异的优异材料, 而目前缺乏对其再生体系的研究。在福建平潭岛分布的野菊中发现大量舌状花形态变异植株, 该研究以其混合瓣型株系茎间薄层和叶盘为外植体建立再生体系。结果表明, 以茎间薄层为外植体, 诱导愈伤组织和不定芽分化的最优培养基为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA, 接种14天愈伤组织诱导率可达100%。不定芽平均分化时间为25天, 接种40天不定芽分化率可达82%。最佳生根培养基为1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA, 10天生根。移栽植株全部成活, 植株生长状态良好且均保留了混合瓣型的形态特征。该研究初步建立了平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层的离体培养再生体系, 为进一步建立其遗传转化体系奠定了基础, 也为解析菊花瓣型变异机理提供了技术方法。

关键词 野菊, 植物生长调节剂, 再生体系, 混合瓣型株系, 茎间薄层

廖敏凌, 蒲娅, 武晓云, 马朝峰, 王文奎, 戴思兰 (2023). 平潭野菊混合瓣型株系再生体系的建立. 植物学报 58, 449–460.

菊花(*Chrysanthemum × morifolium*)是重要的观赏植物和经济作物, 舌状花形态的多样性是其丰富花型的决定因素之一。由于菊花多为异源六倍体或非整倍体, 遗传背景复杂, 调控舌状花平瓣型、管瓣型及中间类型的数量性状基因仍有待挖掘, 导致菊花瓣型遗传机理解析极为困难(Song et al., 2020)。然而, 与菊花近缘的菊属植物野生种中存在很多舌状花形态变异的株系(王文奎等, 1999), 为解析菊花瓣型变异机制提供了理想的研究材料。野菊(*C. indicum*)为菊科菊属多年生草本植物(林镕等, 1983), 是栽培菊花的近缘野生种之一(戴思兰等, 1995, 1998; 周杰, 2009; Ma et al., 2016, 2020)。野菊在我国分布广泛, 不同地理居群的野菊其营养器官和生殖器官的大小或数量均有差异(林镕等, 1983; 汪劲武等, 1993; 周杰, 2009; 张鲜艳等, 2011; 韩正洲, 2017; 马晓蓉, 2017)。本课题组在福建平潭岛调研中发现了多个野菊居群(简称平潭野菊), 其中有大量舌状花形态变异的株系, 包含平瓣、匙瓣、管瓣着生于同一头状花序

的混合瓣型植株, 这为菊科植物瓣型变异研究提供了典型材料。基于此, 我们对平潭地区分布的野菊瓣型变异株系进行调查分析和引种栽培, 并利用混合瓣型株系建立高效再生体系, 为进一步建立遗传转化体系并解析其瓣型变异机制奠定基础。

目前, 在菊科植物中已有部分物种建立了再生体系, 如菊花金不凋(*C. × morifolium* cv. 'Jinbudiao') (吴志莘等, 2020)、切花菊粉贵人(*C. × morifolium* cv. 'Fenguiren') (李亚军等, 2018)、芳香堆心菊(*Helenium aromaticum*) (罗虹等, 2020)和野生菊属植物甘菊(*C. lavandulifolium*) (付建新等, 2012; 武晓云等, 2018)、朝鲜野菊(*C. koraiense*) (陈鹏彦, 2010)、那贺川野菊(*C. yoshinaganthum*) (晨卉等, 2009)和葫芦岛野菊(*C. indicum* var. *huludoensis*) (任江珊等, 2021)。上述研究通常选用叶片、下胚轴、茎间薄层和舌状花等为外植体, 在MS培养基中添加6-BA和NAA组合作为诱导和分化培养基, 在MS和1/2MS中添加低浓度NAA作为生根培养基。此外, 2,4-D和IAA

收稿日期: 2022-06-28; 接受日期: 2022-09-26

基金项目: 国家自然科学基金(No.31530064)和国家重点研发计划(No.2018YFD1000405)

* 通讯作者。E-mail: silandai@sina.com

在菊科植物再生中也有应用(陈鹏彦, 2010; 付建新等, 2012)。在一些较难再生的物种以及品种中, 常用低浓度TDZ促进愈伤组织形成, 以缩短愈伤组织形成时间(徐晓峰和黄学林, 2003)。TDZ浓度过高会导致愈伤组织褐化, 且对菊花和芳香堆心菊的茎段不定芽诱导无促进作用(肖政等, 2009; 罗虹等, 2020)。

前人已和平瓣型野菊中建立了再生及遗传转化体系(韩磊等, 2009; 李娜, 2018; 王想, 2018; 曲晓慧, 2020), 并对芳香(王想, 2018)、花色(王霁佳, 2019)、抗性(李梦雨, 2020; Liu et al., 2021)和株型(李娜, 2018; 宫明雪, 2019)等性状相关基因进行了功能验证。本研究以平潭野菊混合瓣型株系为材料, 探究不同组合和浓度的6-BA、NAA和TDZ对其叶盘和茎间薄层愈伤组织诱导、不定芽分化和生根诱导的影响, 筛选平潭野菊混合瓣型株系的最适外植体, 建立高效再生体系, 旨在为后续建立并利用遗传转化体系研究瓣型变异机理奠定基础。

1 植物材料

本研究以2018年1月在福建省平潭岛调研收集的平潭野菊(*Chrysanthemum indicum* Linnaeus)混合瓣型株系为材料, 株高为0.7–1 m, 顶端头状花序排成疏松伞房状花序, 头状花序同时具有平瓣、匙瓣和管瓣3种舌状花类型。

2 培养基成分与培养条件

2.1 外植体消毒与无菌苗扩繁

取平潭野菊混合瓣型株系顶端2–3节, 洗净后装瓶, 瓶口盖纱布扎紧, 流水冲洗3小时。在超净工作台内按以下步骤消毒: 70%乙醇消毒15秒; 无菌水清洗3分钟; 1%–2% (m/v)次氯酸钠消毒2–3分钟; 无菌水清洗6次, 每次3分钟。消毒过程中始终摇晃广口瓶, 使外植体与液体充分接触。消毒后将外植体接种至经高温高压灭菌的MS固体培养基中, 在组织培养室中培养, 获得无菌苗。取无菌苗中上部带芽茎段, 接种至MS培养基上培养30天以上, 使其长成完整植株, 获得后续实验材料。培养条件: 温度为20–22°C, 日光灯光源, 光照强度为54 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光周期为16小时光照/8小时黑暗。

2.2 愈伤组织诱导和不定芽分化

以MS为基础培养基, 添加不同浓度的6-BA和NAA组合作为愈伤组织诱导和不定芽分化培养基(表1)。以平潭野菊混合瓣型株系无菌苗中上部叶片为外植体, 将0.5 cm×0.5 cm大小的叶盘正面划伤后平铺于培养基。另取平潭野菊混合瓣型株系自顶芽起第2–5节间茎段, 横切成1–2 mm的薄片接种在相同培养基上。每个配方进行3次重复实验, 每次实验处理10–16个叶盘或15–20个茎间薄层。在表1配方实验的基础上, 选叶盘再生体系中表现较好的实验组向其中添加不同浓度的TDZ (表2), 以相同方法, 每个配方进行3次重复实验。离体培养14天后计算愈伤组织诱导率, 40天后计算不定芽分化率。

表1 愈伤组织诱导及不定芽分化培养基配方

Table 1 The composition of the medium for callus induction and adventitious buds differentiation

No.	Basal medium	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Y1	MS	1.0	0.5
Y2	MS	1.0	1.0
Y3	MS	1.0	2.0
Y4	MS	2.0	0.5
Y5	MS	2.0	1.0
Y6	MS	2.0	2.0
Y7	MS	3.0	0.5
Y8	MS	3.0	1.0
Y9	MS	3.0	2.0
CK	MS	0	0

表2 添加不同浓度TDZ的愈伤组织诱导培养基配方

Table 2 The composition of the medium for callus induction with different concentrations of TDZ

No.	Basal medium	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	TDZ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
T1	MS	2.0	1.0	0.1
T2	MS	2.0	1.0	0.2
T3	MS	2.0	1.0	0.4
T4	MS	2.0	2.0	0.1
T5	MS	2.0	2.0	0.2
T6	MS	2.0	2.0	0.4
T7	MS	2.0	3.0	0.1
T8	MS	2.0	3.0	0.2
T9	MS	2.0	3.0	0.4

2.3 生根诱导

待再生苗长至高0.8 cm、叶片数为2–6枚时,接种至生根诱导培养基(表3)。每个配方进行3次重复实验,每次实验处理3株不定芽。生根诱导30天后统计生根株数,计算生根率。

2.4 炼苗及移栽

当再生苗生根且生长状态良好时,移栽至长日照人工气候室进行炼苗。培养条件:温度为25°C,空气湿度为40%–50%,日光灯光源,光照强度为108 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期为16小时光照/8小时黑暗。栽培基质选用营养土:蛭石=1:1 (v/v)。30天后统计成活植株数,计算成活率。待植株完成营养生长后,转移至短日照人工气候室进行成花诱导。培养条件:温度为22°C,空气湿度为40%–50%,日光灯光源,光照强度为108 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期为12小时光照/12小时黑暗。观察并统计再生植株的舌状花状态,按照Song等(2018)的方法,将再生植株舌状花根据花冠筒基部合生程度(corolla tube merged degree, CTMD)分为平瓣、匙瓣和管瓣3种类型,统计各类型舌状花到头状花序总舌状花中的占比。

2.5 数据统计

用Microsoft Excel和SPSS 26.0软件整理数据。采用One-way ANOVA和LSD多重比较法进行差异显著性分析。计算公式如下。

愈伤组织诱导率=(每盘出现愈伤组织的外植体数/每盘培养基中的外植体总数) $\times 100\%$;

不定芽分化率=(每盘出现分化的外植体数/每盘培养基中的外植体总数) $\times 100\%$;

生根率=(每瓶中的生根株数/每瓶中的总株数) $\times 100\%$;

表3 生根诱导培养基配方

Table 3 Formula of rooting medium

No.	Basal medium	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
G1	1/2MS	0.2
G2	1/2MS	0.5
G3	1/2MS	1.0
1/2MS	1/2MS	0
MS	MS	0

成活率=(移栽后成活植株数/移栽植株总数) $\times 100\%$;

各瓣型在头状花序中的占比=(某瓣型舌状花数/该头状花序舌状花总数) $\times 100\%$ 。

3 结果与讨论

3.1 平潭野菊舌状花变异类型与资源收集

根据舌状花的花冠筒基部合生程度(CTMD) (Song et al., 2018),将平潭野菊分为平瓣型(图1A1)、匙瓣型(图1A2)、管瓣型(图1A3)以及在同一头状花序中3种瓣型兼有的混合瓣型(图1A4)。此外,还观察到剪绒(图1B1, B2)、燕尾状裂(图1C1, C2, E4)、外翻(图1D1, E2)及内曲(图1D2, E3)等不同形态的舌状花。在平潭野菊不同植株中,舌状花长度(图1E1)及数量(图1F1–F4)、混合瓣型头状花序中3种瓣型占比(图1G1–G4)和头状花序直径(图1H)也有较大差异。

平潭野菊丰富的舌状花变异类型使其成为解析菊科植物瓣型变异机理的重要材料。2018年将平潭野菊混合瓣型株系植株引种至北京昌平区北京市绿地养护事务管理服务中心。经过连续3年以上的栽培观察,显示该株系头状花序性状与原产地基本一致,舌状花形态仍为混合瓣型(图2)。植株经无菌化处理后,保存于北京林业大学组织培养室。

3.2 平潭野菊混合瓣型株系离体再生体系的建立

3.2.1 不同外植体愈伤组织诱导和不定芽分化培养基的筛选

以平潭野菊混合瓣型株系叶盘为外植体,在含有6-BA和NAA的培养基中离体培养14天,除Y9组 and 对照外,各实验组愈伤组织诱导率均达100%;培养20天,Y3组首先出现分化,随后Y6和Y9组也出现分化芽点,其它实验组均无分化现象(表4),说明NAA浓度为2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时较适宜叶盘愈伤组织的分化。叶盘在培养基中培养10–14天出现褐化现象(图3A),最终导致死亡(图4)。在NAA浓度为2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的实验组中添加不同浓度的TDZ,发现0.1–0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ可有效促进叶盘愈伤组织形成,与不添加TDZ相比,形成愈伤组织时间平均缩短7天。此外,与不添加TDZ相比,添加适宜浓度的TDZ使褐化时间延缓了10天,以T1和T2组褐化程度较轻(图3B),褐化率较低(表5),



图1 平潭野菊舌状花形态变异

(A1) 平瓣型; (A2) 匙瓣型; (A3) 管瓣型; (A4) 混合瓣型; (B1), (B2) 剪绒; (C1), (C2) 燕尾状裂; (D1) 外翻; (D2) 内曲; (E1) 舌状花长度差异; (E2), (E3) 舌状花弯曲程度差异; (E4) 燕尾状裂深度差异; (F1)–(F4) 舌状花数量的差异; (G1)–(G4) 混合瓣型中各瓣型占比差异; (H) 头状花序直径差异。Bars=1 cm

Figure 1 Ray floret variations in *Chrysanthemum indicum* in Pingtan

(A1) Flat type; (A2) Spoon type; (A3) Tubular type; (A4) Mix type; (B1), (B2) Chenille-like; (C1), (C2) Swallowtail-like; (D1) Evaginable; (D2) Incurvate; (E1) Difference in ray floret length; (E2), (E3) Difference in degree of curvature; (E4) Difference in cracking degree; (F1)–(F4) Difference in ray floret number; (G1)–(G4) Difference in proportion of each petal type in mix type; (H) Difference in diameter of capitulum. Bars=1 cm

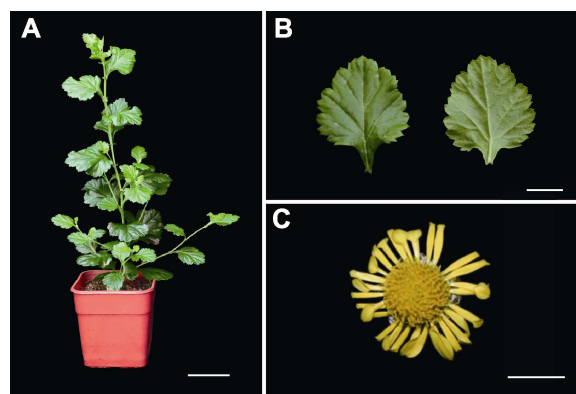


图2 平潭野菊混合瓣型株系

(A) 植株形态(bar=3.5 cm); (B) 叶片形态(bar=1 cm); (C) 头状花序(bar=1 cm)

Figure 2 *Chrysanthemum indicum* in Pingtan stains with various ligulate floret form

(A) Plant (bar=3.5 cm); (B) Leaf shape (bar=1 cm); (C) Capitulum (bar=1 cm)

且愈伤组织诱导率均为100% (表4)。考虑到愈伤组织状态和褐化情况, T1组是实验组合中较适合的叶盘愈伤组织诱导培养基。但T1培养基中叶盘无分化, Y9培养基中叶盘不定芽分化率较高, 将T1培养基中的叶盘转移至Y9培养基, 仍然不能分化。综上, 表明叶盘不适宜作为平潭野菊混合瓣型株系高效再生体系的外植体。

表4 不同培养基配方对平潭野菊叶盘及茎间薄层(tTCLs)愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

Table 4 Effects of different media on callus induction and adventitious buds differentiation for leaves and transverse thin cell layers (tTCLs) of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan

Treatments	Callus formation rate on the 14th day (%)		Differentiation rate on the 40th day (%)		Treatments	Callus formation rate on the 14th day (%)
	Leaves	tTCLs	Leaves	tTCLs		
Y1	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	0	82.00±3.46 a	T1	100.00±0.00 a
Y2	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	0	53.50±4.95 c	T2	100.00±0.00 a
Y3	100.00±0.00 a	90.50±4.95 b	3.71±0.19 b	33.50±6.36 d	T3	97.00±0.04 ab
Y4	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	0	63.50±4.95 bc	T4	83.50±0.06 ab
Y5	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	0	67.00±5.66 b	T5	97.50±0.03 ab
Y6	100.00±0.00 a	98.50±2.12 a	9.39±3.35 b	57.50±0.71 bc	T6	87.50±0.09 ab
Y7	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	0	61.00±1.41 bc	T7	81.50±0.05 b
Y8	100.00±0.00 a	93.50±0.71 b	0	16.50±3.54 e	T8	85.00±0.14 ab
Y9	75.48±4.30 b	98.50±2.12 a	19.09±1.29 a	41.00±4.24 d	T9	90.00±0.06 ab
CK	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	0	0	-	-

Y1-Y9和CK同表1; T1-T9同表2。同列不同小写字母表示LSD检验差异显著($P<0.05$)。

Y1-Y9, and CK are the same as in Table 1; T1-T9 are the same as in Table 2. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences by LSD test ($P<0.05$).

以茎间薄层为外植体, 在含有6-BA和NAA的组合培养基中, 离体培养14天已出现分化; 至40天, 各实验组不定芽分化率均高于同组对照叶盘(表4)。当NAA浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 茎间薄层不定芽分化率较高, 在茎间薄层愈伤组织中可见多个芽点, 但不定芽生长较缓慢, 仅有Y1组在分化后迅速获得0.8 cm以上的不定芽(图5)。

综上, 本研究所用的培养基配方更适合平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层的愈伤组织诱导和不定芽分化。其中, 在Y1培养基($\text{MS}+1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}$)可快速获得0.8 cm以上的不定芽, 分化率高达82%, 因此将Y1培养基作为平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层诱导愈伤组织和不定芽分化的培养基。

3.2.2 生根培养基的筛选

茎间薄层在 $\text{MS}+1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 培养基中经愈伤组织诱导和不定芽分化, 将0.8 cm以上的不定芽移入生根培养基培养。以MS为基础培养基时, 生根率为66.7%, 植株叶色偏黄, 长势较弱(图6A); 以1/2MS为基础培养基时, 生根率为100%, 但植株长势弱, 叶片小, 基部叶自叶尖开始枯萎(图6B)。在1/2MS培养基中添加不同浓度的NAA对生根率和生根数无明显影响, 但延长了生根时间, 且根长变短, 根部形态短粗, 根毛较多; 植株分枝数较少或

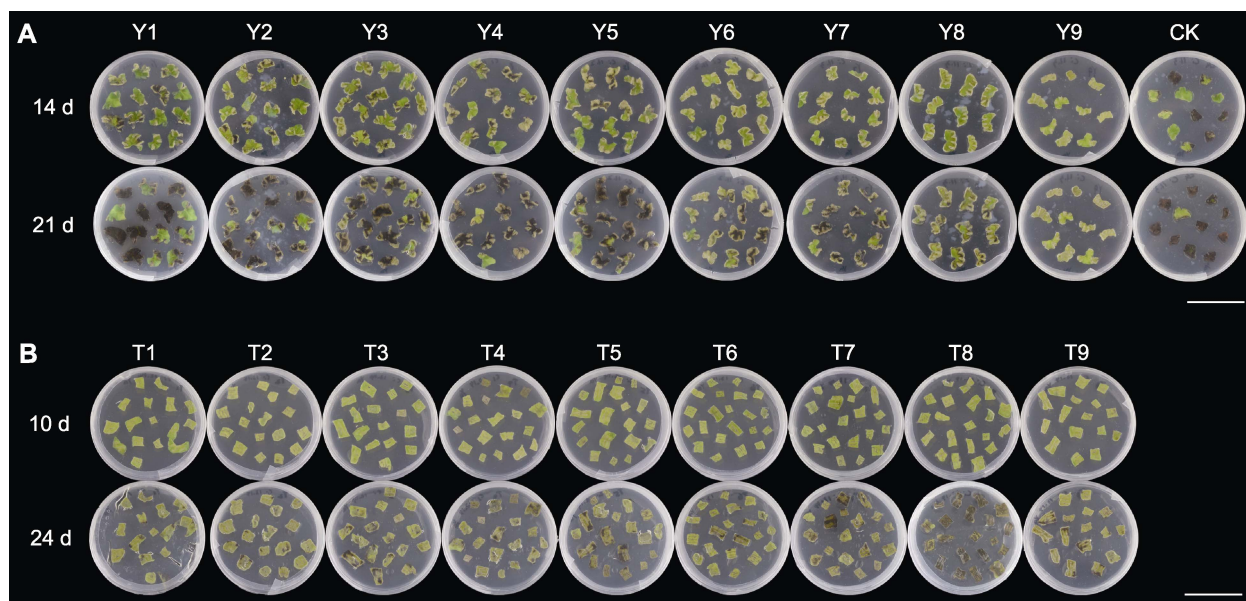


图3 平潭野菊叶盘在不同培养基中的再生状况

(A) 叶盘在不同培养基中的生长状态; (B) 叶盘在含TDZ培养基中的生长状态。Y1–Y9和CK同表1; T1–T9同表2。Bars=4.5 cm

Figure 3 Regeneration of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan leaves in different media

(A) Leaves in different media; (B) Leaves in media with TDZ. Y1–Y9, and CK are the same as in Table 1; T1–T9 are the same as in Table 2. Bars=4.5 cm

表5 平潭野菊叶盘在不同培养基中的褐化率

Table 5 The browning rate for leaves of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan in different media

Treatments	Browning rate on the 21th day (%)	Treatments	Browning rate on the 24th day (%)
Y1	83.04±7.92 abcd	T1	52.78±3.93 f
Y2	96.43±5.05 a	T2	56.08±3.88 ef
Y3	80.36±6.84 bcde	T3	81.80±0.78 c
Y4	90.11±8.58 abc	T4	72.14±2.18 d
Y5	77.56±3.95 cde	T5	89.45±0.78 b
Y6	67.86±9.22 e	T6	61.51±0.56 e
Y7	74.22±2.49 de	T7	97.50±3.54 a
Y8	42.50±5.00 f	T8	100.00±0.00 a
Y9	34.17±1.18 f	T9	87.30±2.25 bc
CK	92.73±9.50 ab		

Y1–Y9和CK同表1; T1–T9同表2。同列不同小写字母表示LSD检验差异显著($P<0.05$)。

Y1–Y9, and CK are the same as in Table 1; T1–T9 are the same as in Table 2. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences by LSD test ($P<0.05$).

不分枝, 相同培养时间内株高更高, 叶片更大, 植株更为健壮(表6; 图6C–E)。综合考虑生根时间、根系生长状态和植株状态, 确定 $1/2MS+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA

为最适生根培养基。

3.2.3 炼苗及移栽

将生根再生苗移入营养土:蛭石=1:1 (v/v)的栽培基质中, 移栽成活率均为100%。植株生长健壮, 株高增高, 叶片增大(图7A1, A2)。移栽60天后进行短日照处理, 再生植株头状花序仍为混合瓣型(图7B)。我们对不同生根培养基中生根植株头状花序的舌状花形态及其数量进行观察统计, 发现其与原始植株头状花序性状一致, 保持混合瓣型, 但3种瓣型在头状花序中的占比不规律(图7C), 总体而言平瓣最多, 其次是管瓣和匙瓣(图7D)。

综上, 平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层经愈伤组织诱导、不定芽分化、生根诱导、炼苗及移栽, 获得了完整开花植株且保留了混合瓣型性状。本研究建立了平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层的再生体系(图8A–I)。

3.3 讨论

菊花是重要的观赏植物和经济作物, 其花型丰富, 品种繁多。舌状花的形态多样性是菊花丰富花型的关键

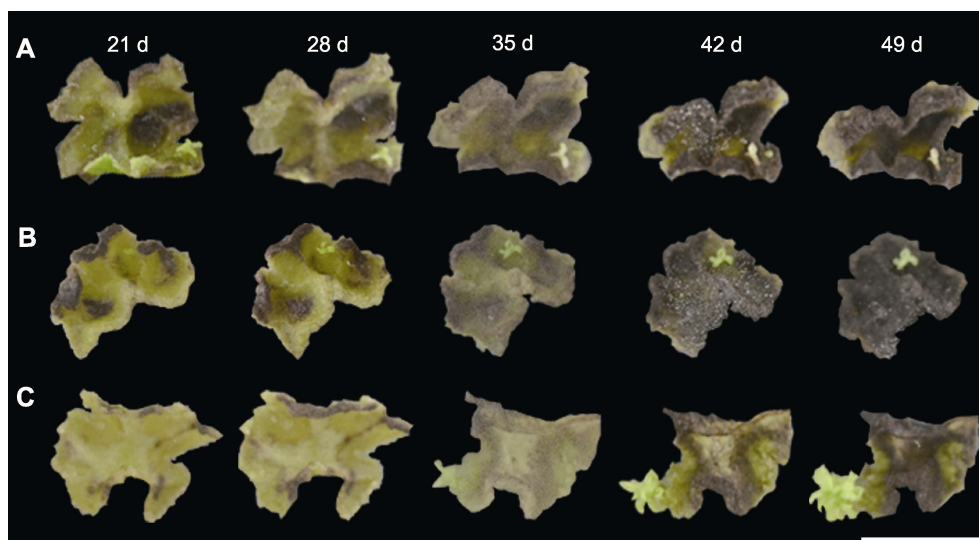


图4 平潭野菊叶盘在不同培养基中的不定芽分化

(A) Y3; (B) Y6; (C) Y9. Y3、Y6和Y9同表1。从左到右: 叶盘在不同培养基中培养21、28、35、42和49天的分化状态。Bar=1 cm

Figure 4 Adventitious bud differentiation for leaves of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan in different media

(A) Y3; (B) Y6; (C) Y9. Y3, Y6 and Y9 are the same as in Table 1. From left to right: Adventitious bud differentiation of leaves in different media at 21, 28, 35, 42 and 49 d. Bar=1 cm

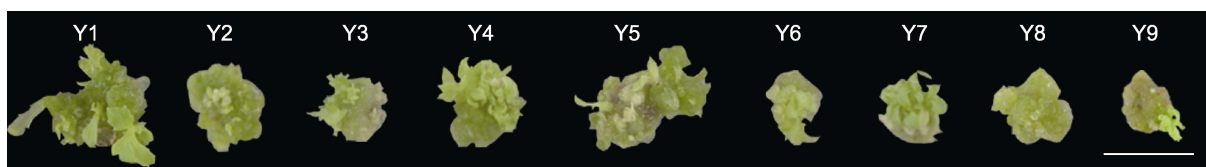


图5 平潭野菊茎间薄层在不同培养基中的不定芽分化状况(40天)

Y1–Y9同表1。Bar=1 cm

Figure 5 Adventitious bud differentiation of transverse thin cell layers of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan in different media (40 d)

Y1–Y9 are the same as in Table 1. Bar=1 cm

表6 平潭野菊不定芽的生根情况和植株状态

Table 6 Rooting and plant status of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan adventitious buds

Treat-ments	Time of rooting (d)	Rate of root-ing (%)	Average root length (cm)	The situation of root and plant	Number of branches
MS	6	66.7	12.59±2.60 a	The root system is dense, slender, and long; the plant is weak with branches and small leaves	3±1 a
1/2MS	6	100	5.49±0.86 b	The root system is sparse and slender; the plant is weak with many branches and small leaves	6±2 a
G1	14	100	4.41±0.80 b	The root system is crude and short, with many root hairs; the plant is weak with branches	4±2 a
G2	10	100	3.21±2.62 b	The root system is crude and short, with many root hairs; the plant is robust and higher, with larger leaves	2±1 a
G3	24	100	3.80±2.22 b	The root system is crude and short, with many root hairs; the plant is robust and highest, with largest leaves	2±1 a

MS、1/2MS、G1、G2和G3同表3。同列不同小写字母表示LSD检验差异显著($P<0.05$)。

MS, 1/2MS, G1, G2, and G3 are the same as in Table 3. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences by LSD test ($P<0.05$).

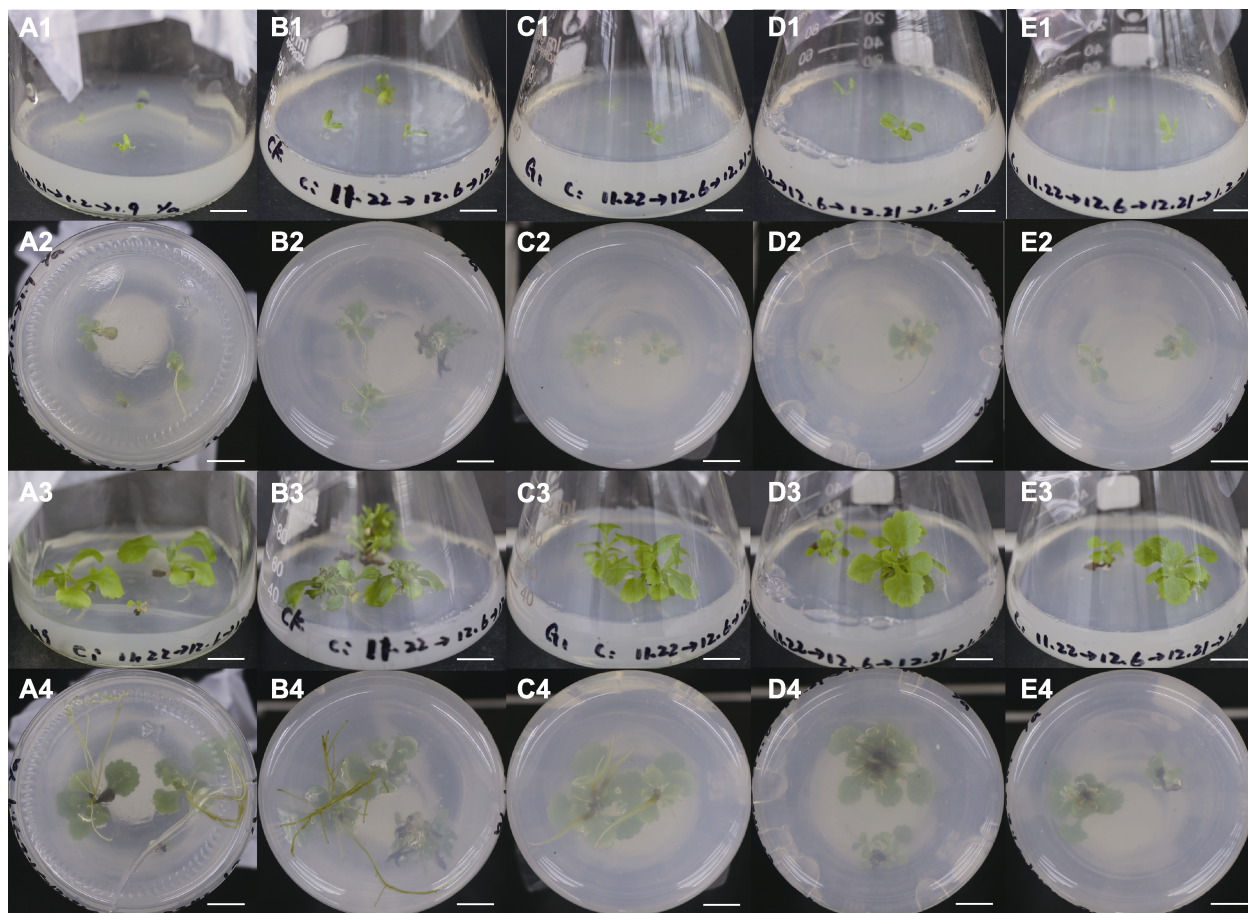


图6 平潭野菊不定芽的生根情况及植株状态

(A1)–(E1) 植株状态(0天); (A2)–(E2) 生根状态(10天); (A3)–(E3) 植株状态(26天); (A4)–(E4) 生根状态(26天)。从左至右分别为MS、1/2MS、G1、G2和G3(同表3)。Bars=1 cm

Figure 6 Rooting and plant status of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan adventitious buds

(A1)–(E1) Plant status (0 d); (A2)–(E2) Rooting condition (10 d); (A3)–(E3) Plant status (26 d); (A4)–(E4) Rooting condition (26 d). From left to right: MS, 1/2MS, G1, G2, and G3 (the same as in Table 3). Bars=1 cm

要素和菊花品种分类的重要依据(汤忠皓, 1963; 张树林, 1965; 许莹修, 2005; 刘倩倩, 2007; Song et al., 2018)。野菊作为栽培菊花近缘野生种, 与栽培菊花亲缘关系较近(戴思兰等, 1995, 1998; 周杰, 2009; Ma et al., 2016, 2020), 遗传背景相对简单, 可作为研究菊花的模式植物。目前, 花卉市场中切花菊的瓣型绝大多数为平瓣(徐晓帆, 2019), 切花菊的瓣型丰富程度远低于切花大菊和传统大菊。菊花新品种培育过程中, 在增加花色的同时也需注重花型和瓣型的改善(钟声远等, 2021)。传统的栽培方法和育种手段周期长, 而高效的再生和遗传转化体系是研究植物性状遗传机理和验证基因功能的重要基础。本研究以同一头状花序上具有平瓣、匙瓣和管瓣3种舌状花变异类

型的平潭野菊混合瓣型株系为实验材料, 建立了平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层再生体系, 为进一步建立平潭野菊混合瓣型株系遗传转化体系奠定了基础, 也为利用平潭野菊混合瓣型株系解析菊花瓣型变异机理提供了技术方法。

在菊科植物再生体系建立过程中, 大多数菊科植物以叶片为外植体建立再生体系的诱导效率最高(罗虹等, 2020), 但利用菊花近缘野生种的叶片诱导不定芽相对困难。前人对多种野生菊属植物叶片进行不定芽诱导, 其中仅那贺川野菊(*C. yoshinaganthum*)和矾菊(*Ajanía pacificum*)形成不定芽(晨卉等, 2009)。此外, 不同种质的叶盘再生能力存在很大差异, 神农架野菊(*C. indicum*)和武夷山野菊(*C. indicum*)叶盘再

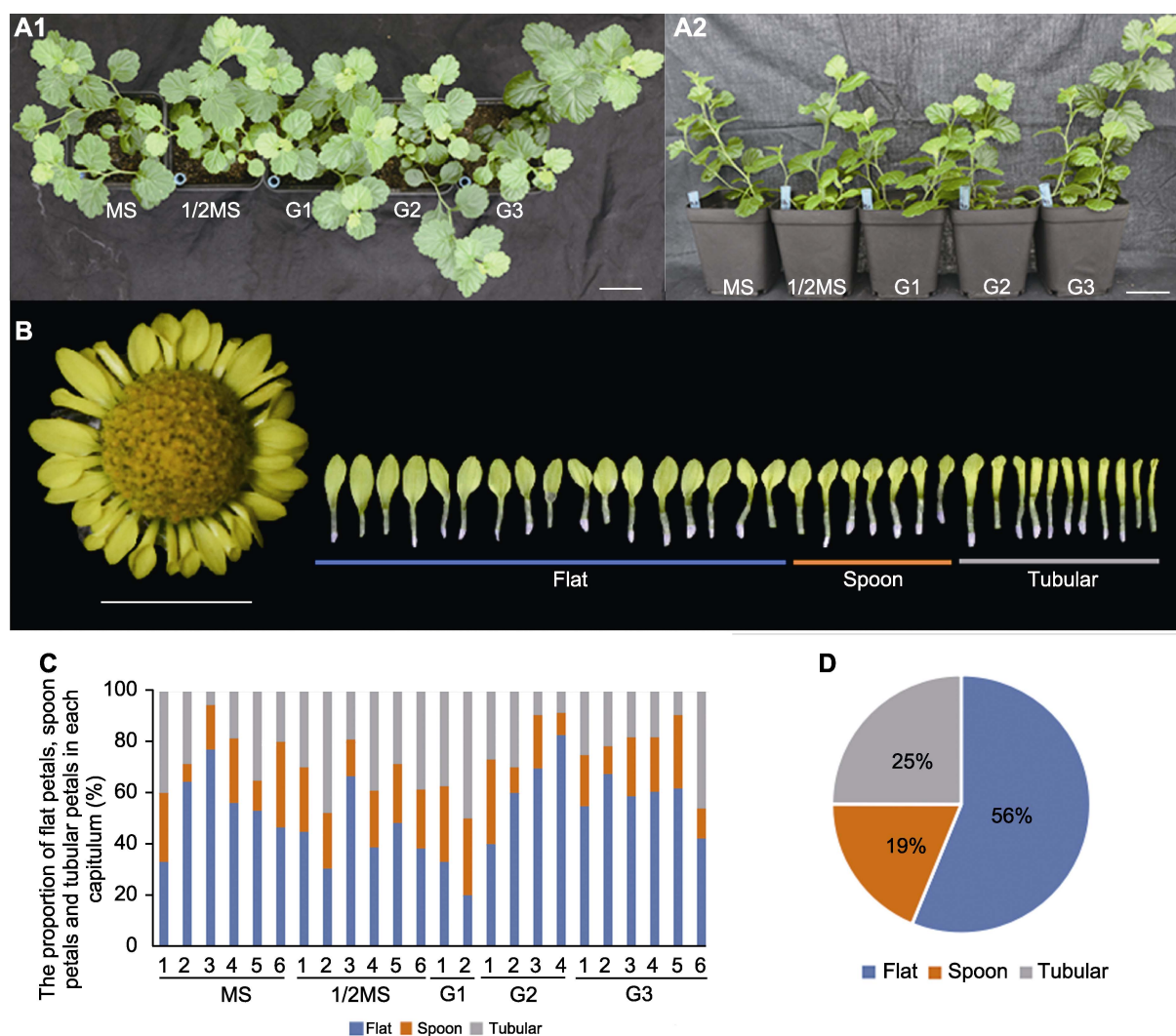


图7 平潭野菊再生植株头状花序及各瓣型占比

(A1), (A2) 移栽后60天生长状态, 从左到右生根培养基分别为MS、1/2MS、G1、G2和G3 (bars=3.5 cm); (B) 再生植株头状花序 (bar=1 cm); (C) 平瓣、匙瓣和管瓣在各头状花序舌状花中的占比; (D) 头状花序中各舌状花类型平均占比。MS、1/2MS、G1、G2和G3同表3。

Figure 7 The capitulum of regenerated plants and the proportion of each petal type in *Chrysanthemum indicum* in Pingtan (A1), (A2) Plant status after transplanting for 60 days, from left to right, their rooting media were MS, 1/2MS, G1, G2, and G3, respectively (bars=3.5 cm); (B) The capitulum of regenerated plants (bar=1 cm); (C) The proportion of flat petals, spoon petals and tubular petals in each capitulum; (D) Average proportion of each petal type in all capitulum. MS, 1/2MS, G1, G2, and G3 are the same as in Table 3.

生能力相对较强, 而云台山野菊(*C. indicum*)和天竺山野菊(*C. indicum*)叶盘在相同诱导培养基中只能形成黄绿色愈伤组织, 不能分化形成不定芽(曲晓慧, 2020)。在本研究中, 即使在前人已经尝试并成功获得不定芽的野菊叶盘诱导和分化培养基(Y1、Y2、Y4和Y5)(王想, 2018; 李娜, 2018)中, 平潭野菊混合瓣型株系的叶盘仍未分化, 仅在NAA浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时

(Y3、Y6和Y9组)(图4)有分化现象, 且不定芽分化率均低于10%(表4), 分化后未能形成健壮的不定芽。而平潭野菊混合瓣型株系的茎间薄层在不同浓度6-BA和NAA组合的培养基中不定芽分化率较高(表4), 说明对于平潭野菊混合瓣型株系, 茎间薄层比叶盘更适宜作为再生体系的外植体。

植物生长调节剂在菊科植物愈伤组织诱导和分

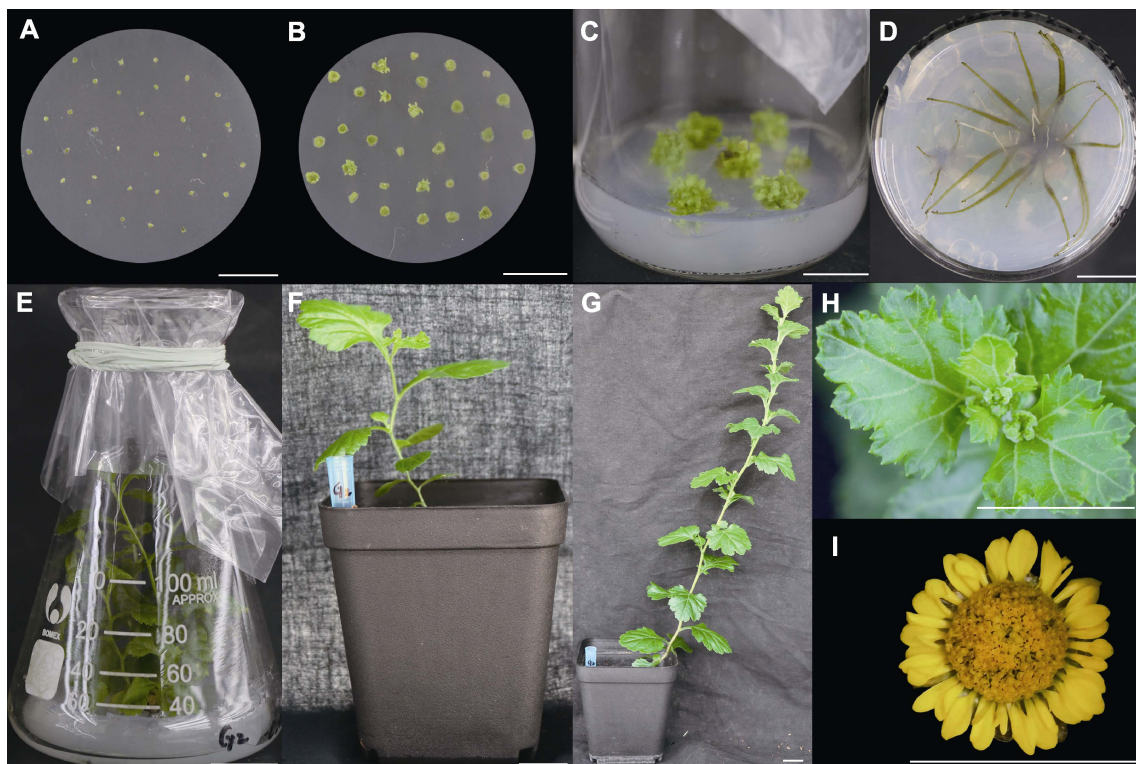


图8 平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层的再生体系

(A), (B) Y1培养基中愈伤组织诱导和不定芽分化; (C) 不定芽生长至0.8 cm; (D), (E) 不定芽在G2培养基中的根系和植株状态; (F), (G) 移栽30天和90天后的植株状态; (H) 现蕾; (I) 再生植株头状花序。Y1同表1; G2同表3。Bars=2 cm

Figure 8 Regeneration system of transverse thin cell layers in *Chrysanthemum indicum* in Pingtan stains with various ligulate floret forms

(A), (B) Callus induction and adventitious bud differentiation in Y1; (C) Adventitious buds grown to 0.8 cm; (D), (E) Rooting and plant status of adventitious buds in G2; (F), (G) Plant status after transplanting for 30 and 90 days; (H) Flower buds; (I) Capitulum of regenerated plant. Y1 is the same as in Table 1; G2 is the same as in Table 3. Bars=2 cm

化过程中发挥重要作用。通常选择6-BA和NAA组合用于愈伤组织诱导和不定芽分化培养基(晨卉等, 2009; 陈鹏彦, 2010; 李娜, 2018; 王想, 2018; 武晓云等, 2018; 曲晓慧, 2020; 任江珊等, 2021)。TDZ可用于多种植物外植体诱导愈伤组织和形成不定芽(徐晓峰和黄学林, 2003; 罗虹等, 2020)。在本研究中, 与空白对照相比, 6-BA和NAA组合有利于促进茎间薄层愈伤组织形成, 平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层在培养14天后愈伤组织诱导率均较高。在添加0.1–0.2 mg·L⁻¹ TDZ的培养基中, 叶盘愈伤组织形成时间缩短, 与罗虹等(2020)的研究结果一致。但添加TDZ后, 叶盘愈伤组织诱导率降低, 无分化迹象, 原因可能是TDZ通过单独或其它生长调节剂共同对植物细胞发挥作用(徐晓峰和黄学林, 2003)。TDZ浓度过高易

导致愈伤组织褐化(肖政, 2009), 且6-BA在野菊丛生芽的诱导中单独作用和其它植物生长调节剂组合作用的最适浓度不同(郑芳昊, 2012)。本研究中, 在MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ NAA中添加0.1或0.2 mg·L⁻¹ TDZ, 或在MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ NAA中添加0.4 mg·L⁻¹ TDZ均可延缓叶盘褐化, 而其它实验组褐化现象较严重(图3B; 表5), 说明在选择TDZ和6-BA的浓度时应考虑培养基中其它植物生长调节剂的浓度以及组合后的浓度。本研究中平潭野菊混合瓣型株系在MS培养基中可长出不定根, 但根系较细, 这与郑芳昊(2012)和李娜(2018)的实验结果一致。在1/2MS培养基中添加NAA对生根率无明显影响, 但植株状态明显优于不添加NAA的1/2MS培养基(图6), 这与李娜(2018)和周婷等(2019)的生根诱

导实验结果相似,但与罗虹等(2020)生根诱导中NAA抑制植株生长的实验结果不同。

综上,在平潭野菊混合瓣型株系再生过程中,NAA浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 且与6-BA组合时有利于叶盘的分化, $0.1\text{--}0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ有利于缩短叶盘愈伤组织形成时间。以茎间薄层为外植体时, $\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA是最佳诱导和分化培养基, $1/2\text{MS}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA是最佳生根培养基,再生植株头状花序仍为混合瓣型。本研究初步建立了平潭野菊混合瓣型株系茎间薄层再生体系,而叶盘再生体系还需通过提高不定芽分化率和生长速率来逐步完善。

参考文献

- 晨卉,王艳芳,陈素梅,刘思余,滕年军,兰伟,陈发棣 (2009). 五种菊花近缘植物组织培养研究. 南京农业大学学报 **32**, 30–35.
- 陈鹏彦 (2010). 朝鲜野菊再生系统建立的研究. 硕士学位论文. 大连: 辽宁师范大学. pp. 17–28.
- 戴思兰,陈俊愉,李文彬 (1998). 菊花起源的RAPD分析. 植物学报 **40**, 76–82.
- 戴思兰,钟杨,张晓艳 (1995). 中国菊属植物部分种的数量分类研究. 北京林业大学学报 **17**(4), 9–15.
- 付建新,张超,王翊,戴思兰 (2012). 甘菊下胚轴离体再生体系的建立. 北京林业大学学报 **34**, 91–96.
- 宫明雪 (2019). 野菊*CiMYB44*基因调控植株垂枝性状的研究. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学. pp. 27–33.
- 韩磊,吕鑫,张文静,杨小霁 (2009). 野菊花蕾的组培与快繁技术研究. 北方园艺 (5), 103–105.
- 韩正洲 (2017). 野菊资源研究与野菊花药材品质评价. 博士学位论文. 广州: 广州中医药大学. pp. 29–52.
- 李梦雨 (2020). 神农香菊*CiMYB4*基因抗旱性功能验证及RNAi载体构建. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学. pp. 22–31.
- 李娜 (2018). *ChiMYB*基因转化野菊的研究. 硕士学位论文. 佳木斯: 佳木斯大学. pp. 24–26.
- 李亚军,李悦,黄河,戴思兰 (2018). 切花菊‘粉贵人’高效再生体系的建立. 见: 中国观赏园艺研究进展2018. 北京: 中国林业出版社. pp. 427–434.
- 林镛,石铸,傅国勋 (1983). 中国植物志,第76卷第1分册. 北京: 科学出版社. pp. 29–42.
- 刘倩倩 (2007). 中国大菊品种形态分类及细胞学研究. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学. pp. 15–41.
- 罗虹,温小蕙,周圆圆,戴思兰 (2020). 芳香堆心菊离体再生体系的建立. 植物学报 **55**, 318–328.
- 马晓蓉 (2017). 大别山地区野菊野生资源调查及其活性成分研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学. pp. 31–37.
- 曲晓慧 (2020). 几种菊属野生植物再生体系的建立. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学. pp. 11–42.
- 任江珊,顾雪琪,蒲娅,黄河 (2021). 葫芦岛野菊舌状花再生体系建立. 现代园艺 **44**(24), 3–4, 7.
- 汤忠皓 (1963). 中国菊花品种分类的探讨. 园艺学报 **2**, 411–420.
- 汪劲武,杨继,李懋学 (1993). 野菊和甘菊的形态变异及其核型特征. 植物分类学报 **31**, 140–146.
- 王霁佳 (2019). 神农香菊*CiMYB4*基因的克隆及对野菊的遗传转化. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学. pp. 23–32.
- 王文奎,周春玲,戴思兰 (1999). 毛华菊花朵形态变异. 北京林业大学学报 **21**(3), 92–95.
- 王想 (2018). 神农香菊单萜合酶基因的克隆及对野菊的遗传转化. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学. pp. 34.
- 武晓云,温小蕙,马朝峰,戴思兰 (2018). 快速诱导甘菊叶片再生植株的方法. 见: 中国观赏园艺研究进展2018. 北京: 中国林业出版社. pp. 461–468.
- 吴志萍,高亦珂,范敏,高耀辉 (2020). 菊花‘金不凋’再生及遗传转化体系的构建. 分子植物育种 **18**, 150–158.
- 肖政 (2009). 菊花离体再生及根癌农杆菌介导*CBF1*基因遗传转化的研究. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学. pp. 16–19.
- 肖政,范崇辉,金万梅 (2009). 生长调节物质对菊花‘小金黄’叶片再生不定芽的影响. 西北林学院学报 **24**(6), 50–53.
- 徐晓帆 (2019). 切花菊叶、花形态多样性与关联性分析. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学. pp. 34–44.
- 徐晓峰,黄学林 (2003). TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报 **20**, 227–237.
- 许莹修 (2005). 菊花形态性状多样性和品种分类的研究. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学. pp. 23–36.
- 张树林 (1965). 菊花品种分类的研究. 园艺学报 **4**, 35–46.
- 张鲜艳,张飞,陈发棣,郭慧敏,陈素梅 (2011). 12份不同地理居群野菊的遗传多样性分析. 南京农业大学学报 **34**(3), 48–54.
- 郑芳昊 (2012). 野菊花种子质量标准与种苗繁育技术的研究. 硕士学位论文. 广州: 广州中医药大学. pp. 33–41.
- 钟声远,罗宇婷,赵勇,王振兴,管志勇,房伟民,陈发棣,王海滨 (2021). 切花菊品种资源表型多样性分析. 植物资源

与环境学报 30(5), 22–33.

周杰 (2009). 关于中国菊花起源问题的若干实验研究. 博士学位论文. 北京: 北京林业大学. pp. 31–36, 109–113.

周婷, 杨惠婷, 胡计红, 朱梦珠, 洪荣钦, 潘东明, 余文琴, 陈桂信 (2019). 单头切花菊‘白扇’组培快繁技术. 热带作物学报 40, 715–723.

Liu XW, Xia B, Purente N, Chen B, Zhou YW, He M (2021). Transgenic *Chrysanthemum indicum* overexpressing *cin-miR396a* exhibits altered plant development and reduced salt and drought tolerance. *Plant Physiol Biochem* 168, 17–26.

Ma YP, Chen MM, Wei JX, Zhao L, Liu PL, Dai SL, Wen J (2016). Origin of *Chrysanthemum* cultivars—evidence from nuclear low-copy *LFY* gene sequences. *Biochem*

Syst Ecol 65, 129–136.

Ma YP, Zhao L, Zhang WJ, Zhang YH, Xing X, Duan XX, Hu J, Harris AJ, Liu PL, Dai SL, Wen J (2020). Origins of cultivars of *Chrysanthemum*—evidence from the chloroplast genome and nuclear *LFY* gene. *J Syst Evol* 58, 925–944.

Song XB, Gao K, Fan GX, Zhao XG, Liu ZL, Dai SL (2018). Quantitative classification of the morphological traits of ray florets in large-flowered *Chrysanthemum*. *HortScience* 53, 1258–1265.

Song XB, Xu YH, Gao K, Fan GX, Zhang F, Deng CY, Dai SL, Huang H, Xin HG, Li YY (2020). High-density genetic map construction and identification of loci controlling flower-type traits in *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.). *Hortic Res* 7, 108.

Establishment of Regeneration System of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan with Various Ligulate Floret Form

Minling Liao¹, Ya Pu¹, Xiaoyun Wu¹, Chaofeng Ma¹, Wenkui Wang², Silan Dai^{1*}

¹Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design; Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing Key Laboratory of Flower Germplasm Innovation and Molecular Breeding, National Flower Engineering Technology Research Center, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

²Fuzhou Planning Design and Research Institute Group Co. Ltd., Fuzhou 350108, China

Abstract Asteraceae plants have high ornamental value due to their rich petal variation in ray florets. *Chrysanthemum indicum* is a wild species and closely related to *C. × morifolium*. Ray florets mutants of *C. indicum* in natural populations, such as flat, spoon and tubular types, are excellent material for studying petal shapes. However, there is currently a lack of research on its regeneration system. In this experiment, considerable ray floret mutants of *C. indicum* were found on Pingtan Island, Fujian province, including the plants with flat, spoon and tubular types of ray florets coexisting in the same capitulum, in which leaves and transverse thin cell layers (tTCLs) were used as explants to establish a regeneration system. The results showed that the best medium for callus induction and adventitious bud differentiation of tTCLs was MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA, and the induction rate was 100% on the 14th day. The average differentiation time was 25 days, and the differentiation rate reached 82% on the 40th day. The best rooting medium was 1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA, and the rooting time was 10 days. All of the rooted and regenerated seedlings were survived after transplanting and kept the mix type in capitulum. An efficient regeneration system for *C. indicum* in Pingtan with various ray floret forms was established in this experiment. The results not only laid the foundation for the establishment of a transformation system but also provided technology for future research on the morphological variation in ray florets.

Key words *Chrysanthemum indicum*, plant growth regulator, regeneration system, stains with various ligulate floret form, transverse thin cell layer

Liao ML, Pu Y, Wu XY, Ma CF, Wang WK, Dai SL (2023). Establishment of regeneration system of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan with various ligulate floret form. *Chin Bull Bot* 58, 449–460.

* Author for correspondence. E-mail: silandai@sina.com

(责任编辑: 白羽红)