

## 菊花品种‘万代风光’再生及遗传转化体系的建立

李晶晶<sup>#</sup>, 李艳飞<sup>#</sup>, 王安琪, 王佳颖, 邓成燕, 卢敏, 马剑英, 戴思兰<sup>\*</sup>

北京林业大学园林学院, 城乡生态环境北京实验室, 花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083

**摘要** 菊花品种‘万代风光’(*Chrysanthemum × morifolium* ‘Wandai Fengguang’)的色素背景适宜利用分子育种技术调控花瓣铁离子浓度而培育蓝色花, 且其在夏秋两季均可开花, 也是研究菊花开花期分子调控机理的重要材料, 但缺少高效的再生体系和遗传转化体系。本研究以该品种为试验材料, 研究不同外植体类型和不同植物生长调节剂组合对其再生的影响, 并探究农杆菌介导的遗传转化方法中相关因素对遗传转化效率的影响。研究结果表明: 适宜‘万代风光’再生的最适外植体为茎间薄层, 最适培养基为 MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 分化率为 70.06%, 不定芽生成系数为 3.37; 经过试验确定: 茎间薄层分化和不定芽生根的卡那霉素选择压分别为 7.5 mg·L<sup>-1</sup> 和 5.0 mg·L<sup>-1</sup>。预培养 1 天, OD<sub>600</sub>=0.8, 处理 5 分钟, 黑暗共培养 3 天为遗传转化处理的最佳体系。经过卡那霉素筛选共获得抗性苗 15 株, PCR 鉴定发现 2 株阳性苗, 转化效率为 13.33%。本研究为利用这一独特品种资源解析菊花基因功能和进行定向改良的分子育种奠定了基础, 为其它菊花品种的再生和转化体系的建立提供了参考。

**关键词** 菊花, 外植体, 遗传转化体系, 再生体系, 茎间薄层

菊花(*Chrysanthemum × morifolium*)原产中国, 距今已有三千多年的栽培历史, 是中国传统十大名花和世界四大切花之一。菊花栽培品种多样, 花色花型丰富, 但在天然菊花品种类群中, 并未找到蓝色菊花品种, 因此培育蓝色菊花始终是育种家追求的目标(洪艳, 2012; 戴思兰和洪艳, 2016)。基因工程技术的发展使育种研究可以突破物种遗传背景限制, 为培育蓝色花提供了可能。目前, 通过重建飞燕草素(Delphinidin, Dp)途径已成功培育出蓝色菊花, 但花色多呈现蓝紫色且蓝色饱和度较低, 需要进一步改良(Brugliera et al., 2013; Huang et al., 2013; Noda et al., 2013; Noda et al., 2017; Han et al., 2021)。

除了飞燕草素途径外, 矢车菊素(Cyanidin, Cy)途径也是花瓣呈现蓝色的重要机制, 矢车菊(*Centaurea cyanus*)和大花绿绒蒿(*Meconopsis grandis*)等均能基于矢车菊素途径产生靓丽的蓝色花朵, 这一过程中铁离子的参与至关重要(Takeda et al., 1996; Tanaka et al., 2001; Shiono et al., 2005; Takeda et al., 2005)。在基于 Dp 途径的郁金香(*Tulipa gesneriana*)花瓣中瞬时表达 *TgVIT1* 基因可以提高液泡中的铁离子浓度, 从而将紫色细胞转化为蓝色细胞(Shoji et al., 2007; Momonoi et al., 2009; Shoji et al., 2010)。同样, 在基于 Cy 途径的蓝色矢车菊中, 液泡铁离子转运蛋白 CcVIT 的氨基酸替换会导致蓝色花转变为紫色(Yoshida et al., 2013)。Li 等(2024)发现, 菊花品种‘万代风光’的总黄酮提取液在加入适当浓度铁离子时可以变为蓝色, 其活体花瓣细胞也能够参与下变蓝, 证明了基于矢车菊素途径培育蓝色菊花的可行性。同时, ‘万代风光’在夏季和秋季均能开花, 开花早且花期长, 也是研究菊花开花期的重要材料。因此, 为了培育蓝色菊花和实现花期的定向改良, 建立菊花品种‘万代风光’高效且稳定的再生及遗传转化体系尤为重要。

在菊花再生体系建立中, 常以叶片(姜宁宁等, 2012; Naing et al., 2016; 李亚军等, 2018; 滕如萍等, 2021)、茎间薄层(Lim et al., 2012; 李亚军等, 2018)、叶柄(韩科厅, 2010)、花瓣等(Song et al., 2011; 魏曼曼等, 2014)为外植体, 在培养基中添加适量的细胞分裂素和生长素类植物生长调节剂, 诱导愈伤组织形成和不定芽分化。在菊花遗传转化体系建立中, 叶片是最常用的外植体, 许志茹等(2013)以露地菊品种‘神韵’(*C. × morifolium* ‘Shenyun’)叶片为外植体材料, 成功将 *BrDFR* 基因转入其体内; 赵静雅等(2019)以叶片为外植体, 建立了匍匐型地被菊‘雨花落英’(*C. × morifolium* ‘Yuhua Luoying’)的高效遗传转化体系; 吴志苹

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 32171849, 32371948), 福建省科技计划项目(No.2022S0004)。

<sup>#</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup> 通讯作者。E-mail: silandai@sina.com

等(2020)利用叶片为外植体,建立了日中性菊花‘金不凋’(*C. ×morifolium* ‘Jinbudiao’)的再生及遗传转化体系,转基因阳性苗频率为 2.5%。但栽培菊花遗传背景复杂,品种变异丰富,再生及遗传转化体系不具有通用性,本项研究前期利用‘万代风光’叶片作为外植体,利用已报道的菊花再生最优培养基,始终无法获得较好的再生效果。本研究通过对外植体类型、植物生长调节剂种类及浓度等因素进行试验,建立了菊花‘万代风光’的再生体系,并成功将外源基因导入。这一研究结果为在该品种中实现转基因育种和相关基因功能解析奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及培养环境

本研究所用的植物材料为小菊品种‘万代风光’,种植于北京市绿地养护管理事务中心。用于无菌苗培养的组培间环境为:温度 20-22 ℃,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。

### 1.2 无菌苗获取

取生长健壮的‘万代风光’插穗,去除叶片,保留顶芽,在含有洗洁精的水中浸泡 30 分钟,随后放入带纱布的广口瓶,流水冲洗 40 分钟;在超净工作台中用 75%的乙醇溶液浸泡 30 秒,无菌水冲洗两次,随后用 2%的次氯酸钠溶液洗涤 6 分钟,不停晃动洗涤瓶,使插穗充分消毒,无菌水冲洗 6 次。将插穗基部平剪,插入 MS 培养基中,培养 20 天后获得无菌苗,即可正常继代培养。

### 1.3 愈伤组织诱导和不定芽分化

选取长势良好的组培苗,以叶片为外植体时,取植株上部的幼嫩叶片,剪成 0.5×0.5 cm 的叶盘,正面轻划两个切口,平铺于培养基上。以叶柄为外植体时,选取无菌苗中上部叶片的叶柄,每段切 0.15 cm 左右。以茎间薄层为外植体时,取植株茎尖下 1-3 节茎段,切成 0.1 cm 的薄层,平放于培养基上。

选择 6-BA 和 KT 为主要细胞分裂素类植物生长调节剂, NAA 和 2,4-D 为主要生长素类植物生长调节剂,共设置四种植物生长调节剂组合,每种组合中设置三种不同浓度配比,共计 12 种培养基(表 1)。每个处理接种 16-20 个外植体,重复三次。培养 35 天后统计分化率和不定芽生成系数。

表 1 愈伤组织诱导及不定芽分化培养基配方  
Table 1 Culture medium for callus induction and adventitious bud differentiation

Medium No.	6-BA(mg·L <sup>-1</sup> )	KT(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA(mg·L <sup>-1</sup> )	2,4-D(mg·L <sup>-1</sup> )
A1	1.5	0.0	0.2	0.0
A2	1.5	0.0	0.4	0.0
A3	1.5	0.0	0.6	0.0
A4	1.5	0.0	0.0	0.2
A5	1.5	0.0	0.0	0.4
A6	1.5	0.0	0.0	0.6
A7	0.0	1.5	0.2	0.0
A8	0.0	1.5	0.4	0.0
A9	0.0	1.5	0.6	0.0
A10	0.0	1.5	0.0	0.2
A11	0.0	1.5	0.0	0.4
A12	0.0	1.5	0.0	0.6

### 1.4 卡那霉素浓度筛选

将茎间薄层分别接种于含有 0、2.5、5、7.5、10、15 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素(Kanamycin, Kan)的 A3 培养基中,共 6 种 Kan 浓度,每种浓度设三次重复,每次重复接种 16 个茎间薄层,培养 35 天后统计外植体出愈率、分化率,筛选出能够有效抑制外植体分化的 Kan 浓度。取最适分化培养基中长出的不定芽,分别接种于含有 0、3、5、7.5、10、12 mg·L<sup>-1</sup> Kan 的 MS 培养基中,每个浓度接种 4 个不定芽,重复 4 次,培养 35 天后统计不定芽生根率,筛选出能够抑制不定芽生根的最适 Kan 浓度。

1.5 工程菌液的制备

从-80℃冰箱中取出含有植物表达载体 pBI121 的 GV3101 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌液(图 1), 冰上解冻后, 在超净工作台中用无菌小枪头蘸取少量菌液, 在含有 50 mg·L<sup>-1</sup> Kan 和 50 mg·L<sup>-1</sup> 利福平(Rifampicin, Rif)的 LB 培养基上划线, 然后置于 28℃培养箱倒置培养 2 天至出现单克隆菌斑。用无菌小枪头挑取单菌落, 接种到含有 Kan 和 Rif 的液体 LB 培养基中, 置于 28℃摇床中震荡培养直至菌液变浑浊。通过菌液 PCR 检测农杆菌中是否含有矢车菊液泡铁离子转运蛋白基因 *CcVIT*, 将含有目的基因的农杆菌以 1:100 比例进行扩大培养, 在高速离心机中以 2800 xg 离心 10 分钟后收集菌体, 用 MS 培养液重悬。

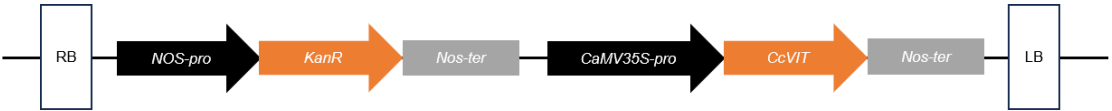


图 1 植物表达载体 pBI121 的结构图  
RB: T-DNA 区段右边界; NOS-pro, 农杆菌胭脂碱合成酶基因启动子; KanR, 卡那霉素抗性筛选标记基因; NOS-ter, 农杆菌胭脂碱合成酶基因终止子; CaMV35S-pro, 花椰菜花叶病毒 35S 启动子; CcVIT, 矢车菊液泡铁离子转运蛋白基因; LB, T-DNA 区段左边界

Figure 1 The structure of plant expression vector pBI121  
RB: Right border of T-DNA region; NOS-pro, *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene promoter; KanR, Kanamycin resistance screening marker gene; NOS-ter, *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene terminator; CaMV35S-pro, Cauliflower mosaic virus 35S promoter; CcVIT, *Centaurea cyanus* vacuolar iron transport protein gene; LB, Left border of T-DNA region.

1.6 遗传转化体系筛选

设计正交实验对影响遗传转化的因素进行筛选, 包括预培养时间、菌液浓度、侵染时间、共培养时间(表 2)。共计 9 个处理, 每处理设置三次重复, 每个重复约 10-13 个茎间薄层, 培养 30 天后统计出愈率、分化率、不定芽生成系数、褐化率。

预培养时间: 将茎间薄层置于 A3 培养基上进行预培养, 预培养时间分别设置为 2 天、1 天和 0 天。

侵染条件: 用 MS 培养液重悬农杆菌菌液, 用紫外分光光度计测定浓度, 调节 OD<sub>600</sub> 值分别为 0.6、0.8 和 1.0。将预培养处理后的茎间薄层置于农杆菌菌液中进行侵染, 侵染时间分别为 5、10、15 分钟, 期间不断晃动容器, 使菌液和外植体充分接触。

共培养时间: 侵染结束后, 用滤纸吸去多余菌液, 将外植体置于最佳再生培养基中, 遮光共培养 1、2、3 天后用 400 mg·L<sup>-1</sup> 羧苄溶液冲洗 10 分钟, 无菌水冲洗 3 分钟, 用无菌滤纸吸干水分, 置于含有 Kan 和 400 mg·L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素的 A3 培养基上。

表 2 ‘万代风光’遗传转化体系筛选正交实验表  
Table 2 Orthogonal experimental table for screening of genetic transformation system of ‘Wandai Fengguang’

Treatments	pre-culture time(d)	Concentration of Agrobacterium(OD <sub>600</sub> )	Infection time(min)	co-culture time(d)
1	0	0.6	5	1
2	0	0.8	10	2
3	0	1	15	3
4	1	0.6	10	3
5	1	0.8	15	1
6	1	1	5	2
7	2	0.6	15	2
8	2	0.8	5	3
9	2	1	10	1

1.7 转基因菊花检测

取 50 mg 叶片, 采用 Edwards 法提取基因组 DNA(郭兆奎等, 1999)。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 用引物 35 S-F(序列为: GGAAAAGGAAGGTGGCTCCT)和 CcVIT-R(ATAAGGGACTGACCACCCGGGCTAGCCTTGACACGACCTTC)对矢车菊液泡铁离子转

运蛋白基因 *CcVIT* 进行 PCR 检测。以 ddH<sub>2</sub>O、野生型植株 DNA 和质粒分别作为空白对照、阴性对照以及阳性对照模板。PCR 体系为: DNA 模板 2  $\mu$ L, 上引物 1  $\mu$ L, 下引物 1  $\mu$ L, PCR mix 10  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序为 95  $^{\circ}$ C 5 分钟; 95  $^{\circ}$ C 15 秒, 58  $^{\circ}$ C 15 秒, 72  $^{\circ}$ C 15 秒, 34 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 分钟。

### 1.8 数据统计与分析

统计指标计算方法如下: 出愈率=(形成愈伤的外植体数/总外植体数) $\times$ 100%; 分化率=(分化出不定芽的外植体数/总外植体数) $\times$ 100%; 不定芽生成系数=分化出的不定芽总数/分化出不定芽的外植体数; 生根率=(生根的不定芽数量/接种的不定芽数量) $\times$ 100%; 褐化率=(褐化的外植体数/总外植体数) $\times$ 100%; 转化效率=(阳性苗数量/抗性苗数量) $\times$ 100%(阳淑金等, 2015; 贾红梅等, 2017; 赵静雅等, 2019; 何珊, 2020)。

用 Excel 和 SPSS 对数据进行单因素方差分析, 用 Duncan's 多重比较法进行差异显著性分析, 用极差分析比较影响指标的主导因素。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体类型对再生的影响

分别选取菊花‘万代风光’的叶片、叶柄和茎间薄层作为外植体(图 2), 设置 12 种不同植物生长调节剂组合的分化培养基, 培养 35 天后统计分化率和不定芽生成系数。如表 3 和图 2 所示, 叶片在培养 14 天时开始形成愈伤组织, 28 天后不定芽开始分化, 但仅能在 A8、A9 和 A10 培养基中分化, 且最高分化率只有 19.44%。叶柄为外植体时, 培养 12 天时逐渐形成愈伤组织, 培养 24 天时不定芽开始分化, 但只能在 A1、A7、A9 和 A12 培养基中分化, 其中在 A1 培养基中分化效果最好, 分化率达到 57.32%, 不定芽生成系数为 1.85。以茎间薄层为外植体, 培养 8 天可形成愈伤组织, 培养 18 天左右不定芽开始分化, 除 A4 和 A6 培养基外, 在其余 10 种培养基中均能正常分化, 分化率最高可达 70.06%, 不定芽生成系数为 3.37。综上所述, 以茎间薄层为外植体时, 愈伤组织形成和不定芽分化所需时间最短, 分化率和不定芽系数最高, 因此菊花品种‘万代风光’再生体系建立的最适外植体为茎间薄层, 其次为叶柄, 叶片不适合作为该品种再生的外植体。

表 3 不同植物生长调节剂组合对‘万代风光’不同外植体再生的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulators combinations on the regeneration of different explants of 'Wandai Fengguang'

Medium No.	Leaf		Petioles		transverse thin cell layers	
	Differentiation rate(%)	Coefficient of adventitious bud production	Differentiation rate(%)	Coefficient of adventitious bud production	Differentiation rate(%)	Coefficient of adventitious bud production
A1	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	57.32 $\pm$ 6.87a	1.85 $\pm$ 0.29a	36.51 $\pm$ 5.50c	3.37 $\pm$ 0.28a
A2	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00c	42.79 $\pm$ 4.28b	2.53 $\pm$ 0.32b
A3	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00c	70.06 $\pm$ 2.84a	3.37 $\pm$ 0.22a
A4	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00f	0.00 $\pm$ 0.00g
A5	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00c	9.79 $\pm$ 2.29e	1.11 $\pm$ 0.19ef
A6	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00f	0.00 $\pm$ 0.00g
A7	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	36.35 $\pm$ 3.38b	1.62 $\pm$ 0.60a	45.93 $\pm$ 1.28b	1.51 $\pm$ 0.31d
A8	8.59 $\pm$ 0.44b	1.00 $\pm$ 0.00b	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00c	41.95 $\pm$ 1.88b	1.62 $\pm$ 0.21d
A9	19.44 $\pm$ 4.81a	1.28 $\pm$ 0.25a	22.56 $\pm$ 4.55c	1.11 $\pm$ 0.19b	46.3 $\pm$ 3.21b	2.73 $\pm$ 0.22b
A10	8.33 $\pm$ 0.00b	1.00 $\pm$ 0.00b	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00c	31.31 $\pm$ 3.50c	1.44 $\pm$ 0.27de
A11	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00c	16.67 $\pm$ 0.00d	1.00 $\pm$ 0.00f
A12	0.00 $\pm$ 0.00c	0.00 $\pm$ 0.00c	8.33 $\pm$ 0.00d	1.00 $\pm$ 0.00b	34.98 $\pm$ 3.90c	2.07 $\pm$ 0.12c

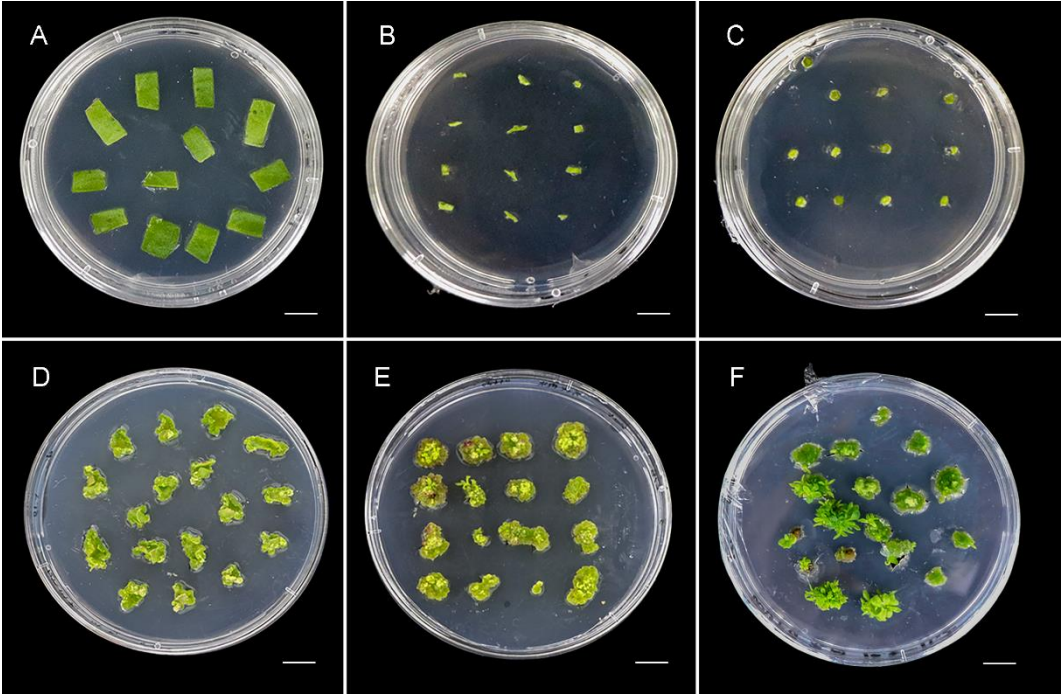
A1-A12 同表 1。同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。

A1-A12 are the same as Table 1. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

### 2.2 植物生长调节剂对‘万代风光’再生的影响

在 6-BA 和 NAA 植物生长调节剂组合(A1~A3)中, 叶柄和茎间薄层均能正常分化且能获得最好的分化效果, 其中叶柄分化的最佳培养基为 A1(MS+1.5 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> NAA), 茎间薄层最适分化培养基为 A3(MS+1.5 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 6-BA+0.6 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> NAA), 而叶片在此组合中

并不能正常分化,说明不同外植体分化所需要的植物生长调节剂浓度不同。在 6-BA 和 2,4-D 组合(A4~A6)中叶片和叶柄均不能正常分化,只有茎间薄层能够在 A5 培养基中正常分化,分化率仅为9.79%。叶片、叶柄和茎间薄层均可以在 KT、NAA(A7~A9)和 KT、2,4-D(A10~A12)两种植物生长调节剂组合中正常分化,且三种外植体均在 KT、NAA 的组合中分化效果更好,说明再生过程中添加 NAA 的效果优于 2,4-D。综上,在菊花‘万代风光’再生体系建立中,6-BA 和 NAA 组合是最佳植物生长调节剂组合,适合‘万代风光’的叶柄和茎间薄层分化;其次为 KT 和 NAA 的组合,适合其叶片分化;6-BA 和 2,4-D 组合的再生效果最差。



**图 2** 菊花‘万代风光’不同外植体的再生情况  
(A-B) 叶片、叶柄、茎间薄层在 A7 培养基中培养 0 天的状态; (D-F) 叶片、叶柄、茎间薄层在 A7 培养基中培养 35 天的再生情况。Bars=1 cm  
**Figure 2** Regeneration of different explants of ‘Wandai Fengguang’  
(A-B) State of leaf, petioles, transverse thin cell layers cultured in A7 medium for 0 days;  
(D-F) Regeneration of leaf, petioles, transverse thin cell layers cultured in A7 medium for 35 days.  
Bars=1 cm

### 2.3 卡那霉素对再生的影响

Kan 为转基因常用的标记抗生素,对受体材料进行 Kan 测试有利于抗性植株的筛选。结果显示,在不含 Kan 的对照培养基中,茎间薄层形成绿色膨大的愈伤组织,正常分化出不定芽。随着 Kan 浓度增加,愈伤组织组织诱导率和分化率逐渐降低,茎间薄层逐渐呈现白色,生长异常。当 Kan 浓度为 7.5 mg·L<sup>-1</sup> 时,不定芽再生完全被抑制,因此选择 7.5 mg·L<sup>-1</sup> Kan 作为‘万代风光’茎间薄层的临界抗性选择压(表 4, 图 3)。

在不含 Kan 的 MS 培养基中,不定芽生长健壮,根系粗壮数量多。随着 Kan 浓度逐渐增加,不定芽生根数量显著减少,当 Kan 浓度达 5 mg·L<sup>-1</sup> 及以上时,不定芽生根完全被抑制,植株出现褐化,当 Kan 浓度达 7.5 mg·L<sup>-1</sup> 及以上时植株出现白化现象,因此选择 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 作为‘万代风光’不定芽生根的 Kan 临界抗性选择压(表 5, 图 4)。

**表 4** 卡那霉素对‘万代风光’茎间薄层分化的影响  
**Table 4** Effect of Kan on transverse thin cell layers of ‘Wandai Fengguang’

Concentration of Kan(mg·L <sup>-1</sup> )	Callus formation rate(%)	Differentiation rate(%)
0	97.22±4.81ab	69.44±12.73a
2.5	100.00±0.00a	16.67±8.34b
5	80.44±4.72bc	5.56±4.81bc
7.5	63.89±12.73cd	0.00±0.00c



10	50.00±8.33de	0.00±0.00c
15	33.33±16.67e	0.00±0.00c

同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

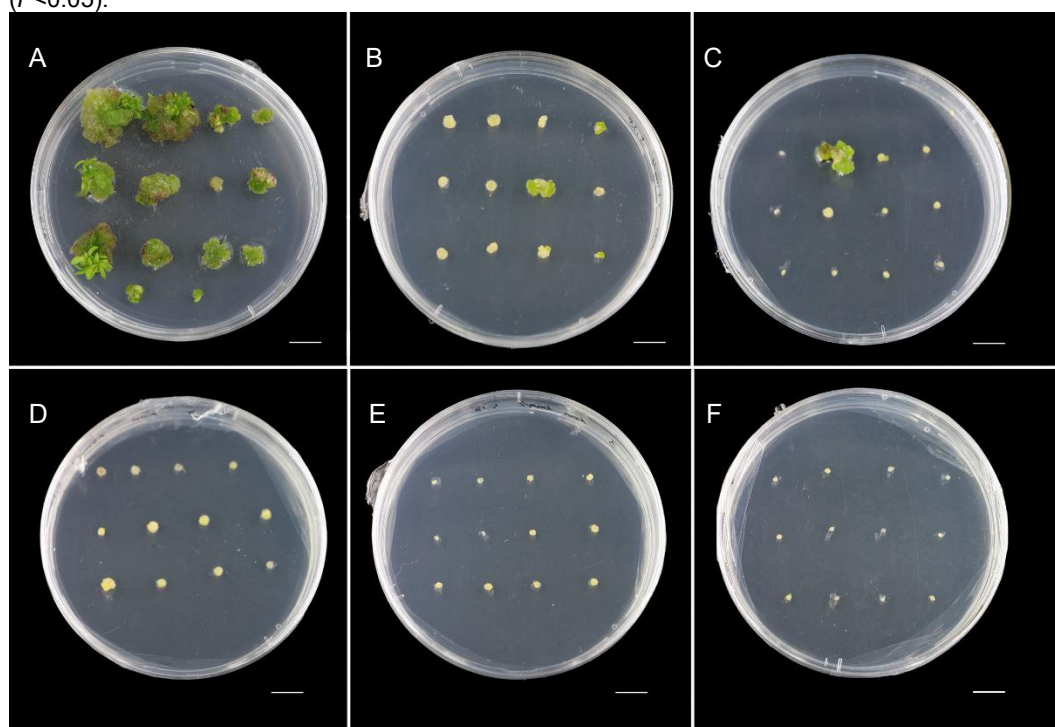


图 3 卡那霉素对‘万代风光’茎间薄层分化的影响

(A-E) 茎间薄层在含有 0、2.5、5、7.5、10、15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Kan 的 A3 培养基中的生长情况。Bars=1 cm

Figure 3 Effect of Kan on transverse thin cell layers of 'Wandai Fengguang'

(A-E) Growth of transverse thin cell layers in A3 culture medium containing 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Kan. Bars = 1 cm

表 5 卡那霉素对‘万代风光’不定芽生根的影响

Table 5 Effect of Kan on rooting of adventitious bud of 'Wandai Fengguang'

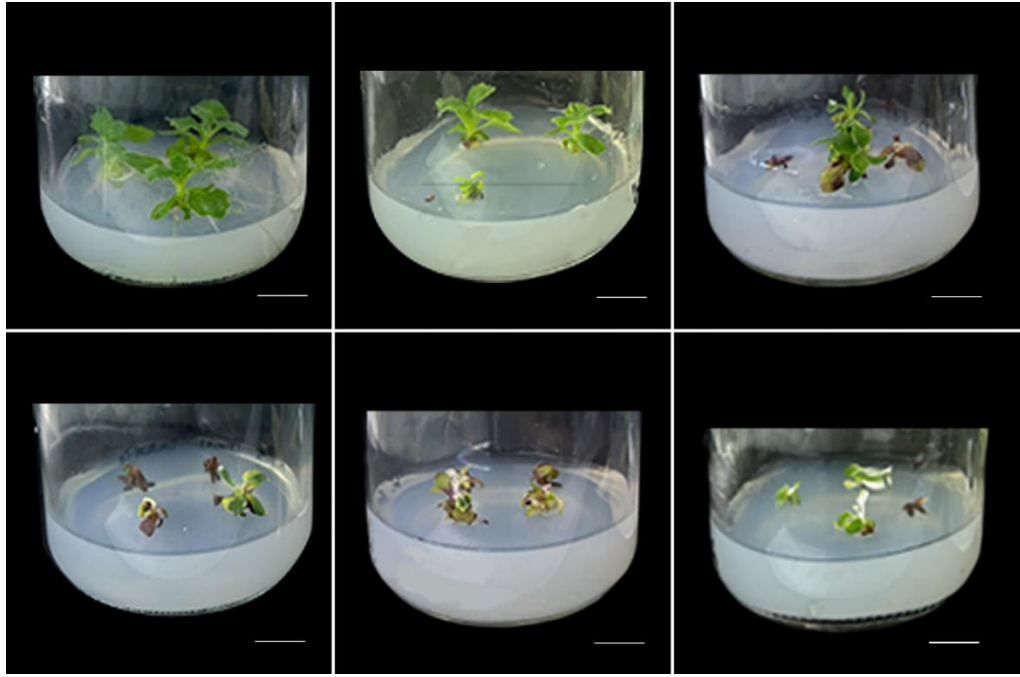
Concentration of Kan( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Rooting rate(%)	Average number of roots
0	88.89±19.25a	3.56±1.02a
3	30.44±4.72b	0.50±0.17b
5	0.00±0.00c	0.00±0.00b
7.5	0.00±0.00c	0.00±0.00b
10	0.00±0.00c	0.00±0.00b
12	0.00±0.00c	0.00±0.00b

同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

## 2.4 ‘万代风光’遗传转化体系建立

预培养时间、菌液浓度、侵染时间和共培养时间是影响植物遗传转化的重要因素，设置正交实验进行筛选，培养 30 天后统计出愈率、分化率、不定芽生成系数和褐化率，结果如表 6 和图 5。



**图 4** 卡那霉素对‘万代风光’不定芽生根的影响

**(A-F)** 不定芽在含有 0、3、5、7.5、10、12 mg·L<sup>-1</sup> Kan 的 MS 培养基中的生根情况。Bars=1 cm

Figure 4 Effect of Kan on rooting of adventitious bud of 'Wandai Fengguang'

**(A-F)** Rooting of adventitious buds in MS culture medium containing 0, 3, 5, 7.5, 10, and 12 mg·L<sup>-1</sup> Kan. Bars = 1 cm.

**表 6** 不同转化条件对‘万代风光’抗性芽生长的影响

**Table 6** Effect of different transformation conditions on the growth of resistant buds of 'Wandai Fengguang'

Treatments	Callus formation rate(%)	Differentiation rate(%)	Coefficient of adventitious bud production	Browning rate(%)
1	80.91±10.48bc	3.33±5.77c	0.33±0.58b	0.00±0.00c
2	94.84±4.51a	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c
3	86.96±5.54b	1.85±3.21c	0.33±0.58b	0.00±0.00c
4	71.11±7.70cd	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c
5	79.55±9.91bc	8.84±0.44bc	1.33±0.58a	0.00±0.00c
6	64.07±7.56d	14.44±6.76ab	1.83±1.04a	28.52±5.70a
7	81.85±3.61bc	0.00±0.00c	0.00±0.00b	18.15±3.61b
8	95.96±3.51a	21.00±9.78a	1.38±0.40a	0.00±0.00c
9	96.08±6.79a	1.96±3.40c	0.33±0.58b	0.00±0.00c

同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

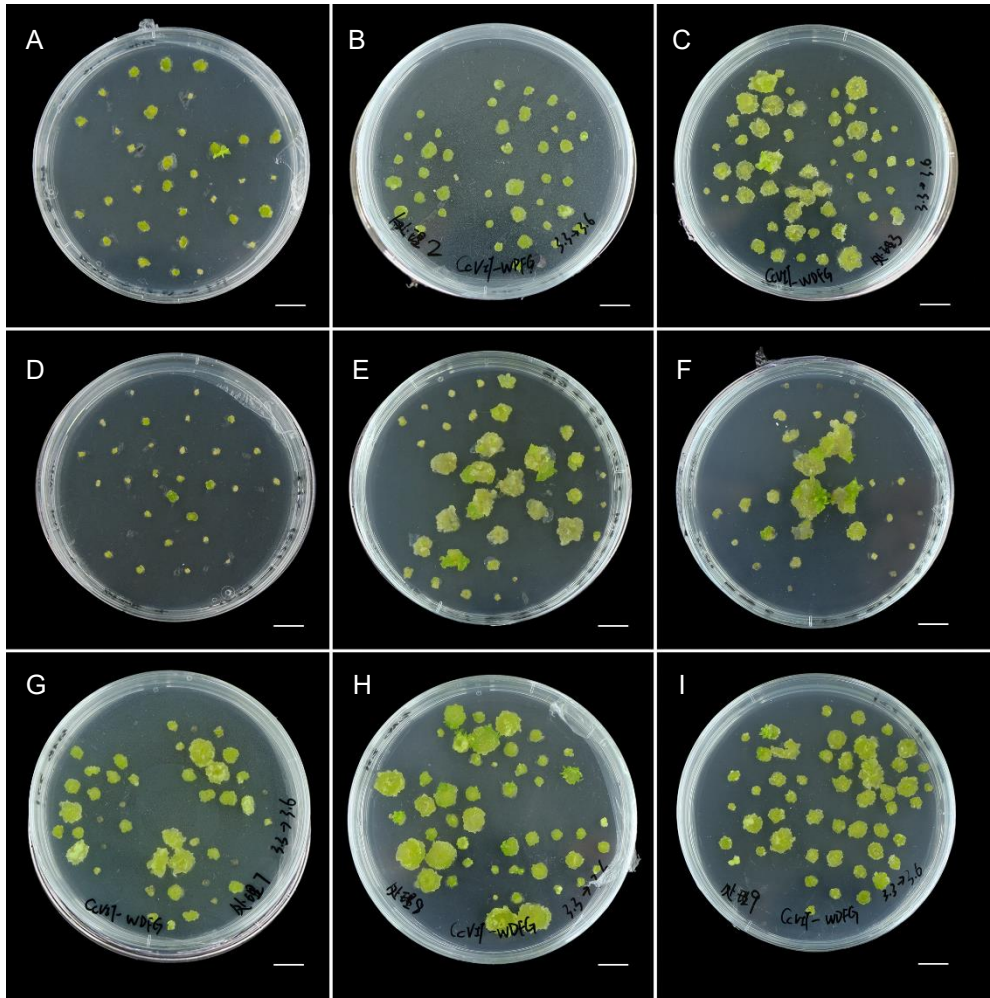


图5 ‘万代风光’遗传转化体系筛选

(A-I) 茎间薄层在处理 1-9 中的生长情况。Bars=1 cm

Figure 5 Screening of 'Wandai Fengguang' genetic transformation system

(A-I) Growth of transverse thin cell layers in treatments 1-9. Bars=1 cm

#### 2.4.1 预培养时间对抗性芽生长的影响

由表 7 可知，经过 1 天预培养可显著提高茎间薄层的不定芽生成系数，预培养为 0 天时，抗性芽分化率仅有 1.73%、不定芽分化系数仅为 0.22，经过 1 天预培养后分化率可提高至 7.76%，不定芽生成系数提高至 1.06。综上，‘万代风光’在转化前需要经过预培养以促进细胞分裂，从而提升抗性芽生长效果，预培养最适时间为 1 天。

表 7 预培养时间对‘万代风光’抗性芽生长的影响

Table 7 Effect of pre-culture time on the growth of resistant buds in 'Wandai Fengguang'

Pre-cultivation time(d)	Callus formation rate(%)	Differentiation rate(%)	Coefficient of adventitious bud production	Browning rate(%)
0	87.57a	1.73a	0.22b	0.00a
1	71.58b	7.76a	1.06a	9.51a
2	91.29a	7.66a	0.57ab	6.05a

同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

#### 2.4.2 菌液浓度对抗性芽生长的影响

当农杆菌浓度为 0.6 时，愈伤诱导率、分化率和不定芽生成系数较低；菌液浓度为 0.8 时愈伤组织诱导率达 90.11%，抗性芽分化率可提高至 9.95%，不定芽生成系数提高至 0.9；当菌液浓度升高至 1.0 时，愈伤组织诱导率、抗性芽分化率和不定芽生成系数降低，褐化率升高。综上，‘万代风光’茎间薄层的最适农杆菌侵染浓度为  $OD_{600}=0.8$ (表 8)。



表 8 菌液浓度对‘万代风光’抗性芽生长的影响  
Table 8 Effect of agrobacterium concentration on the growth of resistant buds in ‘Wandai Fengguang’

Concentration of Agrobacterium(OD <sub>600</sub> )	Callus formation rate(%)	Differentiation rate(%)	Coefficient of adventitious bud production	Browning rate(%)
0.6	77.96b	1.11b	0.11b	6.05a
0.8	90.11a	9.95a	0.90a	0.00a
1	82.37ab	6.09ab	0.83ab	9.51a

同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。  
Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

2.4.3 侵染时间对抗性芽生长的影响

由表 9 可知，农杆菌侵染 5 分钟时，抗性芽分化率和不定芽生成系数最高，分别达到 12.93% 和 1.18，随着农杆菌侵染时间增加到 10 或 15 分钟，分化率和不定芽生成系数显著降低。因此，‘万代风光’茎间薄层的最适农杆菌侵染时间为 5 分钟。

表 9 侵染时间对‘万代风光’抗性芽生长的影响  
Table 9 Effect of Infection time on the growth of resistant buds in ‘Wandai Fengguang’

Infection time(min)	Callus formation rate(%)	Differentiation rate(%)	Coefficient of adventitious bud production	Browning rate(%)
5	80.31a	12.93a	1.18a	9.51a
10	87.34a	0.65b	0.11b	0.00a
15	82.78a	3.56b	0.56ab	6.05a

同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。  
Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

2.4.4 共培养时间对抗性芽生长的影响

将农杆菌侵染完成后的茎间薄层接种于共培养基，在黑暗条件下进行共培养。结果显示(表 10)，共培养时间仅对褐化率有显著影响，而对愈伤组织诱导率、抗性芽分化率和不定芽生成系数均无显著影响，其中共培养三天时抗性芽分化率最高、褐化率最低。综上，‘万代风光’茎间薄层的最适共培养时间为 3 天。

表 10 共培养时间对‘万代风光’抗性芽生长的影响  
Table 10 Effect of co-culture time on the growth of resistant buds in ‘Wandai Fengguang’

co-culture time(d)	Callus formation rate(%)	Differentiation rate(%)	Coefficient of adventitious bud production	Browning rate(%)
1	85.51a	4.71a	0.67a	0.00b
2	80.25a	4.81a	0.61a	15.56a
3	84.68a	7.62a	0.57a	0.00b

同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )。  
Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

2.4.5 不同侵染条件对遗传转化效果的影响

以抗性芽分化率作为主要的评判指标，极差分析结果显示(表 11)，四个因素对遗传转化效率的影响大小为：侵染时间>菌液浓度>预培养时间>共培养时间。根据四因素各水平分化率均值，确定预培养 1 天、OD<sub>600</sub>=0.8，处理 5 分钟，共培养 3 天为‘万代风光’遗传转化处理的最佳体系。

表 11 不同转化条件下‘万代风光’抗性芽分化率的极差分析  
Table 11 Range analysis of resistance bud differentiation rate of ‘Wandai Fengguang’ under different transformation conditions

Factors	Pre-cultivation time(d)	Concentration of Agrobacterium(OD <sub>600</sub> )	Infestation time(min)	co-culture time(d)
K1	5.18	3.33	38.77	14.13

K2	23.28	29.84	1.96	14.44
K3	22.96	18.25	10.69	22.85
k1	1.73	1.11	12.92	4.71
k2	7.76	9.95	0.65	4.81
k3	7.65	6.08	3.56	7.62
R	5.93	8.84	12.27	2.80

2.5 转基因菊花鉴定

实验共侵染茎间薄层 341 个，通过 Kan 抗性筛选，最终获得 15 株抗性苗。对得到的抗性苗进行 DNA 水平的鉴定，有 2 株抗性苗经过 PCR 检测扩增出了长度正确的目的条带，与阳性对照一致，其余 13 株均未扩增到目的条带，且 ddH<sub>2</sub>O 和野生型 DNA 中均未扩增出目的条带(图 6)。因此判定矢车菊液泡铁离子转运蛋白基因 CcVIT 已成功转入‘万代风光’基因组中，共获得 2 株阳性苗，阳性苗概率为 13.33%。

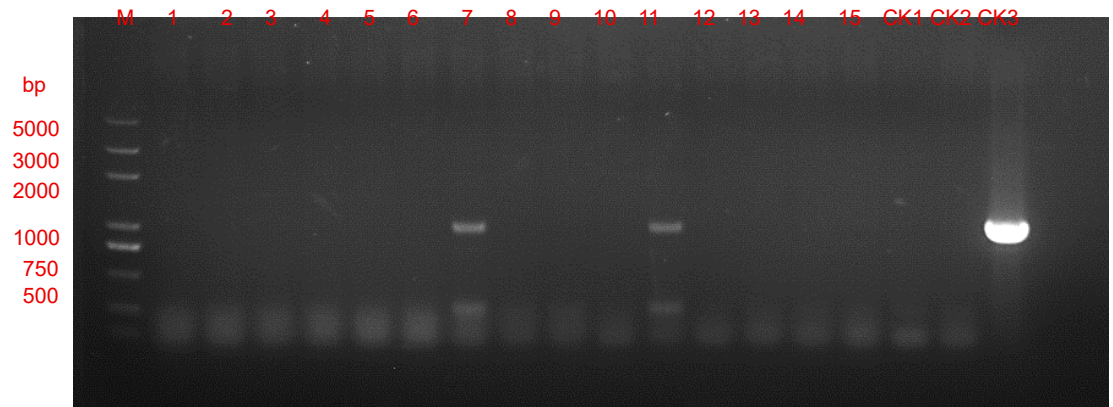


图 6 ‘万代风光’抗性苗 PCR 检测  
M: DL2000 Plus DNA Marker; 1-15: 抗性苗; CK1, ddH<sub>2</sub>O; CK2, 野生型; CK3, 质粒。  
Figure 6 PCR detection of resistant plantlets of ‘Wandai Fengguang’  
M: DL2000 Plus DNA Marker; 1-15: Resistant plantlets; CK1, ddH<sub>2</sub>O; CK2, Wild type; CK3, Plasmid.

3 讨论

3.1 外植体类型对菊花再生的影响

菊花再生可选用的外植体类型多样，叶片、茎段、花瓣、花蕾和花托均可诱导再生，但不同器官的生长发育状态和再生能力具有显著差别，因此选择适宜的外植体是成功建立再生体系的第一步。由于取材方便且取材时间较长，大多数研究者选择叶片或茎段作为外植体(王碧玉, 2017; 刘明星, 2020; 马琦, 2020)。徐式近等(2013)以 9 个菊花品种的叶片、茎段为外植体，研究外植体类型对不同菊花品种再生的影响，结果表明多数菊花品种茎段的再生能力高于叶片；王自布等(2015)以菊花不同外植体为试材进行再生培养，发现以花蕾和花瓣为外植体，不定芽诱导率较高，其次为茎段，叶片的再生能力最差。本实验以菊花品种‘万代风光’的不同外植体进行再生诱导，发现茎间薄层的再生效果最好，其次为叶柄，叶片的再生效果最差，与上述研究结果一致。然而在有些菊花品种中则是叶片再生效果优于茎间薄层(李亚军等, 2018)，这也说明了菊花基因型对再生体系建立有重要影响，不同菊花品种再生的最适外植体类型不同。

3.2 植物生长调节剂对菊花再生的影响

植物生长调节剂的种类和浓度对外植体的再生效果有显著影响，适宜的生长素能够较好地诱导愈伤组织，细胞分裂素则有利于愈伤组织的芽诱导和芽分化，通常以较高浓度的细胞分裂素和较低浓度的生长素进行组合，有利于先形成愈伤组织而后分化出芽(李辛雷等, 2004; 罗虹等, 2020; Bernula et al., 2020; Long et al., 2022; 廖敏凌等, 2023; 武晓云等, 2024)。菊花再生过程中，6-BA 和 NAA 是最常用的植物生长调节剂，此外还有 2,4-D、KT、IAA 等(Renou et al.,1993; 时颂等, 2013; Adedeji et al., 2020)。滕如萍等(2021)对切花菊‘神马’(*C. ×morifolium* ‘Jimba’)的叶片再生体系进行优化，发现在愈伤组织分化过程中 6-BA、NAA 的组合效果优于 6-BA、2,4-D 的组合效果。Naing 等(2016)发现 6-BA、NAA 组合的培

培养基中能获得更好的芽再生, 显著优于 6-BA、IAA 组合。本实验中, 6-BA 和 NAA 组合是诱导再生的最佳植物生长调节剂组合, 其次是 KT 和 NAA 组合。实验结果也同样证明在菊花再生体系的建立中, 6-BA 和 NAA 的组合更有利于愈伤组织诱导和芽分化。

本实验中, ‘万代风光’茎间薄层最适再生培养基为  $MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ , 叶柄最适再生培养基为  $MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ 。切花菊 ‘粉贵人’ (*C. ×morifolium* ‘Fenguiren’)茎间薄层最适分化培养基为  $MS+2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ , 叶片最适分化培养基为  $MS+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ ; 菊花 ‘金不凋’叶片不定芽分化的最适培养基为  $MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ 。由此可见当菊花品种、外植体部位等因素发生改变时, 最适的植物生长调节剂浓度配比也会不同。原因可能是不同品种菊花或不同器官的植物激素水平以及对植物生长调节剂的敏感性不同(李亚军等, 2018; 王亚琴等, 2020a; 吴志苹等, 2020; 逯锦春等, 2022)。

### 3.3 农杆菌介导的菊花遗传转化体系的建立

在农杆菌介导的遗传转化中, 影响转化效率的因素主要包括预培养时间、农杆菌菌液浓度、农杆菌侵染时间和共培养时间等。在侵染前对外植体进行适当时间的预培养, 能够促进细胞分裂, 提高外源基因的整合效率。侵染过程中, 菌液浓度过低或侵染时间太短, 农杆菌不能成功附着; 而浓度过高或侵染时间太长, 农杆菌过多会影响植物生长发育, 两种情况都会导致转化率降低。侵染结束后, 外植体与农杆菌的共培养时间也是影响遗传转化的重要因子, 共培养是目的基因整合到植物基因组中的关键阶段, 适当的共培养时间有利于提高转化效率(赵伶俐等, 2011; 亓帅等, 2014; 曲爱爱, 2016; 王想, 2018; 王亚琴, 2020b; 余晓敏等, 2023)。

菊花 ‘金不凋’以叶片为外植体, 经 1 天预培养, 在菌液浓度  $OD_{600}=0.6$  的农杆菌中侵染 10 分钟, 共培养 2 天, 延迟培养 5 天, 最佳体系转化效率为 2.5%。切花菊 ‘南农粉翠’ (*C. ×morifolium* ‘Nannong Fencui’)预培养 3 天后, 以  $OD_{600}=0.5$  的农杆菌侵染 10 分钟, 共培养 3 天, 延迟培养 7 天, 转化效率为 5%。匍匐型地被菊 ‘雨花落英’叶盘遗传转化的最优组合为预培养 2 天, 侵染 5 分钟, 共培养 2 天, 延迟培养 5 天, 阳性苗概率为 67%(曲爱爱, 2016; 赵静雅等, 2019; 吴志苹等, 2020)。本研究发现 ‘万代风光’茎间薄层在预培养 1 天, 农杆菌浓度  $OD_{600}=0.8$ , 侵染 5 分钟, 共培养 3 天的条件下遗传转化效果最好, 遗传转化效率为 13.33%。综上, 不同菊花品种对农杆菌的敏感性不同, 适宜的农杆菌侵染转化条件也不同, 但通常都需要经过 1-3 天的预培养促进细胞分裂, 以  $OD_{600}=0.4-0.8$  的农杆菌菌液侵染 5-10 分钟, 随后共培养 2-3 天, 以促进农杆菌的 T-DNA 整合到菊花基因组中。

目前菊花转基因工程中存在基因型依赖性强、转化效率低、重复性差等问题, 限制了菊花的大规模分子育种。先前研究在建立菊花遗传转化体系时多使用叶片作为外植体, 但本研究使用的菊花品种 ‘万代风光’以叶片为外植体时获得的再生效果较差, 其叶片并不适合建立遗传转化体系。因此本研究探究了该品种的不同外植体类型以及不同植物生长调节剂组合对其再生的影响, 筛选出适宜菊花品种 ‘万代风光’再生的最适外植体为茎间薄层, 最佳培养基为  $MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ , 随后以茎间薄层为外植体建立其遗传转化体系, 并获得了不错的转化效率。本研究为难以再生的菊花品种的再生及遗传转化体系建立提供了一定的技术支持, 为进一步改良菊花性状和验证基因功能奠定了基础。

### 作者贡献声明

李晶晶, 李艳飞: 构思并设计实验, 完成实验并提供技术支持, 分析数据, 撰写论文; 王安琪, 王佳颖, 邓成燕, 卢敏: 文稿校对; 戴思兰, 构思并设计实验, 提供技术支持, 并审阅文稿。

### 参考文献

- 戴思兰, 洪艳 (2016). 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种. 中国农业科学 49(03), 529-542.
- 郭兆奎, 万秀清, 魏继承, 于艳华, 于金涛 (1999). 适于 PCR 分析的烤后烟叶 DNA 提取方法的研究. 中国烟草科学 4, 7-10.
- 韩科厅 (2010). 花青素苷合成关键结构基因导入对菊花花色的影响. 博士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 41-47.
- 何姗 (2020). 农杆菌介导 *CmWRKY15-1* 基因对菊花的遗传转化. 硕士论文. 辽宁: 沈阳农

业大学.

- 洪艳, 白新祥, 孙卫, 贾锋炜, 戴思兰 (2012). 菊花品种花色表型数量分类研究. 园艺学报 **39**(7), 1330-1340.
- 贾红梅, 王碧玉, 刘迪, 毛洪玉 (2017). 农杆菌介导 *CBL* 基因对菊花品种 'C008' 的转化. 西北林学院学报 **32**(01), 184-189.
- 姜宁宁, 付建新, 戴思兰 (2012). 中国传统菊花品种'小林静'再生及转化体系的建立. 生物技术通报 **28**(4), 87-92.
- 李辛雷, 陈发棣, 王红, 房伟民, 管志勇 (2004). 菊花外植体再生体系的研究. 上海农业学报 (02), 13-16.
- 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. 中国观赏园艺研究进展 2018. 哈尔滨: 中国园艺学会观赏园艺专业委员会. pp. 427-434.
- 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.
- 刘明星 (2020). 盆栽小菊 'Branfountain Pink' 遗传转化体系的建立. 硕士论文. 江苏: 南京农业大学. pp. 14-30
- 逯锦春, 曹丽娜, 佟冠杰, 王鑫颖, 张利英, 喻铨, 李荟芳, 李彦慧 (2022). 大花银莲花愈伤组织诱导及再生体系的建立. 植物学报 **57**(02), 217 - 226.
- 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**(03), 318-328.
- 马琦 (2020). 少芽切花菊分枝性及其遗传转化体系的研究. 硕士论文. 江苏: 南京农业大学. pp. 23-30
- 元帅, 付建新, 王翊, 杨立文, 戴思兰 (2014). 甘菊下胚轴遗传转化体系的建立. 分子植物育种 **12**(02), 356-362.
- 曲爱爱 (2016). 菊花遗传转化体系建立及 *VtF3'5'H* 基因转化'南农粉翠'的研究. 硕士论文. 南京: 南京农业大学. pp. 23-30.
- 时颂, 李青, 赵霜, 戴思兰, 李娜娜 (2013). 不同切花菊品种及处理对愈伤组织诱导和分化的影响. 东北林业大学学报 **41**(01), 77-81.
- 滕如萍, 张佳祺, 刘晓芬, 余璐, 张潮, 李方 (2021). 菊花'神马'组培再生体系的优化. 分子植物育种 1-10.
- 王碧玉 (2017). 菊花再生及遗传转化体系的研究. 硕士论文. 辽宁: 沈阳农业大学. pp. 8-15.
- 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. 硕士论文. 黑龙江: 东北林业大学. pp. 36-38
- 王亚琴, 韦陆丹, 王文静, 刘宝骏, 张春玲, 张俊卫, 何燕红(2020a). 万寿菊再生体系的建立及优化. 植物学报 **55**(06), 749-759.
- 王亚琴 (2020b). 万寿菊再生和遗传转化体系的建立及重要性状的遗传分析. 硕士论文. 武汉: 华中农业大学. pp. 4-7.
- 王自布, 莫国秀, 罗会兰, 张德英 (2015). 菊花不同外植体组培快繁及其再生体系的研究. 北方园艺 (18), 106-109.
- 魏曼曼, 王江民, Muhammad Imtiaz, 洪波 (2014). 菊花花色嵌合花瓣的离体培养及植株再生. 北京林业大学学报 **36**(04), 107-112.
- 吴志苹, 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**(01), 150-158.
- 武晓云, 廖敏凌, 李雪茹, 舒梓淳, 辛佳潼, 张伯晗, 戴思兰 (2024). 毛华菊 3 种瓣型株系再生体系的建立. 植物学报 **59**(02), 245-256.
- 徐式近, 徐忠传 (2013). 不同菊花品种高效直接再生体系的构建. 江苏农业科学 **41**(11), 52-54+100.
- 许志茹, 陈智华, 姜艳东, 侯杰, 佟玲, 李玉花 (2013). 露地菊离体再生体系建立及 *BrDFR* 基因遗传转化. 园艺学报 **40**(08), 1517-1526.
- 阳淑金, 宋爱萍, 何深颖, 朱晓晨, 孙静, 高姣姣, 王银杰, 陈发棣, 蒋甲福 (2015). CaMV 35S 启动子在菊花中驱动 GUS 外源基因的表达分析. 南京农业大学学报 **38**(04), 554-

- 余晓敏, 王亚琴, 刘雨菡, 易庆平, 程文翰, 朱钰, 段枫, 张莉雪, 何燕红 (2023). 根癌农杆菌介导万寿菊遗传转化体系的建立. *植物学报* **58**(05), 760–769.
- 赵静雅, 徐素娟, 陈发棣, 滕年军 (2019). 匍匐型地被菊再生及遗传转化体系的建立. *核农学报* **33**(09), 1686–1697.
- 赵伶俐, 石少川, 张启翔, 高亦珂 (2011). 农杆菌介导的地被菊遗传转化体系的优化. *分子植物育种* **9**(01), 74–80.
- Adedeji OS, Naing AH, Kim CK (2020). Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived calli of *Chrysanthemum* cv. White ND. *Plant Cell Tiss Org* **141**(3), 571–581.
- Bernula D, Benkő P, Kaszler N, Domonkos I, Valkai I, Szöllősi R, Ferenc G, Ayaydin F, Fehér A, Gémes K (2020). Timely removal of exogenous cytokinin and the prevention of auxin transport from the shoot to the root affect the regeneration potential of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Tiss Org* **140**, 327–339.
- Brugliera F, Tao GQ, Tems U, Kalc G, Mouradova E, Price K, Stevenson K, Nakamura N, Stacey I, Katsumoto Y, Tanaka Y, Mason JG (2013). Violet/blue *chrysanthemums*—metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant Cell Physiol* **54**(10), 1696–1710.
- Han XY, Luo YT, Lin JY, Wu HY, Sun H, Zhou LJ, Chen SM, Guan ZY, Fang WM, Zhang F, Chen FD, Jiang JF (2021). Generation of purple-violet *chrysanthemums* via anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation introduced from *Osteospermum* hybrid F3'5'H and *Clitoria ternatea* A3'5'GT. *Ornamental Plant Research* **1**, 4.
- Huang H, Hu K, Han KT, Xiang QY, Dai SL (2013). Flower colour modification of *chrysanthemum* by suppression of F3'H and overexpression of the exogenous *Senecio cruentus* F3'5'H Gene. *PLoS ONE* **8**(11), e74395.
- Li YF, Wang JY, Lu CF, Wang ZM, Deng CY, Gao K, Li JJ, Fang ZJ, Liu H, Hong Y, Dai SL (2024). Flavonoid extracts from *chrysanthemum* with appropriate anthocyanins turn blue when exposed to iron ions. *Hortic Plant J* **10**(3), 837–852.
- Lim KB, Kwon SJ, Lee SI, Hwang YJ, Naing AH (2012). Influence of genotype, explant source, and gelling agent on in vitro shoot regeneration of *chrysanthemum*. *Hortic Environ Biote* **53**, 329–335.
- Long Y, Yang Y, Pan GT, Shen YO (2022). New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Front Plant Sci* **13**, 926752.
- Momonoi K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori C, Shoji K, Nitta A, Nishimura M (2009). A vacuolar iron transporter in tulip, *TgVit1*, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J* **59**, 437–447.
- Naing AH, Park KI, Chung MY, Lim KB, Kim CK (2016). Optimization of factors affecting efficient shoot regeneration in *chrysanthemum* cv. Shinma. *Braz J Bot* **39**(4), 975–984.
- Noda N, Aida R, Kishimoto S, Ishiguro K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Ohmiya A (2013). Genetic engineering of novel bluer-colored *chrysanthemums* produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant cell physiol* **54**(10), 1684–95.
- Noda N, Yoshioka S, Kishimoto S, Nakayama M, Douzono M, Tanaka Y, Aida R (2017). Generation of blue *chrysanthemums* by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Sci Adv* **3**(7), e1602785.
- Renou JP, Brochard P, Jalouzot R (1993). Recovery of transgenic *chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. *Plant Sci* **89**, 185–197.
- Shiono M, Matsugaki N, Takeda K (2005). Structure of the blue cornflower pigment. *Nature* **436**(7052), 791–791.
- Shoji K, Miki N, Nakajima N, Momonoi K, Kato C, Yoshida K (2007). Perianth bottom-specific blue color development in *tulip* cv. Murasakizuisho requires ferric ions. *Plant cell physiol* **48**(2), 243–251.
- Shoji K, Momonoi K, Tsuji T (2010). Alternative expression of vacuolar iron transporter and ferritin genes leads to blue/purple coloration of flowers in *tulip* cv. 'Murasakizuisho'. *Plant cell physiol* **51**(2), 215–224.
- Song JY, Mattson NS, Jeong BR (2011). Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium*. *Plant Cell Tiss*



Org 107(2), 295-304.

Takeda K, Osakabe A, Saito S, Furuyama D, Tomita A, Kojima Y, Yamadera M, Sakuta M (2005). Components of protocyanin, a blue pigment from the blue flowers of *Centaurea cyanus*. *Phytochem*, **66**(13), 1607-1613.

Takeda K, Yamaguchi S, Iwata K, Tsujino Y, Fujimori T, Husain S (1996). A malonylated anthocyanin and flavonols in the blue flowers of *Meconopsis*. *Phytochemistry* **42**, 863-865.

Tanaka M, Fujimori T, Uchida I, Yamaguchi S, Takeda K (2001). A malonylated anthocyanin and flavonols in blue *Meconopsis* flowers. *Phytochemistry* **56**, 373-376.

Yoshida K, Negishi T (2013). The identification of a vacuolar iron transporter involved in the blue coloration of cornflower petals. *Phytochemistry* **94**, 60-67.

## Establishment of Regeneration and Genetic Transformation System for *Chrysanthemum* Cultivar 'Wandai Fengguang'

Jingjing Li<sup>#</sup>, Yanfei Li<sup>#</sup>, Anqi Wang, Jiaying Wang, Chengyan Deng, Min Lu, Jianying Ma, Silan Dai<sup>\*</sup>

National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract** The pigment background of the *chrysanthemum* cultivar 'Wandai Fengguang' is suitable for the cultivation of blue flowers by using molecular breeding techniques to regulate the concentration of iron ions in petals. While it can bloom in both summer and autumn, it is also an important material for studying the molecular regulation mechanism of *chrysanthemum* flowering period. However, it lacks an efficient regeneration and genetic transformation system. In this study, this variety was used as the experimental material to study the effects of different explant types and different combinations of plant growth regulators on its regeneration, and to investigate the effects of relevant factors on the efficiency of genetic transformation in the agrobacterium-mediated genetic transformation method. It was experimentally determined that the most suitable explant for the regeneration of 'Wandai Fengguang' was the transverse thin cell layers, and the optimal culture medium was MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA, with a differentiation rate of 70.06% and an adventitious shoot coefficient of 3.37. The kanamycin selection pressures for the differentiation of the transverse thin cell layers and the adventitious bud rooting were 7.5 mg·L<sup>-1</sup> and 5.0 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. After experimentation, the optimal system for genetic transformation treatment was determined to be pre-culture for 1 day, OD<sub>600</sub>=0.8, treatment for 5 minutes, and co-culture in the dark for 3 days. Fifteen resistant plantlets were screened on kanamycin medium, and two positive plantlets were revealed by PCR identification, with a transformation efficiency of 13.33%. This study laid the foundation for the gene function analysis and targeted improvement molecular breeding of *chrysanthemum* by using this kind of unique variety resource, and provided reference for the establishment of regeneration and transformation system for other *chrysanthemum* varieties.

**Key words** *Chrysanthemum*, Explant, Genetic transformation system, Regeneration system, Transverse thin cell layers

### 通讯作者/团队简介

**戴思兰**, 北京林业大学园林学院教授、博士生导师, 享受国务院政府特殊津贴。现任国家林业和草原局菊花产业国家创新联盟理事长, 中国风景园林学会菊花分会副理事长, 《植物学报》责任编辑。曾获首届全国林业教学名师、宝钢优秀教师奖、中国观赏园艺特别荣誉奖、教育部自然科学二等奖等荣誉奖励。先后主持 30 余项国家和省部级科研项目, 发表学术论文 400 余篇, 出版著作 2 部。其研究团队以菊花为主要研究材料, 从菊花的历史文化、品种资源收集、整理和评价到花色、花型、开花期和抗逆性等观赏品质形成的遗传调控机理, 以及菊花优异新种质创制、产业化栽培技术等进行全面研究, 取得了一系列重要突破性进展和研究成果。

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