

药用菊花种间杂交及 F₁ 代鉴定研究

黄 莺, 王康才*, 张 媛, 陈 韵

南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095

摘 要: 目的 以红心菊及新白菊为母本, 野菊 *Chrysanthemum indicum* 及菊花脑 *Chrysanthemum nankingense* 为父本, 设计 4 种杂交组合进行杂交并鉴定种间杂种, 以了解药用菊花主要性状遗传规律。方法 采用蕾期授粉进行药用菊花种间杂交, 通过形态学、细胞学手段及 RAPD 分子标记技术对药用菊花种间杂种进行鉴定。结果 杂种外观性状介于亲本之间, 有的出现了亲本不具备的性状特征。RAPD 分子标记结果表明, 杂种表现出父本特异带或双亲均不具备的新谱带。杂种染色体数目为亲本平均值。结论 蕾期授粉法进行种间杂交可产生种子, 红心菊及新白菊基因杂合度高, 杂种表现出性状分离, 染色体多为非整倍体。

关键词: 药用菊花; 杂交; RAPD; 野菊; 蕾期授粉

中图分类号: R282.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)04-0783-05

Interspecific hybridization and F₁ hybrids identification of *Chrysanthemum morifolium*

HUANG Ying, WANG Kang-cai, ZHANG Yuan, CHEN Yun

College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Objective Interspecific hybridization was made between *Chrysanthemum morifolium* ‘Hongxinju’ (♀), *C. morifolium* ‘Xinbaiju’ (♀) and *C. indicum* (♂), *C. nankingense* (♂), and F₁ hybrids were identified in order to discover inheritance of main characters in *Chrysanthemum morifolium*. **Methods** Interspecific hybridization of *C. morifolium* were made by bud pollination. Morphological, cytological, and RAPD analyses were used for the identification of interspecific hybrids. **Results** The hybrids showed interspecific morphological traits of their parents or unique morphological traits their parents did not possess. RAPD results indicated that the hybrids produced specific bands of male parent or new bands absent in both parents. Chromosome number of F₁ hybrids was the average of their parents. **Conclusion** Bud pollination could improve heterozygosity of interspecific hybridization of *C. morifolium* ‘Hongxinju’ and ‘Xinbaiju’. Hybrids could be aneuploid chromosomes and show the significant segregation of character.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; hybridization; RAPD; cytology; bud pollination

药用菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 具有散风清热, 平肝明目的功效^[1-4]。近年来, 由于凉茶等产品开发, 药用菊花社会需求量大, 如何提高栽培产量和选育优良品种将是今后研究的方向。开展药用菊花育种工作, 对于创新药用菊花品种, 丰富药用菊花种质资源具有重要意义。目前, 药用菊花育种以系统选育为主, 杂交育种未见报道, 而绝大部分观赏菊花品种都是经人工杂交育成, 有关观赏菊花起源的研究结果表明, 药用菊花及观赏菊花可能有相同的起源, 通过人工杂交的方法进行观赏菊花品种选育在

我国已有历史。Shimotomai^[5]根据种间杂交以及形态学和地理学证据, 认为只有 2~3 个二倍体种参与菊属多倍体系列的形成过程和栽培菊花的起源。陈俊愉^[6]在综合大量研究资料基础上, 提出观赏菊花在晋代通过原产我国的几种野生菊间天然杂交, 并经过长期人工选育而成, 六倍体毛华菊和四倍体野菊是其主要亲本, 六倍体紫花野菊及其他野生种(包括二倍体的甘菊、菊花脑等) 随后在不同程度上参与其中, 形成了丰富多彩的菊花品种。

多位学者通过染色体组分析及 RAPD、ISSR 等分子标记手段对观赏菊、野菊及药用菊花进行聚类

收稿日期: 2010-08-12

基金项目: 江苏省科技厅高新技术研究项目 (BC2005318)

作者简介: 黄 莺 (1986—), 女, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 研究方向为药用菊花栽培育种。E-mail: pianobar@163.com

*通讯作者 王康才 Tel: (025)84396125 E-mail: njwkc2002@126.com

分析,认为菊属植物是由低倍体向异源多倍体化发展的过程,药用菊花相对经过多代人工杂交及筛选的观赏菊更接近野生菊^[7-8],这为药用菊花杂交选育新品种的可行性提供理论基础。本实验根据茶用菊花质量要求,选择有特殊香气的野菊及菊花脑为父本,与药用菊花进行杂交;应用 RAPD 技术,同时结合细胞学和形态学观察、统计分析,对药用菊花种间杂种进行鉴定,以期对药用菊花杂种提供快速准确的鉴定方法,缩短育种周期,提高育种效率。

1 材料

红心菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (Hongxinju)、新白菊 *Chrysanthemum morifolium* (Xinbaiju) 引自江苏洋马药用菊花基地,野菊 *C. indicum* L. 引自安徽阜阳,当地用作香菊,菊花脑 *Chrysanthemum nankingense* (L.) Des Monl var. *aromaticum* Q. H. Liu et. S. F. Zhang. var. nov. 采自紫金山,材料均种植于南京农业大学园艺学院试验田,由南京农业大学中药材科学系王康才教授鉴定。

2 方法

2.1 有性杂交及后代育苗

于 2008 年 11~12 月进行人工授粉杂交。以红心菊和新白菊作为母本,野菊和菊花脑作为父本,设 4 个组合分别进行杂交,采用蕾期授粉法提高结实率。选取生长状况良好的父本植株上未散粉的花序,用硫酸纸套袋,以防止其他植株花粉干扰。选取母本植株上刚显色的花序,剪短舌状花露出柱头以方便授粉,用镊子去除管状花,套袋,于 9:00 至 10:00 时采集套袋的父本花粉,用毛笔授粉,套袋,注明杂交组合及授粉日期。2 d 授粉 1 次。母本柱头分开后每天授粉 1 次,直到开花末期柱头失去可授性。花梗枯萎时采集授粉花序,检测结实率。

2009 年 3 月育苗,定植。考察外观性状,进行杂种鉴定。

2.2 种间杂种鉴定

2.2.1 形态学鉴定 对每一株杂种及其亲本进行外观性状考察,在植株群体现蕾期考察现蕾时间、茎色、叶色、侧芽数、叶腋和分枝数、分枝角度;主蕾显色期考察显色时间,花蕾纵径、横径,叶片长与宽;植株群体开花期考察开花时间跨度、株型直立程度、叶表及叶背颜色、舌状花及管状花数与鲜质量等指标。

2.2.2 分子学鉴定 采用 CTAB 法提取 DNA, RAPD 分析参照秦贺兰等^[9]的方法并作适当改进,20 μ L 反

应体系 (μ L): 10 $\times$ Buffer 2.0, dNTP 1.0, MgCl₂ 1.5, TaqE 0.8, Primer 1.5, DNA 2.0, ddH₂O 11.2, 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 34 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、90 s, 循环 40 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 16 $^{\circ}$ C 退火 2 min。

2.2.3 细胞学鉴定 采用扦插苗新长出的根为材料,进行根尖细胞有丝分裂观察,待新生根长至 1~2 cm 时,剪取 0.5 cm 根尖,用 2 mmol/L 的 8-羟基喹啉 4 $^{\circ}$ C 预处理 4 h,卡诺固定液 [95%乙醇与冰醋酸(3:1)] 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h,清水冲洗后,转入 1 mol/L HCl 60 $^{\circ}$ C 恒温解离 8 min,用清水多次清洗,卡宝品红染色,蒸馏水压片,敲片,在 Leica DM 1 000 显微镜下,观察染色体的形态,统计染色体数目。

3 结果和分析

3.1 形态学鉴定

杂种植株不同生长时期的主要外观性状指标测定结果见表 1。

植株群体现蕾期:杂种分枝性较亲本强,叶色及被毛情况介于亲本之间,新白菊 $\times$ 菊花脑和红心菊 $\times$ 菊花脑茎色均比亲本深。

主蕾显色期:杂种叶片长、宽均大于亲本,表现为超亲优势。

植株群体开花期:亲本材料叶表面颜色除野菊为浅绿外,其他均为深绿,部分杂种表现为浅绿,表现出父本的叶色特征;红心菊与新白菊舌状花为白色,4~5 层,野菊与菊花脑舌状花为黄色,1~2 层;野菊花序小于红心菊及新白菊,菊花脑小于野菊;杂种中红心菊 $\times$ 菊花脑花序大小介于亲本之间,舌状花为白色,与母本一致;红心菊 $\times$ 野菊有 1 株舌状花白色,其余 5 株为黄色,舌状花 1~2 层,与父本性状相似,大小介于亲本之间,这 5 株可能为真杂种;新白菊 $\times$ 野菊有 1 株舌状花白色,4~5 层,与母本性状相似,其余植株舌状花为黄色,部分 4~5 层,多数 1~2 层,与父本性状相似(图 1)。

3.2 分子学鉴定

从 30 个引物中筛选出条带清晰、特异性强、重复性好的引物进行 RAPD 分子标记,对杂种及其亲本进行鉴定。结果表明,红心菊 $\times$ 野菊 6 株杂种中 5 株表现出父本的特异性谱带,新白菊 $\times$ 野菊 8 株杂种中 7 株表现出父本的特异性谱带,为真杂种,红心菊 $\times$ 菊花脑、新白菊 $\times$ 菊花脑均只有 1 株杂种,表现出父本的特异性谱带,为真杂种。新白菊 $\times$ 野菊不同杂种间谱带有一定差异,有的表现出双亲没有的新谱带,说明后代在遗传亲本基因时有一定选

择性，并且发生变异，红心菊×野菊不同杂种间谱带差异不明显，见图 2。

3.3 细胞学鉴定

染色体计数时，统计 5 个以上个体、30 个以上

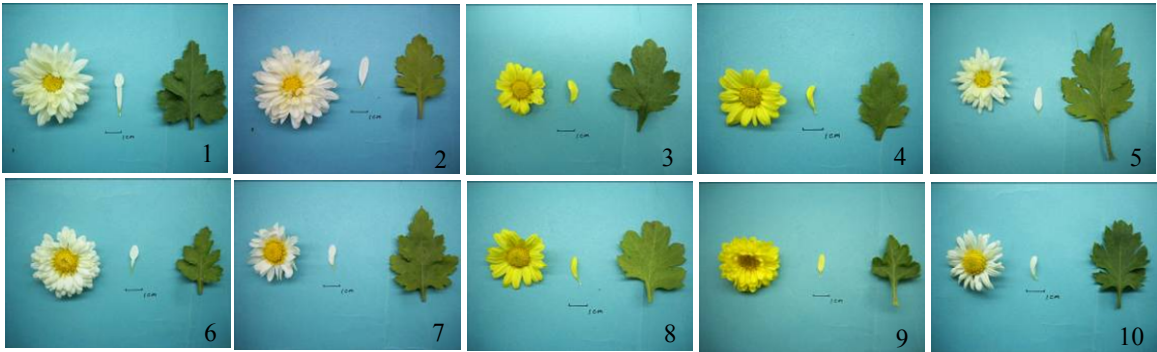
染色体分散良好的细胞，记录染色体的数目，大于 85% 细胞具有恒定一致的染色体，即为该植物的染色体数目^[10]。观察结果表明，红心菊、新白菊均为 6 倍体的非整倍体，其中红心菊 $2n=6x-1=53$ ，新

表 1 种间杂种及亲本外观性状

Table 1 Appearance characters of interspecific hybrids and parents

杂交组合及亲本	茎			叶片		花序		
	茎色	直立性	分枝数	叶表面色	长(cm)×宽(cm)	舌状花颜色	舌状花数目	花径/cm
红心菊×野菊	3~4	1~2	2~7	深绿、浅绿	5.2~5.5×4.0~4.7	黄、白	42~82	3.6~4.2
红心菊×菊花脑	6	4	1	浅绿	5.7×4.0	白	73	3.7
新白菊×野菊	3~5	2~9	2~8	深绿、浅绿	5.0~7.0×3.8~6.8	黄、白	17~31	3.3~3.6
新白菊×菊花脑	6	8	3	浅绿	5.6×4.0	白	25	2.9
红心菊	5	3	1	深绿	5.0×4.0	白	70	4.3
新白菊	4	3	1	深绿	4.2×4.5	白	62	3.5
野菊	3	2	1	浅绿	2.8×2.5	黄	22	2.4
菊花脑	1	9	1	深绿	3.3×2.5	黄	12	1.2

茎色按绿色到紫色以 1~9 记录，数值越大，茎色越紫；直立性按直立到匍匐以 1~9 记录，数值越大，直立性越弱
Stem colore were recorded as 1—9, higher number represents more purple stem color; Ereictness was recorded as 1—9, higher number represents more creeping stem erectness.



1-红心菊 2-新白菊 3-野菊 4、5-红心菊×野菊 6-红心菊×菊花脑 7~9-新白菊×野菊 10-新白菊×菊花脑，标尺=1 cm
1-*C. morifolium* ‘Hongxinju’ 2-*C. morifolium* ‘Xinbaiju’ 3-*C. indicum* 4, 5-*C. morifolium* ‘Hongxinju’×*C. indicum* 6-*C. morifolium* ‘Hongxinju’×*C. nankingense* 7~9-*C. morifolium* ‘Xinbaiju’×*C. indicum* 10-*C. morifolium* ‘Xinbaiju’×*C. nankingense*; Scale bar=1 cm

图 1 部分种间杂种及亲本的花序及叶片外观

Fig. 1 Inflorescence and leaf appearance of parents and some of hybrids

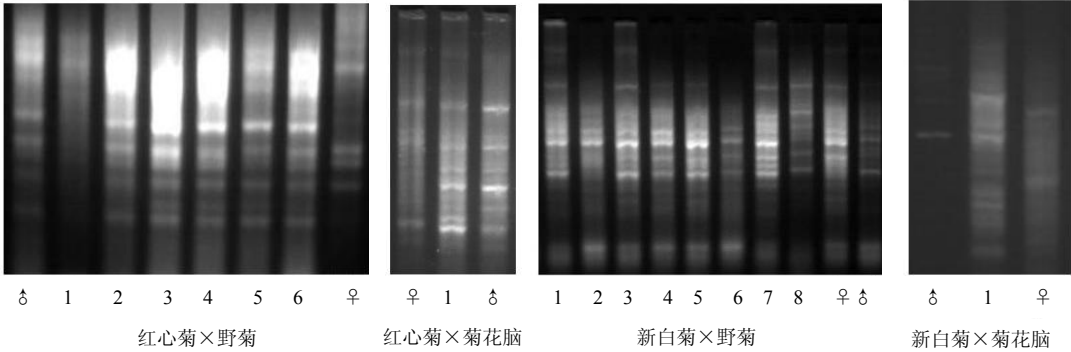


图 2 4 种杂种及其亲本的 RAPD 分子图谱

Fig. 2 RAPD molecular map of four kinds of hybrids and parents

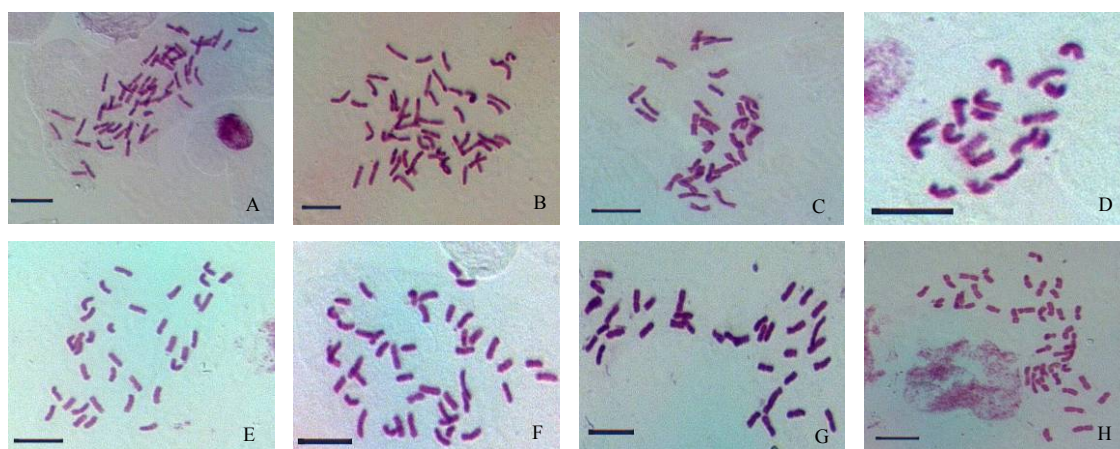
白菊 $2n=6x-2=52$ 。野菊及菊花脑为整倍体, 野菊 $2n=4x=36$, 菊花脑 $2n=2x=18$ 。所有杂种中, 红心菊×菊花脑染色体数 $2n=4x-1=35$, 新白菊×菊花脑 $2n=4x=36$ 均符合预期值, 认为是真杂交后代; 红心菊×野菊 6 株中 2 株染色体数 $2n=5x-1=44$, 3 株 $2n=5x=45$, 1 株为 6 倍体的非整倍体; 新白菊×野菊 8 株中 4 株染色体数 $2n=5x-2=43$,

3 株 $2n=5x=45$, 符合预期值, 1 株为 6 倍体的非整倍体, 为假杂种, 见图 3。

4 讨论

4.1 采用蕾期授粉法提高杂交结实率

在观赏菊花育种研究中, 发现菊花的杂交育种普遍存在结实率低的现象, 影响了优良种质资源的保存和推广。本课题组前期对药用菊花杂交花粉管



A-红心菊 B-新白菊 C-野菊 D-菊花脑 E-红心菊×菊花脑 F-红心菊×野菊 G-新白菊×菊花脑 H-新白菊×野菊, 标尺=10 μm
A-C. *morifolium* 'Hongxinju' B-C. *morifolium* 'Xinbaiju' C-C. *indicum*; D-C. *nankingense*; E-C. *morifolium* 'Hongxinju' × *C. nankingense*;
F-C. *morifolium* 'Hongxinju' × *C. indicum*; G-C. *morifolium* 'Xinbaiju' × *C. nankingense*; H-C. *morifolium* 'Xinbaiju' × *C. indicum*, Scale bar = 10 μm

图3 4种杂种及亲本根尖有丝分裂

Fig. 3 Mitosis of four kinds of hybrids and parents

进行荧光观察研究, 认为花粉管难以穿过柱头进入花柱是药用菊花杂交不结籽的主要原因之一。由于蕾期柱头尚未产生或少量产生萌发抑制物^[11], 本研究采用蕾期授粉的方法, 通过多次大量授粉, 减小柱头萌发抑制物对花粉管生长的影响。以野菊为父本的杂交组合结实率得到提高, 以菊花脑为父本的杂交组合结实率依然很低, 可能 6 倍体的母本与 4 倍体野菊的亲合性比与 2 倍体的菊花脑强, 或菊花脑与药用菊花亲缘关系更远, 杂交不易成功^[12]。

4.2 药用菊花主要性状遗传规律

所有杂种中, 以野菊为父本的杂种出现白色和黄色的花色性状分离。有学者认为, 菊花的花色遗传一般表现为偏母性遗传, 但在不同杂交组合中表现不一致^[13]。栗茂腾等^[14]通过黄色、白色及红色的观赏菊花两两杂交, 发现不同花色有不同的遗传力, 红色是长期进化中产生的花色, 遗传力最强, 白色最弱, 认为除偏母性遗传之外, 不完全显性和镶嵌显性两种遗传现象在菊花中也是存在的。这与菊花细胞中不含任何色素即表现为白色^[15]的理论相符。

因此无论白色花作为母本或父本, 遗传力都是最弱的。菊花的花色遗传组成和染色体组之间的关系错综复杂, 要研究花色性状遗传规律十分困难, 而药用菊花相对观赏菊花较原始, 更适合用于菊花花色的遗传规律探索。

红心菊及新白菊叶片较大, 先端渐尖, 野菊叶片较小, 先端钝, 以野菊为父本的杂种叶片大小及先端形状均有明显的分离, 其中与野菊叶片性状相似的植株花色及花序形态与野菊相似, 反之, 与母本叶片性状相似的植株花色及花序形态与母本相似。认为叶片大小及先端形状的遗传与花色及花序形态的遗传有一定相关性, 遗传基因是否连锁以及显隐性关系有待进一步研究。多数杂种表现出明显的性状分离, 性状介于亲本之间, 可通过进一步回交的方法巩固杂种遗传自亲本的特性, 为实现父母本优良基因和性状的转移奠定了基础。

杜冰群等^[16]对神农香菊进行核型研究, 发现染色体数为 $2n=2x=18$, 本实验材料野菊在安徽阜阳用作香菊, 染色体数为 $2n=4x=36$, 与神农香菊不

同,二者亲缘关系有待进一步研究。2 倍体及 4 倍体野生菊花基因较纯合,产生的配子体较一致,而药用菊花大多为 6 倍体或其非整倍体,杂合度高,杂种细胞染色体多为非整倍体,不育的 F_1 代杂种可以通过体细胞染色体加倍形成异源多倍体而获得育性杂种。RAPD 扩增谱带有的为父本和母本的特异谱带之和,有的表现出父母本均没有的新谱带,可能由于远缘杂交及多倍化形成的异源多倍体具有杂种性和多倍性,新形成的异源多倍体基因组会发生染色体组或 DNA 片段的结构重排、扩增或删除等基因组结构和序列的变化,进而引起基因组变异。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Shen Z, Zhang W T, Hua Y F, *et al.* Fringerprint analysis of four variants of *Chrysanthemi Morifoli Flos* by RP-HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2):153-156.
- [3] 李福高, 邵青, 李凡, 等. 不同物候期杭白菊与其他菊花及野菊花挥发性成分研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(6): 831-833.
- [4] 刘晓珍, 宋文玲, 蔡信之, 等. 两株内生真菌对菊花抗盐特性的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 158-163.
- [5] Shimotomai. Zur karyogenetik der Gattung *Chrysanthemum* [J]. *J Sci*, 1933, 22: 1-100.
- [6] 陈俊愉. 中国花卉品种分类学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2001.
- [7] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波, 等. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3735-3740.
- [8] 赵宏波, 陈发棣, 郭维明, 等. 菊属与亚菊属属间杂种的鉴定及其分类学意义 [J]. *植物分类学报*, 2007, 45(5): 661-669.
- [9] 秦贺兰, 游捷, 高俊平. 菊花 18 个品种的 RAPD 分析 [J]. *园艺学报*, 2002, 29(5): 488-490.
- [10] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题 [J]. *武汉植物学研究*, 1985, 3(4): 297-302.
- [11] 孙春青, 陈发棣, 房伟民, 等. 菊花远缘杂交研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(12): 2508-2517.
- [12] 刘思余, 张飞, 陈素梅, 等. 四倍体菊花脑与栽培菊种间杂交及 F_1 杂种的遗传表现 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(12): 2500-2507.
- [13] 徐文辉, 高海卿, 陈华进. 菊花某些性状遗传规律的初步探讨 [J]. *浙江林学院学报*, 2000, 17(1): 37-41.
- [14] 栗茂腾, 余龙江, 王丽梅, 等. 菊花花色遗传及花色嵌合体发现 [J]. *遗传*, 2005, 27(6): 948-952.
- [15] 陈海霞, 刘明月, 吕长平. 非洲菊花瓣色素分布对花色的影响 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 36(2): 165-169.
- [16] 杜冰群, 刘启宏, 朱翠英, 等. 两种菊属植物的核型研究 [J]. *武汉植物学研究*, 1989, 7(3): 293-296.