

## 单头切花菊‘白扇’组培快繁技术

周婷<sup>1,2</sup>, 杨惠婷<sup>1\*</sup>, 胡计红<sup>1</sup>, 朱梦珠<sup>1</sup>, 洪荣钦<sup>3</sup>, 潘东明<sup>1</sup>, 余文琴<sup>1\*\*</sup>,  
陈桂信<sup>1\*\*</sup>

1. 福建农林大学园艺学院, 福建福州 350002; 2. 福建省林木种苗总站, 福建福州 350002; 3. 尤溪县三叶花卉园艺有限公司, 福建尤溪 365100

**摘要** 以日本单头切花菊‘白扇’的顶芽和带腋芽茎段为外植体, 对其组培快繁技术进行研究。结果表明: 初代培养中, 先用 75%酒精消毒 30 s, 后用 0.1%升汞溶液消毒, 顶芽和带腋芽茎段最佳消毒时间分别为 3 min 和 4 min, 初代最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 平均芽诱导率为 100%, 平均单芽数达 1.69 个。以无菌苗腋芽茎段进行扩增繁殖, 其最佳的增殖培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L, 30 d 后增殖系数达 3.05, 有效芽率 65.26%, 平均株高 3.22 cm; 瓶内生根培养时, 添加了 NAA 和 IBA 的 1/2MS 培养基均能诱导生根, 生根率达 100%; 也可瓶外生根, 插穗浸蘸 NAA 溶液 5 min 后插入基质, 生根效果良好。本研究结果可以为‘白扇’的大面积推广和产业化、标准化生产种苗提供理论与技术指导。

**关键词** 单头切花菊; ‘白扇’; 组培快繁

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A

## Rapid Propagation of Standard Cut *Chrysanthemum* ‘Baishan’

ZHOU Ting<sup>1,2</sup>, YANG Huiting<sup>1\*</sup>, HU Jihong<sup>1</sup>, ZHU Mengzhu<sup>1</sup>, HONG Rongqin<sup>3</sup>, PAN Dongming<sup>1</sup>,  
SHE Wenqin<sup>1\*\*</sup>, CHEN Guixin<sup>1\*\*</sup>

1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Forest Seedling General Station of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350002, China; 3. Youxi Sanye Flower Limited Company, Youxi, Fujian 365100, China

**Abstract** Using terminal buds and stems with axillary buds as the explants, the technology of tissue culture and rapid propagation of standard cut *chrysanthemum* ‘Baishan’ was studied. The best sterilization conditions of apical bud explants and axillary buds was 75% alcohol 30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> for 3 min and 4 min. The best primary culture medium of ‘Baishan’ was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L with the best inducing effect rate 100% and average single bud induction 1.69. The optimal proliferation medium was MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L with multiplication coefficient 3.05, effective rate of bud 65.26% and average height 3.22 cm cultivated 30 d after. The 1/2MS medium supplemented with NAA and IBA could induce rooting in bottles, and the rooting rate was 100%. It could root outside bottles. The buds was inserted into the substrate after 5 minutes of immersion in the NAA solution, and the rooting condition was good. The results could be applied directly for production popularization of ‘Baishan’. The results could provide theoretical and technical guidance for the large-scale promotion and industrialization of ‘Baishan’ and standardized production of seedlings.

**Keywords** standard cut *chrysanthemum*; *Chrysanthemum* ‘Baishan’; tissue culture and rapid propagation

DOI 10.3969/j.issn.1000-2561.2019.04.014

收稿日期 2018-06-12; 修回日期 2018-11-22

基金项目 福建省林业厅科技项目(闽林科[2016]3号)。

作者简介 周婷(1990—), 女, 硕士, 研究方向: 花卉生物技术。\*同等贡献作者: 杨惠婷(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 花卉生物技术。\*\*通信作者(Corresponding author): 余文琴(SHE Wenqin), E-mail: wenqinshe@163.com; 陈桂信(CHEN Guixin), E-mail: guixinchen@126.com。

‘白扇’ (*Chrysanthemum* ‘Baishan’) 是优良的白色单头切花菊品种, 主要出口至日本和韩国, 是上述国家举行葬礼和祭祖拜神的必需品。在 6—9 月, 日本白菊市场基本被夏菊品种‘白扇’占据, 因而研究该品种的繁殖和栽培技术, 特别是组培快速繁殖技术对于开拓日本夏菊市场具有重要的经济意义。

我国种植的‘白扇’种苗均从日本购入, 由于种苗市场垄断, 生产成本低, 难以进行大规模推广应用。‘白扇’侧芽易萌发开花, 且多次扦插繁殖容易造成品种退化, 种植者难以长期自主扦插繁殖。目前我国尚没有关于单头切花菊‘白扇’组培与快速繁殖技术的研究, 而通过本研究所建立的单头切花菊新品种的组培快繁体系, 对打破优质单头菊种苗的垄断、加速引进的单头切花菊优良品种产业化提供优质种苗和技术支持, 具有重要的理论意义和实践价值。

王蔚林<sup>[1]</sup>以 2 个传统名贵菊花品种的叶片和花蕾为外植体进行研究, 获得了高效再生体系。王卉等<sup>[2]</sup>对 13 个品种的地被菊进行组织培养, 并以不同的部位作为外植体进行试验, 发现以茎尖及腋芽作为外植体时, 均能直接诱导产生不定芽, 而其他部位需要经过脱分化形成愈伤组织, 再分化成新的植株。杨玉萍等<sup>[3]</sup>的研究表明, 以根、叶片、叶柄为外植体分化不定芽, 不定芽的诱导率最高。菊科植物的无菌系建立和增殖培养通常采用 MS 培养基或 MS 改良培养基<sup>[4]</sup>。Renou 等<sup>[5]</sup>试验结果显示, 6-BA 和 NAA 为菊花再生的最适生长调节剂, 目前菊花组培中这 2 种生长调节剂的使用也较多, KT、2, 4-D、TDZ 也有一些应用。唐焕伟等<sup>[6]</sup>将无根的食用菊试管苗用生长素处理后扦插至珍珠岩中, 期间注意保持空气湿度和土壤湿度, 30 d 后成活率达 95%。

近年来国内外研究者利用杂交育种、基因工程等技术开发和培育了许多性状优良的菊科花卉新品种<sup>[7-8]</sup>。优良的新品种既需要数量上的快速增殖, 也需要性状上的稳定保持, 可以依靠植物组培快繁技术解决这一问题。目前菊科花卉的离体快繁研究日益成熟, 但也有大量研究表明, 由于每个品种的基因型不同, 其离体再生体系没有普遍性<sup>[9]</sup>。因此启动了本研究, 建立单头切花菊‘白扇’的组培快繁体系, 内容主要包括外植体的选

择和消毒、植物激素的选择与配比、培养条件的调节等方面。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

单头切花菊‘白扇’原种插穗由福建省尤溪县三叶花卉有限公司从北京延庆县永宁盛世鼎新菊苗场购买, 插穗经扦插形成种苗植株, 掐取长度 10 cm 的插穗为实验材料。

### 1.2 方 法

1.2.1 初代培养 将‘白扇’插穗剪去叶片, 切成 1~1.5 cm 的茎段, 用 1%雕牌洗衣粉溶液浸泡后用流水冲洗 90 min, 再用蒸馏水冲洗 2 次; 将顶芽和带腋芽茎段分别转移至消毒过的三角瓶中, 移到超净工作台, 倒入 75%酒精浸泡并不断搅动 30 s, 用无菌水冲洗数次, 再加入 0.1%升汞溶液进行消毒, 设置 5 个不同时间 (2、3、4、5、6 min) 的消毒处理, 最后用无菌水冲洗 5 次。将顶芽和带腋芽茎段接种于附加不同浓度 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg/L) 和 NAA (0.1、0.2、0.3 mg/L) 一一组合至含 30 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂的 MS 培养基上, 培养基的 pH 为 5.8~6.0, 培养条件: 温度(25±2)°C, 光照强度 2000~3000 lx, 光照时间 12 h/d; 每瓶接种 1 个外植体, 每个处理接种 30 瓶, 重复 3 次, 于接种后 20 d 统计污染率和成活率, 其中污染率=污染的外植体数/接种总外植体数×100%, 成活率=成活的外植体数/接种总外植体数×100%。接种后 30 d 统计芽诱导率、单芽总数, 并观察外植体的生长状况, 其中芽诱导率=诱导出芽的外植体数量/接种总外植体数×100%, 单芽总数=培养 30 d 后瓶内有效单芽总数。

1.2.2 增殖培养 由于大田插穗分化较完全, 而无菌苗各个部分均十分幼嫩, 故增殖培养不再区分顶芽和腋芽。取初代培养中生长状态一致的无菌苗, 切成 1~1.5 cm 左右的带芽茎段, 接种至不同激素浓度的增殖培养基中, 其中 6-BA 的浓度为 1.0、1.5、2.0 mg/L, NAA 为 0.05、0.10、0.15 mg/L。培养基分为 MS、1/2MS、1/4MS 三种, 一一组合成 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 的正交试验设计。培养条件同 1.2.1; 每个处理接种 30 瓶, 每瓶接种 5 个带芽茎段, 重复 3 次, 接种后 30 d 统计增殖系数和苗的生长情况, 其中增殖系数=增殖培养后瓶内总芽数/接

种时的总芽数,有效芽率=有效芽数(株高 $\geq 1.0$  cm)/增殖30 d后瓶内总芽数 $\times 100\%$ ,株高(cm)=试管苗基部至顶芽的长度;用Excel 2003软件和SPSS 17.0软件进行数据处理。将初代培养中生长状态一致的无菌试管苗切成1~1.5 cm左右的带芽茎段,转接至最佳增殖培养基(MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.15 mg/L)中,培养条件同1.2.1;光照时间设置3个处理:8、12、16 h/d,每个处理接种30瓶,每瓶接种5个芽,重复3次;接种后30 d统计增殖系数、有效芽率和平均株高(计算方法同1.2.1)。

1.2.3 瓶内生根培养 生根培养基配方采用两因素(NAA/IBA)四水平设计,基本培养基为1/2MS,仅添加NAA(0.05、0.1、0.15、0.2 mg/L)4个处理和仅添加IBA(0.05、0.1、0.15、0.2 mg/L)4个处理以及空白对照;将继代培养中生长状态基本一致的无菌苗切成2 cm左右的切段,接种至生根培养基中,培养条件均同1.2.1;每个处理接种30瓶,每瓶接3个芽,重复3次,接种后20 d观察并统计生根情况,瓶内生根率=生根苗总株数/接种总株数 $\times 100\%$ ,数据处理同1.2.2。

1.2.4 瓶外扦插生根培养 分别探讨生根剂配方和基质比对无菌苗生根的影响。选取继代培养基中生长健壮、株高整齐度较高(5~6 cm)的未生根无菌苗,将培养瓶移到自然条件下松开瓶盖,炼苗1 d,再开盖加入少量无菌水,再炼苗7 d。从瓶中小心取出无菌苗,从其基部剪下,基部用NAA(50、100 mg/L)和ABT生根粉(500 mg/L)分别浸蘸5 min后,插入无菌的移栽基质(蛭石、蛭石:珍珠岩=1:1、草炭土:蛭石=2:1、草炭土:蛭石:珍珠岩=2:1:1)中,浇透水,移到温室中。每个处理96株。昼夜温度为25℃/20℃,空气湿度为90%,基质保持水分充足,每隔3 d观察一次,扦插后7 d统计扦插生根率,扦插生根率=扦插生根总株数/扦插总株数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 生根苗的炼苗与移栽 分别探讨不同炼苗时间和移栽基质对生根苗的移栽效果的影响。对生根培养基培养20 d后的植株进行炼苗,对生根苗先盖盖1 d后开盖2、4、6、8 d再移栽的方式进行炼苗,小心清洗无菌苗根部附着的培养基,移栽到无菌基质(草炭土、草炭土:蛭石=2:1、草炭土:珍珠岩=2:1、草炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1)中,每个处理96株,移栽后15 d统

计移栽成活率,移栽成活率=移栽成活总株数/移栽总株数 $\times 100\%$ 。

### 1.3 数据处理

采用SPSS 17.0软件对实验数据进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 初代培养

2.1.1 消毒时间对外植体消毒效果的影响 不同消毒时间对顶芽和腋芽外植体的消毒效果有明显差异。顶芽以0.1%升汞溶液消毒3 min消毒效果最好,消毒3 min和消毒4 min的污染率均为2.2%,其中消毒3 min后顶芽的成活率最高,达到96.7%。用0.1%升汞溶液消毒6 min后,污染率为0,但由于消毒时间过长造成毒害,成活率仅为30%。用0.1%升汞溶液消毒带腋芽茎段4 min为最佳消毒时间,此时成活率达92.2%,污染率为4.4%。消毒5 min时的污染率为1.1%,但成活率仅为82.2%。消毒6 min时的污染率为0,但成活率迅速下降至55.5%。因此,以0.1%升汞溶液为消毒剂,顶芽外植体的最佳消毒时间为3 min,带腋芽茎段的外植体最佳消毒时间为4 min。具体情况见表1。

表1 不同消毒时间对顶芽和腋芽外植体的消毒效果

Tab. 1 Effects of sterilizing time on sterilizing of terminal buds and lateral buds as explants

消毒部位 Sterilization site	消毒时间 Disinfection time/min	平均污染率 Average pollution rate/%	平均成活率 Average survival rate/%
顶芽 Terminal buds	2	25.6 <sup>a</sup>	74.4 <sup>b</sup>
	3	2.2 <sup>b</sup>	96.7 <sup>a</sup>
	4	2.2 <sup>b</sup>	86.7 <sup>a</sup>
	5	1.1 <sup>c</sup>	57.8 <sup>c</sup>
	6	0.0 <sup>c</sup>	30.0 <sup>d</sup>
	2	37.8 <sup>a</sup>	61.1 <sup>b</sup>
腋芽 Axillary buds	3	14.4 <sup>b</sup>	85.6 <sup>a</sup>
	4	4.4 <sup>c</sup>	92.2 <sup>a</sup>
	5	1.1 <sup>c</sup>	82.2 <sup>a</sup>
	6	0.0 <sup>c</sup>	55.5 <sup>b</sup>

注:同列数据不同小写字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )。

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

2.1.2 激素比对无菌苗诱导的影响 以顶芽作为外植体接种至不同激素配比的初代培养基中,以探讨激素的种类和浓度对无菌苗诱导的影响,

结果见表 2。接种后 30 d, 在所有组合培养基中外植体基部均会产生愈伤组织, 但分化情况出现差异。当 NAA 浓度为 0.2、0.3 mg/L 时, 诱导的愈伤组织数量较多, 说明 NAA 浓度较高不利于顶芽的萌发和不定芽的诱导, 容易产生畸形芽或玻璃化; 当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时, 6-BA 浓度在 0.5~1.5 mg/L 之间时, 均能诱导出大量无菌苗, 当 6-BA 浓度为 1.0、1.5 mg/L 时, 芽诱导率均为 100%, 产生的无菌苗健壮、叶色浓绿, 基部的愈

伤组织呈浅绿色, 并能分化出数量较多的不定芽, 其中 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时芽诱导率 (100%) 和单芽总数 (1.69 个) 均达到最大。为了进一步说明激素配比对外植体无菌苗诱导的影响, 利用 SPSS 软件对初代培养中芽诱导率及单芽总数的数据进行方差分析。经过整理运算,  $P < 0.05$ , 即在  $\alpha = 0.05$  水平上, 各组的方差具有显著性差异。综上所述, 切花菊‘白扇’的最佳初代培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表 2 6-BA 和 NAA 配比对无菌苗诱导的影响

Tab. 2 Effects of different combinations of 6-BA and NAA on induction of sterile plantlets

处理 Treatment	6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	平均芽诱导率 Average shoot induction rate/%	平均单芽总数 Average number of single buds	生长状况 Growth status
1	0.5	0.1	98.9 <sup>a</sup>	1.16 <sup>b</sup>	无菌苗较细弱, 叶片黄绿色, 基部有浅绿色愈伤组织
2	0.5	0.2	23.3 <sup>d</sup>	0.27 <sup>c</sup>	无菌苗诱导时间长, 大部分分化为愈伤组织, 苗生长缓慢, 无菌苗出现部分玻璃化, 基部较多愈伤组织
3	0.5	0.3	3.3 <sup>e</sup>	0.08 <sup>f</sup>	大量愈伤组织, 部分轻微褐化, 大部分分化为愈伤组织, 无菌苗数量稀少, 且出现畸形, 玻璃化严重
4	1.0	0.1	100.0 <sup>a</sup>	1.69 <sup>a</sup>	无菌苗健壮, 叶片浓绿, 生长速度快, 基部有黄绿色愈伤组织
5	1.0	0.2	36.7 <sup>c</sup>	0.40 <sup>d</sup>	芽少, 无菌苗诱导慢, 长势较差, 基部大量愈伤组织
6	1.0	0.3	23.3 <sup>d</sup>	0.26 <sup>e</sup>	芽少, 无菌苗长势差, 部分畸形, 基部大量愈伤组织
7	1.5	0.1	100.0 <sup>a</sup>	1.24 <sup>b</sup>	无菌苗健壮, 叶片浓绿, 生长速度较快, 基部较少黄绿色愈伤组织
8	1.5	0.2	45.6 <sup>b</sup>	0.52 <sup>c</sup>	芽较少, 无菌苗较低矮, 愈伤组织较多
9	1.5	0.3	32.2 <sup>c</sup>	0.37 <sup>de</sup>	芽少, 无菌苗生长缓慢, 小部分叶片畸形, 基部有愈伤组织
CK	0	0	1.3 <sup>e</sup>	0.03 <sup>f</sup>	无菌苗长势差, 极少数产生不定芽

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

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

## 2.2 增殖培养

2.2.1 培养基配方对无菌苗外植体增殖培养的影响 由表 3 可见和图 1, 在所有不同配方的培养基中, 外植体基部均产生少量愈伤组织, 但各处理间外植体的生长情况差异明显。处理 1 (6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L)、处理 6 (6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L)、处理 8 (6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L) 生长速度较快, 植株健壮, 叶片较大且叶色浓绿, 其中以处理 6 的长势最好。处理 3 (6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.15 mg/L)、处理 5 (6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L)、处理 7 (6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L) 的无菌苗生长速度较慢, 植株低矮, 且部分无菌苗底部叶片变黄。综上所述, 以‘白扇’无菌苗切段作为外植体进行增殖培养, 接种至 MS+6-BA

1.5 mg/L+ NAA 0.15 mg/L 中增殖系数最高, 为 3.05。

2.2.2 培养基配方对无菌苗有效芽率的影响 由表 3 可见, 在各处理间有效芽率差异较大, 其中处理 6 的平均有效芽率最高, 高达 65.26%, 处理 7 的有效芽率最低, 仅为 27.98%。通过比较  $R$  值发现, 培养基中的 3 个因素对有效芽率的影响大小依次为: 基本培养基>NAA>6-BA。

用 SPSS 软件对有效芽率进行分析,  $P > 0.05$ , 即在  $\alpha = 0.05$  水平上 9 组配方之间不存在显著性差异, 方差具有齐次性, 因此接下来采用 LSD 法进行数据分析。NAA 和基本培养基对‘白扇’有效芽的诱导率具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 6-BA 对有效芽的诱导率不具有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

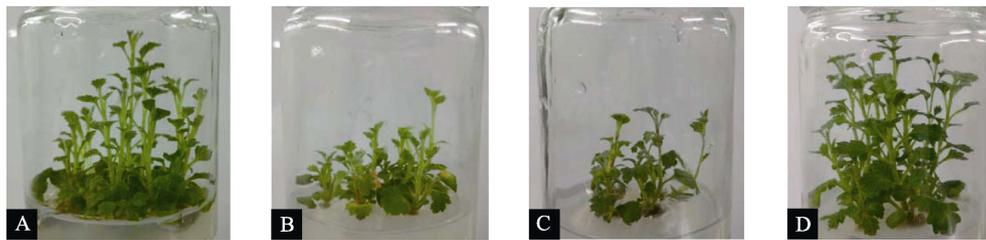
表 3 培养基配方对无菌苗外植体增殖培养的影响

Tab. 3 Effects of different formula of media on multiplication of sterile plantlets

处理 Treatment	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	基本培养基 Basic medium	生长状况 Growth Status	平均有效芽率 Average effective germination rate/%	增殖系数均值 Mean value of proliferation coefficient
1	1.0	0.05	MS	无菌苗较健壮, 茎干较细, 叶片浓绿, 生长速度较快, 基部少量愈伤组织	57.48 <sup>b</sup>	2.81 <sup>b</sup>
2	1.0	0.10	1/2MS	无菌苗叶片较小, 呈翠绿色, 生长速度较快, 基部少量愈伤组织	48.69 <sup>c</sup>	2.13 <sup>c</sup>
3	1.0	0.15	1/4MS	无菌苗生长十分缓慢, 叶片窄小, 部分底部叶片变黄, 基部少量愈伤组织	36.30 <sup>c</sup>	1.79 <sup>f</sup>
4	1.5	0.05	1/2MS	无菌苗茎干细长, 叶片翠绿, 生长速度较慢, 基部少量愈伤组织	41.88 <sup>d</sup>	2.60 <sup>c</sup>
5	1.5	0.10	1/4MS	无菌苗低矮细弱, 生长十分缓慢, 部分底部叶片变黄, 基部少量愈伤组织	35.97 <sup>c</sup>	1.64 <sup>g</sup>
6	1.5	0.15	MS	无菌苗健壮, 叶片浓绿, 生长速度快, 基部少量愈伤组织	65.26 <sup>a</sup>	3.05 <sup>a</sup>
7	2.0	0.05	1/4MS	无菌苗低矮, 生长十分缓慢, 部分底部叶片变黄, 基部有愈伤组织	27.98 <sup>f</sup>	1.55 <sup>g</sup>
8	2.0	0.10	MS	无菌苗健壮, 叶片浓绿, 生长较快, 基部少量愈伤组织	56.53 <sup>b</sup>	2.43 <sup>d</sup>
9	2.0	0.15	1/2MS	无菌苗较健壮, 叶片呈翠绿色, 生长速度一般, 基部少量愈伤组织	56.63 <sup>b</sup>	2.11 <sup>e</sup>

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P<0.05$ )。

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



A: 处理 1; B: 处理 3; C: 处理 5; D: 处理 6。

A: Proliferation culture 1; B: Proliferation culture 3; C: Proliferation culture 5; D: Proliferation culture 6.

图 1 不同增殖培养基中第 45 天的生长状态

Fig. 1 Growth status of different value-added media after 45 days

对  $F$  值进行对比可知, 3 个因素的影响力大小依次为: 基本培养基>NAA>6-BA。

综合以上结果, MS+6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.15 mg/L、MS+6-BA 1.5 mg/L+ NAA 0.15 mg/L 和 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.15 mg/L 均有利于切花菊‘白扇’有效芽的诱导。因此, 根据经济性原则 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L 最有利于获得增殖系数最大的‘白扇’增殖无菌苗。

### 2.2.3 光照时间对无菌苗增殖培养的影响

将初代培养得到的无菌苗切成 1~1.5 cm 左右的带芽茎段, 接种至最佳激素组合的增殖培养基中 (MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L), 光照时间处理为 8、12、16 h/d, 接种后 30 d 统计增殖系数、有效芽率及平均苗高。由表 4 可知, 在 3

个处理中, 处理 2 (光照 12 h/d) 与处理 3 (光照 16 h/d) 的无菌苗最为健壮, 生长速度较快, 其中处理 3 的增殖系数和有效芽率均达到最大值, 其平均苗高达 3.44 cm, 与处理 1 (光照 8 h/d) 之间极差达到 2.02 cm, 有效芽率与处理 1 之间极差达 23.01%。

进一步对数据进行方差分析和多重比较得出, 各组数据方差均具有齐次性, 不同光照时间对增殖系数、有效芽率及平均芽高均有显著性影响。切花菊‘白扇’增殖培养的最佳光照时间为 16 h/d。

综上所述, 切花菊‘白扇’的最佳增殖培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L, 增殖培养的最佳光照时间为 16 h/d。

表 4 光照时间对无菌苗增殖的影响

Tab. 4 Effects of lighting time on multiplication of sterile plantlets

处理 Treatment	光照时间 Illumination time/(h·d <sup>-1</sup> )	平均增殖系数 Average proliferation coefficient	平均有效芽率 Average effective germination rate/%	平均苗高 Average seedling height/cm	生长状况 Growth status
1	8	2.38 <sup>b</sup>	47.08 <sup>c</sup>	1.42 <sup>c</sup>	无菌苗叶片翠绿, 生长速度缓慢
2	12	3.05 <sup>a</sup>	65.26 <sup>b</sup>	3.22 <sup>b</sup>	无菌苗健壮, 叶片浓绿, 生长速度较快
3	16	3.17 <sup>a</sup>	70.09 <sup>a</sup>	3.44 <sup>a</sup>	无菌苗健壮, 叶片较大, 生长速度快
极差		0.79	23.01	2.02	

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

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

### 2.3 瓶内生根

将增殖培养产生的无根苗, 切成 2 cm 左右的切段, 接种至不同激素配比的生根培养基中, 接种 20 d 后观察并统计生根情况 (图 2)。由表 5 可见, 培养基中添加生长素, 对促进无根苗生根具有良好效果, 在生根率、生根根数、根长及根系粗细程度上, 均起到促进作用, 对照组 CK 的生根率为 96.67%, 而添加了生长素的培养基中生根率均达 100%, 且根系生长粗壮。对以上数据用 SPSS 软件进行分析, 结果表明: 不同浓度的 NAA 之间, 生根率、根数、根长均没有显著性差异; 不同浓度的 IBA 之间, 上述各个指标亦均不存在

显著性差异。添加 NAA 的培养基上, 根系较添加 IBA 的处理组粗壮, 但生根根数、根长均略低于 IBA 处理组。综上所述, NAA 和 IBA 均适合进行‘白扇’无根苗的生根。

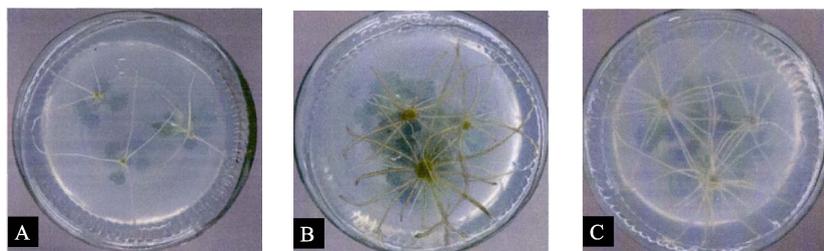
### 2.4 瓶外生根培养

从表 6 可看出, 无菌苗用 50、100 mg/L 的 NAA 溶液处理 5 min 后, 扦插的成活率和生根率均达为 96.9%, 平均生根数分别为 18.7 和 19.0 根, 用 ABT 生根粉 500 mg/L 浸蘸后, 成活率和生根率均为 93.8%, 平均生根数为 12 根, 略低于其他两组处理。因此, ‘白扇’无根苗的最佳瓶外扦插生根剂为 NAA 50 mg/L 和 NAA 100 mg/L。

表 5 激素对比对瓶内生根的影响

Tab. 5 Effects of combinations of plant regulators on rooting of root-free plantlets *in vitro*

处理 Treatment	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	IBA / (mg·L <sup>-1</sup> )	生根率 Rooting rate/%	平均根数 Average number of roots	平均根长 Average root length/cm	根系粗细 Root thickness
CK	0	0	96.67	5.3	1.3	细
1	0.05	0	100	15.2	2.2	粗
2	0.10	0	100	15.2	2.3	粗
3	0.15	0	100	15.0	2.3	粗
4	0.20	0	100	15.4	2.2	粗
5	0	0.05	100	15.9	2.9	较粗
6	0	0.10	100	16.2	2.7	较粗
7	0	0.15	100	16.1	2.6	较粗
8	0	0.20	100	16.0	2.7	较粗



A: 对照组; B: 处理 2; C 处理 6。

A: Rooting culture CK; B: Proliferation culture 2; C: Proliferation culture 6.

图 2 不同生根培养基第 20 天的生根情况

Fig. 2 Rooting situation of different rooting media after 20 days

移栽后 5 d, 观察到 4 种不同配比的扦插基质中, 无根苗均开始生根; 移栽后 7 d 统计成活率及生根率。由表 7 可见, 无根苗在 4 种扦插基质中的生根情况存在一定差异。其中, 扦插到蛭石、蛭石:珍珠岩=1:1 的无根苗成活率和生根率最高, 均为 96.9%, 但蛭石:珍珠岩=1:1 这个组合的平均生根根数较多, 达 14 根。因此, ‘白扇’无根苗的最佳扦插基质为蛭石:珍珠岩=1:1。

综上所述, 瓶外扦插生根的最佳处理为将 5 cm 左右的无根苗基部用生根剂 NAA 50 mg/L 或 NAA 100 mg/L 处理浸蘸 5 min 后, 扦插至蛭石:珍珠岩=1:1 的组合基质中进行培养。

## 2.5 炼苗移栽

2.5.1 炼苗时间对生根苗移栽效果的影响 将生根培养 20 d 左右的无菌苗移到自然条件下, 分别

表 6 生根剂对无菌苗瓶外生根的影响

Tab. 6 Effect of root ingredient on the roots outside sterile bottle

处理 Treatment	生根率 Rooting rate/%	平均生根数 Average number of roots
NAA 50 mg/L	96.9	18.7 <sup>a</sup>
NAA 100 mg/L	96.9	19.0 <sup>a</sup>
ABT 生根粉 500 mg/L	93.8	12.0 <sup>b</sup>

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P<0.05$ )。

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

表 7 基质对比对无菌苗瓶外生根的影响

Tab. 7 Effect of matrix ratio on rooting outside sterile bottle

处理 Treatment	成活率 Survival rate/%	平均生根数 Average number of roots
蛭石	96.9	12.7
蛭石:珍珠岩=1:1	96.9	14.0
草炭土:蛭石=2:1	87.5	11.3
草炭土:蛭石:珍珠岩=2:1:1	93.8	12.0

表 9 不同基质对比对生根苗移栽效果的影响

Tab. 9 Effect of combinations of media on transplanting of rooted plantlets

移栽基质 Transplanting matrix	移栽株数 Number of transplanted plants	成活株数 Number of living plants	成活率 Survival rate/%	生长情况 Growing situation
草炭土	96	90	93.75	小苗恢复较慢, 长势较差
草炭土:蛭石=2:1	96	96	100.00	小苗恢复良好, 长势较好
草炭土:珍珠岩=2:1	96	96	100.00	小苗恢复良好, 长势较好
草炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1	96	96	100.00	小苗恢复迅速, 长势良好

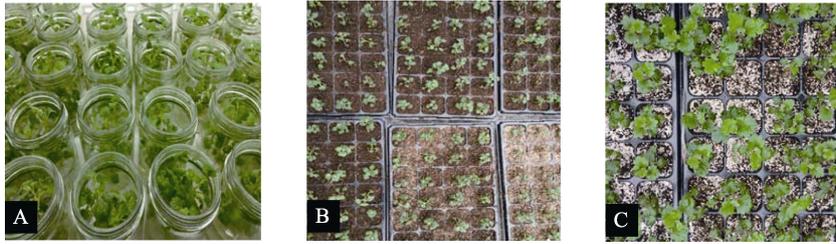
进行不同时间的炼苗后, 移栽至草炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1 的基质组合中, 移栽后 25 d 统计成活率。从表 8 中可知, 松盖 1 d 后开盖 6 d 的炼苗效果最好, 移栽成活率达 100%, 松盖 1 d 后开盖 2 d 的成活率最低, 为 88.54%, 这可能是由于炼苗时间过短, 无菌苗没有充足的时间适应复杂的外界环境, 导致移栽后部分小苗出现萎蔫, 最终枯死。松盖 1 d 后开盖 8 d 的成活率为 91.67%, 在炼苗过程中部分培养基发生污染, 植株根系较绵软, 移栽时易发生断根。因此, 生根苗的最佳炼苗方式为: 松开瓶盖炼苗 1 d, 再开盖炼苗 6 d。

表 8 炼苗时间对生根苗移栽效果的影响

Tab. 8 Effect of time of domestication on transplanting of rooted plantlets

炼苗天数 Days of refining/d	移栽株数 Number of transplanted plants	成活株数 Number of living plants	成活率 Survival rate/%
2	96	85	88.54
4	96	93	96.90
6	96	96	100.00
8	96	88	91.67

2.5.2 基质对比对生根苗移栽效果的影响 将生根培养 20 d 左右的无菌苗移到自然条件下进行松盖炼苗 1 d, 再开盖炼苗 6 d 后, 移栽至 4 种基质配比的基质中, 移栽后 20 d 统计成活率和观察小苗的生长状态 (图 3)。由表 9 可见, 生根苗在草炭土:蛭石=2:1、草炭土:珍珠岩=2:1 和草炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1 这 3 种移栽基质中的成活率均为 100%, 其中草炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1 这个组合小苗的生长情况最佳, 恢复迅速, 且顶端有新叶长出, 叶片大, 叶色翠绿。4 种移栽基质中, 草炭土的移栽效果最差, 成活率为 93.75%, 在移栽过程中出现无菌苗易倒伏的情况。因此, 生根苗的最佳移栽基质为草炭土:蛭



A: 开盖炼苗; B: 4 种移栽基质; C: 移栽后 20 d。  
A: Seedling hardening; B: Four types of substrates; C: 20 days after transplanted.

图 3 炼苗及移栽

Fig. 3 Plantlet acclimatization and transplant

石:珍珠岩=3:1:1。

综合以上分析,生根苗的最佳移栽方式为:先松开瓶盖炼苗 1 d,再开盖炼苗 6 d,清洗掉根系上附着的琼脂,最后移栽到草炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1 的基质中。

### 3 讨论

组培快繁具有繁殖速度快、培养周期短、保持母本优良性状且不受地域、季节限制的优点,被广泛应用到花卉种苗的工厂化生产中,对于一些繁殖系数低或新引进培育的花卉品种进行组培快繁,可以短期内获得大量基因型一致的优质苗木<sup>[10-11]</sup>。

菊科植物常用的再生体系有 2 种,分别为诱导外植体直接分化不定芽成为新植株和诱导愈伤组织再分化这 2 种途径。大多数的研究者认为,由茎段或叶片作为外植体直接诱导不定芽,能较好的保持原有的遗传性状,避免变异和嵌合体的发生。Shinoyama 等<sup>[12]</sup>研究表明通过愈伤组织途径建立再生体系需要 143~180 d,而不定芽直接诱导再生体系仅需 80~120 d,且愈伤诱导体系比不定芽诱导体系的再生率低。本研究采用直接分化不定芽的方法,以‘白扇’的顶芽和腋芽为外植体建立无菌株系,得出如下结果:顶芽外植体的最佳消毒条件为 75%酒精 30 s+0.1%升汞溶液消毒 3 min;带腋芽茎段的最佳消毒条件为 75%酒精 30 s+0.1%升汞溶液消毒 4 min;在初代培养中,以顶芽诱导无菌苗或不定芽的效果比带腋芽茎段更好,因此,顶芽为初代培养的最佳外植体;‘白扇’的最佳初代培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

在植物组织培养中将不同的植物生长调节剂进行组合搭配使用,会比单独使用效果更佳。程

蕾洁<sup>[13]</sup>研究发现,在对外植体的诱导过程中,用不同浓度的 6-BA 和 NAA 进行组合比单一的采用 6-BA 对芽的萌发率影响更大。本研究结果表明,‘白扇’无菌苗的增殖培养的最佳增殖培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L。并且随着光照时间的延长,无菌苗的株高也随之增加,当光照时间为 16 h/d 时,平均株高均高于 8 h/d 和 12 h/d,且无菌苗生长健壮、叶面积增大,这一结果与 Adams 等<sup>[14]</sup>和 Kurilčik 等<sup>[15]</sup>的研究结果一致。

菊科植物为较易生根的草本植物,生根周期较短,在组培快繁中一般将无根试管苗接种至添加了 NAA、IBA 或 IAA 生长素的培养基中,诱导试管苗不定根产生,再进行驯化移栽。陈燕梅<sup>[16]</sup>、王丽华<sup>[17]</sup>等研究表明,1/2MS 培养基较 MS 培养基、1/4MS 培养基更利于菊科花卉的生根培养。本研究得出,只要添加了生长素的 1/2MS 培养基均能诱导‘白扇’无根苗生根,生根率达 100%。无菌苗的驯化炼苗对其出瓶成活率起到关键作用,炼苗可以使无菌苗植株从恒温、恒湿、无菌、高养分的环境逐渐过渡到复杂的自然环境中。经炼苗移栽,即将‘白扇’生根的无菌苗经松盖 1 d,开盖 6 d 进行炼苗,移栽到基质为草炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1 的穴盘中,移栽 15 d 后成活率达 100%;草炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1 为最佳移栽基质,移栽 20 d 后成活率达 100%,小苗恢复迅速,长势良好。

本研究不仅开展了有根试管苗的露地移栽,还尝试了无根苗的瓶外生根试验。结果表明,瓶外扦插生根的最佳处理为将 5 cm 左右的无根苗基部用生根剂 NAA 50 mg/L 或 NAA 100 mg/L 处理浸蘸 5 min 后,扦插至蛭石:珍珠岩=1:1 的组合基质中进行培养。无根苗直接生根可以进一步减少移苗步骤和移栽成本,可以快速的生产‘白

扇’种苗,并且在实际应用中可以将瓶苗直接交给切花菊生产企业,由生产者自主安排扦插时间,减少运输成本和能源消耗,做到种植季节种苗的持续供应。

本研究的不足之处在于诱导的试管苗没有经过变异检测,因此下一步的研究需要进行田间观察和分子鉴定,以确保繁育过程中种苗的一致性与高质量。

## 参考文献

- [1] 王蔚林. 菊花再生体系的建立及用 *PPMADS5* 基因进行遗传转化的研究[D]. 北京: 首都师范大学, 2007.
- [2] 王 卉, 刘少翔, 赵处文, 等. 地被菊组培快繁及栽培技术研究[J]. 山西农业科学, 1995, 35(1): 49-51.
- [3] 杨文雅. 切花多头菊茎尖离体培养与快繁技术研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2014.
- [4] 杨玉萍, 李宜芸, 李茜雯, 等. 紫锥菊叶柄高效再生体系的建立[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2015, 47(4): 94-97.
- [5] Renou J, Brochard P, Jalouzot R. Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection[J]. Plant Science, 1993, 89(2): 185-197.
- [6] 唐焕伟, 曲彦婷, 李 黎, 等. 食用菊花组培苗瓶外生根的研究[J]. 黑龙江科学, 2013, 4(3): 30-31.
- [7] 张冬菊. 切花菊品种遗传多样性研究与杂交育种[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [8] 肖秀丽. 出口专用型切花菊离体快繁及生产应用技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [9] 吕晋慧. 根癌农杆菌介导的 *API* 基因转化菊花的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005.
- [10] Thorpe T A. History of plant tissue culture[J]. Molecular Biotechnology, 2006, 318(2): 169-180.
- [11] 梁称福. 植物组织培养研究进展与应用概况[J]. 经济林研究, 2005, 23(4): 99-105.
- [12] Shinoyama H, Kazuma T, Komano M, et al. An efficient transformation system in *Chrysanthemum [Dendranthema grandiflorum (Ramat.) Kitamura]* for stable and non-chimeric expression of foreign genes[J]. Plant Biotechnology, 2002, 19(5): 335-343.
- [13] 程蕾洁. ‘金山’绣线菊组织培养再生体系的建立[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [14] Adams S R, Langton F A. Photoperiod and plant growth: A review[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2005, 80(1): 2-10.
- [15] Kurilčik A, Dapkūnienė S, Kurilčik G, et al. Effect of the photoperiod duration on the growth of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*[J]. Sodininkystė Ir Daržininkystė, 2008, 27(2): 39-46.
- [16] 陈燕梅. 福建名优菊花工厂化试管育苗关键技术研巧[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [17] 王丽华. 银胶菊组培技术及玻璃化防止措施研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.