

# F<sub>1</sub> 大丽花组培苗快繁技术研究

鞠志新<sup>1</sup>, 李志清<sup>2</sup>, 宁显宝<sup>1</sup>, 刘畅<sup>1</sup> (1. 吉林农业科技学院, 吉林吉林 132101; 2. 吉林师范大学, 吉林四平 133000)

**摘要** 用 F<sub>1</sub> 大丽花的种子、嫩芽及开花茎段做外植体, 以 MS 为基本培养基, 在 5 个分化培养基上接种诱导出芽, 在 4 个继代培养基上扩繁增殖, 在 4 个生根培养基上诱导生根, 在 4 种无土基质上出瓶培养成生产用苗。得出 F<sub>1</sub> 大丽花组培苗速繁适用程序为: 嫩芽及开花茎段为外植体→接种在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L→增殖在 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+B<sub>9</sub> 0.1 mg/L→生根在 1/2MS+0.1 NAA mg/L→落叶松针叶+细沙出瓶培养。试验采用简易材料和药剂, 降低了组培苗生产成本, 选取可控花期的不同部位外植体, 可缩短育苗周期。

**关键词** 大丽花; 组培; 外植体; 快繁程序

**中图分类号** Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)21-06374-02

## Study on the Technology of Tissue Culture and Rapid Reproducing of *Dahlia pinnata* F<sub>1</sub>

JU Zhi-xin et al (Jilin College of Agricultural Science and Technology, Jilin, Jilin 132101)

**Abstract** The seed, bud and stem of *Dahlia pinnata* F<sub>1</sub> were selected as explants, MS was used as the fundamental culture medium including 5 kinds of different media, 4 kinds of generation reproduce media, 4 kinds of rooting media, and 4 kinds of ground substances for plantlets-transplanting. The preliminary conclusion was: the suitable inducing medium for bud and stem was MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L, the generation medium was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + B<sub>9</sub> 0.1 mg/L, the rooting medium was 1/2MS + NAA 0.1 mg/L and the suitable ground substance was Pine needle + sand. In this experiment the simple material and the medicament were used, which reduced the plantlet production cost, and the selection of controllable flowering season in different position explants was allowed to reduce the cycle of plantlet regeneration.

**Key words** *Dahlia pinnata* F<sub>1</sub>; Tissue culture; Explants; Rapid reproduction

大丽花(*Dahlia pinnata*)是菊科大丽花属露地球根花卉, 多年生草本植物, 原产于墨西哥的热带高原。F<sub>1</sub> 大丽花(*Dahlia hybrida*), 是大丽花杂交一代品种的统称。F<sub>1</sub> 大丽花以花大、色艳、重瓣、矮化、花期长等特点深受人们的喜爱, 在园林绿化以及家庭盆栽中应用广泛。由于常规的繁殖方法无法满足绿化美化的需求, 用种子繁殖会发生变异, 扦插繁殖周期长、病毒累积多, F<sub>1</sub> 代种子主要靠进口, 价格较高。这就需要探索扩繁速度快、培育时间短的繁殖方法<sup>[1]</sup>。采用组织培养技术, 可解决生产中对花期、花色要求一致的难题, 同时可降低成本; 为此, 笔者在花期、花色控制和低成本快繁方面做了一些探索。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 为了保证组培苗的无毒和种性, 选用大连捷怡园艺有限公司提供的大丽花 Superman 系列 F<sub>1</sub> 代种子, 采用 F<sub>1</sub> 代种子、F<sub>1</sub> 代幼苗嫩芽和开花成苗茎段 3 种材料做外植体, 幼苗及开花成苗培养阶段要求用防虫网或在培养室内培养, 保证无病虫害、无病毒侵染。选用 MS 基本培养基, 以 6-BA、NAA、B<sub>9</sub> 等激素做配比, 加入琼脂、白糖、白开水制作固体培养基, 用 100 ml 三角瓶及 500 ml 玻璃瓶培养。

## 1.2 方法

**1.2.1 培养基成分。**以 MS 为基本培养基, 3 个阶段培养基主要在激素上加以调节; 琼脂用食用标准的袋装琼脂条, 用量 0.6 g/L; 糖分用食用白糖<sup>[2]</sup>, 用量 18 g/L; pH 5.8~6.0。

接种诱导分化培养基为 5 个配比, Y<sub>1</sub>: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L(单位下同); Y<sub>2</sub>: MS+6-BA 1.0+NAA 0.5; Y<sub>3</sub>: MS+6-BA 1.0+NAA 0.2; Y<sub>4</sub>: MS+6-BA 0.5+NAA 0.2; Y<sub>5</sub>: MS+6-BA 0.2+NAA 0.1。

继代培养基为 4 个配比, J<sub>1</sub>: MS+6-BA 1.0+NAA 0.5; J<sub>2</sub>: MS+6-BA 1.0+NAA 0.2; J<sub>3</sub>: MS+6-BA 1.0+NAA 0.2+B<sub>9</sub> 0.1; J<sub>4</sub>: MS+6-BA 0.5+NAA 0.2+B<sub>9</sub> 0.1。

生根培养基为 4 个配比, S<sub>1</sub>: 1/2MS+6-BA 0.2+NAA 0.5; S<sub>2</sub>: 1/2MS+NAA 0.5; S<sub>3</sub>: 1/2MS+NAA 0.1; S<sub>4</sub>: 1/2MS+NAA 0.05。

**1.2.2 材料处理。**接种用种子经净种选优后, 用 35℃温水自然冷却浸种 2 h, 在自来水下冲洗 1 h, 再在超净工作台上用 70%酒精灭菌 30 s, 0.5% HgCl<sub>2</sub> 浸润 10 min, 冲洗 5 次, 吸干水分, 接种诱导分化培养基上。嫩芽选 6~8 叶阶段的实生苗腋芽, 用 0.5% HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 min, 清洗后接种。茎段选初花阶段的壮苗, 取带芽茎段 1.0~1.5 cm 长, 剪去叶片, 在超净台上用 0.5% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min 后, 切去两个端口, 把茎段从两个腋芽中部切开, 切口向下接种在培养基内, 插入深度控制在 2 mm, 腋芽露出培养基表面<sup>[3]</sup>。继代培养在诱导分化出芽及愈伤瘤后开始, 切割愈伤组织及丛生芽或茎段做转瓶材料, 待转接芽经诱导长到 2 cm 以上时进行生根培养, 在茎段下部生出 3~4 条根, 根长 1.5 cm 以上时, 进行出瓶培养, 在无土无菌基质中培养成生产用苗。

**1.2.3 培养及观察。**培养温度控制在 (22±2)℃, 湿度在 65%~70% 之间, 光照强度 2 000~3 000 lx, 光照 11 h/d。从接种后第 2 天开始观察, 统计外植体形成愈伤组织时期, 生长速度, 芽丛出现时期及芽生长方式。根据生长状况, 接种 4~6 周后进行继代培养, 统计增殖系数及天数。生根阶段观察生根部位、生根时间, 出瓶后观察培养成活情况、开花时间和观赏性状。

出瓶基质采用无土材料混合配制, 各成分等体积配比, 4 个组合, C<sub>1</sub>: 细沙+珍珠岩; C<sub>2</sub>: 落叶松针叶+细沙; C<sub>3</sub>: 草炭+细沙; C<sub>4</sub>: 锯木屑+炉灰。

## 2 结果与分析

**2.1 诱导分化情况** 3 种外植体在 5 种诱导培养基上均有不同程度的分化, 从形成愈伤组织的时间及分化出芽的时间

**基金项目** 吉林神内中心科技项目(2004.0438-Y-2)。

**作者简介** 鞠志新(1967-), 男, 吉林德惠人, 硕士, 副教授, 从事花卉栽培、园林树木、植物组织培养等的教研工作。

**收稿日期** 2007-04-02

和芽类型看,外植体间差异明显(表 1)。种子启动较慢,少部分先出现愈伤化,大部分直接诱导出丛生芽,同时部分瓶有直上生长的茎段芽,长势壮;嫩芽启动较快,诱导出丛生芽最多;茎段大部分 10 d 后腋芽都开始萌动向上生长,茎段切口处有愈伤组织<sup>[4]</sup>,后期老化失绿。

表 1 3 种外植体诱导分化情况

| 项目 | 愈伤组织出现时间//d | 分化出芽时间//d | 分化出芽类型 |
|----|-------------|-----------|--------|
| 种子 | 12          | 27        | 丛生芽为主  |
| 嫩芽 | 7           | 13        | 丛生芽    |
| 茎段 | 10          | 16        | 单生芽为主  |

5 种接种诱导培养基对 3 种接种材料的影响也有明显差异,见表 2。培养基中的激素含量对愈伤组织出现时间存在一定规律性,随着 6-BA 含量减少愈伤化越晚,分化芽类型随着 6-BA 的增加,丛生芽越多,超过 1.0 g/L 后愈伤化严重;从芽诱导率来看,激素含量高愈伤化也高,能用于生产的芽减少。性状最好的为  $Y_4$  配比,丛生芽多而壮; $Y_5$  配比芽直上生长,叶片展开较大,侧芽数量上无增加。

表 2 5 种培养基对外植体诱导分化情况

| 项目    | 愈伤组织出现平均时间//d | 分化出芽类型  | 芽诱导率/% |
|-------|---------------|---------|--------|
| $Y_1$ | 8             | 愈伤丛生芽   | 22     |
| $Y_2$ | 8             | 丛生芽少量愈伤 | 73     |
| $Y_3$ | 10            | 丛生芽     | 90     |
| $Y_4$ | 12            | 丛生芽为主   | 92     |
| $Y_5$ | 9             | 单生茎段芽多  | 95     |

**2.2 增殖培养情况** 将丛生芽块或单芽进行转瓶,在 4 种继代增殖培养基上的发育情况有明显差异。在  $J_1$  上,先长出愈伤组织,之后发育成丛生芽,增殖系数为 4,转接 2 次后开始出现玻璃化苗;在  $J_2$  上仍有愈伤组织增长,之后继续形成丛生芽和单芽段向上生长现象,芽相对弱,增殖系数为 6;在  $J_3$  上,愈伤组织形成后,形成密集的丛生芽,芽非常紧凑,节间短缩,生长速度较慢,增殖系数为 10;在  $J_4$  上,芽略稀疏,仍以丛生芽生长为主,少量单芽拔高但节间短缩,较健壮,叶片大而浓绿,增殖系数为 8。

试验表明,培养基中加入  $B_9$  后对丛生芽发生、成苗及叶增厚、芽粗壮均有明显作用,有利于控制玻璃化苗的出现,对后续的继代转瓶、生根切芽操作有利<sup>[5-6]</sup>。

**2.3 诱导生根及出瓶情况** 在 4 种生根培养基上,均有生根植株,但生根方式、部位、生根时间和生根率不同,见表 3。受 6-BA 影响在  $S_1$  上仍出现愈伤组织块,影响芽的发生,并且根系也在愈伤处发出,对出瓶不利。去掉 6-BA 后, NAA 的浓度以 0.1 g/L 效果为好,生根率高达 96%,降低 NAA 后,生根率下降,但生根部位与常规扦插接近。

生根后,当根长达 1.5 cm 以上,有 3 条根时,进行炼苗后出瓶培养,培养环境温度保持 20~25℃,光照度 3 000~5 000 lx。在 4 种基质中,成活较好的是松针+细沙,成活率达 90% 以上;依次为草炭+细沙,成活率 72%;锯木屑+炉灰,成活率 64%;珍珠岩+细沙,成活率 78%,其原因是与基质保肥保水能力以及感染杂菌和自身稳定性有关<sup>[7]</sup>。锯木屑+炉灰

在培养前期与珍珠岩无区别,但后期出现幼苗黄化,部分根系枯萎,与锯木屑后期的分解有关,同时炉灰的碱性成分仍起作用,草炭的成活率低与草炭透气性差有关。

表 3 不同生根培养基诱导生根情况

| 项目    | 生根时间//d | 生根部位及方式  | 生根率//% |
|-------|---------|----------|--------|
| $S_1$ | 16      | 愈伤组织上    | 54     |
| $S_2$ | 11      | 茎基及愈伤组织上 | 72     |
| $S_3$ | 12      | 茎段基部     | 96     |
| $S_4$ | 14      | 茎基及茎段上   | 84     |

**2.4 性状观察及初花时间比较** 出瓶成活后上钵培养,与实生苗一起正常养护管理,经抽样调查和总体效果对比无变异现象发生,都能正常表达  $F_1$  代大丽花的性状,花色一致。

在开花苗龄上有差异,依次为自然培养实生苗 105 d,种子组培苗 91 d,嫩芽组培苗 72 d,茎段组培苗 51 d。正常管理条件下,自然培养实生苗开花苗龄计算是从播种出苗起至第 1 朵花开放时的天数,组培苗是从出瓶之日起至第 1 朵花开放时的天数。

### 3 结论与讨论

(1) 3 种外植体诱导成芽时间上有差异,种子启动较慢,大约 17 d 以后,而嫩芽尖和茎段在 10 d 左右。嫩芽材料以丛生芽为主,很适合做组培快繁启动材料。如为了单芽生长可选茎段为外植体,种子诱导时间偏长,但利于生产脱毒苗<sup>[8]</sup>。在继代培养中,增殖系数高低决定速繁效率,其中  $J_3$  培养基增殖系数 10,且丛生芽整齐、健壮,非常适合快繁生产<sup>[9]</sup>。从开花苗龄上可见,组培苗普遍比种子实生苗开花早,外植体之间也有很大差异,符合外植体选材规律,为了早开花,可选发育成熟的植株茎段为外植体。

(2) 综合各环节培养基不同激素对生长情况的影响,体现了 6-BA 对形成愈伤组织及促进芽分化上起主导作用, NAA 对芽的诱导及芽的生长有促进作用,  $B_9$  能调控芽的类型和质量,在不同阶段采用不同激素配比的培养基,可调控发展方向。试验得出  $F_1$  大丽花组培苗速繁适用程序可表示为:开花植株嫩芽及茎段为外植体 $\rightarrow Y_4$ :MS+6-BA 0.5+NAA 0.2 $\rightarrow J_3$ :MS+6-BA 1.0+NAA 0.2+ $B_9$  0.1 $\rightarrow S_3$ :1/2MS+0.1 NAA $\rightarrow$ 落叶松针叶+细沙出瓶培养,培养成生产用苗。

(3) 通过用白糖代替蔗糖,白开水代替蒸馏水,食用琼脂代替分析纯琼脂,以及用当地易取得的无土材料做出瓶基质,可减少组培苗的繁育成本。另外,通过采用不同部位的外植体可调控或缩短育苗时间,使开花期花色整齐一致,从而为解决组培苗价格偏高、 $F_1$  代种子偏贵、冬季育苗工作难度大等问题提出可行的办法<sup>[10]</sup>。

### 参考文献

- [1] 梅家训,丁习武.组培快繁技术[M].北京:中国农业出版社,2003:14-21.
- [2] 陈黎.观赏植物的组织培养繁殖技术综述[J].黄山学院学报,2005(3):55-57.
- [3] 郑玉梅,刘青林.木本观赏植物离体快速繁殖技术的进展[J].北京林业大学学报,2001,23(增刊):75-82.
- [4] 胡国富,胡小梅,胡宝忠.大丽花生殖生理学研究[J].北方园艺,2006(4):75-77.
- [5] 黄海帆,李萍,贺爱利.彩叶草的组织培养[J].植物生理学通讯,2003(4):339.

将模型 2 中的三因子中任二个固定为零水平,可得到另一因子对产量的回归效应方程,用微机进行仿真模拟,得出单因子对产量的效应(图 4)。由图 4 可见:①密度对产量的效应。在  $-r \sim 0$  内随密度的增加,产量近似呈斜率为 2 036.0 的直线上升,在  $0 \sim +r$  内,产量近似呈斜率为  $-761.0$  的直线下降。②纯氮量对产量的效应。在  $-r \sim -1$  内,随纯氮量的增加,产量近似呈斜率为 658.5 的直线上升,在  $-1 \sim +r$  内,产量近似呈斜率为  $-804.3$  的直线下降。③控穗时间对产量的效应。在  $-r \sim +r$  内,随 2,4-D 控穗时间的延迟,产量近似呈斜率为  $-387.5$  的直线下降,表明在强化栽培条件下,用 2,4-D 控穗有利于取得高产。

很明显,三因子对产量效应的强度  $X_1 > X_2 > X_3$ 。在该试验条件下,移栽密度、纯氮量、2,4-D 控穗三因子均是影响产量的重要因素,栽培上应根据各因子效应的大小及其作用方向,确定各因子适宜的取值范围,对群体进行科学合理的调控来实现高产。

**2.4 三因子最佳农艺组合方案寻优** 根据数学模型 2,在试验约束区域  $[-r \leq x_i \leq +r]$  内,利用微机对可能的  $5^3 = 125$  套组合方案进行仿真模拟,从中筛选出单产  $\geq 8\,250\text{ kg/hm}^2$  的高产农艺组合方案有 14 套,占 11.2%。最高单产为  $9\,139.5\text{ kg/hm}^2$ ,其编码组合为  $X_1 = 0, X_2 = -1, X_3 = -r$ ,即密度  $15.0\text{ 万穴/hm}^2$ 、纯氮量  $195.0\text{ kg/hm}^2$ 、总茎蘖苗达到预期群体的 60% 时( $225.0\text{ 万/hm}^2$ )进行 2,4-D 控穗。根据 14 套组

合方案中各因子不同水平出现的频率,可得出Ⅲ优 98 强化栽培单产大于  $8\,250\text{ kg/hm}^2$  的最佳因子组合编码水平:  $X_1$  为  $-0.159\,6 \sim 0.697\,6$ ,  $X_2$  为  $-0.981\,5 \sim -0.596\,5$ ,  $X_3$  为  $-1.156\,3 \sim -0.999\,7$ ,即密度  $16.5\text{ 万} \sim 18.0\text{ 万/hm}^2$ ,纯氮施用量  $196.5 \sim 213.0\text{ kg/hm}^2$ ,2,4-D 控穗时间在群体茎蘖达到预期群体的 66.1%  $\sim$  68.0% (群体茎蘖达  $248.0 \sim 255.0\text{ 万/hm}^2$ ) 时,三因子取平均值时产量为  $9\,027.0\text{ kg/hm}^2$ (表 5)。

### 3 小结与讨论

(1)Ⅲ优 98 在强化栽培条件下,各主要经济性状发展变化空间较大,且相互补偿能力很强,可通过不同栽培措施,建立多样性结构的高产群体。在各种高产群体中,以茎蘖苗和有效穗的变化最大,其对产量的影响也最大。因此,在适宜的密度范围内,通过氮肥、湿润管理和 2,4-D 控穗,使群体和个体各性状协调发展,是实现高产的重要途径。

(2)在强化栽培条件下Ⅲ优 98 经济性状效应最大的是最高茎蘖苗,其次是有效穗数,再次是穗总粒数、结实率。适宜的密度有利于优化稻株生长环境,发挥稻株个体生长优势,协调群体和个体之间的矛盾,促进高产;适宜的纯氮施用量能促进分蘖的发生和穗发育,但施氮过多易造成过多的无效分蘖,降低成穗率,使穗型变小而减产;适时进行 2,4-D 控穗,有利于减少无效分蘖的发生,优化群体结构,提高成穗率和结实率,促进高产。

表 5 单产大于  $8\,250\text{ kg/hm}^2$  的农艺组合变量水平频率分析

| 水平       | 密度( $X_1$ )                             |      | 纯氮量( $X_2$ )                      |      | 控穗时间( $X_3$ )              |      |
|----------|-----------------------------------------|------|-----------------------------------|------|----------------------------|------|
|          | 次数                                      | 频率   | 次数                                | 频率   | 次数                         | 频率   |
| $-r$     | 0                                       | 0.00 | 3                                 | 0.21 | 6                          | 0.43 |
| $-1$     | 0                                       | 0.00 | 6                                 | 0.43 | 5                          | 0.36 |
| 0        | 8                                       | 0.57 | 5                                 | 0.36 | 3                          | 0.21 |
| 1        | 6                                       | 0.43 | 0                                 | 0.00 | 0                          | 0.00 |
| $+r$     | 0                                       | 0.00 | 0                                 | 0.00 | 0                          | 0.00 |
| 平均       | 0.428 6                                 |      | $-0.789\,0$                       |      | $-1.078\,0$                |      |
| $S_{xi}$ | 0.137 3                                 |      | 0.098 2                           |      | 0.040 0                    |      |
| 95%置信域   | $0.159\,6 \sim 0.697\,6$                |      | $-0.981\,5 \sim -0.596\,5$        |      | $-1.156\,3 \sim -0.999\,7$ |      |
| 农艺值      | $16.5\text{ 万} \sim 18.0\text{ 万/hm}^2$ |      | $196.5 \sim 213.0\text{ kg/hm}^2$ |      | 66% $\sim$ 68%             |      |

注:控穗时间为占预期总茎蘖苗的百分比。

(3)根据参试因子对产量的回归模型,模拟分析得出产量  $\geq 8\,250\text{ kg/hm}^2$  的栽培措施为:密度  $16.5\text{ 万} \sim 18.0\text{ 万/hm}^2$ ,纯氮量  $196.5 \sim 213.0\text{ kg/hm}^2$ ,2,4-D 控穗时间在群体茎蘖达到预期群体的 66.1%  $\sim$  68.0% ( $248.0\text{ 万} \sim 255.0\text{ 万/hm}^2$ ) 时。三因子取平均值时产量为  $9\,027.0\text{ kg/hm}^2$ 。

### 参考文献

[1] 袁隆平.水稻强化栽培体系[J].杂交水稻,2001,16(4):1-3.

[2] 林贤青,朱德峰,张玉屏.水稻强化栽培体系的原理及其应用效果[J].中国稻米,2003,53(3):23-24.

[3] 毛国娟,温怀楠,张根贤,等.单季晚稻水稻强化栽培试验初报[J].浙江农业科学,2003(增刊):70-72.

[4] 潘志高,陈洪坤,寿建尧,等.水稻强化栽培不同氮肥用量对产量的影响初报[J].中国稻米,2005,64(2):36.

[5] 陈水校,夏国绵,李金先,等.甬优 6 号强化栽培不同密度对产量的影响[J].中国稻米,2006(5):22.

(上接第 6375 页)

[6] 王映华,矮壮素对一串红幼苗生长的影响[J].安徽农业科学,2005,33(5):101,144.

[7] 傅蓼辉,徐惠珠,王豫兰,等.美人梅的茎段离体培养[J].北京林业大学学报,1995(增刊):76.

[8] 姚立平,石文平.对组培技术应用的几点建议[J].辽宁林业科技,2005(4):34-36.

[9] 李湘阳,曾炳山,裘珍飞,等.观赏百合组培苗移植试验[J].浙江林业科技,2006(2):26-29.

[10] 马伟,刘青林.组培苗的成本核算与控制[J].北京林业大学学报,2001,23(增刊):26-29.