

## 菊花品种神马的茎段离体快繁研究

张天静<sup>1</sup>, 雷家军<sup>2</sup>, 孙文松<sup>1</sup>

(1. 辽宁省经济作物研究所, 辽宁 辽阳 111000; 2. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**为加快优质菊花种苗的繁殖,以菊花品种神马的茎段为试材,建立了无菌操作体系,并进行继代增殖、生根培养和驯化移栽。结果表明:升汞消毒茎段 5 min 效果最佳,存活率可达 70.0%,污染率为 13.30%;最佳初代培养基为 MS+BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,萌发率高且生长良好;最佳增殖培养基为 MS+BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,增殖系数达到 6.2;最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,生根率可达 97.8%。

**关键词:**菊花;茎段;离体快繁

中图分类号:S682.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)12-0019-04

菊花是菊属(*Chrysanthemum*)的多年生宿根草本植物,原产于我国,是四大切花之一,还是一种重要的盆花。菊花通常用扦插、嫁接、分株及组织培养等手段繁殖,但扦插和嫁接容易感染病毒,造成观赏品质退化,切花产量和质量下降。该研究以菊花的茎段为外植体,进行离体快繁,以期迅速繁殖大量优质菊花种苗,并提高鲜切花的品质和产量。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

供试材料为菊花品种神马,定植于辽宁省经

济作物研究所温室内,正常田间管理。

#### 1.2 方 法

1.2.1 无菌体系建立 剪取饱满而未萌发腋芽的枝条,将其剪成 2~3 cm 的茎段,置于烧杯中,用饱和洗衣粉溶液漂洗 10 min,流水冲洗 30 min 在超净工作台上先用 70% 酒精消毒 30 s,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡,消毒时间为 3、5、7 min。无菌水冲洗 3~5 次,最后用无菌滤纸吸干植物材料表面的水分,在无菌工作台上将其接种到初代培养基中进行培养。

1.2.2 初代培养 初代培养即得到无菌材料并诱导出芽。基本培养基为 MS,琼脂粉 6.2 g·L<sup>-1</sup>,糖 30 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8,激素为 BA 0.5、1.0、1.5 mg·L<sup>-1</sup> 和 NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>[1]。每个处理接种 40 个外植体,3 次重复。45 d 后统计萌发率、平均茎高及污染率。

1.2.3 增殖快繁 切取初代培养已经萌发 1~2 cm 腋芽,接种到继代培养基中。每处理 20 瓶,

收稿日期:2014-05-24

基金项目:沈阳市农业科技共建资助项目(201423)

第一作者简介:张天静(1979-),女,辽宁省辽阳市人,在读硕士,助理研究员,从事植物组织培养研究。E-mail:zhangtian-jing0903@163.com。

通讯作者:雷家军(1966-),男,辽宁省沈阳市人,博士生导师,教授,从事观赏植物科研教学工作。E-mail:jiajunleisy@163.com。

## Optimization for SSR-PCR Reaction System of Tomato by Orthogonal Design

ZHAO Jian-tao<sup>1</sup>, YIN Yan-xu<sup>1</sup>, CHANG Pei-pei<sup>1</sup>, HU Xiao-hui<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1,2</sup>

(1. College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Experimental Teaching Model Center of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** In order to determine the best SSR-PCR reaction system for tomato, the effect of *Taq* DNA polymerase, Mg<sup>2+</sup> and dNTPs consideration synthetically by 2× *Taq* PCR Master Mix was studied, so as to find out the effect and influence on the SSR-PCR reaction system of tomato and optimize the best reaction system. The results showed that the most remarkable factor was primers followed by template DNA, the least one was 2× *Taq* PCR Master Mix. The optimum reaction system was template DNA (50 ng·μL<sup>-1</sup>) DNA 2 μL, Master Mix 9 μL, primers 3 μL.

**Key words:** tomato; SSR-PCR reaction system; 2× *Taq* PCR Master Mix; orthogonal design

每瓶接6株,3次重复。培养温度25℃,光照强度1800~2400 lx,光照14 h·d<sup>-1</sup>,空气湿度70%~80%。MS为基本培养基,琼脂粉6.2 g·L<sup>-1</sup>,糖30 g·L<sup>-1</sup>,pH5.8。激素浓度为BA 0.5、1.0、1.5 mg·L<sup>-1</sup>,NAA浓度为0.02、0.05、0.10 mg·L<sup>-1</sup>。40 d后统计增殖系数并记录生长状况<sup>[2]</sup>。

1.2.4 生根移栽 小苗高度在1.5~2.0 cm时进行生根。基本培养基采用1/2MS,生长素为NAA 0.02、0.05、0.10 mg·L<sup>-1</sup>。蔗糖15 g·L<sup>-1</sup>,琼脂粉6.2 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8。每个处理接20瓶,每瓶6株,重复3次。培养条件同上。20 d后统计生根率、平均根长和根数,并记录根的生长状况。

将瓶内完成驯化的生根苗取出,洗净根基部

培养基,用0.1%多菌灵溶液浸泡1 min后移栽到穴盘中,基质为草炭土:珍珠岩=1:1<sup>[3]</sup>。菊花茎段离体快繁过程见图1。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒时间对菊花茎段污染和存活的影响

由表1中可以看出,0.1%升汞消毒时间为3 min时,污染率为50.0%,存活率为83.3%,虽然存活率高,但污染率过高。当消毒时间为5 min时,污染率降至13.30%,存活率也可达到70.0%。当消毒时间为7 min时,虽然污染率仅为0.06%,但存活率下降至36.7%。因此用升汞处理菊花外植体的最佳时间为5 min,既可以取得较高的存活率,也可以取得较低的污染率。

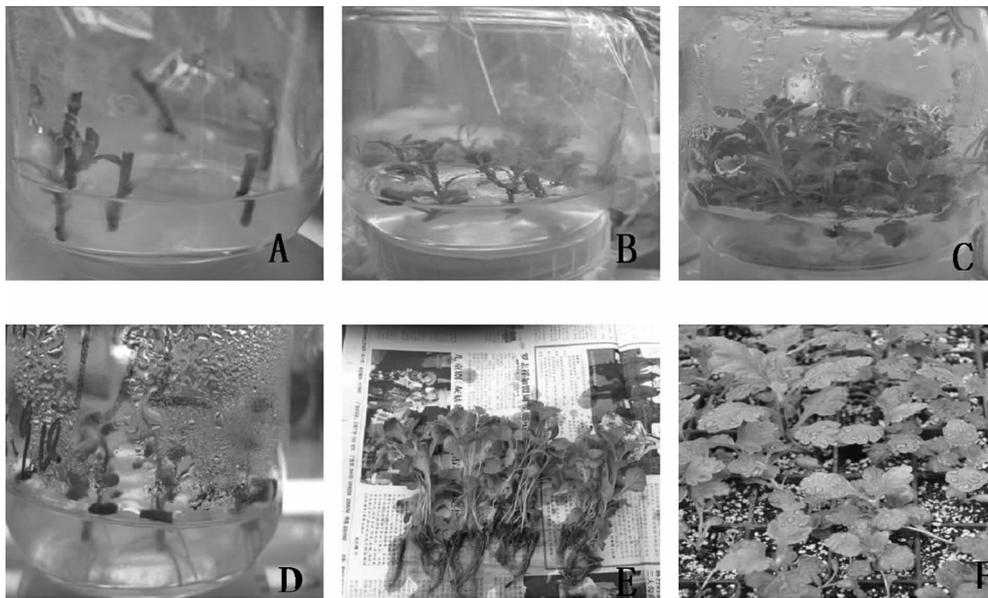


图1 菊花神马茎段离体快繁

A:茎段接种;B:初代培养;C:增殖培养;D:瓶内生根;E:生根苗清洗;F:生根后移栽。

Fig. 1 The micropropagation on stem of *Chrysanthemum* cv. Jinba

A: Inoculation of stem; B: Primary culture; C: Multiplication culture; D: Rooting of plantlet; E: Cleaning of rooting plantlets; F: Transplanting of plantlets.

表1 不同升汞消毒时间对菊花神马茎段存活和污染的影响

Table 1 Effect of sterilization times with 0.1% HgCl<sub>2</sub> on stem survival and contamination of *Chrysanthemum* cv. Jinba

升汞消毒时间/min Sterilization time of HgCl <sub>2</sub>	存活率/% Survival rate	污染率/% Pollution rate
3	83.3	50.00
5	70.0	13.30
7	36.7	0.06

## 2.2 不同激素浓度对菊花初代培养的影响

由表 2 可知,茎段在 MS+BA1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA0.1 mg·L<sup>-1</sup> 培养基中萌发率最高,茎最高,

生长状况最好,当 BA 达到 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 时,出现了玻璃化现象。因此,MS+BA1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA0.1 mg·L<sup>-1</sup> 为最佳初代培养基。

表 2 不同激素浓度对菊花神马茎段初代培养萌发和生长状况的影响

Table 2 Effect of hormone concentration on germination and growth status of stem *in vitro* of *Chrysanthemum cv. Jinba*

激素浓度/mg·L <sup>-1</sup> Hormone concentration		萌发率/%	茎高/cm	生长状况
BA	NAA	Germination rate	Stem height	Growth status
0.5	0.1	95	1.75	较好
1.0	0.1	98	2.34	最好
1.5	0.1	92	1.46	部分有玻璃化现象

## 2.3 不同激素浓度对菊花增殖的影响

由表 3 可以看出,BA 为 0.5~1.5 mg·L<sup>-1</sup>, NAA 浓度为 0.10 mg·L<sup>-1</sup> 时,随着 BA 浓度的增加,增殖系数逐渐增加,但当 BA 浓度超过

1.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,有玻璃化现象出现。因此 MS+BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA0.10 mg·L<sup>-1</sup> 为最佳继代培养基,增殖系数达到 6.2,且生长状态也很好。

表 3 不同激素浓度对菊花增殖的影响

Table 3 Effect of different hormone concentration on Multiplication coefficient of *Chrysanthemum cv. Jinba*

激素浓度/mg·L <sup>-1</sup> Hormone concentration		增殖系数	生长情况
BA	NAA	Multiplication coefficient	Growth status
0.5	0.05	3.0	差
0.5	0.10	3.8	较差
0.5	0.50	3.3	较差
1.0	0.05	4.7	较好
1.0	0.10	6.2	最好
1.0	0.50	5.8	好
1.5	0.05	6.0	较差(有玻璃化现象)
1.5	0.10	6.7	较好(有玻璃化现象)
1.5	0.50	6.4	好(有玻璃化现象)

## 2.4 不同 NAA 浓度对菊花生根的影响

由表 4 可以看出,当 NAA 浓度为 0.02~0.10 mg·L<sup>-1</sup> 时,随着浓度的增加生根率提高,根

长也增长。NAA 浓度超过 0.10 mg·L<sup>-1</sup> 时,生根率反而下降。因此 1/2MS+NAA 0.10 mg·L<sup>-1</sup> 为最佳生根培养基。

表 4 不同 NAA 浓度对菊花神马生根的影响

Table 4 Effect of different NAA concentration on rooting of *Chrysanthemum cv. Jinba*

NAA/mg·L <sup>-1</sup>	平均根长/cm	根数	生根率/%	生长状况
	Average root length	Root number	Rooting rate	Growth status
0.02	1.4	2.9	53.2	弱而短
0.05	1.6	4.8	78.5	短
0.10	2.1	6.1	97.8	壮而长
0.20	1.7	5.2	75.3	弱而短

### 3 结论与讨论

该试验对菊花茎段采用升汞消毒,结果表明,随着消毒时间的延长,污染率下降。但超过5 min,存活率也下降。所以5 min为最适消毒时间,污染率为13.30%,存活率为70.0%。

该试验结果表明,菊花品种神马的最佳初代培养基是MS+BA1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,能得到最高的萌发率,生长状况也最好。

当NAA浓度不变,随着BA浓度升高会促进苗的分化,但BA浓度过高则会诱导愈伤组织产生,同时出现玻璃化现象。当BA浓度不变时,NAA浓度过低不利于组培苗生长,过高则抑制组培苗的分化。只有保持BA和NAA合适的激素浓度配比才能使组培苗正常生长<sup>[4]</sup>。

菊花增殖的基本培养基一般为MS培养基,再添加不同浓度的生长素和细胞分裂素,以控制不定芽的长势及分化数量<sup>[5]</sup>,当BA浓度过高及NAA浓度太低,形成的试管苗会太过于细弱;而NAA浓度过高则愈伤组织生长快,分化芽的数量会降低<sup>[6]</sup>。一般认为在MS+BA0.5~2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IAA0.10~0.20 mg·L<sup>-1</sup>的培养基上进行增殖效果较好。该试验结果表明,随着BA浓度的增加,增殖系数增大,但当BA浓度超过1.0时会出现玻璃化现象。

通过增殖培养形成的无根小苗,需要进一步诱导生根。生根培养基大多不加激素或加少量生长素(IBA或NAA0~0.1 mg·L<sup>-1</sup>)的1/2MS培养基<sup>[7]</sup>。该试验结果表明,NAA浓度为0.02~0.10 mg·L<sup>-1</sup>时,生根率、根条数和根长都随着浓度的增高而增加。浓度超过0.10 mg·L<sup>-1</sup>时,反而下降。因此1/2MS+NAA 0.10 mg·L<sup>-1</sup>为最佳生根培养基,生根率高、根长且壮。经过炼苗移栽,成活率可达到98%,成活后生长健壮且抗病能力较强。

#### 参考文献:

- [1] 李娜,王平.色素万寿菊培养基组成的初步研究[J].北方园艺,2009(6):97-98.
- [2] 李启任,彭恒,王东.孔雀菊组织培养快速繁殖研究[J].云南大学学报:自然科学版,1997,19(4):370-373.
- [3] 田郎,谭海燕.菊花试管苗的研制及其规模化生产[J].福建热作科技,1999,24(1):1-3.
- [4] 孙月剑,车冬梅.欧洲矮化大花萱草组织培养的研究[J].大连民族学院学报,2006,8(3):44-46.
- [5] 向太和.菊花组织培养植株再生及其后代的变异[J].杭州师范学院学报:自然科学版,2006,5(1):42-45.
- [6] 曾凡力.菊花花瓣的组织培养[J].北方园艺,2007(9):207-208.
- [7] Sudharsan C, Aboel-Nil M, Hussain J. Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants[J]. Journal of Arid Environments, 2003, 54(1): 133-147.

## Study on Stem Micropropagation of *Chrysanthemum* cv. Jinba

ZHANG Tian-jing<sup>1</sup>, LEI Jia-jun<sup>2</sup>, SUN Wen-song<sup>1</sup>

(1. Economic Crop Institution of Liaoning Province, Liaoyang, Liaoning 111000; 2. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

**Abstract:** In order to speed up the breeding of high-quality *Chrysanthemum* cv. Jinba, taking stem segment of *Chrysanthemum* cultivar Jinba materials, sterile system was established, and the axillary bud *in vitro* was subcultured, rooted, domesticated and transplanted. The results showed that the disinfection time by 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 5 minutes was optimal, and the survival rate could be up to 70.0%, and contamination rate was 13.3%. When the induction medium was MS+BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>, the germination rate was high and the plantlets grew well. The optimal subculture medium was MS+BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup> with multiplication coefficient of 6.2, and the most suitable rooting medium was 1/2MS+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>, with rooting rate over 97.8%.

**Key words:** *Chrysanthemum* cv. Jinba; stem; rapid propagation *in vitro*