

草莓脱毒及组培快繁研究

冷春玲

(辽宁省辽东学院农学院生物系, 118003)

摘要: 剥离培养 0.3mm 的草莓微茎尖, 脱毒率可达 100%。最佳芽诱导培养基为 MS+BA1.0mg/L; 最佳继代培养基为 MS+BA0.5mg/L; 最佳生根培养基为 MS+BA0.1mg/L+活性炭 1.0g/L。

关键词: 草莓; 脱毒; 培养基

中图分类号: S 668.403.6 **文献标识码:** A

文章编号: 1001-0009(2007)05-0210-02

草莓是市场上极受欢迎的水果之一, 享有水果皇后之美誉。我国是世界上最大的草莓生产国, 年产量约 100 万 t。但从单产水平看, 虽然丹东地区创造过 6 000 kg/667m² 的惊人记录, 但与世界草莓生产先进国家如美国、日本、意大利相比, 我国的平均产量仍较低: 露地一般为 500~1 500 kg/667m², 拱棚一般为 750~2 000 kg/667m², 日光温室一般为 1 500~2 500kg/667m²。产量低的主要因素就在于我国草莓长期连作, 很少应用脱毒苗更新换代, 病毒侵染严重, 造成生长势衰退, 产量大幅度下降, 因此加强脱毒技术研究, 繁育并大力推广脱毒苗已势在必行。对草莓脱毒及脱毒组培苗的快速繁殖技术进行了较为详尽的报道, 希望能对我国草莓产业的健康持续发展起到微薄的促进作用。

1 材料与方 法

1.1 材料选取与灭菌

选择健壮的草莓匍匐茎, 用剪刀剪下来, 摘去茎尖周围的叶片, 用自来水冲洗 1h 左右, 以洗净沾上的泥土和表面的污物, 把冲洗好的匍匐茎尖放在烧杯中, 在超净工作台上先用 0.5% 新洁尔灭消毒 10~20min, 无菌水冲洗一次, 然后用 0.1% 氯化汞消毒 6~8min, 最后用无菌水冲洗 3~5 次。

1.2 茎尖剥离

在超净工作台上, 保证无菌的条件下, 逐层剥去茎尖周围的小叶及叶原基, 露出 生长点, 在显微镜下切取微茎尖, 迅速接种到准备好的芽诱导培养基上, 暗培养 7d, 然后转为光照培养。

1.3 芽诱导培养

芽诱导培养基为 MS+BA1.0mg/L^[1], 培养温度为 25℃, 湿度 70%~80%, 光照强度约 2 000Lx, 光周期为

15h/9h。每 3~4 周更换一次培养基。观察结果并记录。

1.4 继代培养

接种 2~3 个月左右, 当生长点发育成 1cm 左右的芽团时, 将其转移到继代培养基进行快繁培养。继代培养基以 MS+BA0.5mg/L 为主, 根据芽的生长繁殖状态以及不同阶段的不同需求, 适时对 BA 的浓度进行调整, 其他培养条件同上。继代培养时, 分割的芽团含 4~5 个芽。每 3 周左右更换一次培养基。

1.5 诱导生根

生根前的最后一次继代培养将 BA 的浓度降低到 0.2mg/L 进行壮苗。尽量选取健壮的无根幼苗接种到生根培养基中诱导生根。生根培养基为 MS+BA0.1mg/L+活性炭 1.0g/L。

1.6 移栽驯化

当根系长至 2~3cm 时, 将生根幼苗连瓶一并转移到驯化室内进行练苗 7d 左右。方法: 将培养瓶去掉封口膜后集中到一起, 加盖小拱棚及 50% 遮阳网, 注意保持拱棚内的温度及湿度, 每天在保证幼苗不萎蔫的前提下逐渐加大小拱棚的放风量。待幼苗逐渐适应驯化室的温度和湿度后, 把幼苗从瓶中拿出来, 小心洗去根部的培养基, 注意不要伤到根, 按大小分级后移栽到移植盘中。移栽基质为草碳土: 农家肥=1:1 或蛭石: 农家肥=1:1。待长出 5 片左右新叶时, 采用小叶嫁接法用 UC-5 指示植物鉴定其脱毒效果。

2 结果分析与讨论

2.1 脱毒率

研究结果表明, 剥离的茎尖越小, 其萌发速度就越慢, 成活率就越低, 这一结果与邓明琴教授的研究结果是一致的^[2]。0.6mm 的茎尖, 接种后 1 周左右即开始萌发, 成活率可达 90% 以上, 萌发后 5 周左右即可发育成 1cm 左右的小芽团; 0.4~0.5mm 的茎尖, 接种后 10d 左右开始萌发, 成活率在 50% 左右, 萌发后 6 周左右可发育成 1cm 左右的小芽团; 0.3mm 的茎尖, 接种后 2 周左右才开始萌发, 成活率仅有 20%, 萌发后 10 周左右才能发育成 1cm 左右的小芽团。

脱毒率鉴定结果: 0.6mm 茎尖的脱毒率仅为 62%; 0.4~0.5mm 茎尖的脱毒率为 81%; 0.3mm 茎尖的脱毒率为 100%。由此可见, 剥离的茎尖越小, 其脱毒率就越高。这是因为, 茎尖越小其感染病毒的机会就越少, 0.3mm 以下的微茎尖, 其内部还没有分化出输导组织, 因而没有感染病毒, 但是由于剥离 0.3mm 的茎尖要求操作者的技术必须相当熟练, 对于操作技术相对不太成熟者, 剥离的茎尖可稍大些, 首先确保一定的成活率, 翌年选择经过鉴定的脱毒苗重新进行脱毒扩繁, 亦达到同样的效果。

2.2 芽诱导培养

研究发现, 茎尖在剥离后先进行暗培养有利于伤口的恢复, 进而可使茎尖的成活率提高 10% 左右^[3], 详见表 1; 高浓度的 BA (> 2.0mg/L) 会导致幼芽严重玻璃

作者简介: 冷春玲(1965-), 女, 副教授, 研究方向为生物技术。

收稿日期: 2007-01-25

化,而低浓度 BA ($< 0.2 \text{ mg/L}$) 的芽诱导率较低,较适合的浓度为 $\text{BA} 1.0 \text{ mg/L}$,芽诱导率较高且生长状态正常。

表 1 暗培养与光照培养条件下微茎尖的成活率比较

	0.2mm 茎尖	0.4mm 茎尖	0.6mm 茎尖
暗培养	13%	30%	43%
光照培养	10%	23%	36%

2.3 继代培养

继代培养是草莓脱毒苗工厂化生产中最重要的一环。研究发现,在 $0.1 \sim 2.0 \text{ mg/L}$ 范围内,芽的分化频率随着 BA 浓度的升高而提高,但随着芽分化频率的提高,芽势会逐渐减弱,调查结果详见表 2。BA 浓度过高 (2.0 mg/L 以上) 或长时间 (60d 以上) 不更换培养基,都可能导致幼芽玻璃化。BA 的浓度低于 0.2 mg/L 时,芽的长势虽十分健壮,但芽的增殖速度明显减慢,且容易生根,给继代培养的操作带来很大的不便。综合比较,较为适宜的继代激素浓度为 $\text{BA} 0.5 \text{ mg/L}$ 。

表 2 不同 BA 浓度对芽增殖频率的影响

B 浓度 (mg/L)	芽数 (个)	芽高 (cm)
0.2	146	2.8
0.5	169	2.6
1.0	203	2.3

注:选同等状态的芽,每个条件接种 50 个芽,20 天后调查结果。

在继代培养过程中,BA 的浓度应根据芽的生长状态及生产需要及时进行调整。当出现玻璃化现象或因芽密度过大而导致芽势细弱时,应适当降低 BA 的浓度;当芽增殖速率过低或生根现象严重时,应适当提高 BA 的浓度,以提高繁殖速率及抑制生根。高、低浓度交替使用,往往可取得良好培养效果。此外,在继代培养时,接种的芽团大小要适中,以带有 4~5 个小芽的芽团较为适合。芽团过大时,由于芽的密度大会影响芽势;如芽团太小,因其在芽团分割过程中机械损伤加重而导致增殖速度减慢。

培养温度对芽的繁殖速率及生长状态亦有着十分显著的影响。当温度高于 28°C 时,芽老化速度加快,并导致生根现象加重,分化速率明显降低;当温度低于 22°C 时,芽分化速率亦显著降低,比正常条件下可降低 20% 以上;当培养温度降低到 18°C 时,芽分化速率降低 50% 以上,但适当降低培养温度对芽势具有一定的复壮作用。

2.4 生根培养

在以往的研究报道中,一般是采用 NAA 或 IBA 作

为生根诱导激素^[4],在我们的研究中发现,低浓度 BA 条件下的生根效果更为理想。应用 NAA 或 IBA 诱导生根,虽生根速度较快,接种后 5d 左右即有根生成,但根较为细弱,根与茎的基部的接合部位会诱导出水渍状愈伤组织,移栽时常导致根的脱落,降低了移栽成活率。而在低浓度 BA (0.1 mg/L) 的条件下,虽生根速度较慢 (一般 7d 左右开始分化出根),但根发育十分健壮,因而移栽的成活率较高。研究还发现,活性碳对促进生根和抑制芽分化具有十分明显的作用,并有助于玻璃化苗的恢复,因此我们采用 $\text{MS} + \text{BA} 0.1 \text{ mg/L} + \text{活性碳} 1.0 \text{ g/L}$ 比较作为生根培养基。不同生根培养基的比较结果见表 3。此外,适当提高温度和增加光照强度,可促进生根和叶片角质化,进而提高幼苗的移栽成活率。

在生根操作上,我们改变了传统单芽生根的操作方法,而是接种芽丛诱导生根,这样不仅减少接种时对芽的机械损伤,而且大大减少工作量,提高了工作效率,是实现快速工厂化育苗的必要手段。此外,采用瓶外沙培生根亦可有效缓解大批量种苗繁育时实验室内的工作压力,生根频率可达 98% 以上。

表 3 不同生根培养基诱导生根结果比较

培养基	生根率	平均根数	次生根根
$\text{MS} + \text{BA} 0.1 \text{ mg/L} + \text{活性碳} 1.0 \text{ g/L}$	100%	9.4	多
$\text{MS} + \text{BA} 0.1 \text{ mg/L}$	100%	7.8	多
$\text{MS} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg/L}$	100%	6.5	少
$\text{MS} + \text{IBA} 0.2 \text{ mg/L}$	100%	8.1	少

注:表中数据为接种后 15d 调查结果。

2.5 移栽驯化

移栽成活率的高低,除种苗的质量因素外,主要取决于基质的成分以及水分和温度的管理。基质应具有好的透气性、保水性和较充足的养分。低温寡照以及水分和湿度过大,都易引起幼苗感染真菌病害,严重时大面积从地下部分开始腐烂死亡。因此,在苗不萎蔫的前提下,应注意适当控制水分以及放风排湿。一般情况下,移栽驯化的成活率可达到 95% 以上。

参考文献:

- [1] 何欢乐. 草莓脱毒健壮苗繁殖体系的研究 [M]. 草莓研究进展 (一) 113-118.
- [2] 邓明琴. 草莓科研文选 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社 1990: 62-70.
- [3] 王海波, 刘庆忠. 草莓叶片再生体系研究初报 [M]. 草莓研究进展 (一) 119-124.
- [4] 于莉娟. 草莓的组织培养与快速繁殖 [M]. 草莓研究进展 (二) 260-261.

Research on Virus-free and Tissue-culture Techniques in Strawberry

LENG Chun-ling

(Department of Bldogy, Institute of Agriculture College of Liao Dong, Dandong, Liaoning 118003)

Abstract: To make the virus free rate to be 100%, the bud tissue, peeled off from cultivating stem, should be within 0.3mm. The best medium for stem bud inducement is $\text{MS} + \text{BA} 1.0 \text{ mg/L}$. The best medium to be used after the cultivation of stem bud inducement is $\text{MS} + \text{BA} 0.5 \text{ mg/L}$ and the selected medium for the root culture is $\text{MS} + \text{BA} 0.1 \text{ mg/L} + \text{activated carbon} 1.0 \text{ g/L}$.

Key words: Strawberry; De-toxin; Medium