

卡麦若莎草莓离体再生体系的研究

李凤兰¹, 车野¹, 胡国富¹, 徐永清², 刘荣梅¹, 胡宝忠¹

(1. 东北农业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150030 2. 东北农业大学成栋学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 卡麦若莎(Camarosa)为草莓新品种, 果大, 抗病性强, 在我国广泛种植。试验对卡麦若莎(Camarosa)进行组织培养, 选择最佳外植体, 最佳消毒时间, 最佳诱导培养基, 最佳分化培养基与生根培养基。结果表明: 最佳外植体是叶片, 0.1%升汞对外植体消毒 2 min 时效果最好; 诱导愈伤的最佳培养基为: MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA; 最佳分化培养基: MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA; 最佳生根培养基: 1/2MS+0.25 mg·L⁻¹ 6-BA, 此品种容易形成高效再生体系。

关键词: 草莓; 卡麦若莎(Camsrosa); 组织培养; 再生体系

中图分类号: S 668.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)04-0221-03

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)为蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria*)多年生草本植物, 是温带地区的一种重要水果。草莓被称为水果皇后, 在美国、日本、香港倍受青睐, 是春节馈赠亲朋好友的佳品。卡麦若莎(Camarosa)为草莓新品种, 其别名有卡姆罗莎、童子 1 号、美香莎等。为美国品种, 果实较大, 1、2 级序果平均单果重 45.0 g, 最大果重 100 g。果肉红色, 酸甜适宜, 香味浓。果实硬度大, 耐贮运。休眠期短, 开花早, 保护地条件下, 连续结实期 6 个月以上。适应性强, 抗灰霉病和白粉病。其优良的综合性状将成为 21 世纪草莓主栽新品种。20 世纪 90 年代中期引入我国, 在我国南北均有栽培, 在生产中草莓可分株、匍匐茎幼苗以及种子(很少用)等方法繁殖。但目前在生产上存在着繁殖较慢, 繁殖系数低, 种性退化, 病毒病严重等问题。为了解决此类问题, 以组织培养的方法建立的草莓快繁脱毒系统, 不仅比常规育苗繁殖系数高, 生长旺盛, 成活率高, 并可预防病毒病。现对卡麦若莎的组织培养技术进行了研究, 以期为此品种工厂化生产, 获得大量的种苗及抗病育种提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验选用材料为美国引进品种“卡麦若莎(Camarosa)”, 选取叶片, 叶柄, 花萼, 花柄为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 最佳外植体 研究在预实验阶段对不同的外植

体进行了选择。接种外植体分别为叶片(0.5 cm²), 叶柄(1 cm)和花柄(1.5 cm), 花萼。每种外植体接种数为 50 个。

1.2.2 最佳消毒时间的选择 外植体的预处理: 将长势较好的外植体切成合适的大小, 放在自来水下冲洗 1 h 后, 用蒸馏水冲洗几次后用吸水纸吸干水分, 置于超净工作台中, 准备消毒接种。外植体的消毒: 在超净工作台上, 4 种外植体在无菌条件下用 70% 的酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 4~5 次后, 用 0.1% 升汞分别消毒 1、2、3、4、5 min。无菌水冲洗 4 次后, 将叶切成 0.5 cm² 的方块, 花柄叶柄切成 1 cm 的小段, 然后接种, 接种后每 3 d 统计一次污染率, 褐化率, 分化率。培养基采用 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 琼脂粉 9 g/L, 蔗糖 30 g/L, pH 值为 5.8。培养条件采用光照培养, 每天光照 12 h, 光照强度 2 000 lx, 温度(25±2)℃。

1.2.3 丛生芽的诱导及继代培养 以 MS 为基本培养基, 加蔗糖 30 g/L, 琼脂 9 g/L, pH 值 5.8, 并附加不同浓度的 6-BA 0.1~2.5 mg/L, NAA 0.05~2.0 mg/L, 进行分组对比试验, 进行最合适的诱导愈伤、分化培养基的筛选。统计培养条件如上。

1.2.4 再生植株生根诱导 将继代培养基上生长到 2~3 cm 高的小苗转入生根培养基中, 进行根的生诱导。采用基本培养基为 1/2 MS, 植物生长调节剂: NAA、IBA。

1.2.5 再生植株的驯化与移栽 当小苗长至 4~5 cm 时, 就可以进行移栽。移栽前试管苗先在实验室内打开瓶盖练苗 4 d, 然后用自来水冲净根部残留的培养基, 移入由泥炭土、珍珠岩、腐叶土组成的培养土中, 荫蔽度为 90%, 保持高湿度, 适当遮光培养。

2 结果分析

2.1 最佳消毒时间

第一作者简介: 李凤兰(1973-), 女, 黑龙江人, 讲师, 主要研究方向为观赏植物的生殖生物学及组织培养。

通讯作者: 胡宝忠。

收稿日期: 2007-11-02

经不同时间处理的外植体, 培养 1 ~ 2 d 后, 可见 0.1% 升汞处理 1 min 的外植体上有较多的粘液状、白色菌体出现, 而处理 2 min 的外植体上少部分有污染现象, 主要是由于消毒不彻底造成的, 但大部分则无污染。处理 2 min 的外植体褐化程度达到 18%。消毒 3 min 以上的外植体污染率虽小, 但褐化程度深, 对外植体造成一定程度的伤害, 影响愈伤组织的形成。因此, 最佳消毒时间应选 2 min。

表 1 消毒时间对外植体的影响					
0.1% 升汞消毒 时间/ min	接种外 植体数	污染的外 植体数	污染 率/ %	褐化数	褐化 率/ %
1	50	37	74	0	0
2	50	8	16	9	18
3	50	4	8	13	26
4	50	4	8	29	58
5	50	0	0	50	100

注 污染率= (污染的外植体数/ 接种的外植体总数) × 100%; 褐化率= (褐化的外植体数/ 接种的外植体总数) × 100%; 分化率= (出芽的外植体数/ 未污染外植体总数) × 100%。

2.2 最佳外植体

以叶片、叶柄、花萼、花柄作为外植体用理想培养基进行愈伤诱导。定期进行观察发现以叶片为外植体的愈伤诱导较多, 且愈伤组织较大。以花柄与叶柄进行的愈伤诱导, 产生少量的愈伤组织, 且愈伤组织偏小。不适宜作快繁的外植体。因此, 草莓组织培养最佳外植体是叶片。

2.3 植物生长调节剂对草莓愈伤组织的诱导效果

试验根据正交设计选择了几个浓度的 6-BA 和 NAA 组合。在培养了 2 周后对诱导率进行统计, 结果如表 2 所示。根据愈伤组织诱导率确定出了最佳组合: MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 愈伤组织诱导率达到了 95.0%。

表 4 植物生长调节剂对生根的影响							
试验组	6-BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	培养时间/ d	接种数	生根芽数	生根率/ %	生长情况
1	0.1		15	30	15	50.0	根较粗壮, 根长 0.5 cm 左右
2	0.2		15	30	26	86.6	根粗壮, 根长 0.8 cm 左右
3	0.25		15	30	28	93.0	根较粗壮, 根长 1 cm 左右
4	0.5		15	30	17	57.7	根较粗壮, 根长 0.5 cm 左右
5	1.0	0.05	15	30	8	26.7	根细弱, 呈绒毛状
6	0.5	0.01	15	30	6	20.0	根较细弱, 呈绒毛状

2.6 移栽

对生根的小苗(小苗长至 4 ~ 5 cm 时, 生长了 4 ~ 6 条根)进行移栽。采用的基质为泥炭土、珍珠岩、腐叶土(1 : 1 : 1)组成的培养土中, 进行荫蔽, 遮光培养, 保持高湿。培养 10 d 左右长出新叶, 成活率达到 85% 以上。

3 讨论

3.1 品种对草莓叶片离体再生体系建立的影响

有关草莓再生体系研究较多, 涉及的品种也不少,

表 2 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响					
试验组	6-BA / mg · L ⁻¹	NAA / mg · L ⁻¹	接种数	愈伤组织 块数	愈伤组织 诱导率/ %
1	1.5	0.1	40	38	95.0
2	1.0	0.2	40	33	82.5
3	0.5	0.05	40	11	27.5
4	0.5	1.0	40	21	52.5
5	1.0	0.1	40	32	80.0

2.4 植物生长调节剂对草莓愈伤组织芽分化的影响
将继代培养的愈伤组织接种到分化的培养基, 20 d 后愈伤组织分化出绿色芽点。不同浓度植物生长调节剂对芽丛影响结果见表 3。可以看出 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 作为分化培养基的愈伤组织芽分化率最高, 达到了 90%。当芽丛长到 0.3 cm 高, 且有 2 片小叶时, 及时切离愈伤组织, 进行生根培养。

表 3 植物生长调节剂对芽丛形成的影响					
试验组	6-BA / mg · L ⁻¹	NAA / mg · L ⁻¹	接种数	分化数	分化率/ %
1	1.5	0.1	40	11	27.5
2	1.5	0.15	40	16	40
3	2.0	0.1	40	28	70
4	2.5	0.1	40	30	75
5	2.0	0.2	40	36	90
6	2.5	0.25	40	16	40

2.5 植物生长调节剂对生根的诱导效果
将产生的健壮不定芽分别转接到生根培养基上, 进行生根培养。结果如表 4 所示, 20 d 后调查表明, 附加 NAA 的培养基不利于根的诱导, 根生长缓慢细弱且呈绒毛状。芽苗在 MS+0.25 mg/L 6-BA 的培养基上生根效果最明显, 生根率达 93%, 根生长较快, 健壮, 一周后形成根系。比较根的生长情况, 诱导生根的最佳组合为: MS+0.25 mg/L 6-BA。

前人多从器官直接再生芽和愈伤组织分化芽 2 条途径中获得高频率草莓离体再生植株。Nehra 等人以草莓品种“Redcoat”温室苗叶片为外植体获得直接再生植株, 叶片不定芽再生率高达 94%, 在他试验的 10 个草莓品种中, 只有 Redcoat 获得高频率再生芽, 说明草莓再生芽频率受基因型控制。柯善强等人^[1]对草莓品种“全明星”叶片为外植体直接诱导出不定芽, 诱导率分别为 20% 和 65%, 表明这个品种叶片的离体培养的效率不高。在对

草莓品种 M₁₄的组织培养的研究中发现, 叶片为最佳的外植体, 再生率高达 94.44%, 平均每叶片再生芽数为 10.56 个^[2-3], 这些结果表明 M₁₄ 品种的叶片具有较高的诱导率。这些试验都证明草莓的基因型对叶片不定芽再生率起决定性的作用。该试验也确定草莓品种卡麦若莎(Camarosa)最佳的外植体为叶片, 在 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的条件下, 其再生率达到了 94%, 这表明, 这个新引进的品种叶片容易形成芽丛, 具有较高的再生率, 是一个可以进行工厂化大批量生产的好材料。

3.2 基本培养基对草莓再生体系建立的影响

作为草莓组织培养的基本培养基种类很多, 主要有 MS、MS+B5、LS、N6 培养基等。Nehra 于 1989 年最早建立起草莓品种“Redcoat”高频叶盘再生系统。不定芽再生率高达 94%, 其基本培养基为 MS+B5。于冬梅等以草莓品种 M₁₄ 叶片为外植体, 研究 MS 和 MS+B5 基本培养基对叶盘再生不定芽的影响, 结果表明, 芽再生率差异不显著。说明 B5 有机成分对 M₁₄ 叶盘芽再生的诱导效果不明显。LS 基本培养基的使用, 曾见于 Liu ZR 的报道, “全明星”试管苗叶片在 LS+BA 2.5+CH 600

(mg/L)培养基上叶片再生芽诱导率高达 79%。因此现今较多的使用 MS 培养基作为基本培养基^[4-7]。该试验在对卡麦若莎(Camarosa)进行再生体系建立时, 发现在 MS 基本培养基, 就具有较好的分化率, 表明此种品种对培养基的要求较低, 在生产中容易操作, 极易进行大面积的推广。

参考文献

[1] 柯善强, 洪树荣, 黄仁煌, 等. 植物激素对草莓叶片不定芽形成的影响[J]. 武汉植物学研究 1988 6(2): 133-138.
[2] 于冬梅, 胡文玉, 王关林. 基因型和培养因子对诱导草莓叶片再生芽的影响[J]. 沈阳农业大学学报 1998 29(2): 138-143.
[3] 邓馨, 胡文玉. 草莓叶片再生芽及遗传转化系统的建立[J]. 植物学通报, 2000, 17(2): 174-178.
[4] 梁贵秋, 唐燕梅. 草莓的组织培养和快速繁殖[J]. 广西热带农业 2004, 95(6): 8-9.
[5] 潘超, 黄文江, 张小平, 等. 草莓的组织培养与快速繁殖研究[J]. 生物学杂志 2005 22(2): 27-29.
[6] 杨淑珍. 草莓组织培养繁殖培育壮苗技术[J]. 北京农业 2003(12): 15-16.
[7] 郑亚杰, 高玉江. 公四一号草莓组织培养快繁技术研究[J]. 北方果树, 2004(6): 7-8.

Study on Highly Efficient Regeneration System in Vitro of Camarosa Strawberry

LI Feng-lan¹, CHE Ye¹, HU Guo-fu¹, XU Yong-qing², LIU Rong-mei¹, HU Bao-zhong¹

(1. Life Science College Northeast Agriculture University, Harbin, Heilongjiang 150030, China; 2. Chengdong College, Northeast Agriculture University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Camarosa is a new species of strawberry, which has large fruit type and high disease resistance. This species has spread in our country. In this text, tissue culture of Camarosa was investigated, we studied on the optimize explants, sterilize time of explants, the preferable medium of inducing of Strawberry (Camarosa), and the optimize medium of differentiation and rooting were screening. The result showed that the optimize explants was leaves, the explants sterilized in 0.10% aqueous mercuric chloride for 2 min had best effect. The preferable medium of inducing was MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA. The optimize medium of differentiation was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA. The preferable medium of rooting was 1/2 MS supplemented, with 0.25 mg/L 6-BA. It was easy for Camarosa to form highly efficient regeneration system.

Key words: Strawberry; Camarosa; Tissue culture; Regeneration system

欢迎订阅《北方园艺》期刊

邮发代号 14-150 单月刊 每册定价 6.00 元 全年 72.00 元