

“红颜”草莓茎尖组织培养快繁技术研究

董敬超

(辽宁省风沙地改良利用研究所, 辽宁 阜新 123000)

摘 要:以“红颜”草莓苗为试材,以茎尖为外植体,以 MS 为基础培养基,研究了最佳激素配比及最佳移栽基质对“红颜”草莓苗生长的影响,以期建立一个高效的茎尖组织培养快繁技术体系。结果表明:适宜的初代培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L,萌芽率为 81%;适宜的增殖培养基为 MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L,增殖系数为 9.1;最适宜的生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L,生根率为 98.0%;最佳移栽基质为营养土:珍珠岩:蛭石=1:1:1,移栽成活率达到 97.7%。

关键词:“红颜”草莓;茎尖;组织培养;快繁

中图分类号:S 668.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0106-03

草莓属蔷薇科草莓属多年生宿根草本植物,国内各地广泛种植。“红颜”草莓(*Fragaria × ananassa* Duch ‘Benihoppe’)是日本农林省久柄木草莓繁育场以“幸香”为父本,“章姬”为母本杂交选育而成的大果型草莓新品种^[1]。“红颜”草莓生长势较强,果个较大,长圆锥形,最大单果重可达 100 g,一般可结 30~60 个果。糖度高,硬度大,耐贮运^[2],是一个很有发展前途的优良品种,深受阜新地区人们喜爱。

草莓主要靠匍匐茎和分株进行无性繁殖,但效率较低,种苗易退化,不利于优良品种的推广,而且极易造成病毒感染,是限制草莓繁殖的瓶颈问题。组织培养具有培养时间短,不受季节影响的特点,是加速繁殖优良品种,获得无病毒植株的有效途径。而“红颜”草莓组织培养外植体选择和不同激素诱导已有很多报道^[3-5]。该试验利用草莓茎尖为外植体,根据外植体生长状况对激素浓度大小和配比进行协调,研究草莓茎尖组织培养快繁技术,以期完善草莓茎尖组织快繁技术体系奠定基础。

作者简介:董敬超(1979-),女,硕士,助理研究员,现主要从事植物组织培养与生态农业实验室常规化验等研究工作。E-mail:djchl@163.com

收稿日期:2013-09-09

1 材料与方法

1.1 试验材料

以“红颜”草莓(“日本 99”或“99”)品种为试材,取 2~3 cm 健壮草莓苗匍匐茎顶芽灭菌和消毒,纱布包好后用清水清洗 2~4 h,在 1% 84 消毒液或 0.3% H₂O₂ 中预灭菌 20 min,再用自来水冲洗干净。依次用 75% 酒精消毒 30 s,消毒时倒进 0.1% HgCl₂ 溶液和 2 滴吐温灭菌 4~5 min,不停摇动烧杯,至第 1 次倒出后记录时间。最后用无菌水冲洗 4~6 遍。培养室适宜温度 22~26℃,光照强度 2 600~3 000 lx,光周期 16~18 h/d。

1.2 试验方法

1.2.1 初代培养 在无菌条件和解剖镜下剥取茎尖分生组织 0.2~0.3 mm 的茎尖生长点,将带有 1~2 个叶原基的茎尖接种到培养基中。在原有试验基础上,初代培养基以 MS 培养基为基础培养基,添加不同浓度的细胞分裂素 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)和赤霉素(GA₃)、蔗糖 30 g/L,琼脂 5 g/L,pH 5.8。初代培养基设 6 个处理,每个处理接种 100 瓶,每瓶培养基中接种 1 个茎尖分生组织,30 d 后调查萌发情况。茎尖萌芽率(%)=萌发出芽的茎尖数/接种茎尖数×100%。培养基分为以下处理:(A₁)MS+6-BA 0.5 mg/L,(A₂)MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,(A₃)MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L,(A₄)MS+

restraining the pollen tube growth. CFA thinned flower by injuring pollen tube and stigma and the mechanism of thiourea was based on restraining the pollen tube growth which was in the upper part of stigma. Spraying lime sulfur, pollen germinated was normally on stigma, but it had visible restraint to the growth of pollen tube.

Key words: ‘Red Fuji’ apple; red peeled pear; flower and fruit thinning; embryonic development; Kunming area

6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, (A₅) MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.1 mg/L, (A₆) MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L。

1.2.2 继代与增殖培养 把由茎尖分化的幼芽,转入继代培养基中,使其加速生长,30 d后调查增殖情况。增殖系数=培养30 d后幼芽总数/接种幼芽总数×100%。再将获得的各腋芽的芽丛,以后每隔30 d分割1次,每5株切成1块,每瓶接种5块芽丛小块,转到新鲜的继代培养基中。经过多次继代培养,达到增殖的目的。继代培养基配方在原有试验基础上,以MS为基础培养基,在培养基中添加不同配比和浓度的6-BA、IAA、NAA,蔗糖30 g/L,琼脂5 g/L,pH 5.8。设6个处理,每个处理接种30瓶,培养基分设为以下处理:(B₁) MS+6-BA 0.25 mg/L, (B₂) MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.2 mg/L, (B₃) MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.1 mg/L, (B₄) MS+6-BA 0.5 mg/L, (B₅) MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L, (B₆) MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

1.2.3 生根培养 根据生产需要,增殖的数量达到一定要求后,将无根壮苗转入生根培养基中,促进生根。在原有试验的基础上,基础培养基以1/2MS为主,在培养基中添加不同浓度的6-BA、NAA,蔗糖30 g/L,琼脂5 g/L,pH 5.8。设6个处理,每个处理30瓶,每瓶接种切成一簇5株的丛生苗,30 d后调查生根情况。生根率(%)=30 d后生根苗数/接种苗数×100%。培养基分为以下处理:(C₁) 1/2MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L, (C₂) 1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, (C₃) 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L, (C₄) 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L, (C₅) 1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L, (C₆) 1/2 MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

1.2.4 驯化移栽 当生根苗基部形成7~8条根左右,植株叶片展开时挑选长势良好的壮苗进行驯化移栽。先将生根后的植株打开瓶盖,在温度25℃、湿度75%的室温中喷洒0.1%的多菌灵溶液,练苗7 d,移栽前将从生苗根部培养基洗净,成簇移栽在消过毒的基质当中,每天喷水2次,7 d后揭膜,15 d后调查移栽成活率。移栽基质采用营养土、珍珠岩、蛭石3种不同基质配比组合。每个处理30瓶苗,每瓶1簇5株的生根苗。分为以下5个处理:D₁(营养土),D₂(营养土:珍珠岩:蛭石=1:1:1),D₃(珍珠岩:蛭石=1:1),D₄(营养土:珍珠岩=1:1),D₅(营养土:蛭石=1:1)。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对“红颜”草莓不定芽萌发的影响

将茎尖接种到不同激素配比的初代培养基中30 d后分化出丛生芽。由表1可以看出,A₂号培养基与A₃

号培养基萌芽率显著高于其它处理。A₂号培养基萌芽率最高,达到81%,A₄号培养基褐化最严重。6-BA与NAA浓度要有一定比例有利于芽的形成,比例过高或过低都影响诱导效果。NAA浓度在0.1 mg/L时诱导效果最好,增大NAA浓度易发生褐化现象。同时也发现添加GA₃,并没有起到明显促进分化的作用。所以最佳初代培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂5 g/L。

表1 不同激素配比对“红颜”草莓苗不定芽萌发的影响

激素组合	接种数	褐化数	褐化率/%	萌芽数	萌芽率/%
A ₁	100	16	16	57	57 b
A ₂	100	13	13	81	81 a
A ₃	100	14	14	75	75 a
A ₄	100	31	31	37	37 c
A ₅	100	25	25	14	14 d
A ₆	100	27	27	38	38 c

注:同列数据后不同字母表示差异显著(P<5%)。下同。

2.2 不同激素配比对“红颜”草莓增殖和生长的影响

将诱导分化出的丛生芽接种于不同激素配比的继代增殖培养基上。由表2可以看出,30 d后B₁、B₂、B₃号培养基增殖系数显著高于B₄、B₅、B₆号培养基。由此可以看出6-BA浓度是增殖培养的主要因素,6-BA浓度低,增殖系数较高,其次是NAA浓度,NAA浓度高时,增殖系数并不高,但加入少量的NAA对增殖较有效果。所以最佳继代和增殖培养基为B₃号MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂5 g/L。

表2 不同激素配比对“红颜”草莓苗增殖系数的影响

激素组合	接种芽数	30 d后幼芽总数	增殖系数
B ₁	30	273	9.1 a
B ₂	30	235	7.8 a
B ₃	30	279	9.3 a
B ₄	30	174	5.8 b
B ₅	30	180	5.6 b
B ₆	30	168	6.0 b

2.3 不同激素配比对“红颜”草莓苗生根的影响

将健壮的无根苗接种到不同激素配比的生根培养基中,30 d后调查生根情况。由表3可以看出,C₃培养基生根率最高,达到98.00%,且发根整齐。其次是C₆号培养基,C₅号培养基生根率最低。当NAA浓度是0时,生根率最低;当6-BA浓度是0时,生根率依然能达到

表3 不同激素配比对“红颜”草莓苗生根的影响

激素组合	接种苗数	生根苗数	根系数/条	生根率/%
C ₁	150	94	6.3	62.67 b
C ₂	150	76	4.8	50.67 b
C ₃	150	147	9.2	98.00 a
C ₄	150	133	7.5	88.67 a
C ₅	150	38	3.1	25.33 c
C ₆	150	127	7.9	84.67 a

88%以上。由此可见,NAA 浓度是生根培养中的主要因素,能提高生根率和生根速度,并且 NAA 浓度过高或过低诱导生根效果均下降。而 6-BA 在生根培养中作用不明显。所以最佳生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L。

2.4 不同基质及配比对“红颜”草莓苗驯化移栽的影响

由表 4 可以看出,5 种基质均能移栽成活,但 D₂ 基质成活率最高,达到 97.7%。其次是 D₁ 号基质,与其它基质相比差异显著,D₁ 基质成活率最低,单独使用营养土移栽成活率降低,蛭石和珍珠岩透气性能好,保水能力强,与营养土搭配后效果最好。所以最佳移栽基质配比为营养土:珍珠岩:蛭石=1:1:1。

表 4 不同基质及配比对“红颜”草莓苗移栽成活的影响

基质	移栽数	成活率%
D ₁	150	49.6 c
D ₂	150	97.7 a
D ₃	150	70.8 b
D ₄	150	91.5 a
D ₅	150	67.4 b

3 讨论与结论

在该试验以“红颜”草莓茎尖为外植体,在初代培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 中萌芽率达到 81%。虽然花药和叶片作为外植体分化率也很高,董莉等^[6]利用叶片作为外植体诱导率达到了 90%。但草莓茎尖培养不需要形成愈伤和再分化,培养时间较短,变异率低,是一条非常有价值的组织培养快繁途径。但

茎尖培养萌芽率有待提高,不同激素配比控制愈伤形成需要进一步试验研究。

适宜的增殖培养基为 MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.1 mg/L,增殖系数为 9.1。6-BA 在增殖培养中起着决定性作用。最适宜的生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L,生根率为 98.00%。NAA 在生根培养中起着决定性作用。最佳移栽基质为:营养土:珍珠岩:蛭石=1:1:1,移栽效果最好,移栽成活率达到 97.7%。继代培养中,当继代苗到 5 代以上,可通过改变大量元素中的 NH₄NO₃ 用量来控制玻璃化现象,需进一步试验研究。

考虑到分株会导致伤苗、伤根。所以该试验草莓组培苗从芽丛小块到成簇丛生苗,从增殖培养到驯化移栽,始终没分单株,但结果发现基本没有影响生长,丛生苗繁殖较快,长势健壮,可以达到组培苗快繁的要求。

参考文献

- [1] 方博云,费鸣毅.草莓新品种—红颜[J].科技致富向导,2005(2):18.
- [2] 潘忠贵.红颜草莓[J].农业知识,2008(11):13.
- [3] 晁慧娟,刘敏,姬谦龙,等.‘红颜’草莓茎尖培养与快速繁殖[J].北京农学院学报,2009,10(4):14-16.
- [4] 宋向丽,吴志慧,陆梦溪,等.正交试验优化红颜草莓离体再生体系[J].安徽农业科学,2012,40(29):14188-14190.
- [5] 李志强,王晶,丁国亮,等.草莓热处理结合茎尖脱毒技术研究[J].北方园艺,2012(5):125-127.
- [6] 董莉,晁慧娟,董清华,等.红颜草莓叶片再生体系的建立[J].中国农学通报,2010,26(10):246-249.

Tissue Culture of Stem Tip and Rapid Propagation of (*Fragaria* × *ananassa* Duch. ‘Benihoppe’)

DONG Jing-chao

(Liaoning Institute of Sandyland Improvement and Utilization, Fuxin, Liaoning 123000)

Abstract: Taking the *Fragaria* × *ananassa* Duch ‘Benihoppe’ as the experimental material, the shoot tip as explants, MS as the basic medium, the optimal proportion of hormones and best transplanting substrate on growth of strawberry plantlets confidante were studied, in order to establish an efficient system of rapid propagation technique of cultivating a tip of stem tissue. The results showed that the suitable medium for primary MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+ sucrose 30 g/L+agar 5 g/L, germination rate was 81%; suitable proliferation culture medium for MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.1 mg/L+ sucrose 30 g/L+agar 5 g/L, multiplication coefficient was 9.1. The most suitable rooting medium was 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+ sucrose 30 g/L+agar 5 g/L, the rooting rate was 98.00%. The best transplanting matrix: nutrition soil: perlite: vermiculite=1:1:1, transplanting survival rate reached 97.7%.

Key words: *Fragaria* × *ananassa* Duch ‘Benihoppe’; stem tip; tissue culture; rapid propagation