

刘 刃,吕 乐,竺锡武. 红颊草莓组培标准化及穴盘壮苗研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):34-37.

红颊草莓组培标准化及穴盘壮苗研究

刘 刃,吕 乐,竺锡武

(浙江理工大学生物工程研究所,浙江杭州 310018)

摘要:将红颊草莓组培苗生长时期划分为丛生芽生成期、幼苗期、中苗期、不定根生成期、成苗期共5个时期,对组织培养过程中的激素组合和浓度进行筛选,发现组培苗在中苗期时采用MS+6-BA 0.3 mg/L+IBA 0.05 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L培养基具有较高的增殖系数(6.03),不定根生成期时采用1/2MS+IBA 0.4 mg/L+活性炭0.3 g/L培养基较适宜红颊草莓不定根的诱导,并建立了红颊组培操作标准流程。通过基质配比、相对含水量和肥料浓度3因素试验,以穴盘苗壮苗指数和外部形态为比较分析指标,获得最佳参数组合:泥炭基质、相对含水量60%、MS大量元素母液500倍稀释液施肥,适合培育红颊草莓穴盘壮苗。

关键词:红颊草莓;组织培养;标准化;穴盘

中图分类号: S668.404+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0034-04

草莓(*Fragaria ananassa*)为蔷薇科草莓属植物,近年来被世界各地广泛引种。目前,我国草莓的种植面积和产量均已成为世界第一^[1]。红颊是我国民众喜爱的优质草莓品种,目前,红颊草莓组培苗在质量与数量上不能满足农民的种植需求。草莓组织培养已有相关研究。顾虹开展了草莓组培苗标准化研究,确定了草莓组培苗工业化生产的最低标准^[2],草莓组织培养过程标准化研究尚未见报道。穴盘炼苗作为组培苗移栽到田间种植的重要中间环节,前人对很多植物组培

苗穴盘炼苗开展了研究^[3-4]。草莓穴盘育苗的报道主要集中在空间利用率和炼苗存活率方面^[5-6],在利用穴盘培育红颊草莓组培苗、对壮苗技术的系统研究尚未见报道。本试验开展红颊草莓组培过程标准化及穴盘壮苗技术研究,以期红颊草莓从组培苗生产到移栽种植提供完整的技术流程,为规模化生产优质红颊草莓种苗奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试红颊草莓脱毒苗,从宁波华夏现代农业研究所购得,田间种植后,将其植株的不同部位进行灭菌诱导快速繁殖,以获得红颊草莓组培苗作为后续试验材料;50孔聚苯乙烯(PS)塑料穴盘(52 cm×26 cm),购于商品市场;6-BA、IBA、GA₃,购于杭州汇普化工仪器有限公司,均为分析纯。

收稿日期:2012-12-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:31071729)。

作者简介:刘 刃(1986—),男,硕士研究生,研究方向为天然药物与生物反应器。E-mail:liuren0313@163.com。

通信作者:竺锡武,副研究员,硕士生导师。E-mail:zhuxw9999@yahoo.com.cn。

[4] Kimura T, Shi Y Z, Shoda M, et al. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis[J]. *Breeding Science*, 2002, 52(2): 115-121.

[5] Ghosh A K, Lukens L N, Hunter D M, et al. European and Asian pears; simple sequence repeat - polyacrylamide gel electrophoresis - based analysis of commercially important north American cultivars [J]. *HortScience*, 2006, 41(2): 304-309.

[6] Bao L, Chen K S, Zhang D, et al. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus L.*) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2007, 54(5): 959-971.

[7] 曹玉芬, 刘凤之, 高 源, 等. 梨栽培品种 SSR 鉴定及遗传多样性 [J]. *园艺学报*, 2007, 34(2): 305-310.

[8] 范太伟, 蔡丹英, 李红旭, 等. 甘肃中部梨资源遗传变异和亲缘关系的 SSR 分析[J]. *果树学报*, 2007, 24(3): 268-275.

[9] 鲁 敏, 汤浩茹, 罗 娅, 等. 日本“二十世纪”梨及其近缘品种的 SSR 分析[J]. *中国南方果树*, 2012, 41(6): 1-4.

[10] 马兵钢, 赵宗胜, 冯建荣, 等. 梨属 DNA 提纯方法的比较研究 [J]. *石河子大学学报:自然科学版*, 2000, 4(4): 277-281.

[11] Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, et al. Simple sequence re-

peats for the genetic analysis of apple[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 1069-1076.

[12] Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. *Molecular Breeding*, 2002, 10: 217-241.

[13] Lu M, Tang H R, Chen X Y, et al. Comparative genome mapping between apple and pear by apple mapped SSR markers [J]. *American - Eurasian J Agric & Environ Sci*, 2010, 9(3): 303-309.

[14] 夏月明, 李元军. 韩国果树考察报告 [J]. *烟台果树*, 2002(1): 48-49.

[15] 邓彦涛, 谢 艳, 赵 玲, 等. 梨新品种的花粉量、花器特性、花芽率及开花物候期调查 [J]. *山西果树*, 2004, 98(2): 31-32.

[16] 谢 艳. 梨树的高接换头及栽培技术要点 [J]. *落叶果树*, 2005(2): 55-58.

[17] 刘学平, 陶建敏. 早熟梨若光在南京的表现及栽培技术要点 [J]. *中国南方果树*, 2008, 37(2): 60.

[18] 胡钟东, 乔王山, 渠慎春, 等. 若光梨叶片诱导不定芽的研究 [J]. *江苏农业科学*, 2007(2): 91-92.

1.2 方法

1.2.1 外植体灭菌处理方式 外植体消毒灭菌处理方式如表1所示,每个处理分别接种50个外植体,7 d后调查外植体受污染的数量和损伤程度,统计污染率,计算公式为:污染率 $y = \text{污染的外植体数量} \div \text{接种的外植体总数} \times 100\%$ 。

表1 草莓不同外植体灭菌处理方式

处理编号	75%乙醇处理时间(s)	氯化汞处理时间(min)	处理编号	75%乙醇处理时间(s)	氯化汞处理时间(min)
A ₁	10	4	A ₆	20	12
A ₂	10	8	A ₇	40	4
A ₃	10	12	A ₈	40	8
A ₄	20	4	A ₉	40	12
A ₅	20	8			

1.2.2 组培苗生长时期划分 根据组培苗不同时期生长的特点,将组培苗划分为5个时期:(1)丛生芽生成期:愈伤组织分化形成丛生芽并增殖;(2)幼苗期:从丛生芽生长为幼小植株,此时期叶柄伸长,叶片展开;(3)中苗期:植株持续生长,直径显著增大,基部呈现红色;(4)不定根生成期:转接入生根培养基后植株持续生长,不定根形成;(5)成苗期:不定根生长成熟,组培苗可以进行炼苗移栽。

1.2.3 丛生芽增殖优化 (1)继代培养基的优化。采用3因素3水平(6-BA 0.1、0.2、0.3 mg/L, IBA 0.05、0.1、0.2 mg/L, GA₃ 0.05、0.1、0.2 mg/L)试验,利用软件设计正交试验,得到9组不同的培养基组合,编号为B₁至B₉。每种培养基接种50个外植体,25 d后对其增殖系数及生长状态进行观察统计。(2)不同生长时期、不同切割方式的外植体增殖系数及丛生芽状态。对组培苗3个时期及2种切割方式进行组合,得到如下6种处理组合方式(表2)。将不同处理组合的外植体接种至MS+6-BA 0.3 mg/L+IBA 0.05 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L+蔗糖3%+琼脂6.0 g/L、pH值为5.8的培养基上,每种处理组合接种50个外植体,重复3次。25 d后对各组合的外植体增殖系数及丛生芽状态进行观察统计。

1.2.4 不定根诱导优化 在1/2MS培养基上,对不同激素浓度组合设计了2因素3水平(IBA 0.2、0.4、0.8 mg/L, 活性炭 0.1、0.3、0.6 g/L)的试验,得到9组不同的培养基组合,编号为C₁至C₉。将继代培养25 d后的红颊草莓组培苗分别转接入9组培养基上,每种培养基接种50个外植体,25 d后对其根系生长情况进行观察统计。

表3 草莓外植体灭菌效果

处理编号	75%乙醇处理时间(s)	氯化汞处理时间(min)	叶片状况		叶柄状况		匍匐茎状况	
			污染率(%)	损伤程度	污染率(%)	损伤程度	污染率(%)	损伤程度
A ₁	10	4	88	-	84	-	96	-
A ₂	10	8	42	-	50	-	54	-
A ₃	10	12	32	+	42	-	48	-
A ₄	20	4	64	+	56	++	52	-
A ₅	20	8	36	+	28	++	28	-
A ₆	20	12	22	+++	24	++	26	-
A ₇	40	4	48	++	44	+	34	-
A ₈	40	8	18	++	12	++	16	-
A ₉	40	12	10	+++	8	+++	12	-

注:每个“+”代表受损外植体量增加20%,-代表没有受到损伤。

表2 生长时期与切割方式的组合

处理组合编号	丛生芽时期	切割方式
f ₁	丛生芽生成期	每块1个芽
f ₂	丛生芽生成期	每块3个芽
f ₃	幼苗期	每块1个芽
f ₄	幼苗期	每块3个芽
f ₅	中苗期	每块1个芽
f ₆	中苗期	每块3个芽

1.2.5 穴盘壮苗基质的优化筛选 利用3种基质形成4个组合配比如下:E₁:泥炭;E₂:泥炭+蛭石(2:1,体积比,下同);E₃:泥炭+珍珠岩(2:1);E₄:泥炭+珍珠岩+蛭石(3:1:1)。每个处理组30株,重复3次。选取长势一致的红颊成苗期组培苗,经开瓶炼苗5 d后,栽植在50孔塑料穴盘中。植株栽植条件为:25℃,3 500~5 000 lx,加膜覆盖,使空气相对湿度保持在85%以上。缓苗2周后,逐渐降低湿度至60%~70%。试验期间对各处理组的植株生长发育状况进行观察统计,在30 d后对植株的相关指标进行测定,并对结果进行统计分析。

1.2.6 穴盘苗水分管理 选择长势整齐的红颊草莓组培苗,栽植在50孔塑料穴盘中。植株栽植条件同“1.2.5”节。试验设5个处理,育苗基质相对含水量分别为F₁:40%、F₂:50%、F₃:60%、F₄:70%、F₅:80%。每个处理15株,重复3次。穴盘通过称重法确定基质的相对含水量。

1.2.7 穴盘苗养分管理 选择长势整齐的红颊草莓组培苗,栽植在50孔塑料穴盘中。植株栽植条件同“1.2.5”节,基质相对含水量控制在60%。试验设4个处理组,分别为G₁:MS大量元素母液250倍稀释液、G₂:MS大量元素母液500倍稀释液、G₃:MS大量元素母液1 000倍稀释液、G₄:MS大量元素母液2 000倍稀释液。每7 d施稀释液1次,每个处理15株,重复3次。

依据陆帼一等对幼苗品质的研究报道^[7]计算壮苗指数(HI):壮苗指数(HI)=(茎粗/株高+根干重/茎叶干重)×全株干重。

2 结果与分析

2.1 红颊草莓组培关键技术

2.1.1 外植体灭菌方式比较 由表3可见,当采用A₅组处理叶片及叶柄时效果较好,采用A₉组处理匍匐茎茎尖时效果较好。

2.1.2 不同激素组合对丛生芽增殖的影响 由表4可见, B₇ 经综合对比, B₈ 处理组合相对较好, 具有较高的增殖系数处理组合拥有最高的增殖系数, 为 6.67, 但丛生芽状态不佳。(5.97) 和丛生芽质量。

表4 继代培养基对增殖系数及组培苗状态的影响

编号	6-BA (mg/L)	IBA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	丛生芽诱导率 (%)	增殖系数	丛生芽状态
B ₁	0.1	0.2	0.2	25	3.4 ± 0.36e	芽点较少, 诱导率低
B ₂	0.1	0.05	0.05	17	2.03 ± 0.23g	芽少, 诱导率低
B ₃	0.1	0.1	0.1	23	2.77 ± 0.34f	芽少, 诱导率低, 植株细弱
B ₄	0.2	0.05	0.2	33	2.03 ± 0.29g	芽少, 长势均一
B ₅	0.2	0.2	0.1	37	3.93 ± 0.33d	芽点较少, 长势均一
B ₆	0.2	0.1	0.05	43	3.97 ± 0.29d	芽点较少, 状态良好
B ₇	0.3	0.2	0.05	96	6.67 ± 0.47a	芽多, 有畸形和玻璃化发生
B ₈	0.3	0.05	0.1	93	5.97 ± 0.27b	芽多, 状态好
B ₉	0.3	0.1	0.2	100	5.23 ± 0.23c	芽较多, 轻微玻璃化

注: 同列不同小写字母显示 0.05 水平差异显著性, 下同。

2.1.3 不同生长期、不同切割方式下对外植体增殖系数的影响 由表5可见: f₂ 处理组合具有最高的增殖系数, 为 6.17; 但产生的丛生芽细密弱小, 长势缓慢, 在一定程度上延

长了组培生产周期。f₄ 处理组合增殖系数为 6.03, 仅次于 f₂ 组合, 且丛生芽长势旺盛, 状态均一, 更适合工业化生产的需求。

表5 切割方式及生长期对草莓组培苗增殖系数的影响

编号	处理组合	增殖系数	丛生芽状态
f ₁	成苗期 + 每块 1 个芽	5.07 ± 0.27c	均一, 植株低矮, 长势较弱
f ₂	成苗期 + 每块 3 个芽	6.17 ± 0.23a	均一, 丛生芽细密
f ₃	中苗期 + 每块 1 个芽	4.90 ± 0.30c	生长旺盛, 植株健壮, 较均一
f ₄	中苗期 + 每块 3 个芽	6.03 ± 0.29a	生长旺盛, 植株健壮, 较均一
f ₅	不定根生长期 + 每块 1 个芽	3.93 ± 0.27d	接种芽大, 分化芽小, 不均一
f ₆	不定根生长期 + 每块 3 个芽	5.57 ± 0.23b	接种芽大, 分化芽小, 不均一

2.1.4 不同激素、不同浓度组合下对不定根诱导的影响 由表6可见, C₅ 处理组合组培苗根系健壮, 生根数量和长度均

高于其他组合, 与 C₁、C₂、C₃、C₄ 和 C₉ 处理组合有显著性差异。

表6 不同激素、不同浓度生根培养基对草莓组培苗不定根诱导的影响

编号	IBA (mg/L)	活性炭 (g/L)	根长 (mm)	根数 (条)	状态
C ₁	0.2	0.1	49.6 ± 3.3c	6.3 ± 1.3e	有块状褐色物质
C ₂	0.2	0.3	45.4 ± 4.3cd	8.4 ± 1.7d	白色, 较细弱
C ₃	0.2	0.6	41.8 ± 6.0de	7.5 ± 1.5de	白色, 较细弱
C ₄	0.4	0.1	71.9 ± 8.4b	10.1 ± 1.8c	有块状褐色物质
C ₅	0.4	0.3	78.2 ± 9.3a	13.7 ± 2.5a	白色, 数量多, 根系健壮
C ₆	0.4	0.6	71.3 ± 9.1b	12.3 ± 2.0ab	白色, 数量较多, 根系健壮
C ₇	0.8	0.1	40.0 ± 6.5de	10.7 ± 1.9ab	数量较多, 有块状褐色物质
C ₈	0.8	0.3	45.7 ± 6.1cd	11.2 ± 2.1ab	数量较多, 根系较健壮
C ₉	0.8	0.6	37.6 ± 6.1e	10.2 ± 1.6c	数量较少, 根系短小

2.2 红颊草莓穴盘壮苗技术

2.2.1 不同基质比对穴盘壮苗的影响 由表7可见, 不同基质比对红颊草莓穴盘苗的株高影响显著, 由高到低的顺序依次为 E₁ > E₃ > E₄ > E₂, 在叶片宽、叶片长和叶柄直径 3 个方面, 试验组 E₁ 与其他 3 组处理有显著差异, 处理组 E₄ 仅次于 E₁, E₂ 与 E₃ 无显著差异。由表8可见, 在茎粗、根干重、茎叶干重和壮苗指数 4 个方面, E₁ 处理组显著优于其他处理组。E₁ 处理组(即泥炭)为草莓组培苗的穴盘炼苗较为理想的基质。

2.2.2 不同含水量基质对穴盘苗壮苗的影响 由表9可见,

表7 不同基质对草莓穴盘苗株高和叶片的影响

编号	株高 (mm)	叶片宽 (mm)	叶片长 (mm)	叶柄直径 (mm)
E ₁	101.1 ± 13.1a	26.8 ± 2.7a	32.0 ± 3.8a	1.7 ± 0.2a
E ₂	68.9 ± 7.4d	24.9 ± 3.0c	28.8 ± 3.4c	1.4 ± 0.1c
E ₃	82.0 ± 11.0b	24.8 ± 2.1c	29.2 ± 0.2c	1.4 ± 0.2bc
E ₄	77.3 ± 7.2c	25.8 ± 1.8b	30.7 ± 2.5b	1.4 ± 0.1b

从壮苗指数来看, 由大到小的顺序为 F₃ > F₅ > F₄ > F₂ > F₁, F₃ 壮苗指数值最高, 为 0.106 6, 与其他组存在显著差异。基质相对含水量为 60% 时, 较适宜红颊草莓穴盘苗的生长。

表8 不同基质对草莓穴盘苗生长的影响

处理	茎粗 (mm)	株高 (mm)	根干重 (mg/株)	茎叶干重 (mg/株)	壮苗指数
E ₁	6.3 ± 0.2a	102.8 ± 9.8a	66.4 ± 6a	254.1 ± 10a	0.103 5 ± 0.009a
E ₂	4.6 ± 0.3c	69.1 ± 6.1c	19.8 ± 2c	105.4 ± 14c	0.031 9 ± 0.004c
E ₃	5.1 ± 0.2b	82.2 ± 10.5b	30.3 ± 4b	136.6 ± 15b	0.047 3 ± 0.007b
E ₄	4.6 ± 0.3c	77.8 ± 6.3b	30.3 ± 3b	124.6 ± 9b	0.046 9 ± 0.005b

表9 不同含水量基质对草莓穴盘苗生长的影响

处理	基质含水量 (%)	茎粗 (mm)	株高 (mm)	根干重 (mg/株)	茎叶干重 (mg/株)	壮苗指数
F ₁	40	4.5 ± 0.3c	70.8 ± 5.9c	205 ± 2d	113.9 ± 16d	0.032 8 ± 0.003d
F ₂	50	5.1 ± 0.2b	88.5 ± 10.8b	320 ± 3c	140.8 ± 8c	0.049 4 ± 0.004c
F ₃	60	6.4 ± 0.2a	106.4 ± 9.7a	685 ± 6a	245.7 ± 8b	0.106 6 ± 0.010a
F ₄	70	4.9 ± 0.5b	104.4 ± 6.2a	637 ± 5b	253.1 ± 8ab	0.094 7 ± 0.009b
F ₅	80	5.0 ± 0.3b	104.0 ± 5.5a	655 ± 6ab	257.5 ± 10a	0.097 8 ± 0.010b

2.2.3 施用不同大量元素母液稀释液对穴盘苗壮苗的影响

由表10可见,各处理壮苗指数由大到小的顺序依次为 G₂ > G₃ > G₁ > G₄, G₂ 处理壮苗指数值最高,为0.180 5,与其

他3组存在显著差异;在茎粗、株高、根干重和茎叶干重4个方面, G₂ 处理均有较优的表现。施用MS大量元素母液500倍稀释液最为适宜红颊草莓穴盘苗的生长。

表10 不同肥料浓度对穴盘苗生长的影响

处理	MS大量元素 母液稀释倍数	茎粗 (mm)	株高 (mm)	根干重 (mg/株)	茎叶干重 (mg/株)	壮苗指数
G ₁	250	8.2 ± 0.2a	131.3 ± 6.7b	109.5 ± 3.0b	435.3 ± 25.0b	0.171 2 ± 0.005b
G ₂	500	8.2 ± 0.2a	147.9 ± 6.7a	118.0 ± 10.0a	511.3 ± 17.0a	0.180 5 ± 0.017a
G ₃	1 000	8.1 ± 0.1a	147.1 ± 4.6a	112.7 ± 5.0b	508.8 ± 11.0a	0.171 9 ± 0.007b
G ₄	2 000	7.1 ± 0.2b	117.1 ± 7.6c	90.0 ± 2.0c	422.3 ± 11.0b	0.140 5 ± 0.003c

3 小结与讨论

红颊草莓组培标准化流程可以更加有效地指导组培苗的生产操作和管理。根据研究结果,可确定红颊草莓组织培养体系中不同阶段的标准化操作流程为:匍匐茎茎尖经过75%乙醇处理40 s、氯化汞处理12 min,通过Leica L2设备对茎尖生长点剥离后接种在MS培养基上;待培养15 d后,将生长至中苗期无污染、无损伤的外植体转接至MS + 6-BA 0.3 mg/L + IBA 0.05 mg/L + GA₃ 0.1 mg/L + 蔗糖3% + 琼脂6.0 g/L、pH值5.8的培养基上,进行丛生芽的诱导增殖;取不定根生长期红颊草莓外植体接种在1/2MS + IBA 0.4 mg/L + 蔗糖3% + 琼脂6.0 g/L + 活性炭0.3 g/L、pH值5.8的培养基上,在培养25 d后得到成苗期组培苗,即可进行炼苗移栽。

经过此标准化流程得到的成苗期草莓组培苗可达到以下指标:外植体增殖系数为6.03 ± 0.29;新生展开叶叶片长(1.368 ± 0.1) cm、叶片宽(1.104 ± 0.16) cm、叶柄长(4.65 ± 0.83) cm、根长(7.823 ± 0.93) cm、根数13.7 ± 2.5条。

穴盘炼苗作为植物组织培养到大田种植的关键环节,是组培苗大规模生产中必不可少的一步,可以使红颊草莓植株具有更高的壮苗率。以泥炭为基质、基质相对含水量为

60%、施用MS大量元素母液500倍稀释液时,较适宜红颊草莓穴盘苗的生长,能够获得最高的壮苗指数,这是本研究筛选出的炼苗组合指标的最优处理组合。

参考文献:

- [1] 2010年全国各地蔬菜、西瓜、甜瓜、草莓、马铃薯播种面积和产量[J]. 中国蔬菜,2012(1):56.
- [2] 顾虹. 草莓组培苗标准化研究[J]. 安徽农学通报,2003,9(5):53.
- [3] Sato F, Yoshioka H, Fujiwara T, et al. Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature storage in darkness[J]. Scientia Horticulturae,2004,101(4):349-357.
- [4] 杨红丽,王子崇,张慎璞,等. 复配花生糠基质对番茄穴盘苗质量的影响[J]. 中国蔬菜,2009(12):64-67.
- [5] 余红,马华升,方献平,等. 草莓立体穴盘育苗技术[J]. 北方园艺,2011(3):44-45.
- [6] 王连润,杨松光,胡忠荣,等. 草莓试管苗移栽基质研究[J]. 西南农业学报,2010,23(4):1374-1376.
- [7] 陆帼一,张和义,周存田. 番茄壮苗指标的初步研究[J]. 中国蔬菜,1984(1):4.