

李 慧. 红颜草莓的离体培养与快速繁殖[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):66-68.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.018

红颜草莓的离体培养与快速繁殖

李 慧

(江苏联合职业技术学院淮安生物工程分院,江苏淮安 223200)

摘要:以红颜草莓的茎尖作为外植体,研究了外植体的消毒方法、激素组合对其离体培养与快速繁殖的影响。结果表明,幼茎段在0.1%氯化汞+3滴吐温-80溶液中浸泡5 min 灭菌效果最好;茎尖以0.35 mm 大小为宜;诱导丛生芽的最适培养基为:MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA;诱导试管苗生根的最适培养基为:1/2MS+0.1 mg/L IBA。

关键词:草莓;离体培养;不定芽;快速繁殖

中图分类号: S668.404+.3 **文献标志码:** A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0066-03

红颜又称日本99、红颊,是日本静冈县用章姬与幸香杂交育成的早熟草莓栽培品种。叶片大、新茎分枝多,结果能力强,果实品质好,果粒个大,果形、果色、价格明显优于丰香草莓。是春节前后集采摘、鲜食为一体的休闲旅游消费农产品,深受广大果农和顾客的喜爱。但是,红颜草莓苗不抗白粉病,不易育苗,幼苗一旦染病,几天内将全军覆没。因此,试管苗的繁育将有很大的市场前景。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于2014年12月至2015年4月进行。供试材料红颜草莓苗引自淮安怡园果蔬种植专业合作社(实生苗2014年9月栽植在江苏联合职业技术学院淮安生物工程分院花卉实训中心的无土栽培槽内)。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 表面灭菌试验 于晴天的下午取供试红颜草莓刚抽出的匍匐茎的幼茎段(母株要健壮、无病),流水冲洗泥土、灰尘。在无菌条件下,先用75%乙醇浸泡20~30 s,无菌水冲洗3~4次,再转入0.1%氯化汞溶液+2滴吐温-80分别浸泡

8、5、4、2 min,无菌水冲洗5~8次。在以上的过程中要不断摇动,以去除附在外植体表面的气泡。用消毒滤纸吸干水珠后,将茎尖接种于诱导培养基中,调整pH值至5.6~5.8。每个灭菌处理各接种50瓶,1个外植体/瓶,20 d后观察记录外植体的污染、死亡、无菌成活生长等情况。

1.2.2 茎尖分化能力试验 取“1.2.1”节试验最佳处理,在双目显微解剖镜下剥去苞片和幼叶,将茎尖接种于MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基中^[1]。接种外植体1个/瓶,30 d后观察记录茎尖分化情况。

1.2.3 芽诱导试验 取“1.2.2”节试验中最佳的茎尖剥制处理分别接种于以0.5 mg/L 6-BA为基础的附加不同种类生长素(0.2 mg/L)配成的培养基、以0.2 mg/L NAA为基础的附加不同种类生长素及细胞分裂素(0.5 mg/L)配成的培养基中^[2],每个处理各接种30瓶,1个外植体/瓶,30 d后开始调查记录幼芽分化情况。培养基配比如下:(1)MS+0.5 mg/L 6-BA;(2)MS+0.5 mg/L 6-BA+CNAA;(3)MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA;(4)MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA;(5)MS+0.2 mg/L NAA;(6)MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA;(7)MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L KT;(8)MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BZEA。

1.2.4 继代培养与扩大繁殖 将长至1~2 cm的丛生芽每4~6株切成1块,转入不同浓度配比的6-BA和NAA配成

plant cell suspension and hairy root cultures[J]. Plant Cell Reports, 2012,31(3):461-477.

收稿日期:2015-04-14

基金项目:2014年江苏省农业三新工程(编号: SXGC[2014]141)。

作者简介:李 慧(1971—),女,江苏宿迁人,硕士,教授,主要从事园艺作物的组织培养研究。E-mail: lihui710623@163.com.

[3]贾国惠,贾世山. 甘草中黄酮的药理作用研究进展[J]. 中国药 学杂志,1998(9):3-6.

[4]Haraguchi H,Tanimoto K,Tamura Y,et al. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata* [J]. Phytochemistry, 1998,48(1):125-129.

[5]董静洲,易自力,蒋建雄. 我国药用植物资源研究概况[J]. 医学研究杂志,2006,35(1):67-69.

[6]Vanisree M,Lee C Y,Lo S F,et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures[J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica,2004,45(1):1-22.

[7]Cai Z,Kastell A,Knorr D,et al. Exudation:an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from

[8]郑 成,李 卫,杨 铃. 植物有效成分微波萃取的研究进展 [J]. 世界科技研究与发展,2006,28(5):52-61.

[9]程艳芹,孙秀梅,张兆旺,等. 均匀设计法优选甘草的半仿生提取 工艺条件[J]. 中药材,2007,30(5):598-601.

[10]邓引梅,宋发军,崔永明,等. 甘草叶总黄酮提取工艺[J]. 中南 民族大学学报:自然科学版,2008,27(1):41-43.

[11]王 磊,杨 英,周圆圆,等. 甘草细胞培养物黄酮含量测定方 法的建立[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):3046-3047.

[12]Sheludko Y V. Recent advances in plant biotechnology and genetic engineering for production of secondary metabolites [J]. Cytology and Genetics,2010,44(1):52-60.

的继代培养基中。每种处理接种 20 瓶,4 块/瓶,培养 20 d 后统计每瓶幼苗数量,并计算出增殖率。

1.2.5 根诱导试验 用 1/2MS 附加不同浓度 (mg/L) IBA, 有 0.05、0.10、0.20、0.50 mg/L 及不加 IBA 的 5 个处理,接入幼苗 3 周后观察记录根的生长情况。

培养基均加 3% 蔗糖,在 1.0 ~ 1.1 大气压下热压灭菌 20 min。培养温度 (25 ± 2) °C。每日光照 12 h,光照度 2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂对红颜幼茎灭菌的效果

在草莓组织培养中常用灭菌剂的种类很多。我们曾用过次氯酸钠 10% 水溶液 (含有效氯 0.4% ~ 0.5%), 浸泡接种材料 10 ~ 15 min; 次氯酸钙 (漂白粉), 用其饱和上清液, 浸泡接种材料 15 ~ 30 min; 过氧化氢 10% ~ 12% 水溶液, 浸泡 10 ~ 20 min; 新洁尔灭 5% ~ 10% 水溶液, 浸泡 10 ~ 15 min; 氯化汞 0.1% 水溶液, 浸泡 8 ~ 10 min。其中, 前 4 种灭菌剂对接种材料比较安全, 不会使活组织中毒死亡, 但因灭菌时间较长, 常常使接种材料的外层氧化变褐, 影响培养效果。氯化汞有很强的杀菌能力, 但浸泡时间稍长会造成接种材料中毒。即使在氯化汞处理完后, 用无菌水冲洗 7 ~ 8 次, 仍然有少量残留在外植体上, 导致外植体死亡。

用 0.1% 氯化汞溶液浸泡处理 5 min, 外植体染菌率为 0, 成活率为 78%; 4 min 浸泡茎段, 外植体总染菌率为 18%, 死亡 7 个; 当茎段浸泡 2 min 后, 外植体死亡数为 3 个, 但总染菌率高达 56% (表 1)。

表 1 0.1% 氯化汞不同处理时间对草莓幼茎的伤害和染菌情况

处理时间 (min)	染菌数 (个)	污染率 (%)	死亡数 (个)	总成活数 (个)	成活率 (%)
8	0	0	21	29	58
5	0	0	11	39	78
4	9	18	7	34	68
2	28	56	3	19	38

注: 不同处理接入外植体数 50 个, 接种 20 d 后统计结果。

试验结果, 用 0.1% 氯化汞浸泡茎段 8 min, 外植体染菌率虽然很低, 但是死亡率过高; 浸泡 2 min, 外植体死亡率大大降低, 但染菌率却很高, 这 2 种处理方法得到的能正常形成愈伤组织的外植体只是其中很少的一部分, 所耗费的材料太多。因此, 灭菌宜用 0.1% 氯化汞浸泡 5 min, 成活率达到 78%。

观察中发现 4 种处理外植体在接种 1 周内都有不同程度褐化现象并导致生长缓慢, 10 d 后成活的外植体褐化现象消失 (图 1、图 2)。这可能是因为使用乙醇进行表面消毒时, 乙醇毒害所致。

2.2 不同大小的茎尖对形态发生能力的影响

剥制后的红颜茎尖接种在芽诱导培养基中, 7 d 后开始膨大, 并在外植体表面产生愈伤组织, 20 d 后部分愈伤组织上可形成幼芽。从表 2 可以看出, 小于或等于 0.1 mm 的茎尖, 无形态发生能力; 当茎尖达 0.2 mm 时, 只有有限的生长; 茎尖大小达 0.35 mm, 带有最后 1 对较大的叶原基, 而没有顶端下组织时, 茎尖的分化率最高; 如果切取 0.5 mm 的茎尖, 发现茎尖直接形成单株苗, 形成愈伤组织的百分率显著下降。



图 1 接种后第 3 天



图 2 接种后第 8 天

表 2 草莓茎尖的分化能力

茎尖大小 (mm)	培养数 (个)	外植体状态 (个)			正常发育的顶端占培养总数 (%)
		不发育	只扩大不生长	能发育	
0.10	60	—	—	—	—
0.20	120	93	6	21	17.5
0.30	120	66	17	37	30.8
0.35	60	12	2	46	76.7
0.50	60	2	0	58	96.7

注: 接种 30 d 后统计结果。

由于剥制的茎尖要尽量小, 才能有希望得到无病毒苗, 从而达到脱毒的目的。但是, 接种的茎尖若太小, 分化能力就差, 分化苗生长也慢, 较难培养。因此, 带有最后 1 对幼叶而无顶端下组织的茎尖是最适宜的分离培养材料, 其大小在 0.35 mm 左右。

2.3 不同种类生长素、细胞分裂素对幼芽分化的影响

从表 3 可以看出, 以 0.5 mg/L 6-BA 为基础的附加不同种类生长素配成的培养基中, 0.2 mg/L NAA 对幼芽的生长分化最为有利, 有效芽显著高于对照 (无生长素) 及同浓度的 IAA 和 IBA。

表 3 相同用量的 NAA、IAA、IBA 对幼芽分化的影响

用量 (mg/L)	分化幼苗数 (个)	分化率 (%)	有效芽数 (个)
对照	7	23.3	16
NAA 0.2	22	73.3	83
IAA 0.2	12	40.0	34
IBA 0.2	10	33.3	21

注: 不同处理接种材料 30 个, 接种 30 d 后统计结果。

在基本培养基中加入 NAA 0.2 mg/L, 同时分别添加 0.5 mg/L 的 6-BA、KT、ZEA3 种细胞分裂素及对照 (无细胞分裂素), 结果见表 4。

从表 4 可以看出, 6-BA 和 KT 对茎尖的生长分化较为

有效,但在加入KT的组合中,分化苗数量少,苗体尤其是叶片增大较快,长出的大部分是壮苗,基部甚至分化出根系(图3)。而在加入6-BA的组合中培养3~4周后,分化芽还在继续增多,幼苗生长正常。对激素种类与浓度的筛选试验表明,以6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.2 mg/L的组合对外植体分化诱导最好。

表4 相同浓度的6-BA、KT、ZEA对幼芽分化的影响

细胞分裂素	分化幼芽数(个)	每个幼芽分化苗数(个)	成苗率(%)
对照	13	4~6	23.3
6-BA 0.5 mg/L	30	5~8	100.0
KT 0.5 mg/L	27	大部分幼苗长成壮苗	100.0
ZEA 0.5 mg/L	16	幼苗停止分化形成壮苗	100.0

注:不同处理接种材料30个,培养30 d后统计结果;成苗率=分化不定芽的外植体数/接入外植体数×100%。



图3 继代培养后23 d

2.4 不同浓度6-BA和NAA对幼苗增殖的影响

增殖培养基的筛选中,附加6-BA 0.5 mg/L分化反应正常,虽然在相同的时间里新芽分化量相对较少,而长成正常幼苗的数量却明显较多。当6-BA浓度超过1.0 mg/L时,新芽分化量很大,也都能长出叶片,只是叶片簇生在一起成球状,不能长成正常幼苗(表5)。从表5可以看出,2号培养基对幼苗增殖的生长分化最为有利。

此外,转苗过程中去掉原生叶片有利于新苗分化,在扩大繁殖中剔除愈伤组织,有利于新苗增殖和生长。

2.5 不同浓度IBA对试管苗生根的影响

从表6可以看出,以IBA 0.1 mg/L浓度处理的生根率最高,为100%,平均根条数为2.3条。不加IBA及IBA超过0.2 mg/L,多数苗都是先于苗基切口处产生愈伤组织,随后在愈伤组织上分化生根。当生根苗移出栽植后,苗基的愈伤组织很快干死,使苗与根间形成了1个隔离层,成活率大大降低。

3 讨论

本试验以红颜草莓为供试材料,研究其茎尖经脱分化后

表5 不同浓度6-BA和NAA对幼苗增殖的影响

培养基编号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	幼芽分化率(%)	有效芽增殖率(%)
1	0.3	0.1	60	70
2	0.5	0.2	70	100
3	1.0	0.5	92	10
4	2.0	1.0	100	0

注:每块材料1单芽或带有1大于2 mm的小芽统计为2,不足2 mm的芽点突起不计。增殖率计算式:继代后20 d平均芽数/继代当天平均芽数×100%。

表6 不同浓度IBA对试管苗生根的影响

IBA浓度 (mg/L)	出根苗数(个)	出根率(%)	平均每株生根数(条)	最大根长(cm)
0	愈伤组织上生根			
0.05	113	75.3	1.8	1.6
0.10	100	2.3	1.4	
0.20	多数为愈伤组织上生根			
0.50	愈伤组织上生根			

注:不同处理参试苗为150个,培养3周后统计结果。

诱导不定芽发生的因子,旨在提高草莓不定芽发生率。在植物离体形态发生中,影响器官分化的因素很多,但以植物激素的调控为主^[3-6]。不同植物种类,控制其不定芽发生的植物生长调节剂的种类、浓度以及它们之间的组合不同,本试验中为BA与NAA的不同浓度组合。从不定芽发生的动态观察中可知,不定芽发生高峰期集中在接种后20~40 d的时间段内,50 d以后再生的不定芽,其芽体弱小,生长速度慢。这可能是由于随着时间的延长,培养基营养消耗大;同时,外植体自身分泌物的积累限制了不定芽的分化及生长,也可能与愈伤组织内某些生理生化物质的积累有关。

参考文献:

- [1]李慧. 草莓茎尖离体培养研究[J]. 贵州农业科学, 2004(2): 10-12.
- [2]李慧,吴松,孙其文,等. 颠茄的离体培养与快速繁殖研究[J]. 北方园艺, 2007(12): 192-194.
- [3]张宁宁,夏明霞,张琼,等. 卡特兰组织培养研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(4): 42-44.
- [4]李林轩,韦莹,黄浩,等. 红芽大戟组织培养条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 60-62.
- [5]谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [6]王菲彬,王斐,管玲玲,等. 植物激素对东方百合试管苗鳞片分化不定芽的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 53-55.