

不同浓度 TDZ 和 2,4-D 组合对草莓花药组织培养的影响

杜梦卿, 连朋, 王丽娟*

(天津农学院, 天津 300384)

摘要:为探究草莓花药离体再生体系最适宜培养条件,以草莓品种“栃乙女”花药为试材,研究细胞分裂素 TDZ 和生长素 2,4-D 对草莓花药愈伤组织诱导、分化和增殖的影响,筛选不同阶段最适宜草莓花药组织培养激素配比。结果表明,TDZ 和 2,4-D 激素组合可成功培养出草莓花药再生植株,最适宜诱导培养基为 MS+2,4-D 0.2 mg/L+TDZ 1.5 mg/L,最适宜分化培养基为 MS+2,4-D 0.05 mg/L+TDZ 2.0 mg/L,最适宜增殖阶段培养基为 MS+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L。

关键词:草莓;花药;培养基;激素;浓度

中图分类号:S668.4

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2021)02-0073-03

Effects of Different Concentrations TDZ and 2,4-D Combination on Anther Tissue Culture of Strawberry

DU Mengqing, LIAN Peng, WANG Lijuan*

(Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: In order to explore the most suitable culture conditions of strawberry anther in vitro regeneration system, the effects of cytokine TDZ and auxin 2,4-D on callus induction, differentiation and proliferation of strawberry anther were studied, and the most suitable hormone ratio in different stages of strawberry anther culture were selected with the strawberry cultivar "Tochiotome" anther as test material. The results showed that the combination of TDZ and 2,4-D could successfully culture Strawberry Anther regeneration plants. The most suitable induction medium was MS+2,4-D 0.2 mg/L+TDZ 1.5 mg/L. The most suitable differentiation medium was MS+2,4-D 0.05 mg/L+TDZ 2.0 mg/L. The most suitable proliferation medium was MS+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L.

Key words: Strawberry; Anther; Medium; Hormone; Concentration

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)生产中多为匍匐茎繁殖,长期多年繁殖会导致病毒病的加剧,植株长势变弱,种性退化。大泽胜次等^[1]通过花药培养获得再生植株为脱毒植株,脱毒率为100%,认为花药培养可作为脱毒手段,省去病毒鉴定的程序。宫崎正则等^[2]对草莓花药培养的脱毒率进行了研究,品种“America”的脱毒率为50%~81%,品种“Empire”的脱毒率为100%。因此,利用花药为试材进行离体培养可作为草莓脱毒途径之一。同时,利用草莓花药培养获得单倍

体植株,经染色体加倍形成纯合体,为草莓的遗传研究提供纯系材料^[3],因此,草莓花药组织培养在草莓遗传育种过程中意义十分重要。

陈玉波等^[4]研究发现,花药培养中生长调节物质的配比及含量对愈伤组织形成影响很大。目前,我国对于花药培养大多选用6-BA、NAA、IAA等激素^[5-6]。噻重氮苯基脲(Thidiazuron, TDZ)是人工合成的苯基脲衍生物,是一种新型细胞分裂素,具有强烈的细胞活性,其活性超过玉米素和6-BA几倍至几十倍,低浓度下促进细胞增殖效果明显。2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是一种生长素类生长调节剂。TDZ单独或与2,4-D或IBA联合使用对草莓组培苗再生有效^[7-8]。因此,本试验在前人研究的基础上,选用TDZ和2,4-D激素组合分别对草莓花药诱导、分化和增殖阶段激素条件进行优化,以期对草莓花药离体培养途径提供理论依据。

收稿日期:2019-02-20

基金项目:天津市种业重大项目(17ZXZYNC00080);天津市科技成果转化与推广项目(201803010);天津市优秀科技特派员项目(19JCTPJC58200)

作者简介:杜梦卿(1995-),女,在读硕士,主要研究方向为设施园艺作物栽培与生理。

通讯作者:王丽娟,女,博士,教授, E-mail: boshiw@sohu.com

1 材料与方 法

1.1 材料的选择

以适宜天津地区种植草莓品种“栃乙女”花药为材料,于晴天9:00~10:00在天津农学院校外实验基地采集花冠未开放刚露白、花萼略长于花冠、花药微黄且充实的花蕾。低温条件存放,镜检时选择单核中、晚期花药,以单核靠边期为最佳。

1.2 方 法

1.2.1 低温预处理

取处理好的新鲜草莓花药用自来水冲洗干净,再用蒸馏水冲洗2~3次后,放入铺有湿润滤纸的培养皿,于4℃冰箱中低温预处理72 h,期间定期喷水保持滤纸湿润且不会浸泡材料。

1.2.2 材料消毒与接种培养

先将花蕾置于烧杯中,放入洗衣粉,自来水冲洗30 min后放入超净工作台,加入无菌水及1滴Tween-80摇晃均匀后静置8~10 min,用2.5%次氯酸钠浸泡15 min,70%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗3次。接种时用镊子轻轻夹取花药(去除花丝)迅速接种于诱导培养基上。培养温度为(25±1)℃,光照时长为16 h/d,光照强度为40 μmol/m²·s。

1.2.3 培养基配置

试验选用花药基本培养基为MS培养基,pH为5.8,不同阶段设置不同激素配比,详见表1。

1.2.4 数据统计与调查

试验用SPSS 23.0数据分析软件进行差异显著性分析($P<0.05$),每个处理设3次重复。接种后放入光照培养箱中培养(组培瓶规格为直径95 mm,高140 mm,口径60 mm)。30 d后统计愈伤组织数量,观察愈伤组织生长状态。待其诱导出愈伤组织后转移到分化培养基上培养,30 d后统计分化成芽数量,测定叶绿素含量。将产生的不定芽接入增殖培养基,生长20 d后统计并观察生成芽数量和生长状态。每个阶段15 d后均更换一次

表1 不同阶段培养基激素配比 mg/L

培养基类型	处理/激素	6-BA	NAA	TDZ	2,4-D
诱导培养基	T ₀	1.5	0.2	0	0
	T ₁	0	0	0.5	0.1
	T ₂	0	0	0.5	0.2
	T ₃	0	0	1.5	0.1
	T ₄	0	0	1.5	0.2
	T ₅	0	0	2.5	0.1
分化培养基	T ₆	0	0	2.5	0.2
	M ₁	0	0	1.0	0.05
	M ₂	0	0	1.0	0.1
	M ₃	0	0	1.0	0.2
	M ₄	0	0	2.0	0.05
	M ₅	0	0	2.0	0.1
增殖培养基	M ₆	0	0	2.0	0.2
	C ₁	0	0	1.0	0.1
	C ₂	0	0	0.5	0.1
	C ₃	0	0	0.25	0.1
	C ₄	0	0	0.25	0

培养基。主要测定指标为:诱导率=(产生愈伤组织的花药数/接种花药数)×100%;分化率=(已分化的外植体数/接种外植体总数)×100%;增殖系数=1个周期内形成的有效芽数/接种丛生芽数;叶绿素含量用紫外分光光度计测定(型号:RER-SEE:TU-1950)。

2 结果与分析

2.1 不同激素种类和对比对草莓花药诱导的影响

不同激素种类和对比对愈伤组织诱导的影响不同,添加适量浓度的TDZ和2,4-D配合使用效果比添加6-BA和NAA组合的总体生长效果好(表2)。2,4-D对愈伤组织诱导有促进作用,且浓度越高,诱导率越高,出愈时间越短。但是所形成的愈伤组织多数为黄绿色,表面疏松,活性差,长期培养长势缓慢,仅有少部分可形成愈伤组织。随着TDZ浓度的增加,诱导率呈现逐渐升高

表2 不同激素对比对草莓花药诱导的影响

处理	接种花药数量(个)	愈伤组织数量(个)	出愈时间(d)	愈伤组织诱导率(%)	生长状况
T ₀	400	332	25	83.00±1.19c	黄绿色、颗粒状
T ₁	400	298	34	74.50±0.63d	绿色、颗粒状
T ₂	400	334	32	83.50±1.79c	绿色、颗粒状
T ₃	400	361	28	90.25±3.88b	绿色、颗粒状
T ₄	400	387	26	96.75±0.82a	绿色、颗粒状
T ₅	400	344	41	86.00±1.13bc	黄绿色、水渍状
T ₆	400	362	26	90.50±0.75b	黄绿色、水渍状

后降低趋势,以 1.5 mg/L 为最佳浓度,诱导率最高。最佳诱导培养基为 MS+2,4-D 0.2 mg/L+TDZ 1.5 mg/L,出愈率最高为 96.75%,长出愈伤组织时间为 26 d。

2.2 不同激素对比对草莓花药分化的影响

草莓花药分化阶段激素与诱导阶段相比,需更高比例细胞分裂素^[9]。提高 TDZ 浓度的同时降

低 2,4-D 浓度对草莓分化有促进作用。由表 3 看出,TDZ 在 MS 培养基中比例越高,分化率越高,但浓度太高会造成芽生长受抑制,分化率反而降低。在叶绿素含量方面,M₃处理叶绿素含量最高。因此,最佳分化培养基为 MS+2,4-D 0.05 mg/L+TDZ 2.0 mg/L。

表 3 不同激素对比对草莓花药分化的影响

处理	接种愈伤组织数量	分化成芽数量(个)	分化率(%)	叶绿素总含量(mg/g)
M ₁	160	5	3.13±0.28f	0.37±0.03b
M ₂	160	11	6.88±0.53d	0.34±0.04b
M ₃	160	8	5.00±0.13e	0.55±0.03a
M ₄	160	27	16.88±0.51a	0.41±0.05b
M ₅	160	19	11.88±0.81b	0.42±0.02ab
M ₆	160	14	8.75±0.23c	0.36±0.06b

2.3 不同激素对比对草莓花药增殖的影响

由表 4 可知,处理 C₁产生芽数量最多,但玻璃化现象严重,后期不定芽生长受抑制。为改善增殖效果,将激素浓度降低,丛生芽生长状况有很大改善。处理 C₂与 C₃增殖系数结果无显著差异,

且前者玻璃化现象较少,不定芽生长势好。试验继续将丛生芽接种到 C₄培养基上,无玻璃化现象,由于激素浓度过低,不定芽生长缓慢,且增殖系数低。因此,最适宜增殖阶段培养基为 C₂培养基(MS+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L)。

表 4 不同激素对比对草莓花药增殖的影响

处理	接种不定芽数量(个)	产生芽数量(个)	增殖系数	生长状态
C ₁	20	135	6.75±0.26a	增殖数量多,玻璃化严重,不定芽生长受抑制
C ₂	20	91	5.10±0.89ab	增殖数量较多,玻璃化较少,不定芽生长迅速
C ₃	20	77	3.85±0.20bc	增殖数量较多,玻璃化少,不定芽生长一般
C ₄	20	63	3.15±0.46b	增殖数量少,无玻璃化,不定芽生长缓慢

3 讨论与结论

激素种类和浓度对草莓花药离体组织培养有重要影响。在离体组织培养过程中,细胞分裂素有利于花芽形成,生长素有利于根的形成,不同阶段所需激素浓度不同,通过改变二者的比例以达到最适宜花药离体培养条件^[3]。目前,TDZ 在多种草本植物和木本植物中得到了广泛的应用。2,4-D 在草莓花药愈伤组织诱导、不定芽再生和增殖过程中起关键作用,以诱导花药愈伤组织形成的效果最好^[8]。

王敬东等^[6]研究表明,TDZ 和 NAA 组合不能诱导出愈伤组织,可能与激素的浓度、配比以及外植体有关。Roberto Cappelletti^[9]在试验中添加 TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 0.02 mg/L 的培养基中,成功获得了草莓叶片愈伤组织。本试验选用 TDZ 和 2,4-D 组合,成功对草莓花药再生体系进行了优化,且在诱导阶段与 6-BA 和 NAA 组合相比,MS+2,4-D

0.2 mg/L+TDZ 1.5 mg/L 诱导率明显优于 6-BA 和 NAA,达到 96.75%,出愈伤组织的时间缩短到 26 d,愈伤组织状态活性高,生长势旺盛。观察发现在培养 35 d 时,对照激素组合没有分化出不定芽,处理激素组合已经出现不定芽分化现象,诱导效果非常明显。由于所用激素浓度以及外植体种类不同,所用最佳培养基条件有很大差异,激素的种类和浓度是影响外植体器官发生的重要因素。

赵永钦等^[3]研究表明,要获得草莓较高的愈伤诱导率和分化率无论是生长素还是细胞分裂素都应维持在较高的水平,愈伤诱导阶段需要较高浓度的生长素,而分化阶段则需要在较高细胞分裂素的条件下进行。有研究结果表明^[10-14],在愈伤组织分化阶段细胞分裂素的浓度更高。本试验愈伤组织分化阶段,随着细胞分裂素 TDZ 浓度的升高以及 2,4-D 浓度不变或略降低,TDZ 所占比例加大,分化率则变大,当 TDZ 所占比例达到一定程度,分化率反而下降,这可能(下转第 131 页)

- a Suitable Substitute for Stick Spawn in Mushroom Cultivation[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 240: 572-577.
- [10] 王 玉,李 政,班立桐,等.猴头菇液体菌种培养基配方的研究[J].北方园艺,2011(9):202-204.
- [11] 杨云静.金针菇“江山一号”营养要素筛选及其液体菌种培养研究[D].福州:福建农林大学,2017.
- [12] 唐利华,高君辉,茅文俊,等.杏鲍菇工厂化栽培的液体菌种培养条件的优化[J].上海农业学报,2015,31(1):27-29.
- [13] 刘 冉,董 莎,姚志超,等.黑木耳菌糠有机肥的制备及肥效研究[J].东北农业科学,2018,43(6):20-24.
- [14] 刘晓鹏,姜 宁,夏冬冬,等.猴头菌液体发酵培养基及工艺优化的研究[J].广东农业科学,2014,41(18):79-82,86.
- [15] 曾化伟,郑惠华,梁 伟,等.猴头菌液体发酵培养基的优选[J].食品与发酵科技,2014,50(3):29-31.
- [16] 赵金芬.猴头菌液体发酵培养基优化提高菌丝生物量的研究[J].中国医药导刊,2010,12(10):1831-1833.
- [17] 赵竹青,贺长映,都秀俐.不同碳氮比对白玉菇生长影响试验[J].中国果菜,2013(9):7-9.
- [18] 孙荟林,李 明,李守勉,等.茶树菇母种培养基最适碳氮比及碳源、氮源筛选[J].北方园艺,2016(14):148-151.
- [19] 王 涛,谭 琦,李 玉,等.杏鲍菇液体菌种应用工艺参数的优化[J].上海农业学报,2019,35(1):33-37.
- [20] 刘孝利,李晓博,赵敬聪,等.玉米耳液体菌种配方研究[J].食用菌,2019,41(1):37-38.
- [21] 王庆武,乔爱丽,兰玉菲.黑木耳液体发酵菌种的制作技术要点[J].食用菌,2018,40(3):64-65.
- [22] 刘宏宇,郭鹏程,姚方杰.榆耳菌丝原生质体制备及再生的研究[J].东北农业科学,2018,43(2):60-64.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第75页)与不同花药基因型自身的分化能力以及愈伤组织本身内源细胞分裂素水平较低或生长素浓度较高有关。不定芽增殖阶段,生长素和细胞分裂素越高,增殖系数越大,产生芽数越多,此结果与前人研究规律一致^[15-21]。但高浓度激素条件下,丛生芽普遍出现玻璃化现象严重,生长受到抑制。综合考虑,TDZ和2,4-D浓度应在一定范围内。

通过对草莓花药离体组织培养试验研究,结果表明:TDZ和2,4-D组合可成功建立草莓花药离体再生体系。在本试验所设处理中,最适宜诱导培养基为MS+2,4-D 0.2 mg/L+TDZ 1.5 mg/L,最适宜分化培养基为MS+2,4-D 0.05 mg/L+TDZ 2.0 mg/L,最适宜增殖阶段培养基为MS+TDZ 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L。本试验结果为草莓花药单倍体育种研究工作提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 大泽胜次,西贞夫.用花药培养法大量培育草莓无病毒植株的研究[J].农业园艺(日),1974(4):537-540.
- [2] 宫崎正则,美谷诚一,藪内一雄.关于加工用草莓植株育成的研究二[J].东洋食品研究所,1978(13):41-47.
- [3] 赵永钦,吴新新,郑 禾,等.草莓“甜查理”和“章姬”花药培养及单倍体植株的获得[J].中国农业大学学报,2012,17(5):39-45.
- [4] 陈玉波,张学明,姚环宇,等.以草莓花药培养实现脱毒的研究进展[J].北方果树,2016(6):1.
- [5] 张立磊,李桂荣,张 浩,等.不同草莓品种无茵苗增殖及不定芽诱导的研究[J].西北林学院学报,2018,33(2):134-138.
- [6] 胡选萍.IBA对大樱桃“吉塞拉”试管苗生根的效应研究[J].东北农业科学,2015,40(3):106-109.
- [7] 王敬东,张 丽,马洪爱,等.植物生长调节剂TDZ在草莓花药培养中的应用[J].安徽农业科学,2011,39(5):2588-2590,2622.
- [8] 陈纪鹏,彭嗣亮,卢 禹,等.预处理和激素对草莓花药离体培养的影响[J].核农学报,2016,30(11):2144-2150.
- [9] Roberto Cappelletti, Silvia Sabbadini, Bruno Mezzetti. The use of TDZ for the efficient in vitro regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars[J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 207: 117-124.
- [10] 查中萍,柳 俊,刘定富.影响草莓花药培养因素的分析[J].安徽农业科学,2006,34(1):24,28.
- [11] 吴鹏飞,王丽娟,切岩祥和,等.设施草莓组培快繁研究现状分析[J].北方园艺,2016(1):195-199.
- [12] Prior R L, Cao G, Martin A, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of vaccinium species[J]. *Agric. Food Chem*, 1998, 46: 2686-2693.
- [13] 晁慧娟,刘 敏,姬谦龙,等.‘甜查理’草莓花药培养脱毒技术[J].北京农学院学报,2010,25(2):18-21.
- [14] 张玉君,彭兴龙,张哲民,等.草莓组织培养与脱毒技术[J].河南林业科技,2009,29(11):73-75.
- [15] 邹锋康,王秋红,周建朝,等.生长素调节植物生长发育的研究进展[J].中国农学通报,2018,34(24):34-40.
- [16] 陶阿丽,曹殿洁,华 芳,等.植物组织培养技术研究进展[J].长江大学学报(自然科学版),2018,15(18):31-35.
- [17] 王万奇,李文龙,王媛媛,等.植物花药组织培养技术的研究[J].黑龙江农业科学,2015(10):177-179.
- [18] 陈玉波,张学明,姚环宇,等.8个草莓品种在日光温室立体栽培的引种表现[J].东北农业科学,2016,41(6):97-99.
- [19] 杨怀卫.玉米单倍体育种研究[J].种子科技,2018,36(2):53-54.
- [20] 祝剑峰.植物组织培养在育种中的应用[J].安徽农业科学,2014,42(35):12415-12417.
- [21] 程 艳,吴春燕,张晓旭,等.蕹菜叶片SPAD值与叶绿素含量的相关性分析[J].东北农业科学,2018,43(4):44-47.

(责任编辑:刘洪霞)