

西藏地区草莓“章姬”和“红颜”茎尖快繁技术研究

朱振家¹, 王媛花², 杨 瑞¹, 谢东锋¹

(1. 西藏职业技术学院, 拉萨 850000; 2. 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212400)

摘 要:以草莓品种“红颜”和“章姬”匍匐茎茎尖为材料, 研究外植体诱导、试管苗增殖与生根培养过程中外源激素种类与浓度配比及试管苗驯化移栽条件, 为高原低气压地区设施草莓脱毒种苗生产提供理论依据。结果表明: 初代培养中, 随6-BA浓度增加, 草莓茎尖不定芽萌发率先升后降, MS+6-BA_{1.5}处理表现最好; 与只添加6-BA相比, 增加一定量的NAA能显著提高草莓不定芽萌发率, MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.2}组合优势最强, “红颜”和“章姬”不定芽萌发率分别达62%和75%。和初代培养相比, 继代与增殖培养中, 需要较低浓度配比的外源激素, MS+6-BA_{0.2}+NAA_{0.1}组合优势最强, “红颜”和“章姬”丛生芽增殖系数分别达4.2和4.8。加入一定量的IBA, 可促进草莓试管苗发根, 以1/2 MS+IBA_{0.05}处理最有效, “红颜”和“章姬”发根率分别达78.4%和88.1%。驯化移栽过程中, 草炭: 蛭石: 珍珠岩=4: 1: 1基质组合相对较好, 两供试草莓试管苗成活率分别达50.1%和47.9%。6-BA在草莓茎尖快繁体系中起着主导性作用, NAA可协同促进这一作用。

关键词:草莓; 茎尖组织; 脱毒

中图分类号: S668.4

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)04-0075-04

Study on Rapid Propagation Technique of Stem Apex of Two Strawberry Varieties "Zhangji" and "Hongyan" in Tibet

ZHU Zhenjia¹, WANG Yuanhua², YANG Rui¹, XIE Dongfeng¹

(1. Tibet vocational Technical College, Lhasa 850000; 2. Jiangsu Vocational College of Agritural and Forestry, Zhenjiang 212400, China)

Abstract: The stem apex of strawberry stolons "Hongyan" and "Zhang Ji" were used as materials to study the ratio of exogenous hormone species and concentration in the process of explants induction, in vitro plantlet proliferation and rooting culture, and the conditions of in vitro plantlet domestication and transplanting, so as to provide theoretical basis for the production of virus-free strawberry seedlings in low-pressure plateau area. Results show that in the primary culture, with the increase of 6-BA concentration, the stem apex adventitious bud germination of strawberry first increased and then decreased, and MS + 6-BA_{1.5} treatment was the best. Compared with only adding 6-BA, adding a certain amount of NAA could significantly improve the germination rate of adventitious bud of strawberry, and MS + 6-BA_{1.0} + NAA_{0.2} combination had the strongest advantage. The germination rate of "Hongyan" and "Zhangji" adventitious buds of the two tested strawberries is 62% and 75%, respectively. Compared with the primary culture, the subculture and propagation need a lower concentration of 6-BA and NAA, in which the combination of MS + 6-BA_{0.2} + NAA_{0.1} has the strongest advantage, and the multiplication coefficients of cluster buds reached on 4.2 and 4.8, respectively. Adding a certain amount of IBA can promote the rooting of strawberry test tube seedlings, among which 1/2 MS + 6-BA_{0.05} treatment is the most effective. In the process of acclimation and transplanting, the matrix combination of peat, vermiculite and perlite = 4:1:1 was relatively good, and the survival rate of strawberry in vitro seedlings in the two tests was 50.1% and 47.9%, respectively. 6-BA plays a leading role in the tissue culture of stem apex and shoot rapid propagation, which can be promoted by NAA.

Key words: Strawberry; Stem apex tissue; Detoxification

收稿日期: 2020-06-12

基金项目: 西藏自治区自然科学基金项目(XZ 2018 ZR G-133)

作者简介: 朱振家(1978-), 男, 副教授, 博士, 主要从事园艺植物生理生态研究。

在西藏, 草莓主要种植于一江两河(雅鲁藏布江、拉萨河、年楚河)高原河谷区。近年来, 随着设施农业的兴起和快速发展, 西藏拉萨、日喀则、林芝等人口集中的城市近郊, 设施草莓种植面积

逐年增加^[1]。由于规模化栽培时间短,西藏本地仍无专业的草莓种苗生产基地,种苗自繁自育现象相当普遍,由此带来的品种退化、病虫害严重问题日渐突出^[2]。一些农户选择从内地购买种苗,但长距离运输不仅增加了成本,而且存在适应性差,缓苗期长,成活率低等问题。西藏设施草莓产业的快速发展与其滞后的种苗生产之间的矛盾日益加剧,优质种苗生产亟待解决。以草莓茎尖为外植体,通过组织培养的方法获得优质种苗是草莓种苗快繁技术体系中常用的方法^[3]。不仅能够在短期内获得大量优质种苗,而且可结合脱毒技术进行脱毒苗的制备。有关草莓茎尖快繁技术体系研究国内外已有较多报道^[4],但受材料本身基因型、外植体选择、组培环境等不同的影响,结果却不尽一致^[5-7],尤其是在外源激素的选择和用量上差异较大。已有研究证实,在组织培养过程中,不同类型激素间的平衡状况比单一激素的作用更重要。陈英等^[8]的研究结果表明,“红颜”草莓茎尖诱导分化最佳培养基组成为MS+6-BA 0.1 mg/L+IBA 1 mg/L,采用培养基MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.05 mg/L+中苗期+每块3个芽的切割方式能达到最理想的增殖系数。而在“香野”草莓的研究中,连朋等^[9]认为诱导分化最适宜的培养基组成为MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,丛生芽继代增殖阶段最适宜的培养基组成为MS+TDZ 0.75 mg/L+NAA 0.2 mg/L。西藏地处高原,空气稀薄,气压低,特殊的环境条件是否影响组培苗的生长与发育,能否使用已有的技术方法获得优质草莓种苗,目前还未有相关报道。本试验试图结合本土环境,在优化现有技术的基础上,建立西藏地区草莓茎尖快繁技术体系,培育适应性强、优质的种苗,从而为解决区域草莓产业可持续发展提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为草莓品种“红颜”和“章姬”。

1.2 取材与消毒

从结果性状好、品种纯正的草莓母株上剪取长度5~8 cm的匍匐茎段,基部朝下,立即插入盛水容器中,带回实验室,流水冲洗15 min,然后用洗衣粉浸泡10 min,再流水冲洗30 min;将经上述预处理、沥干水后的匍匐茎在超净工作台中用70%酒精浸泡30 s,再用0.1%的氯化汞浸泡15 min,然后用无菌水清洗3~5遍,沥干后,待用。

1.3 培养条件

将脱毒后的材料在解剖镜下进行茎尖剥离,茎尖大小控制在3~5 mm,然后将剥好的茎尖接种到诱导培养基上。培养条件为温度25℃,光强2 800 Lx,14 h/10 h光/暗周期下培养。

1.4 试验处理

以MS为基本培养基,蔗糖3%,琼脂0.7%,pH 6.8,添加不同种类和浓度的外源激素处理,每处理接种10瓶,每瓶接种3~5个茎尖,重复3次。

1.4.1 茎尖诱导

共设9个处理:MS+6-BA_{0.5}、MS+6-BA_{1.0}、MS+6-BA_{1.5}、MS+6-BA_{2.0}、MS+6-BA_{0.5}+NAA_{0.05}、MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.1}、MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.2}、MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.2}+GA3_{0.1}、MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.2}+GA3_{0.3},其中下标数字代表相应激素的浓度,单位为mg/L,下同。

不定芽萌发率=萌发数/接种茎尖数×100%

1.4.2 增殖快繁(继代培养)

设8个处理:MS+6-BA_{0.1}、MS+6-BA_{0.2}、MS+6-BA_{0.4}、MS+6-BA_{0.8}、MS+6-BA_{0.1}+NAA_{0.1}、MS+6-BA_{0.2}+NAA_{0.1}、MS+6-BA_{0.1}+NAA_{0.3}、MS+6-BA_{0.2}+NAA_{0.3}。

增殖倍数=增殖后总芽数/接种芽数×100%

1.4.3 生根培养

设4个处理:MS、MS+IBA_{0.05}、1/2MS、1/2MS+IBA_{0.05}。

发根率=发根植株/接种总植株×100%

1.4.4 驯化移栽

设4个处理:草炭:蛭石:珍珠岩=2:1:1(体积比,下同),草炭:蛭石:珍珠岩=4:1:1,营养土,营养土:珍珠岩=2:1。

1.5 数据整理与分析

采用Excel 2010进行数据整理,采用SPSS 23.0进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 茎尖诱导

经脱毒处理后的草莓茎尖在诱导培养基上培养25 d左右其颜色会逐渐转绿,基部开始膨大,35 d左右可见小茎逐渐伸长,叶原基逐渐形成小叶,50 d左右便可形成小芽苗。表1显示,6-BA浓度在0.5~2.0 mg/L范围内均能诱导出不定芽,其中,0.5~1.5 mg/L浓度区间内,随6-BA浓度升高,草莓茎尖不定芽诱导率不断提高;6-BA浓度增加到2.0 mg/L时,不定芽诱导率出现下降,“红颜”草莓表现更为明显。试验中观察到,尽管1.5 mg/L 6-BA处理下不定芽平均诱导率最高,但诱

表1 BA和NAA对草莓茎尖萌发率的影响

培养基	萌发率(%)	
	“红颜”	“章姬”
MS+6-BA _{0.5}	20e	12e
MS+6-BA _{1.0}	42c	34d
MS+6-BA _{1.5}	45c	46c
MS+6-BA _{2.0}	33d	38bc
MS+6-BA _{0.5} +NAA _{0.05}	22e	13e
MS+6-BA _{1.0} +NAA _{0.1}	53b	37bc
MS+6-BA _{1.0} +NAA _{0.2}	62a	75 a
MS+6-BA _{1.0} +NAA _{0.2} +GA ₃ _{0.1}	58a	69ab
MS+6-BA _{1.0} +NAA _{0.2} +GA ₃ _{0.3}	58a	64 b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同

导出的新芽整体生长势偏弱,有一定玻璃化倾向。与只添加6-BA相比,添加一定浓度的NAA可显著提高不定芽的诱导率,其中以MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.2}组合优势较为明显;添加一定量的GA₃,草莓不定芽诱导率总体变化不明显。综上,6-BA_{1.0}+NAA_{0.2}处理对“红颜”和“章姬”茎尖不定芽诱导率最有利,小苗长势最好。

2.2 增殖快繁

将诱导产生出的丛生芽苗继续在同一培养基上培养,会出现各种畸形,需要将其尽快转接到增殖培养基上。由表2可以看出,MS培养基中只添加6-BA处理,表现为6-BA浓度较低丛生芽增值倍数反而较高。在低浓度6-BA处理基础上,加入一定量的NAA,能显著提高草莓试管苗丛生芽增值倍数,其中,MS+6-BA_{0.2}+NAA_{0.1}处理组合表现最好,“红颜”和“章姬”增殖倍数分别达到4.2和4.8。

表2 6-BA和NAA对草莓不定芽增殖倍数的影响

培养基	增殖倍数	
	“红颜”	“章姬”
MS+6-BA _{0.1}	2.1c	2.8bc
MS+6-BA _{0.2}	2.4c	3.1b
MS+6-BA _{0.4}	1.8d	2.2d
MS+6-BA _{0.8}	1.7d	2.2d
MS+6-BA _{0.1} +NAA _{0.1}	3.4b	3.1b
MS+6-BA _{0.2} +NAA _{0.1}	4.2a	4.8a
MS+6-BA _{0.1} +NAA _{0.3}	2.2c	2.6c
MS+6-BA _{0.2} +NAA _{0.3}	1.8d	2.5c

2.3 生根培养

选取生长健壮、苗高1.5~2 cm未发根的草莓增殖苗,进行生根培养基筛选。由表3可知,供试

表3 不同培养基构成对草莓试管苗发根率的影响

培养基 (IBA浓度,mg/L)	生根率(%)	
	“红颜”	“章姬”
MS	54.7c	76.1d
MS+IBA _{0.05}	66.5b	84.3b
12/MS	55.2c	79.7b
1/2MS+IBA _{0.05}	78.4a	88.1a

几种培养基组合都能完成草莓试管苗发根,相比而言,1/2 MS培养基+0.05 mg/L IBA处理发根效果最好,“章姬”15 d根开始形成,“红颜”25 d根开始形成,“红颜”和“章姬”生根率分别达78.4%和88.1%。

2.4 试管苗驯化移栽

将生根良好的种苗由培养室中移出,放置室内散射光下3 d之后,用镊子小心夹出幼苗,自来水下缓慢冲洗干净植株根部的培养基,移栽至经500倍多菌灵消毒后的不同组成的基质中,在温度15~20℃,相对湿度85%左右的温室中驯化2周,成活率见表4。

表4 不同培养土对草莓试管苗移栽成活的影响

培养土	移栽数(株)	2周后成活率(%)	
		“红颜”	“章姬”
草炭:蛭石:珍珠岩=2:1:1	50	42.4c	30.4d
草炭:蛭石:珍珠岩=4:1:1	50	50.1a	47.9a
营养土	50	30.8d	37.1c
营养土:珍珠岩=2:1	50	47.3b	42.8b

由表4可以看出,4种基质移栽成活率均较低,相比之下,草炭:蛭石:珍珠岩=4:1:1处理成活率较好,成活率在50%左右,营养土:珍珠岩=2:1处理次之。

3 结论与讨论

MS培养基是目前组织培养中使用最普遍的培养基。外源激素通过对植物生长和分化过程的调节,从而促进组织培养顺利进行^[10]。不同激素间的协同效应也已在多项研究中被证实^[11]。本研究发现,在MS培养基中只添加6-BA就能诱导出有效芽苗,且随6-BA浓度提高,不定芽诱导率和丛生芽增殖总体上升。可见,细胞分裂素在草莓茎尖培养中起主导作用。但添加过高浓度的6-BA,则出现芽苗生长势弱、玻璃化现象加剧等问题。同时添加多种外源激素,不仅可显著提高草莓茎尖不定芽诱导率和丛生芽增殖系数,还能在一定程度上消除因6-BA添加过多而引起芽苗细

弱问题,这可能与草莓茎尖的离体发育受多种激素协同调控有关^[12-13],多数研究结果一致也证实了这一推测^[14-15]。

增殖培养中丛生芽的大小对增殖倍数及增殖培养中激素浓度的要求有很大的影响^[16]。分割时芽小,尽管可提高丛生芽增殖倍数,但芽苗生长相对缓慢,在随后的调整中发现,即使调节6-BA和NAA浓度,也很难达到理想的增殖倍数,故在丛生芽快繁过程中,选择大小适宜的丛生芽进行分割是十分重要的。

多数研究已证实^[17-19],当草莓茎尖组织足够小时,可获得脱毒苗。但受条件限制,本试验未能对草莓茎尖培养苗脱毒效果做进一步研究,今后将继续研究解决草莓茎尖组织培养中茎尖取材大小与脱毒效果、丛生芽大小与分割时期、适宜激素比例以及驯化移栽成活率低等问题,以期建立稳定的脱毒快繁体系,为高原低气压环境下草莓脱毒种苗工厂化生产提供参考。

参考文献:

- [1] 王忠红,关志华,李 丹.基于地域资源优势的西藏设施农业发展分析[J].中国农学通报,2010,26(20):388-392.
- [2] 张华国,李宝海.西藏草莓生产现状、存在问题及对策研究[J].农业工程技术(温室园艺),2013(1):16-18.
- [3] 席家军,聂凯华.草莓愈伤组织诱导的几个影响因素研究[J].甘肃农业科技,2008(12):5-8.
- [4] 张 静,连丽艳.有关草莓研究的学位论文文献统计分析[J].东北农业科学,2019,44(1):84-86.
- [5] 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.
- [6] 邓 渊.两个草莓品种茎尖脱毒快繁体系的建立[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2018.
- [7] A Passey, K Barrett, D James. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch) using a range of explant types[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(5): 397-401.
- [8] 陈 英,张西英.草莓品种红颜组培快繁体系的优化[J].新疆农业科学,2016,53(12):2210-2216.
- [9] 连 朋,杜梦卿,王丽娟.草莓茎尖组培消毒方法及激素配比的优选[J].天津农学院学报,2019,26(3):21-25.
- [10] Gregory C Phillips, Martina Garda. Plant tissue culture media and practices: an overview [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 2019, 55(3): 242-257.
- [11] 吕树立,孙喜云,周玉玲,等.草莓组织培养与快速繁殖技术[J].山东农业科学,2010(3):109-110.
- [12] 姚思扬,赵春莉,刘子平,等.红颜草莓组培快繁体系优化[J].福建农业学报,2018,33(9):950-956.
- [13] 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.
- [14] 翟婷婷,刘成连,原永兵,等.草莓茎尖培养快繁体系的研究[J].安徽农业大学学报,2015,42(4):545-548.
- [15] 袁惠燕,谈建中,黄秀勤,等.激素条件对不同品种草莓组培快繁效果的影响[J].苏州大学学报(自然科学版),2007(3):75-79.
- [16] 李 闯,张海燕,谭 化,等.马铃薯新品种‘吉薯1号’茎尖脱毒及组培快繁研究[J].东北农业科学,2019,44(6):62-64,73.
- [17] 陈 英,肖春林,罗燕娜,等.红颜草莓脱毒优化及病毒检测的研究[J].浙江农业学报,2017,29(6):966-970.
- [18] 刘庆忠,赵红军,姜君军,等.无病毒草莓良种繁育技术体系的建立[J].落叶果树,2000(4):1-4.
- [19] 张志宏,肖 敏,杨洪一,等.草莓病毒脱除方法的比较与评价[J].果树学报,2006(5):720-723.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第26页)

- [14] 王新风,朴铁夫. EDTA对向日葵根尖细胞染色体的诱变分析[J].吉林农业科学,2007,32(1):8-9,13.
- [15] 崔秋华,蔚荣海,韩立军.向日葵染色体核型分析[J].吉林农业大学学报,1989(2):23-25,31,121.
- [16] 赵慧博.高蓄能作物油葵的染色体核型分析及遗传转化[D].天津:天津大学,2007.
- [17] 张新玲,张佩玲,尹 洁.6个向日葵品种的核型分析[J].八一农学院学报,1995(3):100-103.
- [18] 李懋学.几种油料植物的核型分析[J].西北植物学报,1987(4):246-251,287.
- [19] 丁海燕,汪春林,武 燕,等.龙葵杂10号向日葵染色体核型分析[J].作物杂志,2019(2):1-3.
- [20] 李懋学,陈瑞阳.关于植物核型分析的标准化问题[J].武汉植物学研究,1985(4):297-302.
- [21] Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [22] Arano H. Cytological studies in subfamily (Carduoideae) of Japan: IX. The karyotype analysis [J]. Botanical Magazine(Tokyo), 1963, 76(895):32-39.
- [23] Stebbins G L. Chromosomal and evolution in higher plants[M]. London: Edward Aronld, 1971: 87-89.
- [24] 刘惠荣,曾子申,利容千.向日葵三个品种的染色体组型分析[J].中国油料,1984(3):26-30.

(责任编辑:刘洪霞)