

# 草莓的初代组织培养技术

张立磊<sup>1,2</sup>, 姚正阳<sup>1\*</sup>

(1. 河南科技学院园艺园林学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南省园艺植物资源利用与种质创新工程研究中心, 河南 新乡 453003)

**摘要:**以草莓品种红颜和丰香为试材,选择草莓匍匐茎的茎尖为外植体,以MS为基本培养基,研究了不同激素配比对草莓组培苗生长的影响。结果表明:(1)红颜最佳芽诱导培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L;丰香最佳芽诱导培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L。(2)适合红颜继代增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L,增殖系数可达12.3;适合丰香继代增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,增殖系数可达18.8。(3)适宜红颜生根培养基为1/2MS+IAA 0.5 mg/L;适宜丰香的生根培养基为1/2MS+IAA 1.5 mg/L。

**关键词:**草莓;茎尖;诱导;增殖;组织培养

中图分类号:S668.4

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2023)03-0087-04

## Study on Tissue Culture of Strawberry

ZHANG Lilei<sup>1,2</sup>, YAO Zhengyang<sup>1\*</sup>

(1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003; 2. Henan Province Engineering Research Center of Horticultural Plant Resource Utilization and Germplasm Enhancement, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** This study investigates the impact of various hormone proportions on the growth of strawberry somaclones, specifically using the Hongyan and Fengxiang strawberry cultivars as test subjects. The analysis entailed using the tips of their stolons as explants and employing MS as the principal culture medium. The results showed that, the best bud induction medium for Hongyan was MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L, the best bud induction medium for Fengxiang was MS+BA 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L. The subculture proliferation medium suitable for Hongyan is MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L, the multiplication factor can reach 12.3. The proliferation medium suitable for Fengxiang is MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L and the multiplication factor can reach 18.8. The suitable rooting medium for Hongyan is 1/2MS+IAA 0.5 mg/L, the suitable rooting medium for Fengxiang is 1/2MS+IAA 1.5 mg/L.

**Key words:** Strawberry; Tissue culture; Induction; Propagation; Primary culture

草莓 (*Fragaria Ananassa* Duchesne) 原产南美,我国各地及欧洲等地广为栽培,目前我国栽培总面积和总产量已达世界第一位<sup>[1]</sup>。草莓为多年生温带草本果树,果实柔软多汁、酸甜适度、营养丰富、外观美丽、香气浓郁,且有保健功效。草莓除鲜食外还可加工成果酱、饮料和罐头等<sup>[2]</sup>,在国内外水果市场一直深受喜爱,有“水果皇后”之誉。由于其具有栽培管理容易、适应性强等诸多优点,在我国大面积栽培<sup>[3]</sup>。种苗是草莓生产的一

个重要前提。传统草莓种苗繁育是种植户自己多年多代通过匍匐茎繁殖获得,即所谓的自留苗无性繁殖。但是在传统生产方式下,它会因长期营养繁殖和连作导致植株体内多种病毒积累<sup>[4-5]</sup>,表现为植株矮化、果形变化、畸形果比例增加<sup>[6]</sup>,而且有花叶、黄边、斑驳等多种症状,造成品种种性退化,严重影响品质和产量<sup>[7]</sup>,降低了果实的经济价值和商品价值,使草莓产业的发展遇到瓶颈<sup>[8]</sup>。利用组织培养对草莓进行快速繁殖获得大量脱毒苗是解决这一问题的有效途径。通过茎尖培养获得的无毒苗,具有生长势强、品质佳等优点<sup>[9-10]</sup>,且培养过程不受季节的影响<sup>[11]</sup>。目前,有关草莓组培的报道很多,但不同品种特性不同,培养方法也有差异<sup>[12-13]</sup>。本试验以红颜草莓和丰香草莓茎

收稿日期:2020-07-06

基金项目:河南省科技攻关项目(192102310485)

作者简介:张立磊(1978-),女,副教授,硕士,研究方向为植物资源研究及设计。

通讯作者:姚正阳,男,博士,讲师,E-mail: zzy@hist.edu.cn

尖为外植体进行组织培养,分析草莓茎尖组织培养各个阶段的最佳培养条件,为草莓试管苗的大量生产提供一定理论基础和指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

以草莓品种红颜、丰香为材料,以匍匐茎尖为外植体,以MS为基本培养基进行试验。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 无菌材料的获得

将采集的草莓匍匐茎的茎尖装进纱布中,在自来水下冲洗30 min。表面冲洗干净后,用洗洁精浸泡1 h冲洗5次,在超净工作台上先用70%乙醇漂洗30 s,漂洗过程中不断摇动烧杯,后用无菌水冲洗3~5次。再用0.1%的升汞( $\text{HgCl}_2$ )消毒约8 min<sup>[14-18]</sup>,最后用无菌水冲洗5次。消毒完毕用滤纸吸干表面水分。

#### 1.2.2 培养基的配置

诱导和继代培养基:均以MS为基本培养基,培养基中添加蔗糖20 g/L,琼脂6 g/L,pH值6.0,添加不同种类和浓度的激素,共设置16个芽诱导培养基(表1)和16个继代培养基(表2)。生根培养基:以1/2MS为基本培养基,培养基中添加蔗糖15 g/L,琼脂6 g/L,pH值6.0,添加不同浓度的激素(表3)。

表1 不同激素配比培养基对茎尖诱导培养的影响

基本培养基	生长调节剂及浓度(mg/L)	平均诱导芽数(个)	
		红颜	丰香
MS	6-BA 0.5	2.1	4.3
	6-BA 1.0	1.9	3.3
	6-BA 1.5	1.6	2.3
	KT 0.5	2.6	3.7
	KT 1.0	3.0	3.7
	KT 1.5	3.0	3.3
	6-BA 0.5+KT 0.5	2.3	2.7
	6-BA 0.5+KT 1.0	1.8	2.7
	6-BA 0.5+KT 1.5	1.8	2.3
	6-BA 1.0+KT 0.5	1.8	2.0
	6-BA 1.0+KT 1.0	2.3	2.3
	6-BA 1.0+KT 1.5	2.3	2.3
	6-BA 1.5+KT 0.5	2.7	5.2
	6-BA 1.5+KT 1.0	2.7	3.3
	6-BA 1.5+KT 1.5	4.0	3.3
	CK	2.3	2.0

表2 不同激素配比的培养基对芽增殖的影响

植物生长调节剂	浓度(mg/L)	平均诱导芽数(个)		增殖系数	
		红颜	丰香	红颜	丰香
IAA	0	2.5	3.8	9.5	9.7
	0.1	3.7	4.2	10.9	10.8
	0.2	4.2	3.5	10.5	9.3
	0.4	3.7	4.1	7.6	11.5
	0.6	3.2	3.8	9.5	10.6
	NAA	0	3.1	4.1	9.3
0.1		3.3	3.6	8.3	9.2
0.2		3.8	3.6	9.5	9.3
0.4		4.2	3.5	12.3	8.9
0.6		2.6	3.6	8.7	8.3
IBA		0	5.0	4.8	11.5
	0.1	4.1	5.5	11.7	18.8
	0.2	3.2	3.4	9.0	9.3
	0.3	3.3	3.4	9.9	9.9
	0.4	4.0	3.6	9.5	8.7
	0.6	1.5	2.5	4.0	5.9
CK	-	2.5	3.8	9.5	9.7

表3 不同激素配比生根培养基对生根的影响

植物生长调节剂	浓度(mg/L)	根数(个)		根长(cm)	
		红颜	丰香	红颜	丰香
NAA	0.5	2.3	0.0	3.6	0.0
	1.0	3.3	0.0	2.9	0.0
	1.5	3.6	0.0	2.9	0.0
IAA	0.5	3.6	1.5	4.2	1.5
	1.0	2.7	1.5	3.6	1.6
	1.5	3.3	3.3	5.3	1.6
IBA	0.5	2.3	1.6	3.8	1.3
	1.0	2.0	2.0	2.6	1.5
	1.5	2.3	1.0	3.9	1.0
CK	-	2.3	1.0	2.5	1.8

茎尖的诱导培养:无菌条件下切取0.3~0.5 mm的茎尖生长点,接种到诱导培养基上,放于室温( $25\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,每天光照16 h,光照强度2 000 lx条件下进行诱导分化培养,每3 d观察1次,使茎尖诱导分化出芽。每个诱导芽的培养基设30个重复,每瓶接种茎尖数为1个,接种30 d后统计分化出的丛生芽。

芽的增殖培养:本试验采用芽诱导的细胞分裂素BA最佳浓度1.0 mg/L和NAA、IAA、IBA的不同浓度相配合,从中筛选出最适的增殖培养基。在超净工作台上用镊子和解剖刀将茎尖分化出的芽丛切割成有3~4个幼芽的芽丛,迅速接种于继代培养基上,在室温( $25\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、每天光照16 h条件下进行培养,25~30 d继代1次。

组培苗生根培养:经过几代增殖培养后,将生长健壮的组培苗转接到不同激素配方的生根培养基1/2MS上,材料接种后置于培养室中,调查组培苗的生根情况。

### 1.3 数据处理及分析

出芽数(个):每个外植体的平均诱导出芽数;根数(个):平均每棵组培苗的根数;根长(cm):根长的平均数;繁殖系数:繁殖材料在继代中一个周期产生不定芽的倍数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素配比培养基对茎尖诱导培养的影响

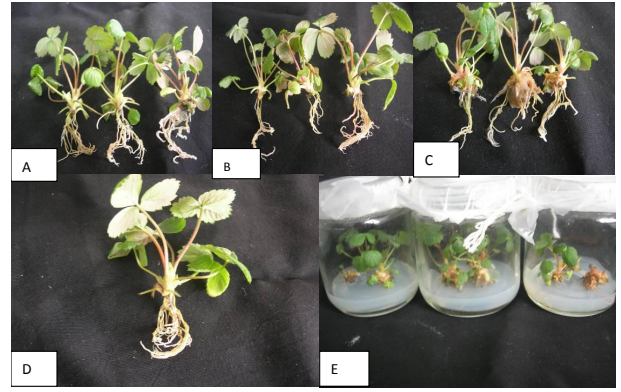
由表1可以看出,丰香诱导分化效果较好的培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L,平均最高诱导芽数可达5.2个。红颜适宜的芽诱导培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L,平均最高诱导芽数可达4.0个。在单独用6-BA诱导下,不同浓度对红颜诱导效果均低于对照,丰香诱导效果高于对照,但随6-BA浓度增加,两个品种诱导的芽数均减少。在不同浓度KT诱导下两个品种的平均芽数变化不大。茎尖在不同浓度的细胞分裂素中发生的情况各不相同。在细胞分裂素浓度较低的培养基中,茎尖成活率较高,但分化率较低。随细胞分裂素浓度的增加,细胞分化逐渐受到抑制。

### 2.2 不同激素配比培养基对芽增殖的影响

由表2可以看出,不同激素配比诱导下两种草莓的平均诱导芽数和增殖系数均表现良好。说明6-BA与NAA、IAA、IBA搭配都可以促进芽的增殖,当IAA浓度为0.4 mg/L,红颜增殖系数较低,仅为7.6。当NAA浓度为0.6 mg/L时,丰香繁殖系数较低,仅为8.3。丰香最佳继代培养基是MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,增殖系数最高,可达18.8;红颜最佳继代培养基是MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L,增殖系数可达12.3。

### 2.3 不同激素配比生根培养基对生根的影响

由图1和表3可以看出,三种生长素处理均能诱导生根,对红颜和丰香的最佳生根培养基分别为1/2MS+IAA 0.5 mg/L和1/2MS+IAA 1.5 mg/L,其幼苗不仅生根速度快、数量多,且根系也较为健壮,20 d后组培苗的生根率可达95%。试验中发现IBA有利于草莓组培苗侧根的生长,IAA则有利于主根的生长。添加不同浓度NAA的培养基均不能诱导丰香生根,但对红颜的诱导效果较好。添加IAA的培养基在不同浓度下对红颜的诱导效果总体好于丰香,对红颜最佳浓度为0.5 mg/L,



注:A.再生植株的根系(IAA 0.5、1.0、1.5);B.再生植株的根系(IBA 0.5、1.0、1.5);C.再生植株的根系(NAA 0.5、1.0、1.5);D.再生植株的根系(IAA 1.5);E.再生植株的根系(NAA 0.5、1.0、1.5)

图1 组培苗的生根情况

诱导平均根数为3.6个,对丰香最佳浓度为1.5 mg/L,诱导的平均根数为3.3个。添加IBA对两个品种来说总体低于添加IAA的诱导效果。从根系的生长情况看,添加NAA的生根培养基诱导的根系较少且细,会先形成大团的愈伤组织,然后才开始生根,相对于添加IAA、IBA的不仅生根速度慢、数量少,且根系较细弱。添加IAA诱导的根系较多且粗,因此添加IAA有利于草莓试管苗的生根。

## 3 结论与讨论

### 3.1 结论

在草莓茎尖培养中,剥取的茎尖越大越容易成活,但易造成污染;剥取茎尖时间不宜过长,这与王会<sup>[9]</sup>对红实草莓茎尖培养的研究结论一致。试验结果表明:不同激素配比诱导芽数不同,红颜最佳的芽诱导培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L,平均诱导芽数可达4.0。丰香最佳芽诱导培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L,平均诱导芽数可达5.2。不同激素对比对芽增殖的影响不同,红颜的最佳继代培养基是MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L,增殖系数可达12.3。丰香最佳的继代培养基是MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,增殖系数可达18.8。红颜草莓在1/2MS+IAA 0.5 mg/L的培养基上生根最好,平均生根3.6个/株。丰香草莓在1/2MS+IAA 1.5 mg/L的培养基上生根最好,平均生根3.3个/株。

### 3.2 讨论

激素是影响植物组织培养的一个关键因素,在植物组织培养中,由于激素的累积作用,要有效诱导一种植物产生苗或促进幼嫩茎良好增殖所需求的激素种类和浓度在不同的培养阶段是不同的。植物组织培养中使用的外植体种类很多,诸



如茎尖、花药、叶片、原生质体、子叶等,在草莓组织中因表面灭菌容易,常采用茎尖作为外植体进行快繁。草莓采用茎尖作为外植体消毒容易,材料易获得。试验结果表明:以草莓匍匐茎的茎尖作为外植体,红颜最佳芽诱导培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L,平均诱导芽数可达4.0个,红颜最佳的芽诱导培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L,平均诱导芽数可达5.2个。丰香最佳的继代培养基是MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,增殖系数可达18.8。红颜的最佳继代培养基是MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L,增殖系数可达12.3。丰香最佳生根培养基为1/2MS+IAA 0.5 mg/L,丰香最佳生根培养基为1/2MS+IAA 1.5 mg/L。在芽诱导、增殖和生根3个关键步骤中所需要的激素种类和浓度不同,这与梁贵秋等<sup>[20]</sup>的研究结论一致。

目前报道中适合草莓茎尖初代培养的培养基大多为MS+6-BA+NAA,本试验使用MS+6-BA+KT的组合。在植物组织培养中,糖用量一般为30 g/L,本研究中蔗糖用量(20 g/L)对草莓继代增殖过程中植物的发育和增殖分化并未产生明显影响。这说明当进行草莓茎尖组织培养工厂化育苗时,继代增殖阶段可使用20~30 g/L范围任一糖用量,不仅可保证芽丛或幼苗的质量,还可降低生产成本,提高经济效益,对于需要多次继代增殖的工厂化生产具有重要意义。

在芽诱导过程中单独使用6-BA的情况下,两个品种均随6-BA浓度增加诱导芽数减少。植物组织培养受到内因和外因的共同影响,内因包括植物组织的基因型、生理状态和发育时期等,而外因则包括培养基、培养条件、继代时间和接种方式等。在本试验中,比较注重外植体的生理状态和发育时期,要求选取幼嫩、无病虫害的茎尖,最终保证茎尖良好的再生能力和彻底脱毒。在外因中,培养基除有激素可直接影响外,蔗糖也是不可忽略的因素之一。在本试验中,生根培养时将蔗糖浓度控制在1.5%,生根率高达95%,且根系生长健壮,即有效促进了试管苗自养能力的增强。在继代时间和接种方式上,本试验发现,继代时间过短则会造成培养基不能充分使用的浪费情况,时间过长会导致营养耗尽使部分芽丛死亡,只有选择合适的继代时间才会物尽其用。接种时应尽量多地对芽丛进行切割处理,有利于芽丛的继代增殖,这与潘超等<sup>[21]</sup>提出的用手术刀碾压试管苗根部或在根部刻伤均有利于腋芽的增殖是一致的。随着草莓温棚栽培技术的成熟和规模

化栽培成功,对草莓的品质要求不断提高,而草莓病毒严重制约草莓生产高产高品质进程。采用组培快繁获得的脱毒草莓备受热捧,市场前景喜人。然而,要做到完全脱毒还需进行后续的病毒检测工作,如指示植物法和运用现代分子生物学技术PCR和RT-PCR等进行快速检测。

#### 参考文献:

- [1] 刘建成,段可,李静,等.草莓NBS-LRR家族基因*FaNBS1*的克隆与表达分析[J].果树学报,2011,28(6):1025-1031.
- [2] 叶正文.中外草莓产业发展趋势[J].柑橘与亚热带果树信息,2005,21(4):5-7.
- [3] 莽克强.农业生物工程[M].北京:化学出版社,2004:116-144.
- [4] 朱至清.植物细胞工程[M].北京:化学出版社,2003:34-51.
- [5] 薛庆善.体外培养的原理和技术[M].北京:科学出版社,2001:1173-1179.
- [6] 钟灼仔,陈文胜,高绍良,等.5个草莓品种组培苗与常规苗栽培性状对比[J].农业科技通讯,2010(6):84-88.
- [7] 王蓉,马璞,苗璐,等.草莓组培快繁技术的研究[J].新疆农业科学,2005(S1):113-114.
- [8] 顾地周,朱俊义,冯颖,等.草莓试管内诱导匍匐茎和高温处理结合茎尖培养脱毒技术研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2010(11):89-94.
- [9] 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.
- [10] 薛其勤,李美芹,吕金浮,等.不同基因型优质草莓组织培养快繁研究[J].北方园艺,2014(21):110-113.
- [11] 贾慧峰.茎尖培养脱除几种常见草莓病毒的方式和PCR病毒检测体系的优化[D].雅安:四川农业大学,2012.
- [12] 刘春颖,孙伯铮,冉学忠.图德拉草莓组培快繁及工厂化育苗技术研究[J].现代农业科技,2011(1):122-123.
- [13] 李新江,郑永春,迟丽华.草莓组培苗继代培养基筛选试验[J].东北农业科学,2013,38(4):63-65.
- [14] 王振磊,闫芬芬,王静,等.草莓组培快繁技术研究[J].北方园艺,2012(11):130-132.
- [15] 李慧.草莓茎尖离体培养研究[J].贵州农业科学,2004,32(2):10-11.
- [16] 陈爱萍,叶祖云,缪雄平.草莓茎尖组织培养研究[J].宁德师专学报(自然科学版),1998,10(1):63-65.
- [17] 翟婷婷,刘成连,原永宾,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.
- [18] 张丙秀,李柱刚,赵树亮,等.森嘎拉草莓叶片不定芽诱导及转化体系的建立[J].东北农业科学,2013,38(5):69-72.
- [19] 王会.红实美草莓茎尖培养快繁体系研究[J].襄樊职业技术学院学报,2005,5(3):11-12.
- [20] 梁贵秋,唐燕梅.草莓的组织培养和快速繁殖[J].广西热带农业,2004(6):8-9.
- [21] 潘超,黄文江,张小平,等.草莓的组织培养与快速繁殖研究[J].生物学杂志,2005(2):27-29.

(责任编辑:王昱)