

草莓叶柄和叶片的组织培养

马崇坚, 廖佩颖 (韶关学院英东生物工程学院, 广东韶关 512005)

摘要 用4种不同培养基配方对草莓叶柄和叶片进行组织培养。结果表明, MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L的愈伤发生率最高; 处理 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L的愈伤生长速度最快, MS+0.5 mg/L 6-BA+NAA 1.0 mg/L诱导芽分化及根形成最佳。

关键词 草莓; 叶柄; 叶片; 组织培养; 愈伤组织。

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)13-03841-02

Tissue Culture of Petiole and Leaf Blade of *Fragaria ananassa*

MA Chong-jian et al (Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005)

Abstract The petiole and leaf blade of strawberry were cultured on 4 media with different formulations. The result showed that callus induction and differentiation of buds. The best medium for differentiation of buds and root regeneration was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L, it has the highest callus induction frequency. The best medium for callus growth was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L, it has the fastest rate.

Key words *Fragaria ananassa*; Petiole; Blade; Tissue culture; Callus

草莓(*Fragaria ananassa* Duch)种苗的繁殖方法主要是匍匐茎繁殖和分株繁殖,这两种方法都存在不足^[1-5]。应用植物组织培养技术,不仅比常规育苗繁殖系数高、生长旺盛、成活率高、可在短期内大量繁殖草莓幼苗,而且能解决种性退化、病毒病严重等问题^[6-8]。20世纪80年代以来,我国也开展了茎尖、叶片、花药、胚和原生质等方面的培养研究,并取得了一定的进展^[9-14]。但国内对草莓利用外植体诱导再生器官或植株不同部位的组织培养方面报道较少。笔者利用丰香草莓取材最为方便的叶柄和叶片,以不同激素配方对愈伤组织生长情况进行研究,探索获得大量草莓试管植株,进而获得大量的生产用种苗的组织培养再生体系,拟改变现时本地区草莓繁殖慢及种苗严重不足的难题,以满足市场需要,为草莓组培苗的大规模生产及推广种植奠定基础。

1 材料与方

选取丰香草莓健壮的叶柄(2 cm左右)和青嫩的叶片,自来水冲洗20 min,在无菌条件下用75%酒精消毒2 min,再用0.1%氯化汞溶液消毒6 min,然后用无菌水冲洗5次,在无菌条件下接种于不同处理的诱导培养基上。处理a: MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 1.0 mg/L,处理b: MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 2.0 mg/L,处理c: MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L,处理d: MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L。将经过灭菌处理的外植体通过无菌操作接种到培养基后,放入培养箱培养。培养温度为(25±1)℃,暗培养。定期观察和记载外植体的变化,愈伤组织产生时间及发育状况等。

2 结果与分析

2.1 草莓叶柄和叶片接种后外植体的总体变化 草莓的叶柄和叶片在接种后第1周内褐变不明显,但1周后会在一些较弱的外植体上出现褐变现象,随着时间的推移,部分外植体会发生死亡,死亡的外植体会出现严重的褐变现象。分析认为褐变是由于外植体死亡而发生的,因此在制作培养基时不必进行防褐化处理。有研究表明,培养基中的6-BA有一定的防褐化作用^[13]。暗培养5 d后,部分叶柄开始表现出生命力变弱的趋势,主要表现为发黄变暗。而能够适应培养

基环境的叶柄大约在接种后的第13天开始萌动,主要表现为叶柄伤口处开始有膨大现象。出现萌动的时机不太一致,不过经统计可总结为接种后的第3天左右。15 d后陆续可见明显的团状愈伤组织,不同的处理所产生的愈伤组织颜色会稍微有些差别,4种处理所产生的愈伤组织基色都为米黄色,表面呈颗粒状,不过其中2种处理所产生愈伤组织的颜色稍微带些红色,另一种处理所产生愈伤组织的颜色则比较白。以后愈伤组织继续增大,增大的同时部分愈伤组织会发黑坏死,1个月后正常发育的愈伤组织可达10 mm。叶片变化的总体情况与叶柄的情形大致相同,有所不同的是愈伤组织萌动和发生的时间较叶柄提早了3 d,即为第10天开始萌动,第12天以后可见明显愈伤组织,且愈伤组织发生的部位是整个叶片外植体,不仅仅发生在伤口处,愈伤组织发生时可见整个叶片外植体出现膨大卷曲变形现象。另外,与叶柄愈伤组织相比叶片愈伤组织的颜色较绿,而且大部分叶片愈伤组织的质地致密,叶柄愈伤组织的质地则较疏松,叶片愈伤组织增大速度较叶柄慢。

2.2 不同处理对诱导草莓愈伤组织的影响 不同培养基处理对草莓愈伤组织的形成有很大的影响(表1),处理a的愈

表1 不同激素组合对草莓愈伤组织的影响

处理	接种//个	愈伤组织//个	诱导效率//%	愈伤组织体积
a	48	7	14.6±2.2	小
b	48	9	18.8±1.5	小
c	48	23	47.9±2.5	大
d	48	14	29.2±2.4	较大

伤组织发生率最小,只有14.6%,生成的愈伤组织体积也较其他3种处理的小,并且生成的愈伤组织中有大部分颜色带些红色,生长速度比较慢,整体上处理a中所生成的愈伤组织不太健康,长势不好;处理b的愈伤组织发生率虽较处理a的稍为高些,但其他情况大致相同,长势不理想,而且随着培养时间的增长,处理a和处理b中的愈伤组织都有停止生长和退化坏死的趋势。处理c的愈伤发生率是4种培养基中最好的,最高可达50.4%,而且所生成的愈伤组织的生长情况也是最好的,叶柄愈伤组织颜色为米黄色,质地疏松,叶片愈伤组织则呈微绿色,质地致密。处理c中生成的愈伤组织生命力强,对其愈伤组织进行切割、转接,成活率可达60%以

作者简介 马崇坚(1975-),男,广西容县人,博士,副教授,从事植物组织培养、植物生理学及发育生物学研究。

收稿日期 2007-01-11

上。处理 d 愈伤发生率较处理 c 的要低,不过愈伤组织生成后的生长速度比其他培养基快,颜色则大部分偏向白色。

结合不同处理分析可得,在 NAA 为 1.0 mg/L 的情况下,6-BA 为 0.5 mg/L 时愈伤组织生成率和愈伤组织生长情况都较 6-BA 为 0.3 mg/L 时好;在 NAA 为 2.0 mg/L 的情况下,6-BA 为 0.5 mg/L 时愈伤组织生成率和愈伤组织生长情况也较 6-BA 为 0.3 mg/L 时好,所以,6-BA 的浓度较高,对愈伤组织的生长发育状况有益。在 6-BA 为 0.3 mg/L 的情况下,NAA 为 1.0 mg/L 时愈伤组织生成率要比 NAA 为 2.0 mg/L 时低;而在 6-BA 为 0.5 mg/L 的情况下,NAA 为 1.0 mg/L 时愈伤组织生成率要比 NAA 为 2.0 mg/L 时高。比较 2 组 6-BA 浓度固定的数据,发现 NAA 的浓度变化对愈伤组织的影响不统一,不存在 NAA 浓度高就一定好或者不好,NAA 的浓度与 6-BA 的浓度搭配决定了 NAA 对愈伤组织的影响。试验后期,应用 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养进行诱导愈伤组织产生不定芽和不定根,成功地获得一批草莓试管植株,并移栽成活。

3 讨论

试验结果表明,MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基最好,而 MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 1.0 mg/L 和 MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 2.0 mg/L 的愈伤发生率都低。究其原因:一是采集草莓外植体的最佳时期应为 6~7 月份,此期间外界的条件最适合草莓生长发育,外植体生命力最强。而试验错过了最佳时期,外植体的优良程度减弱,可能影响了愈伤发生率。二是可能 6-BA 使用浓度偏低,通过比较处理 a、

c、b、d,发现当 6-BA 的浓度上升时愈伤组织的发生率也随着增加,表明若提高 6-BA 的浓度,愈伤组织的发生率也有可能增加,因此,愈伤组织培养阶段 6-BA 的浓度有增加的必要。三是可能因为取材苗龄稍老、分裂能力偏低所致。对于不同苗龄的不同部位材料的诱导反应仍有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 段黄金,段新玲,赵书珍,等.草莓茎段组织培养快繁技术的研究[J].塔里木农垦大学学报,2000,12(2):31-33.
- [2] 曹贵寿,王俊宇.几个草莓优良品种介绍[J].山西果树,2003(2):52.
- [3] 朱文勇,赵玉军,郭黄萍,等.无毒草莓组织培养工厂化快速育苗技术研究[J].山西果树,1995(1):21-22.
- [4] 高山林.草莓改良热处理分生组织脱毒技术及脱毒苗应用[J].江苏农业科学,1999(3):63-64.
- [5] 王常云,李晓亮,王作全,等.我国草莓脱毒研究及应用[J].生物技术通报,1998(3):25-28.
- [6] 张青,贾宗凯,孙万河.草莓病毒病及无病毒苗木的生产[J].北方园艺,2000(2):1-3.
- [7] 黎玉梅,张冬梅.草莓脱毒技术研究进展[J].中国林副特产,2001,58(3):40-41.
- [8] 王文和,邓馨,胡文玉,等.草莓叶片愈伤组织形成及再生芽分化的组织学研究[J].沈阳农业大学学报,1999,30(4):430-433.
- [9] 杭玲,潘颖南,黄卓忠,等.草莓匍匐茎尖组织培养与脱毒苗生产[J].广西农业科学,1999(6):319-320.
- [10] 覃兰英,邓世秀,李青,等.培育草莓脱毒苗方法的研究[J].园艺学报,1998,15(3):175-179.
- [11] 吴伟民,余桂红,马鸿翔,等.草莓花药愈伤组织继代培养和不定芽发生研究[J].江苏农业研究,1999,20(4):19-23.
- [12] 李莲花,朴世领,苏艳敏,等.不同培养基对草莓茎段快速繁殖的影响[J].延边大学农学报,2002,24(3):195-200.
- [13] 董晓颖,李培环,王然,等.哈尼草莓叶片诱导再生植株及快速繁殖研究[J].莱阳农学院学报,2004,21(3):234-237.
- [14] 李慧.草莓新品种的组织培养[J].中国果菜,2003(6):23-24.

(上接第 3837 页)

表 2 覆盖与未覆盖地膜牧草茬次与产量比较

组别	茬次	墨西哥玉米		皇竹草		高丹草	
		刈割时间	产量 kg/hm ²	刈割时间	产量 kg/hm ²	刈割时间	产量 kg/hm ²
对照组	第 1 次	06-25	17 565	06-21	16 230	07-03	18 255
	第 2 次	07-30	21 600	07-18	18 210	08-01	19 725
	第 3 次	08-13	25 200	08-16	21 795	08-26	20 730
	第 4 次	09-05	25 500	09-18	22 665	09-20	20 295
	第 5 次	09-28	20 625	10-02	11 340	10-09	19 050
	第 6 次	10-15	7 320	-	-	-	-
试验组	第 1 次	06-04	18 225	06-01	16 920	06-10	18 945
	第 2 次	06-25	20 280	06-28	19 815	07-20	20 100
	第 3 次	07-12	23 475	07-16	20 175	08-08	24 750
	第 4 次	07-30	28 110	08-15	22 980	08-23	20 910
	第 5 次	08-17	25 950	09-10	23 790	09-16	18 855
	第 6 次	09-05	27 465	10-05	18 465	10-06	17 715
	第 7 次	09-21	23 010	-	-	-	-
	第 8 次	10-08	14 430	-	-	-	-

注:-表示该品种已死亡。试验组墨西哥玉米、皇竹草、高丹草产量分别为 180 945、121 145、121 275 kg/hm²;对照组墨西哥玉米、皇竹草、高丹草产量分别为 117 810、90 240、98 055 kg/hm²;试验组比对照组增产 53.26%、35.36%、23.68%。

达 0.05 水平 ($P < 0.05$);皇竹草试验组刈割 6 茬次,比对照

组 5 茬次增加了 1 茬次,两者间差异达 0.05 水平 ($P < 0.05$);高丹草试验组刈割 4 茬次,比对照组 3 茬次增加了 1 茬次,两者间差异达 0.05 水平 ($P < 0.05$)。

2.2 鲜草产量比较 表 2 表明,墨西哥饲用玉米试验组产草量 180 945 kg,比对照组 117 810 kg 产草量增加 63 135 kg,增产 53.36%,两者间差异达 0.01 水平 ($P < 0.01$);皇竹草试验组产草量 122 145 kg,比对照组产草量 90 240 kg 增加了 31 905 kg,增产 35.36%,两者间差异达 0.01 ($P < 0.01$);高丹草试验组产草量 121 275 kg,比对照组产草量 98 055 kg,增加 23 220 kg,增产 23.68%,两者间差异达 0.05 水平 ($P < 0.05$)。

3 结论

试验结果表明,与未覆盖地膜的对照组相比,覆盖地膜栽培牧草,能够使牧草刈割时期延长,增加刈割茬次,提高牧草产量。

参考文献

- [1] 石凤善.俄罗斯紫花苜蓿二茬草刈割期对产量和品质影响的研究[J].草业科学,2004,21(6):28-29.
- [2] 内蒙古农学院.牧草及饲料作物栽培学[M].北京:农业出版社,1981.
- [3] 高佩民,孙仪和.圈舍饲养绒山羊实用新技术[M].辽宁:沈阳出版社,2002:118-123.
- [4] 孙仪和,高佩民.奶牛小区生产技术指南[M].北京:中国农业大学出版社,2003:275-295.