

草莓花药愈伤组织诱导与分化研究

孟志卿

(孝感学院 湖北省作物病害监测和安全控制实验室,湖北 孝感 432000)

摘要:研究了不同激素浓度组合的培养基对草莓花药愈伤组织诱导增殖和不定芽的诱导及分化的影响。结果表明:单核期花药的诱导率最高,达78.9%左右;MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L对愈伤组织的诱导及不定芽的诱导和增殖都是最适合的培养基。

关键词:草莓;花药;组织培养;愈伤组织;诱导;分化

中图分类号:S681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8581(2007)09-0041-02

Induction and Differentiation of Strawberry Anther Callus

MENG Zhi-qing

(Crop Disease Monitoring and Safe Control Laboratory of Hubei Province, Xiaogan University, Xiaogan 432000, China)

Abstract: The effects of different hormone concentrations on induction and differentiation of strawberry anther callus were studied. The result indicated that, the inductivity of uninucleic anther was the highest, which was 78.9%; the optimum culture medium for induction and differentiation of callus and adventitious bud was MS + NAA 0.2mg/L + 6-BA 1.5mg/L.

Key words: Strawberry; Anther; Tissue culture; Callus; Induction; Differentiation

草莓花药组织培养脱毒快繁是在无菌条件下利用草莓花药,在人工控制的营养和环境条件下繁殖植物,脱除病毒得到无毒苗株,继而在大田快速繁殖的技术。随着种植面积迅速扩大,草莓病毒病已成为影响草莓生产、品质“退化”现象的主要原因。草莓是一种无性系列作物,一旦感染病毒便会代代相传,使草莓长势、品质及产量严重下降。通过花药组织培养获得的试管苗,是获得无毒苗的有效措施,脱毒率几乎达100%,而且利用花药组织培养,占地少,繁殖速度快,因此,草莓花药组织培养对草莓的生产发展具有重大意义^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料 外植体由草莓种植基地提供。晴天上午9时在健壮无病草莓植株上取花蕾。将所采新鲜花药置于2~4℃的冰箱中预处理3d备用。

1.2 培养基 基本培养基为MS+0.2 mg/L NAA +3%蔗糖+7 g/L琼脂,pH 5.8,附加激素6-BA和KT。6-BA处理培养基A₁、A₂、A₃、A₄的浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L;KT处理培养基B₁、B₂、B₃、B₄的浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L。

1.3 培养条件 培养温度25±2℃,黑暗培养1周后转为每日日光灯照16h、光照强度1600 lx、湿度为85%的环境下培养。

2 结果与分析

2.1 花粉发育时期对诱导率的影响 将不同发育期的草莓花粉接种到相同培养基中。研究结果表明,花蕾直

径为3~5 mm、花蕾的花瓣未张开、花药颜色为淡黄色,镜检花粉发育时期为单核期的花药,其诱导率达78.9%左右;花蕾直径在6 mm以上,花瓣微开,花药颜色呈深黄色或褐色,镜检花粉发育时期为单核靠边期或接近双核期,愈伤组织诱导率只有21.1%。小花蕾的诱导率是大花蕾的3~4倍(见表1)。

表1 草莓花粉不同发育期对诱导愈伤组织的影响

花粉发育期	培养基	花药直径 (mm)	接种花药 (枚)	愈伤组织数 (块)	诱导率 (%)
单核期	A ₁	3~5	86	67	78.9
单核边期或初双核期	A ₁	6	86	18	21.1

注:诱导率=愈伤组织块数/花药数×100%。

2.2 不同激素浓度对愈伤组织诱导的影响 试验结果表明,不同激素浓度对愈伤组织诱导的影响不同。当培养基中6-BA和KT在0.5 mg/L时,愈伤组织疏松、颜色浅、突起少;随6-BA和KT浓度的提高,愈伤组织细胞间联系逐渐紧密,颜色也逐渐加深,突起也变多;当6-BA和KT浓度提高到2.0 mg/L时,愈伤组织细胞间联系致密,颜色也为深色,愈伤组织表面上的突起更多,更加紧(见表2)。愈伤组织在A₄、B₄这两组培养基中最早出现。

2.3 6-BA与KT对草莓花药愈伤组织诱导的影响 比较6-BA与KT对草莓花药愈伤组织诱导的影响。结果表明:草莓花药在6-BA 0.5~2.0 mg/L比KT 0.5~2.0 mg/L分化出的愈伤组织多,且在培养基6-BA 1.5

mg/L 的培养基上愈伤组织分化率最高,所诱导出愈伤组织的生长势比 KT 中的生长势强。这说明 6-BA 比 KT 更适合草莓花药愈伤组织诱导,6-BA 1.5 mg/L 是诱导愈伤组织分化的最适合的培养基(见表 3)。

表 2 不同浓度激素对草莓花药愈伤组织的诱导

培养基	愈伤组织出现时间(d)	愈伤组织生长状况
A ₁	36	疏松,淡黄色,无突起
A ₂	29	疏松,半透明黄白色,有突起
A ₃	25	较疏松,半透明黄白色,突起多
A ₄	23	致密,淡黄白色,表面都是突起
B ₁	38	疏松,淡黄色,突起少
B ₂	30	较疏松,半透明黄白色,有突起
B ₃	26	疏松,半透明黄白色,突起多
B ₄	24	致密,淡绿白色,表面都是突起

表 3 6-BA 和 KT 对草莓花药愈伤组织的诱导比较

培养基	花药数(枚)	愈伤组织数(块)	诱导率(%)	长势
A ₁	20	7	35	较差
A ₂	20	11	55	一般
A ₃	20	16	80	旺盛
A ₄	20	12	60	良好
B ₁	20	6	30	较差
B ₂	20	8	40	一般
B ₃	20	14	70	良好
B ₄	20	10	50	较差

注:诱导率 = 愈伤组织块数/接种外植体数 × 100%。

2.4 不同激素浓度对芽诱导的影响 愈伤组织分别接种在含 6-BA 0.5~2.0 mg/L 的培养基上,继代培养 3~5 代,研究不同激素对芽的诱导,结果表明(见表 4)。随着 6-BA 浓度的提高,诱导丛芽的能力增强,但当 6-BA 浓度超过 2.0 mg/L 时,效果则不明显。当 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时效果最好,丛芽发生率为 112.6%,每个丛芽有 3~5 个单芽,且芽健壮,而当 6-BA 浓度大于 1.5 mg/L 时,丛生芽的发生率降低,生长缓慢。说明激素浓度过高不利于芽的诱导。

表 4 不同激素浓度对不定芽的诱导

培养基	愈伤组织总数(块)	诱导丛芽总数(个)	丛芽率(%)
A ₁	72	58	80.5
A ₂	70	71	101.1
A ₃	71	80	112.6
A ₄	70	73	104.3

注:丛芽率 = 丛芽数/愈伤组织块数 × 100%。

2.5 激素浓度对芽增殖的影响 分别以不同浓度的 6-BA 0.5~2.0 mg/L 为不定芽增殖培养基,每个培养基接 1 个单芽,每组 20 瓶,3 周后不定芽的增殖情况见表 5。

由表 5 可以看出,随着 6-BA 浓度的不断增高,新增芽数也随之不断增多,增殖系数也不断提高。其中 MS + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L 中,增殖倍数达

1.95,所诱导出的丛芽多且健壮,有利于进一步增殖和培育壮苗;而当 6-BA 浓度高于 2 mg/L 时,虽然诱导的丛芽倍数不断增加,但所长出的芽弱小,还有一些出现了畸形现象,不利于进一步增殖与培育壮苗。

表 5 不同浓度 6-BA 对不定芽增殖的影响

培养基	接种不定芽数(个)	3周后不定芽数(个)	增殖系数	芽生长情况
A ₁	20	20	1.00	缓慢
A ₂	20	31	1.65	正常
A ₃	20	39	1.95	健壮
A ₄	20	45	2.25	弱小

注:增殖系数 = $\frac{\text{接种不定芽数}}{3\text{周后不定芽数}}$ 。

3 小结与讨论

在继代增殖培养中,适当的激素浓度是获得高增殖倍数及良好生长情况的一个关键因素。过高或过低的激素浓度都会影响芽增殖及生长效果。而在继代的不同阶段要求的激素浓度是不同的。一般随着继代代数的增加,要求激素浓度逐渐降低,这与试验中激素的累积作用有关。在本试验中,继代前期所用 6-BA 浓度为 1.5 mg/L、NAA 浓度为 0.2 mg/L,随着继代代数的增加,6-BA 浓度逐渐降到 0.5 mg/L、NAA 浓度降到 0.05 mg/L 时,便取得了良好的增殖效果。激素是影响植物组织培养成败的一个关键因素。在植物组织培养中,由于激素的累积作用,要有效地诱导一种植物产生苗或促进嫩茎良好的增殖,所需激素的种类和浓度在不同的培养阶段是不同的。在草莓的组织培养中,高水平的细胞分裂素倾向于诱导丛芽的形成,但浓度过高,则形成的芽过于细密且嫩茎质量下降,不利于下一步的生根培养。随着继代代数的增加,所用激素浓度应降低。

花药培养可以生产脱毒苗,其原理有待于进一步的研究,但多数学者认为,花药培养的脱毒率几乎达 100%。草莓脱毒苗长势强,品质明显提高,产量较带毒草莓提高 20%~45%。由于花药培养技术的易操作性和脱毒的高效性,可免去病毒检测,具有广泛的适应性。因此,利用草莓花药培养可实现草莓无病毒栽培,将产生很高的经济效益^[2]。

花药离体培养过程中,各生长调节物质的配比及含量对愈伤组织的产生具有重要的影响^[3]。它们的组成与配比不但显著地影响着出愈率,而且对愈伤也有重要的调控作用。草莓花药培养中附加一定量的生长素和细胞分裂素对愈伤组织的诱导是必需的。培养基中仅加 NAA 时,花药不能被诱导产生愈伤组织,合理的 NAA 与 6-BA 对比对愈伤组织的诱导是不可缺的;较高的细胞分裂素可在一定程度上抑制花丝产生愈伤组织。NAA 能促进细胞的分裂和分化,增加蛋白质的合成,因而可促进愈伤组织产生与生长。同时还发现,出愈率高的激素

(下转第 45 页)

表 3 不同激素浓度组合对诱导生根的影响

编号	培养基 (mg/L)	BA/NAA	接种苗数	平均根数 (条)	平均根长 (cm)	苗体长势
I	1/2MS + BA 0.5 + NAA 0.3	1.67	30	2.57	1.30	叶片淡绿, 苗体细弱
II	1/2MS + BA 0.5 + NAA 0.5	1.00	30	1.53	1.47	叶片淡绿, 叶小, 茎柔弱
III	1/2MS + BA 0.5 + NAA 0.7	0.71	30	4.67	1.60	叶片深绿, 茎秆粗壮
IV	1/2MS + BA 0.5 + NAA 1.0	0.50	30	4.73	1.10	叶片黄绿, 茎秆稍粗壮

2.4 生根苗过渡及移栽 生根培养 30 d 后, 置于室温下 2 d, 揭开封口膜, 将完整小苗从培养瓶中取出, 洗去根部的培养基, 放入 0.1% 的多菌灵溶液中浸根 1min。种植于已配好的基质中, 基质的配方参考香叶天竺葵的生长习性, 其配比为: 微酸性土壤: 腐殖土: 珍珠岩 = 2: 2: 1。移栽后, 注意水、肥、光、温的管理, 香叶天竺葵表皮无革质层, 容易失水, 相对湿度保持在 80% ~ 90%, 温度 20 ~ 25℃, 避免强光照射, 用透过率为 70% 的遮荫网覆盖, 10 d 后每星期浇复合肥营养液一次。成活率可达到 90% 以上。

3 讨论

3.1 不同激素浓度组合对愈伤组织诱导的差异较大

固定 NAA 浓度, 不同 BA 浓度诱导愈伤组织分化的速度、颜色深浅及不定芽长势差异较大。香叶天竺葵愈伤组织诱导对 BA 十分敏感, 在不加任何激素的对照组中愈伤组织的诱导率很低。在附加激素的培养基中, 愈伤组织诱导率突增, 说明香叶天竺葵细胞中富含与细胞分裂素具有高亲和的受体蛋白, 在离体培养条件下细胞分裂素调控基因表达促进蛋白质合成, 从而促进细胞分裂。但并不是 BA 浓度愈高, 诱导率和分化速度就愈高, 当 BA 浓度达到 2.0 mg/L 时, 如果再继续增加其浓度, 诱导率和分化速度反而降低。从 BA/NAA 的比值来看, 比值愈大, 愈伤组织诱导率愈高, 当比值 6.67 时, 诱导率最大, 比值为 8.33 时, 诱导率反而降低了。因此, IV 配方: MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L 是愈伤组织诱导的最好配方。另外, 香叶天竺葵从愈伤组织到不定芽所需的时间较短, 只 7 d 左右, 变异机率低, 故可以提高其繁殖速度, 以满足市场的需要。

3.2 不同激素浓度组合对不定芽分化的差异明显 固定 NAA 浓度, 随着 BA 浓度的逐渐增加, 不定芽分化的数量和增殖率呈不断增加的趋势。说明 BA 浓度与不定芽的增殖率成正相关, 但随着 BA 浓度的增加, 苗体的长势和叶色均受到一定的影响, 可能是高浓度的 BA 促进细胞衰老所致。因此, 不能以不定芽的分化数量作为衡量 BA 浓度的唯一指标。综合考虑, 配方 II: MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L 不仅是愈伤组织诱导的最好配方, 也是不定芽增殖培养的最好配方。另外, 愈伤组织诱导出的不定芽易黄化, 应及时转接增殖培养中, 以免影响不定芽分化质量。

3.3 不同激素浓度组合对诱导生根存在一定差异 随着 NAA 浓度的升高, 诱导的平均根长随浓度的升高而增加, 当 NAA 浓度超过 0.7 mg/L 时, 其根长明显受到抑制。但总的来说, 平均根数和平均根长的差异幅度并不是很明显。主要原因是 BA 抑制不定根的形成。BA/NAA 的比值愈小, 苗体的长势愈好, 平均根长变长, 但比值小于 0.71 时, 长势变差, 平均根长变短。综合平均根数, III 配方: 1/2MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.7 mg/L 促进生根的效果最好。

参考文献:

- [1] 徐昭玺. 百种调料香料类药用植物栽培[J]. 北京 - 中国农业. 香叶天竺葵, 2003, (1): 556 ~ 557.
- [2] 吴红芝, 金寿林. 香叶天竺葵快速繁殖的研究[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(2): 56 ~ 58.
- [3] 叶剑秋. 天竺葵与万寿菊类[J]. 园林, 1999, (7): 24 ~ 25.

(上接第 42 页)

组合, 愈伤组织生长也好。草莓花药离体培养时愈伤组织的形成主要在前 1 个月, 但愈伤产生期可延续 2 个月。只要激素条件适宜, 草莓花药培养的愈伤组织就能不断地产生^[4,5]。

参考文献:

- [1] 郭春沅. 草莓花药组织培养快速繁殖技术[J]. 农业科技通讯, 2000, 11(1): 13.

- [2] 乔奇, 张振臣, 靳秀兰. 草莓花药培养脱毒技术研究[J]. 中国农学通报, 2003, 19(2): 26 ~ 27.
- [3] 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.
- [4] 王壮伟, 赵密珍, 钱亚明. 草莓试管苗移栽技术研究[J]. 江西农业学报, 2006, 18(1): 67 ~ 69.
- [5] 许淑琼. 草莓脱毒苗组培快繁技术研究[J]. 中国南方果树, 2002, 31(2): 42.