

草莓花药组织培养脱毒快繁技术研究

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 [目的] 研究草莓花药组织培养的脱毒快繁技术, 实现草莓无病毒栽培。[方法] 在基本培养基中分别添加 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 的 6-BA 和 KT, 研究不同激素浓度对不同发育期的草莓花药愈伤组织诱导和不定芽的诱导、增殖的影响。[结果] 单核期花药的诱导率高达 78.9%, 单核靠边期或接近双核期花药的诱导率只有 21.1%。6-BA 和 KT 为 2.0 mg/L 时, 愈伤组织的生长状况均最好, 细胞间联系致密, 表面突起更多、更紧。草莓花药在 6-BA 中比 KT 分化出的愈伤组织多。6-BA 1.5 mg/L 的培养基愈伤组织分化率最高, 诱导丛芽的效果最好, 丛芽多而健壮, 丛芽发生率达 112.6%, 增殖系数达 1.95。[结论] 6-BA 比 KT 更适合诱导草莓花药愈伤组织。草莓花药愈伤组织的诱导、不定芽的诱导和增殖最适合的培养基均是 MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L。

关键词 草莓花药; 组织培养; 脱毒快繁

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)02-00440-02

Study on the Virus-free and Rapid Propagation in Tissue Culture of Strawberry Anther

MENG Zhi-qing (Xiaogan University, Hubei Provincial Laboratory of Crop Disease Monitoring and Safety Control, Xiaogan, Hubei 432000)

Abstract [Objective] The purpose of this research was to study the virus-free and rapid propagation technology in tissue culture of strawberry anther so as to realize the virus-free cultivation of strawberry. [Method] 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/L 6-BA and KT were added into basic media to study the effects of different hormones concentrations on the callus induction and adventitious bud induction and multiplication of strawberry anthers in different development periods. [Result] The induction rate of anther in the uninucleate stage was up to 78.9% and that in the late uninucleate stage or in the period close to binucleate stage was only 21.1%. When the 6-BA and KT concentrations were 2.0 mg/L, the growth status of callus was best and the cells contacted with each other compactly with more and denser surface protuberances. Strawberry anther in 6-BA differentiated out more callus than that in KT. The differentiation rate of callus on the medium with 1.5 mg/L 6-BA was highest with the best effect of inducing clumpy buds with many and hale clumpy buds and the occurrence rate reaching 112.6%, and the multiplication coefficient reached 1.95. [Conclusion] 6-BA was more suitable to induce callus of strawberry anthers than KT. The optimum medium for both callus induction and adventitious bud induction and multiplication of strawberry anthers was MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L.

Key words Strawberry anther; Tissue culture; Virus-free and rapid propagation

1 材料与方

1.1 材料 外植体由草莓种植基地提供。晴天上午 9:00 在健壮、无病草莓植株上取花蕾, 将所采新鲜花药置 2~4℃ 的冰箱中预处理 3 d 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 值 5.8, 附加激素为 6-BA 和 KT。2 种激素均设 4 个浓度, 分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L, 即培养基 A1~A4 分别为基本培养基附加 4 个不同浓度的 6-BA; 培养基 B1~B4 分别为基本培养基附加 4 个不同浓度的 KT。

1.3 培养条件 温度(25±2)℃, 黑暗培养 1 周后转为每日光照 16 h, 光照强度 1 600 lx, 湿度 85%。

2 结果与分析

2.1 花粉发育期对诱导率的影响 将不同发育期的草莓

花药接种到相同培养基即 MS+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA+3% 蔗糖+7 g/L 琼脂中。结果表明: 花蕾直径为 3~5 mm, 花瓣未张开, 花药呈淡黄色, 镜检花粉发育期为单核期的花药, 其诱导率达 78.9%; 花蕾直径在 6 mm 以上, 花瓣微开, 花药呈深黄色或褐色, 镜检花粉发育期为单核靠边期或接近双核期, 愈伤组织诱导率只有 21.1%。可见, 小花蕾的诱导率是大花蕾的 3~4 倍。

2.2 不同浓度激素对草莓花药愈伤组织诱导的影响 当培养基中 6-BA 和 KT 浓度为 0.5 mg/L 时, 愈伤组织疏松, 颜色浅, 突起少; 随 2 种激素浓度的增加, 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 浓度增加到 2.0 mg/L 时, 愈伤组织致密, 表面上的突起更多(表 1)。愈伤组织在 A4、B4 这 2 组培养基中最早出现。

表 1 不同培养基对草莓花药愈伤组织诱导情况的影响

Table 1 Effects of different media on callus induction of strawberry anther

培养基 Culture medium	愈伤组织出现 时间// d Time of callus appeared	愈伤组织 数// 块 Callus number	诱导率// % Induction ratio	长势 Growth Potential	愈伤组织生长状况 Growth status of callus
A1	36	7	35	+	疏松, 淡黄色, 无突起 Loose, light yellow, no processes
A2	29	11	55	++	疏松, 半透明黄白色, 有突起 Loose, translucent yellow-white, processes
A3	25	16	80	++++	较疏松, 半透明黄白色, 突起多 Relative loose, translucent yellow-white, processes
A4	23	12	60	+++	致密, 淡黄白色, 表面都是突起 Compact, light yellow-white, processes all over the surface
B1	38	6	30	+	疏松, 淡黄色, 突起少 Relative loose, translucent yellow-white, processes
B2	30	8	40	++	较疏松, 半透明黄白色, 有突起 Relative loose, translucent yellow-white, processes
B3	26	14	70	+++	疏松, 半透明黄白色, 突起多 Loose, translucent yellow-white, many processes
B4	24	10	50	+	致密, 淡绿白色, 表面都是突起 Compact, light green-white, processes all over the surface

注: 诱导率=愈伤组织块数/接种外植体数×100%; +表示较差, ++表示一般, +++表示良好, ++++表示旺盛。每种培养基上均接种花药 20 枚。

Note: Induction ratio= Callus number/explants number×100%; +stands for Poor; ++ stands for General; +++ stands for Good; ++++ stands for Bloom. Each medium is inoculated by 20 anthers.

作者简介 孟志卿(1958-), 女, 河北无极人, 高级讲师, 从事植物组织培养的教学与研究工作。

收稿日期 2007-09-10

比较 6-BA 与 KT 对草莓花药愈伤组织诱导的影响, 结果表明: 草莓花药在含不同浓度 6-BA 的培养基中分化出的愈伤组织较多, 且在 6-BA 浓度为 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 中的生长势也好。说明 6-BA 比 KT 更适合草莓花药愈伤组织的诱导,浓度 1.5 mg/L 6-BA 最适合诱导愈伤组织(表 1)。

2.3 不同浓度激素对芽诱导的影响 将愈伤组织分别接种在含 4 个不同浓度 6-BA 的培养基上,继代培养 3~5 代,研究不同浓度激素对芽诱导的影响。结果表明:6-BA 浓度不同,诱导芽的结果不同。随 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;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 2)。

表 2 不同浓度激素对不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of hormones with different concentrations on induction of adventitious bud

培养基 Culture medium	愈伤组织总数//块 Total number of callus	诱导丛芽总数//个 Total number of cluster buds	丛芽率//% Ratio of cluster bud
A1	72	58	80.5
A2	70	71	101.1
A3	71	80	112.6
A4	70	73	104.3

注:丛芽率=丛芽数/愈伤组织块数×100%。

Note: Cluster budrate = No. of cluster buds / No. of callus × 100 %.

2.4 不同浓度激素对芽增殖的影响 以不同浓度的 6-BA 作为不定芽增殖培养基中的附加激素,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 3。

表 3 不同浓度 6-BA 对不定芽增殖的影响

Table 3 Effects of 6-BA with different concentrations on propagation of adventitious bud

培养基 Culture medium	接种不定芽数 个 No. of adventitious buds inoculated	3 周后不定芽 数//个 No. of adventitious buds 3 w later	增殖系数 K-factor	芽生长情况 Growth status of buds
A1	20	20	不增殖	缓慢
A2	20	31	1.55	正常
A3	20	39	1.95	健壮
A4	20	45	2.25	弱小

注:增殖系数=3 周后不定芽数/接种不定芽数。

Note: Propagation coefficient = No. of adventitious buds 3 weeks later / No. of adventitious buds inoculated.

由表 3 可以看出,随着 6-BA 浓度的不断增加,新增芽数不断增多,增殖系数也不断提高。当 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时,增殖系数达 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,不利于进一步增殖与培育壮苗。

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的增殖及生长效果。而在继代的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。在该试验中,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,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,要有效诱导植物增殖,所要求激素的种类和浓度在不同培养阶段是不同的。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,形成的芽过于细密且嫩茎质量下降,不利于下一步的生根。随着继代代数的增加,所用激素浓度下降。

花药培养可以生产脱毒苗,其原理有待于进一步研究。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,产量较未脱毒草莓提高 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,将产生巨大的经济效益^[1]。

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作用^[2]。它们的组成与配比不但显著影响出愈率,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;较高浓度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的产生与生长。同时试验还发现,出愈率高的激素组合,愈伤组织生长也较好。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,愈伤组织就能不断地产生^[3]。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.

GB/T 7714-2005

专著中析出文献的著录格式

析出文献主要责任者.析出文献题名[文献类型标志].析出文献其他责任者//专著主要责任者.专著题名:其他题名信息.版本项.出版地:出版者,出版年:析出文献的页码[引用日期].获取和访问路径.

示例:

- [1] 程根伟.1998 年长江洪水的成因与减灾对策研究[M]//许厚泽,赵其国.长江流域洪涝灾害与科技对策.北京:科学出版社,1999:32-36.
- [2] 钟文发.非线性规划在可燃毒物配置中的应用[C]//赵玮.运筹学的理论与应用:中国运筹会第五届大会论文集.西安:西安电子科技大学出版社,1996:468-471.
- [3] WEINSTEIN L. SWERTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganism [M]//SODEMAN W A, Jr., SODEMAN W A. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 745-772.