

五叶草莓 (*F. pentaphylla* Lonzink.) 的组织培养繁殖技术研究

王军利

(咸阳职业技术学院, 陕西 西咸新区 712046)

摘要: 为了建立野生五叶草莓茎尖培养组培快繁技术, 为其再生离体诱导及离体染色体加倍等技术奠定基础, 以采挖于秦巴山地的野生五叶草莓 (*F. pentaphylla* Lonzink.) 匍匐茎的茎尖为材料进行初始离体培养, 获得无菌苗, 并以此无菌苗为材料筛选五叶草莓增殖培养基及生根培养基。结果表明: 利用野生五叶草莓匍匐茎茎尖在MS+0.5 mg/L 6-BA培养基上获得无菌苗, 适合五叶草莓快繁的培养基为MS+0.4 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 增值倍数为8.150; 适合其生根的培养基为1/2 MS+0.2 mg/L NAA, 株诱导根数多, 诱导根粗、长度长, 有利于获得壮苗。

关键词: 五叶草莓; 茎尖培养; 野生草莓; 秦巴山地

中图分类号: S668.4

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2019)04-033-005

蔷薇科草莓属的植物在全世界约有50种, 其中全球广为栽培的草莓, 是由八倍体凤梨草莓 (*Fragaria ananassa*) 培育而成的栽培种, 其他倍性的草莓则多呈野生或半野生状态分布于全球各地^[1-2]。常见的野生草莓约有20种, 中国自然分布约11种, 秦巴山地为中国野生草莓的主要集生地之一, 大约有7种, 分别是二倍体 (2x) 的森林草莓 (*F. vesca* L.)、黄毛草莓 (*F. nilgrrensis* Schlecht.)、五叶草莓 (*F. pentaphylla* Lonzink.) 和纤细草莓 (*F. mubicola* Lindl.), 以及四倍体 (4x) 的东方草莓 (*F. orientalis* Lozinsk.)、伞房草莓 (*F. corymbosa* Lozinsk.) 和西南草莓 (*F. moupinensis*(Franch) Card.)^[2-6]。为了开发、利用野生草莓资源, 我国各地大量的科研人员进行很多努力, 对我国野生草莓资源的分布进行调查和鉴定^[1-5]、对野生草莓进行引种驯化^[6]、利用野生资源进行常规育种^[7-8]、用组织培养的方法对部分野生草莓进行培养与快繁^[9, 10]等, 但对于秦巴山地野生草莓资源的组培研究, 所见资料甚少。为了开发利用秦巴山地的野生草莓资源, 本文在前人工作的基础上, 研究了秦巴山地野生五叶草莓的组织培养快繁技术, 为五叶草莓的离

体再生提供了实验技术, 为其离体染色体加倍提供了前期的实验材料, 也为秦巴山地其他野生草莓的组培快繁提供了参考路径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的五叶草莓源自陕西省秦巴山区。项目组将其采挖回来后, 栽培在咸阳职业技术学院仪祉农林学院实训基地的专门苗圃。野生五叶草莓植株长势强, 匍匐茎和叶柄被直立绒毛, 花序梗和小花梗亦密被直立绒毛, 小叶5, 极稀3, 叶片质地较厚, 正面无毛, 背面被疏绒毛, 宿萼反折, 果实白色, 圆形或椭圆形, 种子多枚, 陷于果面下。根据这些特征, 项目组运用《中国植物志》^[11]《秦岭植物志》^[12]《中国果树分类学》^[13]及其他相关检索、鉴定资料 (雷家军, 2004)^[14], 对其进行了鉴定。

1.2 方法

1.2.1 五叶草莓无菌苗的获得 在秦巴山地草莓属野生植物资源苗圃地, 选无病虫害的五叶草莓健壮苗, 用剪刀剪取2cm左右的匍匐茎顶端, 放置在大烧杯中, 置于水龙头下流水冲洗4~6h, 再在超净工

收稿日期: 2019-10-11

项目基金: 陕西省教育厅2018年专项科学研究计划“秦巴山区野生草莓资源的调查及资源圃的建设”(18JK1209)

作者简介: 王军利 (1967—), 男, 陕西蓝田人, 副教授, 研究方向为园林园艺及植物学。

作台上用无菌镊子将其夹出,放入盛有75%酒精的烧杯中消毒35s,然后再用2%的NaClO消毒10min~15min,用无菌水冲洗4~6次,再用无菌滤纸吸干表面的水分,在垫有无菌滤纸的培养皿中用灭菌后放凉的解剖刀切取长约0.5cm~1.0cm的茎尖(带有一个叶原基)作为外植体,接种在Ph=5.8~6.0的MS+0.5mg/L 6-BA+30g/L蔗糖+7g/L琼脂粉的固体培养基上,每个培养瓶接种3个外植体。接种后,将培养瓶放置在培养室中培养,期间注意观察污染情况,及时将未被污染的外植体转接到新的培养基上。培养条件:光照时长为15h/d,光强为1500Lux~2000Lux,温度为25(±2)℃。消毒过程中,由于五叶草莓通体被有绒毛,为使消毒彻底,每一步都不断振摇或搅拌。

1.2.2 不同浓度的6-BA对五叶草莓离体增殖的影响

基本培养基为MS培养基,添加蔗糖30g/L,琼脂粉7g/L,Ph=5.8~6.0,NAA浓度为0.1mg/L。6-BA设置4个浓度处理:0.2mg/L、0.3mg/L、0.4mg/L、0.5mg/L、0.6mg/L。选取生长均匀,高度3cm~5cm,具有4片叶子的五叶草莓无根试管苗接种到该培养基上。每个培养瓶接种4个无根试管苗,每个处理接种15瓶。接种30d后,统计外植体增殖倍数。

1.2.3 基本培养基和生长素种类对五叶草莓生根的影响 基本培养基和生长素的选择设4种配比方式:MS+0.2mg/L IBA、MS+0.2mg/L NAA、1/2MS+0.2mg/L IBA以及1/2MS+0.2mg/L NAA。无根草莓试管苗的选取:选取在MS+0.4mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA培养基上生长健壮的五叶草莓苗,高度5cm左右,具有5片叶子。每种培养基接种10瓶,每瓶接种3株无根试管苗。接种30d后,观察根系生长情况,并统计生根数。

2 结果与分析

2.1 五叶草莓无菌苗的获得

五叶草莓无菌苗的获得过程中,接种3d后开始褐化,褐化比率近乎90%,最终褐化致死率达67.1%。褐化程度不严重、未致死的消毒茎尖,在接种21d时,不经愈伤组织阶段开始萌发新芽,并最终形成丛生芽,获得五叶草莓无菌苗。

2.2 不同浓度的6-BA对五叶草莓离体增殖的影响

将由茎尖培养后选取的相同规格的五叶草莓无菌苗,接种在6-BA不同浓度处理的5种增值培养基上,30d后观察增值苗生长情况,并统计增值数量,计算出增值倍数。结果见表1。

表1 不同浓度6-BA对五叶草莓无菌苗增殖的影响

Table 1 Effect of 6-BA concentration on proliferation of *F. pentaphylla* Lonzink. In vitro culture

6-BA (mg/L)	接种无菌苗数 Amounts of ex-plant	增殖芽数 Proliferation shoots	增值倍数 Proliferation coefficient	增殖苗状态 Shoots state
0.2	60	107	1.783	苗壮,叶色浓绿
0.3	59	380	6.441	苗壮,叶色浓绿
0.4	60	489	8.150	苗壮,叶大、色亮绿
0.5	60	361	6.017	苗弱,偶有黄化
0.6	57	73	1.281	苗低矮、畸形,黄化严重

由表1可见,当6-BA的浓度为0.2mg/L时,五叶草莓长势健壮,但增值倍数较低;当6-BA的浓度增加到0.3mg/L时,增值倍数增加,增值苗生长健壮,叶色浓绿;当6-BA的浓度增加到0.4mg/L时,增值倍数继续增加,外植体增值苗长势良好。但当6-BA浓度增加到0.5mg/L时,增值倍数越过峰值开始下降,且增值苗长势变弱,偶有黄化现象;而6-BA浓度增加到0.6mg/L时,增值倍数下降幅度很大,大多未见增值,苗低矮、畸形,黄化程度比较

严重。由此可见,当基本培养基为MS,NAA浓度为0.1mg/L时,五叶草莓离体增殖的最佳6-BA添加浓度为0.4mg/L。

2.3 基本培养基和生长素种类对五叶草莓生根的影响

选取生长健壮的同规格的五叶草莓无根试管苗接种在4种不同的生根培养基上,30d后,观察其诱导生根情况,结果见表2。

表2 基本培养基及生长素对五叶草莓生根的影响
Table 2 Effect of basal medium and auxins on rooting of *F. pentaphylla* Lonzink.

培养基 Medium	生根率(%) Rooting rate	株平均根数 Root amounts per shoot	根系状态 Root state
1/2 MS + 0.2 mg/L IBA	100	4.2	根细, 长度 0.2cm~0.8cm
1/2 MS + 0.2 mg/L NAA	92.7	6.9	根粗壮, 长度>1.0cm 的根占 41.1%
MS + 0.2 mg/L IBA	100	2.9	根细, 长度 0.2cm~0.6cm
MS + 0.2 mg/L NAA	93.2	3.1	粗壮, 长度 0.6~0.9cm

在实验过程进行时可以观察到, 无论哪种生长调节剂, 1/2 MS培养基上的无根试管苗生根都早于MS培养基。由表2可见: 当生长调节物为IBA时, 无论1/2 MS培养基还是MS培养基, 接种30 d后, 五叶草莓的无根试管苗的生根率都达到100%, 高于NAA的诱导率, 但NAA为添加的生长调节剂时, 诱导生成的根普遍粗壮, 长度也普遍大于以IBA为诱导调节剂。株平均诱导根数以1/2 MS + 0.2 mg/L NAA培养基为最大, 达6.9根/株, 且长度超过1.0 cm的根在总根数中占比超过41.1%。虽然IBA作为生根调节剂的生根率更高, 但NAA作为添加的生根调节剂时, 诱导的根更粗壮、更长、单株生根数更多, 植株在练苗后更容易成活而长成健壮幼苗; 另外, 随着诱导时间的延长, 超过37 d时, NAA为调节剂的诱导生根率也达到100%。故此, 诱导五叶草莓无根试管苗生根的合适培养基为1/2 MS + 0.2 mg/L NAA。

3 讨论与结论

秦巴山区有丰富的野生草莓资源。较之于栽培草莓, 野生草莓在抗病虫害、抗逆性、可溶性有机物含量、果实颜色丰富度以及果实香味物质种类等方面, 有较大的优势^[1-6]。为了利用这些自然资源, 有必要对其进行搜集、整理、研究。野生五叶草莓长势强, 生命力旺盛, 叶片厚, 浓绿, 果实颜色为栽培草莓中少见的白色, 果肉细腻绵软, 香味浓郁, 是优质的杂交育种资源, 也是通过倍性增加、细胞融合甚至转基因方法进行育种的优质基因源^[1-6, 14], 对其进行组织培养研究, 建立茎尖培养组培快繁技术, 为其离体再生、染色体加倍及细胞融合等工作奠定了基础, 对于其野生资源的开发、利用, 具有重要意义。

在外植体的获得时, 发现剥取的茎尖越小, 褐化死亡率越高; 越大, 越有利于外植体成活, 这与王会^[10]对红石美草莓及王燕^[9]对黄毛草莓的研究结论一致, 可见在草莓组织培养外植体的切取过程中, 组织越幼嫩、切口相对越大, 外植体越容易褐化。在6-BA对五叶草莓离体增殖的研究中, 发现在一定范围内, 随着6-BA浓度在培养基中含量的增加, 草莓离体增殖倍数增大, 但超过一定的峰值后, 反而下降, 这与王燕^[9]对黄毛草莓的研究结论一致。在基本培养基和生长素对五叶草莓生根的影响实验中, IBA作为生长调节物时, 30 d试管苗生根率达100%, 无论哪种生长调节剂, 1/2 MS培养基上的无根试管苗生根都早于MS培养基, 这些都和王燕^[9]对黄毛草莓的研究结论一致, 但在NAA作为调节物生成的根粗壮、结实, 这与王燕^[9]对黄毛草莓的研究结论不一致。可见, 同为草莓属植物, 在实验条件基本一致时, 不同的种, 实验结论会有不同。所以不同植物材料进行组织培养时, 具体植物的合适培养基和添加剂, 要通过实验取得。

本实验中得到以下结论: 利用野生五叶草莓匍匐茎茎尖在MS + 0.5 mg/L 6-BA培养基上获得无菌苗, 适合五叶草莓快繁的培养基为MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, 增值倍数为8.150; 适合其诱导生根的培养基为1/2 MS + 0.2 mg/L NAA, 单株诱导根数最大, 诱导根粗, 长度长, 有利于形成壮苗。

参考文献

- [1]朱薇,杨明攀.中国野生草莓资源研究及利用进展[J].中国南方果树,2012,41(4): 50-52,58.
- [2]邹盼红.草莓种质资源研究进展[J].中国园艺文摘, 2016(05):29-31.
- [3]李景佳.草莓在全球的分布概况[J].北京农学院学报,

1983(00): 52-62.

[4]晁无疾,钟新.秦巴山区野生草莓资源及其研究利用[J].中国野生植物, 1988(03):15-18.

[5]李洪雯,刘建军,何健,关斌,王建辉,李旭锋,陈克玲.四川及其周边地区野生草莓资源调查、收集与评价[J].植物遗传资源学报,2012(06):946-951.

[6]张九东,徐伟君.野生黄毛草莓在西安的驯化栽培试验[J].陕西农业科学,2014(09):44-45.

[7]马鸿翔,陈佩度.草莓属低倍性野生资源在育种中利用的研究进展[J].果树学报,2003(04): 305-309.

[8]马鸿翔,陈佩度,余桂红,任丽娟.东北草莓×凤梨草莓种间杂种一代的细胞遗传学观察与RAPD分析[J].园艺学报, 2007(03):597-604.

[9]王燕,陈丙义,章镇,高志红,乔玉山.黄毛草莓组织培养与快繁技术研究[J].西南农业学报,2012(01):252-256.

[10]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,2006(03):11-12+27.

[11]中国科学院植物志编辑委员会.中国植物志(第37卷).北京:科学出版社,1985.350-357.

[12]西北植物研究所.秦岭植物志.北京,科学出版社, 1984.

[13]俞德浚.中国果树分类学.北京:农业出版社,1979. 220-226.

[14]雷家军,谭昌华,朱恒,代汉萍,邓明琴.中国野生草莓种质资源及其利用研究进展[A].全国首届野生果树资源与开发利用学术研讨会论文集[C].中国新疆,2004-08.

[责任编辑 王军利]

Study on Tissue Cultivation and Propagation Techniques of Wild Strawberry *F. Pentaphylla Lonzink*

WANG Jun-li

(Xianyang Vocational & Technical College, Xi-xian New District, Shaanxi 712046)

Abstract: The test was conducted in order to establish the technique of rapid propagation of stem tip culture in wild strawberry *F. pentaphenyla Lonzink*, and lay the foundation for regeneration in vitro induction and in vitro chromosome doubling technology. During the experiment, the stem tip of the stolon from wild strawberry *F. pentaphenyla Lonzink* in the site of Qin-ba Mountain was excavated, which is the explant material for initial in-vitro culture to obtain the aseptic seedling, and the aseptic seedling is used as a test material, and the culture medium suitable for rapid propagation and in-vitro rooting of the *F. pentaphenyla Lonzink* is screened. The results showed that the aseptic seedling was obtained on MS+0.5 mg/L 6-BA medium by using the stolon tip of wild strawberry *F. pentaphenyla Lonzink*, and the suitable medium for rapid propagation of it was MS+0.1 mg/L NAA+0.4 mg/L 6 / BA, and its increment multiple was 8.150. The medium suitable for rooting of the shoots of *F. pentaphenyla Lonzink* was 1 × 2 MS+0.2 mg/L NAA, which was beneficial to obtain strong plant-lets because of its large number of inducing roots, stout and long length.

Key words: *F. pentaphenyla Lonzink*, stem tip cultivation, wild strawberry; Qin-ba Mountain area

(上接第16页)

[2]曲佳文-和谐校园视野下大学生思想政治教育模式的研究《北京化工大学硕士论文》-2011-06-01.

[3]郭念峰.国家职业资格培训教程.心理咨询师(三级)[M].北京:民族出版社,2005.

[4]张文.合理情绪疗法理论对.失恋大学生摆脱情绪困扰的启示[J].思想政治教育,2010年5月:66-68.

[5]周瑞云.边疆少数民族地区高校民族团结教育的社会工作介入[J].学校党建与思想教育.2010年,13期.

[责任编辑 王军利]