

东方草莓茎尖繁殖技术

韩春妮¹, 王军利¹, 豆秀英², 张阿宁³, 李美索⁴, 仝玉琴¹, 冯馨乐¹

(1.咸阳职业技术学院, 陕西 西咸新区 712046; 2.永寿县农技推广中心, 陕西 咸阳 712046;
3.淳化县农技推广中心, 陕西 咸阳 712046; 礼泉县植保植检站, 陕西 咸阳 712078)

摘要:【目的】研究野生东方草莓 (*F. orientalis* Lozinsk.) 的离体茎尖培养快繁技术, 为草莓的离体染色体加倍等育种工作提供野生基因源及前期的材料和技术。【方法】以野生东方草莓匍匐茎的茎尖为材料, 进行离体培养, 获得无菌苗, 并以此无菌苗为材料筛选其增殖培养及生根培养的培养基。【结果】培养基中添活性炭 (AC) 有利于预防外植体褐化; 野生东方草莓可通过匍匐茎的茎尖在MS+0.4 mg/L 6-BA培养基上获得无菌苗; 适合东方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11.26; 适合其生根的培养基为1/2 MS+0.3 mg/L NAA, 株诱导根数多、根粗、长度长, 可获壮苗。【结论】通过离体茎尖培养快繁技术, 可建立野生东方草莓离体组培快繁体系, 进而为其离体诱导及离体染色体加倍等育种工作提供前期材料和技术。

关键词: 东方草莓; 茎尖培养; 野生草莓

中图分类号: S668.4

文献标识码: A

文章编号: 94047- (2020) 02-005

草莓为蔷薇科草莓属草本果树。全球约有草莓属植物50余种, 在全球广为栽培的草莓栽培种, 是人们通过八倍体 (8x) 凤梨草莓 (*Fragaria ananassa*) 培育而成, 而其他倍性的草莓属植物, 多以野生或半野生状态分布于世界各地^[1-3]。全球常见的野生草莓约有20种, 中国自然分布11种左右^[4-5]。可见, 中国的草莓种质资源十分丰富, 基因库较大。然而由于历史原因, 中国草莓育种工作一直比较落后, 中国广为栽培的草莓种, 基本引种自欧美或日本, 自有知识产权的栽培种较少^[3-6]。近年来, 为培育中国自有知识产权的草莓栽培种, 增强草莓栽培种的选择性, 同时, 为把中国野生草莓特有的抗逆性强、香味浓郁、果色丰富等优质基因引入栽培种, 中国各地的科学家们进行了不懈的努力, 取得了一定的成效^[7-10]。

广泛分布于陕西省秦巴山区的东方草莓, 为四倍体 (4x) 野生草莓^[1], 其野生环境为海拔600 m-1800 m的林间或沟坎荒坡、砂地、草丛。该野生种植株较矮, 匍匐茎细长, 具有较强的抗逆性, 耐寒、耐旱能力非常强; 其叶片卵形, 较小, 两性花; 果实为圆形或椭圆形, 深红色; 种子陷于果面

下; 果肉细腻, 果香浓郁^[3-7]。为了开发这一野生资源, 为草莓的育种工作提供前期材料及优质基因来源, 项目组在借鉴前人工作的基础上, 研究了东方草莓的茎尖组培快繁技术, 为其离体再生提供了实验技术, 为其离体染色体加倍等育种工作提供了前期材料, 也为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 试验材料

供试的东方草莓源自陕西省太白山自然保护区。2018年5月中旬, 东方草莓果实成熟期, 项目组于陕西省太白县的太白山自然保护区挖回多株, 栽培于咸阳职业技术学院园林园艺实训基地, 设立了专门圃地, 并根据其匍匐茎、花、果实、叶片等器官的形态特征, 运用雷家军 (2004)^[8]等相关的鉴定资料和方法, 以及《中国植物志》^[9]《中国果树分类学》^[10]《秦岭植物志》^[11]等资料, 对其进行了检索、鉴定, 确定其为东方草莓。

1.2 试验方法

1.2.1 活性炭对东方草莓褐化的影响及无菌苗的获得

收稿日期: 2020-05-19

项目基金: 咸阳市二〇一九年重点研发计划项目 (2019k02-52)

作者简介: 韩春妮 (1984—), 女, 陕西咸阳市人, 讲师, 研究方向为园林园艺及植物学。

2019年5月下旬, 大晴天的午后, 在咸阳职业技术学院实习场地的野生草莓资源圃, 选取健壮、无病虫害的东方草莓苗, 用手术剪剪取长度为1.0 cm~2.0 cm的匍匐茎顶端多枚, 放于大烧杯中, 然后置大烧杯于实验室水龙头下以流水冲洗过夜(12 h以上)。第二天早上, 在超净工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20 s~25 s, 再用2%的NaClO消毒15 min~20 min, 用无菌水冲洗3~5次, 再用高温、高压灭菌后的滤纸吸干表面的水分, 放置在垫有灭菌滤纸的培养皿中, 用高温灭菌后晾凉的解剖刀切取长约0.5 cm~0.8 cm的茎尖(带1个叶原基)作为外植体, 接种在基本培养基为MS, 并添加了0.4 mg/L 6-BA、6 g/L琼脂粉及30 g/L蔗糖的固体培养基上, Ph调至5.8~6.0, 同时, 为试验活性炭对外植体褐化的影响, 活性炭的添加量分4个对比梯度, 分别为: 0 g/L、0.5g/L、1.0 g/L、1.5 g/L。每个培养瓶接种5个外植体, 每组试验接种20瓶。接种后将培养瓶放置在培养室中培养, 观察外植体污染情况, 1d后, 及时将未发生污染的外植体转接到相应的同类新培养基上。培养条件: 光照时长为12 h/d~14 h/d, 光强为1800 Lux~2200 Lux, 温度为22 (±2) °C。在外植体接种的消毒过程中, 由于东方草莓通体被有较长绒毛, 为使消毒彻底, 消毒过程不断摇动烧杯或用无菌玻璃棒不断搅拌。

1.2.2 不同浓度6-BA对东方草莓离体增殖的影响 基本培养基为MS培养基, 添加蔗糖30 g/L, 琼脂粉6

g/L, Ph=5.8~6.0, NAA浓度为0.1 mg/L。6-BA设置6个浓度处理: 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L、0.4 mg/L、0.5 mg/L、0.6 mg/L。选取由茎尖培养而得的生长均匀、高度4 cm~5 cm、具有4~5片叶子的东方草莓无根试管苗, 将其接种到相应培养基上。每个培养瓶接种5个无根试管苗, 每个处理接种10瓶。接种30 d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东方草莓生根的影响 基本培养基设置MS培养基和1/2 MS培养基两个试验, 生长素类调节剂选择IBA和NAA两种, 每种调节剂设置0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L、0.4 mg/L等4种浓度。无根草莓试管苗的选取: 选取在MS + 0.1 mg/L NAA + 0.4 mg/L 6-BA培养基上增殖培养而得的生长健壮的无根草莓苗, 高度5 cm左右, 具有4~5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21 d后, 观察根系生长情况, 并统计生根数。

1.3 数据处理

试验数据运用SPSS 19.0软件进行统计分析, 结果差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 活性炭对东方草莓外植体褐化的影响及无菌苗的获得

接种4 d后, 无菌苗开始褐化。21 d时, 统计褐化情况, 并计算褐化率。结果见表1。

表1 不同活性炭添加量对东方草莓褐化的影响

Table 1 Effect of different amount of activated carbon on Browning of *F. orientalis* Lozinsk.

AC (g/L)	外植体 接种数 Number of explants	污染率 (%) Contamination rate	未污染数 (个) Uncontaminated number	褐化数 (个) Browning number	褐化致死数 (个) Number of deaths from Browning	褐化率 (%) Browning rate	褐化致死率 (%) Mortality rate of Browning
0	100	18 ^a	82	69	42	84.1 ^a	51.2 ^a
0.5	100	20 ^a	80	43	22	53.7 ^b	27.5 ^b
1.0	100	17 ^a	83	33	18	39.8 ^c	21.7 ^c
1.5	100	21 ^a	79	40	23	50.6 ^{bc}	29.1 ^b

注: 表中a、b等不同小写字母表示在同列中数据对比差异性显著(P<0.05)。以下各表相同。

由表1可见, 各组试验的污染率无差别, 可见污染率和培养基没关系。同时可见, 培养基中添加活性炭, 对褐化的影响比较显著。不添加活性炭, 褐化率高达84.1%, 褐化致死率高达51.2%, 添加活

性炭后, 褐化率及褐化致死率均大幅下降, 可见, 在东方草莓的外植体接种时, 添加活性炭有利于降低褐化率, 这一结果与叶睿华(2018)^[12]、常可可(2019)^[13]等在其他植物的试验结果相似。对比添

加了活性炭的3种培养基，它们之间亦有显著差别，当活性炭添加量为1.0 g/L时，褐化率及褐化致死率相对较低。

各组试验中未褐化或褐化程度不严重的茎尖，在接种21 d后，开始不经愈伤组织阶段而直接萌发新芽，最终形成丛生芽，从而获得东方草

莓无菌苗。

2.2 不同浓度的6-BA对东方草莓离体增殖的影响

选取由茎尖培养而来的相同规格的东方草莓无菌苗，接种在不同6-BA浓度的6种增殖培养基上，30 d后观察增殖苗生长情况，统计增殖数量，并计算出增值倍数。结果见表2。

表2 不同浓度6-BA对东方草莓无菌苗增殖的影响

Table 2 Effect of 6-BA concentration on proliferation of *F. orientalis* Lozinsk. in vitro culture

6-BA (mg/L)	接种苗数 Amounts of ex-plant	增殖数 Proliferation shoots	增殖倍数 Proliferation coefficient	增殖苗状态 Shoots state
0.1	50	120	2.40 ^d	生长健壮，叶色深绿
0.2	50	221	4.42 ^e	生长健壮，叶色深绿
0.3	50	476	9.52 ^{ab}	生长健壮，叶大，色浓绿
0.4	50	563	11.26 ^e	生长健壮，叶大、色亮绿
0.5	50	342	6.84 ^b	生长较弱，偶见黄化
0.6	50	89	1.78 ^d	苗矮、皱缩畸形，黄化重

由表2可见，当6-BA的浓度为0.1 mg/L ~0.2 mg/L时，东方草莓长势健壮，但增殖倍数相对较低；当6-BA的浓度增加到0.3 mg/L ~0.4 mg/L时，增殖倍数随着浓度的增加而增加，增殖苗健壮，叶色浓绿；当6-BA的浓度增加到0.5mg/L时，增殖倍数又开始下降，且增殖苗长开始有黄化现象出现。当6-BA浓度增加到0.6mg/L时，增殖倍数急剧下降，且苗低矮、皱缩畸形，黄化程度严重。由表中数据可见，当基本培养基为MS，NAA浓度为0.1 mg/L

时，东方草莓离体增殖的最佳6-BA添加浓度为0.4 mg/L，其增值倍数为11.26。

2.3 基本培养基种类和生长素种类对东方草莓生根的影响

增殖培养结束时，选取基本培养基为MS、NAA浓度为0.1 mg/L、6-BA浓度为0.4 mg/L上的健壮、同规格的东方草莓无根增殖苗，接种在试验设计的16种不同的生根培养基上。21 d后，观察其诱导生根情况，结果见表3。

表3 基本培养基及生长素对东方草莓生根的影响

Table 3 Effect of basal medium and auxins on rooting of *F. orientalis* Lozinsk.

基本培养基 Medium	生长素 Auxins	生根率 Rooting rate	株平均根数 Root amounts per shoot	平均根长 Average root length	根系状态 Root state
1/2 MS	0.1mg/L IBA	100	2.19 ^d	0.38 ^d	细、弱
	0.2mg/L IBA	100	3.39 ^{cd}	0.51 ^{bc}	细
	0.3mg/L IBA	100	3.92 ^c	0.49 ^{bc}	细
	0.4mg/L IBA	100	3.46 ^c	0.44 ^c	细
	0.1 mg/L NAA	89.71	4.33 ^b	0.51 ^{bc}	粗
	0.2 mg/L NAA	91.33	4.69 ^{ab}	0.89 ^a	粗、壮
	0.3 mg/L NAA	92.7	5.13 ^a	1.01 ^a	粗、壮
	0.4 mg/L NAA	88.45	4.37 ^b	0.78 ^b	粗
MS	0.1 mg/L IBA	100	2.41 ^d	0.33 ^d	细、弱
	0.2 mg/L IBA	100	2.47 ^d	0.39 ^e	细、弱
	0.3 mg/L IBA	100	2.51 ^d	0.41 ^c	细
	0.4 mg/L IBA	100	2.52 ^d	0.28 ^d	细弱
	0.1 mg/L NAA	88.89	2.35 ^d	0.51 ^{bc}	粗
	0.2 mg/L NAA	91.21	2.29 ^d	0.79 ^b	粗
	0.3 mg/L NAA	93.27	2.35 ^d	0.77 ^b	粗
	0.4 mg/L NAA	90.10	2.18 ^d	0.58 ^{bc}	粗

实验过程中可见, 无论添加哪种生长调节剂, 基本培养基为1/2 MS上的无根试管苗生根都先于MS培养基。

由表3可见: 当生长调节物为IBA时, 无论基本培养基是1/2 MS培养基还是MS培养基, 接种21 d后, 东方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为生长调节剂时, 无论在1/2 MS培养基还是MS培养基上, 其诱导生成的根普遍粗而且健壮, 平均根长也相对较大。株平均根数以基本培养基为1/2 MS、添加0.3 mg/L NAA的培养基上最大, 为5.13根/株, 且其上的平均根长也最大, 为1.01cm。虽然添加的生根调节剂为IBA时, 生根率达100%, 但添加NAA为生根调节剂时, 诱导出的不定根更粗、更健壮、长度更长, 且单株诱导生根数更多, 植株在出瓶练苗时更易成活; 同时, 诱导时间超过30 d时, 添加NAA为生根调节剂的培养基上, 诱导生根率也达到100%。故此, 诱导东方草莓无根试管苗生根的最佳培养基为1/2 MS + 0.3 mg/L NAA。

3 讨论与结论

较之于现有的栽培草莓, 野生草莓在很多方面具有较大的优势, 其抗病虫害、抗逆性更强, 可溶性有机物种类更多, 果实颜色更丰富, 同时, 果实香味物质的种类也更多^[1-8]。中国作为全球野生草莓的主要发源地之一, 具有丰富的野生草莓资源, 要利用好这些资源, 就有必要对它们进行详细的调查、搜集、整理和研究。野生东方草莓的抗寒性和抗旱性均很强, 生长健壮, 叶色浓绿, 果实颜色深红, 果肉绵软, 香味独特, 是一种优质的杂交育种资源, 也可以通过染色体加倍、细胞融合或者转基因等方法进行育种, 以使该优质基因源得到充分利用^[12-17]。对野生东方草莓进行组织培养研究, 建立其茎尖培养快繁体系, 为其后续通过染色体加倍、细胞融合或者转基因等方法进行育种等工作奠定了基础, 也为其快繁探索了一条道路, 对其野生资源的开发、利用具有一定的现实意义, 同时也为其他草莓属植物的组培快繁提供了借鉴。

试验中发现, 剥取的茎尖外植体越小, 其褐化率及褐化死亡率越高, 相反, 剥取的茎尖外植体越大, 褐化程度越低且越有利于外植体成活, 该结论与王燕^[15]对黄毛草莓的研究、王军利^[3]对五叶草莓、

王会^[16]对红石美草莓的研究结论一致。由此可见, 在草莓属植物组织培养时, 其外植体切取得越小, 外植体越容易褐化。6-BA对东方草莓离体增殖影响的研究中发现, 在一定范围内随着6-BA浓度在培养基中含量的增加, 其增殖倍数增大, 但达到某一峰值后, 增殖倍数开始下降, 这与王军利^[3]对五叶草莓、王燕^[15]对黄毛草莓的研究结论基本一致。在基本培养基和生长素对东方草莓无根苗生根的影响试验中发现, IBA作为添加的生长调节物, 21 d无根试管苗的生根率均达100%; 无论添加哪种生长调节剂, 1/2 MS培养基上无根试管苗生根时间都早于MS培养基, 且生根量相对较大, 长度较长, 这和王军利^[3]在五叶草莓及王燕^[15]在黄毛草莓上的研究结论一致; 但在该实验中发现, NAA作为生根调节剂, 所生成的根普遍更粗、更健壮, 该结论与王军利^[3]在五叶草莓上的研究结论一致, 而与王燕^[15]对黄毛草莓的研究不一致。可见, 同为草莓属植物, 不同的种之间, 实验结果有差异。所以, 在构建不同植物的组织培养体系时, 对具体植物而言, 合适的培养基和添加剂应通过具体实验来取得和验证。

综上所述, 通过离体茎尖培养, 可建立野生东方草莓离体组培快繁体系, 进而为其离体诱导及离体染色体加倍等育种工作提供前期材料和技术。具体而言, 本试验获得如下结论: 野生东方草莓可利用其匍匐茎的茎尖在MS + 0.4mg/L 6-BA培养基上获得无菌苗, 培养基中添1.0 g/L活性炭(AC)有利于预防外植体褐化; 适合东方草莓快繁的培养基为MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, 其增值倍数为11.26; 适合其生根的培养基为1/2 MS + 0.3 mg/L NAA, 株诱导根数多、根粗、长度长, 可获壮苗。

参考文献

- [1]朱薇, 杨明华. 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]王军利, 千小绵, 吴紫安, 羊波, 李伟, 王新. 野生五叶草莓的组织培养繁殖技术研究[J]. 陕西农业科学, 2020(01): 32-34.
- [4]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.
- [5]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.
- [6]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.
- [7]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.
- [8]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.
- [9]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.
- [10]俞德浚.中国果树分类学.北京:农业出版社,1979.220-226.
- [11]西北植物研究所.秦岭植物志.北京,科学出版社,1984.
- [12]叶睿华,吕享,李小兰,田海露,吉宁,张明生.五种抗褐化剂对杜鹃兰原球茎增殖培养的作用效果[J].植物生理学报,2018(06):1103-1110.
- [13]常可可,杨玉珍,张志浩,李娟,赵大芳.‘凤丹’牡丹胚培养及褐化防治研究[J].西部林业科学,2019(05):148-152.
- [14]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.
- [15]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.
- [16]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.
- [17]张爱丽,王元忠,黄衡宇,李继祥,马利娟.‘章姬’草莓茎段愈伤组织诱导及高频植株再生体系的建立[J].广西植物,2018(04):482-491.

[责任编辑:王军利]

Study on Establishment of Tip-shoot Propagation System for Wild Oriental Strawberry

HAN Chun-ni¹, WANG Jun-li¹, DOU Xiu-ying², ZHANG A-ning³, LI Mei-suo⁴, TONG Yu-qin¹, FENG Xin-le¹

(1.Xianyang Vocational & Technical College, Xi-xian New District, Shaanxi 712046; 2. Agricultural Technology Promotion Center of Yongshou County, Xi'an, Shaanxi 710000; 3. Agricultural Promotion Institute of Chunhua County, Shaanxi 712000; 4. Liquan County Plant Protection & Inspection Station, Xianyang, Shaanxi 712000)

Abstract: [Objective] A prompt propagation technique of stem tip culture in wild oriental strawberry (*F. orientalis* Lozinsk.) was studied, which provides the source of wild genes, the materials and techniques in early stage. [Method] The vitro culture of the stem tip of the wild oriental strawberry was carried out to obtain the sterile seedlings, within which, the medium of proliferation culture and rooting culture was screened. [Result] The addition of activated carbon (AC) to the medium is beneficial to prevent explant browning. The sterile seedlings can be obtained from wild oriental strawberries on MS+0.4 mg/L 6-BA medium through the stem tip of stolon. The medium suitable for fast propagation of oriental strawberry was MS+0.4 mg/L 6-BAMS+0.1 mg/L NAA, and the increment ratio was 11.26; The culture medium suitable for its rooting is 1/2 MS+0.3 mg/L NAA; the induced roots are in large quantity, long and strong. [Conclusion] The fast propagation system of wild oriental strawberry in vitro tissue culture can be established. In order to provide early materials and techniques for in vitro induction and chromosome doubling breeding.

Key words: oriental strawberry; tip-shoot propagation; wild strawberry.