



王禹,耿月伟,谭巍,等. 童子一号草莓组织培养快繁体系的建立[J]. 黑龙江农业科学,2019(10):10-14.

童子一号草莓组织培养快繁体系的建立

王禹,耿月伟,谭巍,于非,张毓,刘博文,刘万达

(黑龙江省农业科学院园艺分院,黑龙江哈尔滨 150069)

摘要:为提高草莓种苗的繁殖速度及质量,以童子一号的茎尖为外植体,研究适宜的生长、丛生芽增殖的培养基、继代时间、继代次数以及生根培养基,并探讨了适宜的移栽条件。结果表明:草莓茎尖生长培养基为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.2 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA;增殖培养基为 MS+ $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA,每 30~40 d 继代一次,可连续继代 4 次;生根培养基为 $0.2 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA;组培苗根系长至 2 cm,植株高 4 cm 时进行移栽,移栽后遮光率不高于 60%、空气湿度不高于 60%、环境温度高于 20℃,移栽成活率可达到 87%。

关键词:草莓;茎尖;组织培养;移栽;成活率

草莓属于蔷薇科草莓属 (*Fragaria ananassa* Duch.) 多年生草本植物,其果实鲜嫩多汁,香气浓郁,酸甜适口,富含维生素 C 和 P、Zn、Fe 等营养成分以及多种氨基酸,具有较高的营养价值与保健功能,是一种经济价值较高的水果,在世界范围内被广泛栽培^[1]。草莓具有植株矮小、耐低温、耐弱光、生育期短、适应性强的特性^[2-4]。黑龙江省气候特点是冬季光照弱、温度低,适合草莓的生长发育。黑龙江省草莓栽培面积呈逐年上升的趋势,草莓优良种苗需求也逐年增多。草莓种苗一般采用无性繁殖,在繁殖过程中极易感染病毒,从

而造成草莓品种的种性退化,出现果实变小、品质变劣、产量降低等现象。

植物组织培养具有可脱除部分病毒和生育期短的特点,利用草莓组织培养技术繁育草莓种苗,可提高种苗的繁殖速度及质量^[5-8]。本试验以草莓茎尖为材料,研究适宜的生长、丛生芽增殖的培养基、继代时间、继代次数以及生根培养基,并探讨了适宜的移栽条件,以期建立草莓组织培养快繁体系,提高草莓种苗的繁殖速度及质量。

1 材料与方法

1.1 材料

试验以黑龙江省主要栽培草莓品种童子一号的当年生匍匐茎的茎尖为材料;采集地为黑龙江省农业科学院园艺分院;采集时间为 2018 年 7 月初至 9 月初。

收稿日期:2019-05-19

基金项目:黑龙江省农业科学院院级科研项目(YYYF039)。

第一作者简介:王禹(1982-),女,硕士,助理研究员,从事植物组织培养的研究。E-mail:liuwanda1982@126.com。

Bioinformatics Analysis on *Sh1* Gene of Maize Sucrose Synthase

LAI Yan-hua, ZHAO Ya-zhong

(Heilongjiang Agriculture Development Design Institute, Harbin 150040, China)

Abstract: Sucrose synthase is a key enzyme in the biosynthesis and metabolic pathway of maize to achieve sucrose synthesis and decomposition. Sucrose synthase gene *Sh1* is located in the short arm of chromosome 9 of maize, with the total length of 5 816 bp. *Sh1*-encoded protein SH1, containing a sucrose synthetase subunit(PF00862) and a glycosyl transferase subunit (PF00534) with 802 amino acids, was a combination of reversible enzyme catalytic synthesis and decomposition, which belongs to the stable type of membrane protein without transmembrane structure, and the three possible model shows that it has the complicated space structure. The key period of sucrose biosynthesis in maize is 12-27 days after pollination. In order to reveal the molecular mechanism of sucrose metabolism pathway in maize, the structure and function of *Sh1* gene were analyzed, and the basic physical and chemical properties and species evolution of *Sh1* encoding protein structure were studied.

Keywords: maize; sucrose synthase; *Sh1* gene

1.2 方法

1.2.1 草莓茎尖生长培养适宜培养基 将采集的茎尖自来水流冲洗 1 h,置于超净工作台中,酒精消毒 40 s,蒸馏水冲洗两次,0.1%的升汞消毒 6 min,蒸馏水冲洗两次,剥取 2 mm 内的茎尖(越小脱毒效果越好),接种到生长培养基上,生长培养基采用 6-BA+NAA+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂,pH 5.4~5.8;培养温度为 22~25 ℃,光照时间 14 h·d⁻¹。调查 6-BA、NAA 对茎尖萌发的影响。

1.2.2 草莓增殖培养适宜的培养基 将萌发的草莓茎尖转接到增殖培养基上,增殖培养基采用 6-BA+NAA+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂,pH 5.4~5.8;培养温度为 22~25 ℃,光照时间 14 h·d⁻¹。调查 6-BA、NAA 对草莓丛生芽增殖的影响。

1.2.3 草莓茎尖增殖培养适宜的继代时间及次数 待茎尖长出丛生芽后,将丛生芽切成 0.5 cm×0.5 cm 的丛状,接种到增殖培养基上继续增殖,调查继代时间及继代次数对茎尖增殖的影响。

1.2.4 草莓组培苗生根的适宜的培养基 待组培苗长到 1 cm 高转入到生根培养基中,生根培养基采用 IBA+NAA+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂,pH 5.4~5.8;培养温度为 22~25 ℃;光照时间 14 h·d⁻¹。调查 IBA、NAA 对草莓生根的影响。

1.2.5 草莓组培苗移栽条件 组培苗移栽 20 d 后,调查遮光率、组培苗高度、根系长度、空气湿度及环境温度对移栽成活率的影响。

1.2.6 数据分析 采用 Excel 2007 对试验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 适宜草莓茎尖生长培养基的筛选

茎尖接种 20 d 后开始萌发,生长较快,如 40 d后才萌发,则易褐化,不利于后期增殖。由表 1可知,MS+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 与 MS+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA 的茎尖萌发率较高,可达到 70%以上。因此,茎尖生长培养基可采用 1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2~0.5 mg·L⁻¹ NAA。

表 1 生长激素对草莓茎尖萌发的影响

Table 1 Effects of plant growth regulator on stem tip germination of strawberry

培养基组合 Medium combination	萌芽率 Germination rate/%	芽生长势 Shoot clumps growth situation
MS+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	0	茎尖不萌发
MS+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L ⁻¹ NAA	39	茎尖萌发慢,易褐化
MS+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ NAA	42	茎尖萌发慢,易褐化
MS+1 mg·L ⁻¹ NAA	57	茎尖萌发快,芽浅绿色
MS+1 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L ⁻¹ NAA	72	茎尖萌发快,芽浅绿色
MS+1 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ NAA	76	茎尖萌发快,芽浅绿色

2.2 适宜草莓茎尖增殖培养基的筛选

由表 2 可知,随着 6-BA 浓度的升高,丛生芽产生加快,当达到 3 mg·L⁻¹时芽开始生长不良,出现叶片发黄,卷曲等现象;随着 NAA 浓度的升高,苗生长加快,增殖阶段应以抑制苗生长、加快丛生芽产生为主。综合以上因素,培养基选用 MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.10 mg·L⁻¹ NAA 为最佳。

2.3 适宜草莓茎尖增殖培养的继代时间及次数筛选

由表 3 可知,继代 20 d 时丛生芽产生较少,30 d 时大量产生丛生芽,到 50 d 时丛生芽生长势开始衰弱。因此,草莓增殖培养应 30~40 d 继代一次。由表 4 可知,继代到第 5 代时丛生芽生长势衰弱,植株变细弱或者叶片卷曲,不利于后期移栽成活,不适合再继续增殖。因此,草莓继代到第

5 代时,建议转回到生长培养基中,恢复其生长 势,再开始继代。

表 2 生长激素对丛生芽增殖的影响

Table 2 Effects of plant growth regulator of multiple shoot clumps proliferation

培养基组合 Medium combination	增殖系数 Proliferation coefficient	丛生芽生长势 Multiple shoot clumps growth situation
MS+1 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L ⁻¹ NAA	2.1	丛生芽增殖慢、深绿色、苗生长慢
MS+1 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.10 mg·L ⁻¹ NAA	2.2	丛生芽增殖慢、深绿色、苗生长慢
MS+1 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.30 mg·L ⁻¹ NAA	2.6	丛生芽增殖慢、深绿色、苗生长快
MS+2 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L ⁻¹ NAA	3.8	丛生芽增殖快、深绿色、苗生长慢
MS+2 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.10 mg·L ⁻¹ NAA	4.2	丛生芽增殖快、深绿色、苗生长慢
MS+2 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.30 mg·L ⁻¹ NAA	2.9	丛生芽增殖快、深绿色、苗生长快
MS+3 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L ⁻¹ NAA	3.7	丛生芽增殖快、浅绿色、苗生长慢
MS+3 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.10 mg·L ⁻¹ NAA	4.5	丛生芽增殖快、浅绿色、部分叶片卷曲
MS+3 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.30 mg·L ⁻¹ NAA	4.4	丛生芽增殖快、部分芽发黄,叶片卷曲

表 3 继代时间对丛生芽增殖的影响

Table 3 Effects of transgenerational days of multiple shoot clumps proliferation

培养基组合 Medium combination	继代天数 Transgenerational days/d	增殖系数 Proliferation coefficient	丛生芽生长势 Multiple shoot clumps growth situation
MS+2 mg·L ⁻¹ 6-BA+ 0.1 mg·L ⁻¹ NAA	20	2.6	丛生芽增殖慢、深绿色
	30	4.2	丛生芽增殖快、深绿色
	40	4.6	丛生芽增殖快、深绿色
	50	4.8	丛生芽增殖快、芽干枯、发黄

表 4 继代次数对丛生芽增殖的影响

Table 4 Effects of transgenerational number of multiple shoot clumps proliferation

培养基组合 Medium combination	继代次数 Transgenerational number/times	增殖系数 Proliferation coefficient	丛生芽生长势 Multiple shoot clumps growth situation
MS+2 mg·L ⁻¹ 6-BA+ 0.1 mg·L ⁻¹ NAA	2	4.2	丛生芽增殖快、深绿色
	3	4.2	丛生芽增殖快、深绿色
	4	4.2	丛生芽增殖快、深绿色
	5	3.4	丛生芽增殖快、部分芽长势变弱、或叶片卷曲、或芽变细小
	6	3.1	丛生芽增殖快、深绿色、芽长势变弱、或叶片卷曲、或芽变细小

2.4 适宜草莓组培苗生根培养基的筛选

待植株长到 1 cm 高转入到生根培养基中,生根培养基采用 IBA + NAA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 7 g·L⁻¹ 琼脂,pH 5.4~5.8;培养温度为 22~25 ℃;光照时间 14 h·d⁻¹。调查 IBA、NAA 对草

莓组培苗生根的影响。由表 5 可知,草莓易生根,生根率可达到 80% 以上;组培苗后期移栽时,组培苗高、根多的易成活,应选用植株高、生根条数较多的培养基;但激素浓度高,草莓基部易产生愈伤组织不利于移栽成活。因此,生根培养基可选

用 0.2~0.5 mg·L⁻¹ IBA+0.2 mg·L⁻¹ NAA。

2.5 草莓组培苗移栽适宜条件

试验中发现,草莓组培苗移栽时,组培苗高、根长易成活,移栽成活率较高;移栽后不见光反而不适于草莓快速缓苗;环境温度低或者湿度大草

莓易烂根。由表 6 可知,草莓组培苗移栽的适宜条件为组培苗高度达到 4.0 cm 以上、根系长度 2.0 cm 以上、遮光率不高于 60%、空气湿度不高于 60%、环境温度高于 20 ℃,移栽成活率可达到 87%。

表 5 生长激素对组培苗生根的影响

Table 5 Effects of plant growth regulator of rooting culture

培养基组合	生根比例	生根条数	组培苗生长势
Medium combination	Article take root ratet/%	Rooting number	Tissue culture seedling growth situation
0.1 mg·L ⁻¹ IBA	85	2	叶色绿,植株壮
0.2 mg·L ⁻¹ IBA	89	3	叶色绿,植株壮
0.5 mg·L ⁻¹ IBA	83	4	叶色绿,植株壮
0.2 mg·L ⁻¹ IBA+0.2 mg·L ⁻¹ NAA	85	5	叶色绿,植株壮,生长快
0.5 mg·L ⁻¹ IBA+0.2 mg·L ⁻¹ NAA	86	5	叶色绿,植株壮,生长快
0.5 mg·L ⁻¹ IBA+0.5 mg·L ⁻¹ NAA	83	4	叶色绿,植株壮,根基部产生愈伤组织

表 6 草莓组培苗移栽适宜条件筛选

Table 6 Selection of acclimation conditions of strawberry tissue culture seedlings

组培苗高度								环境温度	移栽成活率
Height	移栽成活率	根系长度	移栽成活率	遮光率	移栽成活率	空气湿度	移栽成活率	The	
of tissue	Transplant	Root	Transplant	Shading	Transplant	Humidity	Transplant	environment	
culture	survival	length/	survival	coefficient/	survival	of the	survival	temperature/	
seedlings/ cm	rate/%	cm	rate/%	%	rate/%	air/%	rate/%	℃	
2.0	28	0.5	13	100	32	80	22	15	42
3.0	71	1.0	76	60	73	65	81	20	85
4.0	87	2.0	87	40	87	50	87	25	87
5.0	87	3.0	87	20	87	40	86	30	83

3 结论与讨论

草莓组织培养快繁体系的步骤为每年的 7 月初至 9 月初,采集当年生匍匐茎的茎尖,自来水冲洗 1 h,置于超净工作台中,酒精消毒 40 s,蒸馏水冲洗两次,0.1%的升汞消毒 6 min,蒸馏水冲洗两次,剥取 2 mm 内的茎尖(越小脱毒效果越好),接种到生长培养基上,生长培养基为 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2~0.5 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+7 g·L⁻¹ 琼脂,pH 5.4~5.8、培养温度为 22~25 ℃、光照时间 14 h·d⁻¹。将萌发的茎尖转

接到增殖培养基上,增殖培养基为 MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.10 mg·L⁻¹ NAA +30 g·L⁻¹ 蔗糖+7 g·L⁻¹ 琼脂,pH 5.4~5.8、培养温度为 22~25 ℃、光照时间 14 h·d⁻¹。将产生的丛生芽切成 0.5 cm×0.5 cm 的丛状,接种到增殖培养基上继续增殖。每 30~40 d 继代一次,可连续继代 4 次;到第 5 代时,转回到生长培养基中,恢复其生长势,再开始继代。将长到 1 cm 高的组培苗转入到生根培养基中,生根培养基采用 0.2~0.5 mg·L⁻¹ IBA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+7 g·L⁻¹ 琼脂,

pH 5.4~5.8;培养温度为 22~25℃;光照时间 14 h·d⁻¹。待根系长至 2 cm、植株高 4 cm 以上时,转至移栽环境开盖放置 3 d。移栽基质采用草炭土,拌入 30%的多菌灵(多菌灵:土 1:100),喷洒 73%快螨特乳油 2 000 倍液,覆盖塑料布消毒 3 d。将组培苗洗净根部培养基栽入育苗盘中,育苗盘采用 50 穴,厚度 7 cm 以上。移栽后遮光率不高于 60%、空气湿度不高于 60%、环境温度高于 20℃,移栽成活率可达到 87%。

茎尖接种 20 d 后才开始逐渐转绿,生长加快,40 d 后必须进行继代增殖;否则芽基部开始出现愈伤组织或者极易褐化,降低增殖率。草莓组培苗增殖时,随着 6-BA 使用浓度的增高,丛生芽产生的越多,越快,但芽易开始生长不良,可添加生长激素,促使丛生芽强壮;随着 NAA 浓度的升高,苗生长加快,但增殖阶段应以抑制苗生长、加快丛生芽产生为主,应少量添加。试验中得出,草莓生根对激素较敏感,激素浓度高,基部产生愈

伤组织或者类似愈伤的生长代谢产物,阻碍根的生长,导致移栽成活率下降。

参考文献:

- [1] 成晓华,杜国强,师校欣.甜查理和红颜草莓组培苗根系发育影响因子分析[J].江苏农业科学,2017,45(24):38-40.
- [2] 王晓玲,唐丽萍,范雨,等.红颜草莓茎尖组织培养的器官发生途径研究[J].四川林业科技,2017,38(6):40-44.
- [3] 汤玲,贺欢,孔芬,等.草莓组织培养研究综述[J].甘肃农业科技,2017(9):68-71.
- [4] 李海玲,吴绍魏,王庆莲,等.“紫金四季”草莓组培快繁研究[J].中国南方果树,2017,46(4):131-135.
- [5] 于非.草莓茎尖组织培养快繁体系的建立[J].中国园艺文摘,2017,33(5):13-14,94.
- [6] 金美芳,曹智,蔡俊杰,等.红花草莓的组织培养与快繁研究[J].广西植物,2017,37(11):1395-1405.
- [7] 李晓亮,张军云,张钟,等.草莓茎尖组织培养和快繁体系的建立[J].作物杂志,2016(4):68-74,173.
- [8] 张春芬,潘天任,邓舒,等.草莓茎尖快速繁殖体系的研究[J].山西农业科学,2016,44(3):2.

Establishment of Rapid Propagation System for Tissue Culture of Tongzi No. 1 Strawberry

WANG Yu, GENG Yue-wei, TAN Wei, YU Fei, ZHANG Yu, LIU Bo-wen, LIU Wan-da

(Horticultural Branch of Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences, Harbin 150069, China)

Abstract: In order to improve the speed and quality of strawberry breeding, in this experiment, the stem tip of Tongzi 1 strawberry was used as explants, we studied suitable for growth of medium, effects of plant growth regulator on multiple shoot clumps proliferation, effects of transgenerational days and number on adventitious bud proliferation, the best culture medium and transplanting conditions for tissue culture seedlings. The results showed that the strawberry stem tip germination medium for 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2-0.5 mg·L⁻¹ NAA; Best adventitious bud proliferation culture medium for MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, once 30-40 d, it could be successively relayed for 4 times; The best rooting culture medium for MS+0.2-0.5 mg·L⁻¹ IBA+0.2 mg·L⁻¹ NAA; We transplanted tissue culture seedling, when it grew to 2 cm of root long and 4 cm of plant height; After transplanting shading coefficient was not higher than 60%, humidity of the air was not higher than 60%, environment temperature was above 20℃, transplanting survival rate could reach 85%.

Keywords: strawberry; stem tip; tissue culture; transplant; survival rate