黑龙江农业科学 2023(8):72-77
Heilongjiang Agricultural Sciences
http://hljnykx.haasep.cn
DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2023.08.0072

王禹,牟蕴慧,侯睿宁,等.草莓茎尖组织培养育苗技术的培养基优化[J].黑龙江农业科学,2023(8):72-77.

草莓茎尖组织培养育苗技术的培养基优化

王　禹,牟蕴慧,侯睿宁,刘万达,谭　巍,于　飞
(黑龙江省农业科学院 园艺分院,黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要:草莓茎尖组织培养育苗技术通常采用诱导分化、增殖、生根3种培养基进行培养,工序较为繁琐,为探索出一种既可用于草莓茎尖诱导分化,也可用于增殖、生根培养步骤的通用培养基,进一步简化操作工序,以草莓"红颜"0.3 mm的茎尖为试材,生长激素采用6-BA、TDZ、NAA、IAA、IBA并分别设置5个不同浓度,应用$L_{25}(5^6)$的正交试验,筛选出可用于茎尖诱导分化、增殖、生根培养的通用培养基为MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1},诱导分化率为67.2%,增殖系数为8.5,生根率为95.1%。

关键词:组织培养;育苗;正交试验;培养基优化

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)[1],蔷薇科(Rosaceae)、草莓属(*Fragaria* L.),多年生宿根性草本植物[2],果实味美、营养丰富,被称为"水果皇后"[1-3];栽培生产周期短、结果早、适应性强,是促进农民增收的经济作物[3-4]。草莓规模化繁育脱毒种苗的企业较少[4],生产上栽培的种苗主要采用田间自育的匍匐茎苗[4-6],连续多年的繁殖导致病毒病传播及积累,出现植株矮化、抗病和抗逆性变差、叶片褪绿、子苗繁殖系数降低、果实品质变劣及产量下降等问题,严重影响生产销售和收益[4-6]。解决这些问题的最经济有效的方法是利用草莓茎尖组织培养技术繁育种苗[7],不仅可培育出无病毒植株,还可加快繁殖速度[8]。

朱文勇等[9]采用微尖脱毒后0.5~1.0 cm的草莓茎尖为外植体研究得出,诱导分化培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1};增殖培养基为MS+IBA 0.05~1.00 mg·L^{-1},生根培养基为MS。沈莉等[10]以7个品种的草莓茎尖为外植体研究得出,诱导分化培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+GA_3 0.2 mg·L^{-1};增殖培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+GA_3 0.2 mg·L^{-1};生根培养基为MS+IBA 0.25 mg·L^{-1}。顾建新等[8]以热处理后2 mm的草莓茎尖为外植体研究得出,诱导分化培养基为MS+6-BA 1.5 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1},增殖培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1},之后采用瓶外扦插生根法进行生根。草莓茎尖组织培养育苗技术通常采用诱导分化、增殖、生根3种培养基培养,生产中需频繁配制及接种更换培养基,工序较为繁琐,导致影响其生产效益的切割损伤、接种污染等因素较多。因此本研究利用正交试验对培养基进行优化,以期探索出一种既可用于草莓茎尖诱导分化,也可用于增殖、生根培养的通用培养基,简化操作工序,使草莓组织培养育苗技术更加易于掌握,有利于技术的推广及应用,从而促进草莓脱毒种苗的规模化生产。

1　材料与方法

1.1　材料

供试草莓品种为"红颜",具有生长势旺、产量高、口味佳等优点,适于设施促成栽培,是黑龙江省草莓生产的主要栽植品种之一。试验材料采自于黑龙江省农业科学院园艺分院。采集的试材为长2 cm无病虫害且生长健壮的匍匐茎茎尖。温室采集时间为6月初至9月中旬,田间采集时间为6月末至8月中旬,此时茎尖生长旺盛,接种后易产生增殖芽。

试验药品购自于杭州临安木木生物公司及哈尔滨市香坊区锦续实验用品经销部。

1.2　方法

1.2.1　培养基的制备及工具准备　所有培养基均采用MS+植物激素+琼脂7 g·L^{-1}+白糖25 g·L^{-1},pH5.4~6.0,在0.103 MPa、121 ℃下,湿热灭菌20 min。无菌水、滤纸及接种工具,在0.103 MPa,121 ℃下,湿热灭菌30 min。解剖镜放入超净工作台紫外灭菌30 min。

1.2.2　试验材料处理　将采集的茎尖在流水状态下冲洗30 min,放入超净工作台中,酒精消毒50 s,无菌水冲洗3次;0.1% $HgCl_2$消毒6 min,

收稿日期:2023-03-05
基金项目:黑龙江省农业科学院院级科研项目(2020YYYF044)。
第一作者:王禹(1982-),女,硕士,助理研究员,从事植物组织培养研究。E-mail:liuwanda1982@126.com。

无菌水冲洗 3 次,每次 1 min,之后置于无菌水中。在解剖镜下剥取 0.3 mm 内茎尖,此形态茎尖脱除病毒病效果较好[11-12]。

1.2.3　培养基中各生长激素的正交试验　培养基中生长激素采用 6-BA、TDZ、NAA、IAA、IBA,6-BA 设置 0.1,0.3,0.5,0.7 和 0.9 mg·L^{-1},TDZ 设置 0.1,0.3,0.5,0.7 和 0.9 mg·L^{-1},NAA 设置 0,0.1,0.3,0.5 和 0.7 mg·L^{-1},IAA 设置 0,0.1,0.3,0.5 和 0.7 mg·L^{-1},IBA 设置 0,0.1,0.3,0.5 和 0.7 mg·L^{-1}进行五因素因素五水平的 $L_{25}(5^6)$正交试验[13-16]。具体配比处理组合编号和配比详见表 1。

表 1　$L_{25}(5^6)$正交试验处理激素浓度组合

单位:mg·L^{-1}

处理	6-BA	TDZ	NAA	IAA	IBA
1	0.1	0.1	0	0	0
2	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1
3	0.1	0.5	0.3	0.3	0.3
4	0.1	0.7	0.5	0.5	0.5
5	0.1	0.9	0.7	0.7	0.7
6	0.3	0.1	0.1	0.3	0.5
7	0.3	0.3	0.3	0.5	0.7
8	0.3	0.5	0.5	0.7	0
9	0.3	0.7	0.7	0	0.1
10	0.3	0.9	0	0.1	0.3
11	0.5	0.1	0.3	0.7	0.1
12	0.5	0.3	0.5	0	0.3
13	0.5	0.5	0.7	0.1	0.5
14	0.5	0.7	0	0.3	0.7
15	0.5	0.9	0.1	0.5	0
16	0.7	0.1	0.5	0.1	0.7
17	0.7	0.3	0.7	0.3	0
18	0.7	0.5	0	0.5	0.1
19	0.7	0.7	0.1	0.7	0.3
20	0.7	0.9	0.3	0	0.5
21	0.9	0.1	0.7	0.5	0.3
22	0.9	0.3	0	0.7	0.5
23	0.9	0.5	0.1	0	0.7
24	0.9	0.7	0.3	0.1	0
25	0.9	0.9	0.5	0.3	0.1

每处理组合接种 10 瓶、每瓶接种 3 个试验材料,3 次重复。每隔 30 d 调查 1 次,共调查 3 次。茎尖诱导芽生长状态包括诱导出芽快慢、叶色、长势。丛生芽增殖芽生长状态包括芽增殖生长快慢、叶色、长势。组培苗生长状态包括组培苗生根快慢、叶色、长势。

茎尖诱导率(%)=诱导出芽茎尖数/接种茎尖数×100

丛生芽增殖系数=增殖芽数/接种芽数

组培苗生根率(%)=生根组培苗数/接种组培苗数×100

1.2.4　培养条件　培养温度 21～25 ℃,夜晚不低于 18 ℃,光照强度为 2 500～3 000 lx,光照时长 14 h·d^{-1},相对空气湿度不高于 50%。

1.2.5　数据分析　试验数据采用极差法和方差法进行分析,分析软件为 Excel 2019 和 SPSS 23.0。

2　结果与分析

2.1　各生长激素处理组合的参数统计

茎尖培养过程中,接种后 1～2 d 茎尖变为黑色,15 d 后茎尖逐渐转绿,开始诱导分化出芽。30 d 时诱导分化发生较快的茎尖可形成小增殖团;有一些外植体虽然诱导出芽,但只伸长生长不产生小增殖团;一些诱导发生较慢的茎尖此时才出芽,叶片呈黄绿色,植株生长不良。在培养基上继续培养,增殖生长和伸长生长同时发生,形成较大增殖团同时苗也长高;有些培养基上小增殖团只继续增殖出芽,不进行伸长生长,导致生根较慢。继续培养至 50～60 d 苗高大约 2～3 cm 时,组培苗基部开始分化出白色较粗壮的根,根部生长迅速,20 d 可生长至 4～5 cm,此时苗也迅速生长。

由表 2 可知,处理 2(MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+TDZ 0.3 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1})的培养基表现最佳,诱导分化率为 65.8%,增殖系数为 8.2,生根率为 93.4%。

2.2　采用极差法筛选最佳培养基组合

采用极差法对培养基中各激素处理组合的结果进行分析,从表 3 诱导分化率来看,5 个因素对其影响大小顺序是 6-BA>TDZ>IAA>NAA>IBA,最佳培养基组合为 MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.3 mg·L^{-1}+NAA 0.3 mg·L^{-1}+IAA 0.5 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}。从增殖系数看,5 个因素对其影响大小顺序是 TDZ>6-BA>IBA>IAA>NAA,最佳培养基组合为 MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}。从生根率来看,5 个因素对其影响大小顺序是 6-BA>IBA>TDZ>NAA>IAA,最佳培养基组合为 MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}。筛选出 3 个最佳组合的培养基均未重复,与表 1 中 25 个处理培养基组合均未重复,继续进行对比验证试验。

表2　各生长激素处理组合对草莓茎尖诱导分化、增殖、生根的影响

处理	诱导分化率/%	芽生长状态	增殖系数	芽生长状态	生根率/%	组培苗生长状态
1	17.5±0.6	诱导出芽慢,叶片黄绿色	0.3±0.0	增殖慢,叶片黄绿色	11.2±0.3	生根慢,叶片黄绿色
2	65.8±0.4	诱导出芽快,叶片绿色	8.2±0.2	增殖快,叶片绿色	93.4±0.5	生根快,叶片绿色
3	40.0±0.4	诱导出芽快,叶片绿色	2.6±0.1	增殖慢,叶片绿色	88.7±0.4	生根快,叶片绿色
4	58.3±0.5	诱导出芽快,叶片绿色	1.8±0.2	增殖慢,叶片绿色	62.5±0.2	生根快,叶片绿色
5	2.1±0.1	诱导出芽慢,叶片绿色	0.0±0.0	无增殖芽	0.0±0.0	无根产生
6	42.5±0.4	诱导出芽快,叶片绿色	1.2±0.2	增殖慢,叶片绿色	85.4±0.6	生根快,叶片绿色
7	61.7±0.9	诱导出芽快,叶片绿色	2.1±0.3	增殖慢,叶片绿色	27.7±0.3	生根慢,叶片绿色
8	43.3±0.1	诱导出芽快,叶片绿色	2.5±0.3	增殖慢,叶片绿色	19.3±0.3	生根慢,叶片绿色
9	23.2±0.2	诱导出芽慢,叶片绿色	5.6±0.4	增殖快,叶片绿色	91.3±0.4	生根快,叶片绿色
10	22.5±0.4	诱导出芽慢,叶片绿色	6.7±0.2	增殖快,叶片绿色	92.9±0.1	生根快,叶片绿色
11	48.3±0.3	诱导出芽快,叶片绿色	5.2±0.2	增殖快,叶片绿色	89.1±0.4	生根快,叶片绿色
12	61.7±0.2	诱导出芽快,叶片绿色	6.7±0.2	增殖快,叶片绿色	91.0±0.3	生根快,叶片绿色
13	39.1±0.3	诱导出芽快,叶片绿色	5.1±0.2	增殖快,叶片绿色	76.9±0.5	生根快,叶片绿色
14	29.8±0.5	诱导出芽快,叶片绿色	8.8±0.2	增殖快,叶片绿色	45.8±0.5	生根慢,叶片绿色
15	35.8±0.6	诱导出芽快,叶片绿色	4.5±0.1	增殖快,叶片绿色	32.4±0.4	生根慢,叶片绿色
16	17.1±0.4	诱导出芽慢,叶片黄绿色	0.0±0.0	无增殖芽	0.0±0.0	无根产生
17	28.5±0.6	诱导出芽慢,叶片黄绿色	6.3±0.2	增殖快,叶片黄绿色	19.3±0.1	生根慢,叶片黄色
18	48.8±0.4	诱导出芽慢,叶片黄绿色	8.3±0.1	增殖快,叶片黄绿色	67.8±0.2	生根快,叶片黄绿色
19	18.2±0.5	诱导出芽慢,叶片黄绿色	7.1±0.3	增殖快,叶片黄绿色	92.5±0.4	生根快,叶片黄绿色
20	0.0±0.0	不诱导出芽	0.0±0.0	无增殖芽	0.0±0.0	无根产生
21	0.2±0.1	诱导出芽慢,叶片黄色	0.0±0.0	无增殖芽	0.0±0.0	无根产生
22	6.1±0.2	诱导出芽慢,叶片黄色	0.0±0.0	无增殖芽	0.0±0.0	无根产生
23	0.0±0.0	不诱导出芽	0.0±0.0	无增殖芽	0.0±0.0	无根产生
24	40.8±0.3	诱导出芽快,叶片绿色	8.2±0.2	增殖快,叶片绿色	19.4±0.4	生根慢,叶片绿色
25	0.0±0.0	不诱导出芽	0.0±0.0	无增殖芽	0.0±0.0	无根产生

表3　各生长激素处理组合下草莓茎尖诱导分化率、增殖率、生根率极差分析

极差项	诱导分化率/%					增殖系数					生根率/%				
	6-BA	TDZ	NAA	IAA	IBA	6-BA	TDZ	NAA	IAA	IBA	6-BA	TDZ	NAA	IAA	IBA
K1	36.7	25.1	24.9	20.5	33.2	2.6	1.3	4.8	2.5	4.4	51.2	37.1	43.5	38.7	17.3
K2	38.6	44.8	32.5	37.1	37.2	3.6	4.7	4.2	5.6	5.5	63.3	45.3	60.7	56.5	68.3
K3	42.9	34.2	38.2	28.2	28.5	6.1	3.7	3.6	3.8	4.6	67.0	50.6	45.0	47.8	73.0
K4	22.5	34.0	36.0	41.0	29.2	4.3	6.3	2.2	3.3	1.6	35.9	62.3	34.6	38.1	45.0
K5	9.4	12.0	18.6	23.6	22.1	1.6	2.2	3.4	3.0	2.2	3.9	25.1	37.5	40.2	14.7
R	33.5	32.6	19.5	20.5	15.1	4.4	5.0	2.6	3.1	3.8	63.2	37.2	26.2	18.4	58.3
优选	0.5	0.3	0.3	0.5	0.1	0.5	0.7	0	0.1	0.1	0.5	0.7	0.1	0.1	0.3
方案	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}	mg·L^{-1}

2.3　采用方差法筛选最佳培养基组合

采用方差法对培养基中各激素处理组合的结果进行分析,表4显示各分析项的处理总效应均未达到5%显著水平,不存在主体效应。各激素对诱导分化率、增殖系数影响均未达到5%显著水平,说明6-BA、TDZ、NAA、IAA、IBA对诱导分化率、增殖系数不产生显著影响;5种激素对诱导率影响大小顺序是6-BA>TDZ>IAA>NAA>IBA,对增殖系数影响大小顺序是TDZ>6-BA>IBA>IAA>NAA,均与极差结果分析一致。激素6-BA、IBA对生根率的影响达到5%显著水平,TDZ、NAA、IAA对生根率的影响未达到5%显著水平,说明6-BA、IBA对生根率产生显著影响,TDZ、NAA、IAA对生根率没有显著影响;5种激素对生根率影响大小顺序是IBA>6-BA>TDZ>NAA>IAA,与极差分析结果不一致。因此只对生根率中各浓度梯度进行Duncan′s检验。

表 4　各生长激素处理组合下草莓茎尖诱导分化率、增殖率、生根率方差分析

变异来源	诱导分化率/%				增殖系数				生根率/%			
	平方和	均方	F	P	平方和	均方	F	P	平方和	均方	F	P
修正模型	10303.500	515.176	3.182	0.135	237.528	11.876	2.744	0.169	34664.680	1733.234	4.451	0.079
6-BA	3834.970	958.743	5.922	0.057	57.350	14.338	3.312	0.136	13149.610	3287.402	8.443	0.031*
TDZ	2986.230	746.558	4.611	0.084	76.846	19.212	4.438	0.089	3941.474	985.368	2.531	0.195
NAA	1323.490	330.873	2.044	0.253	19.186	4.797	1.108	0.462	2062.074	515.518	1.324	0.396
IAA	1524.638	381.160	2.354	0.214	29.130	7.283	1.682	0.313	1244.382	311.095	0.799	0.583
IBA	634.186	158.547	0.979	0.508	55.014	13.754	3.177	0.144	14267.142	3566.785	9.160	0.027*
误差	647.626	161.907			17.314	4.329			1557.518	389.379		
总计	33529.210				587.540				85204.740			
修正后总计	10951.142				254.842				36222.198			
因素主次	$S_{6\text{-BA}}>S_{TDZ}>S_{IAA}>S_{NAA}>S_{IBA}$				$S_{TDZ}>S_{6\text{-BA}}>S_{IBA}>S_{IAA}>S_{NAA}$				$S_{IBA}>S_{6\text{-BA}}>S_{TDZ}>S_{NAA}>S_{IAA}$			

注:表中* 表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。

由表 5 可知,6-BA 0.5 mg·L^{-1}处理生根率与 0.1 和 0.3 mg·L^{-1}处理差异不显著,显著高于 0.7 和 0.9 mg·L^{-1},因此 6-BA 可选用 0.1,0.3 和 0.5 mg·L^{-1};IBA 0.3 mg·L^{-1}处理生根率与0.1 mg·L^{-1}差异不显著,显著高于 0,0.5 和 0.7 mg·L^{-1},因此 IBA 可选用 0.1 和 0.3 mg·L^{-1}。TDZ、NAA、IAA 各浓度处理对生根率影响均不显著,且对诱导率影响也不显著。因此 TDZ、NAA、IAA 选用生根率平均值最高的浓度即可,即 TDZ 0.7 mg·L^{-1}、NAA 0.1 mg·L^{-1}、IAA 0.1 mg·L^{-1}。培养基最佳组合为 MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}、MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}、MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}、MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}(与表 3 最优组合相同)、MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}、MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1},继续进行对比验证。

表 5　生根培养基中 5 种激素 5 个水平下的生根率 Duncan's 检验

6-BA		TDZ		NAA		IAA		IBA	
浓度/(mg·L^{-1})	生根率/%	浓度/(mg·L^{-1})	生根率/%	浓度/(mg·L^{-1})	生根率/%	浓度/(mg·L^{-1})	生根率/%	浓度/(mg·L^{-1})	生根率/%
0.1	51.2 a	0.1	37.1 a	0	43.5 a	0	38.7 a	0	20.3 b
0.3	63.3 a	0.3	46.3 a	0.1	60.7 a	0.1	56.5 a	0.1	68.3 a
0.5	67.0 a	0.5	50.5 a	0.3	45.0 a	0.3	47.8 a	0.3	73.0 a
0.7	35.9 b	0.7	62.3 a	0.5	34.6 a	0.5	38.1 a	0.5	45.0 b
0.9	33.9 b	0.9	25.1 a	0.7	37.5 a	0.7	40.2 a	0.7	14.7 b

2.4　各最佳培养基组合对比试验

将正交试验、极差分析和方差分析得出的最佳组合培养基进行对比验证,每处理组合接种 10 瓶,每瓶接种 3 个试验材料,试验重复 3 次。由表 6 可知,"红颜"在 MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}和 MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}培养基上增殖系数达到了 8.9,但植株生长不健壮、叶片呈黄绿色,且生根率和茎尖诱导分化率较低。在 MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.3 mg·L^{-1}+NAA 0.3 mg·L^{-1}+IAA 0.5 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}培养基上茎尖诱导分化率最高,达到了 68.2%,且植株长势健壮,但生根率和增殖系数低于 MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}培养基。

综合各因素,以 MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}培养效果最好,"红颜"茎尖诱导分化率为 67.2%,增殖系数达到 8.5,生根率为 95.1%。

表6　优异培养基接种'红颜'草莓茎尖诱导分化及组培苗生长状态差异分析

优异培养基	分化率/%	芽生长状态	增殖系数	芽生长状态	生根率/%	组培苗生长状态
MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+TDZ 0.3 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}	65.8±0.4	诱导出芽快，叶片绿色	8.2±0.2	增殖快，叶片绿色	93.4±0.3	生根快，叶片绿色
MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.3 mg·L^{-1}+NAA 0.3 mg·L^{-1}+IAA 0.5 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}	68.2±0.3	诱导出芽快，叶片绿色	8.1±0.2	增殖快，叶片绿色	94.8±0.3	生根快，叶片绿色
MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}	53.7±0.2	诱导出芽快，叶片绿色	8.9±0.1	增殖快，叶片黄绿色	87.6±0.2	生根快，叶片黄绿色
MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}	67.2±0.3	诱导出芽快，叶片绿色	8.5±0.2	增殖快，叶片绿色	95.1±0.2	生根快，叶片绿色
MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}	66.9±0.3	诱导出芽快，叶片绿色	8.9±0.2	增殖快，叶片绿色	88.4±0.2	生根快，叶片绿色
MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}	65.3±0.2	诱导出芽快，叶片绿色	8.5±0.3	增殖快，叶片绿色	92.7±0.2	生根快，叶片绿色
MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}	66.5±0.1	诱导出芽快，叶片绿色	8.4±0.3	增殖快，叶片绿色	91.6±0.3	生根快，叶片绿色
MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}	54.9±0.1	诱导出芽快，叶片黄绿色	8.6±0.2	增殖快，叶片绿色	87.9±0.4	生根快，叶片绿色
MS+6-BA 0.5mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}	42.9±0.1	诱导出芽快，叶片黄绿色	8.9±0.3	增殖快，叶片黄绿色	78.6±0.3	生根快，叶片黄绿色

3　讨论

生长素可影响茎和节间的伸长、向性、顶端优势和生根等现象，组织培养中生长素被用于促进细胞的分裂和生长以及根的分化，发生作用时和外植体的种类和激素的种类、浓度以及相互间的配比有关[17-18]。试验结果显示6-BA在0.1～0.5 mg·L^{-1}范围内，随着浓度升高诱导分化率、增殖率、生根率均升高，当6-BA浓度为0.7 mg·L^{-1}时诱导分化率、增殖率、生根率开始下降，其他激素亦如此。由此得出培养基添加不同种类激素均促进诱导分化、增殖、生根的发生，并在一定范围内随着激素浓度升高诱导分化率、增殖率、生根率呈上升趋势；但激素浓度高则对诱导分化、增殖、生根的发生有抑制作用。每种激素在茎尖诱导分化、增殖、生根的不同生长时期影响主次不同，5种激素对诱导率影响大小顺序是6-BA＞TDZ＞IAA＞NAA＞IBA，对增殖系数影响大小顺序是TDZ＞6-BA＞IBA＞IAA＞NAA。方差分析中对生根率影响大小顺序是6-BA＞IBA＞TDZ＞NAA＞IAA，与极差分析6-BA＞IBA＞TDZ＞NAA＞IAA结果不一致，推测IBA需与6-BA互作才能促进根的发生，所以6-BA、IBA的主次作用不明显。

多级培养时每一种培养基有自己的作用，需要先诱导出分化出芽，然后再转接诱导增殖团，再进行伸长生长并诱导生根。通用培养基的不同之处是培养基既要诱导出芽，又要可以增殖，还要可以促进生根，因此要综合考虑茎尖诱导分化率、增殖系数、生根率及组培苗生长势等多项指标，以筛选出来最适合的培养基[19-20]。如"红颜"在MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0 mg·L^{-1}+IAA 0.3 mg·L^{-1}+IBA 0.7 mg·L^{-1}培养基上增殖系数虽然达到了8.8，但诱导率和生根率仅为29.8%和45.8%；在MS+6-BA 0.5 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}培养基上增殖系数达到了8.9，但植株生长不健壮、叶片呈黄绿色；在MS+6-BA 0.1 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.1 mg·L^{-1}诱导分化率66.9%，增殖系数达到了8.9，且植株生长健壮，但生根率较低，仅为88.4%，生根率是

衡量组培苗能否移栽的关键。因此这些培养基均不能选用。最终筛选出的优化培养基为 MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}。又将此培养基应用于草莓品种“章姬”“安娜”等种苗繁育,结果表明草莓茎尖诱导分化率均达到 65%以上,增殖系数 8.5 以上,生根率 95%以上,且植株长势良好。

由于茎尖在瓶内成苗需要约 80～90 d 的时间,时间较长,可在 30 d 或 50 d 时更换 1 次培养基,为外植体补充养分,使其更好地生长。该培养基可再继续进行优化,探讨如何缩短瓶内生长时间,使该技术操作更加简便,赵春莉等[21]应用响应面法优化软枣猕猴桃的培养基将培育时间从 80 d 缩短至 50 d,实现了软枣猕猴桃一步成苗。

4　结论

培养基添加不同种类激素可促进诱导分化、增殖、生根的发生,但激素浓度过高则对诱导分化、增殖、生根有抑制作用,且各激素之间有互作作用。草莓“红颜”茎尖组织培养优化后的培养基为 MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1},诱导分化率 67.2%,增殖系数 8.5,生根率 95.1%,茎尖诱导分化、增殖、生根培养可通用。

参考文献:

[1] 刘国霞,张全芳,杨雪,等.八倍体草莓 DNA 指纹图谱的构建与初步遗传分析[J].中国农业大学学报,2023,28(2):35-42.

[2] 张学明,陈玉波,姚环宇,等.公主岭设施草莓品种引种试验[J/OL].东北农业科学:1-7[2023-01-10].http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1376.S.20221226.1752.005.html.

[3] 苏代发,代庆忠,严聪文,等.草莓根腐病及其生物防治研究进展[J].江苏农业科学,2022,50(24):16-26.

[4] 李亮杰,楚宗丽,张惠妹,等.河南省草莓生产现状调查、经济效益分析及发展建议[J].中国果树,2022(7):91-96.

[5] 汤玲,贺欢,孔芬,等.甘肃省草莓产业发展现状及建议[J].甘肃农业科技,2017(12):86-89.

[6] 王琼,宗静,马欣.北京市草莓种苗生产现状及对策[J].中国园艺文摘,2017,33(5):49,81.

[7] 沈莉,曹玉梅.7 个品种草莓茎尖组培脱毒苗技术研究[J].青海农林科技,2022(2):96-100.

[8] 顾建新,李芳艳,王蓉,等.草莓组培工厂化育苗大规模生产技术[J].新疆农业科学,2008(S1):131-133.

[9] 朱文勇,赵玉军,郭黄萍,等.无毒草莓组织培养工厂化快速育苗技术研究[J].山西果树,1995(1):21-22.

[10] 沈莉,曹玉梅.7 个品种草莓茎尖组培脱毒苗技术研究[J].青海农林科技,2022(2):96-100.

[11] 邓渊.两个草莓品种茎尖脱毒快繁体系的建立[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2018.

[12] 陈洁,张晓霖,陈燕.草莓生物技术研究进展[J].江西农业,2017(9):100-102.

[13] 杜尚广,余波.木薯的组织培养与快繁体系建立[J].分子植物育种,2020,18(23):7847-7853.

[14] 陶兴魁,高贵珍,张兴桃,等.正交实验在蓝莓组培培养基筛选过程中的应用[J].安徽工程大学学报,2019,34(2):1-5,50.

[15] 白俊峰.用正交实验探究不同激素浓度组合对地被菊花序轴组织培养的影响[J].生物学通报,2018,53(5):47-49.

[16] 邓成军,张少华,巴音克西克,等.正交实验在红枣组培快繁中的应用[J].新疆林业,2003(5):35-36.

[17] 李彦连,张华丽,赵强,等.芡实组培一步成苗技术研究[J].北方园艺,2015(16):107-111.

[18] 梁晖辉.铁皮石斛工厂化育苗技术体系优化研究[D].南京:南京农业大学,2019.

[19] 闫学彤,郑珂媛,王可佳,等.八仙花一步成苗离体培养方法[J].植物生理学报,2022,58(6):1153-1160.

[20] 李先良,李居宁,彭春雷,等.荆半夏叶柄一步成苗组培快繁体系的优化[J].江苏农业科学,2017,45(12):42-44.

[21] 赵春莉,姚思扬,王嫚,等.应用响应面法优化软枣猕猴桃的一步成苗培养基[J].江苏农业科学,2019,47(19):61-64.

Optimization for Tissue Culture Cultivated Seedling Technology of Strawberry Stem Tip

WANG Yu, MU Yunhui, HOU Ruining, LIU Wanda, TAN Wei, YU Fei

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

Abstract: Strawberry stem tip tissue culture and seedling cultivation techniques usually use three types of culture media of induction differentiation, proliferation, and rooting, and the process is relatively complicated. In order to explore a universal culture medium that can be used for both strawberry stem tip induction differentiation, proliferation, and rooting cultivation steps, and further simplify the operation process, the 0.3 mm stem tips of strawberry 'Red Face' were used as test material, and growth hormones were used with 6-BA, TDZ, NAA, IAA and IBA at five different concentrations, and the orthogonal experiment of $L_{25}(5^6)$ was applied. The general culture medium for inducing differentiation, proliferation, and rooting culture of stem tips was selected as MS+6-BA 0.3 mg·L^{-1}+TDZ 0.7 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}+IAA 0.1 mg·L^{-1}+IBA 0.3 mg·L^{-1}. The induced differentiation rate was 67.2%, the value added coefficient was 8.5, and the rooting rate was 95.1%.

Keywords: tissue culture; cultivated seedling; orthogonal experimentt; medium optimization