

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201706026

引文格式: 张爱丽, 王元忠, 黄衡宇, 等. ‘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, 38(4):482-491
ZHANG AL, WANG YZ, HUANG HY, et al. Efficient callus induction and high-frequency regeneration system establishment of strawberry ‘Akihime’ [J]. *Guihaia*, 2018, 38(4):482-491

‘章姬’草莓茎段愈伤组织诱导及 高频植株再生体系的建立

张爱丽¹, 王元忠^{2,3}, 黄衡宇^{1,3*}, 李继祥³, 马利娟¹

(1. 云南中医学院 云南省道地濒危中药材与栽培工程技术研究中心, 昆明 650500; 2. 云南农业科学院
药用植物研究所, 昆明 650200; 3. 云南省玉溪市祥馨农产品种植基地, 云南 玉溪 653100)

摘要: 该研究以‘章姬’脱毒苗带节匍匐茎段为外植体, 以 MS 为基本培养基, 进行单因素预实验, 选取适合‘章姬’草莓生长的植物激素种类和质量浓度范围, 进而通过 $L_9(3^4)$ 正交实验研究不同植物激素种类及其质量浓度对愈伤组织诱导、丛芽发生及植株再生的影响。结果表明: 采用的 3 种基本培养基中, B_5 和 1/2MS 对抑制培养过程中的褐化现象明显优于 MS, 而附加 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 在保证材料存活的前提下, 大大降低了褐化率; 去除褐化的材料在 $\text{MS} + 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 中可同步进行愈伤组织诱导和丛芽发生; 丛芽增殖培养基为 $\text{MS} + 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$, 30 d 后繁殖系数可达 12.86; 试管苗生根则在 $1/2\text{MS} + 1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{AC}$ 中进行, 35 d 后可获得生长健壮的再生植株, 生根率 92.50%。再生苗移栽成活率在 95% 以上。该研究建立了‘章姬’草莓体外高效快速繁殖体系, 对短期内为‘章姬’草莓栽培提供大量种性稳定、质量优良的种苗具有重要意义, 同时为其他草莓品种的体外快繁提供了技术参考。

关键词: ‘章姬’草莓, 匍匐茎, 正交实验, 褐化, 繁殖系数

中图分类号: Q943.1, R282.21 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)04-0482-10

Efficient callus induction and high-frequency regeneration system establishment of strawberry ‘Akihime’

ZHANG Aili¹, WANG Yuanzhong^{2,3}, HUANG Hengyu^{1,3*}, LI Jixiang³, MA Lijuan¹

(1. Yunnan Breeding and Cultivation Research and Development Center of Endangered and Daodi Chinese Medicinal Materials, Kunming 650500, China; 2. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China; 3. Yuxi Xiangxin Agricultural Plantation, Yuxi 653100, Yunnan, China)

Abstract: In order to cultivate an improved variety with higher potential yield and establish an efficient *in vitro* regeneration system of strawberry ‘Akihime’ (*Fragaria × ananassa*), callus induction and plant regeneration protocol was designed for solve browning problem. A formal $L_9(3^4)$ orthogonal experiment was designed to investigate the browning research in pri-

收稿日期: 2017-09-08

基金项目: 国家自然科学基金(31260077); 云南省教育厅重点项目(2015119) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260077); Educational Commission of Yunnan Province(2015119)]。

作者简介: 张爱丽(1986-), 女, 四川成都人, 博士, 讲师, 主要研究方向为药用植物资源开发与利用, (E-mail) zhangailibb@126.com。

*通信作者: 黄衡宇, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为植物发育生物学, (E-mail) hhyhhy96@163.com。

mary culture using explants of creeping stems excised from aseptic seedlings. Based on the improved medium above, single-factor experiments were conducted to select effective plant growth regulators and appropriate concentrations on blank MS medium. A $L_9(3^4)$ orthogonal experiment was designed to study effects of types and concentrations of plant growth regulators on callus induction, adventitious shoot formation, and plant regeneration. The results indicated that MS medium was inferior to B_5 and $1/2MS$ in inhibiting browning condition. The browning rate was dramatically reduced while the callus still survived on the medium with the addition of $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. The callus induction and shoot formation of the explants were observed on $MS + 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2, 4\text{-D} + 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ with effective inhibiting browning. The optimal medium protocol for multiple shoots proliferation was $MS + 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ where the proliferation coefficient was 12.86 after 30 d. Healthily regenerated plants were yielded on culture medium $1/2MS + 1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{AC}$ after 35 d, with a rooting rate of 92.50%. More than 95% of plantlets survived after transplanting into field. The rapid propagation system is helpful to provide homogeneous progeny and high quality seedlings for cultivation of strawberry ‘Akihime’ as well as a technical reference for other strawberry species *in vitro* regeneration.

Key words: strawberry ‘Akihime’, creeping stem, orthogonal test, browning, propagation coefficient

草莓 (*Fragaria* × *ananassa*) 为蔷薇科 (*Rosaceae*) 草莓属 (*Fragaria*) 多年生草本植物, 在园艺学上属于浆果类果树 (雷庆等, 2011), 现世界各地均有栽培 (李邵等, 2014)。目前, 公认草莓属 20 个种分属 5 个不同的染色体倍性类型 ($x=7$), 即 10 种二倍体, 4 种四倍体, 1 种五倍体, 1 种六倍体和 4 种八倍体 (陈丙义等, 2012; 周历萍等, 2015), 栽培种则为 8 倍体 ($2n=8x=56$) (陈丙义等, 2012; 周历萍等, 2015)。草莓是果树中鲜果上市最早的水果, 素有“早春第一果”的美称, 其果实鲜美、营养丰富, 果肉中含有大量的糖类、有机酸、果胶、鞣花酸和花色苷等物质而深受人们喜爱 (Wang & Millner, 2009; Josuttis et al, 2010)。我国草莓自然分布有 11 个种, 约占世界草莓属植物 20 个种的一半, 是世界野生草莓种类最丰富的国家 (陈丙义等, 2012)。草莓以无性繁殖为主, 而长期无性繁殖容易造成病毒在草莓植株体内积累, 表现为植株矮化变形, 畸形果比例增加, 且有花叶、黄边、斑驳等多种症状, 致使草莓种性退化, 产量逐年降低 (金美芳等, 2017; 廖咏梅等, 2006)。利用组织培养技术进行脱毒、快速繁殖是解决草莓这些问题的有效途径。国外对草莓的组织培养在 20 世纪七八十年代的报道较多 (Adams, 1972; Boxus, 1974)。我国的草莓组织培养研究始于 20 世纪 80 年代末, 到目前为止在茎尖脱毒培养、叶片培养、茎段培养、花药培养等方面的研究报道亦有不少

(廖咏梅等, 2006; 马崇坚和廖佩颖, 2007; 朱海生等, 2007; 王翡等, 2010)。尽管对草莓的研究已有很多, 但在消除褐化影响、繁殖系数和周期、移栽成活率及较高成本方面仍存在问题, 使得脱毒组培苗的整体应用仍处于较低水平。

‘章姬’草莓是日本育成的早熟品种, 为云南省主要栽培品种, 该品种生长势旺盛、果形美观、口感佳、风味好, 且抗逆性强。金真等 (2015) 通过对 ‘章姬’ 草莓茎尖进行不同培养基和外源激素的组合处理, 建立了高效的 ‘章姬’ 草莓茎尖组培快繁体系。肖君泽等 (2011) 采用花药组织培养法, 进行了 ‘章姬’ 草莓脱毒苗的快速繁殖。但还未见有关采用带节匍匐茎段作为外植体进行 ‘章姬’ 草莓快繁的报道。本课题组在研究的前期预实验中发现, ‘章姬’ 草莓脱毒苗带节匍匐的茎段, 具有很强的脱分化能力。鉴于此, 本研究以 ‘章姬’ 草莓脱毒苗带节匍匐茎段为外植体, 通过正交实验建立其高效的体外再生体系, 对在短期内为 ‘章姬’ 草莓推广栽培提供大量性状稳定、质量优良的种苗具有重要意义和价值, 同时也可为其他草莓品种的体外快繁提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

材料由云南省玉溪市祥馨农产品种植基地提

供的‘章姬’(Akihime)脱毒苗,2014年5月选取生长健壮、无病虫害、当年生匍匐茎第一节部分为外植体。外植体按地皮消(吕美萍等,2016)的方法进行处理,备用。

1.2 方法

1.2.1 培养基 参照李鹞等(2015)的配置方法。基本培养基:MS,B₅,1/2MS,根据需要附加不同种类及质量浓度植物激素,蔗糖添加量 MS 为 3%,B₅ 为 2%;琼脂 0.46%,pH 值为 5.8~6.0。培养基在 121 ℃ 灭菌 22 min 备用。

抑制褐化培养基:采用 L₉(3⁴) 正交实验,因素分别为基本培养基、Na₂S₂O₃、VC,其组合见表 1。所有组合均附加 1.0 g · L⁻¹ AC,7 d 转接,转接 3 次后,统计外植体存活率。单因素预实验培养基:单独添加不同种类及不同质量浓度植物激素的 MS 培养基进行单因素预实验,其中 6-BA 和 2,4-D 质量浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mg · L⁻¹; NAA 和 IBA 质量浓度为 0.05、0.1、0.5、1.0、1.5 mg · L⁻¹,20 d 后观察各实验组生长情况,筛选出适宜的植物激素种类及其质量浓度范围。愈伤组织诱导、丛芽发生和增殖培养基:根据单因素预实验结果,采用 L₉(3⁴) 正交试验,因素分别为植物激素 6-BA、2,4-D、NAA,其组合见表 2。培养 30 d 后,统计愈伤组织诱导率、丛芽发生率和繁殖系数。生根培养基:选取长约 3~4 cm、长势基本一致的不定芽,接种于附加 1.0 g · L⁻¹ AC、且分别添加 0、0.1、0.5、1.0 mg · L⁻¹ NAA 的 1/2MS 培养基中进行生根诱导。35 d 后统计生根率和根粗壮度。

表 1 抑制褐化 L₉(3⁴) 正交设计
Table 1 L₉(3⁴) orthogonal design for inhibiting browning

水平 Level	因素 Factor		
	A 基本培养基 Basic medium	B Na ₂ S ₂ O ₃ (g · L ⁻¹)	C VC (mg · L ⁻¹)
1	MS	20	20
2	B ₅	30	30
3	1/2MS	50	50

表 2 愈伤组织诱导与芽丛发生 L₉(3⁴) 正交设计
Table 2 L₉(3⁴) orthogonal design for callus induction and adventitious occurrence

水平 Level	因素 Factor		
	A 6-BA (mg · L ⁻¹)	B 2,4-D (mg · L ⁻¹)	C NAA (mg · L ⁻¹)
1	0.1	0.01	0.05
2	0.5	0.05	0.1
3	1.0	0.1	0.5

1.2.2 培养条件 参照李鹞等(2015)中的培养条件。培养室温度控制在(22±1)℃,光照度1 500~2 000 lx,光照时间 10 h · d⁻¹。

1.2.3 炼苗移栽 炼苗移栽参考文献(吕美萍等,2016)中所使用的方法。待幼苗长至约 6 cm 高时,将生根瓶置于室温下炼苗 3 d 后,从培养基中取出幼苗,将残留培养基清洗干净,移栽至消毒后的沙土基质中保温保湿培养,30 d 后统计幼苗成活率及生长状况。

1.2.4 统计指标 统计外植体存活率(%)、愈伤组织诱导率(%)、丛芽发生率(%)、丛芽增殖系数、增殖系数、生根率(%)等指标,参照李鹞等(2015)的计算方法。所得数据利用 Excel 和 SPSS(19.0)软件进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 启动培养中的褐化现象及改善措施

‘章姬’草莓接种后 3 d 即出现褐化现象(图 1:A),7 d 后褐化加剧,材料逐渐死亡(图 1:B)。抑制褐化正交实验结果见表 3,方差分析见表 4。

表 3 极差分析显示,基本培养基类型是抑制褐化、保障培养材料存活的关键因素;其次是 Na₂S₂O₃,这两个因素的极差值均远大于空白对照(3.16),而 VC 的极差值(1.84)小于空白对照(3.16)。表 4 进一步验证了基本培养基类型和 Na₂S₂O₃对‘章姬’草莓茎段培养在抑制褐化、保证材料存活率方面具显著性差异(P<0.05),VC 则无显著性差异(P>0.05)。通过平均值分析,降低褐

表 3 抑制褐化 $L_9(3^4)$ 正交实验结果
Table 3 Results of inhibiting browning
by $L_9(3^4)$ orthogonal test

因素 Factors				外植体 存活率 Survival rate of explant (%)
A 基本培养基 Basic medium	B $Na_2S_2O_3$ ($g \cdot L^{-1}$)	C VC ($mg \cdot L^{-1}$)	D 误差 Error	
MS	20	20	(1)	16.37
MS	30	30	(2)	9.56
MS	50	50	(3)	5.67
B_5	20	30	(3)	88.38
B_5	30	50	(1)	80.45
B_5	50	20	(2)	71.63
1/2MS	20	50	(2)	86.67
1/2MS	30	20	(3)	81.58
1/2MS	50	30	(1)	69.34
K_1	10.53	63.81	56.53	55.39
K_2	80.15	57.19	55.76	55.95
K_3	79.19	48.88	57.59	58.54
R	69.62	14.93	1.84	3.16

表 4 抑制褐化外植体存活率方差分析结果
Table 4 Variance analysis of survival rate of
explants through inhibiting browning

源 Source	Ⅲ 型平方和 Sum of Type Ⅲ square	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Significance
A (培养基 Medium)	9 562.51	2	4 781.26	562.71	$P < 0.05$
B ($Na_2S_2O_3$)	335.66	2	167.83	19.75	$P < 0.05$
C (VC)	5.11	2	2.55	0.30	$P > 0.05$
误差 Error	16.99	2	8.49		

化、提高培养材料存活率的最佳组合为 A_2B_1 , 即 $B_5 + 20 g \cdot L^{-1} Na_2S_2O_3$ 。外植体材料经消毒处理, 转入 $B_5 + 20 g \cdot L^{-1} Na_2S_2O_3 + 1.0 g \cdot L^{-1} AC$ 后, 间隔 7 d 进行一次转接, 3 次后褐化现象得到明显改善(图 1:C), 且可以保持外植体活力(图 1:D)。

2.2 单因素预实验和植物激素种类的选择

单因素实验结果表明, 6-BA 和 2,4-D 均能促进外植体基部产生愈伤组织, 尤以 $0.5 \sim 1.0 mg \cdot L^{-1}$ 6-BA 和 $0.05 \sim 0.1 mg \cdot L^{-1}$ 2,4-D 为好。NAA 和 IBA 作用类似, 均有利于外植体节上不定根和

叶片的萌发。

2.3 愈伤组织诱导、丛芽发生与芽增殖培养

以 6-BA、2,4-D 和 NAA 为因素, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 20 d 后其愈伤组织诱导率和丛芽发生率的极差分析结果如表 5 所示。表 5 结果显示, 6-BA 为‘章姬’草莓茎段愈伤组织诱导最主要的影响因子, 其次为 2,4-D 和 NAA; 3 个因子的极差值均大于空白列(1.13), 表明在愈伤组织诱导上这 3 个因素的效应是可靠的。方差分析(表 6)表明, 6-BA 和 2,4-D 对诱导愈伤组织有显著影响($P < 0.05$), NAA 则无显著影响($P > 0.05$)。对 6-BA 和 2,4-D 3 个水平的 Duncan 检验(表 7、8)表明, 6-BA 在水平 1($0.1 mg \cdot L^{-1}$) 上对愈伤组织诱导率影响最大, 与水平 2、3 均具显著性差异, 其均值明显高于这两个水平; 而 2,4-D 则在水平 2($0.05 mg \cdot L^{-1}$) 上对愈伤组织诱导率影响最大, 与水平 1、3 均具显著性差异, 均值亦明显高于这两个水平。由平均值分析可知, ‘章姬’草莓茎段愈伤组织诱导的最佳激素组合为 $A_1B_2C_2$, 即 $0.1 mg \cdot L^{-1}$ 6-BA + $0.05 mg \cdot L^{-1}$ 2,4-D + $0.1 mg \cdot L^{-1}$ NAA。

表 5 显示, 对于丛芽发生 6-BA 亦为最主要的影响因子。3 个因素对丛芽发生率影响大小依次为 6-BA>NAA>2,4-D, 由 K 值大小可以看出, 各因素不同水平对丛芽发生率影响大小的主次顺序分别为 $A_1 > A_2 > A_3$, $B_2 > B_1 > B_3$, $C_2 > C_3 > C_1$; 6-BA 和 NAA 极差均大于空白列(6.66), 说明这两个因素的效应可靠, 而 2,4-D 极差小于空白列, 说明其在丛芽发生率上的效应不可靠。表 9 显示, 6-BA 和 NAA 对丛芽发生具显著性影响($P < 0.05$), 2,4-D 则无显著影响($P > 0.05$)。表 10 和表 11 表明, 6-BA 在水平 1、2($0.1 \sim 0.5 mg \cdot L^{-1}$) 上对丛芽发生率影响最大, 与水平 3 均具显著性差异; 而 NAA 则在水平 2($0.1 mg \cdot L^{-1}$) 上对丛芽发生率影响最大, 与水平 1、3 均具显著性差异, 均值亦明显高于这两个水平。由平均值分析可知, ‘章姬’草莓茎段愈伤组织诱导丛芽发生的最佳激素组合为 A_1C_2 , 即 $0.1 mg \cdot L^{-1}$ 6-BA + $0.1 mg \cdot L^{-1}$ NAA。

将启动培养消除褐化后的带节茎段接入 MS + 6-BA $0.1 mg \cdot L^{-1}$ + $0.05 mg \cdot L^{-1}$ 2,4-D + $0.1 mg \cdot$

表 5 愈伤组织诱导与丛芽发生 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 5 Results of callus induction and adventitious shoots occurrence by $L_9(3^4)$ orthogonal test

编号 Code	植物激素 Plant hormone (mg · L ⁻¹)				愈伤诱导率 Rate of callus induction rate (%)	芽丛发生率 Rate of buds induction (%)
	A (6-BA)	B (2,4-D)	C (NAA)	D (Error)		
C 1	0.1	0.01	0.05	(1)	86.45	75.36
C 2	0.1	0.05	0.1	(2)	98.87	100.00
C 3	0.1	0.1	0.5	(3)	82.33	77.65
C 4	0.5	0.01	0.1	(3)	76.68	88.36
C 5	0.5	0.05	0.5	(1)	82.57	62.38
C 6	0.5	0.1	0.05	(2)	68.65	51.76
C 7	1.0	0.01	0.5	(2)	53.93	33.21
C 8	1.0	0.05	0.05	(3)	62.85	38.93
C 9	1.0	0.1	0.1	(1)	49.44	56.55
愈伤组织诱导 Callus induction	K_1	89.22	72.35	72.65	72.82	
	K_2	75.97	81.43	74.99	73.82	
	K_3	55.41	66.81	72.94	73.95	
	R_1	33.81	14.62	2.35	1.13	
丛芽诱导 Buds induction	K_1	84.34	65.64	55.35	64.76	
	K_2	67.50	67.10	81.64	61.66	
	K_3	42.89	61.99	57.75	68.31	
	R_2	41.44	5.12	26.29	6.66	

表 6 愈伤组织诱导方差分析结果

Table 6 Variance analysis of callus induction

源 Source	Ⅲ 型平方和 Sum of Type Ⅲ square	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	显著性 Significance
A(6-BA)	1 741.39	2	870.69	758.29	$P<0.05$
B(2,4-D)	326.99	2	163.49	142.39	$P<0.05$
C(NAA)	9.81	2	4.91	4.27	$P>0.05$
误差 Error	2.29	2	1.148		

表 7 6-BA 3 水平 Duncan 检验

Table 7 Duncan's test for three levels of 6-BA

水平 Level	均值 $\bar{x}$	0.05 水平 0.05 level
3	55.41	c
2	75.97	b
1	89.22	a

注：同列不同小写字母表示差异性显著 ($P<0.05$)。下同。
Note: Different lower letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

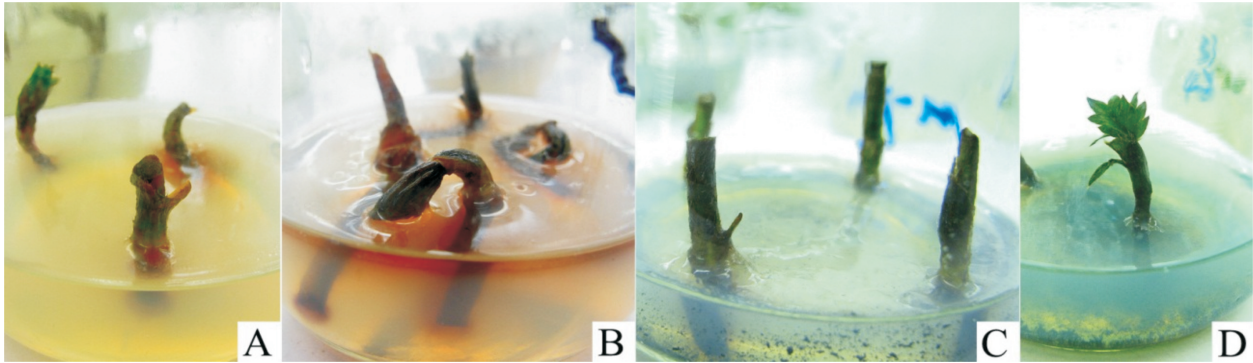
L^1 NAA 中,5 d 后在其节部和基部出现愈伤组织,得愈率为 98.87%;10 d 后愈伤组织增殖迅速,其表面开始出现绿色芽点(图 2:A);15 d 后分化出不定芽丛(图 2:B),丛芽分化率 100%;20 d 后丛芽分化率可达 6.32(图 2:C,D)。

将愈伤组织诱导出的不定丛芽分割为 2~3 株一丛(图 3:A),转接至 $MS + 0.1\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 6-BA +

$0.1\text{ mg} \cdot L^{-1}$ NAA 中,在愈伤组织增殖、芽丛生长为丛芽的同时,新的芽点不断出现,培养 15 d 后丛芽大量繁殖(图 3:B,C);30 d 后可获得生长健壮的试管苗,其不定芽发生系数可达 12.86(图 3:D)。

2.4 生根培养和炼苗移栽

瓶内生根结果显示在 $1/2MS$ 培养基中加入活性炭有利于不定根的诱导,而添加生长素 NAA 则

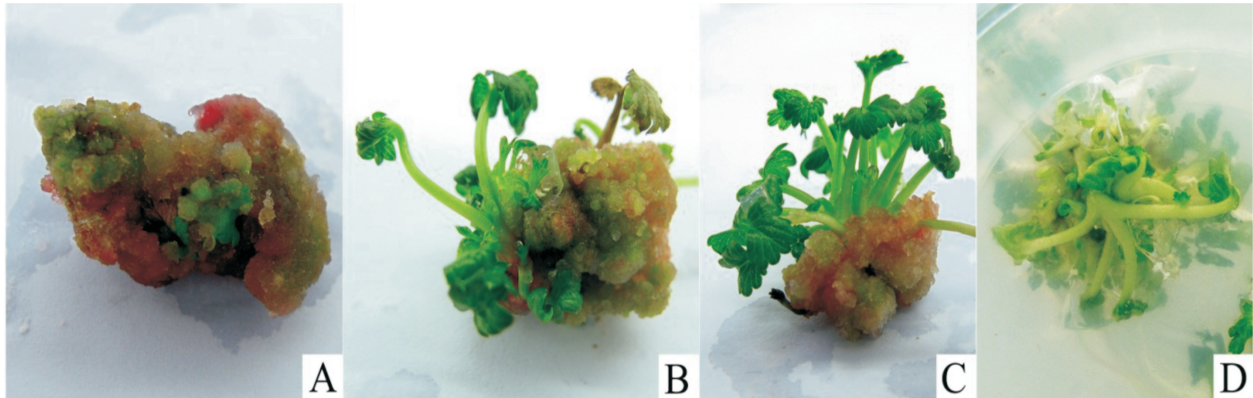


注：A. 3 d 后即出现褐化现象；B. 7 d 后褐化加剧,材料逐渐死亡；C. 外植体在 $B_5 + 20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{AC}$ 转接 3 次后的情况；D. 有活力的外植体,其节上叶片开始生长。

Note: A. Browning after 3 d; B. Browning intensified and material gradually died after 7 d; C. Results of explants on $B_5 + 20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{AC}$ after transferring 3 times; D. Dynamic explant with leaves beginning to grow.

图 1 褐化现象及其控制

Fig. 1 Browning phenomenon and its control



注：A. 培养 10 d 后愈伤增殖迅速,表面开始分化出绿色芽点；B. 15 d 后的不定芽丛；C, D. 20 d 后的芽丛。

Note: A. Callus propagating rapidly and differentiating green bud points after 3 d; B. Adventitious shoots after 15 d; C, D. Adventitious shoots after 20 d.

图 2 愈伤组织诱导和丛芽发生

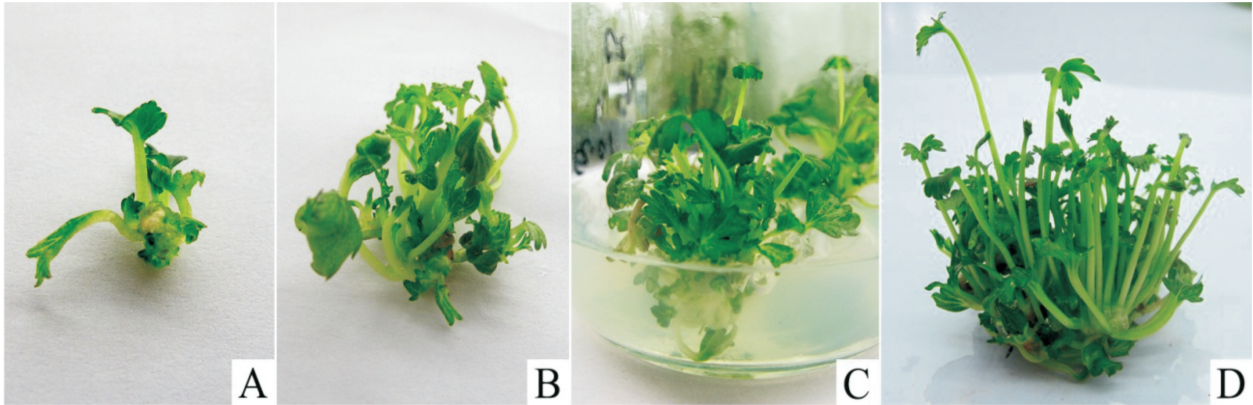
Fig. 2 Callus induction and adventitious shoots occurrence

表 8 2,4-D 3 水平 Duncan 检验

Table 8 Duncan's test in three levels of 2,4-D		
水平 Level	均值 $\bar{x}$	0.05 水平 0.05 level
3	66.81	c
1	72.35	b
2	81.43	a

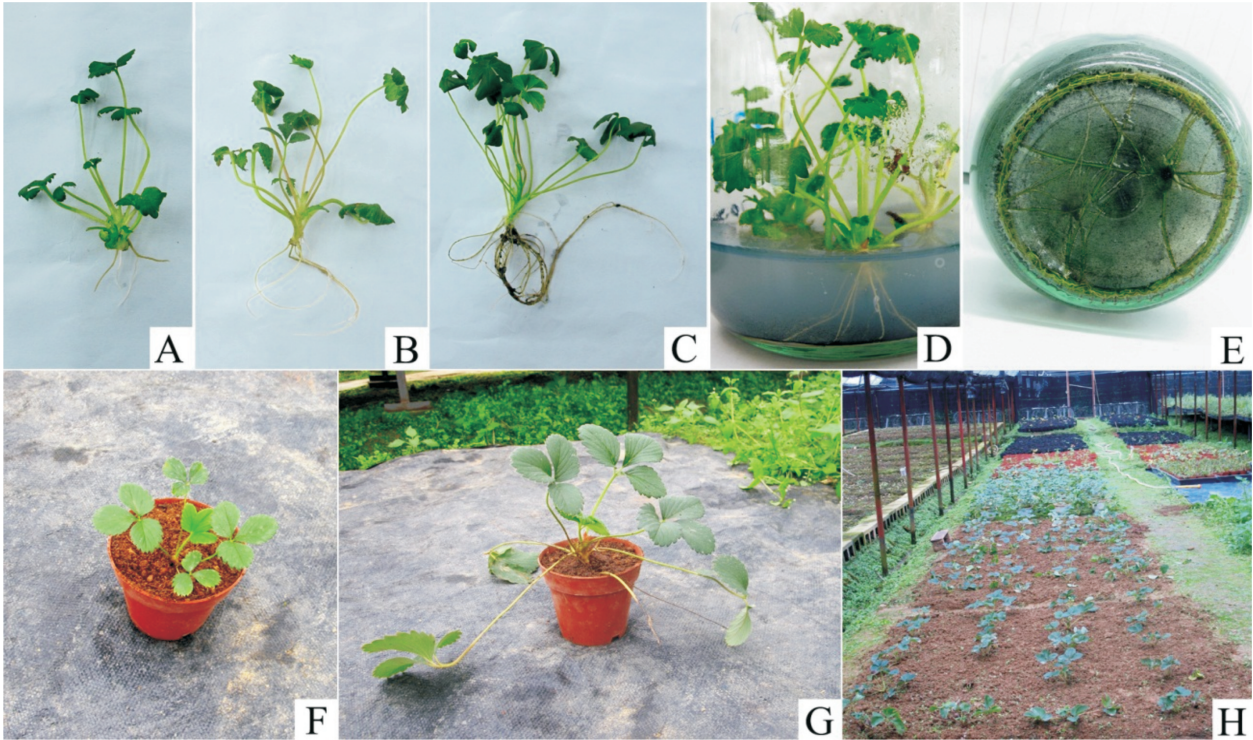
表 9 芽丛发生方差分析结果

Table 9 Variance analysis of adventitious shoots occurrence					
源 Source	Ⅲ 型平方和 Sum of Type Ⅲ square	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Significance
A(6-BA)	2 606.07	2	1 303.04	39.15	$P<0.05$
B(2,4-D)	41.68	2	20.82	0.63	$P>0.05$
C(NAA)	1 267.47	2	633.73	19.04	$P<0.05$
误差 Error	66.57	2	33.28		



注：A. 转入增殖培养基时的芽丛；B,C. 15 d 芽丛大量繁殖；D. 30 d 后丛生芽的生长情况
Note: A. Adventitious shoots of transferring into proliferation media; B, C. Calluses blooming after 15 d; D. Adventitious seedlings after 30 d.

图 3 芽的增殖与生长
Fig. 3 Proliferation and growth of adventitious shoots



注：A. 培养 10 d 后的生根苗；B. 20 d 后的生根苗；C-E. 30 d 后的生根情况；F. 移栽 1 个月后的再生苗；G. 移栽 45 d 后的再生苗；H. 大棚内下地的再生苗。
Note: A. Rooting plantlet after 10 d; B. Rooting plantlet after 20 d; C-E. Root system after 30 d; F. Regenerated plantlet after 30 d; G. Regenerated plantlet after 45 d; H. Regenerated plantlets in greenhouse.

图 4 试管苗生根培养及移栽
Fig. 4 Rooting culture and transplanting of test-tube plantlets

不利于试管苗的生长。加入 NAA 后,不定根变细,叶片两端向上卷曲,且根韧性下降。实验表明,适宜的生根培养基为 $1/2\text{MS} + 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{AC}$ 。试管苗在此培养基中培养 10 d 后,基部开始出现

表 10 6-BA 3 水平 Duncan 检验

Table 10 Duncan’s test in three levels of 6-BA

水平 Level	均值 $\bar{x}$	0.05 水平 0.05 level
3	42.89	c
2	67.50	a
1	84.34	a

表 11 NAA 3 水平 Duncan 检验

Table 11 Duncan’s test in three levels of NAA

水平 Level	均值 $\bar{x}$	0.05 水平 0.05 level
1	66.81	b
3	72.35	b
2	81.43	a

不定根(图 4:A);20 d 后可见明显的根生长量(图 4:B);35 d 后可获得根系粗壮发达且生长健壮的生根苗(图 4:C-E),生根率达 92.50%。炼苗后移栽至沙土基质中,30 d 后即有新叶长出(图 4:F),成活率达 95%以上;45 d 后,再生苗生长健壮(图 4:G),此时可移至大棚内下地生长(图 4:H)。

3 讨论与结论

3.1 褐化现象及改善措施

‘章姬’草莓匍匐茎段外植体在初代培养过程中存在褐化严重的问题,本课题组前期在 MS 培养基中附加不同植物激素的预实验中,褐化率几乎是 100%,2 周内培养物全部死亡。与“丰香”草莓(马崇坚和廖佩颖,2007)外植体先死亡再褐化的现象不同,‘章姬’草莓是外植体先褐化后死亡。因此,控制褐化率是‘章姬’草莓体外快繁的关键。

褐化是外植体切口附近的细胞受到伤害,细胞膜结构发生变化,细胞内区隔化被破坏使多酚物质接触空气,在多酚氧化酶(PPO)的作用下被氧化,形成颜色较深的醌类物质所致(代小梅等,2015a,2015b;冯代弟等,2015)。到目前为止,已有相当多的学者对外植体褐化的发生机理、发生因素和控制措施等进行了研究,指出外植体类型、

外植体生长部位及生理状态、培养基成分和培养条件等是产生褐化现象的主要原因,并提出了各自不同的处理措施(刘洋等,2007;段艳欣和郭斌,2009;马文卿等,2010;夏亚男等,2014;吴玲利等,2015),其中改变基本培养基类型和添加抗氧化剂是抑制褐化现象的重要手段。令人困惑的是,有关草莓组织培养中存在褐化现象的报道不多(牛红云等,2004;马崇坚和廖佩颖,2007;Ko et al, 2009),均只提及出现褐化且很容易得到解决。

本研究结果表明,基本培养基类型是‘章姬’草莓发生褐化的主要原因,其次是抗氧化剂的添加。推测培养基中较低水平的无机盐浓度在‘章姬’草莓初代培养中具抑制褐化现象的作用;而抗氧化剂 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的添加,则进一步降低了褐化率,与在甜叶悬钩子中的研究(郭治友等,2009)类似,外植体存活率会随 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浓度的增加而降低,说明抗氧化剂使用浓度过高对外植体会产生一定的毒害作用。研究表明,‘章姬’草莓最佳初代培养基为 $\text{B}_5 + 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$,每间隔 7 d 进行一次转接,3 次后可彻底消除褐化现象,外植体成活率亦可达 85%以上。此外,减少外植体在空气中的裸露时间,做到“现采现用”;转接时,瓶对瓶,尽量减少外植体与空气的接触;在外植体接入培养瓶后,利用酒精灯外焰加热瓶壁,使瓶内空气尽可能排除等,均是降低褐化率的有效方法。

值得注意的是,外植体褐化一旦消除,在以后各阶段培养过程中,即使不再对培养基进行处理(如更换基本培养基类型或添加抗氧化剂),只要按时转接均少见褐化。从酶促褐化发生的机理来看,这个现象是否暗示外植体材料只要能正常脱分化和再分化,在以后的生长过程中就能释放抑制相关酶产生的物质,从而达到了去除褐化的效果?这一问题值得进一步进行研究。

3.2 外源激素对‘章姬’草莓体外快繁的影响

单因素和正交实验结果表明,6-BA、2,4-D、NAA 的配合使用在愈伤组织诱导方面均显著优于单独使用,表现出极佳的协同效果。其中 6-BA 在愈伤组织诱导和芽丛分化上均具显著性差异,表明 6-BA 在‘章姬’草莓茎段培养中除具促进细胞分裂、促进非分化组织分化的作用外,还具强烈诱

导不定芽分化和生长的作用;2,4-D 在愈伤组织诱导上具强烈促进作用,但在一定程度上抑制了不定芽的发生;NAA 则在愈伤组织诱导中表现出非常理想的协同促进效果,而在下一步的丛芽繁殖生长中具显著性作用。

本研究实现了‘章姬’草莓同步进行愈伤组织诱导和丛芽分化,解决了牛红云等(2004)未能同步诱导愈伤组织和芽丛分化的问题。与前人(牛红云等,2004;廖咏梅等,2006;马崇坚和廖佩颖,2007;朱海生等,2007;Ko et al, 2009;王翡等,2010)对草莓其他品种的研究结果不同,在‘章姬’草莓的再生体系中,所用植物激素质量浓度水平均较低,而生根培养阶段在无植物激素的 1/2MS 上亦能正常长出大量根系。但是,金真等(2015)在不同培养基和外源激素对‘章姬’草莓茎尖培养影响的研究中也发现,不添加激素的 1/2MS+蔗糖培养基不仅能满足草莓苗生根的要求,且根系粗壮,有利于后期草莓苗的移栽成活。这与本研究结果一致。本研究发现加入低质量浓度 NAA 反而抑制了试管苗的生长,与黄衡宇和王美蓉(2014)和李鹏等(2015)研究的一些物种类似。推测‘章姬’草莓匍匐茎节部内源激素水平很低导致对外源激素非常敏感,附加较低浓度的外源激素就能刺激其快速生长;而丛生苗在增殖培养过程中,可将部分外源激素特别是生长素类集积于丛苗基部,甚至部分转化为内源激素,继而在无植物激素的培养基中亦能正常生根生长。这说明不同草莓品种、即使是同一品种的不同外植体部位,植物激素的使用也存较大差异,使用的种类和浓度主要取决于不同品种、不同外植体类型的反应。

‘章姬’草莓体外快繁的培养周期为 25~35 d,在此时间段进行增殖或生根转接,试管苗生长速度快,且长势健壮,根系发达粗壮;超过 35 d,培养物基部褐化导致培养物不能正常生长,而且一旦褐化,在以后的培养中很难去除,只能舍弃不用。这说明培养周期也是影响‘章姬’草莓体外快繁的重要因素之一。

目前,尽管对草莓的研究已有很多,但在消除褐化影响、繁殖系数和周期、移栽成活率及较高成本方面仍存在很多问题,使得脱毒组培苗的整体

应用处于较低水平。本研究解决了草莓组织培养过程中褐化现象严重的问题,成功建立了‘章姬’品种体外高频再生体系。以‘章姬’脱毒苗匍匐茎段为外植体,在 $B_5 + 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 中进行抑制褐化处理;将消除褐化后的外植体接入 $MS + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 中同步进行愈伤组织诱导和丛芽发生;将愈伤组织诱导出的不定芽丛转接至 $MS + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 中进行增殖培养,30 d 一个生长繁殖周期后增殖系数可达 12.86;试管苗不定根诱导在 $1/2MS + 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{AC}$ 进行,炼苗移栽后可获得完整植株。对‘章姬’草莓离体快速繁殖和种性保持具有重要意义,同时为其他草莓品种的体外快繁提供了技术参考。

参考文献:

- ADAMS AN, 1972. An improved medium for strawberry meristem culture [J]. *J Hort Sci*, 48: 263-264.
- BOXUS P, 1974. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation [J]. *J Hort Sci*, 49: 209-210.
- CHEN BY, HUANG JF, GAO ZH, et al, 2012. Karyotype analysis of six wild strawberry species [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 32(8): 1567-1572. [陈丙义, 黄金凤, 高志红, 等, 2012. 6 种野生草莓的核型分析 [J]. *西北植物学报*, 32(8): 1567-1572.]
- DAI XM, SUN ZY, HAN L, 2015a. Callus induction and inhibition effect of citric acid on browning of kentucky bluegrass callus [J]. *Acta Agric Nucl Sci*, 29(2): 270-277. [代小梅, 孙振元, 韩蕾, 2015a. 草地早熟禾愈伤组织诱导及柠檬酸对其褐化的抑制效应 [J]. *核农学报*, 29(2): 270-277.]
- DAI XM, SUN ZY, HAN L, et al, 2015b. Callus induction and inhibition effect of citric acid on browning of perennial ryegrass callus [J]. *Acta Agric Nucl Sci*, 29(10): 1893-1900. [代小梅, 孙振元, 韩蕾, 等, 2015b. 多年生黑麦草愈伤组织诱导及柠檬酸对其褐化的抑制效应 [J]. *核农学报*, 29(10): 1893-1900.]
- DUAN YX, GUO WW, 2009. Study on callus browning in relation to polyphenol content and polyphenol oxidase activity among various *Citrus* embryogenic calli [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 25(15): 117-120. [段艳欣, 郭文武, 2009. 多酚含量及多酚氧化酶活性与柑橘胚性愈伤组织褐化的关系 [J]. *中国农学通报*, 25(15): 117-120.]
- FENG DD, WANG Y, CHEN JP, 2015. Research progress of browning in the plant tissue culture [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 27(6): 1108-1116. [冯代弟, 王燕, 陈剑平, 2015. 植物组培褐化发生机制的研究进展 [J]. *浙江农业学报*, 27(6): 1108-1116.]

- GUO ZY, QIAN SF, LUO Y, 2009. Study on the browning control in tissue culture of *Rubus suavissimus* S. Lee [J]. *Anhui Agric Sci*, 37(19): 8848–8850. [郭治友, 钱绍方, 罗应, 2009. 甜叶悬钩子植物组织培养褐化现象控制研究 [J]. *安徽农业科学*, 37(19): 8848–8850.]
- HUANG HY, WANG MR, 2014. Callus induction and regeneration system establishment of *Ajugae nipponensis* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 45(9): 1313–1318. [黄衡宇, 王美蓉, 2014. 紫背金盘愈伤组织诱导与再生体系的建立 [J]. *中草药*, 45(9): 1313–1318.]
- JIN MF, CAO Z, CAI JJ, et al, 2017. Study on tissue culture and rapid propagation technique of red-flowered strawberry [J]. *Guihaia*, 37(4): 1–12. [金美芳, 曹智, 蔡俊杰, 等, 2017. 红花草莓的组织培养与快繁技术研究 [J]. *广西植物*, 37(4): 1–12.]
- JIN Z, WANG KL, LIANG JH, et al, 2015. Effects of exogenous hormones and medium on stem tip germination “Akihime” strawberry [J]. *J Agric*, 5(8): 73–77. [金真, 王康丽, 梁佳惠, 等, 2015. 培养基和外源激素对‘章姬’草莓茎尖培养的影响研究 [J]. *农学学报*, 5(8): 73–77.]
- JOSUTTIS M, DIETRICH H, TREUTTER D, et al, 2010. Solar UVB response of bioactives in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. l.): a comparison of protected and open-field cultivation [J]. *J Agric Food Chem*, 58(24): 12692–12702.
- KO CY, ALABDULKARIM AM, ALJOWID SM, et al, 2009. An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry [J]. *Afr J Biotechnol*, 8(11): 2611–2615.
- LEI Q, HUANG M, KANG J, et al, 2011. Effect of ion beam irradiation on fresh-keeping of strawberry [J]. *Acta Agric Nucl Sci*, 25(3): 510–513. [雷庆, 黄敏, 康菊, 等, 2011. 电子束辐照草莓保鲜效果研究 [J]. *核农学报*, 25(3): 510–513.]
- LI L, LONG H, GAO J, et al, 2015. Efficient induction system of adventitious shoots and plant regeneration in *Solanum pseudocapsicum* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 46(9): 1360–1367. [李鹏, 龙华, 高洁, 等, 2015. 珊瑚樱从芽高效诱导体系及植株再生研究 [J]. *中草药*, 46(9): 1360–1367.]
- LI S, TIAN J, LU SW, et al, 2014. Study on nursery effect of an elevated and layered seedling raising system for greenhouse strawberry [J]. *Northern Hortic*, (14): 41–45. [李邵, 田婧, 鲁少尉, 等, 2014. 设施草莓高架分层育苗系统育苗效果研究 [J]. *北方园艺*, (14): 41–45.]
- LIAO YM, LEI NF, Chen JS, 2006. Clonal integration of a stoloniferous plant (*Fragaria vesca*) in response to heterogeneous light [J]. *Guihaia*, 26(5): 503–506. [廖咏梅, 雷泞菲, 陈劲松, 2006. 异质性光照条件下匍匐茎草本野草莓的克隆整合 [J]. *广西植物*, 26(5): 503–506.]
- LIU Y, SU SC, LENG PS, et al, 2007. Procedures of diminishing browning of *in vitro* explants in *Pistacia vera* [J]. *J Fruit Sci*, 24(3): 393–396. [刘洋, 苏淑钗, 冷平生, 等, 2007. 阿月浑子外植体褐变抑制方法 [J]. *果树学报*, 24(3): 393–396.]
- LÜ MP, WANG YZ, HUANG HY, 2016. Callus induction and high efficiency plant regeneration system establishment of *Pararuellia delavayana* [J]. *Chin Bull Bot*, 51(1): 89–97. [吕美萍, 王元忠, 黄衡宇, 2016. 地皮消息愈伤组织诱导及植物高效再生体系的建立 [J]. *植物学报*, 51(1): 89–97.]
- MA CJ, LIAO PY, 2007. Tissue culture of petiole and leaf blade of *Fragaria ananassa* [J]. *Anhui Agric Sci*, 35(13): 3841–3842. [马崇坚, 廖佩颖, 2007. 草莓叶柄和叶片的组织培养 [J]. *安徽农业科学*, 35(13): 3841–3842.]
- MA WQ, LI Q, LIU Y, 2010. Studies on browning during the test-tube proliferation of *Cymbidium hybridu* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 26(7): 186–190. [马文卿, 李青, 刘燕, 2010. 大花蕙兰试管苗增殖过程中的褐化研究 [J]. *中国农学通报*, 26(7): 186–190.]
- NIU HY, WANG Q, XUE GB, et al, 2004. Study on tissue culture of the stem of *Fragaria ananassa* Duch [J]. *J NE Agric Univ*, 35(5): 542–545. [牛红云, 王荃, 薛贵彬, 等, 2004. 草莓 (*Fragaria ananassa* Duch) 茎段组织培养的研究 [J]. *东北农业大学学报*, 35(5): 542–545.]
- WANG F, GAO ZH, ZHANG Z, et al, 2010. Establishment of regeneration system of strawberry [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 30(5): 1045–1049. [王翡, 高志红, 章镇, 等, 2010. 草莓高效离体叶片再生体系的建立 [J]. *西北植物学报*, 30(5): 1045–1049.]
- WANG SY, Millner P, 2009. Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic content, and fruit quality of strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) [J]. *J Agric Food Chem*, 57(20): 9651–9657.
- WU LL, KE BF, GONG C, et al, 2015. Tissue culture and rapid propagation of *Akebia trifoliata* var. *australis* [J]. *Plant Physiol*, 51(6): 903–908. [吴玲利, 柯铎峰, 龚春, 等, 2015. 白木通组织培养及快速繁殖 [J]. *植物生理学报*, 51(6): 903–908.]
- XIA YN, JIANG JX, YI ZL, et al, 2014. Effect of three antioxidants on browning of explant and callus induction rate of *Miscanthus lutarioriparius* [J]. *Northern Hortic*, (17): 93–96. [夏亚男, 蒋建雄, 易自力, 等, 2014. 三种抗褐化剂对南荻外植体褐变及愈伤诱导率的影响 [J]. *北方园艺*, (17): 93–96.]
- XIAO JZ, HUANG YH, JIANG FJ, et al, 2011. Study on Virus-free rapid propagation of zhangji strawberry by anther tissue culture [J]. *Acta Agric Jiangxi*, (10): 49–50. [肖君泽, 黄益鸿, 姜放军, 等, 2011. 章姬草莓花药组织培养脱毒好快速繁殖技术的研究 [J]. *江西农业学报*, (10): 49–50.]
- ZHOU LP, WANG SZ, RUAN SL, et al, 2015. Optimization of extraction method for flow cytometry in strawberry [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 27(11): 2024–2028. [周历萍, 王淑珍, 阮松林, 等, 2015. 草莓流式细胞检测提取方法的优化 [J]. *浙江农业学报*, 27(11): 2024–2028.]
- ZHU HS, PAN DM, LIN YZ, et al, 2007. *In vitro* efficient regeneration system of strawberry [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 27(5): 859–863. [朱海生, 潘东明, 林义章, 等, 2007. 草莓高频离体再生体系的研究 [J]. *西北植物学报*, 27(5): 859–863.]