

# 草莓茎尖组织培养技术研究

蒲忠贵, 张庆全

(永靖县农业农村局, 甘肃 永靖 731600)

**摘要:** 为建立完善的草莓组培快繁体系, 解决种苗退化问题, 以当地草莓主栽品种红颜茎尖为试材, 设置0.1%升汞和0.1%升汞+2%吐温-80溶液2种外植体消毒处理, 以MS为基本培养基, 分别添加不同浓度6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)和萘乙酸(NAA)的6个诱导和继代增殖培养基、5个生根培养基, 研究草莓茎尖外植体消毒最佳方式与时间, 筛选诱导、继代增殖及生根培养的最佳培养基。结果表明, 0.1%升汞+2%吐温-80溶液处理8 min时草莓茎尖污染率及褐化率较低, 萌发率最高, 可达82.3%, 为最佳的消毒方式。外植体在MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA培养基中, 可诱导出更多的健壮不定芽, 萌发率为83.3%, 为最佳诱导培养基; 适宜的继代增殖培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA, 增殖系数为4.5%; 1/2MS+0.01 mg/L NAA为最佳生根培养基, 生根率高达100%。

**关键词:** 草莓; 茎尖; 快繁; 组织培养

**中图分类号:** S668.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1463(2022)09-0086-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2022.09.020

## Study on the Tip-shoot Tissue Culture Techniques for Strawberry

PU Zhonggui, ZHANG Qingquan

(Agriculture and Rural Bureau at Yongjing County, Yongjing Gansu 731600, China)

**Abstract:** In order to improve the strawberry tissue culture and rapid propagation system and to address the quality degradation issue in seedlings, taking tip-shoots of a main strawberry variety Hongyan as material, two explant disinfection methods were used i.e., 0.1% HgCl<sub>2</sub> solution and 0.1% HgCl<sub>2</sub> plus 2% Tween-80 solution, 6 induction media and multiplicative culture media and 5 rooting culture media based on MS culture base plus different concentrations of 6-BA and NAA were formulated to study the optimum explant disinfection method and time, and to select the optimum culture media for induction, multiplicative culture and rooting culture for tip-shoot tissue culture of strawberry, respectively. Results showed that 0.1% HgCl<sub>2</sub> plus 2% Tween-80 solution treated for 8 min had the lowest pollution rate and browning rate of tip-shoot tissue, and the highest germination rate of 82.3%, which was considered as the optimum explant disinfection method. The optimum induction medium was MS plus 1.0 mg/L 6-BA plus 0.2 mg/L NAA which could induce more health adventitious buds with a germination rate of 83.3%. The optimum medium for multiplicative culture was MS plus 1 mg/L 6-BA plus 0.02 mg/L NAA which had a multiplication coefficient of 4.5%. The optimal medium for rooting was 1/2MS plus 0.01 mg/L NAA which showed a rooting rate of 100%.

**Key words:** Strawberry; Tip-shoot; Rapid propagation; Tissue culture

草莓为蔷薇科草莓属多年生草本植物, 浆果色泽艳丽, 鲜美可口, 营养丰富, 深受人们喜爱<sup>[1-3]</sup>。草莓在全国各地均有种植。近年来, 永靖县把发展草莓产业作为乡村振兴的重要抓手积极推进, “刘家峡草莓”已享誉兰州、西宁、临夏等周边城市。目前, 全县种植面积达到220 hm<sup>2</sup>, 全部以日光温室和钢架、竹架大棚的形式保护地种植, 主栽品种以红颜和妙香系列为主, 分布在三塬、岷塬、刘家峡、太极等川塬乡镇。采摘期从每年元月份开始, 长达7个月, 平均产量达37 500 kg/hm<sup>2</sup>。主要销往兰州、西宁、临夏等周边城市以

及以电商物流的形式销往全国各地, 电商率达到40%。但近年来, 草莓种植户为追求经济效益, 盲目扩大种植面积, 同时由于种植草莓周期长, 种苗以匍匐茎繁殖和分株繁殖等无性繁殖方式为主, 造成种苗种性退化快、花叶病等病毒病感染率高, 导致果实畸形, 果个不大, 产量和质量下降。从北京、山东、辽宁等种苗繁育基地引进的草莓脱毒种苗, 由于地域差异或者脱毒苗本身问题, 草莓产量很不稳定, 种植户对优质草莓种苗的渴求愈发强烈。我们以红颜草莓匍匐茎茎尖作为外植体, 研究了草莓茎尖培养技术, 以期完善草莓

收稿日期: 2022-03-30; 修订日期: 2022-06-13

基金项目: 甘肃省青年科技基金计划项目(20JR5RA064)。

作者简介: 蒲忠贵(1970—), 男, 甘肃永靖人, 高级农艺师, 主要从事农产品质量安全检验检测和农业技术推广工作。联系电话: (0)13884028618。Email: pzg8618@126.com。

茎尖组培快繁技术体系奠定基础。

## 1 材料与方

### 1.1 外植体制备

供试草莓品种为红颜，大田生产种苗，于5—6月份采集种植于永靖县三塬镇两合村钢架大棚内的草莓匍匐茎尖作为外植体。

### 1.2 外植体消毒

表面消毒剂选用0.1%升汞和0.1%升汞+2%吐温-80溶液。消毒剂消毒时间设4、6、8、10、12 min共5个水平10个处理(表1)，消毒后接种于MS培养基上，筛选出最佳消毒方法。

从健壮的红颜草莓母株上，选取饱满稚嫩的匍匐茎2~4 cm长的顶芽，用纱布包好，流水冲洗1~2 h后沥干，在超净工作台中用75%酒精消毒30 s，迅速用无菌水冲洗4~5次，随即用0.1%升汞+2%吐温-80溶液处理8 min，再用无菌水冲洗4~6次。

### 1.3 芽诱导培养

消毒后的外植体用滤纸吸干水分，在双目解剖镜下剥去幼叶露出茎尖生长点，用解剖针挑去小于0.5 mm的茎尖生长点，立即接入诱导分化培养基(表2)中，每瓶接5个，10瓶为1个处理，重复3次。用封口膜绑扎好后放置在培养架上。观察统计萌发芽数和生长状况，筛选出最佳芽诱导培养基。

### 1.4 继代增殖培养

将萌发的草莓茎尖转接到继代增殖培养基(表3)中，每瓶接种5个丛生芽，各接种10瓶。观察统计增殖芽数、增殖系数和芽生长状况，筛选出适宜的继代增殖培养基。

### 1.5 生根培养

待继代培养结束后，立即转入到生根培养基(表4)中，每瓶接种5株健壮幼苗，各接10瓶。观察统计试管苗生长状况、平均根长、平均根数、平均生根株数，筛选出最佳生根培养基。

### 1.6 培养方法与条件

培养温度为22~26℃，光照时间14 h/d，光照强度1 600~2 000 lx。培养基MS、1/2MS、1/4MS均添加蔗糖3%，琼脂6.5 g/L，pH 5.8。

### 1.7 统计方法

接种10 d后统计污染率、褐化率。接种20 d后统计萌发率。接种30 d后统计增殖芽数，计算

增殖系数和生根率。

$$\text{增殖系数} = (\text{增值芽数} / \text{原个体数}) \times 100\%$$

## 1.8 数据处理

数据采用Excel 2003和SAS 9.1统计软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒剂和消毒时间对茎尖外植体消毒效果的影响

经消毒处理的外植体接种7~10 d后，外植体周围出现褐化现象，但15 d后褐化逐渐减轻。从表1可知，0.1%升汞附加2%吐温-80溶液的处理消毒效果较好，消毒4、6、8、10 min的污染率和褐化率均比0.1%升汞单一处理低，茎尖萌发率均高于0.1%升汞单一处理。可能添加吐温-80溶液作为水包油型乳化剂在降低褐化方面具有特殊机理<sup>[4]</sup>。从表1还看出，0.1%升汞+2%吐温-80处理随着消毒时间从4、6、8、10、12 min延长，污染率也从58.3%、43.4%、25.3%、21.9%逐渐降低为20.4%，当消毒时间为8 min时，茎尖萌发率最高，达82.3%。已萌发的茎尖在后期培养中发现，处理时间越短，茎尖长势越迅速，同时褐化率较低，茎尖生长也较快。因此，0.1%升汞+2%吐温-80处理8 min为草莓匍匐茎尖脱毒最佳的消毒方式。

表1 不同消毒剂和消毒时间对草莓茎尖消毒效果

表面消毒剂	消毒时间 /min	污染率	褐化率	萌发率
		/%	/%	/%
0.1%升汞	4	62.1 a	17.2 f	38.2 h
0.1%升汞	6	49.5 c	24.7 ed	54.6 f
0.1%升汞	8	29.8 e	27.6 cd	79.8 ab
0.1%升汞	10	22.3 fg	33.2 b	76.1 cd
0.1%升汞	12	19.6 g	39.3 a	72.3 d
0.1%升汞+2%吐温-80	4	58.3 b	14.9 f	43.5 g
0.1%升汞+2%吐温-80	6	43.4 d	23.7 e	58.7 e
0.1%升汞+2%吐温-80	8	25.3 f	25.2 ed	82.3 a
0.1%升汞+2%吐温-80	10	21.9 g	30.3 bc	81.4 a
0.1%升汞+2%吐温-80	12	20.4 g	39.9 a	77.5 bc

### 2.2 不同诱导培养基上外植体的诱导效果

从表2可以看出，草莓茎尖在MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA培养基上诱导效果较好，萌发率为83.3%，为最佳诱导培养基。从不同浓度的6-BA来看，高浓度的6-BA会影响茎尖的正常分化与生长，同时NAA浓度也影响到茎尖萌发率。当6-BA浓度为1.0 mg/L，NAA浓度为0.1、0.2 mg/L时的生长状况均较好，幼苗健壮，萌发芽数

和萌发率均较高。说明 6-BA 对草莓组培苗影响较大, 外植体分化培养基中 6-BA 的最适浓度为 1.0 mg/L。同时, NAA 的浓度也影响到茎尖的萌发率, 其浓度为 0.1 mg/L 萌发率远低于 0.2 mg/L, 说明适当提高 NAA 含量有助于促进草莓茎尖的诱导。

### 2.3 草莓幼苗不定芽的继代增殖培养效果

从表 3 可以看出, 随着 6-BA 浓度的不断增加, 草莓增殖系数呈先增后减趋势, 当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L、NAA 的浓度为 0.02 mg/L 时, 增殖系数达到最高, 为 4.5%, 且增殖出的小苗长势健壮、叶片深绿; 当 6-BA 浓度继续升高时, 增殖系数反而有所下降, 说明适于草莓幼苗不定芽增殖的 6-BA 最佳浓度为 1.0 mg/L。因此, 适宜的继代增殖培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA +0.02 mg/L NAA。

### 2.4 不同生根培养基上草莓组培苗的生根情况

由表 4 可知, 草莓组培苗在 5 种生根培养基中均能生根, 但不同的培养基中平均根数、根长及长势均有很大差异。以 1/2MS+0.01 mg/L NAA 为最佳生根培养基, 根数多, 根系粗壮, 利于后期移栽, 生根率达 100%。对不添加激素的培养基而言, 1/4MS 中的草莓植株根系纤长, 长势较弱; 1/2MS

中的植株根系多且长, 生长健壮。表明植株对 NAA 浓度变化比较敏感, 稍高浓度则诱导植株基部形成愈伤组织, 根系虽分化较多, 但生长受到抑制。

### 3 讨论与结论

表面消毒剂的种类, 外植体消毒时间及外植体发育时期是建立草莓茎尖快繁技术体系的关键步骤<sup>[4-5]</sup>。草莓匍匐茎茎尖表面长有大量绒毛, 致使消毒剂通过吸附进入外植体分生组织, 而吐温-80 具有润展剂的作用, 可使外植体表面绒毛与升汞更好的接触、附着及吸入<sup>[6-8]</sup>, 可提高外植体消毒效果。

试验结果表明, 用 0.1% 升汞 +2% 吐温-80 溶液处理 8 min 时草莓茎尖污染及褐化水平较低, 成苗率最高, 可达 82.3%。外植体在 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 的诱导培养基中, 可以诱导出更多的健壮, 萌发率为 83.3%, 为最佳诱导培养基; 适宜的继代增殖培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA, 增殖系数为 4.5%; 1/2MS+0.01 mg/L NAA 为最佳生根培养基, 生根率达 100%。因此, 红颜草莓匍匐茎外植体消毒时采用 0.1% 升汞+2% 吐温-80 处理 8 min 效果为好。

表 2 不同诱导培养基上外植体的诱导效果

诱导培养基	接种芽数 /个	萌发芽数 /个	萌发率 /%	生长状况
MS+0.5 mg/L 6-BA +0.2 mg/LNAA	30	18	60.0 c	长势一般、大部分绿色、少量黄化
MS+1.0 mg/L 6-BA +0.2 mg/LNAA	30	25	83.3 a	长势较好、健壮、深绿、无玻璃化
MS+1.5 mg/L 6-BA +0.2 mg/LNAA	30	16	52.3 d	长势较差、大部分浅绿色、幼苗个体形态较差
MS+0.5 mg/L 6-BA +0.1 mg/LNAA	30	14	46.7 e	长势一般、大部分绿色、少量黄化
MS+1.0 mg/L 6-BA +0.1 mg/LNAA	30	22	73.3 b	长势较好、健壮、无愈伤组织
MS+1.5 mg/L 6-BA +0.1 mg/LNAA	30	13	43.3 e	长势较差、叶色淡黄、玻璃化现象突出

表 3 草莓幼苗不定芽的继代增殖培养效果

继代增殖培养基	接种芽数 /个	增殖芽数 /个	增殖系数 /%	生长状况
MS+0.02 mg/LNAA	50	115	2.3 e	长势较弱、苗小、叶片微黄
MS+0.1 mg/L 6-BA +0.02 mg/LNAA	50	165	3.3 d	长势较弱、苗小
MS+0.5 mg/L 6-BA +0.02 mg/LNAA	50	190	3.8 bc	长势较好、叶绿、叶片大小一般
MS+1.0 mg/L 6-BA +0.02 mg/LNAA	50	225	4.5 a	长势健壮、深绿、叶片较大
MS+1.5 mg/L 6-BA +0.02 mg/LNAA	50	195	3.9 b	长势健壮、叶片大小一般
MS+2.0 mg/L 6-BA +0.02 mg/LNAA	50	170	3.4 cd	长势较弱、苗纤细

表 4 不同生根培养基上草莓组培苗的生根情况

生根培养基	生根株数 /株	生根率 /%	平均根数 /条	平均根长 /cm	生长状况
1/4MS	43	86 b	5	0.6~0.9	长势较弱、根纤细
1/2MS	48	96 a	6	0.8~1.3	长势健壮、根长
MS	47	94 a	6	0.8~1.1	长势良好、根纤细
1/2MS+0.01 mg/L NAA	50	100 a	8	1.2~1.5	长势健壮、根长较粗
1/2MS+0.05 mg/LNAA	50	100 a	7	1.0~1.3	长势健壮、根长

# 农用微生物菌剂修复退化天然草地技术规程

李雪萍<sup>1</sup>, 李建军<sup>1</sup>, 郭致杰<sup>1</sup>, 许世洋<sup>2</sup>, 荆卓琼<sup>1</sup>, 马佳勇<sup>2</sup>, 漆永红<sup>1</sup>, 李敏权<sup>3</sup>

(1. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃省农业科学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 为农用微生物菌剂在退化天然草地的使用提供标准化的技术指导, 从根本上促进草地生态系统的可持续发展, 根据前期使用微生物菌剂修复退化天然草地的经验, 从适用范围、规范性引用文件、术语和定义、基本原则、修复方法和注意事项等方面规范应用农用微生物菌剂修复退化天然草地的关键技术。

**关键词:** 天然草地; 退化程度; 微生物菌剂; 草地修复

**中图分类号:** S812.6 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1463(2022)09-0092-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2022.09.021

## Technical Specifications for the Restoration of Degraded Natural Grassland Using Agricultural Microbial Inoculants

LI Xueping<sup>1</sup>, LI Jianjun<sup>1</sup>, GUO Zhijie<sup>1</sup>, XU Shiyang<sup>2</sup>, JING Zhuoqiong<sup>1</sup>, MA Jiayong<sup>2</sup>, QI Yonghong<sup>1</sup>, LI Minquan<sup>3</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** To provide technical support for the restoration of degraded natural grassland using agricultural microbial inoculants and to promote the sustainable development of grassland ecosystem fundamentally, based on previous experience of restoring degraded natural grassland using agricultural microbial inoculants, key techniques of using microbial inoculants to restore degraded natural grassland were specified in this paper with the following aspects such as scope of application, normative documents, technical terms and definitions, elementary principles, technical steps, and points for attention included.

**Key words:** Natural grassland; Degree of degradation; Microbial inoculant; Grassland restoration

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 甘肃省重点研发计划(20YF3NA021); 兰州市科技计划项目(2021-1-174)。

作者简介: 李雪萍(1989—), 女, 甘肃镇原人, 副研究员, 博士, 研究方向为植物病理与生物防治。Email: lixueping@gsagr.ac.cn。

通信作者: 李敏权(1962—), 男, 甘肃宁县人, 教授, 博士, 研究方向为植物病理学。Email: liminquan@gsagr.ac.cn。

外源激素的浓度和比例能影响培养物的基因表达, 进而影响器官的分化, 通过内源激素的平衡调节来达到控制器官发生的目的<sup>[8]</sup>。在进行草莓诱导分化、继代增殖培养时, 激素种类、浓度和对比对萌发率和增殖系数表现得尤为明显。在增殖培养前期, 使用较高浓度的6-BA能够短期增加基数、缩短继代周期。而在增殖后期, 则较低浓度的6-BA能够分化出较多生长良好的幼苗, 便于后期生根, 可提高育苗生产效率。

### 参考文献:

- [1] 杨馥霞, 汤玲, 贺欢, 等. 低温下7个草莓品种的抗性生理指标比较[J]. 甘肃农业科技, 2021, 52(4): 14-17.
- [2] 李玉亮, 胡轶林, 潘旭升, 等. 兰州新区日光温室绿

色食品草莓生产技术规程[J]. 甘肃农业科技, 2020(5): 91-94.

- [3] 杨馥霞, 汤玲, 贺欢, 等. 取样部位对6个草莓品种低温半致死温度的影响[J]. 甘肃农业科技, 2019(12): 31-34.
- [4] 周厚成, 何水涛. 草莓病毒病研究进展[J]. 果树学报, 2003(5): 421-426.
- [5] 肖君泽, 黄益鸿, 姜放军. 草莓病毒病及其脱毒与检测技术研究进展[J]. 江西农业学报, 2010, 22(8): 88-90.
- [6] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 北京: 中国农业出版社: 1996.
- [7] 王振磊, 闫芬芬, 王静. 草莓组培快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2012(11): 130-132.
- [8] 崔广荣, 刘云兵, 郭蕾娜. 草莓增殖和生根壮苗培养基的筛选[J]. 园艺园林科学, 2003, 19(6): 210-212.