

不同培养条件对‘丰香’草莓离体叶片再生的影响

吴雪梅 汤浩茹* 文国琴 李 燕

(四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014)

摘 要: 以草莓品种‘丰香’离体叶片为外植体, 探讨了基本培养基、不同细胞分裂素、暗培养、硝酸银浓度以及不同植物生长调节剂组合对不定芽再生的影响。结果表明, 基本培养基中以 MS 最为适合, WPM、QL、AS 培养基均不利于不定芽的再生, 而 TDZ 的诱导效果好于 BA。以 MS 基本培养基附加 TDZ 2.0 mg L^{-1} 和 IBA 0.8 mg L^{-1} 可以使‘丰香’叶片不定芽的再生率高达 72.33%, 平均每叶再生芽 5.59 个。暗培养 14 d 可以将‘丰香’叶片的不定芽再生率提高到 90.09%。硝酸银对于提高‘丰香’叶片的不定芽再生没有明显效果, 但在一定程度上改变了细胞分化的方向。

关键词: 草莓; 不定芽; 再生; 体细胞胚发生

中图分类号: S 668.4 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2004) 05-0657-03

Effects of Different Culture Conditions on Regeneration from Leaves of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) ‘Toyonoka’

Wu Xuemei, Tang Haoru*, Wen Guoqin, and Li Yan

(Forestry and Horticultural College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The ideal regeneration system of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) ‘Toyonoka’ by leaf explants was established. In this study, the effects of plant growth regulators, dark periods and AgNO_3 concentrations on shoot regeneration from leaves of strawberry were investigated. The results showed that the highest regeneration rate of 72.33%, with 5.59 shoots per leaf disc, was obtained on the medium MS supplemented with 2.0 mg L^{-1} TDZ and 0.8 mg L^{-1} IBA. TDZ was more effective than BA in inducing shoot regeneration from leaves of strawberry ‘Toyonoka’. Two weeks of dark treatment could increase the shoot regeneration rate to 90.09%. Addition of AgNO_3 to the medium could not stimulate shoot regeneration, but it changed the cell differentiatinal direction in somewhat from the formation of adventitious shoots to that of somatic embryos.

Key words: Strawberry; Adventitious shoots; Plant regeneration; Somatic embryogenesis

1 目的、材料与方法

近年来草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 离体叶片再生不定芽的研究已取得了一定进展, 并已应用于转基因实践^[1], 但不定芽再生率较低^[2]。草莓品种‘丰香’是我国从日本引进的优良品种, 在四川已大面积栽培, 但其最大的缺点是不抗白粉病。本试验的目的在于建立一个高频的‘丰香’草莓叶片再生受体系统, 为对其进行改良奠定技术基础。以 2003 年 3 月用‘丰香’茎尖获得的无菌试管苗为试材, 在 $\text{MS} + \text{KT } 0.5 \text{ mg L}^{-1} + \text{IBA } 0.5 \text{ mg L}^{-1}$, 附加蔗糖 20 g L^{-1} , 琼脂 5.5 g L^{-1} 及水解酪蛋白 (CH) 0.1 g L^{-1} 的培养基上进行继代后, 从苗龄 30 d 左右的试管苗上剪取顶部幼嫩平展的叶片, 剪成 $0.5 \sim 1 \text{ cm}^2$ 的叶块, 背面向下平放于诱导培养基上 (表 1)。基本培养基为 MS, pH 5.8, 经高压灭菌后加入过滤灭菌的植物生长调节剂。接种后用‘Parafilm’密封培养皿, 于光强 $2000 \sim 3000 \text{ lx}$ 、光照周期 16 h/8 h、室温 (23 ± 2) 条件下培养。接种 50 d 后统计不定芽再生率。

收稿日期: 2003-12-25; 修回日期: 2004-03-12

基金项目: 全国优秀博士学位论文专项基金 (200253)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: htang@sicau.edu.cn)

2 结果分析与讨论

2.1 不同细胞分裂素对叶片不定芽分化的影响

在预备试验中将叶块接种在以 BA (0、0.5、1.0、2.0 mg L⁻¹) 分别与 IAA (0、0.2、0.4、0.8 mg L⁻¹)、IBA (0、0.2、0.4、0.8 mg L⁻¹) 和 NAA (0、0.2、0.4、0.8 mg L⁻¹) 组合的 16 种诱导培养基 (MS 为基本培养基) 上。20 d 后以 BA 2.0 mg L⁻¹ + NAA 0.4 mg L⁻¹ (7 号), BA 1.0 mg L⁻¹ + NAA 0.8 mg L⁻¹ (8 号) 两个处理上的愈伤组织发生最佳。但此后只有 8 号上得到了 2.63 % 的不定芽。用 TDZ 替代 BA 分别与上述 3 种生长素在相同浓度条件下组合 (16 种) 试验, 发生愈伤组织的时间与前者基本一致, 但不定芽发生时间较早 (22 d 后即开始), 50 d 后统计, 19、20、23、30 和 31 号 (表 1) 5 种处理上再生出了不定芽。

由此可见, 细胞分裂素的种类对‘丰香’叶片不定芽的再生起着不可忽视的作用, TDZ 的效果明显优于 BA。这与张志宏等^[1]的试验结果一致。这可能是由于 TDZ 具有高的细胞分裂素活性所致。Thmos 等^[3]试验表明, TDZ 可诱导细胞分裂素的生物合成, 并可抑制内源生长素的降解。且部分 TDZ 可能失活或暂时贮存起来, 待转到新的培养基上再释放出来, 从而使外植体中的内源激素水平达到一个动态平衡, 更有效地刺激不定芽的再生。

试验还表明, 细胞分裂素 (BA、TDZ) 单独使用不能诱导草莓叶片不定芽的分化。只有与适当浓度的生长素配合才能刺激不定芽的再生。这与张志宏等^[4]以苹果为材料的试验结果相似。同时他发现, 单独使用 TDZ 却可以在一定程度上诱导‘乔纳金’苹果叶片再生不定芽, 从而推测这是由于 TDZ 可能有提高 IAA 活性的作用所致。这也表明刺激不定芽的分化仍需要细胞分裂素与生长素的适量配合。本试验在 20 号处理上得到了 72.33 % 的不定芽再生率, 但大多数不定芽是经由愈伤组织途径发生而来的 (图版, 1)。而在 19 号处理上虽然有愈伤组织的发生, 不定芽却是在叶片的其它部位直接发生的 (图版, 2)。

2.2 硝酸银对叶片不定芽分化的影响

许多研究者指出, Ag⁺ 可明显促进植株再生。但在本试验中, ‘丰香’叶片在上述 5 种处理中添加不同浓度的 AgNO₃ 后, 不定芽的再生率受到抑制, 而且随着浓度的增大, 抑制效应更明显 (表 2)。其原因可能是‘丰香’对 AgNO₃ 的浓度要求较低。Pua 等^[5]的试验也表明, 过高浓度的 Ag⁺ 会对植物产生胁迫。本试验中, 添加 AgNO₃ 后, 观察到‘丰香’叶片的不定芽再生途径发生了改变, 以直接由叶片再生不定芽为主, 同时还有少量 (11.33 %) 通过体胚途径再生植株 (图版, 3), 且再生的不定芽和植株叶色浓绿, 生长健壮, 分化正常 (图版, 3 和 4)。这与张鹏等^[6]的研究结果类似。这可能是由于 Ag⁺ 的存在使乙烯不能干扰多胺的合成, 而多胺的合成则有利于体细胞胚和芽的发生。

2.3 基本培养基对叶片不定芽分化的影响

表 1 植物生长调节剂对草莓‘丰香’叶片不定芽再生的影响
Table 1 Effects of the combinations of plant growth regulators on shoot regeneration from the leaves of strawberry ‘Toyonoka’

编号 No.	植物生长调节剂 Plant growth regulators (mg L ⁻¹)			再生率 Regeneration (%)	每叶不定芽 再生频率 Shoots per leaf disc
	TDZ	IBA	NAA		
19	1.0	0.4	0	50.48	4.35
20	2.0	0.8	0	72.33	5.59
23	2.0	0	0.4	44.25	3.69
30	1.0	0	0.2	59.33	4.30
31	0.5	0	0.4	63.12	4.02

表 2 硝酸银对草莓‘丰香’叶片不定芽再生率的影响

Table 2 Effects of AgNO₃ concentrations on rate of shoot regeneration from the leaves of strawberry ‘Toyonoka’ (%)

编号 No.	植物生长调节剂 Plant growth regulators (mg L ⁻¹)	AgNO ₃ (mg L ⁻¹)			
		0	2.5	5	10
19	TDZ 1.0 + IBA 0.4	48.67	40.63	0.67	3.52
20	TDZ 2.0 + IBA 0.8	75.00	53.76	1.03	3.58
23	TDZ 2.0 + NAA 0.4	31.60	12.33	10.15	10.01
30	TDZ 1.0 + NAA 0.2	56.67	48.84	7.64	11.13
31	TDZ 0.5 + NAA 0.4	59.67	40.63	11.58	2.71

表 3 基本培养基对草莓‘丰香’叶片不定芽再生率的影响

Table 3 Effects of basic media on rate of shoot regeneration from the leaves of strawberry ‘Toyonoka’ (%)

编号 No.	植物生长调节剂 Plant growth regulators (mg L ⁻¹)	基本培养基 Basic media			
		WPM	QL	AS	MS
19	TDZ 1.0 + IBA 0.4	4.67	3.33	11.33	51.10
20	TDZ 2.0 + IBA 0.8	5.58	1.67	8.58	78.53
23	TDZ 2.0 + NAA 0.4	0	0	1.67	37.67
30	TDZ 1.0 + NAA 0.2	0	5.67	3.75	60.96
31	TDZ 0.5 + NAA 0.4	0	0	8.67	68.72

‘丰香’品种在 MS 培养基上表现良好，不定芽再生率较高，可达 78.53 %（表 3）。此外在 AS 基本培养基上也有一定的不定芽再生且生长正常。而在 WPM 和 QL 两种基本培养基上不能正常分化不定芽（再生率不足 10 %），而且在接种 7 d 后其背面接触培养基处便由绿转红，13 d 后整叶暗绿泛红且于伤口处发生红色致密的颗粒状愈伤组织，32 d 后少数培养基上可见不定芽成暗红色丛生状，且叶片为针状，不伸展。

2.4 暗培养对叶片不定芽分化的影响

将叶块接于最佳处理 20 号上后，发现暗培养对不定芽再生有较明显的促进作用，最佳暗培养时间为 14 d（图 1）。牛建新^[7]等指出，暗培养之所以可以促进不定芽的高效再生，可能是由于减少了 IAA 在光下的分解，从而提高了 IAA 的浓度，进而刺激了不定芽的再生。本试验中诱导发生不定芽的培养基组合中并未添加 IAA。至于暗培养促进不定芽再生的机理还有待进一步研究。

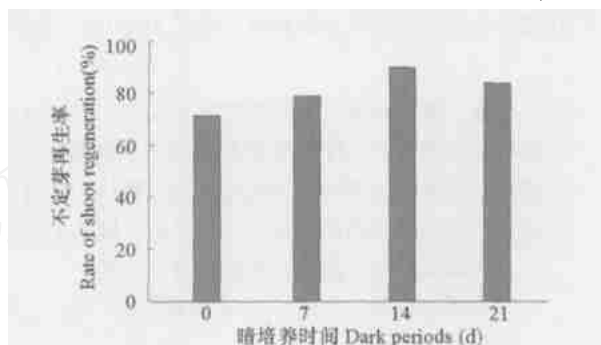
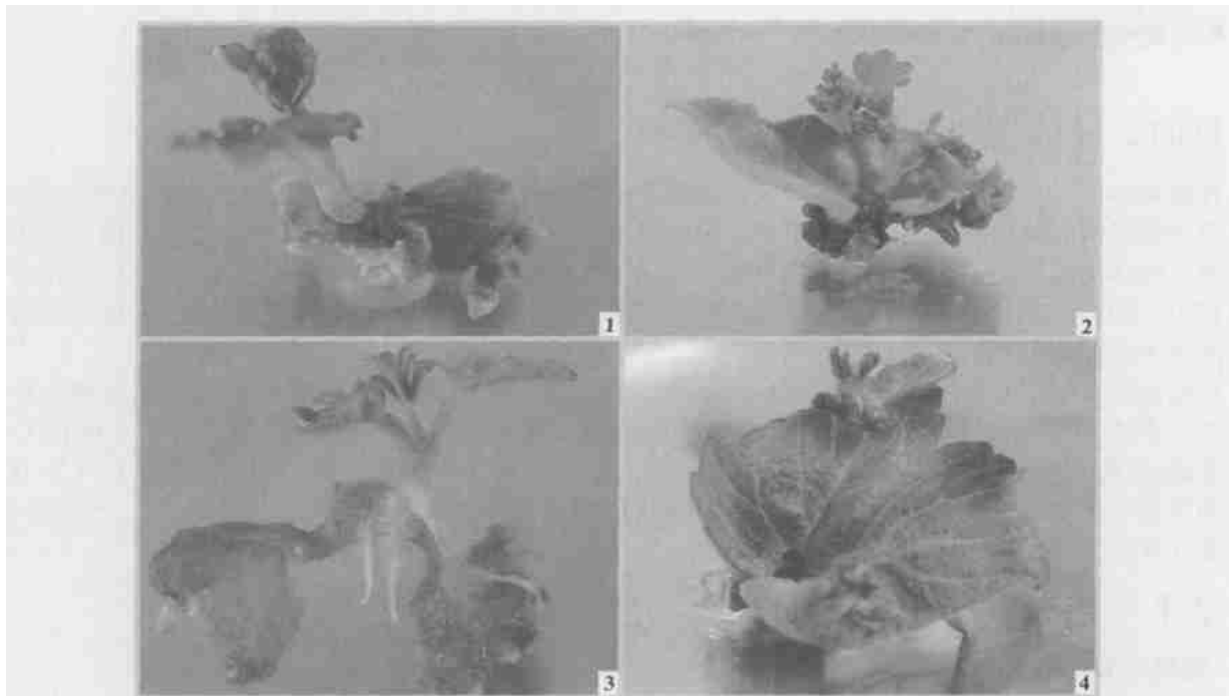


图 1 暗培养对草莓‘丰香’叶片不定芽再生的影响

Fig. 1 Effects of dark periods on shoot regeneration from the leaves of strawberry ‘Toyonoka’

参考文献：

- 1 张志宏, 吴禄平, 代红艳, 等. 草莓主栽品种再生和转化的研究. 园艺学报, 2001, 28 (3): 189 ~ 193
- 2 尹淑萍, 金万梅, 孟凡红. 草莓遗传转化研究进展. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2003, 31 (1): 172 ~ 176
- 3 Thmos J C, Kafferman F R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. Plant Physiol., 1986, 81: 681 ~ 683
- 4 张志宏, 景士西, 王关林. TDZ 对苹果叶片离体再生不定芽的效应. 植物生理学通讯, 1997, 33 (6), 420 ~ 423
- 5 Pua E C, Chi G L, De Novo. Shoot morphogenesis and plant growth of muslard (*Brassica juncea*) in vitro in relation to ethylene. Plant Physiol., 1993, 88: 467 ~ 474
- 6 张 鹏, 博爱根, 王爱国. $AgNO_3$ 在植物离体培养中的作用及可能的机制. 植物生理学通讯, 1997, 33 (5): 376 ~ 379
- 7 牛建新, 鲁晓燕, 于艳华. 外植体和培养因子对草莓不定芽诱导的影响. 北方园艺, 1999, 3: 30 ~ 31



图版说明：1. 经愈伤组织发生的不定芽；2. 愈伤组织与不定芽在叶片的不同部位发生；3. 通过体胚途径再生植株；4. 直接再生的不定芽。

Explanation of plates: 1. Shoot regeneration from the callus; 2. Formation of callus and shoots at different parts of leaves; 3. Shoot regeneration from the somatic embryo; 4. Shoot regeneration directly from the leaves.