

# 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  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  和 IBA  $0.8 \text{ mg L}^{-1}$  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  $\text{AgNO}_3$  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  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ and  $0.8 \text{ mg L}^{-1}$  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  $\text{AgNO}_3$  to the medium could not stimulate shoot regeneration, but it changed the cell differentional 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<sup>[1]</sup>, 但不定芽再生率较低<sup>[2]</sup>。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  $20 \text{ g L}^{-1}$ , 琼脂  $5.5 \text{ g L}^{-1}$  及水解酪蛋白 (CH)  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  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 2000~3000 lx、光照周期 16 h/8 h、室温 ( $23 \pm 2$ ) 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<sup>-1</sup>) 分别与 IAA (0、0.2、0.4、0.8 mg L<sup>-1</sup>), IBA (0、0.2、0.4、0.8 mg L<sup>-1</sup>) 和 NAA (0、0.2、0.4、0.8 mg L<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup> + NAA 0.4 mg L<sup>-1</sup> (7 号), BA 1.0 mg L<sup>-1</sup> + NAA 0.8 mg L<sup>-1</sup> (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<sup>[1]</sup>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<sup>[3]</sup>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<sup>[4]</sup>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<sup>+</sup> 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 AgNO<sub>3</sub> 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 AgNO<sub>3</sub> 的浓度要求较低。Pua 等<sup>[5]</sup>的试验也表明, 过高浓度的 Ag<sup>+</sup> 会对植物产生胁迫。本试验中, 添加 AgNO<sub>3</sub> 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<sup>[6]</sup>的研究结果类似。这可能是由于 Ag<sup>+</sup> 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 <sup>-1</sup> )			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 AgNO<sub>3</sub> 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 <sup>-1</sup> )	AgNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )			
		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 <sup>-1</sup> )	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<sup>[7]</sup>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。

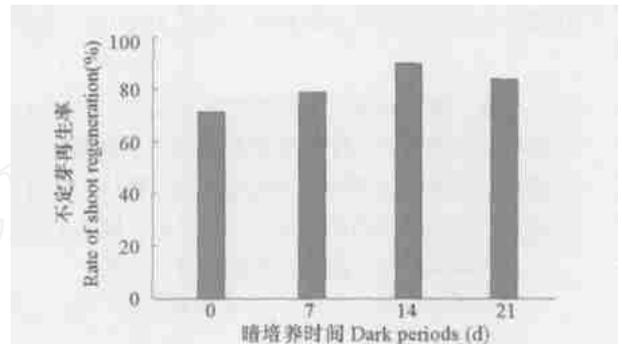
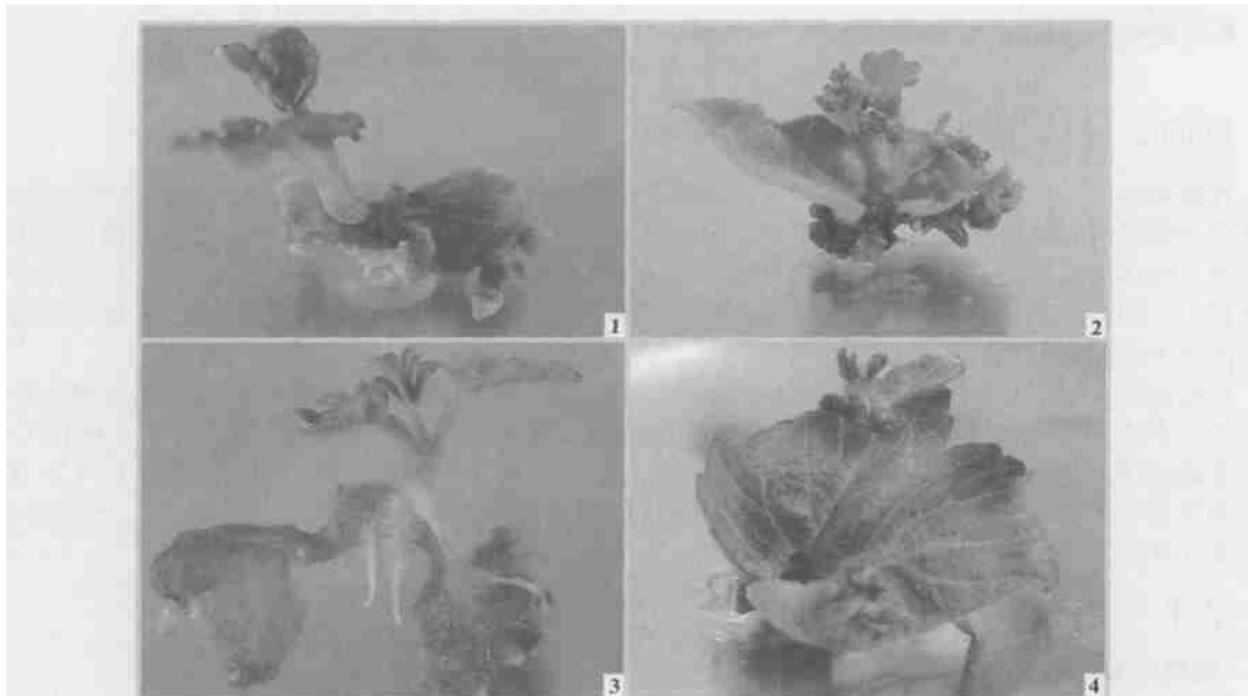


图 1 暗培养对草莓‘丰香’叶片不定芽再生的影响

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<sub>3</sub> 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.