

草莓组培快繁及叶片诱导植株再生的研究

孙瑞芬¹, 李天然², 李¹, 邓香兰²,
石慧芹¹, 张颖力³, 贾利敏³

(1. 内蒙古农业科学院园艺研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010021;
3. 内蒙古农业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要: 以 4 个草莓品种的匍匐茎尖为起始材料, 试验以 MS 为基本培养基附加不同激素草莓茎尖诱导植株再生、增殖、生根的培养基, 确立了草莓组培快繁技术方法; 又以 4 个草莓品种的组培苗叶片为外植体, 探讨了不同激素配比、基因型对诱导草莓不定芽再生的影响; 通过进一步试验, 以 MS+ B₅ 有机为基本培养基附加 6-BA 2.253 mg/L、IAA 1.752 mg/L, 探讨草莓不同基因型及不同外植体对诱导不定芽再生的影响, 初步建立了一个有效的、较高频率的芽再生系统, 也为基因的转化找到一个较好的受体材料。

关键词: 草莓; 匍匐茎尖; 组培; 快繁; 叶片; 诱导

中图分类号: S668.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2002)04-0049-05

多年来, 通过常规育种, 人们对草莓的产量、果实大小和品质等特性进行了改良, 育成了不少抗病、抗虫、耐热、耐贮的新品种。但草莓多为八倍体, 遗传上高度杂合, 给杂交育种带来很大困难, 而且常规育种费时费力, 周期长, 见效慢, 不能适应草莓生产发展的需要。近年来, 生物技术的飞速发展, 为草莓育种开辟了一条新途径, 采用基因工程手段加速作物品种改良已获得了突破性进展^[1~4]。众所周知, 任何目的基因能否转移给受体并获得转基因植株, 其中一个首要条件就是必须先建立起稳定、高频率的芽再生系统。为此, 本试验以 4 个草莓品种为试材, 进行了茎尖快繁及叶片、叶柄诱导再生植株的试验研究, 建立起草莓的组培快繁体系及叶片诱导植株再生体系, 为草莓新品种引进与快繁以及实现遗传转化奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试品种星都一号、星都二号、全明星、戈雷拉由内蒙古农科院园艺研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 茎尖再生植株 摘取 0.5~1 cm 的草莓匍匐茎尖, 用纱布包好, 在流水下冲洗 1~2 h, 用蒸馏水冲洗 3 次, 再用 0.1% 升汞加 1~2 滴 Tween 80 消毒 10 min, 用无菌水冲洗 3~4 次, 然后用灭菌滤纸吸干水分, 将材料接种到 MS 附加不同浓度配比的 6-BA 和 NAA 的培养基上, 培养于温度为 22~28 ℃, 每日光照 16 h 的培养室中, 每瓶接 5 个材料, 每处理重复 5 瓶。培养出丛芽后, 转接在上述培养基中, 同样条件下继代培养。继代培养的植株长到一定大小时,

转接在 4 种不同生根培养基上, 即 1/2MS+ IBA 0.5 mg/L; 1/2MS+ IBA 1.0 mg/L; MS+ IBA 0.5 mg/L; MS+ IBA 1.0 mg/L。每处理重复 4 瓶, 每瓶接 5 株。

待植株长出数条白色须根后, 将瓶苗移到温室中, 打开瓶盖炼苗 3~5 d, 取出植株, 洗去根部粘附的培养基, 移入蛭石中, 浇透水并浇适量的 MS 贮备液, 保湿培养 7 d 观察其成活率。当植株抽出新叶后, 逐渐降低温度, 再经 20 d 过渡移入大田, 7 d 后调查其成活率。

1.2.2 叶片诱导植株再生 以 MS 及 MS 无机盐成分加 B₅ 有机成分(以 MS+ B₅ 表示)为基本培养基, 分别附加不同种类和浓度的激素制成芽再生培养基, 培养基 pH 值为 5.5~6.0, 121℃高压蒸汽灭菌 20 min。

从上述(1.2.1)无菌苗植株上剪取叶片, 并切去其顶端和底部, 垂直主脉在叶片内切 1~2 刀, 切成 4 mm×2 mm 的小叶盘, 将其远轴面朝上, 近轴面朝下, 接种在三角瓶内的培养基上, 每瓶 5 片叶, 每处理重复 5 瓶。

接种后, 将三角瓶置于弱光下培养 3 d, 转入光照培养箱中继续培养, 培养温度为(25±2)℃, 光照时间为 16 h/d, 光照强度为 2 500 lx。接种后 56 d 调查叶盘再生芽率和每叶盘平均再生芽数。

叶盘再生芽率(%) = 具再生芽的叶盘数/接种总叶盘数×100

叶盘平均再生芽数 = 总再生芽数/具再生芽叶盘数

2 结果与分析

2.1 茎尖再生植株培养

2.1.1 茎尖初始培养和继代培养 4 个草莓品种的匍匐茎尖接种 7 d 后, 均陆续开始萌动, 茎尖变绿并生长, 培养 14 d 后开始分化并形成丛芽, 培养 28 d 后, 观察结果表明, 4 个草莓品种均以在 MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.01 mg/L 中的单芽平均增殖数最多, 随着培养天数的增加, 丛芽数不断增加。将丛芽从基部切开, 转接到初始培养的 3 种培养基中继代培养, 不定芽很快萌发, 又迅速形成大量丛芽, 而且不同品种在不同培养基中单芽平均增殖数不同(表 1), 其中星都二号在以上三种培养基中的增芽数最多, 单芽平均增殖芽数为 9~10 个; 星都一号次之, 为 7~8 个; 全明星最少, 为 3~6 个; MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.01 mg/L 培养基的增芽效果最好。

2.1.2 生根培养 将继代培养的植株转接到 4 种生根培养基中培养 10 d 后, 植株基部逐渐形成愈伤组织, 继而出现白色根突, 25 d 后各品种在 4 种培养基中诱导生根率都为 100%, 但品种间在形成须根早晚、长短和多少上有差异。其中, 星都二号培养 15 d, 多数可形成 2 cm 左右的白色须根, 25 d 根长可达 3 cm, 发根数在 8 条以上; 星都一号培养 15 d, 多数形成 1 cm 左右的白色须根, 25 d 根长可达 2 cm, 发根数在 5 条以上; 全明星、戈雷拉较前 2 个品种形成须根晚些。4 个品种均在附加 0.5 mg/L IBA 的培养基中生根效果好, 但在 MS+ IBA 0.5 mg/L 中形成的根更粗一些, 是草莓最适生根培养基。另外, 在生根试验中, 我们还在培养基中添加了 0.15% 的活性炭, 其生根效果更加显著, 主要表现在生根提早、须根增长, 这与植物根系适应土壤中黑暗环境的生理反应是相一致的。

2.1.3 炼苗移栽 当植株须根长到 5 cm 时, 移入蛭石中, 保持湿度 70%, 7 d 后观察 4 个品

种成活率均为 90% 以上，移栽 10 d 后开始抽出新叶，这时可逐渐降低湿度，再经过 20 d 以上过渡，当外界气温适宜时(呼市地区在 4 月中下旬) 即可移入大田，7 d 后调查移栽成活率均达 95% 以上。在田间进行常规的土、肥、水管理，当年或次年就可结果，果实外观好，果形均匀整齐。

表 1 不同品种在不同培养基中的诱芽情况

| 品 种 | 培养基 | 单芽平均增殖数(个) | |
|------|------------------------------------|-------------|------|
| | | 初始培养 | 继代培养 |
| 星都一号 | MS+ 6 BA 1.0 mg/ L | 2.0 | 7.6 |
| | MS+ 6 BA 1.0 mg/ L+ NAA 0.01 mg/ L | 3.0 | 8.4 |
| | MS+ 6 BA 0.5 mg/ L+ NAA 0.01 mg/ L | 1.0 | 7.4 |
| 星都二号 | MS+ 6 BA 1.0 mg/ L | 1.0 | 9.3 |
| | MS+ 6 BA 1.0 mg/ L+ NAA 0.01 mg/ L | 2.8 | 9.9 |
| | MS+ 6 BA 0.5 mg/ L+ NAA 0.01 mg/ L | 1.0 | 9.2 |
| 全明星 | MS+ 6 BA 1.0 mg/ L | 3.0 | 4.9 |
| | MS+ 6 BA 1.0 mg/ L+ NAA 0.01 mg/ L | 4.0 | 5.9 |
| | MS+ 6 BA 0.5 mg/ L+ NAA 0.01 mg/ L | 1.0 | 3.4 |
| 戈雷拉 | MS+ 6 BA 1.0 mg/ L | 1.0 | 5.7 |
| | MS+ 6 BA 1.0 mg/ L+ NAA 0.01 mg/ L | 2.0 | 7.1 |
| | MS+ 6 BA 0.5 mg/ L+ NAA 0.01 mg/ L | 0 | 5.0 |

2.2 叶片诱导植株再生

2.2.1 叶盘接种后的形态变化 叶盘接种在芽再生培养基上 7 d 后开始膨大，边缘向远轴面卷曲，随着培养天数的增加，切口处逐渐形成愈伤组织。

在含 6-BA 和 NAA 以及只含 6-BA 的培养基中，形成愈伤组织的叶盘数量较多；在含 ZT 的培养基中次之；在含 KT 的培养基中几乎不形成愈伤组织。以上形成的愈伤组织普遍为白色，而且质地疏松，均未见不定芽形成。

在含 6-BA 和 IAA 的培养基中，4 个品种均可形成黄绿色、致密的愈伤组织，继续培养 30 ~ 40 d 后，不定芽开始形成，而且数量逐渐增加，多数呈丛芽状。叶盘再生的不定芽可在茎尖继代培养基中长成小植株。

表 2 不同基因型草莓在芽再生培养基上的再生芽率

| 培养基 | 星都一号 | 星都二号 | 全明星 | 戈雷拉 |
|-----------------------------------|------|------|-------|------|
| MS+ 6 BA 1.0 mg/ L | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS+ ZT 1.0 mg/ L | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS+ KT 1.0 mg/ L | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS+ 6 BA 1.0 mg/ L+ NAA 1.0 mg/ L | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS+ 6 BA 2.0 mg/ L+ NAA 1.0 mg/ L | 0 | 0 | 7.10 | 0 |
| MS+ 6 BA 3.0 mg/ L+ NAA 1.0 mg/ L | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS+ 6 BA 4.0 mg/ L+ NAA 1.0 mg/ L | 0 | 0 | 0 | 7.00 |
| MS+ 6 BA 1.0 mg/ L+ IAA 0.1 mg/ L | 1.11 | 2.50 | 6.00 | 0 |
| MS+ 6 BA 2.0 mg/ L+ IAA 0.2 mg/ L | 8.00 | 8.00 | 10.00 | 0 |

2.2.2 激素配比对不同基因型草莓叶盘不定芽再生的影响 取叶龄基本一致的叶盘分别接种

于多种诱导芽再生培养基上, 观察芽再生情况(表 2), 结果表明, 在附加 6-BA 和 NAA 的组合中, 只有全明星和戈雷拉有不定芽再生能力, 而且再生芽率均为 7%, 但这两个品种要求 6-BA 浓度分别为 2.0 mg/L, 4.0 mg/L。星都一号和星都二号在附加 6-BA 和 NAA 的组合中, 不管 6-BA 浓度多大, NAA 对其不定芽再生都不利, 均未诱导出不定芽。而在 6-BA 和 IAA 的组合中, 当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 时, 星都一号、星都二号、全明星都可诱导出不定芽, 而且以 6-BA 2.0 mg/L, IAA 0.2 mg/L 的配比组合中, 不定芽诱导再生率相对高些, 为 8%~10%。

以上结果表明, 激素配比对草莓叶盘不定芽再生率有明显影响, 而草莓的基因型对叶盘不定芽再生起着决定性作用, 全明星是属于易再生不定芽的基因型。

2.2.3 不同外植体对不定芽再生的影响 在以上试验的基础上, 我们进一步试验, 采用 Nehra 建立的 Redcoat 草莓高频率叶盘芽再生系统培养基^[5], 即将 MS 中的有机成份改为 B₅ 有机, 并附加 6-BA 2.253 mg/L, IAA 1.752 mg/L, 接种叶盘和叶柄(叶柄要刻伤), 培养 51 d 后观察芽再生情况(表 3), 结果表明, 不仅 4 个草莓品种的叶盘较以上所用培养基有较高的不定芽再生能力, 而且除戈雷拉外, 其余 3 个品种的叶柄也有不定芽再生能力。由于草莓基因型以及外植体不同, 不定芽再生率及每个外植体平均再生芽数有很大差别, 星都一号的叶柄不定芽再生能力最强, 再生芽率为 71.79%, 平均再生芽数居中, 为 2.9 个; 全明星的叶盘、叶柄不定芽再生能力都较强, 再生芽率分别为 58.89% 和 57.60%, 而且平均再生芽数也较多, 分别为 3.0 个和 3.8 个; 星都一号和星都二号的叶盘不定芽再生率相对低些, 在 20%~25% 之间, 但它们的平均再生芽数较多, 在 3.0~4.0 个之间, 而星都二号的叶柄不定芽再生能力较低, 仅为 12.50%, 平均再生芽数也只有 1.0 个; 戈雷拉的叶盘不定芽再生率很低(10.86%), 叶柄则没有诱导出不定芽。由此表明, 不仅草莓的基因型影响不定芽再生, 而且外植体也对不定芽再生有影响。

表 3 不同外植体对不定芽再生的影响

| 品种 | 叶 盘 | | 叶 柄 | |
|------|---------|-----------|---------|-----------|
| | 再生芽率(%) | 平均再生芽数(个) | 再生芽率(%) | 平均再生芽数(个) |
| 星都一号 | 24.24 | 4.0 | 71.79 | 2.9 |
| 星都二号 | 22.54 | 3.4 | 12.50 | 1.0 |
| 全明星 | 58.89 | 3.0 | 57.69 | 3.8 |
| 戈雷拉 | 13.16 | 1.0 | 0 | 0 |

3 结论与讨论

本研究成功地解决了 4 个草莓品种(星都一号、星都二号、全明星、戈雷拉)组培快繁的系列技术方法。

草莓叶片不定芽的诱导受其基因型、激素配比组合的影响, 其中基因型是决定性因子。全明星和星都一号是属于较易再生不定芽的品种。

草莓不定芽的再生不仅与基因型有关, 而且与其外植体来源有关, 全明星的叶片、叶柄均易再生不定芽, 星都一号叶柄易再生不定芽。

以草莓叶片、叶柄为外植体, 以 MS+ B₅ 有机+ 6 BA 2. 253 mg/L+ IAA 1. 752 mg/L 为芽再生培养基, 初步建立了一个有效的、较高频率的芽再生系统。

由于草莓地上部无茎节分化, 其叶片均为从基部发生的丛生叶, 不易区分其叶龄, 故本试验中, 是以靠近苗心的舒展叶片及其叶柄为研究材料, 有关叶龄对不定芽再生影响需进一步试验。

参考文献:

- [1] 李天然. 植物细胞组织培养与转基因植物[M]. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 1998 88- 98.
- [2] 朱文勇. 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.
- [3] 戴子林. 组织培养在草莓育种上的应用[J]. 江苏农业科学, 1994, (2): 59- 60.
- [4] 于冬梅. 基因型和培养因子对诱导草莓叶片再生芽的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 1998, 29(2): 138- 143.
- [5] Nehra N S, Stushnoff C, Kartha K K. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1989, 114(6): 1014- 1018.

Study on Tissue Culture and Regeneration Plantlet from Strawberry Leaf

SUN Ruifen¹, LI Tianran², LI Kun¹, DENG Xianglan¹,
SHI Huirong¹, ZHANG Yingli³, JIA Limin³

(1. Institute of Horticulture, Inner Mongolia Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010010, China;

2. Faculty of Life Science, Inner Mongolia University, Huhhot 010010, China;

3. Inner Mongolia Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: The medium of regeneration plantlet from shoot tip of strawberry creeping stem supplemented with different hormones was worked out. The protocol of tissue culture and rapid propagation has been developed. The influences of hormone condition, genotypes on shoot regeneration from leaf disc of strawberry were examined. By further studying, the effects of genotypes and explants on shoot induction were also examined when basal medium was MS+ B₅ supplemented with 2. 253 mg/L 6 BA and 1. 752 mg/L IAA. An efficient and higher frequency method of direct shoot regeneration has been established. Meanwhile, a suitable receptor material of genetic transformation.

Key words: Strawberry; Shoot tip of creeping stem; Tissue culture; Rapid propagation; Leaf disc; Induction