

# 草莓组培苗体细胞无性系变异研究

胡盼盼<sup>1,2</sup>, 赵霞<sup>1,2</sup>, 李刚<sup>1,2</sup>, 李亮杰<sup>1,2</sup>, 秦豹<sup>2</sup>, 彭卓<sup>2</sup>, 周厚成<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院东海农业综合试验站, 江苏东海 222300; <sup>2</sup>中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

**摘要:**组培过程中变异的普遍性, 显著影响植物的遗传稳定性, 限制组培技术在农业生产上的应用。草莓组培苗已在农业生产中广泛应用, 但变异却时有发生, 严重影响其生产效益。因此, 如何有效控制变异的发生是草莓及其他组培快繁技术中亟待解决的问题。笔者分析了影响组培变异的主要因素有外植体类型、基因型、培养基中激素种类和配比、继代培养的时间和次数, 和内在遗传机理如染色体异常、转座子活化和基因突变等, 针对这些影响因素, 建议选择幼嫩的外植体、优化培养基配方、控制增殖系数和继代次数以及选择合适的光照和温度等培养条件, 控制组培过程中变异的发生。同时, 利用形态观察和 RAPD、SSR 等技术对组培苗进行检测, 及时剔除变异组织或变异植株, 减少变异对生产的不利影响。通过总结草莓组培中变异发生的原因和有效控制变异的途径, 为包括草莓在内的植物脱毒组培快繁技术的健康发展提供参考, 同时, 对变异的深入认识, 为植物品种改良和新品种的选育提供了新思路。

**关键词:**草莓; 体细胞无性系变异; 快繁; 应用

中图分类号: S668.4

文献标志码: A

论文编号: casb15100124

## Strawberry Plantlets Somaclonal Variation

Hu Panpan<sup>1,2</sup>, Zhao Xia<sup>1,2</sup>, Li Gang<sup>1,2</sup>, Li Liangjie<sup>1,2</sup>, Qin Bao<sup>2</sup>, Peng Zhuo<sup>2</sup>, Zhou Houcheng<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Donghai Agricultural Experimental Station, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Donghai Jiangsu 222300;

<sup>2</sup>Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009)

**Abstract:** Variations are easily induced in tissue culture of plants. They significantly affect the genetic stability of plants, and limit the application of tissue culture technology in agriculture. Strawberry *in vitro* seedlings have been widely used in agricultural production. However, the variations often occur in tissue culture of plant, which seriously influence the agricultural production efficiency. Therefore, it is an urgent problem to effectively control the occurrence of the variations *in vitro* rapid propagation of strawberry and other plants. The main factors affecting the occurrence of the variations were analyzed. These factors included explant types, genotypes, the types and proportion of different hormones in the medium, the time and times of subculture. And the inherent genetic mechanism of the variations had chromosomal abnormalities, transposon activation, gene mutation and so on. In order to effectively control the variation occurrence in tissue culture of strawberry, it was suggested to select the young explants, optimize the culture medium formula, control the multiplication coefficient and the subculture times, and culture the tissues under proper light and temperature conditions. Meanwhile, using the methods of morphological observation, RAPD, SSR and so on to detect the variations in tissue culture seedlings could eliminate the variant seedlings and reduce the adverse effects of the variant plants to production. By summarizing the causes and the effective controlling ways of the variation of

**基金项目:**江苏省科技计划-产学研前瞻性联合研究项目“超低温疗法脱除草莓病毒技术体系的创建及应用”(BY2013049); 苏北科技发展计划-科技富民强县项目“特色果蔬种植与加工科技创新平台建设”(BN2014018)。

**第一作者简介:**胡盼盼, 女, 1988 年出生, 河南鹤壁人, 硕士, 研究方向为草莓遗传育种。通信地址: 450009 河南郑州市未来路南端 中国农业科学院郑州果树研究所, E-mail: hupanpan201@163.com。

**通讯作者:**周厚成, 男, 1974 年出生, 河南信阳人, 副研究员, 博士, 主要从事草莓遗传育种研究。通信地址: 450009 河南郑州市未来路南端 中国农业科学院郑州果树研究所, Tel: 0371-65330972, E-mail: zhouhoucheng@caas.cn。

**收稿日期:** 2015-10-28, **修回日期:** 2015-12-08。

strawberry *in vitro*, it would provide valuable reference for the healthy development of plant virus-free tissue and rapid propagation of plants including strawberry. Moreover, the deep understanding of variation would provide a new way for the improvement and breeding of new varieties.

**Key words:** strawberry; somaclonal variation; rapid propagation; application

## 0 引言

组培即组织培养,又称离体培养,是根据植物细胞具有全能性的理论,利用外植体,在无菌操作条件下进行人工培养以获得完整再生植株或生产具有经济价值的其他产品的无性繁殖技术。草莓组织培养是指用草莓各部分组织,如叶片、茎尖、花药和幼胚等进行培养获得再生植株,也可通过愈伤组织的产生经过再分化形成再生植株的培养技术。

草莓的植物学分类为蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria*),是多年生的草本植物,在园艺学上属浆果类果树<sup>[1]</sup>,其果实香味浓郁、酸甜可口,营养价值高,深受大众喜爱。草莓可进行种子繁殖、分株繁殖、匍匐茎繁殖和组培繁殖,其中,种子繁殖生产效率低,品质不佳,故生产中不常使用,而长期的匍匐茎繁殖,导致植株易受病毒侵染而使得品种退化,产量和质量等均明显下降<sup>[2]</sup>。基于上述原因,草莓无毒苗组培快繁技术得以大量应用和推广。Miner于1963年最先成功地通过茎尖的组培获得了草莓再生植株,随后,20世纪70年代欧洲最先实现了草莓微繁殖的商业化。国内,覃兰英等<sup>[3]</sup>于1981年进行了草莓茎尖离体组培,结果显示组培繁殖可以得到比田间高得多的繁殖系数,且于1985年中国建立了第一个草莓脱毒苗基地,此后草莓的各种器官、组织和细胞等的组培快繁研究迅速发展起来,全国多家科研院所和公司都先后进行了脱毒试管苗的繁殖工作,逐渐实现了草莓脱毒研究及组培生产技术体系的产业化<sup>[4-7]</sup>。

但是,随着对组培体细胞无性系变异的发现和深入研究,发现无性系变异的普遍性严重影响了组培的产业化生产,直接导致组培再生苗质量和品质的下降,阻碍了组培快繁技术的生产应用前景。因此如何有效控制无性系变异的发生,降低变异在组培生产中的发生频率,是确保组培快繁产业化生产持续发展的关键。基于此,笔者对组培体细胞无性系变异的类型、原因、遗传机理和控制途径进行了总结与分析,并对组培快繁技术的生产应用前景进行了展望。

### 1 草莓组培体细胞无性系变异产生的原因和遗传机理

组培体细胞无性系变异,简称组培变异,根据其遗传稳定性,可分为表观遗传变异和遗传变异。表观遗传变异通常表现为生长势、产量及繁殖系数的变化,和

部分生理生化指标如可溶性固形物、糖酸比及与抗性相关的酶活性的变化,其遗传物质未发生改变,后代的表型不受影响<sup>[8]</sup>;遗传变异则表现为遗传物质发生改变,后代的表型受到影响,且在后代中可稳定遗传,目前的研究发现组培变异多为遗传变异。组培变异的发生,严重影响了应用组培技术进行快繁的产业化生产效益,但同时也为植物品种改良和选育新品种提供了新的材料和途径<sup>[9-10]</sup>。

#### 1.1 组培变异产生的可能原因

影响草莓组培变异的外在原因有外植体类型、植物基因型、激素种类与配比、继代时间和次数等。

组培中外植体的选取和植物的基因型,直接影响组培变异发生的频率,选取的外植体离器官分化生长越远,时间越久,体细胞的无性系变异频率就越高,而对品种基因型的组培试验发现,材料基因型不同,组培出愈率、胚性愈伤组织诱导率及成苗率不同,组培变异率也不同,有的基因型较易发生变异,有的则不易发生变异<sup>[11-12]</sup>。

对培养基成分的研究发现,激素和碳源是影响组培变异的关键因素,组培过程中激素对组织或器官的分化具有重要的调控作用,细胞分裂素促进细胞分裂,促进多种组织的分化和生长,可诱导芽的形成和促进芽的生长;生长素则主要用于促进植物主根生长,提高发芽率和成活率,促进细胞生长。激素作为外源添加物,其配比、种类和水平均对变异的诱导和发生频率密切相关<sup>[13]</sup>。已报道的试验表明,混合激素和单一激素的培养基,其组培变异诱变率不同,多数研究表明混合激素的使用易导致高的组培变异率<sup>[14]</sup>。对组培培养基中激素种类的研究发现,与IBA、IAA和NAA相比,2,4-D在组培细胞的脱分化、愈伤组织诱导和胚性细胞形成的过程中作用显著,可加速细胞生长、降低细胞周期所需的时间,但是其诱变作用显著,诱变率大于不含该激素的组培培养基,且不同草莓品种组培所需最优激素类型不同<sup>[15-16]</sup>。此外,对激素浓度的研究发现,较高的激素浓度可产生高的细胞分裂数和增殖系数,但会导致组织生长或发根不良,产生高比例的矮化、褐化和玻璃化苗等不利变异<sup>[17]</sup>。培养的植物组织或细胞,它们的光合作用较弱,因此需在培养基中附加一些碳水化合物以供需求。培养基中碳素的主要来源有蔗

糖、果糖和葡萄糖,若考虑到组培成本,也可使用食用白糖,但需适量增加用量,对上述碳源的研究表明,以蔗糖为碳源的培养基中,草莓再生苗质量较好且玻璃化水平较低,同时,对蔗糖浓度的研究发现,培养基中高浓度的蔗糖会导致再生苗的玻璃化和较高的变异率<sup>[18]</sup>。

组培条件对变异的影响,在由愈伤组织形成再生植株的过程中更加显著。组培过程中,大多数植物都需要先经过愈伤组织的培养,然后再进行形态发生过程,愈伤组织是植物组培中的关键。植物愈伤组织由未分化的薄壁细胞组成,细胞处于多变、未定型的阶段,结构疏松,分裂快,自我增殖能力旺盛,可分化形成不同的器官原基,因此再分化过程中极易受到外界环境的影响,各种影响变异发生的因素在这一过程中作用明显,可导致更高的变异发生频率。组织培养中愈伤组织的继代培养次数,也是影响变异的重要因素之一,继代培养时间越长,继代次数越多,遗传物质在培养过程中受到的影响就越大,其稳定性就越难保留,对组培苗的损害就越大,组培变异率也就越高<sup>[19]</sup>。

## 1.2 组培变异产生的遗传机理

目前,对草莓组培变异内在因素的研究揭示,变异的分子机理主要包括染色体异常、转座子活化和基因突变等。

冯建荣等<sup>[20]</sup>在草莓的组培试验中发现再生苗染色体行为的变异,单春华等<sup>[21]</sup>发现草莓组培再生苗体细胞约有20%左右发生染色体变异,其中染色体减少的细胞占多数,部分为多倍体细胞,此外也发现了水稻和小麦等的愈伤组织或再生植株中较高频率的染色体数目和结构变异<sup>[22-23]</sup>。Amato<sup>[24]</sup>认为体细胞培养有丝分裂过程中纺锤体的异常,使得染色体不均匀分离、仅移向一极、分离延迟或不能进行聚集等,导致细胞染色体数目和结构的异常,同时,无丝分裂过程中,染色体的分离不经过纺锤丝的牵引因而更容易产生错误分配,造成染色体数目异常。目前,对染色体断裂导致的结构异常,其作用机制尚不清楚。组培再生植株或愈伤组织中,染色体畸变越多,植株的损伤程度也就越大。组培过程中,由于细胞分裂速度加快,相对的染色体的复制就发生滞后,从而导致了染色体复制完成后不能及时地分配到子细胞,相应的后代染色体结构和数目发生异常<sup>[25]</sup>。

转座子的活化对组培变异具有重要作用。在植物组织培养过程中,许多低拷贝反转录转座子被激活<sup>[26]</sup>,同时一些高拷贝反转录转座子也具有转录活性<sup>[27]</sup>,且转座频率随培养时间的延长而增加。组培染色体结构

的异常中,诱导了转座子通过去甲基化激活转座作用,修复染色体的断裂部位,引起一系列基因的活化和失活,导致基因突变或染色体畸变,但目前尚不清楚其作用机制和遗传效应的稳定性<sup>[28-29]</sup>。

草莓愈伤组织脱分化和再分化过程中,由基因突变导致的组培变异率很高,与染色体异常导致的变异相比,其对再生植株的损伤较小,但能够很快地进行稳定遗传<sup>[29-30]</sup>。植物细胞经一定时期的离体培养后,基因组中的碱基会发生甲基化的修饰从而影响基因的表达,DNA甲基化与基因的表达密切相关,甲基化水平的变化,可通过改变染色质结构或者与蛋白互作影响转录因子活性,从而抑制或促进基因的表达<sup>[31-32]</sup>。韩伯明等<sup>[33]</sup>对组培导致草莓DNA甲基化变异的研究发现,组培导致了草莓再生苗中DNA甲基化水平的不稳定变化,甲基化水平升高或降低直接影响了基因的表达,使组培再生苗发生基因突变。对组培变异中甲基化稳定性的研究表明,该突变在自交后代中可稳定遗传,但是杂交后代不能保证该变异的稳定遗传,推测其可能遵循孟德尔遗传定律<sup>[34]</sup>。

## 2 组培变异对生产的不利影响

目前,随着组培技术在生产上的大量应用,组培变异的普遍性引起了广大研究者和生产者的重视,变异使得再生苗的遗传稳定性,即保持原良种的特性发生改变。通过植物组织培养获得大量形态和生理特性不变植株的过程中常出现变异,且多为不良变异,这严重影响了组培技术在生产上的推广和应用。

草莓组培快繁中,常发现部分有害变异植株,组培初期,变异组织或幼苗表现为褐化或玻璃化,叶片畸形,部分幼小的再生苗转接后不能正常生根;随后炼苗阶段,变异植株生长缓慢,植株矮小;后期大田育苗和生产阶段,变异再生苗对环境适应性差,抗病虫害和抗逆性显著降低,部分无法进行匍匐茎繁殖,生产后期不开花,果实产量低和畸形果严重等<sup>[35]</sup>。Kinet等<sup>[36]</sup>证实了草莓组培变异苗在果实期出现畸形果,果实变小,对变异的草莓苗进行繁殖,发现这一表型可进行稳定遗传。对多数不利变异进行深入研究,发现变异性状在后代中能进行稳定遗传,这一发现将会给生产带来极大的不利影响,严重影响草莓组培苗的产业效益。

组培变异不仅在草莓的组培快繁生产中具有不利影响,在其他植物的组培快繁中也有严重的有害影响,如在香蕉的微繁殖体系中,变异的植株有矮化株和乔化株,变异植株叶片畸形,出现嵌纹叶、条斑叶和扇形叶等,果实成熟期果穗小,果指短,产量低,经济价值下

降,变异还使得再生植株易感病虫害,抗性减弱,出现畸形果,果实产量降低<sup>[37]</sup>。变异在植物的组培快繁生产上造成很大的经济损失,且容易引起经济纠纷<sup>[38]</sup>。因此,应严格控制组培快繁技术中变异的发生。

### 3 组培变异的检测和控制

组培变异严重阻碍了中国组培苗的产业化发展。组培愈伤组织或细胞一旦发生变异,就可随继代次数的增加而增多,如未及时采取必要的措施,变异苗数量将呈几何级数增长,给生产带来严重后果。值得一提的是,有些变异在组培过程中不易发现,到大田种植后才被发现,其经济损失更大<sup>[39]</sup>。

组培变异的发生有其遗传学基础,可从形态学、细胞学、生物化学和分子生物学等多个方面对其进行检测和鉴定<sup>[40]</sup>。目前常使用的检测技术有 RFLP、RAPD、SSR 等,采用这些方法可在组培苗中发现表型上观察不到的 DNA 水平变异的组织或幼苗,对其及时进行剔除,可减少后期对生产造成的不利影响<sup>[41-42]</sup>。

对草莓组培变异的控制,首先,在外植体的选择上尽量采用优良品种做采样体,品种基因型上筛选不易变异的品种进行快繁,后续采样和灭菌方法均需进行优化,确定最优的实验方案。其次,激素的使用过程中,激素组合不可太多,浓度也不宜太大,培养基成分需进行多组合优化选择,培养的光照与温度条件等也需要进行多梯度选择。最后,进行愈伤组培时,继代培养要及时进行更新,且间隔时间不宜太长,采取以上措施可达到减少组培变异的目标<sup>[43-45]</sup>。此外,对于组培中的有害变异,最先在增殖、壮苗和生根的转接过程中通过其表型的变化,去除外形颜色上差异明显的植株;然后对后期炼苗和大田繁殖时期,有明显表型变化的植株,例如生长缓慢,植株矮化,抗性减弱,不产生匍匐茎,叶形和叶色异常等,及时进行剔除,可有效减少组培中的有害变异。

对于草莓组培快繁过程中的变异,主要可通过以下两种途径进行有效控制。(1)控制变异发生的培养条件。在充分了解引起变异的可能因素和变异产生的理论基础上,采取多种措施减少组培过程中变异的发生频率,剔除表型上可观察到的可能变异组织或植株。草莓组培快繁过程中,应严格控制繁殖系数在 5.0 以下,避免细胞分裂素浓度过高产生大量芽丛;筛选不同品种的最适生长素种类和使用浓度,避免培养过程中产生高变异率的愈伤组织;控制继代增殖代数在 8 代以下。(2)改变组培脱毒苗生产流程。现有草莓脱毒苗生产主要通过茎尖培养脱毒获得经病毒检测的无毒苗,进而在组培条件下进行长时间大量扩繁,这样势必

增加变异的概率。建议不再进行组培快繁,仅在脱毒环节进行茎尖组培,单个茎尖生长为完整植株,经病毒检测确认不带病毒后直接生根移栽,然后在隔离网室的无土基质上进行匍匐茎繁殖一代种苗,即所谓的单茎尖培养。

### 4 组培变异的利用

组培变异在植物组培过程中普遍存在,生物技术研究者和利用组培技术进行快繁的生产者致力于变异的控制,但育种家则认为可对其进行植物品种改良和新品种选育的利用,因此,需全面分析组培中的变异问题。

组培变异在草莓的品种改良和选育中研究的较少,成果不显著,但是利用组培变异,可有目的地进行作物新品种或新种质的培育与筛选,组培变异经人工选择和培育,能获得保留亲本原始优良性状和某些新性状的新品种。通过与人工诱变相结合,可大大增加组培变异频率,提高有益突变体的筛选概率,在组培培养基中添加特定的选择压力,可有目的地筛选到抗性较好的突变体材料<sup>[46]</sup>。组培中利用染色体的变异,可培育出与亲本倍性差异明显的新品种<sup>[47]</sup>。

组培变异植株中可观察到抗性明显提高的有益突变体,因此在组培中可有目的地结合物理或化学诱变,进行有益新品种和新材料地筛选。组培变异为育种提供了大量试验材料,充分利用这些材料可为选育高产优质高抗的新品种提供一个全新的途径<sup>[48-49]</sup>。植物组培产生的突变概率显著高于传统的无性繁殖,世界范围内,通过组培变异已经选育出了众多具有优良性状的新品种,例如观赏植物兰花的很多新品种就来自组培变异,此外,对病害有明显抵抗力的香蕉优良品系,和少数高产优质的草莓等均可来自组培变异,组培变异产生的优良品种在生产中已创造了巨大的经济效益<sup>[50-52]</sup>。因此,随着组培技术的日益成熟,如何有效利用草莓组培中的变异进行草莓新品种的选育,是草莓组培研究者致力于未来草莓新品种培育的新方向。

植物组培变异受很多因素的影响,其中因品种基因型导致的变异中,后代的变异表型和变异频率差异明显,对影响变异发生频率的因素有目的地进行人工控制,可获得较多具有目的性状的变异植株,同时有望通过组培和克隆技术的结合实现品种内目的基因的转移,从而选育出新的植物品系<sup>[53]</sup>。综上所述,组培变异在植物品种改良和新品种培育方面具有重要的指导意义。

## 5 展望

### 5.1 草莓组培苗产业发展应用

草莓组培苗中的有害变异严重影响了组培苗在生产中的应用,但是在了解引起变异的可能因素和变异的理论基础上,通过对培养条件的优化选择结合生物技术检测手段,可有效控制变异的发生,可在技术层面上缓解组培变异带来的不利影响,且草莓传统的匍匐茎无性繁殖方式因其病毒感染严重、品种退化、繁殖系数低、繁殖速度慢,已不能满足当前草莓规模化生产的实际需求,市场急需大量优质草莓苗的供给,因此,草莓组培脱毒苗在生产上的应用不可或缺。

目前,对草莓组培苗变异的研究较少,但是变异组培苗在生产中日益突出的不利影响,使组培变异的有效控制显得愈加重要。因而,今后草莓组培苗的生产中应加强管理和检测,尤其对脱毒苗要进行严格的病毒检测,对组培中变异的检测要提早进行,严密监控组培的每个流程,尽早发现和减少变异对生产的不利影响。中国组培技术体系尚缺乏统一的监管制度,各科研单位的技术水平不一,对组培变异的认识和研究程度不尽相同,对变异的有效控制也多有差异,因此,如何统筹管理组培技术的产业化生产,是未来组培产业化发展的重要前提。

### 5.2 组培变异机理的研究和应用

组培变异的普遍性和其在组培快繁生产中的不被重视,使得有害的变异组培苗严重影响组培快繁的生产效益。通过生物技术检测方法,初步分析变异可能存在的遗传机理,且随着先进科学技术的日益发展,有望通过精细的测序和分析技术等,对组培快繁流程进行阶段性检测,分析组培变异的具体调控机制,进而有目的地寻找到合适的分子标记,用于变异组培苗的检测和剔除。对组培变异原理及其调控途径的深入研究,将有可能揭开表观遗传和遗传变异的真相,为如何有效控制组培变异提供更多切实可行的途径。

## 参考文献

[1] 雷家军,代汉萍,谭昌华,等.中国草莓属(*Fragaria*)植物的分类研究[J].园艺学报,2006,3(1):1-5.

[2] 朱丽君,张馨玉,袁云香,等.草莓组织培养的研究概述[J].辽宁农业科学,2014(6):56-58.

[3] 覃兰英,徐光霞,邓世秀.草莓茎尖离体培养大量繁殖研究初报[J].中国果树,1981,3:38-41.

[4] 司长征,蔡联军,李国强.红颜草莓组培脱毒壮苗快繁技术与应用[J].中国果菜,2013,4:6-9.

[5] 梁凤龙.几种草莓优良品种的组培快繁和脱毒苗生产技术研究[J].现代园艺,2013,10:23.

[6] 王晓云,张晓中,赵海红,等.草莓茎尖组培快繁技术研究[J].农业科技通讯,2014,12:124-125.

[7] 刘维,党聪,孟庆庆,等.草莓优良品种的组培快繁和脱毒苗生产技术研究[J].北京农业,2015(20):51-52.

[8] 张馨宇,张志宏,高秀岩,等.草莓微繁殖苗及其后代性状表观遗传变异研究[J].果树学报,2006,23(4):542-546.

[9] 赵月明,赵雁鸣,刘玉鲲,等.植物体细胞变异的防控及育种应用[J].植物学研究,2013,2:117-124.

[10] Bhojwani S S, Dantu P K. Plant tissue culture: an introductory text [M]. London, Springer, 2013:141-153.

[11] 李美林,张勇,朱丽君,等.草莓的组织培养研究进展[J].吉林农业,2013,8:14.

[12] 薛其勤,李美芹,吕金浮,等.不同基因型优质草莓组织培养快繁研究[J].北方园艺,2014(21):15-16.

[13] Kadhimi A A, Alhasnawi A N, Mohamad A, et al. Tissue culture and some of the factors affecting them and the micropropagation of strawberry[J]. Life Science Journal, 2014, 11(8):484-493.

[14] 王婷婷,蔡蕊,武慧,等.激素配比对草莓叶片不定芽分化的影响[J].北方园艺,2014(8):96-99.

[15] 李会珍,徐东进,陈登金,等.不同植物生长调节剂对脱毒红颜草莓组培快繁的影响[J].江苏农业科学,2013,41(20):43-45.

[16] 刘福平.植物体细胞无性系变异的遗传基础及主要影响因素[J].基因组学与应用生物学,2010,29(6):1142-1151.

[17] Guo L F, Xue F D, Guo J F, et al. Plant tissue culture: a recent progress and potential applications[J]. Agricultural Science & Technology, 2014, 15(12):2088-2095, 2099.

[18] 金真,王康丽,梁佳惠,等.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,2015,5(8):73-77.

[19] Nehra N S, Kartha K K, Stushnoff C, et al. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 29(3):257-268.

[20] 冯建荣,樊新民,马兵刚,等.草莓愈伤组织诱导苗染色体行为变异的研究[J].石河子大学学报,2001,5(1):27-29.

[21] 单春华,邢如义.组织培养条件下草莓染色体数变异[J].农机化研究,2002,1:106-107.

[22] Zhang D, Wang Z H, Wang N N, et al. Tissue culture-induced heritable genomic variation in rice, and their phenotypic implications[J]. PLoS One, 2014, 9(5):e96879.

[23] Kumar S. Studies on plant regeneration and somaclonal variation in wheat[D]. Indian, Chaudhary Charan Singh University, 2014.

[24] Amato F D, Bayliss M W. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1985, 3(1):73-112.

[25] Mujib A, Banerjee S, Ghosh P D. Tissue culture induced variability in some horticultural important ornamentals: chromosomal and molecular basis-a review[J]. Biotechnology, 2013, 12(6):213-224.

[26] Liu Z L, Han F P, Tan M, et al. Activation of a rice endogenous retrotransposon *Tos17* in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(1):200-209.

- [27] Suoniemi A, Narvanto A, Schulman A H. The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays[J]. *Plant Molecular Biology*,1996,31(2): 295-306.
- [28] Azman A S, Mhiri C, Grandbastien M A, et al. Transposable elements and the detection of somaclonal variation in plant tissue culture: a review[J]. *Malaysian Applied Biology*,2014,43(1):1-12.
- [29] Neelakandan A K, Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications[J]. *Plant Cell Report*,2012,31(4):597-620.
- [30] Zhang Z H. Epigenetic and genetic variation in micro-propagated strawberry plants[J]. *Acta Horticulturae*,2014,1049:63-66.
- [31] Stelpflug S C, Eichten S R, Hermanson P J, et al. Consistent and heritable alterations of DNA methylation are induced by tissue culture in maize[J]. *Genetics*,2014,198(1):209-218.
- [32] Wang X, Wu R, Lin X, et al. Tissue culture-induced genetic and epigenetic alterations in rice pure-lines, F<sub>1</sub> hybrids and polyploids [J]. *BioMed Central Plant Biology*,2013,13:77.
- [33] 韩柏明,赵恺,李贺,等.组织培养导致的草莓DNA甲基化变异[J]. *植物生理学通讯*,2010,46(8):797-802.
- [34] Mohamed A E. Somaclonal variation in micro-propagated strawberry detected at the molecular level[J]. *International Journal of Agriculture & Biology*,2007,9(3):721-725.
- [35] Haque M S, Nath U K, Iqbal M S, et al. Assessment of field performance and genetic diversity analysis of tissue culture variants of strawberry[J]. *Journal of Agricultural Technology*,2015,11(1): 107-125.
- [36] Kinet J M, Parmentier A. The flowering behaviour of micropropagated strawberry plants cv. 'Gorella': the influence of the number of sub-cultures on the multiplication medium[J]. *Acta Horticulturae*,1989,265(48):327-334.
- [37] Abdellatif K F, Hegazy A E, Aboshama H M, et al. Morphological and molecular characterization of somaclonal variations in tissue culture-derived banana plants[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*,2012,10(1):47-53.
- [38] Bairu M W, Aremu A O, Staden J V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods[J]. *Plant Growth Regulation*,2011,63 (2):147-173.
- [39] 吴伟怀,郑肖兰.香蕉组培苗变异的原因、防止及其利用研究综述 [J].*中国南方果树*,2007,36(4):31-34.
- [40] 丰先红,李健,罗孝贵.植物组织培养中体细胞无性系变异研究[J]. *中国农学通报*,2010,26(14):70-73.
- [41] 温映红,杨明霞,王俊宇,等.生物技术在草莓遗传育种中的应用[J]. *农学学报*,2014,4(8):88-91.
- [42] Sales E K, Butardo N G. Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers[J]. *International Journal of Biological*,2014,8(6):615-622.
- [43] Bose L K, Kar M, Bhattacharya B, et al. A highly efficient and improved protocol for exploitation of somaclonal variation for enhancing alien gene introgression in wide cross hybrid of *Oryza sativa/Oryza brachyantha*[J]. *African Journal of Agricultural Research*,2014,9(2):262-268.
- [44] Karim R, Ahmed F, Krishna Roy U, et al. Varietal improvement of strawberry (*Fragaria × ananassa* Dutch.) through somaclonal variation using *in vitro* techniques[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*,2015,17(4):977-986.
- [45] Yaacob J S, Mahmad N, Mat Taha R, et al. Optimization of culture conditions (sucrose, pH, and photoperiod) for *in vitro* regeneration and early detection of somaclonal variation in ginger lime (*Citrus assamensis*)[J]. *The Scientific World Journal*,2014,2014:262710.
- [46] Liu S M, Sykes S R, Clingeleffer P R. Improved *in vitro* embryo culture for stenocarpic grapes (*Vitis vinifera* L.)[J]. *Australia Journal of Agricultural Research*,2003,54(9):869-876.
- [47] 邹雪,肖乔露,文安东,等.通过体细胞无性系变异获得马铃薯优良新材料[J].*园艺学报*,2015,2(3):480-488.
- [48] 张东旭,周增产,卜云龙,等.植物组织培养技术应用研究进展[J].*北方园艺*,2011(6):209-213.
- [49] Rastogi J, Siddhant P B, Sharma B L. Somaclonal variation: a new dimension for sugarcane improvement[J]. *GERF Bulletin of Biosciences*,2015,6(1):5-10.
- [50] 徐刚.植物组培技术在花卉领域应用广阔[J].*中国花卉园艺*,2009, 4:12-13.
- [51] Nwauzomal A B, Jaja E T. A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp): mechanisms and applications[J]. *Journal of Applied Biosciences*,2013,67:5252-5260.
- [52] 高清华,叶正文,张学英,等.草莓生物技术育种研究进展[J].*分子植物育种*,2006,4(3):123-129.
- [53] Jamsheed S, Rasool S, Koul S, et al. Crop improvement through plant tissue culture[A]. Hakeem K R, Ahmad P, Ozturk M. *Crop Improvement*[C]. London, Springer,2013:123-148.