

丰香草莓叶片的植株再生研究

马崇坚, 吕斯君, 廖佩颖 (韶关学院英东生物工程学院, 广东韶关 512005)

摘要 [目的]为采用叶片组织培养技术进行大规模生产草莓种苗提供依据。[方法]以丰香草莓叶片为外植体,用4种不同的培养基诱导其愈伤组织,并对愈伤组织进行扩繁,筛选最佳的诱导培养基。[结果]MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基最快产生愈伤组织,愈伤组织诱导率、生根率、不定芽诱导率均最高,分别为69.4%、10%、11.67%,且愈伤组织体积较大,生根总数最多,不定芽生长茂盛,叶片多而大,最终获得具根系可移植室外的完整植株543株,增殖扩繁倍数达50,增殖效果极好。MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基的愈伤组织诱导率为63.8%,且愈伤组织体积最大。[结论]草莓叶片诱导愈伤组织、不定芽并最终获得大量再生植株的最佳培养基是:MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

关键词 草莓;组织培养;愈伤组织

中图分类号 S668.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)23-09888-02

Plant Regeneration of Strawberry Leaves of "Fengxiang"

MA Chong-jian et al (Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005)

Abstract [Objective] The purpose was to provide the basis for mass production of strawberry seedling by adopting of leaf tissue culture technology. [Method] With "Fengxiang" strawberry leaves as explant, its callus was induced with 4 kinds of different culture media, and expanding propagation was performed to on the callus, and the best induction medium was screened. [Result] The medium of MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L generated callus the fastest, on which, the induction rate of callus, rooting rate and induction rate of adventitious bud were all the highest, up to 69.4%, 10.00% and 11.67% resp., and the callus volume was bigger, the total number of rooting was the most, the adventitious bud grown flourishingly and leaves were more and big, eventually 543 complete plantlets with roots that could be transplanted to outdoors were acquired, the multiple of proliferation and expanding propagation was up to 50 and the proliferation effect was extremely good. On the medium of MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, the callus induction of was 63.8% and the volume of callus was the largest. [Conclusion] The optimal medium for strawberry leaves on inducing callus, adventitious bud and acquiring plenty of regenerating plantlet eventually was: MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L.

Key words Strawberry; Tissue culture; Callus

草莓(*Fragaria ananassa* Duch)是当今世界7大水果之一^[1],是一种低热量、低糖的佳果,含钙、磷、铁、抗坏血酸、柠檬酸、苹果酸和多种氨基酸,为很好的滋补果品^[2]。草莓生产在我国的历史很短,但近年来草莓作为一种新兴水果在全国各地迅速发展。草莓在栽培上多用无性繁殖种苗,不仅效率低,种苗易退化,果实渐小,严重影响草莓产量和品质,且使病毒积累逐年加重,草莓病毒的危害可使草莓减产30%~80%^[3]。我国因草莓病毒每年减产35万t,直接经济损失30亿元^[4],给草莓产业带来灾难性的危害。不少草莓生产基地对草莓组培、扩繁等进行了系统的研究^[5],但在实际应用上还有待加强。笔者以韶关当地栽培的丰香草莓叶片为材料进行组织培养,试图建立以叶片为材料的草莓组织培养再生体系,以解决草莓病毒病引起草莓良种退化的难题,为草莓组织培养种苗大规模的推广种植奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 摘取健壮丰香草莓嫩叶为试验材料。

1.2 方法 将采回的新鲜嫩叶用自来水冲洗干净,再用自来水浸泡备用;在超净工作台内用浓度75%酒精浸泡20~30s,然后用浓度0.1%的HgCl₂消毒叶片4~6min,无菌水冲洗4~5次;将经消毒处理好的叶片置于无菌培养皿上,用接种刀沿垂直主脉的方向切1~2刀,最后切成约为1cm×1cm的小片,接种在浓度分别为0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L 6-BA同时附加0.1 mg/L NAA的培养基上,分别标记为1、2、3、4号培养基。接种完成后置于恒温箱中进行暗培养诱导愈伤

组织,温度为(24±2)℃。产生一定的愈伤组织后,转为光培养诱导芽和根的分化。连续观察和记载外植体的变化以及愈伤组织、不定芽和不定根产生时间及发育状况。

2 结果与分析

2.1 不同激素对叶片诱导愈伤组织的影响 试验结果表明,暗培养10d后,叶片开始膨大,边缘向远轴面卷曲,颜色变浅。20d后,明显可见愈伤组织形成并迅速膨大,叶片切口边缘形成更多白色愈伤组织,但各处理出现的时间和数量有所差异(表1)。由表1可知,在不同的处理中,1号培养基最快产生愈伤组织,其愈伤组织的体积较大,颜色在暗培养的条件下是淡黄色。在后期转为光培养,则转为土黄色和淡绿色,诱导率为69.4%,相对其他的培养基处理,其诱导率最高。如果追求高的诱导效率,1号培养基处理是试验各处理中最好的。2号培养基的外植体产生愈伤组织时间略迟,但其愈伤组织的体积是最大的,颜色为淡黄色,诱导率为63.8%,比

表1 不同激素组合对叶片形成愈伤组织的影响

Table 1 Effects of hormone concentrations on the callus formation of leaves

标记号 Marker No.	6-BA 浓度 mg/L 6-BA concentration	愈伤组 织数 Callus number	诱导效 率/% Inoculation efficiency	愈伤组织生长 状况 Growth status of callus
1	0.5	25	69.4±6.9 aA	体积较大 Relatively large volume
2	1.0	23	63.8±8.0 aA	体积大 Large volume
3	2.0	17	47.2±2.8 bB	体积小 Small volume
4	4.0	14	38.9±8.6 bB	体积小 Small volume

注:接种数均为36块;同列数据后不同小写字母表示在0.05水平有差异;不同大写字母表示在0.01水平有差异。表3同。

Note: Inoculation number is all 36. Different capital letters and lowercases in a row mean significant differences at 0.01 and 0.05 levels. The same as Table 3.

基金项目 广东省韶关学院2003年重点课题资助。

作者简介 马崇坚(1975-),男,广西容县人,博士,副教授,从事植物组织培养、植物生理学及发育生物学研究。

收稿日期 2008-05-23

1 号培养基稍低,从愈伤组织体积方面看,2 号培养基处理用于诱导大体积愈伤组织是最好的。而 3 号培养基诱导的愈伤组织体积较小,产生愈伤组织的时间亦比前 2 个培养基要慢,诱导率为 47.2%。4 号培养基愈伤组织体积最小,产生愈伤组织的时间也最慢。4 种培养基的处理都有褐变现象,只要在愈伤组织产生以后及时更换培养基,1 号培养基和 2 号培养基将是很好的诱导愈伤组织的处理。相对于前 2 个处理,3 号和 4 号培养基的诱导率较低,其愈伤组织的质量亦较差,所以没有继续选用的必要。

2.2 叶片愈伤组织诱导再生植株结果

2.2.1 不同激素对愈伤组织诱导不定根的影响。由表 2 可知,较大体积的愈伤组织光培养 10 d 后,在愈伤组织的底部长出白色的细根,随时间推移数量不断增加。3 号和 4 号培养基生根率为 0,可见这 2 个处理不适合诱导愈伤组织产生不定根。1 号培养基的生根率为 10%,在 4 种处理中最高,其生根总数亦最多,和其他几种处理相比,1 号培养基较适合诱导愈伤组织产生不定根。2 号培养基的生根率为 5%,不定根细长,长度约为 3~4 cm,淡黄色。

2.2.2 不同激素条件下愈伤组织诱导不定芽的差异。试验

表 2 愈伤组织在不同培养基上生根情况

Table 2 Rooting situation of callus on different culture medium

标记号 Marker No.	6-BA 浓度//mg/L 6-BA concentration	生根率//% Rooting rate	生长状况 Growth status
1	0.5	10	粗长 Wide and long
2	1.0	5	细长 Long and thin
3	2.0	0	未长根 No rooting
4	4.0	0	未长根 No rooting

注:接种数均为 60 块。下表同。

Note: The inoculation number is all 60. The same as follows.

结果表明,愈伤组织光培养 10 d 后,不定芽亦开始分化形成。有 3 种形式:①先产生不定根,再产生不定芽;②先产生不定芽,再产生不定根;③直接产生不定芽,没有不定根。随时间的推移不定芽数量不断增加。20 d 后统计不定芽诱导情况(表 3)可知,1 号培养基的不定芽诱导率最高,该培养基诱导的不定芽生长茂盛,叶片多较大,可见 1 号培养基在 4 种培养基处理中为诱导不定芽的最佳培养基;2 号培养基的不定芽诱导率为 6.67%,不定芽生长稀疏、较矮、叶片较小;3 号和 4 号培养基的不定芽诱导率为 0,没有选用的必要。

2.3 组织培养获得植株 将 2 种处理已分化不定芽的 11

表 3 愈伤组织在不同培养基上不定芽诱导情况

Table 3 Adventitious bud induction of callus on different culture medium

标记号 Marker No.	6-BA 浓度//mg/L 6-BA concentration	不定芽块数 Number of adventitious bud	诱导率//% Induction rate	不定芽总数 Total number of adventitious bud	生长状况 Growth status
1	0.5	7	11.67	16 aA	生长浓密,叶片多而大 Dense callus, multiple and large leaves
2	1.0	4	6.67	7 bA	生长稀疏,较矮,叶片较小 Loose callus, small leaves
3	2.0	0	0	0 cB	无不定芽 No adventitious bud
4	4.0	0	0	0 cB	无不定芽 No adventitious bud

块愈伤组织连同不定芽一起进行切割分离后继续采用 1 号培养基进行诱导培养,发现原愈伤组织继续膨大,并大量分化形成不定芽。同时已分化的不定芽周围形成大量丛生芽,并且产生了不定根。30 d 后再进行切割分离培养,获得具根系可移植室外的完整植株 543 株。即 1 个月内由 11 块具分化能力的愈伤组织块经诱导培养后,获得了增殖扩繁倍数约为 50 的大量丰香草莓试管植株。

3 结论与讨论

(1)有研究表明,草莓组织培养以茎尖为外植体效果最好,叶柄次之,叶片一般,花药、花托、花瓣比较难于进行^[6]。笔者采用叶片作为外植体,主要是因为茎尖的生长有季节性,不能随时采集,叶柄的数量较少,不能进行大量的组织培养,而叶片一年四季都能采集,并且数量较多适合进行大量的组织培养。国外 Nehra 等用草莓不同品种幼嫩叶片诱导再生植株获得成功^[7-8]。而国内对草莓利用叶片作为外植体诱导再生器官或植株的组织培养工作报道较少^[9-10]。因此,笔者选择叶片作为外植体。

(2)试验结果表明,较适合诱导叶片产生愈伤组织、诱导愈伤组织产生不定芽和不定根的 6-BA 最佳浓度范围为 0.5~1.0 mg/L。从不同培养基配方中 6-BA/NAA 比值看,该比值越小越有利于诱导愈伤组织,诱导愈伤组织产生不定芽和不定根分化。超过 10 后反而抑制了芽及根系的分化,原因有可能是高浓度 6-BA 条件下 NAA 浓度不足,致使两者间不能达到较好的平衡。

(3)通过试验,得到了诱导草莓叶片获得再生植株较为有效的培养基配方,为建立与进一步完善草莓组织培养再生体系提供了科学依据。试验中,从当地优质栽培品种丰香草莓叶片诱导愈伤组织、诱导愈伤组织产生不定芽和不定根,并最终获得了大量的再生植株,为组织培养大量繁殖优质草莓种苗并进行大规模推广种植提供了必要的理论依据。

参考文献

- [1] 史红梅,何之常,杨建民. 草莓研究现状概述[J]. 湖北农业科学,1995(4):53-55.
- [2] 代同现,张艳茹,王中兴,等. 干式草莓酒的酿造[J]. 酿酒科技,2001(6):91-92.
- [3] 高山林. 草莓改良热处理分生组织脱毒技术及脱毒苗应用[J]. 江苏农业科学,1999(3):63-64.
- [4] 张青,贾宗凯,孙万河,等. 草莓病毒病及无病毒苗木的生产[J]. 北方园艺,2000(2):1-3.
- [5] 戴子林,陈秀兰,马鸿翔,等. 组织培养在草莓育种上的应用[J]. 江苏农业科学,1994(2):13-15.
- [6] 陈秀慧,符文英. 草莓的组织培养研究[J]. 海南大学学报:自然科学版,1992(2):33-35.
- [7] NEHRA N S, STUSHNOFFC, KARTHA K K. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks[J]. J Amer Soc Hort, 1989, 114(6):1014-1018.
- [8] JAMES D J, PASSEY A J, BARBAR D J, et al. Agrobacterium-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria ananassa* Dnch) using disarmed binary vectors[J]. Plant Sci, 1990, 69:79-94.
- [9] 李玉花,邓继光,雷家军,等. 高压静电场对草莓花药愈伤组织诱导和分化的影响[J]. 沈阳农业大学学报,1995(2):136-141.
- [10] 祁伟. 草莓茎尖的组织培养技术[J]. 沈阳农业大学学报,1995(2):142-145.