

生长调节物质对草莓叶片再生不定芽的影响

袁维凤¹ 金万梅² 尹淑萍^{2,*}

¹安徽农业大学园艺系, 合肥 230036; ²北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093

摘要 MS培养基中添加3.0 mg·L⁻¹ 6-BA和0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D的草莓“达斯莱克特”叶片再生频率最高可达94%。2,4-D诱导“达斯莱克特”叶片不定芽的能力明显优于IAA、IBA。“童子1号”则以IAA的效果较好。TDZ可提高“童子1号”叶片再生频率达80%,但对“达斯莱克特”的诱导效果不及6-BA。另外,KT与6-BA配合诱导不定芽优于单独使用KT。
关键词 生长调节物质; 不定芽; 再生; 草莓

Effects of Plant Growth Regulators on Adventitious Shoot Regeneration from Strawberry Leaf Disks

YUAN Wei-Feng¹, JIN Wan-Mei², YIN Shu-Ping^{2,*}

¹College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; ²Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093

Abstract Various plant growth regulators were tested in series of experiments to determine their effects on inducing adventitious shoot from leaf disks of strawberry. The result showed that 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA was most favorable to shoot formation of the ‘Darselect’ with 94%. 2,4-D was better than IAA and IBA, whereas IAA was benefit to the ‘Tongzi No.1’. 1.0 mg·L⁻¹ TDZ could increase the adventitious shoot regeneration by 80%. The combination of KT and 6-BA on regeneration frequency was more efficient than single use.

Key words plant growth regulators; adventitious shoot; regeneration; strawberry

草莓离体再生系统的研究较多。最早Nehra和Stashnoff^[1]以10 μmol·L⁻¹ 6-BA+10 μmol·L⁻¹ IBA诱导品种“Redcoat”的叶片再生频率高达84%。张志宏和吴禄平^[2]在“Tudla”品种中也获得较高的叶片再生频率,并认为TDZ的诱导效果优于6-BA。最近,Passy等^[3]研究几种草莓再生时,认为2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ TDZ对草莓“Calypso”和“Tango”叶片有很好的再生效果。生长调节物质种类和对比对草莓再生影响很大,是得到较高再生频率的关键因子。本文研究多种生长调节物质(如6-BA、KT、TDZ、2,4-D、IAA、IBA)对草莓叶片离体再生的影响,并建立了“达斯莱克特”和“童子1号”的高频率再生体系。

材料与方法

材料为草莓(*Fragaria ananassa*)栽培品种“达斯莱克特”(Darselect)和“童子1号”(Tongzi No. 1)。采用当年生匍匐茎茎尖消毒接种,建立无性试管苗繁殖系。取继代4周的无菌苗叶片,剪成3~5 mm²的叶盘,作为接种的外植体,以近轴面向下方向接种在MS基本培养基附加不同生长调节物质种类和浓度的培养基上。除了IAA、TDZ经

0.45 mm微孔滤膜抽滤灭菌,并加入已灭菌的培养基中外,其它的生长调节物质都在灭菌前加入培养基,于121℃下高压蒸汽灭菌20 min,培养基pH值为5.8。所有处理都先暗培养2 d,再置于16 h/8 h光周期、光照度2 000 lx、温度(25±2)℃培养条件下培养。每处理重复3次。观察不定芽再生情况。按公式:芽再生频率=再生芽的叶盘数/接种总叶盘数×100%;再生芽数=叶盘再生芽的总数/再生芽的叶盘数,计算芽再生频率和再生芽数。

结果与讨论

1 6-BA对草莓叶片再生不定芽的影响

在预备实验的基础上,将外植体接种在附加不同浓度6-BA与0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D组合的再生培养基上。6 d左右叶盘切口膨大,向远轴面翘起,10 d左右长出绿色紧凑的愈伤组织,26 d前后有不定芽生成,30~40 d为不定芽大量生成期。不定芽的生成部位主要在叶盘切口边缘及叶脉处。

收稿 2003-11-28 修定 2004-03-29

* 通讯作者(E-mail:spyin@vip.sina.com, Tel:010-82594698)。

6-BA对草莓叶片离体再生影响较大。表1表明,在培养基中只附加0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D时,均无不定芽发生。在其它条件一致下,6-BA浓度变化对叶片再生频率有一定程度的影响(“达斯莱克特”23.3%~94.0%;“童子1号”22.5%~60.0%)。方差分析及多重比较的结果表明,3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D组合对“达斯莱克特”叶片再生最好,其再生频率达到94.0%(表1、图1-a),与其它处理水平差异显著。同时,叶盘再生芽数也相对高。6-BA浓度达到1.0或5.0 mg·L⁻¹时,“达斯莱克特”叶片再生频率都大幅度下降。可见,6-BA浓度过低或过高都不利于“达斯莱克特”叶片不定芽再生。在以上培养基上,“童子1号”的叶片再生频率普遍比“达斯莱克特”低,最高只达到60.0%(表1、图1-b),这可能与基因型差异有关。同时,随着6-BA浓度的上升,其叶片再生能力呈下降趋势(60.0%~22.5%),说明低浓度6-BA对“童子1号”的叶片不定芽再生有利。

表1 不同浓度6-BA对草莓叶片再生不定芽的影响

Table1 Effects of different concentrations of 6-BA on adventitious shoot regeneration from leaf disks of strawberry

浓度/mg·L ⁻¹		“达斯莱克特”		“童子1号”	
6-BA	2,4-D	再生频率/%	再生芽数/个	再生频率/%	再生芽数/个
0	0.1	0c	0c	0c	0c
1.0	0.1	23.3b	1.17b	60.0a	1.33a
3.0	0.1	94.0a	1.39a	25.0b	1.27a
5.0	0.1	28.3b	1.18b	22.5b	1.13b

不同字母表示显著性差异($P \leq 0.05$)。

2 6-BA 分别与 2,4-D、IAA、IBA 配比对草莓叶片再生不定芽的影响

将3.0 mg·L⁻¹ 6-BA分别与不同浓度2,4-D、IAA、IBA相组合,观察草莓叶片不定芽再生的影响。结果(图2)表明,6-BA/2,4-D的比值减小时(3.0/0.1、3.0/0.5、3.0/1.0),“达斯莱克特”

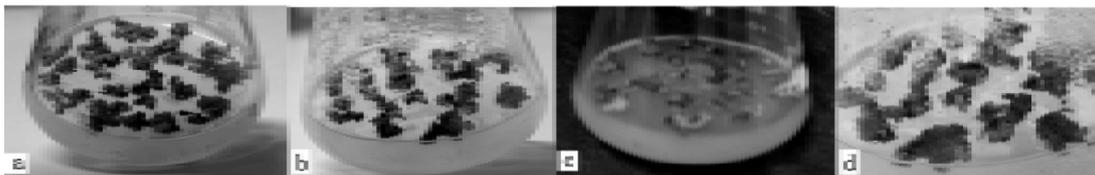


图1 草莓品种“达斯莱克特”和“童子1号”叶片不定芽再生

Fig.1 Adventitious shoot regeneration of leaf disks of strawberry ‘Darselect’ and ‘Tongzi No.1’

a. 加6-BA的“达斯莱克特”叶片再生不定芽; b. 加6-BA的“童子1号”叶片再生不定芽; c. 加TDZ的“童子1号”叶片再生不定芽; d. 加TDZ的“达斯莱克特”叶片再生不定芽。不加6-BA或TDZ情况下均无不定芽发生。

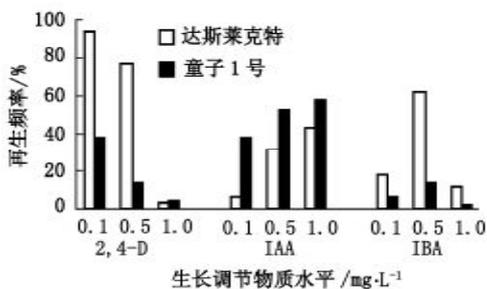


图2 不同生长调节物质对草莓叶片再生不定芽的影响

Fig.2 Effects of different plant growth regulators on adventitious shoot regeneration from leaf disks of strawberry

叶片再生频率下降较明显。而随着IAA浓度的上升,其再生频率逐渐增加。6-BA/IBA的比值由3.0/0.1减小至3.0/0.5和3.0/1.0,其叶片再生频率

分别为18.3%、62.2%、11.1%。另外,IBA浓度升高至1.0 mg·L⁻¹,外植体边缘褐化加重,这可能是造成再生频率下降的原因。对于“童子1号”,其再生频率最高只达到60%,较“达斯莱克特”为低。同样地,低浓度的2,4-D比高浓度的有利于其不定芽诱导。三者相比,IAA对“童子1号”的效果最好,IBA最不利于其不定芽的诱导。而张志宏和吴禄平^[2]认为,IBA对“Tudla”的诱导优于2,4-D,这也说明不同基因型草莓之间在选择生长调节物质类别时应分别对待。细胞分裂素和生长素在调控离体器官发生中起着关键作用,其浓度的比值决定着芽和根的分化^[4]。因此,寻找适宜的生长调节物质种类及配比对草莓叶片离体再生非常重要。于冬梅等^[5]未

能诱导“丰香”再生出不定芽,因而认为它是再生能力较弱的品种。而尹淑萍等^[6]通过对生长调节物质种类和浓度的大量筛选,有效地提高了“丰香”的再生能力,得到98.3%的再生频率。

3 KT及其与6-BA组合对草莓叶片再生不定芽的影响

不同浓度KT(1.0、3.0、5.0 mg·L⁻¹)与6-BA(0、1.0、3.0 mg·L⁻¹)分别组合(均附加0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D),诱导不定芽再生的结果(未列出)表明,不加6-BA,单独使用KT,草莓“童子1号”和“达斯莱克特”的不定芽诱导率都很低,最高再生频率分别只有12.5%(3.0 mg·L⁻¹ KT)和10%(3.0 mg·L⁻¹ KT)。外植体在分化过程中出现愈伤组织褐化现象,且随着KT浓度的升高而越发严重。KT与6-BA配合使用,两种草莓叶片的再生能力都有不同程度的提高。“达斯莱克特”再生频率由6.7%(1.0 mg·L⁻¹ KT)上升到62%(1.0 mg·L⁻¹ KT、3.0 mg·L⁻¹ 6-BA)，“童子1号”再生频率由0%(1.0 mg·L⁻¹ KT)上升到57.5%(1.0 mg·L⁻¹ KT、3.0 mg·L⁻¹ 6-BA)。低浓度KT与6-BA配合使用的效果优于高浓度KT与6-BA组合。这与李英慧和李艳^[7]报道单独用KT诱导辣椒子叶离体再生时,其愈伤组织呈疏松状并逐渐褐化,无不定芽发生的结果大致相似。

4 TDZ对草莓叶片再生不定芽的影响

如表2所示,无论是单独使用TDZ,还是TDZ与2,4-D配合使用,1.0 mg·L⁻¹ TDZ对“童子1号”叶片不定芽的诱导作用都显著高于0.5和5.0 mg·L⁻¹ TDZ(但对叶盘再生芽数并无显著影响)。这说明,过低或过高的TDZ均不利于不定芽再生。与6-BA相比,TDZ诱导的愈伤组织表现出

较强的分化能力,叶片再生频率由60%(1.0 mg·L⁻¹ 6-BA,表1)上升到80%(1.0 mg·L⁻¹ TDZ,表2、图1-c)。对于“达斯莱克特”,TDZ的浓度以及TDZ与2,4-D的配合使用,对不定芽的诱导作用差异不大,且不及6-BA的使用效果,但其叶盘再生芽数较高(表2、图1-d)。可见,TDZ并非对每种基因型草莓都有很好的诱导作用,不同基因型应区别对待。

TDZ是一种棉花脱叶剂,具有较强的细胞分裂活性^[8]。近年来的研究表明TDZ在一些难再生品种上有较好的作用^[2,9]。本文中TDZ诱导“童子1号”叶片再生时,叶片窄小,略有玻璃化现象,这与于冬梅等^[5]用TDZ在草莓品种“M14”上诱导再生时,不定芽较小且玻璃化较严重的结果大致相似。而“达斯莱克特”则易产生丛芽,无玻璃化现象,其不定芽及时转接在继代培养基上,大部分均能正常生长成植株。

总之,植物叶片离体再生是一个复杂的生物学过程,涉及到细胞间相互作用及细胞内诸多生理生化反应和变化。由于植物细胞再生能力的分子机制尚不清楚,所以,再生体系的建立在很大程度上是经验性的。在诱导植物离体再生时,生长调节物质对外植体再生能力有很大影响,培养基中添加一定的植物生长调节物质是外植体脱分化与再分化所必需的。

参考文献

- 1 Nehra NS, Stashnoff C. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J Am Soc Hortic Sci*, 1989, 114(6):1014~1018
- 2 张志宏, 吴禄平. 草莓主栽品种Tudla遗传转化体系的建立. *农业生物技术学报*, 1998, 6(2):200~204
- 3 Passey A, Barrett K, James D. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars using a range of explant types. *Plant Cell Rep*, 2003, 21:397~401
- 4 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(3):238~244
- 5 于冬梅, 胡文玉, 王关林. 基因型和培养因子对诱导草莓叶片再生芽的影响. *沈阳农业大学学报*, 1998, 29(2):138~143
- 6 尹淑萍, 金万梅, 孟凡红等. 草莓品种丰香和哈尼高效再生系统的建立和遗传转化的研究. *农业生物技术学报*, 2002, 10(3)增刊:105~106
- 7 李英慧, 李艳, 杭晓明等. 细胞分裂素对辣椒子叶再生的影响. *园艺学报*, 2001, 28(3):270~272
- 8 Huetteman CA, Preece JE. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 33:105~119
- 9 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

表2 不同浓度TDZ对草莓叶片再生不定芽的影响

Table 2 Effects of different concentrations of TDZ on adventitious shoot regeneration from leaf disks of strawberry

TDZ	2,4-D	“童子1号”		“达斯莱克特”	
		再生频率/%	再生芽数/个	再生频率/%	再生芽数/个
0.5	0	62.5b	1.24a	55.0b	1.36cd
1.0	0	80.0a	1.22a	65.0ab	1.38c
5.0	0	42.5c	1.18a	25.0c	1.29d
0.5	0.1	56.5b	1.19a	50.0b	1.30cd
1.0	0.1	72.5a	1.24a	40.0bc	1.50b
5.0	0.1	37.5c	1.13b	70.0a	1.60a

不同字母表示显著性差异($P \leq 0.05$)。