

中图分类号: S668.403.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2004)06-0008-03

草莓叶片培养研究进展

吴雪梅, 汤浩茹

摘要: 目前, 农杆菌介导的叶盘法是在草莓上应用的主要转化法。然而, 利用该法时, 共培养中农杆菌侵染、选择再生培养基中选择压、抗生素的作用以及继代培养等因素会导致较低的植物基因转化频率。因此, 建立一个高效稳定的叶盘再生受体系统是获得转基因草莓新品种的必要条件。

关键词: 草莓; 叶片培养; 不定芽再生

草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.) 蔷薇科草莓属多年生草本植物, 在世界许多国家均有分布。其栽培品种和类型繁多, 据不完全统计, 现在全世界约有草莓品种 2 000 多个。近年来, 我国草莓生产发展迅速, 提高草莓的品质及其抗性, 以获得更具经济价值的草莓新品种成为当务之急。植物基因工程作为现今植物改良育种的有效手段极大地推动了草莓育种工作的进程。自 1990 年以来, 关于草莓遗传转化的研究, 国内外已陆续有了一些文献报道, 草莓成为继核桃、苹果之后第三个获得转基因植株的果树。目前应用于草莓上的基因导入法主要是农杆菌介导的叶盘法。利用该法时, 由于共培养中农杆菌侵染、选择再生培养基

中选择压、抗生素的作用以及继代培养等因素, 会导致转化外植体比非转化外植体的再生频率有不同程度的降低, 即植物基因转化频率较低。因此, 以叶盘法获得转基因草莓新品种的前提条件就是要建立一个高效稳定的叶盘再生受体系统。现就结合自身的试验研究对影响草莓离体叶片不定芽诱导的主要因素进行综合性论述。

1 材料因素的影响

1.1 基因型

大量试验证实, 组织培养中基因型的依赖性是一种普遍现象。由于基因型的影响, 即使是同一树种、不同品种间的组织再生频率也不同。许多学者就基因型对草莓离体叶片不定芽诱导再生频率的影响做了一定研究, 并认为草莓的基因型对叶盘不定芽诱导再生频率起着决定性作用。最先系统研究这一影响的是 Nehra 等, 他们以 'Redcoat'、'Veestar' 等 10 个品种为试材, 比较了它们之间的不定芽再生率, 发现 'Redcoat' 的再生频率可达 94%, 其它均低于 50%。此后, 邓馨^[1]、于冬梅^[2]、Passey^[3]、Wawrzynczak、Isac 等相继以多种草莓的叶片为试材成功诱导出了不定芽, 获得了 'M14'、'弗吉尼亚'、'Redcoat' 等品种的高频再生受体系统。同时发现, '丰香'、'哈尼' 等品种的不定芽再生能力较弱 (不足 11%), 并认为这是由于基因型的差异从本质上决定了的, 无法通过改良培养基配方的手段来大幅提高其再生率。然而在胡繁荣^[4]的

试验中, '丰香' 的不定芽再生频率可达到 52.8%; 张志宏^[5]以 TDZ 代替 BA 作为细胞分裂素后, 也将 '丰香' 的不定芽再生频率提高了 54%。在笔者的试验中, 通过调节生长调节剂的种类、浓度及配比, 经过 14 d(天) 的暗培养处理, '丰香' 的不定芽再生率达到了 90.09%。这些不同的试验结果表明, 尽管基因型对叶片的不定芽再生有一定影响, 但只要找到了一种合适的培养基配方, 仍有可能刺激芽苗的高效再生。

1.2 生理状态

叶片的生理状态对于诱导不定芽的发生也有较大影响。而叶片的发育程度、来源等又在很大程度上影响着叶片的生理状态, 从而影响其再生能力。叶片本身对再生的影响主要表现在以下几方面。

1.2.1 叶片的来源 Chritel 等以苹果叶片为试材的比较试验发现, 不同来源的苹果叶片其再生能力从大到小的顺序为: 试管苗、温室苗、根蘖苗。冯莉等比较了黄槐试管苗叶片和原植株叶片的诱导能力后指出, 试管苗叶片有较强的再生能力, 并认为这可能是离体培养使植株体细胞复壮的结果。在草莓上, 尽管 Liu、Nehra 等的研究中试管苗叶片诱导愈伤组织再生植株的能力较差, 但是, 为了保证适应遗传转化对外植体稳定、大量来源的要求, 大多数试验也还是以试管苗叶片作为诱导不定芽再生的主要材料, 并认为这种来源的叶片由于经过多次继代, 含有较高的激素水平, 处于细胞分裂旺盛状态, 从而有利于不定芽的再生。

1.2.2 叶片的叶龄及发育程度 于冬梅^[2]取 14 d~30 d(天) 叶龄的 M14 叶片为试材时发现其再生不定芽的频率较高; 叶龄在 30 d(天) 以上, 叶片不定芽再生率下降。牛建新^[6]、郭素枝^[7]等研究也表明, 试管苗完全展开的叶切片效果最差; 而越嫩的叶切片, 产生不定芽的诱导率越高。相似的观察结果在番茄、苹果、胡杨、樱桃、葡萄等上也有报道^[13~15]。他们认为这种成熟叶片难于分化不定芽的现象是由于成熟叶片组织分化特异性较高, 细胞的分裂能力较差、生长较慢而导致的。孙清荣、Nehra 进一步指出, 这可能与叶片所处的生理生化状态以及所含的内源激素水平有关。邓馨等^[4]研究了激素所引起的外植体内部生理生化变化情况后指出, 草莓离体叶片组织呼吸速率、蛋白质、核酸和糖类含量及过氧化氢酶和苯丙氨酸解氨酶的活性水平与愈伤组织的形成及分化有着一定正相关性。不同的激素配比会诱导不同的生理生化过程, 由此引起的各项指标活性高低与否可能是愈伤组织形成或形成后分化不定芽与否的一个原因。来自不同苗龄植株的叶片的再生能力也有差异, 其再生力为: 30 d(天) 苗 > 匍匐茎繁殖的当年苗 > 1 年苗。赵政阳、冯斌等以苹果叶片为材的研究也发现, 随着试管苗的衰老, 其顶部的叶片再生能力下降。

1.2.3 叶片不同部位 同一叶片, 其不同部位的不定芽再生能力也不同。Passey^[3]、Zebrowska、Isac、胡繁荣^[4]、Rugini、Greene、Hammoudeh、Wawrzynczak 等研究认为叶片不同部位的再生能力差异较大: 托叶 > 叶柄 > 带叶脉叶片 > 不带叶脉叶片。丁霞^[14]、赵政阳在采用胡杨和苹果的叶片为试材的研究中也有类似现象, 叶片中部的再生能力大于叶片基部及叶片顶部。大多数学者认为, 这也与叶片的形态分化能力有关, 由于叶片的发育是由两端向中间延伸, 因而叶片中部细胞比两端幼嫩, 有利于不定芽分化。此外, 不同的基因型, 其叶片不同部位的再生能力也有所不同。张志宏^[5]的试验中, 外植

*教育部优秀青年教师资助计划和全国优秀博士学位论文作者专项基金(200253)资助项目。

收稿日期: 2004-08-05

体在‘弗吉尼亚’叶片上的位置对不定芽的再生率没有显著影响。

2 基本培养基的影响

应用于草莓离体叶片不定芽诱导的基本培养基有 MS、MS+B₅(MS 培养基中无机盐成分附加 B₅ 培养基中有机成分)、改良 MS、LS、G、MT 几种。许多已建立了高频再生受体系统的草莓品种都以 MS 作为基本培养基。张志宏^[5]、于冬梅^[2]、Balokhina 等均以 MS 作为基本培养基分别获得‘弗吉尼亚’、M14’、‘Zholtoye Chudo.’ 的不定芽高频再生受体系统。而 Nehra 最早建立起来的‘Redcoat’、邓馨^[1]、宋国庆^[8]等分别建立的 M14’、‘宝交’高频再生受体系统则是以 MS+B₅ 为基本培养基, 他们认为 B₅ 中的有机成分对于草莓叶片不定芽的诱导有促进作用。于冬梅等^[2]以 M14’为试材的试验中 B₅ 有机成分对促进不定芽的发生没有明显效果。Liu 采用 LS 作为基本培养基也获得了‘全明星’(Alistar)的不定芽高频再生受体系统。笔者对 MS、AS、QL、WPM 四种基本培养基的比较试验发现,‘丰香’叶片在 MS 上的表现最好,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%)。总的说来,大多数学者都认为 MS 是比较适合进行草莓叶片不定芽诱导的基本培养基。

此外,不同的氮源也对草莓离体叶片不定芽的诱导有一定影响。Flores^[9]降低 MS 中氮的含量后,在一定程度上提高了 VilaNova’ 的不定芽再生率。Liu 增加 LS 培养基中 KNO₃ 的量(提高 NO₃⁻/NH₄⁺ 的比值)后,发现当 KNO₃ 达到 2 000 mg/L(毫克/升)时,就‘全明星’而言,可促进叶盘(取自大田苗叶片)诱导不定芽再生。在草莓上有关氮源影响的研究还较少。但在其它多种植物上的研究已表明,只有恰当的 NO₃⁻/NH₄⁺ 比对细胞的生长是有利的,高浓度的铵态氮对植物细胞会有毒害作用,使植物的生长发育严重受阻^[17,19]。葛台明试验发现,以硝态氮为主要氮源时,植物对 K、P、Ca、Mg 的吸收都高过以铵态氮为主要氮源时。杨华等^[16]保持 MS 中硝态氮总量不变,降低铵态氮总量后,发现有利于白云卧牛的茎增粗和叶片的增厚。石正强^[18]进一步指出,铵态氮不如硝态氮高效是由于铵态氮启动了植物细胞不产生 ATP 的抗氰呼吸途径,由此对细胞产生毒害。这些试验结果都表明,不同的氮源会影响植株的生长,从而有可能影响到叶片的生理状态,最终影响到其不定芽再生能力。

3 植物生长调节剂的影响

植物生长调节剂调控着草莓的离体形态建成反应。不同的生长调节剂种类及浓度配比控制着细胞的再分化方向。在诱导草莓叶片分化的试验中,大多数的不定芽发生都经历了愈伤组织阶段。王文和观察发现不定芽由愈伤组织表层的叶状体发生而来。张志宏、Nehra、牛建新^[6]、宋国庆^[8]等人观察到的草莓离体叶片的不定芽发生方式也与之相吻合。王文和在试验中还观察到了另一种不定芽再生方式:不定芽由表皮细胞脱分化后直接分裂形成的叶状体再生,不经过愈伤组织发生阶段。Greene(1991)、宋国庆^[8]、Nehra、柯善强诱导‘Baron Solemacher’、‘Redcoat’和‘Veestar’等草莓品种叶片的不定芽再生过程中也有类似现象。邓馨^[1]、郭素枝^[7]也报道了不定芽的这两种再生方式。

培养基中同时附加细胞分裂素类物质和生长素类物质,可以使叶片高效再生不定芽。目前在草莓离体叶片的不定芽诱导中最常用的细胞分裂素是 6-BA,此外还有 TDZ、ZT、KT 等。而 TDZ(噻重氮苯基脲,一种棉花脱叶剂)作为一种

活性较 BA 高得多的细胞分裂素,在草莓离体叶片诱导上已经开始得到广泛的应用。许多试验的结果都表明,TDZ 的效果优于 6-BA,可有效刺激不定芽的发生,且用量少。张志宏^[5]以 TDZ 代替 6-BA 作为细胞分裂素,使 M14’的叶盘不定芽再生频率高达 100%。我们以 TDZ 替代 6-BA 后,使普遍被认为基因型决定了再生能力弱的‘丰香’的叶盘再生率也达到了 90.09%。一般认为这是由于 TDZ 具有高的细胞分裂素活性机理所致。而 Thmos 和 Kafferman 试验证明 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。这有可能使植物外植体中的内源激素水平达到一个动态平衡,从而更有效刺激了不定芽的再生。然而,于冬梅^[2]指出,在组织培养中应用低浓度的 TDZ 的确可促进细胞分裂分化,还可以缩短不定芽再生时间;但同时会导致不定芽密集丛生、不易分离、芽成苗困难,而且玻璃化现象严重。笔者试验中也观察到了类似现象。因此,建议 TDZ 与 6-BA 交替使用为佳。

与大多数植物一样,草莓叶片对不同生长素类物质的反应也不同。IAA 作为植物体内普遍存在的一种天然生长素,有效浓度范围较广,作用比较温和,对器官形成也有更为正常的调节作用。在草莓叶片诱导不定芽的试验中也是绝大多数都以 IAA 作为生长素。宋国庆^[8]、牛建新^[6]等的试验也证实,叶盘诱导不定芽再生过程中应用 IAA 比 IBA 效果好。由于作用比较强烈,有效浓度低、范围较窄、以及有时会引起染色体变异等原因,2,4-D 在草莓叶片不定芽诱导中的使用较少。尽管如此,于冬梅^[2]以 M14’为试材,以相同浓度的 BA(3.0 mg/L(毫克/升))配合不同的生长素(IAA、IBA、2,4-D)发现:BA(3.0 mg/L(毫克/升))+2,4-D(0.2 mg/L(毫克/升))的浓度组合对 M14’叶盘不定芽再生的诱导效果(再生率 94.44%)优于 BA(3.0 mg/L(毫克/升))+IBA(0.5 mg/L(毫克/升))(再生率 90.36%)。这表明特定的基因型有可能对某种特定的细胞分裂素与生长素的配合更具有敏感性。柯善强的试验结果表明,NAA 的效果较 IAA 为佳,但只有 NAA 与 6-BA 的适当浓度组合才能使草莓叶外植体诱导形成不定芽。

4 附加物

水解酪蛋白(CH)作为一种有机氮物质,被认为对外植体的生长及分化有一定促进作用,在组培试验中广泛应用。Liu 在试验中将水解酪蛋白(CH)的量增加到 600 mg/L(毫克/升),促进了‘全明星’的不定芽再生。而在诱导‘VilaNova’的叶片分化时,CH 的加入降低了其不定芽的再生率,且以 CH 和 TDZ 配合使用还降低了愈伤组织的发生率^[9]。

AgNO₃ 作为乙烯的抑制剂,对玉米、小麦、烟草、番茄及芸苔属蔬菜有促进组织或器官再生成植株的作用。张鹏等^[10]对 AgNO₃ 促进菜心子叶柄离体植株再生的组织学的研究证明,AgNO₃ 可使子叶柄维管薄壁细胞直接参与到芽原基形成并发育成苗,不定根和愈伤组织的形成则被抑制。宋国庆^[8]首次将 AgNO₃ 应用于草莓离体叶片不定芽诱导中,发现 AgNO₃ 也有促进草莓叶片不定芽再生的作用,但在不同的培养阶段所起的作用不同:在叶盘愈伤组织诱导起始施用,能刺激不定芽的直接再生;在愈伤组织诱导后施用,能显著地提高不定芽的再生频率。但在笔者的试验中,就草莓品种‘丰香’而言,AgNO₃ 的加入并没有提高其叶片的不定芽再生率,且随着浓度的增加,对不定芽的再生抑制作用越明显。其原因

可能是由于不同植物,甚至不同品种都对 AgNO_3 的作用浓度有特定要求。孙清荣^[20]以西洋梨“丰产”叶片为试材时也发现 AgNO_3 对诱导不定梢再生的促进作用受施用浓度的影响,超过一定浓度,反而会抑制不定梢的再生。此外,笔者试验中还观察到, AgNO_3 的加入还改变了“丰香”叶片的不定芽再生途径,通过体胚途径再生的不定芽增多,与张鹏^[10]、周音等的研究结果类似。这可能是由于 Ag^+ 的存在使乙烯不能干扰多胺的合成,而多胺的合成有利于体细胞胚胎发生的结果。

5 培养条件的影响

5.1 预培养和暗培养

不同的培养条件对叶片外植体不定芽的分化也有所影响。Sorvari 以两个草莓品种的叶片在 G 培养基进行预培养,然后再置于分化培养基上培养。结果发现,将‘Hiku’、‘Jon-sok’先在 $\text{G} + \text{BA} 0.5 \text{ mg/L} + \text{GA}_3 0.2 \text{ mg/L}$ (毫克/升)培养基上预培养 4 个星期后,再用分化培养基诱导,不定芽的再生频率大幅度提高。但仅置于未添加任何激素的 G 培养基上预培养,其再生频率未发生改变。暗培养在许多植物(如:梨、苹果)的离体叶片培养中都可以促进不定芽的高效再生。这一点在许多草莓的离体叶片不定芽诱导试验中也得到了证实。Isac 将材料接种后,先暗培养 2 周,再进行光培养,有利于愈伤组织的形成。与此相似,牛建新^[6]、Barcelo^[11]分别将材料先暗培养 1、2 周,再进行光培养,有利不定芽发生。王艳在研究苹果离体叶片再生时也认为,愈伤组织产生过程需要黑暗,而不定芽分化时需要光照,细胞由脱分化向分化转变时黑暗是关键。对此结果,牛建新^[6]推测可能是由于生长素 IAA 在光下易分解,而先暗培养,减少了分解,提高了 IAA 的浓度,从而有利于不定芽的分化。而张志宏^[5]的研究表明,‘弗吉尼亚’叶片接种后先进行两周暗培养未能提高叶片的不定芽再生频率。于冬梅^[5]的试验进行了 5 个草莓品种的比较,发现对于不同的基因型暗培养的作用效果也有所差异。因此暗培养促进不定芽再生的作用机制尚需作进一步研究。

5.2 放置方式

外植体与培养基的接触方式对叶片不定芽再生也有影响,且以叶盘背面向下与培养基接触有利于不定芽的发生。Nehral^[1-3]、于冬梅^[2]、宋国庆^[8]的试验均证实了这一点。一般认为,造成这种差异的原因是叶背面的气孔较多,组织疏松,角质层不发达,有利于营养的吸收。王文和等对草莓叶片愈伤组织形成及再生芽分化的组织学研究也表明,叶片以维管束周围的薄壁细胞及叶肉表皮或下表皮细胞再生不定芽为主。然而,蒋进的研究指出,胡杨叶片正反面的气孔密度比为 0.94,即叶片背面的气孔密度稍稍大于叶片正面,由此丁霞等估计其吸收营养物质的能力无明显差别。李英慧^[12]的试验采用了叶盘正面向下置于培养基上的放置方式取得了良好效果。张志宏^[5]的试验中,外植体与培养基接触方式(叶片正面与培养基接触或背面与培养基接触)对叶片不定芽再生率也没有显著影响。这表明,关于叶片放置方式对不定芽再生的影响还有待研究。

6 展望

迄今为止,草莓的叶片培养研究已取得了一定的进展,但仍存在着很多亟待解决的问题。首先,草莓基因型对遗传转化的影响很大,是影响农杆菌转化效率的一个重要因素。因此,要收集更广泛的不同基因型品种,以便筛选出容易再生的基因型进行遗传转化。其次,目前以叶盘为转基因受体的系

统所得到的不定芽多采用愈伤组织途径分化而来,直接由器官发生或经胚状体途径发生而来的还少见甚至未见报道。而后者有利于解决遗传转化过程中的嵌合体问题,因此有必要进行进一步研究。再次,不同的草莓品种对不同种类、不同质量浓度的抗生素及抑菌素要求有异。因此,应加大这方面的研究,为转基因的顺利进行奠定基础。此外,有关草莓离体叶片发生不定芽的内在机理还不甚清楚,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 邓馨,胡文玉.草莓叶片再生芽及遗传转化系统的建立[J].植物学通报,2000,17(2):174~178.
- [2] 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[J].沈阳农业大学学报,1998,29(2):138~143.
- [3] Passey AJ, Barrett KJ, James DJ. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria X ananassa* Duch.) using a range of explant types[J]. Plant Cell Reports 2002, 21: 5: 397~401.
- [4] 胡繁荣.丰香草莓叶片离体再生的试验研究[J].辽宁农业职业技术学院学报,2001,3(3):24~25.
- [5] 张志宏,吴禄平,代红艳等.草莓主栽品种再生和转化的研究[J].园艺学报,2001,28(3):189~193.
- [6] 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[J].北方园艺,1999,3:30~31.
- [7] 郭素枝,李晓琳.不同培养基和外植体对草莓不定芽诱导的影响[J].河南职业技术学院学报,2001,29(4):35~38.
- [8] 宋国庆,肖兴国,李绍华等.草莓叶片和叶柄再生体系的建立[J].落叶果树,2000,(2):5~8.
- [9] Flores R, Peters JA, Fortes GR de L, et al. Morphogenesis of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) cv. Vila Nova leaf discs[J]. Revista Científica Rural. 2000, 5(1):8~12.
- [10] 张鹏,傅爱根,王爱国. AgNO_3 在植物离体培养中的作用及可能的机制[J].植物生理学通讯,1997,33(5):376~379.
- [11] Barcelo M, EL Mansouri I, Mercado JA, et al. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1998, 54(1):29~36.
- [12] 李英慧,方宏筠.草莓不同基因型的再生能力比较[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),1997,20(3):244~247.
- [13] 薛建平,于淼,张爱民.安徽葡萄叶片愈伤组织诱导及植株再生技术的研究[J].中国中药杂志,2003,28(3):213~216.
- [14] 丁霞,陈晓阳,李云等.胡杨叶片不定芽再生体系的研究[J].北京林业大学学报,2003,25(2):28~31.
- [15] 李云,冯慧,田砚亭.‘红地球’葡萄叶片、叶柄不定芽再生体系的建立[J].园艺学报,2002,29(1):60~62.
- [16] 杨华,梁一池,姚日理等.白云卧牛组织培养的研究[J].福建林学院学报,2002,22(1):70~73.
- [17] 侯学文,郑穗平,郭勇.悬浮培养玫瑰茄细胞的生长行为及动力学方程的建立[J].武汉植物学研究,2001,19(4):317~322.
- [18] 石正强.铵态氮和硝态氮营养与大豆幼苗的抗氰呼吸作用[J].植物生理学报,1997,23(2):204~208.
- [19] 田霄鸿,李生秀,王朝辉等.莠茅对不同形态氮素的反应[J].应用生态学报,2003,14(3):377~381.
- [20] 孙清荣,孙洪雁.西洋梨“丰产”叶片不定梢再生[J].落叶果树,1999,(4):9~10.

(四川农业大学林学院园艺学院,雅安 625014)