

# 激素对比对草莓叶片不定芽分化的影响

王 婷 婷, 蔡 蕊, 武 慧, 周 晓 霞

(吉林师范大学 生命科学学院, 植物资源科学与绿色生产吉林省重点实验室, 吉林 四平 136000)

**摘 要:**以“晶瑶”草莓叶片为外植体,研究了不同激素配比、 $\text{AgNO}_3$  浓度和暗培养对草莓叶片不定芽分化的影响。结果表明:当培养基为 MS+噻二唑苯基脲(TDZ) 1.0 mg/L+吲哚丁酸(IBA) 0.4 mg/L+ $\text{AgNO}_3$  2.0 mg/L 时,不定芽再生率高达 70.3%,每个外植体平均再生芽数为 4.2 个; $\text{AgNO}_3$  可以有效抑制“晶瑶”草莓叶片玻璃化和褐变;暗培养处理促进“晶瑶”草莓叶片的不定芽诱导,最佳暗培养时间为 14 d。

**关键词:**草莓叶片;噻二唑苯基脲(TDZ);暗处理;不定芽

**中图分类号:**S 668.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0096-04

草莓(*Fragaria ananassa* Duch)属蔷薇科草莓属多年生草本植物,又叫洋梅,原产于欧洲,20 世纪初引进我国。草莓的生育周期短并且产量高,具有较高的经济价值<sup>[1]</sup>。以往草莓品种改良常采用常规的杂交育种技术,但这种育种方式周期长,选择效率低,再加上草莓有无性繁殖的特点,因此适合用基因工程技术进行育种。噻二唑苯基脲(N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea, TDZ)是德国 Schering 公司 1976 年合成的高效激素棉花脱叶剂<sup>[2]</sup>。TDZ 是一种高效的植物生长调节剂,在植物组织

培养快速繁殖体系中应用广泛,主要用于离体再生,被认为是许多植物种类诱导植株再生的唯一生长调节物质<sup>[3-5]</sup>。近年来,诸多难以离体分化的植物因采用 TDZ 而达到高频分化。对于草莓叶片离体再生,除了注意品种的选择外,TDZ 当为首选激素,大量研究表明,TDZ 可促进草莓离体高频再生<sup>[6]</sup>。现以“晶瑶”草莓为试材,研究了不同激素配比、 $\text{AgNO}_3$  浓度和暗培养对草莓叶片不定芽分化的影响,以期对草莓的遗传转化提供理论依据和实践经验。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为植物资源科学与绿色生产吉林省重点实验室繁殖的草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)‘晶瑶’组培苗。所用试剂 TDZ 为 Sigma 进口分装试剂。

**第一作者简介:**王婷婷(1989-)女,硕士研究生,现主要从事草莓遗传转化等研究工作。E-mail:15844404649@163.com。

**责任作者:**周晓霞(1964-),女,博士,教授,硕士生导师,现主要从事植物基因工程等研究工作。E-mail:zhouxiaofu@jlnu.edu.cn。

**收稿日期:**2013-11-22

# 中国产 *Ganoderma lucidum* 的系统发育学分析及栽培技术研究

陈 永 敢, 陈 光 宙, 袁 学 军, 陈 忠 荫, 陈 川 平, 张 来 军

(琼州学院 生物科学与技术学院, 海南 三亚 572022)

**摘 要:**灵芝是一类木腐真菌,广泛存在于热带雨林中。根据形态特征、rDNA-ITS 和 mt SSU 的系统发育学分析,课题组将从 *Cyclobalanopsis bambusae folia* 分离出来的菌株命名为 *G. lucidum*,该菌株可人工培养。系统发育学分析表明,这些菌株类群与亚洲灵芝为一个独立的分支;此外,该研究采用传统椴木栽培技术,实现了分离菌株的人工栽培。人工栽培灵芝子实体粗厚,木栓质,边缘淡黄,在成熟的过程中逐渐变褐。

**关键词:**系统发育学;rDNA-ITS;mt SSU;*Ganoderma lucidum*

## 1.2 试验方法

1.2.1 叶片不定芽的诱导 选取叶龄为 20~30 d 的组培苗,将其子叶切成 0.5 cm×0.5 cm 的叶盘作为外植体,分别接种到含有不同浓度的吲哚丁酸(IBA)、TDZ 配比的诱导培养基(配比浓度见表 1),在人工气候箱内进行 16 h/d 光照,并在光强 2 000 lx、(25±2)℃ 的条件下培养。

1.2.2 AgNO<sub>3</sub> 浓度试验 在再生培养基 MS+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L 的基础上,设置 0、1、2、3、4 mg/L 不同浓度梯度的 AgNO<sub>3</sub>,置于 16 h/d 光照,光强 2 000 lx、(25±2)℃ 条件下培养。

1.2.3 不同时间暗培养处理 选取 20~30 d 的草莓组培苗,将其子叶切成 0.5 cm×0.5 cm 的叶盘接种于再生培养基 MS+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2.0 mg/L 上,先分别进行 0、7、14、21、28 d 的暗处理,再置于 16 h/d 光照,光强 2 000 lx、(25±2)℃ 的人工气候箱中培养。

## 1.3 项目测定

每 7 d 观察统计数据,计算不定芽再生率、平均外植体再生芽个数。不定芽再生率=(再生不定芽的外植体数/总外植体数)×100%;平均外植体再生芽数=外植体再生不定芽总数/再生不定芽的外植体总数。

## 1.4 数据分析

试验数据采用统计软件 SAS 8.2 中的 ANOVA 过程进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素配比对草莓叶片不定芽诱导的影响

单独添加 TDZ 的 MS 培养基中不能诱导再生芽<sup>[7]</sup>,由表 1 可知,当培养基中含有 IBA 时可以诱导草莓叶片的分化,在含 1.0 mg/L TDZ 的培养基中,随着 IBA 浓度的增加,不定芽再生率先增加后减少,IBA 浓度为 0.4 mg/L 时,不定芽再生率达最高,为 78.3%;在含 0.4 mg/L IBA 的培养基中,随着 TDZ 浓度的增加,不定芽再生率逐渐减少,且玻璃化现象严重。图 1 为不同浓度 TDZ、IBA 配比下草莓叶片培养 30 d 后不定芽的分化情况。

表 1 不同激素配比对草莓叶片不定芽发生的影响

Table 1 Effect of different hormone combination on adventitious bud differentiation of strawberry leaves

激素配比 Concentration of hormone		不定芽再生率 Adventitious bud regeneration rate/%	平均外植体再生芽数 No. of regeneration buds per explant/个
TDZ /mg·L <sup>-1</sup>	IBA /mg·L <sup>-1</sup>		
1.0	0.1	27.3e	1.19d
1.0	0.2	42.6de	2.60bcd
1.0	0.3	46.5cde	2.71bcd
1.0	0.4	78.3a	4.70a
1.0	0.5	70.1ab	4.20ab
1.0	0.6	52.3bcd	2.90bc
1.5	0.4	67.9abc	3.70abc
2.0	0.4	41.7de	2.37dc

注:试验重复 3 次,每次重复 3 盘以上,每盘接种 15 个外植体,试验结果为 3 次重复的平均值,同列不同小写字母表示不同处理间差异显著性(P<0.05),下同。

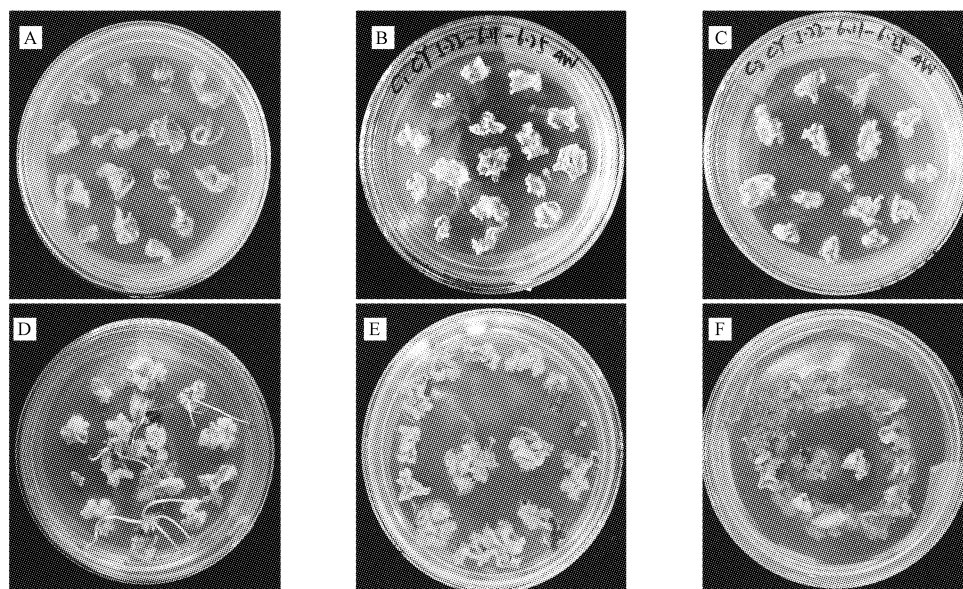


图 1 不同激素配比对草莓叶片不定芽分化的影响

注:A. TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,芽点极少;B. TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L,芽点较少;C. TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L,芽点少;D. TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L,芽点多;E. TDZ 1.5 mg/L+IBA 0.4 mg/L,芽点较多;F. TDZ 2.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L,芽点较少。

Fig. 1 Effect of different hormone combination on adventitious bud differentiation of strawberry leaves

Note: A. The number of buds was very few under TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L; B. The number of buds was less under TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L; C. The number of buds was few under TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L; D. The number of buds was more under TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L; E. The number of buds was a lot under TDZ 1.5 mg/L+IBA 0.4 mg/L; F. The number of buds was less under TDZ 2.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L.

## 2.2 AgNO<sub>3</sub> 浓度对草莓叶片不定芽诱导的影响

由表 2 可知,在培养基中添加 AgNO<sub>3</sub> 后,“晶瑶”草莓叶片不定芽的再生率和平均外植体再生芽数均随着 AgNO<sub>3</sub> 浓度的增加而减少,表现出抑制现象。但草莓叶片不定芽诱导过程中叶片玻璃化现象严重,不利于不定芽的生长。由表 2 可知,加入 2.0 mg/L AgNO<sub>3</sub> 后,虽然不定芽再生率略有减少,但叶片生长状态比不加 AgNO<sub>3</sub> 效果好。因此,该试验选择在“晶瑶”草莓叶片再生培养基中加入使叶片生长状态转好的临界 AgNO<sub>3</sub> 浓度 2.0 mg/L。图 2 中 A、B 分别为生长健壮的草莓叶片再生不定芽和玻璃化的草莓叶片再生不定芽。

表 2 不同浓度 AgNO<sub>3</sub> 对草莓叶片不定芽发生的影响

Table 2 Effect of different concentration of AgNO<sub>3</sub> on adventitious bud differentiation of strawberry leaves

AgNO <sub>3</sub> 浓度 Concentration of AgNO <sub>3</sub> /mg · L <sup>-1</sup>	不定芽再生率 Adventitious bud regeneration rate/ %	平均外植体再生芽数 No. of regeneration buds per explant/个	叶状态 Leaves state
0	78.3a	4.7a	叶黄绿,玻璃化
1.0	73.4ab	4.4a	叶黄绿,叶略透明
2.0	70.3b	4.2b	叶绿,叶正常
3.0	58.5bc	2.8bc	叶浓绿,正常
4.0	40.1c	1.6c	叶浓绿,正常

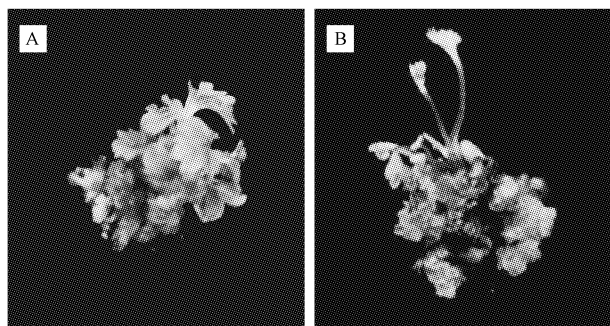


图 2 草莓叶片再生不定芽

注: A. 生长健壮的草莓叶片再生不定芽; B. 玻璃化的草莓叶片再生不定芽。

Fig. 2 Adventitious bud differentiation of strawberry leaves

Note: A. Healthily growth of adventitious bud differentiation of strawberry leaves. B. Vitrification of adventitious bud differentiation of strawberry leaves.

## 2.3 暗处理对草莓叶片不定芽诱导的影响

由表 3 可知,暗培养处理后的材料不定芽再生率和平均外植体再生芽数均高于没有经过暗培养处理;随着暗培养时间的增加,不定芽再生率先增加后减少,暗培养时间为 14 d 时不定芽再生率和平均外植体再生芽数最高,分别为 90.3%,4.95 个。说明暗培养促进“晶瑶”草莓叶片不定芽诱导,暗培养最佳时间为 14 d。

表 3 暗处理对草莓叶片不定芽形成的影响

Table 3 Effect of dark treatment on adventitious bud differentiation of strawberry leaves

处理时间 Treating time/ d	不定芽再生率 Adventitious bud regeneration rate/ %	平均外植体再生芽数 No. of regeneration buds per explant/个
0	70.3c	4.20c
7	89.6a	4.82a
14	90.3a	4.95a
21	87.3b	4.70b
28	85.2bc	4.66b

## 3 结论与讨论

草莓叶片再生的影响因素较多,其中最主要的是不同激素配比。该试验以“晶瑶”草莓叶片为外植体,其叶片在 MS + TDZ 1.0 mg/L + IBA 0.4 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2.0 mg/L 的诱导培养基上不定芽再生率达 70.3%,平均每个外植体再生芽数为 4.2,效果较好。TDZ 是一种具有细胞生长素和分裂素双重功能的人工合成激素,许多难以进行离体分化的植物采用 TDZ 后达到了高频分化<sup>[8]</sup>。许多研究表明,TDZ 可以诱导各种植物外植体培养时不定芽的形成<sup>[9]</sup>。与其它植物激素相同,TDZ 有一定的作用范围,在最适宜的含量范围作用效果明显,含量过低效果不明显,过高则抑制愈伤组织及不定芽生长,表现为脱叶剂的作用,加速叶片脱落、死亡,并且使叶片玻璃化。

AgNO<sub>3</sub> 通过抑制乙烯合成,避免植物细胞离体培养中积累乙烯而抑制外植体分化不定芽<sup>[10-11]</sup>。对于 AgNO<sub>3</sub> 是否有利于草莓叶片再生,秦永华等<sup>[12]</sup>认为 AgNO<sub>3</sub> 对“丰香”,“章姬”草莓不定芽分化表现为抑制作用;周厚成等<sup>[13]</sup>认为 AgNO<sub>3</sub> 可以促进“幸香”草莓叶片再生。该研究表明,AgNO<sub>3</sub> 对“晶瑶”草莓不定芽分化表现为抑制作用,不同草莓品种可能对 AgNO<sub>3</sub> 的反应不同。但草莓叶片不定芽的诱导过程中玻璃化现象严重,适量的 AgNO<sub>3</sub> 可以有效的抑制玻璃化现象,有利于不定芽的生长<sup>[14]</sup>。叶片的生长状态直接影响着不定芽的生长,因此,该试验在“晶瑶”草莓叶片再生培养基中加入使叶片生长状态良好的临界 AgNO<sub>3</sub> 浓度 2.0 mg/L。

暗培养可以促进许多植物离体叶片培养不定芽的分化,许多研究表明,暗培养处理可以减少植物酚类物质溢出,利于不定芽分化<sup>[15-16]</sup>。该试验证明,暗培养对“晶瑶”草莓叶片再生是必须的,且最佳暗培养时间为 14 d。

该研究使“晶瑶”草莓再生芽的频率达 70% 以上,并且大大缩短了培养周期,为草莓的遗传转化提供了初步的科学依据和理论基础。



## 参考文献

- [1] Zhang J, Wang X, Yu O, et al. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) during fruit development and maturation[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(3): 1103-1118.
- [2] Aksaka Y, Daimon H, Mii M. Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron[J]. Plant Science, 2000, 156: 169-175.
- [3] Ahmed M R, Anis M. Role of TDZ in the quick regeneration of multiple shoots from nodal explant of *Vitex trifolia* L. -an important medicinal plant[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 168(5): 957-66.
- [4] Lata H, Chandra S, Wang Y H, et al. TDZ-Induced high frequency plant regeneration through direct shoot organogenesis in stevia rebaudiana bertonii; an important medicinal plant and a natural sweetener[J]. American Journal of Plant Sciences, 2013(4): 117-128.
- [5] Passey A J, Barrett K J, James D J. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) using a range of explant types[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(5): 397-401.
- [6] Landi L, Mezzetti B. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(4): 281-288.
- [7] 胥宇建, 孟箭, 张鲁刚, 等. 不同激素配比和 AgNO<sub>3</sub> 对两种基因型大白菜子叶立体再生的影响[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(6): 564-570.
- [8] Rostami H, Giri A, Sasan M N A, et al. Optimization of multiple shoot induction and plant regeneration in indian barley (*Hordeum vulgare*) cultivars using mature embryos[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2013, 20(3): 251-255.
- [9] 王红霞, 郭尚敬. TDZ 对甜椒不定芽分化的影响[J]. 北方园艺, 2012(3): 104-106.
- [10] Band S M, Jafari M, Ghadimzadeh M, et al. Plant regeneration via direct organogenesis in three alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars using stem nodal explant[J]. Seed and Plant Improvement Journal, 2013, 29(1): 65-80.
- [11] Grauda D, Lapiņa L, Jansone B, et al. Recovering genetic resources of some legume species of latvian origin by plant tissue culture[C]//Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences, 2013, 67(3): 224-228.
- [12] 秦永华, 张上隆, 胡桂兵, 等. AgNO<sub>3</sub> 对草莓试管苗及抗氧化酶活性的影响[J]. 果树学报, 2006, 23(5): 715-719.
- [13] 周厚成, 罗静, 赵霞, 等. 不同培养条件对“幸香”草莓离体叶片再生的影响[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 273-275.
- [14] 魏薇, 韩晶, 刘孟军, 等. 枣离体叶片不定芽的诱导[J]. 河北农业大学学报, 2012(6): 51-54.
- [15] Omar G F, Mohamed F H, Haensch K T, et al. Somatic embryo-like structures of strawberry regenerated in vitro on media supplemented with 2, 4-D and BAP[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2013, 51: 739-745.
- [16] Haddadi F, Aziz M A, Kamaladini H, et al. Thidiazuron- and zeatin-induced high-frequency shoot regeneration from leaf and shoot-tip explants of strawberry[J]. Hort Technology, 2013, 23(3): 276-281.

## Effect of Different Hormone Combination on Adventitious Bud Differentiation of Strawberry Leaf

WANG Ting-ting, CAI Rui, WU Hui, ZHOU Xiao-fu

(Key Laboratory of Plant Resources Science and Green Production of Jilin Province, College of Sciences and Technology, Jilin Normal University, Siping, Jilin 136000)

**Abstract:** Taking the leaves of strawberry ‘Jingyao’ as explants, the effect of different hormone combination, AgNO<sub>3</sub> and dark culture on adventitious bud were investigated. The results showed that the optimum medium for adventitious bud regeneration was MS supplemented with 1.0 mg/L thidiazuron (TDZ), 0.4 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) and 2.0 mg/L AgNO<sub>3</sub>, under this conditions, the isolated regeneration rate of adventitious bud from leaf explant reached 70.3%, and the average number of regenerated buds reached 4.2; AgNO<sub>3</sub> could effectively restrain strawberry leaf vitrification and brown stain; dark treatment promoted adventitious bud differentiation of strawberry leaves, the best time of dark treatment was 14 d.

**Key words:** strawberry leaf; TDZ; dark treatment; adventitious bud