

二倍体草莓 ‘Ruegen’ 再生体系的建立

乔瑞琪¹, 金万梅^{2*}, 沈元月^{1*}

(1. 农业应用新技术北京市重点实验室/北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206;
2. 北京市林业果树科学研究院, 北京 100093)

摘要:【方法】以二倍体草莓 (*Fragaria vesca*) ‘Ruegen’ 叶片为试材, 研究生长调节物质浓度和配比、不同暗培养时间、不同类型植物凝胶对其叶片再生的影响, 【目的】建立 ‘Ruegen’ 草莓叶片再生体系。【结果】结果表明: 暗培养 7 d、以 Carrageenan 为固化剂利于 ‘Ruegen’ 草莓叶片再生; 激素配比为 TDZ 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 时, 再生频率较高, 不定芽的再生率达到 81.03%, 平均再生芽数达到 5.30 个。

关键词: 草莓; ‘Ruegen’; 再生; 体系建立

中图分类号: S668.4 文章编号: 1002-3186 (2018) 03-0035-05 文献标志码: A

Establishment of regeneration system using the leaves of diploid strawberry ‘Ruegen’

QIAO Ruiqi¹, JIN Wanmei^{2*}, SHEN Yuanyue^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Beijing Academy of Forestry and Pomology Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract:【Methods】In this study, we investigated the effects of several treatments on regenerations using leaves of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) ‘Ruegen’, including plant growth regulator concentration and ratio, different incubation time in dark, and different type plant gels. 【Objective】Establishing an efficient leaf regeneration system in Ruegen. 【Results】The results showed that when the leaves were cultivated on Carrageenan containing 2.0mg/L idiazuron (TDZ) and 0.2mg/L dole-3-butyric acid (IBA) for 7d in dark, the regeneration ratios were higher, generated 81.03% adventive buds, and reached average adventive buds at 5.3.

Keywords: Strawberry; Ruegen; regeneration; system establishment

草莓 (*Fragaria ananassa* Duch) 属于蔷薇科草莓属, 多年生草本植物, 中国主要果树树种之一。果实色泽鲜艳、香味独特、口感好, 营养丰富, 受到人们的喜爱。伴随草莓产业的快速发展, 生产上对其优质种苗的需求量增加, 不同草莓品种的需求亦是不断增加。传统育种方法栽培的草莓品种很难在抗寒、抗虫、抗病等方面获得相对精良的品种。随着生物技术的发展, 高效的遗传转化体系成为基因功能验证的基础^[1]。

草莓作为果树分子生物学研究的良好试材,

‘丰香’、‘Hawaii 4’、‘哈尼’等植物材料已成功获得草莓再生体系, 研究叶片放置方式、硝酸银浓度、激素配比等再生条件^[2-4]。品种不同再生培养体系存在差异, 八倍体草莓具有高杂合性, 再生和遗传转化周期长^[5-7]。‘Ruegen’ 是二倍体草莓, 森林草莓与栽培草莓亲缘关系相近, 相较之下二倍体草莓全基因组小, 生育期短, 植株矮小易于栽培。本试验以其叶片为材料, 通过研究暗培养时间、激素配比、不同植物凝胶等方面对不定芽再生的影响, 以期获得二倍体草莓 ‘Ruegen’ 高效、稳定的再生体系, 为

收稿日期: 2018-01-17

基金项目: 北京市自然科学基金重点项目 (6171001), 科技北京百名领军人才培养计划 (LJRC201612)

第一作者: 乔瑞琪, 硕士研究生在读, 研究方向: 果树发育分子生物学, Tel: 010-80794426, E-mail: 1322942918@qq.com

通信作者: 金万梅, 博士, 研究员, 研究方向: 林果类植物分子生物学, Tel: 010-62859105, E-mail: jwm0809@163.com

沈元月, 博士, 教授, 研究方向: 果实发育, Tel: 010-80794426, E-mail: sflmn@163.com

开展二倍体草莓基因工程、经济性状基因研究工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试二倍体草莓品种‘Ruegen’由北京农学院组培中心提供盆栽苗。

1.2 组培苗的获得

采摘健壮草莓母株上当年生匍匐茎茎尖用自来水冲洗 30 min, 转入超净工作台操作, 消毒作业流程如下: 75% 的乙醇溶液 30 s, 1% 的次氯酸钠消毒 5 min, 用无菌水冲洗 3~4 遍, 每次 3~5 min。在无菌滤纸上剥取 0.2~0.5 mm 大小的茎尖生长点接种于初代培养基 (MS+2,4-D 0.011 mg/L+6-BA 0.11 mg/L+TDZ 1.0 mg/L) 上, 建立无性繁殖试管苗系。培养条件: 温度 (25±2)℃、光照度 1 500~3 000 lx、光照 16 h/d。茎尖在初代培养基上成活后, 在 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 培养基上继代培养 1 次, 取 35 d 的无菌苗鲜嫩、舒展的叶片作试验材料。

1.3 试验方法

1.3.1 方法 将叶片剪去叶边缘, 剪成约 2~3 mm² 大小的叶盘作为再生的外植体。以 MS 培养基作基础培养基, 在灭菌前加入生长调节物质, 调节 pH 值为 5.87, 加入蔗糖、Carrageenan, 于 121℃ 下高压蒸汽灭菌 21 min。生根培养基为 MS+IBA 0.2 mg/L+Sucrose 30 g/L+Carrageenan 2.0 g/L。接种于 100 mL 的三角瓶中, 每个处理接种 30 片叶盘, 处理重复 3 次。接种 56 d 后, 计算不定芽再生频率和平均再生芽数。

不定芽再生频率 (%) = 再生不定芽的外植体数 / 接种外植体数 × 100%

平均再生芽数 = 再生芽的总数 / 再生芽的外植体数

1.3.2 不同浓度 TDZ 与 IBA 配比试验 以 MS+Sucrose 30 g/L+Carrageenan 2.0 g/L 为基础培养基, pH 5.87, 设置 TDZ 与 IBA 组合再生培养基, TDZ 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 记为 A₁~A₄, IBA 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L 记为 B₁~B₄, 研究 TDZ 与 IBA 不同的配比对‘Ruegen’叶片不定芽再生的影响。

1.3.3 暗培养时间试验 设置 3、7、14 d 进行暗处理, 结束暗培养后转入光培养; 接种叶片直接进行光培养 (暗培养 0 d) 为对照。每处理接种 6 瓶 (培养基为 MS+TDZ 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+

Sucrose 30 g/L+Carrageenan 2.0 g/L, pH 5.87), 每瓶接种 30 片叶盘, 重复 3 次。

1.3.4 植物凝胶试验 将大小相近、数量等同的叶片分别接种在 MS+TDZ 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+Sucrose 30 g/L+Agar 6.0 g/L, pH 5.87 和 MS+TDZ 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+Sucrose 30 g/L+Carrageenan 2.0 g/L, pH 5.87 的再生培养基上, 放置在室温 25℃、1 500~3 000 lx、光照 16 h/d 下培养, 诱导不定芽的再生。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 TDZ 与 IBA 组合对叶片不定芽再生的影响

培养基中的激素种类和浓度是影响叶盘再生的重要因子。培养‘Ruegen’叶片不定芽再生效果最好的是 2.0 mg/L TDZ+0.2 mg/L IBA, 平均不定芽再生率达 81.03%, 明显高于其他处理, 每个叶盘平均再生芽数达到 5.30 个; 当 TDZ 浓度增高到 3.0 mg/L 时, 不定芽再生率呈下降趋势, 生长势减弱; 当 TDZ 浓度提高到 4.0 mg/L 时, 产生严重玻璃化现象 (表 1)。

表 1 不同浓度激素配比对叶片不定芽再生的影响

Tab 1 Effect of ratio of different concentrations of hormone on shoot regeneration of leaf

处理组合 Treatments	不定芽再生频率/% Regeneration ratio	再生芽数/个 Number of adventive buds
A ₁ B ₁	(40.51±1.06)Ee	(3.45±0.09)Cc
A ₁ B ₂	(50.38±0.85)Dd	(3.56±0.23)Cc
A ₁ B ₃	(64.25±1.12)Cc	(2.51±0.09)EFf
A ₁ B ₄	(38.47±1.07)Ef	(2.87±0.08)Dde
A ₂ B ₁	(63.66±1.11)Cc	(4.48±0.21)Bb
A ₂ B ₂	(81.03±1.18)Aa	(5.30±0.13)Aa
A ₂ B ₃	(72.35±0.93)Bb	(4.53±0.08)Bb
A ₂ B ₄	(49.24±1.80)Dd	(3.39±0.33)Cc
A ₃ B ₁	(39.47±1.01)Eef	(2.89±0.14)Dde
A ₃ B ₂	(49.37±1.43)Dd	(2.94±0.10)Dd
A ₃ B ₃	(38.66±1.12)Ef	(2.65±0.08)DEef
A ₃ B ₄	(24.97±0.85)Fg	(2.22±0.11)FGg
A ₄ B ₁	(23.40±0.73)Fgh	(2.53±0.18)EFf
A ₄ B ₂	(24.49±0.72)Fgh	(2.63±0.10)DEF
A ₄ B ₃	(12.23±0.37)Fh	(2.05±0.16)Gg
A ₄ B ₄	(11.25±0.95)Gi	(1.33±0.09)Hh

注: 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different uppercase letters indicate statistically different variations at $P < 0.01$, different lowercase letters indicate statistically different variations at $P < 0.05$.

2.2 暗培养时间对叶片不定芽再生的影响

经暗培养处理后,不定芽再生率和平均再生芽数均高于未经暗培养的处理;接种叶片后直接进行光培养,叶片的边缘和伤口处易发生褐化变黑现象。试验显示:经过7 d暗培养的处理,其不定芽再生率和平均再生芽数均最高,分别达到78.04%、5.03个。14 d暗培养的叶片边缘和伤口处褐化变黑。'Ruegen'草莓不定芽的再生经暗培养处理有一定的促进作用,暗培养7 d最适合(表2)。

表2 不同暗培养时间对叶片不定芽再生的影响

Tab 2 Effect of different incubation time in dark on shoot regeneration of leaf

暗培养时间/d incubation time in dark	不定芽再生频率/% Regeneration ratio	再生芽数/个 Number of adventive buds
0	(45.89±0.58)Dd	(2.9±0.08)Cc
3	(62.14±0.83)Bb	(3.7±0.07)Bb
7	(78.04±0.46)Aa	(5.03±0.04)Aa
14	(54.22±1.4)Cc	(3.57±0.07)Bb

注:不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different uppercase letters indicate statistically different variations at $P<0.01$, different lowercase letters indicate statistically different variations at $P<0.05$.

2.3 不同植物凝胶对叶片不定芽再生的影响

两种植物凝胶 Agar 和 Carrageenan 处理中,'Ruegen'草莓叶片的平均再生芽数较为相近,Carrageenan 处理中不定芽再生率则高(表3)。可能由于诱导草莓叶片再生过程中,会释放一定量的次生代谢产物,如酚类物质致使外植体所处培养基褐化,再生小环境变差。相比于 Agar 培养基,草莓叶片外植体在 Carrageenan 培养基中的褐化程度明显减轻。

表4 草莓叶片不定芽再生效率

Tab 4 Efficiency of strawberry leaf on shoot regeneration

重复 Repeat	外植体数/个 Explants/per	分化芽的外植体数/个 Bud number of explants/per	不定芽再生频率/% Regeneration ratio	再生芽总数/个 Total number of buds/per	平均再生芽数/个 Average number of buds/per
I	152.0	125	82.21	662	5.30
II	147.0	119	81.03	600	5.04
III	164.0	131	79.85	728	5.56
平均	154.3	125	81.03	663	5.30

3 讨论

果树遗传背景复杂,稳定遗传转化技术发展较缓。植物进行基因功能鉴定以拟南芥、烟草等导入基因最为成熟。近年来,草莓是果树基因功能研究

表3 不同植物凝胶对叶片不定芽再生的影响

Tab 3 Effect of different type plant gels on shoot regeneration of leaf

植物凝胶/(g·L ⁻¹) Plant gel	不定芽再生频率/% Regeneration ratio	再生芽数/个 Number of adventive buds
Agar 6.0	(52.5±1.03)Bb	(3.5±0.08)Bb
Carrageenan 2.0	(77.15±0.54)Aa	(4.2±0.134)Aa

注:不同大写字母极表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different uppercase letters indicate statistically different variations at $P<0.01$, different lowercase letters indicate statistically different variations at $P<0.05$.

分化的不定芽转接至 MS+IBA 0.2 mg/L+Sucrose 30 g/L+Carrageenan 2.0 g/L 生根培养基中,正常生根,生根率达90%以上。

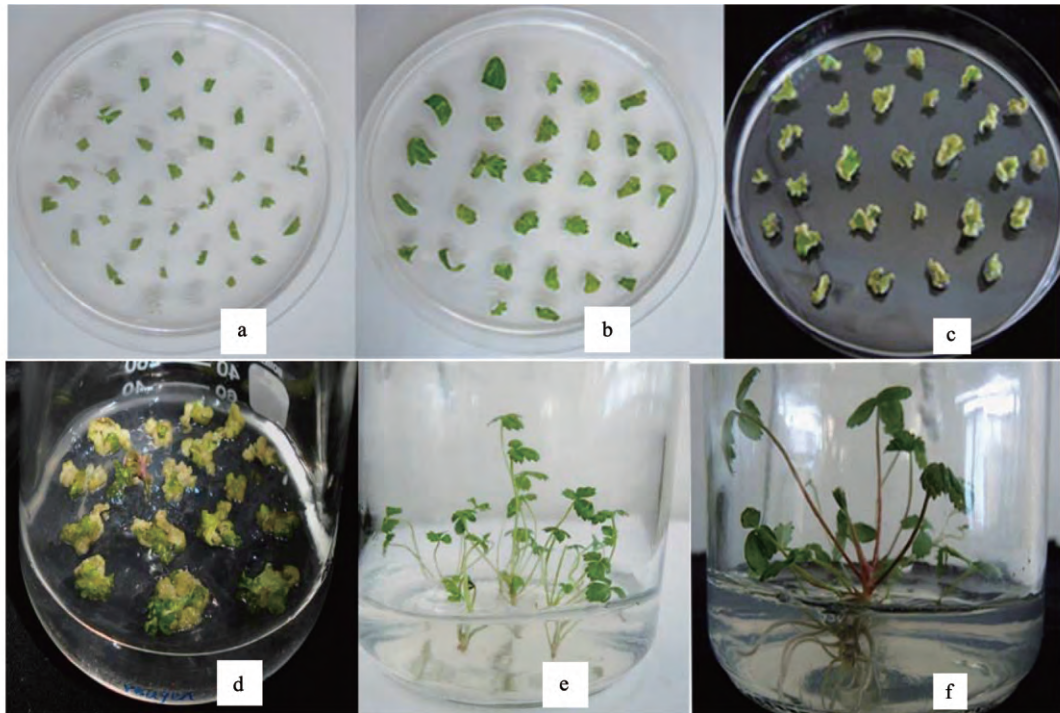
2.4 再生体系操作流程及验证

建立'Ruegen'草莓叶片再生操作流程如下:

(1)将'Ruegen'草莓脱毒苗叶片剪成2~3 mm²的小方块,平铺在 MS+TDZ 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+Sucrose 30 g/L+Carrageenan 2.0 g/L, pH 5.87 的再生培养基上;(2)室温 25℃,黑暗条件下培养7 d左右;(3)转入室温 25℃、1 500~3 000 lx、16 h/d 光照下培养40 d左右,诱导不定芽的再生;(4)分化的不定芽在 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L+Sucrose 30 g/L+Carrageenan 2.0 g/L 的继代培养基上生长30 d左右;(5)转接至 MS+IBA 0.2 mg/L+Sucrose 30 g/L+Carrageenan 2.0 g/L 生根培养基中生根,生根率达90%以上。图1为叶片不定芽再生情况。

设置3个重复,试验结果如表4所示。'Ruegen'草莓叶片不定芽平均再生频率达81.03%,平均再生芽数5.30个,3次重复试验结果相对稳定,结果有效。

的良好试材,其高效遗传转化体系常使用栽培草莓,多为八倍体,具有高杂合性,再生和遗传转化周期略长。高效的遗传转化体系成为基因功能验证的基础,建立高效、稳定、再生能力较强的植物受体系统给优良品种的培育及植物基因工程提供重要



a. 接种叶盘; b. 叶盘膨大; c. 形成愈伤; d. 分化不定芽; e. 继代生长; f. 植株生根

a. Leaf discs; b. discs expansion; c. Callus formation of; d. Adventitious bud; e. Transgenerational growth; f. Plant Rooting

图1 ‘Ruegen’草莓叶片的离体再生

Fig. 1 Regeneration plants of ‘Ruegen’ from Strawberry leaves

保障。二倍体草莓全基因组小,与栽培草莓亲缘关系相近,生育期短,植株矮小易于栽培,本试验以二倍体草莓‘Ruegen’为材料,获得高效、稳定的二倍体草莓再生体系,为进一步开展二倍体草莓基因工程,经济性状基因研究奠定基础。

影响草莓叶片再生的因素很多,除内部基因调控外,亦受外部环境因素影响。不同激素的种类和浓度配比影响较大。细胞分裂素利于芽的产生,生长素增进根的形成,调配两者的浓度、配比可调节芽的形成^[8]。早期 Nehra 和 Stashnoff^[9]用 6-BA 10 $\mu\text{mol/L}$ +IBA 10 $\mu\text{mol/L}$ 诱导‘Redcoat’草莓叶片再生。张志宏等^[10]以‘Tudla’品种作试材,获取较高的叶片再生频率,认为 TDZ 比 6-BA 诱导效果佳。Passey 等^[11]研究多种草莓再生,认为 6-BA 2.0 mg/L+TDZ 1.0 mg/L 对草莓‘Calypso’和‘Tango’叶片起到良好的再生成效。TDZ 具有强烈的细胞分裂素活性^[12],使叶片分化周期缩短,在一些较难再生的植物品种上有不错的效果^[13]。TDZ 诱导产生不定芽时,多为紧密丛芽,叶片狭细,随着浓度增加玻璃化现象加重,与在苹果、枫树^[12]等上的研究结果相似。本研究在研究激素浓度及配比试验时选用 TDZ 和 IBA 两种生长调节物质,在不

同浓度配比条件下,其再生能力有所不同,在 MS+TDZ 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 的诱导培养基上,草莓‘Ruegen’叶片的不定芽再生率达到 81.03%,平均再生芽数为 5.30 个。

培养基中植物凝胶不具有营养,仅作为固化剂存在。本试验分别使用两种植物凝胶,Carrageenan 处理中不定芽再生率高于 Agar 处理,叶片褐化程度比 Agar 处理减轻,对叶片的再生小环境有利,可获得高效的利于培养植物的再生培养基。

暗培养也是影响草莓叶片再生率高低的重要因素之一^[8]。不同草莓品种有效的暗培养时间迥然有异,草莓‘丰香’的最佳暗培养时间是 14 d^[5],草莓‘幸香’是 42 d^[14],该试验结果表明草莓‘Ruegen’叶片再生的暗培养时间在 7 d 左右最好,类同‘晶玉’^[8]。实行暗培养的目是为了让外植体再生过程中,尽可能减少酚类物质溢出,减轻褐化,维持植株材料良好的生理状态^[15,16],因而对再生有利。

本研究成功建立二倍体草莓‘Ruegen’高效、稳定的再生体系,为草莓的分子生物学奠定研究基础。

参考文献:

[1] 李文砚,孔方南,韦优,等.草莓种子萌发成苗及高效离体再生

- 体系的建立[J].西南农业学报,2016,29(10):2463-2469
- [2] 孙崇波,谢鸣,蒋桂华,等.草莓主栽品种“丰香”高效离体再生体系的研究[J].浙江农业学报,2003,15(2):69-72
- [3] 尹淑萍,金万梅,袁维风,等.草莓品种“丰香”和“哈尼”高频再生体系的建立及遗传转化的研究[A]//中国园艺学会第六届青年学术讨论会论文集[C].陕西:中国园艺学会,2004
- [4] 周鹤莹,张玮,张卿,等.森林草莓‘Hawaii 4’高效遗传转化体系的建立[J].北京农学院学报,2015,30(1):10-14
- [5] 吴雪梅,汤浩茹,文国琴,等.不同培养条件对“丰香”草莓离体叶片再生的影响[J].园艺学报,2004,31(5):657-659
- [6] 邓馨,胡文玉.草莓叶片再生芽及遗传转化体系的建立[J].植物学通报,2001,17(2):174-178
- [7] 向发云,吴金平,曾祥国,等.“晶瑶”草莓叶片再生体系的建立[J].江西农业学报,2010,22(11):28-31
- [8] 向发云,韩永超,曾祥国,等.草莓新品种晶玉高效离体再生体系的建立[J].湖北农业科学,2013,52(23):5912-5916
- [9] Nehra N S, Staslmof C. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1989, 114 (6): 1014-1018
- [10] 张志宏,吴禄平.草莓主栽品种 Tudla 遗传转化体系的建立[J].农业生物技术学报,1998,6(2):200-204
- [11] Passey A, Barrett K, James D. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars using a range of explant types[J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 397-401
- [12] 尹淑萍,金万梅,王萍,等.Thidiazuron 对草莓外植体再生不定芽的影响[J].农业生物技术学报,2003,11(4):379-382
- [13] 尹淑萍,金万梅,袁维风,等.生长调节物质对草莓叶片再生不定芽的影响[J].植物生理学通讯,2004,40(4):447-449
- [14] 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):105-108
- [15] 向发云,曾祥国,冯小明,等.草莓叶柄组织培养再生研究[J].湖北农业科学,2010,49(2):273-275
- [16] TIAN M, GU Q, ZHU M Y. The involvement of hydrogen of peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus [J]. Plant Science, 2003, 165 (4): 701-707