

文章编号 :1003-8701(2013)05-0069-04

# 森嘎拉草莓叶片不定芽诱导及转化体系的建立

张丙秀<sup>1,2,3</sup>, 李柱刚<sup>2\*</sup>, 赵树亮<sup>3</sup>, 刘丹<sup>3</sup>, 高庆玉<sup>3</sup>

(1. 东北林业大学博士后科研流动站, 哈尔滨 150086;

2. 黑龙江省农业科学院博士后科研工作站, 哈尔滨 150086; 3. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 本文以草莓森嘎拉组培苗离体叶片为外植体, 研究了暗培养、不同激素配比对不定芽分化及暗培养对叶片不定芽诱导率的影响。结果表明: 森嘎拉的叶片诱导最适培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D, 在此培养基上诱导率可达 73.3%, 平均出芽数可达 2.2。先暗培养 7 d, 再进行光培养, 不定芽的诱导率较高, 不定芽诱导率为 78.2%。对卡那霉素筛选压力和除菌剂浓度的研究表明: 用 300 mg/L(Cef)除菌, 外植体分化率最高, 并确立了森嘎拉在不定芽分化阶段的 Km 筛选压力为 20 mg/L。

**关键词:** 草莓; 不定芽; 培养基; 转化体系

中图分类号: S668.401

文献标识码: A

## Studies on Induction of Adventitious Bud of Leaflet and Construction of Transformation System of 'Sengara' Strawberry

ZHANG Bing-xiu<sup>1,2,3</sup>, LI Zhu-gang<sup>2\*</sup>, ZHAO Shu-liang<sup>3</sup>,  
LIU Dan<sup>3</sup>, GAO Qing-yu<sup>3</sup>

(1. Postdoctoral Station of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086;

2. Postdoctoral Station of Northeast Forestry University, Harbin 150086;

3. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** An efficient regeneration system was established from the explants of leaves of 'Sengara' strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). The effects of dark incubation and plant growth regulator combinations on adventitious bud induction were studied. The results showed that the optimum medium for 'Sengara' leaves induction was MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D, and the induction rate was 73.3%. The average sprouting numbers was up to 2.2. Adventitious bud induction rate was higher when dark cultured for 7 days then the light culture, and the adventitious bud induction rate was 78.2%. For 300 mg/L Cef sterilization, explants differentiation rate was the highest, and Km screening pressure was 20 mg/L for 'Sengala' in adventitious bud differentiation stage.

**Keywords:** Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.); Adventitious bud; Medium; Transformation system

草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.) 是蔷薇科 (Rosaceae) 草莓属 (*Fragaria*) 多年生草本植物。草莓鲜美红嫩, 果肉多汁, 含有特殊的浓郁水果芳香, 营

养价值高, 是一种水果、蔬菜兼用型的特殊经济作物, 在国内外水果市场上占有重要地位。随着草莓生产的不断发展, 传统育种方法在提高草莓品种的产量和品质方面取得了一定的进展, 由于草莓的高杂合性和多倍性, 使其常规杂交育种工作周期长、工作量大, 杂交后代分离广泛, 造成育种效率低<sup>[1]</sup>。现代生物技术的发展为果树的育种工作开辟了新途径, 外源基因的导入则是育种工作更为直接的

收稿日期: 2013-01-25

基金项目: 公益性行业体系专项基金项目(201103037)

作者简介: 张丙秀(1977-), 女, 博士, 讲师, 主要从事果树分子育种和栽培生理研究。

通讯作者: 李柱刚, 男, 研究员, E-mail: lizhugang@163.com

有效手段。在植物遗传转化中,建立高效、稳定且再生能力强的植物受体系统是实现基因转化的先决条件。近年来,虽然草莓的再生体系及遗传转化已在多种品种上获得成功<sup>[2-4]</sup>,但大多采用噻苯隆(thidiazuron, TDZ)作为主要激素<sup>[2,5-6]</sup>,且 TDZ 价格昂贵,成本高。草莓是浆果,不便运输,难藏贮。因此,将它开发加工成草莓食品,不仅可缓解鲜销压力,避免霉烂损失,又能满足不同消费需求,增值增收。森嘎拉作为加工品种在国际市场上极具竞争力,是目前我国现有草莓加工品种的优良换代品种<sup>[7]</sup>,关于加工型品种森嘎拉再生体系方面的研究鲜有见报道<sup>[8-9]</sup>,而草莓基因型对外植体不定芽再生效率影响差异显著<sup>[10-11]</sup>,因此,本研究以森嘎拉为对象,系统研究了影响叶片离体再生的相关因素,建立了不依赖于 TDZ 的高效、稳定的遗传转化受体系统,为森嘎拉草莓的基因转化、品种改良奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

草莓品种森嘎拉由东北农业大学园艺站提供。农杆菌 EHA105 由本实验室保存。

### 1.2 组培苗的培养

4~6 月取草莓刚抽出的匍匐茎的茎尖,用自来水冲洗 30 min,置超净工作台上,先用 75% 的酒精浸泡 30 s,用无菌水冲洗 3 遍,而后用 0.1% 的升汞消毒 4~5 min,再用无菌水冲洗 4~6 遍。处理后用灭菌的吸水纸吸干茎尖表面液体,接种于 MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA 琼脂 7 g/L+蔗糖 30 g/L 的培养基中进行培养。取生长健壮的芽苗进行继代培养,采用 MS+2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IAA 继代培养基,无菌苗高约 2 cm 时,转入不含任何激素的 MS 培养基中培养。

### 1.3 激素对叶片不定芽诱导的影响

从生长 30 d 左右的试管苗上剪取顶部幼嫩平展的叶片,并将该叶片剪为  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$  的叶块,以背面向下平放于诱导培养基。以 MS 为基本培养基,附加不同植物生长调节剂质量浓度配比,6-BA (1、2、3 mg/L) 分别与 2,4-D (0.1、0.2、0.3 mg/L) 组合成 9 种类型,以研究不同浓度植物生长调节剂对不定芽诱导的影响。

### 1.4 暗培养对叶片不定芽分化的影响

叶片接种在筛选出的最佳培养基上分别进行 0 d、7 d、14 d、21 d 的暗期处理后,置于光下常规培养。

### 1.5 再生植株驯化移栽

当抗性芽长到 2~3 cm 高时,从茎部切下,转到生根培养基 MS+0.2 mg/L IBA 中进行生根培养。待再生的小植株根系发达后,培养室中将封口膜打开,炼苗一周。然后取出小植株,小心洗净根部培养基,移栽到营养钵中,并覆盖塑料薄膜,每天对叶片喷雾数次以保湿,长出新叶后,去掉薄膜。培养条件为 20℃,15 000 lx、16 h/d 光照,湿度 85%~90%。

### 1.6 卡那筛选压力

为了获得较大的阳性转化率,对卡那筛选压力进行了筛选。草莓的卡那筛选一般在 0~30 mg/L,所以本试验设置了 0、10、20、30 mg/L 4 个水平,而后设置了 0、2、5、8 mg/L 4 个水平,10 d 继代一次,15 d 后统计愈伤分化率和芽诱导率。

### 1.7 除菌剂浓度对遗传转化的影响

除菌剂筛选主要选用 100 mg/L、300 mg/L、500 mg/L、700 mg/L 的头孢噻肟钠(cef),统计外植体平均分化率。

将农杆菌 EHA105 接种于 YEB 固体培养基上,28℃ 过夜暗培养,至长出单菌落。挑取单菌落,接种在 5 mL 含相应抗生素的 YEB 液体培养基中,于 28℃,200 r/min 振荡培养,待菌液长至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6 时,将其按 1:10 的比例接种到新的培养基中振荡培养,进行二次活化。当 OD<sub>600</sub> 为 0.5~0.6 时,该菌液作为转化用菌液,对叶片外植体进行侵染。

取预培养 2~3 d 的叶盘,置于无菌三角瓶内,加入适量选好的菌液,浸泡 5 min,此间要不时的摇动。浸泡完后,弃菌液,用无菌滤纸吸干多余的菌液。

侵染过的叶盘接种于共培养培养基 MS+3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D(含有 50 mg/L 乙酰丁香酮的继代培养基, pH=5.8) 上,28℃ 暗培养 2~3 d,以肉眼可见菌落为准。

取共培养后的叶盘放于无菌三角瓶内,转入附加不同浓度头孢噻肟钠除菌剂的液体分化培养基冲洗,再用无菌水冲洗 2~3 次后,转到附加除菌剂的固体继代培养基 MS+3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D 上。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素比对不定芽分化的影响

不同激素的种类、浓度及比对草莓叶片不定芽分化影响很大。试验结果表明,森嘎拉的最适

培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D, 在此培养基上诱导率可达 73.3%, 平均出芽数可达 2.2。不同浓度激素对草莓品种森嘎拉不定芽分化的影响见表 1。

表 1 激素对草莓品种森嘎拉不定芽分化的影响

激素(mg/L)		平均每块外植体上		
6-BA	2,4-D	芽分化率(%)	芽数	分化效率(%)
1.0	0.1	38.3	1	38.3
1.0	0.2	36.7	1.2	44.0
1.0	0.3	33.3	1.0	33.3
2.0	0.1	66.7	2.0	133.4
2.0	0.2	43.3	1.4	60.6
2.0	0.3	51.6	1.2	61.9
3.0	0.1	68.3	1.9	129.7
3.0	0.2	73.3	2.2	168.6
3.0	0.3	51.6	1.7	87.7

注: 分化效率(%)= 平均每块外植体上芽数×分化率(%)。

## 2.2 暗培养对叶片不定芽诱导率的影响

本试验以 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 为再生培养基, 对森嘎拉分别进行 0、7、14、21 d 的暗培养(表 2), 发现长时间(14 和 21d)的暗培养并不利于草莓不定芽的产生, 试验结果表明, 先暗培养一周, 再进行光培养, 不定芽的诱导率较高。

表 2 不同时间暗培养对森嘎拉不定芽诱导的影响

暗培养(d)	不定芽诱导率(%)	平均再生芽数(个)
0	70.4	1.7
7	78.2	2.5
14	71.2	1.7
21	67.5	1.6

## 2.3 卡那霉素筛选压力的确定

本试验利用卡那霉素进行草莓转化体系的筛选, 设置了 0、10、20、30 mg/L 4 个水平进行了试验, 15 d 后统计愈伤分化率和芽的分化情况, 结果见表 3。随着天数的增加, 不同浓度的卡那霉素均会抑制草莓的生长, 组织开始变白, 长出的芽出现了白化状况。到 15 d 时, 卡那霉素浓度为 10 mg/L 时转化的愈伤分化率及芽分化率明显降低, 而且, 当达到 20 mg/L 时愈伤和芽的诱导率大大降低, 外植体已经出现了明显的白化。当达到 30 mg/L 时, 叶片外植体的分化完全死亡。

此后设置了 0、5、8 mg/L 3 个水平, 10 d 继代一次, 15 d 后统计愈伤分化率和芽诱导率。结果表明, 卡那霉素浓度为 5 mg/L、8 mg/L 时, 分化率和芽诱导率都很高(表 3)。

## 2.4 除菌剂浓度对遗传转化的影响

从表 4 可以看出, 在除菌筛选阶段, 用 300 mg/L(Cef)除菌, 外植体分化率达到 47.3%。除菌剂浓度低时, 难以抑制住农杆菌。除菌剂浓度过高,

叶片褐化变黑死亡。

表 3 草莓品种森嘎拉的卡那霉素浓度梯度试验

Km 浓度(mg/L)	平均分化率(%)	芽诱导率(%)
0	65.1	70
5	44.7	41
8	21.7	19
10	15.4	13
20	0	0
30	0	0

表 4 除菌剂对森嘎拉不定芽分化的影响

除菌剂种类	接种外植体数	分化外植体数	平均分化率(%)
Cef(100 mg/L)	104	38	36.5
Cef(300 mg/L)	112	53	47.3
Cef(500 mg/L)	82	28	34.1
Cef(700 mg/L)	80	7	8.8

## 3 讨论

草莓再生体系的研究较多。草莓的离体再生受植物的基因型、外植体的种类、激素的种类及配比和培养条件及预处理等一系列的内外因素影响, 这些问题将是影响草莓遗传转化培养体系的主要问题。植物组织培养中, 较高的叶片愈伤组织诱导率可以为遗传转化提供丰富的受体材料, 提高转化效率。最重要的因素是激素的调节作用。植物细胞分裂素可以促进细胞分裂, 调控细胞器的发生等, 在体细胞发生的研究中常用来作为外源调节物质。本试验也通过在培养基中添加不同浓度的 6-BA、2,4-D 对愈伤组织的诱导和再生进行了观察, 在愈伤组织诱导的过程中发现, 当 6-BA 浓度为 3 mg/L、2,4-D 为 0.2 mg/L 时, 愈伤组织诱导率是最高的, 此时分化效率最高。在对一个品种进行遗传转化前进行再生体系的优化还是必要的。

遗传转化过程中, Km 对草莓愈伤组织的诱导、不定芽的分化和植株的生长有很强的抑制作用。如果卡那霉素的筛选压力过低, 已经转入目的基因的细胞的分化就会因为其他细胞的竞争而受到抑制, 而筛选压力过高, 就会对外植体造成毒害。草莓 Km 的筛选压力一般为 20~50 mg/L<sup>[12-13]</sup>。本研究认为 20 mg/L Km 就会完全抑制森嘎拉不定芽的发生。

在农杆菌介导中, 为抑制农杆菌的继续生长, 以便使受体细胞正常生长发育, 有必要进行抑菌培养。Cef 是农杆菌介导的转化中广泛使用的杀菌剂, 对大多数菌株的杀菌效果好。同时也对外植体材料有毒害作用, 会抑制愈伤组织的形成和植株分化。本试验研究表明, 在草莓叶片培养中, 随着 Cef 浓度的增加, 不定芽分化率降低, 愈伤组织

褐化率加剧,生长受到严重抑制。高浓度(500 mg/L)的 Cef 对愈伤组织有显著的毒害作用,以 Cef 浓度为 300 mg/L 为适宜。

暗培养能够抑制外植体酚类物质的外溢,减少褐化,使外植体处于良好的生理状态,对不定芽诱导率有重要的影响<sup>[14]</sup>。暗培养对不同品种草莓的影响不同<sup>[15]</sup>,试验中对暗培养在叶片不定芽诱导率方面做了优化,暗培养 7 d 后进行光照培养森嘎拉的分化率最高。

## 4 结 论

森嘎拉的叶片诱导最适培养基为 MS+3.0 mg/L6-BA+0.2 mg/L2 4-D。最适暗培养时间为 7 d。300 mg/L(Cef)除菌,外植体分化率最高,森嘎拉在不定芽分化阶段的 Km 筛选压力为 20 mg/L。

参考文献:

- [1] 朱海生. 草莓乙烯受体反义基因遗传转化的研究 [D]. 福建农林大学, 2008.
- [2] Schestibratov K A, Dolgov S V. Transgenic Strawberry Plants Expressing a Thaumatin Gene Demonstrate Enhanced Resistance to Botrytis cinerea [J]. Scientia Hort. 2005(106): 177-189.
- [3] Husaini A.M., Abdin M.Z. Development of transgenic strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress [J]. Plant Sci, 2008, 174(4): 446-455.
- [4] Qin Y., Teixeira da Silva J.A., Zhang L., et al. Transgenic

strawberry: state of the art for improved traits[J]. Biotechnol. Adv., 2008, 26(3): 219-232.

- [5] Landi L., Mezzetti B. TDZ, Auxin and Genotype Effects on leaf organogenesis in *Fragaria* [J]. Plant Cell Rep., 2006, 25(4): 281-288.
- [6] Mohamed F.H., Beltagi M.S., Ismail M.A., et al. High frequency, direct shoot regeneration from greenhouse-derived leaf disks of six strawberry cultivars [J]. Pak J.Biol Sci., 2007, 10(1): 96-101.
- [7] 杜国栋,吕德国,高秀岩,等. 草莓加工品种 - 森嘎拉[J]. 落叶果树, 2000(6): 24-25.
- [8] 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.
- [9] 张璐璐,高庆玉. 草莓主栽品种高效再生体系的建立[J]. 陕西农业科学, 2009(4): 44-46.
- [10] 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, 2000, 17(2): 174-178.
- [11] 闫华晓,赵辉,崔德才. 影响草莓叶片植株再生因素的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版) 2003, 34(2): 177-180.
- [12] 李小红,汤浩茹. 草莓的遗传转化研究进展[J]. 西华师范大学学报(自然科学版) 2006, 27(2): 134-138.
- [13] 张红梅,王俊丽. “全明星”草莓叶片遗传转化体系的建立[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 68-70.
- [14] 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]. PlantScience, 2003(165): 701-707.
- [15] 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.

(上接第 57 页)与半光之间差异不显著,由孢子萌发率排序为 P 全光 > P 半光 > P 全暗,说明光照可以提高孢子的萌发率,最适于孢子萌发的条件是全光照。

## 3 结论与讨论

试验结果表明,不同温度、pH 值、光照对菌丝生长的影响为菌丝适宜在偏碱性条件下 pH 在 7~10 间生长;最适宜菌丝生长的温度为 30℃;最适宜菌丝生长的光照条件是全光照。偏酸条件下更适宜孢子萌发;最适宜孢子萌发的温度为 25~35℃;最适于孢子萌发的条件是全光照。不同温度、pH 值、光照对孢子萌发的影响为偏酸条件下 pH 值 4~7 间更适宜孢子萌发;最适宜孢子萌发的温度为 25~35℃;最适于孢子萌发的条件是全光照。

本研究探讨了不同温度、pH 值、光照对杏斑点病病菌的影响,对于不同的碳、氮源对杏斑点病病菌的影响在其他文献中已有记述,对于其他因

子对该病的影响,有待于进一步研究,本研究对于研究杏斑点病病菌的发生规律等具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 戚佩坤. 吉林省栽培植物真菌病害志[M]. 北京: 科学出版社, 1966: 202.
- [2] 戴芳澜. 中国真菌总汇 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 1035-1048.
- [3] 吕国忠. 中国东北地区球壳孢目真菌主要属种的分类研究 [D]. 沈阳农业大学, 1992.
- [4] 方中达. 植病研究法(3 版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [5] 马兴国,杨学鹏,王雪斌. 灵武长枣生物学特性初报[J]. 西北园艺(果树), 2006(2): 1.
- [6] 胡翠凤,吴琼华. 香石竹叶斑病菌的生物学特性[J]. 福建农业大学学报, 1997, 26(3): 308-312.
- [7] 纪瑛,肖崇刚. 红花酸浆草叶斑病菌生物学特性研究[J]. 植物保护, 2006(5): 70-73.
- [8] 张富丽,宁江. 山葵墨入病菌生物学特性研究[J]. 植物保护, 2004, 30(4): 45-48.
- [9] 邵喜鸣,张述义. 核桃枝枯病生物学特性研究及药剂毒力测定[J]. 山西农业科学, 1994, 22(1): 49-51.