

潘娇艳, 肖世伟, 夏 瑾, 等. 绿色草莓再生体系的建立[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(1): 174-182.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.01.019

绿色草莓再生体系的建立

潘娇艳¹, 肖世伟¹, 夏 瑾², 倪知游¹, 邹雨婷¹, 乔玉山^{1,2}

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 建立高效、稳定的绿色草莓再生体系是构建其遗传转化体系的基础。本研究以绿色草莓匍匐茎茎尖为外植体, 置于不同培养基中进行初代培养获得试管苗。在含有不同配比植物生长调节剂的培养基中对叶龄为 30 d 的试管苗叶盘进行脱分化处理。以叶盘诱导产生的愈伤组织为试验材料, 探究不同植物生长调节剂对愈伤组织产生不定芽的影响。结果表明, 最适用于绿色草莓初代培养的培养基是 MS+0.2 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.2 mg/L 赤霉素(GA₃), 在此培养基中绿色草莓离体茎尖成活率最高, 生长状况最好; 诱导叶盘脱分化、愈伤组织再分化和诱导不定芽生根的适宜培养基分别是 MS+1.5 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)+2.0 mg/L 噻苯隆(TDZ)、1/2 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 吲哚丁酸(IBA)和 1/2 MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L 吲哚乙酸(IAA), 其出愈率、再分化率和生根率分别为 100%、91.0%、100%。本研究建立了以绿色草莓匍匐茎茎尖为试验材料获得试管苗的组织快繁体系和以叶盘为外植体经脱分化、愈伤组织再分化 2 个阶段的再生体系, 为建立其遗传转化体系奠定了技术基础。

关键词: 绿色草莓; 愈伤组织; 再生; 遗传转化体系

中图分类号: S668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)01-0174-09

The establishment of regeneration system of *Fragaria viridis* Weston

PAN Jiao-yan¹, XIAO Shi-wei¹, XIA Jin², NI Zhi-you¹, ZOU Yu-ting¹, QIAO Yu-shan^{1,2}

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: The establishment of an efficient and stable regeneration system of *Fragaria viridis* Weston is the basis of its genetic transformation system. In this study, the stolon tips of *Fragaria viridis* Weston were used as explants and placed in different media for primary culture to obtain test-tube seedlings. The leaf discs of test-tube plantlets with leaf age of 30 days were dedifferentiated in the medium containing different ratios of plant growth regulators. The calluses induced by leaf discs were used as materials to explore the effects of different plant growth regulators on adventitious buds. The results showed that the most suitable medium for primary culture of *Fragaria viridis* Weston was MS+0.2 mg/L N-(phenylmethyl)-9H-purin-6-amine (6-BA)+0.2 mg/L gibberellin A3 (GA₃). In this medium, the survival rate of *Fragaria viridis* Weston shoot tips *in vitro* was the highest and the growth condition was the best. The suitable media for inducing leaf discs dedifferentiation, callus redifferentiation and adventitious bud rooting were MS+1.5 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)+2.0 mg/L thidiazuron (TDZ), 1/2 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 3-indolebutyric acid (IBA) and 1/2 MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L 3-indoleacetic acid (IAA), respectively.

收稿日期: 2023-02-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072540); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(21)2019]

作者简介: 潘娇艳(1998-), 女, 广西贺州人, 硕士研究生, 主要从事草莓分子生物学研究。(E-mail) 1853262521@qq.com

通讯作者: 乔玉山, (E-mail) qiaoyushan@njau.edu.cn

The callus incidence, redifferentiation rate and rooting rate were 100%, 91.0% and 100%, respectively. In this study, the tissue rapid propagation system using the stolon tips of *Fragaria viridis* Weston as experimental materials and a regeneration system using leaf discs as explants through dedifferentiation and callus redifferentiation were established,

which laid a technical foundation for the establishment of its genetic transformation system.

Key words: *Fragaria viridis* Weston; callus; regeneration; genetic transformation system

建立高效的离体再生体系是构建遗传转化体系的基础,也是开展植物基因工程研究必要的前提条件之一,对于进一步利用转基因、基因编辑等技术研究草莓基因功能、品种改良及种质创新具有重要意义。不同草莓品种的再生效率及遗传转化效率存在较大差异,一些栽培草莓(*Fragaria×ananassa* Duch.)品种的再生体系及遗传转化体系已经建立,如全明星^[1]、早红^[2]、晶瑶^[3]、红颜^[4]等。野生草莓拥有风味独特、抗逆性强等优良性状,是改良栽培品种的潜在资源^[5]。国外已经建立了部分森林草莓(*F. vesca*)高效、稳定的再生体系及遗传转化体系^[6-9];国内也建立Hawaii 4^[10]、Ruegen^[11]、Yellow Wonder^[12]等森林草莓的再生体系,但这些株系的遗传转化体系还需要进一步研究。黄毛草莓(*F. nilgerrensis* Schltdl. ex J. Gay)茎尖培养体系、组培苗快繁体系、叶片离体再生体系也先后建立起来^[5,13]。绿色草莓(*Fragaria viridis* Weston)属于二倍体野生草莓,具有抗逆性强、果实硬度高等优良性状,同时具有基因组小等优点,在栽培草莓品种改良上具有利用价值^[14],但关于其再生体系及遗传转化体系的研究还比较少。本研究拟以田间自然生长的绿色草莓匍匐茎为外植体,从初代培养开始逐步研究绿色草莓的再生体系,以期为其遗传转化体系的建立奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用绿色草莓的株系为GE-39。2021年4-6月采集田间幼嫩匍匐茎进行初代培养,进而获得试管苗,其他培养材料为试管苗的幼叶及由其诱导产生的愈伤组织。

基本培养基为MS培养基或1/2 MS培养基,均附加3.0%蔗糖和0.7%琼脂,121℃/116℃灭菌20 min/30 min。高温灭菌前,将培养基的pH值调节至5.8~5.9。培养室温度为(25±1)℃,光照周期为16 h/8 h,光照度为2 000 lx。

1.2 试验方法

1.2.1 试管苗的建立 将田间取回的匍匐茎用流水冲洗3~5 h,在超净工作台将匍匐茎保留3~5 cm的茎尖用70%的乙醇消毒30~40 s,消毒结束时用无菌水冲洗

3~4次,再用10%的次氯酸钠消毒10 min,用无菌水再次冲洗3~4次,用灭菌滤纸吸干茎尖表面水分,切除茎尖下端少许,然后接种到MS、MS+0.5 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L赤霉素(GA₃)初代培养基中,每瓶接种1个茎尖,观察并记录茎尖的生长状况,30 d后统计成活率。

1.2.2 试管苗的增殖 茎尖在初代培养基中成活后获得试管苗,将长势相近的试管苗接种至不同增殖培养基中。增殖培养基以1/2 MS为基本培养基,植物生长调节剂组合为:6-BA与吲哚丁酸(IBA)、6-BA与GA₃、6-BA与吲哚乙酸(IAA)。6-BA质量浓度梯度设置为0.1 mg/L、0.3 mg/L、0.5 mg/L,IBA、GA₃、IAA的质量浓度梯度均设置为0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L。每个培养基接种3株试管苗,观察并记录植株的生长状况,培养28 d后对比不同处理对绿色草莓增殖系数(增殖系数=再生芽总数/接种芽数)的影响。

1.2.3 不同植物生长调节剂组合对叶盘脱分化的影响 选取叶龄为30 d的健康试管苗叶片,剪去叶片四周少许,再沿垂直于叶片中脉方向横切,形成近似方形且大小相近的叶盘。将叶盘背面朝下平铺于叶盘脱分化培养基中,均匀摆放。叶盘脱分化培养基以MS为基础培养基,并设置不同植物生长调节剂组合(表1)。每个培养基放置8~15个叶盘,暗培养7 d后分为两部分,一部分继续放在黑暗环境中培养,另一部分置于光下培养。每天观察并记录叶盘的生长状况、愈伤组织的发生情况,每隔14 d更换一次培养基。培养30 d后计算出愈率(愈率=长出愈伤组织的叶盘数/接种的叶盘总数×100%)。

1.2.4 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织再分化的影响 本研究发现叶盘在适宜脱分化培养基中产生的愈伤组织经相同培养基继代培养后,渐渐出现褐化甚至死亡的现象,不产生不定芽,因此需探索适宜的愈伤组织再分化培养基。将愈伤组织接种至不同的愈伤组织再分化培养基(表2)中,基础培养基为1/2 MS,每个培养基放置4~6个愈伤组织。在培养过程中统计愈伤组织再分化率(再分化率=可再分化的愈伤组织数/接种的愈伤组织数×100%)及平均分化芽数(平均分化芽数=不定芽总数/可再分化的愈伤

组织数),并记录再生不定芽的生长状态。

表 1 叶盘脱分化培养基

Table 1 Leaf discs dedifferentiation medium

处理	TDZ (mg/L) + 2,4-D (mg/L)	处理	TDZ (mg/L) + IBA (mg/L)	处理	6-BA (mg/L) + NAA (mg/L)	处理	6-BA (mg/L) + IBA (mg/L)
1	1.0+1.0	10	1.0+0.1	19	0.5+0.1	28	1.0+0.1
2	1.0+1.5	11	1.0+0.2	20	0.5+0.2	29	1.0+0.2
3	1.0+2.0	12	1.0+0.3	21	0.5+0.3	30	1.0+0.3
4	1.5+1.0	13	1.5+0.1	22	1.0+0.1	31	1.5+0.1
5	1.5+1.5	14	1.5+0.2	23	1.0+0.2	32	1.5+0.2
6	1.5+2.0	15	2.0+0.1	24	2.0+0.1	33	2.0+0.1
7	2.0+1.0	16	2.0+0.2	25	2.0+0.2	34	2.0+0.2
8	2.0+1.5	17	3.0+0.1	26	3.0+0.1	35	3.0+0.1
9	2.0+2.0	18	3.0+0.2	27	3.0+0.2	36	3.0+0.2

TDZ:噻苯隆;2,4-D;2,4-二氯苯氧乙酸;IBA:吲哚丁酸;6-BA;6-苄氨基嘌呤;NAA:萘乙酸。

表 2 愈伤组织再分化培养基

Table 2 Callus redifferentiation medium

处理	TDZ (mg/L) + 2,4-D (mg/L)	处理	TDZ (mg/L) + NAA (mg/L)	处理	TDZ (mg/L) + IBA (mg/L)	处理	6-BA (mg/L) + 2,4-D (mg/L)	处理	6-BA (mg/L) + NAA (mg/L)	处理	6-BA (mg/L) + IBA (mg/L)
1	1.0+1.5	5	0.5+0.1	9	0.5+0.1	13	2.0+1.0	17	0.5+0.1	21	1.0+0.1
2	1.0+2.0	6	0.5+0.2	10	0.5+0.2	14	2.0+1.5	18	0.5+0.2	22	1.0+0.2
3	2.0+1.5	7	1.0+0.1	11	1.0+0.1	15	4.0+1.0	19	1.0+0.1	23	1.5+0.1
4	2.0+2.0	8	1.0+0.2	12	1.0+0.2	16	4.0+1.5	20	1.0+0.2	24	1.5+0.2

TDZ:噻苯隆;2,4-D;2,4-二氯苯氧乙酸;IBA:吲哚丁酸;6-BA;6-苄氨基嘌呤;NAA:萘乙酸。

1.2.5 试管苗生根诱导及炼苗移栽 选择生长状况良好且长势相近的试管苗接种至不同的生根培养基中,生根培养基以 1/2 MS 为基础培养基,植物生长调节剂为 IAA、IBA、IBA+IAA。IAA、IBA 的质量浓度均设置为 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L、0.4 mg/L,每个培养基接种 3 株试管苗,培养 30 d 后记录试管苗根系的生长状况、苗的长势并统计生根率。

将试管苗或再生的芽接种到最佳生根培养基中,经过 30 d 的生根培养后,对根系健壮的试管苗开盖放置 3~5 d,炼苗期间注意观察试管苗的生长状况,及时向叶面喷水补充水分。炼苗结束后洗净幼苗根部培养基,并用多菌灵水溶液浸泡根系 10 s。将草莓苗移栽至经高温消毒的基质中,基质成分包含营养土、蛭石与珍珠岩,其体积比为 9 : 3 : 1,在室温条件下缓苗 2~3 d 后转移至适宜环境中,30 d 后统计成活率,成活率=成活植株数/总移栽植株数×100%。

2 结果与分析

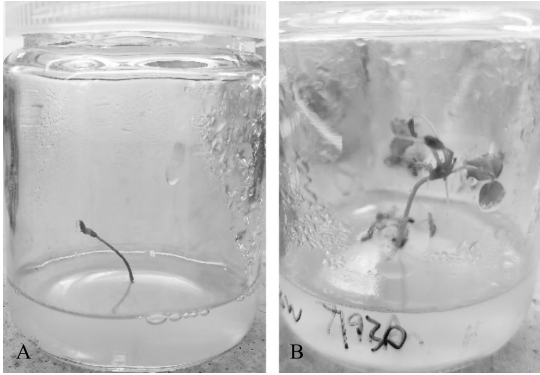
2.1 绿色草莓试管苗的建立

试管苗的建立是绿色草莓再生体系建立的首要

步骤,本研究对绿色草莓初代培养的研究结果表明,在不添加任何激素的 MS 培养基中茎尖的成活率相对较低,为 13.3%,长势较弱且褐化相对严重;而接种在 MS+0.5 mg/L 6-BA、MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA₃培养基中的茎尖生长发育较为健康且能保持较为活跃的生命力,褐化现象较少。其中,在 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA₃培养基中,茎尖的生长状况最为活跃,成活率最高,为 46.6%,且有少量侧芽萌发(图 1),而在 MS+0.5 mg/L 6-BA 培养基中茎尖的成活率仅为 26.6%,因而添加 GA₃的培养基更适用于绿色草莓的初代培养。绿色草莓的初代建立需要经过一系列的消毒步骤,茎尖的生活力受到影响,因此与增殖培养相比,初代建立所需要的时间更长。

2.2 不同培养基对试管苗增殖的影响

不同植物生长调节剂组合对绿色草莓的增殖效果不同,但绿色草莓增殖系数的高低主要由 6-BA 决定。在含有 0.2 mg/L IAA 的增殖培养基中,绿色草莓的增殖系数随着 6-BA 质量浓度的升高而提高;但是当绿色草莓的增殖系数过高时,幼苗在有限的空间内相互挤压,植株的生长势变弱,表现出根系



A:绿色草莓茎尖在 MS+0.2 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.2 mg/L赤霉素(GA_3)培养基中培养 0 d 时的生长状况;B:绿色草莓茎尖在 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA_3 培养基中培养 30 d 时的生长状况。

图1 绿色草莓试管苗的建立

Fig.1 Establishment of *Fragaria viridis* Weston test-tube seedlings

短小、茎叶细弱、略有黄化的现象。在培养基中包含 0.1 mg/L 的 6-BA 时,添加 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L 的 IBA 或 IAA,均可获得明显的增殖效果,且植株形态正常,生长状况良好;而添加 0.3 mg/L 的 GA_3 时,增殖效果一般,但植株更健壮,叶片肥大鲜绿(图 2A)。综合分析,当培养基中添加 0.1 mg/L 6-BA 及 0.2 mg/L IBA 时,绿色草莓的增殖效果最好,增殖系数为 6.4,所诱导产生的草莓苗不但健壮而且叶片鲜绿(图 2B)。



A:绿色草莓在 1/2 MS+0.1 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.3 mg/L赤霉素(GA_3)培养基中培养 28 d 时的生长状况;B:绿色草莓在 1/2 MS+0.1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 吲哚丁酸(IBA)培养基中 28 d 时的生长状况。

图2 绿色草莓在不同培养基中增殖情况

Fig.2 Propagation of *Fragaria viridis* Weston in different media

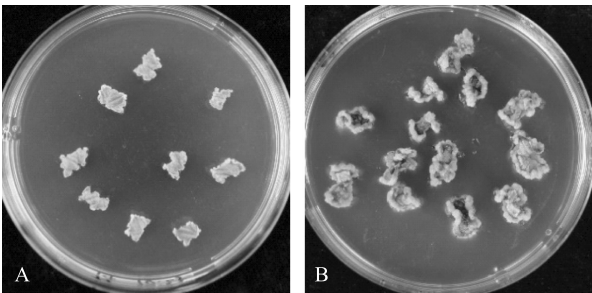
2.3 不同培养基对诱导叶盘脱分化的影响

使用不同培养基诱导叶盘脱分化的研究结果表明,叶盘在 MS+2,4-D(1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L)+噻苯隆(TDZ, 1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L)培养基中连续暗培养 24 d 时多在周围刻伤处形成白色的愈伤组织,质地较软,在这些培养基中叶盘出愈率均为 100%。将白色愈伤组织转移到光照下继续培养,其颜色逐渐变为嫩黄色,愈伤组织快速增殖且质地紧密,但无不定芽分化现象(图 3)。叶盘在相同培养基中暗培养 7 d 后转移至光下培养 23 d,其脱分化效果不明显。叶盘在 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA、MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA、MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA 培养基中连续暗培养 30 d 后,出愈率也为 100%,但叶盘产生的愈伤组织面积不大,多呈黄白色或黄褐色,长势较差,在相同的培养基连续继代培养后,愈伤组织硬化、不具有生命活力。在 TDZ(1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、3.0 mg/L)+IBA(0.1 mg/L、0.2 mg/L)、6-BA(1.0 mg/L、2.0 mg/L、3.0 mg/L)+IBA(0.1 mg/L、0.2 mg/L)、6-BA(1.0 mg/L、2.0 mg/L、3.0 mg/L)+NAA(0.1 mg/L、0.2 mg/L)、1.0 mg/L TDZ+0.3 mg/L IBA、1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA 培养基中,无论是连续暗培养还是暗培养 7 d 后转到光下培养,叶盘生长状况都较差,随着诱导时间的延长,叶盘褐化率逐渐升高,培养 30 d 时叶盘大部分或全部褐化,不产生愈伤组织,出愈率为 0。综合分析,最适宜诱导叶盘脱分化的培养基为 MS+1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L TDZ,在该培养基中出愈率高,且愈伤组织生命力旺盛,在适宜的愈伤组织再分化培养基中产生不定芽的效果最好。

2.4 不同培养基对愈伤组织再分化的影响

愈伤组织再分化产生不定芽的数量和质量因再分化培养基中植物生长调节剂组合的不同而不同。表 3、图 4 显示,在含有 TDZ+NAA、TDZ+IBA 的培养基中,愈伤组织的再分化率都高于 80.0%,平均分化芽数也较多,但分化而来的芽基本表现出质地较脆、叶片细小、生长缓慢的玻璃化特征,不能正常生长,难以进行下一步的生根培养。在含有 TDZ+2,4-D、6-BA+2,4-D 的培养基中,愈伤组织在连续培养 50 d 时,基本都褐化,不分化不定芽。在含有 1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 的培养基中,愈伤组织

在连续继代后仍然保持愈伤状态,颜色为嫩黄色,质地较为疏松,不分化不定芽。愈伤组织在 1/2 MS+6-BA+IBA 培养基中培养18~25 d 后,细胞变得更为紧密并产生绿色突起,30~40 d 后形成不定芽,并产生根系。在 1/2 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA 的培养基中,愈伤组织再分化率最高,为 91.0%,愈伤组织产生的不定芽形态健康、生长活跃且数量最多,因此选用该培养基作为绿色草莓愈伤组织再分化培养基。



A、B:叶盘接种在 MS+1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L TDZ 培养基中 24 d、30 d 时的生长状况。TDZ:噻苯隆;2,4-D:2,4-二氯苯氧乙酸。

图3 叶盘脱分化形成愈伤组织

Fig.3 Leaf discs dedifferentiation to form callus

表 3 不同培养基对绿色草莓愈伤组织再分化的影响

Table 3 Effects of different media on callus redifferentiation of *Fragaria viridis* Weston

处理	植物生长调节剂组合	再分化率 (%)	平均分化芽数(个)	愈伤组织再分化的情况
1	1.0 mg/L TDZ+1.5 mg/L 2,4-D	0	0	0
2	1.0 mg/L TDZ+2.0 mg/L 2,4-D	0	0	0
3	2.0 mg/L TDZ+1.5 mg/L 2,4-D	0	0	0
4	2.0 mg/L TDZ+2.0 mg/L 2,4-D	0	0	0
5	0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA	83.3	21.0	愈伤组织产生大量不定芽,但芽玻璃化严重
6	0.5 mg/L TDZ+0.2 mg/L NAA	83.3	21.0	愈伤组织产生大量不定芽,但芽玻璃化严重
7	1.0 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA	83.3	21.0	愈伤组织产生大量不定芽,但芽玻璃化严重
8	1.0 mg/L TDZ+0.2 mg/L NAA	83.3	21.0	愈伤组织产生大量不定芽,但芽玻璃化严重
9	0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L IBA	85.7	18.6	愈伤组织产生大量不定芽,但芽玻璃化严重
10	0.5 mg/L TDZ+0.2 mg/L IBA	85.7	18.6	愈伤组织产生大量不定芽,但芽玻璃化严重
11	1.0 mg/L TDZ+0.1 mg/L IBA	85.7	18.6	愈伤组织产生大量不定芽,但芽玻璃化严重
12	1.0 mg/L TDZ+0.2 mg/L IBA	85.7	18.6	愈伤组织产生大量不定芽,但芽玻璃化严重
13	2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D	0	0	0
14	2.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L 2,4-D	0	0	0
15	4.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D	0	0	0
16	4.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L 2,4-D	0	0	0
17	0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA	0	0	愈伤组织不产生不定芽,但能保持良好的生长状态
18	0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA	0	0	愈伤组织不产生不定芽,但能保持良好的生长状态
19	1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA	0	0	愈伤组织不产生不定芽,但能保持良好的生长状态
20	1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA	0	0	愈伤组织不产生不定芽,但能保持良好的生长状态
21	1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA	66.7	26.5	愈伤组织产生密集的不定芽,芽较细,有大量细小的根
22	1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA	56.3	19.7	愈伤组织产生较密集的不定芽
23	1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA	91.0	46.2	愈伤组织产生更加密集的不定芽,长势好,有大量细小的根
24	1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA	75.0	32.3	愈伤组织产生不定芽

TDZ:噻苯隆;2,4-D:2,4-二氯苯氧乙酸;IBA:吲哚丁酸;6-BA:6-苄氨基嘌呤;NAA:萘乙酸。

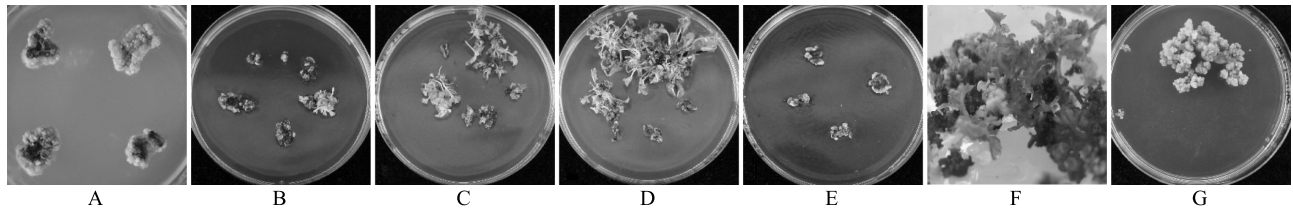
2.5 生根培养和炼苗移栽

绿色草莓生根培养结果(图 5)表明,不同培养基对试管苗生根率的影响无明显差异,生根率均为 100%,但对试管苗生根量和生根长度的影响是不同的。适宜质量浓度的 IBA 能提高生根量,在 IBA 的质量浓度为0.1~0.2 mg/L时,随着 IBA 质量浓度的

增加,根的数量和长度也增加。在添加 0.2 mg/L IBA 的基础上再添加 0.1 mg/L IAA 的培养基中,试管苗的根系比在仅含 0.2 mg/L IBA 培养基中的根系更为粗壮。但是,随着 IAA、IBA 质量浓度增加为 0.3 mg/L、0.4 mg/L时,试管苗生根长度及生根量呈下降趋势,植株的长势也变弱。综合分析,1/2 MS+

0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L IAA 培养基最有利于绿色草莓生根培养,在此培养基中,试管苗根系密集,主根和侧根生长势均衡,植株茎、叶健壮,整体长势较为旺盛。

对根系健壮、长势良好的绿色草莓试管苗进行炼苗,7 d后移栽于经高温灭菌的基质中,在温室培养30 d后,植株的成活率达到93.7%,并有匍匐茎萌发现象(图6)。



A:愈伤组织接种在1/2 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA培养基20 d的生长状况;B:愈伤组织接种在1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA培养基50 d的生长状况;C:愈伤组织接种在1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA培养基50 d的生长状况;D:愈伤组织接种在1/2 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA培养基50 d的生长状况;E:愈伤组织接种在1/2 MS+2.0 mg/L TDZ+1.5 mg/L 2,4-D培养基50 d的生长状况;F:愈伤组织接种在1/2 MS+1.0 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA培养基50 d的生长状况;G:愈伤组织接种在1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA培养基50 d的生长状况。TDZ:噻苯隆;2,4-D:2,4-二氯苯氧乙酸;IBA:吲哚丁酸;6-BA:6-苄氨基嘌呤;NAA:萘乙酸。

图4 不同培养基对愈伤组织再分化的影响

Fig.4 Effects of different media on callus redifferentiation



从左到右所用培养基依次为1/2 MS+0.1 mg/L IBA、1/2 MS+0.2 mg/L IBA、1/2 MS+0.1 mg/L IAA、1/2 MS+0.1 mg/L IBA+0.1 mg/L IAA、1/2 MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L IAA。IBA:吲哚丁酸;IAA:吲哚乙酸。

图5 不同培养基对绿色草莓长势及生根的影响

Fig.5 Effects of different media on growth and rooting of *Fragaria viridis* Weston



图6 炼苗与移栽

Fig.6 Acclimatization and transplanting

3 讨论

3.1 不同培养基对绿色草莓初代培养与离体增殖的影响

在基础培养基中添加适量的细胞分裂素或生长

素有利于初代试管苗的建立。韩如春等^[15]发现,红颜草莓的茎尖在添加6-BA和NAA的培养基中能获得较高的成活率和诱芽率。6-BA与NAA或IBA或IAA组合使用都对红颜草莓再生不定芽有促进作用,其中6-BA与NAA搭配效果最好^[16]。本研究发

现,相较于 MS、MS+0.5 mg/L 6-BA,茎尖在 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA₃培养基中的成活率更高,且成活的茎尖长势更好,因而该培养基更适用于绿色草莓初代培养。

不同草莓品种增殖培养阶段使用的最适植物生长调节剂类型和比例存在差异。6-BA 在减弱根尖优势、刺激新芽萌发方面比其他植物生长调节剂的效果更好^[17]。肖君泽等^[18]发现,章姬草莓的增殖系数随着培养基中添加 6-BA 质量浓度的增加而增加。白雪公主、红颜草莓的最佳增殖培养基均使用 6-BA^[19-20]。本研究也同样发现,绿色草莓增殖系数主要受 6-BA 质量浓度影响,但随着增殖系数的不断提高,会出现幼苗生长势变弱、叶片黄化的现象。6-BA 与 IAA 或 IBA 或 GA₃ 配合使用能缓和单独使用 6-BA 对绿色草莓过度增殖产生植株长势变弱的极端影响;当培养基中添加 6-BA 和 IBA 的质量浓度分别为 0.1 mg/L、0.2 mg/L 时,绿色草莓的增殖效果最好,增殖系数为 6.4,所诱导产生的草莓苗不但健壮,而且叶片鲜绿。

3.2 不同培养条件对绿色草莓叶盘脱分化的影响

以草莓不同部位为外植体诱导产生不定芽的研究已有报道,在不同的外植体中,叶盘的再生率最高^[21]。由于叶片来源广泛、易于处理,草莓叶片已成为离体再生的最佳材料。以叶盘为再生外植体时,其放置方式对不定芽再生率和不定芽质量有一定影响,研究发现,Redcoat^[22]、红颊^[23]等多个草莓品种叶盘背面接触培养基时的再生率更高。但也有研究发现,叶盘背面接触培养基时产生的再生芽不如其他放置方式产生的再生芽健壮,叶盘放置方式对再生效果的影响还有待进一步研究^[24]。目前常用的基本培养基有 MS、1/2 MS、改良 MS 等,MS 基本培养基中各元素的比例合适,缓冲性强,具有高效的 不定芽诱导性,可用于多种植物的各类组织培养^[25-26]。草莓离体再生培养前期需要暗培养,直接进行光照或在不宜光强下培养可能导致无愈伤组织形成^[27]。本研究以 MS 为基础培养基,对绿色草莓叶龄为 30 d 的叶盘进行脱分化处理,采用叶盘背面接触培养基的方式进行培养,在连续暗培养 24 d 后叶盘伤口处产生白色愈伤组织。

控制植物生长调节剂的使用可以调节细胞的分化方向,一般来说,细胞分裂素与生长素的比值高有利于诱导不定芽的产生,细胞分裂素与生长素的比

值低则有利于愈伤组织的诱导和根的形成^[28-31]。TDZ 对愈伤组织的诱导、不定芽再生有不同程度的影响,可以促进一些很难发生器官再生的木本植物的体外再生,如苹果、梨^[32-34]。有研究表明,TDZ 的使用对草莓试管苗再生的效果显著^[35-36]。本研究发现,TDZ (1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、3.0 mg/L) 与 IBA (0.1 mg/L、0.2 mg/L) 组合使用时,出愈率为 0。在培养基中添加 2,4-D (1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L) 和 TDZ (1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L) 时都能使叶盘产生愈伤组织,出愈率都高达 100%,其中在 MS+1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L TDZ 培养基中产生的愈伤组织在适宜再分化培养基中的再分化效果最好。

3.3 不同培养基对绿色草莓愈伤组织再分化的影响

草莓再生不定芽诱导阶段常用的细胞分裂素是 6-BA 和 TDZ^[37]。张志宏等^[38]认为 TDZ 诱导 Tudla 草莓再生的效果优于 6-BA。据报道,在草莓组织培养中单独使用 TDZ 或与 2,4-D、IBA 联合使用能有效诱导不定芽再生^[5,39-40]。也有研究发现,愈伤组织在 6-BA+IBA 培养基中的再分化率比在其他激素组合的培养基中的再分化率更高^[41]。本研究发现愈伤组织在含有 TDZ+2,4-D 的培养基中不能进一步分化;在含有 TDZ+NAA、TDZ+IBA 的培养基中,愈伤组织再分化产生的不定芽玻璃化严重,难以进行生根诱导,不能达到理想的再生效果;在 1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 的培养基中,愈伤组织在连续继代培养后始终保持疏松的愈伤组织状态;6-BA 与 IBA 组合能有效促使绿色草莓愈伤组织分化出不定芽,其中最适组合为 1/2 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA,在该培养基中愈伤组织再分化率为 91.0%,平均分化芽数为 46.2 个,再生芽比较健壮。

3.4 不同培养基对绿色草莓生根的影响

植物生根培养一般采用 MS、1/2 MS 为基本培养基,同时添加或不添加低质量浓度的生长素,如 IAA、IBA 等。在草莓生根培养基中添加低质量浓度的生长素测试中,单独添加 IBA、IAA、NAA 均可进行生根诱导^[42-45]。红颜草莓最佳生根培养基为添加 IBA 的 1/2 MS 培养基^[20]。梁贵秋等^[46]发现,IBA、IAA 分别有利于草莓组培苗侧根、主根的生长,同时使用 IBA 和 IAA 可以取得良好的不定根诱导

效果。本研究发现适宜质量浓度的 IBA、IAA 均能诱导再生芽生根,但生长素质量浓度过高时根的生长势失衡表现为短而粗或细而长。在 IBA 与 IAA 组合使用的培养基中,绿色草莓的根系更为密集,生根形态更自然、更正常,茎、叶长势旺盛,有利于驯化移栽或开展其他与根系相关的试验。综合分析,绿色草莓在 $1/2$ MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L IAA 培养基中的生根效果最好。

参考文献:

- [1] 张红梅,王俊丽. “全明星”草莓叶片再生体系的建立[J]. 生物技术,2005,15(5):75-76.
- [2] 王玉华,郝建国,贾敬芬. ‘早红’草莓高效遗传转化受体系统的建立[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(5):990-997.
- [3] 向发云,韩永超,曾祥国,等. ‘晶瑶’草莓高效再生及遗传转化体系的建立[J]. 中国农学通报,2017,33(15):36-42.
- [4] 王翠华,刘 苒,杜小云,等. 红颜草莓叶盘再生及遗传转化体系的优化[J]. 生物资源,2020,42(2):234-242.
- [5] 刘 玲,葛春峰,王 涛,等. 黄毛草莓叶片离体再生及其同源四倍体的诱导[J]. 核农学报,2017,31(1):51-58.
- [6] EL MANSOURI I, MERCADO J A, VALPUESTA V, et al. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L[J]. Plant Cell Reports,1996,15(8):642-646.
- [7] ALSHEIKH M K, SUSO H P, ROBSON M, et al. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens* [J]. Plant Cell Reports,2002,20(12):1173-1180.
- [8] YILDIRIM A B, TURKER A U. Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and *in vitro*-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)[J]. Scientia Horticulturae,2014,169:169-178.
- [9] OOSUMI T, GRUSZEWSKI H A, BLISCHAK L A, et al. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics[J]. Planta,2006,223(6):1219-1230.
- [10] 周鹤莹,张 玮,张 卿,等. 森林草莓‘Hawaii4’高效遗传转化系统的建立[J]. 北京农学院学报,2015,30(1):10-14.
- [11] 乔瑞琪,金万梅,沈元月. 二倍体草莓‘Ruegen’再生体系的建立[J]. 北京农学院学报,2018,33(3):35-39.
- [12] 猴一杰,冯嘉玥,苏新雷,等. 野生二倍体草莓子叶的再生体系建立[J]. 贵州农业科学,2022,50(11):101-106.
- [13] 王 燕,陈丙义,章 镇,等. 黄毛草莓组织培养与快繁技术研究[J]. 西南农业学报,2012,25(1):252-256.
- [14] GRUNER P, ULRICH D, NEINHUIS C, et al. *Fragaria viridis* Weston: diversity and breeding potential of an underutilised strawberry species[J]. Acta Horticulturae,2017(1156):203-208.
- [15] 韩如春,常 婧,赵 静,等. 草莓茎尖组培快繁体系的建立[J]. 山西农业科学,2022,50(1):15-21.
- [16] 于 超,孙秀霞,薛 琳. 草莓组织培养与快速繁殖技术[J]. 新疆农垦科技,2017,40(2):53-55.
- [17] QUIROZ K A, BERRÍOS M, CARRASCO B, et al. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.) [J]. Biological Research, 2017. DOI:10.1186/s40659-017-0125-8.
- [18] 肖君泽,黄益鸿,姜放军,等. 章姬草莓花药组织培养脱毒快速繁殖技术的研究[J]. 江西农业学报,2011,23(10):49-50,54.
- [19] 张建盈,郭玲娟,张立田,等. “白雪公主”草莓茎尖组培快繁体系研究[J]. 中国南方果树,2019,48(1):94-97.
- [20] 姚思扬,赵春莉,刘子平,等. 红颜草莓组培快繁体系优化[J]. 福建农业学报,2018,33(9):950-956.
- [21] PASSEY A, BARRETT K, JAMES D. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types[J]. Plant Cell Reports,2003,21(5):397-401.
- [22] NEHRA N S, STUSHNOFF C, KARTHA K K. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science,1989,114(6):1014-1018.
- [23] 王 翡,高志红,章 镇,等. 草莓高效离体叶片再生体系的建立[J]. 西北植物学报,2010,30(5):1045-1049.
- [24] 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.
- [25] 曹善东. 组培条件对草莓脱毒试管苗玻璃化影响的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2006,37(2):172-174,180.
- [26] 李坤坤,徐昌杰. 蔷薇科果树离体再生与遗传转化研究进展[J]. 园艺学报,2017,44(9):1633-1644.
- [27] 黄文江,潘 超,阚显照,等. “红丰”草莓无菌系及叶盘再生体系的建立[J]. 西南农业学报,2010,23(5):1640-1643.
- [28] SHEN X L, KANE M E, CHEN J J. Effects of genotype, explant source, and plant growth regulators on indirect shoot organogenesis in *Dieffenbachia* cultivars[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,2008,44(4):282-288.
- [29] LANDI L, MEZZETTI B. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria* [J]. Plant Cell Reports,2006,25(4):281-288.
- [30] 曹 昆,李 霞. 木本植物组织培养不定芽诱导研究进展[J]. 江苏林业科技,2008,35(5):43-48.
- [31] 王慧英. 影响植物愈伤组织形成的因素研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2010,23(2):51-53.
- [32] VAN NIEUWKERK J P, ZIMMERMAN R H, FORDHAM I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro* [J]. Horticultural Science,1986,21(3):516-518.
- [33] PREECE J E, HUETTEMAN C A, ASHBY W C, et al. Micro- and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science,1991,116(1):142-148.
- [34] SINGHA S, BHATIA S K. Shoot proliferation of pear cultures on medium containing thidiazuron and benzylamino purine[J]. Hort-Science,1998,23(3):803.

- [35] CHUNG H H, OUYANG H Y. Use of thidiazuron for high-frequency callus induction and organogenesis of wild strawberry (*Fragaria vesca*) [J]. Plants, 2020, 10(1): 67.
- [36] 杜梦卿, 连朋, 王丽娟. 不同浓度 TDZ 和 2,4-D 组合对草莓花药组织培养的影响[J]. 东北农业科学, 2021, 46(2): 73-75, 131.
- [37] ALDWINCKLE H, MALONY M. Plant regeneration and transformation in the Rosaceae [J]. Transgenic Plant Journal, 2009, 3(1): 1-39.
- [38] 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, 185.
- [39] DEBNATH S C. Strawberry sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2005, 41(5): 671-676.
- [40] YONGHUA Q, SHANGLONG Z, ASGHAR S, et al. Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films [J]. Plant Science, 2005, 168(6): 1425-1431.
- [41] YEASMIN S, BANU T A, GOSWAMI B, et al. In vitro regeneration of strawberry plant from leaf explants via callus induction [J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2022, 32(1): 67-75.
- [42] ZAKARIA H, HUSSEIN G M, ABDEL-HADI A H, et al. Improved regeneration and transformation protocols for three strawberry cultivars [J]. GM Crops & Food, 2014, 5(1): 27-35.
- [43] HUSAINI A M, SRIVASTAVA D K. Efficient plant regeneration from leaf and petiole explants of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) [J]. Phytomorphology, 2011, 61: 55-62.
- [44] SAKILA S, AHMED M B, ROY U K, et al. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) a newly introduced crop in Bangladesh [J]. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 2007, 2(2): 151-154.
- [45] AKTER S, BANU T A, HABIB M A, et al. In vitro clonal multiplication of *Aegle marmelos* (L.) Corr. through cotyledonary node culture [J]. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 2013, 48(1): 13-18.
- [46] 梁贵秋, 唐燕梅. 草莓的组织培养和快速繁殖 [J]. 广西热带农业, 2004(6): 8-9.

(责任编辑: 王 妮)