

植物激素对草莓 叶片不定芽形成的影响*

柯善强 洪树荣 黄仁煌 武显维

(中国科学院武汉植物研究所)

Robert M. Skirvin

(美国伊利诺大学)

提 要 用试管内生长的草莓幼嫩叶片作外植体, 培养在 MS 基本培养基上附加 1.5—2.5 毫克/升 6-BA 和 0.1 毫克/升 NAA, 可直接诱导成不定芽, 诱导率可达 20%。如果不定芽继代培养在同样浓度的培养基上, 继而可形成大量的丛生芽。能使叶外植体形成不定芽的植物激素组合而不能使其愈伤组织分化成芽。IAA 与 6-BA 的不同浓度组合对不定芽形成效果不明显。

关键词 草莓; 叶外植体; 不定芽形成; 植物激素

前 言

有关草莓组织培养研究的报道很多, 一般用茎蔓^[8]、侧芽、顶端生长点^[11,12]、种子和胚芽^[6]及花粉^[9]等作为培养材料, 进行快速繁殖和脱病毒研究, 并已培养出许多无病毒植株和单倍体植株^[3,12]。至于应用草莓叶片作外植体, 直接诱导出不定芽的研究, Schaeffer^[10]曾报道叶片有不定芽发生的可能性, 而 Boxus^[7]等在培养过程中发现不定芽发生, 但未发育成植株而死亡。我们应用草莓叶外植体可直接诱导不定芽, 并由此继续诱导众多的丛生芽。现将结果报道如下。

材料与 方法

实验材料用草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch cv Redcoat) 的栽培品种 'Allstar' 的当年种子。先将种子用水洗净并浸泡 1 小时左右, 然后用 0.1% 的升汞消毒 15 分钟, 再接种到 MS 无激素的培养基上。待种子发芽成苗后取其第一到第三片幼叶作实验材料。诱导不定芽的培养基仍为 MS 基本培养基附加各种组合的 NAA 与 6-BA, IAA 与 6-BA,

本文于 1986 年 9 月 26 日收到。

* 本文初稿承蒙侯嵩生副研究员、钟扬同志提出宝贵意见, 秦益民协助拍照片, 谨此致谢。

另加酪蛋白水解物400毫克/升, 维生素C 100毫克/升以及 GA_3 0.01毫克/升。接种后的叶外植体放置暗室培养5—7天后, 移至每天光照12小时左右, 光强约2000 lux, 温度为 $25 \pm 1^\circ C$ 的条件下诱导培养。

显著性检验按 Duncan's new multiple-range test 方法测定^[18]。

试验结果

在草莓的叶外植体器官发生中, 细胞分裂素与生长素的比例非常重要。我们试验了许多 NAA 与 6-BA 的不同浓度的组合, 发现只有当 NAA 在 0.1 毫克/升, 6-BA 在 2.0

表 1 NAA 和 6-BA 的不同浓度对比对草莓叶外植体不定芽形成的影响

Table 1 Effect of different concentrations and combinations of NAA and 6-BA on adventitious bud formation of leaf explants in strawberry¹⁾

NAA (mg/l)	6-BA (mg/l)							
	0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
	芽诱导率 (%)			Response of buds induced (%)				
0	X ²⁾	X	X	X	X	C ³⁾	C	C
0.01	X	X	X	X	X	C	C	C
0.05	X	X	X	C	C	C	C	C
0.10	X	X	16.6	23.3	10.0	C	C	C
0.15	X	X	X	C	C	C	C	C
0.20	C	C	C	C	C	C	C	C

1) 叶外植体数为30个 (30 leaf explants in this experiment);

2) X 无效应 (No response); 3) 愈伤组织 (Callus)

表 2 IAA 与 6-BA 的不同浓度组合对草莓叶外植体培养的影响

Table 2 Effect of different concentrations and combinations of IAA and 6-BA on leaf explants of strawberry cultured *in vitro*

培养基成份 Constitution of medium	形成愈伤组织数/叶外植体数 No. of calli / No. of leaf induced / explants incubated	愈伤组织诱导率 % % of calli induced	不定芽诱导率 No. of adventitious buds induced
IAA+6-BA (mg/l)			
0.1 + 1.0	2/10	20	0
0.1 + 1.5	5/10	50	0
0.1 + 2.0	5/10	50	0
0.1 + 2.5	10/10	100	0
0.1 + 3.0	10/10	100	0
0.15 + 1.0	0/10	0	0
0.15 + 1.5	5/10	50	0
0.15 + 2.0	7/10	70	0
0.15 + 2.5	10/10	100	0
0.15 + 3.0	10/10	100	0

毫克/升的浓度时对草莓叶外植体的器官发生效果最好(见表1)。除此之外,我们还试验了不同浓度组合的 IAA 和 6-BA, 结果大部分组合只能诱导出愈伤组织(表2), 而未能诱导出不定芽。

表3 NAA 和 6-BA 的不同浓度对比对草莓丛生芽诱导的影响

Table 3 Effect of different concentrations and combinations of NAA and 6-BA on multiple-shoots induced in strawberry

收集天数 Collection days	诱导丛生芽数 No. of multiple-shoots induced															
	NAA	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	6-BA	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
		1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
20		10	32	27	13	15	5	32	35	23	15	5	3	C	C	C
25		14	68	39	C	C	15	64	59	48	24	4	C	6	C	C
30		8	24	58	C	13	32	60	78	80	23	15	RC	C	C	C
35		15	39	54	7	14	26	75	89	84	30	13	7	4	RC	C
40		7	29	39	9	C	46	80	96	73	18	8	C	C	C	RC
45		3	40	43	C	C	31	59	80	64	12	4	RC	RC	C	RC
$\sum_j X_{ij} = X_i$		57	232	260	29	42	155	370	437	372	122	49	10	10	0	0
\bar{X}_i		9.5	38.7	43.3	4.8	7.0	25.8	61.7	72.8	62.0	20.5	8.2	1.7	1.7	0	0

1) C=Callus (愈伤组织); RC=Root and Callus (根和愈伤组织)

2) 表内数据为3瓶的丛生芽平均数(每瓶接种4个芽)

Number in the table showing the mean of No. of multiple-shoots induced in 3 Erlenmeyer flasks (4 shoots incubated in each flask)

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s^2}{r}} = 4.8;$$

$$S_{\bar{d}} = \sqrt{\frac{2s^2}{r}} = 6.797$$

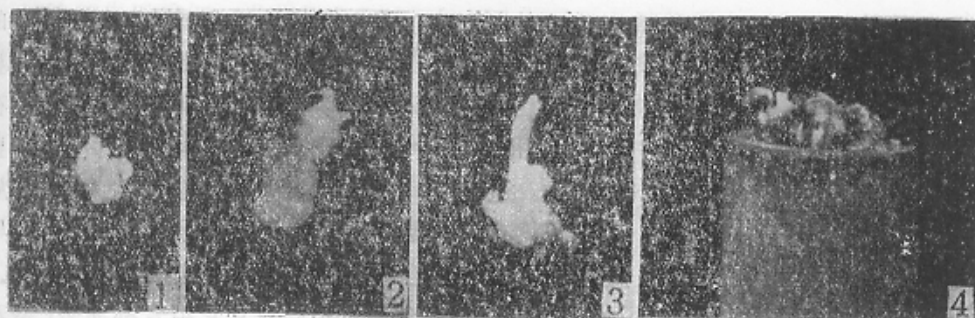


图1-3 叶外植体产生的不定芽(注意图3已分化出丛生芽)

图4 众多的丛生芽

Fig.1-3 Adventitious buds induced from leaf explants of strawberry (Note: Several multiple-shoots differentiated in Fig.3)

Fig.4 Plentiful multiple-shoots

从表1、2中可以看到,不定芽形成仅仅只在 NAA 与 6-BA 配比的很小范围内(图1, 2)最佳组合是在 NAA 0.1毫克/升和 6-BA 2.0毫克/升。其他大部分只能诱导出愈伤组织。但是,诱导出的愈伤组织紧接着接种到能诱导不定芽产生的培养基上,培养的愈伤组织生长很正常,但未能诱导出不定芽。然而,将形成的不定芽(图3)继代培养在同样能诱导不定芽产生的 NAA 和 6-BA 的相同组合浓度培养基上,却能诱导出大量的丛生芽(见图4和表3)。

根据表2所得的数据,按 Duncan 的多重对比差别显著性检验方法进行数据处理。最后我们得到一个显著性测定图(图5)。

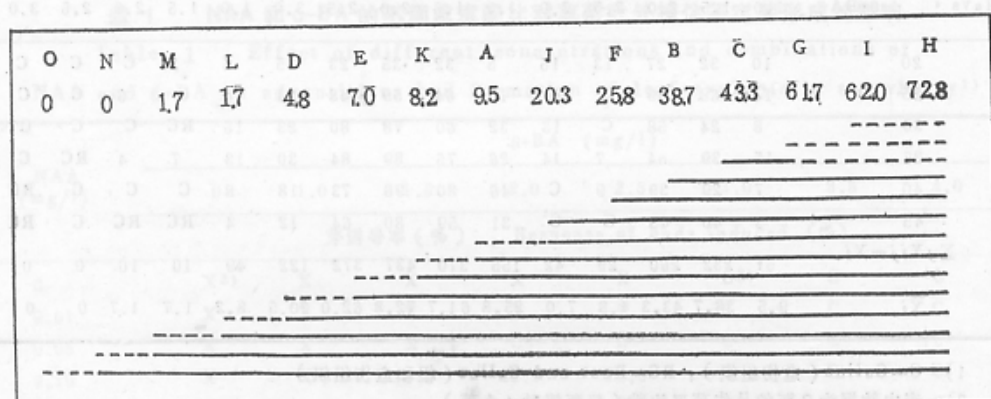


图5 NAA 和 6-BA 的不同浓度组合对草莓丛生芽诱导的影响的显著性检测¹⁾
 Fig. 5 Test of significance of the effect of different concentrations and combinations of NAA and 6-BA on the multiple-shoots induced in strawberry
 ----- 为不显著 (Nonsignificant); ————— 为显著 (Significant)
 1) 在 5% 水平多重对比差别显著性测定 (at 5% level Duncan's multiple-range test)



图6 草莓植株
 Fig. 6 Plantlets of strawberry

从图1中,我们明显地看到,NAA 与 6-BA 的不同浓度配比,对丛生芽的数量影响是非常明显的。但经过 Duncan 多重对比差别显著性检验,在 H.I. 和 G 三种组合的 NAA 与 6-BA 条件下,无显著性。这说明,在这种浓度组合的培养基上诱导丛生芽均有效。虽然其它组合也能诱导丛生芽,但与 H.I.G 三种组合对比,并不是最佳组合,因为 H.I. 和 G 三种组合经过检验对其它组合都显著(参看图5)。

丛生芽经分株再继代培养在 MS 基本培养基上另附加 0.1 毫克/升 NAA, 1.5 毫克/升 6-BA 和 1 毫克/升 GA_3 , 三到四星期即可长成完整的植株(图6)。

讨 论

早在50年代, Skoog 和 Miller^[17] 就提出在细胞分化过程中植物激素的调节学说, 指出生长素和细胞分裂素的比例控制细胞分化和器官形成。Murashige^[18] 在1974年进一步说明, 在使用植物生长素时, 时常先考虑 IAA, 其次才是 NAA, 而很少使用 2,4-D。因为 IAA 是植物体内普遍存在的一种天然生长素。它的有效浓度范围较广, 作用也比较温和, 并对器官形成有更为正常的调节作用。但最近 Accedo^[5] 报道, 在 Arabidopsis 的植株再生时, 证明 IAA 作用效果不如 NAA, 并还认为在使用 IAA 时不方便, 因需过滤。在我们的试验中, 也是 NAA 的效果比 IAA 作用强, 并只有 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(见表1), 而 IAA 与 6-BA 组合未能诱导出不定芽(表2)。看来, 每种植物器官分化所要求的激素种类和浓度是不一样的, 这可能就是 Boxus 在诱导草莓叶外植体不定芽产生时未使其发育成植株的原因之一。另有人^[10] 认为 2,4-D 作用比较强烈, 有效浓度较低, 范围也较窄, 有时会引起染色体变异。但有人^[19] 使用高浓度的 2,4-D (5 毫克/升) 和 0.5 毫克/升 6-BA 也从草莓的子叶组织中诱导形成了胚状体结构, 并进一步发育成植株。这种激素组合是否对草莓叶外植体培养植株再生有同样作用, 值得进一步试验。

一个有趣的问题是, 丛生芽的诱导, 外源激素 NAA 与 6-BA 最适组合范围, 恰好是从叶外植体诱导不定芽产生的最佳组合范围。不定芽产生后, 继代培养在不能诱导不定芽产生的培养基上, 却也能诱导形成丛生芽, 但不是最好激素比例。另一方面, 能产生丛生芽的培养基却不能诱导不定芽发生。值得讨论的是, 一旦叶外植体不定芽形成后, 继代培养在不能形成不定芽的 NAA 和 6-BA 的不同浓度组合的培养基上, 也能形成丛生芽, 而能形成丛生芽的激素组合的培养基却不能诱导叶片不定芽发生。这是否与不定芽形成后, 外植体本身内源激素水平发生变化有关, 同时, 在形成丛生芽的过程中, 能自身调节内源激素水平, 从而形成大量的丛生芽。

试验还告诉我们, 当草莓愈伤组织培养在能使叶外植体产生不定芽的培养基上, 却不能分化成芽。这就说明, 从叶外植体直接诱导出不定芽和从愈伤组织诱导分化成芽所需的外源激素种类和水平是不同的。这是否与细胞组织处于不同的生理状况, 内部新陈代谢的差异所要求的激素水平、种类不同有关。此外, 在叶外植体诱导器官发生时, 不少学者提出^[1,2,9], 叶片的年龄, 叶片的切段位置对不定芽形成影响非常明显, 但在草莓叶外植体培养中, 是否有类似情况, 需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈维伦, 郭东红, 杨善英等. 植物学报, 1980, 22(4): 311-315
- 2 柯善强, Robert M Skirvin, 黄仁煌等. 武汉植物学研究, 1988, 6(4), 待发表
- 3 薛光荣, 费开伟, 胡军. 园艺学报, 1981, 8(1): 9-11
- 4 加古舜治. 园艺植物の器官と组织の培养(第三章, 庄子孝一, イナゴのウイルスフリー株作社), 誠文堂新光社, 1978, 149: 163-164
- 5 Accedo N G. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1986, 6: 109-114
- 6 Belkengren R O, Miller P W. *Plant Dis Rep*, 1962, 46: 119-121

- 7 Boxus P, Panmiano O, Brasseur E. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, New York, Macmillan Publishing Co, 1984; 3: 453-485
- 8 Boxus Q M, Laine J M. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Berlin: Springer-Verlag, 1977: 130-143
- 9 Geier T. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1986; 6: 115-125
- 10 Holdgate D P. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Berlin: Springer-Verlag, 1977: 18-43
- 11 Kartha K K, Leung N L, Pahl K. *J Am Soc Hortic Sci*, 1980; 105: 481-484
- 12 McGrew J R. *Phytopathology*, 1965; 55: 480-481
- 13 McGrew J R. In: *Proceedings on the Conference on Nursery Production of Fruit Plants Through Tissue Culture*. ARR-NE-11, Maryland; USDA-SEA, Agricultural Research Results, 1980: 80-85
- 14 Miller R W, Belkengren R O. *Plant Dis Rep*, 1963; 47: 298-300
- 15 Murashige T. *Ann Rev Plant Physiol*, 1974; 25: 135-162
- 16 Schaeffer G W et al. In: *Proceedings on the Conference on Nursery Production of Fruit Plants Through Tissue Culture*. ARR-NE-11, Maryland; USDA-SEA, Agricultural Research Results, 1980: 64-79
- 17 Skoog F, Miller C O. *Symp Soc Exp Biol*, 1957; 11: 11-131
- 18 Steel R G D, Torrie J H. *Principles and Procedures of Statistics*. Second Edition, New York, McGraw-Hill Book Co, 1980
- 19 Wang Dayuan, Wergin P W, Zimmerman H R. *Hortscience*, 1984; 19(1): 71-72

THE EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON ADVENTITIOUS SHOOT FORMATION FROM STRAWBERRY LEAVES

Ke Shanqiang, Hong Shurong, Huang Renhuang, Wu Xianwei

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica)

Robert M. Skirvin

(University of Illinois, 1707 S Orchard, Urbana, Illinois, 61801 USA)

Abstract Young leaves of open pollinated strawberry (*Fragaria* × *ananas* Duch) seedlings developed adventitious shoots when they were cultured *in vitro* on Murashige and Skoog high mineral salts (MS) supplemented with 6-benzylaminopurine (6-BAP) (1.5 to 2.5mg/liter) and 3-naphthaleneacetic acid (NAA) (0.1 mg/liter). About 20% of all explants formed shoots. Once shoots had formed, they proliferated readily on these media. When callus was transferred to these media, no shoots formed. The substitution of indole-3-acetic acid for NAA gave media that produced no shoots from either leaves or callus.

Key words *Fragaria* × *ananas*; Adventitious shoot formation, *in vitro*; Tissue culture; Callus; Growth regulators