



草莓茎尖脱毒技术研究

聂园军¹,李瑞珍¹,张春芬²,邓 舒²,侯丽媛³,曹秋芬³

(1. 山西省农业科学院 农业资源与经济研究所,山西 太原 030006;2. 山西省农业科学院 果树研究所,山西 太谷 030815;3. 山西省农业科学院 生物技术研究中心,山西 太原 030031)

摘要:为建立操作简便、脱毒效率高的病毒脱除技术,促进草莓脱毒苗产业化发展,采用感染草莓斑驳病毒的草莓母株为材料,通过对草莓茎尖组织培养法、热培养处理后茎尖组织培养法、组培苗再生匍匐茎茎尖培养法等方式进行脱毒技术研究,比较几种脱毒技术手段的优缺点。结果表明:热处理后,草莓组培苗的脱毒率虽然比直接茎尖培养有所上升,但其成活率却下降。而组培苗再生匍匐茎茎尖培养法与直接茎尖培养法、热培养处理后茎尖培养法相比,在相同茎尖长度时,脱毒率和生存率更高,且茎尖长度为 0.8~1.0 mm 时,其存活率和成活率达到 93.3%和 96.4%。因此,组培苗再生匍匐茎茎尖培养法对草莓脱毒是比较有效的方法。

关键词:草莓;脱毒技术;匍匐茎再生

草莓是一种营养价值较高的水果,有“水果皇后”之美誉^[1],极受人们喜爱,而且适应性广,栽培容易,特别是温室保护地栽培技术的快速发展,可以使之提前或延迟上市,实现周年生产和供应^[2],迅速成为各地农村农民脱贫致富的大产业。而随着草莓的栽培面积迅速扩增,生产中的问题也日益严重^[3]。由于草莓繁殖是以母株形成的匍匐茎苗作为子苗的方式进行的,容易受到病毒和真菌性病害侵袭,且一旦感染病毒,母株直接传递给后代,造成严重的品种退化现象,一般产量可降低 30%~80%^[4]。对于病毒病,目前还没有药剂可以治理,无法通过田间管理来解决。因此,培育无病毒苗木,是防治草莓病毒病的根本对策。但我国草莓脱毒快繁研究与生产严重脱节,存在脱毒慢、效率低、繁殖系数小等问题。在已报道的草莓病毒中,危害最为严重的病毒有草莓镶脉病毒(SVBV)、草莓斑驳病毒(SMoV)、草莓皱缩病毒(SCV)、草莓轻型黄边病毒(SMYEV)4种^[5]。在病毒脱除方面,目前国内外应用较多、效果较好的是热处理结合茎尖培养脱毒法^[6-7],但从已有的研究报道来看,普遍存在操作难度大、培养周期长、病毒脱除低等问题。因此新的、更有效的脱毒方法还有待进一步研究。本研究采用感染草莓斑驳病毒的草莓母株为材料,通过调控温度及光照

诱导组培苗产生匍匐茎,以期建立操作简便、脱毒效率高的病毒脱除技术,为实现草莓脱毒苗的产业化发展提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

以草莓栽培品种红颜的匍匐茎茎尖为试验材料,田间选取表现斑驳症状的植株,采用 RT-PCR 测定法,检测草莓斑驳病毒。试验材料为经检测呈阳性的母株,采取其匍匐茎为外植体。材料来自阳曲县浦丰农林科技有限公司试验基地。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验于 2016-2017 年在山西省农业科学院生物技术研究中心园艺植物生物技术试验室进行。以草莓斑驳病毒检测呈阳性的草莓母株所发匍匐茎为外植体材料,在超净工作台内表面消毒后接种于初代培养基,培养 28 d 后转接种至继代培养基,继代培养 20 d 后取其顶芽进行脱毒方法的研究。

1.2.2 培养基类型及培养条件 基本培养基为 MS,附加不同浓度 BA 和 IBA, pH5.8,培养基 121℃ 灭菌 20 min,自然冷却后备用。初代培养基为 1/2 MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA。继代培养基为 MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ IBA,生根培养基为 1/2 MS+0.3 mg·L⁻¹ IBA。培养条件为:温度(25±2)℃,14 h 光照,光照强度 3 000 lx。

1.2.3 外植体消毒 连续晴天的下午,自田间选取母株上生长充实、顶端悬空而小叶的未展开的匍匐茎,带回室内用 75%酒精浸泡 30 s 后,用灭菌蒸馏水冲洗 2~3 遍后,转入 2%次氯酸钠中处

收稿日期:2018-10-18

基金项目:山西省农业科学院特色农业技术攻关项目(YGG17117)。

第一作者简介:聂园军(1987-),男,硕士,助理研究员,从事设施园艺作物高产高效栽培技术研究。E-mail: nie379@126.com。

理 10 min,再用无菌水冲洗 4~5 遍后用无菌吸水纸吸干表面水分,切取约 2 mm 的茎尖,接种于初代培养基上。28 d 后可转入继代培养基中进行继代培养,以继代的试管苗为脱毒材料。

1.2.4 脱毒方法 直接茎尖组织培养脱毒:取继代 20 d 试管苗的顶芽,在解剖镜下切取长度分别为 0.3~0.5 mm、0.5~0.8 mm、0.8~1.0 mm 的茎尖,接种于继代培养基上,每个处理接种 30 个茎尖。21~28 d 后统计成活率,49~56 d 后统计脱毒率。

成活率(%)=(接种成活的外植体数/接种外植体总数)×100;

脱毒率(%)=(脱除病毒的外植体数/成活的外植体数)×100。

热培养处理结合茎尖培养脱毒:取继代 20 d 试管苗的顶芽,在解剖镜下切取 0.8~1.0 mm 的茎尖,接种于继代培养基中,14 d 后进行热处理。热培养处理前采用每小时升温 1℃的逐步升温的方式对试管苗进行预处理培养,起始温度为 25℃,达到 38℃时停止,进行最终的热处理,处理时间分别为 10、20、25、30、35、40、45 d。人工气候箱光照时间 14 h,光照强度 3 000~5 000 lx,相对湿度分别为 70%,热处理后对成活的试管苗剥取长度为 0.3~0.5 mm、0.5~0.8 mm、0.8~1.0 mm 的茎尖接种于继代培养基中。每个处理接种 30 个茎尖,21~28 d 后统计成活率,49~56 d 后统计脱毒率。

匍匐茎高温二次脱毒:切取继代培养 20 d 试管苗的顶芽,在解剖镜下切取 0.8~1.0 mm 的茎尖,接种于继代培养基上,14 d 后转入培养箱二次诱导匍匐茎的产生。人工气候箱温度 30~35℃,光照时间 16 h,光照强度 3 000~5 000 lx,相对湿度 70%,匍匐茎产生后剥取 0.3~0.5 mm、0.5~0.8 mm、0.8~1.0 mm 的茎尖接种于继代培养基上,每个处理接种 30 个茎尖,

12~28 d 后统计成活率,49~56 d 后统计脱毒率。

1.2.5 脱毒效果检测 采集继代良好的试管苗,利用 RT-PCR 技术对草莓斑驳病毒进行检测。根据 NCBI Genbank(The National Center for Biotechnology Information,美国国立生物技术信息中心)中登陆的草莓斑驳病毒基因序列,设计一对特异引物,SMoV1F: 5'-AACCATCCAGTAA GCGACCAC-3'; SMoV1R: 5'-TTCAAGGCAC-CACAGAACCTA-3',生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.6 草莓脱毒苗的生根与移栽 经鉴定为脱除草莓斑驳病毒的草莓组培苗,在继代扩繁后,从健壮苗上切取三叶一心的不定芽接种于添加 0.3 mg·L⁻¹ IBA 的 1/2 MS 生根培养基上,待植株长出 3~5 条 1~3 cm 左右的不定根后,将培养瓶移至温室炼苗。3~5 d 后,从培养瓶中取出植株,洗干净根部培养基,然后浸入 50%多菌灵可湿性粉剂 500 倍液 5~10 min,冲洗,晾干后定植于蛭石作基质的营养钵内并浇透水,保湿培养 7 d 观察其存活情况。

1.2.7 数据分析 采用 Excel 2010 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 茎尖培养

由表 1 可以看出,接种 0.3~1.0 mm 的草莓茎尖都可以诱导出苗,但是茎尖的大小对草莓组培苗的成活率和脱毒率影响比较大,当茎尖小于 0.5 mm 时,诱导绿色植株的时间比较长,需要 30 d,脱毒率可以达到 80.0%,但是成活率仅有 33.3%。当茎尖在 0.8~1.0 mm 时,14 d 左右即可转绿,进而形成小植株,成活率高达 93.3%,但是脱毒率仅有 60.7%。当茎尖大小在 0.5~0.8 mm 时,成活率和脱毒率分别为 63.3%和 68.4%。

表 1 茎尖大小对草莓成活率和脱毒率的影响

Table 1 Effect of stem tip size on survival rate and detoxification rate of strawberry

茎尖长度/mm	处理数	死亡株数	成活株数	脱毒株数	成活率/%	脱毒率/%
Length of stem tip	Treatments No.	Death plant No.	Survival No.	Detoxification No.	Survival rate	Detoxification rate
0.3~0.5	30	20	10	8	33.3	80.0
0.5~0.8	30	11	19	13	63.3	68.4
0.8~1.0	30	2	28	17	93.3	60.7

2.2 不同热处理后茎尖培养对草莓成活率和脱毒率的影响

2.2.1 不同热处理时间对草莓组培苗成活率的影响 草莓组培苗培养 14 d 后置于 38 ℃ 恒温培养箱开始热培养处理。由表 2 可知,热处理组培苗的成活率随处理时间的增长而逐渐降低。热处理 10 d 后,组培苗表现生长迟缓,但成活率仍然很高,达到 93.3%,当处理 20 d 后,叶片开始失绿,变黄,直至枯死,成活率下降至 90.0%。热处理 40 d 时,植株顶芽开始褐化,有一半以上的植株死亡。热处理 45 d 时,成活率仅为 33.3%。因此,在进行茎尖培养时,热处理时间不超过 40 d。

2.2.2 热处理后茎尖培养对草莓成活率和脱毒率的影响 选用热培养处理后成活的组培苗,剥取长度为 0.3~1.0 mm 的茎尖进行培养。由表 3 可以看出,茎尖的大小、处理时间与茎尖的成活率及脱毒率密切相关。热处理时间相同时,茎尖越小,脱毒率越高,但是成活率也越低。热培养处理 10 d 时,茎尖大小为 0.3~0.5 mm 时,成活率为 36.7%,但是脱毒率为 81.8%;当茎尖大小为 0.8~1.0 mm 时,成活率上升至 93.3%,脱毒率降低为 57.1%。热培养处理 30 和 40 d 时,接

种 0.3~0.5 mm 的茎尖,都可以实现 100% 脱毒,但是成活率仅有 30% 和 16.7%;接种 0.8~1.0 mm 的茎尖,成活率增大到 60.0% 和 46.7%,脱毒率也可以达到 90% 以上。同样大小的茎尖,随热培养处理时间增加,成活率降低,但脱毒率呈现增加的趋势。当茎尖大小为 0.3~0.5 mm 时,热培养处理 10 d,成活率和脱毒率分别为 36.7% 和 81.8%,热培养处理 30 d 时,成活率降为 30.0%,但是脱毒率高达 100.0%。

表 2 热处理时间对组培苗成活率的影响

Table 2 The effect of heat treatment time on the survival rate of tissue culture seedlings

热处理时间/d Time of heating treatment	处理株数 Number of treated plants	死亡株数 Death plant number	成活株数 Survival plant number	成活率/% Survival rate
10	30	2	28	93.3
20	30	3	27	90.0
30	30	8	22	73.3
40	30	19	11	36.7
45	30	20	10	33.3

表 3 热处理时间和茎尖长度对成活率和脱毒率的影响

Table 3 The effect of heat treatment time and stem tip size on the rate of survival and detoxification

处理时间/d Time of treatment	茎尖长度/mm Length of stem tip	处理株数 Number of treated plants	成活株数 Survival plant number	成活率/% Survival rate	脱毒株数 Detoxification plant number	脱毒率/% Detoxification rate
10	0.3~0.5	30	11	36.7	9	81.8
	0.5~0.8	30	18	60.0	12	66.7
	0.8~1.0	30	28	93.3	16	57.1
20	0.3~0.5	30	12	40.0	10	83.3
	0.5~0.8	30	18	60.0	13	72.2
	0.8~1.0	30	26	85.7	18	69.2
30	0.3~0.5	30	9	30.0	9	100.0
	0.5~0.8	30	15	50.0	14	93.3
	0.8~1.0	30	18	60.0	17	94.4
40	0.3~0.5	30	5	16.7	5	100.0
	0.5~0.8	30	12	40.0	12	100.0
	0.8~1.0	30	14	46.7	13	92.8

2.3 匍匐茎高温二次脱毒培养的脱毒效果

选取热培养处理后产生匍匐茎的植株,剥取长度为 0.3~1.0 mm 的匍匐茎尖接种于继代培养基上进行培养,结果如表 4 所示,茎尖为 0.3~

0.5 mm 和 0.5~0.8 mm 时,都可以实现 100.0% 脱毒,但成活率分别为 56.7% 和 80.0%。当茎尖为 0.8~1.0 mm 时,成活率和脱毒率也可以同时提高到 90% 以上,分别为 93.3% 和 96.4%。

表 4 匍匐茎茎尖大小对草莓成活率和脱毒率的影响

Table 4 The effect of stolon tip size on the rate of survival and detoxification

茎尖长度/mm	处理株数	死亡株数	成活率/%	脱毒株数	成活率/%	脱毒率/%
Length of stem tip	No. of treated plants	Death plant No.	Survival rate	Detoxification plant No.	Survival rate	Detoxification rate
0.3~0.5	30	13	17	17	56.7	100.0
0.5~0.8	30	6	24	24	80.0	100.0
0.8~1.0	30	2	28	27	93.3	96.4

3 结论与讨论

通过对草莓茎尖组织培养法、热培养处理后茎尖组织培养法和组培苗再生匍匐茎茎尖培养法等方式进行脱毒技术研究得知,热处理后茎尖培养与直接茎尖培养结果相似,但是相同茎尖大小时,热培养处理后茎尖的脱毒率更高。而且随着热处理时间的延长,脱毒率也呈增长趋势,但是存活率呈下降趋势。组培苗诱导匍匐茎茎尖培养法与前 2 种处理相比,在相同茎尖大小时,脱毒率和生存率更高,在茎尖为 0.8~1.0 mm 时,草莓苗的脱毒率也可高达 96.4%。

病毒是一种繁殖和生存寄生于其他生物细胞中的非生物细胞,严格的说任何药剂都不能完全解除其危害,因此对于感染病毒的植株来说不能通过田间管理来解决其危害。而病毒在患病植株上的分布是不均匀的,在老叶及成熟的组织和器官中含量高于幼嫩叶及未成熟的组织和器官^[9],White^[10]发现病毒的根系内分布不均匀,越靠近尖端部分病毒越少,Limasset^[11]发现在芽的分生组织区段病毒分布的不均匀性。这为茎尖脱毒提供了理论依据。在茎尖脱毒技术中,因外植体大小不同,成活率和脱毒率互相制约。在本研究中,茎尖越小,脱毒效率越高,但是死亡率也越高。与之相反,加大茎尖长度,成活率增高,但脱毒率降低。这可能是由于茎尖太小,自身营养不足,难以分化,同时切割时产生机械损伤,导致污染并死亡。而且,茎尖越小,剥取技术要求高,不易掌握、费时间。因此,应该综合考虑成活率和脱毒率两个指标来确定茎尖的大小。

热处理的原理是依据病毒在高温下出现钝化,其复制明显减弱或停止,将植物在高温下培养数周至数月,这个期间生长的嫩梢不带病毒,取其嫩梢进行培养从而达到脱毒的目的^[12-13]。在草莓的脱毒研究中,热处理结合茎尖培养法的应用最多。在热处理结合茎尖培养脱毒试验中,植株的存活率和脱毒率受温度的高低和持续时间长短的影响。通常温度越高、时间越长,脱毒效果相对就越好,但同时植物的生存率却呈下降趋势,在本

研究中当热处理时间超过 40 d 时,成活率就已降至 36.7%,因此热处理时间不宜超过 40 d。热培养处理后茎尖培养与直接茎尖培养结果相似,但是相同茎尖大小时,热培养处理后茎尖的脱毒率更高,同时随热培养处理时间的延长,脱毒率也呈增长趋势,但是存活率呈下降趋势。

通过组培苗诱发匍匐茎从而达到脱毒效果在顾地周^[14]的研究中有报道,而且茎尖为 1.0 mm 时脱毒率高达 100%。本研究通过温度和光照处理诱发匍匐茎进而培养茎尖进行脱毒的方法在草莓脱毒研究上鲜见报道,研究结果表明当茎尖为 0.3~0.5 mm 和 0.5~0.8 mm 时,都可以实现 100%脱毒,且成活率分别为 56.7%和 80.0%。试验结果证明通过组培苗诱导匍匐茎进而达到脱毒效果是可行的,而且与直接茎尖培养法、热培养处理后茎尖培养法相比,在相同茎尖大小时,脱毒率和生存率更高,即使茎尖增大到 0.8~1.0 mm,草莓苗的脱毒率也可高达 96.4%。在保证脱毒率的情况下,如果能使切取茎尖的长度变大,那么操作将更加方便省力。综合考虑,组培苗诱导匍匐茎再生后茎尖培养脱毒法比较于传统的茎尖培养法和热处理茎尖培养法更有效,而这一方法也将成为其他品种和病毒脱除的有效方法。

参考文献:

[1] 忻雅,吴根良,童建新,等. 草莓工厂化育苗基质的筛选[J]. 浙江农业科学,2011(6):1232-1235.
[2] 李靖,王珂,楚新伟,等. 草莓半促成栽培品种比较试验[J]. 河南农业科学,2004(8):61-63.
[3] 张欣馨,王菲,李浪,等. 中国草莓生产中面临的主要问题及发展对策[J]. 中国林副特产,2016(2):92-96.
[4] 何欢乐,阳静,蔡润,等. 草莓茎尖培养脱毒效果研究[J]. 北方园艺,2005(5):79-81.
[5] 李志强,王晶,丁国亮,等. 草莓热处理结合茎尖脱毒技术研究[J]. 北方园艺,2012(5):125-127.
[6] 陈怀勐,高丽,路河,等. 红颜草莓茎尖组培脱毒技术研究[J]. 北京农业,2011(1):18-20.
[7] 高慧卿,樊兰瑛,王秀红,等. 茎尖培养及热处理技术在百合脱毒中的应用研究[J]. 山西农业大学学报,2010,30(6):528-532.

(下转第 35 页)

等元素的吸收^[2,8]。这可能与高 pH 的培养基抑制根系的发育从而降低根系对元素的吸收功能有关。

参考文献:

[1] 黄春辉,夏思进,曲雪艳,等. 蓝莓的栽培利用现状与发展前景[J]. 现代园艺, 2011(6):41-43.
[2] 才丰,崔英宇,杨玉春. 土壤环境对蓝莓生长的影响[J]. 辽宁农业科学, 2013(1):45-48.
[3] 乌凤章,王贺新,李根柱,等. 三种类型越橘根系垂直分布特征研究[J]. 北方园艺, 2011(2):21-24.
[4] 唐雪东,李亚东,臧俊华,等. 土壤施硫对越桔生长发育的影

响[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(5):553-560.
[5] 梁文卫,宋鹏慧,阎聪,等. 美登蓝莓试管苗瓶内快速生根试验[J]. 中国果树, 2015(4):44-47.
[6] 王明洁,吴雨蹊,段亚东,等. 蓝莓栽培土壤改良技术研究[J]. 北方园艺, 2014(14):179-181.
[7] 曹增强,徐莹莹,张宁,等. 不同 pH 对蓝莓组培苗生长和对蓝莓组培苗生长和元素吸收的影响[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(2):50-57.
[8] 唐雪东,李亚东,丁绍文,等. 不同基质和硫磺粉对越橘土壤和叶片矿质营养的的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(3):279-283.

Effects of Different pH Levels Culture Medium on Root Growth of Blueberry

ZHOU Shuang, LIANG Wen-wei, WANG Ming-jie, SUN Lan-ying, YANG Guang

(Institute of Rural Revitalization Science and Technology, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 152204, China)

Abstract: In order to study the effect of pH on blueberry root system, use the ‘Wile Type’ as experimental materials, this paper studied the effect of different pH on the root growth of blueberry. The result showed that increasing the pH level (5.0-5.8) appropriately promoted the rooting rate of blueberry, and the excessive pH(6.0-6.6) inhibited the rooting rate. The average number of roots was inhibited with the increase of pH. Increasing the pH level appropriately (5.3-5.8) promoted root elongation, while increasing the pH level (6.0-6.6) was inhibited root elongation. Average rooting index of increased pH was inhibited.

Keywords: blue berries; root growth; pH

(上接第 32 页)

[8] 杨肖芳,苗立祥,张豫超,等. 浙江省红颜草莓镶脉病毒(SV BV)的调查与茎尖脱毒技术研究[J]. 核农学报, 2015, 29(9):1694-1700.
[9] 葛胜娟. 植物组织培养中的快繁育与脱毒技术及其应用[J]. 农业生物技术科学, 2005, 21(5):104-107.
[10] White P. Multiplication of the virus of tobacco and aucuba mosaic on growing excised tomato roots[J]. Phytopathology, 1934, 24:1003-1011.

[11] Limasset. 草芽脱毒技术的研究[J]. 农业杂志. 1949, 12(4):58.
[12] 覃兰英,邓世秀,李青. 培育草莓脱毒苗方法的研究[J]. 园艺学报, 1988, 15(3):175-179.
[13] 谢文申,付晏昆,周露,等. 野薄荷组织培养脱毒技术研究[J]. 现代农业科技, 2016(6):61-62, 64.
[14] 顾地周,朱俊义,冯颖,等. 草莓试管内诱导匍匐茎和高温处理结合茎尖培养脱毒技术研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2010, 38(11):89-94.

Study on Virus-free Technology of Strawberry Stem Tips

NIE Yuan-jun¹, LI Rui-zhen¹, ZHANG Chun-fen², DENG Shu², HOU Li-yuan³, CAO Qiu-fen³

(1. Institute of Agricultural Resources and Economics, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China; 2. Fruit Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030815, China; 3. Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: In order to establish a simple and efficient virus removal technology and promote the industrialization development of virus-free strawberry seedlings, the virus-free technology of strawberry mother strain infected with strawberry mottle virus was studied by tissue culture of strawberry stem tip, tissue culture of stem tip after heat culture and regeneration of stolon tip of tissue culture seedlings. Advantages and disadvantages were compared. The result showed that the detoxification rate of strawberry tissue culture seedlings increased, but the survival rate decreased after heat treatment. Compared with the direct stem tip culture method and the heat culture method after the stem tip culture, the virus-free rate and survival rate of the stem tip culture method with the same stem tip length were higher, and the survival rate and survival rate reached 93.3% and 96.4% when the stem tip length was 0.8-1.0 mm. Therefore, the regeneration of stolon tip culture with tissue culture was an effective method for strawberry detoxification.

Keywords: strawberry; detoxification technology; stolons regeneration