

# 草莓热处理结合茎尖脱毒技术研究

李志强, 王 晶, 丁国亮, 程建军, 范继红, 左立娟

(北京农业职业学院, 北京 102442)

**摘 要:**以草莓品种“红颜”、“章姬”为试材,采用“茎尖培养+热处理”方法获得草莓脱毒组培苗,并建立其组培快繁体系。结果表明:茎尖诱导培养最佳培养基配方为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L。在继代与增殖培养阶段,初期 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 增殖效果最好,后期培养基 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L 有利于壮苗。生根阶段的最佳培养基配方,以 1/2MS+IBA 0.1 mg/L 生根效果最好,生根率为 100%。练苗移栽的基质为珍珠岩:蛭石为 1:1,移栽成活率可达 95%以上。

**关键词:**草莓;热处理;茎尖脱毒;快速繁育

**中图分类号:**S 668.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)05-0125-03

草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)为蔷薇科草莓属多年生草本植物。草莓主要是用匍匐茎进行无性繁殖,而多年无性繁殖造成病毒在草莓体内积累,致使其结果小、畸形、品质差,叶子皱缩,生长缓慢,一般减产 30%~80%,并逐年加重。当前,危害草莓的病毒主要有草莓斑驳病毒(SMoV)、草莓轻型黄边病毒(SMYEV)、草莓镶脉病毒(SVBV)和草莓皱缩病毒(SCrV),以上病毒多为混合侵染,且症状潜伏期较长。因此,研究草莓的脱毒和脱毒种苗的快速繁殖,对恢复和提高草莓的各项生理指标十分重要。该研究以“红颜”和“章姬”为试验材料,采用“茎尖培养+热处理”的脱毒方法来研究脱除草莓 4 种主要病毒的效率,建立脱毒苗快速繁育体系,为无病毒苗的工厂化生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试草莓品种“红颜”、“章姬”,取自北京农业职业学院实训基地。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体的选取、处理与消毒** 选择植株生长健壮,匍匐茎充实,无病虫害的优良植株。切取小叶尚未完全展开的匍匐茎 3~4 cm,用洗涤灵水溶液清洗后,流水冲洗材料 30 min,置于 40℃ 水浴中处理 4 h。然后将外植体转入超净工作台,用 70% 酒精消毒 30 s,用无菌水冲洗 1~2 次,再用 0.1% 的升汞消毒 5 min 并不断搅动,用无菌水冲洗 4~6 次。最后用无菌滤纸吸干水分

备用。在解剖镜下切取 0.3 mm 以下的茎尖,接种到诱导培养基中,进行无菌培养。

**1.2.2 培养基和培养条件** 茎尖诱导培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L。增殖培养基为 MS+6-BA(0,0.2,0.5,0.5,1.0 mg/L)+NAA(0,0.01,0.01,0.05,0.10 mg/L)。生根培养基采用的基本培养基为 1/2MS,添加不同质量浓度 IBA 和 IAA。以上所有培养基均添加 7 g/L 的琼脂和 30 g/L 的白砂糖,pH 5.8。试验培养条件:培养室温度为(23±2)℃,连续光照时间 12 h/d,光照强度 2 000~2 500 lx。25~30 d 继代 1 次。

**1.2.3 试管苗的练苗与移栽** 移栽前,在温室内去掉培养瓶上的塑料瓶盖练苗 3~5 d。将组培苗从瓶内取出,洗去沾附在根部的琼脂培养基,将其栽入蛭石:珍珠岩为 1:1 的基质中。

**1.2.4 脱毒效果鉴定** 以茎尖组培苗为材料,利用 RT-PCR 技术对草莓苗进行 SMoV、SMYEV、SVBV、SCrV 病毒检测。病毒检测在中国动植物检验检疫研究所进行并出具检测报告。

## 2 结果与分析

### 2.1 茎尖诱导培养

剥取茎尖接种在诱导培养基上进行诱导培养,外植体能诱导单芽或丛生芽的发生。根据观察所有接种的草莓茎尖分生组织培养 14 d 后,陆续膨大、转绿。大多数都继续膨大,露出不定芽,这些芽体在 30 d 后直接分化出小苗,50~60 d 后形成具有真叶的丛生苗。

### 2.2 增殖培养

将生长健壮的不定芽转移到继代培养基中,置于培养室中培养 30 d 后,观察不同激素水平对芽增殖数量、质量的影响,筛选出增殖的最佳培养基。通过 SPSS 软

**第一作者简介:**李志强(1965-),男,陕西大荔人,本科,副教授,现从事设施园艺教学与研究。E-mail:bjnzylzq@sohu.com。

**基金项目:**北京市教委科技面上资助项目(KM201000005008)。

**收稿日期:**2011-12-09

件对不同培养基的增殖系数进行方差分析,培养基的增殖系数之间的相伴概率都小于 0.05,说明各增殖培养基之间都存在显著差别。

在继代增殖培养中,适当的激素浓度是获得高增殖倍数及良好生长情况的一个关键因素。由表 1 可知,在 6-BA 浓度为 0.5 mg/L, NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,草莓幼苗的增殖系数最高,偶尔出现愈伤组织。当 BA 浓度为 1.0 mg/L 时,幼苗出现了严重的玻璃化现象。在不添加任何激素的培养基上幼苗几乎不分化,但植株高大健壮。2 号培养基的增殖系数为 4.8,植株生长健壮,叶片舒展。过高或过低的激素浓度都会影响芽增殖及生长效果。在草莓组培苗增殖培养过程中,前期所用培养基 5 号较适合,随着继代代数的增加,BA 浓度降到 0.2 mg/L, NAA 降为 0.01 mg/L,防止草莓苗的变异。

表 1 不同激素水平对比对增殖的影响

Table 1 Effects of multiplication vigor with the different hormone concentrations

培养基 Medium	6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	NAA /mg · L <sup>-1</sup>	接种数 Inoculation number/株	增殖系数 Multiplication coefficient	生长情况 Growth condition
1	0	0	100	1.2	几乎不分化丛生芽,植株高大、健壮
2	0.2	0.01	100	4.8	诱导出丛生芽,植株健壮
3	0.5	0.01	100	5.1	诱导出丛生芽,长势一般
4	0.5	0.05	100	7.4	诱导大量丛生芽,较健壮,出现愈伤组织
5	1.0	0.10	100	6.0	诱导出丛生芽,苗生长较弱,玻璃化严重

### 2.3 生根培养

由表 2 可知,在不同生根培养基上草莓苗的生根率均为 100%,各处理之间无明显差异,但在生根数和根系生长情况上有明显差异。1/2MS+IBA 0.5 mg/L 的平均根数最多,但根系生长情况较差。综合生根率、平均根数及根系生长情况来看,1/2MS+IBA 0.1 mg/L 是较适合的生根培养基。

表 2 不同激素水平对比对生根的影响

Table 2 Effects of rooting with the different hormone concentrations

培养基 Medium	IBA /mg · L <sup>-1</sup>	IAA /mg · L <sup>-1</sup>	接种数 Inoculation number/株	平均根数 Average root number/条	生根率 Rooting rate/%	生根情况 Rooting complexion
1	0	0	100	4.8	100	根短,量少,健壮
2	0.1	0	100	11.0	100	根长且多,根长势健壮
3	0.5	0	100	15.0	100	根多,较短,根部有愈伤
4	0.1	0.1	100	9.5	100	根长多,生长健壮
5	0	0.5	100	7.2	100	根粗且短,苗生长较弱

## Study on Heat Treatment and Shoot Tip Virus Elimination Technique of Strawberry

LI Zhi-qiang, WANG Jing, DING Guo-liang, CHENG Jian-jun, FAN Ji-hong, ZUO Li-juan  
(Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442)

**Abstract:** Taking 'Hongyan' and 'Zhangji' strawberry as material, virus-free materials of strawberry were obtained from meristem culture *in vitro*, in order to establish the regenerative system by means of plant tissue culture techniques. The

### 2.4 试管苗移栽

打开培养瓶上的封口膜,将生长健壮的组培苗在驯化温室放置 2~3 d。然后将组培苗从瓶内取出,洗去沾附在根部的琼脂培养基,用 800 倍液多菌灵消毒后,将其栽入消过毒的基质中,浇透水,覆盖塑料膜。在温度为 20~25℃,相对湿度 75%~80% 的条件下进行练苗,注意遮荫和通风。7 d 后去掉覆盖膜,2~3 周后移栽苗成活,调查其成活率为 95%。当草莓苗长到“三叶一心”时,可及时移入大田中栽植。

### 2.5 病毒检测

经中国动植物检验检疫研究所检测,未发现草莓皱缩病毒(SCrV)、草莓轻型黄边病毒(SMYEV)、草莓斑驳病毒(SMoV)、草莓镶脉病毒(SVBV),并出具了检测报告。

## 3 结论与讨论

采用“茎尖培养+热处理”的方法获得草莓组培苗,经检测未发现草莓的 4 种主要病毒。茎尖诱导培养最佳培养基配方为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L。在继代与增殖培养阶段,初期 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 增殖效果最好,后期培养基 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L 有利于壮苗。生根阶段的最佳培养基配方,以 1/2MS+IBA 0.1 mg/L 生根效果最好,生根率为 100%。练苗移栽的基质为珍珠岩:蛭石为 1:1,移栽成活率可达 95% 以上。草莓生根较容易,在不添加激素的基本培养基上仍能够生根,因此可以进一步探讨组培无根草莓苗瓶外生根的方法,可以大大减少生产繁育周期,提高生产效率。

### 参考文献

- [1] 高山林. 草莓分生组织培养脱病毒技术及其应用[J]. 北方园艺, 2004 (4): 34-35.
- [2] 晁慧娟, 刘敏, 姬谦龙, 等. '红颜'草莓茎尖培养与快速繁殖[J]. 北京农学院学报, 2009, 24(4): 14-16.
- [3] 张志宏, 肖敏, 杨洪一, 等. 草莓病毒脱除方法的比较与评价[J]. 果树学报, 2006, 23(5): 720-723.
- [4] Zhou H C, He S T. Advances in Strawberry virus research[J]. Journal of Fruit Science, 2003, 20(5): 421-426.
- [5] 孙玉东, 徐冉. 草莓脱毒苗繁育技术规程[J]. 河北农业科学, 2007, 11 (2): 20-22.
- [6] 高遐虹, 李梅. 提高草莓茎尖组织培养脱毒效率研究[J]. 中国果树, 1994(2): 5-6, 14.
- [7] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 125-140.

# 正交设计优化大白菜 ISSR-PCR 反应体系

吴春燕, 高 义, 宋廷宇, 张晓明, 韩玉珠

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**以大白菜为试材,采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取大白菜基因组 DNA,采用正交实验设计方法,对 dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶、引物、及模板 DNA 五因素四水平进行优化,筛选并建立了适合大白菜的 ISSR-PCR 反应体系。结果表明:25  $\mu$ L 的反应体系中含有 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、200  $\mu$ mol/L dNTP、0.5 U *Taq* DNA 聚合酶、0.7  $\mu$ mol/L 引物、30 ng 模板 DNA。在此基础上探讨了最佳循环次数,应用该优化反应体系,用 3 个不同循环数对资源 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增,结果显示优化的反应体系适宜的循环次数是 30。

**关键词:**大白菜;ISSR;正交设计;PCR 反应体系

**中图分类号:**S 634.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)05-0127-03

大白菜,又称白菜、结球白菜、芽白、黄芽菜等,起源于我国,栽培历史悠久,在我国蔬菜市场供应中占有重要地位。据农业部统计,2006 年全国蔬菜播种面积为 18 216.9 km<sup>2</sup>,大白菜播种面积为 2 623.7 km<sup>2</sup>,占全国蔬菜播种面积的 14.4%,产量占全国蔬菜总产量的 18%。其面积和产量在各种蔬菜中均居首位。由此可见,大白菜在蔬菜中占有举足轻重的地位<sup>[1]</sup>。虽然对大白菜分子标记研究报道较多<sup>[2-4]</sup>,但应用 ISSR 标记进行研究的报道甚少。

ISSR 分子标记是在 1994 年创建的一种类似于 RAPD 的 PCR 技术<sup>[5]</sup>,它是在简单重复序列(SSR)的 3' 或 5' 端加锚 1~4 个随机碱基作为扩增引物,用此锚定引物对两侧具有反向排列的 SSR 间的基因组 DNA 片段进行扩增。ISSR 标记结合了 RAPD 和 SSR 标记的优点,操作简单、多态性高、稳定性好。目前已广泛用于植

物的品种鉴定<sup>[6]</sup>、亲缘关系<sup>[7]</sup>、遗传多样性<sup>[8]</sup>、遗传作图<sup>[9]</sup>、基因定位<sup>[10]</sup>等方面。

ISSR 标记技术是基于 PCR 的一种标记,所以  $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、引物、模板 DNA 等反应条件都会影响反应的效果,因此其适宜的 PCR 反应体系需要一定时间的摸索。如果进行单因素试验,就会忽视交互作用,短期内难以得到最佳反应组合;而采用正交实验设计则可以弥补单因素试验的不足,应用较少的水平组合研究多因素之间的互作效应,尽快找到最佳处理。该试验应用正交设计方法,采用  $L_{16}(4^5)$  正交表,对 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、 $Mg^{2+}$ 、模板 DNA、引物 5 个因素进行了研究,并对 PCR 反应中的循环次数进行了优化,以期建立适于大白菜 ISSR 反应的体系,为今后利用 ISSR 标记技术对大白菜进行品种鉴定、遗传作图、QTL 定位分析等提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试大白菜品种为‘丰抗 78’。dNTP、*Taq* DNA 聚合酶由 TAKARA 公司生产,引物 836 由上海生工合成。新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂、糖购自天根公司。Marker 为索莱宝公司产品。

**第一作者简介:**吴春燕(1978-),女,吉林永吉人,博士,讲师,研究方向为蔬菜种质资源创新与利用。E-mail:cuwu315@163.com。

**责任作者:**张晓明(1962-),男,硕士,教授,研究方向为蔬菜栽培生理。E-mail:xiaomingzh@126.com。

**基金项目:**吉林农业大学科研启动基金资助项目(201013)。

**收稿日期:**2011-12-14

results showed that the suitable medium for different culture periods was the suitable medium for differentiation medium was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L;During the proliferating period of clustered shoots,the medium with MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L showed the best effects;MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L was suitable for rooting and getting strong plants;and the best medium for rooting was a modified 1/2MS+IBA 0.1 mg/L,rooting trte for 100%. The rooted plantlets are transferred into the substrate pearlite : vermiculite =1 : 1,and the survival rate of transplants reached above 95% with the best treatment.

**Key words:** strawberry;heat treatment;stem apex detoxification;fast propagation