

# 草莓茎尖培养脱毒效果研究

何 欢乐<sup>1</sup>, 阳 静<sup>1,2</sup>, 蔡 润<sup>1</sup>, 潘 俊 松<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101; 2. 上海市白茅岭监狱苗木基地, 安徽 242242)

**摘 要:**以草莓“丰香”品种为材料, 利用匍匐茎剥取茎尖, 以茎尖培养结合改良热处理、冷处理、二次脱毒等方法来进行草莓脱毒研究, 用电镜及野生草莓小叶嫁接法进行鉴定, 结果表明, 草莓脱毒效果与剥取的茎尖大小有关, 茎尖越小, 脱毒效果越好。以 0.5 mm(毫米)大小剥取茎尖, 直接剥取茎尖法不能够彻底清除病毒, 而二次脱毒法、改良热处理+茎尖培养法、冷处理+茎尖培养法等获得的植株都没有检测到病毒, 脱毒效果良好。其中改良热处理+茎尖培养法的茎尖成活率最高, 达 47.37%。因此最适宜的脱毒法为改良热处理+茎尖培养法, 即先将草莓匍匐茎放在 40℃热水中处理 4 h(小时), 再剥取≤0.5 mm(毫米)大小的茎尖进行培养, 脱毒效果良好。

**关键词:**草莓; 茎尖培养; 改良热处理; 冷处理; 脱毒

**中图分类号:** S668.403.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2005)05-0079-03

草莓(*Fragaria ananassa* DuRoi)是蔷薇科草莓属宿根性多年生常绿草本植物, 是浆果类水果, 在世界浆果类水果生产中, 其栽培面积和产量仅次于葡萄, 为世界性水果<sup>[1]</sup>。

草莓是靠匍匐茎进行无性繁殖的作物, 由于种植年限较长, 加上连作、以结果母株繁殖等, 体内病毒积累逐年增加, 病毒病发生严重。感染了病毒的草莓生长缓慢、叶皱缩、果子一年比一年小、畸形、品质差, 一般减产 30%~80%, 并逐年加重<sup>[2]</sup>。在我国已造成损失的草莓病毒病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), 草莓皱缩病毒(SCrV)等四种。王国平报道这四种病毒总侵染率为 80.2%, 其中单种病毒侵染率为 41.6%, 2种以上的病毒复合侵染率为 38.6%。时至今日, 病毒病已成为草莓主要病害之一, 严重阻碍了草莓产业的进一步发展。

对于病毒病, 目前还没有药剂可以治理。因此, 培育无病毒母本苗, 栽培无病毒苗木, 是防治草莓病毒病的根本对策<sup>[3]</sup>。目前, 世界上培育草莓无毒苗有 3 种方法: 热处理法、花药培养法和茎尖培养法。用茎尖培养法进行无病毒苗的培育, 是目前世界上获得草莓无毒苗最普遍且最有效的方法<sup>[4]</sup>。

1962 年 Belkengren and Miller 首先用组织培养的方法获得了草莓无病毒苗。草莓无病毒苗具有明显的恢复植株长势和增产的效果。我国自邓明琴(1981)通过草莓茎尖获得了无病毒植株以来, 也一直在从事这方面的研究, 并逐步提出了一些改进措施。童尧明等以草莓茎尖分生组织(0.2 mm~0.4 mm(毫米))一次性培养出组培苗, 出苗率为 83%~90%, 脱毒率达 100%。覃兰英等(1988)将草莓苗在 35℃下热处理 7 d(天)后, 逐步升温至 38℃获得 100%的脱毒苗。高山林把切取的草莓芽洗净后经过高温短时间热处理, 然后用茎尖培养法获得无病毒草莓苗<sup>[2]</sup>。高遐虹等用二次脱毒法获得无病毒草莓苗。但是一次性脱毒培养剥取的茎尖小, 技术要求太高。传统热处理法由于较长时间的高温高湿, 很容易感染红蜘蛛一类昆虫危害, 且热处理后的材料在接种组培时, 表面消毒不易彻底。改良热处理的温度及操作过程未见有报

道。而且, 近年来, 用茎尖培养对草莓脱病毒的研究报道很多, 但是, 在电镜及小叶嫁接法对脱病毒检测方面上的报道很少见。本实验针对以上三个方面的问题进行探索, 对草莓茎尖脱毒培养进行研究, 并结合热处理、冷处理和二次脱毒等方法, 为提高草莓茎尖脱毒培养寻找更适合的途径和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验以草莓匍匐茎为材料, 截取 3 cm~4 cm(厘米)长的顶端。品种为丰香, 由青浦赵屯草莓资源圃提供, 其中二次脱毒法所用的材料是一次脱毒的试管苗。

### 1.2 方法

自田间选取健壮草莓母株上生长充实而小叶尚为展开的匍匐茎顶端约 3 cm~4 cm(厘米)长的顶芽, 用自来水冲洗 2 h~3 h(小时)后, 在超净台上进行常规灭菌处理。在双筒解剖镜下由外向内逐层剥去幼叶, 切取 0.5 mm(毫米)左右大小茎尖接种于 MS 诱导培养基上诱导培养, 将分化出的小苗在 1/2MS 培养基上诱导生根。

注: 所有培养基均含有 3%蔗糖, 0.8%琼脂, pH=5.6。

#### 1.2.1 茎尖培养脱毒方法研究

1.2.1.1 直接茎尖培养脱毒法 在超净工作台上, 分别以 0.2 mm、0.5 mm、1.0 mm(毫米)大小切取茎尖生长点接种于最佳诱导培养基上, 移至培养室培养。

1.2.1.2 改良茎尖培养脱毒法 改良茎尖培养脱毒法, 即二次脱毒培养法。先在解剖镜下切取带 3~4 个叶原基、长度为 0.5 mm(毫米)的茎尖生长点, 进行培养, 两个月后, 当试管苗长到 1 cm~2 cm(厘米)时, 从中选取试管苗, 再次切取 0.5 mm(毫米)的茎尖进行二次脱毒培养。

1.2.1.3 改良热处理+茎尖培养脱毒法 改良热处理+茎尖培养法, 是将草莓匍匐茎洗净后, 35℃~50℃水浴处理 4 h(小时), 再在无菌条件下剥取茎尖, 切取 0.5 mm(毫米)大小进行培养。

1.2.1.4 冷处理+茎尖培养脱毒法 自田间采取 3 cm~5 cm 高的草莓苗, 栽在小花盆里, 于 10℃的低温培养箱中培养 2 个月, 选健壮植株剥取 0.5 mm(毫米)茎尖进行培养。

#### 1.2.2 组培苗脱毒效果鉴定

1.2.2.1 野生草莓小叶嫁接法 草莓的病毒像其它多年生

\* 基金项目: 上海市科委重点项目“草莓、甜瓜克隆苗应用技术研究”

(995413011)。

收稿日期: 2005-05-15

作物的病毒一样,很难像一年生草本植物那样,用汁液接种法进行鉴定。现在通常采用野生种草莓,按 Bringhurst 的小叶嫁接法来进行鉴定。本实验所用的指示植物为 UC10,其对草莓卷叶病毒有很好的检测能力<sup>[5]</sup>。首先是从被鉴定的草莓采集长成不久的新叶,除去两边的小叶,中央的小叶带 1 cm~1.5 cm(厘米)长的叶柄,把它削成楔形作接穗;而指示植物除去中间的小叶,在叶柄的中央部切入 1 cm~1.5 cm(厘米)再插入准备好的接穗,用细线扎好,涂上少量的白色凡士林以防干燥。每颗野生草莓做两片叶子。嫁接后两周为保持成活,罩上塑料薄膜袋。40 d(天)后调查野生草莓卷叶病毒病发生情况。

1.2.2.2 电子显微镜鉴定 用电子显微镜鉴定比小叶嫁接的指示植物鉴定法直观,且速度快。主要方法是用负染法处理被测叶片,然后分别在 15 000、20 000、30 000 倍下观察,即可以清楚地看到细胞核及细胞质中是否有病毒粒子。

2 结果与分析

2.1 不同茎尖大小对成活率及脱毒效果的影响

直接从丰香草莓匍匐茎上分别剥取 0.2 mm、0.5 mm、1.0 mm(毫米)大小的茎尖进行培养,结果如表 1 所示。

从表 1 可以看到草莓茎尖成活率受茎尖大小影响非常大。在相同培养基上,草莓茎尖越小,茎尖的成活率越低,反之,剥取的茎尖越大,茎尖的成活率越高。在最优培养基 MS+BA0.5 mg/L(毫克/升)上。大小为 0.2 mm(毫米)的茎尖成活率为 16.67%,大小为 0.5 mm(毫米)的茎尖成活率为 66.67%,大小为 1.0 mm(毫米)的茎尖成活率为 83.33%,可见,剥取的茎尖大小直接影响着草莓在培养基中的成活率。

表 1 茎尖大小对茎尖成活率及脱毒效果的影响

茎尖大小 (mm)	接种 个数	成活 个数	成活率 (%)	脱毒效果	
				电镜检测病毒个数	嫁接表现
0.2	30	5	16.67	0	无皱缩
0.5	30	20	66.67	2	轻微皱缩
1.0	30	25	83.33	7	皱缩

从表 1 还可以看出,以 UC10 野生草莓检测各试管苗带卷叶病毒情况,0.2 mm(毫米)大小茎尖获得的草莓试管苗经嫁接后,指示植物没有皱缩现象发生(图 2-a)。而 0.5 mm(毫米)、1.0 mm(毫米)大小茎尖的试管苗嫁接到 UC10 上后,UC10 表现出不同程度的皱缩,与 1.0 mm(毫米)大小茎尖的试管苗相比,0.5 mm(毫米)的要好得多(图 2-c、d)。从电镜检测结果来看,0.2 大小茎尖得到的试管苗没有检测到病毒,0.5 大小茎尖得到的试管苗经电镜检测每个视野可观察到 2 个杆状病毒(图 1-a),而 1.0 大小茎尖得到的试管苗中,每个视野可观察到 7 个杆状病毒和少量球状病毒(图 1-c)。可见,茎尖大小为 0.2 mm(毫米)的脱毒效果最好,0.5 mm(毫米)次之,但综合茎尖成活率而言,以 0.5 mm(毫米)茎尖大小为最理想。

2.2 改良热处理温度对茎尖成活率的影响

从表 2 可以看出一定范围内,随着处理温度的升高,剥取草莓茎尖的成活率随之下降。在 35℃时,剥取的茎尖成活率为 57.14%,与对照(不经过高温处理)的成活率 62.50%,相差不大。当温度升到 40℃时,成活率降至 47.37%,45℃以上草莓茎尖不能成活。

经不同温度处理得到的试管苗用 UC10 野生草莓嫁接,发现用 35℃处理得到的试管苗在野生草莓上的嫁接表现与

表 2 不同温度处理对茎尖成活率及脱毒效果的影响

温度 (℃)	接种 个数	成活 个数	成活率 (%)	脱毒效果	
				电镜检测病毒个数	嫁接表现
35	21	12	57.14	2	轻微皱缩
40	19	9	47.37	0	无皱缩
42	18	1	5.56	0	无皱缩
45	20	0	0.00	—	—
50	20	0	0.00	—	—
CK	24	15	62.50	2	轻微皱缩

注:剥取的茎尖大小为 0.5 mm(毫米)。

未经高温处理的表现一致,都使野生草莓新生叶表现轻微皱缩(图 2-d),而经 40℃和 42℃高温处理的匍匐茎剥取茎尖得到的试管苗经嫁接后,都表现出无皱缩。同样电镜检测的结果也是如此,35℃处理和对照可用电镜检测到每视野 2 个杆状病毒(图 1-a),40℃和 42℃处理检测不到病毒。可见经 40℃~42℃高温处理匍匐茎后再剥取茎尖,得到的试管苗能达到 100%脱毒率。但综合成活率考虑,只需用 40℃处理就可以了。

2.3 不同脱毒方法对茎尖成活率的影响

为了建立更好的脱毒体系,采用几种方法进行比较:直接茎尖脱毒、二次茎尖脱毒、改良热处理结合茎尖脱毒、冷处理结合茎尖脱毒。

表 3 可以看出,4 种茎尖脱毒方法中,直接茎尖脱毒法的成活率最高,为 66.67%;其次为改良热处理结合茎尖脱毒法,为 47.37%;然后是冷处理的茎尖脱毒法,成活率为 44.44%;最低的是二次茎尖脱毒法,成活率只有 26.67%。

表 3 不同脱毒方法对草莓茎尖成活率及脱毒效果的影响

脱毒方法	接种 个数	成活 个数	成活率 (%)	脱毒效果	
				电镜检测病毒个数	嫁接表现
直接茎尖脱毒	30	20	66.67	2	轻微皱缩
二次茎尖脱毒	30	8	26.67	0	无皱缩
改良热处理+茎尖脱毒	19	9	47.37	0	无皱缩
冷处理+茎尖脱毒	18	8	44.44	0	无皱缩
CK	—	—	—	16	严重皱缩

注:剥取的茎尖大小为 0.5 mm; \*改良热处理温度为 40℃。

根据表 3 结果,以 UC10 野生草莓检测各试管苗带卷叶病毒情况,直接剥取茎尖大小为 0.5 mm(毫米)获得的试管苗以 UC10 野生草莓嫁接检测发现有轻微皱缩(图 2-d),以电镜检测发现,每个视野中可以观察到 2 个杆状病毒(图 1-a)。改良热处理、二次脱毒及冷处理的脱毒方法处理的草莓试管苗经嫁接后,野生草莓上都没有皱缩现象发生,电镜检测也观察不到病毒粒子。而对照(直接田间繁殖)的草莓苗用野生草莓嫁接,新生叶表现出严重皱缩,电镜检测发现每个视野中可观察到多达 16 个病毒(图 1-d、e)。其中除了杆状病毒外,还观察到了球型病毒。可见通过茎尖培养的方法来繁殖种苗能有效的去除草莓体内所带的病毒,且三种改良的草莓茎尖脱毒方法都要比直接剥取茎尖的方法更有效,脱毒率达到 100%。其中以 40℃处理的改良热处理+茎尖培养法的成活率最高,可达到 47.37%。

3 讨论

3.1 脱毒苗的田间繁殖

在脱毒苗的繁殖过程中,最重要的是防止再次感染。首先是脱毒苗在驯化过程中,所用基质必须用蒸汽或用药剂消毒,以防治土壤病菌和线虫。其次是防止病毒介体——叶蝉

和蚜虫传毒,对原种苗仅仅喷药防治是不够的,需用0.4 mm~0.5 mm(毫米)大小的防虫网进行隔离。二级种苗必须选择草莓原种苗作母株,在隔离条件下的专用苗圃内进行繁殖,苗圃和周围草莓园隔离至少2 km(公里),苗圃的土壤要经过氯化苦农药消毒。避免在栽过草莓的土地重茬繁殖无毒苗,并注意定期防治蚜虫。无病毒原种苗可供繁殖3年。无病毒草莓苗的繁殖主要采用匍匐繁殖法。该法具有分生量大、速度快、苗质量好等特点。

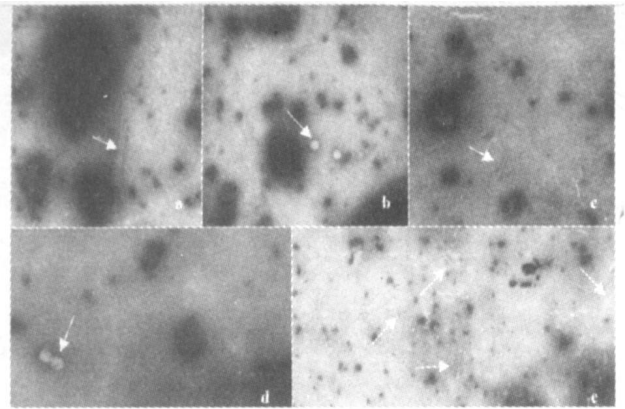


图1 病毒的电镜检测

a. 0.5 mm(毫米)茎尖再生苗(杆状病毒)40K×2; b. 10 mm(毫米)茎尖再生苗(球形病毒)40K×2; c. 10 mm(毫米)茎尖再生苗(杆、线状病毒)27K×2; d. 田间对照苗(球形病毒)40K×2; e. 田间对照苗(杆、线状病毒)20K×2

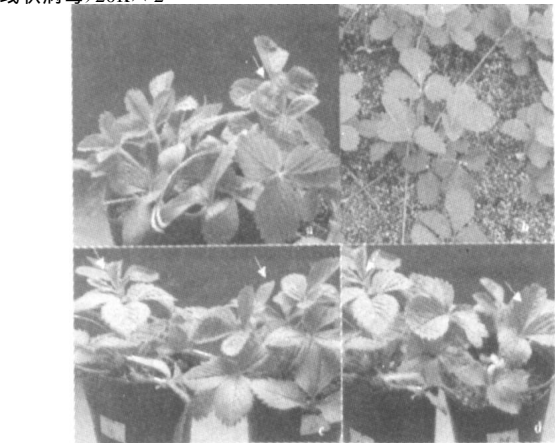


图2 野生草莓小叶嫁接法鉴定脱毒效果

a. 0.2 mm(毫米)茎尖再生苗与对照; b. 未嫁接的野生草莓; c. 10 mm(毫米)茎尖再生苗与对照; d. 0.5 mm 茎尖再生苗与对照

无毒苗繁殖分三个圃:原原种圃、原种圃、生产圃。原原种生产原种,原种生产生产种。这一过程不仅可以大量繁殖生产用苗,还可以及时进行脱毒效果和变异的鉴定。在防虫网室中对原原种苗进行编号定植,在其后代苗——原种圃中分别进行匍匐茎扦插繁殖,仍然按原原种苗的母株进行编号,然后在生产圃中对编号的原种苗进行生产试种,这样可以直接地鉴定其脱毒效果和变异。一旦发现在生产上表现不良,就可按编号全部清除其原原种、原种母株及后代,停止繁殖生产用苗,这样就可以保证生产用苗为无变异的脱毒健壮苗。为长远利益打算,严格隔离的防虫网室必须建立。研究机构应主动与生产单位联系,指导其建立防虫网室,并培训技术人

员在防虫网室中的种苗生产流程。唯有这样,才能将草莓脱毒健壮苗推向广大种植户。

3.2 不同脱毒方法的效果比较

本实验结果表明,茎尖培养过程中,剥取茎尖,开始培养,3 d~7 d(天)陆续转绿、膨大;14 d~28 d(天)后形成黄绿色愈伤组织;42 d~49 d(天)后增殖完成,40 d(天)左右继代一次,生根要20 d(天)左右,移栽到大田,4个月 after 开花结果。与邓群仙、洪燕萍等报道的一致<sup>[10]</sup>。

高遐红等认为改良的茎尖剥离方法(二次脱毒法)比传统茎尖剥离法的分化率高,污染率要低。本实验研究表明,结果恰好相反,改良的茎尖剥离法比传统茎尖剥离法的分化率低、污染率高。其原因估计是因为试管苗比田间苗嫩、水分含量多,且试管苗长度太短,切取茎尖时,操作比较困难,又由于操作过程中,手的消毒很难彻底,所以很容易引起污染。

直接茎尖剥取法,剥取茎尖0.1 mm~0.2 mm(毫米)时,脱毒率可达100%。但是技术要求高、不易掌握、费时间。本实验所用的改良茎尖培养法剥取的茎尖都为0.5 mm(毫米)大小,获得的试管苗经电镜及小叶嫁接法鉴定表明,脱毒率都达100%。但是冷处理+茎尖培养法中,冷处理所需的时间长,而且需将整株植株放到培养箱中培养2个月,成本高,不利于生产上大规模的操作;二次脱毒法污染率太高,污染情况难以克服,所以建议生产上草莓茎尖脱毒法以改良热处理+茎尖培养法较好。该法所需时间短、操作简便、成本低、脱毒率高。另外,本实验发现,经过冷处理的材料,在培养的初期,生长速度明显比对照慢,但是培养到后期,没有明显差别。估计原因是冷处理的低温影响了草莓试管苗前期的生长速度。在生根培养基上,本实验还发现,经过冷处理的草莓苗生根速度明显比对照快,冷处理的草莓试管苗根多、长、粗,而且根上有明显的侧根,这在对照及其他培养过程中是没有的现象。其具体机理还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 张跃进,朱振林.大棚草莓配套栽培技术[M].上海科学普及出版社,2000.  
[2] 高山林.草莓分生组织培养脱毒技术及其应用[J].北方园艺,2000,133(4):34~35.  
[3] 刘红旗.大棚草莓[M].中国农业科技出版社,1999:2~6.  
[4] 高红霞,李梅.草莓三高栽培技术[M].北京:中国农业大学出版社,1995.  
[5] 蒋明杉,林震.草莓病毒检测技术[J].北方果树,2001,(2):13.  
[6] 王永清.草莓病毒病的培育方法[M].四川农业大学果树良种苗木脱毒研究中心.落叶果树病毒病及脱毒研究.成都科技大学出版社,1998:166~173.  
[7] 蔚承祥,李文金.四季草莓赛娃茎尖培养实验[J].中国果树,2000,9(5):25~26.  
[8] 祁伟.草莓茎类后组培技术[J].沈阳农业大学学报,1995,26(2):142~145.  
[9] 洪燕萍,杨顺权.草莓离体培养研究进展[J].福建农业学报,1999,14(2):37~44.  
[10] 邓群仙,熊庆娥.品种和培养基对草莓茎尖培养的影响[J].四川农业大学学报,2000,18(3):252~254.