

# 红颜草莓组培脱毒快繁体系的建立

杜灵均<sup>1</sup>, 马喆<sup>1</sup>, 张阳<sup>1</sup>, 王璐<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北京农业职业学院实验实训中心, 北京

<sup>2</sup>北京农业职业学院园艺园林学院, 北京

收稿日期: 2024年9月3日; 录用日期: 2024年10月4日; 发布日期: 2024年10月12日

## 摘要

以红颜草莓匍匐茎为外植体, 采取热处理脱毒和微茎尖脱毒相结合、直接微茎尖脱毒两种脱毒方法, 以次氯酸钠为消毒剂, 探索不同脱毒方法、消毒时间、消毒浓度对无菌脱毒苗获得的影响, 得出在5% NaClO, 12 min处理后, 直接进行微茎尖脱毒, 成活率能达到95%以上且长势最优, 有明显生长情况。以MS为基本培养基, 探索最佳增殖和生根培养基, 增殖培养基为MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA时, 增值系数为3.4。生根培养基为1/2 MS + 0.1 mg/L IBA时, 生根率能达到100%, 无菌脱毒苗移栽到草炭:蛭石:珍珠岩(1:1:1)的栽培基质中成活率为100%。本试验建立红颜草莓组培快繁体系, 以期为草莓优良品种规模化繁育和工厂化生产提供技术支持。

## 关键词

茎尖脱毒, 热处理脱毒, 组织培养, 快繁体系

# Establishment of a Detoxification and Rapid Propagation System for Red Strawberry Tissue Culture

Lingjun Du<sup>1</sup>, Zhe Ma<sup>1</sup>, Yang Zhang<sup>1</sup>, Lu Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Experimental Training Center, Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing

<sup>2</sup>College of Horticulture and Landscape Architecture, Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing

Received: Sep. 3<sup>rd</sup>, 2024; accepted: Oct. 4<sup>th</sup>, 2024; published: Oct. 12<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

Using the creeping stems of red strawberry as explants, two detoxification methods were adopted,

文章引用: 杜灵均, 马喆, 张阳, 王璐. 红颜草莓组培脱毒快繁体系的建立[J]. 农业科学, 2024, 14(10): 1083-1087.

DOI: 10.12677/hjas.2024.1410136

including heat treatment detoxification and micro stem tip detoxification, and direct micro stem tip detoxification. Sodium hypochlorite was used as the disinfectant to explore the effects of different detoxification methods, disinfection time, and disinfection concentration on obtaining sterile and detoxified seedlings. It was found that after 12 minutes of treatment with 5% NaClO, direct micro stem tip detoxification resulted in a survival rate of over 95% and optimal growth, with significant growth. Using MS as the basic culture medium, explore the optimal proliferation and rooting culture medium. When the proliferation medium is MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA, the value-added coefficient is 3.4. When the rooting medium is 1/2 MS + 0.1 mg/L IBA, the rooting rate can reach 100%, and the survival rate of sterile and virus-free seedlings transplanted into a cultivation medium of peat:vermiculite:perlite (1:1:1) is 100%. This experiment aims to establish a fast propagation system for red strawberry tissue culture, in order to provide technical support for the large-scale breeding and industrial production of excellent strawberry varieties.

## Keywords

Stem Tip Detoxification, Heat Treatment Detoxification, Tissue Culture, Rapid Propagation System

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)是蔷薇科草莓属多年生草本植物,其果实香甜多汁,口感良好,并富含多种微量元素与维生素,具有很高的经济价值[1]。草莓的繁殖特性使病毒从母株传播到子株,并不断传染给后代,草莓产量降低甚至绝产的情况时有发生,严重制约了我国草莓产量以及草莓产业的发展[2]。世界上现有的技术手段,无法治愈感染病毒的草莓植株,通过植物组织培养技术对草莓进行脱毒处理,能够避免草莓感染病毒[3],所形成的三级繁育体系,即原原种(炼苗移栽好的脱毒苗)→原种→种苗(生产苗),保障了草莓种苗质量,以满足种植市场[4]。

目前全世界已有记载的草莓病毒病有 20 多种,一般常见的危害草莓病毒有 5 种,即草莓皱缩病毒、草莓镶脉病毒、草莓轻型黄边病毒、草莓斑驳病毒和黄瓜花叶病毒,其中前四种病毒在我国草莓产地均有发生,侵染率高达 80.2% [5]。由于病毒病的发生流行加上草莓种苗农户自繁自育,造成草莓品种退化严重,抗逆性差,导致草莓产量下降,品质变劣,在一定程度上影响了草莓产业的健康发展。草莓主要通过匍匐茎进行繁殖,繁殖代数的增加会导致品种退化,感染病毒病的植株会通过匍匐茎代代传播,导致病毒病越来越严重,带病的植株长势变弱,抗逆性降低,果实产量及品质严重下降。推广和使用草莓脱毒种苗是保证草莓品质与产量的唯一有效途径。脱毒苗在长势、抗病性、产量、株高、可溶性固形物等方面均比未脱毒苗有显著优势[6] [7]。草莓种苗脱毒依托植物组织培养技术,主要有直接茎尖脱毒、热处理结合茎尖培养脱毒、花药组培脱毒、化学药剂处理脱毒、超低温茎尖脱毒等方法。

红颜草莓作为市场主栽品种,受到消费者的喜爱。在近几年的推广种植中发现病毒存续率时间长,在种植一年后对农户的脱毒种苗进行病毒检测还能检出一种或多种病毒,导致在采集种源地的匍匐茎进行脱毒时,脱毒效果不好,严重影响草莓种苗的生长及产量。本试验通过对红颜草莓匍匐茎进行脱毒处理,探索培养方法,建立组培快繁体系,以期为草莓优良品种规模化繁育和工厂化生产提供技术支撑。

## 2. 试验方法

### 2.1. 外植体的处理

本试验于 2023 年 4 月中旬, 在北京农业职业学院实训基地选取生长健壮的红颜草莓匍匐茎 500 余棵, 以 MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂为培养基, 脱毒处理方法分别为热处理脱毒 + 微茎尖脱毒和直接进行微茎尖脱毒, 并同时进行了消毒剂浓度及消毒时间筛选, 筛选配组如下:

1) 消毒浓度设置为 2% NaClO, 分别设置消毒时间为 8 min, 10 min, 12 min, 15 min, 20 min。两种脱毒处理方式下, 每个处理时间分别接种 10 个茎尖, 30 天后记录成活率和污染率。

2) 消毒浓度设置为 5% NaClO, 分别设置消毒时间为 8 min, 10 min, 12 min, 15 min, 20 min。两种脱毒处理方式下, 每个处理时间分别接种 10 个茎尖, 30 天后记录成活率和污染率。

3) 消毒浓度设置为 8% NaClO, 分别设置消毒时间为 8 min, 10 min, 12 min, 15 min, 20 min。两种脱毒处理方式下, 每个处理时间分别接种 10 个茎尖, 30 天后记录成活率和污染率。

4) 消毒浓度设置为 10% NaClO, 分别设置消毒时间为 5 min, 8 min, 10 min, 12 min, 15 min。两种脱毒处理方式下, 每个处理时间分别接种 10 个茎尖, 30 天后记录成活率和污染率。

5) 消毒浓度设置为 15% NaClO, 分别设置消毒时间为 3 min, 5 min, 8 min, 10 min, 12 min。两种脱毒处理方式下, 每个处理时间分别接种 10 个茎尖, 30 天后记录成活率和污染率。

通过查阅相关文献, 确定培养条件: 设定培育温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , 湿度为 70%, 光照设定为 2000~3000 Lx。

### 2.2. 增殖培养基的筛选

试验材料为初代培养获得的无菌苗。以 MS 为基本培养基, 蔗糖和琼脂添加量分别为 30 g/L、6 g/L。设置 5 种不同培养基组合, 分别为: 1) MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA; 2) MS + 0.2 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA; 3) MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA; 4) MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L GA<sub>3</sub>; 5) MS + 0.3 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L GA<sub>3</sub>。分别接种 45 棵无菌苗, 30 天转接一次, 观察生长情况并计算增殖系数。

转接 2~3 次后, 选取样品送检确定脱毒效果, 无问题则继续转接生根培养。

### 2.3. 生根培养基的筛选

以 1/2 MS 为基本培养基, 蔗糖和琼脂添加量分别为 30 g/L、6 g/L。设置 5 种不同培养基组合, 分别为: 1) 1/2 MS + 0.1 mg/L IBA; 2) 1/2 MS + 0.3 mg/L IBA; 3) 1/2 MS + 0.1 mg/L NAA; 4) 1/2 MS + 0.3 mg/L NAA; 5) 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA。分别接种 45 棵草莓苗, 30 天后观察生根情况, 计算生根率。

### 2.4. 移栽驯化研究

草莓苗生根后, 放至育苗温室进行移栽驯化, 以草炭、蛭石、珍珠岩为栽培基质, 分别设置不同组合为: 1) 草炭:蛭石:珍珠岩(1:1:1); 2) 草炭:蛭石:珍珠岩(2:1:1); 3) 草炭:蛭石(2:1); 4) 草炭:珍珠岩(2:1); 5) 草炭:蛭石:珍珠岩(3:2:1), 每种栽培基质分别移栽 60 棵无菌苗, 中途进行水肥管理, 45 天后观察生长情况。

### 2.5. 试验数据统计方法

污染率(%) = 污染的外植体数/接种的外植体数 × 100%

增殖系数 = 增殖芽数/接种数

生根率(%) = 生根植株数/接种芽数 × 100%

移栽成活率(%) = 移栽后成活苗数/移栽总苗数 × 100%

### 3. 试验结果

#### 3.1. 无菌脱毒苗的获得

1) 热处理脱毒下, 匍匐茎经过水浴 40℃, 4 h 处理后浸泡时间过长, 剥取茎尖难度增大, 易剥坏, 在用 NaClO 直接消毒处理后进行微茎尖剥取脱毒, 剥取茎尖大小合适, 容易剥离, 成活率高且 30 天后观察长势优于热处理脱毒后剥取的茎尖, 初步获得脱毒无菌苗直接选取微茎尖处理脱毒法。

2) 30 天后观察不同消毒浓度和消毒时间配比下无菌苗的成活情况, 消毒浓度为 2% NaClO 时, 污染率接近 30%, 相同浓度下增加消毒时间后, 出现茎尖变黑无生长情况。当消毒浓度高于 8% NaClO, 消毒时间大于 12 min 后, 消毒浓度及消毒时间的增加, 出现草莓茎尖变黑、变烂、死亡的情况。综合对比所有配比后, 当组合为 5% NaClO, 12 min 时, 消毒效果最好, 成活率能达到 95% 以上且长势最优, 有明显生长情况。

#### 3.2. 增殖培养

接种 30 天后, 观察接种结果, 统计丛生芽总数, 计算增殖系数。结果如表 1 所示, 当增殖培养基为 MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 时, 增值系数为 3.4。

Table 1. Results of multiplication culture

表 1. 增殖培养结果

培养基配方				接种总数	丛生芽总数	增殖系数
MS	NAA (mg/L)	GA <sub>3</sub> (mg/L)	6-BA (mg/L)			
MS	0.05		0.5	45	113	2.5
MS	0.01		0.2	45	97	2.1
MS	0.5		0.1	45	153	3.4
MS		0.2	0.5	45	39	0.87
MS		0.2	0.3	45	47	1.04

#### 3.3. 生根培养

Table 2. Rooting culture results

表 2. 生根培养结果

培养基配方			接种总数	平均生根数(条)	生根率(%)
MS	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)			
1/2 MS		0.1	45	5.8	100
1/2 MS		0.3	45	3.9	93.3
1/2 MS	0.1		45	3.5	88.8
1/2 MS	0.3		45	3.1	75.6
1/2 MS	0.5		45	2.7	60

接种 30 天后, 观察结果结果, 统计生根数, 计算生根率。结果如表 2 所示, 当生根培养基为 1/2 MS

+ 0.1 mg/L IBA 时, 生根率能达到 100%。

### 3.4. 移栽驯化

生根后草莓苗进行移栽驯化研究, 移栽 60 天后观察结果如表 3 所示, 当无菌脱毒苗移栽到草炭:蛭石:珍珠岩(1:1:1)的栽培基质中草莓苗生长良好, 有新叶长出, 成活率为 100%。

**Table 3.** Transplant domestication results

**表 3.** 移栽驯化结果

移栽基质	移栽成活率(%)	生长情况
transplanting medium	Survival rate of transplantation	Growth situation
草炭:蛭石:珍珠岩(2:1:1)	40%	长出新叶、无生长现象
草炭:蛭石(2:1)	30%	没有长出新叶
草炭:珍珠岩(2:1)	30%	没有长出新叶
草炭:蛭石:珍珠岩(1:1:1)	100%	长出新叶、生长良好
草炭:蛭石:珍珠岩(3:2:1)	38%	长出新叶、无生长现象

## 4. 结论

1) 通过本试验研究发现, 与热处理脱毒法进行对比, 利用直接微茎尖脱毒法效果较好, 热处理由于水浴对茎尖后期剥取难度增大, 在剥取中被器械反复夹取, 导致茎尖质量变差, 成活率变低。在外植体处理中, 经过 5% NaClO, 12 min 处理后, 直接进行微茎尖脱毒, 成活率能达到 95% 以上且长势最优, 有明显生长情况, 可以获得无菌苗, 无菌苗生长健壮, 经过病毒检测后脱毒效果好, 不携带侵染草莓的病毒。

2) 将已获得的无菌脱毒苗以 MS 为基本培养基建立快繁体系。当增殖培养基为 MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 时, 增值系数为 3.4。生根培养基为 1/2 MS + 0.1 mg/L IBA 时, 生根率能达到 100%。无菌脱毒生根苗移栽到草炭:蛭石:珍珠岩(1:1:1)的栽培基质中成活率为 100%。

通过对红颜草莓组培脱毒快繁体系的建立, 具有繁殖速度快, 品质优, 无病毒病、产量增加等优点, 为草莓优良品种规模化繁育和工厂化生产提供技术支撑。

## 基金项目

北京农业职业学院院级科技创新项目(XF-YF-23-08)。

## 参考文献

- [1] 刘畅, 王晓, 李宪松, 等. 我国草莓生产态势及国内外比较分析[J]. 中国果树, 2023(7): 136-140.
- [2] 苏代发, 童江云, 杨俊誉, 等. 草莓病毒病及其研究进展[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2019, 41(6): 1221-1237.
- [3] 汤玲, 贺欢, 孔芬, 等. 草莓组织培养研究综述[J]. 甘肃农业科技, 2017(9): 68-71.
- [4] 谭永军, 王际轩, 魏永祥, 等. 草莓脱病毒及无病毒苗繁育[J]. 上海蔬菜, 2016(3): 72-74.
- [5] Torrico, A.K., Salazar, S.M., Kirschbaum, D.S., et al. (2018) Yield Losses of Asymptomatic Strawberry Plants Infected with Strawberry Mild Yellow Edge Virus. *European Journal of Plant Pathology*, **150**, 983-990. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1337-z>
- [6] 王峰. 草莓脱毒苗与常规苗田间性状比较试验[J]. 山西果树, 2016(2): 10-11.
- [7] 吴晓云, 高照全, 李志强, 等. 国内外草莓生产现状与发展趋势[J]. 北京农业职业学院学报, 2016, 30(2): 21-26.