

利用玻璃化超低温技术脱除草莓斑驳病毒(SMoV)的初步研究

盛宏亚 万继花 徐川 王红清*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 以携带草莓斑驳病毒(Strawberry mottle virus)的‘红颜’草莓为材料,通过对玻璃化超低温脱毒技术中各程序的优化,建立适合‘红颜’草莓的茎尖玻璃化超低温脱毒体系。结果表明:1~2 mm的茎尖在0.5 mol/L蔗糖的预培养基预培养3~7 d,室温装载处理60 min,0℃玻璃化处理180 min,液氮冷冻60 min,40℃解冻2 min,高糖溶液卸载20 min后接种到MS+2.0 mg/L 6-BA再生培养基上,成活率可达70%以上。再生培养60 d后,随机选取20株再生植株,利用RT-PCR技术检测草莓斑驳病毒的脱毒效果,脱毒率为100%。利用该体系可以克服传统茎尖脱毒受茎尖大小的限制(0.1~0.3 mm),并有效脱除草莓斑驳病毒。

关键词 草莓;超低温;脱毒;草莓斑驳病毒;病毒检测

中图分类号 S 668.4

文章编号 1007-4333(2016)03-0053-05

文献标志码 A

Preliminary study on elimination of Strawberry mottle virus (SMoV) from shoot tips by vitrification-cryopreservation treatment

SHENG Hong-ya, WAN Ji-hua, XU Chuan, WANG Hong-qing*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Strawberry can be infected by virus easily, which lead to yield and quality losses. ‘Benihoppe’ strawberry (Fragaria × ananassaDuch) infected with strawberry mottle virus was used as materials. By optimizing the parameters of vitrification-cryopreservation, appropriate cryopreserved detoxification of Benihoppe shoot tips was established. The results indicated: The shoot tips (1 – 2 mm) were pre-cultured on basic medium with 0.5 mol/L sucrose for 3 to 7 days, then the pre-cultured shoot tips were loaded for 60 min at 25℃ and vitrified for 180 min at 0℃, immersed in liquid nitrogen for 1h, and rewarmed in water for 2 min at 40℃. After uninstalling in high sugar solution for 20 min, the shoot tips were inoculated into regeneration medium. In the end, the percentage of survived shoot tips was more than 70%. Twenty regeneration plants were chosen to test the effect of SMoV elimination. The result showed that elimination rate of SMoV reached 100%.

Keywords strawberry; cryopreservation; virus elimination; Strawberry mottle virus; virus detection

草莓生产中多采用匍匐茎压埋分株无性繁殖方式扩繁,一旦感染病毒会世代相传,导致果实畸形、品质变劣、产量下降、植株生长缓慢等现象,严重时会造成品种严重退化^[1]。目前利用各种手段检测出的菌原体、病毒病和类病毒病等病害在全世界的草莓生产区内已经达到25种以上^[2]。草莓斑驳病毒(Strawberry mottle virus, SMoV)1937年由Harris^[3]首次在英格兰的风梨草莓上发现,主要症状为叶脉

失绿,小叶斑驳,叶片卷曲、叶柄短且弯曲。该病毒在我国发生率50%以上,是危害最严重的草莓病毒。

目前生产上常用的草莓脱毒方法为茎尖培养脱毒法,但该方法的脱毒率受剥离茎尖大小的限制,剥离茎尖越小脱毒率越高,但是再生率越低^[4],一般植株剥取茎尖为0.1~0.3 mm时才能取得较好的脱毒效果,因此,利用该方法面临一个剥取微茎尖的技术挑战^[5]。茎尖超低温脱毒(Cryotherapy of shoot

收稿日期:2015-04-22

基金项目:科技部科技支撑计划(213BAD201301);国家“863”计划(2013AA103002)

第一作者:盛宏亚,硕士研究生, E-mail:shredar2015@163.com

通讯作者:王红清,教授,主要从事果树栽培生理与分子生物学研究, E-mail:wanghq@cau.edu.cn

tips)是将茎尖置于液氮中进行短暂处理后脱除植物病原体的方法。Brison 等^[6]于 1997 年首次报道了超低温疗法脱除李痘病毒(Plum pox virus, PPV),之后超低温脱毒技术被用在了多种植物的脱毒上,并取得了很好的效果^[7-9]。研究表明:该技术不仅脱毒效果好,而且对茎尖大小要求不高,可以克服茎尖培养脱毒的技术难题^[10-12]。截至目前,该技术已成功用于脱除包括马铃薯、甘薯、柑橘、李、葡萄、香蕉、树莓和大蒜等植物在内的多种病原体,如病毒、支原体和细菌^[13-17]。茎尖超低温脱毒被认为是脱除植物病毒最有效的方法,为脱毒苗生产开辟了一条崭新的途径^[19-20]。但该技术在草莓脱毒上研究较少,且尚未建成完善的技术体系。本研究以带病草莓茎尖为材料,通过对超低温脱毒各程序的优化,建立适应草莓的超低温脱毒体系,以期对草莓无毒苗的生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

以‘红颜’草莓为材料,取自北京市昌平区兴寿草莓园,根据 Yoshikawa 等^[21]描述的草莓斑驳病症状,在田间寻找小叶斑驳、叶片卷曲、叶柄短且弯曲的植株。根据 GeneBank 登录的 SMoV 病毒的外壳蛋白序列和线粒体 NADH 脱氢酶基因 ND2 亚基(*ndhB*)基因序列设计引物,SMoV 的引物为: S-F (5'-3'): TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG; S-R(5'-3'): TCTTGGGCTTGGATCGTCACCTG。内标 *ndhB* 基因的引物为: N-F (5'-3') GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC, N-R(5'-3') AGCAATGAGATTCCCAATATCAT; 随机采取具有草莓斑驳症状的草莓叶片,利用 RT-PCR 技术检测该园区草莓 SMoV 病毒携带率为 70%,用以上材料的草莓匍匐茎作为脱毒材料。

1.2 方法

选用 PVS2 溶液作为玻璃化溶液,在传统玻璃化超低温脱毒技术上做了一些改进,简化了操作流程。具体如下:

1.2.1 预培养蔗糖浓度

取草莓匍匐茎 2~3 cm,经消毒处理后剥取 1~2 mm 的茎尖分别接种在蔗糖浓度为 0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 mol/L 的 MS 培养基中,25℃暗培养 3 d,装载液(2 mol/L 甘油+0.75 mol/L 蔗糖+MS)处理 60 min、PVS2 溶液(30%甘油+15%乙二醇+15%DMSO+0.4 mol/L 蔗糖+MS)玻璃化处

理 120 min,之后超低温处理 1 h,卸载液(1.2 mol/L 蔗糖+MS)处理 20 min,干燥后接种在 MS+2.0 mg/L 6-BA 再生培养基上,暗培养 3 d 后转入正常光照培养,30 d 后统计成活率。每个处理 50 个茎尖,重复 3 次。

1.2.2 预培养时间

将 1~2 mm 的茎尖放在 0.5 mol/L 的蔗糖培养基上预培养,25℃黑暗条件下分别预培养 3、5、7、9 和 11 d,装载液处理 60 min、PVS2 溶液化处理 120 min,之后操作同 1.2.1。每个处理 30 个茎尖,重复 3 次。

1.2.3 装载时间

将 1~2 mm 的茎尖在 0.5 mol/L 的蔗糖培养基预培养 3 d 后,分别用装载液处理 0、30、60、90 和 120 min,0℃条件下 PVS2 溶液脱水 120 min,之后操作同 1.2.1。每个处理 50 个茎尖,重复 3 次。

1.2.4 PVS2 处理时间

将 1~2 mm 的茎尖在 0.5 mol/L 的蔗糖培养基预培养 3 d,装载液处理 60 min 后,0℃条件下 PVS2 溶液处理 0、60、120、180 和 240 min,之后操作同 1.2.1。每个处理 50 个茎尖,重复 3 次。

1.2.5 茎尖大小

分别剥取 1~2 和 2~3 mm 的茎尖,在 0.5 mol/L 的蔗糖培养基预培养 3 d,装载液处理 60 min 后,0℃条件下 PVS2 溶液处理 120 min,之后操作同 1.2.1。每个处理 20 个茎尖,重复 3 次。

1.2.6 再生苗 SMoV 的 RT-PCR 病毒检测

再生培养 60 d 后,随机选取 20 株再生植株,提取叶片总 RNA,反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板扩增内标基因 *ndhB* 和草莓斑驳病毒 SMoV 基因,扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析。对照组为带病的阳性植株。

2 结果与分析

2.1 茎尖大小对再生成活率影响

如图 1 所示,1~2 和 2~3 mm 茎尖经过超低温处理后再生培养 30 d 后,成活率分别为 77%和 60%,污染数分别为 4 和 5,成活数分别为 41 和 33。试验结果表明:茎尖大小对超低温处理后的茎尖再生能力有一定影响,1~2 mm 的茎尖,再生能力较强,恢复生长快;2~3 mm 的茎尖超低温处理后,茎尖再生能力较弱,恢复生长所需时间长。

2.2 预培养蔗糖浓度对再生成活率影响

如图 2 所示,未经高糖培养基(普通 MS 培养

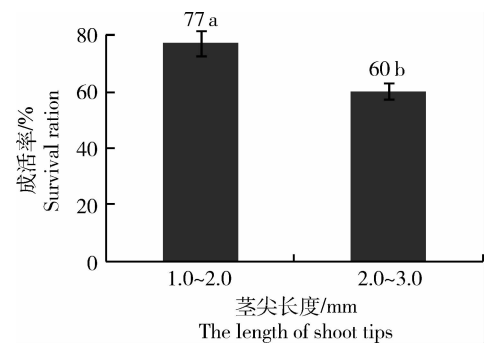


图 1 茎尖长度对成活率的影响

Fig. 1 The effect of the length of shoot tips on survival ratio of strawberry during cryopreservation

基)预培养的茎尖成活率较低,仅为 52%。随着蔗糖浓度的升高,成活率逐渐升高,蔗糖浓度 0.3~0.5 mol/L 时茎尖成活率最高。0.5 mol/L 以上时随浓度升高茎尖超低温成活率显著下降,当蔗糖浓度达 0.9 mol/L 时,成活率仅 38%,说明预培养是超低温脱毒技术的重要步骤,过高的蔗糖浓度会对茎尖造成伤害,蔗糖浓度 0.3~0.5 mol/L 时预培养效果最好,能获得 70% 以上的成活率。

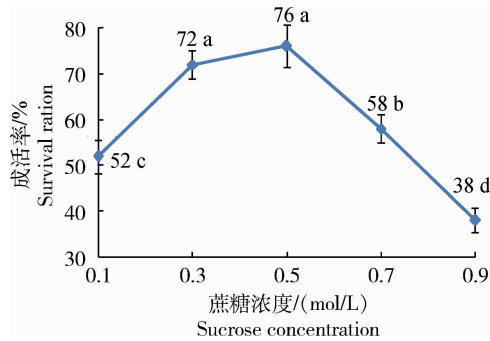


图 2 不同蔗糖浓度的预培养对草莓茎尖存活率的影响

Fig. 2 The effect of different sucrose concentration on survival ratio of strawberry shoot tips during cryopreservation

2.3 预培养时间对再生成活率的影响

如图 3 所示,预培养时间 3~7 d,超低温再生成活率均在 70% 以上。随着预培养时间的延长,再生成活率逐渐降低,预培养 11 d 时成活率仅 58%,说明在茎尖高糖培养基上预培养时间过长,对细胞造成伤害,成活率下降,预培养最佳时间为 3~7 d。

2.4 装载时间对再生成活率的影响

如图 4 所示,未经过装载液处理的茎尖成活率较低,仅为 29%,随着装载时间的延长,茎尖再生成活率逐渐增高,装载 60 min 时茎尖成活率最高,达

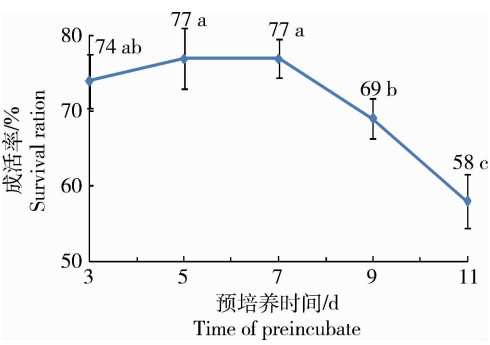


图 3 预培养时间对再生成活率的影响

Fig. 3 The effect of different time of pre-incubation on survival ratio of strawberry shoot tips during cryopreservation

到 78%。之后,成活率呈下降趋势。说明了装载处理是超低温脱毒技术的重要步骤,一定时间的装载处理能提高超低温处理后的再生成活率,但处理时间过长会对细胞造成伤害,降低成活率。

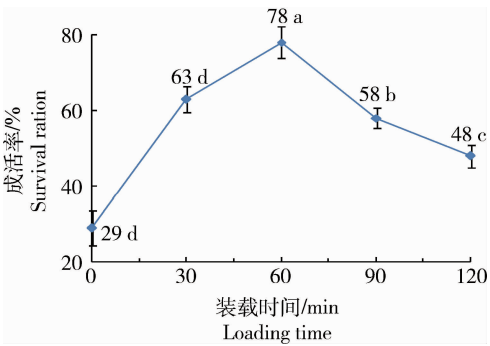


图 4 装载时间对草莓茎尖再生成活率的影响纵坐标

Fig. 4 The effect of different loaded time during cryopreservation

2.5 玻璃化时间对再生成活率的影响

如图 5 所示,未经过 PVS2 溶液玻璃化处理的

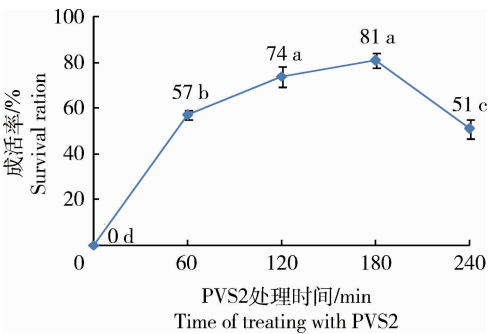
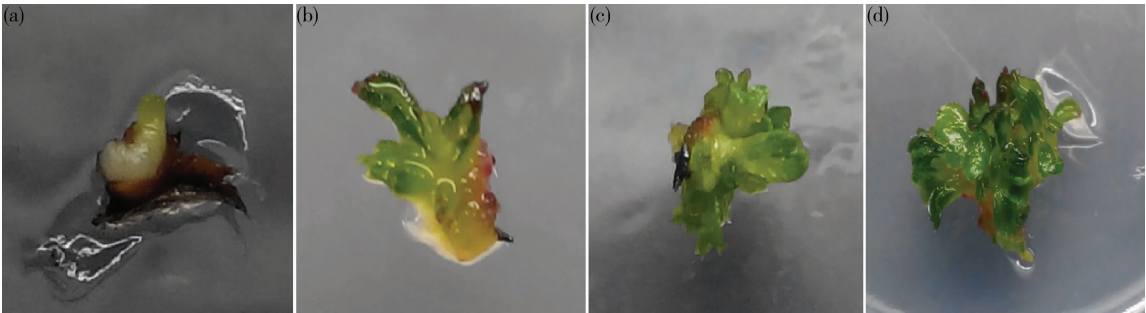


图 5 PVS2 处理时间对草莓茎尖再生成活率的影响

Fig. 5 The effect of different vitrification time on survival ratio of strawberry shoot tips during cryopreservation

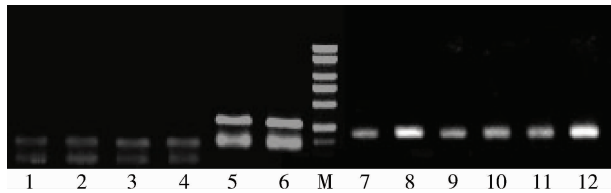
茎尖经过超低温处理后再生成活率为 0,随着玻璃化处理时间的延长成活率呈先上升后下降趋势,并在 180 min 时达到最高,成活率为 80%。说明 PVS2 溶液对茎尖的玻璃化处理是超低温脱毒的必要环节,玻璃化处理 120~180 min 时效果较好,再生成活率在 70%以上。



(a)~(d)分别为再生培养 15、30、45、60 d 的再生苗形态。
(a)–(d) respectively represent the morphology of regeneration plant after subculturing 15,30,45 and 60 d.

图 6 超低温处理后茎尖再生过程

Fig. 6 Observation of regeneration plant after cryopreservation



M 为 Marker;1~4 为超低温再生植株 SMoV 检测;5~6 为阳性对照 SMoV 检测,7~12 为 *ndhB* 内标基因检测。

M, DNA Marker; 1–4, detection of SMoV in regenerated plants from cryopreserved shoot tips; 5–6, detection of SMoV in positive control, 7–12, detection of internal control gene *ndhB* by RT-PCR

图 7 再生植株 SMoV 的 RT-PCR 病毒检测

Fig. 7 Detection of SMoV by RT-PCR

2.7 SMoV 脱毒效果检测

再生培养 60 d 后随机选取 20 株再生植株,利用 RT-PCR 技术检测脱毒效果(图 7)。内标基因 *ndhB* 的 RT-PCR 检测结果显示在 188 bp 位置有清晰条带,说明反 cDNA 质量和完整性良好。草莓斑驳病毒的 RT-PCR 检测结果显示在随机选取的 20 株植株中,均为阴性,脱毒率为 100%。

3 讨论

SMoV 是我国发病率极高的草莓病毒病的病原体,且该病毒为蚜虫传播,一旦感病极易传播。本研究在选择采样地点时,随机采取草莓叶片,利用 RT-PCR 技术检测该病毒的发病情况,选取发病率在

2.6 超低温再生过程观察

将超低温处理后的茎尖放在再生培养基上培养,每隔 15 d 观察再生植株生长情况,发现再生培养 15 d 后茎尖分生组织分化出嫩绿新芽,突破外部冷冻后变褐的表皮;再生培养 30 d 后,分化出的芽已经长出 3、4 片嫩叶,60 d 后再生苗已经成长为 2 cm 的再生植株(图 6)。

70%以上的园区作为采样地点,由于取样量大,能够保证所采样品的带病率。

玻璃化法超低温种质保存成功的关键是如何提高保存材料的耐脱水能力以及克服对高浓度的玻璃化保护液的敏感性^[18-19]。在玻璃化超低温中,通常采取预培养来减少细胞内自由水的含量,增加细胞的抗寒力。在培养基中添加蔗糖有利于细胞膜在严重脱水的情况下保持稳定^[22]。本研究发现在预培养蔗糖浓度为 0.1 mol/L 的 MS 培养基上处理的茎尖成活率仅为 52%,进一步证明了高糖预培养是超低温保存过程中的重要步骤。但是,在预培养时间上,本研究的最佳时间要短于蔡斌华等^[24]报道,经分析认为,本试验去除了预培养前的低温驯化步骤,简化了超低温冷冻的程序。大部分的前人报道中,在用高浓度蔗糖预培养之前,试管苗都要先需要经过一段时间的低温炼苗过程。低温炼苗被证明可以提高茎尖的抗冷冻能力^[22-23],因此未经低温驯化的材料需要的预培养时间可能更长一些。此外,前人研究的材料均为经继代培养后的试管苗,而本研究的植物材料为大田采取的匍匐茎的茎尖,由于通过继代培养可以提高细胞分裂与分化的同步化频率,茎尖分生组织细胞更多,需要的预培养时间更短。

研究表明,相比传统的茎尖培养脱毒方法,超低温脱毒技术对茎尖大小的要求不严格,这不仅克服

了茎尖剥离带来的技术难题,而且解决了茎尖大小与成活率和脱毒率之间的矛盾。该方法突破了传统的微茎尖脱毒的难关,为草莓生产高效快速脱毒带来了新的尝试。

参 考 文 献

- [1] 周厚成,何水涛. 草莓病毒病研究进展[J]. 果树学报,2003,20(5):421-426
- [2] 周厚成,何水涛. 草莓病毒病研究进展[J]. 果树学报,2003,20(5):421-426 (in Chinese)
- [2] 王国平,刘福昌,国际翔. 我国草莓主栽区病毒种类的鉴定[J]. 植物病理学报,1991,21(1):9-14
- [3] Wang G P, Liu F C, Guo J X. Strawberry cold-resistance area virus types of appraisal in China[J]. *Acta Phytologica Sinica*, 1991, 2(1): 9-14 (in Chinese)
- [3] Harris H. An investigation of strawberry virus disease in Ontario[J]. *Canadian Journal Research Section Cell Botany Science*, 1937, 15: 252-280
- [4] Faccioli G, Marani F. *Plant Virus Diseases Control* [M]. Sao Paulo City: American Phytopathological Society (APS) Press, 1998: 346-380
- [5] Yi J Y, Lee G A, Jeong J W. Eliminating *Potato virus Y* (PVY) and *Potato leaf roll virus* (PLRV) using cryotherapy of in vitro-grown potato shoot tips[J]. *Korean Journal of Crop Science*, 2014, 59(4): 498-504
- [6] Brison M, De Boucaud M T, Pierronnet A. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus[J]. *Plant Science*, 1997, 123(2): 189-196
- [7] 赵艳华,吴雅琴,程和禾,李春敏,陈晓玲,卢新雄. 李离体茎尖的超低温保存[J]. 园艺学报,2008,35(3):423-426
- [8] Zhao Y H, Wu Y Q, Cheng H H, Li C M, Chen X L, Lu X X. Cryopreservation of shoot tips from *Prunus* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(3): 423-426 (in Chinese)
- [8] Feng C H, Wang R R, Li J W, Wang B, Yin Z F, Cui Z H, Li B Q, Bi W L, Zhang Z B, Li M F. Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of in vitro-grown shoot tips[J]. *Methods in molecular biology*, 2013, 11013: 463-82
- [9] Wang Q, Valkonen J P T. Cryotherapy of shoot tips: Novel pathogen eradication method[J]. *Trends Plant Science*, 2009, 14: 119-122
- [10] Wang Q, Panis B, Engelmann F, Lambardi M, Valkonen J P T. Cryotherapy of shoot tips: A technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation[J]. *Annals of Applied Biology*, 2009, 154: 351-363
- [11] Bayati S, Shams-Bakhsh M, Moieni A. Elimination of Grapevine virus a (GVA) by cryotherapy and electrotherapy [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 13(3): 443-450
- [12] Feng C H, Yin Z F, Ma Y L. Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(1): 84-93
- [13] Wang Q, Valkonen J P T. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips[J]. *Plant Pathology*, 2008, 57(2): 338-347
- [14] Ding F, Jin S X, Hong N, Zhang Y, Cao Q, Yi G J, Wang G P. Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen from in vitro adult shoot tips[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(2): 241-250
- [15] Brison M, Boucaud M T, Pierronnet A, Dosba F. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus[J]. *Plant Science*, 1997, 123(2): 189-196
- [16] Wang Q, Munir M, Li P, Gafny R, Sela L, Tanne E. Elimination of *Grapevine virus A* (GVA) by cryopreservation of in vitro grown shoot tips of *Vitis vinifera* L[J]. *Plant Science*, 2003, 165(2): 321-327
- [17] Helliot B, Panis B, Poumay Y, Swennen R, Lepoivre P, Frison E. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 20(12): 1117-1122
- [18] 卢利平,艾鹏飞. 冬凌草试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(35): 11394-11395
- [19] Lu L P, Ai P F. Study on cryopreservation and plant regeneration of in vitro shoot-tips of *Rabdosia rubescens* Shar by vitrification[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2007, 35(35): 11394-11395 (in Chinese)
- [19] Hirai D, Sakai A. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification [J]. *Potato Research*, 1999, 42(2): 153-160
- [20] 梁宏,王起华. 植物种质的玻璃化超低温保存[J]. 细胞生物学杂志, 2005, (27): 43-45
- [21] Liang H, Wang Q H. Plant germplasm vitrification cryopreservation [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2005, 27: 43-45 (in Chinese)
- [21] Yoshikawa N, Converse R H. Purification and some properties of strawberry mottle virus[J]. *Annals of Applied Biology*, 1991, 118(3): 565-576
- [22] Niino T, Sakai A, Enomoto S. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification[J]. *Cryo Letters*, 1992, 13(5): 303-312
- [23] Kushnarenko S V, Romadanova N V, Reed B M. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips[J]. *Cryo letters*, 2009, 30(1): 47-54
- [24] 蔡斌华,张计育,渠镇春,高志红,乔玉山,章镇,朱峰. 通过玻璃化超低温处理脱除草莓轻型黄边病毒(SMYEV)研究[J]. 果树学报, 2008, 25(6): 872-876
- [25] Cai B H, Zhang J Y, Qu S C, Gao Z H, Qiao Y S, Zhang Z, Zhu F. Preliminary study on elimination of mild yellow-edge virus from in vitro shoot tips meiyou strawberry cultivar by vitrification-cryopreservation treatment[J]. *Journal of Fruit Science*, 2008, 25(6): 872-876 (in Chinese)