

doi:10.11937/bfyy.20221914

草莓组培苗的病毒检测与其果实品质分析

王建辉, 徐 瑞, 龚晓源, 李 翔, 刘达玉, 张 峯

(成都大学 食品与生物工程学院, 四川 成都 610106)

摘 要:以 2 种不同大小的草莓茎尖分生组织为试材, 进行组织培养, 分别获得再生小植株并进行病毒检测, 利用上述脱毒母株和农家自留种苗分别繁育匍匐茎子苗, 研究了 2 种子苗的病毒发生率与果实品质, 以期通过草莓脱毒试验为脱毒苗的应用推广提供参考依据。结果表明: 不同草莓品种的病毒含量有差异, 并且病毒外壳蛋白表达量与其核酸转录量一致。切取草莓匍匐茎约 5 mm 茎尖分生组织进行第一次脱毒, 其部分再生小植株仍然携带了低浓度病毒。与之相比, 再切取试管苗约 0.5 mm 茎尖组织进行第二次脱毒, 其再生率虽然仅为 31%, 但是二次脱毒株均为无毒苗。利用已鉴定的脱毒母株和农家自留种苗分别繁育匍匐茎子苗, 经过定植后发现 2 种子苗的病毒病发生率差异极显著。二次脱毒母株繁育的子苗果实可滴定酸含量显著低于农家自留种苗($P < 0.05$), 而可溶性总糖等品质参数差异不显著。综上所述, 以 0.5 mm 茎尖分生组织为外植体进行草莓组织培养, 可以获得优质的脱毒母株, 相关研究成果有助于未来草莓良繁体系建设。

关键词:草莓; 草莓轻型黄边病毒; 实时荧光定量 PCR; 组织培养

中图分类号: S 668.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2023)02-0001-09

草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.) 是蔷薇科草莓属多年生草本植物, 世界草莓总产量在浆果类水果中已经跃居第 2 位。2020 年我国栽培总面积已经突破 17.87 万 hm^2 , 预计总产量超 500 万 t, 总产值近 1 000 亿元, 成为世界第一大草莓生产国。草莓果实富含花青苷、多酚、叶酸和抗氧化活性成分^[1], 深受消费者喜爱。目前已报道了 30 多种病毒、植原体等病原体可以侵染草莓宿主, 其中包括 21 种病毒病^[2]。一种或者多种病毒复合感染草莓, 通常不会诱导植株产生明显且特异的田间症状, 所以仅通过感染宿主的典型症状进行草莓病毒病的田间调查, 其病毒病检出率

是低效和不准确的。目前产业上利用匍匐茎繁育子苗, 进行商业化草莓种苗生产。这种无性繁殖子苗的方法, 通常会造成子苗不可避免地由母株上感染各种病原微生物, 从而影响子苗当季的产量与品质^[3]。

草莓轻型黄边病毒(SMYEV)是一种分布较广、危害最严重的 RNA 病毒。SMYEV 侵染性克隆接种森林草莓(*Fragaria vesca*), 诱导宿主产生黄化与极度矮化的症状^[4]。目前在草莓属(*Fragaria*)种质中, 还未发现具有 SMYEV 抗性的品种或者野生资源。蚜虫(*Chaetosiphon* spp)是一种 SMYEV 的主要传播宿主, 可以持久性传播病毒。多年、多点试验表明, 经蚜虫传播的 SMYEV 发生率在 4%~35%, 流行率在 60%~100%, 这主要依赖于采样时间和采样地点^[5]。因此只有种植优质脱毒种苗, 才是解决草莓病毒病流行的最佳方法。

SMYEV 是第一个完成测序的草莓病毒^[6], 其属于弯曲病毒科(Flexiviridae)马铃薯 X 病毒

第一作者简介:王建辉(1978-), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 现主要从事经济栽培与精深加工等研究工作。
E-mail: Kevin_wangjh@126.com.

基金项目:四川省重点研发资助项目(2021YFQ0072); 成都大学引进人才科研启动资助项目(2021BSJJ01)。

收稿日期:2022-05-09

属(*Potexvirus*),具有5个开放阅读框的单链正义RNA病毒。草莓病毒病检测常用指示植物嫁接法。目前第三代转录组测序技术与生物信息技术的高速发展,已经改变了病毒病鉴定的传统策略^[7]。草莓组织中含有大量次生代谢产物,如单宁、多酚和多糖等,可能会影响反转录或者聚合链式反应^[8]。目前已研发了多重PCR技术^[9]和TaqMan探针技术^[10]等对草莓病毒进行核酸检测。荧光定量PCR扩增检测灵敏度是普通PCR的100倍,已在卫生疾控领域得到了广泛应用。2022年3月《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)》指出病毒目的基因的荧光扩增曲线Ct(Cp)值 ≥ 35 ,即为病毒阴性样本。

冷冻疗法、分生组织培养和热疗法是作物脱毒的经典技术。草莓茎尖、侧芽与根尖的分生组织中病毒滴度较低。因此利用分生组织培养,能够脱除感染的细菌、真菌和病毒。适用于栽培种(*Fragria* \times *ananassa*)与野生种(*Fragria vesca*)的组培快繁技术,获得了较高的草莓体胚发生率和试管苗重生率^[11]。越幼嫩的分生组织诱导的重生试管苗,可以繁殖更多的匍匐茎子苗^[12]。培养基富含植物生长激素促进腋芽生理分化,所以产生了更多的匍匐茎^[13]。目前还未报道草莓脱毒种苗进行病毒病的荧光定量PCR检测研究,脱毒子苗的果实品质研究也鲜有报道。该研究利用荧光定量PCR技术进行脱毒种苗的SMYEV检测,比较分析了脱毒母株匍匐茎子苗与未经病毒检测的普通子苗的果实品质,以期对草莓无病毒种苗的应用推广提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为成都天府新区三星镇草莓试验基地采集‘丰香’‘红颜’‘章姬’‘宝交早生’等不同品种的嫩叶,带回实验室立即冻存于超低温冰箱,分别利用酶联免疫法、核酸常规扩增法检测草莓轻型黄边病毒(SMYEV)。该研究用获得脱毒种苗与未经病毒检测的农家自留种苗分别进行各自匍匐茎繁育子苗,2种类型‘丰香’子苗各100株,以株距25 cm,行距25 cm定植于三星镇草莓试验基地的小拱棚内,进行病毒病发生率调查与果实

品质分析。

1.2 试验方法

采集草莓匍匐茎并用湿润报纸包裹后带回实验室。在超净工作台上,75%医用乙醇灭菌1 min,再用灭菌水洗涤3次,每次1 min。置于灭菌滤纸上,吸收多余水分。0.1%升汞灭菌3 min,再用灭菌水洗涤3次,每次1 min。置于灭菌滤纸上,吸收多余水分。解剖镜下取匍匐茎中约5 mm的茎尖分生组织,置于不定芽诱导培养基中(MS+6BA 2 mg \cdot L⁻¹),诱导产生愈伤组织,并分化产生不定芽,进行第1次脱毒。当丛生状不定芽长至2~3 cm,切下转至增殖培养基(MS+6BA 0.5 mg \cdot L⁻¹)进行快繁。大量不定芽转移至生根培养基(1/2MS)培养至长成试管苗。以上述试管苗为材料,取其茎尖约0.5 mm分生组织,共计57个分生组织为外植体,诱导分化不定芽,进行第2次脱毒。采用荧光定量扩增法,对不同脱毒材料进行病毒检测。

获得上述脱毒‘丰香’试管苗,经过炼苗后定植于营养杯,再利用其匍匐茎繁育子苗。以未经病毒检测的农家自留种苗的匍匐茎繁育的子苗作对照,2种类型的子苗各100株,定植于小拱棚内进行促成栽培。利用多重PCR扩增法分别检测45株脱毒母株繁育子苗和39株农家自留种苗繁育子苗的SMYEV发生率。分别采收2种类型子苗的果实进行果实品质分析。

1.3 项目测定

草莓病毒血清学检测:参考酶联免疫试剂盒说明书(Adgen,英国),双抗夹心法开展轻型黄边病毒(SMYEV)的血清学检测。取200 μ L的待测叶片总蛋白提取物转移至96孔板。试剂盒提供健康和病毒感染组织材料分别作为阴性和阳性对照。使用酶标仪(BIO-TEK,美国)测定吸收光值(OD_{405nm})。待测样本405 nm吸光度值是阴性对照平均值3倍以上,则认为是SMYEV感染阳性植株。

草莓病毒常规扩增:SMYEV外壳蛋白基因(*cp*)或者草莓内参基因(*actin*)扩增体系:cDNA 2.0 μ L、Buffer 2.5 μ L、MgCl₂ 2.0 μ L、上游引物 0.5 μ L(FA*actin*-F1 或者 SMYEV-CP1)(表1)、下游引物 0.5 μ L(FA*actin*-R1 或者 SMYEV-

CP2)、*Taq* 聚合酶 0.5 μ L、dNTP 0.5 μ L、ddH₂O 16.5 μ L。PCR(Eppendorf,德国)扩增程序包括:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、64 $^{\circ}$ C 复性 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,共计 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。2%琼脂糖水平电泳后,凝胶成像仪照相记录(BIO-RAD,美国)。

草莓病毒多重扩增:cDNA 2.0 μ L、Buffer 2.5 μ L、MgCl₂ 2.0 μ L、FA*actin*-F1 上游引物 0.5 μ L(表 1)、FA*actin*-R1 下游引物 0.5 μ L、SMYEV-CP1 上游引物 0.25 μ L、SMYEV-CP2 下游引物 0.25 μ L、*Taq* 聚合酶 0.5 μ L、dNTP 0.5 μ L、ddH₂O 16 μ L。PCR(Eppendorf,德国)扩增程序包括:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、60 $^{\circ}$ C 复性 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,共计 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。2%琼脂糖水平电泳后,凝胶成像仪照相记录(BIO-RAD,美国)。

草莓病毒荧光定量扩增:SYBR 10 μ L (Roche,瑞士)、SMYEVcp-F3 0.18 μ L(表 1)、

SMYEVcp-R6 0.18 μ L(表 1)、cDNA 模板 2 μ L、灭菌超纯水 7.64 μ L。Real time PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s、57 $^{\circ}$ C 复性 10 s、72 $^{\circ}$ C 复性 15 s(收集荧光信号),35 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 1 s、60 $^{\circ}$ C 复性 1 s、95 $^{\circ}$ C 持续收集荧光信号;40 $^{\circ}$ C 保存 30 s。Light Cycler®480 软件分析高分辨率熔解曲线(Roche,瑞士),病毒目的基因的扩增曲线 Cp 值 \geq 35 认为无毒苗。

果实品质分析:脱毒母株繁育和农家自留种苗繁育的 2 种类型子苗分别定植于小拱棚内。分别采收不同子苗的果实进行果实品质检测。参考文献[14]方法,使用 NaOH 滴定法检测果汁中可滴定酸含量。使用手持式糖度计测定可溶性固形物含量(PAL-1,ATAGO,日本)。采用斐林试剂滴定法测定果汁可溶性总糖含量。使用色度计(Miniscan EZ, HunterLab,美国)测定果皮红色值(a*)。利用数显果实硬度计测量果实硬度值(GY-4,托普,浙江)。

表 1 扩增引物的核酸序列
Table 1 Pairs of primers used in this study

目标基因 Target gene	引物编号 Primer number	引物序列 Sequence(5'-3')	扩增片段 Amplicon/bp
草莓内参基因 <i>actin-1</i>	FA <i>actin</i> -F1	GTATGGTCAAGGCTGGGTTTGCTGG	126
	FA <i>actin</i> -R1	CGTCACCGACATAAGCATCTTTCTG	
SMYEV(外壳蛋白基因)	SMYEV-CP1	AATGGGCTCTACACCGCCGGTCTTG	378
普通 PCR	SMYEV-CP2	TTCCAGACGCTTGGGGCGTAGAACA	
SMYEV(外壳蛋白基因)	SMYEVcp-F3	CGCTGCTGCCAGTAATAAAGG	145
Real time PCR	SMYEVcp-R6	CGAGGGCGAGGAACCAAT	

1.4 数据分析

使用 Excel 2010 软件进行数据处理,利用 SPSS 25.0 软件分析数据。采用 ANOVA 检验最小显著差数法(LSD)进行统计学的显著性分析。

2 结果与分析

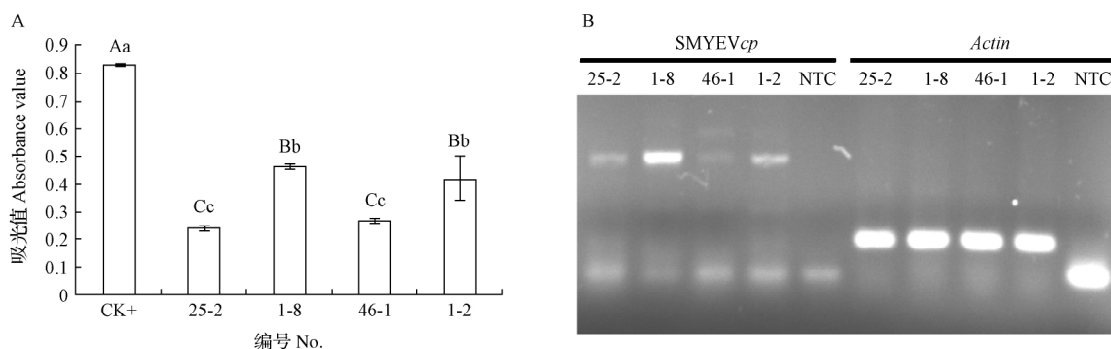
2.1 草莓感染不同浓度的病毒

2 种检测方法表明‘丰香’‘红颜’‘章姬’‘宝交早生’均被 SMYEV 感染,但是不同植株中病毒浓度不同。‘红颜’病毒外壳蛋白在 OD_{405nm} 处的吸光度值约 0.45(图 1),显著高于其它品种(P<0.05)。而‘丰香’和‘章姬’的病毒蛋白表达

量显著低于其它品种(P<0.05)。此外核酸扩增结果也表明‘红颜’中病毒外壳蛋白基因(cp)的转录量也相对高于其它品种(378 bp),而所有品种的植株内参基因(*actin*)转录量在品种之间没有明显差异(126 bp)。(‘红颜’感染病毒的外壳蛋白表达量与其核酸转录量一致,并且显著高于其它品种。宿主中病毒含量差异也许和品种抗病性与采样部位有关。

2.2 茎类组织进行草莓脱毒

解剖镜下剥取田间采集的匍匐茎约 5 mm 的茎尖分生组织为外植体,置于不定芽诱导培养基中培养(图 2A)。愈伤组织诱导不定芽产生(图 2B)。丛生状的不定芽长至 2~3 cm,切下转至增殖培养基(图 2C~D)。不定芽在生根培养

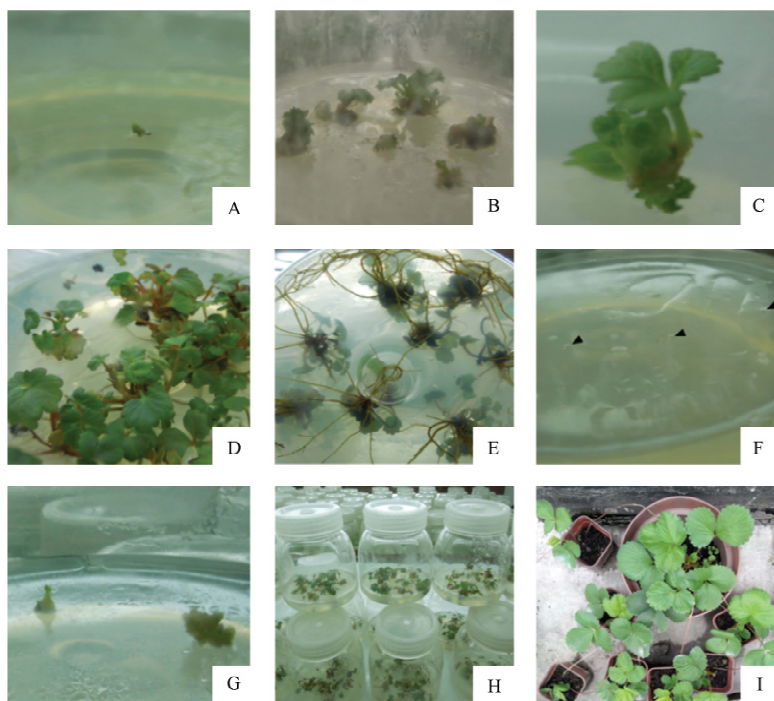


注: A. 酶联免疫法测量宿主体内的病毒蛋白吸收光值; B. 常规 PCR 扩增法检测病毒基因的相对转录量。CK+、25-2、1-8、46-1、1-2 和 NTC 分别代表: 病毒阳性对照、‘丰香’、‘红颜’、‘章姬’、‘宝交早生’和清水对照。

Note: A. absorbance values for virus coat protein concentrations between different cultivars using spectrophotometry; B. the relative expression levels of *coat protein* and *actin* between different cultivars using conventional PCR. CK+, 25-2, 1-8, 46-1, 1-2 and NTC represent virus-infected as positive control, ‘Toyonoka’, ‘Benihoppe’, ‘Akihime’, ‘Hokowase’ and water as negative control.

图 1 2 种检测方法进行草莓病毒检测

Fig 1 Two detection techniques on different SMYEV-infected cultivars



注: A. 匍匐茎尖约 5 mm 分生组织; B. 诱导形成愈伤组织; C. 分化形成不定芽; D. 不定芽快繁; E. 诱导生根获得一次脱毒试管苗; F. 试管苗茎尖约 0.5 mm 分生组织; G. 诱导形成愈伤组织; H. 试管苗快繁; I. 二次脱毒母株利用其匍匐茎繁育子苗。

Note: A. meristem tissues with size of 5 mm in shoot tip from stolon; B. callus induction in culture medium; C. adventitious buds formation; D. adventitious buds to micro-propagation; E. roots induction of the first round of virus-elimination *in vitro* plantlets; F. meristem tissues with size of 0.5 mm in shoot tip from *in vitro* plantlet; G. callus induction; H. adventitious buds to micro-propagation; I. daughter plants propagated from the second of virus-eliminated mother plants.

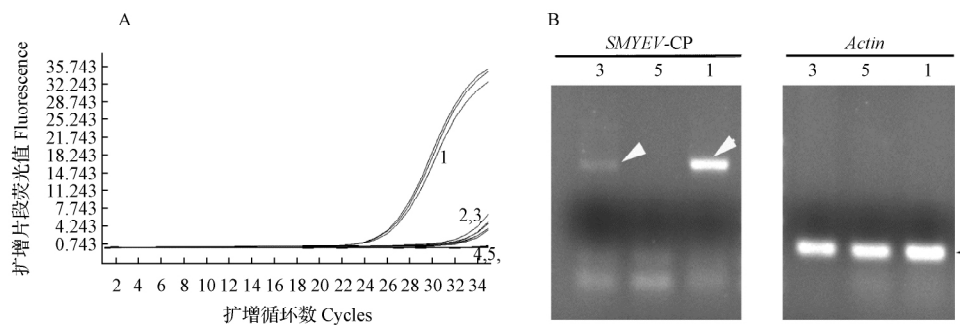
图 2 利用茎尖分生组织生产脱毒苗

Fig 2 Meristem tissues culture to regenerate virus-eliminated seedlings

基中诱导生根(图 2E),一次脱毒试管苗再生率接近 100%。解剖镜下剥取上述试管苗中约 0.5 mm 茎尖分生组织为外植体,共计 57 个外植体接种于不定芽诱导培养基,诱导产生胚性愈伤组织(图 2G)。愈伤组织诱导分化不定芽,共计获得 18 株二次脱毒重生苗(31%的重生率)。平均每株具有 4.5 根,根茎粗 2 mm(图 2H)。二次脱毒母株移栽至灭菌基质中,利用其匍匐茎大量繁育子苗(图 2I)。

利用‘红颜’和‘丰香’匍匐茎中较大茎尖分生组织(约 5 mm)经过第一次脱毒的试管苗(TD-HY和 TD-FX),荧光定量 PCR 扩增的病毒外壳蛋白基因的扩增曲线 $C_p=30$ (图 3A),结果表明 5 mm 茎尖组织为外植体,部分重生苗依然

感染了微量 SMYEV。这可能与第一次剖取的外植体体积较大有关(仍然含有微量的病毒粒子),造成了部分重生苗携带了低浓度病毒。同时 SMYEV 感染阳性对照植株(3-1 号) $C_p=26.53$ 。与之相比较,利用上述试管苗的较小茎尖组织(约 0.5 mm)经过第二次脱毒,获得重生苗(9-1-1 和 9-1-2 样本)成功脱毒($C_p \geq 35$)。另外普通 PCR 扩增结果表明阳性对照样本(3-1 号)中病毒目的基因(*coat protein gene*)的转录量高,第一次脱毒重生苗(TD-FX 样本)仍然感染了微量 SMYEV,但是二次脱毒试管苗(起源于较小的外植体)则无扩增目标条带(图 3B),这与荧光定量 PCR 结果一致。



注:A. 荧光定量 PCR 检测 6 个样本中病毒基因的扩增曲线;B. 普通 PCR 分别扩增其中 3 个样本的病毒基因 *cp* 和宿主内参基因 *actin*。1、2、3、4、5 和 6 分别代表 3-1 病毒感染植株正对照、一次脱毒试管苗 TD-HY、一次脱毒试管苗 TD-FX、二次脱毒试管苗 9-1-1、二次脱毒试管苗 9-1-2 和清水负对照。

Note: A. amplification curve of virus gene in 6 plants by Real time PCR; B. conventional PCR amplified virus gene and reference genes among 3 plants. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 indicate 3-1 virus-infected plant as positive control, TD-HY from the first round of virus-eliminated *in vitro* plantlet, TD-FX from the first round of virus-eliminated *in vitro* plantlet, 9-1-1 from the second round of virus-eliminated *in vitro* plantlet, 9-1-2 from the second round of virus-eliminated *in vitro* plantlet and water negative control.

图 3 2 种类型的组培苗的病毒检测

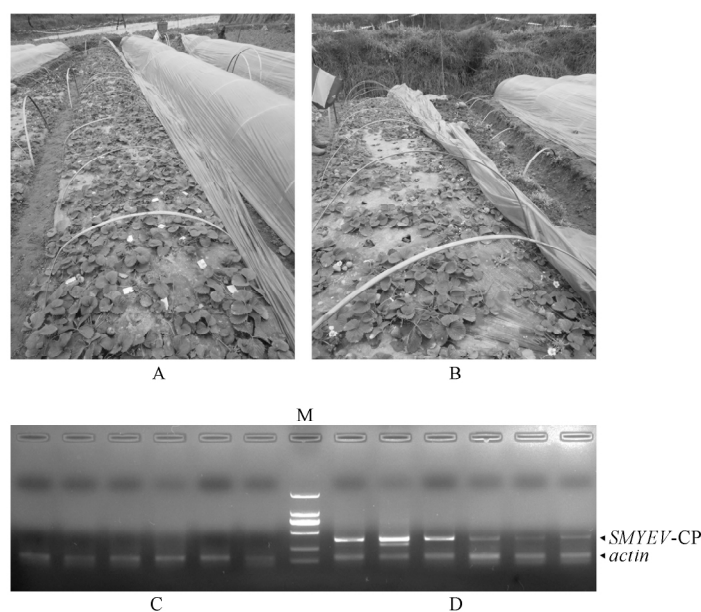
Fig. 3 Comparison on two types of *in vitro* plants based on PCR amplification technique

2.3 2 种类型子苗的果实品质分析

二次脱毒母株与农家自留种苗(作为对照)各自繁育了约 100 株匍匐茎子苗。利用小拱棚进行促成栽培,2015 年 9 月定植子苗,11 月采集叶片调查田间病毒病发生率(图 4A~B)。利用多重 PCR 技术检测了 39 株农家自留种苗繁育的子苗,同时扩增了 378 bp 病毒外壳蛋白基因片段与 126 bp 草莓内参基因片段(图 4D)。结果表明农家长期无性繁殖的种苗感染了 SMYEV 并感染给无性繁殖的后代,其子苗同时扩增了特异性的

病毒基因与宿主内参基因的核酸片段。39 株农家自留种苗的匍匐茎繁育子苗,有 33 株扩增出病毒基因片段,其病毒感染率达到 84.6%。与之相比较,45 株二次脱毒母株匍匐茎繁育的子苗中,仅检测出 4 个阳性植株,其病毒感染率仅为 8.9%。

二次脱毒母株的匍匐茎繁殖子苗与农家自留种苗的匍匐茎繁育子苗的果实品质进行比较分析(图 5)。脱毒母株子苗与自留种苗子苗的果皮色度值(a^*)分别为 35.19 与 35.32。脱毒母株子苗与自留种苗子苗的平均单果质量分别为 20.02 g



注:A.脱毒母株繁育的匍匐茎子苗定植图;B.农家自留种苗繁育的匍匐茎子苗定植图;C.脱毒母株繁育子苗的病毒多重PCR扩增;D.自留种苗繁育子苗的病毒多重PCR扩增。

Note: A. daughter plants in a plot propagated from virus-eliminated *in vitro* plants; B. daughter plants in a plot propagated from virus-undetermined mother plants from growers; C. multiplex PCR detection on the virus incidences for daughter plants from virus-free mother plants; D. multiplex PCR detection on the virus incidences for daughter plants from virus-undetermined mother plants.

图4 2种类型匍匐茎子苗的病毒发生率检测

Fig. 4 Comparison on virus incidences between two types of daughter plants by multiplex PCR technique

和 19.19 g。脱毒母株子苗与自留种苗子苗的果实硬度分别为 $0.93 \text{ kg} \cdot (0.5 \text{ cm}^2)^{-1}$ 与 $1.01 \text{ kg} \cdot (0.5 \text{ cm}^2)^{-1}$ 。脱毒母株子苗与自留种苗子苗的果实可溶性固形物分别为 11.2% 与 11.0%。脱毒母株子苗与自留种苗子苗的果实可滴定酸分别为 0.548% 与 0.596%。脱毒母株子苗与自留种苗子苗的果实总糖分别为 8.04% 与 8.22%。2 种类型子苗的果实之间的果皮红色值 a^* 、平均单果质量、可溶性固形物含量、可溶性总糖含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。但是二次脱毒母株匍匐茎繁育子苗的果实可滴定酸含量显著低于农家自留种苗 ($P < 0.05$)。

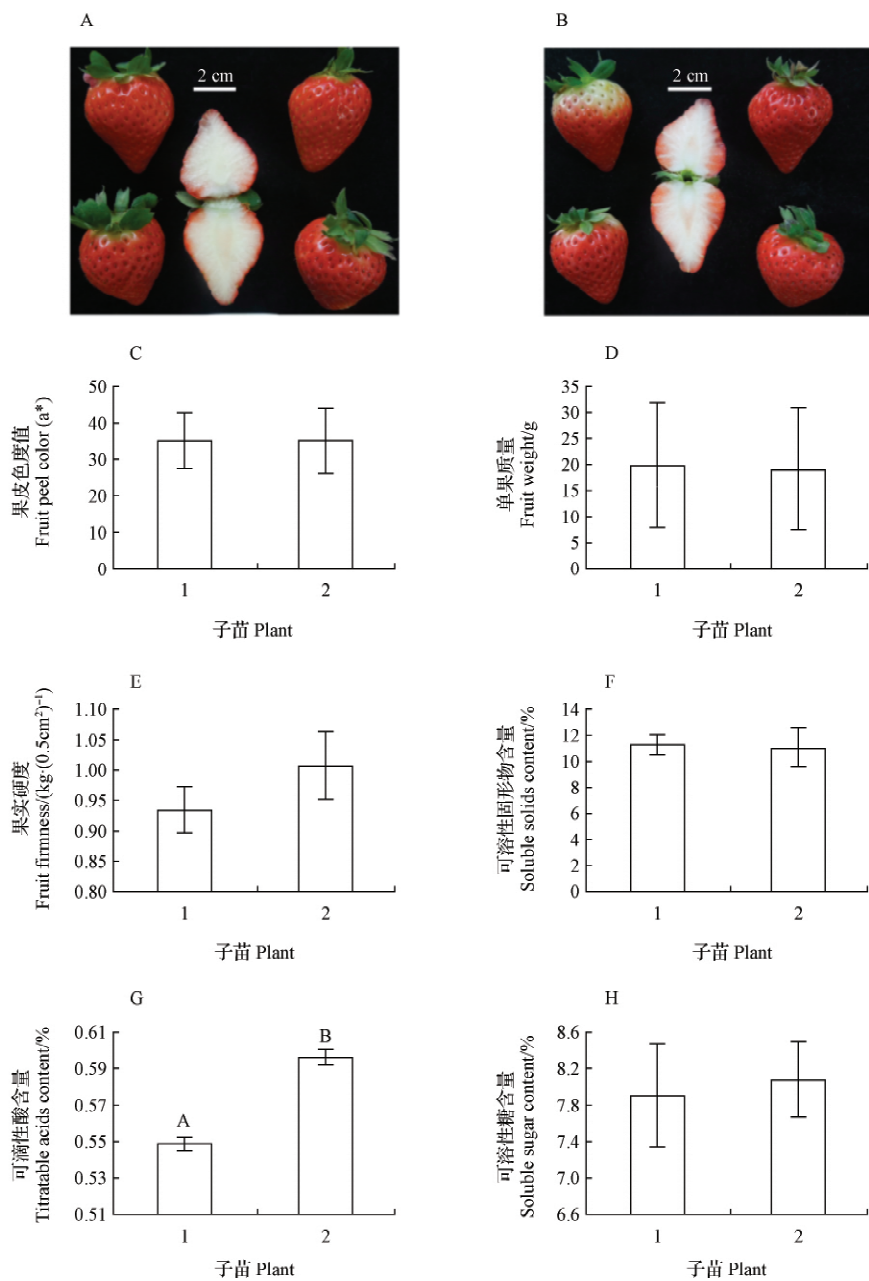
3 讨论与结论

不同地理起源 SMYEV 分离株的外壳蛋白基因 (*coat protein, cp*) 核苷酸序列进行系统进化研究, 结果表明 SMYEV 种群分为 3 个亚组^[15]。最近又鉴定了一个新分离株并命名为第四亚组, 还发现不同病毒分离株 *cp* 的 3' 和 5' 末端发生遗传重组^[16]。病毒进化机制提供了更多

手段增加自身变异, 以修复有害突变^[17]。草莓生长周期内病毒复制量会发生变化, 因此有必要在病毒复制量最高的时候采集样本进行检测^[18]。68% 的感病植株被病毒不同变异株混合侵染^[19]。因此产业亟需一种经济、高灵敏的病毒检测方法。

针对产区主要流行的 1~2 种病毒进行抽样检测, 确保育苗圃内子苗的脱毒率与育苗运行成本之间的平衡^[20]。该研究表明, 多重 PCR 检测技术大约每个样本 34.5 元, 而基于血清学 ELISA 检测技术大约每个样本 29.8 元。基于血清学抗体检测技术, 例如酶联免疫法, 容易受到病毒滴度变化产生的假阴性检测结果。待测样本中病毒复制量变化或未知分离株之间遗传重组, 都将严重影响抗原与抗体之间的免疫反应。因此采用基于核酸扩增的检测技术, 如多重 PCR 检测, 对出圃的核心种苗进行检测以提高优质种苗的脱毒率。

目前商业上广泛采用试管苗组培技术大量生产草莓种苗。这种方法可以高效脱出真菌和病毒^[21]。甘蔗茎尖和腋芽的分生组织培养可以脱



注: A. 二次脱毒母株的匍匐茎繁殖子苗的果实; B. 农家自留种苗的匍匐茎繁育子苗的果实; C. 2 种类型子苗的果皮色度值 (a^*); D. 2 种类型子苗的平均单果质量; E. 2 种类型子苗的果实硬度值; F. 2 种类型子苗的果汁可溶性固形物含量; G. 2 种类型子苗的果汁可滴定酸含量; H. 2 种类型子苗的可溶性总糖。1 和 2 分别代表二次脱毒母株繁殖的子苗和农家自留种苗繁育的子苗。

Note: A. fruits harvested from daughter plants propagated from mother plants obtaining from continuous two-rounds of meristem tissues culture; B. fruits harvested from daughter plants propagated from virus-undetermined mother plants from grower; C. fruit peel color measured between two types of plants; D. fruit weight measured between two types of plants; E. fruit firmness measured between two types of plants; F. total soluble solids measured between two types of plants; G. titratable acidity measured between two types of plants; H. total soluble sugar measured between two types of plants. 1 and 2 show daughter plants propagated from virus-free and virus-undetermined mother plants using their stolon.

图 5 2 种类型子苗的果实品质分析

Fig. 5 Comparative analysis of fruit quality between two types of daughter plants

去5种病毒,而成熟腋芽的分生组织可以获得更高的脱毒率^[22]。该研究发现,试管苗约0.5 mm茎尖分生组织作为外植体,将诱导产生仅31.6%的重生苗,但是成功脱去SMYEV。脱毒率与外植体大小呈负相关,而不定芽分化率依赖于外植体大小^[23]。较大分生组织作为外植体,有可能得到感染微量病毒的重生苗。低浓度病毒感染的样本可能会产生假阴性检测结果。因此必须采用高灵敏度检测技术,对组培苗进行病毒检测。与脱毒苗相比较,SMYEV感染植株的总产量降低了33%^[18]。‘红颜’脱毒苗在生产时期果实病害发生率比常规苗显著降低^[24]。‘章姬’脱毒苗最大单果质量较常规苗增大明显,脱毒苗果实可溶性固形物含量比普通苗增加了15.2%^[25]。该研究表明脱毒母株繁育的匍匐茎子苗果实的可滴定酸含量显著低于普通子苗,因此脱毒子苗拥有更佳的果实品质。

该研究集成了一套从核酸提取、mRNA净化到荧光定量PCR扩增,开展草莓病毒病检测。建立了以0.5 mm茎尖分生组织为外植体,产生试管苗进行脱毒母株生产。利用脱毒母株匍匐茎繁育优质子苗,进行冬草莓生产。

参考文献

- [1] DIENGNGAN S, MAHADEVAMMA M, MURTHY B N, et al. Efficacy of *in vitro* propagation and crown sizes on the performance of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cv. Festival under field condition[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(1): 255-264.
- [2] MARTIN R R, TZANETAKIS I E. Characterisation and recent advances in detection of strawberry viruses[J]. Plant Disease, 2006, 90: 384-396.
- [3] ROJAS P, ALMADA R D, SANDOVAL C, et al. Occurrence of aphidborne viruses in southernmost South American populations of *Fragaria chiloensis* ssp. *Chiloensis*[J]. Plant Pathol, 2012, 62: 428-435.
- [4] TAKAMURA Y, YAMARYO S, WANG W Q, et al. First report of the complete genomic sequences of strawberry mild yellow edge virus and strawberry vein banding virus isolated in Japan[J]. Journal of General Plant Pathology, 2020, 86: 503-506.
- [5] LUCIANI C, CELLI M G, TORRICO A K, et al. Incidence and prevalence of aphid-borne viruses infecting strawberry in Argentina[J]. Ann Appl Biol, 2018, 173: 80-91.
- [6] HEPP R F, MARTIN R R. Occurrence of strawberry mild yellow-edge associated virus in wild *Fragaria chiloensis* in South America[C]. XV International Symposium on Small Fruit Virus Diseases 308, 1991: 57-60.
- [7] MARTIN R R, CONSTABLE F, TZANETAKIS I E. Quarantine regulations and the impact of modern detection methods[J]. Annu Rev Phytopathol, 2016, 54: 189-205.
- [8] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Mol Biol Rep, 1997(15): 8-15.
- [9] WEI T, LU G J, CLOVER G. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses[J]. J Virol Methods, 2008, 151: 132-139.
- [10] VEETIL T T, HO T, MOYER C, et al. Detection of Strawberry necrotic shock virus using conventional and TaqMan® quantitative RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2016, 235: 176-181.
- [11] DONNOLI R, SUNSERI F, MARTELLI G, et al. Somatic embryogenesis, plant regeneration and transformation in *Fragaria* spp[J]. Acta Hort, 2001, 560: 235-239.
- [12] KIKAS A, LIBEK A, VASAR V. Influence of micropropagation on the production of strawberry runner plants, yield and quality[J]. Acta Hort, 2006, 708: 241-244.
- [13] SANSVINI S, ROSATI P, GAGGIOLI D, et al. Inheritance and stability of somaclonal variations in micropropagated strawberry[J]. Acta Hort, 1990, 280: 375-384.
- [14] WANG J H, LIU J J, CHEN K L, et al. Anthocyanin biosynthesis regulation in the fruit of *Citrus sinensis* cv. Tarocco[J]. Plant Mol Biol Rep, 2016(34): 1043-1055.
- [15] THOMPSON J R, JELKMANN W. Strain diversity and conserved genome elements in strawberry mild yellow edge virus[J]. Arch Virol, 2004, 149: 1897-1909.
- [16] TORRICO A K, CELLI M G, CAFRONE E E, et al. Genetic variability and recombination analysis of the coat protein gene of strawberry mild yellow edge virus[J]. Australas Plant Path, 2016, 45: 401-409.
- [17] JAAG H M, NAGY P D. The combined effect of environmental and host factors on the emergence of viral RNA recombinants[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(10): e1001156.
- [18] TORRICO A K, SALAZAR S M, KIRSCHBAUM D S, et al. Yield losses of asymptomatic strawberry plants infected with strawberry mild yellow edge virus[J]. Eur J Plant Pathol, 2017, 150(4): 983-990.
- [19] XIANG Y, NIE X Z, BERNARDY M, et al. Genetic diversity of strawberry mild yellow edge virus from eastern Canada[J]. Archives of Virology, 2020, 165: 923-935.
- [20] TZANETAKIS I E, MARTIN R R. A systems-based approach to manage strawberry virus diseases[J]. Can J Plant Pathol, 2017, 39(1): 5-10.
- [21] WHITEHOUSE A B, GOVAN C L, HAMMOND K J, et

al. Meristem culture for the elimination of the strawberry crown rot pathogen *Phytophthora Cactorum* [J]. *Journal of Berry Research*, 2011, 1(3): 129-136.

[22] CHEONG E J, MOCK R, LI R H. Elimination of five viruses from sugarcane using *in vitro* culture of axillary buds and apical meristems [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2012, 109: 439-445

[23] 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(5): 720-723.

[24] 邹小花, 杨海云, 况慧云, 等. 不同栽培模式下草莓脱毒苗与常规苗对生长和结果影响的比较 [J]. *北方园艺*, 2020(5): 39-40.

[25] 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.

Virus Detections and Fruit Quality Analysis on Micro-propagation Seedlings of Strawberry

WANG Jianhui, XU Rui, GONG Xiaoyuan, LI Xiang, LIU Dayu, ZHANG Yin

(School of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106)

Abstract: Taking two types of seedlings using large or small sizes explants by meristem tissues culture, obtaining regenerated plantlets were detected for Strawberry mild yellow edge virus. The virus-free mother plants and virus-undetermined control were propagated to produce daughter plants using stolon. Then virus incidences and fruit quality between two kinds of daughter plants were investigated, respectively, in order to provide reference for the virus-free seedlings application in future. The virus elimination studies would be useful for virus-free seedlings application in future. The results showed that virus concentration differences in plants were found between different cultivars, and virus coat protein expression was consistent with its transcription level. Meristem tissues using explant in size of 5 mm in stolon were induced to adventitious buds and then differentiated to *in vitro* plantlets at the first round of virus elimination. However, a few *in vitro* plantlets regenerated from explant in size of 5 mm were still infected by lower virus. In comparison, regeneration ratio at the second round of meristem tissues culture using explant in size of 0.5 mm was only 31%. Besides, all seedlings regenerated from the second of meristem culture were found virus free. Two types of daughter plants propagated using stolon from virus-free mother plants and virus-undetermined control were planted at an experimental plot, respectively. The SMYEV incidences were significantly different between two types of daughter plants. The titratable acidity was significantly lower in virus-free daughter plants than control. In conclusion, the virus-free mother plants were successfully produced by meristem tissues culture using explants in sized of 0.5 mm, which could benefit for strawberry propagation program in future.

Keywords: *Fragaria × ananassa*; Strawberry mild yellow edge virus; real-time quantitative PCR; meristem tissues culture