

T/NAIA

团 体 标 准

T/NAIA 0426—2025

草莓茎尖脱毒快繁体系技术规程

Technical protocol for virus-free rapid propagation of strawberry
using apical meristems

2025-10-22发布

2025-10-31实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏大学、银川市农业技术推广服务中心。

本文件主要起草人：张雪艳、李浩、王欣怡、曹行行、李邦耀、张晶晶、谢明学、杨玲。

宁夏团体标准

草莓茎尖脱毒快繁体系技术规程

1 范围

本文件规定了草莓茎尖脱毒快繁的关键技术内容，包括外植体材料选择与消毒处理、愈伤组织诱导、不定芽分化与继代增殖、生根诱导及炼苗驯化等操作流程，明确了各阶段培养基组分与激素配比，构建了草莓脱毒苗快速繁育的标准化技术体系。

本文件适用于宁夏地区设施条件下草莓品种的脱毒种苗生产。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

NY/T 2118-2012 蔬菜育苗基质

NY/T 2236-2012 植物组培苗工厂化生产技术规程

NY/T 5010-2016 无公害农产品 种植业产地环境条件

T/DGSS 001-2016 草莓脱毒种苗生产技术规程

T/LWCM 2-2017 无公害食品草莓育苗技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 茎尖脱毒

利用草莓茎尖生长点中病毒含量极低的特点，通过无菌条件下切取茎尖并进行组织培养，以去除病毒污染、获得健康无毒植株的技术手段。

3.2 无菌快繁

在严格无菌环境下，通过对外植体进行消毒、愈伤组织诱导、不定芽增殖及生根培养等步骤，实现草莓种苗快速、高效繁育的一种组织培养方法。

4 场地环境条件

组培快繁条件应符合 NY/T 2236-2012 要求；炼苗移栽驯化环境应符合 NY/T 5010-2016 要求。

5 生产技术管理

5.1 外植体选择

选择健康、无病虫害、生长旺盛的母株新发生的草莓匍匐茎。

5.2 无菌系的建立

5.2.1 外植体消毒

选取生长健壮、无可见病虫害的匍匐茎，剪除末端保留顶端约 2-5 cm，将处理好的匍匐茎用洗洁精溶液浸泡并搅拌 15 分钟，然后用无菌水冲洗 3-5 次后移入超净工作台中。先用浓度为 75%的乙醇溶液浸泡处理 30-60 s，无菌水冲洗 3-4 次，然后分别使用 0.1%升汞处理 4-7 分钟或 10%过氧化氢处理 10-15 分钟或 10%次氯酸钠处理 8-12 分钟。再用无菌水冲洗 4-5 次，然后用无菌吸水纸吸干匍匐茎表面水分，用解剖刀切取茎尖生长点 0.2-0.5mm，将生长点接种至组培瓶内，数量由组培瓶容量决定，茎尖间距 1 cm 以上。

5.2.2 愈伤组织诱导

将茎尖剥离出的生长点接种在 MS 培养基+6-BA (1.0-1.5mg/L)+NAA (0.10-0.2 mg/L) 中进行愈伤诱导，数量由组培瓶容量决定，茎尖间距 1 cm 以上。置于温度 18-25℃、湿度 60-70%、光照强度 2000-3000 lux、每日光照 12-16 小时的条件下。

5.2.3 丛芽诱导诱导

将诱导出的愈伤组织接种在 MS 培养基+6-BA (1.5-2 mg/L)+NAA (0.15-0.2 mg/L) 进行丛芽诱导，数量由组培瓶容量决定，愈伤组织间距 2 cm 以上。置于温度 18-25℃、湿度 60-70%、光照强度 2000-3000 lux、每日光照 12-16 小时的条件下。

5.2.4 增殖继代诱导

将诱导出的、带有多丛生芽的黄绿色愈伤组织，小心分割成约 0.5-1.0 cm³ 的小块（确保每块至少带有 1 个健壮芽点，避免损伤芽体）。种在 MS 培养基+6-BA(0.75-1mg/L)+NAA(0.1-0.15 mg/L)进行增殖培养，数量由组培瓶容量决定，间距 2 cm 以上。置于温度 18-25℃、湿度 60-70%、光照强度 2000-3000 lux、每日光照 12-16 小时的条件下。

5.2.5 生根诱导

选取增殖培养后生长健壮、高约 2-3 cm 的丛生芽，用解剖刀从其基部切下，获得单株丛生芽。接种在 1/2 MS 培养基+ (0.05-0.15 mg/L) IBA 进行生根诱导，数量由组培瓶容量决定，间距 2 cm 以上。置于温度 18-25℃、湿度 60-80%、光照强度 2000-3000 lux、每日光照 12-16 小时的条件下。

5.3 炼苗驯化

5.3.1 场地准备与环境消毒

炼苗场地应符合标准 T/LWCM 2-2017 中的环境要求。炼苗驯化前，对场地的墙壁、地面、操作台及育苗器具进行清洁和消毒，使用 500-1000 mg/L 的次氯酸钠溶液或 0.1%高锰酸钾溶液进行喷洒或擦拭处理，闷蒸 2-6 h，再充分通风晾干。

5.3.2 炼苗移栽驯化

炼苗过程中应逐步延长瓶口开启时间，使组培苗从瓶内无菌、高湿、弱光环境平稳过渡到外界常规条件，驯化时间一般为 2-3 d，以减少环境突变造成草莓苗萎蔫甚至死亡；移栽前应用无菌水轻柔冲洗根系，彻底去除残留琼脂培养基，并将根系浸蘸 0.01%-0.05%的吲哚丁酸 (IBA) 或萘乙酸 (NAA) 溶液，以促进新根形成和提高移栽成活率。移栽时选用草炭、蛭石、珍珠岩配比为 3:1:1 的基质（应符合 NY/T 2118-2012 基质标准），并在移栽后喷施 500-800 mg/L 的多菌灵溶液。并用组培罩或透明育苗罩覆盖维持较高湿度，2-3 d 后去除组培罩或透明育苗罩，同时架设 50%-75%遮光率的遮阳网调控光照，环境条件控制在温度 18-25℃、相对湿度 75%-90%、光照强度 1000-2000 lx（以散射光为主），避免强光直射及

气流直吹，时间为 3-5 d。成活的草莓应符合标准 T/DGSS 001-2016 中的苗木质量。

5.3.3 驯化环境调控

在移栽后苗木逐渐恢复和生长过程中，应动态调控温度、光照、湿度及通风条件。温度保持在 18-25 ℃，昼夜温差 5-8 ℃，夏季高温时应采取遮阳和喷雾降温，冬季低温时适度加温保温。移栽早期光照保持 1000-2000 lux 的散射光，待植株恢复后逐步提高至 3000-5000 lux，并保持日照时长 12-16 h，以促进光合积累。早期湿度保持 75%-90%，中后期逐步降至 65%-75%，避免长期高湿引发病害。通风管理应循序渐进，前期少量通风，后期增加频率，以提升苗木抗逆性。基质水分保持湿润但不积水（含水量 50%-70%，即手握成团、触之即散），同时可以适量补充缓释肥或叶面喷施低浓度磷酸二氢钾（0.1%-0.2%）每 7-10 d 一次，以增强植株营养和抗逆能力。

5.3.4 病害调控

病害防控应严格遵循“预防为主、综合治理”的原则。炼苗前应对基质进行彻底消毒，并使用清洁水源进行灌溉，从源头阻断病原物传播。对于灰霉病、叶斑病、根腐病等常见病害，需优先通过环境调控（如控制湿度、加强通风）降低发病风险；必要时可选用多菌灵、百菌清或啮菌酯等药剂进行防治，并注意轮换使用以延缓抗药性产生。根腐病可在基质中预混甲基托布津或福美双进行预防，发病后可采用甲霜灵溶液灌根。病毒病防控应严格执行脱毒苗与常规苗的物理隔离，严禁混栽及交叉操作，并定期开展病害监测。

6 草莓茎尖脱毒无菌快繁体系常见问题及应对措施

草莓茎尖脱毒无菌快繁体系常见问题及应对措施见附录A。

附录 A

(规范性)

草莓茎尖脱毒无菌快繁体系常见问题及应对措施

表A.1 草莓茎尖脱毒无菌快繁体系常见问题及应对措施

问题类型	发生规律	表现症状	应对措施
污染率高	种子携带内外源微生物、器具灭菌不完全、接种过程中操作不规范,如未进行酒精消毒、不带手套直接操作。	瓶内出现白色棉絮状霉层、黑色球状霉斑或灰绿色斑块。	(1) 严格执行种子多步消毒流程,包括酒精、次氯酸钠等化学处理,并用无菌水充分漂洗;(2) 所有操作器具高压蒸汽灭菌121°C/15min;(3) 操作台需每日75%酒精消毒并紫外照射30分钟,操作者穿戴灭菌手套与口罩,防止人源污染。
褐化	激素浓度过高时,诱导组织中酚类物质大量积累,在酚氧化酶作用下产生褐变;缺乏光照也易加剧酚类代谢紊乱。	组织表面或内部褐变,早期为浅褐色斑块,后期变深变黑,失去膨大与分化能力,最终形成干枯死组织或液化斑。	(1) 降低激素使用浓度;(2) 在培养基中添加抗氧化剂,如抗坏血酸、活性炭等;(3) 愈伤诱导前期控制光照强度或短期避光,促进内部抗氧化系统建立;(4) 及时清除褐化组织。
玻璃化	瓶内长期处于高湿环境(RH>80%)、培养基水分偏高、通气受阻,易使组织水分过度积聚、细胞间隙含水率上升,引起细胞壁变薄失去支撑。	苗体呈半透明状,叶片肿胀光亮、质脆无弹性,茎部柔软下垂,根系发育受限,炼苗时极易失水萎蔫。	(1) 使用具有透气功能的组培瓶盖;(2) 培养基中减少氨态氮含量,避免水分富集;(3) 调节培养室湿度至60%~70%,过高会导致持续玻璃化。
畸形苗	激素配比失衡、继代频率过快造成植物极性丧失或顶端优势紊乱,诱导出异常分裂结构或胚状芽体畸形。	苗体扭曲弯曲,节间过短或拉长,叶片卷曲、裂叶、双头顶或生长点异常扩增,分枝无序。	(1) 优化激素的使用比例;(2) 适当添加钙镁微量元素提高细胞分裂稳定性。
不定芽诱导率低	使用的愈伤组织老化或褐化严重,激素浓度不足、诱导阶段光照、温湿度不合适,均会影响愈伤组织中原分生组织的激活与再分化。	愈伤组织白化、膨大不明显、边缘褐变,芽点形成缓慢甚至未分化,部分组织液化或转化为根状突起结构	(1) 选择白色、质地紧实的愈伤组织,避免褐化、玻璃化组织;(2) 适度提高6-BA与NAA浓度至有效诱导水平;(3) 保持12~14小时光照,促进光信号诱导芽点启动。
生根率低或生根慢	培养基碳氮比失衡、激素浓度过低或过高,诱导效率会明显下降。	瓶内苗体下胚轴部位膨大但无根伸出,或形成不规则瘤状	(1) 使用1/2MS基础培养基,IBA浓度在0.05~0.2 mg/L之间;(2) 暗培养2~3天后转为正常光照,有利于根原基膨大与极性

		结构, 根长时间不能突破表皮, 部分根尖褐化、变短。	生根; (3) 生根后适时继代或移栽, 避免根系劣化。
炼苗失败	组培苗脱瓶后环境变化剧烈, 如光照强烈、空气干燥、温度波动较大, 易造成苗体蒸腾失衡及根系无法及时吸收水分而造成组培苗萎蔫甚至死亡。	移栽 2~3 天内叶片失水软塌、叶缘干枯, 生长点萎缩, 根系浅白无毛根, 移栽成活率低于 60%。	(1) 炼苗分阶段进行, 前期开瓶通风 2~3 天逐步增加通气时间; (2) 控温 18~25℃, 遮荫 50%~70%; (3) 移栽初期每日喷水保湿, 提高成活率。
愈伤组织诱导失败	外植体切取位置不当、老化程度高或木质化严重, 使得诱导激素无法有效传导并激活分生组织。	培养后外植体不增厚、不膨大, 周缘组织变褐或收缩, 未见明显细胞分裂痕迹, 部分外植体干枯或粘连基面。	(1) 选取生长活跃的茎尖或下胚轴, 避免叶片及纤维化组织; (2) 6-BA 与 IBA 组合浓度适中诱导细胞脱分化; (3) 前 7 天避光或弱光培养促进内源激素累积。
苗体萎蔫	培养温度日夜波动剧烈或瓶中氧气长期不足会影响蒸腾调控与气体交换, 造成苗体代谢紊乱、水分失衡。	幼苗叶片下垂呈疲软状, 颜色变暗或褪绿, 茎基部无力, 根尖发黄或褐化, 瓶苗恢复缓慢甚至坏死。	(1) 保持培养温度 18~25℃、湿度 60%~70%; (2) 短时间逐日开瓶通风利于气体交换; (3) 避免培养基过湿造成根部缺氧; (4) 移栽炼苗前先用 0.1% 吡啶丁酸溶液促进根系恢复。
瓶内水汽凝结	培养基水分偏高或灭菌后未冷却缓慢密封, 导致瓶内温差积水, 液滴凝聚在瓶壁或瓶盖下部干扰苗体光照和通气。	瓶壁水珠密集, 底部有积水现象, 影响苗体光合效率, 增加病原滋生风险, 部分瓶底发霉。	(1) 灭菌后取出冷却需避开冷风直吹; (2) 保持培养室恒温恒湿环境, 避免冷凝水形成。
培养瓶爆瓶	装液量过多、灭菌前未拧松瓶盖导致高压下气体无法释放, 瓶内压力聚集导致玻璃炸裂。	灭菌后发现瓶体破裂或瓶塞冲出, 瓶外有液体渗漏, 影响下一批灭菌与培养室安全。	(1) 控制每瓶装液量不超过瓶体的 1/2~2/3; (2) 灭菌前松开瓶盖 1/4 圈, 灭菌结束后再密封; (3) 使用玻璃厚壁培养瓶, 避免微裂纹或划痕集中应力爆裂; (4) 灭菌温度 121℃, 持续时间不超过 25 分钟。
培养基失水干裂	瓶盖通风时间长或室内湿度过低造成持续水分蒸发, 尤其靠近瓶口的培养基最先干裂, 影响外植体供水。	培养基表面下陷、收缩、边缘脱离瓶壁, 表面泛白甚至龟裂, 影响接种组织吸水发根。	(1) 使用封口膜或丁基橡胶塞密封瓶口, 减少水分挥发; (2) 调整培养室湿度至 65%~75% 左右, 避免空气干燥 (3) 每 2~3 周检查一次培养基水分状况; (4) 必要时适当增加培养基初始加水量。
玻璃瓶污染复发	使用次数过多的瓶子因划痕或材料疲劳残留污染源, 反复灭菌难以彻底清除瓶壁附着微生物。	污染常发生在相同瓶批次、瓶底或瓶壁边缘, 菌落类型重复, 瓶盖或塞内壁发霉明显。	(1) 每次使用后彻底清洗, 使用中性或碱性洗瓶液浸泡 24 h, 再刷洗; (2) 高压灭菌 121℃/25min, 严格灭菌时间与温度控制 (3) 定期淘汰划痕明显或老化瓶体; (4) 瓶内加铝箔或硅胶盖提升密封性。

组织变性黑腐	激素超量刺激下部分组织形成高活性区后突然细胞崩解，或伴随细菌/真菌感染造成细胞崩溃性坏死。	组织表面初期膨大迅速，后期变黑软塌，有腥臭味，结构松散破碎，瓶中有异味、菌丝生长。	(1)降低激素浓度，避免6-BA或IAA超过3.0 mg/L；(2)筛选健康无机械损伤外植体进行培养；(3)操作中确保无菌操作，防止真菌、细菌交叉感染；(4)发现变性组织应及时剔除，并更换新鲜培养基重复接种。
--------	---	---	--