

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201411013

叶维雁,郭晓月,刘惠民,等. 葡萄柚种子无菌苗组培快繁体系的建立[J]. 广西植物, 2015, 35(6):891—898

Ye WY, Guo XY, Liu HM, et al. Establishment of rapid propagation for sterile seedlings of grapefruit by tissue culture[J]. *Guihaia*, 2015, 35(6): 891—898

葡萄柚种子无菌苗组培快繁体系的建立

叶维雁, 郭晓月, 刘惠民*, 王连春, 刘 鹏, 吴海波

(西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 昆明 650224)

摘 要: 以葡萄柚种子在无菌条件下萌发的幼苗作为外植体供体, 子叶切断作为丛生芽初代诱导培养的接种材料, 以 MT 作为基本培养基, 通过调节不同植物生长调节剂及其浓度组合、不同质量浓度的蔗糖, 选择最佳初代培养基、继代培养基和生根培养基, 对葡萄柚组培快繁技术体系进行研究。结果表明: (1) 葡萄柚种子经预处理后, 先用 75% 酒精表面灭菌 15 s, 再用 0.1% HgCl_2 浸泡 20 min 的消毒效果最好, 污染率为 18.33%, 萌发率为 89.91%; (2) 初代培养的最适培养基为 $\text{MT}+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}(6\text{-}\beta\text{-氨基腺嘌呤})+0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ (吲哚丁酸)+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}$ (赤霉素)+蔗糖 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 腋芽诱导率较高, 为 93.33%; (3) 浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 能提高初代培养的腋芽诱导率, 但还达不到显著水平; (4) 继代培养的最适培养基为 $\text{MT}+0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}+0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}+$ 蔗糖 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 丛生芽增殖系数达到 4.25, 芽深绿色, 茎粗壮, 节间较长, 生长旺盛; (5) 浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 能显著提高继代培养的增殖系数; (6) 最适合继代培养的蔗糖浓度为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 丛生芽长势极好; (7) 最佳生根培养基为 $1/2 \text{ MT}+\text{NAA } 0.2 \text{ mg/L}+$ 蔗糖 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}+\text{AC } 0.1\%$, 生根率达 68.89%, 根粗壮; (8) 生根苗移栽 30 d 后成活率在 75% 以上。该研究建立了葡萄柚的组织培养快繁技术体系, 为葡萄柚的规模化生产提供了可行的技术依据。

关键词: 葡萄柚; 种子; 植物生长调节剂; 初代培养; 继代培养**中图分类号:** S666.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)06-0891-08

Establishment of rapid propagation for sterile seedlings of grapefruit by tissue culture

YE Wei-Yan, GUO Xiao-Yue, LIU Hui-Min*,

WANG Lian-Chun, LIU Peng, WU Hai-Bo

(Key laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: The most appropriate sterilization method for tissue culture of grapefruit's seeds was selected, the seedlings sprouted from grapefruit's seeds under sterile conditions acted as explant donors, the cotyledon cuts were used as the inoculation material of the clustered shoots' primary induction culture, the best primary culture medium, sub-culture culture medium and rooting medium were selected by adjusting the concentrations of sucrose, combinations of different plant growth regulators and their concentrations in the MT medium, and the tissue culture and rapid propagation technique system of grapefruit were studied. The results were as follows: (1) Rapidly immersed with 75% alcohol for 15 s plus 0.1% HgCl_2 for 20 min after the pretreatment was the best disinfection method for grapefruit

收稿日期: 2014-11-10 **修回日期:** 2015-03-12**基金项目:** 国家国际科技合作专项项目(2014DFA31060)**作者简介:** 叶维雁(1988-), 男, 广西合浦县人, 在读硕士研究生, 主要从事果树组织培养研究, (Email) flyingywy@163.com。**通讯作者:** 刘惠民, 博士, 教授, 现在主要从事经济林栽培与利用等研究工作, (Email) hmlu@swfu.edu.cn。

seeds with the contamination rate of 18.33%, and the germination rate of 89.91%; (2) The best medium for the primary culture was MT+1.0 mg · L⁻¹ 6-BA (6-Benzylaminopurine)+0.2 mg · L⁻¹ IBA (Indole-3-Butyric acid)+0.2 mg · L⁻¹ GA (Gibberellic acid)+sucrose 40 g · L⁻¹, the axillary shoot induction rate was up to 93.33%; (3) GA the concentration of which was 0.2 mg · L⁻¹ could improve the axillary shoot induction rate of primary culture, but couldn't reach significant level; (4) MT+0.5 mg · L⁻¹ 6-BA+0.2 mg · L⁻¹ IBA+0.2 mg · L⁻¹ GA+sucrose 40 g · L⁻¹ was the most suitable for the subculture with the multiplication coefficient of 4.25, the shoots were dark green with vigorous growth, the stems were thick and internodes were relatively long; (5) GA the concentration of which was 0.2 mg · L⁻¹ could significantly improve the multiplication coefficient of subculture; (6) The most suitable concentration of sucrose for the subculture was 40 g · L⁻¹, the clustered shoots' growth was excellent; (7) The best rooting medium was 1/2MT+NAA 0.2 mg · L⁻¹+sucrose 40 g · L⁻¹+AC 0.1%+sucrose 40 g · L⁻¹ with the rooting rate of 68.89%, the roots were very sturdy; (8) The transplant survival rate of rooting plantlets was up to 75% after being transplanted for 30 d. Through the experiment the tissue culture and rapid propagation technique system of grapefruit was established, which would provided a feasible technical basis for the mass production of grapefruit.

Key words: grapefruit; seed; plant growth regulator; primary culture; subculture

葡萄柚(*Citrus paradise*)是芸香科(Rutaceae)

柑桔属(*Citrus*)常绿植物,是世界柑桔四大类群之一(甜橙类、宽皮柑桔类、柠檬类、葡萄柚和柚类)(杨连珍,1996)。在香港又名“西柚”,广东新会一带称之为“番柑”,结果时果实悬挂成串,簇生如葡萄,故称之为葡萄柚(叶荫民,1997)。葡萄柚果实柔软多汁,酸甜中略带苦味,风味独特,口感好,主要用以鲜食、制果汁、罐头和色拉原料,具有清热退火、消除疲劳、助消化、生津解渴、减肥和保养肌肤的特殊功效(郭林榕等,2002)。葡萄柚精油有较强的抑菌活性,是一种很有价值和开发前景的芳香油植物资源(李悦等,2010)。根据国内外对葡萄柚的市场需求特点,适地适度地发展葡萄柚种植具有客观的市场前景,对改善我国柑桔品种结构具有重要意义(吴海波等,2005)。

柑桔属植物的组织培养研究已进行多年,主要包括胚培养(洪柳等,2005)、营养器官培养(贺红等,1997;陈泽雄等,2007)和种质离体培养(王子成等,2002)。葡萄柚的微芽嫁接中因接穗直接取自大田嫩枝而受季节限制,影响脱毒周期(李丽等,2011),且嫁接前消毒剂对茎尖的消毒会降低其成活率和萌发率,以无菌快繁体系里丛生芽的茎尖作为接穗可以解决这些问题。以葡萄柚的无菌实生苗为材料进行离体再生培养(Yang *et al.*, 2000),与成年态的材料相比,污染率更低,不定芽再生能力更强。本试验以葡萄柚种子形成的无菌实生苗为外植体供体,建立葡萄柚的快繁体系,为优化葡萄柚的微芽嫁接技术提供技术支持,为葡萄柚离体培养体系的建立提供参考和依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

所用试材为从美国佛罗里达州引种的葡萄柚品种“帕利斯(Perlist)”成熟鲜果的种子,采自云南省林科院西双版纳州普文葡萄柚试验园,选取生长结果良好的植株进行取材,取材期为2013年11月。供试的植物生长调节剂为6-苯甲基腺嘌呤(6-BA)、吲哚-3-丁酸(IBA)、赤霉素(GA),其它试剂有蔗糖、琼脂及MT培养基所需的大量元素、微量元素和有机物等,所有药剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 种子的灭菌及无菌苗的获得 挑选籽粒饱满,成熟个大的葡萄柚种子,装入大烧杯,烧杯口用纱布封住,流水冲洗干净表面粘液。将种子装于已灭菌的组培瓶中进行灭菌试验,试验采用75%酒精和0.1% HgCl₂两个因素,设置75%酒精2个水平(处理时间15、30 s),0.1% HgCl₂3个水平(处理时间为15、20和25 min),共6个处理。种子由75%酒精到0.1% HgCl₂处理间不经无菌水冲洗,0.1% HgCl₂处理完后无菌水洗8次。每1升0.1% HgCl₂中滴加1~2滴吐温-20,以提高升汞的杀菌效果(李浚明等,2005)。经灭菌的种子在无菌滤纸上剥除种子的内外种皮,接种于1/5 MT培养基上,每处理接20个组培瓶,每瓶接1粒种子,重复3次。接种15 d后观察和记录种子的污染率和萌发率。

1.2.2 不同植物生长调节剂及其浓度组合对初代培养的影响 接入1/5 MT培养基的种子8 d后开始

萌发(图版 I: A), 取 28 d 后形成的无菌实生苗(图版 I: B) 作外植体供体, 参照王任翔等(2003) 对无菌实生幼苗的分段法, 自上而下可分成顶芽切段、茎切段(带一个腋芽)、子叶切段(带子叶)、根切段。选取长势良好、大小一致的幼苗, 切取大小相同的子叶切断(长 1.5 cm), 按照原来的极性接入丛生芽诱导培养基。诱导试验设 6 个处理: 以 MT 为基本培养基, 附加不同浓度 6-BA (0.5、1.0、1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 GA (0、0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), IBA 均为 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每处理接 20 瓶, 每瓶接 1 个子叶切断, 重复 3 次。诱导培养 30 d 后调查丛生芽的诱导率。

1.2.3 不同植物生长调节剂及其浓度组合对继代培养的影响 继代培养设 15 个处理, 以 MT 为基本培养基, 附加不同浓度 6-BA (0.1、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、IBA (0、0.1、0.2、0.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 GA (0、0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。将诱导培养基上长出的腋芽丛生芽切割成单芽, 挑选长势一致、大小相同(长约 1.5 cm) 的单芽接入增殖培养基, 每处理接 10 瓶, 每瓶接 3 个单芽, 重复 3 次。继代培养 30 d 后统计芽的增殖系数及观察芽苗的生长状况。

1.2.4 不同蔗糖浓度对继代培养的影响 将诱导培养基上长出的腋芽丛生芽切割成单芽, 挑选长势一致、大小相同(长约 1.5 cm) 的单芽接入以 MT+6-BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IBA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +GA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为培养基, 附加不同蔗糖浓度(20、30、40、50、60 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的继代培养基中, 每处理接 10 瓶, 每瓶接 3 个单芽, 重复 3 次, 继代培养 30 d 后统计增殖系数及观察芽的生长状况。

1.2.5 生根培养 当继代培养的丛生芽长约 2 cm 时, 切取长势好且大小一致的单芽, 接种到生根培养基中。生根培养基以 1/2 MT+蔗糖 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC(活性炭) 0.1% 为基本培养基, 附加不同浓度 NAA (0、0.1、0.2、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的激素组合。每个处理接种 15 个芽苗, 重复 3 次。生根培养 30 d 后统计生根率和平均生根数, 观察根的生长状况, 筛选出适合生根的培养基。

1.2.6 移栽 生根培养 40 d 的再生苗置于室内窗户外自然光下炼苗 7 d, 期间逐渐松开瓶盖, 使再生苗逐渐适应外界环境。挑选长势较好、株高约 3 cm、根长约 8 cm 的再生苗 64 棵, 洗净根部的培养基后, 移栽到由草泥炭、珍珠岩、红土(2: 1: 1, v/v/v) 组成的混合基质中, 用 1 000 倍多菌灵液浇透基质, 注意水分、光照和温度的管理, 可视情况浇多菌灵液,

30 d 后统计成活率。

1.2.7 培养基制备和培养条件 目前有关柑桔属植物的组织培养研究, 主要是以 MT 为基本培养基(王彩霞, 2009a, b; 陆荣生等, 2013), 本研究使用的 MT 培养基参照周海霞(2010) 所用的配方; 若无特殊说明, MT 培养基里附加蔗糖 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 1/5 MT 培养基里所有元素含量减为 MT 培养基的 1/5, 琼脂 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 所有培养基 pH 值调至 5.7 ± 0.1 , 经 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 18 min, 冷却备用。培养温度为 $(26 \pm 1) ^{\circ}\text{C}$, 光照强度 2 500 lx, 光照时间 14 h $\cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2.8 数据统计分析 用 SPSS 21.0 进行方差分析、LSD 多重比较等。计算公式如下:

污染率(%) = 污染的外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$; 萌发率(%) = 萌发的外植体数/(接种的外植体数 - 污染的外植体数) $\times 100\%$; 诱导率(%) = 长出丛生芽的外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$; 生根率(%) = 生根的苗数/接种的苗数 $\times 100\%$; 移栽成活率(%) = 移栽成活苗数/移栽苗数 $\times 100\%$; 增殖系数 = 增殖后获得的单芽个数/接种的外植体数; 平均生根数 = 每处理生根的总根数/生根的总苗数。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌处理的灭菌效果

表 1 显示, 0.1% HgCl_2 处理时间相同的条件下, 从 15~30 s 的 75% 酒精处理, 污染率降低, 但不显著; 萌发率显著降低; 说明对 75% 酒精的处理时间进行延长, 会显著降低种子的萌发率而污染率不会显著下降, 15 s 的 75% 酒精处理时间对种子消毒效果较好。75% 酒精处理时间相同的条件下, 0.1% HgCl_2 处理时间从 15 min 增加到 20 min 时, 污染率显著下降, 但萌发率下降不显著; 随着 0.1% HgCl_2 处理时间的继续增加, 污染率下降不显著, 但萌发率下降显著; 说明 0.1% HgCl_2 最佳的处理时间为 20 min。因此, 以 75% 酒精 15 s、0.1% HgCl_2 20 min 的处理灭菌效果较好, 污染程度较低, 污染率为 18.33%, 萌发情况较好, 萌发率为 89.91%。

2.2 不同植物生长调节剂及其浓度组合对初代培养的影响

无菌苗取子叶切断(长 1.5 cm) 接入诱导培养基, 15 d 后基部有膨大, 逐渐萌发出腋芽, 30 d 后长

成 1~1.5 cm 的芽苗可用于继代培养(图版 I:C)。

表 1 不同灭菌处理对外植体灭菌效果的影响
Table 1 Effects of different sterilizations on explants sterilizing

处理 Treatment	消毒时间 Disinfection time (s)		污染率 Infection rate (%)	萌发率 Germination rate (%)
	污染率	萌发率		
	Infection rate (%)	Germination rate (%)		
1	15	15	30.00±5.00a	95.21±4.18a
2	15	20	18.33±7.64bc	89.91±3.05ab
3	15	25	15.00±5.00cd	78.38±3.71c
4	30	15	26.67±7.64ab	84.18±2.74bc
5	30	20	13.33±2.89cd	80.72±3.71c
6	30	25	6.67±2.89d	71.44±2.72d

注：数据以平均值±标准差表示；同一列中不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。
Note: Data are expressed as mean ± SD; Values within the same column follow by the different lowercases are significantly different among treatments at the level of 0.05. The same below.

诱导试验的结果(表 2)表明,对于 6-BA 各水平来说,1.0 mg · L⁻¹ 水平下的诱导率显著高于其它水平下的诱导率,表明 6-BA 浓度为 1.0 mg · L⁻¹ 时对丛生芽的诱导效果最佳;6-BA 浓度低于 1.0 mg · L⁻¹ 时或高于 1.0 mg · L⁻¹ 时,丛生芽的诱导率都会降低。6-BA、IBA 浓度相同的条件下,添加 0.2 mg · L⁻¹ 的 GA 能提高丛生芽的诱导率。因此,激素组合 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA+0.2 mg · L⁻¹ IBA+0.2 mg · L⁻¹ GA 最适合葡萄柚的初代培养。

表 2 不同植物生长调节剂对腋芽诱导的影响
Table 2 Effects of different plant growth regulators on the induction of axillary shoots

处理 Treatment	激素浓度 Concentration of hormone (mg · L ⁻¹)			诱导率 Induction rate (%)
	6-BA	GA	IBA	
1	0.5	0.0	0.2	73.33±7.64b
2	0.5	0.2	0.2	76.67±7.64b
3	1.0	0.0	0.2	91.67±5.77a
4	1.0	0.2	0.2	93.33±2.89a
5	1.5	0.0	0.2	76.67±5.77b
6	1.5	0.2	0.2	80.00±5.00b

2.3 不同植物生长调节剂及其浓度组合对继代培养的影响

表 3 显示,6-BA、IBA、GA 的不同浓度组合对继代芽的增殖系数存在显著性影响。处理 1、2、3、4、5 中,芽苗生长缓慢,芽弱、表现为浅绿色(图版 I:D),甚至少量芽苗死亡,增殖系数也比较小;处理 6、7、8、9、10 中,增殖系数较高,总体生长情况相对最好,其中处理 10 的增殖系数达到 4.25,极显著高于

其它处理的增殖系数,芽显深绿色、茎粗壮、节间长(图版 I:E),生长旺盛;处理 11、12、13、14、15 中,增殖系数一般,其中处理 15 的增殖系数为 3.03,但是几乎都带有不同程度的轻微玻璃化现象,可能是细胞分裂素浓度偏高的原因。综合考虑,处理 10 的激素组合 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA+0.2 mg · L⁻¹ IBA+0.2 mg · L⁻¹ GA 是葡萄柚继代增殖的最佳选择。

当 IBA 的浓度一定(表 3),即为 0、0.1 或 0.2 mg · L⁻¹ 时,继代芽的增殖系数都随着 6-BA 浓度的增加先提高后降低,且在 6-BA 3 个水平上的增殖系数相互间差异极显著;6-BA 浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时的增殖系数极显著高于其它浓度时的增殖系数,且丛生芽显深绿色,生长旺盛。结果表明,6-BA 浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时最适合葡萄柚的继代增殖。

当 6-BA 浓度为 0.5 或 1.0 mg · L⁻¹ 时(表 3),培养基里添加 0.2 mg · L⁻¹ 的 GA 都会极显著提高继代芽的增殖系数,还可能改善芽苗的生长状况,说明继代培养基里添加 0.2 mg · L⁻¹ 的 GA 对葡萄柚的继代增殖有极好的促进作用。当 6-BA 浓度为 0.1 mg · L⁻¹ 时,培养基里添加 0.2 mg · L⁻¹ 的 GA 虽能提高增殖系数,但达不到显著水平,原因可能是 6-BA 浓度过低,不适合芽的增殖,增殖系数低,无法客观地观察出 GA 对继代增殖的影响。

2.4 不同浓度蔗糖对葡萄柚继代培养的影响

由表 4 可知,在温度、光照和植物生长调节剂相同的情况下,葡萄柚继代芽的增殖系数随着蔗糖浓度增加先提高后降低,蔗糖浓度为 40 和 50 g · L⁻¹ 时的增殖系数极显著高于其它浓度下的,芽苗的长势也是最好的;蔗糖浓度为 50 g · L⁻¹ 下的增殖系数稍高于 40 g · L⁻¹ 下的,但无差异,芽苗的长势也一样。因此,结合节约经济的角度考虑,40 g · L⁻¹ 的蔗糖浓度最适合葡萄柚的继代增殖,增殖系数达到 4.16;20 g · L⁻¹ 的蔗糖浓度显然最不适合葡萄柚的增殖,增殖系数极显著地低于其它蔗糖浓度下的,原因可能是蔗糖浓度过低,导致提供给植株生长的碳源和能源不足;蔗糖浓度为 30 和 60 g · L⁻¹ 时的增殖系数无差异,增殖系数都介于处理 1 和处理 3、处理 4 之间,造成这种现象的原因可能不一样,前者可能是因为蔗糖浓度低,满足不了芽苗生长的碳源和能源要求,后者可能是蔗糖浓度过高导致瓶内空气湿度变小或渗透压发生一些不利的变化。

2.5 生根培养

生根培养 40 d 后,在添加不同浓度 NAA 的 4

表 3 不同植物生长调节剂对丛生芽增殖的影响
Table 3 Effects of different plant growth regulators on the proliferation of Clustered shoots

处理 Treatment	激素浓度 Concentration of hormone (mg · L ⁻¹)			增殖系数 Multiplication coefficient	生长情况 Growth condition
	6-BA	IBA	GA		
1	0.1	0.0	0.0	2.12±0.06Hi	1/8 芽苗褐化死亡,芽浅绿色、弱,生长缓慢 1/8 of the shoots browned and died, the shoots were light green and weak with slow growth
2	0.1	0.1	0.0	1.98±0.03Ij	1/10 芽苗褐化死亡,芽浅绿色、弱,生长缓慢 1/10 of the shoots browned and died, the shoots were light green and weak with slow growth
3	0.1	0.1	0.2	2.02±0.03HIj	1/10 芽苗褐化死亡,芽浅绿色、弱,生长缓慢 1/10 of the shoots browned and died, the shoots were light green and weak with slow growth
4	0.1	0.2	0.0	2.13±0.08Hi	1/9 芽苗褐化死亡,芽浅绿色,生长缓慢 1/9 of the shoots browned and died, the shoots were light green with slow growth
5	0.1	0.2	0.2	2.13±0.03Hi	1/9 芽苗褐化死亡,芽浅绿色,生长缓慢 1/9 of the shoots browned and died, the shoots were light green with slow growth
6	0.5	0.0	0.0	3.08±0.09Ccd	芽深绿色,生长旺盛 Shoots were dark green with vigorous growth
7	0.5	0.1	0.0	3.13±0.03Cc	芽深绿色,生长旺盛 Shoots were dark green with vigorous growth
8	0.5	0.1	0.2	3.47±0.05Bb	芽深绿色,茎粗壮,节间较长,生长旺盛 Shoots were dark green with vigorous growth, the stems were thick and the internodes were relatively long
9	0.5	0.2	0.0	3.40±0.05Bb	芽深绿色,茎粗壮,节间较长,生长旺盛 Shoots were dark green with vigorous growth, the stems were thick and the internodes were relatively long
10	0.5	0.2	0.2	4.25±0.08Aa	芽深绿色,茎粗壮,节间较长,生长旺盛 Shoots were dark green with vigorous growth, the stems were thick and the internodes were relatively long
11	1.0	0.0	0.0	2.32±0.03Gh	芽浅绿色、弱,生长缓慢 Shoots were light green and weak with slow growth
12	1.0	0.1	0.0	2.48±0.03Fg	芽绿色,有极少量愈伤组织玻璃化,生长一般 Shoots were green and grewed generally with very small amount of callus vitrification
13	1.0	0.1	0.2	2.82±0.03De	芽绿色,有极少量愈伤组织玻璃化,生长一般 Shoots were green and grewed generally with very small amount of callus vitrification
14	1.0	0.2	0.0	2.68±0.03Ef	芽绿色,少量愈伤组织玻璃化,生长旺盛 Shoots were green and grewed vigorously with a small amount of callus vitrification
15	1.0	0.2	0.2	3.03±0.09Cd	芽绿色,节间长,少量愈伤组织玻璃化,生长旺盛 Shoots were green and grewed vigorously with a small amount of callus vitrification, the internodes were long

注：数据以平均值±标准差表示；同一列中不同大写字母表示处理间在 0.01 水平差异显著；同一列中不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。
Note: Data are expressed as mean ± SD; Values within the same column follow by the different uppercases are significantly different among treatments at the level of 0.01; Values within the same column follow by the different lowercases are significantly different among treatments at the level of 0.05.

种生根培养基中均能诱导生根(表 5),但侧根数少,一般为 1~3 条(图版 I:F);少数芽苗只能形成根原基,不能分化出根。在 1/2 MT+蔗糖 40 g · L⁻¹ + AC 0.1%里添加低浓度的 NAA 有利于生根,NAA 浓度过高则抑制根的诱导和生长。综合比较各培养基根的诱导和生长情况,以 1/2 MT + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + 蔗糖 40 g · L⁻¹ + AC 0.1%培养基上的生根效果最好,生根率达 68.89%,根系粗壮。

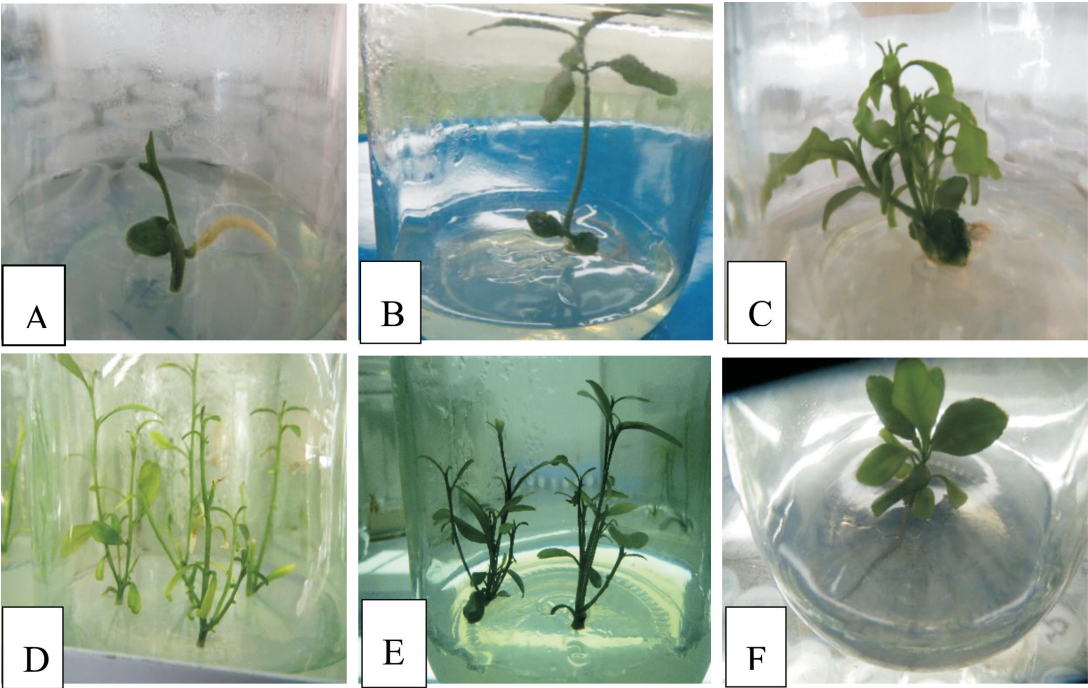
2.6 移栽

生根苗经炼苗后移栽至基质(草泥炭:珍珠

岩:红土=2:1:1,v/v/v)中,21 d 后,幼苗开始长出新叶,30 d 后进行统计,移栽成活率在 75%以上。

3 讨论与结论

在植物组织培养中,获得无菌外植体是材料培养成功的必要前提,通过化学药剂消除植物材料上的杂菌是其中的一个重要环节。本研究中对葡萄柚种子的消毒可把污染率降至 18.33%,同时萌发率为



图版 I 葡萄柚种子无菌苗组培快繁体系建立过程 A. 种子萌发; B. 无菌苗的形成; C. 从子叶切断诱导出的丛生芽; D. 继代培养中长势弱、浅绿色的丛生芽; E. 继代培养中粗壮、深绿色的丛生芽; F. 组培苗生根。

Plate I Establishment process of rapid propagation for sterile seedlings of grapefruit by tissue culture A. Seed germination; B. Formation of a sterile seedling; C. Clustered shoots induced from the the cotyledon cut; D. Weak and pale green buds in the subculture; E. Thick and dark green buds in the subculture; F. Rooting of a tissue culture seedling.

表 4 不同浓度蔗糖对丛生芽增殖的影响

Table 4 Effects of different concentrations of sucrose on the proliferation of clustered shoots

处理 Treatment	蔗糖浓度 Concentration of sucrose (g · L ⁻¹)	增殖系数 Multiplication coefficient	长势 Growth potential
1	20	2.80±0.12Cc	++
2	30	3.40±0.07Bb	++
3	40	4.16±0.10Aa	+++
4	50	4.20±0.13Aa	+++
5	60	3.36±0.10Bb	+

注：数据以平均值±标准差表示；同一列中不同大写字母表示处理间在 0.01 水平差异显著；同一列中不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著，下同。+++：长势极好，++：长势较好，+：长势一般。

Note: Data are expressed as mean ± SD; Values within the same column follow by the different uppercases are significantly different among treatments at the level of 0.01; Values within the same column follow by the different lowercases are significantly different among treatments at the level of 0.05, the same below. +++: Excellent growth potential; ++: Good growth potential; +: General growth potential.

89.91%，与同属的椪柑、红肉脐橙、耐湿脐橙、HB 柚和纽荷尔脐橙成年态节间茎段消毒的污染率差不多，但萌发率要显著高于它们，且成年态节间茎段的取材时间受到很大限制，需采用二次消毒、相对繁琐（王子成等，2005；张家银等，2008；Huang *et al.*，2005）。因为柑桔属植物处于气候温暖、雨水充足的

表 5 NAA 对丛生芽生根的影响

Table 5 Effects of NAA on rooting of clustered shoots

处理 Treatment	NAA 浓度 NAA concentration (mg · L ⁻¹)	生根率 Rooting rate (%)	根的生长情况 Growth condition of roots
CK	0.0	0.00±0.00Dd	无
1	0.1	46.67±6.66Bb	++
2	0.2	68.89±3.85Aa	+++
3	0.5	40.00±0.00BCb	++
4	1.0	31.11±3.85Cc	+

注：+++：极粗壮；++：较粗壮；+：粗壮。
Note: +++:extreme sturdy; ++:more sturdy; +:sturdy.

环境中，成年树在生长过程中携带大量的细菌和真菌，使用二次灭菌的方法虽然能降低污染率，但也使外植体的死亡率增加，萌发率降低。葡萄柚成熟种子藏于果实中，取出来后携带的微生物也较少，消毒过程相对其它外植体更简单，且种子易于保存，不受季节的限制，取材较其它外植体方便。利用无菌的葡萄柚种子进行萌发，短时间内可获得大量合格的无菌小苗，为下一步快繁打下良好的基础。

植物腋芽在一定浓度的激素作用下可形成大量丛生芽，从而显著提高繁殖倍数（严昌敬，1990）。6-

BA 和玉米素(ZT)是诱导葡萄柚芽再生的有效的细胞分裂素,其中使用 6-BA 的成本更低(Randall *et al.*, 2011)。采用 6-BA 和 IBA 的基本组合进行丛生芽的诱导,发现诱导效果最好的 6-BA 浓度是 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,与纽荷尔脐橙的初代诱导相似(陈泽雄等, 2007)。在组织培养中,GA 主要用于诱导离体芽的萌发和伸长(王玉英等, 2006),本研究证实 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA 对葡萄柚初代芽的诱导具有一定的促进作用,但不显著。无菌实生苗子叶切段的初代诱导培养不仅实现了丛生芽的启动,而且在一定程度上进行了芽的增殖。

增殖系数对整个快繁技术能否成功的影响很大,有些植物快繁不能推广的一个重要原因是增殖系数偏低,间接地提高了生产成本(梁称福, 2005)。继代试验中沿用了诱导试验 6-BA 和 IBA 的基本组合,这是丛生芽增殖培养中的常见组合(Rehana *et al.*, 2013)。6-BA 浓度对丛生芽的增殖存在显著影响,浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时最适合丛生芽的增殖生长,与化州橘红的增殖培养里 6-BA 的最佳浓度接近(李凯等, 2011),与尤溪金柑的增殖培养里 6-BA 的最适浓度相差较大(金建涛等, 2014)。本研究证明增殖培养基里添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 能显著提高葡萄柚丛生芽的增殖系数, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA 的激素组合最适合葡萄柚丛生芽的增殖生长,增殖系数达 4.25。

糖类可为培养物生长发育提供碳源和能源,并有调节培养基渗透压的作用,组培中最常用的糖类是蔗糖(陈世昌, 2011)。蔗糖浓度过低,继代芽生长的碳源和能量供应不足,生长不良;蔗糖浓度过高,导致继代芽失水和生长不良。本研究表明葡萄柚增殖阶段的最适蔗糖浓度为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,此时丛生芽的增殖系数最高,长势最好,且不造成材料浪费。

由于柑桔类丛生芽生根困难,生根试验中所有的处理生根侧根数都较少,一般为 1~3 条,这可能与葡萄柚的基因型有关,如何诱导葡萄柚的离体芽苗长出有大量侧根根系,还需作进一步研究。柑桔属植物通过微芽嫁接技术建立快速繁殖种苗法已有不少成功的报道(姜玲等, 1995; 董高峰等, 2001; 刘文龙等, 2009),在生产上可以使用微芽嫁接的方法获得生根的葡萄柚离体小苗,微芽嫁接小苗移栽成活后,将其及时二次嫁接到健壮的大砧木上,可以有效克服茎尖嫁接苗直接移栽苗期长的不足,且二次嫁接苗生长迅速、健壮(李丽等, 2011)。

本研究以种子无菌苗为起始外植体建立葡萄柚的组培快繁技术体系,为其规模化生产提供了可行的技术依据。但尚有许多方面还需进一步研究,如筛选丛生芽的最佳继代周期、最佳基本培养基等,尤其是提高生根率、移栽技术及微芽嫁接方面的研究。

参考文献:

- Chen SC(陈世昌). 2011. Plant Tissue Culture(植物组织培养)[M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社): 33
- Chen ZX(陈泽雄), Liu YQ(刘奕清), Lou J(娄娟). 2007. Improvement of shoot-tip micrografting through adventitious bud induction from *Citrus* stem explants(利用柑橘茎段诱导不定芽改进微芽嫁接技术的研究)[J]. *J Southwest Chin Norm Univ: Nat Sci Ed*(西南师范大学学报·自然科学版), **32**(1): 57-61
- Dong GF(董高峰), Huang T(黄涛), Li GG(李耿光), *et al.* 2001. Studies on the tube-grafting and micro-propagation of mature shatian pomelo(成年沙田柚树试管嫁接及微繁殖的研究)[J]. *Ecol Sci*(生态科学), **20**(3): 20-25
- Guo LR(郭林榕), Chen WG(陈文光), Xiong YM(熊月明). 2002. Marketing and development prospects of grapefruit(葡萄柚的产销及发展前景)[J]. *Fujian Fruits*(福建果树), **3**: 34-35
- He H(贺红), Pan RC(潘瑞炽), He YW(何亚文), *et al.* 1997. A study on the tissue culture and plant regeneration of *Citrus reticulata* cv. Tankan(蕉柑组织培养与植株再生的研究)[J]. *J S Chin Norm Univ: Nat Sci Ed*(华南师范大学学报·自然科学版), **4**: 63-66
- Huang JQ, Yin LY, Yang XH, *et al.* 2005. *In vitro* plant regeneration from the mature tissue of navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) by direct organogenesis[J]. *Agric Sci Chin*, **4**(3): 236-240
- Hong L(洪柳), Liu YZ(刘永忠), Deng XX(邓秀新). 2005. Obtaining of ponkan (*Citrus reticulata* blanco) tetraploid by culturing embryos of mature seeds(椪柑成熟种子胚培养获得四倍体植株)[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报), **32**(4): 688-690
- Jin JT(金建涛), Lai ZX(赖钟雄), Liu SC(刘生财), *et al.* 2014. Optimization of plantlet regeneration system and in vitro conservation of *Fortunella crassifolia* cv. Youxijingan(尤溪金柑离体再生体系优化及试管苗保存)[J]. *J Fujian Agric For Univ: Nat Sci Ed*(福建农林大学学报·自然科学版), **43**(3): 256-262
- Jiang L(姜玲), Wan SY(万蜀渊), Wang YH(王映红), *et al.* 1995. Improvement on the shoot-tip grafting method(柑橘茎尖嫁接操作方法的改进及研究)[J]. *J Huazhong Agric Univ*(华中农业大学学报), **14**(4): 381-385
- Liang CF(梁称福). 2005. Literature review of research and application on plant tissue culture(植物组织培养研究进展与应用概况)[J]. *Nonwood For Res*(经济林研究), **23**(4): 99-105
- Li JM(李浚明), Zhu DY(朱登云). 2005. Plant Tissue Culture Tutorial(植物组织培养教程)[M]. 3rd Ed(第3版). Beijing(北京): China Agricultural University Press(中国农业大学出版社): 20
- Li K(李凯), Chen XT(陈雄庭), Hong L(洪磊), *et al.* 2011. Improving on mature-type *Citrus grandis* stem culture in vitro(化州橘红成年态茎段离体培养的改良)[J]. *J Trop Organ*(热带生物学报), **2**(1): 42-45

- Li L (李丽), Luo JQ (罗君琴), Xu JG (徐建国), *et al.*. 2011. Investigation of techniques of local characteristic citrus varieties shoot-tip micrografting for virus-free seedling(地方特色柑桔品种茎尖微芽嫁接脱毒育苗技术初探)[J]. *Xiandai Horticulture* (现代园艺), **2**: 3+46
- Li L (李丽), Luo JQ (罗君琴), Xu JG (徐建国), *et al.*. 2011. Preliminary report of grapefruit shoot-tip micrografting for virus-free seedling(葡萄柚茎尖微芽嫁接脱毒育苗技术研究初报)[J]. *Zhejiang Citrus* (浙江柑橘), **28**(3): 12-13
- Lu RS (陆荣生), Han ML (韩美丽), Huo XJ (霍秀娟), *et al.*. 2013. Study on regeneration system of adventitious bud from grapefruit(葡萄柚不定芽再生体系建立研究)[J]. *Acta Agric Jiangxi* (江西农业学报), **25**(6): 35-38
- Liu WL(刘文龙), Li JJ(李进进), Chen SY(陈升云), *et al.*. 2009. Discussion on orange micro-shoots grafting in tube(柑橘试管内微芽嫁接方法探讨)[J]. *J Guangdong Ind Techn Coll* (广东轻工职业技术学院学报), **8**(3): 14-16+20
- Li Y (李悦), Hou BB (侯滨滨), Jing BY (静宝元). 2010. The antibacterial activity study of grapefruit essential oil(葡萄柚精油抑菌活性的研究)[J]. *Food Res Devel* (食品研究与开发), **31**(11): 237-240
- Randall PN, Terence JE. 2011. Mixture screening and mixture-a-mount designs to determine plant growth regulator effects on shoot regeneration from grapefruit (*Citrus paradise* macf.) epicotyls[J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, **47**(6): 682-694
- Rehana S, Alam MS, Islam KS, *et al.*. 2013. Influence of growth regulators on shoot proliferation and plantlet production from shoot tips of banana[J]. *Prog Agric*, **20**(1): 9-16
- Wang CX (王彩霞). 2009a. Effect of plant growth regulators on the morphogenesis of three citrus species(植物生长调节剂对 3 个柑橘品种形态建成的影响)[J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), **25**(2): 16-19
- Wang CX (王彩霞). 2009b. Study on in vitro stem culture of adult citrus(柑橘成年态茎段培养技术体系研究)[J]. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), **1**: 47-49
- Wu HB (吴海波), Liu LM (刘惠民). 2005. Progress of grapefruit cultivation and research(葡萄柚的栽培及研究概况)[J]. *Nonwood For Res* (经济林研究), **23**(1): 69-73
- Wang RX (王任翔), Gao CW (高成伟), Li JR (李洁荣), *et al.*. 2003. Tissue culture of *Citrus* cv. Olinda *in vitro*(欧林达夏橙组织培养研究)[J]. *J Guangxi Norm Univ:Nat Sci Ed* (广西师范大学学报·自然科学版), **21**(2): 71-74
- Wang YY(王玉英), Gao X(高新). 2006. Technical Manual of Plant Tissue Culture(植物组织培养技术手册)[M]. Beijing(北京): The JinDun Publishing House(金盾出版社): 43-44
- Wang ZC(王子成), Deng XX(邓秀新). 2002. Cryopreservation of *Citrus* protoplasts(柑橘原生质体的超低温保存)[J]. *J Henan Univ:Nat Sci Ed* (河南大学学报·自然科学版), **32**(3): 38-40
- Wang ZC(王子成), Li ZA(李忠爱), Deng XX(邓秀新). 2005. Studies on the methods of mature *Citrus* stems disinfection(柑橘成年态茎段外植体消毒方法研究)[J]. *J Henan Univ:Nat Sci Ed* (河南大学学报·自然科学版), **35**(2): 57-60
- Yan CJ(颜昌敬). 1990. Plant Tissue Culture Manual(植物组织培养手册)[M]. Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社): 56-79
- Yang LZ(杨连珍). 1996. Summary of grapefruit(葡萄柚概述)[J]. *Chin J Trop Agric* (热带作物研究), **25**(2): 67-71
- Ye YM(叶荫民). 1997. Grapefruit(*Citrus paradisi* Macf.) and development prospects in China(葡萄柚(*Citrus paradisi* Macf.) 及其在我国的发展前景)[J]. *S Chin Fruits* (中国南方果树), **26**(5): 7-9
- Yang ZN, Ingelbrecht IL, Louzada E, *et al.*. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradise* Macf.) [J]. *Plant Cell Reports*, **19**: 1 203-1 211
- Zhou HX(周海霞). 2010. Different virus elimination methods in species variation of *Citrus siensis* Osbeck cv. Hongjiang and the effect of the virus of liberobacter asiaticum(不同脱毒方法对红江橙种性变异及脱黄龙病毒效果的影响)[D]. Zhanjiang(湛江): Guangdong Ocean University(广东海洋大学)
- Zhang JY(张家银), Guo C(郭琛), Xie YM(谢玉明), *et al.*. 2008. In vitro system for the regeneration of mature intermodal stem segments of ponkan(*Citrus reticulata* blanco) (椪柑成年态节间茎段再生体系的建立)[J]. *J Hunan Agric Univ:Nat Sci Ed* (湖南农业大学学报·自然科学版), **34**(2): 182-185

(上接第 816 页 Continue from page 816)

- (β -葡聚糖酶活力测定条件研究)[J]. *Feed Ind Mag* (饲料工业), **30**(2): 20-21
- Guo XJ(郭秀洁), Zhu JB(朱靖博), Zheng M(郑敏), *et al.*. 2010. Extraction and hydrolysis of total saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright(黄姜总皂苷的提取及其水解条件)[J]. *J Dalian Polytechnic Univ* (大连工业大学学报), **29**(3): 161-164
- Ji XM(季秀美), Su Z(舒展), Xu QM(许琼明), *et al.*. 2013. Simultaneous determination of eight saponins in alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis* by HPLC-ELSD(HPLC-ELSD法测定白头翁总皂苷碱水解产物中 8 种皂苷)[J]. *Chin Trad & Herb Drugs* (中草药), **44**(11): 1 416-1 419
- Kim DS(金东史), Cue YS(崔允植), Yu HS(鱼红闪), *et al.*. 2001. Ginsenoside Rh2 prepared from enzyme reaction(酶法制备人参皂甙 Rh2 的研究)[J]. *J Dalian Inst Light Ind* (大连轻工业学院学报), **20**(2): 99-104
- Li DP(李典鹏), Zhang HR(张厚瑞). 2000. Studies and uses of Chinese medicine Luohanguo——a special local product of Guangxi(广西特产植物罗汉果的研究与应用)[J]. *Guihaia* (广西植物), **20**(3): 270-276
- The State Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China(国家药典委员会). 2010. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典 一部)[G]. Beijing(北京): Chinese Medical Science and Technology Press(中国医药科技出版社), **1**: 197
- Wu LJ(吴立军). 2007. Natural Pharmaceutical Chemistry(天然药物化学)[M]. 5th Ed (第 5 版). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社): 81-88