

柑桔无病原体苗培育研究进展

董高峰, 李耿光, 张兰英, 黄涛

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要: 简述了柑桔无病原体苗培育的 2 种主要方法: 热处理法和组织培养法。其中重点介绍了利用珠心培养、胚珠培养以及茎嫁接脱除柑桔病原体的研究现状和最新进展, 并就目前存在的问题及今后的发展方向进行了探讨。

关键词: 热处理; 茎尖嫁接; 组织培养

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)01-0053-06

Advances in the research of cultivating pathogen-free seedlings of citrus

DONG Gao-feng, LI Geng-guang, ZHANG Lan-ying, HUANG Tao

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Two major methods on cultivating pathogen-free seedlings of citrus were briefly recounted; heat treatment and tissue culture. We particularly introduced the recent researching-situation and advances to eliminate citrus pathogens by nucellus culture, ovule culture and shoot-tip grafting, and also discussed the present questions and future direction of development.

Key words: Heat treatment; shoot tip grafting; tissue culture

柑桔的病原体病害在全世界 40 多个柑桔生产国普遍都有发生, 它们的病原体通常存在于长期进行无性繁殖的老系品种中, 能使植株长势减弱, 生活力降低, 生长期变短, 产量降低, 供应期缩短, 品质变劣, 严重地威胁柑桔类的生产。

柑桔的病原体病害主要可分为病毒病、类病毒病和类菌原体病 3 种, 其中最重要的包括: 青果病 (Greening) 或黄龙病 (Yellow-shoot)、衰退病 (Tristeza)、裂皮病 (Exocortis)、鳞皮病 (Psorosis)、碎叶病 (Tafferleaf) 等^[1]。蚜虫传播的衰退病是一

种广泛传播的病毒病, 在巴西圣保罗州, 衰退病就曾使 600 万株甜橙死亡 (占总数的 75%); 美国 1939 年在加利福尼亚州, 1951 年在佛罗里达州; 以色列在 1970 年, 也先后造成毁灭性灾难^[2]。阿根廷也曾因病毒危害毁灭了 1 000 万株柑桔^[1]。

在我国南方地区如广东、广西、福建等地柑桔黄龙病为害尤为严重。经过 40 多年的研究, 已证明是由类菌原体病原和木虱的传延媒介引起的。这种毁灭性的病害, 尚在向云南、江西、浙江、四川等地扩散传延, 造成很大损失。1975~1976

收稿日期: 1999-07-19

作者简介: 董高峰 (1971-), 男, 在读博士研究生, 植物细胞工程专业。

基金项目: 中国科学院地方台作基金项目 (9302), 广东省科技创新百项工程 (99), 中美日国际合作项目 (9807)。

年,仅广东汕头地区因黄龙病而死掉的柑桔树就达 600 万株以上^[4]。柑桔裂皮病,自 1965 年由摩洛哥传入四川重庆以来,据 Roistacher^[5]的调查,四川的柠檬已 100% 的感染,并在广西、湖南及湖北姊归等地传延到甜橙及密柑上。

由于柑桔病毒、类病毒以及类菌原体病害主要通过无性繁殖传染,因此,建立无病原体母本园、采穗圃,进行无病原体的工厂化育苗,供应无毒接穗和苗木是消灭柑桔病原体病的重要途径。美国、埃及、巴西、菲律宾、西班牙、日本和其它一些地方都在开展这方面的工作,并已经取得一定的成效^[6~8]。西班牙还决定从 1975 年起开始全面供应无毒苗木,10 a 内使全国 18 万 hm²柑桔无病原体化^[9]。

目前,无病毒的培育成为发展柑桔生产的重要一环。它主要分为热处理法和组织培养法 2 大类,后者又可分为:(1) 胚珠培养;(2) 珠心培养;(3) 茎尖微型嫁接法。

1 热处理脱毒

热处理脱毒法由于其简便易行,效果比较显著,在国内外应用较久。最早热处理法是应用于治疗桃苗的 'X' 病毒。最初主要是采用温水 50 °C 浸泡接穗,但对接芽的伤害比较严重^[1]。林孔湘等^[10]在华南农学院首创用蒸汽热处理柑桔黄龙病接穗,取得了良好效果。柑桔的接穗热处理要求在暖房中先预处理(白天最高温度 28~40 °C,夜晚 24~27 °C)3~4 个月,效果较好。接穗从果园取回后,如果立即用湿热空气处理时,它们不能成活。但当接穗首先通过预处理后再进行热处理(50 °C,4 h),接穗都能很好地存活。骆学海等^[11]则进一步对两 2 种典型的黄龙病症状“均匀黄化病型”和“斑驳型”的柑桔苗进行了热处理,他们发现 49 °C 湿热空气处理 50~60 min 或用 50 °C 处理 50 min 就可以消灭黄化病病原一类立克氏体。但高日霞和郑和睦^[12]的实验却表明:尽管柑桔苗木经 49 °C 温热空气处理 50 min 后疗效颇佳,但以后苗木的生长势却较弱。

日本的家城洋之^[13]详细研究了热处理对柑桔衰退病毒、矮缩病毒和碎叶病毒的去毒效应。

他们发现去除夏橙、柠檬上的 CTV 病毒(衰退病毒),最短的热处理 8 d 即可得到无毒苗,但要保证去毒,则需 4~5 周。另一方面,对于较大的母树则需要 30 周以上的热处理才可以保证全株无毒。矮缩病毒(SDV):盆栽温州蜜桔白天 40 °C 下 12 h,夜间 30 °C 下 12 h 进行 6~7 周热处理,即可获得无 SDV 的苗木;碎叶病毒(CTLV):2~4 年生盆栽树苗以白天 41 °C 下 12 h,夜间 31 °C 下 12 h 的交替温度处理,要经 92 d 以上才可获得无毒苗木。因此,不同品种,不同的病毒,热处理的温度和时间各异。

柑桔植株防毒热处理的方法:林孔湘等^[14]将柑桔用塑料罩放在温室中,处理 3~4 个月,白天温度 28~30 °C,夜晚 27~28 °C,放置少量水在培养箱容器底部,即可发生湿热气体。美国加州大学将要处理的品种,嫁接在特洛亚积橙砧上,放入调温培养箱中,温度保持白天 40 °C(6 h),夜晚 30 °C 8 h,芽接后的植株生长 4~5 周后弯倒在培养箱中,放置 7~12 周后,取出促进芽的萌发生长^[15]。苹果、葡萄植株的防毒,也可用同样的热处理装置,如能应用自动控制的人工气候箱进行热处理就更为方便。

热处理法治疗柑桔病原体虽然有较显著的效果,但经处理后的苗木和接穗的存活率较低,且对护理要求较严格,护理不好易造成苗木大量死亡^[11]。因此热处理法目前还不宜广泛用于处理生产上种植的苗木和接穗,仅可用于消毒少量苗木和接穗,以供各地建立无病原体母本园。

此外,热处理虽然对去除大多数柑桔病原体有效,但是对于那些基本的病毒如裂皮病毒、顽固病毒的脱除却非常困难^[16]。

2 柑桔组织培养法脱毒

柑桔组织培养法一般通过珠心培养、胚珠培养以及茎尖微型嫁接来获得无病原体种苗。前两种技术主要依据大多数柑桔病原体不能通过种子传染,由无性胚胎发生所产生的珠心胚植株具有同母本相同的特性;茎尖嫁接技术的有效性主要是依据 White^[17]和 Morel 等^[18]的研究;病原体在植物体内分布的不均一性,顶端分生组织几乎

没有或检查不出病原体;嫁接后存活后的植株与母本是完全一致的。

2.1 离体珠心培养

人们很早就已意识到可以对多胚性柑桔品种进行珠心培养以获得无病毒珠心胚植株^[19]。最早 Ranga-Swamy^[20]通过培养多胚性品种的珠心获得珠心胚,但是他在培养的时候就已经形成了珠心前胚。西班牙的 Gonzalez Sicilia 等^[1]播种主要的带病良种甜橙,从多胚性种子得到避毒的新生系。Rangan 等^[21]则第一个成功地诱导出单胚品种珠心胚的形成。Esan 等^[22]还对单胚品种的不定胚胎发生进行了大量的研究。

目前,珠心胚培养已在诱导许多单胚柑桔品种产生珠心胚上获得成功。Navarro 等^[23]先后在无核良种的 Navelate、Washington Navel、Precoz、Navelina Foyos Washington、Newhall 和无核温州蜜桔上用组织培养法培养珠心胚得到了无病毒植株。后来 Navarro 等^[23,24]又从单胚性的克里曼丁桔上,用组织培养方法,培养出无病毒的 Fina、Nules、Oroval 等良种珠心苗。这些无病毒珠心苗嫁接在抗病毒的特洛亚枳橙砧木上,还可以进行结果品质的鉴定。

从不同果龄的果实中获取的珠心在很大程度上可以影响珠心胚的形成。Bitters 等^[25]曾先后成功地诱导出授粉后 10~18 周的 Temple tangor 品种珠心胚的形成,但是其早期和后期的果实都没能成功。Esan^[22]也诱导出授粉后 11~12 周的 Etrog citron 产生珠心胚。Juavel 等^[26]则使用授粉后 12~14 周的 Clementine 果实诱导产生珠心胚。实践证明:适合于产生珠心胚的果实,应是从心形期到早期子叶形成的阶段。

利用珠心胚培养新生系避毒的方法简便易行,其缺点是约有 26% 的变异,同时珠心胚实生苗会具有各种童期性状,如多刺和结果晚,多数品种往往需要 10 a 以上才能结果^[1,2],这极大地影响了它在实践中的应用。

2.2 离体胚珠培养

从无籽的多胚柑桔品种中获取珠心胚植株是比较困难的,一些受控制的杂交品种则比较容易诱导出种子,但是对另外一些品种如脐橙

(Navel),由于其大孢子母细胞极易降解而导致很难获得任何种子。这种问题可以在它们败育之前通过离体胚珠培养加以解决。Bitters 等^[25]在授粉时分离胚珠中的珠心加以培养获得了 Robertson navel、sweet orange 的珠心胚植株。Button 和 Bornman^[28]则从发育的果实胚中分离出完整的胚珠和珠心进行培养而获得了 Washington navel 的珠心胚植株。

胚珠培养主要被用来诱导那些种子易降解的多胚柑桔品种产生珠心胚,如 Washington navel、Robertson navel 以及 Precoz、Ponkan 等品种。以前从单胚品种中试图培养不育或未授粉的胚珠都失败了。胚珠可以从发育的果实或花芽分化期的子房中分离出来,分离时的果龄不会明显影响其外植体诱导产生胚状体的成功率。胚珠通常来源于外源授粉后花发育所形成的果实,从实践的观点来看,使用去雄后花发育成的果实中的胚珠最适宜^[23]。

Navarro 等^[23]还发现柑桔胚珠诱导胚状体产生的机率是相当高的。胚珠能够产生一种类似愈伤的组织,迅速分化形成胚状体,与前胚很相似。Button 和 Bornman^[28]对此进行了详细的研究,并将之命名为假胚芽。胚珠的发育非常缓慢,它们必须移入不含麦芽提取物并附加 1 mg/L GA₃ 或 27 mg/L 腺嘌呤的培养基中才可诱导生根^[29,30]。

和珠心胚一样,胚珠培养获得的植株同样具有多刺,童期长,易产生变异的特点^[31]。已有报道表明:胚珠培养对于去除 Exocortis、Psorosis、Concave gum 和 Vein enation 病毒十分有效^[23,25],但对于去除其它柑桔病毒的效果还不太清楚。

2.3 离体茎尖嫁接

通过茎尖培养获得无病原体植株最初主要是运用在草本植物上^[32],但以后却被广泛应用到其它植物上,如葡萄^[33]、苹果^[34]、梨^[35,36]、大豆^[37]、龙眼等^[38]。但是到目前为止,试图在柑桔类上通过茎尖培养来获得无病原体苗都没有成功。为此,在茎尖培养的基础上发明了茎尖微型嫁接技术,并已初步获得了一些无病原体品种。

Murashige 等^[31]最早将几种柑桔的茎尖嫁接在砧木实生苗上获得了成功。经检测,这些存活

的植株不含有 exocortis 病毒并且不具备童期性状。1975年, Navarro^[43]详细研究了柑桔的茎尖嫁接技术, 他先后将 Lemon、lime 和 Citron 等多种柑桔品种的茎尖嫁接到“Troyer”枳橙实生苗上, 并且获得得了 30%~50% 的嫁接成功率, 嫁接苗从室内移植到大田的存活率也超过了 95%。通过田间指示植物鉴定表明: Lemon、lime 和 Citron 的嫁接苗都成功地去除了 Tristeza、Psorosis 病毒以及 Stubborn spirolasma、Exocortis 类病毒, 并且所有这些无病毒苗都没有产生童期性状。在此基础上他还总结出一套规范性的茎尖嫁接程序, 已被以后的许多实验室所采用。它们具体包括: (1) 砧木的准备; (2) 接穗的准备; (3) 嫁接; (4) 嫁接苗的管理; (5) 移植入大田。其中他们所设计的倒“T”字形嫁接法已成为应用最为广泛的嫁接方式。

随后, 离体茎尖嫁接技术迅速发展起来。1976年, Navarro^[43]开始在西班牙应用这种方法来生产无病毒的柑桔母本树, 大量推广无病毒接穗。1980年以来, 西班牙、美国、以色列、巴西、日本等国也都在研究采用茎尖微型嫁接法来培育无病原体柑桔母本树, 以防治柑桔速衰病、鳞皮病、裂皮病、青果病等病毒、类病毒和类菌原体病^[40]。Navarro^[41]应用茎尖微型嫁接, 采取甜橙、克里曼丁桔茎尖带有 3 个叶原基、约 0.14~0.18 mm 长的生长点, 嫁接到灭菌组培的特洛亚枳橙上, 获得了 100% 的无病毒苗, 去掉了包括裂皮病、速衰病、叶脉突出病、缩叶病等病毒病, 但鳞皮病病毒难以根除。茎尖若从田间或温室 18~25 °C 气温下采取, 经过茎尖嫁接获得的苗木只有 10% 以下的植株无毒, 而从 27~32 °C 的暖室中采集的茎尖经微型嫁接所获得的苗木则有 72% 是无毒的植株。说明茎尖嫁接法脱除病原体的效果还与一定的生态环境有关。Mukhopadnysy 等^[42]还首次采用双嫁接法来鉴定 Tristeza、Greening 等病毒, 并且成功地获得了无病毒的 Darjeeling orange 嫁接苗, 将良种繁殖的时间从 2 a 缩短到 1 a 左右。目前西班牙、美国已经将现有的所有柑桔良种都用茎尖嫁接法生产出无病原体的母本树(如脐橙、夏橙、温州蜜柑、克里曼丁柑、柠檬等), 然后采取接穗进行繁殖推广。

通过茎尖嫁接技术来获取无病原体苗的工作在我国开展的也较早。早在 1978 年, 李耿光等^[41]就获得了暗柳、雪柑和柚子等 3 个柑桔品种的离体茎尖培养植株, 并首次采用“倒 T 字形”方式将甜橙(Citrus sinensis)带 3 个叶原基的茎尖嫁接到枳壳实生苗上, 获得了嫁接绿苗 18.5% 的成活率。但他们没有进一步做病原体鉴定的工作。从 1980 年开始, 华中农大^[41]进行了大量的柑桔茎尖微型嫁接研究, 目前已经取得一定的成功, 先后得到了将脐橙、夏橙等优势株系嫁接到抗病毒的特洛亚枳橙、卡里佐桔橙、枳柚等砧木的良种营养系无毒母本树, 并繁殖推广到四川、广西、湖北、湖南、江西等省。但他们的工作以去除速衰病、裂皮病病毒为主, 对其它一些病毒、类病毒和类菌原体未做更详细的鉴定。同时, 中国农科院柑桔所也在茎尖嫁接脱毒方面做了大量的工作。赵学源等^[44]利用茎尖嫁接获得了无裂皮病毒(Exocortis)的暗橙、伏令夏橙、尤力克柠檬和费米耐劳柠檬的植株。蒋元晖等^[45]则获得了无裂皮病的脐血橙品种。他们还进一步将传统的倒 T 字形嫁接切口改为三角形切口, 提高了嫁接成活率, 并通过采用“二次嫁接法”将从茎尖嫁接到鉴定脱毒效果的时间从 1 a 缩短至 0.5 a。蒋元晖^[46]还具体研究了柑桔茎尖嫁接过程所应着重注意的问题, 并提出了相应的改进措施, 如切割技术、茎尖切口方形以及茎尖大小对脱毒率和嫁接成功率的影响。张秋胜等^[47]则进一步对传统的茎尖嫁接技术作了改进。他将 Navarro 原有的 5 个步骤缩短为 3 个步骤: (1) 砧木不剥皮播于培养土; (2) 茎尖嫁接; (3) 移栽, 从而完全省去了试管培养过程。

除了柑桔类外, 茎尖嫁接技术还广泛运用于其它果树的脱毒上。如桑树^[48]、梨^[49]等品种, 已成为果树脱除病原体病最主要的方式。

3 小结与展望

尽管柑桔珠心胚培养能够有效地去除绝大多数病毒和类菌原体, 但是珠心胚植株常常带有许多童期性状: 过量旺长, 多刺, 结果期极长等等, 往往要栽培许多年后才具备商业价值。此外,

珠心胚植株尤其是离体培养的珠心胚植株常常会发生许多变异。

热处理柑桔种苗不会导致明显的变异,也不会带有各种童期化性状。但是这种技术不能有效地去除裂皮病(Exocortis)和木质陷孔病(Xyloporosis)等世界范围内大量传播的病毒。而且也很容易损伤种苗。

茎尖嫁接结合适当的热处理则很容易去除绝大多数的病毒和类菌原体,包括那些不易被热处理法所去除的病毒,而且茎尖嫁接不会产生变异,也不具有童期性状。因此,茎尖嫁接法是目前最有效的获得无病原体柑桔植株的途径,现在它已被广泛应用于各种柑桔品种的改良以获取可以大量繁殖的无病种苗。相信随着生物技术的迅速发展,茎尖嫁接技术将会与柑桔常规育种、体细胞杂交以及抗病基因转化等技术结合起来,在生产中发挥越来越大的作用。

参考文献:

- [1] 章文才. 果树的病毒病及无病毒良种繁育技术[J]. 园艺学文摘, 1986, 6(1): 1~12
- [2] Brlansky R H. Citrus tristeza virus. 13 popular in south Florida[J]. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 1986, 99: 66~69
- [3] 裘文达主编. 园艺植物组织培养[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986. 195
- [4] 柯冲. 柑桔黄病的病原研究与防治建议[J]. 中国柑桔, 1979, 34(3): 29~32
- [5] Roistacher C N 主编. 柑桔良种工厂化育苗及病毒鉴定[A]. 武汉: 华中农学院园林系整理编印, 1982. 1~20
- [6] Navarro L. Development of a program for disease-free citrus budwood in Spain[A]. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 1981, 70~73
- [7] Navarro L. Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its application, a review[A]. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 1981, 452~456
- [8] Zhao Xue-yuan. Citrus yellow-shoot. A review [A]. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 1981, 466~469
- [9] Navarro L. The citrus variety improvement program in Spain [A]. In. *Proc. 7th conf. IOCV.* Riverside, 1976, 198~202
- [10] 林孔湘, 骆学海. 柑桔黄梢病(黄龙病)治疗的初步研究[J]. 植物保护学报, 1965, 4(2): 169~175
- [11] 骆学海等. 柑桔黄龙病对热治疗的研究[J]. 植物保护学报, 1981, 8(1): 47~50
- [12] 高日霞, 郑和睦. 柑桔黄龙病治疗试验研究[J]. 植物保护学报, 1981, 8(1): 55~58
- [13] 家城洋之. 热处理对柑桔速衰病毒、矮缩病毒和碎叶病毒的去毒效应[J]. 果树试验报告 B (兴津), 1984, 11: 71~87
- [14] 林孔湘, 郑儒钰. 柑桔黄龙病热处理初步研究[J]. 植物病毒学报, 1964, 7(1): 61~65
- [15] Roistacher C N. Elimination of citrus pathogen in propagative budwood. 1. Budwood selection, indexing and thermotherapy[A]. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 1977, 3: 965~972
- [16] Murashige T, Birters P, Rangan T S, et al. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones [J]. *Hortscience.* 1972, 7: 118~119
- [17] White P R. Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaics in growing excised tomato root tips[J]. *Phytopathology.* 1934, 24: 1003~1011
- [18] Morel G. Producing virus-frees Cymbidiums [J]. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 1960, 19: 495~497
- [19] Roistacher C N, Calvan V and Navarro L. Concepts and procedures for importation of citrus budwood [A]. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 1977, 3: 133~136
- [20] Ranga-Swamy N S. Culture of nucellar tissue of citrus in vitro[J]. *Experientia.* 14: 111~112
- [21] Rangan T S, Murashige T and Birters W P. In vitro studies of Zygotic and nucellar embryogenesis in Citrus [A]. *Proc. 1st Int. Citrus Symp.* 1: 225~229
- [22] Esan E B. A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae [M]. Ph. D. Thesis. Riverside: University of California, 1973. 10~22
- [23] Navarro L, Jarez J, Ballester J F, et al. Obtencion de plantas nucelares libres de virus de diversas variedades de agrios del grupo Navel (C. Sinensis (L.) Osbeck) por cultivo de ovules in vitro [A]. *An. INIA. Ser. Prot. Vege.* 1979, 12: 95~113
- [24] Navarro L, Ballester J F, Juarez J, et al. The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) after four years [A]. Riverside: *Proc. 8th Conf. IOCV.* 1979, 289~294

- [25] Bitters W P, Murashige T, *et al.* Investigations on established virus-free plants through tissue culture [A]. Calif. Citrus Nurserymen's Soc. , 1970, **9**: 27~30
- [26] Juavez J, Navarro L and Guardida J L. Obtention de plantes de divers cultivars de demontiniers au moyen de la culture de nucelle in vitro [J]. *Fruits*, 1976, **31**: 751~762
- [27] Navarro L, Juarez J, Pina J A and Ballester J F. The citrus quarantine station in Spain [A]. Riverside: Proc. 9th Conf. IOCV (in press).
- [28] Button J and Bornman C H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of Washington navel orange in vitro [J]. *J. S. Afr. Bot.*, 1971, **37**: 127~134
- [29] Kochba J, Spiegel-Roy P and Safran H. Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus [J]. *Planta*, 1972, **106**: 237~245
- [30] Kochba J, Button J, Spiegel-Roy P, *et al.* Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acid and adenine sulphate [J]. *Ann. Bot.*, 1974, **38**: 795~802
- [31] Roistacher C N. Detection of citrus viruses by graft transmission: a review [A]. Riverside: In. Proc. 7th Conf. IOCV, 1975, IOCV, 175~185
- [32] Quak F. Meristem culture and virus-free plant, In. F. Reinert & Y. P. S. Bajaj (eds.). *Plant Cell tissue and organ culture* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1977, 598~615
- [33] Robacker C D and Chang C J. Shoot-tip culture of Muscadine grape to eliminate pierce's disease bacteria [J]. *Hortscience*, 1992, **27**(5): 449~450.
- [34] 王际轩, 李淑珍, 隋世琴等. 苹果组织培养苗离体嫁接的研究 [J]. *园艺学报*, 1985, **12**(3): 151~157
- [35] 薛光荣, 杨振英, 洪 霓等. 茎尖培养等处理脱除梨病毒的技术研究 [J]. *中国果树*, 1996, **3**: 9~11
- [36] 洪 霓, 王国平, 张尊平等. 梨病毒脱除技术研究 [J]. *中国果树*, 1995, **4**: 5~7
- [37] Grum M, Camloh M, Rudolph K and Ravnika M. Elimination of bean seed-borne bacteria by thermotherapy and meristem culture [J]. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 1998, **52**: 79~82.
- [38] 陈菁瑛, 陈景耀. 龙眼茎尖离体培养及其脱毒效果 [J]. *植物生理学通讯*, 1996, **32**(2): 126~131
- [39] Navarro, L. . Roistacher. C. N. , and Murashige. T. , 1976. Effect of size and source of shoot-tips on psorosis-A and exocortis content of navel orange plants obtained by shoot-tip grafting in vitro [A]. Riverside: In. Proc. 7th Conf. IOCV, 1975, IOCV, 194~197
- [40] 高原利雄等. 简易茎尖嫁接法脱柑桔病毒 [J]. *果树试验场报告*, 1986, **8**: 13~24
- [41] Navarro L, Juarez J, Ballester J F and Pina J A. Elimination of some citrus pathogens producing psorosis-like leaf symptoms by shoot-tip grafting in vitro [A]. Riverside: In. Proc. 8th Conf. IOCV, 1975, 1980, 162~166
- [42] Mukhopadhyay S, Jaishree Rai, Sharma B C, *et al.* Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting [J]. *Journal of Hortscience*, 1997, **72**(3): 493~499
- [43] 李耿光, 胡兰娟, 黄群声等. 柑桔茎尖培养的初步研究 [J]. *植物生理学报*, 1978, **4**(2): 189~195
- [44] 赵学源, 蒋元晖, 李世菱等. 我国柑桔栽培品种的裂皮病的鉴定与脱除 [J]. *园艺学报* (*Acta Horticulture Sinica*), 1986, **13**(2): 91~94
- [45] 蒋元晖, 邱柱石, 苏维芳, 赵学源. 利用茎尖嫁接脱毒培养无裂皮病的脐血橙 [J]. *植物保护学报*, 1983, **10**(8): 166~168
- [46] 蒋元晖. 谈谈柑桔茎尖嫁接技术 [J]. *中国柑桔*, 1987, **2**: 15~16
- [47] 张秋胜, 舒广平, 宁顺华. 柑桔茎尖嫁接技术的改进 [J]. *中国柑桔*, 1991, **20**(2): 11~13
- [48] Fengtong Ma, Chunhui Guo, Yurong Liu, *et al.* In vitro shoot-apex grafting of Mulberry (*Morus alba* L.) [J]. *Hortscience*, 1996, **31**(3): 460~462
- [49] 王国平. 德国果树病毒病研究及防治考察 [J]. *中国果树*, 1991, **47**(1): 55~56