

提高沙田柚茎尖嫁接成活率的研究

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: 研究了可以影响沙田柚茎尖嫁接成活率的部分因素。结果表明: 当沙田柚接穗选择带 4 个叶原基的茎尖、枳壳砧木选择黑暗培养 14 d 的实生苗或培养基中蔗糖浓度选择 7.5% 时各自的嫁接成活率较高。若在茎尖嫁接切口外缠绕 parafilm 胶可令成活率明显增加。若在培养基中加入 GA₃、6-BA 和 IBA 则明显抑制嫁接成活率。GA₃、6-BA 和 IBA 处理接穗和砧木均可提高嫁接成活率, 其中以 10 mg/L GA₃ 处理效果最好, 嫁接成活率可达 45%; 6-BA 和 IBA 处理虽然也可提高嫁接成活率, 但是同时又增加了接穗的脱落死亡率。

关键词: 沙田柚; 茎尖嫁接; 激素; 成活率

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)03-0273-04

Studies on improving the successful frequency of shoot-tip grafting of Shatian Pomelo

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

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

Abstract: Some factors can affect the successful frequencies of shoot-tip grafting of Shatian Pomelo were studied. It is suggested that the more successful frequency of grafting was respectively obtained by using the meristems plus 4 leaf primordia as scions, using 2-week-old dark grown seedlings as rootstocks or choosing liquid culture media with 7.5% sugar concentration. The successful frequency of grafting could be increased obviously if we twisted the grafting-incisions with parafilm. It was obviously restrained if we put GA₃, 6-BA or IBA into liquid culture media. Those treatments with GA₃, 6-BA and IBA on scions and rootstocks all increased the successful frequency of grafting. The effect of 10 mg/L GA₃ was the best, and its successful frequency of grafting reached 45%. 6-BA and IBA could also advanced the successful frequency of grafting, but increased the shedding rate inducing death at the same time.

Key words: *Citrus grandis* Osbeck cv. Shatianyou; shoot-tip grafting; hormone; successful frequency

柑桔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(如病毒、类病毒和类菌原体)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、产量和品质降低, 严重威胁着柑桔生产。目前最常见的培育柑桔无病原体苗的方法主要

包括热处理法、珠心胚培养、茎尖培养及茎尖嫁接等 4 种。热处理法虽然能有效地去除大多数病原体, 但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^[1]。珠心胚培养已被证明会产生童期性状, 且多变异^[2,3]。茎尖培养则存在着增殖和生根极其困

收稿日期: 2000-07-17

作者简介: 董高峰(1971-), 男, 湖北荆门人, 博士生, 主要从事植物细胞工程研究工作。

基金项目: 国家自然科学基金(39870539); 广东省自然科学基金(980478); 广东省百项创新工程(99)资助项目。

难的问题^[4,5]。

茎尖微嫁接技术自 Navarro 等首次应用于柑桔脱毒后,在近 20 a 内得到了迅速的发展。由于它既不会产生变异,也不带童期性状,如结合适当的热处理又很容易脱除绝大多数病原体,因此已成为最有效的获得柑桔无病原体苗的途径^[4,6]。沙田柚作为目前柑桔发展最为迅速的一个品种,正越来越多地受到如黄龙病等病原体病害的侵袭,快速培育沙田柚无病原体苗已成为生产中极为迫切的问题。本文以广东梅州成年沙田柚树为材料,初步研究了提高沙田柚茎尖嫁接成活率的一些因素,以期今后大规模生产沙田柚无病原体苗提供一些有益的借鉴。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试接穗品种为成年沙田柚树 (*Citrus grandis* Osbeck cv. Shatianyou), 采自广东梅州; 砧木为枳壳 (*Poncirus trifoliata* Raf.), 采自广西桂林。实验时间为 1999 年 9~10 月。

1.2 方 法

1.2.1 材料准备 从成熟枳壳果实中取出种子洗净, 用双层棉纱包住置于 55~58 °C 热水中处理 50 min, 0.1% HgCl₂ 消毒 10~15 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 剥去内外种皮, 然后接种于 1/2 MS 培养基上进行黑暗培养, 温度保持在于 25~28 °C。采摘要 1~2 cm 健康的成年沙田柚嫩芽, 剥去较大叶片, 切取 0.5~1 cm 茎尖, 75% 酒精浸泡约 30 s, 0.1% HgCl₂ 消毒 6~3 min, 无菌水冲洗 3~4 次后用作接穗。

1.2.2 嫁接方法 基本的嫁接方法采用李耿光等^[7]的方法, 略作修改。将接穗在显微镜剥至带 2~3 个叶原基的茎尖(约 0.14~0.18 mm), 将其置于去顶的枳壳实生苗上, 再整株移入带滤纸桥的液体培养基上进行培养, 基本培养基采用 MS(蔗糖浓度 7.5%, pH 5.8)。培养温度保持在于 26±2 °C, 光照为 2 000 lx, 每天 14~16 h。培养 1 周后, 除去砧木上长出的不定芽以减少对接穗萌发的影响。待接穗长出 2~3 片叶后将植株转入更大的试管继续培养, 同时蔗糖浓度减至 2%, 此时计算成活的嫁接苗(1 个月左右)。

1.2.3 外源激素处理 不同浓度的 GA₃、6-BA 及 IBA 用 FA0.45 μm 微孔滤膜过滤消毒后待用。将已准备好的接穗及砧木切口部分别置于上述溶液中浸泡约 30 s 后进行嫁接, 嫁接方式采用传统的倒“T”字

形。

1.2.4 嫁接苗的移栽 带 3~4 片伸展叶片的嫁接苗从培养室中移出, 在室内自然光下进一步培养 1 周左右, 然后取出用蒸馏水洗净, 再置于 5 mg/L IBA 溶液中浸泡 24 h 后单株移入营养钵中。营养土采用 50% 塘泥: 50% 黄泥混合, 嫁接苗在外罩遮阴网的网室中正常生长, 其移栽成活率高达 90% 以上。

2 实验结果

2.1 砧木的不同苗龄对沙田柚茎尖嫁接成活率的影响

黑暗培养的枳壳实生苗分成 10、12、14、20、25 d 五种, 接穗大小为带 2 个叶原基的茎尖, 采用传统的倒“T”字形嫁接。由表 1 可知: 砧木的苗龄以 14 d 时沙田柚茎尖成活率最高, 此后随着苗龄的增加, 嫁接成活率逐渐下降。苗龄较小的幼苗, 其嫁接成活率也较低。尽管所采用的砧木及接穗品种有所不同, 但是我们的结果与 Navarro 等^[4]及李耿光等^[7]是基本一致的。

2.2 接穗大小对沙田柚茎尖嫁接成活率的影响

茎尖嫁接时所采用的接穗大小直接影响到嫁接成活率, 以前一般认为当采用较大的接穗时成活率较高。我们的结果表明: 带 4 个叶原基的茎尖嫁接成活率最高, 为 28.6%, 此后若接穗过大也会降低嫁接成活率。考虑到接穗太大会影响到嫁接苗的脱毒效果, 因此我们认为接穗大小仍以带 2~3 个叶原基的茎尖为最佳。

2.3 不同嫁接方式对沙田柚茎尖嫁接成活率的影响

由表 1 可知, 不同的嫁接方式对茎尖嫁接成活率也具有一定的影响。常规的倒“T”字形嫁接法与后来改进的中间三角形嫁接法并没有太大的区别, 它们的嫁接成活率均为 20%, 这点与蒋元晖的结果不太一致^[6]。但若在嫁接后采用 parafilm 胶缠绕固定切口处, 可显著提高嫁接成活率(达到 35% 以上), 而且这种影响与切口的形状关系并不太大。

2.4 不同培养基对沙田柚茎尖嫁接成活率的影响

由表 1 可知, 液体培养基中蔗糖浓度对茎尖嫁接成活率的影响非常显著。当蔗糖浓度为 7.5% 时沙田柚苗的嫁接成活率最高, 达 19%。当蔗糖浓度低于 7.5% 时, 幼苗则极难成活, 我们还观察到即使在嫁接初期接穗萌发一段时间(1 周左右), 但因后期营养跟不上也会导致整株苗干枯死亡; 若蔗糖浓度升至

10%时也会降低嫁接成活率,我们分析可能是由于蔗糖浓度过高影响到植株对其它养分的吸收。若在培养基中分别加入 GA₃、6-BA 及 IBA,都会极大地抑制茎

尖嫁接的成活率。三者都是浓度越高,其接穗越易干枯死亡,其中 GA₃ 的抑制作用最为明显,IBA 相对较弱。我们还发现尽管嫁接时在培养基中加入 GA₃ 会

表 1 不同因素对沙田柚茎尖嫁接成活率的影响

Table 1 Influence of different factors on the successful frequency of shoot-tip grafting of *Citrus grandis* Osbeck cv. Shatianyou

不同因素 Different factors		总嫁接株数 Number of total grafting	成活株数 Number of successful grafting	嫁接成活率(%) Successful frequency of grafting
砧木苗龄 Age of rootstock	10 d	20	2	10
	12 d	20	2	10
	14 d	20	4	20
	20 d	20	1	5
	25 d	21	0	0
接穗大小 Size of scion	仅生长锥 Apical meristem alone	20	0	0
	生长锥带 2 个叶原基 Apical meristem and 2 leaf primordia	20	4	20
	生长锥带 3 个叶原基 Apical meristem and 3 leaf primordia	20	4	20
	生长锥带 4 个叶原基 Apical meristem and 4 leaf primordia	21	6	28.6
	生长锥带 5 个叶原基 Apical meristem and 5 leaf primordia	20	2	10
嫁接切口方式 Incision mode of grafting	顶部倒“T”形 Top inverted T mode	20	4	20
	中间三角形 Middle triangle mode	20	4	20
	顶部倒“T”形外缠 parafilm	20	8	40
	Top inverted T mode twisted parafilm			
	中间三角形外缠 parafilm	20	7	35
Middle triangle mode twisted parafilm				
培养基 Medium	MS + 0% 蔗糖 Sugar	20	0	0
	MS + 3% 蔗糖 Sugar	20	0	0
	MS + 7.5% 蔗糖 Sugar	20	4	20
	MS + 10% 蔗糖 Sugar	21	2	9.5
	MS + 7.5% 蔗糖 Sugar + 0.1 mg/L GA ₃	20	0	0
	MS + 7.5% 蔗糖 Sugar + 1 mg/L GA ₃	20	0	0
	MS + 7.5% 蔗糖 Sugar + 0.1 mg/L 6-BA	20	3	13.3
	MS + 7.5% 蔗糖 Sugar + 1 mg/L 6-BA	20	0	0
	MS + 7.5% 蔗糖 Sugar + 0.1 mg/L IBA	20	4	20
	MS + 7.5% 蔗糖 Sugar + 0.5 mg/L IBA	20	1	5

除不同的嫁接切口方式处理外,其余处理均采用倒“T”字形嫁接。Almost treatments were adopted inverted-T grafting mode except the treatment with different grafting-incision mode.

表 2 不同激素处理对沙田柚茎尖嫁接成活率的影响

Table 2 Influence of treatments with hormone on the successful frequency of shoot-tip grafting of *Citrus grandis* Osbeck cv. Shatianyou

不同激素处理 Treatments with difference hormone	总嫁接株数 Number of total grafting	成活株数 Number of successful grafting	嫁接成活率(%) Successful frequency of grafting	嫁接初期成活后脱落死亡数 Number of shedding-death after early survival grafting	脱落率(%) Shedding frequency
对照 Control	21	4	19	0	0
20 mg/L GA ₃	21	6	28.6	0	0
10 mg/L GA ₃	20	9	45	0	0
5 mg/L GA ₃	21	5	23.8	0	0
1 mg/L IBA	20	4	20	8	40
0.5 mg/L IBA	20	4	20	4	20
5 mg/L 6-BA	21	5	23.8	7	33.3
2 mg/L 6-BA	21	5	23.8	4	19
1 mg/L 6-BA	21	7	33.3	0	0

采用传统的倒“T”字形嫁接,对照为无菌水处理。Adopting traditional inverted-T grafting mode, the control was treated with sterile water.

阻碍接穗与砧木的愈合,但是在接穗已长出 2~3 片叶后再加入 0.1 mg/L GA₃ 会促进嫁接苗叶片的转绿和伸展。

2.5 不同激素处理对沙田柚茎尖嫁接成活率的影响

由表 2 可知,适当的外源激素处理可以影响茎尖嫁接的成活率。一定浓度的 GA₃ 浸泡接穗及砧木,可

令嫁接成活率明显提高,其中以 10 mg/L GA₃ 的处理效果最佳,嫁接成活率为 45%,比对照上升 26%;若 GA₃ 的浓度过高或过低,则对嫁接成活率的促进作用则相应降低。0.5 mg/L 及 1 mg/L IBA 处理对最终的嫁接成活率影响较小,仅从对照的 19%上升到 20%,主要是由于 IBA 处理后极易导致萌发的接穗脱落枯死,从而在很大程度上影响了后期成活率,而且随着 IBA 浓度的提高,嫁接苗的脱落率急剧上升。6-BA 处理也能提高嫁接苗的成活率,在 5、2 及 1 mg/L 三种浓度中以 1 mg/L 效果最佳,其成活率达 33.3%。与 IBA 一样,6-BA 处理也极易导致嫁接苗后期接穗产生离层脱落,且随着 6-BA 浓度的提高,嫁接苗的脱落率也明显增加。在 GA₃、IBA 和 6-BA 这 3 种激素中,只有 GA₃ 处理在提高嫁接成活率的同时又可保持着嫁接苗的正常生长。

3 讨 论

我们采用传统的倒“T”字形茎尖嫁接方式,沙田柚嫁接成活频率一般不超过 20%,与其它柑桔品种相比存在着较大的差距。张秋胜等以枳壳为砧木,椪柑为试材,其嫁接成活频率可达 70%^[9]。蒋元晖以枳橙为砧木,蕉柑和椪柑为试材,其嫁接成活频率分别可达 33.3%和 42.9%,若采用中间三角形切口方式,其成活频率还可提高至 57.1%和 45.5%^[8]。我们认为,不同的砧木以及不同的柑桔品种都可能导致嫁接成活率产生差异。李耿光等曾做过对比,将红江橙嫁接到枳壳、福桔、酸桔及柠檬上,嫁接成活率可在 10%~76.5%之间波动^[10]。我们还发现倒“T”字形切口与中间三角形切口对沙田柚嫁接成活频率的影响并没有明显差异,但若在切口外缠绕 parafilm 胶则可明显提高成活频率,我们分析外缠 parafilm 胶可以有效地减少接穗的蒸发失水,从而可以促进接穗与砧木的愈合,提高成活频率。

自从 Navarro 等^[4]首次应用茎尖嫁接来获得脱毒柑桔苗以来,国内外都已做了大量的工作,但主要还是集中在改进茎尖嫁接的一些具体操作方式上,如改变嫁接切口、缩短嫁接步骤等。我们采用外源激素

处理沙田柚茎尖及砧木嫁接部位则效果比较明显,操作也更为容易。适当浓度的 GA₃、IBA 及 6-BA 处理均可提高茎尖嫁接成活频率,但 IBA 和 6-BA 处理在提高成活频率的同时也增加了脱落率,如何解决这两者的矛盾是今后进一步提高茎尖嫁接成活频率的关键。另外,通过浸泡处理嫁接苗究竟能吸收多少量的外源激素以及其体内的激素水平与嫁接成活频率的相互关系还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Murashige T, Bitters P, Rangan T S, et al. A technique of shoot-apex grafting and its utilization toward recovering virus-free citrus clones[J]. *Hortscience*, 1972, 7: 118—119.
- [2] 章文才. 果树病毒病及无病毒良种繁育技术[J]. 园艺学文摘, 1986, 6(1): 1—2.
- [3] Brlansky R H. Citrus tristeza virus. B popular in South Florida[J]. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 1986, 99: 66—69.
- [4] Navarro L, Roistache C N, Murashige T. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus[J]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1975, 100(5): 471—479.
- [5] 王际轩, 李淑珍, 隋长琴, 等. 苹果组织培养苗离体嫁接的研究[J]. 园艺学报, 1985, 12(3): 151—154.
- [6] Mukhopadhyay S. Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting[J]. *Journal of Horticulture*, 1997, 72(3): 493—499.
- [7] 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—196.
- [8] 蒋元晖. 谈谈柑桔茎尖嫁接技术[J]. 中国柑桔, 1987, 16(2): 15—16.
- [9] 张秋胜, 舒广平, 宋顺华. 柑桔茎尖嫁接技术的改进[J]. 中国柑桔, 1991, 20(2): 11—13.
- [10] Li Gengguang, Chen Ruzhu, Zhang Lanying, et al. High frequency of successful grafts obtained by shoot-tip grafting of citrus in vitro[A]. Proceedings of the international citrus symposium, Guangzhou, Nov., 5—8, 1990, 193—198.