

利用柑橘茎段诱导不定芽改进 微芽嫁接技术的研究^①

陈泽雄, 刘奕清, 娄娟

重庆文理学院 生命科学系, 重庆 永川 402168

摘要: 试验以成年态纽荷尔脐橙茎段为外植体, 诱导产生不定芽改进微芽嫁接成活率与脱毒率. 结果表明: 半木质化茎段作为培养外植体污染率最低, 不定芽诱导的最佳培养基为 MT++6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L. 将诱导的嫩芽进行微芽嫁接, 成活率超过 80.8%, 对照成活率为 61.3%, 聚合酶链式反应(PCR)检测脱毒率达 100%.

关键词: 茎段; 不定芽; 微芽嫁接; 脱毒率

中图分类号: S666.2

文献标识码: A

柑橘是世界上最重要的果树之一, 我国柑橘种植面积现居世界第一, 产量世界第三. 柑橘长期的无性繁殖及频繁的区域调运使其易感染多种病害, 降低了柑橘的产量和品质. 柑橘黄龙病(Citrus yellow shoot virus)是其中较为严重的一种病害^[1]. 通过珠心苗培育、茎尖离体培养和茎尖微芽嫁接均可有效的脱除柑橘黄龙病及其它一些常见病毒, 但由种子获得的珠心苗童期长, 实际应用价值不大. 目前, 通过柑橘茎尖离体培养获得完整植株的报道几乎没有, 茎尖微芽嫁接是获得无病毒苗木最有效的方法. 然而, 嫁接接穗受季节影响较大, 易污染, 成活率较低等特点使得它在实际应用中受到一定限制. 本试验利用成年态柑橘茎段诱导产生不定芽作为嫁接接穗, 解决了接穗受季节限制的问题, 同时提高了嫁接成活率和脱毒率, 为柑橘的无病毒苗木生产提供参考.

1 材料、试剂与方法

1.1 材料

1.1.1 砧木

冰糖橙(*Citrus. sinensis* Osbeck. cv. Bingtang)种子萌发的幼苗作为嫁接砧木.

1.1.2 接穗及培养材料

取自广东果树研究所具典型黄龙病症状的纽荷尔脐橙(*Citrus. sinensis* Osbeck. cv. Newhall)的接穗, 嫁接于 1 年生枳壳实生苗, 隔离保存在华中农业大学国家果树脱毒中心温室中, 萌发的嫩芽作为嫁接的接穗, 新梢作为茎段培养的材料.

1.2 试剂

根据法国学者 Bove 发表的黄龙病病原的部分序列(In-2.6, 基因库号码: M9491)^[2], 设计出 PCR 特异性引物如下: P1 (TCTGTTTTCTTCGAGGTTGGTGAG) 和 P2 (ACCGCAAGACTCCTTACCAG-

① 收稿日期: 2006-12-04

基金项目: 重庆文理学院校级课题资助项目 (Z 2005 SK 33).

作者简介: 陈泽雄(1979-), 男, 湖北黄冈人, 讲师, 硕士, 主要从事植物细胞生物学与细胞工程的教学与科研工作.

GAAC), 由上海生物工程公司合成。

DNA 标准分子量和其它生化试剂为 TaKaRa 产品。用于提取 DNA 和 PCR 操作的各种试剂均用双蒸水配制, 于 4 °C 冰箱中保存。

1.3 方法

1.3.1 砧木苗的培养

取冰糖橙种子, 自来水冲洗, 1 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 3~5 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 2% 的次氯酸钠溶液振荡消毒 5~7 min, 无菌水冲洗 4~5 次后剥去内外种皮, 接种于 MT 基本培养基, 成分为蔗糖浓度 30 g/L, 琼脂糖浓度 7 g/L, pH 5.8~6.0(下同)。置于 25 °C 恒温培养箱中暗培养 14~15 d, 嫁接前 1~2 d 置于自然光下锻炼作为嫁接砧木^[3]。

1.3.2 成年态茎段的离体培养

晴天后取纽荷尔脐橙枝条, 自来水冲洗半小时, 洗涤剂清洗 3~5 min, 70% 的酒精浸泡 30 s, 加入几滴吐温-80, 4 种不同成熟度的材料用于试验, 分别为: ①1 年生秋梢茎段; ②当年生木质化茎段; ③当年生半木质化茎段; ④当年生未木质化茎段。视材料成熟度不同用 0.2% HgCl₂ 振荡消毒 10~30 min, 无菌水冲洗 4 次, 检测污染率的高低。试验重复 3 次, 每次处理数为 10 个。采用 DPS(Data Process System) 软件进行 Duncan 新复极差法检测(下同)。

材料切成 0.5 cm 大小的不带腋芽的茎段, 将其形态学下端接种于附加不同浓度 6-BA、NAA 及 GA₃ 的 MT 培养基中, 每试管中一个茎段, 处理样本数量为 10, 试验重复 3 次。茎段置于光/暗时间为 16/8 h, 光照强度为 45 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度为(25±1) °C 的光照培养室中暗培养 3 周后转入光照培养, 6 周后显微镜下统计不定芽生长情况。

1.3.3 茎尖微芽嫁接

取试管中产生的不定芽直接嫁接于冰糖橙的黄化砧木上; 取温室纽荷尔脐橙 1~3 cm 嫩芽, 自来水冲洗 3~4 次以冲洗表面灰尘, 超净工作台用 2% 的次氯酸钠溶液浸泡 5~7 min, 无菌水冲洗 4 次后嫁接于冰糖橙的黄化砧木上作为对照, 具体方法参见姜玲等^[3]。试验重复 3 次。

1.3.4 嫁接苗移栽

移栽前先准备好培养土, 成分为细沙、蛭石、泥炭, 三者按照体积 1:1:1 配比, 混匀后高压灭菌备用。移栽时将土壤分装于培养钵中, 钵底用石块盖住通气孔, 移栽好的嫁接苗用自来水浇灌直至钵底漏水为止。

苗木用一次性塑料杯罩住保湿, 置于阴暗通风处。待叶片变绿, 生长正常后, 除塑料杯, 将嫁接苗迁入阳光充足处, 1~2 月后, 移栽到大盆中继续生长^[4]。

1.3.5 柑橘黄龙病的 PCR 检测

DNA 提取采用 CTAB 法, 所提 DNA 经检测稀释后作为 PCR 扩增贮备液。在 25 μL PCR 反应体系中, 模板 DNA 1.5 μL, 10 pmol/μL 的上下游引物各 1.0 μL, 10× PCR buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL, 5 μL TaqDNA 聚合酶 0.3 μL。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、58 °C 复性 30 s; 72 °C 延伸 1 min, 32 次循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 反应结束后 4 °C 保存。

PCR 反应产物琼脂糖凝胶电泳, 参考邓晓玲(1996)方法^[5]。

2 结果与分析

2.1 不同成熟度的茎段对培养污染率的影响

表 1 的结果显示, 处理 4 培养污染率最低为 23.3%, 处理 1 污染率最高达 83.3%。1、2 处理之间的差异不显著; 3、4 处理之间差异不显著, 但 1、2 处理和 3、4 处理之间差异显著。这是因为幼嫩材料表皮光滑, 内生菌少, 容易一次消毒彻底, 木质化程度高的材料生长时间长, 表面粗糙, 细菌多, 且含有较多内生菌, 一次消毒污染率高。试验中发现, 未木质化茎段虽然污染率最低, 但萌芽率也较低, 可能因为在消毒过程中幼嫩茎段组织被消毒剂部分破坏, 影响芽体的诱导。半木质化茎段对消毒剂抵抗力较强, 嫩芽萌发率高, 污染率也仅高于未木质化茎段, 综合来看, 取半木质化茎段作为培养外植体最好。

表 1 不同成熟度材料污染率的比较表

Table 1 The Pollution Rate Comparison Between Old Stem and Young Stems

处理号	处理数/重复	消毒时间/min	污染率/%
1	10/3	30	83.3 ± 11.5 a
2	10/3	30	66.7 ± 15.3 a
3	10/3	20	30.0 ± 10.0 b
4	10/3	10	23.3 ± 5.8 b

注: 经邓肯氏新复极差法显著性检测。不同字母表示两两处理之间存在显著差异($\alpha \leq 0.05$)。下同。

2.2 NAA、6-BA 及 GA₃ 对茎段不定芽诱导的影响

不同激素种类和浓度对纽荷尔脐橙茎段不定芽诱导的影响如表 2 所示。试验结果表明, 6-BA 和 NAA 对不定芽的诱导有着较为显著的影响, 从茎段萌芽率来看, 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L 的组合显著优于其它处理, 此二者之间差异不显著; 从萌芽茎段诱导芽数量来看, 二者除与 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 组合差异不显著外, 均优于其它处理。试验中发现, 组合 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 虽然萌芽率和诱导芽数量均最高, 但培养一段时间后该组合不能继续促进芽体进一步生长, 而在添加了 0.2 mg/L 的 GA₃ 后则能有效促进不定芽进一步伸长。因此, MT+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L 为诱导不定芽的最佳配方。

表 2 不同激素浓度对不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of Different Hormone Concentration on Adventitious Bud Inducement

激素浓度/mg · L ⁻¹			诱导率/%	平均芽数
6-BA	NAA	GA ₃		
0	0	0	0 d	0 e
0.5	0	0	43.3 c	1.22 ± 0.2 d
0.5	0.2	0	36.7 c	2.81 ± 0.84 ab
1.0	0	0	56.7 b	2.15 ± 0.47 bc
1.0	0.2	0	76.7 a	3.3 ± 0.34 a
1.0	0.2	0.2	73.3 a	3.0 ± 0.14 a
2.0	0.2	0.2	40.0 c	1.61 ± 0.18 cd

2.3 不同来源的茎尖对嫁接成活率的影响

不同来源的茎尖处理试验对嫁接成活率的影响如表 3 所示。试验结果表明, 试管嫩芽作为嫁接接穗, 其嫁接成活率显著优于田间嫩芽作为接穗的嫁接成活率。3 次重复试验的嫁接成活率分别为 80.8% ± 6.3% 和 61.3% ± 4.9%, 二者之间的差异显著。

表 3 不同来源的茎尖的嫁接成活率

Table 3 The Survival Rate of Different Grafted Plants with Shoot-tips from Different Sources

茎尖来源	成活数/处理数			成活率/%
	1	2	3	
田间	8/14	10/15	9/15	61.3 ± 4.9 a
试管	12/16	12/15	14/16	80.8 ± 6.3 b

2.4 嫁接苗移栽

茎尖微芽嫁接成活的试管苗长到 2、3 片真叶时转管培养以加快生长。嫁接苗木长出 4 至 5 片真叶时便可移栽。移栽情况见表 4。

表 4 试管苗移栽成活率

Table 4 The Transplanted Tube Survival Rate of the Tube Plants

茎尖来源	成活数/移栽数	成活率/%
田间	25/27	92.6
试管	35/38	92.1

由表 4 可知,无论是来自于田间的纽荷尔嫩芽嫁接成活的试管苗还是来自试管的纽荷尔嫩芽嫁接成活的试管苗,其移栽成活率都非常高,分别达到了 92.6% 和 92.1%。

移栽基质的高压灭菌除去了基质中的部分微生物和虫害,有效的防止根部病害发生;移栽前对试管苗进行自然光下的锻炼,提高了苗木移栽后的环境适应性;温室保温保湿的生长环境则有利于移栽苗的快速健康生长。

2.5 柑橘嫁接苗黄龙病的 PCR 检测

随机选取 2 株典型黄龙病症状的纽荷尔脐橙叶片、6 株田间茎尖嫁接而得的苗木叶片及 6 株试管不定芽嫁接苗木叶片共 14 个样品,分别抽提其 DNA. 对所提 DNA 样品进行 PCR 扩增,扩增产物琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1.

由图 1 可知,带黄龙病病原症状的纽荷尔植株叶片 DNA 扩增到特异性的电泳带,与设计的黄龙病病原特异性片段一致,证明了试验材料是带有黄龙病病原的植株. 对随机选取的 12 株经不同来源的茎尖嫁接而得的脱毒苗进行 PCR 检测,没有发现特异性片段,脱毒率达 100%. 试验证明了茎尖微芽嫁接脱除黄龙病病原是十分有效的,不论是来自田间植株的茎尖还是试管产生的嫩芽经微芽嫁接都能够获得健康脱毒的苗木.



1: 2 000 DL DNA 标准; 2, 3: 带症状的植株;

4-9: 田间茎尖嫁接而得的脱毒苗;

10-15: 试管茎尖嫁接而得的脱毒苗.

3 结论与讨论

本试验以成年态纽荷尔脐橙茎段为外植体,诱导产生不定芽改进微芽嫁接成活率与脱毒率. 诱导产生的不定芽作为嫁接接穗进行微芽嫁接其成活率达 80.8%,显著高于对照的 61.3%,嫁接的苗木经 PCR 检测表明脱毒率达 100%. 试验结果表明,产生的不定芽可一年四季提供嫁接接穗,解决了普通茎尖嫁接接穗受季节限制的问题,同时提高了嫁接成活率和脱毒率,为柑橘的无病毒苗木工厂化生产提供基础.

在不定芽的诱导中茎段的木质化程度很大程度影响了其培养的污染率,试验结果表明采用半木质化的茎段作为培养外植体,既能有较高的萌芽率同时污染率也较低,这与王子成等^[6]研究的结果相似.

成年态柑橘茎段不定芽的诱导十分困难,试验发现,采用新生的、不带腋芽的嫩梢作为培养材料有利于培养体系的建立^[7],培养的初期在暗条件下培养一段时间有利于不定芽的诱导^[8,9],适当的激素浓度配比能促进不定芽的萌芽率和萌芽数. 添加少量的赤霉素能有效的促进不定芽的伸长,这与 HUANG Jia-quan 等^[8]、A. K. Kobayashi 等^[9]的研究结果相似.

试管嫩芽能够提高嫁接成活率的原因可能有如下几点: ①试管茎尖来自于试管,砧木在试管中培养得到,微芽嫁接后嫁接苗在试管中培养生长,因此比田间茎尖更适应离体培养环境; ②用试管茎尖嫁接不需要任何的消毒处理,因此避免了消毒过程中消毒剂对茎尖组织细胞的伤害,显著提高了茎尖微芽嫁接的成活率; ③试管茎尖在嫁接过程中停留于超净工作台上的时间短,有效的避免了田间茎尖由于离体时间过长造成的失水和褐化.

对不同来源的茎尖嫁接成活的植株进行 PCR 检测,结果表明在茎尖带有黄龙病病原的情况下,嫁接的苗木脱毒率达 100%,表明了茎尖微芽嫁接能有效的脱除柑橘的黄龙病^[10].

图 1 PCR 检测柑橘茎尖嫁接苗黄龙病病原
Fig. 1 Detection Citrus Yellow Shoot Virus of BLO of Shoot-Tip Grafted Plants by PCR

参考文献:

- [1] 田亚南,柯穗,柯冲. 柑橘黄龙病诊断法研究进展[J]. 福建农业学报, 1998, 13(1): 27-35.
- [2] 田亚南,柯穗,柯冲. 应用聚合酶链式反应(PCR)技术检测和定量分析柑橘黄龙病病原[J]. 植物病理学报, 1996, 26(3): 243-250.
- [3] 姜玲,万蜀渊,王印红,等. 柑橘茎尖嫁接操作方法的改进及研究[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(4): 381-385.
- [4] 姜玲,万蜀渊. 提高柑橘茎尖微芽嫁接成活率的研究[J]. 湖北农业科学, 1992, 4: 26-28.
- [5] 邓晓玲,唐伟文. 应用PCR技术检测柑橘黄龙病病原的研究[J]. 华南农业大学学报, 1996, 17(3): 119-120.
- [6] 王子成,李忠爱,邓秀新. 柑橘成年态茎段外植体消毒方法研究[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2005, 35(2): 57-60.
- [7] Bepalok FJC, Kobayashi AK, Pereira LFP, *et al.* In vitro adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections[J]. Crop Breed. Appl. Biotech. 2001, 1: 27-34.
- [8] HUANG Jia-quan, YIN Li-yan, YANG Xiao-hong, *et al.* In vitro plant regeneration from the mature tissue of Navel Orange(*Citrus sinensis* L. Osbeck) by direct organogenesis[J]. Agricultural Sciences in China, 2005, 4(3): 236-240.
- [9] A. K. Kobayashi, J. C. Bepalok, L. F. P. *et al.* Vieira plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003, 74: 99-102.
- [10] 宋瑞琳,吴如健,柯冲. 茎尖嫁接脱除柑橘主要病原的研究[J]. 植物病理学报, 1999, 29(3): 275-279.

Improvement of Shoot-Tip Micrografting Through Adventitious Bud Induction from Citrus Stem Explants

CHEN Ze-xiong, LIU Yi-qing, LOU Juan

Department of Life Science, Chongqing University of Arts and Science, Yongchuan, Chongqing 402168, China

Abstract: Adventitious buds were induced with mature stem segments of Newhall navel orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] as explants in an in vitro culture experiment to improve the survival rate and virus elimination rate in shoot-tip micro-grafting. Contamination rate was the lowest when half lignified stem segments were used as explants. MT++ 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + GA₃ 0.2 mg/L was the best medium for adventitious bud induction. More than 80.8% of the regenerated shoots survived when used in shoot-tip micro-grafting, in contrast to 61.3% for the control. PCR test showed that 100% of the grafted plants were virus free.

Key words: stem segment; adventitious bud; shoot-tip micro-grafting; virus elimination rate

责任编辑 欧 宾