

# 黄皮茎段初代培养物的建立

宁正祥 黄昌贤

(园艺系)

## 提 要

表面污染是木本植物组织培养污染率高的主要原因。选择晴、阴天气下生长的试材或者采用茎尖培养,是降低污染率、成功建立无菌初代培养物的有效措施。适合黄皮茎段初代培养的条件为:WPM+BA1.0+KT0.5+NAA0.5+GA<sub>3</sub>0.25+4~5%蔗糖。

**关键词** 组织培养;柑桔

## 引 言

本世纪初开创了植物组织培养的研究,本世纪后半期就开始将植物组织技术应用于农业生产的研究了。到目前为止,用茎尖培养技术,培育无毒苗和无性系的快速繁殖以及用花药和花粉培养作为育种手段育成单倍体植株,已经开始应用于生产。

果树组织培养起步较晚,但进展却十分迅速。从文献报道来看,60年代的研究少,70年代和80年代的研究较多。从研究的目的来看,初期着重于育成无毒苗,目前则侧重于快速繁殖。从研究的树种来看,以蔷薇科果树最少,占果树组织培养文献的36% (统计1933~1987年文献约500篇);芸香科果树次之,约占16%,其中又主要集中在柑桔属的文献很少,黄皮属果树的组织培养到目前为止,国内外尚未见报道。

黄皮 [*Clausena lansium* (Lour) Skeels.] 是黄皮属中唯一经济栽培的树种,果实营养丰富,在我国南方广为栽培,但一直无多大发展,商品率低。主要原因是,优良品种资源虽然丰富,但未形成大宗商品栽培面积,大量种植的为多核品种,可食率低、品质较差,急需进行品种更换。黄皮一般采用靠接、劈接和空中压条进行繁殖,年繁殖率较低。特别是无核黄皮、独核黄皮等优、稀品种(系),苗木奇缺,限制了黄皮生产的发展和品质的提高。本试验的目的在于应用组织培养技术,探索黄皮茎段离体繁殖的条件,为快速繁殖黄皮的优、稀品种(系)和单株,解决发展黄皮生产所需的大量优良苗木提供理论和实践依据。

1987年9月16日收稿

## 材 料 和 方 法

供试的品种(系)有无核黄皮、独核黄皮、甜黄皮、鸡心黄皮、白糖黄皮、岐山黄皮和球状黄皮的5年生嫁接树及部分品种(系)的2年生实生苗。在不同物候期取嫩枝侧芽和顶芽茎段进行培养。试验的基本培养基有WPM<sup>[17]</sup>、MS<sup>[9]</sup>、MT<sup>[10]</sup>、White<sup>[15]</sup>、SJ—1<sup>[2]</sup>、B<sub>5</sub><sup>[6]</sup>、N<sub>6</sub><sup>[11]</sup>和Nitsch<sup>[11]</sup>,附加不同浓度6—苄氨基嘌呤(BA)、6—糖氨基嘌呤(KT)、玉米素(NT)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)、赤霉素(GA<sub>3</sub>)等,单独或混合使用。蔗糖0.5~10%,琼脂0.5%,pH调整到5.8、培养基经1.1Kg/cm<sup>2</sup>高压灭菌8分钟,培养室温度白天为26℃,夜间23℃左右。每天照明16小时,光照度5.4Klx每处理接种70支以上,重复二次,接种30~40天后进行观察统计。采用模糊综合评判对处理效果进行评价。计算方法选用加成模型<sup>[3]</sup>。

## 试 验 结 果

### (一) 影响无菌初代培养的因素

1. 黄皮茎段培养的污染源及其表面灭菌效果: 试验前期遇到的最大难题是黄皮茎段外植体存在严重的污染现象,污染率几乎达100%。接种后污染最快的是细菌,2~5天内就在基端切口维管束处出现菌迹,随后在培养基中迅速形成数条白色带状菌环,进而扩展到培养基和外植体表面,形成脓状或混浊菌液层,几天后外植体也随之死亡。污染菌类有革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌及酵母菌。接种7~15天后,外植体表面出现大量真菌斑,主要为青霉和绿霉菌,8.%位于叶腋部位。30~40天后,外植体在接触培养基的界面外偶尔产生暗红色的真菌环,无菌丝,繁殖速度极慢,是一种存在于木本植物表层皮中类似酵母的腐生真菌。

Knox, G.A.等认为<sup>[7]</sup>,木本植物田间材料高的污染率主要是木本植物表皮以内深层组织带菌所致。黄皮茎段最初培养时细菌污染也主要是在切口维管束处。采用不同灭菌程序处理及对污染现象进行研究,发现:(1) 将长于4cm的茎段进行表面灭菌后,切取中段内部组织培养,不存在污染现象;(2) 用自来水或无菌水冲洗材料而后进行表面灭菌的,无论采用何种灭菌剂和多长的灭菌时间,均存在严重的污染现象,存活率在20%以下,若取内部组织培养,当茎段短于1.0cm时,其中段内部组织同样存在污染现象;(3) 外植体不用水冲洗,粗切后直接进行表面灭菌,则基本上不存在污染问题。

以上结果说明黄皮茎段组织内部不存在带菌现象。污染源存在于器官表面。用水冲洗以除去表层污染物的常用前处理方法的污染率之所以高的原因,主要是枝梢为植物体水势最低的器官,在水洗过程中,茎段吸水,污染源随水从切口进入维管束导管腔内部细胞间隙等质外体中,使茎段内部组织污染,这时无论怎样进行活体表面灭菌,都难以

杀灭已进入质外体中的菌类。因为此时外植体的水势比灭菌液的水势要高，杀菌剂只能逆水势梯度靠扩散作用进入质外体，灭菌效果差，组织带菌现象，在自然状况下，中柱鞘的存在使污染源不能随着根系的吸水而进入维管束等内部组织，所以活体植物内部组织一般情况下是无菌的。

2. 雨量对污染率的影响：一些研究者报道<sup>[8][12][13][14]</sup>，季节是影响由间外植体污染率高低的一个主要因素，认为春夏雨季污染严重，秋冬旱季污染较轻，组织培养宜在旱季进行取材。本试验对季节、气候状况与黄皮的污染率的关系进行了研究，结果说明外植体经受雨水的多少是污染率高低的关键性因素。经过二次小雨以上的试材，污染率平均在92%以上；在连续晴、阴天气下生长的试材，则带菌概率小，几乎不存在污染现象。除雨量外，一天中采样的时间对污染率也有一定的影响，在露水大的早上采样，污染较重，待露水干后采样，则污染率低。这可能是采样时，手及器具等接触物上的污染源以露水为媒介传染到试材上，从而增加了外植体的带菌率。

3. 外植体木质化程度和生理状态对污染率的影响：田间材料的带菌率和其相适宜的表面灭菌时间、接种后的生长势等与外植体的木质化程度和生理状态之间有着密切的联系。木质化程度较高，带菌的概率较大，适宜的灭菌时间也相应较长，材料较嫩，带菌率较小。旺盛生长的枝梢，特别是顶芽，很少带菌，但由于其表皮蜡质层相对较薄，表面灭菌时也就极易产生药害。

### (二) 基本培养基对芽外植体的营养效果

基本培养基成分是影响茎段外植体成活和生长的重要因素之一。外植体来源不同，对基本培养基的反应也有所不同（表1），对死亡率、萌芽率和生长势三个衡量指标因素采用 $\tilde{D}_1 = (0.6, 0.1, 0.3)$ 的权数分配进行综合评判，从总效应阵 $\tilde{C}_{11}$ 可看出，茎段

表1 基本培养基营养效果评判结果阵( $\tilde{C}_1$ )<sup>\*</sup>

基本培养基 试 材	MS	MT	WPM	N <sub>6</sub>	B <sub>6</sub>	Withe	SJ-1	Nitsch	$\tilde{C}_{11}$
实生幼苗	0.887	0.903	1.000	0.854	0.821	0.815	1.000	0.716	0.875
甜黄皮	0.756	0.772	0.997	0.394	0.494	0.619	0.902	0.698	0.704
鸡心黄皮	0.825	0.843	0.985	0.747	0.651	0.840	0.905	1.000	0.850
白糖黄皮	0.682	0.503	0.829	0.499	0.474	0.726	0.852	0.715	0.660
无核黄皮	0.494	0.554	0.868	0.235	0.483	0.519	0.726	0.230	0.514
岐山黄皮	0.687	0.592	0.867	0.262	0.403	0.149	0.760	0.414	0.518
球状黄皮	0.701	0.704	0.915	0.000	0.525	0.726	0.875	0.429	0.609
独核黄皮	0.780	0.755	0.920	0.435	0.631	0.609	0.892	0.662	0.711
$\tilde{C}_{12}$	0.727	0.703	0.923	0.428	0.561	0.625	0.864	0.608	

\* 各培养基中均附加BA 1.5mg/l, NAA 0.1mg/l, 蔗糖5%。

外植体对基本培养基的适应能力基本上可分为强、中、弱三类。实生幼苗、鸡心黄皮的适应能力强,综评值在0.85以上。独核黄皮、甜黄皮、和白糖黄皮的适应能力中等,综评值在0.66~0.71之间。无核黄皮、歧山黄皮及球状黄皮对基本培养基要求严格,综评值在0.61以下,在N<sub>6</sub>基本培养基上,死亡率高到83%以上,特别是球状黄皮,无一成活。从C<sub>12</sub>可知,基本培养基之间,以WPM的综评结果最高,达0.923,其次为SJ-1、为0.864。此二种基本培养基对供试的所有品种(系)均表现良好的营养效果,单因素评判值在0.72以上。

### (三) 生长调节剂对初代培养的影响

1. 黄皮茎段外植体对细胞分裂素类的反应:黄皮茎段外植体的萌芽和生长必需激素物质的存在。细胞分裂素类中,效果最好的是BA,在0.5~2.5mg/l(单位下同)的浓度范围内,供试品种(系)都能良好的萌芽和生长。最适浓度为1.5左右,这时萌芽势强,生长快,枝梢粗壮。实生幼苗对BA的敏感性较营养繁殖系低,在BA6.0时,仍能存活,只是萌芽率极低,新梢畸形。

KT、ZT的适宜浓度范围比BA小,最适浓度均为1.0左右。单独使用KT时,新梢粗壮,叶色浓绿,生长速率较BA处理的慢。KT3.0时,对萌芽具有明显的抑制作用。ZT超过2.0时,则产生毒害,3.0时,外植体不能成活。

BA、ZT、KT三种细胞分裂素在不同浓度配合使用,均未能获得良好的培养效果。

2. 生长素和细胞分裂素混合使用的培养效果:细胞分裂素类与低浓度的生长素类组合使用,整体效果比单用为优。在0~2.0的浓度范围内的各种组合形式中,增效作用显著的是BA与生长素类间的搭配。从对萌芽率、生长量及长势进行综合评判的结果阵C<sub>2</sub>中可看出(表2),BA与NAA和IBA在低浓度搭配(0.5:0.25:0.25)时,表现有良好的综合效果。平均萌芽率为94.4%,生长量也较大,接种30天后,新梢平均长度达1.23cm。较高浓度的BA与NAA组合有良好效果,特别是后者在低浓度时,增效明显。BA与IBA配合使用时,萌芽率低,新梢生长缓慢,幼茎呈暗绿色;当IBA/BA比值超过0.5时,叶片淡黄,常有坏死斑块,小叶基部易形成离层,最后脱落。

KT、ZT与生长素类的配合效果均不及BA。KT、ZT、BA任两种或三种同时与生长素组合的培养效果也不理想,其中只有BA0.5,KT0.5,NAA0.25对新梢生长表现有较好的促进作用,综评值为0.773。

3. GA<sub>3</sub>对萌芽的促进作用:GA<sub>3</sub>单独使用时不能促进萌芽,当有适量的细胞分裂素和生长素时,则能极显著地提高外植体的萌芽率。在各种组合中(表2),只有BA1.0,KT0.5,NAA0.5,GA<sub>3</sub>0.25的综合评判结果最优,目标达0.989。初代培养时,GA<sub>3</sub>的浓度不宜过高,当超过1.0时,外植体虽能100%的萌芽,但萌芽后幼茎迅速伸长,呈黄色,扭曲,幼叶皱缩,不能展开,生活力极弱,不久即衰亡。

除上述激素种类和相互间的比值外,芽外植体本身的营养条件、生理状态、极性位置等对初代培养所要求的激素条件也有重要的影响。旺盛生长期的外植体容易启动生长,适宜的激素浓度偏低,附加GA<sub>3</sub>反而对生长不利。休眠芽中生长抑制物质含量高,

表 2 激素组合使用对初代培养的效果\*

BA	KT	NAA	IBA	GA <sub>3</sub>	萌芽率 (%)	生长量 (cm)	长势	综评值 (%)
1.0		0.10			92.3	0.91	0.80	0.748
1.0		0.25			81.8	0.88	0.63	0.603
1.0		0.50			75.0	0.97	0.50	0.540
1.0		0.75			66.7	0.80	0.58	0.457
1.0		1.00			60.0	0.71	0.83	0.481
1.0			0.1		61.4	0.88	0.47	0.409
1.0			0.25		65.2	0.61	0.44	0.322
1.0			0.50		70.5	0.74	0.52	0.435
1.0			0.75		44.5	0.59	0.37	0.047
1.0			1.00		37.1	0.78	0.42	0.198
1.0	0.50	0.50	0	0.25	98.3	1.41	0.85	0.989
0.5	1.00	0.50	0.50	1.00	100	0.85	0.10	0.495
0.5	0.50	0.25	0.25		66.7	1.14	0.69	0.626
0.5	0.50	0.25	0		85.7	1.18	0.72	0.773
0.5	0.25	0.25	0.25		64.7	1.07	0.71	0.595
0.5	0.25	0.25	0		77.8	1.11	0.55	0.629
0.5	0	0.25	0.25		94.4	1.23	0.81	0.883
0.5	1.00	1.00	0		38.9	0.78	0.27	0.150

\* 1. 试材为实生幼苗; 2.  $D_2 = (0.4, 0.3, 0.3)$ ; 3. KT、ZT与生长素类配合的有关数据未列入此表。

启动生长要求相对较高的外源激素条件, GA<sub>3</sub>的浓度也应适当提高。总之, BA、KT、NAA、GA<sub>3</sub>四者之间的相对浓度, 应根据不同物候期中, 外植体的具体情况在一定范围内作适当的调整, 才能获得理想的培养效果。

#### (四) 蔗糖浓度对初代培养的影响

在2~6%的蔗糖浓度范围内, 黄皮茎段外植体95%以上能够萌芽, 糖浓度过高或过低都对萌芽不利。浓度低于1.0%时, 不仅萌芽率明显下降, 而且萌芽后生长极为缓慢, 叶色淡黄, 生活力弱; 糖浓度超过6%时, 外植体萌芽虽较好, 但小叶不能展开, 多在叶柄离区产生乳白色愈伤组织, 随后幼叶脱落, 幼茎呈深绿色, 生长速度下降, 最后滞长。4~5%为最适浓度, 萌芽势强、生长快, 一个月后, 幼梢可长到2~3cm, 展叶迅速, 叶色淡绿, 生长健壮。

## 讨 论

### (一) 关于木本植物组织内部带菌问题

木本植物采用组织培养技术进行快速无性繁殖, 最关键的两个步骤是初代培养物的

建立和根的再生。严重的污染现象是多雨地区组织培养工作中影响初代培养普遍存在的主要障碍。一些研究者将木本植物外植体高的污染率归咎于深层组织带菌,提出在培养基中添加抗菌剂是克服污染的有效方法<sup>[5][7][13][16]</sup>。据对黄皮茎段外植体的观察,我们认为上述观点是试验设计不合理,由试验观察中的假象所造成的。因为:1.组织培养中的污染源都是腐生菌类,在活体植物衰老器官的深层死组织中,不排除这类污染源的存在,但组织培养所用外植体均为十分幼嫩的健壮活组织或器官,腐生菌类不可能在其深层组织中繁殖、生存。2.在严格无菌条件下,切取黄皮茎段深层组织培养,无污染现象产生。但田间材料经水冲洗再灭菌接种,则木质部等深层组织产生带菌现象。在荔枝茎段组织培养过程中也获得同样结果。这说明内部组织污染是在离体后造成的。在自然状况下,深层组织不带菌,至少是不带腐生菌。

## (二) 关于表面污染问题

木本植物严重的表面污染是田间材料污染率高的主要原因。为了提高成活率,许多研究者建议采用温室生长的材料作为降低污染率的有效措施<sup>[4][13][14]</sup>。据对黄皮和荔枝的研究,认为淋雨是造成严重表面污染的主要原因。所以选择晴、阴天气下生长的材料,或者茎尖,或在雨季对田间母本树实行遮雨、套袋等来减少污染,这是试验研究中的切实可行的办法。因为果树一般树体高大,温室只能栽种一些幼苗或小树,采集田间大树上的营养系材料作外植体源,不仅遗传上稳定,而且生产上意义更大。

## 引 用 文 献

- (1) 朱至清等. 中国科学, 1975, (5), 484~490
- (2) 陈振光等. 遗传学报, 1980, 7(2), 189~191
- (3) 陈贻源编. 模糊数学, 武汉: 华中工学院出版社, 1984;
- (4) Barlass, M., Skene, K. G. M., 1982. In vitro plantlet formation from citrus species and hybrids. *Scientia Hort.*, 17, 333~341
- (5) De Fossard, R. A., Baker, P. K., Bourne, R. A., 1977. The organ culture of nodes of four species of *Eucalyptus*. *Acta Horticulturae*, 78, 157~165
- (6) Gamborg, O. L., Miller, R. A., Oijma, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root Cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151~158
- (7) Knox, G. A., et al., 1980. Scanning electron microscopic study of healthy pecan tissue showing the presence or absence of internal fungal contamination. *In Vitro*, 16, 651
- (8) Litz, R. E., Conover, R. A., 1978. Recent advances in papaya tissue culture. *proc. Fla. State Hortic. Sci.*, 91, 180
- (9) Murashige, T., et al., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473
- (10) Murashige, T., Tucker, D. P. H., 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proc. 1st Int. Citrus Symp.*, 3, 115-1162

- (11) Nitsch, J. P., 1951. Growth and development in vitro of excised ovaries. Amer. J. Bot., 38: 566
- (12) Quoirin, M., Gaspar, T., Boxus, P., 1975. Changes in natural growth substances as related to survival and growth of the hybrid ornamental cherry *Prunus accolade* meristems grown in vitro. C. R. Acad. Sci. Ser. D., 281: 1309
- (13) Skirvin, R. M., 1981. Fruitcrops, in: Conger, B. V., Ed., Cloning Agricultural Plants Via in Vitro Techniques., 51-139. CRC Press Inc
- (14) Skirvin, R. M., Chu, M. C., 1978. Tissue culture of peach Shoot tips, Hortscience. 13 ( Abstr.), 359
- (15) White, P. R., 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cell. 2nd ed. The Ronald Press. New York
- (16) Wittenbach, V. A., Bokovac, M. J., 1980. In vitro culture of sour cherry fruits. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 105(2): 277—279
- (17) Wood: B.W., 1982. In vitro proliferation of pecan. Hortsci. 17(6): 890-891

## THE ESTABLISHMENT OF INITIAL CULTURE OF

*Clausena lansium* (Lour.) Skeels

Ning Zhengxiang      Huang Chang-xian

(Department of Horticulture)

### ABSTRACT

The culture of the nodal segments from juvenile and mature shoots of *Clausena lansium* (Lour) skeels grown in field was successfully established in vitro. The suitable medium was WPM+BA 1.0+KT 0.5+NAA 0.5+GA<sub>3</sub> 0.25+ 4-5% sucrose. Surfaces of plant parts carry a wide range of microbial contaminants, which were the main source of infection to plant in vitro.

Key words, Tissue culture, Citrus