

不同培养基对葡萄柚砧木种子萌发的影响

刘月, 刘婷, 王樱潼, 刘惠民, 王连春

(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, 云南 昆明 650224)

摘要:为了找到柚类砧木苗培育的最佳培养基配方,以曼赛龙柚种子为试验材料,研究不同培养基、不同植物激素对种子萌芽和出苗的影响。结果表明:MS培养基对曼赛龙柚种子发芽率和出苗率比1/5MT、1/2MT、MT培养基及1/5MS、1/2MS培养基更好,出苗率为81.7%,是最适培养基。NAA、6-BA、GA₃均能缩短曼赛龙柚种子萌芽时间,而用100 mg·L⁻¹ GA₃浸种24 h的种子发芽率和出苗率最高,效果最好。

关键词:葡萄柚砧木;曼赛龙柚;种子;培养基;植物激素

中图分类号:S666.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)08-0075-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.08.0075

曼赛龙柚(*Citrus maxima* cv. *mansailong*)^[1]是由中国科学院西双版纳热带植物园科研工作者在20世纪后期,从云南省勐腊县勐捧镇曼赛龙村的实生柚树中选育出来的优良品种,故定名为曼赛龙柚^[2]。现已在云南的西双版纳州、德宏州、红河州、思茅地区、临沧地区、广东汕头、福建福清等地引种或生产栽培。在西双版纳州发展很快,面积达0.33万hm²以上,成为该州果树的主要栽培种类之一^[3]。曼赛龙柚的主根强大,根系发达,亲和力强,苗期生长迅速,具有早熟、高产、稳产的优点^[4],可作为柚类的良好砧木。葡萄柚是芸香科柑桔属的常绿植物^[5],果实以鲜食为主,因其风味独特口感好,营养价值高,具有极大的开发价值,受到了国内外消费者及果农的青睐。然而胡龙娇^[6]通过PCR检测普文葡萄柚黄龙病感染情况,采集116个样品进行PCR检测分析,发现采样地林场的葡萄柚及甜柚品种均感染黄龙病。同时116个样品中检测出96个阳性样品,检出率大(82.8%),说明葡萄柚感病严重,而当前脱除黄龙病最有效的方法就是微芽嫁接;而严毅^[7]、孟毅^[8]在研究葡萄柚与不同砧木嫁接亲和性的相关实验中表明曼赛龙柚与葡萄柚的亲和性最高。因此要发展葡萄柚无毒苗,首先必须解决砧木问题。曼赛龙柚传统繁殖方式存在种子播种发芽率低,需要解除限制因素等弊端。而如何建立曼赛龙柚种子快速繁殖体系提高萌芽率,当前在国内

鲜见研究。本文通过开展曼赛龙柚种子组培快繁研究,以期提高种子萌芽率。

本试验选择云南省西双版纳州普文镇试验林场提供的曼赛龙柚种子作为试验材料,探讨不同种类、浓度的基本培养以及不同浓度不同种类的植物生长调节剂对曼赛龙柚种子萌芽的影响,寻求最佳培养基配方,旨在为柚类砧木苗的培育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

所用试材选自云南省西双版纳州普文镇试验林场结果良好的曼赛龙柚植株进行取材,取材时间为2015年11月。

1.2 方法

试验于西南林业大学西南地区生物多样性保育重点实验室内进行。

1.2.1 灭菌与接种 挑选籽粒饱满的曼赛龙柚种子,将种子放入大烧杯中,用1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液浸泡5 min,软化种子表面果胶,用无菌水冲洗5~7遍直到果胶去除干净。(1)在无菌瓶中加入75%乙醇消毒20 s,然后用0.1%升汞溶液加几滴吐温T-20对种子消毒20 min。(2)用无菌水冲洗8次,每次冲洗要不停振荡。(3)在超净工作台上剥去内外种皮,再接种于培养基上培养。(4)将接种好的种子标记日期,置于(25±1℃)恒温培养箱中培养并记录发芽时间。

1.2.2 不同培养基对曼赛龙柚种子萌芽的影响

以MS、MT培养基为基础,培养基设置6个处理,即:1/5MS、1/2MS、MS、1/5MT、1/2MT、MT固体培养基(依次编号A-F)(见表1),每个培养基接种4粒,每种培养基做10瓶,试验重复3次。

收稿日期:2016-05-27

第一作者简介:刘月(1991-),女,云南省昆明市人,在读硕士,从事果树组织培养研究。E-mail:monkeymoon6@sina.com。

通讯作者:刘惠民(1957-),男,博士,教授,从事经济林栽培与利用等研究。E-mail:hmlu@swfu.edu.cn。

表 1 不同培养基处理种子试验设计
Table 1 Experiment design of different culture medium

处理 Treatments	培养基 Medium	处理数 Processing
A	1/5MS+40 g•L ⁻¹ 蔗糖+4.3 g•L ⁻¹ 琼脂	120
B	1/2MS+40 g•L ⁻¹ 蔗糖+4.3 g•L ⁻¹ 琼脂	120
C	MS+40 g•L ⁻¹ 蔗糖+4.3 g•L ⁻¹ 琼脂	120
D	1/5MT+40 g•L ⁻¹ 蔗糖+4.3 g•L ⁻¹ 琼脂	120
E	1/2MT+40 g•L ⁻¹ 蔗糖+4.3 g•L ⁻¹ 琼脂	120
F	MT+40 g•L ⁻¹ 蔗糖+4.3 g•L ⁻¹ 琼脂	120

1.2.3 不同植物激素对曼赛龙柚种子萌芽的影响 以 MS 固体培养基为基本培养基,采用单因素设计,分别设置 50、100、150 mg•L⁻¹ 三个 NAA、6-BA、GA₃ 浓度梯度,共 9 个处理(依次编号 1-9)(见表 2),将种子分别浸泡至相应溶液中,24 h 后将其接种至 MS 培养基上,每瓶接种 4 粒,每种培养基 10 瓶。试验重复 3 次。

1.2.4 田间对照试验 11 月中旬,选取曼赛龙柚比较饱满的阴干种子直接放入大棚穴盘内,每穴放 1 粒,共播种 200 颗,之后覆土浇水,定期管理,并统计种子萌芽率。

1.2.5 培养条件 培养条件均为培养室恒温(25±1)℃,先将种子进行暗培养,待种子萌芽后进行恒温光照培养,光照强度为 2 000 lx。培养时间为 12 h•d⁻¹。

1.2.6 数据统计分析 种子发芽率(%)=发芽种子数/供试种子总数×100;

种子出苗率(%)=出苗种子数/供试种子总数×100

对该试验进行种子发芽率和出苗率统计,利用 Excel 和 SPSS 数据分析软件对统计结果进行差异显著性检验。

表 2 不同植物激素处理种子试验设计
Table 2 Experiment design of different plant hormones

处理 Treatments	培养基 Medium	植物激素浓度/(mg•L ⁻¹) Concentration of hormone			处理数 Processing
		NAA	6-BA	GA ₃	
1	MS	50	-	-	120
2	MS	100	-	-	120
3	MS	150	-	-	120
4	MS	-	50	-	120
5	MS	-	100	-	120
6	MS	-	150	-	120
7	MS	-	-	50	120
8	MS	-	-	100	120
9	MS	-	-	150	120

2 结果与分析

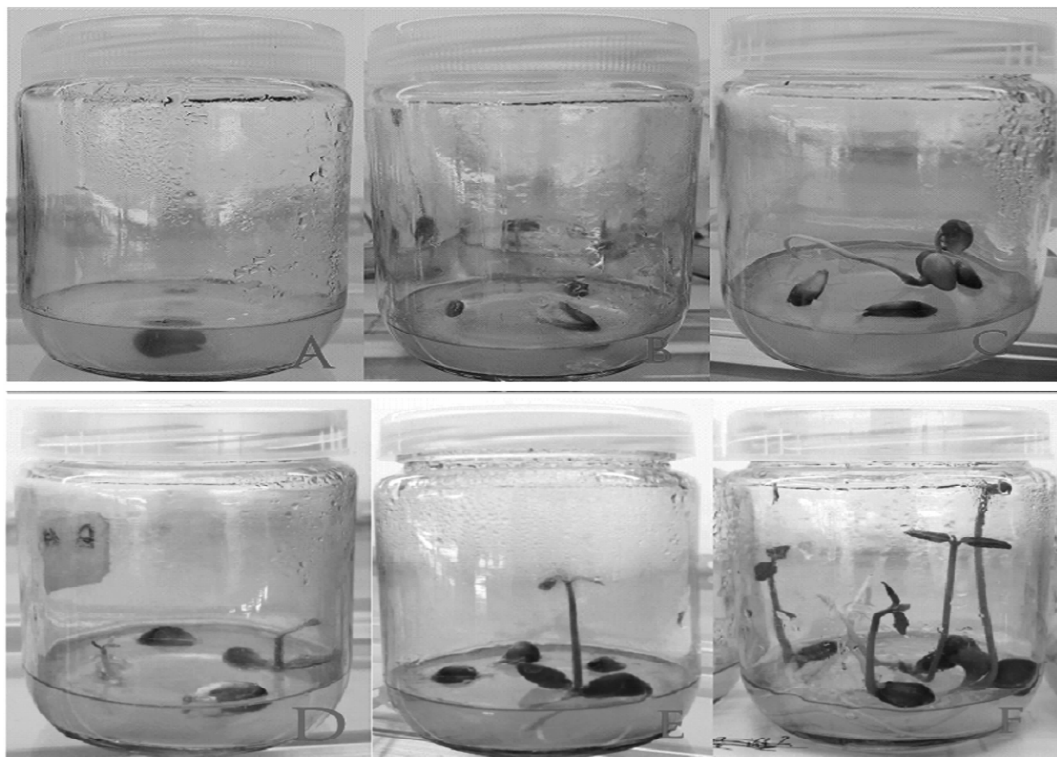
2.1 不同种类基本培养基对种子萌芽的影响

从表 3 可以看出,MS 培养基中的种子普遍生长情况高于 MT,两类培养基的种子均从 20 d 左右开始萌发,但种子萌芽率存在很大差异,20 d 时,1/2MS 培养基上种子大部分由白转绿个别子叶呈深绿色,无顶芽出现,有根出现(见图 1A);MT 培养基上种子个别出现转绿(见图 1B),无顶

表 3 不同培养基对种子萌芽的影响
Table 3 Effect of different culture medium of seed germination

处理 Treatments	发芽率/% Germination rate			出苗率/%Emergence rate
	20 d	30 d	40 d	
A	22.5±0.02 ab	52.5±0.02 a	56.7±0.06 b	49.2±0.04 b
B	25.8±0.04 a	30.8±0.05 b	50.8±0.04 b	50.8±0.05 b
C	20.0±0.03 bc	51.7±0.01 a	86.7±0.01 a	81.7±0.01 a
D	15.8±0.01 cd	18.3±0.01 c	36.7±0.04 c	35.0±0.03 c
E	11.7±0.01 de	20.8±0.01 c	25.8±0.04 d	21.7±0.04 d
F	7.5±0.03 e	17.5±0.03 c	22.5±0.03 d	19.2±0.04 d

出苗率指播种 40 d 时测定。表中数值为平均值±标准差;同列数据不同小写字母表示在 0.05 水平下差异显著。下同。
The seeds germination rate refers to the determination of 40 days. The value in the table is average±standard deviation; Different lowercases in the same column mean significant difference at 0.05 level. The same below.



A:种子生根; B:种子转绿; C:开始萌芽; D:种子出苗; E:幼苗健康生长; F:不定量根系

A:Rooting of seed; B:Seed transformed into green; C:Seed germination; D:Seed emergence; E:Seedlings healthy growth;

F:Seedlings not quantitative take root

图1 曼赛龙柚种子萌发过程

Fig. 1 Mansailong seed germination process

芽出现,有微露白现象,发芽率最低仅为 7.5%。40 d 后,MS 培养基上幼苗生长良好,子叶呈绿色,出现顶芽和根(见图 1C、D、E),幼苗最高。发芽率最高达到 86.7%,MT 培养基上幼苗少数开始露白,其余无萌发迹象,发芽率最低为 22.5%。由表 3 可知,MS 培养基的种子发芽率显著高于其它培养基。播种 40 d 时,各种子出苗率依次为:MS>1/2MS>1/5MS>1/5MT>1/2MT>MT。MS 培养基出苗率显著高于其它培养基,而 MS 所有浓度培养基出苗率均显著高于 MT 培养基。

诱导种子萌芽培养基,一般先诱导生根,而诱导生根的基本培养基一般需要降低无机盐浓度以利于根的分化,对大多数植物而言,大量元素中的 NH_4^+ 不利于发根;分析原因 MT 培养基中的有机物比 MS 浓度高,反而抑制种子萌发,而 1/2MS、1/5MS 培养基中各种营养元素比 MS 的各元素含量减少 1/2、4/5,因此种子长势比 MS 培养基中要差,从这 6 种培养基对曼赛龙柚种子发芽的

试验观察统计数据表明,MS 培养基是适合曼赛龙柚种子萌芽和生长的基本培养基。

2.2 不同植物激素对种子萌芽的影响结果分析

NAA、6-BA、 GA_3 的不同浓度组合对种子萌芽存在显著性差异。用 NAA、6-BA、 GA_3 三种激素浸种 24 h 后,种子的萌芽时间比不浸种的整体时间提前了 10 d 左右。从表 4 看出,10 d 时三种激素之间差异不明显,培养 30 d 后,NAA 处理组中,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度处理后发芽率比 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理高,但比不加激素的发芽率低,说明各浓度的 NAA 对曼赛龙柚种子有抑制作用。6-BA 处理同 NAA 处理一样,且 6-BA 处理组的发芽率随 6-BA 浓度增加而降低,说明高浓度的 6-BA 对曼赛龙柚种子有抑制作用。

在 GA_3 处理组中,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后的种子发芽率 30 d 时达 72.5% 比不加激素处理 30 d 时的发芽率高出 20.8 百分点,而发芽率随着处理浓度增加而降低,这说明低浓度的 GA_3 浸种处理对曼赛龙柚种子萌发有促进作用。经过一定时间

培育后,培养基内种子萌芽产生的幼苗可发育成幼苗而形成小苗,部分小苗则产生不定量的根系(见图 1F),因此可知 GA₃处理后的种子不但能提前打破种子休眠,还能促进种子生根。

三种激素处理后的种子,在后期出苗率均较低,原因是种子消毒时可能受消毒剂的伤害随时

间增长,幼苗出现个别褐化死亡现象,且潜伏在种子表皮的内生菌在适宜的环境下重新生长,即使污染率很低也是造成出苗率有所降低的原因。三种激素中,100 mg·L⁻¹ GA₃ 处理的种子出苗率最高,幼苗粗壮叶片深绿,根系发达且生长快。

表 4 不同植物激素对种子萌芽的影响
Table 4 Effect of different hormones on seed germination

处理 Treatments	发芽率/% Germination rate			出苗率/% Emergence rate
	10 d	20 d	30 d	
1	0.8±0.014 d	25.8±0.01 d	32.5±0.03 d	27.5±0.07e
2	9.2±0.03 ab	34.2±0.03 bc	36.7±0.01 d	31.7±0.03 de
3	3.3±0.04 cd	26.7±0.04 d	34.2±0.04 d	27.5±0.03 e
4	0.8±0.01 d	32.5±0.04 bcd	36.7±0.04 d	30.0±0.03 e
5	3.3±0.04 cd	26.7±0.03 d	45.8±0.06 c	25.8±0.04 e
6	7.5±0.02 bc	30.0±0.05 cd	33.3±0.07 d	37.5±0.04 cd
7	13.3±0.01 a	48.3±0.05 a	60.8±0.01 b	53.3±0.01 b
8	2.5±0.03 cd	46.7±0.04 a	72.5±0.03 a	71.7±0.03 a
9	3.3±0.03 cd	38.3±0.01 b	47.5±0.03 c	43.3±0.03 c

出苗率指播种 30 d 时测定。
The seeds germination rate refer to the determination of 30 days.

2.3 田间试验结果分析

曼赛龙柚喜疏松、肥沃、微酸性土壤,因此穴盘播种土壤均选用腐殖土。播种 68 d 左右种子开始相继萌芽,100 d 后,曼赛龙柚种子萌芽率达到 58.7%。田间播种,种子萌芽时间比组织培养时间延长一倍,分析原因是曼赛龙柚种子离体时间过长,导致种子失水,而果树种子必须在一定的条件(低温、湿润)其内部进行一系列复杂的生理变化后,才能使原生质的溶透性、膨胀性及酶的活性提高,复杂难溶的有机物质逐渐转化为简单易溶的有机物,最后种子才开始萌发。而作为对照试验,在种子萌发过程中除了正常浇水之外,并没有施肥,因而种子只能依靠自身条件完成种子后熟过程。

3 结论与讨论

周梦春等^[9]和潘一山等^[10],在研究琯溪蜜柚、沙田柚和江津柚及龙柚过程中均提到柚类传统繁殖方式存在种子播种发芽率低,需要解除限制因素等弊端,且其遗传性状易产生较大变异,不适合柚类良种大规模发展的需要,因此他们均选择了通过建立快速繁殖体系克服传统方式的缺

点。一直以来柚类组织培养快速繁殖都难以达到生产实用阶段,其原因之一是柚属于木本植物,在组培上有一定难度,其繁殖系数不高,不定芽成苗困难^[11];另一个原因是试管苗生根困难,目前,国内外大多数学者采用茎尖微芽嫁接技术来克服柑橘离体快繁生根困难的问题^[12-14]。若把曼赛龙柚作为砧木培育就不存在遗传变异的顾虑。作为葡萄柚微芽嫁接的最佳砧木,如果能解决曼赛龙柚种子萌芽的问题,便为今后探讨葡萄柚茎尖微芽嫁接技术打下了坚实的基础。

种子萌芽及幼苗生长需要适宜的水、氧气、温度、光照以及营养基质等因子,这些因子虽然有各自不同的作用,但它们又彼此联系,综合地影响种子及幼苗的生命活动^[15]。采用植物生长调节剂浸种是提高种子发芽率、培育壮苗的一种简单易行的有效方法。植物生长调节剂浸种可以打破种子休眠,破坏妨碍种子萌发的活性物质,有利于种子的吸水萌发,从而促进种子胚的发育和种子发芽^[16-18]。

本研究结果表明,基本培养基、NAA、6-BA、GA₃对曼赛龙柚种子萌芽有显著影响。MS 培养

基更适合曼赛龙柚种子的萌芽及幼苗生长。有研究表明,GA₃能解除某些种子的休眠,促进种子萌发^[19],从本试验结果也可以看出,用GA₃处理能促使曼赛龙柚种子萌发时间提前,提高种子的发芽率和出苗率,这与孙立梅^[20]等研究结果一致,说明GA₃能促进种子萌发,但是需要控制GA₃的浓度,曼赛龙柚种子催芽成苗以100 mg·L⁻¹ GA₃浓度浸种24 h为最佳。NAA、6-BA处理均能使种子萌芽提前,不过效果不如GA₃处理显著,且一定浓度下NAA、6-BA处理后反而使种子发芽率降低,说明NAA、6-BA并不适合用于曼赛龙柚种子处理。因此促进曼赛龙柚种子发芽的理想培养基是MS+40 g·L⁻¹蔗糖+4.3 g·L⁻¹琼脂,将种子浸泡于100 mg·L⁻¹ GA₃溶液中24 h能提前10 d打破种子休眠,提高发芽率和出苗率。

值得指出的是,本试验种子发芽率相对较低,这可能是将种子取出阴干的缘故,曼赛龙柚种子通过传统方式育苗出苗率本身不高,其活性会随着离开果肉时间增加而极速降低,故如何保存种子活性也是一个难点,有待今后继续深入研究。

参考文献:

- [1] 严毅,何承忠,李贤忠. 9个葡萄柚品种与曼赛龙柚嫁接生理酶活性研究[J]. 中国南方果树, 2012, 41(2): 50-53.
- [2] 杨坤. 曼赛龙柚特性及其栽培技术[J]. 福建果树, 2001, 116(2): 24-25.
- [3] 陈文奋,彭琼生. 柚子优良品种曼赛龙柚的经济性状及栽培研究[J]. 云南热作科技, 1990, 4(13): 21-25.
- [4] 杨坤. 曼赛龙柚的特性[J]. 柑桔与热带果树信息, 2001, 17(8): 22.
- [5] 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.

- [6] 胡龙娇,伍建榕,叶维雁,等. 云南普文葡萄柚黄龙病病原分子检测及鉴定[J]. 中国南方果树, 2015, 44(2): 14-7.
- [7] 严毅,张南新,何承忠,等. 葡萄柚不同砧木嫁接亲和性与保护酶活性相关性分析[J]. 北方园艺, 2012(11): 8-11.
- [8] 孟毅,何承忠,李贾林,等. 葡萄柚4种备选砧木遗传关系的SSR分析[J]. 中国果树, 2009(5): 19-21.
- [9] 周梦春,苏智先,胡进耀,等. 三种柚子品种的离体快速繁殖[J]. 生物学杂志, 2010, 27(3): 81-83.
- [10] 潘一山,邹金美,潘裕添. 龙柚离体培养快速无性繁殖技术研究[J]. 漳州师范学院学报, 2006, 51(1): 96-99.
- [11] 董高峰,黄涛,李耿光,等. 沙田柚茎尖嫁接苗离体培养的研究[J]. 生态科学, 2001, 20(3): 14-18.
- [12] Singh S, Pay B K, Deka P C. Micropropagation of Citrus jambhiri cultivar ough lemon[J]. Journal of Interacademia, 1999, 3(2): 183-191.
- [13] 陈菁英,宋瑞琳,陈景耀. 枳和枳橙的茎尖培养与增殖研究[J]. 福建农业学报, 1991, 6(1): 53-59.
- [14] 林柏年,胡春根,沈德绪. 甜橙成年树侧芽离体繁殖诱导成苗研究[J]. 园艺学报, 1997, 19(3): 209-214.
- [15] 吴之坤,张长芹,程治英. 不同培养基质及条件对三种报春花种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 种子, 2005, 24(4): 1-5.
- [16] 饶贵珍,李建青. 两种植物生长调节剂浸种对芹菜种子发芽的影响[J]. 农业与技术, 2000(1): 20-23.
- [17] 李凤铃,陈季楚,赵毓橘. 赤霉素和光对拟南芥种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 植物生理学报, 2000(26): 101-104.
- [18] 刘乐承,叶云霞. 不同浓度GA₃, IAA, 6-BA对菜瓜种子发芽的影响[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2011(9): 229-232.
- [19] 杨利平,宋满珍,张晶. 光照和温度对百合属6种植物种子萌发的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(4): 14-18.
- [20] 孙立梅,迟立华. 激素处理对麻黄种子发芽及成苗率的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3512-3550.

Effect of Different Culture Medium on *Citrus maxima* cv. *mansailong* Seed Germination

LIU Yue, LIU Ting, WANG Ying-tong, LIU Hui-ming, WANG Lian-chun

(Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650225)

Abstract: In order to find out the best culture medium formula of pomelo rootstock seedling, taking the Mansailong seeds as experimental material to research the effects of different culture medium and hormones on seed germination and seedling emergence. The results showed that MS culture medium were relatively better for the seed germination and seedling emergence than the other five kinds of culture medium, rate of emergence was 81.7%. All of the NAA, 6-BA and GA₃ could shorten the seed germination time. The highest seed germination rate and germination rate was used with 100 mg·L⁻¹ GA₃ seed soaking for 24 h.

Keywords: grapefruit rootstock; *Citrus maxima* cv. *mansailong*; seed; culture medium; plant hormones