

1 枳壳种子的采集

于8~9月份在枳壳大树上采集充分成熟的枳壳果,或者自然落下的成熟果。采集的果实首先经过堆积发酵,让其腐烂,注意不能堆积时间过长。然后经过水洗,除去果肉、果皮等杂质,取出种子洗净,放在太阳照射不到的地方晾干,不得在太阳下面曝晒干(经过曝晒的种子失去了活力,不会发芽)。

2 层积处理

经过处理的种子可以直接层积,一般采取沙藏,在通风、干燥、避光的屋内地上铺一层10cm左右的湿沙,沙的湿度应掌握在手捏能成团,手松即散的标准。然后将种子与湿沙混合,上面再覆盖一层湿沙,即可。

3 整地

苗圃可以在上年11~12月份进行整地,每666.7m²施入5000~10000kg土杂肥后深翻冻土。次年1~2月份再进行精细整地,可以适当施入复合肥或者尿素,每666.7m²

40~50kg。整地后备播。

4 播种

一般可以于3月20日前后进行播种,采用条播。每666.7m²播种25~30kg。不可以过多增加播种量。播种时应注意土壤湿度,土壤过干时,需要浇一些底水,以保证出苗率。

5 管理和抚育

枳壳出苗以后要及时清除行间杂草,以防杂草与枳壳苗争水争肥,影响枳壳小苗正常生长。苗与苗之间应该保持3~5cm的距离。在枳壳小苗长到5~10cm时,可以在雨天进行追肥,一般每666.7m²撒施尿素3~5kg,也可以施复合肥3~5kg。20~30d(天)雨后,再重复追施一次。当枳壳小苗长到20~30cm高时,进行矮化处理,可以喷施一次多效唑,一般使用浓度为300倍左右。这样当年培育枳壳小苗的根径以上10cm处(嫁接口)的直径大于0.4cm以上,用在翌年春天用于柑橘类果树的嫁接。

温州蜜柑无菌系建立及快繁调控技术研究

罗君琴¹ 李丽¹ 王海琴¹ 聂振朋¹ 林华良²

(1. 浙江省柑橘研究所 台州 黄岩 318020; 2. 台州市黄岩区上垟乡农办)

常规的柑橘繁殖通常采用嫁接法来扩增,但这一方法增殖速度较慢,年增殖倍率仅为10倍左右,并且繁殖成活率深受季节限制,苗出圃周期比较长,难以在短时期内满足大量和快速增殖的要求。植物快繁技术是当今世界国内外农业科研和生产经营者普遍关注的热点问题,是生物技术中最具实用价值的领域。目前,快繁技术主要包括无菌组织培养和非试管快繁技术两大类。它能克服传统嫁接繁殖受季节限制和增殖速度慢的不

足。

近年来,柑橘快速育苗和无毒化育苗逐渐成为柑橘育苗领域的新动向。育苗专家们开始尝试柑橘生物快速育苗技术研究^[1-3],并已取得一定的成绩,如柑橘全光雾绿枝扦插^[1-2]、容器营养土快速育苗^[4]等等技术研究,在提高了柑橘原有繁殖速度方面作出了较大的贡献。但一直以来在柑橘的无菌快速繁殖方面很少见有文章报道。笔者自2005年以来开始进行温州蜜柑无菌系建立及快繁调控技

术试验工作, 尝试柑橘带芽点幼嫩枝段途径建立柑橘无菌系, 进而从器官途径直接诱导芽体增殖, 试验进展顺利, 现将试验结果进行整理, 汇报如下。

1 材料与方法

1.1 材料 以浙江省柑橘研究所本部试验站的 5~6 年生早熟温州蜜柑健壮株为采集试验离体材料的母本株。柑橘无菌系建立及快繁继代培养放在浙江省柑橘研究所品种室组培中心, 培养条件: 25℃ 恒温, 光照 12h/d, 光强 1500lux 左右。

1.2 试验设计 选晴好天气, 采集温州蜜柑优良单株的新生枝, 一个芽眼一段剪好枝段, 清洗液冲洗 30min(分钟), 实验室备用。带芽眼枝段进一步剪短, 放入事先灭过菌的锥形瓶中分处理消毒灭菌, 处理完毕后, 无菌条件下进行无菌诱导及继代增殖培养试验。

1.2.1 不同灭菌处理对温州蜜柑外植体无菌培养效果影响试验。设 70% 乙醇 30s、0.1% 升汞 6min、70% 乙醇 30s+0.1% 升汞 6min、70% 乙醇 60s+0.1% 升汞 12min 四个处理进行离体材料接种前表面灭菌, 每处理 40 个材料。接种后 2 周观察记录培养瓶内材料污染、褐化枯死情况。

1.2.2 生长素种类对温州蜜柑外植体诱导成

苗影响试验。温州蜜柑外植体无菌诱导培养基中细胞分裂素相同, 均选用 KT; 生长素分设 IAA、IBA、NAA 三个不同类型相当浓度(根据高压灭菌热稳定性不同而设定)进行诱导培养。每处理 50 个材料。一个培养周期后观察不同生长素培养基材料出芽情况。

1.2.3 激素浓度与橘苗增殖速度相关试验。共八个处理, 分设两组进行:

试验一组: KT1mg/l+IAA0.1mg/l、KT2mg/l+IAA0.2mg/l、KT3mg/l+IAA0.3mg/l、KT4mg/l+IAA0.4mg/l、KT5mg/l+IAA0.5mg/l;

试验二组: KT1mg/l+IAA0.1mg/l、KT2mg/l+IAA0.1mg/l、KT3mg/l+IAA0.1mg/l;

取长势相当的无菌橘苗切成小丛(每丛 2 个单株), 分别接种于试验一、二组培养基中进行增殖培养。培养 45d 后, 每处理随机抽取 15 丛, 记录丛苗总株数。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌处理对温州蜜柑外植体无菌培养效果的影响 四个不同的温州蜜柑嫩枝段接种前表面灭菌处理, 在接种后 2 周, 观察统计各自处理材料的污染率、褐化枯死率, 并合计材料总损耗率, 结果如表 1 所示。

表 1 不同灭菌处理对温州蜜柑外植体无菌培养效果的影响

处理	70%乙醇30s	0.1%升汞6min	70%乙醇30s+0.1%升汞6min	70%乙醇60s+0.1%升汞12min
污染率/%	97.5	85.0	12.5	0
褐化枯死率/%	2.5	12.5	42.5	95
总损耗率/%	100	97.5	55.0	95

备注: 材料总损耗率包括因污染或褐化枯死而丢弃的外植体材料数占原有总接种材料数比例

从表 1 可以发现: 单独使用外植体表面灭菌剂 70% 乙醇、0.1% 升汞不易杀净温州蜜柑枝芽眼内所带菌源, 两处理的灭菌后外植体污染率均在 85% 以上, 加上材料褐化枯

死部分, 接种外植体总损耗率大于 97%。处理 70% 乙醇 60s+0.1% 升汞 12min 虽然污染率为 0, 但已灭菌过度, 材料在培养周期过程中褐化死亡 95%, 接近柑橘嫩枝灭菌处理临界

范围。四个灭菌处理中处理 70% 乙醇 30s+0.1% 升汞 6min 无菌系建立成功机率最大, 该处理去除 12.5% 的外植体材料污染率和 42.5% 的外植体材料褐化枯死率, 可获得不带菌并且存绿的离体材料 45%。在本实验结果中我们可以初步看出, 温州蜜柑大田嫩枝采用二次杀菌 (不同灭菌剂先后交叉灭菌) 方式, 灭菌效果可明显优于单种灭菌剂处理, 但二次杀菌同时也容易引起灭菌过度, 造成无菌材料褐化死亡。在二次杀菌中合理控制每一次灭菌时间是能否成功建立无菌系的关键所

在, 提倡在能杀灭离体材料病菌的基础上尽可能地缩短灭菌时间, 以保证尽可能多的外植体存活。本试验中处理 70% 乙醇 30s+0.1% 升汞 6min 灭菌效果尚可, 可在杀菌时间控制上作细微调整, 推广试用于其它柑橘类嫩枝段外植体杀菌处理中。

2.2 不同生长素种类对温州蜜柑外植体诱导成苗的影响 不同生长素种类、相同细胞分裂素条件下, 25℃ 恒温条件下, 温州蜜柑带芽生长点橘枝无菌诱导培养, 2 个月后统计出愈率及成芽率, 结果如图 1 所示。

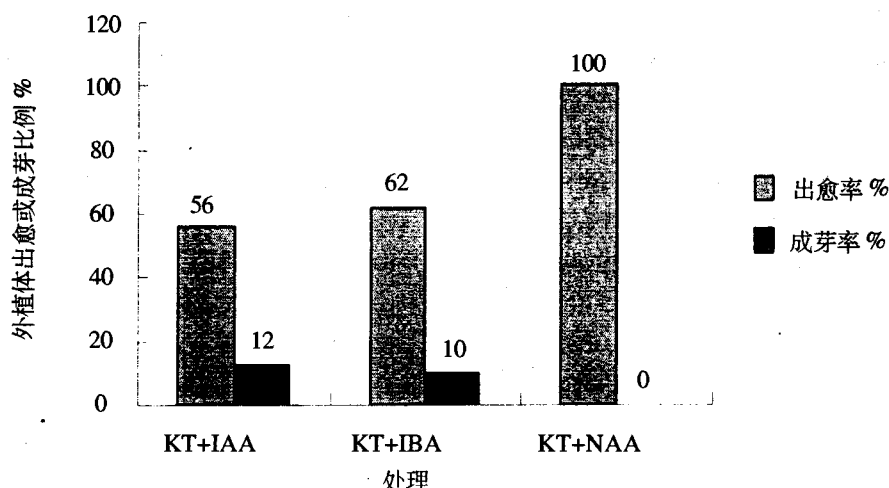


图 1 生长素种类对温州蜜柑外植体成芽影响

从图中可以看出: KT+IAA、KT+IBA 和 KT+NAA 三个处理外植体愈伤组织形成比例均较高, 在 50% 以上, 其中的 KT+NAA 处理诱导产生愈伤的能力极强, 已经达到 100%, 不利于外植体原有芽生长点直接诱导成苗体, 其芽体萌动受愈伤组培生长营养竞争严重。KT+NAA 处理不适合带芽点外植体直接诱导成无茵苗, 这可能与 NAA 更能促成原橘枝芽生长点转向愈伤分化, 愈伤生长逐渐覆盖了原有芽生长, 从而抑制了原有芽生长点的直接成苗。本试验中 KT+IAA、KT+IBA 处理诱导温州蜜柑外植体成苗优于 KT+NAA, 两处理均有近 10% 外植体成功诱导

原有芽生长点萌发成芽苗, 尽管比例较低。

2.3 激素浓度与橘苗增殖速度间存在的相关性 长势相当的无茵橘苗切成小丛分别接种于试验一、二组培养基中, 恒温 25℃、12 h/d 光照条件下培养 45d 后, 随机抽样 15 丛 (30 个单株), 记录丛苗所含芽苗株数及苗体表现, 并计算各处理的小苗增殖倍数, 结果如表 2 所示。

从表 2 一组试验不难看出: 当 KT 与 IAA 浓度比例保持不变时, 随着激素浓度的增加, 橘苗的增殖速度递增, 但当递增到一定浓度时, 苗势会有所削弱。比较一组和二组又可以发现: 相同 KT 浓度, 增加 KT/IAA 配

表 2 不同激素对比对无菌橘苗增殖效果的影响

处理	KT/mg/l	IAA/mg/l	接种苗数/株	45d后苗数/株	增殖倍数	备 注
一组 1	1	0.1	30	48	1.6	苗健好, 叶色绿
2	2	0.2	30	102	3.4	苗健好, 叶色绿
3	3	0.3	30	132	4.4	苗健好, 叶色绿
4	4	0.4	30	159	5.3	苗偏弱, 叶色较绿
5	5	0.5	30	177	5.9	苗细弱, 叶色嫩绿
二组 6	1	0.1	30	48	1.6	苗健好, 叶色绿
7	2	0.1	30	105	3.5	苗健好, 叶色绿
8	3	0.1	30	141	4.7	苗健好, 叶色绿

比, 橘苗的增殖速度也可相应增高, 一定程度上可通过 KT/IAA 配比调高来减少 IAA 使用量, 而同时又不影响苗增殖倍率。

3 小结

3.1 温州蜜柑嫩枝段接种前表面灭菌宜采用二次灭菌处理, 但由于所处理的材料为植株中最幼嫩组织部位, 容易杀菌过度, 导致外植体中芽点细胞不可逆转的深度中毒, 每次灭菌时间尽可能短。本试验中, 采用 70% 乙醇 30s+0.1% 升汞 6min 灭菌方法可获得温州蜜柑 45% 有生命力无菌培养材料, 效果尚可, 可在其它柑橘类嫩枝段外植体杀菌处理中借鉴试用。

3.2 在不同生长素种类对温州蜜柑外植体诱导成苗效果影响试验中, IAA 和 IBA 与细胞分裂素搭配使用, 促成温州蜜柑诱导成苗的效果明显优于 NAA。含 NAA 处理容易引起

外植体愈伤分化过于强烈, 竞争生长点细胞获取营养生长, 若不及时切除, 最终容易导致芽死亡, 造成诱导失败。

3.3 在激素浓度与橘苗增殖速度相关性试验中, 根据组培苗培养周期中增殖倍率与增殖苗的苗体生长状况综合考虑, 温州蜜柑无菌苗增殖配方可选用 KT2 ~ 3mg/l+IAA0.1 ~ 0.3 mg/l 激素范围。

参 考 文 献

- 〔1〕 陆玉英, 阮经宙等. 柑橘生物快繁技术研究. 中国农学通报, 2006,22(11):79 ~ 82
- 〔2〕 李玉石, 白世红等. 佛手间歇弥雾绿枝单芽扦插快速繁育技术. 林业科技, 2005,30(2):9 ~ 10
- 〔3〕 席联同. 柑橘快速育苗技术. 中国南方果树, 2001,30(6):22
- 〔4〕 刘干生, 胡壮怀等. 柑橘活动苗床营养土育苗技术. 果树科学, 1997,14(1):66 ~ 67