

葡萄柚成年态茎段外植体的消毒与抗褐化

刘月, 叶维雁, 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:以葡萄柚不同品种的成年态茎段为外植体,研究了不同茎段长度、品种、消毒方式及培养基对葡萄柚成年态茎段消毒以及防褐化的影响。结果表明:2 cm 大小茎段消毒效果最好,污染率最低,萌芽率最高。不同品种的污染率和发芽率存在差异,“里约红”污染率最低,“星路比”污染率较高,但萌芽率最高。用 75% 酒精处理 20 s, 5% NaClO 溶液处理 20 min, 放置 48 h 后,再用 5% NaClO 溶液处理 20 min, 污染率最低达 21.3%, 为最佳消毒方法。NaClO 二次消毒后接种于 WPM+100 mg·L⁻¹ 半胱氨酸培养基上可有效控制褐化, 污染率最低为 15.6%, 萌芽率最高为 83.1%。

关键词:葡萄柚;成年态外植体;消毒;褐化

中图分类号:S 666.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)07-0131-05

葡萄柚(*Citrus Paradisi* Macf)属芸香科柑橘属的植物,为世界柑橘四大类群之一,因果实悬挂成串簇生如葡萄,故称葡萄柚^[1]。葡萄柚起源于西印度群岛的巴巴多斯,在欧美地区大量种植^[2]。葡萄柚的营养价值丰富,果实柔嫩,风味独特,既可鲜食,又可加工制成罐头,果汁及色拉等原料^[3-5],越来越受到世界各国的生产者和消费者的喜爱,因此发展葡萄柚种植具有可观的前景^[6]。

由于葡萄柚生产过程中,长期进行无性繁殖,所以易感染病毒、类病毒。据不完全统计,世界上已经报道的柑橘病害及类病毒病有 80 余种^[7],其中危害较大的有 20 多种。如国内发生的柑橘黄龙病(*Liberobacter asiaticum*)、衰退病(*tristeza*)、裂皮病

(*exocortis*)^[8]以及碎叶病(*tatter leaf*)等都极大的危害葡萄柚生产,这些危险性病毒病和类似病毒病可以通过嫁接代代相传,通过苗木接穗调运扩散蔓延,是葡萄柚高产优质的严重障碍^[9-10]。柚类属于多年生木本植物,其组织培养的难度远比草本植物大,尤其是成年树的组织进行离体培养时,外植体消毒、诱导愈伤和根系的分化方面难度更大^[11];柑橘属植物处于气候温和,雨水充足环境中,成年树在生长过程中携带大量的细菌和真菌,会出现消毒不彻底和过分消毒导致萌芽率低的现象。在沙田柚^[12-14]、文旦柚、蜜柚^[15]和近年来增加的葡萄柚^[16-17]等柚类组培快繁研究中,都因为成年态外植体消毒难以解决而采用种子实生苗作为快繁材料。关于葡萄柚成年态外植体组织培养的无菌体系建立,目前国内尚鲜见相关研究。该试验以不同品种的葡萄柚的成年态茎段作为外植体,对葡萄柚外植体消毒方法进行筛选,以期解决接穗污染率高、褐变率高、萌芽率低的问题,为葡萄柚成年态外植体离体培养和茎尖微芽嫁接提供参考依据。

第一作者简介:刘月(1991-),女,云南昆明人,硕士研究生,研究方向为果树组织培养。E-mail:monkeymoon6@sina.com.

责任作者:刘惠民(1957-),男,博士,教授,现主要从事经济林栽培与利用等研究工作。E-mail:hmlu@swfu.edu.cn.

基金项目:西南林业大学科技创新基金资助项目(15088);国家国际科学合作专项资助项目(2014DFA3060)。

收稿日期:2016-12-15

information index (*I*) was 0.510 6, the genetic similarity coefficients among the tested clones ranged was 0.488 2—0.815 2, with an average of 0.668 8. Cluster analysis was conducted by using UPGMA method, it was concluded that the 39 clones of *C. azalea* could be divided into 2 groups (the genetic distance was 0.360), and the second group included 6 subgroups (the genetic distance was 0.304).

Keywords: *Camellia azalea*; clones; genetic diversity; ISSR

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄柚品种为美国佛罗里达州引种的“火焰”(‘Flame’)“哈路比”(‘Hudson Foster’)“瑞路比”(‘Ray Ruby’)“里约红”(‘Rio Red’)“星路比”(‘Star Ruby’),选取一年生成年态茎段为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体取材与预处理 取半木质化茎段,装于干净的保鲜袋中带回实验室。用稀释的洗洁精溶液浸泡 3~5 min,再用自来水冲洗 60 min,除去表面灰尘,放置于超净工作台上,先用无菌水冲洗 3~4 次,装于无菌的烧杯中备用。接种于 WPM 固体培养基中,每种处理 40 个茎段,重复 4 次,5 d 开始观察,20 d 后统计污染率。污染率(%)=污染的外植体数/接种外植体总数×100。

1.2.2 不同长度茎段消毒处理 取“星路比”茎段 5 cm,在超净工作台,用 75%酒精浸泡 20 s 后,用 5% NaClO 灭菌 20 min,用无菌水冲洗 5~6 次,分别剪成 1、2、3、4、5 cm。接种于预试验筛选出的最佳培养基 WPM + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ 上诱导腋芽萌发,2 周后统计污染率和萌芽率,并对茎段生长情况进行观察。萌芽率(%)=萌芽外植体数/接种外植体总数×100。

1.2.3 不同品种的消毒处理 以“火焰”“哈路比”“瑞路比”“里约红”“星路比”的茎段为试材,75%酒精浸泡 20 s,用 5%次氯酸钠灭菌 20 min,用无菌水冲洗 5~6 次。接种于 WPM+6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ 培养基上,观察不同品种茎段的污染率、萌芽率和芽体萌发情况。

1.2.4 不同消毒方法处理 取“星路比”茎段进行预处理(在超净工作台,75%酒精浸泡 20 s,消毒剂处理后无菌蒸馏水冲洗 7~8 次),以 0.1% HgCl₂ 和 5% NaClO 的不同处理时间为梯度,共 9 个处理,试验设计见表 1。2 周后统计污染率、萌芽率和褐化率。褐化率(%)=褐化外植体/接种外植体总数×100。

1.2.5 茎段外植体抗褐化、内生菌培养基的选择 取“星路比”茎段,在超净工作台上用 75%酒精浸泡 20 s 之后,分别用 0.1% HgCl₂、5%次氯酸钠灭菌 20 min,放置于培养室 48 h 后,再用 0.1% HgCl₂ 或 5%次氯酸钠处理 20 min,再以无菌水冲洗 7~8 次。分别接种于 WPM、WPM+100 mg·L⁻¹ 半胱氨酸、WPM+15 mg·L⁻¹ 硫酸庆大霉素、WPM+

8 g·L⁻¹ 清菌易培养基中,试验设计见表 2。2 周后统计污染率、萌芽率和褐化率。

表 1 不同灭菌处理对外植体灭菌影响试验设计

Table 1 Effects of different sterilizations on explants sterilizing

处理 Treatment	消毒试剂 Disinfection reagent	消毒方式 Disinfection way	消毒时间 Disinfection time/min
1	0.1% HgCl ₂	一次消毒	20
2	0.1% HgCl ₂	二次消毒(24 h)	20+20
3	0.1% HgCl ₂	二次消毒(48 h)	20+20
4	0.1% HgCl ₂	二次消毒(72 h)	20+20
5	5% NaClO	一次消毒	20
6	5% NaClO	二次消毒(24 h)	20+20
7	5% NaClO	二次消毒(48 h)	20+20
8	5% NaClO	二次消毒(72 h)	20+20
9	0.1% HgCl ₂ +5% NaClO	一次消毒	10+10

表 2 不同培养基对外植体灭菌的影响

Table 2 Effects of different culture medium on explants disinfection

处理 Treatment	消毒试剂 Disinfection reagent	消毒时间 Disinfection time/min	培养基 Medium
1	0.1% HgCl ₂	20+20	WPM
2	0.1% HgCl ₂	20+20	WPM+半
3	0.1% HgCl ₂	20+20	WPM+半+庆
4	0.1% HgCl ₂	20+20	WPM+半+清
5	5% NaClO	20+20	WPM
6	5% NaClO	20+20	WPM+半
7	5% NaClO	20+20	WPM+半+庆
8	5% NaClO	20+20	WPM+半+清

1.2.6 培养条件 以 WPM+6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ 为诱导固体培养基,培养基中均添加蔗糖 40 g·L⁻¹、琼脂 4.3 g·L⁻¹,调节 pH 为 5.8,121 °C 高温高压灭菌 20 min。培养室恒温(25±2)°C,培养光照 2 000 lx,光照时间 12 h·d⁻¹。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel、SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,显著水平 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同长度茎段的消毒效果比较

在外植体茎段消毒试验中,茎段两端的切口处褐变严重,茎段伤口成漂白状,且伤口周围呈水渍状。由表 3 可知,外植体切割长度对污染率影响较大,经消毒处理后的茎段即使清洗数遍两端切口也极易褐变,若直接接种,切口褐变范围会继续增大,使整个茎段呈漂白状死亡,污染率高达 89.4%。若切口分别剪去 0.5 cm,接种后茎段伤口较不切伤口褐化程度稍轻,而褐化率依旧高达 75.6%;当两端切口分别切除 1.0、1.5、2.0 cm,茎段两端切口褐变现

表 3 不同长度茎段消毒试验结果

外植体长度	切口褐变情况	污染率	萌芽率
Explant length/cm	Browning of incision	Infection rate/%	Germination rate/%
1	轻	29.4±0.038c	15.6±0.052b
2	轻	35.6±0.038c	30.6±0.038a
3	轻	51.9±0.063b	23.1±0.014ab
4	水浸状较重	75.6±0.090a	14.4±0.029b
5	水浸状严重	89.4±0.063a	12.5±0.063b

注:表中数值为平均值±标准差;同列数据后不同小写字母表示在0.05水平下差异显著。下同。

Note: The value in the Table is average±standard deviation. Different lower-case letters in the same column represent significant difference at 0.05 level. The same below.

象明显减轻,且无水渍状。其中茎段两端切除1.0~2.0 cm时,褐变率明显降低,且萌芽率明显升高。其中留茎段1 cm污染率最低为29.4%,这主要是因为茎段越长,表面积越大,携带的外生菌和内生菌就越多,茎段越短,表面积越小,携带菌数越少,更容易被杀死,因此越短的茎段污染率越低。而1 cm的茎段虽然污染率低于2 cm茎段,但是2 cm茎段的萌芽率却高于1 cm茎段,主要是1 cm茎段太小,吸收营养有限的缘故。因此,消毒时先将外植体切成5 cm左右的茎段,消毒后茎段2端各切除1.5 cm,以剩余茎段为2 cm的处理方式更好。

2.2 不同品种消毒试验的差异

由表4可知,不同品种的葡萄柚外植体茎段在一次消毒处理后污染率存在一定的差异。其中“里约红”污染率最低为30.6%;其它品种,经一次灭菌后均有较高污染率,“瑞路比”污染率最高,达到68.8%，“哈路比”和“星路比”污染率均高于“里约红”,然而萌芽率却高于“里约红”,其中虽然“星路比”污染率比“哈路比”还高,但是萌芽率也是最高的,为21.3%;“哈路比”和“星路比”新生芽生长最快,芽呈深绿色且生长旺盛,可能由于“哈路比”和“星路比”的树体生长整体比“里约红”好,半木质化茎段比较粗壮受消毒剂伤害程度轻,故萌芽率高于“里约红”。由此可见,茎段污染率受不同材料影响较大,不同品种的葡萄柚在相同的生长环境下,生长情况差异大,而不同品种葡萄柚本身结构也有差别,其枝条表面所带有的外生菌和韧皮部携带的内生菌皆不同,且不同品种对消毒剂的耐受力也有显著差异。

2.3 不同消毒方法的效果比较

由表5可知,处理7污染率最低为21.3%,而且材料死亡较少,处理4污染率其次,为25.6%。处理

表 4 不同品种茎段消毒试验结果

品种	污染率	萌芽率	生长情况
Variety	Infection rate/%	Germination rate/%	Growth condition
“火焰”	45.9±0.069b	9.4±0.024b	++
“Flame”			
“哈路比”	41.3±0.116c	20.0±0.035a	+++
“Hudson Foster”			
“瑞路比”	68.8±0.079a	10.6±0.038b	+
“Ray Ruby”			
“里约红”	30.6±0.048c	18.8±0.032a	++
“Rio Red”			
“星路比”	60.6±0.048a	21.3±0.032a	+++
“Star Ruby”			

注: +表示芽长势差; ++表示芽长势一般; +++表示芽长势最好。

Note: + represents the plantlet growing the bad; ++ represents the plantlet growing the normal; +++ represents the plantlet growing the best.

1、5、9的一次消毒污染率皆高于二次消毒,污染率最高可达70.6%。这是由于一次消毒之后的茎段虽然大部分的微生物被杀死,但依旧有部分微生物孢子对消毒剂有较强的抗性没有被杀死,在适宜的温度下又相继萌发,而二次消毒效果,不同时间处理差异较大,却能在孢子二次萌芽时对其进行二次灭活,故而二次消毒效果整体高于一次消毒。在二次消毒中以48 h处理的污染率最低,萌芽率最高。延长 HgCl_2 和 NaClO 的二次消毒时间,虽然污染率随时间延长而降低,但是褐化率也随之升高,当二次消毒时间超过48 h后,萌芽率反而降低,因此二次消毒最佳时间是48 h。48 h后5% NaClO 二次消毒,虽然褐化率远高于 HgCl_2 ,但萌芽率却高于 HgCl_2 ,达到52.5%,表明最佳消毒方式是5% NaClO 48 h二次消毒。

表 5 不同消毒方法的试验结果

处理	污染率	褐化率	萌芽率
Treatment	Infection rate	Brown rate	Germination rate
1	68.1±0.080a	4.4±0.024c	23.1±0.024f
2	37.5±0.046c	5.0±0.024c	31.3±0.014e
3	28.1±0.069c	6.9±0.020c	45.6±0.024b
4	25.6±0.018cd	7.5±0.032c	34.4±0.032de
5	70.6±0.052a	12.5±0.035b	20.0±0.014f
6	36.3±0.032c	15.6±0.024ab	40.6±0.031c
7	21.3±0.014d	18.8±0.032a	52.5±0.041a
8	34.4±0.069c	18.1±0.020a	41.9±0.032bc
9	49.4±0.052b	5.6±0.014c	37.5±0.046cd

2.4 不同抗生素培养基对茎段褐化的影响

茎段消毒后不同培养基接种褐化程度不同,其中5% NaClO 虽然消毒效果比0.1% HgCl_2 好,但是褐化率远高于0.1% HgCl_2 ,由于褐化程度严重,萌芽率也受到影响,因此使用抗褐化物质及不同抗

生素的培养基进行对比试验。由表 6 可知, HgCl_2 和 NaClO 二次消毒后分别接入不同培养基, 其中加入半胱氨酸的茎段褐化率明显下降, 由于 HgCl_2 消毒本身褐化并不严重, 因此褐化降低程度没有 NaClO 明显, 而 NaClO 二次消毒本身褐化严重, 消毒后的外植体接入培养基, 使与外植体接触部分的培养基变为褐色, 加入含有半胱氨酸培养基, 褐化率从 18.1% 下降为 3.8%, 明显抑制了茎段褐化情况, 提高萌芽率。

从处理 3、4、7、8 可发现, 不同消毒处理后的茎段分别加入含有硫酸庆大霉素、清菌易的培养基中, 污染率并没有低于不加抗生素, 个别反而更高, 而萌芽率远低于只加半胱氨酸的培养基, 可能是葡萄柚茎段本身内生菌种类和数量过多, 抗生素对其作用不大, 反而毒害茎段本身, 对茎段细胞造成伤害使其生长受到影响, 反而生长速度慢于内生菌, 因而污染率反而升高, 萌芽率降低。 NaClO 二次消毒后的茎段, 经过半胱氨酸抑制褐化后, 萌芽率反而大大提高至 83.1%, 萌芽率远高于 HgCl_2 二次消毒。

表 6 不同培养基的试验结果

处理	污染率	褐化率	萌芽率
Treatment	Infection rate	Brown rate	Germination rate
1	25.6±0.024c	5.6±0.024b	45.6±0.024e
2	12.7±0.032e	3.1±0.013ab	63.8±0.032b
3	24.7±0.046c	1.3±0.014ab	50.6±0.043cd
4	30.8±0.014ab	0.6±0.013c	41.3±0.014e
5	26.3±0.032c	18.1±0.031a	50.0±0.020cd
6	15.6±0.031d	3.8±0.025ab	83.1±0.041a
7	29.2±0.031b	5.6±0.052b	47.5±0.029de
8	32.5±0.035a	3.8±0.032ab	53.1±0.024c

3 结论与讨论

在自然条件下, 植物外植体由于携带大量的细菌和真菌, 经过消毒处理后的茎段在诱导培养过程中极易产生内生菌, 造成培养茎段大量污染, 故建立外植体离体无菌培养体需首先解决消毒问题^[18-21]。CHANG 等^[22]、王子成等^[23]、李丽^[24]对柑橘茎段消毒做了一些研究, 成年态柑橘茎段外植体的不同长度、不同消毒方式对污染率的影响很大。而褐化是外植体培养中, 自身组织分泌酚类化合物在溢出过程中与多酚类氧化酶接触, 迅速氧化成褐色的醌类物质, 其将与络氨酸酶等作用与外植体组织发生蛋白质聚合, 进一步引起其它酶系统失活, 从而导致外植体代谢紊乱, 生长停滞, 最终衰老死亡^[25-26]。葡萄柚茎段外植体的脱毒培养困难, 使用酒精、 HgCl_2 、 NaClO 进行一次消毒, 污染率高, 使用多次消毒污染

率能够得到控制, 但是茎段褐化严重, 当一部分褐化后, 茎段长势变弱, 严重影响萌芽率。

该研究结果表明, 1 cm 大小的茎段污染率最低, 但 1 cm 大小的茎段材料萌芽率反而比 2 cm 的茎段材料低。原因可能是太小的材料, 消毒剂极易从茎段两端渗透至组织内直至腋芽组织中, 对植株产生毒害作用, 引起萌芽率下降。因此外植体取大小 2 cm 左右的茎段最佳, 与李丽^[24]的研究结果一致。间二消毒方法^[16]能有效降低葡萄柚茎段离体培养的污染率, 虽然 48 h 二次处理的 NaClO 污染率最低, 但是褐化现象很严重, 严重影响外植体萌芽。

葡萄柚外植体多次消毒后有较严重的褐化现象, HgCl_2 处理的褐化率相对较低, 但 HgCl_2 本身对植物毒害严重导致萌芽率低, 而 NaClO 虽然消毒效果比 HgCl_2 好, 但 NaClO 间二消毒法处理后褐化严重, 反而使外植体活性降低。在培养基中添加半胱氨酸 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 能使褐化率从 18.1% 降低到 3.8%, 且萌芽率高达 83.1%, 是葡萄柚外植体培养理想的抗褐化剂。解决 NaClO 消毒褐化严重的问题之后, NaClO 间二消毒和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 半胱氨酸培养基成为最佳消毒方式和抗褐化培养基组合, 诱导腋芽成活率提高到 83.1%。

木本植物离体快繁一直存在很多问题, 因为木本植物结构复杂, 其内生菌难以根除, 在柚类快繁相关试验中, 对外植体消毒的界限一直把握不好, 消毒时间太短内生菌难以除去, 消毒时间过长造成植物死亡。该试验的间二消毒法(48 h)在消毒方面取得一定效果, 是因为植物在间隔期间气孔张开, 导致消毒剂更好与植物接触并且灭菌, 但间二消毒法时间过长, 植物褐化, 是因为外植体取材均为半木质化, 当取材在木质化与半木质化之间, 外植体耐受灭菌剂能力增强, 是否能提高萌芽率, 降低污染率, 如果在取材后把材料放置室内停留 24、48、72 h 之后, 待植物气孔张开后进行间二消毒法消毒效果是否更好, 以此可以作为今后柚类离体快繁无菌体系建立的研究方向。

柑橘病毒类种类繁多, 且多存在复合侵染, 需要脱毒范围广、效果显著的脱毒方法。目前应用较多的脱毒方法有热处理、茎尖培养、化学制剂脱毒法等, 但都存在脱毒率较低或操作难度大的问题, 茎尖微芽嫁接是目前柑橘脱毒技术中最先进有效的方法, 既能有效解决木本植物组培生根困难的问题, 又能达到脱毒效果缩短培育年限。但是常规茎尖微芽嫁接取材都是直接用消毒剂消毒茎尖, 在无菌环境

下嫁接,通过成年态茎段诱导不定芽作为接穗可以使茎尖避免消毒剂伤害,提高嫁接成活率。目前国内尚鲜见利用不定芽改进葡萄柚微芽嫁接相关研究,该试验以葡萄柚成年态茎段为试材,初步建立葡萄柚无菌培育体系,为今后葡萄柚离体快繁和微芽嫁接试验提供参考依据,而如何在此基础上提高外植体萌芽率,降低污染率还有待深入研究。

参考文献

- [1] 郎进宝,曹晓滨,陈继府,等. 葡萄柚的特性及其栽培技术要点[J]. 宁波农业科技,2007(3):20-21.
- [2] 陶燕蓝,蓝增全,吴田. 基于葡萄柚叶片离体再生体系的研究[J]. 热带作物学报,2015,36(3):487-492.
- [3] 吴海波,刘惠民. 葡萄柚的栽培及研究概况[J]. 经济林研究,2005,23(1):69-73.
- [4] 柴倩. 橘皮精油提取成分分析及其贮藏加工过程中的品质变化研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [5] 沈思强,蒋卓勤,罗晓琳,等. 星路比葡萄柚化学成分分析及营养评价[J]. 广东农业科学,2009,36(8):160-161.
- [6] 吴海波. 引进葡萄柚的生物学特性及果实品质初步研究[D]. 昆明:西南林学院,2005.
- [7] 周海霞. 不同脱毒方法对红江橙种性变异及脱黄龙病毒效果的影响[D]. 湛江:广东海洋大学,2010.
- [8] 范永梅. 冰糖橙胚性愈伤组织诱导及无碎叶病植株再生[D]. 长沙:湖南农业大学,2003.
- [9] 红叶,陈力耕,周雪平. 柑橘病毒与类似病毒病分子生物学和抗病毒基因工程研究进展[J]. 果树科学,2000,17(2):131-137.
- [10] 祁鹏志. 柑橘茎尖微芽嫁接脱毒及黄龙病和衰退病分子检测的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [11] 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.
- [12] 黄涛,董高峰,张兰英,等. 影响沙田柚叶片离体培养的因素研究[J]. 广西植物,2003,23(6):561-564.
- [13] 韩美丽,吴耀军,陆荣生. 外界因子对沙田柚上胚轴不定芽发生影响研究[J]. 广西林业科学,2004,33(2):60-63.
- [14] 董高峰,黄涛,李耿光,等. 沙田柚不同外植体离体培养与植株再生的研究[J]. 武汉植物学研究,2001,19(5):440-444.
- [15] 邹金美,余金富,叶国利,等. 文旦柚和下河蜜柚组织培养快速无性繁殖[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版),2006,6(2):74-77.
- [16] 陶燕蓝,姚春光,蓝增全,等. 葡萄柚组织培养快繁体系的建立[J]. 南方农业学报,2014,45(12):2208-2214.
- [17] 叶维雁,郭晓月,刘惠民,等. 葡萄柚种子无菌苗组培快繁体系建立[J]. 广西植物,2015,35(6):891-898.
- [18] 曲文静,李青,刘燕. 芍药组织培养中地下芽污染的克服[J]. 植物研究,2014,34(4):524-528.
- [19] 招雪晴,苑兆和,徐榕,等. 自由人城‘秋焰’组织培养中外植体的选择研究[J]. 山东林业科技,2009,39(4):70-72.
- [20] 王尚,全瑞霞,翟宝黔. 博爱八月黄柿组织培养影响因素研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2010,36(2):177-180.
- [21] 周权男,姜泽梅,李哲,等. 植物组织培养中污染控制技术的研究现状[J]. 热带农业科学,2012,32(9):53-56.
- [22] CHANG S H, HOC K, CHEN Z Z, et al. Micropropagation of *Taxus marirei* from mature trees[J]. Plant Cell Report,2001(20):496-502.
- [23] 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.
- [24] 李丽. 柑橘茎尖微芽嫁接脱毒技术研究[D]. 杭州:浙江大学,2014.
- [25] 马莉贞. 植物组织培养中褐变现象的研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(15):3583-3584.
- [26] 韦凤娟,廖克波,杨梅. 擎天树组培外植体消毒与褐化抑制的研究[J]. 中国农学通报,2011,27(31):18-22.

Disinfection and Browning Prevention for Mature Explant of Grapefruit

LIU Yue, YE Weiyan, WANG Yingtong, LIU Huimin, WANG Lianchun

(Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: Stem segments of grapefruit were used as explants, the effects of different stem lengths, seedling varieties, disinfection methods and media types on disinfection result and browning prevention were studied. The results showed that 2 cm of stem section was the best disinfection effect. Difference of contamination and sprout rate existed among cultivars. ‘Rio Red’ pollution rate was the lowest, the ‘Star Ruby’ was higher, but it had the highest germination rate. After treated by 75% ethanol for 20 seconds and followed by 5% hypochlorous sodium for 20 minutes, the materials were kept in culture room for 48 hours, then the material was treated by 5% hypochlorous sodium for 20 minutes again. This was the best way to disinfect with the minimum pollution rate 21.3%. With sodium hypochlorite secondary sterilization after vaccination in WPM+100 mg·L⁻¹ cysteine medium, it could effectively control the degree of browning and get minimum pollution rate, only 15.6%, the highest germination rate was 83.1%.

Keywords: *Citrus paradisi* Macf; mature explant; disinfection; browning