



杜翔鹰,谢颖苑,廖飞扬,等.木麻黄外植体选择与启动研究[J].黑龙江农业科学,2020(1):104-106.

木麻黄外植体选择与启动研究

杜翔鹰,谢颖苑,廖飞扬,黄良宙

(湛江市林业科学研究所,广东 湛江 524037)

摘要:为探索木麻黄优良无性系品种抗性退化问题,对木麻黄优良无性系外植体启动进行组织培养试验,通过9组方案进行组合试验。结果表明:木麻黄以木质化外植体,选择用70%乙醇+0.3%新洁尔灭+3%次氯酸钠+0.5%升汞的灭菌方案,能达到最佳的少毒杀、灭菌、少褐化、高成活率等的效果。

关键词:木麻黄;外植体;灭菌;防褐化;组织培养

木麻黄科(Casuarinaceae)植物是广泛栽培于热带、亚热带地区具有多种用途的树种,它适合于滨海防风、固沙、盐碱地改良和干旱地区造林,也能固氮和提供用材、薪材。但目前选出的木麻黄优良无性系,繁殖采用水中扦插的方法,普遍存在苗木质量不稳定,品种退化,抗逆性下降的问题^[1-2]。因此,对优良木麻黄无性系进行组培繁殖是维持其优良抗性的途径之一。本文对木麻黄优良无性系外植体启动进行组织培养试验,记录了木麻黄外植体芽条启动过程,为最终提纯后的优良木麻黄芽苗快速推广奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2014年3月进行,试验材料取自湛江市林业科学研究所采穗园内,两年生于无性系苗G88,种苗由广东省林业科学研究院提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒 取材于两年生无性系苗,尽量取基部萌蘖枝条,分别取木质化茎段、半木质化茎段、及初生嫩枝3种作业外植体。先将试验材料用毛刷沾洗衣粉在流水状态下进行彻底清洗,尤其要洗干净茎段交叉部位,细心剪平除所有茎段上子叶,清洗后试验材料插放于无菌水内保湿,放置于超净工作台。对无性系品种外植体,选择3种消毒准备方案:方案①,70%乙醇1 min+0.3%新洁尔灭20 min+3%次氯酸钠10 min+0.5%升汞2 min;方案②,70%乙醇1 min+0.3%新洁尔灭20 min+0.5%升汞1 min;方案③:70%乙

醇1 min+0.3%新洁尔灭10 min+3%次氯酸钠10 min。操作前分别配置好,并进行好灭菌工作,摆放于方便处。每一种灭菌剂配制后,须添加吐温混合,每次灭菌后,须用无菌水进行清洗3~5次以上。经过3种备案的灭菌过程后,试验材料放于接种盘内,切去伤口部分,切成长度1~3 cm小枝,接种到启动培养基上,3种不同外植体类型,按3种方案灭菌后,共9种组合,每个组合接种30瓶,每一瓶接种3~5株处理过的外植体小枝,1~2 d统计被灭菌过程毒杀外植体,5 d开始统计陆续污染的数量,10 d后统计褐化严重无法生长的数量,14和25 d后统计外植体被对出芽率(以上统计不重复计算)。并按公式计算相差参数:

毒杀率(%)=接种1~2 d内外植体被灭菌剂毒杀数量/接种个数×100;

污染率(%)=接种5 d后(未被毒杀)已污染数量/接种个数×100;

褐化率(%)=(接种数-毒杀数-污染数)已褐化数量/接种个数×100;

存活率(%)=(接种个数-毒杀数-污染数-褐化数)最后成活数量/接种个数×100;

出芽率(%)=正常生长并且长出腋芽外数量/最后存活数量×100;

污染与褐化同时感染时,只算污染数。

1.2.2 外植体的启动培养 将消毒处理的外植体接种于6-BA 1.50 mg·L⁻¹,NAA 0.05 mg·L⁻¹的培养基上,大量元素营养以DKW为主培养基。

2 结果与分析

2.1 外植体的选择

2.1.1 外植体种类对其成活率的影响 将3种

收稿日期:2019-08-01

第一作者:杜翔鹰(1986-),男,林业工程师,从事植物组织培养研究。E-mail:dutstudent@126.com。

外植体分别经过 3 种消毒方案进行灭菌,通过统计,得出表 1,可以看出,经过 3 个方案的灭菌过程后,全部初生嫩枝都死亡,其次是半木质化外植体死亡率也较高,最后只有木质化外植体成活率最高达到 15.6%,其次是半木质化茎段,成活率为 5.5%,初生嫩枝全部死亡。

表 1 不同种类外植体对成活率的影响

Table 1 Effects of different kinds of explants on survival rate

外植体种类 Types of explants	毒杀率 Poisoned rate/%	污染率 Pollution rate/%	褐化率 Browning rate/%	成活率 Survival rate/%
木质化茎段 Lignified stem segment	0	51.1	33.3	15.6
半木质化茎段 Semi lignification stem segment	35.6	47.8	11.1	5.5
嫩枝 Tender branch	95.5	4.4	0	0

2.1.2 外植体种类对腋芽的生长影响 观察成活的外植体生长情况,从表 2 可以看出,没有死亡的外植体材料,不同种类其腋芽生长的时间相差不多,都是 15~20 d,抽芽率两者也相差不多,只有腋芽的质量有所区别。

表 2 外植体种类对腋芽生长情况的影响

Table 2 Effects of explants on axillary bud growth

外植体种类 Types of explants	抽芽时间 Sprouting time/d	抽芽数 Sprouting number	抽芽率 Germination rate	腋芽生长情况 Axillary bud growth
木质化茎段 Lignified stem segment	15~20	5	33.3	健壮绿
半木质化茎段 Semi lignification stem segment	15~20	1	20.0	纤弱黄
嫩枝 Tender branch	0	0	0	0

2.2 外植体表面灭菌

从表 3 结果可以得出,方案①比方案②增加了灭菌剂的种类,方案②又比方案③增加灭菌剂种类与时间。结果表明方案①的灭菌效果也比较好;但副作用也比较明显,就是除木质化外植体外,其余 2 种外植体类型成活率大大下降,此外褐化的程度也随着灭菌强度的增加而升高。从效果

来看最佳的组合是用木质化作外植体使用方案①进行灭菌。

消毒方案的不同,对外植体新出腋芽的出现时间也有一定的影响,方案①消毒比方案②强效,前者同一类型的外植体出腋芽的时间要慢 3~5 d。

表 3 不同消毒方案对外植体的影响(每一组合数量 30 瓶)

Table 3 Effects of different disinfection schemes on explants (30 bottles for each combination)

外植体种类 Types of explants	方案 Plan	毒杀数 Poisoned number	污染数 Pollution number	褐化数 Browning number	成活数 Survival number	成活率 Survival rate/%
木质化 Lignified	①	0	6	13	11	36.7
	②	0	15	12	3	10.0
	③	0	25	5	0	0
半木质 Semi lignification	①	18	5	5	2	6.6
	②	11	12	4	3	10.0
	③	3	26	1	0	0
嫩枝 Tender branch	①	30	0	0	0	0
	②	30	0	0	0	0
	③	20	10	0	0	0

2.3 褐化

在对外植体培养过程中,发现外植体普遍与外植体茎段的幼态相关。只有新生的嫩枝褐化的情况比较少,特别是使用方案③时,在灭菌烈度低时,对嫩枝外植体生理损坏较低,褐化程度明显较轻,直到全部污染死亡后,褐化数量仍然很少。而木质化、半木质化的外植体在使用灭菌方案①②后,在接种 1 d 就开始出现大量褐化,使用灭菌方案③后,7~10 d 才开始褐变,直到污染全部死亡,褐化程度仍然不高。

表 4 不同处理方案对控制外植体褐化的影响

Table 4 Effects of different treatment schemes on control of explant browning		
外植体种类 Types of explants	褐化率 Browning rate/%	褐化程度 Browning degree
木质化茎段 Lignified stem segment	60	褐斑半径 1.5 cm
半木质化茎段 Semi lignification stem segment	45	褐斑半径 0.5~1.0 cm
初生嫩枝 Tender branch	2	褐色浅薄

3 结论与讨论

外植体的生理成熟度,取材部位,取材环境都可能影响外植体启动成功率。研究结果表明,取木麻黄外植体前,天晴数日,近午取材料效果最好。

木麻黄外植体的枝条中,木质化枝条因其外表皮毛孔密集,表面粗糙,小叶多,不规则褶皱多,灭菌困难,但其皮层较厚,茎内所含养分较多,其内生菌少,只要灭菌彻底,其生存率与出芽率都较

高。半木质化枝条,虽然表皮较饱满平滑,小叶少,褶皱少,但耐灭菌药较性差,只有在灭菌烈度适当,同时内生菌较小的情况下,才有可能取得较高的生存率与出芽率。细嫩枝条,表皮饱满平滑,无小叶少,无褶皱,但新生表皮较薄,耐灭菌效果差,虽然褐变率低,如果使用低烈度灭菌方案,则灭菌不彻底,容易感染,除非在取外植体前,进行一段时间预防性防护措施,减小细菌数量,方可采用低烈度灭菌方案,成活才有成功希望,否则不应推荐作为外植体材料。

灭菌药剂中 70%乙醇与 0.5%升汞对植物体有较强的渗透作用,因此使用时间不应太长。0.3%新洁尔与 3%次氯酸钠 10min 对植物毒害作用不明显,使用时间可以适当延长。

木麻黄表皮有大量毛孔与小叶、细毛,藏匿大量细菌,因此非用强力杀菌剂不可。但为防止植物体被杀菌剂毒杀,又需要该外植体有较厚的表皮进行防护,因此选用木质化外植体为最佳。必须在灭菌强度与外植体表皮之间取得平衡才能达到最佳的效果。

本试验经过统计,最佳方案是:以木麻黄木质化茎段外植体,用灭菌方案 70%乙醇 1 min + 0.3%新洁尔灭 20 min + 3%次氯酸钠 10 min + 0.5%升汞 2 min 后,在 DKW+6-BA 1.50 mg·L⁻¹ + NAA0.05 mg·L⁻¹ 培养基上进行启动培养,可以取得较佳的成活率与抽芽率。

参考文献:

[1] 李莹,罗晓芳,蒋湘宁. 美国红枫外植体选择及启动培养研究[J]. 黑龙江农业科学,2010(8):6-9.
[2] 刘英,仲崇禄,白嘉雨,等. 不同盐浓度对木麻黄无性系愈伤组织的影响[J]. 广东林业科技,2003,19(2):47-50.

Study on the Selection and Initiation of *Casuarina equisetifolia* Explants

DU Xiang-ying, XIE Ying-yuan, LIAO Fei-yang, HUANG Liang-zhou
(Zhanjiang Forestry Science Research Institute, Zhanjiang 524037, China)

Abstract: In order to explore the problem of resistance degradation of superior clones of *Casuarina equisetifolia*, the tissue culture experiment was carried out on the explants of superior clones of *Casuarina equisetifolia* through 9 groups of schemes. The results showed that the best sterilization scheme was 70% ethanol + 0.3% Bromogeramine + 3% sodium hypochlorite + 0.5% mercuric chloride, which could achieve the effects of less toxicity, sterilization, less browning and high survival rate.

Keywords: *Casuarina equisetifolia*; explants; sterilization; anti-browning; tissue culture