

桉树外植体诱导褐变原因初探^{*}

李海玲 朱 艳

(广西生态工程职业技术学院 柳州 545004)

摘 要:桉树外植体诱导产生褐变的因子很多,在此只讨论不同无性系、不同木质化程度的茎段、不同的消毒处理、不同的光照对外植体褐变的影响。从试验结果得出:不同的无性系外植体产生褐变程度不同,采集半木质化或刚木质化的茎段,用 0.1% HgCl_2 分两步消毒可以减轻褐变,在培养过程中采用全暗光的方法有效控制褐变,萌芽率也高。

关键词:桉树;组织培养;外植体;褐变

Initial Discussion on Reason of Induction Brown - turning outside *Eucalyptus* Plant Body

Li Hailing Zhu Yan

(Guangxi Ecological Engineering Professional Technology Institute Liuzhou 545004)

Abstract: There are many factors causing brown - turning on induction outside *Eucalyptus* plant body, here, only discusses different clone, different stem section of lignifications degree, different disinfection processing and influence of different illumination to brown - turning outside plant body. The result is obtained from the test that different clone outside plant body to cause different brown - turning degree, gather stem section of half or just lignifications to reduce brown - turning using 0.1% HgCl_2 to disinfect by two steps, adopts method of entire obscure ray to control effectively and germinating rate is also high during breeding process.

Key words: *Eucalyptus*; tissue culture; outside plant body; brown - turning

桉树 *Eucalyptus* 是世界三大树种之一,在我国南方发展速度很快,桉树育苗技术也发展很快,桉树组织培养是桉树快繁的 1 条重要途径。桉树组织培养主要是指以桉树茎尖、茎段腋芽为外植体,在人工环境中进行无菌培养,获得再生植株的生物技术,这种技术具有能保持母体速生、丰产优良特性,周年能生产,繁殖系数大,生长期迅速,尤其在种源缺少的条件下很快能满足市场需求等特点,是桉树快繁的 1 个重要途径。但桉树茎段接种后,切口处易产生褐色渗出物,使茎段周围的培养基变成棕褐色,插入培养基里的基部变褐而失去生命力,导致外植体死亡^[1]。了解影响桉树接种褐变

的原因,是外植体诱导成功的关键,在工作中也进行初步探索,现将其总结如下。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

DH32-22、DH201-2、U6 3 个无性系。

1.2 外植体的采集

在基因库里选定优良无性系单株采用环割的方法促进萌芽,在连续晴朗 3 d 以上的天气采集,采集时间最好是在午后进行。

1.3 外植体的处理

将采回来的枝条在自来水下冲洗 20 min, 剪除叶片, 自顶端往下依次剪取带 1~2 节长约 1.5 cm 长的茎段, 置于 0.1% 的高锰酸钾溶液中消毒 5 min, 用去离子水冲洗 2~4 次, 然后带人接种室置于超净台上。在超净台上用 70.0% 酒精消毒 10 s, 无菌水冲洗干净后用 0.1% 的 HgCl_2 水溶液进行消毒处理 8~12 min, 无菌水冲洗干净。接种于准备好的培养基, 1 支试管接种 1 支芽条, 以免交叉污染。

1.4 培养基及培养条件

培养基的 pH 值调到 6.5~6.8 之间, 分装进试管后, 送进高压灭菌。培养基灭菌为恒温 121 $^{\circ}\text{C}$, 恒压 1.1 P_a , 时间 15 min。培养室的温度 25 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 70%~80%。

2 结果与分析

2.1 不同无性系外植体产生褐变的情况

在连续晴朗 3 d 分别采集 DH32-22、DH201-2、U6 的芽条, 在试验中分别选择未木质化、半木质化或刚木质化以及木质化强度高, 生长健壮, 无病虫害的枝条为采集对象。经过同样的消毒处理后, 培养条件一致, 培养 10 d 后进行观察, 重复试验 3 次取平均值, 结果见表 1。

表 1 不同无性系外植体消毒产生褐变情况

无性系	茎段类型	接种数/个	褐变率/%	萌动芽数/个	萌动率/%
DH32-22	未木质化	40	93	0	0
	半或刚木质化	40	64	12	30
	木质化强度高	40	100	0	0
DH201-2	未木质化	40	96	0	0
	半或刚木质化	40	45	20	50
	木质化强度高	40	100	0	0
U6	未木质化	40	92	0	0
	半或刚木质化	40	85	3	8
	木质化强	40	100	0	0

从上表可以看出: 在同样的消毒处理培养条件下, 采集 DH32-22、DH201-2 以及 U6 3 个无性系进行外植体诱导试验时发现 U6 这个无性系很容易产生褐变, 萌动率很低。这说明不同无性系间外植体诱导产生褐变的程度不同, 这可能与各无性系间的内分泌物有关。同时未木质化和木质化强

度很高的茎段经过消毒以后容易产生褐变。所以采集外植体以半木质化或刚木质化的茎段最好, 萌芽率高。

2.2 不同的消毒处理对外植体产生褐变的影响

采集 DH201-2 半木质化或刚木质化的枝条, 进行 5 种不同的消毒处理, 即: ① 0.1% HgCl_2 消毒 8 min; ② 0.1% HgCl_2 消毒 12 min; ③ 0.1% HgCl_2 加 1 滴吐温消毒 8 min; ④ 0.1% HgCl_2 加 1 滴吐温消毒 12 min; ⑤ 0.1% HgCl_2 消毒 6 min 后, 无菌水冲洗 3~4 次, 再消毒 2 min。结果见表 2。

表 2 不同的消毒处理对外植体产生褐变的影响

不同的处理	茎段类型	接种数/个	褐变率/%	获得率/%
(1) 0.1% HgCl_2 消毒 8 min	半或刚木质化	40	56	48
(2) 0.1% HgCl_2 消毒 12 min	半或刚木质化	40	74	42
(3) 0.1% HgCl_2 + 吐温 1 滴, 消毒 8 min	半或刚木质化	40	62	36
(4) 0.1% HgCl_2 + 吐温 1 滴, 消毒 12 min	半或刚木质化	40	85	24
(5) 0.1% HgCl_2 消毒 6 min, 用无菌水洗 3~4 次, 再消毒 2 min	半或刚木质化	40	45	66

从上表可以看出: 用 0.1% HgCl_2 消毒 DH201-2 的枝条, 浸泡的时间越长, 外植体产生褐变越严重; 而加吐温消毒的更加严重, 是因吐温具有软化组织表面的作用, 有利于消毒剂的浸入到外植体内, 一般是在外植体表面有很多绒毛、油脂、蜡质等的情况下使用效果会好些。采用第 5 种分步方法消毒, 褐变率低, 获得率也比较高, 是外植体消毒效果最好的方法。在灭菌时间允许范围内, 尽量缩短灭菌时间, 以保证较高的外植体存活率。

2.3 不同光照对外植体褐变的影响

把接种出来的材料分别放在不同光照环境下培养, 即 ① 全光照培养; ② 全暗光培养; 培养 10 d 后观察结果, 见表 3。

(下转第 67 页)

料为植物重新创造良好的立地条件,通过植物生长活动,逐渐使锚杆、土工网、专业护坡材料层与植物根系形成1个立体网络结构,达到稳定坡面、绿化坡面,并最终形成自然景观为目标的高新技术。该项技术的核心是植生基质材料,主要由植生基质、土壤、植物种子等组成。植生基质是植被种子生长发育,根系发展的基体。由有机质、生物菌肥、粗细纤维、pH值调整剂、全价缓释肥、保水剂、消毒剂、壤土和水组成,作用是保证植被长期生长所需的养分平衡和水分平衡。该项绿化技术可应用于年平均降雨量大于600 mm非高寒地区的以下边坡:坡度小于1.0:0.3的稳定的硬质岩边坡、软质岩边坡、开挖的土质边坡,包括瘠薄土质、酸性土质等劣质土坡。混凝土面及浆砌片石面人工绿化具有结构简单,施工迅捷;基植抗旱耐寒性强;独特的养分缓释供应;施工容易,价格合理;自然协调;管理粗放;维护简便等优点。该项技术护坡绿化,可以降低坡体空隙水压力,截留降雨,减弱溅蚀,控制土粒流失,并且可以恢复被破坏的生态环境。边坡植被的生存为各种小动物、微生物的生存繁殖提供了有

利的环境,完整的生物链又逐渐形成,被破坏的环境也慢慢的恢复到原始的自然环境。使用该项技术还可以降低噪音、光污染、保证行车安全;促进有机营养物的降解,净化大气、调节小气候。

4.3 植草塑料固土网垫技术

植草塑料固土网垫是1种三维结构的似丝瓜网络样的网垫,质地疏松、柔韧留有90%的空隙可填充土壤、沙粒和细石,网垫的成品制作成宽1 m,长30 m或50 m的形状,为方便运输通常打成卷放置。由于植物的根系可以穿过此空间舒适、整齐、均衡的生长,所以长成后的草皮能使网垫、草根和泥土表层牢固地结合在一起,又由于植物根系可深入地表以下30~50 cm,于是边坡表面便形成了1层坚固的绿色复合保护层,从而对边坡起到防护作用。该产品除普通塑料网垫以外还有可降解型网垫。该网垫的铺设是1种生物防护手段,对公路环境的绿化、美化、净化都有重要的作用。

(湖北省仙桃职业学院园林工程系 詹克兰)

(上接第21页)

表3 不同光照对外植体褐变的影响

无性系	茎段类型	接种数/个	光照处理	褐变率/%
DH32-22	半或刚木质化	40	全自然光照	90
DH32-22	半或刚木质化	40	全暗光	64
DH201-2	半或刚木质化	40	全自然光照	85
DH201-2	半或刚木质化	40	全暗光	45
U6	半或刚木质化	40	全自然光照	100
U6	半或刚木质化	40	全暗光	85

从上表可以看出:在全光照培养条件下褐变率高,全暗光培养效果最好。暗光处理能有效控制外植体的褐变是因为与褐变有关的酶在黑暗条件下减少,从而使褐变得到控制,有利于萌芽。

3 结论

(1)不同无性系的外植体在同样的培养条件下产生褐变的程度不同,这可能是与各无性系间的内

分泌物有关。木质化程度不同的茎段消毒以后产生褐变程度也不同,为了减轻褐化,采集外植体要选择半木质化或刚木质化的茎段。

(2)不同的消毒处理对外植体产生褐变也有很大的影响,消毒时间越长产生褐变越严重,在灭菌允许的短时间内尽量缩短消毒时间,以保证较高的外植体存活率。外植体消毒处理最好的方法是用0.1%的HgCl₂消毒6 min,用无菌水冲洗3~4次,再消毒2 min,用无菌水冲洗干净。

(3)光照对外植体褐化也有很大的影响,将接入培养基的材料放置暗光条件下培养可以有效控制褐变,有利于芽的萌动。

(4)影响桉树外植体褐变的因子还有很多,这些都有待在以后工作中不断进行试验总结。

参考文献

[1]祁述雄.中国桉树.北京:中国林业出版社,2002.