

毛白杨与珠美海棠试管苗低温贮存技术初探*

白淑霞 刘立秋 陈文龙

(中国科学院石家庄农业现代化研究所 石家庄 050021)

摘 要 白淑霞,刘立秋,陈文龙.毛白杨与珠美海棠试管苗低温贮存技术初探.生态农 业 研究,1996,4(4):31~34.

林木试管苗通过 0~10℃ 的自然低温贮存后,具有较高的成活率且抗冷性明显提高。观察和分析不同贮存阶段的试管苗形态和生理指标的变化,结果表明,试管苗随着贮存温度的降低,淀粉呈下降趋势,而可溶性糖相应上升,粗蛋白含量波动起伏略有升高,这是试管苗适应低温和弱光照的生理反应。贮存 165 d 的分化苗和 120 d 的生根苗污染损失率均低于 10.0%;分化苗的有效苗数显著增加,生根率在 95.5% 以上,生根苗的移栽成活率为 93.5%~98.5%。

关键词 试管苗 低温贮存

Abstract Bai Shuxia, Liu Liqiu and Chen Wenlong (Institute of Agricultural Modernization, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021): A preliminary study on the technology for storage of tissue-cultured plantlets in low temperature condition, *EAR*, 1996, 4(4): 31~34.

After stored in natural low temperature (0~10℃), forest tree tissue-cultured plantlets had a higher survival rate, their chilling resistant ability was increased visibly. The results from observing and analysing the morphological and physiological characters of the plantlets at different storage period showed that with the decreasing of storage temperature, starch content was decreased, while the soluble sugar content increased, crude protein content was increased slightly with fluctuation, which are the physiological reactions that the tissue-cultured plantlets adapted to low temperature and weak light. The losing rates after storage for the 165 days differentiated plantlets and 120 days rooted plantlets were all lower than 10.0%. After the storage the effective number of the differentiated plantlets was greatly increased with more than 95.5% rooting rate and the transplanting survival rate of the rooted plantlet reached 93.5%~98.5%.

Key words Tissue-cultured plantlets, Low temperature storage

运用植物组织培养技术进行工厂化生产,在短时期内培育出大量苗木,已在毛白杨、苹果、桉树等多种林木上得以实现。但是,大批的组培分化苗需经常继代以保持其较强的分化能力;生根苗需按时移栽种植以促进其茁壮成苗。无疑,这些程序化的系列操作势必要花费大量的人力、物力,占用较多的时间、空间和土地,大大提高了组培苗的生产成本。离体培养低温保存植物材料具有许多优点,已引起人们极大的注意^[1]。只是以往的研究多侧重在对种质资源的低温或超低温保存上,方法也多以添加保护剂、植物生长调节剂等改

* “八五”国家科技攻关项目部分内容。

本文于 1996 年 1 月 23 日收到。

变培养基成分或通过玻璃化作用冷冻保存培养材料^[4], 常温、低温保存种质的资料较少^[2], 配合工厂化生产, 批量低温保存试管苗的研究尚未见报导。为降低组培苗生产成本、加速工厂化生产进程, 特别是使保存的材料利用组织培养快速繁殖, 在短时间内能够大量提供苗木, 我们于 1992 年开始进行了低温保存试管苗的试验研究。

1 材料和方法

供试植物材料为毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)和珠美海棠(*Malus. Zumi*)。按照过去的方法得到试管植物(分化苗和生根苗)^[3]。供试试管苗分别放于 4℃ 冰箱和地下贮存窖中。冰箱中的试管苗保存时间均在 6 个月以上(有的已长达 10 个月), 地下贮存窖均在每年 11 月初或中旬用高锰酸钾熏蒸消毒后放入试管苗, 存至翌年 4 月中旬, 保存时间一般为 5~5.5 个月。期间窖内温度为 0~10℃, 相对湿度为 90%~95%, 光照强度接近 0lx。每月测定 1 次试管苗的绿叶数、黄叶数及全株粗蛋白、可溶性糖和淀粉的含量, 随时观察试管苗的外部生长形态。组织粗蛋白测定参照凯氏定 N 法, 淀粉测定参照酸水解法, 可溶性糖测定参照铜还原碘量法。

2 结果和分析

2.1 抗冷性的提高

可溶性糖、脯氨酸、可溶性蛋白质的含量变化对于植株抗冷、抗寒能力的形成, 已为人所知^[1]。本试验结果表明, 试管苗内可溶性糖的含量随着贮存温度的下降而上升, 在贮存温度的最低点即每年的 1 月中下旬其含量上升到最高点, 其中, 毛白杨试管生根苗的可溶性糖含量为 21.85%, 珠美海棠为 8.99%, 随后稍有下降但幅度不大。与此同时, 淀粉含量不断下降且速度很快, 从贮存开始至结束, 毛白杨试管生根苗的淀粉含量由 28.65% 到 16.00%, 珠美海棠由 27.74% 到 18.70%, 分别下降了 44.15% 和 32.59%。粗蛋白含量随贮存温度的降低基本呈上升趋势, 至 1 月中旬达到最高峰值, 此时, 毛白杨试管生根苗的粗

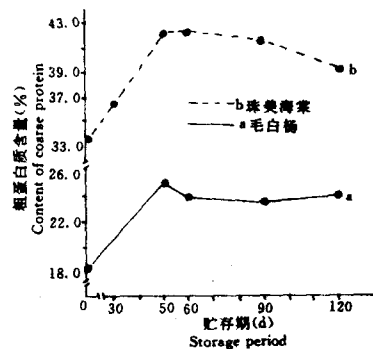


图 1 试管生根苗粗蛋白含量的变化 *

Fig. 1 Changes of crude protein content of the tube cultured rooted plantlets

蛋白含量为 25.13%, 珠美海棠为 42.26%, 以后随贮存期的延长, 毛白杨试管苗的粗蛋白含量波动起伏, 而珠美海棠试管苗的粗蛋白含量略有降低。以上试管苗内含物的变化(见图 1-3)表明, 试管苗为适应低温和黑暗的贮存环境, 其内部生理代谢发生变化, 继而表现在各内含物含量的升高或降低。淀粉需转化为糖类才会被植株吸收利用, 而可溶性糖含量的上升或较小幅度的波动, 为试管苗维持正常的代谢活动提供了能源保证。Yoshida 认为在低温贮存期间蛋白质起调节基因表达的作用, 并有特殊蛋白质形成, 从而导致耐寒性增加。本研究也观察到试管苗在贮存过程中蛋白质含量随着贮存温度的降低有不断增加的现象, 可能有蛋白质形成。至于两树种在整个贮存过程中, 有无新蛋白质的合成及其差异有待深入探索。

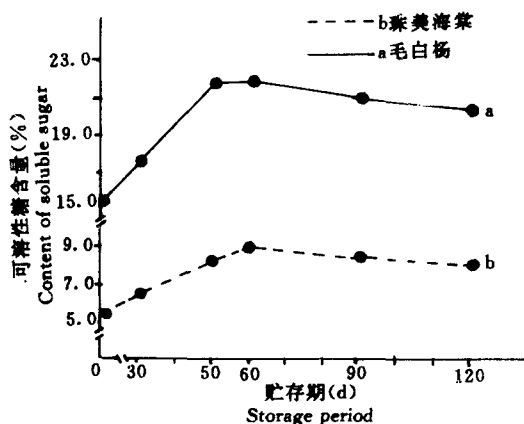


图2 试管生根苗可溶性糖含量的变化

Fig. 2 Changes of soluble sugar content of the tube cultured rooted plantlets

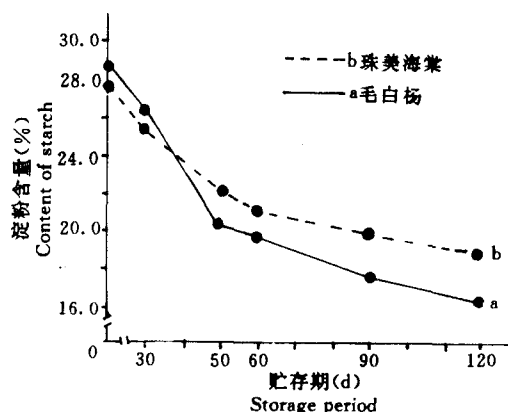


图3 试管生根苗淀粉含量的变化

Fig. 3 Changes of starch contents of the tube cultured rooted plantlets

2.2 有效苗数的增加

芽的增殖是快速繁殖最重要的一个阶段,这一阶段既要求在一定的容器里短期内产生大量的芽,还需要他们整齐生长到一定高度,以得到适于生根和移栽阶段所需的嫩枝,这是决定快速繁殖效率高低的关键。在一个固定体积的容器中只能容纳有限数量的试管植物,而效率的高低将由试管苗的密度和质量来决定。单子叶植物由于叶片直立狭长,可以达到较高密度,但很多双子叶植物,特别是木本阔叶树种试管苗叶片大且节间伸长不足,因此密度难以提高,短的茎对根的诱导和植株移栽也极为不利。将转接1个月带有芽的毛白杨、珠美海棠接种物转移到0~10℃自然温度地下窖中黑暗贮存,贮存4~5.5个月的试管苗生长的主要特点是生长加快,节间长度增加,叶片的扩张受到强烈抑制,距顶部1/2~2/3茎叶多呈绿黄色,能够利用的嫩枝数大大提高。不同处理,存于冰箱中的试管苗由于温度变化恒定,黄化作用较自然温度地下窖中的明显,有效嫩枝数较多,地下窖中的相对矮壮,呈绿色;不同树种,速生毛白杨受黄化作用影响较大,每瓶(100ml)有效苗数由光下培养的20个增加到32个,提高了60.0%,珠美海棠每瓶(100ml)有效苗数由光下培养的18个增加到28个,提高了55.6%。低温弱光贮存,其作用类似黄化处理,可大大提高嫩枝的数量。贮存黄化后叶片变小,嫩枝几乎成棍状,操作时可以避免叶片相互缠绕,更为简便,也减少了操作引起的污染,既达到贮存保苗的目的,又提高了快繁效率,大大节约了同期培养室培养所需的一切费用,使集约化程度大幅度提高。

2.3 贮存效果

低温下长期保存试管植株,收于容器密闭,湿度较大,棉塞易长霉,造成污染。地下窖虽然经过人工消毒,但易落入灰尘和微生物,比同期冰箱贮存的污染损失率稍高,其中毛白杨的污染率为8.6%,珠美海棠的污染率为9.5%,冰箱保存的污染损失率均在7.5%以下。从污染情况看,多数为霉菌污染。贮存4~5.5个月的分化苗和生根苗通过继代、生根和移栽试验,结果证明,除了污染、干枯和死亡的苗外,凡茎干、根系正常,不管叶干枯与否,转接移栽后均能成活。其中毛白杨生根率为98.0%,移栽成活率为93.5%~98.5%,

珠美海棠的生根率为 95.5%,移栽成活率为 95.0%~98.5%。观察植株干枯情况,一般萎蔫首先从下部叶片开始,然后向植物学顶端发展。

研究表明,霉菌和干枯是影响本研究试管苗保存率高低两个主要方面。由于地下窖中空气相对湿度较大,其中的霉菌污染是主要方面,而冰箱保存的试管苗干枯情况略为严重。因此,在地下窖贮存时应注意在转接材料时保持清洁,控制湿度,定期检查。在转接保存材料时,严格操作,减少污染。更换封口膜减少杂菌污染的做法需进一步验证。

参 考 文 献

- 1 陶国清等. 利用组织培养法低温保存马铃薯材料. 植物学报, 1980, 22(2): 20~23.
- 2 钟仲贤, 陈澍棠. 利用试管苗在室温下长期保存茎椰菜种质研究初报. 园艺学报, 1985, 12(3): 213~214.
- 3 陈文龙, 孙志华主编. 华北地区年产百万株林木组培苗工厂化生产技术研究概述. 华北林木组培工厂化育苗技术研究, 北京: 中国科学技术出版社, 1992.
- 4 Withers L. A. Cryopreservation of plant cell and tissue cultures, In "Tissue Culture Methods for Plant Pathologists", Blackwell Scientific Publications Oxford, 1980, 63~70.

慈利县生态农业建设初见成效

湖南省慈利县过去由于对资源盲目开发与掠夺性经营,造成林草资源枯竭,水土流失加剧,环境日趋恶化,农业生产徘徊不前。该县森林覆盖率由 50 年代的 60% 降至 1985 年的 25.3%,土壤有机质由 4% 降至 1.8%,被列为湖南省“670hm² 荒山大户”、“水土流失大户”和“中低产田大户”。人民饱食恶性循环的苦果,始终摆脱不了贫困落后的面貌。沉痛的教训使人们认识到,生存与环境要统一,资源开发与保护要协调,要合理开发资源,使资源永续利用,走良性循环持续发展的生态农业之路。1985 年,慈利县委、县政府大力调整农业结构,推行立体农业。1990 年该县成立了生态农业领导小组,作出了保护生态环境、推广生态农业的历史性抉择,从规划着手,抓好山、水、田、林、路综合治理,建设 10 大农村支柱产业。该县重点突出生态环境的改善和基础产业的形成,狠抓了长江中上游防护林体系、农村电气化、优质棉基地、外向型蔬菜基地、草食性牲畜基地、稻田养鱼基地、旱粮基地的建设和农业综合开发、以工代赈、丘岗山地开发等,并取得了较好的经济、生态和社会效益:一是农村经济持续发展。1995 年农业总产值达 5.86 亿元,比 1990 年增长 2.75 倍;乡镇企业总产值 15.6 亿元,比 1990 年增长 5.8 倍;粮食产量达 25.5 万 t,年递增 2.4%;农民人均纯收入 1133 元,比 1990 年增加 628 元;二是农产品数量有较大幅度增加。1995 年产油菜籽 27.6 万 t、茶叶 340t、水果 4.96 万 t、杜仲皮 400t,出栏肥猪 34.2 万头,出笼家禽 200 万只,分别比 1990 年增长 215.6%、45.9%、249.2%、396%、20% 和 16.5%;三是生态环境明显改善。5 年来共造人工林 5.3 万 hm²,退耕还林 6667hm²,森林覆盖率达 57.8%;中低产田面积由 95.4% 降至 64.3%;稻田养鱼 2333hm²,治理污染企业 15 家,关闭污染源 11 处,控制了工业“三废”对农业环境的污染。