

短叶省藤种质离体培养保存研究

曾炳山, 许煌灿^L, 刘英, 尹光天

5687.3035

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东广州 510520)

摘要: 本文对短叶省藤种质的离体培养保存进行了探索性研究, 结果表明: 种质以丛芽形式, 采用 RE0 保存培养基, 在温度 12.5℃ 和光照 300 lx × 12 h/d 的保存条件下, 可安全保存 18 个月以上, 保存率 > 25%, 丛芽平均高生长小于 2.2 cm。种质保存一年后, 转接至增殖或生根培养基, 仍可诱导增殖和生根。结果表明离体保存具一定可行性, 其保存模式可预定为: 增殖培养 2 个月 + 离体保存 18 个月的循环模式。

关键词: 短叶省藤; 种质; 离体培养保存; 保存率; 保存模式

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A

In vitro conservation of germplasm of *Calamus egregius*

ZENG Bing-shan, XU Huang-can, LIU Ying, YIN Guang-tian

(The Research Institute of Tropical Forestry, Guangzhou 510520, China)

Abstract: This paper deals with *in vitro* conservation of germplasm of *Calamus egregius* Burret. Stored on RE0 medium with temperature of 12.5 ± 0.5 °C and illumination of 300 ± 50 lx × 12 hours / day, clumps with 1~3 buds can be preserved safely for 18 months without transfer, and the survival rate > 25 %, the height increment < 2.2 cm. After one year's conservation, when transferred onto proliferation or rooting media, the germplasm can still be induced to multiply or to root. *In Vitro* conservation procedure of germplasm of *Calamus egregius* could be scheduled as a circulation of 2 months' proliferation culture + 18 months' conservation culture.

Key words: *Calamus egregius*; germplasm; *in vitro* conservation; preserved ratio; conservation procedure

80年代以来, 我国先后在海南、广东和广西等地建立了藤种园和收集圃, 共收集/引种棕榈藤3属49种6变种, 保存36种5变种⁽¹⁾。然而, 迁地和原地保存的种质资源因各种原因而不断丢失。在广州藤种基因库, 60%以上的藤种遭受严重鼠害, 1 m以下的萌蘖藤株被吡啉致死。国外迁地保

收稿日期: 1998-07-13

作者简介: 曾炳山(1969-), 男, 硕士, 助理研究, 主要从事林木组培和藤类栽培研究。

基金项目: 本研究为国家基金“棕榈藤萌蘖机理研究”(39470597)和中国林业科学研究院基金“棕榈藤种质保存方法的研究”(9686110)的研究内容之一。

存的种质则普遍遭受蛀杆害虫和大象的危害而不断丢失⁽²⁾。离体保存可以避免病虫害、气象灾害和野生动物等导致的种质丢失^(3,4)。为此,我们开展了短叶省藤(*Calamus egregius* Burret.)种质离体保存的初步研究,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 保存材料

选取已增殖培养7次,具5~20个单芽的短叶省藤离体丛芽作为试验材料,将其切分为1~3芽组成的芽丛,进行保存试验。

1.2 保存培养基和保存条件

MS0保存培养基为改良的MS培养基,其大量元素KNO₃、NH₄NO₃、CaCl₂、MgSO₄和KH₂PO₄的含量为0.5MS,有机物肌醇、烟酸、盐酸吡哆醇、盐酸硫胺素、甘氨酸的含量为1.0MS,微量元素KI、H₃BO₃、MnSO₄、ZnSO₄、Na₂MoO₄、CuSO₄、CoCl₂、FeSO₄的含量为1.0MS,蔗糖为4%。RE0保存培养基则由短叶省藤的增殖培养基改制而成,其大量元素KNO₃、NH₄NO₃、CaCl₂、MgSO₄和KH₂PO₄的含量分别为0.75MS、0.3MS、0.75MS、0.75MS和1.0MS,有机物肌醇、烟酸、盐酸吡哆醇、盐酸硫胺素、甘氨酸的含量分别为1.5MS、1.0MS、1.5MS、2.0MS和1.5MS,微量元素和蔗糖的含量与MS0保存培养基相同。种质置于BPII 818型生长箱,在12.5±0.5℃恒温、300lx×12h/d光照的条件下保存。

1.3 试验观测

观测指标包括:增殖芽数、芽高、芽体和叶片的形态等。种质萌发的新芽数计为增殖芽数;芽体失绿变褐,水浸状,视为死亡;芽丛的所有芽死亡,则将芽丛视为死亡;芽高是指芽的活体高度。观测频率为每3个月1次。

2 结果与分析

2.1 保存种质的形态变化

种质自增殖培养基转至保存培养基,在温度低、光照弱的保存条件下,1~2个月内处于适应状

表1 不同保存培养基中保存芽的高生长

Table 1 Height growth of *in vitro* buds on different media

保存时间 Time (months)	保存培养基 Medium MS0				保存培养基 Medium RE0			
	伸长芽百分数 Percentage of elongating buds (%)	伸长长度 Length increment (cm)	死缩芽百分数 Percentage of shortening buds (%)	死缩长度 Shortened length (cm)	伸长芽百分数 Percentage of elongating buds (%)	伸长长度 Length increment (cm)	死缩芽百分数 Percentage of shortening buds (%)	死缩长度 Shortened length (cm)
3	67.0	0.19	19.3	0.24	82.6	0.31	5.50	0.20
6	50.0	0.16	10.2	0.17	61.5	0.24	8.26	0.13
9	26.1	0.26	3.4	0.13	44.0	0.23	12.8	0.57
12	9.1	0.201	13.6	0.29	31.2	0.25	12.8	0.78
15	3.4	0.80	3.4	1.00	28.4	0.31	1.83	0.30
18	3.4	0.17	1.1	0.60	18.3	0.45	5.50	0.43
21	2.27	0.10	0.0	/	16.5	0.38	1.83	0.25

注:伸长芽百分数是指有高生长的芽数占初始保存芽数的百分比,死缩芽百分数类推。

Notice: Percentage of elongating buds means ratio between buds with height increment and buds initially preserved. So does percentage of shortening buds.

态,无明显高生长,无芽增殖,形态和颜色也无明显变化。至3个月时,部分芽体外层的老叶鞘开始变褐,剪伤或少数极小的芽死亡;高于1.5cm的芽,有一定的高生长,尤其是已展叶的芽,一旦展

出新叶片, 高度增加 1~2 cm; 部分芽丛开始增殖新芽; 培养基基本不褐变。

保存 6~9 个月, 约半数芽的外层老叶鞘变褐死亡, 内层叶鞘则呈稳定状态; 带叶片的芽, 叶尖开始失绿变白; 少数芽丛继续展叶或萌出新芽; 部分培养基开始变褐, 但无明显失水现象。

保存 12~15 个月, 在 RE0 培养基上, 少数芽丛仍能萌发新芽和展新叶, 但长出的新叶片先纵向卷曲, 而后横向外翻, 需较长时间才得以伸展, 且轻度缺绿, 老叶则长出褐色绒毛。培养基因失水而开始干缩。

保存 18~21 个月, 培养基的褐变和干缩明显加快, 种质死亡加速。无叶的芽体, 其外部叶鞘转褐变黑后, 内部叶鞘及芽心也变褐而死。具叶片的芽体, 叶片基部或中部先白化或变褐, 而后整芽死亡。

2.2 种质的高生长

保存过程中, 具活力的芽, 可观测到高生长, 也有部分芽因活力逐渐丧失, 叶尖或叶鞘顶部变褐死亡, 其活体高度则因顶部的死亡而短缩。伸长和死缩的测定结果表明: 在保存培养基 MS0 上, 具高生长的芽迅速减少, 保存 12 个月后, 仅 9.1% 的芽体伸长; 高生长的变化幅度大, 在 0.10~0.80 cm 之间, 21 个月的总高生长为 1.88 cm; 死缩芽的数量在保存 3 和 12 个月时出现两个高峰。在 RE0 上, 具高生长的芽数递减慢, 12 个月后, 仍有 31.2% 的芽体伸长; 高生长的变化幅度小, 在 0.23~0.45 cm 之间, 但 21 个月的总高生长大, 为 2.17 cm; 死缩芽的数量仅在保存 9~12 个月时出现一个高峰。

2.3 种质的增殖

保存过程中, 种质受增殖培养植物生长调节剂的后续影响, 部分芽丛会继续萌 1~2 个芽。在 MS0 上, 保存 3 个月, 7.7% 的芽丛萌芽, 至 6 个月, 仍有 2.4% 的芽丛萌芽, 而后停止萌新芽; 在 RE0 上, 18 个月的保存期内, 皆有一定比例的芽丛萌芽, 21 个月后才无萌芽现象。

表 2 种质增殖情况

Table 2 Proliferation of *in vitro* germplasm

保存时间 Time (months)	保存培养基 Medium MS0				保存培养基 Medium RE0			
	活芽丛数 Number of alive clumps	增殖芽丛数 Number of clumps with proliferation	萌芽数 Number of proliferated buds	芽丛增殖率 Percentage of proliferating clumps (%)	活芽丛数 Number of alive clumps	增殖芽丛数 Number of clumps with proliferation	萌芽数 Number of proliferated buds	芽丛增殖率 Percentage of proliferating clumps (%)
0	61				61			
3	52	4	6	7.7	61	5	5	8.2
6	41	1	1	2.4	51	1	1	2.0
9	20	0	0	0.0	43	4	5	9.3
12	18	0	0	0.0	29	1	1	3.5
15	6	0	0	0.0	21	3	4	14.3
18	4	0	0	0.0	17	1	2	5.9
21	2	0	0	0.0	15	0	0	0.0

保存 12 个月后, 取出部分种质, 转接到增殖培养基进行增殖培养, 培养 2~3 代即可恢复原有增殖系数, 再进行生根诱导, 生根率可达 90% 以上。

2.4 种质的活力与数量变化

2.4.1 种质的活力 随着保存时间的延长, 种质逐渐丧失活力, 保存的芽或芽丛逐渐死亡。在 MS0 上, 芽丛的死亡高峰期出现在 6~9 个月, 累计芽丛死亡率由 0% 剧增至 41%, 调查间隔期内死亡的芽丛多, 分别为 11 和 14 丛; 在 RE0 上, 芽丛死亡高峰延后, 保存 12 个月时出现, 累计芽丛死亡率由 14.8% 增至 31.1%, 同期内死亡的芽丛为 10 丛。因而, 以 RE0 作保存培养基, 短叶省藤种质易保持活力。

表3 不同培养基上保存芽丛的生活力和数量变化
Table 3 Vitality and quantity changes of *in vitro* bud clumps on different media

保存时间 Time (months)	保存培养基 Medium MS0						保存培养基 Medium RE0					
	活芽 丛数 Number of alive clumps	死亡数 Dead Number	累计死 亡率(%) Accumu- lative dead percentage	污染数 Conta- minated number	累计污染率 Accumulative contaminated percentage (%)	芽丛保 存率 Preserved percentage (%)	活芽 丛数 Number of alive clumps	死亡数 Dead Number	累计死 亡率(%) Accumu- lative dead percentage	污染数 Conta- minated number	累计污染率 Accumulative contaminated percentage (%)	芽丛保 存率 Preserved percentage (%)
0	61						61					
3	52	0	0.0	9	14.8	85.2	61	0	0.0	0	0.0	100.0
6	41	11	18.0	0	14.8	67.2	51	7	11.5	3	4.9	83.0
9	20	14	41.0	7	26.2	32.8	43	2	14.8	6	14.8	70.5
12	18	2	44.3	0	26.2	29.5	29	10	31.1	4	21.3	47.5
15	6	7	55.7	5	34.4	9.8	21	2	34.4	6	31.1	34.4
18	4	2	59.0	0	34.4	6.6	17	4	41.0	0	31.1	27.9
21	2	2	62.3	0	34.4	3.3	15	1	42.6	1	32.8	24.6

芽丛母芽的死亡情况(表4)表明:保存种质的初始高度与其活力密切相关。保存3~9个月内死亡的母芽,其平均高度在1.0 cm以下。因此,高度>1.0 cm的芽或芽丛易保存。但增殖培养时,高度>2.5 cm的芽不易增殖,所以适宜的保存高度为1.0~2.5 cm。

2.4.2 种质数量变化 保存种质的数量

受死亡和污染两个因素的综合影响。死亡率受种质材料、保存培养基、保存时间、保存条件等因素的制约。方差分析⁽⁵⁾表明(表5):死亡率在不同的调查期内有极显著差异,在不同的培养基上也有极显著差异。污染则是随机

表4 保存母芽的初始高度与母芽的死亡
Table 4 The relationship between death and initial height of mother buds

保存时间 Time (months)	3	6	9	12	15	18	21
死亡母芽数 Number of the dead	2	19	18	11	10	5	8
累计死亡率 Accumulative percentage of the dead (%)	1.6	17.2	32.0	41.0	49.2	53.3	59.8
死亡母芽的初始高 Initial height of the dead (cm)	0.65	0.56	0.92	1.47	3.68	1.28	3.00

表5 保存期芽丛保存率和污染率方差分析
Table 5 Variance analysis of preserved percentage and contaminated percentage on different media

污染率方差分析 Variance analysis of contaminated percentage					保存率方差分析 Variance analysis of preserved percentage				
变异来源 Source of variation	离差平方和 Sum of squares	自由度 d. f.	均方 Mean square	均方比 F-Ratio	变异来源 Source of variation	离差平方和 Sum of squares	自由度 d. f.	均方 Mean square	均方比 F-Ratio
保存间隔期 Time	575.1	6	95.9	2.64	保存间隔期 Time	11114.6	6	1852.4	61.6***
培养基 Media	3.6	1	3.6	0.10	培养基 Media	1685.2	1	1685.2	56.0***
剩余 Residual	217.8	6	36.3		剩余 Residual	180.4	6	30.1	
总和 Total	796.5	13			总和 Total	2980.2	13		

的,调查间隔期之间,污染率无显著差异。芽丛死亡率、污染率和保存率的变化图显示:在MS0上,芽丛的数量下降快,保存15个月后,芽丛保存率<10%;在RE0上,芽丛死亡慢,保存18个月后,芽丛保存率仍>25%。方差分析也表明芽丛在RE0上的保存率显著高于在MS0上的保存率。

芽的死亡是种质损失的主要因素,然而,污染带来的种质损失不容忽视。在RE0上,保存21个月后,污染率达32.8%,死亡率为42.6%(表3、图2),污染与死亡丢失的芽丛的比例已达3/4。因此,在种质保存过程中,应严格控制保存环境条件,降低污染率,从而延长不转接的期限。

3 讨论

3.1 离体保存的可行性

短叶省藤离体种质,以丛芽形式,采用RE0保存培养基,在温度12.5℃和光照300 lx·12 h/d的保存条件下,其生长、增殖、抽叶、代谢皆显著减缓,保存18个月,保存率>25%,丛芽平均高

生长 < 2.2 cm。保存一年后, 种质在增殖培养基上仍可恢复增殖能力, 在生根培养基上能诱导生根。由此可见, 短叶省藤种质离体培养保存具有一定的可行性。种质离体保存与保存材料的状态, 培养基、温度等许多因子有关^[6]。因而, 作者认为, 随着对保存材料、保存培养基、保存温度等研究的深入, 离体保存有可能成为棕榈藤种质保存的新途径。

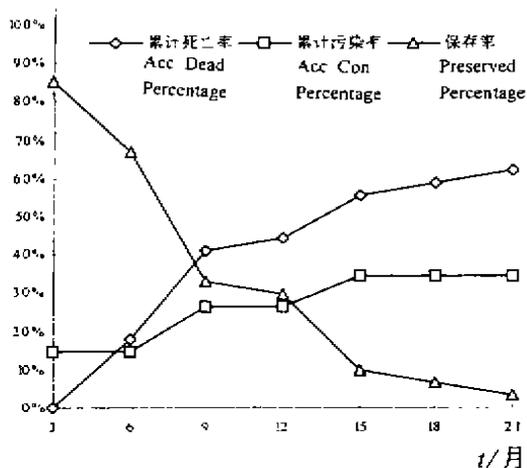


图1 MS0 保存培养基上芽丛数量变化

Fig. 1 Quantity changes of bud clumps on medium MS0

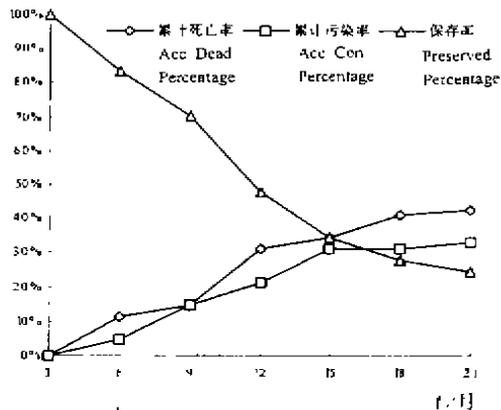


图2 RE0 保存培养基上芽丛数量变化

Fig. 2 Quantity changes of bud clumps on medium RE0

3.2 保存模式的探讨

种质离体培养保存过程中, 当保存率下降至 25 % 时, 应转接至增殖培养基, 进行增殖培养^[6]。在 RE0 上, 种质保存 18 个月, 保存率为 27.9 %。应进行增殖培养。增殖培养 2~3 代, 使种质数量恢复至保存前的水平, 再进行下一轮保存培养。鉴于此, 短叶省藤的种质离体培养保存模式可预定如图 3。

当然, 种质离体保存受众多因素的影响和制约, 本文仅对这一保存方法的可行性和保存模式作初步探讨, 许多问题有待进一步研究。

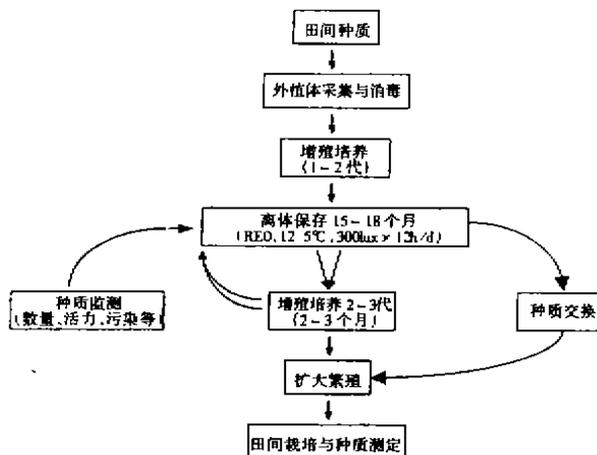


图3 短叶省藤种质离体培养保存模式*
Fig. 3 Model of *in vitro* conservation of germplasm of *C. egregius*
* 双箭头表示循环重复; * Double array means circulation for many times

参考文献:

- (1) 尹光天, 许煜灿, 张伟良等. 棕榈藤物种的收集和引种驯化的研究 [J]. 林业科学研究, 1993, 6(6): 609~617
- (2) Rao V R, Rao A N. Bamboo and Rattan Genetic Resources and Use [Z]. Proceedings of the First INBAR Bio-diversity, Genetic Resources and Conservation Workshop, 1994
- (3) 张宇和. 植物种质保存 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983
- (4) 程治英, 张凤雷. 离体保存热带植物种质资源 [J]. 植物杂志, 1992, 19(4): 23~24
- (5) 北京林学院主编. 数理统计 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1979
- (6) John H D. *In vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources [M]. The University Press, Cambridge, UK, 1991