

# 巨尾桉种质胶丸常温保存条件研究\*

曹月华 刘文明

**摘要** 巨尾桉组培苗的节段(包括茎尖、第1和第2节段)用海藻酸钠包成胶丸,胶丸埋于无营养的琼脂培养基内,在25~30℃,1 500 lx(10~14 h)一般培养室条件下,保存10个月时,再生率可达52%,研究证实这是一种可行的种质保存方法。光照是保存的必要外部条件。低浓度(1.5%~2%)海藻酸钠比高浓度(5.5%)有利于维持种质的活力。胶丸基液筛选结果表明,蔗糖浓度是制约种质活力和再生率的关键因子,低浓度蔗糖(0.5%)和无机盐表现出有益影响,蔗糖易导致胶丸内节段变黑、降低种质活力和再生率;保存期间,胶丸颜色由绿逐渐转白或转黑,是胶丸种质丧失活力和再生能力的两个主要表现过程;由此显示,可用种质胶丸颜色估测保存种质的活力状态。

**关键词** 巨尾桉种质、胶丸、常温保存、蔗糖浓度、海藻酸钠浓度

种质保存是维持物种多样性的重要手段<sup>[1]</sup>。随着生物技术的发展,组织培养物形式的种质的冷冻和低温保存技术研究发展迅速<sup>[2,3]</sup>。为降低冷冻和低温保存的成本,而引起对试管、常温保存方法的重视<sup>[4,5]</sup>。早在1989年,作者在法国的BSSFT实验室,首次完成与放线菌共生的固氮树种、轮状枝拟果木麻黄[*Allocasuarina verticillata* (Lam.) L. Johnson]的微形插条胶丸常温保存方法研究(向法国专利局ANVAR提出的报告),同时也进行一些有关桉树的研究。目前,胶丸形式种质保存大多是用于低温、短期贮存人工种子<sup>[6,7]</sup>,未见有关胶丸种质常温下长期保存的报道。本研究论述了有关巨尾桉组培苗节段制成胶丸种质后,在常温下保存的适宜条件研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 种质材料

选择绿色、健壮、1.5个月龄的巨尾桉(*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden × *E. urophylla* S. T. Blake)组培苗(由广西钦州林科所提供原始材料),在无菌条件下,切取长约2 mm的茎尖及带叶第1和第2节段(以下简称为节段)用海藻酸钠胶包埋,采用滴球法<sup>[8]</sup>,在1%~2%氯化钙( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )固化液中固化20 min成型制成包有1个节段的胶丸,用相应的溶液冲洗3次后,取出埋入厚约8 mm琼脂培养基中(8 g/L琼脂,以下简称基质 $M_0$ )。装有 $M_0$ 基质的培养皿用密封胶条(4061 complete,美国产)密封后保存。

### 1.2 保存条件

在25~30℃,1 500 lx(10~14 h)培养室保存。

### 1.3 处理

1.3.1 配制胶丸基液处理 (1)无菌水( $\text{H}_2\text{O}$ );(2)无菌水加0.5%、3%或6%蔗糖;(3)在上

1994-12-23 收稿。

曹月华副研究员,刘文明(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

\* 本研究为1991~1993年国家自然科学基金资助项目。生理生化测试由中国科学院华南植物研究所协助完成,并承蒙林植芳教授提出宝贵意见,宋湘豫和郭丽云参加了部分实验工作,在此一并表示谢意。

“(2)”的基础上添加 1/4 MS 基本培养基大量元素+3 倍的 MS 有机微量元素。

1.3.2 海藻酸钠浓度处理 (1)加 1.5%海藻酸钠;(2)加 3.5%海藻酸钠;(3)加 5.5%海藻酸钠。以上基液均为 H<sub>2</sub>O。

1.3.3 埋置胶丸的基质处理 H<sub>2</sub>O 为无菌水;M<sub>0</sub> 为无营养的琼脂培养基(琼脂 8 g/L);M 为改良 MS 培养基+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖。

1.4 保存胶丸颜色

胶丸颜色(实为其内节段的颜色)分为:绿色(G)、黄绿色(GY)、黑绿色(GB)、黑红色(BR)、黑色(B)和白色(W)。

包于胶丸内的节段生长分别描述为:绿胶丸完好(GI),绿芽长出胶丸(GO)等等。

1.5 种质活力

采用保存于胶丸内节段的叶绿素(Chl)以及可溶蛋白(SP)的相对含量作为评价种质活力指标。

1.6 再生力

在保存进入 10 个月后,将不同颜色的胶丸分别转入新鲜的 M 增殖培养基上(1 支试管 1 个胶丸)进行再生能力检查,芽突破胶丸而生长或增殖即为有再生能力,再生率(GR)计算公式如下:

$$GR\% = \frac{Mg \cdot g\% + Mgy \cdot gy\% + Mgb \cdot gb\% + Mbr \cdot br\% + Mb \cdot b\%}{Mg + Mgy + Mgb + Mbr + Mb + Mw}$$

公式中,Mg、Mgy、…分别为绿色、黄绿色等颜色胶丸总数;g%、gy%、…分别为不同颜色胶丸的再生率。

2 结果分析

2.1 保存基质影响

没包埋的节段(UG)插入 M 培养基(改良 MS 培养基+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA +30 g/L 蔗糖+ 8 g/L 琼脂,作为一种保存胶丸基质),保存 1 个月和 2 个月后鲜重为初始重的 15 倍和 63 倍;然而,在同一基质内,包埋于胶丸内节段(EG)保存 2 个月后鲜重仅为初始重 14 倍(见表 1)。值得指出的是,海藻酸钠内 O<sub>2</sub> 的含量仅为水中的 25%<sup>[9]</sup>,显然,上面的结果表明胶丸内的低氧抑制了节段的生长。而当包埋的节段保存在无营养琼脂培养基 M<sub>0</sub> 内或无菌水两种基质中,生长进一步受抑制(表 1)。显然,无营养的和低 O<sub>2</sub> 容量的基质或无菌水进一步降低了节段的代谢,呈现出一种“微生长状态”。所以,“微生长状态”可以被认为是长期保存种质的一种适宜的生长状态。无菌水虽然可以获得与琼脂培养基相同效果,但易受污染、不便交换,因此,采用固体基质保存胶丸更为合适。

表 1 保存基质对胶丸种质的鲜重影响 (单位:mg/个)

初始重	UG(M)		EG(M)		EG(M <sub>0</sub> )		EG(H <sub>2</sub> O)
	保存 1 个月	2 个月	1 个月	2 个月	1 个月	10 个月	1 个月
3.5	51.4	221.0	62	48.4	6.8	16.1	5.9
(1.0)	(14.7)	(63.1)	(1.8)	(14.0)	(1.9)	(4.6)	(2.6)

注:①表内为 20~30 个样品的平均值;②UG(M):保存于 M 基质内的没包埋种质;EG(M)、EG(M<sub>0</sub>)和 EG(H<sub>2</sub>O)分别表示包于胶丸内种质保存于 M 基质、M<sub>0</sub> 基质以及无菌水(H<sub>2</sub>O)基质。③括号内数字为各处理与初始鲜重相比增加的倍数。

## 2.2 海藻酸钠浓度影响

不论基液中是否添加 1/4 MS 无机大量元素+0.1 mg/L 6-BA+3%蔗糖,均以低浓度海藻酸钠(1.5%~2%)胶丸的活力最高(表 2)。高浓度(5.5%)胶丸保存 10 个月时,胶丸变黑率高达 42%,几乎全部丧失活力(表 2)。这与小苍兰研究的结论相一致<sup>[6]</sup>。估计这是由于保存过程中,种质呼吸过分被抑制并积累了有毒物质所致。

表 2 海藻酸钠浓度对种质活力影响

基 液	海藻酸钠 (%)	GI+GBI <sup>①</sup> (%)	BI <sup>②</sup> (%)
1/4 MS+0.1 mg/L 6-BA+3%蔗糖	2.0	74	—
	4.0	57	—
无 菌 水	1.5	96	9
	3.5	87	27
	5.5	89	42

注:①系保存 6 个月时的绿色或黑绿色节段包于胶丸内的种质的百分比率;②系保存 10 个月时节段变黑仍包于胶丸内的种质的百分率。

## 2.3 基液适宜成分的选择

常温下桉树胶丸种质保存过程中,种质变黑、丧失活力是个严重问题。为了解基液各种成分对保存种质活力的影响趋势,采用正交设计,选择以 MS 培养基为基础的无机大量元素、蔗糖、有机微量元素、6-BA 和 IAA 5 个因子按正交表  $L_{16}(4^5)$  设置 16 个处理,进行综合因子研究,并计算各不同颜色胶丸百分比以及  $K$  值, $K$  值为同因素不同水平对同一指标影响效果值的差值(即从最大值减去最小值的差值)。 $K$  值越大说明该因子对某指标作用越大,是个关键因子。经统计分析蔗糖的  $K$  值高达 73.2,其余 4 个因子的  $K$  值均不超过 20,变动在 12~18 之间。这表明,蔗糖是影响种质活力与维持胶丸种质“微生长”的关键因子。绿色胶丸完好率(GI%)随蔗糖浓度升高而降低,而黑色胶丸变化正相反(图 1 左),同时发现加 0.5 mg/L IAA 时,绿色胶丸完好率(GI%)也高(图 1 右),基液含 1/4 MS 无机大量元素以及 3 倍有机微量元素(GI%)亦较其它水平高。

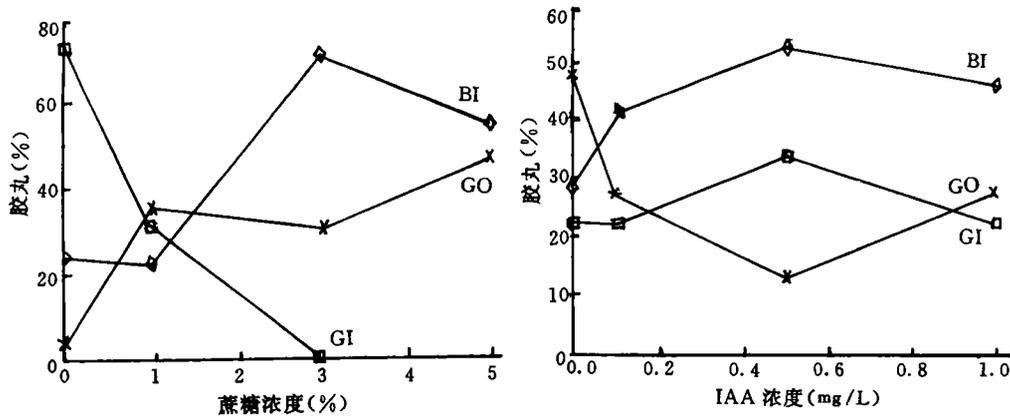


图 1 蔗糖和 IAA 浓度对种质胶丸颜色和生长状况影响

GI: 胶丸种质(包于胶丸之中节段)色绿,呈微生长状态包于胶丸内;

GO: 色绿,长出胶丸; BI: 色黑,无明显生长仍包于胶丸内

进一步对蔗糖单因子试验的结果表明,作为评价保存种质活力的叶绿素(Chl%)和可溶蛋白质(SP%)相对含量的两条动态变化曲线,随蔗糖浓度升高呈相反变化趋势(图2)。两条曲线相交在小于1%蔗糖处。从图2又可见,保存10个月时的再生率也依赖蔗糖浓度变化,加0.5%蔗糖时再生率最高,可以认为添加0.5%蔗糖可获得最高的种质活力和再生率。叶绿素和可溶蛋白两条曲线相交处(图2),可以用作选择适宜蔗糖浓度的综合指标。

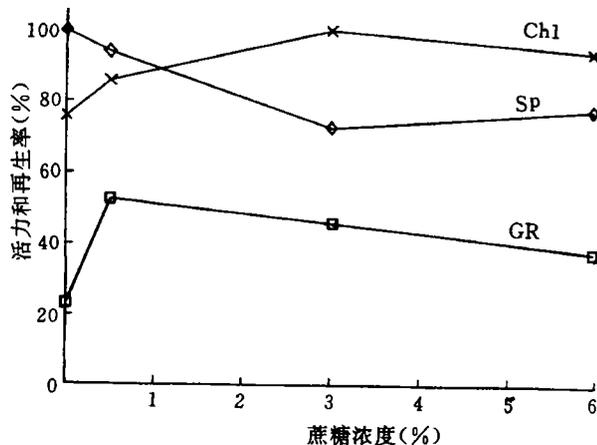


图2 蔗糖浓度对再生率和叶绿素可溶蛋白含量的影响  
GR:再生率(%);Chl:叶绿素相对含量;SP:可溶蛋白相对含量

如果制备海藻酸钠的基液仅是无菌水,在保存10个月时,胶丸种质几乎完全丧失活力和再生力(图3),若改用营养液(1/4 MS大量元素+3倍MS有机微量元素+0.1 mg/L 6-BA),则胶丸种质活力会提高到36%,再生率达23%。在此基础上,再添加0.5%蔗糖,活力和再生率两者都会达50%左右(图3)。

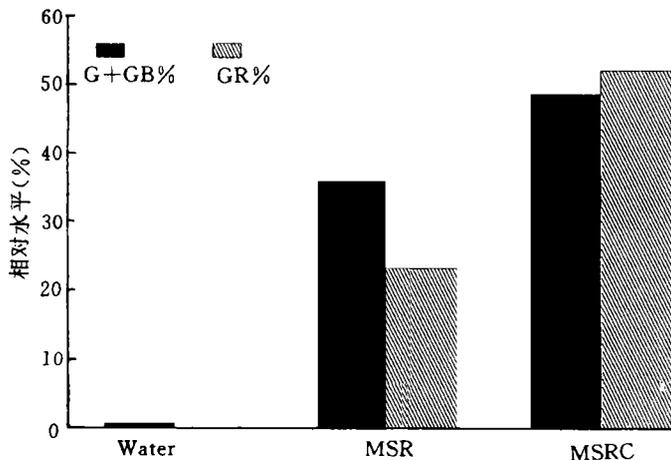


图3 基液对种质活力和再生率影响

Water:水; MSR: 1/4 MS培养基大量元素+3倍MS有机微量元素+0.1 mg/L 6-BA; MSRC:MSR+0.5%蔗糖; G+GB%:绿和黑绿色胶丸%

### 2.4 光照影响

光是光合作用的能源,又是多种酶活化的重要因子。总的来说,组织培养物的保存大多在有关条件下<sup>[10~12]</sup>。试验结果表明,光是桉树种质保存的必要因子(表3),黑暗条件下保存3个月时98%的胶丸变成黄白色,保存10个月时,几乎全转白色而失去活力。当将胶丸置于光照分别为1500 lx和700 lx下,保存10个月时,高活力胶丸(G+GY+GB)分别达98%和36%。因此,光照的有利影响是显而易见的。

的来说,组织培养物的保存大多在有关条件下<sup>[10~12]</sup>。试验结果表明,光是桉树种质保存的必要因子(表3),黑暗条件下保存3个月时98%的胶丸变成黄白色,保存10个月时,几乎全转白色而失去活力。当将胶丸置于光照分别为1500 lx和700 lx下,保存10个月时,高活力胶丸(G+GY+GB)分别达98%和36%。因此,光照的有利影响是显而易见的。

表3 光照强度对各色胶丸%的影响

光强 (lx)	胶丸数量	保存3个月后(%)					保存10个月后(%)					
		G	GY	GB	B	WY	G	GY	GB	BR	B	W
0	297	0	0	0	0	93	0	0	0	0	0	100
700	240	0	0	18	63	19	—	—	—	—	—	—
1500	1320	44	36	11	6	3	0	13	23	12	8	44

## 2.5 再生率和叶绿素以及可溶蛋白含量间相关关系

种质保存期间胶丸颜色变化的趋向可以划为 5 个类型,类型 I (绿→黄绿→黄白→白)和类型 II (绿→黑绿→黑红→黑)是两个主要种质活力降低表现过程(表 4)。不同颜色胶丸的叶绿素和可溶蛋白含量变化由大到小的顺序是黑绿→绿→黑红→黑→白,再生率的变化相似于叶绿素的变化。经计算再生率和叶绿素以及可溶蛋白的相对百分含量间的相关系数分别为 0.926 6 和 0.938 4,而叶绿素和可溶蛋白相对含量间也表现了更为紧密的相关( $r=0.963 2$ )。这清楚地表明,再生率正相关于叶绿素和可溶蛋白的代谢水平,而种质胶丸颜色可以直观反映出叶绿素和可溶蛋白的代谢水平。

表 4 不同颜色胶丸种质的 Chl 和 SP 含量和相对含量以及再生率比较

胶丸颜色	叶绿素含量		可溶蛋白含量		再生率 (%)
	μg/10 粒	(%)	mg/10 粒	(%)	
G,GY	16.6	73.0	0.560	89.0	42
GB	22.8	100.0	0.630	100.0	56
BR	8.4	37.0	0.380	60.0	40
B	4.1	18.0	0.076	12.0	23
W	0.0	0.0	0.011	2.0	2

注:保存 10 个月时的测定结果。

## 3 讨 论

低温保存种质的机理是依靠低温抑制生长。一些学者曾采用生长抑制剂抑制生长或含低容量  $O_2$  的石蜡油或无菌水在较常温低的温度(12~25 °C)下保存水稻试管苗或小苍兰人工种子、咖啡试管苗<sup>[4,6,11~13,15]</sup>。我们早期研究中曾将桉树节段保存在无营养、低  $O_2$  的琼脂培养基内达 1 a 之久<sup>[5]</sup>,本研究将低  $O_2$  的海藻酸钠胶丸与低  $O_2$  的琼脂结合应用,为控制保存种质最低的代谢水平创造了最适合的气体条件。然而,在长期保存中,由于缺乏营养使种质最终丧失了活力。而在胶丸基液中添加低浓度蔗糖和矿质营养元素后,这种情况得到改善。即限制营养和低  $O_2$  条件的结合,使胶丸形式保存的种质处于微生长状态,从而为其常温保存提供了新途径。

对胶丸颜色的变化观察表明,种质活力的丧失与胶丸的黑化或褪色相关联。绿色或黑绿色胶丸反映出它们的高活力和再生力。张丽欣报道叶绿素和可溶蛋白的含量是四种叶菜贮存衰老的指标<sup>[14]</sup>。在本研究中观察到在低  $O_2$  和低营养胁迫下,叶绿素和可溶蛋白的降解出现在保存的第 2 或第 4 个月,以及叶绿素和可溶蛋白与再生率的紧密相关显示它们可能被用作种质活力的质量指标,而种质胶丸颜色正是估测种质活力的有效外观指标。

## 参 考 文 献

- 1 张宇和.植物的种质保存.上海:上海科学技术出版社,1983.
- 2 Bajaj Y P S. Biotechnology of the conservation of germplasm and the establishment of gene banks. Inter. Workshop Biotechnology in Agriculture. New Delh, Indica, 1985. 95~110.
- 3 Aitken-Christie J. Cold storage of tissue culture from cell and tissue culture in forestry. Editor: J. M. Bonge. Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 99~111.
- 4 赵成章.水稻试管苗保存技术.植物生理学通讯,1991,27(2):103~104.
- 5 曹月华.桉树组培新技术初报.林业科技通讯,1992,(267):25~27.
- 6 羊涪.液体石蜡贮存小苍兰人工种子的试验初报.北京林业大学学报,1989,11(4):145~149.

- 7 王韵. 干燥、液体石蜡与 2℃低温结合贮存胡萝卜人工种子. 见:李修庆主编. 植物人工种子研究. 北京:北京大学出版社,1990. 91~93.
- 8 李修庆. 胡萝卜人工种子制作流程的建立. 植物学报,1989,31(9):667~673.
- 9 Hiemstra H. Diffusion of oxygen in alginate gel related to the kinetics of methanol oxydation by immobilized *Hansenula polymorpha* cells. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.,1983,(14):189~196.
- 10 Son H S. Cold storage of *in vitro* cultures of hybrid poplar shoots (*Populus alba* L. × *P. grandidentata* Michx.). Plant Cell Tissue and Organ Culture,1991,(27):161~168.
- 11 Bertrand—Beshrunais Anna. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) 2: Influences of reduced concentrations of sucrose and low temperature. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992,(31):105~110.
- 12 Assy-Bah. Medium-term conservation of mature embryos of Coconut. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1993,(33):19~21.
- 13 Bessembinder. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth condition. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1993,(33):121~127.
- 14 张丽欣. 四种叶菜衰老期间呼吸、乙烯生成和过氧化物酶的变化及其相互关系. 植物生理学报,1988,14(1):81~87.
- 15 Caplin S M. Mineral oil overlay for conservation of plant tissue culture. Amer. J. Bot., 1959,(46):324~329.

## Studies on the Requirements of Conservation of *Eucalyptus* Germplasm Encapsulated in Alginate Beads at Room Temperature

Cao Yuehua    Liu Wenming

**Abstract** *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* microcuttings *in vitro* were encapsulated with alginate as the gel bead style and maintained in agar medium without nutrition. It was found that this style was a suitable method for the conservation of *Eucalyptus* germplasm. Regenerative rates of shoot were 52% after ten months' conservation. High vigor of germplasm was observed in low concentration (1.5%~2.0%) of encapsulated sodium alginate. The tests of basic components supplemented in the alginate by single factor or multiple factors orthogonal design showed that sucrose concentration was the key factor limiting the vigor and regenerative rate of germplasm. Low concentration of sucrose(0.5%) and minerals showed the benefited effect, but 5.5% sucrose induced blackening of microcuttings, decreased the vigor, and decreased the regenerative rate of germplasm. During the conservation period, changes of alginate bead colour from green to white or to black were the two main apparent indicators of losing vigor and regeneration capacity. The results suggest that apparent colour of gel bead might be used to estimate the vigor status of conserved germplasm. Light was a necessary factor for conservation of the encapsulated culture germplasm.

**Key words** germplasm of *Eucalyptus*, alginate bead-type conservation, room temperature, genetic conservation, concentration of sucrose and alginate

---

Cao Yuehua, Associate Professor, Liu Wenming (The Research Institute of Tropical Forestry, CAF Guangzhou 510520).