

中国林业科学研究院

科学技术发展基金资助项目论文选编

(一)



中国林业科学研究院科学技术发展基金委员会

中国林业科学研究院
科学技术发展基金资助项目论文选编

(一)

江苏工业学院图书馆
藏书章

前 言

为了加强我院应用基础研究,培养青年科技工作者,促进林业科技事业的发展,从1987年起院设立了“中国林业科学研究院科学技术发展基金”。院属各单位的科技人员均可按有关规定申请,采取同行评议择优支持的原则,重点资助中青年科学工作者。院基金资助的项目,必须是有重要科学意义,重要应用前景的基础研究课题以及有开发实用价值或国际合作的前期项目。要求立项课题学术思想新颖,立论依据充分,研究内容和目标明确、具体、先进,技术路线合理可行,近期内可望取得预期成果。

中国林业科学研究院从1989年起拨专款建立了院科研基金。每年拨款从最初的15万元增加到1995年的100万元,7年翻了2番多,累计达到355万元,共支持了250个科研和开发项目。这些项目对培养青年科技人才,支持开发前期研究,搞好必要的基础性研究工作,发挥了重要作用。

几年来,尽管院科技发展基金资助的平均单项经费不高,但是绝大多数项目的进展是好的,经费使用是比较有效的。主要表现在有一部分项目从院基金起步,在取得一定成果后又争取到其它经费来源,有的纳入攻关项目,有的进入国家自然科学基金项目,使院基金的资助起到“加油”或“催化”的作用。但必须强调指出,院基金资助项目,都是在各所(中心)已有条件下完成的,这些单位提供了科研工作所必需的仪器、设备以及后勤支持与保证,没有这些条件和必要的支持,院基金资助项目的顺利完成是不可能的。

为了使领导及广大科技工作者对院基金所取得的成就有所了解,促进科技信息交流,现将从1993年以前资助的项目中选出一批比较优秀的论文共55篇编辑成册。可能还有更重要的论文没有被收集进来,或没有被发现,好在今后还要继续收集、汇编和出版。

在编辑本选编中得到了科技工作者和完成单位的大力支持,在此表示衷心的感谢!

洪菊生

1995年12月

论文目录

杉木组培嫩梢增殖与复壮的分析.....	阙国宁等(1)
杉木悬浮细胞系的建立和原生质体的分离.....	诸葛强等(6)
黑荆树悬浮单细胞低温驯化.....	王敬文等(11)
油桐(<i>Aleurites fordii</i>)分子育种初报.....	花锁龙等(15)
大型真菌冬菇 103 工业发酵产物及生物活性的研究.....	李玉萍等(20)
柚木种实萌发生理的研究.....	宋学之等(29)
海南红豆种子生理特性及萌发影响因素的研究.....	刘文明等(38)
植物稳态矿质营养研究的理论与技术.....	贾慧君等(45)
不同个体(基因型)差异在杨树杂交育种中的效应研究.....	苏晓华等(50)
马占相思苗木施肥研究初报.....	徐大平等(56)
毛竹叶和其他器官硅素分布的研究.....	胡炳堂(61)
杨树干部液流时空动态的研究.....	刘奉觉等(66)
日本甜柿果实发育期间单宁和糖类的变化.....	费学谦等(73)
多效唑对核桃生长发育的影响及其生理基础.....	朱丽华等(78)
生长调节剂与板栗生长成花及结果的研究.....	朱长进等(83)
香榧性别的早期鉴定.....	黄少甫等(89)
组织化学技术快速检测泡桐丛枝病研究.....	金开璇等(95)
毛白杨树皮内含物对光肩星天牛抗性的探讨.....	王 蕤等(99)
紫胶虫杂交育种初步研究.....	陈晓鸣等(103)
中国多刺蚁属(膜翅目:蚁科)昆虫研究.....	王常禄等(108)
白蜡虫对不同气候环境适应性研究.....	张长海等(114)
海南岛尖峰岭热带树木园主要树种的物候研究.....	粟 娟等(118)
日本乔木型大叶黄杨在北京引种驯化的研究.....	傅紫芝等(127)
单木生长模型竞争指标的优化算法.....	张守攻等(134)
林业调查数据的单片机记录、传输装置的研究 以及加装测直径传感器的设想.....	关永福(141)
云南干热河谷的植物资源及开发利用研究.....	陈玉德等(151)
林业专家数据库管理信息系统的研究.....	郭志伟等(155)
德国:接近自然的林业—技术政策和技术路线.....	邵青还(163)
事实型数据库的研建.....	王忠明(172)
《林业叙词表》的研制.....	陈兆文(179)
大片刨花压缩流变性能的研究.....	王培元等(184)
刨花板垂直平面压缩流变性能研究(I).....	许 伟等(190)
刨花板垂直平面压缩流变性能研究(II).....	许 伟等(197)
柞木横纹压缩流变性能.....	施建平(202)
木材渗透性可控制原理研究.....	鲍甫成等(209)
碳水化合物作添加剂制木质刨花板的研究	

1. 热压工艺的制定	陆熙娴等(216)
碳水化合物作添加剂制木质刨花板的研究	
I. 糖的作用机理	秦特夫等(222)
杨木木粉的醚化 I. 羟乙基化条件以及处理方法对产物性质的影响	吴书泓等(228)
杨木木粉的醚化 II. 木粉的羧甲基化及其性质	吴书泓等(234)
刀具角度对杨木刨片和刨花板性能的影响	管 宁等(239)
关于兰考泡桐木材变色成份的初步研究	祖勃荪等(244)
用紫外分光光度法测定木腐菌木素分解酶活力的研究	刘秀英等(251)
黑荆树皮单宁提取分级和黄烷 3-醇分离鉴定	虞启庄等(255)
米老排材性及制浆造纸适应性的基础研究	
—— I 米老排木材性质的研究	谢国恩等(260)
米老排材性及制浆造纸适应性的基础研究	
—— II 米老排硫酸盐浆及其漂白性能的研究	房桂干等(265)
米老排材性及制浆造纸适应性的基础研究	
—— III 化学机械浆(CMP)制浆漂白工艺研究	吴 庄等(271)
米老排材性及制浆造纸适应性的基础研究	
—— IV 废液废水污染特征及治理途径的研究	杨殿隆等(276)
黑荆树皮多聚原花色素分子量与分子量分布测定	沈宏毅等(286)
黑荆树皮多聚原花色素分子量及其分布研究	沈宏毅等(294)
黑荆树皮原花色素的分离鉴定及其 ¹³ CNMR 特征	沈兆邦等(299)
马尾松抗松毛虫植株针叶化学组成的研究	粟子安等(309)
脂松香及其改性产品的耐氧化性	刘红军等(317)
松香加压酯化反应的研究	王文龙等(324)
化学法制造活性炭的有关机理初探	邓先伦等(328)
紫胶复合材料—NR—499 型外墙涂料的研制	易 鹏等(332)
(141) 曹永光	
(151) 曹新玉	
(152) 曹志群	
(163) 曹青	
(171) 曹忠王	
(179) 文兆	
(181) 曹永	
(190) 曹	
(197) 曹	
(205) 曹	
(208) 曹	

杉木组培嫩梢增殖与复壮的分析*

阙 国 宁

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)

摘要 用取自1年、5年和10年生母本上的杉木茎段作为原始外植体,接种于含有BAP 0.75mg/l和IBA 0.25mg/l的“GN”培养基中($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- = 1:2.86$)。经1年连续4代培养,结果表明:嫩梢及苗木产量因外植体母本的年龄不同有很大差异。如母本年龄为1年的外植体,每个平均可获嫩梢170.3~445.7根,其中有效嫩梢78.0~194.9根,包括I级11.1~25.1根;II级36.1~87.9根;III级29.5~78.6根。随着原始外植体母本年龄的增加,以上各项数值都相应下降。另一方面,由于组织培养对于成年母本的外植体具有不同程度的复壮效应,使得嫩梢增殖效果差异很大。如取自年龄为5、10年生母本上的外植体,平均年嫩梢产量为4.1~234.3根,如此大范围的变化为培养体的复壮选择提供了可能性。此外,还对嫩梢增殖的生产效应作了初步分析。

关键词 杉木 组织培养 增殖 复壮

在树木组织培养中,形态发生能力以及嫩梢增殖与生长状况通常是细胞和组织成熟度的重要标志之一^[3]。通过组培复壮以获得具童期性状的个体,这是当今值得重视的研究课题。在杉木组织培养中,虽然已解决了一般的繁殖技术问题^[1,2],然而当今组培工厂化生产面临的问题是高效率地繁殖那些已确定具高遗传增益树木的个体。树木性状的表现力在一定的生长阶段通常与年龄成正相关,而营养繁殖能力又与年龄成负相关^[4],为此,许多树木个体一旦达到充分表现其优良性状的成熟年龄,往往失去旺盛的营养繁殖能力,这个规律一般也适合于组织培养。但是,在离体培养条件下由于所分离的树木组织或细胞通常有可能自由表达其受压抑的潜在特性,利用个体内细胞及组织之间的生理成熟度差异,通过培养选择诱发幼嫩性,恢复活性以达到复壮的目的。本研究目的在于探索不同年龄母本上的外植体的嫩梢增殖规律和成年母本外植体的组培复壮技术,为制定合理的苗木工厂化生产流程,确定正确的经济指标,提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

选取分别属于1年、5年、10年树龄的杉木实生植株,于春夏之交剪取当年生的新梢,长5~10cm,剪除全部针叶,经充分洗涤后按组培常规的无菌法将新梢剪成1.2cm左右的茎段作原始外植体,培养于温度为 $25\pm 3^\circ\text{C}$ 、光照强度为1500~2000lx、每日光照时间达12~14h的培养室中,经培养萌发后3个月观察所分化的嫩梢数量及品质,接着,每3个月进行继代培养一次,一年后统计分析所获得试验结果。

按实际生产要求,我们将所分化的嫩梢或芽分为两大类:

1. 有效嫩梢(芽) 具有较粗壮的嫩梢或饱满的芽,经培养可能长成供继代培养或生根培养的嫩梢。通常又根据其生长状况分为3级。其中,I级:嫩梢粗壮,长达3~5cm,剪切此嫩梢经继代培

* 参加工作的还有诸葛强同志。

养有可能继续增殖成有效的嫩梢或芽；Ⅱ级：嫩梢较细，但生长正常，长度>2cm，切取这类嫩梢培养于生根培养基中，可形成能移栽成活的完整植株；Ⅲ级：在愈伤组织四周生长着的较为粗壮的芽以及<2cm 较为粗壮的嫩梢，这些芽及嫩梢连同其愈伤组织经继代培养后可以长成Ⅰ～Ⅱ级嫩梢。

2. 无效嫩梢(芽) 虽然已分化成可见的芽，甚至也开始生长，但过于密集细嫩，经继代培养后，一般不能长成有效嫩梢。

本试验全部采用修改的“MS”(简称“GN”)为基本培养基，并附加 BA (0.75mg/l)和 IBA (0.25mg/l)。与“MS”相比，“GN”的显著特点是增加硝态氮含量，其 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 比值从原来的 1:1.87 降至 1:2.86^[5]，钾元素含量基本保持不变，同时显著降低磷、钙、镁的含量。本试验重复 10 次，并计算其变异状况。

2 结果与讨论

2.1 嫩梢增殖的概况分析

从不同年龄母本上取来的每一原始外植体，经 1 年连续 4 代培养，按初代培养所得的嫩梢实值推算年嫩梢产量理论值，结果见表 1。然而，实际上不同培养代数增殖的嫩梢数量及其品质是受继代再生率、有效嫩梢比率及不同品质嫩梢比率控制的。实际试验的调查数据表明，不同年龄母本的外植体，从第一次继代培养起，在继代再生率上差异显著，为此按不同年龄分别列出。而有效嫩梢的比率差异不大，为了便于统计只按各年龄平均值列出予以统计，其结果见表 2。

表 1 不同年龄杉木母本的外植体嫩梢增殖数理论值的估计

培养代数 ^①	每一外植体产嫩梢(芽)数		
	1 年生	5 年生	10 年生
初代 ^②	33±6.3	24±13.3	9±6.1
1	1 089	576	81
2	35 937	13 824	729
3	1 185 921	331 776	6 561

①各代培养时间均为 3 个月，以下同；②初代培养样品数=10。

表 2 不同年龄杉木母本的外植体各培养代数的嫩梢数量及品质比率

培养代数	继代再生率 ^① (%)			有效嫩梢比率 (%)	不同级别有效嫩梢比率(%)		
	1 年生	5 年生	10 年生		Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级
初代	100	100	100	55.0	20	50	30
1	40.0	45.8	77.7	50.8	15	50	35
2	30.3	33.3	66.6	46.7	10	45	45
3	24.2	29.1	30.2	30.2	5	40	55

①继代再生率(%)=(各次继代培养总的嫩梢平均数/初代培养总的嫩梢平均数)×100。

从表 1 所列的结果，不难看出，就理论值而言，不同年龄母本的外植体的嫩梢增殖潜力差异很大，若将 1 年生与 10 年生相比较，经 1 年培养后，其数量差异可达 180 倍，这说明从幼龄母本上采取的外植体，具有巨大的增殖优势。然而，随着外植体的母本年龄的增加，其嫩梢增殖数量的变化幅度(即变异系数)却明显加大，即 1 年生为 19.0%，5 年生为 55%，而 10 年生高达 68%(表 1 中的 $\text{CV}(\%) = S/\bar{x} \cdot 100$)，这说明植物个体发育的不均衡性。在母本年龄为 5 年生时，有部分原始外植体，经初代培养后的嫩梢数已达到或超过母本年龄为 1 年生的外植体；同样也有少数母本年龄为

10年生的原始外植体,经初代培养后达到了母本年龄为5年生的外植体的增殖水平。为此,只要通过一代培养,选择分化增殖旺盛的培养体,也能达到复壮的目的。当然,从10年生以后已达到成熟年龄的母本上所采得的外植体,这种复壮机率就显著下降。从遗传学观点来看,一般杉木达到5~10年生时,在表型上其优劣特性就已较为明显地得以表达,而这时尚未完全丧失再生能力,若建立以繁殖优良单株无性系为目的组培繁殖体系,这时或许是选取外植体较为合适的母树年龄。分析表2所列的继代再生率,不难发现随着培养代数的增加培养体的生命力将全面下降。实际上,用经初代培养以后的不同年龄母本上的外植体所增殖的无菌嫩梢作培养体,结果表明,各培养体所增殖的嫩梢数量随着培养代数的增加而逐渐接近,相对而言,就出现了随着外植体母本年龄的增加继代再生率有逐渐增加的趋势,这也从另一角度说明了组培的复壮效应。

2.2 不同年龄母本上的外植体嫩梢增殖效应分析

如果从来源于不同年龄母本的外植体所产生的嫩梢中,剔除那些细小、嫩弱以及愈伤组织化了的梢(芽),余下的按品质分类,属Ⅰ级者供继代培养复壮再生,属Ⅱ级者供生根培养移栽成苗,属Ⅲ级者继续培养促使分化生长,同时按一定比例不断接种若干新的外植体以补充淘汰的老化培养体。这样就使得培养、增殖、生根、移栽组成了一套完整的连续生产体系。

表3 不同外植体母本年龄与培养代数的嫩梢增殖与复壮效应

外植体母 本年龄(a)	培养代数 (代)	平均总嫩梢数 (根/每外植体)	平均有效嫩梢数(根/每外植体)			
			Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	总和
1	初	27.3—39.9	3.0—4.4	7.5—10.9	4.5—6.6	15.0—21.9
	1	10.9—15.9	0.8—1.2	2.7—4.0	1.9—2.8	5.5—8.0
	2	8.3—12.1	0.4—0.6	1.7—2.5	1.7—2.5	3.9—5.6
	3	6.6—9.7	0.1—0.2	0.8—1.1	1.1—1.6	2.0—2.9
5	初	10.0—37.3	0.8—3.0	2.6—10.3	1.9—7.2	5.5—20.5
	1	4.6—17.1	0.3—1.3	1.2—4.4	0.8—3.0	2.3—8.7
	2	3.3—12.4	0.2—0.6	0.8—2.6	0.8—2.6	1.5—5.8
	3	2.9—10.8	0—0.2	0.4—1.4	0.5—1.5	0.9—3.2
10	初	2.9—15.1	0.3—1.7	0.8—4.2	0.5—2.5	1.6—8.3
	1	2.3—11.7	0.2—0.9	0.6—2.9	0.4—2.1	1.2—5.9
	2	1.9—10.1	0.1—1.0	0.4—1.8	0.4—1.9	0.9—4.7
	3	1.6—8.4	0—0.1	0.2—1.0	0.3—1.4	0.5—2.5

注:置信度(α)=95%

从表3可看出,取自1年生母本上的单个原始外植体,在萌发后,经3个月的初代培养,平均可形成27.3~39.9根嫩梢(芽),其中有效梢15.0~21.9根(Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级分别为3.4~4.4、7.9~10.9、4.5~6.6根)。继代培养后,由于受再生率影响,继代外植体所产生的总嫩梢数及各级嫩梢数也随之下落,这种趋势在各不同年龄母本的外植体中几乎同样存在。这种以各培养代数为基础的数据,仅从横向阐明了培养效果。在生产实践中,更重要的是以连续生产为基础的各培养代数的累计数值,即从纵向了解培养效果。表4列出了取自不同年龄母本上的单个原始外植体,经1年4代连续培养后,产生的各级嫩梢累计数值,其结果说明了实际产生的嫩梢数与理论值差异很大。如果

分别按年龄为1年、5年、10年生的外植体所培养的结果统计,其实际值与理论值之比分别为 $1.4 \times 10^{-4} \sim 3.7 \times 10^{-4}$ 、 $0.4 \times 10^{-4} \sim 0.7 \times 10^{-3}$ 以及 $0.6 \times 10^{-3} \sim 1.6 \times 10^{-2}$ 。说明按理论模式推算的繁殖率绝不能用于生产实践,否则将造成无法挽回的损失。另外,取自一年生母体的外植体,经4代连续培养后,出现了无I级嫩梢的培养体,这说明此时少数培养体已开始衰退以至无法再取其粗壮的无菌苗梢作继代培养。然而多数还具再生能力,这种能力甚至能保持2~3年之久。对于母本年龄为5年与10年的外植体来说,这种衰退现象从第3代甚至第2代就开始出现。只有少数的培养体,由于受到组培复壮机制的诱导,仍能形成I级嫩梢,保持着继代培养的再生能力。应用这种特性进行繁殖成年优株无性系是极为有效的。

表4 不同年龄母本的每个外植体一年内各代嫩梢连续增殖数

外植体母 本年龄(a)	培养代数 (代)	继代培养 体数(个)	平均总嫩 梢数(根)	平均有效嫩梢数(根)			
				I级	II级	III级	总和
1	初	1	27.3—39.9	3.0—4.4	7.5—10.9	4.5—6.6	15.0—21.9
	1	5—7	54.0—111.0	5.4—11.0	13.0—28.0	8.0—17.0	27.0—57.0
	2	7—14	58.0—169.0	2.7—7.9	12.0—35.0	12.0—35.0	27.0—79.0
	3	5—13	31.0—126.0	0—1.8	3.6—14.0	5.0—20.0	9.0—37.0
	合计	18—35	170.3—445.9	11.1—25.1	36.1—87.9	29.5—78.6	78.0—194.9
5	初	1	10.0—37.3	0.8—3.0	2.6—10.3	1.9—7.1	5.5—20.5
	1	1—4	4.6—68.0	0.3—5.2	1.2—17.3	0.8—12.1	2.3—34.7
	2	0—7	0—86.0	0—2.8	0—12.0	0—12.0	0—28.0
	3	0—4	0—43.0	0—0.6	0—5.0	0—6.8	0—12.5
	合计	2—16	14.6—234.3	1.1—11.6	3.8—44.6	2.7—38.0	7.8—95.7
10	初	1	2.9—15.1	0.3—1.7	0.8—4.2	0.5—2.5	1.6—8.3
	1	0—3	1.2—35.0	0—2.6	0—13.0	0—2.1	0—17.7
	2	0—4	0—35.0	0—1.6	0—7.2	0—7.2	0—16.0
	3	0—2	0—22.0	0—0.3	0—2.6	0—3.6	0—6.5
	合计	1—10	4.1—107.0	0.3—6.2	0.8—27.0	0.5—15.4	1.6—48.5

注:置信度(α)=95%。

2.3 嫩梢增殖的生产效应

在组培苗工厂化生产中,建立起能连续增殖大量嫩梢,并可不断提供这些嫩梢作为生根及继代培养的培养体(或称之为试管母本),是至关重要的。它如同常规扦插繁殖中的采穗株一样,在无性系繁殖中起决定性作用。据我们长期实践得知:一般在良好的条件下繁殖杉木,组培嫩梢的生根率可达80%左右,移栽成活率可达70%左右,初代外植体接种萌发率可达50%左右。按此估计,如用1年生的实生杉木苗为母本,取表4中年产II级嫩梢值(36.1~87.9)的平均数,则每一正常萌发的外植体每年平均可生产供生根的嫩梢62根,预计产生商品苗数=供生根的嫩梢数×生根率×移栽成活率=62×80%×70%=34.7株。这样按照工厂化生产所需要的指标及劳动生产率和上述的技术经济指标,就不难推算出所需的设备、人工、能源资本等重要经济总指标,从而可为工厂化生产流

程提供以试验为依据的较为正确的成本核算方法。鉴于林木生产的效益涉及到直接、间接、经济、社会诸方面,小试的核算结果尚有待中试及大规模生产实践加以证实。为此,更为详细的生产效应须待以后深入研究再加以解决。

参考文献

- 1 阙国宁. 杉木组织培养的初步研究. 林业科学(增刊), 1980, 137~140.
- 2 阙国宁. BA 和 IBA 对离体培养的杉木芽分化和生长的影响. 林业科学, 1983, 19(4): 406~409.
- 3 Bonga J M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation in tissue culture in forestry, 1982, 387~406.
- 4 Faver J M et al. In vitro growth of buds taken from seedling and adult plant material in *Quercus robur* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 1987, (8): 49~60.
- 5 Bltjo G M et al. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 1987, (10): 11~19.

AN ANALYSIS OF SHOOT MULTIPLICATION AND REJUVENATION OF CHINESE-FIR IN VITRO

Que Guoning

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

Abstract Segments of stem cutting from 1-5-and 10-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) were cultured in vitro on GN($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 1 : 2.86$) medium containing BAP (0.75mg/1) and IBA (0.25mg/1). After four successive subculture lasted for one year, the results show that there is a great difference in yields of shoots and nursery stocks due to different ages of maternal plants of the explants. For example, an explant which was one year old obtained 170.3~445.7 shoots on average, including 78~194.9 efficient shoots. Among these shoots there were 11.1~25.1 shoots of 1 degree (advanced, able to be on subculture); 36.1~87.9 shoots of 2 degree (moderate, able to be rooted) and 29.5~78.6 shoots of 3 degree (to be needed to subculture). And it is estimated that the yield of nursery stocks can reach 34.7 on average. With the increase of ages of maternal plants of the explants, the above data decreased. However, the yield of shoots per explant, 5-and 10-year-old, was 4.1~234.3 because of an effect of rejuvenation in vitro as well as a great difference in shoot multiplication. Thus, there is a possibility in selecting rejuvenated cultures. Besides, this paper put forward a preliminary analysis on the effect of production of shoot multiplication.

Keywords *Cunninghamia lanceolata* In vitro Multiplication Rejuvenation

杉木悬浮细胞系的建立 和原生质体的分离*

诸葛强 阙国宁

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)

摘要 由杉木(*Cunninghamia lanceolata* Hook.)成熟种子胚在含有2.0mg/l 2,4-D、0.2mg/l KT的MS培养基上诱导愈伤组织,通过筛选继代培养,得到了生长旺盛、质地松散的愈伤组织细胞系。继代初期适当降低蔗糖浓度有助于减少愈伤组织的褐化。将5个月龄的愈伤组织转移至含1.5~2.0mg/l 2,4-D、0.1~0.2mg/l KT、200mg/l CH的MS液体培养基振荡培养,建立了增殖快、分散性良好的杉木悬浮细胞系。从4个月龄的悬浮细胞酶解(2%纤维素酶、0.25%果胶酶和13%甘露醇),游离得到大量的杉木原生质体,产量为 9.3×10^5 个/gFW,活力达到80%以上。

关键词 杉木 悬浮细胞系 原生质体分离

运用植物悬浮细胞系和原生质体是生物技术中进行突变系筛选以及植物基因转移、细胞杂交等项研究较理想的手段^[1],同时对于生理学、生物化学、细胞学、遗传学、分子生物学等研究亦是良好的实验系统^[2]。与草本植物相比,林木有关细胞悬浮培养及原生质体培养等方面的研究起步晚、基础弱。其中难度较大的针叶树种的研究进展更为缓慢^[3]。近些年来,Attree等^[4,5]对白云杉,Gupta等^[6~8]对火炬松以及其它数十种针叶树种如花旗松、落叶松等进行了研究,取得了许多重要的进展。

杉木是我国南方重要的速生用材针叶树种之一,但就细胞培养和原生质体分离及培养等研究方面目前尚未见报道。本文采用杉木(*Cunninghamia lanceolata* Hook.)种子胚诱导愈伤组织,筛选继代培养,进而建立悬浮细胞系,并经酶解,分离出有活力的原生质体。旨在期望借助于细胞培养及原生质体培养技术,为杉木的遗传改良、基因导入及细胞融合等研究提供实验基础。

1 材料方法

1.1 愈伤组织的诱导

杉木成熟种子(采自贵州锦屏)吸涨后剥去种皮,先后用75%酒精溶液快浸,0.125%氯化汞(HgCl_2)溶液约3~4min灭菌,无菌水冲洗3~4次。分别切取子叶、下胚轴等接种于愈伤组织诱导培养基(见表1)中,置于 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 下暗培养。约1个月后,切口周缘出现愈伤组织,选取淡黄色质地松散的愈伤组织,进行继代培养,约每月1次。继代初期,培养基均采用愈伤组织诱导培养基。第4次继代培养时,将挑选的愈伤组织转移至含2.0mg/l 2,4-D、0.2mg/l KT、200mg/l CH、3%蔗糖的MS培养基上。

* 本文显微摄影部分得到本所赵治芬同志的大力帮助。

1.2 悬浮细胞系的建立

将经过7次继代培养、约5个月龄、生长旺盛的淡黄色愈伤组织(约6g)转移至含液体培养基的100ml三角瓶中(液体培养基的成份与上述的愈伤组织继代培养基相同)。而后置于约100rpm的摇床上,在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 黑暗下进行振荡培养。5~6天继代1次。悬浮细胞生长率采用细胞干重法进行测定^[10],即悬浮液经双层尼龙网过滤后烘干(60°C ,18h)、称重。

1.3 原生质体的分离

取经自然沉降后弃去上清液、继代后第4天的悬浮细胞(约4个月龄)约5ml,加入等体积的酶液。酶液组成是:2%纤维素酶(Onozuka R-10)、0.25%果胶酶(Pectinase SERVA)、7mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1mM KNO_3 、1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、13%甘露醇、5mM MES, pH 5.6。酶液用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤灭菌。酶解物置于摇床(30~40rpm)上, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下酶解3.5h以上。酶解液先后用 $154\mu\text{m}$ 和 $75\mu\text{m}$ 的尼龙网过滤,除去大细胞团。酶解液低速离心(500rpm,5min),收集的原生质体用上述不含酶的盐溶液洗涤3次。经纯化的原生质体用血球计数器计数,得出杉木悬浮细胞每克鲜重的原生质体产量。原生质体的活力采用0.1%伊文思蓝溶液染色后测定(即统计未被染色的原生质体占原生质体总数的百分比)^[11]。

2 结果和讨论

2.1 愈伤组织的诱导与筛选

表1 愈伤组织诱导培养基(mg/l)及其诱导率(%)

培养基编号	1	2	3	4	5	6	7
基本成份	MS	MS	MS	MS	MS	改良 MS	改良 MS ^[12]
2,4-D	1.0	2.0	3.0	—	—	2.0	—
NAA	—	—	—	1.0	2.0	—	2.0
KT	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1
蔗糖	20 000	20 000	20 000	20 000	20 000	20 000	20 000
琼脂	7 800	7 800	7 800	7 800	7 800	7 800	7 800
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
诱导率	62	70	80	62	69	80	78

杉木种子胚不同部位外植体接种于愈伤组织诱导培养基1个月后,外植体膨大,切口处产生愈伤组织,统计其愈伤组织诱导率。愈伤组织可分为二种类型,第一种类型(类型I)的愈伤组织浅褐色,质地紧密,增殖速度慢;第二种类型(类型II)的愈伤组织乳黄色,质地松散,继代增殖速度快。

从表1可见在本试验的诱导培养基上愈伤组织的诱导率差异不明显,但试验结果表明,在2号培养基上类型II的愈伤组织发生频率高于其它培养基。在含NAA的培养基中,诱导产生的愈伤组织生长速度较慢,如转至含2,4-D的培养基中,则愈伤组织的类型可相互转换。降低培养基中的2,4-D浓度,愈伤组织颜色略转绿,结构变为紧密。愈伤组织继代培养初期,减少培养基中蔗糖浓度可相应减轻愈伤组织褐化的程度。与黑暗培养相比,光照培养增加了愈伤组织褐化的发生频率。

2.2 悬浮细胞系的建立及其生长状况

选择质地松散的愈伤组织进行悬浮培养,刚开始继代时,稀释率以 1:1 较好,以后逐渐增大稀释率,待悬浮系稳定后可保持约 1:4 的稀释率。每次换液时,将待继代的培养瓶静置,尽量吸取底部细胞质浓的小细胞团及单细胞。弃去大细胞团以及漂浮的细胞。

生长素 2,4-D 浓度对悬浮细胞的生长影响很大。当 2,4-D 浓度小于 1.0mg/l 时,悬浮细胞团块变大;而当 2,4-D 浓度大于 6.0mg/l 时,培养物易变褐。最适于悬浮细胞生长的 2,4-D 浓度为 1.5~2.0mg/l。

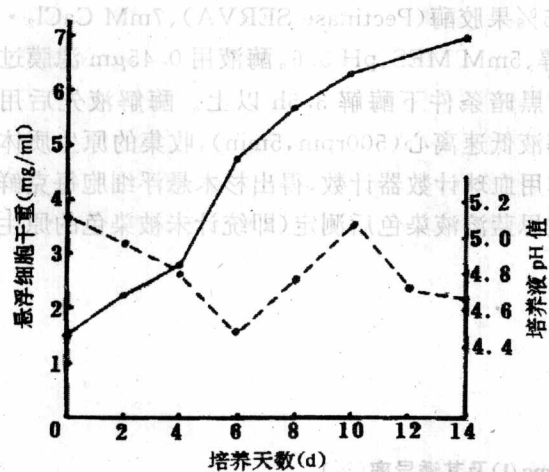


图 1 14 天培养中悬浮细胞的生长曲线和培养液 pH 变化
—— 悬浮细胞的干质 培养基的 pH 值

从图 1 悬浮细胞生长曲线和培养液 pH 值变化曲线可看出,悬浮细胞干重在继代 4 天后增加了 1 倍,6~8 天达到了线性增长期,培养 2 周后悬浮细胞干重增加了约 5 倍。悬浮液的 pH 值在换液后的前 5 天是逐渐下降的,即由 5.1 降至 4.5。将这期间的 pH 值变化与悬浮细胞生长曲线对照,可看出这期间的细胞处在生长相对停滞时期,但在 pH 值最低的那点,悬浮细胞就已开始迅速增殖,细胞的对数生长期出现在第 5~7 天,这期间 pH 值变化趋势开始转折,由低逐渐升高。当细胞进入缓慢生长期(10 天后),pH 值又开始下降。据实验观察,12~14 天后悬浮细胞变成灰褐色,悬浮细胞液泡增大。因此,继代周期不宜超过 10 天,否则,悬浮细胞系易变褐、死亡。本试验在培养基中添加 MES,结果表明对悬浮细胞的生长影响不大。另一个值得注意的现象是,本试验采用的一个以 AA^[13] 为基本培养基

并附加适量谷酰胺、天冬胺酸、精氨酸、甘氨酸的悬浮培养液,在经过 7 次继代培养后,细胞悬浮系全部变黑、甚至死亡。

2.3 原生质体的分离

采用了三种不同组成的酶液用于杉木原生质体的分离,试验结果表明,纤维素酶的含量对原生质体的产量影响较大(见表 2)。在含有 1% 纤维素酶和 0.25% 果胶酶的酶解液中,游离出的原生质体量很少;增加纤维素酶的含量至 2%,则能获得大量有活力的原生质体(见图 2~5)。用 0.1% 伊文思蓝溶液测定活力,达 80% 以上,纯化后的原生质体产量为 9.3×10^5 个/g FW。酶液中增加半纤维素酶(Sigma),分离效果无明显改进。

表 2 酶液组成对原生质体产量的影响

酶液编号	酶液组成	原生质体产量
1	1%纤维素酶、0.25%果胶酶	很少
2	2%纤维素酶、0.25%果胶酶	多
3	2%纤维素酶、0.25%果胶酶、0.25%半纤维素酶	多

悬浮材料的继代培养时间对原生质体产量的影响很大。继代培养第 4 天的材料,游离出的原生

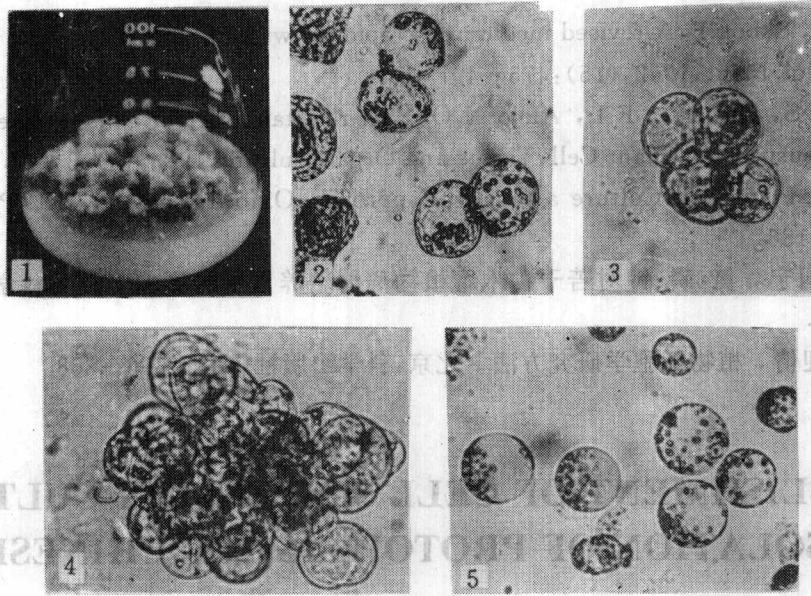


图2 杉木悬浮细胞系的建立及其原生质体的分离

1. 类型Ⅱ杉木愈伤组织；2~4. 悬浮培养中圆形细胞分裂为二细胞、四细胞、细胞团 200×；
5. 从悬浮细胞分离的新鲜原生质体 200×

质体数量多,大小差异不大。试验表明,相对于静置酶解来说,酶解时慢速(30~40rpm)摇动有利于酶解。继代培养8天以上的悬浮材料,游离出的原生质体数量减少,大小差异很大,出现许多液泡化程度较高的原生质体。

本试验结果表明,采用杉木悬浮细胞系游离原生质体,具有取材均一、方便、重复性好、游离出的原生质体数量多、活性高等优点。原生质体培养的研究现正在继续进行。

参考文献

- 1 牛德水,邵启全,秦金山等. 枸杞细胞系的建立及单细胞培养再生植株. 科学通报,1985,(4): 296~298.
- 2 孙敬三,路铁刚,Söndahl M R. 超甜玉米单倍体悬浮细胞系的建立及其生长特性. 植物学报,1989,31(10):742~749.
- 3 黄敏仁,许农,陈道明. 林木原生质体培养的现状. 植物生理学通讯,1990,(2):75~78.
- 4 Attree S M, Bekkaoui F, Dunstan D I. Regeneration of somatic embryos from protoplasts isolated from an embryogenic suspension culture of white spruce (*Picea glauca*). Plant Cell Reports, 1987,(6):480~483.
- 5 Hakman I, Fowke L C. An embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* (white spruce). Plant Cell Reports, 1987,(6):20~22.
- 6 Gupta P K, Durzan D J. Bio/technology, 1987,(5):710~712.
- 7 Kirby E G, In Sala F et al. (eds). Plant cell cultures, results and perspectives. Amsterdam Elsevier/Nort Holland, 1980, 289.
- 8 Bekkaoui F, Saxena P K, Attree S M et al. The isolation and culture of protoplasts from an embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* (Moench) Voss. Plant Cell Reports, 1987,

- (6):476~479.
- 9 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 1962, (15):473~497.
 - 10 Garciglia R S, Gutierrez F L, Alejo N O. NaCl-resistant variant cells isolated from sweet potato cell suspension. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1985, (5):3~12.
 - 11 Dixon R A. *Plant Cell Culture a practical approach*. Oxford, England: IRL Press Limited, 1985, 184~186.
 - 12 诸葛强, 阙国宁. 氮、磷、钾对若干种木本植物离体培养繁殖的影响. *林业科学研究*, 1990, 3 (1):41~46.
 - 13 孙敬三, 钱迎倩. *植物细胞学研究方法*. 北京: 科学出版社, 1987, 356~358.

ESTABLISHMENT OF CELL SUSPENSION CULTURE AND ISOLATION OF PROTOPLAST OF CHINESE FIR

Zhuge Qiang Que Guoning

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

Abstract Callus was induced by embryos from mature seeds of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* Hook.), which had been cultured in MS medium containing 2.0mg/l 2,4-D and 0.2mg/l KT. After successive subculture and selection, cell colonies of the calli which were friable and in rapid growth were obtained. In the period of initial subculture, decrease of sucrose concentration was beneficial to diminishing callus browning. The cell suspension culture, which grew rapidly and consisted mainly of smaller cell aggregates, was established by transferring five-month-old calli to liquid MS medium supplemented with 1.5~2.0mg/l 2,4-D, 0.1~0.2mg/l KT and 200mg/l CH. A great amount of Chinese fir protoplasts were released from the cell suspension cultures, with protoplast yield (9.3×10^5 /g FW) and viability (above 80%). Enzyme mixture was consisted of 2% cellulase R-10, 0.25% pectinase and 13% mannitol.

Keywords Chinese Fir Cell suspension culture Protoplast isolation

黑荆树悬浮单细胞低温驯化*

王敬文 蒋 晶

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)

摘要 由黑荆树幼茎诱导愈伤组织,由愈伤组织制备悬浮单细胞。悬浮细胞可以作为最小的驯化单位。在2℃、8h短光照条件下14天,悬浮细胞可耐受到-7.5℃(LD₅₀),而不经驯化的仅耐受到-2.5℃。悬浮细胞抗寒性是用细胞质壁分离法测定的。单一的低温或短光照驯化不能使单细胞提高抗寒力,必须低温和短光照同时存在才能使其驯化,提高抗寒力。

关键词 黑荆树 悬浮细胞 低温驯化

黑荆树(*Acacia mearnsii* Wild)是我国引种的优良栲胶原料树种,现主要在我国亚热带地区种植,冬季低温常使一些种植区的黑荆树受到冻害,-5℃低温是黑荆树耐受的低温极限。随着我国建设事业的发展,对栲胶的需求量越来越大,为了扩大栲胶资源和便于就地生产栲胶,需要向北扩大黑荆树种植范围,因而需要选育抗寒品系。提高木本植物的抗寒性和选育抗寒品系,传统的方法是实生苗逐代低温驯化,低温和短日照作为外部刺激的信号,选育抗寒品系的周期需要几十年。欧洲赤松只能耐受-7℃低温,当对其幼苗进行充分的低温驯化时可耐受-31℃低温^[3,4],但用苗进行低温驯化要花费相当长的时间,而且当达到致死低温时又会造成苗死亡。近代生物技术的发展为选育抗寒品系提供了新手段,为了缩短选育抗寒品系周期,缩小植物驯化单位,在严酷的条件下驯化草本植物的愈伤组织^[2]和木本植物(杨树)的愈伤组织^[6],然而由于愈伤组织细胞的不均一性和分化成苗的无预定性,使选育抗寒苗木仍有相当多困难。为了克服这些困难,本文研究低温驯化单位是否可缩小到单细胞和单细胞能否接受外界信号进行低温驯化而提高抗寒能力。

1 材料和方法

黑荆树(*Acacia mearnsii* Wild)种子采自四川省通江县林地,该处是我国黑荆树种植区域的最北边缘。

1.1 黑荆树悬浮细胞制备

取黑荆树种子500粒,投入300ml沸水中,待其自然冷却至室温后用纱布搓去种子表面的蜡质层,洗净,放在0.5%升汞中消毒5min,用无菌水洗去升汞,接种在1%的琼脂培养基中,25℃培养、发芽,待幼茎长至4~5cm时,取白色幼茎切段接种在改良的MS培养基中,培养基组成如下:KNO₃ 18.80mM、KH₂PO₄ 1.25mM、NH₄NO₃ 20.63mM、CaCl₂ 2.29mM、MgSO₄ 1.50mM、MnSO₄ 0.10mM、ZnSO₄ 3.7×10⁻²mM、CuSO₄ 0.01×10⁻²mM、KI 0.5×10⁻²mM、CoCl₂ 0.01×10⁻²mM、H₃BO₃ 0.10mM、Na₂MoO₄ 0.01×10⁻²mM、甘氨酸 2.66×10⁻²mM、生物素 0.02×10⁻²mM、叶酸 0.11×10⁻²mM、肌醇 0.56mM、尼克酸 4.06×10⁻²mM、盐酸吡哆醛 0.02×10⁻²mM、盐酸硫胺 0.12mM、硫酸腺嘌呤 21.72×10⁻²mM、赤霉素 0.12×10⁻²mM、激动素 0.93×10⁻²mM、2,4-D 0.9

* 本所黑荆树课题组提供实验种子,特此致谢。

$\times 10^{-2}$ mM、蔗糖 30g/L、酪朊水解物 1g/L、琼脂 8g/L, pH5.8。培养 2~3 周后诱导出愈伤组织,将旺盛生长的愈伤组织转移到不加琼脂的相同培养基中,以 150rpm 往复振荡,200 目尼龙丝网滤去细胞团块,滤液为细胞悬浮液,单细胞在 95% 以上。

1.2 驯化处理

将悬浮细胞制备液按双层培养法^[1]分装在三角瓶中,驯化处理共分 6 组: 1. 在 25℃, 每天 16h 光照条件下保持 14 天; 2. 在 25℃, 每天 8h 光照条件下保持 14 天; 3. 在 2℃, 每天 16h 光照条件下保持 14 天; 4. 在 2℃, 每天 8h 光照条件下保持 14 天; 5. 在 25℃, 每天 16h 光照条件下保持 7 天, 随后在 2℃, 每天 8h 光照条件下保持 7d; 6. 在 2℃, 每天 8h 光照条件下保持 7 天, 随后在 25℃, 每天 16h 光照条件下保持 7 天。

1.3 冷冻试验

将经过上述驯化处理后的每组样品再分装于试管中进行冷冻试验,测定其抗寒性。制备 0℃ 到 -12℃ 的梯度冷浴,用食盐和冰块调节冰浴温度,每一梯度降温 2℃,每组样品在各个温度梯度上保持 2h,冷冻处理后试管放回 0℃ 过夜,测定抗寒性。测定抗寒性用细胞质壁分离法,取一滴悬浮细胞液放入 0.5M 蔗糖液中,显微镜下观测细胞质壁分离,能发生典型质壁分离的细胞是活细胞,不能发生典型质壁分离的细胞都计数为死细胞,每份样品观测 20 个视野,统计 2 000 个细胞的存活数。

2 实验结果

本研究实验重复 3 次,现报告 3 次实验的平均结果。

2.1 在整个实验研究过程中,各组驯化处理的悬浮细胞都发生自然死亡,自然死亡率为 14.4%~16.2%,这表明细胞自然死亡不是由于驯化条件引起的,而是由于细胞本身生理状态不良引起的,从气态生长的愈伤组织转移到悬浮的液相环境,会引起一部分细胞自然死亡。

2.2 在实验过程中,悬浮细胞从 25℃ 转到 2℃ 这一急剧变化,不影响悬浮细胞的活力,在 25℃ 制备和贮存的悬浮细胞能发生质壁分离的为 96.4%,转移到 2℃ 环境中 6h 后测定,能发生质壁分离的细胞为 95.8%。

在 25℃ 和 16h 长光照条件下制备和贮存的悬浮细胞能发生质壁分离的为 95.2%,转移到 2℃, 8h 短光照环境中放置 8h 后测定,能发生质壁分离的细胞为 94.1%,这表明从 25℃, 16h 长光照环境中转移到 2℃, 8h 短光照环境中也不影响悬浮细胞的活力。

2.3 在 25℃, 每天 16h 光照条件下保持 14 天,也就是没有进行低温驯化的悬浮细胞半数致死温度为 -2.5℃ (图 1—I)。在 25℃, 每天 8h 光照条件下保持 14 天,也就是只有 8h 短光照单一信号驯化的悬浮细胞半数致死温度为 -2.5℃ (图 1—II),短光照处理没有提高抗寒性。在 2℃, 每天 16h 光照条件下保持 14 天的悬浮细胞半数致死温度为 -2.5℃ (图 1—III),单一的低温驯化条件也不能提高细胞的抗寒性。

2.4 在 2℃, 每天 8h 短光照条件下保持 14 天的悬浮细胞的抗寒性大幅度提高,半数致死温度为从 -2.5℃ 降低到 -7.5℃ (图 1—IV),当温度降低到 -12℃ 时仍有 4.3% 的细胞存活下来。实验表明,驯化过程中低温和短光照这二个外部信号必须同时存在才能刺激细胞提高抗寒能力。在驯化过程中,不论是前半期还是后半期只要低温和短光照二个信号同时存在都能够使悬浮细胞提高抗寒能力(见图 2、3),但是这二个信号持续时间只有 7 天,使得驯化还不够充分,细胞的抗寒潜力还没有能够充分表达出来。