维普资讯 http://www.cqvip.com

海南龙血树组织培养快速繁殖技术研究

何旭君[1] 刘善辉[1] 冯远来[2] 林晓萍[1] 张华通[1]
(1. 广东省林业学校 广州 510520; 2. 深圳市园林花木公司)

摘要 以海南龙血树优株顶芽和茎段为外植体,通过不同细胞分裂素、生长素以及培养基不同浓度的组合对诱导芽的分化、增殖、伸长及生根的对比实验及试管苗移栽管理,筛选出 MS + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L 培养基诱导芽的形成,MS + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L 培养基用于芽的增殖,MS + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 0.5 mg/L 培养基用于壮芽伸长;1/2MS + 蔗糖 15 g/L + NAA 0.2 mg/L 用于诱导芽生根;选用泥炭土、椰糠和珍珠岩混合基质,于晚春和秋季移栽试管苗,成活率达 90% 左右,达到工厂化苗木生产的要求。

关键词 海南龙血树 组织培养 培养基
中图分类号:S723.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1006-4427(2006)01-0022-04

海南龙血树(*Dracaena cambodinna* Pierre ex Gagnep)又名小花龙血树,也称山海带,属百合科龙血树属,主要分布于海南岛沿海地区,从昌江、东方、乐东、三亚、凌水、万宁及文昌一带沿海的花岗岩、低丘陵地热带常绿季雨林至沿海的一些岛屿均有生长[1]。小乔木,茎不分枝或分枝,叶绿色,带状密生于茎;树形美观,幼树叶洒脱翠绿,整个株形宛若喷泉,既可用于室内盆栽,又可用于园林绿化;其适应性强,既耐阳光照射又耐荫、耐干旱瘠薄。该植物树皮及叶子可提取名贵的中药血竭,被国家列为三级保护植物,是具有开发利用前景的室内盆栽、园林绿化及药用植物。本校结合引进开发,对该植物进行组织培养快速繁殖技术研究并获得成功,每年能生产苗木 200 万株。现将有关研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源及选择

采用海南岛三亚引进的海南龙血树种子,播种发芽后,幼芽生长 2 个月移植于塑料大棚内,并于取材 10 d 前开始停止淋水,喷洒 1 g/L 的 70% 甲基托布津可湿性粉剂水溶液,每隔 3 d 喷一次,以植株及盆土淋湿为止,连喷 3 次。接种材料选择筛选的优株顶芽和茎段作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料的获取及丛生芽诱导 选择生长正常、株形和叶色良好、无病虫害的植株作为外植体,消毒用 1 g/L 的 $HgCl_2$ 溶液浸 4 min,用无菌水冲洗两次,再用 1 g/L 的 $HgCl_2$ 溶液浸 3 min,无菌水冲洗 5 次。将消毒好的材料切成约 1.5 ~ 2.5 cm 长的小段,接种到 MS + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L 的培养基上,诱导促发不定芽的形成。

1.2.2 芽增殖继代培养基及壮芽培养基的筛选 切取经丛生芽诱导培养的芽作材料,进行连续两次的芽增殖继代培养基及壮芽培养基筛选试验。第一次试验,基本培养基为 MS,并分别附加细胞分裂素 6-BA 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L 和蔗糖 30 g/L,共 6 种处理;第二次试验基本培养基为 MS、3/4MS、1/2MS,并附加细胞分裂素 6-BA 2.0 mg/L,生长素 NAA 0.01 mg/L 和蔗糖 30 g/L,共 3 种处理。两次试验每处理 10 瓶,每瓶接种 5 个丛芽(带 3 个小芽),置于(25 ± 2)℃的培养室中培养,每天光照 8 h,光照强度为 1 500 ~ 3 000 lx。培养 30 d 后调查试验结果,观察分化出芽的总数、生长反应情况。

1.2.3 不定根诱导培养基筛选试验 把接种于壮芽培养基中长 3.0 cm,4 片叶子以上的芽单个切下,接种于生根培养基,设计两组生根培养基,基本培养基都为 1/2MS,蔗糖 15 g/L,第一组附加生长素 NAA 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L,共 5 种处理;第二组附加生长素 IBA 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L, 共 6 种不同浓度的处理,每处理 20 瓶,每瓶接种 10 个芽。培养 30 d,观察各处理不定芽生根及根的生长情况。

2 试验结果与分析

2.1 外植体的消毒效果及不定芽的诱导

本试验采用外植体采集前控制水分、淋杀菌剂的预处理方法可降低材料的污染率,提高诱导的成功率。

维普资讯 http://www.cqvip.com

接种于诱导培养基的茎段或顶芽的外植体培养 10 d 后，部分外植体开始转绿，其余部分的慢慢变白或褐变而最终死亡，以后每 20 d 转一次，约 45 d 左右，部分转绿而没有污染的外植体在叶腋处抽生小芽，约 65 d 左右，部分外植体的切口处膨大，继续培养，产生嫩绿色的愈伤组织而最终形成丛生的小芽。将叶腋处抽生的小芽和嫩绿色的愈伤组织形成的丛生小芽继续转到原来的诱导培养基继续增殖形成丛生芽。不定芽诱导培养基进行了 4 种培养基初步对比实验，最终选择 MS + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 3.0 mg /L + NAA 0.01 mg/L 的培养基，其特点是比较简单，广普而有利在工厂化育苗中应用。

2.2 芽增殖继代培养基及壮芽培养基的筛选结果

表 1 不同浓度 6-BA 对诱导不定芽增殖的影响

编号	6-BA (mg/L)	接种芽数 (个)	增殖后芽数 (个)	增殖倍数 (倍)	平均芽长 (cm)	芽生长情况
1	0	150	165	0.10	3.8	正常、芽抽长快
2	0.5	150	310	1.06	3.6	正常、芽抽长比较快
3	1.0	150	365	1.43	2.2	正常、芽抽长比较慢
4	2.0	150	450	2.00	1.5	正常、芽抽长比较慢
5	3.0	150	525	2.50	1.1	部分玻璃化、芽抽长比较慢
6	4.0	150	595	2.96	0.8	大部分玻璃化、芽矮小、不大正常

注：芽增殖倍数 =（增殖后芽总数 - 增殖前接种芽个数）/增殖前芽个数，平均芽长 = 原母芽长度 + 新分化芽的长度。

表 1 的结果显示，培养基中添加不同浓度的 6-BA 对芽的分化、增殖、伸长和生长的影响比较明显，尤其对芽的增殖影响大，增殖倍数表现为随浓度升高而升高，芽长度则表现为随浓度升高而降低。随 6-BA 添加的浓度达到一定值后，芽的生长开始表现不正常，部分出现玻璃化现象。从整体来看，不加激素的 1 号培养基和加浓度为 0.5 mg/L 6-BA 的 2 号培养基诱导长出芽的增殖倍数分别为 0.10 倍和 1.06 倍，芽平均长为 3.8 cm 和 3.6 cm；浓度为 1.0 mg/L 6-BA 的 3 号培养基和 2.0 mg/L 的 4 号培养基的增殖倍数分别为1.43倍和 2.00 倍，芽平均长分别为 2.2 cm 和 1.5 cm，芽生长均正常；6-BA 浓度增加到 3.0，4.0 mg/L 的 5，6 号培养基，虽然芽增殖倍数越来越高，但诱导出的芽开始出现玻璃化现象，且随浓度升高玻璃化现象越严重。因此，选择伸长和增殖倍数比较高、芽生长正常的 4 号培养基作为芽增殖培养基较好，而选择芽伸长比较快、有一定增殖的 2 号培养基作为壮芽培养基。

表 2 的结果显示，本研究所采用的 MS 基本培养基浓度不同，而附加激素均为 6-BA 2.0 mg/L，NAA 0.01 mg/L，蔗糖 30 g/L 的情况下，芽增殖倍数差异不大，在 2.02 倍 ~ 2.15 倍之间，芽的伸长在 1.4 ~ 1.7 cm 之间，表明基本培养基的含量对诱导芽增殖、生长影响不明显。从生产的需要考虑，综合表 1，2 的结果最终选择 7 号培养基作为芽增殖培养基，2 号培养基作为壮芽培养基。

表 2 培养基矿质元素不同浓度对诱导芽增殖的影响

编号	MS 浓度	接种芽数 (个)	增殖后芽数 (个)	增殖倍数 (倍)	平均芽长 (cm)	芽生长情况
7	MS	150	473	2.15	1.7	正常
8	3/4MS	150	465	2.10	1.5	正常
9	2/3MS	150	453	2.02	1.4	正常

2.3 不定根诱导培养基筛选结果

在 1/2MS 培养基中添加不同种类、不同浓度生长素诱导单芽不定根的结果见表 3，4。表 3 的结果显示，培养基中 NAA 的浓度对接种的芽诱导不定根、根数和根长的影响比较明显，生根率及根数随浓度升高而升高，而根长随浓度的升高而缩短。而不加激素的 10 号培养基接种的芽不生根；添加 NAA 0.3 mg/L 的 11 号培养基接种的芽生根率为 91%，平均根数为2.5条，平均根长最长，为 3.4 cm；而添加 NAA 0.5，1.0，2.0 mg/L的 12，13，14 号培养基，芽生根率均达 96% 以上，平均根数分别为 3.0，4.5，5.0 条，平均根长分别为 2.5，1.4，1.1 cm。12，13 培养基接种的芽生根率和平均根数虽较高，但根系生长不正常，互相粘成排根。因此，选择生根率比较高、有一定根数且根生长正常的 11 号培养基作为芽诱导不定根的生根培养基较好。

在根诱导培养试验过程中发现，芽接种于生根培养基后，部分好的培养基上的芽于 13 d 就开始生根，20 d 大部分生根，到 25 d 已基本生根。表 4 的结果显示，培养基中添加浓度为 0.2 ~ 3.0 mg/L IBA 对诱导不定

维普资讯 http://www.cqvip.com

根的效果没有NAA好,但不同浓度对诱导不定根、根数和根长有一定的差异,但不太明显,其生根率在42%~64%,较添加NAA的生根率低得多,而根数1.8~2.8条,根长在2.2~3.4 cm之间,且根系生长粗细均匀。

表3 不同浓度NAA对诱导不定芽生根的影响

编号	NAA (mg/L)	接种芽数 (个)	生根率 (%)	平均根数 (条)	平均根长 (cm)	生长情况
10	0	200	0	0	0	
11	0.2	200	91	2.5	3.4	粗壮、均匀
12	0.5	200	96	3.0	2.5	粗大、不均匀、部分排根
13	1.0	200	100	4.5	1.4	粗大、互粘成排根
14	2.0	200	100	5.0	1.1	粗短、互粘成排根

表4 不同浓度IBA对诱导不定芽生根的影响

编号	IBA (mg/L)	接种芽数 (个)	生根率 (%)	平均根数 (条)	平均根长 (cm)	生长情况
15	0	200	0	0	0	
16	0.2	200	44	1.8	3.4	粗细均匀
17	0.5	200	46	2.2	3.2	粗细均匀
18	1.0	200	52	2.5	2.8	粗细均匀
19	2.0	200	64	2.8	2.6	粗细均匀
20	3.0	200	42	2.4	2.2	粗细均匀

综合表3、表4的结果,结合工厂化生产育苗的需要,最后选择生根率比较高、有一定根数且根生长正常的11号培养基作为芽诱导不定根的生根培养基。

2.4 生根培养与炼苗

把单芽接种到生根培养基后,第二天放在玻璃温室中培养,温度控制在20~30℃之间,经过13 d后芽开始生根,30 d即可移植。整个生根的过程,也就是炼苗的过程,这样培养出来的幼苗才壮,移栽成活率高。

2.5 试管苗移栽及管理

移栽基质选用泥炭土、珍珠岩和椰糠混合,移栽前,基质用35%的甲醛溶液20 ml/L稀释液淋透15 d后使用,移栽时,将已生根且经炼苗的合格试管苗取出,用自来水冲洗干净基部的培养基,然后种植在装好基质的育苗筛上并盖上塑料盖保湿,3 d后逐渐打开塑料盖,7 d后把塑料盖完全打开。种植后第1~2天喷急救回生丹一次,以后每周喷多菌灵或甲基托布津或急救回生丹和1/2MS无机成分溶液或"花多多"一次,每天根据天气及基质干湿情况进行喷水,注意基质不能过湿,特别是冬季和早春,否则容易引起烂根而引致幼苗死亡,影响移栽成活率。60 d后可出圃销售或移栽到花盆种植。试管苗移栽环境的温度在一年中随季节的变化而变化,其高低影响着试管苗移栽的成活率。从多次大量移栽试验的结果看,一年中不同季节移栽的成活率呈现出差异,其中早春和冬季移栽的成活率比较低,如移植条件达不到要求,尤其是移植环境无法增温的情况下,则应避开早春和冬季移植;晚春和秋季移栽的成活率最高,在90%以上,其次是夏季,在70%~90%之间。

3 结论与讨论

3.1 经过多年的摸索研究,总结了海南龙血树组织培养繁殖育苗的成熟技术,应用该技术方法已能进行工厂化生产育苗,速度快、生产量大,年产量可达200万株。其主要技术指标为芽继代增殖达到每月增加2.15倍,芽诱导生根率为90%~95%,试管苗移栽成活率达到80%~90%。

3.2 对海南龙血树芽诱导、继代增殖的培养过程中诱导的不定芽出现过褐化和"玻璃化现象"[2],通过减少切割伤口和缩短转移时间可降低和防止材料的"褐变"[3],而降低激素的浓度可防止不定芽的玻璃化现象。

3.3 在继代增殖培养和生根培养过程中,不但激素的种类及浓度对芽苗生根率有影响,而且生根培养环境的温度对其也有很大的影响。其中芽苗对NAA的反应比较敏感,较低的浓度梯度就能引起生根率的大幅度改变和根生长的不正常,而对IBA则相对比较迟钝,其生根率不高,变化不大;幼芽对生根培养环境的温度较敏感,如低于15℃和高于32℃就很难生根,一般要求在20~25℃左右比较合适,而芽的增殖培养,如温度

维普资讯 http://www.cqvip.com

高于34℃就会引起材料枯黄死亡。

3.4 组织培养工厂化生产育苗生产效率与试管苗增殖的快慢有关，而试管苗移栽成活率的高低与生根苗的强壮程度有着密切的关系。在试管苗移栽及管理过程中，培养强壮的生根苗是移栽成活的前提，而温度和水分的控制是提高移栽成活率的主要措施。因此，培育壮苗，选择晚春和秋季进行移栽、适当提高移栽环境的湿度(90%以上)，控制基质的水分，可提高试管苗移栽的成活率，使移栽成活率达到90%左右。这样可提高试管苗增殖速度，使工厂化生产育苗获得成功。

3.5 在芽诱导培养过程中发现诱导培养增殖形成的丛生芽多且密，并有部分芽产生玻璃化现象，因而有必要进行芽增殖继代培养及壮芽培养的筛选试验。

参考文献

[1] 林秀春，钟琼芯，庞日名. 关于小花龙血树资源的开发利用与保护问题[J]. 海南师范学院学报：自然科学版，1991，4(1)：76-78.

[2] 蔡祖国，符树根，黄宝祥，等. 植物组织培养中玻璃化现象的研究进展[J]. 江西林业科技，2005(2)：35-37.

[3] 陈惠娟. 植物组织培养中褐变的产生机理及克服措施[J]. 植物保护，2005，31(2)：79-81.

The Study on Rapid Tissue Culture Propagation Technology of *Dracaena cambodinna*

He Xujun[1] Liu Shanhui[1] Feng Yuanlai[2] Lin Xiaoping[1] Zhang Huatong[1]

(1. Guangdong Forestry School, Guangzhou, 510520; 2. Shenzhen Landscape Flower and Tree Corporation)

Abstract The excellent plant apical bud and stem were used as explant in some contrast experiment about Induction of bud differentiation, elongation, multiplication and radication with different concentrations of auxetic, auxin, various combination of culture medium concentration and transplant survivable ratio of the tube seedling in different moisture, temperature and medium. The results show that: the culture medium of MS + 30 g/l sucrose + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L is suitable for the induction of bud formation, MS + 30 g/Lsucrose + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.02 mg/L can be applied in bud multiplication, MS + 30 g/L sucrose + 6-BA 0.5 mg/L is fit for robust bud elongation, and the suitable medium for bud radication induction is 1/2MS + 15 g/L sucrose + NAA 0.2 mg/L. The application of compound medium of peat soil, coco - husk and perlite powder in tub seedling transplant in late spring and autum will make the transplant surviable ratio come to about 90% that is up to the deamand of the seedlings industrial production.

Key words *Dracaena cambodinna*, tissue culture, culture medium