

香龙血树组织培养研究

漆丽萍¹, 马剑¹, 李剑美¹, 李援龙², 强继业¹ (1. 普洱学院, 云南普洱 665000; 2. 昆明嘉滨商贸有限责任公司, 云南昆明 650000)

摘要 [目的]通过香龙血树组织培养技术研究,建立香龙血树再生繁殖体系。[方法]以茎段作为外植体,探索最适灭菌时间以及诱导培养基及增殖培养基最适 6-BA 和 NAA 的浓度组合。[结果]灭菌最适宜时间 9 min;以 MS 作为基本培养基,诱导培养最适的 6-BA 和 NAA 浓度组合:2.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA 易诱导长出出芽,5.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA 和 5.0 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA 易诱导形成愈伤组织;以 MS 作为基本培养基,增殖培养最适 6-BA 和 NAA 浓度组合:3.0 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA。[结论]利用带腋芽茎段作为组织培养的外植体可迅速建立香龙血树离体快繁体系。

关键词 组织培养;香龙血树;带腋芽茎段;快速繁殖

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)34-0071-04

Study on Tissue Culture of *Dracaena fragrans*

QI Li-ping, MA Jian, LI Jian-mei et al (1. Puer University, Puer, Yunnan 665000; 2. Kunming Jiabin Commerce Limited Liability Company, Kunming, Yunnan 650000)

Abstract [Objective]The regeneration and reproduction system of *Dracaena fragrans* was established via tissue culture. [Method]The optimal sterilization time and the concentration combination of 6-BA and NAA for induction and proliferation media were determined using stem segments as explants. [Result]The optimum sterilization time was 9 minutes. For the MS basic medium, the optimal concentration combinations of 6-BA and NAA for clumpy buds induction, callus formation and proliferation culture were 2.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA, 5.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA and 5.0 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA, and 3.0 mg/L 6-BA and 0.10 mg/L NAA, respectively. [Conclusion]The propagation system of *D. fragrans in vitro* could be rapidly established by using stem segments with axillary bud as explants for tissue culture.

Key words Tissue culture; *Dracaena fragrans*; Stem segments with axillary bud; Rapid propagation

龙血树(*Dracaena cambodian*)属于百合科龙血树属,树叶为线状披针形,簇生于枝条顶端,树形极具特点,可塑性强,可以根据人的意愿塑造出不同形状,树干古朴沧桑,同时还能在顶部萌发新枝,给人一种沉稳而不失朝气的感觉,且十分耐阴,可在室内盆栽多年仍然绿意盎然,是园林绿化及家庭盆栽的名贵树种,具有很好的观赏价值。同时药用价值极高,具有止血、生肌、行气等功效。

香龙血树(*Dracaena fragrans*)是百合科龙血树属植物,别名也门铁、大龙血树、香千年木、巴西木、巴西铁树、山德氏龙血树^[1-4]。香龙血树茎干挺拔,株形整齐,是重要的室内观叶树种;其小花具有浓烈的香气,因此是良好的香味树种;它喜光照充足、高温、高湿环境,耐阴、耐干燥,多生长于热带或亚热带地区^[5]。也门铁具有绿叶也门铁品种,后来又相继出现了金心也门铁、金斑也门铁和金边也门铁新品种,成为近年来异军突起的时尚观叶植物新宠^[6]。香龙血树为单茎直立灌木,叶丛生于茎顶,无柄叶长宽线形,叶缘具波纹,呈深绿色,常见品种包括金边香龙血树(*cv. Victoriae*),叶缘深黄色带白边;金心香龙血树(中斑香龙血树)(*cv. Massangeana*),叶面中央具黄色纵条斑;黄边香龙血树(*cv. Linderi*),叶缘淡黄色;银边香龙血树(*cv. Lindeniana*),叶片边缘乳白色^[4,7]。这些品种与上文提到的也门铁新品种是相同变种。

2007年春,广东大规模推广种植的也门铁呈现爆发式开花,开花率为80%~90%,而按照以往种植经验也门铁是很少开花,尤其是种植3年以下的幼株鲜有开花,由于花后死亡的传言让漂亮成品滞留花场,但也门铁爆发式开花涉及内因

和外因,原因尚待考证^[8]。实际上香龙血树需经过多年才能进入开花期,香龙血树室内栽培很少开花,观察发现,香龙血树在北方室内栽培13年才首次开花,香味浓烈,但开花后不能结果^[5]。香龙血树目前多采用扦插法繁殖^[1,7]。但由于香龙血树为直立单茎灌木,分枝极少,扦插繁殖不能满足大规模种苗需求,而组织培养途径可以有效地解决市场种苗短缺的问题^[2]。目前关于香龙血树组织培养方面的研究报道较多,组织培养多采用MS作为基本培养基,培养基中添加的植物生长调节物质有6-BA、IAA、IBA、KT、NAA等,通常以顶芽、嫩茎段、腋芽、叶片作为外植体进行接种,都取得了较好的结果^[2,9-13]。笔者对香龙血树品种的组织培养技术进行研究,以期建立龙血树品种快速繁殖体系,为满足园林绿化苗木和市场对药用资源的需求并进行规模化生产提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料 香龙血树顶芽和带腋芽茎段取自于喜庆园林责任有限公司,取材时间是正午。

1.2 方法

1.2.1 外植体预处理。采集外植体前应对母株或器官的生长环境进行评估(有害微生物的滋生程度),这是灭菌的重要依据。为了减少在组织培养中的褐化,可以对材料进行避光保湿(用湿润的毛巾包裹,装到避光处理的容器中),然后对外植体进行修整,切除枝条上的叶片及附属物,用软毛刷在流水下进行刷洗,清洗好以后,用毛巾把水吸干,然后将外植体剪成带2~3个节的茎段,最后再用流水冲洗。龙血树属于木本植物,容易褐化,所以材料需要在流水下冲洗12 h,才能彻底冲洗净外植体表面所附带的泥土、虫卵、病菌孢子。

1.2.2 外植体灭菌。对预处理的外植体用75%乙醇擦拭,然后拿到超净工作台上用紫外灯消毒30 min,接着用0.1%升汞

基金项目 云南省教育厅科学研究基金项目(2017zzx049);普洱学院高层次人才科研启动经费项目(K2015033)。

作者简介 漆丽萍(1983—),女,四川威远人,讲师,博士,从事遗传育种研究。

收稿日期 2018-05-01

消毒处理 5~10 min, 每种处理用 20 个外植体。将外植体接种于 MS 培养基中, 45 d 后统计外植体的污染率、存活率, 筛选龙血树外植体最佳消毒时间。污染率指污染芽数占总接种芽数的比例; 死亡率指未污染芽中死亡芽数占总接种芽数的比例; 存活率指未污染芽中存活芽数占总接种芽数的比例。

1.2.3 香龙血树诱导培养。以带腋芽茎段为外植体接种到诱导培养基上, 诱导培养基配方: MS+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂+0.3 g/L 活性炭+6-BA+NAA, 6-BA 设置 2.0、5.0 mg/L 2 个浓度, NAA 设置 0.20、0.50、1.00 mg/L 3 个浓度。6 种诱导培养基配方见表 1, 每个培养基处理接种 20 个外植体。

表 1 诱导培养基配方

Table 1 Induction medium formulation

编号 Number	基础培养基 Basic medium	6-BA mg/L	NAA mg/L
1	MS+30 g/L 蔗糖+	2.0	0.20
2	6 g/L 琼脂+	2.0	0.50
3	0.3 g/L 活性炭	2.0	1.00
4		5.0	0.20
5		5.0	0.50
6		5.0	1.00

1.2.4 香龙血树增殖培养。以诱导培养获得的不定芽为外植体接种到增殖培养基上, 增殖培养基配方: MS+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂+0.3 g/L 活性炭+6-BA+NAA, 6-BA 设置 2.0、3.0 mg/L 2 个浓度, NAA 设置 0.05、0.10、0.50 mg/L 3 个浓度。6 种增殖培养基配方见表 2, 每个培养基处理接种 10 个外植体。

表 2 增殖培养基配方

Table 2 Proliferation medium formulation

编号 Number	基础培养基 Basic medium	6-BA mg/L	NAA mg/L
7	MS+30 g/L 蔗糖+	2.0	0.05
8	6 g/L 琼脂+	2.0	0.10
9	0.3 g/L 活性炭	2.0	0.50
10		3.0	0.05
11		3.0	0.10
12		3.0	0.50

1.3 诱导培养和增殖培养条件 温度(25±2)℃, 光照时间 12~14 h/d, 光照强度 1 500~3 000 lx, 光质为 T4 灯管发出的光。

表 4 不同浓度 6-BA、NAA 对香龙血树诱导形成愈伤组织和诱导长芽的影响

Table 4 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on callus and buds induction in *Dracaena fragrans*

编号 Number	愈伤组织块数 Number of callus//块	愈伤组织诱导率 Induction rate of callus//%	诱导长芽块数 Number of induced sprout //块	诱导长芽率 Rate of induced sprout //%	出芽总数 Total number of sprout 个	平均长芽数 Average number of buds//个
1	2	10	11	55	88	8.0
2	4	20	6	30	31	5.2
3	6	30	4	20	25	6.3
4	8	40	2	10	8	4.0
5	7	35	3	15	12	4.0
6	5	25	6	30	35	5.8

1.4 统计公式 各处理均在培养 45 d 后统计结果, 记录诱导率、出芽情况、芽增殖倍数及生长状况。诱导率=[形成愈伤组织的茎段数/(接种总的茎段数-污染数)]×100%; 芽增殖倍数=(增殖后芽总数/增殖前芽个数)×100%。

1.5 统计分析 数据采用 Excel 2010 进行分析。

2 结果与分析

2.1 外植体最佳灭菌时间筛选 由表 3 可知, 灭菌 9 min 效果最好, 灭菌存活率最高, 死亡数相对较低, 污染率较低。

表 3 不同灭菌时间对香龙血树组织培养的影响

Table 3 Effects of different sterilization time on tissue culture of *Dracaena fragrans* %

灭菌时间 Sterilization time//min	污染率 Contamination rate	死亡率 Mortality	存活率 Survival rate
5	35	25	40
6	35	35	30
7	30	35	35
8	25	35	40
9	20	30	50
10	15	50	35

2.2 外植体诱导培养 由表 4 可知, 外植体在接种 45 d 后, 1~6 号培养基都有愈伤组织形成(图 1), 其中 4 号培养基诱导形成愈伤组织数量最多, 诱导率为 40%, 其次为 3 号培养基, 诱导率为 35%。由此可见, MS+5.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA 和 MS+5.0 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA 更易诱导形成愈伤组织, 并具有分化能力; 1~6 号培养基都诱导长出芽(图 1), 其中 1 号培养基(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA)更易诱导长芽。综合看来初代培养中每种培养基都有较好的效果。

2.3 不定芽增殖培养 从表 5 可以看出, 8 号和 11 号培养基增殖倍数最高为 2.0, 8 号培养基不定芽有 2 株长出根, 生长良好(图 2), 11 号培养基不定芽长势好, 叶片绿; 7 号培养基增殖倍数为 1.9, 但不定芽生长缓慢, 有一些开始变黄; 9 号和 10 号培养基增殖倍数为 1.6, 9 号培养基不定芽长根同时带有红色分泌物附着在培养基表面, 10 号培养基不定芽长势不明显, 有红色分泌物附着在培养基表面(图 3); 12 号培养基增殖倍数最低为 1.5, 但不定芽长势好, 叶片绿。综合看来 11 号培养基增殖效果最好(图 4)。



图1 茎段诱导形成愈伤组织和芽

Fig.1 Callus and buds induced from stems

表5 不同浓度的6-BA、NAA对香龙血树不定芽增殖倍数的影响

Table 5 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on adventitious bud multiplication of *Dracaena fragrans*

编号 Number	45 d 后总芽数 The total number of buds after 45 days //个	增殖倍数 Proliferation multiple	生长情况 Growing situation
7	19	1.9	生长缓慢,有些变黄
8	20	2.0	有2株长根,生长良好
9	16	1.6	有4株长根同时带有红色分泌物
10	16	1.6	长势不明显,有红色分泌物
11	20	2.0	增殖倍数高,长势好,叶片绿
12	15	1.5	长势好,叶片绿



图2 增殖分化长出的根

Fig.2 Roots from proliferation and differentiation

3 结论与讨论

组培香龙血树用到的是长了2~3个月的枝条,选用的都是解剖刀能切割下来的带腋芽茎段,外植体灭菌过程中要根据植物的生长环境以及生长时间来制定灭菌时间,需严格执行,探索中发现用升汞灭菌9 min 能达到灭菌效果,诱导过程中存活数最高,死亡数较少,这与黄莉雅等^[14]研究结果一致。

香龙血树接种在培养基MS+30 g/L蔗糖+6 g/L琼脂+0.3 g/L活性炭+2.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA 上更容易诱导长出丛芽,在培养基MS+30 g/L蔗糖+6 g/L琼脂+0.3 g/L活性炭+5.0 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA 和MS+30 g/L蔗糖+6 g/L琼脂+0.3 g/L活性炭+5.0 mg/L 6-BA+0.50 mg/L



图3 增殖过程中产生的红色分泌物

Fig.3 Red secretions produced during proliferation



图4 增殖分化长出的丛芽

Fig.4 Cluster buds after differentiation

NAA 上更容易诱导形成愈伤组织,形成的愈伤组织经诱导分化能长出生长健壮的苗。

血竭来源于自然界中生长10年以上的龙血树,这种龙血树受到刻伤、病害、虫害,才会分泌一种红色的液体附在伤口表面,在增殖培养中发现,有些培养基表面附有一些红色分泌物,可能是血竭。杨本鹏等^[15]在海南龙血树组织培养过程中进行了不同生长调节剂及浓度对血竭形成诱导的研究,结果表明在含有GA₃、KT、AD、NAA、2,4-D和IAA这6种生长调节剂的培养基上均不产生红色,只有在含6-BA的培养基上才能诱导龙血树无菌组培苗产生血竭,且诱导血竭与6-BA浓度无关。该试验中每种培养基均含有6-BA,但并不是所有培养基均能产生红色分泌物,可能是由于除了6-BA外,培养基中还含有NAA;也可能是取材不同造成的。该研究中的香龙血树形成“血竭”对生长调节剂和浓度要求与海南龙血树不一样。在组培过程中生产出血竭是非常有意义的,能有效地推动药用植物在组培过程中的实践与发展,但该试验中红色分泌物是否为血竭结果还有待证实。

继代培养过程中2.0 mg/L 6-BA和0.10 mg/L NAA组合培养基上长出了根,对组培苗驯化,将其移栽到自然环境中,有1株和其他香龙血树明显不一样,在叶片上出现了金边

(图 5a), 而野生型植株叶色表现全绿(图 5b), 可能是体细胞变异, 使香龙血树表现型出现了差异, 虽然市场上已经有金边香龙血树, 但该研究中的金色叶缘变异和现有的金边性状

还存在很大差异, 可能是一种新的变异类型。这种变异产生的原因是否属于可遗传的变异, 以及后代能否 100% 保持这种变异还有待进一步研究。



注: a. 金色叶缘(突变型); b. 正常叶缘(野生型)

Note: a. Golden leaf margin (mutant); b. Normal leaf margin (wild type)

图 5 生根香龙血树移栽后表现

Fig.5 Performance of rooted *Dracaena fragrans* after transplantation

参考文献

- [1] 刘志政, 张广楠. 香龙血树的扦插与栽培技术[J]. 青海农林科技, 2004(2): 59-60.
- [2] 刘颂颂, 朱剑云, 何业华, 等. 也门铁工厂化育苗技术[J]. 经济林研究, 2006, 24(4): 71-73.
- [3] 刘和平, 何业华, 林剑波, 等. 也门铁及其嵌合体叶绿素合成特性研究[J]. 北方园艺, 2011(14): 120-122.
- [4] 杜文成. 香龙血树[J]. 花木盆景(花卉园艺), 2004(11): 30-31.
- [5] 李锦, 李彦明. 北方室内盆栽香龙血树[J]. 中国花卉园艺, 2007(18): 40-41.
- [6] 胡一民. 时尚观叶新宠——也门铁[J]. 中国花卉盆景, 2007(1): 8-9.
- [7] 卢思聪. 香龙血树及其常见同属植物[J]. 中国花卉盆景, 1998(1): 4-6.
- [8] 钟志权. 关于也门铁爆发式开花[J]. 花木盆景(花卉园艺), 2007(8): 28.

- [9] 陈兴华, 何旭君, 张华通, 等. 也门铁组培工厂化育苗技术路线[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2010, 23(2): 21-24.
- [10] 陈丽文, 杨利平, 荣慧, 等. 金心也门铁工厂化育苗技术研究[J]. 北方园艺, 2013(13): 138-141.
- [11] 何业华, 刘和平, 刘颂颂, 等. 也门铁嵌合体品种在离体培养中的变异规律及调控[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(2): 70-73.
- [12] 侯占铭, 满都拉. 香龙血树和紫铁的组织培养与快速繁殖[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2001, 32(6): 642-643.
- [13] 易清, 何业华, 刘颂颂, 等. 3个也门铁品种高效离体繁殖体系的建立[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(4): 440-446.
- [14] 黄莉雅, 陈国臣, 马锦林. 剑叶龙血树芽外植体诱导分化[J]. 广西林业科学, 2010, 39(3): 144-146.
- [15] 杨本鹏, 张树珍, 蔡文伟, 等. 海南龙血树组织培养过程中血竭形成的诱导[J]. 热带作物学报, 2009, 30(2): 181-185.

(上接第 70 页)

3 讨论

分子标记技术能从分子水平上反映生物个体间差异, 具有较高的多态性与重演性, SSR 分子标记技术用于作物纯度鉴定已是成熟的技术, 能以较小的成本、较短的时间准确、稳定地鉴定品种的纯度。该研究从均匀分布在水稻染色体上的 48 对 SSR 引物中筛选到 18 对用于鑫两优 212 杂交种纯度鉴定, 选用其中的 3 对引物可以快速、较为准确地鉴定出鑫两优 212 纯度。从筛选的 18 对引物中筛选特异性较强的引物组合对鑫两优 212 杂交种进行鉴定, 能够减少很多的工作量和成本, 且效果更好, 可靠性更高。

利用 SSR 分子标记技术进行纯度鉴定时, 有些与杂交种带有明显差异的单株在种植鉴定时并不一定表现出表型性状的差异, 因此 SSR 分子标记技术用于纯度鉴定时, 可以有效鉴别出大田无法确定的表型以及难以鉴别的植株, 因而分子鉴定和种植鉴定结果必然存在一定的差异, 而种植鉴定是最符合生产实践的纯度鉴定方法, 如何使分子鉴定结果更接近种植鉴定、更好地辅助种植鉴定结果还需进一步研究。

参考文献

- [1] 王兆贤, 高前宝, 王友存, 等. 两系杂交水稻纯度检测方法探讨[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(10): 5011-5034.
- [2] 乔兰兰. 利用 SSR 分子标记鉴定杂交稻种子齐两优 918 纯度[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(17): 120, 129.
- [3] 叶尚. 利用温泉热能与控光技术鉴定杂交稻种子纯度的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004.
- [4] 李召华, 朱克永, 陈祖武, 等. SSR 分子标记技术在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用[J]. 杂交水稻, 2006, 21(4): 11-14.
- [5] 黄成志, 黄文章, 严明建, 等. 利用 SSR 分子标记鉴定杂交水稻真伪与纯度[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3437-3438.
- [6] 吕桂兰, 丁芬, 沈枫, 等. SSR 标记技术在水稻遗传育种中的应用[J]. 北京水稻, 2007(3): 23-26.
- [7] 张琳, 杜娟, 齐丽霞, 等. SSR 标记在杂交早稻新组合纯度鉴定中的应用[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(3): 502-506.
- [8] 陈荣林, 黄运川, 唐梅, 等. SSR 分子标记检测超级杂交稻桂两优 2 号种子纯度的研究[J]. 杂交水稻, 2013, 28(4): 75-78.
- [9] 阳庆华, 李秀琼, 鲁孟海. SSR 分子检测与田间小区种植鉴定两优 6 号纯度的比较[J]. 中国种业, 2014(7): 49-50.
- [10] 肖子发, 朱克永, 刘之熙, 等. 利用 SSR 标记构建湖南省审杂交水稻品种 DNA 指纹图谱[J]. 杂交水稻, 2011, 26(3): 51-56.
- [11] 周桂林, 范家萌, 周贤达, 等. 两系超级稻丰两优四号指纹图谱构建及纯度快速鉴定[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(13): 138-141.
- [12] 尤佳, 王晋, 王朝慧, 等. 应用 SSR 技术鉴定杂交种种子纯度的方法探究[J]. 种子, 2015, 34(5): 46-49.
- [13] 王文余, 陈海洲, 张孝国, 等. 两系杂交早稻鑫两优 212 的选育与应用[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(18): 39, 63.