

棕榈藤继代培养增殖和成苗特性的研究^{*}

刘 英 曾炳山 许煌灿 尹光天

摘要 本文研究了黄藤、短叶省藤、单叶省藤及其同一藤种不同家系之间在组织继代培养过程中增殖和成苗特性及其变化规律;观察比较繁殖体的各继代增殖速度及增殖芽苗的形态特征和生长情况;揭示继代繁殖 3 个发育过程,即驯化适应期、适应繁殖期和衰老期,讨论了繁殖体在一代培养过程中愈伤恢复、迅速增殖和增殖衰老的阶段性变化特性。确定 3 个藤种继代培养合适的代数 and 培养时间。

关键词 棕榈藤、继代培养、繁殖体、增殖、成苗特性

植物组织培养苗各培养阶段的生长特性,对苗木快速繁殖,实现工厂化生产起着重要的作用。掌握其特性和生长规律,在培养过程中可把握适时更新培养材料,达到快繁壮苗的目的。国内这一研究仅见观赏植物——杜鹃的观察研究报告^[1],而国内外文献虽见棕榈藤组培技术的观察研究^[2~6],然而,也未见对组培苗各阶段生长特性研究报告。本研究是通过我国 3 种主要商品藤种——黄藤(*Daemonorops margaritae* (Hance) Becc.)、短叶省藤(*Calamus egregius* Burret)、单叶省藤(*Calamus simplicifolius* Wei) 组培苗各生长发育阶段的观察,力求摸清其特性和变化规律,为棕榈藤植物快速繁殖和苗木的工厂化生产提供依据,同时为其它植物苗木的快速繁殖提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

取单叶省藤 6 个家系、短叶省藤及黄藤混合材料 2 批作为试验材料。单叶省藤和黄藤材料采集于广东省高州市伦道藤场,短叶省藤材料采集于本所藤种收集园;3 种藤种的第一批材料为 1992 年采集,经脱分化继代增殖培养 4~5 代的增殖培养芽苗,第二批黄藤和短叶省藤培育观察材料为 1993 年脱分化胚培养的材料。

1.2 方法

1.2.1 增殖培养 选择生长旺盛、形态正常的各藤种或家系芽苗为繁殖体,用经筛选的特定培养基,连续继代培养 7~10 次,每代 30 d。在一代增殖培养过程中,每 10 d 观察增殖的生长情况,确定继代时间。在每次接种前 2~3 d,随机抽取 30 瓶(每瓶 3~4 个植体)观测繁殖体芽苗增殖倍数、生长情况。

1995—09—12 收稿。

刘英助理工程师,曾炳山、许煌灿、尹光天(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

^{*} 本项研究为国家自然科学基金“棕榈藤萌蘖机理的研究”和“八五”攻关专题“泡桐无病毒苗和棕榈藤种苗快速繁殖工艺”内容之一。

1.2.2 伸长培养 采用1992年第一批脱分化的芽苗,从第7代至第12代,对各藤种(家系)在固定的抽高生长培养基中进行试管苗培养。取芽形态正常、苗高1cm左右,未开始抽高的芽苗作为试材。定时(30d,60d)定瓶(30瓶)观测苗高生长的生根情况。苗高测定以培养基凹面至最长叶尖的长度。统计分析该阶段的生长特性及其规律。

1.2.3 生根诱导 使用改良的MS培养基(SG2),利用经伸长培养出来的各继代高2cm以上的无根苗进行生根诱导,隔天观察始根期,定瓶观测生根情况,统计生根诱导结果,分析各藤种的生根特性。

1.2.4 资料整理和统计分析 试验数据按藤种和家系分别统计各观测指标的平均值,并对主要观测指标值的百分率和增殖倍数分别按反正弦和平方根变换,作双因素方差分析,比较各藤种或家系间的差异。

2 结果分析与讨论

2.1 继代增殖特性

2.1.1 继代增殖的一般规律 3个藤种和单叶省藤不同家系继代培养增殖试验结果表明:初转接增殖时,其增殖倍数较低,增殖率亦低;随着继代次数的增加,其增殖倍数逐渐提高。这一现象在其它观赏植物组培中也出现^[1]。对这一现象的解释是:在嫩芽中逐步积累了较多的细胞分裂素,并逐渐适应了培养条件,通常将这一过程叫做驯化阶段;植物组织对细胞分裂素和生长素的要求也会有所降低;当继代增殖培养到达一定代数后,增殖倍数到达最高点,随后慢慢下降(见图1,2),同时,芽苗逐渐变得肥大、结构疏松、颜色变白或逐渐变得圆短、结构紧密、颜色浓绿,出现不正常形态芽苗。芽苗随着继代的增加而老化的现象,可能的解释是幼芽随着继代的增加,体内激素不断积累,而幼苗已经适应高速繁殖的生长条件,对激素浓度及配比的要求发生变化。试验证明,根据繁殖体芽苗增殖变化情况及芽苗形态特征,适时适当降低外源激素浓度或改变外源激素配比,能改善幼苗形

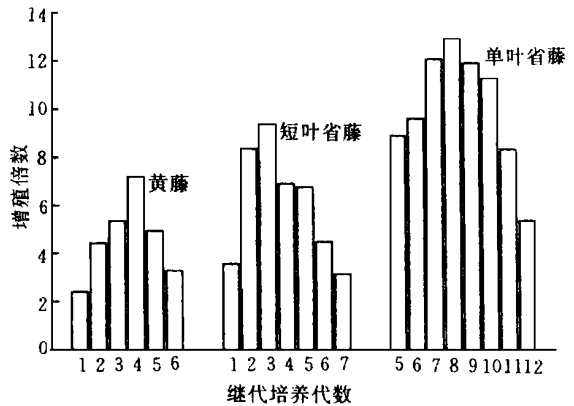


图1 不同藤种继代培养的繁殖体芽苗增殖倍数

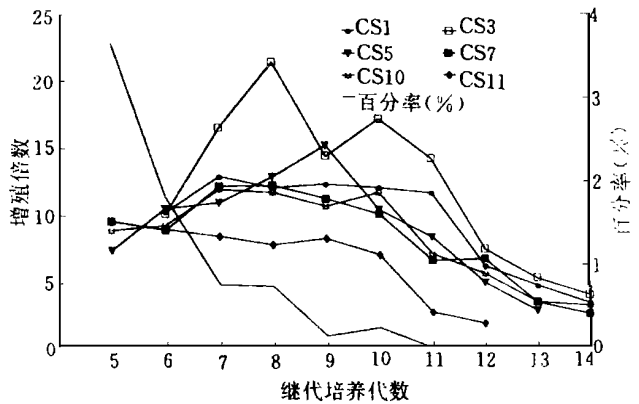


图2 单叶省藤不同家系继代培养繁殖体芽苗增殖倍数

(CS1~11表示单叶省藤各家系)

态、颜色, 提高增殖倍数, 延长培养材料的老化时间, 提高成苗率。

从单叶省藤多个家系试验结果(图2)中可以看出, 继代增殖的变化规律可分3个阶段: (1) 驯化适应期: 此时, 苗木在逐渐适应高激素浓度的生长环境, 繁殖体芽苗增殖倍数低, 增殖率亦低, 产生的4 cm以上的芽苗逐代变少。(2) 适应繁殖期: 芽苗已适应培养条件, 很少有4 cm以上芽苗产生, 增殖倍数高, 增殖率亦高。(3) 衰老退化期: 无4 cm以上芽苗产生, 出现芽苗老化、粗大、肥胖、结构疏松, 甚至死亡等现象, 继代增殖倍数迅速下降, 增殖率低, 家系间存在着差异, 个别家系(CS11)出现略早到达适应繁殖期, 故图2未能显示驯化适应期。

单叶省藤的驯化适应期为6个月(连续继代培养6次), 适应繁殖期为4~5个月(再连续继代4~5次), 衰老退化期很短, 衰老迅速。建议在继代增殖培养的适应繁殖期的前期, 在原有外源激素水平配比上及早降低激素浓度, 因为此时芽苗对外源激素的要求降低; 当继代培养到适应繁殖期的后期, 应根据繁殖体芽苗形态, 尽早改变外源激素水平或配比, 延缓繁殖体老化或准备更换新的培养材料, 从而提高增殖倍数, 达到继代所需要的繁殖系数。

在同一种培养基上, 对3个藤种连续7代继代培养观察结果的方差分析表明(表1), 繁殖体芽苗增殖倍数在不同藤种间及培养代数间的差异均达到极显著水平($P < 0.01$), 即藤种不同对培养基的要求也不同, 要达到高的繁殖系数, 必须进行各藤种培养基的筛选。

对单叶省藤6个家系连续8次继代培养增殖倍数进行二元方差分析结果(表2)表明, 无论是家系还是不同代数之间的差异都达到了极显著水平($P < 0.01$), 即同一藤种的不同家系间, 其继代增殖倍数存在着极大差异, 说明要达到高的繁殖系数, 应选择合适的家系作为繁殖材料。

2.1.2 繁殖体在培养过程中的生长和变化特性 为了分析繁殖体在一代培养过程中增殖的变化规律, 对黄藤增殖高峰期(第五代)作了连续两个月的观测, 结果表明, 芽的数目不断增加, 累计增殖芽数变化基本上呈S型曲线, 而增殖速度(每10 d增加的芽数)呈钟形曲线(图3), 繁殖体一代增殖过程中, 大概可分为3个时期:

(1) 愈伤恢复期(0~20 d)——这个时期从接种至出现褐化物, 并且其

表1 3个参试藤种继代培养繁殖体芽苗增殖倍数的方差分析

变源	平方和	自由度	平方平均数	F值
藤种	1.066 703 64	2	0.533 351 82	7.449 218 95**
代数	4.684 750 34	6	0.780 791 72	10.905 162 9***
误差	0.859 180 26	12	0.071 598 35	
总和	6.610 634 24	20		

表2 单叶省藤不同家系继代培养繁殖体芽苗增殖倍数的方差分析

变源	平方和	自由度	平方平均数	F值
家系	5.784 805	5	1.156 961	14.440 01***
代数	14.570 46	7	2.081 494	25.979 08***
误差	2.804 267	35	0.080 122	
总和	23.159 53	47		

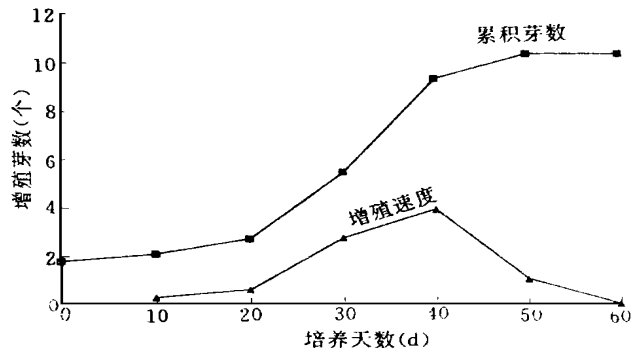


图3 一代培养过程中繁殖体增殖芽变化过程

颜色由浅至深逐渐达到相对稳定或愈伤组织生长稳定为止。此期,母芽很少增殖,增殖倍率很低,芽较细弱。

(2) 迅速增殖期(21~40 d)——此期的褐化物含量已经稳定,幼芽数量逐渐增加,幼芽生长旺盛,增殖倍率高,但幼芽小而嫩,尚不适于继代培养。

(3) 衰老期(41~60 d)——随后增殖芽数逐渐减慢,增殖倍率下降。这时,新增殖的芽生长已基本稳定,母芽开始老化,培养基中的营养成分几乎耗尽,需要及时继代培养,以利于下一代芽的增殖。

这一变化规律与其它作物悬浮细胞培养过程中细胞数目的变化规律基本相似^[7]。试验结果表明,黄藤的愈伤恢复期为20 d,迅速增殖期也持续20 d,一般于接种后50 d继代增殖培养一次较好。单叶省藤和短叶省藤一般30 d左右继代培养一次较佳。

2.1.3 繁殖体上母芽数量对增殖的影响 接种繁殖体的母芽数量(个数),对继代增殖倍数及继代培养过程中所需时间的长短亦有影响。通过多代的观察发现,单叶省藤和短叶省藤等容易产生愈伤组织的藤种,对繁殖体的大小反应灵敏,差异小。常用1个母芽作繁殖体,但母芽太小无法分开时,可用2~3个母芽作为繁殖体,均能取得较好的增殖倍率。而黄藤由于在继代转接受伤后很少出现愈伤组织,且大多出现褐化物,受伤后很难恢复。故繁殖体母芽数量的多少,直接影响到继代增殖倍率的高低及继代增殖所需的时间,甚至影响到繁殖体的成活。黄藤繁殖体以母芽3个左右,继代培养效果好。母芽数量少的嫩弱繁殖体,接种后,增殖慢甚至死亡,死亡率最高时达到30%。

经多次继代培养后的母芽高度对继代增殖率也有影响,一般已开始生长的母芽,连续多次继代培养仍继续抽高生长,只有约30%的少数繁殖体经多次继代培养后能重萌新芽。

在继代增殖培养过程中,4 cm以上的芽苗一般随着继代的增加而逐渐减少,大多数藤种或家系在第6、7代培养均有一定数量的4 cm以上芽苗,但第8代以后即少见。

2.2 继代高生长特性

对3个主要藤种的连续5代抽高生长调查表明(表3),藤种不同,其抽高生长的表现亦异。单叶省藤最易抽高生长,伸长培养60 d后,平均高生长为1.63 cm,平均最高苗生长为7.4 cm,萌芽率最高达43.4%,而抽高率及成苗率仅次于短叶省藤。繁殖体培养60 d后,少数芽苗开始出根,形成完整植株,成苗出根率占成苗量的5%左右。短叶省藤虽抽高生长略慢于单叶省藤,萌芽率低,但抽高率(平均74.8%)及成苗率(平均48.4%)最高,繁殖体培养60 d后,成苗出根率为10%左右。黄藤抽高生长较难,高生长亦慢,经伸长培养60 d后,平均高生长仅0.75 cm,不足单叶省藤的1/2,除其平均萌芽数高于前两个藤种外,其它各项主要高生长特性指标均低于前两个藤种。繁殖体培养60 d后,60%~70%的芽苗出根,与前两个藤种有很大差异。

综上所述,黄藤最难抽高生长,其次是短叶省藤,单叶省藤较易抽高生长,同时,黄藤最易生根,其次是短叶省藤,最难生根的是单叶省藤。

表3的观测分析结果表明:藤种不同,其继代高生长的变化规律也不一致。单叶省藤经数代继代培养后,平均高生长、成苗率、最高苗生长均随继代的递增而下降,据此可见其苗木质量随着继代的递增而下降。繁殖体培育过程中,各代均有萌芽现象,但代间无规律性变化,抽高率也无规律变化。短叶省藤与单叶省藤相近似,除继代抽高率随着继代的增加而下降,继代最高

苗生长无规律性变化外, 其余特性与单叶省藤相同。黄藤与前两个藤种有较大差异。高生长较稳定, 代间变化幅度小, 基本上呈直线型, 其余特性无规律性变化。

同一藤种的不同家系在继代抽高培养过程中, 平均高生长和平均成苗率在家系间均无显著差异, 然而在继代间则存在极显著差异(见表 4)。

表 3 3 个主要藤种繁殖体芽苗继代抽高生长调查结果

藤种	继代数	抽高率 ^① (%)	平均高生长 (cm)	成苗率 ^②	最高苗高 (cm)	萌芽率 ^③ (%)	平均萌芽数
短 叶 省 藤	7	96.5	2.48	103	9.0	67.4	5.0
	8	80.0	1.21	49.4	7.5	7.9	3.0
	9	80.4	1.13	50.0	6.0	39.1	4.8
	10	67.8	0.97	32.1	6.5	11.5	3.9
	12	49.4	0.91	7.3	7.0	3.4	0
	平均	74.8	1.34	48.4	7.2	25.9	3.3
单 叶 省 藤	7	70.8	2.47	40.0	10.2	53.4	5.0
	8	57.2	2.13	23.6	8.8	62.8	4.6
	9	55.0	1.82	22.7	9.6	44.4	3.7
	10	67.0	1.02	21.6	5.8	52.4	4.9
	12	40.0	0.72	6.7	2.8	4.0	1.3
	平均	58.0	1.63	22.9	7.4	43.4	3.9
黄 藤	7	72.2	0.75	17.8	3.8	7.8	3.0
	8	51.7	0.76	23.0	4.5	67.8	7.1
	9	73.3	0.77	18.9	7.0	46.7	4.5
	10	31.1	0.71	2.2	6.0	6.7	10.0
	12	74.2	0.74	13.8	4.0	22.2	6.2
	平均	60.5	0.75	15.1	5.1	30.2	6.2

①抽高率: 抽高生长的植体占接种植体的百分数。②成苗率: 抽高 1 cm 以上的芽苗占总接种芽数的百分比。③萌芽率: 在伸长培养基上继续萌芽的植体占接种植体的百分数。

表 4 单叶省藤不同家系繁殖体芽苗连续 5 次(60 d) 继代抽高培养高生长和成苗率方差分析

变源	高 生 长				成 苗 率			
	平方和	自由度	平方平均数	F 值	平方和	自由度	平方平均数	F 值
家系	0.252 295	3	0.084 098 33	0.288 1	0.015 294	3	0.005 098	0.535 4
代数	7.536 43	4	1.884 107 5	6.455 8**	0.378 814	4	0.094 704	9.947 4***
误差	3.502 13	12	0.291 844 17		0.114 246	12	0.009 52	
总和	11.290 855	19			0.508 354	19		

2.3 继代生根特性变化

连续多代的生根诱导培养观测结果表明(表 5), 在同代培养条件下, 黄藤的平均始根期最早, 短叶省藤次之, 单叶省藤最迟; 黄藤的生根率、平均根数、总根长等其它各项生根特性指标均比短叶省藤和单叶省藤高。短叶省藤除平均根数为 1.62 根/每植体, 与单叶省藤的 1.70 根/每植体接近, 平均始根期为 11.4 d, 较单叶省藤的 19.1 d 早外, 其它各项生根特性指标均较单叶省藤高。综上所述, 红藤最易生根, 短叶省藤次之, 单叶省藤最难。

为了解决单叶省藤生根难的问题, 对生根诱导 60 d 后未生根的芽苗进行第 2 次生根诱

导,采用两种不同的接种手段,第1种剪掉较老基部(a),第2种剪直幼嫩基部(b)。试验观测结果表明(表6),重复进行生根诱导,可以大大提高芽苗生根率,适当的接种手段不仅增加根条数,而且可提高出根率。

表5 不同藤种繁殖体芽苗生根诱导(60 d)调查结果

藤种	代数	始根期 (d)	生根率 (%)	平均根数 (条)	总根长 (cm)	平均根长 (cm)	最长根 (cm)	平均高生 长(cm)	相对高生 长(%)
单	7	22.0	30.9	2.21	2.22	0.98	3.52	1.89	52.2
叶	8	15.8	13.3	1.50	1.13	0.86	1.32	1.13	21.2
省	9	21.2	19.2	1.33	1.84	1.52	2.80	1.92	38.0
藤	10	17.5	49.7	1.78	5.44	3.20	9.50	1.94	54.6
	平均	19.1	28.0	1.70	2.63	1.64	4.29	1.72	41.5
短	7	7.5	61.2	1.85	4.81	2.60	9.00	1.79	54.4
叶	8	9.0	33.0	1.44	3.22	2.24	10.00	1.53	40.3
省	9	16.0	70.7	1.76	5.47	3.11	10.50	2.22	51.4
藤	10	13.0	20.6	1.43	4.11	2.88	7.0	3.07	70.0
	平均	11.4	46.4	1.62	4.40	2.71	9.12	2.15	54.0
黄藤	7	7.0	96.4	3.10	10.60	3.42	8.00	2.62	89.5

表6 单叶省藤繁殖体芽苗第二次生根诱导(60 d)观测结果

接种手段	生根率 (%)	总生根率 (%)	平均根数 (条)	总根长 (cm)	平均根长 (cm)	最长根 (cm)	须根率 (%)
a	90.5	93.2	1.16	6.53	5.64	6.05	23.8
b	95.6	96.8	1.82	7.93	4.35	5.98	22.8

3 结 论

(1) 棕榈藤类植物在继代组织培养过程中,根据其增殖速度可将其分成驯化适应期、适应繁殖期和衰老期。不同藤种和同一藤种不同家系的增殖速度表现出较大的差异,但它们的变化规律是基本一致的。利用组织培养技术,对棕榈藤类植物进行快速繁殖时,应根据不同藤种的增殖特性,确定具体的继代培养代数和更换培养材料的时间。试验研究结果表明,单叶省藤的继代培养代数为10~12代,继代培养时间约为1 a左右即需要更换新的培养材料。

(2) 在继代增殖培养的高峰期,对一代培养过程中增殖规律研究表明,其累计芽数呈S型曲线,而增殖速度则呈钟型曲线。其整个过程可以分成3个阶段,即愈伤恢复期、迅速增殖期和衰老期。对黄藤的观测结果表明,每个阶段持续20 d左右。

(3) 对繁殖体芽苗的伸长培养和生根诱导结果表明,参试的藤种在抽高生长速度上的排列顺序为单叶省藤大于短叶省藤大于黄藤,而其生根能力上的排列顺序为黄藤大于短叶省藤大于单叶省藤。

(4) 无论是增殖培养还是抽高生长培养,各藤种在培养继代间都存在极显著差异。一般来说,繁殖体在3~12代时增殖倍数较高,达到快速繁殖的技术指标。

参 考 文 献

- 1 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养.北京:中国林业出版社,1991.494.

- 2 庄承纪, 周建葵. 省藤组织培养的植株再生. 云南植物研究, 1991, 13(1): 97~100.
- 3 张方秋. 棕榈藤组织培养技术研究. 林业科学研究, 1993, 6(5): 486~492.
- 4 Ramanuja I V, Aziah M Y, Rao A N et al. Propagation of bamboo and rattan through tissue culture, Kuala Lumpur: The IDRC bamboo and rattan research network. 1990. 35~54.
- 5 Rao A N, Aziah M Y. Proceedings of the seminar on tissue culture of forest species, Kuala Lumpur: Forest Research Institute Malaysia, 1987, 45~69.
- 6 Bonga J M, Darzan D J. Tissue culture in forestry. London: Martinus Nijhoff/ Dr W Jank Publishers, 1982. 383~413.
- 7 张丕方, 倪德祥, 包慈华. 植物组织培养与繁殖上的应用. 上海: 上海教育出版社, 1985. 183.

A Study on the Characteristics of Rattan Tissue Sub-culture

Liu Ying Zeng Bingshan Xu Huangcan Yin Guangtian

Abstract This study deals with tissue sub-culture of three important commercial rattan species, namely *Calamus simplicifolius*, *Daemonorops margaritae* and *Calamus egregius*. Periodic characteristics of the propagule were observed among species and their families during the whole culture period. The results showed that the whole development period of sub-culture can be divided into three stages, i. e. adaptive stage, propagation stage and slow death stage. The study also revealed the development pattern in one generation, from callus recovery, rapid growth and aging. All these results provided important information for determining the appropriate time for transferring.

Key words rattan, tissue sub-culture, propagule, propagation, stock growth characteristics

Liu Ying, Assistant Engineer, Zeng Bingshan, Xu Huangcan, Yin Guangtian (The Research Institute of Tropical Forestry, CAF Guangzhou 510520).