

# 棕桐藤组培技术研究\*

张方秋

**摘要** 经对单叶省藤、黄藤和白藤组织培养系列试验证明：半成熟种胚是棕桐藤组织培养最佳外植体，在RM<sub>5-1</sub>和RM<sub>8-2</sub>培养基中，相继各培养50 d，即形成完整的试管苗；外植体在总盐浓度为6 899 mg/L的培养基中，置于690 lx光照度下每天照射16 h诱导愈伤组织效果最好；RM<sub>6</sub>是丛芽诱导和继代培养最理想培养基。一个外植体经一年的培养增殖，其理论繁殖系数为 $2.8 \times 10^5/a$ 。组培诱导分化的丛生苗切片显微观测结果显示：母芽节间距离极度缩短，当节部分生细胞发生分裂、密度加大时，即形成多个腋芽原基，继而发育成丛生无根苗。2年生苗木茎尖经组培诱导后，分生细胞直径变小，密度增大，核体积极异常扩大，呈明显的幼态特征，即具有组培复幼现象。

**关键词** 棕桐藤、组培、诱导、繁殖

棕桐藤经济价值高，社会需求量大，但资源十分短缺，常规的种子育苗因发芽率低、发芽时间长，种植后2~3 a生长缓慢、萌蘖率低而严重阻碍扩大栽培。60~70年代试用切干扦插、分根埋条、蘖芽分植等无性繁殖，未能获得理想效果<sup>[1]</sup>。80年代以来，国内外研究者探寻应用生物技术，通过组织培养，实现优良藤种的迅速繁育。Rao<sup>[2]</sup>首先成功地培养马兰省藤(*Calamus manan* Miq.)的丛生无根苗，庄承纪<sup>[3]</sup>也实现了云南省藤(*C. yunnanensis* Pei & Chen)和倒卵果省藤(*C. obovoideus* Pei & Chen)的植株再生。其它一些藤种的组培研究也取得不同程度的进展，但均未获得丛生无根苗<sup>[4-6]</sup>。我们自1988年起，开展了以我国优良商品藤种黄藤[*Daemonorops margaritae* (Hance) Becc.]、白藤(*C. tetradactylus* Hance)、单叶省藤(*C. simplicifolius* Wei)的组织培养研究，获得显著进展，成功地培养出丛生试管苗木，并大田移植成功，现报告如下。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 材料

试验藤种：黄藤、白藤和单叶省藤。

外植体：半成熟种胚，成熟种胚，种子萌发的幼芽，5年生植株的蘖芽，2年生苗木的茎尖、叶原基、根尖和甘蓝状嫩叶。

1992-11-03收稿。

张方秋助理研究员(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

\*本研究为林业部“七五”重点研究课题和加拿大国际发展研究中心(IDRC)与中国林科院热林所合作的“棕桐藤研究(Rattan China)”的研究内容之一。研究过程中得到了邝炳朝、许焯灿先生的悉心指导，陈美红、陈燕、孙冰等同志参与部分工作，特此致谢。

## 1.2 方法

1.2.1 培养基 参阅有关棕榈藤组培文献,按各试验项目需要,在MS培养基配方的基础上,调节营养元素、维生素、氨基酸及激素种类和含量,以筛选适合诱导愈伤组织及芽增殖和生根的培养基。

1.2.2 组培观测 定量观察按组培常规方法进行,定性指标依据以下分级标准定级:

无根苗生长等级: 1—优, 2—良, 3—中, 4—差, 5—死亡。

愈伤组织结构: 1—紧密, 2—较紧密, 3—较疏松, 4—疏松。

愈伤组织颜色: 1—嫩绿色, 2—浅绿色, 3—乳白色, 4—黄白色, 5—黄褐色。

根颈粗细目测等级: 1—粗, 2—较粗, 3—较细, 4—细。

1.2.3 显微观测 观测材料用4%甲醛固定,酒精脱水后,浸蜡包埋切片,再行PAS-甲苯胺蓝染色,之后用加拿大树胶封片。在BH-2型Olympus显微镜下观测和拍片。

1.2.4 资料整理和统计分析 棕榈藤具有相近的生物学特性,通过组培的各组试验,观测到藤种之间差异微小,但又充分考虑到棕榈藤是一个大的植物族群,包括藤种多,参试的3个藤种各有其特殊的生物学特性。因此,本研究在资料整理时,各组试验的各项观测资料,首先按藤种归纳整理,再综合分析评价。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体筛选

对黄藤、白藤和单叶省藤的半成熟种胚、成熟种胚、种子萌发的幼芽、茎尖、根尖、叶原基、蘖芽、甘蓝状嫩叶等8种外植体的培养试验,结果表明:以上8种外植体均可用于棕榈藤组织培养,但以半成熟种胚为最佳,其消毒成功率达100%(表1),体现外植体再生能力的愈伤组织、单芽和丛生苗诱导率分别为83.3%、100%和85%(表2),分生组织细胞密度达16.6个/mm<sup>3</sup>(表3),其他的依次为成熟种胚、种子萌发的幼芽、茎尖或蘖芽、叶原基和甘蓝状嫩叶或根尖。

### 2.2 愈伤组织诱导

从外植体诱导出愈伤组织,再进一步诱导胚状体,以产生丛生苗是组织培养提高繁殖系数的有效途径。用黄藤、白藤和单叶省藤的半成熟种胚和茎尖为外植体,在改良MS培养基上所进行的愈伤组织诱导试验表明,盐浓度和光因子是影响棕榈藤愈伤组织形成期、数量和质地的两个重要因素(表4):6899 mg/L的总盐浓度是诱导愈伤组织形成的最适浓度,其形成期最短,平均仅6.8d;以690 lx,16 h/d最有利,产生的愈伤组织质地和数量均优于其它处理。

### 2.3 芽诱导和增殖

直接从外植体培养诱导出单芽或丛生芽是植物组培的另一条途径。以3藤种的半成熟种

表1 外植体的消毒试验效果

外植体	消毒成功率 (%)	消毒致死率 (%)	消毒后污染率 (%)	消毒难易趋势
半成熟种胚	100	0	0	易
成熟种胚	94.6	0	5.4	↓ 难
萌蘖芽	83.6	8.3	8.7	
茎尖	81.5	10.7	7.8	
种子萌发的幼芽	66.1	15.3	18.6	
根尖	58.5	12.2	29.3	
叶原基	55.4	23.8	20.8	
甘蓝状幼叶	33.9	38.5	17.6	

注:消毒采用75%酒精+0.1% HgCl<sub>2</sub>的最佳方法。

表 2 外植体的再生能力观察

诱导目的	观察分析指标	外 植 体 种 类							
		半成熟种胚	成熟种胚	种子萌发的幼芽	茎尖	萌蘖芽	叶原基	甘蓝状幼叶	根尖
愈伤组织	样品数	60	60	60	60	60	12	30	30
	产生愈伤组织样品数	50	50	22	22	20	4	17	11
	愈伤组织平均直径(mm)	4.6	2.5	0.8	0.7	0.7	0.8	1.2	0.7
	诱导率(%)	83.3	83.3	36.7	36.7	33.3	33.3	56.7	36.7
单芽	样品数	50	50	50	50	50	10	50	50
	产生单芽样数	50	50	50	50	50	10	0	0
	诱导率(%)	100	100	100	100	100	100	0	0
丛芽	样品数	40	40	40	40	40	8	8	8
	产生2个以上芽样数	34	32	25	20	22	0	0	0
	芽梢平均数	6.1	5.9	6.0	5.7	5.6	0	0	0
	诱导率(%)	85	80	62.5	50	55	0	0	0
再生能力趋势		强 → 弱							

表 3 外植体分生组织显微观察

外植体种类	构 造 特 征				染 色 表 现 <sup>①</sup>	
	总体积 (mm <sup>3</sup> )	细胞总数 (个)	细胞密度 (个/mm <sup>3</sup> )	细胞直径 (μm)	细胞质着色程度 [紫色(淀粉、无定形糖)]	细胞核着色程度 (蓝色)
半成熟种胚	294	4 891	16.6	4.86	++	++++
成熟种胚	581	5 472	10.0	5.81	++	+
种子萌发幼芽	230	1 829	7.4	6.83	+	+++
茎 尖	241	1 470	6.1	6.79	+	+++
根 尖	134	724	5.5	7.05	+	++

①+表示着色程度。

表 4 培养基盐浓度和培养的光照处理对棕桐藤愈伤组织诱导的影响

观察项目 <sup>①</sup>	盐总浓度 (mg/L)				F 值	光 照 度 (lx)				F 值
	2 369	4 634	6 899	9 268		1.8	690	1 030	2 070	
始现天数	16.7	14.4	6.8	10.5	7.95**	9.0	6.8	11.4	13.7	4.23*
直径 (mm)	3.0	4.2	6.5	4.8	3.87*	6.0	6.5	5.7	5.4	3.41*
结构等级均值	2.5	2.5	2.6	3.2		2.7	2.6	3.0	3.5	
颜色等级均值	2.9	2.8	2.8	2.7		3.0	2.8	2.7	3.8	

注：① 盐浓度试验光照度取690 lx，光照试验是在6899 mg/L的盐浓度下进行；据培养30 d的观测值分析。

②  $F_{0.05(3,56)} = 3.16$ ,  $F_{0.01(3,56)} = 5.01$ 。

胚、成熟种胚、种子萌发的幼芽、茎尖和蘖芽5种外植体，在MS培养基的基础上，通过调节维生素、氨基酸及矿质营养含量，配制的RM<sub>2-2</sub>、RM<sub>5-1</sub>、RM<sub>4</sub>、RM<sub>6</sub>和RM<sub>7</sub>系列培养基，进行诱导试验，连续观测和资料分析(表5)表明：①供试藤种间及外植体间，始芽期和各生长观测值等评价指标均无显著差异，而不同培养基间则表现显著差异。由此证明，以MS培养基为基础配方，调节培养基配方中的矿质营养元素、维生素和氨基酸含量是实现棕桐藤组培从外植体直接快速培养获得单芽或丛生苗的关键技术。②在RM<sub>5-1</sub>培养基中，外植体诱导生成的芽多为单芽，且始现期最短，仅7.0 d，而在RM<sub>2-2</sub>、RM<sub>4</sub>、RM<sub>6</sub>和RM<sub>7</sub>培

培养基中分别是RM<sub>5-1</sub>的3.6、2.2、1.5和1.6倍的时间,由此可见RM<sub>5-1</sub>培养基是棕榈藤组培快速诱导单芽的最佳培养基。在RM<sub>6</sub>培养基中,虽然外植体快速诱导芽不及RM<sub>5-1</sub>培养基,但是,可诱导生成平均6.1枚芽的丛生无根苗,显著优于其它系列培养基,可见RM<sub>6</sub>是棕榈藤组培实现由外植体直接诱导丛生苗的最佳培养基。③ RM<sub>6</sub>培养基的一个培养周期约为50 d,如此连续7代(即一年时间)繁殖的结果,理论上一个芽的年繁殖量可达6<sup>7</sup>(≈2.8×10<sup>5</sup>)个芽。

表5 不同培养基的芽梢诱导效应

培养基系列	培养基基本特征	生长起始期	芽数	苗高	叶片数	生长等级
	(改良MS基础上)	(d)	(枚)	(mm)	(片)	均值
RM <sub>2-2</sub>	调节维生素和氨基酸	25.8	1.1	22	2.5	1.3
RM <sub>5-1</sub>	调节营养元素和氨基酸	7.0	1.2	48	3.5	1.2
RM <sub>4</sub>	调节氨基酸	15.7	3.1	37	2.8	1.2
RM <sub>6</sub>	调节营养元素和维生素	10.4	6.1	21	12.3	1.1
RM <sub>7</sub>	调节营养元素、维生素、氨基酸	11.2	4.6	30	9.2	1.4
F 值		3.35*	3.24*	3.54**	4.28**	

注: ①培养60天后观测值; ②3藤种各10个半成熟种胚的培养结果作分析统计; ③ $F_{0.05(4,145)} = 2.67$ ,  $F_{0.01(4,145)} = 3.45$ 。

## 2.4 生根诱导

当芽诱导培养60 d后,苗高20~40 mm时,即分别以单根苗和丛生无根苗转管移入以改良MS培养基配制的RM<sub>8-1</sub>至RM<sub>8-6</sub>的6种系列培养基试管中,进行生根诱导试验以培养完整植株。结果表明(表6):上述6种培养基,除RM<sub>8-3</sub>无效外,RM<sub>8-4</sub>、RM<sub>8-5</sub>和RM<sub>8-6</sub>均能诱导丛生无根苗在其各自的基部生根,但对单根苗无效;RM<sub>8-1</sub>和RM<sub>8-2</sub>对单根苗与丛生无根苗均有很好的效果,但RM<sub>8-2</sub>诱导生根在始根期和能反映生根质量之根径、根长和根数的观测指标均显著优于RM<sub>8-1</sub>。

表6 RM<sub>8</sub>系列培养基诱导生根效应

培养基	无根苗种类	观测分析指标				
		始根期(d)	根数(条)	总长(mm)	单根平均长(mm)	根径(等级均值)
RM <sub>8-1</sub>	单根苗	21.4	5.6	42	7.5	2.1
	丛生苗	10.5	5.6	101	18.0	2.3
RM <sub>8-2</sub>	单根苗	14.8	5.2	75	14.4	1.3
	丛生苗	9.8	6.4	128	20.0	1.2
RM <sub>8-3</sub>	单根苗	—	0	0	0	—
	丛生苗	—	0	0	0	—
RM <sub>8-4</sub>	单根苗	—	0	0	0	—
	丛生苗	13.1	5.2	57	11.0	2.2
RM <sub>8-5</sub>	单根苗	—	0	0	0	—
	丛生苗	12.3	4.7	56	11.9	2.1
RM <sub>8-6</sub>	单根苗	—	0	0	0	—
	丛生苗	14.3	5.1	48	9.4	1.9
F 值	单根苗		6.42**	6.33**	5.84**	
	丛生苗		5.92**	4.78**	4.20**	

注: ①培养40 d观测值; ② $F_{0.05(5,54)} = 2.54$ ,  $F_{0.01(5,54)} = 3.69$ 。

## 2.5 组培苗田间移植

完整的试管丛生苗(具有2~3株苗)生长至苗高4~5 cm、3~4片叶,经10 d自然光照锻炼,即可移植于装有基质(按沙、黄心土和火烧土各1/3配制)的育苗杯,置于能保持80%湿度和50%光照的培养棚下细心管护培育。20 d后,藤苗即可长出新根,便可搬入苗圃,作常规管理,成活率达90%以上。

用外植体经组织培养直接诱导,培养达到上述标准的完整丛生试管苗到大田移植约需4~5个月,这与白藤或黄藤种子育苗从播种经芽苗移植直至藤苗生长至4~5片叶需经8~12个月相比,成苗时间减少1/3,且可以直接生产丛生苗木,提高造林效果。

## 2.6 组培丛生苗观察

萌蘖丛生是多数棕榈藤的主要生物学特性<sup>[7,11]</sup>。以上述藤种半成熟胚和2年生茎尖为外植体的组培丛生苗作试验材料,观察芽的形成过程,可见当外植体在RM<sub>0</sub>培养基中培养45 d,首枚芽(母芽)始现,随后多枚新芽自母芽叶腋四周生成。显微观察表明:母芽具极度缩短的节间构造,节间距离仅420 μm,各节部叶腋均生长许多腋芽,腋芽于叶腋周边不同部位形成。

通过对半成熟种胚、成熟种胚、种子萌发的幼芽、1年生苗茎尖、2年生苗茎尖及组培丛生苗茎尖的切片染色显微观察和测定(表7)证明,3藤种生长点细胞直径和细胞壁厚度随其年龄的增大而增大,但细胞密度却表现随年龄增大而减小的趋势;年龄较大的外植体,经组培,表现出生长点细胞明显变小,细胞密度增大之幼态特征;细胞核大小及其它与整个细胞体积之比,这两个观测指标,似有随年龄增大而逐渐增大(除半成熟种胚外),即年龄越大,生长点细胞核直径越大,核占细胞体积增大之趋势,这与Schaffner<sup>[12]</sup>对Hedera helix的观察研究相类似。就此而论,未成熟种胚的细胞年龄最幼,它的细胞核及其所占细胞体积比率也应最小,但观测情况恰恰相反,细胞直径达2.11 μm,细胞核与细胞体积比最大,达0.08,这可能是由于未成熟种胚处于细胞发育初始阶段,发育尚未完全的缘故,这与植物受精合子发育阶段,细胞具有巨型细胞核的情形相一致<sup>[12,13]</sup>。显微观测发现,由2年生苗茎尖培育出的丛生苗芽尖,其生长点细胞的细胞核具有与半成熟胚细胞核相类似的现象。其细胞核占细胞体积比达0.05,可能的解释是通过组培,细胞代谢发生变化,活力增强,恢复到胚性细胞的状态,从而也有利于诱导产生多个蘖芽的丛生苗。

表7 分生组织细胞特征

材料来源	细胞密度 (个/mm <sup>3</sup> )	细胞直径 (μm)	细胞壁厚 (μm)	细胞核直径 (μm)	核占整个细胞的比率 (%)	年龄
半成熟种胚	16.6	4.86	0.414	2.11	8.1	小
成熟种胚	10.0	5.81	0.555	1.33	1.2	↓
种子萌发幼芽	7.4	6.38	0.777	1.89	1.6	
1年生苗茎尖	6.9	6.59	0.777	2.07	3.1	
2年生苗茎尖	5.6	6.98	0.777	2.22	3.2	大
组培丛生苗芽尖	12.6	5.33	0.666	2.00	5.2	幼小

### 3 结语

(1) 半成熟种胚是棕榈藤组培实现优良藤种快繁之理想外植体。

(2) 培养基总盐浓度为6 899 mg/L 和光照度690 lx 最利于黄藤、白藤和单叶省藤外植体的愈伤组织诱导。

(3) 以MS为基本培养基, 配制的棕榈藤组培试验的RM系列培养基中, RM<sub>5-1</sub>是诱导单芽及其伸长生长的最佳培养基; RM<sub>6</sub>是诱导丛生苗及其继代增殖的最优培养基; RM<sub>8-2</sub>是诱导无根苗生根的最好培养基。

(4) 以半成熟种胚、成熟种胚、茎尖和蘖芽为组培外植体, 经100~120 d的培养室培育, 即可获得完整小苗, 比常规种子播种育苗可缩短约1/3时间。外植体在RM<sub>6</sub>培养基诱导增殖分化, 每50 d即可从一个芽上产生6个芽, 继代增殖的理论繁殖系数为 $2.8 \times 10^5/a$ 。

(5) 组培丛生苗的解剖和显微观察显示: 母芽节间距离极度短缩, 藤节部细胞密集, 当横向直径显著增大时, 于叶腋处突现许多腋芽原基; 2年生苗茎尖经组培后, 分生组织细胞具有胚性细胞类似的结构, 这与新近有些学者提出的组培复幼理论相吻合。

### 参 考 文 献

- 1 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.
- 2 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.
- 3 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.
- 4 Barfa R C, Patena L J, Mercado M M. Tissue culture of rattan. Kuala Lumpur: Universiti Pertanian Malaysia, 1985. 18~25.
- 5 Padmanabhan D, Iiangovan R. Studies on embryo culture in *Calamus rotang* Linn. RIC Bulletin, 1989, 8(1): 1~1.
- 6 Lilian F, Patena C, Roman C, et al. Rattan tissue culture in the philippins. Newsletter, 1991, (12): 11~11.
- 7 Wong K M, Manokarn N. Proceedings of the rattan seminar. Kuala Lumpur: The Rattan Information Centre, 1985. 16~21.
- 8 Nimfa K T, Erlinda H B. Rattan. Cebu: International Development Research Centre, 1990. 98~102.
- 9 Rao A N. Recent research on rattan. Kuala Lumpur: The IDRC bamboo and rattan research network, 1989. 144~147.
- 10 北京林学院主编. 数理统计. 北京: 中国林业出版社, 1979.
- 11 Dransfield J. A manual of the rattans of the Malay Peninsula. Kuala Lumpur: Forest department, Ministry of Primary Industries Malaysia, 1979. 3~5.
- 12 Schaffner K H, Nagl W. Differential DNA replication involved in transition from juvenile to adult phase in *hedra helix* (Araliaceae). Plant systematics evolution, 1979, (Supplement 2): 105~110.
- 13 Bonga J M, Darzan D J. Tissue culture in forestry. London: Martinus Nijhoff/Dr W. Jank publishers, 1982. 383~413.

## *A Study on Rattan Tissue Culture*

Zhang Fangqiu

**Abstract** This paper deals with tissue culture of three important commercial rattan species in China. The results show that the immature embryo is the best one of eight kinds of explants selected for rattan tissue culture. The embryos cultured respectively in media  $RM_{5-1}$  and  $RM_{8-2}$  for 50 days were introduced into complete plantlets. Callus could be introduced from different explants shining 16 hours a day with 690 lx on the medium with salt concentration of 6899 mg/L.  $RM_6$  is the super medium for introducing multiple shoots. It is estimated that  $2.8 \times 10^6$  shoots can be obtained from one of the subcultured shoots a year. Microscopical observation on the multiple shoots shows that the distance between the nodes on a main shoot is very short, only 420  $\mu\text{m}$  and the meristematic tissue of nodes can produce many axillary bud primordium while it is carrying out periclinal and anticlinal division. And the axillary bud primordium can be introduced into multiple shoots further. The meristematic cells of shoots from two years old seedlings can be rejuvenated by tissue culture, that is the cells, introduced by tissue culture, and have the following characters: smaller cell diameter, higher density and an enlarged nuclear.

**Key words** rattan, tissue culture, introduction, propagation

Zhang Fangqiu, Assistant Professor (The Research Institute of Tropical Forestry, CAF Guangzhou 510520).

### 欢迎订阅《福建林学院学报》

《福建林学院学报》是林业综合性学术刊物，创刊于1960年，主要刊登林学、经济林、森林保护、园林绿化、水土保持、花卉、森林采运工程、林业机械、木材加工、林产化工、制浆造纸工程、人造板、室内装修装潢、民用建筑、计算机应用等专业及林业基础理论方面的学术论文、科研报告以及有关林业各学科研究进展的综合述评、专题讨论、研究简报、科技简讯或科技信息等文章。附有英文目录、摘要和关键词等。

主要读者对象：林业院校师生，林业生产、科研和设计单位科技人员，以及各有关部门的专业技术干部。

公开发行，国内统一刊号 CN 35-1095/S，国际标准连续出版物号 ISSN 1001-389X，国际刊名代码 CODEN FLXUE7。季末月出版，国内定价2.00元，全年订价10.00元(含邮资)。自办发行，欢迎订阅，请订读者将订购款邮寄或银行信汇本刊编辑部，开户行：农行南平西芹营业所，帐号：538085。国外发行：中国出版对外贸易总公司，北京782号信箱。

本刊编辑部地址：福建省南平市 邮政编码：353001

《福建林学院学报》编辑部