

海南龙血树离体快繁的研究

陈梅, 莫饶* (华南热带农业大学农学院, 海南儋州 571737)

摘要 [目的]加强龙血树组织培养的再生体系,为其迅速繁殖及大规模工厂化育苗提供依据。[方法]以龙血树的幼嫩茎段为外植体,用9种6-BA、NAA不同浓度配比的诱导培养基和NAA不同浓度的生根培养基进行对比试验,研究海南龙血树的组织培养与快速繁殖。[结果]龙血树幼嫩茎段的诱导和生长与6-BA、NAA有关系,两者的配比直接影响茎段的再生频率。6-BA浓度对愈伤组织的形成影响极为显著,NAA的影响不是很明显。MS+0.3 mg/L NAA的生根时间最短,15 d左右生根,根数多,根系良好,移栽成活率高达95%。[结论]龙血树幼嫩茎段的诱导和不定芽增殖的最适培养基为MS+6.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,增殖系数达10以上,最适宜的生根培养基为MS+0.3 mg/L NAA。

关键词 海南龙血树;组织培养;快速繁殖

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)03-00968-01

Study on Rapid Propagation in vitro of *Dracaena cambodiana*

CHEN Mei et al (College of Agronomy, South China University of Tropical Agriculture, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract [Objective] The research aimed to strengthen the tissue culture regeneration system of *Dracaena cambodiana* and provide basis for its rapid propagation and industrial seedling on a large scale. [Method] With tender stem segments of *Dracaena cambodiana* as explants, comparative test was conducted on 9 kinds of induction medium with different concentrations of 6-BA and NAA, and rooting medium with different concentrations of NAA to study the tissue culture and rapid propagation of *Dracaena cambodiana*. [Result] The induction and growth of tender stem segment of *D. cambodiana* had relation with 6-BA and NAA and the matching ratio of the two directly affected the regeneration frequency of stem segment. The effect of 6-BA concentration on the formation of callus was extremely significantly and the effect of NAA was not obvious. The rooting time of MS+NAA 0.3 mg/L was shortest, about 15 d, with much roots and better root system and the transplanting survival rate reached 95%. [Conclusion] The optimum medium for the induction of tender stem segment and the propagation of adventitious buds in *Dracaena cambodiana* was MS+6-BA 6.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L and its propagation coefficient reached over 10. The optimum rooting medium was MS+NAA 0.3 mg/L.

Key words *Dracaena cambodiana*; Tissue culture; Rapid propagation

海南龙血树(*Dracaena cambodiana*)为百合科常绿乔木。从海南龙血树中可提取我国传统中医内外科要药“血竭”,有止血、活血、生肌、行气之效。但是它的生长十分缓慢,几百年才长成一棵树,几十年才开一次花,十分稀有。为此,笔者对海南龙血树的离体快繁技术进行了研究,以期找到最优培养基配方大规模育苗。

1 材料与方法

1.1 材料 龙血树的幼嫩茎段,取自华南热带农业大学农学院教学基地。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养条件。①培养基成分:实验所用培养基配方见表1。②培养条件:培养基均附加蔗糖30%、琼脂粉6.4%,pH值5.8~6.0,121℃下高压灭菌20 min。培养温度25~28℃,光照强度1500 lx,光照周期12 h/d。

1.2.2 外植体处理。选取龙血树的幼嫩茎段作为外植体来源,采用两步培养法来诱导外植体再生,首先从外植体上诱导出愈伤组织,然后从愈伤组织上诱导不定芽^[1-4]。先将龙血树植株在自来水下冲洗干净。小心地剥去叶片,然后用洗涤剂浸泡10 min,再用自来水冲洗干净,晾干水分。在无菌条件下用75%(体积分数)的酒精消毒10 s;取出后放入1 g/L升汞(HgCl₂)溶液中消毒15 min;然后无菌水冲洗3~5次,无菌滤纸吸干水分。在超净工作台上将其切成1~2 cm的小块接种于诱导培养基1~9号和CK中(表1),每瓶接4个外植体,每个处理25瓶。

1.2.3 龙血树苗的增殖培养。将从生芽团切成小块接种于

9号培养基上进行继代增殖培养。

表1 培养基配方

Table 1 Medium formula

培养基 编号	基本 成分	附加成分//mg/L Additive ingredient		培养基 编号	基本 成分	附加成分//mg/L Additive ingredient	
No. of medium	Basic ingredient	6-BA	NAA	No. of medium	Basic ingredient	6-BA	NAA
CK	MS	0	0	7	MS	4.0	0.6
1	MS	4.0	0.4	8	MS	5.0	0.4
2	MS	5.0	0.5	9	MS	6.0	0.5
3	MS	6.0	0.6	10	MS		0.1
4	MS	4.0	0.5	11	MS		0.3
5	MS	5.0	0.6	12	MS		0.5
6	MS	6.0	0.4				

1.2.4 生根培养。经增殖培养长成的无根苗切成单株,接种于10~12号培养基上进行生根培养。

1.2.5 移栽。经生根培养长出完整植株后,打开培养基瓶盖炼苗3 d,用自来水冲洗掉根部培养基后将其移栽至苗床,移栽后注意遮阴保湿。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织再生实验 外植体接种7 d后,可观察到3、7、8、9号培养基的部分外植体开始膨大出现愈伤组织。外植体接种14 d后,CK及培养基1~9号的出愈率分别为0%、33%、42%、57%、37%、28%、37%、57%、55%和62%。可见,利用幼嫩茎段诱导愈伤组织,激素种类和浓度均较大程度影响愈伤组织的形成。6-BA浓度对愈伤组织的形成影响极为显著,浓度增加可以提高诱导率,随着6-BA浓度的增加玻璃化现象也加重。NAA对愈伤组织的诱导影响不明显,在6-BA浓度低时,NAA浓度的增加可以促进愈伤组织的形成,但随

(下转第1068页)

作者简介 陈梅(1982-),女,广东东昌人,硕士研究生,研究方向:细胞工程与种质创新。*通讯作者,博士,副教授,E-mail:xi-aotaomo@tom.com。

收稿日期 2007-09-28

睾丸中的围管类肌细胞可以用免疫组化法来鉴定其纯度。Feulgen 染色发现,核仁周围有卫星核小体,证实所分离的是 Sertoli 细胞。

支持细胞是生精上皮中唯一与生精细胞接触的细胞,除对生精细胞起支持和营养作用外,还能分泌包括转运蛋白类、调节蛋白类、生长因子类、类固醇类以及其他一些活性因子,这些物质在精子发生过程中起着重要的调控作用^[11-12]。Sertoli 细胞分泌雄激素结合蛋白(Androgen binding protein, ABP),它是调节周期性精子发生的重要因素,可提高整个雄性生殖管道的雄激素浓度^[8];干细胞因子(Stem cell factor, SCF)也是由 Sertoli 细胞合成,是跨膜酪氨酸激酶受体 c-kit 的配体,而 c-kit 受体存在于精原细胞上。这表明 Sertoli 细胞可直接通过 SCF 配体和 c-kit 受体的结合达到与精原细胞的交流^[13]。由于 Sertoli 细胞直接和 SSCs 接触,通过内部因子和外部影响因子调控了睾丸的微环境,再通过细胞之间的相互作用间接调控了 SSCs 的基因表达。培养 5 d 后, Sertoli 细胞作饲养层的培养体系中保留的 SSCs 要比对照组明显增多。表明 Sertoli 细胞能明显促进 SSCs 的增殖。分离纯化 Sertoli 细胞并探讨其对体外 SSCs 生物学行为的影响,为建立稳定的 Sertoli 细胞系和 SSCs 长期存活并增殖的培养体系提供实验依据。

参考文献

[1] SHARPE R M, MCKINNEL C, KIVLIN C, et al. Proliferation and functional

maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood[J]. Reproduction, 2003, 125(6): 769-784.

- [2] SVINGEN T, BEVERDAM A, VERMA P, et al. Aard is specifically up-regulated in sertoli cells during mouse testis differentiation[J]. Int J Dev Biol, 2007, 51(3): 255-268.
- [3] TENG Y, XUE W J, DING X M, et al. Isolation and culture of adult sertoli cells and their effects on the function of co-cultured allogeneic islets in vitro[J]. Chin Med J, 2005, 118(22): 1857-1862.
- [4] 曹博, 郑俊波, 郭筠秋. 大鼠睾丸支持细胞的分离纯化与鉴定[J]. 解剖科学进展, 2004, 10(1): 34-36.
- [5] SHI Y Q, WANG Q Z, LIAO S Y, et al. In vitro propagation of spermatogonial stem cells from KM mice[J]. Front Biosci, 2006, 1(11): 2614-2622.
- [6] VALDES GONZALEZ R, SILVA TORRES L, RAMIREZ GONZALEZ B, et al. Method for evaluating quality of cultured neonatal pig Sertoli cells[J]. Xenotransplantation, 2005, 12(4): 316-323.
- [7] 高小燕, 孙燕, 张家骅. 支持细胞中促卵泡素信号通路研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(5): 1-5.
- [8] 杨君杰, 刘善荣, 杨玲. 小鼠睾丸支持细胞的分离培养与鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(7): 741-743.
- [9] MORI C, NAKAMURA N, DIX D J, et al. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70 knockout mice[J]. Dev Dyn, 1997, 208: 125-136.
- [10] OKE BO S-QC. Localization of secretory, membrane-associated and cytoskeletal proteins in rat testis using an improved immunocytochemical protocol that employs polyester wax[J]. Biol Reprod, 1993, 48(3): 621-631.
- [11] 韩晓冬, 龚炎, 屠志刚. 大鼠睾丸支持细胞的原代培养与鉴定[J]. 解剖学报, 2005, 36(6): 682-684.
- [12] 吕伟宏, 田怀军. 低氧对大鼠睾丸支持细胞形态结构与存活率的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 65-69.
- [13] OATLEY J M, AVARBOCK M R, TELARANTA AI, et al. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(25): 9524-9529.

(上接第 968 页)

着 BA 浓度的增加, NAA 的作用也越不明显。综合考虑, 诱导龙血树愈伤组织的培养基配方为: MS + 6-BA 6.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L(图 1a, b)。

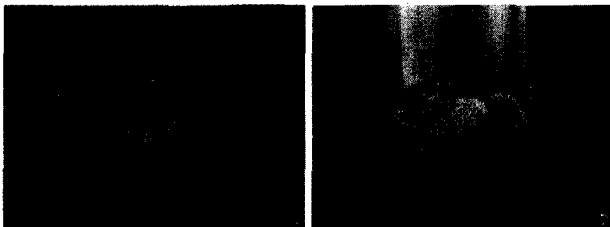


图 1 龙血树愈伤组织

Fig. 1 Callus of *Dracaena cambodiana*

2.2 继代增殖培养 由茎段分化得到的不定芽继续在 9 号培养基上进行增殖培养, 每 45 d 转瓶一次, 其增殖速度非常快, 增殖系数达 10 以上(图 2)。



图 2 龙血树分化出芽

Fig. 2 Buds differentiated from *Dracaena cambodiana*



图 3 龙血树生根

Fig. 3 Rooting of *Dracaena cambodiana*

2.3 生根和移栽 将壮苗培养后高 1.5~2.0 cm 的不定芽切下, 转入生根 10~12 号培养基和 CK 中, 结果都会生根, 只

是生根的数量和天数不相同。通过观察比较, 11 号培养基的生根时间最短, 15 d 左右即可生根, 且根数多, 根系良好, 移栽成活率高。因此, 11 号培养基是龙血树生根的最适培养基(图 3)。

将炼苗后的小苗从培养基中取出, 轻轻洗去根部培养基, 在 0.5% 多菌灵溶液中消毒 30 s, 移栽于椰糠: 河沙 = 1:1 的混合基质中。移栽初期, 注意遮阴、保湿; 7 d 后小苗成活率达 95%。

3 结论与讨论

该实验以龙血树的幼嫩茎段为外植体, 用 9 种不同浓度激素的诱导培养基和 3 种不同浓度激素的生根培养基组合进行对比实验。结果表明, 龙血树幼嫩茎段的诱导和生长与生长素、细胞分裂素 2 种激素有关, 两者的配比直接影响了茎段的再生频率, 龙血树幼嫩茎段的诱导和不定芽增殖的最适培养基为 MS + 6-BA 6.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L。最适生根培养基为 MS + NAA 0.3 mg/L。该试验通过两步培养法, 获得了较高的不定芽诱导率。同时对培养基进行了梯度对比实验, 并选出了最优培养基, 使增殖培养的增殖系数达到 10, 大大缩短了常规育苗时间, 为其迅速繁殖及大规模工厂化育苗提供了有力的技术支撑。

参考文献

- [1] 吴繁花, 朱文丽, 莫饶, 等. 海南龙血树的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 186.
- [2] 杨本鹏, 张树珍, 杨学, 等. 海南龙血树的组织培养与快速繁殖[J]. 热带作物学报, 2005, 26(2): 20-23.
- [3] 张翠玲, 文慧婷. 龙血树的组织培养和快速繁殖[J]. 云南农业科技, 2006(3): 27-28.
- [4] 李克烈, 李志英, 徐立, 等. 海南龙血树的组织培养与快速繁殖[J]. 热带农业科学, 2006, 26(5): 21-23.