

香港四照花外植体的抗褐化处理与诱导培养

陈梦倩, 范李节, 王小德

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 以香港四照花 *Dendrobenthamia hongkongensis* 嫩叶、茎段和带芽茎段为外植体, 研究外植体类型、消毒时间、基本培养基、预处理方法、抗褐化剂种类及质量浓度对香港四照花褐化的影响以及 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)和 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)对 3 种外植体诱导培养的影响。结果表明: 香港四照花外植体的最佳消毒时间为 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化汞消毒 5 min; 最适基本培养基为木本植物用培养基(woody plant medium, WPM); 用 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)浸泡 3.0 h, 3 种外植体褐化率明显下降; $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸(CA)是嫩叶的最佳抗褐化剂, 褐化率为 27.4%; $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP 为茎段和带芽茎段的最佳抗褐化剂, 其褐化率分别为 13.3%和 16.7%; 嫩芽的最佳愈伤组织诱导培养基为 WPM+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D; 茎段和带芽茎段最佳诱导培养基均为 WPM+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D。图 2 表 6 参 14

关键词: 园艺学; 香港四照花; 外植体; 抗褐化; 诱导

中图分类号: S604⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2018)04-0778-07

Anti-browning treatments and induction on explants of *Dendrobenthamia hongkongensis*

CHEN Mengqian, FAN Lijie, WANG Xiaode

(School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To study the effects of different types of explants, sterilization time, basic mediums, pretreatment methods, and anti-browning agent types and their concentration on browning of three explants, *Dendrobenthamia hongkongensis* with young leaves, with stem segments, and with stem segments having buds, were used as treatments. This research also studied the effect of 6-Benzylaminopurine (6-BA), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on induction of the three explants through tissue culture technology. Results showed that disinfecting explants for five min with $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Mercury dichloride solution was the best way of disinfection with woody plant medium (WPM) being the most suitable basic culture medium. When soaking explants in $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ polyvinyl pyrrolidone (PVP) for 3.0 h, the browning rates of the three explants were greatly decreased ($P<0.05$). For young leaves, $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ citric acid (CA) was the best anti-browning agent having a browning rate of 27.4%; $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP was the best anti-browning agent for stem segments (browning rate of 13.3%) and stem segments with buds (browning rate of 16.7%). The best callus induction medium for young leaves was WPM + $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, and the best induction medium for stem segments and stem segments with buds was WPM + $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D. [Ch, 2 fig. 6 tab. 14 ref.]

Key words: horticulture; *Dendrobenthamia hongkongensis*; explants; anti-browning; induction

香港四照花 *Dendrobenthamia hongkongensis* 是山茱萸科 Cornaceae 四照花属 *Dendrobenthamia* 常绿乔

收稿日期: 2017-07-03; 修回日期: 2017-09-29

基金项目: 中央财政林业科技推广示范项目([2013]TS03)

作者简介: 陈梦倩, 从事园林植物及其应用研究。E-mail: 734899867@qq.com。通信作者: 王小德, 教授, 博士, 从事园林植物引种与应用、植物造景和生态园林等研究。E-mail: wxd65@zafu.edu.cn

木，自然分布于华东、华南、西南等地区。主干通直，冠型饱满；初夏头状花序顶生，花苞片大而洁白，观赏性强；秋季核果聚生成球形，红艳可爱，既可食用又可酿酒、入药^[1-2]。四照花属的大部分植物种子都具有深休眠的特性，影响了优良种质资源的有性繁殖和推广^[3]。植物组织培养技术作为一种成熟的扩繁技术，不仅能保持繁殖体的优良特性，且繁殖速度快，周期短，不受场地、环境限制，是苗木良种化、工厂化的重要途径^[4]。因此，进行香港四照花的诱导培养研究，对香港四照花的扩繁和推广应用具有现实意义。香港四照花在初代培养中极易褐化，会影响外植体的诱导与生长，严重时能致其死亡，故对它进行抗褐化研究显得尤为重要。目前，常用的抗褐化措施有预处理材料，选择适宜的培养条件，使用抗褐化剂等^[5]。其中，常用抗褐化剂主要有聚乙烯吡咯烷酮(PVP)，活性炭(AC)，抗坏血酸(VC)，硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)及柠檬酸(CA)等^[6]。刘均利等^[7]发现 PVP 对华盖木 *Manglietiastrum sinicum* 外植体的抗褐化效果显著。李萍等^[8]研究表明，在培养基中加入 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ AC 培养 4 d 再转入不含 AC 的培养基中，能有效控制牡丹 *Paeonia suffruticosa* 外植体褐化。本研究选择香港四照花嫩叶、茎段和带芽茎段为外植体，通过不同消毒方式处理、筛选基本培养基、材料预处理和使用抗褐化剂等方法，以期得出能有效降低香港四照花外植体褐化率的最佳方案，并采用正交试验法，研究不同植物生长调节剂种类及质量浓度对外植体诱导的影响。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所用材料为浙江农林大学校园的香港四照花，于 2017 年 3 月中旬至 5 月中旬，选择生长健壮、无病虫害的当年生嫩叶、茎段和带芽茎段作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基与培养条件 所有基本培养基若无特殊说明均为木本植物用培养基(woody plant medium, WPM)，添加蔗糖 $30.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，琼脂 $6.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，除植物生长调节剂配比试验外，均附加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苄基腺嘌呤(6-BA)+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘乙酸(NAA)，pH 5.8。各试验中 3 种外植体均接种 20 瓶·处理⁻¹，3 个·瓶⁻¹，重复 3 次·处理⁻¹。培养室温度为 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ ，光照时间 $12 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ ，光照强度 $1\ 800\sim 2\ 000 \text{ lx}$ ，接种后先暗培养 7 d 再进行光培养。

1.2.2 外植体的消毒处理 将采集的 3 种外植体用流水冲洗并用软毛笔刷去表面脏物，放在洗洁精溶液中浸泡 5 min，流水冲洗 1 h。沥干水后，在超净工作台上先用体积分数为 70%乙醇消毒 30 s，用无菌水漂洗 3 次后，分别用 2 种消毒剂处理： $30.0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 次氯酸钠(NaClO)溶液(5, 10, 15 min)和 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化汞(HgCl_2)溶液(5, 8, 10 min)，消毒后用无菌水漂洗 5 遍。切除与消毒液接触的伤口部位，将嫩叶切成 $1.0 \text{ cm}\times 1.0 \text{ cm}$ 大小，茎段和带芽茎段切成 $1.0\sim 1.5 \text{ cm}$ 长，接种于培养基上。每日观察统计污染率和存活率。

1.2.3 基本培养基的筛选 采用 1.2.2 筛选出的最佳消毒方式处理的 3 种外植体，分别接种在 MS (Murashige and Skoog)，DKW(Driver and Kuniyuki)，WPM 培养基上。每日观察统计褐化率及诱导率。

1.2.4 外植体抗褐化预处理 将流水冲洗 1.0 h 后的外植体分别置于 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP， $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸和 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ VC 中浸泡 3.0 h，以未预处理为对照(ck)，浸泡后将 3 种外植体置于超净工作台上消毒并接种。每日观察统计褐化率。

1.2.5 抗褐化剂实验 在培养基中添加不同质量浓度的 PVP($0.5, 1.0, 2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)，柠檬酸($0.5, 1.0, 2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)，VC($0.5, 1.0, 2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)，活性炭($0.5, 1.0, 2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和硫代硫酸钠($0.1, 0.2, 0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)，以不添加任何抗褐化剂为对照(ck)，将 3 种外植体接种到各培养基中。每日统计外植体褐化率。

1.2.6 植物生长调节剂配比试验 采用正交试验设计 $L_9(3^4)$ ，在 WPM 培养基中添加不同质量浓度 6-BA ($0.5, 1.0, 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)，NAA($0, 0.1, 0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D, $0.1, 0.2, 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)，接种后每日观察并记录外植体启动时间，统计出愈率及萌发率。

1.3 数据统计与处理

在接种后第 30 天统计各处理的数据。用 Excel 2007 进行数据处理，SPSS 19.0 进行方差分析。污染率=(形成愈伤组织的外植体数/接种外植体数) $\times 100\%$ ；褐化率=(外植体褐化数/接种外植体数) $\times 100\%$ ；

存活率=(存活的外植体数/接种外植体数) \times 100%; 诱导率=(诱导数/接种外植体数) \times 100%; 出愈率=(诱导出愈伤组织的外植体数/接种外植体数) \times 100%; 萌发率=(诱导出芽的外植体数/接种外植体数) \times 100%。

2 结果与分析

2.1 消毒时间对外植体污染率及存活率的影响

3种外植体消毒处理结果表明(表1):随着消毒时间延长,3种外植体污染率都有显著下降($P<0.05$)。结合30 d后统计的存活率(图1B), $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化汞溶液消毒5 min为最佳消毒时间,嫩叶污染率仅为33.89%,茎段、带芽茎段分别为25.00%和27.78%,3种外植体之间差异显著($P<0.05$)。用 $30.0\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 次氯酸钠溶液消毒的外植体褐化情况较轻,但自培养第4天起不断出现污染,污染率较高,且存活率较低(图1A)。

表1 不同消毒药剂及时间对3种外植体污染率的影响

Table 1 Effects of different disinfectants and time on the contamination rate of 3 explants

消毒剂	t/min	接种数/(个 \cdot 外植体 $^{-1}$)	污染率/%		
			嫩叶	茎段	带芽茎段
$30.0\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 次氯酸钠	5	60	100.00 Aa	100.00 Aa	100.00 Aa
	10	60	91.11 Ab	83.33 Bb	88.89 Ab
	15	60	80.55 Ac	70.00 Bc	76.11 Ac
$1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化汞	5	60	33.89 Ad	25.00 Cd	27.78 Bd
	8	60	26.67 Ae	18.89 Be	20.55 Be
	10	60	18.33 Af	11.11 Bf	11.67 Bf

说明:不同大写字母表示同一消毒时间内不同外植体之间差异显著($P<0.05$),不同小写字母表示同种外植体不同消毒时间之间的差异显著($P<0.05$)

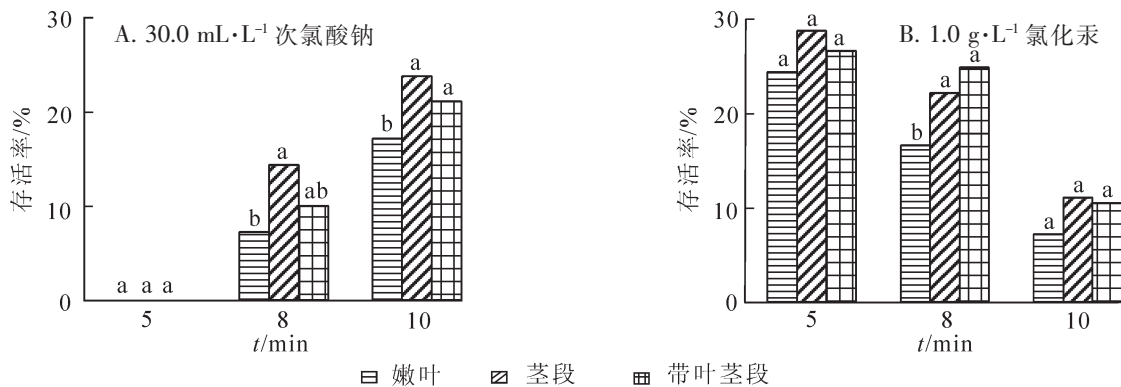


图1 不同消毒药剂及时间处理下的3种外植体存活率

Figure 1 Survival rate of 3 explants treated with different disinfectants and time

2.2 不同基本培养基对外植体褐化及诱导的影响

将3种外植体接种于MS, DKW和WPM等3种不同基本培养基,结果表明(表2):接种于WPM培养基的3种外植体褐化率均低于接种于MS和WPM培养基的褐化率,嫩叶、茎段和带芽茎段的褐化率分别是67.8%,60.0%和61.7%。试验中发现茎段与嫩叶经诱导产生愈伤组织,带芽茎段经诱导易萌发出新芽,其中接种于WPM培养基的外植体生长状况最好,诱导率最高。WPM与其他2种培养基的外植体褐化率与诱导率均差异显著($P<0.05$),故以WPM培养基为最适基本培养基。

2.3 不同抗褐化剂预处理对外植体褐化率的影响

表3表明:采用 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP, $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ VC和 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸浸泡3 h的外植体褐化率都有所下降,其中 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP预处理后的外植体褐化率最低,与对照(ck)差异显著($P<0.05$)。3种外植体经 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP预处理后,茎段褐化率为33.3%,显著低于嫩叶褐化率(50.6%)和带芽茎段褐化率(38.9%)($P<0.05$)。

表 2 不同基本培养基对外植体褐化及诱导的影响

Table 2 Effects of different basic culture medium on the browning rate and induction rate of explants

培养基类型	外植体类型	接种数	褐化率/%	诱导率/%	生长状况	
					愈伤组织	新芽
MS	嫩叶	180	72.8 Aa	6.1 Ba	淡黄色, 结构疏松	
	茎段	180	68.3 Ba	10.6 Ab	黄绿色, 结构紧密	
	带芽茎段	180	67.8 Ba	9.4 Ab	生长缓慢, 叶片发黄	
DKW	嫩叶	180	75.5 Aa	4.4 Ba	黄褐色, 结构松散	
	茎段	180	66.7 Ba	13.9 Ab	黄绿色, 结构紧密	
	带芽茎段	180	70.6 Aa	16.1 Aa	生长缓慢, 叶片发黄	
WPM	嫩叶	180	67.8 Ab	8.9 Ba	淡黄色, 结构疏松	
	茎段	180	60.0 Ab	20.6 Aa	黄绿色, 结构紧密	
	带芽茎段	180	61.7 Ab	18.9 Aa	生长迅速, 叶片嫩绿	

说明：不同大写字母表示同一基本培养基不同外植体之间差异显著($P<0.05$)，不同小写字母表示同种外植体不同基本培养基之间的差异显著($P<0.05$)

表 3 不同抗褐化剂预处理对 3 种外植体褐化率的影响

Table 3 Effects of pretreatment with different anti browning agents on the browning rate of 3 explants

处理方式	接种数/(个·外植体 ⁻¹)	褐化率/%		
		嫩叶	茎段	带芽茎段
ck	180	67.8 Aa	62.8 Ba	61.7 Ba
1.0 g·L ⁻¹ PVP	180	50.6 Ac	33.3 Cd	38.9 Bd
1.0 g·L ⁻¹ VC	180	61.7 Ab	46.7 Bc	47.3 Bc
1.0 g·L ⁻¹ 柠檬酸	180	65.7 Aa	53.3 Bb	55.6 Bb

说明：不同大写字母表示同一预处理不同外植体之间差异显著($P<0.05$)，不同小写字母表示同种外植体不同预处理之间的差异显著($P<0.05$)

2.4 不同抗褐化剂及质量浓度对外植体褐化率的影响

以未添加抗褐化剂为对照(ck)，在培养基中添加不同质量浓度的 PVP，柠檬酸和 VC 后，3 种外植体褐化率均低于 ck(表 4)，且与 ck 差异显著($P<0.05$)。添加 0.5 g·L⁻¹ 活性炭后，外植体褐化情况显著下降($P<0.05$)，但若培养基活性炭质量浓度过高，反而加重外植体褐化。在培养基中添加了不同质量浓度的硫代硫酸钠，3 种外植体褐化率随质量浓度上升而上升。由表 4 得知：2.0 g·L⁻¹ PVP 为茎段和带芽茎段的最佳抗褐化剂，其褐化率分别为 13.3% 和 16.7%，与其他抗褐化剂有显著差异($P<0.05$)。嫩叶的最佳抗褐化剂为 1.0 g·L⁻¹ 柠檬酸，褐化率为 27.4%。嫩叶褐化率与茎段、带芽茎段褐化率差异性显著($P<0.05$)，茎段与带芽茎段之间差异不显著($P>0.05$)。

2.5 不同植物生长调节剂种类及质量浓度对外植体诱导的影响

由 6-BA，NAA 和 2,4-D 的极差(R)可知：嫩叶与茎段愈伤组织诱导的主因素分别为 2,4-D(11.30)和 NAA(20.52)(表 5)。叶片诱导愈伤组织的最佳培养基组合为 WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D，出愈率为 58.3%，8 d 叶片四周产生愈伤组织(图 2A)。茎段与叶片启动时间相近，7 d 基部膨大并长出少量愈伤组织(图 2B)，其最佳愈伤组织诱导培养基为 WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA +0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D，出愈率为 75.4%，与其他处理间存在显著差异($P<0.05$)。

由不同因素的极差(R)可知(表 6)：影响带芽茎段诱导的主因素为 6-BA。经 Tukey s-b 分析可知：7 号和 4 号处理与其他处理有显著差异($P<0.05$)，其萌发率分别为 76.7% 和 72.8%。故带芽茎段诱导新芽的最佳组合为 WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA +0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D，萌发时间为 8 d(图 2C)。

3 结论与讨论

褐化现象制约着木本植物组织培养的发展，本试验采用单因素试验法，从不同消毒方式、基本培养基、外植体预处理方式、抗褐化剂等 4 个方面进行研究，寻找降低香港四照花褐化率的有效途径。结果表明：外植体采用 1.0 g·L⁻¹ 氯化汞消毒 5 min 存活率最高。这与路承香等^[9]的研究结果一致，与唐佳佳

表4 不同抗褐化剂及质量浓度对3种外植体褐化率的影响

Table 4 Effects of different concentrations of anti browning agents on the browning rate of 3 explants

抗褐化剂	$\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	接种数/(个·外植体 ⁻¹)	褐化率/%		
			嫩叶	茎段	带芽茎段
ck	0	180	50.6 Ab	33.3 Cc	38.9 Bc
PVP	0.5	180	45.0 Ac	25.0 Bd	22.8 Be
	1.0	180	33.3 Ae	18.9 Be	22.2 Be
	2.0	180	35.0 Ae	13.3 Bf	16.7 Bf
柠檬酸	0.5	180	37.8 Ad	26.7 Bd	30.0 Bd
	1.0	180	27.4 Af	25.6 Ad	27.2 Ae
	2.0	180	31.1 Ae	27.2 Ad	26.7 Ae
VC	0.5	180	47.8 Ac	32.2 Bc	36.8 Bc
	1.0	180	42.2 Ad	28.5 Bc	31.7 Bd
	2.0	180	41.1 Ad	26.1 Bd	29.4 Bd
活性炭	0.5	180	45.56 Ac	28.9 Bc	33.9 Bd
	1.0	180	51.1 Ab	36.1 Bb	36.7 Bc
	2.0	180	53.3 Ab	40.0 Bb	42.8 Bb
硫代硫酸钠	0.1	180	48.9 Ab	31.1 Bc	35.0 Bc
	0.2	180	58.3 Aa	45.0 Ba	46.7 Bb
	0.5	180	61.7 Aa	48.9 Ca	53.3 Ba

说明：不同大写字母表示同一抗褐化剂和质量浓度不同外植体之间差异显著($P<0.05$)，不同小写字母表示同种外植体不同抗褐化剂和质量浓度之间的差异显著($P<0.05$)

表5 不同植物生长调节剂种类及质量浓度对愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effects of different hormone kinds and concentrations on callus induction

处理编号	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$			接种数/(个·外植体 ⁻¹)	嫩叶		茎段	
	6-BA(A)	NAA(B)	2,4-D(C)		出愈率/%	开始时间/d	出愈率/%	开始时间/d
1	0.5(1)	0(1)	0.1(1)	180	33.9 c	10	51.7 c	8
2	0.5	0.1(2)	0.2(2)	180	45.6 b	7	48.3 c	7
3	0.5	0.2(3)	0.5(3)	180	36.1 c	8	38.3 d	9
4	1.0(2)	0	0.2	180	40.0 b	9	37.8 d	9
5	1.0	0.1	0.5	180	17.8 e	12	26.7 e	12
6	1.0	0.2	0.1	180	58.3 a	8	60.0 b	7
7	2.0(3)	0	0.5	180	42.2 b	10	75.4 a	7
8	2.0	0.1	0.1	180	31.1 d	11	28.3 e	12
9	2.0	0.2	0.2	180	26.1 d	14	40.6 d	10
K_1	38.52	38.70	41.11	k1	46.11	54.97	46.67	
K_2	38.70	31.48	29.81	k2	41.49	34.45	42.22	
K_3	33.15	40.18	32.04	k3	48.11	46.30	46.82	
R	5.55	8.70	11.30	R	6.62	20.52	4.60	
优水平	A2	B3	C1	优水平	A3	B1	C3	

说明：左下列为嫩叶出愈率的极差分析，右下列为茎段出愈率的极差分析。不同小写字母表示不同处理差异显著($P<0.05$)

等^[3]在狭叶四照花 *Dendrobenthamia angustata* 的研究结果不一致，可能因其选用1年生幼苗更易灭菌。3种外植体接种于WPM培养基中褐化率最低，诱导率相对较高，生长状况最好。推测原因为WPM培养基无机盐总含量较低，减轻了外植体褐变^[10]。想从根本上解决组织培养中外植体褐化的问题，还需从分子、遗传等角度对其外植体进行更深入的研究。

PVP为专一吸附酚类物质的常用吸附剂，能阻止酚类物质被氧化为醌类物质，可降低外植体褐化程度。柠檬酸通过抑制多酚氧化酶的活性来抑制褐化^[11]。本研究发现：在接种前用1.0 g·L⁻¹PVP浸泡香港四照花外植体能有效降低褐化率，在培养基中添加2.0 g·L⁻¹PVP能明显减轻茎段与带芽茎段的褐化现象。嫩叶在添加1.0 g·L⁻¹柠檬酸的培养基中褐化率最低，但柠檬酸遇高温会产生酸性物质，影响培养基

表 6 不同植物生长调节剂种类及质量浓度对带芽茎段诱导的影响

Table 6 Effects of different hormone kinds and concentrations on the induction of stem segment with bud

处理编号	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$			接种数/(个·外植体 ⁻¹)	带芽茎段	
	6-BA(A)	NAA(B)	2,4-D(C)		萌发率/%	开始时间/d
1	0.5(1)	0(1)	0.1(1)	180	23.9	10
2	0.5	0.1(2)	0.2(2)	180	18.3	11
3	0.5	0.2(3)	0.5(3)	180	37.8	8
4	1.0(2)	0	0.2	180	72.8	6
5	1.0	0.1	0.5	180	30.6	11
6	1.0	0.2	0.1	180	45.6	8
7	2.0(3)	0	0.5	180	76.7	7
8	2.0	0.1	0.1	180	57.2	9
9	2.0	0.2	0.2	180	61.1	7
K_1	26.67	57.78	42.22			
K_2	49.63	35.37	36.67			
K_3	65.00	48.15	48.34			
R	38.33	22.41	11.67			
优水平	A3	B1	C3			

说明：左下列为带芽茎段萌发率的极差分析



A. 叶片诱导产生的愈伤组织；B. 茎段诱导产生的愈伤组织；C. 带芽茎段诱导萌发的新芽

图 2 3 种外植体的诱导培养

Figure 2 Induction of 3 explants

凝固，故需高压灭菌后用注射器加入，不利于工厂化生产。硫代硫酸钠与柠檬酸活性炭褐化效果不明显，甚至在高质量浓度下加重了外植体褐化。这与在核桃楸 *Juglans mandshurica*^[12] 和黑莓 *Rubus*^[13] 上的研究结论不一致，可能因选用基本培养基不同，也可能是不同树种差异性所致。

不同的外植体类型对该种植物的诱导培养有很大的影响。试验结果表明：茎段是诱导愈伤组织的最佳外植体，而带芽茎段诱导属腋芽萌发，污染率及褐化率较低，最易萌发产生新芽；叶片褐化率较高，出愈率低于茎段，可能因其分化程度较高；试验中发现少数带芽茎段会在切口处长出奶黄色愈伤组织，但不影响带芽茎段继续萌发，故本试验只统计其萌发率。

植物生长调节剂对外植体的形态建成及其调控起着重要作用。本试验将组织培养中广泛应用的 3 种植物生长调节剂组合使用，以期寻找最佳诱导培养基。结果表明：嫩叶最佳植物生长调节剂组合为：1.0 mg·L⁻¹6-BA+0.2 mg·L⁻¹NAA+0.1 mg·L⁻¹2,4-D；茎段与带芽茎段的最佳激素组合均为：2.0 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹2,4-D。通过对正交试验结果的直观分析，2,4-D 和 NAA 对嫩叶、茎段诱导愈伤组织的影响较大，而 6-BA 在诱导腋芽萌发具有突出的促进作用^[14]。

4 参考文献

- [1] 韦直, 何业祺. 浙江植物志: 第 3 卷[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 388 - 389.
 - [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 56 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
 - [3] 唐佳佳, 刘翠玉, 尚旭岚, 等. 狭叶四照花茎段的离体培养与植株再生[J]. 中国农学通报, 2014, 30(22): 79 - 83.
- TANG Jiajia, LIU Cuiyu, SHANG Xulan, *et al.* In vitro culture and plant regeneration from stem segments of *Den-*

- drobenthamia angustata* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, **30**(22): 79 – 83.
- [4] 胡爱双, 赵玉辉, 刘镇东, 等. 优良榛资源快繁体系的建立与优化[J]. 沈阳农业大学学报, 2015, **46**(4): 476 – 480.
HU Aishuang, ZHAO Yuhui, LIU Zhendong, *et al.* Establishment and optimization of rapid propagation system of elite hazelnut resources [J]. *J Shenyang Agric Univ*, 2015, **46**(4): 476 – 480.
- [5] 谢志亮, 吴振旺. 木本植物组培褐化研究进展[J]. 中国南方果树, 2013, **42**(5): 42 – 46.
XIE Zhiliang, WU Zhenwang, Advances in browning of woody plants in tissue culture [J]. *South China Fruits*, 2013, **42**(5): 42 – 46.
- [6] 吕宗友, 苏衍菁, 赵国琦, 等. 不同防褐化措施对苏丹草愈伤诱导以及抗褐化的效果研究[J]. 草业学报, 2011, **20**(3): 174 – 181.
LÜ Zongyou, SU Yanqing, ZHAO Guoqi, *et al.* Effect of anti-browning agent on the sudangrass callus of *Sorghum sudanense* [J]. *Acta Pratacult Sin*, 2011, **20**(3): 174 – 181.
- [7] 刘均利, 马明东. 华盖木组织培养中褐化控制研究[J]. 浙江林业科技, 2007, **27**(1): 20 – 23, 32.
LIU Junli, MA Mingdong. Study on browning of endangered *Manglietiastrum sinicum* in tissue culture [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2007, **27**(1): 20 – 23, 32.
- [8] 李萍, 成仿云, 张颖星. 防褐剂对牡丹组培褐化发生、组培苗生长和增殖的作用[J]. 北京林业大学学报, 2008, **30**(2): 71 – 76.
LI Ping, CHENG Fangyun, ZHANG Yingxing. Effects of browning antagonists on antibrowning, growth and multiplication of tissue culture of tree peony [J]. *J Beijing For Univ*, 2008, **30**(2): 71 – 76.
- [9] 路承香, 李仲芳, 王有科, 等. 峨眉四照花茎尖组织培养技术[J]. 安徽农业科学, 2008, **36**(4): 1416 – 1418.
LU Chengxiang, LI Zhongfang, WANG Youke, *et al.* Preliminary discussion on tissue culture technology for the stem-tip in the rare and protected plant *Dendrobenthamia japonica* var. *emeinsi* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2008, **36**(4): 1416 – 1418.
- [10] 邱璐, 陈善娜, 夏跃明, 等. 桑树组织培养中褐化问题的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2000, **22**(1): 76 – 78.
QIU Lu, CHEN Shanna, XIA Yueming, *et al.* Study on browning in tissue culture of *Morus alba* L. [J]. *J Yunnan Univ*, 2000, **22**(1): 76 – 78.
- [11] 彭思佳, 丁力, 刘清波, 等. 抗褐化剂对荻外植体褐化和愈伤组织生长的影响[J]. 草原与草坪, 2015, **35**(5): 7 – 11, 16.
PENG Sijia, DING Li, LIU Qingbo, *et al.* Effect of antioxidant on explant browning and callus growth of *Miscanthus sacchariflorus* [J]. *Grassland Turf*, 2015, **35**(5): 7 – 11, 16.
- [12] 张建瑛, 祁永会, 吕跃东, 等. 核桃腋芽再生体系研究[J]. 植物研究, 2015, **35**(1): 22 – 26.
ZHANG Jianying, QI Yonghui, LÜ Yuedong, *et al.* Regeneration system for axillary bud of *Juglans mandshurica* Maxim. [J]. *Bull Bot Res*, 2015, **35**(1): 22 – 26.
- [13] 王小敏, 吴文龙, 李海燕, 等. 黑莓外植体褐化影响因素分析及适宜培养条件筛选[J]. 植物资源与环境学报, 2009, **18**(3): 63 – 68.
WANG Xiaomin, WU Wenlong, LI Haiyan, *et al.* Analysis of influence factor on browning of blackberry explants and selection of suitable culture condition [J]. *J Plant Resour Environ*, 2009, **18**(3): 63 – 68.
- [14] 叶润燕, 童再康, 张俊红, 等. 樟树茎段组培快繁[J]. 浙江农林大学学报, 2016, **33**(1): 177 – 182.
YE Runyan, TONG Zaikang, ZHANG Junhong, *et al.* Tissue culture and rapid propagation for stems of *Cinnamomum camphora* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, **33**(1): 177 – 182.