

闽楠微扦插繁育体系的建立

肖业玲¹, 童再康¹, 吴建辉²

(1. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江省建德市三都镇人民政府, 浙江 建德 311605)

摘要:【目的】以闽楠 *Phoebe bournei* 近成熟胚为外植体, 采用多种方法建立闽楠微扦插繁育体系。【方法】探究不同子叶切除强度对胚褐化的影响, 以及抗褐化剂和吲哚丁酸(IBA)对近成熟胚萌发和无菌苗微扦插生根的影响。【结果】闽楠近成熟胚褐化的主要部位为子叶, 子叶切除后胚可以萌发但不能正常生长, 添加聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)对抑制子叶褐化有明显效果且不影响胚的萌发。近成熟胚萌发最佳培养基为 1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IBA+2 g·L⁻¹ PVP, 萌发率最高可达 89.71%。无菌苗微扦插最佳生根培养基为 1/2MS+1.5 mg·L⁻¹ IBA+2 g·L⁻¹ PVP, 顶芽生根率为 100%, 平均生根数为 3.86 条, 平均根长 1.56 cm; 侧芽生根率为 60.27%, 平均生根数为 1.55 条, 平均根长 0.85 cm。筛选出的 3 号株系的繁殖系数达 24.40。【结论】研究结果可为闽楠良种繁育提供参考。图 2 表 6 参 16

关键词: 树木育种学; 闽楠; 微扦插; 褐化

中图分类号: S722.8

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2020)01-0188-07

A micro-cutting system for breeding of *Phoebe bournei*

XIAO Yeling¹, TONG Zaikang¹, WU Jianhui²

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;

2. The People's Government of Sandu Town, Jiande 311605, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The mature embryos of *Phoebe bournei* were used as explants, and a variety of methods were used to establish the micro-cutting and breeding system of *P. bournei*. [Method] To explore the effects of different cotyledon excision intensities on embryo browning, the type and concentration of anti-browning agent, the effect of indolebutyric acid (IBA) on the germination of near mature embryos, and the rooting of sterile seedlings, nearly-mature cotyledon embryos of *P. bournei* were used as explants. [Result] The main browning part of *P. bournei* nearly-mature cotyledon embryos was the cotyledon. The embryo could germinate but it grew weak after the cotyledon was cut off. The addition of anti-browning agents inhibited the browning. The optimal culture medium for germination of the nearly-mature cotyledon embryo was 1/2 Murashige and Skoog (MS) + 0.2 mg·L⁻¹ IBA + 2 g·L⁻¹ polyvinylpyrrolidone (PVP) with a germination rate of 89.7%. The optimal culture medium for rooting of an aseptic seedling was 1/2 MS + 1.5 mg·L⁻¹ IBA + 2 g·L⁻¹ PVP, and the rooting rate of the apical bud was 100%. The average number of roots was 3.86, and the average root length was 1.56 cm; whereas, the rooting rate of the lateral bud was 60.3%. The average number of roots was 1.55, and the average root length was 0.85 cm. Also, the three selected strains had a reproductive coefficient of 24.40. [Conclusion] The results could lay a foundation for the breeding of further varieties. [Ch, 2 fig. 6 tab. 16 ref.]

Key words: tree breeding; *Phoebe bournei*; microcuttage; browning

闽楠 *Phoebe bournei* 为樟科 Lauraceae 楠属 *Phoebe* 植物, 常绿乔木, 分布于江西、福建、浙江南部、

收稿日期: 2018-12-29; 修回日期: 2019-04-04

基金项目: 浙江省农业(林业)新品种选育重大科技专项(2016C02056-2)

作者简介: 肖业玲, 从事林木遗传育种研究。E-mail: 1334566316@qq.com。通信作者: 童再康, 教授, 博士, 博士生导师, 从事珍贵树种资源保育与育种研究。E-mail: zktong@zafu.edu.cn

广东、广西等地的亚热带常绿阔叶林地带，为中国特有的国家二级保护植物。闽楠材质优良、用途广泛，有很高的经济价值，是优良珍贵用材和园林绿化树种^[1-2]。然而，由于长期人为破坏，闽楠自然繁育率低，自然资源已接近枯竭^[3]。种子繁殖是楠木常规的繁殖方式^[4]，但是种苗繁殖效率低，生长周期长，具有很高的杂合性，很难保持其优良性状。目前，在扦插繁殖中，基质、生根促进剂质量浓度、季节等3种因子都会影响闽楠嫩枝扦插生根率及幼根生长^[5-6]。植物组织培养技术是建立珍贵树种无性繁殖体系的重要手段，这一技术不仅能缩短育种周期，在短时间内快速繁育良种，还能为转基因平台的搭建打下基础。以闽楠近成熟种子为外植体进行组培快繁技术研究未见报道。因此，本研究以闽楠近成熟胚为外植体建立闽楠微扦插繁殖体系，探讨抗褐化剂和生长素对近成熟胚萌发以及微扦插生根的影响，以期获得闽楠微扦插繁殖的最佳培养条件，为闽楠良种的快速繁殖、后续生理及分子研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

闽楠果实在未成熟时为青绿色，质地较硬，等到发育至成熟时果皮变为紫黑色，同时果肉变软，挤压有汁液流出。由于未成熟的闽楠种子组培萌发率较低，而成熟种子外部的果肉易霉烂，组培污染率较高，因此以果皮颜色变为紫黑色而果肉未明显变软的近成熟果作为试验材料。

2017年11月19日于江西婺源上梅洲塘村和马家村采集闽楠近成熟果实。选取长势良好、树干通直、结实量较多的7个株系，采集光滑饱满、无病虫害的果实，沙藏保存，每隔5 d喷水1次。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒处理 取闽楠近成熟果实于组培瓶中，流水冲洗2 h后，用体积分数为75%的乙醇浸泡30 s，无菌水冲洗3~4次后，加入质量分数为0.1%的氯化汞(HgCl₂)溶液消毒8~10 min，期间摇动组培瓶2~3次，使消毒液与果实充分接触，随后用无菌水冲洗4~5次。在超净工作台上，用无菌滤纸吸干表面水分，用镊子将果皮拨开，用解剖刀将种皮划开。将去掉种皮的胚快速接种至培养基中，每瓶接种2~4个。培养温度为(25±2)℃，光照/黑暗周期为18 h/6 h，光照强度为2 000~2 500 lx。

1.2.2 胚褐化试验 以1/2 MS为基础培养基，添加0.2 mg·L⁻¹的IBA。将种子消毒后去掉种皮，分别切去全部子叶、切去一半子叶，与保留全部子叶(ck)作为对照组，每组试验至少接种5瓶，每瓶4~6个胚，重复3次，统计褐化率。褐化率=褐化植株数量/接种植株数量×100%。

1.2.3 褐化程度和褐化多酚氧化酶(PPO)活性 以1/2 MS为基础培养基，添加0.2 mg·L⁻¹的IBA，分别添加1.00、2.00、4.00 g·L⁻¹的聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)和0.25、0.50、1.00 g·L⁻¹的维生素C(VC)。取接入培养基0、3和10 d的7号株系近成熟胚，测定其褐化程度等生理指标。褐化程度：取0.5 g胚，加入预冷磷酸缓冲液(pH 7.0)3 mL，快速研磨，将研磨液倒入离心管中，用7 mL缓冲液冲洗研钵，合并后4℃离心(1 200×g)10 min，取上清液3 mL于比色皿中，在475 nm测光密度，重复3次。以光密度代表褐化程度，光密度D(475)越大代表褐化程度越大^[7]。PPO活性：取0.5 g胚，加入预冷的磷酸缓冲液(pH 7.0)3 mL，研磨，转移至离心管中，再用7 mL缓冲液冲洗研钵，合并提取液，4℃离心(1 200×g)10 min，取上清液为粗酶液，将0.5 mL邻苯二酚加入2 mL磷酸缓冲液(pH 7.0)中，加入0.5 mL酶提取液，立即于波长410 nm下测定光密度，2 min后再计光密度，以不加酶提取液的反应液为对照，重复3次，以2 min内光密度上升1为1个酶活单位^[8]。

1.2.4 不同抗褐化剂对胚萌发试验 采用的实验材料为3号株系，以1/2 MS为基础培养基，添加0.2 mg·L⁻¹ IBA，分别添加1.00、2.00、4.00 g·L⁻¹ PVP和0.25、0.50、1.00 g·L⁻¹ VC，每组培养基均添加30 g·L⁻¹蔗糖，7 g·L⁻¹琼脂，pH调至6.0，每个处理接种15瓶，接种2~4个胚·瓶⁻¹，重复3次。培养45 d后统计萌发情况，并计算每个处理相应的萌发率。萌发率=萌发植株数量/接种植株数量×100%。

1.2.5 不同吲哚丁酸(IBA)质量浓度对胚萌发试验 以1/2 MS为基础培养基，设计单因素试验，分别添加0.2、0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹ 4个质量浓度的IBA，以不添加植物生长素为对照(ck)，附加2 g·L⁻¹ PVP，7 g·L⁻¹的琼脂，蔗糖30 g·L⁻¹，pH调至6.0，每个处理接种15瓶，重复3次。培养45 d后统计萌发情况，并计算出每个处理相应的萌发率。

1.2.6 不同抗褐化剂对微扦插生根试验 采用5号株系作为实验材料，以1/2 MS+1.5 mg·L⁻¹ IBA为基础

培养基, 分别加入 0.25、0.50、1.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{VC}$ 和 1.00、2.00、4.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{PVP}$, 以不添加任何抗褐化剂的基础培养基作为对照(ck), 每个处理接种 10 瓶, 接种 3~5 个芽 $\cdot\text{瓶}^{-1}$, 重复 3 次。30 d 后统计生根率、平均生根数和平均根长。生根率=生根植株数量/接种植株数量 $\times 100\%$; 平均生根数=所有生根植株总的生根数量/生根植株数量; 平均根长=所有生根的长度总和/生根植株数量。

1.2.7 不同质量浓度 IBA 对无菌苗微扦插试验 以 1/2MS 为基础培养基, 采用 6 号株系, 分别添加 0.2 和 1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2 个 IBA 质量浓度, 以不添加 IBA 的培养基为对照(ck), 附加 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP, 7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂, 蔗糖 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 调至 6.0, 每个处理接种 15 瓶, 重复 3 次。培养 45 d 后统计生根情况, 并计算出每个处理相应的生根率。

1.2.8 繁殖系数 闽楠近成熟胚接种 30 d 后去掉顶芽, 60 d 后侧芽可用于微扦插, 微扦插苗生长 60~90 d 后可进行移栽, 每年每株无菌苗最多可剪取 4 次芽用于微扦插。去掉顶芽 60 d 后统计长度大于 1 cm 芽的数量, 每个株系至少统计 5 株。繁殖系数=平均新生侧芽数量。

1.3 数据统计与处理

采用 Excel 2007 与 SPSS 20.0 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 子叶切除处理下的胚褐化

从表 1 可见: 虽然不同株系胚褐化率有所差异, 但是整体表现出相似的规律, 即保留全部子叶时褐化率最高, 其中 1 号株系褐化率最高, 达 60.81%, 而不留子叶时褐化率最低, 在 6 号株系中褐化率仅为 13.84%。然而, 对萌发后无菌苗后续生长观察发现, 切除全部子叶的无菌苗较细长, 长势较差, 真叶无法正常展开。因而, 后续研究中采用保留全部子叶、通过抗褐化剂控制子叶褐化程度的方法来提高胚的萌发率并保证无菌苗的生长。

表 1 子叶切除对胚褐化的影响

Table 1 Effect of cotyledonectomy on embryo browning

子叶切除状态	不同株系的褐化率/%					
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号
保留全部子叶	60.81 \pm 9.84 cB	49.77 \pm 3.14 cB	47.25 \pm 2.45 bB	54.07 \pm 3.57 cC	59.67 \pm 3.96 cB	55.98 \pm 1.32 cB
切除一半子叶	39.89 \pm 4.88 bA	39.13 \pm 7.49 bB	35.62 \pm 10.47 bAB	36.65 \pm 2.35 bB	48.34 \pm 3.26 bB	43.33 \pm 8.22 bB
切除全部子叶	20.89 \pm 3.04 aA	14.29 \pm 4.34 aA	18.03 \pm 8.14 aA	14.78 \pm 4.75 aA	32.12 \pm 4.70 aA	13.84 \pm 6.80 aA

说明: 褐化率为平均值 \pm 标准差。同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$), 同列不同大写字母表示不同处理间差异极显著($P < 0.01$)

2.2 不同抗褐化剂下子叶褐化和 PPO 活性

2.2.1 子叶褐化 如图 1A 所示: 闽楠近成熟胚在 1/2 MS 培养基中培养 3 d 时开始发生褐变, 在未加入任何抗褐化剂时, 种子褐化程度较重, 10 d 时光密度 $D(475)$ 达 1.2, 且萌发较为迟缓。而添加 VC 和 PVP 的种子褐化程度降低, 生长状况渐好。不同种类和质量浓度的抗褐化剂对抑制褐化的效果不同, 添加了 PVP 或 VC 时在第 3 天时都有不同程度褐化, 其中褐化程度为添加 1.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{PVP} > 2.00 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{PVP} > 4.00 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{PVP}$ 。VC 褐化值在 0~10 d 均低于 PVP 和 ck, 到第 3 天时, 添加 0.50 和 1.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{VC}$ 的褐化值均下降, 到了第 10 天时, VC 褐化程度均呈上升趋势, 当 VC 的添加量为 1.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 10 d 时, 种子褐化率最低, 为 25%。

2.2.2 PPO 活性 分析 PPO 活力(图 1B)可见: 在添加了 PVP 的培养基中, 子叶中 PPO 活性在第 3 天时与 ck 大致相等, 呈平稳状态, 到第 10 天时, PVP 组的活性高于 ck 组, 其中, PPO 活性为添加 4.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{PVP} > 1.00 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{PVP} > 2.00 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{PVP}$ 。VC 组在整个过程中, 子叶中 PPO 活性一直呈下降趋势, 第 3 天时, PPO 活性为添加 1.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{VC} > 0.25 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{VC} > 0.50 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{VC}$, 到了第 10 天, PPO 活性为添加 0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{VC} > 0.50 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{VC} > 1.00 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{VC}$, 且一直低于 PVP 组和 ck 组。因此, 添加的最适抗褐化剂为 2.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{PVP}$ 。

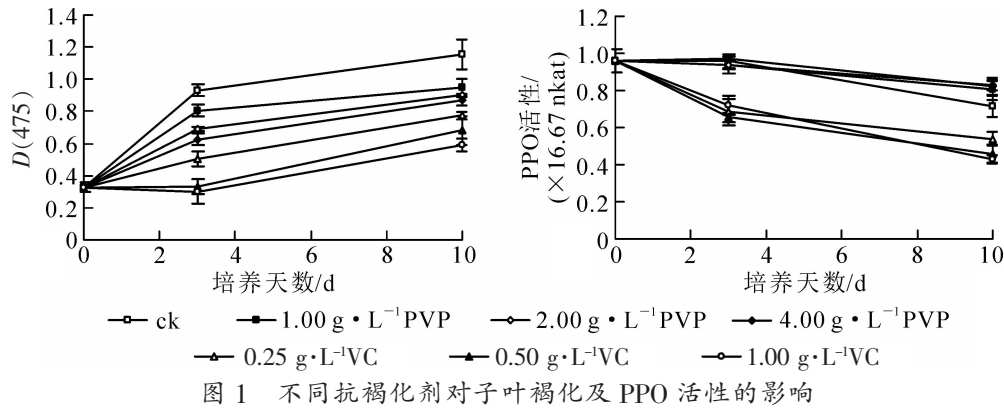


Figure 1 Influence of different anti-browning agents on browning and PPO activity

2.3 不同抗褐化剂对胚萌发的影响

从表 2 可见：以 1/2 MS 为基础培养基，添加 0.2 mg·L⁻¹ IBA，3 号株系在添加 PVP 诱导近成熟种子胚的萌发效果较好，而添加 2.00 g·L⁻¹ PVP 的效果最好，萌发率为 83.57%，添加 VC 时胚萌发则较差，在添加 0.25 g·L⁻¹ 时，胚萌发率为 53.06%。

2.4 不同质量浓度 IBA 对胚萌发的影响

从表 3 可以看出：闽楠近成熟胚萌发对 IBA 较为敏感，较低质量浓度的 IBA 诱导即可萌发，且萌发率较高。IBA 质量浓度为 0.2 mg·L⁻¹ 时效果最好，萌发率最高的 6 号株系可达 89.71%。随着 IBA 质量浓度的升高萌发率下降，IBA 质量浓度达 1.0 mg·L⁻¹ 及以上时，萌发率低于 ck。闽楠近成熟胚萌发较适 IBA 质量浓度为 0.2 mg·L⁻¹。

表 2 不同抗褐化剂下胚萌发的变化

Table 2 Change of different anti-browning agents on cotyledon embryo germination

抗褐化剂	质量浓度/(g·L ⁻¹)	萌发率/%
PVP	1.00	61.64 ± 5.61 bAB
PVP	2.00	83.57 ± 4.49 aA
PVP	4.00	43.80 ± 9.24 cdBC
VC	0.25	53.06 ± 9.78 bcBC
VC	0.50	33.27 ± 1.52 deCD
VC	1.00	19.43 ± 4.66 eD

说明：萌发率为平均值±标准差。同列不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)，同列不同大写字母表示处理间差异极显著(P<0.01)

表 3 不同质量浓度 IBA 下胚萌发的变化

Table 3 Change of different concentrations of IBA on cotyledon embryo germination

IBA 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	不同株系的萌发率/%		
	4 号	5 号	6 号
0.2	75.37 ± 5.75 aA	84.27 ± 3.41 aA	89.71 ± 6.63 aA
0.5	67.96 ± 7.78 aA	73.27 ± 5.89 aAB	78.43 ± 7.13 aAB
1.0	38.20 ± 9.38 bB	58.67 ± 9.01 aB	40.42 ± 4.69 cC
1.5	29.97 ± 4.64 bB	27.92 ± 8.09 aC	36.95 ± 1.91 cC
0(ck)	42.77 ± 7.33 bB	52.53 ± 6.57 aB	61.82 ± 9.24 bB

说明：萌发率为平均值±标准差。同列不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)，同列不同大写字母表示处理间差异极显著(P<0.01)

2.5 不同抗褐化剂对无菌苗微扦插生根的影响

从表 4 可见：以添加 1.5 mg·L⁻¹ IBA 的 1/2 MS 培养基为基础培养基，添加 PVP 诱导闽楠无菌苗微扦插生根效果较好，顶芽生根率均达 100%。其中，添加 2.00 g·L⁻¹ PVP 在接种 15 d 开始生根，至 30 d 时，顶芽平均生根数为 3.86 条，平均根长 1.56 cm；侧芽生根率为 60.27%，平均生根数为 1.55 条，平均根长 0.85 cm。添加 VC 时生根效果较差，仅在添加 0.25 g·L⁻¹ 时有 66.81% 的顶芽生根，但是生根数量与平均根长均明显低于添加 PVP 的培养基，而随着质量浓度的升高，顶芽微扦插后无法生根。在添加了 VC 的生根培养基中，侧芽均无法生根。在不添加任何抗褐化剂(ck)中顶芽生根情况也没有添加 PVP 效果好，闽楠近成熟种子微扦插生根较适用的抗褐化剂为 2.00 g·L⁻¹ PVP。

2.6 不同质量浓度 IBA 对无菌苗微扦插的影响

如图 2 所示：闽楠微扦插生根较慢，平均 15 d 左右开始生根。从表 5 可以看出：在无菌苗继代生根培养中，1.5 mg·L⁻¹ IBA 效果最好，生根率最高，顶芽生根率均达 100%，15 d 可发新根，平均生根数约 2.85 条，平均根长为 1.07 cm，侧芽生根率为 52.24%，平均生根数约 1.48 条，平均根长为 0.56 cm。闽楠无菌苗微扦插生根较适培养基为 1/2 MS+1.5 mg·L⁻¹ IBA+2.00 g·L⁻¹ PVP。

表4 不同抗褐化剂下微扦插生根的变化

Table 4 Change of different anti-browning agents and concentrations on rootage after microcuttage

抗褐化剂	质量浓度/ (g·L ⁻¹)	顶芽			侧芽		
		生根率/%	平均生根数/条	平均根长/cm	生根率/%	平均生根数/条	平均根长/cm
PVP	1.00	100 aA	2.13 ± 0.08 bcC	1.47 ± 0.49 aA	32.84 ± 6.01 cC	1.12 ± 0.23 bB	0.43 ± 0.33 bAB
	2.00	100 aA	3.86 ± 0.37 aA	1.56 ± 0.31 aA	60.27 ± 1.74 aA	1.55 ± 0.19 aA	0.85 ± 0.29 aA
	4.00	100 aA	2.72 ± 0.37 bB	1.47 ± 0.35 aA	45.85 ± 7.29 bB	1.31 ± 0.11 bAB	0.75 ± 0.2 aA
VC	0.25	66.81 ± 7.78 bB	1.69 ± 0.42 cC	0.51 ± 0.31 bB	0 dD	0 cC	0 cB
	0.50	0 dD	0 eE	0 bB	0 dD	0 cC	0 cB
	1.00	0 dD	0 eE	0 bB	0 dD	0 cC	0 cB
ck	0.00	38.89 ± 6.76 cC	1.05 ± 0.14 dD	0.23 ± 0.09 bB	0 dD	0 cC	0 cB

说明：数据为平均值±标准差。同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)，同列不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)

表5 不同质量浓度 IBA 处理下无菌苗微扦插的变化

Table 5 Change of different concentrations of IBA on micro-cutting of sterile seedlings

IBA 质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	顶芽			侧芽		
	生根率/%	平均生根数/条	平均根长/cm	生根率/%	平均生根数/条	平均根长/cm
0.2	66.67 ± 3.85	1.44 ± 0.23	0.97 ± 0.46	33.41 ± 5.49	1.25 ± 0.16	0.22 ± 0.10
1.5	100	2.85 ± 0.32	1.07 ± 0.28	52.24 ± 6.75	1.48 ± 0.23	0.56 ± 0.30

说明：数据为平均值±标准差

2.7 不同株系的繁殖系数

从表6可见：4号、5号、6号株系生根率均为100%。其中4号株系的无菌苗芽小而短，可用于微扦插的芽较少，因而繁殖系数偏低，而3号株系有较多丛生芽现象出现(图2G~I)，繁殖系数高。综上，闽楠无菌苗微扦插体系中，3号、5号、6号株系表现较好，其中3号家系繁殖系数为24.40。

表6 不同株系繁殖系数的变化

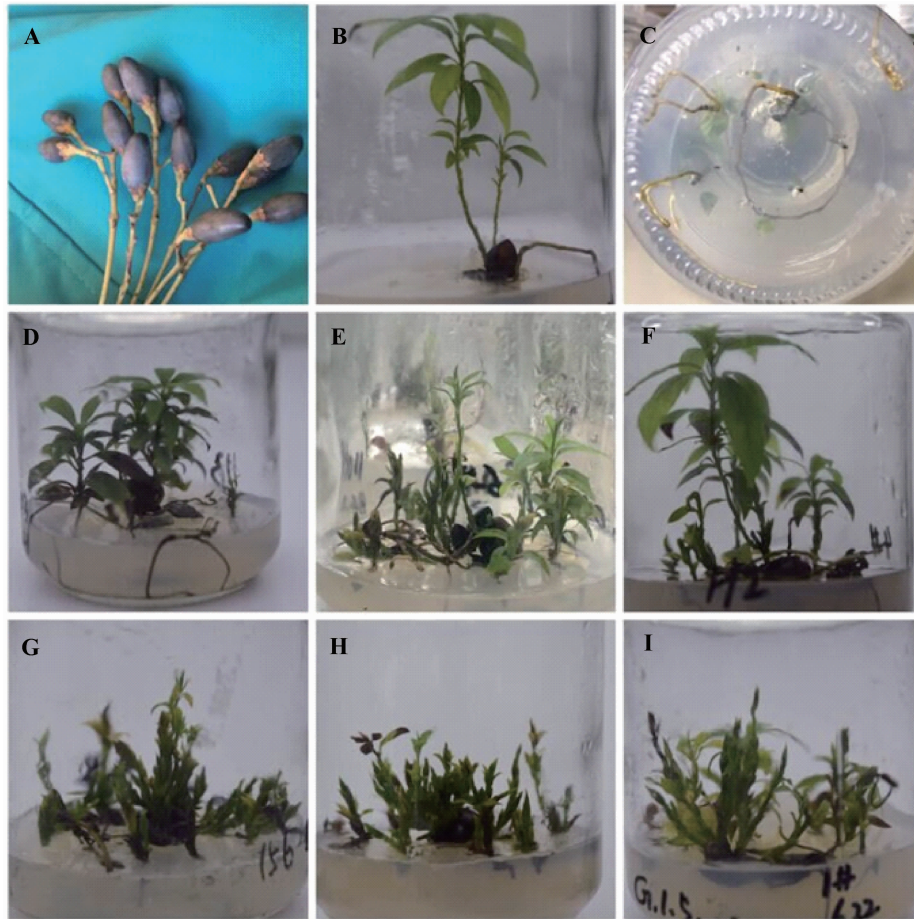
Table 6 Change of reproductive coefficient of different families

株系	生根率/%	平均生根数/条	平均根长/cm	繁殖系数
1号	91.27 ± 6.89 aB	2.18 ± 0.41 bcCD	1.09 ± 0.22 abBC	7.29
2号	96.38 ± 2.28 aAB	2.57 ± 0.25 bcBC	1.18 ± 0.35 abBC	4.00
3号	75.48 ± 4.31 bC	1.85 ± 0.18 cD	0.97 ± 0.12 bA	24.40
4号	100 aA	4.14 ± 0.35 aA	1.69 ± 0.20 aA	3.20
5号	100 aA	3.86 ± 0.37 aA	1.56 ± 0.31 abAB	3.44
6号	100 aA	2.85 ± 0.32 bB	1.07 ± 0.28 abC	3.55

说明：平均生根率、平均生根数、平均根长为平均值±标准差。同列不同小写字母表示同一指标不同株系间差异显著($P<0.05$)，同列不同大写字母表示同一指标不同株系间差异极显著($P<0.01$)

3 结论与讨论

PPO 是一类广泛存在于植物中的氧化酶^[9]，在褐化过程中起关键作用^[10]。当细胞中的膜结构遭到破坏后，原本绑定于膜上的 PPO 随即被激活^[11]，将酚类物质氧化生成醌类物质，再经非酶促反应聚合形成褐色物质，对植物产生毒害作用^[12]。褐化发生与外植体内酚类物质的含量呈正相关^[13]。由于细胞中含有较多的酚类化合物，闽楠近成熟胚在组培体系中萌发时，子叶褐化情况较为严重，对其萌发以及后续的生长均会产生不利影响。在切除子叶后发现，胚在培养基中的萌发率明显提高，但由于缺乏子叶所提供的营养，其后续生长较为缓慢，叶片无法正常展开。因此，本研究保留子叶以保证无菌苗萌发后的生长，同时通过添加抗褐化剂的方法来抑制子叶褐化。抗褐化剂按作用原理可主要分为2种：一种是具有还原能力的抗氧化剂，另一种是具有多孔洞结构的吸收剂。还原型抗氧化剂主要有维生素C(VC)、硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)和硝酸银(AgNO₃)等，添加这一类抗褐化剂可以改变外植体周围的氧化还原电势，从



A. 闽楠近成熟果实；B. 无菌苗；C. 微扦插生根；D~F. 微扦插生长情况；E~I. 微扦插苗繁殖情况
图 2 闽楠近成熟胚微扦插繁育情况

Figure 2 Micro-cutting and breeding of near mature embryos of *P. bournei*

而抑制酚类氧化，减轻褐变。而吸收型抗褐化剂主要有聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和活性炭(AC)等，这类抗褐化剂具有特殊的孔洞结构，能够吸收固定酚类物质，阻止其与 PPO 的接触，从而起到减轻褐化的效果^[14]。本研究发现：还原型抗褐化剂 VC 能够抑制 PPO 活性，对子叶褐化的抑制能力较强，但是它同时也影响了其他生理过程，最终造成胚萌发受阻。而吸收型抗褐化剂 PVP 不影响 PPO 活性，对子叶褐化有一定的抑制能力，能够显著提高胚的萌发率，同时对无菌植株的后续生长也无明显抑制。因此，本研究中闽楠胚萌发培养基中添加 $2.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP 显著抵制 PPO 活性，这与陈梦倩等^[15]研究的抗褐化剂对香港四照花 *Dendrobenthamia hongkongensis* 褐化的影响试验结果一致。

适宜质量浓度的抗褐化剂不仅能够缓解子叶的褐化和促进胚的萌发，同时在微扦插生根时也能起到积极作用。本研究中，添加 $2.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP 时顶芽和侧芽的生根情况最好，与不添加任何抗褐化剂的对照组(ck)相比，所生出的根较为粗壮，颜色也较浅。而 VC 作为一种还原剂，虽然能强烈抑制褐化，但同时也抑制了植物组织其他正常的生理活动，导致微扦插生根率降低。

添加适量的 IBA 能够显著提高生根率和不定根以及试管苗的生长速度。本研究表明：添加 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 能够促进闽楠近成熟胚萌发。随着 IBA 质量浓度的升高，萌发率下降。IBA 质量浓度达 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上时，根粗短、植株小、长势慢，不利于后期生长，这与二花蝴蝶草 *Torenia biniflora* 的组织培养及植株再生现象相似^[16]。添加高质量浓度的 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 能够促进闽楠无菌苗生根，顶芽生根率为 100%，平均生根数为 3.86 条，平均根长为 1.56 cm；侧芽生根率为 60.27%，平均生根数为 1.55 条，平均根长为 0.85 cm，比添加低浓度 IBA 效果显著。

4 参考文献

[1] 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.

- [2] 何应会, 梁瑞龙, 蒋焱, 等. 珍贵树种闽楠研究进展及其发展对策[J]. 广西林业科学, 2013, **42**(4): 365 – 370.
HE Yinghui, LIANG Ruilong, JIANG Yi, *et al.* Research progress of precious species *Phoebe bournei* and its development strategies [J]. *Guangxi For Sci*, 2013, **42**(4): 365 – 370.
- [3] 李志辉, 李柏海, 祁承经, 等. 我国南方珍贵用材树种资源的重要性及其发展策略[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, **32**(11): 1 – 8.
LI Zhihui, LI Bohai, QI Chengjing, *et al.* Studies on importance of valuable wood species resources and its development strategy [J]. *J Cent South Unive For Technol*, 2012, **32**(11): 1 – 8.
- [4] 张丽君, 胡炜, 莫木信, 等. 闽楠苗木繁育及造林技术[J]. 中南林业调查规划, 2016, **35**(2): 41 – 44.
ZHANG Lijun, HU Wei, MO Muxin, *et al.* Study on seedling breeding and afforestation technology of *Phoebe bournei* (Hemsl.) Yang [J]. *Cent South For Inventory Plann*, 2016, **35**(2): 41 – 44.
- [5] 范剑明, 谢金兰, 张冬生, 等. 闽楠嫩枝扦插繁育研究[J]. 林业与环境科学, 2017, **33**(6): 30 – 33.
FAN Jianming, XIE Jinlan, ZHANG Dongsheng, *et al.* Study on softwood cutting technology of *Phoebe bournei* [J]. *For Environ Sci*, 2017, **33**(6): 30 – 33.
- [6] 王东光, 尹光天, 邹文涛, 等. 不同基质和季节对闽楠嫩枝扦插生根的影响[J]. 热带作物学报, 2013, **34**(8): 1458 – 1462.
WANG Dongguang, YIN Guangtian, ZOU Wentao, *et al.* Effects of different substrates and seasons on shoot cutting propagation of *Phoebe bournei* [J]. *Chin J Trop Crops*, 2013, **34**(8): 1458 – 1462.
- [7] COSETENG M Y, LEE C Y. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning [J]. *J Food Sci*, 1987, **52**(4): 985 – 989.
- [8] 张月玲, 肖尊安, 熊红. 红豆杉愈伤组织生长与 PPO, POD 比活性和多酚质量分数变化的研究[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2002, **38**(6): 800 – 804.
ZHANG Yueling, XIAO Zun'an, XIONG Hong. A study on the callus growth of *Taxus* and the changes in polyphenol level and the activity of polyphenol oxidase and peroxidase [J]. *J Beijing Norm Univ Nat Sci*, 2002, **38**(6): 800 – 804.
- [9] MAYER A M, HAREL E. Polyphenol oxidases in plants [J]. *Phytochemistry*, 1979, **18**(2): 193 – 215.
- [10] LEI J, LI B J, ZHANG N, *et al.* Effects of UV-C treatment on browning and the expression of polyphenol oxidase (PPO) genes in different tissues of *Agaricus bisporus* during cold storage [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2018, **139**: 99 – 105.
- [11] ORENES-PIÑERO E, GARCÍA-CARMONA F, SÁNCHEZ-FERRER A. Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): purification, activation and some properties [J]. *J Sci Food Agric*, 2006, **86**(13): 2172 – 2178.
- [12] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, **27**(增刊): 481 – 486.
ZHOU Junhui, ZHOU Jiarong, ZENG Haosen, *et al.* Advance of studies on browning and antibrowning techniques in the tissue culture of horticultural plants [J]. *Acta Hort Sin*, 2000, **27**(suppl): 481 – 486.
- [13] DALAL M A, SHARMA B B, RAO M S. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in in vitro cultures of grapevine [J]. *Sci Hort*, 1992, **51**(1/2): 35 – 41.
- [14] 王倩颖, 唐佳妮, 刘志高, 等. 景宁木兰组织培养外植体选择与抗褐化研究[J]. 广西植物, 2017, **37**(9): 1088 – 1095.
WANG Qianying, TANG Jiani, LIU Zhigao, *et al.* Explant selecting and anti-browning of *Magnolia sinostellata* in tissue culture [J]. *Guihaia*, 2017, **37**(9): 1088 – 1095.
- [15] 陈梦倩, 范李节, 王小德. 香港四照花外植体的抗褐化处理与诱导培养[J]. 浙江农林大学学报, 2018, **35**(4): 778 – 784.
CHEN Mengqian, FAN Lijie, WANG Xiaode. Anti-browning treatments and induction on explants of *Dendrobenthamia hongkongensis* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2018, **35**(4): 778 – 784.
- [16] 王瑛华, 石秋英, 陈雄伟, 等. 二花蝴蝶草的组织培养及植株再生[J]. 广西植物, 2015, **35**(2): 250 – 254, 249.
WANG Yinghua, SHI Qiuying, CHEN Xiongwei, *et al.* Tissue culture and plant regeneration from *Torenia biniflora* [J]. *Guihaia*, 2015, **35**(2): 250 – 254, 249.