

不同抗褐变剂组合对海南龙血树组织培养 及抗褐变效果的影响

胡燕梅¹, 方中明^{2*}, 郑孝丹²

(¹江汉大学 期刊社, 武汉 430056; ²武汉生物工程学院 生命科学与技术学院, 武汉 430415)

摘要:【目的】探讨不同抗褐变剂及其组合对海南龙血树组织培养及抗褐变效果的影响,为其种苗的快速繁殖提供参考依据。【方法】采用3种抗褐变剂处理海南龙血树外植体嫩茎,开展愈伤组织诱导与抗褐变试验;在基本培养基MS中添加不同浓度的6-BA和NAA组合,检测其对海南龙血树愈伤组织分化不定芽和丛生芽形成的影响。【结果】海南龙血树嫩茎在0.1 g/L半胱氨酸(Cys)溶液中浸泡10 min后接种于含0.1 g/L维生素C(Vc)的培养基中,褐变率比对照(CK)低,仅20.5%,愈伤组织诱导率最高,为75.5%;适宜龙血树嫩茎愈伤组织诱导的植物生长调节剂组合为6.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,诱导率为75.5%;适宜龙血树芽增殖的植物生长调节剂组合为4.0 mg/L 6-BA +0.2 mg/L NAA,增殖倍数为3.3。【结论】采用Cys和Vc两种抗褐变剂组合处理可适当减轻龙血树组培过程中嫩茎的褐变程度,促进愈伤组织诱导;培养基中适当添加6-BA和NAA可促进愈伤组织的不定芽分化和丛生芽形成。

关键词:海南龙血树;愈伤组织;褐变;半胱氨酸(Cys);维生素C(Vc)

中图分类号:S722.37

文献标志码:A

文章编号:2095-1191(2017)11-2023-07

Effects of different anti-browning agent combinations on tissue culture and anti-browning of *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep.

HU Yan-mei¹, FANG Zhong-ming^{2*}, ZHENG Xiao-dan²

(¹Journal Department, Jiangnan University, Wuhan 430056, China; ²School of Life Science and Technology, Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan 430415, China)

Abstract:【Objective】Effects of different anti-browning agents and agent combinations on tissue culture and anti-browning of *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep. were studied to provide reference basis for rapid propagation of seedlings. 【Method】Young stems of *D. cambodiana* explants were treated by three kinds of anti-browning agents to test the callus induction and anti-browning. Different combinations of plant growth regulator 6-BA and NAA at various concentrations were added into basic medium MS to detect their effects on adventitious bud differentiation from callus and cluster bud formation of *D. cambodiana*. 【Result】The result showed that the anti-browning rate (20.5%) was lower than CK, and callus induction rate reached the maximum (75.5%) under the treatment of soaking the young stems in 0.1 g/L cysteine (Cys) solution for 10 min and then inoculating it on medium with 0.1 g/L of vitamin C (Vc). Plant growth regulator combination 6.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA was suitable for callus induction of *D. cambodiana* young stems, and the induction rate was 75.5%. 4.0 mg/L 6-BA +0.2 mg/L NAA combination was optimal for bud proliferation, and the proliferation multiple was 3.3. 【Conclusion】Using anti-browning agent Cys and Vc can reduce the browning level of young stems in *D. cambodiana* tissue culture and improve callus induction rate. Adding appropriate amount of 6-BA and NAA combinations into culture medium can promote adventitious bud differentiation from callus and cluster bud formation.

Key words: *Dracaena cambodiana*; callus; browning; cysteine (Cys); vitamin C (Vc)

0 引言

【研究意义】海南龙血树(*Dracaena cambodiana*

Pierre ex Gagnep.)为龙舌兰科常绿灌木,生长十分缓慢,生命期长达八千年,被誉为植物寿星,是我国

收稿日期:2016-12-01

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31301250);湖北省教育厅科学技术研究项目(B2015384)

作者简介:*为通讯作者,方中明(1984-),博士,主要从事植物生物技术研究工作,E-mail:zmfang@mail.hzau.edu.cn。胡燕梅(1979-),副教授,主要从事植物学及植物生物技术研究工作,E-mail:55688461@qq.com

传统名贵中药材血竭的两种基源植物之一,主要分布于热带雨林,多用于园林观赏。由于某些生态因子严重抑制种子萌发或小苗生长,海南龙血树自然更新极差(郑道君等,2009,2016),我国已将其定为珍稀濒危植物,属国家二级重点保护树种。目前海南龙血树野生资源因遭受掠夺性采挖而急剧下降。随着市场需求的增加,应加快开展龙血树野生资源繁育技术研究,并建立规范化、规模化的生产基地以满足市场需求(黄莉雅等,2009)。规模化种植基地的培育首先需要规模化种苗的生产,而海南龙血树较难收获种子,繁殖率较低,通过植物组织培养繁育种苗又存在愈伤组织褐化严重等问题。因此,探讨海南龙血树的组织培养及其抗褐变措施,对龙血树种苗的快速繁育和资源的保护利用具有重要意义。【前人研究进展】杨晓虹等(2009)研究了剑叶龙血树愈伤组织的形成,结果出现严重褐化;黄莉雅等(2010)以剑叶龙血树芽为外植体诱导芽分化,同时探讨了聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和活性炭(AC)防褐化的效果;靳静晨等(2010)研究发现,海南龙血树可以顶芽或腋芽为外植体诱导丛生芽形成,但这种外植体取材方式会消耗大量母本材料;罗冠勇等(2012)以海南龙血树侧芽和顶芽为外植体诱导愈伤组织时,发现暗培养可减轻褐变,提高诱导率;齐安民等(2015)提出控制普通也门铁茎段褐化效果最理想的培养基为MS+0.25 g/L Vc+0.50 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;吴雪松等(2017)以海南龙血树顶芽和茎段为外植体在含6-BA和NAA的培养基中可获得愈伤组织和不定芽。【本研究切入点】海南龙血树为木本植物,其外植体茎段前期培养形成愈伤组织过程中褐化现象严重,影响愈伤组织的形成和再分化,难以快速繁殖,而目前针对抗褐变现象开展的试管苗快速生产研究鲜见报道。【拟解决的关键问题】探讨海南龙血树愈伤组织初始培养阶段的抗褐变措施及后期试管苗增殖的适宜激素组合,为海南龙血树种苗工业化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

海南龙血树购于武汉堤角花卉市场。常规消毒流程为:取健康植株长约5.0 cm幼嫩茎段,置于洗洁精中泡3~5 min后用自来水冲洗30 min,再用蒸馏水冲洗5次;将幼嫩茎段置于超净工作台上用75%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗1次,再用0.1% HgCl_2 溶液泡8 min,无菌水反复冲洗4次。将消毒后的茎段切成长约1.0 cm的小段,每个茎段尽量带一个腋芽,接种

于各试验组培养基中。接种材料均置于光照培养室中培养,培养温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,光照强度1500 lx,光照时间10 h/d。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体茎段愈伤组织诱导与抗褐变试验 以MS+30.0 g/L蔗糖+5.6 g/L琼脂+6.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA($\text{pH}=5.8\pm 0.2$)为基本培养基,以海南龙血树嫩茎为外植体,经过常规消毒流程后直接接种于基本培养基中为对照(CK);选择半胱氨酸(Cys)、维生素C(Vc)和AC 3种抗褐变剂,设I a~I e、II a~II i、III a~III g和IV a~IV b共23个处理(表1)。

1.2.2 6-BA和NAA组合对茎段愈伤组织诱导的影响 以MS+30.0 g/L蔗糖+5.6 g/L琼脂+0.1 mg/L Vc($\text{pH}=5.8\pm 0.2$)为诱导培养基,分别添加6.0、4.0和2.0 mg/L 3个水平的6-BA及0.5和1.0 mg/L 2个水平的NAA,切好的海南龙血树茎段均在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于诱导培养基上,以检测6-BA和NAA组合对茎段愈伤组织的诱导效果。

1.2.3 6-BA与NAA组合对丛生芽增殖的影响 以MS+30.0 g/L蔗糖+5.6 g/L琼脂为增殖培养基,添加6.0、4.0和2.0 mg/L 3个水平的6-BA及0.2和0.5 mg/L 2个水平的NAA,将1.2.2中愈伤组织上得到的海南龙血树芽切成有4~6个芽的丛生芽小块,转接到增殖培养基上,以检测6-BA和NAA组合对丛生芽增殖的影响。

1.3 测定项目及方法

1.2.1和1.2.2中各处理均培养45 d后观察愈伤组织长势,以“-”表示无愈伤组织形成,“+”表示有愈伤组织形成,“+”越多表示愈伤组织长势越好。1.2.3中各处理的丛生芽生长状况记录同愈伤组织生长状况表示。统计有效接种数(接种培养45 d后未污染的接种数),记录诱导率、褐变率、芽增殖倍数及长势状况。同时对材料的生长状态进行拍照。

愈伤组织诱导率(%)=(有效接种数中形成愈伤组织的茎段数/有效接种数) $\times 100$

褐变率(%)=(褐化的外植体茎段数/有效接种数) $\times 100$

丛生芽增殖率(%)=(增殖的丛生芽团数/接种的丛生芽团数) $\times 100$

不定芽分化率(%)=(再生不定芽的愈伤组织数/愈伤组织数) $\times 100$

丛生芽增殖倍数=增殖后芽总数/接种芽数

1.4 统计分析

采用Excel 2003对数据进行处理,以SPSS 18.0进行差异显著性分析。

表 1 海南龙血树抗褐变处理方式
Table 1 Methods of anti-browning treatment for *D. cambodiana*

组合方式 Combination mode	处理 Treatment	抗褐变处理方式 Method of anti-browning treatment
无抗褐变处理 No anti-browning treatment	CK	基本培养基
单一抗褐变处理 Single anti-browning treatment	I a	基本培养基中加入0.1 g/L Vc
	I b	基本培养基中加入0.1 g/L Cys
	I c	基本培养基中加入0.1 g/L AC
	I d	外植体在0.1 g/L Vc溶液中浸泡10 min后接种于基本培养基
	I e	外植体在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于基本培养基
2种抗褐变方式组合 Two combined anti-browning treatment	II a	外植体在0.1 g/L Vc溶液中浸泡10 min后接种于 I a
	II b	外植体在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于 I a
	II c	外植体在0.1 g/L Vc溶液中浸泡10 min后接种于 I b
	II d	外植体在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于 I b
	II e	外植体在0.1 g/L Vc溶液中浸泡10 min后接种于 I c
	II f	外植体在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于 I c
	II g	外植体接种于加有0.1 g/L Cys+0.1 g/L AC的基本培养基(记为 I b+I c)
	II h	外植体接种于加有0.1 g/L Vc+ 0.1 g/L AC的基本培养基(记为 I a+I c)
	II i	外植体接种于加有0.1 g/L Vc+ 0.1 g/L Cys的基本培养基(记为 I a+I b)
3种抗褐变方式组合 Three combined anti-browning treatment	III a	外植体在0.1 g/LVc溶液中浸泡10 min后接种于 I a+I b
	III b	外植体在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于 I a+I b
	III c	外植体在0.1 g/L Vc溶液中浸泡10 min后接种于 I a+I c
	III d	外植体在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于 I a+I c
	III e	外植体在0.1 g/L Vc溶液中浸泡10 min后接种于 I b+I c
	III f	外植体在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于 I b+I c
	III g	外植体接种于加有0.1 g/L Vc+0.1 g/L Cys+0.1 g/L Ac的 基本培养基(记为 I a+I b+I c)
4种抗褐变方式组合 Four combined anti-browning treatment	IV a	外植体在0.1 g/L Vc溶液中浸泡10 min后接种于 I a+ I b+I c
	IV b	外植体在0.1 g/L Cys溶液中浸泡10 min后接种于 I a+ I b+I c

2 结果与分析

2.1 抗褐变处理对海南龙血树茎段愈伤组织诱导和褐变的影响

接种培养15 d后部分嫩茎边缘处少量开始愈伤化,褐变得到有效控制,但大部分嫩茎褐变严重,且边缘处无愈伤化迹象(图1);培养45 d后已形成的愈伤组织多为绿色致密的桑葚状(图2)。



图 1 海南龙血树外植体茎段褐变
Fig.1 Stem segment browning of *D. cambodiana* explant

2.1.1 单一抗褐变方式处理的抗褐变结果 由表2可知,CK的愈伤组织诱导率为0,褐变率达100.0%,完全无生长迹象; I a~I e 5种抗褐变处理中, I a~I c处理的愈伤组织诱导率均为0,说明直接在培养基中加入抗褐变剂效果较差; I e处理的诱导率为

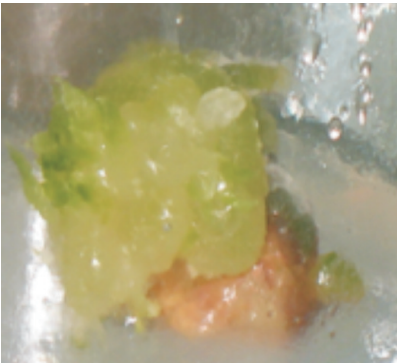


图 2 海南龙血树外植体茎段愈伤组织
Fig.2 Stem segment callus of *D. cambodiana* explant

50.4%,显著高于CK及其他单一抗褐变剂处理($P<0.05$,下同),且褐变率仅35.5%,显著低于CK及其他大部分抗褐变处理(I b处理褐变率为0),说明海南龙血树嫩茎在Cys溶液中浸泡10 min后再接种(I e处理),其愈伤组织诱导和抗褐变效果较好。

2.1.2 2种抗褐变方式组合处理的抗褐变结果 由表3可知, II a~II d处理的外植体经Cys或Vc浸泡后再接入含Vc或Cys的培养基中,其愈伤组织诱导率较CK均显著增加,褐变率显著降低,其中, II b处理的抗褐变效果最佳,其愈伤组织诱导率达75.5%,显著高于其他组合方式处理,褐变率也较低,仅20.5%,说明外植体在Cys溶液中浸泡10 min后再接种到加有0.1 g/L Vc的培养基中,既可提高嫩茎的愈伤诱导

表 2 单一抗褐变方式处理海南龙血树外植体的抗褐变结果分析

Table 2 Anti-browning results analysis of *C. cambodiana* explant under single anti-browning treatment

抗褐变处理 Anti-browning treatment	有效接种数(块) Effective incubation number(piece)	愈伤组织诱导率(%) Callus induction rate	褐变率(%) Browning rate	愈伤组织生长状况 Callus growth status
CK	56	0c	100.0a	—
I a	48	0c	88.8±4.6b	—
I b	39	0c	0e	—
I c	52	0c	95.6±5.2ab	—
I d	56	12.5±1.8b	69.2±3.8c	+
I e	45	50.4±3.7a	35.5±2.4d	++

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。表3~表7同
Different lowercase letters in the same column represented significant difference($P<0.05$). The same was applied in Table 3-Table 7

率,又能降低褐变率;由表2和表3可知,Ⅱb与Ⅰe处理相比,其抗褐变效果也有所提高,褐变率下降15.0%(绝对值,下同),愈伤组织诱导率提高25.1%,说明外植体茎段经Cys浸泡后加入含Vc的培养基中,其愈伤组织诱导及抗褐变效果比单独浸泡Cys效

果更佳;Ⅱe~Ⅱh处理的愈伤组织诱导率和褐变率均为0,而这些培养基中均有AC存在,说明抗褐变剂AC加入培养基中虽能控制褐变却不能诱导愈伤;Ⅱi处理中没有愈伤组织形成,褐变率也较高,印证了表1中Ⅰa+Ⅰb处理的抗褐变效果。

表 3 2种抗褐变方式组合处理海南龙血树外植体的抗褐变结果分析

Table 3 Anti-browning results analysis of *C. cambodiana* explant under two combined anti-browning treatments

抗褐变处理 Anti-browning treatment	有效接种数(块) Effective incubation number(piece)	愈伤组织诱导率(%) Callus induction rate	褐变率(%) Browning rate	愈伤组织生长状况 Callus growth status
CK	56	0e	100.0±0a	—
Ⅱa	50	50.3±2.6b	30.6±4.8c	++
Ⅱb	47	75.5±5.2a	20.5±2.1c	+++
Ⅱc	49	20.4±2.3cd	65.2±5.0b	+
Ⅱd	52	33.5±2.9c	59.3±4.3b	+
Ⅱe	36	0e	0d	—
Ⅱf	41	0e	0d	—
Ⅱg	44	0e	0d	—
Ⅱh	39	0e	0d	—
Ⅱi	46	0e	80.4±5.4a	—

2. 1. 3 3种抗褐变方式组合处理的抗褐变结果 由表4可知,Ⅲa~Ⅲb处理的愈伤组织诱导率为0,且褐变严重;而Ⅲc~Ⅲg处理的褐变率虽为0,但诱导率也为0,即外植体既不能形成愈伤组织也未发生褐变,可能是由于Ⅲc~Ⅲg处理培养基中含有抗褐变剂AC所致,印证了表3中Ⅱe~Ⅱh处理的研究结果;在2.1.2

中Ⅱb处理的抗褐变效果最佳,但Ⅲb处理的诱导率却为0,而Ⅲb处理比Ⅱb处理的培养基中仅多了抗褐变剂Cys,可能是Cys和Vc反应产生了某种物质,在试验中发现加有Vc和Cys的培养基均有难闻气味产生,导致诱导愈伤组织效果较差。

表 4 3种抗褐变方式组合处理的海南龙血树外植体抗褐变结果分析

Table 4 Anti-browning results analysis of *C. cambodiana* explant under three combined anti-browning treatments

抗褐变处理 Anti-browning treatment	有效接种数(块) Effective incubation number(piece)	愈伤组织诱导率(%) Callus induction rate	褐变率(%) Browning rate	愈伤组织生长状况 Callus growth status
CK	56	0	100.0±0a	—
Ⅲa	51	0	90.2±4.6b	—
Ⅲb	49	0	88.6±3.8b	—
Ⅲc	38	0	0c	—
Ⅲd	55	0	0c	—
Ⅲe	46	0	0c	—
Ⅲf	42	0	0c	—
Ⅲg	35	0	0c	—

2. 1. 4 4种抗褐变方式组合处理的抗褐变结果 由表5可知,Ⅳa和Ⅳb处理的褐变率均为0,其愈伤组织诱导率也为0,可能也是培养基中均加有抗褐变剂AC所致。

综合分析表2~表5结果可知,在培养基中加入AC处理的海南龙血树外植体的愈伤组织诱导率和褐变率均为0,即外植体茎段在加入AC的培养基中虽未褐变但也无任何生长迹象,说明AC在吸附有害

表 5 4种抗褐变方式处理组合海南龙血树外植体的抗褐变结果分析

Table 5 Anti-browning results analysis of *C. cambodiana* explant under four combined anti-browning treatments

抗褐变处理 Anti-browning treatment	有效接种数(块) Effective incubation number(piece)	愈伤组织诱导率(%) Callus induction rate	褐变率(%) Browning rate	愈伤组织生长状况 Callus growth status
CK	56	0	100.0a	—
IVa	48	0	0b	—
IVb	54	0	0b	—

物质的同时也吸附了培养基中的激素从而使其失去作用,影响了外植体的进一步生长发育。

综上所述,Ⅱb处理即外植体浸泡Cys后接种在加有Vc的培养基上,其抗褐变效果最佳,褐变率仅20.5%,愈伤组织的诱导率达75.5%,生长状况也较佳(图3),当愈伤组织长大到一定体积后产生了丛生芽(图4)。

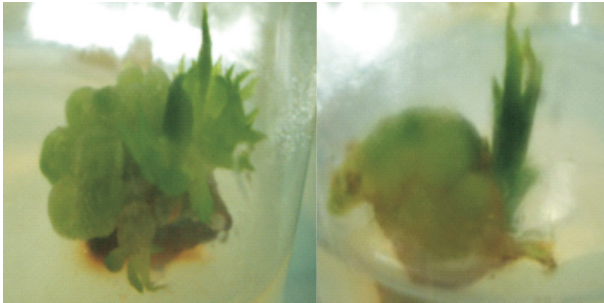


图 3 海南龙血树愈伤组织分化出不定芽
Fig.3 Adventitious buds differentiated from callus of *C. cambodiana*

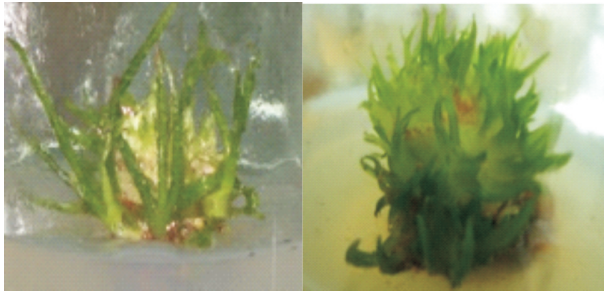


图 4 海南龙血树丛生芽增殖
Fig.4 Cluster buds multiplication of *C. cambodiana*

2.2 6-BA和NAA组合对海南龙血树外植体愈伤组织诱导的影响

海南龙血树外植体茎段接种15 d后观察,茎段

边缘处开始发生愈伤迹象,30 d时部分较大的愈伤组织表面出现绿色芽点,40 d后绿色愈伤组织上均分化出小不定芽(图3)。培养45 d后统计试验结果如表6所示,结果显示,最适宜龙血树嫩茎愈伤组织诱导的激素组合为6.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,诱导率为75.5%。

2.3 6-BA和NAA组合对丛生芽增殖的影响

丛生芽接种20 d后芽丛表面开始出现新的芽点,新芽均为嫩绿色;培养45 d后接种的丛芽基部侧边增殖了新芽,丛生芽增殖率均达100.0%,但芽增殖倍数存在差异,同时仍有少数芽丛基部发生了褐变(图4)。由表7可看出,各处理丛生芽增殖率均达100.0%,表明6-BA+NAA组合对海南龙血树丛生芽增殖效果明显,各处理虽然均有增殖,但增殖倍数差异显著。当6-BA浓度相同时,0.2 mg/L NAA处理较0.5 mg/L NAA处理更有利于丛生芽增殖;当NAA浓度一定时,随着6-BA浓度增加,其增殖倍数呈先增后降的变化趋势,其中4.0 mg/L 6-BA处理的丛生芽增殖倍数均最高,分别达3.3和1.2,说明添加0.2 mg/L NAA比添加0.5 mg/L NAA整体效果更好。

3 讨论

外植体的木质化程度越高、切面与体积的比率越大,其褐化程度越严重;消毒剂对外植体的损伤程度越严重,褐化程度也越高(冯代弟等,2015),木本植物的外植体茎段在愈伤组织诱导阶段容易产生褐变。杨瑞玮(2012)报道硫代硫酸钠能有效控制林荫银莲花外植体褐变;谭谊谈和曾凯芳(2014)研究得出Cys和Vc处理可有效降低鲜切芋艿贮藏期间褐变度的结论。本研究选取3种抗褐变剂在两种不同方

表 6 6-BA和NAA组合对海南龙血树外植体愈伤组织的诱导结果分析

Table 6 Results analysis of combinations 6-BA and NAA on callus induction of *C. cambodiana* explant

激素(mg/L)Hormone		有效接种数(块) Effective incubation number(piece)	愈伤组织诱导率(%) Callus induction rate	不定芽再生率(%) Regeneration rate of adventitious bud	愈伤组织生长状况 Callus growth status
6-BA	NAA				
2.0	0.5	54	10.2±2.0d	100.0	+
4.0	0.5	48	33.3±1.4c	100.0	++
6.0	0.5	52	75.5±6.5a	100.0	+++
2.0	1.0	42	33.6±4.2c	100.0	+
4.0	1.0	39	37.5±3.4c	100.0	++
6.0	1.0	40	60.8±5.0ab	100.0	+++

表 7 6-BA和NAA组合对海南龙血树愈伤组织丛生芽增殖的影响

Table 7 Effects of combinations 6-BA and NAA on cluster buds multiplication *C. cambodiana* callus

激素(mg/L) Hormone		有效接种数(株) Effective incubation number(plant)	丛生芽增殖率(%) Multiplication rate of cluster buds	丛生芽增殖倍数 Multiplication time of cluster buds	丛生芽生长状况 Growth status of cluster buds
6-BA	NAA				
2.0	0.2	48	100.0	1.7±0.3bc	+
4.0	0.2	53	100.0	3.3±0.4a	+++
6.0	0.2	45	100.0	2.2±0.3b	++
2.0	0.5	39	100.0	0.5±0.1de	+
4.0	0.5	56	100.0	1.2±0.2cd	+
6.0	0.5	52	100.0	0.8±0.1cde	+

式下的23种处理对海南龙血树茎段初始培养阶段的抗褐变效果试验,取得了较理想的抗褐变效果。其中,以外植体茎段浸泡Cys溶液后接种于含有Vc的培养基中愈伤组织诱导和抗褐变效果较好,可能是嫩茎在Cys溶液中浸泡后对伤口有保护作用,而Vc又可以降低茎段伤口的氧化程度,所以能达到既降低褐变又提高愈伤化的目的。

6-BA是植物组织培养过程中常用的细胞分裂素之一。本研究在基本培养基中添加4.0 mg/L 6-BA后海南龙血树丛生芽增殖倍数最高,且增殖的芽长势最好,与何旭君等(2006)、陈梅和莫饶(2008)对海南龙血树的研究结果相似;但6-BA浓度高于4.0 mg/L后丛生芽增殖倍数下降。

试验过程中将海南龙血树愈伤组织上的丛生芽切割进行芽增殖时其丛生芽增殖效果较好,但直接将龙血树上的芽消毒后作为外植体进行接种时,其芽增殖效果却较差,芽下端仅愈伤化而未发生丛生芽。薛鹰等(2007)的试验结果也提出以海南龙血树的单芽为外植体诱导率降低,以单芽为外植体接种更易脱分化形成愈伤组织,但在继代增殖过程中,以丛芽为接种材料对芽的增殖数和生长均比单芽有利。本研究还发现,海南龙血树外植体茎段切割方式对试验的影响也很重要,由于海南龙血树是木本植物,其茎中央木质化严重,所以外植体切块时要除去中央木质化部分,且外植体上尽可能带一个腋芽,这样的带芽茎段作为外植体诱导愈伤组织的概率较高,外植体上腋芽抽生小芽的可能性也很高,与吴繁花等(2005)的研究结果相似。靳静晨等(2010)研究发现,海南龙血树以带腋芽的茎段为外植体也可直接进行丛生芽诱导,但目前此类研究报道较少。

李克烈等(2006)以海南龙血树种子为外植体进行愈伤诱导出芽的方式可快速繁殖海南龙血树植株,而本研究是以嫩茎为外植体诱导愈伤组织并获得丛生芽的方式,从而快速繁殖海南龙血树种苗,在外植体选取上有一定区别。

4 结论

采用Cys和Vc两种抗褐变剂组合处理可适当减轻龙血树组培过程中嫩茎的褐变程度,促进愈伤组织诱导;培养基中添加适当浓度6-BA和NAA可促进愈伤组织上不定芽的分化和丛生芽的形成。

参考文献:

- 陈梅,莫饶. 2008. 海南龙血树离体快繁的研究[J]. 安徽农业科学,36(3):968. [Chen M, Mo R. 2008. Study on rapid propagation *in vitro* of *Dracaena cambodiana* [J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 36(3):968.]
- 冯代弟,王燕,陈剑平. 2015. 植物组培褐化发生机制的研究进展[J]. 浙江农业学报,27(6):1108-1116. [Feng D D, Wang Y, Chen J P. 2015. Research progress of browning in the plant tissue culture [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 27(6):1108-1116.]
- 何旭君,刘善辉,冯远来,林晓萍,张华通. 2006. 海南龙血树组织培养快速繁殖技术研究[J]. 广东林业科技,22(1):22-25. [He X J, Liu S H, Feng Y L, Lin X P, Zhang H T. 2006. The study on rapid tissue culture propagation technology of *Dareaena acmbodinna* [J]. Guangdong Forestry Science and Technology, 22(1):22-25.]
- 黄莉雅,陈国臣,马锦林. 2010. 剑叶龙血树芽外植体诱导分化[J]. 广西林业科学,39(3):144-146. [Huang L Y, Chen G C, Ma J L. 2010. Induction and differentiation of explants from bud of *Dracaena cochinchinensis* [J]. Guangxi Forestry Science, 39(3):144-146.]
- 黄莉雅,张日清,马锦林,陈国臣. 2009. 我国濒危龙血竭基源植物的资源现状[J]. 广西林业科学,38(4):256-258. [Huang L Y, Zhang R Q, Ma J L, Chen G C. 2009. The resource status of endangered resina draconis source plants in China [J]. Guangxi Forestry Science, 38(4):256-258.]
- 靳静晨,卜媚,罗雪枫,陈雄进,谭家壮. 2010. 海南龙血树组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 广西农业科学,41(8):755-757. [Jin J C, Bu M, Luo X F, Chen X J, Tan J Z. 2010. A tissue culture technique for rapid propagation of *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 41(8):755-757.]
- 李克烈,李志英,徐立,马千全,罗联忠,黄碧兰,陈伟. 2006. 海南龙血树的组织培养与快速繁殖[J]. 热带农业科学,

- 26(5):22-23. [Li K L, Li Z Y, Xu L, Ma Q Q, Luo L Z, Huang B L, Chen W. 2006. Tissue culture and rapid propagation of *Dracaena cambodiana* [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 26(5):22-23.]
- 罗冠勇, 钟云芳, 宋希强, 戴好富, 杨冬华. 2012. 海南龙血树基于愈伤组织诱导途径的组培快繁技术体系优化[J]. 热带作物学报, 33(10):1824-1828. [Luo G Y, Zhong Y F, Song X Q, Dai H F, Yang D H. 2012. Optimization of tissue culture and rapid propagation technical system based on callus induction of *Dracaena cambodiana* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 33(10):1824-1828.]
- 齐安民, 王家琼, 李楠, 贺涛, 李薇, 崔大方. 2015. 也门铁的组织培养技术研究[J]. 亚热带植物科学, 44(1):23-28. [Qi A M, Wang J Q, Li N, He T, Li W, Cui D F. 2015. Tissue culture technique of *Dracaena fragrans* [J]. Sub-tropical Plant Science, 44(1):23-28.]
- 谭谊谈, 曾凯芳. 2014. 抗坏血酸、半胱氨酸与氯化钙复合处理对鲜切芋艿褐变的影响[J]. 食品科学, 35(4):231-235. [Tan Y T, Zeng K F. 2014. Effects of combined treatment with ascorbic acid, cysteine and CaCl_2 on browning of fresh-cut taro [J]. Food Science, 35(4):231-235.]
- 吴繁花, 朱文丽, 莫饶, 符常明. 2005. 海南龙血树的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 41(2):186. [Wu F H, Zhu W L, Mo R, Fu C M. 2005. Tissue culture of *Dracaena cambodiana* [J]. Plant Physiology Communications, 41(2):186.]
- 吴雪松, 李燕山, 贺珑, 周琴, 黄逢龙, 甘青, 龚伟. 2017. 海南龙血树快繁技术研究[J]. 南方林业科学, 45(2):35-38. [Wu X S, Li Y S, He L, Zhou Q, Huang F L, Gan Q, Gong W. 2017. Tissue culture and fast propagation in *Dracaena cambodiana* [J]. South China Forestry Science, 45(2):35-38.]
- 薛鹰, 黄宝灵, 吕成群, 赵银萍, 周传明, 李莺. 2007. 海南龙血树离体快速繁殖[J]. 广西植物, 27(6):937-940. [Xue Y, Huang B L, Lü C Q, Zhao Y P, Zhou C M, Li Y. 2007. Rapid propagation of *Dracaena cambodiana* in vitro [J]. Guihaia, 27(6):937-940.]
- 杨瑞玮. 2012. 林荫银莲花组织培养过程中褐变控制技术及相关机理研究[D]. 武汉:华中农业大学. [Yang R W. 2012. Studies on browning control technology and its mechanism in tissue culture of *Anemone flaccid* FR. Schmidt [D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University.]
- 杨晓虹, 侯思名, 和凤美, 郭丽红, 陈子牛. 2009. 剑叶龙血树愈伤组织的诱导及其增殖培养研究[J]. 昆明学院学报, 31(6):64-66. [Yang X H, Hou S M, He F M, Guo L H, Chen Z N. 2009. The callus induction and proliferation of *Dracaena cochinchinensis* [J]. Journal of Kunming University, 31(6):64-66.]
- 郑道君, 吴宇佳, 云勇, 姜殿强, 陈宣, 张治礼. 2016. 濒危植物海南龙血树种子萌发及其环境适应性分析[J]. 热带亚热带植物学报, 24(1):71-79. [Zheng D J, Wu Y J, Yun Y, Jiang D Q, Chen X, Zhang Z L. 2016. Seed germination and its environment adaptability of endangered tree *Dracaena cambodiana* [J]. Journal of Tropical and Sub-tropical Botany, 24(1):71-79.]
- 郑道君, 谢良商, 王盈, 张治礼, 张文. 2009. 中国血竭基源植物的研究与利用[J]. 中国野生植物资源, 28(6):15-20. [Zheng D J, Xie L S, Wang Y, Zhang Z L, Zhang W. 2009. Research advances in dragon's blood plants in China [J]. Chinese Wild Plant Resources, 28(6):15-20.]

(责任编辑 邓慧灵)