

# 基于均匀设计法优化土沉香的组培再生体系研究

贾 贤<sup>1,2</sup>, 贾 瑞<sup>1,2</sup>, 王 颖<sup>2</sup>, 吴 坤 鑫<sup>2</sup>, 陈 雄 庭<sup>2</sup>

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101)

**摘 要:**以带有腋芽的幼嫩土沉香茎段为外植体,运用 DPS 数据处理系统,通过均匀设计法筛选诱导土沉香茎段从出芽到生根整个再生体系的适宜培养基。结果表明:适宜土沉香茎段腋芽萌发的培养基为 7/10 MS+6-BA 0.35 mg/L+NAA 0.01 mg/L,诱导率为 93.33%;适宜土沉香出芽增殖的培养基为 7/10 MS+KT 1.27 mg/L+NAA 0.2 mg/L,增殖倍数为 3.53;适宜土沉香茎段生根的培养基为 7/10 MS+6-BA 0.02 mg/L+IBA 1.23 mg/L+CM 25 mL/L,诱导率为 33.33%。该试验优化了土沉香茎段再生体系的培养条件,为其快速繁殖的推广及遗传转化体系的建立提供了基础支持。

**关键词:**土沉香;组织培养;均匀设计;优化

**中图分类号:**S 772.3<sup>+</sup>7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0100-05

土沉香(*Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.) 属瑞香科(Thymelaeaceae)沉香属(*Aquilaria* Lam.) 植物,又称白木香(广州)、牙香树、女儿香(广东)、莞香(东莞)、香材(海南)<sup>[1]</sup>、奇南栈、栈香(香栈)<sup>[2]</sup>、沉香<sup>[3]</sup>。沉香属植物约 15 种,分布于缅甸、泰国、越南、老挝、柬埔寨、印度东北部及不丹、马来半岛、苏门答腊、加里曼丹等地。我国有 2 种,分别为土沉香和云南沉香,其中土沉香分布在海南、广东、广西、福建等地,云南沉香主要产于云南(西双版纳及临沧地区)<sup>[4]</sup>。

土沉香树干经真菌侵染或物理、化学等因素的伤害,会分泌出树脂,沉于土下,日久堆积,即形成了一种天然珍贵的药材—沉香。其味辛、苦,微温,具有降气调中、暖肾止痛的功效。可用于治疗胸腹疼痛、胸闷、呕吐呃逆、腹鸣泄泻以及气逆喘促等症<sup>[5]</sup>。同时沉香的提取物又被作为一种天然香料用于香水、香皂等高档化妆品。土沉香树皮纤维发达,是良好的人造棉和纸生产的原料。其木材也可以做建筑材料用。研究表明,沉香有一定的抗癌活性<sup>[6]</sup>。但是随着消费水平的提高,沉香的供应量不足等原因,导致沉香价格日益增高,Barden 等<sup>[7]</sup>曾报道沉香最终卖到了 10 000 美元/kg。加之自然环境和人为的破坏,土沉香资源量日益枯竭,1987 年与 1999 年分别将沉香列为国家珍稀濒危三级保护植物<sup>[8]</sup>和国家二级重点保护野生植物<sup>[9]</sup>。

目前国内外已有不少关于利用土沉香不同组织进行组织快繁体系研究的报道<sup>[10-16]</sup>,但是不同报道对于相同材料所得出的激素浓度差异较大。该研究在前人研究基础上,利用均匀设计法对土沉香茎段诱导出芽、芽的增殖生长以及茎段的生根培养基进行筛选,以期为提高优质土沉香组培苗的生产率提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试土沉香茎段采摘于中国热带农业科学院苗圃内无病虫害的优良土沉香实生植株。于 2012 年 9 月某连续 3 d 晴朗的下午 15:00 左右,从高 1 m 以上的枝条上剪取约 10 cm 带有叶芽的幼嫩茎段,立即放入冰盒中带回实验室备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体材料的消毒 将采摘回来的茎段剪去叶子,保留约 0.3 cm 长的叶柄以保护腋芽。在试验前,先用酒精棉球擦洗茎段表面的灰尘,洗衣粉水溶液浸泡 20 min 后,用流水冲洗干净,在超净工作台中用 75% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 1 次,再用加入若干滴吐温-20 的 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 min,最后用无菌水冲洗 4~5 次,直至洗去表面消毒液为止。将材料置于无菌滤纸上,吸取残余水分,用医用手术刀切去消毒液与材料接触的部分,约 0.5 cm,将茎段切成包含有腋芽的约 2 cm 左右长的小段,插入到不添加任何激素的 1/2MS 培养基中培养 7 d,以获取无菌材料。

1.2.2 诱导土沉香茎段出芽培养基的筛选 设 1/5MS、2/5MS、3/5MS、4/5MS、MS 5 种基本培养基,添加浓度范围分别为 0.01~1.0 mg/L 的 6-BA 和 0.01~0.1 mg/L 的 NAA 的进行研究。利用 DPS 数据处理系

**第一作者简介:**贾贤(1988-),男,硕士研究生,研究方向为热带林木遗传育种。E-mail:tomjim100@sina.com.

**责任作者:**陈雄庭(1957-),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向为橡胶树细胞工程。E-mail:cxt66988063@163.com.

**基金项目:**海南省重大科技攻关资助项目(ZDZX2013023-1)。

**收稿日期:**2013-12-03

统的混合水平均匀设计试验功能( $n < 255$ )设计 10 个试验组的  $U_{10}(5 \times 10^2)$  均匀表(表 1), 14 d 后进行观察统计, 以考察 MS 大量元素和 6-BA、NAA 对土沉香茎段腋芽萌发启动率的影响。

表 1 土沉香茎段芽诱导的  
 $U_{10}(5 \times 10^2)$  因素及水平设计

Table 1  $U_{10}(5 \times 10^2)$  Factors and levels design for media for buds induction of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.

处理 Treatment	因素 Factors/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
	MS( $x_1$ )	6-BA( $x_2$ )	NAA( $x_3$ )
1	1/5	0.34	0.07
2	1/5	0.89	0.02
3	2/5	0.01	0.05
4	2/5	0.56	0.10
5	3/5	0.78	0.08
6	3/5	0.23	0.03
7	4/5	1.00	0.06
8	4/5	0.45	0.01
9	1	0.12	0.09
10	1	0.67	0.04

1.2.3 诱导土沉香茎段芽的增殖培养基的筛选 依据上述诱导出芽培养基的结果分析, 设计以 7/10 MS 为基本培养基, 添加 KT 浓度为 0.15~1.50 mg/L, NAA 浓度为 0.02~0.20 mg/L,  $\text{GA}_3$  浓度为 0.10~1.00 mg/L 的激素组合。利用 DPS 数据处理系统的均匀设计试验功能设计 10 个试验组的  $U_{10}(10^3)$  均匀表(表 2), 60 d 后进行观察统计, 以考察 6-BA、NAA 以及  $\text{GA}_3$  对土沉香茎段出芽增殖倍数的影响。

表 2 土沉香茎段芽增殖的  
 $U_{10}(10^3)$  因素及水平设计

Table 2  $U_{10}(10^3)$  Factors and levels design for media for bud multiplying of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.

处理 Treatment	因素 Factors/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
	KT( $x_1$ )	NAA( $x_2$ )	$\text{GA}_3$ ( $x_3$ )
1	0.15	0.14	0.60
2	0.30	0.06	0.30
3	0.45	0.18	0.90
4	0.60	0.10	0.10
5	0.75	0.02	0.70
6	0.90	0.20	0.40
7	1.05	0.08	1.00
8	1.20	0.16	0.20
9	1.35	0.04	0.50
10	1.50	0.12	0.80

1.2.4 诱导土沉香茎段生根培养基的筛选 同样依据上述诱导出芽培养基的结果分析, 设计以 7/10MS 为基本培养基, 添加 6-BA 浓度为 0.02~0.20 mg/L, IBA 浓度为 0.2~2.0 mg/L, 椰乳浓度为 5~25 mL/L。利用 DPS 数据处理系统的均匀设计实验功能设计 10 个试验组的  $U_{10}(5 \times 10^2)$  均匀表(表 3)。利用间接生根法, 14 d 后将无菌苗转入到只附加有 1 g/L 活性炭的 7/10MS 培养基中, 60 d 后进行观察统计, 以考察 6-BA、NAA 以及椰乳对土沉香茎段生根诱导率的影响。

表 3 土沉香茎段生根的  
 $U_{10}(5 \times 10^2)$  因素及水平设计

Table 3  $U_{10}(5 \times 10^2)$  Factors and levels design for media for rooting of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.

处理 Treatment	因素 Factors		
	6-BA( $x_1$ )/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IBA( $x_2$ )/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CM( $x_3$ )/ $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$
1	0.02	1.00	10.00
2	0.04	1.80	25.00
3	0.06	0.60	15.00
4	0.08	1.40	5.00
5	0.10	0.20	20.00
6	0.12	2.00	10.00
7	0.14	0.80	25.00
8	0.16	1.60	15.00
9	0.18	0.40	5.00
10	0.20	1.20	20.00

1.2.5 练苗与移栽 将高约 5 cm、长约 3 cm 左右的根的组培苗从培养箱中取出, 放置于室外较为阴凉的地方约 7 d 时间, 每隔 1 d 将瓶盖开口打开一点, 以使组培苗适应外界环境, 待全部打开时, 用自来水将组培苗根部残留的培养基洗去, 用 0.5 g/L 的甲基托布津浸泡 20 min, 最后植入经灭菌的蛭石: 细河砂=1:1 的混合基质中, 用透明塑料杯覆盖以达到保湿保温的作用, 1 个月后统计移栽成活率。以上所有设计的培养基均添加蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 调至 5.8 左右, 在温度为  $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度为 1 500 lx、光照周期 8 h/d 的条件下培养。每组接种 30 个无菌材料, 重复 3 次取平均值。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 DPS 9.50 数据处理系统利用二次多项式逐步回归进行回归分析, 求得回归方程, 并找到最优解的组合加以验证<sup>[17]</sup>。

腋芽萌发启动率(%) = 外植体腋芽萌发数/接种外植体数  $\times 100\%$ ; 增殖倍数 = 增殖周期结束时芽数/增殖周期开始时芽数; 生根诱导率(%) = 生根苗数/总苗数  $\times 100\%$ ; 移栽成活率(%) = 成活苗数/移栽总苗数  $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱导土沉香茎段出芽培养基的筛选

通过 DPS 进行二次多项式逐步回归分析得到回归方程:  $Y = -56.71 + 353.90X_1 + 138.95X_2 - 227.18X_1^2 - 99.18X_2^2 - 98.23X_1X_2 - 179.26X_1X_3$ ; 其中  $F_{(0.01, 6, 3)} = 27.91$ ,  $F$  值 = 43.5120  $> F_{(0.01, 6, 3)}$ ,  $P$  值 = 0.0052  $< 0.01$ , 复相关系数  $R = 0.9943$ , 调整相关系数  $R_a = 0.9828$ , 剩余标准差  $SSE = 3.826$ , 决定系数  $R^2 = 0.9887$ , 调整决定系数  $R_a^2 = 0.9659$ , 表明回归方程有意义, 可用于预测。通过比较各变量显著水平值的大小, 可以知道对土沉香茎段出芽诱导率的影响大小顺序为  $X_1 > X_1^2 > X_2 > X_2^2 > X_1X_2 > X_1X_3$ , 说明  $X_1$  (MS 培养基的大量元素) 和  $X_2$  (6-BA 浓度) 对于结果的影响较大。根据回归方程求出  $Y$  的最优组合为:  $X_1 = 0.70$ ,  $X_2 = 0.35$ ,  $X_3 = 0.01$ 。在

此组合基础上求得最优解:  $y=90.86$ , 此解为该回归方程的解析解。根据公式  $Y=y \pm u_{\alpha} \cdot s$  (其中  $u_{\alpha}$  为正态分布的双侧分位数,  $s$  为剩余标准差) 得到优化值区间估计为  $Y=90.86 \pm 14.18$ , 即  $76.68\% \sim 105.04\%$ 。采用最优组合加以验证, 将土沉香茎段接种到 7/10 MS+6-BA 0.35 mg/L+NAA 0.01 mg/L 的培养基中, 14 d 后进行观察统计, 土沉香出芽诱导率为 93.33%, 在预测的优化值区间范围, 且高于 10 个组合中的最大值, 表明在该试验所设计浓度范围内诱导土沉香茎段出芽的最佳培养基为 7/10 MS+6-BA 0.35 mg/L+NAA 0.01 mg/L。30 d 后, 土沉香出芽叶片约 3~4 片, 且茎段基部略有膨大(图 1A)。

表 4 土沉香茎段芽诱导的

 $U_{10}(5 \times 10^2)$  均匀设计处理与结果Table 4  $U_{10}(5 \times 10^2)$  uniform design test plan and the results for media for buds induction of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.

处理 Treatment	因素 Factors/mg · L <sup>-1</sup>			启动率 Y The rate of starting Y/%
	X <sub>1</sub> (MS)	X <sub>2</sub> (6-BA)	X <sub>3</sub> (NAA)	
1	1/5	0.34	0.07	31.11
2	1/5	0.89	0.02	31.90
3	2/5	0.01	0.05	44.44
4	2/5	0.56	0.10	68.89
5	3/5	0.78	0.08	62.91
6	3/5	0.23	0.03	86.67
7	4/5	1.00	0.06	35.56
8	4/5	0.45	0.01	85.31
9	1	0.12	0.09	57.32
10	1	0.67	0.04	45.56

注: X<sub>1</sub> 表示 MS 培养基的大量元素量取倍数; X<sub>2</sub> 表示 6-BA 浓度; X<sub>3</sub> 表示 NAA 浓度; Y 为 3 次重复试验除去褐化及污染后的平均值统计。

## 2.2 诱导土沉香茎段芽的增殖培养基的筛选

当新生茎段长至约 3 cm 时(图 1B), 切除基部的老茎段, 再转至设计诱导茎段芽增殖的培养基中。

通过 DPS 进行二次多项式逐步回归分析得到回归方程:  $Y=0.36+4.54X_1-2.12X_1^2+2.81X_1X_2$ ; 其中  $F_{(0.01,3,6)}=9.78$ ,  $F$  值 = 30.3606 >  $F_{(0.01,3,6)}$ ,  $P$  值 = 0.0005 < 0.01, 复相关系数  $R=0.9686$ , 调整相关系数  $R_a=0.9525$ , 剩余标准差  $SSE=0.2274$ , 决定系数  $R^2=0.9382$ , 调整决定系数  $R_a^2=0.9073$ , 表明回归方程有意义, 可用于预测。通过比较各变量显著水平值的大小, 可以知道对土沉香茎段出芽增殖倍数的影响大小顺序为  $X_1 > X_1^2 > X_1X_2$ , 说明  $X_1$  (KT 浓度) 对于结果的影响较大,  $X_3$  (GA<sub>3</sub> 浓度) 对于结果的影响较小。根据回归方程求出  $Y$  的最优组合为  $X_1=1.27$ ,  $X_2=0.2$ 。在此组合基础上求得最优解:  $y=3.39$ , 此解为该回归方程的解析解。根据公式  $Y=y \pm u_{\alpha} \cdot s$  (其中  $u_{\alpha}$  为正态分布的双侧分位数,  $s$  为剩余标准差) 得到优化值区间估计为  $Y=3.39 \pm 1.33$ , 即  $2.06 \sim 4.72$ 。采用最优组合加以验证, 将土沉香出芽茎段接种到 7/10MS+KT 1.27 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基中, 60 d 后进行观察统计, 土沉

香芽的增殖倍数为 3.53, 在预测的优化值区间范围, 且高于 10 个组合中的最大值, 表明在该试验所设计浓度范围内诱导土沉香茎段芽增殖最佳培养基为 7/10MS+KT 1.27 mg/L+NAA 0.2 mg/L。接种后约 20 d, 茎段明显长高增粗(图 1C), 并在基部产生丛生小芽, 每隔 30 d 用此培养基继代一次, 约 65 d 新生叶片长大(图 1D)。

表 5 土沉香茎段芽增殖的  $U_{10}(10^3)$  因素及水平设计Table 5  $U_{10}(10^3)$  uniform design test plan and the results for media for bud multiplying of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.

处理 Treatment	因素 Factors/mg · L <sup>-1</sup>			增殖倍数 Y Multiplying coefficient Y
	X <sub>1</sub> (KT)	X <sub>2</sub> (NAA)	X <sub>3</sub> (GA <sub>3</sub> )	
1	0.15	0.14	0.60	1.10
2	0.30	0.06	0.30	1.78
3	0.45	0.18	0.90	2.09
4	0.60	0.10	0.10	2.17
5	0.75	0.02	0.70	2.48
6	0.90	0.20	0.40	3.30
7	1.05	0.08	1.00	3.29
8	1.20	0.16	0.20	3.42
9	1.35	0.04	0.50	2.84
10	1.50	0.12	0.80	2.70

注: X<sub>1</sub> 表示 KT 浓度; X<sub>2</sub> 表示 NAA 浓度; X<sub>3</sub> 表示 GA<sub>3</sub> 浓度; Y 为 3 次重复试验除去褐化及污染后的平均值统计。

## 2.3 诱导土沉香茎段生根培养基的筛选

通过 DPS 进行二次多项式逐步回归分析得到回归方程:  $Y=-10.16-34.39X_1+53.20X_2-22.84X_2^2+0.14X_2X_3$ ; 其中  $F_{(0.01,4,5)}=11.39$ ,  $F$  值 = 16.16 >  $F_{(0.01,4,5)}$ ,  $P$  值 = 0.0046 < 0.01, 复相关系数  $R=0.9634$ , 调整相关系数  $R_a=0.9331$ , 剩余标准差  $SSE=3.0393$ , 决定系数  $R^2=0.9282$ , 调整决定系数  $R_a^2=0.8707$ , 表明回归方程有意义, 可用于预测。通过比较各变量显著水平值的大小, 可以知道对土沉香茎段生根率的影响大小顺序为  $X_2 > X_2^2 > X_1 > X_2X_3$ , 说明  $X_1$  (6-BA 浓度) 和  $X_2$  (IBA 浓度) 对于结果的影响较大。根据回归方程求出  $Y$  的最优组合为  $X_1=0.02$ ,  $X_2=1.23$ ,  $X_3=25$ 。在此组合基础上求得最优解:  $y=27.34$ , 此解为该回归方程的解析解。根据公式  $Y=y \pm u_{\alpha} \cdot s$  (其中  $u_{\alpha}$  为正态分布的双侧分位数,  $s$  为剩余标准差) 得到优化值区间估计为  $Y=27.34 \pm 13.99$ , 即  $13.35 \sim 41.33$ 。采用最优组合加以验证, 将土沉香茎段接种到 7/10MS+6-BA 0.02 mg/L+IBA 1.23 mg/L+CM 25 mL/L 的培养基中(图 1E), 利用间接生根法, 14 d 后将无菌苗转入空白的附加活性炭 1 g/L, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 调节至 5.8 左右的 7/10 MS 培养基, 60 d 后进行观察统计(图 1F), 土沉香茎段的生根率为 33.33%, 在预测的优化值区间范围, 且高于 10 个组合中的最大值, 表明在该试验所设计浓度范围内诱导土沉香茎段生根的最佳培养基为 7/10 MS+6-BA 0.02 mg/L+IBA 1.23 mg/L+CM 25 mL/L。



表 6 土沉香茎段生根的  
U<sub>10</sub>(5×10<sup>2</sup>)因素及水平设计

Table 6 U<sub>10</sub>(5×10<sup>2</sup>)uniform design test plan and  
the results for media for rooting of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.

处理 Treatment	因素 Factors			诱导率 Y The rate of induction/ %
	X <sub>1</sub> (6-BA) /mg · L <sup>-1</sup>	X <sub>2</sub> (IBA) /mg · L <sup>-1</sup>	X <sub>3</sub> (CM) /mL · L <sup>-1</sup>	
1	0.02	1.00	10.00	21.75
2	0.04	1.80	25.00	16.67
3	0.06	0.60	15.00	10.00
4	0.08	1.40	5.00	18.89
5	0.10	0.20	20.00	0.00
6	0.12	2.00	10.00	1.11
7	0.14	0.80	25.00	13.45
8	0.16	1.60	15.00	17.78
9	0.18	0.40	5.00	0.00
10	0.20	1.20	20.00	17.78

注: X<sub>1</sub> 表示 6-BA 浓度; X<sub>2</sub> 表示 IBA 浓度; X<sub>3</sub> 表示 CM 浓度; Y 为 3 次重复试验除去褐化及污染后的平均值统计。

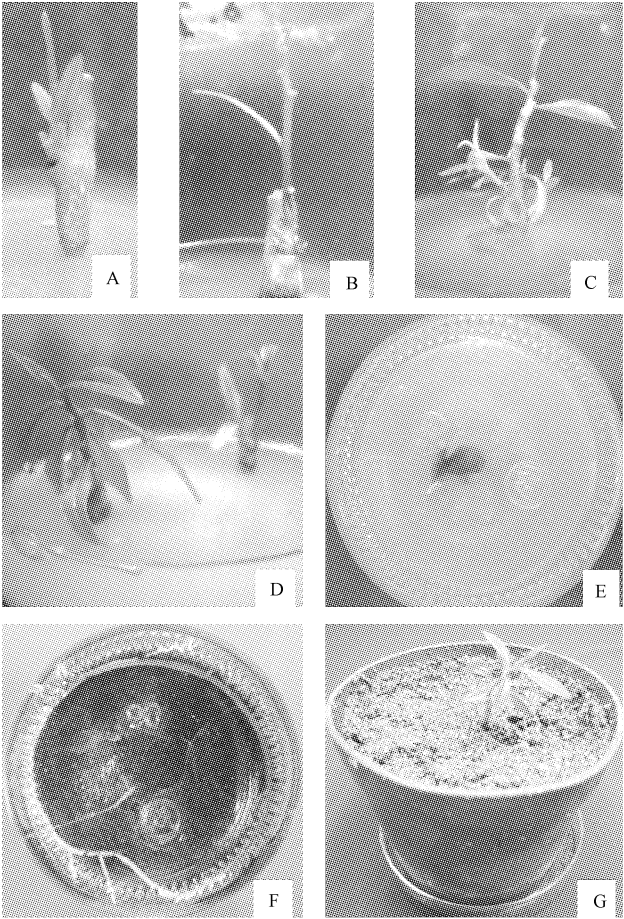


图 1 不同阶段培养基的筛选

注: A: 茎段的出芽; B~C: 芽茎的伸长; D: 继代增殖; E~F: 间接生根初期与末期的生根情况; G: 移栽。

Fig. 1 Selective test of culture medium in different stages

Note: A: Germination of stem segment; B~C: Buds elongation; D: Subculture multiplication; E~F: Root induction of the indirect rooting method; G: Transplanting.

2.4 移栽与练苗

将长势良好的生根组培苗放置于室外, 1 个月后统计移栽成活率达到 85% 以上(图 1G)。

3 讨论

对于土沉香的组织培养已有前人通过茎段、叶片、胚等组织进行了研究。多数研究发现连续在以 1/2MS 培养基为基本培养基, 添加适当浓度激素的条件下适宜土沉香组培苗的生长, 但所报道使用的同种激素浓度却相差较大。该研究发现, 7/10 MS+6-BA 0.35 mg/L+NAA 0.01 mg/L 培养基对于土沉香茎段芽的诱导具有显著的效果, 其中 MS 培养基的大量元素对于芽的诱导影响较大, 当用 MS 为基本培养基时, 接种的茎段在 8 h 内即显现褐化现象, 而采用该试验设计预测的 7/10 MS 则能有效降低褐化的发生率。低浓度的 6-BA 对于土沉香茎段芽的诱导具有促进作用, 当单独将 6-BA 浓度提高至 2.0 mg/L 时, 土沉香茎段出现严重褐化, 材料死亡, 虽偶尔有少量未褐化或褐化较轻的茎段也能诱导出芽, 但常常伴随着畸形、玻璃化的现象发生, 此现象与何旭君等<sup>[18]</sup> 研究发现的问题相符。在研究芽的增殖时发现芽的数量随着细胞分裂素 KT 浓度的提高而增加, 但是过高浓度的 KT 也会造成芽的长势细弱, 并且 KT 与 NAA 之间存在相互作用, 当二者浓度接近时易产生愈伤组织, 不利于芽的增殖。因此, 在该试验设计浓度的范围内诱导土沉香茎段芽增殖的最佳培养基为 7/10 MS+KT 1.27 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

木本植物组培生根困难一直是个普遍的现象, 该试验采用的间接生根法对于诱导土沉香茎段无菌苗生根具有较好的效果, 而且在接入生根培养基前先切除茎段基部所产生的愈伤组织将更利于根的生成。因为在高浓度生长素的培养基里诱导茎段生根往往会使其基部膨大并产生愈伤组织, 通过该试验发现, 倘若不切除愈伤组织, 根虽然也能从愈伤组织中产生, 但在练苗时, 根也易同愈伤组织一起脱落, 造成幼苗的死亡, 这可能与根系与茎段的疏导组织不相通或连接错位有关, 此结果与顾地周等<sup>[19]</sup>、Danielle 等<sup>[20]</sup> 研究中所发现的情况相似。采用间接生根法得到的生根苗效果明显优于直接生根法, 可能是由于无菌苗短时间内在含有较高浓度 IBA 的培养基中生长, 改变了其内源 IAA 的水平, 从而启动根原基的发生, 而后期的根原基伸长和根的生长则不再需要外源生长素的维持。这种方法在檀香<sup>[21]</sup>、核桃<sup>[22]</sup>、烟草<sup>[23]</sup>、扁桃<sup>[24]</sup>、樱桃矮砧<sup>[25]</sup> 等一些温带果树和较难诱导生根的木本植物培养中都得到了应用, 或许将成为解决木本植物生根的一种适合途径。该试验不高的生根率可能和选取的无菌苗较为幼嫩或与不同种源的土沉香有关<sup>[26]</sup>, 也有可能和光周期有关, 具体原因有待进一步研究。由结果和验证试验表明, 该试验设计浓度范围内所

筛选出的诱导土沉香茎段生根的最佳培养基为 7/10MS+6-BA 0.02 mg/L+IBA 1.23 mg/L+CM 25 mL/L。

近年来,虽然叶勤法等<sup>[11-12]</sup>、何旭君等<sup>[18]</sup>、汪腾越<sup>[26]</sup>先后对于土沉香组培的研究进行了报道,但是大规模的土沉香组培苗工厂化生产并不成熟,特别是土沉香组培苗的生根率没有得到较好的提高。因此仍有必要对于土沉香的组织培养进行深入研究。应用均匀设计法对土沉香茎段诱导再生体系培养基的设计方案大大缩短了筛选时间。该试验通过优化土沉香茎段再生体系的培养条件,为土沉香的组培大规模工厂化生产以及为其遗传转化体系的建立提供了技术依据。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院华南植物研究所. 海南植物志[M]. 第1卷. 北京: 科学出版社, 1964.
- [2] (清)赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [3] (梁)陶弘景集, 尚志钧辑校. 名医别录[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会, 谷粹芝. 中国植物志[M]. 第52卷. 北京: 科学出版社, 1999: 290-292.
- [5] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [6] Gunasekera S P, Kinghorn A D, Cordell G A, et al. Plant anticancer agents. XIX. Constituents of *Aquilaria Malaccensis*[J]. J Nat Prod, 1981, 44: 569-572.
- [7] Barden A, Anak N A, Mulliken T, et al. Heart of the matter: agarwood use and trade, and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis* [M]. TRAFFIC International, 2000.
- [8] 国家环境保护局, 中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危保护植物名录(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [9] 国家林业部. 国家重点保护野生植物名录(第一批)[Z]. 国家农业部令(第4号), 1999.
- [10] 牛焕琼, 鲁学祥, 王亚丽, 等. 土沉香无性繁殖试验初报[J]. 林业调查规划, 2010(6): 119-123.
- [11] 叶勤法, 戚树源, 林立东. 白木香组织培养及快速繁殖[J]. 植物学通报, 1997(S1): 61-64.
- [12] 叶勤法, 戚树源, 林立东. 土沉香愈伤组织培养及植株再生(简报)[J]. 热带亚热带植物学报, 1998(2): 172-176, 179.
- [13] 何梦玲, 戚树源, 胡兰娟, 等. 印度沉香的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004(2): 209.
- [14] He M L, Qi S Y, Hu L J. Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Aquilaria agallocha* [J]. Journal of Zhejiang University Science, 2005(8): 849-852.
- [15] 张翹, 郑希龙, 潘超美. 不同培养体系对白木香成熟胚丛芽诱导的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2009(10): 2566-2567.
- [16] 韩汉鹏. 试验统计引论[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
- [17] 张仲欣, 杜双奎. 食品试验设计与数据处理[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2011.
- [18] 何旭君, 蔡乙东, 陈永镇, 等. 沉香树组织培养快速繁殖技术研究[J]. 林业建设, 2006(4): 10-12.
- [19] 顾地周, 姜云天, 陆爽. 宽叶杜香的高效植株再生[J]. 林业实用技术, 2012(7): 45-47.
- [20] Danielle J D, William E V, Kwai Y L. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1985(1): 43-50.
- [21] 陈伟玉, 卢瑜, 邢增俊. 檀香茎段组织培养技术研究[J]. 热带林业, 2013(2): 7-10.
- [22] 李春燕, 肖蓉, 张拥兵, 等. 核桃试管苗生根的研究进展[J]. 北方园艺, 2013(1): 190-193.
- [23] Christine H, Vendrig J C, Onckelen H V. The accumulation and metabolism on plant growth regulators during organogenesis in cultures of thin cell layers of *Nicotiana tabacum*[J]. Physiol Plant, 1991, 83: 578-584.
- [24] 刘进平, 曹孜义, 李唯, 等. 扁桃试管苗生根培养的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2001(2): 135-139.
- [25] 任凝辉, 叶霞, 夏国海, 等. 樱桃矮砧试管苗生根技术研究[J]. 河南科学, 2002(3): 263-265.
- [26] 汪腾越. 土沉香组织培养再生体系的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.

## Study on Uniform Design Methods for Optimization of Plant Regeneration of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng. *in vitro*

JIA Xian<sup>1,2</sup>, JIA Rui<sup>1,2</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, WU Kun-xin<sup>2</sup>, CHEN Xiong-ting<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101)

**Abstract:** Taking the stems of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng. as explants, using DPS, the whole system for shoot regeneration were established through uniform design experiments. The results showed that the medium of 7/10 MS+6-BA 0.35 mg/L+NAA 0.01 mg/L was suitable for buds induction, and the rate of starting was 93.33%; the medium of 7/10 MS+KT 1.27 mg/L+NAA 0.2 mg/L was suitable for bud multiplying, and the multiplying coefficient was 3.53; the rooting medium which was 7/10 MS+6-BA 0.02 mg/L+IBA 1.23 mg/L+CM 25 mL/L was suitable with the rate of induction of 33.33%. The medium supplement for regeneration system of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng. was optimized, which provides a basis support for its propagation and construction of genetic transformation system.

**Key words:** *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.; tissue culture; uniform design; optimization