

地涌金莲组织培养中的褐化抑制

侯健华, 李正红*, 马宏, 刘秀贤, 万友名

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南昆明 650224)

摘要:地涌金莲组织培养中的褐化问题一直是其优良品种选育及规模化生产的技术瓶颈。为解决这一问题,以地涌金莲未成熟雄花为试材,研究了外植体消毒方式、植物生长调节剂种类及配比和不同抗褐化剂对愈伤组织褐化的影响。结果表明,未经消毒的外植体其污染率为0%,且褐化率和褐化指数均显著低于消毒后的外植体;6-BA在地涌金莲愈伤组织诱导中起主要作用,浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有利于愈伤组织的诱导,能显著降低褐化指数;添加柠檬酸+抗坏血酸(VC)混合液、表面添加VC均对地涌金莲褐化未起到明显抑制作用,姜汁和阿魏酸对抑制愈伤组织褐化有较好的效果, $48.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿魏酸能显著降低愈伤组织的褐化,使愈伤组织分化率达17.9%,较对照的2.9%提高了15%。

关键词:地涌金莲;组织培养;愈伤组织;褐化;抗褐化剂

中图分类号:S722.3

文献标识码:A

Studies on Anti-Browning During Tissue Culture of *Musella lasiocarpa*

HOU Jian-hua, LI Zheng-hong, MA Hong, LIU Xiu-xian, WAN You-ming

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: Callus necrosis during *in vitro* propagation is a large obstacles in breeding and large scale production of *Musella lasiocarpa*. To solve this problem, the effects of sterilizing methods of explants, the ratio of plant growth regulators and 4 kinds of browning inhibitors on callus browning were studied with the callus induced from its immature male flowers as the explants. The results indicated that the contamination rate of unsterilized explants was 0%, and its browning rate and browning index were all significantly lower than that of the explants after disinfection; 6-BA played a major role in callus induction of *M. lasiocarpa*. It conducted to callus induction and significantly reduced browning index when the concentration of 6-BA was $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ or $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Adding VC on the surface and VC mixture of citric acid failed to suppress browning. However, Ginger and ferulic acid gave satisfactory result to reduced browning, $48.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ferulic acid could significantly reduce the callus browning and increased the rate of differentiation to 17.9%, 15% higher than that of the control.

Key words: *Musella lasiocarpa*; tissue culture; callus; browning; browning inhibitors

地涌金莲(*Musella lasiocarpa*(Fr.)C. Y. Wu ex H. W. Li)系芭蕉科(Musaceae)地涌金莲属(*Musella*(Fr.)C. Y. Wu ex H. W. Li)植物,包括原变种地涌金莲(*M. lasiocarpa*(Fr.)C. Y. Wu ex H. W. Livar. *lasiocarpa*)和变种红苞地涌金莲(*M. lasiocar-*

pavar. rubribracteata Zhenghong Li&H. Ma)。其具有浓郁的南亚风情和宗教特色,有较高的观赏价值^[1]。地涌金莲原变种花苞片为黄色,2011年Ma *et al.*在四川省境内发现了花苞片呈橘红色至红色的红苞地涌金莲新变种^[2],成为花色单一的地涌金莲培育新

收稿日期:2014-10-22

基金项目:国家自然科学基金项目(31400559);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(CAFYBB2014QB045)

作者简介:侯健华(1989-),男,湖南郴州人,硕士研究生,主要研究方向:园林植物遗传资源与利用。

* 通讯作者

优品种的重要种质资源。随后,中国林业科学研究院资源昆虫研究所选育出了‘佛喜金莲’、‘佛乐金莲’、‘佛悦金莲’等具有自主知识产权和广阔市场前景的系列红苞新品种^[3-5]。

褐化是植物组织培养中的一个难题,是很多植物组培能否成功的关键因素。影响褐化的因素较多,外植体的取材、植物生长调节剂、培养基、添加剂、培养条件及培养方式都会影响愈伤组织的褐化程度^[6]。地涌金莲组织培养研究中多以吸芽为外植体,在愈伤组织诱导、增殖、分化阶段均会发生严重的褐化现象,导致分化率低^[7-10]。前人对地涌金莲组织培养褐化抑制的研究较少,且未见对红苞地涌金莲组织培养的报道。红苞地涌金莲及‘佛喜金莲’等新品种在组培过程中褐化现象比原变种地涌金莲更为严重,本课题前期研究的愈伤组织分化率仅为3%左右,严重制约了红苞品种培育及产业化进程。针对导致褐化因素,本试验研究了外植体的消毒方式、植物生长调节剂的种类和浓度及抗褐化剂对地涌金莲愈伤组织诱导和褐化的影响,旨在为抑制地涌金莲组织培养的褐化提供理论依据,为红色系地涌金莲新品种的进一步选育及规模化生产提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料采自栽种于中国林业科学研究院资源昆虫研究所滇中高原试验站的原变种地涌金莲和红苞地涌金莲成年母株。为排除个体差异,所有试验均用三株混合的未成熟雄花作为外植体。

原变种地涌金莲的外植体用于外植体消毒试验和6-BA和2,4-D浓度试验;红苞地涌金莲外植体用于不同浓度抗褐化剂试验。

1.2 基础培养基

以前期研究选出的效果较好的培养基作为基础培养基:

基础愈伤组织诱导培养基:改良MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+2,4-D 3.0 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂5.5 g·L⁻¹+椰子汁10%(v/v)+AC 1 g·L⁻¹+精胺4.5 mg·L⁻¹;PH值为5.8。接种后在温度(25±2)℃下暗培养。

基础分化培养基:改良MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂5.5 g·L⁻¹+椰子汁10%(v/v)+AC 1.0 g·L⁻¹+精胺4.5 mg·L⁻¹;PH值

为5.8。置于(25±2)℃下培养,转瓶周期为30 d。

1.3 外植体消毒方式对愈伤组织诱导及褐化的影响

在无菌条件下将原变种地涌金莲花苞层层剥离,取出长度为0.6~1.2 cm的未成熟雄花作为外植体,分为二组,第一组不经消毒直接接种至诱导培养基中。第二组(对照)外植体用3%戊二醛表面消毒3 min,无菌水清洗4次,再用0.1%的升汞表面消毒3 min,无菌水清洗4次,接种至愈伤组织诱导培养基中。对照和处理各接种5瓶,每瓶5个外植体,重复3次。30 d后统计愈伤组织诱导率、褐化率、褐化指数。

1.4 6-BA和2,4-D浓度组合对愈伤组织诱导及褐化的影响

在基础愈伤组织诱导培养基的基础上,采用2因素区组试验设计,设置6-BA浓度为0.5、1、2、3 mg·L⁻¹,2,4-D浓度为1、2、3、4 mg·L⁻¹组合成16种配方,将原变种地涌金莲外植体在无菌条件下不经消毒接种在愈伤组织诱导培养基上,每个处理接种2瓶,每瓶接种5个外植体,重复3次。30 d后统计愈伤组织诱导率、颜色和质地、褐化率、褐化指数。

1.5 不同抗褐化剂种类及其浓度的褐化抑制效应

以红苞地涌金莲长度为0.6~1.2 cm的未成熟雄花作为外植体,将其在无菌条件下不经消毒接种在添加了不同种类不同浓度抗褐化剂的愈伤组织诱导培养基中,表面添加1 ml VC液,VC浓度设置为50、100、200 mg·L⁻¹;VC+柠檬酸浓度设置为100:50、100:100、100:150 mg·L⁻¹;阿魏酸浓度设置为48.5、97、194 mg·L⁻¹;姜汁液浓度设置为0.5、1.5、4.5 g·L⁻¹,其中VC以及VC+柠檬酸的混合液采用过滤灭菌法灭菌,阿魏酸和姜汁液采用湿热灭菌法灭菌。以不添加任何抗褐化剂的培养基作为对照,每个处理接种3瓶,每瓶接种5个外植体,重复3次。30 d后统计愈伤组织诱导率,褐化率和褐化指数,并转接至添加了与愈伤组织诱导相同抗褐化剂的基础愈伤组织分化培养基中。此后,30 d继代一次,直至愈伤组织分化出芽,每次继代前统计褐化率、褐化指数,180 d后统计生长量及分化率。

1.6 统计分析方法

污染率 = 染菌外植体数/接种外植体数 × 100%

愈伤组织诱导率 = 产生愈伤组织外植体数/接种外植体数 × 100%

愈伤组织分化率 = 分化出苗的愈伤组织/愈伤

组织总数 $\times 100\%$

褐化率 = 达 1 级褐化标准以上愈伤组织数 / 愈伤组织总数 $\times 100\%$

褐变指数 = \sum (褐化级的愈伤组织块数 \times 该褐化级别) / (愈伤组织总数 \times 最高的褐化级别) $\times 100\%$

用褐变指数表示外植体褐变程度,参照顾之中^[11]水稻愈伤组织褐变指数的方法,将外植体的褐变程度分为以下五级标准进行统计:0 级:褐化部分在 25% 以下;1 级:褐化部分在 25% ~ 50%;2 级:褐化部分在 50% ~ 75%;3 级:褐化部分在 75% 以上但未全部褐化;4 级:全部褐化或接近于全部褐化。

试验数据采用 Excel 和 SPSS 18.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒方式对原变种地涌金莲愈伤组织诱导及褐化的影响

接种前对外植体分别进行消毒和不消毒处理,接种 30 d 后,未消毒外植体的污染率同消毒后外植体的污染率一致,均为 0%;经过消毒的外植体褐化率为 12.1%、褐化指数为 3.9%,而不消毒外植体的褐化率和褐化指数均低于消毒处理,分别为 1.5%、0.3%;消毒外植体培养出来的愈伤组织质地较疏松、表现出水渍状,呈黄褐色,而不消毒外植体培养出来的愈伤组织质地较致密、无明显的水渍状,呈黄绿色(表 1)。

表 1 外植体消毒处理对原变种地涌金莲愈伤组织诱导的影响

处理编号	消毒方式	诱导率 /%	污染率 /%	褐化率 /%	褐化指数 /%	愈伤组织质地
1	不消毒	92a	0a	1.5a	0.3a	较致密,黄绿色
2	消毒	91a	0a	12.1b	3.9b	较疏松,黄褐色

注:表中数字后不同的字母表示 0.05 水平差异显著($p < 0.05$),下同。

2.2 6-BA、2,4-D 浓度对原变种地涌金莲愈伤组织诱导及褐化的影响

将地涌金莲外植体接种在添加不同浓度的 6-BA、2,4-D 的基础愈伤组织诱导培养基中,经过 30 d 的愈伤组织诱导,结果表明:浓度不同的植物生长调节剂对地涌金莲愈伤组织诱导的影响较大,当 6-BA 的浓度在 0.5 ~ 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时,低浓度 6-BA 对外植体的诱导率低,诱导出的愈伤组织褐化率高,出愈量小;高浓度 6-BA 对外植体的诱导率高,诱导

出的愈伤组织褐化率较低,出愈量大;6-BA 浓度为 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时愈伤组织的诱导效果最好。当 2,4-D 浓度为 1 ~ 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,2,4-D 的浓度对愈伤组织诱导的影响不大(表 2)。在一定范围内 6-BA 浓度同愈伤组织的出愈率呈显著正相关($r = 0.850, p < 0.01$),同愈伤组织褐化率呈显著负相关($r = -0.834, p < 0.01$),同愈伤组织出愈量呈显著正相关($r = 0.895, p < 0.01$);2,4-D 浓度同愈伤组织的出愈率、褐化率、出愈量相关性均不显著。

表 2 6-BA、2,4-D 浓度对地涌金莲愈伤组织的诱导效果

处理编号	植物生长调节剂的浓度		诱导率 /%	褐化率 /%	出愈量
	6-BA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	2,4-D / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			
A1	0.5	1	66.7cd	18.9c	+
A2	0.5	2	70.8bd	34.4ab	+
A3	0.5	3	58.3de	43.3a	+
A4	0.5	4	50.0e	41.1a	+
B1	1	1	83.3b	20.5c	+
B2	1	2	75.0bc	21.7bc	++
B3	1	3	83.3b	19.8c	++
B4	1	4	75.0bc	21.7bc	++
C1	2	1	91.6a	4.7d	+++
C2	2	2	95.8a	4.2d	+++
C3	2	3	100.0a	8.3cd	+++
C4	2	4	91.6a	4.7d	+++
D1	3	1	100.0a	4.2d	+++
D2	3	2	95.8a	4.7d	+++
D3	3	3	100.0a	4.2d	+++
D4	3	4	95.8a	8.9cd	+++

注: + 表示出愈量小; ++ 表示出愈量中; +++ 表示出愈量大。

2.3 不同抗褐化剂种类及其浓度对红苞地涌金莲的褐化抑制效应

添加了不同种类、不同浓度抗褐化剂的愈伤组织诱导培养基都能诱导出愈伤组织,但添加 194 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿魏酸时愈伤组织的诱导率较低,为 63.1%。在继代培养过程中愈伤组织褐化越来越严重,褐化指数不断升高;在分化培养基培养 150 d 后,添加 48.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿魏酸的愈伤组织褐化指数最低,为 62.3%;添加了 97 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿魏酸、0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜汁的愈伤组织的褐化指数分别为 75.1%、77.5%、74.6%,也均显著低于对照;当阿魏酸浓度为 194 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、姜汁浓度为 4.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不利于褐化的有抑制,其愈伤组织褐化指数分别为 93.8%、92.4%,均显著高于对照。

愈伤组织生长量在外植体接种 30 d 后表现出差异性,接种 120 d 时差异最为明显,统计 120 d 时的生长量结果表明:添加阿魏酸和姜汁会减少愈伤组织的生长量,且阿魏酸和姜汁的浓度越高其生长

量越低,当阿魏酸浓度为 $194 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、姜汁浓度为 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时愈伤组织的生长量最低,均为“+”。接种 180 d 后开始有愈伤组织分化出苗,接种 300 d 后愈伤组织或分化出苗或已经褐化坏死,统计愈伤组织的分化率,结果表明:添加 $48.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿魏酸和添加 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的姜汁其愈伤组织的分化率均显著高于对照,其中添加

$48.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿魏酸的愈伤组织分化率最高,为 17.9%; $100:150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VC + 柠檬酸、 $194 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿魏酸、 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的姜汁抑制愈伤组织分化,分化率均为 0; 添加 $100:50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100:100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VC + 柠檬酸混合液和在培养基表面添加 1 ml VC 时其愈伤组织的分化率均同对照差异不显著,为 3% 左右(表 3)。

表 3 不同种类不同浓度抗褐化剂对红苞地涌金莲愈伤组织的影响

处理	水平	浓度	诱导率/%	褐化指数/%				120 d 生长量	分化率/%
				30 d	60 d	120 d	180 d		
对照			90.5a	3.2d	35.8ef	72.8cd	87.2cd	+++	2.9ef
表面添加 1 ml VC/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	1	50	90.8a	1.7e	33.6f	72.5cd	86.4d	+++	3.9e
	2	100	89.8ab	1.5e	33.7f	72.1cde	86.2d	+++	3.7ef
	3	200	89.6ab	1.9e	33.4f	73.9c	87.2cd	+++	3.6ef
VC + 柠檬酸/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	1	100:50	88.7ab	3.1d	36.6def	72.8cd	87.8c	+++	2.7fg
	2	100:100	89.0ab	3.7cd	37.8de	73.1c	87.5cd	+++	3.0ef
	3	100:150	89.2ab	3.9cd	38.0de	73.1c	87.8c	++	1.8g
阿魏酸/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	1	48.5	87.9ab	4.2c	27.7g	67.7f	62.3g	+++	17.9a
	2	97	82.2c	5.6b	37.3de	69.9ef	75.1f	++	12.8b
	3	194	63.1d	9.6a	52.2a	86.5a	93.8a	+	0.00h
姜汁液/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	1	0.5	87.8ab	3.9cd	40.0cd	70.6de	77.5e	++	7.6d
	2	1.5	87.0b	4.2c	42.0bc	68.9ef	74.6f	++	10.3c
	3	4.5	79.4c	5.6b	43.8b	80.4b	92.4b	+	0.0h

注: + 表示愈伤组织生长量小; ++ 表示愈伤组织生长量中; +++ 表示愈伤组织生长量大。

3 结论与讨论

外植体的伤害程度会影响愈伤组织的褐化,伤害越大愈伤组织褐化程度越严重,在外植体消毒时,消毒液会导致外植体的正常细胞受损,使其细胞膜结构破坏进而引发褐化^[12-13]。本试验外植体为被花苞紧被的未成熟雄花,与外界处于隔离状态,表面所带的细菌和真菌极少,且未成熟雄花细胞处于活跃的分生阶段,内源菌较少。试验中发现,外植体不经消毒在无菌条件下接种,其污染率为 0,且褐化率、褐化指数均低于消毒处理的对照组,愈伤组织的质地也好于对照。因此,不对外植体消毒,既可避免原变种地涌金莲组织培养中外植体的污染,也解决了消毒对外植体造成损害进而引发的褐化问题,使组织培养在接种之初就减轻了褐化的程度。在地涌金莲组织培养中,采用未经开放的内藏未成熟雄花作为外植体最好。

对于不同植物,有效诱导其愈伤组织的植物生长调节剂的种类也有所不同。影响芦荟 (*Aloe spp.*)、火鹤 (*Anthurium andraeanum* L.) 叶片愈伤组织诱导率的主导因子均为 6-BA, 2,4-D 为次要因子^[14-15], 而 2,4-D 则是影响诱导香蕉 (*Musa nana*

Lour.) 叶片愈伤组织发生的重要因子^[16]。本试验说明,在原变种地涌金莲的愈伤组织诱导中 6-BA 起主导作用,其浓度对愈伤组织的褐化率、褐化指数、出愈量有较大的影响,2,4-D 的浓度对愈伤组织的诱导作用不显著,其浓度对愈伤组织的出愈率、褐化率、出愈量影响不显著。

VC 为多羟基还原物质,作为一种有效的抗褐化剂被应用于多种植物组织培养中;其作用原理一方面是可以使多酚氧化酶失活,阻止酚类物质氧化,另一方面 VC 在酶的催化下能消耗溶解氧,使酚类物质因缺氧而无法氧化,从而达到抑制褐化的效果^[17]。本试验采用与 Ko *et al.* 相同的办法^[18],即在培养基表面添加一定量的 VC 液,处理在愈伤组织诱导的早期获得了较好效果,但继代后期褐化严重,同对照无显著性差异,这可能与红苞地涌金莲愈伤组织褐化程度较高有关。有研究表明,柠檬酸与 VC 的结合使用可对愈伤组织褐化抑制起到协同作用,使多酚氧化酶 (PPO) 酶活性受抑制更为明显,这可能由于添加一定量的柠檬酸可增强 VC 的稳定性,降低 VC 的损失而提高其抑制效果^[19]。但本试验中,VC + 柠檬酸组合处理对愈伤组织褐化抑制没有很好的效果。添加适宜浓度的姜汁有利于抑制红苞

地涌金莲愈伤组织褐化,姜汁浓度为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时效果最好,分化率可达 10.3%,褐化指数为 74.6%。Morfeine 在小果野蕉 (*Musa acuminata* Colla) 组织培养中首次采用姜汁抑制褐化,采用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的姜汁处理外植体,接种 3 周后培养基和外植体的褐化强度分别为“无”和“低”,对褐化的抑制达到了很好的效果^[20],本试验的结果与其一致。

Huang *et al.* 在紫竹 (*Phyllostachysnigra* (Lodd. ex Lindl.) Munro) 组织培养的抗褐化研究中对培养基中添加阿魏酸、VC、曲酸、半胱氨酸、硫脲等 5 种 PPO 抑制剂,发现当阿魏酸浓度为 $194 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时培养基的褐化比率为 0,平均褐化的芽数为 0.25 个左右,抑制褐化的效果最好^[21]。作为一种多酚,阿魏酸具有很强的抗氧化功效,同时也是一种化感物质,这可能与多酚-蛋白质具有可逆的结合反应有关,同时多酚这一重要的化学性质也导致了阿魏酸对酶具有抑制作用,进一步抑制了植物的生长^[22-23]。本试验中,高浓度的阿魏酸会降低愈伤组织诱导率,明显抑制愈伤组织的生长。在愈伤组织继代 60 d 以后,低浓度的阿魏酸可以显著降低愈伤组织的褐化指数,并随着愈伤组织继代的时间延长效果越明显,这可能与阿魏酸具有强的还原性、抗氧化能力以及对 PPO 有抑制作用有关。当浓度为 $48.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿魏酸对愈伤组织的生长量抑制不明显,却能显著的降低愈伤组织的褐化指数,使愈伤组织的分化率达到 17.9%,较对照的 2.9% 提高了 5 倍,从而在一定程度上解决了红色系列地涌金莲新品种组培苗难以获得而无法上市的瓶颈问题。

参考文献:

- [1] 冯国楣,李雅茹. 云南植物志第 2 卷 [M]. 北京: 科学出版社. 1979: 725-727.
- [2] Ma H, Pan Q J, Wang L, *et al.* *Musellasiocarpa* var. *rubibracteata* (Musaceae), a new variety from Sichuan, China [J]. *Novon*, 2011, 21(3): 349-353.
- [3] 万友名,李正红,马宏,等. 地涌金莲新品种“佛喜金莲” [J]. *园艺学报*, 2013, 40(4): 811-812.
- [4] 马宏,李正红,万友名,等. 地涌金莲新品种“佛乐金莲” [J]. *园艺学报*, 2013, 40(8): 1625-1626.
- [5] 马宏,李正红,万友名,等. 地涌金莲新品种“佛悦金莲” [J]. *园艺学报*, 2013, 40(6): 1219-1220.
- [6] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题 [J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(6): 501-506.
- [7] 张树河,林江波,甘勇辉,等. 地涌金莲组培快繁技术研究 [J]. *亚热带植物科学*, 2004, 33(4): 35-36.
- [8] 王云波,凌青,李玉香,等. 地涌金莲组培快繁技术研究 [J]. *现代农业科技*, 2011(6): 211-213.
- [9] 刘秀贤,潘庆杰,李正红,等. 地涌金莲的离体培养与快速繁殖技术研究 [J]. *安徽农业科学*, 2010(009): 4442-4444.
- [10] 曾宋君,吴坤林,陈之林,等. 珍稀药用和观赏植物地涌金莲的组织培养和快速繁殖 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2007, 15(1): 55-62.
- [11] 顾之中,江绍玫,熊友发,等. 水稻愈伤组织发生褐变的影响因素研究 [J]. *江西农业大学学报*, 1992, 14(3): 206-211.
- [12] Bonga J M, Durzan D J. 树木组织培养 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1988: 273-279.
- [13] 蒋跃明. 果实褐变及控制 [J]. *植物杂志*, 1991, 18(6): 22-23.
- [14] 肖波,廖尔华,胡开治,等. 植物生长物质诱导芦荟叶片愈伤组织效果的研究 [J]. *中国农学通报*, 2006, 22(1): 163-165.
- [15] 杜宝贵,梁彩红,黎扬辉,等. 影响火鹤愈伤组织诱导、增殖和芽分化的因素研究 [J]. *农业科学*, 2012(2): 43-48.
- [16] 朱祝英,郑锦玲,杨玉梅,等. 植物生长调节剂对离体香蕉叶片愈伤组织诱导的影响 [J]. *广东农业科学*, 2013(11): 29-32.
- [17] 陈惠娟. 植物组织培养中褐变的产生机理及克服措施 [J]. *植物保护*, 2005, 31(2): 79-82.
- [18] Ko W H, Su C C, Chen C L, *et al.* Control of lethal browning of tissue culture plantlets of *Cavendish banana* cv. *Formosana* with ascorbic acid [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2009(96): 137-141.
- [19] ÇÖRDÜK N, AKI C. Inhibition of browning problem during micro-propagation of *Sideritistrojana* Bormm., an endemic medicinal herb of Turkey [J]. *Romanian Biotechnological Letters*, 2011, 16(6): 6760-6765.
- [20] Morfeine E A. Effect of anti-browning on initiation phase of *Musa* species grand naine in vitro [J]. *Journal of forest products & industries*, 2013, 2(2): 45-47.
- [21] Huang L C, Lee Y L, Huang B L, *et al.* High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture [J]. *In vitro cellular & developmental biology-plant*, 2002, 38(4): 358-365.
- [22] 何华勤,梁义元,贾小丽,等. 酚酸类物质的抑草效益分析 [J]. *应用生态学报*, 2004, 15(12): 2342-2346.
- [23] 石碧,狄莹. 植物多酚 [M]. 北京: 科学出版社. 2000: 111-118.