

文章编号:1001-7380(2016)06-0020-04

## 雷公藤组织培养中嫩叶外植体褐化的控制

陈凌艳<sup>1</sup>, 陈 拓<sup>1</sup>, 吴玉香<sup>1</sup>, 沈少炎<sup>1</sup>, 荣俊冬<sup>2</sup>, 何天友<sup>1</sup>, 郑郁善<sup>2\*</sup>

(1.福建农林大学园林学院, 福建 福州 350002; 2.福建农林大学工业原料林研究所, 福建 福州 350002)

**摘要:**以雷公藤当年生嫩叶为材料进行离体愈伤组织诱导培养,研究了不同处理对减轻外植体褐化率的影响。结果表明:初代愈伤组织诱导时选用液体培养基,能有效降低褐化率并延迟褐化发生时间;接种前后的特殊处理,如接种前在 1.0 g/L PVP 溶液中切割外植体,接种后在暗培养和冷藏条件下预处理,均能有效延迟褐化发生时间;转接时间缩短到 3 d,能很好地保证愈伤组织的诱导效果,又在一定程度上降低褐化率;在培养基中加入低质量浓度(0.02 g/L)的硝酸银,能在保证有愈伤组织产出的前提下,降低雷公藤外植体的褐化。

**关键词:**雷公藤;组织培养;愈伤组织;诱导;褐化;总酚

**中图分类号:**R282.2 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2016.06.005

## Control of browning in the process of callus induction with *Tripterygium wilfordii*'s new leaves

CHEN Ling-yan<sup>1</sup>, CHEN Tuo<sup>1</sup>, WU Yu-xiang<sup>1</sup>, SHEN Shao-yan<sup>1</sup>,  
RONG Jun-dong<sup>2</sup>, HE Tian-you<sup>1</sup>, ZHENG Yu-shan<sup>2\*</sup>

(1.College of Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2.Institute of Industrial Forest, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The effects of different treatments on the browning alleviation in the callus induction with *Tripterygium wilfordii*'s new leaves were compared in this paper. The results showed as follows. Liquid medium at initial stage could delay the browning happening and reduce the browning rate. Such special treatments as cutting the explants in 1.0 g/L PVP before inoculation, treating the explants in darkness and low temperature, could delay the browning occurrence. And the browning of explants could be also decreased effectively by transferring into another medium every 3 days. Furthermore, the good anti-browning effect could be got when adding 0.02 g/L AgNO<sub>3</sub> into medium as the healthy callus was also got as well.

**Key words:** *Tripterygium wilfordii*; Tissue culture; Callus; Induction; Browning; Total phenolics

由酚类造成的外植体或培养物的褐化、枯死现象是植物组织培养过程中十分常见的问题,严重影响着组织培养的最终结果。有研究表明,组织培养过程中的褐化过程与植物的年龄、基因型、培养条件等相关。不少学者深入研究后发现,初始外植体总酚含量与 PPO 活性能够表征试管苗的褐化情况<sup>[1-3]</sup>,且可以通过使用各种抗褐化处理,降低总酚

含量,以减少褐化程度。刘真华等在蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究中发现,谷胱甘肽控制褐化的效果虽不及活性炭,但综合效果最佳<sup>[4]</sup>;李萍等在对牡丹组织培养防褐化的研究中发现,使用硝酸银能有效控制褐化<sup>[5]</sup>;龚晓洁在对马铃薯愈伤组织培养的抗褐化研究中发现,硫代硫酸钠和柠檬酸的防褐化效果最好<sup>[6]</sup>;蔡长福等在对对比了各种抗氧化剂

收稿日期:2016-08-14;修回日期:2016-09-21

**基金项目:**国家科技支撑计划项目(2009BAI73B00);福建省中药材 GAP 工程技术研究中心项目(2008Y2001);福建省科技重大专项基金项目(2004YZ02-05)

**作者简介:**陈凌艳(1986-),女,福建福州人,讲师。从事园林植物与观赏园艺研究。

**\*通信作者:**郑郁善(1960-),男,福建永泰人,教授,博士生导师。从事森林培育学研究。

和吸附剂的使用效果后得出,在培养基中添加活性炭的抗褐化效果最佳<sup>[7]</sup>;而侯健华等在对地涌金莲的组织培养中发现,姜汁和阿魏酸对抑制愈伤组织褐化有较好的效果<sup>[8]</sup>。

雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)是一种传统的道地中药材,褐化是严重影响其组织培养效果的因子之一,尤其在雷公藤离体器官的愈伤组织诱导阶段,褐化现象普遍存在。本文展示的是雷公藤愈伤组织诱导过程中各种抗褐化处理的效果对比研究,目的在于为寻找抑制褐化的最佳方案提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料来自于福建泰宁地区雷公藤种植基地移栽至福建农林大学“福建省中药材 GAP 工程技术研究中心”苗圃的优良雷公藤苗。采摘长势优良的雷公藤当年生嫩叶后,立刻用洗涤剂浸泡 10 min 后在自来水中冲洗 2 h,待用。

### 1.2 试验方法

愈伤组织诱导过程中,其诱导效果常受培养基中无机盐浓度、蔗糖质量浓度和光照等条件的影响。对褐化的抑制,一般通过选择适宜的培养基,调节植物生长调节剂的种类与含量(低质量浓度的 BA, ABA 等),再配合使用抗氧化剂如硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )、维生素 C ( $\text{V}_\text{C}$ )、柠檬酸、硝酸银( $\text{AgNO}_3$ )抑制多酚氧化酶的活性,以吸附剂(PVP, AC)吸附细胞分泌的醌类物质或缩短继代时间,减轻醌类物质对外植体生长的抑制;或者通过物理方法如热激和低温处理,抑制多酚氧化酶的活性<sup>[9-12]</sup>。

1.2.1 培养基状态对雷公藤嫩叶褐化的影响 以 MS+1.0 mg/L 2,4-D +1.0 mg/L 6-BA 为基本培养基,设 3 个处理:(1)固体培养基附加 8 g/L 琼脂;(2)半固体培养基附加 4 g/L 琼脂;(3)液体培养基不加琼脂,以珍珠岩为支撑物。

1.2.2 不同预处理对雷公藤外植体褐化的影响 在愈伤组织诱导培养之前,分别对外植体进行以下预处理:接种前在 5℃ 下对外植体进行冷藏,时间分别为 1, 3, 5 d;接种时,外植体在 1.0 g/L PVP 溶液中切割;接种后,外植体先进行暗培养(25℃),时间分别为 1, 3, 5 d 和 7 d,以正常培养为对照。预处理之后在正常光照温度条件下培养。

1.2.3 转瓶间隔时间对雷公藤外植体褐化的影响 以 MS+1.0 mg/L 2,4-D +1.0 mg/L 6-BA 为基本

培养基,间隔 3, 6, 9, 15, 30 d 转瓶 1 次。调查不同转瓶间隔时间对外植体褐化的影响。

### 1.2.4 不同抗褐化剂对雷公藤外植体褐化的影响

以 MS+1.0 mg/L 2,4-D +1.0 mg/L 6-BA 为基本培养基,加入不同抗褐化剂,包括  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 $\text{V}_\text{C}$ 、柠檬酸、 $\text{AgNO}_3$  及吸附剂 PVP 和 AC,经预试验确定所需浓度范围,设定 3 个梯度水平,采用完全随机试验设计<sup>[7-8]</sup>(见表 1)。

表 1 不同抗褐化剂处理

水平	抗氧化剂/(g/L)				吸附剂/(g/L)	
	维生素 C	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	柠檬酸	$\text{AgNO}_3$	PVP	AC
1	0.02	0.02	0.02	0.02	0.5	0.5
2	0.05	0.05	0.05	0.04	1.0	1.0
3	0.1	0.1	0.1	0.08	2.0	2.0
CK	0	0	0	0	0	0

无特别说明,以上所有培养基均加入琼脂 8 g/L,蔗糖 30 g/L, pH 5.8。每个处理接种 30 瓶,每瓶接种 3 片大小约为 1 cm<sup>2</sup> 的嫩叶叶片。培养室温度控制在 (25±2)℃,光照强度为 1 000—1 500 lx。接种后,密切观察外植体褐化出现的时间;愈伤组织诱导培养 30 d 后,分别统计形成健康愈伤组织的外植体数量和褐化的外植体数量,再计算愈伤组织诱导率和外植体褐化率。

愈伤组织诱导率=(获得健康愈伤组织的外植体数量/同一批次总外植体数量)×100%;

外植体褐化率=(褐化的外植体数量/同一批次总外植体数量)×100%。

所得数据均通过 Excel 及 DPS7.5 软件进行整理,并以 Tukey 法进行多重比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对雷公藤外植体抗褐化的影响

#### 2.1.1 培养基状态对雷公藤外植体抗褐化的影响

结果见表 2。从表 2 可以看出,培养基的凝固状态对外植体褐化有明显的影响:采用液体培养基的外植体褐化率最低,为 18.52%,且褐化出现时间较晚,为 10 d;半固体培养基次之;而采用固体培养基的外植体褐化率最高,达 32.41%,且在接种后第 4 d 就出现了褐化现象。因此,在愈伤组织诱导过程中,可选用液体培养基以减轻外植体的褐化。

表 2 不同培养基状态对雷公藤外植体褐化的影响

培养基状态	愈伤组织诱导率/%	褐化出现时间/d	褐化率/%
固体	92.33	4	32.41 Bc
半固体	94.00	6	25.36 Ab
液体	91.67	10	18.52 Aa

表中褐化率后不同大小写字母分别表示结果差异极显著 ( $P<0.01$ ) 和显著 ( $P<0.05$ )

2.2.2 预处理对雷公藤外植体抗褐化的影响 从结果(见表 3)可以看出,在没有任何预处理的对照组中,雷公藤外植体在接种后第 3 d 就出现褐化现象,而在进行正常光照之前,采取暗培养或冷藏处理,褐化现象明显延迟,褐化率也分别从对照的 32.11%降低为 24.38%和 23.25%,说明暗培养或冷藏预处理,对外植体褐化起到了一定的抑制作用。但随着时间推移,褐化现象也随即产生,说明黑暗和低温处理只是在短时间内抑制了褐化物质的产生。接种前在 1.0 g/L PVP 溶液中切割外植体也能减轻褐化,褐化现象延迟了 4 d,褐化率从对照的 32.11%降低为 24.72%,降低了 7.39%。一般认为,PVP 能及时除去外植体切割时分泌的酚类物质,防止氧化酶催化。

表 3 不同预处理对雷公藤外植体褐化的影响

预处理	处理时间/d	愈伤组织诱导率/%	褐化出现时间/d	褐化率/%
暗培养(25 ℃)	1	92.60	3	31.75 Bc
	3	90.83	5	29.63 Bb
	5	88.47	9	26.50 Aa
	7	85.67	10	24.38 Aa
冷藏(4 ℃)	1	90.33	4	29.79 Bb
	3	87.79	8	25.02 Aa
	5	83.46	11	23.25 Aa
在 1.0 g/L PVP 溶液中切割		90.58	7	24.72 Aa
CK		92.63	3	32.11

表中褐化率后不同大小写字母分别表示结果差异极显著 ( $P<0.01$ ) 和显著 ( $P<0.05$ )

2.2.3 转瓶间隔时间对雷公藤外植体抗褐化的影响 雷公藤嫩叶外植体接种后转瓶间隔时间不一样,褐化程度明显不一样(见表 4)。试验结果以 3 d 转瓶 1 次抗褐化效果最好,褐化率降到 10.56%,且愈伤组织诱导率最大,30 d 转瓶 1 次情况刚好相反。表明勤转瓶可有效减轻褐化程度,提高外植体的生

长质量。

表 4 不同转瓶间隔时间对雷公藤外植体抗褐化的影响

转瓶间隔时间/d	愈伤组织诱导率/%	褐化率/%
3	100	10.56 Aa
6	98.67	12.21 Ab
9	97.24	15.74 Bb
15	95.00	23.63 Cc
30	92.33	32.04 Dd

表中褐化率后不同大小写字母分别表示结果差异极显著 ( $P<0.01$ ) 和显著 ( $P<0.05$ )

2.2.4 抗褐化剂对雷公藤外植体抗褐化的影响 从表 5 中可以看出,在各种抗褐化剂的效果对比中,AgNO<sub>3</sub>的效果极显著( $F$  值为 639.07)。在试验范围内,随着 AgNO<sub>3</sub>质量浓度的增大,褐化程度逐渐减轻,AgNO<sub>3</sub>质量浓度为 0.08 g/L 时,外植体底部及培养基呈乳白色,褐化现象得到了有效的控制,然而有效愈伤组织的诱导也受到较为严重的抑制。在培养基中添加低质量浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,不仅没有抑制褐化,反而使褐化加重,当 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 为 0.1 g/L 时,外植体褐化程度减轻,但高质量浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 不利于愈伤组织的诱导。其他抗氧化剂柠檬酸、V<sub>C</sub> 控制外植体褐化的效果均不理想。方差分析中,不同处理间的抗褐化达到了极显著水平。综合比较,0.02 g/L AgNO<sub>3</sub>控制褐化及诱导愈伤组织的综合效果最好。

3 讨论与结论

酚类物质是导致褐化的关键因素,含酚较高的外植体材料可采用减少其酚类物质的相对含量为主,抑制多酚氧化酶活性为辅的途径,获得理想的抗褐化效果,提高组织培养的成功率<sup>[13-14]</sup>。不同处理对雷公藤外植体抗褐化的效果不同。本研究发现在初代进行愈伤组织诱导时选用液体培养基可有效降低外植体的褐化率;接种前后的一些特殊处理也能有效减轻褐化,如接种前在 1.0 g/L PVP 溶液中切割外植体,接种后采用暗培养或冷藏预处理等措施,能在短时间内对褐化起到一定的抑制作用,这可能是因为雷公藤体内的酶系统在光照条件下会加速酚类物质的氧化<sup>[15]</sup>;3 d 转瓶 1 次抗褐化效果很好,褐化率降到 10.56%,且愈伤组织诱导率最大,这可能与转接后植物材料的总酚含量下降有关,培养天数超过 3 d 后,总酚含量不断积累上升,外植体又会受到毒害。



在通过使用抗氧化剂和吸附剂的方法抑制褐化的研究中发现:抗氧化剂  $\text{AgNO}_3$  对嫩叶外植体褐化能起到较好的抑制作用;而吸附剂 PVP 控制外植体褐化的效果也不理想,由于 PVP 专一的吸附作用,增加了外植体内外酚类物质的浓度差,造成酚类物质的过度外渗而发生了氧化,氧化后酚类物质转化为了醌类物质,反而不能有效抑制褐化发生;而 AC 在吸附培养基中的酚、醌等物质的同时,也会吸附培养基中的生长调节物质和营养物质,导致外植体生长受到影响,而且随着 AC 用量的增加,培养基中的渗透压增大,从而进一步刺激了愈伤组织中酚类物质的释放,反而导致外植体的褐化加剧。以上说明,抑制组织培养中外植体的褐化,没有固定的模式,不同植物材料、不同外植体类型在具体附

加抗氧化剂、吸附剂的种类和浓度上有较大差别。

本研究结果表明:初代愈伤组织诱导时选用液体培养基,能有效降低褐化率并延迟褐化发生时间;接种前后的一些特殊处理,如接种前在  $1.0\text{ g/L}$  PVP 溶液中切割外植体,接种后在暗培养和冷藏条件下预处理,均能有效延迟褐化发生时间;转接时间缩短到 3 d,能够很好地保证愈伤组织的诱导效果,又在一定程度上降低褐化率;在培养基中加入低质量浓度( $0.02\text{ g/L}$ )的硝酸银,能在保证有愈伤组织产出的前提下,降低雷公藤外植体褐化的情况。在生长旺盛期,也是褐化高峰期,如果将这几种抗褐化方法结合使用,会起到更好的抗褐化效果,促进愈伤组织生长。

表 5 不同抗褐化剂对雷公藤外植体抗褐化的影响

抗褐化剂	质量浓度/(g/L)	30 d 后褐化率/%	愈伤组织培养效果
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.02	37.17 Cc	愈伤组织分化较多,褐化较严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分浅棕色,质脆
	0.05	41.78 Cc	愈伤组织分化较少,褐化较严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
	0.10	28.28 Cc	愈伤组织分化较多,褐化现象略有减轻。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分浅棕色,质脆
$\text{V}_\text{C}$	0.02	33.86 Cc	愈伤组织分化较多,褐化较严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
	0.05	35.39 Cc	愈伤组织分化较多,褐化较严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
	0.10	46.64 Cc	愈伤组织分化较少或无,褐化严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
柠檬酸	0.02	34.28 Cc	愈伤组织分化较多,褐化较严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
	0.05	39.52 Cc	愈伤组织分化较多,褐化严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
	0.10	42.67 Cc	愈伤组织分化较少或无,褐化严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
$\text{AgNO}_3$	0.02	15.39 Cc	愈伤组织分化多,健康,色绿。蓬松褐化部分较少,浅棕色,质脆
	0.04	0.28 Bb	少量愈伤组织,色黄绿,质较蓬松
	0.08	0.00 Aa	无愈伤组织分化
PVP	0.50	54.65 Dd	愈伤组织分化较少或无,褐化严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
	1.00	62.56 Dd	愈伤组织分化较少或无,褐化严重。褐化部分深棕色,质脆
	2.00	72.56 Dd	无愈伤组织分化,褐化严重。
AC	0.50	40.64 Cc	愈伤组织分化较少或无,褐化严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
	1.00	42.67 Cc	愈伤组织分化较少或无,褐化严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
	2.00	40.94 Cc	愈伤组织分化较少或无,褐化严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆
CK		31.67 Cc	愈伤组织分化较多,褐化较严重。未褐化部分色黄绿,质硬;褐化部分深棕色,质脆

表中褐化率后不同大小写字母分别表示结果差异极显著( $P<0.01$ )和显著( $P<0.05$ )

参考文献:

[1] 罗晓芳,田硕亭,姚洪军.组织培养过程中 PPO 活性和总酚含量的研究[J].北京林业大学学报,1999,21(1):92-95.

[2] 李焕秀,王乔春,李春秀.梨芽和茎尖多酚氧化酶活性和总酚

含量的初步研究[J].四川农业大学学报,1994,2(2):218-222.

[3] 戴勤,俞建妹,谭玲,等.擎天树初始外植体总酚含量与 PPO 活性的关系[J].中南林业科技大学学报,2014,34(4):50-53,59.

(下转第 40 页)

### 3 讨论与结论

细胞膜相系统是植物细胞、细胞器和环境的一个界面结构。Martineau 等<sup>[4]</sup>认为当植物受到高温胁迫时,细胞膜相结构遭到破坏,膜透性增大,从而使细胞内电解质外渗,电导率增大。电解质渗透率越大,其稳定性越差,植物受到的高温伤害也越大。细胞膜透性的稳定性(CMT)是测定离体叶片在一定温度范围内渗透的特性,是一种灵敏、快捷估测植物耐热性的方法<sup>[5-6]</sup>。本研究采用的离体叶片经梯度高温处理后,处理温度与细胞伤害率之间呈现 S 型曲线,而且发现当温度升至 45 ℃ 时,‘发现’和‘拳王’2 个品种的细胞伤害率最小,仅为 12.18% 和 22.56%,表明此高温范围内,相对于其他品种,它们受到高温的影响相对较小;而‘大英雄’和‘鸿运’2 个品种细胞伤害率最大,表明其耐热性相对较差。

自 Sullivan 首次用电导法测定细胞膜热稳定性以来,采用电导法配合 Logistic 方程计算半致死温度( $LT_{50}$ ) 现已应用于多种植物材料<sup>[7-10]</sup>。但该方法在万寿菊不同品种中的应用,本试验当为首次。根据半致死温度,9 个品种耐热性依次为‘金门’、‘拳王’、‘发现’、‘巨人’、‘珍妮’、‘小英雄’、‘迪阿哥’、‘鸿运’和‘大英雄’。其结果与本课题组前期田间试验形态观测基本一致,表明此方法是鉴定万寿菊属不同品种耐热性的一种简单易行的方法。但由于本试验是在离体条件下测定,其半致死高温只在一定程度上反映出植物的耐热性,其结果可作为今后万寿菊属植物耐热性测定的指标之一,但如

果要对植物的抗性做出更客观、全面、科学的评价,必须进一步测定活体植株在高温胁迫下的生长及生理反应,综合评价万寿菊属植物耐热性的差异。

#### 参考文献:

- [1] 赵玉宏. 应用 Logistic 方程测定冷地型草坪草抗热性研究[J]. 湖北农业科学, 2004(4): 108-110.
- [2] 盖钧镛. 试验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 56-59.
- [3] 陈发棣, 陈素梅, 房伟民, 等. 五个小菊品种(或种)的耐热性鉴定[J]. 上海农业学报, 2001, 17(3): 80-82.
- [4] MARTINEAU J R, SPECHT J E, WILLIAMS J H, et al. Temperature Tolerance in Soybeans. I. Evaluation of a Technique for Assessing Cellular Membrane Thermostability1 [J]. Crop Science, 1979(1): 75-78.
- [5] YEH D M, LIN H F. Thermostability of cell membranes as a measure of heat tolerance and relationship to flowering delay in chrysanthemum[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2003, 128(5): 656-660.
- [6] WU M T, WALLNER S J. Heat stress responses in cultured plant cells; Development and comparison of viability tests [J]. Plant Physiology, 1993, 72(3): 817-820.
- [7] 徐 康, 夏宜平, 徐碧玉, 等. 以电导法配合 Logistic 方程确定茶梅‘小玫瑰’的抗寒性[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 148-150.
- [8] 许 瑛, 陈发棣. 菊花 8 个品种的低温半致死温度及其抗寒适应性[J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 559-564.
- [9] 谢晓金, 郝日明. 南京地区 12 种常绿阔叶树种冬季抗寒性动态变化[J]. 生态学报, 2009, 29(4): 2149-2153.
- [10] 蔡 化, 张鹤山, 田 宏, 等. 5 份野生鸭茅材料高温半致死温度与耐热性研究 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(24): 6068-6070.
- [10] 景 宁, 康 晋, 张耀宏, 等. 桃儿七愈合组织的诱导及植株再生[J]. 浙江农林大学学报, 2015, 32(01): 162-166.
- [11] 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.
- [12] FINNIE S J, POWELL W, DYER A F. The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Plant Breeding, 1989, 103(2): 110-115.
- [13] 王文姬, 方 正, 李英丽, 等. 蝴蝶兰组织培养中防褐化技术研究[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(5): 33-36.
- [14] 印 芳, 葛 红, 彭克勤, 等. 酚类物质与蝴蝶兰褐化关系初探[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 1137-1140.
- [15] 戴 莹, 杨世海, 赵鸿峥, 等. 药用植物组织培养中褐化现象的研究进展[J]. 中草药, 2016, 46(2): 344-351.
- [4] 刘真华, 葛 红, 郭绍霞, 等. 蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 732-734.
- [5] 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.
- [6] 龚晓洁. 几种防褐剂对马铃薯愈伤组织培养褐化现象的抑制效应[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10410-10412.
- [7] 蔡长福, 卢丽俐, 苏庆桂, 等. 朱砂根组织培养防褐化探讨[J]. 福建林业科技, 2013, 40(1): 99-102.
- [8] 侯健华, 李正红, 马 宏, 等. 地涌金莲组织培养中的褐化抑制[J]. 林业科学研究, 2015, 28(2): 217-221.
- [9] 李 丽, 张湮帆, 何 康, 等. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制[J]. 复旦学报(自然科学版), 2006, 45(6): 702-707.

(上接第 23 页)