植物组织培养中褐变问题研究进展

付影, 荣俊冬, 陈礼光, 郑郁善*

(福建农林大学工业原料林研究所, 福建福州 350002)

摘要: 褐变问题是植物组织培养中经常遇到的问题, 已经成为影响组织培养成功的重要因素。结合近些年的研究, 对褐变发生的原因、影响褐变的因素以及控制褐变的措施进行了综述, 以期为解决褐变问题提供理论依据。

关键词: 组织培养; 褐变; 进展

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-0925(2007)03-0190-06

Advances in browning researches in plant tissue culture

FU Ying, RONG Jun-dong, CHEN Li-guang, ZHENG Yu-shan

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

Abstract: Browning has become an important factor that affects the success of plant tissue culture. It is frequently encountered in plant tissue culture. Integrating the lately studies, the reason and the influences of browning and the methods to overcome browning were researched to offer the theory basis to settle browning matter.

Key words: tissue culture; browning; advance

植物组织培养中所说的褐变是指外植体在诱导脱分化或再分化过程中, 自身组织从表面向培养基释放褐色物质, 以至培养基逐渐变成褐色, 外植体也随之进一步变褐而死亡的现象。褐变在植物组织培养过程中普遍存在, 这种现象与菌类污染和过度含水化(即玻璃化)并称植物组织培养的3大难题。而控制褐变比控制污染和过度含水化更加困难, 因而, 有人认为褐变能否得到有效控制是植物组织培养能否成功的关键所在^[1]。近年来, 植物组织培养技术发展很快, 有关褐变的研究也越来越深入。本文根据国内外的最新研究成果, 对褐变发生的原因、影响褐变的因素以及控制褐变的方法做一介绍, 以期为解决褐变问题提供理论依据。

1 褐变发生的原因

褐变包括酶促褐变和非酶促褐变, 目前认为植物组织培养中的褐变主要是由酶促褐变引起的。酶促褐变必须具有酶、底物和氧3个条件。

引起褐变的酶有多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶等, 但最主要的是PPO。PPO可分为两大类, 即漆酶和儿茶酚氧化酶。习惯上, 常把儿茶酚氧化酶称为酚氧化酶、PPO、酪氨酸酶、儿茶酚酶或甲酚酶, 它与漆酶有明显的区别。漆酶的催化底物范围很广, 可以催化单酚、三酚、邻和对位二酚以及芳香族某些氨基酸。儿茶酚氧化酶是一种含铜酶, 可以催化2种不同的反应, 即催化含一个羟基的酚形成二醌和催化邻苯二酚形成二醌。漆酶可催化对苯二酚或苯酚形成对苯醌或邻苯醌, 还可以催化其他多种基质的氧化, 如抗坏血酸、对苯二酚等^[2]。引起褐变的酶的底物主要是酚类化合物, 按其组成可分成3类: 第一类是苯基羧酸, 包括邻羟基苯酚、儿茶酚、没食子酸、莽草酸等; 第二类是苯丙烷衍生物, 包括绿原酸、肉桂酸、香豆酸、咖啡酸、单宁、木质素等; 第三类是黄烷衍生物, 包括花青素、黄酮、芸香苷等^[2]。王泽农等^[3]把酚类及其衍生物分为6大类: 黄烷醇类、4-羟基黄烷醇类(花白素类)、花色苷类(花青素类)、黄酮醇类、黄酮类及酚酸类。其合成途径有2种: (1)由苯丙氨酸脱氨基而形成, 此途径被认为是高

收稿日期: 2007-05-14

基金项目: 国家科技部重点项目(2004DA0440); 福建省林业厅种苗攻关项目资助。

作者简介: 付影(1982-), 女, 硕士研究生。研究方向: 植物组织培养。

* 通讯作者: 郑郁善(1960-), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 森林培育学。

等植物中最主要的途径,PAC(苯丙氨酸氨裂解酶)是催化该反应的关键酶,苯丙氨酸脱氨基后转变成肉桂酸,后者经羟化酶转化为香豆酸,香豆酸由PPO催化加上2个羟基转变为咖啡酸。(2)经莽草酸途径形成查耳酮后,再经一系列不同反应生成黄酮、双查耳酮、异黄酮、花青素、黄酮醇、儿茶素等。但并非所有的酚类物质都是PPO的底物。谭兴杰等^[4]从荔枝果皮中得到6种酚类化合物,其中只有1种对荔枝果皮PPO有活性,测定其紫外吸收光谱,发现荔枝果皮PPO的天然底物与邻苯二酚的紫外吸收光谱相似。

在正常发育的植物组织中,底物、氧气、PPO同时存在并不发生褐变,这是因为在正常的组织细胞内由于多酚类物质分布在细胞的液胞内,而PPO则分布在各种质体或细胞质内,这种区域性分布使底物与PPO不能接触。而当细胞膜的结构发生变化和破坏时,则为酶创造了与PPO接触的条件,在氧存在的情况下使酚类物质氧化成醌,进行一系列的脱水、聚合反应,最后形成黑褐色物质,从而引起褐变^[2]。

2 影响褐变的因素

影响植物组织培养褐变的因素是复杂的,随着植物的种类、基因型、外植体部位及生理状态等的不同,褐变的程度也有所不同。

2.1 植物材料

2.1.1 植物种类及基因型 不同种植物,同种植物不同类型、不同品种在组织培养中褐变发生的频率、严重程度都存在很大差别。木本植物、单宁含量或色素含量高的植物容易发生褐变,这是因为酚类的糖苷化合物是木质素、单宁和色素的合成前体,酚类化合物含量高,木质素、单宁或色素形成就多,而酚类化合物含量高同时也导致了褐变的发生。因此,木本植物一般比草本植物容易发生褐变。已经报道发生褐变的植物中,大部分都是木本植物。在木本植物中,核桃单宁含量很高,在进行组织培养时难度很大,不仅接种后的初代培养期发生褐变,而且在形成愈伤组织以后还会因为褐变而出现死亡^[5]。Dalal等比较2个葡萄品种“Pusa Seedless”和“Beauty Seedless”的褐变时,发现后者比前者严重,酚类化合物含量也是后者明显高^[6]。

2.1.2 材料年龄 幼龄材料一般都比成龄材料褐变轻。平吉成^[7]从小金海棠、八楞海棠和山定子刚长成的实生苗上切取茎尖进行培养,接种后褐变很轻,随着苗龄增长,褐变逐渐加重;取自成龄树上的茎尖褐变更加严重。幼龄材料褐变较轻与其酚类化合物含量少有关。在欧洲栗的培养中,用幼年型的材料培养时含醌类物质少,而用成年型材料培养时含醌类物质多,后者比前者褐变严重。用油棕的幼嫩外植体(如胚)培养较少出现褐变,而用高度分化的叶片接种后则容易褐变^[2]。

2.1.3 取材部位 外植体的部位不同,接种后褐变的程度也不同。在分别对辣椒下胚轴及子叶组织培养时发现,下胚轴具有较强的分生能力,整个外植体生长旺盛,其褐变程度低于子叶^[9]。在荔枝无菌苗不同组织的诱导实验中发现,茎最容易诱导出愈伤组织,且愈伤组织生长良好;叶大部分不能诱导出愈伤组织,诱导出的愈伤组织多中度褐变;根大部分不能诱导出愈伤组织,诱导出的愈伤组织全部褐变^[8]。产生这种情况的原因可能是不同生长部位,不同生理状态的外植体材料,酚类物质的含量及PPO的活性上有所差异。

2.1.4 取材时期 王续衍和林秦碧对24个苹果品种进行茎尖培养时发现,以冬春季取材褐变死亡率最低,其它季节取材则都不同程度地加重^[10]。Wang等^[11]也报道“富士”苹果和“金华”桃在9月到2月取材褐变轻,5月到8月取材则褐变严重。核桃的夏季材料比其它季节材料更易氧化褐变,因而一般都选在早春或秋季取材。造成这种季节性差异主要是由于植物体内酚类含量和多酚氧化酶活性的季节性变化,植物在生长季节都含有较多的酚类化合物之故。

2.1.5 外植体大小及受伤害程度 外植体大小对褐化的影响,表现为小的材料更容易发生褐化,相对较大的材料则褐化的程度较轻。另外切口越大,酚类物质的被氧化面也越大,褐化程度就会更严重。蒋迪军和牛建新报道,金冠苹果茎尖小于0.5 mm时褐变严重,当茎尖长度在5-15 mm之间时褐变较轻,成活率可达85%^[11]。

外植体组织受伤害程度直接影响褐变。为了减轻褐变,在切取外植体时,应尽可能减小其伤口面积,伤口剪切尽可能平整些。除了机械伤害外,接种时各种化学消毒剂对外植体的伤害也会引起褐变。酒精

消毒效果很好,但对外植体伤害很重;升汞对外植体伤害比较轻。Ziv 等^[30]用 0.3% 升汞代替次氯酸钙进行消毒可明显减轻鹤望兰的褐变。一般讲,外植体消毒时间越长,消毒效果越好,但褐变也越严重,因而,消毒时间应掌握在一定范围内,才能保证较高的外植体存活率。

2.2 培养条件

温度对褐变影响很大。王明华等^[12]在褐变很严重的“芭蕾”苹果上验证了低温对褐变的抑制作用。苹果、桃、葡萄、金缕梅、丝穗木等植物的茎尖外植体如果取自田间自然光照下的植株枝条,那么接种后很容易褐变,而事先对取材母株或枝条进行遮光处理,之后再切取外植体,则可有效控制褐变。暗处理之所以能控制外植体褐变,是因为在酚类化合物合成和氧化过程中,需要许多酶系统,其中一部分酶系统的活性是受光诱导的。这些酶在自然光照条件下生长的植物体内非常活跃,从这样的植株上取得外植体很容易发生褐变,而把取材母株放置在黑暗或弱光条件下生长,植株组织内光诱导的那些参与酚类合成与氧化酶的活性就大大减弱,以至酚类化合物的合成减少,其氧化产物醌类也相应减少使褐变得到控制^[11]。

2.3 培养基

2.3.1 培养基状态 由于培养基中琼脂的用量和 pH 值的高低不同,培养基可配制成固体培养基、半固体培养基或液体培养基。许多试验证明,液体培养基可有效克服外植体褐变,液体培养基再加上滤纸作成“纸桥”,效果更好^[13]。在液体培养基中,外植体溢出的有毒物质可以很快扩散,因而对外植体造成的危害较轻。韩碧文和刘淑兰用低氧的半固体培养基培养酚类化合物含量很高的核桃,同样也收到了较好的抑制效果^[5]。

2.3.2 无机盐 在初代培养时,培养基中无机盐浓度过高可引起酚类外溢物质的大量产生,导致外植体褐变,降低盐浓度则可以减少酚类外溢,从而减轻褐变。无机盐中有些离子,如 Mn^{+} 、 Cu^{2+} 是参与酚类合成与氧化酶类的组成成分或辅因子,因此盐浓度过高会增加这些酶的活性,酶又进一步促进酚类合成与氧化。为了抑制褐变,在初代培养期使用低盐培养基,可以收到较好的效果。

2.3.3 植物生长调节剂 有报道说,初代培养处在黑暗条件下,生长调节剂的存在是影响褐变的主要原因,此时去除生长调节剂可减轻褐变。BAP(6-苄氨基腺嘌呤)或 KT(激动素)不仅能促进酚类化合物的合成,而且还能刺激多酚氧化酶的活性^[14],而生长素类如 2,4-D 可延缓多酚合成,减轻褐变发生。还有人推测外植体内源乙烯水平会影响酚类化合物含量^[11]。

2.3.4 pH 培养基低 pH 值可降低多酚氧化酶活性和底物利用率,从而抑制褐变。升高 pH 值则明显加重褐变^[1]。

2.3.5 螯合剂 培养基中加入螯合剂后,可与多酚氧化酶发生螯合,降低酶活性,从而达到抑制褐变的目的^[31]。

2.4 培养方式

2.4.1 外植体在培养基中的放置方式 薯蓣在用茎段作外植体进行组培时,将茎段正向插入培养基中,出现明显褐变,而将茎段倒向插入,则褐变完全消失。其原因尚不清楚^[15]。

2.4.2 培养方法 周延清等^[16]在培养决明原生质体时,对浅层培养、琼脂糖包埋培养和漂浮培养 3 种方法进行了比较。发现前 2 种静置培养方法由于原生质体沉淀造成营养与通气不良,导致原生质体破裂,释放出酚类物质而出现褐变;漂浮培养则克服了原生质体沉淀,从而减轻褐变,提高原生质体分裂率。

2.4.3 转瓶周期 对于易褐变的材料,接种后转瓶时间长,伤口周围积累醌类物质增多,褐变加重,而缩短转瓶周期可减轻褐变。在山月桂树的茎尖培养中,接种后 12-24 h,转入液体培养基中,这之后的 1 周内,每天转 1 次瓶,褐变得到完全控制。无刺黑莓上也有类似经验^[17]。

2.4.4 原生质体植板密度 山杏原生质体培养在 $0.1 \times 10^5 \cdot ml^{-1}$ 的植板密度下即可启动分裂,以 $0.5 \times 10^5 \cdot ml^{-1}$ 植板密度分裂频率和植板率最高。随着植板密度的增大,褐变逐渐加重,分裂频率和植板率下降^[18]。

3 控制褐变的措施

由于 PPO 是一种含铜离子的蛋白质,因此,寻找良好的抗褐变剂可从 3 个方面入手:(1)用将 Cu^{2+} 络合掉使酶失活的物质,如植酸(PA)和乙二胺四乙酸钠盐(EDTA)等;(2)加入与酶蛋白和底物的结合部位

能够结合的酶抑制剂,从而抑制醌类的产生;(3)加入能减少酚类或使醌类还原的物质,如活性炭(AC)、抗坏血酸(Vc)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等。由于不同物种的PPO存在着性质上的差异,适宜不同植物抗褐变剂也会有所不同。从理论上讲,酶促褐变可以通过以下3种方法加以抑制:(1)除去引起氧化的物质——氧;(2)捕捉或减少聚合反应的中间物;(3)抑制有关的酶^[2]。

3.1 选取适当的外植体

选择适当的外植体是克服褐变的重要手段。不同时期、不同年龄的外植体在培养中褐变的程度不同,成年植株比实生幼苗褐变的程度严重,夏季材料比冬季、早春及秋季材料褐变的程度强。而冬季的芽进入深休眠状态,不太容易生长,所以最好选用早春和秋季的材料作为外植体。取材时还应注意外植体的基因型及部位,选择褐变程度较小的品种和部位作外植体^[2]。

Danhua 和 Carole 研究了外植体起源与组织褐变的关系,他们认为生长在避荫处的外植体比生长在全光下的外植体褐变率低,腋生枝上的顶芽比其他部位枝的顶芽褐变率低。陈正华^[19]认为适宜的无机盐成分、蔗糖浓度、激素水平、温度及在黑暗条件下培养可以显著减轻材料的褐变。许传俊,李玲等^[24]对蝴蝶兰褐变外植体进行扫描电镜和显微结构观察,发现褐变叶片外植体的上表皮已经变形,维管束完全破坏,被有毒的鞣质填充,有些薄壁细胞中发现有不明物质沉积。初步分析褐变外植体分泌到培养基中的成分有缩合鞣质。外植体总酚含量和 PAL 活性随褐变程度加重逐渐增加,两者呈现显著正相关。

3.2 对培养材料进行预处理

将外植体用流水冲洗,后在 50 ℃ 左右处理 12 - 24 h,消毒后先接种在只含有蔗糖的培养基上 5 - 7 d,使组织中的酚类物质部分先渗入培养基,取出外植体,用适当方法清洗,再接种到合适的培养基上,可减轻外植体的褐变^[32]。李焕秀等用 6 种不同的预处理来研究其对苍溪梨外植体褐变和成活的影响,结果发现,低温处理对降低褐变有一定作用,用抗氧化剂或 PPO 溶液进行预处理也可起到减轻褐变的作用^[20]。苏梦云等^[25]对乐东拟单性木兰茎段愈伤组织诱导研究的结果表明,在接种前,将外植体在 4 ℃ 下冷处理 2 h,能使外植体的褐变率从对照的 35% 降低为 25%。

3.3 选择适当的培养基和培养条件

在培养基的选择上应注意适当的无机盐成分、蔗糖浓度、激素水平与组合以及配合一些抗褐变剂等都可减轻褐变现象的发生。培养过程中还要注意适宜的培养条件。因为在酚类物质的合成和氧化过程中,有许多酶系统参与,其中部分酶系统是光活性的。较高的温度会使酶促褐变加强。所以建议在培养初期保持较低的温度(15 - 20 ℃),黑暗或弱光下培养,均可减轻培养材料的褐变^[32]。闫桂琴等^[26]对翅果油树愈伤组织诱导的研究结果表明,葡萄糖为碳源的培养基能有效地防止褐变。张勇等^[23]的试验表明多酚氧化酶的最适 pH 值为 5.0;在 pH 值 5.0 - 6.5 范围内酶活力最大;其他 pH 值下均表现出不同程度的抑制,因此可通过调节 pH 值来控制香蕉褐变的程度。

在外植体接种后 1 - 2 d 即转移至新鲜培养基中或同一培养基的不同部位,可以防止酚类物质在伤口周围积累过多,连续转移几次即可防止褐变。此外,在外植体的培养过程中适当缩短转瓶周期,适当改变培养基的硬度等方法均可减轻褐变。胡凯等^[28]的试验结果表明,第 20 天就开始转移继代和提高愈伤组织与培养基接触面的氧气供给能较好克服褐化。

3.4 抑制剂和吸附剂的使用

在培养基中加入抗氧化剂和其他抑制剂可以有效地减轻外植体在组培过程中的酶促褐变。在培养基中加入 Vc 可有效地防止褐变。这是因为 Vc 为多羟基还原物质,一方面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^[32]。黄霞等(1999)发现活性炭与 Vc 配合使用可有效地防止香蕉茎尖培养中外植体的褐变^[21]。刘曼西等在研究中发现有机酸对马铃薯 PPO 活性有抑制作用;此外,蛋白水解产物、氨基酸、2 - 巯基苯并噻唑、硫脲、二氨基二硫代硫酸钠、氯化钾、多胺等物质都可作为抑制剂来防止褐变的发生^[22]。

活性炭是一种较强的吸附剂,它可以吸附培养物分泌到培养基中的酚、醌等有害物质,从而有效地减轻褐变。需要注意的是,活性炭在吸附有害物质的同时也吸附培养基中的生长调节物质,而使其失去作

用,影响外植体的正常发育。因此,在加入活性炭的培养基中应适当改变激素配比,使得在防止褐变的同时,外植体能够正常地发育^[32]。

用吸附剂抑制褐变时,吸附剂在吸附有毒酚类的同时,也要吸附培养基中的生长调节剂。因此,Zaid^[29]认为在加有活性炭的培养基中,生长调节剂的浓度应适当提高。顾小平等^[27]利用小佛肚竹、凤尾竹和孝顺竹幼竹的茎尖和带节茎段研究了愈伤组织诱导和控制褐变的方法。试验结果表明:在3种生长调节剂(2,4-D、KT、IBA)的组合中,以2,4-D ($2-3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)效果最好,愈伤组织的诱导率最高,大部分外植体都能诱导出愈伤组织,生长良好; $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT能使部分茎段诱导出愈伤组织,而茎尖诱导的愈伤组织水渍化,易褐变; $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT能使个别茎段有愈伤组织产生,但易褐化; $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA能诱导出愈伤组织,但生长缓慢。添加抗氧化剂控制愈伤组织褐变的效果要优于吸附剂,其防褐化能力:坏血酸($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > 半胱氨酸($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > PVP($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) > 活性炭($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。在培养基中加入抗坏血酸($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),小佛肚竹、凤尾竹、孝顺竹的茎尖的褐变率分别比对照下降了51.3%、43.3%、36.8%,其茎段的褐变率则分别比对照下降了62.7%、42.7%、30.8%。

4 小结

到目前为止,组织培养过程中的褐变现象研究已进行了几十年,积累了大量的资料,也提出了各种假说,但还是不能确切的阐述组织培养褐变的详细过程。通过对褐变现象研究的回顾和了解,可以得到以下共识:组织培养褐变是酚类物质被氧化的结果,其中PPO能促进褐变的发生。引起褐变的因素是复杂的,就内因来讲,外植体材料的生理状态、基因型、同一基因型的不同栽培条件、营养状况、生长部位和大小都会影响褐变的发生;就外因而言,培养基的成分、外加激素的含量及比例、培养条件(温度、光照时间、光照强度、通气状况等)等也会影响褐变的发生。褐变的发生往往是多种因素同时作用的结果。

总之,植物组织培养中的褐变,在培养基、取材时间、激素、外植体的生理状态方面的原因研究较多,但对于外植体发生褐变时其结构变化和褐变产物分析的研究报道较少。在以后的研究中,可以做这方面的分析,为深入认识发生褐变的机理和防止褐变提供理论基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 崔堂兵, 郭勇, 张长远. 植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J]. 广东农业科学, 2001(3): 16-18.
- [3] 王泽农. 茶叶生物化学[M]. 北京: 农业出版社, 1980.
- [4] 谭兴杰, 周永成. 荔枝果皮多酚氧化酶酶促褐变的研究[J]. 植物生理学报, 1987, 13(2): 197-203.
- [5] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986, 456-465.
- [6] DALAL M A, SHARMA B B, RAO M S. Studies on stock plant treatment and initiation culture made in control of oxidative browning in *in vitro* cultures of grapevine. Hort Sci, 1992, 51: 35-41.
- [7] 平吉成. 苹果属几个种的组织培养繁殖技术及其组培苗缺铁胁迫反应的研究[D]. 北京: 北京农业大学, 1994.
- [8] 王异星. 荔枝细胞培养的初步研究[J]. 暨南大学学报, 1997, 18(5): 84-85.
- [9] 范志强, 杜希华, 蹇兆忠, 等. 辣椒组织培养中褐变问题的研究[J]. 山东农业科学, 2000(6): 35-36.
- [10] 王续衍, 林秦碧. 苹果组织培养研究简报[J]. 四川农业大学学报, 1988, 3(1): 46-48.
- [11] 蒋迪军, 牛建新. 苹果茎尖快速繁殖研究[J]. 新疆农业科学, 1992(4): 171-173.
- [12] 王明华, 李光晨, 李正应. 芭蕾苹果微繁中抑制褐化的研究[D]// 中国科协第二届青年学术年会园艺学论文集. 北京: 北京农业大学出版社, 1995: 365-369.
- [13] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 349-350.
- [14] 袁文达, 曹孜义. 植物组织培养实用技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989: 96-98.
- [15] ASSHIEA J, NITSCH J P. Effect of polarity and kinetin on the browning reaction of *Dioscorea batatas* and *D. japonica*[J]. Planta, 1969, 24: 292-294.
- [16] 周延清, 苑保军, 张根发, 等. 决明原生质体的分离与培养研究[J]. 华北农学报, 1998, 13(3): 107-111.
- [17] BROOME O C, ZIMMERMAN R H. *In vitro* propagation of blackberry[J]. Hort Sci, 1978, 13: 151-153.
- [18] 马锋旺, 李嘉瑞. 山杏原生质体培养再生植株[J]. 园艺学报, 1998, 25(3): 224-229.
- [19] 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1995, 5(3): 76-84.

- [20] 李焕秀,乔霓娇. 降低苍溪梨外植体组培褐变途径的研究[J]. 西南农业大学学报, 2000,23(6):524-526.
- [21] 黄霞,黄学林,高东徽. 防止香蕉茎尖培养中外植体褐变的研究[J]. 广西植物,1999,19(1):78-80.
- [22] 刘曼西,于秀芝. 有机酸对马铃薯多酚氧化酶活性的影响[J]. 植物生理学通讯,1991,27(5):350-353.
- [23] 张勇,池建伟,翁其标,等. 香蕉多酚氧化酶褐变性质的研究[J]. 食品发酵工业,2004(5):53-57.
- [24] 许传俊,李玲,李红. 蝴蝶兰褐变外植体的显微结构观察以及褐变成分的初步分析[J]. 园艺学报,2005,32(6):1111-1113.
- [25] 苏梦云,姜景民. 乐东拟单性木兰茎段愈伤组织诱导与褐变控制的研究[J]. 林业科学研究,2004,17(6):757-762.
- [26] 闫桂琴,田丽宏,杨利艳. 濒危植物翅果油树愈伤组织诱导中褐变问题的研究[J]. 西北植物学报,2004,24(8):1384-1389.
- [27] 顾小平,苏梦云,岳晋军,等. 几种丛生竹愈伤组织诱导与防褐变技术研究[J]. 林业科学研究,2006,19(1):75-78.
- [28] 胡凯,祝顺琴,谈锋,等. 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐化的研究[J]. 西南师范大学学报,2004,29(4):659-663.
- [29] ZAID A. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to data palm cultures-A review[J]. Acta Hort, 1987, 212:561-556.
- [30] ZIV M, HALERY A H. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strellitia reginae*[J]. Hort Sci,1983,18(4):434-436.
- [31] GEROGE E F, SHERRINGTON P D. Plant propagation by tissue culture[M]. Great Britain:Eastern Press, 1984.
- [32] 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.