

热激处理在抑制植物组织褐变中的应用^①

杨 玲^{1,2)} 黄绵佳^{1)②} 葛 红²⁾

(1 华南热带农业大学园艺学院 海南儋州 571737;

2 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京市 100081)

摘 要 综述了植物组织培养过程中的褐变机制及迄今常用的抗褐变方法, 并分析其利弊, 探讨了热激处理作为一种新的抗褐变方法的应用前景。

关键词 组织培养; 褐变; 热激处理

分类号 Q813.1²

Application of Heat Shock in Controlling Plant Tissue Browning

YANG Ling^{1,2)} HUANG Mianjia^{1)②} GE Hong²⁾

(1 College of Horticulture, SCUTA, Danzhou, Hainan 571737;

2 Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Beijing 100081)

Abstract The tissue browning mechanisms and the methods to overcome browning in tissue culture were reviewed and the advantages and disadvantages of these methods were analyzed. A prospective application of heat shock as a new method to control browning was discussed.

Keywords heat shock; browning; tissue culture

1 植物组织培养的褐变研究

褐变是指外植体在诱导脱分化或再分化过程中, 从组织表面向培养基释放分泌物质, 这种分泌物氧化后使培养基逐渐变成褐色(或黑色), 外植体随之进一步变褐而死亡的现象^[1]。褐变现象在植物组织培养过程中普遍存在^[2], 它与菌类污染和过度含水化(即玻璃化)并称植物组织培养三大难题。而控制褐化比控制污染和玻璃化更加困难。

大量研究表明, 褐变与植物体内酚类物质紧密相关, 酚类氧化形成有色物质而引起组织褐变, 研究与酚类物质合成氧化相关的酶类, 成为人们研究褐变发生机理、寻求抗褐变途径的主要方向。而这些酶中最受研究者关注的是 PAL(苯丙氨酸解氨酶)、PPO(多酚氧化酶)和 POD(过氧化物酶)。

大多数植物的酚类是苯丙烷类化合物的代谢产物。苯丙烷类代谢可生成反式肉桂酸、香豆酸、阿魏酸和芥子酸等中间产物, 这些酚类物质可以进一

步转化为香豆素和绿原酸, 也可以形成 CoA 酯, 再进一步转化为类黄酮和木质素等^[3]。PAL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶, 也是苯丙烷类代谢途径中研究最多的酶^[4]。研究发现, 植物在遭受机械伤害、低温、高温或紫外辐射等逆境时, PAL 活性迅速升高, 同时积累大量酚酸、类黄酮和木质素等苯丙烷类次生代谢物质^[5]。

目前, 对组织培养过程中外植体产生褐变起到关键作用的氧化酶类研究较多的有 PPO 和 POD 等。它们都能以酚类物质为底物。当细胞受到破坏时, 胞质和液泡中的物质发生混合, 酚类物质很容易被氧化酶氧化, 产生一些褐色物质, 抑制其它酶的活性, 导致组织代谢紊乱, 抑制外植体脱分化、再分化和组培苗的正常生长, 严重时使生长停滞甚至死亡^[6~9]。

针对植物组织培养过程中普遍发生的褐变现象, 人们利用不同植物材料从不同角度进行了大量

① 收稿日期: 200-03-13; 责任编辑/孙继华

<http://rdnk.chinajournal.net.cn/> E-mail: rdnk@chinajournal.net.cn 或 rdnk@163.com

② 通讯作者。联系电话: (0898)3113 2686; E-mail: hmj886@163.com

的研究^[10~15]，以探明褐变发生的机理，为控制褐变奠定理论基础。同时，以此为基础，在寻求切实有效的抗褐变方法的道路上进行着不懈的努力，并取得了一定的成果。如采用不同培养条件，添加与酚类物质合成、氧化相关的酶抑制剂等等，以防止褐变的发生，减轻褐变带来的不良影响。近年来，热激处理在抑制组培褐变中的应用也越来越多地引起人们的关注。

2 植物中的热激反应和热休克蛋白

细胞对热激或其它应激如 pH 改变、化学物质处理、干旱、紫外线照射、高盐以及重金属条件等均能产生一定的反应，来抵抗这些条件造成的伤害，该反应统称为热激反应^[16]。这种热激反应已被证实广泛存在于各种生物物种中^[17]。约 400 万年的陆生植物的进化依赖于其对迅速变化的环境条件的一些特殊适应性，其中包括应激耐受机制^[18]。

热激反应是通过一系列平时不表达或表达水平很低的基因的激活而实现的，这些基因的产物一般被命名为热休克蛋白（也被称为热激蛋白，heat shock protein, HSPs）。热休克蛋白的研究已经进行了 40 多年了，大量的文献对 HSPs 的结构特性，在正常和受损伤细胞或组织中的作用，以及应激条件下的 HSPs 表达的分子机制等进行了阐述。

根据其在细胞中的表达机制，热休克蛋白分为 2 类：一类是在应激条件下才表达，称为诱导型热休克蛋白；另一类是在不受应激处理时也进行表达的，称为组成型热休克蛋白。这些热休克蛋白在保护细胞免受应激伤害中起作用，并在恢复过程中帮助细胞的功能正常化^[19~22]。其中，热休克蛋白作为伴侣分子的作用研究最为深入。这些热休克蛋白作为伴侣分子在蛋白质的折叠，在细胞内分配定位，组装和降解中起重要作用。例如 Hsp101 (ClpA/B/X) 帮助 ATP 依赖的蛋白质聚集体的分离；Hsp90 (HtpG) 参与了信号转导复合体的协调；Hsp70/Hsp40 (DnaK/J) 维持新生多肽的稳定性及其 ATP 依赖性的结合和释放；Hsp60/Hsp10 (GroEL/S) 在特异的蛋白质折叠机制中发挥重要作用；Hsp20 参与形成的高分子寡聚体可以作为维持未折叠蛋白质稳定的支架（从该支架上释放则需要该寡聚体中的

Hsp70/40 和/或 Hsp101 参与）^[23~29]。

最近几年的研究发现，不同 HSPs 家族的成员往往组成一个“伴侣分子机器 (chaperone machine)”联合作用^[21, 27, 29, 30]，甚至不同的伴侣分子复合体也可以相互作用形成一个复杂的网络，在蛋白质的成熟、组装和定位中起作用^[31~34]。

近年来的研究还发现，热休克蛋白除了保护植物在热激、高盐和干旱等逆境条件下免受伤害外，在植物的抗病害中也起一定作用，例如 HSP 类似蛋白 RTM1 和 RTM2 基因产物，在热耐受性上并不起作用，但可限制 etch 病毒对烟草的侵害^[35]；植物免疫系统对病原体的识别由结构上相关的多态的疾病抗性基因 [disease resistance (R) genes] 产物控制，HSP90 协同 RAR1 和 SGT1 协调 R 蛋白的激活^[36]。另外，还发现，在一些作物种子、水果或蔬菜的储存过程中，HSPs 能防止引起品质下降的褐变现象^[37, 38]。

3 防止植物组培褐变的方法

目前，研究者和生产者常用的控制褐化的方法有在培养基中加入抑制剂、吸附剂及控制培养条件等。

3.1 培养基中加入褐化抑制剂

人们往往通过抑制与酚类物质合成和氧化相关酶的活性来达到减轻褐变的目的。Peiser 等人在研究中分别发现，使用 PAL 抑制剂 AOPP (α -aminooxy- β -phenylpropionic acid)^[39]、AIP (2-aminoindan-2-phosphonic acid) 以及草甘磷 (glyphosate)^[40] 等处理莴苣，能有效地抑制莴苣的褐变，说明通过影响酚类合成可以防止褐变发生。

抑制酚氧化酶的活性是研究较多的抗褐化方法之一^[41~46]。常见的抑制剂有抗坏血酸 (Vc)、硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、氨基酸、有机酸、硝酸银 (AgNO_3) 和二硫苏糖醇等。

虽然抑制剂能在不同程度上抑制褐变的发生，但抑制剂也常常对植物材料的生长产生不良影响。如李风华等在培养基中加入抗氧化剂 AgNO_3 ，对于何首乌愈伤组织的褐变有一定的抑制，但同时也发现 AgNO_3 对细胞特别是叶片有很强的毒性，试验中发现大量的叶片死亡现象^[45]。而张俊琦等发现， $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、Vc 和铜试剂 (DDTC) 在牡丹的组培中加剧了

组织培养物的褐化程度^[46]。说明抑制剂的作用机理及其效果仍不是很明确。

3.2 培养基中加入吸附剂

培养基中加入吸附剂可以抑制褐变。常用的吸附剂有活性炭(AC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。PVP 是酚类物质的吸附剂,生化分离制备中常用作酚类物质和细胞器的保护剂^[47]。然而,有些学者通过试验证明了 PVP 没有普遍防止褐变的效果,原因是植物体内存在着不同的酚类物质,而 PVP 也存在不同分子量的类型^[48]。但 AC 和 PVP 除了吸收有毒物质外,也能吸附培养基中的生长调节剂^[49, 50]。

3.3 控制培养条件

研究表明,抗氧化剂预处理外植体能取得较好抑制褐变的效果^[51~53];油菜^[54]、核桃^[55]、苹果^[56]等在 4~5℃ 下进行低温预处理一段时间均有助于减轻褐变。Das 等^[57]、邱璐^[58]、付凤玲^[59]、吴晓玲^[60]等认为暗培养能使褐变得到控制,而光照培养易导致愈伤组织褐变。此外,李世君在对芜菁油菜叶肉原生质体培养中发现提高培养基的 pH 值可明显地控制褐变^[61]。

3.4 转入新鲜培养基

目前生产中仍采用频繁将外植体转入新鲜培养基中的办法来减轻褐变,从而提高外植体的分化率和组培成活率^[62~65]。但这种方法大大增加了组培过程中的劳动量,增加了组培苗的生产成本,不利于规模化和商品化生产。

4 热激处理在组培褐化中的应用

热激反应普遍存在于活的生物体中,热休克蛋白的诱导和合成改变了其它基因的转录和翻译^[66]。近年发现热激处理可抑制褐变的发生。

伤害会产生从受伤组织到相邻未受伤组织传播的信号,并诱导某些特定伤害诱导蛋白的从头合成。PAL 就是这些诱导蛋白中的一种,其活性的增加导致酚类化合物的积累(如绿原酸、异绿原酸等)并引起组织褐化。Hisaminato 发现褐变与 PAL 活性之间的关系是显著的^[40]。通过使用 AIP(苯丙氨酸途径的抑制剂)和草甘磷(莽草酸途径的抑制剂)2 种酶抑制剂,显著抑制了鲜切莴苣的褐变,使用 AIP 的处理总酚含量和 PAL 活性都降低,表明通过干扰伤害后 PAL

活性的增加或者是酚类前体的合成和积累,对减轻褐变是极为有效的。

近年来研究发现,热激处理可以通过抑制伤害后 PAL 活性的增加,减轻组培过程中褐变的发生。热激处理诱导产生热休克蛋白,减少伤害诱导的 PAL 活性增加,降低由 PAL 催化的酚类化合物的合成,进而阻止组织褐变。研究还发现,植物组织在同时受到热激和受伤 2 种刺激时,优先诱导产生热休克蛋白而不是 PAL^[67]。Kanga 等人采用 hsp23 的抗体对来自于受伤的和热激处理莴苣中脉叶组织的分离蛋白质进行蛋白质点杂交分析^[68],研究发现,只有那些能诱导 hsp23 合成的热激处理才能成功地减少由伤害诱导的 PAL 活性和随后的酚类物质积累。未经伤害的完整叶片在 45℃ 下处理 150 s 而诱导产生的 hsps,并不能与在未经热激处理的受伤叶片中已合成的 PAL 相互作用而限制其活性,因此,热激处理很可能是通过抑制非热激蛋白的合成影响其他蛋白的合成(如 PAL)而起作用的。也就是说,热激处理减少 PAL 活性是通过抑制 PAL 合成而实现的。Saltveit 认为,热激“关闭”了非热激蛋白的合成,对蛋白质合成进行了重新定向。细胞的总蛋白质合成能力是有限的,热激处理后,热激蛋白优先合成,占据了大量的蛋白质合成能力,使细胞没有足够的能力合成 PAL^[67]。

人们在对不同植物材料的研究中证明了热激处理对减轻组培褐变的效果。研究表明,在受伤的莴苣中,短期的热激处理能减轻 PAL 活性,减少酚类化合物积累和组织褐变^[69~71]。夏铭采用 45℃ 处理红豆杉外植体,表明热激处理对克服褐变有效^[72]。热激也能降低转基因烟草的 PAL 活性^[73]。Julio G 等热激处理芹菜离体芹菜叶柄(50℃ 90 s)能显著减少 PAL 活性的增加及降低褐变率^[74]。Saltveit 在莴苣研究中也发现,热激持续诱导合成热休克蛋白,阻止了因伤害而诱导的苯丙氨酸代谢酶的产生。45℃ 时无论是在受伤前 4 h 进行热激处理,还是在受伤后 2 h 进行热激处理,90 s 的热激作用能抑制 PAL 活性增加^[67]。以上试验结果表明,热激处理抑制 PAL 活性而减轻褐变发生的机制在植物中是普遍存在的。

对热激与褐变关系的研究较多地围绕着控制

PAL活性对减轻褐变的影响。然而,有研究认为,热激处理对与褐变过程相关的氧化酶也会产生影响,如Martin D A B等人在对莴苣的研究结果表明,在50℃水中处理过的新鲜切割的莴苣,在整个贮藏期间,其PPO及POD活性显著低于在4℃和25℃处理的,热激处理抑制了贮藏过程中PPO及POD的合成^[38]。虽然Saltveit和Murata等认为热激处理能够降低总酚含量,减轻褐变^[75, 76];然而Fukumoto等发现即使热激处理减少了总酚含量,也不完全与褐变相联系^[77]。他发现,酚含量较低的冰山莴苣组织表现出更高的褐变水平。因此,酚类物质的积累所直接引起的褐变是不明确的。Fukumoto发现,热激可降低POD活性,使得褐变减轻。他从而认为,POD可能在褐变中起到重要作用。但是,迄今为止,POD活性与褐变相关和不相关的报导都存在^[78, 79]。

因而,尽管诸多研究表明,热激处理在控制组培褐变中起到了积极的作用,但是,其机制是由于酚类物质(底物)缺乏形成的反馈抑制使酶活性降低,还是一种涉及PAL、POD和PPO合成的未知受体的直接影响,或是由于蛋白质合成的转向合成热激蛋白,“关闭”了褐变相关的酶的合成,仍然不是很清楚。热激处理抑制褐变的作用机理还需要大量的研究去证明。

5 结语

纵观以上各种防止褐变的处理方法,在实际应用中均各有利弊,如采用吸附剂和抗氧化剂,能够在一定程度上降低褐变水平,然而一方面在加入培养基中时操作比较麻烦,增加瓶苗污染;另一方面,抑制剂的效果因植物材料的不同而有差异,这些化学物质对有些外植体还可能在不同程度的危害,同时在蔬菜和水果等组培过程中加入化学成分,还可能产生毒害或者影响蔬菜营养价值,甚至涉及到食品的安全性,因而,采用添加抗褐剂来防止褐变也有其弊端。通过光照温度等其他处理或者多种条件组合处理,控制褐变的效果往往不佳或者程序过于复杂,不便于大批量生产应用。因而寻找既简单实用、安全可靠又能达到良好效果的抗褐变方法仍然是组培工作研究的重点。

在不同植物材料中的研究表明,热激处理能够不同程度地减轻褐变,因而,通过热激研究揭示褐变发生的机理,探索一条有效且安全的抗褐变途径,对于攻克组培褐变这一技术难题具有重要的理论和实际意义。

参考文献

- 1 Sgarbi E, Fornasiero R B, Lins A P, et al. Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Science*, 2003, 165(5): 951~957
- 2 Hildebrandt V, Hamey PM. Factor affecting the release of phenolic exudates from explants of *Pelargonium x hortorum* Bailey, 'Sprinter Scarlet'. *Journal of Horticultural Science*, 1988, 63(4): 651~675
- 3 Weisshaar B, Jenkins G I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998(1): 251~257
- 4 江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展. *安徽农业大学学报*, 2001, 28(4): 425~430
- 5 Beckman C H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plant? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000, 57(3): 101~110
- 6 Lankkanen Hanna, Häggman Hely, Kontunen-Soppela Sari, et al. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologia Plantarum*, 1999, 106(3): 337~343
- 7 周俊辉, 周家容. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展. *园艺学报*, 2000, 27(增刊): 481~486
- 8 李浚明. 植物组织培养教程. 北京: 中国农业大学出版社, 1996. 345
- 9 危常州. 酚类物质在植物体内的生理作用. *石河子农学院学报*, 1996, 34(2): 77~80
- 10 顾之中. 水稻愈伤组织发生褐化的影响因素研究. *江西农业大学学报*, 1992, 14: 206~211
- 11 宋平, 沈丙辉. 活性炭培养基对棉花愈伤组织诱导的效果. *植物生理学通讯*, 1988(5): 47~48
- 12 林植芳, 李双顺, 张东林. 采后荔枝果皮色素、总酚及有关酶活性的变化. *植物学报*, 1988, 30(1): 40~45

- 13 李焕秀, 晏本菊. 梨外植体组培褐变与氧化酶活性和同工酶的关系. 西南农业大学学报, 2001, 23(5): 432~437
- 14 鞠志国, 朱广廉, 曹宗巽. 莱阳梨果实褐变与 PPO 及酚类物质区域化分布的关系. 植物生理学报, 1988, 14(4): 256~261
- 15 Zaid A. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures - a review. *Acta Horticulturae*, 1987, 212: 561~566
- 16 Diller Kenneth R. Stress protein expression kinetics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2006, 8: 403~424
- 17 Craig E A. The heat shock response. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 1985, 18(3): 239~280
- 18 Levitt J. Responses of Plants to Environmental Stresses. New York: Academic Press, 1980
- 19 Nover L. Heat shock response. Boca Raton: CRC Press, 1991. 131
- 20 Nover L, Scharf K D. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell*, 1997, 53: 80~103
- 21 Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998, 92: 351~366
- 22 Feder Martin E, Hofmann Gretchen E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 1999, 61: 243~282
- 23 Ellis R J. Chaperone substrates inside the cell. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(5): 210~212
- 24 Forreiter Christoph, Nover Lutz. Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones. *Journal of Biosciences*, 1998, 23(4): 287~302
- 25 Hartl F Ulrich, Hayer-Hartl Manajit. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 2002, 295(5561): 1852~1858
- 26 Birkhäuser Basel. sHsps and their role in the chaperone network. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, 59(10): 1649~1657
- 27 Young Jason C, Barral José M, Hartl Ulrich F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28(10): 541~547
- 28 Soll Jürgen, Schleiff Enrico. Protein import into chloroplasts. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2004, 5(3): 198~208
- 29 Wegele H, Müller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90 -- a relay team for protein folding. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2004, 151: 1~44
- 30 Walter Stefan, Buchner Johannes. Molecular chaperones -- Cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie*, 2002, 41(7): 1098~1113
- 31 Frydman J. Folding of newly translated proteins *in vivo*: The role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70: 603~647
- 32 Johnson J L, Craig E A. Protein folding *in vivo*: Unraveling complex pathways. *Cell*, 1997, 90(2): 201~204
- 33 Forreiter Christoph, Nover Lutz. Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones. *Journal of Biosciences*, 1998, 23(4): 287~302
- 34 Lee Garrett J, Vierling Elizabeth. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology*, 2000, 122(1): 189~198
- 35 Whitham Steven A, Anderberg Robert J, Chisholm Stephen T, et al. Arabidopsis *RTM2* gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell*, 2000, 12(4): 569~582
- 36 Holt Ben F, Belkhadir Youssef, Dangl Jeffery L. Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science*, 2005, 309(5736): 929~932
- 37 Campos-Vargasa Reinaldo, Nonogakia Hiroyuki, Suslowa Trevor, et al. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiologia Plantarum*, 2005, 123(1): 82~91
- 38 Martin-Diana Ana Belen, Rico Daniel, Barry-Ryan Catherine, et al. Effect of heat shock on browning-related enzymes in minimally processed iceberg lettuce and crude extracts. *Bioscience*,

- Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(9): 1677~1685
- 39 Peiser G, López-Gálvez G, Cantwell M I, et al. Phenylalanine ammonia-lyase inhibitors control browning of cut lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 1998, 14: 171~177
 - 40 Hisaminato H, Murata M, Homma S. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65(5): 1016~1021
 - 41 胡风庆, 王森林, 马辉, 等. 东北红豆杉细胞培养物 PPO 活性研究. *植物研究*, 2001, 21(4): 583~586
 - 42 刘兰英. ‘薄壳香’核桃组培中的褐化及防止措施研究. *园艺学报*, 2002, 29(2): 171~172
 - 43 周敏, 庄东红. 谷氨酰胺和硝酸银对花生幼叶芽再生的促进作用. *植物生理学通讯*, 2002, 38(3): 240~241
 - 44 梅兴国, 董妍玲, 潘学武. 红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究. *天然产物研究与开发*, 2001, 13(4): 8~11
 - 45 李凤华, 汤绍虎, 孙一铭, 等. 降低何首乌愈伤组织褐化研究. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 30(2): 337~340
 - 46 张俊琦, 罗晓芳. 牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究. *沈阳农业大学学报*, 2006, 37(5): 720~724
 - 47 姚洪军, 罗晓芳. 植物组织培养外植体褐变的研究进展. *北京林业大学学报*, 1999(3): 65~70
 - 48 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. *北京林业大学学报*, 1999, 21(1): 93
 - 49 Michio Tanaka, Munenori Kumura, Masanori Goi. Optimal conditions for shoot production from *Phalaenopsis* flower stalk cuttings cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 1988, 35(9): 117~126
 - 50 Bonga J M, Durzan D J. 树木组织培养. 阙国宁, 郭达初, 李金田译. 北京: 中国林业出版社, 1988. 143~145
 - 51 韦鹏霄, 覃伟, 岑秀芬, 等. 不同抗氧化剂预处理防止优质籼稻种胚愈伤组织褐化的研究. *广西农业生物科学*, 2005, 24(2): 109~112
 - 52 梁计南, 谭中文, 谭志勇, 等. 甘蔗不同基因型组织培养特性的研究. *华南农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 23(4): 37~40
 - 53 汤浩茹, 王永清, 邓群仙. 用 8-羟基喹啉硫酸盐防止梨、苹果外植体褐变. *果树科学*, 1998, 15(2): 112~115
 - 54 潘刚, 魏泽兰. 预处理对冬油菜遗传转化外植体褐化的影响. *中国油料作物学报*, 2004, 26(2): 81~83
 - 55 张卫芳, 高疆生. 抑制核桃组培中的褐化现象初探. *落叶果树*, 2003(3): 5~7
 - 56 Block R, Lankes C. Reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M₉ during *in vitro* establishment. *Gartenbauwissenschaft*, 1995, 60(6): 276~279
 - 57 Das Sudripta, Jha Timir B, Jha Sumita. *In vitro* propagation of cashewnut. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(8): 615~619
 - 58 邱璐, 陈善娜, 杨跃仙, 等. 桑树组织培养中褐化问题的研究. *云南大学学报(自然科学版)*, 2000, 22(1): 76~78
 - 59 付凤玲, 李晚忱. 桑树茎尖培养外植体褐化的防止. *中国蚕业*, 2000, 22(1): 10
 - 60 吴晓玲, 胡海英, 邓光存, 等. 黄芩愈伤组织诱导条件的研究. *生物技术*, 2005, 15(2): 77~79
 - 61 李世君, 钱秀红, 李德葆. 茺菁油菜叶肉原生质体再生植株. *浙江农业大学学报*, 1995, 21(1): 47~50.
 - 62 Duan J X, Chen H, Yazawa S. *In vitro* propagation of *Phalaenopsis* via culture of cytokinin-induced nodes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1996, 15(3): 133~137
 - 63 Ernst Robert. Effect of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, 39(3): 273~275
 - 64 李进进, 廖俊杰. 蝴蝶兰根段的组织培养. *植物生理学通讯*, 2000, 36(1): 37
 - 65 郑丽屏, 王玲. 蝴蝶兰的组织培养快速繁殖技术. *资源开发与市场*, 1998, 14(1): 11
 - 66 Vierling Elizabeth. The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, 42: 579~620
 - 67 Saltveit M E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 21: 61~69
 - 68 Kang H M, Saltveitb Mikal E. Wound-induced PAL

- activity is suppressed by heat-shock treatments that induce the synthesis of heat-shock proteins. *Physiologia Plantarum*, 2003, 119(3): 450~455
- 69 Loaiza-Velarde Julio G, Tomás-Barberá Francisco, Saltveit Mikal E. Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on wound-induced phenolic metabolism in iceberg lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1997, 122(6): 873~877
- 70 Loaiza-Velarde Julio G, Saltveit Mikal E. Heat shock applied either before or after wounding reduce browning of lettuce leaf tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2001, 126(2): 227~234
- 71 Saltveit Mikal E. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Postharvest Biology and Technology*, 2001, 21(2): 169~177
- 72 夏 铭, 吴绛云, 张丽梅. 红豆杉组织培养中褐变问题的研究. *生物技术*, 1996, 6(3): 18~20
- 73 Moriwaki Masamitsu, Yamakawa Takashi, Washino Tutomu, et al. Suppressed phenylalanine ammonia-lyase activity after heat shock in transgenic *Nicotiana glauca* containing an *Arabidopsis* HSP18.2-Parsley PAL2 chimera gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87(5): 588~593
- 74 Loaiza-Velarde Julio G, Mangrich Mary E, Campos-Vargas Reinaldo, et al. Heat shock reduces browning of fresh-cut celery petioles. *Postharvest Biology and Technology*, 2003, 27(3): 305~311
- 75 Saltveit Mikal E. Heat-shock and fresh cut lettuce. *Perishables Handling Quarterly*, 1998(95): 5~6
- 76 Murata Masatsune, Tanaka Eriko, Minoura Emiko, et al. Quality of cut lettuce treated by heat shock: prevention of enzymatic browning, repression of phenylalanine ammonia-lyase activity, and improvement on sensory evaluation during storage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(3): 501~507
- 77 Fukumoto Lana R, Toivonen Peter M A, Delaquis Pascal J. Effect of water wash temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic and vascular tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(16): 4503~4511
- 78 Ke Danyang, Saltveit Jr Mikal E. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiologia Plantarum*, 1989, 76(3): 412~418
- 79 Cantos Emma, Espín Juan Carlos, Tomás-Barberán Francisco A. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(1): 322~330