

防褐剂对牡丹组培褐化发生、组培苗生长和增殖的作用

李萍 成仿云 张颖星

(北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室)

摘要:牡丹组培中褐化现象的发生,影响了组培苗的生长、增殖和组培过程的进行。该文研究了活性炭、硝酸银、PVPP和维生素C 4种防褐剂对牡丹品种‘乌龙捧盛’组培中褐化控制的作用及对组培苗生长和增殖的影响。结果表明:褐化集中发生在转接后4 d内。活性炭能有效控制褐化,但长时间处理会抑制组培苗的生长和增殖;继代培养初期在含活性炭2.0 g/L的培养基中进行4 d短期处理,不仅能有效控制褐化,还在一定程度上促进了组培苗的生长和增殖。硝酸银1.0~8.0 mg/L能明显减轻褐化,其中2.0 mg/L的效果最好并能显著促进增殖;8.0 mg/L时组培苗生长量最大。PVPP能部分控制褐化,1.0 g/L效果较好;低浓度的PVPP促进组培苗生长,高浓度时促进增殖。维生素C控制褐化的效果不佳,且易导致组培苗玻璃化。综合分析认为:牡丹品种‘乌龙捧盛’继代转接时,先在添加活性炭2.0 g/L的培养基中培养4 d,然后转入不含活性炭的培养基中,能有效控制褐化和避免活性炭对生长和增殖的负面影响;在培养基中加入硝酸银2.0 mg/L,能在有效控制褐化的同时,促进组培苗生长与增殖,推荐在牡丹组培中应用。

关键词:牡丹;组织培养;防褐剂;褐化控制;增殖

中图分类号:S685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1522(2008)02-0071-06

LI Ping; CHENG Fang-yun; ZHANG Ying-xing. **Effects of browning antagonists on antibrowning, growth and multiplication of tissue culture of tree peony.** *Journal of Beijing Forestry University* (2008) 30 (2) 71-76 [Ch, 30 ref.] Key Laboratory for Genetic and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, National Floriculture Engineering Research Center, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

Browning occurring in tissue culture of tree peony restrains the growth and multiplication of propagators and success of micropropagation. Contrast tests of activated charcoal, silver nitrate, PVPP and vitamin C were designed in tissue culture of tree peony to study their effects on antibrowning, growth and multiplication of subculture propagators. Results showed that browning occurred during the first four days of subculture. Activated charcoal eliminated browning effectively but restrained growth and multiplication of propagators synchronously because of its absorbency on nutrient elements in culture media. A four-day treatment of 2.0 g/L activated charcoal after subculture initiation, also eliminated browning as well as promoted appreciably the growth and multiplication of propagators. Silver nitrate with concentrations of 1.0-8.0 mg/L controlled browning obviously, in which treatment of 2.0 mg/L was optimal to the antibrowning and multiplication of propagators and that of 8.0 mg/L was most effective to promote the growth of them. PVPP controlled browning to some extent. Its lower concentration benefited the growth, while the higher one promoted the multiplication. Vitamin C was not suitable for both antibrowning and development of the propagators. In conclusion, a two-step process, during which the subculture propagators were treated firstly in the culture media with activated charcoal 2.0 g/L for four days, then in the media without it, should be used in tissue culture of tree peony to obtain the best effect of antibrowning as well as promote the growth and multiplication of propagator to some

收稿日期:2006-12-18

<http://www.bjfujournal.cn>, <http://journal.bjfu.edu.cn>

基金项目:“948”国家林业局引进项目(2003-4-23)、国家林业科技支撑计划项目(2006BAD01A1801)。

第一作者:李萍, 博士生。主要研究方向:植物组织培养。Email: liping-star@163.com 地址:100083北京林业大学园林学院。

责任作者:成仿云, 博士, 教授, 博士生导师。主要研究方向:园林植物育种与生物技术。电话:010-82371556-605 Email: chengfy8@

263.net 地址:同上。

extent. The inclusion of 2.0 mg/L silver nitrate in media should also be used to effectively control browning and promote the growth and multiplication of propagators.

Key words tree peony; tissue culture; browning antagonists; antibrowning; multiplication

牡丹 (*Paeonia × suffruticosa*) 是我国传统名花, 享有“花王”的美誉, 在园林绿化与花卉生产中具有巨大的潜力, 国内外市场前景广阔。然而, 牡丹生产中至今沿用传统的嫁接与分株法进行繁殖, 繁殖系数低、速度慢^[1-2], 无法满足市场发展的需要。因此, 利用组织培养进行快速繁殖, 自然引起了国内外研究者的兴趣。李玉龙等^[3]、Harris 等^[4]、Bouza 等^[5-8]和 Beruto 等^[9]的研究都取得了不同程度的进展, 但作为一种行之有效的方法, 组织培养在牡丹繁殖生产中尚未得到应用, 有许多问题需要进一步研究解决, 褐化就是其中最主要的瓶颈之一^[9]。

褐化是植物材料受伤后, 体内释放的酚类物质在酚氧化酶的作用下被氧化成褐色的醌类物质的结果。褐化主要与植物材料的基因型和生理状态、取材时期、培养基以及培养条件等有关^[10]; 在植物、尤其是木本植物组织培养中普遍存在。因此从植物材料预处理^[11-13]、调整培养基^[14-16]、控制培养条件^[11, 17]、添加防褐剂^[18-26]等多方面, 都有大量研究报道, 其中研究和应用最多的是在培养基中添加防褐剂, 常用的主要有吸附醌类物质的吸附剂(如活性炭、PVPP等)和防止酚类物质氧化的抗氧化剂(如维生素C、硫代硫酸钠、半胱氨酸等)。近年来, 随着对乙烯活性的深入了解, 发现乙烯能促进酚氧化酶的活性, 引起酚类物质次生代谢的发生, 从而导致植物组织褐化^[23]。因此, 另一种防治褐化的方法——在培养基中添加乙烯生物合成的抑制剂(如AVG)或生理活性的抑制剂(如硝酸银、硫代硫酸银等), 已经应用于一些植物的组织培养中, 并取得了良好的效果^[18, 21-24]。

牡丹组培中褐化现象严重^[25]。有人报道了在叶片和叶柄的离体培养中, 活性炭、PVPP和维生素C对减轻组织及随之引起的培养基褐化有一定作用^[25-26]; 而在通常以芽为外植体的牡丹组织培养中, 尽管组培苗在继代培养中会发生严重褐化, 但这方面的褐化控制研究尚未见报道。硝酸银作为防褐剂用于褐化控制, 在牡丹组培中也未见报道。因此, 本试验以继代培养中牡丹组培苗的褐化控制为目的, 同时研究探讨4种防褐剂(活性炭、硝酸银、PVPP和维生素C)对组培苗生长和增殖的影响, 以期找到既能控制褐化, 又不影响生长和增殖的方法, 从而较好地解决牡丹组培中的褐化问题。

1 材料与方法

试验于2006年5月在北京林业大学园林学院

组培室进行, 以牡丹品种‘乌龙捧盛’初代培养的无菌苗为试材。继代时, 按照 Hosoki^[27]的方法把无菌苗切分, 将大小一致的芽体分别接种于添加活性炭、硝酸银、PVPP和维生素C的不同处理中。采用单因子试验设计, 每处理接种10芽, 重复3次; 以不添加任何防褐剂的处理作对照。转接后7d统计褐化情况, 统计指标包括培养基中的褐化发生级别、褐化发生半径和褐化发生高度范围。褐化发生级别根据褐色的深浅, 划分为无或很浅、浅、中、较深、深5级, 分别用1、2、3、4、5表示; 褐化发生半径为褐色区域的半径; 褐化发生高度范围为褐色区域的竖直高度。每10d统计1次组培苗的生长量, 方法是先用电子天平称出培养基的质量, 然后将组培苗转接进去, 再称出培养基和组培苗的总质量, 两者的差值为组培苗的质量。每10d重复1次上述过程, 用后10d组培苗的质量减去前10d的质量, 结果即为10d内组培苗的生长量。30d后统计组培苗增殖情况, 增殖芽的标准为有独立茎段且茎段长 ≥ 0.5 cm, 茎基部直径 ≥ 0.4 cm, 叶片数 ≥ 3 , 能够单独切割下来进行培养的芽子。培养基为改良WPM[Ca(NO₃)₂加倍, NH₄NO₃减半, K₂SO₄减半]+6-BA 0.5 mg/L + GA₃ 0.2 mg/L + 30 g/L蔗糖 + 6.0 g/L琼脂, pH6.0。硝酸银采用过滤灭菌法加入培养基以防止其受热分解, 其他防褐剂直接加入培养基中进行高压灭菌。培养条件: 温度25℃左右, 光照时数14 h/d, 光强1 500~2 000 lx。用SPSS10.0软件对上述统计结果进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 防褐剂对褐化发生的作用

对照处理在接种培养半小时后, 褐色物质开始从切口处向培养基扩散, 并逐渐加深。添加活性炭的处理中, 接种的芽体和培养基均未发现褐化现象。其他各处理中, 褐化发生的起始时间都比对照晚。第4天以后, 所有培养基中的褐化情况均变化不大。培养7d后, 统计各处理上的褐化情况(表1), 发现活性炭处理中均无褐化发生, 这与前人在牡丹叶片培养中的报道一致^[25]。试验中将部分在添加活性炭2.0 g/L的培养基中培养4d的组培苗, 转入对照培养基中, 发现组培苗和新培养基也不褐化(图1A), 进一步说明褐化的发生, 集中在转接后4d内。

硝酸银1.0~8.0 mg/L的处理, 控制褐化的效果明显好于对照, 但在10.0 mg/L时, 仅褐化发生高度

表 1 防褐剂对牡丹品种‘乌龙捧盛’褐化发生的作用
TABLE 1 Effects of different browning antagonists on the antibrowning of *P. × suffruticosa* ‘Wu Long Peng Sheng’

处理	褐化发生级别	褐化发生半径/cm	褐化发生高度范围/cm
对照	5.00 ± 0.00a	0.62 ± 0.17ab	1.29 ± 0.35a
2.0	1.00 ± 0.00e	0.00 ± 0.00h	0.00 ± 0.00g
活性炭/ (g·L ⁻¹)	2.0(4 d)	1.00 ± 0.00e	0.00 ± 0.00g
	3.0	1.00 ± 0.00e	0.00 ± 0.00g
	4.0	1.00 ± 0.00e	0.00 ± 0.00g
	1.0	2.83 ± 0.53c	0.39 ± 0.10ef
	2.0	1.67 ± 0.22d	0.22 ± 0.14g
硝酸银/ (mg·L ⁻¹)	4.0	2.57 ± 0.27c	0.34 ± 0.15fg
	6.0	3.70 ± 0.40b	0.39 ± 0.12ef
	8.0	4.00 ± 0.70b	0.46 ± 0.20cdef
	10.0	4.73 ± 0.29a	0.68 ± 0.23a
	0.25	4.70 ± 0.30a	0.60 ± 0.27abc
PVPP/ (g·L ⁻¹)	0.50	3.77 ± 0.54b	0.55 ± 0.20abcd
	1.00	3.67 ± 0.17b	0.43 ± 0.13def
维生素 C/ (mg·L ⁻¹)	25	5.00 ± 0.00a	0.65 ± 0.24a
	50	5.00 ± 0.00a	0.49 ± 0.19bcde
	100	5.00 ± 0.00a	0.50 ± 0.20bcde

注: 继代转接后 7 d 统计。表中各指标下的数值均为各处理中的平均数 ± 标准差; 对各指标进行单因素方差分析和多重比较, 不同小写字母表示 $P = 0.05$ 差异显著水平。表 2 同此。

范围明显小于对照, 褐化发生级别和褐化发生半径均与对照差别不大。硝酸银 2.0 mg/L 控制褐化的效果最佳(图 1B), 升高或降低其浓度, 褐化都会加重; 4.0 mg/L 的处理, 控制褐化的效果也较好(图 1C)。

PVPP 各处理对控制褐化都有一定作用, 且浓度越高效果越好; 1.00 g/L 的处理中, 所有褐化发生指

标均显著低于对照(图 1D); 0.50 g/L 时, 褐化发生级别和褐化发生高度范围也明显小于对照。

维生素 C 50 或 100 mg/L 的处理, 控制褐化的效果略好于对照(图 1E ~ F), 褐化发生高度范围明显比对照低; 而 25 mg/L 时, 褐化情况却比对照严重。

2.2 防褐剂对组培苗生长的影响

表 2 显示, 在含活性炭 2.0 g/L 的培养基中处理 4 d 后, 转入对照培养基中的组培苗, 在培养的中后期, 其生长量略微大于对照; 而活性炭长期处理(30 d)的组培苗, 其生长量在各个时期均小于对照, 且活性炭浓度越高, 生长量越小; 其中 3.0 和 4.0 g/L 时, 在培养的中后期, 组培苗的生长量比对照明显降低; 而在培养后期, 所有长期处理中组培苗的生长量都明显比短期处理(4 d)中的小, 说明活性炭长期处理, 对组培苗的生长产生了抑制作用。活性炭处理中, 组培苗叶色油绿, 无玻璃化现象, 生长正常(图 1G ~ H)。

硝酸银处理中, 组培苗在培养的前 10 d, 长势均不如对照; 以后均好于对照, 其中 8.0 和 10.0 mg/L 中, 生长量显著大于对照和其他硝酸银处理; 6.0 mg/L 时, 组培苗在培养后期的生长量也较大。所有硝酸银处理中, 组培苗均生长良好, 8.0 mg/L 中长势最好(图 1I)。

PVPP 0.25 和 0.50 g/L 时, 组培苗的生长量大于对照; 0.25 g/L 中长势最好并且在培养的后期, 组培苗的生长量大于或显著大于对照和其他 PVPP 处理; 1.00 g/L 时, 对生长产生抑制。PVPP 处理中的组培苗, 叶色不如活性炭处理中的绿, 但生长也属正

表 2 防褐剂对牡丹品种‘乌龙捧盛’生长和增殖的影响

TABLE 2 Effects of different browning antagonists on the growth and multiplication of *P. × suffruticosa* ‘Wu Long Peng Sheng’

处理	每株生长量/g			增殖系数
	0 ~ 10 d	10 ~ 20 d	20 ~ 30 d	
对照	0.17 ± 0.04ab	0.25 ± 0.09def	0.46 ± 0.15cd	1.47 ± 0.24gh
2.0	0.12 ± 0.07abcd	0.18 ± 0.03fgh	0.32 ± 0.10fg	1.00 ± 0.00i
活性炭/(g·L ⁻¹)	2.0(4 d)	0.15 ± 0.05abc	0.27 ± 0.09cd	1.58 ± 0.30fg
	3.0	0.10 ± 0.06bcd	0.17 ± 0.05gh	1.00 ± 0.00i
	4.0	0.09 ± 0.05bcd	0.15 ± 0.05hi	1.00 ± 0.00i
	1.0	0.10 ± 0.06bcd	0.27 ± 0.13cd	2.25 ± 0.22cd
	2.0	0.10 ± 0.04bcd	0.25 ± 0.10def	3.00 ± 0.29a
硝酸银/(mg·L ⁻¹)	4.0	0.12 ± 0.02abcd	0.29 ± 0.07cd	2.60 ± 0.23b
	6.0	0.12 ± 0.03abcd	0.26 ± 0.12cde	2.17 ± 0.35de
	8.0	0.14 ± 0.04abc	0.43 ± 0.09a	1.97 ± 0.47e
	10.0	0.15 ± 0.05abc	0.37 ± 0.10ab	1.70 ± 0.33f
	0.25	0.20 ± 0.04a	0.39 ± 0.10ab	2.13 ± 0.40de
PVPP/(g·L ⁻¹)	0.50	0.19 ± 0.04a	0.33 ± 0.10bc	2.40 ± 0.33c
	1.00	0.12 ± 0.06abcd	0.23 ± 0.03defg	2.30 ± 0.26cd
	25	0.08 ± 0.02cd	0.19 ± 0.07fgh	1.27 ± 0.11h
维生素 C/(mg·L ⁻¹)	50	0.07 ± 0.03cd	0.18 ± 0.08fgh	1.57 ± 0.19fg
	100	0.05 ± 0.03d	0.09 ± 0.04i	1.33 ± 0.25h

注: 生长量为一定时间内单株组培苗质量的增加量, 分别于继代培养 10、20 和 30 d 统计; 增殖系数 = 继代培养末期外植体上的平均芽数/继代培养初期外植体上的平均芽数, 继代培养 30 d 统计。

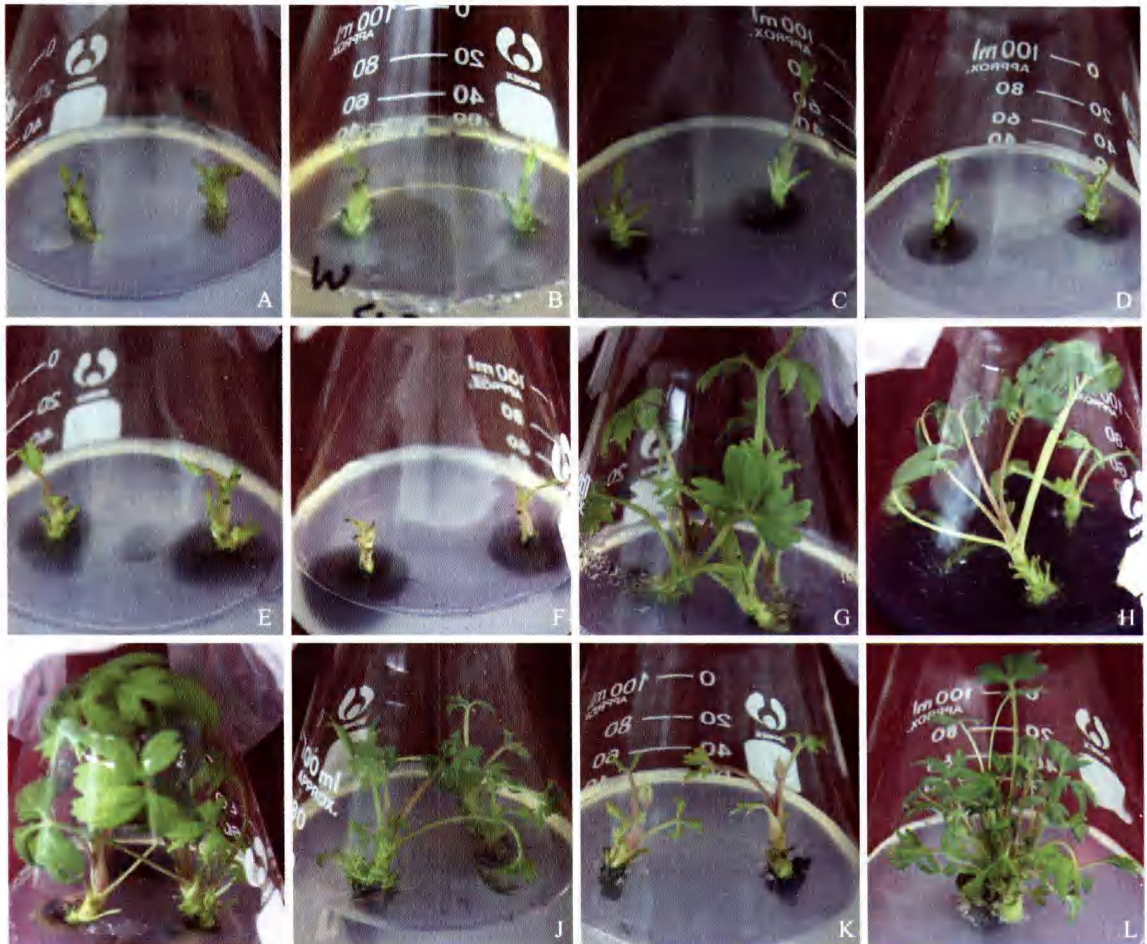


图1 防褐剂对牡丹品种‘乌龙捧盛’组培中褐化发生、组培苗生长和增殖的影响

FIGURE 1 Effects of browning antagonists on antibrowning, growth and multiplication of tissue culture of *P. x suffruticosa* ‘Wu Long Peng Sheng’

注:A~F.不同防褐剂对褐化发生的影响(A.活性炭2.0 g/L中处理4 d,然后转入对照培养基中;B.硝酸银2.0 mg/L;C.硝酸银4.0 mg/L;D.PVPP 1.00 g/L;E.维生素C 100 mg/L;F.对照)。G~L.不同处理中组培苗的生长和增殖情况(G.活性炭2.0 g/L中处理4 d,然后转入对照培养基;H.活性炭2.0 g/L处理;I.硝酸银8.0 mg/L处理;J. PVPP 0.50 g/L处理;K.维生素C 25 mg/L处理;L.硝酸银2.0 mg/L处理)。A~F.继代培养7 d;G~L.继代培养30 d。

常(图1J)。

维生素C处理中,组培苗的生长量在培养的前20 d均小于对照;而在20 d以后25 mg/L中,略大于对照。观察发现,维生素C各处理中,组培苗极易玻璃化,叶柄发红、叶色发黄,长势不佳(图1K)。

总体上讲,防褐剂的种类和用量都对牡丹组培苗的生长造成影响,且这种影响在培养的中后期表现较为明显。

2.3 防褐剂对组培苗增殖的影响

由表2可知,活性炭2.0 g/L处理4 d的组培苗,其增殖系数高于对照;而长期处理中的组培苗,均没有新芽形成,增殖系数明显小于对照,说明活性炭对组培苗的增殖有很强的抑制作用,不适合在牡丹增殖培养中长时间使用。

与对照相比,硝酸银各处理均明显促进组培苗增殖;2.0 mg/L时,增殖系数最高,达3.00,升高或降低其浓度,增殖系数都会下降,这与该物质在褐化控制时的趋势一致。观察发现,硝酸银处理中,除了茎基

部叶腋里有新芽形成外,在伸长茎上以及新芽的叶腋里也都有小芽出现(图1L),因此提高了增殖系数。

PVPP处理对增殖有明显的促进作用,在组培苗茎基部的叶腋里,通常有新芽形成(图1J),0.50 g/L时新芽形成最多,1.00 g/L中次之,但两者差异不显著。

维生素C处理对增殖的作用不明显,50 mg/L时增殖效果略好于对照。

3 结论与讨论

3.1 防褐剂对褐化发生的影响

本试验发现,在牡丹组培苗继代培养的褐化控制方面,效果最好的是活性炭,然后分别是硝酸银2.0、4.0和1.0 mg/L, PVPP 1.00 g/L;而维生素C各处理,硝酸银10.0 mg/L和PVPP 0.25 g/L效果不理想。活性炭控制褐化效果最好,但使用浓度不宜过高,浓度越高,对生长的抑制作用越明显;这与在蝴蝶兰的组培中,高浓度的活性炭却能明显促进组培

苗生长^[19]有所不同。活性炭使用时间不宜太长,否则对增殖也产生抑制。由于褐化集中出现在转接后 4 d 内,因此将组培苗在添加活性炭 2.0 g/L 的培养基中处理 4 d,然后转入不含活性炭的培养基中培养,既有效地控制了褐化,还避免了活性炭长期吸附对生长和增殖造成的影响,值得借鉴。其他浓度的活性炭中做短期处理是否也有同样的效果,需要进一步研究。

硝酸银对控制牡丹组培中的褐化有一定作用。由于组织培养在密闭或半密闭的容器中进行,加之生长调节剂的作用,使得植物细胞产生并释放出乙烯^[28],植物材料受伤后,乙烯释放量更多^[29],而乙烯的产生和积累,最终导致植物组织发生褐变。硝酸银是一种较好的乙烯活性抑制剂,通过竞争性结合位于细胞膜上的乙烯受体蛋白,阻止或降低乙烯的作用^[22],从而减轻了褐化。本试验发现,随着硝酸银处理浓度的增加,控制褐化的效果先增强后减弱,其原因尚不清楚。我们推测可能是因为硝酸银 1.0 mg/L 时,不足以完全结合乙烯受体蛋白,而 2.0 mg/L 时可以完全或较多的结合该蛋白,因此褐化最轻;但随着浓度的进一步提高,多余的银离子对细胞造成了重金属盐伤害,因而又加重了褐化。

PVPP 对控制牡丹组培中的褐化现象有一定作用,这与何松林等^[26]在牡丹叶柄外植体培养中的报道相似。而维生素 C 控制褐化的效果不佳,与前人^[26]的报道有所不同,推测与试验材料和维生素 C 用量不同有关;另外,维生素 C 25 mg/L 的处理甚至比对照褐化严重,可能是该浓度时维生素 C 与组培苗的生理机制不协调或使之发生紊乱的结果;也可能是各处理间,组培苗切割时创伤程度不同,导致乙烯和酚类物质释放量的差异,因而褐化程度也出现差异。

3.2 防褐剂对组培苗生长和增殖的影响

本试验表明,对促进组培苗生长,效果最好的是硝酸银 8.0 mg/L,然后依次是 PVPP 0.25 g/L,硝酸银 10.0 和 6.0 mg/L;而活性炭长期处理,维生素 C 100 mg/L 和 PVPP 1.00 g/L 均抑制组培苗生长;其余处理与对照差异不明显。另外,维生素 C 易导致组培苗玻璃化,降低了组培苗的质量。防褐剂的种类和用量都对牡丹组培苗的生长造成影响,且这种影响在培养的中后期表现较为明显。

在组培苗增殖方面,硝酸银各处理和 PVPP 各处理均明显促进增殖,以硝酸银 2.0 mg/L 时增殖系数最高,然后依次是硝酸银 4.0 mg/L, PVPP 0.50 和 1.00 g/L。维生素 C 处理的增殖效果与对照差别不明显;活性炭长期处理中均没有新芽形成,明显抑制

了组培苗的增殖,而 2.0 g/L 中短期处理 4 d 可以略微促进增殖。

3.3 褐化控制与组培苗的生长和增殖

褐化控制是组培中不容忽视的课题之一,最常用的方法便是在培养基中添加防褐剂。最好的防褐剂应该是在有效控制褐化的同时,又能促进繁殖材料的生长和增殖。本试验发现,在培养基中添加硝酸银 2.0 mg/L,能在控制褐化的同时促进组培苗生长和增殖,因此硝酸银是适合在牡丹组培中使用的防褐剂。然而,关于硝酸银的作用还需要进一步研究,例如硝酸银促进生长和增殖的机制是什么;为什么不利于褐化控制的硝酸银浓度却能明显促进了组培苗生长,褐化发生与生长和增殖之间有什么联系等。这些问题可能需要从酶活性、物质代谢和激素水平等方面研究解决。

在牡丹组培中,活性炭有明显的控制褐化作用,但它在吸附培养基中酚类物质的同时,还吸附了生长调节剂和其他培养基成分,对生长和增殖造成影响。因此,在实际应用中可以利用褐化物质集中出现在转接后 4 d 内的这一特点,在添加活性炭培养基中短期培养后,再转入不含活性炭的培养基中培养;或者调整活性炭与生长调节物质等培养基成分的用量,使其皆能发挥有效作用^[30]。

参 考 文 献

- [1] 李嘉珏,赵潜龙. 中国牡丹与芍药[M]. 北京:中国林业出版社,1998.
LI J J, ZHAO Q L. *Chinese tree peony and herbaceous peony*[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1998.
- [2] 成仿云,李嘉珏,陈德忠,等. 中国紫斑牡丹[M]. 北京:中国林业出版社,2005.
CHENG F Y, LI J J, CHEN D Z, et al. *Chinese flare tree peony*[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2005.
- [3] 李玉龙,吴德玉,潘淑龙,等. 牡丹试管苗繁殖技术的研究[J]. 科学通报,1984,29(8):500-502.
LI Y L, WU D Y, PAN S L, et al. Study on propagation of tree peony in cuvette[J]. *Science Bulletin*, 1984, 29(8):500-502.
- [4] HARRIS R A, MANTELL S H. Effect of stage II subculture duration on the multiplication rate and rooting capacity of micropropagated shoots of tree peony[J]. *Journal of Horticultural Science*, 1991, 66(1):95-102.
- [5] BOUZA L, JACQUES M, MIGINIAC E. *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry': Developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase[J]. *Scientia Horticulturae*, 1994, 57(3):241-251.
- [6] BOUZA L, JACQUES M, MIGINIAC E. Requirements for *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry'[J]. *Scientia Horticulturae*, 1994, 58(3):223-233.
- [7] BOUZA L, JACQUES M, SOTTA B, et al. Relation between auxin and cytokinin contents and *in vitro* rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.)[J]. *Plant Growth Regulation*, 1994, 15(1):69-73.

- [8] BOUZA L, JACQUES M, SOTTA B, *et al.* The reactivation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) vitroplants by chilling is correlated with modifications of abscisic acid, auxin and cytokinin levels[J]. *Plant Science*, 1994, 97(2):153-160.
- [9] BERUTO M, LANTERI L, PORTOGALLO C. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*)[J]. *Plant Cell, Tiss and Org Cult*, 2004, 79(2): 249-255.
- [10] 陈正华. 木本植物组织培养[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 34-36, 408-419, 456-465, 466-480.
CHEN Z H. *Tissue culture of woody plants* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1986: 34-36, 408-419, 456-465, 466-480.
- [11] 夏铭, 吴绛云, 张丽梅. 红豆杉组织培养中褐变问题的研究[J]. *生物技术*, 1996, 6(3):18-20.
XIA M, WU J Y, ZHANG L M. Studies on the problem of darkening in tissue culture of *Taxus*[J]. *Biotechnology*, 1996, 6(3):18-20.
- [12] 周玉珍, 张雨清. 金叶风箱果初代离体培养中影响外植体褐化的因素[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37(2):122.
ZHOU Y Z, ZHANG Y Q. Factors influencing the explant browning in preliminary culture of *Physocarpus opulifolius* 'Lutein' [J]. *Plant Physiology Communications*, 2001, 37(2):122.
- [13] 何琼芳, 张东方, 王润华. 抗坏血酸预处理防止香蕉吸芽外植体褐变的研究初报[J]. *华南农业大学学报*, 1995, 16(3): 79-82.
HE Q F, ZHANG D F, WANG R H. Preliminary studies on browning prevention of suck bud explants by pretreatment by vitamin C[J]. *Journal of Huanan Agricultural University*, 1995, 16(3): 79-82.
- [14] 钟红梅, 曹明华. 八宝剑凤梨的组织培养与快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(3):202.
ZHONG H M, CAO M H. Tissue culture and rapid propagation of *Vriesea poelmanii*[J]. *Plant Physiology Communications*, 1998, 34(3):202.
- [15] 盛长忠, 王淑芳, 王宁宁, 等. 红豆杉愈伤组织培养中褐化现象的初探[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2001, 34(4): 120-122.
SHENG C Z, WANG S F, WANG N N, *et al.* Preliminary study on the problem of browning in callus culture of *Taxus* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium University Nankaiensis*, 2001, 34(4):120-122.
- [16] 李东杰, 魏景芳, 鲁绍伟, 等. 不同植物激素对冬凌草愈伤组织增殖及褐化的影响[J]. *水土保持研究*, 2006, 13(3): 149-150.
LI D J, WEI J F, LU S W, *et al.* Effect of different phytohormone on callus tissue growth and browning of *Rabdosia rubescens* [J]. *Research of Soil and Water Conservation*, 2006, 13(3):149-150.
- [17] 王定康, 王琼芳. 玉香梨的组织培养与快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(3):207.
WANG D K, WANG Q F. Tissue culture and rapid propagation of *Pyrus pyrifolia* 'Yu Xiang'[J]. *Plant Physiology Communications*, 1999, 35(3): 207.
- [18] 王立浩, 张宝玺, 郭家珍, 等. 辣椒花药培养中若干影响因素研究[J]. *园艺学报*, 2004, 31(2):199-204.
WANG L H, ZHANG B X, GUO J Z, *et al.* Studies of effects of several factors on anther culture of *Capsicum annuum* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(2):199-204.
- [19] 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.
LIU Z H, GE H, GUO S X, *et al.* Studies on antibrowning in the tissue culture of *Phalaenopsis*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(4): 732-734.
- [20] 刘兰英. '薄壳香'核桃组培中的褐化及防止措施研究[J]. *园艺学报*, 2002, 29(2):171-172.
LIU L Y. Studies on browning of walnut explants in *in vitro* culture [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29(2):171-172.
- [21] 张淑红, 王蒂, 王清. 影响马铃薯叶肉原生质体褐化的因素及 AgNO₃ 对其褐化和分裂的作用[J]. *中国马铃薯*, 2004, 18(2):77-81.
ZHANG S H, WANG D, WANG Q. Factors influenced browning of leaf protoplast and effect of AgNO₃ on browning and division [J]. *Chinese Potato*, 2004, 18(2): 77-81.
- [22] GOH C J, NG S K, LAKSHMANAN P, *et al.* The role of ethylene on direct shoot bud regeneration from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) leaves cultured *in vitro*[J]. *Plant Science*, 1997, 124(2):193-202.
- [23] HOUSTI F, COUPE M, D'AUZAC J. Effect of ethylene on enzymatic activities involved in the browning of *Hevea brasiliensis* callus[J]. *Physiologia Plantarum*, 1992, 86(3):445-450.
- [24] OZDEN-TOKATLI Y, OZUDOCRU E A, AKCIN A. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate[J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 106(3):415-426.
- [25] WANG H, VAN STADEN J. Establishment of *in vitro* cultures of tree peonies[J]. *South African Journal of Botany*, 2001, 67(2): 358-361.
- [26] 何松林, 陈笑蕾, 陈莉, 等. 牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[J]. *河南科学*, 2005, 23(1):47-50.
HE S L, CHEN X L, CHEN L, *et al.* The preliminary researches on browning of leafstalk in tissue culture of *Paeonia suffruticosa*[J]. *Henan Sciences*, 2005, 23(1): 47-50.
- [27] HOSOKI T, ANDO M, KUBARA T. *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method[J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 8(4):243-246.
- [28] YANG S F, HOFFMAN N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1984, 35(1):155-189.
- [29] BEYER E M, MORGAN J P W, YANG S F. Ethylene [G]// WILKINS M B. *Advanced plant physiology*. Bath, UK: Pitman Press, 1984:111-126.
- [30] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(4):214-217.
LIU Y S, LI Y Y. The use of activated charcoal in plant tissue culture [J]. *Plant Physiology Communications*, 1994, 30(4): 214-217.

(责任编辑 董晓燕)