

‘傲雪’金银木组培快繁技术研究

左利娟, 石进朝*, 陈兰芬, 马 喆

(北京农业职业学院园艺系, 北京 102442)

摘 要: 以‘傲雪’金银木带腋芽的半木质化茎段为材料, 研究外植体消毒方法、不同植物生长调节剂对其继代增殖与生根的影响。结果表明: (1) 先用 75% 的乙醇浸泡 30 s, 无菌水冲洗 4~6 次, 然后加入 0.1% HgCl_2 杀菌 7 min, 褐化与污染率较低; (2) 增殖最佳培养基为 $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{GA}_3 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 增殖系数可达 2.93; (3) 生根最佳培养基为 $1/2\text{MS} + \text{IBA } 1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 生根率达 93.9%。以上培养基均添加蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 值为 6.0。

关键词: ‘傲雪’金银木; 增殖; 生根

中图分类号: S686

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)04-0701-05

Establishment of an in vitro propagation system for *Lonicera macckii* ‘Aoxue’

ZUO Lijuan, SHI Jinchao, CHEN Lanfen, MA Zhe

(Department of Horticulture, Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442)

Abstract: In this paper, semi-lignified stems were used to initiate an in vitro culture of *Lonicera macckii* ‘Aoxue’. Effects of surface sterilization methods and plant growth regulators on induction of adventitious buds, shoot multiplication, and rooting were determined. The results indicated: (1) Low contamination and browning of stem explants were observed when they were surface-sterilized with 75% ethanol for 30 s followed by washing with sterile water for 4-6 times, and then soaking in 0.1% mercuric chloride (HgCl_2) for 7 min; (2) The best medium for shoot proliferation was $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{GA}_3 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, with a proliferation rate of 2.93; (3) The rooting rate of plantlets was up to 93.9% in $1/2$ strength of MS medium supplemented with $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA. All media used contained $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose and $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar. The medium pH was adjusted to 6.0 before autoclaving.

Key words: *Lonicera macckii* ‘Aoxue’; proliferation; rooting

金银木 (*Lonicera maackii* Maxim), 为忍冬科忍冬属植物, 落叶灌木, 株形圆满, 高可达 6 m。金银木春季观花, 秋季观果, 花果入药, 是优良的观花观果树种, 在中国园林造景中广泛应用^[1]。‘傲雪’金银木 (*L. macckii* ‘Aoxue’) 是普通金银木在自然界中的自然变异类型, 具有稳定的耐寒性, 比普通金银木落叶晚 20~30 d, 具有落叶期晚、生长期长等特性^[2]。‘傲雪’金银木的繁殖主要采用扦插方法, 由于母本少、成苗量少、繁殖系数低等特点, 限制了这种优良园林绿化材料的生产与推广。石进朝等^[3-4]在 2006-2011 年对金银木组织培养进行了系

统的研究, 但是仍存在外植体诱导时间较长、增殖率及生根率不高等问题, 还未建立完善的组织培养快速繁殖和大规模人工栽培现代化生产体系。作者以带腋芽半木质化茎段为材料, 探究‘傲雪’金银木的组织培养体系, 以期为规模化生产‘傲雪’金银木奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为 4 年生‘傲雪’金银木, 在 2010 年 9 月采自北京农业职业学院实训中心, 外植体为

收稿日期: 2013-12-02

基金项目: 2013 年北京市属高等学校人才强教深化计划——创新人才(教学名师)建设项目 (PXM2013_157203_000005) 资助。

作者简介: 左利娟, 讲师。

* 通信作者: 石进朝, 教授。E-mail: shijinchao88@163.com

露地生长的带腋芽且芽体饱满的半木质化茎段。试验在北京农业职业学院植物组织培养中心进行。

1.2 方法

试验中均在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 光培养 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ，光照度 $40 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 环境下培养，以下各培养基均含有添加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，pH 为 6.0。

1.2.1 外植体适宜消毒时间的筛选 材料用湿纱布轻轻将表面的尘土除去，放入三角瓶中，加入几滴洗涤剂轻摇 20 min 左右，并用自来水冲洗至无泡沫为止，用滤纸吸干水分。用 75% 的乙醇浸泡 30 s，无菌水冲洗 4~6 次，然后加入 0.1% HgCl_2 ，杀菌 3、5、7、9 min，均用无菌水冲洗 6 次，用无菌滤纸吸干材料表面水分，切割成 1.5~2 cm 长的带一对腋芽茎段，接种 40 瓶，每瓶 2 个茎段，接入 MS 培养基。经 15 d 培养后，统计 3 种消毒处理的污染率及幼苗生长状况。

1.2.2 增殖培养基的筛选 不同浓度的 6-BA 和 NAA 组合对‘傲雪’金银木增殖的影响。以 MS 培养基为初代培养基，腋芽能够直接萌发生长。将初代培养获得的带腋芽茎段切成 1~1.5 cm 左右，接入以 MS 作为基本培养基，并附加不同浓度 6-BA 和 NAA 组合。其中 6-BA 设 5 个质量浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，NAA 设 2 个质量浓度分别为 0.05 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，共计 10 个处理。每个处理接种 20 个外植体，重复 3 次，35 d 后统计增殖系数、 $\geq 2 \text{ cm}$ 新梢率、萌发新芽数量以及观察小苗的长势。

加入不同浓度的 GA_3 对‘傲雪’金银木增殖的影

响。将初代培养获得的带腋芽茎段切成 1~1.5 cm 左右，接入以 MS 作为基本培养基，并附加不同浓度 6-BA、NAA 和 GA_3 。试验为正交设计 $L_9 (3^3)$ ，其中 6-BA 设 3 个质量浓度分别为 0.5、1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，NAA 设 3 个质量浓度分别为 0.05、0.1 和 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， GA_3 设立 3 个质量浓度，分别为 0.1、0.3 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每个处理接种 20 个外植体，重复 3 次，35 d 后统计增殖系数。

1.2.3 生根培养基的筛选 继代培养 35 d 时，分别以 MS 和 1/2 MS 作为基本培养基，切取生长健壮、均匀一致、长度在 1.5 cm 以上的嫩梢，分别接入 NAA 质量浓度为 0.5、1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 IBA 质量浓度为 0.5、1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中培养，每处理 20 瓶，每瓶接种 2 个，20 d 后观察生根情况。

1.2.4 试验数据 增殖系数 = 不定芽的总数 (个) / 接种外植体总数 (个)； $\geq 2 \text{ cm}$ 新梢率 (%) = $\geq 2 \text{ cm}$ 新梢 / 所有新枝数量；生根率 = (生根芽数 / 接种芽总数) $\times 100\%$ 。用 SPSS 软件对试验数据进行统计和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对外植体腋芽污染率的影响

4 种处理腋芽污染率不同 (表 1)，3 min 消毒处理污染率达 95%，茎段略有褐化，7 和 9 min 消毒处理污染率均为 12.5%，但是 9 min 处理时有明显的褐化现象，因此，以金银木半木质化茎段为外植体的消毒时间以 7 min 为宜。

表 1 外植体适宜消毒时间的筛选

Table 1 Effects of different disinfection time on the bud contamination

处理时间/min Treatment time	处理数量/瓶 Treated number/bottle	污染瓶数/瓶 Contaminated number/bottle	污染率/% Contamination rate
3	40	38	95.0
5	40	15	37.5
7	40	5	12.5
9	40	5	12.5

2.2 增殖培养基的筛选

2.2.1 6-BA 和 NAA 的不同浓度组合对‘傲雪’金银木增殖的影响 在 MS 培养基上培养的腋芽 25 d 左右开始萌发生长。腋芽萌发出的继代苗再接入增殖培养基中 (表 2) 平均在 35 d 左右可获得较多带腋芽的茎段。将带腋芽的无菌苗接种到高浓度 6-BA ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 NAA (0.05 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组合的增殖培养基上，接种 30 d 后诱导的部分瓶苗出现玻璃化现象，茎段的长度明显伸长，且部分小苗基部

出现较多愈伤组织，生长势较弱。综合来看‘傲雪’金银木较为适合增殖的培养基为：MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。

2.2.2 GA_3 对‘傲雪’金银木继代苗增殖的影响 在 6-BA 和 NAA 激素组合中加入 GA_3 能明显促进‘傲雪’金银木生长和增殖 (表 3)。从极差分析来看，影响金银木增殖的因子从大到小依次是：6-BA 浓度 $>$ GA_3 浓度 $>$ NAA 浓度。当 6-BA 达到 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，小苗较细弱，茎段节间较长，接种 30 d 后诱导的部

分瓶苗出现玻璃化现象, 基部出现较多愈伤组织。 6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.15 mg·L⁻¹+GA₃ 0.5 mg·L⁻¹ 所以, 综合来看‘傲雪’金银木增殖培养基以: MS+ 为宜。

表 2 不同浓度 6-BA 和 NAA 对‘傲雪’金银木诱导增殖的效果
Table 2 Effect of 6-BA and NAA on proliferation of *L. macckii* ‘Aoxue’

编号 No.	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	萌发新芽数 Germinated number of new bud	≥2 cm 新梢率/% Shoot rate	增殖系数 Proliferation coefficient
1	0.10	0.05	12.10 ^{Ee}	32.40 ^{Ff}	1.23 ^{li}
2	0.10	0.10	13.33 ^{Ee}	30.37 ^{Ef}	1.33 ^{Hh}
3	0.30	0.05	15.43 ^{Dd}	33.77 ^{Ef}	1.49 ^{Gg}
4	0.30	0.10	15.77 ^{Dd}	36.03 ^{Ee}	1.61 ^{Ff}
5	0.50	0.05	16.67 ^{Cc}	46.47 ^{Cc}	3.31 ^{Ee}
6	0.50	0.10	17.40 ^{Cc}	45.83 ^{Cc}	1.81 ^{Dd}
7	1.00	0.05	17.43 ^{Cc}	43.57 ^{Dd}	1.81 ^{Dd}
8	1.00	0.10	20.10 ^{Bb}	47.77 ^{Cc}	2.03 ^{Cc}
9	1.50	0.05	21.33 ^{Aa}	53.73 ^{Bb}	2.08 ^{Bb}
10	1.50	0.10	22.00 ^{Aa}	56.40 ^{Aa}	2.32 ^{Aa}

表 3 不同植物激素诱导‘傲雪’金银木增殖的效果
Table 3 Effect of 6-BA, NAA and GA₃ on proliferation of *L. macckii* ‘Aoxue’

处理编号 Code for treatment	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	GA ₃ /mg·L ⁻¹	增殖系数 Proliferation coefficient
1	0.5	0.05	0.1	1.28
2	0.5	0.10	0.3	1.57
3	0.5	0.15	0.5	2.30
4	1.0	0.05	0.1	2.48
5	1.0	0.10	0.3	2.78
6	1.0	0.15	0.5	2.93
7	1.5	0.05	1.0	2.78
8	1.5	0.10	0.3	2.70
9	1.5	0.15	0.5	2.50
k1	1.717	2.18	2.303	
k2	2.730	2.350	2.183	
k3	2.660	2.577	2.620	
R	1.013	0.397	0.437	

表 4 不同培养基诱导不定根的效果
Table 4 Effects of plant growth regulators on the induction of adventitious root

处理 Treatment	NAA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	生根率/% Rooting rate	平均根长/cm Average root length
MS	0.5	0	36.8±0.1 ^a	0.6±0.4
	1.0	0	40.6±0.1 ^b	1.0±0.9
	1.5	0	52.6±0.1 ^c	1.0±0.4
	0	0.5	53.1±0.08 ^d	1.0±0.4
	0	1.0	69.0±0.6 ^e	2.3±0.7
	0	1.5	79.3±0.0 ^f	1.1±0.6
1/2MS	0.5	0	43.6±0.9 ^a	0.7±0.3
	1.0	0	53.9±0.7 ^b	1.5±0.3
	1.5	0	70.2±0.5 ^c	2.0±0.2
	0	0.5	53.4±0.1 ^d	1.0±0.2
	0	1.0	88.5±0.6 ^e	1.9±0.3
	0	1.5	93.3±0.3 ^f	2.5±0.3

注: 表中数据为平均值±SD, 同一列中不同字母表示数据差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Values represent the mean ± SD, means followed by different letters indicate significant difference at the 0.05 level.

2.3 生根培养基的筛选

当继代苗高为 2.5 cm 时, 转入添加了 NAA (0.5、1.0 和 1.5 mg·L⁻¹) 和 IBA (0.5、1.0 和 1.5 mg·L⁻¹) MS 和 1/2MS 的生根培养基中。在 MS 培养基中的小苗, 15 d 左右发现有新根长出; 而在 1/2MS 培养基加入不同生根激素的瓶苗, 10 d 左右发现新根长出, 从生长 20 d 后统计数据可以看出(表 4), 不同的培养基对生根率有显著影响, 即以 1/2MS 为基本生根培养基的生根率和瓶苗平均根长均好于 MS 基本培养基。

在同一基本培养基中, 不同的生根激素对生根情况也有较为显著的影响。在 1/2MS 培养基中以加入 IBA 1.5 mg·L⁻¹ 的生根率最高, 平均根长最长, 生长势最好。所以, IBA 更有利于‘傲雪’金银木的生根。适宜的生根培养基为 1/2MS+ IBA 1.5 mg·L⁻¹。

3 讨论

忍冬属植物小枝中空, 外植体消毒时容易污染。所以, 无菌材料的建立是金银木组培快繁中最关键的也是最困难的一步^[5]。石进朝等^[3-4]对长绿期金银木和变叶金银木的组培中, 外植体消毒后仍会有较高污染率也证明了这一点。所以, 在采集外植体时, 特别注意采集未中空的半木质化带腋芽小枝为试验材料。以‘傲雪’金银木的半木质化茎段为外植体, 利用 75% 的乙醇浸泡 30 s, 配合 0.1% HgCl₂ 消毒 7 min, 可以达到较好的消毒效果。这与石进朝等^[4]对变叶金银木进行组织培养研究时外植体的消毒方法和结果略有差异, 同样以半木质化茎段为外植体, ‘傲雪’金银木消毒后污染率明显低于变叶金银木。这可能是由于植物材料和外植体的类型、采集时间、消毒剂的种类以及操作人员都与以前不同^[6], 所以灭菌效果与前人的研究有所区别。在忍冬属植物^[7-14]的在组培过程中, 部分会出现褐化, ‘傲雪’金银木在腋芽诱导阶段也发现轻微褐化现象。褐化是植物材料受伤后, 体内释放的酚类物质在酚氧化酶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^[15]; 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^[16-18]、调整培养基^[19-21]、控制培养条件^[16, 22]、添加防腐剂^[23-31] 等多方面, 都有大量研究报道。本试验只在初代培养过程发现轻微褐化, 在继代增殖过程中未见明显褐化现象。在初代培养过程发现外植体褐化后, 分别在 3 d 和 7 d 时各转苗 1 次, 即发现褐化现象消失。分析可能是半木质化带腋芽小枝为试验

材料为金银木较为理想的外植体; 在无菌体系建立过程中经常转苗可以有效控制‘傲雪’金银木褐化现象。

芽的增殖培养速率是组培快繁中最重要的一环, 增殖系数大, 在生产中才有应用价值^[32-33]。提高 6-BA 和 NAA 的浓度能有效的促进‘傲雪’金银木腋芽的生长和增殖^[10, 12], 但当 6-BA 浓度超过 1.0 mg·L⁻¹ 时, 有玻璃化现象, 部分小苗基部出现较多愈伤组织, 愈伤组织随着 6-BA 浓度的增加而增加, 生长势较弱^[11]。以 MS 为基本培养基附加 6-BA 和 NAA 的激素组合中, ‘傲雪’金银木较为适合增殖的培养基为: MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+ NAA 0.1 mg·L⁻¹。

GA₃ 是一种广泛存在的一类植物激素, 可刺激叶和芽的生长。本试验尝试加入 GA₃ 来促进其茎段的生长与增殖。结果显示, GA₃ 能明显促进茎段的伸长生长^[7]。以接入培养基为 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+ NAA 0.1 mg·L⁻¹+ GA₃ 0.5 mg·L⁻¹ 的小苗为例, 在生长 28 d 左右可以获得较多的丛生枝条, 可以继代 1 次; 而不加 GA₃ 的需要生长 35 d 才能继代 1 次。接入添加 GA₃ 的培养基中的小苗在萌发新芽数量和增殖率方面普遍高于不加 GA₃ 的。但是当 6-BA 达到 1.5 mg·L⁻¹, 小苗较细弱, 茎段节间较长, 接种 30 d 后诱导的部分瓶苗出现玻璃化现象, 基部出现较多愈伤组织。这与李翔等^[11]的研究结果相似。所以, 综合来看‘傲雪’金银木最适增殖培养基以: MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.15 mg·L⁻¹+GA₃ 0.5 mg·L⁻¹ 为宜。

‘傲雪’金银木适宜的生根培养基为 1/2MS+ IBA 1.5 mg·L⁻¹。在生根培养基的筛选方面以 1/2MS 培养基好于 MS 培养基, 而生根激素 IBA 的效果比好于 NAA。在 1/2MS 培养基中以加入 IBA 1.5 mg·L⁻¹ 的生根率最高, 平均根长最长, 生长势最好。所以, IBA 更有利于‘傲雪’金银木的生根。

参考文献:

- [1] 李桂伶. 3 种金银木抗性生理特性比较[J]. 中国农学通报, 2009, 25(18): 208-211.
- [2] 郑志勇, 石进朝, 王德芳. 长绿期金银木耐寒性与叶片组织结构的关系[J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊): 331-333.
- [3] 石进朝, 陈兰芬. 长绿期金银木的组织培养研究[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(4): 97-100.
- [4] 石进朝, 陈兰芬, 王晶, 等. 变叶金银木组织培养研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(6): 116-121.
- [5] 王中美, 吴亚飞, 李树举, 等. 利用茎尖不定芽建立朝鲜蓟高效再生体系[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(6): 612-616.
- [6] 甄雪花. 欧洲荚蒾组织培养技术及品质测定研究[D].

- 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [7] 赵贤慧. 红金银花繁殖技术及耐寒性研究[D]. 青岛: 青岛农业大学, 2007: 22.
- [8] 覃拥灵. 皱叶忍冬的组织培养与快速繁殖初步研究[J]. 河池学院学报, 2004(4): 32-34.
- [9] 唐效蓉, 李午平, 彭晓锋. 灰毡毛忍冬的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 642.
- [10] 孙朝晖, 尹会. 蕊帽忍冬的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 125-126.
- [11] 李翔, 杨美纯, 全泉, 等. 华南忍冬组织培养的无菌体系建立[J]. 广西植物, 2008, 28(6): 823-826.
- [12] 王晓明, 李永欣, 聂启英. 灰毡毛忍冬新品种组织培养的无菌体系建立[J]. 经济林研究, 2005(4): 14-16.
- [13] 黄守印, 张福, 邢路军, 等. 北京忍冬的组织培养试验[J]. 河北林业科技, 2004(4): 3.
- [14] 李景刚, 孙满枝. 良种金银花的组培快繁技术研究[J]. 山东林业科技, 2004(7): 36.
- [15] 陈正华. 木本植物组织培养[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 34-480.
- [16] 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.
- [17] 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): 1221.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 张淑红, 王蒂, 王清. 影响马铃薯叶肉原生质体褐化的因素及 AgNO_3 对其褐化和分裂的作用[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(2): 77-81.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Ozden-Tokatli Y, Ozudogru E A, Akcin A. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate [J]. Scientia Horticulturae, 2005, 106(3): 415-426.
- [30] Wang H, Van Staden J. Establishment of *in vitro* cultures of tree peonies [J]. South African Journal of Botany, 2001, 67(2): 358-361.
- [31] 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.
- [32] 苏梦云. 美国枫香茎段组织培养与植株再生[J]. 林业科学研究, 2005, 18(1): 98-101.
- [33] Lauzer D, Vieth J. Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L. cv. ‘Green Globe’[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1990, 21(3): 234-237.