

‘海大 2 号’菠萝蜜茎尖组培褐变过程中酚类物质及相关酶活性的影响

丁 燕, 郭佳慧, 范紫云, 向星星, 干雨露, 闵天雨, 杨 廷, 丰 锋*,
叶春海

广东海洋大学滨海农业学院, 广东湛江 524088

摘 要: 菠萝蜜果实香甜深受大众喜爱, 市场前景非常广阔, 但常规种子繁殖难以保持其优良性状且嫁接法繁殖成活率极低。组培快繁技术在许多珍稀名优植物繁殖上已有广泛应用, 但目前还没有应用于菠萝蜜生产实践的报道。组培过程中发现, 菠萝蜜茎尖褐化严重, 导致无性繁殖体系难以建立, 为有效探究褐化的克服措施, 促进菠萝蜜组培快繁技术体系的建立, 为构建菠萝蜜种苗繁育技术体系及其产业化生产示范提供理论依据。以菠萝蜜品种‘海大 2 号’茎尖为外植体, 利用不同时长低温预处理后将外植体接种至不同浓度的 PVP 培养基中对其进行初代培养, 15 d 后分别统计其褐化率和萌芽率, 并通过测定其 PPO 活性变化、总酚及总黄酮含量, 探究外植体经过低温预处理后不同浓度 PVP 对菠萝蜜茎尖组织培养中褐化的抑制情况。结果表明: 茎尖经过 12~24 h 低温处理后再接入添加 2.0 g/L PVP 的 1/2 MS 培养基中, 这一处理下菠萝蜜外植体的褐化率最低且萌芽率最高。且验证结果表明, 此方法有利于菠萝蜜外植体的增殖。

关键词: 菠萝蜜; 组织培养; 褐化; 抗褐化剂

中图分类号: S667.8 文献标识码: A

Effects of Phenolic Substances and Related Enzyme Activities in the Process of Tissue Culture Browning of *Artocarpus heterophyllus* Stem Tips of ‘Haida 2’

DING Yan, GUO Jiahui, FAN Ziyun, XIANG Xingxing, GAN Yulu, MIN Tianyu, YANG Ting, FENG Feng, YE Chunhai

College of Coastal Agriculture Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China

Abstract: *Artocarpus heterophyllus* is popular for its sweet fruit and has a very promising market, but conventional seed propagation makes it difficult to maintain its excellent traits and the grafting method has a very low survival rate. The technique of tissue culture and rapid propagation has been widely used in the propagation of many rare and valuable plants, but there are no reports of its application in the production of *A. heterophyllus*. In the process of tissue culture, it was found that the stem tip of *A. heterophyllus* was severely browned, which led to the difficulty of establishing asexual reproduction system. In order to effectively investigate the measures to overcome the browning, this experiment took the stem tips of *A. heterophyllus* ‘Haida 2’ as the explants and inoculated them into different concentrations of PVP medium after low-temperature pretreatment at different lengths for primary culture, the browning rate and germination rate were calculated after 15 d, and PPO activity, total phenol and total flavonoid content were determined to explore the inhibition of different concentrations of PVP on browning in stem the tip tissue culture of *A. heterophyllus* after low-temperature pretreatment. The results showed that the browning rate of *A. heterophyllus* explants was the lowest

收稿日期 2022-05-10; 修回日期 2022-07-10

基金项目 国家重点研发计划项目(No. 2017YFD0202102); 广东省科技计划项目(No. 2016B020201010, No. 2014A020208137)。

作者简介 丁 燕(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 园艺植物组培快繁。*通信作者(Corresponding author): 丰 锋(FENG Feng), E-mail: ff1703@126.com。

and the germination rate was the highest after 12–24 h low-temperature treatment of stem tip and then in 1/2MS medium supplemented with 2.0 g/L PVP. The experimental results showed that this method was beneficial to the proliferation of *A. heterophyllum* explants. The purpose of this experiment is to promote the establishment of technique of tissue culture and rapid propagation for *A. heterophyllum*, with a view to providing a theoretical basis for the construction of the *A. heterophyllum* seedling breeding technology system and its industrial production demonstration.

Keywords: *Artocarpus heterophyllum*; tissue culture; browning; anti-browning agent

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.03.013

菠萝蜜 (*Artocarpus heterophyllum* Lam.), 属于桑科木菠萝属的热带果树, 常绿乔木, 是一种集食用、药用、木本粮食于一身的多用途经济树种^[1], 因果实甜美而受到欢迎, 市场前景广阔。大量研究表明, 菠萝蜜的叶、茎、种子和果肉具有较高的药用、食用价值^[2]。

目前, 菠萝蜜的繁殖方式主要有实生繁殖、嫁接繁殖和组织培养^[3]。由于实生繁殖后代易发生性状分离而难以保存木本优良性状等问题, 导致果实品质和品质发生较大改变^[4]。目前生产上主要采取嫁接繁殖的方法, 此方法可以保存母本优良性状。但因菠萝蜜存在流胶较多的特性, 嫁接时创面极易被胶污染, 成活率受到严重影响^[5]。

组织培养可加快植物的繁殖速度, 在短期内获得大量遗传性一致的种苗, 并使其保持母本优良的性状, 更有利于新品种的选育^[10], 目前在香蕉、桉树、蝴蝶兰等植物上得到广泛应用。前人曾利用菠萝蜜嫩茎等外植体通过组织培养获得试管苗^[7-9]。但利用成年菠萝蜜树茎尖来进行繁殖尚无报道。1960 年, MOREL^[10]就利用大花穗兰的茎尖成功诱导分化出植株。利用此技术于 ‘海大 2 号’ 组培快繁中发现, 菠萝蜜组织培养过程中褐化严重, 导致其难以建立无性繁殖体系, 产业化生产难以实现。

周亚辉等^[11]研究认为, 组培褐化机制可分为酶促褐变和非酶促褐变 2 种, 菠萝蜜外植体的褐变主要是酶促褐变, 在氧化酶催化下酚类物质形成褐色的醌类及其聚合物称为酶促褐变。牛佳佳等^[12]研究认为, 醌类化合物的产生会使得外植体的伤口处变深褐色, 这些褐色物质产生后会慢慢渗透到培养基中, 来达到抑制其他酶活性产生这一目的, 植株在吸收营养物质时受到阻止, 导致外植体褐变而死亡, 植株的生长受到影响。

菠萝蜜组织培养快繁全过程的理论和技术的已基本成熟, 然而在实际生产上却难于重复和推广^[13]。为尽早实现菠萝蜜的工厂化繁殖, 为获得

大量优质苗木而奠定基础, 本研究以菠萝蜜茎尖为材料, 探究经过不同低温 (4 °C) 处理后及不同浓度 PVP 对外植体褐化的影响, 并测定各处理下茎尖 PPO 活性、酚类物质含量, 以此更深入地了解菠萝蜜组织培养褐化的因素, 探究褐化的机理。旨在促进菠萝蜜组培快繁技术体系的建立, 以为构建菠萝蜜种苗繁育技术体系及其产业化生产示范提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本研究试验材料 ‘海大 2 号’ 菠萝蜜外植体来自广东海洋大学后山园林基地, 选取长势强壮, 无病虫害的植株, 在晴天早晨进行采摘。实验培养基采用 1/2 MS 培养基, NAA 0.1 mg/L, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 5.5~6.0 g/L, pH 5.8, 培养温度 (24±1) °C, 光照强度 2000 Lx, 光照 10 h/d。实验中所用药剂均来自麦克林公司及广州试剂厂。

经过表面灭菌处理后, 将外植体依次接种至灭菌培养基中, 每个处理接种 30 瓶, 每瓶接种 1 个顶芽, 3 次重复。15 d 后统计菠萝蜜外植体的污染率和褐化率。低温 (4 °C) 处理时间分别设定为 12、24、48 h, 15 d 后分别统计其褐化率及萌芽率, 并测定其 PPO 活性及酚类物质含量^[6, 14]。

外植体经过 12~24 h 的低温处理后将接入不同浓度的 PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 培养基中, 15 d 后分别统计其褐化率及萌芽率, 并测定其 PPO 活性及酚类物质含量。

1.2 方法

外植体底部褐色色块超过 0.1~0.5 cm 均为褐化 (图 1)。采用以下诱导评价公式计算萌芽率及褐化率。

萌芽率=诱导出腋芽的瓶数/同批次接种的外植体瓶数×100%

褐化率=褐化的外植体数/同批次接种的外植体瓶数×100%



A: 褐变 1 级, 边缘明显褐变; B: 褐变 2 级, 褐变延伸至中部; C: 褐变 3 级, 完全褐变。
A: Browning grade 1, with obvious browning at the edges; B: Browning grade 2, browning extending to the middle;
C: Browning grade 3, complete browning.

图 1 外植体褐变等级分类

Fig. 1 Classification of browning grades of explants

1.3 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 2007 软件对重复样的平均值与标准差进行计算, 采用 DPS 7.05 软件和 Duncan’s 分析法对不同指标进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同低温预处理时间对菠萝蜜茎尖组培褐化的影响

如表 1 所示, 未进行低温处理的外植体, 褐化率高达 58.89%, 萌芽率为 38.89%。随着低温处理时间的延长, 其褐化率显著降低。低温处理 12 h, 外植体的褐化率为 46.67%, 与其他处理相比, 差异显著。低温处理 24 h, 萌芽率最高, 达到 57.78%, 与对照组相比, 差异显著。结果表明, 采集后的菠萝蜜外植体经过一定的低温预处理后, 对其褐化率及萌芽率影响显著 (图 2)。

表 1 低温处理时间对 ‘海大 2 号’ 茎尖褐化的影响
Tab. 1 Effects of low temperature treatment time on browning of stem tips of ‘Haida 2’

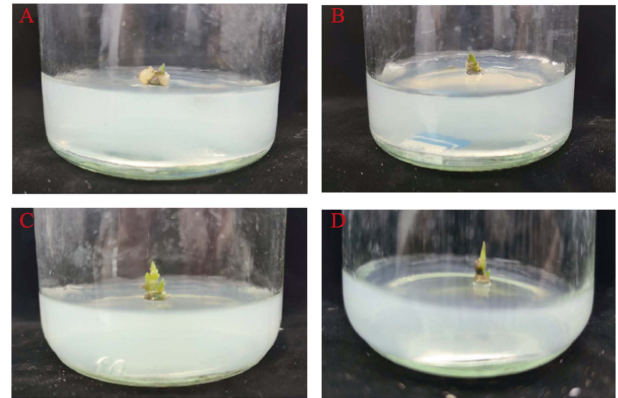
处理时间 Treatment time/h	褐化率 Browning rate/%	萌芽率 Germination rate/%
0	58.89±4.01 ^{aA}	38.89±2.94 ^{bB}
12	46.67±3.33 ^{bAB}	56.67±5.77 ^{aA}
24	33.33±1.93 ^{cB}	57.78±4.01 ^{aA}
48	55.56±1.11 ^{abA}	35.56±4.01 ^{bB}

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P < 0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$).

2.2 不同 PVP 浓度对菠萝蜜茎尖组培褐化的影响

如表 2 所示, PVP 的添加对菠萝蜜外植体褐化及萌芽率的影响显著。PVP 浓度为 2.0 g/L 时, 褐化率最低, 萌芽率最高, 分别为 15.56% 和



A: 低温预处理 0 h; B: 低温预处理 12 h; C: 低温预处理 24 h; D: 低温预处理 48 h。

A: Low-temperature pretreatment for 0 h; B: Low-temperature pretreatment for 12 h; C: Low-temperature pretreatment for 24 h; D: Low-temperature pretreatment for 48 h.

图 2 ‘海大 2 号’ 低温预处理后外植体生长情况

Fig. 2 Growth of explants after low temperature pretreatment of ‘Haida 2’

66.67%, 与对照组相比, 褐化率降低了 41.11%, 萌芽率升高了 30.00%, 差异显著。结果表明, PVP 对菠萝蜜外植体的褐化能够起到抑制作用, 且在浓度为 2.0 g/L 时, 效果最佳。具体生长情况见图 3, 验证效果见图 4。

2.3 不同低温预处理时间对 ‘海大 2 号’ 菠萝蜜茎尖 PPO 活性、总酚及总黄酮含量的影响

2.3.1 PPO 活性 如图 5A 所示, ‘海大 2 号’ 菠萝蜜茎尖在经过低温处理后, 体内 PPO 的活性并

表 2 PVP 浓度对 ‘海大 2 号’ 茎尖褐化的影响
Tab. 2 Effect of PVP concentration on the browning of stem tips of ‘Haida 2’

PVP 浓度 PVP concentration/(g·L ⁻¹)	褐化率 Browning rate/%	萌芽率 Germination rate/%
0	56.67±3.33 ^{aA}	36.67±5.09 ^{bB}
1.0	31.11±5.88 ^{bB}	41.11±1.11 ^{bB}
2.0	15.56±2.22 ^{cB}	66.67±3.85 ^{aA}
3.0	33.33±3.33 ^{bB}	40.00±3.85 ^{bB}

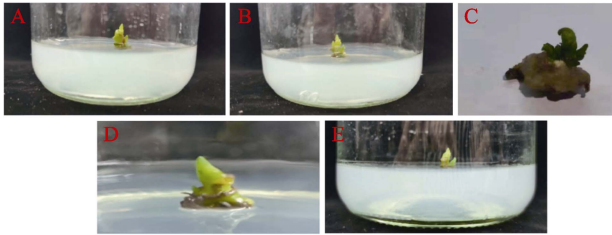


图3 菠萝蜜外植体在 PVP 培养基中的生长及分芽情况
Fig. 3 Growth and germination of *A. heterophyllus* explants in PVP medium

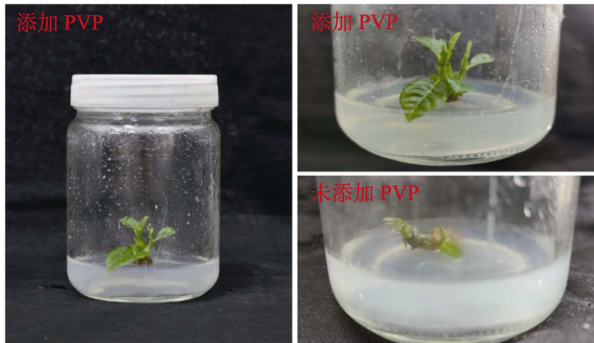
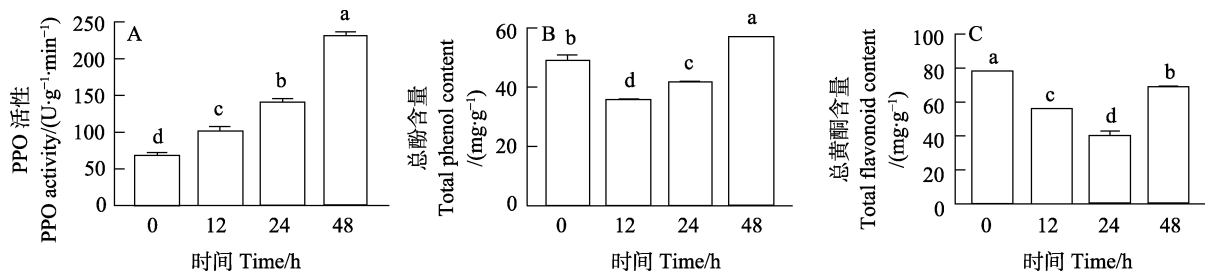


图4 外植体的增殖情况
Fig. 4 Proliferation of explants



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图5 不同低温处理时间对‘海大2号’茎尖 PPO 活性、总酚含量及总黄酮含量的影响

Fig. 5 Effects of different low temperature treatments time on PPO activity, total phenol content and total flavonoid content in stem tips of ‘Haida 2’

2.4 不同 PVP 浓度对‘海大2号’菠萝蜜茎尖 PPO 活性、总酚及总黄酮含量的影响

2.4.1 PPO 活性 如图 6A 所示, 培养基中添加 PVP 后, 菠萝蜜外植体内 PPO 活性与对照组相比, 差异显著, 当添加浓度为 2.0 g/L 时, PPO 活性最低, 为 82.67 U/(g·min), 与对照组相比降低了 318.66 U/(g·min)。其他处理组与对照组相比, PPO 活性均有不同程度的降低, 且与对照组相比分别降低了 185.06、70.66 U/(g·min)。

2.4.2 总酚含量 如图 6B 所示, 当添加浓度为 1.0 g/L 时, 总酚含量与对照组相比无明显差异。添加的 PVP 浓度为 2.0 g/L 时, 菠萝蜜茎尖总酚含量最低, 为 28.46 mg/g, 与对照组相比降低了

未出现下降的趋势, 各处理组均高于对照, 且随着低温处理时间的延长, 体内 PPO 活性随之增加, 在低温处理 48 h 时, PPO 活性达到最高值, 为 229.07 U/(g·min), 且各处理与对照组相比, 差异显著。

2.3.2 总酚含量 如图 5B 所示, ‘海大2号’菠萝蜜茎尖在经过低温处理后, 与对照组相比, 呈现先降低后升高的趋势。低温处理 12 h 和 24 h, 其体内的总酚含量与对照组相比有下降的趋势, 且在低温处理 12 h 时达到最低值, 为 35.47 mg/g, 与对照组相比下降了 13.56%。在低温处理 48 h 后, 茎尖的总酚含量高于对照组。

2.3.3 总黄酮含量 如图 5C 所示, 菠萝蜜茎尖在经过低温处理后, 外植体体内黄酮的含量均呈现不同程度的降低, 与对照组相比差异显著。在低温处理 24 h 后, 菠萝蜜外植体体内的总黄酮含量最低, 为 40.04 mg/g, 与对照组相比下降 37.25 mg/g。低温处理 12 h 和 48 h 后, 外植体总黄酮含量与对照组相比分别降低 21.62% 和 8.72%。

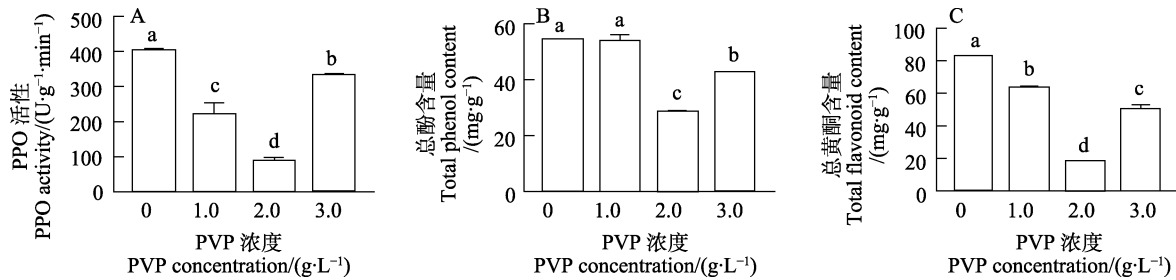
25.90 mg/g, 差异显著。添加的 PVP 浓度为 3.0 g/L 时, 与对照组相比总酚含量下降了 11.79 mg/g。

2.4.3 总黄酮含量 如图 6C 所示, PVP 添加后, 外植体的总黄酮含量显著降低。PVP 浓度为 1.0 g/L 时, 外植体的总黄酮含量与对照组相比降低了 19.21 mg/g。PVP 浓度为 2.0 g/L 时, 菠萝蜜外植体总黄酮含量达到最低值, 为 17.21 mg/g。PVP 浓度为 3.0 g/L 时, 外植体的总黄酮含量与对照组相比降低了 33.06 mg/g。各处理组与对照组相比, 差异显著。

3 讨论与结论

3.1 讨论

菠萝蜜茎尖组织培养中, 经过低温处理后能



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 6 不同 PVP 对浓度 ‘海大 2 号’ 茎尖 PPO 活性、总酚含量及总黄酮含量的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of PVP on PPO activity, total phenol content and total flavonoid content in stem tips of ‘Haida 2’

够有效地降低褐化。前人研究发现,外植体在高温培养下,褐变加剧,而降低培养温度后发现,褐化得到明显的改善,这与本试验研究结果一致^[15-16]。喻娜^[17]研究认为,低温组培下的外植体有利于降低褐化,刘兰英^[15]在核桃组织培养过程中发现,低温下进行组织培养可降低褐化,罗丽华^[16]在板栗愈伤组织培养中研究发现,低温处理可减轻外植体褐化的现象。在本研究中,菠萝蜜外植体进行一定时间的低温预处理后,与对照组相比,外植体内的总酚及总黄酮含量显著降低,试验结果与前人研究结果一致,即适当的低温处理有利于外植体褐化率的降低。

PVP 添加后,发现不同浓度的 PVP 均能降低外植体的褐化,这与刘英^[18]研究结果一致。目前普遍认为,外植体的褐化与多酚氧化酶(PPO)对酚的作用有关,也兰春等^[19]研究认为 PPO 是酚类催化反应的关键酶,因为酚会氧化形成醌^[20],醌会导致外植体的褐化,目前很多学者认为这是导致褐化的主要原因,但不是唯一的原因,众多学者一直就这方面进行研究与探讨,但目前还未得到一致结论。酚酸、类黄酮和单宁是酚类物质结构的三大类化合物,这三大类化合物在褐变过程中充当着重要的角色^[21]。印芳^[22]研究认为,蝴蝶兰的褐化与酚酸类物质有关,刘红^[23]研究结果表明,各处理下的外植体总酚含量与褐化程度呈正相关,即褐化越重,总酚含量越高,本研究也得到了同样结果。

前人研究表明,辣椒和葡萄的褐化可用硝酸银缓解^[24-25],焦金凤^[26]认为,合适的抗褐化剂物质有利于降低植物组织培养过程中出现的褐化问题,植物组培中常用的抗褐化剂根据其作用机理可分为两大类型:(1)防止酚氧化的抗氧化剂,如,VC、Na₂S₂O₃、CA等;(2)用来吸附醌类物

质的吸附剂,如 AC、PVP 等。本研究结果表明,添加 PVP 2.0 g/L 时用菠萝蜜组织培养抗褐化的效果最好,这可能是因为同一种褐化剂的不同浓度起到的抗褐化效果不一样^[26],张俊林等^[27]在核桃组培中,JAIN 等^[28]在欧洲李组织培养中研究发现,抑制植物组培褐化效果最好的抗褐化剂是 PVP,本试验在添加 2.0 g/L PVP 时,对抑制菠萝蜜茎尖褐化起到了较好的效果。张小红等^[29]在对核桃进行组织培养中发现,Na₂S₂O₃ 抑制植物组培褐化效果最好。刘霞等^[30]研究发现,培养基中添加 AC 对乌龙子根芽眼组织培养的效果最好,由此可见,不同植物的外植体、取材时间、部位等均会影响抗褐化剂的效果^[26]。本研究结果表明,酚类物质的含量与褐变程度呈正比,这与许传俊等^[31]在蝴蝶兰的研究中、毛沛琪^[6]在牡丹等的研究中结果一致。此外,前人研究表明,降低酚类物质即可降低褐化^[32-33],本研究结果也反映出了这一现象。

3.2 结论

本研究以 ‘海大 2 号’ 菠萝蜜茎尖为试验材料,分析了低温预处理后菠萝蜜的茎尖及不同浓度 PVP 对菠萝蜜茎尖 PPO 活性、总酚及总黄酮含量的影响,研究结果表明:在低温处理 12 h,菠萝蜜外植体总酚含量最低,低温处理 24 h,外植体总黄酮含量最低。茎尖经过 12~24 h 低温处理后再接入添加 2.0 g/L PVP 的 1/2 MS 培养基中,这一浓度下菠萝蜜外植体的褐化率最低且萌芽率最高,且验证结果表明,此方法有利于菠萝蜜茎尖的增殖。

本试验对菠萝蜜外植体组培过程中褐化的抑制进行了研究,初步探索了菠萝蜜外植体在组培过程中影响褐化的一些外部因素,且对部分影响

较大的因素如总酚、总黄酮及多酚氧化酶进行了指标的测定,菠萝蜜褐变的研究是一项长期而又艰巨的任务,菠萝蜜组织培养技术还不够成熟,其增殖及生根体系等有待进一步研究,希望今后可以进行深入的研究,加大对醌类物质的鉴定分析。

参考文献

- [1] 丰锋,叶春海,李映志. 菠萝蜜的组织培养和植物再生[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 915-916.
FENG F, YE C H, LI Y Z. Tissue culture and plant regeneration of *Artocarpus heterophyllus* Lam.[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 42(5): 915-916. (in Chinese)
- [2] 赵宇鹏. 菠萝蜜茎叶活性物质的分离纯化及结构鉴定[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2018.
ZHAO Y P. Isolation, purification and structural identification of active substances from stems and leaves of *Artocarpus heterophyllus* Lam.[D]. Guangzhou: Zhongkai College of Agricultural Engineering, 2018. (in Chinese)
- [3] 杨转英, 丰锋, 叶春海. 一种菠萝蜜种苗快速繁殖的方法: CN106577147A[P]. 2017-04-26.
YANG Z Y, FENG F, YE C H. A method for rapid propagation of *Artocarpus heterophyllus* Lam. seedlings: CN106577147A[P]. 2017-04-26. (in Chinese)
- [4] CHRISTENSEN M V, ERIKSEN E N, ANDERSEN A S. Interaction of stock plant irradiance and auxin in the propagation of apple rootstocks by cuttings[J]. Scientia Horticulturae, 1980, 12(1): 11-17.
- [5] 曾武, 黎建伟, 李家宇. 菠萝蜜芽苗砧嫁接育苗技术[J]. 中国南方果树, 2012, 41(5): 98-99.
ZENG W, LI J W, LI J Y. Grafting and nursing techniques of *Artocarpus heterophyllus* Lam. sprouts on stocks[J]. South China Fruit Trees, 2012, 41(5): 98-99. (in Chinese)
- [6] 毛沛琪. 硝酸银在‘凤丹’牡丹组培苗愈伤组织褐化过程中的生理生化作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
MAO P Q. Physiological and biochemical effects of silver nitrate in the process of callus browning of ‘Fengdan’ peony tissue culture seedlings[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2018. (in Chinese)
- [7] ROY S K, RAHMAN S L, MAJUAR R. *In vitro* propagation of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)[J]. Journal of Horticultural Science, 1990, 65(3): 355-358.
- [8] AMIN M N, JAISWAL V S. *In vitro* response of apical bud explants from mature trees of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (*Artocarpus heterophyllus*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 33(1): 59-65.
- [9] 郑维全, 潘学峰, 陈海平. 菠萝蜜嫩茎诱导芽与外源激素作用效应研究[J]. 热带农业科学, 2012, 32(7): 23-26.
ZHENG W Q, PAN X F, CHEN H P. Study on the effect of young *Artocarpus heterophyllus* Lam. stems on bud induction and exogenous hormones[J]. Tropical Agricultural Science, 2012, 32(7): 23-26. (in Chinese)
- [10] MOREL G M. Producing virus-free cymbidiums[J]. American Orchid Society Bulletin, 1960(29): 495-497.
- [11] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 王国彬, 祝展平. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000(S1): 481-486.
ZHOU J H, ZHOU J R, ZENG H S, WANG G B, ZHU Z P. Research progress on browning phenomenon and anti-browning resistance in tissue culture of horticultural plants[J]. Journal of Horticulture, 2000(S1): 481-486. (in Chinese)
- [12] 牛佳佳, 吴静, 贺丹, 何松林. 牡丹离体培养中褐化问题的研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(11): 34-37.
NIU J J, WU J, HE D, HE S L. Research progress on browning of peony *in vitro* [J]. China Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(11): 34-37. (in Chinese)
- [13] 苏兰茜, 白亭玉, 吴刚, 鱼欢, 谭乐和. 菠萝蜜栽培研究现状及发展趋势[J]. 热带农业科学, 2019, 39(1): 10-15, 41.
SU L Q, BAI T Y, WU G, YU H, TAN L H. Research status and development trend of *Artocarpus heterophyllus* Lam. cultivation[J]. Tropical Agricultural Science, 2019, 39(1): 10-15, 41. (in Chinese)
- [14] YI O S, MEYER A S, FRANKEL E N. Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1997, 74(10): 1301.
- [15] 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(2): 171-172.
LIU L Y. Study on browning and preventive measures in tissue culture of ‘Bohuxiang’ walnut[J]. Journal of Horticulture, 2002(2): 171-172. (in Chinese)
- [16] 罗丽华. 板栗组织培养及褐变研究[D]. 长沙: 中南林学院, 2004.
LUO L H. Research on chestnut tissue culture and browning[D]. Changsha: Central South Forestry University, 2004. (in Chinese)
- [17] 喻娜. 银杏组织培养中幼茎尖外植体抗褐化培养条件的优化[J]. 分子植物育种, 2020, 18(18): 6135-6142.
YU N. Optimization of anti-browning culture conditions for young shoot tip explants in *Ginkgo biloba* tissue culture[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(18): 6135-6142. (in Chinese)
- [18] 刘英. 火力楠种胚组培快繁研究[J]. 植物研究, 2021, 41(1): 79-88.
LIU Y. Tissue culture via seed embryo for *Michelia mac-*

- clurei*[J]. Bulletin of Botanical Research, 2021, 41(1): 79-88. (in Chinese)
- [19] 乜兰春, 孙建设, 辛蓓, 吕新琼. 苹果果实酶促褐变底物及多酚氧化酶活性的研究[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 502-504.
NIE L C, SUN J S, XIN B, LYU X Q. Study on the substrates for enzymatic browning of apple fruit and the activity of polyphenol oxidase[J]. Journal of Horticulture, 2004, 31(4): 502-504. (in Chinese)
- [20] LAUKKANEN H, HGGMAN H, SARI K S. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase[J]. Physiologia Plantarum, 1999, 106(3): 337-343.
- [21] 李欣颖. 酚积累影响费约果组织培养褐化效应研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2019.
LI X Y. The effect of phenol accumulation on the browning effect of Feiyuguo fruit tissue culture[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2019. (in Chinese)
- [22] 印芳. 蝴蝶兰组织培养褐变机理的研究[D]. 湖南: 湖南农业大学, 2006.
YIN F. Study on the mechanism of browning in *Phalaenopsis* tissue culture[D]. Hunan: Hunan Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [23] 刘红. 枇杷花药愈伤组织诱导及褐化机理和控制方法研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
LIU H. Study on the mechanism and control method of callus induction and browning in loquat anthers[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [24] AYDIN S, İŞLEK C, ÜNAL B. Effect of silver nitrate solvent on total protein, total phenolic and some antioxidant enzyme activities in cell suspension culture of *Capsicum annuum* L[J]. Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology, 2017, 5(12): 1-5.
- [25] 饶慧云, 邵祖超, 柳海宁, 吴月燕, 刘蓉, 李学孚, 李美芹, 钱萍仙. 抗褐化剂对葡萄愈伤组织继代培养过程中酚类物质、相关酶及其基因表达的影响[J]. 植物生理学报, 2015, 51(8): 1322-1330.
RAO H Y, SHAO Z C, LIU H N, WU Y Y, LIU R, LI X F, LI M Q, QIAN P X. Effects of anti-browning agents on phenolic substances, related enzymes and their gene expression during subculture of grape callus[J]. Chinese Journal of Plant Physiology, 2015, 51(8): 1322-1330. (in Chinese)
- [26] 焦金凤. 红锥组织培养中褐化抑制方法研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
JIAO J F. Research on browning inhibition method in red cone tissue culture[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [27] 张俊林, 刘庆忠, 刘松, 樊靖, 高扬, 秦岭. 核桃茎尖培养中防止褐变的方法[J]. 北京农学院学报, 2007, 22(2): 17-19.
ZHANG J L, LIU Q Z, LIU S, FAN J, GAO Y, QIN L. Methods to prevent browning in walnut shoot tip culture[J]. Journal of Beijing Agricultural University, 2007, 22(2): 17-19. (in Chinese)
- [28] JAIN N, BABBAR S B. Regeneration of 'juvenile' plants of black plum, *Syzygium cuminii* Skeels, from nodal exp of mature trees[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2003, 73(3): 257-263.
- [29] 张小红, 代侃韧, 马兆平, 许巧玲. 核桃离体培养中外植体褐化的研究[J]. 陕西林业科技, 2005(4): 7-9.
ZHANG X H, DAI K R, MA Z P, XU Q L. Study on browning of explants in *in vitro* culture of walnut[J]. Shaanxi Forestry Science and Technology, 2005(4): 7-9. (in Chinese)
- [30] 刘霞, 余马, 舒晓燕, 侯大斌. 乌头子根芽眼组织培养中抗褐化剂的筛选[J]. 中药材, 2015, 38(10): 2035-2037.
LIU X, YU M, SHU X Y, HOU D B. Screening of anti-browning agent in tissue culture of *Radix Aconitum*[J]. Chinese Journal of Medicinal Materials, 2015, 38(10): 2035-2037. (in Chinese)
- [31] 许传俊, 李玲. 蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD 和 PAL 的关系[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 671-674.
XU C J, LI L. The relationship between browning of *Phalaenopsis* explants and total phenolic content, PPO, POD and PAL[J]. Journal of Horticulture, 2006, 33(3): 671-674. (in Chinese)
- [32] 庞发虎. 驱蚊香草外植体多酚含量及 PPO 活性与褐变的关系[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(10): 1183-1185.
PANG F H. The relationship between polyphenol content and PPO activity of mosquito repellent herb explants and browning[J]. Hubei Agricultural Science, 2008, 47(10): 1183-1185. (in Chinese)
- [33] 李新风, 巩振辉, 孙冬青, 王军娥. 不同品种牡丹几个生理参数的比较及其与组培中褐化的关系[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 142-145.
LI X F, GONG Z H, SUN D Q, WANG J E. Comparison of several physiological parameters of different varieties of peony and their relationship with browning in tissue culture[J]. Northwest Agricultural Journal, 2008, 17(1): 142-145. (in Chinese)