

不同消毒方法对组织培养中大岩桐叶片生长状况的影响

杨晨星¹,李晶²,穆立蔷^{1*}

(1. 东北林业大学 林学院,黑龙江 哈尔滨 150040;2. 黑龙江省林业科学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为优选出大岩桐组织培养中最佳的消毒灭菌方法,以大岩桐幼嫩叶片为试验材料,研究前期 75%酒精(10、30、60 s)预处理以及后期 0.1% HgCl₂、5% NaClO、10% H₂O₂ 3种不同消毒剂种类分别在(8、10、12 min)处理下对大岩桐生长状况的影响。结果表明,10% H₂O₂ 处理下的长菌率和褐化率显著高于 0.1% HgCl₂ 和 5% NaClO 的处理,且长菌和褐化发生时间较早;研究中消毒效果最佳的 2 个组合为 75%酒精处理 30 s+0.1% HgCl₂ 处理 10 min 和 75%酒精处理 30 s+5% NaClO 处理 10 min。该研究为与大岩桐类似的其他被子植物的组织培养提供了参考。

关键词:大岩桐;叶片;组织培养;消毒时间;消毒剂种类

中图分类号:S723.13 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2020)04-0089-06

Effects of Different Disinfection Methods on the Leaf Growth of *Sinningia speciosa* in Tissue Culture

YANG Chen-xing¹, LI Jing², MU Li-qiang^{1*}

(1. Forestry College, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. Heilongjiang Academy of Forestry Science, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to optimize the sterilization method in tissue culture of *Sinningia speciosa*, young leaves of *S. speciosa* were used as experimental materials. The effects of pretreatment with 75% alcohol (10, 30, and 60 s) in the early stage and post-treatment with 0.1% HgCl₂, 5% NaClO and 10% H₂O₂ (8, 10, and 12 min each) on the growth of *S. speciosa* leaves were studied. The results showed that the pollution rate and browning rate under 10% H₂O₂ treatment were significantly higher than those of 0.1% HgCl₂ and 5% NaClO, and the pollution and browning occurred earlier. The two most effective combinations were 75% alcohol treatment for 30 s+0.1% HgCl₂ for 10 min and 75% alcohol treatment for 30 s+5% NaClO for 10 min. This experiment provides a reference for tissue culture of other angiosperms similar to globulus.

Key words: *Sinningia speciosa*; leaf; tissue culture; sterilization time; disinfectant species

大岩桐 (*Sinningia speciosa*) 是苦苣苔科 (Gesneriaceae) 大岩桐属 (*Sinningia*) 多年生肉质草本花卉, 原产于巴西, 我国在 20 世纪 30 年代开始引种试种, 现在已被广泛种植^[1]。因其花色繁多, 花大优美而成为备受欢迎的家居盆栽花卉, 具有较高的观赏价值和广阔的开发前景。

大岩桐传统的繁殖方式有种子繁殖、分球繁殖及扦插繁殖^[2-3]。重瓣大岩桐雌雄蕊均退化, 无法产

生种子^[3]; 单瓣大岩桐花柱与花药不等高, 且雄性早熟或不育, 很难进行自花授粉而获得种子。大岩桐种子特别细小, 寿命短, 用种子繁殖成本很高, 且种子繁殖难以保存亲本的优良性状, 易造成品种退化^[4]。扦插和分球繁殖速度慢, 1 个叶柄每次扦插仅可得到 1 棵苗, 花柄扦插成苗率最高仅为 20%^[3], 难以满足生产需要。组织培养作为无性繁殖的一种, 具有繁殖速度快、繁殖系数高的特点, 因

收稿日期: 2019-10-15 修回日期: 2019-12-04

基金项目: 黑龙江省林业外来物种调查与研究 (KJZXSA2019031)。

作者简介: 杨晨星。研究方向: 资源植物保护与利用。E-mail: yanchenxing123@foxmail.com

* 通信作者: 穆立蔷, 教授, 博士。研究方向: 树木学及资源植物保护与利用。E-mail: mlq0417@163.com

此可以采用,不仅保存了优良性状,而且能在短时间内得到大量无菌苗。

在植物的组织培养过程中,无菌体系的建立是决定试验能否成功的关键。大岩桐全株密被绒毛,为消毒灭菌带来了困难。据报道,在组织培养中,单瓣大岩桐的叶片^[4-5]、叶柄^[6-7]、子叶^[8]、茎尖^[2,6]、茎段^[4,6,9-10]、根^[7]、下胚轴^[8]、花柄^[11]、重瓣大岩桐的叶片^[12-13]、嫩茎^[13]、茎尖^[14]都可以作为诱导增殖的外植体。因为叶片试验材料多,生根率更高^[15],大多数大岩桐组织培养都以叶片为首选外植体。目前有关大岩桐组织培养的研究大多集中在培养基的筛选^[4,16],组培苗的移栽^[1,6]以及试管花芽的分化^[17],几乎未发现有关其外植体消毒灭菌方法的研究。

外植体消毒灭菌效果的影响因素一般包括消毒剂的种类及消毒处理时间。在消毒剂种类的选择上,升汞应用最为广泛。郭丽^[16]、闫海霞等^[18]采用75%酒精浸泡10 s,再用0.1% HgCl₂消毒4~8 min的消毒方法,污染率约为30%;李建民^[19]、秦丽等^[20]增加75%酒精的处理时间为30 s,王秀英^[21]、杨凉花^[22]在此基础上增加了0.1%的处理时间,最长处理时间为12 min;尹智慧^[23]用75%酒精消毒30~60 s结合0.1%处理8 min的消毒方法。唐豆豆^[24]用75%酒精消毒30 s,结合0.1% HgCl₂消毒8 min达到最佳效果,污染率和成活率分别为32%和64%。谢羽^[25]用酒精联合NaClO对3种典型植物进行消毒,3种不同浓度(2%、5%、10%)的次氯酸钠处理下,污染率分别为89%、86%、79%,均没有达到良好的消毒效果。本试验通过分析消毒时间、不同消毒剂种类对大岩桐叶片消毒效果的影响,优选出最佳的消毒灭菌方法,以期为大岩桐的外植体消毒提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料大岩桐购买自哈尔滨花卉大市场,试验于2018—2019年在黑龙江省林业科学院组织培养实验室进行。

1.2 材 料 的 预 处 理

采集生长状态良好大岩桐的幼嫩叶片,在流水下冲洗,剪去叶柄,将叶片放在洗洁精水中浸泡3~5 min,再用软毛刷轻轻刷洗。将叶片包在无菌纱布中,悬挂流水下继续冲洗0.5 h。取出放在超净工作台上,紫外线灭菌30 min备用。

1.3 方 法

1.3.1 培养条件 以MS为基本培养基,添加蔗糖28 g·L⁻¹,琼脂5.5 g·L⁻¹,激素含量6-BA 1.0

mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹^[16,22],并经过预试验优化选出。培养温度为(25±2)℃,光照时间16 h·d⁻¹^[23],光照强度为1 500~2 000 lx^[26],pH调至5.8。

1.3.2 试验设计 先将备用试验材料用75%的酒精消毒,处理时间为10、30、60 s,用蒸馏水冲洗后再分别用不同消毒剂对叶片进行消毒处理。消毒剂种类为:0.1% HgCl₂溶液、5% NaClO溶液、10% H₂O₂溶液;处理时间为8、10、12 min。消毒后用无菌滤纸吸干叶片表面水分,用无菌刀片将叶片切成1 cm×1 cm的小块。取所有3因子所有水平之间的组合(表1),每种处理的接种数为3瓶,每瓶接种3个外植体,每个处理重复3次。

表1 消毒处理组合

Table 1 Disinfection treatment combination

处理	75%酒精 +0.1% HgCl ₂	处理	75%酒精 +5% NaClO	处理	75%酒精 +10% H ₂ O ₂
A ₁	10 s+8 min	B ₁	10 s+8 min	C ₁	10 s+8 min
A ₂	10 s+10 min	B ₂	10 s+10 min	C ₂	10 s+10 min
A ₃	10 s+12 min	B ₃	10 s+12 min	C ₃	10 s+12 min
A ₄	30 s+8 min	B ₄	30 s+8 min	C ₄	30 s+8 min
A ₅	30 s+10 min	B ₅	30 s+10 min	C ₅	30 s+10 min
A ₆	30 s+12 min	B ₆	30 s+12 min	C ₆	30 s+12 min
A ₇	60 s+8 min	B ₇	60 s+8 min	C ₇	60 s+8 min
A ₈	60 s+10 min	B ₈	60 s+10 min	C ₈	60 s+10 min
A ₉	60 s+12 min	B ₉	60 s+12 min	C ₉	60 s+12 min

1.3.3 测定指标 接种后定期观察外植体状态,记录污染开始的时间、长菌数、褐化数、处理长菌及褐化的外植体,防止交叉污染。25 d后统计分析各处理下的长菌率、褐化死亡率及存活率,确定大岩桐叶片的最佳消毒灭菌方法。

指标计算公式如下:

$$\text{长菌率} = \frac{\text{长菌的叶片数}}{\text{接种的总叶片数}} \times 100\%^{[27]}$$

$$\text{褐化} = \frac{\text{褐化的叶片数}}{\text{接种的总叶片数}} \times 100\%^{[27]}$$

$$\text{存活率} = \frac{\text{未长菌未褐化的叶片数}}{\text{接种的总叶片数}} \times 100\%^{[28]}$$

1.3.4 数据处理 试验数据采用Excel 2016和SPSS 19.0软件进行统计分析。用Duncan法分析酒精处理时间、消毒剂种类、消毒剂处理时间对大岩桐叶片外植体长菌率和褐化率的交互作用以及差异显著性影响($\alpha=0.05$)。用单因素方差分析分别分析消毒剂HgCl₂、NaClO和H₂O₂对大岩桐叶片的消毒灭菌的差异显著性($\alpha=0.05$)。用Excel 2016进行柱形图的绘制。所有测定结果用平均值和标准误差来表示。

2 结果与分析

2.1 HgCl₂ 对大岩桐叶片消毒效果的影响

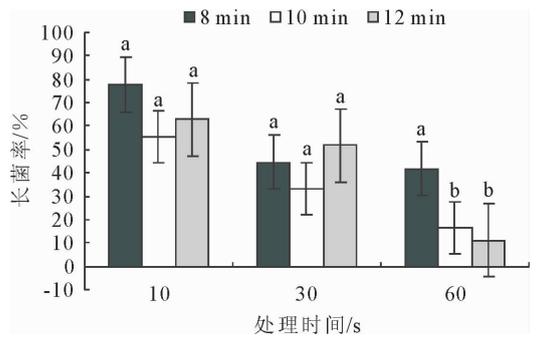
由图 1 和图 2 可知,当 HgCl₂ 处理时间一定时,叶片长菌率随着酒精处理时间的增加而下降。叶片褐化率随酒精处理时间的增加呈上升趋势。

酒精处理时间、消毒剂处理时间显著影响大岩桐叶片外植体长菌率($P < 0.05$),但二者的交互作用对长菌率影响差异不显著($P > 0.05$),说明二者交互作用对长菌率的影响要取决于酒精和消毒剂的处理时长;当酒精处理时间为 10 s 和 30 s 时,HgCl₂ 的处理时间对长菌率及褐化率影响差异不显著($P = > 0.05$)。随着 HgCl₂ 处理时间的增加,长菌率先下降后上升,褐化率呈上升趋势;当酒精处理时间为 60 s 时,HgCl₂ 的处理时间对长菌率影响差异显著($P = < 0.05$),对褐化率的影响差异极显著($P = < 0.01$)。当增加 HgCl₂ 的处理时长时,长菌率显著下降,但褐化率显著上升,当 HgCl₂ 处理时间为 12 min 时,叶片长菌率降至 11.11%,此时褐化率最高可达 85.18%。

综合长菌率和褐化率两方面,处理 A₅(表 1)对大岩桐叶片外植体的消毒灭菌效果最好,此时存活率为 51.86%。

2.2 NaClO 对大岩桐叶片消毒效果的影响

由图 3 和图 4 可知,当 NaClO 处理时间一定时,叶片长菌率及褐化率随前期酒精处理时间的增加没有明显的变化规律。



注:不同小写字母表示相同酒精处理时间不同消毒剂处理时间处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。

图 1 不同酒精处理时间下 HgCl₂ 对大岩桐叶片长菌率的影响

Fig. 1 Effects of HgCl₂ on the pollution rate of *Sinningia speciosa* leaves under different alcohol treatment time

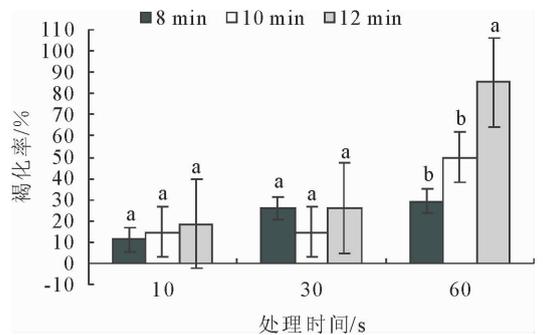


图 2 不同酒精处理时间下 HgCl₂ 对大岩桐叶片褐化率的影响

Fig. 2 Effects of HgCl₂ on the browning rate of *S. speciosa* leaves under different alcohol treatment time

表 2 不同酒精处理时间下 HgCl₂ 对大岩桐叶片生长状况的影响

Table 2 Effect of HgCl₂ on the growth of *S. speciosa* leaves under different alcohol treatment time

处理	长菌率	褐化率	死亡率	存活率
A1	77.78±7.86a	11.11±16.67a	88.89	11.11
A2	55.56±7.86a	14.82±29.39a	70.38	29.62
A3	62.96±10.31a	18.52±24.21a	81.48	18.52
A4	44.44±11.11a	25.93±12.14a	70.37	29.63
A5	33.33±9.62a	14.81±8.07a	48.14	51.86
A6	51.85±11.26a	25.93±12.14a	77.78	22.22
A7	41.67±11.26a	29.17±11.68b	70.84	29.16
A8	16.67±6.30b	50±12.60b	66.67	33.33
A9	11.11±5.56b	85.18±8.07a	96.29	3.71

当酒精处理时间为 10、30 s 时,NaClO 的处理时间对长菌率影响差异不显著($P > 0.05$),对褐化率影响不显著($P > 0.05$)。当酒精处理时间为 10 s 时,叶片长菌率较高,随着 NaClO 处理时间的增加,褐化率呈下降趋势;当前期酒精处理时间为 30 s 时,随着 NaClO 处理时间的增加,长菌率呈上升趋势,褐化率先下降后上升;当前期酒精处理时间为

60 s 时,NaClO 的处理时间对长菌率影响差异显著($P < 0.05$),对褐化率的影响差异不显著($P > 0.05$)。当增加 NaClO 的处理时长时,长菌率显著下降,褐化率先上升后下降。

综合长菌率和褐化率来看,处理 B₁(表 1)对大岩桐叶片外植体的消毒灭菌效果极差,死亡率达到了 100%;处理 B₅(表 1)对大岩桐叶片外植体的消

毒灭菌效果较好,此时存活率为 58.33%。

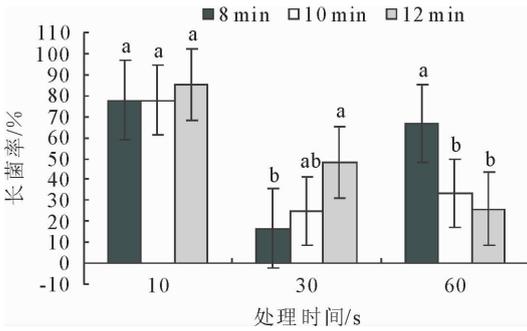


图 3 不同酒精处理时间下 NaClO 对大岩桐叶片长菌率的影响

Fig. 3 Effects of NaClO on the pollution rate of *S. speciosa* leaves under different alcohol treatment time

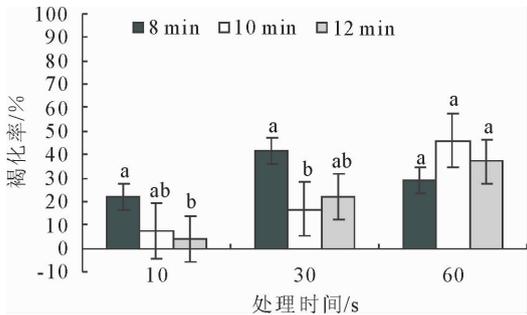


图 4 不同酒精处理时间下 NaClO 对大岩桐叶片褐化率的影响

Fig. 4 Effects of NaClO on the browning rate of *S. speciosa* leaves under different alcohol treatment time

表 3 不同酒精处理时间下 NaClO 对大岩桐叶片生长状况的影响

Table 3 Effects of NaClO on the growth of *S. speciosa* leaves under different alcohol treatment time %

处理	长菌率	褐化率	死亡率	存活率
B ₁	77.78±7.86a	22.22±7.86a	100	0
B ₂	77.78±9.62a	7.41±4.90ab	85.19	14.81
B ₃	85.18±9.80a	3.70±3.70b	88.88	11.12
B ₄	16.67±6.30b	41.67±8.33a	58.34	41.66
B ₅	25.00±8.33ab	16.67±6.30b	41.67	58.33
B ₆	48.15±12.56a	22.22±7.86ab	70.37	29.63
B ₇	66.67±8.91a	29.17±9.83a	95.84	4.16
B ₈	33.33±8.91b	45.83±10.80a	79.16	20.84
B ₉	25.92±10.80b	37.04±10.31a	62.96	37.04

2.3 H₂O₂ 对大岩桐叶片消毒效果的影响

由图 5 和图 6 可知,当 H₂O₂ 处理时间一定时,叶片长菌率及褐化率随前期酒精处理时间的增加没有明显的变化规律。

当前期酒精处理时间为 10 s 时,H₂O₂ 的处理时间对长菌率影响差异不显著(P>0.05),对褐化率影响显著(P<0.05)。随着 H₂O₂ 处理时间的增

加,长菌率呈上升趋势,褐化率先下降后上升;当前期酒精处理时间为 30 s 时,H₂O₂ 的处理时间对长菌率及褐化率影响差异极显著(P<0.01),随着 H₂O₂ 处理时间的增加,长菌率显著下降,褐化率显著上升;当前期酒精处理时间为 60 s 时,H₂O₂ 的处理时间对长菌率及褐化率影响差异不显著(P>0.05)。当 H₂O₂ 的处理时长增加时,长菌率先下降后上升,褐化率先上升后下降。

从长菌率和褐化率来看,处理 C₂ 情况下大岩桐叶片外植体的存活率较高,也仅达到 33.34%;且处理 C₆、C₇、C₈、C₉,这 4 种处理的外植体死亡率均达到 100%。说明当前期酒精处理时间为 10 s、30 s、60 s 时,H₂O₂ 是 3 种消毒剂中灭菌效果最差的一种。

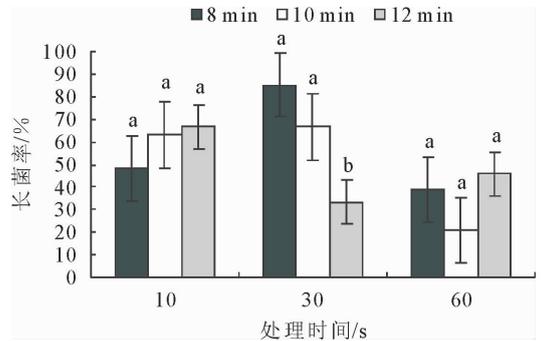


图 5 不同酒精处理时间下 H₂O₂ 对大岩桐叶片长菌率的影响

Fig. 5 Effects of H₂O₂ on the pollution rate of *S. speciosa* leaves under different alcohol treatment time

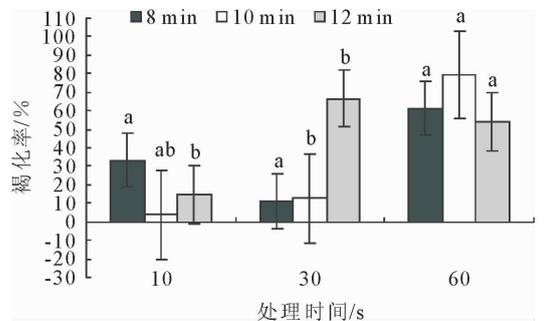


图 6 不同酒精处理时间下 H₂O₂ 对大岩桐叶片褐化率的影响

Fig. 6 Effects of H₂O₂ on the browning rate of *S. speciosa* leaves under different alcohol treatment time

3 结论与讨论

试验发现酒精处理时间对长菌率和褐化率影响很大。对同种植物,使用不同消毒剂进行消毒灭菌,达到最优消毒效果时,前期酒精处理时间不同。当用 75%酒精处理 60 s 时,增加 HgCl₂ 和 NaClO 处理时长都显著降低长菌率,提高褐化率,这与胡彦等^[29]

表4 不同酒精处理时间下 H₂O₂ 对大岩桐叶片生长状况的影响

Table 4 Effects of H₂O₂ on the growth of *S. speciosa* leaves under different alcohol treatment time %

处理	长菌率	褐化率	死亡率	存活率
C ₁	48.15±12.56a	33.33±9.62a	81.48	18.52
C ₂	62.96±8.69a	3.7±3.70ab	66.66	33.34
C ₃	66.67±11.11a	14.81±8.07b	81.48	18.52
C ₄	85.19±8.07a	11.11±5.56a	96.3	3.7
C ₅	66.67±10.91a	12.5±6.10b	79.17	20.83
C ₆	33.33±7.86b	66.67±7.86b	100	0
C ₇	38.89±10.24a	61.11±10.24a	100	0
C ₈	20.83±8.77a	79.17±8.77a	100	0
C ₉	45.83±6.10a	54.17±6.10a	100	0

表5 大岩桐叶片外植体长菌率和褐化率方差分析

Table 5 Anova of pollution rate and browning rate in leaf explants of *S. speciosa*

变异来源	自由度	长菌率/%	褐化率/%
A	2	<0.001	<0.001
B	2	0.188	0.034
C	2	0.020	0.053
A×B	4	<0.001	0.064
A×C	4	0.126	<0.001
B×C	4	0.757	0.035
A×B×C	8	<0.001	<0.001

注:A:酒精处理时间;B:消毒剂种类;C:消毒剂处理时间。

的研究结果一致。其中 0.1% HgCl₂ 处理 12 min 的平均长菌率比处理 8 min 低 30.56%, 但平均褐化率升高了 56.01%, 存活率也由 29.16% 降至 3.71%。当使用 H₂O₂ 处理时, 处理 C₄ 长菌率最高, 达到了 85.19%, 处理 C₆ 以及处理 C₇、C₈、C₉ 死亡率都达到了 100%。这可能是由于对于大岩桐叶片而言, H₂O₂ 的使用浓度偏高, 破坏了外植体表面细胞。由分析结果及对试验的观察记录可知, 当使用 H₂O₂ 消毒时, 长菌与褐化现象发生较早, 较其他两种消毒剂早 1~2 d, 且褐化现象较严重。相比而言, H₂O₂ 较不适宜于大岩桐叶片外植体的消毒。当使用 HgCl₂ 和 NaClO 消毒时, 外植体存活率峰值都在 75% 酒精处理 30 s 的组, 且存活率最高的消毒处理为处理 A₅ 以及处理 B₅, 两者的外植体存活率分别为 51.86% 和 58.33%, 是本试验中消毒效果最好的两个组合。

本试验大岩桐叶片外植体的消毒还未达到理想效果, 这可能是由于采用传统的消毒方法使得叶片表面绒毛阻碍了消毒剂与外植体的接触。为解决长菌率高这一问题, 可以考虑减压灭菌, 抽走植物组织中的气体使消毒剂更易与植物体接触。周俊辉^[30] 采用这一办法, 使植物组织污染率从对照的 93.3% 降低到 40.0%。另外高温高湿环境有利于细菌繁衍, 避免在

这种天气接种能在一定程度上降低长菌率。

本试验没有采取专门的降低褐化率的措施, 部分处理褐化率较高, 直接导致了外植体死亡率升高。李琰^[31]、徐耀华^[32]、季元祖等^[33] 发现在培养基中加入抗褐化剂能显著降低褐化率。符珍珠等^[33] 通过对组培褐变现象的研究发现, 提高过氧化物酶(POD)活性及降低多酚氧化酶(PPD)活性均能有效控制试管苗褐化。此外, 在培养初期进行暗培养处理, 有助于抑制褐化发生^[35-37]。

目前许多大岩桐的组培试验都是在前期酒精处理后直接采用一种消毒剂进行消毒。本试验根据前人的试验设计, 扩大了消毒方法的研究范围。将 75% 酒精的处理时间设置为 10、30、60 s, 将消毒剂的设置时间为 8、10、12 min, 消毒剂种类设置为 3 种, 分别为 0.1% HgCl₂、NaClO、H₂O₂, 提高了消毒灭菌的效率。但是消毒剂的种类和消毒时间对植物体的不同部位消毒效果不一样, 本试验没有就不同外植体进行比较, 这也是以后试验的研究方向。

参考文献:

- [1] 李发虎, 蔡永敏, 樊明寿, 等. 不同基质对大岩桐移栽成活率的影响研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 112-114.
- [2] 苏荣德, 刘丽荣, 张明伟, 等. 利用大岩桐腋芽诱导分化育苗技术研究[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2003, 5(3): 13-15.
- [3] 何惠英, 兰芹英. 大岩桐的繁殖方法[J]. 广西农业生物科学, 2003, 22(1): 35-36, 49.
- [4] 曹桂萍, 王建美. 大岩桐的组织培养与快速繁殖研究[J]. 山东农业科学, 2002(5): 16, 22.
- [5] 胡鑫, 徐全乐, 连续组织培养引起大岩桐再生植株的表型变化[J]. 西北农业学报, 2010, 19(5): 167-170.
HU X, XU Q L. Morphological variations of somaclone regenerated from series tissue culture of gloxinia[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(5): 167-170. (in Chinese)
- [6] 袁正仿, 孔令葆, 赵兴兵, 等. 大岩桐的组培快繁和温室栽培[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2001, 14(4): 456-458.
- [7] 张肯定. NAA 浓度对大岩桐叶柄和根外植体再生的影响[J]. 甘肃农业科技, 2010(6): 29-31.
- [8] PAEK K Y, HAN K R. Micropropagation of gloxinia(*Sinningia speciosa*) from hypocotyl and cotyledon segments and treatment of EMS and Colchicine on regenerated shoot tips[J]. J. Korean Soc. Hort. Sci., 1988, 29(2): 126-135.
- [9] 邵果园, 梁国鲁, 王力超, 等. 大岩桐快繁体系优化研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(4): 127-130.
SHAO G Y, LIANG G L, WANG L C, et al. Study on optimized system for rapid propagation in vitro of *Sinningia speciosa*[J]. Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 2007, 29(4): 127-130. (in Chinese)
- [10] 张耀华, 张慧英, 薛艳霞, 等. 大岩桐试管苗的快速繁殖[J]. 北方园艺, 2006(3): 128-129.
- [11] 胡章琼, 赵依杰, 秦建斌, 等. 大岩桐组培快繁技术[J]. 福建农

- 业科技,2005(1):22.
- [12] 任如意,赵金良,宗宪春,等.大岩桐叶片组织培养及其组织学观察[J].北方园艺,2008(6):183-185.
- [13] 朱苏文,马庆,刘康武.植物激素对大岩桐愈伤组织诱导和芽分化增殖的影响[J].激光生物学报,2006,15(4):394-398.
ZHU S W, MA Q, LIU K W. Effects of hormone on callus and bud differentiation of *Sinningia speciosa* [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2006, 15(4): 394-398. (in Chinese)
- [14] 唐伟斌.大岩桐组织培养与快繁技术研究[J].安徽农业科学,2005,8(1):14-18.
- [15] 张明哲,王利琳,叶丹,等.农杆菌介导的CFL(*Cucumber-FLO-LFY*)基因遗传转化大岩桐[J].农业生物技术学报,2011,19(3):455-461.
ZHANG M Z, WANG L, YE D, et al. Transformation of CFL (*Cucumber-FLO-LFY*) gene in gloxinia (*Sinningia speciosa*) mediated by agrobacterium tumefaciens [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2011, 19 (3): 455-461. (in Chinese)
- [16] 郭丽,朱飞雪,贾文庆.大岩桐高频再生体系的研究[J].江苏农业科学,2015,43(5):51-53.
- [17] 董璐,李青.大岩桐试管花芽分化与开花影响因素[J].东北林业大学学报,2015,43(9):34-40.
DONG L, LI Q. Influence factors of floral bud differentiation and *in vitro* flowering of *Sinningia speciosa* [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2015(9): 34-40. (in Chinese)
- [18] 闫海霞,蒋月喜,何荆洲,等.重瓣大岩桐离体培养的两种途径[J].江西农业学报,2016,28(11).
YAN H X, JIANG Y X, HE J Z, et al. Two pathways for isolated culture of *Sinningia speciosa* [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2016, 28(11). (in Chinese)
- [19] 李建民,文清成,吕守成,等.大岩桐的组培快繁及其产业化技术研究[J].北方园艺,2011(4):153-154.
- [20] 秦丽,胡雪梅,廖青,等.植物大岩桐(*Sinningia speciosa*)组织培养体系的建立和优化[J].新疆农业科学,2007,44(3):336-339.
- [21] 王秀英,张大惠.重瓣大岩桐组织培养[J].黑龙江农业科学,2009(3):11-12.
- [22] 杨凉花.大岩桐的组培快繁和驯化移栽[J].陕西农业科学,2013,59(1):36-37.
- [23] 尹智慧,宋丽莉,司亮,等.大岩桐叶片再生体系的建立及卡那霉素敏感性研究[J].北方园艺,2013(10):100-102.
- [24] 唐豆豆,李厚华,张延龙, et al. '凤丹'牡丹组织培养研究[J].西北林学院学报,2016,31(2):160-166.
TANG D D, LI H H, ZHANG Y L, et al. Studies on tissue culture of *Paeonia ostii* 'Feng Dan' [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(2): 160-166. (in Chinese)
- [25] 谢羽,夏凯,黎敏,等.不同类被子植物组培快繁及其消毒方式的影响[J].分子植物育种,2017,15(3):255-260.
XIE Y, XIA K, LI M, WU C L. Effects of different angiosperms on callus induction and sterilization methods research [J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(3): 255-260. (in Chinese)
- [26] 李玉梅,马强.组织培养中培养条件对培养物的影响[J].北方园艺,2001(6):35-36.
- [27] 李响,郭晋平,张芸香,杜仲带芽茎段诱导和分化的组培体系优化[J].北方园艺,2019(5):38-44.
- [28] 杜连彩[1].马铃薯芽外植体消毒灭菌试验研究[J].种子,2014,33(10):78-80.
DU L C. Experimental study on sterilization effect of bud explants of potato [J]. Seed, 2014, 33(10): 78-80. (in Chinese)
- [29] 胡彦,赵艳.植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题[J].陕西师范大学学报:自然科学版,2004(Supp. 1):130-134.
HU Y, ZHAO Y. Application of tissue culture and the problem during tissue culture [J]. Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition, 2004 (Supp. 1): 130-134. (in Chinese)
- [30] 周俊辉,周厚高,刘花全.植物组织培养中的内生细菌污染问题[J].广西植物,2003,23(1):41-47.
- [31] 李琰,冯俊涛,王永宏,等.抗褐变剂对雷公藤愈伤组织生长和次生代谢产物含量的影响[J].武汉植物学研究,2010,28(2):224-228.
LI Y, FENG J T, WANG Y H, et al. Effects of browning inhibitors on callus growth and secondary metabolites production in *Tripterygium wilfordii* Hook f [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2010, 28(2): 224-228. (in Chinese)
- [32] 徐耀华,杨春华,刘晓波,等.扁穗牛鞭草组织培养中褐化控制技术初探[J].草业科学,2013,30(2):212-217.
- [33] 季元祖,雷颖,李晓玲, et al. 唐古特瑞香愈伤组织培养与再生体系建立[J].西北林学院学报,2018,33(6):100-105.
JI Y Z, LEI Y, LI X L, et al. Establishment of the tissue culture and regeneration system of *Daphne tangutica* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2018, 33(6): 100-105. (in Chinese)
- [34] 符真珠,陈静,徐盼盼,何松林,王政.牡丹组培褐变与总酚含量及相关酶活性的关系[J].西北林学院学报,2011,26(6):66-69.
FU Z Z, CHEN J, XU P P, et al. Relationship between tissue browning and the contents of phenolics and related enzymes activity in *Paeonia suffruticosa* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(6): 66-69. (in Chinese)
- [35] 陈菲,李黎,宫伟.植物组织培养的防褐化探讨[J].北方园艺,2005(2):69-69.
- [36] 赵伶俐,葛红,范崇辉,等.不同光照强度对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响[J].北方园艺,2006(4):160-161.
- [37] 梁春辉,闫晓冬,黄敏,等.降低卷丹百合组培褐变技术研究[J].亚热带植物科学,2017,46(2):122-125.
LIANG C H, YAN X D, HUANG M, et al. Techniques of reducing tissue culture browning of *Lilium lancifolium* [J]. Subtropical Plant Science, 2017, 46(2): 122-125. (in Chinese)