

药用植物组织培养研究进展

刘晓鹏^{1,2}, 王 锋¹, 赵黎明², 王道才¹, 姜 宁^{1,2*}

(1.湖北民族大学 生物科学与技术学院 湖北 恩施 445000;

2.生物资源保护与利用湖北省重点实验室(湖北民族大学) 湖北 恩施 445000)

摘要: 药用植物是中药的重要组成部分,我国对药用植物的需求量非常巨大.组织培养是对传统药用植物繁殖方法的突破,它能使有性繁殖成活率低或不能有性繁殖的药用植物繁育出新的植株,且不受时间的限制和空间的约束;为药用植物的规模化和标准化生产提供资源种苗,防止品种退化且优化品种;可以保存濒危药用植物种质资源、防止物种灭绝、保护生物的多样性.本文综述了药用植物组织培养快速繁殖及珍稀濒危药用植物组培研究现状,讨论了药用组织培养的未来发展方向及应用意义.

关键词: 药用植物; 快速繁殖; 组织培养; 濒危药用植物

中图分类号: Q813.1

文献标志码: A

Advances of Tissue Culture of Medicinal Plants

LIU Xiaopeng^{1,2}, WANG Feng¹, ZHAO Liming², WANG Daocai¹, JIANG Ning^{1,2*}

(1.School of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

2.Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization(Hubei Minzu University), Enshi 445000, China)

Abstract: Medicinal plants are an important part of traditional Chinese medicine and the demand for medicinal plants in our country is tremendous. Tissue culture is a breakthrough in the traditional propagation of medicinal plants, which enables medicinal plants with low or no sexual reproduction to breed new plants without the restriction of time and space. It can provide resource seedlings for large-scale and standardized production of medicinal plants to prevent variety degradation and optimize varieties, preserve endangered medicinal plant germplasm resources, and prevent species extinction, as well as to protect biodiversity. This article summarized the current situation of rapid propagation of medicinal plants, tissue culture of rare and endangered medicinal plants, and discussed the development direction and application significance of medicinal tissue culture.

Key words: medicinal plants; rapid propagation; tissue culture; endangered medicinal plants

我国是药材大国,药用植物资源有 383 科 2 309 属 11 146 种^[1].药用植物资源主要来自野生和栽培,野生药用植物的质量、疗效等方面要优于栽培,倍受消费者青睐,也使得野生药用植物被大量消耗,致使野生药用植物资源日趋减少,价格节节攀升,特别是野生珍稀濒危药用植物.药用植物在栽培过程中会出现很多问题,如品质退化、种子带病、农药残留、栽培年限长和栽培成本高等.从而使得药用植物中有效成分与活性物质发生改变,很大程度影响中药材药效^[2].

自从 Haberlandt 提出植物细胞具有全能性之后,植物组织培养得到迅猛发展^[3-4].植物组织培养技术在选择材料、外置体消毒、培养基选择、愈伤组织诱导、初代培养、继代培养、分离鉴定等方面都日趋完善和成熟.药用植物组织培养具有产量高、质量好、成本低、繁殖系数高和保护珍稀濒危药用植物资源^[5]等特点.因此药用植物组织培养研究、开发和利用具有广阔前景和应用价值.本文对药用植物快速繁殖的相关研究和濒危药用植物组织培养研究现状进行综述,以期更加合理地利用和保护药用植物资源.

收稿日期: 2019-01-18.

基金项目: 国家自然科学基金项目(81460573); 湖北省技术创新专项(2017AKB077; 2017ABA139; 2016AKB058); 2016 年湖北省中央引导地方科技发展专项资金项目(2016055); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI04B04-5); 湖北民族学院青年科研基金项目(MY2017Q022); 2014 年度湖北省本科高校“专业综合改革”试点项目(2014029); 2017 年湖北民族学院研究生院研究生创新计划项目(201718).

作者简介: 刘晓鹏(1971-) 男,博士,教授,主要从事天然产物方面的研究;* 通信作者: 姜宁(1968-) 女,博士,副教授,主要从事天然产物方面的研究.

1 药用植物快速繁殖研究

药用植物的快速繁殖是利用组织培养在短时间内繁殖大量药用植物.它最大特点就是药材繁殖速度快,生长周期短,并且不受季节、气候、自然灾害等因素的影响.利用快速繁殖技术可以解决药用植物材料短缺和农药及重金属污染等问题.

1.1 药用植物快速繁殖关键技术

1.1.1 无菌体系的建立 建立无菌体系需要对培养基、外植体、消毒方式等方面进行选择.雒晓芳^[6]对药用植物当归进行的组织培养研究.发现温室材料比野外采摘的材料更容易获得无菌体系;在生长旺盛的季节做组织培养容易污染;在减少污染时用不同类型消毒药剂配合使用效果会更好.彭向前等^[7]研究了山东道地药用植物高唐栝楼的组织培养.外植体用高唐栝楼茎尖,茎尖不经过愈伤组织比经过愈伤组织生根发芽要快,在高唐栝楼快速繁殖体系过程中解决了高唐栝楼以种子繁育雌雄比例不协调的问题.

郝梦洁等^[8]建立了芦蒿的高效再生体系.芦蒿顶端嫩茎经自来水冲洗、70%酒精速蘸、0.1%升汞消毒、蒸馏水冲洗,最后筛选出了未被污染的无菌苗.陈海军等^[9]建立了黑果枸杞的组织培养和再生体系.外植体选用黑果枸杞的种子,用 8%的次氯酸钠消毒 7 min,无菌水清洗 2 次,再用 75%酒精消毒 2 min,最后接种到 MS 培养基中,从而建立了黑果枸杞的快繁体系.刘显峰^[10]建立了刺山柑组织培养快速繁殖体系.刺山柑嫩枝经 70%酒精浸泡 10 s、无菌水冲洗、0.1%的 HgCl_2 溶液消毒、无菌水冲洗,筛选出了未被污染的无菌苗,建立了刺山柑离体培养无菌体系.

1.1.2 继代增殖培养 继代增殖培养是为了进一步提高药用植物繁殖系数.继代增殖受营养、激素、pH、温度和光照等培养条件影响.特别是 NAA 在继代增殖培养过程中起到明显的作用^[10].李小艳等^[11]对黑果枸杞进行快速繁殖技术研究.继代增殖培养使用 MS 培养基加入 0.7%的琼脂和 3%的蔗糖进行培养,不需要加入任何激素.培养体系的增殖系数最大,没有添加激素的原因可能是黑果枸杞对激素需求较少,在增殖培养过程中加入激素不利于植株生长,反而具有抑制作用,所以选择不添加激素.

衡静等^[12]进行了红金银花茎段愈伤组织的诱导研究.不同的激素和浓度条件对愈伤组织增殖培养具有不同的影响效果.愈伤组织在 $\text{MS}+6\text{-BA}(1.5\text{ mg/L})+\text{NAA}(0.4\text{ mg/L})+\text{KT}(0.1\text{ mg/L})$ 培养基条件下,其愈伤组织增殖倍数最高,可达 90%.李慧等^[13]研究了皱叶酸模的愈伤组织培养.皱叶酸模在继代培养过程中 6-BA 和 2,4-D 两种激素的搭配是最理想的,两种激素的搭配可以使愈伤组织的生长速度快、颜色嫩绿、质地疏松.

1.1.3 生根培养 生根培养是组织培养中不可缺少的一步,尤其对于根部作为入药成分的药用植物,需诱导生根才能具有药用价值.李梓欣等^[14]进行了枸杞离体快速繁殖研究.植物激素 NAA 对生根起到显著作用,NAA 能促进生根和促进细胞分裂与扩大,从而在诱导愈伤组织形成不定根过程中具有明显促进作用.当培养基中加入 NAA 0.5 mg/L 和 6-BA 1.5 mg/L 时是生根培养最佳培养条件,生根数量多,根系密集.

蔡时可等^[15]进行了独脚金离体培养与快速繁殖研究.IBA 和 NAA 都能够诱导生根,但是两者配合使用可以提高无菌苗根的数量和质量,并且能使根的大小和长度一致.李君等^[16]建立了树莓组织培养快繁体系.生根培养条件是 $1/2\text{ MS}+6\text{-BA} 0.5\text{ mg/L}+3\%\text{蔗糖}+0.8\%\text{琼脂}$,该条件下无菌苗的生根率达到 91%,平均根长为 3.0 cm,平均根条数为 3.8 个,有效的提高了无菌苗的生根质量.牛倩等^[17]进行颖半夏的快速繁殖优化研究.颖半夏最佳生根培养基为 $1/2\text{ MS}+\text{NAA} 0.2\text{ mg/L}+\text{PP}_{333} 0.2\text{ mg/L}$.药用植物在生根过程中,因为营养成分的制约,使得根长与根数通常呈现反比关系,所以在生根培养基的优化过程中,根据根数还是根的长度作为考察指标,要根据具体情况,加以综合考虑.

1.1.4 炼苗移栽 炼苗移栽是药用植物快速繁殖的重要阶段.闫晓红等^[18]研究了玫瑰组织培养与快繁技术.炼苗选择生长良好的玫瑰组织植株,移栽前将试管苗移至大棚、遮阴,适应一段时间后再打开瓶盖,加入适量的水至瓶中炼苗一段时间,使其适应大棚的环境;移栽时将培养基洗净;无菌苗根系浸蘸适量的 IBA 溶液,移栽的成活率能明显提高.李蕾等^[19]对鼓槌石斛进行组培苗移栽.鼓槌石斛的炼苗期为 7 d 效果最好,春季移栽将组培瓶放在大棚 10 d 最好,秋季移栽是放在大棚 7 d 为宜.合理的栽培管理条件可以使组培苗在移栽过程中具有更高的成活率.肖雅等^[20]进行了黄精组培苗移栽技术研究.黄精组培苗移栽和季节无关,有根的组培苗才能够存活.根据黄精的生态习性,选择的培养环境既需要透气性,也需要保湿性,从而栽培基质应

土质疏松、透气、保湿,才有利于黄精组培苗的移栽生长。

1.2 药用植物快速繁殖存在的问题和解决方案

1.2.1 污染 污染是植物培养过程中经常遇到的困难,污染对于药用植物往往具有破坏性,越到生长后期苗木较大时越难控制,群落感染和片区感染的频率较大,并且污染也加重了组培苗生产的难度,延长生产周期,加大直接成本^[21]。污染有内源性的,也有外源性的,内源性的包括植物体内自生的微生物,一般是不能够通过外在的消毒方式将其消灭,外源性的包括空气中的微生物,外源性的污染是可以过不同的灭菌方法来消除的,如通过不同消毒剂交叉灭菌和严格遵守组培操作规范等^[22]。利用抗菌药物也可以防治组织培养中的一些污染问题,但需要根据污染的种类选择不同的抗菌药物及使用浓度,针对不同的实验材料选择最适合的抗菌素才能更好的控制组培苗的污染,注意抗菌药物可能会影响药用植物的生长^[23]。

1.2.2 褐变 褐变是药用植物组织培养中影响植物正常生长的现象,很多中药材植物在培养中都可能发生褐变,在木本药用植物的组织培养中比较严重^[24]。褐变的原因有酶促褐变和非酶促褐变,酶促褐变是由药用植物组织中细胞代谢过程产生的多酚氧化酶的活化引起的,影响酶促褐变的因素有植物的种类及基因型,培养基的成分及培养条件,外植体的生长部位、生理状态及愈伤组织的繁殖方法等^[25]。非酶促褐变是由细胞程序化死亡导致^[26]和细胞中的氧化类物质无关,细胞程序化死亡有可能是自然发生的,也有可能是在不利的环境条件下发生的。

在药用植物组织培养中应尽量减少材料的褐变程度,可从选择适宜的外植体、降低培养基中的无机盐成分、调整植物生长技术浓度、适当降低环境温度、连续转移和使用抗氧化剂等方面入手,实际操作时通过降低酶活性、改变酶作用条件、和阻断与氧的接触等^[27]。在培养基中加入柠檬酸、抗坏血酸、硫代硫酸钠、半胱氨酸、谷胱甘肽、活性炭或聚乙烯吡咯烷酮等抗氧化剂和吸附剂能够有效的减少褐变^[28-29]。张红兵等^[30]通过在培养基中添加一定量的活性炭或维生素 C 来抑制褐变,活性炭的吸附作用、维生素 C 的还原作用都可以防止褐变,愈伤组织诱导的过程中,外植体先在黑暗条件下培养一段时间后将转移至新鲜培养基中,并及时地继代转移,可以有效的缓解褐化^[31]。蔗糖浓度也会影响褐变,蔗糖浓度越高,药用植物的生长越弱,褐变现象也越严重^[32]。

1.2.3 玻璃化 玻璃化是试管苗的外观呈半透明状,这是过度水合的现象,是植物组织培养过程中特有的生理病变或失调,解决药用植物的玻璃化也是组织培养中需要解决的难题,提高蔗糖含量或加入渗透剂、提高光照强度、选用灰量低的琼脂粉、降低细胞分裂素和赤霉素的浓度均可降低玻璃化程度^[33]。陈瑞芳^[34]研究马蓝的玻璃化防治措施,发现 6-BA 的浓度越高玻璃化越严重,蔗糖和琼脂高浓度对玻璃化有抑制效果,pH 值为 5.8 时玻璃化抑制效果最好,组织培养的规范操作方法也能降低玻璃化现象。

于永梅等^[35]对蓝莓的玻璃化进行防止措施研究,发现适量增加无机营养成分、减少氮素含量,添加适当琼脂和蔗糖,细胞分裂素浓度适当降低,增加自然光照和控制光照时间可以防止玻璃化。鲍庆晗等^[36]进行百合玻璃化试管苗的生理生化特性及其调控研究,通过对不同激素变化的研究,发现可能与 6-BA 有关,因此适当的 6-BA 含量能够一定程度上降低玻璃化苗。韩淑兰等^[37]进行了降低黄芩再生苗玻璃化率的研究,6-BA 的浓度较低时玻璃化率会降低,提高蔗糖含量可以降低玻璃化率,将多效唑加入到培养基中可以缓解玻璃化状态。刘庚伟^[31]研究了激素对翅果油树植株组织培养的玻璃化的影响,组培过程中培养温度越低,玻璃化程度会越轻,GA3 的含量越高玻璃化的产生也越严重。

1.2.4 遗传稳定性 愈伤组织在诱导过程中细胞需要经过分化和脱分化的过程,而分化和脱分化的过程中会出现一些细胞变异的现象,从而导致了植株遗传物质的不稳定性,影响到药用植物的特性。黄放^[38]进行了鱼腥草快繁体系的建立及其遗传稳定性研究,鱼腥草在组织培养过程中遗传物质具有良好的稳定性,在形态上栽培苗和组培苗基本相同,在体细胞上组培苗和栽培苗无差异,通过分子水平检测组培苗与栽培苗差异比较小,有一些突变但是突变的频率很低、遗传物质发生改变的程度很小。王启业^[39]对铁皮石斛进行组织培养再生植株及遗传稳定性分析,用 RAPD 分子标记技术对铁皮石斛进行组培苗的遗传稳定性分析,再生植株在组培过程中相对于野生植株在 DNA 水平上发生了一定的变异,不同再生组培苗中也同样存在一定的变异。

药用植物快繁过程中可通过体细胞增殖、减少继代培养次数、培养基的定期更换、使用低激素浓度、减少培养基中产生诱变的化学物质等方法来保持遗传物质的稳定性^[40]。李进进等^[41]发现 AgNO₃ 在铁皮石斛组织培养中具有一定抗衰老作用,硝酸银不仅抑制了乙烯的产生,而且提高了铁皮石斛原球茎的增殖率和芽分

化效率,还能促进种苗的生长,提高移栽成活率.硝酸银在铁皮石斛组织培养中具有抗衰老作用和良好的遗传稳定性.

2 濒危药用植物组织培养研究

2.1 濒危药用植物组织培养研究概况

由于生态环境的不断恶化和人类对药用植物的大量运用,许多的药用植物受到严重的破坏,有很多已经濒临灭绝.中国科学院植物研究所 2013 年版的《中国植物红皮书》第一卷中,共收录了 388 种国产珍稀濒危野生植物,其中我国濒危药用植物有 46 种^[42].

药用植物种类较多,所涉及的科目广,在草本、木本、藤本植物中都普遍存在,濒危药用植物体细胞中含有较多的生物活性成分,很多药用活性成分易导致植物材料褐化,组织培养难度较大.经过长期的组织培养研究,目前濒危药用植物的组织培养已取得一定成就^[43],在百合科^[44]、五加科^[45]、石竹科^[46]、杜仲科^[47]、木兰科^[48]、蝶形花科^[49]等科属中已有部分濒危药用植物实现组织培养快速繁殖.

2.2 影响濒危药用植物组织培养的主要因子

2.2.1 外植体 外植体类型是濒危药用植物组织培养的重要影响因子之一.席培宇等^[50]用金铁锁幼嫩茎段作为外植体进行组织培养.金铁锁幼嫩茎段经过不定芽诱导、不定芽增殖和不定根诱导建立了简便、安全、高效的金铁锁不定根培养体系.刘庚伟^[31]比较了不同外植体不定芽分化能力.生长良好的种子萌发无菌苗,切取上胚轴、下胚轴、叶柄、叶脉为外植体,上胚轴为最适外植体,不定芽分化率为 92.6%,玻璃化和褐化程度都较低.

李温平等^[51]用黄精叶钩吻的叶片、叶柄、茎、花瓣和花柄为外植体,研究不同外植体对愈伤组织诱导的影响.黄精叶钩吻的五种外植体都能够诱导出愈伤组织,茎诱导愈伤组织数量最多,也是愈伤组织诱导率最高的.在两端切口处形成绿色大块的愈伤组织.杨艳娟等^[52]用铁锁幼茎和叶片为外植体进行组织培养.组培过程中切口处愈伤组织开始膨胀,然后乳白色愈伤组织生长,最后愈伤组织逐渐覆盖住切口.曹磊等^[46]以带芽茎段为材料诱导愈伤组织分化.带芽茎段在其节上休眠芽萌发后,基部可产生质地紧密、再分化能力极强的愈伤组织.

宋玉霞等^[53]研究了肉苁蓉的组织培养.外植体选择肉苁蓉肉质茎的维管组织,选择该处外植体是愈伤组织诱导时间最短、分化的数量最多、诱导率最高、组织状态最好.黄芳等^[54]研究了荷叶铁线蕨的组织培养与快速繁殖.以荷叶铁线蕨成熟孢子为外植体.经过一系列消毒后,将孢子接种在孢子萌发培养基上.孢子能够很好的萌发生长出原叶体,并且原叶体簇生成团.

2.2.2 培养基 培养基为植物提供吸收所需要的各种物质,不同药用植物所需要营养成分不尽相同,因此选择适合培养基是非常重要的.孙丹等^[55]对影响平贝母愈伤组织生长诸因素研究.研究发现 MS 培养基最适合平贝母愈伤组织培养,其次是 B5 培养基.White、LS 和 N6 培养基是最不适合平贝母愈伤组织培养的培养基.

吕梅^[56]对比了 MS 培养基和 B5 培养基对甾子三尖杉的愈伤诱导的影响.发现 MS 培养基接种一段时间后叶的表面有不均匀的颗粒愈伤长出.用 B5 培养基的嫩叶,颜色变成深绿色,没有愈伤生成,该结果表明 B5 培养基不适宜甾子三尖杉的愈伤诱导.李小泉等^[57]研究不同培养基对濒危药用植物地枫皮的组织培养.在筛选 6 种培养基的过程中不同培养基中芽的长势、芽数均有很大区别.MS 培养基中的芽壮,数量多,但 VW 培养基中的芽细,数量很少.不同培养基中芽的长势从壮到弱顺序为:MS>ER>B5>N6>N68>VW.陈碧华等^[58]研究了不同培养基对降香黄檀外植体诱导和继代增殖的影响.在外植体诱导过程中用改良 DCR(增加 KNO_3 460 mg/L)诱导愈伤组织最好,继代培养过程中用 MS1 能生长正常,无褐化或极少数褐化,增殖率也最高.

2.2.3 激素 外源激素的种类、浓度和比例是植物组织培养中最重要的因素之一.保持激素比例适中时,则会继续保持原有结构的愈伤组织形态^[57].胡刚^[59]研究不同浓度的 6-BA 和 NAA 的配比对半枫荷外植体诱导和诱导丛生芽的影响.NAA 浓度的增加外植体愈伤组织诱导率会随之增加.丛生芽的增殖系数会随着 6-BA 浓度增加而提高,但是随着 6-BA 浓度增加生长出来的丛生芽易破碎,有效芽几乎不能分离出来.杨艳娟等^[52]对药用植物金铁锁进行组织培养研究.研究中发现 2,4-D 对于愈伤组织诱导和生长要比 6-BA 和 IAA 显著.6-BA 和 IAA 对愈伤组织诱导和生长有一定影响效果,适宜浓度 6-BA 和 IAA 的配比可以明显促

进金铁锁愈伤组织的增值.黄芳等^[54]研究了荷叶铁线蕨的组织培养与快速繁殖.荷叶铁线蕨在含有2,4-D培养基上愈伤组织为块状、颗粒状,白色,在含有KT的培养基上愈伤组织为颗粒状,黄绿色,在同时添加了KT和NAA培养基中愈伤组织的诱导效果最佳.王建华等^[60]探讨了不同激素对人参组织培养的影响.2,4-D对愈伤组织诱导影响最大,而BA对不定芽的生长影响最大,激素的浓度不同对组织培养过程中的影响程度也不相同.因此激素对濒危药用植物组织培养有至关重要的作用.

2.2.4 环境条件 光照、温度、pH等环境因素能明显的影响濒危植物组培效果.吕梅^[56]对比了光暗培养对薹子三尖杉愈伤组织的影响.光照培养愈伤组织诱导率要高于暗培养条件,而在暗培养条件下愈伤组织的发生时间较光照培养要早.光照培养的愈伤组织颜色鲜绿,愈伤组织膨胀水润,而暗培养愈伤组织颜色暗黄,仅有较小愈伤颗粒,外植体干皱.张红梅^[61]对药用植物翅果油树进行组织培养研究.暗培养对愈伤组织诱导过程中可以明显提高诱导速率,但是诱导出愈伤组织质量低,并且也极易褐化.光培养对愈伤组织诱导较慢,但是诱导出来的愈伤组织质量高,且不易褐化.所以暗培养对愈伤组织脱分化有明显提高,而光培养则是在愈伤组织继续生长有显著效果.

3 展望

药用植物组织培养是对传统药用植物繁殖方法的突破,为药用植物无性繁殖拓展了一个新的天地,可以使有性繁殖低或不能有性繁殖的药用植物在组培过程中繁育出新的植株,并且不受时间限制和空间约束.可以为药用植物规模化 and 标准化生产提供资源种苗,防止品种退化且优化品种.可以保存濒危药用植物种质资源,防止物种灭绝、保护生物多样性.

目前不少药用植物中都建立了相应的组织快繁体系,但对于药用植物组织培养过程中不同的培养因素对植物有效药用成分的影响研究的不多,今后在药用植物组织培养中要在培养阶段就紧密的和药用价值相结合,根据其药用价值的高效性来建立植物的组织培养快速繁殖体系.使用组织培养、多倍体诱导等技术快速繁殖优良种质药用植物;濒危药用植物有效成分通过植物生物反应器生产,或通过生物转化、酶促反应生产药物是药用植物组织培养的发展方向.

参考文献:

- [1] 王英伟.中国药用植物资源的开发与利用[J].林业勘查设计,2017(1):16-17.
- [2] 程茂高,乔卿梅,李先芳.药用仿野生栽培研究进展[J].郑州牧业工程高等专科学校学报,2015,35(3):12-14.
- [3] 李黎,陈菲,宫伟.药用植物组织培养的研究进展[J].林业科技情报,2005,37(1):6-8.
- [4] 于岩.植物组织培养生产药物研究进展[J].江西农业,2018(6):119.
- [5] 王纪华,赵冬梅.药用植物组织和细胞培养生产药物及色素研究进展[J].特产研究,1991(1):28-29.
- [6] 雒晓芳.药用植物当归的组织培养研究[D].兰州:西北师范大学,2005.
- [7] 彭向前,李光勇,刘辉,等.高唐栝楼茎尖分生组织培养与快速繁殖技术研究[J].安徽农业科学,2018,46(25):81-83.
- [8] 郝梦洁,石岭,张东辉,等.芦蒿高效再生体系建立的研究[J].内蒙古农业大学学报(自然科学版),2016,37(2):17-22.
- [9] 陈海军,刘嘉伟,李佳,等.黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)组织培养与再生体系的建立[J].内蒙古农业大学学报(自然科学版),2018,39(4):14-23.
- [10] 刘显峰.刺山柑组织培养快速繁殖及RAPD分析[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2010.
- [11] 李小艳,王梅,段鹏慧,等.黑果枸杞的组织培养快速繁殖技术[J].贵州农业科学,2017,45(6):12-14.
- [12] 衡静,韩春叶,王明山,等.红金银花茎段愈伤组织的诱导[J].北方园艺,2018(19):94-99.
- [13] 李慧,夏鸿飞,王晓旭,等.皱叶酸模愈伤组织培养及其大黄素的分析[J].延边大学学报(自然科学版),2012,38(4):296-300.
- [14] 李梓欣,孙萌,何橙,等.枸杞离体快速繁殖技术研究及蛋白质含量测定[J].山东化工,2018,47(10):47-50.
- [15] 蔡时可,魏杰,李战超,等.独脚金离体培养与快速繁殖[J].亚热带植物科学,2017,46(4):375-378.
- [16] 李君.树莓组织培养快繁体系的建立[D].泰安:山东农业大学,2017.
- [17] 牛倩,郭伟娜,黄和平.道地中药藜半夏组培快繁优化研究[J].中药材,2017,40(8):1777-1779.
- [18] 闫晓红,李红梅,舒永宏.玫瑰组织培养与快繁技术试验研究[J].中国园艺文摘,2011,27(9):32-33.
- [19] 李蕾,刘伟.鼓槌石斛组培苗移栽试验[J].安徽农学通报,2018,24(Z1):63-64.
- [20] 肖雅,雷艳,麻琼方,等.黄精组培苗移栽技术研究[J].现代农业科技,2018(2):57-59.
- [21] 张朕,马艳丽.植物组织培养中污染防控方法研究[J].山西农经,2018(1):66-67.
- [22] 白荣芬.刺五加组培苗生产中存在的问题与建议[J].辽宁林业科技,2016(3):43-45.
- [23] 张维民.石斛兰生根培养过程污染的控制研究[J].广西农业科学,2005,36(2):113-114.

- [24] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986.
- [25] 陈惠娟.植物组织培养中褐变的产生机理及克服措施[J].植物保护,2005,31(2):79-82.
- [26] 罗阳春,杨云,李仕伟,等.组织培养中植物外植体及愈伤组织褐变的研究进展[J].贵州农业科学,2018,46(1):5-10.
- [27] 戴莹,杨世海,赵鸿峥,等.药用植物组织培养中褐化现象的研究进展[J].中草药,2016,47(2):344-351.
- [28] 孙姿.夏蜡梅组织培养技术研究[D].南京:南京林业大学,2015.
- [29] 吴瑕,姜继龙,刘芳,等.降低沙棘组培过程中外植体褐化的研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2009,21(5):10-13.
- [30] 张红兵,武芸,刘金龙,等.铁皮石斛茎段组培快繁体系的改良研究[J].湖北民族学院学报(自然科学版),2011,29(3):282-284.
- [31] 刘庚伟.翅果油树植株再生体系的优化[D].临汾:山西师范大学,2010.
- [32] 喻娜,罗开秀,向丹,等.银杏茎尖无菌接种条件的优化[J].分子植物育种,2018,16(11):3661-3665.
- [33] 马吉义.暗紫贝母组织培养和快速繁殖的研究[D].西宁:青海师范大学,2011.
- [34] 陈瑞芳.马蓝组织培养技术及玻璃化防治措施研究[D].福州:福建农林大学,2013.
- [35] 于永梅,王冰,余海英,等.蓝莓组织培养中污染褐变玻璃化的防止措施[J].现代农业科技,2018(10):105-106.
- [36] 鲍庆晗,赵一欣,明玥彤,等.百合玻璃化试管苗的生理生化特性及其调控[J].江苏农业科学,2016,44(12):104-107.
- [37] 韩淑兰,王慧梅,张丹.降低黄芩再生苗玻璃化率及其生根的研究[J].植物研究,2016,36(1):90-96.
- [38] 黄放.鱼腥草快繁体系的建立及其遗传稳定性研究[D].长沙:湖南农业大学,2013.
- [39] 王启业.铁皮石斛组织培养再生植株及遗传稳定性分析[D].长沙:中南林业科技大学,2012.
- [40] 孙立平,章林,王晓娜,等.组培快繁应重点解决的几个问题[J].吉林林业科技,2009,38(4):46-47.
- [41] 李进进,廖俊杰,许继勇,等. $AgNO_3$ 在铁皮石斛组织培养中抗衰老作用[J].中草药,2007,38(6):914-917.
- [42] 傅立国.中国植物红皮书:稀有濒危植物[M].北京:科学出版社,2013.
- [43] 陆胤,邱英雄,潘琦,等.珍稀濒危药用植物有效成分和可持续利用的研究[C]//药用植物研究与中药现代化,2004:47-58.
- [44] 冯治朋.太白贝母组织培养和繁殖研究[D].西安:西北农林科技大学,2017.
- [45] 韩宏义,郑静,白鹏.药用植物刺五加组织培养及快速繁殖的研究[J].山东农业科学,2008(2):18-20.
- [46] 曹磊,钱子刚,黄衡宇,等.金铁锁体外高效再生体系的建立[J].中药材,2017,40(1):12-17.
- [47] 王征.杜仲组织培养及愈伤组织植株再生体系的建立[D].长沙:中南林业科技大学,2013.
- [48] 马英姿,许欢,王志毅,等.凹叶厚朴快繁技术体系的建立[J].中草药,2014,45(12):1769-1774.
- [49] 杨卫星.降香黄檀组织培养技术研究[J].现代农业科技,2018(10):150-151.
- [50] 席培宇,王虹,刘燕,等.金铁锁不定根培养体系建立[J].种子,2017,36(2):131-134.
- [51] 李温平,陈贝贝,蒋明,等.黄精叶钩吻愈伤组织诱导研究[J].江苏农业科学,2012,40(6):43-44.
- [52] 杨艳娟,潘琼.金铁锁组织培养研究[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(74):33.
- [53] 宋玉霞,郭生虎,张芦燕,等.肉苁蓉愈伤组织培养及所含有效成分量的研究[J].中草药,2006,37(8):1237-1241.
- [54] 黄芳,程治英,龙春林.荷叶铁线蕨的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2008,44(2):307-308.
- [55] 孙丹,朴炫春,廉家盛,等.影响平贝母愈伤组织生长诸因素的研究[J].北方园艺,2008(4):218-220.
- [56] 吕梅.篮子三尖杉繁殖技术研究[D].长沙:中南林业科技大学,2010.
- [57] 李小泉,韦坤华,王艳,等.地枫皮组织培养获得再生植株的研究[J].江苏农业科学,2015,43(9):87-89.
- [58] 陈碧华,姚庆端,李乾振,等.降香黄檀组织培养技术研究[J].武夷科学,2010,26:47-51.
- [59] 胡刚,胡光平,王桂萍,等.濒危植物半枫荷 *Semiliquidambar cathayensis* 组织培养快繁技术研究[J].种子,2012,31(12):116-120.
- [60] 王建华,王义,孙国伟,等.人参组织培养的多因子正交试验研究[J].吉林农业大学学报,2006,28(6):648-651.
- [61] 张红梅.翅果油树组织培养的研究[D].晋中:山西农业大学,2003.

责任编辑:高山