

# Research on the Disinfection of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Explants

Lijun Guo, Zhiwen Luo, Fuchu Hu, Huidong Deng, Min Hua, Fan He, Hongyan Fan\*

Tropical Fruit Research Institute, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tropical Fruit Tree Biology of Hainan Province, Investigation Station of Tropical Fruit Trees, Ministry of Agriculture, Haikou Hainan  
Email: \*fanhongyan\_1979@126.com

Received: Oct. 22<sup>nd</sup>, 2015; accepted: Nov. 10<sup>th</sup>, 2015; published: Nov. 13<sup>th</sup>, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

In order to develop rapid propagation system, the various concentrations of the disinfectants were prepared for single factor experiments taking mangosteen leaves and stem cuttings as the materials. Based on the results, an orthogonal experiment with  $L_{16}(4^4)$  array of four factors and four levels, namely explants, NaClO disinfection time and  $HgCl_2$  disinfection time, was conducted. The results showed that a 10 - 15 min's disinfection time of 0.1%  $HgCl_2$  was strongly proposed when the leaves were used as explants. Stem tip explants were much better than leaves and terminal cuttings in view of its lower rate of contamination and relatively higher survival rate. A concentration of 75% alcohol for 90 s followed by a 15 min's disinfection time of 0.1%  $HgCl_2$ , or a concentration 10% NaClO for 18 min followed by a 10 min's disinfection time of 0.1%  $HgCl_2$  was the corresponding sterilization method. It showed a poor disinfection effect when stem cuttings were used as explants.

## Keywords

Mangosteen, Explants, Orthogonal Experiment, Sterilization Method

## 山竹外植体消毒技术研究

郭利军, 罗志文, 胡福初, 邓会栋, 华敏, 何凡, 范鸿雁\*

海南省农业科学院热带果树研究所, 海南省热带果树生物学重点实验室, 农业部海口热带果树科学观测试验站, 海南 海口

\*通讯作者。

文章引用: 郭利军, 罗志文, 胡福初, 邓会栋, 华敏, 何凡, 范鸿雁. 山竹外植体消毒技术研究[J]. 植物学研究, 2015, 4(6): 117-124. <http://dx.doi.org/10.12677/br.2015.46014>

Email: \*fanhongyan\_1979@126.com

收稿日期: 2015年10月22日; 录用日期: 2015年11月10日; 发布日期: 2015年11月13日

## 摘 要

为了建立山竹组培快繁体系, 以山竹叶片、茎段为外植体材料, 开展了3种消毒剂不同消毒时间的单因素试验, 在此基础上, 设计 $L_{16}(4^4)$ 正交试验研究了外植体类型、75%酒精、10%次氯酸钠及0.1%升汞的消毒时间对消毒效果的影响, 结果表明: 叶片为外植体材料建议只采用0.1%升汞进行消毒处理, 处理时间10~15 min; 茎尖为最适宜的外植体材料, 消毒方式为75%酒精消毒90 s, 再用0.1%升汞消毒15 min或10%次氯酸钠消毒18 min, 再用0.1%升汞消毒10 min。以茎段为外植体材料, 消毒效果不佳。

## 关键词

山竹, 外植体, 正交试验, 消毒方式

## 1. 引言

山竹(*Garcinia mangostana* L.)原产于马来群岛, 在马来西亚、泰国、菲律宾、缅甸栽培较多, 主要分布在我国海南保亭县和五指山市境内, 其果形扁圆, 外壳呈深紫色, 由4片果蒂盖顶, 酷似柿样, 又名“莽吉柿”[1]。目前国内市场上销售的山竹果, 几乎全部从马来西亚、泰国进口, 每年进口量达千万吨, 山竹果制成的果汁饮料、糕点、果冻很受消费者的喜爱, 其独特的药用价值也获得人们的青睐, 山竹果皮和果壳中含有具有抗癌作用和抗氧化作用的氧杂蒽酮, 研究人员还从山竹果皮提取物中分离鉴定出化合物 $\beta$ -谷甾醇和芦丁[2]等独特的生物活性物质, 引起了医药、保健食品领域的广泛关注。从山竹种子中提炼的油脂已经被频繁用作藤黄油、起酥油的替代品, 果壳中对光热稳定的红色素, 还可作为天然食用色素的提取原料[3]。

我国市场上销售的种苗大部分从泰国、越南等地引进, 单株成本高达40元, 而每个山竹果中具备生活力的种子平均数量不超1个, 有限的种苗数量严重制约了山竹产业的发展。通过组织培养的方法, 可以在短时间内获得大量均一、优质的山竹材料, 这是进行种苗繁殖的最佳选择, 也是开展山竹遗传改良研究的必要步骤。目前, 仅国外开展了山竹组培技术研究, 且多以幼嫩叶片为外植体, 采用80%酒精消毒3~5 min后再用20%次氯酸钠消毒20 min的方式作为消毒条件开展后续组培快繁研究[4] [5], 但有关山竹多种外植体材料的系统性消毒研究尚未见报道。本文以山竹多种材料为研究对象展开消毒技术研究, 以期建立山竹组培再生体系, 为解决山竹种苗供应不足问题及其遗传改良研究奠定技术基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试验材料

外植体材料采于海南省农科院果树所永发试验基地和保亭县三道镇亨通公司, 选择生长旺盛、健壮、无病虫害的山竹植株, 取当年萌生的枝条顶芽、带腋芽茎段和叶片为外植体材料。

### 2.2. 培养基及培养条件

接种培养基为 $\frac{1}{2}$ MS + 6-BA 5.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 8 g/L, pH 5.8; 培养基在 0.11 MPa 高压下,

121℃灭菌 17 min。培养温度为 $(25 \pm 2)$ ℃，先进行 3 d 的暗培养处理，然后在 1500 lx 光照强度下培养。

### 2.3. 外植体准备

将采下的外植体用洗衣粉水来清洗外植体 10 min，流水冲洗 30 min，修剪叶片、枝条，得到叶片、顶芽和茎段外植体。于超净工作台中进行不同消毒药剂和消毒时间的处理，处理完毕后用无菌水涮洗 3 次。将消毒好的外植体置于铺有无菌滤纸的盘中，吸干材料表面的水分。对于叶片，切掉四周与药液接触的部分，再切成含中脉的  $1.0 \text{ cm}^2$  左右的小块；对于顶芽，则切掉末端与药液接触的部分；对于茎段，则切掉两端与药液接触的部分，接入至  $\frac{1}{2}$ MS + 6-BA 5.0 mg/L 的诱导培养基。

### 2.4. 试验方法

10%次氯酸钠溶液消毒叶片预实验表明，10~20 min 叶片污染率达 95%以上，存活率低于 2%，由于过高的污染率和较低存活率所以本研究设置叶片消毒时长 10 min 以内；而消毒茎段 20 min，污染率仍达 100%，消毒茎段时间过长，且污染率极高，失去了培养意义，所以实验未进行 10%次氯酸钠溶液消毒茎段试验。

因植物材料的不同，75%左右的酒精具有很强的穿透力和杀伤力，一般 5~60 s 即可杀死外植体表面绝大部分微生物，延长消毒时间会加重外植体的损伤程度，采用 0.1%升汞 10 min 内能有效杀死外植体表面的微生物[6] [7]，而目前外植体消毒研究中 70%~75%酒精消毒时长大都设置在 90 s 范围内[8] [9]，0.1%升汞消毒时长也多设置在 0~15 min 范围内[10]-[12]。鉴于山竹生长在高温高湿环境中，本研究在此基础上分别设置 75%酒精最高消毒时长 90 s 和 0.1%升汞最高时长 15 min。

#### 2.4.1. 叶片单因素消毒效果试验

##### 1) 10%次氯酸钠溶液消毒叶片效果试验

叶片 10%次氯酸钠溶液消毒时长设置为 0、2.5、5、7.5 min，消毒完毕后，用无菌水漂洗 3 次，接至培养基。每个处理 8 瓶，每瓶 3~4 个外植体，重复 3 次。7 d 后统计污染率，30 d 后统计死亡率。

##### 2) 75%酒精消毒叶片效果试验

叶片 75%酒精消毒时长设置为 0、30、60、90 s，消毒完毕后，用无菌水漂洗 3 次，接至培养基。每个处理 8 瓶，每瓶 3~4 个外植体，重复 3 次。7 d 后统计污染率，30 d 后统计死亡率。

##### 3) 0.1%升汞消毒叶片效果试验

叶片 0.1%升汞消毒时长设置为 0、5、10、15 min，消毒完毕后，用无菌水漂洗 3 次，接至培养基。每个处理 8 瓶，每瓶 3~4 个外植体，重复 3 次。7 d 后统计污染率，30 d 后统计死亡率。

#### 2.4.2. 茎段单因素消毒效果试验

##### 1) 75%酒精消毒茎段效果试验

茎段 75%酒精消毒时长设置为 0、30、60、90 s，消毒完毕后，用无菌水漂洗 3 次，接至培养基。每个处理 8 瓶，每瓶 3~4 个外植体，重复 3 次。7 d 后统计污染率，30 d 后统计死亡率。

##### 2) 0.1%升汞消毒茎段效果试验

茎段 0.1%升汞消毒时长设置为 0、5、10、15 min，消毒完毕后，用无菌水漂洗 3 次，接至培养基。每个处理 8 瓶，每瓶 3~4 个外植体，重复 3 次。7 d 后统计污染率，30 d 后统计死亡率。

#### 2.4.3. 影响消毒效果因素的正交试验设计

在前期单因素试验处理基础上，试验进一步开展了针对不同外植体类型的不同消毒药剂和消毒时间的  $L_{16}(4^4)$  正交试验。

设定外植体类型(A)、75%酒精消毒时长(B)、10%次氯酸钠溶液消毒时长(C)和 0.1%升汞消毒时长(D)4 个因素。

各因素水平见表 1, 参考实验前期单因素优化实验数据, 选用  $L_{16}(4^4)$  正交试验表见表 2 进行试验, 每个处理重复 3 次, 每重复接种 20~30 个外植体。

## 2.5. 数据统计与分析

外植体接种 7 d 后统计污染率, 30 d 后统计死亡率。所有百分数经平方根反正弦化  $ASIN(\sqrt{X})$ 、个数经平方根转化  $\sqrt{X}$ , 采用 SPSS 分析软件进行方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较( $P = 0.05$ )。文中数据为未转化数据均值。

$$\text{污染率} = \frac{\text{污染的外植体数}}{\text{接种的外植体总数}} \quad \text{存活率} = \frac{\text{存活的外植体数}}{\text{接种的外植体总数}}$$

Table 1. Levels of factors for orthogonal experimental design method

表 1. 正交试验各因素水平

水平	因素 Factor			
	A	B (s)	C (min)	D (min)
1	7~9 d 生叶片	0	0	0
2	10~15 d 生叶片	30	6	5
3	茎段	60	12	10
4	茎尖	90	18	15

Table 2. Orthogonal experiment of  $L_{16}(4^4)$

表 2.  $L_{16}(4^4)$  正交实验表

试验编号	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	3	3	1	3
3	4	4	1	4
4	2	2	1	2
5	2	4	3	1
6	4	3	2	1
7	3	2	4	1
8	1	4	4	3
9	4	1	4	2
10	1	3	3	2
11	2	3	4	4
12	2	1	2	3
13	3	1	3	4
14	3	4	2	2
15	4	2	3	3
16	1	2	2	4

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 10%次氯酸钠溶液消毒叶片效果

由表 3 可知, 消毒时长 0~5 min 范围内, 叶片外植体污染率逐渐下降, 消毒时长达 5 min 时, 污染率达到最小值 90.66%, 存活率达到最高值 7.44%; 消毒时长 5~7.5 min 范围内, 污染率则显著升高, 达到 96.51%, 存活率下降至 3.49%。分析结果可知, 10%次氯酸钠作为山竹叶片消毒剂, 其污染率达 90%以上, 存活率最高为 7.44%左右, 以 10%次氯酸钠溶液作为外植体消毒剂效果不理想。

#### 3.2. 75%酒精消毒叶片效果

由表 4 可知, 酒精消毒时间在 30~90 s 内, 叶片污染率呈逐渐下降的趋势, 存活率呈逐渐上升的趋势。消毒时间在 30~90 s 内, 三个处理间的污染率和存活率变化不显著。不同处理间污染率仍高达近 90%, 与 10%次氯酸钠处理效果相近, 所以采用单一的酒精消毒效果也不是十分理想。

#### 3.3. 0.1%升汞消毒叶片效果

试验结果表明(见表 5), 对于叶片外植体采用 0.1%升汞消毒可以达到很好的效果。随着消毒时间的延长, 外植体污染率呈逐渐下降的趋势, 存活率呈逐渐上升趋势, 消毒时长达 10 min 后, 污染率和存活率即达到了稳定状态(10 min 和 15 min 两个处理的污染率、存活率无显著差异)。所以, 消毒时长达 10~15 min 时, 污染率和存活率两指标达到最佳值, 污染率 29.28%~34.47%, 存活率为 65.53%~70.72%。采用 0.1%升汞对叶片进行消毒, 适宜的消毒时长可维持在 10~15 min 左右。

#### 3.4. 75%酒精消毒茎段效果

由表 6 可见, 当用茎段作为外植体, 增大了表面消毒难度。采用 75%酒精消毒时长在 1 min 以内, 并不能显著改善外植体污染状况, 当消毒时长达 90 s 污染率才显著降低, 但污染率仍高达 87.47%; 而各个处理间的存活率差异不明显。结果表明, 采用单一的酒精作为茎段消毒剂, 并不能达到较佳效果。

Table 3. Disinfection effects of 10% sodium hypochlorite of leaves

表 3. 10%次氯酸钠溶液消毒叶片效果

10% NaClO 消毒时长/min	外植体总数/个	污染率%	存活率%
0	95	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00b
2.5	101	94.13 ± 1.54a	5.87 ± 1.54a
5	96	90.66 ± 1.58b	7.44 ± 1.46a
7.5	89	96.51 ± 2.06a	3.49 ± 2.06ab

注: 表中显著性水准为 0.05。

Table 4. Disinfection effects of 75% ethyl alcohol of leaves

表 4. 75%酒精消毒叶片效果

75%酒精消毒时长/s	外植体总数/个	污染率%	存活率%
0	97	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00b
30	100	95.19 ± 3.29ab	4.81 ± 3.29ab
60	89	92.21 ± 2.90ab	7.79 ± 1.74ab
90	99	89.71 ± 2.32b	10.29 ± 2.32a

注: 表中显著性水准为 0.05。

### 3.5. 0.1%升汞消毒茎段效果

由表 7 可见, 相对叶片来说, 采用升汞消毒效果不理想。消毒时间小于 10 min, 外植体全部污染, 当消毒时间达到 15 min, 污染率下降至 86.51%, 外植体存活率仅为 8.19%, 污染率得到了一定程度的控制, 但存活率仅为 8.19%。所以采用单一的升汞对茎段进行消毒, 并不能达到良好效果。

### 3.6. 消毒效果影响因素的正交试验

16 个不同处理间在污染率和存活率指标上均存在显著差异(见表 8)。尽管  $A_1B_1C_1D_1$ 、 $A_2B_2C_1D_2$ 、 $A_2B_4C_3D_1$ 、 $A_1B_4C_4D_3$ 、 $A_1B_3C_3D_2$ 、 $A_2B_1C_2D_3$ 、 $A_1B_2C_2D_4$  几个处理存在污染率极低的处理, 但由于这 7 个处理的外植体存活率为 0, 失去了培养的意义。剩余的处理中,  $A_4B_4C_1D_4$  及  $A_4B_1C_4D_2$  处理存活率没有显著差异, 但显著高于其它处理, 其对应的污染率指标除高于  $A_2B_3C_4D_4$  号处理外, 均显著低于剩余的其它处理。尽管  $A_2B_3C_4D_4$  号处理污染率为 0, 但其外植体存活率仅为 5.08%。综上所述  $A_4B_4C_1D_4$ 、 $A_4B_1C_4D_2$  两个处理为外植体消毒的最佳处理, 即以茎尖为外植体 75%酒精消毒 90 s, 再用 0.1%升汞消毒 15 min 或 10%次氯酸钠消毒 18 min, 0.1%升汞消毒 10 min。

**Table 5.** Disinfection effects of 0.1% mercuric chloride of leaves  
**表 5.** 0.1%升汞消毒叶片效果

0.1%升汞消毒时长/min	外植体总数/个	污染率%	存活率%
0	121	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00c
5	117	84.83 ± 2.11b	15.17 ± 2.11b
10	124	34.47 ± 3.30c	65.53 ± 3.30a
15	106	29.28 ± 2.14c	70.72 ± 2.14a

注: 表中显著性水准为 0.05。

**Table 6.** Disinfection effects of 75% alcohol of stem cutting  
**表 6.** 75%酒精消毒茎段效果

75%酒精消毒时长/s	外植体总数/个	污染率%	存活率%
0	97	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
30	88	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
60	88	96.63 ± 1.93a	0.00 ± 0.00a
90	88	87.47 ± 2.36b	0.00 ± 0.00a

注: 表中显著性水准为 0.05。

**Table 7.** Disinfection effects of 0.1% mercuric chloride of stem cutting  
**表 7.** 0.1%升汞消毒茎段效果

0.1%升汞消毒时长/min	外植体总数/个	污染率%	存活率%
0	88	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00b
5	89	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00b
10	87	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00b
15	89	86.51 ± 1.93b	8.19 ± 1.61a

注: 表中显著性水准为 0.05。

**Table 8.** Duncan's multiple range test of 16 treatments in an orthogonal test  
**表 8.** 正交试验 16 个处理消毒效果的多重比较

试验编号	组合	污染率%	存活率%
1	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub>	100.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00e
2	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	60.61 ± 8.13b	9.09 ± 0.55b
3	A <sub>4</sub> B <sub>4</sub> C <sub>4</sub> D <sub>4</sub>	20.69 ± 2.17d	41.38 ± 2.18a
4	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub>	2.27 ± 0.28e	0.00 ± 0.00e
5	A <sub>2</sub> B <sub>4</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub>	0.00 ± 0.00f	0.00 ± 0.00e
6	A <sub>4</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub>	15.25 ± 2.68b	25.43 ± 1.72b
7	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> D <sub>1</sub>	88.00 ± 4.12a	4.00 ± 1.02cd
8	A <sub>1</sub> B <sub>4</sub> C <sub>4</sub> D <sub>3</sub>	36.84 ± 2.31c	0.00 ± 0.00e
9	A <sub>4</sub> B <sub>1</sub> C <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	11.11 ± 1.30d	38.89 ± 2.52a
10	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub>	18.92 ± 1.08cd	0.00 ± 0.00e
11	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>4</sub> D <sub>4</sub>	0.00 ± 0.00f	5.08 ± 0.61cd
12	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	11.63 ± 1.61d	0.00 ± 0.00e
13	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> D <sub>4</sub>	80.65 ± 1.93a	3.23 ± 0.74d
14	A <sub>3</sub> B <sub>4</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>	53.57 ± 2.36b	32.14 ± 3.30b
15	A <sub>4</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	30.19 ± 2.83c	9.43 ± 1.68b
16	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	0.00 ± 0.00f	0.00 ± 0.00e

注：表中显著性水准为 0.05。

## 4. 结论与讨论

### 4.1. 讨论

目前采用单一的消毒药剂对叶片进行消毒的做法较为普遍，百合、金钱树、杨树[13]-[15]等植物的消毒研究表明以叶片为外植体消毒材料，只采用 0.1%升汞消毒即可达到较佳消毒效果，此外也有研究人员先用 75%酒精对叶片进行 10~20 s 短时间预处理，再采用单一的 0.1%升汞进行消毒，在杨树、胡椒木[16][17]等植物上得到了较好的试验结果，控制污染率的同时，也未对叶片造成明显伤害。本研究表明，对叶片仅采用 0.1%升汞消毒 10~15 min 即可控制污染率在 29.28%~34.47%，存活率达到 65.53%~70.72%；而经 75%酒精、10%次氯酸钠和 0.1%升汞多种消毒剂处理后，虽然污染率最低降低到 0，但是存活率指标也降低到 0，多种消毒剂处理不利于外植体生存。所以对于山竹叶片采用单一的升汞消毒处理效果明显好于多种消毒剂的复合使用效果。

多种消毒剂的配合使用可以明显提高表面消毒效果，很多研究也证明这一点。龙眼茎尖培养采用 75%酒精消毒 60 s，再用 0.1%升汞处理 10 min，最后用 3%次氯酸钠处理 30 min，进行表面消毒处理用于芽的诱导研究[18]，苹果茎尖消毒采用 75%酒精浸泡 30 s，再用 0.1%升汞浸泡 10 min 后，进行超低温保存研究[19]。欧李茎尖用 75%酒精消毒 30~40 s，再用 0.11% HgCl<sub>2</sub> 消毒 6~12 min，获得的消毒材料用于芽增殖研究[20]。黄冠梨茎尖消毒以 75%酒精处理 10 s、再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 4 min 的消毒效果最佳，污染率控制在 25%，成活率达到 71.88% [21]。本研究表明，茎尖最佳的消毒方式为 75%酒精与 0.1%升汞或者 10%次氯酸钠与 0.1%升汞复合消毒效果最佳，这与上述研究结果是一致的。

分析不同外植体类型消毒方式不一的原因可能与外植体与药剂接触面有关。由于叶片表面相对平整，

与消毒剂接触面积较大,单一消毒药剂即可达到较好的效果。茎尖凹陷不平,使得药剂不能有效深入凹陷部位,所以结合不同的消毒药剂,方能达到较好的消毒效果。所以对外植体消毒应依据具体的材料类型确定最佳的消毒剂种类及消毒时间。

## 4.2. 结论

以 7~9 d 生叶片和 10~15 d 生叶片为外植体,进行不同消毒药剂的组合消毒试验结果表明,不同药剂间的组合在很大程度上降低了污染率,但对外植体造成了很大的损伤,存活率仅为 0%~1.27%。参考前期单因素处理试验,建议只采用 0.1%升汞进行消毒处理,处理时间维持 10~15 min;以茎尖为外植体,适宜的消毒方式为 75%酒精消毒 90 s,再用 0.1%升汞消毒 15 min 或 10%次氯酸钠消毒 18 min,再用 0.1%升汞消毒 10 min;采用茎段作为外植体材料消毒效果不佳。

## 基金项目

本研究受海南省农业科学院农业科技创新专项“山竹组培快繁技术研究”(项目编号: CXZX201411)资助,特此感谢!

## 参考文献 (References)

- [1] 张运华,李敏. 南洋果后山竹[J]. 花卉, 2004(7): 31.
- [2] 赵岩,王春宇,李平亚. 莽吉柿果皮化学成分的研究[J]. 特产研究, 2007, 29(3): 39-42.
- [3] 蒋依辉,李春雨,戴宏芬,匡瑞彬. 山竹的食用药用价值及综合利用研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(3): 50-53.
- [4] Goh, H.K., Rao, A.N. and Loh, C. (1990) Direct Shoot Bud Formation from Leaf Explants of Seedlings and Mature Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Trees. *Plant Science*, 68, 113-121.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90159-L](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(90)90159-L)
- [5] Goh, H.K.L., Rao, A.N. and Loh, C.S. (1988) In Vitro Plantlet Formation in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *ANN BOT-LONDON*, 62, 87-93.
- [6] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯, 1996(6): 444-446.
- [7] 孙振元,钱永强,韩蕾,巨关升,冯霞,杨学军. 一种野牛草成熟种子的灭菌方法[P]. 中国专利, CN100334945 C. 2007.
- [8] 郭军战,舒庆艳. 四倍体刺槐组织培养中的外植体选择和消毒研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(1): 15-18.
- [9] 王子成,李忠爱,邓秀新. 柑橘成年态茎段外植体消毒方法研究[J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2005, 35(2): 57-60.
- [10] 冯金玲,陈辉,杨志坚,陈世品. 锥栗组织培养外植体消毒和选择[J]. 福建林学院学报, 2006, 26(1): 22-25.
- [11] 林妃,李敬阳,常胜合,唐粉玲,王必尊. 花梨木组织培养外植体消毒方法初步探讨[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 522-525.
- [12] 陈仁利,彭海波,梁文婕. 海南降香黄檀外植体消毒方案的初步研究[J]. 林业实用技术, 2012(2): 23-25.
- [13] 张艺萍,屈云慧,熊丽,吴学尉. 百合叶片离体不定芽发生和快繁技术研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(4): 751-753.
- [14] 潘学峰,王俊豪,符青苗. 金钱树组培快繁技术研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2007, 25(4): 402-407.
- [15] 李树丽. 中华红叶杨外植体消毒方式影响因素研究[J]. 北方园艺, 2012(20): 120-122.
- [16] 沈周高,项艳,蔡诚,吴大强. 3个杨树品种叶片再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2006, 22(11): 90-96.
- [17] 李晓东,徐浩,张晓红,程智慧. 胡椒木叶片离体培养与植株再生[J]. 西北农业学报, 2009, 18(2): 213-216.
- [18] 王家福,何碧珠. 龙眼茎尖的培养[J]. 福建农业大学学报, 2000, 29(1): 23-26.
- [19] 吴永杰,赵艳华,周明德. 苹果休眠茎尖的超低温保存研究[J]. 华北农学报, 1999, 14(1): 129-133.
- [20] 焦淑华,林丽华,李宝江,张淑红. 欧李茎尖组织培养研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(4): 573-577.
- [21] 宗娟,朱立武,贾兵. 黄冠梨茎尖离体培养再生体系建立初探[J]. 广东农业科学, 2010, 37(2): 51-53.