



付双彬, 李慧, 赵健, 等. 油松胚性愈伤组织培养中褐化因素研究及增殖培养基的优化[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(5): 91-96.

油松胚性愈伤组织培养中褐化因素 研究及增殖培养基的优化

付双彬¹, 李 慧¹, 赵 健¹, 符学军², 朱松林², 张金凤¹

(1 林木育种国家工程实验室/林木花卉遗传育种教育部重点实验室/国家林业局树木花卉
育种生物工程重点开放实验室/北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083;
2 山西吕梁山国有林管理局 国家油松良种基地, 山西 临汾 041300)

摘要:【目的】调查油松 *Pinus tabulaeformis* 胚性愈伤组织增殖培养阶段不同因素对于褐化产生的影响, 并结合增殖率对培养基进行调整优化以降低褐化率, 提高利用率。【方法】以 3 个年份的 9 个细胞系的油松胚性愈伤组织为材料, 利用单因素试验设计对放置不同数量愈伤块、pH、植物凝胶含量、糖种类和含量以及培养时间的褐化率和增殖率进行测定计算。采用正交试验选出最佳培养条件。【结果】单因素试验结果表明, 褐化率在不同基因型间差异显著, 且与增殖继代年龄显著正相关; 在培养皿中放置 6~7 块愈伤组织、pH 5.8~6.0、培养基中添加 2.0~3.0 g·L⁻¹ 植物凝胶、添加 10 g·L⁻¹ 蔗糖能保证较低的褐化率和较高的增殖率, 且蔗糖优于葡萄糖和麦芽糖。【结论】结合正交设计, 90 mm 培养皿中放置 7 块愈伤组织, 培养基中添加 2.5 g·L⁻¹ 植物凝胶、10 g·L⁻¹ 蔗糖, 调节 pH 为 5.9 时, 褐化率、增殖率和利用率最理想。

关键词: 油松; 胚性愈伤; 褐化; 增殖; 正交设计
中图分类号: S722 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2017)05-0091-06

Investigation of browning factors in embryogenic callus culture of *Pinus tabulaeformis* and optimization of proliferation medium

FU Shuangbin¹, LI Hui¹, ZHAO Jian¹, FU Xuejun², ZHU Songlin², ZHANG Jinfeng¹

(1 National Engineering Laboratory for Tree Breeding/Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education/Key Laboratory of Forest Trees and Ornamental Plants Biological Engineering of State Forestry Administration/College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2 National *Pinus tabulaeformis* seed base, State-owned Forest Administration of Lüliang Mountain, Linfen 041300, China)

Abstract: 【Objective】To study the effects of different factors on browning of embryogenic callus of *Pinus tabulaeformis* during proliferation, and optimize the culture medium based on proliferation rate for lower browning rate and higher efficiency. 【Method】Embryogenic callus of *P. tabulaeformis* from nine cell lines and three different year were used as material. We performed a serious of single factor experiments and calculated the browning rates and proliferation rates of embryogenic callus under the treatments of different callus number, pH, phytagel content, type and content of sugars, and culturing time. Orthogonal experiment was then conducted to screen out the best culture

收稿日期: 2016-12-01 优先出版时间: 2017-07-14
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170714.0859.032.html>
作者简介: 付双彬(1989—), 男, 硕士, E-mail: shuangbinfu@gmail.com; 通信作者: 张金凤(1964—)女, 教授, 博士, E-mail: zjf@bjfu.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金(31370658); 948 项目(2014-4-59); 北京林业大学青年教师科学研究中长期项目(2015ZCQ-SW-02); 北京市园林绿化局计划项目(CEG-2016-01)

conditions. 【Result】 Results of the single factor experiments showed that browning rate was significantly different among different genotypes, and it was significantly positively correlated with the age of subculture. The browning rate was relatively low and the proliferation rate was relatively high when the callus number in each petri dish was 6–7, medium pH was 5.8–6.0, phytigel was 2.0–3.0 g·L⁻¹, and sucrose was 10 g·L⁻¹. Sucrose was better than glucose and maltose. 【Conclusion】 Based on the orthogonal design, placing 7 callus in each 90 mm petri dish, adding 2.5 g·L⁻¹ phytigel and 10 g·L⁻¹ sucrose to the medium, and adjusting the pH to 5.9 could achieve the preferred browning rate, proliferation rate and efficiency.

Key words: *Pinus tabulaeformis*; embryogenic callus; browning; proliferation; lorthogonal design

油松 *Pinus tabulaeformis* 是我国北方 14 个省(自治区、直辖市)重要的乡土树种,生态适应区约 300 万 km²,是我国华北、西北及东北部分地区的主要造林树种。油松用途广,选育目标多样,在较好的立地,可以培育工业用材林;它耐干旱、贫瘠,适应力强,对维护国土生态安全具有特殊重要地位^[1]。然而,由于林木本身的限制,其良种的繁育远远达不到造林以及商业化的要求,因此开辟新的育种途径,加快油松的育种和繁殖进程是油松育种中亟待解决的问题。得益于油松体细胞胚胎发生体系的建立,为油松的快速繁育提供了新的途径,为其无性系育种和优良无性系繁殖推广提供了高效的繁殖技术。然而,随着研究的不断深入,发现一些油松胚性愈伤组织会产生褐化现象,并会逐渐影响未褐化组织的生长,严重的会导致整块的组织死亡,使珍贵的材料丢失^[2]。

组织培养中的褐变是指外植体在诱导分化或再分化的过程中自身组织从表面向培养基中释放褐色有毒物质,使培养基逐渐变成褐色,以至于外植体也随之变褐死亡的现象。褐变在组织培养过程中普遍存在^[3],这在果树等酚类物质含量较高的木本植物中尤其严重^[4]。对于这种较普遍的现象,国内外研究主要集中在果树等经济林树种的组织培养中^[5],针叶树种中只有欧洲赤松、红豆杉^[6-8]等少数几个树种有组织培养方面的研究,油松并没有专门进行这方面研究的报道。目前研究认为,引起褐化的原因包括酶促褐变和非酶促褐变,近年也有与美拉德反应相联系^[9];但组织培养中的褐变主要是由酶引起的细胞内的氧化褐变,培养基和培养条件等都成为影响褐化的重要外因^[3-4]。

根据原有的培养基和培养条件进行培养,油松胚性愈伤褐化率平均在 30% 左右,而在一些愈伤组织中甚至无一幸免。为了尽量避免胚性愈伤的褐化,保证材料的完整性,我们对现有的培养基和培养条件进行了优化和调整,选择了 3 个不同年份共 9 个细胞系作为供试材料,研究 90 mm 培养皿接种愈伤

块数量,培养基中不同植物凝胶含量、糖种类和蔗糖含量对于褐化产生的影响,同时结合增殖率对现有的培养条件和培养基进行优化,希望借此能够筛选合适的基因型,选择最优的培养基、创造最佳的培养条件以避免褐化,保证胚性愈伤的良好状态。

1 材料与方法

1.1 材料

油松胚性愈伤组织试验材料有 3 类,第 1 类是 2013 年获得,已增殖继代 3.2 年的 3 个胚性细胞系(13a2、13b2 和 13c2),第 2 类是 2015 年获得,已增殖继代 1.2 年的 3 个胚性细胞系(15c4a、15c4b 和 15n38a),第 3 类是 2016 年获得,已增殖继代 0.2 年的 3 个胚性细胞系(16c4a、16n77a 和 16z36a)。

1.2 单因素试验

1.2.1 基础培养基 采用 mLV^[10]基本培养基,90 mm 一次性培养皿,每块胚性愈伤称 200 mg(采用 15n38a),放置 8 块,培养基中添加外源激素 2,4-D 0.2 mg·L⁻¹、6-BA 0.1 mg·L⁻¹,蔗糖 20 g·L⁻¹,植物凝胶(美国 Sigma 公司)3 g·L⁻¹,pH 5.8,接种 2 周后统计褐化率和平均增殖率。

1.2.2 胚性愈伤组织褐化的判断 在油松胚性愈伤培养的过程中,其褐化的出现多呈现愈伤颜色变成黄色或褐色、表面变得光滑,呈萎缩状,不再具有胚性愈伤良好的状态;而正常的胚性愈伤则呈白色或半透明,表面呈颗粒或尖刺状(图 1)。

1.2.3 基因型及增殖继代年龄对褐化的影响 选择 9 个胚性细胞系,接种 2 周后统计褐化率,同时对增殖继代年龄与褐化率进行相关性分析,每试验重复 5 次。

1.2.4 培养皿中放置愈伤块数对褐化的影响 培养皿中分别放置 6、7、8、9、10、12 块未褐化的胚性愈伤,其他同基础培养基,同时为避免营养成分的影响,将统计褐化率和增殖率时间改为 1 周,每试验重复 3 次。

1.2.5 pH 对褐化的影响 培养基灭菌前分别调 pH
<http://xuebao.scau.edu.cn>

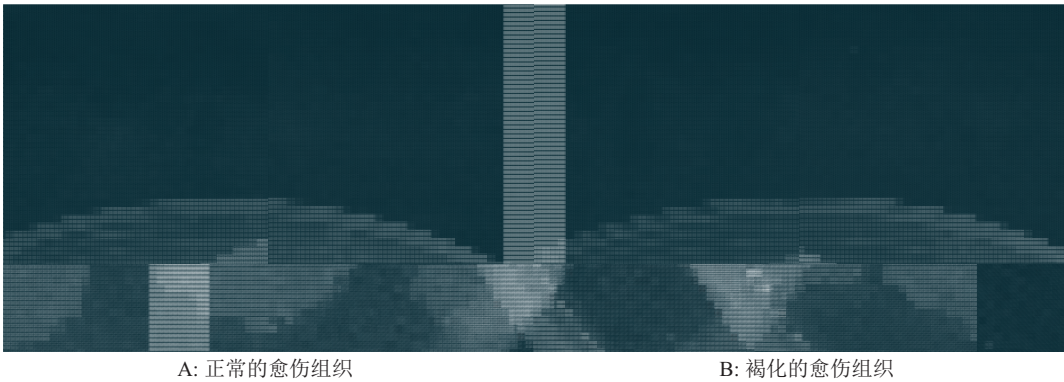


图 1 正常和褐化的油松胚性愈伤组织(15n38a)

Fig. 1 Normal and browning embryogenic callus of Chinese pine (15n38a)

到 5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2, 其他同基础培养基, 每试验重复 3 次。

1.2.6 植物凝胶含量对褐化的影响 植物凝胶依次添加 1.5(能使培养基凝固的最少含量)、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 g·L⁻¹, 其他同基础培养基, 每试验重复 3 次。

1.2.7 培养基中蔗糖含量和糖的类型对褐化的影响 蔗糖依次添加 10、20、30、40、50 g·L⁻¹, 而葡萄糖、麦芽糖均设为 20 g·L⁻¹, 其他同基础培养基, 每试验重复 3 次。

1.3 正交设计与验证

利用正交试验设计, 对放置愈伤块数、pH、植物凝胶含量、蔗糖含量 4 个因素的单因素结果最优范围附近各挑选 3 个水平进行试验, 参照 L₉(3⁴)正交表, 选出最佳组合, 每试验重复 3 次。

为了验证调整后的培养基的效果, 对 5 周内, 原培养基和调整后的培养基的褐化率进行了统计, 绘制图表。原培养基参照“1.2.1”。优化培养基: 采用 mLV 基本培养基, 90 mm 培养皿中胚性愈伤组织放置 7 块, 外源激素 2,4-D 0.2 mg·L⁻¹、6-BA 0.1 mg·L⁻¹, 蔗糖 10 g·L⁻¹, 植物凝胶(Sigma) 2.5 g·L⁻¹, pH 5.9。

1.4 数据分析

采用 SPSS19.0 软件对数据进行分析, 相关性分析采用 SPSS 双变量相关性分析, 结果取平均数±标准误, 利用最小显著极差法(LSD)进行多重比较。

褐化率 = $\frac{\text{褐化的愈伤组织的块数}}{\text{愈伤组织总的块数}} \times 100\%$,

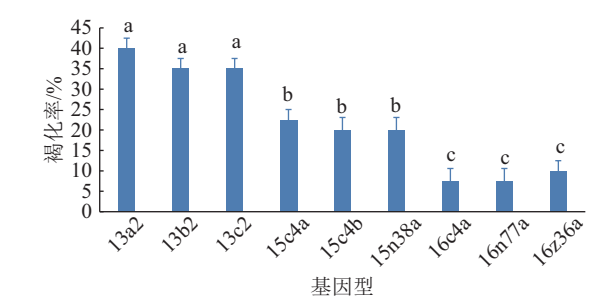
平均增殖率 = $\frac{\text{鲜质量增加的量}}{\text{初始量}} \times \text{放置愈伤块数} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 不同基因型间褐化率的统计及增殖继代年龄与褐化率的关系

9 个测试基因型的褐化率是不同的, 基因型对 <http://xuebao.scau.edu.cn>

于褐化率的影响显著($P=0.000$)(图 2); 经过回归分析(图 3)发现, 增殖继代年龄与褐化率之间呈正相关关系, 相关系数 $r=0.922$, 在 0.01 水平上显著相关($P=0.000$), 即随着增殖继代年龄的加大, 褐化率增高。



图柱上凡具有一个相同小写字母者, 表示不同基因型间差异不显著 ($P>0.05$, LSD 法)。

图 2 不同基因型的褐化率

Fig. 2 Browning rates of different genotypes

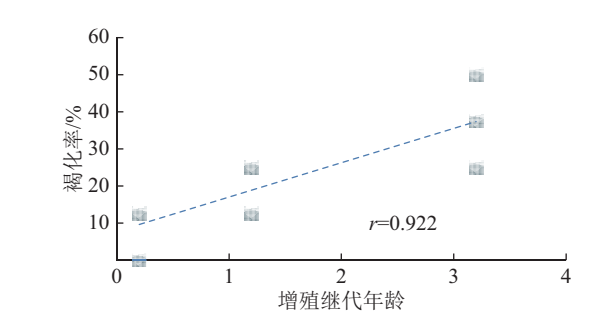
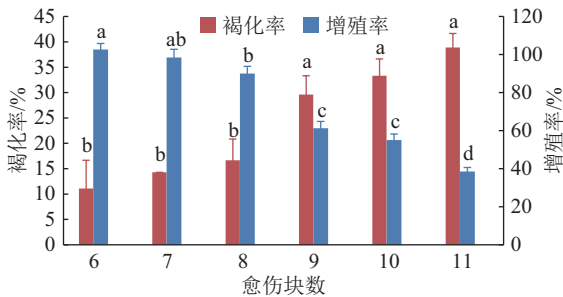


图 3 增殖继代年龄与褐化率的关系

Fig. 3 Correlation between subculture time and browning rate

2.2 培养皿中胚性愈伤块数对褐化的影响

从图 4 中可以看出, 随着愈伤块数的增加, 褐化率整体呈上升的趋势, 而愈伤的生长受到了褐化的影响, 增殖率呈下降趋势; 综合来看, 培养皿中放置 6~8 块愈伤, 其褐化率差异并不显著, 如果结合增殖率, 则 6 或 7 块最好。因此, 如果要将褐化最低化, 则放置的愈伤越少越好, 但在培养基足够的情况下, 放置 7 块会达到高的利用效率。

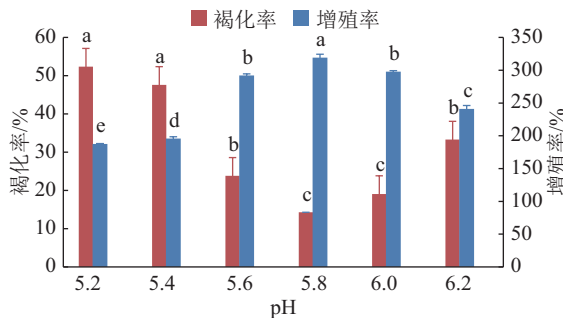


相同颜色图柱上凡具有一个相同小写字母者,表示不同处理间差异不显著($P>0.05$, LSD 法)。

图 4 培养皿中愈伤块数对于褐化率和增殖率的影响
Fig. 4 Effects of callus number in the petri dish on browning and proliferation rates

2.3 pH 对褐化的影响

由图 5 可知, pH 对愈伤组织的生长和褐变都有较大的影响。在 pH 为 5.2~5.4 时, 愈伤组织生长很慢, 且褐变率最高; 随着 pH 的升高, 愈伤组织的生长加快, 褐化率降低, 到 pH 为 5.8 时, 褐变率最小, 当 pH 为 6.0 时, 褐化又开始升高, 增殖受到影响。由此可知, pH 为 5.6~6.0 时, 褐化程度较小(差异不显著), 特别是 pH 为 5.8 时, 其增殖最好。



相同颜色图柱上凡具有一个相同小写字母者,表示不同处理间差异不显著($P>0.05$, LSD 法)。

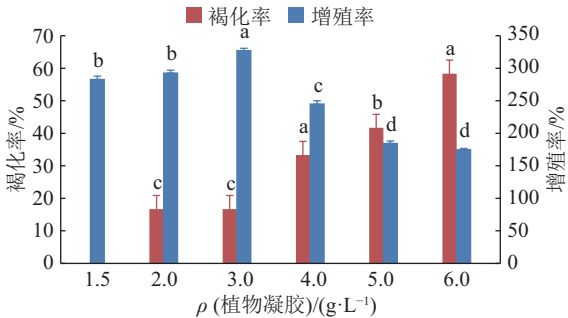
图 5 培养基 pH 对于褐化率和增殖率的影响
Fig. 5 Effects of pH on browning and proliferation rates

2.4 植物凝胶含量对褐化的影响

从图 6 可以看出, 随着植物凝胶用量的加大, 褐化率呈逐渐升高的态势; 而且植物凝胶含量过多会显著影响胚性愈伤的增殖率, 同时会影响其形态和结构(愈伤表面干化, 呈结晶状); 而凝胶含量过少($1.5\sim2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 愈伤组织周围水分堆积, 虽不会产生褐化, 但影响其增殖和形态。所以综合来看, 培养基中添加 $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的植物凝胶是最优的选择。

2.5 培养基中蔗糖含量和糖的类型对褐化的影响

随着蔗糖含量的增加, 褐化率呈增高态势, 当蔗糖质量浓度达到 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 未褐化的愈伤已所剩无几, 当蔗糖质量浓度达到 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已全部褐



相同颜色图柱上凡具有一个相同小写字母者,表示不同处理间差异不显著($P>0.05$, LSD 法)。

图 6 培养基中植物凝胶含量对于褐化率和增殖率的影响
Fig. 6 Effects of phytagel content on browning and proliferation rates

化, 而葡萄糖、麦芽糖等褐化虽不算严重, 但会影响愈伤的增殖(表 1); 在蔗糖质量浓度 $10\sim30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 增殖率随着蔗糖含量增加而增加, 但由于褐化组织的增多而导致最后的平均增殖率差异不显著, 因此 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 是最优的选择。

表 1 蔗糖含量和糖的类型对褐化率和增殖率的影响¹⁾
Tab. 1 Effects of sucrose content and type of sugar on browning rate

糖种类	$\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	褐化率/%	增殖率/%
葡萄糖	20	20.83 \pm 2.55cd	285.44 \pm 3.56b
麦芽糖	20	20.83 \pm 2.55cd	289.12 \pm 8.40b
蔗糖	10	16.67 \pm 2.55d	316.23 \pm 9.14a
	20	29.17 \pm 2.55b	318.87 \pm 3.89a
	30	54.17 \pm 2.55b	319.94 \pm 6.89a
	40	91.67 \pm 2.55a	167.62 \pm 7.03c
	50	95.83 \pm 2.55a	132.53 \pm 4.55d
	60	100.00 \pm 0.00a	97.92 \pm 2.11e

1) 同列数据后上凡具有一个相同小写字母者, 表示不同处理间差异不显著($P>0.05$, LSD 法)。

2.6 正交试验结果

根据上述结果, 选定 4 个因素最优范围内 3 个水平进行正交试验, 2 周后愈伤组织褐化率见表 2。1 号处理褐化率最低(5.56%), 6 号为 9.53%, 其他试验褐化率均在 10%~21%, 8 号最高, 为 20.83%。极差分析显示放置愈伤块数极差最大(7.41), 对结果影响最大, 其次为蔗糖含量、pH 和凝胶含量; 从平均值看, 如将褐化降到最低, 各因素最好搭配为放置 6 块愈伤, pH 为 5.9, 植物凝胶为 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蔗糖为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。如将效率最大化, 则可放置 7 块愈伤, 蔗糖添加 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (在一定范围内, 蔗糖含量增加, 增殖率会增加)。

如图 7 所示, 在半固体培养基中随着培养时间
<http://xuebao.scau.edu.cn>

表 2 正交设计统计表
Tab. 2 Orthogonal design statistics

试验号	愈伤块数	pH	$\rho(\text{凝胶})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{蔗糖})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	平均褐化率 ¹⁾ /%
1	6	5.7	2.5	5	5.56±2.77h
2	6	5.8	3.0	10	11.11±3.92f
3	6	5.9	3.5	15	11.11±3.92f
4	7	5.7	3.0	15	19.05±4.76b
5	7	5.8	3.5	5	14.29±0.00d
6	7	5.9	2.5	10	9.53±3.37g
7	8	5.7	3.5	10	16.67±3.37c
8	8	5.8	2.5	15	20.83±4.17a
9	8	5.9	3.0	5	12.50±2.95e
k_1	9.26	13.76	12.00	10.78	
k_2	14.29	15.41	14.22	12.44	
k_3	16.67	11.05	14.02	17.00	
R	7.41	4.36	2.22	6.12	

1)同列数据后上凡具有一个相同小写字母者,表示不同处理间差异不显著($P>0.05$, LSD法)。

的增加,褐化也逐渐加重。在原培养基上,褐化率几乎呈直线升高趋势,2 周时即可达 20% 左右,而胚性愈伤在优化的培养基生长 2 周时褐化率只有不到 5%,效果是比较显著的。

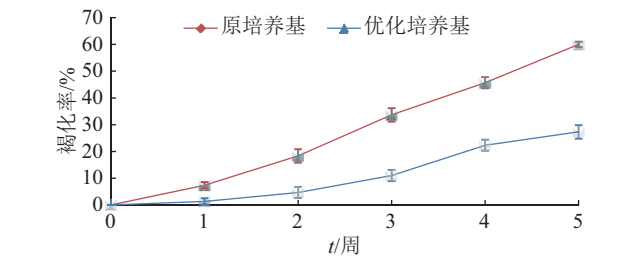


图 7 培养基调整前后褐化率的统计
Fig. 7 Browning rate before and after adjustment of medium

3 讨论与结论

随着继代时间的增长,胚性愈伤组织往往会出现一些不利的甚至不可逆的变化,如坏死、胚性丧失和褐化等,而目前较好的解决方法是筛选优秀的细胞系、在其增殖高峰时进行超低温保存或置于悬浮培养条件下^[11-12]。在油松胚性愈伤中,褐化的现象在不同基因型间差异显著,且会随着时间的增加而加重,在此结果来看,每年筛选优良的基因型的确是较好的解决方法,但时间的耗费和目前并不令人满意的诱导率远远不如考虑调整优化培养基更为实际。

体细胞胚胎发生是细胞全能性表达最完全的一种方式,重演了合子胚形态发生的进程^[13]。在自

<http://xuebao.scau.edu.cn>

然环境下,松树种子中的合子胚是在雌配子体里面完成生长和发育过程,但是离体环境下进行体细胞胚胎发生,除了诱导初期大多数时间不是在雌配子体内进行的,理论上人工培养基越接近雌配子体的环境就越利于胚性愈伤组织的生长,因而培养基的优化对胚性愈伤快速、健康的生长很重要,但需要结合各方面综合考虑。

培养皿、培养基是胚性愈伤所处的环境和营养来源,其变化也会影响外植体状态^[3]。如果培养皿中放置的愈伤数量过多,相互之间的竞争及物理空间限制,一些较差的愈伤会受此影响而处于不利的状态^[14-15]。

pH 与褐变也密切相关, pH 对酚类和酚氧化酶结合部位产生影响^[16]。在板栗愈伤组织培养中, pH 在 5.8 以下、6.0 以上时褐化明显加剧^[3],而牡丹愈伤培养中培养基需调到 6.5 才能使褐化最低^[17], 本研究中将培养基中 pH 调到 5.9 是最佳的。

在云桑的组织培养中,琼脂用量大,褐变率低;随着琼脂用量的减少,组织褐化则加重^[18]。然而,在油松胚性愈伤的培养中,添加过量的凝胶是不利的,会加大褐化的概率,也会对其增殖和形态产生不利的影响;当然,如果凝胶含量偏少,愈伤本身或培养基中的水分会积累过多,同样不利于其生长。

糖类是愈伤生长的重要碳源,是必不可少的,但同时它与培养基内的渗透压、酚类合成、酶活动等紧密相关,含量升高时,渗透压增大,促进细胞分裂,而过高时反而会导致细胞分裂下降,褐化升

高^[19-20]。而尝试更换成麦芽糖、葡萄糖,虽未产生异常的褐化^[9],但愈伤生长确不如蔗糖,可见不同植物对糖源的要求是不一样的^[20]。

此外,培养基中无机盐含量、激素含量等都会影响褐化^[3],但通过对 2,4-D 和 6-BA 的调整,发现其对褐化影响并不显著,而无机盐涉及到基本培养基,在此并未调整。但相较于原有的培养基和培养条件,通过上述的调整和优化,在 2 周内,15n38a 细胞系褐化出现频率很低,而所有油松胚性愈伤的平均褐化率下降到了 10% 左右,同时又能保证增殖的效率,已经很好地达到了目的。当然,褐化还未完全避免,研究褐化的机理、运用一些抗褐化试剂将是下一步研究的问题。

参考文献:

- [1] 沈熙环. 油松、华北落叶松良种选育实践与理论[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [2] 翟晓巧. 木本植物组织培养褐化控制策略[J]. 河南林业科技, 2008, 28(1): 38-40.
- [3] 罗丽华. 板栗组织培养及褐变研究[D]. 长沙: 中南林学院, 2004, 9-17.
- [4] 邹英宁, 吴强盛. 果树组织培养中褐变现象及其抑制研究进展[J]. 长江大学学报(自科版), 2007, 4(3): 47-50.
- [5] 庞勇. 果树组织培养中褐化现象的研究进展[J]. 甘肃林业科技, 2004, 29(1): 16-18.
- [6] PIRTTILA A M, JOENSUU P, POSPIECH H, et al. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures[J]. *Physiol Plant*, 2004, 121(2): 305-312.
- [7] KHOSROUSHAHI A Y, NADERI-MANESH H, SIMONSEN H T. Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production[J]. *Bioimpacts*, 2011, 1(1): 37-45.
- [8] 陈建勇. 杉木愈伤组织培养中的褐化控制研究[J]. 亚热带植物科学, 2011, 40(3): 47-49.
- [9] BUSINGE E, EGERTSDOTTER U. A possible biochemical basis for fructose-induced inhibition of embryonic development in Norway spruce (*Picea abies*)[J]. *Tree Physiol*, 2014, 34(6): 657-669.
- [10] LITVAY J D, VERMA D C, JOHNSON M A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.)[J]. *Plant Cell Rep*, 1985, 4(6): 325-328.
- [11] BRETON D, HARVENGT L, TRONTIN J F, et al. High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2005, 41(4): 494-504.
- [12] KONG L, VON ADERKAS P. A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2011, 106(1): 115-125.
- [13] SILVEIRA V, FLOH E S, HANDRO W, et al. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular proteins, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2004, 76(1): 53-60.
- [14] PETREK J, ZITKA O, ADAM V, et al. Are early somatic embryos of the Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) organised?[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144093.
- [15] 崔国栋. 林木悬浮细胞系建立过程中的影响因素[J]. 山西林业科技, 2010, 39(4): 35-37.
- [16] 谭兴杰, 李月标. 荔枝多酚氧化酶的部分纯化及性质[J]. 植物生理学报, 1984, 10(4): 339-345.
- [17] 王政, 周方方, 尚文倩, 等. 培养基成分对牡丹愈伤组织褐化的影响[M]//张启翔. 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 2015: 248-252.
- [18] 邱璐, 陈善娜, 杨跃仙, 等. 云杉组织培养中褐化问题的研究[J]. 蚕业科学, 2000, 26(2): 118-119.
- [19] DONG Y S, FU C H, SU P, et al. Mechanisms and effective control of physiological browning phenomena in plant cell cultures[J]. *Physiol Plant*, 2016, 156(1): 13-28.
- [20] 刘艺平, 王政, 牛佳佳, 等. 不同糖源及蔗糖质量浓度对牡丹愈伤组织褐化的影响[J]. 河南农业科学, 2013, 42(3): 103-106.

【责任编辑 庄 延】