

3 种抗褐化剂影响水曲柳体胚发生的生理分析

彭春雪 崔雪梅 刘春苹 杨玲 王秋水 沈海龙*

(东北林业大学林学院 林木遗传育种国家重点实验室 哈尔滨 150040)

摘要 水曲柳体胚发生过程中往往伴随褐化现象的产生,并且大多体胚生长褐化的外植体上,为解析外植体褐化和体胚发生之间的联系,本研究通过在培养基中添加 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、L-Glu(L-谷氨酸)和 AgNO₃(硝酸银),探究其对外植体褐化、体胚发生和生理生化的影响。研究结果表明:(1)低浓度(0.1、0.5 g · L⁻¹) PVP 和 100 mg · L⁻¹ L-Glu 处理加剧了外植体褐化,但显著促进了体胚发生,并且体胚发生率高达 60% 以上(分别比对照组提高了 6.59%、24.08% 和 22.88%);(2)200 mg · L⁻¹ L-Glu 处理有效降低了外植体褐化,褐化率为 68.11%(相比对照组降低了 5.83%),但是体胚发生率降低,其发生率为 46.32%(相较于对照组降低了 22.8%);(3)3 种抗褐化剂处理后外植体细胞内的多酚氧化酶活性(PPO)和超氧化物歧化酶(SOD)活性均低于对照组,过氧化物酶(POD)活性和丙二醛(MDA)含量均高于对照组。因此,研究表明低浓度的抗褐化剂可以促进体胚发生,在这个过程中涉及到 POD 活性升高和 MDA 含量增加。本研究为解析水曲柳体胚发生伴随外植体褐化的生物学机理以及水曲柳体胚高频发生提供理论依据。

关键词 水曲柳;体胚发生;外植体褐化;抗氧化酶活性

中图分类号: S722.8 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2019.02.011

Physiological Analysis of Three Anti-Browning Agents Affecting Somatic Embryogenesis in *Fraxinus mandshurica*

PENG Chun-Xue CUI Xue-Mei LIU Chun-Ping YANG Ling WANG Qiu-Shui SHEN Hai-Long*

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract The somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* Rupr. is often accompanied by browning, and most somatic embryos grow on browning explants. We analyzed the relationship between explant browning and somatic embryogenesis, by adding PVP (polyvinylpyrrolidone), L-Glu (L-glutamic acid) and AgNO₃ (silver nitrate) to the culture medium, and studied its effects on browning, somatic embryogenesis and physiological and biochemical characteristics of explants. The results showed that: (1) Low concentration (0.1 and 0.5 g · L⁻¹) PVP, and 100 mg · L⁻¹ L-Glu treatment exacerbated browning of explants, but significantly promoted somatic embryogenesis, somatic embryogenesis rate exceeded 60% (increased by 6.59%, 24.08% and 22.88% compared to the control, respectively). (2) The 200 mg · L⁻¹ L-Glu treatment effectively reduced the browning of explants, the browning rate was 68.11% (down 5.83% compared with the control), but the somatic embryogenesis rate was reduced to 46.32% (down 22.8% compared with the control). (3) The activities of polyphenol oxidase (PPO) and superoxide dismutase (SOD) in explants were lower than those of

基金项目: 林木遗传育种国家重点实验室(东北林业大学)创新项目(C01);基于外植体褐化效应的水曲柳体胚发生发育生物学机制解析(31570596)

第一作者简介: 彭春雪(1992—),女,硕士研究生,主要从事树木组织培养和繁殖生物学与技术研究。

* 通信作者: E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn

收稿日期: 2018-10-23

Foundation item: The Innovation Project of State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding (Northeast Forestry University) (C01); Biological mechanism elucidation for initiation and development of *Fraxinus mandshurica* somatic embryos based on explant browning (31570596)

First author introduction: PENG Chun-Xue (1992—) female master, mainly engaged in research of tree tissue culture and plant propagation biology and technology.

* Corresponding author: E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn

Received date: 2018-10-23

control after treatment with three anti-browning agents , peroxidase(POD) activity and malondialdehyde(MDA) content were higher than the control. Therefore , it is believed that a low concentration of anti-browning agent can promote somatic embryogenesis , and in this process , an increase in POD activity and an increase in MDA content are involved. We analyzed the biological mechanism of somatic embryogenesis with explants browning and got the frequency of somatic embryogenesis of *F. mandshurica*.

Key words *Fraxinus mandshurica*; somatic embryogenesis; explant browning; antioxidase activity

水曲柳(*Fraxinus mandshurica* Rupr.) 是木犀科(Oleaceae) 白蜡树属(*Fraxinus*) 高大乔木 , 温带阔叶红松林重要组成树种、我国珍贵优质阔叶用材树种、北方城乡绿化优良树种 , 具有重要的经济价值、生态价值和美化价值^[1-2]。植物体胚发生既是胚胎细胞生物学和分子生物学研究的全能模型 , 也是植物种质创新和优良种质材料规模化扩繁的有效系统^[3-6]。此外 , 植物体胚发生可以结合最优无性系个体之间的控制授粉制种及种质的超低温保存和利用 , 并可以与基因组选择育种相结合 , 从而直接与良种选育结合在一起 , 有效提高树木育种效率^[6]。因此 , 系统研究水曲柳体胚发生技术、掌握其生物学机理 , 对加速水曲柳良种选育和快速规模化繁殖具有重要意义。

目前 , 水曲柳体胚发生与植株再生培养体系已经建立 , 并对水曲柳体胚发生过程中的形态解剖、生理生化、DNA 甲基化、蛋白质组学等进行了一系列的研究^[7-11]。在以前的研究中发现 , 水曲柳体胚产生过程中伴随着外植体的褐化现象 , 并且水曲柳体胚大部分都产生在褐化的外植体上^[2, 9-11]。这与外植体褐化是组织培养不利因素的普遍认知不同 , 但与以下研究有相同或相似之处: 李官德等在棉花(*Gossypium hirsutum* L.) 体胚发生过程中发现的褐化的愈伤组织也能分化出体胚^[12]; Tapia 等在葡萄(*Vitis vinifera* L.) 体胚研究中发现外植体培养到 8 ~ 14 天时发生轻度褐化、但不影响活性和再生能力^[13]; Ko 等在大豆(*Glycine max*(L.) Merr.) 体胚研究中发现体胚主要发生在培养中子叶外植体远轴端边缘不断分化和褐化/坏死的组织上^[14]; Find 等在辐射松(*Pinus radiata*) 研究中合子胚下胚轴和胚根产生的褐色的愈伤组织可以再生出胚性愈伤组织^[15]。这些研究结果表明 , 褐化可能存在某种有利的一面 , 或者是某种有利因素的一种关联外在表现。因此 , 我们对外植体褐化与水曲柳体胚发生的关系进行了一系列研究^[9-11, 16] , 以期解析水曲柳体胚发生伴随外植体褐化的生物学机理 , 为水曲柳体胚高频发

生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料与体胚诱导方案

水曲柳种子于 2013 年 11 月采自东北林业大学实验林场 , 去翅后用流水冲洗 2 d , 在超净工作台用 75% 酒精处理 30 s , 蒸馏水冲洗 3 ~ 5 次 , 5% NaClO 灭菌 15 min , 最后用无菌蒸馏水冲洗 6 ~ 7 次 , 将种子的胚轴端切除 2 ~ 3 mm , 挤出胚 , 将两片子叶内侧贴于培养基上。诱导培养基为 MS1/2(将 MS 培养基中所有成分都减半) 附加 400 mg · L⁻¹ 酸水解酪蛋白(CH) , 75 g · L⁻¹ 蔗糖 , 5 mg · L⁻¹ NAA , 2 mg · L⁻¹ BA , 6.5 g · L⁻¹ 琼脂 , 调节 pH 至 5.8 , 接种后暗培养 , 培养室的温度为 25 ± 2℃ , 培养室的相对湿度为 40% ~ 60%。

1.2 抗褐化剂处理

PVP 处理浓度分别为 0.1 , 0.5 , 1.0 和 2.0 g · L⁻¹; L-Glu 处理浓度分别为 50 , 100 和 200 mg · L⁻¹; AgNO₃ 处理浓度分别为 1 和 10 mg · L⁻¹ , 共 9 种处理 , 以不加任何抗褐化剂处理作为对照组。其中 PVP 于灭菌前加入培养基中 , L-Glu 和 AgNO₃ 以过滤灭菌形式加入培养基。每个处理重复 10 次 , 每个重复接种 10 个外植体。

1.3 测定指标及方法

在培养过程中 , 用体视显微镜每天连续观察外植体变化 , 培养 45 d 统计体胚发生率及褐化率并对不同处理的外植体进行生理生化指标测定。多酚含量及 PPO 活性参照刘春苹的方法测定^[17] , SOD 采用氮蓝四唑光化还原法来测定^[18] , POD 采用愈创木酚法来测定^[10] , MDA 采用硫代巴比妥酸反应比色测定法^[19]。每项指标均重复测定 3 次 , 取平均值。

$$\text{体胚发生率}(\%) = \frac{\text{诱导产生体胚外植体数}}{\text{接种存活外植体数}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{褐化率}(\%) = \frac{\text{褐化外植体数}}{\text{接种存活外植体数}} \times 100 \quad (2)$$

1.4 数据分析

试验数据用 Microsoft Office Excel 2007 进行统计处理,利用 SPSS Statistics 19.0 对数据进行方差分析和差异显著性检验,并用 Sigmaplot12.5 作图。

2 结果与分析

2.1 抗褐化剂处理对水曲柳体胚发生及外植体褐化的影响

PVP、L-Glu 和 AgNO_3 的添加显著影响水曲柳体胚发生 ($P < 0.05$),在 0.1 、 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glu 处理下促进体胚发生,体胚发生率为 60.00% 、 69.85% 和 69.17% ,分别比对照组显著提高了 6.59% 、 24.08% 和 22.88% ,其余处理均显著低于对照组,其中 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 下体胚发生率最高为 69.85% , $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 下体胚发生率最低为 14.83% ,相较于对照组降低了 74.99% 。同样抗褐化剂 PVP、L-Glu 和 AgNO_3 也显著影响水曲柳外植体的褐化 ($P < 0.05$),只有 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glu 处理降低外植体褐化率,其褐化率为 68.11% 相较于对照组降低了 5.83% ,其余处理外植体褐化程度均高于对照组,其中在 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 下褐化率最高,为 96.09% 相比对照组提高了 32.85% ,在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 下褐化率最低褐化率是 74.66% 相比对照组提高了 2.33% (图 1)。

2.2 抗褐化剂处理对水曲柳体胚发生外植体内的多酚含量和 PPO 活性的影响

PVP、L-Glu 和 AgNO_3 添加显著影响外植体细胞内多酚含量 ($P < 0.05$)。在 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glu 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glu 下加剧了多酚含量的积累,其中,在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glu 下多酚含量最高,为 0.41% ,相较于对照组增加了 32.25% ,在 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 多酚含量最低,为 0.31% ,与对照组相同,其余处理均抑制了多酚含量的积累,其中在 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 下,多酚含量为 0.15% ,相较于对照组降低了 51.61% ,在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 下多酚含量最高,为 0.27% ,相较于对照组降低了 12.90% 。PVP、L-Glu 和 AgNO_3 添加同样显著影响外植体细胞内 PPO 活性 ($P < 0.05$) 3 种抗褐化剂处理后外植体细胞内的 PPO 活性均低于对照组 (图 4)。在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 浓度处理下,PPO 活性最高,与对照组相比下降了 30.1% ,在 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 浓度处理下,PPO 活性最低,与对照组相比降低 81.2% 。从整体角度观

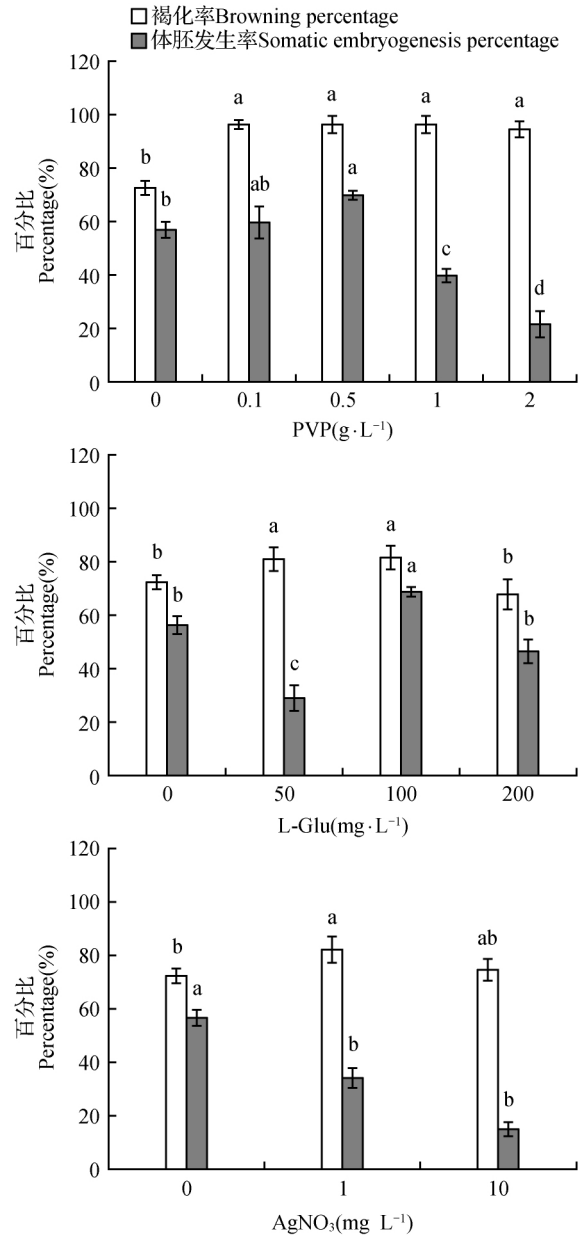


图 1 抗褐化剂对水曲柳外植体褐化率和体胚发生率的影响 同一测定指标上不同字母表示 $P < 0.05$ 水平差异显著,不同。

Fig. 1 Effects of antioxidants on explant browning rate and somatic embryogenesis of *F. mandshurica* Different letters within the same measurement index indicated the significant difference at 5% level, the same as below.

察,发现 PVP 和 AgNO_3 的添加在降低多酚含量积累的同时也抑制 POD 活性 (图 2)。

2.3 抗褐化剂处理对水曲柳体胚发生外植体抗氧化酶 SOD 和 POD 活性的影响

PVP、L-Glu 和 AgNO_3 的添加显著影响外植体细胞内的 SOD 活性 ($P < 0.05$) 3 种抗褐化剂的处理中 SOD 活性均低于对照组,其中,在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

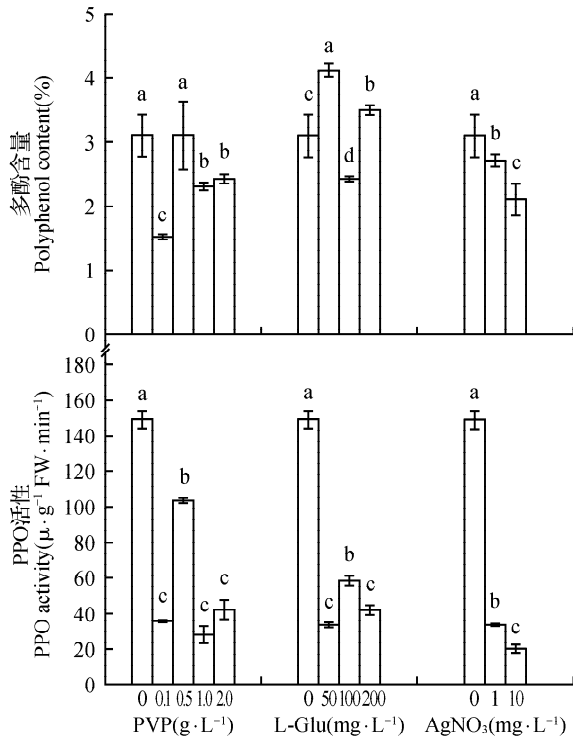


图2 3种抗褐化剂对水曲柳体胚发生外植体多酚含量和PPO活性的影响

Fig.2 Effects of three antioxidants on total phenolic content and PPO activity in explants of *F. mandshurica* somatic embryogenesis

AgNO₃ 下 SOD 活性最高 377.59 μg·g⁻¹FW, 与对照组相比下降了 29.1%, 在 1.0 mg·L⁻¹ PVP 下 外植体细胞中的 SOD 活性最低 58.09 μg·g⁻¹FW 与对照组相比降低了 80.9%; 同时, 抗褐化剂 PVP、L-Glu 和 AgNO₃ 的添加显著影响外植体细胞内 POD 活性 ($P < 0.05$), 所有处理的 POD 活性显著的高于对照组, 其中在 100 mg·L⁻¹ L-Glu 下, POD 活性最高, 为 109 473.4 μg·g⁻¹FW, 相较于对照组提高了 471.8%, 在 1 mg·L⁻¹ AgNO₃ 下, POD 活性最低, 为 36 722.16 μg·g⁻¹FW, 相较于对照组提高了 110.86% (图 3)。

2.4 抗褐化剂处理对水曲柳体胚发生外植体内的 MDA 含量的影响

水曲柳体胚发生过程中, PVP、L-Glu 和 AgNO₃ 添加显著影响外植体细胞内 MDA 含量 ($P < 0.05$) 3 种抗褐化剂的处理中外植体细胞内 MDA 含量均高于对照组。在 0.1 g·L⁻¹ PVP 下外植体细胞内 MDA 含量最高, 与对照组相比提高了 131.1% 在 1.0 g·L⁻¹ PVP 下外植体细胞内 MDA 含量最低, 与对照组相比提高了 41.5% (图 4)。

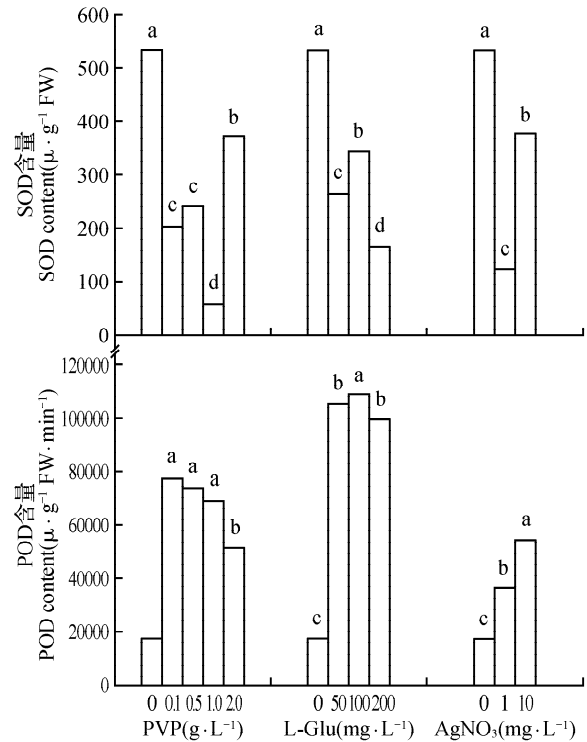


图3 3种抗褐化剂对水曲柳体胚发生外植体中SOD活性和POD活性的影响

Fig.3 Effects of three antioxidants on SOD activity and POD activity in explants of *F. mandshurica* somatic embryogenesis

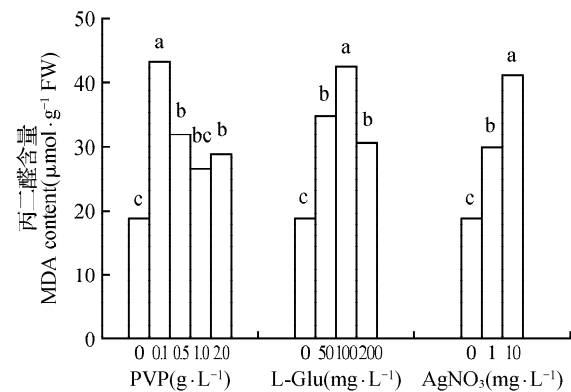


图4 3种抗褐化剂对水曲柳体胚发生外植体中MDA含量的影响

Fig.4 Effects of three antioxidants on MDA content in explants of *F. mandshurica* somatic embryogenesis

2.5 外植体生理生化指标与体胚发生及褐化的相关性分析

PVP 处理后, 外植体生理生化指标与体胚发生之间没有显著相关性。然而, 外植体褐化率与细胞内的 POD 活性呈显著正相关 ($P = 0.016 <$

0.05) ,与 SOD 活性呈显著负相关 ($P = 0.043 < 0.05$) 与其他指标之间无显著相关性 ,同时 ,POD 活性与 SOD 活性呈显著正相关 ($P = 0.029 < 0.05$) 。L-Glu 处理后 ,外植体生理指标与体胚发生及褐化之间均无显著相关性 ,而 PPO 活性与 POD 活性呈显著负相关 ($P = 0.032 < 0.05$) 。AgNO₃ 处理后 ,体胚发生率与 POD 活性呈显著负相关 ($P = 0.042 < 0.05$) ,与其他指标相关性较小 ,褐化率与外植体生理生化指标之间没有显著相关性 ,而外植体生理生化指标 POD 活性与 MDA 含量呈显著正相关 ($P = 0.016 < 0.05$) 。

3 讨论

水曲柳体胚产生过程中伴随着外植体的褐化现象^[2,9-11] ,褐化现象普遍被认为是阻碍组织培养^[20] 。有研究表明 ,抗褐化剂的添加能够有效降低外植体褐化率 ,且在很多植物的褐化研究中取得成效^[21-22] 。然而 ,在本研究中发现抗褐化剂 PVP、L-Glu 和 AgNO₃ 的添加并没有降低水曲柳外植体褐化反而进一步加剧褐化现象 ,这与大多数认知不符 ,但与以下研究具有相同或相似之处 :饶慧云等在葡萄愈伤褐化研究中发现 ,抗褐化剂硫代硫酸钠 (Na₂S₂O₃) 的添加 ,加剧了外植体褐化^[23] ;Pinto 等在蓝桉 (*Eucalyptus globulus* Labill.) 体胚诱导的研究中发现抗褐化剂的添加并没有显著降低外植体的褐化能力^[15] ;陈爱萍等在豆科牧草 (*Legume forage*) 愈伤组织褐化的研究中发现抗褐化剂 PVP 和柠檬酸的添加加剧了外植体的褐化^[24] 。结果表明不同种类的抗褐化剂对不同种类植物的抗褐化效果及作用机理存在显著差异 ,只有选择适合的抗褐化剂才能达到降低褐化的效果。同时 ,本研究发现低浓度 PVP (0.1 和 0.5 g · L⁻¹) 和 L-Glu (100 mg · L⁻¹) 处理下有利于体胚发生 ,但其褐化率却显著的高于对照组。叶睿华等在五种抗褐化剂对杜鹃兰 (*Cremastra appendiculata*) 原球茎增殖培养的研究中以及刘香江等在抗褐化剂对山葵 (*Wasabia japonica*) 组培苗增殖的研究中均存在相似的现象^[20-25] 。这表明在水曲柳体胚发生中抗褐化剂的添加在加剧外植体褐化的同时促进体胚发生并不是一个偶然现象 ,通过相关性分析发现体胚发生与褐化率之间并没有显著的相关性 ,说明低浓度的抗褐化剂并不是通过改变外植体褐化程度来促进体胚发生。

早期研究表明 ,外植体细胞内多酚含量和

PPO 活性与外植体褐化关系密切 ,并且外植体褐化阻碍组织培养^[26-28] 。在本研究中发现 ,在 PVP 处理下低浓度 PVP (0.1 和 0.5 g · L⁻¹) 处理中体胚发生率与多酚含量并没有显著关系 ,说明低浓度的抗褐化剂并不能通过改变外植体细胞内多酚含量及 PPO 活性来促进体胚发生。POD 通常与脂酶、酸性磷酸酶一起做为组织培养中胚性和器官发生快速灵敏的生理指标^[29] ,本研究中发现 ,在 PVP (0.1 和 0.5 g · L⁻¹) 处理下 POD 活性较高。关正君等在樱桃番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 叶体细胞胚发生的研究^[30] 以及王义等在人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey) 体细胞胚胎发生的研究中^[31] 也有相似现象 ,这说明 POD 活性促进体胚发生是一个普遍现象 ,而 POD 活性加剧促进体胚发生机理可能是在早期体胚发生时 ,细胞保持较强的分化能力 ,其物质代谢和呼吸作用都十分旺盛 ,POD 的活性增加可以加快对 H₂O₂ 的消除 ,以维持细胞对活性氧的平衡^[31] 。同时 ,本研究发现在 PVP 处理下高体胚发生处理中 (0.1 和 0.5 g · L⁻¹ PVP) 外植体细胞内 MDA 含量积累显著高于其它处理 ,MDA 作为膜脂过氧化指标 ,表示膜脂过氧化程度和对逆境反应的强弱 ,MDA 含量越高 ,则损伤越大^[32-33] ,说明水曲柳体胚发生与细胞内活性氧代谢平衡具有一定的联系 ,但具体机理还需进一步研究。

综上所述 ,低浓度抗褐化剂 (0.1 g · L⁻¹ PVP、0.5 g · L⁻¹ PVP 和 100 mg · L⁻¹ L-Glu) 在促进水曲柳体胚发生的同时加剧了 POD 活性及 MDA 含量的积累 ,这表明水曲柳体胚发生与细胞内活性氧代谢平衡具有一定的联系。因此在未来的研究中 ,需要进一步探究活性氧代谢与体胚发生之间的调控机理。

参 考 文 献

1. 孔冬梅, 沈海龙, 冯丹丹, 等. 水曲柳体细胞胚与合子胚发生的细胞学研究[J]. 林业科学, 2006, 42(12): 130-133.
Kong D M, Shen H L, Feng DD, et al. Cytological investigation of somatic and zygotic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* [J]. Scientia Sinicae, 2006, 42(12): 130-133.
2. 杨玲, 刘虹男, 张冬严, 等. 生长调节剂和渗透调节物质对水曲柳体胚发生的影响[J]. 植物研究, 2017, 37(5): 682-689.
Yang L, Liu H N, Zhang D Y, et al. Effect of plant growth

- regulators and osmoticums on somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* Rupr. [J]. Bulletin of Botanical Research 2017 37(5): 682–689.
3. Smertenko A ,Bozhkov P V. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning [J]. Journal of Experimental Botany ,2014 ,65 (5) : 1343 – 1360.
 4. Us-Camas R ,Rivera-Solís G ,Duarte-Aké F ,et al. In vitro culture: an epigenetic challenge for plants [J]. Plant Cell , Tissue and Organ Culture 2014 ,118(2) :187–201.
 5. Lelu-Walter M A ,Teyssier C ,Guérin V ,et al. Vegetative propagation of larch species: somatic embryogenesis improvement towards its integration in breeding programs [M]. //Park Y S ,Bonga J M ,Moon H K. Vegetative propagation of forest trees. Seoul ,Korea: National Institute of Forest Science 2016: 551–571.
 6. Lelu-Walter M A ,Thompson D ,Harvengt L ,et al. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art ,benefits ,challenges and future direction [J]. Tree Genetics & Genomes 2013 9(4) :883–899.
 7. Kong D M ,Preece J E ,Shen H L. Somatic embryogenesis in immature cotyledons of Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) [J]. Plant Cell ,Tissue and Organ Culture 2012 ,108(3) :485–492.
 8. Yang L ,Bian L ,Shen H L ,et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of Manchurian ash(*Fraxinus mandshurica* Rupr.) [J]. Plant Cell ,Tissue and Organ Culture 2013 ,115(2) :115–125.
 9. 丛建民 沈海龙 李玉花 等. 水曲柳体胚发生过程中不同状态类型外植体的生理生化状态 [J]. 华南农业大学学报 2012 33(1) :48–52.
Cong J M ,Shen H L ,Li Y H ,et al. Physiological and biochemical status of different-types of explants in somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* [J]. Journal of South China Agricultural University ,2012 ,33(1) :48–52.
 10. 孙倩 杨玲 沈海龙 等. PPO 处理对水曲柳合子胚子叶外植体褐化和体胚发生的影响 [J]. 东北林业大学学报 2012 40(11) :1–5 9.
Sun Q ,Yang L ,Shen H L ,et al. Effect of PPO treatments on zygotic cotyledon explant browning and somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* [J]. Journal of Northeast Forestry University 2012 40(11) :1–5 9.
 11. 刘艳 沈海龙 丛建民. 5-氮胞苷对水曲柳合子胚外植体状态及体胚发生的影响 [J]. 东北林业大学学报 2011 ,39(8) :25–27 32.
Liu Y ,Shen H L ,Cong J M. Effect of 5-azacytidine on zygotic cotyledon explants and somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* [J]. Journal of Northeast Forestry University 2011 39(8) :25–27 32.
 12. 李官德 肖娟丽 罗晓丽 等. 不同棉花愈伤组织状态与胚胎发生及其植株再生的关系 [J]. 山西农业科学 ,2006 34(1) :29–31.
Li G D ,Xiao J L ,Luo X L ,et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration of calli derived from cotton(*Gossypium hirsutum* L.) depending on their quality [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences 2006 34(1) :29–31.
 13. Tapia E ,Sequeira Á ,Castro Á ,et al. Development of grapevine somatic embryogenesis using an air-lift bioreactor as an efficient tool in the generation of transgenic plants [J]. Journal of Biotechnology 2009 ,139(1) :95–101.
 14. Ko T S ,Nelson R L ,Korban S S. Screening multiple soybean cultivars(MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons [J]. Crop Science 2004 44(5) :1825–1831.
 15. Find J I ,Hargreaves C L ,Reeves C B. Progress towards initiation of somatic embryogenesis from differentiated tissues of radiata pine(*Pinus radiata* D. Don) using cotyledonary embryos [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 2014 50(2) :190–198.
 16. Liu C P ,Yang L ,Shen H L. Proteomic analysis of immature *Fraxinus mandshurica* cotyledon tissues during somatic embryogenesis: effects of explant browning on somatic embryogenesis [J]. International Journal of Molecular Sciences ,2015 ,16(6) :13692–13713.
 17. 刘春苹 水曲柳体胚发生伴随外植体褐化的生理机制及差异蛋白研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学 2009.
Liu C P. Physiologymeechanism and differential protein of *Fraxinus mandshurica* somatic embryo genes is accompanied explant browning [D]. Harbin: Northeast Forestry University 2009.
 18. 杨和平 程井辰 周吉源 等. 石刁柏体细胞胚胎发生过程中超氧化物歧化酶活性的变化 [J]. 植物学报 ,1993 35(6) :490–493.
Yang H P ,Cheng J C ,Zhou J Y ,et al. Change of superoxide dismutase activities during somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. [J]. Acta Botanica Sinica ,1993 35(6) :490–493.
 19. 赵世杰 许长成 邹琦 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进 [J]. 植物生理学通讯 ,1994 30(3) :207–210.
Zhao S J ,Xu C C ,Zou Q ,et al. Improvement of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues [J]. Plant Physiology Communications ,1994 30(3) :207–210.
 20. 叶睿华 吕享 李小兰 等. 五种抗褐化剂对杜鹃原球茎增殖培养的作用效果 [J]. 植物生理学报 ,2018 54

- (6): 1103 – 1110.
Ye R H ,Li X ,Li X L ,et al. Effects of five browning inhibitors on protocorms proliferation culture of *Crematstra appendiculata* [J]. *Plant Physiology Journal* ,2018 ,54(6) : 1103 – 1110.
21. 高红兵 杜凤国 ,王欢. 抗褐化剂对天女木兰芽外植体褐化与酚酸氧化的影响 [J]. *林业科学研究* ,2017 ,30(3) : 525 – 532.
Gao H B ,Du F G ,Wang H. Effects of browning inhibitors on bud explants browning and phenolic acids oxidation of *Magnolia sieboldii* K. Koch [J]. *Forest Research* ,2017 ,30(3) : 525 – 532.
22. 夏亚男 蒋建雄 易自力 ,等. 3 种抗褐化剂对南荻外植体褐变及愈伤诱导率的影响 [J]. *北方园艺* ,2014(17) : 93 – 96.
Xia Y N ,Jiang J X ,Yi Z L ,et al. Effect of three antioxidants on browning of explant and callus induction rate of *Miscanthus lutarioriparius* [J]. *Northern Horticulture* ,2014(17) : 93 – 96.
23. 饶慧云 邵祖超 柳海宁 ,等. 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 ,et al. Effect of browning inhibitors on callus subculture of phenolic compounds ,enzyme and gene expression of grape [J]. *Plant Physiology Journal* ,2015 ,51(8) : 1322 – 1330.
24. 陈爱萍 冯维卫 刘允康. 3 种豆科牧草愈伤组织继代培养抗褐化的研究 [J]. *中国农学通报* ,2017 ,33(22) : 138 – 144.
Chen A P ,Feng W W ,Liu Y K. Anti-browning agents affecting callus subculture of three legume forage species [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* ,2017 ,33(22) : 138 – 144.
25. 刘香江 杨丽 吴红芝. 山葵组培中抗褐化剂的筛选及其对增殖和生长的影响 [J]. *江苏农业科学* ,2018 ,46(7) : 33 – 36.
Liu X J ,Yang L ,Wu H Z. Screening of anti-browning agents in tissue culture of wasabi and the effect on proliferation and growth [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences* ,2018 ,46(7) : 33 – 36.
26. 段艳欣 郭文武. 多酚含量及多酚氧化酶活性与柑橘胚性愈伤组织褐化的关系 [J]. *中国农学通报* ,2009 ,25(15) : 117 – 120.
Duan Y X ,Guo W W. Study on callus browning in relation to polyphenol content and polyphenol oxidase activity among various citrus embryogenic calli [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* ,2009 ,25(15) : 117 – 120.
27. 岑忠用 苏江 邓晰朝 ,等. 总酚含量及多酚氧化酶活性与岩黄莲愈伤组织褐化的相关性研究 [J]. *作物杂志* ,2016 (1) : 149 – 153.
Cen Z Y ,Su J ,Deng X C ,et al. Study on total phenolic content and correlation between PPO activity and browning of *Corydalis saxicola* bunting callus [J]. *Crops* ,2016 (1) : 149 – 153.
28. Wang J B ,Liu B H ,Xiao Q ,et al. Cloning and expression analysis of litchi(*Litchi chinensis* Sonn.) polyphenol oxidase gene and relationship with postharvest pericarp browning [J]. *PLoS One* ,2014 ,9(4) : e93982.
29. Coppens L ,Gillis E. Isoenzyme electrofocusing as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis in callus tissues of *Hordeum vulgare* L. [J]. *Journal of Plant Physiology* ,1987 ,127(1 – 2) : 153 – 158.
30. 关正君 郭斌 尉亚辉. 樱桃番茄叶体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性和生理参数的变化 [J]. *核农学报* ,2011 ,25(3) : 594 – 601.
Guan Z J ,Guo B ,Wei Y H. Changes of anti-oxidative enzymes activities and physiological parameters during somatic embryogenesis of cherry tomato [J]. *Journal of Nuclear-Agricultural Sciences* ,2011 ,25(3) : 594 – 601.
31. 王义 赵文君 孙春玉 ,等. 人参体细胞胚胎发生过程中的生理变化 [J]. *东北师大学报: 自然科学版* ,2008 ,40(2) : 93 – 97.
Wang Y ,Zhao W J ,Sun C Y ,et al. Physiology changes of the somatic embryogenesis in *Panax ginseng* [J]. *Journal of Northeast Normal University: Natural Science Edition* ,2008 ,40(2) : 93 – 97.
32. 蒋燕 孟玲 赵会杰. 高温干旱处理对番茄不同品种幼苗生长的影响 [J]. *北方园艺* ,2007 (1) : 1 – 5.
Jiang Y ,Meng L ,Zhao H J. Influences of high temperature with soil drought on physiological character of tomato seedlings [J]. *Northern Horticulture* ,2007 (1) : 1 – 5.
33. 张英鹏 林咸永 章永松 ,等. 不同氮素形态对菠菜生长及体内抗氧化酶活性的影响 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版* ,2006 ,32(2) : 139 – 144.
Zhang Y P ,Lin X Y ,Zhang Y S ,et al. Effect of nitrogen forms on the growth and antioxidative enzyme activities of spinach [J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Sciences* ,2006 ,32(2) : 139 – 144.