

粗枝云杉胚性愈伤组织增殖后期的体细胞胚发生方式转变

张建伟¹, 王军辉^{1,*}, 马建伟²

¹中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京100091; ²甘肃省小陇山林业科学研究所, 甘肃天水741022

摘要: 粗枝云杉愈伤组织在增殖后期体细胞胚的分化能力显著降低, 转变愈伤组织增殖方式和体细胞胚分化培养方式有利于体细胞胚发生能力的提高。采用液体悬浮增殖取代半固体增殖更有利于胚性的保持。在增殖后期, 首选的体细胞胚发生方式为“液体增殖-滤纸分化”, 其次为“块状增殖-块状分化”, 最后是“块状增殖-滤纸分化”。

关键词: 粗枝云杉; 胚性愈伤组织; 增殖时期; 体细胞胚发生

The Way Change of Somatic Embryogenesis at the Late Stage of Embryogenic Callus Proliferation of *Picea asperata* Mast

ZHANG Jian-Wei¹, WANG Jun-Hui^{1,*}, MA Jian-Wei²

¹Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; ²Xiaolongshan Forestry Research Institute, Tianshui, Gansu 741022, China

Abstract: Somatic embryogenesis of *Picea asperata* decreased significantly ($P < 0.01$) as the time extension. At the late proliferation stage, changing the ways of proliferation and maturation could significantly increase the capacity for somatic embryogenesis. Compared with semi-solid culture, suspension culture was more conducive to retention of embryogenesis. At the late stage of proliferation, the optimal maturation approach was suspension culture-paper differentiation, chunk culture-chunk differentiation came in second, followed by chunk culture-paper differentiation.

Key words: *Picea asperata*; embryogenic callus; proliferation stage; somatic embryogenesis

植物体细胞胚胎发生是指在离体条件下, 已分化的体细胞在特定的环境条件下, 发育成与合子胚类似的胚状体的过程。作为一种最具潜力的植物无性繁殖技术, 体细胞胚胎发生是利用植物细胞工程手段实现植株再生的重要途径之一, 尤其对于难以扦插繁殖且繁殖周期较长的针叶树种来说具有巨大的应用价值(Klimaszewska等2007)。在体细胞胚胎发生过程中, 最为关键的形态建成事件即是在分化培养基上胚性愈伤组织由胚性细胞团向体细胞胚的转变(Stasolla和Yeung 2003; von Arnold和Clapham 2008; Joshi和Kumar 2013)。在胚性愈伤组织增殖过程中, 随着增殖时间的延长, 愈伤组织内源激素不断积累, 胚性也随之逐渐降低(Bozhkov等2002), 严重降低了体细胞胚的质量和收获量(Stasolla和Yeung 2003)。在增殖后期, 如何继续保持愈伤组织的高度胚性以及延长愈伤组织胚性的保持时间, 一直是体细胞胚胎发生技术研究所面临的难题。目前, 在由胚性愈伤组织增殖和体细胞胚分化培养构成的体细胞胚发生过程

中, 常用的愈伤组织增殖方式有半固体增殖(Gemperlova等2009; 刘宝光等2010; Montalbán等2012)和液体悬浮增殖两种(Gupta和Timmis 2005; Pullman和Skryabina 2007; 陈志等2007); 常用的体细胞胚分化方式有“块状增殖-滤纸分化”(Bozhkov和von Arnold 1998; von Arnold等2005; 杨模华等2011)和“块状增殖-块状分化”(吕守芳等2005; Kim等2009; Nakagawa等2011)。目前, 不同树种多采用单一的体细胞胚发生方式, 这不仅不能解决愈伤组织增殖后期胚性降低的问题, 还有可能由于评价误导导致一些珍贵细胞系的丢失。

粗枝云杉也称云杉, 为我国特有种, 也是国内云杉属树种中分布较广的树种, 具有重要的工业价值(Fu等1999; 四川省粗枝云杉纸浆材协作组2001)。本文针对粗枝云杉胚性愈伤组织在增殖后

收稿 2013-09-11 修定 2014-01-13

资助 “十二五”国家科技支撑项目(2012BAD01B01)。

* 通讯作者(E-mail: wangjh@caf.ac.cn; Tel: 010-62888539)。

期存在的胚性降低的问题,通过构建多样化的体细胞胚发生方式,以期在增殖后期继续维持愈伤组织的高度胚性,提高体细胞胚的发生频率和质量。

材料与方法

1 植物材料

粗枝云杉(*Picea asperata* Mast)未成熟球果采自甘肃省小陇山林科所云杉国家级种质资源库,于2012年6月用未成熟合子胚诱导胚性愈伤组织,包括1113、1911、1921、1931、2322、2614和2711共7个不同分化能力的细胞系。愈伤组织诱导和增殖培养基为:1/2LM(Litvay等1985)+2.2 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.1 mg·L⁻¹ 6-BA,附加500 mg·L⁻¹谷氨酰胺(过滤灭菌, Sigma公司产品)、1 g·L⁻¹酶水解酪蛋白(Sigma公司产品)、10 g·L⁻¹蔗糖、2 g·L⁻¹凝胶(gellan gum, Sigma公司产品), pH 5.8。所有细胞系均在相同培养基上增殖,每14 d转接继代一次,(24±1) °C黑暗中培养。根据体细胞胚分化能力的变化,将增殖2个月的胚性愈伤组织定义为增殖的早期阶段,此时胚性细胞系刚刚建立起来;将增殖8个月的胚性愈伤组织定义为增殖的后期阶段,此时规模化的胚性愈伤组织增殖细胞系已经建立。

2 方法

2.1 体细胞胚分化培养

采用实验室常用的“块状增殖-滤纸分化”方式,对分别增殖2月和8月的7个细胞系胚性愈伤组织进行体细胞胚分化,即转接增殖14 d后,从表面取约1 g鲜重的愈伤组织平铺到一张边缘经过剪裁的滤纸(Whatman™ 2, 直径90 mm)上,随后将附有胚性愈伤组织的滤纸平铺到分化培养基上。体细胞胚分化培养基为:1/2LM+16 mg·L⁻¹脱落酸(ABA, 过滤灭菌, Gibco公司产品)+50 g·L⁻¹ PEG4000(Merck公司产品)+30 g·L⁻¹蔗糖+1 g·L⁻¹活性炭(Sigma公司产品)+4 g·L⁻¹凝胶,附加500 mg·L⁻¹谷氨酰胺和1 g·L⁻¹水解酪蛋白(Sigma公司产品), pH 5.8。(24±1) °C黑暗培养。增殖2个月的愈伤组织每个细胞系3次生物学重复,增殖8个月的愈伤组织每个细胞系6次生物学重复,以一个培养皿(87 mm×15 mm)为一个重复,连续培养6周后统计发育正常的体细胞胚数量。

2.2 胚性愈伤组织增殖后期的增殖培养

将在1/2LM培养基上增殖8个月后的7个胚性

细胞系,转接增殖14 d后,分别用半固体和液体悬浮两种方式进行增殖。半固体增殖培养基为:1/2LM+2.2 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.1 mg·L⁻¹ 6-BA,附加500 mg·L⁻¹谷氨酰胺、1 g·L⁻¹酶水解酪蛋白、10 g·L⁻¹蔗糖、2 g·L⁻¹凝胶, pH 5.8。液体悬浮增殖培养基中不添加凝胶,两者成分相同。将半固体增殖培养的愈伤组织表面分成直径约0.5 cm的小块,取约3 g放置在盛有50 mL液体培养基的250 mL锥形瓶中,(24±1) °C下黑暗培养,摇床转速110 r·min⁻¹。每个细胞系4瓶,10 d转接一次。

2.3 胚性愈伤组织增殖后期的分化培养

胚性愈伤组织增殖后期,采用3种方式进行体细胞胚的分化。(1)“块状增殖-块状分化”。将7个细胞系的胚性愈伤组织在半固体培养基上增殖8个月后,继续转接增殖14 d,用镊子将其分成1 cm左右的小块,直接进行分化培养,每个培养皿放置7块。(2)“块状增殖-滤纸分化”。将7个细胞系的胚性愈伤组织在半固体培养基上增殖8个月后,继续转接增殖14 d,再进行分化培养。(3)“液体增殖-滤纸分化”。将建立起液体悬浮增殖体系的1921和1931两个细胞系,继续转接增殖14 d,取胚性愈伤组织转到未添加生长调节剂的液体培养基中,按照细胞静置体积和液体培养基体积之比1:3进行混合,取5 mL混匀的愈伤组织平铺到滤纸上,用布氏漏斗抽滤后转到分化培养基上培养。分化培养基和培养条件同2.1节,每个细胞系6次生物学重复。

2.4 数据分析

体细胞胚的分化能力用单位鲜重的胚性愈伤组织分化产生发育正常的体细胞胚数量[个·g⁻¹(FW)]表示,按下式进行计算:培养皿中分化的发育正常的体细胞胚数量/分化接种量;分化接种量=接种胚性愈伤组织后的培养皿质量-接种前的培养皿质量。方差分析采用SPSS 16.0, Duncan法进行多重比较。

实验结果

1 粗枝云杉体细胞胚的发育过程及不同增殖时期的分化能力比较

胚性愈伤组织分化培养1 d后球形胚开始出现(图1-A),分化第1周内淡黄色球形胚数量不断增加(图1-B、C、F);随后,球形胚伸长,发育产生柱状胚,2周后柱状胚大量产生(图1-D、G、H);继续培

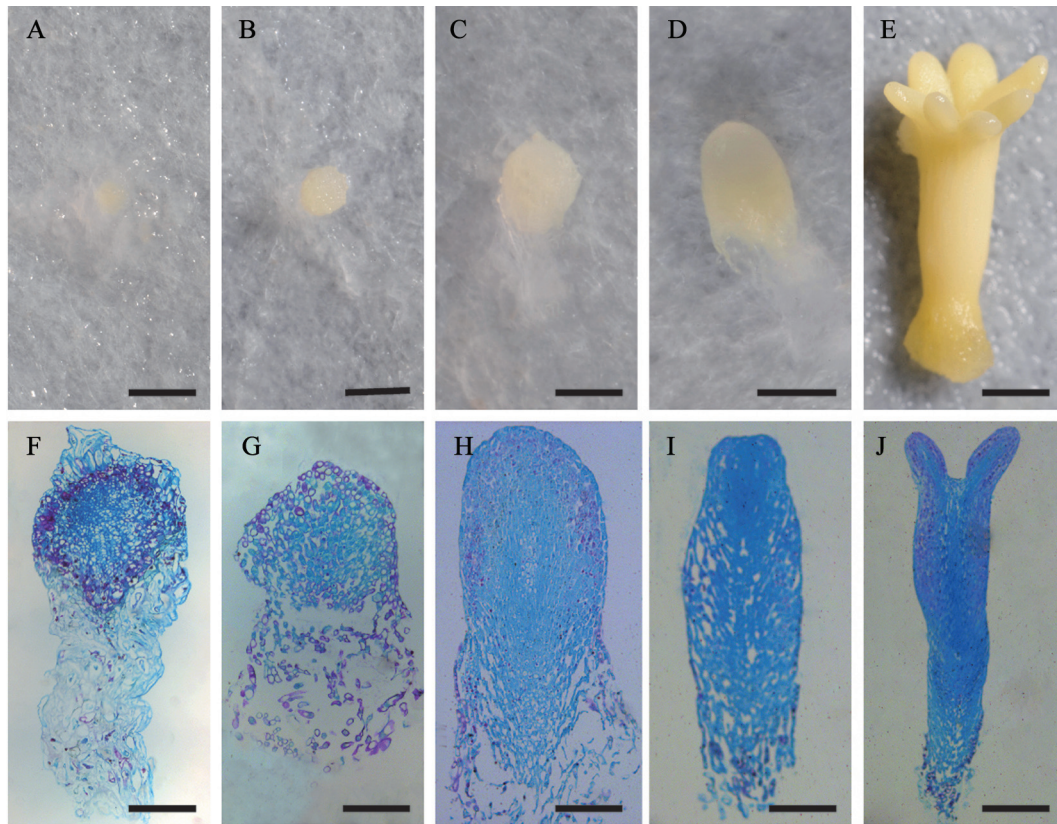


图1 粗枝云杉体细胞胚的发育过程及显微结构观察

Fig.1 Development process and histological observation of *P. asperata* somatic embryos

A~E: 体细胞胚的发育过程。A~C: 分别为发育1、4和7 d的球形胚, 标尺=1 mm; D: 发育2周时的柱状胚, 标尺=1 mm; E: 发育6周时的成熟子叶胚, 标尺=500 μm 。F~J: 体细胞胚发育各阶段的石蜡切片观察。F: 分化7 d时的球形胚, 标尺=100 μm ; G: 分化10 d时的柱状胚, 标尺=200 μm ; H: 分化2周时的柱状胚, 标尺=200 μm ; I: 分化4周时的早期子叶胚, 标尺=500 μm ; J: 分化6周时的成熟子叶胚, 标尺=500 μm 。

养3~4周后, 早期子叶胚开始出现(图1-I); 培养5~7周后, 发育为成熟子叶胚; 成熟子叶胚呈淡黄色, 子叶伸展, 胚轴明显(图1-E和J)。

方差分析表明, 愈伤组织在增殖的不同时期, 各细胞系的分化能力均不同程度地极显著降低 ($P < 0.01$)。在增殖后期, 愈伤组织平均分化产生体细胞胚 $17.30 \text{个} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW), 较增殖早期降低了9.6倍; 且部分细胞系(如1113、2322和2614)几乎不能正常分化(图2-A)。在分化培养基中, 增殖早期分化产生的体细胞胚呈现高度的同步化现象(图3-A); 而在后期分化的滤纸上, 非胚性愈伤组织呈黑褐色颗粒状堆积, 降低了体细胞胚的质量(图3-B)。此外, 体细胞胚的分化能力在不同分化方式及细胞系和分化方式的交互作用间也存在极显著的差异 ($P < 0.01$)。分化方式对体细胞胚的发生能力影响较大, 方差分量达到53.62%; 其次是细胞系和分

化方式的交互作用, 方差分量为23.17%。

2 胚性愈伤组织增殖后期的增殖方式转变

7个胚性细胞系的愈伤组织经过1个月的转接增殖后, 只有1921和1931两个胚性细胞系能够建立液体悬浮增殖体系(图4-A和B); 其他细胞系仍然呈块状或粘连丝状(图4-C~G)。观察半固体增殖的7个细胞系发现, 不能进行悬浮培养的愈伤组织大多非常粘稠, 丝状明显, 不易分开; 而能够悬浮增殖的愈伤组织稍疏松, 易分开, 在液体培养基中分散性较好, 新的胚性愈伤组织能够在小块状愈伤组织周围快速形成(图4-H)。在液体悬浮增殖过程中, 胚性愈伤组织生长迅速, 9~12 d后培养基即变浑浊, 增殖量增加4倍以上, 较相同时间内半固体增殖的增加2倍以上。此外, 悬浮增殖的胚性愈伤组织多为细小颗粒状, 细胞均一性程度高, 保证了后期体细胞胚分化的高度同步化。

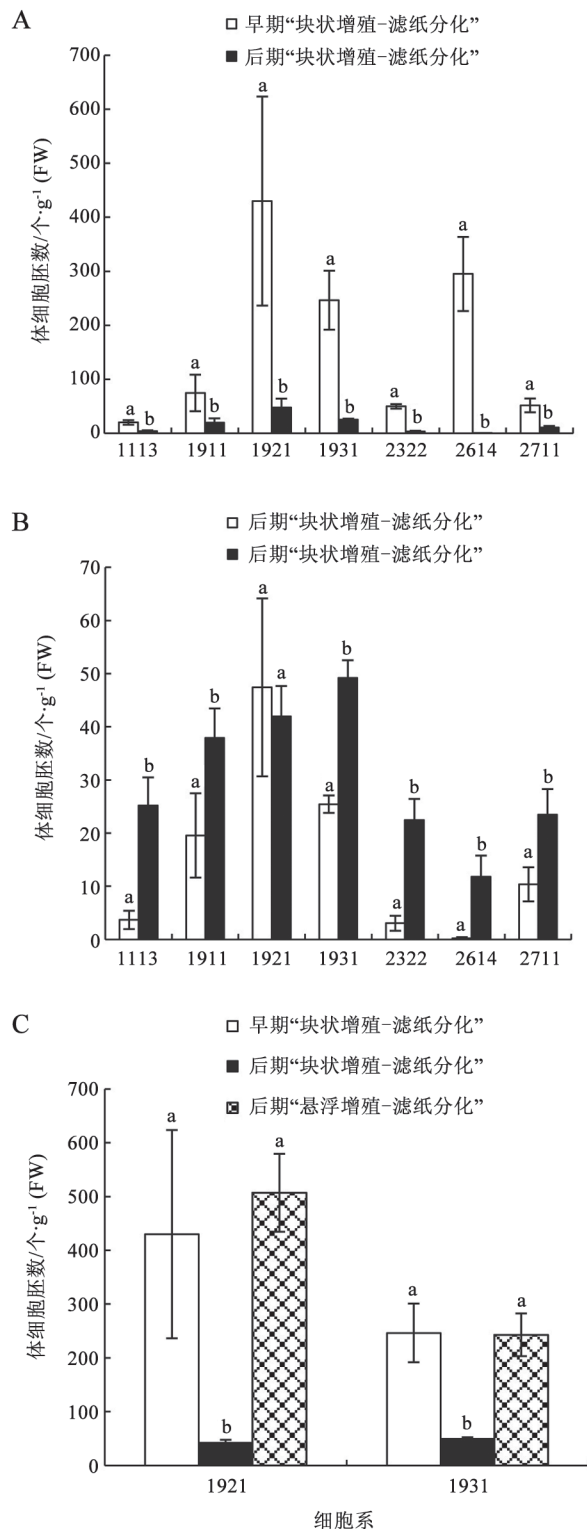


图2 不同分化方式下粗枝云杉体细胞胚分化能力的比较

Fig.2 Comparison of maturation capacity of *P. asperata* somatic embryos among different differentiation ways

同一细胞系中相邻列间的不同字母表示0.05水平差异显著, 相同字母表示差异不显著。

3 胚性愈伤组织增殖后期的3种分化方式比较

由图2-B可知, 在增殖后期, 和“块状增殖-滤纸分化”方式相比, 采用“块状增殖-块状分化”的方式, 可使绝大多数细胞系的体细胞胚分化能力显著提高($P<0.05$); 同时, 分化产生的体细胞胚多聚集在愈伤组织的表面, 同步化程度较高, 子叶明显, 胚轴健壮(图3-C)。此外, 用分化培养判断愈伤组织是否有胚性时, 由于胚性细胞堆积, 容易分化产生体细胞胚, 而用“块状增殖-块状分化”的方式更有利于胚性的鉴别, 可以避免珍贵的低胚性细胞系的丢失。

由图2-C可知, 在增殖后期, 和“块状增殖-块状分化”方式相比, 通过建立液体悬浮增殖体系, 采用“液体增殖-滤纸分化”的方式进行体细胞胚分化, 不仅能够获得数量巨大的体细胞胚, 而且同步化程度更高(图3-D)。在后期愈伤组织胚性降低的情况下, 甚至能够产生和早期“块状增殖-滤纸分化”方式分化数量相当的体细胞胚。由此可见, 随着愈伤组织胚性的降低, 在增殖后期, 适合的体细胞胚分化方式应当优先选择“液体增殖-滤纸分化”, 其次是“块状增殖-块状分化”, 最后是“块状增殖-滤纸分化”。

讨 论

在粗枝云杉体细胞胚胎发生过程中, 采用半固体增殖方式进行胚性愈伤组织增殖时, 随着增殖时间的延长, 愈伤组织的胚性不断降低。在胚性愈伤组织增殖后期, 采用悬浮增殖, 不仅自动化程度高, 增殖效率也极大地提高(Avila等1996)。目前, 液体悬浮培养已被认为是最有可能使针叶树种的体细胞胚发生技术实现商业化的关键技术(Aquea等2008)。在粗枝云杉胚性愈伤组织增殖后期, 通过构建液体悬浮增殖体系, 不仅能够获得较大的收获量, 还能提高胚性愈伤组织的质量, 有利于后期体细胞胚的分化(Gupta和Timmis 2005)。

在增殖早期, 采用“块状增殖-滤纸分化”可以获得大量且同步化程度较高的体细胞胚。对马尾松愈伤组织进行体细胞胚分化时发现, 将愈伤组织放置在滤纸上进行分化培养, 每克最多能够获得244个发育正常的体细胞胚(杨模华等2011)。而在胚性愈伤组织增殖后期, 采用“块状增殖-块状分

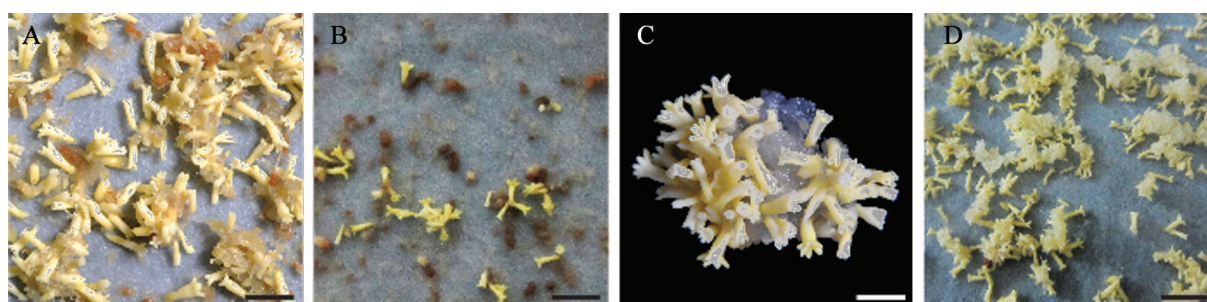


图3 粗枝云杉不同增殖时期3种分化方式产生的体细胞胚

Fig.3 *P. asperata* somatic embryos developed through three approaches at different stages of proliferation

A: 增殖早期,“块状增殖-滤纸分化”,标尺=5 mm; B: 增殖后期,“块状增殖-滤纸分化”,标尺=1 cm; C: 增殖后期,“块状增殖-块状分化”,标尺=5 mm; D: 增殖后期,“液体增殖-滤纸分化”,标尺=1 cm。

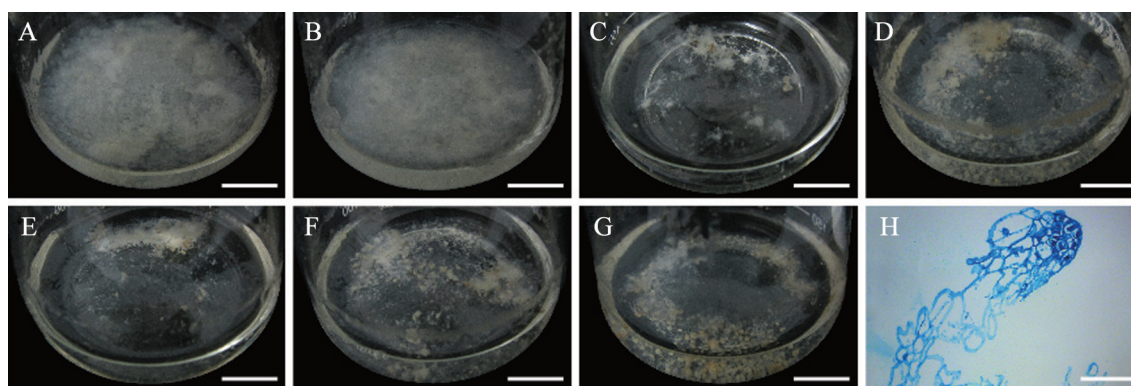


图4 粗枝云杉7个胚性细胞系的悬浮增殖表现

Fig.4 Suspension culture performance of seven *P. asperata* embryogenic cell lines

A~G: 分别为1921、1931、1113、1911、2322、2614和2711胚性细胞系,标尺=1 cm; H: 液体增殖中的胚性愈伤组织的显微结构,标尺=100 μ m。

化”能够更有效地提高体细胞胚的分化效率。Afele等(1992)发现,将北美蓝云杉的愈伤组织分成直径约为0.5 cm的块状进行分化时,能够分化产生同步化程度较高的体细胞胚。将直径为0.5~1 cm的辐射松块状愈伤组织放在半固体分化培养基上,能够获得生长健壮且易于萌发的成熟体细胞胚(Aquea等2008)。Nakagawa等(2011)在库页云杉的体细胞胚分化中,每克鲜重最多能够获得710个体细胞胚。在采用“块状增殖-块状分化”方式进行分化培养时,胚性愈伤组织呈块状堆积,对胚性愈伤组织的需求量大,因而在粗枝云杉增殖早期并不适用。相比之下,在增殖后期,采用“液体增殖-滤纸分化”方式能同时发挥液体悬浮增殖和“块状增殖-滤纸分化”的优势,不仅获得大量体细胞胚,而且保证体细胞胚的高度同步化,这对评价体细

胞胚的分化质量来说十分关键。采用“液体增殖-滤纸分化”的方式,增殖4年的欧洲云杉愈伤组织,每个培养皿仍然能够获得约80个完整的体细胞胚(Find 1997);欧洲赤松和海岸松每克鲜重的胚性愈伤组织分别最高可以获得262和39个成熟的体细胞胚(Lelu等1999);同样,花旗松也能够获得数量巨大且同步化程度非常高的体细胞胚(Gupta和Timmis 2005)。因此,在粗枝云杉胚性愈伤组织增殖后期,应该根据细胞系的增殖和分化特性开发相应的体细胞胚发生方式。

目前,不同树种大多采用单一的体细胞胚发生方式,如“块状增殖-滤纸分化”(Beardmore和Charest 1995; Klimaszewska等2001)、“块状增殖-块状分化”(Afele等1992; Krajňáková等2009)和“液体增殖-滤纸分化”(Harry和Thorpe 1991; Nørgaard

1997; Pullman等2005; Viji等2012)等。研究表明,粗枝云杉不同细胞系都有可能拥有一套独立的体细胞胚发生方式。本研究仅对目前国内外常用的增殖方式和分化方式进行了比较,今后可以开发更多的愈伤组织增殖和体细胞胚的分化方式,以建立更加合理和高效的体细胞胚发生方法。

参考文献

- 陈志, 陈金慧, 边黎明, 李婷婷, 吴淳, 施季森(2007). 杂交鹅掌楸胚性细胞悬浮系的建立. 分子植物育种, 5: 137~140
- 刘宝光, 李成浩, 张含国(2010). 红皮云杉胚性愈伤组织保持与增殖阶段影响因子的筛选与分析. 东北林业大学学报, 38: 56~60
- 吕守芳, 张守攻, 齐力旺, 孙晓梅, 王建华(2005). 日本落叶松体细胞胚胎发生的研究. 林业科学, 41: 48~53
- 四川省粗枝云杉纸浆材协作组(2001). 粗枝云杉纸浆材种源林分区划研究. 四川农业大学学报, 19: 34~36
- 杨模华, 张东林, 李志辉, 靳小翠, 丁贵杰(2011). 马尾松幼胚体细胞胚胎发生研究. 植物生理学报, 47: 904~912
- Afele JC, Senaratna T, McKersie BD, Saxena PK (1992). Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo culture in blue spruce (*Picea pungens* Engelman.). *Plant Cell Rep*, 11: 299~303
- Aquea F, Poupin MJ, Matus JT, Gebauer M, Medina C, Arce-Johnson P (2008). Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*. *Biotechnol Lett*, 30: 1847~1852
- Avila AD, Pereyra SM, Arguello JA (1996). Potato micropropagation: growth of cultivars in solid and liquid media. *Potato Res*, 39: 253~258
- Beardmore T, Charest PJ (1995). Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance. I. Effects of abscisic acid, cold, and heat treatments on the germinability of mature black spruce somatic embryos. *Can J Forest Res*, 25: 1763~1772
- Bozhkov PV, Filonova LH, von Arnold S (2002). A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotech Bioeng*, 77: 658~667
- Bozhkov PV, von Arnold S (1998). Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol Plantarum*, 104: 211~224
- Find JI (1997). Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Sci*, 128: 75~83
- Fu LG, Li N, Mill RR (1999). Pinaceae. In: Editorial board of flora of China (ed). *Flora of China* (vol 4). Beijing: Science Press, 27
- Gemperlova L, Fischerova L, Cvikrova M, Mala J, Vondrakova Z, Martincova O, Vagner M (2009). Polyamine profiles and biosynthesis in somatic embryo development and comparison of germinating somatic and zygotic embryos of Norway spruce. *Tree Physiol*, 29: 1287~1298
- Gupta PK, Timmis R (2005). Mass propagation of conifer trees in liquid cultures progress towards commercialization. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Netherlands: Springer, 389~402
- Harry IS, Thorpe TA (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. *Bot Gaz*, 152: 446~452
- Joshi R, Kumar P (2013). Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. *Agri Rev*, 34: 1~20
- Kim YW, Newton R, Frampton J, Han KH (2009). Embryogenic tissue initiation and somatic embryogenesis in Fraser fir (*Abies fraseri* [Pursh] Poir.). *In Vitro Cell Dev-Pl*, 45: 400~406
- Klimaszewska K, Park YS, Overton C, Maceacheron I, Bonga JM (2001). Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 37: 392~399
- Klimaszewska K, Trontin JF, Becwar MR, Devillard C, Park YS, Becwar MR, Lelu-Walter MA (2007). Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree Forest Sci Biotechnol*, 1: 11~25
- Krajňáková J, Häggman H, Gömöry D (2009). Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 96: 251~262
- Lelu MA, Bastien C, Drugeault A, Gouze ML, Klimaszewska K (1999). Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiol Plantarum*, 105: 719~728
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985). 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.). *Plant Cell Rep*, 4: 325~328
- Montalbán IA, Diego ND, Moncaleán P (2012). Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. *Acta Physiol Plant*, 34: 451~460
- Nakagawa R, Kurushima M, Matsui M, Nakamura R, Kubo T, Funada R (2011). Polyamines promote the development of embryonal-suspensor masses and the formation of somatic embryos in *Picea glehnii*. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 47: 480~487
- Nørgaard JV (1997). Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. *Plant Sci*, 124: 211~221
- Pullman GS, Gupta PK, Timmis R, Carpenter C, Kreitinger M, Welty E (2005). Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. *Plant Cell Rep*, 24: 271~279
- Pullman GS, Skryabina A (2007). Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep*, 26: 873~887
- Stasolla C, Yeung EC (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 74: 15~35
- Viji M, Maheswari P, Karuppanapandian T, Manoharan K (2012). Effect of polyethylene glycol and mannitol on somatic embryogenesis of pigeonpea, *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Afr J Biotechnol*, 11: 10340~10349
- von Arnold S, Bozhkov P, Clapham D, Dyachok J, Filonova L, Högberg KA, Ingouff M, Wiweger M (2005). Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 81: 323~329
- von Arnold S, Clapham D (2008). Spruce embryogenesis. In: Suarez MF, Bozhkov PV (eds). *Methods in Molecular Biology* (vol 427): *Plant Embryogenesis*. Totowa, NJ: Humana Press, 31~47