

山核桃间接体细胞胚发生和植株再生

张启香^{1,2}, 胡恒康^{1,2,3}, 王正加^{1,2}, 袁佳^{1,2}, 万俊丽^{1,2}, 黄坚钦^{1,2,*}

(¹浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江临安 311300; ²浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江临安 311300; ³江西农业大学园林与艺术学院, 南昌 330045)

摘要: 以山核桃 (*Carya cathayensis* Sarg.) 自然授粉后 10 周的幼胚为外植体, 对影响胚性愈伤组织和体胚发生的主导因子 (基本培养基、植物生长调节物质等) 进行了比较分析; 对影响体胚萌发的脱水处理时间进行了比较; 并采用石蜡切片法对幼胚脱分化产生胚性愈伤组织及体胚发生发育过程进行了组织细胞学观察。结果表明, 幼胚胚轴和子叶接种在基本培养基 1/2 MS 上, 胚性愈伤组织诱导率显著高于其它处理, 达 45.3%。接种于基本培养基 DW 中的幼胚体细胞胚诱导率显著高于其它培养基处理, 达 16.7%。显微镜下可观察到球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚。培养基添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ picloram (氨基吡啶酸) 组合时, 胚性愈伤组织诱导率最高, 为 48.6%; 而 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 与 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ picloram 组合, 体胚诱导率最高, 为 23.6%。体细胞胚发生方式属于间接体胚发生。用饱和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 对体胚进行脱水处理, 脱水处理 3 d 后萌发率为 39.03%, 显著高于对照及其余处理。将脱水处理后的体胚接种至 WPM 基本培养基中, 光照条件下培养, 10 周后可长成具 3~4 片真叶的完整植株。

关键词: 山核桃; 体细胞胚; 间接发生; 植株再生; 组织细胞学观察

中图分类号: S 664.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 06-1063-08

Indirect Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Carya cathayensis*

ZHANG Qi-xiang^{1,2}, HU Heng-kang^{1,2,3}, WANG Zheng-jia^{1,2}, YUAN Jia^{1,2}, WAN Jun-li^{1,2}, and HUANG Jian-qin^{1,2,*}

(¹School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China; ²The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China; ³College of Landscape Architecture and Art, Jiangxi Agriculture of University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Immature embryos of 10 weeks after pollination of *Carya cathayensis* were selected as explants. The factors which affect embryogenic calli formation and somatic embryogenesis including basal medium, plant growth regulators (PGRs) and desiccation length of somatic embryos were tested. Cytohistological observations of anatomical structure change during embryogenic callus formation and somatic embryos production were also made. Embryogenic callus percentage was significantly higher on the medium 1/2 MS than other treatments, reached 45.3%. Somatic embryogenesis percentage was significantly higher on DW medium than other media, reached 16.7%. Global embryo, heart-shaped embryo, embryos

收稿日期: 2010-11-17; **修回日期:** 2011-06-08

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目 (Z307534); 浙江农林大学 B 类创新团队项目; 浙江省自然科学基金项目 (Y3090091); 浙江省科技厅面上项目 (2009C32027); 浙江省大学生科技创新计划项目 (2009)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: huangjq@zjfc.edu.cn)

and cotyledonary embryos were easily observed under microscope. The highest embryogenic callus percentage was obtained on the medium with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ picloram, reached 48.6%. The highest somatic embryogenesis percentage was obtained on the medium with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ picloram, reached 23.6%. The formation and development of somatic embryogenesis is indirect somatic embryogenesis which goes through callus phase. Subsequent desiccation for 3 d with saturated $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ resulted in 39.03% germination. Non-desiccated somatic embryos failed to germinate. Germinated somatic embryos developed into plantlets with 3 to 4 leaves 10 weeks after they were transferred to WPM basal medium under light condition.

Key words: *Carya cathayensis*; somatic embryo; indirect somatic embryogenesis; plant regeneration; cytohistological observation

山核桃 (*Carya cathayensis* Sarg.) 主要分布在浙皖交界的天目山区 (郭传友 等, 2004)。长期以来, 山核桃主要采用实生与嫁接繁殖。实生繁殖难以保持品种的优良特性 (张婷和张虹, 2007)。山核桃试管苗生根较难, 也限制了其离体繁殖技术的应用 (万俊丽 等, 2009)。山核桃体细胞胚 (简称“体胚”) 具有完整的两极结构, 能一次再生完整植株。在核桃 *Juglans regia* L. (汤浩茹 等, 2000a)、黑核桃 *J. nigris* L. (方宏筠 等, 2000)、灰核桃 *J. cinerea* L. (Pijut, 1993)、函滋核桃 *J. hindsii* Jeps. (Tulecke & McGranahan, 1985)、美国山核桃 *Carya illinoensis* (Burns et al., 1997) 等胡桃科植物中, 体胚研究报道大多集中在优化体胚条件和建立直接体胚发生体系等方面。山核桃愈伤组织诱导 (朱玉球 等, 2001) 和不定芽诱导 (万俊丽 等, 2009) 也已有报道, 但其间接体胚发生和体胚发生的组织细胞学方面的研究尚未见报道。

本试验以山核桃自然授粉后 10 周的幼胚为外植体, 从基本培养基、植物生长调节物质、体胚脱水以及体胚发生的组织细胞学等方面研究山核桃胚性愈伤组织发生、体胚诱导以及植株再生体系的形成的影响, 以期获得稳定、高效的体胚发生条件, 为山核桃遗传转化体系的建立提供理论依据和实验平台。

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年 7 月上旬于浙江省临安市板桥乡罗塘村采集自然授粉后 10 周的山核桃幼果, 带回实验室, 剪去花柱及柱头, 用洗涤剂洗净表面后, 用 75% 酒精涮洗 30 s, 自来水冲洗干净, 用 0.5% 次氯酸钠溶液加少许吐温-20, 抽真空 20 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 无菌滤纸吸干表面水分 (杨海芸 等, 2008), 超净工作台上去除果皮和种皮后取出完整的幼胚作为外植体备用。

1.2 胚性愈伤组织及体胚的诱导

1.2.1 基本培养基处理

基本培养基采用单因子试验, 共 7 种培养基: MS (Murashige & Skoog, 1962), 1/2MS (MS 大量元素减半), DKW (McGranahan et al., 1987), WPM (Lloyd & McCown, 1980), DW (DKW 所有元素的半量加 WPM 所有元素的半量), MW (MS 所有元素的半量加 WPM 所有元素的半量) 和 MD (MS 所有元素的半量加 DKW 所有元素的半量)。基本培养基中附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ picloram (氨基吡啶酸)。每处理接种 20 个幼胚, 重复 3 次, 接种后前 3 d 外植体每天转接

1 次至相同的诱导培养基中, 以后每 2 周转接 1 次至不含植物生长调节物质的 1/2MS 培养中。6 周后统计愈伤组织诱导率, 12 周后统计体胚诱导率。

1.2.2 植物生长调节剂处理

以 1/2MS 为基本培养基, 以 6-BA 和 picloram 为植物生长调节物质, 分别选取 6-BA (0、0.5、1.0、2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 单位下同) 和 picloram (0、0.001、0.01、0.1) 进行 2 因素 4 水平完全设计, 共 16 个处理。每处理接种幼胚 20 个, 重复 3 次, 接种后前 3 d 外植体每天转接 1 次至相同的诱导培养基中, 以后每 2 周转接 1 次至不含植物生长调节物质的 1/2MS 培养中。6 周后统计愈伤组织诱导率, 12 周后统计体胚诱导率。培养温度 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 暗培养 2 d 后放入光暗周期为 16 h/8 h, 光照强度为 $40 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下培养, 所有培养基高压灭菌前加水解酪蛋白 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 (agar type A) $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.7。

1.3 植株再生培养

将生长健壮子叶胚进行脱水处理: 将体胚放置于直径为 9 cm 的 3 格无菌培养皿中, 其中 2 格每格放置 20 个体胚, 另外一格中加 5 mL 饱和的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 密封并置于 30°C 下暗培养。脱水时间为 0、1、2、3、4 和 5 d, 处理后将色泽乳白至淡黄的体胚接种至 WPM 基本培养基中, 光照条件下培养, 光暗周期为 16 h/8 h, 光照强度 $40 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 10 周后统计体胚萌发率。

1.4 体胚发生过程的组织细胞学观察

不同处理下培养 1 个月的外植体, 经 FAA (50%酒精配制) 固定, 系列酒精脱水经二甲苯过渡到石蜡 ($52 \sim 54^{\circ}\text{C}$) 并包埋。Lecia 自动切片机切片, 厚 $8 \mu\text{m}$, Haupt 粘贴剂粘片, 经烤片、烘干后, 脱蜡并经酒精系列复水至苏木精 (0.5%) 中染色 24 h, 2%硫酸铁铵分色, 再系列酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, Olympus BX60 显微镜下观察, Olympus DP70 全自动照相系统拍照。

1.5 数据处理

数据采用 SigmaPlot8.0 和 SPSS16 系统软件进行统计分析并进行显著性分析。试验数据均为 3 次重复的平均值。胚性愈伤组织诱导率 (%) = (诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体数) $\times 100$, 体胚诱导率 (%) = (诱导出体胚的外植体数/接种的外植体数) $\times 100$, 体胚萌发率 (%) = (萌发的体胚数/脱水处理的体胚数) $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对山核桃幼胚愈伤组织及体胚诱导的影响

不同基本培养基对幼胚愈伤组织和体胚诱导率 (表 1) 存在显著差异 ($P < 0.05$)。显微结构分析表明, 山核桃子叶由上下表皮、薄壁细胞及维管束组成 (图 1, 1)。以 1/2MS 为基本培养基, 2 周后形成乳白色愈伤组织 (图 2, 1), 胚性愈伤组织 (图 1, 2) 诱导率最高, 达到 45.3%, 继代培养后, 愈伤组织细胞的细胞质逐渐变浓, 颜色淡黄, 并可大量增殖 (图 2, 2~3)。以 MS 和 DW 为基本培养基, 幼胚胚轴和子叶表面细胞大量脱分化, 形成胚性愈伤组织, 诱导率分别为 26.7%和 29.0%, 培养 10 周后体胚从胚性愈伤组织中发生。以 DKW 和 WPM 为基本培养基, 胚性愈伤组织诱导率分别为 18.6%和 4.7%, 子叶表面细胞脱分化, 但随后褐化, 未形成体细胞胚。以 MW 基本培养基时, 胚性愈伤组织诱导率为 8.0%, 幼胚在接种后便开始褐化, 但随后褐化的组织中细胞也可以脱分化, 逐渐形成胚性细胞团。而以 MD 作为基本培养基, 胚性愈伤组织诱导率为 32.7%, 幼胚子

叶边缘细胞大量脱分化,但伴随着组织褐化,未形成多细胞原胚。

以 DW 为基本培养基,6 周后体胚开始从胚性愈伤组织中产生,12 周后体胚诱导率为 16.7%,显著高于其余培养基处理(表 1)。10 周后不同发育阶段体胚从胚性愈伤组织中产生(图 1,3~9;图 2,4~8),其中鱼雷胚时期出现原形成层,子叶胚时期出现 V 字型维管束,而 V 字型维管束通常被认为是体胚发生的一个标志(陈金慧,2003)。

方差分析和多重比较显示,在胚性愈伤组织诱导期,1/2MS 与其余培养基处理存在显著差异,而在体胚诱导期,DW 与其余培养基处理存在显著性差异。因此,1/2MS 为山核桃胚性愈伤组织诱导的最理想基本培养基,而 DW 为体胚诱导的最佳基本培养基。

表 1 基本培养基对山核桃胚性愈伤组织及体胚诱导的影响

Table 1 Effect of basal media on induction of embryogenic callus and somatic embryos of *Carya cathayensis*

基本培养基 Basal medium	胚性愈伤组织诱导率/% Embryogenic callus percentage	体细胞胚诱导率/% Somatic embryogenesis percentage
MS	26.7 ± 1.2 c	6.6 ± 1.2 de
1/2MS	45.3 ± 2.0 a	4.3 ± 0.7 e
DKW	18.6 ± 1.2 d	13.3 ± 0.9 b
WPM	4.7 ± 1.2 e	12.3 ± 1.20 bc
DW	29.0 ± 0.6 bc	16.7 ± 1.2 a
MW	8.0 ± 1.1 e	9.0 ± 1.1 cd
MD	32.7 ± 1.4 b	10.0 ± 1.2 bcd

注:同一列中小写字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: Values within the same column follow by the different lower-case letter are significantly different at the level of 5%. The same below.

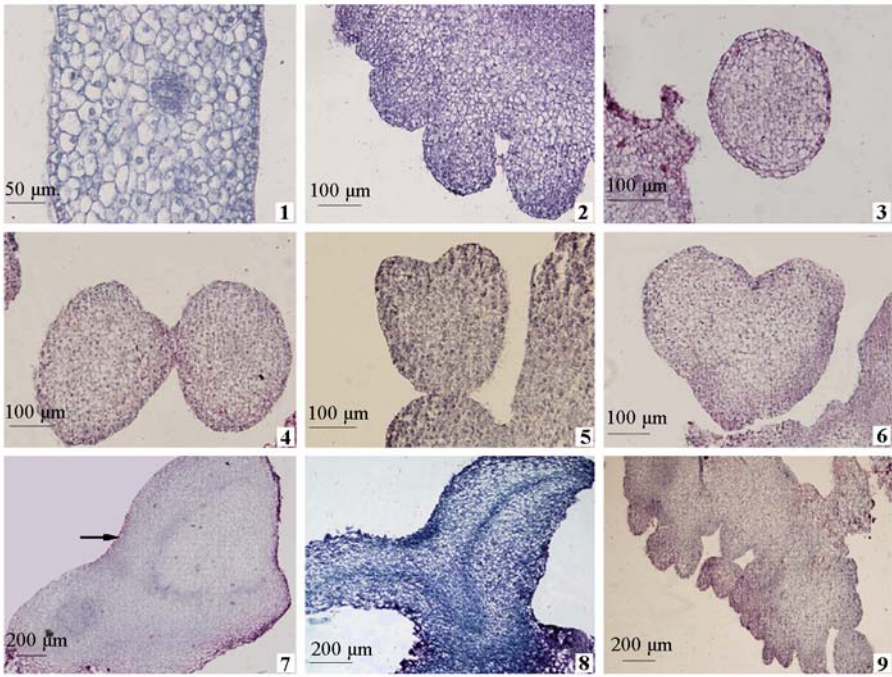


图 1 山核桃体胚发生期的组织细胞学观察

1: 山核桃子叶横切面结构; 2: 1/2MS 培养基中培养 4 周后子叶表面细胞脱分化形成愈伤组织; 3: 球形胚; 4: 晚期球形胚; 5: 早期心形胚; 6: 心形胚; 7: 鱼雷胚, 原形成层已发育(箭头所指); 8: 子叶胚, V 字型维管束清晰可见; 9: 子叶胚大量发生。

Fig. 1 Cytohistological observation of somatic embryogenesis in *Carya cathayensis*

1: Cross section of cotyledon of hickory; 2: Callus derived from superficial of cotyledon on 1/2MS; 3: Globular embryo; 4: Late globular embryo; 5: Early heart-shaped embryo; 6: Heart-shaped embryo; 7: Torpedo embryos derived from embryogenic callus in which precambium developed; 8: Cotyledonary embryo derived from embryogenic callus where V vascular bundle formed; 9: Cotyledonary embryos formed abundantly.

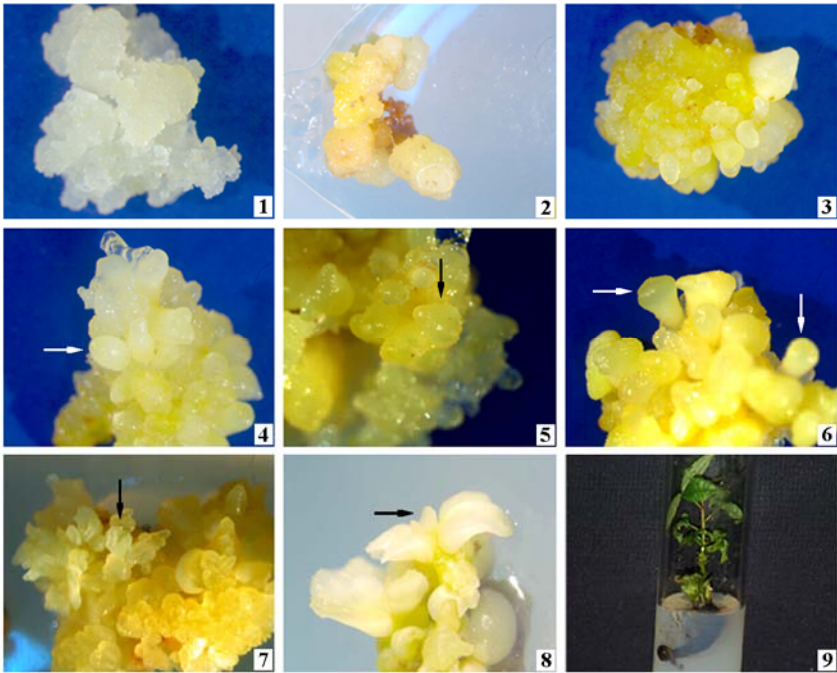


图 2 山核桃体胚发生和植株再生

1: 乳白色愈伤组织; 2: 淡黄色至黄色愈伤组织; 3: 体细胞胚从胚性愈伤组织中产生; 4: 球形胚 (箭头所示); 5: 心形胚; 6: 鱼雷胚; 7: 早期子叶胚; 8: 子叶胚; 9: 再生植株。

Fig. 2 Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Carya cathayensis*

1: White embryogenesis callus originated from cotyledons of immature embryo; 2: Light yellow or yellow callus;
3: Somatic embryos derived from embryogenic callus; 4: Global-shaped embryo; 5: Heart-shaped embryo;
6: Torpedo-shaped embryos; 7: Early cotyledonary embryos; 8: Cotyledonary embryos; 9: Plant regeneration.

2.2 不同植物生长调节物质对比对胚性愈伤组织及体胚诱导的影响

6-BA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, picloram $0.01\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性愈伤组织诱导率最高, 为 48.6%; 随着 6-BA 浓度增加, 胚性愈伤组织诱导率呈先升高后降低的趋势, 6-BA 为 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均诱导率为 13.0%, $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性愈伤组织诱导率处理之间存在显著性差异, 平均 36.5%; 6-BA 超过 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性愈伤组织发生率受到抑制, 并随浓度升高而逐渐下降。picloram 浓度较低时对胚性愈伤组织发生具有明显促进作用, 当浓度为 $0.01\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均胚性愈伤组织诱导率最高, 为 25.05%, 而当浓度上升为 $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时下降为 20.73% (表 2)。

表 2 植物生长调节物质对山核桃胚性愈伤组织及体胚诱导的影响

Table 2 Effect of plant growth regulators on induction of embryogenic callus and somatic embryos of *Carya cathayensis*

处理 Treatment	6-BA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Picloram/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	胚性愈伤组织诱导率/% Embryogenic callus percentage	体胚诱导率/% Somatic embryogenesis percentage
1	0	0	0.0 h	0.0 j
2	0	0.001	3.0 h	1.6 j
3	0	0.01	5.0 h	2.3 j
4	0	0.1	3.0 h	2.0 j
5	0.5	0	12.0 g	2.6 j
6	0.5	0.001	11.6 g	3.0 j
7	0.5	0.01	15.0 g	4.6 j
8	0.5	0.1	13.3 g	5.0 j
9	1.0	0	23.6 f	13.6 cd
10	1.0	0.001	33.6 c	23.6 a
11	1.0	0.01	48.6 a	17.5 b
12	1.0	0.1	40.0 b	15.0 bc
13	2.0	0	30.0 cd	6.0 hi
14	2.0	0.001	33.3 c	8.6 fg
15	2.0	0.01	31.6 cd	10.6 df
16	2.0	0.1	26.6 df	6.6 gh

植物生长调节物质对比对体胚诱导也有明显的影响(表2)。当 6-BA 为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, picloram 为 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体胚诱导率最高, 为 23.6%, 明显高于其他处理。多重比较显示, 该处理诱导体胚与其他处理之间存在显著性差异。随着 6-BA 浓度增加, 体胚诱导率均呈先升高后降低的趋势, 当 6-BA 为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 平均体胚诱导率仅为 3.8%; 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体胚诱导率与其余处理之间存在显著性差异, 为 17.5%; 而当 6-BA 浓度超过 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体胚发生率受到抑制, 并随浓度升高而逐渐下降。picloram 浓度较低时, 对体胚发生具有明显促进作用, 当浓度为 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体胚诱导率最高, 达 11.25%, 随着浓度的升高诱导率则逐渐下降。

2.3 脱水处理对植株再生的影响

不同脱水处理时间对山核桃体胚萌发具有显著影响(表3)。与对照(不脱水)相比, 随着脱水时间的延长, 萌发率呈先上升后下降的趋势。当脱水时间为 3 d 时, 体胚萌发率最高至 39.03%, 而当脱水时间更长, 脱水过快过多, 部分体胚褐化死亡, 萌发率也随之下降。体胚经脱水处理后, 接种至 WPM 基本培养基中, 光照条件下培养, 10 周后可长成完整的植株(图2, 9)。

表3 脱水对体细胞胚植株再生的影响
Table 3 Effect of desiccation on germination of somatic embryo

处理 Treatment	脱水时间/d Desiccation length	萌发率/% Germination percentage
1 (对照 Control)	0	0 d
2	1	9.9 b
3	2	12.1 b
4	3	39.03 a
5	4	10.4 b
6	5	2.8 c

3 讨论

3.1 山核桃体胚发生方式

植物体胚发生过程可分为直接发生和间接发生两种方式(Quiroz-Figueroa et al., 2006)。直接发生是从幼胚子叶或胚轴等部分直接长出体胚, 而不经愈伤组织阶段, 大多来源于表皮细胞或表皮下数层细胞, 如地被菊等体胚发生(蒋细旺等, 2008)。间接发生是先从植物组织形成愈伤组织, 再从胚性愈伤组织表面或内部形成体胚, 多数来源于表皮细胞或表皮下数层细胞脱分化形成愈伤组织, 如中国沙棘等体胚发生(李俊等, 2009)。胡桃科中, 汤浩茹等(2000a)以自然授粉后 7~8 周的核桃幼胚为外植体, 不同发育时期的体细胞胚直接形成于胚轴与子叶表面, 属于直接体胚发生途径。以美国山核桃自然授粉后 15 周幼胚为外植体进行体胚诱导, 发现直接发生和间接发生两种途径都存在(Yates & Reilly, 1990), 但未从间接发生途径中获得再生植株。与以上研究不同的是, 本研究以自然授粉后 10 周幼胚为外植体, 进行体胚诱导, 未观察到直接体胚发生, 而是通过胚性愈伤组织诱导体细胞胚的发生, 属于间接发生的方式, 这与陈金慧等(2003)在鹅掌楸中的研究一致。

3.2 山核桃体胚发生的影响因素

3.2.1 基本培养基

培养基中氮素是体胚发生所必需的元素, 不同基本培养中氮素含量不同, 而不同植物对氮素的要求也不一样。如松柏类植物的体胚诱导一般要求其培养基中 NO_3^- 及 NH_4^+ 的总量较低, 而另一些树种则要求较高含量的还原氮(Burns & Wetzstein, 1997)。DKW 一般作为核桃科植物体胚发生的首选培养基, 总量 NO_3^- 及 NH_4^+ 较高, 略高于 MS, 为 WPM 的 3 倍, 但 WPM 适用于黑核桃(*J. nigra*) (方宏筠和王关林, 2000) 和美国山核桃(Wetzstein, 1989) 体胚的诱导。相同条件下, 培养在 MS 上的核桃幼胚胚轴体胚发生频率高, 而培养在 DKW 上的子叶成胚频率高(汤浩茹等, 2000a)。本研究中对基本培养基筛选后发现, 1/2MS 为山核桃胚性愈伤组织及体胚诱导的最佳基本培养基,

诱导率较高, 这与核桃、黑核桃及美国山核桃等略有不同, 可能与 1/2MS 盐浓度较低有关。

3.2.2 生长素

对于大多数木本植物来说, 生长素类物质, 如 2,4-D、picloram、IBA 和 NAA 等是诱导植物体胚发生的必要生长调节物质。胚性愈伤组织形成后, 应去除或降低生长素的浓度才能完成体胚的诱导与植株再生。但也有研究指出, 生长素类物质在部分植物体细胞胚诱导过程中无效, 甚至阻碍体细胞胚的发生 (Maalej et al., 2006)。胡桃科中, 2,4-D 诱导核桃 *J. regia*、美国山核桃 *C. illinoensis* 等体细胞胚的效果不显著, 因而采用 IBA、NAA 等, 其体细胞胚的发育也较 2,4-D 诱导的体胚发育正常 (Rodriguez & Wetzstein, 1998)。在山核桃间接体胚发生过程中, 使用 2,4-D 对其进行诱导, 未形成体细胞胚, 而 picloram 诱导效果明显优于 2,4-D (万俊丽 等, 2009)。本研究, 较低浓度的 picloram ($0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对山核桃体细胞胚诱导效果良好, 这与 Olivares 等 (1990) 在美国山核桃中的研究一致。山核桃体胚间接发生体系中畸形体胚较多, 部分体胚发育至早期胚时期便开始脱分化, 体细胞胚萌发率较低, 植株再生体系需进一步优化。

3.3 脱水处理对山核桃体胚萌发的影响

体胚脱水处理是在一定温度和相对湿度下使体胚失水而进入与自然种子合子胚相似的休眠或静止状态 (吴立东 等, 1993)。与自然成熟的合子胚脱水一样, 脱水处理是引导体胚进入静止状态的最有效办法 (Gray, 1989)。Hay & Charest (1999) 将体胚脱水的方法分为部分脱水和完全脱水。Roberts 等 (1990) 第一次报道了部分脱水的方法, 发现将云杉体胚进行一段时间脱水处理后可以提高后期的胚胎发育, 大大缩短了萌发的时间。本研究发现, 适度脱水处理对山核桃体胚萌发具有良好的促进作用, 这与木薯 (Mathews et al., 1993)、核桃 (汤浩茹 等, 2000b)、美国山核桃 (Wetzstein et al., 1989) 等体胚的萌发特性相似。

References

- Burns J A, Wetzstein H Y. 1997. Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48: 93 - 102.
- Chen Jin-hui. 2003. Studies on the somatic embryogenesis of *Liriodendron* hybrids [*L.chinese*(Hemsl.) Sarg. \times *L.tulipifera* L.] [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 陈金慧. 2003. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生研究 [博士论文]. 南京: 南京林业大学.
- Chen Jin-hui, Shi Ji-sen, Zhu Ge-qiang, Huang Min-ren. 2003. Studies on the somatic embryogenesis of *Liriodendron* hybrids (*L. chinese* \times *L. tulipifera*). *Scientia Silvae Sinicae*, 39 (4): 49 - 54. (in Chinese)
- 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 黄敏仁. 2003. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生研究. *林业科学*, 39 (4): 49 - 54.
- Fang Hong-jun, Wang Guan-lin. 2000. Somatic embryogenesis of *Juglans nigra* L. and establishment of gene transformation system of walnut. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (6): 406 - 411. (in Chinese)
- 方宏筠, 王关林. 2000. 黑核桃体细胞胚状体发生及基因转化系统的建立. *园艺学报*, 27 (6): 406 - 411.
- Gray D J. 1989. Effect of dehydration and exogenous growth regulators on dormancy, quiescence and germination of grape somatic embryos. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 25: 1173 - 1178.
- Guo Chuan-you, Huang Jian-qin, Fang Yan-ming. 2004. Review and perspective of research on *Carya cathayensis*. *Nonwood Forest Research*, 22 (1): 61 - 63. (in Chinese)
- 郭传友, 黄坚钦, 方炎明. 2004. 山核桃研究综述及展望. *经济林研究*, 22 (1): 61 - 63.
- Hay E I, Charest P J. 1999. Somatic embryo germination and desiccation tolerance in conifers // Mohan J S, Gupta P K, Newton R J. *Somatic embryogenesis in woody plants*, Vol.4. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 61 - 69.
- Jiang Xi-wang, Chen Fa-ju, Lu Miao, Cai Ming, Zhang Qi-xiang. 2008. Direct somatic embryogenesis in ground-cover chrysanthemum. *Journal of Beijing Forestry University*, 30 (2): 65 - 70. (in Chinese)
- 蒋细旺, 陈发菊, 陆苗, 蔡明, 张启翔. 2008. 地被菊直接体细胞胚发生研究. *北京林业大学学报*, 30 (2): 65 - 70.

- Li Jun, Xia Xin-li, Liu Cui-qiong, Yin Wei-lun. 2009. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration of *Hippophae rhamnoides* sub. *sinensis*. Journal of Beijing Forestry University, 31 (3): 89 - 95. (in Chinese)
- 李 俊, 夏新莉, 刘翠琼, 尹伟伦. 2009. 中国沙棘体细胞胚胎间接发生与植株再生. 北京林业大学学报, 31 (3): 89 - 95.
- Lloyd G, McCown B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc Int Plant Prop Soc, 30: 421 - 427.
- Maalej M, Rkhiss A C, Drira N. 2006. Contribution to the improvement of olive tree somatic embryogenesis by mineral and organic analysis of zygotic embryos. Euphytica, 151: 31 - 37.
- Mathews H, Schopke C, Cracamo R, Chavarriaga P, Fauquet C, Beachy R N. 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. Plant Cell Reports, 12: 328 - 333.
- McGranahan G H, Driver J A, Tulecke W. 1987. Tissue culture of *Juglans* // Bonga J M, Durzan D H. Cell and tissue culture in forestry 3. Boston: Martinus Nijhoff Publishers: 261 - 272.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15: 373 - 497.
- Olivares C J, Phillips G C, Bulter S A. 1990. Somatic embryogenesis from pecan zygotic embryo explants. HortScience, 25 (8): 983.
- Pijut P M. 1993. Somatic embryogenesis in butternut, *Juglans cinerea*. Canadium J Forest Research, 23 (5): 835 - 838.
- Quiroz-Figueroa F R, Rojas-Herrera R R, Galaz-Avalos R M, Loyola-Vargas V M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss Organ Cult, 86: 285 - 301.
- Roberts D R, Sutton B C S, Flinn B S. 1990. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. Can J Bot, 68: 1086 - 1090.
- Rodriguez A P M, Wetzstein H Y. 1998. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Protoplasma, 204: 71 - 83.
- Tang Hao-ru, Wang Yong-qing, Ren Zheng-long, Krczal G. 2000a. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic axes and cotyledons of walnut immature embryos of cv.No.120. Acta Horticulturae Sinica, 27 (1): 59 - 61. (in Chinese)
- 汤浩茹, 王永清, 任正隆, Krczal G. 2000a. 德国核桃 ‘No.120’ 幼胚胚轴与子叶体细胞胚胎发生及其植株再生. 园艺学报, 27 (1): 59 - 61.
- Tang Hao-ru, Wang Yong-qing, Ren Zheng-long. 2000b. An overview of progress on somatic embryogenesis and transformation in walnut. Scientia Silvae Sinicae, 36 (3): 102 - 110. (in Chinese)
- 汤浩茹, 王永清, 任正隆. 2000b. 核桃体细胞胚发生与转基因研究进展. 林业科学, 36 (3): 102 - 110.
- Tulecke W, McGranahan G H. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. Plant Sci, 40 (1): 57 - 63.
- Wan Jun-li, Huang Jian-qin, Xia Guo-hua, Zhang Qi-xian, Huang Li-chun. 2009. Adventitious bud induction with immature embryo of *Carya cathayensis*. Journal of Zhejiang Forestry College, 26 (5): 762 - 766. (in Chinese)
- 万俊丽, 黄坚钦, 夏国华, 张启香, 黄丽春. 2009. 山核桃幼胚不定芽诱导. 浙江林学院学报, 26 (5): 762 - 766.
- Wetzstein H Y, Ault J R, Merkle S A. 1989. Further characterization of somatic embryogenesis regeneration in pecan (*Carya illinoensis*). Plant Science, 64: 193 - 201.
- Wu Li-dong, Ke Shan-qiang, Gui Yao-lin. 1993. Review of the studies on desiccation of plant somatic embryos. Chinese Bulletin of Botany, 10 (1): 22 - 27. (in Chinese)
- 吴立东, 柯善强, 桂耀林. 1993. 植物体细胞胚干化处理研究述评. 植物学通报, 10 (1): 22 - 27.
- Yang Hai-yun, Gui Ren-yi, Tang Ding-qin, Fang Wei. 2008. Micropropagation of *Sasa fortunei*. Journal of Zhejiang Forestry College, 25 (2): 255 - 258. (in Chinese)
- 杨海芸, 桂仁意, 汤定钦, 方 伟. 2008. 菲白竹组织培养技术. 浙江林学院学报, 25 (2): 255 - 258.
- Yates I E, Reilly C C. 1990. Somatic embryogenesis and plant development in eight cultivars of pecan. HortScience, 25 (5): 573 - 576.
- Zhang Ting, Zhang Hong. 2007. Research progress on chemical compounds of the green peel of *Carya cathayensis* Sarg. and its biological activity. Food Science and Technology, (5): 116 - 119. (in Chinese)
- 张 婷, 张 虹. 2007. 山核桃青皮化学成分及生物活性研究进展. 食品科技, (5): 116 - 119.
- Zhu Yu-qiu, Liao Wang-yi, Huang Jian-qin. 2001. A preliminary study on induction of callus in *Carya cathayensis*. Journal of Zhejiang Forestry College, 18 (2): 115 - 118. (in Chinese)
- 朱玉球, 廖望仪, 黄坚钦. 2001. 山核桃愈伤组织诱导的初步研究. 浙江林学院学报, 18 (2): 115 - 118.