

DOI:CNKI:61-1390/S. 20110907. 1102. 023

网络出版时间:2011-09-07 11:02

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110907.1102.023.html>

栓皮栎体胚再生与增殖能力的保持研究

贾小明,张焕玲,张存旭

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**提高栓皮栎体胚的再生与增殖能力。**【方法】**将栓皮栎不同发育阶段合子胚诱导的胚性愈伤组织及不同发育时期的体胚,分别接种于含不同组合激素的 MS 培养基上,在不同光照条件下培养,探讨影响栓皮栎体胚再生与增殖能力保持的因素。**【结果】**随着继代次数的增加,胚性愈伤组织再生体胚能力呈下降趋势;6-BA 与 NAA 配合使用可延缓继代过程中胚性愈伤组织再生体胚能力的下降,1.00 mg/L 6-BA 与 0.25 mg/L NAA 是继代中保持胚性愈伤组织再生体胚能力的最佳培养基激素组合;胚性愈伤组织再生体胚需要自然散射光,强光及全程暗培养均不利于体胚再生;合子胚外植体发育程度影响胚性愈伤组织再生体胚能力,处于心形期及早子叶形期的幼嫩合子胚诱导的胚性愈伤组织,其再生体胚能力强于成熟子叶形合子胚诱导的胚性愈伤组织;体胚发育阶段越老,再生与增殖体胚能力越差,胚性愈伤组织及处于球形期的体胚,再生增殖体胚能力强于其他发育时期的体胚。**【结论】**选择处于心形期的幼嫩合子胚诱导胚性愈伤组织,然后在含 1.00 mg/L 6-BA 与 0.25 mg/L NAA 的 MS 培养基上于自然散射光下培养,可有效保持栓皮栎的体胚再生与增殖能力。

[关键词] 栓皮栎;体细胞胚;增殖与再生

[中图分类号] S722.3⁺7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)10-0081-06

Studies on regeneration and proliferation of somatic embryos in *Quercus variabilis*

JIA Xiao-ming, ZHANG Huan-ling, ZHANG Cun-xu

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research was done to improve regeneration and proliferation abilities of somatic embryos of *Quercus variabilis*. **【Method】** Factors affecting regeneration and proliferation abilities of somatic embryos of *Q. variabilis* were discussed by culturing embryogenic calluses at different development stages of somatic embryos, which were induced from immature zygotic embryos on the MS medium supplied with different phytohormone combinations in variable light conditions. **【Result】** The embryoids regeneration ability of embryogenic callus presented downward trend with increasing times of subculture on medium, while match usage of 6-BA and NAA could delay this trend. The optimal medium for maintaining embryoids regeneration ability of embryogenic callus was MS medium containing 1.00 mg/L 6-BA and 0.25 mg/L NAA. Natural light was essential to maintain embryoids regeneration ability of embryogenic callus, while darkness and intensive light were inimical. Embryoids regeneration ability of embryogenic callus was also influenced by the development degree of zygotic embryos. Embryogenic callus from junior heart-shape or early cotyledonary zygotic embryos had higher embryoids regeneration ability than the one from mature cotyledonary zygotic embryos. The older was the development stage of somatic embryo, the weaker was the

* [收稿日期] 2011-03-28

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2007K01-11-04);西北农林科技大学唐仲英育种基金项目(09YZ082)

[作者简介] 贾小明(1973—),男,甘肃泾川人,讲师,在读博士,主要从事林木生物技术育种研究。

regeneration and proliferation ability. The regeneration and proliferation abilities of initial embryogenic calluses and globular-shape somatic embryos were higher than others. 【Conclusion】 Regeneration and proliferation abilities of somatic embryos of *Q. variabilis* can be maintained effectively by selecting embryogenic calluses from junior zygotic embryos and culturing them on the MS medium containing 1.00 mg/L 6-BA and 0.25 mg/L NAA under the natural light.

Key words: *Quercus variabilis*; somatic embryos; proliferation and regeneration

栓皮栎(*Quercus variabilis*)是我国重要的软木资源树种,具有多种经济用途。近年来,由于人们对栓皮栎林的过度开采利用,导致其优良资源濒于枯竭。因此,亟需开展栓皮栎优良无性系快繁、遗传改良和基因资源保存工作^[1]。

栓皮栎的常规繁殖方式是种子繁殖,但栎属植物种子繁殖存在种子大小年严重、贮藏困难、繁殖周期长等问题^[1],而传统的无性繁殖如扦插等又被证明在栎属植物中是极其困难的^[2-3]。因此,体胚发生途径可能是栎属植物优良资源快繁的最好方法^[3],也为栎属植物的人工种子研制、遗传转化、遗传改良等提供了新途径。除栓皮栎外,已成功诱导体胚的栎属树种有美国红栎(*Q. rubra*)^[4]、英国栎(*Q. robur*)^[5]、无梗栎(*Q. petraea*)^[6]、欧洲栓皮栎(*Q. suber*)^[7]、麻栎(*Q. acutissima*)^[8]、冬青栎(*Q. ilex*)^[9]等树种。Kim 等^[10]首次利用栓皮栎合子胚诱导了栓皮栎的体胚发生;我国张存旭等^[1,11]利用未成熟合子胚及幼叶诱导了栓皮栎的体胚发生,并探讨了影响栓皮栎体胚发生以及体胚成熟与萌发过程中的各种因素。

同多数木本植物一样,栓皮栎通过体胚发生途径再生植株过程中主要存在 2 个问题:一是多次继代后体胚再生与增殖能力下降乃至丧失;二是体胚成熟率与萌发率比较低^[1-3,12]。一个高效的体胚再生植株体系,必须具有再生体胚的稳定性、高效性及长期性^[13]。因此,在体胚发生研究中,获得胚性愈伤组织及体胚后,如何科学、合理地进行继代增殖培养,并采取措施使胚性物长期保持高频率再生及增殖体胚能力,对持续开展栓皮栎体胚研究具有重要意义。张焕玲等^[14]、Zhang 等^[1]仅研究了激素对由栓皮栎叶片诱导的胚性愈伤组织增殖的影响,目前尚未见用栓皮栎合子胚诱导胚性愈伤组织再生体胚,以及用不同发育阶段体胚增殖体胚的研究报道。为此,本试验以栓皮栎胚性愈伤组织及不同发育阶段的体胚为试材,对影响栓皮栎体胚再生与增殖能力的几种主要因素进行了研究,旨在提高栓皮栎体胚的再生与增殖能力,以期为促进该树种体胚发生

研究的持续发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

栓皮栎 1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#] 优树选自陕西省周至县楼观台栓皮栎天然林,以其未成熟合子胚诱导的胚性愈伤组织和处于不同发育阶段的体胚为供试材料。

1.2 方法

1.2.1 胚性愈伤组织及体胚的诱导 参考张存旭等^[11]的方法,分别于 2009-07-10、2009-07-25 从选取的栓皮栎自由授粉优树上,采集不同发育时期的未成熟球果,从中剥取合子胚,进而诱导体胚发生,获得胚性愈伤组织及不同发育时期的体胚。合子胚接种前于解剖镜下观察胚的形状,确定发育时期。

1.2.2 体胚再生与增殖能力的保持 (1)继代次数、光照及激素对胚性愈伤组织再生体胚能力的影响。以 2009-07-10 采集的 3[#] 优树合子胚诱导的胚性愈伤组织为材料,挑选生长旺盛、颜色为淡黄色或白色半透明的胚性愈伤组织团块,切割成 0.25 cm² 的小块,分别接种在附加不同质量浓度 6-BA 和 NAA 组合的 MS 培养基上培养,25 d 继代 1 次,共继代 8 次。每处理接种 15 瓶,每瓶接种 4 块外植体。培养温度(25±2)℃,培养光照设置自然光(不提供人工光照)、强光(12 h 光照,1 000~2 000 lx)及全程暗培养 3 种,每种光照条件下每处理 5 瓶。

(2)合子胚外植体发育程度对胚性愈伤组织再生体胚能力的影响。分别以 2009-07-10、2009-07-25 采集的 5 株优树合子胚诱导的胚性愈伤组织为材料,在筛选出的培养基及光照条件下培养,观察不同胚性愈伤组织体胚的再生情况。每处理接种 5 瓶。

(3)体胚发育阶段对再生次生胚增殖率的影响。将 2009-07-10 采集的 3[#] 优树合子胚诱导产生的胚性愈伤组织及各发育阶段的体胚,在筛选出的培养基及光照条件下进行体胚再生与增殖培养,研究不同发育时期体胚再生增殖体胚能力的差异。每处理接种 5 瓶。

1.2.3 统计指标及数据分析 在培养过程中,每隔 4 d 观察培养物的变化情况,于培养物每次继代前统计每个外植体上的再生增殖体胚数。数据整理后用统计软件 SPSS V13.0 对数据作平方根转换后,进行方差分析及 LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 继代次数、激素对栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的影响

表 1 结果表明,随着继代次数的增加,不同激素组合培养基中栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚的能力变化趋势一致,均呈下降趋势。图 1-A 是在无激素培养基中继代 8 次后的体胚再生情况,再生体胚数由 10.88 下降至 1.54,下降了 86.1%。方差分析结果表

明,继代次数对胚性愈伤组织再生体胚的影响达极显著水平,以 1.00 mg/L 6-BA 与 0.25 mg/L NAA 激素组合为例,不同继代间 F 值为 81.53, $P<0.01$ 。

添加激素后,栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚的能力明显增强,再生体胚数随继代次数的增加而下降的趋势明显减慢。在相同继代次数下,培养基中激素组合对胚性愈伤组织再生体胚的影响达到极显著水平(表 1)。图 1-B 是在单独添加 1.00 mg/L 6-BA 的培养基中继代 8 次后的体胚增殖情况,与不加激素继代 2 次后的再生体胚数相当;与同一培养基中继代 1 次后的再生体胚数相比,下降了 56.7%;与无激素培养基中继代 1 次后的再生率相比,仅下降了 24.3%。这说明,细胞分裂素 6-BA 具有明显提高栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的作用。

表 1 继代次数、激素对栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的影响

Table 1 Effect of subculturing times and exogenous hormone on embryoids regeneration of embryogenic callus in *Q. variabilis*

处理 Treatment		每个外植体的再生体胚数 Number of somatic embryos per explant			
6-BA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	继代 1 次 Subculturing 1 time	继代 2 次 Subculturing 2 times	继代 3 次 Subculturing 3 times	继代 8 次 Subculturing 8 times
0.00	0.00	10.88±1.16 D	8.88±1.17 D	6.26±1.17 D	1.54±0.67 D
0.50	0.00	14.72±1.13 C	13.38±1.68 C	11.68±1.08 C	5.64±0.83 C
1.00	0.00	18.90±1.32 B	17.24±1.06 B	15.48±1.11 B	8.18±0.80 B
0.50	0.25	16.70±1.58 BC	15.36±1.35 BC	13.20±1.16 BC	5.82±0.97 C
1.00	0.25	25.40±1.50 A	24.78±1.62 A	23.28±2.04 A	15.42±1.40 A
1.00	0.50	12.68±1.22 CD	9.36±1.24 D	6.68±0.68 D	1.84±0.52 D

注:表中数据为自然光照条件下的数据,每个数据表示为“平均值±标准差”,不同激素处理间进行 LSD 多重比较,标有不同字母的数据表示有极显著差异($P<0.01$)。

Note:Data in the table were collected under the condition of natural light. Values are “means±SE”. LSD test was done between the treatments of hormone. Values followed by different letters are significantly different at $P<0.01$ level according to LSD test.

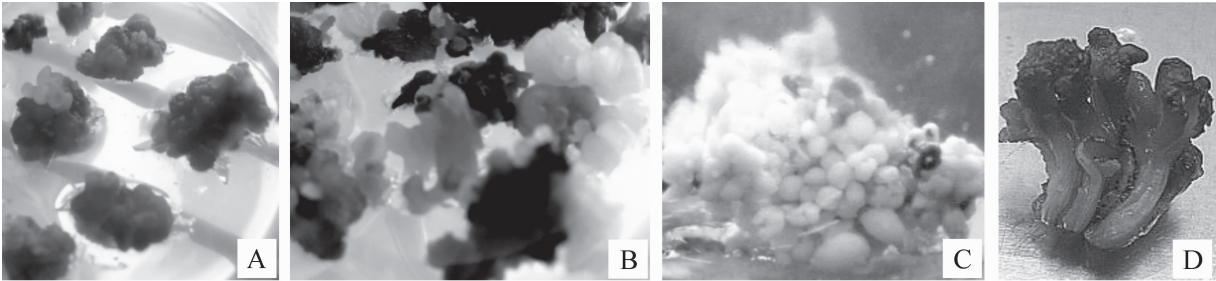


图 1 激素对栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的影响

A. 无激素条件下继代 8 次后的体胚再生情况;B. 培养基中添加 1.00 mg/L 6-BA 继代 8 次后的体胚再生情况;
C. 培养基中添加 1.00 mg/L 6-BA 再生的体胚簇;D. 培养基中添加高质量浓度生长素(NAA)产生的畸形胚

Fig. 1 Effect of exogenous hormone on embryoids regeneration of embryogenic callus in *Q. variabilis*

A. Regeneration of somatic embryos on plant hormones-free medium after subculturing 8 times;

B. Regeneration of somatic embryos on medium with 1.00 mg/L 6-BA after subculturing 8 times;C. Cluster of somatic embryos on medium with 1.00 mg/L 6-BA;D. Abnormal somatic embryos on medium with high auxin(NAA) concentration

在一定质量浓度范围(0~1.00 mg/L),栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力随 6-BA 质量浓度的升

高而增强,含高质量浓度 6-BA 培养基中再生的体胚呈簇状(图 1-C)。后续试验表明,6-BA 质量浓度

超过 2.0 mg/L 时,体胚的再生能力反而会受到抑制(数据未提供),外植体发育停滞或仅有愈伤组织可再增殖。

在栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚的过程中,6-BA 与 NAA 配合使用比单独使用 6-BA 效果好。1.00 mg/L 6-BA 与 0.25 mg/L NAA 是最佳的激素组合,此时继代 1 次的再生体胚数与单独添加 1.00 mg/L 6-BA 时相比,增加了 34.4% ($P<0.01$),继代 8 次后再生体胚数较不加激素继代 1 次后的还高 41.7%。当 NAA 质量浓度高于 0.25

mg/L 时,再生体胚数又开始下降,多数外植体只增殖愈伤组织,而再生的体胚发育畸形(图 1-D)。

2.2 光照对栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的影响

表 2 结果显示,光照条件对栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚的影响达极显著水平,如 1.00 mg/L 6-BA 与 0.25 mg/L NAA 激素组合中,不同光照条件间 F 值为 79.74, $P<0.01$ 。自然光照条件下各激素组合再生体胚数最高,强光下次之,黑暗中最低。

表 2 光照对栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的影响

Table 2 Effect of light on embryoids regeneration of embryogenic callus in *Q. variabilis*

处理 Treatment		每个外植体的再生体胚数 Number of somatic embryos per explant		
6-BA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	自然光照 Natural light	强光 Strong light	黑暗 Dark
0.00	0.00	10.88±1.16 A	3.64±0.63 B	0.84±0.46 C
0.50	0.00	14.72±1.13 A	5.36±0.90 B	1.74±0.54 C
1.00	0.00	18.90±1.32 A	8.26±2.00 B	2.30±0.87 C
0.50	0.25	16.70±1.58 A	6.68±1.37 B	2.28±0.95 C
1.00	0.25	25.40±1.50 A	14.58±1.69 B	4.40±2.44 C
1.00	0.50	12.68±1.22 A	4.72±1.48 B	0.00±0.00 C

注:表中数据为各处理继代 1 次的数据,每个数据表示为“平均值±标准差”,不同光照间进行 LSD 多重比较,标有不同字母的数据表示有极显著差异($P<0.01$)。

Note:Data in the table were collected after 1 time of subculture. Values are “means±SE”. LSD test was done between the treatments of light. Values followed by different letters are significantly different at $P<0.01$ level according to LSD test.

自然光照条件下培养的栓皮栎胚性愈伤组织为浅黄色颗粒状,质地疏松,体胚白色半透明,细胞分裂旺盛,培养物轻微发生褐变(图 2-A)。强光(1 000~2 000 lx)条件下的胚性愈伤组织褐变较重,尤其是紧贴培养基的愈伤组织,几乎全部变成黄

褐色,严重者褐化坏死,上部培养物颜色呈浅黄绿色、质地紧实,生长慢,再生体胚能力低,尤其表面再生的次生体胚数量少。在黑暗条件下,培养物一直呈现白色疏松的颗粒状,愈伤组织仅不断增殖,而很少再生体胚(图 2-B)。

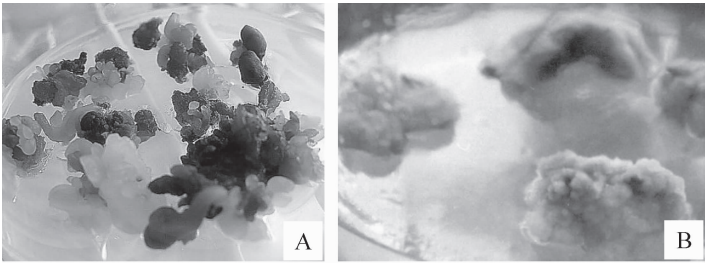


图 2 光照对栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的影响

A. 自然光照下体胚的再生情况;B. 黑暗条件下体胚的再生情况

Fig. 2 Effect of light on embryoids regeneration of embryogenic callus in *Q. variabilis*

A. Somatic embryos regenerated in natural light;B. Somatic embryos regenerated in dark

2.3 合子胚外植体发育程度对栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的影响

合子胚外植体发育程度显著影响栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚的能力。利用 2009-07-10 采集的合子胚产生的胚性愈伤组织再生体胚时,1[#]、2[#]、3[#] 和

5[#] 4 株优树诱导的胚性愈伤组织再生体胚能力没有明显差异,但均强于 4[#] 优树(表 3)。但 2009-07-25 采集的 1[#]、2[#]、3[#] 和 5[#] 4 株优树,其胚性愈伤组织再生体胚的能力与 07-10 采集的 4[#] 优树相当(表 3)。研究发现,1[#]、2[#]、3[#] 和 5[#] 4 株优树的合子胚发育比较

同步,较 4[#] 优树合子胚发育晚 15 d 左右。2009-07-10 采集的 4 株优树合子胚均处于发育较年幼的心形胚期或早子叶形期,细胞分裂旺盛,体胚再生容易;而当时的 4[#] 优树合子胚已发育至成熟子叶期胚,细胞分裂能力差,体胚再生能力差。2009-07-25 采集的 1[#]、

2[#]、3[#] 和 5[#] 优树合子胚发育程度与 2009-07-10 采集的 4[#] 优树合子胚发育程度相当。这说明,合子胚外植体发育程度是影响栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的主要因素。

表 3 不同发育程度合子胚诱导的栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的比较

Table 3 Comparison of embryoids regeneration abilities of embryogenic callus induced by zygonic embryos in *Q. variabilis* at different development stages

优树 Plus tree	07-10 采集 Collected on 10 th , July		07-25 采集 Collected on 25 th , July	
	胚性愈伤组织 再生体胚数 Regeneration somatic embryos numbers of embryogenic callus	合子胚外植体 发育状况 Development status of zygonic embryos	胚性愈伤组织 再生体胚数 Regeneration somatic embryos numbers of embryogenic callus	合子胚外植体 发育状况 Development status of zygonic embryos
1 [#]	25.6	心形胚期或早子叶形期,胚体乳白色半透明状,3~5 mm,种皮与胚易分离	8.6	子叶期,胚体浅黄色,6~10 mm,浅黄色,2/3 合子胚种皮紧贴胚,难分离
2 [#]	24.8	Heart-shape or early cotyledonary, lacte and translucent, 3—5 mm long, epispem can be easily peeled from embryo	8.4	Cotyledonary, light yellow, 6—10 mm long, 2/3 of epispem stick to embryo, hard to peel
3 [#]	27.4		9.3	
5 [#]	26.2		9.0	
4 [#]	8.9	子叶期,胚体浅黄色,8~10 mm,种皮紧贴胚,难分离 Cotyledonary, light yellow, 8—10 mm long, epispem stick to embryo, hard to peel	3.3	成熟子叶期,胚体黄色,8~10 mm,种皮紧贴胚,难分离 Mature cotyledonary, yellow, 8—10 mm long, epispem stick to embryo, hard to peel

2.4 体胚发育阶段对栓皮栎再生次生胚增殖率的影响

体胚发育阶段对栓皮栎再生次生胚增殖率的影响达到了极显著水平(F 值 87.86, $P<0.01$)。随着体胚的不断发育,其再生次生胚增殖能力逐渐下降(图 3)。以胚性愈伤组织再生体胚的能力最强,其继代 2 次后,平均每个愈伤组织团块再生体胚数可达 25.8;其次是继代 2 次后的胚性愈伤组织产生的球形体胚及心形体胚,二者产生的次生体胚数分别为 20.1 和 14.5;继代 2 次后的胚性愈伤组织产生的子叶形体胚的次生胚增殖力最差,仅有 9.6 个,是胚性愈伤组织再生体胚数的 37.2%。

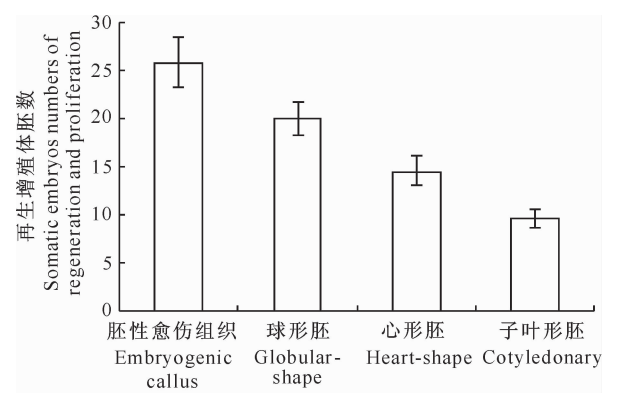


图 3 不同发育时期栓皮栎体胚再生增殖体胚数的比较
Fig. 3 Comparison of regeneration and proliferation numbers of somatic embryos in *Q. variabilis* at different development stages

3 结论与讨论

继代次数、培养基激素组配、光照条件等外界因素,以及合子胚外植体发育程度、体胚发育程度等内部因素,均可影响栓皮栎体胚的再生与增殖。选择处于心形及早子叶形期的幼嫩合子胚诱导的胚性愈伤组织,在含 1.00 mg/L 6-BA 与 0.25 mg/L NAA 的 MS 培养基上,于自然散射光下培养,可有效保持栓皮栎体胚的再生与增殖能力。

一般认为,初诱导产生的胚性愈伤组织或经过短期培养的胚性愈伤组织,比较容易诱导产生体细胞胚,但随着培养时间的延长和继代次数的增加,体细胞胚再生能力会降低^[15]。本研究也得出相同结论,即随着继代次数的增加,栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚的能力逐代下降,继代 9 个月以后,体胚的增殖能力几乎丧失。生长素与细胞分裂素在植物体胚的诱导中起着决定性作用^[16-17],一般认为,在诱导胚性愈伤组织后要及时降低甚至去掉生长素(一般用 2,4-D)才能诱导体胚发生^[1-2,11,13]。本研究表明,细胞分裂素 6-BA 与生长素 NAA 联合使用,可以延长体胚的再生时间,减轻胚性愈伤组织因多次继代而导致的再生体胚能力下降或者丧失的现象。在此过程中,6-BA 质量浓度不能超过 1.00 mg/L, NAA 质量浓度不能超过 0.25 mg/L,否则体胚的再生能力会迅速下降。也有报道表明,随继代次数的增加,畸

形胚发生频率和再生植株不育率会逐渐升高^[18],因此,6-BA 与 NAA 配合使用,虽然可以抑制栓皮栎胚性愈伤组织再生体胚能力的下降,延长继代次数,但是否会引起畸形胚发生频率升高,以及对体胚成熟与萌发产生影响,尚需进一步研究确定。

光照条件对一些植物的体胚发生、继代和次生胚的产生有影响,但不同植物对光照的要求不同,光周期可能是通过光敏素来调控内源 ABA 的水平,最终以 ABA 含量的变化来调控体胚的发生^[19]。多数植物体胚的发生与增殖需要在黑暗条件下进行^[11,14,19-21],但栓皮栎的体胚再生与增殖需要在自然散射光下进行,这与周丽依等^[21]对菠萝体胚的研究结果类似。不同树种体胚发生对光照需求的不同,可能与树种特性有关,研究中应引起注意。

合子胚发育程度是影响其所诱导的愈伤组织再生体胚能力的主要因素,处于心形期或早子叶形期的幼嫩合子胚诱导的愈伤组织再生体胚能力强,保持时间长;合子胚越接近成熟,诱导的愈伤组织再生体胚能力越差,保持时间越短;心形期合子胚与成熟子叶期合子胚诱导的胚性愈伤组织,再生体胚能力的保持时间相差 4 个月。因此,在栓皮栎体胚诱导时,应选择合适的合子胚外植体,这对后续体胚的再生与增殖至关重要。

此外,体胚自身的发育阶段(体胚类型)也影响其再生与增殖能力,胚性愈伤组织及球形幼胚再生、增殖体胚的能力最强,其次是心形幼胚,最差的是子叶形期体胚。因此,在栓皮栎体胚研究中,可以通过有目的地选择培养物,实现体胚再生与增殖能力的长期保持。

[参考文献]

- [1] Zhang C X,Zhang H L,Jia X M,et al. Proliferation,maturation and germination of somatic embryos in *Quercus variabilis* [J]. Scientia Silvae Sinicae,2008,44(6):39-45.
- [2] 韩碧文,刘淑兰. 植物离体细胞胚胎发生 [J]. 植物生理学通讯,1988(1):9-15.
Han B W,Liu S L. Plant somatic embryogenesis *in vitro* [J]. Plant Physiology Communications,1988(1):9-15. (in Chinese)
- [3] Bueno M A,Astorga R,Manzanera J A. Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber* [J]. Physiologia Plantarum,1992,85:30-34.
- [4] Gingas V M,Lineberger R D. Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult,1989,17:191-203.
- [5] Chalupa V. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and lin-

- den (*Tilia cordata* Mill.) [J]. Plant Cell Rep,1990,9(7):398-401.
- [6] Jorgensen J. Embryogenesis in *Quercus petraea* and *Fagus sylvatica* [J]. Plant Physiol,1993,132:638-640.
- [7] Manzanera J A,Astorga R,Bueno M A. Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. [J]. Silv Genet,1993,42:90-93.
- [8] Kim Y W,Youn Y,Noh E R,et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima* [J]. Plant Cell Rep,1997,16(12):869-873.
- [9] Mauri P V,Manzanera J A. Induction, maturation and germination of holmoak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos [J]. Plant Cell Tiss Org Cult,2003,74:229-235.
- [10] Kim Y W,Youn Y,Noh E R. Somatic embryogenesis and germination from immature embryos of *Quercus variabilis* [J]. Research Report of the Forest Genetics Research Institute,1995,31:147-152.
- [11] 张存旭,姚增玉,赵忠. 栓皮栎体胚诱导关键影响因素研究 [J]. 林业科学,2005,41(2):174-177.
Zhang C X,Yao Z Y,Zhao Z. Factors influencing the induction of somatic embryogenesis in *Quercus variabilis* [J]. Scientia Silvae Sinicae,2005,41(2):174-177. (in Chinese)
- [12] Cuenca B,San-José M C,Martínez M T,et al. Somatic embryogenesis from stem and leaf explant of *Quercus robur* L. [J]. Plant Cell Rep,1999,18:538-543.
- [13] 崔凯荣,戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学 [M]. 北京:科学出版社,2000:53.
Cui K R,Dai R L. Molecular biology in plant somatic embryogenesis [M]. Beijing:Science Press,2000:53. (in Chinese)
- [14] 张焕玲,张存旭,贾小明. 栓皮栎胚性愈伤组织诱导及增殖体系的建立 [J]. 西北林学院学报,2005,20(1):74-77.
Zhang H L,Zhang C X,Jia X M. Embryogenic callus induction and proliferation lines construction of *Quercus variabilis* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2005,20(1):74-77. (in Chinese)
- [15] 王喆之,李克勤,张大力,等. 陆地棉胚性愈伤组织的变异及高频胚胎发生 [J]. 植物学报,1994,36(5):331-335.
Wang Z Z,Li K Q,Zhang D L,et al. Variation of embryogenic callus and high frequency of embryogenesis on upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Journal of Integrative Plant Biology,1994,36(5):331-335. (in Chinese)
- [16] 汤浩茹,王永清,任正隆. 果树的体细胞胚发生 [J]. 四川农业大学学报,1999,17(1):69-79.
Tang H R,Wang Y Q,Ren Z L. Somatic embryogenesis of fruit trees [J]. Journal of Sichuan Agricultural University,1999,17(1):69-79. (in Chinese)
- [17] 唐巍,杨映根,桂耀林,等. 松柏类植物体细胞胚胎发生的研究与应用 [J]. 植物学通报,1996,13(1):25-31.
Tang W,Yang Y G,Gui Y L,et al. Study and application on somatic embryogenesis in conifers [J]. Bulletin of Botany,1996,13(1):25-31. (in Chinese)