

网络出版时间:2013-12-25 11:05

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.018

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.018.html

川滇高山栎体胚诱导关键影响因素研究

张翠叶¹, 幸福梅², 杨小林², 洛桑曲杰²

(1 西藏自治区林业调查规划研究院, 西藏 拉萨 850000;

2 西藏大学 农牧学院, 西藏 林芝 860000)

【摘 要】 【目的】探讨影响川滇高山栎体胚诱导的关键因素, 为建立川滇高山栎体胚再生植株体系奠定基础。【方法】以川滇高山栎未成熟合子胚为外植体, 研究基本培养基、植物生长调节剂配比、采样时期、抗氧化剂以及培养条件(光培养或暗培养)对其体胚诱导的影响。【结果】川滇高山栎未成熟合子胚在 MS、1/2MS、B₅ 和 WPM 基本培养基上均有体胚发生, 其中 MS 基本培养基诱导效果较好, 诱导率达 60.0%, 显著高于其他培养基, 且愈伤组织量最多; 以 MS 为基本培养基, 同时添加 1 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L 2,4-D, 诱导率达 83.3%, 显著高于二者单独添加及其他组合处理; 光照强度 1 000~2 000 lx, 每天光照 12 h 的光培养比暗培养更有利于体胚的发生; 在林芝地区最佳采样时期为 08-10 左右; 培养基中添加 1.0 g/L PVP 可有效减轻褐变的发生。【结论】初步建立了川滇高山栎体胚诱导的培养体系。

【关键词】 川滇高山栎; 未成熟合子胚; 体胚发生

【中图分类号】 S792.18

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)01-0051-06

Factors influencing the induction of somatic embryogenesis in *Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils

ZHANG Cui-ye¹, XIN Fu-mei², YANG Xiao-lin², LUOSANG Qu-jie²

(1 Forest Inventory and Planning Institute of Tibet Autonomous Region, Lasa, Tibet 850000, China;

2 College of Agriculture and Animal Husbandry, Tibet University, Linzhi, Tibet 860000, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the factors that influence the induction of somatic embryogenesis in *Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils. 【Method】 Using immature zygotic embryos of *aquifolioides* as explants, effects of basic medium, hormones, concentrations of antioxidants medium, and culturing conditions on the induction of somatic embryogenesis were investigated. 【Result】 Somatic embryos were induced in all four tested basic medium including MS, 1/2 MS, B₅, and WPM. MS medium had the best induction rate of 60.0% with the maximum amount of callus. High induction rate of 83.3% was achieved in MS medium supplemented with 1 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L 2,4-D, which was significantly higher than all other treatments. Light intensity of 1 000—2 000 lx for 12 h per day was more conducive to the occurrence of somatic embryogenesis than dark culture. Optimal sampling period was around August 10th and medium supplemented with 1.0 g/L PVP effectively reduced browning. 【Conclusion】 A culture system with optimal culture conditions for induction of somatic embryogenesis of *Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils was established.

【收稿日期】 2013-08-06

【基金项目】 国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAC04B01); 西藏大学农牧学院林学特色专业建设项目

【作者简介】 张翠叶(1967—), 女, 河北石家庄人, 副研究员, 主要从事营林和种苗规划研究。E-mail: shannan111@163.com

【通信作者】 幸福梅(1981—), 女, 甘肃武威人, 副教授, 在读博士, 主要从事森林培育与组织培养研究。

E-mail: xzxinfumei@163.com

Key words: *Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils.;immature zygotic embryo;embryogenesis

体细胞胚胎发生是指在离体条件下使植物体细胞通过与合子胚类似的发育途径形成新个体的过程。相对于器官发生而言,体细胞胚胎发生具有数量多、速度快、结构完整、再生率高等优点。体细胞胚胎发生为植物细胞分化、全能性表达提供了理想的试验体系,在林木人工种子育苗、濒危植物挽救等方面具有重要意义^[1]。栎属植物是林木体细胞胚胎发生的研究热点之一。目前研究涉及的主要树种有十余种,研究较多的有欧洲栓皮栎(*Quercus suber*)^[2-3]、夏栎(*Quercus robur*)^[4]、麻栎(*Quercus acutissima*)^[5-6]、栓皮栎(*Quercus variabilis*)^[7]等,已在研究材料、培养技术等方面取得较大成功。

川滇高山栎(*Quercus aquifolioides*)作为西藏东南部、四川西部、云南西北部的特有树种,主要分布范围为海拔 2 400~3 400 m,乔木高达 30 m,但在干旱阳坡或遭受经常樵采后则退变成灌木丛林^[8]。该树种适应性好,具有较强的抗环境干扰能力和旺盛的萌蘖能力以及优良的水土保持和水源涵养作用,是当地重要的造林树种。同时也具有较高的经济价值,其木材坚硬,树皮和坚果含单宁,可用于鞣制皮革、护肤、入药等,亦可作为生物能源和为食用菌生产提供原料。因川滇高山栎种子易受种实害虫侵害且不耐储藏,并且嫁接、扦插困难,目前主要依靠天然更新。前人对川滇高山栎的研究主要集中在形态结构、生理特征、生长特点、生物量、种群群落生态学等方面^[9-15],尚未见有关其体胚发生及组织培养方面的报道。为此,本研究以川滇高山栎未成熟合子胚为材料,研究基本培养基、植物生长调节剂配比、采样时期、培养条件、抗氧化剂等因素对川滇高山栎胚性细胞诱导的影响,以期对川滇高山栎优良无性系繁殖、基因保存、遗传改良等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

分别于 2011-06-10、07-10、08-10、09-10 从西藏林芝地区八一镇觉木沟川滇高山栎天然林的同一林分中采样,每次固定从胸径相当、彼此相距 30 m 左右的 10 棵树上,将前一年开花授粉所结的小坚果连同壳斗一起采下,用塑料袋分装带回实验室,保存于 4℃ 的冰箱内备用。

1.2 川滇高山栎体胚诱导试验方法

1.2.1 外植体的消毒 接种前剥去川滇高山栎壳

斗取出完整小坚果,先用自来水冲洗 2~3 h,再用体积分数 70%酒精消毒 30 s,接着在 1 g/L 氯化汞溶液中消毒 15~20 min,最后用无菌水冲洗 3~5 次。无菌条件下用解剖刀剥去果皮,取出种子,再剥去种皮后,胚根向下将全胚接种于培养基上。

1.2.2 基本培养基的筛选

以 MS、1/2MS、B₅ 和 WPM 为基本培养基,同时添加 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D,以单因素对比试验筛选确定川滇高山栎胚性愈伤组织形成的最适基本培养基。

1.2.3 植物生长调节剂配比的筛选

以 MS 为基本培养基,设单独添加 0,1,2,4 mg/L 6-BA 和 0,0.5,1.0 mg/L 2,4-D 的处理以及二者按上述质量浓度两两配比的处理,观察川滇高山栎胚性愈伤组织的生长情况,以确定其最佳植物生长调节剂配比。

1.2.4 采样时期的筛选

将 2011-06-10、07-10、08-10、09-10 采集的来自于同一母树的川滇高山栎未成熟合子胚,接种于添加 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上进行培养观察,以确定其最佳采样时期。

1.2.5 培养条件的筛选

以 MS 为基本培养基,同时添加 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D,接种川滇高山栎未成熟合子胚进行光暗培养条件的筛选。其中光照培养时光照周期为 12 h/d、光照强度 1 000~2 000 lx;暗培养时无光照,在培养瓶上覆黑布。观察光暗培养条件下胚性愈伤组织的生长情况。

1.2.6 抗氧化剂对褐变的抑制

所用培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D,另附加 0,0.5,1.0 g/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP),以确定 PVP 最佳质量浓度。统计的褐变指标包括培养基中的褐变发生级别、褐变发生半径和褐变发生高度。褐变发生级别根据褐色的深浅,划分为无或很浅、中、深 3 级,分别用 1、2、3 表示;褐变发生半径为褐色区域的半径;褐变发生高度为褐色区域的竖直高度。

以上各项试验的所有处理均附加 30 g/L 蔗糖,4.5 g/L 琼脂,pH 值 5.8,培养温度(25±2)℃。除培养条件筛选试验的暗培养处理外,其余处理为防止褐变,均于接种后先暗培养 3 d,然后置于光照周期 12 h/d、光照强度 1 000~2 000 lx 的条件下培养。所有处理均接种 10 瓶,每瓶 3 个外植体,重复 3 次。

1.3 数据处理

采用 Excel 和 SPSS13.0 软件对试验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 基本培养基和培养条件对川滇高山栎体胚诱导的影响

由表 1 可知,将川滇高山栎未成熟胚分别接种于添加 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 的 MS、1/2MS、B₅ 和 WPM 培养基上,所有基本培养基上均有胚性愈伤组织及体胚产生。其中 MS 基本培养基在接种 5 d 后即能够产生乳白色体胚和愈伤组织

表 1 基本培养基和培养条件对川滇高山栎体胚诱导的影响

培养基 Medium	培养条件 Culture condition	外植体数 Number of explants	诱导率/% Induction rate	褐变率/% Browning rate	愈伤组织量 Callus volume
MS	光培养 Light	30	60.0 a	67 b	+++
	暗培养 Dark	30	43.3 b	53 d	++
1/2MS	光培养 Light	30	46.7 b	53 d	++
	暗培养 Dark	30	33.3 c	50 e	+
B ₅	光培养 Light	30	23.3 e	70 a	+
	暗培养 Dark	30	20.0 e	67 b	+
WPM	光培养 Light	30	33.3 c	67 b	+
	暗培养 Dark	30	26.7 d	63 c	+

注:①同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$);②+表示愈伤组织的量:++++ > +++ > ++ > +。下表同。
Note:① Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level;②+ indicates callus size:++++ > +++ > ++ > +. The same below.

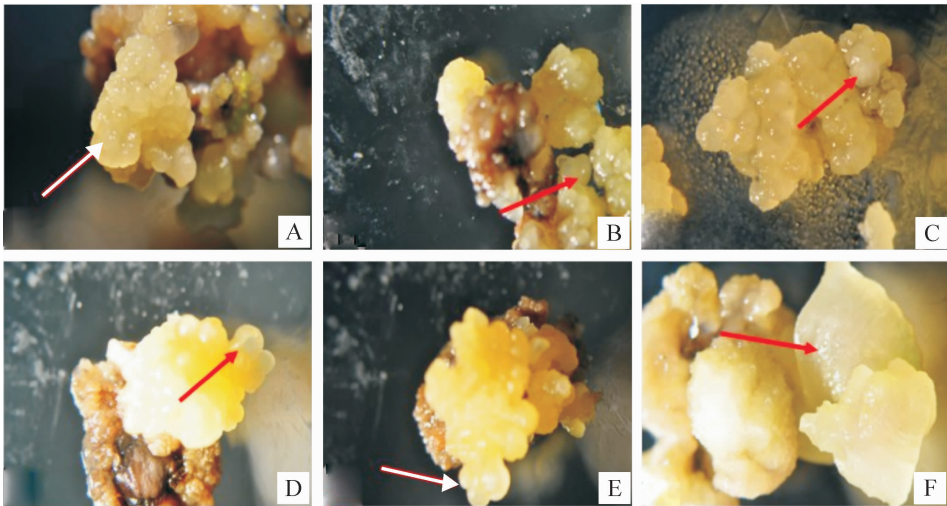


图 1 川滇高山栎体胚的发生过程
A. 胚性愈伤组织;B. 体胚增殖;C. 球形期;D. 心形期;E. 鱼雷期;F. 子叶期
Fig. 1 Somatic embryogenesis process in *Quercus aquifolioides*
A. Embryogenic callus tissue;B. Proliferation of somatic embryos;C. Globular stage;
D. Heart-shaped stage;E. Torpedo stage;F. Cotyledon stage

2.2 植物生长调节剂配比对川滇高山栎体胚诱导的影响

以 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度的 2,4-D、6-BA 及二者的组合,研究各处理对川滇高山栎胚性愈伤组织诱导的影响,结果见表 2。从表 2 可

(图 1-A、B),体胚诱导率明显较其他处理高;1/2 MS、B₅ 和 WPM 培养基上产生的体胚个数较少,愈伤组织的量也较少,且颜色偏黄;另外,所有处理均有较严重的褐变现象发生。由表 1 还可知,光培养和暗培养 2 种培养条件下,川滇高山栎体胚诱导率有较明显变化,光培养条件下的诱导率较高,但褐变也较重,而暗培养时褐变较轻;与光培养条件相比,除 B₅ 外,其余基本培养基在暗培养条件下的体胚诱导率均显著降低。

以看出,不添加植物生长调节剂的 MS 培养基也能诱导出愈伤组织,但诱导率较低,添加植物生长调节剂则可提高川滇高山栎未成熟胚的诱导率。培养基中只添加 6-BA 时,不同质量浓度 6-BA 所对应的诱导率存在差异,其中当 6-BA 质量浓度为 1 mg/L

时,诱导率为 36.7%,且愈伤组织量较多。培养基中只添加不同质量浓度的 2,4-D 时,所对应的诱导率差异明显,其中 2,4-D 质量浓度为 1.0 mg/L 时,诱导率为 36.7%。6-BA 与 2,4-D 配合使用时,未成熟胚的诱导率较高,愈伤组织量也相应增加,诱导过

程中原胚经历了球形期、心形期、鱼雷期和子叶期等发育时期(图 1-C、D、E、F);当 1 mg/L 6-BA 与 0.5 mg/L 2,4-D 配合使用时,诱导效果显著提高,诱导率高达 83.3%,且愈伤组织量最多。值得注意的是,所有植物生长调节剂处理的褐变率均较高。

表 2 2,4-D 与 6-BA 不同质量浓度配比对川滇高山栎体胚诱导的影响

Table 2 Effects of different 2,4-D and 6-BA concentrations on induction of somatic embryogenesis in *Quercus aquifolioides*

2,4-D/ (mg · L ⁻¹)	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	诱导率/% Induction rate	褐变率/% Browning rate	愈伤组织量 Callus volume
0	0	16.7 h	60 g	+
	1	36.7 de	77 b	++
	2	23.3 f	57 h	+
	4	23.3 f	77 b	+
0.5	0	33.3 de	63 f	++
	1	83.3 a	63 f	++++
	2	70.0 b	73 c	+
	4	53.3 c	70 e	+
1.0	0	36.7 d	73 c	+
	1	53.3 c	80 a	+
	2	26.7 g	77 b	+
	4	23.3 f	73 c	+

2.3 采样时期对川滇高山栎体胚诱导的影响

将不同时期采集于同一母树的川滇高山栎未成熟合子胚统一接种于添加 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基中,研究采样时期对川滇高山栎胚性愈伤组织诱导的影响,结果见图 2。从图 2 可以看出,川滇高山栎未成熟合子胚的采样时期对胚性愈伤组织诱导的影响较大,以 08-10 采集

的合子胚愈伤组织诱导率较其他采样时期高,可产生大量白色透明或半透明的颗粒状愈伤组织;06-10 采集的合子胚初代培养 20 d 后出现少量胚性愈伤组织;07-10、08-10 采集的合子胚在接种 5 d 后即有颗粒状愈伤组织形成,15 d 后大量发生,08-10 采集的合子胚褐变率较 07-10 的低;09-10 采集的合子胚褐变率明显增加,且愈伤组织诱导率急剧降低。

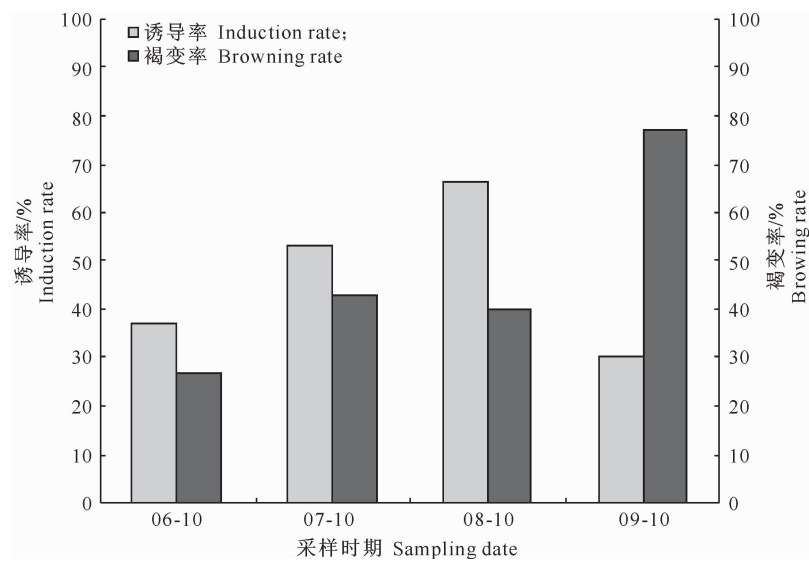


图 2 采样时期对川滇高山栎体胚诱导的影响

Fig. 2 Effects of sampling dates on induction of somatic embryogenesis of *Quercus aquifolioides*

2.4 PVP 对川滇高山栎体胚诱导中褐变的抑制作用

褐变在川滇高山栎体胚诱导中发生较严重,为寻找有效减轻褐变的措施,在培养基中添加了不同

质量浓度的抗氧化剂 PVP,观察其对褐变的抑制作用。由表 3 可知,不同质量浓度 PVP 对控制褐变具有一定作用,在本试验过程中,PVP 质量浓度越高

抑制效果越好,当 PVP 为 1.0 g/L 时,所有褐变发
生指标均明显降低;同时随着褐变减轻,产生的愈伤

组织量有所增加。

表 3 PVP 对川滇高山栎体胚诱导中褐变的抑制作用

Table 3 Inhibition of PVP on browning in somatic embryogenesis induction of *Quercus aquifolioides*

PVP/ (g · L ⁻¹)	褐变发生级别 Browning level	褐变发生半径/cm Browning radius	褐变发生高度/cm Browning height	愈伤组织量 Callus volume
0	3	0.6	0.6	+
0.5	2.27	0.4	0.3	++
1.0	1.67	0.2	0.1	+++

3 讨 论

本研究结果表明,基本培养基、植物生长调节剂
配比、采样时期、培养条件等均会对川滇高山栎体胚
发生产生影响。栎属植物体胚诱导大多以 MS 或
WPM 为基本培养基^[16-17],本试验采用的 4 种基本
培养基中,MS 较其他培养基更有利于川滇高山栎
体胚的发生,可见,无机盐含量高、微量元素齐全的
MS 培养基,除对栓皮栎外^[18],对川滇高山栎幼胚的
体胚发生也是有利的。

栎属植物体胚诱导时,植物生长调节剂以细胞
分裂素和生长素为主,一般两者配合使用,生长素与
细胞分裂素在植物体胚诱导中起着决定性作用^[19-21]。
降低或去掉生长素能提高体胚发生的诱导
效果^[22]。以川滇高山栎未成熟合子胚为外植体诱
导体胚发生时,不同配比的 6-BA 和 2,4-D 均能诱
导体胚发生,但诱导效果存在较大差异,本试验中以
1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 的配比诱导效果较
好。不同发育时期的未成熟合子胚因其分化程度存
在差异,诱导率也各不相同,生长在西藏林芝地区八
一镇的川滇高山栎以 08-10 左右采集的未成熟合子
胚诱导率较高。

光照在体胚发生中具有较为重要的作用。栎属
植物不同种在体胚发生中对光照的要求有较大差
异,如夏栎(*Q. robur*)的合子胚在暗培养条件下诱导
率较高^[23],麻栎(*Q. acutissima*)和欧洲栓皮栎
(*Q. suber*)的合子胚则在每天 16 h 光照条件下培养
体胚的诱导率较高^[24-25],而红栎(*Q. rubra*)在持续
光照条件下具有较高的体胚诱导率^[26]。本研究中,
川滇高山栎未成熟合子胚在光照和暗培养条件下均
能诱导体胚发生,但光照条件下诱导率较高。

木本植物组织培养过程中褐化现象严重,材料
中总酚含量与褐化程度呈正相关,这类褐色物质在
培养基中不断扩散,抑制其他酶的活性,毒害培养材
料,甚至导致其死亡,严重影响组织的生长。本研究
在培养基中添加抗氧化剂 PVP 能减缓褐化、促进组

织生长;另在操作过程中应尽量减少机械损伤,以防
止褐变。

本研究以川滇高山栎未成熟合子胚为外植体,
初步建立了川滇高山栎体胚诱导体系,但要真正实
现从体胚诱导、体胚增殖、体胚成熟、体胚萌发以
及最终的试管苗的移栽,仍有许多工作需要进一步
研究完善。

[参考文献]

[1] 尹伟伦,王华芳. 林业生物技术 [M]. 北京:科学出版社,2009.
Yin W L, Wang H F. Forestry biotechnology [M]. Beijing: Sci-
ence Press, 2009. (in Chinese)

[2] Loureiro J, Pinto G, Lopes T, et al. Assessment of ploidy stabil-
ity of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. u-
sing flow cytometry [J]. Planta, 2005, 221: 815-822.

[3] Santos C, Loureiro J, Lopes T, et al. Genetic fidelity analyses of
in vitro propagated cork oak (*Quercus suber* L.) [M]//Jain S
M, Haggman H. Protocols for micropropagation of woody trees
and fruits. Netherlands: Springer, 2007: 67-83.

[4] Chalupa V. Protocol of somatic embryogenesis; Pedunculate oak
(*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea*/Matt/
Liebl) [M]//Jain S M, Gupta P K. Protocol for somatic em-
bryogenesis in woody plants. Netherlands: Springer, 2005: 369-
378.

[5] 廖 婧,方炎明,虞木奎. 麻栎成熟合子胚外植体体胚发生和植
株再生 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(2): 398-402.
Liao J, Fang Y M, Yu M K. Somatic embryogenesis and plant
regeneration from mature embryo explants in *Quercus acutissi-
ma* Carr [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2012, 32(2): 398-
402. (in Chinese)

[6] Okamura M, Taniguchi T, Kondo T. Efficient embryogenic cal-
lus induction and plant regeneration from embryonic axis ex-
plants in *Quercus acutissima* [J]. J For Res, 2001(6): 63-66.

[7] Zhang C X, Yao Z Y, Zhao Z, et al. Histological observation of
somatic embryogenesis from cultured embryos of *Quercus vari-
abilis* B [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biolo-
gy, 2007, 33(1): 33-38.

[8] 侯德勋. 云南森林 [M]. 北京:中国林业出版社,1986.
Hou D X. Yunnan forest [M]. Beijing: China Forestry Publish-
ing House, 1986. (in Chinese)

[9] 管中天. 森林生态研究与应用 [M]. 成都:四川科学技术出版

- 社,2005:650-660.
- Guan Z T. Forest ecosystem research and application [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2005: 650-660. (in Chinese)
- [10] Zhou Z K. Taxonomical and evolutionary in plications of the leaf anatomy and architecture of *Quercus* L. subgen *Quercus* from China [J]. Cathaya, 1995, 7(22): 1-34.
- [11] 周浙昆,孙 航,俞宏渊. 西藏壳斗科的地理分布 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(2): 144-152.
- Zhou Z K, Sun H, Yu H Y. The geographical distribution of Fagaceae in Tibet [J]. Yunnan Plant Research, 1995, 17(2): 144-152. (in Chinese)
- [12] 李 进,陈可咏,李渤生. 川滇高山栎群体遗传结构的初步研究 [J]. 北京林业大学学报, 1997, 19(2): 93-98.
- Li J, Chen K Y, Li B S. Preliminary study on genetic structure of Alpine Oaks in Tibet [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1997, 19(2): 93-98. (in Chinese)
- [13] 刘兴良,刘世荣,宿以明,等. 巴郎山川滇高山栎灌丛地上生物量及其对海拔梯度的响应 [J]. 林业科学, 2006, 42(2): 1-7.
- Liu X L, Liu S R, Su Y M, et al. Aboveground biomass of *Quercus aquifolioides* shrub community and its responses to altitudinal gradients in Balang Mountain, Sichuan Province [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2006, 42(2): 1-7. (in Chinese)
- [14] 王国严,罗 建,徐阿生,等. 藏东南川滇高山栎群落物种多样性格局 [J]. 林业科学研究, 2012, 25(6): 703-711.
- Wang G Y, Luo J, Xu A S, et al. Pattern of plant species diversity of *Quercus aquifolioides* community in southeast Tibet [J]. Forest Research, 2012, 25(6): 703-711. (in Chinese)
- [15] 胡宗达,刘世荣,史作民,等. 不同海拔梯度川滇高山栎林土壤颗粒组成及养分含量 [J]. 林业科学, 2012, 48(3): 1-6.
- Hu Z D, Liu S R, Shi Z M, et al. Soil particle composition and its relationship with nutrient contents in a *Quercus aquifolioides* forest at different altitudinal gradient [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48(3): 1-6. (in Chinese)
- [16] 张存旭,姚增玉. 栎属植物体细胞胚胎发生研究现状 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(2): 356-362.
- Zhang C X, Yao Z Y. Recently research situation of somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2004, 24(2): 356-362. (in Chinese)
- [17] Wilhelm E. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2000, 36: 349-357.
- [18] 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): 174-178.
- 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): 174-178. (in Chinese)
- [19] 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)
- [20] 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)
- [21] 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)
- [22] 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.
- [23] Manzanera J A, Bueno M A, Pardos J A. *Quercus robur* L. (pedunculate oak) [M]//Bajaj Ypa. Biotechnology in agriculture and forestry: Vol. 35, Tree IV. Berlin, Netherlands: Springer, 1996: 321-341.
- [24] Kim Y W, Youn Y, Noh E R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima* [J]. Plant Cell Rep, 1997, 16: 869-873.
- [25] Maataoui M, Espagnac H. Comportement *in vitro* embryons zygotiques de chêne lège (*Quercus suber* L.) excises divers stades de leur development [J]. Ann Sci For, 1989, 46: 145-148.
- [26] Gingas V M, Lineberger R D. Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus* [J]. Plant Cell Tiss Orgeu Cult, 1989, 17: 191-203.