

欧石楠体细胞胚发生和植株再生

李际红, 邢世岩*, 姚培娟, 谭起航, 王海林

山东农业大学林学院, 农业生态与环境重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 以欧石楠茎段为外植体, 研究其体细胞胚胎发生和植株再生。对影响茎段不定芽分化及胚性愈伤组织诱导的主导因子进行比较分析, 并研究其体胚萌发、生根及移栽; 同时, 采用树脂切片法对茎段脱分化产生胚性愈伤组织及体胚发育过程进行组织细胞学观察。结果表明, 接种在1/2WPM基本培养基上的茎段, 胚性愈伤组织诱导率为88.7%, 显著高于其他处理, 不定芽诱导率可达90.6%, 平均分化倍数为3.6个, 平均分化苗高3.82 cm; 体细胞经过成熟培养后, 在添加1.0 mg·L⁻¹ ZT和0.3 mg·L⁻¹ IBA的1/2WPM培养基上萌发, 萌发的体胚在1/2WPM附加0.2 mg·L⁻¹ NAA和0.3 mg·L⁻¹ IBA的培养基上形成完整的体胚苗植株, 体胚苗生根率达到87.4%, 经炼苗后移栽到蛭石:珍珠岩=3:1 (V/V)的栽培基质中, 成活率可达63.7%。在显微镜下可观察到球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚; 体细胞胚以间接方式发生, 表现为愈伤组织外层细胞直接发生和愈伤组织组织内部细胞发生。

关键词: 欧石楠; 体细胞胚; 体胚发生; 植株再生; 组织细胞学观察

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Erica carnea* L.

LI Ji-Hong, XING Shi-Yan*, YAO Pei-Juan, TAN Qi-Hang, WANG Hai-Lin

Key Laboratory of Agricultural Ecology and Environment, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: In this study, we investigated somatic embryogenesis and plant regeneration in *Erica carnea* with stem section as explant. The effects on adventitious bud differentiation from stem and embryogenic callus induction were carried on comparative analysis. Subsequently, we explored its somatic embryo germination, rooting and transplantation. Meanwhile, embryogenic callus from stem differentiation and somatic embryogenesis were also observed by semi-section with resin embedded. The results showed that the induction rate (88.7%) of embryogenic callus on the basal medium 1/2WPM was higher than those on other media. The induction rate of adventitious bud, the average differentiation coefficient and the average height of differentiation seedlings reached 90.6%, 3.6 and 3.82 cm, respectively. Somatic cells germinated on the 1/2WPM medium with 1.0 mg·L⁻¹ ZT and 0.3 mg·L⁻¹ IBA after maturation. Thereafter, germinated somatic embryos formed complete plantlets, and rooting rate reached 87.4% on 1/2WPM medium containing 0.2 mg·L⁻¹ NAA and 0.3 mg·L⁻¹ IBA. The plantlets from somatic embryos were transplanted onto the substrate with vermiculite and perlite (3:1, V/V), and survival rate reached 63.7%. Furthermore, globular embryos, heart-shaped embryos, torpedo embryos and cotyledon embryos were observed under a microscope. The somatic embryogenesis was occurred in two ways: direct somatic embryogenesis from outer cells of callus and indirect somatic embryogenesis from intercells of callus.

Key words: *Erica carnea*; somatic embryo; somatic embryogenesis; plant regeneration; cytohistological observation

我国北方地区地处温带, 受季风影响, 四季分明。特定的地理和气候条件决定了我国北方的植物景观以落叶阔叶树和常绿针叶树为主(张莉俊等2006)。目前, 我国北方地区能够用于冬季开花的地被植物非常有限, 因此, 从国外引种适应我国气候和环境条件的冬季地被开花植物, 对满足我国绿化建设的需要具有重要的意义。

欧石楠是我们于2006年从华野园艺引进的适合我国北方地区的欧洲最新地被开花植物, 为常绿小灌木, 分枝多而密, 可随意修剪成型, 花色丰

收稿 2012-07-18 修定 2012-10-18

资助 山东省泰安市科技局项目(2011-2013)和山东省泰安市大学生科技引领创新计划项目(2008D2010和2009D1009)。

* 通讯作者(xingsy@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8243903)。

富, 花期为每年10月到第2年4~5月, 为公园、花坛、庭院绿化首选的地被植物(孟凡志等2004)。经过几年的引种驯化, 在山东东营和泰安已分别有八年生和六年生的欧石楠, 其营养生长与繁殖生长均正常, 表现出比较强的适应性(沙文勇2002)。然而, 欧石楠自然生长较慢, 种子成熟率较低, 繁殖和推广比较困难。采用嫁接扦插等营养繁殖的方法需要花费大量的时间, 消耗大量的劳力, 又会受到季节及数量的限制, 还容易传播病虫害。本文采用植物体细胞胚胎发生途径获得再生植株, 旨在较短时间内获得大量的欧石楠苗木。

植物体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis, SE)是指在离体培养条件下, 体细胞通过与合子胚发生类似途径形成的类似合子胚结构的过程。植物体胚的产生在高等植物中相当普遍, 现已从140多个树种的组织培养中观察到体胚的发生或诱导出再生植株(王菲等2011)。经植物体细胞胚胎发生途径获得再生植株, 具有数量多、繁殖速度快、结构完整、植株再生率高、不受季节影响等特点(Park等2006); SE发育初期获得的胚性愈伤组织(embryogenic callus, EC)是一种全能性干细胞, 具有多向分化潜能, 是植物快速繁殖、基因工程遗传转化的良好受体细胞(Trontin等2007)。体胚发生技术的研究对无菌苗的大规模生产和人工种子的制备具有重要的作用, 可以广泛应用于繁殖较慢或比较困难的园林植物的快速繁殖, 对园林植物的遗传转化、遗传改良的研究均具有重要作用(孔东梅等2006; Pescador等2008; 杨玲和沈海龙2011; 江荣翠等2010; 张建瑛等2010)。目前, 有关欧石楠体细胞胚发生和植株再生的研究尚未见报道。

本试验选取欧石楠当年生嫩梢为外植体, 从基本培养基、植物生长调节物质、体胚发生的组织细胞学及体细胞胚的发生方式等方面研究欧石楠茎段胚性愈伤组织的发生、体胚诱导以及植株再生, 以期获得稳定、高效的欧石楠体胚再生体系, 为欧石楠快速繁殖及遗传转化体系的建立提供理论依据和实验(技术)平台, 为欧石楠工厂化育苗提供一条新途径。

材料与方法

1 试验材料

2010年春季和秋季分别从移栽在山东农业大

学林学实验站的六年生欧石楠(*Erica carnea* L.)母株采集当年生嫩梢。流水下冲洗2 h, 在超净工作台上用75% (V/V)酒精浸泡30 s, 0.1% (V/V)升汞消毒8~10 min, 无菌水冲洗4~6次; 用灭菌滤纸吸取茎段表面的水分, 用无菌剪刀剪取1.0 cm左右长的茎段作为诱导体细胞胚胎的外植体备用。

2 试验方法

2.1 基本培养基的筛选

采用单因子试验, 从MS (Murashige和Skoog 1962)、1/2MS (MS大量元素减半)、WPM (Lloyd和McCown 1980)、1/2WPM (WPM大量元素减半)、B₅ (Gamborg等1968) 5种培养基中筛选基本培养基, 培养基中均附加1.0 mg·L⁻¹ ZT和0.3 mg·L⁻¹ IBA。每个处理接种20个茎段, 重复3次。6周后统计愈伤组织诱导率、不定芽的平均分化倍数及平均分化苗高。

2.2 用于胚性愈伤组织及体胚诱导的植物生长调节剂

以1/2WPM为基本培养基, 分别设置ZT为0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹三个浓度梯度, IBA为0、0.3、1.0 mg·L⁻¹三个浓度梯度, 按L₉(3⁴)正交设计, 共9个组合处理, 每处理接种20个茎段, 重复3次。6周后统计愈伤组织诱导率、不定芽的平均分化倍数及平均分化苗高。

2.3 体胚发生过程中的组织细胞学观察

不同处理下培养45~50 d的外植体, 经FAA (50%酒精配制)固定, 经梯度酒精脱水、二甲苯过渡到树脂并包埋。Lecia自动切片机制片, 厚8 μm, Haupt粘贴剂粘片, 经烤片、烘干后, 脱蜡并经梯度酒精复水至苏木精(0.5%)中染色24 h, 2%硫酸铁铵分色, 再梯度酒精脱水, 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。

2.4 体细胞胚的成熟、萌发与炼苗及移栽

将胚性愈伤组织在1/2WPM添加1.0 mg·L⁻¹ ZT和0.3 mg·L⁻¹ IBA的培养基中培养15 d左右, 诱导体细胞胚成熟; 继续培养30 d左右, 使成熟的体细胞胚萌发; 将萌发到3 cm左右的体胚苗移栽到1/2WPM添加0.2 mg·L⁻¹ NAA和0.3 mg·L⁻¹ IBA的基质培养基(李际红等2012)中培养45 d左右, 体胚苗生根, 形成完整体胚苗小植株; 将生根的体胚苗在大棚驯化10 d, 移栽到3:1 (V/V)的蛭石与珍珠岩栽

培养基中, 30 d后统计体胚苗的成活率, 并将健壮体胚苗移栽到温室花盆中。温室温度22~28 °C, 相对湿度50%~70%。

2.5 培养条件与数据处理及分析

培养温度(25±2) °C, 光暗周期为12 h/12 h, 光照强度为40~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 培养基中添加琼脂(agar type A) 8.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4.8~5.2。单因素和两因素方差分析及Duncan多重比较均利用DPS数据处理系统, 进行统计及显著性分析。不定芽的诱导率(%)=(诱导出不定芽的外植体数/接种的外植体数)×100; 平均分化倍数=再生不定芽总数/接种外植体数; 平均分化苗高=再生不定芽的苗高/接种外植体数; 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)×100; 体胚苗生根率(%)=生根体胚苗数/接种体胚苗数×100; 体胚苗的移栽成活率(%)=移栽成活株数/移栽总株

数×100。

实验结果

1 基本培养基对欧石楠茎段不定芽及基部胚性愈伤组织诱导的影响

由表1可知, 以1/2WPM为基本培养基, 6周后在其茎段基部形成浅绿色的胚性愈伤组织, 胚性愈伤组织诱导率可达88.7%, 高于其他4种培养基; 方差分析和多重比较显示, 1/2WPM与其他处理相比达到极显著差异。培养45~50 d时, 新梢(茎段)不定芽诱导率、平均分化倍数、平均分化苗高均是以1/2WPM为基本培养基上的最高, 分别达到90.6%、3.6个和3.82 cm; 方差分析和多重比较显示, 1/2WPM与其他处理相比达到极显著差异。因此, 1/2WPM为欧石楠胚性愈伤组织诱导及新梢不定芽诱导的最佳培养基。

表1 基本培养基对欧石楠胚性愈伤组织及不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of basal media on the induction of embryogenic callus and adventitious buds of *E. carnea*

培养基类型	不定芽诱导率/%	平均分化倍数	平均分化苗高/cm	胚性愈伤组织诱导率/%
MS	55.8±1.732 ^d	1.5±0.441 ^{Cc}	1.80±0.173 ^{Bc}	76.8±1.039 ^{Bc}
1/2MS	65.8±2.886 ^c	2.0±0.116 ^{Bc}	2.07±0.040 ^{Bc}	80.0±1.155 ^{Bb}
WPM	77.3±1.154 ^b	2.8±0.115 ^{Bc}	3.23±0.156 ^{Ab}	77.3±0.173 ^{Bc}
1/2WPM	90.6±0.577 ^a	3.6±0.346 ^{ABab}	3.82±0.104 ^{Aa}	88.7±0.173 ^{Aa}
B ₅	63.2±2.887 ^c	1.3±0.116 ^{Cc}	1.70±0.116 ^{Bc}	53.3±0.404 ^{Cd}

各列中标有不同大、小写字母表示在1%及5%水平差异显著; 培养基中均附加1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZT和0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA。

2 植物生长调节剂对欧石楠新梢不定芽及基部胚性愈伤组织诱导的影响

由表2可知, 第5个组合即1/2WPM+ZT 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA 0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的诱导效果最好, 其平均分化倍数最

高达到3.5个, 平均分化苗高为3.62 cm, 胚性愈伤组织的诱导率达到87.5%。方差分析和多重比较显示, 第5个组合极显著高于其他处理, 为欧石楠胚性愈伤组织诱导及新梢不定芽诱导的最佳激素组合。

表2 植物生长调节剂对欧石楠胚性愈伤组织及不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on the induction of embryogenic callus and adventitious buds of *E. carnea*

组合	ZT浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	IBA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	平均分化倍数	平均分化苗高/cm	胚性愈伤组织诱导率/%
1	0.5	0	1.20±0.173 ^{Cc}	2.15±0.029 ^{Bb}	53.3±1.905 ^{Dd}
2	0.5	0.3	1.15±0.029 ^{Cc}	3.11±0.052 ^{Aa}	82.3±1.559 ^{ABab}
3	0.5	1.0	2.50±0.116 ^{Bb}	1.30±0.116 ^{CDcd}	85.5±3.1754 ^{Aa}
4	1.0	0	1.28±0.046 ^{Cc}	1.12±0.069 ^{DEd}	76.3±2.714 ^{ABbc}
5	1.0	0.3	3.50±0.116 ^{Aa}	3.62±0.173 ^{Aa}	87.5±3.175 ^{Aa}
6	1.0	1.0	1.23±0.075 ^{Cc}	0.88±0.069 ^{EFe}	85.6±3.233 ^{Aa}
7	1.5	0	1.07±0.040 ^{Cc}	1.47±0.017 ^{Cc}	41.7±3.655 ^{Dc}
8	1.5	0.3	1.39±0.006 ^{Cc}	0.78±0.127 ^{Fe}	56.8±3.347 ^{Cd}
9	1.5	1.0	1.22±0.012 ^{Cc}	0.84±0.092 ^{EFe}	71.3±1.559 ^{Bc}

各列中标有不同大、小写字母表示在1%及5%水平差异显著; 基本培养基为1/2WPM。

3 欧石楠体胚的形态学特征

将欧石楠外植体接种到体胚诱导最适培养基 $1/2\text{WPM}+\text{ZT } 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 上, 培养30 d 时, 外植体切口处产生少量半透明或淡黄色的愈伤组织; 培养50 d时, 外植体基部部分或全部被胚性愈伤组织包裹, 为白色半透明或淡绿色, 表面颗粒状, 呈现不同的形态特征(图1)。从形态变化过程可发

现欧石楠体细胞胚发生的各个时期, 如胚性愈伤组织表面有数个近球形、半透明、表面光滑的球形胚和棒状胚(图1-A), 心形胚(图1- B~D), 双子叶及多子叶形胚(图1-E), 体胚萌发形成的再生植株(图1-F)。观察表明, 欧石楠体细胞胚的发育过程像合子胚一样, 经历了球形胚、心形胚、鱼雷形胚到分化出子叶胚及再生植株的全过程。

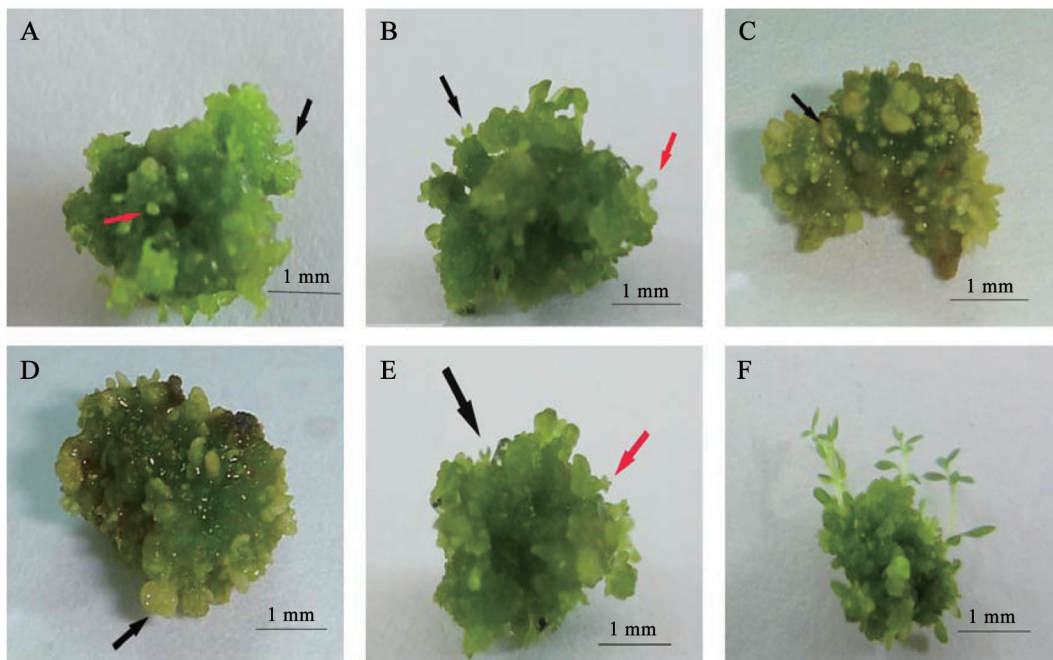


图1 欧石楠体胚发生的形态学观察

Fig.1 Morphological observation on somatic embryogenesis of *E. carnea*

A: 球形胚(红箭头)和棒状胚(黑箭头); B: 心形胚(黑箭头)和次生球形胚(红箭头); C: 心形胚的侧面(黑箭头); D: 膨大的心形胚(黑箭头); E: 双子叶(黑箭头)和三子叶(红箭头); F: 体胚萌发形成的再生植株。

4 欧石楠体细胞胚发生的组织学观察

观察欧石楠胚性愈伤组织不同发生阶段的树脂切片可知, 欧石楠体胚突起初期, 突起部位的细胞小、壁厚、胞质浓厚、核大, 为胚性愈伤组织(图2-A、C、D), 而图2-J显示的为非胚性愈伤组织。体胚突起初期的胚性愈伤组织, 随着细胞分裂的进行, 细胞数量不断增加, 体胚发育进入球形胚期(图2-B黑色箭头所示和图2-C)或者进入梨形胚期(图2-A黑色箭头所示); 球形胚期, 细胞纵向伸长, 两侧细胞分裂较快进而向外突出, 形成两个突起, 体胚进一步发育, 进入体积增大的心形胚期(图2-C和D); 心形胚发育形成两片子叶, 胚状体伸长形成鱼雷形胚, 再迅速发育进入形态清晰的子叶

形胚(图2-E和F); 体细胞胚进入子叶期之后逐渐从其胚性愈伤组织上分离出来, 形成独立的个体(图2-F), 这是体胚萌发进一步发育成完整植株的关键时期。树脂切片的细胞学观察结果表明, 欧石楠通过体胚发育可以形成大量的再生植株, 体胚再生是欧石楠快速繁殖的主要再生方式。

由图2可知, 欧石楠体胚发生方式为间接发生, 茎段培养30 d左右, 在其基部形成愈伤组织, 继续培养15 d, 由愈伤组织诱导形成体胚。愈伤组织的外层及组织内均存在胚性细胞(图2-G、K、L箭头所示), 它们均有发育为体细胞胚的潜能(图2-G、H、I)。分布在愈伤组织内部的胚性细胞逐渐由内向外发育, 而非胚性愈伤组织不断地褐化、死亡,

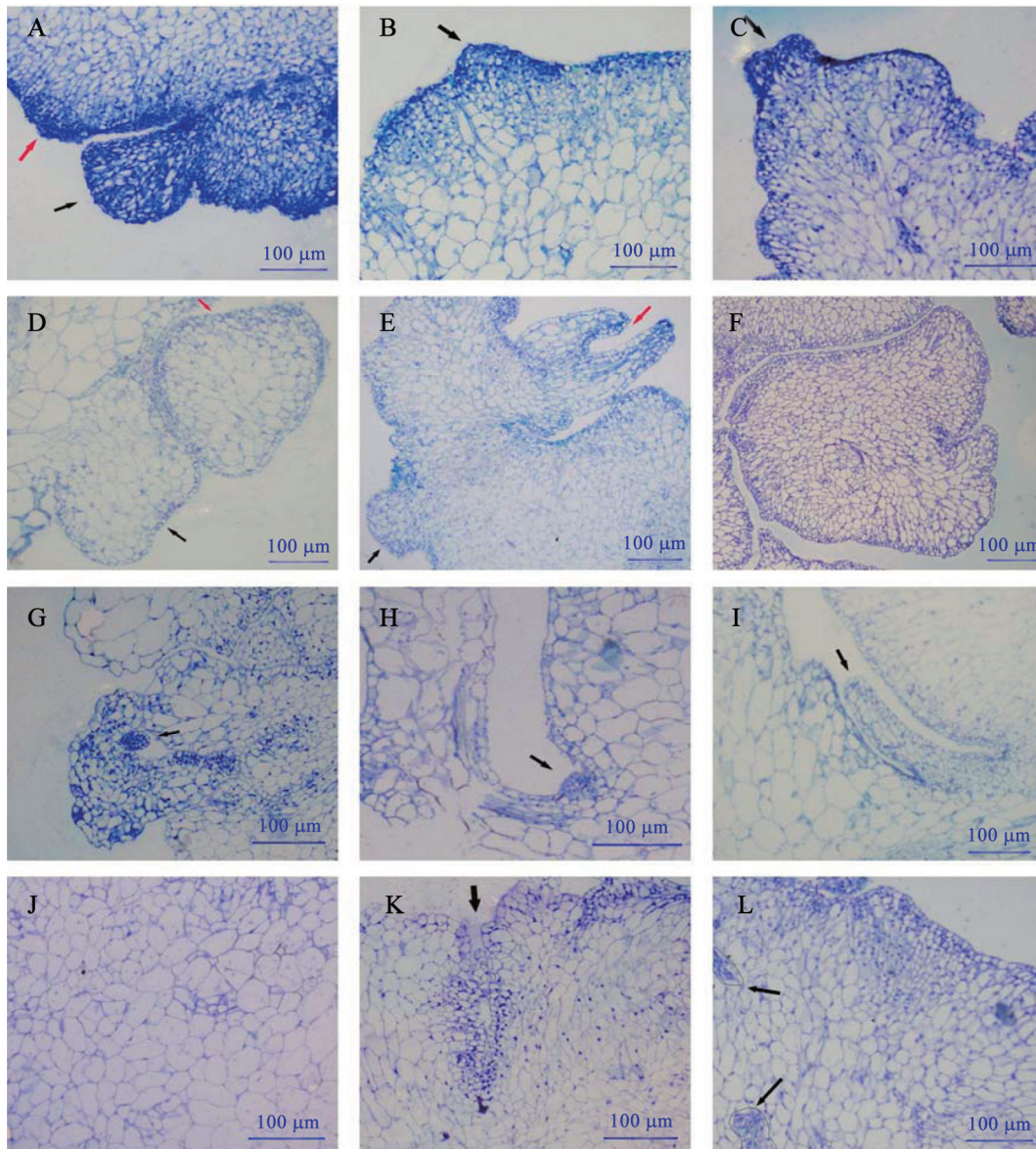


图2 欧石楠体胚发生的组织细胞学观察

Fig.2 Cytohistological observation on somatic embryogenesis of *E. carnea*

A: 梨形胚(黑色箭头)和球形胚发生前期(红色箭头); B: 球形胚(黑色箭头); C: 心形胚前期(黑色箭头); D: 心形胚(红色和黑色箭头); E: 子叶期(红色箭头)和次生球形胚(黑色箭头); F: 子叶形胚; G: 从表皮细胞发生的球形胚(黑色箭头); H: 组织内部产生的球形胚(黑色箭头); I: 内部球形胚的伸长(黑色箭头); J: 非胚性愈伤组织; K: 组织内的胚性愈伤组织(黑色箭头); L: 组织内的胚性细胞团(黑色箭头)。

形成隔离, 产生髓腔(图2-H、I、K), 髓腔两侧密集分布着大量的胚性细胞(图2-H、I、K黑色箭头所示)。同时, 观察发现愈伤组织内多处分布有胚性细胞团(图2-L箭头所示), 它们在适宜的条件下可能发育形成体胚。愈伤组织内部的胚性细胞团也明显存在体细胞胚发生的整个过程, 如体细胞胚初期的球形突起(图2-H), 逐渐发育进而使体细胞胚伸长, 形成鱼雷形胚(图2-I)。根据体细胞胚发生

过程的树脂切片观察以及细胞变化的典型特征可推知, 欧石楠体细胞胚胎发生方式为间接发生, 愈伤组织的表皮细胞及组织内细胞均能发育成体细胞胚。

5 体胚的成熟与萌发

愈伤组织在添加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZT和 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的1/2WPM培养基中培养15 d, 体细胞胚成熟(图3-A); 继续培养30 d, 成熟的体细胞胚萌发(图

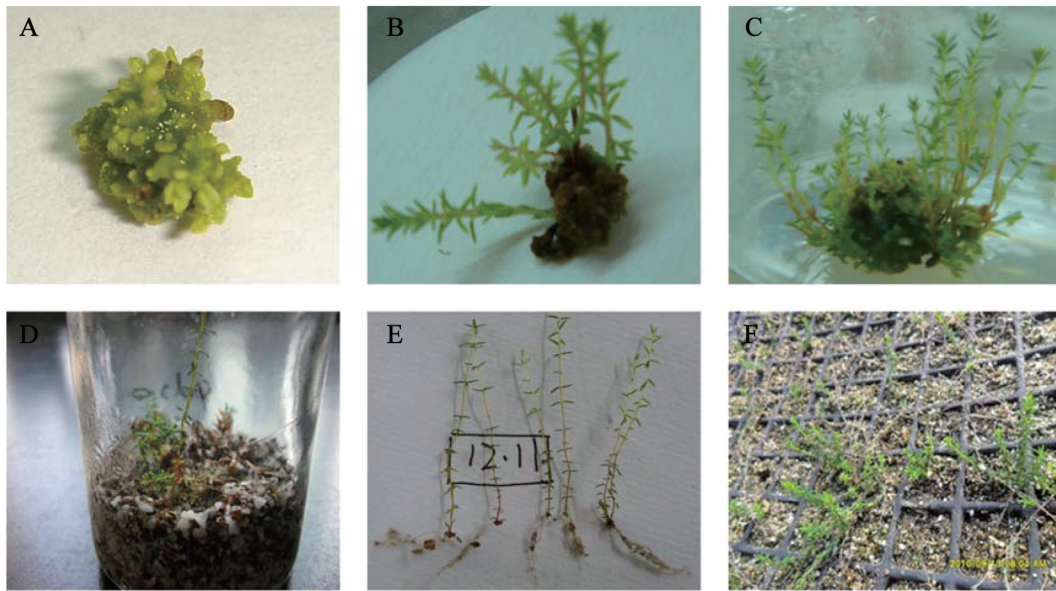


图3 欧石楠体胚萌发成植株

Fig.3 Somatic embryo germination and plant establishment of *E. carnea*

A: 体细胞胚; B和C: 体细胞胚萌发; D和E: 体胚苗生根; F: 移栽苗。

3-B和C); 将生长到3 cm左右的体胚苗移栽到1/2WPM+0.2 mg·L⁻¹ NAA+0.3 mg·L⁻¹ IBA的基质培养基(李际红等2012)中培养45 d, 体胚苗生根(生根率87.4%), 形成完整小植株(图3-D和E); 体胚苗在大棚驯化10 d后, 移栽到蛭石与珍珠岩3:1 (V/V)的栽培基质中培养30 d, 体胚苗的成活率可达63.7% (图3-F), 将健壮的体胚苗移栽到温室(温度22~28 °C, 相对湿度50%~70%)花盆中。

讨 论

植物体胚发生方式可分为直接发生和间接发生两种(Quiroz-Figueroa等2006): 前者是不经过愈伤组织阶段, 从幼胚子叶或胚轴等部分直接长出体胚, 如地被菊等(蒋细旺等2008); 后者是先生成胚性愈伤组织, 再从胚性愈伤组织表面或内部形成体胚, 如中国沙棘(李俊等2009)。研究发现, 欧石楠新稍的体胚发生是通过间接发生途径, 经历了球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚几个典型发育期, 最后发育成熟, 这与大多数植物体细胞胚胎发生过程相同(陈金慧2003; 孔东梅等2006; 沈海龙等2011; 张启香等2011)。

大量的研究表明, 植物器官发生与体胚发生对基本培养基的要求不同, 如WPM适合多种木本

植物(Woo和Wetzstein 2008)。培养基中氮是体胚发生所必需的元素, 不同培养基中氮素含量不同, 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培养基中NO₃⁻及NH₄⁺的总量较低, 而另一些树种则要求较高含量的还原氮(Burns和Wetzstein 1997)。本研究对基本培养基筛选后发现, 1/2WPM为欧石楠胚性愈伤组织及体胚诱导的最佳基本培养基(其中附加1.0 mg·L⁻¹ ZT和0.3 mg·L⁻¹ IBA), 其诱导率较高, 可达87.5%~88.7%。在MS、WPM、B₅三种基本培养基中, 氮素的提供形式和含量均不同: WPM中为NO₃⁻, 含量为956 mg·L⁻¹, 1/2WPM中仅478 mg·L⁻¹; MS中为NO₃⁻和NH₄⁺, 两者合计3 550 mg·L⁻¹; B₅中为NO₃⁻, 含量为2 500 mg·L⁻¹。可见, WPM的无机盐和离子浓度较低, 适合多种木本植物, 这与Burns和Wetzstein (1997)的结论基本一致。

对于大多数木本植物来说, 2,4-D是诱导植物体胚发生的必要生长调节物质, 但也有研究指出, 2,4-D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等2006)。在胡桃科中, 2,4-D诱导核桃(*Juglans regia*)、美国山核桃(*Carya illinoensis*)等体细胞胚的效果不显著, 而采用IBA、NAA等较2,4-D诱导的体胚发育正常

(Rodriguez和Wetzstein 1998); 本试验的研究结果与此相符, 即在欧石楠体细胞胚发生过程中, 生长素使用IBA获得了较为理想的诱导效果。

参考文献

- 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
- 江荣翠, 彭芳仁, 谭鹏鹏, 郝明灼(2010). 楸树体细胞胚胎发生的研究. 南京林业大学学报(自然科学版), 34 (2): 15~18
- 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
- 孔冬梅, 沈海龙, 冯丹丹, 张莉杰(2006). 水曲柳体细胞胚与合子胚发生的细胞学研究. 林业科学, 42 (12): 130~133
- 李际红, 孟凡志, 刘海燕, 张义群(2012). 稀土及多胺对欧石楠瓶苗生根的效应. 山东农业大学学报(自然科学版), 43 (2): 169~173
- 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
- 孟凡志, 徐力, 戴百荣, 赵祥文(2004). 欧石楠的适应性及其栽培. 山东林业科技, (4): 33~34
- 沙文勇(2002). 欧洲常绿地被植物——欧石楠和彩萼石楠. 中国花卉园艺, (9): 14~15
- 沈海龙, 翟小杰, 杨玲(2003). 极东锦鸡儿幼胚子叶的体细胞胚胎发生和植株再生. 植物生理学报, 47 (4): 399~405
- 王菲, 薛白鹭, 王一然, 李响, 姜思佳, 何晓慧, 隋文静(2011). 园林植物体胚发生的研究进展. 安徽农业科学, 39 (1): 18~20
- 杨玲, 沈海龙(2011). 花楸树体细胞胚与合子胚的发生发育. 林业科学, 47 (10): 63~69
- 张建瑛, 姜思佳, 邢亚娟, 郭树平, 郭喜军, 王菲(2010). 胡桃楸胚性愈伤组织诱导与体细胞胚胎发生. 植物研究, 30 (1): 22~26
- 张莉俊, 刘振林, 戴思兰(2006). 北方冬季园林植物景观的调查与分析. 中国园林, 22 (12): 87~90
- 张启香, 胡恒康, 王正加, 袁佳, 万俊丽, 黄坚钦(2011). 山核桃间受体细胞胚发生和植株再生. 园艺学报, 38 (6): 1063~1070
- Burns JA, Wetzstein HY (1997). Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. Plant Cell Tiss Org Cult, 48: 93~102
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res, 50: 151~158
- 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, Chaari-Rkhiss A, Drira N (2006). Contribution to the improvement of olive tree somatic embryogenesis by mineral and organic analysis of zygotic embryos. Euphytica, 151: 31~37
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15: 373~497
- Park YS, Lelu-Walter MA, Harvengt L, Trontin JF, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM (2006). Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. Plant Cell Tiss Org Cult, 86: 87~101
- Pescador R, Kerbauy GB, Kraus JE, Ferreira WM, Guerra MP, Figueiredo-Ribeiro RCL (2008). Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 44: 289~299
- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera RR, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss Org Cult, 86: 285~301
- Rodriguez APM, Wetzstein HY (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
- Trontin JF, Walter C, Klimaszewska K, Park YS, Lelu-Walter MA (2007). Recent progress in genetic transformation of four *Pinus* spp. Transgenic Plant J, 1: 314~329
- Woo SM, Wetzstein HY (2008). Morphological and histological evaluations of *in vitro* regeneration in *Elliottia racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron. J Amer Soc Hort Sci, 133 (2): 167~172