



吴祖明,蒋润迪,国春策,等.山苍子体胚发生及其增殖培养技术研究[J].江西农业大学学报,2026,48(2):477-491.
WU Z M,JIANG R D,GUO C C,et al.Research on the embryonic development and propagation culture techniques of *Litsea cubeba* [J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2026,48(2):477-491.

山苍子体胚发生及其增殖培养技术研究

吴祖明^{1,2},蒋润迪³,国春策²,郭悦¹,曾冬鹏¹,毛卓佳¹,易敏¹,
张露¹,陈尚钊⁴,王宗德⁴,汪加魏^{1,4*}

(1.江西农业大学 林学院/亚热带森林资源培育江西省重点实验室,江西 南昌 330045;2.江西乡土树种良种选育与
高效利用江西省重点实验室,江西 南昌 330045;3.云南农业职业技术学院,云南 昆明 650031;4.国家林业草原木本香
料(华东)工程技术研究中心,江西 南昌 330045)

摘要:【目的】山苍子是我国重要的木本油料树种,为突破其传统繁育技术瓶颈,研究旨在建立高效的山苍子体胚发生体系,为实现规模化繁殖提供技术支撑。【方法】以5—8月的山苍子种胚为外植体,设置7个采集时间处理,通过单因素和正交试验等方法,探究采集时间、高浓度蔗糖浸泡、活性炭浓度、有机营养及激素(6-BA、2,4-D和IAA)对体胚发生和次生胚增殖的影响,从而确定山苍子体胚发生及其次生胚增殖较适宜的培养基及其培养条件。【结果】体胚发生阶段在(24±2)℃黑暗环境下培养90 d,结果表明:山苍子种胚可通过直接或间接途径形成体细胞胚;种胚最佳采集时间为盛花期后75 d,此时的种子表现出适当的分化能力和抗逆性,具有较高的体胚发生潜力;培养基中添加一定浓度的活性炭可提高体胚发生率,150 mg/L为其适宜浓度,超过此浓度将对体胚发生产生抑制作用;对不同浓度6-BA(0.5,1.0,1.5,2.0 mg/L)、2,4-D(0.2,0.4,0.6,0.8 mg/L)与IAA(0.25,0.5,0.75,1.0 mg/L)进行三因素四水平的正交试验,极差分析表明:在不考虑交互作用的情况下,因子主次顺序依次为IAA、6-BA和2,4-D,筛选出促进山苍子体胚诱导的最佳培养基为MS+30 g/L蔗糖+7.0 g/L琼脂+700 mg/L水解酪蛋白+2 mg/L 6-BA+0.6 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L IAA,其体胚发生率最高可达23.3%。次生胚增殖阶段在(24±2)℃黑暗环境下培养30 d,结果表明:6-BA($P<0.01$)和NAA($P<0.05$)对次生胚增殖的影响最为显著,最佳增殖培养基为MS+30 g/L蔗糖+7.0 g/L琼脂+700 mg/L水解酪蛋白+0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+600 mg/L肌醇+200 mg/L环糊精,最高增殖倍数达20.17倍。【结论】研究显著提高了山苍子体胚发生率及次生胚增殖效率,为山苍子规模化繁殖提供了技术支撑。

关键词:山苍子;体胚发生;发生途径;次生胚增殖;激素;有机营养

中图分类号:S722.3 **文献标志码:**A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2286(2026)02-0477-15

CSTR:32399.14.aauj.2026040



Research on the embryonic development and propagation culture techniques of *Litsea cubeba*

WU Zuming^{1,2},JIANG Rundi³,GUO Chunce²,GUO Yue¹,ZENG Dongpeng¹,
MAO Zhuojia¹,YI Min¹,ZHANG Lu¹,CHEN Shangxing⁴,
WANG Zongde⁴,WANG Jiawei^{1,4*}

收稿日期:2025-05-12 **修回日期:**2025-07-04 **接受日期:**2025-07-11

基金项目:国家自然科学基金项目(32560384)

Project supported by National Natural Science Foundation of China(32560384)

作者简介:吴祖明,硕士生,orcid.org/0009-0006-5746-9442,13517090903@163.com;*通信作者:汪加魏,讲师,博士,
主要从事森林培育研究,orcid.org/0000-0003-4245-1945,jiaweiwang@jxau.edu.cn。

©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND协议

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory for Subtropical Forest Resources Cultivation, School of Forestry, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Jiangxi Key Laboratory of Superior Breeding and Efficient Utilization for Native Tree Species, Nanchang 330045, China; 3. Yunnan Vocational and Technical College of Agriculture, Kunming 650031, China; 4. National Forestry and Grassland Administration Engineering Research Center for Woody Spices (East China), Nanchang 330045, China)

Abstract: [Objective] As an economically important woody oilseed species in China, *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. faces significant bottlenecks in conventional propagation methods. This study aims to establish an efficient somatic embryogenesis system for *L. cubeba* to achieve mass propagation, thereby overcoming the limitations of traditional breeding techniques characterized by long cycles and low multiplication rates. [Method] Somatic embryogenesis stage: The single factor experimental method was used to explore the effect of activated carbon concentration on somatic embryogenesis, and the embryos of *L. cubeba* from May to August were used as explants, and 7 collection times were set to explore the effects of different collection times on somatic embryogenesis. In this study, the effects of high-concentration sucrose solution immersion, sucrose and acid hydrolyzed casein content on somatic embryogenesis were investigated by three-factor and three-level orthogonal experiments. Besides, the effects of different concentrations of 6-BA, 2, 4-D and IAA on somatic embryogenesis were investigated by using a three-factor and four-level orthogonal experimental method. Secondary embryo proliferation stage: The effects of different concentrations of 6-BA, NAA, inositol and cyclodextrin on the proliferation of secondary embryos were investigated by a four-factor three-level experimental method. In this way, the most suitable medium and culture conditions for the somatic embryogenesis and secondary embryogenesis of *L. cubeba* and its secondary embryonic proliferation were determined. [Result] During somatic embryogenesis (cultured at 24 ± 2 °C in darkness for 90 days), embryos developed through direct or indirect pathways. The optimal collection time was 75 days after full bloom, when seeds exhibited appropriate differentiation and stress resistance with high embryogenic potential. Activated charcoal at 150 mg/L showed the best effect, while higher concentrations inhibited embryogenesis. Orthogonal tests with three factors 6-BA (0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg/L), 2, 4-D (0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 mg/L), and IAA (0.25, 0.5, 0.75, and 1.0 mg/L) revealed the primary-secondary order of effects as $IAA > 6-BA > 2, 4-D$. The optimal induction medium was MS + 30 g/L sucrose + 7.0 g/L agar + 700 mg/L casein hydrolysate + 2 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L IAA, achieving a maximum somatic embryogenesis rate of 23.3%. For secondary embryo proliferation (cultured at 24 ± 2 °C in darkness for 30 days), 6-BA ($P < 0.01$) and NAA ($P < 0.05$) were identified as key factors. The best proliferation medium was MS + 30 g/L sucrose + 7.0 g/L agar + 700 mg/L casein hydrolysate + 0.1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 600 mg/L inositol + 200 mg/L cyclodextrin, yielding a maximum proliferation rate of 20.17-fold. [Conclusion] This study significantly improves the efficiency of somatic embryogenesis and secondary embryo proliferation in *L. cubeba*, providing a technical foundation for its large-scale propagation.

Keywords: *Litsea cubeba*; somatic embryogenesis; developmental pathway; secondary embryo proliferation; hormones; organic nutrients

【研究意义】山苍子 (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.) 是我国南方重要的木本香料和经济树种^[1-2], 其果实富含柠檬醛 (60%~90%)^[3-4], 在香料、食品、医药及生物防治等领域应用广泛^[5]。然而, 目前山苍子产业仍依赖实生苗繁殖, 存在遗传性状不稳定、种苗性别不可控、繁殖效率低等问题^[6-7], 严重制约了良种推广与规模化种植。因此, 开发高效繁育技术已成为山苍子产业发展的迫切需求。【前人研究进展】体细胞胚胎发生 (somatic embryogenesis) 是一种高效的无性繁育技术, 其通过体细胞诱导形成两极结构的体细胞胚 (体胚)^[8-9], 与合子胚发育类似, 经历了球形胚、心形胚、子叶胚等形态阶段^[10], 具有单细胞起源、遗传稳定性强、繁殖系数高等优势, 被认为是突破木本植物无性繁殖瓶颈、实现种质保存以及分子育种的关键手

段^[11-12]。体胚发生通常需要经过胚性愈伤组织诱导和体细胞胚分化2个阶段,根据是否经历胚性愈伤组织诱导阶段可分为直接发生和间接发生2条途径^[13],直接发生途径指外植体部分细胞尚未丧失胚性,无需经过胚性愈伤诱导,在一定条件下能够直接诱导得到体细胞胚;间接发生指外植体细胞胚性丧失,不能直接形成体胚,必须先通过诱导外植体形成愈伤组织,再使愈伤组织胚性化,获得发育成体胚的能力。当前木本植物主要以未成熟种子为外植体进行体胚发生,这一过程受到采集时间、外源激素、培养基组成等多重因素调控^[14-16]。在采集时间上,未成熟种子分化程度低,部分细胞仍具有胚性,在无菌环境下可直接诱导产生体细胞胚;随着种子成熟,胚性逐渐丧失,脱分化难度升高,难以诱导体胚发生^[17]。在激素调控上,外源生长素是体胚发生的重要诱导信号^[18],内源生长素水平是体胚发生的关键因素^[19-20],而2,4-D与6-BA的协同使用是诱导胚性愈伤的关键^[8,21],其通过调节内源生长素水平影响细胞脱分化。在培养基组分上,碳源不仅提供能量,还通过调节渗透压影响体胚发生率^[22];有机氮源(如水解酪蛋白)可通过优化C/N比提升胚性愈伤组织的可溶性蛋白含量,提高体胚发生率^[23]。此外,渗透胁迫的精准调控对维持细胞胚性化至关重要,在诱导初期,脱分化的愈伤组织因细胞壁较薄,吸水速率较快,易导致细胞质浓度下降,不利于细胞胚性化^[24-25]。在次生胚增殖阶段,球形期体胚表现出更强的再生增殖体胚能力,强于其他发育时期的体胚^[26];低浓度NAA与6-BA的配合使用可显著提升增殖效率并维持胚性^[26-28]。目前山苍子体胚发生相关研究较少,相关影响因素和调控机制尚不明确,仅毛卓佳等^[29]以7—8月的山苍子未成熟种子为材料,成功诱导出胚性愈伤组织及体胚。樟科植物中,香樟(*Cinnamomum camphora*)的体胚发生体系已较为完善,杜丽^[30]于2005年首次以香樟幼胚为材料成功诱导胚性愈伤组织并建立再生体系,后续研究证实蔗糖为最佳碳源^[31]。戴小英等^[32]提出仅心形胚期合子胚可诱导胚性愈伤,外加一定浓度水解酪蛋白可保持胚性愈伤组织增殖和体细胞胚诱导^[33]。近年来,荆茹月等^[34]通过多维度分析揭示了胚性愈伤特征,杨柳等^[35]优化了胚萌发条件,使该技术体系日趋完善。

【本研究切入点】目前,山苍子体胚发生研究仍处于起步阶段,现有研究仅涉及7—8月种子的体胚诱导^[29],尚未阐明采集时间与胚性潜力的关系,也未优化激素组合及有机添加物配比,诱导机制和影响因素仍不清晰,高效再生体系尚未建立。香樟与山苍子同为樟科树种且果实形态相似,其成熟的技术体系可为本研究提供重要借鉴。【拟解决的关键问题】研究以5—8月山苍子未成熟种胚为外植体,系统探究采集时间、植物生长调节剂及有机添加物等对体胚发生和次生胚增殖的影响,揭示其关键调控因素,从而建立高效、可重复的山苍子体胚发生体系,解决传统繁殖方式中遗传不稳定、性别不可控等技术瓶颈,为山苍子良种快繁、分子育种及种质资源保存奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2024年5月1日(约盛花期后30 d)至8月1日(约盛花期后120 d),在江西农业大学中药园(28°46'N, 115°49'E)选取3个优良雌株,于每月的1日和15日分别采集目标单株的种子作为试验材料,单次采集种子不少于600粒。采集的种子先于流水下冲洗1 h,去除表面杂质及浮于水面的种子,将剩余种子置于灭菌的量杯后转移至超净工作台内消毒,消毒及接种方法参照毛卓佳等^[27]的方法,最后取出幼胚均匀接种于无菌培养基上。

1.2 培养基及培养条件

试验以MS为基础培养基,在高温高压灭菌前将培养基pH值调节至5.8,并以121℃下灭菌20 min。除特别说明外,培养基均采用M1配方:MS+蔗糖30 g/L+琼脂7.0 g/L+酸水解酪蛋白(ACH)700 mg/L+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L IAA。每皿接种5粒山苍子种子,每个处理重复6次;所有培养物均置于(24±2)℃环境下,体胚发生阶段暗培养90 d,每30 d继代1次,次生胚增殖阶段暗培养30 d。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基活性炭浓度对体胚发生的影响

于2024年7月1日采集种子,经清洗消毒后取出幼胚接种于添加不同浓度的活性炭(AC)的培养基M1上,设计4个浓度梯度(50, 100, 150, 200 mg/L)进行单因素试验,观察并记录体胚发生情况。

1.3.2 采集时间对体胚发生的影响

于盛花期后 30~120 d,每 15 d 采集 1 次种子,共采集 7 次,对不同成熟的外植体进行单因素试验。采集的种子经清洗消毒后取出幼胚接种于 M1 培养基上,观察并记录体胚发生情况。

1.3.3 高渗蔗糖浸泡处理及有机营养对体胚发生的影响

采集 2024 年 7 月 15 日的种子,经流水冲洗后去除肉质果皮,将其放入 1 mol/L 高渗蔗糖溶液中,于 4 ℃ 冰箱中进行浸泡处理,处理后将幼胚接种于培养基 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L,设计高渗蔗糖溶液浸泡时间(0,12,24 h)、蔗糖(20,30,40 g/L)和酸水解酪蛋白浓度(350,700,1 050 mg/L)(表 1)三因素三水平正交试验,观察并记录体胚发生情况。

表 1 高渗蔗糖浸泡时间、蔗糖和酸水解酪蛋白浓度对体胚发生的影响 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

Tab.1 Effects of hypertonic sucrose immersion duration,sucrose concentration,and acid-hydrolyzed casein concentration on somatic embryogenesis:an $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design			
水平 Level	高渗蔗糖溶液浸泡时间/h Hypertonic sucrose solution immersion duration	蔗糖浓度/(g·L ⁻¹) Sucrose concentration	酸水解酪蛋白浓度/(mg·L ⁻¹) ACH concentration
1	0	20	350
2	12	30	700
3	24	40	1 050

1.3.4 培养基激素组合对体胚发生的影响

2024 年 6 月 15 日采集种子进行试验,将种子冲洗、消毒后接种于培养基 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L+酸水解酪蛋白浓度 700 mg/L 中,培养基添加不同浓度 6-BA(0.5,1.0,1.5,2.0 mg/L)、2,4-D(0.2,0.4,0.6,0.8 mg/L)与 IAA(0.25,0.5,0.75,1.0 mg/L)组合(表 2),设计三因素四水平的正交试验,共 16 处理组,分析不同组合外源激素对体胚发生的影响。

表 2 激素对山苍子体胚发生的影响 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计

Tab.2 Effects of phytohormones on somatic embryogenesis in <i>L. cubeba</i> :an $L_{16}(4^3)$ orthogonal experimental design			
水平 Level	6-苄氨基嘌呤/(mg·L ⁻¹) 6-BA	2,4-二氯苯氧乙酸/(mg·L ⁻¹) 2,4-D	吲哚乙酸/(mg·L ⁻¹) IAA
1	0.5	0.2	0.25
2	1.0	0.4	0.5
3	1.5	0.6	0.75
4	2.0	0.8	1.0

1.3.5 筛选最佳次生胚增殖培养基

选取诱导得到的大小一致、长势良好的小颗粒状山苍子体胚(球形胚),用小勺挑取约 0.3 g 均匀接种于增殖培养基 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L+酸水解酪蛋白 500 mg/L 中,培养基添加不同浓度的 6-BA(0.1,0.3,0.5 mg/L),NAA(0.2,0.5,0.8 mg/L),肌醇(200,400,600 mg/L)和环糊精(100,200,300 mg/L),设置四因素三水平试验(表 3),该试验共 9 个处理组,每个处理组接种 6 皿,每 2 皿为 1 组,重复 3 次。观察并记录愈伤组织增殖情况及体胚诱导情况,增殖培养结束后,使用精度 0.001 g 的分析天平称量每皿细胞团的质量,最后计算每皿的增殖倍数(Y)。同时在体视显微镜下对体胚分化过程进行持续观察,确定较适宜的增殖继代培养周期和体胚诱导周期。

表 3 激素和有机添加物对山苍子次生胚增殖的影响 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

Tab.3 Impact of phytohormone-organic additive combinations on secondary embryo proliferation in <i>L. cubeba</i> :an $L_9(3^4)$ orthogonal array experiment				
水平 Level	1-萘乙酸/(mg·L ⁻¹) NAA	肌醇/(mg·L ⁻¹) Inositol	6-苄氨基嘌呤/(mg·L ⁻¹) 6-BA	环糊精/(mg·L ⁻¹) Cyclodextrin
1	0.2	200	0.1	100
2	0.5	400	0.3	200
3	0.8	600	0.5	300

1.4 数据统计与分析

试验每处理重复3次,采用Excel 2019进行数据整理,采用SPSS 26.0软件进行极差分析、方差分析和Duncan多重比较。对于零值较多、不满足方差齐性的数据使用Kruskal-Wallis非参数检验进行分析。

定期使用体视显微镜Nikon-SMZ745T观察愈伤组织及体细胞胚的形态。

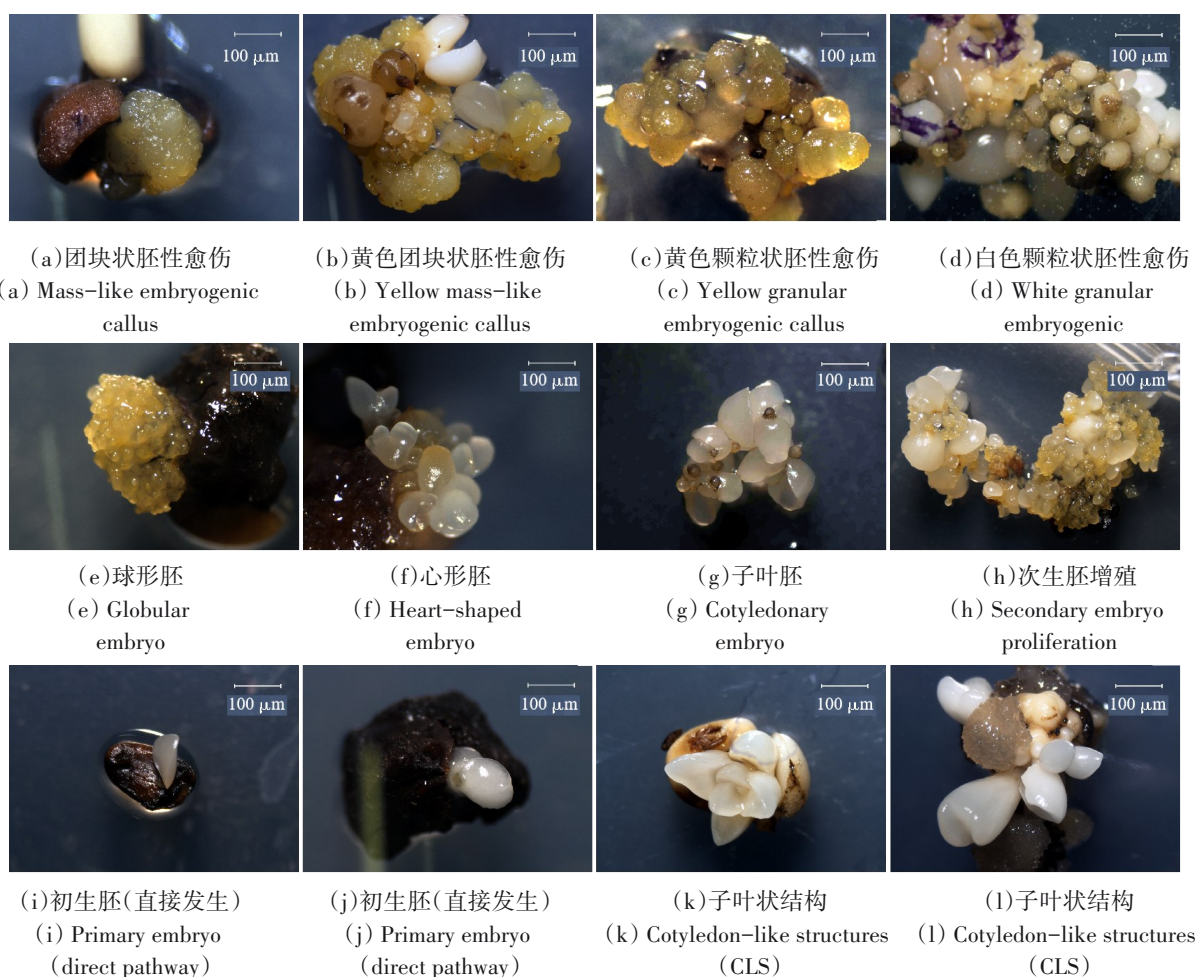
体胚发生率=(直接发生的外植体数+间接发生的外植体数)/总接种外植体数×100%

次生胚增殖倍数(Y)=(一个月后次生胚鲜重-接入时次生胚鲜重)/接入时鲜重

2 结果与分析

2.1 体胚发生过程形态特征

山苍子体胚发生存在直接发生和间接发生2条途径。间接途径中观察到4种胚性愈伤组织类型:I型为源于子叶间的黄色团块状愈伤,质地紧实;II型由非胚性愈伤转化形成;III型呈黄色大颗粒状;IV型为白色大颗粒状(图1a~d)。各类愈伤组织均可分化为球形胚,继而发育为心形胚(体积增大3~5倍)和子叶胚。直接途径产生的体胚直接发生于外植体褐化区域,具有1~2片规则子叶(图1i~j)。间接发生途径在显微镜下观察可分为3个发育时期:第1个阶段为球形胚时期,这个时期体细胞胚在显微镜下能够被观察到,与外植体间显著分离,无连接关系,体积小且数量极多,既可增殖也可分化(图1e);第2个阶段是心形胚时期,这个阶段体细胞胚的体积快速增加,观察较为容易(图1f);第3个阶段为子叶胚时期(图1g)。体胚自球形胚形成后不断产生次生胚,因此在次生胚增殖时不同发育阶段的体胚同时存在(图1h)。试验



a~g:间接发生途径;h:次生胚增殖;i,j:直接发生途径;k,l:子叶状结构。

a~g: Indirect pathway; h: Secondary embryo proliferation; i, j: Direct pathway; k, l: Cotyledon-like structures.

图1 山苍子体胚发生过程形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of somatic embryogenesis in *L. cubeba*

还发现一类异常的子叶状结构(CLS),其特征表现为:诱导后 14 d 即出现,发生频率高,体积远大于正常体胚,与外植体紧密,不易分离,继代培养后多数只能产生多子叶变异体(图 1k~l)。

2.2 不同活性炭浓度对体胚发生的影响

由表 4 可知,子叶状结构在 50 mg/L 活性炭处理(处理 1)下诱导率最高,达 40.00%,极显著高于其他处理($P<0.01$)。随着活性炭浓度增加,诱导率逐渐降低,但仍高于对照组,这表明在培养基 M1 中,低浓度活性炭可促进子叶状结构诱导,而高浓度活性炭可能存在抑制效应。由于体胚发生率数据不满足方差齐性检验($P<0.05$),不适合直接进行经典方差分析,故使用 Kruskal-Wallis 非参数检验。结果由表 5 可知,组间差异边际显著($\chi^2(4)=8.98, P=0.062$),处理 3 的体胚发生率中位数(10)显著高于 CK 和处理 4 (Dunn 检验, $P=0.043$),其他组间无统计学差异。

表 4 活性炭浓度对体胚发生的影响

Tab.4 Effect of activated carbon concentration on somatic embryogenesis

处理 Treatment	活性炭浓度/(mg·L ⁻¹) AC concentration	子叶状结构诱导率/% CLS induction rate	体胚发生率/% Somatic embryonic incidence
CK	—	3.33±3.33 ^b	0±0 ^a
1	50	40.00±5.77 ^a	6.67±3.33 ^{ab}
2	100	16.67±3.33 ^b	3.33±3.33 ^{ab}
3	150	16.67±3.33 ^b	10.00±0 ^b
4	200	10.00±5.77 ^b	0±0 ^a

诱导率均为均值±标准误差形式,不同处理间的不同小写字母表示存在显著差异($P<0.05$)。

Data are presented as mean ± SE. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

表 5 Kruskal-Wallis 检验结果汇总表(体胚发生率)

Tab.5 Kruskal-Wallis test results summary (Somatic embryonic incidence)

处理 Treatment	样本量 Sample size	中位数 Median	均值秩 Mean rank	Kruskal-Wallis 检验 K-W test	多重比较(Dunn 检验) Post-hoc (Dunn Test)
CK	3	0 ^a	2.5	$\chi^2(4)=8.98$	3 vs CK: $P=0.043^*$
1	3	10 ^{ab}	7.8	$P=0.062$	3 vs 4: $P=0.043^*$
2	3	0 ^{ab}	5.0	$\varepsilon^2=0.043$	其他比较: $P=0.132$
3	3	10 ^b	10.5		
4	3	0 ^a	2.5		

2.3 不同发育期种胚外植体对体胚发生的影响

5月1日至8月1日期间,不同采集时间采集的种子呈现明显形态差异,组织学观察显示:5月采集的种子处于原胚后期-球形胚时期(图 2a),胚未成形,胚体呈胶质状,内果皮木质化程度低,子叶未分化;6月1日进入心形胚时期,内果皮明显增厚,胚体半透明化并开始形成子叶;6月15日子叶发育完全,呈半透明或白色(图 2b),胚体发育完整且保持较高分化潜能;此后种子逐渐成熟,子叶由半透明转为淡黄色(图 2c~d),内果皮木质化程度进一步加深。体胚发生率数据满足方差齐性检验($P>0.05$),进一步对山苍子种子的体胚发生率进行方差分析,试验数据显示:处理组间无显著差异,在5月1日至8月1日的7个采集时间中,其体胚发生率大致呈现先升高后降低的趋势(表 6),其中子叶胚时期(处理 4)表现最佳,体胚发生率达 13.33%;而8月1日成熟种子诱导率最低,为 0%。从操作适应性和生理特性分析,最佳外植体选择需兼顾两方面因素:一是物理耐受性,5月采集的幼嫩种子因内果皮发育不完全(图 2a),切割时易造成大面积创伤面,释放的酚类物质导致严重褐化;二是发育可塑性,心形胚至子叶胚时期(6月上旬至中旬)的种子兼具适度的分化程度和较强的脱分化能力,其细胞仍保持较高的全能性表达潜能,而原胚期抗逆性差,成熟期种胚分化程度过高,均不利于体胚诱导。试验观察到,心形胚至子叶胚时期外植体在接种 30 d 后即可通过直接发生途径产生半透明状初生胚(图 1i~j),51 d 后形成典型的黄色团块状胚性愈伤(图 1a),证实其具有较强的体胚发生潜力。

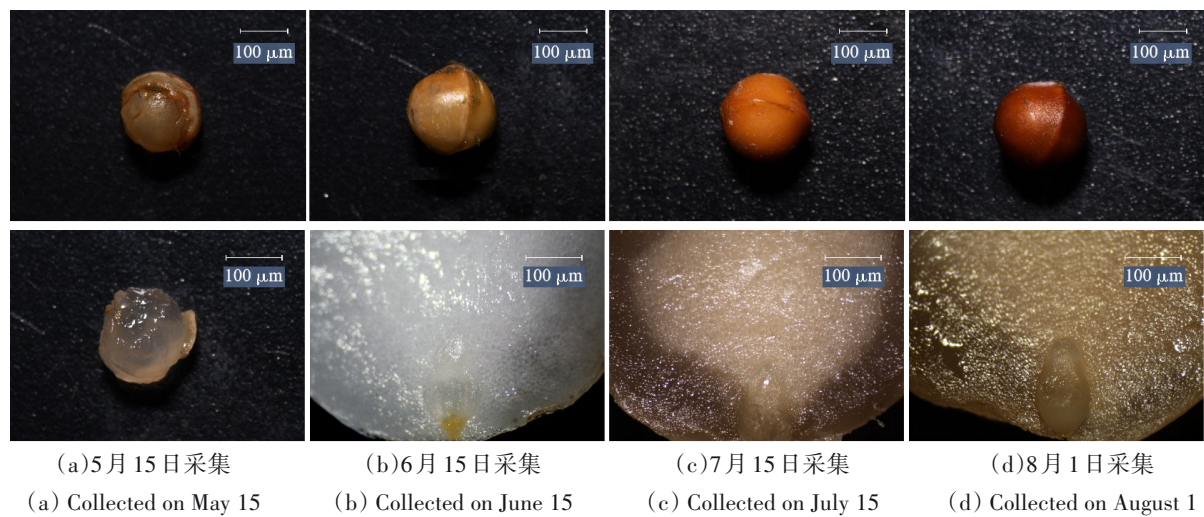


图2 不同采集时间山苍子种子果实、种胚形态图(5—8月)

Fig.2 Morphological changes in fruits and embryonic seeds of *L. cubeba* during maturation(May–August)

表 6 不同采集时间对山苍子胚性愈伤组织诱导的影响

Tab.6 The effect of different collecting time on callus and embryonic callus induction of *L. cubeba*

处理 Treatment	采集时间 Collecting time	愈伤诱导率/% Induction rate of callus	体胚发生率/% Somatic embryonic incidence
1	5月1日	13.33±6.67 ^d	10.00±5.77 ^a
2	5月15日	6.67±3.33 ^d	3.33±3.33 ^a
3	6月1日	16.67±3.33 ^{cd}	6.67±3.33 ^a
4	6月15日	46.67±17.64 ^a	13.33±3.33 ^a
5	7月1日	36.67±14.53 ^{ab}	3.33±3.33 ^a
6	7月15日	26.67±14.53 ^{bc}	3.33±3.33 ^a
7	8月1日	16.67±8.82 ^{cd}	0±0 ^a

诱导率均为均值±标准误形式,不同处理间的不同小写字母表示存在显著差异($P<0.05$)。
Data are presented as mean ± SE. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

2.4 高渗蔗糖浸泡处理及不同有机营养对体胚发生的影响

高渗蔗糖浸泡时间、培养基蔗糖浓度和酸水解酪蛋白浓度对体胚发生的影响结果见表7,处理3具有最高子叶状结构诱导率(16.67%)和体胚发生率(13.33%);极差分析显示,在不考虑交互作用的情况下,因子主次顺序依次为蔗糖、酸水解酪蛋白和高渗蔗糖浸泡处理。由于体胚发生率数据不满足方差齐性检验($P<0.05$),不适合直接进行经典方差分析,因此使用Kruskal–Wallis非参数检验。结果显示(表8),组间差异未达统计学显著水平($P=0.085$),但处理组3的中位数(10)和均值秩(23.8)最高,且效应量 $\epsilon^2=0.19$ 提示可能存在实际差异。

2.5 不同激素组合对体胚发生的影响

选取2024年6月15日采集的山苍子种子,进行三因素四水平 $L_{16}(4^3)$ 正交试验,接种3个月后,不同激素组合处理下子叶状结构诱导率及体胚发生率见表9。由表9可知,试验在CK(对照组)、处理1、处理2、处理3、处理5、处理8、处理12、处理14、处理15均观察到体胚发生,其中处理15体胚发生率最高,达23.3%。对 $L_{16}(4^3)$ 正交试验的体胚发生率结果进行极差分析,结果表明,在不考虑交互作用的情况下,因子主次顺序依次为IAA、6-BA和2,4-D,体胚发生最优组合为A4B3C2,即2.0 mg/L 6-BA+0.6 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L IAA。体胚发生率数据满足方差齐性检验($P>0.05$),进一步对山苍子种子的体胚发生率进行方差分析(表10),结果表明生长素IAA边缘显著, P 值为0.099,极差分析和方差分析显示生长素IAA是山苍子体胚发生影响最大的因素。

表 7 高渗蔗糖浸泡处理、蔗糖和酸水解酪蛋白浓度对体胚发生的影响

Tab.7 Impact of hypertonic sucrose soaking,sucrose,and acid-hydrolyzed casein levels on somatic embryogenesis

处理 Treatment	高渗蔗糖浸泡处理/h Hypertonic sucrose soaking treatment	蔗糖/(g·L ⁻¹) Sucrose	酸水解酪蛋白/ (mg·L ⁻¹) ACH	子叶状结构诱导率/% CLS induction rate	体胚发生率/% Somatic embryonic incidence
1	0	20	350	10.00±5.77	0±0
2	0	30	1 050	10.00±0	0±0
3	0	40	700	16.67±8.82	13.33±3.33
4	12	20	1 050	3.33±3.33	0±0
5	12	30	700	0±0	6.67±3.33
6	12	40	350	6.67±3.33	3.33±3.33
7	24	20	700	10.00±5.77	0±0
8	24	30	350	0±0	3.33±3.33
9	24	40	1 050	0±0	0±0
水平均值 K1' Average level K1'	4.44	1.11	2.22		
水平均值 K2' Average level K2'	2.22	0	5.55		
水平均值 K3' Average level K3'	2.22	7.78	1.11		
极差 R Range R	2.22	7.78	4.44		

表 8 Kruskal-Wallis 检验结果汇总(体胚发生率)

Tab.8 Kruskal-Wallis test results summary(Somatic embryonic incidence)

处理 Treatment	因子组合 Factors(A/B/C/D)	样本量/n	中位数 Median	均值秩 Mean rank	Kruskal-Wallis 检验 K-W Test	显著性 Significance
1	1/1/1/1	3	0	9.5	$\chi^2=13.86$	a
2	1/2/3/2	3	0	9.5	$P=0.085$	a
3	1/3/2/3	3	10	23.8	$\varepsilon^2=0.19$	b
4	2/1/3/3	3	0	9.5		a
5	2/2/2/1	3	0	9.5		a
6	2/3/1/2	3	0	16.3		ab
7	3/1/2/2	3	0	13.2		ab
8	3/2/1/3	3	0	9.5		a
9	3/3/3/1	3	0	13.2		ab

2.6 综合筛选次生胚增殖培养基

称取增殖培养试验前后质量并通过计算得到增殖倍数,由表 11 可知,在处理 1、处理 6、处理 8 均可实现次生胚的大量增殖,其中在处理 6 增殖倍数最高,达 20.17 倍(Y3),在不考虑交互作用的情况下,因子主次顺序依次为 6-BA、NAA 和肌醇环糊精。方差分析结果(表 12)显示,激素 6-BA 和 NAA 对次生胚增殖具有显著性($P<0.05$),其中 6-BA 对次生胚增殖的影响达极显著水平($P<0.01$)。采用 Duncan 法对 6-BA 和 NAA 处理下体胚发生率进行多重比较(表 13),结果表明,低水平(0.1 mg/L)的 6-BA 显著促进次生胚的增殖,而 NAA 在 0.5 mg/L 水平下对次生胚增殖效果最佳。次生胚增殖的适宜继代周期约为 30 d(图 3),30 d 内增殖的次生胚活性高,体胚颜色由淡黄色逐渐变成白色,这是体胚逐渐成熟的象征;培养时间超过 1 个月,部分体胚转变为黄褐色逐渐老化,且远离培养基的次生胚因营养供应不足而干枯死亡。

表 9 激素对山苍子体胚发生的影响

Tab.9 Effects of plant growth regulators on somatic embryogenesis in *L. cubeba*

处理 Treatment	6-苄氨基嘌呤/ (mg·L ⁻¹) 6-BA	2,4-二氯苯氧乙酸/ (mg·L ⁻¹) 2,4-D	吲哚乙酸/ (mg·L ⁻¹) IAA	子叶状结构诱导率/% CLS induction rate	体胚发生率/% Somatic embryonic incidence
1	0.5	0.2	0.25	33.33±11.55	10.00±0
2	0.5	0.4	0.5	23.33±20.82	6.67±5.77
3	0.5	0.6	0.75	30.00±17.32	6.67±11.55
4	0.5	0.8	1	30±30.00	0±0
5	1	0.2	0.5	20.00±10.00	13.33±5.77
6	1	0.4	0.25	26.67±11.55	0±0
7	1	0.6	1	0±0	0±0
8	1	0.8	0.75	20.00±17.32	6.67±11.55
9	1.5	0.2	0.75	23.33±20.82	0±0
10	1.5	0.4	1	0±0	0±0
11	1.5	0.6	0.25	16.67±11.55	0±0
12	1.5	0.8	0.5	6.67±11.55	3.33±5.77
13	2	0.2	1	33.33±15.28	0±0
14	2	0.4	0.75	26.67±5.77	3.33±5.77
15	2	0.6	0.5	20.00±17.32	23.33±5.77
16	2	0.8	0.25	26.67±11.55	0±0
水平均值 K1' Average level K1'	5.84	5.83	2.50		
水平均值 K2' Average level K2'	5.00	2.50	11.67		
水平均值 K3' Average level K3'	0.83	7.50	4.17		
水平均值 K4' Average level K4'	6.67	2.50	0		
极差 R Range R	5.84	5.00	11.67		

表 10 激素对山苍子体胚发生率的方差分析结果

Tab.10 Analysis of variance results of hormones on the somatic embryo incidence of *L. cubeba*

影响来源 Sources of influence	III类平方和 Sum of squares III	自由度 Degrees of freedom	均方 The mean square	F值 F value	P值 P value
6-BA	80.569	3	26.856	0.879	0.503
2,4-D	74.992	3	24.997	0.818	0.529
IAA	302.681	3	100.894	3.303	0.099
误差 Error	183.3	6	30.55		
总计 Total	977.622	16			

表 11 激素和有机添加物对次生胚增殖的影响

Tab.11 Effects of hormones and organic additives on secondary embryo proliferation

处理 Treatment	1-萘乙酸/ (mg·L ⁻¹) NAA	肌醇/ (mg·L ⁻¹) Inositol	6-苄氨基嘌呤/ (mg·L ⁻¹) 6-BA	环糊精/ (mg·L ⁻¹) Cyclodextrin	增殖倍数 Proliferation ratio		
					Y1	Y2	Y3
1	0.2	200	0.1	100	0.32	4.32	11.14
2	0.2	400	0.5	200	2.79	4.17	5.14
3	0.2	600	0.3	300	0.89	1.95	2.23
4	0.5	200	0.5	300	3.12	4.25	5.16
5	0.5	400	0.3	100	4.14	5.24	8.40
6	0.5	600	0.1	200	4.21	12.52	20.17
7	0.8	200	0.3	200	1.02	1.08	2.05
8	0.8	400	0.1	300	6.28	6.12	7.29
9	0.8	600	0.5	100	0.89	3.15	2.06
水平总值 K1 Total level K1	10.98	10.82	24.12	13.22			
水平总值 K2 Total level K2	22.41	12.52	9.00	17.71			
水平总值 K3 Total level K3	9.97	16.02	10.24	12.43			
水平均值 K1' Average level K1'	3.66	3.61	8.04	4.41			
水平均值 K2' Average level K2'	7.47	5.51	3.00	5.90			
水平均值 K3' Average level K3'	3.32	5.34	3.41	4.14			
极差 R Range R	4.15	1.90	5.04	1.76			

Y1、Y2 和 Y3 为 3 次重复试验的增殖倍数。

Y1、Y2 and Y3 represent the proliferation ratios from three replicates.

表 12 次生胚增殖试验的方差分析(主体间效应的检验)

Tab.12 Analysis of variance for secondary embryo proliferation experiment(test for intersubjective effects)

影响来源 Sources of influence	III 类平方和 Sum of squares III	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
NAA	95.254	2	47.627	4.142	0.033
肌醇 Inositol	19.951	2	9.975	0.868	0.437
6-BA	140.972	2	70.486	6.130	0.009
环糊精 Cyclodextrin	16.264	2	8.132	0.707	0.506
误差 Error	206.982	18	11.499		

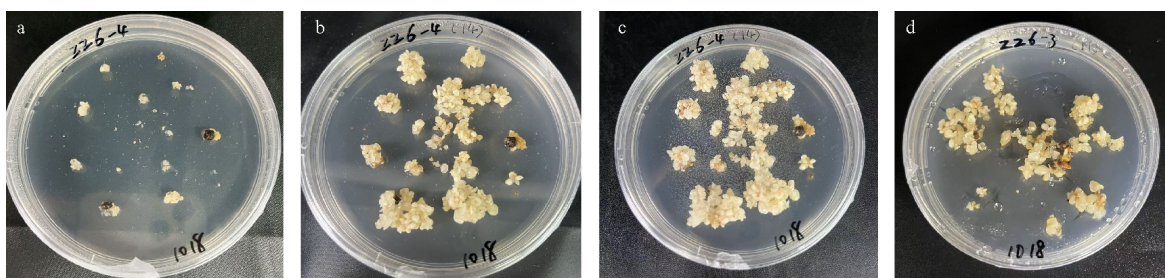
表 13 6-BA 和 NAA 处理下次生胚增殖倍数的 Duncan 多重比较

Tab.13 Duncan multiple comparison of secondary embryo proliferation multiples under 6-BA and NAA treatments

水平 Level	NAA		6-BA	
	质量浓度/(mg·L ⁻¹) Mass concentration	增殖率均值/% Average proliferation ratio	质量浓度/(mg·L ⁻¹) Mass concentration	增殖率均值/% Average proliferation ratio
1	0.2	3.66±3.23 ^{ab}	0.1	8.04±5.83 ^a
2	0.5	7.47±5.58 ^a	0.3	3.00±2.50 ^b
3	0.8	3.33±2.54 ^b	0.5	3.41±1.42 ^b

同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).



a: 培养0 d; b: 培养21 d; c: 培养30 d; d: 移除次生胚后继续培养21 d。

a: Initial culture (Day 0); b: Culture at Day 21; c: Culture at Day 30; d: Culture after 21 days post-secondary embryo removal.

图3 次生胚增殖培养

Fig.3 Secondary embryo proliferation culture

3 讨论与结论

3.1 讨论

本研究结果表明,在6-BA、2,4-D和IAA 3种激素处理下,生长素IAA对山苍子体胚发生的影响最大。部分研究指出生长素是体胚发生的关键信号转导因子^[36],可通过与外源激素互作激活生长素合成关键基因YUC4,促进内源IAA积累及种子脂质储备的形成^[37],从而促进体胚发生^[24]。本研究筛选出的最适合作为体胚发生的采集时间为6月中旬(盛花期后75 d),此时的种子发育阶段为心形胚-子叶胚时期,这与欧洲栓皮栎的研究^[25]一致。该阶段种子活性高、抗逆性强,具有较强的胚性诱导潜力,对于各类组织均有较好的诱导效果,其原因可能是此时期种子处于生长旺盛期,内源生长素水平达到峰值,有利于体胚发生。活性炭能够吸附外植体释放的酚类物质,减轻褐化现象,试验结果表明活性炭的吸附作用具有双向性:低浓度(150 mg/L)可清除褐化抑制物,而高浓度可能吸附激素(如IAA)和微量营养物质,导致诱导效率下降。相关研究亦表明,活性炭对IAA的吸附量与其用量呈正相关,且吸附能力远高于对2,4-D的吸附能力^[38],因此体胚发生时需严格控制其用量。本试验中,高渗蔗糖溶液浸泡处理和酸水解酪蛋白添加对体胚发生的影响不显著;随浸泡时间延长,子叶诱导率和体胚发生率逐渐降低,其原因可能是去除肉质果皮后,在高渗蔗糖溶液中体胚浸泡时间过长导致外植体脱水、活性降低甚至死亡。因此,在前期高渗蔗糖浸泡处理时,可降低其浓度或减少浸泡时间,避免外植体活力降低影响后续培养。值得注意的是,方差分析及Duncan多重比较结果显示,高浓度蔗糖极显著促进体胚发生($P<0.01$),在较高水平蔗糖(40 g/L)添加的处理3、6、9中均实现体胚发生,说明高渗培养基有利于促进细胞胚性化^[39]。类似研究也表明,通过添加蔗糖提高渗透压并撤除外源生长素,可促使胚性愈伤组织产生体细胞胚^[40];提高培养基渗透压能增加细胞内可溶性蛋白、糖及游离脯氨酸含量,增强细胞保水能力,从而促进胚性愈伤组织的形成^[41-42]。此外,本研究还观察到,在透气封口膜培养条件下,即使部分外植体褐化,其表面仍能形成初生胚或胚性愈伤组织,在这种培养基中,培养基的脱水硬化可能模拟自然种子成熟中的水分梯度变化,进而激活相关基因。在逐渐脱水的培养基中,非胚性细胞体积会减小,而其硬度增加,对于细胞的分化具有重要影响^[42],这与脱落酸、PEG和高渗培养基等胁迫因子可促进体胚形成的研究结果相吻合^[43-45]。本研究发现,山苍子胚性细胞表现出比非胚性细胞更强的抗逆性,基于这一特性,在体胚发生和分化阶段,可通过逆境培养(如贫营养、高渗透压、延长继代时间、模拟干旱条件)选择性抑制非胚性细胞生长^[46],从而提高胚性材料的诱导效率。

在体胚发生诱导阶段,还观察到子叶状结构的高频发生,这种结构多出现在诱导早期,颜色半透明或白色,且体积快速膨胀增加,虽可继代但基本无增殖能力,继代只增加子叶数量,部分子叶切下后在伤口处产生胚性愈伤或体胚,但多数随着继代周期不断增加仍不能诱导体胚最终褐化或衰老死亡,这类组织与体细胞胚相比,体积大、子叶数量多、与外植体连接紧密且基本无增殖能力,猜测其为幼胚未经脱分化进一步发育的结果,这也是本研究将其与体细胞胚区分的原因。子叶状结构的快速膨胀的能力被认为会抑制胚性愈伤的诱导,因此,控制未成熟种子在诱导初期的膨胀被视为提高胚性愈伤诱导率的关键因素^[47]。在早期香樟体胚发生研究中,此类子叶状结构曾被视为体胚纳入诱导率统计,如杜丽^[48]将其视

为停滞于子叶胚阶段的体胚,这类结构很少能观察到类似于合子胚的常规发育阶段(球形胚、心形胚、鱼雷胚等阶段)。然而,由于这类结构与体细胞胚存在本质差异,后续研究已将其视为畸形子叶,而非体细胞胚,不再纳入体胚诱导率统计^[47]。这些发现为优化山苍子体胚发生体系提供了新的研究方向,特别是为早期胚性材料的诱导筛选提供了重要的技术思路。

在山苍子次生胚增殖阶段,球形胚阶段的体胚表现出极强的增殖能力,这与贾小明等^[26]的研究结果一致;外源激素组合对增殖效率具有决定性影响,其中NAA和6-BA的不同浓度处理间存在显著差异,这一结果与刺槐等木本植物的研究结论一致^[28,47],证实低浓度NAA($P<0.05$)与6-BA($P<0.01$)的激素组合有利于次生胚增殖。在培养周期优化方面,研究确定30 d为最适继代周期,超过此周期时,距离培养基较远的次生胚会经历明显的衰老过程:颜色由淡黄色渐变为黄褐色(图3c),活性降低最终干枯死亡,及时移除成熟体胚可促进培养皿内残留胚性细胞的持续增殖(图3d)。山苍子体胚自球形胚形成之后至植株形成期间不断产生次生胚,因此,在次生胚增殖阶段球形胚、心形胚、子叶胚等体胚同时存在(图1h),其体胚同步发育仍需进一步研究。

3.2 结论

山苍子体胚发生阶段在 $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 温室、黑暗条件下培养90 d,试验结果表明:盛花期后75 d(子叶胚时期)是最佳采集时间,此时体胚发生潜力最高;较适宜的活性炭浓度为150 mg/L;最佳体胚发生培养基为MS+30 g/L蔗糖+7.0 g/L琼脂+700 mg/L水解酪蛋白+2 mg/L 6-BA+0.6 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L IAA,体胚发生率达23.3%。次生胚增殖阶段在 $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 温室、黑暗条件下培养30 d,试验结果显示:最佳次生胚增殖培养基为MS+30 g/L蔗糖+7.0 g/L琼脂+700 mg/L水解酪蛋白+600 mg/L肌醇+200 mg/L环糊精+0.5 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA,最高增殖倍数达20.17倍,6-BA($P<0.01$)和NAA($P<0.05$)是促进次生胚增殖的关键影响因子。本研究成功实现山苍子体细胞胚的高效规模化生产,为后续植株再生及规模化繁殖提供了可靠的技术支撑。

致谢:江西省林业局樟树研究专项(2020CXZX07-2020-01-03)、云南省教育厅科学研究基金项目(2025J1520)和江西省2024年研究生创新专项资金项目(YC2024-S331)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

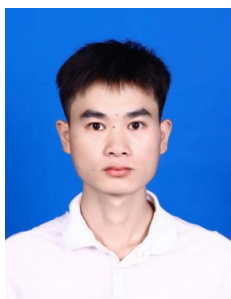
- [1] CHEN Y C, WANG Y D, HAN X J, et al. Biology and chemistry of *Litsea cubeba*, a promising industrial tree in China[J]. Journal of essential oil research, 2013, 25(2): 103-111.
- [2] SHI X D, WANG J W, ZHANG L, et al. Prediction of the potentially suitable areas of *Litsea cubeba* in China based on future climate change using the optimized MaxEnt model[J]. Ecological indicators, 2023, 148: 110093.
- [3] 蓝公毅, 陈景震, 马英姿, 等. 山苍子果实发育及内含物、精油的变化规律[J]. 经济林研究, 2020, 38(2): 201-208.
LAN G Y, CHEN J Z, MA Y Z, et al. Regulations of fruit development in *Litsea cubeba* and changes of its inclusions and essential oil[J]. Non-wood forest research, 2020, 38(2): 201-208.
- [4] 苏文娟, 陈霞, 曹瑞兰, 等. 山苍子 WRKY 基因家族鉴定及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(7): 1290-1302.
SU W J, CHEN X, CAO R L, et al. Identification and expression analysis of WRKY gene family in *Litsea cubeba*[J]. Journal of agricultural biotechnology, 2022, 30(7): 1290-1302.
- [5] QIU Y F, YU Y S, LAN P, et al. An overview on total valorization of *Litsea cubeba* as a new woody oil plant resource toward a zero-waste biorefinery[J]. Molecules, 2021, 26(13): 3948.
- [6] 陈霞, 王习政, 苏文娟, 等. 嫁接方法与套袋处理对山苍子生长、光合特性及叶绿素荧光特征的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2024, 52(3): 51-61.
CHEN X, WANG X Z, SU W J, et al. Effects of grafting methods and bagging on growth, photosynthetic and chlorophyll fluorescence characteristics of *Litsea cubeba*[J]. Journal of northwest A&F university(natural science edition), 2024, 52(3): 51-61.
- [7] 王习政, 陈霞, 苏文娟, 等. 山苍子嫁接愈合过程的组织解剖和生理特性[J]. 中南林业科技大学学报, 2024, 44(3): 56-64.
WANG X Z, CHEN X, SU W J, et al. Tissue anatomy and physiological characteristics of grafting healing process of *Litsea*

- cubeba*[J].Journal of central south university of forestry & technology, 2024,44(3):56-64.
- [8] KLUBICOVÁ K, UVÁČKOVÁ L, DANCHENKO M, et al. Insights into the early stage of *Pinus nigra* Arn. somatic embryogenesis using discovery proteomics[J]. Journal of proteomics, 2017, 169:99-111.
- [9] MARTÍNEZ M, CORREDOIRA E. Recent advances in plant somatic embryogenesis: where we stand and where to go?[J]. International journal of molecular sciences, 2024, 25(16):8912.
- [10] ZIMMERMAN J L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants[J]. The plant cell, 1993, 5(10):1411-1423.
- [11] PAIS M S. Somatic embryogenesis induction in woody species: the future after OMICs data assessment[J]. Frontiers in plant science, 2019, 10:240.
- [12] HORSTMAN A, BEMER M, BOUTILIER K. A transcriptional view on somatic embryogenesis[J]. Regeneration, 2017, 4(4):201-216.
- [13] ZHANG M, WANG A B, QIN M, et al. Direct and indirect somatic embryogenesis induction in *Camellia oleifera* Abel[J]. Frontiers in plant science, 2021, 12:644389.
- [14] HUANG M Q, GUO W Y, WU X Y, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Litchi chinensis* Sonn. cv. 'Zili' from immature zygotic embryos[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2023, 156:39.
- [15] KIMANI P N, WAMALWA L N, NGUGI K, et al. *In vitro* regeneration of immature zygotic embryos of *Melia volkensii* Gürke for accelerated breeding[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2024, 156:27.
- [16] ASGHAR S, GHORI N, HYAT F, et al. Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plant: a story from competence towards completion[J]. Plant growth regulation, 2023, 99:413-428.
- [17] ISAH T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants[J]. Acta physiologiae plantarum, 2016, 38:118.
- [18] 王浩, 冯健, 于世河, 等. 林木体细胞胚胎发生过程表观遗传学调控作用研究进展[J]. 世界林业研究, 2024, 37(6):20-25.
- WANG H, FENG J, YU S H, et al. Research progress in epigenetic regulation of somatic embryogenesis in forest trees[J]. World forestry research, 2024, 37(6):20-25.
- [19] MÉNDEZ-HERNÁNDEZ H A, LEDEZMA-RODRIGUEZ M, AVILEZ-MONTALVO R N, et al. Signaling overview of plant somatic embryogenesis[J]. Frontiers in plant science, 2019, 10:77.
- [20] CHEN Z L, DEBERNARDI J M, DUBCOVSKY J, et al. Recent advances in crop transformation technologies[J]. Nature plants, 2022, 8:1343-1351.
- [21] ELHITI M, STASOLLA C. Transduction of signals during somatic embryogenesis[J]. Plants, 2022, 11(2):178.
- [22] BARTOS P M C, GOMES H T, DO AMARAL L I V, et al. Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L.[J]. 3 Biotech, 2018, 8:209.
- [23] 吴高殷, 韦小丽, 王晓, 等. 碳氮源对花榈木胚性愈伤组织诱导、发育及有机物积累的影响[J]. 广西植物, 2022, 42(12):2109-2116.
- WU G Y, WEI X L, WANG X, et al. Effects of carbon and nitrogen sources on the induction, development and organic matter accumulation of embryogenic callus in *Ormosia henryi*[J]. Guihaia, 2022, 42(12):2109-2116.
- [24] 申序, 陈晓慧, 张婧, 等. 龙眼染色质重塑因子 Snf2 基因家族的进化动力学研究及在体胚发生早期的表达[J]. 园艺学报, 2022, 49(1):41-61.
- SHEN X, CHEN X H, ZHANG J, et al. Evolutionary dynamics investigation and the expression analysis of chromatin remodeling factor Snf2 gene family during early somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan*[J]. Acta horticulturae Sinica, 2022, 49(1):41-61.
- [25] ENDEMANN M, WILHELM E. Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur* L.[J]. Biologia plantarum, 1999, 42:499-504.
- [26] 贾小明, 张焕玲, 张存旭. 栓皮栎体胚再生与增殖能力的保持研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(10):81-86.
- JIA X M, ZHANG H L, ZHANG C X. Studies on regeneration and proliferation of somatic embryos in *Quercus variabilis*[J]. Journal of northwest A & F university (natural science edition), 2011, 39(10):81-86.
- [27] PINTO G, PARK Y S, SILVA S, et al. Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic em-

- bryos of *Eucalyptus globulus* Labill.[J].Plant cell,tissue and organ culture,2008,95:69-78.
- [28] 姜治国,马鑫,胡胜,等.三叶木通体细胞胚胎发生及植株再生研究[J].西南林业大学学报(自然科学),2022,42(3):34-41.
JIANG Z G,MA X,HU S,et al.Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Akebia trifoliata*[J].Journal of southwest forestry university(natural sciences),2022,42(3):34-41.
- [29] 毛卓佳,易敏,蒋润迪,等.诱导山苍子胚性愈伤组织的影响因素研究[J].西南林业大学学报(自然科学),2024,44(6):184-193.
MAO Z J,YI M,JIANG R D,et al.The factors influencing the embryogenic callus induction of *Litsea cubeba*[J].Journal of southwest forestry university(natural sciences),2024,44(6):184-193.
- [30] 杜丽.香樟体胚发生途径的植株再生体系的建立以及农杆菌介导遗传转化的初步研究[D].武汉:华中农业大学,2005.
DU L.Preliminary studies on plant regeneration via somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.)[D].Wuhan:Huazhong Agricultural University,2005.
- [31] 杜丽,叶要妹,包满珠.香樟未成熟合子胚体胚发生及植株再生研究[J].林业科学,2006,42(6):37-39.
DU L,YE Y M,BAO M Z.Study on somatic embryogenesis and plant regeneration of immature zygotic embryo of *Cinnamomum camphora*[J].Scientia silvae Sinicae,2006,42(6):37-39.
- [32] 戴小英,章挺,汪信东,等.樟树组织培养技术研究进展[J].江西农业大学学报,2017,39(5):900-906.
DAI X Y,ZHANG T,WANG X D,et al.The advance in the research on the tissue culture of *Cinnamomum camphora*[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2017,39(5):900-906.
- [33] 戴小英,刘新亮,章挺,等.樟树胚性愈伤组织诱导与体胚发生研究[J].江西农业大学学报,2019,41(6):1120-1129.
DAI X Y,LIU X L,ZHANG T,et al.Embryogenic callus induction and somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Cinnamomum camphora*[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2019,41(6):1120-1129.
- [34] 荆茹月,霍坤,李志辉.香樟胚性与非胚性愈伤组织间的差异研究[J].中南林业科技大学学报,2020,40(10):70-78.
JING R Y,HUO K,LI Z H.Difference between embryogenic and non-embryogenic callus of *Cinnamomum camphora* L.[J].Journal of central south university of forestry & technology,2020,40(10):70-78.
- [35] 杨柳,林立彬,李志辉.樟树胚萌发早期影响因素及植株再生[J].中南林业科技大学学报,2020,40(3):60-70.
YANG L,LIN L B,LI Z H.Study on the early influencing factors of embryo germination and plant regeneration of *Cinnamomum camphora*[J].Journal of central south university of forestry & technology,2020,40(3):60-70.
- [36] WÓJCIKOWSKA B,GAJ M D.Expression profiling of *AUXIN RESPONSE FACTOR* genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*[J].Plant cell reports,2017,36:843-858.
- [37] ZHANG W J,TANG L P,PENG J,et al.A WRH1-dependent module is essential for the accumulation of auxin and lipid in somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*[J].New phytologist,2024,242(3):1098-1112.
- [38] 王港,杨秀平,李周岐.活性炭对组织培养中几种植物激素的吸附作用[J].林业工程学报,2006,20(6):26-27.
WANG G,YANG X P,LI Z Q.Absorption effect of activated charcoal to hormones during plant tissue culture[J].Journal of forestry engineering,2006,20(6):26-27.
- [39] 杨玲,刘虹男,张冬严,等.生长调节剂和渗透调节物质对水曲柳体胚发生的影响[J].植物研究,2017,37(5):682-689.
YANG L,LIU H N,ZHANG D Y,et al.Effect of plant growth regulators and osmoticums on somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* Rupr.[J].Bulletin of botanical research,2017,37(5):682-689.
- [40] LONG X F,ZHANG J J,WANG D D,et al.Expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Liriodendron* hybrids[J].Forestry research,2023,3:15.
- [41] 宁娜娜,邓为,朱仲龙,等.红花玉兰胚性与非胚性愈伤组织的诱导及生理生化差异分析[J].分子植物育种,2018,16(10):3278-3285.
NING N N,DENG W,ZHU Z L,et al.Embryogenic or not callus induction and analysis of physiological and biochemical differences in *M. wufengensis*[J].Molecular plant breeding,2018,16(10):3278-3285.
- [42] GUO M,PEGORARO A F,MAO A,et al.Cell volume change through water efflux impacts cell stiffness and stem cell fate[J].Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America,2017,114(41):8618-8627.
- [43] YANG X,CHANG M X,YANG N,et al.ABA exerts a promotive effect on the early process of somatic embryogenesis in

- Quercus aliena* Bl.[J].Plant physiology and biochemistry,2024,214:108969.
- [44] 吴晓雪,张艾婧,盖颖,等.外源激素对日本落叶松体细胞胚发生不同阶段的影响[J].林业科学,2021,57(1):30-39.
WU X X,ZHANG A J,GAI Y,et al.Effects of exogenous hormones on different stages of somatic embryogenesis of *Larix kaempferi*[J].Scientia silvae Sinicae,2021,57(1):30-39.
- [45] DANSO K E,FORD-LLOYD B V.Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation[J].Plant cell reports,2004,22:623-631.
- [46] PRAKASH M G,GURUMURTHI K.Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis* [J].Plant cell, tissue and organ culture, 2010, 100 (1):13-20.
- [47] 施雪萍.樟树体细胞胚再生体系的优化和转化 *Barnase*、*PaFT* 基因的研究[D].武汉:华中农业大学,2009.
SHI X P.Enhancement of somatic embryogenesis and genetic transformation with *Barnase* and *PaFT* genes in *Cinnamomum camphora* L.[D].Wuhan:Huazhong Agricultural University,2009.
- [48] 杜丽.香樟子叶胚体胚发生诱导的研究[J].河南农业科学,2014(10):108-111.
DU L.Research on somatic embryogenesis induction from cotyledonary embryo of *Cinnamomum camphora* L.[J].Journal of Henan agricultural sciences,2014(10):108-111.
- [49] 冯玥,习洋,陈串,等.刺槐胚性细胞悬浮体系的建立[J].东北林业大学学报,2014,42(12):80-84.
FENG Y,XI Y,CHEN C,et al.Establishing embryogenic callus suspension culture system in black locust [J].Journal of northeast forestry university,2014,42(12):80-84.

(责任编辑:刘玉香)



第一作者简介:吴祖明,硕士生,2017—2021年就读于南昌工程学院风景园林专业,2023—2026年就读于江西农业大学林业专业,2024年和2025年分别获“学业奖学金”。研究方向为山苍子体细胞胚胎发生及其调控机制,主持江西省研究生创新专项项目(YC2024-S331)1项。



通信作者简介:汪加魏,讲师,博士。长期从事森林培育与经济林高效栽培研究,重点关注山苍子、油橄榄、油茶等木本油料树种的种质评价与高效培育、南酸枣果材兼用林高效培育及林下中药材栽培与推广示范等。主持科研项目7项,其中主持国家自然科学基金、中央财政林业科技推广项目等国家级项目3项。发表论文40余篇,其中中文核心期刊论文20篇、教改论文2篇。授权专利3项。参与公布国家行业标准1项。参编专著4部(其中国家规划教材1部,科研成果专著3部)。登记科技成果4项(基础理论2项,应用技术2项)。曾获校级以上奖励或荣誉10余次,其中获“江西省科学技术进步奖”一等奖1项、“江西省教学成果奖”1项。