

早实核桃体细胞胚发生和植株再生的影响因素研究

常英英¹, 张启香², 宋晓波¹, 查巍巍¹, 裴东^{1*}

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;
2. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 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)

摘要: [目的] 建立 2 种早实核桃高效和稳定的体胚发生体系, 为离体快繁技术及其基础研究提供技术和理论支撑, 也为核桃遗传转化体系的构建奠定基础。 [方法] 分别以实生核桃‘林早香’和嫁接核桃‘中林 6 号’花后 42~77 d 的幼胚为试材进行离体培养, 通过统计体胚诱导率, 筛选体胚的最佳诱导时期; 统计多次继代的体胚畸变率, 并筛选最适 ABA 调节浓度; 选取发育成熟的体胚进行饱和 NH_4NO_3 溶液脱水处理, 分别处理 0、24、48、72、96 和 120 h 后统计失水量和转株率, 探讨脱水程度对体胚植株再生的影响。 [结果] 外植体的发育时期对体胚发生至关重要, 以‘林早香’和‘中林 6 号’幼胚为外植体进行体胚诱导, 最佳诱导时期分别为花后约 49 d 和 56 d, 体胚诱导率分别为 88.32% 和 86.67%。体胚经多次继代培养后产生较高畸变率, 适量 ABA 处理不仅降低体胚畸变率, 且提高体胚发生率, 最佳 ABA 调节浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随着体胚脱水时间的延长, 体胚失水量逐渐增加, 植株再生率先升高后降低, 脱水 72 h 时, ‘林早香’和‘中林 6 号’的体胚萌发率达到最高, 分别为 56.67% 和 53.33%, 此时失水量分别为 38.73% 和 40.56%。 [结论] 早实核桃幼果发育过程中, 合子胚的体胚发生率随着发育时期变化, 适宜发育时期是提高体胚诱导发生的关键; 适量 ABA 在体胚多次继代培养过程中对畸形胚起重要调节作用; 适度的脱水处理对核桃体胚再生具有良好的促进作用。

关键词: 早实核桃; 体细胞胚; 植株再生

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)03-0034-06

核桃 (*Juglas regia* L.) 是核桃科核桃属植物, 在植物分类中属于落叶阔叶型高大乔木。体细胞胚 (下称: “体胚”) 具有数量多、繁殖快、结构完整、植株再生率高以及不受季节影响等特点, 是遗传转化的优良试材, 也是人工种子制备的基础^[1]。自 Tuleche 等首次报道核桃的体细胞胚发生以来, 相继在核桃属的其他种和杂交品种中成功应用^[2]。核桃体胚的诱导和发生阶段, 外植体与培养基 (包含植物生长调节剂) 起决定作用。研究表明, DKW 培养基是核桃体胚发生的首选培养基, 幼胚及其组成成分作为外植体时胚性感受态水平较高^[3]。不同果实发育时期的幼胚及其组成成分具有不同的胚性感受态水平, 果实发育早期, 体胚诱导效果不明显, 易产生

愈伤组织, 而果实发育成熟期, 子叶更易于产生不定根^[4-6]。前人对采样时间及幼胚形态已有相关报道^[7], 然而, 不同取材时间的形态特征与对应的外观表型的关系还需深入研究。此外, 随着胚性愈伤组织培养时间的延长和继代次数的增多, 体胚畸变率逐渐升高, 再生能力逐渐下降^[8]。在核桃的继代培养过程中, 通常出现连体胚、子叶畸形胚及玻璃化胚等几种类型的畸形胚, 在球形胚阶段人工分离子代体胚或筛选畸形子叶胚可在一定程度降低畸变率, 但效率较低^[1]。适量浓度的 ABA 处理不仅能抑制针叶树畸形胚的产生, 而且能提高植株再生率^[9]。探索 ABA 在抑制核桃体胚畸变中的作用, 将提高核桃体胚发生及再生效率。在核桃的体胚萌发阶段,

收稿日期: 2018-03-05 修回日期: 2019-03-21

基金项目: 国家自然科学基金“RNAi 介导的山核桃嫁接砧穗基因沉默信号的表达机理研究”(项目编号 31470682); 国家自然科学基金“核桃 CRISPR/Cas9-GA20ox 基因定点突变信号的砧穗应答机制”(项目编号 31670682) 和自然科学基金项目“核桃复幼提高不定根发生能力的多基因作用机制解析”(项目编号 31672126)

* 通讯作者: 裴东. E-mail: peigu@caf.ac.cn

存在萌发率较低的问题。低温或者不同干燥处理可提高萌发率。Tuleche 等对核桃 2℃ 低温暗培养 8~10 周后获得核桃的完整植株^[2]。Tang 等^[10]用 3~4℃ 处理了 2~3 个月的核桃体胚,仅 4%~19% 萌发为完整植株。张启香等^[11]用饱和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 对山核桃体胚进行脱水处理,可将预处理时间缩短至 3 d,最高萌发率达 39.03%。

早实核桃是我国核桃主栽类型之一。《中国果树志·核桃卷》记载,我国有 104 个早实核桃类群,尤其以新疆地区较多^[12]。早实核桃实生苗的幼龄期为 1~3 a,具有结实早、丰产性强等特点^[13]。然而,由于其开花年龄提前,树体较小,生命周期较短;同时,早实核桃种子形成过程中胚发育程度也存在差异,在生产中易出现播种出苗率低的现象;在试管继代培养中发现早实核桃容易瓶内开花,从而影响嫩茎的生长^[14]。因此,研究早实核桃的体胚发生和再生技术对核桃快繁体系的建立具有重要实践意义,同时也为核桃的基因功能研究奠定了基础。

本研究以‘林早香’(*J. Regia*)和‘中林 6 号’(*J. regia* ‘Zhonglin 6’) 花后 42~77 d 的幼果为试验材料,分别研究了果实发育时期对诱导体胚发生的影响,体胚继代培养过程中 ABA 对中畸形胚的调节作用以及适度脱水对体胚萌发的促进作用,以期建立高效、稳定的体胚发生和植株再生体系,为早实核桃的工厂化繁育提供实验平台,为早实核桃的遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘林早香’为 25 年生实生大树,种植第 2 年始果,开花雌性先熟。‘中林 6 号’为 25 年嫁接树,砧木为山西小龙眼实生苗,嫁接后第 2 年始花,开花雄性先熟。2 种核桃幼果均采自中国林业科学研究院图书馆前。采集时间为 2016 年 5 月 28 日至 6 月 25 日,即盛花期后 42~70 d,每 7 d 采集 1 次。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 将未成熟果实的外果皮用洗洁剂刷洗干净,在超净台内进行表面消毒和接种工作:将冲洗干净的核桃青果置于无菌的大烧杯内,75% 的酒精消毒 1 min,无菌水冲洗 3~5 次,之后浸没于 2% NaClO ,抽真空处理 20 min,无菌水漂洗 3~5 次,之后用无菌的修枝剪剖开,用无菌镊子将幼胚与胚乳分离,幼胚用于接种。

1.2.2 早实核桃体胚的诱导 分别将‘林早香’和‘中林 6 号’的幼胚接种于 $\text{DKW} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA} + 30 \text{ g}$ 蔗糖固体培养基中暗培养,温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,每个胚龄接种 3 个平板,每个平板 15 个幼胚。3 周后观察并统计不同发育时期幼胚的体胚诱导率。

1.2.3 早实核桃体胚的继代培养 统计继代培养 20 代和 40 代的体胚发生畸变率,以继代 40 代相同状态的成熟体胚为材料,在含有不同浓度 ABA ($0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 DKW 培养基处理 10 d,转置不含激素的 DKW 培养基上继代培养,观察子代体胚的形态并统计体胚发生率及畸变率。每个处理重复 3 次,每个处理接种 15 个幼胚,3 周后统计体胚的畸变率。

1.2.4 早实核桃体胚的脱水及萌发 将成熟体胚用饱和 NH_4NO_3 溶液环境 (23°C , 暗培养) 进行脱水处理,分别处理 0、24、48、72、96、120 h,转置于 $\text{DKW} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA} + 30 \text{ g}$ 蔗糖固体培养基上, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 光照和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光强的组培室中培养。每个处理 30 个待萌发的体胚,重复 3 次,6 周后统计失水率和萌发率。

1.2.5 数据处理 体胚诱导率 = (诱导出体胚的外植体数/接种的外植体数) $\times 100\%$, 体胚畸变率 = (畸形体胚个数/体胚总个数) $\times 100\%$, 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 早实核桃幼果发育时期对体胚发生的影响

核桃体胚发生与幼果的发育时期有密切关系,不同发育时期的幼果诱导产生体细胞胚的能力存在显著差异。随着‘林早香’和‘中林 6 号’幼果的生长,体胚诱导率呈先升高后降低的趋势,分别于花后约 49 d 和 56 d 达到最高,最大诱导率分别为 $88.32\% \pm 2.28\%$ 和 $86.67\% \pm 1.57\%$ (图 1)。

不同发育时期幼果的外观表型也不同。‘中林 6 号’幼果发育比‘林早香’晚 7 d 左右。图 2 所示,‘中林 6 号’5 个采样时期的幼果,花后 42 d,果实膨大,果皮密被黄绿色柔毛,果顶渐尖,柱头和雌蕊未脱落,种室内胚乳胶状,部分果实出现球形胚或鱼雷胚;花后 49 d,果皮密被柔毛变少,果顶变圆,柱头枯萎未脱落,幼胚为乳白色翅状;花后 56 d,果实迅速膨大,果皮变光滑,果壳变硬,子叶伸展,柱头逐渐脱落;花后 63 d,子叶迅速伸展,出现多个内褶;花后

72 d, 子叶充满种室, 柱头完全脱落。

2.2 ABA 对抑制畸形胚的调节作用

随着继代培养次数的增多, 子代体胚出现大量畸形胚, 从而影响体胚的萌发。‘中林6号’继代20代时, 体胚的畸变率约为8.67%, 继代培养40代时, 畸变率上升到约43.33%, 而‘林早香’畸变率略低(图3A)。适宜浓度的ABA可提高体胚诱导率并降低体胚畸变率。随着ABA浓度的增加, 体胚畸变率呈下降趋势, ABA浓度 $>1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ABA的调节效应不明显; 而体胚诱导率呈现先升高后降低的趋势, ABA浓度 $>1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体胚子叶干皱, 呈现老化状态, 体胚诱导率降低(图3B)。因此, 最佳ABA调节浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

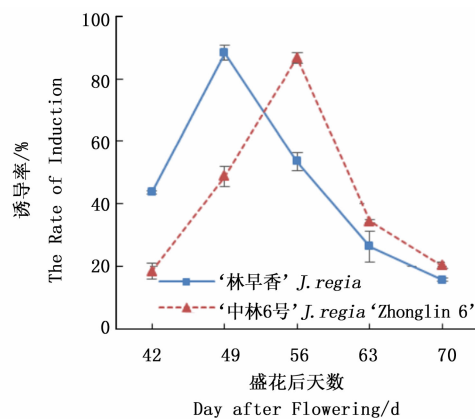
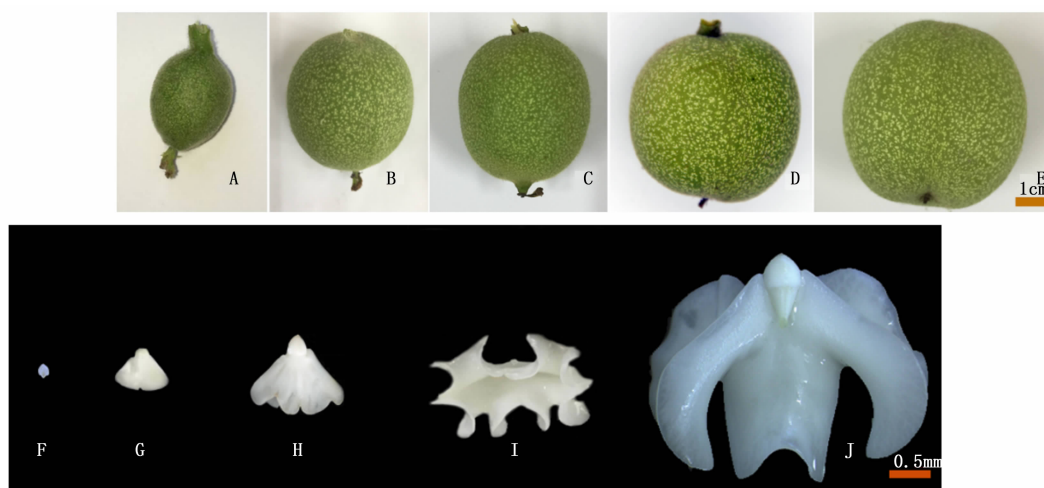


图1 幼胚发育时期对体胚发生的影响

Fig. 1 The effect of immature embryo development stages on the somatic embryogenesis



注: A~E 分别为5个采样时期‘中林6号’的幼果侧视图; F~J 分别为5个采样时期的‘中林6号’的幼胚侧视图。

Note: A-E is the side view of the young fruit for ‘Zhonglin 6’ collecting at five sampling points respectively. F-J is the side view of the zygotic embryo for ‘Zhonglin 6’ collecting at five sampling points respectively.

图2 ‘中林6号’不同发育时期的果实外部形态及幼胚发育

Fig. 2 The morphology of fruits and development of zygotic embryo collected from ‘Zhong Lin 6’ at different developmental stages

2.3 脱水处理对早实核桃体胚萌发的影响

随着成熟体胚脱水时间的延长, 体胚萌发率呈现先升高后降低的趋势(表1)。脱水处理0~24 h的体胚, 胚根伸长, 但难成苗; 脱水处理48 h‘中林6号’和‘林早香’的体胚萌发率显著提高, 分别为 $16.67\% \pm 0.80\%$ 和 $18.82\% \pm 0.22\%$; 脱水72 h后, ‘中林6号’和‘林早香’体胚萌发率最高, 分别为 $53.33\% \pm 0.13\%$ 和 $56.67\% \pm 0.39\%$; 若干燥时间继续延长, 体胚的萌发率下降, 部分体胚的子叶和生长点焦枯, 甚至坏死, 影响体胚的萌发。

表1 脱水对两种早实核桃体细胞胚植株再生的影响

Table 1 Effect of deciccation on germination of two precocious walnuts

处理 Treatment	脱水时间/h Desiccation length	萌发率/% Germination percentage	
		‘林早香’	‘中林6号’
1(对照 Control)	0	6.67 ± 0.06 F	3.36 ± 0.12 e
2	24	8.78 ± 0.12 D	3.34 ± 0.05 e
3	48	18.82 ± 0.22 C	16.67 ± 0.80 c
4	72	56.67 ± 0.39 A	53.33 ± 0.13 a
5	96	35.56 ± 0.14 B	35.56 ± 0.20 b
6	120	7.12 ± 0.13 E	6.67 ± 0.07 d

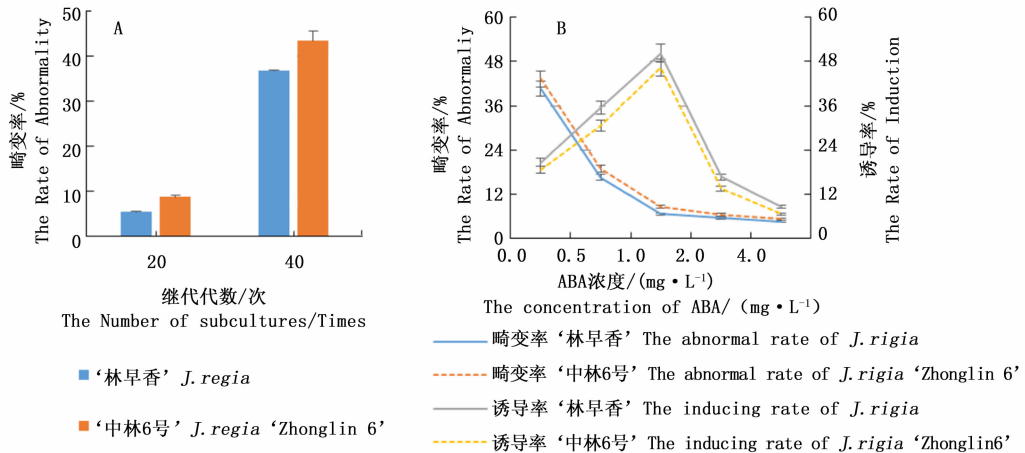


图3 继代次数及 ABA 浓度对畸形胚的影响

Fig. 3 Effects of subculture times and ABA concentration on abnormal somatic embryos

将脱水处理后的体胚置于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 的固体培养基进行光照培养, 4 ~ 5 d 之后胚根伸长, 茎端生长点变为绿色 (图 3A), 1 个月后可发育成完整植株 (图 3B)。

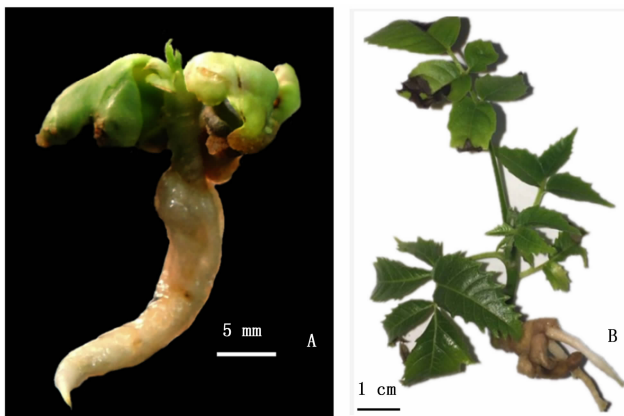


图4 脱水处理对核桃体胚萌发的影响

Fig. 4 The effect on the germination of the walnut somatic embryogenesis

3 讨论

3.1 影响早实核桃体胚发生的关键因素分析

3.1.1 果实不同发育时期对核桃体细胞胚发生的影响 植物外植体的组织、基因型及发育时期等都对体胚的诱导产生影响。在核桃中, 幼胚及子叶具有较高的胚性感受态水平。本研究采用早实核桃幼胚作外植体获得核桃体胚, 2 种早实核桃体胚诱导率不同, '林早香' 比 '中林 6 号' 略高, 表明早实核桃幼胚的发育时期对其胚性感受态水平的影响至关重要。资料表明, Payne、Early Ehrhardt、Franquette、

Scharsch-Franquette 和 Plant Introduction 18256 等核桃的 5 个栽培品种的体胚最佳诱导时间不同, 分别为花后 7 ~ 11 周^[2]。山核桃 8 ~ 10 周的合子胚最易形成愈伤组织, 间接发生体细胞胚; 而 11 ~ 12 周的合子胚可直接诱导发生体细胞胚^[15]。黑核桃在授粉后 6 ~ 7 周时子叶的体胚发生能力最高。这可能与核桃果实成熟的一个关键时期有关系, 在该时期子叶迅速生长, 果壳变为半木质化^[7]。本研究中, 随着 '林早香' 和 '中林 6 号' 分别于花后约 49 d 和 56 d 时幼胚的体胚诱导率最高, 此时果实的表型特征为果实状态为外果皮绒毛变少, 开始变光滑, 种壳近胚端变硬, 子叶迅速伸展, 胚乳液体状。本研究将为早实核桃体胚发生体系的建立提供理论指导。

3.1.2 ABA 对继代培养的调节作用研究 畸形胚在植物体胚发生过程中普遍存在, 主要表现为连体胚、子叶畸形胚、重新愈伤化的体胚、玻璃化体胚及生长点畸形胚^[16]。畸形胚不能发育成苗, 严重影响体胚在生产和育种中的应用。通过研究橡树体胚发生各个时期的内源激素变化, 结果表明, ABA 在橡树 E2 时期内源含量最高^[17]。在继代培养基中加入适量 ABA 能抑制核桃楸畸形胚的产生^[18]。这可能是由于外源 ABA 促进了细胞蛋白的积累, 抑制细胞扩增并促进体胚的发育^[19]。ABA 在激素水平提高了体胚的耐干旱性, 从而提高体胚的质量^[20]。本研究中, 2 种早实核桃子代培养 40 代后, 产生大量畸形体胚, 畸变率分别为 36.67% 和 43.33%, 添加低浓度 ABA ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 不仅降低了体胚畸变率, 且在一定程度上提高了早实核桃的体胚发生率。

3.2 早实核桃体胚植株再生过程的分析

核桃体胚的成熟、萌发及成株率较低是限制其应用的主要问题。正常体胚子叶乳白色且有生长点,成熟后,经过低温或脱水处理后可大大缩短萌发时间,提高萌发率,这可能是由于体胚进入与自然种子相似的休眠和静止状态^[21]。Jariteh 等对 Persian 核桃合子胚和体胚成熟过程中进行研究,发现成熟的合子胚及体胚中含有较高浓度的脯氨酸、蛋白及抗氧化酶活性^[22]。相较于低温(2~4℃)处理,脱水处理时间变短,常用的干燥剂有 CaCl₂·6H₂O、Ca(NO₃)₂·4H₂O、ZnSO₄ 及 NH₄NO₃ 饱和溶液。本研究用饱和 NH₄NO₃ 溶液对成熟体胚进行不同天数脱水处理,结果表明,3 d 脱水处理下体胚失水量约为 40%,此时体胚萌发率达到最高。该处理为早实核桃的植株再生及工厂化生产提供了良好的技术支持。

4 结论

在早实核桃‘中林6号’和‘林早香’的继代培养过程中,适度 ABA 处理可提高继代胚的质量。体胚萌发前,进行脱水处理可大大提高体胚萌发率。早实核桃体胚发生和植株再生体系的建立,完善了核桃属快速繁殖技术,也为其他物种的相关研究提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Gupta P K, Pullman G, Timmis R, *et al.* Forestry in the 21st Century[J]. Nature Biotechnology, 1993, 11(4): 454-459.
- [2] Tulecke W, McGranahan G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L.[J]. Plant Science, 1985, 40(1): 57-63.
- [3] 汤浩茹,任正隆. 核桃体细胞胚发生与转基因研究进展[J]. 林业科学, 2000, 36(3): 102-110.
- [4] Cornu D. Walnut somatic embryogenesis, physiological and histological aspects[J]. Forest Tree Physiology, 1989, 46: 133s-135s.
- [5] 裴东,袁丽钗,谷瑞升,等. 核桃子叶不定根发生调控的研究[J]. 林业科学, 2003, 39(6): 33-39.
- [6] 周贝贝,张俊佩,王伟,等. Fe³⁺ 浓度对核桃成熟子叶离体生根培养的影响[J]. 经济林研究, 2011, 29(1): 124-127.
- [7] Cornu D. Somatic Cell Genetics of Woody Plants; Somatic embryogenesis in tissue cultures of walnut (*Juglans nigra*, *J. major* and hybrids *J. nigra* × *J. regia*) [M]. Dordrecht: Springer, 1988: 45-49.
- [8] Hongjun F, Guanlin W. Somatic embryogenesis of *Juglans nigra* L. and establishment of gene transformation system of walnut[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(6): 406-411.
- [9] Hosoi Y, Maruyama T E. Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications; Somatic embryogenesis in sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.) [M]. New Delhi: Springer, 2016: 41-53.
- [10] Tang H, Ren Z, Krczal G. Improvement of English walnut somatic embryo germination and conversion by desiccation treatments and plantlet development by lower medium salts[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2000, 36(1): 47-50.
- [11] 张启香,胡恒康,王正加,等. 山核桃间接体细胞胚发生和植株再生[J]. 园艺学报, 2011, 38(6): 1063-1070.
- [12] 郗荣庭,张毅萍. 中国果树志·核桃卷[M]. 北京:中国林业出版社, 1996: 12-58.
- [13] 裴东,鲁新政. 中国核桃种质资源[M]. 北京:中国林业出版社, 2011.
- [14] 裴东,奚声珂. 核桃早实品种微枝接穗试管扩繁技术的研究[J]. 林业科学研究, 1998, 11(4): 350-354.
- [15] 胡恒康. 山核桃合子胚发育,体胚再生及其生物学特性研究[D]. 南昌:江西农业大学, 2011.
- [16] 孔冬梅,沈海龙. 植物组织培养中畸形胚的发生和控制[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 1018-1024.
- [17] Pérez M, Viejo M, LaCuesta M, *et al.* Epigenetic and hormonal profile during maturation of *Quercus suber* L. somatic embryos[J]. Journal of plant physiology, 2015, 173: 51-61.
- [18] 陈金慧,施季森,诸葛强,等. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生研究[J]. 林业科学, 2003, 39(4): 49-53.
- [19] Vahdati K, Bayat S, Ebrahimzadeh H, *et al.* Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia* L.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2008, 93(2): 163-171.
- [20] Zhou X, Zheng R, Liu G, *et al.* Desiccation Treatment and Endogenous IAA Levels Are Key Factors Influencing High Frequency Somatic Embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2054.
- [21] 吴立东,柯善强,桂耀林. 植物体细胞胚干化处理研究述评[J]. 植物学通报, 1993, 10(1): 22-26, 53.
- [22] Jariteh M, Ebrahimzadeh H, Niknam V, *et al.* Developmental changes of protein, proline and some antioxidant enzymes activities in somatic and zygotic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2015, 122(1): 101-115.

Analysis on Key Factors Affecting Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Precocious Walnuts

CHANG Ying-ying¹, ZHANG Qi-xiang², SONG Xiao-bo¹, ZHA Wei-wei¹, PEI Dong¹

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. College of Forestry and Biotechnology, The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

Abstract: [**Objective**] To establish an efficient and stable somatic embryogenesis system, to provide technical and theoretical support for *in vitro* rapid propagation and its further research, and to lay a foundation for the construction of gene transformation of walnut. [**Method**] Two early-bearing walnut young fruits were sampled during 42–77 days after blooming. Somatic embryogenesis percentages were counted to screen the optimum development stage of the fruit. After subcultured for several times, the somatic embryos distortion percentage was calculated and then the optimum ABA concentration was tested. The somatic embryos were desiccated respectively for 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h with saturated NH_4NO_3 , and the germination rate of somatic embryo can be obtained. [**Result**] The highest somatic embryogenesis percentage of ‘Zao Lin Xiang’ and ‘Zhong Lin 6’ reached 88.32% and 86.7%, respectively, when the young fruits were sampled at 49 d and 56 d after flowering, respectively. Moderate concentration of ABA supplement not only reduced the rate of somatic embryos aberration, resulted from multiple subcultivation, but also increased the rate of somatic embryogenesis, and the optimum ABA concentration was $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. As the dehydration time was prolonged, the water loss increased gradually, while the germination rate increased at first and decreased later on. After dehydrated for 72 h, the germination rate of ‘Zao Lin Xiang’ and ‘Zhong Lin 6’ were up to the highest (56.67% and 53.33%), while the water loss was 38.73% and 40.56%, respectively. [**Conclusion**] In the process of young fruit development of early-bearing walnut, the inducing rate of somatic embryogenesis is changed with the development period. The suitable development period is the key to improve somatic embryo induction. Proper amount of ABA also plays an important role in regulating deformed embryo in the process of somatic embryo multiple subculture. What is more, moderate dehydration treatment has a well promoting effect on the regeneration of somatic embryo of walnut.

Keywords: precocious walnut, somatic embryogenesis, plant regeneration

(责任编辑:张 研)