

## 研究评述

### Review and Progress

## 核桃基因克隆及转基因技术的研究进展

李好先<sup>✉</sup>, 曹尚银<sup>✉</sup>, 薛华柏<sup>✉</sup>, 郭俊英<sup>✉</sup>, 刘丽<sup>✉</sup>

中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州, 450009

✉ 通讯作者: s.y.cao@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 33 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0033

收稿日期: 2012 年 05 月 21 日

接受日期: 2012 年 06 月 04 日

发表日期: 2012 年 06 月 29 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

李好先等, 2012, 核桃基因克隆及转基因技术的研究进展, 分子植物育种(online) Vol.10 No.33 pp.1235-1245 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0033)

引用格式(英文):

Li et al., 2012, The Research Progresses on Genes Cloning and Transgenic Technology in Walnut, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.33 pp.1235-1245 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0033)

**摘要** 本文综述了核桃分子生物学方面的研究, 特别是一些特有的基因的克隆、功能验证和序列分析、核桃再生体系的建立、遗传转化方法以及核桃转基因技术等。已经克隆出一些重要基因如苯丙氨酸解氨酶基因、早实基因和成花基因等基因, 为下一步转基因提供基因。核桃转基因技术作为改良核桃的一个重要手段, 可以将一些有价值的基因(如抗病虫基因、生根基因)导入核桃中, 增强其抗逆性以及其它特性。本文还对核桃基因克隆和转基因技术存在的问题及发展趋势作了初步分析。

**关键词** 核桃; 基因克隆; 转基因技术

## The Research Progresses on Genes Cloning and Transgenic Technology in Walnut

Li Haoxian<sup>✉</sup>, Cao Shangyin<sup>✉</sup>, Xue Huabai<sup>✉</sup>, Guo Junying<sup>✉</sup>, Liu Li<sup>✉</sup>

Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou, 450009

✉ Corresponding author, s.y.cao@163.com; ✉ Authors

**Abstract** This article reviewed the research progresses molecular biology on walnut (*Juglans regia* L.), especially on the aspects of the unique gene cloning, functional verifying, sequence analyzing walnut regeneration system building, as well as genetic transformation methods and transgenic technology. Some key genes such as phenylalanine ammonia-lyase gene, precocious gene and *LEAFY* gene have been cloned, which could provide target gene in future for developing genetically modified crops. It is well known that transgenic technology is a powerful way by adding some valuable genes such as disease resistant genes, insecticidal genes, and rooting genes to enhance their resistance and other features. The problem on gene cloning and transgenic technology were discussed as well as the prospects of biotechnology in walnut were also discussed in this paper.

**Keywords** Walnut (*Juglans regia* L.); Gene cloning; Transgenic technology

### 研究背景

核桃(*Juglans regia* L.)属胡桃科(Juglandaceae)胡(核)桃属(*Juglans*), 国外称为英国核桃、欧洲核桃或波斯核桃, 是胡(核)桃属中栽培最为广泛的品种(吴国良等, 2009)。核桃是温带坚果树种, 具有极高的经济价值。核桃果实富含蛋白质、脂肪、矿物质元素和碳水化合物, 其木材由于高密度特性可用于制作家具、枪托、橱柜和胶合板, 其果皮可用于纺织染色(赵登超等, 2009; 董超萍等, 2011)。分子生物学技术特别是基因工程的发展促进了核桃中特异基因的开发, 现已克隆出一些有价值的基因, 如控

制核桃早实性的早实基因, 对其基因的控制表达进行研究有助于加深对植物童期的认识。离体繁殖技术是核桃优良品种培育所广泛使用的一门技术, 可节省大量人力和物力, 在过去的几十年里开展了以不同材料(顶芽, 茎段, 叶片, 叶柄, 子叶, 胚等)为外植体的微繁, 并总结出一套行之有效的试验方案(Payghamzadeh and Kazemitabar, 2011)。转基因技术为培育核桃优良特性品种提供一种较为有效的手段, 目前已经得到育种专家的极大关注。这些研究工作促进了核桃优良品种培育发展, 为核桃标准化栽培提供基础条件。

## 1 核桃基因的克隆研究

### 1.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因

苯丙氨酸解氨酶(PAL, E.C4.3.1.5)是催化苯丙烷代谢途径第一步反应的酶,也是这个途径的关键酶和限速酶。苯丙烷类途径生成的黄酮、类黄酮、木质素和生物碱等次生代谢在植物的生长发育过程中起着重要的作用,所以 PAL 对植物的生理意义非常重大。王燕等(2008)根据 PAL 基因设计兼并引物,克隆得到核桃苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因 cDNA 片段,并命名为 *JrPAL*, Genbank 登录号为 AY747676。 *JrPAL* 长 866 bp, 编码 289 个氨基酸。通过核苷酸和蛋白质序列多重比较,发现 *JrPAL* 与其他植物的 PAL 基因高度同源。Claudot 等(1993)研究表明, PAL 活性与杂种核桃(*Juglans nigra* L. × *Juglans regia* L.)插条的生长率之间存在一定的比例关系。通过克隆 *JrPAL*, 研究人员获得了调控核桃黄酮化合物的代谢基因资源,在此基础上借助转基因技术研究其表达调控机理,从而揭示其在核桃插条生长过程中所起的作用。

### 1.2 水通道蛋白(CcPIP)基因

植物 *CcPIP* 是调节水分在细胞间以及植物整个体内水平衡的分子基础,这类蛋白在植物的各种组织大量存在,通过与其他物质成分的集合形成特异的水分运输通道,有助于水分的长距离运输和细胞内外的跨膜水分运输。艾雪等(2009)以山核桃(*Carya cathayensis* Sarg.)为材料,利用 cDNA 末端快速扩增技术(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)技术克隆出山核桃水通道蛋白(*CcPIP*)的基因全长,并应用 BLAST 软件进行序列同源行分析,结果显示核桃 *CcPIP* 基因与多种水通道蛋白植物的氨基酸序列具有较高的同源性,其中与葡萄和菜豆的同源性最高为 99%。这项研究结果从分子水平为研究山核桃嫁接成活过程中水分的运输提供理论支持,对于揭示 *CcPIP* 基因在山核桃接穗和砧木连接成活过程中的相关功能和水分运输途径提供物质基础。

### 1.3 成花基因

He 等(2011)利用 RT-PCR 和 RACE 技术从核桃早实品种“中林 5 号”花芽中克隆出 *LEY* 基因的同源基因 *JrLFY* (Genbank 登录号: GU194836), cDNA 序列大小为 1 496 bp, 其中开放阅读框(ORF)为 1 158 bp。与其相应的基因组序列(Genbank 登录号: HQ019159)显示, *JrLFY* 包含 3 个外显子和 2 个内

含子,推测编码 385 个氨基酸,并含有与其他 *LEY* 同系物相应序列的 C 末端保守区域。*LEY* 系统进化树表明,核桃的 *LEY* 蛋白与山核桃、栗树相应蛋白相似。这项研究为了解核桃早实性机制提供了基础条件,为下一步将 *JrLFY* 基因导入晚实核桃做准备。黄有军等(2009)利用互补脱氧核苷酸扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)技术从山核桃中克隆成花相关的特异基因片段(TDFs),经测序和序列同源性分析,其中 65 个 TDFs 为未知基因序列,213 个 TDFs 具有同源序列,其功能涉及激素合成、酶合成、细胞信号转导、叶绿素合成和光诱导等。李敏(2009)以早实核桃花芽为材料,利用同源序列法克隆出 *jrAPI* (*jrAPATALLA1*)基因全序列和 *jrSEPI* (*jrSEPALLATA1*)、*jrNEFI* (*jrNO EXINE FORMATION 1*)基因的部分片段,序列分析表明 *jrAPI* 与白桦、桉树的 MADS-box 基因具有较高的同源性(分别为 76%, 62%),归入 MADS-box 基因家族 AP1 亚家族;*jrSEPI* 基因与板栗、大豆、桃树的 MADS-box 基因具有较高的同源性(分别为 92%, 92%, 88%),归入 MADS-box 基因家族 SEPI 亚家族;*jrNEFI* 与调控葡萄、杨树、拟南芥花粉壁形成的基因具有较高的同源性(分别为 88%, 83%, 89%),是调控花粉壁形成的一类基因。Breton 等(2004)利用体胚再生获得早实核桃苗,并从中克隆出调控花芽分化的基因 *AGAMOUS* (*AG*)和 *APETALA3* (*AP3*)的同源基因,被命名为 *jrAG* 和 *jrAP3*, 分别属于 MADS-box 基因家族的 AG 亚家族和 AP1 亚家族。*APETALA3* (*AP3*)和 *AGAMOUS* (*AG*)都是决定花器官形成的基因。

### 1.4 早实基因

在普通核桃中存在着一类播种 1~2 年后就能开花结实的早实类群。早实核桃的童期(幼年阶段)大大缩短,这一特性在核桃的栽培和育种实践中具有重要的意义。研究者利用分子生物学技术寻找与核桃早实性状相关的基因研究。奚声珂(1987)通过对我国核桃属的优良品种早实核桃的杂交试验研究,初步认定核桃的早实性状是由两对以上的等位基因决定的显性性状。杨克强等(2002)利用 RAPD 分子标记技术获得与核桃早实基因连锁的特异标记 OPB-08<sub>900</sub>, 完成了对早实基因的定位,为下一步早实基因的克隆奠定了基础。王国安等(2004)以早实核桃和晚实核桃类群为试材,参照分群法(Bulked Segregant Analysis, BSA),运用 RAPD 技术初步确

定 OPG15<sub>710</sub> 是与核桃早实基因相关的 RAPD 标记。张虎平等(2007)利用构建的早实核桃和晚实核桃近等位基因池 DNA, 获得与核桃早实性相关的显性的 RAPD 标记 OPG15<sub>759</sub>, 并将其转化为稳定的 SCAR 标记。牛建新等(2008)利用引物 OPG15 (5'-ACTGGGACTC-3')扩增得到一条约 710 bp 的早实核桃特异片段。朱天丁等(2011)采用 RACE 技术克隆了 SCAR 标记的核桃早实性相关基因片段的末端序列, 为验证其功能和早实核桃分子育种奠定基础。

### 1.5 其他基因

核桃的壳厚薄影响出仁率和取食的难易, 是核桃品质好坏的重要指标。张丽(2008)利用 RAPD 技术, 并参照 BSA 法, 寻找到与核桃壳厚薄基因相关的分子标记 SBS-T16<sub>1224</sub>, 并将其转化为 SCAR 标记。Goué 等(2003)利用同源序列法从黑核桃 (*Juglans nigra* L.) 和普通核桃 (*Juglans regia* L.) 的杂种核桃中克隆出周期蛋白依赖激酶 A (CDKA) 基因。研究发现 CDKA 基因在核桃的纵向生长过程中表达, 通过对 CDKA 基因的内含子的大小和位置以及 Southern 杂交显示, 在杂种核桃的基因组中存在 CDKA 基因的多个拷贝(大于 2)。CDKA 在协调叶片细胞分裂和分化, 促进叶片发育过程中起着关键的作用。Teuber 等(1999)从核桃中克隆出种子储存前体蛋白 *Jug r 2* 的 cDNA 序列, 核桃蛋白 *Jug r 2* 与豌豆球蛋白类似, 是一种主要的食物过敏蛋白。

## 2 核桃基因的导入研究

### 2.1 筛选标记基因

标记基因被用于从大量的非转化细胞中筛选出正确的转化子, 可以为获得真正的转化体提供可靠的依据, 在核桃遗传转化的过程中发挥着至关重要的作用, 有效的筛选可以提高转化效率。McGranahan 等(1988)利用农杆菌转化法首次将外源基因 *Kan* (抗卡那霉素基因) 基因成功导入核桃体细胞胚中, 但转化效率很低, 且技术手段复杂。Dandekar 等(1989)利用改进后的方法将 *GUS* ( $\beta$ -葡萄糖醛酸酶) 基因和 *APH* (3') (氨基糖苷磷酸转移酶) 基因转入核桃体胚中, 提高了转化效率。通过试验测定发现, *Kan* 不会杀死体胚组织, 但抑制了未转化次生胚的形成。El Euch 等(1998)将 *npt II* (新霉素磷酸转移酶 II) 基因和 *GUS* 基因导入杂种核桃 (*Juglans nigra* L.  $\times$  *Juglans regia* L.) 体细胞胚中。Escobar 等(2000)将 *GFP* (绿色荧光蛋白) 基因成功

导入核桃体胚中, 试验测定认为, 使用 *GFP* 作为筛选基因可以明显减少遗传转化过程中的工作量和工作时间, 降低成本。

### 2.2 有价值基因

Dandekar 等(1994)将编码杀虫晶体蛋白或  $\delta$ -内毒素(即 Bt 蛋白)基因之一的 *cry I A(c)* (原毒素) 导入核桃体细胞胚中, 但转基因植株抗虫能力较差, 这是因为该基因的遗传密码发生较大偏移, 其来源于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的野生变种 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) *cry I A(c)* 基因序列。然而, Dandekar 等(1998)将人工合成的完整 *cry I A(c)* 基因再次转入核桃体胚中, 再生植株表现出较高的抗虫性, 同时也证实了在核桃受到昆虫伤害时, 这种途径对于昆虫防御反应的有效性。

汤浩茹等(2001)哈兹木霉几丁质酶 *ThEn-42* 基因导入核桃体细胞中, 检测转化的体细胞系的几丁质酶的活性提高了几十到几千倍, 哈兹木霉几丁质酶 *ThEn-42* 基因在核桃中得到表达。几丁质酶是一种诱导酶, 是植物受到病原菌侵染后产生的防御物质之一, 可以催化几丁质(真菌细胞壁的主要成分)水解, 以及分别肽聚糖(细菌细胞壁和节肢动物外骨骼的主要成分)。Escobar 等(2002)将色氨酸单加氧酶 (*iaaM*) 基因和异戊烯转移酶 (*ipt*) 基因转移到核桃中, 通过诱导沉默了植株体内这两个基因的表达, 从功能上提高了植株对冠瘿病的抗性。

核桃新梢难以生根, 主要是大量的类黄酮酚类化合物存在于核桃插条内, 这类物质大量在新梢的周围组织的积累直接阻碍根的诱导。查尔酮合成酶 (*CHS*) 基因控制类黄酮酚类物质的合成, *CHS* 是植物花色苷等类黄酮化合物生物合成途径中的一个关键酶, 它催化丙二酰辅酶 A (malony CoA) 的三个乙酰基与对羟基苯丙烯辅酶 A (coumaroyl CoA) 的一个乙酰基的缩合, 生成基本结构为一个三碳环连接两个芳香烃的四羟基查尔酮 (naringenin chalcone), 再经过异构化能导致花色苷、黄酮、异黄酮等类黄酮物质的合成。El Euch 等(1998)和 Jay-Allemand 等(1991)将 *CHS* 反义基因导入到杂种核桃 (*Juglans nigra* L.  $\times$  *Juglans regia* L.) 体细胞胚中, 经检测再生植株中 *CHS* 活性极低, 同时柞苷、杨梅苷、儿茶素、花色苷等黄酮类物质未检测到, 外源生长素加强了转基因植株在诱导生根阶段的敏感性, 提高了生根能力。Vahdati 等(2002)将 *rolABC* 基因转入奇异核桃 ("Paradox") (*Juglans*

*hindsii* L. × *Juglans regia* L.)的体细胞胚中, 对比转化系与未转化系的各项表型特征(包括生根潜力), 以普通核桃为砧木嫁接获得转化系和未转化系, 剪取插条经 K-IBA 处理, 观察发现二者生长高度相同, 但冠层明显不同, 转化系上层生长浓密且叶片稍微卷曲, 枝条节间长度变短, 节点和侧枝数目增加, 春季枝条伸长和秋季进入落叶期推迟; 另一组试验中, 以“Chandler”为接穗嫁接到转化系和未转化系的砧木上, 二者对接穗均无明显影响, 但二者根的形态特征明显不同, 存在转化系砧木直径超过 15 cm 的须根数量相对较少, 进一步测定发现, 转化系根数量明显多于未转化系, 但干重低于未转化系, 这说明转化系作为砧木促进生根, 但对接穗的表型无明显影响。

### 3 核桃遗传再生体系的建立

植株再生体系的建立是进行基因遗传转化的前提和基础。目前植物界常用的转基因再生的组培系统为: (1)原生质体再生, 用于直接 DNA 转化和农杆菌介导转化; (2)叶、茎外植体再生, 只适合于农杆菌介导转化。但是, 迄今为止, 还没有原生质体再生培养的成功报道, 而叶圆片再生已经有成功案例(表 1)。刘淑兰和韩碧文以叶片、茎尖和叶柄为外植体(刘淑兰和韩碧文, 1984, 植物生理学通讯, 4: 38), 诱导愈伤组织的形成, 诱导培养基为 WPM+10 mg/L BA+4 mg/L NAA+2 mg/L, 但没有获得完整植株。

Roschke 和 Pijut 首次以黑核桃叶片为外植体(Roschke C., and Pijut P.M., 2006, <http://www.agriculture.purdue.edu/fnr/htirc/pdf/posters/Christian.pdf>), 利用筛选出最佳诱导培养基 1/2DKW+1/2WPM+0.2 mg/L IBA+1.5 mg/L TDZ, 暗培养 3 周后转接, 分化培养基 1/2DKW+1/2WPM+2.0 mg/L BA+0.001 mg/L IBA+0.000 5 mg/L BS, 光照下培养 5 周后, 成功实现植株再生。邢瑞丹等(2010)以“香玲”核桃叶片外植体, 筛选离体叶片的最适分化和生根培养基, 分别为 MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L TDZ, 1/2DKW +5.0 mg/L IBA, 同时优化离体再生条件。

核桃的体胚由于具有完整的两极结构, 次生胚能反复再生形成胚无性系, 这种体胚发生是核桃转基因研究良好的离体培养再生系统(表 2)。Tulecke 和 McGranahan (1985)首次以函兹核桃(*Juglans hindsii*)的未成熟子叶为外植体进行次生胚的增殖, 实现了体胚的再生。Yates (1990)通过研究不同的激素水平下不同核桃品种的体胚再生, 发现不同的品种间胚性细胞的感知能力存在差异性。Rodriguez 和 Wetzstein (1994)的研究表明, 不同类型和浓度的生长素对体胚的形态及转化为植株的比例存在差异, 在促进愈伤组织的增殖方面萘乙酸不如 2,4-D, 但其有利于类似合子胚结构的形成和球状胚向植株的转化, 而 2,4-D 在体胚的增殖方面效果较好。

表 1 核桃叶片愈伤报道一览表

Table 1 The list of published reports that achieved callogenesis from the walnut leaves (*Juglans spp.*)

种名 Species/ cultivar	外植体 Explant	诱导培养基* Inductive medium	分化培养基 Differential medium	参考文献 References
核桃 <i>J.regia</i>	叶片 Leaves	WPM+44.4BA+21.4NAA+5.8GA3	/	刘淑兰和韩碧文, 1984, 植物生理学通讯, 4: 38
黑核桃 <i>J.nigra</i>	叶片 Leaves	DW+1.0IBA+6.8TDZ	DW+8.8BA+0.005IBA+0.001BS; DW+0.001BS; DW+0.005BS; DW+0.005IBA+1.5TDZ+0.005BS; DW+0.005IBA+1.5TDZ+0.001BS	Roschke C., and Pijut P.M., 2006, <a href="http://www.agriculture.purdue.edu/fnr/htirc/pdf/posters/Christian.pdf">http://www.agriculture.purdue.edu/fnr/htirc/pdf/posters/Christian.pdf</a>
核桃 <i>J.regia</i>	叶片 Leaves	DKW+8.8BA+21.4NAA; MS+8.8BA+21.4NAA; WPM+8.8BA+21.4NAA; BTM+8.8BA+21.4NAA	/	Avilés et al., 2009
核桃 <i>J.regia</i>	叶片 Leaves	MS+2.2BA+2.7NAA+4.5TDZ	MS+2.2BA+2.7NAA+4.5TDZ	邢瑞丹等, 2010

注: \*: 植物激素浓度单位 μmol/L

Note: \*: The unit of plant hormone concentration μmol/L

表 2 核桃体胚发生报道一览表

Table 2 The list of the published reports that achieved somatic embryogenesis in walnut (*Jugans spp.*)

种名 Species/Cultivar	外植体 Explant	诱导培养基* Inductive medium	继代培养基 Subculture medium	参考文献 Reference
核桃 <i>J.regia</i>	未成熟子叶 IC	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Tulecke et al., 1985
函兹核桃 <i>J.hindiss</i>				
黑核桃 <i>J.nigra</i>	胚轴 EA	WPM	WPM	Heile-Sudholt et al., 1986
杂种核桃 <i>Pterocarya</i> × <i>J.regia</i>	幼胚 EM	DKW	DKW	McGranahan et al., 1988
核桃 <i>J.regia</i>	胚乳 EN	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Tulecke et al., 1988
大核桃 <i>J.major</i>	未成熟子叶 IC	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Cornu, 1988
核桃 <i>J.regia</i>	未成熟子叶 IM	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Lee et al., 1988
杂种核桃 <i>J.nigra</i> × <i>J.regia</i>	未成熟子叶 IM	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Cornu, 1989
美国山核桃 <i>Carya illinoensis</i>	幼胚 EM	WPM	WPM	Wetzstein et al., 1989
核桃 <i>J.regia</i>	幼胚 EM	DKW+4.4BA	DKW+4.4BA	袁巧平等, 1990, 林业科技通讯, 7: 13-14
美国山核桃 <i>Carya illinoensis</i>	幼胚 EM	BDS+4.4BA+0.04picloram; BDS+2.2BA+0.41picloram	/	Corte-Olivares et al., 1990
美国山核桃 <i>Carya illinoensis</i>	胚珠 OV	DKW+2.3 2, 4-D+9.3KT+0.01IBA	DKW	Yates, 1990
核桃 <i>J.regia</i>	叶柄 PE	DKW+2.3 2,4-D+9.3KT+0.01IBA	/	刘淑兰等, 1992
核桃 <i>J. regia</i>	胚珠 OV	DKW+0.45TDZ+4.6ZT+17.0IAA	DKW+0.05TDZ+5.7IAA	Aly et al., 1992
杂种核桃 <i>J.nigra</i> × <i>J. regia</i>	未成熟子叶 IC	DKW+14.3GA3	DKW	Deng and Cornu, 1992
黑核桃 <i>J.nigra</i>	未成熟子叶 IC	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Long et al., 1992
灰核桃 <i>J.cinerea</i>	未成熟子叶 IC	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Pijut, 1994
黑核桃 <i>J.nigra</i>	未成熟子叶 IC	WPM+0.05~5.0TDZ+1.0~10.0 2,4-D	WPM	Neuman et al., 1993
核桃 <i>J.regia</i>	幼胚 EM	MS	MS+4.4BA	Kornova et al., 1993
黑核桃 <i>J.nigra</i>	未成熟子叶 IC	WPM+5.0TDZ+1.0 2,4-D	WPM	Long et al., 1995
核桃 <i>J.regia L.</i>	胚轴 EA	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Chauhan et al., 1999
核桃 <i>J.regia L.</i>	未成熟子叶 IC	DKW+26.0GA3	DKW	Dumanoglu, 2000
核桃 <i>J.regia L.</i>	胚轴 EA	DKW+7.2~14.4GA3	DKW	汤浩茹等, 2000

续表 2

Continuing table 2

美国山核桃 <i>Carya illinoensis</i>	幼胚 EM	WPM+0.4BA+ 32.0NAA	WPM+1.44GA3	Vendrame et al., 2000
核桃 <i>J.regia</i> L.	幼胚 EM	DKW+4.4BA+9.3KT+0.05IBA	DKW	Breton et al., 2004
核桃 <i>J.regia</i> L.	未成熟子叶 IC	DKW	DKW	Vahdati et al., 2008
美国山核桃 <i>Carya illinoensis</i>	幼胚 EM	DKW+4.4BA+0.2IBA+5.7GA3	DKW	Payghamzadeh and Kazemitabar, 2010
核桃 <i>J.regia</i> L.	未成熟子叶 IC	DKW+2.22B+2.32KT+5.77GA3	DKW	Ali et al., 2010
山核桃 <i>Carya cathayensis</i>	幼胚 EM	1/2MS+4.4BA+0.004picloram	WPM	张启香等, 2011

注: IC: immature cotyledon; EM: embryo; EA: embryo axe; OV: ovules; PE: petiol; EN: endosperm; \*: 植物激素浓度单位  $\mu\text{mol/L}$   
 Note: IC: immature cotyledon; EM: embryo; EA: embryo axe; OV: ovules; PE: petiol; EN: endosperm; \*: The unit of plant hormone concentration  $\mu\text{mol/L}$

Dumanoglu (2000)发现干燥和  $\text{GA}_3$  处理提高核桃体胚的萌发率, 且二者的组合强于单独处理, 干燥下暗培养 15 后萌发率最高(46%)。Vahdati 等(2008)研究认为 ABA (脱落酸)促进了体胚成熟和萌发, 但阻碍了次生胚的再生, 而蔗糖提高了次生胚的数量, 但对胚的成熟没有任何影响。Sirmandi 等(2010)优化了核桃体胚再生体系, 发现 Gelrite 在促进体胚的再生方面优于聚乙二醇(PEG), 当其浓度为 0.2%时次生胚再生率最高(70%), 但随着 Gelrite 的浓度提高, 正常胚数量下降。进一步的研究发现, 对体胚进行冷冻预处理( $4^\circ\text{C}$ 下保持 4 周)后, 在添加植物生长调节剂和 0.3%的 Gelrite 的培养基上, 体胚转化为植株的比例最高(50%)。Ali 等(2010)研究结果也证实了上述结论, 同时发现 7.5% PEG 是产生子叶胚的最佳浓度, 3.0% PEG 是产生正常胚(白色不透明状, 有两片子叶, 根、茎分生组织可见)的最佳浓度, 0.5% Gelrite 和 7.5% PEG 导致最大畸形胚的产生, 冷冻处理转化为植株的比例最低, 但促进根的萌发, 添加植株生长调节剂促进萌发的效果不如冷冻处理, 仅仅促进新梢的萌发。

Merkle 和 Wetzstein (1987)首次诱导出美国山核桃的体胚再生。随后, Wetzstein 等(1989)进一步的研究发现, 授粉 15 周时山核桃体胚的再生率最高, MS 培养基优于 WPM 培养基, 低浓度的 NAA 诱导效果好于 2,4-D, 同时进行 5 周的低温和干燥处理可以加强了胚转化为植株的能力。Burns 和 Wetzstein (1997)以未成熟子叶为材料研究山核桃体胚的悬浮培养, 在添加 NAA 的固体培养基上进行

诱导体胚产生, 转移到无植物生长调节剂的液体培养基上增殖培养, 此时的悬浮液由球状胚聚合体、悬浮球状胚和球状胚前体聚合体组成, 然后用滤纸收集球状胚前体转移到固体培养基进行球状胚生长, 进而转变成植株, 这是胡桃属胚发生培养取得的重要进展。张启香等(2011)以山核桃自然授粉后 10 周的幼胚为材料, 对影响胚性愈伤组织和体胚发生的主导因子(基本培养基、植物生长调节剂等)进行了比较分析, 幼胚胚轴和子叶在 1/2MS 培养基上胚性愈伤组织的诱导率显著高于其他处理, 幼胚在 DW (DKW 所有元素半量加 WPM 所有元素半量)培养基上的体胚的诱导率显著高于其他处理。

#### 4 核桃遗传转化方法的研究

目前已经报道的较为成熟的植物遗传转化的方法主要分为两大类: 一类是以外源生物为载体介导的转化方法, 主要有农杆菌介导法和病毒介导法, 其中农杆菌介导的转化方法操作简便、成本低、转化率高, 在双子叶植物的遗传转化领域应用广泛; 另一类是基因直接转移技术, 主要是通过人工的方法(物理或化学法)将目的基因导入植物细胞, 包括基因枪法、花粉管通道法、原生质体法、PEG 介导转化法、电击转化法等(马明, 2007)。

McGranahan 等(1988)用核桃体胚为受体进行遗传转化的研究, 建立了胚胎发生-农杆菌介导系统, 首次获得抗卡那霉素的转基因完整植株。这个系统的特点为: (1)适于多种树种; (2)具有抑制嵌合转基因植株形成的潜力, 可以将有价值基因插入商业用品种中而不失基因的完整性(朱丽华, 1993)。这

种遗传转化方法是目前应用最为广泛的外源基因的导入途径,但是这种方法不可避免的导致畸形胚的出现,体胚的增殖受到严格的条件限制,这些都不利于植株的再生。相比较器官再生途径,这些都是体胚作为受体进行遗传转化的限制因素,随着叶片愈伤再生体系的建立,核桃器官发生途径将会受到越来越多的关注。

侯立群等利用花粉管通道法和微注射法将外源基因导入到核桃未成熟的幼胚和子房中(侯立群等, 2004, 山东林业科技, 1: 8-9),发现不同的处理手段对坐果率影响不同,同时需要进一步对基因的整合进行鉴定。王晓蔓(2009)通过对核桃花粉管通道法中外源 DNA 浓度、导入时间、和导入方法等因素的研究,发现外源 DNA 浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,结实率和果实子叶 *GUS* 基因的瞬时表达率最高,授粉 14~48 h 后是最佳的导入时间,切割柱头滴加法是最适宜的导入方法,这种方法既能保证坐果率,又有利于外源 DNA 的导入。值得注意的是,这种遗传转化的方法会受到季节性环境条件的严格限制,大大减少应用的潜力。

## 5 问题和展望

核桃的的早实特性引起了育种专家的极大关注和深入研究,利用这一特性可以通过人工手段缩短果树的童期。早实基因作为十分珍贵的自然资源,通过克隆核桃的早实基因,并利用转基因技术研究其表达机理和进行性状鉴定,可应用于核桃育种和栽培实践,从而有助于我们进一步揭示木本植物童期发育的机理。目前,只获得一些与早实性状相关的分子标记和特异基因片段,还未获得其完整基因序列,未来应充分利用现有的自然资源克隆早实基因,并通过转基因技术进行基因的导入,通过基因序列的对比和性状的观察验证基因的表达。

虽然在核桃体胚再生方面的进行了广泛深入的研究,但是体胚的成熟、萌发以及转化成植株的比例依然很低,这是制约核桃体胚再生发展的主要因素。除此之外,不同的核桃品种在体胚的再生培养方面存在差异,每一个品种都需要尝试和探索,以获得最佳的培养条件和激素配比。对于体胚的起源,需要进行细胞学观察和基因型测序,以获得准确而可靠的结果。Polito 等(1989)的研究表明,体胚来源于子叶和初生胚的下胚轴,贯穿于表面细胞的斜面。尽管对核桃初生胚的起源有多种观点,但其次生胚却是起源于表皮单细胞。尽管如此,仍然

需要对体胚再生的植株进行鉴定,以确保材料准确。目前看来,叶圆片再生的遗传转化方法是进行外源基因导入的很有前途的手段,随着叶片再生体系的建立和优化,在核桃的转基因方面会得到应用。

到目前为止,核桃的转基因研究主要集中在抗病虫、提高生根能力等方面,并取得一定的成果。基因工程技术在核桃优良品种的遗传改良应用已经成为一种重要的手段,也越来越得到育种专家的青睐。但转基因核桃植株的后期观察和功能验证仍然是研究人员需要面临的问题,如何确保基因在后代的稳定遗传,遗传力的多少以及它的环境适应性问题都需要解决。随着我国核桃种植面积的广大以及病虫害的扩张,核桃的某些病虫害(如举肢蛾、细菌性黑斑病)已经严重威胁到核桃生产,培育抗病虫品种就显得很有必要,这也是根治核桃病虫害的根本途径。

## 作者贡献

李好先是本综述的主要执行人;郭俊英、薛华柏、刘丽负责本综述的后期修改;曹尚银是本综述的构思者。全体作者都阅读并同意最终的文本。

## 致谢

本研究由科技部科技基础性工作专项(2012FY110100)资助。感谢两位匿名的同行评审人的评议和修改建议。

## 参考文献

- Ai X., Chu H.L., Li X.Q., Huang J.Q., Jiang M.L., and Zheng B.S., 2009, The analysis of *Carya carthayensis* palasma membrane intrinsic protein gene *CcPIP* clone and expression, Fujian Linxueyuan Xuebao (Journal of Fujian College of Forestry), 29(3): 252-257 (艾雪, 褚怀亮, 李雪芹, 黄坚钦, 江敏利, 郑炳松, 2009, 山核桃水通道蛋白 *CcPIP* 同源基因的克隆与表达分析, 福建林学院学报, 29(3): 252-257)
- Ali S.B.G.M., Kourosh V., Hassan B.S., Siamak K., and Charles L., 2010, Enhancement of maturation and germination of somatic embryos in Persian walnut (*Juglans regia* L.) using osmolites, hormones and cold treatments, African Journal of Food Science, 4(12): 735-743
- Aly M.A.M., Fjellstrom R.G., McGranahan G.H., and Parfitt D.E., 1992, Origin of walnut somatic embryos determined by RFLP and isozyme analysis, HortScience, 27(1): 61-63
- Avilés F., Ríos D., González R., and Sánchez-Olate M., 2009, Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.), Chilean Journal of

- Agricultural Research, 69(3): 460-467
- Breton C., Cornu D., Chriqui D., Sauvanet A., Capelli P., Germain E., and Jay-Allemand C., 2004, Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of "Early Mature" walnut trees (*Juglans regia* L.) that flower in vitro, *Tree Physiol.*, 24(4): 425-435 <http://dx.doi.org/10.1093/treephys/24.4.425> PMID:14757582
- Burns J.A., and Wetzstein H.Y., 1997, Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48(2): 93-102 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005832331593>
- Chauhan V., Kumar S., and Sharma D.R., 1999, Somatic embryogenesis in walnut (*Juglans regia* L.), *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 12(3): 433-435
- Claudot A.C., Jay-Allemand C., Magel E.A., and Drouet A., 1993, Phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and polyphenolic compounds in adult and rejuvenated hybrid walnut tree, *Trees*, 7(2): 92-97 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00225475>
- Cornu D., 1988, Somatic embryogenesis in tissue culture of walnut (*Juglans nigra*, *J. major* and hybrids *J. nigra* × *J. regia*), *Forestry Sciences*, 30: 45-49 [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-2811-4\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-2811-4_5)
- Cornu D., 1989, Walnut somatic embryogenesis: physiological and histological aspects, *Ann. For. Sci.*, 46(S): 133-135 <http://dx.doi.org/10.1051/forest:19890529>
- Corte-Olivares J., Phillips G.C., and Butler-Nance S.A., 1990, Somatic embryogenesis from pecan zygotic embryo explants, *HortScience*, 25(8): 983
- Dandekar A.M., McGranahan G.H., Leslie C.A., and Uratsu S.L., 1989, *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos as a method for the production of transgenic plants, *Methods in Cell Science*, 12(4): 145-150
- Dandekar A.M., McGranahan G.H., Vail P.V., Uratsu S.L., Leslie C., and Tebbets J.S., 1994, Low levels of expression of wild type *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cry I A (c) sequences in transgenic walnut somatic embryos, *Plant Science*, 96(1-2): 151-162 [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90232-1](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(94)90232-1)
- Dandekar A.M., McGranahan G.H., Vail P.V., Uratsu S.L., Leslie C.A., and Tebbets J.S., 1998, High levels of expression of full-length cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos, *Plant Science*, 131: 181-193 [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00256-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00256-2)
- Deng M.D., and Cornu D., 1992, Maturation and germination of walnut somatic embryos, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28(2): 195-202 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00055517>
- Dong C.P., Dong J., and Xia J.M., 2011, Dyeing of pearl fiber fabric with walnut bark dye, *Yinran (Dyeing And Finishing)*, 8: 26-32 (董超萍, 董杰, 夏建明, 2011, 珍珠纤维织物的核桃皮天然植物染料染色, 印染, 8: 26-32)
- Dumanoglu H., 2000, Desiccation using saturated salt solutions and improvement germination rate of walnut (*Juglans regia* L.) somatic embryos, *Turk. J. Agric. For.*, 24: 491-498
- El Euch C., Jay-Allemand C., Pastuglia M., Doumas P., Charpentier J.P., Capelli P., and Jouanin L., 1998, Expression of antisense chalcone synthase RNA in transgenic hybrid walnut microcuttings. Effect on flavonoid content and rooting ability, *Plant Mol. Biol.*, 38(3): 467-479 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006034709501> PMID:9747854
- Escobar M.A., Park Jae-in, Polito V.S., Leslie C.A., Uratsu S.L., McGranahan G.H., and Dandekar A.M., 2000, Using GFP as a scorable marker in walnut somatic embryo transformation, *Annals of Botany*, 85: 831-835 <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.2000.1143>
- Escobar M.A., Park J.I., Polito V.S., Leslie C.A., Uratsu S.L., McGranahan G.H., and Dandekar A.M., 2002, Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.), *Plant Science*, 163(3): 591-597 [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00164-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00164-4)
- Gou é N., Montiel G., Levert I., Gaudet M., Jay-Allemand C., and Label P., 2003, CDKA orthologue isolation and its expression during cambial activity in hybrid walnut (*Juglans nigra* × *Juglans regia*), *Trees*, 17(4): 316-324
- He F.Q., Wang H.X., and Zhang Z.H., 2011, Molecular cloning and sequence analysis of an *LFY* homologous gene from *Juglans regia* L., *Frontiers of Agriculture in China*, 5(3): 366-371 <http://dx.doi.org/10.1007/s11703-011-1095-1>
- Heile-Sudholt C., Huettelman C.A., Preece J.E., Sambeek J.W., and Gaffney G.R., 1986, In vitro embryonic axis and seedling shoot tip culture of *Juglans nigra* L., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6(2): 189-197 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00180804>
- Huang Y.J., Zhou L., Chen F.F., Zhou Q., Haung J.Q., Huang M.R., and Wang M.X., 2009, Gene expression with cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism) during flowering of *Carya cathayensis*, *Zhejiang Linxueyuan Xuebao (Journal of Zhejiang Forestry College)*, 2009, 26(3): 297-301 (黄有军, 周丽, 陈芳芳, 周秦, 黄坚钦, 黄敏仁, 王明麻, 2009, 山核桃成花过程中基因表达的 cDNA-AFLP 分析, 浙江林学院学报, 26(3): 297-301)
- Jay-Allemand C., Jouanin L., Deng M.D., Claudot A.C., Drouet



- A., and Cornu D., 1991, Biotechnologies and development. Transfer of chalcone synthase antisense gene: new strategy for studying polyphenols involved in walnut rhizogenesis, *Colloques de l'INRA*, 59: 305
- Kornova K., Stephanova A., and Terzijsky D., 1993, In vitro culture of immature embryos and cotyledons of *Juglans regia* L. Morphological and anatomical analyses of some regenerants, *Acta Horticulturae*, No.311
- Lee B.C., Shim S.Y., and Lee S.K., 1988, Mass propagation and germination of somatic embryos in *Juglans regia* L. (English walnut), *Res. Rep. Inst. For. Gen., Korea*, 24: 99-106
- Li M., 2009, Floral organ variations and cloning the genes for floral development in precocious walnut (*Juglans regia* L.), Thesis for M.S., Shandong Agricultural university, Supervisor: Yang K.Q., and Hou L.Q., pp.1-60 (李敏, 2009, 早实核桃(*Juglans regia* L.)花器官变异及其花发育相关基因克隆研究, 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 杨克强, 侯立群, pp.1-60)
- Liu S.L., Han B.W., and Chen Z.H., 1992, Somatic embryogenesis and cytological observation from petiole of walnut (*Juglans regia* L.), *Beijing Nongye Daxue Xuebao (Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis)*, 18(1): 29-32 (刘淑兰, 韩碧文, 陈正华, 1992, 核桃叶柄体细胞胚胎发生及其细胞学观察, 北京农业大学学报, 18(1): 29-32)
- Long L.M., Preece J.E., Gaffney G.R., and Van Sambeek J.W., 1992, Somatic embryogenesis and organogenesis of Eastern black walnut (*Juglans nigra*), *HortScience*, 27(6): 584
- Long L.M., Preece J.E., and Van Sambeek J.W., 1995, Adventitious regeneration of *Juglans nigra* L. (eastern black walnut), *Plant Cell Reports*, 14(12): 799-803 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00232926>
- Ma M., 2007, Molecular genetic mapping for walnut precocious gene, Thesis for M.S., Shandong Agricultural University, Supervisor: Yang K.Q and Hou L.Q., pp.1-95 (马明, 2007, 核桃(*Juglans regia* L.)早实基因定位的研究, 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 杨克强, 侯立群, pp.1-95)
- McGranahan G.H., Leslie C.A., Uratsu S.L., Martin L.A., and Dandekar A.M., 1988, *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants, *Nature Biotechnology*, 6: 800-804 <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0788-800>
- Merkle J.R., and Wetzstein H.Y., 1987, Somatic embryogenesis in tissue cultures of pecan (*Carya illinoensis*), *HortScience*, 22(1): 128-130
- Neuman M.C., Preece J.E., Sambeek J.W., and Gaffney G.R. 1993, Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1): 9-18 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00040110>
- Niu J.X., Lv J.Q., Wang L., Ye C.X., Zhang H.P., and Zhang L.X., 2008, SCAR marker linked to early-bearing genes in walnut, *Guoshu Xubao (Journal of Fruit Science)*, 25(5): 732-735 (牛建新, 吕建强, 王林, 叶春秀, 张虎平, 张录霞, 2008, 核桃早实性相关性状的 SCAR 标记, 果树学报, 25(5): 732-735)
- Payghamzadeh K., and Kazemitabar S.K., 2010, *In vitro* germination of Pecan (*Carya illinoensis*) embryo, *Biharean Biologist*, 4(1): 37-43
- Payghamzadeh K., and Kazemitabar S.K., 2011, *In vitro* propagation of walnut-A review, *African Journal of Biotechnology*, 10(3): 290-311
- Pijut P. M., 1994, Micropropagation of butternut, *Juglans cinerea*, *HortScience*, 29(5): 431
- Polito V.S., McGranahan G., Pinney K., and Leslie C., 1989, Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Juglans regia* L.): implications for *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Cell Reports*, 8(4): 219-221 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00778537>
- Rodriguez A.P.M., and Wetzstein H.Y., 1994, The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants, *Plant Cell Reports*, 13(11): 607-611 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00232930>
- Sirmandi H.B., Vahdati K., and Kalantari S., 2010, Enhancement of maturation and germination of somatic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.) by gellan gum, cold and PGR, *Acta Horticulturae*, No.861
- Tang H.R., Wang Y.Q., Ren Z.L., and Krczal G., 2000, Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic axes and cotyledons of walnut immature embryos of cv. No.120, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 27(1): 59-61 (汤浩茹, 王永清, 任正隆, Krczal G., 2000, 德国核桃“No.120”幼胚轴与子叶体细胞胚胎发生及其植株再生, 园艺学报, 27(1): 59-61)
- Tang H.R., Wallbraun M., Ren Z.L., Reustle G.M., and Krczal G., 2001, Genetic transformation of the trichoderma endochitinase gene *ThEn-42* to somatic embryos of English walnut, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 28(1): 12-18 (汤浩茹, Wallbraun M., 任正隆, Reustle G.M., Krczal G., 2001, 通过农杆菌介导法将哈兹木霉几丁质酶 *ThEn-42* 基因导入核桃, 园艺学报, 28(1): 12-18)
- Teuber S.S., Jarvis K.C., Dandekar A.M., Peterson W.R., and Ansari A.A., 1999, Identification and cloning of a

- complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, *Jug r 2*, from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104(6): 1311-1320 [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70029-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70029-1)
- Tulecke W., and McGranahan G., 1985, Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L., *Plant Science*, 40(1): 57-63 [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90163-3](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(85)90163-3)
- Tulecke W., McGranahan G., and Ahmadi H., 1988, Regeneration by somatic embryogenesis of triploid plants from endosperm of walnut, *Juglans regia* L. cv Manregian, *Plant Cell Reports*, 7: 301-304 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00269923>
- Vahdati K., McKenna J.R., Dandekar A.M., Leslie C.A., Uratsu S.L., Hackett W.P., Negri P., and McGranahan G.H., 2002, Rooting and other characteristics of a transgenic walnut hybrid (*Juglans hindsii* × *J. regia*) rootstock expressing *rolABC*, *J. Amer. Soc., Hort. Sci.*, 127(5): 724-728
- Vahdati K., Bayat S., Ebrahimzadeh H., Jariteh M., and Mirmasoumi M., 2008, Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia* L.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(2): 163-171 <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9355-3>
- Vendrame W.A., Kochert G.D., Sparks D., and Wetzstein H.Y., 2000, Field performance and molecular evaluations of pecan trees regenerated from somatic embryogenic cultures, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 125(5): 542-546
- Wang G.A., Zhang H.P., Hu H.F., Niu J.X., and Ma B.G., 2004, Identification of a RAPD marker related to early-bearing characteristic of walnut seedlings, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 21(5): 485-487 (王国安, 张虎平, 虎海防, 牛建新, 马兵钢, 2004, 核桃早实性状相关关联的 RAPD 标记, *果树学报*, 21(5): 485-487)
- Wang X.M., 2009, Studies on the efficiency factors of gene transformation via pollen-tube pathway in walnut, Thesis for M.S., Agricultural University of Hebei, Supervisor: Du G.Q., pp.1-42 (王晓蔓, 2009, 核桃花粉管通道法基因转化效率因子的研究, 硕士学位论文, 河北农业大学, 导师: 杜国强, pp.1-42)
- Wang Y., Zhang F.X., Zhu J., Li L.L., Xu F., and Cheng S.Y., 2008, Molecular cloning and sequence analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Juglans regia*, *Hubei Nongye Kexue (Hubei Agricultural Sciences)*, 47(6): 622-626 (王燕, 张凤霞, 朱俊, 李琳玲, 许锋, 程水源, 2008, 核桃苯丙氨酸解氨酶的基因克隆与序列分析, *湖北农业科学*, 47(6): 622-626)
- Wetzstein H.Y., Ault J.R., and Merkle S.A., 1989, Further characterization of somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan (*Carya illinoensis*), *Plant Science*, 64(2): 193-201 [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90024-1](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(89)90024-1)
- Wu G.L., Liu Q.L., Zheng X.B., Song Y.Q., Jian Z.H., and Peng G.B., 2009, Advances in research on the worldwide walnut germplasm, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 26(4): 539-545 (吴国良, 刘群龙, 郑先波, 宋宇琴, 简在海, 彭功波, 2009, 核桃种质资源研究进展, *果树学报*, 26(4): 539-545)
- Xi S.K., 1987, Gene resources of *Juglans* and genetic improvement of *Juglans regia* in China, *Linye Kexue (Scientia Silvae Sinicae)*, 1987, 23(3): 342-350 (奚声珂, 1987, 我国胡桃属(*Juglans* L.)种质资源与核桃(*Juglans regia* L.)育种, *林业科学*, 23(3): 342-350)
- Xing R.D., Li Y.D., Liu Q.Z., Li G.T., Chen X., and Chen M., 2010, Adventitious shoot regeneration from in vitro leaf of *Juglans regia* cv. Xiangling, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 27(1): 146-149 (邢瑞丹, 李亚东, 刘庆忠, 李国田, 陈新, 陈明, 2010, 香玲核桃离体叶片再生体系的建立, *果树学报*, 27(1): 146-149)
- Yang K.Q., Wang Y.J., Zhang Y.D., and Zheng X.Q., 2002, RAPD analysis for the identification of the precocious trait in walnuts, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 29(6): 573-574 (杨克强, 王跃进, 张银东, 郑学勤, 2002, 核桃早实性状的 RAPD 分析, *园艺学报*, 29(6): 573-574)
- Yates I.E., 1990, Somatic embryogenesis and plant development in eight cultivars of pecan, *HortScience*, 25(5):573-576
- Zhang H.P., Niu J.X., Hu H.F., Ma B.G., and Wang G.A., 2007, Screening of a RAPD marker related with precocious bearing trait in walnut (*Juglans regia* L.) and the SCAR marker conversion, *Shihezi Daxue Xuebao (Journal of Shihezi University (Natural Science Edition))*, 25(4): 426-428 (张虎平, 牛建新, 虎海防, 马兵钢, 王国安, 2007, 与核桃早实性相关的 RAPD 标记筛选及其 SCAR 标记转换, *石河子大学学报(自然科学版)*, 25(4): 426-428)
- Zhang L., 2008, SCAR markers linked to thickness gene of shuck in walnut, Thesis for M.S., Sichuan Agricultural University, Supervisor: Zhou L.Y. and Xiao Q.W., pp.1-37 (张丽, 2008, 与核桃壳厚薄连锁基因的 SCAR 标记转化, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 周兰英, 肖千文, pp.1-37)
- Zhang Q.X., Hu H.K., Wang Z.J., Yuan J., Wan J.L., and Huang J.Q., 2011, Indirect somatic embryogenesis and plant

- regeneration of *Carya cathayensis*, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 38(6): 1063-1070 (张启香, 胡恒康, 王正加, 袁佳, 万俊丽, 黄坚钦, 2011, 山核桃间接体细胞胚发生和植株再生, 园艺学报, 38(6): 1063-1070)
- Zhao D.C., Wang J.Y., Han C.M., Cui S.Y., and Hou L.Q., 2009, Analysis of fat and fatty acids composition and content in walnut varieties, Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali-Sinica), 24(z1): 295-298 (赵登超, 王钧毅, 韩传明, 崔淑英, 侯立群, 2009, 不同品种核桃仁脂肪含量及脂肪酸组成与成分分析, 华北农学报 24(z1): 295-298)
- Zhu L.H., 1993, Advances in applied research of biotechnology in *Juglans* plants, Shijie Linye Yanjiu (World Forestry Research), 2: 46-53 (朱丽华, 1993, 核桃生物技术的应用研究与进展, 世界林业研究, 2: 46-53)
- Zhu T.D., Niu J.X., Ye C.X., Liu N., and Zhang F., 2011, Cloning of the terminal sequence of the SCAR marker (1-1<sub>500</sub>) that linked to early-bearing genes in walnut, Xinjiang Nongye Kexue (Xinjiang Agricultural Sciences), 48(3): 393-398 (朱天丁, 牛建新, 叶春秀, 刘娜, 张飞, 2011, 核桃早实性相关 SCAR 标记(1-1<sub>500</sub>)基因末端序列的克隆, 新疆农业科学, 48(3): 393-398)