林业科学研究 2003,16(3):343～350
Forest Research

文章编号: 1001-1498(2003)03-0343-08

乔木树种体细胞胚胎发生的研究与应用

金晓玲[1,2], 何 平[2,3]
(1. 浙江师范大学环境与生命科学学院,浙江 金华 321004;
2. 中南林学院,湖南 株洲 412006; 3. 中国国际工程咨询公司,北京 100044)

摘要:综述了乔木树种体细胞胚胎发生的研究现状,其中包括体细胞胚胎发生的基本步骤;影响乔木树种体细胞胚胎发生及其植株再生的因素。展望了乔木树种体细胞胚胎发生的应用前景及研究方向,提出了乔木树种体细胞胚胎发生在研究和应用过程中存在的问题。

关键词:乔木树种;体细胞胚;体细胞胚发生
中图分类号:Q944.6 **文献标识码**:A

体细胞胚胎发生是指在离体条件下植物体细胞通过与合子胚发生相似的途径发育成新个体的过程[1]。由于其速度快、数量大、结构完整等特点,利用体细胞胚胎发生进行乔木树种的人工种子育苗,可能成为未来人工林苗木来源的一种重要手段[2,3]。此外,胚性培养物是全能性原生质体的重要来源,可用于树种的遗传转化及体细胞杂交等研究,达到改良森林树种的目的[4,5]。

体细胞胚胎发生是植物界的普遍现象,自1948年Curits等从兰属杂种胚愈伤组织中首次发现和正常胚相似的胚状体结构以来,已在43科97属114种植物中有了体细胞胚胎发生的报道[6]。乔木树种的体细胞胚胎发生研究起步虽然较晚,但这个领域的研究却取得了令人瞩目的进展。自1985年首次从挪威云杉(*Picea abies* Karst.)的未成熟合子胚形成体细胞胚胎并再生完整植株以来[7],据初步统计已从油棕(*Elaeis guineensis* Jacquin)、石刁柏(*Asparagus officinalis* L.)、欧洲七叶树(*Aesculus hippocastanum* L.)、胡桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim.)、花旗松(*Pseudotsuga menzieesii* (Mirbel) Franco)、缘毛杨(*Populus ciliata* Wall.)、欧洲落叶松(*Larix decidua* Mill.)、小叶杨(*Populus simonii* Carr.)、群众杨(*P.* × *xiaozhuanica* W. Y. Hsu et Liang cv. 'Popularis')、橡树(*Quercus* spp.)、北美叠罗汉木兰(*Magnolia pyramidata* Bartram)、桉树(*Eucalyptus* spp.)、青杆(*Picea wilsonii* Mast)和白杆(*P. meyeri* Rehd. et Wils.)等[8～19]不同树种的外植体诱导产生了体细胞胚。本文就乔木树种体细胞胚胎发生的基本过程、影响因素、发展方向和应用前景进行综述。

1 体细胞胚胎的发生

体细胞胚的发生可分为直接和间接的两种方式[20]。直接的体细胞胚胎发生即在外植体

收稿日期: 2002-12-16
基金项目: 国家林业局高技术项目"榉树工厂化微繁及造林技术研究"(99-14)的部分内容
作者简介: 金晓玲(1963—),女,副教授,中南林学院在读博士研究生.

上直接形成体细胞的方式。达克东等通过该途径成功地诱导了苹果(*Malus pumila* Mill.)离体叶片的体细胞胚并获得了再生植株[21]。间接的体细胞胚胎发生途径是指:外植体先形成胚性愈伤组织,体细胞胚由胚性愈伤组织发育而来[22]。在间接的体细胞胚胎发生途径中,又有两种培养方式:即在固体或半固体培养基上静止培养诱导体细胞胚胎发生和通过细胞悬浮培养形成体细胞胚[23~25]。周丽依研究发现:荔枝幼胚诱导形成的胚性愈伤组织通过悬浮培养,胚性细胞团分散度高,体细胞胚胎发生的频率也高,可达 62.0 %;在固体培养基上静止培养的胚性愈伤组织主要是不断增殖,形成的体细胞胚较少,体细胞胚胎发生率只有 23.4 %;但是,成熟的体细胞胚在液体培养基中继代培养时易褐变死亡难于萌发,而固体静止培养则有利于体细胞胚萌发成苗。因此,他认为,成熟的体细胞胚及时转移到固体培养基上是保证体细胞胚正常萌发的技术关键[26]。目前报道较多的是通过间接发生途径诱导体细胞胚胎发生,这种途径主要包括:胚性愈伤组织的诱导;胚性愈伤组织的保持和增殖;体细胞胚的成熟和体细胞胚的萌发和植株再生等 4 个步骤。在体胚的发生过程中,各种因素都对它产生较大的影响。

2 影响体细胞胚胎发生的因素

2.1 外植体

体细胞胚胎的发生因所选择的外植体的状态、类型、基因型不同有很大差异。一般来讲,子房、胚珠、珠心、合子胚及其组成部分和籽苗等(也称为胚性预决定外植体)较易直接产生体细胞胚,而处于分化较高阶段的组织或器官,如幼嫩的营养器官(也称为胚性重决定外植体),通常必需经过分化形成胚性愈伤组织后再产生体细胞胚,但这类外植体诱导出体细胞胚的实用价值往往超过前一类。早期对乔木树种的体细胞胚胎发生研究的外植体往往局限于幼胚。近年来,从成熟胚成功诱导体细胞胚的报道不断增多, Wilhelem E[3]成功地从 50 a 以上树龄的橡树的叶子中诱导形成了体细胞胚。另外,在红桧(*Chamaecyparis formosensis* Matsum)、台湾油杉(*Keteleeria formosana* Hayata)等[27,28]植物中都已成功的诱导了体细胞胚。

2.2 培养基的选择

培养基的种类和浓度对植物愈伤组织及体细胞胚的诱导至关重要,合适的基本培养基对乔木树种体细胞胚的成功诱导起关键作用。目前,最常用的培养基有 DCR、GD、LM、LP、SH、P_6、MS 及各种改良的 MS 培养基。氮素是体细胞胚胎发生所必需的元素。林木体细胞胚诱导的一个特点是,大量元素中的 NO_3^- 及 NH_4^+ 的总量较低。实验证明,只有在明显降低 NO_3^- 及 NH_4^+ 的含量时,才能促进体细胞胚的发育和诱导产生更多的分化芽[29]。外加的 N 对一些植物也起重要作用。有些氨基酸对植物胚状体有促进作用,而有些氨基酸对植物胚状体有抑制作用。Ser、Gln、Asn 和 Ala 均有利于胚状体的发生,但 Sugan Epan[30]发现 Ser、Try、Pro、Asp、Glu 等几种氨基酸对松的体细胞胚的诱导起抑制作用。在培养基中添加椰乳(CW)、水解酪蛋白(CH)、酵母提取液(YE)等天然复合物对体细胞胚的诱导也有促进作用[31]。

铁盐也是影响体细胞胚胎发生的一个重要因素。在一些种子植物的花粉培养中,螯合铁盐的效果要比其它铁盐的效果好,而且在缺铁情况下,胚不能从球形胚发育成心形胚。

由额外的蔗糖、肌醇、山梨醇或 PEG 产生的高渗透压条件可促进体细胞胚发生,并防止其早熟萌发,其中以肌醇和 PEG 最为有效[32,33]。

2.3　植物激素的影响

在诱导体细胞胚胎发生初期常采用 2,4-D 或 NAA 和 KT、BA 组合形式。多数植物组织培养脱分化都必须有 2,4-D,特别是单子叶植物,往往需要较高浓度的 2,4-D。青杆胚性愈伤组织在改良 59 附加 2,4-D 和 KT 各 1.0 mg·L^{-1}的培养基上继代 3 a,仍具有旺盛的增殖能力。该胚性愈伤组织转入 1/2 改良 59 附加 ABA 1.0 mg·L^{-1}的分化培养基上,约 3 个月可分化出大量体细胞胚。体细胞胚的分化率达 90 %以上,而且遗传性十分稳定[34]。双子叶植物需要 2,4-D 的浓度通常只有单子叶植物的 1/10～1/20,而且诱导脱分化后必须及时降低或去掉 24-D,胚性细胞才能正常发育,但在有些植物如玉米(*Zea mays* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)的花药培养中,即使不加任何激素,胚状体也能形成。这些不同植物的差别,可能与各种植物内源激素的存在状况有关[35]。

一般讲,由外植体诱导最初产生的体细胞胚不一定十分理想,需经过不同培养条件下多次继代,才会使体细胞胚质量不断提高。在刺五加(*Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms)人工种子的研究中,外植体使用 MS + 2,4-D 0.5 mg·L^{-1}可诱导产生胚状体,但此时的胚状体体积较小且分化产生次级胚状体。若在原培养基上继代,所产生的 3～5 mm 的优良体细胞胚发生率仅为 5.7 %;若将它们转移至 MS + 6-BA 0.5 mg·L^{-1} + NAA 0.5 mg·L^{-1}的培养基上,继代后体细胞胚普遍长大,3～5 mm 的双子叶优良体细胞胚发生率为 71.5 %;如果在 MS + 6-BA 0.5 mg·L^{-1} + ABA 0.5 mg·L^{-1}的培养基上继代,子叶期正常胚的分化率可提高到 87.5 %。显然,在体细胞胚发生过程中,每种激素各有其作用的特异性。ABA 曾被用于促进野蒿(*Artemisia campestris* L.)和大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)的体细胞胚成熟[36]。同样,ABA 在乔木树种的体细胞胚胎发生中也起着十分重要的作用[37]。实验表明,在将体细胞胚转至无激素培养基使最终萌发之前,用 ABA 处理可明显促进体细胞胚成熟。ABA 的作用是防止裂生多胚现象,因而可促使单个化并进一步发育成熟。早期通过将体细胞胚培养在含 ABA 的培养基上使白云杉产生了成熟胚,但成熟频率很低,而且成熟过程不同步。Fowke 和 Attree 发现,将白云杉(*Picea glauce* (Moeach) Voss.)未成熟体细胞胚置于 ABA (16～22 μmol·L^{-1})和 PEG 4 000 (7.5 %)的组合物中 4～8 周后,不但可抑制早熟萌发,而且成熟频率明显提高,成熟同步发生形成高质量的胚[4]。廖宇赓[38]在台湾云杉(*Picea morrisonicola* Hayata)的研究中也得到类似的结果。Pullman 等[39]发现,在子叶胚发育培养基中同时加入 ABA 和活性炭,可使子叶胚产生一种与合子胚更加类似的改善的顶端优势区,几周后即可形成大量粗壮的子叶胚(双极性),而且,在这种培养基上产生的体细胞胚可在同一培养基上于 4～5 ℃的条件下保存很长时间而不会丧失活力。这些贮藏的胚转至生根培养基上后,能正常地形成完整小植株,同时由体细胞胚转变为小植株的频率也大为提高(由原来的 1 %～2 %提高到 25 %)。

2.4　光照与温度的影响

从胚性愈伤组织的诱导直至子叶胚的形成的诱导条件以黑暗和温度 22～25 ℃为最佳。Pullman 等[40]发现,光照条件的效应在很大程度上与所选用的培养基成分有关。Verhagen 等[41]利用改良 1/2MS 培养基对挪威云杉的成熟胚进行培养,在 24 h 光照下同样可诱导产生白色半透明的胚性愈伤组织。外植体产生胚性组织的频率与黑暗条件下无明显差异。他们认为这可能是基本培养基中的无机盐 NH_4NO_3 换成了有机态氮化物(Gln 或 Asp)之故。在利用 DCR 和改良 P_6 培养基进行马尾松体细胞胚发生研究时发现,虽然在胚性愈伤组织的诱导初期,光照

与黑暗条件下相差不大,但随着继代次数增加,光照条件下产生的胚性愈伤组织容易褐化并局部变绿,且愈伤组织生长过快,这对以后的体细胞胚形成不利。

胡自华使用了含有不同浓度的 ABA、GA3 和脯氨酸及三者成分不同浓度的各种组合的培养基诱导胡萝卜(*Daucus carota* L.)体细胞胚胎发生,结果发现当上述 3 个因素在适当浓度配组时,体细胞胚质量的提高比单独使用任何一种调节物都要明显,不但体细胞胚形态正常,双子叶分化率高,而且同步化程度也大大加强。在体细胞胚胎发生过程中,植物激素的调节作用是首要的[42],但在不同的阶段,如将 N 源或 C 源与激素交替使用,则会很好地诱导产生大量的高质量体细胞胚。根据前人的经验,陈德富[43]用 MS + 0.5 mg·L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg·L^{-1} KT 很好地诱导出了根茎的愈伤组织,但在诱导体细胞胚时仍用 KT 作为外源激素,则会引起体细胞胚的胚根肿大、数量减少,去除 KT,并附加肌醇、葡萄糖则能很好地诱导产生具双子叶、胚根正常的体细胞胚。这说明植物激素、N 源、C 源是调节体细胞胚胎发生的 3 大因素,三者的作用既有特异性,又有协同性。不同的植物类型,将三者有机地配合使用,对提高体细胞胚的质量会起到意想不到的效果。

3 乔木树种体细胞胚胎发生研究的发展方向及应用前景

3.1 种质保存

胚性细胞系是种质保存的良好材料,但胚性细胞系的生长和胚胎发生能力往往随着时间而改变,而且保存这些培养物需花费大量时间,还会有被污染的危险。超低温保存技术为种质和无性系的长期保存及其在农业生产上的应用展现了良好的前景。Laine 等[44]利用蔗糖和二甲基亚砜(DMSO)作为低温保护剂,加勒比松(*Pinus caribaea* Morelet)的胚性细胞悬浮系能在液氮中保存 4 个月,融化后的细胞系经短期停滞后即继续生长,这些重新建立的培养物与非冷冻保存物具有相似的体细胞胚发生能力。Gupta 等[45]的研究表明,在液氮中保存的挪威云杉及火炬松(*P. taeda* Linn.)体细胞胚在短时间内可恢复活力。在 Kartha 等[46]的研究中,他们将白云杉体细胞胚在液氮中超低温保存了 1 a,然后解冻,结果胚端细胞和少数次生胚柄细胞仍恢复了活力。改进方法后,从白云杉的超低温保存的胚性细胞系中再生的组织,已经通过诱导体细胞胚胎发生形成了再生植株,及通过器官发生诱导产生了不定芽。Bercetche 等将挪威云杉的胚性愈伤组织超低温保存 3 个月,当解冻后培养于附加 ABA 的培养基上时,超低温保存的组织比非保存的组织更易形成子叶胚[47]。Klimaszewska 等[48]将黑云杉(*Picea mariana* B. S. P.)的胚性细胞系超低温保存后,重新诱导了体细胞胚胎发生和植株再生,移植于苗圃越冬后,其生长情况及表型与来自合子胚的植株没有任何差别。此外,经过超低温保存后的再生植株,有可能产生高抗寒性的新品种。

3.2 快速繁殖 ——人工种子的生产

植物产生的胚性愈伤组织中,每一个细胞都可以发育成一个完整植株,而且胚状体具有两极性,可直接生成小植株,避免多次继代培养造成感染。郑均宝等[49]成功地建立了油松(*Pinus tabulaeformis* carr.)细胞无性系。建立良好的体细胞胚胎发生体系必须满足以下两个条件:(1)体细胞胚很容易诱导和控制;(2)体细胞胚能很好地维持下来或快速繁殖,遗传上稳定。

体细胞胚的诱导和发生是制备人工种子的基础。体细胞胚的干化及用海藻酸钠等材料包裹体细胞胚制成人工种子,为选择基因型的廉价无性繁殖及无病毒无性系的贮存和生产提供

了可能。在不考虑适应性反应的条件下播种于土壤中的人工种子,其成活率一般与诱导体细胞胚胎发生的材料的生理状态有关[50]。由于人工种子必须具有相似于自然种子的萌发率及发育状态,才有可能应用于商业生产。对于大多数乔木树种,其体细胞胚萌发形成再生植株的频率较低,因此有必要对乔木树种的体细胞胚的抗性、区系性及贮存营养物质的释放等作进一步的了解。以诱导植物形成体细胞胚的方式进行无性繁殖是组织培养技术中最具潜力和经济效益的技术。这种技术可以生产出大量的无性后代,既保持优良母本的性状,又因产量高而使生产成本降低。目前对挪威云杉、火炬松、辐射松(*P. radiata* D. Don)和青杆等树种的体细胞胚已进行了人工种子的研制研究[47],有若干树种已能大量重复生产体细胞胚苗,并已进入实际造林评估阶段[51]。使用性状均一、遗传性优良的体细胞胚苗将成为可能。

3.3　突变体的诱导和筛选

植物组织培养中常常产生遗传上变异的植株,特别是愈伤组织经多次继代培养后发生染色体变异,从而产生多倍体、混倍体等植株。这种现象一方面对获得遗传性稳定的植株造成了困难,但同时也提供了十分丰富的基因资源,若对突变体进行筛选,有希望获得具有优良性状的变异植株。此外,通过愈伤组织克隆、原生质体克隆或在性别水平上进行诱变和选择,可以得到遗传变异的个体,这些个体中有些具有分化为胚状体的能力,这就为缩短育种周期,避免大量劳动力的使用开辟了新途径。利用这种诱变筛选途径,我国已培育出 4-氧赖氨酸烟草(*Nicotiana* spp.)突变体,耐盐的水稻和芦苇(*Phragmites communis* Trin.)突变体以及高糖甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)细胞突变体等。

3.4　原生质体培养及融合在基因工程中的应用

原生质体培养的主要目的之一是获得完整的再生植株。通过体细胞胚胎发生途径形成完整植株,具有速度快、数量大、结构完整且易于同步控制等优点。在乔木树种中首次将原生质体培养成完整植株的便是通过体细胞胚胎发生途径获得的。

植物基因工程是近几年发展起来的生物技术,这一技术的发展和应用是建立在植物细胞的全能性和较完善的植物组织培养技术,特别是体细胞胚胎发生和成功的植株再生技术的基础上。通过遗传转化技术将有用的外源基因导入乔木树种,获得抗除草剂、抗病毒、抗虫或木质改良的转基因植株,无疑对林业的发展具有重要意义[52]。最近十几年,通过基因操作,已获得很大成就:抗病毒、抗虫以及高抗逆性的工程植株已进入了大田试验;抗除草剂工程植株以及提高种子或植物营养成分的工程植株也已培育出来,并进入大田试验,但是,这些成功的例子主要集中在草本植物,乔木树种目前仅获得杨树等少数植物的转基因植株。主要原因不在于细胞转化技术,而在于无法将转化的细胞诱导形成完整植株[53]。

总之,由于乔木树种在林业生产与环境绿化中的重要地位,它们的体细胞胚胎发生的研究受到极大重视。有关乔木树种的体细胞胚胎发生的研究报道越来越多,特别是有关松柏类植物的报道。在挪威云杉、白云杉、黑云杉、北美云杉(*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.)、火炬松、欧洲落叶松、北美黄杉(*Pseudotsuga menzieii* (Mirbel) Franco)及青杆、白杆等松柏类植物的研究上取得了一些重大进展;另外在杨树(*Populus* sp.)、榆树(*Ulmus* sp.)、榛(*Corylus* sp.)、银杏(*Ginkgo biloba* L.)等[54]阔叶树种的研究上也有较大的成功。目前,研究人员不仅掌握了这些植物体细胞胚胎发生的诱导条件,而且在此基础上进行了细胞悬浮培养、原生质体培养及遗传转化等研究工作,为通过基因工程进行乔木树种的品种改良和良种选育提供了可能。在不同

的乔木树种上建立起可控制的同步化的高频率体细胞胚胎发生体系及通过细胞悬浮培养获得分散性好的体细胞胚,将促进人工种子的机械化生产及其在商业生产上的应用。

但是,乔木树种体细胞胚胎发生的研究仍存在着一些问题,诸如:体细胞胚的诱导频率普遍较低,而且由于胚性细胞与二次胚的不断形成,在同一培养体系中不同发育阶段的体细胞胚同时存在,提高体细胞胚的质量和诱导频率将直接影响到该植物的体细胞胚在实际生产上的应用;不同的植物体细胞胚胎发生的影响因素有较大的差别,这对某一树种的研究成果的普遍性受到了限制;有关乔木树种体细胞胚胎发生形成的植株的生长特性等研究资料很少。这些问题极大地限制了体细胞胚胎发生在生产和研究中的应用。

参考文献:

[1] Haccis B. Question of unicellar origin on non-zygotic embryos in callus cultures[J]. Phytomotphology, 1978,28:74～81

[2] Mengoli M, Bagni N, Luccarini G,et al. Daucus carota cell cultures: polyamines and effect of polyamine biosynthesis inhibitors in the preemfryogenic phase and different embryo stages[J]. J Plant Physiol,1989,134:389

[3] Wilhelm E. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) [J]. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 2000,36(5):349～357

[4] Attree S M, Dunstan D I, Fowke L C. Plantlet regeneration from embryogenic protoplasts of white spruce (*Picea glauca*) [J]. Bio/Technology,1989,7:1060

[5] 黄健秋,卫志明. 针叶树体细胞胚胎发生研究进展[J]. 植物生理学通讯,1995,31(2):85～90

[6] 周俊. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 II. 影响植物胚状体发生和发育的因素[J]. 植物生理学报,1982,8:90～99

[7] 黄健秋,卫志明. 松属树种组织培养和原生质体培养[J]. 植物学通报,1994,11(1):34～42

[8] Sharp W R, Sondahl M R, Caklas L S, et al. The physiology of in vitro asexual embryogenesis[J]. Hort Rcv, 1980,2:268～310

[9] 王彦清,吴克贤,张泉. 胡桃楸体细胞胚发生的研究[J]. 林业科技,2000,25(2):8～9

[10] Durzan D J, Gupta P K. Somatic embryogenesis and polyembrogenesis in Douglas fir cell suspension culture[J]. Plant Sci,1987,52(3):229～235

[11] Currider S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension and tissue culture of mature Himalayan popular (*Populus ciliata*) [J]. Plant Cell Reports,1989,8:124～127

[12] Bonga J M. The effect of collection date and frozen storage on the formation of embryo-like structures and elongating sboots from explants from mature *Larix deciduas* and *L.* × *eurolepis*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1997,51(3):195～200

[13] 王影,黄敏仁,陈道明,等. 杨树细胞悬浮培养及体细胞胚发生的研究[J]. 南京林业大学学报,1991,15(3):31～36

[14] 张绮纹,张望东. 群众杨 39 无性系耐盐悬浮细胞系的建立和体细胞变异体完整植株的诱导[J]. 林业科学研究,1995,8(4):395～401

[15] Merkle S A, Watson-Pauley B A. *In vitro* conversion of pyramid magnolia somatic embryos[J]. Hort Science, 1994,29(10):1186～1188

[16] Taber R P, Zhang C, Hu W S. Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development[J]. Canadian Journal of Botany, 1998,76(5):863～871

[17] Termignoni R R, Po Jen Wang, Ching Yeh Hu. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996,45(2):129～132

[18] 刘春朝,王玉春,欧阳藩. 青杆胚性愈伤组织悬浮培养动力学及体细胞胚胎发生[J]. 西北植物学报,1998,18(2):155～159

[19] 杨金玲,桂耀林,杨映根,等. 白杆体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 植物学报,1997,39(4):315～321

[20] 周丽依,曹静,邝哲师,等. 园艺植物体胚发生及植株再生技术研究[J]. 热带作物学报,1998,19(2):15～19

[21] 达克东,张松,李雅志,等. 苹果离体叶片培养直接体细胞胚胎发生研究[J]. 园艺学报,1996,23(3):241～245

[22] 黄学林,李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成与调控[M]. 北京:科学出版社,1995. 156～205

[23] 杨映根,谷瑞升,郭仲琛. 青杆胚性细胞悬浮培养中影响体细胞胚发生因素的研究[J]. 植物学报,1994,36(12):934～939
[24] 张守英,阙国宁. 晚松悬浮细胞系的建立和原生质体的分离[J]. 林业科学研究,2002,15(2):247～251
[25] 张宏伟,黄学林,傅家瑞. 大叶相思体细胞胚发生的初步研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),1997,36(1):122～125
[26] 周丽依,邝哲师,马雪筠,等. 影响荔枝幼胚体细胞胚胎发生因素的研究[J]. 农业生物技术学报,1996,4(2):161～165
[27] 何政坤,杨政川. 台湾油杉空粒种子形成原因与体胚诱导之探讨[J]. 台湾省林业试验所简讯,1995,2(2):9～10
[28] 蔡佳蓉,姜家华,王亚男. 台湾扁柏与红桧之体胚发生[J]. 中华林学季刊,1990, 23 (4):3～19
[29] Ellis D D, McCabe D E, McInnis S, et al. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration[J]. Bio/Technology, 1993, 11:84
[30] 王傲雪,李景富. 植物体细胞胚状体的诱导研究及应用[J]. 黑龙江农业科学,1999(2):21～25
[31] 贺凤美,王力华,刘阳. 落叶松体细胞发生研究进展[J]. 辽宁林业科技,2000,6:33～35
[32] Attree S M, Pomeroy M K, Fowke L C. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce(*Picea glauca*(Moench) Voss) somatic embryos: Effects of a non-plasmolysing water stress and adscisic acid[J]. Ann Bot,1991,68:519～525
[33] 杨映根,桂耀林,唐巍,等. 青杆愈伤组织在继代培养中的分化能力及染色体稳定性研究[J]. 植物学报,1994,36(12):934～939
[34] 张立功,张永华. 杨树体细胞胚状体的诱导发生[J]. 林业科学,1981,17(4):426～427
[35] 詹祥灿. 植物体细胞胚状体与器官发生的激素的调节[J]. 植物生理学报,1983,9(3):317～325
[36] Roberts D R. Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumilation in somatic embryos of interior spruce[J]. J Physiol Plant, 1991,83:247
[37] Ackerson R C. Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. [J]. J Exp Bot, 1984,35:403
[38] 廖宇赓. 台湾云杉(*Picea morrisonicola* Hay.)体胚发生与植株再生[J]. 中华林学季刊,1999,32(2):161～170
[39] Pullman G S, Gupta P K. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using adsorbent materials in the development stage media[J]. U S Patent,1991,5:326
[40] Gupta P K, Pullman G S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using adscisic acid and somotic potential varition[J]. U S Patent,1991, 5:36
[41] Verhagen S A, Wann S R. Norway spruce somatic embryogenesis: High frequency initiation from light cultured mature embryos[J]. Plant Cell Tiss Org Cult,1989,16:103
[42] 白淑霞,刘立秋,陈文龙. 植物人工种子高质量体细胞胚胎发生的研究[J]. 河北农业大学学报,1988,21(1):97～101
[43] 陈德富,程炳嵩,王春香,等. 根芹体细胞产量与质量的研究[A]. 见:李修庆. 植物人工种子研究[M]. 北京:北京大学出版社,1990. 19～26
[44] Laine E, David A. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*[J]. Plant Cell Reports, 1992,11:295
[45] Gupta P K, Pullman G S, Timmis R. Forestry in the 21st Century-The biotechnology of somatic embryogenesis[J]. Bio Technology, 1993,11:454～459
[46] Kartha K K, Indra K, Vasil, et al. Plant Cell and Tissuc Culture[M]. Dordrecht: Kluwer Acadcmic Publishers, 1994. 195～230
[47] 唐巍,杨映根,桂耀林,等. 松柏类植物体细胞胚胎发生的研究与应用[J]. 植物学通报,1996,13(1):25～312
[48] Klimaszewska K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis[J]. Plant Sci, 1989,54(1):63
[49] 郑均宝,王金茂,杜克久,等. 油松体细胞无性系的建立[J]. 植物遗传学报,1996,23(4):307～314
[50] 郭仲琛,桂耀林. 植物体细胞胚发生和人工种子[M]. 北京:科学出版社,1990. 1～19
[51] Ellis D D, McCabe D E, Russel D, et al. Expression of inducible angiosperm promotors in a gymnosperm *Picea glauca* (white spruce) [J]. Plant Mot Biol,1991,17:19
[52] 程东升. 木本植物基因工程研究进展及存在问题[J]. 生命科学,1993,5(5):20
[53] Durzan D J, Lpushnski S M. Propagation of American elm via cell suspension cultures[J]. Can J For Res,1975,5(2):273～277
[54] Perez C, Ferandez B, Rodriguez R. *In vitro* plantlet regeneration through asexual embryogenesis in cotyledonary segments of *Corylus avellanal*[J]. Plant Cell Rep,1983,2:226～228

Study and Application on Somatic Embeyogenesis in Arbor Tree

JIN Xiao-ling[1,2], *HE Ping*[2,3]

(1. Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; 2. Central South Forestry University, Zhuzhou 412006, Hunan, China;
3. International Engineering Consulting Corporation, Beijing 100044, China)

Abstract: The research achievements in somatic embryogenesis in forest tree species were reviewed, in which two subjects were discussed: (1) the inducement of somatic embryogenesis and (2) the factors influencing somatic embryogenesis and plant regeneration in forest tree species. We suggested a direction for future application and research on somatic embryogenes in forest tree species, and figured out the main problems in the present research and the application of the somatic embryogenesis as well.

Key words: arbor tree species; somatic embryo; embryogene