

文章编号:1001-1498(2004)03-0392-07

落叶松体细胞胚胎发生研究进展

吕守芳, 张守攻, 齐力旺, 孙晓梅, 王建华

(中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091)

摘要:综述了欧洲落叶松、日本落叶松、欧日和日欧杂种落叶松、西部落叶松和华北落叶松体细胞胚胎发生的研究进展,对胚性培养物的超低温保存、原生质体培养和基因转化等技术进行了介绍,并对落叶松体细胞胚胎发生的研究趋势作了展望。

关键词:落叶松;体细胞胚胎发生;超低温保存;原生质体;基因转化

中图分类号:S791.22 **文献标识码:**A

落叶松(*Larix*)原产于北半球的北温带地区和喜马拉雅山脉,我国学者认为该属约有18个种,仅中国就有10种及1个变种^[1]。落叶松比松树和云杉生长快,且材质良好,是重要的造林树种,但大多数落叶松种子产量低。目前无性繁殖技术主要是扦插,其中组织培养技术进展缓慢,但体细胞胚胎发生技术却取得了较好的进展。体细胞胚胎发生技术已经能大规模地繁殖针叶树种中的几个基因型,比扦插繁殖效率高。细胞胚胎发生的胚性细胞系在低温保存下能长时期处于幼态,可以进一步进行以下研究:(1)大规模生产体细胞胚胎发生的小苗;(2)原生质体的研究;(3)超低温保存的研究;(4)基因转化的研究;(5)人工种子的研究。由于体细胞胚胎发生具有很大的研究潜力,因此有必要对落叶松在体细胞胚胎发生方面的研究进展和趋势进行综述。

1 落叶松体细胞胚胎发生的过程

落叶松体细胞胚胎发生属于间接体细胞胚胎发生途径,主要分为胚性培养物诱导、继代与增殖、体胚成熟和萌发几个阶段。

1.1 胚性愈伤组织诱导阶段

落叶松外植体在诱导培养基上产生大量愈伤组织,只有少数能形成胚性培养物,以西部落叶松(*Larix occidentalis* Nuttall.)为例,只有3%的外植体能产生胚性细胞系,经过6个月的培养形成成熟体细胞胚^[2]。观察到愈伤组织是从外植体(成熟胚或幼胚)的以下几个部分长出:胚柄的上端,胚的基部,前子叶期胚的中部,成熟胚的胚轴和子叶。

1.2 继代与增殖阶段

在继代与增殖阶段,胚柄包着胚性团形成胚性细胞系,培养物中有一系列大小的胚性团,只有保持适宜的培养条件,胚性团才能不断地无序分裂,细胞系得以正常继代。落叶松培养物

收稿日期:2003-01-19

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(No.2001AA244021)

作者简介:吕守芳(1968—),男,安徽无为,人,助理研究员,在读博士生。

经常产生红色素,出现红色的胚性培养物能产生成熟体细胞胚。西部落叶松每次继代中都出现具有光滑表皮并能发育为成熟体细胞胚的细胞系,通过一段液体悬浮培养可以产生较多的正常极性体胚^[2]。一些细胞系在长期培养过程中会失去体胚发生能力,而有体胚发生能力的培养物是光滑的,其它培养物表面会出现绳索状生长物。这些不同的生长类型可能出现于一个细胞系中,也可能出现于一个培养皿中。

1.3 体细胞胚成熟与萌发阶段

落叶松胚性培养物在不同的条件下形成成熟的体细胞胚,有一些欧日杂种的胚性培养物在无生长调节剂的继代培养基上能不断地形成体细胞胚,这些体细胞胚能萌发并发育成植株。大多数胚性培养物在继代时需生长素(2,4-D)和激动素(KT或BA),如果没有ABA,这些胚性培养物就不能进一步发育成体细胞胚^[3]。一般来说,ABA的浓度从低的 $0.025 \mu\text{mol L}^{-1}$ 到高的 $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ 对体细胞胚成熟诱导是必要的。另外,培养基中渗透压的增加可以提高ABA的诱导效果,提高渗透压可以添加己糖、糖醇或中性聚合体如PEG。成熟体细胞胚相似于合子胚的地方在于都有一条根、一个胚轴和几片子叶,合子胚有5~6片子叶,而体细胞胚的子叶数变化不定,体细胞胚的胚轴一般比合子胚的长,这些差异主要取决于细胞系,特别取决于ABA的处理。

2 影响落叶松体细胞胚胎发生的主要因素

2.1 外植体

外植体的选择对落叶松体细胞胚胎的发生有着重要意义,决定着体细胞胚胎发生的可行性,相关试验表明,落叶松以未成熟胚作为外植体较容易使体细胞胚胎发生成功。1990年 von Aderkas等^[4]用欧洲落叶松(*Larix deciduas* Mill.)、日本落叶松(*Larix leptolepis* S. et Z.)和欧日杂种落叶松(*Larix × leptoeuropaea*)未成熟合子胚诱导胚性愈伤组织。

Lelu等^[5]详细地研究了欧洲落叶松外植体的不同发育阶段对体细胞胚发生的影响,前子叶期合子胚及子叶早期合子胚比子叶期合子胚诱导胚性愈伤组织容易。从贮藏5a的种子中取出的成熟胚诱导出胚性培养物,其中的一个种批取出的成熟胚诱导胚性培养物的频率为5%,这是首次从成熟胚中诱导胚性培养物。西部落叶松子叶早期胚比前子叶期胚诱导频率高,而欧洲落叶松、杂种落叶松是前子叶期的诱导频率高^[2]。Lelu等^[5]在试验中发现杂种落叶松的亲本选择对未成熟合子胚胚性培养物的诱导频率有明显影响,当欧洲落叶松267作父本、日本落叶松3016、3026作母本时,其子代的胚性培养物诱导频率比较高;当欧洲落叶松139作父本时,母本不变,其子代的胚性培养物诱导频率比较低。日本落叶松3026(母)×欧洲落叶松267(父)杂种的胚性培养物诱导频率比反交欧洲落叶松267(母)×日本落叶松3026(父)的杂种高。另外,成熟的体细胞胚再诱导胚性培养物的频率非常高(83%);将体细胞胚萌发小苗的子叶和针叶在 $4.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA的培养基上预培养1周后诱导形成胚性培养物,但其诱导频率较低,子叶为8%,针叶为3%。从未成熟合子胚诱导出的胚性培养物形成成熟体细胞胚的数量与子叶和针叶相似,然而,从成熟体细胞胚诱导出的胚性培养物再形成成熟体细胞胚的数量是未成熟合子胚的3倍多。

未成熟胚的采集受时期限制,并且其体胚苗需要进行无性系选择。营养器官的外植体如果体细胞胚胎发生成功,其体胚苗与母株的性状一致即可不进行无性系选择而直接用于造林。Bonga^[6]从30年生的成年树芽中取出嫩梢进行诱导,形成的粘性培养物在外型上与胚性培养

物相似,然而,这些粘性培养物不能进一步发育成胚。此后 Bonga^[7]用冷藏方法继续从事此项研究将嫩梢作为外植体诱导胚性愈伤组织,但未见体细胞胚胎发生成功的报道。

2.2 接种方法

Thompson 等^[2]在西部落叶松体细胞胚发生的试验中,幼胚的接种方法有以下几种:(1)直接用幼胚,没有附带雌配子体的组织;(2)幼胚附带一半雌配子体(纵向切割雌配子体);(3)幼胚附带一半雌配子体的珠孔;(4)幼胚连同雌配子体直接培养。连同雌配子体直接培养的幼胚一直没有形成胚性培养物,而没有附带雌配子体组织的幼胚其胚性培养物诱导频率最高为32%。

2.3 培养基和培养条件

Chalupa^[8]用欧洲落叶松未成熟的合子胚进行诱导,接入改良的MS培养基中,2,4-D为 2.0 mg L^{-1} ,BA为 $0.4 \sim 0.8 \text{ mg L}^{-1}$,诱导出的胚性培养物接入BA为 0.1 mg L^{-1} 、ABA为 0.5 mg L^{-1} 的培养基中,培养一段时期后转入无激素的培养基中,最终体细胞胚在无激素的培养基中形成。Kim Yong Wook 等^[9]用日本落叶松未成熟胚在LM、LP和MS培养基上诱导出胚性愈伤组织,其中2,4-D为 $9.0 \mu\text{mol L}^{-1}$,BA为 $4.4 \mu\text{mol L}^{-1}$,诱导频率与采集日期相关,7月30日采集的胚在LM、LP和MS培养基上的诱导频率分别为60%、67%和59%; $4.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ABA处理诱导成熟体细胞胚数最高,高浓度ABA与长时间处理没有增加成熟体细胞胚数,但影响了体细胞胚的早期萌发,共形成400个体胚苗,72株移植于土壤中,其中69株成活。

Klimaszewska^[3]首次用F₂代杂种未成熟胚诱导获得胚性培养物,并对不同发育时期的合子胚形成胚性培养物的能力进行了研究,三种诱导培养基分别为:DCR附加 50 mg L^{-1} 谷胺酰胺和 500 mg L^{-1} 水解酪蛋白;LM附加 500 mg L^{-1} 谷胺酰胺和 1000 mg L^{-1} 水解酪蛋白;MSG附加 1460 mg L^{-1} 谷胺酰胺,这些培养基再添加2%蔗糖、 2 mg L^{-1} 2,4-D和 0.5 mg L^{-1} BA。浓度高(>1.2%)或浓度低(<0.6%)的琼脂易使继代的培养物褐化,高浓度(>0.5%)或低浓度(<0.1%)凝胶也是如此,琼脂浓度1.0%和凝胶浓度0.4%比较适宜。使用凝胶比琼脂好,但1/2MSG培养基除外,凝胶有聚合Mg²⁺离子的作用,降低了组织中Mg²⁺离子的有效性,即使在1/2MSG培养基添加MgSO₄也没有明显效果。胚性培养物在 0.1 mg L^{-1} ABA、 0.2 mg L^{-1} KT的MSG培养基上培养3周,随后在没有生长调节剂的MSG培养基上继续培养6周,获得了体细胞胚,最多为74个,体胚在没有激素的培养基上萌发,获得了35株小苗,移植成活。

Lelu 等^[25,26]研究了杂种落叶松合子胚不同的发育阶段对胚性培养物诱导频率的影响。使用了两种诱导培养基,一种为MSG培养基,另一种为BM3培养基,添加了高浓度肌醇(1 g L^{-1})、谷胺酰胺(0.5 g L^{-1})、水解酪蛋白(0.45 g L^{-1})和琼脂(7 g L^{-1})。两个培养基都添加了 $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ 2,4-D和 $4.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA,诱导效应没有明显差别,但采种时期对诱导频率有明显的影响,其中5月31日采集的种子胚诱导频率最高。体细胞胚成熟诱导时,将胚性培养物置于16h/24h的光照下,培养基中IBA保持 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ 不变,调节ABA和蔗糖的浓度。没有ABA时, 0.1 mol L^{-1} 蔗糖诱导出绿色子叶的体细胞胚, 0.2 mol L^{-1} 使体细胞胚早萌发, 0.4 mol L^{-1} 抑制体细胞胚的发育。培养基中附加ABA($20, 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ 或 $60 \mu\text{mol L}^{-1}$)和蔗糖($0.1, 0.2 \text{ mol L}^{-1}$)获得的成熟体细胞胚与成熟合子胚相似,当ABA为 $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ 或 $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ 和蔗糖为 0.2 mol L^{-1} 时,获得的体细胞胚数量最大。ABA的浓度对体细胞胚以后的萌发和体胚苗的产生没有显著的影响,但ABA处理时间从3周扩展到5周显著地降低了体细胞胚萌发和

体胚苗的形成量。

Thompson 等^[2]在研究西部落叶松体细胞胚胎发生时,诱导培养基为 1/2LM 培养基附加 1 g L^{-1} 水解酪蛋白、 3.4 mmol L^{-1} 谷胺酰胺、 9.0 mmol L^{-1} 2,4-D、 2.2 mmol L^{-1} BA 和 0.4% 凝胶,继代培养基为去除 BA、含有 10% 原来浓度 2,4-D 的培养基,培养物置于 20℃ 暗室中培养。研究了不同浓度的 ABA 及其处理时间对 7 个胚性细胞系体细胞胚成熟诱导的影响,只有低浓度的 ABA 或不加 ABA 时,有 4 个胚性细胞系形成成熟体细胞胚。ABA 最适浓度为 $0.025 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,这远远低于其它针叶树种体细胞胚成熟诱导时的浓度。PEG₄₅₀ 和 ABA 组合也不能提高成熟体细胞胚数量,但能促进体细胞胚萌发。胚性细胞系每克鲜质量培养物最多能形成 30 个成熟体细胞胚,只有 1 个胚性细胞系形成的成熟体细胞胚能萌发形成体胚苗,盆栽后移入温室。

齐力旺^[12]首先在华北落叶松 (*Larix principis-rupprechtii* Mayr) 体细胞胚发生方面作了研究,用未成熟胚作为外植体,愈伤组织诱导使用的培养基为 S 培养基,采用 311-A 最优回归设计,获得了 3 因子的最佳配比组合为 2,4-D (1.29 mg L^{-1})、KT (0.58 mg L^{-1}) 和 BA (0.39 mg L^{-1})。愈伤组织增殖培养基由 S 培养基更换为 S+B 培养基 (H_3BO_3 的浓度由 S 的 3.1 mg L^{-1} 增加到 7.75 mg L^{-1}),并添加了 NAA (0.11 mg L^{-1}) 激素,比较了 2,4-D 和 NAA 的效果。在诱导体细胞胚成熟时,采用 311-A 最优回归设计优选了最佳组合为 ABA ($18.9138 \text{ mg L}^{-1}$)、PEG₄₀₀₀ (88.8007 g L^{-1}) 和 AgNO_3 (10.7513 g L^{-1})^[13]。将成熟体细胞胚转入无激素的 WPM 培养基和 S 培养基中,置光照 1000~1600 lx 下培养 15~20 d,体细胞胚萌发,呈绿色,下胚轴伸长,25~30 d 再转接 1 次,60 d 后,形成完整小植株,WPM 培养基比 S 培养基的体细胞胚生根率高 2 倍以上。

2.4 体胚苗移植

Lelu 等^[10,11]将体胚苗移入玻璃广口瓶中,培养基质为沙子、蛭石和堆肥,按 1:1:1 配制,消毒后,用 0.1% 营养液 (N:P:K 为 20:20:20) 湿润。培养 1 个月后,将温度降为 20℃,瓶口打开 1 cm 间隙以便通气,随后逐渐增大瓶口间隙,1 个星期后,完全将瓶口打开。将驯化的体胚苗盆栽后移入温室,923 株体胚苗按以上程序培养后,893 株成活 (成活率 97%);而体胚苗不经过玻璃广口瓶的驯化,直接从萌发培养基中移到温室,491 株体胚苗有 423 株成活 (成活率 86%)。1992 年在法国 INRA 苗圃中栽植 1000 株体胚苗进行田间试验,至今这些体胚苗生长旺盛,没有出现异常情况。

3 落叶松体细胞胚胎发生技术的应用

3.1 超低温保存

体细胞胚胎发生技术为无性繁殖提供了很大的方便,在无性系选择期间可将其胚性培养物进行超低温保存。胚性愈伤组织置于 -196℃ 液氮中保存,可长期处于休眠状态而保持体细胞胚胎发生潜力,解冻后仍能继续培养形成植株。在一些林木树种的研究中显示这种胚性愈伤组织超低温保存系统是可行的^[14,15],随着体细胞胚胎发生技术的大规模发展,超低温保存将成为常规技术。

Klimaszewska 等^[16]首次用欧日杂种落叶松胚性培养物进行超低温保存获得成功,挑取块状胚性愈伤组织置于液体培养基中,剧烈摇晃将组织散开,用 74 μm 网孔的尼龙网过滤悬浮液,从网

孔中收集 0.5 g (鲜质量) 组织放置烧瓶中, 添加含有不同浓度的二甲基亚砜 (DMSO) 及 D-山梨醇的 10 mL 液体培养基, 烧瓶振荡 20~24 h。从悬浮液中取出 1 mL 样本移入 1.2 mL 的低温小瓶中, 按 0.33 min^{-1} 的降温速度冷却到 -40 后浸入液氮中保存。经过一段保存期后将低温小瓶取出, 在 $37 \sim 42$ 温水中旋转解冻, 将小瓶中的物质倒入圆形过滤纸上, 随后将过滤纸置于固体培养基的表面进行再培养。山梨醇浓度为 $0.2 \sim 1.0 \text{ mol L}^{-1}$ 时不抑制体胚苗生长, 2.0 mol L^{-1} 时对生长抑制很严重; 二甲基亚砜浓度高于 0.5% 时就抑制生长, 0.4 mol L^{-1} 的山梨醇和 10% 二甲基亚砜综合作用效果最佳, 能使解冻后的胚性组织中细胞迅速恢复活性。胚性培养物解冻 2 周后, 移入成熟培养基中, 9 周后形成成熟体细胞胚。田间试验显示低温保存的胚性培养物解冻后再生的体胚苗与没有经过冷冻的直接诱导的体胚苗表现一样。

3.2 原生质体培养

Klimaszewska^[17] 用欧日杂种落叶松体细胞胚胎发生试验中获得的两个细胞系来制备原生质体。将细胞系在 0.4 mol L^{-1} 甘露醇 + 10 mmol L^{-1} CaCl_2 + 5 mmol L^{-1} MES ((2-CN-吗啉代) 乙磺酸) + 0.1% Macerace pH 值 5.8 的溶液中预处理 1 h, 随后置于 0.4 mol L^{-1} 甘露醇 + 0.5% 纤维素酶 R-10 + 0.5% Macerozyme + 10 mmol L^{-1} CaCl_2 + 5 mmol L^{-1} MES pH 值 5.8 的溶液中处理, 用尼龙筛过滤和离心将原生质与残渣分开, 球形原生质体从离心管中取出后在含有 0.4 mol L^{-1} 甘露醇、去蔗糖的培养基中冲洗, 用不连续 Percoll 浓度梯度离心分离, 在暗室 25 下培养 12 d, 此后每隔 10 d 注入新鲜的液体培养基, 第 1 次用 0.2 mol L^{-1} 甘露醇, 第 2 次 0.1 mol L^{-1} , 第 3 次不加甘露醇。保持培养物生存能力的关键因素有: (1) 逐渐降低高渗物质的浓度, 降低渗透压; (2) 每个培养皿中的原生质体的悬浮液要小于 2.5 mL; 8 周后培养物接入 2 mg L^{-1} 2,4-D、 0.5 mg L^{-1} BA 和 0.4% 凝胶的 MSG 培养基上, 2~3 周后形成大量胚性培养物, 再移入成熟培养基中。获得 5 株体胚苗, 移植于土壤中继续生长。

Thompson 等^[2] 在西部落叶松的原生质体制备中, 将培养液倒入培养皿 5 mm 进行培养, 西部落叶松的原生质体这种浅层悬浮培养方法效果好, 培养 3 周后原生质体再生体细胞胚。Zoglauer K 等^[18] 将欧洲落叶松原生质体通过体细胞胚胎发生进行植株再生, 比较了各种各样组织的原生质体, 仅有胚性原生质体进行细胞分裂, 而非胚性愈伤组织的原生质体只是再生相同的非胚性愈伤组织。雌、雄花序的营养组织中分离出很多原生质体, 茎轴幼嫩针叶中没有分离出原生质体。Korlach J 等^[19] 研究了欧洲落叶松原生质体直接通过体细胞胚胎发生的发育方式, 从悬浮的胚性培养物中分离出原生质体, 将其培养在尼龙网眼中的海藻酸盐上, $2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 2,4-D 和 IAA 能使单细胞伸长和液泡化, 但未见正常的胚性化过程。

3.3 基因转化

基因的遗传转化是落叶松体细胞胚胎发生的主要目的之一, 就目前的研究而言, 很难获得针叶树转基因植株的原因是不能将转化的细胞再生成完整植株。Huang Y 等^[20] 用野生型农杆菌 Ri11325 质粒感染欧洲落叶松下胚轴, 3~4 周后明显看到被感染膨大的茎部产生大量的毛根或不定芽等, 对照则没有; 显微扫描检测到农杆菌感染落叶松细胞, 转化测定冠瘿碱反应阳性, 用再生株针叶组织提取 DNA 进行 Southern Blot 检验证明转化是成功的。Klimaszewska K 等^[21] 进行了落叶松体细胞胚胎发生和遗传转化研究, 90% 以上的成熟胚在诱导培养基上是次生胚胎发生, 这种体细胞胚能被用于遗传转化。用金粉粒包裹 DNA 轰击, 只有 pBI₁₂₆ 产生两个转基因体系 (2D₁ 和 2D₂), 2D₁ 细胞系产生了幼芽、根、下胚轴和子叶, 独立表达了 gus 基因, 但

是没有更进一步的发育,2D₂系产生了转基因植株,PCR扩增表明再生植株中有其基因片段的存 在。Shin等^[22]用发根农杆菌介导法,将抗虫基因*B. t.*和抗除草剂基因*aroA*转入欧洲落叶松,获得了转基因植株,外源基因得到稳定的表达。

4 展望

落叶松体细胞胚胎发生研究已经取得了一定的进展,获得了较稳定的体细胞胚胎发生体系,并在此基础上进行了超低温保存、细胞悬浮培养、原生质体培养及遗传转化等方面的研究工作,为通过基因工程进行落叶松树种的遗传改良打下了基础。另外,在体细胞胚胎发生的形态学、生理生化和分子生物学等方面也都进行了一些研究^[23~27],探讨了体细胞胚胎发生的机理。但是,落叶松体细胞胚胎发生的研究仍存在着一些问题,例如,体细胞胚的诱导频率较低,在培养过程中一些细胞系会失去体细胞胚的发生能力;体细胞胚发生不同步化,在同一培养皿中不同发育阶段的体细胞胚同时存在,这是由于胚性细胞与二次胚的不断分化形成的。所以提高体细胞胚的诱导频率和实现体细胞胚发生的同步化是落叶松体细胞胚胎发生在生产上得以应用的前提,而其机理的研究是实现这个前提的基础。因而落叶松体细胞胚胎发生的进一步研究还是很有必要的,结合形态和超微结构的研究来探讨生长调节剂在体细胞胚胎发生过程中的作用,探讨落叶松体细胞胚发生的生化机制,进一步进行人工种子和基因转化的研究,分离与胚性发育相关的基因,进行体细胞胚胎发生分子机理的研究。这些研究将会促进对落叶松体细胞胚胎发生的调控能力,并使其应用价值和理论水平都能得到很大的提高。

参考文献:

- [1] 郑万均. 中国树木志(第一卷)[M]. 北京:中国林业出版社, 1983. 237~253
- [2] Thompson R G, von Aderkas P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch[J]. *Plant Cell Rep*, 1992, 11:379~385
- [3] Klimaszewska K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis[J]. *Plant Sci*, 1989a, 63:95~103
- [4] von Aderkas P, Klimaszewska K, Bonga J M. Diploid and haploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua* and their reciprocal hybrids[J]. *Can J For Res*, 1990, 20:9~14
- [5] Lelu M A, Klimaszewska K, Charest P J. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*[J]. *Can J For Res*, 1994(c), 24:100~106
- [6] Bonga J M. Somatic embryogenesis in explants from a 30-year-old *Larix decidua* tree[C]. Sixth Meeting Intern, Conifer Biotechn[A]. 1992(abstract)
- [7] Bonga J M. Frozen storage stimulates the formation of embryo-like structures and elongating shoots in explants from mature *Larix decidua* and *L. X eurolepis* trees[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1996, 46(2):91~101
- [8] Chalupa V. Larch (*Larix decidua* Mill.) [J]. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees*, 1991, 16:446~470
- [9] Yong Wook Kim, Yang Youn, Eu Rae Noh, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature Zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*) [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1999, 55:95~101
- [10] Lelu M A, Bastien C, Klimaszewska K, et al. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*): Part . Somatic embryo maturation[J]. *Plant Cell Tissue Cult*, 1994(a), 36:107~115
- [11] Lelu M A, Bastien C, Klimaszewska K, et al. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*): Part . Control of germination and plantlet development[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1994(b), 36:117~127
- [12] 齐力旺, 韩一凡, 李玲. 华北落叶松体细胞胚发生及植株再生实验系统的建立[J]. *实验生物学报*, 2000, 33(4):357~365

- [13] 齐力旺,韩一凡,李玲.应用 311-A 最优回归设计研究 ABA、PEG₄₀₀₀及 AgNO₃ 对落叶松体细胞胚发生数量的影响[J].生物工程学报,2001,17(1):84~89
- [14] Dumet D,Engelmann F,Chabrilange N,et al. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) somatic embryos involving a desiccation step[J]. Plant Cell Rep,1993,12:352~355
- [15] Laine E, Bade P, David A. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*[J]. Plant Cell Rep,1992,11:295~298
- [16] Klimaszewska K, Ward C, Cheliak W M. Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix ×eurolepis*) and black spruce (*picea mariana*) [J].J Exp Bot,1992,43:73~79
- [17] Klimaszewska K. Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix ×eurolepis*[J]. Plant Cell Rep,1989b,8:440~444
- [18] Zoglauer K,Dembny H,Behrendt U. Plant regeneration from protoplasts of *Larix decidua* by somatic embryogenesis[J]. Wissenschaftliche Zeitschrift der Humboldt Universitaet zu Beilin Reihe Mathematik Naturwissenschaften,1992,41(3):51~62
- [19] Korfach J,Zoglauer K. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplast cultures of European larch (*Larix decidua* Mill) [J]. Plant Cell Reports,1995,15(3-4):242~247
- [20] Huang Y,Diner A M,Karnosky D F. Agrobacterium rhizogenes mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*[J]. In vitro cellular & developmental biology plant,1991,27(4):201~207
- [21] Klimaszewska K,Devantier Y,Lachance D,et al. *Larix laricina* (Tamarack): Somatic embryogenesis and genetic transformation[J]. Can J For Res,1997,27(4):538~550
- [22] Shin D I, Pbdila G K, Huang Y, et al. Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance[J]. Can J For Res,1994,24:2059~2067
- [23] Stasolla C,Kong L,Yeung E C,et al. Maturation of somatic embryos in conifers:morphogenesis,physiology,biochemistry and molecular biology[J]. In vitro Cell Dev Biol-Plant,2002a,38:93~105
- [24] von Aderkas P,Rohr R,Sundberg B,et al. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap,storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos[J]. Plant Cell Tiss Org Cult,2002,69:111~120
- [25] Jourdain I,Lelu MA,Label P. Hormonal changes during growth of somatic embryogenic masses in hybrid larch[J]. Plant Physiology and Biochemistry(paris),1997,35(9):741~749
- [26] Pitel J A,Yoo B Y,Klimaszewska K,et al. Changes in enzyme activity and protein patterns during the maturation phase of somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix ×eurolepis*) [J]. Can J For Res,1992,22(4):553~560
- [27] Cairney J,Xu X,Pullman G S,et al. Natural and somatic embryo development in loblolly pine: gene expression studies using differential display and DNA arrays[J]. Appl Biochem Biotech,1999,77-79:5~17

The Current Status of Larix Somatic Embryogenesis Research

LU Shoufang, ZHANG Shou gong, QI Li-wang, SUN Xiaomei, WANG Jian-hua

(Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: The current status of *Larix* somatic embryogenesis research was summarized, including *Larix deciduas*, *Larix leptolepis*, *Larix ×eurolepis* and *Larix ×leptoeuropaea*, *Larix occidentalis* and *Larix principis-rupprechtii*. Cryopreservation, protoplasts and gene transformation were described too. In conclusion, further development studies of *Larix* somatic embryogenesis remain to be done.

Key words: *Larix*; somatic embryogenesis; cryopreservation; protoplasts; gene transformation