

## 植物组织培养中畸形胚的发生和控制

孔冬梅<sup>1,2,\*</sup>, 沈海龙<sup>3</sup>

<sup>1</sup>山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006; <sup>2</sup>东北林业大学<sup>2</sup>生命科学学院, <sup>3</sup>林学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

## Formation and Control of Abnormal Somatic Embryogenesis in Plant Tissue Culture

KONG Dong-Mei<sup>1,2,\*</sup>, SHEN Hai-Long<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; <sup>2</sup>College of Life Science, <sup>3</sup>College of Forestry, Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

摘要: 文章介绍植物组织培养中畸形胚的常见类型、发生原因、发生机制、调控手段及畸形胚成苗等研究进展。

关键词: 体细胞胚发生; 形态建成; 畸形胚

体细胞胚胎(以下简称体胚)发生是植物体细胞在离体培养条件下再生植株的一条基本途径。随着体胚发生研究的不断深入, 已从至少100种植物中诱导出了体胚(陈金慧等2003)。但由于多数植物体胚发生中还存在这样或那样的问题, 致使体胚发生的实际应用受到限制。畸形胚的形成是植物体胚发生中甚为普遍的现象之一。例如, 我们曾从水曲柳(*Fraxinus mandshurica*)的成熟和近成熟合子胚获得约30%的体胚诱导率, 但这些体胚中绝大多数发育时呈现畸形, 不能萌发成苗(孔冬梅等2006)。畸形胚由于其形态、生理异常, 难以发育成苗或不能移栽成活, 严重制约了体胚发生技术在生产和育种中的应用。此现象已引起人们的普遍关注。本文就植物组织培养中畸形胚的常见类型、发生机制及调控手段的研究进展作介绍。

### 1 畸形胚的形态表现

体胚发生发育过程中产生畸形是相当普遍的, 根据其形态大致可分为以下几种类型(邝哲师等1996; 刘德华等1999; 亓建飞等2004; 陶铭2001; 郑泗军等1993)。

**1.1 连体胚** 2个或多个体胚相互联合在一起, 形成双生胚或多生胚。体胚之间的联合可以发生在胚轴、子叶或胚根部位, 甚至2到多个胚之间从头到尾均联合在一起, 从而形成复杂的连体胚现象。连接部分较少的连体胚用机械的方法容易分开, 连接

部位较多的则不易分开。

**1.2 子叶畸形胚** 包括子叶形态畸形和子叶数目畸形两种, 具体表现为子叶发育不全、过小, 甚至无子叶; 子叶数目减少或增加, 或子叶连合形成喇叭状, 或子叶过度生长、膨大, 形成超度含水态等。

**1.3 重新愈伤组织化的体胚** 体胚切割或受创伤时, 在含有较高浓度生长素或细胞分裂素的培养基上很容易重新愈伤组织化。愈伤组织化可以发生在体胚的任何发育时期、任何部位, 甚至整个胚体都可以重新愈伤组织化, 致使胚停止发育。未受创伤的体胚在一定条件下也可以重新愈伤组织化。

**1.4 超度含水态胚** 也称玻璃化胚。整个体胚肿胀畸形, 呈半透明状, 其形态结构类似于超度含水态苗。超度含水态胚的子叶加厚或变薄, 常过度生长、膨大, 胚芽、胚根很少发育。

**1.5 白化胚** 体胚子叶的全部或局部失绿而形成白化胚, 萌发后形成白化苗。

**1.6 生长点畸形胚** 包括以下3种情况。(1)单极胚: 无茎尖生长点或无根尖生长点, 一般单芽极体胚成苗率比单根极高;(2)多极胚: 由至少2个芽生长点和根生长点构成, 以芽多极胚最多见, 萌发后往往

收稿 2008-06-11 修定 2008-09-04

资助 山西省自然科学(青年)基金(2008021042)和山西大学青年科技基金(2007108)。

\* E-mail: kdongmei@sxu.edu.cn; Tel: 0351-7010599

形成多头苗; (3)无极胚: 没有胚根和胚芽, 由于没有生长点, 一般不能发育成植株。

**1.7 其它类型的畸形胚** 以上是比较典型的畸形胚类型。由于植物种类繁多, 在复杂的培养条件下畸形胚的形态也往往复杂多样, 无法用上述几种类型来归类。如棉花(*Gossypium hirsutum*)组织培养中, 所形成的体胚的胚轴多种多样, 有的细长, 有的粗短, 有的扁平, 有的呈纺锤形, 形态各异, 只有胚轴均匀细长者才是正常的体胚(张宝红等 1996)。

事实上, 更多的畸形胚会同时表现多种类型复合的特征。最常见的复合类型就是子叶畸形与芽分生组织缺失相伴。而同一种植物, 也往往在同一培养体系中表现多种异常形态。这为研究畸形胚的发生及控制带来困难。尽管如此, 近年来对畸形胚的发生原因和控制的研究还是取得了不少进展。

## 2 畸形胚发生的原因

畸形胚的发生与遗传背景、培养基成分和培养环境等多种因素有关。

**2.1 外源植物激素和生长调节物质** 外源激素和生长调节物质是影响畸形胚发生的主要因素之一。大多数植物, 如香蕉(*Musa sapientum*)、水稻(*Oryza sativa*)、香根草(*Vetiveria zizanioides*)和一些松属(*Pinus*)树种等, 较高浓度的 2,4-D 是这些植物体胚发生所必需的。2,4-D 作为强效生长素, 在胚性愈伤组织的长期继代培养过程中所导致的变异有累积效应, 影响体胚的发生并且导致畸形胚的产生。其它类型的生长素和细胞分裂素的类似物如 NAA 和 6-BA 对体胚诱导也有类似的效应, 即长期处在高浓度的生长素和细胞分裂素和它们的类似物的培养基中可导致畸形胚的发生。

乔琦等(2005)在防风(*Saposhnikovia divaricata*)体胚诱导研究中发现, 当长期用  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 进行胚性愈伤组织的继代培养, 和分化培养基中生长素和细胞分裂素类物质的任何之一或二者均超过诱导培养基所用的浓度时, 体胚的发生率即大大降低, 并且产生大量畸形胚, 如多子叶胚、连体胚、玻璃化胚和喇叭形胚等。菠萝(*Ananas comosus*)叶基愈伤组织诱导体胚产生的最佳 2,4-D 浓度为  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 当 2,4-D 浓度在  $7.0\sim 11.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 畸形胚比率即随着 2,4-D 浓度的增加而大幅度增加; 2,4-D 浓度达到或超过  $11.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时产生的体胚即不能萌发(何业华等 2007)。大豆(*Glycine max*)畸形胚的

发生也与 2,4-D 有直接关系(Buchhelm 等 1989)。高浓度的 NAA 能促进菠萝叶基胚性愈伤组织产生体胚, 但高浓度 NAA 得到的体胚多为畸形胚, 很难继续增殖, 且在萌发时只生根不发芽(何业华等 2007)。周志国等(2007)报道萝卜(*Raphanus sativus*)小孢子培养基中添加 6-BA 可以显著提高体胚的诱导率, 6-BA 在促进小孢子分裂形成体胚的同时畸形胚也明显增加, 并对体胚进一步分化成苗有抑制作用。

赤霉素类( $\text{GA}_3$ )对陆地棉等少数植物体胚发生有一定的促进作用。但  $\text{GA}_3$  必须控制在一个低浓度的范围, 浓度过高也会导致畸形胚的发生(吴蝴蝶等 1997; 张宝红等 1996)。

**2.2 培养基成分** 早期培养基中添加 L-脯氨酸可以明显促进月季(*Rosa hybrida*)2 个品种的叶柄或根发生体胚, 但在体胚成熟培养阶段, 添加 L-脯氨酸则诱发单子叶和融合子叶胚的产生, 且畸形胚发生率与 L-脯氨酸的浓度呈正相关, 这些胚均不能正常萌发(Marchant 等 1996)。

**2.3 培养条件和方式** 玻璃化胚的形成与培养容器内的湿度有密切关系, 封口膜的透气性差时容易产生玻璃化胚, 这种体胚多半不能发育成正常植株。连续在黑暗下培养, 茶树(*Camellia sinensis*)子叶的畸形胚发生率高; 在光照下培养的茶树子叶外植体, 其畸形胚发生率明显降低, 且在子叶片上形成畸形胚的数量也少(刘德华等 1999), 说明光照对体胚的形态建成也有一定的影响。

**2.4 继代时间和次数** 培养时间是造成体胚畸变的一个重要原因。实验证明, 随着胚性愈伤组织培养时间的延长和继代次数的增多, 体胚变异频率逐渐升高, 再生能力逐渐下降。薛美凤等(2002)观察‘川棉239’胚性愈伤组织不同培养时间产生体胚的结果表明, 随着培养代数的增加, 畸形胚发生频率有呈逐渐升高的趋势, 最高可达 90% 以上。在连体胚、无级胚、单级胚、多级胚、子叶畸形胚、胚轴畸形胚、玻璃化胚、白化胚和重新愈伤化胚等多种畸形胚中, 除连体胚有可能进一步发育长成再生植株外, 其它类型的胚均难以发育成正常苗。

**2.5 其它因素** 一般认为次生胚发生是体胚增殖的一种方法, 但次生胚的不断产生可能会影响初级胚本身的正常发育, 最终发育成畸形(Popescu 1996)。此外, 不同种或不同品种, 或基因型不同, 畸形胚发

生潜力也不同, 如陆地棉(李克勤等 1991)。

### 3 畸形胚的发生机制

近年来, 采用各种先进的仪器和技术手段, 从细胞学、生理生化、基因表达调控等角度研究植物体胚发生机制的进展虽然迅速, 但对体胚形态变异的机制了解还很少(Ibaraki 等 2000; 亓建飞等 2004)。

**3.1 畸形胚的形态建成** 为了了解体胚形态异常的机制, Ibaraki 等(2000)连续观察胡萝卜体胚形成过程的结果表明, 一些胚性细胞团是由几个相互独立生长的部分组成的, 如果两个部分联合形成一个体胚, 则偶尔会看到卷曲和肿块状的异常胚形成。据此认为一个胚性细胞团内不同部分的联合是胚卷曲或膨大的原因之一。因此他们认为, 收集只有一个组成部分的胚性细胞团或分离一个胚性细胞团的不同部分, 培养形态上整齐一致的高质量体胚的几率即会大一些, 但有关这一方法的具体实施目前还是未知数。Halperin (1966)还观察到小的胚性细胞团( $<45 \mu\text{m}$ )只形成单个胚, 而大的胚性细胞团( $>45 \mu\text{m}$ )可以形成多个体胚, 这些胚的一端融合在一起, 即为连体胚。后来有人研究也发现, 原胚复合物离解成单个原胚的效率和原胚本身的大小是影响体胚群体中各类胚比例的主要因素, 较小的原胚可以顺利地进行体胚各个阶段的发育; 如果过大, 分化培养基中即会形成两个生长中心, 从而发育成双头胚甚至多重胚; 如果原胚增大部位发生在芽端, 则在带根的胚轴中即形成两个苗芽(沈海龙 2005)。因此认为每个胚性细胞团的大小与最终形成体胚的数量和形态可能有关系。

**3.2 畸形胚发生的组织学** 胚胎发生过程中内部组织的分化是在球形胚到心形胚的过度阶段发生的(Kaplan 和 Cooke 1997), 内部组织分化的异常有可能表现为外部形态上的畸形。正常胚胎在心形胚以后的胚轴内可见到呈“Y”形状分布的维管束, 此种维管束从茎顶端的两侧一直延伸到根端, 其形成层最为明显。位于子叶基部的顶端分生区很明显, 其组成细胞的核明显大于周围细胞; 根端也具有明显的顶端分生组织和根冠。而畸形胚往往没有茎顶端分生区, 胚轴内也无清晰的形成层(Choi 等 2001), 甚至没有茎维管束的分化(孔冬梅等 2006)。

畸形胚的形成与原胚结构发育的顺序不正常有关。正常的分化和发育通常是按细胞分裂、细

胞增大和分化的顺序, 这种顺序对于形态发生的结果影响很大。Ammirato (1983)从细胞学角度总结过子叶发育畸形的几种发生情况认为: 一般双子叶植物体胚子叶的形成是由原胚经过一系列的细胞分裂实现的, 其中一圈细胞形成“子叶托”, 并出现两个生长中心, 由此发育出两个子叶原基; 如果出现过多的细胞分裂或过早的细胞增大, 这种“子叶托”细胞的结构即受影响, 可能形成多个生长中心, 发育出多个子叶; 如果形成子叶托的细胞分裂过少, 最后则只能形成一个子叶; 如在子叶托形成, 甚至在子叶原基发生之后, 细胞分裂活动仍旺盛进行, 子叶发育即会彼此连成一片; 如果细胞分裂活性过低, 细胞液泡化即过早出现, 从而导致子叶发育停止。

**3.3 畸形胚发生中的细胞学变异** 畸形胚是遗传变异的一个重要表现。一般认为, 间接发生途径比直接发生途径所产生的体胚更容易产生变异, 这无疑与愈伤组织的形成有关。

细胞学研究表明, 染色体变异是植物体细胞无性系变异的主要来源之一。在离体培养条件下, 染色体的变异主要发生在愈伤组织及其继代培养过程中。邝哲师等(1996)观察继代培养一段时间的荔枝(*Litchi chinensis*)幼胚胚性愈伤组织的细胞组织的结果表明, 胚性愈伤组织细胞中存在大量染色体数目变异, 有整倍性, 也有非整倍性的变异。棉花继代培养6个月以上的胚性悬浮系中胚性愈伤组织细胞也存在大量染色体数目和结构的变异, 有从二倍到六倍体的整倍性变异, 也有16~78以上的非整倍性变异, 在有丝分裂间期存在着多核和微核, 中期出现环状染色体、末期染色体桥等结构产生变异(郑泗军等 1993)。因此这些植物胚性愈伤组织中细胞染色体变异可能是导致大量畸形胚形成的原因之一。陈发菊等(2007)的研究也表明, 胚性愈伤组织细胞在染色体水平上的变异, 可能是瘦椒树(*Tapiscia sinensis*)畸形胚产生的根本原因。另有研究表明, 染色体数目变异与培养时间也有很大关系(郭晓红等 2001; 叶新荣和余毓君 1989)。

**3.4 畸形胚发生的位置** 茶树子叶柄的切口附近畸形胚的发生有位置效应, 即在子叶柄切口附近处正常胚分化率高, 越靠近子叶片, 畸形胚分化率越高, 甚至在子叶片上的不定胚几乎全部是畸形胚(肖海军等 2005), 这可能是细胞的位置效应所至, 其机制还有待进一步研究。

**3.5 畸形胚发生与内源生长素的极性运输** 胚性细胞的形成通常要求高浓度的生长素。胚性细胞一旦形成, 其后的形态发生和发育则要求一定水平的内源生长素梯度的极性分布, 任何影响内源生长素梯度分布的因素都会影响胚胎正常的形态建成。例如, 生长素极性运输抑制剂三碘苯甲酸(2,3,5-triiodobenzoic acid, TIBA)干扰胚性细胞团内生长素的极性运输可以影响体胚的形态建成和后期发育。刺五加(*Eleutherococcus senticosus*)体胚发生的研究表明, 早期球形胚时期用 TIBA 可影响胚轴和子叶的正常分化, 导致胚的愈伤组织化或子叶融合, 分化出子叶以后用 TIBA, 则具融合子叶的体胚既不生根也不长茎, 只有胚轴伸长(Choi 等 2001)。这表明, TIBA 不仅抑制胚轴形成和两侧对称性分化, 也抑制根/茎生长点的形成。有些研究结果还表明, 球形胚期形成的生长素的极性运输对体胚的进一步发育尤为重要(Liu 等 1993; 谢从华和柳俊 2004)。甘薯(*Ipomoea batatas*)体胚发生的研究表明, 体胚生理极性的建成先于形态极性(Chee 和 Cantliffe 1989); 而拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的一些缺失生长素极性运输的突变体在形态上则表现为根/茎生长点的缺失(Mayer 等 1993; Laux 等 1996; Aida 等 1997), 这些结果表明, 维持体胚内部一定水平的生长素的极性梯度分布, 对体胚正常的形态建成至关重要。

大多数植物体胚诱导阶段需要 2,4-D, 而体胚形成和发育阶段则需要去除 2,4-D, 否则体胚的正常分化即受抑制, 2,4-D 的这种抑制作用似乎也是由于内源生长素的梯度分布受到干扰所致(Choi 等 2001)。

**3.6 畸形胚发生的分子生物学** 体胚的形成和进一步发育决定于起始细胞的最初几次分裂。与细胞分裂、生长和分化的有序过程有关的遗传因素在胚胎发生的最初阶段非常重要, 这些遗传因素是畸形胚发生的主要原因之一(Popescu 等 1996)。荔枝的 RAPD 分析表明, 不同细胞系类型之间、白色正常胚与玻璃化胚之间的 DNA 分子标记存在差异, 这表明, 白色胚与玻璃化胚之间的差异不仅仅是生理性的, 其遗传基础也有不同(黄素华和赖钟雄 2006)。

#### 4 畸形胚发生的控制和转化

一般认为畸形胚在体胚发生的初期就已形成, 随着培养的进程而逐渐表现出来(张宝红等 1996),

因此对畸形胚发生的控制应在体胚发生的早期采取措施。有关控制畸形胚发生的研究还不是很深入, 大多通过调整培养基和改善培养环境来降低畸形胚发生率。

#### 4.1 畸形胚发生的控制

**4.1.1 调整生长调节物质的种类和浓度** 在有些裸子植物中, 培养基中加入适当浓度的 ABA, 胚发育不正常的情况, 如子叶合生和早熟发芽等均会受到抑制。加入适量的 ABA, 不仅能够抑制杂交鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)畸形胚的产生, 而且能够提高体胚的萌发率; 一旦球形胚形成以后, 立即转入不含任何生长调节物质的 MS 培养基上, 也能有效减少畸形胚的发生(陈金慧 2003)。胚性愈伤组织形成后降低 2,4-D 浓度, 或选用适当浓度 NAA 替代 2,4-D, 对降低一些植物畸形胚的发生率也有显著效果。盾叶鬼臼(*Podophyllum peltatum*)胚性愈伤组织在含有 2,4-D 的 MS 培养基上能够诱导体胚形成, 但形成的体胚在后期表现为子叶畸形或没有极性等, 若将胚性愈伤组织先放在含 ABA 的培养基中培养 3 周, 再转至不含生长调节物质的培养基上, 则体胚的后期发育即表现正常(Kim 等 2007)。适当浓度的 ZT 对于高频率诱导荔枝胚性愈伤组织分化正常胚至关重要(赖钟雄和桑庆亮 2003)。通过调整生长调节物质的种类和浓度来控制畸形胚的发生在防风、棉花中也有明显的效果(马骥等 2005; 乔琦等 2005; 迟吉娜等 2005; 许欣然等 2005)。

**4.1.2 制造一定的水分胁迫环境** 体胚发育后期一定程度的水分胁迫有助于体胚正常发育, 促进体胚成熟。在培养中, 通常通过增加蔗糖浓度、添加 PEG、用适当种类和浓度的固化剂等来提高渗透压, 或用直接干燥的方法造成水分胁迫, 从而减少畸形胚的发生。

在荔枝组织培养中, 胚性愈伤组织分化可形成白色胚和玻璃化胚, 白色胚的比例随着蔗糖浓度的增加而呈上升趋势, 蔗糖浓度为 20 和 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 白色胚所占比例分别为 60% 和 90% 左右, 蔗糖浓度提高到 60~90  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 白色胚可达 100% (赖钟雄和桑庆亮 2003)。在棉花的组织培养中, 胚性愈伤组织向胚分化时用 2.0、2.5 和 3.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  三种不同浓度的 Gelrite, 畸形胚的发生率分别为 4.0%、2.5% 和 2.0% (吴家和等 1999)。Kumria 等(2003)在固体培养基上铺上滤纸, 以使放在滤纸上的棉花胚性愈

伤组织处于一定的水分胁迫状态, 其体胚的正常发生和发育即受到明显的促进。

一定程度的水分胁迫促进胚的正常发育, 可能是由于此种条件下的胚性愈伤组织从培养基中吸收营养物质受到影响之果, 这种营养饥饿状态可能在一定程度上会促进胚性愈伤组织向胚分化, 进而促进苗的形成。

**4.1.3 调整培养基成分**  $\text{AgNO}_3$  对细胞染色体有稳定作用。  $\text{AgNO}_3$  可以抑制乙烯的形成或抑制其生理效应以及防止胚性愈伤组织由于体胚发育而丧失胚性, 在一些植物胚性愈伤组织长期继代保持中起关键性作用(赖钟雄等 2001)。另外, 在 MS 培养基中加入  $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的水解酪蛋白 CH, 同时将  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  减半和  $\text{KNO}_3$  加倍可显著降低棉花异常胚发生的比例(迟吉娜等 2005)。

**4.1.4 缩短培养时间** 培养时间也是造成表型变异的原因之一。因此, 要克服大量畸形胚的产生, 减小再生植株的变异频率, 就必须缩短培养时间, 用短期培养的胚性愈伤组织诱导体胚发生。

**4.1.5 调整接种和培养的方式** 调整接种胚性愈伤组织的密度、数量以及放置方法也能控制畸形胚的发生。如在防风体胚发生中, 减少接种密度并且将胚性愈伤组织按其颗粒的自然状态分割成较小的块, 或者先将胚性愈伤组织进行悬浮培养 24 h 后再转入固体培养基中, 便可以有效减少芽端畸形胚和连体胚的发生, 从而促进正常体胚的发生和发育(马骥等 2005)。控制高温高湿的出现以及选用透光良好、通气较好的培养容器也能有效减少多种植物的畸形胚发生。

**4.2 畸形胚的转化** 控制畸形胚发生的最终目的是为了得到正常健康的小植株, 但很多时候采取的各种措施并不一定收到明显的效果。尤其是在直接途径发生体胚、从球形胚到子叶胚的过度又特别快的情况下, 往往很难把握住措施的合适时期。如我们实验室培养的水曲柳子叶曾观察到, 从外植体表面产生早期原胚到子叶胚的形成只需 3 d 就可完成, 而且体胚的发生不同步(孔冬梅 2004), 很难找到畸形胚发生的有效控制途径。但如果能在体胚转化成苗过程中采取一定的措施, 促使畸形胚萌发后能得到正常的小植株, 也可以达到同样的目的。一些研究已查明, 体胚早期发育的不正常现象并不一定完全影响嗣后的器官建成和正常发育, 在后期

采取一定的措施促使一些类型的畸形胚转化为正常苗也是可行的(达克东等 2004; 冯大领等 2004; 王声斌等 2002; Loureiro 等 2005)。

通常柑橘(*Citrus*)体胚发育后期常会发生较高比例的畸形胚, 王声斌等(2002)将切割的宽皮橘蕉柑(*Citrus reticulata*)畸形胚放在  $\text{MT}+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{IAA}$  培养基上不断地继代培养, 可以诱导形成形态正常的丛生芽, 再将此幼芽放在  $1/2\text{MT}+1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}$  的生根培养基上培养 1 个多月后大部分能正常生根成苗。2,4-D 诱导的花生(*Arachis hypogaea*)畸形体胚较严重, 往往发育不全, 特别是没有茎生长点, 但这些体胚可在含有低浓度 BA、KT 和 TDZ 的培养基中萌发形成再生植株(梁丽琨等 2004)。枳椇(*Hovenia dulcis*)在体胚诱导培养基上只能形成无再生能力的畸形胚(Eom 等 2002), 而适当将培养温度提高至  $30^\circ\text{C}$  时, 这些畸形的初生胚上可以诱导出大量发育正常的次生胚, 这些次生胚在  $20^\circ\text{C}$  下大多能正常萌发和再生(李成浩等 2007)。经过调整培养方式或培养条件, 或对培养物进行适当处理后, 畸形胚可以正常成苗在棉花、花生、柑橘、爬山虎(*Parthenocissus tricuspidata*)和苹果(*Malus domestica*)中也都获得成功(张宝红等 1996; Chengalrayan 等 1997; 洪勇等 2000; 冯大领等 2004; 达克东等 2004)。利用畸形胚能够再次愈伤组织化并形成胚性愈伤组织这一特点可使陆地棉胚性愈伤组织的胚性至少保持 20 个月(迟吉娜等 2005), 这表明从畸形胚得到正常苗是可能的。

## 5 结束语

体胚的发生是一个复杂的过程, 研究这一问题仅仅局限于形态学和细胞胚胎学的直观描述是不够的, 还应该在已有研究基础上, 结合细胞胚胎学过程和体胚发育过程中的生理生化机制, 探讨体胚发生的分子生物学基础。近年来对组织培养中畸形胚的形态、发生和控制的研究已有了一定的基础, 但有关体胚发生的分子调控和机制的研究相对比较薄弱, 对畸形胚形成的根本原因还缺乏足够的了解。今后, 还应加强这方面的研究。

## 参考文献

- 陈发菊, 赵志刚, 梁宏伟, 熊丹, 李凤兰(2007). 银鹊树胚性愈伤组织继代培养过程中的细胞染色体数目变异. 西北植物学报, 27 (8): 1600~1604  
陈金慧, 施季森, 诸葛强, 黄敏仁(2003). 杂交鹅掌楸体细胞胚胎

- 发生研究. 林业科学, 39 (4): 49~53
- 迟吉娜, 马峙英, 韩改英, 李喜焕, 王彦霞(2005). 陆地棉组织培养体细胞胚胎发生技术改进. 棉花学报, 17 (4): 195~200
- 达克东, 张松, 臧运祥, 吴禄平, 束怀瑞(2004). 苹果离体叶片培养直接体细胞胚胎发生的形态学研究. 核农学报, 18 (2): 118~120
- 冯大领, 李云, 孙振元(2004). 爬山虎体细胞胚的发生及组织学研究. 北京林业大学学报, 26 (4): 97~99
- 郭晓红, 慈忠玲, 孙静(2001). 珍稀濒危树种 - 四合木组织培养过程中的染色体变异. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 22 (1): 55~59
- 何业华, 罗吉, 吴会桃, 王瑞霞, 高爱平, 赵春香, 余小玲, 叶自行, 王泽槐, 韩景忠等(2007). 菠萝叶基愈伤组织诱导体细胞胚. 果树学报, 24 (1): 59~63
- 洪勇, 何永睿, 梁丽, 陈善春, 张进仁(2000). 柑桔畸形胚再生植株的研究. 中国南方果树, 29 (6): 13~14
- 黄素华, 赖钟雄(2006). 荔枝体细胞胚性培养物的DNA提取方法和RAPD分析. 热带作物学报, 27 (4): 56~59
- 孔冬梅(2004). 水曲柳体细胞胚胎发生及体细胞胚与合子胚的发育[博士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- 孔冬梅, 沈海龙, 冯丹丹, 张莉杰(2006). 水曲柳体细胞胚与合子胚发生的细胞学研究. 林业科学, 42 (12): 130~133
- 邝哲师, 周丽依, 马雪筠, 陈俊秋, 曹静(1996). 荔枝组织培养中胚状体产生的类型及分析. 果树科学, 13 (增刊): 25~28
- 赖钟雄, 陈春玲, 黄素华, 桑庆亮, 潘东明, 陈振光(2001). 龙眼胚性愈伤组织长期继代培养及其染色体数目变异. 福建农业大学学报, 30 (1): 29~32
- 赖钟雄, 桑庆亮(2003). 荔枝胚性愈伤组织体胚发生系统的优化及转化抗性愈伤组织培养再生植株. 应用与环境生物学报, 9 (2): 131~136
- 李成浩, 刘宝光, 王伟达, 刘立琨, Yu Chang-yeon (2007). 温度对枳椇次生胚发生和植株再生的影响. 植物生理学通讯, 43 (3): 453~456
- 李克勤, 王喆之, 张大力, 郭德志, 郝联芳, 张苏峰, 沈志刚(1991). 陆地棉组织细胞培养的研究. 西北植物学报, 11 (2): 144~153
- 梁丽琨, 林荣双, 由翠荣, 王庆华, 肖显华(2004). 不同激素对花生离体分化的影响. 植物研究, 24 (2): 187~191
- 刘德华, 周带娣, 熊格生, 陈庆余, 李敏, 杨安元(1999). 茶树体细胞植株再生的光照效应. 湖南农业大学学报, 25 (2): 112~115
- 马骥, 乔琦, 肖娅萍, 王佩香, 王喆之(2005). 防风组织培养中畸形胚状体的发生和控制. 西北植物学报, 25 (3): 552~556
- 亓建飞, 李付广, 张朝军, 刘传亮(2004). 植物组织培养中畸形胚发生机理的研究进展. 棉花学报, 16 (4): 243~248
- 乔琦, 肖娅萍, 王喆之(2005). 外源激素对防风体细胞胚发生和发育的影响. 西北大学学报(自然科学版), 35 (3): 316~319
- 沈海龙(2005). 植物组织培养. 北京: 中国林业出版社
- 陶铭(2001). 组织培养中畸形胚状体及超度含水态苗的研究. 西北植物学报, 21 (5): 1048~1058
- 王声斌, 黄自然, 余让才, 王喆之(2002). 宽皮橘蕉柑的胚性愈伤组织诱导、悬浮细胞系建立及植株再生. 华南农业大学学报(自然科学版), 23 (3): 52~55
- 吴蝴蝶, 王泽云, 陈雄庭, 郑文茹, 谢玉萍(1997). 影响橡胶体细胞胚萌发成植株的几个因素. 热带农业科学, 17 (2): 5~8
- 吴家和, 罗晓丽, 肖娟丽, 巩万奎, 李燕娥, 李淑君(1999). Gelrite的浓度对棉花愈伤组织胚分化的影响. 中国棉花, 26 (8): 18
- 肖海军, 刘德华, 彭正云, 张丽霞, 向勤程, 唐道方(2005). 茶树子叶分化的研究. 福建茶叶, (4): 11~13
- 谢从华, 柳俊(2004). 植物细胞工程. 北京: 高等教育出版社
- 许欣然, 王清连, 姚长兵, 巩万奎(2005). 棉花优良品种中棉所27直接胚胎发生与植株再生. 河南农业科学, (7): 28~30
- 薛美凤, 郭余龙, 李名扬, 裴炎(2002). 长期继代对棉花胚性愈伤组织体胚发生能力及再生植株变异的影响. 西南农业学报, 15 (4): 19~21
- 叶新荣, 余毓君(1989). 小麦再生植株的变异研究: 再生植株当代(R1代)的细胞学和形态学变异. 遗传学报, 16 (2): 105~110
- 张宝红, 李秀兰, 李付广, 王武, 李凤莲(1996). 棉花组织培养中畸形胚的发生和转化. 作物学报, 22 (1): 107~111
- 郑泗军, 吴吉祥, 洪彩霞(1993). 棉花组织培养中畸形胚产生原因的分析. 浙江农业大学学报, 19 (2): 193~197
- 周志国, 龚义勤, 王晓武, 柳李旺, 张延国(2007). 不同萝卜品种游离小孢子的诱导及培养体系优化研究. 西北植物学报, 27 (1): 33~38
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. Plant Cell, 9: 841~857
- Ammirato PV (1983). Embryogenesis. In: Evans DA. Handbook of Plant Cell Culture, vol 1, Techniques for Propagation and Breeding. New York: Macmillan Publishing Co, 82~123
- Buchhelm JA, Colbum SM, Ranch JP (1989). Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. Plant Physiol, 89: 768~775
- Chee RP, Cantliffe DJ (1989). Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir. and production of individualized embryos. Plant Cell Tiss Org Cult, 17: 39~52
- Chengalrayan K, Mhaske VB, Hazra S (1997). High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. Plant Cell Rep, 16: 783~786
- Choi YE, Katsumi M, Sano H (2001). Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. Plant Sci, 160: 1183~1190
- Eom SE, Shin DY, Lee HY, Kim MJ, Kim JD, Choi WC, Heo K, Yu CY (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Hovenia dulcis* Thunb. Korean J Medicinal Crop Sci, 10: 41~45
- Halperin W (1966). Alternative morphogenetic events in cell

- suspensions. *Amer J Bot*, 53: 443~453
- Ibaraki Y, Matsushima R, Kurata K (2000). Analysis of morphological changes in carrot somatic embryogenesis by serial observation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 61: 9~14
- Kaplan DR, Cooke TJ (1997). Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. *Plant Cell*, 9: 1903~1919
- Kim YS, Lim S, Choi YE, Ramesh Anbazhagan V (2007). High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Podophyllum peltatum* L., an important source of anticancer drug. *Curr Sci*, 92 (5): 662~666
- Kumria R, Sunnichan VG, Das DK, Gupta SK, Reddy VS, Bhatnagar RK, Leelavathi S (2003). High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Rep*, 21 (5): 635~639
- Laux T, Mayer KFX, Berger J, Jürgens G (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122: 87~96
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant cell*, 5: 621~630
- Loureiro J, Pinto G, Lopes T, Dolezel J, Santos C (2005). Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta*, 221: 815~822
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Power JB (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Floribunda* rose (*Rosa hybrida* L.) cvs. Trumpeter and Glad Tidings. *Plant Sci*, 120: 95~105
- Mayer U, Buttner G, Jürgens G (1993). Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryo: studies on the role of gnom gene. *Development*, 117: 149~162
- Popescu CF (1996). Somatic embryogenesis and plant development from anther culture of *Vitis vinifera* (L.). *Plant Growth Regul*, 20 (1): 75~78