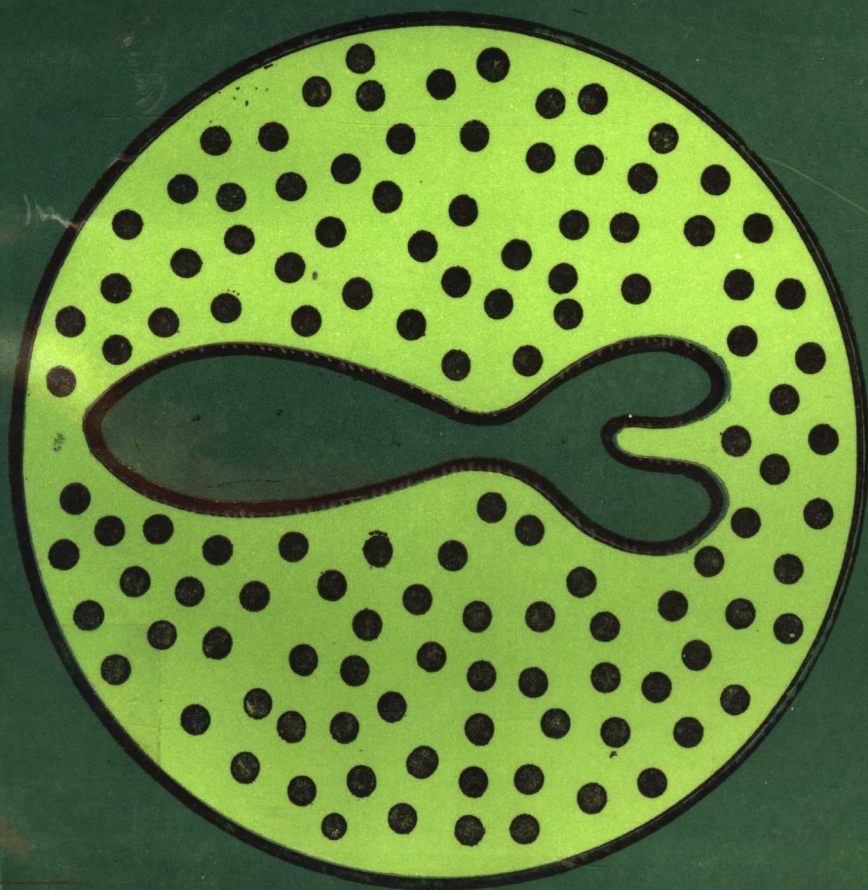


人工种子

陈正华 Kieth Redenbaugh 主编



高等教育出版社

人 工 种 子

陈正华 Kieth Redenbaugh 主编

高等教育出版社

内 容 提 要

本书是国内外“人工种子”方面的第一本专著,由中国科学院遗传研究所陈正华研究员任主编,美国植物遗传公司高级研究员、著名人工种子研制专家Dr. Kieth Redenbaugh任副主编。全书约13万字,共收集13篇文章,其中除“人工种子研究的进展”、“体细胞胚的包裹及人工胚乳”和“高频率体细胞胚胎发生”3篇由Dr. Kieth Redenbaugh撰写外,其余10篇为:“植物体细胞胚胎发生及其同步控制”、“植物体细胞胚胎发生的生理生化基础”、“木本植物人工种子的特殊问题及其应用前景”、“华腺萼木叶片形态发生及芽的包裹研究”、“桉树叶片培养的形态发生与人工种子的研究”、“赤桉再生植株体细胞染色体变异”、“油菜体细胞胚胎发生”、“高营养胡萝卜人工种子的制作、贮存、发芽及胚状体的机械筛选”、“芜荑叶柄离体体细胞胚胎发生”和“含外源基因的苜蓿人工种子的研制”,均为国内专家学者包括陈正华、郭仲琛、韩碧文、李修庆、朱激、李宝健等30余人近年来在人工种子方面的研究成果。

人 工 种 子

陈正华 Kieth Redenbaugh 主编

*

高等教育出版社出版

新华书店总店北京科技发行所发行

北京印刷一厂印装

*

开本850×1168 1/32 印张 5.25 字数 130 000

1990年7月第1版 1990年7月第1次印刷

印数0001—2100

ISBN 7-04-003007-1/Q·157

定价1.90元

前 言

“人工种子”在生物技术中有可能最快地应用于生产。提出人工种子这一术语至今仅十余年，而其研究的进展却是十分迅速的。

人工种子可不受季节环境的限制快速地繁殖一个良种，并且可以采用无病毒的材料进行繁殖，从而显著地提高作物的生长势及抗性，增加产品的产量，改进商品品质。对木本植物来说，用人工种子可不必等待漫长的有性世代，即可以快速繁殖优良性状的转基因植物推广到生产中去。此外，有些育性不佳的材料，难以保存的种质资源以及遗传性不稳定的材料，均可采用人工种子的方法得到繁殖。

人工种子体积小，贮藏运输方便，而且可以像天然种子那样用机械在田间直接播种。

但是，人工种子的研究刚刚起步，现在还没有在生产中真正应用，高质量繁殖材料的获得、人工胚乳及包裹材料的研究与开发，人工种子的干燥与贮藏，人工种子的遗传变异性等等，都还有待进一步研究。

1989年4月，中国遗传学会与中国科学院遗传所经济作物细胞工程试验室联合邀请国内外专家讲学，应邀参加人工种子讲习班的专家有美国 Keith Redenbaugh 博士、韩碧文教授、李宝健教授、郭仲琛研究员，李修庆副教授等。在讲习班报告的基础上，加上国内人工种子方面的一些研究成果，编写成此书。

中国遗传学会办公室安锡培同志是人工种子讲习班的主要组织者之一，他为本书的编写做了大量的工作。谷冬梅、阎玲同志为本书的稿件打字。中国科学院遗传研究所孙勇如、张世同先生对本

书的编写给予了极大的帮助。陈之征及袁开文先生在讲习班中担任了口译，袁开文及周霞仙先生翻译了K. Redenbaugh博士的两篇文章。我们在此对他们谨表深切的谢意。

陈正华

1989年10月

目 录

- 第 1 章 人工种子研究的进展 Kieth Redenbaugh (1)
- 第 2 章 体细胞胚的包裹及人工胚乳
Kieth Redenbaugh (13)
- 第 3 章 高频率体细胞胚胎发生 Kieth Redenbaugh (28)
- 第 4 章 植物体细胞胚胎发生及其同步控制
郭仲琛 桂耀林 柯善强 (45)
- 第 5 章 植物体细胞胚胎发生的生理生化基础 韩碧文 (56)
- 第 6 章 木本植物人工种子的特殊问题及其应用前景
陈正华 姚渝光 (69)
- 第 7 章 华腺萼木叶片形态发生及芽的包裹研究
陆永林 梁月群 陈正华 李文彬 关月兰 (87)
- 第 8 章 桉树叶片培养的形态发生与人工种子的研究
姚渝光 陈正华 张丽华 王文富 刘桂珍 (99)
- 第 9 章 赤桉再生植株体细胞染色体变异
谷爱秋 耿玉轩 姚渝光 朱保葛 (111)
- 第 10 章 油菜体细胞胚胎发生 王文富 陈正华 (119)
- 第 11 章 高营养胡萝卜人工种子的制作、贮存、发芽及胚
状体的机械筛选
李修庆 朱 澍 黄美娟 邓荣莲 牛小牧
陈兵元 刘 凡 陆承勋 张天宏 (129)
- 第 12 章 茺菱叶柄离体体细胞胚胎发生
刘淑兰 吴 新 韩碧文 (137)
- 第 13 章 含外源基因的苜蓿人工种子的研制 李宝健 (145)
- 附 录 本书采用的缩写 (162)

第1章 人工种子研究的进展

Kieth Redenbaugh

(美国植物遗传公司)

一、人工种子应用的潜力

建立并发展人工种子技术是为了快速地繁殖一个优良品种或杂种（特别是用手工生产的杂种一代种子），以保持它们的优良种性和整齐度。一些名贵品种、难以保存的种质资源、遗传性不稳定的或育性不佳的材料，均可采用人工种子的技术进行繁殖。特别值得提出的是通过遗传工程创造出的新型植物，如体细胞杂种或转基因植物，可用人工种子技术进行快速繁殖。人工种子体积小，仅几毫米，而通常离体快速繁殖所用的繁殖体是十几或几十厘米，繁殖体小的人工种子，贮藏和运输均十分方便，而且可以像天然种子那样用机械在田间直接播种。

二、人工种子的研究概况

1958年首次发现了体细胞胚胎的形成（Reinert, 1958; Steward, 1958）。直到20年后，人工种子（即经包裹的单个体细胞胚）的概念才见诸于文献报道。Murashige (1977) 在国际园艺作物组织培养讨论会上，提出了建立大规模、高速度无性繁殖技术的设想，并在论文集中写道：“采用这种无性繁殖技术必须特别快，每天可生产数百万植株，在经济上要胜过种子繁殖方法…”，

第二年才首次报道了人工种子的概念 (Murashige, 1978)。

在人工种子的研究中, 早期做出贡献的还有孟山都公司的 Walker, 他对苜蓿的人工种子进行了研究 (Walker 和 Sato, 1981)。同年, 美国碳化物联合会的 Lawrence, 也对芹菜和莴苣人工种子进行了研究。Lawrence (1981), 主要研究体细胞胚包装的液胶包埋带(fluid drilling)技术, 同时还利用聚氧乙烯制成种子带 (Laurence, 私人通讯)。1981年9月在纽约召开的“大规模无性繁殖方法的研究进展讨论会”上, Walker (1981) 和 Lawrence (1981) 探讨了一种廉价、大量繁殖蔬菜和农作物的技术, 讨论的重点集中在体细胞胚制成液胶包埋带或单粒人工种子上。

1986年 Gray 在美国加州召开的第22届国际园艺学会议期间组织了第一次人工种子的学术报告会, 会上报告的题目有: 合子的胚胎学及胚的成熟; 对自旋生物反应装置费用的评估; 用生物反应器生产体细胞胚; 体细胞胚的包装和胚的干燥等。

我们报道了用水凝胶囊(如藻酸钠)生产单胚人工种子 (Redenbaugh 等, 1984、1986), 此后, 越来越多的研究者试验了水凝胶囊的包裹法, 对这一方法将在下面评述。

(一) 液胶包埋法 (fluid drilling) (图1-1)

此法是将胚状体或小植株悬浮在一种粘滞的流体胶中直接播入土壤。Drew (1979) 提出, 要建立一种种植成批 (或许是几百万胚或小植株) 的技术。他把大量的胡萝卜体细胞胚放在无糖而有营养的基质上 (上加滤纸桥), 获得了3个小植株。他认为如果胚状体的质量能得到显著改善, 具有良好的光合作用能力, 便可能将胡萝卜体细胞胚用液胶包埋系统种植到田间去。但后来未见进一步的报道。

Baker (1985) 曾报道一种体细胞胚的液胶包埋方法, 他将胡萝卜的体细胞胚与蔗糖、激素及流体胶混合, 并播于温室中, 4%的胚活了7天, 后来胚因干燥而死亡。他认为蔗糖对胚状体

的存活很重要，在流体胶中如不含蔗糖，胚便不能存活。

(二) 干燥包裹法 (desiccated coating) (图1-1)

Kitto和Janick (1982) 在美国园艺科学协会第79次年会上，首次报道了用聚氧乙烯包裹胡萝卜的胚性悬浮物，其中含有细胞、细胞团、愈伤组织块及成熟的胚状体。一个十分有意义的结果是3%所包裹的干燥体细胞胚存活下来了，而未包裹的胚则都未存活。包裹的干燥胚重新水合后仍能发芽并生长。他们又报道了胡萝卜胚在高蔗糖及接种物（胚性悬浮物）高浓度下（冷处理、加或不加ABA），胚的存活率得到了提高，胚在重新水合后，重新生长并长出了真叶 (Kitto和Janick, 1985a、1986b)。Gray等 (1987)报道了将鸭茅的体细胞胚干燥至仅含13%水分，在23℃下贮存，成株率随贮藏时间加长逐渐降低。开始未经干燥未经贮藏

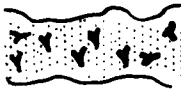
作物	概念	研究者
苜蓿 芹菜	 人工种子——包裹的胚	Redenbaugh等, 1984, 1986a、b、c
胡萝卜	 人工种子——干燥种皮 包裹——丛胚	Kitto和Janick, 1985a、b
鸭茅 葡萄	 干燥未包裹的胚	Gray, 1987, 1988
甘薯	 液胶包裹法——许多胚 包埋在液胶中	Baker, 1985

图 1-1 体细胞胚种植系统的研究

(Fujii 等, 1986、1987)

的成株率为32%，贮藏7天的为8%，干燥后贮藏21天的有4%，

他采用的干燥方法是將胚狀體放在空培養皿中，培養皿放在23℃相對濕度為 $70 \pm 5\%$ 的黑暗條件下，使胚逐漸干燥，干燥后胚發生了不同的變化。胚經干燥后體積均變小，但有些顏色變黃并易碎，它們的細胞壁被破壞了，這種胚不易發芽；只有那些白色不透光的、發育良好的胚，大小約為1—1.5毫米，可以發育成植株。過小或過大的胚均不能發芽。尽管試驗所得的成株率很低，貯藏期很短，但證明了體細胞胚可以干燥包裹，從而生產干燥的人工種子。此后，許多學者對體細胞胚干燥進行了研究（表1-1）。

表 1-1 體細胞胚干燥的研究

作 物	成株率(%)	处 理	文 献
苜蓿 (<i>Medicago sativa</i>)	33 21	干燥 未干燥	Fujii 和 Redenbaugh (未发表)
苜蓿 (<i>Medicago sativa</i>)	65 65	干燥 未干燥	McKersie, Senaratna, Bewley 和 Bowley (1988)
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	3 存活 0	用聚氧乙烯包裹 未包裹	Kitto 和 Janick (1982, 1985a, b)
芹菜 (<i>Apium graveolens</i>)			Janick (1988) Kim 和 Janick (1987)
葡萄 (<i>Vitis longii</i>)	20 34 5	干燥后贮藏21天 干燥后贮藏7天 干燥后不贮藏	Gray (1987, 1988)
鸭茅 (<i>Dactylis glomerata</i>)	4 8 32	干燥后贮藏21天 干燥后贮藏7天 不干燥不贮藏	Gray (1987)
大豆 (<i>Glycine max</i>)	30 60	干燥 不干燥	Obendorf 和 Slawinska (1986, 1988); Slawinska 和 Obendorf (1987)
小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)	50	干 燥	Carman, Jefferson 和 Campbell (1987, 1988)

(三) 水凝胶法 (hydrogel)(图1-1)

我们用水溶性胶囊来生产单胚的人工种子,如藻酸钠便是一种较好的包裹材料(Redenbaugh等,1986)。用它可包裹形成单胚苜蓿的人工种子,离体成株率高达86%。如种于温室中,成株率可达20%(Redenbaugh等,1986a、1986b、1987)。

我们用藻酸钠水凝胶包裹了几种作物的体细胞胚,列于表1-2,有关技术将在第2章详述。许多学者也进行了用藻酸钠包裹体细胞胚的研究(表1-3)。

表 1-2 在藻酸钙小球中包裹的作物

拉 丁 名	汉 名
<i>Apium graveolens</i> L.	芹菜
<i>Brassica species</i>	生长周期快的芸苔属的一些种
<i>Daucus carota</i> L.	胡萝卜
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	棉花
<i>Lactuca sativa</i> L.	莴苣(生菜)
<i>Medicago sativa</i> L.	苜蓿
<i>Zea mays</i> L.	玉米
<i>Oryza sativa</i> L.	水稻

(Redenbaugh等,1988)

Lutz等(1985)报道用水凝胶包裹胡萝卜体细胞胚,胚突破了包裹体而发芽,但是否长成植株则未见报道。他认为要采用一种生产体系(delivery system),胚质量的优劣是一个限制因子。Hama(1986)认为,人工种子是将一个不定胚与营养、抗菌素溶液及某种吸水的聚合材料共同包裹在一种水凝胶中。他按Redenbaugh的水凝胶包裹法,加入抗菌素及吸水聚合材料,包裹了胡萝卜的体细胞胚,10天之内人工种子可以突破种皮并正常发芽,但未报道是否形成正常植株。Kamada(1985)也用了藻酸钠的水凝胶系统,他用一个双连接管,一头含有胚、营养及激素的溶液,经过一个内管移动,同时藻酸钠沿外管移动,两种溶液在管口相

表 1-3 用水凝胶制备人工种子

作 物	成株率(%)	水凝胶包裹材料	文 献
苜蓿 (<i>Medicago sativa</i>)	90(离体)	各种水凝胶中	Redenbaugh等 (1984, 1986a, b, c)
石刁柏 (<i>Asparagus officinalis</i>)	未报道	藻酸钙	Yamakawa(1985), Nishimura(1986)
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	未报道	藻酸钙	Yamakawa(1985), Nishimura(1986)
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	未报道	未发表包裹胚的材料	Lutz 等 (1985)
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	50	藻酸钙	Kamada (1985, 1988)
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	有	藻酸钙 角叉胶 在蛭石上	Hama (1986)
芹菜 (<i>Apium graveolens</i>)	90(离体)	藻酸钙	Redenbaugh等 (1984, 1986b)
火炬松 (<i>Pinus taeda</i>)	0	藻酸钙	Gupta和Durzan (1987)
欧洲云杉 (<i>Picea abies</i>)	0	藻酸钙, 能发芽	Durzan 和Gupta (1988)

(Redenbaugh等, 1987a)

遇而形成小滴, 滴入氯化钙溶液中, 大约有一半包裹体含有胚。Gupta和Durzan(1987)用藻酸钠包裹了火炬松体细胞胚, 将包裹的胚贮存在4℃黑暗条件下4个月, 当转入有光的20℃条件时, 胚变绿, 证明它是存活的, 但未得到植株。

三、人工种子在不同作物中应用的可能性

大量繁殖体细胞胚并制成人工种子为无性繁殖开辟了崭新的领域。采用人工种子生产的作物可分为两种情况, 第一种是容易建立人工种子生产工艺的作物, 因有些作物已经建立了生产高质量的体细胞胚的技术, 如胡萝卜、苜蓿等(表1-4); 第二种是商

品价值很高，繁殖却很困难的作物，这些作物由于育性不佳，不能进行有性繁殖，或生产杂种种子费工而昂贵，或因其他原因而使种子价格昂贵（表1-4）。可以预料，首批商业性人工种子可能

表 1-4 可能生产人工种子的作物

1. 容易建立生产工艺的作物 (已具备体细胞胚胎形成体系)	2. 可能产生很高商品价值的作物 (每粒种子价值高)	3. 容易建立生产工艺与能产生高商品价值的作物
苜蓿 鸭茅 香菜 稷 胡萝卜 狼尾草属	石刁柏 凤仙花属 秋海棠 莴苣 嫩茎花椰菜 矮牵牛 花椰菜 菠萝 黄瓜 马铃薯 仙客来 水稻 黄花菜 菠菜 大蒜 甘蔗 天竺葵 烟草 扶郎花属 番茄 西洋参 西瓜 火炬松 花旗松	苜蓿 棉花 芹菜 油棕 咖啡 葡萄 玉米 芒果 柑橘 核桃

是那些能产生高质量胚的作物以及那些单粒种子成本高的作物。虽然已经有许多作物能够生产体细胞胚，但到目前为止，只有少数作物能够产生高质量的胚。还有些作物由于种子生产的成本高，采用人工种子技术十分重要，但却缺少体细胞胚胎发生系统。因此，只有少数作物具备使用人工种子技术的可能性及商业前景（表1-4中的第三类作物）。从商业的角度来看，虽然表1-4第三类中所列的作物是首先发展的对象，但表1-4中第一类的几种作物具有更佳的体细胞胚胎发生系统。

多数作物人工种子的利用取决于价格。以苜蓿体细胞胚为例，生产14日龄温室移植苗的费用为每株 3.3 美分（表 1-5），而人工种子本身的费用为 0.026 美分。许多作物的人工种子的生产费用都大大超过天然种子（如苜蓿天然种子每粒仅需花费0.0008美分）。因而人工种子必须在某一方面具有特殊的价值或对品种开发有某种特殊利益以证明所增加的费用是合算的。特殊的价值可以是多方面的，例如在利用人工种子后植株整齐一致（尽管至今在体细胞胚方面尚未完全得到证实），或植物遗传学特性得到改进，

表 1-5 根据苗圃模式系统³⁾用人工种子
生产 10^6 移植苗的费用估算

生 长 期	劳务费 (美元)	材料费 (美元)
愈伤组织生长(21天)	4.00	1.36
诱导(3天)	4.00	2.00
胚再生(28天)	4.00	2.00
成熟处理(21天)	4.00	2.00
包裹(1天)	112.00	28.00
温室内种植(1天) ²⁾	32.00	7 500.00
温室内生长(60天) ¹⁾	128.00	10 500.00
小计(直接费用)	288.00	18 035.36
合计		18 323.36
移植生产(间接费用)		4 000.00
一般管理费(占直接费用的60%)		10 994.02
每一百万株植株的总费用		33 317.38
每株费用		0.033

1) C. Sluis 协助于1986年7月作出的决算(私人通讯)。

2) 每400个填料穴的浅式苗床为3美元。

3) 每天每400株移植苗为7美分。

如增强抗病性, 改进了营养成分或改进了通过减数分裂产生的形态学上的不稳定性。因此, 为开发人工种子生产而选择哪一种作物, 必须考虑工艺过程及扩大生产时的全部费用, 并将它与采用人工种子后增殖的部分相比较是否合算才能作出决定 (Redenbaugh, 1986)。

四、结 论

据以上所述, 所谓人工种子, 即首先应该具有一个发育良好的体细胞胚 (即具有能够发育成完整植株能力的胚), 为了使胚能够存活并发芽, 也需要有人工胚乳, 还应有起保护作用的人工种

皮的包裹(图1-2)。为了制备出合格的人工种子,应进行下列几方面的研究:(1)大量生产发育正常的体细胞胚的技术;(2)人工胚乳及种皮的包裹材料,包括人工种皮的研
究;(3)人工种子生产的机械化;(4)人工种子的田间试验;(5)人工种子生产
的经济核算等。

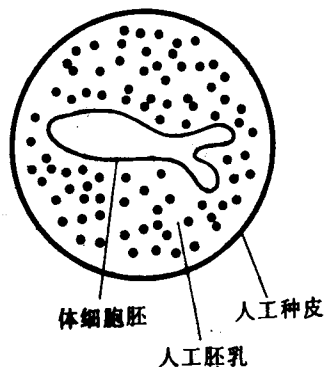


图 1-2 人工种子的概念

参 考 文 献

- [1] Baker, C. :1985. Synchronization and fluid sowing of carrot (*Daucus carota*) somatic embryos, MS Thesis. Ann.Arbor, University Microfilms.
- [2] Drew, R. :1979. The development of carrot (*Daucus carota* L.) embryooids (derived from cell suspension culture) into plantlets on a sugar-free basal medium, Hort. Res., 19:79—84.
- [3] Durzan, D. and P. Gupta:1988. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in conifers. In Biotechnology in Agriculture (A. Mizrahi ed.), Alan Liss, Inc., NY., p. 53—81.
- [4] Gray, D.:1987. Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration, HortSci., 22:810-814.
- [5] Gray, D.:1988. Effects of dehydration on quiescence and germination of grape somatic embryos, In Vitro Cell, Dev.Bio., 24:70A.
- [6] Gupta, P. and D. Durzan:1987. Biotechnology of somatic

polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine, Bio/Tech., 5:147-151.

- [7] Hama, I.: 1986. Artificial seeds, Japanese Patent Application No.40708/1986, Feb., 27 (in Japanese).
- [8] Kamada, H.: 1985. Artificial seed. In Practical Technology on the Mass Production of Clonal Plants (R. Tanaka ed.), CMC Publisher, Tokyo, p.48 (in Japanese).
- [9] Kamada, H., T. Kiyosue and H. Harada: 1988. New methods for somatic embryo induction and their use for synthetic seed production, In Vitro Cell, Dev. Bio., 24:71A.
- [10] Kitto, S. and J. Janick: 1982. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos, HortScience, 17:448.
- [11] Kitto, S. and J. Janick: 1985a. Production of synthetic-seeds by encapsulating asexual embryos of carrot, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 110:277-282.
- [12] Kitto, S. and J. Janick: 1985b. Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 110:283-286.
- [13] Lawrence, R. Jr.: 1981. In vitro cloning systems, Environ. and Exp. Bot., 21:289-300.
- [14] Lutz, J., J. Wong, J. Rowe, D. Tricoli and R. Lawrence Jr.: 1985. Somatic embryogenesis for mass cloning of crop plants, In: Tissue Culture in Forestry and Agriculture (R. Henke, K. Hughes, M. Constantin, A. Hollaender eds.), New York, Plenum Press, p. 105.
- [15] Murashige, T.: 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices, Acta Hort., 78:17-30.
- [16] Murashige, T.: 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. In Frontiers of Plant Tissue Culture 1978 (T. Thorpe ed.), The International Association for Plant Tissue Culture, University of Calgary, Alberta, Canada, p. 15-26.

- [17] Nishimura, S.: 1986. Somatic seeds. In *4th Tokai Regional Meeting for Biotechnology*, Nagoya, Japan, p. 12 (in Japanese).
- [18] Redenbaugh, K., J. Nichol, M. Kossler and B. Paasch: 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production, *In Vitro*, 3: 256—257.
- [19] Redenbaugh, K., B. Paasch, J. Nichol, M. Kossler, P. Viss and K. Walker: 1986. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos, *Bio/Technology*, 4:797—801.
- [20] Redenbaugh, K., J. Fujii, D. Slade, P. Viss and M. Kossler :1986. Synthetic seeds—encapsulated somatic embryos, 78th Annual Meeting of the American Society of Agronomy, in press.
- [21] Redenbaugh, K.: 1986. Delivery system for meristematic tissue, U. S. Patent, 4, 583, 320.
- [22] Redenbaugh, K.: 1986. Analogs of botanic seed, U. S. Patent, 4,562, 663.
- [23] Redenbaugh, K., D. Slade, P. Viss and J. Fujii: 1987a. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats, *HortSci.*, 22:803—809.
- [24] Redenbaugh, K., P. Viss, D. Slade and J. Fujii: 1987b. Scale-up: artificial seeds, In *Plant Tissue and Cell Culture* (C. Green, D. Somers, W. Hackett, D. Biesboer eds.), Alan Liss, Inc., NY., p. 473—493.
- [25] Redenbaugh, K., J. Fujii and D. Slade: 1988. Encapsulated plant embryos, In *Biotechnology in Agriculture* (A. Mizrahi ed.). Alan Liss, Inc., NY., p. 225—248.
- [26] Redenbaugh, K., D. Slade, P. Viss and M. Kossler: 1988. Artificial seeds: encapsulation of somatic em-