

植物体细胞胚胎 发生和人工种子

高学保 杜联林 主编



科学出版社

PLANT SOMATIC EMBRYOGENESIS AND ARTIFICIAL SEED

Edited by
Guo Zhongchen and Gui Yaolin

Science Press

1990

前 言

植物人工种子的研制近年来在国外普遍引起重视,美国、法国、日本等均相继开展此项工作。在欧洲共同体尤里卡的高技术发展计划中,人工种子研究也占有重要地位。我国自1985年以来,在国家科学技术委员会及其专家委员会的领导下,已将此项研究列为国家高技术发展的课题,并由中国科学院植物研究所、中国科学院遗传研究所、中山大学生物系、北京大学生物系等单位共同承担此项研究任务。

通过5年来的努力,我们除了对黄连、胡萝卜、芹菜、西洋参、云杉等十种植物的体细胞胚胎发生作了全面深入的基础理论研究之外,在人工种子制作及工艺流程的建立、人工胚乳及人工种皮成分的改进与人工模拟、芽的人工种皮包裹及抗寒与抗旱试验、人工种子的贮藏和大田播种等方面均作了广泛的探索。其中,如人工种皮的模拟及防腐问题、胡萝卜人工种子生产工艺流程的建立以及黄连、胡萝卜、芹菜、刺五加人工种子在土壤中萌发并转换成幼苗等方面,已经取得了可喜的进展。

人工种子的研制目前尚处于实验室阶段,作为用于商业化的生产还有一段距离。从当前人工种子研究中所存在的问题看,如体细胞胚胎发生中的高频率诱导及同步化研究、人工胚乳的最适成分配比及供氧问题、人工种子包埋的自动化生产及人工种皮的透性与抗逆性等,这些都与提高人工种子的生产效率、降低成本以及在商业上能否付诸应用有关。因此,如何从不同学科角度出发,共同努力突破上述种种问题是我国科学工作者的重要任务。

为了更好地总结近几年来我国人工种子研究的成果,我们邀请国内有关从事此项研究的专家共同编写了此书,以期从人工种子研究的不同侧面反映当前我国在人工种子研究中所取得的进展,并交流经验,取长补短,以加快我国人工种子研究的进程。

本书由中国植物学会《植物学报》编辑部崔郁英、张秀荣、李长复、宋美英同志负责编辑,中国科学院植物研究所徐廷玉同志协助绘制部分插图,对他们的辛勤工作表示衷心感谢。由于时间仓促,书中很可能有不少疏漏以至错误,热情希望读者批评指正。

郭仲琛 桂耀林
1990年4月 于北京

目 录

前 言

植物体细胞胚胎发生和人工种子的研究.....	郭仲琛 (1)
植物人工种子的研制.....	桂耀林 (10)
刺五加体细胞胚胎发生及人工种子研制.....	桂耀林 郭仲琛 顾淑荣 柯善强 (20)
西洋参胚状体发生及人工种子制作的研究.....	李忠森 郭仲琛 (26)
黄连人工种子研制.....	柯善强 何子灿 徐立铭 侯嵩生 桂耀林 郭仲琛 (35)
石刁柏体细胞胚的高频率发生与同步培养.....	程井辰 邝哲师 赵 洁 (43)
棉花体细胞胚胎发生研究.....	李淑君 董合忠 焦致丽
.....	岳建雄 张慧君 陈志贤 (52)
胡萝卜人工种子制备的初步研究.....	胡自华 李宝健 (57)
胡萝卜体细胞胚在人工种子制作中的分级分选.....	
.....	朱 澂 黄美娟 牛小牧 李修庆 傅晓棣 (63)
胡萝卜人工种子的子叶数变异与染色体数变异.....	李修庆 张纯斌 王 韵 (70)
青扞胚性愈伤组织的悬浮培养和体细胞胚胎发育过程的观察.....	李映红 郭仲琛 (76)
芹菜人工种子系统的研究.....	严祥和 金冀毅 郭仲琛 (81)
芹菜体细胞胚同步培养的生理基础研究.....	魏玉凝 李曜东 (87)
猕猴桃胚状体发生的激素调节.....	桂耀林 徐廷玉 刘淑琼 洪树荣 (93)
影响四会贡柑体细胞胚胎发生因素的初步研究.....	
.....	邹韵霞 郭惠珊 许丽萍 李宝健 (100)
唐菖蒲组织培养与人工种子的研究.....	何子灿 柯善强 徐立铭 (106)
热带兰花人工种子的研究.....	
.....	王文富 陈正华 关月兰 张铁汉 崔元芳 梅庆超 麦小燕 刘荣作 (112)
华腺萼木离体快速繁殖及包裹腋芽制作人工种子的研究.....	
.....	陈正华 李文彬 关月兰 林大添 陆永林 梁月群 (118)
赤桉人工种子——再生幼芽包裹的研究.....	
.....	姚渝光 陈正华 王文富 张丽华 刘桂珍 (122)
组织培养条件下赤桉染色体数变异.....	谷爱秋 耿玉轩 姚渝光 朱保葛 (127)
人工包埋胶丸种子的抗旱效应.....	徐本美 郭仲琛 (132)
野生大豆体细胞胚胎发生中贮藏蛋白基因的表达.....	邹吉涛 林忠平 钱迎倩 (141)
外源基因导入苜蓿细胞及其人工种子构建的初步研究.....	叶克难 李宝健 (146)
人工种子胚乳基质的研究.....	许光学 林少琨 卢泽俭 林尚安 (152)
人工种子种皮的研究.....	林少琨 许光学 卢泽俭 林尚安 (160)
种皮的结构、成分与功能及人工模拟研究 I. 几种植物种皮的结构、成分与功	
能的探讨.....	姜在阶 唐佩华 姜 华 郭仲琛 (166)
种皮的结构、成分与功能及人工模拟研究 II. 几种植物种子的 X 射线微区分	
析.....	姜 华 唐佩华 郭仲琛 姜在阶 常崇艳 周 固 (175)
种皮的结构、成分与功能及人工模拟研究 III. 人工种皮的合子胚筛选系统的建立	

.....唐佩华 姜 华 郭仲琛 姜在阶 尹承烈 林爱秋 (180)	
种皮的结构、成分与功能及人工模拟研究Ⅳ. 人工种皮新材料的筛选.....	
.....林爱秋 王佩珍 郭建权 尹承烈 姜在阶 唐佩华 郭仲琛 (186)	

CONTENTS

Preface	
Studies Somatic Embryogenesis and Artificial Seed of Plant ...	
.....Guo Zhongchen (1)	
Studies on the Artificial Seed of Plant	Gui Yaolin (10)
Somatic Embryogenesis of <i>Acanthopanax senticosus</i> and Studies on	
Artificial Seed	Gui
Yaolin, Guo Zhongchen, Gu Shurong and Ke Shanqiang (20)	
Studies on Somatic Embryogenesis and Synthesis of Artificial	
Seed of American Ginseng	
.....Li Zhongsen and Guo Zhongchen (26)	
Studies on Artificial Seeds of <i>Coptis chinensis</i>	
.....Ke Shanqiang, He Zican,	
Xu Liming, Hou Songsheng, Gui Yaolin and Guo Zhongchen (35)	
High Frequency and Synchronous Somatic Embryogenesis in	
<i>Asparagus officinalis</i>	
.....Cheng Jinchun, Kuang Zheshi and Zhao Jie (43)	
Studies on Somatic Embryogenesis in Cotton	
..... Li Shujun, Dong Hezhong,	
Jiao Zhili, Yue Jianxiong, Zhang Huijun and Chen Zhixian (52)	
Preliminary Studies on the Production of Carrot Artificial Seed	
.....Hu Zihua and Li Baojian (57)	
Fractional Selection of Somatic Embryos in the Production of	
Carrot Artificial Seeds	Zhu Cheng,
Huang Meijuan, Niu Xiaomu, Li Xiuqing and Fu Xiaodi (63)	
Somaclonal Variation of Cotyledon Number and Chromosome	
Number in Carrot Artificial Seeds	
.....Li Xiuqing, Zhang Chunbin and Wang Yun (70)	
Suspension Culture and Development of Somatic Embryo in	
<i>Picea wilsonii</i> Mast	Li Yinghong and Guo Zhongchen (76)
Studies on Artificial Seeds System of Celery	
.....Yan Xianghe, Jin Jiye and Guo Zhongchen (81)	
The Physiological Basis of Somatic Embryogenesis of Celery Pe-	
tiote in Synchronous Culture	Wei Yuning and Li Yaodong (87)
Hormonal Control on Embryogenesis of Chinese Gooseberry in	
Vitro	
Gui Yaolin, Xu Tingyu, Liu Shuqiong and Hong Shurong (93)	

Preliminary Studies of Factors Influencing the Somatic Embryogenesis of <i>Citrus reticulata</i>	
.....Zou Yunxia, Guo Huishan, Xu Liping and Li Baojian (100)	
Studies on Cormel Formation in Vitro and Artificial Seeds of <i>Gladiolus hortatans</i>	
.....He Zican, Ke Shanqiang and Xu Liming (106)	
The Study of Artificial Seeds of Tropical Orchids.....	Wang Wenfu, Chen Zhenghua, Guan Yuelan, Zhang Tiehan, Cui Yuanfang, Mei Qingchao, Mai Xiaoyan and Liu Rongzuo (112)
Studies on in Vitro Micropropagation and Artificial Seeds by Encapsulating Axillary Buds of <i>Mycetia sinensis</i> (Hemsl.) Craib.	Chen Zhenghua, Li wenbin Guan Yuelan, Lin Datian, Lu Yonglin and Liang Yuequn (118)
Studies on the Artificial Seeds by Encapsulating Regenerated Shoots of <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Yao Yuguang, Chen Zhenghua, Wang Wenfu, Zhang Lihua and Liu Guizhen (122)
Chromosome Number Variation in <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Daluh under Tissue Culture.....	
.....Gu Aiqiu, Geng Yuxuan, Yao Yuguang and Zhu Baoge (127)	
Effects of Encapsulating Seeds on Drought Resistance	
.....Xu Benmei and Guo Zhongchen (132)	
Gene Expression of Storage Protein during Genesis of Somatic Embryo of Wild Soybean.....	
.....Zou Jitao, Lin Zhongping and Qian Yingqian (141)	
The Transformation and Production of Artificial Seeds in Chinese Alfalfa.....	Ye Kenan and Li Baojian (146)
Studies on the Endosperm Matrix of Artificial Seed.....	
...Xu Guangxue, Lin ShaoKun, Lu Zejian and Lin Shang'an (152)	
Studies on the Artificial Seed Coat.....	
...Lin Shaokun, Xu Guangxue, Lu Zejian and Lin Shang'an (160)	
Studies on the Structure, Components and Function of Seed Coat and Its Artificial Imitation I. Discussion on the Relationship Between the Structure, Components and Function of the Seed Coat in Some Plants	
Jiang Zaijie, Tang Peihua, Jiang Hua and Guo Zhongchen (166)	
Studies on the Structure, Components and Function of Seed Coat and Its Artificial imitation II. X-ray Microanalysis of the Seeds in Some Plants.....	Jiang Hua, Tang Peihua, Guo Zhongchen, Jiang Zaijie, Chang Chongyan and Zhou Gu (175)

Studies on the Structure, Components and Function of Seed Coat and Its Artificial Imitation III. The Establishment of Zygotic Embryo System for Selection of Artificial Seed Coat.....	
.....Tang Peihua, Jiang Hua, Guo Zhongchen, Jiang Zaijie, Yin Chenglie and Lin Aiqiu (180)	
Studies on the Structure, Components and Function of Seed Coat and Its Artificial Imitation IV. Screening of Novel Materials for Artificial Seed Coat.....	
.....Lin Aiqiu, Wang Peizhen Guo Jianquan, Yin Chenglie, Jiang Zaijie, Tang Peihua and Guo Zhongchen (186)	

植物体细胞胚胎发生和人工种子的研究

郭 仲 琛

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

摘 要

本文对人工种子的研究进行了概述。植物人工种子的研制包括: ①体细胞胚胎的诱导; ②胚胎发生及其同步控制; ③人工种皮的研究; ④人工种子的包埋; ⑤人工种子的贮藏; ⑥人工种子的萌发。最后对人工种子的应用前景进行了讨论。

关键词 体细胞胚胎发生; 人工种子

STUDIES SOMATIC EMBRYOGENESIS AND ARTIFICIAL SEED OF PLANT

Guo Zhongchen

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

Abstract

The article summarized the studies on artificial seeds. The making of artificial seeds of plants are consists of: ① the induction of somatic embryos; ② synchronous control of embryogenesis; ③ artificial seed coat; ④ capsule production of artificial seeds; ⑤ storage of artificial seeds; ⑥ studies on germination of artificial seeds. Finally the application of the artificial seed in the future has been discussed.

Key words Somatic embryogenesis; Artificial seed

1978年,在加拿大召开的第四届国际植物组织、细胞培养会议上,著名的植物组织培养学家 T. Murashige 首次提出利用植物组织培养中具有体细胞胚胎发生的特点,把胚状体包埋在胶囊内形成球状结构,使其具有种子的机能并可直接播种于田间^[1]。此后,不少科学工作者把兴趣转向于人工种子的研究。所谓“人工种子”,其最外面为一层有机的薄膜包裹,以保护水分免于丧失及防止外部的物理力量冲击,中间含有培养物(胚状体等)所需的营养成分和某些植物激素,以作为胚状体萌发时能量和刺激因素,最内面则是被包埋的胚状体或芽,通过这几部分的组合,以人为方法创造出一种与天然种

子相类似的结构。

80年代初,美、日、法相继开展了植物人工种子的研究。美国加州植物遗传公司已研制了胡萝卜、苜蓿、芹菜、花椰菜、莴苣、花旗松等植物的人工种子,并在人工种皮的研究上申请了二项专利^[1-8]。除苜蓿和胡萝卜外法国还研制了天竺葵、山茶、西红柿等。欧洲共同体的尤里卡计划也把人工种子列为重点研究课题。日本麒麟啤酒公司等也在加紧植物人工种子的研制,重点研究蔬菜和水稻等作物。但总的来看,由于人工种子要求强壮的体细胞胚胎和合适的人工种皮,其研制技术难度较大,各国的这项工作还处于实验室研究阶段,尚未在农业上推广应用。

在国家科学技术委员会及其专家委员会的领导和支持下,我国植物人工种子的研究取得了可喜的进展^[1-6]。在体细胞胚胎的诱导方面,对胡萝卜、黄连、芹菜、苜蓿、西洋参、橡胶树、松树、刺五加、华腺萼木、四会贡柑、岭南杂种番木瓜等十几种材料进行了系统的研究,其中在胡萝卜、黄连、芹菜、苜蓿方面已得到大量的体细胞胚,其人工种子在无菌条件下发芽率可达90%以上^[2]。

在人工种皮的研究中,对自然种子的种皮结构和功能进行了研究,用扫描电镜观察区分出大石细胞层、骨石细胞层和薄壁细胞层,并用X射线微区分析各层次的元素分布情况,从仿生学角度模拟自然种子的结构和特性,取得了一定进展。此外,在种皮中加入防腐剂的研 究已取得较大的突破。黄连、胡萝卜、芹菜在有菌土壤中萌发已初步获得成功。这为实现人工种子研制的完整工艺流程打下了必要的基础。不过,目前在有菌条件下萌发率比较低,有些人工种子发芽后易出现枯黄现象,这都有待于进一步研究。

人工种子具有以下优越性:

1)通过植物组织培养产生的胚状体,具有数量多(一升培养基中可产生10万个胚状体)、繁殖速度快、结构完整等特点。提供营养的“种皮”可以根据不同植物对生长的要求来配制,以便能够更好地促进胚状体的快速生长和适于进行机械化播种。特别是在大量快速繁殖苗木和用于人工造林方面,人工种子比现时采用的试管苗繁殖更能降低成本和节省劳力,所以也是开辟种苗生产的又一途径。

2)体细胞胚是由无性繁殖体系产生的,可以固定杂种优势,一旦获得优良基因型,可以多年使用而不需三系配套等复杂的育种过程。

3)在人工种子制作过程中,可以加入某些农药、菌肥或有益微生物,也可以添加激素类物质以调节植物的生长发育。

4)利用胚状体发育途径,可作为高等植物基因工程和遗传工程的桥梁。

植物人工种子的研制主要包括以下几方面内容:①体细胞胚的诱导;②体细胞胚胎发生的同步控制;③人工种皮的研究;④人工种子的包埋;⑤人工种子的贮存和萌发。现分述于下。

一、植物体细胞胚的诱导

1. 胚状体的概念

什么是胚状体?胚状体是由孢子体或配子体的细胞通过无性繁殖产生的一种类似于合子胚的结构。在形态上,它与合子胚一样具有经原胚、心形胚、鱼雷形胚及至具子叶

的成熟胚的发育程序；在组织学上，它同亲本没有维管束联系并容易与母体分离。

由于胚状体的形态发生过程与合子胚很相似，因此对于这种由体细胞来源的“胚”（胚状体）曾有着各种各样的名称，如胚、体细胞胚、不定胚、副胚、类胚体、花粉胚等等。不过，文献中经常所指的胚状体，主要是在组织和细胞培养中，起源于非合子细胞的并经过多次分裂产生的一种与胚相似的结构。这种胚状体具有三个特点：①是组织和细胞培养的产物，以区别于自然界中的无融合生殖的胚；②起源于非合子细胞以区别于由卵和精子结合而形成的合子胚；③具有胚根的胚。胚芽和胚轴的完整结构与外植体的维管组织无联系，而区别于组织培养中的不定芽或不定根。

2. 胚状体产生的普遍性及其来源

从1958年 Reinert 在胡萝卜的组织培养中最先发现胚状体以来^[10]，在细胞、组织培养中获得胚状体的植物数目不断增加，如檀香、芫荽、人参、大麦、油棕、咖啡、侧柏、苜蓿、石刁柏、川芎等。诱导胚状体比较困难的禾本科植物，如水稻、小麦、玉米、珍珠谷等植物现在也都能通过离体培养产生胚状体。至今可以产生胚状体的植物约有43科，92属，100种以上。

胚状体可由下面几种方式产生：

1) 起源于外植体的表皮细胞。如石龙芮、刺五加等，可经愈伤组织直接由外植体的表皮细胞进行垂周和平周分裂而形成胚状体。

2) 由愈伤组织产生。在玉米组织培养中，在合适的培养条件下，从玉米愈伤组织能够产生大量胚状体。由愈伤组织诱导产生的胚状体多数起于愈伤组织的表面细胞，如玉米、西洋参等。也有少数如猕猴桃等由愈伤组织的内部发生。胚状体的原始细胞出现时表现出原生质较浓，细胞核显著增大，核处于细胞质的中央等特点。随着细胞开始进行有丝分裂，最初形成二个子细胞，一个为顶端细胞，一个为基细胞。基细胞有时分裂（或不分裂）形成多细胞的胚柄，顶端细胞则先进行纵的分裂，然后进行横的分裂，以致形成四个细胞的原胚，由这四个细胞原胚再进行多次分裂形成胚体。其分裂顺序和合子胚的大体相似，但由于离体培养下各种因素的影响，胚状体的形状多种多样，其中以喇叭状胚、多子叶胚等畸型胚较为普遍。

3) 在细胞悬浮培养中，由单细胞产生的胚状体。用胡萝卜、芹菜进行细胞培养比较容易得到单细胞起源的胚。胡萝卜的体细胞胚，通常具有丝状细胞结构及有较长的胚柄。芹菜的胚状体也有相似的结构。其分裂和发育顺序与由愈伤组织产生胚状体的情况大体相似。

4) 由花粉产生的单倍体胚状体。花粉胚具有四种发育途径：均等分裂发育途径；营养核分裂发育途径；生殖核分裂发育途径及营养核与生殖核发育途径。花粉单倍体胚状体和由体细胞发育的二倍体胚状体，在发育程序上基本相似。

5) 由原生质体产生的胚状体。在玉米、黄瓜等植物的原生质体培养中，都可由原生质体分裂并发育形成胚状体。黄瓜在组织培养中很难分化，而在原生质体培养中通过胚状体途径则可获得再生植株，这对进行基因转导的遗传工程研究，提供了一个极为有效的试验系统。

3. 影响胚状体发生和发育的条件

(1) 植物激素的作用 绝大多数研究结果证明, 在外植体细胞脱分化、愈伤组织诱导及胚性细胞形成的过程中, 培养基中加入 2, 4-D 是极为重要的诱导因子。在诱导胚状体发生时, 单子叶植物和双子叶植物要求有不同浓度的 2, 4-D。一般单子叶植物要求 2, 4-D 的浓度较高, 其浓度范围在 0.5—5mg/L, 通常使用的浓度为 2mg/L; 双子叶植物要求 2, 4-D 的浓度较低, 其浓度范围在 0.02—1mg/L, 通常使用的浓度为 0.1mg/L。有人把诱导胚状体的发生分为两个阶段: 第一阶段为诱导阶段, 培养基中必须加入 2, 4-D; 第二阶段为胚状体形成阶段, 要降低培养基中 2, 4-D 含量或者去掉 2, 4-D, 以保证胚状体正常生长。一般说来, 2, 4-D 被认为对胚状体的形成有着重要的作用。但在有些植物中, 如水稻、玉米等的花药培养, 在无任何植物激素的培养条件下, 也能形成胚状体。另外, 象人参、西洋参、刺五加等, 在含有 2, 4-D 的培养基上不需转换培养基也可产生大量胚状体。这些不同植物间的差别, 可能与各种植物中内源植物激素的存在状况有关。

不同植物的胚状体发生, 要求有不同的激素种类, 如颠茄细胞原生质体培养中, 愈伤组织培养在含有 NAA (2mg/L) 和激动素 (0.1mg/L) 培养基上能够形成胚状体。在南瓜的体细胞胚胎发生中采用 NAA 和 IBA 配合使用更为合适。

在胡萝卜组织培养中, 在培养初期 IAA 是必需的, 一旦建立起 IAA 系统, 以后就不再需要了。实验证明, 在胡萝卜培养中, 24 小时就可建立起这种 IAA 的实验系统。

一般认为, 赤霉素对胚状体的形成没有作用, 而脱落酸 (ABA) 对胚体的发育则有促进作用。对胡萝卜组织培养中的 ABA 测定表明, 培养开始时, 内源 ABA 的浓度很低, 约为 8 μ g/L, 培养 7 天后 ABA 的含量有明显增加。因而 7 天后培养基中若加入 ABA 就会抑制胚状体的产生, 但 ABA 的加入有利于正常胚的发育。在菊芋的细胞培养中, 加入 1—5mg/L 的 ABA, 有丝分裂指标可以提高一倍。

在胡萝卜的细胞悬浮培养中, 加入 0.1mg/L 的玉米素能促进胚状体的发生, 玉米素对诱导猕猴桃胚乳产生胚状体有特殊作用, 培养基中加入 1—3mg/L 玉米素, 胚乳愈伤组织才能分化出胚状体。用咖啡进行离体培养, 要在高激动素和生长素 (激动素 18.4 mg/L 和 IAA 4.5mg/L 配合使用) 的培养基上诱导出愈伤组织后, 才能高频率地产生胚状体。这些都是植物激素应用在不同植物的体细胞胚胎发生中各自表现出的特异性。

(2) 氮素对胚状体形成的影响 氮源被认为是胚胎发生的重要因素, 特别是还原态氮, 象硝酸铵和氯化铵在诱导体细胞胚胎发生中是很有效的, 而硫酸铵被认为没有很大效果。Wetherell 和 Dougall 的研究中指出, 用硝酸盐作为唯一氮源时 (5—55 μ mol/L), 每一培养瓶中仅得到一个胚状体, 当再加入非常低的氯化铵时, 则对胚状体的形成有促进作用。用 40 μ mol/L 硝酸钾和 30 μ mol/L 氯化铵化合物比较有利于胚状体的发育^[21]。

比较 White 和 MS 二种基本培养基中氮的含量, 它们有很大的差异。White 培养基中含有 3.2 μ mol/L 的氮而 MS 中有 60 μ mol/L 的氮, 所以通常情况下 MS 培养基比 White 培养基对胚状体的形成有更好的效果。Reinort (1959) 认为高含量的氮

和低的生长素是胚状体产生的必要条件^[10]。

(3) 氨基酸的影响 有机氮对胚状体的发生具有显著作用。Kamanda 在研究胡萝卜体细胞胚胎发生中, 当把二丙氨酸加入到培养基中后, 细胞的蛋白质含量和氨基酸的总量迅速增加, 特别对早期胚细胞分裂以及细胞团数目的增加效果显著^[13]。Durzan 指出, 谷氨酰胺对 *Dioscorea floriburuda* 和 *Picea glauca* 胚胎发生具有较好的促进作用。其他的一些氨基酸, 如谷氨酸、天冬酰胺、精氨酸和脯氨酸等对胚状体的产生都有一定的影响^[10]。

(4) 天然提取物对胚状体形成的作用 椰子乳汁被认为是对胚胎发生最有效的物质。它是一种液汁胚乳, 对胚的生长发育有明显的促进作用。其他如未成熟的玉米胚乳、水稻胚乳、小麦胚乳, 对胚的生长都有一定作用。酵母、麦芽、酪朊等提取物在以往的报道中, 对促进胚状体的产生和发育都是较为有效的天然物质。

(5) 活性炭 有些作物, 如玉米、枣树、番木瓜等的培养基中, 加入活性炭对胚状体的发育大有好处。在玉米花药培养中加入活性炭能够显著提高花粉胚状体的诱导频率。活性炭的作用可能与吸附一些外植体分泌出的有毒物质有关, 这些有毒物质对胚状体的发生和发育有抑制作用。

二、体细胞胚胎发生的同步控制

体细胞胚胎发生中的一个普遍现象就是胚状体发生的不同步性, 常常在同一外植体上可以观察到不同发育时期的大大小的胚状体。胚状体发生的不同步性, 不但给深入研究胚胎发生的分化机制及生化调控带来很多麻烦, 而且使人工种子的制作和用于生产方面也难以实现。根据目前的研究进展, 对许多植物诱导胚状体的发生并不是困难的事, 但要控制胚状体的同步生长, 却仍存在不少问题。近几年来, 日本科学家 Atsushi Komanine 和美籍华人宋仁美教授对胡萝卜体细胞同步化已进行了许多工作, 取得了较大的进展^[7], 其他一些科学家的研究也给人们以启发。下面就几个方面来对同步控制问题作一介绍。

1. 同步脱分化促进细胞的同步分裂

在细胞培养的初期加入 DNA 合成抑制剂, 如五氨基尿嘧啶等物质, 使其暂时停止 DNA 合成。在除去抑制剂后, 细胞开始进入同步分裂。例如 Eriksson (1966) 在单冠毛菊细胞悬浮培养中, 采用四种 DNA 合成抑制剂, 经过 12—24 小时处理后, 除去抑制剂后 10—16 小时, 细胞出现有丝分裂高峰^[11]。另一方面, 采用低温处理抑制细胞分裂, 然后再把温度提高到正常的培养温度, 也能达到部分同步化的目的。

2. 分离过筛

用尼龙筛或在 Ficoll 溶液中进行密度梯度离心来选择胚性细胞团, 然后转移到无生长素的培养基上培养 (在胡萝卜叶柄细胞培养时用 MS 培养基加入 2, 4-D 1mg/L, 当长成细胞团后, 把细胞团移植到没有 2, 4-D 的培养基上), 使胚状体能正常发育。这个系统中胡萝卜体细胞的胚胎发生频率可以达到 90%, 这对研究从单细胞到完整植株的胚

胎发育过程是十分有用的。

3. 在悬浮培养中控制通气

在烟草的组织培养中,乙烯的产生与细胞生长有密切的关系,在细胞生长达到高峰前有一个乙烯的合成高峰。所以细胞生长可以受乙烯的抑制因素所控制。Constans 采用在培养基中通氮气或乙烯,每 10 或 20 小时通一次,每次通气 3—4 秒,可以使细胞的有丝分裂提高到 12—16%。如果适当延长通氮气的时间,还可以相应提高细胞分裂的百分比^[8]。

4. 利用渗透压控制胚的同步生长

不同发育阶段的胚状体具有不同的渗透压。如向日葵的幼胚发育过程中,圆球胚的渗透压为 17.5%,心形胚为 12.5%,鱼雷形胚为 8.5%,成熟胚 0.5%,胚由小到大,其渗透压由高到低。我们利用不同发育阶段的胚状体对不同渗透压的要求就可控制胚的发育使其停留于某一阶段。

控制胚状体同步发生的问题,受到诸多因素的制约。除了上面所说可以通过各种理化因子来进行适当调节之外,试验材料本身的细胞敏感性及胚胎发生潜力等遗传因素也有很大影响。所以,在进行胚胎发生及同步控制研究时,应从材料选择、培养程序的处理及胚胎发生规律的掌握等多方面给予综合考虑。

三、植物人工种皮的研究

人工种皮的研究从 1985 年以来逐步取得进展,Drew 用流体状物质包埋胚状体,播种在无碳源的培养基上,得到了 3 棵植物^[9]。Kitto 和 Janick 用聚乙烯包埋胡萝卜体细胞胚、根和愈伤组织切块,一些切块包埋后仍能存活^[10]。Reden-baugh(1986)等成功地利用水凝胶系统,使用海藻酸钠和氯化钙包埋单个体细胞胚,生产人工种子得到了较好的效果^[11]。目前发现只有琼脂、褐藻酸盐、白明胶、角叉菜胶和槐豆胶 6 种凝胶比较好,它既能包住体细胞胚又能使胚存活和萌发并长成植株。其中最好的是褐藻酸钙,主要优点是凝聚作用好,使用方便,无毒及价格便宜等。

我们对自然种子的结构和功能进行了研究。用扫描电镜进行种皮结构的观察,如田菁种皮由外向内依次分为大石细胞层、骨石细胞层和薄壁细胞区域。用 X 射线微区分析,研究 K、Ca、S、P 等元素在各层分布情况,通过观察分析,我们认为人工种皮的研制,可以从仿生学的角度模拟自然种子的结构和特性进行人工模仿。我们比较了国内外的许多用来制造人工种子的胶质物质,发现它们的透气性都比较差,为了克服这一缺点,我们在包埋剂中加入纤维素等物质,取得了较好的结果,在包埋的人工种子试验中提高了发芽率。

在继续研究 Protanal-LF20 为基质的种皮材料海藻酸钠胶丸的表面状况,加入了 5% CaCO₃ 粉末,经过涂粉的种胚,最高发芽率可达 70% 左右。

合成胚乳。人工种子与自然种子一样需要有一些合成胚乳作为种子萌发和生长时的能量来源。如芹菜种子是含有胚乳的种子,因此必须加入人工合成胚乳以供种子萌发过

程中所需的碳源和养分。而苜蓿种子是不含胚乳的种子,按道理可不要合成胚乳,然而美国植物遗传公司报告,芹菜和苜蓿都要加入人工合成胚乳才能提高种子的萌发率^[15]。这两种植物的合成胚乳采用配方是一半浓度的 Schenk 等(SH)培养基^[22]加上 1.5% 的麦芽糖。在我们的试验中再加入 2mg/L 的赤霉素效果更好。也有报道以 SH 培养基加入水解的马铃薯淀粉组成的转变培养基效果最好。其他的玉米淀粉、土豆淀粉、水稻淀粉、小麦淀粉等组成培养基都能起到一定作用。当然不同种的植物其人工合成胚乳的成分应该有所不同,这些均须作进一步的研究。

四、人工种子的包埋与干燥

国外虽然研制成功人工种子包埋机,每秒钟可包埋 10 粒人工种子。但此机器还需进一步改进才能应用于大规模生产。目前还处于手工包埋阶段。目前最常用的包埋剂是褐藻酸盐。包埋时,首先把胚状体和 2—4% 的褐藻酸钠及营养成分混合在一起,然后用一定口径的吸管吸入混合物并滴入 2.5% 氯化钙中,便会发生离子交换反应,表面的络合作用立刻开始。一般情况下,15 分钟便形成胶囊丸的圆形人工种子。胶囊丸的大小以滴管的口径来控制,而人工种皮的厚度可以根据离子交换时间长短来控制。如硬度合适,必须立刻把人工种子放在水中冲洗,以便使它停止离子交换,种皮太厚不利于人工种子的萌发,相反,种皮太薄不利于保存、运输和播种。

褐藻酸钙胶囊丸通常较湿,彼此可能相互粘在一起。为了克服这个问题,设想改变胶囊丸表面特性,即在胶团的表面加一层疏水的界面,使其粘性下降。目前已找到一种适于包裹褐藻酸盐胶囊丸的 Elvax 聚合物 (Redenbaugh, 1987)^[18]。

另一种方法是将胚放入一个大小适中的模子里,然后滴入一种湿度依赖型的凝胶(如琼脂),当温度下降时,即发生凝胶化作用,胚状体便被包埋于胶囊中。

利用胚状体和人工种子的干燥可以克服水凝胶系统的不足。合子胚在发育过程中要经历一个干燥阶段。干燥有助于胚的成熟,并可启动合子胚由发育相转变到萌发相^[12]。干燥不仅有利于人工种子贮存及播种,同时可促使胚状体发育及成熟。Kitto 和 Janick 将胡萝卜胚状体放在 25% 聚氧乙烯藻盘上干燥,每个盘上放上许多胚,当盘子重新水化时,胚状体可以恢复萌发生成幼苗^[14]。我们在芹菜研究中发现,低温干燥后的胚状体由于水分丢失,逐渐由玻璃化转为正常状态,把胚状体接种在合适培养基上能长成正常植株。

五、人工种子的贮存与萌发

人工种子的保存是目前研究人工种子的另一个难题,现在还没有一套完善的保存办法,多数是把人工种子放在 4°C 低温条件下保存,但随着保存时间的延长,人工种子萌发率显著下降。其主要原因可能是人工种子被包埋时,胚尚未处于休眠状态,而包埋使胚得不到氧气等原因所致。但美国也有报道,把人工种子放在液体石蜡之中,保存时间可达 6 个月以上^[20]。

用胡萝卜做材料,将人工种子干燥脱水贮藏,在干燥度为 67%、温度为 7°C 条件

下, 贮藏期间, 人工种子无一萌发, 两个月后取出做发芽试验, 发芽率仍接近 100%。用此法贮存人工种子效果较好, 对我们今后进行分期播种试验及人工种子的运输都提供了有利的条件。此外, 还有铝箔袋保存, 即将人工种子密闭, 贮存于铝箔中, 在 4°C 条件下, 贮存 20 天, 其发芽率为 95%, 但延长到 60 天, 发芽率便丧失。

多数人工种子萌发率比较低, 主要与两个方面的因素有关: 第一, 目前通过液体培养特别是通过长期继代培养产生的胚状体多数不正常, 我们在西洋参体细胞胚的研究中发现, 有 80% 胚处于不正常状态, 其萌发率比较低。因此, 首先要设法获得健壮的体细胞胚才能提高人工种子的萌发率。第二是人工种皮的材料必须能保持营养供给和通气。这方面有赖于仿造自然种子种皮的结构, 及寻找更合适的包裹胶囊的材料, 以便更好地解决控制养分流失及通气供氧问题。

由于植物人工种子在今后农业实践中具有重要意义, 故各国政府和许多私营公司都在开展研究^[1, 12]。但由于时间比较短, 目前人工种子的研制仍有许多问题, 如高质量体细胞胚的诱导、人工种皮的材料、人工种子的贮存与萌发等, 都有待于作更多的工作。我国植物人工种子的研究起步较晚, 目前还处于开始研究阶段, 但由于我国政府的重视, 人工种子的研究已被列入高技术发展计划, 并取得了比较大的进展^[1-5]。今后应加强协作, 开展多学科综合性研究, 才能使我国人工种子的研究更快地应用于生产实践, 进入世界先进行列。

参 考 文 献

- [1] 李映红、郭仲琛, 1989: 青杆体细胞胚胎发生及小苗形成的研究。植物细胞工程应用基础研究新进展, 学术期刊出版社, 49—53 页。
- [2] 李修庆, 1989: 胡萝卜人工种子基本制作流程的建立。植物学报, 31: 673—677。
- [3] 金冀义、郭仲琛, 1989: 芹菜人工种子的研究。植物细胞工程应用基础研究新进展, 学术期刊出版社, 84—89 页。
- [4] 柯善强、桂耀林、郭仲琛, 1989: 直杆接试管短枝人工包埋种皮的研究。植物细胞工程应用基础研究新进展。学术期刊出版社, 77—83 页。
- [5] 柯善强、桂耀林、郭仲琛, 1989: 植物人工种子研究。植物学通报, 6: 205—210。
- [6] 郭仲琛、金冀义, 1988: 有关植物人工种子的研究。植物学通报, 5: 5—6。
- [7] Komanine, A., 1979: Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.*, 64: 162-164.
- [8] Constants, F. et al., 1971: Histological studies on embryos produced from cell cultures of *Bromus*. *Canada J. Bot.*, 49: 1415-1417.
- [9] Drew, R., 1979: The development of carrot (*Daucus carota* L.) embryoids derived from cell suspension culture into plantlets on a sugar-free basal medium. *Hort. Res.*, 19: 79.
- [10] Durzan, D., 1982: Somatic embryogenesis and sporoblasts in conifer cell suspension. In Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue Cell Culture, pp. 113-114.
- [11] Eriksson, T. et al., 1978: Protoplast isolation cultivation and development. In: "Frontiers of Plant Tissue Culture" (Thorpe T. A. eds), Calgary, Canada. pp. 131-139.
- [12] Gray, D. et al., 1987: Desiccated quiescent somatic embryos of Orchardgrass for use as synthetic seeds. In *Vitro Cell Dev. Biol.* 23: 29-33.
- [13] Kamada, H. and H. Harada, 1981: Changes in the endogenous level and effect of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant & Cell Physiol.*, 22: 1423.
- [14] Kitto, S. and I. Janick, 1981: Testing artificial seed coat for asexual embryos. *Hortscience*, 16: 452.
- [15] Kitto, S. and I. Janick, 1985: Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *Amer. Soc. Hort.*, 110: 277-281.
- [16] Kitto, S. and I. Janick, 1980: Water soluble resins as artificial seed coats. *Hortscience*, 15: 349.

- [17] Murashige, T., 1978: The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. *Frontiers of Plant Tissue Culture*, (T.Thorpe, ed) Calgary, Canada, pp. 15-26.
- [18] Redenbaugh, K. et al., 1986: Synthetic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio/Technology*, **4**: 797.
- [19] Reinert, J., 1958: Morphogenese und ihre kontrolle an gewsbekulturen aus carotten. *Naturwissenschaft..* **45**: 344-345.
- [20] Wang Yichang and Jules Janick, 1987: *In Vitro* Production of jojoba liquid wax by zygotic and somatic embryos. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **111**: 798-807.
- [21] Wetherell, D. F. and D. K. Dougall, 1976: Sources of nitrogen suporting growth and embryo-genesis in cultivated wild carrot tissue. *Physiol Plant*, **37**: 97-103.
- [22] Schenk, R. U. and A. C. Hildebrant, 1972: Medium and techniques for induction and growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous plant cell culture. *Can. J. Bot.* **29**: 199-204.