

一个高频率的活体-离体胚胎发生研究系统

何玉池^{1, 2*}, 陈俊义^{1*}, 郭荆哲¹, 孙蒙祥^{1**}, 杨弘远¹

(1. 武汉大学生命科学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

摘要: 通过对受精后烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 胚珠的体外培养, 建立了一个简便、实用、高频率的胚胎发生研究系统。采用 MS 培养基附加 6% 蔗糖, 然后换以 2% 蔗糖对烟草胚珠进行培养, 结果受精后胚珠在体外可以完成正常的胚胎发生并可直接萌发成幼苗。追踪观察表明, 合子体外胚胎发生过程中关键发育事件, 如合子休眠期间的定向生长、一次不对称分裂的完成、胚柄的形成和解体、胚的分化等过程均可在体外重现。体外培养形成的胚珠及胚胎在形态上与自然状态下形成的胚珠及胚胎几乎没有差异。此体系操作简单, 稳定性好, 且关键发育事件的时空调控与自然胚胎发育进程相吻合。

关键词: 胚珠培养; 烟草; 胚胎发生

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)01-0006-06

A High-frequency *in vivo-in vitro* Experimental System for Embryogenesis Study

HE Yu-Chi^{1, 2*}, CHEN Jun-Yi^{1*}, GUO Jing-Ze¹, SUN Meng-Xiang^{1**}, YANG Hong-Yuan¹

(1. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: An *in vivo-in vitro* experimental system was set up, in which zygotes could develop into fertile plants through normal embryogenesis with high frequency by means of ovule culture. Some key developmental events of embryogenesis, such as directional expansion, asymmetrical first division, suspensor formation and degeneration as well as embryo differentiation, occurred as that in *in planta* embryogenesis in the experimental condition. No morphological difference was observed between embryos gained from ovule culture and embryos grown *in planta*, indicating that the *in vitro* ovule culture system phenocopies the *in planta* developmental program of embryogenesis. This system is simple and stable, and therefore can be a useful tool for the study of embryogenesis mechanism.

Key words: Ovule culture; Tobacco(*Nicotiana tabacum*); Embryogenesis

由于胚胎深埋于层层胚珠组织之中, 使得对胚胎发育的研究, 尤其是对早期胚胎发生的研究有诸多不便。多年来人们一直试图建立各种离体胚胎发生系统以克服这一困难。这些系统可以作为研究一些具体问题的技术平台, 也可以用于远缘杂交育种中胚胎的拯救。近十年来, 对植物离体胚胎发生技术的研究取得了显著的进步, 禾本科的玉米(*Zea mays*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.) 的自然合子, 玉米体外受精所形成的离体合子以及双子叶植物烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 的合子均在体外被成功诱导再生了可育植株^[1-5], 但是合子在体外培养过程中

所形成的胚胎均表现为某种程度的不正常, 主要表现为愈伤组织化, 二次胚胎发生或者器官发生。此外, 离体胚胎发生毕竟不能完全代表体内自然状态下胚胎发生的真实过程。而通过培养合子时期的大麦、小麦以及黑麦草(*Lolium multiflorum* Lam.) 的胚珠^[6-10], 均获得了形态发育正常的胚胎并再生了可育植株。因而利用这个系统可以在已知条件下全程跟踪胚胎的体外发育状况, 并便于测试各种因素的影响效果。

未受精的烟草胚珠体外培养可以产生正常发育的成熟胚囊^[11]; 受精后 4~6 d 的烟草胚珠可以直接诱导成苗, 但这个时期的胚胎已经处于原胚的发

收稿日期: 2005-06-28, 修回日期: 2005-09-23。

基金项目: 国家自然科学基金(30370743, 90408002); 国家杰出青年基金(30225006); 湖北大学人才专项基金资助。

作者简介: 何玉池(1975-), 女, 博士, 现为湖北大学生命科学学院教师; 陈俊义(1982-), 女, 硕士研究生, 从事植物发育生物学研究。

* 同为第一作者。

** 通讯作者(E-mail: mxsun@whu.edu.cn)。

育阶段,而烟草合子时期的胚珠诱导成苗尚未见报道。此外,早期的胚珠培养研究多侧重于诱导成苗的操作技术,较少关注构建胚胎发生研究的离体操作系统。同时,作为实用的研究系统,离体胚胎发生应具有高频率、稳定性好的特点。本实验着重探讨合子时期胚珠活体-离体胚胎发生条件的选择以及对关键发育事件的追踪观察,以期建立一个胚胎发生研究系统并评价其实用性与可重复性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种SR-1。材料种植于温室,在25℃、16 h/d光照下以常规方法种植与管理,取受精后不同时间的胚珠为材料。

1.2 胚珠培养方法

将受精后烟草的子房,用75%的酒精擦拭表面,然后用4%的次氯酸钠消毒10 min,无菌水洗3次,每次3 min。用无菌牙签小心剥离胚珠接种于培养基。

1.3 培养基

MS₁: MS^[12]基本培养基,6%蔗糖,不附加外源激素,用0.25 μm的微孔滤膜过滤灭菌,pH调至5.8。

MS₂: MS基本培养基,2%蔗糖,不附加外源激素,用0.25 μm的微孔滤膜过滤灭菌,pH调至5.8。

1.4 细胞学检测

细胞壁的荧光标记:采用CW(荧光增白剂)为细胞壁的标记探针,25℃染色10~20 min,用13.0%的甘露醇溶液清洗2次。细胞核的荧光标记:采用DAPI(3 μg/mL)为细胞核的标记探针,25℃染色30~45 min,用13.0%的甘露醇溶液清洗2次。

1.5 观察与摄影

荧光显微观察及Nomarski干涉差显微观察均用Cooled-CCD(MicroMAX, Princeton Instruments)采集图像。胚珠以及再生幼苗用Olympus SZX12体视显微镜观察摄影。

1.6 统计分析

比较不同发育时期胚珠体外培养效果,每次实验不少于2000个胚珠。培养一定时间后,用4%的多聚甲醛固定12 h,然后1.5%纤维素酶外加0.5%的果胶酶,震荡酶解4~5 h,温度28℃,然后随机选择500个左右胚珠压片观察。经多聚甲醛固定后压片分离得到的胚囊形态完整,可以清楚看见合子及幼胚的形态。

比较自然条件及培养条件下胚珠生长速度,用Image J软件每次统计200个胚珠,以单个胚珠外观图像所占的像素数表示其沿长轴的截面积的大小。

所有实验均至少重复3次,用Microsoft excel 2000软件进行统计分析和作图。

2 实验结果

2.1 不同发育时期胚珠体外培养效果的比较

胚珠体外培养时,诱导频率的高低与胚珠的发育时期明显相关(图1),72~108 HAP(hours after pollination)胚珠内80%以上的合子都可以完成定向生长的过程,形成临近第一次分裂之前合子的典型形态,从而进入一次不对称分裂。随后的发育表明,越是成熟的合子,其形成胚胎的频率越高,在培养中直接萌发以及最终形成植株的频率也越高。72 HAP胚珠仅有48.53%可以通过胚胎发生途径直接萌发生成植株,而132 HAP的胚珠,即二胞原胚时期的胚珠,有80.43%可直接萌发成植株。

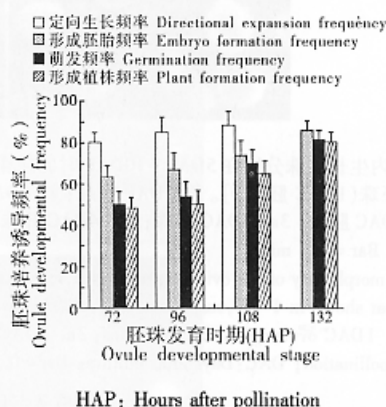


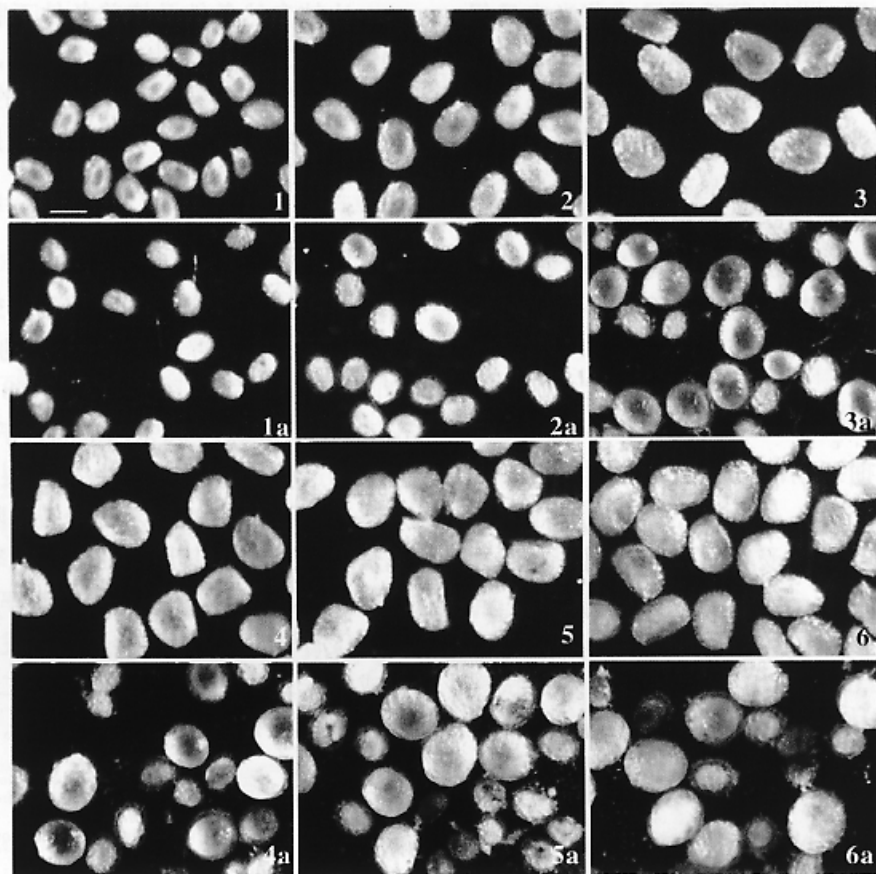
图1 发育时期对胚珠体外培养的影响
Fig.1 Effect of developmental stages on ovule culture in vitro

108 HAP的胚珠内合子已充分发育。处于分裂前状态。该时期的胚珠内有高达73%的合子能发育为胚,且形态正常。表明该系统是有效而稳定的。

2.2 活体胚珠与离体胚珠发育的比较

形态上,培养的胚珠生长过程中其边缘膨大,呈透明的膜状,大部分胚珠与自然条件下发育的一样为白色,少部分表面出现褐化的斑点(图2),但不影响继续发育。

体视显微镜下观察,培养胚珠与自然条件下子房内的胚珠生长规律相似。都呈逐渐膨大的发育趋势(图2:1a~6a)。少数败育胚珠体积不再膨大,并逐渐褐化,由于其膨大停滞在很早阶段,体积明显较小,很容易与正常发育的胚珠区别开来(图2:4a~6a)。



1~6 为体内生长胚珠分别在 5DAP~10DAP 时的胚珠外观; 1a~6a 为同时期培养条件下的胚珠外观[授粉后 5 d 的胚珠(5DAP 胚珠) = 培养 1 d 的胚珠(1DAC 胚珠)]。1. 5DAP 胚珠; 2. 6DAP 胚珠; 3. 7DAP 胚珠; 4. 8DAP 胚珠; 5. 9DAP 胚珠; 6. 10DAP 胚珠。1a. 1DAC 胚珠; 2a. 2DAC 胚珠; 3a. 3DAC 胚珠; 4a. 4DAC 胚珠, 较小的胚珠为败育胚珠; 5a. 5DAC 胚珠; 6a. 6DAC 胚珠。DAP: 授粉后天数; DAC: 培养天数; Bar = 0.5 mm

1~6. The morphology of the ovules grew *in vivo*, representing 5DAP~10DAP ovule, respectively; 1a~6a. Cultured ovules at the same developmental stages as that shown in 1~6, respectively. 1. 5DAP ovules; 2. 6DAP ovules; 3. 7DAP ovules; 4. 8DAP ovules; 5. 9DAP ovules; 6. 10DAP ovules. 1a. 1DAC ovules; 2a. 2DAC ovules; 3a. 3DAC ovules; 4a. 4DAC ovules, small ovules were aborted; 5a. 5DAC; 6a. 6DAC ovules. DAP: Days after pollination; DAC: Days after culture; Bar = 0.5 mm

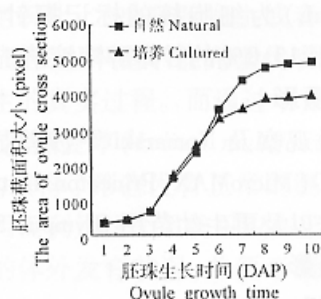
图 2 自然条件及培养条件下胚珠发育外观

Fig. 2 The morphology of the ovules grew both *in vivo* and *in vitro*

以沿胚珠长轴的横截面大小为指标, 比较了培养条件下和自然条件下胚珠的生长情况, 发现分离的胚珠刚接入培养基时, 胚珠在培养条件下前 2 d 内表现出比自然状态较低的膨大速率。随后培养胚珠生长速度增加, 其横截面积明显大于同期自然条件下体内生长的胚珠。在培养的前 5 d, 胚珠增大迅速, 以后则逐渐趋缓。在自然条件和培养条件下胚珠有相同的生长趋势, 呈典型的“S”型生长曲线(图 3)。胚胎发育情况的进一步检测表明这种胚珠体积上的膨大指示着内部胚胎的正常发育。未能正常膨大的胚珠内胚胎发育亦停滞。

2.3 活体与活体-离体胚胎发生过程观察

96 HAP 的胚珠仍为合子时期。培养 24 h 后观察, 合子已定向伸长并观察到发生第一次不等分裂, 产生一个体积较小的顶细胞和一个较大且为长型的



胚珠截面积大小用 Image J 软件统计, 以单个胚珠外观图像所占的像素数(pixel)表示其沿长轴的截面积的大小。实验重复 3 次, 每次统计 200 个胚珠。DPA: 授粉后天数

The data of the area of ovule cross section (pixel) were calculated and analyzed via Image J software, the area of ovule cross section along major axis was expressed by pixels of its picture. Experiment was repeated three times and 200 ovules were measured in each experiment. DAP: Days after pollination

图 3 自然条件及培养条件下胚珠生长速度的比较

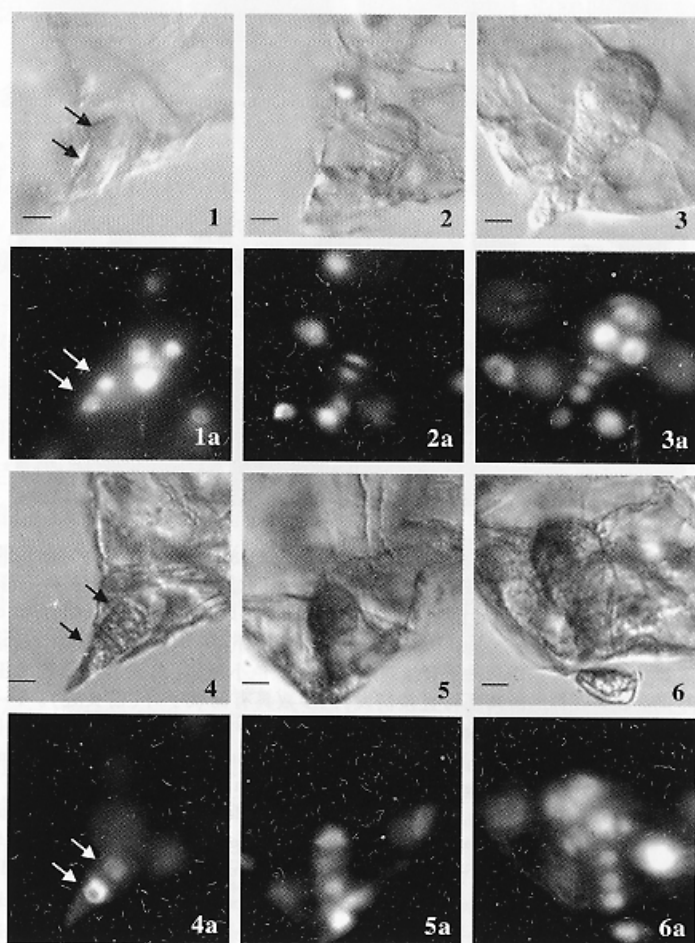
Fig. 3 Comparison of growth speed between cultured and natural ovules

基细胞(图4:1,1a);胚珠培养48 h后观察,胚胎进一步分裂形成4细胞原胚(图4:2,2a)。12细胞原胚出现在培养72 h后(图4:3,3a),这与自然生长胚珠内的2胞、4胞和12细胞原胚的发育进程极为相似,且胚胎的形态基本相同(图4:4,4a, 5,5a,6,6a)。

培养4 d后可以观察到具有正常胚柄结构的小球形胚(图5:4);自然条件下胚珠在8DAP(days

after pollination)时出现这种小球形胚(图5:1)。培养8 d后形成胚柄逐渐退化的大球形胚或刚刚开始分化的胚(图5:2a,3a),培养10 d以后可见鱼雷形胚(图5:4a);这与自然条件下胚珠在相应生长时间的发育状况相同(图5:2~4)。

随后胚珠逐渐形成成熟的种子,表面为褐色(图5:5),10~15 d后直接萌发形成小植株(图5:7)。

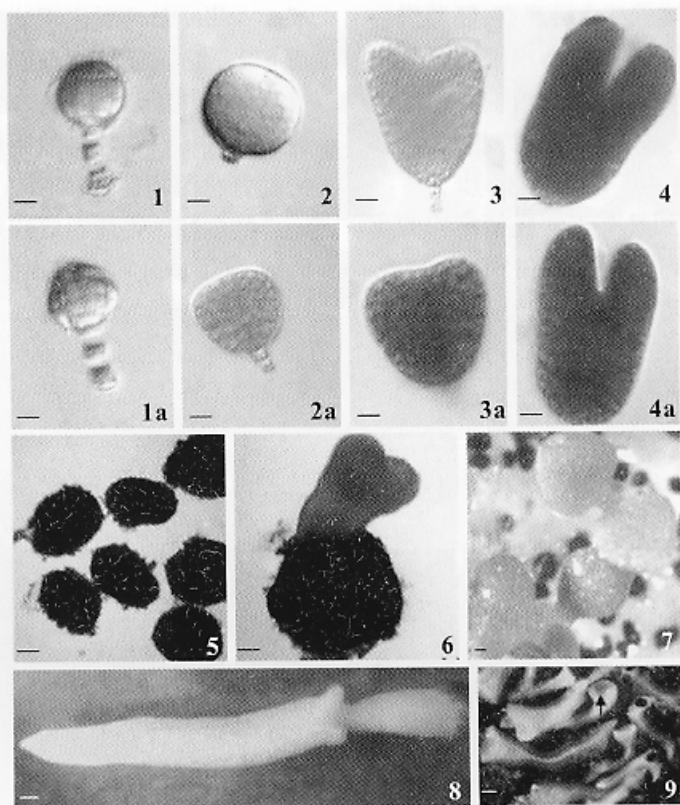


1. 自然条件下5DAP合子定向生长后发生第一次不对称分裂,箭头示2个细胞;1a.同一2细胞原胚的DAPI荧光图像,箭头示2个细胞核;2.自然条件下6DAP时形成的4细胞胚;2a.为同一4细胞原胚的DAPI荧光图像;3.自然条件下7DAP时形成的12细胞原胚,3a.为同一12细胞原胚DAPI荧光图像;4.为96HAP的胚珠培养24 h后合子发生第一次不均等分裂,箭头示2个细胞;4a.为同一2细胞原胚的DAPI荧光图像,箭头示2个细胞核;5.为96HAP的胚珠培养48 h后形成的4细胞原胚;5a.为同一4细胞原胚的DAPI荧光图像;6.96HAP的胚珠培养72 h后形成的12细胞原胚;6a.为同一12细胞原胚的DAPI荧光图像。可见早期细胞分裂模式与自然条件完全相同。Bar = 15 μ m

1. The elongation and the first unequal division of zygote occurred at 5DAP in natural condition. Arrows indicate two cells of the proembryo; 1a. DAPI fluorescent image of the same embryo. Arrows indicate two nuclei of the proembryo; 2. 4-cell proembryo appeared at 6DAP in natural condition; 2a. DAPI fluorescent image of the same 4-cell proembryo; 3. 12-cell proembryo appeared at 7DAP in natural condition; 3a. DAPI fluorescent image of the same 8-cell proembryo; 4. The 96HAP ovule after 24 h culture, the zygote was unequally divided. Arrows indicate two cells of the proembryo; 4a. DAPI fluorescent image of the same 2-cell proembryo. Arrows indicate two nuclei of the proembryo; 5. 4-cell proembryo formed after 48 h culture in 96HAP ovule. 5a. DAPI fluorescent image of the same 4-cell proembryo; 6. 12-cell proembryo formed after 72 h culture in 96HAP ovule. 6a. DAPI fluorescent image of the same 12-cell proembryo. The figures indicating early embryogenesis *in vitro* is entirely the same as that of *in vivo*. Bar = 15 μ m

图4 自然条件及培养条件下胚珠早期胚胎发育状况比较

Fig. 4 Comparison of early embryogenesis between cultured and natural ovules



1. 自然条件下8DAP时形成的具有正常胚柄结构的小球形胚; 1a. 96HAP胚珠培养4 d时出现的形态相似的小球形胚; 2. 自然条件下形成的大球形胚; 2a. 96HAP胚珠培养8 d时出现的过渡型胚; 3. 自然条件下形成的开始分化的胚; 3a. 96HAP胚珠培养8 d时出现的刚刚开始分化的胚; 4. 自然条件下形成的成熟胚; 4a. 培养10 d时出现的成熟的分化胚; 5. 前10 d培养于 MS_1 , 以后转入 MS_2 培养的胚珠形成的种子群体; 6. 没有降低渗透压的胚珠, 30 d时分化胚突破种皮生长; 7. 更换培养基并降低渗透压后种子直接萌发形成的绿色小植株; 8. 没有降低渗透压时完全脱离胚珠游离在培养基中的胚; 9. 完全脱离胚珠的游离胚可直接萌发, 但多数具有筒状子叶(箭头处)。1~4和1a~4a; Bar = 15 μm ; 5, 9; Bar = 0.15 mm; 6~8; Bar = 0.35 mm

1. Small globular embryo with normal suspensor cells formed at 8DAP in natural condition; 1a. Similar globular embryo appeared after 4 d culture of 96HAP ovule; 2. Large globular embryo formed in natural condition; 2a. The embryo at transitional stage appeared after 8 d culture of 96HAP ovule; 3. The embryo initiated differentiation in natural condition; 3a. A embryo began to differentiate after 8 d culture of 96HAP ovule; 4. Mature embryo formed in natural condition; 4a. Similar mature embryo appeared after 10 d culture of 96HAP ovule; 5. Seeds developed from the ovules that were cultured in MS_1 in the first 10 days and were then cultured in MS_2 ; 6. Without reducing osmotic pressure, the mature embryo liberated out of the seed coat after 30 d culture of 96HAP ovule; 7. After changing culture medium and thus reducing osmotic pressure, seeds directly germinated and grew into plantlets; 8. Without reducing osmotic pressure, the mature embryos could be out of ovules and grew in culture medium; 9. Mature embryos that liberated from seed coat in culture medium could directly germinate, but most of them had cup-shaped cotyledons (arrow). 1~4 and 1a~4a; Bar = 15 μm ; 5, 9; Bar = 0.15 mm; 6~8; Bar = 0.35 mm

图5 胚胎发生晚期及种子萌发形成植株

Fig. 5 Later embryogenesis and seed germination into plantlets

2.4 渗透压对胚珠培养的影响

适时降低渗透压是胚珠形成种子并直接萌发的关键。培养10 d时将胚珠由含6%蔗糖的 MS_1 培养基及转入含2%蔗糖的 MS_2 培养基则胚珠可形成能萌发的正常种子。如一直采用 MS_1 培养, 第25 d左右胚珠表面开始破裂, 随后胚胎便从破裂的位置突出来(图5:6), 直至脱离胚珠, 游离到培养基中(图5:8), 转至光照条件下游离的胚胎也可以转变为绿色, 但是通过此种途径产生的幼苗形状不如种子苗规则, 容易形成筒状子叶和黄化植株(图5:9)。

如果在培养的第10 d转入 MS_2 培养基, 胚珠表面破裂的情况便不会出现, 培养基更换15 d后部分胚珠便开始直接萌发成苗(图5:7), 紧接着大量的胚珠陆续出苗, 幼苗具有发达的根系和正常的子叶, 与种子苗无异。移栽大田, 进行常规管理, 植株可以正常开花结实, 种子育性较高, 发芽率为95%以上。

3 讨论

胚胎发生过程历经了一系列重要发育事态, 涉及细胞分裂、分化、细胞命运抉择、胚胎发育轴向选

择等重大而深刻的生物学问题,一直受到发育生物学家的广泛关注。显然,一个简单而有效的体外胚胎发生系统,对胚胎发生的细胞生物学和分子生物学研究的重要意义是不言而喻的。虽然玉米、小麦、大麦、水稻、烟草的合子离体培养均已成功再生可育植株,但合子在体外培养过程中均某种程度地偏离体内发育模式^[1-5]。这为了解和认识胚胎发生的自然规律带来诸多不便。因而,欲作为研究系统尚需进一步改进。

胚珠的培养也已在多种植物中取得成功,如小麦、大麦、黑麦草等^[5-10]。早期的胚珠培养是作为生物技术的一种手段,因而,研究的重点是改进培养条件和提高植株再生频率。较少关注在离体条件下胚胎发生模式的研究。本实验室也曾开展过烟草子房培养,离体授粉的子房内一定比例的胚珠也能发育并形成种子。但合子时期的胚珠培养尚未见报道。

本实验结果表明,烟草胚珠培养是一个简单而有效的离体试验系统,可高频率地诱导烟草合子胚胎发生,具有良好的稳定性和可靠性。比较离体发育的胚珠内与自然生长的胚珠内合子的发育及胚胎发生的关键事态,表明两者在发育进程和形态上都高度一致。说明胚珠在体外培养时,其内部的合子发育基本遵循了自然状态下的关键发育程序,如合子休眠期间的定向生长、顶-基极性的建立、胚柄的形成和解体以及胚的分化等。其关键发育事件时空调控与自然发育的时间进程亦大致吻合。此外,与完全分离的合子在体外发育的情况相比,胚珠发育明显较少受到离体环境的影响^[13]。同时,由于烟草胚珠的数量大、易分离,其培养操作亦相对简单可行。对各种试剂处理效果很容易进行大量统计分析。因而,是一个可靠而实用的实验系统。胚珠培养过程中,培养基中渗透压的调整是胚珠形成种子并直接萌发的关键。保持初始渗透压不变,胚胎生长较快,可破珠被而出。及时调整渗透压可得到形体、大小正常的胚胎。渗透压的适时改变,可能正好顺应了胚胎在体内发育过程中渗透压逐渐降低的内环境。在芥菜的原胚培养过程中,根据胚胎自身发育过程中的这一特点,研究者曾经设计了双环培养法,在内外双环中并列放置两种渗透压不同的培养基,起始的时候原胚接种于渗透压较高的内环,随着发育过程的推进,外环中低渗透的培养基逐渐与内环高渗透培养基相互交换,满足了胚胎发生对于渗透压改变的要求,从而成功将芥菜球形胚胎诱导发育为成熟胚胎^[14]。而在双环培养法基础上改进而

来的双层培养法,操作更加简单,将两种高低渗透压的培养基分别加在培养皿的上下两层,此系统既维持了营养物质的持续供应又保证了渗透压的逐渐降低,成功诱导了8-36细胞的原胚通过正常胚胎发育途径再生植株,频率高达75%^[15]。在烟草合子离体培养过程中,渗透压的调节对合子离体胚胎发生也有明显影响(何玉池等未发表资料)。

胚珠作为胚胎发育的微环境,对胚胎发生的作用有重要影响,但其机制尚不清楚。胚珠培养实验系统的建立对在相对独立的环境下探讨珠被组织对合子早期发育的作用提供了便利,并可与合子离体培养及胚胎培养作为很好的比较研究系统。

参考文献:

- [1] Holm P B, Knudsen S, Mouritzen P, Negri D, Olsen F L, Roué C. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell [J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 531 - 543.
- [2] Leduc N, Matthys - Rochon E, Rougier M, Mogensen L, Holm P, Magnard J-L, Dumas C. Isolated maize zygotes mimic *in vivo* embryonic development and express microinjected genes when cultured *in vitro* [J]. *Dev Biol*, 1996, 177: 190 - 203.
- [3] Kumlehn J, Lörz H, Kranz E. Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants [J]. *Planta*, 1998, 205: 327 - 333.
- [4] Zhao J, Zhou C, Yang H Y. Isolation and *in vitro* culture of zygotes and central cells of *Oryza sativa* L [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 321 - 326.
- [5] 何玉池,孙蒙祥,杨弘远. 烟草合子离体培养再生可育植株 [J]. 科学通报, 2004, 49(5): 457 - 461.
- [6] Toepfer R, Steinbiss H H. Plant regeneration from cultured fertilized barley ovules [J]. *Plant Sci*, 1985, 41: 49 - 54.
- [7] Zenkteleer M, Nitzsche W. *In vitro* culture of ovules of *Triticum aestivum* at early stages of embryogenesis [J]. *Plant Cell Rep*, 1985, 4: 168 - 171.
- [8] Holm P B, Knudsen S, Mouritzen P, Negri D, Olsen F L, Roué C. Regeneration of the barley zygote in ovule culture [J]. *Sex Plant Reprod*, 1995, 8: 49 - 59.
- [9] Kumlehn J, Nitzsche W. Plant regeneration from isolated ovules of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.): effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and different cytokinins supplemented to the ovule culture medium [J]. *Plant Sci*, 1995, 111: 107 - 116.
- [10] Kumlehn J, Schieder O, Lörz H. *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture [J]. *Plant Cell Rep*, 1997, 16: 663 - 667.
- [11] Lobanova L, Enaleeva N. The development of embryo sacs in *in vitro* ovaries of *Nicotiana tabacum* L [J]. *Plant Science*, 1998, 132(2): 191 - 202.
- [12] Murashige T, Skoog F A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473 - 479.
- [13] 李师钺,傅纛,孙蒙祥,杨弘远. 烟草合子与二胞原胚在离体培养中的发育 [J]. 实验生物学报, 1998, 31: 309 - 315.
- [14] Liu C M, Xu Z H, Chua N H. Proembryo culture, *in vitro* development of early globular-stage zygotic embryos from *Brassica juncea* [J]. *Plant J*, 1993, 3: 291 - 300.
- [15] Monnier M. Culture of zygotes embryos [A]. In: Thorpe T A ed. *Frontiers of plant tissue 1978* [M]. Calgary, Canada: Univ of Calgary Press, 1978. 277 - 286.