

# 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发生及组织学观察

崔广荣<sup>1,2</sup>, 侯喜林<sup>1\*</sup>, 张子学<sup>2</sup>, 张从宇<sup>2</sup>, 胡能兵<sup>2</sup>, 刘跃成<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学园艺学院, 南京 210095; <sup>2</sup>安徽科技学院植物科学系, 安徽凤阳 233100)

**摘要:**以蝴蝶兰试管苗幼叶为外植体, 以 1/2MS 为基本培养基, 研究了不同浓度 6-苄基腺嘌呤 (6-BA)、腺嘌呤硫酸盐 (Ad)、萘乙酸 (NAA) 及其组合对胚状体发生的影响, 同时也探讨了蔗糖浓度及椰汁添加量对胚状体形成的影响。结果表明: 细胞分裂素 6-BA 对胚状体的诱导效果较 Ad 好, NAA 与二者配合使用可提高胚状体的发生率, 其最佳浓度组合为 6-BA 4.0 mg/L + Ad 2.0 ~ 4.0 mg/L + NAA 1.0 ~ 2.0 mg/L。蔗糖 20 ~ 40 g/L + 椰汁 200 mL/L 有利于胚状体的形成。组织学观察表明, 胚状体起源于叶片气孔附近的上表皮细胞或上表皮下方的叶肉组织细胞, 为单细胞起源, 其发育过程与一般植物胚状体发生发育特征相似, 最终发育成为类原球茎。

**关键词:** 蝴蝶兰; 叶片; 胚状体; 组织培养; 组织学观察; 原球茎

**中图分类号:** S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0431-06

## Efficient Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of *Phalaenopsis* in Vitro Culture and Histological Observations

CUI Guang-rong<sup>1,2</sup>, HOU Xi-lin<sup>1\*</sup>, ZHANG Zi-xue<sup>2</sup>, ZHANG Cong-yu<sup>2</sup>, HU Neng-bing<sup>2</sup>, and LIU Yue-cheng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; <sup>2</sup> Plant Science Department of Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100, China)

**Abstract:** The leaves of *Phalaenopsis* were used as explants and cultured in the 1/2MS basic medium with different kinds of plant growth regulators for somatic embryos induction. The effects of different concentrations of three kinds of plant growth regulators of 6-BA, Ad, NAA and their combinations on somatic embryogenesis were studied in *in vitro* culture. Meanwhile, the influences of the concentrations of sucrose and coconut water on somatic embryogenesis were studied, too. The results showed that the effects of cytokinins 6-benzyladenine (6-BA) was better than adenine sulphate (Ad) in embryoid induction. The auxin A-naphthalene acetic acid (NAA) combined with given concentrations of 6-BA and Ad could effectively raise the frequency of somatic embryogenesis. The optimum plant growth regulator combination for somatic embryogenesis was 6-BA 4.0 mg/L + Ad 2.0 - 4.0 mg/L + NAA 1.0 - 2.0 mg/L. 20 - 40 g/L sucrose and 200 mL/L coconut water added in the medium was of benefit to somatic embryogenesis. The results of histological observations indicated that somatic embryos originated from upper epidermis and mesophyll single cell nearby stoma. The course of somatic embryos development was similar to other plants. Finally, the somatic embryos became protocorm-like body.

**Key words:** *Phalaenopsis*; Leaf; Somatic embryo; Plant tissue culture; Histological observation; Protocorm-like body

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 的人工繁殖主要通过种子无菌发芽和组织离体培养 (刘真华 等, 2005;

收稿日期: 2006 - 08 - 23; 修回日期: 2007 - 03 - 12

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (070411010); 安徽省科技厅重点项目 (04023069)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hxl@njau.edu.cn)

魏琪 等, 2006) 两条途径进行。离体茎尖、叶片等经培养后产生类原球茎 (Protocorm-like body, PLB)。类原球茎的发生途径可通过愈伤组织 (Park et al, 2003) 或由茎尖、幼叶等器官直接产生 (Begum et al, 1994; Ishii et al, 1998; Chen et al, 1999)。许多研究者认为兰花体细胞胚胎的发生是 PLB 形成的早期阶段, 蝴蝶兰类原球茎的诱导过程就是典型的体细胞胚胎发生过程 (Begum et al, 1994; Chen et al, 1999, 2006; 秦凡和周吉源, 2003)。关于蝴蝶兰叶片离体培养直接诱导胚状体虽有少数报道 (Begum et al, 1994; Chen et al, 2006), 但诱导效率不高, 所用植物生长调节剂也是价格极为昂贵的 TDZ 等。本试验以蝴蝶兰试管苗幼叶片为外植体, 系统研究了最为常用的几种植物生长调节剂的不同浓度及其组合、新鲜椰汁、蔗糖浓度等多种因子对胚状体发生的影响, 建立了蝴蝶兰叶片离体培养胚状体高效发生体系; 同时对发生胚状体的叶片进行了组织学观察, 试图阐明蝴蝶兰类原球茎发生发育的组织细胞学特征及其分化成苗的一些组织培养特性, 为进一步研究兰花胚状体形成的机制以及完善工厂化育苗技术提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

材料为安徽科技学院通过花梗芽培育的蝴蝶兰试管苗, 品种为条纹花系‘霍娅淑女’, 所用外植体为 3~4 片叶试管苗的顶部两片叶。基本培养基为 1/2MS, 添加 4.0 g/L 琼脂粉作为凝固剂, 高压灭菌前用 1.0 mol/L KOH 溶液调节 pH 5.5。植物生长调节剂组合、蔗糖浓度、添加椰汁量等见表 1~4。将叶片切成约 1 cm 见方接种于不同的培养基上, 每处理 10 瓶, 每瓶接种 4 块, 叶片正面向上。培养室温度 (25 ±1) °C, 光照强度约 1 500 lx (光源为 40 W 日光灯), 光照时间 12 h/d。

待叶片表面出现芽点状突起时, 制作常规石蜡切片, 切片厚度 8 μm, 番红、固绿染色, 光学显微镜下拍照 (Olympus-CY30, Japan)。接种后 50 d 统计胚状体或愈伤组织发生情况。形成率 = 形成胚状体块数 / 接种外植体总块数。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物生长调节剂对叶片胚状体诱导的影响

2.1.1 6-BA 和 NAA 及其组合的影响 如表 1 所示, 6-BA 对胚状体的形成起关键作用, 单独使用 6-BA 或与 NAA 配合使用, 均能诱导原球茎或愈伤组织的形成, 但 NAA 单独使用时则不能。

表 1 6-BA 和 NAA 对蝴蝶兰叶片诱导胚状体的影响

Table 1 Effects of 6-BA and NAA on somatic embryogenesis from Phalaenopsis leaf

处理号 Treatment code	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	形成胚状体时间 Time of somatic embryogenesis formed (d)	胚状体数 Number of somatic embryogenesis	形成率 Somatic embryogenesis formed rate (%)	愈伤组织 Callus
F1	0.0	0.0		0	0.0e	-
F2	0.0	1.0		0	0.0e	-
F3	0.0	2.0		0	0.0e	-
F4	2.0	0.0		0	0.0e	+
F5	2.0	1.0	47	2	5.0d	+
F6	2.0	2.0	45	5	12.5cd	++
F7	4.0	0.0	40	9	22.5bc	-
F8	4.0	1.0	40	12	30.0b	-
F9	4.0	2.0	40	15	37.5a	-
F10	8.0	0.0	38	7	17.5c	-
F11	8.0	1.0	37	16	40.0a	-
F12	8.0	2.0	37	15	37.5a	-

注: 基本培养基为 1/2MS + 蔗糖 20 g/L + 椰汁 200 mL/L; “+”表示有极少量愈伤组织, “++”表示有少量愈伤组织, “-”表示无愈伤组织; 小写字母表示 5% 水平上差异显著。

Note: Basic medium is 1/2MS + sucrose 20 g/L + coconut water 200 mL/L; “+” means few of calli; “++” means a few of calli; “-” means no callus; Different small letters mean significance at  $P < 0.05$ .

6-BA在低浓度 (2.0 mg/L) 单独作用时, 只能形成极少量的愈伤组织, 而与 NAA 配合使用时, 既有少量愈伤组织又有少数胚状体形成。6-BA在较高浓度 (4.0 ~ 8.0 mg/L) 时, 均有胚状体产生, 但无 NAA 配合使用时, 胚状体的形成率相对较低, 而有 NAA 配合使用时形成率显著提高, 可达 37.5% ~ 40.0%。另外, 叶片表面产生肉眼可见胚状体的培养时间随 6-BA 浓度的提高而缩短。虽然 NAA 单独使用不能诱导出胚状体或愈伤组织, 但其与 6-BA 的配合使用能有效提高胚状体的形成率。在所有的处理中, 从接种后 3 d 起, 叶片伤口处的分泌物逐渐褐化, 随着培养时间的延长, 褐化程度逐渐加重, 最终使培养基褐变 (图版, A), 各处理间无明显差异。

2.1.2 Ad 和 NAA 及其组合的影响 如表 2 所示, 不同浓度 Ad (腺嘌呤硫酸盐) 及其与 NAA 的配合使用对蝴蝶兰叶片胚状体的发生影响较大。Ad 在单独使用时不能诱导胚状体的形成或形成率低。与 NAA 配合使用时, 只有在浓度为 2.0 mg/L 和 4.0 mg/L 时胚状体的形成率相对较高, 而在高浓度 8.0 mg/L 时胚状体的形成率反而降低, 培养的部分叶片在培养后期有黄化现象。总体来看 Ad 的诱导效果较 6-BA 差, 不能诱导愈伤组织的形成。Ad 在高浓度时能缩短胚状体发生的培养时间, 这一点与 6-BA 作用效果相似。NAA 在与较低浓度的 Ad 配合使用时也能有效促进胚状体的形成。

表 2 Ad 和 NAA 对蝴蝶兰叶片诱导胚状体的影响

Table 2 Effects of Ad and NAA on somatic embryogenesis from *Phalaenopsis* leaf

处理号 Treatment code	Ad (mg/L)	NAA (mg/L)	形成胚状体时间 Time of somatic embryogenesis formed (d)	胚状体数 Number of somatic embryogenesis	形成率 Somatic embryogenesis formed rate (%)	愈伤组织 Callus
II-1	0.0	0.0		0	0.0e	-
II-2	0.0	1.0		0	0.0e	-
II-3	0.0	2.0		0	0.0e	-
II-4	2.0	0.0		0	0.0e	-
II-5	2.0	1.0	47	4	10.0c	-
II-6	2.0	2.0	47	7	17.5b	-
II-7	4.0	0.0	45	6	15.0b	-
II-8	4.0	1.0	45	10	25.0a	-
II-9	4.0	2.0	36	11	27.5a	-
II-10	8.0	0.0	33	2	5.0d	-
II-11	8.0	1.0	32	4	10.0c	-
II-12	8.0	2.0	33	3	7.5cd	-

注: 基本培养基为 1/2MS + 蔗糖 20 g/L + 椰汁 200 mL/L; “-”表示无愈伤组织。

Note: Basic medium is 1/2MS + sucrose 20 g/L + coconut water 200 mL/L; “-” means no callus

2.1.3 6-BA、Ad 和 NAA 组合的影响 表 3 的结果表明, 6-BA、Ad 和 NAA 的组合能显著提高胚状体的发生率, 表现出较强的协同效应。其中处理 -5 的诱导率达到了 65.0%, 诱导率最低的处理 -8 也达到了 37.5%。6-BA 4.0 mg/L、Ad 2.0 ~ 4.0 mg/L、NAA 1.0 ~ 2.0 mg/L 的组合较为适宜。

表 3 6-BA、Ad 和 NAA 组合对蝴蝶兰叶片诱导胚状体的影响

Table 3 Effects of 6-BA, Ad and NAA on somatic embryogenesis from *Phalaenopsis* leaf

处理号 Treatment code	6-BA (mg/L)	Ad (mg/L)	NAA (mg/L)	形成胚状体时间 Time of somatic embryogenesis formed (d)	胚状体数 Number of somatic embryogenesis	形成率 Somatic embryogenesis formed rate (%)	愈伤组织 Callus
-1	4.0	2.0	1.0	35	24	60.0 a	-
-2	4.0	4.0	1.0	35	20	50.0 b	-
-3	8.0	2.0	1.0	40	16	40.0 c	-
-4	8.0	4.0	1.0	41	17	42.5 c	-
-5	4.0	2.0	2.0	33	26	65.0 a	-
-6	4.0	4.0	2.0	32	25	62.5 a	-
-7	8.0	2.0	2.0	40	19	47.5 b	-
-8	8.0	4.0	2.0	39	15	37.5 d	-

注: 基本培养基为 1/2MS + 蔗糖 20 g/L + 椰汁 200 mL/L; “-”表示无愈伤组织。

Note: Basic medium is 1/2MS + sucrose 20 g/L + coconut water 200 mL/L; “-” means no callus

## 2.2 蔗糖浓度及椰汁对叶片胚状体诱导的影响

关于蔗糖浓度及椰汁对蝴蝶兰类原球茎诱导的影响相关研究已有一些报道 (鲁雪华 等, 2002; 何松林 等, 2003; Chen et al, 2006), 但结果不尽相同, 除了与品种、外植体、培养条件等不同因素有关外, 培养基中的植物生长调节剂种类和浓度是不可忽视的重要因素。表 4 结果表明, 在经过 6-BA、Ad 和 NAA 优化组合的培养基中添加椰汁添加 200 mL/L 较为合适。在椰汁添加量不变的情况下, 随着蔗糖浓度增加, 胚状体形成率也有增大的趋势。在椰汁添加量为 200 mL/L 时, 培养基中蔗糖浓度为 20 ~ 40 g/L 时较适合胚状体的形成。

表 4 蔗糖及椰汁对叶片胚状体诱导的影响

Table 4 Effects of sucrose and coconut water on somatic embryogenesis from *Phalaenopsis* leaf

处理号 Treatment code	椰汁 Coconut water (mL/L)	蔗糖 Sucrose (g/L)	形成胚状体时间 Time of somatic embryogenesis formed (d)	胚状体数 Number of somatic embryogenesis	形成率 Somatic embryogenesis formed rate (%)	愈伤组织 Callus
N-1	100	10	40	18	45.0c	-
N-2	200	10	35	18	45.0c	-
N-3	400	10	32	17	42.5cd	-
N-4	100	20	39	20	50.0bc	-
N-5	200	20	33	27	67.5a	-
N-6	400	20	32	22	55.0b	-
N-7	100	40	37	21	52.5b	-
N-8	200	40	33	28	70.0a	-
N-9	400	40	33	25	62.5ab	-

注: 基本培养基为 1/2MS + 6-BA 4.0 mg/L + Ad 2.0 mg/L + NAA 2.0 mg/L; “-”表示无愈伤组织。

Note: Basic medium is 1/2MS + 6-BA 4.0 mg/L + Ad 2.0 mg/L + NAA 2.0 mg/L; “-” means no callus

## 2.3 胚状体发生发育的组织学观察

叶片形成绿色芽点状胚状体和黄绿色愈伤组织的部位主要位于叶片表面和切口边缘 (图版, A、B), 胚状体的形成主要起源于叶片上表皮气孔附近的单细胞或上表皮细胞下方的一些叶肉细胞 (图版, E、F)。Chen 等 (2006) 也证明蝴蝶兰叶片胚状体起源于叶片上表皮的单细胞, 但他们未见胚状体起源于叶肉细胞。发生胚状体的原始细胞的细胞质浓厚, 染色较深, 与周围其余细胞有着较为明显的界限 (图版, E、F), 这与一般的体细胞胚胎发生的特征类似。原始细胞经过多次分裂后, 较快地形成细胞较小、胞质浓厚的多细胞球形胚 (图版, G、H), 但仍与其它组织有较紧密的联系。叶表皮形成的多细胞胚继续发育成拳头状突起的心形胚 (图版, I、J), 整个胚体随着发育的推进, 与周围其它组织的联系越来越疏松, 处于联结部位的其它叶肉组织细胞拉长变大, 成为结构疏松的薄壁组织 (图版, J、K 箭头所示), 这一方面可能与迅速膨大的体细胞胚营养物质的运输有关, 另一方面也为发育长大成为原球茎个体易于从母体叶片的分离奠定了组织学基础。突起的心形胚继续发育, 其周边的细胞分裂生长迅速, 中间逐渐凹陷, 最终形成类似于典型的植物茎尖生长点结构状的心形胚。这种体胚已是相当成熟, 进一步发育即形成较大的颗粒状的原球茎 (图版, C)。另外, 发育中的胚状体一些细胞也可作为新的胚状体发生的原始细胞, 形成新的胚状体 (图版, L), 这可能是原球茎不断分裂形成一团类似桑葚果状类原球茎的细胞组织学基础。

## 2.4 原球茎增殖及分化成苗

将叶片诱导形成的胚状体 (或类原球茎) 连同部分叶片切下在上述筛选的诱导效果最好的培养基中继代培养 (图版, B), 直至形成肉眼可见的嫩绿色、颗粒状的原球茎 (图版, C), 再转瓶于含有不同种类、浓度激素的分化苗培养基中培养 (数字未列)。约 3 周, 类原球茎从顶部分化出 1 ~ 2 片幼叶 (图版, D)。总的来看蝴蝶兰类原球茎分化苗较为容易, 低浓度激素甚至不加任何外源激素均可有效再生成苗, 且随着培养时间的延长, 再生成苗率不断提高。

### 3 讨论

6-BA、Ad和 NAA 配合使用能有效诱导蝴蝶兰叶片胚状体的发生, 其最佳浓度组合为 6-BA 4.0 mg/L +Ad 2.0 ~ 4.0 mg/L +NAA 1.0 ~ 2.0 mg/L。在此植物生长调节剂条件下, 蔗糖浓度及椰汁的添加量对胚状体的诱导率会产生一定的影响, 蔗糖 20 ~ 40 g/L +椰汁 200 mL/L 较为适合蝴蝶兰叶片胚状体的形成。组织学观察表明, 胚状体起源于叶片气孔附近的上表皮细胞或上表皮下方的叶肉组织细胞, 为单细胞起源。其发育过程与一般植物胚状体发生发育特征相似, 最终形成为成熟的胚状体——类原球茎。蝴蝶兰类原球茎比较易于分化发育成新的植株。

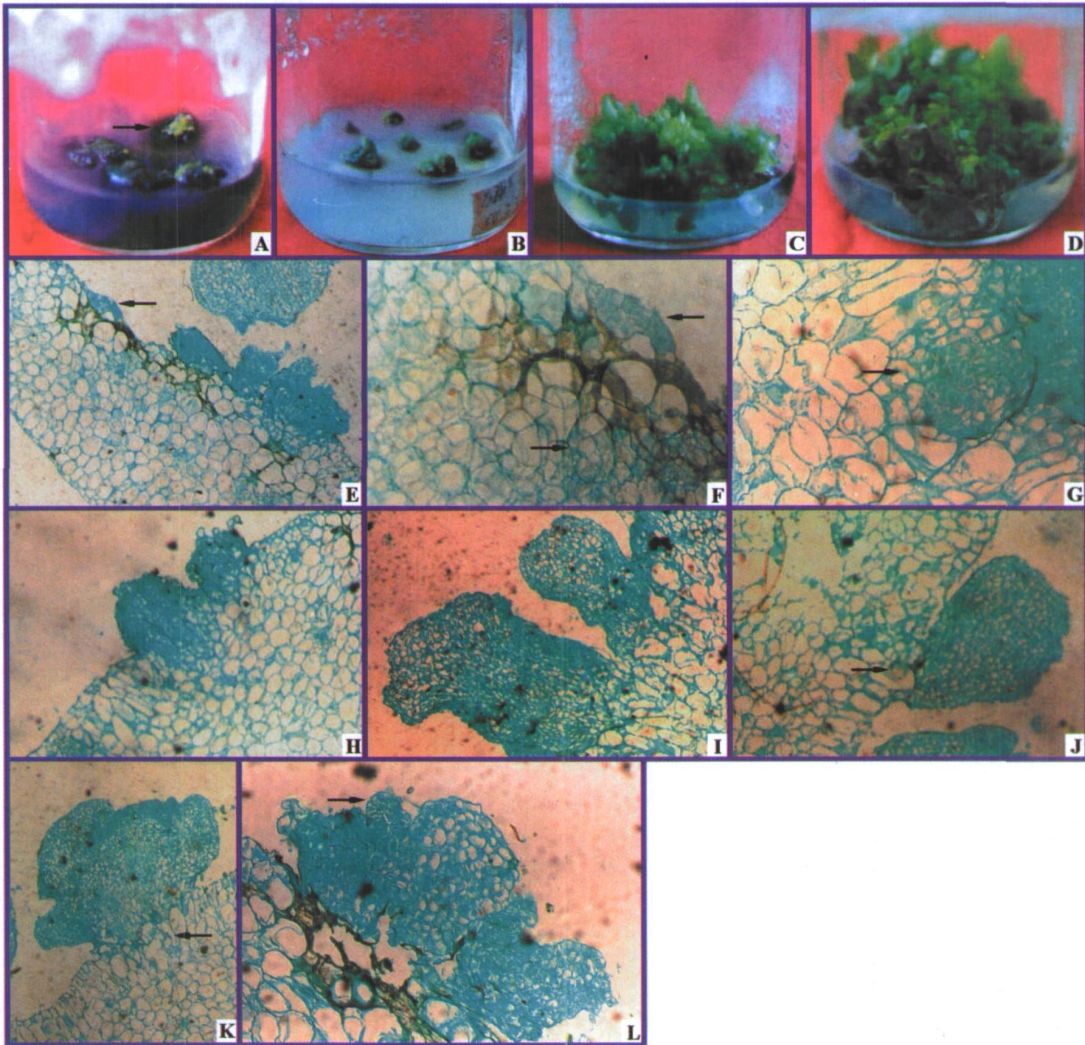
本试验的结果从组织学的角度进一步证明了蝴蝶兰离体培养叶片胚状体或类原球茎的发生可从表皮单细胞或靠近上表皮的叶肉细胞起源, 其发生发育过程同一般的植物相似。但就胚细胞起源来看, 又与其它植物不同, 胚细胞仅起源于叶片上表皮细胞或上表皮下方的一些叶肉细胞, 而未见叶片下表皮细胞起源的胚细胞, 其原因还有待于进一步的研究。

本试验结果与秦凡和周吉源 (2003) 研究认为 6-BA 在促进蝴蝶兰体细胞胚胎发生过程中起着决定作用的观点一致, 6-BA 在较高浓度下与 Ad、NAA 相互配合使用时获得了高效的胚状体诱导体系。这 3 种植物生长调节剂的配合使用, 特别是 6-BA 和 Ad 的配合使用对文心兰原球茎的诱导、增殖和丛芽的诱导、增殖也有较强的“加性效应” (崔广荣等, 2004, 2005)。这些结果提示我们, 这 3 种植物生长调节剂的优化组合有可能对其它兰花尤其是洋兰胚状体的发生、原球茎的诱导、增殖有较好的促进作用, 这还有待进一步的试验证明。

### References

- Begum A A, Tamaki M, Tahara M, Kako S. 1994. Somatic embryogenesis in *Cymbidium* through in vitro culture of inner tissue of protocorm-like bodies. *Jpn Soc Hortic Sci*, (63): 419 - 427.
- Chen J T, Chang C, Chang W C. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Rep*, (19): 143 - 149.
- Chen J T, Chang W C. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, (6): 169 - 173.
- Chen Zhang, Cai You-hua. 2000. Foreign orchid. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press: 47 - 51. (in Chinese)
- 陈璋, 蔡幼华. 2000. 洋兰. 福州: 福建科学技术出版社: 47 - 51.
- Cui Guang-rong, Liu Shi-xun, He Yu-hua, Liu Yun-bing, Gu Ye-li. 2005. Establishment of the high efficiency system of *Oncidium* shoot propagation. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 25 (3): 562 - 567. (in Chinese)
- 崔广荣, 刘士勋, 何玉华, 刘云兵, 谷业理. 2005. 文心兰试管苗丛生芽高效增殖体系的建立. *西北植物学报*, 25 (3): 562 - 567.
- Cui Guang-rong, Liu Shi-xun, Liu Ming, Wang Qing-yun, He Yu-hua, Zhang Ning. 2004. Study on shoot tip tissue culture of *Oncidium*. *Seed*, 23 (12): 16 - 19. (in Chinese)
- 崔广荣, 刘士勋, 刘敏, 王青云, 何玉华, 张宁. 2004. 文心兰茎尖组织培养的研究. *种子*, 23 (12): 16 - 19.
- He Song-lin, Wang Xian, Lu Lin, Liu Bao-guo, Ren Ning-hui, Yang Qiu-Sheng. 2003. The effect of culture media and organic compounds on the differentiation of *Phalaenopsis* PLB. *Journal of Central South Forestry University*, 23 (5): 11 - 13. (in Chinese)
- 何松林, 王献, 鲁琳, 刘保国, 任凝辉, 杨秋生. 2003. 培养基和添加物对蝴蝶兰原球茎分化幼苗的影响. *中南林学院学报*, 23 (5): 11 - 13.
- Ishii Y, Takamura T, Goi M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep*, (17): 446 - 450.
- Liu Zhen-hua, Ge Hong, Guo Shao-xia, Liu Hong-tao. 2005. Studies of antibrowning in the tissue culture of *Phalaenopsis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 732 - 734. (in Chinese)
- 刘真华, 葛红, 郭绍霞, 刘洪涛. 2005. 蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究. *园艺学报*, 32 (4): 732 - 734.
- Lu Xue-hua, Guo Wen-Jie, Xu Li-hui, Lin Xin-hua. 2002. The preliminary research on the rapid propagation of *Phalaenopsis* by using the joint-points of flower-stems as explants. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (5): 491 - 492. (in Chinese)
- 鲁雪华, 郭文杰, 徐立晖, 林新华. 2002. 蝴蝶兰花梗节间段培养繁殖的初步研究. *园艺学报*, 29 (5): 491 - 492.
- Park S Y, Murthy H N, Paek K Y. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science*, (164): 919 - 923.

- Qin Fan, Zhou Ji-yuan. 2003. Effect of different hormone on rapid propagation of *Phalaenopsis*. Journal of Wuhan Botanical Research, 21 (5): 452 - 456. (in Chinese)
- 秦 凡, 周吉源. 2003. 不同生长调节剂对蝴蝶兰快速繁殖的影响. 武汉植物学研究, 21 (5): 452 - 456.
- Wei Qi, Li Feng-lan, Hu Guo-fu, Hu Bao-zhong. 2006. Review of research on the plant tissue culture of *Phalaenopsis* hybrid. Acta Horticulturae Sinica, 32 (4): 915 - 920. (in Chinese)
- 魏 琪, 李凤兰, 胡国富, 胡宝忠. 2006. 蝴蝶兰快速繁殖研究进展. 园艺学报, 33 (4): 915 - 920.



图版说明: A. 叶片表面形成芽点状突起的胚状体 (箭头所示); B. 连同叶片切下的胚状体继代培养; C. 继代增殖生长的原球茎; D. 原球茎分化苗; E. 起源于气孔附近叶片上表皮细胞的多细胞胚 (箭头所示, 40  $\times$ ); F. 起源于气孔附近叶片上表皮细胞和叶肉细胞的多细胞胚 (箭头所示, 100  $\times$ ); G. 起源于叶肉细胞的圆球胚 (箭头所示, 100  $\times$ ); H. 来源于叶肉细胞的球形胚从叶片表面突起 (40  $\times$ ); I. 发育成熟过程中与周围组织联系较为紧密的心形胚; J. 发育成熟胚与其它组织联系疏松 (40  $\times$ ); K. 类似于植物茎尖生长点结构的成熟心形胚 (40  $\times$ ); L. 胚体上又发生次生胚 (箭头所示, 100  $\times$ )。

**Explanation of plates:** A. Embryoid formed in the upper surface of leaf explants (arrow); B. Embryoid subcultured in the optimum medium; C. Protocorm-like body (PLB) proliferation in subculture; D. Plantlets regeneration from PLBs; E. Somatic embryos originated from upper epidermis single cell nearby stoma (arrow, 40  $\times$ ); F. Somatic embryos originated from upper epidermis and mesophyll single cell nearby stoma (arrow, 100  $\times$ ); G. Poly-cell somatic embryos originated from mesophyll cell (arrow, 100  $\times$ ); H. Globular embryoid protruding from the surface of leaf explants (40  $\times$ ); I. Heart-shaped embryoid linked closely with other tissue during development (40  $\times$ ); J. Mature heart-shaped embryoid linked loosely with other tissue (40  $\times$ ); K. Mature heart-shaped embryoid similar to the structure of plant shoot-tip (arrow, 40  $\times$ ); L. Secondary somatic embryo on the embryoid (arrow, 100  $\times$ ).