

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2026.02.006

杜鹃兰体胚发生细胞学观察和生理生化差异

高 晗¹, 王毅敏¹, 李 薇¹, 梁宏伟², 杨艾菊³, 高本旺¹

(1.三峡植物园,湖北 宜昌 443100)
(2.三峡大学生物与制药学院,湖北 宜昌 443002)
(3.宜昌市夷陵区樟村坪林场,湖北 宜昌 443100)

[摘要] 本研究以建立稳定的杜鹃兰(*Cremastra appendiculata*)体胚发生和再生体系,促进珍稀药用植物杜鹃兰种质资源保存和规模化繁殖,为其遗传转化提供依据。以杜鹃兰未成熟幼胚为外植体,诱导杜鹃兰愈伤组织,研究不同浓度及配比(IBA 与 6-BA 组合)的植物生长调节剂对愈伤组织增殖的影响;对不同形态的愈伤组织进行了形态学和生理生化差异分析(可溶性糖、可溶性蛋白及抗氧化酶活性检测);利用体视显微镜观察和石蜡切片技术详细研究了体细胞胚的起源及发育过程。结果显示,杜鹃兰种子可通过 1/2 MS 培养基诱导出淡黄色愈伤组织,愈伤组织增殖最适培养基为 MS+(0.5 mg/L、1 mg/L) IBA+(2 mg/L、3 mg/L) 6-BA,增殖形成的胚性愈伤组织可在添加 0.2 mg/L IBA 的 1/2 MS 培养基上诱导再生植株,通过体视显微镜及组织切片观察,杜鹃兰细胞胚经过球形胚、梨形胚、凹沟胚和子叶胚阶段,与合子胚发育过程类似。不同形态愈伤组织可溶性糖、可溶性蛋白及抗氧化酶活性具有显著差异,其中 I 型愈伤组织胚状体发生潜力最大, I 型、III 型愈伤组织抗逆性最强。本研究成功建立了杜鹃兰的体细胞胚胎发生与植株再生体系,确定了关键的培养基配方(诱导、增殖和再生)。结果揭示了不同形态愈伤组织的生理生化特性及其与胚状体发生潜力和抗逆性的关联,并明确了杜鹃兰体细胞胚与合子胚发育过程的相似性。

[关键词] 杜鹃兰,体胚发生,细胞学观察,生理生化

[中图分类号] S682.31 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2026)02-0059-08

Cytological Observation and Physiological and Biochemical Difference of Embryogenesis in Callus of *Cremastra appendiculata*

Gao Han¹, Wang Yimin¹, Li Wei¹, Liang Hongwei², Yang Aiju³, Gao Benwang¹

(1. Three Gorges Botanical Garden, Yichang 443100, China)
(2. College of Biological and Pharmaceutical Sciences of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)
(3. Zhangcunping Forest Farm in Yiling District, Yichang 443100, China)

Abstract: The study was to establish a stable somatic embryogenesis and regeneration system for *Cremastra appendiculata*, promote the conservation of germplasm resources and large-scale propagation of this rare medicinal plant, and provide a basis for its genetic transformation. Immature embryos of *C. appendiculata* were used as explants to induce callus formation. The effects of plant growth regulators at various concentrations and ratios (combinations of IBA and 6-BA) on callus proliferation were systematically investigated. Morphological and physiological-biochemical differences among various callus types were analyzed, including assays of soluble sugars, soluble proteins, and antioxidant enzyme activities. Furthermore, stereomicroscopic observation and paraffin sectioning techniques were employed to examine the origin and developmental process of somatic embryos in detail. Seeds of *C. appendiculata* could induce pale-yellow callus on 1/2 MS medium. The optimal medium for callus proliferation was MS supplemented with IBA (0.5 mg/L, 1 mg/L) combined with 6-BA (2 mg/L, 3 mg/L). Embryogenic callus formed under these conditions could regenerate plants on 1/2 MS medium containing 0.2 mg/L IBA. Observations *via* stereomicroscopy and tissue sections revealed that *C. appendiculata* somatic embryos developed through globular, pear-shaped, cotyledonary and mature embryo stages, similar to the development of zygotic embryos. Significant differences in soluble sugar, soluble protein content and antioxidant enzyme activities were observed among callus types. Type I callus exhibited the highest embryoid potential,

收稿日期: 2025-10-20.

基金项目: 2024 年湖北省林业生态文明建设资金项目(42000021816T300000130)、湖北省重点实验室开放课题项目(SNJGKL202103)、湖北省科技厅中央引导地方科技发展项目(2022BGE265).

通讯作者: 高本旺, 高级工程师, 研究方向: 植物引种驯化及应用. E-mail: 953146673@qq.com

whereas Types I and III callus showed the strongest stress resistance. This study successfully established a somatic embryogenesis and plant regeneration system for *C. appendiculata* and identified key medium formulations for induction, proliferation and regeneration. The results reveal the physiological and biochemical characteristics of different callus types and their correlation with embryoid potential and stress tolerance, and confirm the similarity between the developmental processes of somatic and zygotic embryos in *C. appendiculata*.

Key words: *C. appendiculata*, somatic embryogenesis, cytological observation, physiology and biochemistry

兰科植物是单子叶植物中的第一大科,也是生物学研究的热点类群之一。由于兰科植物适生生境狭窄,且种子细小,自然条件下极难萌发,致使野生兰科植物日渐稀少,逐渐成为生物多样性保护的“旗舰”类群之一。植物组织培养被广泛应用于兰科植物的繁殖及遗传多样性保护研究,且其在组织培养领域以类原球茎的形式完成植株再生的过程已被普遍认可^[1],如大花蕙兰^[2]、石斛^[3]、蝴蝶兰^[4]等。现有研究中有关杜鹃兰组织培养的研究也大多如此^[5-6]。杜鹃兰(*C. appendiculata*)为杜鹃兰属(*Cremastra*)多年生地生草本植物,适生海拔 500~2 900 m,属国家二级保护物种。在我国具有悠久的药用历史,具有化痰散结、清热解毒功效,其提取物具有抗癌^[7-8]、抗氧化^[9-10]、神经保护^[11]等作用。随着其药用成分的开发利用,市场需求扩大,杜鹃兰野生资源被过度采挖,野生资源急剧减少。杜鹃兰成熟种子因内种皮的存在通过休眠度过寒冷期,在特定的真菌及适宜的环境条件下才开始萌发;而在无菌萌发过程中,内种皮也阻碍了种胚吸水及营养物质的吸收^[12]。目前人工栽培繁殖主要利用种球及组培育苗,繁殖系数低,生产周期长。杜鹃兰的相关研究主要集中在其药用成分、种子萌发^[12-13]、组织培养^[6]等方面,对于其体细胞胚胎发生起源及发育过程鲜有报道。本研究通过间接体胚发生途径:愈伤组织诱导、增殖、体胚发生完成植株再生的过程,并通过组织切片观察体胚发生起源及发育过程,为杜鹃兰种质资源保存及规模化繁殖提供重要途径,同时为其生物技术育种和遗传转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试未成熟的杜鹃兰蒴果采自湖北省五峰土家族自治县。

1.2 方法

1.2.1 植物组织培养

(1)愈伤组织诱导

将采集的未成熟杜鹃兰蒴果流水冲洗 30 min,于无菌操作台进行 75%酒精浸泡消毒 1 min,0.1%升汞溶液浸泡消毒 12 min。酒精消毒后无菌水冲洗 3 次,升汞消毒后无菌水冲洗 6 次。消毒灭菌完成后于无菌操作台上用解剖刀切开蒴果,将种子均匀接种于愈伤组织诱导培养基上。愈伤组织诱导培养基 1/2 MS 为基本培养基。

(2)愈伤组织增殖诱导及体胚发生

采用三因素及双因素正交试验设计,将杜鹃兰愈伤组织转接到(1/4,1/2,1)MS+(0 mg/L,0.1 mg/L,0.2 mg/L,0.5 mg/L,1 mg/L)IBA+(0 mg/L,1 mg/L,1.5 mg/L,2 mg/L,3 mg/L)6-BA 中,实验处理设计见表 1。培养 30 d 后观察杜鹃兰愈伤组织增殖、分化、褐化情况及形态变化,统计增殖的愈伤组织块占比。

表 1 杜鹃兰愈伤组织增殖诱导及体胚发生实验正交设计表

Table 1 Orthogonal design for callus proliferation induction and somatic embryogenesis in *C. appendiculata*

基本培养基	MS	MS	MS	1/2 MS	1/2 MS	1/2 MS	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
IBA/(mg/L)	0.2	0.1	0	0.1	0	0.2	0.2	0.1	0
6-BA/(mg/L)	1	1.5	0	0	1	1.5	0	1	0.5
基本培养基	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
IBA/(mg/L)	0	0	0	0.5	0.5	0.5	1	1	1
6-BA/(mg/L)	1	2	3	1	2	3	1	2	3

(3)植株再生

将杜鹃兰成熟胚性愈伤组织或不定芽转接到添加 0.2 mg/L IBA 的 1/2 MS 培养基中,继续培养至生根成苗。

1.2.2 细胞学鉴定

取各时期的愈伤组织用 70% FAA 固定液固定并排尽气体保存。制作石蜡切片时,取出固定的材料依次用 50%、70%、85%、85%、95%、100%酒精分别脱水 2 h,酒精用量为材料的 3~5 倍。然后酒精中取出后置于 1/2 二甲苯、二甲苯中分别透明 2 h,在盛有材料的小杯中放入少量二甲苯,再加少量蜡屑,放入 38 ℃ 左右温箱过夜,隔天将材料用 60 ℃ 纯石蜡浸泡 4 h,重复 3 次后进行包埋和切片。染色时在通风橱中以二甲苯、1/2 二甲苯分别浸泡 10 min、5 min 脱蜡,随后分别浸入 100%、95%、85%、70%、50%的乙醇 2 min 复水。采用番红固绿染色:番红染色 45 min、蒸馏水洗 3 次,分别浸入 50%、70%、85%、95%的乙醇中 2 min,固绿染色 30 s,95%酸酒精 30 s,100%酒精 2 min,1/2 二甲苯 2 min、二甲苯 2 min,最后用加拿大中性树脂封片。利用显微镜对石蜡切片进行观察和拍照。

1.2.3 生理生化指标测定

可溶性糖测定采用蒽酮比色法,可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法,淀粉测定采用酸水解法将淀粉分解为葡萄糖,而后通过蒽酮比色法测定葡萄糖含量,换算出淀粉含量;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 WST-8 法测定;过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法;过氧化氢酶(CAT)活性测定采用过氧化氢还原法。

每组样品重复 3 次,用 SPSS 23.0 对数据进行差异显著性分析,Graphpad Prism 9.5 软件制图。

2 结果与分析

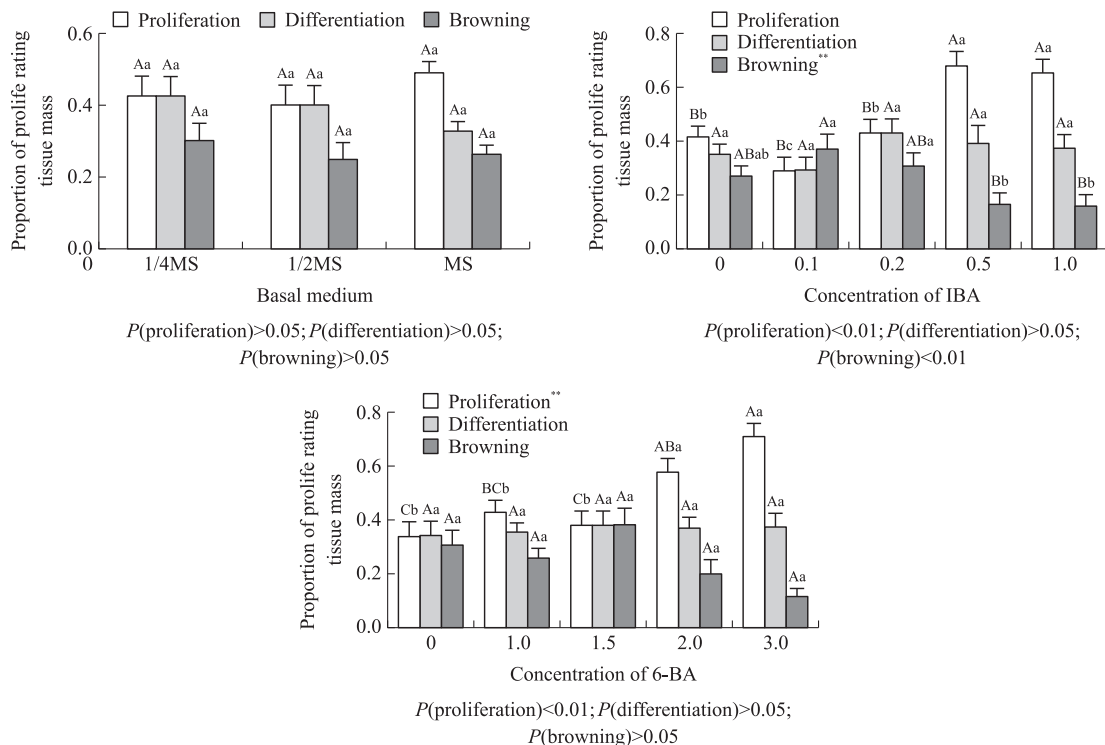
2.1 愈伤组织诱导

杜鹃兰种子于诱导培养基中培养 120 d,仅有少量杜鹃兰种子可见吸水膨大,继续培养 30~60 d,通过“饥饿”胁迫,20%杜鹃兰种子诱导出淡黄色愈伤组织。

2.2 愈伤组织增殖

杜鹃兰愈伤组织转接于增殖培养基后,20~30 d 可见明显增殖,为淡黄色、紧密、质地较硬的胚性愈伤组织,部分接种的愈伤组织块出现分化或褐化现象。

对具有增殖、分化、褐化现象的愈伤组织块数量进行统计分析,结果如图 1 所示。IBA、6-BA 浓度越高,



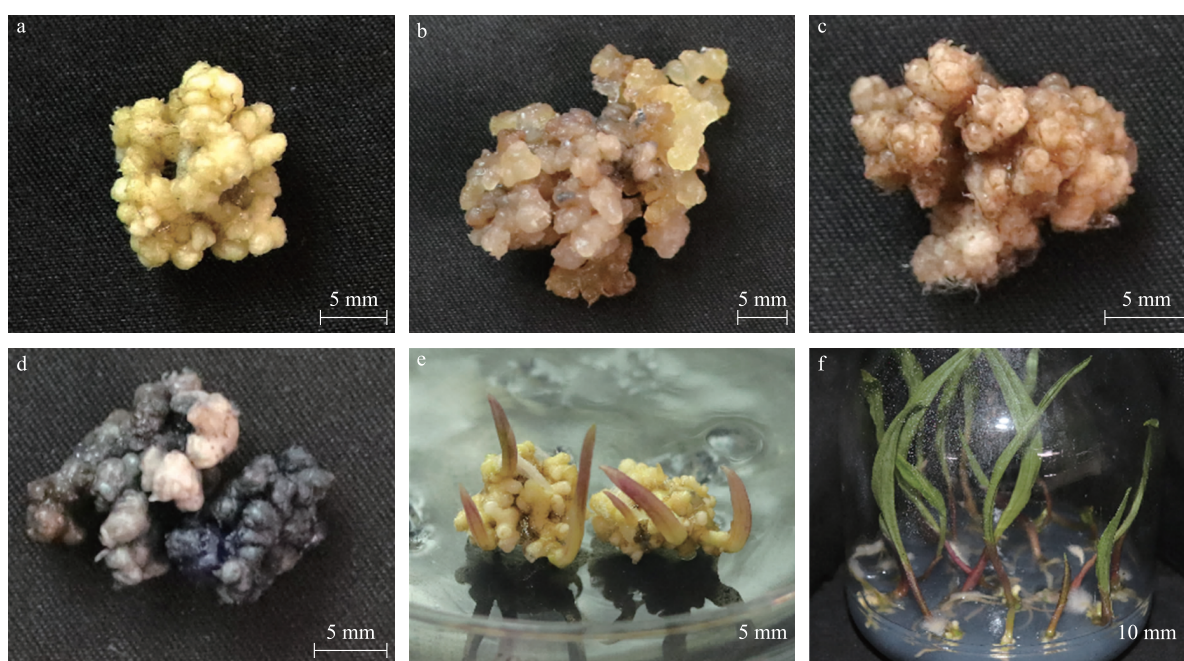
不同大写字母表示 $P < 0.01$ 差异显著,不同小写字母表示 $P < 0.05$ 差异显著(下同)。

图 1 MS、6-BA、IBA 对杜鹃兰愈伤组织生长的影响

Fig. 1 Effects of MS, 6-BA and IBA on callus growth of *C. appendiculata*

杜鹃兰愈伤组织增殖越明显;杜鹃兰愈伤组织分化比例,随 IBA 浓度的升高呈现先升高后降低的趋势. 通过方差分析,本实验范围内,交互作用对杜鹃兰愈伤组织增殖、分化及褐化现象的影响不显著,基础培养基对杜鹃兰愈伤组织生长影响差异不显著,但其中 MS 培养基中愈伤组织增殖的组织块比例最大. IBA 浓度对愈伤组织块的增殖及褐化现象具有显著影响,IBA 浓度为 0.5 mg/L 和 1 mg/L 时,杜鹃兰愈伤组织增殖的组织块比例最大,褐化的比例最小. 6-BA 浓度对愈伤组织增殖具有显著影响,浓度为 2 mg/L 和 3 mg/L 时其增殖比例最大.

杜鹃兰愈伤组织培养过程中,观测其形态学差异发现,杜鹃兰愈伤组织呈现 4 种形态: I 型愈伤组织形态特征表现为淡黄色、紧密、硬实(图 2a); II 型愈伤组织形态特征表现为半透明黄褐色、水渍状、松软(图 2b); III 型愈伤组织形态特征表现为黄褐色、紧密、硬实(图 2c); IV 型愈伤组织形态特征表现为黑色、紧实、易松散(图 2d). 其中 I 型愈伤组织通过继代培养能够继续增殖并形成不定芽成苗, II 型、III 型、IV 型愈伤组织通过继代培养均能诱导出 I 型愈伤组织而后增殖并形成不定芽成苗.



a. I 型愈伤组织;b. II 型愈伤组织;c. III 型愈伤组织;d. IV 型愈伤组织;e. 不定芽;f. 再生植株.

图 2 杜鹃兰愈伤组织和植株再生

Fig. 2 Callus and plant regeneration of *C. appendiculata*

2.3 植株再生

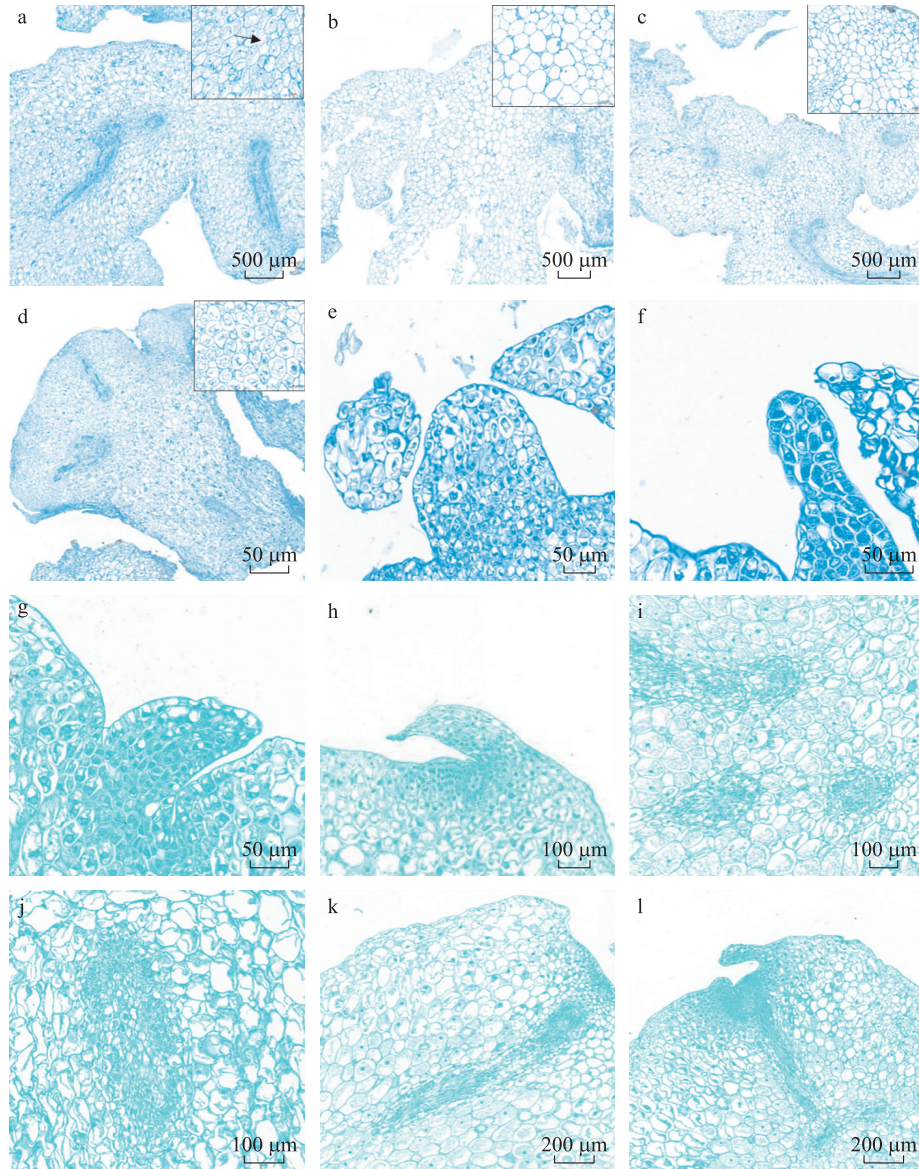
将成熟体细胞胚或已形成的幼芽转接到 1/2 MS 上添加 0.2 mg/L IBA 的培养基中继续培养观察,15~20 d 后可观察到再生植株不定芽生长(图 2e),20~30 d 可见地上部分成苗,45~60 d 可见生根(图 2f).

2.4 愈伤组织细胞学观察分析

通过组织切片观测不同形态愈伤组织的形态差异: I 型愈伤组织切片中细胞排列整齐而紧密,细胞核明显,有分散的、大量的淀粉粒,细胞处于不断分裂状态(图 3a); II 型愈伤组织细胞体积大、排列疏松、无规则、不易染色,细胞核不明显,无淀粉粒(图 3b); III 型愈伤组织细胞体积大,细胞核不明显,无淀粉粒,可观察到体胚发生(图 3c); IV 型愈伤组织细胞排列紧密有规则、细胞核明显,无淀粉粒(图 3d).

通过石蜡切片进一步明确杜鹃兰体细胞胚胎发生的过程发现,杜鹃兰体胚发生包括外起源和内起源两种方式,通过石蜡切片显微图像初步统计,外起源占比 64.41%,内起源占比 35.59%. 外起源过程:愈伤组织表层细胞分裂,形成突出于表层或位于表层下的胚性细胞,胞质浓厚,细胞核染色深,经多次分裂形成细胞团突起,边界规则,排列紧密,形成球形胚(图 3e);球形胚下方细胞继续伸长、生长并分裂产生更多的长条形细胞,头部细胞继续向外分裂生长,更加突出组织表层,细胞排列紧密有规则、胞质浓厚、细胞核染色深,形成梨形胚(图 3f);梨形胚细胞团顶端一侧细胞快速分裂,胚性细胞团向一侧弯曲,形成凹沟胚(图 3g);凹沟胚细胞进一步向外生长,形成子叶胚(图 3h). 内起源过程:愈伤组织内部胚性细胞分裂形成

多细胞原胚,体积小而紧密,与周围细胞形成明显边界(图 3i);原胚细胞继续分裂形成更大的胚性细胞团,初步显现出两极性(图 3j);继续向两端伸长、生长分裂,出现两极,可明显区分球状的头部和细胞伸长的基部(图 3k);最后突破愈伤组织表层细胞,成为突出于愈伤组织表面的原胚,但仍通过“胚柄”与母体相连(图 3l).



a. I型愈伤组织石蜡切片,右上角为局部放大 100 μm 图片,可见大量染红的淀粉粒;b. II型愈伤组织石蜡切片;c. III型愈伤组织石蜡切片;d. IV型愈伤组织石蜡切片;e.球形胚(外起源);f.梨形胚(外起源);g.凹沟胚(外起源);h.子叶胚(外起源);i.内起源胚性细胞团;j.胚性细胞团继续分裂;k.胚性细胞团向两端伸长、生长分裂;l.突出表层细胞.

图 3 杜鹃兰愈伤组织及体胚发生细胞学观察

Fig. 3 Cytological observation of callus and somatic embryogenesis of *C. appendiculata*

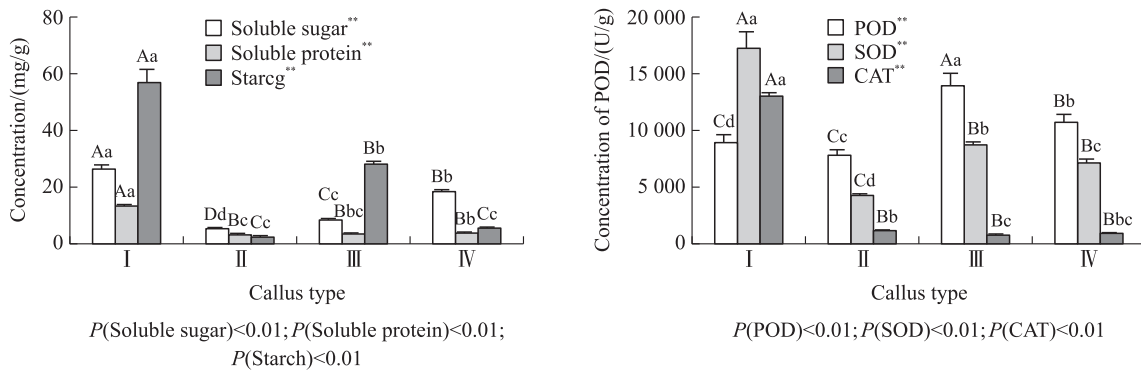
2.5 生理生化指标差异分析

植物体胚发生的复杂进程中,伴随着一系列复杂的生理生化反应,不同的愈伤组织呈现出不同的生理生化特性.

杜鹃兰不同类型愈伤组织可溶性糖含量测定结果如图 4 左, I 型愈伤组织可溶性糖含量明显高于其他 3 种类型愈伤组织, II 型愈伤组织可溶性糖含量次之, III、IV 型愈伤组织可溶性糖含量最低. 不同类型愈伤组织可溶性蛋白含量测定结果如图 4 右, I 型愈伤组织可溶性蛋白含量明显高于其他 3 种类型愈伤组织, III、IV 型愈伤组织可溶性蛋白含量次之, III、IV 型愈伤组织可溶性蛋白含量差异不显著, II、III 型愈伤组织可溶性蛋白含量最低,且两者间差异不显著, II、IV 型愈伤组织可溶性蛋白含量差异显著. 不同类型

愈伤组织淀粉含量测定结果如图 4 左,4 种类型愈伤组织淀粉含量差异显著,淀粉含量大小依次为 I 型>IV 型>III 型>II 型。

杜鹃兰不同类型愈伤组织过氧化物酶(POD)含量测定结果如图 4 右,4 种类型愈伤组织 POD 含量差异显著,含量大小依次为 III 型>IV 型>I 型>II 型;不同类型愈伤组织超氧化物歧化酶(SOD)含量测定结果如图 4 右,4 种类型愈伤组织 SOD 含量差异显著,含量大小依次为 I 型>III 型>IV 型>II 型;不同类型愈伤组织过氧化氢酶(CAT)含量测定结果如图 4 右,I 型愈伤组织 CAT 含量明显高于其他 3 种类型愈伤组织,II、IV 型愈伤组织 CAT 含量次之,II、IV 型愈伤组织 CAT 含量差异不显著,III、IV 型愈伤组织 CAT 含量最低,且两者间差异不显著,II、III 型愈伤组织 CAT 含量差异显著。



左图为不同类型愈伤组织可溶性糖、可溶性蛋白、淀粉含量差异,横坐标为不同类型愈伤组织,纵坐标为指标浓度;右图为不同类型愈伤组织过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)差异,横坐标为不同类型愈伤组织,纵坐标为指标浓度。不同大写字母表示 $P < 0.01$ 差异显著,不同小写字母表示 $P < 0.05$ 差异显著。

图 4 不同形态愈伤组织生理生化指标差异

Fig. 4 Differences in physiological and biochemical indexes of different forms of callus

3 讨论

杜鹃兰植物组织培养研究多依赖种子或假鳞茎诱导类原球茎(protocorm-like bodies, PLBs)进行营养繁殖,旨在促进 PLBs 的快速增殖与丛生芽形成^[5-6]。本研究从未成熟幼胚出发,通过 IBA 与 6-BA 的特定配比诱导出胚性愈伤组织,进而启动体胚发生程序,其发育阶段(球形胚、梨形胚、子叶胚)与合子胚高度相似,表明细胞经历了真正的胚胎发育途径,而非简单的器官发生。以幼胚直接诱导形成胚性愈伤组织形成再生植株,遗传更为稳定、发育更同步。同时,植物生长调节剂对植物愈伤组织诱导、增殖、体胚发生及植株再生具有重要作用^[14-15]。在杜鹃兰组织培养相关研究中,原球茎增殖基础培养基以 MS 为主,丛生芽诱导及分化基本培养基为 1/2 MS 或 1/4 MS,通过添加植物生长调节剂 NAA、6-BA、IBA、TDZ、IAA、KT 等以促进其增殖和再生^[16-17]。本研究中通过 1/2 MS 空白培养基诱导出杜鹃兰胚性愈伤组织,未见形成类原球茎阶段,在杜鹃兰组织培养中较为少见。在愈伤组织培养过程中可通过细胞分裂素与细胞生长素配比的不同,促进植物细胞生长、分裂。本研究中,IBA、6-BA 浓度越高,杜鹃兰愈伤组织增殖越明显;杜鹃兰愈伤组织分化比例,随 IBA 浓度的升高呈现先升高后降低的趋势,与 IBA 浓度显著相关,这与石斛^[3]研究结果一致,激素配比调整可从促进器官分化为导向转向特异性诱导和维持胚性状态,建立了适配体胚发生的独特激素调控体系。

体细胞胚胎发生包括直接发生途径和间接发生途径,间接发生途径即经过愈伤组织诱导产生体胚进而再生出植株的过程。而植物体胚起源方式包括外起源和内起源两种途径^[18],如芍药体胚^[19]、紫花苜蓿^[20]、百合^[21]。兰科植物属于单子叶植物,目前,单子叶植物体胚发生的组织细胞学研究较少,单子叶植物胚发育过程大致分为球形胚期、梨形胚期、凹沟胚期、子叶胚期^[22-23]。陈依宁等^[24]在石蒜体胚发生过程中观察到了原胚、球形胚、心形胚、棒状胚、子叶胚过程。袁雪等^[25]在铁炮百合胚性愈伤组织诱导过程中观察到球形胚和心形胚。杨柏云等^[26]在龙牙百合体胚诱导过程中观察到原胚、球形胚、心形胚、成熟胚等阶段,可能是由于切片角度的不同观察到的形态不同。本研究通过体视显微镜及石蜡切片观察到杜鹃兰体胚发生分为内起源和外起源两种方式,并观察到体胚发生过程中球形胚、梨形胚、凹沟胚及子叶胚,初步揭

示了杜鹃兰体胚发育的全过程,对于研究杜鹃兰体胚发生的机理奠定了基础,同时也为单子叶植物、兰科植物保护及建立高效的遗传转化体系提供了细胞学依据。

细胞学观察可溶性糖、蛋白质及淀粉与植物体细胞胚胎发生密切相关,可溶性糖是植物体胚发生过程中重要的能源物质;可溶性蛋白含量高低可间接揭示细胞内部各种代谢活动的活跃程度,在植物体胚发生过程中具有重要作用^[27-28];淀粉的积累与植物体细胞胚胎发生的潜能密切相关,丰富的淀粉粒是胚性细胞的标志之一^[29]。本实验中,4种类型愈伤组织中可溶性糖含量最高,为体胚发育、胚状体形成及植株再生储备了充分的能量来源。而I型愈伤组织可溶性糖、可溶性蛋白及淀粉含量显著高于其他类型愈伤组织,说明其细胞代谢最旺盛,胚状体发生潜力最大。POD、SOD和CAT是细胞中关键的保护酶,能够有效清除植物细胞在逆境胁迫下产生的活性氧,也有研究表明,活性氧代谢对细胞体胚发生过程及细胞分化过程具有一定影响^[30-31]。本实验对杜鹃兰4种愈伤组织抗氧化酶活性进行了研究,Ⅲ型愈伤组织POD活性最高,I型愈伤组织SOD、CAT活性最高,I型、Ⅲ型愈伤组织抗逆性最强,可筛选为后期扩繁及植株再生的主要材料。

4 结论

(1)杜鹃兰种子可通过1/2 MS培养基诱导出淡黄色愈伤组织,愈伤组织增殖最适培养基为MS+(0.5 mg/L、1 mg/L) IBA+(2 mg/L、3 mg/L) 6-BA,增殖形成的胚性愈伤组织可在1/2 MS添加0.2 mg/L IBA培养基上诱导再生植株。

(2)杜鹃兰体胚发生包括外起源和内起源两种方式,胚性愈伤组织经过球形胚、梨形胚、凹沟胚和子叶胚完成体胚发育的全过程,与合子胚发育过程类似。

(3)不同形态愈伤组织可溶性糖、可溶性蛋白及抗氧化酶活性具有显著差异,本实验中I型愈伤组织胚状体发生潜力最大,I型、Ⅲ型愈伤组织抗逆性最强。

[参考文献]

- [1] Cardoso, Jean C, Cesar A Z, et al. An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 985.
- [2] 席银凯, 杨武德. 大花蕙兰‘黄金小神童’胚性愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 广西植物, 2022, 42(4): 682-690.
- [3] 邵世光, 侯北伟, 周琪, 等. 基于正交实验法的铁皮石斛原球茎分化和生根条件研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2009, 32(4): 98-102.
- [4] 刘福平, 陈丽璇. 蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导的氧化还原动态[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(6): 737-743.
- [5] 陈芳, 覃顺旺, 王跃华, 等. 杜鹃兰类原球茎快速增殖研究[J]. 种子, 2021, 40(6): 141-145.
- [6] 王跃华, 陈芳, 陈燕, 等. 杜鹃兰种子快速萌发产生原球茎的研究[J]. 种子, 2020, 39(9): 147-149.
- [7] 李玉鹏, 陈兴龙, 袁盛兴, 等. 杜鹃兰化学成分及其生物活性研究[J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(2): 1-6.
- [8] 王焱霏, 李擎虎, 彭瑶, 等. 菊藻丸联合化疗对中晚期胃癌患者临床效果及生活质量的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(5): 700-703.
- [9] 王源, 宋梦楠, 刘忍阳, 等. 杜鹃兰叶总黄酮提取工艺的优化及抗氧化活性研究[J]. 湖北医药学院学报, 2023, 42(1): 1-6.
- [10] Zhang X, Bi C, Shi H, et al. Structural studies of a mannoglucan from *Cremastra appendiculata* (Orchidaceae) by chemical and enzymatic methods[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 272: 118524.
- [11] 林松, 高欢, 张帅, 等. 杜鹃兰化学成分及神经保护活性研究[J]. 中草药, 2016, 47(21): 3779-3786.
- [12] 王汪中. 杜鹃兰种子萌发障碍原因及其破除方法研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2017.
- [13] 彭思静, 高燕燕, 杨宁线, 等. 杜鹃兰种子非共生萌发中的形态结构变化[J]. 种子, 2021, 40(12): 1-8.
- [14] 吴高殷. 花榈木体细胞胚胎发生诱导及其机理研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2024.
- [15] 高晗, 王毅敏, 陈发菊, 等. 不同生长调节剂对白芨无菌萌发及成苗影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(2): 784-790.
- [16] 吴彦秋, 叶睿华, 吕享, 等. 秋水仙素诱导杜鹃兰原球茎产生多倍体[J]. 植物生理学报, 2017, 53(3): 407-412.
- [17] 吴彦秋. 兰科几种珍稀药用植物的丛生芽诱导研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2017.

- [18] Williams E G, Maheswaran G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group[J]. *Annals of Botany*, 1986, 57(4): 443-462.
- [19] 魏冬霞, 张滕, 郑严仪, 等. 芍药愈伤组织中体细胞胚发育过程的组织细胞学观察[J]. *植物研究*, 2018, 38(1): 56-63.
- [20] 刘振虎, 卢欣石, 葛军. 紫花苜蓿愈伤组织及体细胞胚的细胞学观察[J]. *草业科学*, 2005, 22(2): 37-40.
- [21] Fu L, Zhu Y, Li M, et al. Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2019, 139(4): 237-248.
- [22] 赵彦峰, 贾冬冬. 不同胚性愈伤率小麦胚发育过程生化和显微结构特征研究[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(1): 7-11.
- [23] Wehbi H, Soulhat C, Morin H. et al. One-week scutellar somatic embryogenesis in the monocot *Brachypodium distachyon*[J]. *Plants*, 2022(11): 1068.
- [24] 陈依宁, 雷雪, 李欣, 等. 石蒜体胚发生过程的细胞学和生理特性[J]. *浙江农林大学学报*, 2024, 41(2): 243-251.
- [25] 袁雪, 钟雄辉, 李晓昕, 等. 铁炮百合的胚性愈伤组织诱导和植株再生[J]. *核农学报*, 2012, 26(3): 454-460.
- [26] 杨柏云, 杨慧琴, 蔡奇英, 等. 龙牙百合体细胞胚的诱导及植株再生[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2005, 29(6): 536-539.
- [27] 孙政, 陈发菊, 高晗, 等. 楸树胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织的生理生化差异[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(11): 4642-4646.
- [28] 张慧君, 华玉伟, 黄天带, 等. 橡胶树体胚发生过程中的生理生化特性[J]. *热带农业科学*, 2014, 34(10): 12-14.
- [29] 鲁娇娇, 严瑞, 何香杉, 等. 朱顶红 'Red Lion' 胚性愈伤组织诱导及体细胞胚发生[J]. *园艺学报*, 2016, 43(12): 10.
- [30] 马鑫, 胡胜, 姜治国, 等. 三叶木通体胚发生的细胞学观察和生理生化差异[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(7): 2386-2392.
- [31] 詹园凤, 吴震, 金潇潇, 等. 大蒜体细胞胚胎发生过程中抗氧化酶活性变化及某些生理特征[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(9): 1799-1802.

[责任编辑: 黄 敏]