



## 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展

张朝军, 李付广\*, 张玲

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点  
开放实验室, 河南 安阳 455000)

**摘要:** 体细胞胚胎的诱导是大多数植物组织培养中的关键环节。在愈伤组织分化胚性愈伤组织的过程中, 随着细胞功能的转变, 细胞内部基因的差异表达, 引起了植物体内蛋白质组分、酶组分与活性、激素等各方面的变化, 这些变化一直是组织培养研究中的热点。本文对体细胞胚胎的氨基酸变化、标记性蛋白、基因的差异表达、同工酶变化、激素动态和高体细胞胚胎发生率的材料遗传与选育等方面的研究进展作了综述。

**关键词:** 植物组织培养; 体细胞胚; 氨基酸; 同工酶; 激素

**中图分类号:** S562.035.3      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2008)02-0141-07

### Advance in Research on Plant Somatic Embryogenesis

ZHANG Chao-jun, LI Fu-guang, ZHANG Ling

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China)

**Abstract:** Induction of embryogenic callus (EC) is a key course of the whole plant regeneration process of plant tissue culture. Recent progresses in plant somatic embryogenesis, including the dynamic change of amino acid, enzyme and phyto hormones, protein marker and gene different expressions, and the heritability of regeneration capacity *in vitro* plant were reviewed. In the process of inducing callus to EC by tissue culture, the changes would happen to protein components, enzyme activity, phyto-hormone contents with cell functions transforming, and a series of genes expressing in plant, and how these affect the induction were the hot point of tissue culture researches. The research results of the increased content of nucleic acid, amino acid, and protein of EC were applied into the improvement of culture medium which was added more amino acids like Arg and Glu. It was proved that POD, APase and Esterase Isoenzymes played important roles in the differentiation of EC. In the same time, High ABA among of phyto-hormone was benefit to increase the ability of EC differentiation with low PEP. The study on differentia expression of gene was just at the initial stage, in which the common sequencings of protein of 35~55 kD was found as the marker of EC. The differentia expression gene had never been cloned. The researches on proteomics, which should be enhanced, were so far at initial research period of isoenzyme and protein marker. In genetics researches, though the genotype limitation existed in most of plants, the materials with high differentiation rates were only selected in few crops. So it is necessary to further search for the main genes of embryogenic callus and to select the high differentiation materials rapidly.

**Key words:** plant tissue culture; somatic embryo; amino acid; isoenzyme; phyto hormone

转基因生物及其产业的社会和经济效益巨大,已成为全球竞争的焦点。植物转基因技术研究也成为人们关注的焦点。近年来,遗传转化方法不断创新,以转化系统的原理大致可分为三类:农杆菌介导的基因转移;以原生质体、细胞或组织为受体的直接转移,如电激、微注射、PEG介导转化原生质体等;种质系统的基因转移(germline transformation),如利用注射子房、种胚、体细胞胚及花粉等途径导入外源基因。其中农杆菌介导遗传转化方法是目前应用最多、最成功的方法。但是农杆菌介导遗传转化方法依赖于高效植物组织培养体系的建立。植物体细胞再生植株多数是通过体细胞脱分化产生愈伤组织、再分化诱导出胚性愈伤组织,经胚状体途径获得再生植株,如小麦、玉米、水稻、棉花,也有直接再生植株的,如烟草。经胚状体途径获得再生植株的过程一般可以分为以下三个阶段:体细胞脱分化产生愈伤组织、再分化诱导出胚性愈伤组织,经胚状体途径获得再生植株。其中胚性愈伤组织的诱导是组织培养中的关键环节,其研究内容涉及生物学领域的各个学科。在植物组织培养由愈伤组织分化胚性愈伤组织的过程中,随着细胞功能的转变,细胞内部基因的差异表达,引起了植物体内蛋白质组分、酶组分与活性、激素等各方面的变化,这些变化一直是组织培养研究中的热点。激素动态、氨基酸变化等生化研究已经应用到培养基改良中;基因的差异表达研究处于起始阶段,多种植物胚胎发生早期产生35~55 kD多肽是共有的胚性发生分子标志,对特异表达的基因的克隆与研究尚未开展;蛋白质组学的研究仍处于同工酶变化、标记性蛋白等初级阶段;在遗传方面,多数植物存在基因型限制,但对其遗传规律仍不明确。本文对这些方面的研究进展进行了概述。

## 1 愈伤组织和胚性愈伤组织(EC)的氨基酸与酶体系的变化

### 1.1 氨基酸含量的变化

棉花从下胚轴开始诱导出愈伤组织到愈伤组织出现胚分化,其可溶性糖、淀粉含量呈下降趋势,而蛋白质和核酸含量呈上升趋势<sup>[1]</sup>。愈伤组织至胚性愈伤组织阶段游离氨基酸含量降低,而蛋白质氨基酸和总氨基酸的含量却在增加<sup>[2]</sup>。并不是所有的氨基酸含量都发生非常明显的变化,往往只有几种发生较大变化,分析表明:Arg、

Glu、Ala、Leu、Gly、Cys、Val和Pro几种氨基酸的含量在胚性愈伤中含量较高,而Asp、His、Arg、Lys的含量较低<sup>[2]</sup>,它们可能是胚状体发生的关键性氨基酸<sup>[3-5]</sup>。其中Arg在细胞内的大量积累有利于细胞分裂和细胞分化能力的提高<sup>[6-8]</sup>,Glu有利于棉花胚状体发生,所以可以被添加到培养基中<sup>[1,5,9]</sup>,因此在棉花组织培养中多添加Arg和Glu。此外,在培养基中加入Arg、Asp、His和Lys等也有促进胚性愈伤形成方面的正效应<sup>[7-8]</sup>。

### 1.2 体细胞胚发生中酶活性及同工酶研究

胚性愈伤组织(EC)发生与发育是大量酶特异性合成和参与代谢的结果<sup>[9,10-11]</sup>。报道较多的是与活性氧代谢有关的酶类:酸性磷酸酶、乙醇脱氢酶、酯酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和磷酸葡萄糖变位酶等。研究发现过氧化物酶同工酶的变化与形态发生有关,在多数植物的SE发生中过氧化物酶(POD)的活性较高,同工酶的种类较多<sup>[12-14]</sup>,在枸杞<sup>[15]</sup>、小麦<sup>[16]</sup>、烟草<sup>[17]</sup>、豌豆<sup>[12]</sup>、柑桔<sup>[18]</sup>的组织培养中进行过研究,发现细胞分化在过氧化物酶同工酶酶谱变化上都有极其细致的反映,有研究认为过氧化物酶同工酶的变化可以作为组织培养过程中细胞再分化的指标。以胡萝卜(Daucus carota)体细胞胚发生为材料的研究报道更多<sup>[19-23]</sup>。大量研究表明,在组织培养中,过氧化物酶及酯酶同工酶酶谱的变化是有规律可循的。

以胡萝卜为材料研究结果证明,鸟氨酸甲酰转移酶的瞬时增加与体细胞胚发生潜力相关。还有报道认为,野生胡萝卜体细胞胚形成过程中需要多胺和精氨酸脱羧酶的参与。对哈密瓜4种脱氢酶同工酶的研究结果表明<sup>[24]</sup>,长芽和不长芽愈伤组织中的6-磷酸葡萄糖脱氢酶和苹果酸脱氢酶同工酶酶谱明显不同,长芽愈伤组织中酶带较多且酶活性较强。对向日葵的形态发生过程中的酸性磷酸酶、乙醇脱氢酶、酯酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和磷酸葡萄糖变位酶的图谱分析结果表明,各个发育时期均有其特异性酶带,而且2,4-D浓度等并未导致图谱的明显差异<sup>[25]</sup>。因此,也有研究认为,可以把氧化物酶,结合酯酶和酸性磷酸酶同工酶作为EC发生的标志酶<sup>[18,23-24]</sup>。

### 1.3 体细胞胚发生的标记性蛋白研究

体细胞经脱分化、再分化为胚性细胞受细胞内外多种因子调控<sup>[22]</sup>,其中最重要的是受特定基因的调控,根据特定蛋白的变化可以判断出胚胎

发生的基因程序是否已经表达<sup>[10,27]</sup>。Sung<sup>[23]</sup>等指出根据 3 个方面的生化变化可以判断出胚胎发生的基因程序是否已经表达, 即精胺和亚精胺的合成、胚胎特异蛋白的合成、抗环己亚胺(蛋白质合成抑制剂)能力。不同植物 EC 发生有不同的标记性蛋白: 苜蓿<sup>[28]</sup> EC 发生中膜上的 50 kD 多肽; 在枸杞<sup>[15]</sup>、小麦<sup>[16,35]</sup>、烟草<sup>[17,29]</sup>、柑桔<sup>[18]</sup>、哈密瓜<sup>[24]</sup>、秦艽<sup>[26]</sup>、紫花苜蓿<sup>[23]</sup>等 EC 中的 45~55 kD 的胚胎相关性多肽; 小麦<sup>[16,35]</sup> 体细胞胚发生早期的 49 kD 的胚胎相关性多肽; 枸杞<sup>[15]</sup> EC 中的 35 kD 和 44 kD 特异蛋白质等。在蒲公英和苜蓿的体细胞胚中, 细胞核中的 AGL15 蛋白明显增加。AGL15(AGAMOUS-like 15)蛋白是一标志蛋白<sup>[33]</sup>。大量研究表明, 伴随着特定的基因的表达, 产生 35~55 kD 多肽是多种植物胚胎发生早期共有的胚性发生分子标志<sup>[20,32]</sup>。

## 2 核酸代谢与基因的差异表达

### 2.1 体细胞胚发生中 DAN, RNA 合成动态

细胞 DNA 复制不仅为细胞增殖奠定了物质基础, 也为愈伤组织再分化为胚性愈伤组织提供了条件<sup>[34]</sup>。应用 3H-胸苷(3H-thymidine) 标记放射自显影方法研究小麦<sup>[35]</sup>、红豆草<sup>[36]</sup> 体细胞胚发生结果表明, DNA 合成动态正好与胚性愈伤组织生长曲线相一致, 加入抑制剂后不仅抑制了 DNA 的复制, 同时也抑制了胚性愈伤组织的增殖, 而且抑制剂加入时间愈早, 影响愈严重。

对体细胞胚胎发生过程的研究表明, 胚性愈伤组织的 RNA 合成速率增加迅速, 其 RNA 合成速率明显高于非胚性愈伤组织<sup>[3,10,37]</sup>。胡萝卜是研究最多的植物, RNA 合成起始于诱导培养的第 2~4 h。培养 2 d 后, 细胞分裂加快, 总 RNA 和蛋白质含量增加, 且在胚性细胞中合成的 RNA 主要是 mRNA。应用 3H-尿苷标记放射自显影方法研究小麦<sup>[35]</sup>、红豆草<sup>[36]</sup> 体细胞胚发生结果表明, 胚性愈伤组织的 RNA 合成速率迅速增, 而且在体细胞胚发育过程中一直保持较高的水平, 加入 AMD 对 RNA 的合成具有显著的抑制效应, 而且加入时间愈早, 抑制效应越明显。AMD 不仅抑制 RNA 的合成, 同时抑制了胚性愈伤组织的生长和分化。

### 2.2 特异表达基因的研究

现有报道主要利用 mRNA 差异显示技术及其相关的改良技术<sup>[38]</sup>, 进行植物体细胞胚胎发生

中特异表达的基因的 ESTs 序列检测与分析。在对胡萝卜的研究中发现其体细胞胚中的 cDNA 序列与在黄瓜的胚、根和芽等器官中表达的基因具有同源性, 有些也与黄豆<sup>[39]</sup>、小麦、芹菜等的 cDNA 具有同源性。对陆地棉品种珂字 201 胚性和非胚性愈伤组织的研究发现, 胚性愈伤组织中的 RNA 含量高于非胚性愈伤组织, RNA 和 mRNA 的含量高于下胚轴和经过诱导的非胚性愈伤组织中的含量。同时获得了大量胚性愈伤组织中特异表达的基因, 发现该类基因与多种代谢途径有关<sup>[40-41]</sup>。

## 3 激素动态研究

植物激素并非是由其中某一类型单独发挥作用, 而在更多情况下, 是由多种类激素相互协调、相互影响和相互对立条件下促进植物成长发育的, 体细胞胚胎发生与内源激素关系十分密切<sup>[42-44]</sup>。多数组织培养工作者认为胚性愈伤组织的形成和维持受内源激素调控, 高水平内源 ABA、低水平内源乙烯有利于胚性能力的启动或表达。体胚发生和发育受内源激素调节, 在体胚发生过程中, 各种内源激素都会发生动态变化。内源 IAA 含量上升或维持在较高水平的是胡萝卜、水稻等体胚发生的关键因素; 高水平内源 KT 对不同植物体胚发生作用不同, 有明显的基因型差异; 内源 ABA 有利于体胚发育和成熟; 高水平内源乙烯抑制体胚发生, 高水平多胺促进体胚发生, 二者相互制约。外源生长调节物质与体胚发生中内源激素的关系比较复杂, 相对明确的是添加 ABA、多胺能提高其相应内源物质的水平, 进而调节体胚发生<sup>[44]</sup>。

由于不同植物、同种植物的不同基因型对激素调节的水平不同, 在组织培养过程中对外源激素的反应也表现出基因型的特征。在棉花组织培养中, 筛选一个合适的基因型与激素组合是诱导体细胞胚胎发生的关键。在众多的测试组合中, 发现 IBA 无论在胚性愈伤的诱导还是活力保持上均优于 2,4-D 和 IAA。IBA 与 KT 配合使用能使珂字 201 品种的愈伤组织的胚胎分化率提高到 89.5%<sup>[45]</sup>。有研究表明 BR 能使难以进行胚胎发生的品种进行胚胎发生<sup>[45]</sup>。

## 4 能量代谢动态

在棉花愈伤组织分化为体细胞胚的过程中,

可溶性糖含量先上升后下降。在枸杞的早期胚性细胞中<sup>[46]</sup>, ATP 酶反应产物主要沉积于质膜和液泡膜上。当在质膜上 ATP 酶活性高, 且呈连续分布时其它部位未见 ATP 酶活性。在胚性细胞后期, ATP 酶活性从细胞质膜逐渐转入细胞内, 细胞质、液泡以及细胞核中均有 ATP 酶活性反应。处于“生理隔离”的晚期胚性细胞或胚性细胞团一直处于一个厚壁包围之中, 并与其周围细胞之间的胞间连丝消失, 随着胚性细胞壁的加厚, 在细胞间隙和细胞壁上存在广泛的 ATP 酶活性。

## 5 体细胞胚胎发生的遗传研究及应用

组织培养基型的限制集中在愈伤组织分化为胚性愈伤组织的能力上<sup>[47]</sup>。在水稻中的组织培养特性的遗传研究, 有关再生力方面有的报道较多。不少双列杂交的研究表明, 水稻体细胞培养愈伤组织的再生力表现较高的遗传力, 既有一个控制高再生力的显性基因, 也有一个控制高再生力的隐性基因<sup>[48-49]</sup>, 国外也有控制高再生力的显性基因<sup>[50-53]</sup>的报道。水稻愈伤组织增殖力与 2 组基因有关, 并且在高增殖力的 Kuju 与低增殖力的 Somewake 的 F<sub>2</sub> 中, 低增殖力和高增殖力类型的分离符合 1 对因子分离的 3 : 1 的理论比<sup>[51]</sup>。水稻的愈伤组织增殖和再生力是由不同的基因控制的。

徐丽娟<sup>[54]</sup>等对 6 个世代的胚性愈伤组织频率进行了分析, 认为玉米幼胚胚性愈伤组织发生频率不存在上位性; 而主要以加性效应为主, 显性度为 0.1, 狭义遗传力为 92%, 广义遗传力为 97%, 控制该性状的基因至少有 3 对。国外有报道认为<sup>[55]</sup>, 玉米愈伤组织的发生频率和植株再生能力, 主要受 2 对核基因控制, 另外还有一对核基因位点可能只对其有修饰作用, 基因间的作用方式主要以加性效应为主, 不存在上位性效应。但是, 许多研究者对于细胞质的作用提出了不同的看法, 认为母性效应会影响胚性愈伤组织的诱导, 它的遗传方式较为复杂。对小麦<sup>[56]</sup>、大麦<sup>[57-58]</sup>、油菜<sup>[59]</sup>、向日葵<sup>[60]</sup>及橡树<sup>[61]</sup>等的研究认为也存在主基因, 但存在较多争议。

棉花与其它植物一样, 在基因型限制的研究中存在争议, 主要结果有: (1) 再生能力可以遗传, 为数量性状<sup>[62]</sup>。(2) 再生能力是质量性状<sup>[5]</sup>, 一对隐性主基因控制胚状体的发生能力, 而胚状体

诱导率受少数修饰基因存在。(3) 品种的局限性具有一定规律<sup>[47]</sup>。在美国爱字棉和斯字棉系列难再生, 岱字棉极难或不能再生, 珂字棉最易再生。在我国, 黄河流域品种容易, 长江流域品种困难。(4) 一个封闭基因系统(Blocker gene system)控制着再生性状。

对棉花组织培养中体细胞胚胎发生的研究主要集中在培养体系的建立与改良方面<sup>[45, 63-64]</sup>, 对发生机制、生理生化动态的研究比水稻、枸杞、胡萝卜等的研究落后较多, 需要加强开展这方面的工作。

## 6 高分化率材料的选育

在大多数已经建立组织培养体系的植物中都存在基因型限制问题, 但是人们在建立组织培养体系的过程中考虑最多的是品种(系)间的差异, 对异花、常异花授粉植物的品种(系)内单株间组织培养特性的差异研究较少。如棉花组织培养中外常用的珂字 312、珂字 201 等, 国内常用的冀合 713、中棉所 24、泗棉 3 号等。很少进行品种内单株培养特性的筛选。吴家等等<sup>[65]</sup>利用棉花单株一半种子种植、一半种子用于组织培养的方法, 从泗棉 3 号中选育出 2 个适用于组织培养的棉花特种材料。同时把珂字 312 的愈伤分化率提高到 96.1% 左右。张朝军等<sup>[66]</sup>建立了棉花叶柄组织培养与高分化率材料选育体系, 并在中棉所 26、中棉所 36 中选育出了 20 多个分化率高于 95% 的株系。

## 7 结语

植物组织培养的关键步骤是细胞脱分化后的再分化, 即胚性愈伤组织的产生。植物细胞的脱分化与再分化是大量基因差异表达、协同作用的结果, 也是基因与培养条件互作的结果。不同基因型要求不同的环境, 因此存在基因型限制问题。研究组织培养要从基因型与培养体系两方面入手, 综合多学科的知识与试验手段, 对植物细胞发育进行系统的研究, 才可能获得突破。目前的研究主要集中在胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织间的差异上, 对从愈伤组织到胚性愈伤组织阶段缺乏动态研究。在基因型限制方面对不同培养条件下的基因型限制关系也缺乏系统研究。利用植物组织培养中存在的基因型差异, 寻找关键基因, 有可能是揭示植物组织培养中体细胞分化的重点。

## 参考文献:

- [1] 李付广, 李秀兰, 李凤莲, 等. 棉花体细胞胚胎发生及主要物质生化代谢机制[J]. 河南农业大学学报, 1994, 28(3): 313-316.
- [2] 吴家和, 陈志贤, 李淑君, 等. 棉花体细胞再生过程中代谢物质变化规律的初探[J]. 生物学杂志, 1999, 16(2): 25-26.
- [3] 崔凯荣, 邢更生, 周功克, 等. 体细胞胚发生的生化基础[J]. 生命科学, 2001, 13(1): 28-33.
- [4] 魏开发, 高武军, 孙富丛, 等. 影响玉米胚状体建成关键因素研究进展[J]. 生物技术, 2004, 12(2): 67-68.
- [5] 张献龙, 孙济中, 刘金兰. 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生[J]. 遗传学报, 1991, 18(5): 461-467.
- [6] 齐力旺, 李玲, 韩一凡. 落叶松不同类型胚性和非胚性愈伤组织的生理生化差异[J]. 林业科学, 2001, 37(3): 20-29.
- [7] KE Zhen-shou, Stewart J McD. Evaluation of selected amino acids on embryogenesis of cotton[C]// Proceedings of the 1996 Beltwide Cotton Conference, Nashville, TN; National Cotton Council of America, 1996: 1246.
- [8] NAIR S Y, John A W, Agnes E L. Effects of plant growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria perplexa* (*Gracilariales, Rhodophyta*) [J]. Phycological Research, 2004, 52: 244-254.
- [9] 张献龙, 孙济中, 刘金兰. 陆地棉品种“Coker201”胚性与非胚性愈伤组织生化代谢产物的比较研究[J]. 作物学报, 1992, 8(3): 176-182.
- [10] 崔凯荣, 邢更生, 刘新民, 等. 细胞信号转导与植物体细胞胚发生[J]. 生命科学, 2002, 14(3): 171-175.
- [11] 臧运祥, 郑伟尉, 孙仲序, 等. 植物胚状体发生过程中主要代谢产物变化动态研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2004, 35(11): 131-136.
- [12] 白守信, 苏文辉, 梁红卫. 豌豆组织培养中器官的分化生长、过氧化物酶同工酶及核酸含量的变化[J]. 西北植物学报, 1985, 5(3): 192-198.
- [13] 刘天磊, 江晓雯, 王仑山. 苜蓿组织培养中球形胚发生时特异蛋白质和同工酶分析[J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 625-628.
- [14] SHUBAN K R, Menta A R. Changes in enzyme activity and isoperoxidases in haploid tobacco callus during organogenesis[J]. Plant Sci Lett, 1982, 24(1): 67-77.
- [15] 王亚馥, 王仑山, 陆卫, 等. 枸杞组织培养中过氧化物酶和可溶性蛋白质的变化[J]. 实验生物学报, 1989, 22(1): 1-7.
- [16] 王亚馥, 崔凯荣. 小麦体细胞胚发生的蛋白质组分和过氧化物酶同工酶的变化[J]. 兰州大学学报, 1993, 29(3): 189-193.
- [17] 王熊, 罗士韦. 烟草组织培养过程中过氧化物酶同工酶的变化[J]. 植物生理学报, 1981, 7(1): 73-82.
- [18] KOCHBA J, Lavee S, Spiegel-Roy P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic ‘Shamouti’ orange ovular callus lines[J]. Plant Cell Physiol, 1977, 18(2): 463-467.
- [19] 邢更生, 崔凯荣, 山仑, 等. 植物体细胞胚发生的分子基础[J]. 遗传, 1999, 21(1): 30-34.
- [20] 郑艳红, 熊庆娥. 植物体细胞胚胎发生的研究进展[J]. 四川农业大学学报, 2003, 21(1): 59-63.
- [21] CHIBBAR R N. Esterase isozymes as makers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells[J]. J Plant Physiol, 1988, 133: 367-370.
- [22] SASAKI K, Shimomura K, Kamada H, et al. IAA metabolism in embryogenic and nonembryogenic carrot cells[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35: 1159-1164.
- [23] SUNG Z R, Okimoto R. Coordinate gene expression during somatic embryogenesis in carrots (*Daucus Carota*) [J]. Acad Sci USA, 1983, 80(9): 2661-2665.
- [24] 徐桂芳, 牛玉仙, 张静兰, 等. 哈密瓜子叶脱分化和再分化过程中几种脱氢酶同工酶的研究[J]. 植物学报, 1983, 25(2): 131-135.
- [25] NESTARES G, Zorzoli R, Mroginski L, et al. Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower[J]. Plant Breeding, 2002, 121: 366-368.
- [26] 潘有福, 王星, 孟玉玲, 等. 秦艽体细胞胚不同发育阶段几种同工酶的特性[J]. 西北植物学报, 1994, 15(5): 6-10.
- [27] DUDITS D, Bogre L, Gyorgye Y. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro* [J]. Cell Sci, 1991, 99: 473-482.
- [28] GIROUX R. Characterization of embryogenesis-related proteins in alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 96: 585-592.
- [29] 朱至清, 孙敬三, 李守全, 等. 烟草叶外植体脱分化细胞中的蛋白体[J]. 植物学报, 1984, 26(2): 126-129.
- [30] COPPENS L, Gillis E. Isoenzyme electrofocusing as

- biochemical maker system of embryogenesis and organogenesis in callus tissues of *Hordeum vulgare* L. [J]. *J Plant Physiol*, 1987, 127: 153-158.
- [31] DORIS W, Frank W, Kieran D, et al. Floral induction in tissue culture: a system for the analysis of LEAFY-dependent gene regulation[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39: 273-282.
- [32] EVERETT N P. Biochemical makers of embryogenesis in tissue culture of maize inbred B73[J]. *Plant Sci*, 1986, 41: 133-140.
- [33] SHARYN E P, Melissa D L, Donna E F. The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse wrightine [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120: 121-129.
- [34] CIONINI P R. Nuclear DNA changes during Plant development[J]. *Giorn But Ital*, 1989, 123: 111-121.
- [35] 崔凯荣, 王晓哲, 陈雄, 等. 小麦体细胞胚发生中 DNA, RNA 和蛋白质的合成动态[J]. *核农学报*, 1997, 11(4): 209-214.
- [36] 路铁钢, 郑国辑. 红豆草体细胞胚发生早期 DNA, RNA 和蛋白质的合成动态变化[J]. *植物学报*, 1989, 31(10): 757-762.
- [37] 韩碧文, 李颖章. 植物组织培养中器官建成的生理生化基础[J]. *植物学通报*, 1993, 10(2): 1-6.
- [38] 崔凯荣, 邢更生, 秦琳, 等. 利用 mRNA 差别显示技术分析枸杞体细胞胚发生早期基因的差别表达[J]. *遗传*, 1998, 20(5): 16-19.
- [39] CROWELL D N, Kadlecak A T, John M C, et al. Cytokinin induced mRNAs in cultured soybean cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 8815-8819.
- [40] ZENG Fan-chang, Zhang Xian-long, Zhu Long-fu, et al. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60: 167-183.
- [41] 李惠英, 张献龙. 陆地棉体细胞胚发生过程中的 mRNA 差异显示分析[J]. *棉花学报*, 2003, 15(5): 264-268.
- [42] JIMENEZ V M, Bangerth F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot[J]. *Physiol Plant*, 2001, 111(3): 389-395.
- [43] EPSTEIN F, Kocbba J, Neumann H. Metabolism of indoleacetic acid by embryogenic and non-embryogenic callus lines of 'shamouti' orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1977, 85: 263-268.
- [44] 刘华英, 萧浪涛, 何长征. 植物体细胞胚发生与内源激素的关系研究进展[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 28(4): 349-354.
- [45] 张献龙, 孙玉强, 吴家和, 等. 棉花细胞工程及新种质创造[J]. *棉花学报*, 2004, 16(6): 368-373.
- [46] 李杉, 邢更妹, 崔凯荣, 等. 植物体细胞胚发生中 ATP 酶活性时空分布动态与内源激素的变化[J]. *植物学通报*, 2001, 15(3): 308-317.
- [47] 张家明, 孙雪飘, 郑学勤, 等. 陆地棉愈伤诱导及胚胎发生能力的遗传分析[J]. *中国农业科学*, 1997, 30(3): 36-43.
- [48] 张林, 服部一三. 水稻愈伤组织增殖力的遗传研究[J]. *华南农业大学学报(自然科学版)*, 2003, 24(4): 44-47.
- [49] ZHANG Lin, Hattori K. Inheritance of shoot regeneration ability of seed callus in a rice cultivar Joshu [J]. *Breeding Science*, 1998, 48: 41-44.
- [50] ABE T, Futsuhara Y. Diallel analysis of callus growth and plant regeneration in rice seed-callus[J]. *Jpn J Genet*, 1991, 66: 129-140.
- [51] TAGUCHI-SHIOBARA F, Komatsuda T, Oka S. Comparison of two indices for evaluating regeneration ability in rice (*Oryza sativa* L.) through a diallel analysis[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 378-382.
- [52] TAKEUCHI Y, Abe T, Casahara T. Genetic analysis of plant regeneration from seed-callus in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Genet Science*, 1997, 37: 963-965.
- [53] TSUKAHARA M, Hirosawa T, Nagai E, et al. Genetic analysis of plant regeneration ability and cell suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Breeding Science*, 1995, 45: 425-428.
- [54] 孙世孟, 徐丽娟, 何忠诚, 等. 玉米胚性愈伤组织发生频率及其遗传规律的研究[J]. *莱阳农学院学报*, 1995, 12(3): 173-176.
- [55] ARMSTRONG C L, Green C E, Phillips R L, et al. Genetic control of plant regeneration from maize tissue culture[J]. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, 1985, 59: 92-93.
- [56] YE Xing-guo, Xu Hui-jun, Xu Qiong-fang. Genetic analysis and combining ability evaluation of the anther culture response in common wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)*, 1997, 6: 49-54.
- [57] RIKIISHI K, Matsuura T, Maekawa M, et al. Genetic analysis of tissue culture traits in barley cv. 'Lenins' [J]. *Plant Breeding*, 2003, 122: 99-104.
- [58] MANNINEN O. Associations between anther cul-

- ture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 57-62.
- [59] 刘 泽, 周永明, 石淑稳, 等. 甘蓝型油菜离体小孢子胚胎发生能力的遗传分析[J]. *作物学报*, 2000, 26 (1): 104-109.
- [60] NESTARES G, Zorzoli R, Mroginski L, et al. Heritability of in *vitro* plant regeneration capacity in sunflower[J]. *Plant Breeding*, 2002, 121: 366-368.
- [61] SANCHEZ M C, Martinez M T, Valladares S, et al. Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants; RAPD markers for genetic analysis of regenerants[J]. *J Plant Physiol*, 2003, 160(6): 699-707.
- [62] GAWEL N J, Robacker C D. Genetic control of somatic embryogenesis in cotton petiole callus cultures [J]. *Euphytica*, 1990, 49(3): 249-253.
- [63] 汪静儿, 孙玉强, 祝水金. 棉花原生质体培养与体细胞杂交研究进展[J]. *棉花学报*, 2007, 19 (2): 139-144.
- [64] 迟吉娜, 马峙英, 韩改英, 等. 陆地棉组织培养体细胞胚胎发生技术改进[J]. *棉花学报*, 2005, 17 (4): 195-200.
- [65] 吴家和, 张献龙, 罗晓丽, 等. 两个陆地棉体细胞胚胎发生新品系的选育[J]. *棉花学报*, 2003, 15 (4): 254-256.
- [66] 张朝军, 李付广, 喻树迅, 等. 棉花叶柄组织培养与高分化率材料选育方法: 中国, 1864477[P]. 2006-11-22. ●