

四倍体野生棉毛棉体细胞胚胎发生与植株再生研究

张巧,汪静儿,叶春丽,燕树峰,陈进红,洪彩霞,祝水金*

(浙江大学农业与生物技术学院,杭州 310029)

摘要:通过对培养基激素配比,以及不同浓度的 PEG、CuSO₄ 和 AgNO₃ 等处理,对棉属四倍体野生棉种毛棉 (*G.tomentosum* Nutt.&Watt)进行了体细胞培养,获得了大量体细胞胚状体并实现植株再生。与四倍体陆地棉 (*G.hirsutum*, cv. Coker 201)相比,毛棉体细胞培养难度较大,且体细胞胚畸形严重,萌发困难,但通过培养条件的调控可以得到大量胚状体和少量再生植株。试验结果表明,激素组合 0.1 mg·L⁻¹ KT+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D 诱导的愈伤组织较松脆,分化潜力高;PEG 处理不利于毛棉的胚性和非胚性愈伤的诱导,而不同浓度的 CuSO₄ 和 AgNO₃ 处理对于体细胞胚状体诱导和萌发以及植株再生效果有明显差异。其中 3.5 mg·L⁻¹ CuSO₄+0.5 mg·L⁻¹ IBA + 0.2 mg·L⁻¹ KT 和 3 mg·L⁻¹ AgNO₃+ 0.5 mg·L⁻¹ IBA + 0.2 mg·L⁻¹ KT 组合利于胚性愈伤的增殖和体细胞胚的萌发。

关键词:毛棉;体细胞胚胎发生;硫酸铜;硝酸银;PEG

中图分类号:S562.035.3 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2010)03-0217-07

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Wild Cotton Species of *G.tomentosum*

ZHANG Qiao, WANG Jing-er, YE Chun-li, YAN Shu-feng, CHEN Jin-hong, HONG Cai-xia, ZHU Shui-jin*

(Agronomy Department, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The wild cotton species of *G.tomentosum* has some outstanding characters such as the higher resistance to pests and tolerance to drought. However, the upland cotton germplasm with the trait has not been obtained through sexual hybridization between *G.hirsutum* and *G.tomentosum* due to the distant relationship between the wild species and upland cotton. Protoplast fusion technique which depends on the success in the somatic culture of two different species can avoid sexual incompatibility. The callus inducing and somatic embryo germination of *G.tomentosum* were studied through the regulation of culture conditions such as plant growth regulators (PGRs), PEG, CuSO₄ and AgNO₃. The results indicated that under the same condition the frequency of somatic embryo germination and the plant regeneration ability of *G.tomentosum* were lower and the plant regeneration was more difficult than Coker 201. But through the regulation of culture conditions, we can get many embryoids and few of them converted to plantlets. The callus of *G.tomentosum* induced in the medium with the hormone combination of 0.1 mg·L⁻¹ KT + 0.1 mg·L⁻¹ 2, 4-D held good for cell differentiation, and it was better for proliferation of the embryogenic callus in the medium with 0.5 mg·L⁻¹ IBA + 0.2 mg·L⁻¹ KT. The medium supplied with PEG was not helpful for initiation of somatic embryos. But the medium of MSB₃ with 3.5 mg·L⁻¹ CuSO₄+0.5 mg·L⁻¹ IBA + 0.2 mg·L⁻¹ KT, or 3 mg·L⁻¹ AgNO₃+0.5 mg·L⁻¹ IBA+ 0.2 mg·L⁻¹ KT were good for the proliferation of embryogenic callus and germination of somatic embryo. This report provides an useful technique for somatic culture of the wild cotton species, and also ensures the protoplast fusion feasibly between these wild cotton species and other cotton species to centralize several good traits into a new germplasm. However, it is needed to study further about the various culture factors and conditions for building a quick and high efficient regeneration technique of *G.tomentosum*.

Key words: *G.tomentosum*; somatic embryogenesis; CuSO₄; AgNO₃; PEG

收稿日期:2009-11-10 作者简介:张巧(1985-),女,硕士研究生;*通讯作者,shjzhu@zju.edu.cn

基金项目:国家 973 计划项目(2004CB117305);公益性行业(农业)科研专项经费项目(3-19)和国家自然科学基金(30671325、30700511)

棉属(*Gossypium*)中包括51个棉种,其中四倍体的陆地棉(*G. hirsutum* L.)和海岛棉(*G. barbadense* L.),以及二倍体的亚洲棉(*G. arboreum* L.)和草棉(*G. herbaceum* L.)四个棉种为栽培棉种,其余47个棉种为野生棉种。棉属野生种中具有陆地棉栽培种所缺少的许多优良性状,如抗虫、抗病、抗旱、高强纤维、胞质雄性不育、耐低温等,是棉花遗传育种的宝贵资源。毛棉(*G. tomentosum* Nutt.&Watt)是四倍体野生棉种,其染色体组与栽培陆地棉和海岛棉相同,均为AADD染色体组。毛棉具有多毛、无蜜腺等抗虫性状,以及抗旱、纤维品质优良等性状,是陆地棉品种改良的优良种质资源^[1]。通过棉种间体细胞杂交获取种间杂种,进而转育野生棉四倍体的优良性状是一条行之有效的技术途径,而建立一套适合这些四倍体野生棉种的体细胞胚胎发生和植株再生体系是体细胞杂交创造种间杂种的基础和先决条件。然而,棉属野生棉体细胞胚胎发生和植株再生仅在几个二倍棉种上获得成功^[2-4],有关四倍体野生棉种体细胞发生和植株再生的研究还未见报道。

本研究以四倍体野生棉种毛棉为材料,通过对培养基激素配比,以及不同浓度的PEG、CuSO₄和AgNO₃处理,研究四倍体野生棉体细胞培养和植株再生,以建立适于四倍体野生棉种的愈伤组织诱导、体细胞胚胎发生和植株再生体系。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂

毛棉来源于中国农科院棉花研究所海南野生棉种植园,植株保存于本实验室的网室内,冬季剪枝后移至温室。对照陆地棉品种珂字棉201来源于中国农业科学院棉花研究所。

植物凝胶Phytigel为美国Sigma公司产品,其余试剂均为国产分析纯试剂。基本培养基采用MS培养基的无机物+B₅培养基的有机物(简称MSB₅)。

1.2 实验方法

1.2.1 无菌苗的培养和愈伤组织的诱导。棉花种子去种壳后用75%(V/V)酒精消毒2min,再用0.1%(W/V)HgCl₂消毒7min,然后用无菌水清洗

2~3次,置于1/2MS+30g·L⁻¹葡萄糖+8g·L⁻¹琼脂粉的培养基中,暗培养至萌发后再进行光培养,光周期16/8h,光照强度50μE·m⁻²·s⁻¹,培养温度为(28±1)℃。1周后,切取无菌苗的下胚轴、子叶和根系接种到愈伤组织诱导培养基(MSB₅+不同激素组合)上诱导愈伤组织。其中下胚轴切段长为5~10mm,子叶切片约5mm²,根切段长约5mm。

1.2.2 胚性愈伤组织的增殖和体细胞胚的诱导。挑选新鲜、黄绿色颗粒状的愈伤组织接种于不同的培养基上进行增殖、胚性愈伤组织诱导和体细胞胚的诱导。愈伤组织继代培养在附加不同浓度PEG、CuSO₄和AgNO₃的MSB₅培养基上进行,以研究PEG、CuSO₄和AgNO₃对愈伤组织增殖和体细胞胚发生的影响。

1.2.3 数据统计及分析。在培养过程中,接种或继代3周后进行数据统计,记录胚性愈伤组织的增殖量、体细胞胚胎发生率等。愈伤的增殖量为平均每天增殖的愈伤组织的鲜重,即继代培养28d后胚性愈伤组织鲜重增殖量除以培养天数(28)。体细胞胚胎发生频率为每克鲜重胚性愈伤组织中的体细胞胚胎数。所得数据用Excel 2003进行分析。

2 结果与分析

2.1 毛棉的愈伤组织诱导效果

将毛棉无菌苗的下胚轴、子叶和叶柄等不同外植体接种于MSB₅+0.1mg·L⁻¹2,4-D+0.1mg·L⁻¹KT+2.5g·L⁻¹Phytigel+30g·L⁻¹葡萄糖的培养基上,1周后,外植体切割处开始膨大,产生愈伤组织。愈伤组织的里层为绿色、黄色或浅白色,表面却包以白色或黄绿色愈伤组织,且生长缓慢。而对照陆地棉种质系珂字201下胚轴诱导出的愈伤组织颜色为黄绿色,质地疏松,生长迅速(图1)。

不同外植体诱导产生的愈伤组织差异较大,愈伤组织的颜色从黄色到绿色到白色,质地从致密到紧凑到松软,生长速度从缓慢到迅速。其中以下胚轴为外植体诱导产出黄绿色的愈伤组织质地疏松,有利于诱导出胚性愈伤组织。子叶和叶柄产生的愈伤组织玻璃化、水渍化严重(图1),继续培养则褐化严重,不宜进行体细胞培养。

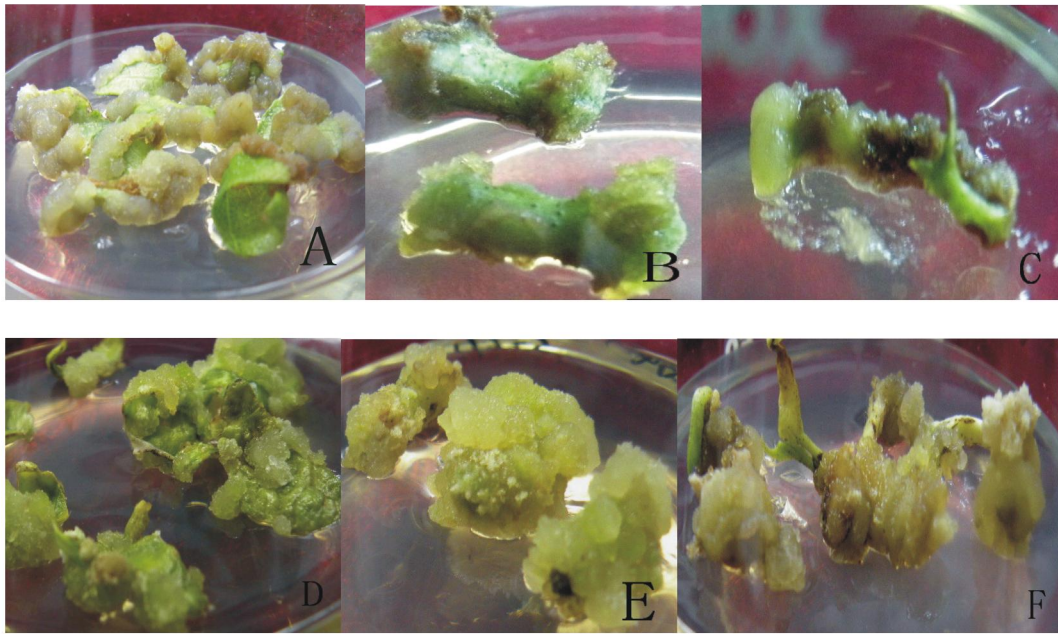


图 1 毛棉和陆地棉(珂字棉 201)不同外植体的愈伤组织诱导效果
A. 毛棉子叶诱导产生的愈伤组织;B. 毛棉下胚轴诱导产生的愈伤组织;C. 毛棉叶柄诱导产生的愈伤组织;D. 陆地棉珂字棉 201 子叶诱导产生的愈伤组织;E. 陆地棉珂字棉 201 下胚轴诱导产生的愈伤;F. 陆地棉珂字棉 201 叶柄诱导产生愈伤

图 1 毛棉和陆地棉(珂字棉 201)不同外植体的愈伤组织诱导效果

Fig.1 Callus induced from different explants of *G.tomentosum* and *G.hirsutum*

表 1 不同激素组合对毛棉和陆地棉下胚轴愈伤组织诱导效应

Table1 Effects of different PGRs combinations on callus induction of cotton hypocotyls

棉种	激素组合 / (mmol·L ⁻¹)	出愈率 / %	愈伤组织生长情况		
			增殖量	颜色	质地
<i>G.tomentosum</i>	(0.1)2,4-D+(0.1)KT	90.0±1.0	+++	黄绿色	较疏松
	(0.5)IAA+(0.1)KT	29.3±5.1	+	绿色或白色	紧凑
	(0.5)IBA+(0.1)KT	45.3±2.3	++	绿色	紧凑
<i>G.hirsutum</i>	(0.1)2,4-D+(0.1)KT	100.0±0.0	+++++	淡绿色	疏松
	(0.5)IAA+(0.1)KT	32.0±13.7	+	绿色或白色	致密
	(0.5)IBA+(0.1)KT	71.0±7.5	+++	黄色	疏松

注:数值为 3 次重复的平均数±标准差,下同。

不同激素组合对于毛棉愈伤组织诱导效果有显著差异,其中在 MSB5+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ KT 的培养基上,下胚轴接种 1 周左右,两端膨大,产生少量愈伤组织,随天数的增加,愈伤组织量逐渐增多,28 d 后愈伤量多且为疏松黄绿色,在继代过程中仍能很好地生长。由此可以得出 2,4-D+KT 组合适合于毛棉愈伤组织的诱导。在 IAA+KT 培养基上,下胚轴产生少量愈伤组织,多为绿色质地紧密的愈伤组织。在添加 IBA+KT 组合培养基上产生的愈伤组织多为稀松的黄绿色愈伤,边缘为褐色,少数愈伤边

缘泛红色,量介于 2,4-D+KT 组合和 IAA+KT 组合之间。由此可以看出 2,4-D 对毛棉愈伤组织诱导起到了至关重要的作用。

2.2 毛棉的愈伤组织增殖与体胚发生效果

2.2.1 PEG 对毛棉愈伤组织增殖的影响。四倍体野生棉种毛棉最初诱导产生的愈伤组织呈黄绿色,随着生长时间的增长,愈伤组织的颜色逐渐趋于绿色且生长迅速。诱导 1 个月后将愈伤组织转移到继代培养基上,继代 3 次后,在继代培养基中添加不同浓度的 PEG,研究不同 PEG 水平胁迫下愈伤组织的增殖、胚性愈伤组织诱

导和体胚发生的效果。结果表明(表2),PEG处理对毛棉愈伤组织的增殖有抑制作用。低浓度(5.0 g·L⁻¹)PEG处理对毛棉愈伤组织增殖的影响较小,但愈伤组织褐化严重,形成的胚状体量较少;中等浓度(10.0 g·L⁻¹)PEG处理对毛棉的愈伤组织有轻微抑制作用,但愈伤组织的质地较好,为黄绿色健康愈伤,并出现大量的体细胞

胚,体细胞胚的畸形率较高;高浓度的PEG处理对于愈伤组织的增殖有明显的抑制作用,且体胚畸形率更高。这说明,高浓度的PEG处理不利于毛棉体胚发生和植株再生,但中等浓度的PEG处理可抑制毛棉愈伤组织生长过快,提高愈伤组织的质量,有利于毛棉体胚的形成和植株再生。

表2 不同浓度的PEG对毛棉愈伤组织增殖和体胚发生的影响

Table 2 Effect of PEG on callus proliferation and somatic embryogenesis of *G.tomentosum*

棉种	PEG的浓度/(g·L ⁻¹)	增殖量/(g·L ⁻¹)	褐化程度	体细胞胚胎发生
<i>G.tomentosum</i>	0	1.31±0.14	部分褐化	有体胚
	5	0.98±0.11	褐化	无正常体胚、有少量畸形
	10	0.66±0.13	黄绿	无正常体胚、多畸形胚
	15	0.51±0.11	黄绿色、少量褐化	无正常胚、多畸形
<i>G.hirsutum</i>	0	1.47±0.05	部分褐化	有体胚
	5	1.2±0.1	褐化较多	无正常体胚、有少量畸形
	10	0.83±0.15	黄绿	无正常体胚、多畸形胚
	15	0.53±0.15	黄绿色、少量褐化	无正常胚、多畸形

2.2.2 激素组合对毛棉胚性愈伤的诱导和体胚发生的影响。不同的激素配比对毛棉体细胞胚性愈伤组织的诱导和体胚发生也具有明显的调控作用,2,4-D+KT激素组合不利于体细胞胚发生,而IBA+KT激素组合有益于体细胞胚胎发生。其

中,0.5 mg·L⁻¹IBA+0.2 mg·L⁻¹KT对毛棉体细胞培养胚性愈伤组织的增殖效果最好,体胚发生率较高,培养过程中出现了大量的正常胚状体,并萌发产生再生小植株(表3和图2)。

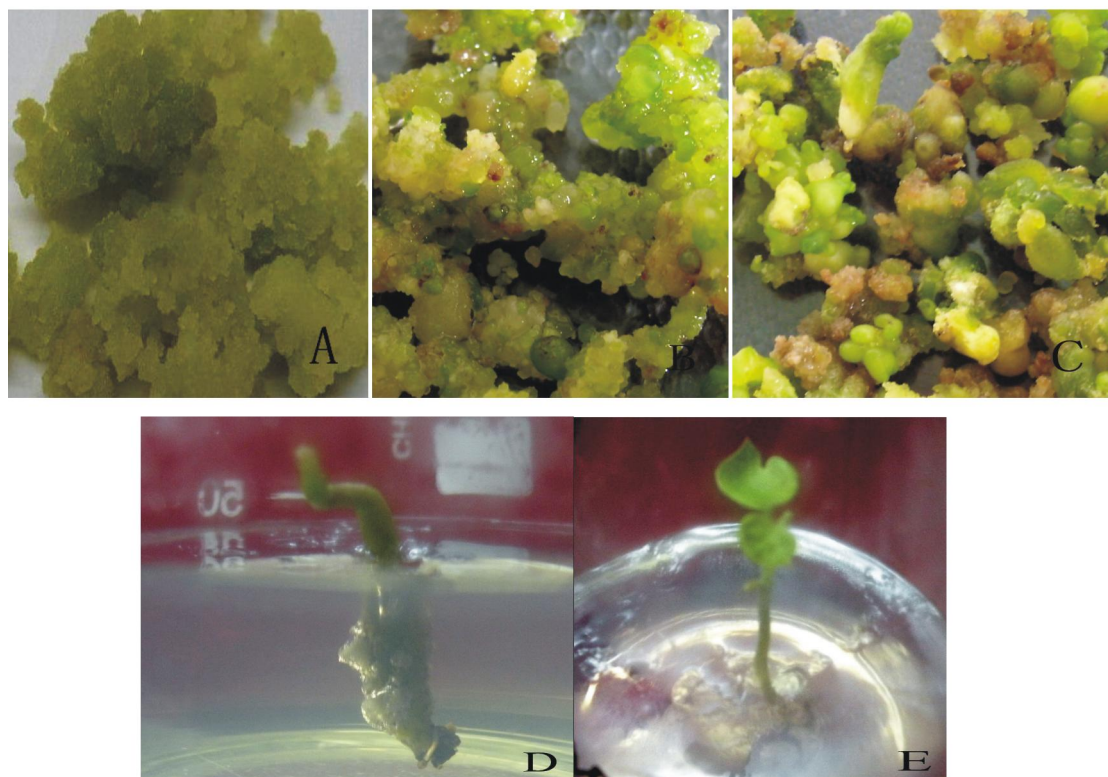
表3 不同激素配比对毛棉胚性愈伤组织(鲜重)诱导和体细胞胚胎发生的影响

Table 3 Effects of PGRs combinations on EC proliferation and somatic embryogenesis of *G.tomentosum*

棉种	激素组合/(mg·L ⁻¹)	胚性愈伤增殖/(g·d ⁻¹)	愈伤褐化程度	体胚发生率/%
<i>G.tomentosum</i>	(0.5)IBA+(0.2)KT	0.067±0.034	褐化较少	14.0±5.29
	(0.25)IBA+(0.3)KT	0.055±0.004	褐化少	12.3±1.15
	(0.25)IBA+(0.1)KT	0.052±0.004	褐化较多	14.6±2.05
	(0.1)2,4-D+(0.2)KT	0.049±0.003	褐化较少	0
	(0.5)IAA+(0.2)KT	0.049±0.002	褐化较少	8.6±1.25
<i>G.hirsutum</i>	(0.5)IBA+(0.2)KT	0.08±0.006	褐化较少	42.7±4.08
	(0.25)IBA+(0.3)KT	0.07±0.008	褐化较少	78.5±10.30
	(0.25)IAA+(0.1)KT	0.05±0.004	褐化较少	19.96±3.28
	(0.1)2,4-D+(0.2)KT	0.05±0.004	褐化较少	0
	(0.5)IAA+(0.2)KT	0.05±0.008	褐化较少	8.3±1.41

2.2.3 CuSO₄对毛棉胚性愈伤增殖和体细胞胚发生的影响。CuSO₄对于棉花体细胞培养的体胚发生和植株再生具有较大的影响。将继代多次的愈伤组织转移到含有不同浓度CuSO₄的培养基上,28 d后统计胚性愈伤增殖量和体胚发生率。添加了CuSO₄的培养基上愈伤组织表面干燥、具有颗粒状结构,并且出现了白色、紧密的胚

性愈伤组织。将胚性愈伤组织继代在添加不同浓度的CuSO₄的胚性愈伤增殖培养基上,在含有3.5 mg·L⁻¹ CuSO₄的增殖培养基上,毛棉胚性愈伤的增殖量最大,愈伤褐化少,产生了大量的胚状体(表4)。说明一定浓度的CuSO₄对胚性愈伤的增殖有利,同时也一定程度上有利于体胚的发生。



注:A. 毛棉非胚性愈伤组织;B.毛棉胚性愈伤组织;C. 毛棉胚状体;D. 胚状体萌发;E. 再生小植株。

图 2 毛棉体细胞培养体胚发生与植株再生

Fig. 2 Somatic embryogenesis and plant regeneration of *G.tomentosum*

表 4 CuSO_4 对毛棉胚性愈伤增殖和体胚发生的影响

Table 4 Effect of CuSO_4 on EC proliferation and somatic embryogenesis of *G.tomentosum*

棉种	CuSO_4 的浓度 / ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	胚性愈伤增殖 / ($\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)	愈伤褐化程度	体胚发生率 / %
<i>G.tomentosum</i>	0.0	0.067±0.034	褐化较多	14±5.29
	2.0	0.098±0.021	褐化较少	11.3±2.88
	3.5	0.132±0.033	褐化少	16.5±3.05
	5.0	0.096±0.025	褐化较少	16.3±3.21
<i>G.hirsutum</i>	0.0	0.08±0.006	褐化较少	42.7±4.08
	2.0	0.11±0.018	褐化较少	35.67±6.03
	3.5	0.14±0.015	褐化少	46±1
	5.0	0.13±0.014	褐化较多	30.67±2.08

2.2.4 AgNO_3 对毛棉胚性愈伤增殖和体胚发生的影响。挑选大小、颜色、质地基本一致的非胚性愈伤组织分别转移到添加不同浓度 AgNO_3 的培养基上,研究不同 AgNO_3 浓度对毛棉体细胞培养的效果。结果表明(表 5),添加 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{AgNO}_3$ 可显著增加毛棉胚性愈伤组织,且愈伤组织褐化少,体胚发生率最高。这说明,添加适当浓度的 AgNO_3 有利于器官的发生和体胚的发生,对毛棉体细胞再生体系的研究有一定的促进作用。

3 讨论

自 Price 等 1979 年首次报道通过悬浮培养获得克劳茨基棉胚状体以来,许多学者相继对四倍体栽培棉的体细胞再生做了大量研究。Davidonis 等^[5]采用 Coker310 子叶愈伤组织在改良 LS 培养基上获得了体细胞胚和再生植株。Trolinder 等^[6,9]发现陆地棉中珂字棉系的体细胞胚胎发生能力极强,是棉花组织培养的模式材

表5 不同浓度的AgNO₃对毛棉胚性愈伤增殖和体胚发生的影响
Table 5 Effect of AgNO₃ on EC proliferation and somatic embryogenesis of *G.tomentosum*

棉种	AgNO ₃ 的浓度/(g·L ⁻¹)	胚性愈伤增殖/(g·d ⁻¹)	愈伤褐化程度	体胚发生率/%
<i>G.tomentosum</i>	0.0	0.067±0.034	褐化较多	14±5.29
	1.0	0.078±0.026	褐化较少	7.67±0.57
	3.0	0.104±0.048	褐化少	26.7±10.1
	4.0	0.062±0.003	褐化较多	15±6
<i>G.hirsutum</i>	0.0	0.08±0.006	褐化较少	42.7±4.08
	1.0	0.1±0.002	褐化较少	39.7±2.08
	3.0	0.13±0.011	褐化少	46±2
	4.0	0.11±0.009	褐化较多	33.7±2.08

料。此外,Sakhanokho H等^[10]、魏良民等^[11]对海岛棉进行了大量研究并均获得了再生植株。有关二倍体棉种的体细胞培养研究报道相对较少,到目前为止,仅在*G.arboreum*、*G.davidsonii*、*G.klotzschianum*、*G.raimonidii*、*G.stocksii*、*G.aridum*、*G.australe*和*G.nelsonii*等棉种获得了成功^[3-4]。本研究以四倍体野生棉毛棉为材料,以易于再生的陆地棉珂字棉201为对照,通过对不同外植体、不同植物激素配比,以及不同浓度的PEG、CuSO₄和AgNO₃的比较,获得了适合于四倍体野生棉毛棉细胞培养的培养体系,并获得了再生小植株。

研究结果发现,通过调整培养基激素配比和添加不同浓度的PEG、CuSO₄和AgNO₃可改善四倍体野生棉种毛棉体细胞培养效率,并获得大量的体细胞胚状体。添加PEG能起到抑制愈伤增殖过快和保持愈伤组织紧凑性的作用,但畸形胚率高。添加CuSO₄和AgNO₃有利于胚性愈伤的增殖,其中3.5 mg·L⁻¹ CuSO₄ + 0.5 mg·L⁻¹ IBA + 0.2 mg·L⁻¹ KT和3 mg·L⁻¹ AgNO₃ + 0.5 mg·L⁻¹ IBA + 0.2 mg·L⁻¹ KT组合有利于体细胞胚的形成和萌发。培养基中的附加物质对植物细胞的离体培养起着重要的作用,改变其种类和浓度往往是提高培养效率最有效的手段^[12-14]。很多学者对AgNO₃在体细胞培养中的作用进行了研究:Philippe Vain等^[15]研究表明,AgNO₃在大麦、水稻、二粒小麦、硬粒小麦和玉米等单子叶植物组织培养中均有促进愈伤组织分化的作用;叶新荣^[16]、谭祖国^[17]和李韬等^[18]分别将AgNO₃应用于柑橘、红江橙、朋娜、纽贺尔、芦柑和雪柑等植物的胚珠培养中,攻克了较难获得胚性愈伤组织的难题,获得了相应的胚性细胞系。多数学者认为,AgNO₃

作为乙烯抑制剂在组织及细胞培养中能够促进胚性愈伤组织的形成;也有人认为它能促进多胺的合成以提高胚性愈伤组织的形成,进而提高愈伤组织分化频率。有关CuSO₄对植物体细胞培养效果的研究不多,Ha C D等^[19]证明在草地早熟禾品种Kenblue的诱导培养基中添加0.1 μmol·L⁻¹的CuSO₄能显著提高诱导率、生长速率和胚性愈伤率,但作用机理尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] FRYXWLL P A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae) [J]. *Rhoeidea*, 1992, 2: 108-165.
- [2] RAJASEKARAN K, Sakhanokho H F, Zipf A, et al. Somatic embryo initiation and germination in diploid cotton (*Gossypium arboreum* L.) [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2004, 40: 177-181.
- [3] SUN Yu-qing, Zhang Xian-long, Huang Chao, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from different wild diploid cotton (*Gossypium*) species [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(4): 289-296.
- [4] 汪静儿, 孙玉强, 章方镛, 等. 棉属G染色体组野生棉种的体细胞胚胎发生与植株再生研究 [J]. *作物学报*, 2007, 33(8): 1279-1285
WANG Jing-er, Sun Yu-qiang, Zhang Fang-biao, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton species of G genome [J]. *Agronomica Sinica*, 2007, 33(8): 1279-1285.
- [5] DAVIDONIS G H, Hamilton R H. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Plant Sci Lett*, 1983, 32: 89-93.
- [6] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 231-234.
- [7] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). I. Effects of source of explant and hormone regime [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1988, 12: 31-42.

- [8] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). II. Requirements for embryo development and plant regeneration [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1988, 12: 43-53.
- [9] TROLINDER N L, Chen Zhi-xian. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton[J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 8: 133-136.
- [10] SAKHANOKHO H, Peggy O A, May O, et al. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2005, 81:91-95.
- [11] 魏良民. 海岛棉悬浮培养体细胞胚胎发生[J]. *生物技术*, 1996, 6(3): 11-14.
WEI Liang-min. Somatic embryogenesis of *Gossypium barbadense* L. in suspension culture [J]. *Biotechnology*, 1996, 6(3): 11-14.
- [12] 张朝军, 李付广, 张 玲. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. *棉花学报*, 2008, 20(2):141-147.
ZHANG Chao-jun, Li Fu-guang, Zhang Ling. Advance in research on plant somatic embryogenesis[J]. *Cotton Science*, 2008, 20(2):141-147.
- [13] 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.
CHI Ji-na, Ma Zhi-ying, Han Gai-ying, et al. Technical Improvement of tissue culture and somatic embryogenesis in upland cotton[J]. *Cotton Science*, 2005, 17(4):195-200.
- [14] 汪静儿, 孙玉强, 燕树锋, 等. 陆地棉原生质体培养与植株再生技术研究[J]. *棉花学报*, 2008, 20(6):403-407.
WANG Jing-er, Sun Yu-qiang, Yan Shu-feng, et al. Study on the plant regeneration from protoplasts of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via somatic embryogenesis[J]. *Cotton Science*, 2008, 20(6):403-407.
- [15] PHILIPPE V, Horth Y, Pascal F. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type callus in *Zea mays* L. by AgNO₃ [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1989, 18: 143-151.
- [16] 叶新荣, 章文才. 柑桔胚性细胞系的建立[J]. *果树科学*, 1994, 11(2): 81-83.
YE Xin-rong, Zhang Wen-cai. Establishment of embryogenic cell in Orange[J]. *Journal of Fruit Science*, 1994, 11(2):81-83.
- [17] 谭祖国. 红江橙原生质体分离培养以及植株再生的研究[J]. *江西农业科技*, 1998(4): 28-31.
TAN Zu-guo. Studies on the protoplast culture and plant regeneration of Hongjiangcheng[J]. *Jiangxi Agriculture Science and Technology*, 1998(4): 28-31.
- [18] 李 韬. 芦柑, 雪柑胚性愈伤组织的诱导[J]. *福建果树*, 1997(3): 11.
LI Tao. The induction of embryogenic callus of Lugan and Xuegan[J]. *Fujian Fruit*, 1997(3):11.
- [19] HA C D, Peggy G, Lemaux P G, et al. Stable transformation of a recalcitrant Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) cultivar using mature seed-derived highly regenerative tissues[J]. *Vitro Biology*, 2001, 37: 6-17. ●