

木本植物体细胞胚胎发生的影响因素研究

严 治, 潘池钦*

贵州华旭林业勘察设计有限公司, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年4月3日; 录用日期: 2023年5月29日; 发布日期: 2023年6月9日

摘 要

体细胞胚胎发生(SE)是体细胞产生体细胞胚胎的一种自然现象。它被认为是植物繁殖最有效的形态发生途径。体细胞胚胎发生的关键特征之一是利用细胞全能性, 即诱导去分化以促进细胞增殖, 然后使用植物生长调节剂诱导分化以产生完整新植株。近年来, 大量研究报道了木本植物体细胞胚胎发生过程的多项进展。本文综述了植物生长调节剂、温度、溶氧水平、化学环境、外植体类型和植物材料基因型等主要因素对SE的影响, 旨在寻找影响木本植物体胚发生的关键问题以及进一步研究的方向, 以期确定改善体胚发生的策略, 从而促进体胚发生, 为有效保存濒危种质资源以及快速繁殖高质量的遗传改良材料提供选择。

关键词

体细胞胚胎, 植物生长调节剂, 外植体类型, 基因型

Study on Influencing Factors of Somatic Embryogenesis in Woody Plants

Zhi Yan, Chiqin Pan*

Guizhou Huaxu Forestry Survey and Design Co., Ltd., Guiyang Guizhou

Received: Apr. 3rd, 2023; accepted: May 29th, 2023; published: Jun. 9th, 2023

Abstract

Somatic Embryogenesis (SE) is a natural phenomenon through which somatic embryos are produced from somatic cells although. It is considered the most efficient morphogenic pathway for plant multiplication. One of the key features of somatic embryogenesis is the use of cellular totipotency, where dedifferentiation is induced to foster cell proliferation, followed by the induction of differentiation using plant growth regulators to produce complete new plants. In recent years, many advances in

*通讯作者。

somatic embryogenesis in woody plants have been reported. In this paper, the effects of plant growth regulators, temperature, dissolved oxygen level, chemical environment, explants type and plant material genotype on SE were reviewed. The purpose of this paper was to find out the key issues affecting somatic embryogenesis in woody plants and the direction of further research, so as to determine the strategies to improve somatic embryogenesis and promote somatic embryogenesis. To provide options for effective conservation of endangered germplasm resources and rapid propagation of high-quality genetic improved materials.

Keywords

Somatic Embryo, Plant Growth Regulator, Explants Type, Genotype

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

体细胞胚胎发生(下称体胚发生)是植物细胞全能性的一个充分体现,其本质是体细胞的发育命运发生重塑,重新获取细胞全能性,从而再分化为完整个体的过程[1] (见图 1)。体胚发生不仅在植物的遗传改良和产业化快速繁育等方面有重大实践意义,还是研究细胞全能性和合子胚胎发生过程的重要生物学模型[2]。在木本植物中,体胚发生在克隆繁殖中起着关键作用,是合成种子生产、种质保存和低温保存的有力工具,体胚发生的关键步骤是细胞命运从体细胞向胚胎细胞的转变。已有研究表明,在体细胞胚胎发生过程中,基因型、外植体类型、碳水化合物来源、培养条件(如光质和强度)、溶氧(DO)水平、细胞密度、植物生长调节剂(PGR)信号均是体胚成功的主要驱动因素[3]。因此,本文就体胚发生的影响因素作一综述,旨在寻找影响木本植物体胚发生的关键问题,以期确定改善体胚发生的策略,从而促进体胚发生,为有效保存濒危种质资源以及快速繁殖高质量的遗传改良材料提供选择。

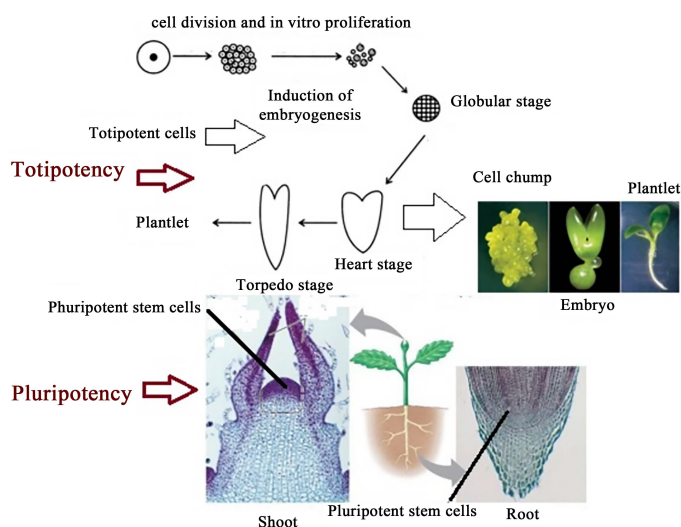


Figure 1. The totipotency and pluripotency of plant regeneration (Bidabadi *et al.*, 2020)

图 1. 植物再生的全能性和多能性 (Bidabadi *et al.*, 2020)

2. 植物生长调节剂对体胚发生的影响

2.1. 生长素

生长素被认为是植物体胚发生的有效启动因子, 植物体胚发生诱导需要高浓度的外源 IAA。许多研究表明, 高浓度的吲哚-3-乙酸(IAA)、2-萘氧基乙酸(2-NOA)、3-吲哚丁酸(IBA)和 1-萘基乙酸(NAA)均可诱导体胚(SE)形成。然而, 当细胞开始在组织中分裂和胚胎开始分化时, 外源 IAA 水平必须降低, 以保证内源 IAA 的生物合成和转运, 以及组织分布动态继续进行[4]。生长素在不同部位所表现出的功能存在差异, 在茎尖分生组织中的功能是促进原基的形成, 包括营养期的叶原基以及生殖期的花原基[5]。截至目前, 最常用的是人工合成的生长素 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-d), 它在各种离体培养体系中显示出最高的体胚诱导效率, 且不同物种表现出不同的时间响应规律。例如, 在苜蓿培养基中处理 2,4-d (100 μ M) 至少 1 h, 在培养两周后诱导 SE, 在胡萝卜表皮细胞中处理 2,4-d (4.5 μ M) 12~24 h, 促进了 SE。尽管外源生长素类物质对植物细胞的体外培养是必须的, 但试验证明, 内源激素代谢和动态平衡在细胞分化中起关键作用。裸子植物体细胞胚性细胞的长时间培养一直是一个挑战。因此, 为了加速体细胞胚胎发生的过程, Wang 等测试了外源激素的施用对体细胞胚胎发生效率的影响。结果发现, 施加外源亚精胺能通过影响内源植物激素含量来影响体细胞胚胎发生效率[6], 该研究有利于林业产业的长期经济产出, 并为研究体细胞胚胎发生效率的分子机制奠定基础。然而, 该方法对其它裸子植物是否适用还需进一步研究。

2.2. 细胞分裂素

细胞分裂素在体细胞获得胚胎能力方面也起着积极的作用, 控制植物生长、细胞分裂、再生、芽诱导和器官形成等各种发育功能[5]。据报道, 除了生长素是 SE 的主要诱导剂外, 使用外源供应的细胞分裂素诱导 SE 已在许多物种中得到很好的证实。例如, 枫香(*Liquidambar formosana*)从非胚性愈伤组织(NEC)到胚性愈伤组织(EC), 共有 31 个差异表达基因(DEGs)参与细胞分裂素信号转导, 包括 4 个 CRE1 (2 个上调 1 个下调)、7 个 B-ARR (2 个上调 5 个下调)和 11 个 A-ARR (2 个上调 4 个下调)基因[7] (见图 2)。红松(*Pinus radiata*)内源性芳香族细胞分裂素参与 SE, 尤其在体胚发生早期阶段[8]。此外, 内源性芳香族 CK 在诱导过程中似乎受到温度的高度影响, 并可能强烈影响诱导过程的成功, 因此后续需要进一步的研究来证实它在不同植物种类和发育阶段的活性。

2.3. 小分子抑制剂

近年来, 一些表观遗传抑制剂, 也已被证明可以促进体外植物细胞在小孢子胚胎发生中的重编程, 从而促进体胚发生。例如, Berenguer 等研究发现, 一种合成的哺乳动物糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)小分子抑制剂能够刺激细胞重编程和初始增殖, 增加前胚胎形成的百分比以及晚期胚的最终产量[9] (见图 3)。形成的这些胚胎还具有良好的质量, 能够发芽并转化为幼苗, 以类似于未使用这些分子处理的植物的方式进一步发育(2021)。另外, Tis108 (独角金内酯生物合成抑制剂)可以通过调节内源 IAA (吲哚-3-乙酸)、JA (茉莉酸)、GA (赤霉素)和 ABA (脱落酸)的水平来影响龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)早期 SE, 促进体胚发生。这些发现有力地表明, 使用这些动物或植物的激素类似物, 以增加植物细胞重编程和胚胎生产产量。未来更深入地了解这些分子的作用机制, 通过使用小细胞可渗透的合成分子来提高离体植物再生产量, 以有效地开发其在植物细胞重编程和胚胎发生中的潜在应用, 将为新的生物技术策略铺平道路。

3. 温度

胚胎发生过程中诱导的表观遗传修饰可以作为植物快速适应气候变化的一种机制, 特别是对于树木

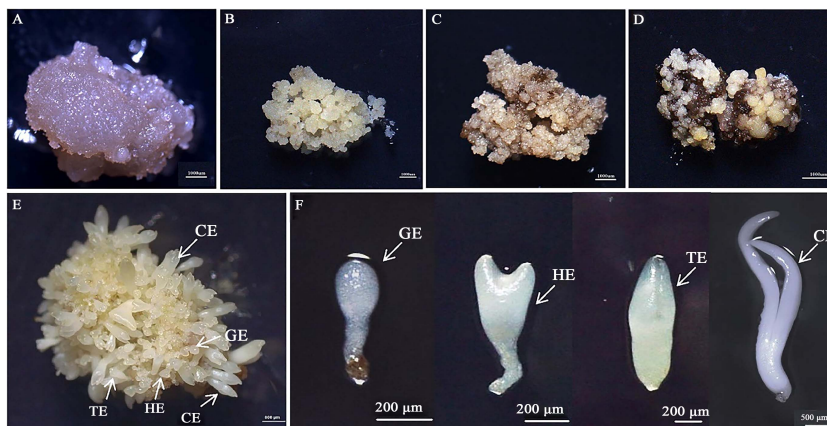


Figure 2. Synchronous cultivation of maple SE. (A) NEC: Non embryonic callus; (B) EC: Embryonic callus; (C) PEM1: Embryogenic mass for 20 days; (D) PEM2: Embryonic mass 45 days ago; (E) Somatic cell embryogenic callus; (F) Somatic cell embryos (globular, heart-shaped, torpedo shaped, cotyledon) at different stages of development. A~D scale = 1000 μ m; E scale = 800 μ m; F scale = 200 μ m, 500 μ m (Qi *et al.*, 2021)

图 2. 枫香 SE 的同步培养。(A) NEC: 非胚性愈伤组织; (B) EC: 胚性愈伤组织; (C) PEM1: 促胚性肿块 20 天; (D) PEM2: 45 天前胚性肿块; (E) 体细胞胚性愈伤组织; (F) 不同发育阶段的体细胞胚(球状胚、心形胚、鱼雷形胚、子叶胚)。A~D 比例尺 = 1000 μ m; E 比例尺 = 800 μ m; F 比例尺 = 200 μ m, 500 μ m (Qi *et al.*, 2021)

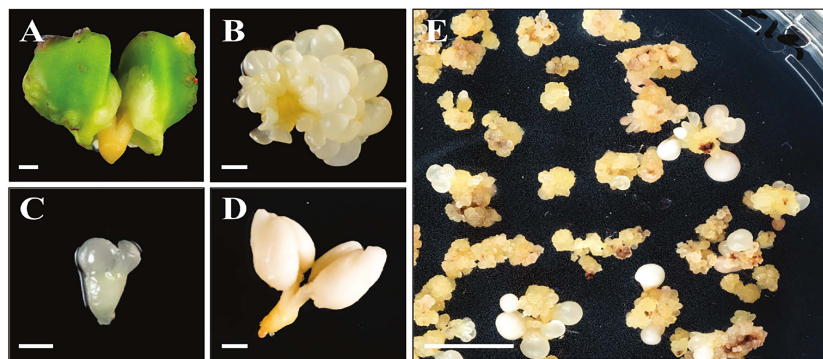


Figure 3. Small molecule GSK-3 β effects of inhibitors on somatic cell embryogenesis of *Quercus suber*. The main stages of *Q. suber* somatic cell embryogenesis: (A) Immature zygote embryos, the initial explants before embryogenesis induction; (B) Embryogenic masses originating from the original explants after induction; (C) Torpedo embryos; (D) Mature cotyledon embryos; (E) Panorama of culture plate, showing proliferative embryogenic masses and somatic cell embryos at different development stages (Berenguer *et al.*, 2021)

图 3. 小分子 GSK-3 β 抑制剂对栓皮栎(*Quercus suber*)体细胞胚胎发生的影响。*Q. suber* 体细胞胚胎发生的主要阶段: (A) 未成熟的合子胚胎, 胚胎发生诱导前的初始外植体; (B) 诱导后起源于原始外植体的胚性团块; (C) 鱼雷胚胎; (D) 成熟的子叶胚胎; (E) 培养板全景图, 显示不同发育阶段的增殖胚性团块和体细胞胚胎(Berenguer *et al.*, 2021)

等长寿生物。近些年, 体细胞胚胎发生技术可用于植物物种的大规模繁殖, 并可与低温保存等技术相结合, 为生物技术带来了巨大的优势和应用, 研究者们已经在牡丹(*Paeonia suffruticosa*)、红皮云杉(*Picea koraiensis*)、杉木(*Cunninghamia lanceolata*)、落叶松(*Larix gmelinii*)等树种上取得成果, 实现这些物种种

质资源的大量繁殖与保存[10] [11] [12] [13]。最近一项研究分析了高温对体胚发生的影响[14], 结果表明, 地中海白松(*Pinus halepensis* Mill.)在 60°C 处理 5 min 得到的胚胎比 40°C 处理 4 h 和 50°C 处理 30 min 更细长, 认为在高温下提高体细胞胚胎发生过程的效率是可能的。据 IPCC 报道, 未来全球变化将导致极端气候(高温、低温、干旱等)事件发生[15], 因此开展体胚发生相关生理参数的分析, 以确认不同温度处理对不同树种体胚发生的贡献, 将有利于植物更好地适应当前的气候变化背景, 同时促进优良树种种质资源保存和繁殖。

4. 外植体类型

外植体选择是植物体胚发生的关键环节, 截至目前, 体细胞胚胎已被报道可由不同类型的外植体再生, 如叶外植体、根外植体、茎外植体、腺毛状体, 或由雌雄配子体细胞减数分裂产生的单倍体细胞, 甚至完全分化的气孔保护细胞等。不同外植体类型体胚发生过程因树种而异[16]。例如, 岩黄连叶片出现愈伤组织的时间早于茎尖和茎节, 且诱导率也最高, 然而茎尖的再分化能力最强, 再分化率高达 66.7%, 因此认为叶片是岩黄连诱导愈伤组织较好的外植体材料[17]。海枣(*Phoenix dactylifera* L.)的体胚发生主要来自于茎尖外植体。香椿茎段芽作为外植体诱导体胚发生效果最好, 能在短时间内获得大量丛生芽[18]。花榈木(*Ormosia henryi* Prain)成熟合子胚的胚性愈伤组织和体细胞胚诱导率最高[19]。然而, 这些外植体在进行体胚诱导过程可能因出现褐化而失败, 因此, 如何预防和缓解其愈伤组织的褐化现象、提高再分化率将是下一步研究的重点内容之一(见图 4)。

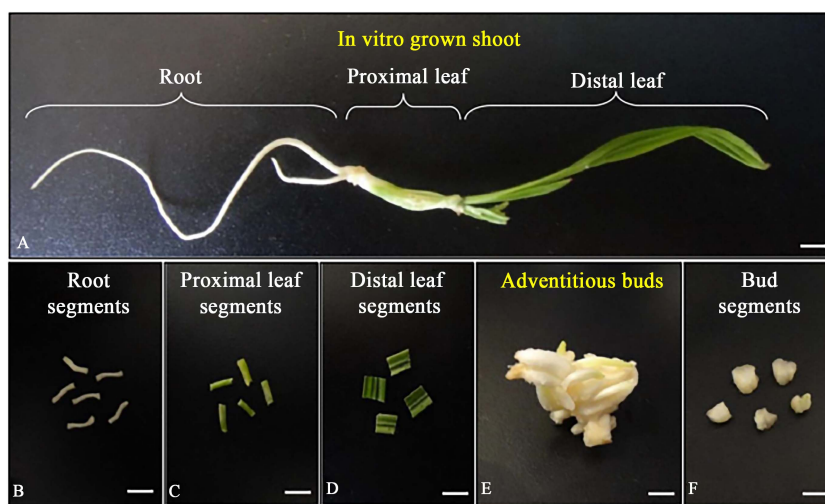


Figure 4. Source of explants for inducing somatic cell embryogenesis. (A) Buds obtained by organogenesis *in vitro*; (B) Root segment; (C) Proximal segment; (D) Distal segment; (E) Adventitious buds obtained from organogenesis *in vitro* as explants; (F) Bud segment. The scale is 0.5 centimeters (Mazri *et al.*, 2017)

图 4. 用于诱导体细胞胚胎发生的外植体的来源。(A) 通过体外器官发生获得的芽; (B) 根段; (C) 近端叶段; (D) 远端叶段; (E) 通过体外器官发生获得的芽; (F) 芽段。比例尺为 0.5 厘米 (Mazri *et al.*, 2017)

5. 溶氧(DO)水平

植物在体胚发生过程中, 鱼雷期胚胎是不可避免的, 在双子叶培养的情况下, 处于不同发育阶段(球形、心型、鱼雷型和子叶期)的胚胎经常混合在悬浮液中。Shimazu 等研究发现, 当培养基中的溶氧水平较低($2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时, 会抑制体细胞胚胎发育到子叶期, 从而增加了鱼雷期胚胎的形成率(2010)。通过改变

曝气中的氧气浓度能很容易的控制 DO 水平[20]。因此, 通过控制 DO 水平进行体胚同步培养有望用于鱼雷期胚的高效培养。然而, 相关方面的研究鲜有报道, 后续应该开展更多探索, 从而增加大规模体胚培育的成功率。

6. 化学环境

体胚发生成熟阶段的化学环境变化是体胚向植株转化的决定因素。此外, 体细胞胚胎的生化和形态方面的研究有助于促进体胚。研究表明, 有机氮的来源是诱导 SE 过程成功的培养基的重要组成部分, 氨基酸能有效提供体细胞胚胎的成熟度, 氨基酸混合物也能有效促进体胚发生。碳水化合物能增加培养基的渗透性, 目前培养基中的碳水化合物常见来源为蔗糖。研究表明, 不同碳水化合物或氨基酸组合会显著影响培养基渗透压, 限制介质的水分可用性(增加结冷胶浓度), 从而促进体胚形成[21]。多胺被认为是一种与细胞增殖相关的化合物, 且在 SE 过程中发挥重要作用, 还可能与植物细胞中引起的应激有关[22]。在大量研究中发现, 遗传信息传递、植物激素转导、糖酵解、脂肪酸生物合成与代谢、半乳糖代谢是体细胞胚胎发生的主要途径, 这不仅证实之前关于多胺代谢途径和胁迫反应在植物体细胞胚胎发生中的作用的转录组结果, 而且能鉴定出体细胞胚胎发生的关键蛋白质, 为植物体细胞胚胎发生的分子机制提供了新的见解[23]。此外, 我们对细胞内多胺水平的复杂空间和时间调节的认识也已经取得了相当大的进展, 但多胺发挥生理反应的确切分子机制仍然需要深入研究, 可能是未来研究工作的主要领域[24]。

7. 植物材料基因型

前期的很多研究都表明, 通过体细胞胚胎发生得到再生植株具有很高的基因依赖性, 也就是说, 很多种植物类型中只能某些品种才能具有体细胞胚产生能力。例如, 葡萄(*Vitis vinifera* cv Nebbiolo)的高经济价值与传统的基因型有关, 这些基因型通过无性繁殖繁殖了几个世纪。Gambino 等采用体细胞胚胎发生技术将 CVT185 L1 和 L2 层相关的两种基因型分离成不同的体细胞无性系[25]。尽管“Nebbiolo (内比奥罗)”对胚胎发生过程有抵触, 但仍然再生了 58 个体细胞无性系, SNV 基因分型试验证明它们的基因型都与母株不同, 仅可归因于 L1, 而 L2 对体细胞胚的分化能力较低或没有(2021), 说明基因型对体胚发生过程是否成功有很大决定作用。此外, 有研究表明, 基因型在很大程度上决定了低温保存对橄榄体细胞胚胎发生的影响, 研究发现, 在增殖期, 仅在品系 T1 中观察到显著变化; 在成熟和萌发阶段, 只有 P5 基因型受到低温保存的影响。研究者认为, 基因型之间的差异可能是由于胚性组织性质的差异, 组织稳定性的差异也与基因组成的差异有关, 基因组的某些成分使其更容易显示变异, 在对杨梅的研究中也有类似的结论[26]。此外, 由于个体遗传禀赋可能会影响表观遗传变化, 不同基因型在低温保存过程中也可能发生不同的应激表观遗传修饰[27]。因此, 在未来继续观察再生体细胞无性系是很重要的, 不仅是在表型检查方面, 而且在寻找体细胞无性系变异的分子来源(例如 DNA 甲基化模式的差异)方面, 这可能会导致识别对环境改变和/或病原体具有更好适应性的基因型。

8. 结论与展望

8.1. 结论

植物体胚发生是一个非常复杂的过程, 受多个因素调控, 如植物材料基因型、植物生长调节剂、化学环境、外植体类型、温度等。这些因素诱导植物体胚发生的作用程度存在差异, 且相同因素在不同树种间的作用也不尽相同, 多数植物需要各种因素配合使用时才能快速高效地诱导体胚发生。尽管前人对不同植物体细胞胚发生的影响因素进行了研究, 但植物体细胞从单细胞到体胚再到完整植株的整个发育过程的生理及分子机制仍存在许多不确定性, 因此, 未来需要进行深入研究。

8.2. 展望

1) 由于没有精确的分子标记, 无法跟踪体细胞分化命运的转变及全能性细胞的产生过程, 也无法建立完善的全能性细胞鉴定体系; 此外, 我们也不清楚全能性细胞进行细胞增殖和分化, 进而发育成体细胞胚胎的调控过程, 因此, 需要开展进一步研究。

2) 随着全球变暖, 未来发生极端气候事件的可能性和频率将继续增加, 因此开展植物离体培养对逆境胁迫的响应, 找出适宜植物大规模繁殖的最佳方案, 将有利于在未来气候变化下, 植物更好地应对环境。

3) 未来使用小细胞可渗透的合成分子来提高离体植物再生产量, 以有效地开发其在植物细胞重编程和胚胎发生中的潜在应用, 将为新的生物技术策略铺平道路。

4) 体细胞全能性获取仍有许多问题有待解决。例如: 哪些细胞有潜力转化为全能细胞, 哪些调节机制使这些细胞产生 SE, 生长素抑制体细胞重编程以获得全能性的机制是什么等。这些都是亟待解决的问题。

5) 近年来, 一些研究集中在针叶树体细胞胚胎发生过程的开发和优化上, 以使其在获得的植物数量和特性方面更有效。然而, 由于手工加工的高成本, 这些进步还不够完善, 无法在许多松属植物上实现商业应用。为了增加扩繁规模及多树种体胚诱导成功率, 需要开展更深一步的研究, 以获得更好地适应当前气候变化形势所引发的环境压力的松属树种。

参考文献

- [1] 唐丽苹, 李兴国, 张宪省, 等. 体细胞胚胎发生: 植物体细胞命运的重塑[J]. 植物生理学报, 2020, 56(8): 1664-1680.
- [2] Ramirez-Mosqueda, M.A. (2022) Overview of Somatic Embryogenesis. In: Ramirez-Mosqueda, M.A., Ed., *Somatic Embryogenesis, Methods in Molecular Biology*, Vol. 2527, Humana, New York, 1-8. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_1
- [3] Ramirez-Mosqueda, M.A. (2022) Perspectives of Somatic Embryogenesis: Concluding Remarks. In: Ramirez-Mosqueda, M.A., Ed., *Somatic Embryogenesis, Methods in Molecular Biology*, Vol. 2527, Humana, New York, 267-270. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_19
- [4] Perez-Pastrana, J., Testillano, P.S., Barany, I., et al. (2021) Endogenous Auxin Accumulation/Localization during Zygotic and Somatic Embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. *Journal of Plant Physiology*, **258-259**, Article ID: 153333. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153333>
- [5] Asghar, S., Ghorri, N., Hyat, F., Li, Y. and Chen, C. (2022) Use of Auxin and Cytokinin for Somatic Embryogenesis in Plant: A Story from Competence towards Completion. *Plant Growth Regulation*, **99**, 413-428. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00923-9>
- [6] Wang, D., Guo, Y., Long, X., et al. (2020) Exogenous Spermidine Promotes Somatic Embryogenesis of *Cunninghamia lanceolata* by Altering the Endogenous Phytohormone Content. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, **89**, 27-34. <https://doi.org/10.32604/phyton.2020.08971>
- [7] Qi, S., Zhao, R., Yan, J., et al. (2021) Global Transcriptome and Coexpression Network Analyses Reveal New Insights into Somatic Embryogenesis in Hybrid Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* × *Liquidambar formosana*). *Frontiers in Plant Science*, **12**, Article 751866. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.751866>
- [8] Castander-Olarieta, A., Pereira, C., Montalbán, I.A., et al. (2021) Quantification of Endogenous Aromatic Cytokinins in *Pinus radiata* Embryonal Masses after Application of Heat Stress during Initiation of Somatic Embryogenesis. *Trees*, **35**, 1075-1080. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02047-x>
- [9] Berenguer, E., Careros, E., Perez-Perez, Y., Gil, C., Martínez, A. and Testillano, P.S. (2021) Small Molecule Inhibitors of Mammalian GSK-3 β Promote *in Vitro* Plant Cell Reprogramming and Somatic Embryogenesis in Crop and Forest Species. *Journal of Experimental Botany*, **72**, 7808-7825. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab365>
- [10] 程雨飞, 季雯, 王健文, 冯立国, 朱向涛. “凤丹白”牡丹体细胞胚的诱导及萌发[J]. 分子植物育种, 2021, 19(17): 5775-5781.

- [11] 高芳, 陈士刚, 秦彩云, 才巨锋, 王聪慧, 董环宇, 陶晶. 红皮云杉体胚发生体系优化和超低温保存技术研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(3): 100-108.
- [12] 吕守芳, 张守攻, 齐力旺, 孙晓梅, 王建华. 落叶松体细胞胚胎发生研究进展[J]. 林业科学研究, 2004, 17(3): 392-398.
- [13] 曲弈, 吴华, 施季森, 郑仁华, 王鹏凯, 陆叶, 陈金慧. 杉木体胚再生植株低温胁迫的响应机制[J]. 林业科技开发, 2014, 28(5): 49-52.
- [14] Pereira, C., Castander-Olarieta, A., Montalbán, I.A., *et al.* (2020) Embryonal Masses Induced at High Temperatures in Aleppo Pine: Cytokinin Profile and Cytological Characterization. *Forests*, **11**, Article 8078. <https://doi.org/10.3390/fl1080807>
- [15] IPCC (2007) Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Working Group II Contribution to the Fourth Assessment Report, WHO and UNEP, Geneva. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=98143>
- [16] Mazri, M.A., Belkoura, I., Meziani, R., Mokhless, B. and Nour, S. (2017) Somatic Embryogenesis from Bud and Leaf Explants of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cv. Najda. *3 Biotech*, **7**, Article No. 58. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0676-y>
- [17] 苏江, 岑忠用, 邓晰朝, 覃勇荣. 不同外植体类型诱导岩黄连愈伤组织和再分化的初步研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(17): 13-15.
- [18] 李玲, 黄榕, 艾薇, 王友如. 香椿离体再生技术研究进展[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(2): 366-370.
- [19] Wu, G., Wei, X., Wang, X. and Wei, Y. (2020) Induction of Somatic Embryogenesis in Different Explants From mormosiahenryiprain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **142**, 229-240. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01822-5>
- [20] Shimazu, T. and Kurata, K. (2010) Improvement of Synchronization on Carrot Somatic Embryo Culture by Controlling Dissolved Oxygen Concentration. *Environment Control in Biology*, **37**, 179-184. <https://doi.org/10.2525/ecb1963.37.179>
- [21] Do Nascimento, A.M.M., Polesi, L.G., Back, F.P., *et al.* (2021) The Chemical Environment at Maturation Stage in Pinus spp. Somatic Embryogenesis: Implications in the Polyamine Profile of Somatic Embryos and Morphological Characteristics of the Developed Plantlets. *Frontiers in Plant Science*, **12**, Article 771464. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.771464>
- [22] Sundararajan, S., Sivakumar, H.P., Nayeem, S., *et al.* (2021) Influence of Exogenous Polyamines on Somatic Embryogenesis and Regeneration of Fresh and Long-Term Cultures of Three Elite Indica Rice Cultivars. *Cereal Research Communications*, **49**, 245-253. <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00098-x>
- [23] Zhu, H., Cheng, W., Tian, W., *et al.* (2018) Itraq-Based Comparative Proteomic Analysis Provides Insights into Somatic Embryogenesis in *Gossypium hirsutum* L. *Plant Molecular Biology*, **96**, 89-102. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0681-x>
- [24] Baron, K. and Stasolla, C. (2008) The Role of Polyamines during *in Vivo* and *in Vitro* Development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **44**, 384-395. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9176-4>
- [25] Gambino, G., Moine, A., Boccacci, P., Perrone, I. and Pagliarini, C. (2021) Somatic Embryogenesis Is an Effective Strategy for Dissecting Chimerism Phenomena in *Vitis vinifera* cv Nebbiolo. *Plant Cell Reports*, **40**, 205-211. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02626-9>
- [26] Martins, J., Correia, S., Pinto, G. and Canhoto, J. (2022) Cloning Adult Trees of *Arbutus unedo* L. through Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **150**, 611-626. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02314-4>
- [27] Bradai, F. and Sanchez-Romero, C. (2021) Effect of Cryopreservation on Olive (*Olea europaea* L.) Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis. *Plants*, **10**, Article 34. <https://doi.org/10.3390/plants10010034>