

# 不同陆地棉品种愈伤组织诱导比较及遗传转化验证

鲍红帅, 尚红燕, 王国宁, 王省芬, 马峙英, 吴金华

(河北农业大学 农学院 / 华北作物改良与调控国家重点实验室 / 河北省作物种质资源重点实验室,  
河北 保定 071000)

**摘要:** 愈伤组织的诱导能力受基因型的影响, 基因型的拓宽可促进棉花遗传转化的发展。本文以 8 个陆地棉品种的下胚轴为材料, 研究不同品种愈伤组织的增殖和状态差异, 然后以可再生的品种为受体进行 *GhAPX* 基因的遗传转化。结果表明: 8 个品种均能诱导出愈伤组织, 且 2 号和 3 号陆地棉品种愈伤组织增殖速度快, 依次为 7 号、1 号和 8 号, 除 5 号和 6 号外, 其它品种均获得再生植株; 获得以 8 号品种为受体转 *GhAPX* 基因且经 PCR 鉴定的阳性苗 3 株, Real-time PCR 分析显示 *GhAPX* 基因在 3 株阳性植株中都上调表达。本研究为棉花遗传转化中受体基因型的拓宽奠定了基础。

**关键词:** 陆地棉; 下胚轴; 愈伤组织; 基因型

**中图分类号:** S188

**文献标志码:** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Comparison of callus induction ability of different upland cotton varieties and verification of genetic transformation

BAO Hongshuai, SHANG Hongyan, WANG Guoning, WANG Xingfen,  
MA Zhiying, WU Jinhua

(College of Agronomy / State Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation / Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Hebei, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

**Abstract:** The induction ability of callus is affected by genotype. And broadening of genotype is important for the development of cotton genetic transformation. The hypocotyls collected from eight upland cotton varieties were used as materials to study the callus proliferation and callus status. Then *GhAPX* gene was transformed into the regenerated variety. The results showed that callus could be induced from the hypocotyls of all the eight varieties, and the callus of variety No. 2 and No. 3 proliferated rapidly, followed by variety No. 7, No. 1 and No. 8. Regenerated plants were obtained except variety No. 5 and No. 6. Finally, we obtained three positive plants of variety No. 8 which were identified by PCR of the transformed *GhAPX* gene. Real-time PCR analysis further confirmed higher transcripts of *GhAPX* gene in all the three positive plants. This study laid a foundation for broadening receptor genotypes in cotton genetic transformation.

**Keywords:** upland cotton; hypocotyl; callus; genotype

棉花是仅次于粮食的第二大农作物, 也是重要的经济作物, 涉及农业和纺织工业两大产业, 是关

系国计民生的战略物资。我国的棉花一直处于供不应求的局面, 因此利用基因工程技术培育高产、优质、

收稿日期: 2022-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401426)。

第一作者: 鲍红帅(1999—), 男, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事棉花遗传育种。

通信作者: 吴金华(1978—), 女, 山西朔州人, 博士, 副研究员, 主要从事棉花遗传育种。E-mail: nxywjh@126.com

本刊网址: <http://hauxb.hebau.edu.cn>

抗病虫等的棉花品种已得到国家的高度重视与大力支持。

棉花组织培养再生技术是基因工程的手段,包括体细胞胚胎发生和器官发生,体细胞胚胎发生再生体系的建立是棉花高效的遗传转化技术的基础<sup>[1-3]</sup>。大量研究表明体细胞胚胎发生再生的棉花转基因体系具有遗传稳定性好和嵌合体少等优点,是棉花遗传转化的首选途径<sup>[4]</sup>。随着棉花基因工程和转基因育种的不断发展,陆地棉的组织培养和遗传转化技术已经被建立和完善<sup>[5]</sup>。刘丽等<sup>[6]</sup>通过诱导研究,建立了‘新陆早 32 号’和‘新陆早 33 号’的再生组织培养体系;邹甜等<sup>[7]</sup>以具有一定胚胎发生能力的陆地棉品种‘珂字棉 312’的下胚轴为外植体,成功的建立了体细胞胚胎发生及植株再生体系;葛书娅等<sup>[8]</sup>建立了‘新陆早 45 号’的再生组织培养体系。Li 等<sup>[9]</sup>利用连续再生驯化策略培育出具有高再生能力的棉花品种‘Jin668’。这些研究极大地推动了全球棉花体细胞培养技术的发展和再生植株的研究。

但棉花组织培养中存在的体细胞培养和再生困难、基因型依赖性强、遗传转化率低等问题还未能解决,仍然制约着生物技术在棉花育种和生产中的应用。棉花胚胎发生的再生途径只有在有限的陆地棉材料上获得了成功,所以现在迫切需要扩展不同基因型棉花再生体系。体细胞胚胎发生是从愈伤组织的诱导到愈伤组织的再分化。愈伤组织的诱导受细胞内外多种因素的影响,愈伤组织的不同状态,包括颜色、质地等,都决定是否分化出体细胞胚和再生植株。诱导愈伤组织是棉花组织培养的初始阶段,能否诱导出活力旺盛而易分化的愈伤组织是建立棉花组织培养再生体系的前提。

抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase; APX)是一种血红素过氧化物酶,是植物体内抗坏血酸谷胱甘肽循环(AsA-GSH)中关键的酶之一<sup>[10]</sup>,以抗坏血酸作为电子供体清除植物体内的过多的过氧化氢( $H_2O_2$ ),反应为过氧化氢( $H_2O_2$ )+2 抗坏血酸(Ascorbate) $\rightarrow$ 2 水( $H_2O$ )+2 单脱氢抗坏血酸(Monodehydroascorbate)<sup>[11]</sup>。

前人研究的珂字棉系品种再生能力强,但是综合农艺性状较差。本试验采用课题组育成农艺性状较好的品种为研究对象,同时以珂字棉系部分品种和 YZ-1 为对照材料,比较其在愈伤诱导过程中的

差异,为后续基因遗传转化中受体基因型的选择奠定基础,同时将可再生品种作为受体进行 *GhAPX* 基因的遗传转化,以验证筛选到的受体品种的遗传转化能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为 8 个陆地棉品种(1-YZ-1; 2-珂 201; 3-珂 312; 4-农大棉 7 号; 5-农大棉 8 号; 6-农大 601; 7-冀棉 19; 8-冀棉 14),供试基因 *GhAPX* 的质粒,均由河北农业大学农学院棉花育种组保存并提供。农杆菌菌株为 LBA4404 购自大连宝生物公司,常规试剂为国产分析纯。

引物合成以及 DNA 测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 供试培养基配制 根据试验需要配制种苗培养基和愈伤组织诱导培养基(表 1)。基本培养基为 MS 培养基(含有机),配制好的培养基于 121 °C 高温高压蒸汽灭菌 15 min 后分装备用。

表 1 供试培养基配方

Table 1 Media used for callus induction

培养基 Media	培养基成分 Component of media	pH 值 pH value
种苗培养基	1/2 MS+ 葡萄糖 15 g/L	5.8 ~ 6.0
愈伤诱导培养基	MS+IBA 1 mg/L+ KT 0.5 mg/L+ 葡萄糖 30 g/L	5.8 ~ 5.85

1.2.2 种子的处理 每个品种选取 100 粒成熟度好且大小均匀饱满的棉籽去壳,无菌条件下将种仁先用 75% 乙醇表面浸泡 1 min,然后用 0.1%  $HgCl_2$  浸泡 8 ~ 10 min,最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次。无菌水中浸泡暗培养过夜至种子露白,温度为( $28 \pm 2$ )°C。

1.2.3 无菌苗的获得 露白后的种子种到种苗培养基上,每瓶培养基种苗 8 棵,每个品种种 10 瓶,放到 28 °C 暗培养箱中培养 2 ~ 3 d。

1.2.4 愈伤组织的诱导 待幼苗长到 3 cm 以上,两片子叶完全展开时,无菌条件下切去靠近子叶呈绿色及靠近根呈白色的部位,保留无菌幼苗下胚轴中间段,切成 0.8 ~ 1 cm 的小段,注意切口要平滑,不要损伤下胚轴。每个品种保证 50 个以上切段,于温度( $28 \pm 2$ )°C,光照强度 2 000 Lx,16 h 光照/8 h 黑暗的光照培养室中。

1.2.5 愈伤组织的继代与增重 下胚轴培养 2 个月

后形成愈伤组织, 愈伤组织诱导培养每隔 15 d 继代一次, 将无褐变的愈伤组织转移到新鲜的愈伤组织诱导培养基中进行增殖培养, 愈伤组织共继代 3 次, 每次继代时先称培养基的重量, 将愈伤组织转接进去后按以上方法再称重, 计算出单个愈伤组织的重量。继代后观察愈伤组织形态。

采用 Excel 2007 和进行数据方差分析及多重比较。

**1.2.6 转 *GhAPX* 基因的阳性苗鉴定** 以可再生的品种为受体转化 *GhAPX* 基因进行超表达, 获得的再生植株长到接近三角瓶瓶口约 8 ~ 10 cm 时进行阳性鉴定。采用 CTAB 法提取幼嫩叶片的基因组 DNA, 根据基因及载体序列设计跨载体检测引物, 对提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 并对扩增产物进行测序检测。跨载体引物序列为 F1 (5'-GACGTAAGGGATGACGCACA-3') 和 R1 (5'-AGGTGGTGGGTGAGGCTTGT-3')。

**1.2.7 *GhAPX* 基因在转基因植株中表达分析** 阳性植株 RNA 提取和反转录分别通过天根生化科技(北京)有限公司 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒与反转录试剂盒 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(TIANGEN Biotech), 具体操作按照说明书进行。qPCR 表达分析所用 PerfectStart® Green qPCRSuperMix 购自北京金式金生物技术有限公司。qPCR 引物为 qF (5'-AGTGTGCTTGTGCTCAACTCGT-3') 和 qR (5'-ATGGACCTCCGGTCTTGGTCTT-3'); 棉花 *GhHis3* 作为内参, *GhHis3*-qF (5'-TCAAGACTGATT

TGCGTTTCCA-3') 和 *GhHis3*-qR (5'-GCGCAAAGGTTGGTGTCTTC-3')。反应体系和反应条件参照杨君等<sup>[12]</sup>的方法, 在 Bio-Rad CFX96 Real-time System 荧光定量 PCR 仪上进行, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行基因相对定量分析, 利用 Graphpad Prism 软件进行统计分析并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织增重品种间差异分析

8 个品种在 3 个继代阶段的愈伤组织增重均具有极显著差异(表 2), 增重的变幅分别为 0.549 ~ 0.767 g, 0.401 ~ 0.736 g 和 0.720 ~ 1.495 g; 变异系数分别为 10.79% ~ 22.61%, 8.66% ~ 29.56%, 10.50% ~ 29.75% 之间。第 1 次继代时增重的最大值为 0.973 g、最小值为 0.236 g, 第 2 次继代时增重的最大值为 0.979 g、最小值为 0.253 g, 第 3 次继代时增重的最大值为 1.863 g、最小值为 0.510 g, 即随着继代次数的增加, 愈伤的增重速度加快。

第 1 次继代品种 3 和 9 之间差异不显著, 但其增重显著高于其它品种, 品种 1、2、7 之间增重差异不显著, 且显著低于其它品种; 第 2 次继代品种 2 增重显著高于其它品种, 品种 4 和 5 之间增重差异不显著, 但显著低于其它品种; 第 3 次继代品种 2 增重显著高于其它品种, 品种 4 和 5 之间差异不显著(表 2), 可见, 珂字棉系增重较明显, 进一步验证了早期采用该系列品种可作为受体易进行遗传转化。

表 2 8 个品种愈伤组织增重差异分析

Table 2 Difference analysis of callus weight gain among eight varieties

品种 Variety	第 1 次继代 The first subculture				第 2 次继代 The second subculture				第 3 次继代 The third subculture			
	增重 /g Weight gain	最大值 /g Maximum value	最小值 /g Minimum value	变异系数 /% coefficient of variation	增重 /g Weight gain /g	最大值 /g Maximum value	最小值 /g Minimum value	变异系数 /% Coefficient of variation	增重 /g Weight gain	最大值 /g Maximum value	最小值 /g Minimum value	变异系数 /% Coefficient of variation
1	0.559 ± 0.106 d	0.764	0.389	19.06	0.525 ± 0.077 d	0.620	0.416	14.76	1.154 ± 0.186 c	1.376	0.740	16.09
2	0.600 ± 0.136 cd	0.794	0.236	22.61	0.736 ± 0.064 a	0.848	0.618	8.66	1.495 ± 0.157 a	1.710	1.250	10.50
3	0.767 ± 0.083 a	0.821	0.630	10.79	0.688 ± 0.203 b	0.979	0.428	29.56	1.399 ± 0.416 b	1.863	0.900	29.75
4	0.610 ± 0.091 c	0.815	0.441	14.85	0.430 ± 0.091 e	0.633	0.306	21.21	0.784 ± 0.132 ef	1.043	0.586	16.79
5	0.679 ± 0.092 b	0.790	0.455	13.59	0.401 ± 0.084 e	0.508	0.305	20.84	0.840 ± 0.105 de	0.968	0.650	12.49
6	0.629 ± 0.098 bc	0.806	0.503	15.57	0.519 ± 0.060 d	0.623	0.418	11.47	0.720 ± 0.102 f	0.888	0.510	14.12
7	0.549 ± 0.119 d	0.737	0.314	21.73	0.603 ± 0.090 c	0.740	0.453	15.01	1.332 ± 0.140 b	1.587	1.130	10.50
8	0.767 ± 0.127 a	0.973	0.493	16.50	0.484 ± 0.108 d	0.647	0.253	22.26	0.899 ± 0.202 d	1.227	0.590	22.51

注: 不同小写字母表示相同继代条件下品种间的增重差异 ( $P < 0.05$ )。



## 2.2 不同品种间愈伤组织状态比较

不同品种形成的愈伤经过继代后状态差异很大,品种 5 和 6 硬化且不易分化;1、2、3、7 和 8 较疏松且品种 2 和 3 的颜色浅黄;品种 4 颜色有点发褐色,生长不旺盛、不易分化。愈伤状态差异直接决定其分

化成苗,硬化的愈伤后期生长缓慢且不易成苗(图 1)。

品种 5 和 6 没有形成再生苗,其它品种都生成了再生苗,且品种 2 和 3 较其它品种形成再生苗更早(图 2),因此愈伤组织诱导的速度及愈伤组织的状态均会影响再生苗形成及再生周期的长短。

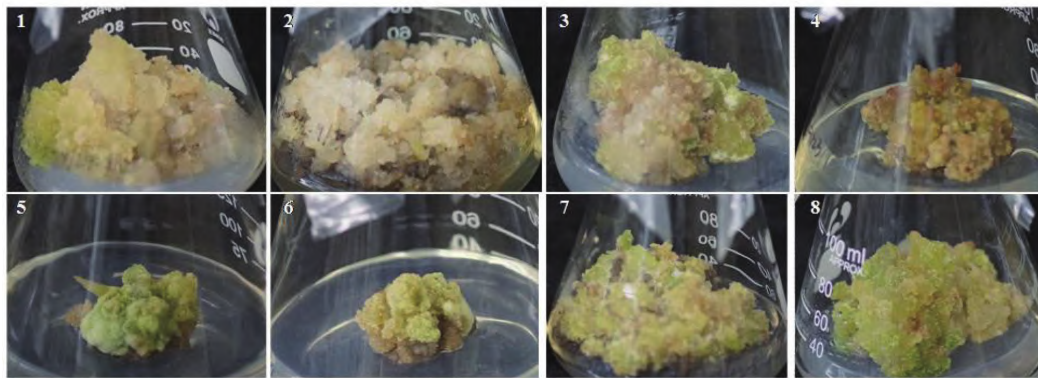


图 1 8 个品种的愈伤组织状态比较

Fig. 1 Comparison of callus status among eight varieties



图 2 棉花组织培养再生过程

Fig. 2 Regenerative process of cotton tissue culture

## 2.3 转化 *GhAPX* 基因超表达植株的鉴定

以可再生的品种‘冀棉 14’为受体转化 *GhAPX* 基因获得再生植株 4 株,经 PCR 鉴定 3 个转基因超表达植株可以扩增到与阳性质粒对照一致的 519 bp 大小的目的条带,而阴性对照植株和水均未扩增到目的条带(图 3)。目的片段测序结果显示与 *GhAPX* 基因序列完全一致,表明 PCR 扩增的目的片段正确(图 4)。

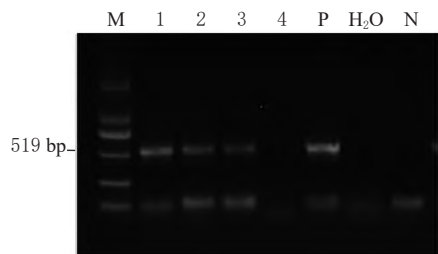


图 3 转基因阳性植株 PCR 检测

Fig. 3 Detection of transgenic positive plants by PCR

GhAPX22-CDS.txt	.....	3
Line_2.seq	GGACAGGCGGAGCTACGCGCTCTCGAGGTGACGCTATGATTAAGCTT	100
Consensus	atg	
GhAPX22-CDS.txt	.....	53
Line_2.seq	acaaagtgttaccacacogtttagcagaggtacacaaacgcogttcaaaa	150
Consensus		
GhAPX22-CDS.txt	.....	103
Line_2.seq	ggctaagaggaagctaagaaggtctcatgctgagaagaactgtgctccac	200
Consensus		
GhAPX22-CDS.txt	.....	153
Line_2.seq	tcatgctcogtctagcgttggaactcagctggaactttgatgtcaagacc	250
Consensus		
GhAPX22-CDS.txt	.....	203
Line_2.seq	aagaacggaggtccattoggaacacgaagcaacctgctgagctgctca	300
Consensus		
GhAPX22-CDS.txt	.....	253
Line_2.seq	tgtgtctaacaacoggtctcgatattgcagtcaggtctctogagcogata	350
Consensus		
GhAPX22-CDS.txt	.....	303
Line_2.seq	aggagcagttccatctcttatacgtgactctatcatcagctgtgctgt	400
Consensus		
GhAPX22-CDS.txt	.....	353
Line_2.seq	gttggtgctgttgagatcaacoggtgggctgaaattccatttcactctg	450
Consensus		
GhAPX22-CDS.txt	.....	402
Line_2.seq	.....	484
Consensus	aagagtggacaagcctcaacc accaact a	

图 4 阳性植株 *GhAPX* 基因测序比对结果

Fig. 4 Sequence alignment of *GhAPX* gene in positive plant

## 2.4 *GhAPX* 基因在转基因植株的表达分析

为明确 *GhAPX* 基因在转基因植株中的表达量,采用 Real-time PCR 技术对 *GhAPX* 基因在转基因植株中的表达进行分析(图 5),结果表明 *GhAPX* 基因在 3 个转基因植株中都上调表达,且该基因在转基因株系 1 中的表达极显著高于阴性对照 J14,相

对表达量为对照的 1.5 倍, 在转基因株系 2 和 3 中的表达显著高于 J14, 由此表明, *GhAPX* 基因成功整合进棉花染色体并正常转录, 获得转基因超表达棉花植株。

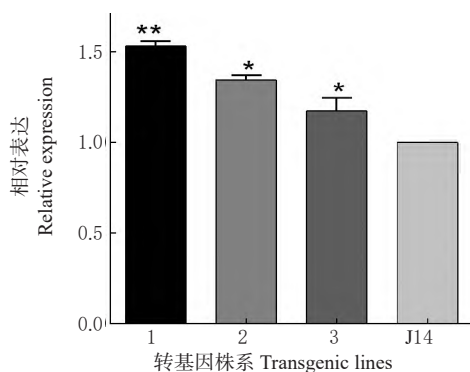


图 5 *GhAPX* 基因在转基因植株中的表达分析

Fig. 5 Relative expression of *GhAPX* in transgenic plants

### 3 结论与讨论

本研究以 8 个陆地棉品种下胚轴为外植体进行愈伤组织诱导研究, 其中 2 号、3 号、7 号、1 号和 8 号陆地棉品种愈伤组织诱导状态好且增殖速度快, 可缩短品种再生周期; 以可再生的 8 号品种为受体进行 *GhAPX* 基因遗传转化获得显著上调表达的 3 个阳性植株, 进一步说明愈伤组织的诱导和增殖能力是影响受体品种遗传转化的重要因素之一。

愈伤组织的诱导取决于许多因素, 如基因型、外植体、植物生长调节剂、培养基和条件及受体的发育阶段等<sup>[13-14]</sup>。基因型决定了愈伤组织的诱导率<sup>[15]</sup>。愈伤组织继代培养是关键阶段之一, 有研究认为愈伤组织长期继代后, 分化能力降低<sup>[16-17]</sup>, 因此愈伤的快速增殖也是影响植株再生的因素之一, 能够胚胎发生的愈伤组织增殖都比较迅速<sup>[18]</sup>。研究表明 8 个陆地棉品种愈伤增重的变幅大, 随着继代次数的增加, 愈伤的增重速度也加快。除前人报道的珂字棉系列以及 YZ-1 外, 7 号和 8 号品种增重较快。由于用于遗传转化的陆地棉受体基因型具有一定的局限性, 本试验通过品种筛选拓宽了遗传转化中的陆地棉受体类型。棉花 4 个栽培种中的 3 个栽培种 (陆地棉、海岛棉和亚洲棉) 通过体细胞培养得到再生植株, 陆地棉较易诱导体细胞胚, 亚洲棉次之, 海岛棉较差。接种后 30 d 愈伤组织的鲜重陆地棉最高, 亚洲棉次之, 海岛棉和非洲棉较低<sup>[19]</sup>。棉花基因型丰富, 目前珂字棉、岱字棉、鲁棉、冀棉系列品种获得了体细胞胚和再生植株, 但珂字棉

品种农艺性状不理想<sup>[20]</sup>, 因此筛选农艺性状优良的基因型对棉花遗传转化具有重要意义。本研究采用的品种均为陆地棉, 2 号和 3 号为珂字棉系列, 4 号、7 号和 8 号系谱亲缘关系来源于岱字棉, 5 号来源于斯字棉和岱字棉, 珂字棉系统胚胎发生能力强, 岱字棉次之, 斯字棉最差, 这与董合忠<sup>[19]</sup>, 迟吉娜等<sup>[21]</sup>研究结论一致。

棉花体细胞植株再生经过愈伤组织诱导、体细胞胚以及植株再生 3 个阶段。在这过程中, 基因型对愈伤组织诱导及体细胞胚的影响机制尚不完全清楚。利用不同的培养方法和调控手段能扩大体细胞胚胎发生的基因型。张东向等<sup>[22]</sup>发现胚性愈伤组织诱导率与内源 ABA 水平呈正相关。外源 ABA 与内源 ABA 对体细胞胚胎发生起着相互调节和促进作用, 补加适量的外源 ABA 可提高胚胎发生的频率<sup>[23]</sup>。植物生长调节剂在植物组织培养中扮演着重要的角色。大量研究表明, 生长调节剂对于愈伤组织的诱导是必不可少的, 不同植物生长调节剂在棉花组织培养中发挥着不同的作用<sup>[24]</sup>。诱导棉花愈伤组织的激素主要有 KT、2, 4-D、NAA 和 IBA 等<sup>[25]</sup>。本研究表明 IBA+KT 组合可使 8 个陆地棉品种诱导出愈伤组织, 愈伤组织多为淡黄色和淡白色且质地疏松, 尤其适合 2 号、3 号、7 号和 8 号陆地棉品种愈伤组织的诱导和增殖。相同条件下 5 号和 6 号品种愈伤组织多为淡绿色, 增殖速度较慢。不同激素种类及其对比对愈伤组织的诱导和增殖速度影响很大, 相同激素处理条件下愈伤组织的状态也会因基因型不同有所差别。因此, 针对不同的基因型, 设置不同的激素种类及浓度也是决定试验成败的关键之一。

研究表明  $\beta$ -catenin 是许多细胞增殖和自我更新的必要因子<sup>[26-27]</sup>。在棉花体细胞胚胎发育过程中, 激活了 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号路径, 从而激活  $\beta$ -catenin, 并通过相关的途径促进细胞的增殖<sup>[28]</sup>。胚胎发育早期 WUS 的表达决定细胞是否获得胚性能力<sup>[29]</sup>, *SERK* 基因可作为区分细胞是否获得分化能力以及胚性能力强弱的标志<sup>[30]</sup>, *LEC* 基因在胚胎发育晚期及胚的形态建成中起重要作用<sup>[31]</sup>。*LEC* 表达不足会导致子叶胚轴畸形, 超表达 *LEC* 可以加快合子胚发育和无性繁殖中愈伤的形成<sup>[32]</sup>。本研究后续将通过生物芯片或转录组分析鉴定并验证愈伤增殖和分化的相关基因, 结合相应的培养基及激素种类, 构建遗传转化的预测网络, 解析体细胞胚胎发生的机制。

## 参考文献:

- [1] 刘正杰, 张园, 王彦霞, 等. 陆地棉异质型 ACCase 基因的种子特异表达载体构建与遗传转化 [J]. 分子植物育种, 2011, 9(3): 270-277.
- [2] 陈天子, 吴慎杰, 李飞飞, 等. 新疆棉花 4 个主栽品种的体细胞胚胎发生及植株再生 [J]. 作物学报, 2008, 34(8): 1374-1380.
- [3] 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.
- [4] Ulhaq I, Zafar Y. Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. African Journal of Biotechnology, 2004, 3(6): 319-323.
- [5] 林君. 陆地棉体细胞胚胎发生和植株再生体系的建立 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [6] 刘丽, 王娟, 王旭文, 等. 新陆早 32 号、33 号的体细胞胚胎发生和植株再生比较研究 [J]. 棉花学报, 2011, 23(3): 259-264.
- [7] 邹甜, 郑顺利, 匡琛, 等. 珂字棉 312 组织培养体系的建立 [J]. 棉花科学, 2016, 8(4): 3-7.
- [8] 葛书娅, 沈秋平, 何积明, 等. 陆地棉新陆早 45 号体细胞胚胎发生及再生体系的建立 [J]. 棉花学报, 2018, 30(6): 492-497.
- [9] Li J, Wang M, Li Y, et al. Multi-omics analyses reveal epigenomics basis for cotton somatic embryogenesis through successive regeneration acclimation process [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(2): 435-450.
- [10] 王润豪, 于永昂, 胡海燕, 等. 小麦抗坏血酸过氧化物酶 *TaAPX* 基因克隆与表达分析 [J]. 华北农学报, 2020, 35(2): 48-56.
- [11] Asada Kozi. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50(1): 601-639.
- [12] 杨君, 张艳, 王伟巧, 等. 海岛棉 *GbHyPRP1* 克隆及其转基因拟南芥抗黄萎病验证 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(3): 594-602.
- [13] Panjaitan S B, Abdullah S, Aziz M A, et al. Somatic embryogenesis from scutellar embryo of *Oryza sativa* L. var. MR219 [J]. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science, 2009, 32(2): 185-194.
- [14] Rahman Z A, Ramli A, Kamaruzaman R, et al. Efficient plant regeneration of Malaysian aromatic rice (*Oryza sativa* L.) through somatic embryogenesis pathway [J]. Emirates Journal of Food and Agriculture, 2015, 27(11): 857-863.
- [15] 宋彦平, 申书兴, 王彦华, 等. 茄子游离小孢子培养获得愈伤组织的研究 [J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(3): 32-35.
- [16] Hao Y J, Deng X X. Stress treatments and DNA methylation affect somatic embryogenesis from citrus callus [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(6): 673-677.
- [17] 张俊娥. 碳源对柑橘愈伤组织生长及体细胞胚胎发生能力的影响 [J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(5): 62-64, 76.
- [18] 周小凤, 张碧瑶, 刘冠泽, 等. 新疆棉花高体细胞胚胎发生能力基因型的筛选 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 819-826.
- [19] 董合忠. 不同基因型棉花下胚轴离体培养胚状体发生的研究 [J]. 莱阳农学院学报, 1991, 8(2): 97-101.
- [20] 金双侠. 棉花遗传转化体系的优化及突变体的创制 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [21] 迟吉娜, 马峙英, 张桂寅. 中国棉花体细胞植株再生的基因型分析 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 75-82.
- [22] 张东向, 张崇浩, 李杰芬. 玉米叶片胚性愈伤组织诱导及其与内源 IAA 和 ABA 关系的初步研究 [J]. 作物学报, 2000, 26(2): 195-199.
- [23] 霍妙娟, 魏岳荣, 胡家金等. 脱落酸在植物体细胞胚胎发生中的调控作用 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(11): 92-98.
- [24] 朱华国, 张献龙, 金双侠, 等. 两种常用激素组合下棉花体细胞胚胎发生过程的组织学观察 [J]. 棉花学报, 2012, 24(2): 159-166.
- [25] 王清连, 王敏, 师海荣. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导及调节作用 [J]. 生物技术通讯, 2004, 15(6): 577-579.
- [26] Dravid G, Ye Z H, Hammond H, et al. Defining the role of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(10): 1489-1501.
- [27] Perez-Ruiz A, Ono Y, Gnecchi V F, et al.  $\beta$ -catenin promotes self-renewal of skeletal-muscle satellite cells [J]. Journal of Cell Science, 2008, 121(9): 1373-1382.
- [28] 胡丽松. 棉花体细胞胚胎发生相关基因 GhHmgB3 的克隆及功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [29] Su Y H, Zhao X Y, Liu Y B, et al. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis* [J]. 2009, 59(3): 448-460.
- [30] Schmidt E D, Guzzo F, Toonen M A, et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos [J]. Development, 1997, 124(10): 2049-2062.
- [31] To A, Valon C, Savino G, et al. A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation [J]. Plant Cell, 2006, 18(7): 1642-1651.
- [32] Lotan T, Ohto M A, Yee K M, et al. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells [J]. Cell, 1998, 93(7): 1195-1205.

(责任编辑: 梁虹)