

·专题介绍·

棉花体细胞胚胎发生的研究进展

武秀明, 刘传亮, 张朝军, 李付广*

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, 安阳 455004

摘要 经过30多年的发展, 已经在多个不同的棉花品种中获得了体细胞胚, 并再生成苗。但由于体细胞胚胎发生往往受多种因素影响, 如何从愈伤组织高效率地转化为胚性愈伤组织依然是限制棉花组织培养与遗传转化的关键问题之一。本文概述了棉花体细胞胚胎发生的研究进展, 分别从棉花体细胞胚胎发生的起源、影响棉花体细胞胚胎发生的内外因素以及寻找棉花体细胞胚胎发生特异表达基因等几方面进行综述, 并对研究中存在的问题进行了讨论。

关键词 棉花, 影响因素, 体细胞胚胎发生, 组织培养

武秀明, 刘传亮, 张朝军, 李付广 (2008). 棉花体细胞胚胎发生的研究进展. 植物学通报 25, 469–475.

棉花是世界主要经济作物之一, 在发展国民经济、保障人民生活 and 国防建设中起着重要的作用。我国棉花生产的发展一直都与新品种培育和推广密切相关。近年来, 组织培养以及以此为基础的转基因技术逐渐受到了人们的广泛关注。这项技术具有不受亲缘关系限制、可充分利用自然界的遗传资源和加快育种进程等优势, 为我国棉花产业的发展提供了一条新的途径。目前, 虽然棉花组织培养再生的研究取得了很大进展, 已建立起陆地棉(Trolinder and Goodin, 1987)、海岛棉(李仁敬等, 1993)、克劳茨基棉(Zhang et al., 1996)棉种的再生体系, 但依然存在着技术瓶颈, 即如何从愈伤组织高效率地转化为胚性愈伤组织, 继而得到再生植株。本文主要综述了棉花体细胞胚胎发生的研究进展。

1 棉花组织培养的研究历程

1971年, Beasley首次从陆地棉胚珠的珠孔端诱导出了愈伤组织(Beasley, 1971)。随后, Price 和 Smith (1979)报道了从克劳茨基棉细胞悬浮培养中获得体细胞胚, 但未能得到再生植株。1983年, Davidonis 和 Hamilton从继代培养2年的陆地棉子叶愈伤组织中获得

了体细胞胚, 进而得到再生植株(Davidonis and Hamilton, 1983)。直到1986年, 才有正式报道从陆地棉珂字棉 3 1 2 和珂字棉 2 0 1 中得到再生植株(Shoemaker et al., 1986)。

我国棉花组织培养在20世纪80年代始见报道。刘桂云(1983)最先从野生戴维逊氏棉的愈伤组织中诱导分化并形成再生小植株。此后陈志贤和李淑君(1987)、吴敬音和陈松(1988)、谭晓连和钱迎倩(1988)及陆振鑫和夏振澳(1991)分别从亚洲棉、陆地棉、雷蒙得氏棉、拟似棉和戴维逊氏棉等不同棉属种的下胚轴、子叶、幼叶、叶柄和幼茎等外植体愈伤组织诱导体细胞胚胎发生或得到再生植株, 进而探明了胚状体发生以及植株再生的培养条件, 初步建立并完善了棉花体细胞胚胎发生和植株再生体系, 并利用我国自育品种如晋棉11号、冀合 321、鲁棉 6 号、中棉所 13 号等培育出了再生植株, 初步建立了棉花体细胞胚胎发生的再生体系(丰嵘等, 1997)。到目前为止, 在棉属 51 个种中已有 8 个种诱导获得了胚状体(崔凯荣等, 2001)。

这些工作为将植物基因工程技术应用于棉花遗传改良打下了良好的基础。但是与其它作物相比, 棉花组织培养依然比较困难, 主要表现在体细胞胚胎发生率低、

收稿日期: 2007-10-25; 接受日期: 2008-01-20

基金项目: 863 计划(No. 2006AA100105)

* 通讯作者。E-mail: lifug@cricaas.com.cn

培养周期长、畸形胚频率高等方面。

2 棉花体细胞胚胎发生

棉花组织培养体系主要有胚珠培养、体细胞培养、茎尖培养、原生质体培养、花药和花粉培养体系,它们在棉花育种与生物技术研究中发挥了重要作用。目前,最为常见的是体细胞培养。

棉花体细胞胚胎发生的主要过程是从棉花无菌苗的下胚轴、子叶、胚根、叶柄或成株的幼茎、幼叶以及不同来源的原生质体,经过愈伤组织诱导、胚状体发生、胚状体萌发而成为再生植株。棉花外植体诱导产生的愈伤组织大致分为2类:胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织。前者能诱导体细胞胚胎发生,后者则不能诱导体细胞胚胎发生。它们在来源、形态、产生时间等方面都存在差异,在特定的条件下二者可以相互转化,但转化的难易程度不同。一般胚性愈伤组织易转化成非胚性愈伤组织,而后者较难转化为前者(崔凯荣等, 2000)。

棉花体细胞胚胎发生途径类似于合子胚的发育,先后经历了原胚期、球形胚期、心形胚期、鱼雷胚期和子叶胚期。张献龙等(1991)利用愈伤组织活体压片、石蜡包埋切片、悬浮细胞系活体压片等多种方法研究了陆地棉体细胞胚胎发生的过程,从单个胚性细胞追踪到成熟胚,发现体细胞胚胎发生具有多种途径。既有单细胞途径,又有多细胞途径;既有内起源途径,又有外起源途径。

3 棉花体细胞胚胎发生过程中的生理生化代谢

目前,由于陆地棉中珂字棉的体细胞胚胎发生能力相对较强,是棉花组织培养的模式材料,因此,在已报道的研究中,多以珂字棉系列品种为研究对象。吴家和等(1999)发现在从下胚轴开始诱导出愈伤组织再到体细胞胚胎发生的过程中,其可溶性糖和淀粉含量呈下降趋势,而蛋白质与核酸含量呈上升趋势。这是由于蛋白质和核酸是细胞的重要组成部分,其含量的高低决定了细胞

的组织成分。在由愈伤组织向胚性愈伤组织分化时,细胞内的组织成分发生了巨大的变化,细胞内部的蛋白质和核酸代谢处于旺盛阶段,其含量高是正常的。而这时细胞内部的糖和淀粉被迅速转移和利用以提供能量,所以可溶性糖和淀粉的含量较低。这些结果与在其它植物(高述民和陆幅一, 2000; 刘华英等, 2002)中的研究结果一致。说明愈伤组织向胚性愈伤组织定向分化时,细胞内的代谢物质必须要符合一定的条件,但其代谢物质含量的上限为多少尚处于研究当中。Zeng等(2007)研究了棉花体细胞胚胎发生发育过程中的生物化学及细胞生物学变化。发现伴随着细胞的去分化和再分化,内源吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)和异戊烯腺苷(isopentenyladenosine group, iPAs)含量发生剧烈变化,同时染色质也发生去凝聚和再凝聚。这些现象表明内源生长素和细胞分裂素含量的变化以及染色质的再组织(chromatin reorganization)可能与棉花体细胞胚胎发生发育具有密切的关系。

4 影响棉花体细胞胚胎发生的主要因素

棉花体细胞胚胎发生是一个复杂的过程,受细胞内外多种因素影响,主要包括植物基因型、外植体类型和生理状态、培养基种类、培养条件以及激素水平等方面。

4.1 细胞外因素

外植体是一个重要的影响因素。不同类型的外植体得到愈伤并且分化为体细胞胚胎的能力不同。其中下胚轴最容易,子叶较差,真叶和茎最差。另外,外植体的生理状态也很重要。一般暗处萌发的无菌苗外植体比光照下获得的无菌苗外植体更容易形成愈伤和胚状体。

不同的培养基成分和培养条件对体细胞胚的产生具有重要影响。大多数研究者认为培养基的pH值在5.8-6.2之间是适于棉花体细胞胚胎发生和植株再生的。而外部的培养温度以28-30℃为宜。Price和Smith(1979)曾指出,影响棉花体细胞胚胎发生的另外一个关键因素是在培养基中加入谷氨酰胺,这可能是由于在棉花胚胎发育和萌发过程中,氮的变化途径是从谷氨酰胺

经天门冬酰胺、精氨酸转化为贮藏蛋白。Trolinder 和 Goodin(1988)还指出, 氮化物对于体细胞胚胎的发生和成熟都是很重要的, 增加 KNO_3 的浓度可以促进棉花体细胞胚胎发生。而Kumria等(2003)却发现代谢胁迫也能促进体细胞胚的产生和成熟。当把愈伤接种到 1/5 MS 培养基上后, 体细胞胚产生的频率可以提高 2-3 倍。

培养基中适当应用植物激素不仅是成功诱导体细胞胚胎发生的决定因素, 也是影响胚状体高频率诱导的主要因素(张宝红等, 2000)。吡啶乙酸是诱导出胚性愈伤组织和胚状体的重要激素。细胞分裂素中 6-苄基腺嘌呤(激动素, kinetin, KT)的效果较好。2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)可以诱导愈伤组织并易出现胚性愈伤组织, 但却抑制胚性愈伤组织分化为胚状体, 所以在胚状体生长的培养基中一般要去掉 2,4-D(郑艳红和熊庆娥, 2003)。吕复兵等(1999)以陆地棉品种珂字棉 201 为材料, 比较了 IAA+KT 和 2,4-D+KT 在愈伤诱导和悬浮培养中的效应。实验结果表明, 愈伤组织诱导中 IAA 和 2,4-D 表现为正效应, 且 2,4-D 的效应强于 IAA, KT 则表现为负效应; 而在胚性愈伤悬浮培养中, 3 种激素都表现出负效应。

4.2 细胞内因素

细胞内因素主要体现在基因型的限制上, 即不同品种的棉花体细胞胚胎发生的能力相差很大。Trolinder 和 Chen(1989)分析了 38 个品种分化产生体细胞胚的能力, 发现它们可以分成 4 大类: 高能力的品种、中等能力的品种、低能力的品种和不能产生体细胞胚的品种。另外同一品种不同种子间产生体细胞胚的能力也有差异, 这些结果表明品种间和个体间产生体细胞胚的能力存在差异, 这种差异很可能就是由基因型决定的。谢德意等(2007)以分别适宜长江和黄河流域棉区种植的各 10 个棉花品种, 以及珂字棉 201 和 YZ1 共 22 个基因型为实验材料, 对不同棉花品种的体细胞胚胎发生和植株再生能力进行了比较, 发现胚性愈伤组织的分化率在 50%-80% 之间。而王喆之等(1994)以陆地棉的 3 个栽培品种鲁棉 6 号、鲁棉 1024 号、冀棉 14 号为实验材料,

研究了陆地棉胚性愈伤组织的变异及高频胚胎发生, 虽然 3 个棉花品种的体细胞胚发生率都相对较高, 但依然存在明显差异。体细胞胚胎发生频率最高的品种为鲁棉 6 号, 其分化率达到 98%, 而冀棉 14 号为 90%。国外品种中, 珂字棉最容易再生, 爱字棉和斯字棉难再生, 岱字棉极难或不能再生; 国内品种中, 黄河流域品种易再生, 陕西、河北的品种次之, 长江流域的品种难以获得胚性愈伤组织(蔡小宁等, 1997)。基因型对体细胞胚产生的影响是一个复杂的过程。Gawel 和 Robacker(1990)将能产生体细胞胚的品种 Coker 321 和 T25 分别与不能产生体细胞胚的品种 Acala SJ-5、Paymaster 303、T1 和 T169 杂交, 分析了 F_1 、 F_2 和 BC_1 后代群体产生体细胞胚的能力。统计结果表明, 这是一个多基因参与的过程。

5 棉花体细胞胚胎发生特异表达基因研究及相关技术

体细胞胚胎发生是一个复杂的动态过程。从愈伤组织到胚性愈伤组织的发育过程中有多种环境因素、外源物质和激素的参与, 细胞内的代谢与信号转导过程也发生着巨大的变化。在这个复杂的转换过程中, 基因的特异表达起着决定性作用。因此研究棉花体细胞胚胎发生过程中基因的差异表达, 以及分离特异表达的基因具有重要意义。

近年来, 分离特异表达基因的技术不断发展与完善, 出现了 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)、cDNA 扩增片段长度多态性技术(cDNA-AFLP)、抑制性消减杂交法(SSH)、基因表达序列分析法(SAGE)、代表性序列差别分析技术(RDA)和 cDNA 微阵列等技术。这些方法已得到广泛应用, 并已成功分离了许多体细胞胚胎发生的特征表达基因。

5.1 mRNA 差异显示技术

mRNA 差异显示技术由 Liang 和 Pardee(1992)创立。Eric 和 Venu(1994)将这种方法正式命名为差异展示反转录聚合酶链式反应(differentially display reverse tran-

scription polymerase chain reaction), 简称 DDRT-PCR。该技术使用微量总 RNA 为模板, 能从多组样品中灵敏快速地检测出差异表达基因片段, 但假阳性率较高。李惠英和张献龙(2003)通过 DDRT-PCR 技术对陆地棉珂字棉 201 的胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织的体细胞胚胎发生过程中的 cDNA 表达差异进行了研究, 得到约 200 个差异表达 cDNA 片段, 其中 51 个为陆地棉胚性愈伤组织所特有, 并分离到了一个可能与陆地棉品种“珂字棉 201”体细胞胚胎发生相关的新的 cDNA 片段。

5.2 cDNA 扩增片段长度多态性技术

cDNA 扩增片段长度多态性技术(cDNA-amplified fragment length polymorphism, cDNA-AFLP)是将 RT-PCR 和 AFLP 技术结合起来分析基因表达差异。该技术重复性好, 假阳性率低, 可用于基因表达分析、遗传标记分析和差异表达基因的克隆等领域。冷春旭等(2007)利用 cDNA-AFLP 技术研究了陆地棉标准系 TM-1 胚胎发生过程中基因的差异表达。选择了 180 对引物组合, 在显示的约 3 000 条谱带中, 38 条为胚性愈伤组织中所特有的差异谱带。对这些差异片段进行克隆、序列测定和同源性分析, 其中 12 个差异片段同已知陆地棉、雷蒙德氏棉和亚洲棉不同发育时期器官的 EST 序列高度同源。而且这些差异片段与花及纤维发育相关, 证明在植物形态建成早期相关基因已经表达, 也就是说在植物胚胎发育阶段特定器官的基因表达就已经发生。

5.3 抑制性消减杂交技术

Diatchenko 等(1996)提出了新的克隆差异表达基因的方法, 抑制性消减杂交法(suppression subtractive hybridization, SSH)。该方法能够选择性地扩增差异表达基因片段, 并具有高度灵敏性和较低的假阳性率, 但要求起始材料的量较多, 至少需要 2 μ g 的 mRNA(郭新红等, 2001)。抑制性消减杂交法最初多用于动物, 随着技术的不断成熟, 其在植物学研究领域的应用越来越多, 目前在棉花上也有应用。Zeng 和 Zhang(2006)通过抑制性消减杂交法对陆地棉珂字棉 201 的胚性愈伤组织和非

胚性愈伤组织的体细胞胚胎发生过程中的 cDNA 表达进行研究, 得到了 671 个差异表达的 cDNA 片段, 其中 242 个片段被证实表达水平明显上调。同时采用 cDNA arrays 分析了胚性愈伤组织分化不同阶段中这些基因的表达模式, 认为有多条途径共同调节棉花胚性愈伤组织分化。将差异表达 cDNA 片段与 GenBank 中的已知基因进行比对、归类, 可以推知其中 8% 的片段与代谢相关, 11% 的片段与转录及转录后修饰有关。

6 问题与展望

迄今为止, 棉花组织培养再生的研究已经取得了很大进展, 建立起多个棉种的再生体系, 在棉花细胞分化和胚胎发生的机理、细胞的基因表达调控、杂种优势的固定和遗传转化等方面取得了极其重要的研究成果, 并成为棉花遗传转化的主要途径和手段之一。但棉花组织培养中仍存在一些问題, 主要表现在以下几方面。

(1)组织培养中对基因型的依赖性强, 种间、品种间的再生能力差异很大。品种局限性是棉花组织培养的一个难题, 棉花组织培养中以珂字棉、鲁棉、冀棉的体细胞胚发生率较高, 而其它大部分品种的体细胞胚发生率相对较低(迟吉娜等, 2004)。这样使利用组织培养技术对一些优良品种进行改良受到了限制。虽然目前已有报道称建立起了一套体系可以满足 10 个品种的组织培养条件(Wu et al., 2004), 但降低基因型依赖性的工作依然任重道远。在今后的研究中仍要努力扩大棉花再生的基因型范围, 继续探讨棉花组织培养的最佳条件, 建立高效、稳定且对基因型限制不严格的再生体系。

(2)培养过程复杂, 周期长, 重复性差。棉花组织培养再生植株均需要经过多次继代培养才能获得成功。培养过程易受基因型、培养基成分、培养条件等因素影响, 不同品种的培养条件也不完全相同, 重复性比较差。棉花体细胞胚胎的诱导和发育条件以及胚状体成苗技术尚需进一步研究, 以简化操作步骤, 缩短再生时间, 提高组织培养效率。

(3)对于棉花体细胞胚胎发生率低和畸形胚胎频率高

的现象缺乏系统研究。胚性愈伤组织在长期的继代培养过程中易产生染色体变异,在胚胎发生过程中往往伴随着大量异常胚状体的发生,因此获得大量正常的棉花再生植株仍存在一定困难。畸形苗是在人工提供的培养基和培养条件下的产物,故培养环境对畸形苗的发生有很大影响,同时遗传背景不同,畸形苗的发生率也不同。多数学者认为,畸形苗的形成与培养基内的激素、糖、水分、固化剂、培养温度和培养容器等有关,但对畸形苗的发生机理,诸如其发生过程、遗传上的根本改变、分子水平上的变化还缺乏研究(亓建飞等,2004)。周大云等(2000)发现,选用畸形苗作为外植体进行再次培养,可以使棉花体细胞胚胎发生率得到提高,这为棉花组织培养提供了一个新的思路。而弄清染色体变异的规律和畸形胚产生的原因以及如何控制变异率,仍是今后研究的方向之一。

(4)高效的棉花体细胞胚胎发生体系需要不断优化。通过在不同成分的培养基上多次继代,棉花愈伤组织完成了从胚性愈伤诱导到再生植株的转化过程。培养基成分影响愈伤组织中的基因表达、蛋白合成修饰和相关的信号转导途径,进而影响体细胞胚胎的产生和分化。目前对实验材料的生长状态与培养基组成的关系研究得还不够深入,组织培养过程中体细胞胚胎发生频率较低。所以需要不断优化棉花体细胞胚胎发生体系,建立高效的棉花组织培养体系。

(5)对棉花体细胞胚胎发生及发育过程中的分子机制了解很少。目前大多数的研究都集中在各种外界条件以及不同基因型对棉花体细胞胚胎发生发育的影响方面,并且通过各种手段努力提高棉花体细胞胚胎发生频率。这些努力都获得了很大进展,使棉花组织培养周期明显缩短,效率明显提高。但是对于这一过程的分子机制研究仍然较少,目前仅有少数文献报道。虽然已经分离得到了一些相关基因,但是在这个复杂过程中起重要调控作用的关键基因以及相关信号转导途径还未见报道。

综上所述,棉花体细胞胚胎发生不仅仅是简单的繁殖过程,而已成为一个研究领域,诸如遗传学、转基因工程体系、生理生化、棉花发育过程中的基因表达和调控以及功能基因组学等。而对棉花体细胞胚胎发生

过程的研究将对理解棉花体细胞形态建成、组织分化及植株再生方面具有重要价值。

参考文献

- 蔡小宁, 吴敬音, 余建明 (1997). 陆地棉胚性愈伤组织诱导和植株再生. 江苏农业学报 13, 225-230.
- 陈志贤, 李淑君 (1987). 棉花细胞悬浮培养胚胎发生和植株再生某些特性的研究. 中国农业科学 20, 6-11.
- 迟吉娜, 李喜焕, 王省芬 (2004). 棉花体细胞胚胎发生和植株再生的影响因素. 棉花学报 16, 55-61.
- 崔凯荣, 邢更生, 周功克, 刘新民, 王亚馥 (2000). 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节. 遗传 22, 349-354.
- 崔凯荣, 邢更生, 周攻克 (2001). 体细胞胚胎发生的生化基础. 生命科学 12, 6-8.
- 丰嵘, 王清连, 张宝红 (1997). 棉花组织培养植株再生的基因型分析. 西北农业学报 6, 27-30.
- 高述民, 陆幅一 (2000). 大蒜体细胞胚胎发生研究进展. 植物学通报 17, 338-344.
- 郭新红, 姜孝成, 潘晓玲 (2001). 抑制性消减杂交技术(SSH)及其在基因克隆上的应用. 激光生物学报 10, 236-239.
- 郑艳红, 熊庆娥 (2003). 植物体细胞胚胎发生的研究进展. 四川农业大学学报 21, 59-63.
- 冷春旭, 李付广, 陈国跃 (2007). 陆地棉体细胞胚胎发生过程的 cDNA-AFLP 分析. 西北植物学报 27, 233-237.
- 李惠英, 张献龙 (2003). 陆地棉体细胞胚胎发生过程中的 mRNA 差异显示分析. 棉花学报 15, 264-268.
- 李仁敬, 孟庆玉, 魏良民 (1993). 新疆海岛棉体细胞胚状体的发生和芽的分化. 新疆农业科学 1, 9-11.
- 刘桂云 (1983). 棉花胚状体的发生. 中国棉花 10, 24-25.
- 刘华英, 萧浪涛, 何长征 (2002). 植物体细胞胚发生与内源激素的关系研究进展. 湖南农业大学学报(自然科学版) 28, 349-354.
- 陆振鑫, 夏振澳 (1991). 戴维逊棉的组织培养与原生质体培养研究. 植物学报 33, 98-103.
- 吕复兵, 张献龙, 刘金兰 (1999). 陆地棉原生质体培养与植株再生. 华北农学报 14, 73-78.
- 亓建飞, 李付广, 张朝军 (2004). 植物组织培养中畸形苗发生机理的研究进展. 棉花学报 16, 243-248.
- 谭晓连, 钱迎情 (1988). 不同外植体来源和培养条件对拟似棉植

- 株再生的影响. 遗传学报 **5**, 81–87.
- 王喆之, 李克勤, 张大力 (1994). 陆地棉胚性愈伤组织的变异及高频胚胎发生. 植物学报 **36**, 331–338.
- 吴家和, 陈志贤, 李淑君 (1999). 棉花体细胞愈伤组织诱导和增殖期间某些代谢产物的动态变化. 中国棉花 **26**, 17–18.
- 吴敬音, 陈松 (1988). 外源激素和定向选择对棉花体细胞胚胎发生能力长期保持的影响. 江苏农业学报 **4**, 9–15.
- 谢德意, 金双侠, 郭小平 (2007). 长江和黄河流域棉区棉花品种体细胞胚胎发生和植株再生比较研究. 作物学报 **33**, 394–400.
- 张宝红, 刘方, 刘志红 (2000). 外源激素对棉花体细胞胚胎发生及发育的调控作用. 棉花学报 **12**, 17–21.
- 张献龙, 孙济中, 刘金兰 (1991). 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生. 遗传学报 **18**, 461–467.
- 周大云, 张宝红, 刘方, 刘志红 (2000). 一种新型的棉花体细胞胚胎发生的快速诱导法. 生命科学研究 **4**, 237–242.
- Beasley CA (1971). *In vitro* culture of fertilized cotton ovules. *Bioscience* **21**, 906–907.
- Davidonis GH, Hamilton RH (1983). Plant regeneration from callus of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Sci Lett* **32**, 89–93.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6025–6030.
- Eric H, Venu R (1994). Effects of primer choice and source of Taq DNA polymerase on the banding patterns of differential display RT-PCR. *Biotechniques* **17**, 226–228.
- Gawel NJ, Robacker CD (1990). Genetic control of somatic embryogenesis in cotton petiole callus cultures. *Euphytica* **49**, 249–253.
- Kumria R, Sunnichan VG, Das DK, Gupta SK, Reddy VS, Bhatnagar RK, Leelavathi S (2003). High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Rep* **21**, 635–639.
- Liang P, Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967–971.
- Price HJ, Smith RH (1979). Somatic embryogenesis in suspension cultures of *G. klotzschianum* Anderss. *Planta* **145**, 305–307.
- Shoemaker RC, Couche LJ, Galbraith DW (1986). Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep* **5**, 178–181.
- Trolinder NL, Goodin JR (1987). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep* **6**, 231–234.
- Trolinder NL, Goodin JR (1988). Effects of source of explant and hormone regime. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **12**, 31–42.
- Trolinder NL, Chen XX (1989). Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. *Plant Cell Rep* **8**, 133–136.
- Wu JH, Zhang XL, Nie YC, Jin SX, Liang SG (2004). Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of chinese cottons (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol* **40**, 371–375.
- Zeng FC, Zhang XL (2006). Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Plant Mol Biol* **60**, 167–183.
- Zeng FC, Zhang XL, Jin SX, Cheng L, Liang SG, Hu LS, Guo XP, Nie YC, Cao JL (2007). Chromatin reorganization and endogenous auxin/cytokinin dynamic activity during somatic embryogenesis of cultured cotton cell. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **90**, 63–70.
- Zhang BH, Feng R, Li XL (1996). Anther culture and plant regeneration of cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss). *Chin Sci Bull* **41**, 1340–1343.

Progress of Somatic Embryogenesis in Cotton

Xiuming Wu, Chuanliang Liu, Chaojun Zhang, Fuguang Li*

Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455004, China

Abstract Over the past 30 years, somatic embryogenesis induction and plant regeneration has been successful in many different cotton cultivars. However, the efficient conversion of callus into embryogenic callus is still a restricting step during cotton tissue culture and genetic transformation, because embryogenic callus induction is affected by many factors. This paper reviews the research into cotton embryogenic callus in terms of the origin, intrinsic and extrinsic factors affecting callus differentiation, as well as the techniques used to investigate the differential gene expression in the conversion process. We also discuss the problems encountered during the research.

Key words cotton, factors, somatic embryogenesis, tissue culture

Wu XM, Liu CL, Zhang CJ, Li FG (2008). Progress of somatic embryogenesis in cotton. *Chin Bull Bot* **25**, 469–475.

* Author for correspondence. E-mail: lfug@cricaas.com.cn

(责任编辑: 刘慧君)