

植物激素对离体再生的调控及其在南瓜上的作用

王彬¹ 陈敏氩¹ 林亮² 白昌辉¹ 朱海生^{1*} 温庆放^{1*}

(¹福建省农业科学院作物研究所, 福建省农业科学院蔬菜研究中心,
福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013; ²连江县农业经济技术中心, 连江 350500)

摘要 离体再生涉及植物激素信号应答, 细胞分化、脱分化获得组织器官发生以及细胞再分裂形成特定的器官原基和分生组织等过程。激素调控是影响植物离体再生的重要因素。一些关键的启动子元件和转录因子在激素应答信号的检测和转导过程中起着重要作用, 激素的控制对象通常是使细胞的形态和代谢发生转变的决定性基因, 以转录因子和表观遗传因子为主, 它们共同完成对全基因组基因表达的重排, 实现细胞命运的转变。该文对植物离体再生中激素的诱导、应答模式和信号转导以及植物器官发生和体细胞胚胎发生过程激素的分子调控进行了综述, 并概述了近年来国内外有关南瓜离体再生过程激素作用的研究, 旨在为提高南瓜属作物的离体再生率提供新思路。

关键词 植物激素; 离体再生; 分子调控; 南瓜

Regulation of Phytohormone on Regeneration *In Vitro* and Its Role in Pumpkin

Wang Bin¹, Chen Mindong¹, Lin Liang², Bai Changhui¹, Zhu Haisheng^{1*}, Wen Qingfang^{1*}

(¹Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences; Vegetable Research Center,
Fujian Academy of Agricultural Sciences; Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China;
²Lianjiang Agricultural Economy and Technology Center, Lianjiang 350500, China)

Abstract Regeneration *in vitro* involves in phytohormone perception, cell differentiation, dedifferentiation to acquire organogenic competence, and organization of cell division to form specific organ primordia and meristems. Hormone regulation is an important factor affecting plant regeneration *in vitro*. Some key promoter elements and transcription factors play an important role in the process of hormone-response signals detection and transduction. The control object of hormone is usually the crucial genes that change the morphology and metabolism of cells, which are mainly transcription factors and epigenetic factors. They jointly complete the rearrangement of gene expression in genome-wide, and realize cell-fate transition. This review focused on the hormone induction, response patterns, signal transduction of plant regeneration *in vitro*, hormone molecular regulation in plant organogenesis and somatic embryogenesis, and summarized the role of hormone in pumpkin regeneration *in vitro* in recent years, aiming to provide a new idea for improving the regeneration rate of *Cucurbita* crops *in vitro*.

Keywords phytohormone; regeneration *in vitro*; molecular regulation; pumpkin

收稿日期: 2018-05-02 接受日期: 2018-06-11

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2018R1026-5)、福建省农业科学院蔬菜科技创新团队项目(批准号: STIT2017-1-2)、福建省自然科学基金项目(批准号: 2017J01062)和福建省农科院青年科技英才“百人计划”(批准号: YC2017-5)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87572110, E-mail: zhs0246@163.com; E-mail: fjvrc@163.com

Received: May 2, 2018 Accepted: June 11, 2018

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2018R1026-5), Fujian Academy of Agricultural Sciences Project of Vegetable Science and Technology Innovation Team (Grant No.STIT2017-1-2), Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2017J01062) and Fujian Academy of Agricultural Sciences Hundreds of Young People in Science and Technology (Grant No.YC2017-5)

*Corresponding authors. Tel: +86-591-87572110, E-mail: zhs0246@163.com; E-mail: fjvrc@163.com

网络出版时间: 2018-08-29 14:38:03 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180829.1437.016.html>

植物离体再生的研究最早开始于19世纪后半叶,人们开始设想是否可以将植物的部分组织培养成完整的植株。1902年,细胞全能性学说的提出为植物离体再生的成功带来了希望^[1]。直至1948年,首例再生植株从烟草茎段培养中成功获得^[2]。目前,植物离体再生技术已经成熟,广泛应用于植物基因工程育种、倍性育种和无性变异系创制等诸多领域。然而,有关植物离体再生的细胞和分子机理还有许多地方需要探索。植物离体再生可分为三个阶段:第一阶段激素诱导离体再生启动,细胞对激素作出应答,获得组织器官再生的潜能;第二阶段在激素控制下细胞再分裂、分化并向特定组织器官发育;第三阶段组织器官形态建成。目前的研究揭示,激素行为是调控植物离体再生的重要因素^[3],激素的控制对象通常是使细胞的形态和代谢发生转变的决定性基因,以转录因子和表观遗传因子为主,它们共同完成对全基因组基因表达的重排,实现细胞命运的转变。本文将对植物离体再生中激素的诱导、应答模式和信号转导以及植物器官发生和体细胞胚胎发生过程激素的分子调控进行重点综述,并概述近年来国内外有关南瓜离体再生过程激素的作用研究,旨在为提高南瓜属作物的离体再生率提供新思路。

1 植物离体再生过程激素的诱导

植物离体再生过程往往需要外源激素与内源激素的协同诱导。植物内源激素含量调控细胞分化和生长的方向与进程;外源激素起着传递遗传物质脱分化、再分化等发育信号的作用。外源激素可以改变植物本身内源激素的水平,内源激素的种类和水平决定着外源激素的作用效果。

内源激素对愈伤组织的生理状态有重要的影响,其种类、含量及协调平衡是植物愈伤组织形成和分化的关键。迄今为止,国内外研究较多的内源激素包括生长素[auxin,也称为吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)]、细胞分裂素(cytokinin, CTK)、脱落酸(abscisic acid, ABA)和赤霉素(gibberellin, GA),其中IAA被证实是白桦^[4]、早熟禾^[5]、棉花^[6]等多种植物愈伤组织生长的重要内部因子,高浓度的IAA有利于外植体胚性愈伤组织和胚性细胞的诱导;ABA对胡萝卜^[7]、枸杞^[8]等体细胞胚胎的形成和发育具有重要作用,并与水稻绿苗分化直接相关^[9];GA的作用刚好相反,对胚性细胞的发生起负调控作

用。目前学者普遍认为,内源IAA含量高、CTK含量低的外植体具有更高的出愈率,而IAA含量降低、CTK含量升高或者IAA/ABA比值降低则会促进愈伤组织的分化过程。

外源激素的种类、浓度和配比是植物离体形态建成的关键因素。在愈伤组织诱导阶段,可以优先考虑外施萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)和IAA,因为它们对细胞的毒害作用较轻,若效果不佳,可以采用2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D),浓度范围以0.001~10 mg/L为宜,并且在此过程同时添加CTK[如激动素(kinetin, KT)、6-苄基氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)等]可以明显改善愈伤组织的质量^[10]。愈伤组织的分化阶段一般需要IAA和CTK的配合使用。外源IAA/CTK浓度比高时易于诱导根的形成,浓度比例低时促进芽的分化,浓度比处于中间值时则易导致细胞无规则繁殖形成愈伤组织^[11]。在某些生殖器官的分化过程,外源IAA的浓度起着决定性作用,即再生花芽分化前越早期的器官所需的生长素浓度要越低,而再生花芽分化后越晚期的器官所需的生长素浓度越低^[12]。除此之外,一些研究表明,外施ABA对植物体细胞胚胎的发生与发育起着重要作用^[13]。

2 植物离体再生过程激素的应答

植物激素应答过程包括3个环节,首先激素信号被识别并与受体结合,然后经过下游复杂分子运动进行信号转导,最后发生信号响应引起细胞形态和代谢的改变。近几年有关IAA和CTK应答模式和信号转导的研究及综述较多,报道显示,一些关键的启动子元件和转录因子在其中起着重要作用^[14-16]。

2.1 IAA的应答模式和信号转导

目前,研究中最常用人工启动子DR5驱动报告基因GUS(β -glucuronidase)或绿色荧光蛋白GFP(green fluorescent protein)和黄色荧光蛋白YFP(yellow fluorescent protein)的表达来检测IAA应答信号在植物体内的分布情况。基于DR5的指示效果,国内外学者发现,IAA应答信号在植物愈伤组织、不定根、不定芽、体细胞胚胎的形成过程均有分布,并基本了解各自的应答模式。Gordon等^[17]发现,IAA信号最早出现在增殖细胞中,愈伤组织形成后逐渐减少,提示在愈伤组织诱导期间IAA应答仅是早期细胞增殖所必需的。Che等^[18]研究了IAA信

号在不定根再生过程中的应答模式, 结果表明, IAA信号开始出现在愈伤组织的边缘区域, 当转入根诱导培养基(root-inducing medium, RIM)信号分布在WOX5(WUSCHEL-RELATED-HOMEOBOX 5)基因的表达区域, 即根尖分生组织(root apical meristem, RAM)的静止中心(quiescent center, QC)。Cheng等^[19]分析了IAA信号在不定芽再生过程中的分布情况, 发现IAA信号也在愈伤组织边缘被检测到, 可当转入芽诱导培养基(shoot-inducing medium, SIM), 信号被转移到细胞外层, 分布在WUS(WUSCHEL)基因表达区域的周围。Su等^[20]对IAA信号在体细胞胚胎发生中的分布进行研究, 结果显示, IAA信号在胚性愈伤组织中未被检测到, 当转入体细胞胚胎诱导培养基(somatic embryo-inducing medium, SEIM)信号出现在WUS基因表达区域的周围, 在胚胎形成后集中分布在原分生组织顶部。由此可见, IAA应答信号在植物不同的离体再生过程中呈现差异分布。现阶段的研究表明, IAA应答信号的这种差异分布是通过极性运输实现的, 极性运输会导致IAA在植物体内呈现不同浓度的梯度分布, 从而特异性地调控植株不同离体形态的建成。目前已知输入载体AUX1蛋白(AUXIN-RESISTANT1)和输出载体PIN蛋白家族(PINFORMEDs)的活性控制着IAA的极性运输过程, 其中PIN蛋白家族在细胞膜上的极性分布模式是决定IAA极性运输方向的关键调控因子^[21]。

IAA的信号转导过程与AUX/IAA(auxin/indole-3-acetic acid)蛋白的降解和ARF(auxin response factors)蛋白的激活有关。AUX/IAA蛋白是调节IAA基因表达的转录因子, ARF蛋白是调控IAA响应基因表达的转录因子。高浓度水平的IAA会促进运输抑制剂响应蛋白TIR1(transport inhibitor response protein 1)受体和AUX/IAA蛋白结合, 使AUX/IAA蛋白泛素化降解, 激活ARF蛋白用于转录, 从而调节下游基因的表达, 引起IAA应答过程^[22-23](图1)。目前有关AUX/IAA蛋白降解的精细调控机制仍不清楚。Yang等^[24]的研究发现, 植物蛋白PTRE1(proteasome regulator 1)可能在此过程中发挥了重要作用, 它能与TIR1共同精确调控AUX/IAA蛋白的平衡及IAA信号。李艳林等^[25]依据国内外最新的研究成果对ARF在植物生长发育中的调控机制进行综述, 他们认为, ARF在信号转导途径中会因为光信号、生长激素、环境条件、microRNA及ta-siRNA等的变化影响植物的内源性

反应, 从而调控植物的生长发育。近年来, 学者们还热衷于AUX/IAA基因家族的研究, 他们发现AUX/IAA基因能够在IAA诱导的早期做出响应, 并且会因为时间和空间表达上的不同, 以及基因启动子对IAA响应因子的亲合性差异产生功能特异性, 而植物激素和外界环境因子对发挥AUX/IAA功能具有重要的调控作用^[26]。

2.2 CTK的应答模式和信号转导

植物体内CTK应答信号的检测常使用TCS和ARR(ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR)启动子元件。研究发现, CTK信号主要在植物愈伤组织、不定芽和体细胞胚再生过程发生应答, 并且其应答模式与IAA不同, 如在愈伤组织的形成过程中, CTK信号分布较广^[17]。不定芽再生过程中, CTK信号早期出现在愈伤组织的边缘区域, 当转入SIM后集中分布在WUS基因的表达区域^[19]。体细胞胚胎发生过程CTK信号主要分布在WOX5基因的表达区域^[20]。

CTK的信号转导类似于细菌二元调控体系。CTK通过与组氨酸激酶AHKs(*Arabidopsis* histidine kinases)受体结合, 发生自动磷酸化, 磷酸基团被传递到磷酸转运蛋白AHPs(*Arabidopsis* histidine-phosphotransfer proteins)上, 接着转移到反应调节因子ARRs(*Arabidopsis* response), 进而调节下游的CTK应答, 产生一系列生理效应^[27](图2)。ARRs是一类转录因子, 包括A型ARR和B型ARR, 二者存在反馈循环。B型ARR可激活A型ARR基因的转录, 在CTK信号转导过程中起主要作用^[16]。Rashotte等^[28]利用芯片技术发现一系列含有Ap(activator protein)转录因子的CRF(CYTOKININRESPONSEFACTOR)基因家族, 它们可能与B型ARR共同调节部分CTK反应下游基因的表达。此外, 具有非典型锌指结构的转录因子GeBP(glabrous enhancer binding protein)也影响CTK的信号转导^[29]。CTK被证实是目前与其他信号通路互作或交叉反应最为活跃的植物激素, 包括光途径、其他激素途径、植物早期发育相关的信号途径和生物钟信号途径等^[30], 并且在应答过程中存在着特别的功能冗余性, 此现象在受体及其下游众多关键组分如AHK、AHP以及ARR中均有发现^[31]。在近几年的研究中发现, CTK主要的信号元件不仅具有功能冗余性, 在调控特定的植物生长发育过程中也会呈现特异性^[30]。因此, 在今后的研究

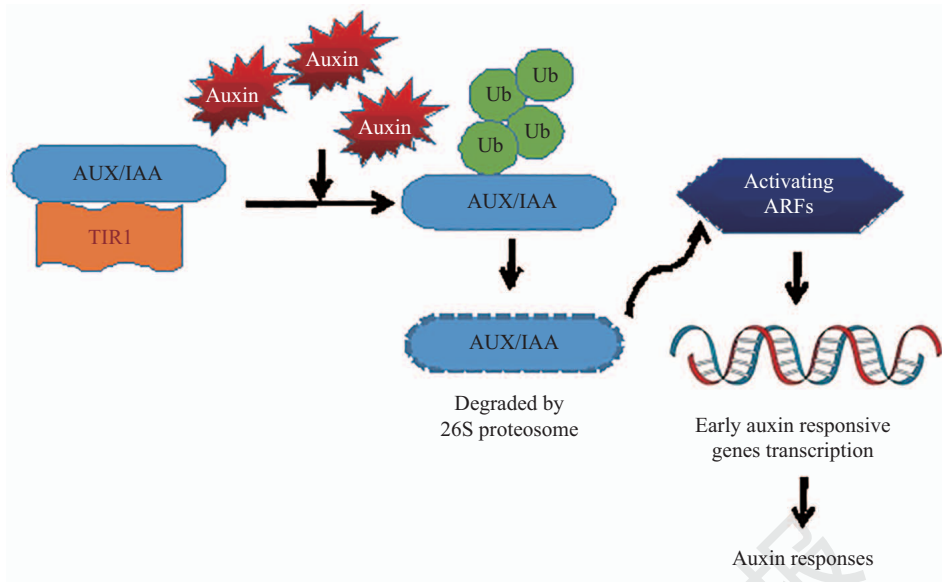


图1 生长素信号转导简图

Fig.1 Diagram of auxin signal transduction pathway

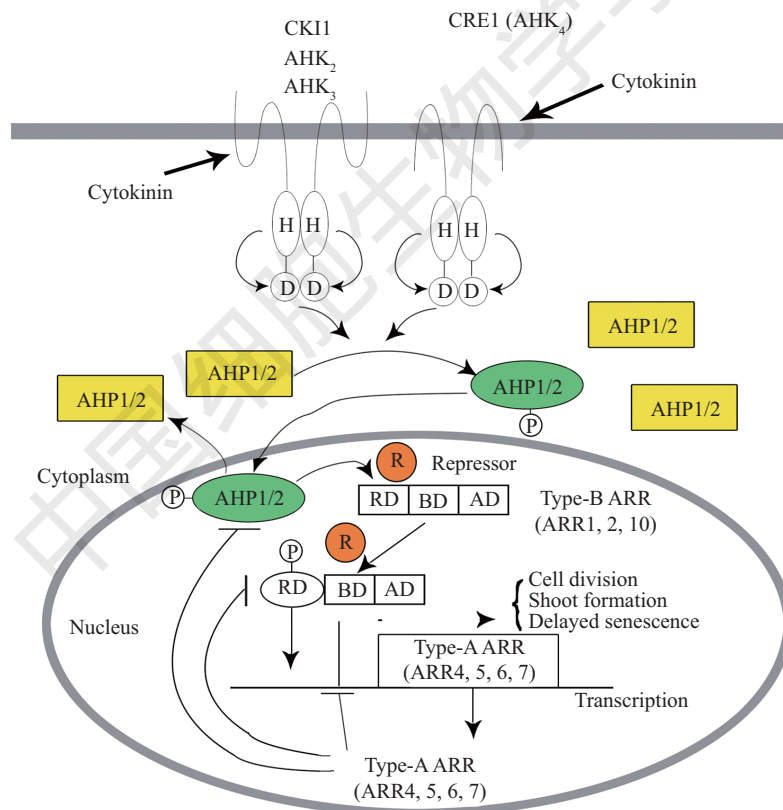


图2 拟南芥细胞分裂素信号转导途径简图(根据参考文献[27]修改)

Fig.2 Diagram of cytokinin signal transduction pathway in *Arabidopsis* (modified from reference [27])

中, 阐明CTK信号转导过程中主要信号元件的功能特性和交叉反应的作用机制具有重要的理论意义。

3 植物离体再生过程激素的分子调控

植物离体再生一般通过器官发生和体细胞胚

胎发生两种方式实现。激素调控是影响植物器官发生和体细胞胚胎发生的重要因素, 其中IAA、CTK和ABA的作用尤为关键。

3.1 植物器官发生过程激素的分子调控

植物离体器官再生可以通过直接和间接两种

途径,前者不经过愈伤组织阶段,后者先形成愈伤组织,接着再生出不定根和不定芽。本文探讨离体器官再生间接途径的分子调控。

3.1.1 愈伤组织的形成 长期以来,IAA诱导愈伤组织的形成被认为是经典植物离体再生的起始步骤。然而,其中所涉及的分子机制至今仍未被阐明。目前的观点趋向于认为愈伤组织的发生过程借用了根发生机制,与侧根和不定根再生过程相似,愈伤组织的本质就是一团在外源激素(高浓度IAA)刺激下无序分裂的根原基。最新研究显示,LBD(lateral organ boundaries domain)转录因子在植物离体再生过程中介导IAA信号,是愈伤组织形成的关键调控因子,其中LBD16、LBD18、LBD19、LBD29能够协助IAA信号转导启动细胞分裂形成愈伤组织^[32]。拟南芥的LBD16、LBD18和LBD29已被发现是IAA应答因子ARF7和ARF19的直接或间接靶点^[33]。Xu等^[34]进而发现,bZIP类转录因子能够与LBD以异源二聚复合体的形式,调控IAA诱导的愈伤发生过程。为了进一步了解愈伤组织形成过程中的调控机制,He等^[35]分析了拟南芥叶片外植体和愈伤组织的基因表达谱,结果表明,以叶片为外植体形成愈伤组织的过程可分为IAA应答基因上调表达、叶基因下调表达和根系基因上调表达3个阶段,并发现此过程受表观遗传的调控,PRC2(polycomb repressive complex 2)介导的组蛋白3赖氨酸27的三甲基化(histone H3 lysine 27 trimethylation, H3K27me3)修饰抑制了叶基因的表达,H3K27的去甲基化促进了IAA应答基因和根调控基因的表达。由此证实,H3K27me3的重编程是愈伤组织形成过程的关键步骤。

3.1.2 不定根形成 早在60多年前,国外学者就已发现,IAA是诱导不定根发生过程中根尖分生组织形成的关键要素。Xu^[36]分析了植物不定根发生的分子机制,认为根器官发生由两种创伤信号触发,即短期创伤信号和长期创伤信号。短期创伤信号主要参与调控IAA的运输和细胞代谢转换,长期创伤信号主要参与调节创伤处周围的细胞环境和维持IAA水平^[37]。Chen等^[38]分析了创伤信号下游的基因,发现YUC基因家族参与应答创伤信号,并促进叶肉细胞和感受态细胞中IAA的生物合成,其中YUC2与YUC6是提供生根所需基本IAA水平的主要基因。孙贝贝等^[14]根据已有的研究结果并结合侧根的发育模型,将再生不定根的过程分为引导、起

始、模化和显现四个阶段。引导阶段创伤信号诱导离体叶片中内源IAA的合成,IAA通过极性运输进入叶原形成层细胞,接着IAA通过信号转导激活WOX11/12(WUSCHEL-related homeobox 11/12)基因的表达,使原形成层细胞向根母细胞转变。Liu等^[39]的研究发现,WOX11/12基因是引导阶段产生根母细胞的重要标志基因,增强或抑制WOX11/12基因的表达会相应促进或阻断不定根的离体再生。起始阶段主要发生细胞分裂促使根母细胞转变为根原基细胞,WOX5和LBD16转录因子在其中起着关键作用。根据Liu等^[39]的研究,引导阶段的WOX11/12基因能诱导LBD16基因上调表达,说明引导阶段和起始阶段在分子上可能存在着继承关系。模化阶段细胞逐渐分化为具有不同功能域的根尖分生组织,其核心为干细胞龛(stem cell niche),由位于中央静止中心的细胞和其周围的初始细胞组成。许多分生组织基因参与其中,如WOX5基因、SHR(SHORT-ROOT)基因和SCR(SCARECROW)基因,其中WOX5基因是根尖干细胞龛中的特征基因^[40]。最后显现阶段需要NAC1、ATAF1、ATAF2、CUC2(CUP-SHAPED COTYLEDON 2)及其同源基因的共同作用协助根尖顶出,完成不定根再生^[41]。

3.1.3 不定芽形成 不定芽离体再生过程一般需要经过两个阶段,芽发生潜能获得阶段和不定芽再生阶段。芽发生潜能获得阶段主要产生具有多能性的愈伤组织。上文提到,愈伤组织的本质就是根原基。Hofhuis等^[42]发现,根原基发育缺陷的plt3/plt5/plt7(plethora3/5/7)三突变体在离体再生培养中不具有再生不定芽的能力,表明再生不定芽的细胞需要带有根原基属性。IAA在愈伤组织和不定根再生过程起着重要作用。因此,IAA也参与了不定芽的再生过程。Gordon等^[17]研究发现,在芽尖分生组织有IAA输出载体PIN1的分布,推测不定芽再生过程同样需要IAA的极性运输。在不定芽再生阶段,多能性的非胚性愈伤组织能在富含CTK的SIM中产生芽祖细胞,提示CTK是不定芽再生的关键激素,接着,芽祖细胞发生类似于不定根再生的模化过程建立芽尖分生组织,之后芽尖分生组织分化形成成熟的芽尖完成不定芽的显现。研究发现,WUS基因、CUC2基因和STM基因(SHOOTMERISTEMLESS)是芽祖细胞形成过程以及芽尖分生组织发育过程中的重要调控因子,其中WUS是芽尖干细胞龛的特征基因,类似

于*WOX5*基因在根尖干细胞龛的功能^[17]。Chatfield等^[43]研究表明,*WUS*基因的上调表达对不定芽的产生至关重要。Cheng等^[19]发现,模化阶段CTK在芽尖干细胞龛的静止中心高度积累,提示CTK可能直接通过激活*WUS*基因的表达建立芽尖分生组织。Zhang等^[44]进而证实,*WUS*基因的表达直接受CTK信号途径B型ARR转录因子的调控,并提出了不定芽再生的分子框架,即CTK富集导致*WUS*基因座位上H3K27me3的表观抑制修饰逐渐丢失,随后B型ARR转录因子ARR1、ARR2、ARR10和ARR12通过与miRNA165/6靶向HD-ZIP-III转录因子结合,在空间上激活*WUS*基因表达,进而调控芽尖分生组织发育。由此进一步证实,CTK在调控不定芽再生过程中起着关键作用。Che等^[18]利用既有芯片技术分析拟南芥不定芽发生过程中基因表达的变化情况,发现在芽发育的早期阶段,表达量增加较多的是与CTK信号转导相关的基因,最为显著的是A类ARR基因。最近有研究显示,不同年龄的外植体表现出不同的不定芽再生效率,提高CTK浓度可以解决成年期植物不定芽再生能力下降的问题。Zhang等^[45]的研究证实,这一现象与植物年龄途径的关键因子miR156(microRNA156)及其靶基因SPL家族密切相关,它们通过调控CTK的信号转导通路,进而影响不定芽的再生能力。

3.2 体细胞胚胎发生过程激素的分子调控

体细胞胚胎发生过程受到多种激素的共同调控,如IAA、CTK、ABA和GA等。Braybrook等^[46]提出了可能的调节过程,首先IAA诱导并启动体细胞胚胎的发生,随后细胞内的ABA水平升高,GA水平降低,这为胚胎生长提供了一个合适的内环境,促使胚胎细胞向成体细胞转变。有研究表明,IAA类似物2,4-D是诱导植物离体再生过程中体细胞转为胚胎细胞的重要激素^[47]。陈雄等^[8]在枸杞的离体再生培养中发现,添加2,4-D可以诱导67 kDa和33 kDa蛋白质产生,这些蛋白质与体细胞胚胎生长与发育密切相关。Loschiavo等^[48]在进行胡萝卜的悬浮培养中却发现,高浓度的2,4-D会导致细胞核DNA甲基化增加,从而降低胚胎基因的表达活性,抑制体细胞胚胎发育。有研究显示,2,4-D可能是通过改变细胞内源IAA代谢来促进胚胎发育^[49]。陈以峰等^[50]证实,在水稻愈伤组织中,内源IAA含量上升或者维持高水平是诱导胚性细胞的必要条件之一。IAA在诱

导胚胎细胞中的作用可能与它能迅速激活基因表达有关,这些基因可以控制IAA受体、运输载体以及IAA合成及代谢相关酶等的蛋白合成。Su等^[20]研究发现,内源IAA的极性分布能诱导*WUS*基因的表达,并认为这是起始胚胎发生的重要步骤。在之后的研究中人们又发现,IAA在调控胚胎发育过程存在两面性,它既可以激活某些基因表达,促进体细胞胚胎发育,又可以抑制这些基因的表达,阻碍胚胎的发育过程^[51]。有关CTK作用机制的报道较少。目前的研究显示,CTK在离体胚胎发生过程能够调控与细胞分化相关基因的表达,并与IAA相互作用,促进细胞的生长、分化和分裂^[47]。ABA也在植物体细胞胚胎的生长和发育过程中起着重要作用。Su等^[52]在拟南芥的体细胞胚胎培养中添加ABA合成的强效抑制剂氟利酮,结果有效地抑制了胚胎的发育过程。崔凯荣等^[53]研究了枸杞体细胞胚胎发生过程,发现内源ABA含量在胚胎发生过程出现两次高峰,分别是胚性细胞启动分化期和球形胚形成期,并且添加外源ABA可以明显地提高细胞胚胎的质量和发生频率。深入研究发现,添加外源ABA能够提高胚胎细胞的质量与ABA能够抑制异常体细胞胚的发生有关,而胚胎发生频率的提高可能是由于ABA能有效地诱导胚性愈伤组织的产生^[47]。其实,早在1993年Misra等^[54]就已发现,ABA能够调控胚胎发生过程特异基因的表达,合成贮藏蛋白、晚期胚胎发生丰富蛋白(late-embryogenesis-abundant protein, LEA)和胚胎发生的特异性蛋白等。孙贝贝等^[14]认为,激素可能是与这些特异基因组成调控网络来驱动体细胞向胚胎细胞转化。在拟南芥的遗传研究中,控制体细胞胚胎发生的基因主要分为3类:胚胎发育特征基因、芽尖特征基因和表观遗传因子。其中,胚胎发育特征基因*LEC1*、*LEC2*、*FUS3*和*AGL15*分别调控着不同激素途径相关基因的表达,如*LEC2*基因控制着IAA合成途径中*YUC*基因的表达^[55-56];*LEC2*基因和*FUS3*基因控制着GA合成途径中赤霉素3-氧化酶(gibberellin 3-oxidases)*AtGA3ox2*基因的表达^[57],*AGL15*基因控制着IAA信号转导*IAA30*基因的表达^[58]。值得一提的是,表观遗传因子通常在胚胎发生过程发挥抑制作用。PcG途径中的两个复合体PRC1(polycomb repressive complex 1)和PRC2在体细胞胚胎发生中抑制胚胎发育特征基因和芽尖特征基因的表达^[59-60]。最近的研究表明,B3结构域蛋

白 VAL1(VP1/ABI3-LIKE1) 和 VAL2 能够与 PRC1 相互作用介导 H3K27me3 抑制胚胎特征基因表达, 之后由 PRC2 介导 H3K27me3 维持胚胎基因被抑制的状态, 推测 PRC1 和 PRC2 可能控制同一个胚胎基因^[61]。ATP 依赖型染色质重塑因子 PKL(pickle) 也具有抑制胚胎发育特征基因的能力。然而, 目前对 PKL 的抑制作用仍存在争议。有研究认为, PKL 可能是通过促进 PRC2 基因的表达间接抑制 LEC1 基因和 FUS3 基因的表达^[62], 也有研究推测 PKL 对 LEC 基因的抑制作用可能受 H3K27me3 介导^[63-64]。

综上, 愈伤组织、不定根、不定芽和体细胞胚胎的形成过程可能共享并互相借鉴了很多激素与分子机制。例如 IAA 不仅是愈伤组织和不定根再生的重要激素, 同样也参与不定芽和体细胞胚胎的发生过程。CTK 在不定芽和体细胞胚胎发生过程都起着重要作用。形成过程上, 愈伤组织的形成被认为是借鉴了不定根的再生机制, 不定根的再生过程可以分成引导、起始、模化和显现四个阶段, 在不定芽再生过程也有类似的模化和显现过程。分子机制上, IAA 是维持根尖干细胞活性的核心激素, CTK 是维持芽尖干细胞活性的核心激素, 在不定根再生过程, 可以利用 IAA 促进不定根和愈伤组织的发生, 在不定芽再生过程, 同样可以利用 CTK 来促进不定芽的发生。WOX5 和 WUS 分别是控制根尖干细胞和芽尖干细胞的核心基因, 在不定根和非胚性愈伤组织发生中需要激活 WOX5 基因的表达, 同样地, 不定芽再生也需要激活 WUS 基因的表达。此外, 植物的多种离体再生过程均受到表观遗传的调控, 在愈伤组织、不定芽和体细胞胚胎的形成过程都发现有组蛋白精氨酸甲基化修饰, 它能够通过调控某些关键基因, 如 WUS 基因、ARF3 基因等的表达来影响植物离体形态建成。

4 南瓜离体再生过程激素的作用

南瓜是一种世界广泛分布的粮菜兼用的瓜类作物, 品种繁多、遗传变异性状丰富, 利用空间巨大。目前, 我国南瓜育种还是以传统杂交选育为主, 通过该方式最终获得带有目标性状的后代往往耗时又费工。近年来, 植物离体再生技术的发展为南瓜育种提供了有力支撑, 利用植物离体再生能够快速、高效地纯化亲本, 从而辅助常规杂交育种。然而植物离体再生具有很强的物种依赖性和基因型特异性。

与黄瓜、西瓜、甜瓜等瓜类蔬菜相比, 南瓜离体再生在实际操作中较为困难, 因此, 国内外学者一直在努力寻求提高南瓜离体培养再生率的方法。

在激素的研究上, 国内学者主要通过筛选外源激素的类型和配比来获得最适合南瓜离体再生的培养条件。基于长期的实验结果, 他们也归纳出一些规律, 如诱导南瓜体细胞胚胎发生过程需要注意激素的类型和浓度, 主要采用 NAA、2,4-D 和 6-BA 诱导胚状体, 所使用的浓度范围分别为 0.25~0.50 mg/L、0~5 mg/L 和 1.0 mg/L。南瓜不定芽诱导过程大多单独采用 CTK 或与 IAA 组合, 目前最常用的 CTK 是 6-BA。伸长过程一般只添加低浓度的 6-BA, 或者与 GA3 或 IAA 结合使用。赵建萍等^[65]发现, 6-BA 浓度为 0.5~1 mg/L 时可以保证芽的增殖和芽苗的质量。南瓜生根培养过程, 通常采用 1/2MS 与 NAA 组合, 但有时无激素的 1/2MS 更利于南瓜生根^[66]。然而, 由于南瓜的离体再生过程还受到基因型、外植体类型、培养基和培养过程的生理生化变化等诸多因素的影响, 因此, 仅仅通过激素的筛选想要提高南瓜的离体再生率是完全不够的, 应该更多地关注激素本身的分子调控以及它与其他影响因素的互作机制。目前, 国外在这些方面已有一些相关报道。Leljak-Levanić 所在的实验室长期致力于南瓜体细胞胚胎发育过程的研究, 他们确认了内源 ABA 对南瓜胚胎发育的重要性, 发现添加 2,4-D 会导致体细胞胚胎发育早期发生高度的 DNA 甲基化, 并且这个过程并不依赖于外源 IAA^[67-69]。在 Leljak-Levanić 等^[70]最新研究中, 他们提出了一个开放性的假设, 推测南瓜胚胎发育过程的 DNA 甲基化机制可能为 RNA 介导的 DNA 甲基化 (RNA-directed DNA methylation, RdDM)。近年来, 研究已经发现, RdDM 路径涉及植物的生长发育、胁迫应答过程, 并对植物的表型多样化、生理适应性以及植物进化具有显著影响^[71], 然而在植物离体培养的研究中还相对较少, 因此, RdDM 路径或将成为未来此领域的一个新的研究方向。另外, 除了 RNA 介导的 DNA 甲基化, 组蛋白甲基化也与 DNA 甲基化相关。上文中提到组蛋白甲基化 H3K27me3 在植物胚胎发育过程起着重要的调控作用, 因此, 可以考虑在南瓜的体细胞胚胎再生中开展组蛋白甲基化相关的研究。在南瓜的体细胞胚胎发育过程, 若培养基中以 NH₄Cl 为唯一氮源, 体细胞胚将停留在球形胚阶段, 只有添加含有硝态氮和铵态氮的复合氮

源, 才用完成胚胎的后期发育^[72]。Pěnčik等^[73]研究了铵对南瓜体细胞胚胎发生的影响, 发现在添加了复合氮源后, 胚胎细胞中的内源ABA水平会出现明显上升, 而内源IAA水平则显著下降, 并且IAA水平的降低与培养基的pH有关。Mihaljević等^[74]进而发现, 经过铵诱导产生的植物激素效应, 除了能调节其自身的激素含量还能影响细胞内的氧化应激反应, 从而控制南瓜体细胞胚胎的发育过程。由于植物体细胞胚胎发育过程中还有许多激素的共同参与, 如CTK、GA和乙烯(ethylene, ETH)等。因此, 在未来的研究中还需要分析它们之间复杂的信号通路, 与此同时, 阐明激素信号特别是IAA信号和氮素反应之间的内在联系可能对今后提高南瓜体细胞胚胎的再生能力会有积极作用。

5 小结与展望

激素调控是影响植物离体再生的重要因素, 涉及器官发生和体细胞胚胎发生等多个过程, 如诱导离体再生启动、信号识别与转导以及响应过程的分子控制等。一些关键的启动子元件和转录因子在激素信号的检测与转导过程中起着重要作用。激素控制着多种转录因子和表观遗传因子, 促使细胞的形态和代谢发生转变, 实现细胞命运的转变。然而, 激素的作用机制极其复杂, 目前仍有许多细胞和分子机理需要探索。例如, 哪些基因是激素调控细胞的形态和代谢发生转变的直接靶向基因? 它们与激素之间是否存在相互协作或制约? 虽然调控植物器官发生和体细胞胚胎发生的基因已经确定, 然而从激素到关键基因, 包括表观遗传调控的网络尚未建立, 有关分子间的相互作用的直接证据也是缺乏的。在南瓜属作物上, 有关离体再生分子机理的研究尚少, 虽然目前国外已有一些相关报道, 但研究范围仍比较局限, 多集中在体细胞胚胎发育方面。在今后的研究中, 可以继续从激素本身的分子调控及其与其他影响因素的互作机制这两个角度对植物离体再生的其他过程进行拓展研究。除此之外, 有关南瓜离体再生基因的开发上国内外至今尚未见报道。目前已从拟南芥、水稻、玉米等作物中克隆并鉴定了一些再生相关的候选基因, 如*OsSERK1*、*OsNiR*、*Os22A*、*AtLECI*和*AtWUS*基因^[75]。在未来的研究中, 这些控制细胞命运转变的基因可能会成为定向控制植物离体再生的分子工具, 具有巨大的应用前景。因此, 获得并鉴定南

瓜再生相关基因, 探明这些基因对南瓜再生的效用也将成为今后南瓜离体再生研究的新方向。

参考文献 (References)

- Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 2007; 12(6): 245-52.
- Skoog F, Tsui C. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured. *Amer J Bot* 1948; 35(10): 782-7.
- Su YH, Zhang XS. The hormonal control of regeneration in plants. *Curr Top Dev Biol* 2014; 108: 35-69.
- 陶静, 詹亚光, 由香玲, 杨传平, 刘玉喜. 白桦组培再生系统的研究(III)—组培过程中内源激素的变化. *东北林业大学学报* (Tao Jing, Zhan Yaguang, You Xiangling, Yang Chuanping, Liu Yuxi. Study on tissue culture and regeneration system of *Betula platyphylla* Suks (III): Change of endogenous hormones in tissue culture. *Journal of Northeast Forestry University*) 1998; 26(6): 6-9.
- 张媛媛, 马晖玲, 俞玲, 赵媛. 草地早熟禾愈伤组织诱导和分化中内源激素水平分析. *甘肃农业大学学报* (Zhang Yuanyuan, Ma Huiling, Yu Ling, Zhao Yuan. Tissue culture and endogenous hormones change of *Poa pratensis*. *Journal of Gansu Agricultural University*) 2013; 48(2): 74-9.
- 郭敏敏, 王清连, 胡根海. 利用高效液相色谱法分离和测定棉花组织培养过程中4种内源激素. *生物技术通讯* (Gou Minmin, Wang Qinglian, Hu Genhai. Separation and determination of four plant hormones during somatic embryogenesis of *Gossypium hirsutum* L with HPLC. *Letters in Biotechnology*) 2009; 20(2): 213-6.
- Nishiwaki M, Fujino K, Koda Y, Masuda K, Kikuta Y. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 2000; 211(5): 756-9.
- 陈雄, 王星, 王亚馥. 激素对枸杞体细胞胚发生及可溶性蛋白质含量和组分的影响. *西北植物学报* (Chen Xiong, Wang Xing, Wang Yafu. Effects of hormones on somatic embryogenesis and soluble protein content and components in *Lycium barbarum* L.. *Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica*) 1995; 15(5): 26-30.
- 王秀红, 史向远, 吴先军, 汪旭东, 周开达. 内源激素对水稻不同外植体培养力的影响. *中国农业科学* (Wang Xiuhong, Shi Xiangyuan, Wu Xianjun, Wang Xudong, Zhou Kaida. The influence of endogenous hormones on culture capability of different explants in rice. *Scientia Agricultura Sinica*) 2004; 37(12): 1819-23.
- 李代丽, 康向阳. 植物愈伤组织培养中内外源激素效应的研究现状与展望. *生物技术通讯* (Li Dali, Kang Xiangyang. The status and prospect of exogenous hormone and endogenous hormone impact in plant callus tissue culture. *Letters in Biotechnology*) 2007; 18(3): 546-8.
- Feldmann KA, Marks MD. Rapid and efficient regeneration of plants from explants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 1986; 47(1): 63-9.
- 陆文樑. 植物器官的克隆—实践、理论和在人与动物器官克隆中应用的可能性. *农业生物技术学报* (Lu Wenlian. Cloning organs in plants—practices, theories and the possibilities applied

- in cloning organs of human and animals. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2005; 13(1): 1-9.
- 13 高述民, 李凤兰. ABA对植物体细胞胚胎发育影响的研究进展. 北京林业大学学报(Gao Shumin, Li Fenglan. *Advances in researches on effects of ABA on somatic embryogenesis. Journal of Beijing Forestry University*) 2002; 24(4): 122-9.
- 14 孙贝贝, 刘杰, 葛亚超, 盛李宏, 陈吕琴, 胡小梅, 等. 植物再生的研究进展. 科学通报(Sun Beibei, Liu Jie, Ge Yachao, Sheng Lihong, Chen Lvqin, Hu Xiaomei, *et al.* *Recent progress on plant regeneration. Chinese Science Bulletin*) 2016; 61(36): 3887-902.
- 15 沈燕霞, 倪君. 植物根尖生长素信号研究进展. 中国细胞生物学学报(Shen Yanxia, Ni Jun. *Progress in the research of plant root tip auxin signal. Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 34(9): 931-5.
- 16 刘长洲, 张婷婷, 赵娟, 李小平. 细胞分裂素的信号转导机制. 安徽农业科学(Liu Changzhou, Zhang Tingting, Zhao Juan, Li Xiaoping. *Molecular transduction mechanism of cytokinin, Journal of Anhui Agricultural Sciences*) 2012; 40(25): 12360-2, 12378.
- 17 Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM. Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* 2007; 134(19): 3539-48.
- 18 Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol* 2006; 141(2): 620-37.
- 19 Cheng ZJ, Wang L, Sun W, Zhang Y, Zhou C, Su YH, *et al.* Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiol* 2013; 161(1): 240-51.
- 20 Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD, Zhang XS. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 2009; 59(3): 448-60.
- 21 李俊华, 种康. 植物生长素极性运输调控机理的研究进展. 植物学报(Li Junhua, Zhong Kang. *Current research advances on polar auxin transport in plant. Chinese Bulletin of Botany*) 2006; 23(5): 466-77.
- 22 Remington DL, Vision TJ, Guilfoile TJ, Reed JW. Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. *Plant Physiol* 2004; 135(3): 1738-52.
- 23 Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estella M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; 435(7041): 441-5.
- 24 Yang BJ, Han XX, Yin LL, Xing MQ, Xu ZH, Xue HW. *Arabidopsis* PROTEASOME REGULATOR1 is required for auxin-mediated suppression of proteasome activity and regulates auxin signaling. *Nat Commun* 2016; 7: 11388.
- 25 李艳林, 高志红, 宋娟, 王万许, 侍婷. 植物生长素响应因子 ARF与生长发育. 植物生理学报(Li Yanlin, Gao Zhihong, Song Juan, Wang Wanxu, Shi Ting. *Auxin response factor (ARF) and its functions in plant growth and development. Plant Physiology Journal*) 2017; 53(10): 1842-58.
- 26 司马晓娇, 郑炳松. 植物生长素原初响应基因Aux/IAA研究进展. 浙江农林大学学报(SiMa Xiaojiao, Zhen Binsong. *Advances in primary auxin-responsive Aux/IAA gene family: a review. Journal of Zhejiang A&F University*) 2015; 32(2): 313-8.
- 27 Huang I, Sheen J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 2001; 413(6854): 383-9.
- 28 Rashotte AM, Mason MG, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ. A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(29): 11081-5.
- 29 Chevalier F, Perazza D, Laporte F, Hornitschek P, Bonneville JM, Herzog M, *et al.* GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that regulate cytokinin response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008; 146(3): 1142-54.
- 30 邓岩, 王兴春, 杨淑华, 左建儒. 细胞分裂素: 代谢、信号转导、交叉反应与农艺性状改良. 植物学通报(Deng Yan, Wang Xingchun, Yang Shuhua, Zuo Jianru. *New insights into cytokinins: metabolism, signal transduction cross talks and potentials in agricultural applications. Chinese Bulletin of Botany*) 2006; 23(5): 478-98.
- 31 郑丙莲, 张素芝, 孙加强, 邓岩, 左建儒. 细胞分裂素信号转导: 已知的简单性与未知的复杂性. 科学通报(Zhen Binlian, Zhang Suzhi, Sun Jiaqiang, Deng Yan, Zuo Jianru. *Cytokinin signal transduction: known simplicity and unknown complexity. Chinese Science Bulletin*) 2003; 48(9): 885-91.
- 32 Fan M, Xu C, Xu K, Hu Y. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res* 2012; 22(7): 1169-80.
- 33 Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; 19(1): 118-30.
- 34 Xu CY, Cao HF, Zhang QQ, Wang HZ, Xin W, Xu EJ, *et al.* Control of auxin-induced callus formation by bZIP59-LBD complex in *Arabidopsis* regeneration. *Nat Plant* 2018; 4(2): 108-15.
- 35 He C, Chen X, Huang H, Xu L. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured *Arabidopsis* tissues. *PLoS Genet* 2012; 8(8): e1002911.
- 36 Xu L. *De novo* root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition. *Curr Opin Plant Bio* 2018; 41: 39-45.
- 37 Chen L, Sun B, Xu L, Liu W. Wound signaling: the missing link in plant regeneration. *Plant Signal Behav* 2016; 11(10): 4273-84.
- 38 Chen L, Tong J, Xiao L, Ruan Y, Liu J, Zeng M, *et al.* YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2016; 67(14): 4273-84.
- 39 Liu J, Sheng L, Xu Y, Li J, Yang Z. WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2014; 26(3): 1081-93.
- 40 Rovere FD, Fattorini L, D'Angeli S, Velocchia A, Del Duca S, Cai G, *et al.* *Arabidopsis* SHR and SCR transcription factors and AUX1 auxin influx carrier control the switch between adventitious rooting and xylogenesis in planta and in *in vitro* cultured thin cell layers. *Ann Bot* 2015; 115(4): 617-28.
- 41 Chen X, Cheng J, Chen L, Huang H, Zhang YJ, Xu L. Auxin-independent NAC pathway acts in response to explant-specific wounding and promotes root tip emergence during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2016; 170(4): 2136-45.
- 42 Hofhuis H, Laskowski M, Du Y, Prasad K, Grigg S, Pinon V,

- et al.* Phyllotaxis and rhizotaxis in *Arabidopsis* are modified by three PLETHORA transcription factors. *Curr Biol* 2013; 23(11): 956-62.
- 43 Chatfield SP, Capron R, Severino A, Penttila PA, Alfred S, Nahal H, *et al.* Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *Plant J Cell Mol Biol* 2013; 73(5): 798-813.
- 44 Zhang TQ, Lian H, Zhou CM, Xu L, Jiao YL, Wang JW. A two-step model for *de novo* activation of WUSCHEL during plant shoot regeneration. *Plant Cell* 2017; 29(5): 1073-80.
- 45 Zhang TQ, Lian H, Tang HB, Dolezal K, Zhou CM, Yu S, *et al.* An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *Plant Cell* 2015; 27(2): 349-60.
- 46 Braybrook SA, Harada JJ. LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci* 2008; 13(12): 624-30.
- 47 崔凯荣, 邢更生, 周功克, 刘新民, 王亚馥. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节. *遗传*(Cui Kairong, Xing Gengsheng, Zhou Gongke, Liu Xinmin, Wang Yafu. The induced and regulatory effects of plant hormones in somatic embryogenesis. *HEREDITAS*) 2000; 22(5): 349-54.
- 48 Loshiavo F, Filippini F, Cozzani F, Vallone D, Terzi M. Modulation of auxin-binding protein in cell suspension: I. Different responses of carrot embryo cultures. *Plant Physiol* 1991; 97(1): 60-4.
- 49 Sasaki K, Simomura K, Kamada H, Harada H. IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. *Plant Cell Physiol* 1994; 35(8): 1159-64.
- 50 陈以峰, 周燮, 汤日圣, 张金榆, 梅传生. 水稻体细胞培养中胚性细胞出现与IAA的关系. *植物学报*(Chen Yifeng, Zhou Xie, Tang Risheng, Zhang Jinyu, Mei Chuansheng. Correlation between appearance of embryogenic cells and the IAA levels in rice somatic cell culture. *Chinese Bulletin of Botany*) 1998; 40(5): 474-7.
- 51 王晓哲, 陈雄, 王亚馥. 植物体细胞胚发生中基因表达调控研究的某些现状. *遗传*(Wang Xiaozhe, Chen Xiong, Wang Yafu. Current research on gene expression and regulation in plant somatic embryogenesis. *HEREDITAS*) 1995; 17(s1): 34-8.
- 52 Su YH, Su YX, Liu YG, Zhang XS. Abscisic acid is required for somatic embryo initiation through mediating spatial auxin response in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul* 2013; 69(2): 167-76.
- 53 崔凯荣, 裴新梧, 秦琳, 王君健, 王亚馥. ABA对枸杞体细胞胚发生的调节作用. *实验生物学报*(Cui Kairong, Pei Xinwu, Qin Lin, Wang Junjiang, Wang Fuya. Regulating effect of ABA on somatic embryogenesis of *Lyciumbarbarum*. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*) 1998; 31(2): 195-201.
- 54 Misra S, Attree SM, Leal I. Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Ann Bot* 1993; 71(1): 11-22.
- 55 Wójcikowska B, Jaskóła K, Gąsiorek P, Meus M, Nowak K, Gaj MD. LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta* 2013; 238(3): 425-40.
- 56 Wójcikowska B, Gaj MD. LEAFY COTYLEDON2-mediated control of the endogenous hormone content: implications for the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2015; 121(1): 255-8.
- 57 Curaba J, Moritz T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, Herzog M, Vachon G. AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2004; 136(3): 3660-9.
- 58 Zheng Y, Ren N, Wang H, Stromberg AJ, Perry SE. Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *Plant Cell* 2009; 21(9): 2563-77.
- 59 Bouyer D, Roudier F, Heese M, Andersen ED, Gey D, Nowack MK, *et al.* Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS Genet* 2011; 7(3): e1002014.
- 60 Chen D, Molitor A, Liu C, Shen WH. The *Arabidopsis* PRC1-like ring finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. *Cell Res* 2010; 20(12): 1332-44.
- 61 Yang C, Bratzel F, Hohmann N, Koch M, Turck F, Calonje M. VAL-and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to post germinative growth in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2013; 23(14): 1324-9.
- 62 Aichinger E, Villar CB, Farrona S, Reyes JC, Hennig L, Kohler C. CHD3 proteins and polycomb group proteins antagonistically determine cell identity in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 2009; 5(8): e1000605.
- 63 Zhang H, Bishop B, Ringenberg W, Muir WM, Ogas J. The CHD3 remodeler PICKLE associates with genes enriched for trimethylation of histone H3 lysine 27. *Plant Physiol* 2012; 159(1): 418-32.
- 64 Zhang H, Rider SD Jr, Henderson JT, Fountain M, Chuang K, Kandachar V, *et al.* The CHD3 remodeler PICKLE promotes trimethylation of histone H3lysine 27. *J Biol Chem* 2008; 283(33): 22637-48.
- 65 赵建萍, 柏新付, 蒋小满, 毕可华. 培养因子对艾西丝南瓜芽增殖及不定根形成的影响. *植物学通报*[(Zhao Jianping, Bai Xinfu, Jiang Xiaoman, Bi Kehua. Effect of cultural factors on propagation of shoots and formation of adventitious roots in pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Chinese Bulletin of Botany*] 2000; 17(1): 84-6.
- 66 耿新丽, 赵一鹏, 秦勇. 金童观赏南瓜离体繁殖技术研究. *安徽农业科学*(Geng Xinli, Zhao Yipeng, Qin Yong. Study on *in vitro* propagation technology of pumpkin ornamental pumpkin. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*) 2006; 34(7): 1338-9.
- 67 Jelaska S. Embryogenesis and organogenesis in pumpkin explants. *Physiol Plant* 1974; 31(4): 257-61.
- 68 Leļjak-Levanić D, Jelaska S. Callus formation and somatic embryo production in pumpkin *Cucurbita pepo* L. explants on hormone free medium. *Periodicum Biologorum* 1995; 97(4): 327-32.
- 69 Leļjak-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, Jelaska S. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep* 2004b; 23(3): 120-7.
- 70 Leļjak-Levanić D, Mrvková M, Turečková V, Pěňčík A, Rolčík J, Strnad M, *et al.* Hormonal and epigenetic regulation during embryogenic tissue habituation in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep* 2016; 35(1): 77-89.
- 71 焦晓明, 范云六, 王磊. 植物表观遗传中的RNA介导的DNA甲基化. *中国农业科技导报*(Jiao Xiaoming, Fan Yunliu, Wang Lei.

- RNA-dependent DNA methylation in plant epigenomics. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2009; 11(6): 7-13.
- 72 Leljak-Levanic' D, Bauer N, Mihaljevic' S, Jelaska S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *J Plant Physiol* 2004a; 161(2): 229-36.
- 73 Pěnčík A, Turečková V, Paulišić S, Rolčík J, Strnad M, Mihaljević S. Ammonium regulates embryogenic potential in *Cucurbita pepo* through pH-mediated changes in endogenous auxin and abscisic acid. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2015; 122(1): 89-100.
- 74 Mihaljević S, Radić S, Bauer N, Garić R, Mihaljević B, Horvat G, *et al.* Ammonium-related metabolic changes affect somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *J Plant Physiol* 2011; 168(16): 1943-51.
- 75 叶兴国, 余茂云, 王珂, 杜丽璞, 徐惠君. 植物组织培养再生相关基因鉴定、克隆和应用研究进展. *作物学报*(Ye Xingguo, She Maoyun, Wang Ke, Du Lipu, Xu Huijun. Identification, cloning, and potential application of genes related to somatic embryogenesis in plant tissue culture. *Acta Agronomica Sinica*) 2012; 38(2): 191-201.

中国细胞生物学学报