

DOI: 10.1360/yc-007-0528

## 植物不定芽离体再生分子调控的评述

黄剑<sup>1</sup>, 沈海龙<sup>1</sup>, 刘长莉<sup>2</sup>, 李玉花<sup>2</sup>

1. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040;

2. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

**摘要:** 植物的不定芽再生过程涉及众多基因及其互作。细胞分裂素诱导体细胞启动、启动的体细胞进行分裂和由此引发的茎分生组织发育是这一过程中的3个重要步骤。探讨这3个步骤的相关基因表达及其关系, 有助于揭示植物不定芽再生的分子调节机制。文章就这些步骤所涉及的分子调节过程的研究成果作一评述。

**关键词:** 不定芽再生; 细胞分裂素; 细胞周期; 分生组织; 信号转导

## Review on molecular regulation of *in vitro* shoot regeneration of plants

HUANG Jian<sup>1</sup>, SHEN Hai-Long<sup>1</sup>, LIU Chang-Li<sup>2</sup>, LI Yu-Hua<sup>2</sup>

1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** *In vitro* shoot regeneration is a developmental process that multiple genes and their interactions are involved in. Initiation of somatic cells stimulated by cytokinin, division of the initiated somatic cells and succeeding shoot meristem development are three key steps in the process. Therefore, exploration of gene expression and their interactions involved in these steps will shed light on our understanding of the molecular mechanism for regulation of plant *in vitro* shoot regeneration. Here we reviewed the research results of molecular regulation process involved in these steps.

**Keywords:** *in vitro* shoot regeneration; cytokinin; cell cycle; meristem; signal transduction

不定芽离体再生(*in vitro* shoot regeneration)是指在植物组织培养过程中, 从培养的体细胞分化出再生芽的发育过程。不定芽再生的发育过程不仅为我们解决植物种苗快速繁殖的问题提供了一个有效途径, 而且为我们在离体培养条件下进行植物发育及遗传转化等研究提供了必要的实验体系。此前, 对植物不定芽再生的形态学及生理学研究使得我们对不定芽再生的起源和生理调节有了很好的了解<sup>[1]</sup>。但是绝大多数用于器官再生的植物遗传背景比较复杂、分子生物学信息积累较少, 限制了有关

不定芽再生分子机理的研究。最近十几年来, 随着cDNA 差异筛选<sup>[2]</sup>和突变体技术等遗传学和分子生物学手段的迅速发展及其在不定芽再生机制研究中的广泛应用<sup>[3-5]</sup>, 人们相继在拟南芥等几种植物中分离出一些与不定芽再生相关的重要基因<sup>[6-11]</sup>, 并对这些基因的表达模式及其可能功能进行了分析, 对不定芽再生的分子机制有了新的了解。本文就这些年来有关不定芽再生分子机制的研究成果作一评述。

收稿日期: 2006-07-02; 修回日期: 2007-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30371155)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30371155)]

作者简介: 黄剑(1979—), 男, 广西百色人, 助教, 博士生, 研究方向: 发育生物学。E-mail: huangcl0323@yahoo.com.cn

通讯作者: 沈海龙(1962—), 男, 山东日照人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 种苗培育、树木组织培养和森林定向培育。Tel: 0451-82191044; E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn/shen6259@yahoo.com.cn

## 1 植物不定芽再生的基本模式

植物在离体培养条件下实现不定芽再生和植株再生,是以植物细胞所具有的“细胞全能性”为基础的。植物细胞在组织培养的特定条件下,能够不断的分裂和增殖,进而发育成完整的再生植株。一般而言,植物不定芽再生可以划分为两种途径,即外植体上不定芽的直接增生以及通过愈伤组织阶段再分化不定芽的间接增生。普遍认为,植物不定芽再生过程包括3个主要步骤:(1)体细胞对激素的诱导产生反应;(2)产生反应的细胞发生特异的细胞分裂;(3)这些发生特异分裂的细胞进入不定芽再生的发育路径<sup>[12]</sup>。在第一、第二个阶段,特定细胞要作出相应的识别、应答反应需要得到激素的诱导和刺激;而在第三个阶段,这些细胞已经获得了某种“决定”,沿着这一决定了的特定路线进入不定芽发育路径,因此这一阶段不再需要激素的参与<sup>[12]</sup>。

人们通过大量的研究,相继发现了与这3个重要步骤密切相关的调控元件:(1)与细胞分裂素应答有关的因子 *CRE1*<sup>[13]</sup>、*AHKs*<sup>[14]</sup>;(2)与细胞周期和细胞分裂的启动相关的重要因子——细胞周期蛋白(cyclin)<sup>[15]</sup>和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDKs)<sup>[16~20]</sup>;(3)与茎分生组织发育相关基因 *KNI*<sup>[21]</sup>、*STM*<sup>[22]</sup>、*WUS*<sup>[23~25]</sup>、*CLV1-3*<sup>[26~30]</sup>。这些步骤所涉及的调控元件,存在着密切的互作关系<sup>[31,32]</sup>。

由此,探讨这3个步骤的相关基因表达及其关系,对于揭示植物不定芽再生的分子调节机制有着重要的意义。

## 2 植物不定芽再生的分子机制

### 2.1 体细胞对激素信号的感知——CK 信号通路对不定芽再生的调节

细胞分裂素(Cytokinin, CK)在细胞分裂和根、茎发育等许多植物发育过程中都起着至关重要的作用,也是不定芽诱导过程中用得最多的植物激素<sup>[33]</sup>,它既能单独起着诱导作用,又能与生长素协同作用对不定芽进行诱导。细胞对CK的感受,首先需要通过受体的识别与信号感受<sup>[34~38]</sup>。

#### 2.1.1 CK 的受体

CKII(Cytokinin-independent1)是第一个发现的具有CK受体特征的蛋白,在不添加CK的培养基上,*CKII*基因的超量表达导致特异的CK应答反应,细

胞分裂大大加速并增生出不定芽,但是,由于其在体外不能结合细胞分裂素,因此无法证明其具有受体的功能<sup>[39]</sup>。

目前,比较得到认可的CK受体是AHK2、AHK3和CRE1/AHK4。这些蛋白的共同特性就是具有一个组氨酸激酶结构域<sup>[36,37]</sup>。除此之外,AHK2与AHK3具有3个跨膜结构域,而CRE1/AHK4具有两个跨膜结构域。研究发现,*CRE1*基因的突变体在离体培养时表现为对CK敏感性的大幅降低<sup>[13]</sup>。序列分析表明,*CRE1*基因与拟南芥*AHK4*基因<sup>[40]</sup>同源。*CRE1*基因表达的蛋白具有一个特殊的杂合激酶结构域、两个C端应答调节子结构域、一个组氨酸激酶结构域。N端是CK的结合部位,与*ETR1*相同,在传递模件的下游还有一个受体结构域<sup>[13]</sup>。原生质体的细胞分裂应答反应表明*CRE1*是CK的受体<sup>[41]</sup>。在酵母和大肠杆菌中对*CRE1/AHK4*进行表达分析的结果表明,CK是*CRE1/AHK4*的配体<sup>[37,40,42]</sup>,亦表明该基因的表达产物具有CK受体的功能。在敲除了融合型激酶的酵母中表达植物的*CRE1*,即用拟南芥的*CRE1*来替代酵母的相关激酶,表现为细胞分裂素存在时能够使酵母已经改变的生长类型得到恢复,表明*CRE1*与细胞分裂素结合后其激酶活性被激活,能够将磷酸基团转移给酵母固有的HPT结构域蛋白,从而启动双组分级联系统<sup>[13]</sup>。

#### 2.1.2 CK 信号转导的下游组分

那么,CK被受体感知后,受体如何将其信号传递呢?在拟南芥的CK信号转导研究中,人们已经分离出了信号转导的下游组分:拟南芥*AHPs*基因。*AHP2*基因的超量表达,使得根和胚轴对CK的敏感性增加<sup>[43]</sup>,而且,以CK处理的细胞中发现*AHPs*在细胞核周围大量积累<sup>[41,44]</sup>,表明该基因可能是一个传递元件,作为一个信使,将CK受体所获得的信号传递到下游的细胞核应答元件<sup>[45,46]</sup>。基因突变体的研究结果,进一步证实了*AHPs*所具有的作为CK信号转导元件的功能<sup>[47]</sup>。

*AHPs*信号的进一步传递,导致下游应答调控因子(*Arabidopsis* response regulators, ARR)的激活。根据其序列的相似性、结构域及对CK的响应特性,人们将ARRs分为两类<sup>[48,49]</sup>。A类ARRs有N端接受域和较短的C端延伸,其mRNA在细胞分裂素处理后迅速积累,表明其转录为细胞分裂素所诱导,被认为可能是最初的应答基因<sup>[50,51]</sup>;B类C端延伸较长,ARRs具有受体结构域和一个转录激活结构域,

其转录不受细胞分裂素的诱导, 而具备转录因子的功能。拟南芥的叶肉原生质体中 B 类 ARR<sub>s</sub> 和 A 类 ARR<sub>s</sub> 的表达分析结果表明, A 类 ARR<sub>s</sub> 的表达受到 B 类 ARR<sub>s</sub> 的调节, 即 B 类 ARR<sub>s</sub> 激活 A 类 ARR<sub>s</sub><sup>[41,52]</sup>。

越来越多的研究结果所提供的证据, 使得 CK 信号转导通路变得越来越明晰。目前普遍认可的 CK 信号转导模式为: 在质膜上, CK 的信号被含有组氨酸激酶结构域的受体(CRE1、AHK4、WOL)所感知; 接着, 这些受体内部发生自体磷酸化, 磷酸基团由组氨酸传递到天冬氨酸, 然后转递给 AHPs 将其激活, AHPs 穿梭进入核内进而将磷酸基团传递到核内的 B 型 ARR<sub>s</sub>, 磷酸化的 B 型 ARR<sub>s</sub> 作为转录因子调节目标基因 A 型 ARR<sub>s</sub> 的表达; 最终激发细胞核的反应, 即: CK—CRE1/AHK4/WOL—AHPs—B 型 ARR<sub>s</sub>—A 型 ARR<sub>s</sub>—核反应<sup>[47]</sup>。

与 CK 信号转导有关的基因, 在植物不定芽再生过程中起着重要的作用, 说明 CK 信号转导元件可能参与了不定芽再生发育过程的调节。但是, 参与 CK 信号转导的基因如何调节不定芽分化的过程还相当模糊<sup>[39,53,54]</sup>。

## 2.2 细胞分裂的启动——细胞周期蛋白对不定芽再生的调节

CK 的诱导信号通过信号的级联反应传递到细胞核以后, 下一步就是细胞分裂的启动。此时, 原已高度分化的细胞, 在上述诱导下失去其在不同组织中所承担的各种功能, 重新进入细胞分裂程序而恢复到具有分裂能力的状态, 这也就是我们常说的“脱分化”过程。细胞能够感受 CK 的诱导信号而重新进入细胞分裂的程序是不定芽再生的前提。因此, 参与细胞周期调控的主要因子, 在此过程中就起着举足轻重的作用, 这些因子包括细胞周期蛋白(cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)。

### 2.2.1 细胞周期蛋白(cyclin)

细胞周期蛋白自从首次在海洋无脊椎动物中发现<sup>[55]</sup>之后, 人们在哺乳动物中相继发现了 8 类不同的细胞周期蛋白(A-H): A 型和 B 型为细胞进入有丝分裂所必需, 被称为有丝分裂细胞周期蛋白; C、D 和 E 型细胞周期蛋白被称为 G1 细胞周期蛋白, 其中 D 型与细胞从静止状态(G0)重新进入细胞周期有关<sup>[56]</sup>。目前研究者已经从几种植物中分离出有丝分

裂型细胞周期蛋白(A 型和 B 型), 如玉米<sup>[57]</sup>和烟草<sup>[58]</sup>等。普遍认为, 植物中的 A 型和 B 型细胞周期蛋白在功能上与动物有丝分裂型细胞周期蛋白同源<sup>[57]</sup>。外源添加 CK 以后, 植物细胞内的基因表达发生了巨大的变化<sup>[59]</sup>。因此, 对 CK 产生应答反应的基因, 就有可能是 CK 信号转导的元件。例如, cyclin D3 (CycD3)可能在细胞周期的 G1-S 期的过渡中起着重要的作用, 在添加外源的 CK 时表现为转录水平大大增加<sup>[31]</sup>。与此相一致的是, CycD3 在细胞增殖的茎分生组织、幼嫩的叶原基、腋芽、原形成层以及成熟叶的维管组织组织中表达<sup>[31]</sup>。另一方面, 虽然外源添加的 CK 使得其转录水平增加, 但是其表达模式并未改变, 表明该基因对 CK 的反应具有组织特异性<sup>[31]</sup>。CycD3 的超量表达, 使得培养物在不含 CK 的情况下保持绿色, 细胞持续增殖。这些结果表明, CK 和细胞增殖的调控之间具有重要的联系。

### 2.2.2 细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDKs)

第一个 CDKs 基因 *CDC2* 是在动物中发现的<sup>[60]</sup>。而后, 人们从拟南芥<sup>[16]</sup>、水稻<sup>[19]</sup>、大豆<sup>[20]</sup>等植物中分离出了 *CDC2* 基因的同源基因。

细胞周期调控的关键因素是细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs), 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 可在特定的细胞周期被激活, 之后磷酸化相应的底物, 从而引起后续事件的发生。此外, CDKs 功能的实现还依赖于细胞周期蛋白的存在, 由于细胞周期蛋白在不同的细胞周期表达量不同, 因而可以时相性地激活 CDKs。

有关 *CDC2* 基因的表达情况, 研究得较多的是拟南芥 *cdc2aAt* 基因。研究表明, 该基因的表达与细胞分裂和细胞分裂能力有关<sup>[16,61,62]</sup>。原位杂交研究的结果表明, *cdc2aAt* 在根、茎尖分生组织、正在发育的新叶以及不定根发生的根-茎连接部位表达。在完全展开的叶片中几乎检测不到该基因的表达。在植物茎尖, *cdc2aAt* 的表达与核分裂能力密切相关。在根部,除了顶端分生组织之外, *cdc2aAt* 表达只限于具有分裂能力的中柱鞘细胞。在玉米中, 也发现类似的表达情况<sup>[63]</sup>。

研究表明, *CDC2* 基因可能在一定程度上与植物生长调节剂相互作用共同调节着细胞分裂的进程。在 *cdc2aAt* 基因的 *GUS* 转基因研究中, Hemerly 等<sup>[62]</sup>发现, 将烟草原生质体在含有生长素或 CK 的培养基上进行培养, 导致 *cdc2aAt* 介导的 *GUS* 基因的表

达。与这些结果一致的是,在受伤的转基因拟南芥叶片中,也发现有 *cdc2aAt* 融合的 *GUS* 基因表达量增加。类似的,在玉米<sup>[63]</sup>中也发现 *cdc2* 转录水平与组织细胞增殖的相关性。尽管 *cdc2* 基因的表达要启动细胞分裂可能还需要有其他因素的参与,但是以上研究结果表明 *cdc2* 与细胞分裂有着密切的联系。水稻 R2 蛋白与 CDK7 亲缘关系最近,且具有 CDK 激酶的活性;而水稻 cyclin H 则可以特异性的与 R2 结合并激活其激酶活性。利用糖皮质激素诱导系统使水稻 R2 的 cDNA 在烟草叶片外植体中过量表达,发现在富含生长素的培养基上,根的形态发生受到抑制,从而引起细胞无规则增殖导致愈伤组织的形成<sup>[64]</sup>。

### 2.3 茎分生组织的发育——分生组织发育相关基因

#### 的调节

在植物合子胚发生过程中,可以观察到茎分生组织的发育情况。由于该组织位于植物生长点的顶端,通常被称为茎端分生组织(shoot apical meristem, SAM)。茎端分生组织(SAM)具有特定的组织结构,通常可以明显地区分出不同的细胞层及分区。根以外的所有侧生器官都源于 SAM。

通过对玉米、拟南芥及其他植物的遗传学和分子生物学研究,人们发现了茎端分生组织发育所必需的重要基因。最先发现的是玉米 *KN1* 基因<sup>[21]</sup>。*KN1* 基因编码一个同源异型盒蛋白,在胚的 SAM 和生长点中特异表达,而在叶原基中则不表达<sup>[65]</sup>。对 *KN1* 基因进行功能分析发现,玉米 *KN1* 基因在烟草中的异位表达以及其同源基因在拟南芥中的异位表达均能使培养组织产生不定芽<sup>[66,67]</sup>,表明该基因在茎分生组织发育过程中起着至关重要的作用。而后,在拟南芥中发现的 *KN1* 基因的同源基因 *KNAT1*,亦具有同样的功能<sup>[67]</sup>,丰富了 *KN1* 基因家族的成员。

另一个基因是 *STM* 基因,其突变导致胚胎发生过程中不能形成茎端分生组织。序列分析表明 *STM* 基因编码一个类 *KN1* 同源异型盒蛋白,因此是 *KN1* 基因家族的一员,该基因的表达同样只局限于 SAM,很可能是通过转录调控而影响 SAM 的形成<sup>[22]</sup>,且该基因与茎端分生组织的发育和分生能力的维持有关<sup>[68,69]</sup>。在 *stm* 突变的成熟胚中,茎端分生组织显著减少,甚至完全缺失。在胚后发育过程中,*stm* 突变株在本该发育出茎端分生组织的位置发育为丛生的不定芽<sup>[68]</sup>。*stm* 突变株中的种种缺陷,均是 *STM* 具有阻止分生组织中心细胞分化为茎原基所致<sup>[68]</sup>。

除此之外,研究表明在拟南芥中还有其他几个基因与茎分生组织发育和分生能力维持相关的基因。*WUS* 基因编码一个同源盒转录因子<sup>[24]</sup>,该基因的突变株 *wus* 表现为茎分生组织发育受阻而停止。*WUS* 的表达首先是在胚胎发生过程中的表皮细胞,而后逐渐的仅限于 SAM<sup>[24]</sup>,表明该基因与 SAM 中心区域“干细胞”的启动和保持有关。在拟南芥中,*WUS* 和 *STM* 是被独立激活的;但是,*STM* 在 *wus* 突变株中不表达,反过来,*WUS* 在 *stm* 突变株中亦不表达<sup>[70]</sup>。*STM* 在 *WUS* 的上游表达<sup>[68]</sup>。

除了 *STM* 和 *WUS* 在促进茎分生组织活性中起作用之外,在拟南芥中还有另外一组基因 *CLV1-3*,与限制 SAM 中的细胞增殖有关。这些基因的突变导致 SAM 和花分生组织膨大<sup>[26-28]</sup>。遗传分析表明,*CLV1* 和 *CLV3* 的产物以相同的途径对 SAM 中的细胞增殖进行调节<sup>[27]</sup>。虽然 *CLV2* 基因的产物调控分子组织发育的途径可能与 *CLV1* 和 *CLV3* 一样,但是其在植物发育中的作用似乎还要更广泛<sup>[28]</sup>。*CLV1* 基因编码一个富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)的跨膜受体丝氨酸/苏氨酸激酶,在 SAM 和花分生组织的中心部位表达<sup>[71]</sup>。*CLV1* 受体具有蛋白结合结构域,可能与胞外蛋白或多肽配基结合。*CLV3* 编码一个小型的胞外蛋白,该蛋白在 SAM 和花分生组织的顶部表达,尤其在 L1 层和 L2 层表达<sup>[29]</sup>。遗传学、分子生物学和生物化学的研究有力的证明,*CLV3* 或其表达产物是 *CLV1* 受体激酶的配基<sup>[72]</sup>。根据这些研究结果,人们推测,*STM*、*CLV1-3* 和 *WUS* 可能在 SAM 活性的保持中起作用,使 SAM 得以成为植物发育过程中的真正“干细胞”而保持永久的分生能力<sup>[28,29,68,71,72]</sup>。

除 *STM*、*WUS* 和 *CLV1-3* 之外,在拟南芥中已经分离了很多与茎分生组织发育和分生能力维持有关的基因,如 *CUC1* 和 *CUC2*。表达分析表明 *CUC1* 和 *CUC2* 都在球形胚期的叶原基之间表达,表明这两个基因是胚胎茎尖分生组织形成的重要基因<sup>[73,74]</sup>。在拟南芥的不定芽再生系统中,*CDC2* 基因的大量表达,使得茎分生组织开始形成,不定芽得以再生<sup>[75]</sup>。序列分析表明,*CDC1* 和 *CDC2* 基因具有转录因子起作用,因为 *STM* 基因的表达以及茎分生组织的发育都需要这两个基因的参与<sup>[74]</sup>。

除此之外,与细胞分裂素的诱导密切相关的 AP2 基因家族的成员,在不定芽发育的过程中起着至关重要的调节作用。这一类基因的共同特征是有

一个 AP2 结构域, 在不定芽发育的过程中通过对其他基因的转录调节而起着调控作用。这类基因的相继发现, 使得人们对不定芽发育的多基因互作的调控模式又有了新的见解。此间具有代表性的是拟南芥 *ESR1* 基因, 该基因的超量表达使得根外植体在不添加细胞分裂素的培养基中就可以产生不定芽<sup>[6]</sup>。序列分析表明, *ESR1* 基因编码的蛋白具有 AP2/EREBP 结构域, 因此是 AP2/ERBP 家族的成员, 该基因家族参与植物的许多发育过程和对环境信号的响应。*ESR1* 基因的超量表达, 可以使拟南芥根培养物在不添加细胞分裂素的培养基上增生出茎丛。而且, 在添加细胞分裂素的情况下, 该基因的超量表达亦能大大提高不定芽增生的效率。与未表达 *ESR1* 基因的培养物相比, 要获得最高的诱导率所需的细胞分裂素浓度降低。在添加细胞分裂素的情况下, *ESR1* 基因的超量表达虽然对愈伤组织诱导和根增生都没有太大影响, 但却大大促进了不定芽增生。在野生型拟南芥中, *ESR1* 基因表现为依赖于细胞分裂素诱导表达的特性。对 *ESR1* 基因在不定芽增生过程中的时空表达动态进行研究, 该基因在不定芽增生过程中 *ESR1* 具有瞬时表达的特性, 说明该基因在不定芽增生的这一特定发育阶段起着特异的调节作用。同样是野生型的根外植体, 当培养在含细胞分裂素的培养基即茎丛诱导培养基中时, 瞬间提高了 *ESR1* 的转录水平, 其表达是在细胞获得不定芽增生能力之后<sup>[6]</sup>。最近, *ESR2* 基因的发现, 丰富了 AP2 基因家族的成员。该基因亦是一个具有 AP2 结构域的转录因子, 在不定芽发育过程中起着重要的作用。一方面, 其超量表达使得来自 *cre1/ahk4* 突变株的外植体在不添加细胞分裂素的情况下实现不定芽增生, 表明 *CRE1* 基因并不参与 *ESR2* 介导的不定芽发育过程的调节; 另一方面, 以 RNA 干扰(RNAi) 技术进行 *ESR2* 基因的敲除试验, 发现该基因的敲除使得 *CUC1* 基因的表达量减少, 不定芽增生的频率降低, 表明 *ESR2* 基因在通过对 *CUC1* 基因的转录调控在不定芽再生的过程中起着调节作用<sup>[76]</sup>。Che 等<sup>[11]</sup> 所进行的研究中, AP2/EREBP 基因家族的成员 *RAP 2.6L* 的表达量在芽分化过程中增加, 该基因的 T-DNA 敲除突变降低了组织培养过程中芽分化的频率, 影响了芽分生组织特异基因的表达, 并可以使不定芽再生过程中 35% 受特异性正调节的基因表达量显著降低, 表明其编码的转录因子在芽再生过程中发挥重要作用。

*MADS* 盒式基因家族, 亦在茎发育过程中起着重要的作用。该基因家族是一类调控植物生长发育的关键基因, 散布在整个植物基因组中。多数 *MADS* 盒式基因在植物生殖发育过程中起重要作用; 同时也参与调节营养生长、子房发育、种皮发育、根的形成、胚形态建成等植物发育过程。Prakash 等<sup>[77]</sup> 在泡桐(*Paulownia kawakamii*) 叶片外植体不定芽增生过程中分离出 *PkMADS1* 基因。Northern 杂交分析表明该基因在不定芽增生的培养物中表达, 而在形成愈伤组织的培养物中则不表达; 在茎尖组织中表达, 而在根尖、叶片及花部组织均不表达。原位杂交分析表明该基因的表达限于增生不定芽的茎原基, 表明其在茎原基的发育过程中起着至关重要的作用。超量表达该基因的转基因泡桐在表型上发生了很大的变化, 茎发育异常, 腋芽增生; 而在反义基因转化株中则表现为茎萎缩, 发育受阻, 在一些植株中甚至表现为茎端分生组织发育的提前停止。在组织培养中, 来自反义基因转化株的叶片外植体其增生不定芽比来自野生型或正义基因转化株的要减少 10 倍。这些研究表明, *PkMADS1* 基因在泡桐茎发育的起始和后发育过程中均起着重要的调节作用<sup>[77]</sup>。

#### 2.4 不定芽再生相关基因的互作

植物茎分生组织发育和分生能力的维持涉及很多基因, 其发育过程在细胞分裂素的介导下受到这些基因的调控。目前, 尽管这些基因的功能及互作关系仍有待于进一步阐明, 与这些复杂过程有关的分子机制的某些方面已经得到确定。有证据表明, CK 的诱导、细胞周期与茎分生组织发育这 3 个步骤存在着互作关系<sup>[31,32,78-80]</sup>。例如, CK 合成基因 *IPt* 在拟南芥中的超量表达, 导致 *KNAT1* 和 *STM* 水平的增加<sup>[32]</sup>。在转基因水稻中 *KNI* 基因同源基因 *OSH1* 的超量表达, 也导致活性状态的细胞分裂素水平增加<sup>[81]</sup>。将 *KNAT2* 的同源盒结构域与 GR 受体的激素结合结构域组成融合蛋白进行表达分析, 随着细胞分裂素处理之后 *KHAT2-GR* 融合蛋白的活化, 不定芽再生的速度增加, 表明细胞分裂素和 *KNAT2* 对茎分生组织活性调节起着协同作用<sup>[79]</sup>。

Che 等<sup>[11]</sup> 的研究分析了拟南芥愈伤组织产生、不定芽增生和生根过程中基因的表达情况, 发现了在不同的发育过程中表达量出现上调或下调的基因。在不定芽分化过程中, 拟南芥根特异表达的许多基因的表达被关闭, 而在芽发育的早期阶段, 表

达量增加的许多基因是与细胞分裂素信号转导有关的基因, 最为显著的是A类ARR基因<sup>[11]</sup>。这表明, 茎的发育过程与细胞分裂素的信号转导有着密切的联系。

在 Ikeda 等<sup>[76]</sup>的研究中, 以 RNA 干涉(RNAi)技术进行 *ESR2* 基因的敲除实验, 敲除 *ESR2* 基因的结果使得不定芽再生重要基因 *CUC1* 的表达量减少, 不定芽增生的频率降低, 表明 *ESR2* 基因在通过对 *CUC1* 基因的转录调控在不定芽再生的过程中起着调节作用。

这些事实, 为我们理解不定芽发育的机制提供了丰富的信息, 同时也表明了不定芽再生分子调节过程的是一个复杂的、由多种调控元件平衡互作的调控网络。那么, 摆在我们面前迫切需要解答的问题是: 这些与茎分生组织的发育相关的结构基因与前述的“CK 信号传递”和“细胞分裂”有着什么样的承接关系? 如果能清楚的回答这个问题, 无疑对最终阐释不定芽再生的根本机制有着重要的促进作用。

### 3 小结与展望

植物离体培养在一个世纪的发展过程中, 所获得的成就远远要比 Haberlandt 在一百年前所预言的要大得多, 要令人振奋得多。随着遗传学、分子生物学和生物化学各种实验手段的迅速发展, 众多研究者不断发现了与植物不定芽再生的遗传控制相关的基因, 并对这些基因的表达行为进行了广泛的研究, 为对植物这种发育现象的内部机制的了解提供了许多令人鼓舞的信息。而且, 许多这方面的工作还在进行之中<sup>[11,82,83]</sup>, 研究者正在努力填补这一领域的研究空白。但是, 到目前为止, 对于细胞诱导——分裂——产生不定芽这几个步骤中的关键调节因子如何将诱导信号一步一步地传递下去, 最终准确无误地启动不定芽再生的根本机制, 人们尚不能够很好地阐释。也就是说, 目前的研究还停留在阶段性的特异基因表达分析之上, 而有关不定芽发育整体过程的信号转导途径的研究仍方兴未艾。越来越多与不定芽再生相关基因的发现与鉴定, 使得研究者能够将这些关键基因作为不定芽发育过程中的分子标记, 发现更多的与不定芽发育相关基因, 同时通过已有的分子标记寻找各个调控元件在表达上、功能上的联系, 由此势必能够对不定芽发育过程中各个分子调节元件之间的互作关系有着更加深

刻、更加明晰的了解<sup>[84-89]</sup>。随着分子生物学的不断发展及细胞信号转导理论与技术的不断进步<sup>[90-92]</sup>, 植物不定芽再生机制研究必将得到不断的推动, 而对其机制的阐明无疑会对植物组织培养的应用产生重要的指导作用。

### 参考文献 (References):

- [1] Joy RW, Thorpe TA. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology, In: Soh WH, Bhojwani SS, eds. Morphogenesis in Plant Tissue Cultures. Kluwer Academic Publishers, 1999, 171-214.
- [2] Sagerstrom CG, Sun BI, Sive HL. Subtractive cloning: past, present, and future. *Annu Rev Bio Chem*, 1997, 66: 751-783.
- [3] Yasutani I, Ozawa S, Nishida T, Sugiyama M, Komamine A. Isolation of temperatures-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the redifferentiation of shoots. *Plant Physiol*, 1994, 105(3): 815-822.
- [4] Che P, Gingerich DJ, Lall S, Howell SH. Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2002, 14(11): 2771-2785.
- [5] Shary S, Guha-Mukherjee S. Isolation and expression studies of differentiation-specific genes in tobacco dihaploids using PCR-based subtractive hybridization method. *Plant Sci*, 2004, 166(2): 317-322.
- [6] Banno H, Ikeda Y, Niu QW, Chua NH. Overexpression of *Arabidopsis* *ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell*, 2001, 13(12): 2609-2618.
- [7] Low RK, Prakash AP, Swarup S, Goh CJ, Kumar PP. A differentially expressed bZIP gene is associated with adventitious shoot regeneration in leaf cultures of *Paulownia kawakamii*. *Plant Cell Rep*, 2001,20(8): 696-700.
- [8] Daimon Y, Takabe K, Tasaka M. The CUP-SHAPED COTYLEDON gene promote adventitious shoot formation on calli. *Plant and Cell Physio*, 2003, 44(2): 113-121.
- [9] Kirch T, Simon R, Grunewald M, Werr W. The DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION gene of *Arabidopsis* acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development. *Plant Cell*, 2003, 15(3): 694-705.
- [10] Lall S, Nettleton D, DeCook R, Che P, Howell SH. Quantitative trait loci associated with adventitious shoot formation in tissue culture and program of shoot development in *Arabidopsis*. *Genetics*, 2004, 167(4): 1883-1892.
- [11] 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): 620-637.
- [12] Sugiyama M. Organogenesis *in vitro*. *Curr Opin Plant*

- Biol*, 1999, 2(1): 61–64.
- [13] Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 2001, 409(6823): 1060–1063.
- [14] Haberer G, Kieber JJ. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol*, 2002, 128(2): 354–362.
- [15] Shaul O. Regulation of cell division in *Arabidopsis*. *Crit Rev Plant Sci*, 1996, 15(2): 97–112.
- [16] Ferreira PC, Hemerly AS, Villarroel R, Van Montagu M, Inze D. The *Arabidopsis* functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *Plant Cell*, 1991, 3(5): 531–540.
- [17] Hirayama T, Imajuku Y, Anai T, Matsui M, Oka A. Identification of two cell-cycle-controlling cdc2 gene homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 1991, 105(2): 159–166.
- [18] Imajuku Y, Hirayama T, Endoh H, Oka A. Exon-intron organization of the *Arabidopsis thaliana* protein kinase genes CDC2a and CDC2b. *FEBS Lett*, 1992, 304(1): 73–77.
- [19] Hashimoto J, Hirabayashi T, Hayano Y, Hata S, Ohashi, Y, Suzuka, I, Utsugi T, Toh EA, Kikuchi Y. Isolation and characterization of cDNA clones encoding cdc2 homologues from *Oryza saliva*: a functional homologue and cognate variants. *Mol Gen Genetics*, 1992, 233(1-2): 10–16.
- [20] Miao GH, Hong Z, Verma DPS. Two functional soybean genes encoding p34cdc2 protein kinases are regulated by different plant developmental pathways. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1993, 90(3): 943–947.
- [21] Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, Hake S. The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature*, 1991, 350(6315): 241–243.
- [22] Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature*, 1996, 379(6560): 66–69.
- [23] Laux T, Mayer KFX, Berger J, Jrgens G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 1996, 122(1): 87–96.
- [24] Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jrgen G, Laux T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 1998, 95(6): 805–815.
- [25] Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A, Sato Y, Matsuoka M. Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J*, 2003, 35(4): 429–441.
- [26] Leyser HMO, Furner IJ. Characterization of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 1992, 116(2): 397–403.
- [27] Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM. CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development*, 1995, 121(7): 2057–2067.
- [28] Kayes JM, Clark SE. CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development*, 1998, 125(19): 3843–3851.
- [29] Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science*, 1999, 283(5409): 1911–1914.
- [30] De Young BJ, Bickle KL, Schrage KJ, Muskett P, Patel K, Clark SE. The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2006, 45(1): 1–16.
- [31] Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmar A, Murray JAH. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*, 1999, 283(5407): 1541–1544.
- [32] Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmuelling T. Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J*, 1999, 18(5): 557–563.
- [33] Howell SH, Lall S, Che P. Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science*, <http://plants.trends.com>, 2003.
- [34] Kakimoto T. Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, 1(5): 399–403.
- [35] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 183–215.
- [36] Lohrmann J, Harter K. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol*, 2002, 128(2): 363–369.
- [37] Aoyama T, Oka A. Cytokinin signal transduction in plant cells. *J Plant Res*, 2003, 116(3): 221–231.
- [38] Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmuelling T. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, 2006, 18(1): 40–54.
- [39] Kakimoto T. CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 1996, 274(5289): 982–985.
- [40] Suzuki T, Sakurai K, Imamura A. The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(2): 107–113.
- [41] Hwang I, Sheen J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, 2001, 413(6854): 383–289.

- [42] Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(9): 1017–1023.
- [43] Suzuki T, Ishikawa K, Yamashino T, Mizuno T. An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (HPT) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitivity to cytokinin. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(1): 123–129.
- [44] Yamada H, Koizumi N, Nakamichi N. Rapid response of *Arabidopsis* T87 cultured cells to cytokinin through His-to-Asp phosphorelay signal transduction. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(9): 1966–1976.
- [45] Miyata S, Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domain in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 1998, 437(1/2): 11–14.
- [46] Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, Nakamura A, Ueguchi C, Mizuno T. Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(11): 2486–2489.
- [47] Ferreira FJ, Kieber JJ. Cytokinin signaling. (Cell signaling and gene regulation.). *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(5): 518–525.
- [48] D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ. Characterization of the response of the *Arabidopsis* ARR gene family to cytokinin. *Plant Physiol*, 2000, 124(4): 1706–1717.
- [49] Mason MG, Li J, Mathews DE. Type-B response regulators display overlapping but distinct expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2004, 135(2): 927–937.
- [50] Kiba T, Yamada H, Mizuno T. Characterization of the ARR15 and ARR16 response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 histidine kinase in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(9): 1059–1066.
- [51] Rashotte AM, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ. Expression profiling of cytokinin actin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 132(4): 1998–2011.
- [52] Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 2001, 294(5546): 1519–1521.
- [53] Hutchison CE, Kieber JJ. Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2002, 14(Suppl.): s47–s59.
- [54] Chow B, McCourt P. Hormone signalling from a developmental context. *J EXP Bot*, 2004, 55(395): 247–251.
- [55] Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 1983, 33(2): 389–396.
- [56] Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kalo JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G-I phase in rodent fibroblasts. *Genes Devel*, 1993, 7(8): 1559–1571.
- [57] Renaudin JP, Colasanti J, Rime H, Yuan Z, Sundaresan V. Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mitotic cyclins. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1994, 91: 7375–7380.
- [58] Qin LX, Richard L, Perennes C, Gadal P, Bergounioux C. Identification of a cell cycle-related gene, cyclin, in *Nicotiana tabacum* (L.). *Plant Physiol*, 1995, 108(1): 425–426.
- [59] Schmulling T, Schafer S, Romanov G. Cytokinins as regulators of gene-expression. *Physiologia Plantarum*, 1997, 100(3): 505–519.
- [60] Hindley J, Phear GA. Sequence of the cell division gene CDC2 from *Schizosaccharomyces pombe*: patterns of splicing and homology to protein kinases. *Gene*, 1984, 31(1-3): 129–134.
- [61] Martinez MC, Jorgensen JE, Lawton MA, Lamb CJ, Dorer PW. Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1992, 89(16): 7360–7364.
- [62] Hemerly AS, Ferreira P, De Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inze D. Cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell*, 1993, 5(12): 1711–1723.
- [63] Colasanti J, Tyers M, Sundaresan V. Isolation and characterization of complementary DNA clones encoding a functional P34cdc2 homologue from *Zea mays*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1991, 88(8): 3377–3381.
- [64] Yamaguchi M, Kato H, Yoshida S, Yamamura S, Uchimiya H, Umeda M. Control of *in vitro* organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(13), 8019–8023.
- [65] Smith L G, Jackson D, Hake S. Expression of knotted1 marks shoot meristem formation during maize embryogenesis. *Develop Genet*, 1995, 16(4): 344–348.
- [66] Sinha NR, Williams RE, Hake S. Overexpression of the maize homeo box gene, KNOTTED-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Devel*, 1993, 7(5): 787–795.
- [67] Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K, Hake S. A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell*, 1994, 6(12): 1859–1876.
- [68] Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ, Laux T.



- The Shoot Meristemless gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *Wuschel* and *Zwille*. *Plant J*, 1996, 10(6): 967–979.
- [69] Satoh N, Itoh JI, Nagato Y. The SHOOTLESS2 and SHOOTLESS1 genes are involved in both initiation and maintenance of the shoot apical meristem through regulating the number of indeterminate cells. *Genetics*, 2003, 164(1): 335–346.
- [70] Lenhard M, Juergens G, Laux T. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfill complementary roles in *Arabidopsis* shootmeristem regulation. *Development*, 2002, 129(13): 3195–3206.
- [71] Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM. Control of shoot and floral meristem size in *Arabidopsis* by a putative receptor-kinase encoded by the *CLAVATA1* gene. *Cell*, 1997, 89(4): 575–585.
- [72] Rojo E, Sharma VK, Kovaleva V, Raikhel NV, Fletcher JC. CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell*, 2002, 14(5): 969–977.
- [73] Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 841–857.
- [74] Takada S, Hibara KL, Ishida T, Tasaka M. The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development*, 2001, 128(7): 1127–1135.
- [75] Cary AJ, Che P, Howell SH. Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2002, 32(6): 867–877.
- [76] Ikeda Y, Banno H, Niu QW, Howell SH, Chua NH. The enhancer of shoot regeneration 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED cotyledon 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(11): 1443–1456.
- [77] Prakash AP, Kumar PP. PkMADS1 is a novel MADS box gene regulating adventitious shoot induction and vegetative shoot development in *Paulownia kawakamii*. *Plant J*, 2002, 29(2): 141–151.
- [78] Ori N, Juarez MT, Jackson D. Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell*, 1999, 11(6): 1073–1080.
- [79] Hamant O, Nogu e F, Belles-Boix E. The KNAT2 homeodomain protein interacts with ethylene and cytokinin signaling. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 657–665.
- [80] Jung JH, Yun J, Seo YH, Park CM. Characterization of an *Arabidopsis* gene that mediates cytokinin signaling in shoot apical meristem development. *Mol Cells*, 2005, 19(3): 342–349.
- [81] Kusaba S, Kano-Murakami Y, Matsuoka M. Alteration of hormone levels in transgenic tobacco plants overexpressing the rice homeobox gene *OSH1*. *Plant Physiol*, 1998, 116(2): 471–476.
- [82] Gong HaiBiao, Pua EngChong. Identification and expression of genes associated with shoot regeneration from leaf disc explants of mustard (*Brassica juncea*) *in vitro*. *Plant Sci*, 2004, 167(6): 1191–1201.
- [83] Ono Y, Takahata Y. Genetic analysis of shoot regeneration from cotyledonary explants in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(6): 895–898.
- [84] Satoh H, Takashina T, Escalante A, Egashira H, Imanishi S. Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene Rg-2 in *Lycopersicon chilense*. *Breeding Science*, 2000, 50(4): 251–256.
- [85] Zhao QH, Fisher R, Auer C. Developmental phases and STM expression during *Arabidopsis* shoot organogenesis. *Plant Growth Regulation*, 2002, 37(3): 223–231.
- [86] Li W, Sun G, Liu J, Masilamany P, Taylor JH, Yan W, Kasha KJ, Pauls K P. Inheritance of plant regeneration from maize (*Zea mays* L.) shoot meristem cultures derived from germinated seeds and the identification of associated RAPD and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(4): 681–687.
- [87] Torelli A, Soragni E, Borinato M, Branca C. The expression of LESK1 morphogenetic marker along the tomato hypocotyl axis is linked to a position-dependent competence for shoot regeneration. *Plant Science*, 2004, 166(1): 179–190.
- [88] Aswath CR, Mo SugYoun, Kim SunHyung, Kim DooHwan. IbMADS4 regulates the vegetative shoot development in transgenic chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora* (Ramat.) Kitamura). *Plant Science*, 2004, 166(4): 847–854.
- [89] Wagner D, Wellmer F, Dilks K, William D, Smith MR, Kumar P P, Riechmann JL, Greenland AJ, Meyerowitz EM. Floral induction in tissue culture: a system for the analysis of LEAFY-dependent gene regulation. *Plant J*, 2004, 39(2): 273–282.
- [90] Koornneef M, Bade J, Hanhart C, Horsman K, Schel J, Soppe W, Verkerk R, Zabel P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *Plant J*, 1993, 3(1): 131–141.
- [91] Jone AM. Surprising signal in plant cells. *Science*, 1994, 263(14): 183.
- [92] SUN Da-Ye, GUO Yan-Lin, MA Li-Geng, CUI Su-Juan. Cell Signal Transduction (Third Edition). Beijing: Science Press, 2001.  
孙大业, 郭艳林, 马力耕, 崔素娟. 细胞信号转导(第三版). 北京: 科学出版社, 2001.