

植物体细胞胚发生的分子基础^①

邢更生 崔凯荣 山 仑 王亚馥^②

(兰州大学干旱农业生态国家重点实验室, 兰州 730000)

Molecular Foundation in Plant Somatic Embryogenesis

XING Geng-Sheng CUI Kai-Rong SHAN Lun WANG Ya-Fu

(The State Key Laboratory of Arid Agroecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

植物通过体细胞胚胎发生途径形成再生植株已是及其普遍的现象, 这一发育途径为研究植物细胞的分化、发育、全能性表达和作物品种改良、突变体筛选等提供了良好的实验体系, 在理论上和应用中都具重大意义。体细胞分化为胚性细胞是受细胞内外多种因子所调控^(1, 2), 其中最重要的是受特定基因的调控, 在胚性细胞的分化过程中伴随着特定的遗传信息表达, 其分化过程的实质是基因按顺序表达调控, 是相应基因产物作为胚性细胞形成的分子基础。本文结合我们的工作来探讨体细胞胚发生分子基础研究现状。

1 体细胞胚发生中特异蛋白质的表达

在适当条件下, 胚性细胞团中的某些细胞可发育成体细胞胚, 体细胞胚的发生、发育过程包含着细胞内特异基因的选择性表达⁽¹⁰⁾, 许多植物的体细胞胚发生能力受基因型的控制, 组织培养中某些控制再生的基因已被定位在某一特定的染色体区域。在苜蓿中, 体细胞胚发生具基因型特异性和高度可遗传性, 胚性发生受两个等位显性基因控制, Yu 和 Pauls 证明⁽³⁶⁾, 在苜蓿体细胞胚发生中, 有一个 RAPD 带与胚性决定基因共分离; 在诱导培养第 5 天的胚性细胞团中有 50KD 的胚胎发生特异性蛋白表达, 这种蛋白质是膜相关蛋白, 胚性细胞 mRNA 体外翻译产物中含有 50KD 带, 而非胚性细胞的体外翻译产物中则缺少这一条带, 由此认为膜上的 50KD 蛋白可作为苜蓿体细胞胚发生的分子标志⁽¹⁶⁾。在胡萝卜、水稻、玉米、豌豆等组织培养中, 胚性和非胚性愈伤组织中有不同的蛋白质合成模式, 所有这些材料的胚性愈伤组织中都存在 45~55KD 的胚胎相关性多肽的合成。我们在小麦体细胞胚发生早期也检测到 49KD 的胚胎相关性多肽⁽³⁾, 在枸杞体细胞胚发生早期检测到 35KD 的胚胎相关性多肽⁽⁴⁾。因此, 35~55KD 的胚胎相关性多肽是多种植物胚胎发生早期共有的胚性发生分子标志。

目前研究较多的是一种阿拉伯半乳聚糖蛋白(AGPs)在植物体细胞胚的发生、发育中起重要作用。AGPs 是一种细胞表面粘蛋白, 它与植物细胞的生长、发育密切相关, 在胡萝卜、水稻、梨、烟草等植物的体细胞胚发生培养物中都检测到特异 AGPs 的表达^(11, 12, 20, 22, 27)。梨中 AGP 的 cDNA 编码一个 294 个氨基酸的多肽, 这种多肽含有一段很短的富含 Hyp/Pro 的链, 这个短链两侧存在 Asn 残基, 而 Asn 残基在典型的 AGP 主链中不存在; 另外, Hyp、Pro 和 Asn 在多肽链中大量出现趋向于破坏 α -螺旋, 因此这个 294 个氨基酸的多肽有可能形成螺旋-转角-螺旋结构, 这种结构是蛋白质与 DNA 结合的基本单位⁽⁵⁾, 基因调控蛋白就是通过这种单位与 DNA 结合, 识别特定的 DNA 序列, 调控基因的表达, 因此推测梨中 AGP 的这一 294 个氨基酸的多肽有可能是作为基因调控蛋白在体细胞胚发生中起作用。在烟草中已得到 AGPs 的三种 cDNA(AGPNa1, AGPNa2 和 AGPNa3), AGPNa1 编码一个 132 个氨基酸的多肽, 这种多肽的分布范围和氨基酸组成与梨中的 294 个氨基酸的多肽相似; AGPNa2 的 cDNA 编码一个 437 个氨基酸的多肽, 这种多肽含有两个特殊区域, 其中富含 Pro 区

①国家自然科学基金资助的项目。

②通讯联系人。

域的组成和氨基酸序列与典型的 AGP 主链相似; AGPNa3 编码一个由三个区域组成的 169 个氨基酸的多肽; 进一步研究发现在烟草胚性培养物中有 AGPNa1 和 AGPNa2 的表达, 而 AGPNa3 只在成熟组织中表达。有学者鉴定并克隆了白云杉体细胞胚发生中三个热激蛋白 (*HSPs*) 基因的 cDNA, 这三个基因的 cDNA 具有同源性序列, 不仅对热胁迫表现较强的反应, 而且 ABA 和聚乙二醇等因子也能诱导该基因的表达, 在胚性愈伤组织中有两种 *HSPs* 基因的转录随着体细胞胚的发育而增加, 但到形成幼苗时几乎检测不到这两种基因表达^[13], 因此认为这两种 *HSPs* 基因的表达与体细胞胚的发生、发育有关; 他们还观察到白云杉体细胞胚发生中有丰富的 mRNA 表达, 从子叶胚中分离出 28 个 cDNAs, 这些 cDNAs 编码不同的产物^[14], 显然这些基因是在体细胞胚发育晚期表达的。白云杉的成熟体细胞胚中存在蛋白贮藏液泡 (PSVs), 在其中检测到有液泡形成体蛋白 (TIP) 存在, 而胚性愈伤组织和萌发 13 天的幼苗中不存在 TIP^[24], TIP 可能是一种运输蛋白体, 它与营养的积累和消耗有关, TIP 也是一种晚期表达的胚胎相关性蛋白。

另外, 在胡萝卜胚性细胞中分离出一个 883bp 的 cDNA, 它含有一个开放读框, 这个读框编码一个 181 个氨基酸的多肽, 该多肽与动物和酵母中的 ADP-核糖基化作用因子相似^[21]; 在苜蓿早期体细胞胚中用 RACE-PCR 法克隆了表达的周期蛋白基因, 周期蛋白 (Cyclins) 是真核细胞分裂周期中存在的一类复杂蛋白家族, 它依赖蛋白激酶而起作用, 植物中存在多种特异性的周期蛋白^[25], 显然这种蛋白在胚性细胞的分裂、胚体的发育中起作用。

2 ABA 对植物体细胞胚发生的调控作用

脱落酸 (ABA) 对植物体细胞胚的发生、发育具有重要作用, 对某些植物体细胞胚发生的特异基因表达起调控作用, 激活相关基因的表达, 大量合成贮藏蛋白、晚期胚胎丰富蛋白 (LEA) 和少量胚胎发生特异性蛋白^[32]。在鹰嘴豆的体细胞胚发生研究中发现, 用 ABA 处理可产生三种特异的 cDNA 克隆, mRNA 的体外翻译和 Northern blot 分析表明这三种克隆的表达与胚的成熟有关^[9]。在白云杉研究中发现, 用 ABA 处理愈伤组织 6h 后有新蛋白质的合成, 同时提高了体细胞胚发生的频率^[15]。在大麦中发现, 外源 ABA 对胚的萌发起决定作用^[33]。在棉花的体细胞胚发生中, ABA 诱导出胚胎特异性蛋白质 ECP31 和 LEA(D34) 蛋白质, 并具有表达的时空顺序性, ABA 可以使胡萝卜体细胞胚发生的 *DC59* mRNA 水平提高, 用抑制剂 fluridione 降低 ABA 的合成, 也影响了 *DC59* mRNA 的转录水平, 表明 ABA 至少部分地在转录水平上对该基因进行调控。

关于 ABA 调节作用的可能机理研究发现, 水稻中 ABA 诱导的基因家族的上游-294 至+27bp 之间序列是 ABA 调节该基因表达作用的区域, 在此区域内存在保守序列 (RTACGTGGR) 可能是 ABA 的结合位点。在大麦中由 ABA 诱导的基因表达必须有启动单位参与, ABA 诱导 *Lea* 基因表达的 ABA 应答复合物 (ABRC) 是由 10bp 的含 ACGT 核心的框和 11bp 的上游序列组成, 只需有一个拷贝的 ABRC 就足以发生 ABA 诱导作用^[28]; 以上实验结果表明保守序列 (RTACGTGGR) 在 ABA 诱导的基因表达中起了关键作用, 它可能是 ABA 诱导的调控启动位点, 它与 cAMP 感应因子结合序列 TGACGTCA 相似, 可同时结合几个反式作用因子, 而 ABA 等因子有可能直接作为反式因子调节基因表达, 但更可能是先与靶细胞效应部位结合, 然后通过细胞的第二信使分子传递信号, 激活反式作用因子与顺式作用元件结合, 从而在转录水平上调控基因表达。对大麦的研究结果表明, Ca^{2+} 在 ABA 诱导的基因表达中起作用, 外加 Ca^{2+} 的浓度可影响 ABA 诱导的特异 *RAB* 基因的表达, 在 ABA 含量固定的情况下, 增加外源 Ca 的量可检测到 *RAB* mRNA 表达的增加; 在大麦糊粉层原生质体中 *RAB* 基因的表达被 Ca 通道阻断剂所抑制, 抑制能力由所提供的阻断剂浓度决定, 而 Ca^{2+} 抑制剂和 Ca^{2+} 拮抗物均能强烈抑制 *RAB* 的表达^[34]。

3 氧化胁迫对细胞分化的影响

所有需氧生物都必须依赖氧才能获得能量和维持生命, 然而氧对所有生物又具有毒害作用。自从 MoCord 首先在牛血红细胞中发现 SOD 以来, 生物氧自由基代谢及其生理作用受到广泛关注, 已有研究证明氧自由基

(O_2^-) 在生理代谢过程中起重要的调控作用。有研究发现氧化胁迫与细胞分化有关, 因此在体细胞胚发生这一特定的细胞分化过程中必然有氧化胁迫的影响。正常情况下, 需氧生物体内活性氧的生成和清除处于动态平衡, 当活性氧超过正常水平时, 即对细胞构成氧化胁迫。生物体为了减轻和防止活性氧损伤, 已形成了复杂的氧化应激机制, 其中主要是通过提高几种保护酶的活性; 多种活性氧可通过酶类(保护酶有 SOD、POD、CAT 等)或非酶类[还原型谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)和胡萝卜素(CAR)]反应进行转换。有研究表明, 在细胞分化过程中 GSH 浓度降低了 90%, 而 H_2O_2 含量和脂质过氧化则增加很多, 这说明细胞分化过程中氧化胁迫水平升高, 细胞分化频率与 SOD 活性和 GSH 含量密切相关。BSO 是 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶抑制剂, LOC 是 GSH 合成激活剂, 用 BSO 处理培养物使其 GSH 含量降低, 其细胞分化频率增高, SOD 活性增加迅速。用 LOC 处理培养物其 GSH 含量升高, 细胞分化频率降低, SOD 活性变化不大。因此证明 SOD 活性的增加与细胞分化频率成正比, 而分化频率与 GSH 含量成反比; 已有研究表明 SOD 在细胞分化中的作用机理可能是消除 O_2^- 或是增加 H_2O_2 的产量, 研究发现强氧化剂处理可促使细胞分化, 抗氧化剂处理则不引起分化; SOD 活性增加, 通过产生 H_2O_2 而增加氧化胁迫, 因而促使细胞分化; 已有人提出 H_2O_2 可能是一种细胞信号传递物质^[7, 17], 因此, H_2O_2 可能是通过细胞的信号传递系统影响基因的表达, 从而诱导细胞分化; 另外 H_2O_2 参与了木质素的合成, 植物细胞壁木质化和结构蛋白的多聚化, 在阻止病原体侵染细胞中起重要作用。植物细胞壁的木质化就导致细胞壁加厚, 而在体细胞胚发生细胞分化途径中, 胚性细胞壁的加厚是体细胞胚形成和发育的重要环节, 也就是说 H_2O_2 可促进胚性发生, 还可改变和诱导多种多肽合成, 有些蛋白质特异性地受 H_2O_2 激活。还有研究发现, 增加氧化胁迫可引起细胞内游离 Ca 的释放, 在几种细胞中已证明, Ca 是细胞分化的诱导者。因此, 我们推断氧化胁迫可能是通过增加细胞质内 Ca 的浓度或是通过改变细胞内 Ca 的分布来影响细胞分化。氧化胁迫的增加是一种生理现象, 它的功能是动员细胞内的 Ca, 使细胞内的 Ca 作为一个信号传递分子, 通过细胞内的信号传递途径调控相关基因的表达, 促进细胞的分化。

4 体细胞胚发生中基因表达的调控

植物体细胞胚的发生是细胞内胚性发生相关基因差别表达的结果, 之所以有基因的差别表达是因为细胞内外存在许多调控因子的调控作用; 基因表达的调节有转录水平、转录后水平、转译水平和转译后修饰水平等多层次调控。对绝大多数基因来讲转录水平的调控是最主要的, 只有转录水平的调控可确保没有多余的中间体形成。

胡萝卜体细胞胚发生中 *DC8*、*DC59* 等几个相关基因上游顺序具有高度同源性, 含有类同的顺式作用元件, 富含 AT 区, 在体细胞胚发生中由相同的反式作用因子进行协同调控; Munksgaard 等测定了胡萝卜不同发育时期体细胞胚的 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)、S-腺苷半胱氨酸(SAH)和 DNA 甲基化的浓度, 发现在体细胞胚发生过程中它们的浓度均升高, 其中升高最多的是 SAM, 更重要的是甲基化指标(SAM/SAH)升高, 因此推断 SAM 和 SAH 可能是通过影响 DNA 的甲基化水平来调控体细胞胚发生, 而 DNA 的甲基化又可引起基因活性的改变, 从转录水平上调了基因的表达^[23]; 胡萝卜的培养细胞转入无生长素的培养基后可诱导 *DC2·15* 基因的表达, 继而发育成体细胞胚^[18], 通过 PCR 技术直接鉴定了 *DC2·15* 启动子的组成, 已证明有五种启动子序列在结构上高度一致, 但有大约 15bp 的区域稍有不同, 它包含来源于人类 *HOX* 基因的 GATA 结合位点, 体细胞胚发育到鱼雷胚期, 有 2 种启动子活性很高, 推测可能是细胞信号激活启动子, 使特异的胚性相关基因(*DC2·15*)表达, 促使体细胞胚发生、发育。苜蓿体细胞胚发生的研究中发现, 一种 50KD 蛋白质与胚胎发生能力有关^[16]。利用 IEF/SDS-PAGE 双向电泳对 50KD 蛋白质的进一步研究表明, 这种蛋白质是等电点不同而分子量相同的三种蛋白质, 在非胚性愈伤组织中缺乏这种蛋白质, 因此这种蛋白质是胚胎发生特异性蛋白质, mRNA 的体外翻译实验证明, 胚性样品的 RNA 翻译产物中有这种蛋白质, 而非胚性样品的翻译产物中无这种蛋白质, 因此, 推测这种胚性蛋白基因的表达具转录水平的调控, 而体外翻译产物的双向电泳结果表明, 50KD 蛋白质在 IEF 中只有一条蛋白带, 因为体外的蛋白质合成没有象蛋白质磷酸化^[25]那样的翻译后修饰过程, 就说明这种 50KD 的蛋白质表达后, 在体内有一个修饰过程。植物发育和新陈代谢调控中蛋白质的磷酸化有很重要

的影响; 这种翻译后的加工可通过构形的改变来激活或减弱蛋白质的功能; 苜蓿体细胞胚发生中之所以有三种不同等电点的 50KD 蛋白质存在可能是蛋白质在不同位点上被磷酸化的结果; 因此, 胚性组织中有特异 mRNA 的表达, 而且表达产物存在翻译后的修饰。

5 其它因素对体细胞胚发生的调控

在植物胚胎形成过程中, 调节诱导相互作用的传递信号分子是很重要的, 在胡萝卜 tsll 细胞系中, 发现 Nod 因子可以促进球形胚的形成⁽²⁹⁾, Nod 因子是存在于细菌中的一种分子, 在豆科植物中 Nod 因子可以触发根瘤的形成, 有诱导植物内源生长调节物质相互平衡的活性, 因此推测 Nod 因子可能是作为一种活性调控系统分子, 通过调节细胞内源激素的浓度来影响、调节体细胞胚的发生, 在烟草体细胞胚发生的研究中, 用茉莉酮酸甲基酯处理外植体, 胚胎发生中有新 mRNA 和蛋白质出现, 其中 *Lea* 基因的转录有时空顺序性⁽²⁶⁾; 茉莉酮酸甲基酯可选择性地诱导几种胚性 mRNA 和蛋白质的表达, 这种表达与球形胚的形成和发育密切相关, 因此茉莉酮酸甲基酯在烟草体细胞胚发生过程中可调控特异基因的表达, 促进体细胞胚发生。Torre 等⁽³⁰⁾的研究发现光周期和光敏素对体细胞胚发生过程有影响, 经长时间的远红光, 红光和远红光处理材料可促进体细胞胚的形成, 而短时间处理则使体细胞胚发生频率降低; 24h 间隔的远红光长时间处理可抑制体细胞胚发生, 24h 间隔的红光短时间处理则可促进体细胞胚发生; 推测光周期可调控体细胞胚发生, 而在光周期的调控过程中光敏素起关键作用; Weatherwax 等的研究发现, 光敏素可调控细胞内源 ABA 的水平, 因此光周期可能是通过光敏素来调控细胞内源 ABA 的水平, 最终是以 ABA 浓度的变化来调控体细胞胚的发生⁽³⁵⁾。

还有些理化因子, 如渗透胁迫、干化作用、外源脯氨酸、谷氨酰胺、PEG 和甘露醇等因子对体细胞胚发生中的基因表达、内源激素的积累有明显作用^(8, 19, 31); 另外有关 2, 4-D、NAA 等外源激素对植物体细胞胚发生的影响已有很多报导^(4, 6), 这里就不再一一讨论, 总之植物体细胞胚的发生、发育过程是受细胞内外多种因子所调控, 各种因子的影响最终都是从转录、转译、转译后加工等水平上调节胚胎发生, 因此对调控因子和调控分子机理等有待深入的研究, 最终揭示体细胞胚发生这一特定细胞分化过程的本质。

参 考 文 献

- 1 王亚馥等. 小麦组织培养中体细胞胚胎发生的细胞胚胎学及淀粉消长动态的研究. 实验生物学报, 1993, 26 (3): 259~267
- 2 崔凯荣等. 植物体细胞胚发生研究的一些现状. 植物学通报, 1993, 10 (3): 14~20
- 3 王亚馥等. 小麦体细胞胚发生的蛋白质组分和过氧化物酶同工酶的变化. 兰州大学学报, 1993, 29 (3): 189~193
- 4 陈 雄等. 激素对枸杞体细胞胚发生及蛋白质含量和组分的影响. 西北植物学报, 1995, 15 (5): 26~30
- 5 Albert B *et al.* Molecular Biology of Cell, Garland Publishing, Inc. N. Y. London, 1994
- 6 Asano Y *et al.* Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and alpha-ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *zoysia japonica* steud. J. Plant Physiol., 1996, 149: 413~417
- 7 Burdon R H *et al.* Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Rad Biol. Med., 1995, 18: 775~794
- 8 Bronsema F B F *et al.* Uptake and biochemical analysis of 2, 4-D in cultured zygotic embryos of *Zea mays* L. J. Plant Physiol., 1996, 149: 363~371
- 9 Colorado P *et al.* Expression of three ABA-regulated clones and their relationship to maturation processes during the embryogenesis of chick-pea seeds. Physiologia Plantarum, 1995, 94: 1~6
- 10 Dudits D *et al.* Molecular biology of somatic embryogenesis, *In Vitro* Embryogenesis in Plant (T A Thorpe, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 1995, pp. 267
- 11 Du H *et al.* Isolation of the protein backbone of an arabinogalactan-protein from the styles of *nicotiana glauca* and characterization of a corresponding cDNA. Plant Cell, 1994, 6: 1643~1653
- 12 Du H *et al.* Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *nicotiana glauca*. Plant Journal, 1996, 313~323
- 13 Dong J Z *et al.* Characterization of three heat-shock-protein genes and their developmental regu-

- lation during somatic embryogenesis in white spruce [*Picea glauca*(moench) voss], *Planta*, 1996, 200: 85~91
- 14 Dong J Z *et al.* Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca*(moench) voss]. *Planta*, 1996, 199: 459~466
- 15 Dong J Z *et al.* Induced gene expression following ABA uptake in embryogenic suspension cultures of *Picea glauca*. *Plant Physiol. Plant Physiol. Biochem.*, 1996, 34: 579~587
- 16 Giroux R W *et al.* Characterization of embryogenesis-related proteins in alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiologia Plantarum*, 1996, 96: 585~592
- 17 Hilde W *et al.* Differential expression of catalase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 10450~10454
- 18 Holk A *et al.* Regulation of an embryogenic carrot gene(DC2.15) and identification of its active promoter sites, *Plant Mol. Biol.*, 1996, 31: 1153~1161
- 19 Helleboid S *et al.* Inhibition of direct somatic embryogenesis by alpha-difluoromethylarginine in a cichorium hybrid; effects on polyamine content and protein patterns. *Planta*, 1995, 196: 571~576
- 20 Kreuger M *et al.* Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota*L. *Planta*, 1995, 197: 135~141
- 21 Kiyosue T *et al.* Cloning of a carrot cDNA for a member of the family of ADP-ribosylation factors(ARFs) and characterization of the binding of nucleotides by its product after expression in *E. coli*. *Plant Cell Physiol.*, 1995, 36: 849~856
- 22 Mau S L *et al.* Cloning of a carrot cDNA for a member of the family of ADP-ribosylation factors(ARFs) and characterization of the binding of nucleotides by its product after expression in *E. coli*. *Plant Journal*, 1995, 8: 269~281
- 23 Munksgaard D *et al.* Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. *Physiologia Plantarum*, 1995, 93: 5~10
- 24 Oliivusson P *et al.* A tonoplast intrinsic protein(TIP) is present in seed, roots and somatic embryos of Norway spruce(*Picea abies*). *Physiologia Plantarum*, 1995, 95: 288~295
- 25 Russinova E *et al.* Cloning novel alfalfa cyclin sequences—a RACE-PCR approach. *Cellular and Molecular Biology*, 1995, 41: 703~714
- 26 Reibotho C *et al.* Induction by methyl jasmonate of embryogenesis-related proteins and mRNAs in *Nicotiana*. *Plant Science*, 1994, 104: 59~70
- 27 Smallwood E A *et al.* Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta*, 1996, 193: 452~459
- 28 Shen Q X *et al.* Modular nature of abscisic acid(ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, 1996, 8: 1107~1119
- 29 Raven Press. New York Schmit E D L *et al.* Signal molecular involved in plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26: 1305~1313
- 30 Torne J M *et al.* Photocontrol of somatic embryogenesis and polyamine content in *Araujia* petals. *Physiologia Plantarum*, 1996, 98: 413~418
- 31 Tetteroo F A A *et al.* Induction of complete desiccation tolerance in carrot(*Daucus carota*) embryoids. *J. Plant Physiol.*, 1995, 145: 349~356
- 32 Tetteroo F A A *et al.* Effect of ABA and slow drying on DNA replication in carrot(*Daucus carota*) embryoids. *Physiologia Plantarum*, 1995, 95: 154~158
- 33 Visser K *et al.* Rapid germination of a barley mutant is correlated with a rapid turnover of abscisic acid outside the embryo. *Plant Physiol.*, 1996, 111: 1127~1133
- 34 Vandermeulen R M *et al.* Effects of modulation of calcium levels and calcium fluxes on ABA-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Science*, 1996, 117: 75~82
- 35 Weatherwax S * Interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiol.*, 1996, 111: 363~370
- 36 Yu K F *et al.* Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa. 1993. *Plant Mol. Biol.*, 22: 267~277