

狗蔷薇类原球茎发育过程的显微观察

姜福星, 田传卫, 张建甫, 马男, 张常青, 赵梁军*

中国农业大学农学与生物技术学院观赏园艺与园林系, 北京 100198

摘要: 对狗蔷薇类原球茎发育进行显微观察的结果表明: 类原球茎发育过程中外部形态发生了明显的变化; 毛状不定根及其产生的类原球茎均具备根的结构特点; 类原球茎由毛状不定根中维管柱顶端外围的中柱鞘薄壁细胞发育而来, 是包括胚性细胞和薄壁细胞在内的囊腔状结构的复合组织, 胚性细胞在类原球茎中的发育经历了原胚、球形胚、心形胚和鱼雷胚阶段, 并且与周围的细胞存在明显的生理隔离; 类原球茎具有明显的极性, 并且可以重复发生形成次类原球茎。

关键词: 狗蔷薇; 毛状不定根; 类原球茎; 发育过程; 显微观察

Microscopic Observations on Development of Protocorm-Like Body of *Rosa canina* L.

JIANG Fu-Xing, TIAN Chuan-Wei, ZHANG Jian-Fu, MA Nan, ZHANG Chang-Qing, ZHAO Liang-Jun*

Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100198, China

Abstract: In this work, we make a microscopic observation on the development of protocorm-like body (PLB) of dog rose (*Rosa canina*). Our results indicate that there are obvious external morphological changes during the developing process of PLB, hair adventitious root and PLB which is derived from it have anatomic structure characteristics of the root. PLB originated from the outside pericycle parenchymatous cells of the vascular cylinder tip in hair adventitious root, while it was a complex tissue of pouch cavity shape structure that contained embryonic cell and parenchymatous cell. We found that the development of embryonic cell in PLB underwent classic phases of embryo development including proembryo, globular embryo, heart-shaped embryo and torpedo embryo, and embryonic cell forms obvious physiological isolation from surrounding cells. Furthermore, the PLB has obvious polarity and can form secondary PLB repeatedly.

Key words: dog rose; hair adventitious root; protocorm-like body; development; microscopic observations

狗蔷薇原产欧洲, 属于落叶灌木, 具有一定的观赏价值和药用价值; 因其具有长势强健、少刺、抗性、易于生根、耐寒性强等优点, 是培育树状月季的优良砧木(梁艳华和彭春生 2002)。但是存在着利用常规繁殖方法繁殖困难、再生效率低等问题, 而且不同程度地遭受白粉病、黑斑病、蚜虫等病虫害侵扰, 亟需采用基因工程技术对其进行遗传改良(杨倩和彭春生 2003; 余晓丽等 2005, 2006)。

植物体细胞胚多为单细胞起源, 具两极性、高度敏感性、高效再生性等特点, 是最理想的遗传转化受体; 并可作为良种快繁、种质资源保存、原生质体培养、细胞工程育种、人工种子以及植物发育生物学研究的良好材料(王关林和方宏筠 2004)。但是蔷薇属植物体细胞胚胎发生和遗传转

化存在着受基因型限制、发生率和再生率低、遗传转化体系不成熟等诸多问题(高莉萍和包满珠 2005; 李进等 2007)。关于狗蔷薇高效再生体系的研究, 仅见余晓丽等(2005, 2006)利用不同植物生长调节剂组合对茎尖再生体系进行优化以提高离体植株再生频率的报道, 而关于狗蔷薇的体细胞胚胎发生和其他再生途径鲜见报道。

“类原球茎”(protocorm-like body, PLB)一词最初是用来描述兰科植物组织培养过程中发生的类似于种子萌发所产生的原球茎的特殊组织结构。

收稿 2010-04-16 修定 2010-05-28

资助 国家自然科学基金(30871733)和国家“十一五”支撑计划项目(2006BAD07B01)。

* 通讯作者(E-mail: zhaolj5073@sina.com; Tel: 010-62733315)。

原球茎是在兰花种子萌发过程中自然发生的, 种子中的幼胚吸水膨胀后开始发育, 胚的细胞质变浓, 细胞核变大, 中间部分的胚细胞分裂增殖, 突破合点端种皮形成球形或椭球形的结构(徐程等 2002)。由于在兰科植物的组织培养中, 根尖、叶片等适宜的外植体通过诱导也能产生一些类似于原球茎的结构, 通常把这种结构称为类原球茎或拟原球茎; 并且已被证明其起源和本质是胚性细胞或者是胚胎发生与器官发育的整合体, 现已作为许多种兰科植物的植株再生、细胞工程育种以及遗传转化的主要材料或受体(叶秀麟 1995; 谷祝平等 1990; 徐程等 2002; 詹忠根等 2002; 崔广荣等 2007; 潘超美等 2008; 张启香等 2009; Chai 等 2002)。

我们以前的工作发现狗蔷薇等蔷薇属植物在组织培养条件下能够产生类似于兰花的类原球茎的结构, 通过对各种培养条件进一步优化, 建立了高频、稳定的蔷薇类原球茎的发生体系及利用类原球茎进行快速繁殖的高效再生系统, 其过程为: 叶片外植体—毛状不定根—类原球茎—再生植株(Tian 等 2008); 并证明了香水月季等其他蔷薇属植物上也能产生类原球茎, 而狗蔷薇最容易稳定地产生类原球茎(郭艳超 2008; 郭艳超等 2008)。关于蔷薇类原球茎的组织细胞学研究较少, 目前仅对狗蔷薇的毛状不定根及其顶端变绿膨大形成绿点的时期(即类原球茎的起始阶段)进行了初步观察, 发现由毛状不定根的顶端形成的绿色组织内含有球形胚, 而关于其内部结构、性质、起源、后续发育过程以及次类原球茎如何产生等问题尚不明确。

本文以最容易稳定产生类原球茎的狗蔷薇为材料, 旨在通过对狗蔷薇类原球茎发育过程进行细致的显微观察, 揭示和探讨狗蔷薇类原球茎的内部结构、性质、起源、发育过程以及次类原球茎的形成机制等问题, 为通过类原球茎途径建立蔷薇属植物的高效再生体系提供科学依据和参考。

材料与amp;方法

1 材料及组织培养

1.1 材料 选取狗蔷薇(*Rosa canina* L.)组培苗茎段的中上部叶片为实验材料。

1.2 毛状不定根的诱导 在超净工作台上将叶片用锋利的解剖刀切成 1 cm×1 cm 的小块, 接种于添加

1.5 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 MS 培养基上暗培养, 20~30 d 后, 从叶片的切口周围长出很多毛状不定根。

1.3 类原球茎的诱导 将长出毛状不定根的叶片转入添加 20 mg·L⁻¹ 噻苯隆(thidiazuron, TDZ)的 1/2MS (无机盐减半)培养基上光照培养, 20~30 d 后, 毛状不定根根尖顶端开始变绿, 开始分化形成类原球茎, 再培养 60 d 左右后类原球茎发育成熟。

2 方法

2.1 类原球茎启动及发育过程中外观形态的变化

从毛状不定根根尖变绿到类原球茎发育成熟期间, 选取其发育比较典型的阶段进行观察分析, 如毛状不定根根尖变绿前后、类原球茎外观明显的变化、类原球茎表面形成不规则突起、次类原球茎的形成时期等。不同时期的类原球茎材料采用数码相机进行照相。

2.2 类原球茎显微观察 固定液为 70% 乙醇配制的卡诺氏固定液[无水乙醇:冰醋酸=3:1 (V/V)], 室温下固定 24~48 h, 先用 70% 乙醇冲洗 2 次, 再以 (70%、80%、90%、100%) 酒精梯度脱水, 石蜡包埋, 切片厚约 12 μm, 采用番红-固绿染色和铁矾苏木精-固绿双重染色法, 中性树胶封片, 用日本 Olympus 光学显微镜观察照相。

实验结果

1 类原球茎发育过程中外部形态的变化

毛状不定根接种到含 20 mg·L⁻¹ TDZ 的 1/2MS 培养基上, 光照培养 20~30 d 后, 根尖端逐渐发绿膨大形成绿点, 形如小米粒(1~2 mm×1~2 mm) (图 1-A~C), 又过 20 d 后发育成为高粱粒大小(4 mm×4 mm) (图 1-D 和 E), 40 d 后为绿豆粒大小(6 mm×6 mm) (图 1-F), 60 d 后发育到黄豆粒大小(8 mm×8 mm) 的小绿球(图 1-G 和 H), 这时类原球茎发育达到成熟。选取不同时期的类原球茎(特别是形如小米粒的绿点时期), 用解剖刀轻轻地剥去外面绿色的分生组织, 放在显微镜下观察, 可以看到类原球茎内部有多个乳白色或浅黄色的胚胎, 说明其是由绿色分生组织包裹的体胚所组成的复合组织(图 1-I)。

2 毛状不定根和类原球茎的解剖结构

毛状不定根和类原球茎的内部结构都是由三部分组成, 由外到内依次为: 表皮、皮层和维管柱。表皮由单层细胞构成, 处于最外围; 皮层由

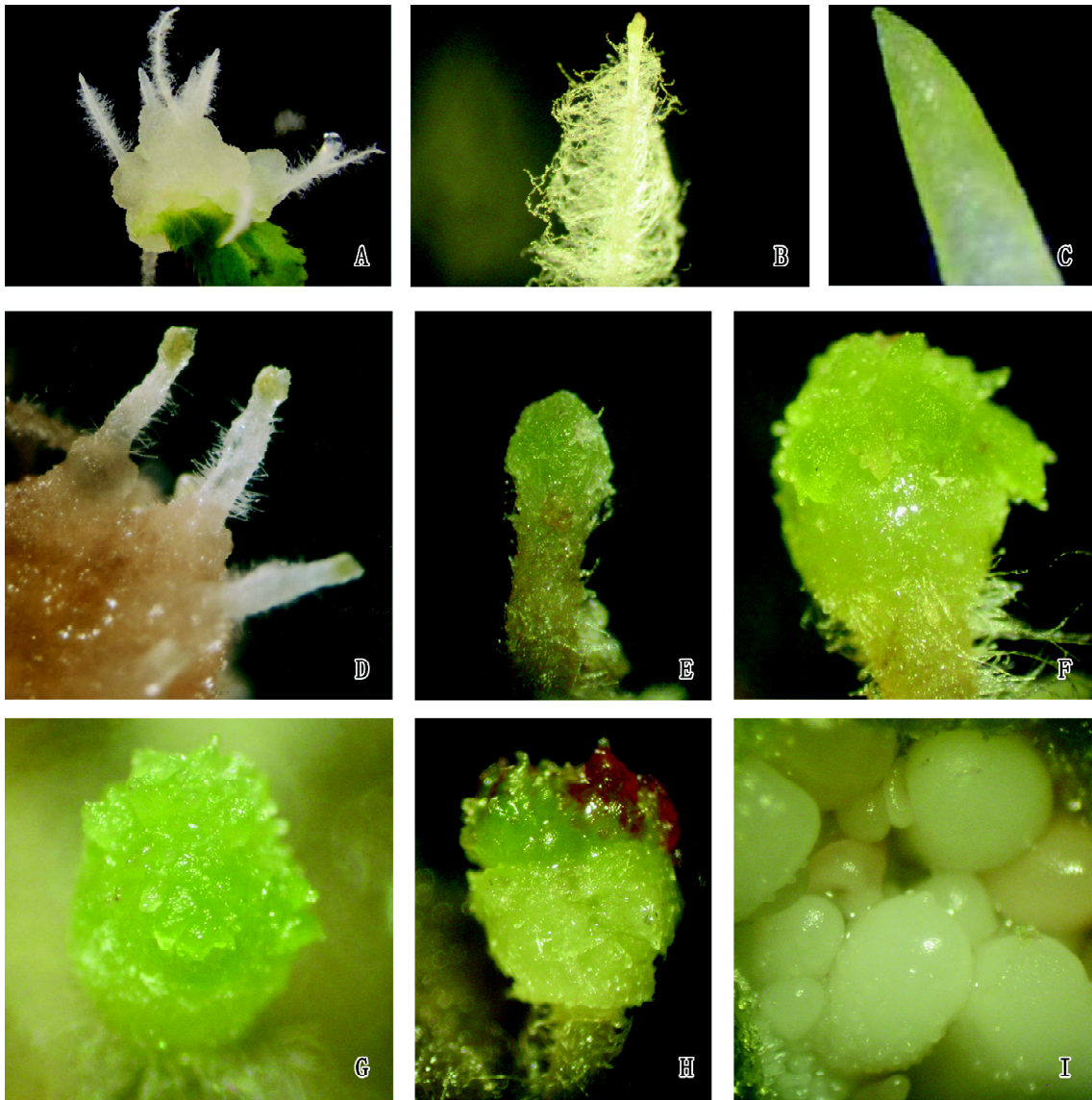


图1 类原球茎发育过程中外部形态的变化

Fig.1 Morphological changes during the development of PLB

A: 毛状不定根; B: 毛状不定根顶端开始变绿并膨大成小绿点, 形如小米粒(1~2 mm×1~2 mm); C: 毛状不定根顶端变绿放大观察; D: 类原球茎从小米粒大小逐渐膨大, 长成为高粱粒大小(4 mm×4 mm); E: 类原球茎从高粱粒大小到绿豆粒大小的过渡时期; F: 类原球茎长成为绿豆粒大小(6 mm×6 mm); G: 类原球茎从绿豆粒大小发育到黄豆粒大小的过渡时期, 表面具有多个不规则的突起; H: 类原球茎基本发育成熟, 成为黄豆粒大小(8 mm×8 mm), 表面形成多个小的次生类原球茎; I: 类原球茎由绿色的分生组织包裹的体胚组成。

6~8层细胞组成, 细胞排列疏松, 细胞间隙明显(图2)。绿色的类原球茎的维管柱(图2-C)与毛状不定根的维管柱(图2-A)几乎完全一致, 均位于中央的圆柱状结构, 也是由中柱鞘、木质部和韧皮部组成, 维管柱的外围明显可以看到一层体积比较大、染色较淡的薄壁细胞, 内部可看到相间排列的韧皮部和木质部及外始式发育的导管和筛管。

3 类原球茎起源于毛状不定根的中柱鞘薄壁细胞

毛状不定根中维管柱顶端外围的中柱鞘薄壁细胞形成类原球茎的过程如图3所示: 毛状不定根中的维管柱顶端在未转接到含有TDZ的1/2MS培养基和光照培养以前没有膨大(图3-A), 转接到含有含有TDZ的1/2MS培养基并在光照培养下20~30 d以后, 维管柱顶端逐渐发育膨大, 而根中其他部位

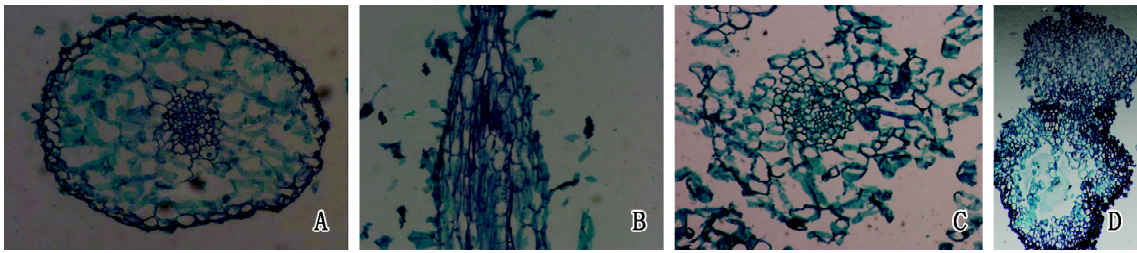


图2 毛状不定根与类原球茎的解剖结构

Fig.2 Anatomical structure of hair adventitious root and PLB

A: 毛状不定根(横切面); B: 毛状不定根(纵切面); C: 类原球茎中的维管柱及其周围的细胞(横切面); D: 类原球茎及其次生类原球茎的表皮和皮层中的薄壁细胞(纵切面)。

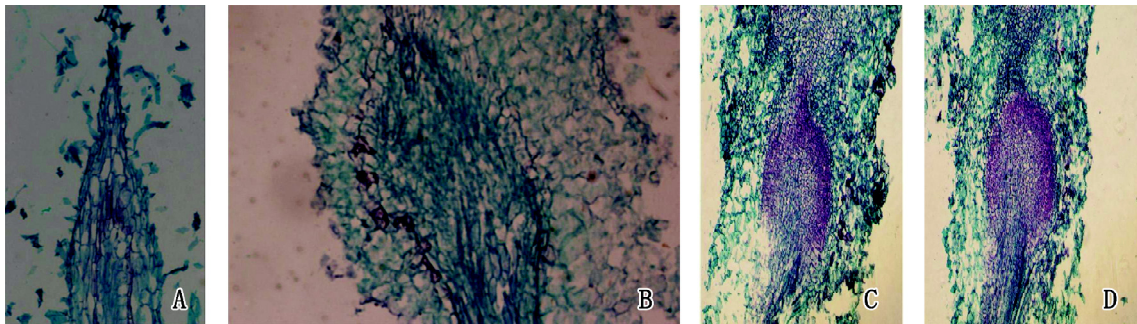


图3 毛状不定根维管柱顶端的外围中柱鞘薄壁细胞形成类原球茎

Fig.3 Parenchymatous cells of pericycle from vascular cylinder tip in hair adventitious root form PLB

A: 毛状不定根中表皮、皮层和维管柱; B: 毛状不定根根尖表层下的维管柱顶端开始膨大; C: 不定根根尖表层下的维管柱顶端外围中柱鞘薄壁细胞开始增殖分化, 形成球形原胚细胞; D: 毛状不定根根尖表层下的维管柱顶端外围球形原胚细胞分裂越来越多, 形成球形的胚性细胞团, 类原球茎开始启动发生。

未见明显变化(图3-B), 与之相对应的外部形态的变化是毛状不定根的根尖明显变绿且膨大(图1-A~C)。根尖明显变绿且膨大是因为维管柱顶端外围的中柱鞘薄壁细胞向原胚细胞转变: 原胚的细胞具有体积小、细胞质浓、核大、染色深等特点, 因为不断地进行DNA和染色体的复制, 非常活跃, 处于剧烈地分化、分裂和增殖状态, 被铁矾苏木精染成紫红色; 而维管柱中的其他细胞处于相对静止的状态, 被固绿染成绿色, 两者形成鲜明的对比(图3-C和D)。

4 体胚在类原球茎中的发育过程与生理隔离

类原球茎主要是由胚性细胞和薄壁细胞所组成的囊腔状结构的复合组织, 胚性细胞在这个囊腔状的结构里继续发育, 经历了原胚、球形胚、心形胚和鱼雷胚阶段(图4), 分别与外部形态的变化(小米粒、高粱粒、绿豆粒和黄豆粒时期)相对应(图1-C~H)。

在类原球茎这个囊腔状结构中, 胚性细胞与薄壁细胞之间形成隔离区。胚性细胞体积小、排列紧密, 其细胞壁逐渐木质化并加厚, 被番红染成鲜红色; 而其周围的薄壁细胞体积大、排列比较松散, 其细胞壁只含有纤维素, 被固绿染成绿色。胚性细胞由于具有较厚的木质化的细胞壁, 与周围细胞形成明显的隔离区, 处于相对独立状态, 即生理隔离(图4-A~F)。胚性细胞与其周围的薄壁细胞出现明显的隔离区, 形成囊腔状的结构, 使体胚处于相对独立的状态, 有利于体胚摆脱周围组织的束缚; 这同时也证明了显微镜观察的结果, 说明狗蔷薇的类原球茎是由包括胚性细胞和薄壁细胞在内的具有囊腔状结构的复合组织(图1-I和图4)。

5 类原球茎中出现胚柄状的结构

在类原球茎发生的中期和后期, 类原球茎顶端的表层下出现了胚柄状结构: 其前端伸向类原球茎顶基下的表层, 像一个吸盘从周围吸收营养物质, 细

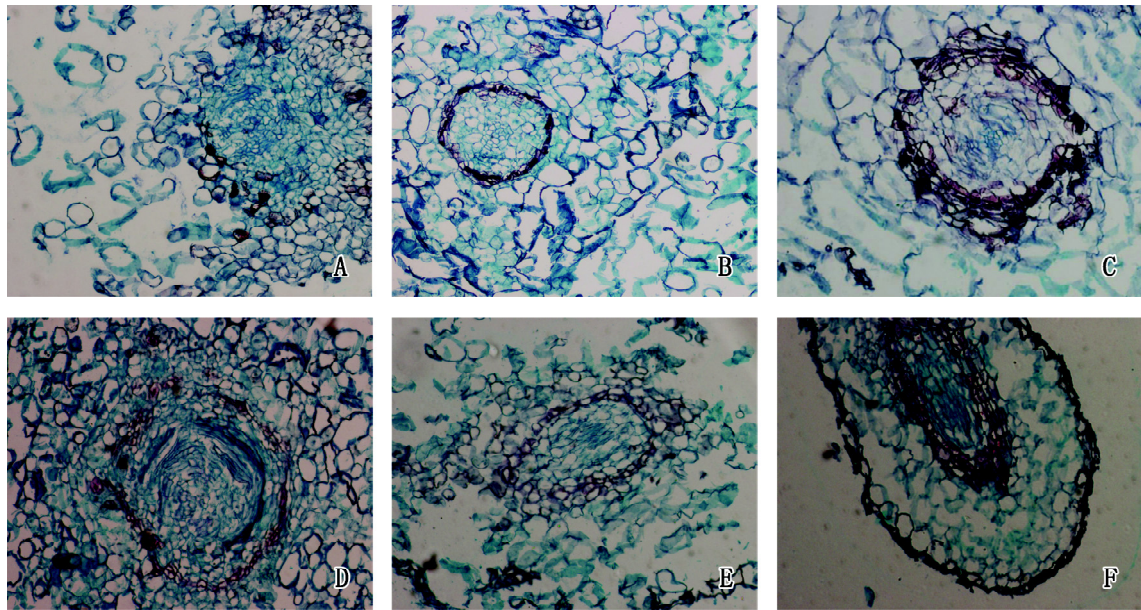


图4 体胚在类原球茎中的发育过程与生理隔离

Fig.4 Development and physiological isolation of somatic embryo in the PLB

A: 类原球茎顶端的原胚细胞; B: 球形胚时期; C: 球形胚向心形胚过渡时期; D: 心形胚时期; E: 心形胚向鱼雷胚过渡的时期; F: 鱼雷胚时期。

胞壁没有木质化, 仍然是只含有纤维素的状态, 细胞体积小并排列紧密, 被固绿染成深绿色, 与周围体积较大并排列疏松的薄壁细胞形成明显的区别, 但是与周围的薄壁细胞存在着较密切的联系; 后端伸向类原球茎的内部, 与胚性细胞相联系(被番红染成深红色) (图5)。

6 类原球茎具有明显的极性

从整体来看, 类原球茎表现出明显的极性, 类原球茎周围特别是顶端的组织细胞体积小、排列密集、细胞质浓厚、染色较深、分裂增殖较快,

具分生组织细胞特点; 而其中部组织细胞体积较大、排列疏松、染色较浅, 具备薄壁组织细胞的明显特征(图6); 处于类原球茎顶端表层下的某些薄壁细胞非常活跃, 可以在类原球茎的表面形成多个凸起的分生区域, 并且进一步发育成为胚性细胞(图6-B和C); 胚性细胞明显地分布于类原球茎的顶端且在细胞排列紧密的分生区域中(图6-D)。

7 类原球茎可重复发生形成次类原球茎

类原球茎顶端表层下的某些薄壁细胞的细胞核大, 细胞质浓密, 非常活跃, 可形成胚性细胞, 向

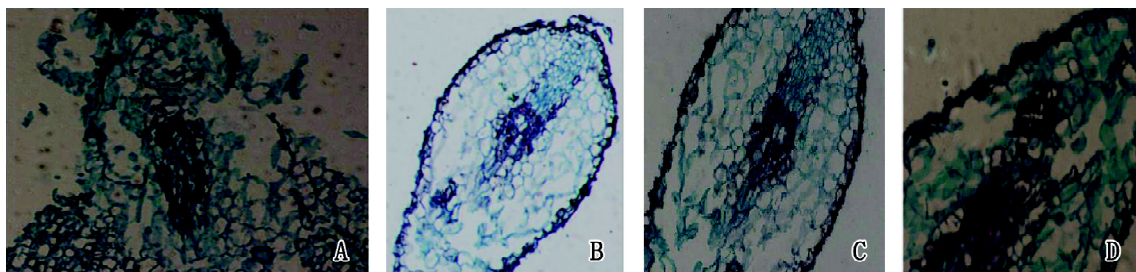


图5 类原球茎中的胚柄状结构

Fig.5 Suspensor-like structure in the PLB

A: 类原球茎顶端表层下的胚柄状结构起始阶段; B: 胚柄状结构正在发育; C: 胚柄状结构发育成熟; D: 与体胚相连的胚柄状结构逐渐退化消失。

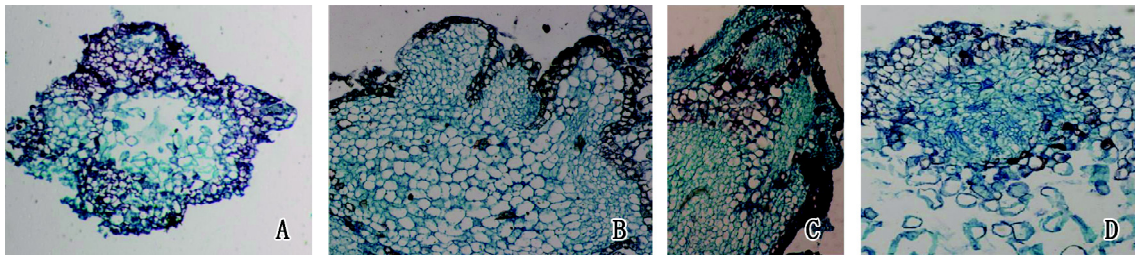


图6 类原球茎表现出明显的极性

Fig.6 PLB showed obvious polarity

A: 类原球茎周围特别是顶端的分生组织细胞排列比较致密; B: 类原球茎的顶端形成多个活跃的分生区域; C: 类原球茎顶端表层下的薄壁细胞可形成胚性细胞; D: 体胚位于类原球茎的顶端表层下。

外增殖凸出在类原球茎的表面形成不规则突起, 不断发育形成次生类原球茎, 并从母类原球茎分离开来, 形成相对独立的个体(图7)。

讨 论

要确定由狗蔷薇叶片边缘产生的白色毛状不定根及其顶端产生的绿色的类原球茎的性质, 最根本的依据是要看其内部结构。植物的根与茎皆为辐射对称的长轴状器官, 初生结构皆由表皮、皮层和维管柱三部分组成; 但两者在表皮、皮层和维管柱等结构上存在明显的不同, 特别是维管柱上存在显著的差异(郑湘如和王丽 2007)。通过对狗蔷薇毛状不定根和类原球茎的外部特征及其解剖结构进行比较分析, 特别是对类原球茎内部的维管柱结构进行观察的结果, 可以认为不但狗蔷薇的毛状不定根具有根的结构特征, 而且其产生的类原球茎也具有根的某些结构特点。

一般的植物几乎没有绿色的根, 但某些兰科植

物的根是绿色的, 因其含有叶绿体, 并能进行光合作用。如异型兰的茎不明显, 通常无叶片, 主要靠根中的叶绿体进行光合作用而生存(李桂双等 2006)。而且现已证明, 兰花的类原球茎也是一种含有叶绿体的特殊的根, 对墨兰组织培养中较成熟的绿色“原球茎”进行形态解剖研究表明, 不论是球状突起还是根状茎, 其内部结构均有根的特征(张鹏等 1999; 祝建等 2000; 徐程等 2002)。本研究表明狗蔷薇的类原球茎与兰花的类原球茎在结构上很相似, 均为圆球形含有叶绿体的特殊的根。

兰花类原球茎可起源于根尖和其他组织的薄壁细胞。詹忠根等(2005, 2006)证实铁皮石斛离体根尖由直接和间接两种途径形成类原球茎, 直接发生途径即根尖生长点的细胞直接转变成胚性细胞进而直接形成类原球茎; 间接发生途径即根尖生长点的细胞先形成愈伤组织后, 再转变为胚性细胞形成类原球茎。除了根尖以外, 兰花的类原球茎还可通过茎尖、茎节等外植体表层下的薄壁细胞通过胚性

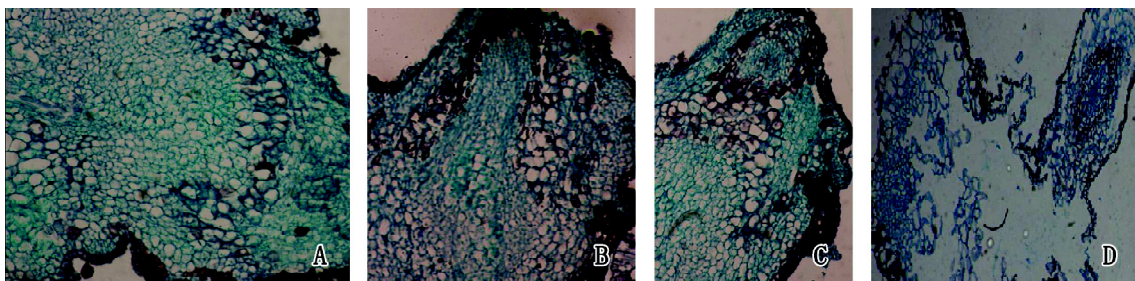


图7 次生类原球茎的形成

Fig.7 Formation of secondary PLB

A: 类原球茎顶端表皮下的薄壁细胞非常活跃, 在类原球茎的表面形成多个分生区; B: 在类原球茎顶端的表皮下, 薄壁细胞开始形成胚性细胞; C: 类原球茎的表皮下的胚性细胞向外凸起, 开始突破类原球茎的表皮; D: 已经形成的次类原球茎及其体胚。

细胞而产生(叶秀麟 1995; 吕晓辉等 2007; 潘超美等 2008; 张启香等 2009)。本研究表明狗蔷薇的类原球茎由毛状不定根中柱鞘顶端的薄壁细胞发育而来的胚性细胞产生, 类似于兰花的直接发生途径。

狗蔷薇的毛状不定根根尖形成类原球茎与根芽和根上形成胚胎等现象很相似, 根芽现象不论在自然条件下还是组织培养条件下都可以普遍发生, 根上形成胚胎则只能在组织培养条件下诱导产生(van der Salm 等 1996; Fambrini 等 2003; 郑湘如和王丽 2007; 李燕等 2008)。在根的各种组织中, 根尖下维管柱外围中柱鞘薄壁细胞是最容易形成不定芽或者胚胎的部位: 陈惠(2001)认为柘楼不定芽主要起源于根尖下维管柱外围中柱鞘薄壁细胞; 周燕等(2004)对胡萝卜体胚发生的组织细胞学研究表明, 经过培养后的下胚轴中维管柱周围的薄壁细胞是胚性愈伤组织的主要来源; Yang等(2010)证明绿花椰菜根中的中柱鞘细胞可以直接产生胚胎。在本文中, 我们观察到狗蔷薇的毛状不定根维管柱顶端外围中柱鞘的薄壁细胞可发育成为类原球茎, 进一步证明了前人的研究结果, 即中柱鞘薄壁细胞非常活跃, 具有很强的可塑性和发育潜力, 在特定的生长阶段和适当的条件下能发育成为多种组织和器官(De Smet 等 2006; 郑湘如和王丽 2007; Atta 等 2009)。

不但由狗蔷薇的毛状不定根中柱鞘薄壁细胞发育而来的类原球茎具有根的内部结构特点, 从拟南芥不定根中柱鞘上形成的绿色瘤状突起也具有许多根的结构特点(Atta 等 2009)。为何由根的中柱鞘薄壁细胞发育而来的瘤状突起和类原球茎具有根结构特点呢? 可能是因为它是由根的维管柱外围的中柱鞘薄壁细胞发育而来的, 缺乏一个能够促使根的初生结构转变为茎的初生结构的“根-茎过渡区”(郑湘如和王丽 2007), 所以它们继续保留了根的结构特点, 具体原因有待于深入研究。

在植物的体细胞胚胎发生中, 生理隔离状态是普遍现象, 崔凯荣和戴若兰(2000)认为这可能是因为胚性细胞只有与周围细胞分开, 保持相对独立和生理隔离的状态, 促进胚胎发生的相关基因才可以表达, 实现并完成胚胎发育的过程。赵鹏(2007)研究认为, 铁皮石斛的类原球茎是球胚及其周围的薄壁细胞形成的囊腔状结构, 两者之间形成明显的隔

离区, 体胚在囊腔内处于相对独立的生理隔离状态, 但是体胚在囊腔中并不是完全独立的, 体胚基部出现了胚柄状的结构, 它的作用可能是保持体胚与周围薄壁组织的联系, 并从周围组织中汲取营养物质供给体胚的发育需要。本文对狗蔷薇类原球茎的研究结果与之很相似。

能够重复产生次生类原球茎是狗蔷薇类原球茎所具有的明显特点, 这是因为类原球茎具有极性, 顶端表皮下分布的活跃的薄壁细胞不断形成胚性细胞团进而发育而来; 这与兰花次生类原球茎的产生也很相似(徐程等 2002; 张启香和方发明 2005; 赵鹏 2007)。

本文对狗蔷薇类原球茎的发育过程进行了比较系统的显微观察, 认为狗蔷薇类原球茎在外形、结构、性质、起源、发育过程等方面与兰花的类原球茎相似, 均是含有叶绿体, 起源于薄壁细胞, 具有根的解剖结构特征, 包括薄壁细胞和胚性细胞在内的囊腔状结构的复合组织, 并且有极性, 能产生次生类原球茎。从现有的研究来看, 兰科和蔷薇科这两类在系统发育和进化上亲缘关系比较远、形态结构差异很大的植物, 为何会产生非常相似的类原球茎? 其他植物是否也能诱导出类原球茎? 类原球茎途径在植物上是否具有普遍意义? 如何调控类原球茎的发生? 类原球茎对于植物人工种子的研制有何启示和借鉴意义, 如何利用类原球茎进行高效再生、快速繁殖、遗传育种及发育生物学等问题, 都有待于深入探索。

参考文献

- 陈惠(2001). 柘楼不定根尖分化不定芽过程中的细胞组织学研究. 云南植物研究, 23 (4): 488-492
- 崔广荣, 侯喜林, 张子学, 张从宇, 胡能兵(2007). 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发生及组织学观察. 园艺学报, 34 (2): 431-436
- 崔凯荣, 戴若兰(2000). 植物体细胞胚发生的分子生物学. 北京: 科学出版社, 22-25
- 高莉萍, 包满珠(2005). 月季的植株再生及遗传转化研究进展. 植物学通报, 22 (2): 231-237
- 谷祝平, 高金城, 李柏年, 颜挺进(1990). 大花蕙兰茎尖培养的扫描电镜观察研究. 西北植物学报, 10 (2): 128-131
- 郭艳超(2008). 蔷薇属植物类原球茎再生途径的研究[学位论文]. 北京: 中国农业大学
- 郭艳超, 张倩, 田传卫, 陈菊, 赵梁军(2008). 香水月季类原球茎(PLBs)途径再生植株的研究. 中国农业大学学报, 13 (5):

- 29~34
- 李爱民, 叶秀麟, 陈泽镰(2003). 墨兰试管苗植株的发育解剖学研究. 热带亚热带植物学报, 11 (2): 161~165
- 李桂双, 陈之林, 曾宋君, 吴坤林, 段俊(2006). 异型兰的种子试管育苗. 植物生理学通讯, 42 (5): 905
- 李进, 阮颖, 刘春林, 邓荟芬, 范亚丽(2007). 月季组织培养和遗传转化体系的研究进展. 西北植物学报, 27 (7): 1479~1483
- 李燕, 张惠英, 王欣欣, 王欣宇(2008). 秦艽发根系体细胞胚的诱导和植株再生. 兰州大学学报(自然科学版), 44 (4): 81~85
- 梁艳华, 彭春生(2002). 树状月季砧木的选择. 北方园艺, (4): 38~39
- 吕晓辉, 黄象男, 郭晓慧, 宿显瑞, 臧新(2007). 蝴蝶兰愈伤组织诱导和体细胞胚发生的研究. 安徽农业科学, 35 (25): 8068~8070
- 潘超美, 董家赞, 刘丹霞, 胡爱群, 杨舒晴(2008). 铁皮石斛离体培养体细胞胚发生的组织细胞学研究. 广州中医药大学学报, 25 (1): 74~76
- 王关林, 方宏筠(2004). 植物基因工程. 第2版. 北京: 科学出版社, 344~355
- 徐程, 詹忠根, 张铭(2002). 中国兰的组织培养. 植物生理学通讯, 38 (2): 171~174
- 杨倩, 彭春生(2003). 树月季砧木的驯化和快速繁殖. 北京林业大学学报, 25 (2): 85~93
- 叶秀麟(1995). 石斛兰组织培养和细胞学观察. 园艺学报, 21 (1): 83~87
- 余晓丽, 康洁, 李玉英, 杨玉玲(2005). 狗蔷薇茎尖再生体系的优化. 西北植物学报, 25 (8): 1536~1539
- 余晓丽, 马剑民, 李玉英, 王世茹(2006). 提高狗蔷薇离体植株再生频率. 云南植物研究, 28 (2): 203~207
- 詹忠根(2006). 铁皮石斛根尖诱导丛生芽研究. 中草药, 37 (6): 929~931
- 詹忠根, 徐程, 张铭(2002). 兰科植物原球茎(类原球茎)的形态建成. 种子, 125 (5): 36~37
- 詹忠根, 徐程, 张铭, 罗紫娟(2005). 铁皮石斛离体根尖经体细胞胚再生植株研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 31 (5): 579~580
- 张鹏, 赵勇锋, 李开良, 石红军, 张军, 祝建(1999). 墨兰“原球茎”结构初探. 上海铁道大学学报, 20 (5): 22~24
- 张启香, 方炎明(2005). 铁皮石斛组织培养及试管苗营养器官和原球茎的结构观察. 西北植物学报, 25 (9): 1761~1765
- 张启香, 付素静, 方炎明, 陈娜(2009). 铁皮石斛拟原球茎的发生过程. 浙江林学院学报, 26 (3): 444~448
- 赵鹏(2007). 铁皮石斛体细胞胚胎发生的研究[学位论文]. 成都: 西南交通大学
- 郑湘如, 王丽(2007). 植物学. 第2版. 北京: 中国农业大学出版社, 75~106, 83~87, 97, 137~138
- 周燕, 高述民, 李凤兰(2004). 胡萝卜体细胞胚胎发生中的细胞组织化学和蛋白质组成变化. 植物生理学通讯, 40 (2): 181~183
- 祝建, 张军, 石红军, 谢良生, 李开良, 赵勇峰(2000). 墨兰组织培养中原球茎的形态解剖研究. 华南农业大学学报, 21 (4): 47~50
- Atta R, Laurens L, Boucheron-Dubuisson E, Guivarch A, Eugenie C, Giraudat-Pautot V, Rech P, Chriqui D (2009). Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. Plant J, 57: 626~644
- Chai ML, Xu CJ, Senthil KK, Kim JY, Kim DH (2002). Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Sci Hortic, 96, 213~224
- De Smet I, Vanneste S, Inze D, Beeckman T (2006). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. Plant Mol Biol, 60: 871~887
- Fambrini M, Cionini G, Conti A, Michelotti V, Pugliesi C (2003). Origin and development *in vitro* of shoot buds and somatic embryos from intact roots of *Helianthus annuus* × *H. tuberosus*. Ann Bot, 92: 145~151
- Tian CW, Chen Y, Zhao XL, Zhao LJ (2008). Plant regeneration through protocorm-like bodies induced from rhizoids using leaf explants of *Rosa* spp. Plant Cell Rep, 27: 823~831
- van der Salm TPM, van der Toorn CJG, Hanischten Cate CH, Dons HJM (1996). Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the rootstock *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. Plant Cell Rep, 15: 522~526
- Yang JL, Seong ES, Kim MJ, Ghimire BK, Kang WH, Yu CY, Li CH (2010). Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. Plant Cell Tiss Org Cult, 100: 49~58