

刺五加体细胞胚发生研究进展

周晨光, 刘立琨, 赵波, 夏德安, 李成浩*

东北林业大学, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 综述了国内外对刺五加体细胞胚发生研究的现状。分别对刺五加体细胞胚发生方式、体细胞胚发育相关生理生化变化(包括生长素极性运输、DNA甲基化和代谢途径调控)、体细胞胚生物反应器培养的研究现状进行了评述。

关键词: 刺五加; 体细胞胚发生

Research Progress in Somatic Embryogenesis of *Eleutherococcus senticosus* Maxim.

ZHOU Chen-Guang, LIU Li-Kun, ZHAO Bo, XIA De-An, LI Cheng-Hao*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Recent progresses in somatic embryogenesis of *Eleutherococcus senticosus* were reviewed. This paper investigated the pattern of somatic embryogenesis and physiological and biochemical changing in somatic embryo development, including auxin polar transportation, DNA methylation and metabolic pathways regulation. Bioreactor culture of somatic embryos of *E. senticosus* was also discussed.

Key words: *Eleutherococcus senticosus*; somatic embryogenesis

刺五加(*Eleutherococcus senticosus* Maxim.)为五加科多年生落叶灌木, 主要分布在中国东北部、俄罗斯远东地区及日本北海道等地, 是常用的药用植物。以刺五加为原料生产的各种片剂、冲剂、针剂和刺五加参茶等产品远销国外, 具有很高的经济价值。由于自然环境的破坏, 无计划的采挖等原因, 刺五加野生资源遭到严重破坏, 已被各生产国列为保护植物, 严格限制野生采挖(祝宁等 1998)。上世纪80年代末开始了刺五加人工栽培的研究, 主要进行种子繁殖、扦插等方面研究(韩承伟等 2003)。由于刺五加种子质量差、自然状态下后熟时间长以及发芽率低、扦插生根率低等原因, 制约了人工栽培的发展。近年来利用组织培养、细胞培养快速繁殖刺五加的研究成为热点。体细胞胚发生作为植物快速繁殖的方法之一, 可以不受地区、季节和气候性灾害等自然条件限制, 具有繁殖速度快、繁殖系数高等优点。另外, 体细胞胚胎发生重演受精卵形态发生的特性, 是深入研究植物细胞分化、发育、形态发生与合子胚发育机制的理想离体实验体系(Yang 和 Zhang 2010)。

自从Gui等(1991)通过体细胞胚发生形成植株

再生成功以来, 刺五加体细胞胚发生的研究已有很多报道。目前, 研究主要集中在体细胞胚发生机理、利用体细胞胚培养的苗木快速繁殖、次生代谢产物生产、体细胞胚特异合成的生物活性物质的分离、利用转基因技术改变代谢产物生物合成途径以及体细胞胚的生物反应器培养等方面。本文主要就近几年国内外关于刺五加体细胞胚发生的研究进展进行综述。

1 体细胞胚发生方式

植物的体细胞胚发生方式可以分为直接从外植体产生体细胞胚的直接方式和先产生愈伤组织然后由愈伤组织再分化出体细胞胚的间接方式(Yang 和 Zhang 2010)。刺五加的体细胞胚发生以直接诱导方式为主。Gui等(1991)由子叶及胚轴直接诱导体细胞胚, 最初产生的体胚为一些小的圆柱状突起, 表面十分光滑。在纵向伸长以后, 顶端开始出现瓣

收稿 2010-05-10 修定 2010-06-07

资助 国家自然科学基金(30671701)和国家林业局“948”项目(2009-4-26)。

* 通讯作者(E-mail: chlio@163.com; Tel: 0451-82190607)。

状裂片。当体胚发育至鱼雷形时期以后, 由于胚轴伸长及子叶联合, 致使整个体胚呈喇叭状。对培养材料的切片观察表明刺五加的体胚起源于子叶或胚轴表皮层及表皮层下的细胞团, 属于多细胞起源。多细胞起源的体细胞胚几个基部相连, 集聚成团, 较难分离, 且无再生能力; 发育正常, 有再生能力的体细胞胚是通过次生胚产生的。

Choi等(1999a)把刺五加体细胞胚在添加2,4-D的诱导培养基持续培养, 从部分体细胞胚可以产生胚性愈伤组织, 胚性愈伤组织的固体培养和液体培养都能得到同步化发育的大量体细胞胚, 这对苗木大量扩繁和胚发育相关生理、生化和分子生物学研究有重要意义。他们发现, 外植体的选择对体细胞胚的正常发育和植株转化起关键作用, 即从合子胚诱导的体细胞胚与Gui等(1991)的报道相同, 大部分为多胚, 不能发育成完整植株; 而从发芽1~3周后幼苗的不同组织诱导的体细胞胚为单胚(single embryo), 能正常发芽并转化为完整植株(Choi等1999b)。

You等(2006)把刺五加成熟合子胚在 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇或蔗糖中进行3~24 h的质壁分离处理, 使体细胞胚在无植物生长调节剂的培养基中高频诱导, 而且全部体细胞胚均从合子胚表面的单一表皮细胞直接诱导。用荧光分析法检测到经质壁分离处理后的合子胚中胼胝质的量急剧增加, 而未经处理的合子胚中仍保持较少; 合子胚的质壁分离处理导致原生质膜与细胞壁之间沉积大量胼胝质。据此推论可能是合子胚的质壁分离处理诱导胼胝质的沉积, 并阻断细胞间联络, 刺激表皮细胞重新编程, 使表皮细胞成为胚性感受态细胞并最终诱导单细胞发育成体细胞胚。李成浩等(2006)通过饥饿和高温混合处理从成熟合子胚成功直接诱导体细胞胚, 并以次生胚发生方式继续在不加激素的培养基里增殖和维持8年以上, 最近建立了cDNA文库, 开展胚发生过程中基因表达研究(刘立琨等2008)。

2 体胚发育相关生理生化变化

2.1 生长素极性运输与体胚发生 高等植物的生长发育受激素的广泛调控, 其中生长素的作用尤为独特。激素在植物组织的相对含量决定了该组织的发育命运。目前已知的植物激素中只有生长素具有极性运输特征, 因此很自然地就把植物的极性发

育、分化、生长等生理现象与生长素的极性运输联系在一起, 例如植物的顶端优势、维管组织的发生及向性生长等(Estelle 1998)。Choi等(2001)发现刺五加的体细胞胚发生需要一定的生长素浓度梯度。刺五加胚性细胞团在添加生长素极性运输抑制剂TIBA的培养基上培养时, 体细胞胚的形成受到抑制却不影响细胞的分裂。将不同时期球形胚转移到含TIBA的培养基上培养, 导致筒状子叶的发生, 特定时期的球形胚中轴和两侧极性的发育受到抑制, 并且茎和根顶端分生组织的进一步发育和微管分化也受到抑制。刺五加芽、根顶端分生组织形成及内部组织分化发生在球形胚向心形胚转化时期, 说明在刺五加球形期体细胞胚由轴向对称的生长方式转向心形期的两侧对称的生长方式的过程中, 生长素极性运输起着非常重要的作用(Choi等2001)。

2.2 DNA甲基化与体胚发生 DNA甲基化是在DNA复制后, 在甲基转移酶催化下将S-腺苷-甲硫氨酸上的甲基基团连接到DNA分子的腺嘌呤碱基或胞嘧啶碱基上, 进行DNA修饰的过程。DNA甲基化参与植物基因表达的调控, 在植物的生长发育中起着非常重要的作用(Finnegan等2000)。Chakrabarty等(2003)利用高效液相色谱(HPLC)和甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)比较刺五加胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织的基因组DNA甲基化水平, 发现胚性愈伤组织的DNA甲基化水平明显降低。

2.3 代谢途径调控 植物新陈代谢分为初生代谢与次生代谢。植物次生代谢产物是指植物体中一大类并非植物生长发育所必需的小分子有机化合物, 是药物(如长春花生物碱)和化工原料(如橡胶)的重要来源, 对人类的生产和生活影响较大, 具有很好的经济和社会效益(高文远等2003)。目前, 研究药用植物次生代谢产物生物合成的基因调控已成为分子生物学十分活跃的前沿研究领域, 其中植物甾醇和三萜类皂苷是两种具有调节生物体免疫力、抗血糖过多、抗癌症等生理功能的植物次生代谢产物, 其含量和组分主要取决于生物合成关键酶以及在细胞中的表达水平(刘强等2006)。

鲨烯合酶(squalene synthase, SS)是催化两分子的法呢酯焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)缩合产生鲨烯的关键酶, 而鲨烯是生物合成三萜、甾醇等

萜烯类重要物质的共同前体。因此, SS 酶成为生物合成三萜、甾醇等物质的一个关键酶, 其含量和活性决定了后续产物的产量(赵明文等 2003)。韩国江原大学Choi YE实验室通过转基因人参的研究证明人参 SS 酶在植物甾醇和三萜类皂苷的生物合成中具有很强的调控功能(Lee 等 2004)。在此基础上, 将人参 SS 酶基因克隆到植物高效表达载体 pCAMBIA1302 中, 通过根癌农杆菌介导法转化刺五加体细胞胚, 结果表明, 转基因植物的 SS 酶活性是野生型的 3 倍。GC-MS 与 HPLC 分析显示, 转基因植物中甾醇类和三萜皂苷的含量是野生型的 2~2.5 倍。由此可见, 增强植物 SS 酶活性会使刺五加甾醇和三萜皂苷的产量显著增加(Seo 等 2005)。随着分子生物学的快速发展, 可以通过对次生代谢相关合成酶和相关基因异源表达酶活性的研究以及反应动力学分析, 筛选和确定次生代谢物质的关键酶基因, 然后通过人工改造关键酶基因使之高效表达, 进而提高植物次生代谢产物的产量。

3 体细胞胚生物反应器培养

生物反应器技术是植物组织培养的重要组成部分, 具有工作体积大、单位体积生产能力强、物理和化学条件控制方便等优点。植物细胞培养生产天然化合物将逐渐成为弥补天然资源短缺的有效途径(Paek 等 2005)。目前药用植物细胞培养有一个很大的弊端, 即有效成分的含量不稳定, 药用植物的有效成分往往是次生代谢产物, 次生代谢产物的合成在细胞阶段并不积极, 也可以说对植物细胞本身来说意义不大; 器官培养可以克服这一缺点, 成为目前药用植物发酵培养研究的重点(高文远等 2003)。目前, 用于生产次级代谢物的植物器官包括毛状根、芽(Bourgau 等 2001)、体细胞胚和幼植物体(Paek 等 2005)等。

近年来, 国际上越来越多的学者认识到植物体各器官间的协同作用对次生代谢产物合成的重要性, 开始加强相关领域的研究(Luczkiwicz 和 Kokotkiewicz 2005; Iwase 等 2005)。国内学者也进行了对水母雪莲毛状根和野生植物的苯丙素类(phenylpropanoids)次生代谢产物合成能力的比较(Fu 等 2006)。另外, 也陆续出现一些利用体细胞胚生物反应器培养生产次生代谢产物方面的论文(Eeva 等 2003; Shohael 等 2006a, b)。同时, 由于

组织培养技术和生物反应器设计技术的进步, 在刺五加(Choi 等 2002; Li 2004)、*E. sessiliflorus* (Shohael 等 2005)、*E. koreanum* (Park 等 2005)等药用植物中实现了高密度培养的体细胞胚在生物反应器培养中同步化发芽和快速生长, 特别是刺五加体细胞胚的增殖速度和产量已接近或达到细胞培养的水平(Choi 等 2002; Paek 等 2005; Li 2004)。

Choi 等(2002)把刺五加体细胞胚在 10 L 生物反应器中培养, 得到大量幼植物体, 并提出利用培养的幼植物体直接作为药用植物原料的可能性。Li (2004)在 10 L 鼓泡式生物反应器培养 30 g 体细胞胚, 经过 4~5 周培养可以得到 1 500 g 左右的幼植物体, 生物量增长速度和产量达到了细胞培养的水平; 对培养的幼植物体提取物的抗氧化、抗菌、抗癌等生物活性测定结果与 5 年野生刺五加根皮提取物无明显差异。李成浩等(2006)在不添加任何植物激素的培养环境下从成熟种子诱导体细胞胚, 并通过生物反应器培养大量生产再生植株。

刺五加体细胞胚生物反应器培养中的光、温度等理化因子对细胞生物量积累、抗氧化系统的诱导、谷胱甘肽代谢和次生代谢产物合成的影响也开始受到重视。Shohael 等(2006a)研究了不同光处理对生物反应器中刺五加体细胞胚发生的影响, 发现与其他光处理相比, 红光处理的体细胞胚具有很高的氧胁迫应力水平; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽转硫酶(glutathione S-transferases, GSTs)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)、愈创木酚过氧化物酶(guaiacol peroxidase, G-POD)等抗氧化酶活性增强, 抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、单二氢抗坏血酸还原酶(mono-dehydroascorbate reductase, MDHAR)、二氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)活性下降; 五加苷 E、E1 产量增加。荧光处理的体细胞胚的石碳酸、类黄酮、绿原酸含量明显高于其他处理。说明不同光源引起的氧胁迫伤害及并发的植物抗性机制不同, 所以产生了不同的抗氧化酶活性及次生代谢产物。Shohael 等(2006b)将刺五加体细胞胚培养在不同温度的生物反应器中, 研究温度对次生代谢物产量和抗氧化酶活性的影响。在低温(12 °C)和高温(30 °C)下的体细胞胚生长受

到抑制, 石碳酸、类黄酮、绿原酸、五加苷含量下降; 12℃时, SOD、CAT、GR、APX、MDHAR、DHAR 活性明显增强。由于低温和高温使得细胞内蛋白变性, 进而对体细胞胚的生长造成了不可逆的抑制。另外, 低温处理时抗氧化酶活性增强, 是细胞对低温引发的氧胁迫的一种自我保护, 可以减轻对自身造成的伤害。Shohael 等(2007)发现, 与非胚性愈伤组织相比, 在刺五加体细胞胚发育早期氧化型谷胱甘肽(GSSG)与还原型谷胱甘肽(GSH)比值持续增大, 心形胚时期达到最大值, 鱼雷胚和子叶胚阶段急剧下降, 子叶胚时达到最小值。在体细胞胚成熟过程中, GST、G-POD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性明显增强。另外, APX、MDHAR、DHAR 等抗氧化酶也被诱导。在刺五加体细胞胚发育过程中氧化还原状态非常重要, 植物胚胎发生开始需要还原态的培养环境, 这更有利于细胞增殖。较高的 GSSG/GSH 能促进胚胎发育过程中重要的谷胱甘肽结合蛋白的合成。抗氧化酶与谷胱甘肽氧化还原体系同等上调说明: 抗氧化酶通过改变谷胱甘肽的氧化还原状态, 在刺五加体细胞胚发育过程中发挥着重要的作用。

转基因植物作为生物反应器也是当前国内外在分子生物学和生物技术领域的研究热点, 目前已用于生产重要的药用蛋白, 如抗体、血液替代品和疫苗等(杨晶等 2009)。大肠杆菌热不稳定毒素 B 亚单位(LTB)是一种强力粘膜免疫原, 又是辅佐抗原的免疫佐剂, 大规模生产 LTB 能够推进可食性疫苗的开发(Kang 等 2006)。Kang 等(2006)将人工合成的 LTB 亚单位基因克隆到植物高效表达载体 pMYO51 中, 利用根癌农杆菌介导转化将基因转至刺五加体细胞胚, 以表达代谢终产物。通过气升式生物反应器培养, 其代谢产物 LTB 含量基本保持在全部可溶性蛋白的 0.36%。酶联免疫测试表明, 体细胞胚合成的 LTB 蛋白能够特异结合神经节苷脂 G_{M1} , 由此说明 LTB 蛋白参与活跃五聚体的形成, 具有正常的生物活性, 为利用植物生产药用蛋白提供了新的途径。

4 结语

近年来, 刺五加体细胞胚的研究有很大进展和突破, 但是仍面临很多问题: (1)外植体单一。目前,

大部分体细胞胚发生的研究均以合子胚作为外植体, 虽然有些林木已经能从成年组织诱导出体细胞胚, 但诱导率较低, 而且从刺五加成熟组织诱导而得体的细胞胚还未见报道。(2)体细胞胚发生体系不完善, 如褐化问题严重、畸形胚的出现、体细胞胚胎的个体差异大等。(3)分子水平上研究较少, 对于刺五加体细胞胚发生的调节机制不够了解。(4)生物反应器培养刺五加体细胞胚, 对其生长过程中的组织细胞学、植物生理学、分子生物学等方面研究太少, 这对改善刺五加生物反应器培养条件、控制其代谢产物的产量等均有一定的限制。

生物科学技术的迅速发展, 为体细胞胚发生的研究带来了新的契机, 并取得了大量成果。目前, 刺五加体细胞胚发生的研究工作还需在以下几个方面加强: 选育优良外植体作为研究对象, 从刺五加成熟组织诱导体细胞胚发生, 将成为完善无性繁殖方式的重大课题; 系统地研究刺五加体细胞胚发生时的内在机制及其调控机制, 从而为建立更稳定的体细胞胚发生和再生体系提供理论依据; 对刺五加体细胞胚的生物反应器培养的各个时期进行系统研究, 特别是在其生长状态、生理生化变化、分子水平方面的研究; 扩大生物反应器培养范围, 较大限度地应用于大工业化生产中, 这就需要大规模采用自动化体细胞培养的培养体系, 而在这方面仍需进行大量改进。

参考文献

- 高文远, 贾伟, 段宏泉, 肖培根(2003). 药用植物发酵培养的工业化探讨. 中国中药杂志, 28 (5): 385~390
- 韩承伟, 刘克武, 谭放, 明兆清, 张大稳, 高明, 付柏林, 刘玉福, 别志远, 丛立光(2003). 刺五加苗木繁育及丰产栽培技术. 中国林副特产, 64 (1): 3
- 李成浩, 杨传平, 刘桂丰, 牛遇达, 赵波, 韩君(2006). 不依赖植物激素的刺五加体细胞的诱导和植株再生方法. 中国发明专利号: ZL20061009783.5
- 刘立琨, 李成浩, 李俊秀, 阎秀峰(2008). 刺五加体细胞胚 cDNA 文库的构建. 植物生理学通讯, 44 (4): 715~718
- 刘强, 丛丽娜, 张宗申(2006). 植物甾醇与三萜类皂苷生物合成基因调控的研究进展. 安徽农业科学, 34 (19): 4844~4846
- 杨晶, 李天航, 熊丽东, 庞实峰, 李校堃(2009). 植物生物反应器的研究进展. 生物工程学报, 25 (5): 650~657
- 赵明文, 钟家禹, 王南, 梁婉琪, 潘迎捷(2003). 鲨烯合酶的研究进展. 微生物学报, 43 (5): 676~680
- 祝宁, 卓丽环, 臧润国(1998). 刺五加(*Eleutherococcus senticosus*)会成为濒危种吗? 生物多样性, 6 (4): 253~259
- Bourgaard F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001). Production of

- plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*, 161: 839~851
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003). Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci*, 165: 61~68
- Choi YE, Katsumi M, Sano H (2001). Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Sci*, 160: 1183~1190
- Choi YE, Kim JW, Yoon ES (1999a). High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann Bot*, 83: 309~314
- Choi YE, Lee KS, Kim EY, Kim YS, Han JY, Kim HS, Jeong JH, Ko SK (2002). Mass production of Siberian ginseng plantlets through large-scale tank culture of somatic embryos. *Plant Cell Rep*, 21: 24~28
- Choi YE, Yang DC, Yoon ES (1999b). Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 58: 93~97
- Eeva M, Ojala T, Tammela P, Galambosi B, Vuorela H, Hiltunen R, Fagerstedt K, Vuorela P (2003). Propagation of *Angelica archangelica* plants in an air-sparged bioreactor from a novel embryogenic cell line, and their production of coumarins. *Biol Plant*, 46: 343~347
- Estelle M (1998). Polar auxin transport: new support for an old model. *Plant Cell*, 10: 1775~1778
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev*, 10: 217~223
- Fu CX, Xu YJ, Zhao DX, Ma FS (2006). A comparison between hairy root cultures and wild plants of *Saussurea involucreata* in phenylpropanoids production. *Plant Cell Rep*, 24: 750~754
- Gui Y, Guo Z, Ke S, Skirvin RH (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Cell Rep*, 9: 514~516
- Iwase A, Aoyagi H, Ohme-takagi M, Tanaka H (2005). Development of a novel system for producing ajmalicine and serpentine using direct culture of leaves in *Catharanthus roseus* intact plant. *J Biosci Bioeng*, 99: 208~215
- Kang TJ, Lee WS, Choi EG, Kim JW, Kim BG, Yang MS (2006). Mass production of somatic embryos expressing *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in Siberian ginseng. *J Biotechnol*, 121: 124~133
- Lee MH, Jeong JH, Seo JW, Shin CG, Kim YS, In JG, Yang DC, Yi JS, Choi YE (2004). Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant Cell Physiol*, 45: 976~984
- Li CH (2004). Mass propagation of plantlets through bioreactor culture and analysis of biological activities in *Eleutherococcus senticosus* Maxim [PhD thesis]. Kangwon Nat'l University
- Luczkiewicz M, Kokotkiewicz A (2005). Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Sci*, 169: 862~871
- Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 81: 287~300
- Park SY, Ahn JK, Lee WY, Murthy HN, Paek KY (2005). Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Sci*, 168: 1221~1225
- Seo JW, Jeong JH, Shin CG, Lo SC, Han SS, Yu KW, Harada E, Han JY, Choi YE (2005). Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation. *Phytochemistry*, 66: 869~877
- Shohael AM, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2007). Glutathione metabolism and antioxidant responses during *Eleutherococcus senticosus* somatic embryo development in a bioreactor. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 89: 121~129
- Shohael AM, Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Islam R, Paek KY (2006a). Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. *Proc Biochem*, 41: 1179~1185
- Shohael AM, Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2006b). Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 85: 219~228
- Shohael AM, Chakrabarty D, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2005). Application of bioreactor system for large-scale production of *Eleutherococcus sessiliflorus* somatic embryos in an air-lift bioreactor and production of eleutherosides. *J Biotechnol*, 120: 228~236
- Yang XY, Zhang XL (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit Rev Plant Sci*, 29: 36~57
- You XL, Yi JS, Choi YE (2006). Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 227: 105~112