

专题介绍 Special Topics

TDZ 对植物体细胞胚胎发生的作用

陈云凤 张春荣 黄霞 黄学林*

中山大学生命科学学院, 广州 510275

Effect of TDZ on Somatic Embryogenesis of Plant

CHEN Yun-Feng, ZHANG Chun-Rong, HUANG Xia, HUANG Xue-Lin*

School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China

提要 介绍了TDZ在植物体细胞胚胎发生中的作用及其可能的作用机制的研究进展。

关键词 thidiazuron (TDE); 体细胞胚胎发生; 组织培养

植物体细胞胚胎发生(以下简称体胚发生)是植物体细胞表达全能性、进行植株再生的重要途径之一,也是植物发育早期阶段研究的一个有效的研究模式。尽管从不同植物的培养系统,特别是在胡萝卜、菊苣、苜蓿、针叶树的实验体系中,所获得的体细胞胚胎发生相关的信息数量大大增加,但我们对于体胚发生,特别是它的早期的调控机制的本质,还知之甚少(Feher等2003)。很多实验都证明,在体胚发生的早期阶段,植物生长调节物质的作用很重要(Jiménez和Bangerth 2001),阐明它们在体胚发生中的作用机制有利于我们认识体胚发生的本质。

苯基噻二唑脒(thidiazuron, TDZ)是一种人工合成的苯基脒类化合物,化学名称为*N*-苯基-*N'*-噻二唑-5-脒(*N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)(图1),最初用作棉花的脱叶剂(Arndt等1976)。自1982年Mok等发现TDZ有很强的细胞分裂素活性以来,TDZ广泛应用于植物组织培养中,并已有大量的研究报道(Victor等1996; Murthy等1998; 周俊彦和郭扶兴1990; 杨业正1991; 徐晓峰和黄学林2003),许多难于再生植株的植物采用TDZ可成功地获得体细胞胚及再生植株(Chengalrayan等1997; Xie等2001)。

TDZ对植物体胚发生的作用因植物种类而异,它对体胚发生有促进或抑制作用,甚至对同一种植物不同栽培种的体胚发生,有的是促进,有的则是抑制,如棉花(张宝红和李秀兰1995a, b)、苜蓿(黄学林等1994; Iantcheva等1999)。本文介

绍TDZ在植物体胚发生中的作用及其可能的作用机制。

1 TDZ对体胚发生的作用

1.1 促进体胚发生 TDZ对大多数植物的体胚发生有促进作用(表1),如烟草、花生、天竺葵、鹰嘴豆、印度楝树、兰花、黄瓜、大豆、黑胡桃、粗皮桉等,而且TDZ对体胚的诱导率常高于其他植物生长调节物质,其中以花生、兰花、天竺葵的研究最多。

TDZ既可以在愈伤组织诱导阶段起作用,也可以在体胚诱导、发育或萌发阶段起作用。在间接体胚发生过程中,通常在愈伤组织诱导阶段加TDZ,如花生、兰花、天竺葵、大豆、黄瓜、棉花、葡萄等(林荣双等2002; Chen和Chang 2000; Murthy等1998; 赵桂兰等1998; Ashok等2003; 徐华松等1996)。在直接体胚发生过程中,通常在体胚诱导阶段加TDZ,如花生、兰花、天竺葵、桉树、黄瓜、烟草、西洋梨、百合等(Murch和Saxena 1999; Chen和Chang 2001; Hutchinson等1997b; Tibok等1995; Akula等2003; 徐晓峰和黄学林2003; 孙清荣等2003; Nhut等2002)。有的植物甚至在种子萌发阶段就加TDZ,也能影响其外植体的体胚发生,如花生、印度楝树、白蜡、鹰嘴豆(徐华松等1996;

收稿 2005-02-24 修定 2005-12-03

资助 2002年度教育部高等学校博士点基金项目(20020558040)。

*通讯作者(E-mail: ls17@zsu.edu.cn, Tel: 020-84110797)。

Murthy和Saxena 1998)。一般先再生根的体胚是较难转换成植株的,在花生体胚发育阶段,有人曾用7种生长调节物质进行处理,发现 $22.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ对具根的体胚长出芽端再生成植株的促进作用最大(Chengalrayan等1997)。

TDZ对体胚发生的促进作用与浓度和处理时间有关。如在天竺葵体胚诱导期间用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ处理3 d,体胚发生率最高;TDZ浓度高于 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或处理时间长于3 d都会严重地抑制体胚发生(Hutchinson和Saxena 1996a)。在印度楝树种子萌发时用TDZ处理,发现TDZ低于 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能促进直接体胚发生,大于 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能促进间接体胚发生(Murthy等1998)。用TDZ处理非洲紫罗兰雄蕊时,发现低于 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TDZ促进芽器官发生,高浓度($5\sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的TDZ促进体胚发生(Mithila等2003)。TDZ对成熟的香蕉体胚的萌发有明显的促进作用,但使用的浓度偏高时玻璃化现象也相应增加(魏岳荣2005)。

1.2 抑制体胚发生 TDZ也可抑制某些植物的体胚发生,如苜蓿、橄榄、棕榈、棉花等(表1),这些植物大多数是间接体胚发生。在晋南苜蓿(黄学林等1994)、亚洲棉‘石西亚1号’和陆地棉‘珂201号’(张宝红和李秀兰1995a, b)的愈伤组织诱导阶段加入TDZ后,愈伤组织诱导受到促进,但体胚发生受抑。

2 TDZ对体胚发生的作用机制

许多报道认为,在植物体胚发生过程中,TDZ通过调节内源植物激素或相关的酶活性,或者通过胁迫诱导起作用,它还能调整细胞膜结构、能量水平、营养吸收和同化作用(Victor等1996; Hutchinson和Saxena 1996a, b; Hutchinson等1997a, b)。

2.1 调节植物内源激素 有研究表明,TDZ与不同激素的配合,对诱导体胚发生的差异很大(Chen和Chang 2001)。Visser等(1992)首先发现TDZ可以代替IAA和6-BA诱导天竺葵下胚轴的体胚发生,这说明TDZ具有IAA和6-BA双重作用功能。他们还发现TDZ能替代生长素和细胞分裂素促进许多植物的体胚发生,并且比这些植物激素诱导体胚发生的速度更快(徐晓峰和黄学林2003)。TDZ能使花生子叶外植体中内源生长素和细胞分

裂素增加(Murthy等1998)。有的实验还证明,TDZ可诱导细胞分裂素的生物合成,并可抑制内源生长素的降解(Thomas和Katterman 1986)。以前认为难以诱导体胚发生的多种植物,TDZ都可诱导体胚发生而再生植株(Murthy和Saxena 1998)。因此认为TDZ对体胚发生的作用与其他生长调节物质有密切关系。

2.1.1 影响细胞分裂素的作用 从TDZ结构(图1)上看,它完全不同于腺嘌呤型细胞分裂素,其分子结构中有苯基和噻二唑2个功能基团,如果改变它们中的任何一个,TDZ的活性都会下降,说明TDZ的作用依赖于其本身的完整分子结构,而不是其代谢物(Mok等1982)。另外,对称型的 N,N' -2-噻重氮也是具有类似于细胞分裂素活性的化合物,这说明在TDZ诱导的反应中这两个环状结构有相互促进的作用(Mok等1982)。

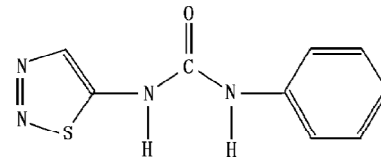


图1 TDZ分子结构式

TDZ能增强组织中催化细胞分裂素核苷酸向细胞分裂素核苷转变的酶的活性,也可抑制细胞分裂素氧化酶对内源玉米素类物质的分解作用,这也许是TDZ能促进体胚发生的原因之一(Mok等1982)。TDZ在促进花生体胚发生过程中,能引起腺嘌呤、腺苷、玉米素和二氢玉米素物质的积累(Victor等1996)而减少异戊烯腺嘌呤含量,这是TDZ抑制细胞分裂素氧化酶活性而引起的。加入腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(adenine phosphoribosyl transferase, APRT)的活性抑制剂二氨基嘌呤(diaminopurine, DAP),可减少腺嘌呤、玉米素和二氢玉米素,而增加异戊烯腺嘌呤的含量,从而抑制TDZ对体胚发生的诱导(Murthy和Saxena 1998; Hutchinson和Saxena 1996a; 陈肖英等2003)。在这些作用中,TDZ可能是通过诱导内源细胞分裂素的积累而诱导体胚发生。TDZ和DAP的作用位点如图2所示(Victor等1996)。

已发现TDZ和6-BA都可以识别从绿豆黄化苗

表1 TDZ对植物体胚发生的作用

植物种类	外植体种类	体胚发生方式	TDZ处理阶段	对体胚发生的影响	文献
花生(<i>Arachis hypogaea</i>)	幼叶、胚轴	间接	愈伤组织诱导	促进体胚发生	林荣双等 2002
	子叶、胚轴	直接	体胚诱导	促进体胚发生	Murch 和 Saxena 1999
	下胚轴	直接	种子萌发	促进体胚发生	Victor等1996
	成熟胚的小叶	直接	体胚发育	促进体胚发育	Chengalrayan等1997
兰花(<i>Oncidium Gower Ramesy</i>)	花柄、叶	直接	体胚诱导	促进体胚诱导, 抑制体胚萌发	Chen 和 Chang 2001
	花柄、根、根状茎、幼叶	间接	愈伤组织诱导	促进体胚诱导和萌发	Xie等2001
兰花(<i>Cymbidium ensifolium</i>)	原胚体	间接	愈伤组织诱导	促进愈伤组织诱导和增殖	Huan等2004
	假鳞茎、根状茎、根	间接	愈伤组织诱导 体胚诱导	促进愈伤组织诱导, 促进体胚诱导	Chang 和 Chang 1998
兰花(<i>Doritaenopsis New candy</i>)	根尖	间接	愈伤组织诱导	促进诱导原胚体结构产生	Park等2003
兰花(<i>Phalaenopsis amabilis</i>)	原胚体	直接	体胚诱导	促进体胚发生	Ishii等1998; Chen 和 Chang 2003
天竺葵(<i>Pelargonium hortorum</i>)	子叶	间接	愈伤组织诱导	促进体胚发生	Murthy等1998
	下胚轴	直接	体胚诱导	促进体胚发生	Hutchinson和Saxena 1996a
桉树(<i>Eucalyptus urophylla</i>)	下胚轴	直接	体胚诱导	促进心型胚发生	Tibok等1995
粗皮桉(<i>E. pellita</i>)	下胚轴	间接	体胚诱导	促进体胚发生	Xie等2001
木豆(<i>Cajanus cajan</i>)	子叶节	直接	体胚诱导	促进体胚发生	Singh等2003
大豆(<i>Glycine max</i>)	花药	间接	愈伤组织诱导、 体胚诱导、发育	促进体胚诱导和发育	赵桂兰等1998
黄瓜(<i>Cucumis sativus</i>)	花药	间接	愈伤组织诱导	促进愈伤组织诱导	Ashok等2003
		直接	体胚诱导	促进体胚发生	
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	叶圆盘	直接	体胚诱导	促进体胚诱导、发育、 植株再生	徐晓峰和黄学林 2003
西洋梨(<i>Pyrus communis</i>)	幼叶	直接	体胚诱导、发育	促进体胚发生	Nhut等2002
乌敛莓(<i>Cayratia japonica</i>)	幼花序	间接	愈伤组织诱导、 体胚诱导	促进体胚发生	Zhou等1994
百合(<i>Lilium longiflorum</i>)	假球茎	直接	体胚诱导、增殖	促进胚状结构产生及其增殖	Nhut等2002
陆地棉‘鲁棉6号’(<i>Gossypium hirsutum</i>)	下胚轴、子叶	间接	愈伤组织诱导	促进愈伤组织诱导, 促进体胚发育	张宝红和李秀兰 1995a
二倍体野生苜蓿(<i>Medicago</i> spp)	顶端分生区	直接	体胚诱导	促进体胚发生	Iantcheva等1999
印度楝树(<i>Azadirachta indica</i>)	成熟种子	直接	种子萌发	促进体胚发生	Murthy 和 Saxena 1998
可可(<i>Theobroma cacao</i>)	叶	间接	愈伤组织诱导	促进体胚发生	Akula等2003
	雄蕊	间接	愈伤组织诱导	促进体胚发生	Li等1998
非洲紫罗兰(<i>Saintpaulia ionantha</i>)	叶、叶柄	直接	体胚诱导	促进体胚发生	Mithila等2003
黄连木(<i>Pistacia vera</i>)	叶	间接	愈伤组织诱导	促进体胚发生	Universitesi等2000
甜菜(<i>Beta vulgaris</i>)	幼苗	间接	愈伤组织诱导	促进体胚发生	Zhang等2001
香蕉(<i>Musa</i> spp.)	雄花序	间接	种子萌发	促进体胚发生	魏岳荣 2005
鹰嘴豆(<i>Cicer arietinum</i>)	幼苗	直接	种子萌发	促进体胚发生	徐华松等1996
白蜡(<i>Fraxinus americana</i>)	子叶、胚轴	间接	种子萌发	促进体胚发生	徐华松等1996
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	叶	间接	愈伤组织诱导	促进体胚诱导、发育	徐华松等1996
晋南苜蓿(<i>Medicago sativa</i>)	叶柄	间接	愈伤组织诱导	促进愈伤组织诱导, 抑制体胚发生	黄学林等1994
亚洲棉‘石系亚1号’(<i>Gossypium arboreum</i>)	下胚轴、子叶	间接	愈伤组织诱导	促进愈伤组织诱导, 抑制体胚发生	张宝红和李秀兰 1995a
陆地棉‘珂201’(<i>Gossypium hirsutum</i>)	下胚轴	间接	愈伤组织诱导	促进愈伤组织诱导, 抑制体胚发生	张宝红和李秀兰 1995b
油棕榈(<i>Elaeis guineensis</i>)	胚	间接	体胚诱导	抑制体胚发生	Rajesh等2003
锯齿棕榈(<i>Serenoa repens</i>)	未成熟胚	直接	体胚发育	降低体胚萌发率, 促进体胚产生根	Gallo-Meagher和Green 2002
橄榄(阿列布) (<i>Olea europea</i>)	根	间接	体胚诱导	抑制体胚发生	Shibli等2001

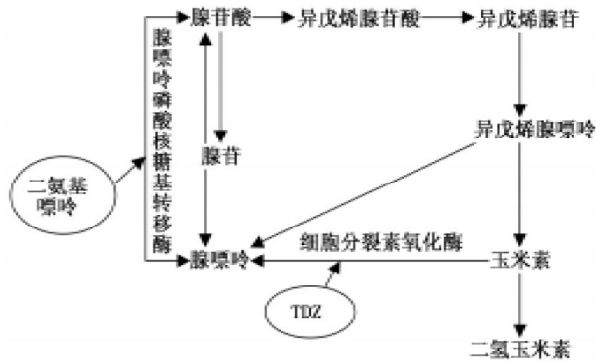


图2 TDZ和DAP抑制嘌呤代谢的作用位点(Victor等1996)

中所分离的细胞分裂素特异性结合蛋白(cytokinin-specific binding protein, CSBP) (Nagata等1993), 而且TDZ与CSBP的结合能力高于6-BA。这说明TDZ的细胞分裂素活性高于嘌呤型细胞分裂素。此外, TDZ也有与6-BA不同的独特作用, 如用TDZ与6-BA分别处理花生种子等, TDZ可诱导出体胚发生, 而6-BA则能诱导出苗(Victor等1999)。

2.1.2 与生长素的相互作用 在组织培养中, 脱分化和分化是再生植株的必要条件, 而生长素则是两者的关键性因素。生长素是诱导许多植物包括花生和印度楝树体胚发生的关键物质。但单独使用TDZ也可诱导这两种植物的体胚发生(Murch和Saxena 1999; Murthy和Saxena 1998), 这表明TDZ有类似生长素的作用。另外, 在含TDZ培养基上生长的花生幼苗中的 β -吡啶基乙胺和色氨酸含量增加, 这说明TDZ能刺激生长素的从头合成; 生长素合成抑制剂2-(*p*-氯苯氧)-2-甲基丙酸(PICB)可以降低TDZ对天竺葵体胚发生(Hutchinson和Saxena 1996a)和花生体胚发生(Murthy等1998)的诱导率, 从而进一步证明了上述假说的可能性。

生长素极性运输的抑制剂2, 3, 5-三碘苯甲酸(triiodobenzoic acid, TIBA)可以减少体胚发生, 但不能降低用TDZ处理过的组织中的生长素浓度, 这进一步说明在体胚发生中TDZ与生长素是相互作用的(徐晓峰和黄学林2003; Malik和Saxena 1992)。

2.1.3 影响乙烯的作用 乙烯对体胚发生既有促进效应, 也有抑制效应(Biddington 1992)。胚性和

非胚性愈伤组织或细胞的乙烯产生能力不同。例如苜蓿非胚性悬浮培养细胞在接种后出现2个乙烯生成高峰, 第一高峰在接种后立即出现, 为应激乙烯峰, 第二乙烯峰在接种后6 h出现; 而胚性细胞只出现第一高峰, 不产生第二乙烯峰(Cvikrová等1991)。挪威云杉[*Picea abies* L. (Karst)]的非胚性愈伤组织中乙烯合成速率比胚性愈伤组织要快19~117倍(Wann等1987)。当以TDZ替代苜蓿组织培养中的KT时, 在愈伤组织体胚发生能力丧失的同时, 其乙烯生成和苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性升高; 而ACC氧化酶抑制剂 CoCl_2 在抑制TDZ处理的愈伤组织中乙烯产生的同时, 也可部分地恢复其体胚发生能力, 程度也均受到促进, 这显示乙烯可能是通过愈伤组织的胚性潜能改变而影响体胚发生的(黄学林等1994)。也已有实验证实, 苜蓿愈伤组织的诱导和体胚的成熟要求乙烯参与(Kepezynski等1992)。在诱导天竺葵体胚发生时, 培养基中添加TDZ会导致培养器皿上部空间中的乙烯水平升高(Hutchinson和Saxena 1996b), 而氨基乙氧乙烯甘氨酸(aminoethoxy ethyleneglycine, AVG)可降低其乙烯含量, 且能提高天竺葵胚轴组织培养时的胚胎反应; 外源乙烯或乙烯合成前体1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC), 可使胚胎发生反应降低到用TDZ诱导的组织培养的水平(Hutchinson和Saxena 1996b)。

TDZ还可能有促使植物体内非结合态IAA保持高水平的功能, 从而导致乙烯合成增加(张志宏等1997)。这一结论尚有待证实。

2.1.4 影响赤霉素的作用 尽管还没有TDZ调节植物内源赤霉素的相关报道, 但是在天竺葵中用 GA_3 生物合成抑制剂[三唑(triazoles)和ancymidol]均能改善TDZ诱导的体胚发生(Hutchinson等1997b)。至于TDZ对体胚发生的影响与赤霉素代谢相关性, 仍需要更多而深入的研究。

2.2 对相关酶活性的调节作用 TDZ在细胞内非常稳定, 处理2~33 d内仍是未分解的有活性分子(Mok和Mok 1985)。许多研究发现, TDZ和外源细胞分裂素类似, 可以提高一些植物的酸性磷酸酶、NADP-甘油-3-磷酸脱氢酶、硝酸还原酶、过氧化物酶和苯丙氨酸酶的活性(刘亚菊等2003

黄学林等1994)。细胞分裂素氧化酶是使植物体内细胞分裂素不可逆失活的唯一酶,它催化细胞分裂素上不饱和类异戊二烯侧链分解而使其彻底失活。在一些植物的体胚发生过程中,TDZ抑制细胞分裂素氧化酶活性(Victor等1996)。

2.3 诱导胁迫反应 TDZ诱导体胚发生的作用机制与胁迫反应有关。如Murch和Saxena(1999)用TDZ和脯氨酸、硫代脯氨酸或谷氨酰胺处理花生种子后,胚形成数量便减少,但胚则增大、变绿。他们进一步分析体胚发生阶段萌发种子中的氨基酸含量时,发现脯氨酸含量增加,占干种子重量的6%,其它氨基酸含量是未处理的10倍(徐华松等1996)。这表明,在TDZ诱导体胚发生时,脯氨酸起关键作用。

TDZ处理整株花生幼苗后,花生幼苗中的矿物质元素锰、铁、铜、钙、镁、钾和ATP、ADP、AMP含量增加(Murch和Saxena 1997);TDZ处理整株天竺葵幼苗后,天竺葵根中的蛋白质、脱落酸和4-氨基丁酸等与胁迫相关的代谢物同时增加(Murch等1997),处理期间NADPH与NADP⁺比值提高。上述这些物质的变化均属于胁迫生理现象(Murch等1997)。把胡萝卜培养在不含TDZ等生长调节物质的培养基中,增补锌、铜或钠可诱导体胚发生(Kiyosue等1990)。根据以上情况,可以猜测,在TDZ作用下,植物组织中代谢物含量和矿物质含量相对提高,这些都是外植体对抗胁迫的反应。由此看来,TDZ诱导体胚发生可能是植物克服胁迫的体现(徐晓峰和黄学林2003)。

2.4 影响细胞分化 TDZ对体胚发生的作用与其对细胞的分化有密切关系。将TDZ处理的首蓓愈伤组织进行体胚诱导悬浮培养1周后,TDZ处理的首蓓愈伤组织难以摇散,始终保持块状细胞团结构,组织切片等可见到许多不规则的管状分子,还见到类似于器官发生早期的组织结构(黄学林等1994;黎茵2003)。

2.5 影响蛋白质成分 在体胚发生过程中,TDZ也会影响基因的差异表达,从而影响蛋白质成分的变化。在首蓓愈伤组织继代期间,用TDZ替代KT,体胚发生明显受抑制。分析蛋白质结果发现,TDZ处理的首蓓愈伤组织中30.8~63.1 kDa的8种多肽成分发生改变,其中30.8、39.8和63.1 kDa多肽为TDZ处理的愈伤组织所特有(黄学林等

1994;黎茵2003)。但TDZ处理引起的蛋白质组分变化与愈伤组织胚性之间的关系还有待进一步探讨。

综上所述,目前虽然人们对TDZ影响体胚发生的作用机制已有了部分解释,但还有许多问题仍值得深入探讨,尤其是在分子生物学水平上迄今尚无实验。

参考文献

- 陈肖英,叶庆生,刘伟(2003). TDZ研究进展. 亚热带植物科学, 32: 59~63
- 黄学林,李筱菊,傅家瑞,劳彩玲(1994). Thidiazuron对首蓓愈伤组织的乙烯生成及其体细胞胚胎发生的影响. 植物生理学报, 20: 367~372
- 黎茵(2003). 首蓓体胚发生调控及SYFP491基因的转化(学位论文). 广州:中山大学生命科学学院
- 林荣双,王庆华,梁丽琨,肖显华(2002). TDZ诱导花生幼叶的不定芽和体细胞胚胎发生. 植物研究, 23: 169~172
- 刘亚菊,殷红,朱四易(2003). 塞二唑苯基脲在平贝母脱分化过程中引起的生理生化变化. 西北植物学报, 23: 433~437
- 孙清荣,刘庆忠,赵瑞华(2003). 西洋梨叶片直接再生体细胞胚. 园艺学报, 30: 85~86
- 魏岳荣(2005). 香蕉(*Musa spp.*)胚性细胞悬浮培养及其超低温保存和植株再生的研究[学位论文]. 广州:中山大学生命科学学院
- 徐华松,徐九龙,黄学林(1996). TDZ在植物组织培养中的作用. 广西植物, 16: 77~80
- 徐晓峰,黄学林(2003). TDZ:一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报, 20: 227~237
- 杨业正(1991). TDZ与植物细胞和组织培养. 贵州农业科学, 6: 43~46
- 张宝红,李秀兰(1995a). TDZ(thidiazuron)在棉花组织培养中的效应. 作物学报, 21: 253~258
- 张宝红,李秀兰(1995b). 棉花组织培养中植株再生技术的研究. 西北农业学报, 8: 42~47
- 张志宏,景士西,王关林(1997). TDZ对苹果叶片离体再生不定芽的效应. 植物生理学通讯, 33: 420~423
- 赵桂兰,刘艳芝,尹爱平(1998). 大豆花药培养中胚状体萌发的研究. 科学通报, 43: 1512~1516
- 周俊彦,郭扶兴(1990). 苯基脲衍生物的细胞分裂素活性. 植物生理学通讯, 4: 7~13
- Akula C, Akula A, Drew R (2003). Somatic embryogenesis in clonal neem, *Azadirachta indica* A. Juss. and analysis for *in vitro* azadirachtin production. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 39: 304~310
- Arndt F, Rusch R, Stilfried HV (1976). SN49537, a new cotton defoliant. Plant Physiol, 57: 99~104

- Ashok KHG, Murthy HN, Paek KY (2003). Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Sci Hortic*, 98: 213~222
- Biddington NL (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul*, 11: 173~187
- Chang C, Chang WC (1998). Plant regeneration from callus of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. *Plant Cell Rep*, 17: 251~255
- Chen JT, Chang WC (2000). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Sci*, 160: 87~93
- Chen JT, Chang WC (2001). Effect of auxin and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explant of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Growth Regul*, 34: 229~232
- Chen JT, Chang WC (2003). Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 40: 290~293
- Chengalrayan K, Mhaske VB, Hazra S (1997). High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. *Plant Cell Rep*, 16: 783~786
- Cvikrova M, Meravy L, Machackova I (1991). Phenylalanine ammonia-lyase, phenolic acid and ethylene in alfalfa (*Medicago sativa* L.) cell cultures in relation to their embryogenic ability. *Plant Cell Rep*, 10: 251~255
- Feher A, Pastermak TP, Dudits D (2003). Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 74: 201~228
- Gallo-Meagher M, Green J (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 68: 253~256
- Huan LYT, Takamura T, Tanaka M (2004). Callus formation and plant regeneration through embryo structures in *Cymbidium orchid*. *Plant Sci*, 166: 1443~1449
- Hutchinson MJ, Krisharaj S, Saxena PK (1997a). Inhibitory effect of GA₃ on the development of TDZ-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium × hortorum*) hypocotyles cultures. *Plant Cell Rep*, 16: 435~438
- Hutchinson MJ, Murr DP, Krisharaj S (1997b). Does ethylene play a role in TDZ-regulated somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium × hortorum*) hypocotyles cultures. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 33: 136~141
- Hutchinson MJ, Saxena PK (1996a). Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Rep*, 15: 512~515
- Hutchinson MJ, Saxena PK (1996b). Role of purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium × hortorum*) hypocotyl cultures. *Physiol Plant*, 98: 517~522
- Iantcheva A, Vlahova M, Bakalova E, Elliott MC, Atanassov A (1999). Regeneration of diploid annual medics *via* direct somatic embryogenesis promoted by thidiazuron and benzylaminopurine. *Plant Cell Rep*, 18: 904~910
- Ishii Y, Takamura T, Goi M (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep*, 17: 446~450
- Jimenez VM, Bangerth F (2001). Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 67: 37~46
- Kepezynski J, Mchersie BD, Brown DCW (1992). Requirement of ethylene for growth of callus and somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. *J Exp Bot*, 43: 1199~1204
- Kiyosue T, Takano K, Kamada H (1990). Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can J Bot*, 68: 2301~2303
- Li ZJ, Traore A, Maximova S, Gultinan MJ (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 34: 293~299
- Malik KA, Saxena PK (1992). TDZ induces high-frequency shoot regeneration in intact seedling of soybean (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*). *Aust Plant Physiol*, 19: 731~740
- Mithila J, Hall JC, Victor JM, Saxena PK (2003). Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl). *Plant Cell Rep*, 21: 408~414
- Mok MC, Mok DWS (1985). The metabolism of carbon-14 thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. *Physiol Plant*, 65: 627~632
- Mok MC, Mok DWS, Armsstrong DJ (1982). Cytokin activity of *N*-phenyl-*N*-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry*, 21: 1509~1511
- Murch SJ, Krishnaraj S, Saxena PK (1997). Thidiazuron-induced morphogenesis of Regal geranium (*Pelargonium domesticum*): A potential stress response. *Physiol Plant*, 101: 183~191
- Murch SJ, Saxena PK (1997). Modulation of mineral and fatty acid profiles during TDZ mediated somatic embryogenesis in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *J Plant Physiol*, 151: 358~361
- Murch SJ, Saxena PK (1999). The role of proline in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 5: 102~105

- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998). Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 34: 267~275
- Murthy BNS, Saxena PK (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Plant Cell Rep*, 17: 469~475
- Nagata R, Kawachi E, Hashimoto Y (1993). Cytokinin-specific binding protein in etiolated mung bean seedlings. *Biochem Biophys Res Commun*, 19: 543~549
- Nhut DT, Le BV, Minh NT, Silva JT, Fukai S, Tanaka M, Van KTT (2002). Somatic embryogenesis through pseudo-bulb-let transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regul*, 37: 193~198
- Park SY, Murthy HN, Paek KY (2003). Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Sci*, 164: 919~923
- Rajesh MK, Radha E, Karun A, Parthasarathy VA (2003). Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm—the effect of exogenous polyamines. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 75: 41~47
- Shibli RA, Shatnawi M, Abu-Elin, Al-Juboory KH (2001). Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (*Olea europea* L.). *Sci Hort*, 88: 243~256
- Singh ND, Sahoo L, Sarin NK, Jaiwal PK (2003). The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Plant Sci*, 164: 341~347
- Thomas JC, Katterman FR (1986). Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiol*, 81: 681~683
- Tibok A, Blackhall NW, Power JB, Davey MR (1995). Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. *Plant Sci*, 110: 139~145
- Üniversitesi D, Fakültesi FE, Bölümü B, Turkey D (2000). Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf explants of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Turk J Bot*, 24: 91~95
- Victor JMR, Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK (1999). Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: the role of thidiazuron and N⁶-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. *Plant Growth Regul*, 28: 9~15
- Victor JMR, Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1996). Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regul*, 28: 41~47
- Visser C, Quresni JA, Gill R, Saxena PK (1992). Morphoregulatory role of TDZ. Substitution of auxin and cytokin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyls cultures. *Plant Physiol*, 99: 1704~1707
- Wann SR, Johnson MA, Noland TL, Carlson JA (1987). Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic cells of *Picea abies* (L.) Karsk. *Plant Cell Rep*, 6: 39~44
- Xie XM, Chen XY, Han LB (2001). Plant regeneration in *Eucalyptus pellita*. *Forestry Studies China*, 3: 7~14
- Zhang CL, Chen DF, Elliott MC, Slater A (2001). Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *In Vitro Cell Deve Biol-Plant*, 37: 305~310
- Zhou JY, Ma H, Guo FX (1994). Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 36: 73~79