

## 糖、GA<sub>3</sub> 及 ABA 对印度娃儿藤 (*Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill) 体细胞胚发生的影响

# Effect of Sugars, Gibberellic Acid and Abscisic Acid on Somatic Embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill\*\*

T. Dennis Thomas\* 张玉霞 译

Postgraduate and Research Department of Botany, St. Thomas College, Pala, Arunapuram (P. O.), Kottayam (Dt.), PIN- 686 574, Kerala, India

**摘 要** 从印度娃儿藤节间外植体获取愈伤组织,分析了糖、赤霉素(GA<sub>3</sub>)及脱落酸(ABA)对愈伤组织形成体细胞胚的影响。实验证明,含 4 μmol/L 2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D)的 MS 培养基是获得具有成胚功能的愈伤组织的最佳培养基。在含有 6 μmol/L 激动素(Kn)的 MS 培养基上,高达 69%的愈伤组织分化为体细胞胚,平均单位外植体(每克愈伤组织)产胚 25 个。在 6 μmol/L Kn 存在的条件下,分析了蔗糖、葡萄糖对胚产生的影响,不同的糖及不同糖浓度对体细胞胚的发生影响很大。6 μmol/L Kn 与 200 mmol/L 蔗糖处理胚胎发生率最大(71%),单位外植体生成 49 个胚。然而葡萄糖与 Kn、或者葡萄糖、蔗糖与 Kn 三者加在一起则降低成胚率及产胚数。一定浓度的 GA<sub>3</sub> 和 ABA 能促进体细胞胚的产生。在含 200 mmol/L 蔗糖的培养基中加 10 μmol/L GA<sub>3</sub> 胚的生成率为 98%,单位外植体产胚 51 个。在含 200 mmol/L 蔗糖的培养基中加 2 μmol/L ABA 能显著增加体细胞胚的量,该培养基上每外植体平均生成 44 个胚,产率为 95%。本研究显示,含 200 mmol/L 蔗糖的培养基中分别加入 6 μmol/L Kn、10 μmol/L GA<sub>3</sub> 或者 2 μmol/L ABA 能显著提高印度娃儿藤体细胞胚发生率,而单独的葡萄糖或葡萄糖和蔗糖则有抑制作用。得到的胚均能正常发育并分化为植株。

**关键词** ABA, GA<sub>3</sub>, 体细胞胚, 糖, 印度娃儿藤

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0465-07

**Abstract** The effect of sugars, gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and abscisic acid (ABA) on somatic embryogenesis from internodal explant-derived callus of *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill has been investigated. Embryogenic calli were produced from internodal explants and the best result was achieved by using MS medium supplemented with 4 μmol/L 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). Up to 69% of such embryogenic calli differentiated into somatic embryos with an average of 25 embryos per explant (per gram of the calli) on Murashige and Skoog (MS) medium containing 6 μmol/L kinetin (Kn). The individual effect of sucrose and glucose together with 6 μmol/L Kn was evaluated. There was a significant difference among concentrations of sugar and among kinds of sugar tested in somatic embryogenesis. Sucrose at 200 mmol/L with 6 μmol/L Kn gave rise to a maximum embryogenesis (71%) with an average of 49 embryos per explant. However, glucose together with 6 μmol/L Kn or a combination of glucose, sucrose and 6 μmol/L Kn reduced the percentage of embryogenesis culture and the number of embryos per explant. The presence of GA<sub>3</sub> and ABA at particular concentrations promoted somatic embryogenesis in *T. indica*. The addition of 10 μmol/L GA<sub>3</sub> into the 200 mmol/L sucrose-containing medium gave a 98% embryogenesis response with an average of 51

Received: November 28, 2005; Accepted: February 20, 2006.

\* Corresponding author. Tel: 91-4822-212316, 17; Fax: 91-4822-216313; E-mail: den-thuruthiyil@yahoo.com

**Abbreviations** ABA: abscisic acid; 2, 4-D: 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid; GA<sub>3</sub>: gibberellic acid; Kn: kinetin; MS: Murashige and Skoog.

\*\*本文英文原文请浏览本刊英文版: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>

embryos per explant. Somatic embryogenesis was significantly enhanced by the addition of  $2\mu\text{mol/L}$  ABA to  $200\text{mmol/L}$  sucrose-containing medium. On this medium 95% embryogenesis with an average of 44 embryos per explant was observed. The study reported here indicates that  $200\text{mmol/L}$  sucrose with  $6\mu\text{mol/L}$  Kn,  $200\text{mmol/L}$  sucrose with  $10\mu\text{mol/L}$  GA<sub>3</sub> and  $200\text{mmol/L}$  sucrose with  $2\mu\text{mol/L}$  ABA significantly improved somatic embryogenesis in *T. indica* whereas glucose alone or in combination with sucrose had an inhibitory role. The embryos obtained developed normally and were easily converted into plants.

**Key words** abscisic acid, gibberellic acid, somatic embryos, sugar, *Tylophora indica*

用生物技术方法能克服许多传统植物育种的不足。体细胞胚是植物基因工程和体外人工育种中最重要和最简便的系统。它能减少植物繁殖的时间,降低种子遗传突变频率。因此许多研究致力于一些植物的体细胞胚发生,也有专门研究生理及生化因子对诱导和形成一些作物的体细胞胚发生影响的报道<sup>[1,2]</sup>。

印度娃儿藤是一种有毒的医药用藤本植物,该植物的叶和根都含有具有很高药理学活性的娃儿藤生物碱和娃儿藤次碱,研究发现该植物还具有治疗支气管哮喘、通便、促使发汗和祛痰的作用<sup>[3]</sup>。由于不合理的过度开发利用,该植物的野生种数量在以惊人的速度下降。印度娃儿藤一般是以种子繁殖,由于异花授粉,该植物品种严重杂合。由于种子成活力和萌发率非常低,使得该植物不易以种子进行扩大繁殖,因此,利用可靠的无性繁殖体系代替种子繁殖,可以很好的满足药用需求,并且可以保存这种珍贵的药用植物资源。体外无性繁殖对保存和繁殖娃儿藤生物碱和娃儿藤次碱含量高的基因型非常有利。植物组织培养为以后的遗传操作和提取特异的植物次生代谢产物奠定了基础。印度娃儿藤芽培养<sup>[4]</sup>、愈伤组织培养和原生质体培养等已有多篇报道<sup>[5-10]</sup>,体细胞胚发生的研究也已有报道<sup>[11,12]</sup>。但这些都是初步的探索研究,大量获得体细胞胚还需进行更深入的研究和更完善的技术体系。Chaudhuri<sup>[12]</sup>等人的研究为获得该植物大量体细胞胚的可能性提供了有力的依据。许多研究表明糖、GA<sub>3</sub>和ABA在不同的组织培养系统中对胚芽的生长起到了积极的作用<sup>[13-16]</sup>。但是不同浓度的糖、GA<sub>3</sub>和ABA对体细胞胚的形成还没有研究报道。因此,在本研究中我们报道了糖、GA<sub>3</sub>和ABA对印度娃儿藤体细胞胚的形成的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料处理

从校园附近的田里选取健壮植株的节间部分,

用1% Savlon 溶液(含溴棕三甲铵,一种洗涤剂和消毒剂;Johnson and Johnson,美国)充分洗涤 10min 后用无菌双蒸水彻底冲洗干净。节间部分 0.1% (V/V)升汞表面消毒 5min 后,用无菌双蒸水漂洗 3 次。

### 1.2 实验方法

处理好的节间部分切成 1cm 左右的小段放于加有  $4\mu\text{mol/L}$  2, 4-D 的无菌 Murashige Skoog (1962)<sup>[17]</sup> 培养基(MS 培养基)以诱生具有成胚功能的愈伤组织。MS 培养基添加 0.8% (W/V)的琼脂(Qualigens, Mumbai India)用于培养实验。生长调节因子添加到培养基中用 1mol/L NaOH 调节 pH 到 5.8。所有培养基都在  $121^\circ\text{C}$ 、 $103\text{kPa}$  条件下灭菌 20min。GA<sub>3</sub> 和 ABA 过滤除菌后加至灭过菌的培养基中。所有培养均在  $24^\circ\text{C}$ , 光照 16h/8h (白天/夜间)的条件下进行,光源为冷白色荧光灯(Philips, India)。实验为完全随机设计,每种处理 24 个培养,所有试验重复 3 次。每支试管装 15mL 培养基及 1mg 愈伤组织进行胚发生实验,在立体显微镜下计数每管生成的体细胞胚。

生长于含有  $4\mu\text{mol/L}$  2,4-D 的 MS 培养基上的愈伤组织转接于不同浓度的 6-苄基腺嘌呤(2、4、6、8  $\mu\text{mol/L}$ )和 Kn(2、4、6、8  $\mu\text{mol/L}$ )的培养基上进行体细胞胚的发生并计算体细胞胚的发生率和单位外植体(例如,1g 愈伤组织)产生的体细胞胚数。

为比较蔗糖和葡萄糖各自浓度对体细胞胚发生的影响,约 1mg 愈伤组织分别移到含有  $6\mu\text{mol/L}$  Kn 和 0、50、100、200、300 mmol/L 的蔗糖及  $6\mu\text{mol/L}$  Kn 和 0、50、100、200、300 mmol/L 葡萄糖的培养基上。

为比较不同浓度蔗糖与葡萄糖、GA<sub>3</sub> 或 ABA 诱导体细胞胚发生的影响,添加 0、50、100、200 和 300mmol/L 蔗糖与 0、50、100、200、300mmol/L 葡萄糖 + Kn( $6\mu\text{mol/L}$ ) 或 0、50、100、200、300mmol/L 蔗糖与 0、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$  GA<sub>3</sub> 或 0、50、100、200、300mmol/L 蔗糖与 0、0.5、1、2、5 $\mu\text{mol/L}$  ABA 于诱

导培养基,培养 45d 后计体细胞胚的数目。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最佳愈伤组织培养条件

含  $4\mu\text{mol/L}$  2, 4-D 的 MS 培养基对愈伤组织的诱导效果最佳,高于或低于此浓度都会使效果降低(数据未列出)。在正常光照培养 45d 后,节间外植体即长出生长良好的微黄色具有成胚功能的愈伤组织。随后每 45 天更换 1 次 MS 培养基(含  $4\mu\text{mol/L}$  2, 4-D)。

### 2.2 BAP、Kn、蔗糖、葡萄糖等对印度娃儿藤体细胞胚发生的影响

为了诱导胚的发生,将愈伤组织转移到含不同浓度 BAP 或 Kn 的 MS 培养基上。在以上两种培养基上,胚胎生成率及单位外植体上体细胞胚的数目都很低,但含 Kn 的 MS 培养基效果优于 BAP,其中含  $6\mu\text{mol/L}$  Kn 的 MS 培养基效果最好(图 1 A, B)。在含  $6\mu\text{mol/L}$  Kn 的 MS 培养基上,69% 的外植体出胚(图 2 A),平均 25 胚/外植体(图 2 B)。外植体培养 15d 后即可观察到胚的形成,微黄色的愈伤在胚形成前即变绿。体细胞胚的分化是连续的、非同步的,而且形态学上未发生异常变化。为了进一步提高胚胎生成效率,我们比较了不同浓度蔗糖、葡萄糖分别与  $6\mu\text{mol/L}$  Kn 组合的效果。结果表明,当培养基中蔗糖浓度逐渐提高至  $200\text{mmol/L}$  时,单位外植体产生体细胞胚的数目逐渐增大,再提高蔗糖浓度则数目逐渐减小。当培养基中蔗糖浓度为  $200\text{mmol/L}$  时,单位外植体产生胚 49.2 个,产胚率达到最大,为 71.2% (图 3)。蔗糖是诱导体细胞胚发生的常用糖类,已报道其能在胡萝卜<sup>[13]</sup>、茄属植物<sup>[14]</sup>、黑色鸢尾<sup>[18]</sup> 和西伯利亚人参<sup>[19]</sup> 等植物中起作用。不同浓度的葡萄糖单独或与蔗糖结合使用都能减少胚的生成。产胚百分率和单位外植体产生体细胞胚的数目随葡萄糖浓度的增高而降低(从  $50\mu\text{mol/L}$  到  $300\mu\text{mol/L}$ ) (图 4)。葡萄糖与蔗糖共同使用也会降低反应特性频率(图 5 A、5 B)。由此可见,葡萄糖单独或与蔗糖一起使用都会抑制系统中体细胞胚的形成。碳水化合物通常在较低浓度时起作用,因此其主要生理作用可能是影响胚胎的形成过程,而非提供能源<sup>[20]</sup>。高浓度的糖类(大于或等于  $300\text{mmol/L}$ ) 通常抑制体细胞胚的形成,其机制可能为糖类通过改变渗透压来调节代谢<sup>[21]</sup>。在许多系统中,糖浓度不仅影响体细胞胚的形成,而且还关系到体细胞胚的分化、植株的生根以及器官的形成<sup>[22-24]</sup>。



图 1 印度娃儿藤节间愈伤组织不同阶段体细胞胚的发生

Fig. 1 Different stages of somatic embryogenesis

from internodal callus of *T. indica*

A: well developed friable embryogenic calli just before embryogenesis on MS medium supplemented with  $6\mu\text{mol/L}$  Kn. Bar: 5mm; B: somatic embryos developing from the internodal calli on MS medium supplemented with  $6\mu\text{mol/L}$  Kn. A stage slightly advanced than Fig. 1A. Bar: 6mm; C: an early stage of the cotyledonary somatic embryo on MS medium supplemented with  $2\mu\text{mol/L}$  ABA and  $200\text{mmol/L}$  sucrose. Bar:  $1000\mu\text{m}$ ; D: a close up view of the different stages of somatic embryo on MS medium supplemented with  $2\mu\text{mol/L}$  ABA and  $200\text{mmol/L}$  sucrose. Bar:  $1000\mu\text{m}$ .

### 2.3 不同浓度的 GA<sub>3</sub> 和蔗糖对印度娃儿藤体细胞胚形成的影响

本实验中  $200\text{mmol/L}$  的蔗糖和  $10\mu\text{mol/L}$  的 GA<sub>3</sub> 能够明显刺激体细胞胚的形成。在含  $200\text{mmol/L}$  蔗糖的培养基中加  $10\mu\text{mol/L}$  GA<sub>3</sub> 胚生成率为 98%, 单位外植体产胚 51 个(图 6A、B)。在不同蔗糖浓度

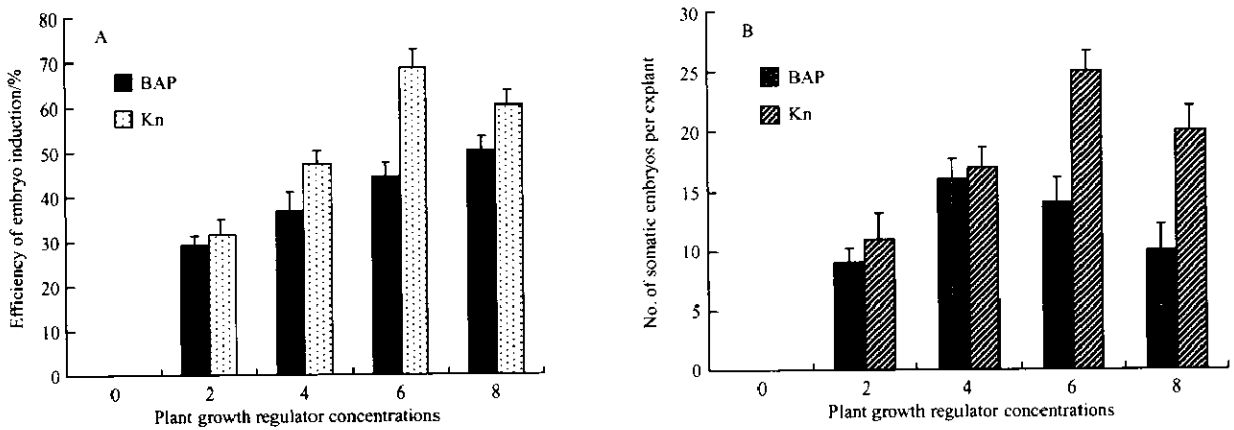


图 2 不同浓度 BAP 和 Kn 对印度娃儿藤胚发生期间胚诱导效率(A)和单位外植体产胚数量(B)的影响

Fig. 2 The influence of different concentrations of BAP and Kn on the efficiency of embryo induction (A) and the number of embryos per explant (B) during embryogenesis in *T. indica*

(Results expressed as means of three replicates  $\pm$  SD. Sucrose concentration 300 mmol/L. Culture period 45d.

Control: 6  $\mu$ mol/L Kn and 300 mmol/L sucrose.)

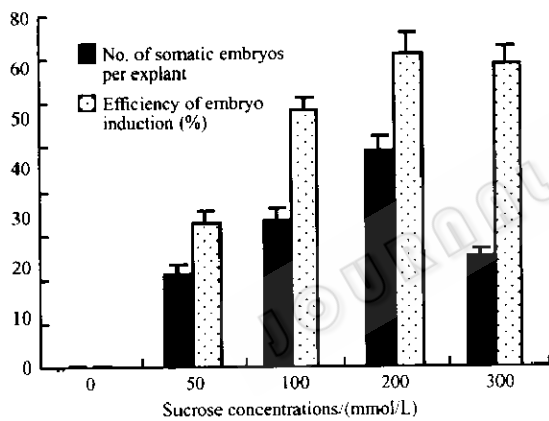


图 3 添加在 6  $\mu$ mol/L Kn 的不同浓度的蔗糖对印度娃儿藤胚胎发生期间胚诱导效率和单位外植体产胚数的影响

Fig. 3 The influence of different concentrations of sucrose together with 6  $\mu$ mol/L Kn on number of somatic embryos per explant and efficiency of embryo induction during embryogenesis in *T. indica*

(Results expressed as means of three replicates  $\pm$  SD.

Culture period 45 d. Control: 6  $\mu$ mol/L Kn and 300 mmol/L sucrose.)

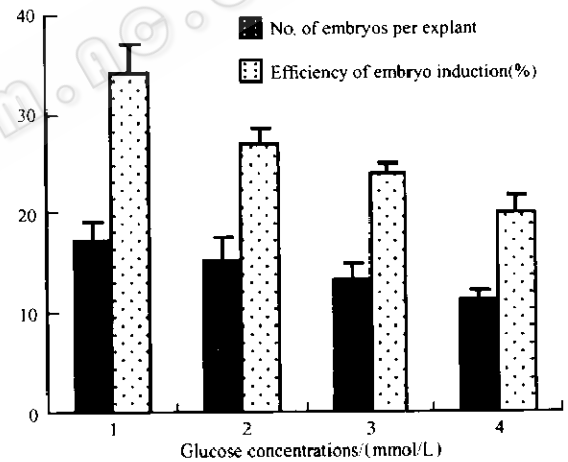


图 4 在 6  $\mu$ mol/L ABA 存在条件下不同浓度的葡萄糖对印度娃儿藤胚胎发生期间胚诱导效率和单位外植体产胚数量的影响。

Fig. 4 The influence of different concentrations of glucose together with 6  $\mu$ mol/L Kn on number of embryos per explant and the efficiency of embryo induction (%) during embryogenesis in *T. indica*.

(Results expressed as means of three replicates  $\pm$  SD.

Culture period 45 d.)

时,GA<sub>3</sub> 超过 10 $\mu$ mol/L 和低于 10 $\mu$ mol/L 都会导致体细胞胚的数量略有减少。在早期印度娃儿藤的体细胞胚的研究中,每克愈伤组织最多可以获得 29.5 个体细胞胚,本研究表明,更高的体细胞产率可以通过

调整 GA<sub>3</sub> 和蔗糖的含量达到。类似结果在其他系统也有报道<sup>[15, 25, 26]</sup>。然而,也有报道表明在体细胞胚的生成中 GA<sub>3</sub> 有负面效果,GA<sub>3</sub> 对不同植物有不同的作用效果<sup>[27-29]</sup>。

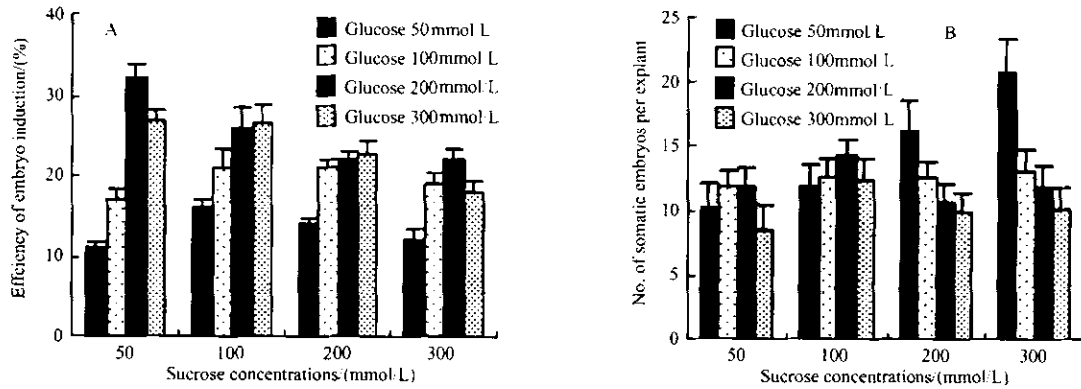


图 5 不同浓度的蔗糖、葡萄糖和 6 $\mu$ mol/L Kn 对印度娃儿藤胚胎发生期间胚诱导效率(A)及单位外植体产胚数量(B)的影响。

Fig. 5 The influence of different concentrations of glucose, sucrose and 6 $\mu$ mol/L Kn on efficiency of embryo induction (A) and the number of embryos per explant (B) during embryogenesis in *T. indica* (Results expressed as means of three replicates (SD. Culture period 45 d.)

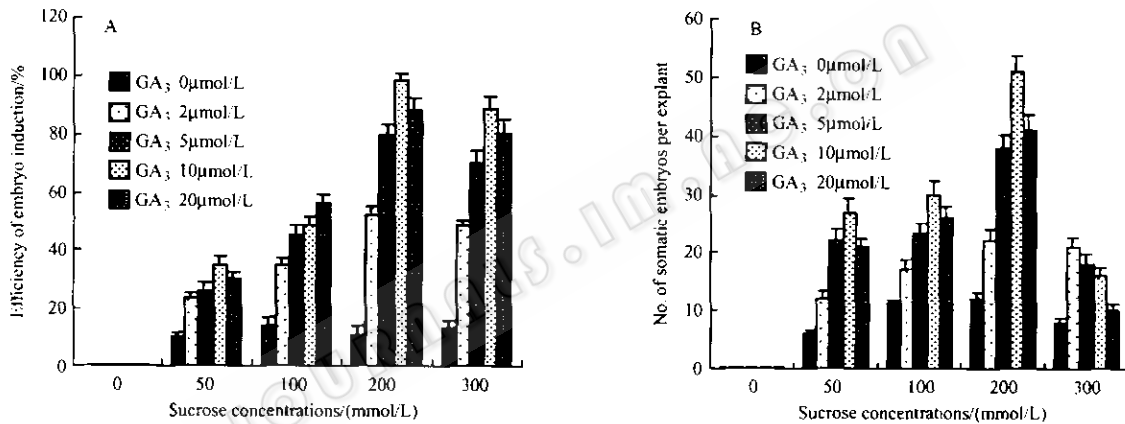


图 6 不同浓度的蔗糖和 GA<sub>3</sub> 对印度娃儿藤胚胎发生期间胚诱导效率(A)及单位外植体产胚数量(B)的影响

Fig. 6 The influence of different concentrations of sucrose and GA<sub>3</sub> on the efficiency of embryo induction (A) and the number of embryos per explant (B) during embryogenesis in *T. indica*

(Results expressed as means of three replicates  $\pm$  SD. Culture period 45 d. Control: 6 $\mu$ mol/L Kn and 300mmol/L sucrose.)

#### 2.4 不同浓度的 ABA 和蔗糖的组合在诱导体细胞胚的形成中的影响

当应用 2 $\mu$ mol/L ABA 和 200mmol/L 蔗糖组合时, 体细胞胚的形成的反应特性最大(Fig. 1 C, D)。在含 200 mmol/L 蔗糖的培养基中加入 2 $\mu$ mol/L ABA 能显著增加体细胞胚的量。该培养基上单位外植体平均生成 44 个胚, 产率为 95% (Fig. 7A、B)。ABA 能促进在 *Picea abies*<sup>[16]</sup>, *Hevea brasiliensis*<sup>[30]</sup> 和 *Cucumis melo*<sup>[19]</sup> 中的体细胞胚形成。ABA 的存在可以明显减少不必要的成熟体细胞胚的反复成胚, 而且也不影响胚萌发<sup>[31]</sup>。在诱发橡树 (*Hevea brasiliensis*) 的体细胞胚的形成时需要低水平的内生 ABA<sup>[32]</sup>, 然而胡萝

卜 (*Daucus carota*) 中高浓度的 ABA 也能够促进体细胞胚的形成<sup>[33]</sup>。经 ABA 处理后, 人参 (*Panax ginseng*) 75% 的胚可以分化生根, 而无 ABA 处理的胚则不能分化生根<sup>[34]</sup>。有人推论 ABA 抑制多胚的分裂和单胚的形成与进一步分化<sup>[35]</sup>。ABA 在植物胚形成中很多过程都起到重要的作用<sup>[36]</sup>, 包括能够抑制萌芽提前发生<sup>[37]</sup>、胚胎形态的形成和对干旱环境的耐受性<sup>[38, 39]</sup>。

体细胞胚分化成为小植株后转移到塑料瓶, 并在温室中[室温(26  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C; 相对湿度 90%]培养 3 个月, 最终有 94% 的植株存活下来(图 8)。所有存活下来的植株移到大田中可以正常生长。

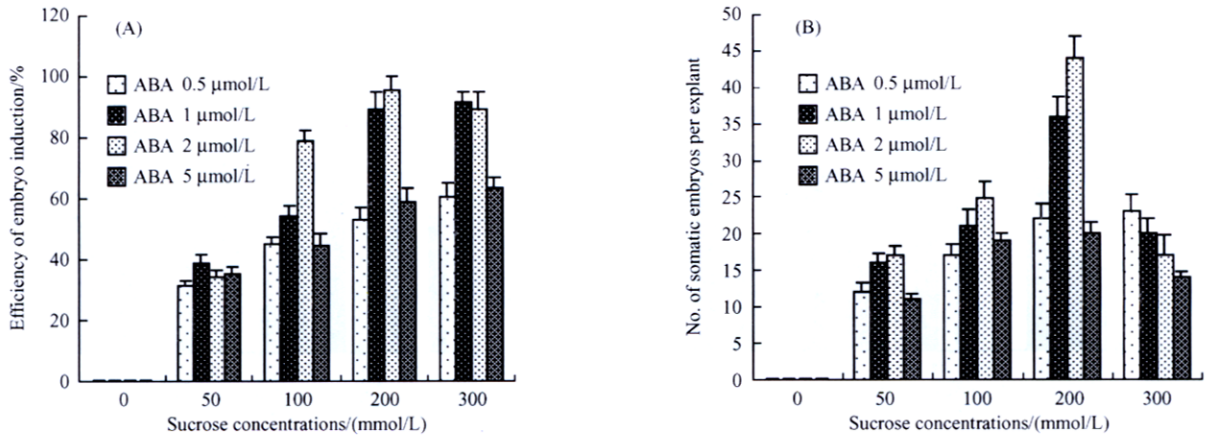


图7 不同浓度的蔗糖和 ABA 对印度娃儿藤胚胎发生期间胚诱导效率(A)及单位外植体产胚数(B)的影响

Fig. 7 The influence of different concentrations of sucrose and ABA on the efficiency of embryo induction (A) and the number of embryos per explant (B) during embryogenesis in *T. indica*

(Results expressed as means of three replicates ( SD. Culture period 45 d. Control: 6 μmol/L Kn and 300 mmol/L sucrose.)



图8 印度娃儿藤体细胞胚分化出植株,分化小苗种在塑料杯中3个月后移栽至大田

Fig. 8 Somatic embryo derived *T. indica* plants growing in plastic cups three months after transfer to field(Bar: 0.5cm)

### 3 小结

本实验表明了糖类、ABA 和  $GA_3$  对体细胞胚形成的重要性,印度娃儿藤、特定浓度的  $GA_3$  和 ABA 能够促进体细胞胚的形成。在所应用的两个糖中,高浓度的蔗糖能够促进体细胞胚的形成,然而葡萄糖对其有抑制作用。类似的是,  $10\mu\text{mol/L}$   $GA_3$  与  $200\text{mmol/L}$  蔗糖和  $2\mu\text{mol/L}$  ABA 与  $200\text{mmol/L}$  蔗糖能够促进体细胞胚的形成。本研究为获得印度娃儿藤体细胞胚提供了一个有效的实验技术。

致谢 感谢印度科技部青年科学项目(No. SR/FTP/LSA-06/2002)对本研究的支持,同时感谢印度

Pala 学院 St. Thomas 主任为本研究提供了必要的实验条件。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Merkle SA, Parrot WA, Flinn BN. Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *in vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, pp.155 - 203
- [2] Benelli C, Fabbri A, Grassi S *et al.* Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olive europaea* L.). *J Hort Sci Biotechnol*, 2001, **76**:112 - 119
- [3] Varier PS. Indian Medicinal Plants. Vol I. India: Orient Longman, New Delhi, 1993
- [4] Sharma N, Chandel KPS. Effect of ascorbic acid on axillary shoot induction in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1992, **29**:109 - 113

- [5] Rao PS, Narayanaswamy S, Benjamin BD. Differentiation *ex oculo* of embryos and plantlets in stem tissue cultures of *Tylophora indica*. *Physiol Plant*, 1970, **23**:140 - 144
- [6] Rao PS, Narayanaswamy S. Investigations in callus cultures of *Tylophora indica*. *Physiol Plant*, 1972, **27**:271 - 276
- [7] Benzamine BD, Heble MR, Chadha MS. Alkaloid synthesis in tissue culture regenerated plants of *Tylophora indica* Merr. (Asclepiadiaceae). *Z Pflanzenphysiol*, 1972, **92**:77 - 84
- [8] Mhatre M, Bapat VA, Rao PS. Plant regeneration in protoplast cultures of *Tylophora indica*. *J Plant Physiol*, 1984, **115**: 231 - 235
- [9] Faisal M, Anis M. Rapid mass propagation of *Tylophora indica* Merrill via leaf callus culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2003, **75**: 125 - 129
- [10] Faisal M, Anis M. An efficient *in vitro* method for mass propagation of *Tylophora indica*. *Biol Plant*, 2005, **49**:257 - 260
- [11] Jayanthi M, Mandal PK. Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plants in *Tylophora indica* (Burm. f. Merrill.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2001, **37**:576 - 580
- [12] Chaudhuri KN, Ghosh B, Jha S. The root: a potential new source of competent cells for high frequency regeneration in *Tylophora indica*. *Plant Cell Rep*, 2004, **22**:731 - 740
- [13] Gleddie S, Keller W, Setterfield G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (egg plant). *Can J Bot*, 1983, **61**:656 - 666
- [14] Verma DC, Dougall DK. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiol*, 1977, **59**:81 - 85
- [15] Rudus I, Kepczynska E, Kepczynski J. Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul*, 2002, **36**:91 - 95
- [16] Arnold S von, Hakman I. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). *J Plant Physiol*, 1988, **132**:164 - 169
- [17] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, **15**:473 - 497
- [18] Shibli RA, Ajlouni MM. Somatic embryogenesis in the endemic black iris. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2000, **61**:15 - 21
- [19] Choi YE, Jeong JH. Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservations of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. *Plant Cell Rep*, 2002, **20**:1112 - 1116
- [20] Kochba J, Spiegel-Roy P, Saad S *et al*. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* tissue culture by galactose. *Naturwissenschaften*, 1978, **65**:261 - 262
- [21] Nakagawa H, Saijyo T, Yamauchi N *et al*. Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Sci Hort*, 2001, **90**:85 - 92
- [22] Mamiya K, Sakamoto Y. Effects of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. *Sci Hort*, 2000, **84**:15 - 26
- [23] Conner AJ, Falloon PG. Osmotic versus nutritional effects when rooting *in vitro* asparagus minicrown on high sucrose media. *Plant Sci*, 1993, **89**:101 - 106
- [24] Harada T, Yakuwa T. Studies on the morphogenesis of Asparagus VI. Effect of sugar on callus and organ formation in the *in vitro* culture of shoot segments of the seedlings. *J Fac Agr Hokkaido Univ*, 1983, **61**:307 - 314
- [25] Hita O, Lafarga C, Guerra H. Somatic embryogenesis from chick pea (*Cicer arietinum* L.) immature cotyledons: the effect of zeatin, gibberellic acid and indole -3- butyric acid. *Acta Physiol Plant*, 1997, **19**:333 - 338
- [26] Shimizu K, Nagaike H, Yabuya T *et al*. Plant regeneration from suspension culture of *Iris germanica*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, **50**:27 - 31
- [27] Fujimura T, Komamine A. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci Lett*, 1975, **5**:359 - 369
- [28] Noma M, Huber J, Pharis RP. Quantitation of gibberellins and the metabolism of [<sup>3</sup>H] gibberellin A, during somatic embryogenesis in carrot and anise cell cultures. *Planta*, 1979, **155**:369 - 376
- [29] Mikula A, Wilbik W, Rybczynski JJ. Wplyw regulatorow wzrostu na somatyczna embriogeneza *Gentiana* sp w kulturach *in vitro*. II Ogolnopolska Konferencja "Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roslin". 1998, **13**:141 - 154
- [30] Linossier L, Veisseire P, Cailloux F *et al*. Effect of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Sci*, 1997, **124**:183 - 191
- [31] Mauri PV, Manzanera JA. Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2004, **40**:495 - 498
- [32] Etienne H, Berger A, Carron MP. Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis. *Physiol Plant*, 1991, **82**:213 - 218
- [33] Kiyosue T, Takano K, Kamada H *et al*. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can J Bot*, 1990, **68**: 2301 - 2303
- [34] Langhansova L, Konradova H, Vanek T. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Rep*, 2004, **22**:725 - 730
- [35] Durzan DJ, Gupta PK. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglasfir cell suspension cultures. *Plant Sci*, 1987, **52**:229 - 235
- [36] Quatrano RS. Regulation of gene expression by abscisic acid during angiosperm embryo development. *Plant Mol Cell Biol*, 1986, **3**: 467 - 477
- [37] Kermode AR. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 1990, **9**:155 - 195
- [38] Skriver K, Mundy J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 1990, **2**:503 - 512
- [39] Hetherington AM, Quatrano RS. Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytol*, 1991, **119**:9 - 32