

百合类体细胞胚和体细胞胚的形态学与组织学研究

吴泽¹, 钟雄辉¹, 曹兴², 官本贺¹, 程运河¹, 陈全全¹, 义鸣放^{1,*}

(¹ 中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100193; ² 聊城大学农学院, 山东聊城 252059)

摘要: 以东方百合 ‘Siberia’ 的无菌苗叶柄为试材, 诱导产生初始分生结节组织。其后对分生结节组织进行分化再生采用体式显微镜观察和石蜡切片分析的方法对诱导得到的类体细胞胚和体细胞胚再生结构进行形态学和组织学观察。百合类体细胞胚结构呈球形至心形结构或芽状, 组织内部主要由薄壁细胞组成, 与母体组织存在着明显的维管组织联系, 具有多个维管组织中心, 其外形与体细胞胚极为相似。百合体细胞胚发源于分生结节表面新生的胚性愈伤组织, 经历球形、椭圆形和子叶形胚阶段发育形成完整的植株, 在整个发育过程中与母体愈伤组织在整个发育过程中无维管组织联系, 且它的根芽两极同时发生, 相互联系。研究表明, 两种再生结构虽然具有极相似的外观形态, 但是在发育方式和内部组织结构上截然不同。

关键词: 百合; 分生结节; 类体细胞胚; 体细胞胚

中图分类号: S 682.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 08-1716-07

Morpho-histological Study of Somatic Embryo-like Structures and Somatic Embryos in Lily

WU Ze¹, ZHONG Xiong-hui¹, CAO Xing², GONG Ben-he¹, CHENG Yun-he¹, CHEN Quan-quan¹, and YI Ming-fang^{1,*}

(¹Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ²College of Agricultural Science, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China)

Abstract: Petioles of lily were used as explants to induce primary nodular callus. Then, somatic embryo-like structures were induced from the primary nodular callus and somatic embryos were induced from the proliferated nodular callus, a systematic morpho-histological study was conducted for showing the differences of the two regenerated structures by microscope observation and paraffin section analysis. The somatic embryo-like structures were globular to oval-shaped or similar to shoots, and consisted of parenchymatous cells. Histological observations indicated their connection with the maternal tissue by evident vascular strands and the existence of multiple vascular centers during morphogenesis. These structures closely resembled somatic embryos in appearance. Somatic embryos derived from the newly embryonic callus situated at the surface of the proliferated nodular callus, and the early-stage somatic

收稿日期: 2014 - 04 - 24; 修回日期: 2014 - 06 - 09

基金项目: 农业部 ‘948’ 项目 (2011-G17); 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (200903020)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: ymfang@cau.edu.cn)

embryos were formed by embryonic cells. Somatic embryo grew into a complete plantlet after passing through globular, oval and cotyledonary-shaped stages. Histological observations did not reveal any vascular connections with the maternal tissue during the whole development process. Moreover, the shoot pole and root pole of them appeared simultaneously, their connection was built up through a single vascular bundle. Therefore, even much similar appearance between the two regenerated structures, their development manners and organizational structures totally differ.

Key words: lily; nodular callus; somatic embryo-like structure; somatic embryo

植物体细胞胚再生方式具有普遍发生、遗传稳定、适于作为外源基因转化受体系统等优点, 因而是原生质体培养、人工种子制作、优良无性系繁殖、突变体筛选和植物基因工程等理想的实验体系。目前国内外关于体细胞胚发生的研究报道较多, 在百合上也有不少有关基因型(胡凤荣 等, 2007; Bakhshaie et al., 2010)、植物生长调节剂(Nhut et al., 2001; Wang et al., 2008; 王杰 等, 2008; 翟彦 等, 2011)和培养方式(Pelkonen & Kauppi, 1999; Nhut et al., 2006)等对体细胞胚诱导的影响及体细胞胚发生的研究报道, 但是大部分的研究只是凭肉眼观察到的形态特征来判断是否属于体细胞胚, 未进行组织细胞学验证(Nhut et al., 2002; 胡凤荣 等, 2007; Khosravi et al., 2007; 翟彦 等, 2011; 孙安妮 等, 2012); 有些研究虽然进行了组织切片观察, 但是缺少体细胞胚完整发育的过程观察(刘选明和屈姝存, 1997; Tribulato et al., 1997; Nakano et al., 2000; Nhut et al., 2001; 王杰 等, 2008), 结果将许多外观类似于体细胞胚但属于器官发生方式的类体细胞胚的发生归为体细胞胚的发育方式, 造成了混淆, 从而不利于对百合体细胞胚发育的理论研究和体胚途径的遗传转化体系的建立。体细胞胚发育过程不仅是细胞分裂和外部形态上的改变, 更重要的是其内部组织器官的不断分化和发育(何业华 等, 2012), 因此, 结合形态学从组织细胞学的层面, 系统地研究体胚发生发育的全过程, 不仅有利于揭示细胞全能性, 以及体胚的起源与发育机理, 也可建立真正的体胚再生形式的高效遗传转化受体系统提供细胞学依据。

本试验中以东方百合‘Siberia’无菌苗的叶柄组织为外植体诱导产生分生结节组织, 进而对分生结节组织进行增殖和分化再生, 对其分化再生过程中所产生的类体细胞胚结构和体细胞胚进行系统的形态学和组织细胞学的研究, 以期明确类体胚与体胚的区别以及不同再生方式的诱导条件和技术, 为今后在百合上建立真正的体胚再生的高效遗传转化体系奠定理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为 2011 年购自于北京盛斯通生态科技有限公司的东方百合‘Siberia’的种球, 经组织培养得到的无菌苗叶柄组织; 试验在中国农业大学观赏园艺与园林系的观赏植物栽培生理与生物技术实验室进行。

从 4 °C 冷库中取出百合健壮种球, 剥取中层及内层无病斑的鳞片, 洗净后置于 4% 的百菌清溶液, 将洗净后的百合鳞片置于其中浸泡 3 h 灭菌, 流水冲洗 5 h。在超净工作台中用 75% 的酒精浸泡 30 s, 然后用 1% 的次氯酸钠溶液振荡处理 15 min, 再用无菌水冲洗至干净。将百合鳞片放置在双层无菌滤纸上吸干水分后, 从其基部切取 1 cm × 1 cm 大小的组织接种于基本 MS 培养基上, 温度条件 25 °C, 光周期为 16 h/8 h, 光照强度为 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。诱导分化产生不定芽, 其后将不定芽转接到新鲜的基本 MS 培养基上诱导其生根形成无菌苗植株, 每月更换 1 次新鲜的培养基。

1.2 百合分生结节组织的诱导

取健壮百合无菌苗的叶柄，切割成 1 cm 左右的小段，接种于含有 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Picloram 与 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 的 MS 培养基上诱导产生分生结节组织（瘤状愈伤组织）。25 °C 黑暗条件下培养，2 周继代 1 次，培养两个月。

1.3 百合类体细胞胚结构的诱导

取诱导培养两个月的外植体上的初始分生结节组织直接转移到不含植物生长调节剂的 MS 培养基上 25 °C 16 h/8 h 光周期条件下培养 5 周，每 2 周继代 1 次，诱导产生类体细胞胚结构和不定芽。

1.4 百合体细胞胚的诱导

取诱导培养两个月的外植体上的初始分生结节组织转移至附加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Picloram 的液体 MS 培养基中增殖，全光照（光照强度为 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）条件下 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 悬浮培养，每 2 周更换 1 次新鲜培养基。4 周后从液体培养基中取出生长状态良好的分生结节组织，转移到含有同样组分的固体再生培养基上，25 °C 16 h/8 h 光周期，每 2 周继代 1 次。增殖后的分生结节在再生培养基上会分化产生胚性愈伤组织和早期的体细胞胚组织，此时将其转移到基础 MS 培养基使其发生体细胞胚的增殖和分化。

1.5 形态学与细胞学观察方法

诱导分化再生过程中每隔 1 周取样观察。形态学观察采用 OLYMPUS 体式显微镜，组织细胞学切片采用常规的石蜡切片方法，染色方法采用铁矾—苏木精染色法和 PAS 染色法（胡适宜，1994）。

2 结果与分析

2.1 类体细胞胚的分化再生

百合无菌苗叶柄外植体初始分生结节组织在基本 MS 培养基上分化再生时，观察到了一种特殊的再生方式，一些绿色的表面光滑的球形、心形结构直接从瘤状愈伤组织上产生，然后快速膨大（图 1，A），外观类似于体细胞胚的结构，但是结构之间独立发生，界限明显。这些类体细胞胚结构在其后的培养过程中可以逐渐分化（图 1，B、C）形成完整的植株。

组织细胞学切片显示这些绿色的球形、心形的类体细胞胚结构直接从愈伤组织中分化产生，主要是由非胚性的薄壁细胞构成，且与母体组织有着直接的维管组织联系（图 1，D、E），其内部存在多个维管组织中心（图 1，F）。随着这些维管组织中心的分化，在随后的培养中这些结构会显示出明显的双极性，这种双极性的分化特性与体细胞胚很相似，但是它们的双极性分化是不同步的。类体细胞胚结构的芽极与根极相互独立，两极之间没有直接的维管组织的联系。至培养的末期，类体细胞胚结构的多个维管组织中心会建立起统一的维管联系，使其根极与芽极联系起来成为一个整体（图 1，G）。

组织学研究发现这些发育成熟的类体细胞胚结构由芽原基、叶原基和根原基组织组成，是一个完整的植株结构。在培养过程中，芽极首先出现，随后迅速扩展，叶片伸展，最后根原基生根形成，成为一个完整的植株。

根据组织学切片的结果推断，这种发生和发育方式实质上可被视为不定芽发生的方式，即这些类体细胞胚结构从分生结节组织中长，各自成为一个独立的分化个体进行细胞和组织的分化，最终形成一个双极性的完整的百合植株。

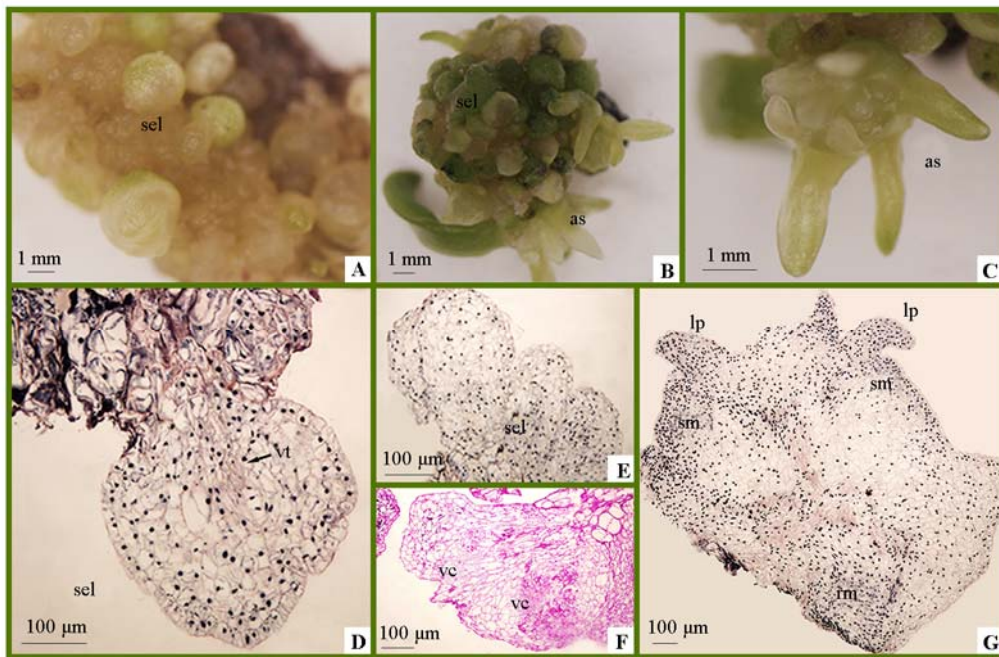


图 1 百合类体细胞胚的形态和组织结构观察

A: 类体细胞胚组织团; B: 类体细胞胚组织团上可以形成不定芽组织; C: 一个独立的再生不定芽; D: 一个球形的类体细胞胚结构纵切图, 可见其主要是由薄壁细胞组成, 与母体组织存在维管组织联系 (箭头所示); E: 一些发育中的类体细胞胚结构具有球形或心形的结构; F: 类体细胞胚具有多个维管组织中心; G: 类体细胞胚结构发育而来的植株存在双极性。
as: 不定芽; lp: 叶原基; rm: 根原基; sel: 类体细胞胚结构; sm: 芽原基; vc: 维管中心; vt: 维管组织。

Fig. 1 Morpho-histological observation of somatic embryo-like structures

A: Group of somatic embryo-like structures; B: Clump of somatic embryo-like structures and shoots regeneration from them; C: A shoot developing from somatic embryo-like structure; D: Longitudinal section of a globular somatic embryo-like structure, the globular somatic-like structure is composed of parenchymal cells, showing a vascular connection with the mother tissue (arrow); E: Longitudinal section of some more developed somatic embryo-like structures showing the globular or heart shape; F: Transverse section of a somatic embryo-like structure showing multiple vascular centers; G: Longitudinal section of a regenerated plant showing a bipolar structure.

as: Adventitious shoot; lp: Leaf primordial; rm: Root meristem; sel: Somatic embryo-like structure;

sm: Shoot meristem; vc: Vascular center; vt: Vascular tissue.

2.2 体细胞胚的分化再生

百合无菌苗叶柄外植体增殖后的分生结节组织可以再分化产生新的愈伤组织 (图 2, A), 这些愈伤组织可以再分化形成不定芽和体细胞胚。再生培养基上培养 4 周后可见一些球状透明组织出现在淡黄色的新生愈伤组织表面 (图 2, B), 组织学切片发现这些淡黄色的愈伤组织内含有的胚性细胞和非胚性细胞 (图 2, D), 属胚性愈伤组织, 而在这些胚性愈伤组织表面出现的球状透明组织即为早期的体细胞胚 (图 2, E)。通过切片分析发现, 体细胞胚起源于胚性愈伤组织表面的胚性细胞, 这些细胞体积明显小于内部的非胚性细胞, 且细胞核大, 细胞质浓。将含有胚性细胞的愈伤组织转移到基础 MS 培养基上, 可以观察到大量球形和椭圆形的体细胞胚产生 (图 2, C)。当球形胚发育至椭圆形胚阶段时, 可以明显观察到其中央部位为密集的分裂旺盛的分生组织细胞, 这些细胞核大、体积小、胞质浓, 构成了体细胞胚的生长中心, 是体胚发育两极分化的生长点, 此时即可见胚的两极性分化 (图 2, F)。这些体细胞胚进一步发育可以形成子叶形胚 (图 2, C), 此时的胚状体明显拉长, 细而尖的一端为芽端, 粗而钝圆的一端为根端 (图 2, G), 并可见明显的维管组织分化, 将根芽两极相互连接, 此时其在外形上与百合的合子胚十分相似 (图 2, G、I)。随着子叶形胚的进一步发育, 形成成熟的体细胞胚结构, 可见子叶和芽原基的分化 (图 2, H)。在体细胞胚分化再

生的同时, 还有大量的不定芽分化产生, 其不定芽发生的方式与母体存在有维管组织的联系 (图 2, J)。

本试验中诱导产生体细胞胚的发生属于体细胞胚的间接发生方式, 体细胞胚由胚性愈伤组织中的胚性细胞分化形成, 在形成的起始阶段由细胞核显著的胚性细胞构成, 细胞小而一致, 结构紧凑与母体愈伤组织没有维管组织的联系, 独立发育; 体细胞胚分化后期形成单一的维管组织连接根芽两极, 芽端与根端同时分化产生。

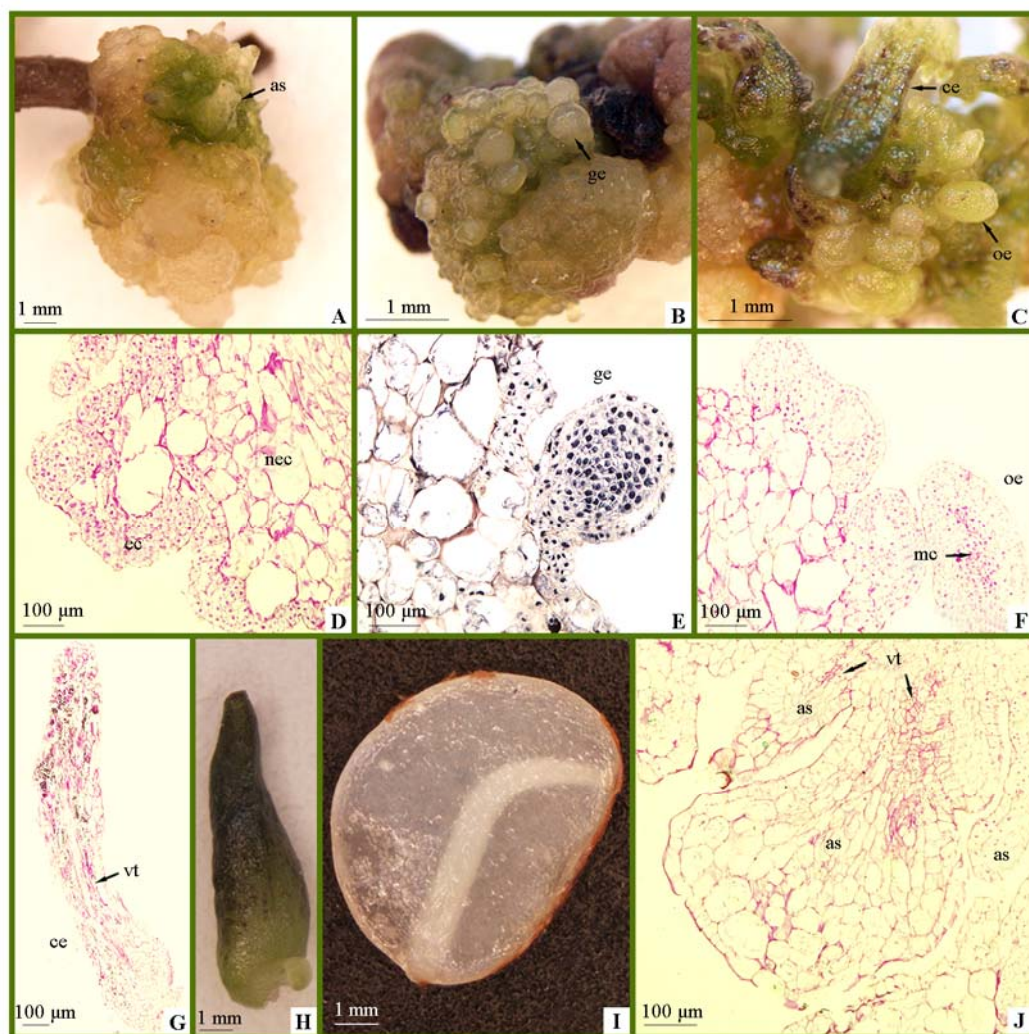


图 2 百合成熟分生结节分化产生体细胞胚和不定芽的形态和组织结构观察

A: 在增殖后的分生结节组织表面产生新生的愈伤组织, 同时还有不定芽在其表面发生 (箭头所示); B: 愈伤组织表面存在一团球状透明的早期体细胞胚组织; C: 椭圆形和子叶形胚; D: 胚性愈伤组织; E: 纵切球形胚阶段体细胞胚;

F: 纵切椭圆形体细胞胚存在明显的分生中心; G: 子叶形胚存在维管束的分化, 表现出明显的双极性;

H: 分离出来的单个子叶形胚; I: 合子胚; J: 非胚性愈伤组织表面产生的不定芽组织。

as: 不定芽; ce: 子叶形胚; ec: 胚性细胞; ge: 球形胚; mc: 分生中心; nec: 非胚性细胞; oe: 椭圆形胚; vt: 维管组织。

Fig. 2 Morpho-histological observation of somatic embryogenesis and organogenesis from the proliferated nodule

A: Adventitious shoots (arrow) and new callus formed at the periphery of the nodules; B: Group of globular somatic embryos (arrow) on the surface; C: Oval-shaped and cotyledonary embryos (arrow); D: Embryonic callus; E: Longitudinal section of a globular somatic embryo; F: Longitudinal section of an oval-shaped somatic embryo showing a single meristematic center (arrow); G: Longitudinal section of a cotyledonary embryo, showing bipolarity of meristematic regions; H: Single detached cotyledonary embryo; I: Zygotic embryo; J: Adventitious shoots regenerating from non-embryonic callus. as: Adventitious shoot; ce: Cotyledonary embryo; ec: Embryonic cell; ge: Globular embryo;

mc: Meristematic center; nec: Non-embryonic cell; oe: Oval embryo; vt: Vascular tissue.

3 讨论

Haensch (2004) 曾在天竺葵 (*Pelargonium × hortorum* Bailey) 下胚轴的组织培养诱导产生体细胞胚的过程中, 发现类胚结构, 将之称为类体细胞胚结构 (Somatic embryo-like structure)。之后, 在其他植物的组织培养中, 如草莓 *Fragaria × ananassa* (Omar et al., 2013)、西番莲 *Passiflora edulis* (Rocha et al., 2012)、番红花 *Crocus sativus* (Sharifi et al., 2010)、猕猴桃 *Actinidia deliciosa* (Popielarska-Konieczna et al., 2011)、凤梨 *Vriesea reitzii* (Dal Vesco & Guerra, 2010) 等也有类体细胞胚结构发生的报道, 说明这种结构的发生在植物组织培养过程中是普遍存在的现象。

Haensch (2004) 研究发现, 类体细胞胚与体细胞胚具有相似的外观, 使其极易与真正的体细胞胚混淆, 常被误认为就是体细胞胚组织, 但是其发育的方式及内部组织结构完全不同。根据 Zimmerman (1993) 的体细胞胚发生理论, 体细胞胚发生于胚性细胞, 其过程中不产生与母体组织相联系的维管组织, 与植物合子胚的发育过程类似, 具有两极性的发生形式, 因此类体细胞胚的发生方式是不符合体细胞胚发生理论的。本研究的结果与 Haensch (2004) 和 Zimmerman (1993) 的结论一致。在百合上也观察到类体细胞胚结构, 虽然其在外形上与体细胞胚相似, 表面光滑, 呈球形或心形结构, 且发育后期在基本 MS 培养基上可形成双极性的结构, 随后发育形成完整的植株, 但是, 通过组织学切片观察发现类体细胞胚结构发生于非胚性的愈伤组织, 与母体组织存在着维管组织的联系, 且其早期结构组成主要是薄壁细胞而非胚性细胞。根据前人的理论和本研究的结果, 认为百合的类体细胞胚发育应该是一种属于不定芽发生的发育方式。另一方面, 诱导得到了真正的体细胞胚组织, 通过形态学观察发现典型的百合体细胞胚再生的全过程是, 胚性细胞发育, 经历球形胚、椭圆形和子叶形胚阶段, 发育形成完整植株; 通过组织学切片证明百合体细胞胚在发育过程中与原始的母体组织不出现维管组织的联系, 体细胞胚个体独立发育, 形成双极性的结构, 由一个分生组织中心发育形成根端和芽端, 其发育过程具有与合子胚发育相似的形态学和组织学特征 (Ikeda et al., 2003)。试验中还发现百合体细胞胚发育过程中的形态变化与其他单子叶非禾本科的植物具有相似性, 未出现在双子叶植物体细胞胚发育过程中常见的心形胚结构, 而是球形胚进一步发育形成椭圆形胚结构 (Lilien-Kipnis & Ziv, 1994; Suzuki & Nakano, 2001)。

总之, 在进行体细胞胚诱导的相关研究时, 不能仅凭形态学的外观相似和组织学上存在双极性的结构就确定是否是体细胞胚的发生方式, 必须进行深入的组织细胞学的研究, 这样才能在真正意义上建立起百合体细胞胚发生的体系, 为今后良种繁育、基因改良和基因工程等研究工作奠定基础。

References

- Bakhshaie M, Babalar M, Mirmasoumi M, Khalighi A. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an endangered species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102 (2): 229 – 235.
- Dal Vesco L L, Guerra M P. 2010. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. *Scientia Horticulturae*, 125 (4): 748 – 755.
- Haensch K T. 2004. Morpho-histological study of somatic embryo-like structures in hypocotyl cultures of *Pelargonium × hortorum* Bailey. *Plant Cell Reports*, 22 (6): 376 – 381.
- He Ye-hua, Fang Shao-qi, Hu Zhong-yi, Ma Jun, Luo Ji, Wu Cheng-hou, Cao Li, Lu Min, Chen Cheng-jie. 2012. Morphological and anatomical analysis of pineapple somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (1): 57 – 63. (in Chinese)
- 何业华, 方少秋, 胡中沂, 马 均, 罗 吉, 伍成厚, 曹 莉, 卢 敏, 陈程杰. 2012. 菠萝体细胞胚发育过程的形态学和解剖学研究. *园艺学报*, 39 (1): 57 – 63.
- Hu Feng-rong, Xi Meng-li, Liu Guang-xin, Chi Jian, Shi Ji-sen. 2007. Study on organogenesis and somatic embryogenesis of oriental lily. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 31 (2): 5 – 8. (in Chinese)

- 胡凤荣, 席梦利, 刘光欣, 池 坚, 施季森. 2007. 东方百合的器官发生与体胚发生研究. 南京林业大学学报: 自然科学版, 31 (2): 5 - 8.
- Hu Shi-yi. 1994. Method of preparation of slides for simultaneous demonstrations of starch grains, proteins and lipid bodies in plant tissues. Chinese Bulletin of Botany, 11: 49 - 51. (in Chinese)
- 胡适宜. 1994. 植物胚胎学实验方法. 植物学通报, 11: 49 - 51.
- Ikeda N, Niimi Y, Han D S. 2003. Production of seedlings from ovules excised at the zygote stage in *Lilium* spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73 (2): 159 - 166.
- Khosravi S, Azghandi A V, Mojtahedi N, Haddad R. 2007. *In vitro* propagation of *Lilium longiflorum* var. ceb-dazzle through direct somatic embryogenesis. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10 (15): 2517 - 2521.
- Lilien-Kipnis H, Ziv M. 1994. Scaled-up proliferation and regeneration of Nerine in liquid cultures Part II. Ontogeny of somatic embryos and bulblet regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 39 (2): 117 - 123.
- Liu Xuan-ming, Qu Shu-cun. 1997. *In vitro* induction of indefinite buds and somatic embryos from scale leave of tetraploid 'Longya Lily'. Acta Horticulturae Sinica, 24 (4): 353 - 358. (in Chinese)
- 刘选明, 屈姝存. 1997. 百合鳞片叶离体诱导形成不定芽和体细胞胚. 园艺学报, 24 (4): 353 - 358.
- Nakano M, Sakakibara T, Suzuki S, Saito H. 2000. Decrease in the regeneration potential of long-term cell suspension cultures of *Lilium formosanum* Wallace and its restoration by the auxin transport inhibitor, 2,3,5-triiodobenzoic acid. Plant Science, 158 (1): 129 - 137.
- Nhut D T, Hanh N T M, Tuan P Q, Nguyen L T M, Tram N T H, Chinh N C, Nguyen N H, Vinh D N. 2006. Liquid culture as a positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of *Lilium longiflorum*. Scientia Horticulturae, 110 (1): 93 - 97.
- Nhut D T, Van Le B, Minh N T, de Silva J T, Fukai S, Tanaka M, Van K T T. 2002. Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. Plant Growth Regulation, 37 (2): 193 - 198.
- Nhut D T, Van Le B, Van K T T. 2001. Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37 (1): 44 - 49.
- Omar G F, Mohamed F H, Haensch K T, Sarg S H, Morsey M M. 2013. Somatic embryo-like structures of strawberry regenerated *in vitro* on media supplemented with 2,4-D and BAP. Indian Journal of Experimental Biology, 51 (9): 739 - 745.
- Pelkonen V P, Kauppi A. 1999. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. International Journal of Plant Sciences, 160 (3): 483 - 490.
- Popielarska-Konieczna M, Kozieradzka-Kiszkurno M, Bohdanowicz J. 2011. Cutin plays a role in differentiation of endosperm-derived callus of kiwifruit. Plant Cell Reports, 30 (11): 2143 - 2152.
- Rocha D I, Vieira L M, Tanaka F A O, Da Silva L C, Otoni W C. 2012. Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 111 (1): 69 - 78.
- Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, Karimi M. 2010. Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron-induced multiple shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 46 (3): 274 - 280.
- Sun An-ni, Zhang Yan-long, Niu Li-xin, Wang Xian-zhi, Cui Ya-jing, Wang Run-feng. 2011. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Lilium leucanthum*. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 20 (8): 142 - 146. (in Chinese)
- 孙安妮, 张延龙, 牛立新, 王仙芝, 崔雅静, 王润丰. 2012. 宜昌百合体细胞胚诱导及植株再生. 西北农业学报, 20 (8): 142 - 146.
- Suzuki S, Nakano M. 2001. Organogenesis and somatic embryogenesis from callus cultures in *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37 (3): 382 - 387.
- Tribulato A, Remotti P, Löffler H, van Tuyl J. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. Plant Cell Reports, 17: 113 - 118.
- Wang Jie, Liu Guo-feng, Bao Man-zhu, Huang Li. 2008. Adjustment of the status of embryogenic callus and plant regeneration of *Lilium longiflorum*. Acta Horticulturae Sinica, 35 (12): 1795 - 1802. (in Chinese)
- 王 杰, 刘国锋, 包满珠, 黄 莉. 2008. 麝香百合胚性愈伤组织状态的调整与植株再生. 园艺学报, 35 (12): 1795 - 1802.
- Wang S S, Wang J G, Fan J P, Che D D. 2008. Somatic embryogenesis in lily bulb scale cultures. Journal of Northeast Agricultural University: English Edition, 15 (4): 11 - 14.
- Zhai Yan, Zhang Zong-qin, Jia Min, Wang Yan, Song Xi-de, Zhou Lei. 2011. Plant regeneration and somatic embryogenesis of *Lilium* spp. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 31 (4): 834 - 841. (in Chinese)
- 翟 彦, 张宗勤, 贾 敏, 王 岩, 宋西德, 周 雷. 2011. 百合体细胞胚胎发生和植株再生. 西北植物学报, 31 (4): 834 - 841.
- Zimmerman J L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. The Plant Cell, 5 (10): 1411.