

大豆子叶节高频愈伤组织诱导及其植株再生

孙明杰, 魏玄, 邹丹丹, 赵春梅, 蔡春梅, 薛仁镐

(青岛农业大学 生命科学院, 山东 青岛 266109)

摘要:以萌发7 d的大豆子叶节切断及其切片为外植体,研究了萌发培养基、不同激素及其配比对大豆子叶节愈伤组织诱导与分化的影响。结果表明:当不添加BA时,在子叶节切断处几乎无愈伤组织的产生,只有添加BA时,才能产生愈伤组织。外植体切取方式、愈伤组织诱导培养基中BA和TDZ的浓度对比对愈伤组织诱导率产生很大影响。BA浓度为 $0.05 \sim 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,TDZ浓度为 $0.04 \sim 0.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,子叶节切断外植体的愈伤组织诱导率较低,平均不到20%;BA浓度为 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和TDZ浓度为 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织诱导率最高,达到50%;而以子叶节切片为外植体时,愈伤组织诱导率得到极大提高,平均达到85%以上,最高可达95%。将诱导的愈伤组织转到含有不同浓度BA的分化培养基上诱导不定芽发生,BA浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不定芽诱导率最高可达21.4%。

关键词:大豆;子叶节切断;子叶节切片;愈伤组织;植株再生

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)04-0546-06

High Frequency Induction of Callus from Soybean Cotyledonary Node Explants and Its Plant Regeneration

SUN Ming-jie, WEI Xuan, ZOU Dan-dan, ZHAO Chun-mei, CAI Chun-mei, XUE Ren-gao

(Department of Life & Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China)

Abstract: Effects of germination medium and different concentration ratios of BA and TDZ on the callus induction and plant regeneration were studied using fragments and slices of 7 day-germinated soybean cotyledonary nodes as explants. The result showed that the callus formation occurred from the cotyledonary node fragments only when it was cultured on germination medium containing BA. There were significant differences in callus induction frequencies among different explants, different concentration ratios of BA and TDZ on callus induction medium. The induction frequency of callus was low for cotyledonary node fragment explants (average less than 20%) under the combination concentration of BA ($0.05 \sim 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and TDZ ($0.04 \sim 0.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), the highest induction frequency (50%) was obtained when cotyledonary node fragments were cultured on callus induction medium containing $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA and $0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ. However, the induction frequency of callus was significantly enhanced by using the cotyledonary node slices as explants (average more than 85%), the highest frequency reached 95%. The callus induced was transferred to differentiation medium containing BA for shoot induction. The highest induction frequency of shoots (21.4%) was obtained on differentiation medium containing $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA.

Key words: Soybean; Cotyledonary node fragment; Cotyledonary node slice; Callus; Plant regeneration

大豆是重要的世界性粮油作物,大豆组织培养及其遗传转化研究一直受到世界各国学者的普遍重视。通过器官发生和体细胞胚胎发生均能获得大豆再生植株。对于器官发生途径,Cheng等^[1]通过子叶节首次报道获得再生植株。此后,许多学者通过下胚轴^[2]、叶片^[3]、成熟种子胚尖^[4]等外植体获得再生植株。尽管利用器官发生再生体系已经建立了一些转基因体系^[4-6],但由于这些器官发生体系均是通过外植体直接诱导不定芽植株再生,因此,这些转基因体系存在易产生嵌合体、重复性差、效率低等缺点。大豆体细胞胚具有繁殖快、单细胞

起源、两极性等优点,是很好的大豆遗传转化受体系统,但该体系仍存在转化效率低、培养周期长,易变异等问题,同时由于大豆体细胞胚胎发生所用的外植体是未成熟子叶、未成熟胚等^[7-9]未成熟组织,因此,存在取材受季节限制、外植体制备较复杂等缺点。

愈伤组织再生体系与直接再生体系相比具有单细胞起源不易产生嵌合体,重复性好,转化效率高等优点。然而,迄今为止,通过大豆愈伤组织途径获得再生植株报道^[10-11]较少,因此开展并确立高

收稿日期:2011-02-24

基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项资助项目(2008ZX08010-002,2009ZX08010-009B)。

第一作者简介:孙明杰(1984-),女,在读硕士,研究方向为植物分子生物学。E-mail: suen_ming_jie@163.com。

通讯作者:薛仁镐(1965-),男,教授,研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail: xuerengao@163.com。

频大豆愈伤组织再生体系对建立高效大豆转基因技术体系具有重要意义。

该试验以大豆子叶节为外植体,通过对不同激素及其浓度调节,获得了高频愈伤组织及再生植株,为大豆愈伤组织遗传转化体系的建立奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试大豆品种:小粒黄。

1.2 培养基

萌发培养基有 2 种,一种为 MS 无机盐, B_5 有机物, 3% 蔗糖, 0.8% 琼脂 (MSB_5); 另外一种为在上述培养基中再添加激素 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA。愈伤组织诱导培养基为“Finer and Nagasawa”(FNL) 无机盐, B_5 有机物, 3% 蔗糖, 0.8% 琼脂, 添加不同浓度 BA 与 TDZ。继代培养基与诱导培养基相同。分化培养基为 FNL 添加不同浓度的 BA ($0.05 \sim 4.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。生根培养基为 $1/2\text{ MSB}_5$ 。所有的培养基 pH 为 5.8, 121°C 灭菌 20 min。激素 BA 与 TDZ 过滤除菌,待培养基灭菌后降温至 50°C 时加入。

1.3 外植体的制备

挑选籽粒饱满、无病虫害的大豆种子,先用自来水冲洗,然后在超净工作台中用 75% 乙醇消毒 1 min,无菌水冲洗 1 次,再用 0.1% 的升汞溶液浸泡 8~10 min,用无菌水冲洗 3~4 次后,置于萌发培养基中,在 26°C , 16 h 光照/8 h 黑暗环境中培养。培养 7 d 后,从幼苗中制备子叶节外植体。制备的子叶节外植体有 2 种,一种是将 2 片子叶切除,且在子叶节处与轴垂直方向横切去除上胚轴,在下胚轴离子叶节 5 cm 处横切,保留下来的子叶节及下胚轴,称之为子叶节切断外植体;另一种在子叶节处与轴垂直方向横切取厚度约 1 mm 左右的薄片,称之为子叶节切片外植体。

1.4 外植体的培养

1.4.1 愈伤组织的诱导 从 2 种不同萌发培养基中萌发 7 d 的大豆幼苗上切取子叶节切断外植体;而子叶节切片外植体是从添加 BA 的萌发培养基中萌发的幼苗中切取获得。将子叶节切断水平放置到诱导培养基中,每个培养皿中放置 13~16 个外植体,3 次重复;而子叶节切片是将其横切面与愈伤组织诱导培养基接触放置,每个培养皿中放置 35~40 个外植体,3 次重复。培养 12~15 d 后统计结果,记录愈伤组织诱导状况。

愈伤组织诱导率(%) = (诱导愈伤的外植体数/外植体总数) $\times 100$ 。

1.4.2 愈伤组织继代培养 将诱导的愈伤组织切取下来,一部分放到继代培养基中培养,另一部分放到分化培养基中进行不定芽分化实验。

1.4.3 愈伤组织分化 在诱导培养基中诱导出的愈伤组织转移到含有 BA 的分化培养基中培养,30 d 后观察记录分化结果。

不定芽诱导率(%) = (分化不定芽的愈伤数/接种的愈伤总数) $\times 100$ 。

1.4.4 再生苗伸长与生根 分化芽点过多时,适当将组织块切成小块,利于分化芽伸长,过于拥挤不利于再生芽的伸长。分化的小苗抽茎后,长到约 2 cm 左右时,切取转到生根培养基中诱导生根。

2 结果与分析

2.1 萌发培养基对愈伤组织诱导的影响

萌发培养基中 BA 的添加极大影响子叶节愈伤组织诱导。将大豆种子放在不含有 BA(图 1A)和含有 BA(图 1B)的 2 种萌发培养基上萌发 7 d 后,从幼苗中分别制备子叶节切断外植体并置于愈伤组织诱导培养基上诱导愈伤组织发生。在萌发培养基中不添加 BA 时,子叶节切断几乎无愈伤组织产生(数据未列);而只有在 BA 存在条件下萌发获得的子叶节

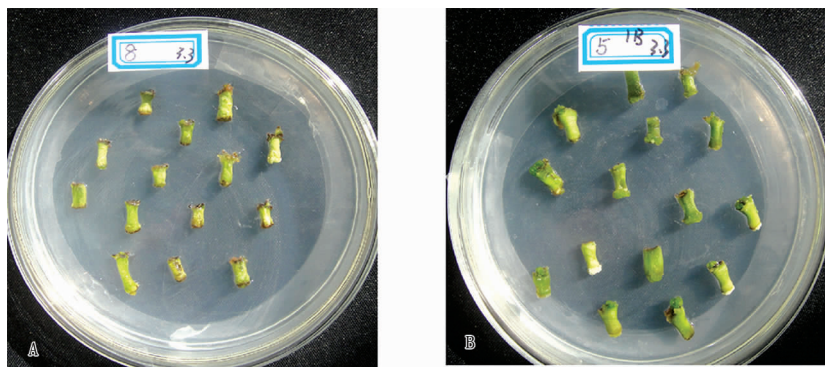


图 1 萌发培养基对愈伤组织诱导的影响

Fig. 1 Effect of germination medium on callus induction

切断才能形成愈伤组织。可见萌发培养基中 BA 对后续子叶节切断诱导愈伤组织起重要作用。

2.2 不同浓度 BA 与 TDZ 比对愈伤组织诱导的影响

为诱导愈伤组织,在愈伤组织诱导培养基中共做了 18 种 BA 和 TDZ 不同浓度配比处理,不同激素配比处理下的子叶节切断愈伤组织诱导率存在差

异。在 TDZ 浓度为 $0.04\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,配合 BA 浓度为 0.05 或 $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,未能诱导出愈伤组织;其它处理诱导率在 $7.1\% \sim 50.0\%$ 范围内;在 TDZ 浓度为 $0.08\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、BA 浓度为 $0.25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤诱导率达到最高,为 50% 。以上结果表明,BA 和 TDZ 在大豆子叶节愈伤组织诱导中具有协同作用。

表 1 不同浓度 BA 与 TDZ 对比对子叶节切断愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different concentration ratios of BA and TDZ on induction of callus induced from cotyledonary node fragments

外植体总数 Total number of explants	TDZ 浓度 Concentration of TDZ / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	BA 浓度 Concentration of BA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	愈伤组织诱导率 Callus induction frequencies/%	质量 Qualities
42	0.04	0.05	0	
42	0.04	0.10	0	
40	0.04	0.15	27.3	+
40	0.04	0.20	12.5	++
41	0.04	0.25	20.0	++++
41	0.04	0.30	15.0	+
40	0.08	0.05	7.1	+
40	0.08	0.10	7.1	+
43	0.08	0.15	50.0	++
42	0.08	0.20	30.8	++
42	0.08	0.25	23.1	++++
42	0.08	0.30	21.3	++
41	0.12	0.05	22.0	+
40	0.12	0.10	21.4	++
40	0.12	0.15	18.2	+
40	0.12	0.20	25.0	++
40	0.12	0.25	33.3	++++
40	0.12	0.30	24.5	++

外植体总数为子叶节切断在 3 次重复试验中的平均数。

Total number of explants were the average of 3 times repeat experiments.

诱导出的愈伤组织状态多样,有的呈淡黄色,松软,无光泽,生长较快;有的呈浅黄绿色,松软,无光泽;有的呈深绿色,致密,表面光滑,生长较慢。图 2 外植体的上部切断处为子叶节处,下部为下胚轴处。红色箭头所指处为深绿色,致密,表面光滑的愈伤;白色箭头所指处为淡黄色,松软,无光泽愈

伤。在后续试验中观察得知,只有那些致密光滑深绿色愈伤组织,才能在后续培养中分化出不定芽。根据致密光滑深绿色愈伤组织的多少,将愈伤组织质量分级,“+”越多表明质量越好,从表 1 可知,在 BA 浓度为 $0.25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织质量普遍较好。

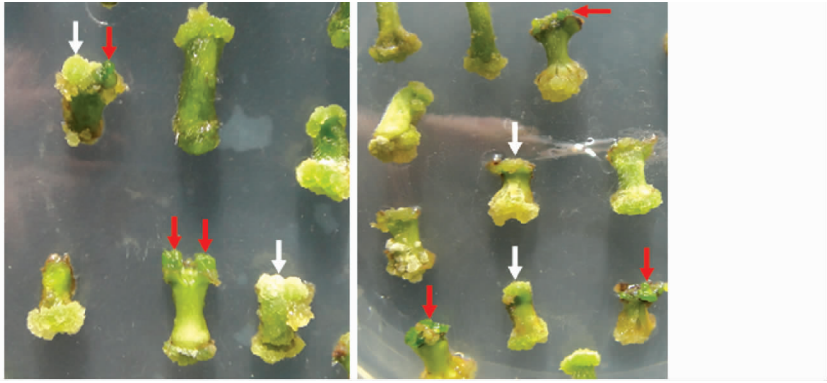


图 2 子叶节切断诱导的愈伤组织

Fig. 2 Callus induced from the cotyledonary node fragments

2.3 外植体不同切取方式对愈伤组织诱导的影响

由于采用子叶节切断为外植体时,愈伤组织诱导率较低,因此改进子叶节切取方式。当以子叶节切片为外植体时,愈伤组织诱导率极大提高,平均达到 85% 以上,最高可达 95% (表 2)。同时,愈伤

组织质量也得到了提高(图 3)。之所以子叶节切片外植体能提高愈伤组织诱导效率,可能是由于切片较薄有利于直接吸收营养成分且通过木质部和韧皮部快速运输到子叶节切口处^[12]。

表 2 不同浓度 BA 与 TDZ 对比对子叶节切片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different concentration ratios of BA and TDZ on induction of callus induced from cotyledonary node slices				
外植体总数 Total number of explants	TDZ 浓度 Concentration of TDZ /mg · L ⁻¹	BA 浓度 Concentration of BA /mg · L ⁻¹	愈伤组织诱导率 Callus inductivity/%	质量 Quality
105	0.04	0.05	45	+
108	0.04	0.10	53	+
110	0.04	0.15	81	++
106	0.04	0.20	82	+++
106	0.04	0.25	92	++++
105	0.04	0.30	92	++++
102	0.08	0.05	91	++++
105	0.08	0.10	93	++
108	0.08	0.15	94	++
105	0.08	0.20	95	++++
107	0.08	0.25	90	+++
100	0.08	0.30	95	+++
111	0.12	0.05	91	++
110	0.12	0.10	91	+++
103	0.12	0.15	93	++
123	0.12	0.20	93	+++
121	0.12	0.25	92	++++
105	0.12	0.30	86	+++

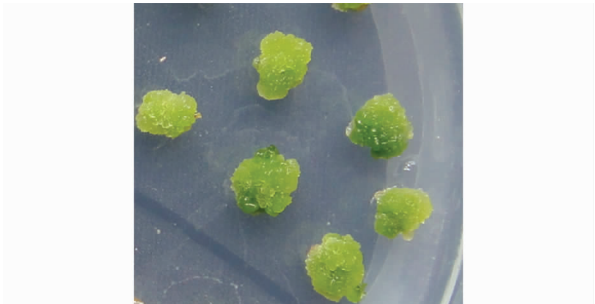
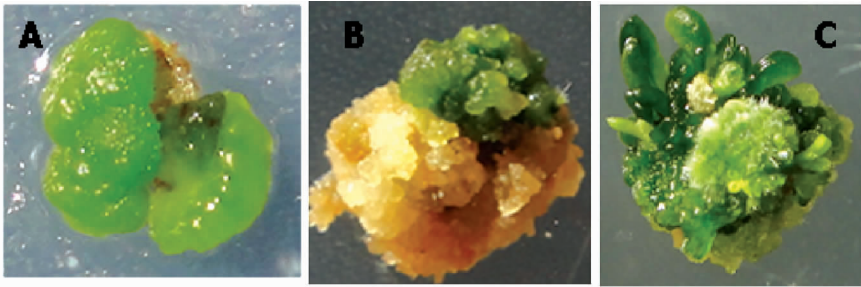


图 3 子叶节切片外植体诱导的愈伤组织
Fig.3 Callus induced from cotyledonary nodes slices

2.4 愈伤组织继代过程中出现的问题

为了扩增诱导的愈伤组织,进行了愈伤组织继代培养实验,然而在继代过程中,常发生愈伤组织变硬、提前分化、玻璃化或失去分化能力等现象(图 4),能正常扩增的愈伤组织频率较低(数据未列),表明这种愈伤组织很难扩增,这可能是由于愈伤组织较致密,不利于进一步生长,而倾向于分化。玻璃化现象可能与培养容器通气性有关,当愈伤组织分化时换成通气封口膜时,玻璃化现象大大减少。



A:继代过程中,愈伤变硬;B:继代过程中产生黄褐色愈伤;C:愈伤组织提前分化且玻璃化。
A: Callus became hard in proliferation; B: Yello-brown callus formation in proliferation; C: Advanced differentiation and vitrification of callus.

图 4 愈伤组织继代过程中出现的各种问题
Fig.4 Problems during callus proliferation

2.5 愈伤组织分化与再生

将诱导出的愈伤组织转到含有不同浓度 BA 的

分化培养基上以促使愈伤组织分化不定芽。BA 浓度从 0.05 ~ 4.00 mg · L⁻¹共做了 7 个不同处理,结

果表明,在 $0.05 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内均能诱导出不定芽,但诱导率并不高,在 BA 浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导率最高,达到 21.4%,较适宜的 BA 浓度范围是 $0.1 \sim 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,当 BA 浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,没有不定芽发生(表 3)。在愈伤分化时,常观察到在 1 个愈伤组织块上产生很多芽点,此时要及时将愈伤分割,否则幼芽过多,不利于抽茎。

将继代增生的愈伤组织转到分化培养基上进

行分化时,发现分化所需时间较长,且诱导的不定芽不易生根。当不定芽伸长至 2 cm 左右时,将其切割转到 1/2MSB5 生根培养基上诱导出不定根发生,获得再生小植株(图 5E)。目前,我们尽管获得了高频率的愈伤组织,但是愈伤组织不定芽诱导率仍然较低(表 3),有关愈伤组织分化条件有待进一步研究确立。

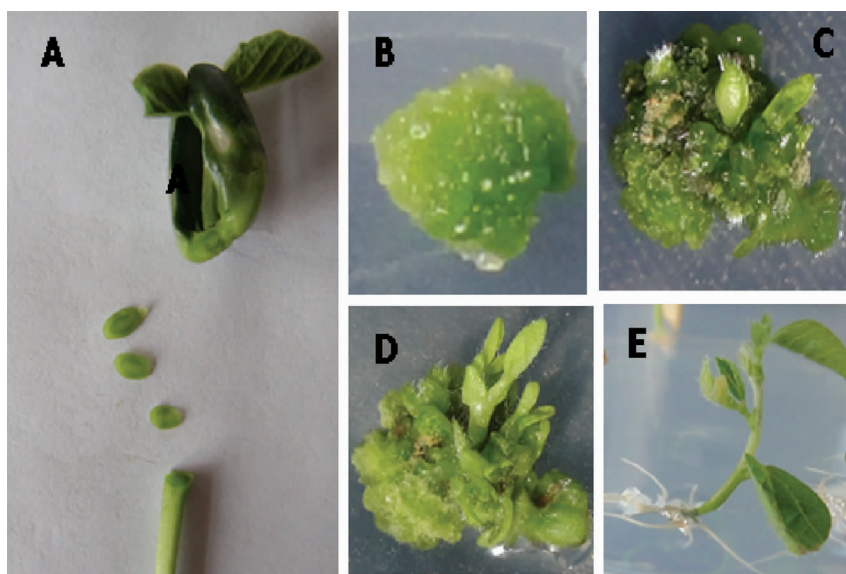
表 3 BA 浓度对愈伤组织不定芽诱导的影响

Table 3 Effect of BA concentrations on the shoot induction of callus

分化培养基中 BA 浓度 Concentration of BA in shoot induction medium / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	愈伤组织总数 Total number of callus	分化的愈伤组织数 No. of callus with shoots	不定芽诱导率 Inductivity of shoots / %
0.05	51	5	9.8
0.1	51	10	19.6
0.2	56	12	21.4
0.3	55	11	20.0
1.0	48	8	16.7
2.0	53	10	18.9
4.0	53	0	0

所接种的愈伤是从子叶节切片诱导的。

The callus inoculated was induced from slices of cotyledonary nodes.



A: 子叶节切片外植体; B: 诱导的愈伤组织; C: 开始分化的愈伤组织; D: 不定芽的伸长; E: 再生小植株。

A: Explants of cotyledonary node slices; B: Induced callus; C: Callus started to differentiate; D: Elongation of shoots; E: Plantlet.

图 5 子叶节切片愈伤组织诱导及再生过程

Fig. 5 Callus induction and regeneration from cotyledonary node slices

3 讨论

在萌发培养基中不添加 BA 时,子叶节切断几乎无愈伤组织产生;而只有在 BA 存在条件下萌发获得的子叶节切断才能形成愈伤组织。可见萌发

培养基中 BA 对后续子叶节切断诱导愈伤组织起重要作用。Kim 等^[13]研究也表明,只有在 BA 存在条件下萌发获得的子叶节外植体才能在不定芽诱导培养基上形成丛生芽,而那些在水中萌发而获得的子叶节外植体不能形成丛生芽。进一步研究表明,

在 BA 处理条件下,在子叶节处形成能分化的原再生组织,而无 BA 处理时通常不能形成。

TDZ 是一种苯基脲衍生物,具有类细胞分裂素活性,已被用于大豆组织培养,当用发芽种子的下胚轴或子叶节作外植体时, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 诱导不定芽的效率比 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 要高。Zhou^[14] 研究了 BA、TDZ 和二者配合使用对大豆未成熟胚轴培养不定芽再生效率的影响,认为 TDZ 具有很强的细胞分裂素活性,激素组合以 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的诱导效率最高,是适合于多种大豆基因型的高效率诱导培养基。该试验使用低浓度 TDZ 和 BA 浓度配比,通过愈伤组织途径获得再生植株,提高了植株再生效率,使不定芽诱导率最高达到了 21.4%。BA 与 TDZ 对愈伤组织的诱导具有协同效应,BA 与 TDZ 对植株再生影响在许多作物上已有报道^[15-19]。TDZ 与 BA 配合使用所起的作用主要是类似于生长素的作用。

试验结果表明,只有致密,光滑,深绿色愈伤组织,较容易分化生成不定芽。这种愈伤组织在豌豆中已有报道^[20]。芽原基在致密的愈伤组织中形成,成簇紧密生长,需要切割才能将其分开,而通过 2,4-D 诱导生成的体细胞胚较易分离^[21]。

参考文献

- [1] Cheng T Y, Saka H, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91-99.
- [2] Yoshida T. Adventitious shoot formation from hypocotyl sections of mature soybean seeds[J]. Breeding Science, 2002, 52: 1-8.
- [3] Wright M S, Ward D V, Hinchee M A, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue[J]. Plant Cell Reports, 1987, 6: 83-89.
- [4] Liu H K, Yang C, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system[J]. Planta, 2004, 219: 1042-1049.
- [5] Paz M, Martinez J C, Kalvig A, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 206-213.
- [6] Olhoft P M, Bernal L M, Grist L B, et al. A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary node explants from seedlings[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2007, 43: 536-549.
- [7] Komatsuda T, Ohyama K. Callus and somatic embryo formation by immature embryo culture in soybean [J]. Japanese Journal of Breeding, 1986, 36 (Suppl 2): 230-231.
- [8] Tomlin E S, Branch S R, Chamberlain D, et al. Screening of soybean (*Glycine max* L. Merrill) lines for somatic embryo induction and maturation capability from immature cotyledons[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2002, 38: 543-548.
- [9] Hephner A, Boulter M E, Harris N, et al. Development of a superficial meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Botany, 1988, 62: 513-519.
- [10] Sairam R V, Franklin G, Hassel R, et al. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 75: 79-85.
- [11] Hong H P, Zhang H, Olhoft P, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2007, 43: 558-568.
- [12] Shelp B J, Swanton C J, Hall J C. Glufosinate (Phosphinothricin) mobility in young soybean shoots[J]. Journal of Plant Physiology, 1992, 139: 626-628.
- [13] Kim J, Hack E, LaMotte C E. Synergistic effects of proline and inorganic micronutrients and effects of individual micronutrients on soybean (*Glycine max*) shoot regeneration *in vitro* [J]. Journal of Plant Physiology, 1994, 144: 726-734.
- [14] Zhou X A. Effects of plant growth regulators and genotypes on plant regeneration in soybean[D]. Agricultural University of Poznan, 1998.
- [15] Franklin G, Carpenter L, Davis E, et al. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons[J]. Plant Growth Regulation, 2004, 43: 73-79.
- [16] Nielsen J M, Hansen J, Brandt K. Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus X oriformis* "Giganteus" [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 41: 165-170.
- [17] Khalafalla M M, Hattori K. A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.) [J]. Plant Growth Regulation, 1999, 27: 145-148.
- [18] Franklin G, Carpenter L, Davis E, et al. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons[J]. Plant Growth Regulation, 2004, 43: 73-79.
- [19] Kim J, Hack E, LaMotte C E. Synergistic effects of proline and inorganic micronutrients and effects of individual micronutrients on soybean (*Glycine max*) shoot regeneration *in vitro* [J]. Journal of Plant Physiology, 1994, 144: 726-734.
- [20] Zambre M, Chowdury B, Kuo Y H, et al. Prolific regeneration of fertile plants from green nodular callus induced from meristematic tissues in *Lathyrus sativus* L. (grass pea) [J]. Plant Science, 2002, 163: 1107-1112.
- [21] Liu W, Moore P J, Collins G B. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 1992, 28: 153-160.