

# 大豆高效体细胞胚诱导和增殖方法的研究

程琳静, 闫军辉, 钟云鹏, 姚陆铭, 王彪, 卢欣欣, 武天龙

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

**摘要:**以10个不同基因型的大豆幼胚为材料进行组织培养,研究不同播种季节和基因型对体细胞胚诱导率的影响,以及继代培养基状态和蔗糖含量对体细胞胚增殖的影响。结果表明:(1)同一基因型大豆幼胚,不同播种季节对体细胞胚诱导率的影响表现为春季>温室>秋季>夏季;(2)在同一培养和诱导条件下,体细胞胚诱导率较高的基因型是垦丰23,北4217,绥农30和绥农28;(3)液体的继代培养基相对固态,更有利于体细胞胚增殖;(4)继代培养基中高浓度蔗糖( $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )有利于体细胞胚的增殖。

**关键词:**基因型;体细胞胚;诱导率;继代培养基

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0305

## Research to the Effective Methods of Soybean Somatic Embryo Induction and Proliferation

CHENG Lin-jing, YAN Jun-hui, ZHONG Yun-peng, YAO Lu-ming, WANG Biao, LU Xin-xin, WU Tian-long

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** With 10 genotypes of soybean immature embryos obtained from different seasons, the effects of different planting seasons and genotypes on somatic embryogenesis induction were primarily studied. And in order to optimize the regeneration system of soybean somatic embryos, the impact of liquid and solid subculture medium and the concentration of sucrose on the proliferation of somatic embryos were further researched. The result showed that (1) For the same genotype of soybean immature embryos, the effect of different planting conditions on somatic embryogenesis induction rate was spring > greenhouse > autumn > summer. (2) In the same culture condition, the genotypes which possessed the higher embryo induction rate were Kenfeng 23, North 4217, Suinong 28 and Suinong 30. (3) Compared to solid culture, liquid culture was favor of the proliferation of somatic embryos. (4) Subculture medium containing high concentration of sucrose ( $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was conducive to the proliferation of somatic embryos.

**Key words:** Genotype; Somatic embryo; Induction rate; Subculture

大豆是世界上重要的油料及植物蛋白质来源,也是重要的经济作物。目前,大豆被公认为遗传转化率较低的物种之一,无论是利用农杆菌转化、超声波辅助转化<sup>[1]</sup>,还是基因枪转化进行转基因操作,高效大豆再生体系的建立将是影响大豆转化的重要步骤之一。目前已见报道的大豆再生体系主要包括器官发生途径<sup>[2-9]</sup>及体细胞胚发生途径<sup>[10-11]</sup>。由于器官发生途径中所采用的外植体细胞分化程度高,容易产生嵌合体,相比之下,体细胞胚发生途径有着更为广泛的应用前景。

有研究表明,利用体细胞胚进行大豆植株再生,其效率受到培养基成分及培养条件等多种因素的影响<sup>[12-16]</sup>。Finer等<sup>[14]</sup>发现体细胞胚在含2,4-D的培养基上具有较高的诱导率及增殖速率。同时不同大豆基因型及在不同生长环境中所获得的幼胚,其体细胞胚诱导及增殖能力亦具有差异<sup>[17-18]</sup>。

本研究对10个大豆基因型的幼胚诱导体细胞胚能力进行评估,并对其中诱导能力较强的4个基因型的体细胞胚进行增殖能力分析,从而为高效、优质的大豆体细胞胚再生体系的建立提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试基因型

以10个大豆基因型作为供试材料,分别为:交大133和200538(上海交通大学),垦丰23、垦丰16和垦丰5号(黑龙江省农垦科学院农作物开发研究所),绥农30和绥农28(黑龙江省农业科学院绥化分院),合丰50(黑龙江省农业科学院佳木斯分院),北4217(黑龙江省国营农场总局北安农管局农科所),9626(东北农业大学)。

收稿日期:2013-12-09

基金项目:国家转基因重大专项(2013ZX08004-003);引进国际先进农业科学技术计划“948计划”(2011-G1(2)-16);上海市重点学科建设基金(B209)。

第一作者简介:程琳静(1986-),女,在读硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:orangeroom@126.com。

通讯作者:武天龙(1951-),男,教授,博士生导师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:tianlongwu@263.net。

## 1.2 试验方法

1.2.1 大豆体细胞胚的诱导 将选用的10个大豆基因型分4个不同时期播种,A1:4月份大田播种(春季播种,2013年4月15日);A2:6月份大田播种(夏季播种,2013年6月15日);A3:8月份大田播种(秋季播种,2013年8月15日);A4:1月培养室播种(2013年1月,温室的条件为:光照时间16 h/8 h,温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光照强度为 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。播种后75 d左右取新鲜的幼荚(开花后14 d,幼胚直径3~8 mm),流水冲洗3~4遍,然后用20%的NaClO消毒20 min( $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡, $23^\circ\text{C}$ ),取出后用无菌水清洗3~5次直至黄色消失,用镊子除去荚皮和幼胚种皮,将近轴端接触D40培养基<sup>[19]</sup>。

每个基因型设10次重复,每重复含有6个幼胚,接种16 d后统计出现体细胞胚的幼胚数量,计算其诱导率。

体细胞胚的诱导率(%) =

$$\frac{\text{诱导出体细胞胚的幼数量}}{\text{总的幼胚数量}} \times 100$$

1.2.2 体细胞胚的继代培养 为保证取材的一致性,将诱导产生的体细胞胚置于含有蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的D20培养基<sup>[19]</sup>中增殖培养20 d,取直径为3 mm、具有再生能力的次生体细胞胚团作为最终的植物材料。

试验采用30和 $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个不同的蔗糖浓度梯度,固、液体两种不同的培养基形态进行试验,比较不同生长条件下,不同基因型的增殖速率。将上述所获得的次生体细胞胚团移入新的D20固体培养基和FN液体培养基<sup>[14]</sup>中,统计起始阶段体细胞胚团的数量,每隔4 d统计1次,共计16 d,每一个独立试验中,所使用的体细胞胚团的数量为50个。

增殖速率NFS,即单个体细胞胚4 d中平均增

殖的体细胞胚数量的公式为:

$\text{NFS} = (\text{4 d后体细胞胚的总数量} - \text{4 d前的体细胞胚总数量}) / \text{4 d前的体细胞胚总数量}$

0~4 d的 $\text{NFS}_1 = (\text{第4天体细胞胚总数量} - \text{初始体细胞胚总数量}) / \text{初始体细胞胚总数量}$

4~8 d的 $\text{NFS}_2 = (\text{第8天体细胞胚总数量} - \text{第4天体细胞胚总数量}) / \text{第4天体细胞胚总数量}$

8~12 d的 $\text{NFS}_3 = (\text{第12天体细胞胚总数量} - \text{第8天体细胞胚总数量}) / \text{第8天体细胞胚总数量}$

12~16 d的 $\text{NFS}_4 = (\text{第16天体细胞胚总数量} - \text{第12天体细胞胚总数量}) / \text{第12天体细胞胚总数量}$

16 d内的 $\text{NFS}_{16} = (\text{NFS}_1 + \text{NFS}_2 + \text{NFS}_3 + \text{NFS}_4) / 4$

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆幼胚的诱导体细胞胚差异分析

2.1.1 不同播种时期对诱导体细胞胚的影响 各基因型大豆幼胚接种16 d后分别对其进行诱导率统计分析,表1结果显示,春季播种所获得的大豆幼胚,各基因型体细胞胚的诱导率普遍较高,变化幅度为16.67%~81.67%,其次是温室,所获体细胞胚诱导率为15.00%~73.33%。秋季所获体细胞胚诱导率变化幅度为11.67%~53.33%,诱导率最低的是夏季所获的幼胚,为6.67%~38.33%。可见,不同播种条件对同一基因型大豆幼胚体细胞胚诱导率的影响是不同的,表现为春季>温室>秋季>夏季。

2.1.2 不同基因型诱导体细胞胚的差异比较 春季播种所获幼胚,垦丰23诱导能力显著高于其他基因型,达到81.67%,其次为绥农30、北4217及绥农

表1 不同基因型大豆在不同季节播种所获幼胚体细胞胚诱导率

Table 1 Comparison on the inductivity of immature embryos obtained from different genotypes of soybean planted in different seasons(%)

基因型 Genotype	A1	A2	A3	A4
绥农30 Suinong 30	46.67 ± 1.03 b	16.67 ± 0.67 c	30.00 ± 0.63 cd	33.33 ± 0.67 b
垦丰23 Kenfeng 23	81.67 ± 1.10 a	38.33 ± 0.48 a	53.33 ± 0.63 a	73.33 ± 0.97 a
垦丰16 Kenfeng 16	16.67 ± 0.67 c	8.33 ± 0.53 d	15.00 ± 0.57 d	18.33 ± 0.74 c
垦丰5号 Kenfeng 5	16.67 ± 0.67 c	6.67 ± 0.52 d	11.67 ± 0.48 d	15.00 ± 0.57 c
交大133 Jiaoda 133	23.38 ± 0.52 c	16.67 ± 0.47 d	20.00 ± 0.63 cd	21.67 ± 0.48 c
绥农28 Suinong 28	40.00 ± 0.52 b	23.33 ± 0.52 bc	35.00 ± 0.57 bc	36.67 ± 0.63 b
合丰50 Hefeng 50	21.67 ± 1.06 c	16.67 ± 0.82 d	20.00 ± 0.63 cd	23.33 ± 0.52 c
北4217 North 4217	46.67 ± 0.79 b	30.00 ± 0.79 b	41.67 ± 0.53 ab	43.33 ± 0.52 b
9626	30.00 ± 0.79 c	15.00 ± 0.74 d	18.33 ± 0.74 cd	20.00 ± 0.63 c
200538	18.33 ± 1.10 c	8.33 ± 0.53 d	16.67 ± 0.67 d	18.33 ± 0.57 c

不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ , LSD)。

The different lowercase letters in the columns mean significant difference at 0.05 level( $P < 0.05$ , LSD).

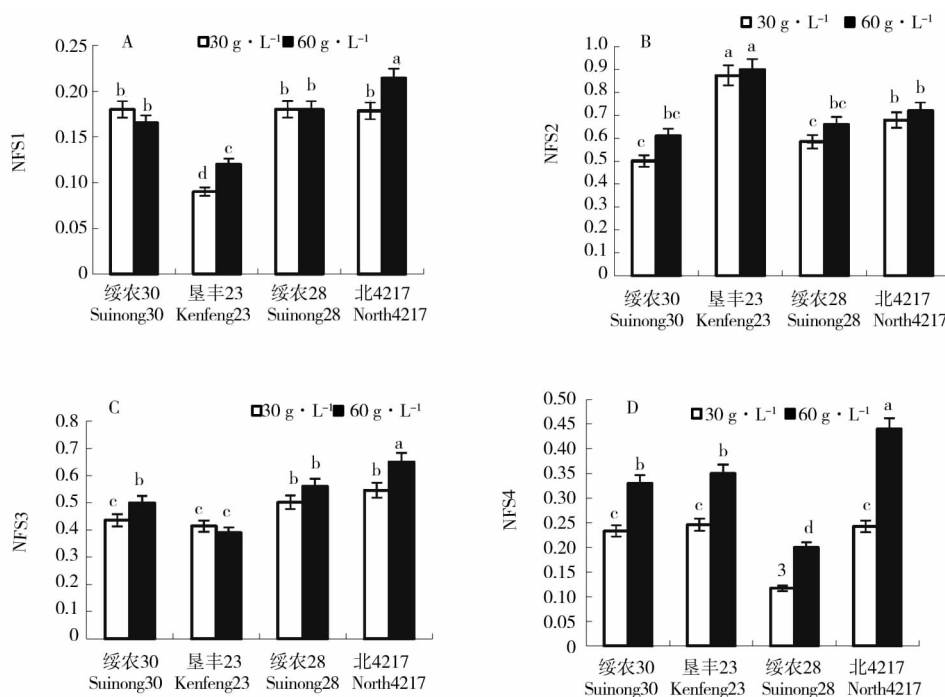
28,诱导率分别为46.67%、46.67%和40.00%。其他3个播期,垦丰23的体细胞胚诱导率仍显著高于其他基因型,分别达到了38.33%、53.33%及73.33%。夏季播种所获得的幼胚,北4217的诱导率为30.00%,绥农30和绥农28诱导率分别为16.67%和23.33%。秋季播种和温室播种的上述4个基因型诱导率都显著高于其他基因型。绥农30,绥农28和北4217在秋季获得的体细胞胚其诱导率分别为30.00%、35.00%和41.67%,温室中这3个基因型的诱导率分别为33.33%、36.67%和43.33%。这一结果表明,相同的培养条件,不同基因型大豆,其体细胞胚的诱导能力存在差异。

为进一步探索大豆体细胞胚再生体系中影响其增殖的重要因素,本实验采用上述诱导能力较强的4个大豆品种的体细胞胚做进一步的研究。既满足了试验中对体细胞胚的大量需求,又在一定程度上反映了继代培养条件对不同基因型体细胞胚培

养的普遍性。

## 2.2 大豆基因型体细胞胚不同时间段增殖速率比较

2.2.1 固体培养基对体细胞胚不同时间段增殖速率的影响 图1结果显示,固体培养基中,4个大豆基因型的增殖速率均呈现先升高后降低的趋势,即当体细胞胚处于0~4 d时,各基因型的增殖速率都较低(图1A),当处于4~8 d时,体细胞胚的增殖速率都快速升高(图1B)。随后的8 d内,各体细胞胚的增殖速率都开始下降(图1C和D)。同时图1结果也表明,蔗糖含量由 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加为 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各基因型在各个生长阶段的增殖速率都表现出升高的趋势,尤其在12~16 d内表现出显著的差异性( $P<0.05$ )。试验结果表明固体培养时,继代培养4~8 d,体细胞胚的活性较高,且蔗糖含量为 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 有利于促进体细胞胚的增殖。



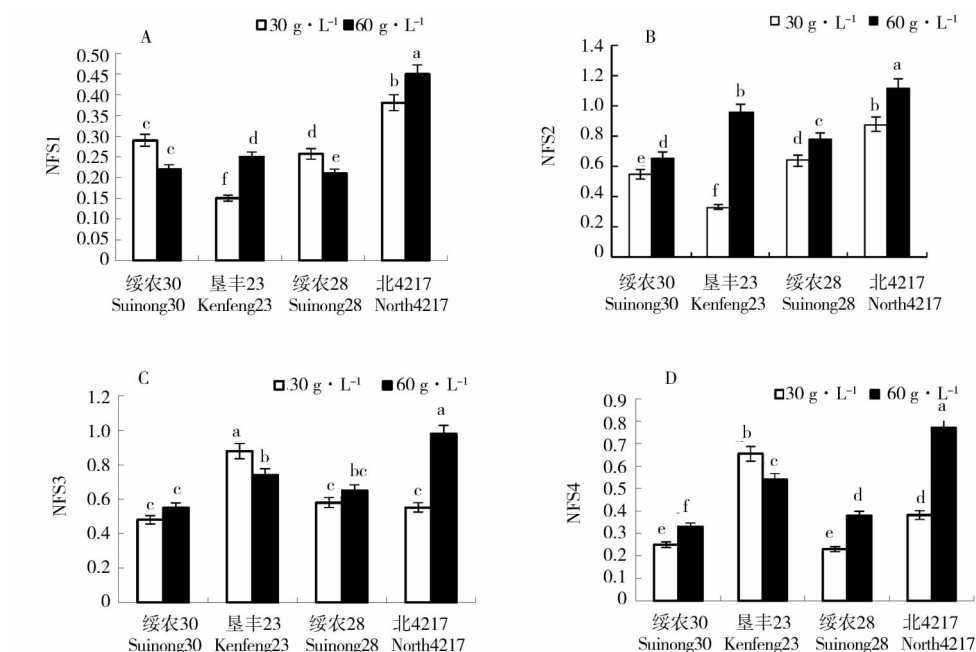
A:0~4 d;B:4~8 d;C:8~12 d;D:12~16 d.

图1 4个大豆基因型体细胞胚在不同蔗糖含量的固体继代培养基增殖速率

Fig.1 NFS of four genotypes of soybean somatic embryo in solid culture with different sucrose content

2.2.2 液体培养基对体细胞胚不同时间段增殖速率的影响 图2结果表明,液体培养的4个大豆基因型体细胞胚,其增殖速率与固体培养的增殖速率趋势是一致的,表现为先升高后降低,除了垦丰23在蔗糖浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、培养8~12 d时(图2C)表现出较高的增殖速率外(0.88个),其他基因型都是在培养4~8 d(图2B)内,增殖速度最高。图2同时

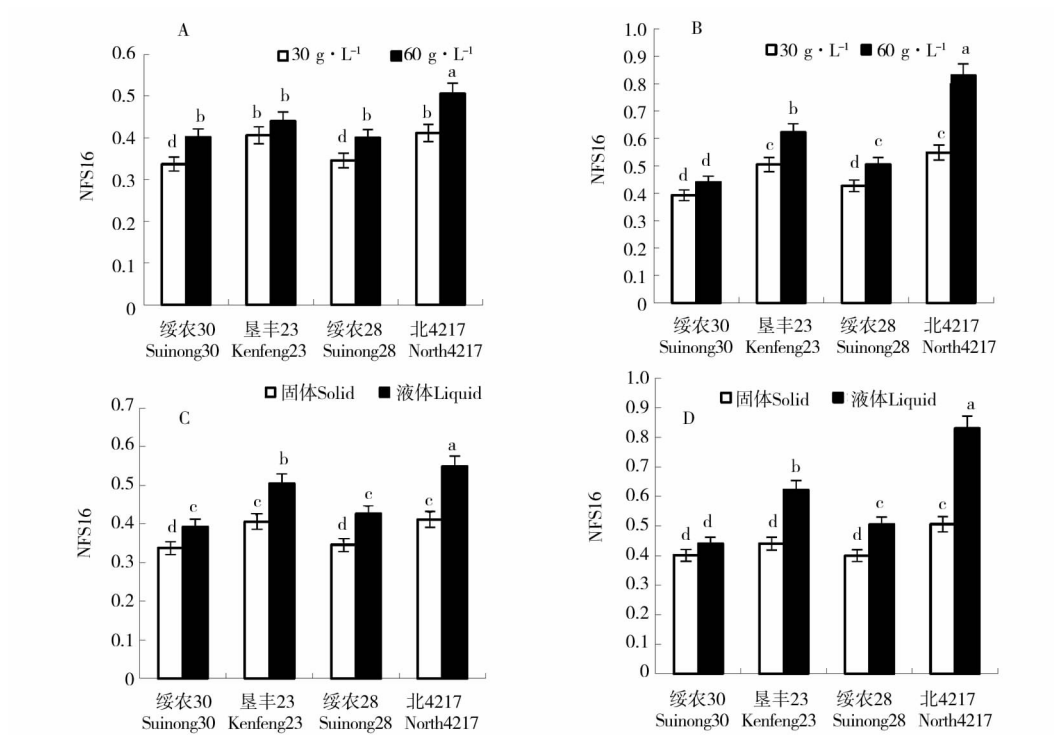
显示,整个继代过程中,体细胞胚在 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 中的增殖速率高于 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 中的增殖速率。然而垦丰23在继代培养的后两个阶段,低浓度蔗糖培养的体细胞胚活性要高于高浓度蔗糖培养。本试验表明,液体培养基的 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖有利于体细胞胚的增殖,大部分基因型的体细胞胚在继代4~8 d表现出较高的增殖活性。



A: 0~4 d; B: 4~8 d; C: 8~12 d; D: 12~16 d

图2 4个大豆基因型体细胞胚在不同蔗糖含量的液体继代培养基增殖速率比较

Fig.2 Comparison on NFS of four genotypes of soybean somatic embryo in liquid culture which contain different sucrose content



A: 不同蔗糖浓度的固体培养; B: 不同蔗糖浓度的液体培养; C: 蔗糖浓度为 30 g/L 的固液态培养; D: 蔗糖浓度为 60 g/L 的固液态培养。

A: Solid cultivation with different sucrose concentration; B: Liquid cultivation with different sucrose concentration; C: Solid and liquid cultivation with 30 g/L sucrose; D: Solid and liquid cultivation with 60 g/L sucrose.

图3 4个大豆基因型体细胞胚在不同蔗糖含量固液培养基中增殖速率比较

Fig.3 Comparison on proliferation of four genotypes of soybean somatic embryo in solid and liquid culture with different sucrose

### 2.3 不同大豆基因型体细胞胚增殖速率的比较

2.3.1 蔗糖浓度对基因型大豆体细胞胚增殖速率的影响 图 3A 结果表明,固体培养的各基因型体细胞胚团,除了垦丰 23,其增殖速率没有受到蔗糖浓度的影响外,其他 3 个基因型增殖速率都表现出显著性差异,分别增加了 19% (绥农 30)、16% (绥农 28) 和 23% (北 4217)。液体培养中(图 3B),蔗糖浓度并未对绥农 30 增殖速率造成显著性差异,其余各基因型体细胞胚在蔗糖含量为  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的平均增殖速率显著高于蔗糖含量为  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的平均增殖速率,增加幅度分别为 23% (绥农 30)、18% (绥农 28) 和 51% (北 4217)。

2.3.2 固、液体培养基对基因型大豆体细胞胚增殖速率的影响 绥农 30 在高浓度的蔗糖( $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,图 3D) 试验条件下,固液态培养基差异不显著( $P > 0.05$ ),其余试验材料,在蔗糖含量为  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 3C) 和  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 3D) 条件下,液体培养的平均增殖速率显著高于其固体培养的平均增殖速率。同时图 3 结果也表明:北 4217 的平均增殖速率最高,可达 0.83 个,其次是垦丰 23,其平均增殖速率为 0.62 个,绥农 28 和绥农 30 分别为 0.5 和 0.44 个。

## 3 讨 论

### 3.1 播期对体细胞胚诱导能力的影响

不同季节和环境所获得的大豆幼胚其诱导体细胞胚差异分析表明,上海 4 月中旬至 6 月下旬,适宜大豆生长,获得的幼胚有着很强的生命力,所以该阶段的各大豆基因型幼胚表现出较高的体细胞胚诱导率。虽然温室中的温度、光照、湿度相比大田中的环境因子更加的稳定、可靠,但是其所获得的大豆幼胚诱导体细胞胚的能力不如春季播种的,可能是由于早春温室中的生长因子不如自然界的原因造成的。夏季播种阶段正值上海一年中气温最高的月份,日最高温度甚至可达  $40^{\circ}\text{C}$ ,虽然植株在营养生长的过程中已经积累了足够的营养物质,但是,大豆夏播结荚期高温的影响,使得输送于幼胚的营养物质大量受阻,造成开花两周后无幼胚生成,即使有幼胚,也常常表现为颜色发黄,幼胚干瘪的现象。如果想得到长度为  $3\sim 8\text{ mm}$  的幼胚则需要更长的时间,而超过两个周的幼胚又会错过最佳的诱导体细胞胚的时期,所以夏季播种所获得的幼胚,各基因型体细胞胚诱导率是最低的,最低可达 8.33%。由于秋播的温度和光照影响,植株非常矮小,只有正常高度的一半,导致植物提前开花结果<sup>[20-21]</sup>,其幼胚的生长虽然表现上是正常的,但是

相对于春季播种和温室播种阶段,幼胚的体细胞胚的诱导率依然是很低的。本试验结果表明,由于环境因子的差异,导致了相同的基因型在不同的生长环境中,诱导出体细胞胚的能力大大不同,总体表现为春季播种 > 温室播种 > 秋季播种 > 夏季播种。即在上海地区,4 月中旬至 6 月中旬大田所获得的幼胚,体细胞胚的诱导力是最强的。同时本试验也表明,不同的基因型对于体细胞胚的诱导能力起着关键性作用,在 10 个大豆基因型中,垦丰 23 诱导体细胞胚的能力是最强的,其次为北 4217、绥农 28 和绥农 30。

### 3.2 培养基及蔗糖浓度对增殖速率的影响

液体培养基中,体细胞胚团能够更充分的与培养基接触,既能及时补充所需的营养成分,又可以借助液体的流动,带走自身的代谢物质,使其在单位时间内,增殖速率相对于在固体培养时更快。糖类物质是植物生长过程中最重要的碳源<sup>[22]</sup>,一般来讲,足够的碳源能够使植物体生长得更好更快,但是,过多的糖反而会造成植物的质壁分离,甚至造成严重的酸中毒。Samoylov<sup>[23]</sup> 认为, $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的液体培养基对于体细胞胚的继代培养是有利的,也有报道指出有的基因型在  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖环境中,可以继代培养体细胞胚长达 8 个月之久<sup>[24]</sup>。Finer 等<sup>[14]</sup> 及一些实验室的早期文献<sup>[25-26]</sup> 中提到当蔗糖为  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,会得到理想、数量较多的体细胞胚,加之前人对悬浮培养体系的建立及优化,使得高数量、优质的体细胞胚的获得成为可能。本试验显示,蔗糖含量为  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的液体培养基在单位时间内会大大促进体细胞胚的增殖。

### 3.3 继代培养时间对体细胞胚活性的影响

因液体培养基中,植物细胞代谢速率和营养的消耗速率都相对较高<sup>[27]</sup>,体细胞胚团经过 0~4 d 的适应期后,在 4~8 d 表现出较高的活性,但快速增长的体细胞胚对氧气的需求和空间的利用程度也会相应的有所提高,加之代谢物质的逐步累积,使得绝大部分基因型大豆体细胞胚生长速率在 8 d 后逐渐降低。为保证体细胞胚正常的生长速率及代谢,最大程度地防止畸形的发生,培养基的更换频率及培养基中体细胞胚的浓度将成为整个继代培养的重要因素。本试验对继代体细胞胚 16 d 内不同生长阶段增长量的统计,有助于根据不同的基因型选择合适的更换培养基周期,保持体细胞胚的活性,并为下一步遗传转化提供合适的转化材料。

研究不同大豆基因型诱导体细胞胚能力的差异,寻求最佳的大豆体细胞胚继代培养的方法,不

仅可以优化整个大豆再生体系,而且将为后续的转基因大豆的研究提供可靠的保障。

## 参考文献

- [1] Trick H N, Finer J J. SAAT; sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Transgenic Research, 1997, 6 (5): 329-336.
- [2] Hinchey M A, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6(8): 915-922.
- [3] Maughan P, Philip R, Cho M J, et al. Biolistic transformation, expression, and inheritance of bovine  $\beta$ -casein in soybean (*Glycine max*) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1999, 35(4): 344-349.
- [4] Zhang Z, Xing A, Staswick P, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 56(1): 37-46.
- [5] Aragão F J L, Sarokin L, Vianna G R, et al. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101(1-2): 1-6.
- [6] Donaldson P, Simmonds D. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(5): 478-484.
- [7] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method [J]. Planta, 2003, 216(5): 723-735.
- [8] Zeng P, Vadnais D, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(7): 478-482.
- [9] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, 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(3): 206-213.
- [10] Christou P, McCabe D E, Swain W F. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles [J]. Plant Physiology, 1988, 87(3): 671-674.
- [11] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean *via* particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1991, 27(4): 175-182.
- [12] Lippmann B, Lippmann G. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. [J]. Plant Cell Reports, 1984, 3(6): 215-218.
- [13] Ranch J, Oglesby L, Zielinski A C, et al. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans [J]. In vitro Cellular & Developmental Biology, 1985, 21(11): 653-658.
- [14] Finer J J, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1988, 15(2): 125-136.
- [15] Hartweck L, Lazzeri P, Cui D, et al. Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons [J]. In vitro Cellular & Developmental Biology, 1988, 24(8): 821-828.
- [16] Hephner A, Boulter M, Harris N, et al. Development of a superficial meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Annals of Botany, 1988, 62(5): 513-519.
- [17] Stewart Jr C N, Adang M J, All J N, et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIIAc* gene [J]. Plant Physiology, 1996, 112(1): 121-129.
- [18] Meurer C, Dinkins R, Redmond C, et al. Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2001, 37(1): 62-67.
- [19] Santarém E R, Finer J J. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1999, 35(6): 451-455.
- [20] 彭东升, 赵守边. 诱导梅花提早开花初探 [J]. 湖北园林, 1986, 125-126. (Peng D S, Zhao S B. Primary research of inducing wintersweet to blossom in advance [J]. Hubei Landscape, 1986, 125-126.)
- [21] 徐雨晴, 陆佩玲, 于强. 气候变化对植物物候影响的研究进展 [J]. 资源科学, 2004, 26(1): 129-136. (Xu Y Q, Lu P L, Y Q. The research of climate change influencing plant phenology [J]. Resource Science, 2004, 26(1): 129-136.)
- [22] 李汉伟, 苏秀红, 董诚明, 等. 氮源和碳源对冬凌草愈伤组织生长及迷迭香酸的积累的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 50. (Li H W, Su X H, Dong C M, et al. Effects of carbon, nitrogen sources on growth and rosmarinic acid accumulation of *rabdosia rubescens* (Henmsl.) hara callus [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(6): 50.)
- [23] Samoylov V, Tucker D, Parrott W. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1998, 34(1): 8-13.
- [24] Singh R, Klein T, Mauvais C, et al. Cytological characterization of transgenic soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96(2): 319-324.
- [25] Komatsuda T, Lee W, Oka S. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 28(1): 103-113.
- [26] Finer J J. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Plant Cell Reports, 1988, 7(4): 238-241.
- [27] 方文娟, 韩烈保, 曾会明. 植物细胞悬浮培养影响因子研究 [J]. 生物技术通报, 2005(5): 11-15. (Fang W J, Han L B, Zeng H M. Research advances in factors affecting establishment of plant cell suspension culture [J]. Biotechnology Bulletin, 2005(5): 11-15.)