



大豆体细胞胚诱导再生的影响因素和相关基因的研究进展

薛永国, 刘鑫磊, 曹 旦, 栾晓燕

(黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:大豆是世界上重要的油料和经济作物,也是种植面积最大的转基因作物。大豆体细胞胚再生途径的转基因方法至今仍未有较大突破,主要原因是体细胞胚诱导再生频率低且不稳定,同时受基因型影响明显,这些原因限制了其在不同大豆品种中的应用。文章对影响大豆体细胞胚频率的基因型、激素、pH 及其它因素进行了梳理总结,从同源克隆、基因定位和重测序等方面对体细胞胚诱导再生的相关基因的研究进展情况进行了详细综述。并对大豆体细胞胚诱导再生的应用前景和存在问题进行了归纳分析,旨在为大豆体细胞胚诱导再生的进一步研究提供参考。

关键词:大豆; 体细胞胚; 影响因素; 再生基因

Research Progress on Related Genes and Factors Influencing Somatic Embryo Induction and Regeneration from Immature Cotyledon of Soybean

XUE Yong-guo, LIU Xin-lei, CAO Dan, LUAN Xiao-yan

(Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy Agricultural of Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Soybean is the most important oil and cash crops and the transgenic crops with the largest planting area in the world. There is still no major breakthrough in the transgenic method of soybean somatic embryo regeneration. The low and unstable induction and regeneration frequency of somatic embryos is the main reason, and it is obviously influenced by genotypes. Those reasons limit its application in different soybean cultivars. This paper summarized the factors affecting the regeneration of somatic embryos of soybean. The genotypes, hormones, pH and other factors that influence the frequency of somatic embryogenesis in soybean were summarized. The research progress of somatic embryo induction and regeneration related genes was reviewed in detail from homologous cloning, gene mapping and resequencing. The application prospect and existing problems of somatic embryogenesis and regeneration in soybean were also summarized and analyzed aiming purpose is to provide directions and reference for further research on somatic embryogenesis and regeneration in soybean.

Keywords: Soybean; Somatic embryo; Influencing factors; Regeneration gene

大豆是世界上重要的油料和经济作物,也是人类植物蛋白重要的来源,同时也是世界上种植面积最大的转基因作物^[1-2]。大豆再生体系在转基因和基因诱变等方面具有重要的应用价值,相关研究一直受到重视。大豆再生体系通常包含大豆体细胞胚发生途径,大豆器官发生途径,大豆原生质体发生途径,以及花粉花药途径^[1-3]。大豆目前仍没研究出不受基因型限制、效率高、结果稳定的再生系统,大豆再生体系主要是采用大豆器官发生途径,例如豆苗茎尖、子叶节、发育中的籽粒等再生植株^[1,4-6]。大豆体细胞胚胎再生途径相比于器官发生途径具有结构更完整,再生率更高,再生苗数量多,嵌合体少,稳定性更高等优势。这些优势可为研究植物细胞的分化、发育、全能性的表达和遗传

转化以及突变体的筛选等提供基础,因此获得了广大研究者的关注^[7-9]。早在 20 世纪 80 年代,有学者先后研究大豆体细胞胚再生途径,并诱导出了大豆鱼雷胚,但未获得再生植株^[10-12]。1983 年,Christianson 等^[13]利用添加一定浓度 2,4-D 的 MS 培养基,通过悬浮培养,诱导出大豆体细胞胚,并获得了第一个再生植株。1985 年, Lazzeri^[10] 和 Ranch 等^[11]进一步完善了大豆体细胞胚获得的诱导条件。1991 年, Finer 等^[12]发表了大豆体细胞胚诱导的悬浮培养系统报告,该培养系统能够让胚性细胞增殖,形成众多体细胞胚,这些体细胞胚可分化成再生植株。随后的众多研究表明大豆体细胞胚的发生受基因型影响明显,系统不稳定,因而阻碍了其实际应用;它的突破对大豆转基因遗传转化、大豆

收稿日期:2018-01-24

基金项目:哈尔滨市应用技术与开发项目(2017RAQYJ064);黑龙江省农业科技创新工程(2017SJ011)。

第一作者简介:薛永国(1981-),男,博士,助理研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:xyg81@126.com。

通讯简介:栾晓燕(1964-),女,硕士,研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:luanxiaoyan1201@163.com。

诱变再生、种质改良等方面具有重要意义。近些年植物体细胞胚再生研究方面取得许多重要进展,本文就大豆体细胞诱导和再生的因素和相关基因研究方面的问题进行梳理和总结,旨在为大豆体细胞胚诱导再生的进一步研究提供参考。

1 大豆体细胞胚诱导的各因素探讨

大豆体细胞诱导与再生过程同有性合子胚的发育过程类似。大豆体细胞胚是指大豆正常细胞在激素作用下,让单个体细胞胚性化,形成体细胞胚。随后类似合子胚发育,会分化出胚芽和胚根,再生成植株。当今大豆体细胞胚胎再生途径是大豆再生系统研究极为重要的组成部分。20 世纪 80 年代大豆体细胞胚再生体系初获成功^[11-14],随后国内外针对其影响因素进行了大量研究和探讨,主要集中在以下几方面。

1.1 大豆体细胞胚诱导受基因型的影响

不同大豆品种(即基因型)的体细胞胚胎发生频率明显不同。程琳静等^[9]研究了 10 个大豆品种的体细胞胚诱导再生率,发现垦丰 23、北 4217、绥农 30、绥农 28 体细胞诱导率较高,尤其垦丰 23 达到 81.67%。而且同一品种,不同播期,对其体细胞胚诱导率影响也十分明显。王鹏飞等^[1]对 41 个北方春大豆品种进行了体细胞胚诱导的筛选研究,发现各基因型诱导率差异明显,最高的垦丰 23 达到 99.7%,对照 Jack 达到 80% 以上,垦丰 16 等 4 个品种没有诱导出体细胞胚。刘艳芝等^[14]进行了 52 份东北大豆体细胞胚诱导再生的基因型筛选工作,21 品种获得了体细胞胚,诱导频率从 1.9% ~ 56.3%,差异很大,而其余均无体细胞胚产生。张淑珍等^[15]研究初步筛选了 30 个黑龙江省当时主栽的不同大豆基因型,确定东农 42、东农 46、东农 47、黑农 42 具有较高的体细胞胚诱导率。王萍等^[16]筛选了 26 个不同大豆基因型,其体细胞胚诱导率存在明显差异,3.33% ~ 83.3% 不等。李宁辉等^[17]针对合丰 25 体细胞胚发生条件摸索,使其体细胞胚诱导率达 70.7%。李海燕等^[18]根据采用 4 个东北主栽品种,对其体细胞胚诱导条件探索发现,不同品种体细胞胚诱导率差异明显,pH、低温处理对于不同品种的体细胞胚诱导率也有影响。Van 等^[19]在利用大豆体细胞胚再生途径进行诱导构建突变体库的研究工作中,也同样发现不同大豆品种体细胞胚诱导率和再生率差异明显,加拿大品种 Jack 最优异。

1.2 大豆体细胞胚诱导受激素种类和浓度的影响

植物体细胞胚的发生是体内不同激素变化所

致。因此,大豆体细胞胚诱导通常均是采用不同种类的激素或者不同浓度的激素进行诱导,激素浓度与激素种类是诱导体细胞胚发生的最重要诱发因素。大豆体细胞胚影响因素探讨的研究中,2,4-D 是体细胞胚诱导用到第一重要激素,其浓度范围一般为 10 ~ 40 mg·L⁻¹,分为低浓度和高浓度,均有成功获得体细胞胚的实例,也有在此基础上增加别的激素,如 NAA、柠檬酸铵等^[17-23]。

1.3 大豆体细胞胚诱导受 pH 的影响

大豆体细胞胚诱导中,pH 是非常关键的因素,李宁辉等^[17]对 pH7.0 和 5.8 两个梯度,结合光强,进行探索。发现 pH7.0 和暗培养时,最利于体细胞胚诱导。以往研究者在体细胞诱导和继代培养增殖中基本均采用这两个 pH 浓度^[1,9,14,19],在不同基因型大豆中取得良好的效果。且以往国外研究者,对大豆体细胞胚的诱导多采用 pH7.0 的诱导培养基,均获得非常好的效果,成功诱导出大豆体细胞胚,并顺利获得再生植株。同时李海燕等^[18]研究发现 pH7.0 时,结合低温处理,体细胞胚诱导率最佳。

1.4 其它因素

取材大小和时间,取材部位,各类激素外物质的添加,蔗糖浓度,活性炭,光照强度和时间,消毒剂的选择和消毒方法的选择等细节因素都会对大豆体细胞胚的诱导产生一定影响^[19,24]。李海燕等^[18]研究表明,不同的低温处理 1 ~ 3 d,也可以提高体细胞胚的诱导率,但对不同品种的影响程度存在差别。取材时间约为开花后 14 d,效果最佳。

2 大豆体细胞胚诱导再生相关的基因研究进展

2.1 同源克隆

Lotan 等^[25]从拟南芥中分离出的一种胚胎发育调控基因 *LEC1* 基因,其单独就可以诱导体细胞向胚性细胞转变。随后有不同学者利用同源克隆方法在玉米^[26]、胡萝卜^[27]、向日葵^[28]、花生^[29]等植物中克隆研究了 *LEC1*。Stone 等^[30]在拟南芥中还发现另一个胚胎发育的重要调控因子 *LEC2* 基因。对于 LEC 基因家族,武小霞等^[31]利用同源克隆从大豆中得到 4 个 *GmLEC* 基因,初步分析与大豆的胚胎发育调控相关。杨超^[32]利用水稻等其它植物中与体细胞胚发生相关的受体蛋白激酶全长序列,采用同源克隆和大豆 EST 库克隆研究了 *GmSERK1*,发现其在大豆体细胞胚发生过程中起一定作用。Thakare 等^[33]利用拟南芥中与体细胞胚诱导相关的调控因子 *AGL15*,通过同源克隆的方法,在大豆中

克隆出 *GmAGL15*, 研究表明其过量表达可以明显提高大豆体细胞胚诱导率。Zheng 等^[34-35] 研究发现调控转录因子 *GmAGL15* 与控制大豆体细胞胚的激素密切相关。通过添加 2,4-D 进行诱导, 可以诱发调控因子 *AGL15* 表达, 从而调节生长素和赤霉素降低, 乙烯各途径水平, 最终促进大豆体细胞胚的形成。先后有与大豆体细胞胚诱导再生相关的基因 *GmARF*^[36]、*GmESR1*^[37]、*ESR2*^[38]、*GmBIMI*^[39]、*PHAVOLUTA*、*GmCUC1*、*GmCUC2*、*GmLEC2*、*GmWUS*、*GmSTM*、*GmPID*、*GmCLV*、*SERK* 等被克隆研究^[37,40-41], 但针对性的大豆体细胞胚诱导再生的分子机理和提高体细胞胚诱导率关键基因的直接证据还未见报道。

2.2 基因定位

利用正向遗传学方法, 运用体细胞胚诱导率高的品种和体细胞胚诱导率低的品种, 进行杂交, 建立群体, 利用群体进行基因定位研究相对较少。杨超^[32] 利用体细胞胚诱导率有显著差异的科丰 1 和南农 1138-2 的 RIL 群体 (NJRIKY 群体), 进行体细胞胚诱导率表型鉴定, 结合连锁图谱进行基因定位分析, 检测出 4 个 QTL, R^2 为 7.79% ~ 14.16%。Song 等^[42] 利用体细胞胚诱导率高低明显不同的 Perking 和 Keburi 建立的 RIL 群体, 进行体细胞胚发生和体细胞胚诱导率高低位点的 QTL 定位, 在 C2 和 G 连锁群共定位到 6 个相关 QTL, 其中 Satt307 和 Satt286 定位到 C2 连锁群上, 与体细胞胚频率相关, 解释率为 45.21% 和 25.97%, 其余 4 个与每个外植体体细胞胚数量和体细胞胚的效率相关, 位于 G 连锁群。大豆再生是一个复杂的过程, 它涉及到众多基因相互作用, 从而构成了一个复杂的再生调控网络, 然而到目前为止对调控网络途径的解析和重要关键基因的表达调控认识仍有待进一步完善。

2.3 重测序分析

大豆体细胞胚诱导与再生, 是由众多基因参与的复杂过程, 虽有很多相关基因被克隆研究, 但对关键基因的表达模式和调控方式仍处于初步认识, 网络中的关键基因仍需要进一步研究和解析^[33-34]。Thibaud-Nissen 等^[41] 利用 EST 测序方法, 对体细胞胚诱导率高的 Jack 品种, 对其从子叶到诱导出体细胞胚 5 个阶段进行基因表达差异分析, 发现 495 差异基因, 表明体细胞胚的出现伴随着储藏蛋白表达和赤霉素合成。这些研究为阐明植物组织培养中存在比较强的基因型特异性的机理提供基础, 进一步为体细胞胚的诱导和不定芽的诱导率的提高提供帮助。

大豆体细胞胚诱导再生受基因型影响明显, 极大限制了转基因方法在许多优良大豆品种中的直接利用。目前大豆转基因多是将目的基因转到易再生转化的品种中, 然后再通过杂交转育的方法进行转基因品种培育, 这样既增加了育种年限, 又限制了基因的应用范围。所以针对提高体细胞胚诱导再生的关键基因, 突破基因型对其的影响具有重要意义。Mookkan 等^[43] 在玉米、高粱等单子叶植物的体细胞再生系统取得突破性进展, 应用 BABY BOOM 和 WUSCHEL2 与干燥诱导型 CRE/lox 切除的共表达系统, 使得的玉米自交系 B73 和高粱 P898012 转化率提高到 15% 和 11%, 且无外来标记基因引入。他们另一个研究表明, 提高 BABY BOOM 和 WUSCHEL2 的表达, 可使转化率提高到 25% ~ 50%, 随后有关单子叶植物体细胞胚诱导及转化效率提高的分子机理进一步被解析^[44-46]。目前大豆上针对这种关键基因的克隆并证实此基因功能的相关研究还未见报道。

3 大豆体细胞胚应用的研究进展

3.1 大豆体细胞胚遗传转化的研究进展

大豆体细胞胚再生作为转基因方法的重要途径之一, 得到国内外学者广泛应用, 而且就组培条件和转化方法等因素进行了多方面优化。早在 1991 年第一次利用悬浮培养获得的大豆体细胞团作为转化受体, 利用基因枪轰击, 并最终成功获得转基因植株。随后又有多位研究者将利用悬浮培养方法获得的大豆体细胞胚成功转化了抗虫基因 *Bt-CryIA*^[47]、牛酪蛋白基因^[48], 实现了多个基因同时转化^[49] 等, 并获得转基因植株。Maughan 等^[50] 改悬浮培养为固体培养获得胚性细胞团, 利用基因枪法成功获得转基因植株。2000 年 Aragao 等^[51] 以大豆胚尖为外植体, 应用基因枪转化法获得了转基因植株, 转化效率高达 20.1%。目前 Jack 和东农 50 已经建立成熟的体细胞胚和子叶节转化诱导体系, 已成为转基因遗传转化常用基因型品种, 国际上利用 Jack 体细胞胚进行遗传转化研究和体细胞胚再生的相关研究非常普遍^[19,32,36,46,52-54], 大豆垦丰 23 具有非常高体细胞胚诱导率已经被不同研究证实^[1,9]。但是对于大多数大豆基因型来说, 仍然存在体细胞胚诱导率低、不稳定、转化困难的问题。

3.2 大豆体细胞胚构建突变体库的研究进展

随着组培技术的发展, 人们把甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变与组培技术相结合, 在诱变率上取得许多进展。1976 年, Sung 等^[55] 利用化学诱变大豆体

细胞胚,发现存在明显高于自然突变的效果,证实了这种诱变的可行性。1986 年,Tfuii 等^[56]利用 EMS 诱变大豆体细胞胚,研究发现,这种诱变会发生许多突变,突变的显隐性特点是随机的,同时许多点突变可以遗传给后代,例如叶子的某些突变。利用体细胞胚获得的突变体进行筛选和回交改良育种,可以加速育种进程,提高育种效率,在水稻上已有相关的成功案例。Chen 等^[57]利用 EMS 诱导利用水稻体细胞胚产生大量突变体,突变率达到 29.4% 以上,而且多是点突变。Abe 等^[58]利用水稻体细胞胚建立的突变体库,利用其少数位置点突变的特点,进行回交,然后自交构建 F₂ 代群体,进行了基因精细定位和功能解析。Hiroki 等^[59]已经在水稻育种上成功应用,利用高突变率和点突变的特点,成功获得抗盐的隐性突变,充分利用推广品种的优良特性,短期内获得了抗盐性的可推广品种。

大豆中利用体细胞胚诱导再生途径,进行化学诱变,构建突变体的研究也有报道, Van 等^[19]在几个特定大豆品种中成功利用 EMS 诱导大豆体细胞胚产生突变体,而且多是方便遗传研究的点突变,突变率达到 12% 以上。Hofmann 等^[60]同样在大豆体细胞胚诱导再生过程中增加化学诱变,利用 RAPD 分子标记技术对大豆基因检测,获得了良好诱变效果。

近年来兴起的利用重离子束辐照诱变育种技术,已经在许多作物中取得很好的效果^[61-65],在大豆籽粒中也进行了尝试使用,但是因为每次辐照的数量仅 100 粒^[65-68],有限的数量限制了其变异类型,同时也增加了成本。若是利用体细胞胚的体积小,数量大,可获得大量再生苗等特点,同样体积的辐照处理量,将会增加 10 ~ 100 倍以上的再生个体数,可以获得更多变异类型后代,有非常大的应用前景。

4 体细胞胚研究存在的问题

目前科研者已经对大豆体细胞胚诱导再生过程中涉及到的众多条件进行过研究和优化。大豆体细胞胚诱导再生受基因型、激素、pH 等各类因素影响明显;同时也会受到取材时间、部位、大小、光照周期等细节因素影响。还没有一个统一的培养基配方和操作方法,能够适应所有大豆品种。但大量的大豆体细胞胚的研究结果中仍然有许多共识。大豆体细胞胚诱导和再生受基因型明显,不同大豆品种具有明显的诱导率差异^[1,15,23,69]。例如,垦丰 23 和 Jack 属于诱导率极高的基因型,垦丰 16 属于

低诱导率的品种类型。培养基和激素添加方面虽然也有很大差异,但主要仍是以附加一定浓度的 2,4-D 的 MS 培养为主^[70-71]。不同大豆品种除了体细胞胚诱导率差异外,诱导出的体细胞胚的状态也有很大差别,健康状态的体细胞胚是葡萄状、颜色鲜绿、独立存在,基本上都可以再生成植株。非健康状态的体细胞胚形态各异,有畸形胚、有些颜色为鹅黄、成簇生长,很难再生成植株^[1]。

目前,研究者针对许多大豆基因型,对大豆体细胞诱导再生各因素的探讨和研究,已经足以获得稳定的体细胞胚和再生植株。但对于大多数大豆品种,其诱导再生率低,且受基因型影响明显,仍是一个关键问题,也是限制大豆体细胞胚诱导再生应用的最重要因素之一。虽然大豆中已获得众多与体细胞胚诱导和再生相关的基因,但与单子叶作物中确定的关键基因 BABY BOOM 和 WUSCHEL2 相比,仍需进一步确定与大豆体细胞胚诱导再生相关的关键基因,以突破基因型对体细胞胚诱导率的限制。现在已建立的稳定体细胞胚诱导体系,获得的高质量体细胞胚能为综合利用多种现代分子生物学技术手段,提高大豆体细胞胚诱导再生率,突破其受基因型的影响,提供基础。同时可以利用正向遗传学方法,针对体细胞胚诱导率高低表型构建遗传群体,进行基因定位和精细定位,确定关键基因进行克隆和验证;可以利用体细胞胚发育过程中转录组测序和 ATAC-Seq 进行体细胞胚发育过程中差异基因和相应的调控基因作用的研究,构建大豆体细胞胚诱导发育的调控网络,揭示其分子机理;这些研究最终有助于大豆体细胞胚诱导再生途径的利用,有助于推动大豆转基因方法的实施和大豆种质资源材料的创新,也助于探明大豆体细胞胚发育机制。

参考文献

[1] 王鹏飞,刘丽君,唐晓飞,等. 适于体细胞胚发生的大豆基因型筛选 [J]. 大豆科学,2013, 32(1): 43-45. (Wang P F, Liu L J, Tang X F, et al. Screening of soybean genotypes suitable for somatic embryogenesis [J]. Soybean Science,2013, 32 (1): 43-45.)

[2] Cheng T Y, Saka H, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture [J]. Plant Science Letters, 1980, 19(2): 91-99.

[3] Kartha K K, Pahl K, Leung N L, et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: Soybean, cow bean, peanut, chick-pea, and bean [J]. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 1671-1679.

[4] Barwale U B, Kerns H R, Widholm J M. Plant regeneration from

- callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organ genesis[J]. *Planta*, 1986, 167: 473-481.
- [5] 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.
- [6] Kim J, LaMotte C E, Hack E. Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings [J]. *Plant Physiology*, 1990, 136: 664-669.
- [7] 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.
- [8] 侯文胜,林抗雪,陈普,等. 大豆规模化转基因技术体系的构建及其应用[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(21): 4198-4210. (Hou W S, Lin K X, Chen P, et al. Establishment and prospect of efficient transformation systems for soybean[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(21): 4198-4210.)
- [9] 程琳静,闫军辉,钟云鹏,等. 大豆高效体细胞胚诱导和增殖方法的研究[J]. *大豆科学*, 2014, 33(3): 305-310. (Cheng L J, Yan J H, Zhong Y P, et al. Research to the effective methods of soybean somatic embryo induction and proliferation[J]. *Soybean Science*, 2014, 33(3): 305-310.)
- [10] Lazzeri P A, Hildebrand D F, Collins G B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1985, 3(4): 160-168.
- [11] Ranch J P, 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.
- [12] 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.
- [13] Christianson M L, Warnick D A, Carlson P S. A morphogenetically competent soybean suspension culture[J]. *Science*, 1983, 222(4624): 632-635.
- [14] 刘艳芝,赵桂兰,刘莉,等. 大豆幼胚子叶诱导胚胎发生[J]. *吉林农业科学*, 1999(6): 16-18. (Liu Y Z, Zhao G L, Liu L, et al. The induction of embryogenesis from immature cotyledon of soybean[J]. *Journal of Jilin Agricultural Sciences*, 1999(6): 16-18.)
- [15] 张淑珍,徐鹏飞,林世锋,等. 大豆体细胞胚再生体系的研究进展及展望[J]. *大豆科学*, 2004, 23(3): 232-235. (Zhang S Z, Xu P F, Lin S F, et al. Recent advances and prospect on soybean somatic embryogenesis system[J]. *Soybean Science*, 2004, 23(3): 232-235.)
- [16] 王萍,王罡,季静,等. 大豆体细胞胚胎发生与农杆菌介导的遗传转化[J]. *遗传*, 2004(5): 695-700. (Wang P, Wang G, Ji J, et al. Studies of somatic embryogenesis and genetic transformation by *Agrobacterium*-mediated in soybean[J]. *Hereditas*, 2004(5): 695-700.)
- [17] 李宁辉,徐鹏飞,范素杰,等. 大豆品种合丰 25 体细胞胚发生条件的优化[J]. *作物杂志*, 2011(4): 23-27. (Li N H, Xu P F, Fan S J, et al. Optimizing of regeneration conditions of somatic embryo for soybean variety 'Hefeng 25' [J]. *Crops*, 2011(4): 23-27.)
- [18] 李海燕,朱延明,刘北东,等. 大豆幼胚子叶体细胞胚诱导主要影响因素的研究[J]. *作物学报*, 2002, 28(6): 852-856. (Li H Y, Zhu Y M, Liu B D, et al. Study on main factors influencing somatic embryo inducing from immature cotyledon of soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2002, 28(6): 852-856.)
- [19] van K, Hyun J J, Jang Y E, et al. Regeneration of plants from EMS-treated immature embryo cultures in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. *Journal of Crop Science Biotechnology*, 2008, 11(2): 119-126.
- [20] 周思君,尹光初,雷勃钧,等. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. *大豆科学*, 1989, 8(1): 39-44. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. From soybean young embryo induced embryogenesis regeneration plant[J]. *Soybean Science*, 1989, 8(1): 39-44.)
- [21] 王萍,吴颖,杨武杰,等. 大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生及其相关因子的分析[J]. *中国油料作物学报*, 2002, 24(1): 29-32. (Wang P, Wu Y, Yang W J, et al. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean and analysis of correlative factors[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2002, 24(1): 29-32.)
- [22] 曲桂芹,张贤泽,霍俊伟. 大豆体细胞胚的成熟处理及植株再生[J]. *东北农业大学学报*, 2002, 33(1): 82-89. (Qu G Q, Zhang X Z, Huo J W. Maturation of soybean somatic embryos and the plant regeneration[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2002, 33(1): 82-89.)
- [23] 王晓春,刘尚前,季静,等. 影响大豆体细胞胚萌发率的因素[J]. *大豆科学*, 2004, 23(2): 151-154. (Wang X C, Liu S Q, Ji J, et al. The affect factors on the germination frequency of somatic embryos of soybean [J]. *Soybean Science*, 2004, 23(2): 151-154.)
- [24] Chugh A, Khurana P. Gene expression during somatic embryogenesis[J]. *Current Science*, 2002, 83(6): 715-723.
- [25] Lotan T, Ohto M, Matsudaira Y K, et al. *Arabidopsis* LEAFY-COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells[J]. *Cell*, 1998, 93(6): 1195-1205.
- [26] Zhang S, Wong L, Meng L, et al. Similarity of expression patterns of knotted1 and Zm LEC1 during somatic and zygotic embryo-gensis in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Planta*, 2002, 215(2): 191-194.
- [27] Yazawa K, Takahata K, Kamada H. Isolation of the gene encoding carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(3): 215-223.
- [28] Fambrini M, Durante C, Cionini G, et al. Characterization of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene in *Helianthus annuus* and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis[J]. *Development Genes and Evolution*, 2006, 216(5): 253-264.
- [29] 李爱芹,夏晗,王兴军,等. 花生 *LEC1* 基因的克隆及表达研究[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(9): 1730-1735. (Li A Q, Xia H, Wang X J, et al. Cloning and expression analysis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) *LEC1* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(9): 1730-1735.
- [30] Stone S L, Kwong L W, Yee K M, et al. LEAFY COTYLEDON2

- encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(20): 11806-11811.
- [31] 武小霞,王敏,陈庆山,等. 大豆再生相关基因 *Gm LEC* 的克隆及生物信息学分析[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(4): 1-9. (Wu X X, Wang M, Chen Q S, et al. Cloning and bioinformatics analysis of regeneration related gene *GmLEC* in soybean[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2015, 46(4): 1-9.)
- [32] 杨超. 大豆植株再生和遗传转化技术体系的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009. (Yang C. Study on technological system of plant regeneration and genetic transformation in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.)
- [33] Thakare D, Tang W, Hill K, et al. The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean [J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(4): 1663-1672.
- [34] Zheng Q, Zheng Y, Ji H, et al. Gene regulation by the AGL15 transcription factor reveals hormone interactions in somatic embryogenesis[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(4): 2374-2387.
- [35] Perry S E, Zheng Q, Zheng Y. Transcriptome analysis indicates that GmAGAMOUS-Like 15 may enhance somatic embryogenesis by promoting a dedifferentiated state[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, 11(7): e1197463.
- [36] Li S N, Su A Y, Yu Y C, et al. Bioinformatics and expression analysis of regeneration related gene *GmARF* in soybean[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(10): 2187-2193.
- [37] Zhang C, Wu X, Zhang B, et al. Functional analysis of the *GmESR1* gene associated with soybean regeneration [J]. *PloS One*, 2017, 12(4): e0175656.
- [38] Rose R J, Sheahan M B, Tiew T W Y. Connecting stress to development in the induction of somatic embryogenesis[M]// Aslam J, Srivastava P S, Sharma M P. Somatic embryogenesis and gene expression. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013: 146-165.
- [39] Xing S, Quodt V, Chandler J, et al. SPL8 acts together with the brassinosteroid-signaling component BIM1 in controlling *Arabidopsis thaliana* male fertility[J]. *Plants*, 2013, 2(3): 416-428.
- [40] Sun J, Li J, Liu M, et al. Construction and analysis of a suppression subtractive hybridization library of regeneration-related genes in soybean[J]. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2015, 14(1): 763-773.
- [41] Thibaud-Nissen F, Shealy R T, Khanna A, et al. Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(1): 118-136.
- [42] Song X, Han Y, Teng W, et al. Identification of QTL underlying somatic embryogenesis capacity of immature embryos in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. *Plant cell reports*, 2010, 29(2): 125-131.
- [43] Mookkan M, Nelson-Vasilchik K, Hague J, et al. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators BABY BOOM and WUSCHEL2[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(9): 1477-1491.
- [44] Horstman A, Li M, Heidmann I, et al. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(2): 848.
- [45] Ge F, Huang X, Hu H, et al. Endogenous small interfering RNAs associated with maize embryonic callus formation[J]. *PloS One*, 2017, 12(7): e0180567.
- [46] Liu Y, Zhang Z, Fu J, et al. Transcriptome analysis of maize immature embryos reveals the roles of cysteine in improving *Agrobacterium* infection efficiency[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1778.
- [47] Stewart C N J, Adang M J, All J N, et al. Genetic transformation recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* *cryIac* gene[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(1): 121-129.
- [48] Santarem E R, Pelissier B, Finer J J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1997, 33(1): 13-19.
- [49] Hadi M Z, McMullen M D, Finer J J. Transformation of 12 different plasmids into soybean *via* particle bombardment [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(7): 500-505.
- [50] Maughan P J, 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.
- [51] Aragao 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: 1-6.
- [52] Walker D R, Parrott W A. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, 64(1): 55-62.
- [53] Santarem E R, Pelissier B, Finer J J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1997, 33(1): 13-19.
- [54] 邱波,王志坤,孟凡立,等. 不同大豆基因型再生性及对农杆菌敏感性的研究[J]. *大豆科学*, 2011, 30(5): 752-756. (Qiu B, Wang Z K, Meng F L, et al. Regeneration and sensitivity to *Agrobacterium* of different soybean genotypes [J]. *Soybean Science*, 2011, 30(5): 752-756.)
- [55] Sung Z R. Mutagenesis of cultured plant cells [J]. *Genetics*, 1976, 84: 51-57.
- [56] Tfuui J. The mutagenic effect of EMS on somatic mutation (M1) and recessive mutation (M2) of soybean[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1986, 26(2): 191-195.
- [57] Chen Y L, Liang H L, Ma X L, et al. An efficient rice mutagenesis system based on suspension-cultured cells [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(2): 122-130.

[58] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap [J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(2):174-178.

[59] Hofmann N E, Raja R, Nelson R L, et al. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers [J]. Biologia Plantarum, 2004, 48 (2): 173-177.

[60] Hiroki T, Muluneh T, Akira A, et al. MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 445-449.

[61] 曲颖, 李文建, 周利斌, 等. 重离子辐射植物的诱变效应研究及应用[J]. 原子核物理评论, 2007, 24(4): 294-298. (Qu Y, Li W J, Zhou L B, et al. Research and application of mutagenic effects in plants irradiated by heavy ion beams [J]. Nuclear Physics Review, 2007, 24(4): 294-298.)

[62] 周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 重离子束辐照育种研究进展及发展趋势[J]. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 165-170. (Zhou L B, Li W J, Qu Y, et al. Progress and tendency in heavy ion irradiation mutation breeding[J]. Nuclear Physics Review, 2007, 24(4): 294-298.)

[63] 刘建光, 王永强, 赵贵元, 等. 重离子辐照诱变育种应用及其生物学效应研究进展[J]. 作物杂志, 2016, 3(3): 12-16. (Liu J G, Wang Y Q, Zhao G Y, et al. Advances of heavy ion beam application in plant breeding and their biological effect[J]. Crops, 2016, 3(3): 12-16.)

[64] 杨陶丽薇, 刘瑞媛, 顾文婷, 等. 碳离子辐照对甜高粱糖分与蔗糖代谢相关酶活力的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2015, 33(5): 44-51. (Yang-Tao L W ,Liu R Y, Gu W T, et al. Effects on the sugar components and related enzyme activity of sucrose metabolism by carbon ion irradiation in sweet sorghum [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2015, 33 (5): 44-51.)

[65] 冯学金, 郭秀娟, 杨建春, 等. 诱变技术在亚麻育种中的应用[J]. 核农学报, 2017, 31(7): 1310-1316. (Feng X J, Guo X J, Yang J C ,et al. Application of mutation technology in flax breeding[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31 (7): 1310-1316.)

[66] Ubonprasert B, Srinivers P, Lamseejan S, et al. Effects of gamma irradiation of soybean cotyledon explants on embryo induction and regeneration in a somatic embryo cycling system[J]. Journal of Breeding & Genetics,1998,30(1):19-24.

[67] 余丽霞, 李文建, 杜艳, 等. 碳离子束辐照大豆当代诱变效应及褐皮突变体的初步研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2014, 32(2): 53-59. (Yu L X, Li W J, Du Y, et al. Preliminary study on current mutagenic effects and brown seed mutant of soybean induced by carbon ion irradiation[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2014, 32(2): 53-59.)

[68] 张秋英, 余丽霞, 李彦生, 等. 重离子束辐照大豆籽粒当代效应的初步研究[J]. 大豆科学, 2013, 32(5): 587-590. (Zhang Q Y, Yu L X, Li Y S, et al. Preliminary investigation of acceptable heavy ion beam irradiation dosage treated to soybean (*Glycine max* L.) seed[J]. Soybean Science, 2013,32(5):587-590.)

[69] 曲桂芹, 张贤泽, 霍俊伟. 影响大豆体细胞胚胎诱导因素的研究[J]. 植物研究, 2001(2): 210-214, 323. (Qu G Q, Zhang X Z, Huo J W. Studies on somatic studies on somatic embryos induction in soybean (*Glycine Max* L.) [J]. Bulletin of Botanical Research, 2001(2): 210-214, 323.)

[70] 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究[J]. 植物学通报, 1992(2): 38-43. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. Studies on the influential factors of the somatic embryogenesis of soybean[J]. Chinese Bulletin of Botany, 1992 (2): 38-43.)

[71] 吴超, 武天龙. 大豆未成熟子叶体细胞再生及相关农艺性状影响因子的分析[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 22-25. (Wu C, Wu T L. Somatic embryogenesis from immature cotyledons and analysis of correlative agronomic characters [J]. Soybean Science, 2004, 23(1): 22-25.)