

大豆悬浮细胞培养及作为外源基因转化受体的研究

方 星,胡倩倩,王建国,岳 娜,孟祥勋

(苏州大学 基础医学与生物科学学院,江苏 苏州 215123)

摘 要:以吉林小粒7号大豆品种为材料,切取无菌幼苗下胚轴诱导愈伤组织,初步建立了大豆悬浮细胞系,测定不同硼酸浓度下悬浮细胞生长变化;采用农杆菌介导法对大豆悬浮细胞进行外源 *GUS* 基因的转化,先通过不同程度的超声处理确定最佳超声时长,然后在最佳超声处理时长的基础上,探讨了硼酸浓度对转化效率的影响;最后采用 PCR 和 Southern blot 杂交对抗性愈伤做分子鉴定。结果表明:大豆悬浮细胞正常生长硼酸浓度在 $2.0 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 过高或过低均会抑制大豆细胞正常的生长,高于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制作用最显著。但在转化过程中,适当增加硼酸浓度 ($10 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 则能够提高悬浮细胞的转化效率,并且有助于转化组织的筛选,借以 3 min 超声的辅助作用, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸浓度下转化效率达到 1 mg 转化细胞团中含 28 个转化体。

关键词:大豆;悬浮细胞;硼酸;农杆菌;超声;转化

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0036

Culture and Exogenous Gene Transformation of Suspension Cells in Soybean

FANG Xing, HU Qian-qian, WANG Jian-guo, YUE Na, MENG Xiang-xun

(School of Basic Medicine and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu)

Abstract: In the experiment, a soybean suspension cells was initially established with the callus induced from the hypocotyl of sterile seedling of Jilinxiaoli 7 soybean. And then the influence of concentrations of boric acid on the growth of suspension cell cultures (fresh weight) were determinated and the transformation of exogenous *GUS* gene to the cells were conducted by using *Agrobacterium* - mediated method. The transformation efficiencies influenced by sonication duration and boric acid concentration were mainly investigated through histochemical method in order to find an appropriate genetic transformation way. The positive transformed cell cultures were further identified by PCR technique and Southern blot hybridization. The results showed that boric acid concentration for normal growth of soybean suspension cell was between 2.0 and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, higher or lower boron medium would inhibited soybean cell growth, especially at a high level of more than $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. However, the appropriate increase in boric acid concentration ($10 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) could improve the transformation efficiency of the cell suspension, which was also helpful to the screening of the transformant in the transformation process. Twenty eight transformants were obtained in 1 mg transformed cells under $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ boric acid concentration with the assistance of 3 min sonication.

Keywords: Soybean; Suspension cell; Born acid; *Agrobacterium*; Sonication; Transformation

随着现代生物技术的发展,采用基因工程技术对大豆进行改良,提高产量、改善品质及抗逆性等已成育种家的重要目标。植物悬浮细胞系具有个体小且均一,植物代谢旺盛,分裂活跃,可以克服转化效率低和嵌合体^[1]等问题。国内外许多学者利用悬浮细胞作为转化受体取得了成功^[2-3],但关于大豆悬浮细胞的此类研究报道相对较少,Trick 等^[4]利用超声波辅助的农杆菌介导转化大豆获得了抗性愈伤组织,而 Ganapathi 等^[5]直接使用农杆菌介导转化大豆悬浮细胞,在抗性愈伤中检测到了外源性的乙肝表面抗原的表达。

硼是植物生长发育必需微量元素之一,在维持细胞壁和细胞间连接、糖类物质运输和信号传递等

方面具有重要的功能。Kobayash 等^[6]发现硼浓度过高或过低将导致植物细胞壁结构紊乱、功能异常。本试验定量分析硼酸浓度对大豆悬浮细胞生长的影响,并进一步探讨了超声处理时间和硼酸浓度对农杆菌介导的悬浮细胞遗传转化的影响,旨在找到一种高效优良的大豆遗传转化方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆品种 吉林小粒7号,由吉林农业科学院大豆研究所提供。

1.1.2 菌种与质粒 根癌农杆菌 EHA105,含质粒 pCAMBIA1301,质粒上有潮霉素 (*Hyg*) 和卡那霉素

(*Kan*) 抗性基因与 *GUS* 报告基因,由苏州大学基础医学与生物科学学院遗传系实验室保存。

1.1.3 培养基 MSB 培养基为 MS 培养基中无机成分加 B₅ 培养基中有机成分(其中硼酸浓度为 $6.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),MSB₀ 为不含硼元素的 MSB 培养基。YEP 培养基配方:酵母提取物 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NaCl $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH7.0。

1.2 方法

1.2.1 大豆无菌苗的培养 选取饱满、无破损、大小均一的大豆种子,用自来水冲洗 2~3 次,75% 酒精灭菌 50 s,0.1% 升汞处理 8 min,无菌水继续清洗 3~4 次,用镊子接种到萌发培养基($1/2\text{MSB} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$,pH5.80)^[7], $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下暗培养 2~3 d,后转移到光照下培养 2 d,光照周期 16 h/8 h,至大豆下胚轴和子叶变绿。

1.2.2 愈伤诱导及悬浮细胞系的建立 选取长势优良的无菌苗,切除子叶,在近子叶节端的下胚轴上切取厚约 2 mm 的薄片,按切口处贴近培养基,轻轻接种在诱导培养基($\text{MSB} + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT}$ pH5.80)上,每皿接种 5 块外植体,置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照周期 16 h/8 h 下培养,每 14 d 继代 1 次,培养约 28 d。

挑选松散、颜色浅绿、颗粒状的愈伤组织块,约 0.5 g 用解剖刀稍做切碎,分散到 25 mL 液体 MSB 培养基(同诱导培养基)中, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 振荡培养,初代培养 10 d 后,滤去大的团块,静置 10~15 min,尽量倾去上清,按 1:5 的体积比接种到新的液体培养基中,每 7 d 继代 1 次,继代 4~5 次,即可得到稳定均一的大豆悬浮细胞系。

1.2.3 不同硼酸浓度下悬浮细胞生长测定 配制液体 MSB₀ 培养基($\text{MSB} + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT}$),分别加入硼酸浓度为 2.0,6.2,10,30,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,调 pH 至 5.80。取上述稳定的大豆悬浮细胞,倾上清,按 1:5 的体积比分别接种至不同硼酸浓度的 MSB₀ 培养基中, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 振荡培养,隔 3 d 取样,多层纱布过滤,称鲜重,每个浓度重复 3 次。

1.2.4 超声时间的确定 从 -80°C 取出甘油菌,平板划线活化。挑取单菌落接种到液体 YEP 培养基(含 *Kan* $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)中, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 28°C 振荡培养过夜,按 1:100 的比例接种到新鲜的 YEP 培养基中,培养至 $\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 0.6$ 。 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心收集菌体,用等体积重悬液($\text{MSB} + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT} + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AS}$,pH5.50)重悬菌体,室温放置 1~2 h。

将正常硼酸浓度下培养的悬浮细胞植板于固体 MSB 培养基上(加隔滤纸一层),置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照周期 16 h/8 h 下,预培养 7 d 后,转入制备好的农杆菌悬浮液,摇动混匀,再放入超声波发生仪中进行超声处理,样品分别处理时长为 0,1,2,3,5 min,取出后室温静置 15 min。小心地吸尽多余菌液,转接到固体共培养基($\text{MSB} + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT} + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AS}$,pH 5.50),置于 28°C 下黑暗培养 2 d。每个超声时长重复 3 次。

1.2.5 不同硼酸浓度下悬浮细胞的遗传转化 将预培养、重悬液以及共培养等操作中的 MSB 培养基替换成不同硼酸浓度的 MSB₀ 培养基,硼酸浓度分别为 0,6.2,10,30,50,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,超声处理为转化效果最佳时的超声时长,其余操作均不做改变,进行悬浮细胞的侵染转化。每个硼酸浓度重复 3 次。

取出共培养后的细胞,无菌水漂洗 3~4 次,液体除菌培养基($\text{MSB} + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT} + 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{cef} + 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{carb}$,pH5.80)振荡洗涤 45 min,转移到延迟筛选培养基(成分同除菌培养基,加入 0.70% 琼脂)中培养 7 d,然后,转移至梯度筛选培养基(延迟筛选培养基加入 hyg),hyg 浓度依次为 50,75,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个抗生素浓度培养 10 d,培养 4 代,可得到直径 1 cm 左右抗性愈伤组织块。培养条件均为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照周期 16 h/8 h、光照强度 1 500 ~ 2 000 lx。

1.2.6 *GUS* 组织化学染色 取适量的延迟培养的细胞,洗去表面的培养基,按照 Jefferson^[8] 方法进行 *GUS* 组织化学染色,统计 *GUS* 显色个数,称量细胞总质量,计算染色率。

GUS 基因瞬时表达率($\text{个} \cdot \text{mg}^{-1}$) = GUS 着色细胞团个数/细胞总质量

1.2.7 PCR 及 Southern blot 分子鉴定 采用 SDS 法^[9] 提取愈伤组织基因组,筛选得到抗性愈伤组织为试验组,使用未转化的细胞作为阴性对照,质粒 pCambia1301 作为阳性对照。应用软件 Primer Premier 5.0 针对 *GUS* 基因设计特异性引物,上游引物:5'-TAATGTTCTGCGACGCTCA-3';下游引物:5'-ACA GGTATGGAATTTCCGCCG-3',片段长度 321 bp。PCR 反应程序:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^\circ\text{C}$ 变性 45 s,56 $^\circ\text{C}$ 退火 45 s,70 $^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,循环 34 次,70 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 保温停止反应。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物,拍照。

Southern blot 杂交试验中,质粒为正对照、未转化基因为负对照、将二者和转化组织基因分别用 *EcoR* I 酶切 10~12 h,20~30V 电泳 8~10 h,碱性毛细管转移

法转移约 24 h 至带正电尼龙膜上,按照 Roche 试剂盒说明书(DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche, Germany),预杂交、杂交、洗膜、CSPD 荧光检测,X 光片显影观察杂交结果。

1.3 数据分析

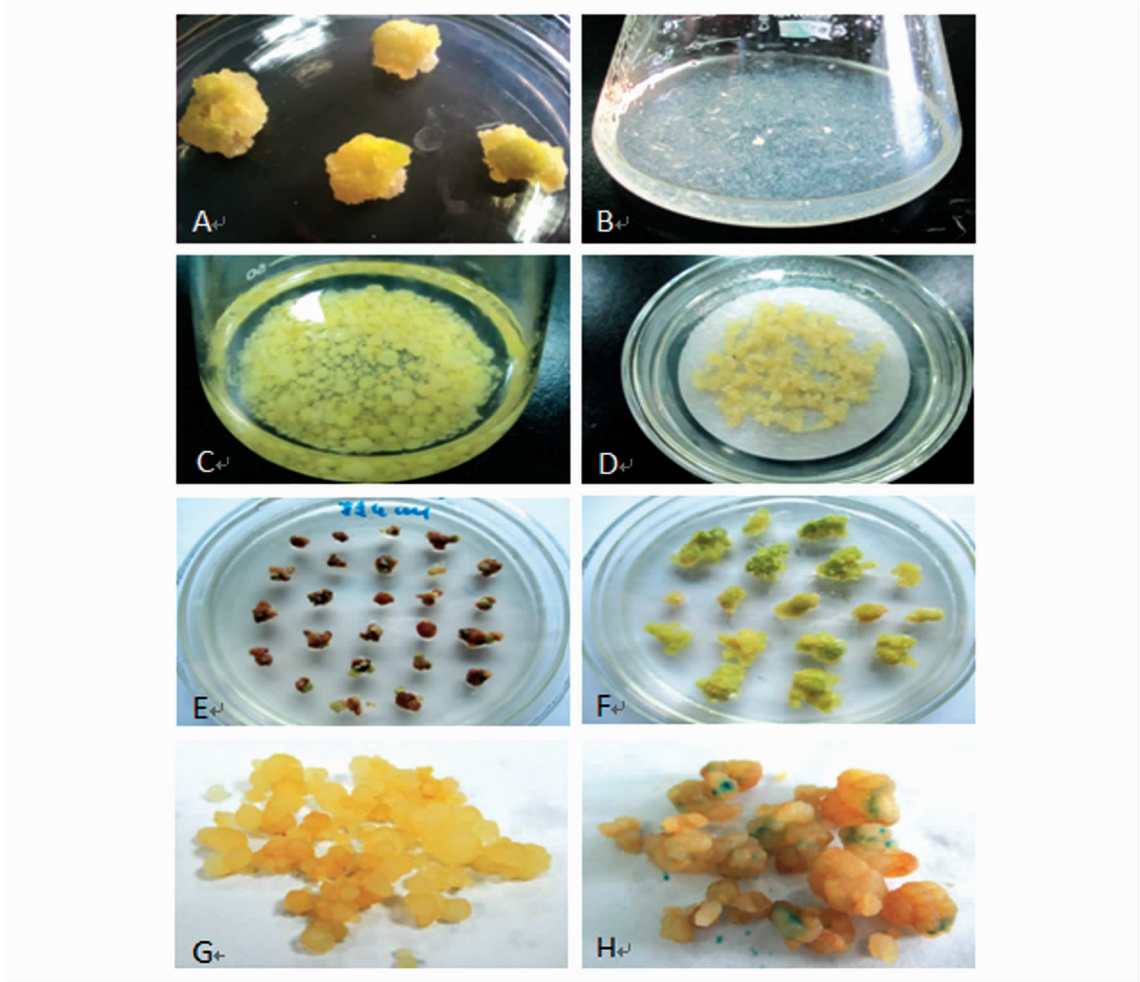
采用 Excel 2010 对数据进行处理、统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 大豆悬浮细胞培养及遗传转化过程

大豆下胚轴光照条件下经过 25 d 左右的诱导

培养,得到浅黄色的松散愈伤细胞(图 1A),接种到液体 MSB 培养基中,14 d 产生均匀小颗粒的细胞悬液(图 1B),继代培养,细胞进入快速生长阶段并且出现在均一细胞团(图 1C)。将悬浮细胞转移到固体 MSB 培养基上,细胞短暂调整后可以继续正常生长(图 1D),用农杆菌介导外源基因的转化,得到了抗性的大豆愈伤组织(图 1E 和 1F)。延迟培养 7 d 后,转化细胞团 *GUS* 染色出现呈现蓝色斑点(图 1H),未转化个体无显色反应(图 1G)。



A:下胚轴愈伤组织诱导;B ~ C:悬浮细胞系的建立;D:转到固体培养基上的悬浮细胞;E ~ F:抗性愈伤组织的筛选;G:非转化细胞团的 *GUS* 染色;H:转化细胞团 *GUS* 染色。

A:Hypocotyl callus induction;B - C:Establishment of soybean suspension cell;D:Suspension cells cultured on solid medium;E - F:Screening of resistant callus;G:*GUS* staining of non - transformed clumps;H:*GUS* staining of transformed clumps.

图 1 大豆悬浮细胞系建立及遗传转化

Fig. 1 Establishment of soybean suspension cell and its genetic transformation

2.2 硼酸浓度对大豆悬浮细胞生长的影响

图 2 为大豆悬浮细胞的生长曲线,在不同硼酸浓度下,细胞的生长总体上均呈现过渡期、增长期和稳定期的趋势。按照 MS 培养基的标准配方,正常硼酸浓度为 $6.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,细胞 3 d 即进入快速增长

期,12 d 达到了生长最大值(10.3 倍);而硼酸浓度($2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)较低时,过渡期延长到 5 d,生长最大值也略有下降(9.6 倍);当硼酸浓度略高于正常浓度上升为 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,过渡期延长至 4 d,生长最大值为 10.9 倍,高于正常硼酸浓度下 0.6 倍

($P>0.05$);然而,当硼酸浓度远远高于正常浓度时,无论是过渡期还是生长最大值均极显著低于正常浓度($P<0.01$)。

2.3 超声时长对转化效率的影响

在正常硼酸浓度下,只改变转染过程中超声处理时间的长短,统计最终 *GUS* 基因瞬时表达情况,所得结果如图 3。在超声处理 3 min 时,*GUS* 染色大豆悬浮细胞团块的个数最多,重复操作的误差小,稳定性好;而超声时间不足和时间过长,*GUS* 染色效率呈现明显的下降,重复稳定性差。由此,在本实验中得出农杆菌 EHA105 介导的大豆悬浮细胞时超声处理 3 min 时,*GUS* 染色个体数最多,转化效果最好。

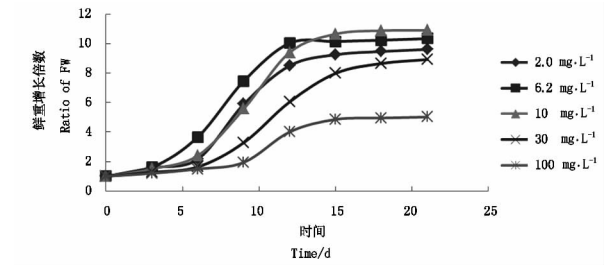


图 2 不同硼酸深度下大豆悬浮细胞生长变化
Fig.2 The growth difference of soybean suspension culture under different boric acid concentrations

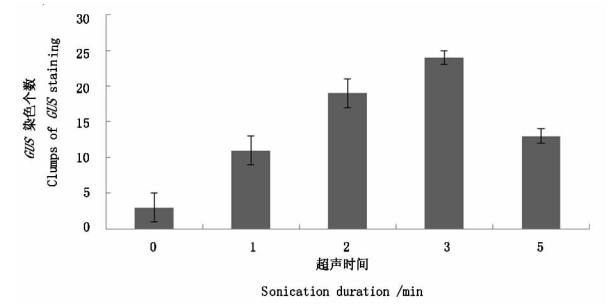


图 3 超声时间对大豆细胞团中 *GUS* 基因瞬时表达率的影响
Fig.3 Effect of sonication duration on transient *GUS* expression in soybean cell clumps

2.4 硼酸浓度对转化效率的影响

对不同硼酸浓度培养的大豆悬浮细胞进行转化,超声处理 3 min,延迟培养 7 d,统计 *GUS* 染色效率。结果显示:硼酸浓度分别为 0, 6.2, 10, 30, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对应 *GUS* 染色个数分别是 27 ± 3 , 24 ± 1 , 25 ± 1 , 28 ± 2 , 23 ± 4 , 18 ± 7 。以 MS 培养基中硼酸浓度 $6.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为参考标准,不添加硼酸和硼酸浓度过高(大于 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,转化细胞团 *GUS* 染色个数均会减少,尤其是当硼酸的浓度高于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,减少个数更加明显,细胞易褐化死亡,但相对于正常硼酸浓度,小幅度增加硼酸浓度可以在一定程度上提高 *GUS* 染色个数, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸浓度时 *GUS* 染色个数平均达到 28 个。研究中还

发现,硼酸浓度略高于正常值,转化细胞较不添加硼酸时能更快恢复生长,且对抗生素更加敏感,利于筛选。

2.5 PCR 与 Southern blot 分子鉴定

筛选培养 28 ~ 35 d 后,随机挑取颜色鲜绿、活力较强的愈伤团块,提取基因组,以 *GUS* 基因为目的基因进行 PCR 扩增,结果如图 4,抗性愈伤同质粒均扩增出了 321 bp 的目标条带,而未转化的愈伤细胞没有出现此条带,初步证明外源 *GUS* 基因已导入到大豆基因组中。

分别取 5 ng 质粒、15 μg 抗性愈伤基因组与 15 μg 未转化基因组, *EcoR* I 酶切过夜,以质粒 *GUS* 基因 PCR 扩增产物为探针模板进行 Southern blot 杂交分析。所得结果如图 5,质粒和抗性组织都出现了阳性条带,且条带大小不一,而未转化组织未出现任何条带,这些结果更进一步证实外源 *GUS* 基因已整合到大豆基因组,整合具有随机性。

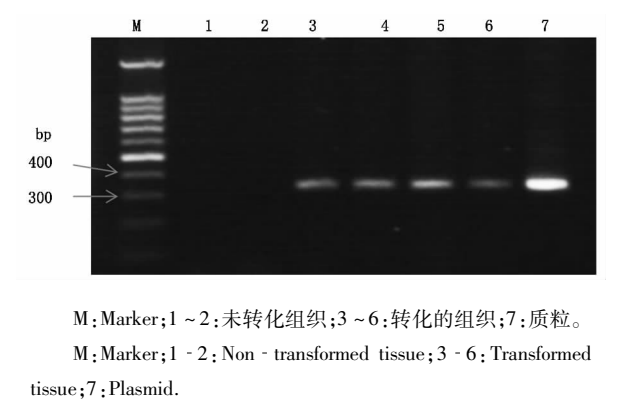


图 4 转基因组织 PCR 鉴定
Fig.4 PCR identification of transformed tissue

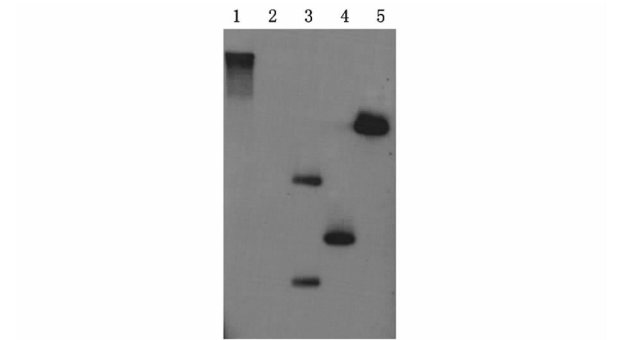


图 5 转基因组织的 Southern blot 检测
Fig.5 Southern blot analysis of DNA from transformed tissue

3 结论与讨论

大豆是公认的难转化植物之一,而以往的研究大多数集中在大豆器官发生和转化上,如子叶

节^[10]、胚轴^[11]、未成熟胚^[12]等,这些转化受体有些虽然能够得到转基因植株,但还存在着效率较低、嵌合体等弊端。本研究中所采用的大豆悬浮细胞系,MSB 培养基成分简单,无需添加诸如二硫苏糖醇(DTT)和半胱氨酸(lysteine)等^[13]防止褐化,导入外源的 *GUS* 基因,能够快速的获得表达,只需要很少量细胞,就能够得到大量的转化细胞团,被证明是一种理想的转化受体。

硼可以与植物细胞壁中的半乳糖醛鼠李聚糖(RG-Ⅱ)组成 B-RG-Ⅱ 复合物,此复合物又与果胶多糖交联,构成了完整的细胞壁结构^[14]。刘鹏等^[15]和胡倩倩等^[16]研究均认为硼酸浓度过低或过高会影响大豆的生长代谢。本研究中,硼酸浓度为 2.0 mg · L⁻¹ 时,过渡期延长,说明细胞的正常生长受到低硼的抑制,而生长最大值为 9.6 倍,较正常硼酸浓度下只略有下降,这与 Toru Matoh 在 1996 年的研究^[17]相符合,大豆是一种对硼低敏感的植物,只需很少量的硼营养就能够维持细胞的正常生理需求,而悬浮细胞生长快,大多为薄壁细胞,这也减少了对硼的需求;当硼酸浓度远远高于正常浓度时,无论是过渡期还是生长最大值均极显著低于正常浓度,这则如 Toru Matoh^[18]研究得出的结论,大部分的硼元素仍以游离的硼酸盐形式聚集在植物细胞壁中,当环境中硼酸浓度过高时,硼酸就会流溢到细胞质中,干扰细胞质的生理代谢,引起中毒。此外,本试验采用的方法为定量分析,进一步得到大豆悬浮细胞正常生长的硼酸浓度应在 2.0 ~ 10.0 mg · L⁻¹。

农杆菌介导的大豆转基因受到很多转化条件的影响,其中包括农杆菌的类型、乙酰丁香酮、外植体的预培养^[19]等,本研究在进行侵染操作前将悬浮细胞转移到固体培养基上培养 7 d,并在侵染过程中,加入了 100 μmol · L⁻¹ 乙酰丁香酮,这些综合的改进措施都极大地改善了遗传转化的结果。

超声波的生物学效应主要是空化作用,使细胞膜发生可逆的透性变化^[20]。Trick 等^[4]研究认为,超声可以破坏组织的表层结构,而细菌则能够大量聚积在这些受损的部位,进而吸附到相邻完整细胞的细胞壁上,转移 T-片段基因,整合到细胞核基因组,完成侵染过程。在此基础之上,本研究对比多个超声时长的转化效率,得到了悬浮细胞最佳的超声时长为 3 min,此时的转化个数远远高于未超声处理的情况,而在进一步的硼酸对转化效率影响研究当中,发现硼酸浓度为 30 mg · L⁻¹ 时要比正常浓度下转化效率高,这在某种程度上更加说明改变受体细胞壁的结构可以提高转化效率,因为硼酸具有维持细胞壁的结构和功能的作用,而异常的硼酸浓度会

破坏这种稳定结果,当辅以超声波处理,这种本就不稳定的细胞壁就会更容易紊乱,并且硼酸浓度异常造成的紊乱只是暂时的,可以通过转移到正常硼酸浓度下继续培养得以恢复^[21],这些都为农杆菌的附着侵染提供了良好的条件,从而更加容易实现遗传转化的进行。本研究针对的是愈伤组织悬浮细胞的转化,但转化后的诱导再生仍然是一大技术障碍,有必要进一步研究探讨。

参考文献

[1] Roderick J S, John D. Transformation of carrot tissues derived from proembryonic suspension cells; A useful model system for gene expression studies in plants[J]. Plant Molecular Biology, 1987, 8: 265 - 274.

[2] 翟红,刘庆昌. 甘薯胚性悬浮细胞遗传转化的研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 487 - 491. (Studies on the genetic transformation of embryogenic suspension cultures in sweetpotato [J]. 2003, 36(5): 487 - 491.)

[3] Ganapathi T R, Higgs N S, Balint - Kurti P, et al. *Agrobacterium* - mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB) [J]. Plant Cell Reports, 2001, 20:157 - 162.

[4] Trick H N, Finer J J. Sonication - assisted *Agrobacterium* - mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 482 - 488.

[5] Ganapathi T R, Sunil Kumar G B, Srinivas L. et al. Analysis of the limitations of hepatitis B surface antigen expression in soybean cell suspension cultures[J]. Plant Cell Reports, 2007, 26:1575 - 1584.

[6] Kobayashi M, Matoh T, Azuma J. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross - linked by boratediol ester bonds in higher plant cell walls[J]. Plant Physiology, 1996, 110: 1017 - 1020.

[7] 刘海坤,卫志明. 一种大豆成熟种子的消毒方法[J]. 植物生理学通讯,2002,38(3):260 - 261. (Liu H K, Wei Z M. A method fertilizing mature seeds of soybean[J]. Plant Physiology Communication, 2002, 38 (3):260 - 261.)

[8] Jefferson R A. *GUS* fusions; Beta - glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO Journal, 1987, 6: 3901 - 3907.

[9] 王振东,孙仓,王惠. 不同方法从大豆不同组织中提取基因组 DNA 效果的比较[J]. 2008, 27(1): 42 - 43. (Wang Z D, Sun C, Wang H. Comparison of the genomic DNA extraction methods from soybean different tissues[J]. Soybean Science, 2008, 27 (1): 42 - 43.)

[10] 李桂兰,乔亚科,杨少辉,等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化的研究[J]. 作物学报,2005,31(2):170 - 176. (Li G L, Qiao Y K, Yang S H, et al. Study of the *Agrobacterium* - mediated transformation systems of soybean cytoledonary node[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2):170 - 176.)

- [11] 汲逢源,王戈亮,许亦农. 抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达的影响[J]. 植物生态学报,2006,30(2):330-333. (Ji F Y, Wang G L, Xu Y N. The effects of antioxidants on the transient exprssion of *GUS* gene in soybean hypocotyls mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Plant Ecology, 2006, 30(2):330-333.)
- [12] 钱雪艳,郭东全,杨向东,等. 超声波辅助农杆菌介导转化大豆未成熟胚的研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):658-661. (Qian X Y, et al. Study on ultrasonic - assisted *Agrobacterium* - mediated transformation of soybean immature cotyledons[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(2):658-661.)
- [13] Okpuzor J, Omidiji O. Peroxidase - polyphenol oxidase association in *dioscorea esculenta* [J]. Zeitschrift fur Naturforschung C, 1998, 53(11-12): 957-960.
- [14] 黄益宗. 植物对硼元素不足的反应及其成因探讨[J]. 土壤与环境, 2002, 11(4):434-438. (Huang Y Z. Plant response to boron deficiency and origin of formation[J]. Soil and Environmental Sciences, 2002, 11(4):434-438.)
- [15] 刘鹏,徐根娣,赵娅儿. 锰、硼对大豆几种生理效应的影响[J]. 中国油料作物学报,2003,25(4): 73-76. (Liu P, Xu G D, Zhao Y E. Effect of boron and manganese on some physiological characteristics of soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(4): 73-76.
- [16] 胡倩倩,方星,王建国,等. 硼营养对大豆组织再生其及农杆菌介导的遗传转化效率的影响[J]. 大豆科学, 2013, 32(4): 445-448. (Hu Q Q, Fang X, Wang J G, et al. Effect of boron on the explant regeneration and the frequency on *Agrobacterium* - mediated transformation of soybean[J]. Soybean Science, 2013, 32(4):445-448.)
- [17] Matoh T, Kawaguchi S, Kobayashi M. Ubiquity of a boraterhamno - galacturonan II complex in the cell walls of higher plants[J]. Plant Cell Physiology,1996, 37:636-640.
- [18] Matoh T. Boron in plant cell walls[J]. Plant and Soil, 1997, 193:59-70.
- [19] Lin Y J, Zhang Q F. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Reports, 2005, 23:540-547.
- [20] Carstensen E L. Biological effects of acoustic cavitation[J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 1986, 12(9): 703-704.
- [21] 葛正珍,杨光宇,仲艳,等. 硼对大豆愈伤组织的细胞结构及形态的影响[J]. 大豆科学,2009,28(2):225-228. (Ge Z Z, Yang G Y, Zhong Y, et al. Effect of boron on cell structure and shape in soybean (*Glycine max*) callus [J]. Soybean Science, 2009, 28(2):225-228.)

(上接第 35 页)

- [6] 才华,朱延明,柏锡,等. 野生大豆 *GsbZIP33* 基因的分离及胁迫耐性分析[J]. 分子植物育种, 2011, 9(4): 397-401. (Cai H, Zhu Y M, Bai X, et al. Isolation and tolerance analysis of *GsbZIP33* gene linked to response on stress in *Glycine soja* [J]. Molecular Plant Breeding, 2011, 9(4): 397-401)
- [7] Xu L, Xu Z, Liu X, et al. The subcellular localization and ectopic expression analysis in *Arabidopsis* of soybean *GmbZIP60* gene[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2013; 10. 1007/s13562-013-0228-4.
- [8] Foster R, Izawa T, Chua N H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements[J]. The FASEB Journal, 1994, 8(2): 192-200.
- [9] Izawa T, Foster R, Chua N H. Plant bZIP protein - DNA binding - specificity[J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 230(4): 1131-1144.
- [10] Martinez - Garcia J F, Moyano E, Alcocer M J C, et al. Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C - box/G - box motif and help to define a new subfamily of bZIP transcription factors[J]. The Plant Journal, 1998, 13(4): 489-505.
- [11] Xiang C, Miao Z, Lam E. DNA - binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 34: 3-15.
- [12] Grigoryan G, Keating A E. Structure - based prediction of bZIP partnering specificity[J]. Journal Molecular Biology, 2006, 355(5): 25-42.
- [13] Terzaghi W B, Bertekap R L, Cashmore A R. Intracellular localization of GBF proteins and blue light - induced import of GBF2 fusion proteins into the nucleus of cultured *Arabidopsis* and soybean cells[J]. The Plant Journal, 1997, 11(5): 67-82.
- [14] Riechmann J L, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription factors:Genome wide comparative analysis among eukaryotes[J]. Science, 2000, 290: 2105-2110.
- [15] Paulo S S, Fábio T S, Nogueira, et al. Identification of new ABA - and MEJA - activated sugarcane bZIP genes by data mining in the SUCEST database[J]. Plant Cell Report, 2008, 27: 335-345.
- [16] Guiltinan M J, Marcottel A. Plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic and response element[J]. Science, 1990, 250: 267-270.
- [17] Choi H, Hong J, Kang J, et al. ABFs, a family of ABA responsive element binding factors[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 1723-1730.
- [18] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE2 dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2005, 17: 3470-3488.
- [19] Kang J, Choi H, Kim S Y. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress responsive abscisic acid signaling[J]. The Plant Cell, 2002,14: 343-357.
- [20] Kim J B, Kang J Y, Kim S Y. Over - expression of a transcription factor regulating ABA responsive gene expression confers multiple stress tolerance[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2(5): 459-466.