

水稻热激蛋白基因 *HSP90* 转化大豆的研究

于志晶¹, 尚丽霞¹, 蔡勤安¹, 孟凡钢², 马 瑞¹

(1. 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院 大豆研究所, 吉林 长春 130033)

摘要: 由于干旱和盐碱化的严重影响,我国大豆生产受到很大限制。为了提高大豆的抗旱性,培育抗旱转基因大豆新品种,利用农杆菌介导的子叶节遗传转化技术体系,首次将水稻热激蛋白基因 *HSP90* 导入大豆受体材料 Bert 中,通过 *HSP90* 在大豆中过表达,获得了耐旱转基因大豆新材料。本试验中4 000个子叶节外植体用于遗传转化,再生转化苗经 PCR 和 Southern 杂交鉴定结合 PPT 抗性筛选(*bar* 为筛选标记),共获得 128 棵阳性转基因植株,转化率为 3.2%。经初步筛选,获得 15 份耐旱性较好的材料,其耐旱性显著优于对照。研究结果为进一步筛选耐旱转基因大豆新材料奠定了较好的基础。

关键词: 大豆;耐旱;热激蛋白;遗传转化
中图分类号: S565. 1 **文献标识码:** A **DOI:** 10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 02. 0222

Transformation of Heat Shock Protein Gene *HSP90* of Rice into Soybean

YU Zhi-jing¹, SHANG Li-xia¹, CAI Qin-an¹, MENG Fan-gang², MA Rui¹

(1. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China; 2. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Soybean is an important food and oil crop in China, and is vital to the national economy. However, the soybean production is limited by drought and salinization. In order to breed the transgenic soybean variety with drought tolerance, the heat shock protein gene *HSP90* from rice was first transformed into soybean mediated with *Agrobacterium tumefaciens* in this study. The transgenic plants with tolerance to drought can be further selected through over-expression *HSP90* gene driven by TMV35S promoter. In this experiment total 4 000 cotyledonary node explants infected and 128 independent transgenic plants were obtained by PCR and Southern blot analysis combining PPT selection. The transformation efficiency was 3.2%. Fifteen transgenic plants with drought tolerance were selected. The transgenic plants obtained in this study would be important for further drought tolerance breeding of soybean.

Keywords: Soybean; Drought tolerance; Heat shock protein; Genetic transformation

干旱是影响农作物生长发育和产量的重要因素,也是造成我国农业生态环境进一步退化、限制我国农业可持续发展的重大问题之一。据统计,全球干旱和半干旱土地面积约占世界可耕地面积的 1/3。我国干旱耕地面积约为7 000万 hm²,占全国总耕地的 51.9%。特别是自 2000 年以来,全国干旱发生的频率和影响范围逐步扩大,北方地区持续干旱,问题日趋严重。

大豆作为重要的粮食作物和油料作物,在我国国民经济中占有重要地位。我国大豆主产区主要分布在干旱、盐碱、高寒地区。严峻的生长环境特别是干旱和土壤盐碱化给大豆生产带来严重威胁。据不完全统计,每年因干旱和盐碱化造成的大豆产量损失达到 50% 左右,因此,提高大豆的耐旱能力,培育抗旱大豆新品种是育种工作急需解决的关键问题。然而,由于缺乏有效的耐旱大豆种质资源,利用常规育种技术改良大豆抗旱性研究进展较为

缓慢。随着现代分子生物技术的飞速发展,利用基因工程技术可定向改造植物的遗传性状。目前,科研工作者已经鉴定和克隆出一批与耐旱相关的基因,特别是一些特殊生境微生物的有利抗性基因,极大地拓宽了耐旱大豆新品种培育所必需的遗传资源,为利用基因工程培育耐旱转基因大豆新品种提供了较为丰富的基因资源。

HSP90 蛋白广泛分布于真菌、动物和植物中,是一个受 ATP 调节的重要分子伴侣,其主要定位于细胞质,也有少部分存在于内质网、线粒体和叶绿体等亚细胞器中,帮助参与信号转导的大多数蛋白的折叠、聚集以及运输^[1-5]。它可以帮助初生肽的合成,也可以与其它蛋白形成复合体,从而阻止成熟蛋白的失活^[6-9]。胁迫条件下,*HSP90* 可保护机体蛋白质免遭损伤或修复已受损伤的蛋白质,从而对植物起保护作用,热激蛋白的诱导形成能使植物获得耐热性^[10-15]。最新研究表明,*HSP90* 在拟南芥、

收稿日期:2015-06-11
基金项目:吉林省科技厅重点科技攻关项目(20130206005NY);农业部转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08004-002-001)。
第一作者简介:于志晶(1977-),女,硕士,主要从事植物分子生物学、遗传转化与代谢工程研究。E-mail:yuzhijing0001@163.com。
通讯作者:孟凡钢(1978-),男,硕士,副研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:mengfg2013@163.com;
马瑞(1966-),男,博士研究生,主要从事植物生物技术研究。E-mail:ruimaa@126.com。

烟草和水稻的发育、环境胁迫应答及抗病性中起着重要作用^[16]。本研究利用农杆菌介导法将来源于水稻的 *HSP90* 基因^[17] 导入大豆栽培品种中,经过分子检测并结合 PPT 抗性筛选,旨在获得转基因阳性大豆植株,进一步筛选耐旱转基因大豆新材料。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆栽培品种 Bert, 来源于美国。

1.2 植物表达载体和农杆菌

所用植物表达载体为 pCAMBIA3301-H90 (图1), 载体包含筛选标记 *Bar* 基因, 目的基因 *HSP90*, 均由 35S 启动子驱动, 由吉林省农业科学院生物中心构建; 农杆菌株为 EHA105, 由吉林省农业科学院生物中心保存。

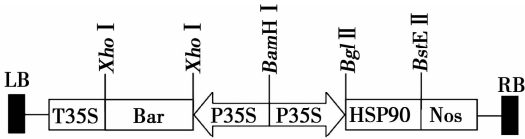


图1 植物表达载体 pCAMBIA3301-H90 的 T-DNA 结构示意图

Fig.1 T-DNA of Binary vector pCOMBIA3301-H90

1.3 菌液的制备

从固体 LB 培养基挑取含有 pCAMBIA3301-H90 载体的根癌农杆菌 EHA105 单菌落, 接种到 LB 液体培养基(含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素和 25 mg·L⁻¹ 利福平)中, 在 28℃, 180 r·min⁻¹ 震荡培养 15 h 左右, 至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.6 ~ 0.8); 悬浮系在 4℃, 4 000 r·min⁻¹ 低速离心 10 min, 去除上清液, 再用液体共培养基(0.321 g·L⁻¹ B₅ 培养基^[18] + 3.9 g·L⁻¹ MES + 1.67 mg·L⁻¹ BAP + 0.25 mg·L⁻¹ GA₃ + 200 μmol·L⁻¹ AS + 400 mg·L⁻¹ Cys + 154.2 mg·L⁻¹ DTT + 3% 蔗糖, pH5.4) 重悬, 菌液浓度调至 OD₆₀₀ = 0.5 备用。

1.4 大豆种子灭菌和外植体的准备

大豆种子灭菌根据 Paz 等^[19] 的方法, 将装有大豆种子的培养皿放入干燥器中, 用氯气(250 mL 的烧杯中加入 75 mL 的次氯酸钠 + 3 mL 浓度为 36% 的 HCl) 灭菌 16 h。将灭菌后种子种于(脐朝下) 固体萌发培养基(3.1 g·L⁻¹ B₅ 基本培养基 + 2% 蔗糖 + 3 g 植物凝胶, pH5.8) 上, 在培养箱中(23℃) 暗培养 16 h。将萌发后种子去掉种皮, 用解剖刀沿中轴线将 2 片子叶切开, 去除腋芽, 分别在子叶节部位平行于中轴划 4 ~ 5 刀。

1.5 农杆菌侵染与转化植株再生

将划伤的外植体置于盛有农杆菌重悬液的培养皿中, 于摇床震荡(30 r·min⁻¹) 侵染 30 min。侵染结束后, 将子叶节外植体放入(平面朝上) 带有一

层滤纸的共培养基中(0.321 g·L⁻¹ B₅ 培养基 + 3.9 g·L⁻¹ MES + 1.67 mg·L⁻¹ BAP + 0.25 mg·L⁻¹ GA₃ + 200 μmol·L⁻¹ AS + 400 mg·L⁻¹ Cys + 1 mmol·L⁻¹ DTT + 3% 蔗糖 + 5 g·L⁻¹ 琼脂粉, pH5.4), 23℃ 黑暗培养, 3 d 后, 将外植体的子叶节和下胚轴部分(大约 1 ~ 2 cm) 与培养基平面呈 45° 角插入丛生芽诱导培养基中(3.21 g·L⁻¹ B₅ 基本培养基 + 0.59 g·L⁻¹ MES + 1.67 mg·L⁻¹ BAP + 250 mg·L⁻¹ Tic + 100 mg·L⁻¹ Cef + 5 mg·L⁻¹ PPT + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 8 g·L⁻¹ 琼脂, pH5.7), 子叶节平面朝上, 透气胶带封口, 于 25℃, 16 h/8 h 光暗条件下培养。14 d 后, 将外植体下胚轴切短(保留约 5 mm), 转入新的诱导培养基继续培养 14 d。结束丛生芽诱导后, 将外植体子叶去除, 转入芽伸长培养基(4.43 g·L⁻¹ MS 基本培养基 + 0.59 g·L⁻¹ MES + 50 mg·L⁻¹ 天冬氨酰 + 50 mg·L⁻¹ L-焦谷氨酸 + 0.1 mg·L⁻¹ IAA + 0.5 mg·L⁻¹ GA₃ + 1 mg·L⁻¹ 玉米素核苷 + 5 mg·L⁻¹ PPT + 100 mg·L⁻¹ 头孢噻肟钠 + 250 mg·L⁻¹ 特美汀 + 3% 蔗糖 + 8 g·L⁻¹ 琼脂, pH5.7), 每隔 14 d 去除老叶后继代培养 1 次。当芽伸长到 3 ~ 5 cm 时, 将其从基部切下, 转入生根培养基(4.43 g·L⁻¹ MS 基本培养基 + 0.59 g·L⁻¹ MES + 50 mg·L⁻¹ 天冬氨酰 + 50 mg·L⁻¹ L-焦谷氨酸 + 1 mg·L⁻¹ IBA + 50 mg·L⁻¹ 头孢噻肟钠 + 125 mg·L⁻¹ 特美汀 + 2% 蔗糖 + 3 g·L⁻¹ 植物凝胶, pH5.6) 中诱导生根。约 14 d 后, 待根系发育完好, 经炼苗后移入温室草炭土中进行盆栽。

1.6 转化植株的 PPT 抗性筛选和分子检测

通过转化植株叶片上涂抹除草剂 PPT (240 mg·L⁻¹) 筛选 PPT 抗性苗。用 *bar* 基因试纸条(EN-VIROLOGIX: Quickstix kit for LibertyLink) 检测叶片, 筛选阳性转化植株。对抗性植株进行 PCR 检测, CTAB 法^[10] 提取抗性苗叶片基因组 DNA, 用于 PCR 检测。目的基因 *HSP90* 的 PCR 上游引物序列: 5'-GTGGATTGATGTGATATCTCCACTG-3', 下游引物序列: 5'-GAAGTTCAGATTTGGCAATGGTCC-3', 扩增片段为 646 bp, PCR 反应体系为 25 μL, 扩增反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 50 s, 60℃ 50 s, 72℃ 75 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。筛选标记 *bar* 基因的 PCR 上游引物序列: 5'-GCACCATCGTCAACCACTA-CATCGAG -3', 下游引物序列: 5'-TGAAGTC-CAGCTGCCAGAAACCCAC-3', 扩增片段为 441 bp, PCR 反应体系为 25 μL, 扩增反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 50 s, 58℃ 50 s, 72℃ 75 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪分析。对 PCR 阳性株进一步进行 Southern 杂交检测, 用 CTAB 法大量提取基因组 DNA, 用量为 30 μg, 限制性内切酶为 *EcoR* I。用目的基因

HSP90 引物,以质粒 pCAMBIA3301-H90 为模板制备杂交探针。Southern 杂交采用罗氏公司地高辛标记试剂盒(I 型),具体操作过程根据试剂盒使用说明书进行。

1.7 转基因植株的耐旱性鉴定

将非转基因植株和转基因植株的种子种到盆里,大约 30 d 后不浇水,旱胁迫 28 d 左右观察结果。

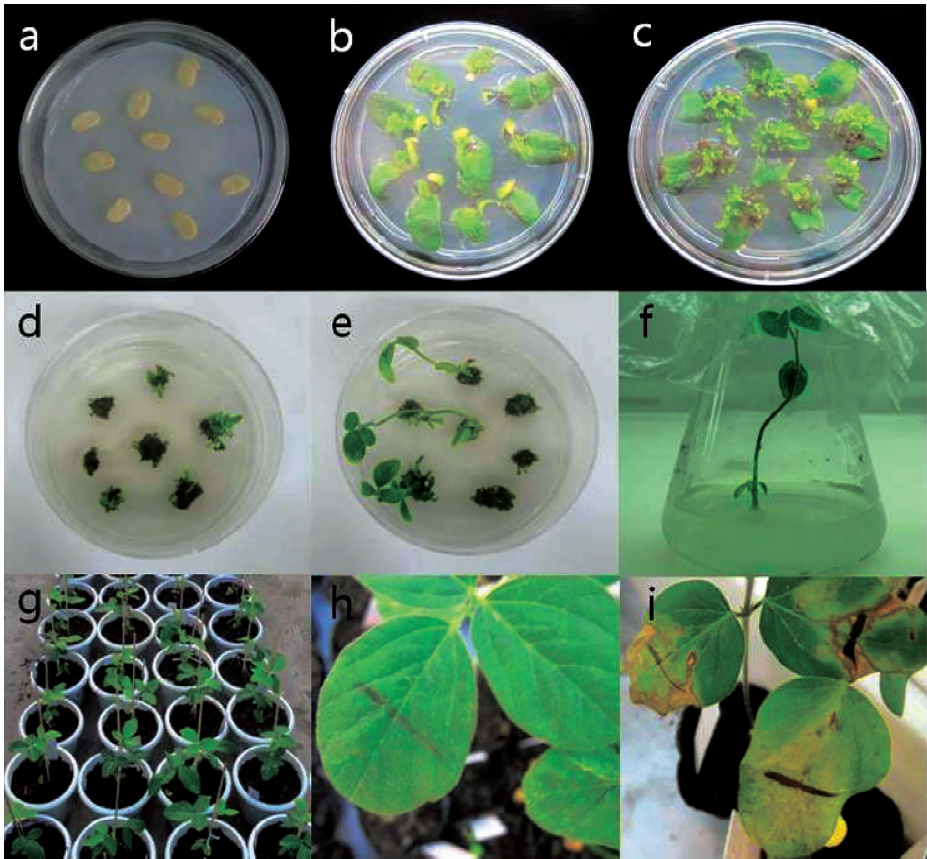
1.8 数据统计

记录侵染外植体数和阳性植株数,再生率(%) = (阳再生植株数/侵染外植体总数) × 100;转化效率(%) = (阳性植株数/侵染外植体总数) × 100。

2 结果与分析

2.1 大豆遗传转化效率

试验共侵染外植体4 000个,转化过程中(图 2a-g)芽诱导和芽伸长阶段培养基筛选剂 PPT 浓度为 +5 mg·L⁻¹,获得再生植株 240 株,植株再生率为 6%;转化植株经过 PPT 抗性筛选(图 2h、I,PPT 240 mg·L⁻¹),PCR(图 3)、Southern 杂交(图 4)和 *bar* 试纸条(图 5)等分子检测,获得阳性转基因苗 128 棵,转化效率为 3.2%。



a: 共培养;b,c:芽诱导;d,e:芽伸长;f:生根培养;g:转化植株;h:转基因阳性植株 PPT 抗性; i:阴性转化植株 PPT 抗性。
a:Co-culture; b,c: Shoot induction; d,e:Elongation;f:Rooting; g: Transformed plant; h: PPT resistance of transgenic positive plants; i: Negative transformed plant PPT resistance.

图 2 *HSP90* 基因对大豆的遗传转化

Fig. 2 Genetic transformation of *HSP90* gene to soybean

2.2 转化植株拷贝数

本研究中,目的基因在转基因植株的拷贝数变化较大,拷贝数为 1~7(表 1)。其中,单拷贝阳性

植株 36 株,占 28.1%,双拷贝阳性植株 28 株,占 21.9%。

表 1 转基因材料中目的基因的拷贝数

Table 1 Copy levels of the *HSP90* gene in transgenic lines of soybean

	拷贝数 Copy number					
	1	2	3	4	5	6
阳性植株 No. of transgenic plants	36	28	28	11	11	10
百分率 Percentage/%	28.1	21.9	21.9	8.6	8.6	7.8

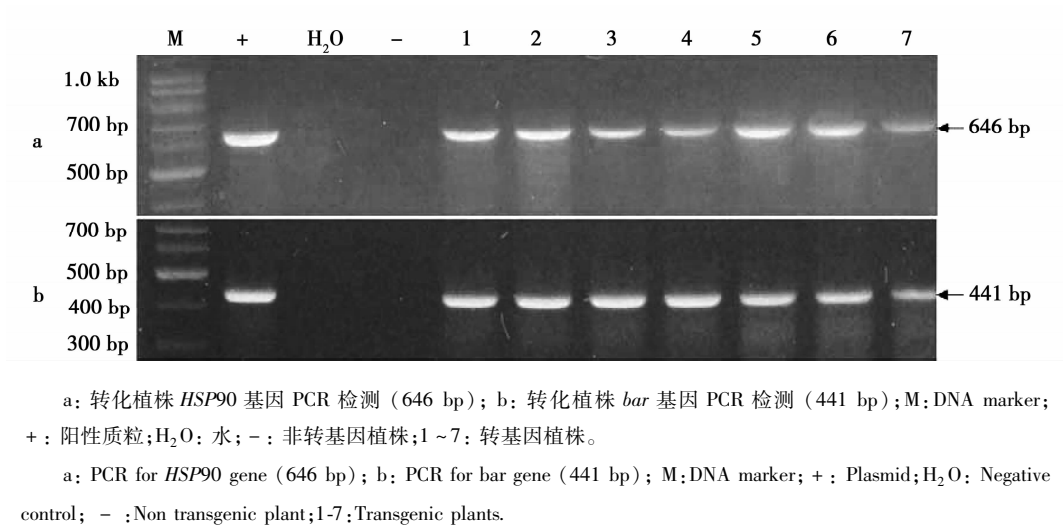


图 3 转化植株 PCR 检测

Fig.3 PCR analysis of transgenic plants

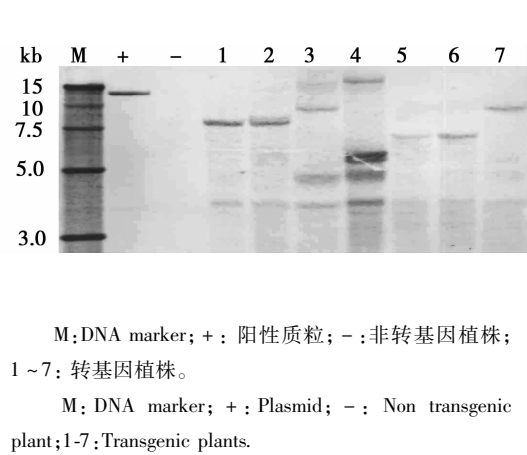


图 4 转化植株 Southern 杂交分析

Fig.4 Southern blot analysis of transgenic plants

2.3 转化植株耐旱性鉴定

将非转基因植株和转基因植株种到盆里,进行了28 d左右的旱胁迫,结果发现28 d后非转基因植株基本完全死掉了,而转基因植株长势良好(图 6)。

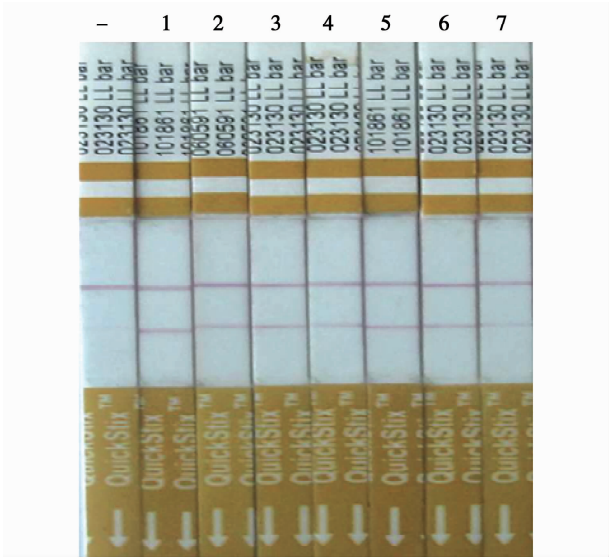


图 5 转化植株 *bar* 基因表达蛋白试纸条检测

Fig.5 Quick strip detection for *bar* gene of transgenic plants



图 6 转化植株的耐旱性鉴定

Fig.6 The drought-tolerance identification of transgenic plant

3 讨论

农杆菌介导的大豆遗传转化中,大豆基因型、外植体、农杆菌菌株、转化载体、筛选体系和培养条件等是影响转化效率的主要影响因素^[19-22]。常用的大豆基因型为 Willimas 82 和 Jack,外植体为子叶节,农杆菌菌株为 EHA105、EHA101 和 LBA4404 等^[23-29]。在已报道的转基因研究中 Willimas 82 和 Jack 的转化效率较高,分别为 3.7% ~ 4.39% 和 1.7% ~ 4.8%^[19,22,26]。Song 等^[22]从我国的主栽大豆品种中筛选出 Yuechun 04-5 (转化效率为 2.42%) 和 Tianlong 1 (4.59%) 等较好的转基因材料,为我国大豆转基因研究奠定了较好的基础。本研究所用转化受体材料为 Bert,易于转化外植体为子叶节,农杆菌菌株 EHA105,转化效率为 3.2%,与 Paz 等^[19]的研究结果 (Bert 的转化效率为 3.8%) 相同。

在植物遗传转化中,外源基因整合到受体材料中的拷贝数是影响外源基因表达水平和遗传稳定性的重要因素^[30]。转基因后代低拷贝数整合的外源基因不仅具有较好的表达效果^[31-32],而且其遗传易于稳定^[33-35]。因此,准确测定转基因植物中外源基因的拷贝数对转基因分子育种至关重要。已有研究表明,农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化中外源基因的拷贝数变化较大 (为 1 ~ 7 个拷贝),低拷贝数 (1 ~ 2 拷贝数) 转化体约占 65%,多拷贝 (3 个以上拷贝数) 转化体占有较大的比例,约为 35%^[19-20,22,26,36-41]。本研究转化植株外源基因拷贝数变幅为 1 ~ 7,同已报道的研究结果相一致;低拷贝数 (1 ~ 2 拷贝数) 转化体占 50%,多拷贝 (3 个以上拷贝数) 转化体比例较高,为 50%。

HSP90 广泛参与植物生长发育过程,在植物生长发育进程中起着至关重要的作用,胁迫条件下 HSP90 可以促使损伤蛋白的修复^[42-43]。HSP90 蛋白参与植物对非生物胁迫的响应过程^[44-46]。刘大丽等^[47]将水稻 *HSP90* 基因在烟草中过表达,转基因烟草的耐盐性有了明显提高。本研究首次将水稻 *HSP90* 基因导入大豆栽培品种中,获得了稳定遗传的转基因材料,经初步筛选,获得 15 份耐旱性较好的材料,其耐旱性均显著优于对照。所获得的转基因材料为进一步培育耐旱转基因大豆新品种奠定了很好的基础。

参考文献

[1] Lindquist S. The heat-shock response[J]. Annual Review of Biochemistry, 1986, 55: 1151-1191.

[2] Lindquist S, Craig E A. The heat-shock proteins[J]. Annual Review of Genetics, 1988, 22: 631- 677.

[3] Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1992, 89: 10449-10453.

[4] Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59: 1640-1648.

[5] Wegele H, Muller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90-A relay team for protein folding[J]. Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology. 2004, 151: 1- 44.

[6] Jackson S E, Queitsch C, Toft D. HSP90: From structure to phenotype[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2004, 11: 1152-1155.

[7] Shinozaki F, Minami M, Chiba T, et al. Depletion of hsp90beta induces multiple defects in B cell receptor signaling[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281:16361-16369.

[8] Sangster T A, Salathia N, Undurraga S, et al. Hsp90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(8): 2963-2968.

[9] Young J C, Moarefi I, Hartl F U. Hsp90: A specialized but essential protein-folding tool[J]. Journal of Cell Biology, 2001, 154: 267-273.

[10] Wegele H, Wandinger S K, Schmid A B, et al. Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90[J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 356: 802-811.

[11] Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of heat shock response and beyond [J]. The FASEB Journal, 2001, 15: 1118-1131.

[12] Pareek A, Singla S L, Grover A. Immunological evidence for accumulation of two high-molecular-weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high temperature stress in diverse plant genera[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 29: 293-301.

[13] Liu D, Zhang X, Cheng Y, et al. *rHsp90* gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44: 380-386.

[14] Yamada T, Satoshi W, Maiko A, et al. Cotyledonary node prewounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean [J]. Plant Biotechnology, 2010, 27: 217-220.

[15] Nishizawa A, Tainaka H, Yoshida E, et al. The 26S Proteasome function and Hsp90 activity involved in the regulation of HsfA2 expression in response to oxidative stress[J]. Plant Cell Physiology, 2010, 51: 486-496.

[16] Sangster T A, Queitsch C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(1): 86-92.

[17] Takano T, Liu S. Nucleotide sequence of a rice cDNA similar to heat shock protein 90 (HSP90) of barley and *Catharanthus* [G]. Published Only in Database, 2000, GenBank; AB037681.1.

[18] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. Experimental Cell Research, 1968, 50(1):151-158.

- [19] Paz M M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. *Euphytica*, 2004, 136(2): 167-179.
- [20] Santarem E R, Trick H N, Essig J S, et al. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: Optimization of transient expression [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 752-759.
- [21] 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.
- [22] Song Z Y, Tian J L, Fu W Z, et al. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability[J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2013, 14(4): 289-298.
- [23] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 18(3-4): 180-186.
- [24] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 892-899.
- [25] 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(6): 1042-1049.
- [26] 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.
- [27] Liu S J, Wei Z M, Huang J Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(3): 489-498.
- [28] 应珊,何晓薇,王秀荣,等. 影响农杆菌介导的大豆转化效率的因素研究[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1): 32-40. (Ying S, He X W, Wang X R, et al. Assessment of factors affecting the transformation efficiency of soybean cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated transformation system [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6(1): 32-40.)
- [29] Mariashibu T S, Subramanyam K, Arun M, et al. Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(1): 41-54.
- [30] 杨晓杰,刘传亮,张朝军,等. 不同转化方法获得的转基因棉花外源基因拷贝数分析[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(2): 221-229. (Yang X J, Liu C L, Zhang C J, et al. Copy level analysis of transgenic cotton obtained by different transformation methods[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(2): 221-229.)
- [31] Flavell R B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1994, 91: 3490-3496.
- [32] Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, et al. Transgene-induced gene silencing in plants[J]. *Plant Journal*, 1998, 16: 651-659.
- [33] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant Journal*, 1994, 6(2): 271-282.
- [34] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(16): 745-750.
- [35] Cheng M, Fry J E, Pang S, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiology*, 1997, 115: 971-980.
- [36] Xing A Q, Zhang Y Z, Sato S, et al. The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybean [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2000, 36: 456-463.
- [37] Olhoft P M, Somers D A. L-Cysteine increases *Agrobacterium* mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(8): 706-711.
- [38] Ko T S, Lee S, Krasnyanski S, et al. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 439-447.
- [39] Zeng P, Vadrnais D A, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22: 478-482.
- [40] Yamada K, Uchida A, Fukao Y, et al. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 37794-37804.
- [41] Arun M. *In vitro* regeneration and transfer of γ -tocopherol methyltransferase gene into Indian soybean cultivar[D]. Doctor Thesis, 2012: 208.
- [42] Prasinos C, Krampis K, Samakovli D, et al. Tight regulation of expression of two *Arabidopsis* cytosolic *Hsp90* genes during embryo development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(412): 633-644.
- [43] Sangster T A, Salathia N, Lee H N, et al. HSP90-buffered genetic variation is common in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105: 2969-2974.
- [44] Yabe N, Takahashi T, Komeda Y. Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90- Family Gene HSP81, *Plant and Cell Physiology*, 1994, 35(8): 1207-1219.
- [45] Pareek A, Singla S, Grover A. Immunological evidence for accumulation of two high molecular weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high temperature stress in diverse plant genera[J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29: 293-301.
- [46] Liu D, Zhang X, Cheng Y, et al. *rHsp90* gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44: 380-386.
- [47] 刘大丽,张欣欣,程玉祥,等. 逆境下水稻 (*Oryza sativa* L.) *rHsp90* 基因的克隆及功能分析[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(3): 317-322. (Liu D L, Zhang X X, Cheng Y X, et al. Cloning and functional analysis of gene *rHsp90* from rice (*Oryza sativa* L.) in stress [J]. *Plant Molecular Breeding*, 2006, 4(3): 317-322.)