

大豆 HB 基因 *GmSbh1* 的分离与生物信息学分析

舒英杰^{1,2}, 陶 源¹, 王 爽¹, 黄丽燕¹, 陈 明¹, 麻 浩¹

(1. 南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 安徽科技学院 农学院, 安徽 凤阳 233100)

摘 要:从大豆叶片中分离到 *GmSbh1* 基因 cDNA 的完整开放阅读框(ORF)序列, 对其编码的氨基酸序列、蛋白质一级、二级结构及互作蛋白等进行了生物信息学分析。结果表明:在 *GmSbh1* 基因 cDNA 序列的第 156 ~ 1 293 bp 处有一个完整的 ORF, 编码 379 个氨基酸;*GmSbh1* 具有同源异型盒(homeobox, HB) 基因家族典型的 KNOX1、KNOX2、ELK 和 Homeodomain (HD) 结构域;检索到 18 条与 *GmSbh1* 核酸序列一致性大于 80% 的序列;*GmSBH1* 为亲水性蛋白, 不具有信号肽, 分子量为 42. 37 kDa, 其中丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asn)和亮氨酸(Leu)分别为占 10%、9. 8% 和 8. 4%, 可能发生磷酸化的位点分别在 Ser(13 个)、酪氨酸(Tyr)(2 个)和苏氨酸(Thr)(1 个)上;二级结构预测结果显示, *GmSBH1* 序列存在 α -螺旋(占 39. 31%)、 β -转角(占 5. 28%)、延伸链(占 8. 44%) 和无规则卷曲(占 46. 97%), 不存在跨膜螺旋;蛋白互作预测表明, *GmSBH1* 与拟南芥中的 RPL、BEL1、AT4G32980. 1-P、BLH2 和 BLH3 等蛋白的互作程度较高, 其中与 BEL1 共表达的几率较高。

关键词:大豆;同源异型盒基因;基因分离;生物信息学分析
中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 02. 0212

Isolation and Bioinformatics Analysis of *GmSbh1* in Soybean

SHU Ying-jie^{1,2}, TAO Yuan¹, WANG Shuang¹, HUANG Li-yan¹, CHEN Ming¹, MA Hao¹

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Agriculture, Anhui Science & Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: The cDNA sequences of *GmSbh1* gene in soybean were isolated, and its bioinformatics character was analyzed. The results showed that there was an intact ORF in 156-1 293 bp, and it encoded a 42. 37 kDa protein with 379 amino acids. The *GmSBH1* protein contains the KNOX1, KNOX2, ELK and Homeodomain (HD). There were 18 homologous sequences that have more than 80% identity with *GmSbh1*. *GmSBH1* was a hydrophilic protein without signal peptide and contained 10% Ser, 9. 8% Asn and 8. 4% Leu, the phosphorylation sites were located at Ser(13), Tyr(2) and Thr(1), respectively. Secondary structure prediction results showed that the *GmSBH1* protein contains alpha-helix (39. 31%), beta turn (5. 28%), extended strand(8. 44%) and random coil (46. 97%), but without transmembrane helical structure. The probability of *GmSBH1* interacted with RPL, BEL1, AT4G32980. 1-P, BLH2 and BLH3 was higher, and coexpression with BEL1 in *Arabidopsis*.

Keywords: Soybean; Homeobox gene; Gene isolation; Bioinformatics analysis

同源异型盒(Homeobox, HB) 基因是一类在植物中高度保守, 与同源异型现象直接相关的基因, 其编码的蛋白是一类与生长发育相关的转录因子, 包含一个由 60(或 61) 个氨基酸组成的高度保守的同源异型域(Homeodomain, HD)^[1]。Vollbrecht 等^[2]1991 年从玉米中克隆到了植物的首个 HB 基因 *Kn1*, 到目前, 研究者已分别从拟南芥、玉米、水稻、大豆、大麦、番茄、苹果、云杉、兰花、苜蓿等植物中克隆了 HB 基因^[3-5]。研究表明, HB 基因在调节植物的胚胎发育^[6]、影响花的演化^[7]、影响细胞间物质运输^[8]、控制雄性减数分裂^[9]、应答环境胁迫^[10] 和激素处理^[11] 等方面发挥重要作用。

GmSbh1 是 Ma 等 1994 年在大豆中克隆到的首

个 HB 基因^[12], 序列分析表明, *GmSBH1* 与玉米的 *Kn1* 同源域同源性为 87. 5%; *GmSbh1* 在早期发育的胚中优先表达, 随后表达量降低, 在大豆的茎和下胚轴中表达量很低, 在其他组织中几乎不表达。在随后将近 20 年时间内, 未见有关 *GmSbh1* 基因的相关报道。将 *GmSbh1* 的 cDNA 序列与大豆基因组数据库 Phytozome 进行比对发现, *GmSbh1* 位于大豆的第 9 号染色体上, 且只有 1 个拷贝。本实验室在研究春大豆种子田间劣变的差异蛋白质组学时发现, 不抗田间劣变品种宁镇 1 号经高温高湿胁迫后, 与对照相比, *GmSBH1* 蛋白显著上调表达^[13], 抗性品种湘豆 3 号下调表达。因此, 我们推测 *GmSbh1* 可能与春大豆种子田间劣变有关, 为进一步了解

收稿日期:2014-06-12
基金项目:国家自然科学基金(31101212, 31171572);安徽省教育厅高等学校省级优秀青年人才基金(2012SQRL143)。
第一作者简介:舒英杰(1977-), 男, 博士, 副教授, 主要从事大豆种子发育与遗传控制研究。E-mail: shuyj@ahstu. edu. cn。
通讯作者:麻浩(1965-), 男, 教授, 博导, 主要从事种子科学与大豆遗传育种研究。E-mail: lq-ncsi@njau. edu. cn。

GmSbh1 与春大豆种子劣变的关系,并从基因水平揭示 *GmSbh1* 参与春大豆种子田间劣变的分子机制,我们首先从大豆叶片中分离到了 *GmSbh1* 基因 cDNA 序列,并利用现代生物信息学工具和相关数据库对其进行了较为系统的分析,旨在为研究其表达模式及其参与种子田间劣变方面的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种湘豆 3 号,由本实验室收集保存。采用水培方法培育大豆幼苗,待长出第一片真叶时(V1 期),取第一片真叶用无菌水冲洗,再用干净的吸水纸吸干,液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 取适量(0.1 g 左右)大豆幼嫩叶片,置高温处理过的研钵中,加液氮研磨,采用北京天根生化科技公司的 Trizol 试剂盒提取总 RNA。取 $2\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 以 Olig dT18 为引物进行反转录,反转录酶为 TaKaRa 的 M-MLV,反应程序为 30°C 10 min, 42°C 40 min, 95°C 4 min, 4°C 5 min。反转录体系含 $5\times\text{M-MLV Buffer}$ $4\text{ }\mu\text{L}$, dNTPs ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $4\text{ }\mu\text{L}$, RNase Inhibitor($40\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, M-MLV ($200\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, Oligo (dT)₁₈ Primer ($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, Sample RNA $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ $2\text{ }\mu\text{L}$, RNase Free ddH₂O $7\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.2.2 基因的分离 以 NCBI (National Center of Biotechnology Information) 公布的 *GmSbh1*CDS 序列 (GenBank Accession No. L13663) 为模板,用 Premier 5.0 软件设计特异引物(上游引物 5'-AGGGCAAAAAGGATAAGACAGTGA-3', 下游引物 5'-TGAATCTATTATCAGCAGCCACACA-3'),由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。以检测符合条件的 cDNA 为模板,进行 *GmSbh1*cDNA 序列 ORF 全长扩增。反应体系含 $10\times\text{Ex Taq Buffer}$ ($\text{Mg}^{2+}\text{ Free}$) $2.5\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $2\text{ }\mu\text{L}$, dNTPs ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $2\text{ }\mu\text{L}$, 上下游引物 ($10.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $1\text{ }\mu\text{L}$, TaKaRa LA Taq $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ $0.25\text{ }\mu\text{L}$, cDNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $9.25\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为 95°C 预变性 5 min, 94°C 45 s, 63°C 50 s, 72°C 2 min, 33 个循环, 72°C 延伸 10 min。

扩增结束后,对扩增产物进行电泳检测、回收,用 TaKaRa 的 pMD18-T 载体对回收片段进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,取阳性克隆菌液送北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 (1)相似性搜索和 ORF

查找:运用 NCBI 的 BLASTn 程序分别对 nr 数据库和 EST 数据库进行相似性搜索,运用 BLASTx 程序对 nr 数据库进行同源性搜索。将获得的全长序列以 FASTA 格式输入到 NCBI 的 ORF Finder,查找其可能的开放阅读框,结合 BLASTx 结果预测其阅读框。

(2)蛋白质结构的预测 用 ProtParam 软件 (<http://www.web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质序列理论参数,用 SOPMA 软件 (<http://www.expasy.org>) 预测蛋白质二级结构,用 Protscale 软件 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 预测蛋白的亲疏水性,用 SignalP 4.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽,用 Kinase-Phos 软件 (<http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw/index.html>) 预测激酶磷酸化修饰位点,用 TMHMM Server v. 2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜区。

(3)多重比对以及进化树的构建:蛋白质序列多重比对由 MEGA5.0 和 DNAMAN 完成;利用 MEGA5.0 的邻位连接法(NJ)构建进化树,BootStrap 值 N1000。

(4)蛋白质互作预测:将大豆 GmSBH1 蛋白序列提交 STRING 数据库,以拟南芥中与大豆 GmSBH1 蛋白同属于 KNOX I 的 AtSTM 为模板搜索互作蛋白的信息及其表达蛋白。

2 结果与分析

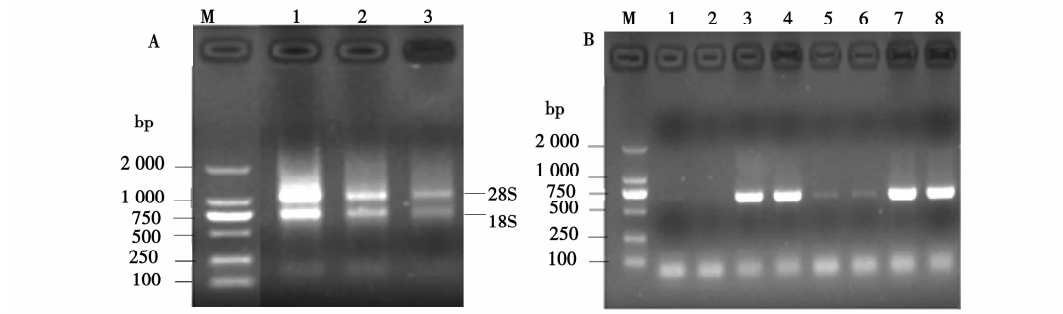
2.1 大豆叶片 RNA 及 cDNA 第一链质量检测

取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 大豆叶片总 RNA 样品,用 1.0% 琼脂糖凝胶分离总 RNA(120 V, 约 15 min)。结果发现, RNA 降解较少,有两条最大的带,且 28S RNA 和 18S RNA 亮度约比约为 2:1(图 1 A 中 1 号样品),说明 1 号样品 RNA 完整性较好,可用于后续试验。

cDNA 第一链合成后用大豆 *Actin* 基因进行扩增、检测,结果发现在 750 bp 附近有清晰的特异性条带(图 1 B),说明反转后的 cDNA 能满足后续的试验。

2.2 *GmSbh1* cDNA 序列 ORF 全长扩增结果

以检测合格的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,经电泳检测,发现在 1 000 bp 以上位置有清晰的特异性条带(图 2),与 *GmSbh1* cDNA 的 ORF 全长序列(1 137 bp)大小相符。扩增产物回收、连接、转化后送华大基因进行测序,表明其大小为 1 252 bp,与 NCBI 公布的 *GmSbh1* cDNA 序列的 ORF 比对无碱基差异。



A:大豆叶片 RNA; B: cDNA 第一链。
A:Total RNA of soybean leaf; B: The cDNA first chain.

图 1 大豆叶片 RNA 及 cDNA 第一链质量检测

Fig. 1 Total RNA extracted from the leaves of soybean and PCR production of actin gene

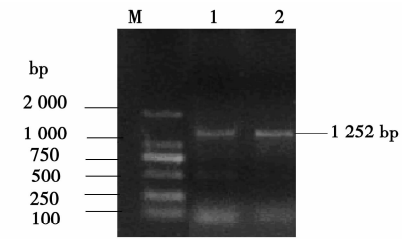


图 2 *GmSbh1* cDNA 的 ORF 全长扩增
Fig. 2 ORF PCR products of *GmSbh1*

2.3 *GmSbh1* 核酸及蛋白的生物信息学分析

2.3.1 ORF 查找与序列相似性搜索 分别用 BioXM 软件和 ORF 在线查找软件 ORF finder 分析 *GmSbh* 的 ORF,在 cDNA 序列的第 156(ATG)-1295(TAG)处有一个完整的开放阅读框,编码 379 个氨基酸。将 *GmSbh1* 基因序列在非冗余蛋白库(nr)中进行 BLASTn,共搜索到 18 条与 *GmSbh1* 核酸序列

一致性在 80% 以上的序列,其中一致性较高的分别是大豆 *GmSBH1-LIKE* 蛋白(XM_006596988. 1) (一致性 93%)、大豆的 *JCVI-FLGm-21P16* 蛋白(BT097391. 1) (一致性 92%) 以及菜豆测的 *PHA-VU_006G145800g* 蛋白(一致性 89%)。

2.3.2 氨基酸序列结构域分析 *GmSbh1* 所编码的 379 个 AA 共有 4 个保守的结构域,第 123 ~ 159 个 AA 处为“KNOX1”结构域,第 178 ~ 226 个 AA 处为“KNOX2”结构域,第 261 ~ 281 个 AA 处为“ELK”结构域,第 281 ~ 344 个 AA 处为“Homedomain(HD) 结构域”(图 3)。其中保守域“KNOX1”的主要功能是抑制靶基因的表达,“KNOX2”是形成同源二聚体和行使功能所必须的,“ELK”是 Tale/Knox 同源域基因蛋白的核定位所必须的,“Homeodomain”为 DNA 结合域,这些区域与主要真核生物发育进程的调节有关。

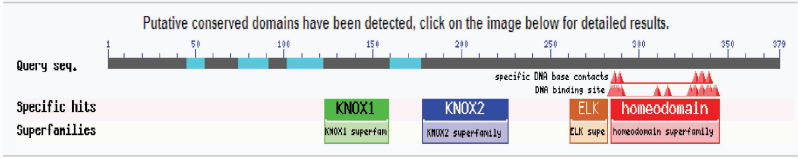


图 3 *GmSbh1* 编码的氨基酸序列保守域

Fig. 3 The conserved domains of amino acid sequence of *GmSbh1*

2.3.3 氨基酸多序列比对与系统发生树构建 将 *GmSbh1* 对应的氨基酸序列与大豆的 *KNT1*、拟南芥的 *STM*、苜蓿的 *KNOX1* 以及菜豆的 *PHAVUD* 等几种典型的 HB 蛋白的氨基酸序列进行比对(Clustalx)发现,*GmSbh1* 对应的氨基酸序列具有 HB 蛋白典型的 KNOX1、KNOX2、ELK 和 Homeodomain 4 个功能区域(图 4)。

利用 MEGA5.0 软件,用邻位连接法(NJ)将 *GmSBH1* 与已发现物种的 HB 基因氨基酸全长序列构建系统进化树(图 5)。进化树可分为两个分支,*GmSBH1* 与菜豆的 *PHAVU*、豌豆的 *HOP1*、苜蓿的

KNOX1、拟南芥的 *STM* 以及玉米的 *KN1* 同在第一分支,属于 HB 基因的 KNOX(*KNOTTED1-like*)型中的第一类。这一类与植物中第一个 HB 基因 *Kn1* 序列相似性较高(> 70%) ,在分生组织中高度表达,在叶中不表达,被认为对茎端分生组织发育、维持细胞的不确定分化状态及在分生细胞中表达是必须的^[14];且发现这类 KNOX 基因的功能被细胞分裂素、乙烯和赤霉素的交互作用所调控^[15]。

2.3.4 蛋白质结构与功能预测 (1)蛋白质理化性质预测:利用 ProtParam 软件对 *GmSBH1* 序列进行预测的结果氨基酸残基数为 379,相对分子量

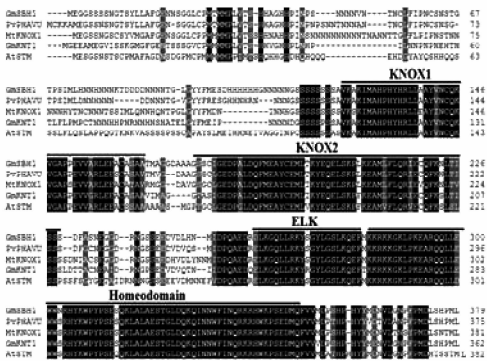


图 4 GmSBH1 氨基酸序列比对图

Fig. 4 Multiple alignments of the amino acid sequences from various class 1 KNOX proteins

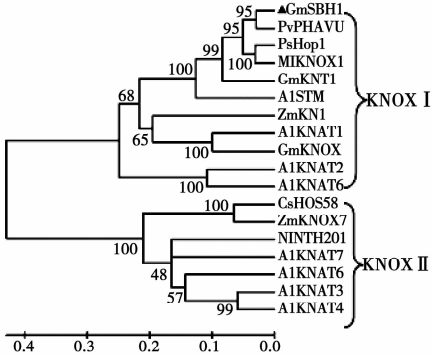


图 5 不同植物 HB 蛋白的进化树

Fig. 5 The phylogenetic tree of HB protein from different plants

(Mr) 为 42.37 kD, 理论等电点 (PI) 为 6.07, 正电荷氨基酸残基总数 (Arg + Lys) 为 33, 负电荷氨基酸残基总数 (Asp + Glu) 为 43, 分子式为 $C_{1828}H_{2801}N_{533}O_{581}S_{26}$ 。氨基酸组分析表明, GmSBH1 中丝氨酸 (Ser)、天冬酰胺 (Asn) 和亮氨酸 (Leu) 比例较高, 分别为 10%、9.8% 和 8.4%, 而半胱氨酸 (Cys) 和色氨酸 (Trp) 比例较低, 分别为 2.1% 和 1.3%。

蛋白的亲疏水性预测结果表明, 在 83 位 Asp 分值最低 (−3.032), 亲水性最强; 第 170 位的 Gly 具有最高分值 (0.853), 疏水性最强; 从整体来看, GmSBH1 的亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸, 即 GmSBH1 表现为亲水性 (图 6)。

(2) 蛋白质信号肽与磷酸化位点预测: 信号肽是位于蛋白的 N 端, 由 16 ~ 30 个氨基酸组成序列, 其功能是引导蛋白质跨膜转移到特定亚细胞结构或分泌到胞外。SignalP 预测结果显示, GmSBH1 蛋白不具有信号肽 (即 SP = “NO”)。

磷酸化和去磷酸化能使酶活化或失活, 对许多反应起着生物“开/关”作用, 控制诸如细胞分裂这样的过程。磷酸化可发生在许多种类的氨基酸上, 其中以 Ser 最多, 其次是 Thr, 而 Tys 则相对较少。软件预测结果显示, GmSBH1 中在 Ser 上可能发生

磷酸化的位点 (分值大于 0.5) 有 13 个 (分别位于第 6、116、117、118、119、120、122、227、233、242、243、314 和 345 个氨基酸上), 在 Tys 上可能发生磷酸化的位点有 2 个 (第 192 和第 360 个氨基酸), 在 Thr 上可能发生磷酸化的位点有 1 个 (第 197 个氨基酸)。

(3) 跨膜区结构预测: 蛋白质序列含有跨膜区说明它可能作为膜受体起作用, 跨膜受体是参与细胞与外界通讯的特殊整合膜蛋白, 在信号转导中发挥独特和重要功能。胞外激素等信号分子只有附加到跨膜受体后才能引发细胞的信号转导, 从而发挥功能。通过 TMHMM 服务器预测后发现, GmSBH1 蛋白不存在跨膜螺旋, 即 TMH = 0。

(4) 蛋白质二级结构预测: 蛋白质二级结构是指氨基酸残基形成的 α 螺旋、 β 折叠、无规则蜷曲及模体等组件。蛋白质分子的生物学功能由其高级结构决定, 蛋白质二级结构分析与预测, 对了解其空间结构及功能具有重要意义^[16]。

运用 SOPMA 软件预测 GmSBH1 的二级结构, 结果显示, 该蛋白质序列存在 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规卷曲二级结构, 其中 α -螺旋占 39.31%、 β -转角占 5.28%、延伸链占 8.44%、无规卷曲占 46.97% (图 7)。

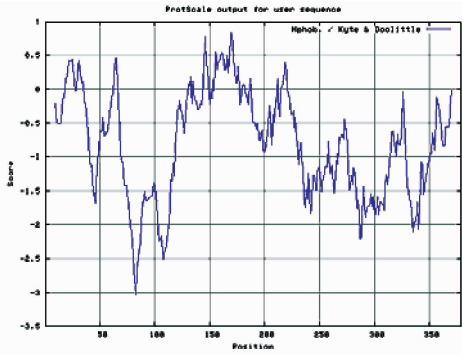


图 6 GmSBH1 蛋白疏水性/亲水性检测
Fig. 6 Prediction of hydrophobicity/hydrophilic for GmSBH1 protein

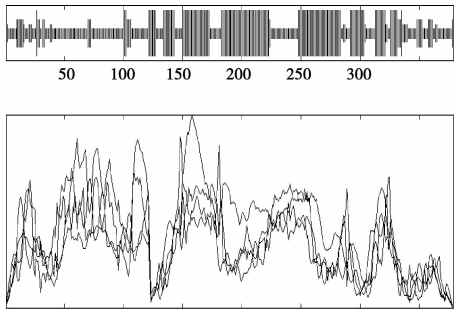


图 7 GmSBH1 蛋白二级结构的预测
Fig. 7 Prediction of secondary structure for GmSBH1 protein

(5)蛋白质互作预测:STRING 数据库是以模式植物拟南芥中已知蛋白为基础预测互作蛋白的数据库,包括直接的物理互作和间接的功能互作^[17]。将 GmSBH1 序列提交 STRING 数据库,以拟南芥中与大豆 GmSBH1 同属于 KNOX I 的 AtSTM 为模板搜索互作蛋白的信息。结果表明,GmSBH1 蛋白可能与拟南芥中的 RPL、BEL1、AT4G32980.1-P、BLH2、BLH3、WUS、AS1、CSR、ZLL、CL3 等蛋白互作,其中与 RPL、BEL1、AT4G32980.1-P、BLH2、BLH3 等蛋白互作程度高(图8)。对 GmSBH1 及其互作蛋白的共表达进行了预测,从在拟南芥中的共表达可知,GmSBH1 与拟南芥的 BEL1 共表达几率最高,在其他物种中尚未发现共表达现象(图9)。

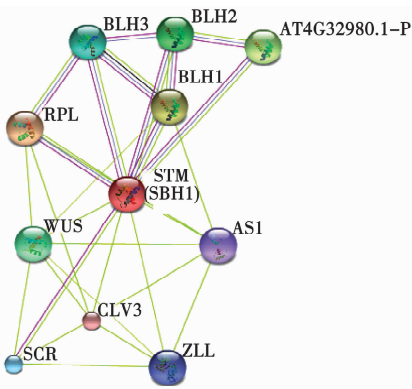


图8 GmSBH1 与拟南芥中已知蛋白互作网络
Fig. 8 Interaction network of GmSBH1 protein with other proteins in Arabidopsis

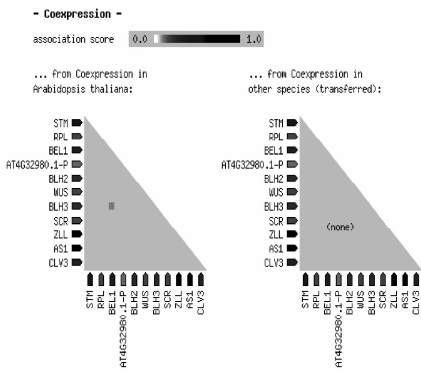


图9 GmSBH1 与互作蛋白的共表达预测
Fig. 9 Coexpression predicted of interacting protein with GmSBH1

3 讨论

Ma 等^[12]用玉米 *Kn1* 的 cDNA 作为探针从大豆中分离到了 *GmSbh1* 的 cDNA,该序列全长为 1 515 bp,具有螺旋-折叠-螺旋结构域的保守序列。由于当时生物信息学分析工具的和相关数据库的限制, Ma 等未能对 *GmSbh1* 的结构进行更深入、系统的分析。在随后的 20 年时间内,未见有关 *GmSbh1* 结构

和功能的相关报道。本研究根据 NCBI 公布的 *GmSbh1* 的 cDNA 序列设计特异引物,以大豆幼嫩叶片的 mRNA 反转的 cDNA 为模板,对 *GmSbh1* 进行扩增,扩增产物经回收、连接、转化和测序,得到大小为 1 252 bp 包含 *GmSbh1* ORF 全长(1 137 bp)的 cDNA 片段。由于大豆基因组测序完成^[17],所以我们没有对 *GmSbh1* 的 cDNA 序列全长进行扩增,只扩增了完整的 ORF。但由于没有关于 *GmSbh1* 序列扩展的相关文献可参考,仍然发现要扩展完整的 *GmSbh1*cDNA 序列 ORF 全长难度较大,从引物设计到换用不同 *Taq* 酶再到优化 PCR 反应条件,摸索了很长时间,这是不是 *GmSbh1* 从 1994 年首次报道以来一直未见相关报道的原因不得而知。

在研究基因功能之前,利用分子生物学分析软件和数据库分析其结构和预测其功能,是一种快速低廉的了解基因功能的重要手段。本研究利用生物信息学分析软件和相关数据库对 *GmSbh1* 序列进行了较为全面的分析,了解了该基因及其编码蛋白的基本特征,对进一步研究其功能具有指导意义。我们实验室正对该基因在大豆中的时空表达模式、响应高温高湿胁迫和激素诱导以及转基因功能分析等方面进行研究,为最终选育高抗田间劣变春大豆品种奠定基础。

参考文献

[1] Kerstetter R, Vollbrecht E, Lowe B, et al. Sequence analysis and expression patterns devide the maize knotted-like homeobox gene into two classes[J]. *Plnat Cell*, 1994, 6 (12):1877-1887.

[2] Vollbercht E, Veit B, Sinha N, et al. The developmental gene *Knotted-1* is a member of a Maize homeobox gene family [J]. *Nature*, 1991, 350(6315) : 241-243.

[3] Mukherjee K, Brocchieri L, Bürglin T R, et al. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26 (12) : 2775-2794.

[4] Muller K J, Romano N, Gerstner O, et al. The barley hooded mutation caused by aduplication in a homeobox gene intron [J]. *Nature*, 1995, 374(6524) : 727-730.

[5] Jouannic S, Collin M, Vidal B,et al. A class *IKNOX* gene from the palm species *Elaeis guineensis* (Arecaceae) is associated with meristem function and a distinct mode of leaf dissection [J]. *New Phytologist*, 2007, 174(3) : 551-568.

[6] Xu Y Y, Wang X M, Li J,et al. Activation of the *WUS* gene induces ectopic initiation of floral meristems on mature stem surface in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57: 773-784.

[7] Lucas W J, Bouche-Pillon S, Jackson D P, et al. Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata [J]. *Science*, 1995, 270: 1980-1983.

in the U. S. [J]. China Biotechnology, 2012, 32(1): 129-133.)

[8] 叶汉英, 杨伟华. 转基因大豆的发展及其安全性评价[J]. 粮油加工, 2007(4): 45-48. (Ye H Y, Yang W H. The development and safety evaluation of transgenic soybean[J]. Cereals and Oils Processing, 2007(4): 45-48.)

[9] 叶增民, 潘婕. 转基因大豆及其制品的安全性研究现状[J]. 生物技术通报, 2009(2): 26-28. (Ye Z M, Pan J. Current situation in safety of transgenic soybean and its products[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(2): 26-28.)

[10] Owen M D K. Current use of transgenic herbicide-resistant soybean and corn in the USA[J]. XIVth International Plant Protection Congress, 1999, 7: 25-30.

[11] 潘良文, 陈家华, 沈禹飞, 等. 进口转基因抗草甘膦油菜籽和大豆中 CP4-EPSPS 基因的检测比较研究[J]. 生物技术通讯, 2001, 21(3): 175-177, 207. (Pan L W, Chen J H, Shen Y F, et al. Detection comparison of CP4-EPSPS gene from genetically modified Roundup-Ready rapeseed and soybean[J]. Letters in Biotechnology, 2001, 21(3): 175-177, 207.)

[12] 向文胜. 抗除草剂草甘膦转基因作物[J]. 东北农业大学学报, 1998, 29(1): 92-98. (Xiang W S. Glyphosate resistant transgenic crops [J]. Journal of Northeast Agriculture University, 1998, 29(1): 92-98.)

[13] de Block M, Herrera-Estrella L, van Montagu M, et al. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny[J]. The EMBO Journal, 1984, 3: 1681-1689.

[14] Horsesh R B, Fraley R T, Rogers S G. Inheritance of functional foreign genes in plants[J]. Science, 1984, 223: 496-498.

[15] 王振华, 杨德光, 张辉, 等. 大豆遗传转化技术在转基因大豆研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(10): 60-66. (Wang Z H, Yang D G, Zhang H, et al. Research progress of transgene method in transgenic soybean (*Glycine max* L.) [J]. Biotechnology Bulletin, 2010(10): 60-66.)

[16] Zhang Z, Guo Z, Shou H, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation and routine recovery of transgenic soybean [J]. Plant Genetic Engineering, 2000(5): 88-94.

[17] 王萍, 张淑珍, 李文滨, 等. 大豆不同基因型胚尖不定芽的诱导及对抗生素的敏感性[J]. 作物杂志, 2010(2): 50-53. (Wang P, Zhang S Z, Li W B, et al. Induction of adventitious shoots from embryonic tip of different soybean genotypes and their sensibility to antibiotics [J]. Crop, 2010(2): 50-53.)

[18] 王罡, 季静, 郑丽红, 等. 口杯法便捷外植体灭菌的方法[P]. 中国: 201110202739. 7. (Wang G, Ji J, Zheng L H, et al. A convenient method to sterilize explants use cups [P]. China: 201110202739. 7.

[19] 张艳敏, 杨帆, 游颜杰, 等. 小麦茎生长点转化研究初报[J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 17-22. (Zhang Y M, Yang F, You Y J, et al. In planta transformation of wheat apical meristem: A preliminary study [J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica, 2005, 20(1): 17-22.)

[20] 郭华, 罗军武, 周建平, 等. 几种油料的子叶细胞形态与主要化学成分分析[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 33-36. (Guo H, Luo J W, Zhou J P, et al. The morphology of cotyledon cells and chemical components of some oil raw stuff [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(4): 33-36.)

[21] 原向阳, 郭平毅, 张丽光, 等. 不同时期喷施草甘膦对大豆生理指标的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2009, 48(2): 90-94. (Yuan X Y, Guo P Y, Zhang L G, et al. Impact of spraying glyphosate on physiological index of soybean at different growth stages [J]. Journal of Sun Yat-sen University (Natural Science), 2009, 48(2): 90-94.)

[22] 陈虎保, 陈国海. 草甘膦的作用机理及部位[J]. 林业科技通讯, 1997(1): 23-25. (Chen H B, Chen G H. Mechanism and site of action of glyphosate [J]. Forest Science and Technology, 1997(1): 23-25.)

[23] 原向阳, 郭平毅, 张丽光, 等. 第三复叶期喷施草甘膦对转基因大豆和普通大豆生理指标的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3886-3892. (Yuan X Y, Guo P Y, Zhang L G, et al. Impact of glyphosate on physiological index of transgenic and conventional soybean on three-trifoliate leaf stage [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(11): 3886-3892.)

(上接第 216 页)

[8] Xiao H Y, Christopher A M, Hong M, et al. The *Arabidopsis* MALE MEIOCYTE DEATH1 gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis [J]. Plant Cell, 2003, 15: 1281-1295.

[9] Wang Y J, Li Y D, Luo G Z, et al. Cloning and characterization of an HDZip I gene *GmHZ1* from soybean [J]. Planta, 2005, 221: 831-843.

[10] Qin Y F, Li D D, Wu Y J, et al. Three cotton homeobox genes are preferentially expressed during early seedling development and in response to phytohormone signaling [J]. Plant Cell Reporter, 2010, 29: 1147-1156.

[11] Ma H C, McMullen M D, Finer J J, et al. Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24: 465-473.

[12] Wang L Q, Ma H, Song L R, et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress [J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(7): 2109-2127.

[13] Scofield S, Murray J A. *KNOX* gene function in plant stem cell niches [J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60: 929-946.

[14] Hay A, Craft J, Tsiantis M, et al. Plant hormones and homeoboxes: Bridging the gap [J]. Bioessays, 2004, 26: 395-404.

[15] 王洋, 柏锡. 大豆 NAC 基因家族生物信息学分析[J]. 大豆科学, 2014, 33(3): 325-333. (Wang Y, Bai X. Bioinformatics analysis of NAC gene family in *Glycine max* L. [J]. Soybean Science, 2014, 33(3): 325-333.)

[16] 王志坤, 常健敏, 李丹丹, 等. 大豆 *GmWR1a* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 11-16. (Wang Z K, Chang J M, Li D D, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *GmWR1* in soybean [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(7): 11-16.)

[17] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463(7278): 178-183, 120.