

杨艳丽, 杨 勇, 李大红, 等. 转桃 *PpCuZnSOD* 基因大豆的耐旱性[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 978-983.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.05.003

转桃 *PpCuZnSOD* 基因大豆的耐旱性

杨艳丽¹, 杨 勇², 李大红¹, 李鸿雁¹

(1. 黄淮学院生物与食品工程学院, 河南 驻马店 463000; 2. 黄淮学院园林中心, 河南 驻马店 463000)

摘要: 为探索桃 (*Prunus persica* L.) 铜/锌超氧化物歧化酶基因 (*PpCuZnSOD*) 在植物抗干旱胁迫中的作用, 应用农杆菌介导法, 将 *PpCuZnSOD* 基因转入大豆品种中黄 13 中。Southern 印迹分析证实 *PpCuZnSOD* 基因已整合到大豆基因组中。定量 PCR 分析结果表明, 转基因大豆中 *PpCuZnSOD* 表达水平明显增加。用 15% PEG4000 模拟干旱胁迫时, 转基因大豆种子萌发率与主根长显著高于非转基因大豆。在干旱 10 d 条件下, 转基因大豆与非转基因大豆相比, 超氧化物歧化酶 (*SOD*)、过氧化氢酶 (*CAT*) 和过氧化物酶 (*POD*) 活性增加, 而丙二醛 (MDA) 含量下降, 叶绿素含量降低较少。活性氧 (ROS) 染色结果显示, 转基因植株在干旱胁迫下活性氧少于非转基因植株。复水后 4 d, 转基因大豆的成活率显著高于非转基因大豆。这些结果表明, *PpCuZnSOD* 能提高大豆的耐旱性。

关键词: 转基因; 耐旱性; 大豆; *PpCuZnSOD* 基因

中图分类号: S565.103.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)05-0978-06

Drought tolerance of transgenic soybean with *PpCuZnSOD* gene

YANG Yan-li¹, YANG Yong², LI Da-hong¹, LI Hong-yan¹

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China; 2. Garden Center, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China)

Abstract: To explore the role of copper/zinc superoxide dismutase gene (*PpCuZnSOD*) in drought stress in plants, *PpCuZnSOD* gene from peach (*Prunus persica* L.) was transferred into soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) by agrobacterium-mediated transformation. Integration of *PpCuZnSOD* gene was confirmed by southern blot analysis. The expression levels of *PpCuZnSOD* in transgenic plants were significantly increased via real time PCR. When the soybean seeds were treated with 15% PEG4000, the seed germination rate and main root length of transgenic soybean were significantly higher than those of non-transgenic soybean (wild type, WT) plants. Under the condition of drought stress for 10 d, the activities of *SOD* (superoxide dismutase), *CAT* (catalase) and *POD* (peroxidase) increased, while malondialdehyde (MDA) content decreased and chlorophyll content decreased slightly in transgenic soybean compared with those in WT. The results of reactive oxygen species (ROS) staining showed that transgenic plants had less reactive oxygen species under drought stress than those of WT. After four days of rehydration, the survival rate of transgenic soybean was significantly higher than that of WT. In conclusion, *PpCuZnSOD* plays an important role in enhancing the drought tolerance of soybean.

Key words: transgene; drought tolerance; soybean; *PpCuZnSOD* gene

收稿日期: 2018-05-03

基金项目: 河南省科技计划项目 (182102110305); 河南省高等学校
重点项目 (16A210032)

作者简介: 杨艳丽 (1979-), 女, 河南驻马店人, 本科, 实验师, 主要从事
园林技术及植物生理研究开发工作。(E-mail)
1654460639@qq.com

通讯作者: 李鸿雁, (E-mail) 1248762303@qq.com

寒冷、干旱、涝害等环境胁迫可产生有毒自由基, 危害农作物生产^[1-3]。活性氧 (ROS) 对细胞具有潜在的毒性, 通过氧化脂质、核酸和蛋白质而破坏正常的新陈代谢^[4]。一些研究结果表明, ROS 少量存在时, 可以作为重要的信号分子发挥作用, 参与控制病原体防御、激素信号传导、应激反应和植物生长发

育等过程^[5]。然而,当活性氧产生量增加时,它们能够损伤甚至杀死植物细胞。但是,植物已经进化出一些防御机制来减轻不利环境条件造成的损害。例如,一些 ROS 清除酶,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物还原酶(PRXR),可以清除超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)等氧化物,从而保护植物免受环境胁迫^[6]。

超氧化物歧化酶(SOD)是参与 ROS 降解的第一个酶,能把超氧阴离子转换成 H_2O_2 。SOD 有几种异构体,异构体类别取决于活性位点上的金属辅因子,例如,锰超氧化物歧化酶(*MnSOD*)、铜/锌超氧化物歧化酶(*CuZnSOD*)、铁超氧化物歧化酶(*FeSOD*)和镍超氧化物歧化酶(*NiSOD*)等^[7]。*CuZnSOD* 是细胞质、细胞核和线粒体膜间隙中的主要自由基清除剂^[8]。在胁迫状态下,SOD 活性和其转录表达水平增高^[9-10]。有研究表明,在干旱和盐胁迫下玉米和番茄中 *MnSOD* 和 *CuZnSOD* 高水平表达,这些有较高活性抗氧化酶的植物更耐盐、干旱或氧化胁迫,高盐和干旱胁迫能够改变抗氧化酶水平,在很大程度上提高幼苗的抗逆性^[11]。逆境条件下,水稻盐敏感品种 SOD 水平显著高于耐盐品种^[12]。过表达水稻叶绿体 *OsCu/Zn-SOD* 基因的转基因株系在 NaCl 和 $NaHCO_3$ 胁迫下发芽率显著高于非转基因株系^[13]。也有研究表明在烟草叶绿体中增强锌超氧化物歧化酶的表达后叶绿体对甲基紫精铜(MV)的耐受性也增强^[14]。在转基因马铃薯和拟南芥上也有相似的现象^[15-16]。因而,盐胁迫和干旱胁迫下植物 SOD 活性的增加是缓解逆境损伤的一个步骤^[17]。

大豆是一种重要的农业作物,为人类主要植物蛋白质来源和植物油来源。在环境胁迫下,大豆往往在其细胞中积累活性氧,影响其生长发育和产量^[18]。Guttikonda 等^[19]把拟南芥 *DREB1D* 转录因子导入大豆中,在缺水时,与对照相比,转基因植株能保持较高的相对含水量,而且存活率显著高于非转基因植株。此外,与非转基因植株相比,转基因植株还保持了 17%~24% 的叶片细胞膜稳定性,说明耐旱性增强。李大红等^[20]将苜蓿(*Medicago sativa*) *DREB1* 基因导入大豆,获得 rd29A 和 CaMV-35S 2 类启动子驱动的 *MsDREB1* 转基因大豆,在严重干旱胁迫下,这 2 种启动子转基因株系均有一定耐旱能力。秦迪等^[21]发现在干旱条件下,8 个转菠菜 *BADH* 基因大豆株系叶片中 *BADH* 基因表达量较

高,转基因大豆发芽指数高于非转基因大豆,在 8 个转基因大豆材料中有 7 个增产。魏嵘等^[22]利用农杆菌介导法获得过表达 *AtCBF4* 基因和过表达 *BoWS* 基因的大豆株系,这 2 个株系均有很强的耐旱性。本研究将桃 *PpCuZnSOD* 基因通过农杆菌介导法导入大豆基因组中,在干旱胁迫条件下检测转基因大豆苗期的耐旱性及其相关生理指标,以期获得具有一定应用价值的耐旱大豆新种质,为筛选具有育种应用价值的材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和菌株

大豆品种中黄 13 号由驻马店农业科学院提供。大肠杆菌 DH5 α 和根癌农杆菌 EHA105 菌株均由本实验室保存。

1.2 质粒载体和试剂

克隆载体 pMD-18 和 DNA 聚合酶购自 TaKaRa(中国大连)有限公司,pCambia1301 为本实验保存。TRIzol 试剂购自 Sigma 公司,其他试剂为进口或国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建与转化 根据 GenBank 中桃基因序列(XP_021817567)设计引物 P1(5'-CG-GATCCATGGTGAAAGGCGTTGCTGTTTC-3')和 P2(5'-CGAGCTCTCAGTTTGGAGACCAATAATA-3'),下划线为相应酶切位点。用 TRIzol 试剂提取 RNA,按说明书方法逆转录 cDNA 第一链及双链 DNA。PCR 反应体系(25 μ l)为:12 μ l ddH $_2$ O,1 μ l 模板,10 μ l *Ex Taq* Mix,上、下游引物各 1 μ l。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 60 s,53 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增所得片段连接到 T 载体上。送上海生工公司测序后,与 GenBank 序列进行同源性比对。将载有目的基因 *PpCuZnSOD* 序列的 T 载体和表达载体 pCambia1301 分别用限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Sac* I 双酶切(图 1),1.2% 琼脂糖电泳检测酶切结果。使用 DNA 回收试剂盒回收目的基因片段和表达载体片段,1.2% 琼脂糖电泳检测回收效果,将目的基因片段 50 ng 与载体 17 ng 加入到缓冲液中,加入 T4 连接酶 1 μ l(10 ng/ μ l),4 $^{\circ}$ C 过夜连接。转化后用 PCR 与双酶切检测质粒构建是否成功。用冻融法将表达载体转入农杆菌中。



图1 重组表达载体结构简图

Fig.1 Structural diagram of transgenic plant expression vector

1.3.2 转基因大豆株系的获得 大豆转化采用农杆菌介导的子叶节转化法^[23]。用 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素筛选抗性转基因植株。抗性转基因大豆植株经练苗后进行盆栽。

1.3.3 转基因大豆 Southern blot 检测 参照 Murray 等^[24] 的 CTAB 法提取大豆基因组 DNA。*PpCuZnSOD* 基因 PCR 分析: 引物为 P3 (5'-GAATCATCAACTTCACCCAG-3')、P4 (5'-CCAATAATACCACAAGCAAC-3'), 模板为大豆基因组 DNA, 复性温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 反应条件同方法 1.3.1。用 *EcoR* I 内切酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下酶解大豆基因组 DNA。以地高辛随机标记的 *PpCuZnSOD* 基因全长作为探针进行 Southern 杂交检测, 具体方法参照德国罗氏地高辛说明书 (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) 进行。

1.3.4 转基因植株 mRNA RT-qPCR 检测 对阳性植株的 *PpCuZnSOD* 基因表达量进行分析。用 TRIzol 试剂提取转基因大豆叶片 RNA, 用紫外分光光度计测定 260 nm 吸光度与 280 nm 吸光度比值, 计算 RNA 浓度。参照 SMART cDNA synthesis Kit 说明书合成 cDNA 第一链。在 ABI 7500 实时检测系统上进行 qRT-PCR 检测, 试剂为 Power Sybr Green PCR 试剂 (ABI)。荧光定量 PCR 引物为 P5 (5'-GAATCATCAACTTCACCCAGGA-3') 和 P6 (5'-CCAATAATACCACAAGCAACCC-3')。*Actin* 基因作为内参, 上游引物为 5'-TGATGGTGTGAGTCACACTGTACC-3', 下游引物为 5'-GGACAATGGATGGGCCAGACTC-3'。反应体系参照文献^[25]。所有 PCR 进行 3 个重复, 并用同一个条件进行测试。采用两步法 PCR 扩增标准程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 下 45 s, 循环 40 次。基因拷贝数的定量采用双标准曲线法^[25]。

1.3.5 转基因大豆耐旱性分析 将检验正确的转基因和野生型 (对照) 大豆种子进行萌发试验, 分别将转基因大豆与对照用 15% PEG4000 处理, 7 d 后, 记录主根长及种子萌发率。另外对转基因与对照大豆进行缺水试验。将发芽 20 d 的转基因与对照大豆苗移到含有砂与土 (质量比 1:1) 基质中栽培 7

d。然后进行缺水胁迫处理, 10 d 后, 测定其在干旱胁迫下相关生理指标变化。*SOD* 活性测定采用 NBT (四唑氮蓝) 还原法, 叶绿素含量测定采用分光光度法, *POD* 活性测定采用比色法, MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法, *CAT* 活性测定采用紫外吸收法, 具体方法均参照文献^[26]。 O_2^- 和 H_2O_2 检测分别用 NBT 和 DAB (3,3-二氨基联苯胺) 进行染色, 参照 Yan 等^[27] 方法进行。然后复水 4 d, 计算其存活率。每组每个株系 6 株。

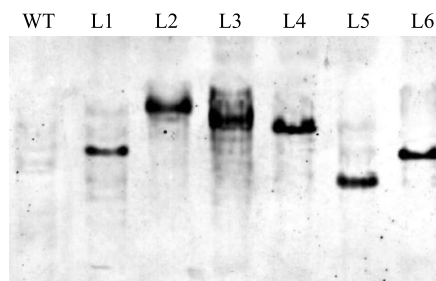
1.4 数据分析

试验数据分析使用 Excel 2013 及 SPSS17.0。

2 结果与分析

2.1 转基因植株分子检测

通过子叶节转化再生途径获得 6 个大豆转基因株系。用特异引物对再生苗进行 PCR 检测, 均为阳性植株。为了进一步确认转基因植株, 对这 6 个转基因株系进行 Southern blot 检测。以 *PpCuZnSOD* 基因的全长作为探针, 对转基因株系进行 Southern 杂交验证, 结果显示 6 个转基因株系均有 1 个拷贝的 *PpCuZnSOD* 基因整合到大豆基因组中 (图 2)。

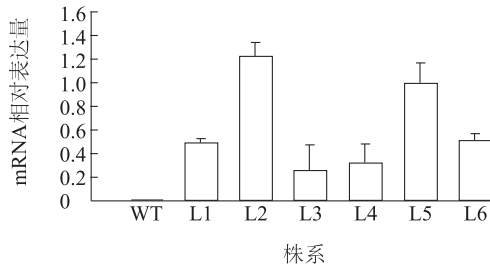


WT: 野生型; L1~L6: 转基因株系。

图2 大豆转 *PpCuZnSOD* 基因 Southern 杂交分析Fig.2 Southern blot analysis from transgenic lines with expression *PpCuZnSOD* gene in soybean

2.2 转基因大豆株系 *PpCuZnSOD* 表达量分析

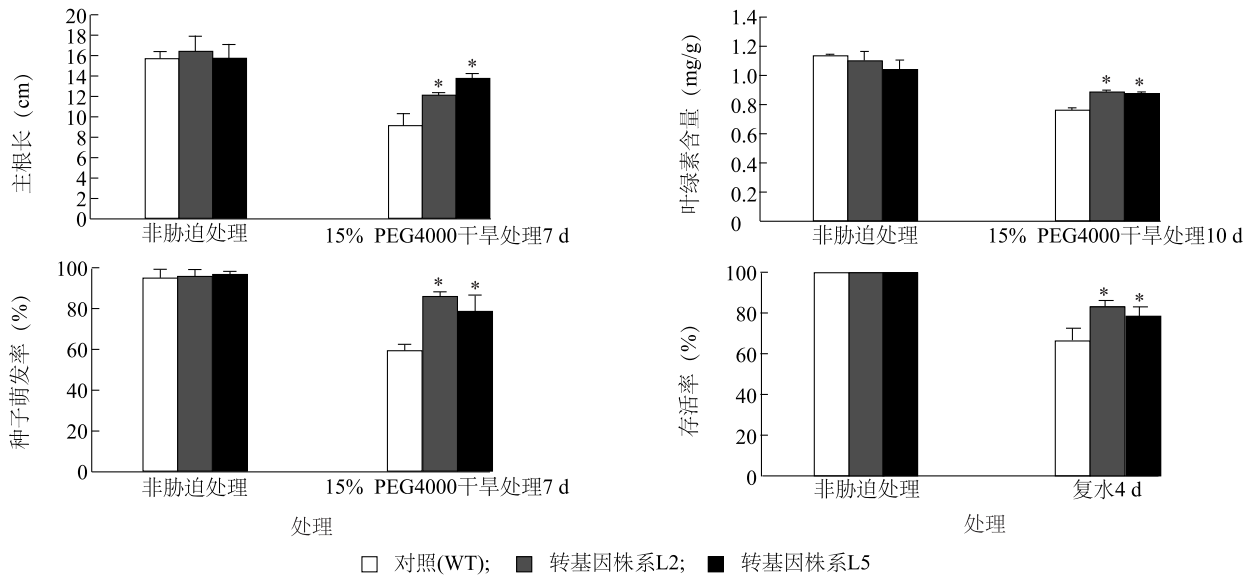
为了检测目的基因的表达效果, 对 6 个转基因株系 PCR 及 Southern blot 阳性苗进行 qRT-PCR 检测。结果显示转 *PpCuZnSOD* 株系目的基因均能表达, 但基因表达量存在较大差异。其中 L2、L5 株系 *PpCuZnSOD* 为过表达, 其他株系表达较弱, 而野生型植株基本没有表达。由此可见, *PpCuZnSOD* 基因已经转到大豆基因组中, 且有 2 个株系表达量较高 (图 3)。



WT:野生型;L1~L6:转基因株系。

图3 转基因大豆各株系的 *PpCuZnSOD* 表达量

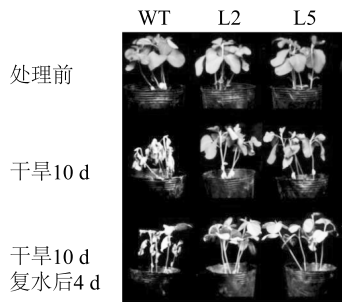
Fig.3 Expression of *PpCuZnSOD* gene in wild type (WT) and transgenic soybean lines



* 表示相同处理条件下不同转基因株系与对照差异显著 ($P < 0.05$)。

图4 转基因大豆株系 (L2、L5) 与对照在干旱胁迫条件下表型及生理变化

Fig.4 Phenotypic and physiological changes of transgenic soybean lines (L2 and L5) and WT under drought stress



WT:野生型;L2、L5:转基因株系。

图5 转基因大豆缺水胁迫试验

Fig.5 Drought stress test of transgenic soybean lines

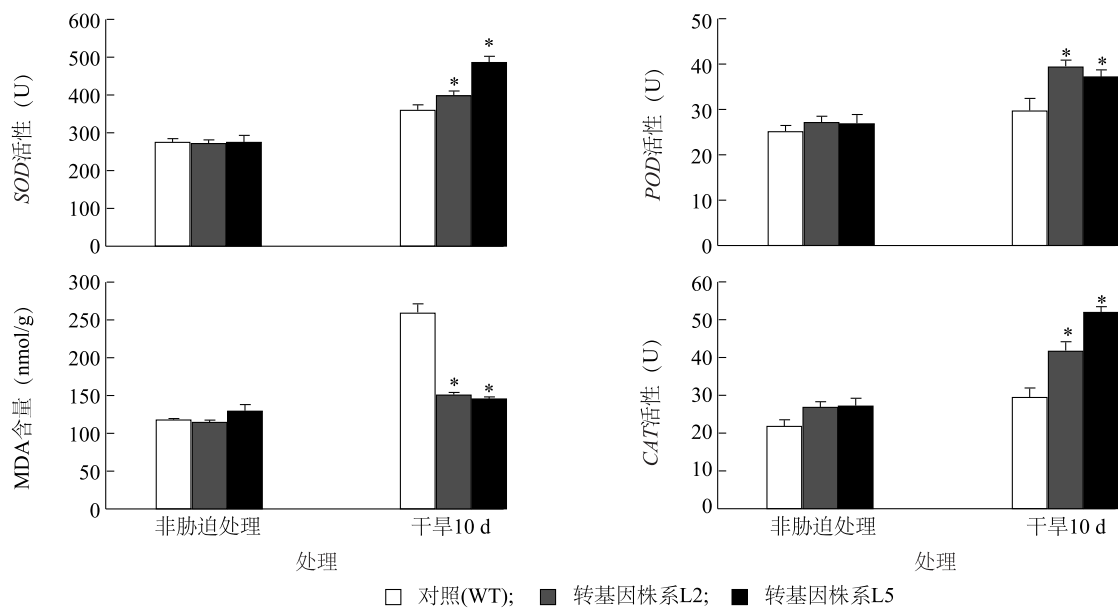
为了比较大豆转基因植株和野生型植株的耐旱性,将 27 日龄的盆栽转基因植株进行干旱胁迫处

2.3 转基因大豆耐旱性分析

对经过检测的转基因大豆及对照种子用 15% PEG4000 进行模拟干旱处理。7 d 后,转基因大豆种子的萌发率和主根长都显著高于对照(图 4)。对盆栽 27 d 转基因植株与对照进行缺水胁迫处理 10 d,结果显示转基因大豆长势明显好于对照,叶绿素含量显著高于对照;复水后,转基因植株的成活率显著高于对照(图 4、图 5)。

理,处理 10 d 后测定转基因大豆各株系 *SOD*、*POD* 和 *CAT* 活性及丙二醛含量。结果(图 6)表明,各株系与对照差异显著。干旱胁迫条件下,*PpCuZnSOD* 的过表达植株 MDA 含量显著低于对照,而 *POD*、*SOD* 及 *CAT* 活性显著高于对照。说明 *PpCuZnSOD* 过表达导致转基因植株耐旱性提高。

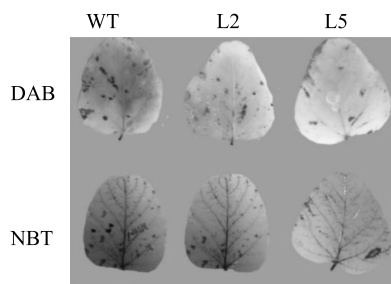
为了进一步检测转基因大豆的耐旱性,对转基因大豆与对照的 ROS 进行检测,分别用 NBT 和 DAB 进行染色。结果(图 7)显示,干旱胁迫后,过表达大豆植株叶片颜色明显浅于对照植株,表明过表达植株中 O_2^- 和 H_2O_2 的积累明显低于对照植株。说明干旱胁迫下过表达 *PpCuZnSOD* 基因可增强大豆细胞内活性氧清除能力,使 O_2^- 和 H_2O_2 的积累减少,从而减少细胞受损或细胞死亡,增强植物的耐旱性。



* 表示相同处理条件下不同转基因株系与对照差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 干旱胁迫处理 10 d 后转基因大豆苗 SOD、POD、CAT 活性及 MDA 含量变化

Fig.6 Changes of SOD, POD and CAT activity and MDA content in seedlings of transgenic soybean in drought stress treatment for 10 days



WT: 野生型对照; L2、L5: 转基因株系。

图 7 干旱胁迫下转基因大豆叶片 NBT 和 DAB 染色结果

Fig.7 NBT and DAB staining of transgenic soybean leaves under drought stress

3 讨论

干旱是世界范围内日益严重的农业问题。干旱严重影响作物产量和品质^[28]。通过常规育种方法也能增加大豆的耐旱性,但费力费时,而且遗传多样性限制了改进的潜力。分子生物学方法有助于提高作物的耐旱性。许多研究表明,导入外源基因能增加植物的耐旱性。Kudo 等^[29]发现过量表达 *OSPIL1* 和 *DREB1A* 的转基因拟南芥植株表现出较高的耐旱性。Hui 等^[30]将 *CuZnSOD* 和 *APX* 基因转入甘薯,提高了甘薯的耐盐性。本研究将 *PpCuZnSOD* 基因转入大豆品种中黄 13 中,在干旱胁迫下转基因植株根系主根长度明显大于

非转基因对照,耐旱性增强。

植物在干旱胁迫下能产生活性氧 (ROS),危害植物生长发育^[31]。*SOD* 通过催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化反应,将其还原为 H_2O_2 ,然后, *APX* 将过氧化氢氧化为水和氧^[32]。我们发现转基因大豆中 *SOD* 和 *APX* 活性均较高。表明转基因植株清除 ROS 的能力显著高于对照。转基因植物具有较强耐旱表型,例如在干旱胁迫下具有较低的叶绿素损失和脂质过氧化。转基因植株中 *CAT*、*SOD* 和 *POD* 活性的升高降低了干旱胁迫引起的 ROS 毒性。此外,DAB、NBT 染色结果也表明转 *PpCuZnSOD* 基因大豆过氧化氢和超氧阴离子少于非转基因植株。

SOD 在植物对不同类型胁迫的响应中起着重要作用。*PpCuZnSOD* 是一种明显响应干旱胁迫的 *SOD*,异源过表达可以增强大豆的耐旱性,表明 *PpCuZnSOD* 基因在植物响应干旱胁迫过程中发挥着一定作用,这对以后定向培育抗旱优良品种具有参考价值。

参考文献:

- [1] GARG N, CHANDEL S. The effects of salinity on nitrogen fixation and trehalose metabolism in *Mycorrhizal Cajanus cajan* (L.) Millsp. plants [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2011, 30 (4):490-503.
- [2] 何静丹,文仁来,田树云,等. 抽雄期干旱胁迫与复水对不同

- 玉米品种生长及产量的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(3):408-415.
- [3] 沙依然·外力,李晨,葛道阔,等.干旱胁迫下水稻光合特性、冠层-空气温差及水分利用效率的变化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1):86-89.
- [4] SHARMA P, JHA A B, DUBEY R S, et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defense mechanism in plants under stressful conditions[J]. Journal of Botany, 2012, 12(1):1-26.
- [5] NEGI N P, SHRIVASTAVA D C, SHARMA V, et al. Overexpression of *CuZnSOD*, from *Arachis hypogaea*, alleviates salinity and drought stress in tobacco [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(7):1109-1126.
- [6] WANG X, ZHANG H, GAO Y, et al. Characterization of Cu/Zn-SOD enzyme activities and gene expression in soybean under low nitrogen stress [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 96(8):2692.
- [7] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, et al. Reactive oxygen gene network of plants [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(10):490-498.
- [8] HWANG C S, RHIE G E, OH J H, et al. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (*Cu/ZnSOD*) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence [J]. Microbiology, 2002, 148(11):3705-3713.
- [9] HERNÁNDEZ J A, ALMANSA M S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves [J]. Physiologia Plantarum, 2002, 115(2):251-257.
- [10] XU J, DUAN X, YANG J, et al. Coupled expression of Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in cassava improves tolerance against cold and drought stresses [J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(6):24-25.
- [11] SOMMER C. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2010, 48(9):772-777.
- [12] DIONISIO-SESE M L, TOBITA S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress [J]. Plant Science, 1998, 135(1):1-9.
- [13] GUAN Q, LIAO X, HE M, et al. Tolerance analysis of chloroplast *OsCu/Zn-SOD* overexpressing rice under NaCl and NaHCO₃ stress [J]. PLoS ONE, 2017, 12(10):e0186052.
- [14] KWON S Y, JEONG Y J, LEE H S, et al. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress [J]. Plant Cell Environ, 2002, 25:873-882.
- [15] TANG L, KWON S Y, KIM S H, et al. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(12):1380-1386.
- [16] SHAFI A, CHAUHAN R, GILL T, et al. Expression of *SOD* and *APX* genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(6):615-631.
- [17] SHIRIGA K, SHARMA R, KUMAR K, et al. Expression pattern of superoxide dismutase under drought stress in Maize [J]. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 2014, 3(4):11333-11337.
- [18] JASPERS P, KANGASJÄRVI J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling [J]. Physiologia Plantarum, 2010, 138(4):405-413.
- [19] GUTTIKONDA S K, VALLIYODAN B, NEELAKANDAN A K, et al. Overexpression of *AtDREB1D*, transcription factor improves drought tolerance in soybean [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(12):7995-8008.
- [20] 李大红,郑文娜,蒋炳伸,等.过表达苜蓿 *MsDREB1* 基因大豆耐旱性分析[J]. 植物生理学报, 2017, 53(8):1479-1488.
- [21] 秦迪,赵翠兰,郑成忠,等.转 *BADH* 基因大豆耐旱性分析[J]. 中国油料作物学报, 2015, 37(6):752-758.
- [22] 魏峡,王兴宇,唐晓飞,等.过表达 *AtCBF4*、*BoWS* 大豆对干旱胁迫的响应[J]. 分子植物育种, 2015, 13(2):424-430.
- [23] WESTGATE M E, PETERSON C M. Flower and pod development in water-deficient soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(258):109-117.
- [24] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8:4321-4325.
- [25] LI D H, LIU H, YANG Y L, et al. Down-regulated expression of *RACK1* gene by RNA interference enhances drought tolerance in rice [J]. Rice Science, 2009, 16(1):14-20.
- [26] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006:211-213, 217.
- [27] YAN H, JIA H, CHEN X, et al. The cotton WRKY transcription factor GhWRKY17 functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production[J]. Plant & Cell Physiology, 2014, 55(12):2060-2076.
- [28] ZHANG F, ZHOU Y, ZHANG M, et al. Effects of drought stress on global gene expression profile in leaf and root samples of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) [J]. Bioscience Reports, 2017, 37(3):1-11.
- [29] KUDO M, KIDOKORO S, YOSHIDA T, et al. Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 15(4):458-471.
- [30] HUI Y, QIANG L, PARK S C, et al. Overexpression of *CuZn-SOD*, and *APX*, enhance salt stress tolerance in sweet potato [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2016, 109:20-27.
- [31] TORRES M A. ROS in biotic interactions[J]. Physiologia Plantarum, 2009, 138(4):414-429.
- [32] SHAFI A, CHAUHAN R, GILL T, et al. Expression of *SOD* and *APX* genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(6):615-631.

(责任编辑:张震林)