

· 研究报告 ·

优化子叶节转化法培育大豆*MtDREB2A*转基因植株

吴国栋, 修宇, 王华芳*

北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083

摘要 将正交因素试验与*GUS*基因组织化学染色等技术相结合, 优化大豆(*Glycine max*)品种东农50遗传转化体系, 导入抗旱关键基因*MtDREB2A*。结果表明, 大豆种子表面消毒, NaClO溶液法与Cl₂气熏蒸法的去污染率分别达到98.67%和93.33%。子叶节法转*GUS*基因组织化学染色率(68.33%)显著高于下胚轴法(14.00%)和胚尖法(0.67%) ($P < 0.05$)。种子萌发5天, 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)培养温度25°C, OD₆₀₀=0.9, 共培养5天的转*GUS*基因子叶节最高达72.00%; 恢复培养5天, 草丁膦(3 mg·L⁻¹)、头孢噻肟钠(200 mg·L⁻¹)和羧苄青霉素(300 mg·L⁻¹)筛选诱导分化的转*GUS*基因不定芽最多为3.33%; 优化的大豆遗传转化体系转化效率为1.11%。转*MtDREB2A*基因大豆东农50植株根系更加密集, 主根长度和侧根数量均显著高于对照($P < 0.05$), 证实*MtDREB2A*基因具有促进大豆根系生长的作用, 为利用该基因进行大豆抗旱育种奠定了坚实的基础并提供了理论依据。

关键词 大豆, 遗传转化体系优化, *GUS*基因, *MtDREB2A*基因, 根系改良

吴国栋, 修宇, 王华芳 (2018). 优化子叶节转化法培育大豆*MtDREB2A*转基因植株. 植物学报 53, 59–71.

大豆(*Glycine max*)起源于中国, 后传入美国和欧洲等地(赵团结和盖钧镒, 2004), 富含植物油、蛋白质及多种营养物质(Hao et al., 2011), 是重要的油料和粮食作物(Wang and Xu, 2008; 姜琼等, 2015)。干旱是影响大豆产量和品质的重要环境因素之一(Tran et al., 2009; 王玲等, 2017)。DREB2A (Dehydration Responsive Element Binding Proteins 2A)基因响应干旱胁迫, 调控靶基因的表达, 提高植株的抗旱性(Liu et al., 1998; Shinozaki et al., 2003)。目前已相继从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Sakuma et al., 2006)、油菜(*Brassica napus*) (Gao et al., 2002)、水稻(*Oryza sativa*) (Dubouzet et al., 2003)、玉米(*Zea mays*) (Qin et al., 2007)和洋白蜡(*Fraxinus pennsylvanica*) (Xiu et al., 2016)等植物中克隆获得DREB2A的相关基因, 它们都受干旱胁迫的诱导且与植物的抗旱相关。本实验室从豆科植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中克隆获得*MtDREB2A*基因(GenBank登录号: DQ908959), 该基因具有改变转基因蒺藜苜蓿植株根冠比和提升抗旱性的功能(Chen et al., 2009)。将*MtDREB2A*用于大豆育种, 以期定向

培育优质抗旱新品种(邱波等, 2011; 王志坤等, 2014; 杜艳丽和谢甫缙, 2015)及提高大豆产量和品质(Seo et al., 2012)。

大豆遗传转化受多种因素的影响, 不同大豆基因型不定芽再生率和农杆菌敏感性差异明显。Hinchee等(1988)从100个大豆品种中筛选出Peking, 其农杆菌介导转化的*GUS*基因染色率最高。大豆16个基因型(邱波等, 2011)和10个品种(薄路花和曹越平, 2015)分别以农杆菌LBA4404和EHA105介导*GUS*基因转化, 品种东农50的不定芽再生率和*GUS*基因染色率最高(刘银等, 2013)。大豆转化体系对转化效率影响较大(武小霞等, 2010)。通过比较农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法、基因枪法和花粉管通道法等转化(董蕾等, 2011; 侯文胜等, 2014), 可知农杆菌介导法已成功用于大豆子叶节(Donaldson and Simmonds, 2000; Olhoft and Somers, 2001; Olhoft et al., 2003)、子叶(Hinchee et al., 1988)、下胚轴(Wang and Xu, 2008)、胚尖(Liu et al., 2004)、花序(Hong et al., 2007)和未成熟胚来源的胚性愈伤(Ko and Korban, 2004)等外植体的转化。然而, 目前大豆的再生

收稿日期: 2016-12-23; 接受日期: 2017-05-04

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(No.2009ZX08009-089B-4)

* 通讯作者。E-mail: hfwang@bjfu.edu.cn

频率及转化效率与烟草(*Nicotiana tabacum*)和水稻等作物相比仍然较低(林树柱等, 2005; 马晓红等, 2008), 且该研究依然是基因工程育种领域的难点(姚丙晨等, 2015)。

本研究以大豆植株再生率高的品种东农50为试材, 优化子叶节转化体系以提高转化效率。在建立简便、高效、无菌培养体系的基础上, 利用子叶节、下胚轴和胚尖3种转化法筛选获得最佳转化方法。以正交因素试验和GUS基因组织化学染色等技术优化农杆菌侵染与不定芽诱导条件, 探讨种子萌发时间、菌液培养温度、浓度(OD₆₀₀值)、共培养和恢复培养时间, 及培养基中草丁膦(phosphinothricin, PPT)、头孢噻肟钠(cefotaxime sodium, Cef)和羧苄青霉素(carbenicillin, Cb)浓度对转化效率的影响。以优化体系将MtDREB2A基因导入东农50受体, 获得根系发育健壮的植株, 为大豆抗旱新品种培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大豆(*Glycine max* (L.) Merrill)品种东农50种子由东北农业大学赵琳副研究员惠赠; 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株EHA105/pCAMBIA3301-35S-GUS由中国农业大学章家长教授惠赠, 该载体所含抗性筛选基因PPT和报告基因GUS的启动子均为CaMV 35S; GV3101/pCAMBIA1301-rd29A-MtDREB1C与GV3101/pBin438-35S-MtDREB2A为本实验室构建和保存。

1.2 植物表达载体的构建

用MtDREB2A基因替换上述载体GUS基因, 用rd29A启动子替换CaMV 35S启动子, 构建质粒pCAMBIA3301-rd29A-MtDREB2A, 并导入农杆菌菌株EHA-105用于大豆东农50转化。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)转化: 分别提取质粒pCAMBIA3301-35S-GUS、pCAMBIA1301-rd29A-MtDREB1C以及pBin438-35S-MtDREB2A (Takara, Code No. 9760), 以热激法转化大肠杆菌菌株DH5α (Takara, Code No. 9057), 并涂布于含50 mg·L⁻¹ Kan (卡那霉素)的LB固体培养基上, 37°C黑暗倒置过

夜培养。挑取单菌落置于含50 mg·L⁻¹ Kan的LB液体培养基中, 37°C, 220 r·min⁻¹黑暗振荡过夜培养后, 提取质粒进行电泳分离检测。

pCAMBIA3301-rd29A-GUS质粒构建: 根据质粒pCAMBIA1301-rd29A-MtDREB1C序列(Chen et al., 2010), 用Primer Premier 5.0软件设计启动子引物rd29A-F1和rd29A-F2 (表1), PCR扩增其全长序列。反应程序为: 94°C 10分钟; 94°C 30秒, 49.2°C 30秒, 72°C 1分钟, 35个循环; 72°C延伸10分钟。对PCR产物进行电泳分离检测, 切胶回收(Takara, Code No. 9762)后连接到pMD 18-T载体(Takara, Code No. 6011)上, 热激法转化DH5α。用Amp (氨苄霉素)筛选转化的DH5α, 提取质粒以rd29A-T1和rd29A-T2引物(表1)进行PCR检测, 获得质粒pMD 18-T-rd29A。用Bam-HI和NcoI分别双酶切pCAMBIA3301-35S-GUS与pMD 18-T-rd29A, 电泳分离后分别回收大、小片段。以T4连接酶(Takara Code No. 2011A)连接回收产物12小时, 之后热激转化DH5α。用Kan筛选转化的DH5α, 提取质粒以rd29A-T1和rd29A-T2引物PCR检测rd29A启动子, 获得质粒pCAMBIA3301-rd29A-GUS。

pCAMBIA3301-rd29A-MtDREB2A质粒构建: 根据MtDREB2A序列(GenBank登录号: DQ908959)设计特异引物MtDREB2A-F1和MtDREB2A-F2 (表1), PCR扩增其全长。反应程序为: 94°C 10分钟; 94°C 30秒, 53.5°C 30秒, 72°C 1分钟, 35个循环; 72°C延伸10分钟。PCR产物按上述方法连接到pMD 18-T载体上并转化DH5α。用Amp筛选转化的DH5α, 提取质粒以MtDREB2A-T1和MtDREB2A-T2引物进行PCR检测, 验证质粒pMD 18-T-MtDREB2A。用NcoI和Bst-EII分别双酶切pCAMBIA3301-rd29A-GUS和pMD 18-T-MtDREB2A, 电泳分离后分别回收大、小片段。按照上述方法将回收的片段用T4连接酶(Takara Code No. 2011A)连接12小时, 热激转化DH5α (Takara, Code No. 9057)。用Kan筛选转化的DH5α, 提取质粒以MtDREB2A-T1和MtDREB2A-T2引物PCR检测MtDREB2A基因。pCAMBIA3301-rd29A-MtDREB2A分别以rd29A-T1和rd29A-T2及MtDREB2A-T1和MtDREB2A-T2引物进行测序, 测序结果拼接后分别与rd29A启动子和MtDREB2A基因序列进行比对验证。

表1 植物表达载体构建所需引物

Table 1 The primers used in construction of plant express vector

Primer name	Primer sequence (5'-3')	T _m (°C)	Product length (bp)
<i>rd29A-F1</i>	GGCTTTACACTTTATGCTTCC	49.2	859
<i>rd29A-F2</i>	TTGTTAGGCTCCCTCATTTTC		
<i>rd29A-T1</i>	CAGTTTGAAAGAAAAGGGAA	46.7	71
<i>rd29A-T2</i>	GCTTTTTGGAACATCATGTCG		
<i>MtDREB2A-F1</i>	CATGCCATGGTGAAAATTGAAAGATGGGTGCT	53.5	971
<i>MtDREB2A-F2</i>	GGGTGACCGGATTATTATCTAGTTGCCCAAACG		
<i>MtDREB2A-T1</i>	ACTTTTCCGACGGCTCAA	44.0	472
<i>MtDREB2A-T2</i>	GTCATTACACACACCCTCTC		

农杆菌转化: 提取质粒pCAMBIA3301-*rd29A-MtDREB2A*, 使用冻融法转化农杆菌EHA105, 用于后续大豆遗传转化实验。

1.3 东农50遗传转化体系的优化

1.3.1 无菌培养体系的建立

分别用NaClO溶液消毒法和Cl₂气熏蒸法对大豆东农50种子进行表面消毒。

NaClO液体消毒: 用无菌蒸馏水冲洗种子3次, 每次1分钟; 转至超净工作台上, 以70%乙醇(v/v)浸泡30秒, 无菌蒸馏水冲洗2次, 每次3分钟; 分别加入浓度为0.10%、0.25%和0.50%的NaClO溶液, 120 r·min⁻¹振荡处理3、5和10分钟; 再用无菌蒸馏水清洗种子2次, 每次3分钟。在灭菌滤纸上沥干水分, 种脐向下接种于萌发培养基(表2)上。实验因素按正交设计L₉(3⁴), 共9组处理, 每组处理50粒种子, 重复3次, 共处理种子1 350粒。

Cl₂气熏蒸: 参照杜升伟等(2010)的方法, 在通风橱中使100 mL NaClO溶液(5%, m/v)和3.5 mL HCl(浓盐酸)(12 mol·L⁻¹)反应生成Cl₂。用向上排空气法将Cl₂通入装有大豆种子的50 mL广口瓶中, 直至黄绿色气体充满容器, 分别密闭熏蒸种子1、2、4、6和8小时, 共5组处理。在超净工作台上将种子置于无菌培养皿中, 当超净工作台气流吹至无氯味后, 种脐向下接种在萌发培养基(表2)上。在通风橱中向制备Cl₂的容器和广口瓶中加入KOH溶液(1 mol·L⁻¹)吸收剩余的Cl₂。每组处理50粒种子, 重复3次, 共处理种子750粒。

种子培养条件: 温度(25±1)°C, 光源为18 J·s⁻¹荧光灯(7根), 光密度为120 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为

18小时光照/6小时黑暗。7天后统计去污染率、污染率和死亡率。

去污染率(%)=(去污染的萌发种子数/供试种子数)×100%;

污染率(%)=(污染种子数/供试种子数)×100%;

死亡率(%)=(死亡种子数/供试种子数)×100%。

1.3.2 转化方法的优化

参照前人使用的转化法及培养基配方, 分别采用子叶节法(Olhoft et al., 2003)、下胚轴法(段莹莹等, 2010)和胚尖法(Liu et al., 2004)转化大豆东农50。每种方法50个外植体, 重复3次。用GUS基因组织化学染色法确定最佳转化方法, 以子叶节伤口处染色阳性进行染色率统计。

组织化学染色率(%)=(GUS组织化学染色阳性转化数/供试转化外植体数)×100%。

1.3.3 子叶节转化体系的优化

以正交因素试验分别对子叶节转化体系中农杆菌侵染和不定芽诱导条件进行优化。

农杆菌侵染条件优化: 以4个因素(萌发时间、农杆菌培养温度、OD₆₀₀值、共培养时间)4个水平设计L₁₆(4⁵)正交因素试验, 共16个处理。将0.1 mL EHA105/pCAMBIA3301-35S-GUS保存菌种接种到1 mL新鲜液体YEP培养基中, 28°C, 180 r·min⁻¹黑暗振荡培养至OD₆₀₀达到0.9。取1 mL培养物接种到100 mL新鲜液体YEP培养基中(50 mg·L⁻¹ Rif(利福平)和75 mg·L⁻¹ Kan), 分别于25°C、26°C、27°C和28°C, 180 r·min⁻¹黑暗振荡培养至OD₆₀₀达0.3、0.5、0.7和0.9时分装入50 mL离心管中。4°C, 3 000 ×g离心10分钟, 弃

表2 子叶节法转化大豆东农50的培养基成分

Table 2 List of components used in media preparation for transformation method

	Germination medium	Re-suspension medium	Co-cultivation medium	Shoot induction medium	Shoot elongation medium	Rooting medium
MS salts	1/2 x	1/2 x	—	—	—	—
MS iron stock	1/2 x	1/2 x	1 x	1 x	1 x	1 x
MS vitamins	1/2 x	1/2 x	—	—	—	—
B5 salts	—	—	1 x	1 x	1 x	1/2 x
B5 vitamins	—	—	1 x	1 x	1 x	—
Sucrose (g·L ⁻¹)	15	—	30	30	30	30
Glucose (g·L ⁻¹)	—	10	—	—	—	—
Agar (g·L ⁻¹)	8	—	5	8	8	8
pH	5.8	5.8	5.5	5.5	5.5	5.6
6-BA (mg·L ⁻¹)	—	—	1.7	1.7	1.7	—
GA (mg·L ⁻¹)	—	—	—	—	1.0	—
IBA (mg·L ⁻¹)	—	—	—	—	—	1.0
MES (g·L ⁻¹)	—	—	0.6	0.6	0.6	0.6
L-cys (mg·L ⁻¹)	—	—	182.5	182.5	182.5	—
Na ₂ S ₂ O ₃ (mg·L ⁻¹)	—	—	250	250	250	—
DTT (mg·L ⁻¹)	—	—	154.3	—	—	—
AS (mg·L ⁻¹)	—	39.2	39.2	—	—	—
Cef (mg·L ⁻¹)	—	—	—	100–400	100–400	—
Cb (mg·L ⁻¹)	—	—	—	100–400	100–400	—
PPT (mg·L ⁻¹)	—	—	—	0, 2–5	—	—

6-BA: 6-苄基腺嘌呤; GA: 赤霉素; IBA: 3-吲哚丁酸; MES: 2-(N-吗啡啉)乙磺酸; L-cys: L-半胱氨酸; DTT: 二硫苏糖醇; AS: 乙酰丁香酮; Cef: 头孢噻肟钠; Cb: 羧苄青霉素; PPT: 草丁膦

6-BA: 6-benzylaminopurine; GA: Gibberellin; IBA: 3-indole-butyric acid; MES: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid; L-cys: L-cysteine; DTT: Dithiothreitol; AS: Acetosyringone; Cef: Cefotaxime sodium; Cb: Carbenicillin; PPT: Phosphinothricin

上清液收集菌体,以重悬培养基(表2)调整OD₆₀₀值至0.9,用于侵染。分别取培养3、4、5和6天的种子切取子叶节(Olhof et al., 2003),农杆菌侵染30分钟(修宇, 2016)。在灭菌滤纸上沥干附着菌液,将外植体转移至共培养培养基(表2)上,25°C分别黑暗培养2、3、4和5天后,统计GUS基因组织化学染色率。每处理50个外植体,重复3次,共2 400个外植体。培养基改良自Olhof等(2003)的方法(表2)。子叶节组织化学染色率(%)统计按前文所述方法进行。

不定芽诱导条件优化:以恢复培养时间、PPT浓度、Cef浓度和Cb浓度4个因素4个水平设计L₁₆(4⁵)正交因素试验,共16个处理。以上述农杆菌侵染优化条件侵染子叶节和共培养,外植体转移到不含PPT的诱导培养基(表2)(分别添加100、200、300和400 mg·L⁻¹ Cef及Cb)上分别培养0、5、10和15天;将子叶节连同不定芽转接到新鲜诱导培养基上(分别添加2、

3、4和5 mg·L⁻¹ PPT以及100、200、300和400 mg·L⁻¹ Cef及Cb)培养28天(每7天更换1次培养基,培养条件同1.3.1节)。统计不定芽诱导率(不定芽诱导率(%))=(诱导出不定芽的外植体数/供试外植体数)×100%) and GUS基因组织化学染色率(方法同前)。正交试验16个处理,每处理30个外植体,重复3次,共1 440个外植体。

1.3.4 转基因抗性植株的驯化养护

将按上述优化条件转化东农50(3次重复,每重复150个外植体)获得的抗性芽转移至伸长培养基(表2),每7天转接1次,直至抗性芽生长至高约3 cm,将抗性芽转移到生根培养基(表2)上培养14天(培养条件同1.3.1节)。打开培养瓶盖炼苗7天后,移植到含混合基质(珍珠岩:草炭土=1:1, v:v)的营养钵中生长14天。待植株生长壮实且长出新叶后移栽至大盆中生长,

温室养护。

1.3.5 转 *GUS* 基因大豆植株 PCR、RT-PCR 和组织化学染色

用 CTAB 法提取对照大豆和抗性植株叶片总 DNA, PCR 检测 *GUS* 基因。正向引物: 5'-AGCGTTGAACTGCGTGAT-3', 反向引物: 5'-GTTCTTTTCGGCTTGTTC-3', PCR 产物长度为 484 bp。反应程序为: 94°C 10 分钟; 94°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 1 分钟, 35 个循环; 72°C 延伸 10 分钟。对 PCR 产物进行 0.6% 琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选转基因植物。

采用 CTAB-Li 法提取大豆叶片总 RNA (Xiu et al., 2016), 去除基因组 DNA (Promega, Cat No. M6101) 后反转录 (Promega, Cat No. A5000) 获得 cDNA。反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 检测 *GUS* 基因表达。其中内参基因 *lectin* 正向引物: 5'-GC-CCTCTACTCCACCCCATCC-3', 反向引物: 5'-G-CCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG-3', PCR 产物长度为 118 bp (刘营等, 2012)。反应程序为: 94°C 10 分钟; 94°C 30 秒, 57°C 30 秒, 72°C 20 秒, 30 个循环; 72°C 延伸 10 分钟。*GUS* 基因 RT-PCR 反应程序同上。

将用灭菌蒸馏水清洗的植物材料置于组织化学染色液中 (以 1 mL 二甲基甲酰胺溶解 50 mg X-gluc, 加入 58 mL 磷酸缓冲液 (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.0), 10 mL K₃Fe(CN)₆ 溶液 (5 mmol·L⁻¹), 10 mL K₄Fe(CN)₆ 溶液 (5 mmol·L⁻¹), 2 mL EDTA 溶液 (0.5 mol·L⁻¹, pH 8.0), 100 μL Triton X-100, 20 mL 甲醇), 抽真空 10 分钟。37°C 温育 12 小时, 26°C 继续温育 2 天, 弃染色液。70% 乙醇 (v/v) 脱色, 每天更换脱色液至材料变为白色, 统计染色率。

1.4 转 *MtDREB2A* 基因大豆 PCR 检测和根系形态观测

用农杆菌 EHA105/pCAMBIA3301-*rd29A-MtDREB2A* 介导的优化子叶节法将 *MtDREB2A* 基因导入大豆东农 50 获得抗性再生植株, 使用 CTAB 法提取抗性植株叶片 DNA, 以 *MtDREB2A-T1* 和 *MtDREB2A-T2* 引物 (表 1) 进行 PCR 检测 *MtDREB2A* 基因。PCR 产物经 0.6% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收和测序, 与 *MtDREB2A* 基因比对, 筛选转基因植物。将阳性再生植株移栽至装有混合基质的无色培养瓶中, 成活后透过

培养瓶观察转基因植株根系的生长发育状况。将转 *MtDREB2A* 基因大豆移栽至钵 (直径 30 cm, 高 30 cm) 中温室养护, 收获种子。将转基因和对照大豆种子播种在含有混合基质的营养钵 (直径 10 cm, 高 30 cm) 中温室养护, 7 天后统计根系数量和长度。

1.5 数据处理

用 IBM SPSS Statistics 19 软件对实验数据进行单因素和多因素方差分析并进行差异显著性检验 (Duncan)。用 Microsoft Office Excel 2013 和 SigmaPlot 12.0 软件绘制图表。

2 结果与讨论

2.1 植物表达载体的构建

提取植物表达载体 pCAMBIA3301-*rd29A-MtDREB2A*, 分别以 *rd29A-T1*、*rd29A-T2*、*MtDREB2A-T1* 和 *MtDREB2A-T2* 引物进行 PCR 检测 (图 1A, B), PCR 产物长度分别为 71 和 472 bp。该载体分别以 *rd29A-T1*、*rd29A-T2*、*MtDREB2A-T1* 和 *MtDREB2A-T2* 引物进行测序与拼接, 拼接序列分别与 *rd29A* 启动子和 *MtDREB2A* 基因全长比对, 序列完全相同 (结果未显示), 表明 pCAMBIA3301-*rd29A-MtDREB2A* 植物表达载体构建成功, 其结构如图 1C 所示。

2.2 大豆东农 50 遗传转化体系的优化

2.2.1 外植体表面消毒方法对消毒效果的影响

用 NaClO 溶液对东农 50 种子进行 L₉(3⁴) 9 个表面消毒处理, 7 天后统计分析表明, NaClO 浓度、处理时间及二者的相互作用对去污染率均有显著影响 ($P < 0.05$)。用 0.5% NaClO 表面消毒 10 分钟的处理, 大豆种子去污染率显著高于其它处理, 而污染率与死亡率均显著低于其它处理 ($P < 0.05$) (表 3)。

Cl₂ 气熏蒸法处理时间对东农 50 的去污染率、污染率和死亡率均有显著影响 (表 4)。处理 6 小时的种子去污染率最高, 达 93.33%; 处理 1 小时的种子去污染率最低, 为 82.00%。Cl₂ 气熏蒸 1 小时和 2 小时的处理污染率分别为 13.33% 和 12.00%, 显著高于处理 4–8 小时的污染率 (1.33%–2.67%) ($P < 0.05$)。熏蒸 8 小时的处理死亡率达 10.67%, 显著高于熏蒸 1–6 小时的死亡率 (4.00%–5.33%) ($P < 0.05$)。

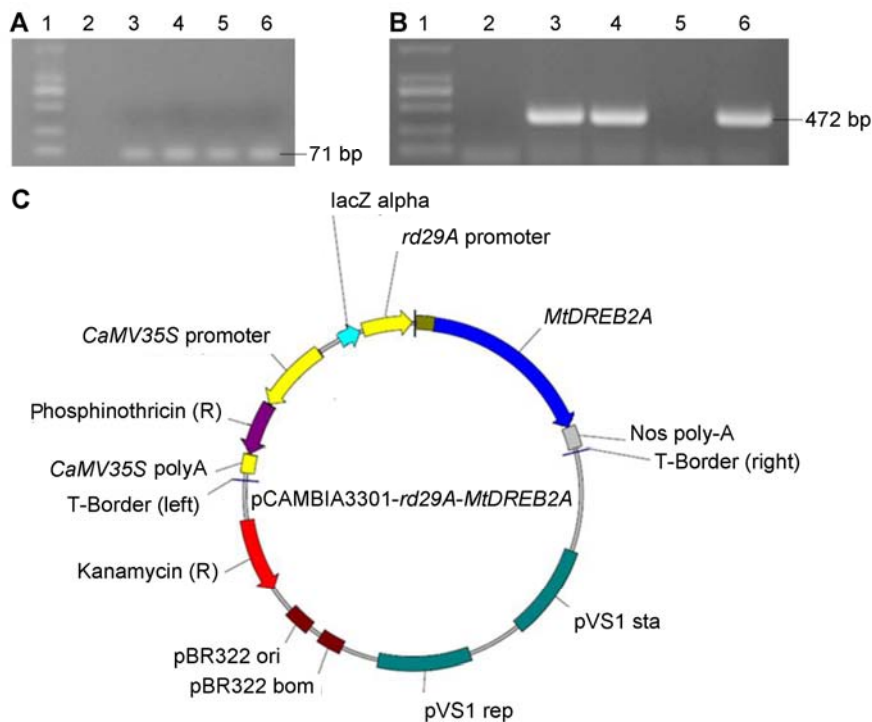


图1 植物表达载体pCAMBIA3301-*rd29A*-*MtDREB2A*的构建

(A) *rd29A*启动子的PCR鉴定(1: Marker; 2: pCAMBIA3301-35S-*GUS*对照; 3-6: *rd29A*的PCR产物); (B) *MtDREB2A*基因的PCR鉴定(1: Marker; 2: pCAMBIA3301-35S-*GUS*对照; 3-6: *MtDREB2A*的PCR产物); (C) pCAMBIA3301-*rd29A*-*MtDREB2A*的结构示意图

Figure 1 Construction of plant express vector pCAMBIA3301-*rd29A*-*MtDREB2A*

(A) PCR confirmation of *rd29A* promoter (1: Marker; 2: pCAMBIA3301-35S-*GUS*; 3-6: PCR product of *rd29A*); (B) PCR confirmation of *MtDREB2A* genes (1: Marker; 2: pCAMBIA3301-35S-*GUS*; 3-6: PCR product of *MtDREB2A*); (C) Structure of pCAMBIA3301-*rd29A*-*MtDREB2A*

表3 东农50种子NaClO法表面消毒实验结果(平均值±标准差)

Table 3 Effect of NaClO method on seed sterilization of *Glycine max* cv. 'Dongnong 50' (means±SD)

Treatment	NaClO concentration (%)	Time (min)	Sterilization rate (%)	Contamination rate (%)	Death rate (%)
1	0.10	3	81.33±3.06 e	16.00±2.00 b	2.67±1.16 bcd
2	0.10	5	72.67±1.16 f	24.00±2.00 a	3.33±1.16 bc
3	0.10	10	88.67±1.16 bc	10.67±1.16 cd	0.67±1.16 d
4	0.25	3	86.67±1.16 cd	10.00±2.00 cde	3.33±1.16 bc
5	0.25	5	70.67±2.31 f	23.33±4.16 a	6.00±2.00 a
6	0.25	10	90.67±1.16 b	8.00±2.00 de	1.33±1.16 cd
7	0.50	3	83.33±3.06 de	13.33±3.06 bc	3.33±1.16 bc
8	0.50	5	89.33±2.31 bc	6.00±2.00 ef	4.67±1.16 ab
9	0.50	10	98.67±1.16 a	0.67±1.16 g	0.67±1.16 d

同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著(Duncan's test)。

Different lowercase letters within column indicate significant differences at 0.05 level according to Duncan's test.

表4 东农50种子Cl₂气熏蒸法表面消毒实验结果

Table 4 Effect of Cl₂ method on seed sterilization of *Glycine max* cv. 'Dongnong 50'

Treatment	Time (h)	Sterilization rate (%)	Contamination rate (%)	Death rate (%)
1	1	82.00±5.29 b	13.33±5.78 a	4.66±1.16 b
2	2	82.67±6.11 b	12.00±6.00 a	5.33±3.06 b
3	4	92.00±3.46 a	2.67±2.31 b	5.33±3.06 b
4	6	93.33±1.16 a	2.67±2.31 b	4.00±2.00 b
5	8	88.00±3.46 ab	1.33±2.31 b	10.67±1.16 a

同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著(Duncan's test)。

Different lowercase letters within column indicate significant differences at 0.05 level according to Duncan's test.

2.2.2 转化方法对GUS基因组织化学染色率的影响

大豆东农50子叶节、下胚轴和胚尖转化GUS基因的转化效率如图2A所示。子叶节法转化GUS基因的染色率达68.33%，显著高于下胚轴法(14.00%)和胚尖法(0.67%) ($P<0.05$)。因此用正交因素试验对子叶节转化法进行主要影响因素的优化。

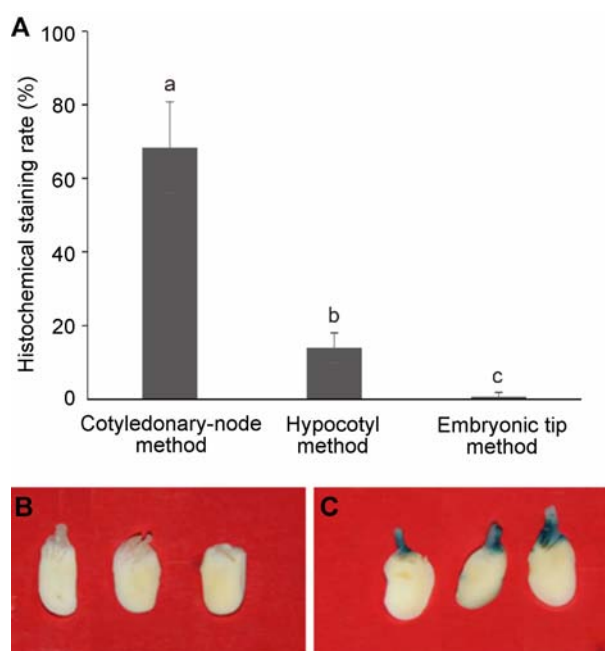
2.2.3 子叶节法遗传转化体系的优化

2.2.3.1 农杆菌侵染条件的优化

4种因素(表5)——种子萌发时间、农杆菌培养温度、浓度(OD₆₀₀值)和共培养时间, L₁₆(4⁵)16个组合处理对子叶节GUS基因组织化学染色率(图2B, C)均影响显著 ($P<0.05$)。极差分析表明, 4种因素的影响从大到小依次为共培养时间>农杆菌培养温度>萌发时间>OD₆₀₀值。GUS基因染色率随着共培养时间的延长及农杆菌培养温度的降低而增加, 共培养5天和农杆菌培养温度为25°C时最高。此外, GUS基因染色率随着种子萌发时间的增加呈先升高后下降的趋势, 萌发5天达到最高; 随着OD₆₀₀值的增大则呈先下降后升高的趋势, 在OD₆₀₀值为0.9时达到最高。4种因素的优化组合为A₃B₁C₄D₄。此组合在正交试验中未出现, 以此进行的3次重复实验转GUS基因组织染色率分别为36/50、34/50和38/50, 平均为(72.00±2.00)%。

2.2.3.2 不定芽诱导条件的优化

农杆菌转化后, 4种因素——恢复培养时间、PPT浓度、Cef浓度和Cb浓度, L₁₆(4⁵) 16个组合对不定芽诱导率及GUS基因染色率的影响如表6所示。恢复培养时间和PPT浓度对不定芽诱导率的影响显著 ($P<0.05$), 不定芽诱导率随恢复培养时间的延长和PPT浓度的降低而增加。4种因素的最佳组合为A₄B₁C₄D₂ (组合13),


图2 GUS基因组织化学染色

(A) 转化方法对GUS基因组织化学染色率的影响, 不同小写字母表示在0.05水平差异显著(Duncan's test); (B), (C) 共培养后的子叶节GUS基因组织化学染色((B) 阴性对照; (C) 组织化学染色阳性)

Figure 2 GUS gene histochemical staining

(A) The effect of transgenic methods on histochemical GUS staining rate, different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level according to Duncan's test; (B), (C) The GUS gene histochemical staining of cotyledonary node after co-cultivation ((B) Negative control; (C) Positive result of histochemical stain)

此组合的不定芽诱导率最高, 达55.56%。

恢复培养时间对转GUS基因不定芽组织化学染色率影响显著 ($P<0.05$)。极差分析显示, 4种因素的影响依次为恢复培养时间>PPT浓度=Cef浓度=Cb浓度;

表5 农杆菌侵染大豆东农50的条件优化

Table 5 The results of orthogonal experiment for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glycine max* cv. 'Dongnong 50'

Treatment	Factor				Histochemical staining rate of cotyledonary-node (%)
	Germination time (d) (A)	Culture temperature (°C) (B)	OD ₆₀₀ value (C)	Co-cultivation time (d) (D)	
1	3	25	0.3	2	8.00±2.00 g
2	3	26	0.5	3	31.05±10.46 def
3	3	27	0.7	4	38.27±5.46 cde
4	3	28	0.9	5	46.30±17.65 bcd
5	4	25	0.5	4	39.70±19.34 cde
6	4	26	0.3	5	59.33±3.06 ab
7	4	27	0.9	2	4.00±2.00 g
8	4	28	0.7	3	21.33±6.43 efg
9	5	25	0.7	5	68.33±12.42 a
10	5	26	0.9	4	51.06±7.65 abc
11	5	27	0.3	3	30.56±16.17 def
12	5	28	0.5	2	4.00±5.29 g
13	6	25	0.9	3	40.95±11.61 bcd
14	6	26	0.7	2	8.52±1.70 g
15	6	27	0.5	5	20.36±9.30 efg
16	6	28	0.3	4	12.67±10.26 fg
K ₁	30.91	39.25	27.64	6.13	
K ₂	31.09	37.49	23.78	30.97	
K ₃	38.49	23.30	34.12	35.43	
K ₄	20.62	21.07	35.58	48.58	
R	17.87	18.18	11.80	42.45	

K_n为第n水平下的平均响应值, R为因素对染色率的效应极差。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著(Duncan's test)。

K_n are the average response values under the levels of n, R are the ranges of factors. Different lowercase letters with in column indicate significant differences at 0.05 level according to Duncan's test.

最佳组合为A₂B₂C₂D₃, 该组合在试验中未出现, 对其进行验证实验(3次重复, 每重复30个外植体, 染色率分别为1/30、1/30和1/30), 不定芽染色率为(3.33±0.00)%。

2.2.3.3 转GUS基因植株的检测

在上述优化条件下转化大豆东农50, 将再生抗性芽经诱导生根的小植株移栽到营养钵养护(图3A–D)。之后, 提取叶片基因组DNA进行GUS基因PCR检测, 显示10个抗性植株中有7个扩增出GUS基因特异片段(图3E)。对7个PCR检测呈阳性的植株的新生叶片进行GUS表达的RT-PCR检测(图3F)和组织化学染色(图3G), 结果5个植株为阳性, 表明GUS基因成功转入大豆东农50并表达; 转化效率为(1.11±0.38)% (1/150、2/150和2/150的统计平均值)。

2.3 转MtDREB2A基因再生植株根系生长

以优化的大豆东农50子叶节转化法获得的转MtDRE-

B2A基因再生植株叶片, PCR扩增的MtDREB2A特异片段(约484 bp)序列与MtDREB2A基因序列比对一致(结果未显示), 获得3个阳性转基因株系(图4A)。与对照相比, 转MtDREB2A基因植株根系更密集, 根的数量、长度和生长量明显增加(图4B, E)。转基因大豆可正常开花并产生种子(图4D)。收获的种子播种于营养钵中, 根系数量和长度均显著高于对照($P<0.05$) (图4C, F)。

2.4 讨论与结论

2.4.1 大豆种子外植体表面消毒的简便高效方法

植物基因转化有赖于建立高效的遗传转化体系, 而遗传转化体系依靠无菌体系的建立。Cl₂气熏蒸时间对种子污染率和死亡率均有显著影响(表4), 熏蒸时间过短(1–2小时)污染率较高, 过长(8小时)则死亡率较高。NaClO溶液消毒法最佳处理组的种子去污染率达98.67%, 高于最佳Cl₂气熏蒸处理组(93.33%)。但考虑到Cl₂气熏蒸法操作简便, 可1次对大批量种子进行

表6 不定芽诱导条件正交试验的不定芽诱导率和组织化学染色率

Table 6 The adventitious bud induction rate and histochemical staining rate of orthogonal experiment

Treatment	Factor				Adventitious bud induction rate (%)	Histochemical staining rate of adventitious bud (%)
	Recovery time (d) (A)	PPT concentration (mg·L ⁻¹) (B)	Cef concentration (mg·L ⁻¹) (C)	Cb concentration (mg·L ⁻¹) (D)		
1	0	2	100	100	1.11±1.92 f	0.00±0.00
2	0	3	200	200	1.11±1.92 f	1.11±1.92
3	0	4	300	300	3.33±5.77 f	2.22±1.92
4	0	5	400	400	1.11±1.92 f	1.11±1.92
5	5	2	200	300	22.22±9.62 cd	2.22±1.92
6	5	3	100	400	7.78±3.85 ef	3.33±0.00
7	5	4	400	100	4.45±3.85 f	1.11±1.92
8	5	5	300	200	2.22±3.85 f	1.11±1.92
9	10	2	300	400	31.11±5.09 bcd	0.00±0.00
10	10	3	400	300	18.89±3.85 de	0.00±0.00
11	10	4	100	200	27.78±10.18 cd	0.00±0.00
12	10	5	200	100	21.11±8.39 cd	1.11±1.92
13	15	2	400	200	55.56±5.09 a	0.00±0.00
14	15	3	300	100	42.22±12.62 b	0.00±0.00
15	15	4	200	400	33.33±13.33 bc	0.00±0.00
16	15	5	100	300	23.33±8.82 cd	0.00±0.00
Adventitious bud induction rate	K ₁	1.67	27.50	15.00	17.22	
	K ₂	9.17	17.50	19.44	21.67	
	K ₃	24.72	17.22	19.72	16.94	
	K ₄	38.61	11.94	20.00	18.33	
	R	36.94	15.56	5.00	4.72	
Histochemical staining rate	K ₁	1.11	0.56	0.83	0.56	
	K ₂	1.94	1.11	1.11	0.56	
	K ₃	0.28	0.83	0.83	1.11	
	K ₄	0.00	0.83	0.56	1.11	
	R	1.94	0.56	0.56	0.56	

同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著(Duncan's test)。

Different lowercase letters within column indicate significant differences at 0.05 level according to Duncan's test.

表面消毒,且消毒过程中大豆种子不吸涨也几乎无Cl₂气残留,始终处于休眠状态,便于4°C保存备用。故Cl₂气熏蒸法较NaClO溶液消毒法更加简便高效,适合规模化和标准化操作。

2.4.2 大豆东农50的遗传转化体系优化

农杆菌侵染和不定芽诱导的多种因素对大豆植株再生与遗传转化效率均有明显影响(邱波等, 2011)。有关大豆遗传转化的研究多采用单因子试验方法逐一分析(林树柱等, 2005; 武小霞等, 2010; 薄路花和曹越平, 2015),虽然简单明了但对于因素间相互作用的分析可能有局限性(林荣双等, 2003)。正交因素试验法一并分析多个因素及其相互作用的影响,简化了实验并确定了因素的主次效应,可获得最优组合(刘瑞江等, 2010)。该方法已用于植物分生组织、不定芽

诱导和不定根发生影响因素等的研究(韩献忠等, 1990; 林荣双等, 2003; 马艳等, 2004)。本研究将正交试验方法与转GUS基因的组织化学染色技术相结合(袁鹰等, 2004; 桑庆亮等, 2014)探索多个因素对大豆子叶节法转化效率的影响,节省了人力物力且提高了检测效率。

农杆菌培养温度显著影响大豆的转化效率。大豆遗传转化体系的农杆菌培养温度多为27–28°C (Donaldson and Simmonds, 2000; Liu et al., 2004; Hong et al., 2007; Wang and Xu, 2008; 段莹莹等, 2010; 邱波等, 2011)。该温度最适合农杆菌生长,此温度下细菌分裂繁殖速度较快。正交因素试验表明,在一定范围内,转GUS基因组织化学染色率随农杆菌培养温度的降低而升高,当培养温度为25°C时染色率最高。对农杆菌侵染转化过程进行分析,发现温度降低

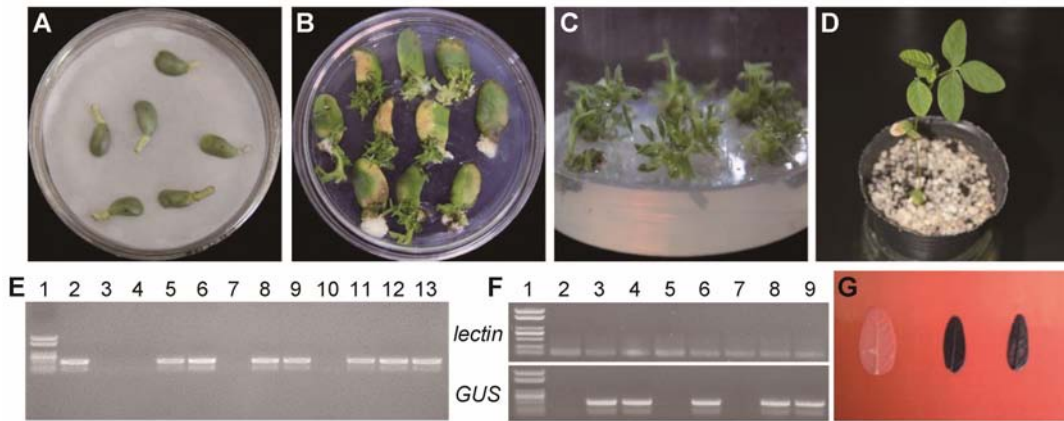


图3 优化的子叶节法转化大豆东农50

(A) 农杆菌侵染后共培养; (B) 不定芽诱导; (C) 不定芽伸长; (D) 抗性芽移栽成活; (E) 抗性植株GUS基因PCR检测(1: Marker; 2: pCAMBIA3301-35S-GUS; 3: 对照大豆; 4-13: 抗性植株); (F) 抗性植株GUS基因RT-PCR检测(1: Marker; 2: 对照大豆; 3-9: 抗性植株); (G) 对照大豆(左)和抗性植株(中、右)叶片的组织化学染色

Figure 3 Transformation system of *Glycine max* cv. 'Dongnong 50' using optimized cotyledonary-node method

(A) Co-cultivation after transformation; (B) Shoot induction; (C) Shoot elongation; (D) Resistant bud transplant; (E) PCR confirmation of *GUS* gene (1: Marker; 2: pCAMBIA3301-35S-GUS; 3: Control soybean; 4-13: Resistant plant); (F) RT-PCR confirmation of *GUS* gene (1: Marker; 2: Control soybean; 3-9: Resistant plant); (G) Histochemical staining of leaves from control (left) and resistant plant (middle and right)

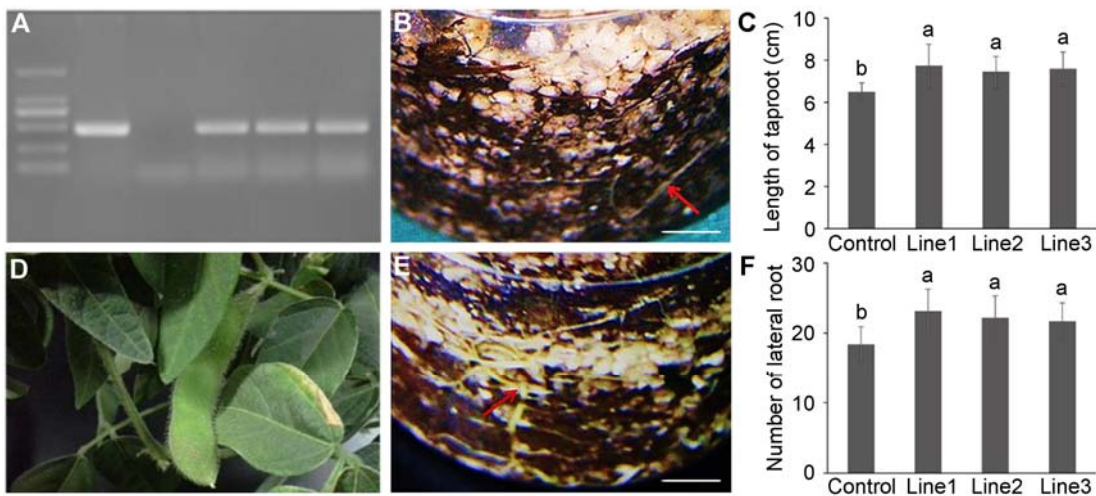


图4 转MtDREB2A基因大豆东农50鉴定和根系生长状况测定

(A) *MtDREB2A*基因PCR检测(1: Marker; 2: pCAMBIA3301-rd29A-MtDREB2A; 3: 对照大豆; 4-6: 转MtDREB2A基因大豆); (B) 对照大豆根系(Bar=1 cm); (C) 对照和转MtDREB2A基因大豆主根长度; (D) 转MtDREB2A基因大豆荚果; (E) 转MtDREB2A基因大豆根系(Bar=1 cm); (F) 对照和转MtDREB2A基因大豆侧根数量。图(C)和(F)中不同小写字母表示在0.05水平差异显著(Duncan's test)。

Figure 4 Confirmation and root system analyses of *MtDREB2A* transgenic soybean Dongnong 50

(A) PCR result of *MtDREB2A* transgenic soybean (1: Marker; 2: pCAMBIA3301-rd29A-MtDREB2A; 3: Control soybean; 4-6: *MtDREB2A* transgenic soybean); (B) The root of control soybean (Bar=1 cm); (C) The length of taproot of control and transgenic soybeans; (D) The pod of *MtDREB2A* transgenic soybean in greenhouse; (E) The root of *MtDREB2A* transgenic soybean (Bar=1 cm); (F) The number of lateral root of control and transgenic soybeans. Different lowercase letters in Figures (C) and (F) indicate significant differences at 0.05 level according to Duncan's test.

可能导致农杆菌分裂速度变慢及在溶液中的黏性增大, 影响受体细胞侵染、T-DNA插入及基因组DNA重组和在其中稳定表达。农杆菌EHA105浓度在OD₆₀₀为0.3–0.5时的升高速度较慢, OD₆₀₀为0.5–0.7时为对数生长期, 升高速度最快; OD₆₀₀为0.9时进入平台期(杨莹, 2013); 而平台期浓度转化的组织化学染色率最高, 表明侵染液高浓度农杆菌利于大豆侵染。大豆种子萌发时间延长, *GUS*染色率增加, 但萌发时间达到6天的染色率反而降低(表5)。这可能与萌发阶段细胞的有丝分裂活性有关(段莹莹等, 2010)。

影响不定芽诱导的4种因素L₁₆(4⁵)正交试验表明, 转化材料恢复培养时间的延长或培养基PPT浓度降低均可提高不定芽的诱导率, 恢复培养时间延长至15天, PPT浓度为2 mg·L⁻¹时不定芽的诱导率最高, 但*GUS*基因组织化学染色率最低(表6), 这表明*GUS*染色不定芽/不定芽总数的比例发生了变化, 即非转化不定芽数量的增加较快。相反, 侵染后立即在含有较高浓度PPT的诱导培养基上培养, *GUS*基因组织化学染色率随恢复培养时间的延长和PPT浓度的升高呈现先上升后下降趋势。这表明农杆菌介导转化的细胞对PPT抗性存在迟滞, 恢复培养时间过短易造成转化细胞死亡, 进而降低不定芽的诱导率。适度地恢复培养有利于提高转化细胞分化不定芽的比例。在本文所述条件下, 大豆子叶节法的转化效率已提高到1.11%。

2.4.3 转*MtDREB2A*基因大豆植株增强根系生长

*DREB2*基因具有促进植物根系生长和抗旱的功能(Liu et al., 1998; Shinozaki et al., 2003; Xiu et al., 2016)。本实验室前期的工作表明, *MtDREB2A*基因促进豆科植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)根系的生长(Chen et al., 2009)。以优化的遗传转化体系将*MtDREB2A*基因导入大豆东农50, 转基因再生植株在温室条件下生长, 根系的长度和数量均显著高于对照($P < 0.05$), *MtDREB2A*基因促进根系生长的功能再次在大豆转化中得到了验证。后续研究需对转*MtDREB2A*基因大豆植株正常开花结实的后代的抗旱性和农艺性状进行检测, 以期为利用该基因进行大豆抗旱改良提供更丰富的基础依据。

参考文献

薄路花, 曹越平 (2015). 不同大豆品种对农杆菌EHA105和

- GV3101敏感性及其培养条件的优化. 上海交通大学学报(农业科学版) **33**, 26–31.
- 董蕾, 任广明, 陈宝, 金羽, 曲娟娟 (2011). 转*DREB*基因大豆东农50对土壤氮素转化菌数量及生化强度的影响. 作物杂志 (5), 22–26.
- 杜升伟, 刘业丽, 姚丙晨, 白晨, 苗兴芬, 刘春燕, 陈庆山, 胡国华 (2010). 大豆转化体系的优化和*Dof4*基因转入大豆的研究. 大豆科学 **29**, 398–402.
- 杜艳丽, 谢甫缙 (2015). 转基因技术在大豆性状改良上的应用. 大豆科学 **34**, 320–328.
- 段莹莹, 赵琳, 陈李淼, 李文滨 (2010). 农杆菌介导的大豆子叶节和下胚轴转化方法的比较及优化. 大豆科学 **29**, 590–593.
- 韩献忠, 张治国, 刘骅, 赵立红 (1990). 条叶龙胆离体根培养条件的初步研究. 植物学通报 **7**(3), 49–51.
- 侯文胜, 林抗雪, 陈普, 贾志伟, 周扬, 于洋, 刘雁华 (2014). 大豆规模化转基因技术体系的构建及其应用. 中国农业科学 **47**, 4198–4210.
- 姜琼, 王幼宁, 王利祥, 孙政玺, 李霞 (2015). 盐胁迫下大豆根组织定量PCR分析中内参基因的选择. 植物学报 **50**, 754–764.
- 林荣双, 梁丽琨, 肖显华, 王顺珍 (2003). 花生幼叶为外植体的植株再生系统的建立. 植物学通报 **20**, 307–312.
- 林树柱, 曹越平, 卫志明, 马晓平, 陈鲁勇 (2005). 6-BA诱导大豆子叶节和茎尖出芽的研究. 上海交通大学学报(农业科学版) **23**, 138–142.
- 刘瑞江, 张业旺, 闻崇炜, 汤建 (2010). 正交试验设计和分析方法研究. 实验技术与管理 **27**(9), 52–55.
- 刘银, 史秀岚, 王静磊, 刘琪迹, 王幼平 (2013). 大豆子叶节再生体系的建立. 扬州大学学报(农业与生命科学版) **34**, 68–72.
- 刘营, 张明辉, 霍楠, 仇有文, 敖金霞, 高学军 (2012). 转基因大豆*OsDREB3*品系特异性定性PCR检测方法的建立. 中国农业大学学报 **17**(4), 34–39.
- 马晓红, 姚陆铭, 武天龙 (2008). 大豆整个子叶节外植体再生体系的建立及与子叶节、胚尖再生体系的比较. 大豆科学 **27**, 373–378.
- 马艳, 肖娅萍, 王彩玲, 王哲之 (2004). 苦皮藤试管苗生根培养研究. 植物学通报 **21**, 332–336.
- 邱波, 王志坤, 孟凡立, 李文滨 (2011). 不同大豆基因型再生性及对农杆菌敏感性的研究. 大豆科学 **30**, 752–756.
- 桑庆亮, 赖钟雄, 林玉玲, 陈裕坤 (2014). 荔枝基因枪转化及其*GUS*瞬时表达研究. 热带作物学报 **35**, 2223–2229.

- 王玲, 郭长奎, 任丁, 马红 (2017). 水稻非生物胁迫响应基因 *OsMIP1* 的表达与进化分析. 植物学报 52, 43–53.
- 王志坤, Sebastian A, 常健敏, 李丹丹, 邱波, 张大勇, 李文滨 (2014). 转 *GmDof11* 基因高油转基因大豆的鉴定及主要农艺性状调查. 作物杂志 (2), 39–42.
- 武小霞, 李静, 王志坤, 刘珊珊, 李海燕, 马永, 李文滨 (2010). 乙酰丁香酮浓度和共培养pH对大豆再生频率的影响. 东北农业大学学报 41(5), 1–4.
- 修宇 (2016). *FpDREB2A* 基因调控刺槐直根生长抗旱机制及选育改良抗旱优质材料基础研究. 博士学位论文. 北京: 北京林业大学. pp. 80–81.
- 杨莹 (2013). 大豆中黄13农杆菌介导转化体系优化. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学. pp. 25–26.
- 姚丙晨, 闫双勇, 苏京平, 马忠友, 王晓静, 孙玥, 刘学军 (2015). 大豆转基因研究进展. 大豆科技 (5), 18–26.
- 袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 温刚, 王玉民, 徐文静 (2004). 用基因枪将 *GUS* 基因导入玉米自交系的瞬时表达. 玉米科学 12, 41–43.
- 赵团结, 盖钧镨 (2004). 栽培大豆起源与演化研究进展. 中国农业科学 37, 954–962.
- Chen JR, Lü JJ, Liu R, Xiong XY, Wang TX, Chen SY, Guo LB, Wang HF (2010). *DREB1C* from *Medicago truncatula* enhances freezing tolerance in transgenic *M. truncatula* and China Rose (*Rosa chinensis* Jacq.). *Plant Growth Regul* 60, 199–211.
- Chen JR, Lü JJ, Wang TX, Chen SY, Wang HF (2009). Activation of a DRE-binding transcription factor from *Medicago truncatula* by deleting a Ser/Thr-rich region. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 45, 1–11.
- Donaldson PA, Simmonds DH (2000). Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep* 19, 478–484.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* 33, 751–763.
- Gao MJ, Allard G, Byass L, Flanagan AM, Singh J (2002). Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 49, 459–471.
- Hao YJ, Wei W, Song QX, Chen HW, Zhang YQ, Wang F, Zou HF, Lei G, Tian AG, Zhang WK, Ma B, Zhang JS, Chen SY (2011). Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *Plant J* 68, 302–313.
- Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB (1988). Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Nat Biotechnol* 6, 915–922.
- Hong HP, Zhang HY, Olhoft P, Hill S, Wiley H, Toren E, Hillebrand H, Jones T, Cheng M (2007). Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43, 558–568.
- Ko TS, Korban SS (2004). Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40, 552–558.
- Liu HK, Yang C, Wei ZM (2004). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta* 219, 1042–1049.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1391–1406.
- Olhoft P, Somers D (2001). L-cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20, 706–711.
- Olhoft PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216, 723–735.
- Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LSP, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *Plant J* 50, 54–69.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006). Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 1292–1309.
- Seo JS, Sohn HB, Noh K, Jung C, An JH, Donovan CM, Somers DA, Kim DI, Jeong SC, Kim CG, Kim HM, Lee SH, Choi YD, Moon TW, Kim CH, Cheong JJ (2012).

Expression of the Arabidopsis *AtMYB44* gene confers drought/salt-stress tolerance in transgenic soybean. *Mol Breed* **29**, 601–608.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 410–417.

Tran LSP, Quach TN, Guttikonda SK, Aldrich DL, Kumar R, Neelakandan A, Valliyodan B, Nguyen HT (2009). Molecular characterization of stress-inducible *GmNAC* genes in soybean. *Mol Genet Genomics* **281**, 647–664.

Wang GL, Xu YN (2008). Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference. *Plant Cell Rep* **27**, 1177–1184.

Xiu Y, Iqbal A, Zhu C, Wu GD, Chang YP, Li N, Cao Y, Zhang WB, Zeng HM, Chen SY, Wang HF (2016). Improvement and transcriptome analysis of root architecture by overexpression of *Fraxinus pennsylvanica* DREB2A transcription factor in *Robinia pseudoacacia* L. 'Idaho'. *Plant Biotechnol J* **14**, 1456–1469.

Breeding of *MtDREB2A* Transgenic Soybean by an Optimized Cotyledonary-Node Method

Guodong Wu, Yu Xiu, Huafang Wang*

Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract Orthogonal factorial experiments and histochemical *GUS* staining were combined to optimize the genetic transformation system of *Glycine max* cv. 'Dongnong 50' and transfer the key gene *MtDREB2A* for drought resistance into the soybean. Sterile of soybean seeds used as explants with NaClO solution and Cl₂ gas fumigation methods reached 98.67% and 93.33% germination, respectively. Histochemical staining rate of the tissues transformed with *GUS* by the cotyledon node method was 68.33%, significantly higher than that by the hypocotyl (14.00%) and embryo tip (0.67%) methods ($P < 0.05$). The cotyledon node-transformed *GUS* gene was up to 72.00% in germinated sterile seeds for 5 days, mediated by *Agrobacterium tumefaciens* cultured at 25°C, OD₆₀₀ 0.9, and co-cultured for 5 days. The shoots were induced and differentiated with cotyledon node-transformed *GUS* up to 3.33% by optimal recovery culture for 5 days and were screened on culture medium containing phosphinothricin (3 mg·L⁻¹), cefotaxime sodium (200 mg·L⁻¹) and carbenicillin (300 mg·L⁻¹). The transgenic efficiency was 1.11% with the optimized soybean genetic transformation system. The *MtDREB2A* transgenic plant roots of soybean 'Dongnong 50' were more dense and both taproot length and lateral root number were significantly longer and greater than those of the control ($P < 0.05$). The study verified that the *MtDREB2A* gene plays a role in promoting soybean root growth, which lays a solid foundation and provides a theoretical basis for the gene using in drought resistance breeding of soybean.

Key words soybean, optimization of gene transformation system, *GUS*, *MtDREB2A*, root enhancement

Wu GD, Xiu Y, Wang HF (2018). Breeding of *MtDREB2A* transgenic soybean by an optimized cotyledonary-node method. *Chin Bull Bot* **53**, 59–71.

* Author for correspondence. E-mail: hfwang@bjfu.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)