

发根农杆菌介导的大豆 *DAD* 基因沉默嵌合植株的获得

许娜<sup>1</sup>, 闫强<sup>1,2</sup>, 崔晓霞<sup>1</sup>, 郭娜<sup>1</sup>, 窦道龙<sup>2</sup>, 邢邯<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学 植物保护学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 利用发根农杆菌介导的转化方法, 获得了大豆 *DAD* 基因在根组织中沉默的嵌合植株。同时在 pHellsGate12 载体基础上插入一个 GFP 表达盒使得对转基因组织的筛选变得更加简便; 通过对荧光组织进行 qPCR 检测发现转基因组织与对照相比, *DAD* 基因转录水平降低 45% ~ 70%。以上结果表明大豆 *DAD* 基因在转基因根组织中已被成功沉默, 并且利用改造后的 pHellsGate12:GFP 载体通过荧光可以对转基因组织进行初步快速筛选。  
**关键词:** 大豆; 转基因根毛; 嵌合植株; 发根农杆菌; *GmDAD*  
**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.04.0576

*Agrobacterium*-mediated *GmDAD1* Gene Silence of Transgenic Hairy Roots in Chimeric Soybean

XU Na<sup>1</sup>, YAN Qiang<sup>1,2</sup>, CUI Xiao-xia<sup>1</sup>, GUO Na<sup>1</sup>, DOU Dao-long<sup>2</sup>, XING Han<sup>1</sup>

(1. Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement /Key Laboratory of Biology and Genetics and Breeding for Soybean, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China; 2. Department of Plant Pathology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** *Agrobacterium rhizogenes* is able to transform plant genomes and induce the production of hairy roots. In this work, we described the use of *A. rhizogenes* in soybean to rapidly assess gene expression and function. We first cloned the soybean *DAD* gene into pHellsgate12:GFP vector, which was reconstructed by inserted a 35S:GFP:nos expression cassette into *SacI* digested pHellsGate12, then transformed the *DAD* gene fragment into soybean by using this chimeric hairy root transgenic system. The transcription level of *DAD* in the fluorescence hairy roots were reduced to 45% ~ 70%. The results revealed that the *DAD* gene was silenced in transgenic hairy roots, and the reconstructed RNAi vector could simplify the progress of positive hairy roots screen.  
**Keywords:** Soybean; Hairy root; Chimeric plant; *A. rhizogenes*; *GmDAD*

建立高效的遗传转化技术体系是进行作物遗传改良和基因功能分析的基础。根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) 介导的植物稳定转化技术是最常用的遗传转化技术, 但是操作过程却费时费力, 尤其像大豆这种难以进行遗传操作的作物, 要得到稳定的转基因植株则更加困难<sup>[1]</sup>。相对地, 发根农杆菌 (*A. rhizogenes*) 介导的转化能够大大缩短操作时间, 并且在许多植物品种中都能够诱导产生转基因发状根组织。

目前利用发根农杆菌介导侵染植物产生发状根的方法有两种: 一种为通过侵染无菌处理过的植物外植体, 经在培养皿中培养获得发状根组织。这种方法培养的根组织在无激素培养基中可以迅速生长, 但由于要进行组织培养工作, 因此要求的操作条件较为严格; 另一种方法是通过侵染植物本身获得具有野生型茎叶和转基因发状根组织的“嵌合植株” (chimeric plant)<sup>[2-7]</sup>。与前者相比, 这种“嵌合植株”转化能够在非无菌条件下操作并在植物整株水平上进行功能分析。在豆科植物中, 这种嵌合植株主要用于鉴定寄主与根瘤菌共生相关基因的功能<sup>[8,9]</sup>, 例如 Vieweg 等<sup>[9]</sup> 研究了 *MtTrHb1* 和 *Mt-*

*TrHb2* 在苜蓿和丛枝菌根真菌共生过程中的功能。Kereszt 等<sup>[5]</sup> 和 Cao 等<sup>[6]</sup> 分别对大豆嵌合植株的转化方法进行了探索, 随后, Cao 等<sup>[7]</sup> 利用嵌合植株转化方法研究了 *TaNHX2* 基因在大豆耐旱过程中的功能。

*DAD* (defender against apoptotic cell death) 基因最初从温度敏感的仓鼠 *tsBN7* 突变体细胞中分离出来, 并被证明具有抑制细胞程序化死亡 (program cell death, PCD) 的功能。*DAD* 蛋白在从酵母到哺乳动物中的氨基酸序列中均高度保守。在植物中, 目前已经在拟南芥、水稻、大麦等植物中分离到 *DAD* 基因<sup>[10]</sup>。同时研究表明豌豆 *DAD1* 也参与了细胞程序化死亡过程, 表达量随着植物的衰老而逐渐降低<sup>[11]</sup>。在烟草叶片中瞬时表达小麦 *TaDAD2* 基因能够抑制 BAX 触发的细胞程序化死亡, 而 *TaDAD2* 基因沉默的小麦植株则对条锈病菌敏感性增强<sup>[12]</sup>。因此, *DAD* 基因参与植物-病原菌的互作过程。

为了探明大豆 *DAD* 基因在大豆-疫霉互作过程中的功能, 本研究利用发根农杆菌介导的转化方法得到根组织中 *DAD* 基因沉默的大豆嵌合植株, 为进一步分析 *DAD* 基因的功能提供了基础。

收稿日期: 2014-10-09  
基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-004-PS10); 转基因生物新品种培育重大专项 (2014ZX08004-002); 南京农业大学自然科学基金重大项目 (KYZ201202-3); 长江学者和创新团队发展计划 (PCSIRT13073); 江苏省现代作物生产协同创新中心资助。  
第一作者简介: 许娜 (1990-), 女, 硕士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: xuna@njau.edu.cn。  
通讯作者: 邢邯 (1963-), 男, 教授, 博导, 主要从事大豆育种研究。E-mail: hanx@njau.edu.cn。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大豆品种选用对大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 2 号生理小种 (P6497) 表现抗性的 Williams-82 (*Rps1k*); 本氏烟 (*Nicotiana tabacum*); 大豆疫霉菌株选用 2 号生理小种 (P6497); 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 $\alpha$ , 发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 菌株 K599, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101, 以上材料均为本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 植物材料培养 选取健康饱满的大豆种子种植于含有灭菌营养土和蛭石 (1:2) 花盆中, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ , 16 h 光照 8 h 黑暗光周期条件的温室里培养。当子叶变为深绿色、两片子叶尚未展开时选取生长状态一致的植株进行发根农杆菌转化。用于目的基因克隆扩增的材料则待幼苗长至 2 周, 取叶片液氮速冻后置于 -70 $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

本氏烟育苗后移植到含有灭菌营养土的一次性塑胶杯中, 置于上述条件温室里培养。取生长 35 ~ 42 d 的植株用于注射瞬时表达外源基因。

1.2.2 RNA 提取、RT-PCR 和 qRT-PCR 样品 RNA 的提取采用 RNA simple Total RNA kit (TIANGEN, 北京) 试剂盒, 并按照说明书进行 RNA 抽提操作。基因组 DNA 消除和 RNA 反转录采用 Prime-Script<sup>TM</sup> RT reagent Kit (TaKaRa, 日本) 试剂盒并按说明操作。

阳性发状根验证: 以 *GFP* 基因片段和大豆内参基因 *GmTubulin* (*GmTUB*) (GenBank ID AC235288) 用于 RT-PCR 分析, 引物序列如表 1 所示。

*DAD* 沉默效率分析: 选取 *DAD* 基因中的一段 118 bp 序列和内参基因 *GmEF1 $\beta$*  (GenBank ID AK286947.1) 用于 qRT-PCR, 引物序列如表 1 所示。

qRT-PCR 采用 SYBR green real-time (Takara, 日本) 试剂, PCR 反应在 ABI PRISM 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, 美国) 进行。扩增数据经 ABI 7500 System Sequence Detection Software Version 1.4 软件初步处理后, 在 Excel 2010 中根据

导出的各样品 Ct 值利用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  计算目的基因的相对表达量。数据采用 Dunnett's test 进行显著性分析。

1.2.3 烟草叶片瞬时转化 将携带目的质粒的 GV3101 甘油菌在含有卡那霉素的 LB 平板上活化, 挑取单克隆经 PCR 验证后, 在含有 50 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素的 LB 液体培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$  震荡培养 48 h。培养菌液在 4 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$  条件下离心 4 min 后收集菌体, 菌体用 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub> 清洗 3 遍后用诱导缓冲液 (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  MES, 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub>, 150 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  acetosyringone, pH5.6) 悬浮并调节 OD<sub>600</sub> 值至 0.4。28 $^{\circ}\text{C}$  黑暗静置 2 h 后注射生长健康的烟草叶片。注射过的植物放回培养室继续培养 48 h 后用于荧光观察。

1.2.4 pHellsGate12 载体改造和沉默载体构建 利用含有 *Sac* I 酶切位点的引物 Full-GFP-F 和 Full-GFP-R, 以本实验室保存质粒 pBIN:GFP 为模板, 扩增完整的 35S:GFP:nos 表达盒序列, 将扩增到的 35S:GFP:nos 基因与 T-easy 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 通过 PCR 鉴定阳性克隆, 并测序验证核酸序列是否发生改变。将提取的质粒与载体 pHellsGate12 分别经 *Sac* I 酶切后连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后筛选阳性克隆, 此重组转化子即为 pHellsGate12:GFP 载体, 用于子叶转化。

依据已报道的植物 *DAD* 基因序列, 在大豆基因组数据库 (<http://www.phytozome.net>) 中进行 Blast 搜索, 选择同源性最高的基因命名为 *GmDAD*。利用 Primer Premier 5 软件设计引物 (表 1) 并从大豆 cDNA 中扩增 351 bp 的 *DAD* 基因全长用于构建 RNAi 载体, 电泳检测并切胶回收后利用 BP 连接酶将目的片段置换至 Gateway 中间载体 pDONR221 上, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 利用 pDONR221 上所带 M13 序列引物进行菌落 PCR 验证; 挑取阳性克隆提取质粒, 之后经 LR 反应置换至改造的 pHellsGate12:GFP 载体中, 菌落 PCR 验证采用两对引物 P27-5&DAD-R 和 DAD-R&P27-3 检测, 以确保 *DAD* 基因以反向互补形式同时插入到目的载体中。构建完成的 pHellsGate12:GFP:DAD 载体通过电击法转化转入发根农杆菌 K599, 用于根毛转化。

表 1 本研究中所用引物核酸序列  
Table 1 The oligonucleotides used in the study

引物名称 Primer name	核酸序列 Primer sequence	用途 Purpose
ELF1 $\beta$ -F	5'- GTTGA AAAAGCCAGGGGACA -3'	qRT-PCR
ELF1 $\beta$ -R	5'- TCTTACCCCTTGAGCGTGG -3'	
Tubulin (TUB)-F	5'- GGAGTTTACAGAGGCAGAG -3'	
Tubulin (TUB)-R	5'- CACTTACGCATCATAGCA -3'	RT-PCR
DADqPCR-F	5'-AGCAAGGACGCCCAAGAC-3'	qRT-PCR
DADqPCR-F -R	5'-CCTGGATGAAAGCGGTGA-3'	
Full-GFP-F	5'-GAGCTCGTCAACATGGTGGAG CACGAC -3'	
Full-GFP-F	5'-GAGCTCGTCACTGGATTTTGCTTTTAGG-3'	Gene amplify
p12-DAD-F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCCTCGGTCTAGCAGC-3'	RNAi
p12-DAD-R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTACCAAGGAAGTTCATGATCAC-3'	
GFP2-F	5'- GAACCCCTAATTCCTTATCTG-3'	
GFP2-R	5'- AAGACCCCAACGAGAAGC-3'	RT-PCR

1.2.5 大豆嵌合植株获得 转化方法主要参照 Kereszt 等<sup>[5]</sup>的方法并做略微改进。主要操作过程如下所述:首先将携带 pHellsGate12:GFP 和 pHells-Gate12:GFP:DAD 质粒的发根农杆菌 K599 在含有 50 mg·mL<sup>-1</sup>卡那霉素的 LB 培养基上划线,28℃活化培养 2 d。挑取单克隆在 28℃、200 r·min<sup>-1</sup>摇床中培养 24 h,然后 4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min 后收集菌体并用 10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>洗菌 3 次,最后将得到的细菌悬浮液调节 OD<sub>600</sub>至 0.5~0.6 用于侵染。取培养好的大豆幼苗,在子叶节部位用 1 mL 注射器将细菌悬浮液小心注射进茎部,可反复重复注射几次以确保注射足够量的菌液。注射后的植株置于塑料薄膜密封的培养架里,并连接加湿器保证足够的湿度。大约 14 d 后,待发状根长至 3~5 cm 时,从发状根产生萌发部位将茎剪断,并进行荧光筛选,用镊子小心去除无 GFP 荧光的根,之后将此嵌合植株放于

装有灭菌自来水的三角瓶中继续培养。待根生长至足够量后则取样用于 RNA 提取及抗性分析。

2 结果与分析

2.1 载体改造

根据图 1 设计,以本实验室保存 pBIN:GFP 载体为模板扩增含有 Sac I 酶切位点的 35S:GFP:nos 表达盒序列(图 2a),得到长度为 1 852 bp 的目的序列。将目的片段连接至 T 载体转化后挑取阳性克隆进行 PCR 验证(图 2b)进一步经测序验证序列正确,得到 35S:GFP:nos 表达盒序列片段。利用 Sac I 酶从 T 载体上切下该目的片段,并回收(图 2c),与该酶处理过的 pHellsGate12 载体连接并转化大肠杆菌,得到的克隆经菌落 PCR(图 2d)和测序验证后得到 pHellsGate12:GFP。

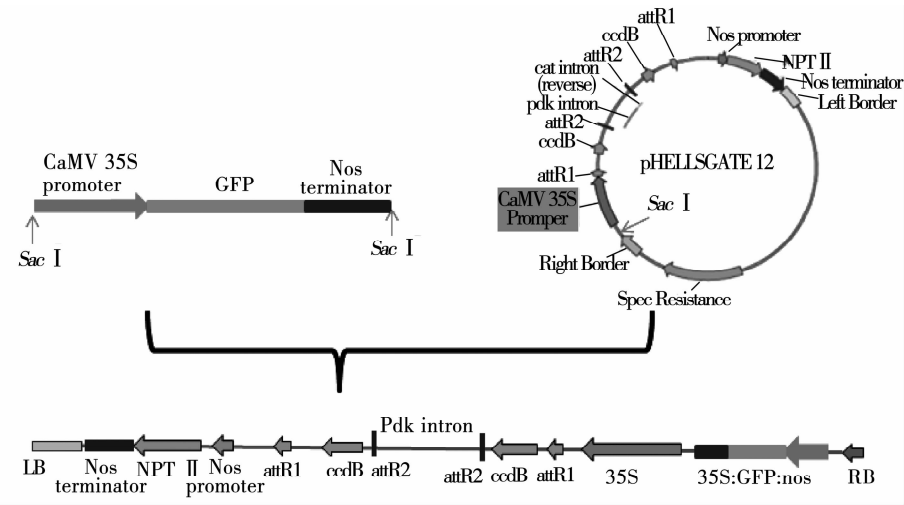
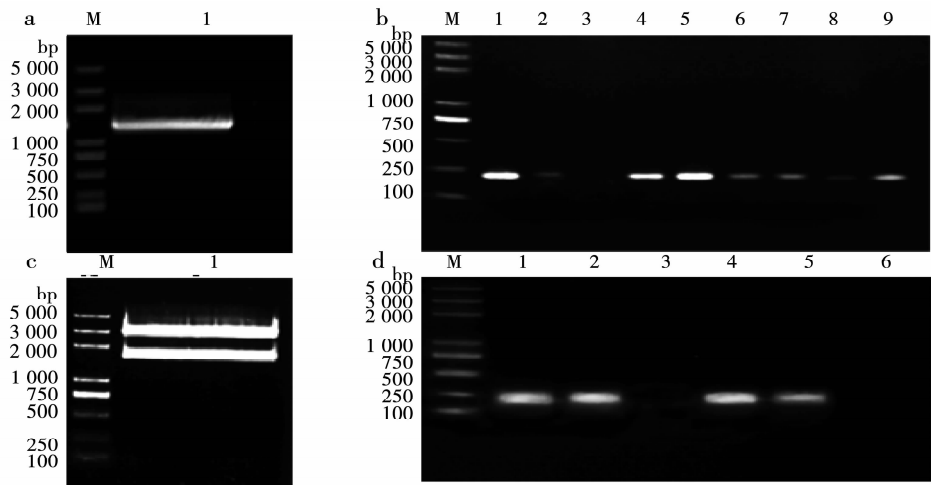


图 1 pHellsGate12:GFP 载体构建示意图  
Fig. 1 The structures of vector pHellsGate12:GFP



a: 35S:GFP:nos 全长扩增, M: DNA 分子量标准, 1: PCR 产物; b: T: 35S:GFP:nos 菌落 PCR 验证, M: DNA 分子量标准, 1~9: 不同单菌落; c: T: 35S:GFP:nos Sac I 酶切, M: DNA 分子量标准, 1: 酶切产物; d: pHellsGate12:GFP 菌落 PCR 验证, M: DNA 分子量标准, 1~6: 不同单菌落。  
a: Amplification of the 35S:GFP:nos full length, M: Marker, 1: PCR product; b: PCR identification of the mono-clony, M: Marker, 1-9: different bacterium clones; c: Restriction enzyme digestion of T:35S:GFP:nos with Sac I, M: Marker, 1: Enzyme digested product; d: PCR identification of the mono-clony, M: Marker, 1-9: Different bacterium clones.

图 2 pHellsGate12:GFP 载体构建  
Fig. 2 Construction of the pHellsGate12:GFP vector

为了进一步验证 pHellsGate12:GFP 的生物学活性,将其在烟草叶片中瞬时表达,能够观察到强烈的 GFP 荧光信号,而只注射菌液叶片则没有荧光信号(图 3),说明改造的载体中 GFP 蛋白能够在植物体内正常表达。

2.2 大豆 *DAD* 基因克隆及 RNAi 载体构建

根据序列比对的结果,克隆扩增长度为 351 bp 的全长 *DAD* 基因全长用于 RNAi 载体构建。利用引物 DADRNAi-F/DADRNAi-R 经 PCR 扩增,电泳后切胶回收,得到目的片段(图 4a),与 pDONR221 经 BP 反应连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取菌

落 PCR 验证阳性单克隆提取质粒并测序(图 4b),经测序验证的质粒经过 LR 反应与 pHellsGate12:GFP 连接、转化大肠杆菌。利用引物(两对,分别为 P27-5&DAD-R 和 DAD-R&P27-3)进行菌落 PCR 进行验证,结果如图 4c 和 4d。提取阳性克隆质粒, *Xho* I 和 *Xba* I 酶切产物电泳结果表明切下的片段符合预期大小(图 4e)。同时,质粒测序结果也与之前序列一致,证明 *DAD* RNAi 片段成功克隆至 pHellsGate12:GFP 载体。构建成功的 *DAD* 基因沉默载体和空质粒通过电击法转化至发根农杆菌 K599 菌株。

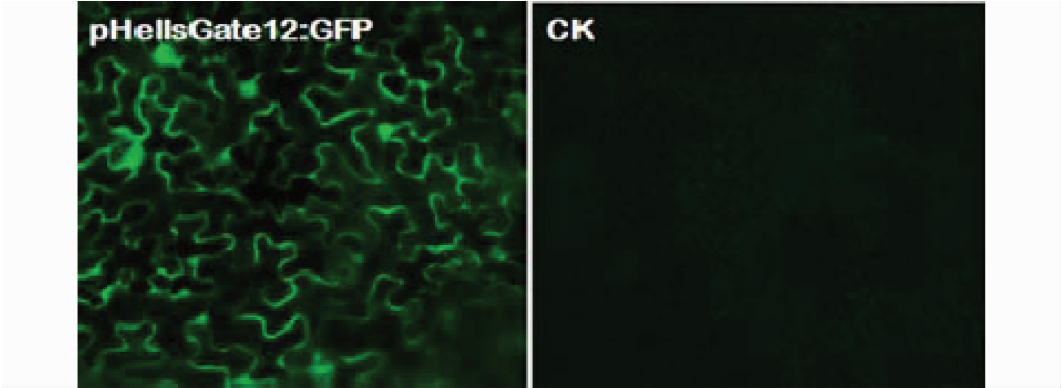
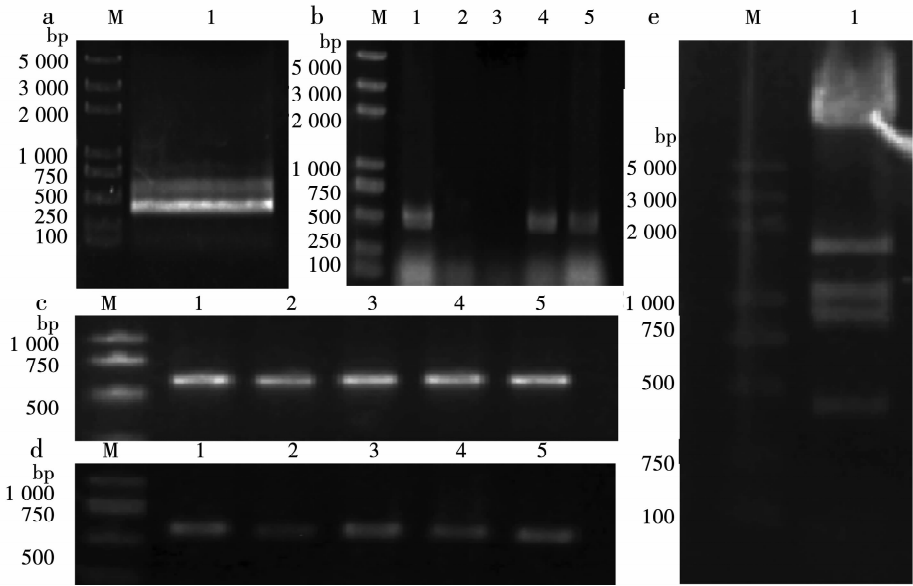


图 3 pHellsGate12:GFP 烟草叶片瞬时表达 GFP 荧光检测  
Fig. 3 GFP fluorescence of pHellsGate12:GFP in *N. benthamiana* transient expressed leaves



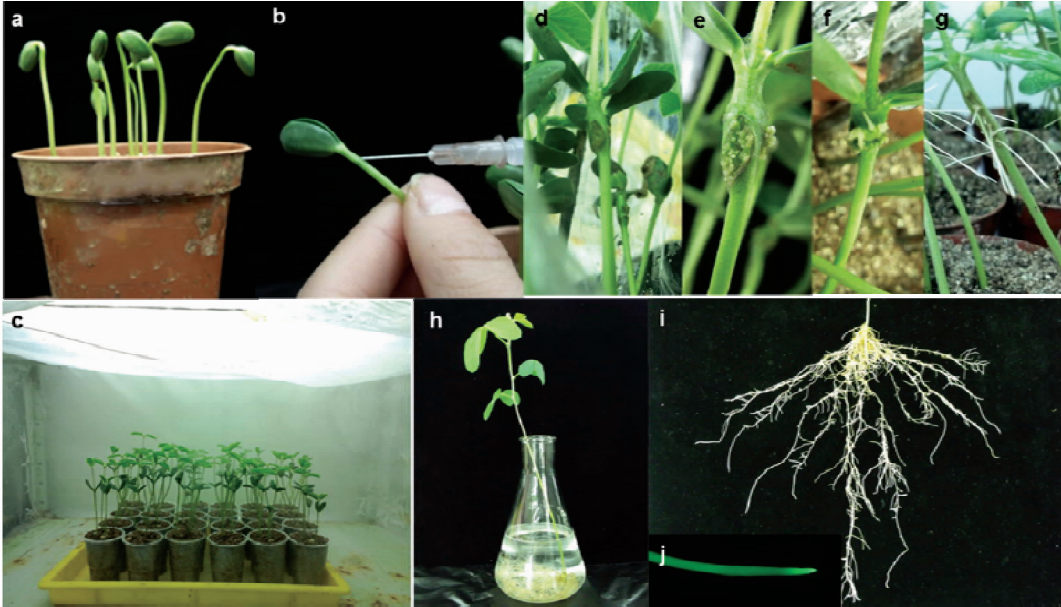
a: *DAD* RNAi 片段 PCR 扩增, M: DNA 分子量标准, 1: PCR 产物; b: pDONR221: *DAD* 菌落 PCR 验证, M: DNA 分子量标准, 1 ~ 5: 不同单菌落; c: pHellsGate12:GFP: *DAD* P27-5 和 *DAD*-R 菌落 PCR 验证, M: DNA 分子量标准, 1 ~ 5: 不同单菌落; d: pHellsGate12:GFP: *DAD* *DAD*-R 和 P27-3 菌落 PCR 验证, M: DNA 分子量标准, 1 ~ 5: 不同单菌落; e: pHellsGate12:GFP: *DAD* 质粒 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切验证, M: DNA 分子量标准, 1: 酶切产物。  
a: Amplification of the *DAD* RNAi fragment, M: Marker, 1: PCR product; b: pDONR221: *DAD* PCR identification of the mono-colony, M: Marker, 1-5: different bacterium clones; c: pHellsGate12:GFP: *DAD* PCR identification of the mono-colony by using P27-5 and *DAD*-R, M: Marker, 1-5: different bacterium clones; d: pHellsGate12:GFP: *DAD* PCR identification of the mono-colony by using *DAD*-R and P27-3, M: Marker, 1-5: different bacterium clones; e: pHellsGate12:GFP: *DAD* digested by *Xho* I and *Xba* I, M: Marker, 1: Enzyme digested product.

图 4 pHellsGate12:GFP: *DAD* RNAi 载体构建  
Fig. 4 Construction of the pHellsGate12:GFP: *DAD* RNAi vector

2.3 大豆 DAD 基因沉默嵌合植株获得

利用发根农杆菌(*A. rhizogenes*) K599 在大豆幼苗子叶节处进行侵染诱导发状根的转化过程如图(图 5a~j)所示。菌液侵染 3 d 后侵染位点即可见

明显膨大(图 5d),第 7 天侵染位点继续膨大并开始形成瘤状愈伤组织(图 5e),大约第 10 天开始发状根开始从愈伤组织中形成(图 5f)之后快速生长 14 d 后即可长至 3~5 cm(图 5g)。



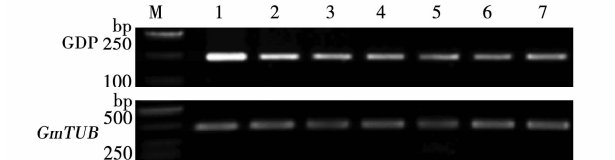
a: 萌发 5 d 的大豆幼苗;b: 在子叶节处注射农杆菌悬浮液;c: 农杆菌侵染后保湿;d, e, f, g: 农杆菌侵染 3, 7, 10, 14 d 后侵染点愈伤形成及根毛萌发;h: 切除原生根后将植株移至灭菌自来水中继续培养;i: 嵌合植株根毛生长状态(转化后 28 d);j: 转化根毛的荧光观察。  
a: 5-day-old seedlings with unfolded cotyledons; b: The *A. rhizogenes* K599 harboring the constructs were infiltrated by using syringe; c: in the cells of a germination tray; d, e, f, g: soybean plant 3, 7, 10, 14 days after inoculation with *A. rhizogenes*; h: transformed soybean plant after the removal of the primary root; i: the phenotype of the transgenic hairy roots; j: GFP fluorescence in transgenic soybean hairy roots.

图 5 大豆嵌合植株遗传转化过程  
Fig. 5 Different stages of the soybean hairy root transformation

在此阶段,从侵染位点向往下约 1 cm 处将植株茎部剪断,将发状根在荧光显微镜下进行荧光筛选(图 5j),用镊子小心夹除不发荧光的发状根,然后迅速将植株置于装有灭菌自来水的培养瓶中继续培养(图 5h,i),进行进一步的转基因检测及功能分析。此植株具有野生型的茎、叶器官,发状根则为转基因部分。

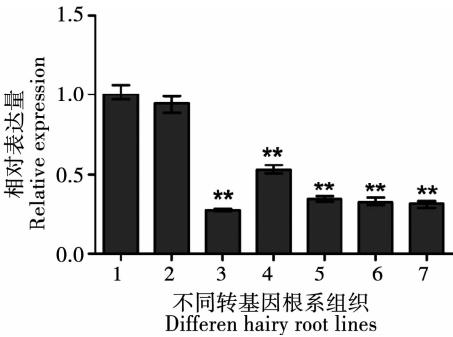
2.4 嵌合植株发状根组织 DAD 转录水平分析

经过荧光筛选的大豆发状根组织培养到一定程度,进行进一步的转基因检测。首先用 RT-PCR 的方法检测 GFP 基因转录水平,结果表明在转 DAD 和空质粒对照的组织中均能扩增出 GFP 特异片段(图 6),结合荧光筛选的结果证明 GFP 片段已成功转入大豆发状根组织并能够正常行使生物学功能。



1, 2: 空载体对照组织; 3~7: DAD 沉默组织。  
1 and 2: Vector control; 3-7: DAD silencing hairy roots.  
图 6 发状根组织中 GFP 基因 RT-PCR 验证  
Fig. 6 RT-PCR analyses of GFP expression in soybean hairy roots

为了检测嵌合植株发状根组织中 DAD 基因是否发生沉默,利用 qRT-PCR 的方法检测 DAD 基因转录水平。结果表明,与转空质粒对照相比,在随机选取的 5 个荧光筛选过发状根样品的中,DAD 基因转录水平均发生了不同程度的降低,沉默效率大约在 45%~70%(图 7)。



1, 2: 空载体对照组织; 3~7: DAD 沉默组织。 \*\* 表示显著性水平为  $P < 0.01$ 。  
1 and 2: Vector control; 3-7: DAD silencing hairy. \*\* Stands for the level of significant difference  $P < 0.01$ .  
图 7 转基因发状根组织中 DAD 表达水平分析  
Fig. 7 qRT-PCR analysis of DAD silencing efficiency



3 结论与讨论

基于农杆菌介导的嵌合植株转化系统在苜蓿、花生、咖啡等植物根中研究根瘤形成及其它生物学功能的应用已见报道<sup>[13-15]</sup>。在大豆中,目前应用相对广泛的方法是利用大豆子叶作为外植体诱导产生发状根。例如 Lozovaya 等<sup>[16]</sup>通过在大豆发状根组织中转化大豆 *CHS6* 和 *IF2* 基因研究大豆植物抗毒素合成与抗镰刀菌之间的关系。Subramanian 等<sup>[17]</sup>通过 RNA 干扰的方法沉默大豆 *IF2* 研究其在大豆疫霉抗性中的功能。Yan 等<sup>[18]</sup>则利用此方法分析了 *GmSGT1* 在大豆对疫霉完全抗性与部分抗性中的功能。虽然 Kereszt 和 Li 等对大豆嵌合植株的转化方法都进行了探索<sup>[1,5]</sup>,但目前利用这种体系研究大豆与病原菌互作过程中相关基因功能的报道还比较少。

在本研究中,获得了大豆 *DAD* 基因沉默的嵌合植株,在此技术体系下获得可供实验的嵌合植株仅需要 3~4 周的时间,并且省去了子叶外植体转化中的组织培养,避免了组织培养中操作条件和环境等严格要求所带来的麻烦,大大降低了操作难度,适宜初步对大批量的候选基因进行功能验证。

*DAD* 蛋白在动物、植物以及酵母中均高度保守,并且在植物中的时空表达范围十分广泛,在所有检测组织中几乎都能被检测到,但其表达强度和模式存在明显差异<sup>[10]</sup>。目前已经有证据表明 *DAD* 基因在植物中也参与 PCD 过程,而 PCD 作为植物病理学中研究寄主与病原菌互作过程中的热点之一,对 *DAD* 在植物抗病反应中功能的研究具有重要意义,有利于进一步认识植物的抗病机制。本试验中大豆 *DAD* 沉默嵌合植株的获得为此奠定了研究基础。

参考文献

[1] Li J, Todd T C, Trick H N. Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants[J]. Plant Cell Report, 2010, 29(2):113-123.

[2] Collier R, Fuchs B, Walter N, et al. *Ex-vitro* composite plants: An inexpensive, rapid method for root biology[J]. The Plant Journal, 2005, 43(3):449-457.

[3] Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares J, et al. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(12):1385-1393.

[4] Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares J, et al. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus*

*spp.* by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. Nature Protocols, 2007, 2(7):1819-1824.

[5] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4):948-952.

[6] Cao D, Hou W, Song S, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2009, 96(1):45-52.

[7] Cao D, Hou W, Liu W, et al. Overexpression of *TaNHX2* enhances salt tolerance of 'composite' and whole transgenic soybean plants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 107(3):541-552.

[8] Ane J M, Kiss G B, Riely B K, et al. *Medicago truncatula* *DMI1* required for bacterial and fungal symbioses in legumes[J]. Science, 2004, 303: 1364-1367.

[9] Vieweg M F, Hohnjec N, Küster H. Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*[J]. Planta, 2005, 220(5):757-766.

[10] 潘永娟,金晓琴,刘伟娜,等. 抗细胞凋亡蛋白 *DAD* 研究进展[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版),2014,37(2):212-218. (Pan Y J, Jin X Q, Liu W N, et al. On the research progress in defender against cell death protein[J]. Journal of Zhejiang Normal University(Nature Science), 2014, 37(2):212-218. )

[11] Orzáez D, Granell A. The plant homologue of the defender against apoptotic death gene is down-regulated during senescence of flower petals[J]. Febs Letters, 1997, 404(2-3):275-278.

[12] Wang X J, Tang C L, Zhang H C, et al. *TaDAD2*, a negative regulator of programmed cell death, is important for the interaction between wheat and the stripe rust fungus[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24: 79-90.

[13] Akasaka Y, Mii M, Daimon H. Morphological alterations and root nodule formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. Annals of Botany, 1998, 81: 355-362

[14] Alpizar E, Dechamp E, Espeout S, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and chimeric plants for studying gene expression in coffee roots[J]. Plant Cell Report, 2006, 25(9): 959-967.

[15] Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(6):695-700.

[16] Lozovaya V V, Lygin A V, Zernova O V, et al. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase[J]. Planta, 2007, 225(3):665-679.

[17] Subramanian S, Graham M Y, Yu O, et al. RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*[J]. Plant Physiology, 2005, 137(4):1345-353.

[18] Yan Q, Cui X X, Su L M, et al. *GmSGT1* is differently required for soybean *Rps* genes-mediated and basal resistance to *Phytophthora sojae*[J]. Plant Cell Report, 2014, 339(8):1275-1288.