

## 硼营养对大豆组织再生及农杆菌介导的遗传转化效率的影响

胡倩倩, 方 星, 王建国, 岳 娜, 孟祥勋

(苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

**摘要:** 硼在维持植物细胞壁和细胞膜等方面有着重要的作用。以大豆品种吉林小粒7号为试验材料, 研究硼浓度对大豆子叶节丛生芽的诱导的影响, 并在不同硼元素浓度下采用农杆菌介导法将报告基因(*GUS*)导入大豆中, 用组织化学法测定*GUS*基因的表达并计算瞬时表达率, 最后采用PCR和斑点杂交做进一步的鉴定, 以探讨硼介导的大豆转化效率及可行性。结果显示高硼和低硼培养基对大豆丛生芽诱导均有一定的抑制作用, 尤其是高硼情况下丛生芽诱导率显著降低。30 mg·L<sup>-1</sup>硼酸环境下农杆菌介导的大豆转化效率较之正常硼酸环境下有显著的提高, *GUS*瞬时转化率高达35.92%。这一现象对建立新的大豆遗传转化体系的意义有待于进一步探究。

**关键词:** 大豆; 硼; 农杆菌; *GUS*基因; 转化

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-9841(2013)04-0445-04

## Effect of Boron on Explant Regeneration and Frequency of *Agrobacterium*-mediated Transformation in Soybean

HU Qian-qian, FANG Xing, WANG Jian-guo, YUE Na, MENG Xiang-xun

(School of Basic Medicine and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** Boron plays an important role in maintaining the structural and functional integrity of cell wall and cell membrane in plant. In the present experiment, the influence of concentration of boron element in the medium on the regeneration of cotyledonary node and induction of multiple shoots as well as the transformation efficiency of *Agrobacterium*-mediated report gene(*GUS*) were investigated using seedlings of Jilinxiaoli 7 soybean as culture explant. The transient expression rates of *GUS* gene expression were calculated based on the histochemical method and the stable transformed shoots were further detected by PCR and Dot blotting to explore the efficiency of soybean transformation in a suitable boric acid concentration. The results showed that both high boron and low boron medium had an inhibition effect on induction of multiple shoots of cotyledonary node, especially at high level boron multiple shoots induction rates were significantly reduced. However, *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency in soybean explant were significantly risen at 30 mg·L<sup>-1</sup> boric acid concentration compared with normal boric acid environment, with the *GUS* transient conversion rate as high as 35.92%. The significance of this phenomenon remains to be further explored for establishment of a new soybean genetic transformation system.

**Key words:** Soybean; Boron; *Agrobacterium*; *GUS* gene; Transformation

大豆(*Glycine max* L.)是我国重要的农作物,也是公认的难转化植物之一。自1988年Hinchee<sup>[1]</sup>首次采用农杆菌侵染大豆子叶节获得转基因植株以来,大豆转基因的研究不断深入,但转基因效率仍然没有显著的提高。农杆菌介导的大豆遗传转化法操作简单,并且能够准确、完整地将T-DNA以单拷贝或低拷贝的形式插入到受体基因组中,因此仍然是大豆遗传转化的首选方法。

硼是植物生长发育中必需微量元素之一。它在维持植物细胞壁和细胞膜的功能、基因表达调控、信号传递、糖类物质运输与酶活性的调节等方面都有重要的功能<sup>[2]</sup>。细胞中的硼大部分存在于细胞壁上,通过与果胶结合影响细胞壁结构<sup>[3]</sup>。本试验研究硼元素对大豆再生系统的影响,并采用农

杆菌介导的方法,通过控制转化中硼元素的含量,将含*GUS*基因的外源质粒转入大豆中,旨在寻找一种更有效的大豆遗传转化方法。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 大豆材料 吉林小粒7号,由吉林省农业科学院大豆研究所提供。

1.1.2 农杆菌菌株与质粒 质粒pCAMBIA1301、潮霉素(*Hyg*)和卡那霉素(*Kan*)抗性,含报告基因*GUS*,由苏州大学基础医学与生物科学学院遗传学实验室保存。采用冻融法将质粒导入农杆菌菌株EHA105中,作为遗传转化的材料。

收稿日期:2013-01-13

基金项目:吉林省科技发展计划重点项目(20060202)。

第一作者简介:胡倩倩(1989-),女,硕士,主要从事植物分子遗传与基因工程研究。E-mail:huqianqian0917@126.com。

通讯作者:孟祥勋(1955-),男,博士,教授,主要从事植物分子遗传与基因工程研究。E-mail:mengxiangxun@suda.edu.cn。

1.1.3 培养基 MSB 培养基为 MS 培养基的无机成分加 B<sub>5</sub> 培养基的有机成分, MSB<sub>0</sub> 为不含硼元素的 MSB 培养基, 所有培养基均加入 3% 蔗糖, 固体培养基除共培养基(0.5% 琼脂)外琼脂含量均为 0.65%。

## 1.2 方法

1.2.1 大豆无菌苗的培养 选取饱满、种皮无破损的大豆种子, 经 75% 酒精灭菌 50 s, 0.1% 升汞处理 8 min, 无菌水冲洗 4~5 次后接种于萌发培养基(1/2MSB + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA pH5.8)<sup>[4]</sup>, (25 ± 1) °C 暗培养 2~3 d 后转至光照下培养 2~3 d, 光照周期 16 h/8 h。

1.2.2 大豆子叶节丛生芽的诱导 挑选长势优良的无菌苗, 去掉种皮, 切去大部分的下胚轴, 仅保留靠近子叶的下胚轴约 3~5 mm。从下胚轴中线处切开两片子叶节, 除去顶芽、腋芽及约 1/3 的子叶节末端, 在子叶与胚轴交接处直径约 3 mm 的范围内划 5~6 刀。

将处理后的子叶节外植体分别接种至不同硼酸添加量的诱导培养基<sup>[5]</sup> (MSB<sub>0</sub> + 4.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.025 mg·L<sup>-1</sup> IBA pH5.8) 中, 设置 0~500 mg·L<sup>-1</sup> 共 16 组硼酸浓度梯度(表 1), 每组约 50 个外植体, (25 ± 1) °C、光照周期 16 h/8 h 下培养。

丛生芽诱导率(%) = (出芽外植体数量/总外植体数量) × 100

1.2.3 大豆下胚轴的转化 挑取单菌落接种于含 Kan 50 mg·L<sup>-1</sup> 的 YEP 液体培养基中, 28 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养过夜, 以 1:100 的比例稀释于相同的新鲜培养基中, 至 OD<sub>600</sub> = 0.5~0.6, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 收集菌体, 用等体积不同硼酸浓度(0, 6.2, 30, 100 mg·L<sup>-1</sup>) 的重悬液 (MSB<sub>0</sub> + 1.6 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.2 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 1.06 g·L<sup>-1</sup> L-cysteine + 0.154 g·L<sup>-1</sup> DTT + 200 μmol·L<sup>-1</sup> AS pH5.5) 重悬菌体。

选取长势优良的无菌苗, 在近子叶节端的下胚轴上切取厚约 0.5 mm 的薄片, 接种至预培养基(1/2 MSB + 1.6 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA pH5.8) 培养 1 d 后取出放入重悬的菌液中, 28 °C 侵染 30 min。倒掉菌液用无菌滤纸吸干外植体表面菌液, 接种至共培养基 (MSB<sub>0</sub> + 1.6 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.2 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 1.06 g·L<sup>-1</sup> L-cysteine + 0.154 g·L<sup>-1</sup> DTT + 200 μmol·L<sup>-1</sup> AS<sup>[6]</sup> pH5.5), 共培养基添加与重悬液相同浓度的硼酸, 每组 150~200 个外植体。置于 28 °C 培养箱暗培养 3 d。

1.2.4 GUS 组织化学染色 取出共培养后的外植体, 无菌水漂洗 3~5 次、除菌培养基 (MSB + 1.6 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 200 mg·L<sup>-1</sup> cef + 150 mg·L<sup>-1</sup> carb pH5.8) 振荡漂洗 30 min 后吸干表面液体, 按照 Jefferson<sup>[7]</sup> 的方法进行 GUS 组织化学染色。加入 GUS 染液 (50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钠缓冲液 pH 7.0, 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA-Na<sub>2</sub>, 5 μg·L<sup>-1</sup> X-Gluc, 0.1% Triton X-100, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]), 37 °C 保温显色 3~5 h。

GUS 基因瞬时表达率(%) = (有 GUS 表达的外植体数量/总外植体数量) × 100

1.2.5 分子生物学检测 使用天根生化科技(北京)有限公司生产的 DNasecure Plant Kit 提取 GUS 染色阳性的组织 DNA。使用未转化的组织作为阴性对照, 质粒作为阳性对照对所提 DNA 进行 PCR 检测。应用软件 Primer Prieier 5.0 针对 GUS 基因设计特异性引物, 上游引物: 5'-TACCTCGCATTACCCTTA-3'; 下游引物: 5'-TACCTTCTCTGCCGTTTC-3'。PCR 扩增产物长度为 472 bp。PCR 程序: 94 °C 预变性 3 min 30 s, 94 °C 变性 70 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 33 次; 72 °C 延伸 10 min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

pCAMBIA1301 质粒经 PCR 后割胶回收目的片段, 地高辛标记制备探针。用 EcoR I 对质粒、PCR 阳性组织和未转化组织的基因组酶切过夜, 将酶切产物 100 °C 变性后点样于尼龙膜上, 紫外交联固定 DNA。依照 Roche 说明书, 42 °C 杂交过夜, 洗膜后 CSPD 荧光检测, X 光片显影观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 硼酸浓度对丛生芽诱导率的影响

表 1 显示了在不含硼的诱导培养基中添加 16 组不同硼酸浓度情况下丛生芽的诱导率。在 1 号完全不添加硼酸的培养基中, 丛生芽诱导率为 28.29%, 当硼酸浓度升至 5 mg·L<sup>-1</sup> 时, 丛生芽诱导率达到最高。9 号硼酸浓度为 6.2 mg·L<sup>-1</sup> 的正常培养基中丛生芽诱导率为 38.67%。当硼酸浓度升至 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 之后, 丛生芽的诱导率开始呈下降趋势。15 号培养基中外植体大量褐化死亡, 丛生芽诱导率仅 4.33%。硼酸浓度为 500 mg·L<sup>-1</sup> 的 16 号培养基中外植体全部死亡。由此得出, 硼酸浓度在 5.0~10.0 mg·L<sup>-1</sup> 即在正常浓度附近时丛生芽的诱导率最高, 且丛生芽分蘖多、生长也较为迅速。

使用 SPSS v19.0 对硼酸浓度与丛生芽诱导率进行相关性分析, 证明二者在 0.01 水平上显著

相关。

表 1 不同硼酸浓度下丛生芽的诱导率比较

Table 1 Comparison on shoots induction rate in different boric acid concentrations

培养基编号 Medium No.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 浓度 Concentration of H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /mg·L <sup>-1</sup>	丛生芽诱导率 Shoots induction rate/%	培养基编号 Medium No.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 浓度 Concentration of H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /mg·L <sup>-1</sup>	丛生芽诱导率 Shoots induction rate/%
1	0.0	28.92	9	6.2	38.67
2	0.5	31.93	10	7.0	42.31
3	1.0	27.30	11	10.0	31.25
4	1.5	28.31	12	20.0	26.92
5	2.0	35.42	13	50.0	18.42
6	3.0	29.92	14	100.0	15.38
7	4.0	30.77	15	200.0	4.33
8	5.0	42.50	16	500.0	0.00

## 2.2 硼酸浓度对 *GUS* 基因在大豆下胚轴中瞬时表达率的影响

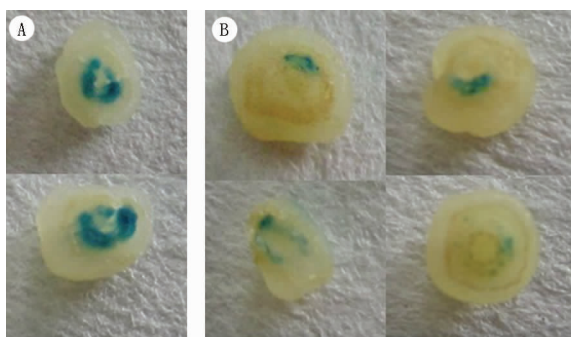
对侵染中 4 组不同硼酸浓度添加的外植体进行 *GUS* 化学组织染色。依照染色程度的不同将染色结果分为两类, A 级有较高的瞬时表达, 表现为染色位点多且染色深; B 级的表达位点少且染色较浅(图 1)。从表 2 可以看出, 在完全不含硼酸与含有标准

硼酸浓度的侵染实验中, *GUS* 基因的瞬时表达率分别为 32.21% 和 31.17%, 在硼酸浓度为 30 mg·L<sup>-1</sup> 的侵染实验中, *GUS* 基因的表达率虽略高于前两组, 但 A 级表达率高达 15.12%, 远高于组 1 的 7.73% 和组 2 的 8.25%。而当硼酸浓度增至 100 mg·L<sup>-1</sup> 时, 外植体出现大量褐化死亡, A 级瞬时表达率和总表达率分别为 1.52% 和 11.19%。

表 2 侵染中硼酸浓度对 *GUS* 基因瞬时表达率的影响

Table 2 *GUS* gene transient expression rate influenced by different boric acid concentration at infection

培养基编号 Medium No.	侵染及共培养中 H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 浓度 Concentration of H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> at infection and co-culture/mg·L <sup>-1</sup>	GUS 基因瞬时表达率 Transient conversion rate of <i>GUS</i> gene/%		
		A 级 Grade A	B 级 Grade B	总 Total
1	0	7.73	24.48	32.21
2	6.2	8.25	22.92	31.17
3	30	15.12	20.80	35.92
4	100	1.52	9.67	11.19



A: A 级着色; B: B 级染色

A: Dyeing of grade A; B: Dyeing of grade B

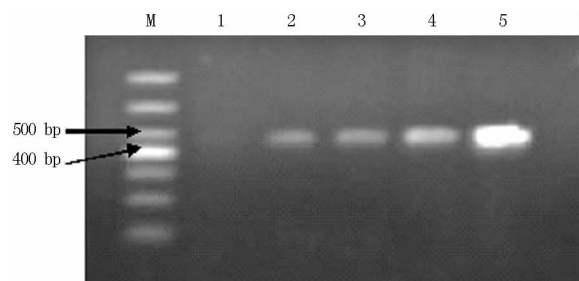
图 1 下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达的级别

Fig. 1 The instantaneous expression level of *GUS* gene in hypocotyl

## 2.3 PCR 与斑点杂交结果

对获得的 *GUS* 阳性组织进行 PCR 检测, 结果均扩增出约 470 bp 的电泳带(图 2), 而阴性对照未出现此条带。初步证明外源基因已整合到大豆的基

因组中。



M: Marker; 1: 未转化组织; 2~4: 转化的组织; 5: 质粒

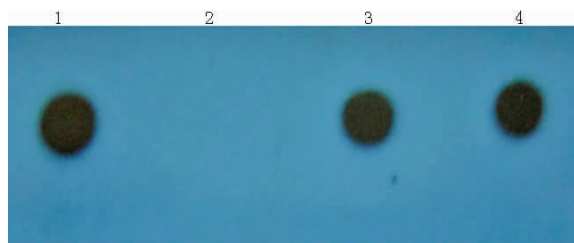
M: Marker; 1: No transformed explant; 2-4: Transformed explant; 5: Plasmid

图 2 转基因组织的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of transformed explant

将 *EcoR* I 酶切后的质粒、转化的组织及未转化的组织点样于尼龙膜以质粒 *GUS* 基因片段为探针进行斑点杂交检测。结果显示转化的组织及阳性对照均出现预期斑点, 而阴性对照无斑点(图 3)。

证明 *GUS* 基因已整合到大豆基因组中。



1:质粒;2:未转化的组织;3~4:转化的组织

1: Plasmid; 2: No transformed explant; 3-4: Transformed explant

图3 转基因组织的斑点杂交检测

Fig.3 Dot blotting detection of transformed explant

### 3 讨论

农杆菌介导的遗传转化在大豆中一直有着广泛的应用,但仍然存在许多难题,如组织培养植株再生困难、基因型差异明显及转化效率较低等。

大豆子叶节诱导丛生芽是大豆器官发生途径获得再生植株中再生频率最高的一种方式。硼可以与植物细胞壁中的半乳糖醛酸鼠李聚糖(RG-Ⅱ)组成B-RG-Ⅱ复合物,此复合物又与果胶多糖构成完整细胞壁必不可少的组成成分之一,所以缺硼会影响植物细胞壁结构的正常形成<sup>[8]</sup>。本试验结果表明硼元素缺乏对丛生芽诱导率的影响不大,其原因可能是在接种至诱导培养基前外植体本身贮存了一定的营养物质,故外植体对低硼不敏感。而在高硼情况下,丛生芽的诱导率随着硼酸浓度升高迅速降低,这与刘鹏等<sup>[9]</sup>发现硼元素达到 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (即硼酸 $28.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )时大豆已经处于中毒状态的研究相符。也为下一步研究硼元素介导农杆菌进行外源基因的转化提供高频受体打下基础。

大豆中不含有内源的 $\beta$ -半乳糖苷酶(*GUS*)活性,同时由于*GUS*组织化学染色操作简便易行,所以本试验采用将*GUS*基因导入大豆外植体的方式对硼元素在介导转基因中的转化效率进行研究。由于子叶节外植体诱导率低且再生困难不便于概率的统计,故使用了便于染色和大量重复实验的下胚轴作为外植体。研究发现将农杆菌侵染过程中硼酸浓度控制在 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 极大地提高了遗传转化效率,且出现大量染色深的A级表达,这些着色深的表达位点更有利于稳定的遗传。葛正珍等<sup>[10]</sup>研究发现在高硼浓度( $70\sim 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )下培养大豆愈伤组织,细胞松散,细胞壁具有一定程度的解离损伤,但在正常条件下继代培养可以得到恢复。本试

验中 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸浓度下转化效率最高的原因可能与细胞壁一定程度的解离造成组织细胞松散有关,松散的细胞可能更易于农杆菌的侵入。但 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸浓度下的外植体转化效率显著降低,这可能与高硼对外植体的毒害较大有关。本试验得出适当提高大豆侵染中硼元素的含量有利于提高大豆下胚轴转化的效率,这一现象对建立新的大豆遗传转化体系的意义有待于进一步探究。

### 参考文献

- [1] Hinchey M A, Connerward D V, Newell C A. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* mediated DNA transfer [J]. *Biotechnology*, 1988, 6: 915-922.
- [2] Loomis W D, Durst R Y. Chemistry and biology of boron [J]. *BioFactors*, 1992, 3: 229-239.
- [3] Maath T. Boron in plant cellwalls [J]. *Plant and Soil*, 1997, 193 (122): 59-70.
- [4] 刘海坤, 卫志明. 一种大豆成熟种子的消毒方法 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38 (3): 260-261. (Liu H K, Wei Z M. A method for sterilizing mature seeds of soybean [J]. *Plant Physiology Communication*, 2002, 38 (3): 260-261.)
- [5] 李海芬, 刘庆梅, 杨光宇, 等. 硼酸诱导的大豆子叶节转化新方法 [J]. *大豆科学*, 2010, 30 (2): 194-197, 204. (Li H F, Liu Q M, Yang G Y, et al. Boric acid mediated transformation of soybean (*Glycine max*) cotyledonary node [J]. *Soybean Science*, 2010, 30 (2): 194-197, 204.)
- [6] 汲逢源, 王戈亮, 许亦农. 抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴*GUS*基因瞬时表达的影响 [J]. *植物生态学报*, 2006, 30 (2): 330-334. (Ji F Y, Wang G L, Xu Y N. The effects of antioxidants on the transient expression of *GUS* gene in soybean hypocotyls mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Journal of Plant Ecology*, 2006, 30 (2): 330-334.)
- [7] Jefferson R A. *GUS* fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *EMBO Journal*, 1987, 6: 3901-3907.
- [8] 黄益宗. 植物对硼素不足的反应及其成因探讨 [J]. *土壤与环境*, 2002, 11 (4): 434-438. (Huang Y Z. Plant response to boron deficiency and origin of formation [J]. *Soil and Environmental Sciences*, 2002, 11 (4): 434-438.)
- [9] 刘鹏, 徐根娣, 赵娅儿. 锰、硼对大豆几种生理效应的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2003, 25 (4): 73-76. (Liu P, Xu G D, Zhao Y E. Effect of boron and manganese on some physiological characteristics of soybean [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2003, 25 (4): 73-76.)
- [10] 葛正珍, 杨光宇, 仲艳, 等. 硼对大豆愈伤组织的细胞结构及形态的影响 [J]. *大豆科学*, 2009, 28 (2): 225-228. (Ge Z Z, Yang G Y, Zhong Y, et al. Effect of boron on cell structure and shape in soybean (*Glycine max*) callus [J]. *Soybean Science*, 2009, 28 (2): 225-228.)