

## 大豆再生相关基因 *GmESR1* 的克隆及其表达分析

刘明<sup>1</sup>, 苏安玉<sup>2</sup>, 李静<sup>1</sup>, 孙晶<sup>1</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 李思楠<sup>1</sup>, 李文滨<sup>1</sup>, 武小霞<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学农学院, 国家教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 利用同源克隆技术, 对拟南芥再生相关基因 *ESR1* 进行同源序列比对, 得到大豆再生相关基因 *GmESR1*。结果表明, 大豆再生相关基因 *GmESR1* 全长 1 164 bp, 转录区为 981 bp, 编码 326 个氨基酸, 含有一个 AP2/ERF 结构域, 属于 AP2 家族成员。对大豆叶片进行细胞分裂素处理, 实时定量 PCR 技术分析表明细胞分裂素能明显促进 *GmESR1* 基因表达。

**关键词:** 大豆; 再生; *GmESR1*

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2012)05-0731-03

## Cloning and Expression Analysis of Regeneration Related Gene *GmESR1* in Soybean

LIU Ming<sup>1</sup>, SU An-yu<sup>2</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, LI Si-nan<sup>1</sup>, LI Wen-bin<sup>1</sup>, WU Xiao-xia<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, Heilongjiang; 2. School of Resource & Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** In order to establish an efficient and stable soybean regeneration system, a soybean regeneration-related gene *GmESR1* was cloned through candidate gene homology-based method and analyzed its function. Our results showed that the complete length and coding region of *GmESR1* was 1 164 and 981 bp respectively, and encoded a peptides consisting of 326 amino acids. Protein sequence analysis indicated that *GmESR1* contains an AP2/ERF domain, and belongs to the AP2 family, which contained members of cytokinin inducible transcription factors that were extensively involved in plant resistance against stress and transcriptional regulation during shoot regeneration. Blast search showed that *GmESR1* shared high homology with *Arabidopsis ESR1* gene, which was also a member of the AP2 family. Exogenous hormone treatment experiment showed that the expression level of *GmESR1* was increased under the cytokinin treatment.

**Key words:** Soybean; Regeneration; *GmESR1*

与水稻、烟草等作物相比, 大豆的遗传转化效率较低, 阻碍了大豆分子育种和大豆基因功能的研究。自 Hinchee 等<sup>[1]</sup> 用农杆菌介导法获得转基因大豆植株以来, 虽有大量相关的报道, 但突破性进展很少。大豆再生体系的研究, 目前主要集中在组织培养方面, 对大豆的再生过程分子基础和调控机制研究较少, 但近些年随着人们对再生的认识加深, 在拟南芥等模式植物中已有关于再生的基因被克隆出来。

2001 年 Banno 等<sup>[2]</sup> 从拟南芥中成功克隆得到 *ESR1* 基因, 拟南芥 *ESR1* 基因是受细胞分裂素诱导密切相关的 AP2 基因家族的成员, 这类基因的共同特征是有一个 AP2 结构域, AP2 基因家族成员广泛参与植物抗逆及其再生过程的转录调控。研究表明拟南芥 *ESR1* 基因的超量表达能使根外植体在不添加细胞分裂素的培养基中就可以产生不定芽, 在

添加细胞分裂素的情况下, 该基因的超量表达亦能大大提高不定芽增生的效率; 随后的研究进一步阐述了 *ESR1* 基因作为一个转录因子通过转录调节调控再生过程, 并且 *ESR1* 和 *ESR2* 基因在调节拟南芥茎再生过程中的作用具有差异性<sup>[3-6]</sup>。本研究通过同源克隆的方法从大豆中得到 *GmESR1* 基因, 并通过生物信息学和分子生物学等相关技术手段对该基因功能进行初步分析, 以期进一步研究该基因在大豆再生体系中的作用, 为最终建立高效、稳定的大豆再生体系奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

大豆品种东农 50, 由东北农业大学大豆研究所提供, Trizol 试剂购自 Takara 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 限制性内切酶、DNA 连接酶

收稿日期: 2012-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(31071438); 黑龙江省自然科学基金(201117); 黑龙江省教育厅项目(11551048); 东北农业大学人才启动基金(2009RC47)。

第一作者简介: 刘明(1988-), 男, 在读硕士, 研究方向为作物遗传育种与大豆生物技术。E-mail: liuming19880119@126.com。

通讯作者: 武小霞(1971-), 女, 博士, 研究员, 从事大豆遗传育种与生物技术应用研究。E-mail: dadousuo@yahoo.com.cn。

购自 Fermentas 公司;pMD19-T 载体购自 Takara 公司;LA Taq DNA 聚合酶其它各种生化试剂均为国产分析纯;引物合成自上海英骏公司,测序由华大基因组(BGI)完成。

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 取大豆三叶期叶片,采用 CTAB 法<sup>[7]</sup>提取叶片基因组 DNA。

1.2.2 克隆引物设计 以拟南芥 *ESR1* 基因 (GeneBank 登录号:AF353577.1) 序列为探针 (全长 1 265 bp 转录区 987 bp) 在大豆基因组数据中 BLAST 获得同源最高序列进行克隆,在该基因的上下游设计引物用于扩增目的基因,引物如下:

F;5'-TGGATCCCTTCAGAAAGTATCACTAC-3';

R;5'-AGAGCTCTAATTGAAAGGCCAGAC-3'。

1.2.3 目的基因的 PCR 扩增 以植株叶片提取总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,反应体系为:DNA 1  $\mu$ L,10  $\times$  PCR buffer 2  $\mu$ L,10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP mix 0.3  $\mu$ L,GmESR1-F 0.5  $\mu$ L,GmESR1-R 0.5  $\mu$ L,Taq DNA polymerase 0.3  $\mu$ L,Sterilized distilled water 15.4  $\mu$ L。PCR 反应条件为:94℃ 变性 5 min;94℃ 变性 30 s,58℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1 min 30 s,扩增 35 个循环;72℃ 终延伸 10 min;4℃ 终止反应。

将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,采用海基有限公司的胶回收试剂盒回收 DNA 片段,将回收的目的片段与 pMD19-T Vector 连接,送上海生工测序。

1.2.4 GmESR1 基因序列分析 利用生物信息学方法得到 *ESR1* 的基因序列。从 NCBI 网 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索并下载拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*),玉米 (*Zea mays*),水稻 (*Oryza sativa*),沟酸浆属植物 (*Mimulusguttatus*) 和苜蓿 (*Medicago truncatula*) 进行同源比对和进化树分析。

1.2.5 实时定量 PCR 分析 对播种后三周左右的东农 50 第一片三出复叶进行 6-BA 喷施,6-BA 浓度为 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,以未喷施为对照,分别在处理后 0、1、2、4、8、12、24 h 进行取样。Trizol 法提取总 RNA,反转录成 cDNA 待用,利用 Primer5 软件设计 GmESR1 的实时定量引物及 actin4 引物如下:

RTGmESR1F;5'-CTTCCACTCAGAACTTCCACGAC-3';

RTGmESR1R;5'-TAACAGACAAAGAGCCTCCACAA-3';

Actin 4F;5'-GTGTCAGCCATACTGTCCCCATTT-3';

Actin 4R;5'-GTTTCAAGCTCTTGCTCGTAATCA-3';

按以下成分加入实时定量反应液:SYBR Real time Master 10  $\mu$ L;第一链 cDNA 1  $\mu$ L;PCR 上游引物和下游引物 1  $\mu$ L,水 8  $\mu$ L。反应条件为:95℃ 变性 1 min;95℃ 变性 5 s,58℃ 复性 20 s,72℃ 延伸 20 s,

扩增 40 个循环;进行实时定量 PCR 反应。

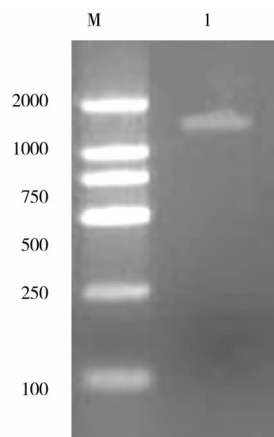
## 1.3 数据分析

采用 Opticon Monitor 3.1 进行数据分析,计算出 *GmESR1* 基因在受细胞分裂素处理后的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的克隆

以大豆基因组 DNA 为模版,用所设计的引物进行 PCR 扩增,经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,得到 1 342 bp 的目的条带,与在大豆基因组数据库比对的片段大小一致。



M:标准分子量 2000;1:目的条带

M;Marker 2000;1;PCR product of *GmESR1*

图 1 PCR 扩增基因片段电泳结果

Fig. 1 Cloning of fragment *GmESR1* and PCR screen positive clone

### 2.2 GmESR1 基因同源比对及进化树分析

利用 DNA MAN 软件对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*);玉米 (*Zea mays*);水稻 (*Oryza sativa*);沟酸浆属植物 (*Mimulusguttatus*) 和苜蓿 (*Medicago truncatula*) 进行同源比对和进化树分析。分析结果表明在 60 ~ 120 氨基酸处都有一段非常保守的 AP2 结构域(图 2),AP2 结构域在植物的再生过程中起到了重要的作用。构建同源进化树表明(图 3),大豆再生相关基因 *GmESR1* 基因与沟酸浆属植物 (*Mimulusguttatus*) 亲缘较近。

### 2.3 细胞分裂素处理后 *GmESR1* 基因的表达分析

对播种后三周的东农 50 第一片三出复叶喷施处理和未喷施处理后的 0、1、2、4、8、12、24 h 进行荧光定量分析,结果表明 *GmESR1* 基因受 6-BA 诱导,在 0 ~ 2 h 内有明显的上调,并且在处理 1 h 时表达量达到最高,处理 4 h 后处理和对照的表达量趋于平缓。



- ricultural Research in the Arid Areas, 2007, 25(2): 35-39. )
- [15] 申丽霞, 王璞. 保护性耕作对土壤综合特性的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 265-268. (Shen L X, Wang P. Effects of conservation tillage on characteristics of soil[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(8): 265-268. )
- [16] 鲁向晖, 隋艳艳, 王飞, 等. 秸秆覆盖对旱地玉米休闲田土壤水分状况影响研究[J]. 干旱区资源与环境, 2008, 22(3): 156-159. (Lu X H, Sui Y Y, Wang F, et al. Study on soil water status of maize's fallow under straw mulch in dryland[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2008, 22(3): 156-159. )
- [17] 李玲玲, 黄高宝, 张仁陟, 等. 不同保护性耕作措施对旱作农田土壤水分的影响[J]. 生态学报, 2005, 25(9): 2326-2332. (Li L L, Huang G B, Zhang R Z, et al. Effects of conservation tillage on soil water regimes in rainfed areas[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(9): 2326-2332. )
- [18] 余嘉, 陈海涛, 纪文义, 等. 小麦茬地免耕大豆精密播种机性能试验研究[J]. 大豆科技, 2010, (3): 31-33. (Yu J, Chen H T, Ji W Y, et al. Performance test of no-tillage soybean precision seeder in wheat stubble field[J]. Soybean Science & Technology, 2010, (3): 31-33. )
- [19] 唐启义. DPS<sup>®</sup>数据处理系统—实验设计、统计分析 & 数据挖掘[M]. 北京: 科学出版社, 2010. (Tang Q Y. DPS<sup>®</sup> data processing system—experimental design, statistical analysis and data mining[M]. Beijing: Science Press, 2010. )
- [20] Milton A S, Glover B T. No-tillage and surface-tillage agriculture (the tillage revolution) [M]. New York: A Wiley Inter-science, 1986.
- [21] Brookes G, Barfoot P. Global impact of biotech crops: Environmental effects 1996-2009[J]. GM Crops, 2011, 2(1): 34-49.
- [22] García F O, Ambroggio M, Trucco V. No-tillage in the Pampas of Argentina: a success story[J]. Better Crops International, 2000, 14(1): 24-27.
- [23] Pengue W A. Transgenic crops in Argentina: The ecological and social debt[J]. Bulletin of Science, Technology & Society, 2005, 25(4): 1-9.
- [24] Finger R, Hartmann M, Feitknecht M. Adoption patterns of herbicide-tolerant soybeans in Argentina[J]. Journal of Agrobiotechnology Management & Economics, 2009, 12(3&4): 404-411.
- [25] Díaz-Zorita M, Duarte G A, Grove J H. A review of no-till systems and soil management for sustainable crop production in the subhumid and semiarid Pampas of Argentina[J]. Soil and Tillage Research, 2002, 65(1): 1-18.
- [26] Sanford J O, Myhre D L, Merwine N C. Double cropping systems involving no-tillage and conventional tillage[J]. Agronomy Journal, 1973, 65(6): 978-982.
- [27] Sanford J O, Touchton J T, Johnson J W. Soybean tillage and planting method effects on yield of double-cropped wheat and soybeans[J]. Agronomy Journal, 1981, 74(1): 57-59.
- [28] Sanford J O. Straw and tillage management practices in soybean-wheat double-cropping[J]. Agronomy Journal, 1981, 74(6): 1032-1035.
- [29] Vyn T J, Opoku G, Swanton C J. Residue management and minimum tillage systems for soybean following wheat[J]. Agronomy Journal, 1998, 90(2): 131-138.

# (上接第 733 页)

- [6] Matsuo N, Mase H, Makino M, et al. Identification of enhancer of shoot regeneration 1-upregulated genes during in vitro shoot regeneration[J]. Plant Biotechnology, 2009, 26: 385-393.
- [7] Saghai M A, Soliman K M, Jorgensen R A. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81: 8014-8018.
- [8] Naomi O, Michelle T J, David J, et al. Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene knotted 1 under the control of a senescence-activated promoter[J]. The Plant Cell, 1999, 11: 1073-1080.
- [9] Hu H, Xiong L, Yang Y. Riceserk1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection[J]. Planta, 2005, 222: 107-117.
- [10] Nishimura A, Ashikari M, Lin S, et al. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102: 11940-11944.
- [11] Ozawa K, Kawahigashi H. Positional cloning of the nitrite reductase gene associated with good growth and regeneration ability of calli and establishment of a new selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant, 2006, 170: 384-393.
- [12] Lotan T, Ohto M, Yee K M, et al. *Arabidopsis* leafy cotyledon 1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells[J]. Cell, 1998, 93: 1195-1205.
- [13] Zuo J, Niu Q, Frugis G, et al. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2002, 30: 349-359.
- [14] Zhang S, Liu X, Lin Y, et al. Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 105: 29-37.