

## 硼对大豆愈伤组织的细胞结构及形态的影响

葛正珍<sup>1</sup>, 杨光宇<sup>2</sup>, 仲艳<sup>1</sup>, 杜青珍<sup>1</sup>, 孟祥勋<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>苏州大学, 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123; <sup>2</sup>吉林省农业科学院大豆研究中心, 吉林 长春 130033)

**摘要:** 硼是植物生长发育必需的微量元素之一, 对维持植物细胞壁与细胞膜的结构和功能发挥着重要的作用。在对大豆愈伤组织诱导培养技术成熟的基础上, 研究高浓度的硼对大豆愈伤组织的细胞结构和细胞形态的影响, 探讨组织培养中硼对愈伤组织诱导与再生的调节作用。采用植物组织培养的方法, 在硼酸含量不同的培养基上诱导大豆下胚轴产生愈伤组织, 并进行继代培养试验。结果表明: 下胚轴在硼酸浓度大于  $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基上诱导 20 d 后, 一些新生的愈伤组织结构疏松, 细胞分散, 细胞间的正常连接无法形成。把这些结构疏松的愈伤组织在正常的培养基 MS + 2, 4-D  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  上进行继代试验, 发现细胞仍具有分裂能力, 新生的愈伤组织细胞结构更加松散, 单细胞的数目增多, 并且细胞的形态也各异。

**关键词:** 大豆; 硼; 愈伤组织; 细胞结构; 细胞形态

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2009)02-0225-04

## Effect of Boron on Cell Structure and Shape in Soybean (*Glycine max*) Callus

GE Zheng-zhen<sup>1</sup>, YANG Guang-yu<sup>2</sup>, ZHONG Yan<sup>1</sup>, DU Qing-zhen<sup>1</sup>, MENG Xiang-xun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Basic Medicine and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu; <sup>2</sup>Soybean Research Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin, China)

**Abstract:** Boron is one of the essential microelements for plant growth, playing an important role in maintaining the structural and functional integrity of cell wall and cellular membrane. In this experiment the influences of excess boron on structure and shape of callus cells and the regulatory function of boron in callus induction and regeneration were studied using the successfully induced soybean callus. The medium with various content of boric acid were used to culture soybean tissue of hypocotyledonary axis to induce the callus and successive cell generations. Our results suggested that some callus on the medium with over  $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  boron was loosen and its cells were rarefaction after twenty day-culture. When this callus was transferred into the normal medium MS + 2, 4-D  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for a subsequent culture, it was observed that the cells of the callus still had the capability of division and the structure of the callus became looser and more unicells appeared with various cell shapes.

**Key words:** Soybean (*Glycine max* Merr); Boron; Callus; Cell structure; Cell shape

硼是植物生长发育过程中必不可少的一种微量元素。大量研究表明, 缺硼可给植物带来严重危害, 造成产量损失<sup>[1]</sup>。吴静等<sup>[2]</sup>对大豆的研究发现, 在缺硼条件下, 植株根系生长受到抑制, 变粗变短, 颜色加深; 地上部生长点坏死, 使植株长得矮小, 干重降低。有报道表明, 严重缺硼时还能引起蕾全脱落, 花期延长, 果、穗不实, 块根、浆果心腐或坏死。一般认为, 植物从营养生长阶段进入生殖生长阶段时, 硼的作用更显重要, 它能促进植物花粉萌发和花粉管

伸长, 促进雌蕊的形成与发育<sup>[3-4]</sup>。关于硼在植物中的功能研究表明, 硼能维持细胞壁和细胞膜的功能, 参与信号的传递、基因表达的调控、糖类物质的运输与酶活性的调节等<sup>[5]</sup>。Toru Maoth<sup>[6]</sup>研究发现细胞中的硼大部分存在于细胞壁上, 从细胞壁上分离得到的一种复杂的多糖—鼠李半乳糖醛酸 II (rhamnogalacturonan II, RG-II), 它要依赖硼离子才能形成 B-dRG-II 复合物, 此复合物能与果胶多糖形成果胶网络, 果胶网络是构成完整细胞壁必不可

收稿日期: 2008-11-02

基金项目: 吉林省科技发展计划重点项目 (20060202)

作者简介: 葛正珍 (1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物细胞与分子遗传学。

通讯作者: 孟祥勋, 教授, 博士。E-mail: mengxiangxun@suda.edu.cn。

少的组成成分之一,它能使细胞结合紧密。Fleischer A 等<sup>[7]</sup>得出,在缺硼的条件下,细胞壁的结构遭到破坏,细胞的体积增大,细胞壁的孔径变大。但有关高浓度硼的生理学效应以及对细胞壁和细胞膜的影响,尤其是在组织培养中对愈伤组织形成与再生的影响,尚缺乏报道。大豆组织培养再生技术是实现外源基因转化,获得转基因植株的关键。在大豆愈伤组织的诱导过程中,探讨高浓度的硼对愈伤组织的细胞结构和形态的影响,为建立高效的组织培养再生技术以及通过硼营养的介导提高外源基因转化效率奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆品种,吉林小粒豆 7 号,由吉林省农业科学院大豆所提供。

### 1.2 无菌外植体的建立

精选饱满、种皮没有破损的大豆种子,自来水冲洗 15 min 后进行灭菌。先用 70% 的酒精灭菌 50 s,再用 0.1% 的升汞处理 10 min,升汞处理后,用无菌水冲洗 4~5 次<sup>[8]</sup>。将灭菌后的大豆种子接种于用 0.4% 琼脂固化的萌发培养基上,(25±1)℃ 的条件下进行暗培养。

### 1.3 愈伤组织的诱导

种子萌发 3 d 后,选取萌发状态较好的种子,在近子叶节端的下胚轴上切取 4 块厚约 0.5 mm 的薄片,分别接种到添加不同量硼酸的 1~16 号诱导培养基(表 1)上,每瓶接种 4 块外植体,把培养瓶放在

表 1 诱导培养基种类

Table 1 The type of inducing medium

培养基编号 Medium No.	培养基成分 Medium elements	培养基编号 Medium No.	培养基成分 Medium elements
1	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0	9	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 140
2	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 1.6	10	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 160
3	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 10	11	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 180
4	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 30	12	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 200
5	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 50	13	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 400
6	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 70	14	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 600
7	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 100	15	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 800
8	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 120	16	A + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 1000

A - 为改良的培养基 MS(不含硼酸) + 6-BA 1.6 + NAA 0.1 + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂。

A - represent the medium MS (none boric acid) + 6-BA1.6 + NAA0.1 + 3% sugar + 0.7% agar.

上述温度下进行暗培养。培养 10 d 后,移入温度为 (25±1)℃、光照强度为 1500~2000 lx、每天光照时间 12 h 的条件下培养。观察和记载不同培养基上愈伤组织的诱导情况以及它的细胞结构和形态的变化。

### 1.4 高硼环境中形成的愈伤组织的继代培养

将 7~12 号培养基上的愈伤组织在水中分散后,将小颗粒的愈伤块接种到硼含量正常的继代培养基 MS + 2,4-D 0.4 上,观察愈伤组织细胞结构和形态的变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同的硼酸浓度对愈伤组织诱导及生长的影响

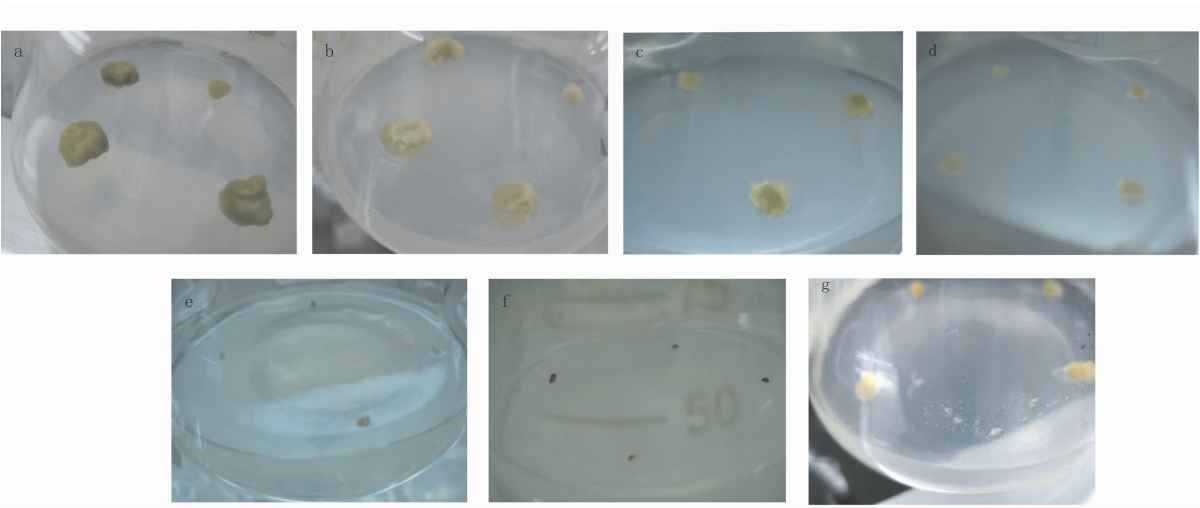
经过 10 d 的暗培养,1~12 号培养基上愈伤组织生长状态相似,除 12 号愈伤组织较小外,其他 11 个培养基愈伤组织的大小相差不大,愈伤组织结构紧密,质地坚硬;13 号培养基上愈伤组织形成不明显,14 号到 16 号没有愈伤组织的形成,大部分外植体已经死亡。20 d 后,对新生愈伤组织的观察发现,1~5 号培养基上的愈伤组织仍然结构紧密;但 6~12 号培养基上,新生的愈伤组织结构疏松,极易分散成很小的颗粒;13 号培养基上一半以上的外植体已经死亡,存活的愈伤组织结构也很松散。14 号之后的外植体全部死亡(图 1)。由此可以得出,低浓度硼在短时间内对愈伤组织的结构没有明显的影响,随着硼含量的逐渐增加,细胞结构变得很疏松,当达到一定的量时对细胞产生毒害作用,使外植体无法正常形成愈伤,最终死亡。

### 2.2 不同的硼浓度对细胞结构和形态的影响

培养 20 d 后,1~5 号培养基上的愈伤组织结构紧密,用徒手切片进行观察,愈伤组织的细胞结构没有变化,细胞结合紧密(图 1)。用镊子挑取一小块 6~13 号培养基上疏松的愈伤组织,把它们直接分散在生理盐水中,盖上盖玻片,用倒置显微镜进行观察,发现这些新生愈伤组织的细胞很分散,细胞之间连接不紧密,出现了一些游离的单细胞(图 3)。由此可以看出,在硼酸的浓度大于 70 mg·L<sup>-1</sup>时,细胞间的正常连接无法形成,细胞松散。

### 2.3 继代后愈伤组织的细胞结构和形态变化

愈伤组织培养 20 d 后把结构松散的愈伤组织用水分散后,挑取小颗粒在正常的培养基 MS + 2,4-D 0.4 上进行继代培养,30 d 后,发现新生的愈伤组



a-f 分别为 1 号、5 号、6 号、12 号、13 号、14 号培养基上的愈伤组织,g 瓶壁上为 6 号培养基上松散的愈伤组织  
a-f are callus on medium No. 1, 5, 6, 12, 13 and 14, respectively, g is noncohesive callus on triangular flask wall from medium No. 6

图 1 愈伤组织的生长状态

Fig.1 Status of growing callus

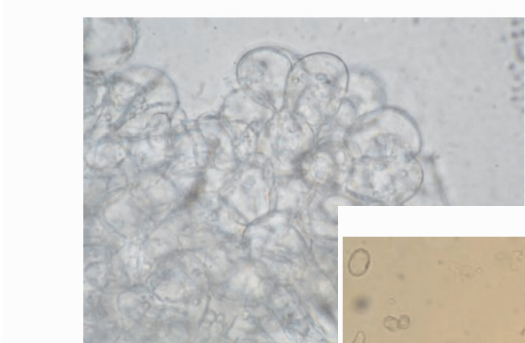


图 2 结构紧密的愈

Fig.2 Slice of compacted

组织类似菌落生长,结构非常紧密,细胞团较少,单细胞的数目增多

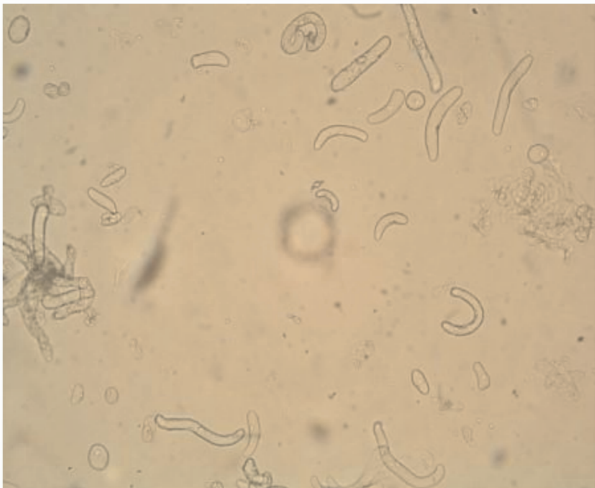


图 4 继代培养后愈伤组织涂片

Fig.4 Smear of secondary culture callus

可观察到细胞核,有一些还具备叶绿体。这种愈伤组织再继续培养约 10 d,局部区域转变成浅黄绿色,之后其中的有些区域转变为深绿色,深绿色部位愈伤组织的结构比浅黄绿色的略结实一些。浅黄色的区域,愈伤组织的结构和细胞形态还没有恢复正常状态。

的愈伤组织涂片  
hesive structure of callus  
了变化,除了正常的形态外,出现了半月状、杆状等多种形态变异的细胞(图 4),在这些变形的细胞中,

3 讨论

结果得出,愈伤组织在硼酸浓度 0 ~ 30 mg · L<sup>-1</sup> (硼 0 ~ 5.2 mg · L<sup>-1</sup>) 的范围内能正常生长。刘鹏等<sup>[9]</sup>研究大豆的主要营养元素生理指标中发现,硼 5 mg · L<sup>-1</sup> (硼酸 28.6 mg · L<sup>-1</sup>) 时,大豆已经处于中毒状态。这两个结果表明,愈伤组织和整个植株生

长所能耐受的硼酸的量是相近的。在含硼酸  $70 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基上形成的愈伤组织结构松散,细胞结合不紧密,这表明高浓度的硼酸影响了细胞壁中果胶网络层的形成。Koichi Kakegawa<sup>[10]</sup>等的研究发现,植物细胞在硼浓度较低条件下悬浮培养,细胞壁和细胞内硼的含量也随之降低。据此可以推断:在一定的范围内,细胞内硼的含量也随着外界硼浓度的升高而增加。因此推测,在硼酸浓度较高的环境中,B-dRG-Ⅱ合成不会受阻,能与果胶糖形成足量的复合物来维持果胶层功能。这种现象产生的原因可能是:一、果胶酶活性的增强,使水不溶性的果胶转变为水溶性果胶,细胞间结合力下降;二、硼的过量吸收对其它离子的吸收造成了协同或拮抗作用,影响了细胞内一系列代谢过程,使多糖的合成受阻或影响了多糖甲酯化程度,无法形成原果胶。这些都需要进一步的证实。

在本次的继代试验中,愈伤组织的细胞出现变形,变大这个现象。Koichi Kakegawa 等<sup>[10]</sup>认为低于正常浓度的硼能使细胞变形、变大并且破损。这两个试验的相似之处在于,细胞继代时都存在硼的浓度差。据此推测这个现象是由于细胞内外硼离子的浓度差造成的。变异细胞周围的游离态水可能是细胞变形的直接因素,当这些细胞壁受损的细胞从高浓度的硼酸环境转接到正常的硼酸环境中生长,离子浓度差使细胞吸水,细胞壁的孔径逐渐变大,细胞壁拉伸,细胞变大,但由于细胞壁还具有一定的支持功能,并没有使细胞破裂。同时,由于细胞壁和细胞

内流失的硼与细胞周围的水形成了一个小范围的高硼环境,使新生愈伤组织的结构仍然非常松散,但随着培养时间的延长,硼离子的作用逐渐减弱,愈伤组织逐渐变得结实,并且能正常形成叶绿素。

在高硼浓度 ( $70 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 下培养大豆愈伤组织,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。这种现象可为采用硼营养作为介质,介导外源基因的转化提供新的途径,这值得进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 祖艳群,林克惠. 硼在植物体中的作用及对作物产量和品质的影响[J]. 云南农业大学学报,2000,15(4):359-363. (Zu Y Q, Lin K H. The role of boron in plants and its effect on the yield and quality of crops [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2000,15(4):359-363.)
- [2] 吴静,李春俭,江荣凤,等. 缺硼对大豆植株生长和根瘤固氮活性的影响[J]. 华北农学报,1999,14(2):1-5. (Wu J, Li C J, Jiang R F, et al. Effects of boron-deficiency on soybean growth and nitrogenase activity [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1999,14(2):1-5.)
- [3] Cheng C, Rerkasem B. Effects of boron on pollen viability in wheat [J]. Plant and Soil, 1993,155-156(1):313-315.
- [4] 刘鹏. 大豆钼、硼营养研究进展[J]. 中国农业通报,2001,17(6):41-44,118. (Liu P. The research development of molybdenum & boron nutrition in soybean [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2001,17(6):41-44,118.)
- [5] Bolaños L, Lukaszewski K, Bonilla I, et al. Why boron? [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004,42(11):907-912.
- [6] Maath T. Boron in plant cell walls [J]. Plant and Soil, 1997,193(1-2):59-70.
- [7] Kakegawa K, Ishii T, Matsunaga T. Effects of boron deficiency in cell suspension cultures of *Populus alba* L. [J]. The Plant Cell Reports, 2005,23(8):573-578.
- [8] 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.)
- [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.)