

薛迎斌, 宋佳, 李泉艺, 等. 大豆 *GmMADS4* 基因克隆、亚细胞定位及功能分析 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 420-429.
XUE Yingbin, SONG Jia, LI Xiaoyi, et al. Cloning, subcellular localization and functional analysis of *GmMADS4* in soybean[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 420-429.

大豆 *GmMADS4* 基因克隆、亚细胞定位及功能分析

薛迎斌^{1,2†}, 宋佳^{2,3†}, 李泉艺¹, 李小豪^{2,3}, 陈经烨^{2,3}, 伍萍珍³, 朱胜男⁴, 刘颖^{2,3}

(1 广东海洋大学 化学与环境学院, 广东 湛江 524088; 2 国家耐盐碱水稻技术创新中心 华南中心, 广东 湛江 524088;
3 广东海洋大学 滨海农业学院, 广东 湛江 524088; 4 岭南师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘要:【目的】挖掘大豆 *Glycine max* MADS 转录因子家族成员 *GmMADS4* 基因信息, 分析其结构及功能。【方法】通过生物信息学分析, 对 *GmMADS4* 基因进行基因结构、编码蛋白信息、保守结构域、系统进化树以及互作蛋白预测等分析。利用烟草叶片瞬时转化法分析亚细胞定位, 通过 RT-qPCR 进行组织部位及响应缺素的表达模式分析, 利用下胚轴复合植株转化法分析超量表达 *GmMADS4* 对转基因毛根生长的影响。【结果】*GmMADS4* 基因开放阅读框长 732 bp, 编码蛋白相对分子质量为 28 000; 保守结构域含有 MADS-box 和 K-box, 属于 II 型 MADS 家族成员, 与拟南芥的 AtAP3 相似性较高; *GmMADS4* 在大豆多个部位均有表达, 且在花和种子中的表达量较高; 缺氮和缺磷处理均显著增加 *GmMADS4* 在叶和根部的表达量; *GmMADS4* 主要定位在细胞核, 超量表达 *GmMADS4* 显著增加转基因毛根的可溶性磷含量。【结论】*GmMADS4* 属于大豆 II 型 MADS 家族成员, 具有核定位功能, 可能在大豆种子和花的发育过程中发挥作用, 并参与大豆根部缺磷响应及磷稳态调节。

关键词: 大豆; *GmMADS4*; 亚细胞定位; 表达模式; 功能分析

中图分类号: S184

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0420-10

Cloning, subcellular localization and functional analysis of *GmMADS4* in soybean

XUE Yingbin^{1,2†}, SONG Jia^{2,3†}, LI Xiaoyi¹, LI Xiaohao^{2,3}, CHEN Jingye^{2,3}, WU Pingzhen³, ZHU Shengnan⁴, LIU Ying^{2,3}

(1 College of Chemistry and Environment, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2 South China Branch, National Saline-Alkali Tolerant Rice Technology Innovation Center, Zhanjiang 524088, China; 3 College of Coastal Agricultural Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 4 Life Science and Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: 【Objective】To explore the genetic information of *GmMADS4*, a member of soybean (*Glycine max*) MADS transcription factor family, and analyze its structure and function. 【Method】The structure, coding protein information, conserved domain, phylogenetic tree analysis and interaction protein prediction of *GmMADS4* were analyzed by bioinformatics analysis. Transient transformation of tobacco leaves was used to

收稿日期: 2022-03-04 网络首发时间: 2022-10-18 10:46:09

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20221017.1611.002.html>

作者简介: 薛迎斌, 讲师, 博士, 主要从事植物抗逆研究, E-mail: yingbinxue@yeah.net; 宋佳, 硕士研究生, 主要从事植物抗逆研究, E-mail: S929497809@163.com; †表示同等贡献; 通信作者: 朱胜男, 讲师, 博士, 主要从事植物抗逆研究, E-mail: shnzhu@163.com; 刘颖, 副教授, 博士, 主要从事植物抗逆研究, E-mail: liuying85168@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (32002131); 广东省自然科学基金 (2020A1515011570); 广东海洋大学“南海青年学者”项目 (002029001012)

analyze subcellular localization, RT-qPCR was used to analyze its expression patterns in different tissues and response to nutrient deficiency, and hypocotyl complex plant transformation method was used to analyze the effects of overexpression of *GmMADS4* on transgenic hair root growth. 【Result】 The length of open reading frame of *GmMADS4* was 732 bp and the relative molecular mass of coding protein was 28 000. The conserved domain of *GmMADS4* contained MADS-box and K-box, which was a member of type II *MADS* family, and had a high similarity with *Arabidopsis* AtAP3. *GmMADS4* was expressed in many parts of soybean, especially in flowers and seeds. The expression of *GmMADS4* in leaves and roots significantly increased by nitrogen and phosphorus deficiency induction. *GmMADS4* was mainly located in the nucleus, and overexpression of *GmMADS4* significantly increased soluble phosphate content in transgenic hair roots. 【Conclusion】 *GmMADS4* is a member of soybean type II *MADS* family, and has nuclear localization function, which may play a role in the development of soybean seeds and flowers, as well as participate in soybean root adaptive responses to phosphorus deficiency and the regulation of phosphate homeostasis.

Key words: Soybean; *GmMADS4*; Subcellular localization; Expression pattern; Functional analysis

MADS 是一类重要的转录因子, 其命名来源于酿酒酵母的 *Mini chromosome maintenance 1(MCM1)*、拟南芥 *AGAMOUS(AG)*、金鱼草 *DEFICIENS(DEF)* 和人类 *Serum response factor(SRF)* 基因, 它们所编码蛋白的 N 端都含有由 50~60 个氨基酸组成的 MADS-box 保守结构域^[1]。植物 MADS 家族从系统发育上可分为 I 型和 II 型 (又称 MIKC 型) 2 种, 二者的区别主要在于有无 K-box 结构域^[2-3]。关于 I 型 *MADS* 基因家族成员的报道较少。在水稻中, I 型的 *OsMADS78* 和 *OsMADS79* 在种子发育早期发挥了重要的调控作用^[4]; 拟南芥中研究比较深入的 I 型 *MADS* 是 *AtAGL62*, 参与调控拟南芥胚乳发育过程中的细胞分化^[5]。II 型 *MADS* 基因是植物所特有的, 也是目前研究最多的, 其中被广泛熟知的是参与花器官的形成和发育, 如经典的花器官发育模型 “ABC(D)E 模型” 中控制花萼和花瓣形成的 *AP1*、控制花瓣和雄蕊形成的 *AP3*、控制雄蕊和心皮形成的 *AG* 等基因, 均属于 *MADS* 家族成员^[3]。除了参与调控开花, *MADS* 基因还被报道参与植物多种生长发育过程。水稻的 *OsMADS25* 通过正调控生长素的累积参与促进主根和侧根的生长^[6]; 豆科作物大豆 *Glycine max* 的 *MADS* 成员 *GmNMH7* 能够抑制结瘤相关基因的表达, 进而在根瘤的形成和发育过程中扮演负调控角色^[7]。*MADS* 家族基因还参与植物应对非生物胁迫的适应性调控^[8]。拟南芥 *AtAGL6* 通过抑制盐胁迫响应基因的表达, 负调控植物耐盐^[9]; 水稻 *OsMADS25* 响应 ABA 信号, 正调控植株对低温的适应性^[10]; 超量表达野生大豆 *MADS* 基因 *GsMAS1*, 增加了拟南芥对铝毒的耐受性^[11]。此外,

多个 *MADS* 基因被报道参与缺磷的响应, 如水稻的 *OsMADS23*、*OsMADS25* 和 *OsMADS27*^[12], 但具体分子功能还有待进一步研究。

大豆是我国重要的粮油作物, 然而我国大豆生产严重不足, 每年约 1 亿吨需要进口^[13]。限制大豆生产的因素很多, 其中, 磷作为植物生长必需的大量营养元素, 在土壤中很容易被吸附固定, 导致土壤有效磷含量普遍偏低, 低磷胁迫是限制我国大豆生长和产量的重要因素之一^[14-15]。研究大豆磷营养调控机理, 挖掘调控大豆适应低磷胁迫的重要转录因子, 对于磷高效大豆品种的遗传改良和培育具有重要意义^[15-16]。*MADS* 家族转录因子在大豆全基因组共有 163 个成员^[17], 但是目前有功能报道尤其是有响应低磷胁迫功能的相对较少。本研究克隆了 1 个大豆 II 型 *MADS* 成员——*GmMADS4*, 并通过生物信息学、亚细胞定位、表达模式分析以及超量表达该基因对根系磷稳态的影响分析, 进一步挖掘该基因可能的功能, 为深入解析 *GmMADS4* 在大豆生长发育以及低磷胁迫适应过程中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用植物材料为大豆品种 ‘粤春 03-3’, 由华南农业大学根系生物学研究中心惠赠; 烟草 *Nicotiana benthamiana* 为本氏烟草。所用菌株为大肠埃希菌 DH5 α 、根癌农杆菌 GV3101、发根农杆菌 K599。

1.2 试验处理及样品准备

不同组织部位表达模式及缺素处理表达模式分析参考 Yao 等^[18] 的方法。挑选大小一致的大豆

种子, 播种于砂土中进行萌发, 5 d 后选择长势一致的幼苗, 转移到 1/2 Hoagland 正常营养液中进行培养。对于不同组织部位样品, 分别在培养的第 32 天 (大豆开花时) 收获根、茎、叶、花, 第 50 天收获种子。对于缺素处理样品, 幼苗在正常营养液培养 1 周后, 取部分幼苗分别转移到无氮、无磷、无钾的 1/2 Hoagland 营养液 (北京酷来搏公司) 中处理 24 h, 然后收获根和新叶以备分析。试验于 2021 年 4—6 月在日光温室进行, 白天平均气温 30 ℃, 夜晚平均气温 25 ℃, 日平均光照时间为 13 h。收获后的样品立即用液氮冷冻, 之后放入-80 ℃ 条件下保存, 用于 RNA 提取。

用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 分别提取根、茎、叶、花和种子的总 RNA, 具体方法参照其说明书中的步骤。测定提取的总 RNA 的浓度和纯度, 检测合格后, 取 1 μL 的总 RNA, 根据逆转录试剂盒 (Promega 公司) 说明书去除基因组 DNA 后进行逆转录反应, 获得相应的 cDNA, 保存于-20 ℃, 作为载体构建和 RT-qPCR 的模板。

1.3 生物信息学分析

GmMADS4 基因基本信息包括开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 长度、外显子/内含子数目、氨基酸长度, 从 Phytozome 数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 获得。GmMADS4 蛋白相对分子质量及等电点通过 Expasy 数据库 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 获得。GmMADS4 蛋白保守结构域的预测通过 NCBI conserved domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行。基因结构通过 GSDS 网站 (<http://gsds.gao-lab.org/index.php>) 获得。蛋白二级结构通过 Prabi 网站 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 进行预测。*GmMADS4* 基因启动子 (5' UTR 上游 2 000 bp 的 DNA 序列) 顺式作用元件预测通过 PlantCARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行。*GmMADS4* 互作蛋白预测通过 STRING 网站 (<https://www.string-db.org/>) 根据氨基酸序列进行。系统进化树分析通过 MEGA 5.05 软件完成, 采用邻接法 (Neighbor-joining method), Bootstrap 设置为 1 000 次。

1.4 载体构建

以大豆花的 cDNA 为模板, 用基因特异引物 (OE-*GmMADS4*-F/R) 对 *GmMADS4* 基因 ORF 全长进行 PCR 扩增。50 μL 的 PCR 反应体系: 10× Ex Taq Buffer 5 μL、dNTP 4 μL、正反向引物各 1 μL、cDNA 模板 2 μL 以及 ddH₂O 37 μL。PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s、59 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 保温 10 min。扩增出的目标基因片段纯化回收后, 先连入 pMD18-T 载体, 经测序无误后, 用 *Sac* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 再通过 T4 DNA 连接酶将 *GmMADS4* 基因连入目标载体 pTF101s, 获得 *GmMADS4*-pTF01s 重组质粒, 检测无误后转入发根农杆菌 K599 备用。

1.5 亚细胞定位分析

构建 *GmMADS4* 融合绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达载体, 用基因特异引物 GFP-*GmMADS4*-F/R (酶切位点为 *Kpn* I 和 *Bam* H I) 扩增 *GmMADS4* 基因 ORF 全长, 并连入目标载体 pBEGFP, 测序无误后转化农杆菌 GV3101 备用。引物设计通过 PerlPrimer 软件完成, 引物序列见表 1。

构建 *GmMADS4* 融合绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达载体, 用基因特异引物 GFP-*GmMADS4*-F/R (酶切位点为 *Kpn* I 和 *Bam* H I) 扩增 *GmMADS4* 基因 ORF 全长, 并连入目标载体 pBEGFP, 测序无误后转化农杆菌 GV3101 备用。引物设计通过 PerlPrimer 软件完成, 引物序列见表 1。

1.5 亚细胞定位分析

GmMADS4 蛋白亚细胞定位通过烟草叶片表

表 1 本研究所用到的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') ¹⁾ Primer sequence	注释 Annotation
OE- <i>GmMADS4</i> -F	<u>CGAGCTC</u> ATGGGTCGTGGCAAGAT	超量表达
OE- <i>GmMADS4</i> -R	GCTCTAGATCAAGCAAGGCGAAGGTC	Overexpression
GFP- <i>GmMADS4</i> -F	GGGGTACCGATGGGTCGTGGCAAGAT	融合绿色荧光蛋白
GFP- <i>GmMADS4</i> -R	CGGGATCCCCGAGCAAGGCGAAGGTCATG	Fused with GFP
RT- <i>GmMADS4</i> -F	GAGACAGATCAGGCATAGGA	RT-qPCR
RT- <i>GmMADS4</i> -R	CCTACAGGTATCAGTCCGAG	
RT- <i>GmEF-1α</i> -F	TGCAAAGGAGGCTGCTAACT	RT-qPCR
RT- <i>GmEF-1α</i> -R	CAGCATCACCGTTCTTCAAA	

1) 下划线为酶切位点
1) The restriction sites are underlined

皮细胞瞬时表达^[19] 进行分析。将含有 *GmMADS4*-pBEGFP 载体质粒的农杆菌 GV3101 活化后扩大培养, 菌体收集后用重悬液 (包含 10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L MES 以及 0.1 mmol/L 乙酰丁香酮) 重悬, 使 *D*_{600 nm} 为 0.5 左右, 静置 2~3 h, 通过注射器导入生长 3~4 周的烟草叶片下表皮, 转化 3 d 后即可进行观察。以转化空载体 pBEGFP 的叶片为对照。GFP 荧光的观察通过激光共聚焦显微镜进行, 激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 507 nm。

1.6 RT-qPCR 分析

将大豆待测 cDNA 样品稀释 10 倍作为模板, RT-qPCR 参考 Liu 等^[20] 的方法, 试剂采用 Go Taq qPCR Master Mix(Promega, 美国), 通过 StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国) 完成, 程序设置为 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s、60 ℃ 15 s, 40 个循环; 72 ℃ 30 s。基因定量引物 RT-*GmMADS4*-F/R 和内参基因 *GmEF-1α* (Glyma17g23900) 定量引物 RT-*GmEF-1α*-F/R 见表 1。目的基因的相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

1.7 大豆复合植株转化

大豆复合植株转化参考 Zhuang 等^[21] 的方法。种子萌发后, 用注射器的针头分别蘸取适量携带 pTF101s 空载体和 *GmMADS4*-pTF101s 的 K599 发根农杆菌, 然后在大豆幼苗子叶节的位置穿孔并涂抹菌体, 进行侵染。约 10 d 左右可以看到有毛根长出, 待毛根长到 10 cm 左右, 把原来的主根剪掉, 留下毛根, 即为转基因复合植株。将超量表达 *GmMADS4* 和对照转基因复合植株转移到正常营养

液中培养 2 周, 收获地上部和毛根进行相关指标的测定。

1.8 生物量的测定

植株生物量用干质量表示, 样品收获后立即在 105 ℃ 烘箱杀青 30 min, 然后调到 75 ℃ 烘干至恒质量, 称取植株总干质量; 每个处理有 4 次独立的生物学重复。

1.9 可溶性磷含量的测定

将 0.1 g 毛根用液氮速冻并研磨至粉碎, 加 1 200 μL 双蒸水继续研磨以充分提取毛根中的可溶性磷; 将研磨混合液转入 2 mL 离心管, 于 4 ℃、14 000 r/min 离心 30 min; 取上清液采用钼锑抗比色法^[22] 测定磷含量, 测定波长为 700 nm。

2 结果与分析

2.1 *GmMADS4* 基因结构及保守结构域预测

随着基因组数据库的更新, 本研究获得了 1 个大豆 *MADS* 成员, 基因座位号为 Glyma01g37470, 命名为 *GmMADS4*, 该基因 ORF 长度为 732 bp, 编码 244 个氨基酸, 预测蛋白相对分子质量为 28 000, 等电点为 9.31。 *GmMADS4* 基因结构如图 1A 所示, 该基因由 7 个外显子和 6 个内含子组成, 两端各有 1 段非编码区。通过 NCBI conserved domains 保守结构域预测网站分析 *GmMADS4* 蛋白保守结构域, 结果表明, 该基因编码蛋白 N 端第 2—77 个氨基酸, 为保守的 *MADS* 结构域, 说明该基因属于 *MADS* 超家族, 此外还含有 1 个 K-box 结构域 (图 1B)。

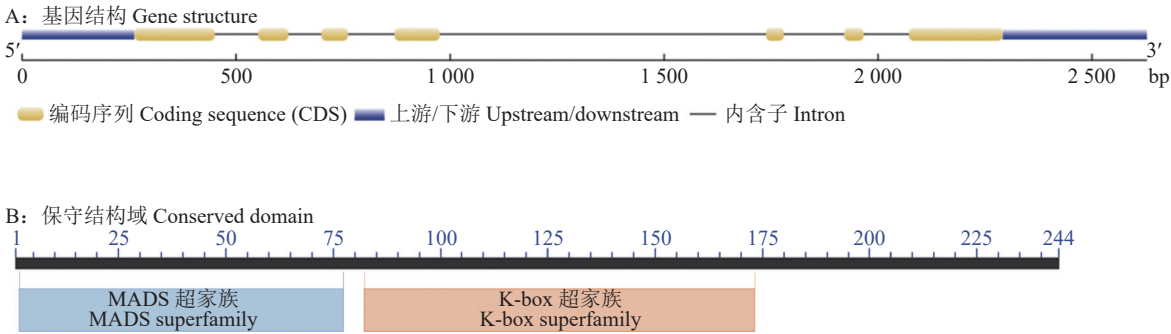


图1 *GmMADS4* 基因结构及保守结构域预测

Fig. 1 Gene structure and conserved domain prediction of *GmMADS4*

2.2 *GmMADS4* 蛋白二级结构预测

进一步分析了 *GmMADS4* 蛋白二级结构, 结构表明 *GmMADS4* 蛋白包含多个 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲 (图 2)。其中, α 螺旋最多, 占 51.44%; 其次为无规则卷曲, 占 23.05%; 延伸链占 16.05%; β 转角最少, 占 9.47%(图 2)。

2.3 *MADS* 家族蛋白进化树分析

为了预测 *GmMADS4* 基因的功能, 本研究将 *GmMADS4* 蛋白序列与已报道的模式植物拟南芥和水稻 *MADS* 家族成员, 以及大豆 *MADS* 家族其他成员进行了系统进化树分析。这些 *MADS* 成员大致可以分成 2 个亚家族, 分别为亚家族 I 和亚家



大写字母表示 GmMADS4 蛋白氨基酸序列；小写字母代表不同的二级结构，h 代表 α 螺旋，c 代表无规则卷曲，e 代表延伸链，t 代表 β 转角
Capital letters indicate amino acid sequence of GmMADS4 protein; Lowercase letters represent different secondary structures, where h stands for α helix, c for random coil, e for extended strand, and t for β turn

图 2 GmMADS4 蛋白二级结构预测

Fig. 2 Secondary structure prediction of GmMADS4

族 II (图 3)。I 型 MADS 成员包括已报道的拟南芥的 AtAGL23/62 和水稻的 OsMADS78/79；GmMADS4 属于 II 型 MADS 成员，该类型的 MADS 成员还包括拟南芥的 AtAP1、AtAG、AtSOC1、AtANR1、AtP1、AtAP3、AtAGL12/14/15/16/17/18/21，水稻的 OsMADS20/23/25/26/

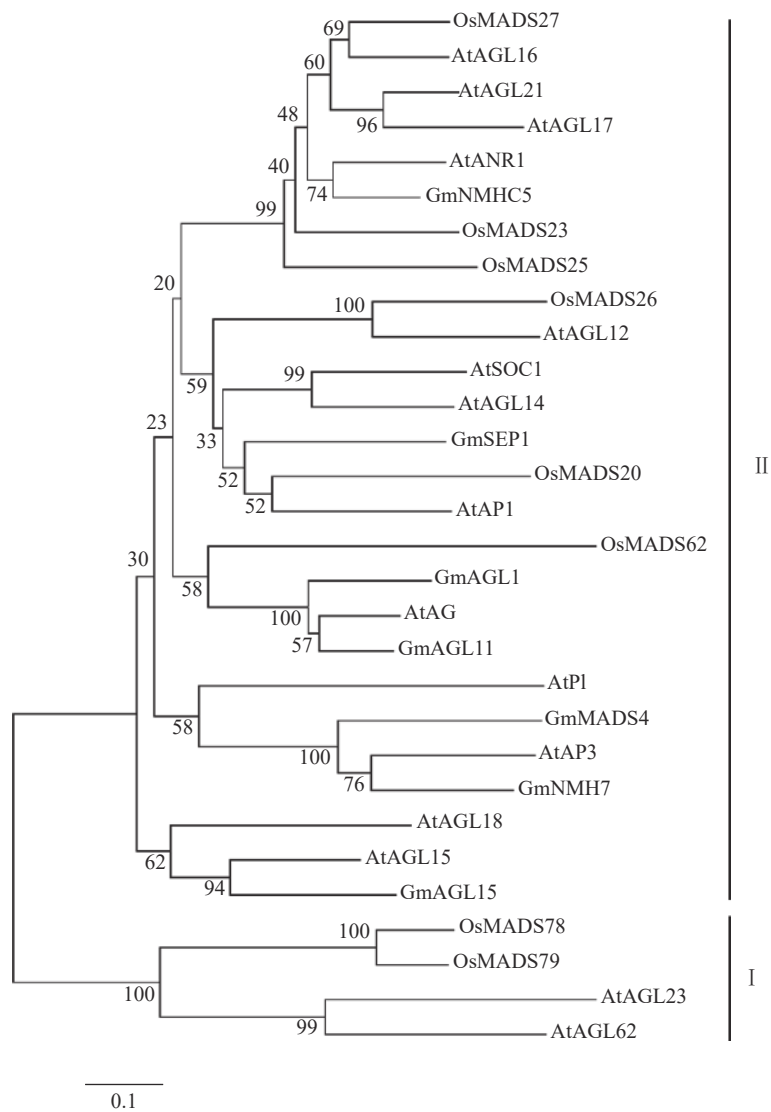


图 3 MADS 家族蛋白系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of MADS family proteins

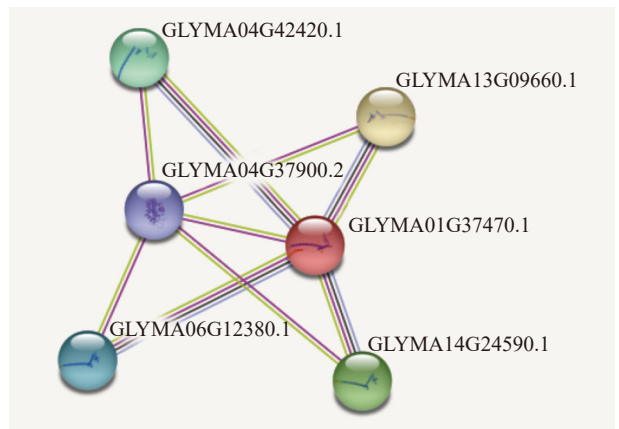
27/62, 大豆的 *GmNMHC5*、*GmNMH7*、*GmSEP1* 以及 *GmAGL1/11/15*, 其中 *GmMADS4* 与拟南芥的 *AtAP3* 序列相似性较高 (图 3)。

2.4 *GmMADS4* 基因启动子顺式作用元件分析

取 *GmMADS4* 基因 5'UTR 上游 2 000 bp 的序列为启动子, 分析其中的顺式调控元件, 结果表明, 在 *GmMADS4* 基因启动子中含有多种类型的顺式调控元件。其中最多的是典型的光响应元件, 有 22 个, 包括 9 个 Box 4、5 个 G-Box、3 个 GT1-motif、2 个 TCCC-motif、2 个 AE-box 和 1 个 LAMP-element 元件。其次是植物激素响应相关的元件, 有 9 个, 其中响应茉莉酸甲酯的有 4 个, 包括 2 个 CGTCA-motif 和 2 个 TGACG-motif; 还有 4 个脱落酸响应元件 ABBRE 和 1 个赤霉素响应元件 P-box。除了光响应和激素响应元件外, 还包括胚乳表达相关元件 *GCN4_motif*、分生组织表达相关元件 *CAT-box* 等参与生长发育调控的元件, 厌氧感应元件 ARE, 以及 MYB 和 MYC 转录因子介导的多种逆境胁迫响应元件。

2.5 *GmMADS4* 互作蛋白预测

通过 STRING 网站对 *GmMADS4* 的互作蛋白进行了预测, 结果发现, 有 5 个候选蛋白可能与 *GmMADS4* (GLYMA01G37470.1) 存在互作关系 (图 4)。其中, *GmMADS8* (GLYMA13G09660.1)、*GmMADS9* (GLYMA14G24590.1)、*GmMADS10* (GLYMA04G42420.1)、*GmMADS7* (GLYMA06G12380.1) 为 MADS 家族蛋白, *GmLFY1* (GLYMA04G37900.2) 为 LEAFY 家族蛋白。



不同颜色的圆球表示不同的蛋白, 其中红色为 *GmMADS4*; 直线相连的 2 个蛋白预测存在相互作用

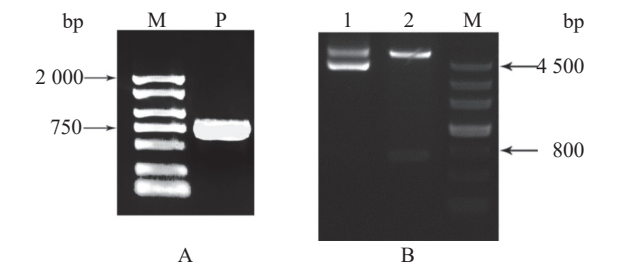
Different colored spheres indicate different proteins, red is *GmMADS4*; Two proteins connected in a straight line are predicted to have an interaction

图 4 *GmMADS4* 互作蛋白预测

Fig. 4 Interaction protein prediction of *GmMADS4*

2.6 *GmMADS4* 基因克隆及超量表达载体构建

为了分析 *GmMADS4* 基因功能, 本研究用特异性引物 OE-*GmMADS4*-F/R 通过 PCR 克隆了 *GmMADS4* 基因 ORF 全长, 结果如图 5A 所示; PCR 扩增获得 1 条单独的条带, 位置在 750 bp 左右, 与 *GmMADS4* 基因 ORF 全长 732 bp 大小一致。经测序无碱基突变后, 进一步连接到超量表达载体 pTF101s 上。图 5B 为 *GmMADS4*-pTF101s 重组质粒酶切检测, 与重组质粒酶切前 (泳道 1) 相比, 经 *Sac* I 和 *Xba* I 限制性内切酶双酶切后 (泳道 2) 在略低于 800 bp 的位置出现了 1 个条带, 大小与 *GmMADS4* 基因 ORF 全长一致, 说明重组质粒构建成功。



A: *GmMADS4* 基因 PCR 扩增, B: *GmMADS4*-pTF101s 重组质粒酶切检测; M 代表 DNA marker, P 代表 PCR 产物, 泳道 1 为重组质粒酶切前, 泳道 2 为重组质粒酶切后

A: PCR amplification of *GmMADS4* gene, B: Digestion verification of *GmMADS4*-pTF101s recombinant plasmid; M represents DNA marker, P represents PCR product, lane 1 is the recombinant plasmid before digestion, lane 2 is the recombinant plasmid after digestion

图 5 *GmMADS4* 基因克隆及酶切检测

Fig. 5 Cloning and enzyme digestion of *GmMADS4*

2.7 *GmMADS4* 在大豆不同部位的表达模式

为了分析 *GmMADS4* 基因主要在大豆哪个部位发挥功能, 本研究通过 RT-qPCR 分析了该基因在大豆根、茎、叶、花和种子中的表达量 (图 6)。在大豆根、茎、叶、花和种子中都能检测到 *GmMADS4* 基因的表达; 值得注意的是, *GmMADS4* 主要在花和种子中有较高的表达量, 尤其在花中的表达量最

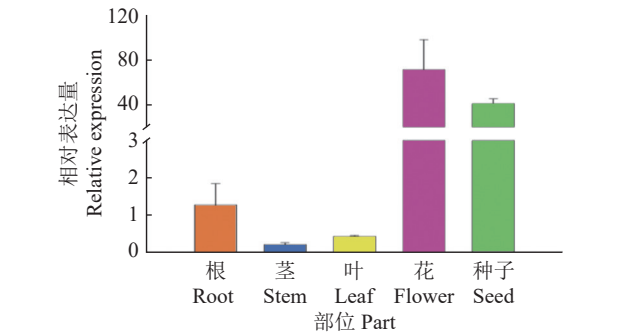


图 6 *GmMADS4* 在大豆不同部位的表达分析

Fig. 6 Expression pattern analysis of *GmMADS4* in different soybean organs

高,而在根、茎和叶中表达量相对较低,尤其在茎中表达量最低(图6)。GmMADS4 基因在花中的表达量约是种子中的 1.7 倍,同时约是根、茎和叶中表达量的 50 倍以上。

2.8 GmMADS4 在大豆根和叶中响应缺素的表达模式

进一步分析了 GmMADS4 基因对缺氮、缺磷、缺钾胁迫的响应,结果表明 GmMADS4 在大豆叶和根中响应多种非生物胁迫(图7)。GmMADS4 在大

豆根中主要受缺氮和缺磷处理上调表达,而对于缺钾处理没有响应;与正常处理的对照组相比,GmMADS4 在缺氮和缺磷处理下的表达量分别提高了 11.2 和 6.6 倍(图7A)。在大豆叶部,缺氮、缺磷和缺钾处理均上调 GmMADS4 的表达;与正常处理的对照组相比,GmMADS4 在缺氮、缺磷和缺钾处理叶中的表达分别提高了 12.0、0.7 和 5.2 倍(图7B)。

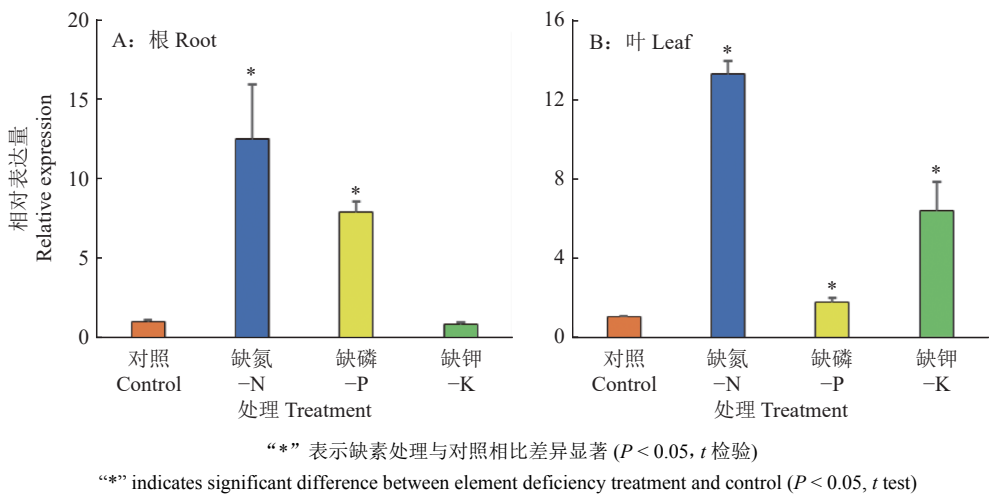


图 7 GmMADS4 在大豆根和叶中响应缺素的表达模式分析

Fig. 7 Expression pattern analysis of GmMADS4 in response to element deficiency in soybean roots and leaves

2.9 GmMADS4 亚细胞定位分析

为了研究 GmMADS4 蛋白在亚细胞水平的具体定位,本研究通过烟草叶部瞬时转化,将携带 GmMADS4 融合 GFP (GmMADS4-GFP) 的农杆菌 GV3101 转化烟草叶片,通过激光共聚焦显微镜观

察荧光位置,其中以 GFP 空载体为对照。转化 GFP 空载体的叶片在细胞核、细胞质、细胞膜都有较强的绿色荧光,而转化 GmMADS4 的叶片主要在细胞核有较强绿色荧光,此外在细胞膜也有微弱的绿色荧光(图8)。这些结果表明 GmMADS4 主要定

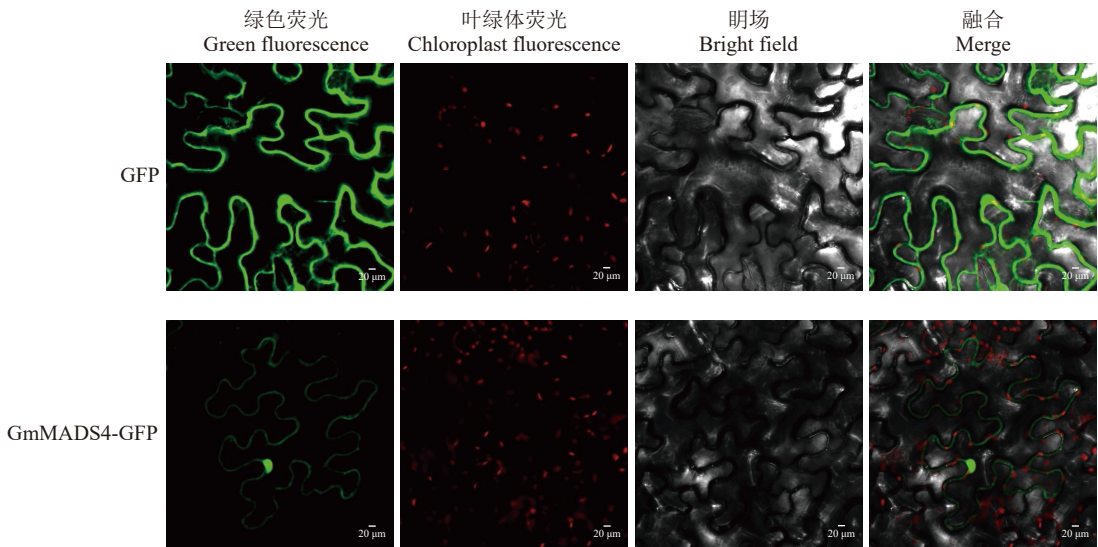


图 8 GmMADS4 亚细胞定位分析

Fig. 8 Subcellular localization analysis of GmMADS4

位在细胞核。

2.10 超量表达*GmMADS4* 影响大豆可溶性磷浓度

为了研究 *GmMADS4* 基因的功能, 本研究进一步利用发根农杆菌 K599, 通过下胚轴复合植株转化法, 获得超量表达 *GmMADS4* 的大豆转基因复合植株, 即根系为转基因毛根、地上部位正常的大豆植株。将超量表达株系与转化空载体的对照株系在大豆营养液中培养 14 d, 观察表型。与对照相比, 超量表达 *GmMADS4* 有促进毛根生长、减缓地上部生长的趋势, 但是从毛根、地上部以及整株干质量上看差异均不明显 (图 9)。超量表达 *GmMADS4* 虽然没有改变复合植株的生物量 (图 10A), 但是显著增加了毛根的可溶性磷含量 (图 10B), 与对照相比, 超量表达 *GmMADS4* 转基因复合植株毛根中的可溶性磷含量显著增加 51% (图 10B)。



图 9 超量表达 *GmMADS4* 转基因复合植株的生长表型
Fig. 9 Growth phenotypes of overexpressing *GmMADS4* transgenic composite plants

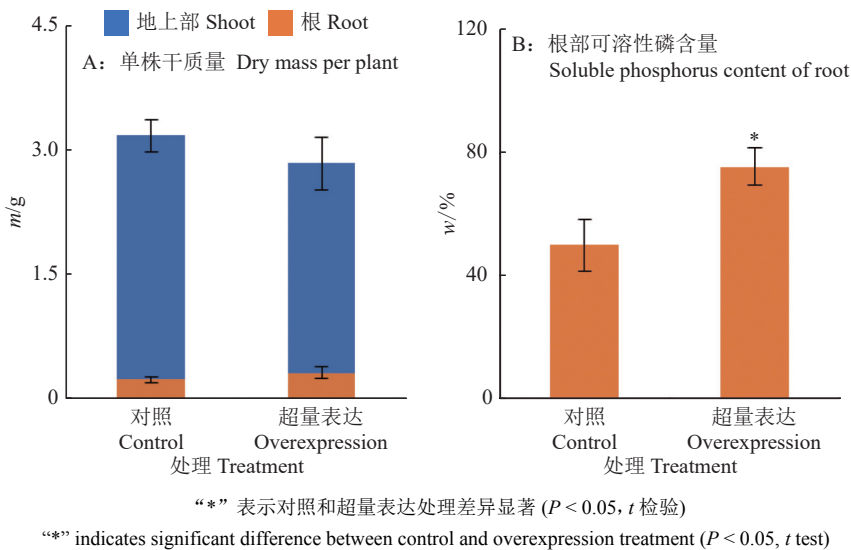


图 10 超量表达 *GmMADS4* 对大豆复合植株生物量和可溶性磷含量的影响

Fig. 10 Effects of overexpressing *GmMADS4* on biomass and soluble phosphorus content of soybean composite plants

3 讨论与结论

MADS 转录因子家族在植物多个生长发育过程中发挥重要的调控作用。本研究克隆了大豆 II 型 MADS 成员——*GmMADS4*, 从进化关系上, *GmMADS4* 与拟南芥 MADS 家族成员 *AP3* 的序列相似性最高。 *AP3* 属于经典的 ABC 模型中的 B 型基因, 在花器官识别中扮演重要角色^[23-24], 同时, 不同部位表达模式分析表明 *GmMADS4* 基因在大豆花中表达量最高, 暗示 *GmMADS4* 可能在花器官形成和发育中发挥重要作用。在拟南芥花分生组织发育的调控过程中, 拟南芥 MADS 成员 *SEP3* 与 *AG*、*AP3* 和 *PI* 均存在明显互作, 以异源二聚体的形式发挥功

能^[25]。本研究通过互作蛋白预测发现 *GmMADS4* 与其他 4 个 MADS 成员 *GmMADS7/8/9/10* 存在相互作用, 表明 *GmMADS4* 可能以复合体的形式参与调控作用。虽然关于大豆 *GmMADS7/8/9/10* 的具体功能还未见报道, 但表达模式分析表明 *GmMADS7/8/9/10* 这 4 个成员均主要在花中特异表达^[17]。这些结果表明, *GmMADS4* 可能与其他蛋白互作, 以异源二聚体的形式调控花器官的形成和发育。除了在花中高表达, *GmMADS4* 在大豆种子中也有较高的表达量, 且 *GmMADS4* 启动子中含有胚乳表达相关元件 *GCN4_motif*, 暗示 *GmMADS4* 还参与大豆种子发育。互作蛋白预测发现 *GmMADS4* 与 *GmLFY1* 也

存在互作, *GmLFY1* 被报道主要在发育中的豆荚和种子中表达, 而在茎尖分生组织中不表达, 可能参与大豆的种子发育而不是开花^[26]。这些结果表明, *GmMADS4* 可能在大豆种子发育调控中也发挥重要功能。

MADS 转录因子已被报道参与植物多种非生物胁迫, 并在调控网络中扮演关键角色^[27]。本研究发现, *GmMADS4* 在根和叶中响应缺氮和缺磷胁迫上调表达, 同时在叶中也受缺钾胁迫上调表达, 暗示 *GmMADS4* 可能参与氮、磷或钾元素缺乏胁迫的适应性调控。在拟南芥中, *MADS* 家族成员 *AtAGL14/19/20/21/44* 均在根部受缺氮胁迫上调表达, 其中, *AtAGL20* 同时还受缺磷胁迫上调表达^[28-29]。超量表达 *AtAGL44* (也即 *AtANRI*) 能够促进拟南芥根系发育, 增加侧根数目和长度, 且这种调控方式依赖于硝酸根离子的存在^[30]。水稻 *OsMADS61* 在根部受缺氮胁迫上调表达^[12], 相反, *OsMADS27/57* 在根部受缺氮胁迫下调表达^[12, 31]。其中, *OsMADS57* 已被证明通过直接调控 *OsNRT2.3a* 的表达, 进而调控水稻中硝酸根离子从根往地上部的长距离运输^[32]。此外, 在水稻中多个 *MADS* 基因在根部受缺磷胁迫下调表达, 如 *OsMADS23/25/27/57*^[12, 31]。除了拟南芥和水稻, 在小麦 180 个 *MADS* 成员中有 54 个 *MADS* 基因的表达在根部响应缺磷, 其中 *TaMADS21/93/121* 这 3 个成员受缺磷胁迫上调表达超过 4 倍^[33]。但是, 关于 *MADS* 基因参与磷信号调控功能的报道较少。本研究发现, 在大豆毛根中超量表达 *GmMADS4* 能够增加毛根中可溶性磷的含量, 暗示 *GmMADS4* 可能参与调控大豆根系磷稳态。

综上所述, 大豆 *GmMADS4* 在花和种子中高表达, 可能通过与其他转录因子互作参与调控花和种子发育。另一方面, 低磷胁迫上调 *GmMADS4* 在根系中的表达, 且超量表达 *GmMADS4* 增加了转基因毛根的可溶性磷含量。因此, *GmMADS4* 可能在大豆耐低磷胁迫中发挥重要调节作用。

参考文献:

[1] ALVAREZ-BUYLLA E R, PELAZ S, LILJEGREN S J, et al. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(10): 5328-5333.

[2] BECKER A, THEISSEN G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(3): 464-489.

[3] 王莹, 穆艳霞, 王锦. *MADS-box* 基因家族调控植物花器官发育研究进展[J]. *浙江农业学报*, 2021, 33(6): 1149-1158.

[4] PAUL P, DHATT B K, MILLER M, et al. *MADS78* and *MADS79* are essential regulators of early seed development in rice[J]. *Plant Physiology*, 2020, 182(2): 933-948.

[5] KANG I H, STEFFEN J G, PORTEREIKO M F, et al. The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(3): 635-647.

[6] ZHANG G, XU N, CHEN H, et al. *OsMADS25* regulates root system development via auxin signalling in rice[J]. *The Plant Journal*, 2018, 95(6): 1004-1022.

[7] MA W Y, LIU W, HOU W S, et al. GmNMH7, a MADS-box transcription factor, inhibits root development and nodulation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.)[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(3): 553-562.

[8] 姚琦园, 李纷纷, 张林成, 等. 植物 MADS-box 转录因子参与调控非生物胁迫的研究进展[J]. *江西农业学报*, 2018, 30(5): 73-79.

[9] ZHAO P X, ZHANG J, CHEN S Y, et al. Arabidopsis MADS-box factor AGL16 is a negative regulator of plant response to salt stress by downregulating salt-responsive genes[J]. *New Phytologist*, 2021, 232(6): 2418-2439.

[10] 闫凌月, 张豪健, 郑雨晴, 等. 转录因子 *OsMADS25* 提高水稻对低温的耐受性[J]. *遗传*, 2021, 43(11): 1078-1087.

[11] ZHANG X, LI L, YANG C, et al. *GsMAS1* encoding a MADS-box transcription factor enhances the tolerance to aluminum stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 2004. doi: 10.3390/ijms21062004.

[12] YU C, SU S, XU Y, et al. The effects of fluctuations in the nutrient supply on the expression of five members of the *AGL17* clade of MADS-box genes in rice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105597.

[13] 曹永强, 王昌陵, 王文斌, 等. 国内外大豆产业、科技现状浅析与我国大豆产业发展思考[J]. *辽宁农业科学*, 2019(6): 44-48.

[14] 田江, 梁翠月, 陆星, 等. 根系分泌物调控植物适应低磷胁迫的机制[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 175-185.

[15] 李欣欣, 杨永庆, 钟永嘉, 等. 豆科作物适应酸性土壤的养分高效根系遗传改良[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 186-194.

[16] 刘国选, 陈康, 陆星, 等. 大豆 *GmPIN2b* 调控根系响应低磷胁迫的功能研究[J]. *华南农业大学学报*, 2021, 42(4): 33-41.

[17] FAN C M, WANG X, WANG Y W, et al. Genome-wide expression analysis of soybean MADS genes showing potential function in the seed development[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62288.

[18] YAO Z, TIAN J, LIAO H. Comparative characterization

- of *GmSPX* members reveals that *GmSPX3* is involved in phosphate homeostasis in soybean[J]. *Annals of Botany*, 2014, 114(3): 477-488.
- [19] ZHU S, CHEN M, LIANG C, et al. Characterization of purple acid phosphatase family and functional analysis of *GmPAP7a/7b* involved in extracellular ATP utilization in soybean[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 661. doi: 10.3389/fpls.2020.00661.
- [20] LIU Y, XUE Y, XIE B, et al. Complex gene regulation between young and old soybean leaves in responses to manganese toxicity[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 155: 231-242.
- [21] ZHUANG Q, XUE Y, YAO Z, et al. Phosphate starvation responsive *GmSPX5* mediates nodule growth through interaction with *GmNF-YC4* in soybean (*Glycine max*)[J]. *The Plant Journal*, 2021, 108(5): 1422-1438.
- [22] MURPHY J, RILEY J P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1962, 27: 31-36.
- [23] JACK T, BROCKMAN L L, MEYEROWITZ E M. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens[J]. *Cell*, 1992, 68(4): 683-697.
- [24] PARENICOVÁ L, DE FOLTER S, KIEFFER M, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(7): 1538-1551.
- [25] SMACZNIAK C, IMMINK R G, MUINO J M, et al. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1560-1565.
- [26] NAN H, CAO D, ZHANG D, et al. *GmFT2a* and *GmFT5a* redundantly and differentially regulate flowering through interaction with and upregulation of the bZIP transcription factor *GmFDL19* in soybean[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97669.
- [27] CASTELAN-MUNOZ N, HERRERA J, CAJERO-SANCHEZ W, et al. MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 853. doi: 10.3389/fpls.2019.00853.
- [28] GAN Y, FILLEUR S, RAHMAN A, et al. Nutritional regulation of *ANRI* and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*, 2005, 222(4): 730-742.
- [29] GAN Y B, ZHOU Z J, AN L J, et al. A comparison between northern blotting and quantitative real-time PCR as a means of detecting the nutritional regulation of genes expressed in roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(3): 335-342.
- [30] GAN Y, BERNREITER A, FILLEUR S, et al. Overexpressing the *ANRI* MADS-box gene in transgenic plants provides new insights into its role in the nitrate regulation of root development[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(6): 1003-1016.
- [31] YAN Y, WANG H, HAMERA S, et al. MiR444a has multiple functions in the rice nitrate-signaling pathway[J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(1): 44-55.
- [32] HUANG S, LIANG Z, CHEN S, et al. A transcription factor, OsMADS57, regulates long-distance nitrate transport and root elongation[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(2): 882-895.
- [33] MA J, YANG Y, LUO W, et al. Genome-wide identification and analysis of the MADS-box gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181443.

【责任编辑 李庆玲】