



# 大豆 *GmPHD3* 基因的克隆及逆境表达分析

王依隆,赵海红,沈英姿,钱佩佩,麻浩

(南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

**摘要:**为探讨大豆 PHD-finger 转录因子家族编码基因 *GmPHD3* 在抵抗中国南方高温高湿非生物胁迫造成种子劣变过程中的调控作用,分离全长 *GmPHD3* 基因并进行生物信息学分析、亚细胞定位和转录激活活性分析,以种子劣变抗性品种湘豆 3 号和不抗品种宁镇 1 号叶片及不同组织 cDNA 为材料,通过 RT-PCR,进行组织表达模式分析和高温高湿胁迫下的表达模式分析。生物信息学分析结果表明基因 CDS 序列长度为 738 bp,编码 246 个氨基酸,包含 Alfin 和 PHD-finger 2 个结构域。进化树结果表明该基因与木豆 ALFIN-Like 3-like(XM\_020363358. 1)的遗传距离较近。亚细胞定位结果显示该蛋白在细胞核内表达。转录激活试验结果表明基因全长有转录激活活性,激活域为 N 端 Alfin 结构域,C 端 PHD-finger 结构域无转录激活活性。组织表达模式分析发现该基因主要在成熟期高表达,且 2 个品种间存在差异。胁迫下的表达模式分析发现随着胁迫时间的延长,基因的表达量逐渐升高。研究结果为进一步阐明高温高湿胁迫下的调控机制研究奠定一定理论基础。

**关键词:**大豆; *GmPHD3*; 表达分析; 高温高湿

## Cloning and Abiotic Expression Analysis of *GmPHD3* Gene in Soybean

WANG Yi-long, ZHAO Hai-hong, SHEN Ying-zi, QIAN Pei-pei, MA Hao

(National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In order to investigate the regulatory role of soybean PHD-finger transcription factor family coding gene *GmPHD3* in resisting high temperature and humidity abiotic stress in seed degradation in southern China, we isolated the full-length *GmPHD3* gene and conduct bioinformatics analysis, subcellular localization and transcriptional activation analysis. We used leaves and cDNAs of pre-harvest seed deterioration resistance varieties Xiangdou 3 and deterioration varieties Ningzhen 1 as materials to perform the tissue expression pattern analysis and expression pattern analysis under high temperature and humidity stress with RT-PCR. The results of bioinformatics analysis showed that the length of CDS sequence was 738 bp, encoding 246 amino acids, containing two domains of Alfin and PHD-finger. The results of the phylogenetic tree indicated that the genetic distance of this gene was close to that of pigeon pea ALFIN-Like 3-like (XM\_020363358. 1). Subcellular localization results showed that the protein was expressed in the nucleus. Transcription activation test results showed that the gene had transcription activation activity in the full length, the activation domain was the N-terminal Alfin domain, and the C-terminal PHD-finger domain had no transcription activation activity. Analysis of tissue expression patterns revealed that the gene was mainly expressed at maturity and there was a difference between the two varieties. Analysis of the expression pattern under stress showed that the relative expression of the gene gradually increased with the extension of stress time. The research results lay a theoretical foundation for further elucidating the research on the regulation mechanism under high temperature and humidity stress.

**Keywords:** Soybean; *GmPHD3*; Expression analysis; High temperature and humidity

大豆[*Glycine max* (L.) Merrill]是重要的粮食作物和油料作物,也是主要的植物蛋白来源,中国大豆年产量与消耗量之间存在巨大差距,环境因素是限制中国大豆产量的主要原因之一<sup>[1]</sup>。中国大豆种植区域分布广泛,主要可分为北方春大豆产区、黄淮海夏大豆产区和南方多熟制大豆产区<sup>[2]</sup>。

南方春大豆生理成熟期(R7)正值南方夏季高温多雨天气,易导致种子在田间条件下发生劣变,影响种子活力、品质、产量和营养价值,对中国南方春大豆的生产造成了极大影响<sup>[3]</sup>,因而培育高温高湿高抗品种迫在眉睫。

为确保播种后较高的田间出苗率,大豆收获后

收稿日期:2020-02-26

基金项目:国家自然科学基金(31371711,31671772,31971996);国家重点研发计划(2018YFD0100905)。

第一作者简介:王依隆(1995-),男,硕士,主要从事大豆种子遗传育种研究。E-mail:1248147730@qq.com。

通讯作者:麻浩(1965-),男,博士,博导,主要从事种子科学与大豆遗传育种研究。E-mail:Lq-ncsi@njau.edu.cn。

和播种前都会测定种子活力,种子活力的高低决定播种用种量的多少,也会影响产量和品质<sup>[4]</sup>。在大豆整个生命周期中,生理成熟期时种子活力达到最高,随着种子老化或环境条件的影响,种子活力严重下降,这个过程是不可逆的,即种子在田间出现劣变,若种子活力过低,则不宜用于制种<sup>[3]</sup>。南方春大豆生理成熟期的高温高湿环境,会对种子活力造成很大影响,是造成种子发生劣变的重要原因之一。本课题组前期对 92 份春大豆品种进行高温高湿胁迫,筛选到种子劣变抗性品种湘豆 3 号和不抗品种宁镇 1 号<sup>[5]</sup>;并进行差异蛋白质组学分析,发现经高温高湿胁迫后宁镇 1 号中 *GmSBH1* 蛋白上调表达<sup>[6]</sup>;继而分离得到其基因全长,通过一系列试验发现该基因与种子劣变相关<sup>[7]</sup>,对其启动子区域进行分析,发现其启动子区含有顺式作用元件 HSE 元件 (GAACCTTC),该元件响应高温高湿胁迫,经验证该元件参与 *GmSBH1* 对高温高湿胁迫的应答过程,通过酵母单杂试验,筛选得到 *GmPHD3* 等下游调控基因<sup>[8]</sup>。*GmPHD3* 属于 PHD-finger 转录因子家族成员,PHD-finger 转录因子在动物结构和功能研究已很透彻,但在植物中的研究较少,直到 1993 年才第一次在拟南芥中发现并命名为 HAT3.1,该类转录因子家族在植物中的研究才逐步加深,在水稻、玉米、大豆等多主要农作物中都有发现<sup>[9-12]</sup>。后经研究发现 PHD-finger 转录因子含有典型的 Plant Homeodomain finger 结构域,故将该类转录因子统称为 PHD-finger 转录因子家族<sup>[13]</sup>。PHD-finger 转录因子参与植物生长发育、光周期途径、响应多种非生物胁迫等生命活动过程,同时也是重要的组蛋白阅读器<sup>[14-16]</sup>。Wei 等<sup>[17]</sup>对大豆干旱和盐胁迫下的表达谱鉴定发现 6 个 PHD-finger 转录因子家族基因,将它们命名为 *GmPHD1-6*,后续研究发现不同转录因子对不同的逆境胁迫的响应存在差异,但该研究主要围绕盐胁迫和干旱胁迫展开,并未涉及高温高湿胁迫和种子活力变化。

大豆中 PHD-finger 转录因子相关研究鲜有报道,*GmPHD3* 参与高温高湿胁迫下调控作用的研究也未见报道。本研究分离 *GmPHD3* 基因,对其编码的蛋白进行亚细胞定位;分析 *GmPHD3* 在大豆不同组织的表达特性,研究其在高温高湿胁迫下的表达情况;探明 *GmPHD3* 基因对提高大豆高温高湿胁迫抗性 & 提高种子劣变抗性的影响,为大豆抗逆分子育种奠定理论基础。本研究旨在推动南方春大豆抗逆分子育种发展,为大豆抗逆育种提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试大豆品种为湘豆 3 号和宁镇 1 号,均由本实验室保存。供试烟草为本氏烟草,种植于南京农业大学理科楼人工气候培养室。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自安徽吐露港生物科技公司,酵母感受态 AH109 为本实验室留存。

### 1.2 试验设计

将湘豆 3 号和宁镇 1 号播种于高 30 cm 的花盆中,室外培养。为了解 *GmPHD3* 基因在大豆不同组织中的表达特性,取第一叶期 (V1) 的根、茎和叶、盛花期 (R2) 的花、盛荚期 (R4) 的 2 cm 幼荚、鼓粒期 (R5) 的 3 mm 幼嫩籽粒、完熟期 (R8 期) 的成熟种子进行 qRT-PCR 试验。分别从 3 株大豆取样,取完样后立即进行液氮冷冻并放入 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱超低温保存。

待大豆生长至生理成熟期 (R7) 时,将植株移至人工气候培养箱进行高温高湿胁迫处理,同时设置空白对照和单胁迫对照 (高温对照、高湿对照)。处理条件参照 Liu 等<sup>[18]</sup>的方法,高温条件为:白天 40  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 75%、10 h,夜晚 20  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 70%、14 h;高湿条件为:白天 30  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 100%、10 h,夜晚 20  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 70%、14 h。分别从处理组和对照组中取 3 株大豆处理 0, 6, 12, 24, 48, 96 和 168 h 的籽粒样品,迅速放入液氮冻存,提取不同胁迫时长的籽粒 RNA 样品并反转成 cDNA 后进行 qRT-PCR 试验。

### 1.3 方法

1.3.1 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 以大豆各生长时期的不同组织为材料,采取 Trizol 法<sup>[2]</sup>提取大豆各组织 RNA,使用 1.5% 琼脂糖凝胶检测所提取 RNA 的质量, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用;采用 Prime-Script<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 合成 cDNA 第一链, -20  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存备用。

1.3.2 基因的分离与生物信息学分析 根据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公布的 *GmPHD3* (GenBank: AB197242.1) 的 CDS 序列,使用 Primer premier 5.0 软件设计扩增引物, *GmPHD3*-F: 5'-ATCAGGTCATTTATGGGAGTCAGG-3'; *GmPHD3*-R: 5'-TCAAACATAAAACTATCCATCAGC-3'。分别以湘豆 3 号和宁镇 1 号的 DNA 和 cDNA 为模板,使用高保真酶 *Ex Taq*<sup>®</sup> (RR001Q, TaKaRa, 日本) 扩增 *GmPHD3* 基因片段, PCR 程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性

2 min,95 ℃变性 5 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 50 s,32 个循环,72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 ToloPrep 柱式 PCR 纯化/胶回收试剂盒 (Tolobio) 纯化目的产物后,连接 pMD19-T (TaKaRa) 载体,转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,培养 12 h 后,挑取单克隆进行菌落 PCR (PCR 程序同上),选取阳性单克隆送安徽通用生物科技公司测序,使用 BioXM 软件对测序结果进行比对分析,测序正确的单克隆经 ToloPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒后置于 -20 ℃备用。在 NCBI 数据库搜索同源序列并下载,使用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树,采用邻接法 (NJ) 进行亲缘关系分析<sup>[19]</sup>;使用 Pfam 网站对蛋白的保守结构域进行在线分析;使用 DNAMAN 8.0 软件进行氨基酸序列多重比对。

1.3.3 亚细胞定位载体构建及蛋白定位观察 以目的基因 *GmPHD3* 的 ORF 为模板设计特异引物,*pA7-PHD-F*:5'-CATTTACGAACGATACTCGAGATGGA-GGCGCTAAGTCGCT-3';*pA7-PHD-R*:5'-CACCATCA-CTAGTACGTCGACGCGAGCTCTCTTGTACTG-3'。以阳性单克隆菌液为模板进行 PCR 扩增,产物经

ToloPrep 柱式 PCR 纯化/胶回收试剂盒 (Tolobio) 纯化后置于 4 ℃备用。根据同源重组原理,利用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Sal* I (TaKaRa) 对 *pA7-GFP* 载体进行酶切,通过同源重组试剂盒将酶切后的载体与胶回收得到的目的片段进行连接,得到 *pA7::GmPHD3* 重组质粒,置于 -20 ℃保存。

取四叶期的本氏烟草幼嫩叶片,用无菌水冲洗干净并除去主叶脉,将背面朝上置于 MS 固体培养基上,备用。使用 PDS-1000/He 基因枪 (Bio-Rad) 将重组质粒转化到烟草叶片细胞中,25 ℃暗培养 12 ~ 16 h。使用 LSM 780 激光共聚焦显微镜 (Zeiss) 观察 GFP 蛋白表达信号并拍照。

1.3.4 酵母表达载体构建及转录激活活性分析 酵母表达载体构建方法与亚细胞定位载体相同,选择酵母表达载体 pGBKT7,使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I (TaKaRa) 对载体进行酶切,并根据 *GmPHD3* 基因的不同结构域区间分段构建载体,引物信息见表 1,分别转化酵母 AH109 感受态,在营养缺陷型培养基 SD/Trp 和 SD/-Trp/-His 上培养 2 ~ 3 d,观察酵母生长情况。

表 1 转录激活试验引物  
Table 1 Sequences of primers used intrascriptional activation test

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primers sequence(5'-3')	片断区间 Segment interval
full-F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGAGGCGCTAAGTCGCT	基因全长 (1 ~ 246 aa)
full-R	CCGCTGCAGGTCGACGGATCCGCGAGCTCTCTTGTACTG	
Alfin-F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCCTCCGTGGAAGACGTATTTCG	Alfin 结构域 (1 ~ 140 aa)
Alfin-R	CCGCTGCAGGTCGACGGATCCTGCTGTAACAACTTCAAAT	
Unknow-F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCGCAAAGAAACAAGTTAAAG	未知功能域 (141 ~ 191 aa)
Unknow-R	CCGCTGCAGGTCGACGGATCCATGCCCCACACAAGGTATC	
Alfin + unknow-F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCCTCCGTGGAAGACGTATTTCG	Alfin 结构域 + 功能未知域 (1 ~ 191 aa)
Alfin + unknow-R	CCGCTGCAGGTCGACGGATCCATGCCCCACACAAGGTATC	
PHD-F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGTACTGAGAATTATGG	PHD 结构域 (192 ~ 246 aa)
PHD-R	CCGCTGCAGGTCGACGGATCCGCGAGCTCTCTTGTACTG	
Unknow + PHD-F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCGCAAAGAAACAAGTTAAAG	功能未知域 + PHD 结构域 (141 ~ 246 aa)
Unknow + PHD-R	CCGCTGCAGGTCGACGGATCCGCGAGCTCTCTTGTACTG	

1.3.5 qRT-PCR 分析 采用 Trizol 法<sup>[2]</sup>提取大豆不同生长时期的不同组织的 RNA 样品和不同胁迫时长的大豆籽粒 RNA 样品,并使用 ToloScript RT EasyMix for qPCR + 2-Step gDNA Erase-Out RNA 反

转录试剂盒 (Tolobio) 进行反转录合成 cDNA。以 *Actin* 为内参基因,使用 Primer premier 5.0 软件设计扩增引物,*Actin-F*:5'-GTTCTCTCCTTGTATGCAAGTG-3';*Actin-R*: 5'-CCAGACTCATCATATTCACCTTTAG-3';

qRTPHD-F: 5'-GCTCTTACCACCGATGTTG-3'; qRTPHD-R: 5'-GGCAAGGGCAAGTAACCAT-3'。PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 20 s,40 个循环;读取荧光值,72 ℃ 孵育 10 min,读取熔解曲线。每个反应设置 3 个重复。

1.4 数据分析

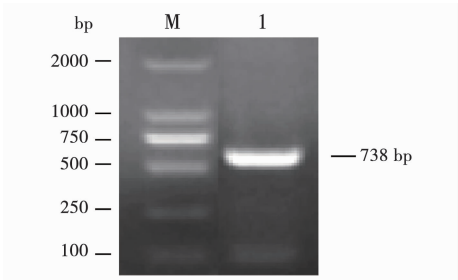
采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[2]</sup> 分析基因的相对表达量,使用 Excel 2007 对数据进行处理,使用 SPSS 18.0 软件的单因素随机区组方法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 基因的分离与生物信息学分析

分别以湘豆 3 号和宁镇 1 号 cDNA 为模板,并以特异引物扩增目标序列,得到与目标序列大小相似的条带(图 1),经测序比对后发现该序列长度为 738 bp,与 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公布的 *GmPHD3* (GenBank: ABI97242.1) 序列相同,并且在 2 个品种中无差异。不同物种序列的进

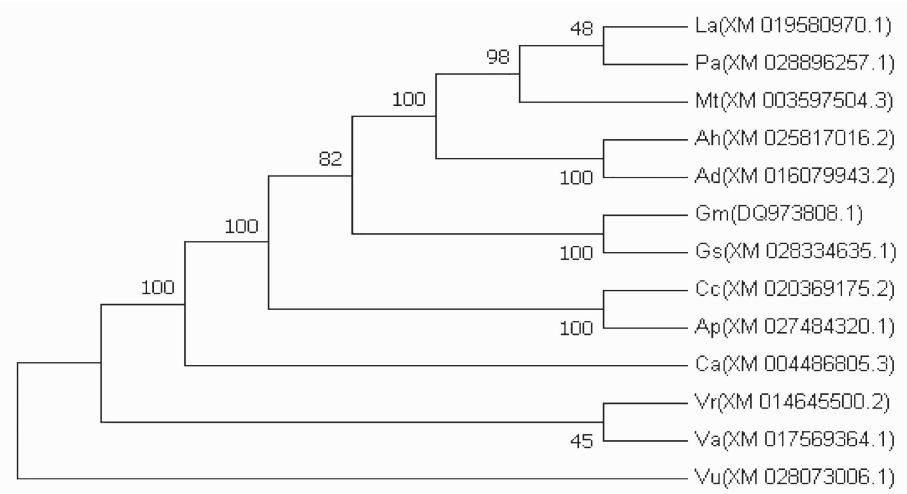
化树结果显示,同源性较高的序列均来自豆科植物(图 2)。保守结构域分析结果表明 *GmPHD3* 编码蛋白的第 7~134 个氨基酸为 Alfin 结构域,第 193~243 个氨基酸为 PHD-finger 结构域(图 3)。对同源性较高的 4 条序列进行氨基酸序列比对,发现这几条氨基酸序列 C 端均含有 PHD-finger 结构域(图 4)。



M:2 000 bp Marker; 1: *GmPHD3* 扩增产物。  
M: 2 000 bp marker; 1: *GmPHD3* PCR amplified product.

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplified product



La:羽扇豆; Pa:白牧豆树; Mt:蒺藜苜蓿; Ah:落花生; Ad:蔓花生; Gm:大豆; Gs:野大豆; Cc:木豆; Ap:非洲相思子; Ca:鹰嘴豆; Vr:绿豆; Va:赤豆; Vu:豇豆。

La: *Lupinus angustifolius*; Pa: *Prosopis alba*; Mt: *Medicago truncatula*; Ah: *Arachis hypogaea*; Ad: *Arachis duranensis*; Gm: *Glycine max*; Gs: *Glycine soja*; Cc: *Cajanus cajan*; Ap: *Abrus precatorius*; Ca: *Cicer arietinum*; Vr: *Vigna radiata*; Va: *Vigna angularis*; Vu: *Vigna unguiculata*.

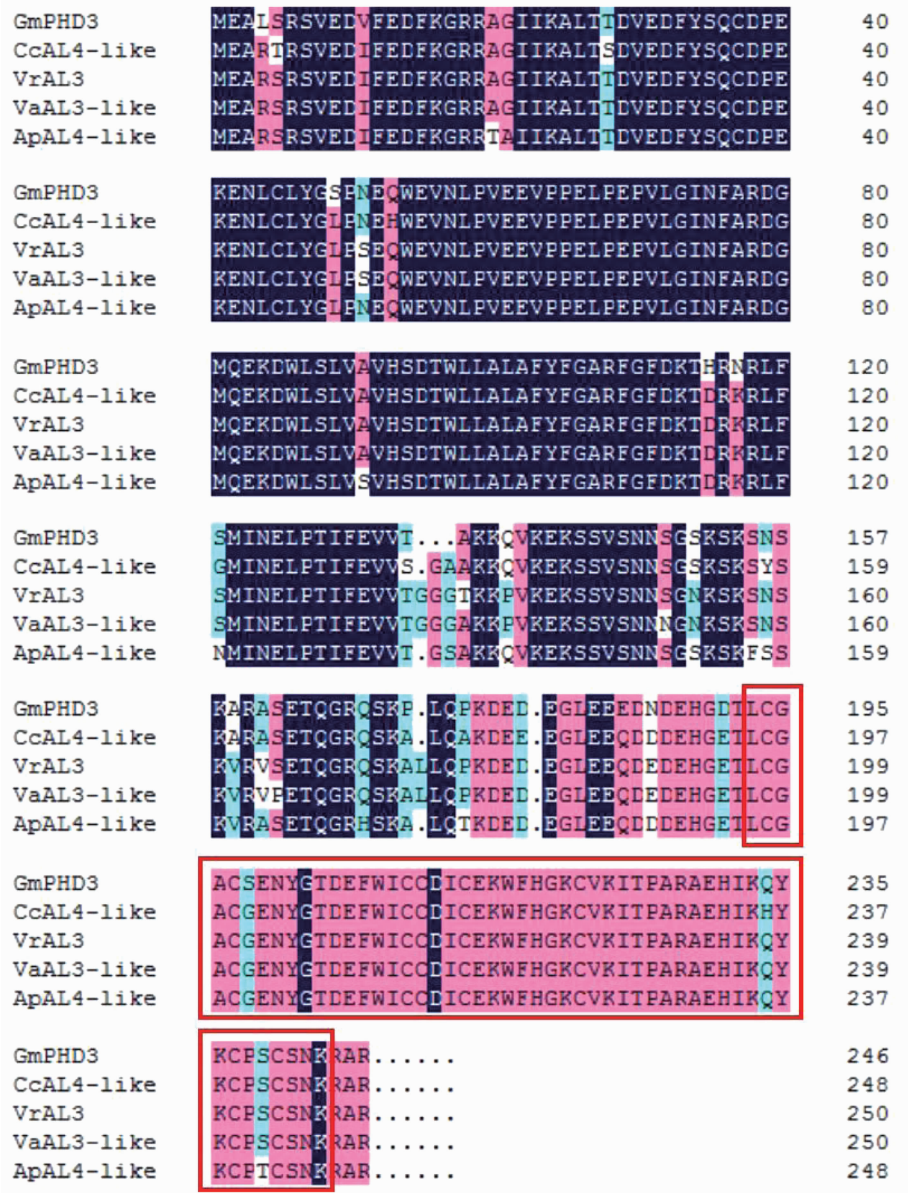
图 2 不同物种 PHD-finger 家族系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of PHD-finger family with various organisms



图 3 *GmPHD3* 基因编码蛋白的结构示意图

Fig. 3 Schematic representation of the structure of protein coded by *GmPHD3*



红色方框部分为 PHD-finger 结构域。  
The red box indicates the PHD-finger domain.

图 4 GmPHD3 与其它物种氨基酸序列多重比对

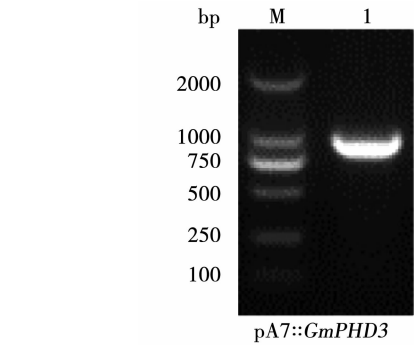
Fig. 4 Multiple alignment of the GmPHD3 amino acid sequences and other plants

2.2 GmPHD3 蛋白的亚细胞定位

GmPHD3 蛋白定位于细胞核内,并与核 Marker 蛋白 mCherry 重合,而对照蛋白定位于细胞膜上和细胞核内(图 5 和 6)。表明 *GmPHD3* 编码产物定位于细胞核内。

2.3 转录激活活性分析

酵母转录激活结果显示:组合 pGBKT7-full/pGBKT7、pGBKT7-Alfin + unknow/pGBKT7、pGBKT7-Alfin/pGBKT7 的菌液可在 SD/-Trp/-His 缺陷型培养基上生长,其它组合不能在缺陷型培养基上生长(图 7)。表明 GmPHD3 全长有转录激活活性,转录激活域为 N 端 Alfin 结构域,C 端 PHD-finger 结构域无自激活活性。



M:2 000 bp Marker; 1: pA7::GmPHD3 载体。  
M: 2 000 bp marker; 1: Vector pA7::GmPHD3.

图 5 亚细胞定位载体 pA7::GmPHD3 的酶切验证  
Fig. 5 Enzyme digestion identification of subcellular localization vector pA7::GmPHD3



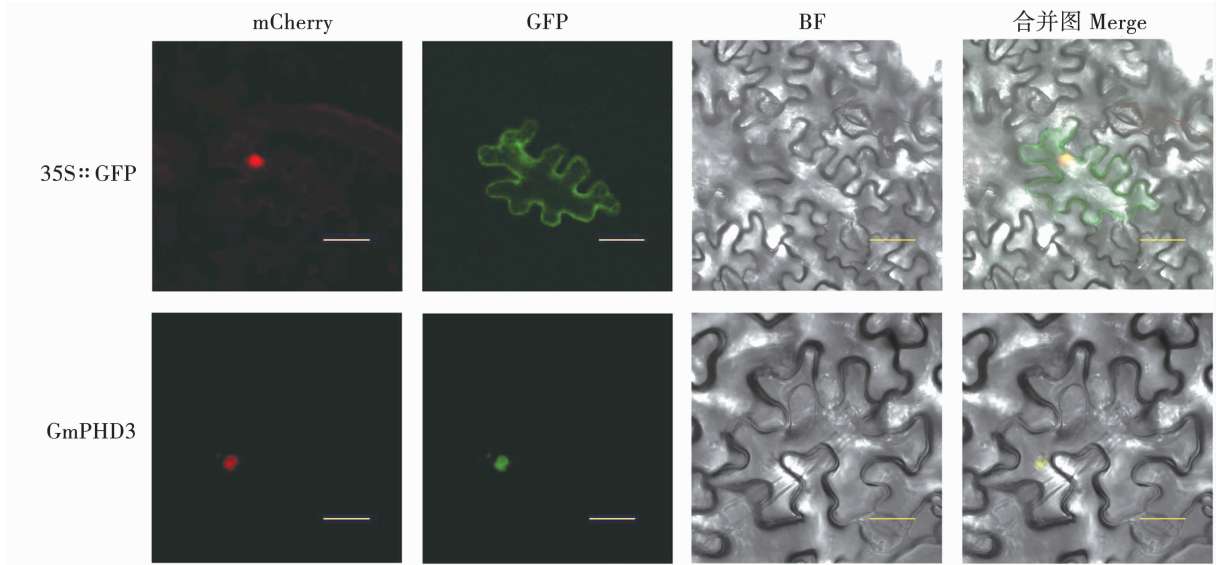


图 6 *GmPHD3* 蛋白亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of *GmPHD3* protein

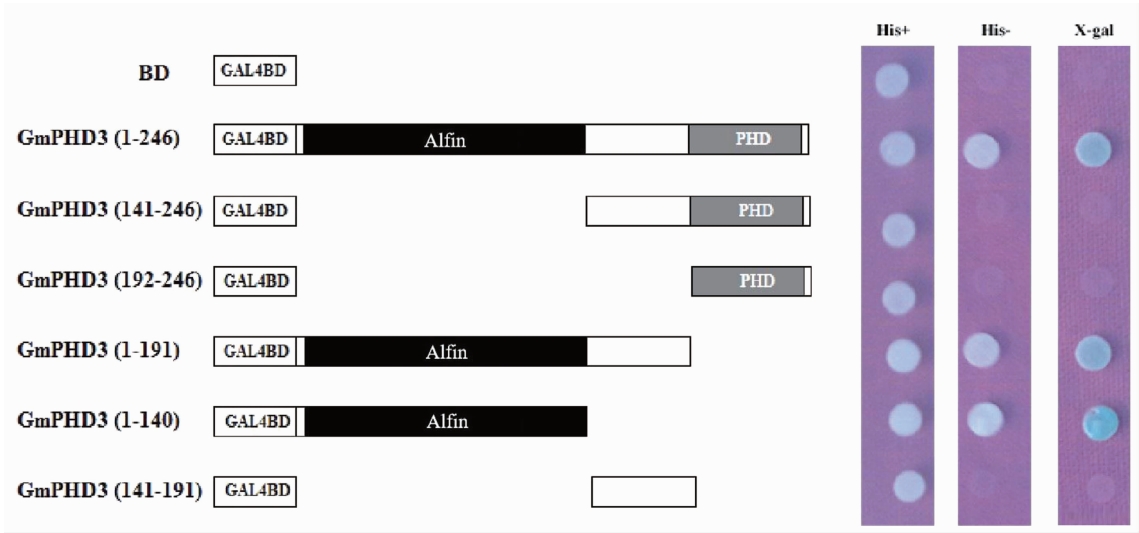


图 7 *GmPHD3* 转录激活活性分析

Fig. 7 Analysis of transactivation activity of *GmPHD3*

2.4 组织表达模式分析

2 个品种的不同组织的基因表达量存在差异, 湘豆 3 号的根、茎、叶、花、成熟的荚和幼嫩的籽粒中的基因表达量均显著高于宁镇 1 号, 在幼嫩的荚和成熟的籽粒中的表达量与宁镇 1 号的表达量差异不显著(图 8)。结果表明生理成熟期时 *GmPHD3* 基因在湘豆 3 号荚和籽粒中的表达量均高于宁镇 1 号。

2.5 高温高湿胁迫下的基因表达模式分析

在 2 个品种中, *GmPHD3* 的基因表达量均呈现

出先升高后下降再上升的趋势, 呈现出阶段性的变化, 若以 1 d 的 24 h 为 1 个周期, 第一个周期内 0, 6, 12 和 24 h 的表达量呈现出先升高再下降的趋势, 6 h 时的表达量最高, 12 h 后表达量下降推测是因为夜间温度降低, 植株自身调节导致表达量下降; 第二至七个周期的 48, 96 和 168 h, 基因表达量呈现出持续升高趋势(图 9)。结果表明 *GmPHD3* 响应高温高湿胁迫, 并随着时间的延长而呈现出基因表达量持续升高的趋势。

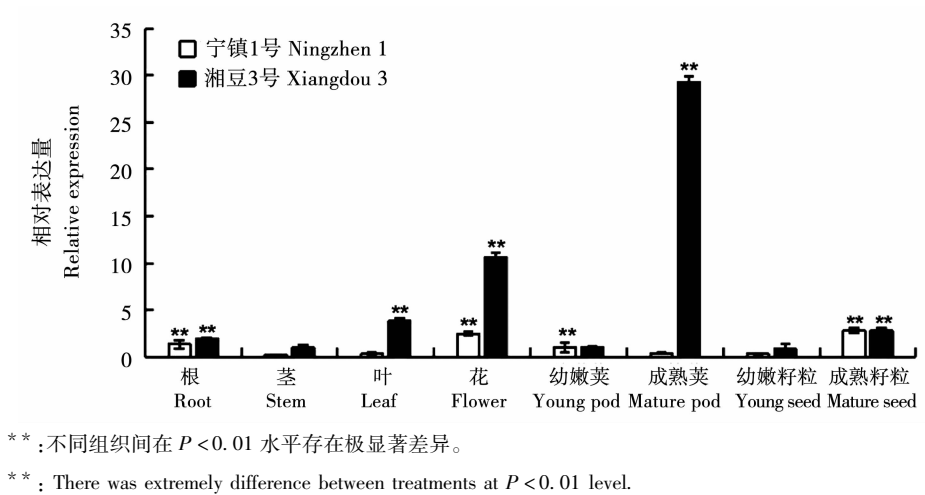
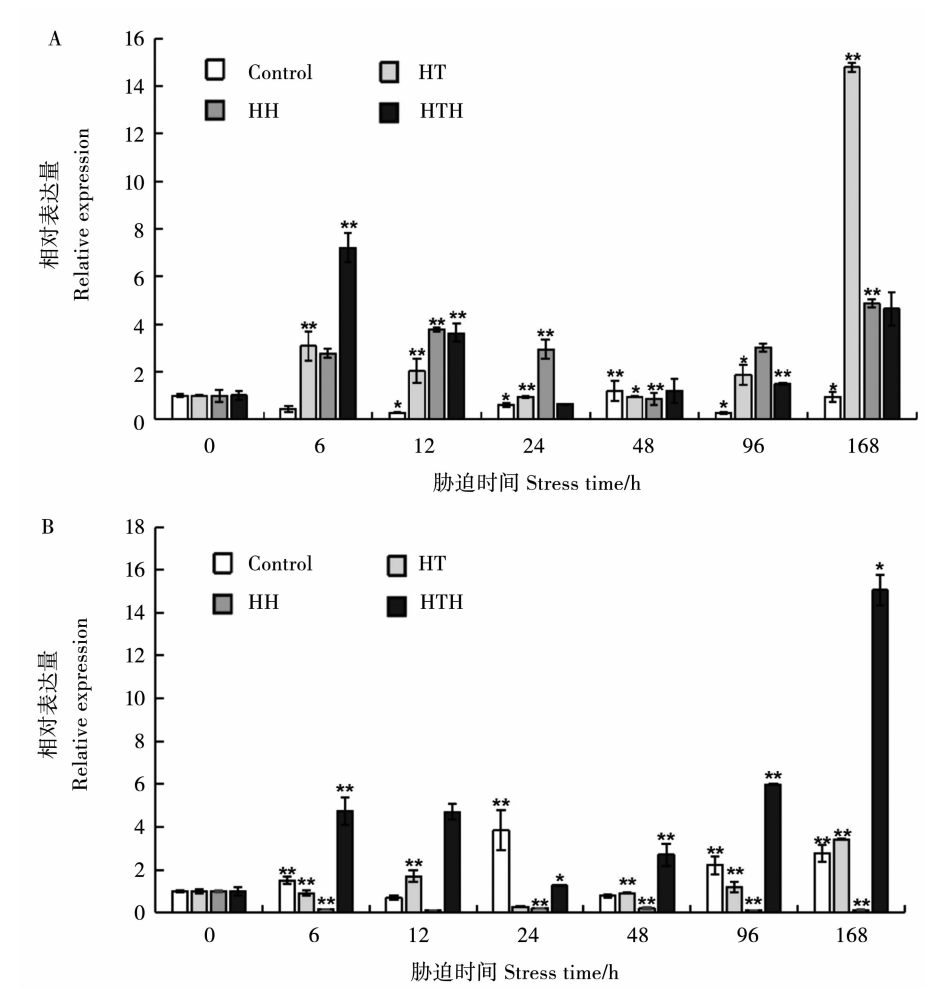


图 8 大豆 *GmPHD3* 基因在两个品种不同组织中的表达量分析

Fig. 8 The relative expression of *GmPHD3* gene in different soybean organs of the two cultivars



A: 湘豆 3 号; B: 宁镇 1 号; Control: 空白对照; HT: 高温处理对照; HH: 高湿处理对照; HTH: 高温高湿胁迫处理; \*: 不同处理间在  $P < 0.05$  水平存在极显著差异; \*\*: 不同处理间在  $P < 0.01$  水平存在极显著差异。  
A: Xiangdou 3; B: Ningzhen 1; Control: No treatment control; HT: High temperature treatment control; HH: High humidity treatment control; HTH: High temperature and humidity treatment; \*: There was significant difference between treatments at  $P < 0.05$  level; \*\*: There was extremely significant difference between treatments at  $P < 0.01$  level.

图 9 不同高温高湿处理时 *GmPHD3* 在两个大豆品种成熟籽粒中的表达量分析

Fig. 9 The relative expression of *GmPHD3* gene in mature seeds of the two soybean varieties under different high temperature and high humidity treatment

3 讨 论

PHD-finger 转录因子家族基因参与植物生长发育多个环节,在不同植物的不同组织中的表达情况存在差异,如当拟南芥在缺 P 条件下,*ALFIN-LIKE 6* 在根中高表达,能够促进根毛的伸长生长<sup>[20]</sup>; *VIN3* 编码的 PHD-finger 结构域特异性结合三甲基化的组蛋白 H3K27,调节拟南芥春化作用<sup>[21]</sup>;在香蕉果实成熟过程中,*MaPHD1* 基因的表达可抑制细胞壁降解基因 *MaXTH6* 的表达,从而抑制细胞壁降解<sup>[22]</sup>。本研究结果表明生理成熟期时,*GmPHD3* 在抗性品种湘豆 3 号籽粒中的表达量高于不抗品种宁镇 1 号,所以推测 *GmPHD3* 可能参与种子活力形成过程;并且当大豆生理成熟期遭遇高温高湿胁迫时,提高大豆高温高湿胁迫抗性,缓解了种子活力迅速下降的情况。

PHD-finger 转录因子家族基因响应多种非生物胁迫,在拟南芥中过表达 *ALS* 基因可提高拟南芥干旱胁迫和盐胁迫抗性<sup>[23]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup> 对玉米进行全基因组分析发现 77 个 PHD-finger 转录因子家族基因,其中 *ZmPHD7/14/19/30/39* 等基因可提高植株 ABA 抗性。在大豆中对 PHD-finger 转录因子家族基因的研究也有过报道,如 *GmPHD5* 和 *GmPHD6* 均提高植株对盐胁迫的抗性<sup>[24-25]</sup>。本研究中,通过进行实时荧光定量后发现,对大豆施加高温高湿胁迫后,基因表达量呈现出持续升高的趋势,说明随着胁迫时间的延长而出现 *GmPHD3* 的逐渐累积,推测 *GmPHD3* 基因响应高温高湿胁迫,并提高植株高温高湿胁迫抗性。该研究结果对南方春大豆种植区耐逆分子育种提供了一定的理论依据。

PHD-finger 结构域常参与转录调控过程,在拟南芥种子发育过程中,AL PHD-PRC1 复合体可促使组蛋白 H3K4me3 向 H3K27me3 转换来抑制种子发育相关基因的表达,从而调节种子萌发进程<sup>[26]</sup>。Li 等<sup>[27]</sup> 研究发现,拟南芥 SHL 和 EBS 两个蛋白均含有 BAH 和 PHD 结构域,并可与 EMF1 互作后形成复合体,从而特异识别 H3K27me3 来抑制靶基因的表达,调控植物生长发育。本研究亚细胞定位结果显示 *GmPHD3* 蛋白定位于细胞核内,由此推测该蛋白可能参与转录调控环节,该结果对研究大豆种子萌发和生长发育提供了新的思路。

4 结 论

本研究通过分离得到 *GmPHD3* 基因全长序列,

并对基因结构、系统进化关系、亚细胞定位、组织特异性表达和胁迫下的表达模式进行分析,对此基因有了更充分地认识,并发现生理成熟期时 *GmPHD3* 基因在湘抗性品种豆 3 号荚和籽粒中的表达量均高于不抗品种宁镇 1 号,这为进一步研究该基因在大豆高温高湿胁迫下的调控机制研究奠定了试验基础和理论依据,也有助于推动种子田间劣变抗性育种的进程。

参考文献

[1] 查霖,钟宣伯,周启政,等. 我国大豆产业发展现状及振兴策略[J]. 大豆科学, 2018, 37(3): 458-463. (Zha T, Zhong X B, Zhou Q Z, et al. Development status of China's soybean industry and strategies of revitalizing[J]. Soybean Science, 2018, 37(3): 458-463. )

[2] 舒英杰,周玉丽,陶源,等. 生理成熟期高温高湿胁迫对春大豆种子生理特性及种子劣变相关基因 *GmSbhl* 表达的影响[J]. 生态学杂志, 2016, 35(12): 3286-3292. (Shu Y J, Zhou Y L, Tao Y, et al. Effects of high temperature and humidity stress on the physiological characters of spring soybean seeds and the expression of seed deterioration-related gene *GmSbhl* at the physiological maturity stage [J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(12): 3286-3292. )

[3] 宋利茹,王爽,牛娟,等. 春大豆种子田间劣变性和劣变抗性的差异蛋白质组学研究[J]. 中国农业科学, 2015, 48(1): 23-32. (Song L R, Wang S, Niu J, et. al. Differentially proteomics analysis of pre-harvest seed deterioration and deterioration resistance in spring soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(1): 23-32. )

[4] 朱雅婧,周亚丽,刘骥骅,等. *GmHMADP* 参与高温高湿下大豆种子活力形成及铜镉胁迫响应的研究[J]. 中国农业科学, 2018, 51(14): 2642-2654. (Zhu Y J, Zhou Y L, Liu S S, et al. *GmHMADP* involved in seed vigor formation of soybean under high temperature and humidity stress and its study responsive to copper and cadmium stress [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(14): 2642-2654. )

[5] 王芳,王丽群,田鑫,等. 中国南方春大豆收获前后种子劣变的抗性研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2637-2647. (Wang F, Wang L Q, Tian X, et al. Pre-harvest and post-harvest seed deterioration resistance of spring soybean germplasm in South China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11): 2637-2647. )

[6] Wang L Q, Ma H, Song L R, et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(7): 2109-2127.

[7] Shu Y J, Tao Y, Wang S, et al. *GmSBHL*, a homeobox transcription factor gene, relates to growth and development and involves in response to high temperature and humidity stress in



soybean[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(11): 1927-1937.

[8] Chen M, Qian P P, Wang Z K, et al. Identification and functional analysis of soybean *GmSBHI* gene promoter conferring high temperature and humidity-induced expression[J]. Turkish Journal of Botany, 2019, 43: 431-443.

[9] Schindler U, Beckmann H, Cashmore A R. HAT3. 1, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region[J]. The Plant Journal, 1993, 4(1):137-150.

[10] Sun M Z, Jia B W, Yang J K, et al. Genome-wide identification of the PHD-finger family genes and their responses to environmental stresses in *Oryza sativa* L. [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18: 2005.

[11] Wang Q Q, Liu J Y, Wang Y, et al. Systematic analysis of the maize PHD-Finger gene family reveals a subfamily involved in abiotic stress response [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16: 23517-23544.

[12] 杨珺凯, 沈阳, 才晓溪, 等. 大豆 PHD 家族蛋白的全基因组鉴定及表达特征分析[J]. 作物杂志, 2019(3): 55-65. (Yang J K, Shen Y, Cai X X, et al. Genome-wide identification and expression patterns analysis of the PHD family protein in *Glycine max*[J]. Crops, 2019(3): 55-65. )

[13] Mariann B. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2005, 31(1): 35-40.

[14] Sung S B, Schmitz R J, Amasina R M. A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in *Arabidopsis*[J]. Genes and Development, 2006, 20: 3244-3248.

[15] Tao J J, Wei W, Pan W J, et al. An Alfin-like gene from *Atriplex hortensis* enhances salt and drought tolerance and abscisic acid response in transgenic *Arabidopsis*[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 2707.

[16] Sanchez R, Zhou M M. The PHD finger: A versatile epigenome reader[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2011, 36(7): 364-372.

[17] Wei W, Huang J, Hao Y J, et al. Soybean GmPHD-type transcription regulators improve stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e7209.

[18] Liu S S, Liu Y M, Jia Y H, et al. *GmI-MMP* is involved in growth and development of leaf and seed, and enhances tolerance to high temperature and humidity stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Science, 2017, 259: 48-61.

[19] 金玲, 张浩, 王松明, 等. 大豆 *GmAMS* 基因及其启动子的克隆和表达分析[J]. 大豆科学, 2019, 38(6): 889-897. (Jin L, Zhang H, Wang S M, et al. Cloning and expression analysis of *GmAMS* gene and its promoter in soybean[J]. Soybean Science, 2019, 38(6): 889-897. )

[20] Chandrika N N P, Sundaravelpanddian K, Yu S M, et al. ALFIN-LIKE6 is involved in root hair elongation during phosphate deficiency in *Arabidopsis* [J]. The New phytologist, 2013, 198(3): 709-720.

[21] Kim D H, Sung S B. The binding specificity of PHD-finger domain of VIN3 moderates vernalization response [J]. Plant Physiology, 2017, 173: 1258-1268.

[22] Wei W, Fan Z Q, Chen J Y, et al. A banana PHD-type transcription factor *MaPHD1* represses a cell wall-degradation gene *MaXTH6* during fruit ripening [J]. Horticultural Plant Journal, 2017, 3(5): 190-198.

[23] Wei W, Zhang Y Q, Tao J J, et al. The Alfin-like homeodomain finger protein AL5 suppresses multiple negative factors to confer abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2015, 81(6): 871-883.

[24] Wu T, Pi E X, Tsai S N, et al. GmPHD5 acts as an important regulator for crosstalk between histone H3K4 di-methylation and H3K14 acetylation in response to salinity stress in soybean[J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 178.

[25] Wei W, Tao J J, Chen H W, et al. A histone code reader and a transcriptional activator interact to regulate genes for salt tolerance [J]. Plant Physiology, 2017, 175: 1304-1320.

[26] Anne M M, Bu Z Y, Yu Y, at el. *Arabidopsis* AL PHD-PRC1 complexes promote seed germination through H3K4me3-to-H3K27me3 chromatin state switch in repression of seed developmental genes[J]. PLoS Genetics, 2014, 10(1): e1004091.

[27] Li Z C, Fu X, Wang Y Z, et al. Polycomb-mediated gene silencing by the BAH-EMF1 complex in plants [J]. Nature Genetics, 2018, 50(9): 1254-1261.