



# 大豆 *GmPM31* 基因生物信息学、组织表达及高温高湿响应分析

刘骥骅<sup>1</sup>,邱颖胜<sup>1</sup>,刘燕敏<sup>1</sup>,李 阳<sup>2</sup>,魏家萍<sup>3</sup>,沈英姿<sup>4</sup>,吴酬飞<sup>2</sup>

(1. 湖州学院 理工学院,浙江 湖州 313000; 2. 湖州师范学院 生命科学学院,浙江 湖州 313000; 3. 甘肃农业大学 农学院/农作物生物学国家重点实验室,甘肃 兰州 730070; 4. 南京农业大学 农学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

**摘 要:** sHSPs 家族基因 *GmPM31* 具有典型的 ACD 结构域,为了预测和研究 *GmPM31* 的功能,本研究以田间劣变抗性春大豆湘豆 3 号为材料,分离 *GmPM31* 及其启动子序列,对该基因的结构及启动子上的顺式作用元件进行生物信息学分析,采用 qRT-PCR 方法对 *GmPM31* 的组织表达模式及高温高湿处理下的表达量变化进行分析。结果表明:*GmPM31* 基因的 ORF 全长为 459 bp,编码 153 个氨基酸,包含 1 个 ACD 保守域结构。蛋白质系统进化树分析结果显示,*GmPM31* 与 CI(Class I)亚家族的 sHSPs 同源性较高,表明 *GmPM31* 属于 Class I sHSPs 家族成员。*GmPM31* 基因启动子中有多个逆境胁迫响应元件,包括激素应答相关元件 ABRE、ERE 和 AAGAA-motif 等,干旱和冷胁迫相关的 MYB 和 MYC 转录因子作用元件,高盐胁迫相关元件 Box III,厌氧胁迫相关元件 ARE 等。qRT-PCR 结果显示,*GmPM31* 在成熟种子中大量表达,其次在幼荚和叶片中表达,在根、茎和花中表达量极低。种子发育过程中,*GmPM31* 表达量呈现先上升后下降的趋势,在开花后第 45 天表达量达到最大。高温高湿胁迫处理 96 和 168 h 时种子中 *GmPM31* 的表达量显著高于对照组,说明高温高湿胁迫诱导种子中 *GmPM31* 上调表达。研究结果表明 *GmPM31* 参与了春大豆种子的发育以及高温高湿胁迫响应过程。

**关键词:** 春大豆; *GmPM31*; 生物信息学分析; 顺式作用元件; 表达; 种子; 高温高湿

## Analysis of Soybean *GmPM31* Bioinformatics, Tissue Expression and Response to High Temperature and High Humidity

LIU Su-shuang<sup>1</sup>, QIU Ying-sheng<sup>1</sup>, LIU Yan-min<sup>1</sup>, LI Yang<sup>2</sup>, WEI Jia-ping<sup>3</sup>, SHEN Ying-zi<sup>4</sup>, WU Chou-fei<sup>2</sup>

(1. Institute of Science and Technology, Huzhou College, Huzhou 313000, China; 2. School of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China; 3. College of Agriculture, Gansu Agricultural University/State Key Laboratory of Aridland Crop Biology, Lanzhou 730070, China; 4. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** *GmPM31* contains a typical ACD domain of the sHSPs family. In order to predict and study the function of *GmPM31*, we isolated the sequence of *GmPM31* and its promoter from spring field deterioration resistant soybean Xiangdou 3, and resistance the structure and *cis*-regulatory element of *GmPM31* by bioinformatics. In addition, we analyzed the tissue expression pattern and the expression levels of *GmPM31* under high temperature and high humidity by qRT-PCR. The results showed that the complete ORF of *GmPM31* was 459 bp. *GmPM31* encoded 153 amino acids and contained a highly conserved ACD domain. The results of the evolutionary tree showed that *GmPM31* has high homology with the Class I sHSPs, so we speculated *GmPM31* may belong to the Class I sHSPs family. The prediction result of promoter *cis*-elements showed that the *GmPM31* promoter contained many stress responsive elements such as hormone responsive element ABRE, ERE, AAGAA-motif, element involved in MYB and MYC transcription factors related to drought and cold stress, high salt stress responsive element Box III, and anaerobic stress responsive element ARE. qRT-PCR results showed that the highest expression level of *GmPM31* was found in mature seeds, followed by in young pods and leaves, and a lowest expression level in root, stems, leaves and flowers. Over the seed developing, the expression of *GmPM31* increased at first and then decreased, and reached higher levels at 45 d after flowering. Compared to the corresponding control, the expression of *GmPM31* in seeds was significantly higher at 96 and 168 h under high temperature and high humidity stress, which indicated that *GmPM31* in seeds was up-regulated by high temperature and high humidity stress. These results showed that *GmPM31* was involved in the development of spring soybean seeds and the response to high temperature and high humidity stress.

**Keywords:** Spring soybean; *GmPM31*; Bioinformatics analysis; *Cis*-element; Expression; Seed; High temperature and high humidity stress

我国南方是重要的春大豆产区,该区域是我国多种蛋白类豆制品加工的重要大豆原料产地之一。然而在种子成熟时期,正值高温、多雨的夏季(6 月底至 8 月初),春大豆种子极易发生田间劣变,导致

种子活力的下降甚至丧失,造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。

前期研究发现大豆基质金属蛋白酶 Gm2-MMP 参与了春大豆种子田间劣变抗性过程<sup>[2]</sup>,进一步以

收稿日期:2021-04-14

基金项目:浙江省自然科学基金(LQ20C130003);浙江省教育厅一般科研项目(YZ0Z145972)。

第一作者:刘骥骅(1990—),男,博士,讲师,主要从事种子学和植物耐逆分子生物学研究。E-mail:837870552@qq.com。

通讯作者:吴酬飞(1980—),男,博士,副教授,主要从事农业微生物生态研究。E-mail:loginst6@163.com。

从 92 份我国南方春大豆地方品种以及推广品种中筛选得到的田间劣变抗性春大豆种质湘豆 3 号<sup>[3]</sup>为试验材料,通过筛选湘豆 3 号的种子膜蛋白酵母双杂交文库,鉴定出能与 Gm2-MMP 互作的蛋白—大豆种子成熟蛋白 GmPM31<sup>[4]</sup>。GmPM31 具有 ACD ( $\alpha$ -crystallin domain) 结构域,属于植物小分子热激蛋白 (small Heat Shock Proteins, sHSPs) 家族<sup>[5]</sup>。sHSPs 是一类分子量约为 12 ~ 42 kDa 的蛋白家族,因其分子量较小,有时也被称做 Hsp20 蛋白<sup>[6]</sup>。根据 sHSPs 在细胞内的定位,可以将其分为六大类:在细胞质或细胞核分布的 CI、CII、CIII 亚家族;在质体分布的 P 亚家族;在内质网分布的 ER 亚家族;在线粒体分布的 M 亚家族<sup>[7]</sup>。ACD 结构域在热激响应中起到分子伴侣的作用<sup>[8]</sup>。sHSPs 在高等植物中极为丰富,且在各细胞器中均有分布<sup>[9]</sup>,其主要的生物学功能是参与植物的生长发育过程,特别是参与植物种子、幼苗的发育过程,在植物非生物逆境胁迫响应等方面也发挥重要功能。通常在适宜的温度下,热激蛋白在植物组织中的表达量较少,受到热激诱导后,热激蛋白才会大量表达,但是 sHSPs 在植物的特定时期也会积累,如种子萌发和种子成熟阶段。玉米 sHSPs 在种子发育以及成熟过程中表达量上升,说明其参与了玉米种子的发育过程<sup>[10]</sup>。Arce 等<sup>[11]</sup>通过对番茄果实成熟期进行转录组测序,发现了 4 个差异表达的 sHSPs,并推测 CI、CII 型 sHSPs 在果实发育中发挥重要作用。对番茄 CI-sHSP 进行 RNAi 可降低番茄成熟果实中蔗糖和果糖含量<sup>[12]</sup>。在拟南芥种子成熟的中期,CI sHSPs 蛋白开始表达,在成熟后期达到最大。向日葵中 CI sHSPs 在种子成熟早期不表达,而在脱水期表达。对 3 个野生大豆和 3 个栽培大豆的种子贮藏蛋白的蛋白质组学差异分析结果显示 PM31 蛋白在开花后 30 d 开始表达,花后 50 d 表达量升高,干种子中表达量最大<sup>[13]</sup>。热激蛋白是指当植物受到干旱、高盐、缺氧以及高温等非生物逆境胁迫影响时,表现为正常蛋白表达受到抑制,而诱导合成新的蛋白或功能增加的应激蛋白。一般认为,在热激情况下热激蛋白可大量表达,指导蛋白质降解并使错误折叠的蛋白质重构,降低细胞结构的损伤,从而增强植物对高温的耐受性<sup>[7]</sup>。另外,热激蛋白在植物非生物逆境胁迫响应如高温、低温和高盐胁迫等方面也发挥重要功能。

目前,大豆中有 51 个 sHSPs 基因已被报道<sup>[14]</sup>。Yu 等<sup>[15]</sup>对两个低植酸大豆突变体进行定量蛋白质组学分析时发现,在两个突变体植株种子萌发时 GmPM31 蛋白差异表达,表明其参与了大豆种子萌

发过程。但是有关 *GmPM31* 在非生物逆境胁迫响应中的作用,特别是参与高温高湿胁迫下的种子田间劣变的机理尚未见报道。本研究对 NCBI 公布的 *GmPM31* 基因及其上游启动子序列进行特异性扩增,使用 PlantCARE 网站对 *GmPM31* 启动子中的顺式作用元件进行预测分析,利用 qRT-PCR 对 *GmPM31* 在湘豆 3 号品种的各组织器官、种子发育过程及高温高湿胁迫下的表达情况进行分析,以期揭示 *GmPM31* 在非生物逆境胁迫响应中的分子机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试品种为田间劣变抗性春大豆种质湘豆 3 号<sup>[3]</sup>。

### 1.2 试验设计

下载 NCBI 公布的 *GmPM31* 序列(基因登陆号: NM\_001251076.2)进行生物信息学分析。

于田间采集用于 *GmPM31* 基因组织特异性表达分析的大豆样品。一节期(V1)采集根、茎和叶,盛花期(R2)采集花,盛荚期(R4)采集幼荚,完熟期(R8)采集成熟的种子。

在大豆开花后不同时间分别取整个豆荚,用于分析种子发育时期 *GmPM31* 基因的表达情况。开花后 15 ~ 60 d 取样,每 5 d 取样 1 次,3 次重复。

将生理成熟期(R7)大豆种子于盆钵中播种,每盆 3 株,按常规方法管理。设置两个处理用于分析高温高湿胁迫下劣变抗性大豆种质湘豆 3 号 *GmPM31* 基因的表达情况。高温高湿胁迫处理:白天(10 h、相对湿度 100%、40 ℃)/黑夜(14 h、相对湿度 70%、30 ℃);对照组:白天(10 h、相对湿度 75%、30 ℃)/黑夜(14 h、相对湿度 70%、20 ℃),3 次重复。

以上所有材料取材完毕后立即置于液氮中冷冻,−80 ℃超低温冰箱保存备用。

### 1.3 方法

1.3.1 *GmPM31* 基因 ORF 和启动子序列分离 使用生工生物工程(上海)股份有限公司的植物 DNA 快速抽提试剂盒提取 DNA,以 NCBI 公布的 *GmPM31*(登录号: NM\_001251076) CDS 序列为模板,使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增,PCR 反应程序参照 Liu 等<sup>[4]</sup>。得到的 459 bp 产物与 pUC57 载体连接,再转化大肠杆菌并筛选阳性克隆,测序后获得 pUC57-*GmPM31* 重组载体。引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。提取测序正确的阳

性克隆质粒并利用 *EcoR* I 和 *Sal*I 进行双酶切鉴定,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

以 *GmPM31* DNA 序列起始位点 (NCBI) 上游 2 058 bp 序列为模板,设计特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增并测序,方法同上。

1.3.2 生物信息学分析 从 GenBank 下载不同物种的 sHSPs 序列,利用 DNAMAN 8.0 软件进行氨基酸多重序列比对,通过 MEGA 7.0 软件的邻位连接法 (NJ) 构建不同物种的 sHSPs 序列的系统进化树。利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 *GmPM31* 基因启

动子顺式调控元件。

1.3.3 总 RNA 提取及 cNDA 合成 使用生工生物工程 (上海) 股份有限公司的植物总 RNA 快速抽提试剂盒以及 cDNA 反转录试剂盒提取总 RNA 并进行反转录。通过琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量以及 cDNA 完整性。

1.3.4 qRT-PCR 检测 以 *GmPM31* 的 CDS 序列 (NCBI) 为模板设计特异性引物 (表 1)。使用 BIO-RAD CFX96 Real-Time PCR 仪,参照 Wang 等<sup>[16]</sup> 方法进行 qRT-PCR 分析,3 次重复。

表 1 供试引物  
Table 1 Primers sequences used in the study

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列 (5' - 3')<br>Primer sequence (5' - 3') | 用途<br>Usage |
|---------------------|---|-------------|
| GmPM31-F            | ATGGATTGGATCGGAGCGTAC                       | 基因扩增        |
| GmPM31-R            | AACCACATCAATCTGCCTCAC                       |             |
| P-GmPM31-F          | TCACACTCTTTTATCACTTTTATT                    | 启动子扩增       |
| P-GmPM31-R          | TCAGTCTCAGCCAGTCAAC                         |             |
| qRT-GmPM31-F        | CACTGATTGTGGGACCCT                          | 荧光定量检测      |
| qRT-GmPM31-R        | TCGAGCGTCAGCTGATCT                          |             |
| Actin-F             | CCTCAACCCAAAGTCAACAG                        |             |
| Actin-R             | GACCAGCGAGATCCAAACGAA                       |             |

1.4 数据分析

经利用 SigmaPlot 10.0 软件分析基因表达量;采用 DPS 7.05 进行方差分析,检测差异显著性。

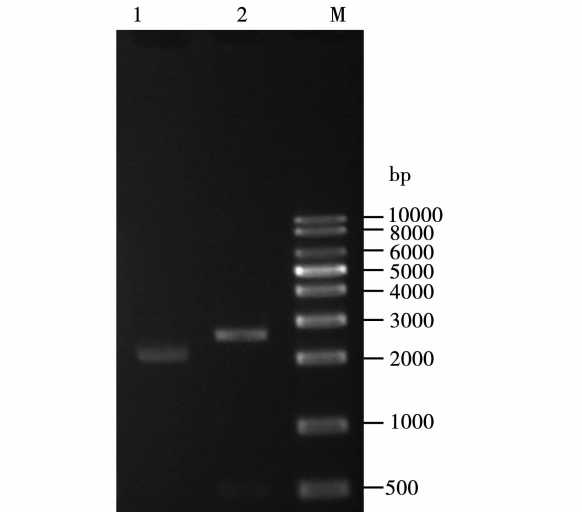
2 结果与分析

2.1 *GmPM31* 基因序列分析

经重组载体双酶切产物的电泳检测 (图 1) 和测序分析,扩增片段序列与 NCBI 公布的 *GmPM31* 序列一致,*GmPM31* 基因 cDNA 全长 655 bp,开放阅读框 (ORF) 459 bp,编码 153 个氨基酸。

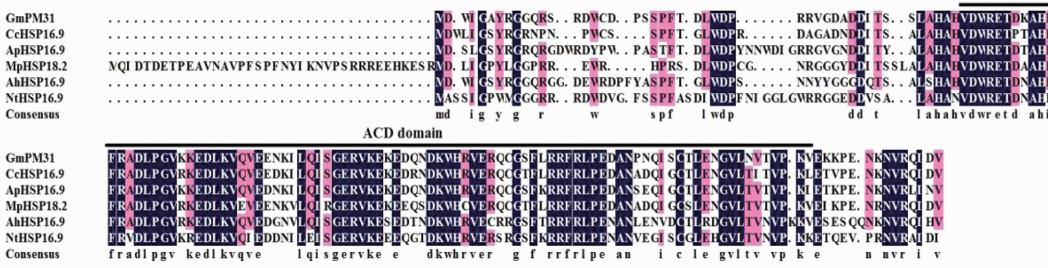
2.2 *GmPM31* 基因的生物信息学分析

2.2.1 氨基酸序列多重比对 *GmPM31* 基因编码的氨基酸序列与不同物种 sHSPs 序列的同源比对结果表明,*GmPM31* 基因编码的产物与 Class I sHSPs 家族的 CcHSP16.9、ApHSP16.9、MpHSP18.2、AhHSP16.9 和 NtHSP16.9 蛋白序列相似性较高,分别为 80.00%、77.16%、76.43%、68.55% 和 61.39%。*GmPM31* 的 C 端具有典型的 ACD 结构特征 (图 2)。



M. Marker;1. pUC57 载体;2. 酶切后的重组载体。  
M. Marker;1. pUC57 vector;2. The recombinant vector after digestion.

图 1 重组载体的双酶切鉴定结果  
Fig. 1 The enzyme digestion analysis of the recombinant vectors

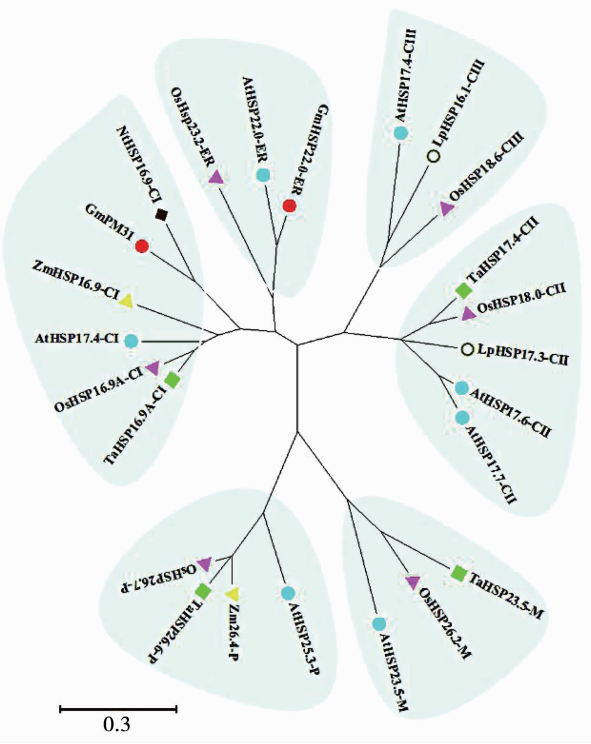


横线表示 ACD 结构域。Gm. 大豆;Cc. 木豆;Ap. 相思子;Mp. 蠶豆;Ah. 花生;Nt. 烟草。  
Theline represents the ACD domain. Gm. *Glycine max*;Cc. *Cajanus cajan*;Ap. *Abrus precatorius*;Mp. *Mucuna pruriens*; Ah. *Arachis hypogaea*; Nt. *Nicotiana tabacum*.

图2 GmPM31 氨基酸序列与其它植物相关序列的多重比对

Fig.2 The alignment of GmPM31 amino acid sequence with related sequence of other plants

2.2.2 基因进化分析 GmPM31 及其他植物 4 个（烟草）、ZmHSP16.9（玉米）、AtHSP17.4（拟南芥）、sHSPs 亚家族同源蛋白的系统树如图 3 所示，OsHSP16.9A（水稻）以及 TaHSP16.9A（小麦）的同源性较高。



At. 拟南芥;Gm. 大豆;Lp. 番茄;Nt. 烟草;Os. 水稻;Ta. 小麦;Zm. 玉米。  
At. *Arabidopsis thaliana*;Gm. *Glycine max*;Lp. *Lycopersicon esculentum*;Nt. *Nicotiana tabacum*;  
Os. *Oryza sativa*;Ta. *Triticum aestivum*;Zm. *Zea mays*.

图3 多个物种的 GmPM31 蛋白进化树

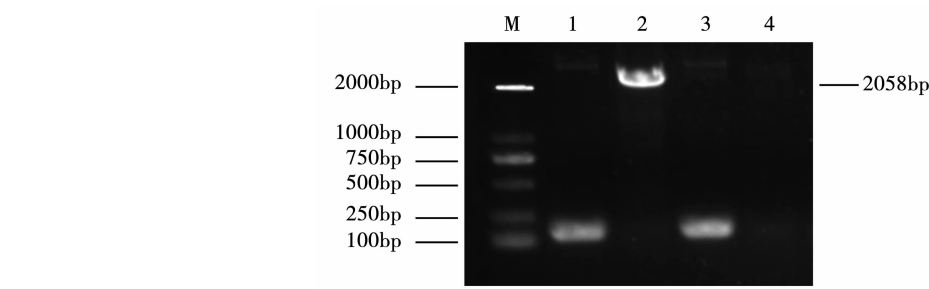
Fig.3 The phylogenetic tree of GmPM31 proteins from various organisms

2.3 GmPM31 启动子分离及顺式作用元件分析

2.3.1 GmPM31 启动子分离 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增序列在 2 058 bp 位置有清楚的特异性条带(图 4),与预期大小一致。特异性条带测序结果与 NCBI 公布的序列一致。

2.3.2 GmPM31 启动子顺式作用元件分析 启动子序列分析结果如表 2 所示,该启动子除了含有 TATA-box 和 CAAT-box 基本转录元件,还包含多个

非生物逆境调控元件,如光应答元件 AP-1、Box 4、G-Box、TCT-motif 和 chs-CMA2a;脱落酸应答元件 ABRE 和 ABRE4;乙烯应答元件 ERE;茉莉酸甲酯应答元件 AAGAA-motif;干旱和寒冷胁迫诱导的 MYB 和 MYC 蛋白因子识别的保守序列;干旱诱导响应元件 Myb;节律钟元件 circadian 等。作用元件分布如图 5 所示。



M. DL2000 marker;2. 阳性克隆。  
M. DL2000 marker;2. Positive clone.

图 4 *GmPM31* 基因启动子 PCR 扩增电泳图  
Fig.4 The PCR amplification electrophoresis of *GmPM31* gene promoter

表 2 *GmPM31* 启动子序列顺式作用元件

Table 2 The *cis*-acting regulatory elements in the promoter sequences of *GmPM31*

| 顺式作用元件<br><i>Cis</i> -acting regulatory element | 数量<br>No. | 序列<br>Sequence | 生物学功能<br>Biological function   |
|---|-----------|----------------|--|
| AAGAA-motif                                     | 1         | gGTAAAGAAA     | 茉莉酸甲酯应答元件<br>Methyl jasmonate responsive element   |
| ABRE  | 3         | ACGTG          | 脱落酸诱导涉及的顺式作用元件<br><i>Cis</i> -acting element involved in abscisic acid induction             |
| ABRE4   | 1         | CACGTA         | 脱落酸应答相关元件<br>ABA responsive element  |
| AP-1  | 1         | TGAGTTAG       | 光响应元件<br>Light responsive element  |
| ARE   | 2         | AAACCA         | 厌氧诱导必需的顺式调节元件<br><i>Cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction |
| Box 4   | 2         | ATTAAT         | 光响应元件<br>Light responsive element  |
| Box III   | 2         | atCATTTTCACt   | 盐胁迫响应<br>High salt stresses ponsive element  |
| CAAT-box  | 21        | CAAT           | 启动子和增强子区域普通顺式作用元件<br>Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions      |
| CARE  | 1         | CAACTCAC       | cAMP 响应元件<br>cAMP responsive element   |
| ERE   | 2         | ATTTCAT        | 乙烯应答元件<br>Ethylene responsive element  |
| G-box   | 3         | TACGTG         | 光反应中的顺式调节元件<br><i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness        |
| GCN4_motif                                      | 1         | TGAGTCA        | 参与胚乳表达的元件<br>Element involved in endosperm expression  |
| MYB   | 1         | CAACCA         | MYB 转录因子作用元件<br>Element involved in MYB transcription factors                                |
| MYC   | 3         | CATTTG         | MYC 转录因子作用元件<br>Element involved in MYC transcription factors                                |
| Myb   | 1         | TAACTG         | 干旱响应元件<br>Drought stress responsive element  |
| TATA-box  | 12        | TATA           | 启动子和增强子区域普通顺式作用元件<br>Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions      |
| TCT-motif                                       | 2         | TCTTAC         | 光响应元件<br>Light responsive element  |
| chs-CMA2a                                       | 1         | TCACTTGA       | 光响应元件<br>Light responsive element  |
| circadian                                       | 1         | CAAAGATATC     | 参与昼夜节律控制的顺式调节元件<br><i>Cis</i> -acting regulatory element involved in circadian control       |

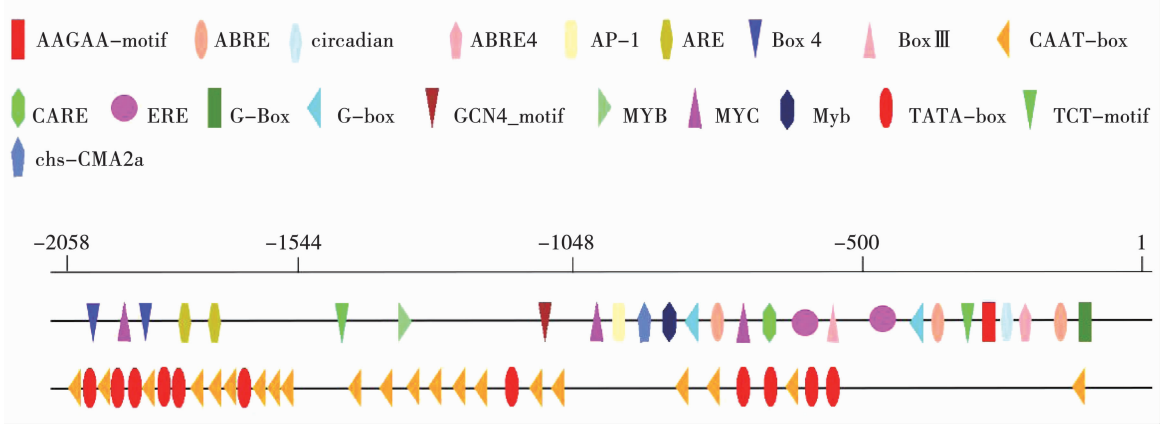
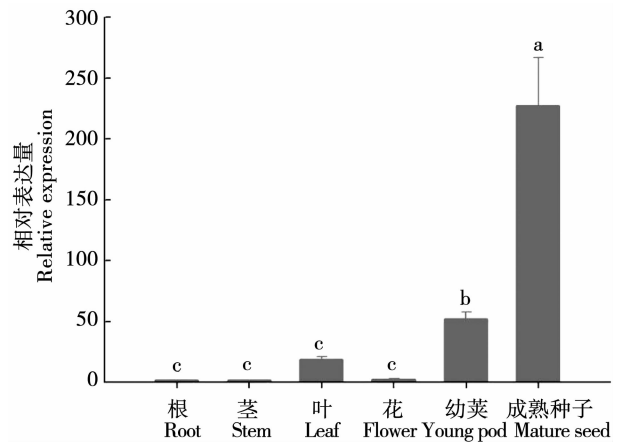


图 5 *GmPM31* 启动子中顺式作用元件分布图

Fig. 5 The location of *cis*-acting regulatory elements on *GmPM31* promoter

2.4 *GmPM31* 基因的表达模式分析

2.4.1 *GmPM31* 基因的组织特异性表达分析 经 qRT-PCR 检测, *GmPM31* 基因在湘豆 3 号成熟种子中的表达量最高, 其次是在幼荚和叶片中, 而在花、茎和根中的表达量极低(图 6)。



不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平存在差异显著。下同。  
Different lowercase indicate significant difference at  $P < 0.05$  level. The same below.

图 6 *GmPM31* 在湘豆 3 号不同组织中的表达分析  
Fig. 6 The expression of *GmPM31* in different tissues of Xiangdou 3

2.4.2 *GmPM31* 基因在种子发育过程中的时间表达特性分析 *GmPM31* 基因从种子发育的前期到种子成熟阶段持续表达, 表达量呈先升高再降低趋势, 在种子发育的中期(开花后 35 ~ 45 d)表达量较高, 并于开花后 45 d 达到最大值(图 7)。

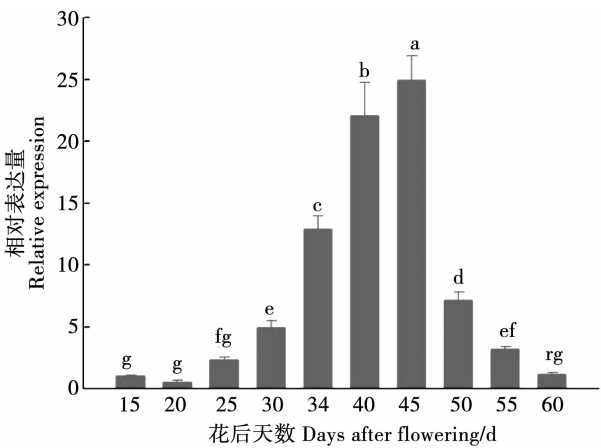


图 7 *GmPM31* 基因在种子发育过程中表达量变化  
Fig. 7 The expression of *GmPM31* in soybean seed developing period

2.5 高温高湿下种子中 *GmPM31* 基因的表达分析

分析结果表明, 处理 96 h 后, 对照组和高温高湿处理组的 *GmPM31* 基因表达量均明显升高, 并且处理 96 和 168 h, 处理组的 *GmPM31* 基因表达量显著高于对照组(图 8)。结果表明, *GmPM31* 受高温高湿胁迫诱导表达。

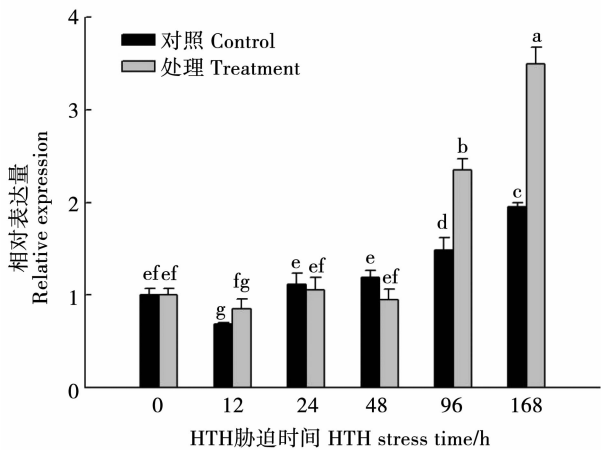


图 8 高温高湿胁迫下种子中 *GmPM31* 基因表达量分析  
Fig. 8 The expression patterns of *GmPM31* gene in the seeds under high temperature and high humidity stress



3 讨论

植物 sHSPs 最显著的特征是其都含有保守的由 7~8 个反向平行的  $\beta$  折叠构成的 ACD 结构域<sup>[17]</sup>。ACD 蛋白提高植物对高温的耐受性主要是通过与其分子量大小相当的变性蛋白结合形成稳定的复合体、协助变性蛋白质重新正确折叠、防止其不可逆的非特异性聚集实现的<sup>[18]</sup>。本研究从田间劣变抗性春大豆种质湘豆 3 号的 cDNA 中扩增分离到包含完整编码区的 *GmPM31* 基因。通过氨基酸序列的多重比对发现, *GmPM31* 蛋白包含 1 个 ACD 保守域结构, 推测其可能作为分子伴侣在高温、干旱、高盐等逆境胁迫下阻止变性蛋白聚集从而提高抗逆性。进化树结果表明, *GmPM31* 与 CI 亚家族的 sHSPs 同源性较高, 属于 CI sHSPs 家族成员, 可能在植物生长发育及逆境胁迫响应中发挥与 CI sHSPs 家族成员类似的功能。预测 CI 和 CII sHSPs 定位在细胞质中<sup>[19]</sup>, 因此推测 *GmPM31* 蛋白可能也定位于细胞质中。

启动子位于基因的上游, 是能与反式作用因子及 RNA 聚合酶特异性结合、调控基因转录的一段 DNA 序列。启动子有 3 种类型, 分别是组成型、诱导型和组织特异型启动子<sup>[20]</sup>。本研究分离获得了 2 058 bp *GmPM31* 基因启动子片段, 其含有多个 TATA-box 和 CAAT-box 启动子的基本转录元件, 同时包含光应答元件、种子发育相关元件、激素应答相关元件、干旱和寒冷胁迫相关元件、高盐胁迫相关元件和厌氧胁迫相关元件等特定的调控元件, 推测该启动子可能与大豆的种子生长发育以及抵御逆境胁迫相关。

冯玉芹<sup>[21]</sup>研究表明, 与野生型拟南芥相比, 过表达 *AtHSP22.0* 能有效提高种子发芽率及对衣霉素胁迫的耐受能力。*OsHSP16.9*、*OsHSP17.4A*、*OsHSP17.9A*、*OsHSP23.2* 和 *OsHSP26.7* 在水稻种子花期以及萌发过程中对高温的耐受性有关键调控作用<sup>[22]</sup>。与非转基因水稻种子相比, RNAi *Cl-sHsp* 的种子萌发延迟, 种子耐热性受到负面影响。因此, 推测 *sHsp* 基因对幼苗耐热性和种子生理特性有关键调控作用<sup>[23]</sup>。拟南芥中 *AtFtsH6* 的降低会导致 *AtHSP21* 大量表达, 进而增强植株的耐热性<sup>[24]</sup>。番茄果实经低温诱导后, sHSPs 家族成员转录显著上调<sup>[25]</sup>。并且, 在烟草中过表达番茄 *LeHSP21* 时烟草的抗氧化能力增强, 表明 *LeHSP21* 对植株的抗氧化能力有显著促进作用<sup>[26]</sup>。本研究表明 *GmPM31* 在湘豆 3 号成熟种子中大量表达, 幼荚和叶片中少量表达, 根、

茎和花中表达量极低。开花后 15~60 d 种子发育过程中, *GmPM31* 表达量呈现先上升后下降的趋势, 在开花后第 45 天表达量达到最大, 表明 *GmPM31* 与种子的发育密切相关。

目前, 国内学者开展了高温高湿胁迫下春大豆种子田间劣变分子机制的相关研究。Wang 等<sup>[27]</sup>对高温高湿胁迫的湘豆 3 号种子进行双向电泳及质谱分析, 共检测到 33 个差异表达蛋白, 涉及 13 个细胞应答和代谢途径。Tao 等<sup>[28]</sup>研究推测 *GmSBH1* 通过与 *GmBLH4* 形成异源二聚体后参与高温高湿胁迫下的种子劣变过程。Wang 等<sup>[16]</sup>研究表明, *GmCDPKSK5* 与 *GmTCTP* 互作参与高温高湿胁迫响应。周亚丽等<sup>[1]</sup>发现 *GmLEA* 参与高温高湿胁迫下种子活力的形成。本研究前期研究发现 *Gm2-MMP* 参与了春大豆种子田间劣变抗性过程, 通过对湘豆 3 号春大豆种子膜蛋白酵母双杂交文库进行筛选, 发现了能与 *Gm2-MMP* 互作的蛋白 *GmPM31*<sup>[2]</sup>。本研究对高温高湿胁迫下湘豆 3 号品种 R6~R7 期种子中 *GmPM31* 的表达特性进行的分析结果表明, 高温高湿胁迫处理 96 和 168 h 时 *GmPM31* 的表达量显著高于对照组, 其余时间点差异不显著, 表明 *GmPM31* 受到高温高湿胁迫诱导上调表达。本研究通过对 *GmPM31* 基因、启动子序列以及其表达模式的分析结果表明 *GmPM31* 参与了春大豆种子发育以及高温高湿胁迫响应过程, 研究结果可为后续进一步研究 *GmPM31* 在种子发育以及高温高湿胁迫下种子田间劣变过程的分子机制研究奠定基础。

4 结论

*GmPM31* 基因的 ORF 全长为 459 bp, 编码 153 个氨基酸, 含有 1 个 ACD 保守域结构。 *GmPM31* 与 Class I 亚家族的 sHSPs 同源性较高, 属于 Class I sHSPs 家族的成员。 *GmPM31* 基因启动子含有多个 TATA-box 和 CAAT-box 基本启动子转录元件, 同时还包含与光应答、种子发育、激素和逆境等相关的多个调控元件。 *GmPM31* 在湘豆 3 号成熟种子中大量表达, 在幼荚和叶片中少量表达, 在根、茎和花中的表达量极低。种子发育成熟的过程中, *GmPM31* 表达量呈现先上升后下降的趋势, 在种子发育的中期(开花后 35~45 d)表达量较高, 在开花后第 45 天表达量达到最大。高温高湿胁迫处理 96 和 168 h 时 *GmPM31* 的表达量显著高于对照组。研究结果表明 *GmPM31* 参与了春大豆种子发育以及高温高湿胁迫响应过程。

## 参考文献

- [1] 周亚丽,朱雅婧,赵飞云,等. 大豆 GmLEA 的分离及其在种子活力中的功能分析[J]. 中国农业科学,2018,51(23):4397-4408. (Zhou Y L, Zhu Y J, Zhao F Y, et al. Isolation and functional analysis of soybean GmLEA in seed vigor[J]. Scientia Agricultura Sinica,2018,51(23):4397-4408.)
- [2] Liu S S, Jia Y H, Zhu Y J, et al. Soybean matrix metalloproteinase Gm2-MMP relates to growth and development and confers enhanced tolerance to high temperature and humidity stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2018,36(1):94-106.
- [3] 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.)
- [4] Liu S S, Jia Y H, Zhu Y J, et al. Soybean matrix metalloproteinase Gm2-MMP relates to growth and development and confers enhanced tolerance to high temperature and humidity stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2018,36(1):94-106.
- [5] Chow T Y, Lin T Y, Hsing Y C. A soybean seed maturation protein cDNA GmPM31 (accession No. AF117885) encode a class I low molecular weight heat shock protein. (PGR99-177) [J]. Plant Physiology, 1999,121(4):1383.
- [6] 张宁,姜晶. 植物中小分子热激蛋白基因家族(sHSPs)研究进展[J]. 植物生理学报,2017,53(6):943-948. (Zhang N, Jiang J. Research advances of small heat shock protein gene family (sHSPs) in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2017,53(6):943-948.)
- [7] 王敏,江彪,林毓娥,等. 小分子热激蛋白参与植物抗逆性方面的研究进展[J]. 安徽农业科学,2018,46(18):29-32,35. (Wang M, Jiang B, Lin Y E, et al. Advances of small heat shock proteins participating in plant resistance [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2018,46(18):29-32,35.)
- [8] Basha E, O' Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and  $\alpha$ -crystallins: Dynamic proteins with flexible functions[J]. Trends in Biochemical Sciences,2012,37(3):106-117.
- [9] Sun W N, Vanmontagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002,1577(1):1-9.
- [10] Wang W Q, Ye J Q, Rogowska-wrzesinska A, et al. Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of ze mays seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance[J]. Journal of Proteome Research,2014,13(2):606-626.
- [11] Arce D P, Krsticevic F J, Bertolaccini M R, et al. Analysis of small heat shock protein gene family expression (RNA-seq) during the tomato fruit maturation [J]. IFMBE Proceedings, 2015,49(3):679-682.
- [12] Zhang N, Shi J, Zhao H, et al. Activation of small heat shock protein (SHSP17.7) gene by cell wall invertase inhibitor (SIC1F) gene involved in sugar metabolism in tomato[J]. Gene, 2018,679:90-99.
- [13] 李春梅. 大豆种子蛋白的差异蛋白质组研究[D]. 南京:南京农业大学,2007. (Li C M. Comparative proteomic analysis on soybean seed protein [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,2007.)
- [14] Lopescaitar V S, Carvalho M C D, Darben L M, et al. Genome-wide analysis of the Hsp20 gene family in soybean: Comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses [J]. BMC Genomics, 2013,14:577.
- [15] Yu X M, Jin H X, Fu X J, et al. Quantitative proteomic analyses of two soybean low phytic acid mutants to identify the genes associated with seed field emergence [J]. BMC Plant Biology, 2019,19(1):569.
- [16] Wang S, Tao Y, Zhou Y L, et al. Translationally controlled tumor protein GmTCTP interacts with GmCDPKSK5 in response to high temperature and humidity stress during soybean seed development [J]. Plant Growth Regulation,2017,82(1):187-200.
- [17] 俞佳虹,冯坤,程远,等. 植物小热激蛋白的研究进展[J]. 分子植物育种,2017,15(8):3016-3023. (Yu J H, Feng K, Cheng Y, et al. Research progress on small heat shock proteins in plants [J]. Molecular Plant Breeding,2017,15(8):3016-3023.)
- [18] McHaourab H S, Godar J A, Stewart P L. Structure and mechanism of protein stability sensors:Chaperone activity of small heat shock proteins[J]. Biochemistry,2009,48(18):3828-3837.
- [19] Ma C, Haslbeck M, Babujee L, et al. Identification and characterization of a stress-inducible and a constitutive small heat-shock protein targeted to the matrix of plant peroxisomes [J]. Plant Physiology,2006,141:47-60.
- [20] Hernandez-Garcia C M, Finer J J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements[J]. Plant Science, 2014,217-218:109-119.
- [21] 冯玉芹. 过表达内质网小分子热激蛋白对拟南芥抗逆性的影响[D]. 济南:山东师范大学,2010. (Feng Y Q. The study of the transgenic *Arabidopsis* with overexpression of endoplasmic reticulum small heat shock protein [D]. Jinan: Shandong Normal University,2010.)
- [22] Chen X, Lin S, Liu Q, et al. Expression and interaction of small heat shock proteins (sHsps) in rice in response to heat stress[J]. Biochimica et Biophysica Acta,2014,1844(4):818-828.
- [23] Neelam K S, Sachin K, Manu A, et al. Silencing of class I small heat shock proteins affects seed related attributes and thermo-tolerance in rice seedlings[J]. Planta,2020,251:26.
- [24] Sedaghatmehr M, Mueller-Roeber B, Balazadeh S. The plastid metalloprotease FtsH6 and small heat shock protein HSP21 jointly regulate thermomemory in *Arabidopsis* [J]. Nature Communications, 2016,7:12439.
- [25] Sanchez-Bel P, Egea I, Sanchez-Ballesta M T, et al. Proteome changes in tomato fruits prior to visible symptoms of chilling injury are linked to defensive mechanisms, uncoupling of photosynthetic processes and protein degradation machinery [J]. Plant Cell Physiology,2012,53(2):470-484.
- [26] Zhang J, Chen H, Wang H, et al. Constitutive expression of a tomato small heat shock protein gene LeHSP21 improves tolerance to high-temperature stress by enhancing antioxidation capacity in tobacco [J]. Plant Molecular Biology Report, 2016,34(2):399-409.
- [27] 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.
- [28] Tao Y, Chen M, Shu Y J, et al. Identification and functional characterization of a novel BEL1-LIKE homeobox transcription factor GmBLH4 in soybean [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2018,134(2):331-344.