



野生大豆 *GsEXPA3* 基因的生物信息学、逆境转录及毛状根转化分析

李翠婷¹, 王琳琳¹, 李凤兰¹, 贺付蒙¹, 王雪¹, 李丽¹, 王丽娟¹, 冯旭^{1,2}

(1. 东北农业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为进一步发掘野生大豆中的优质抗逆基因以用于大豆的种质改良,本研究选取积极参与调控植物生长和非生物胁迫抗性的扩展蛋白基因为对象,在野生大豆中克隆了 *GsEXPA3* 基因并对其进行了生物信息学分析,通过 qRT-PCR 检测该基因在逆境胁迫下的转录情况,采用大豆毛状根转化试验分析其对于根系生长的调控作用。结果显示:启动子分析表明 *GsEXPA3* 基因的转录可能参与光、脱落酸及干旱胁迫响应并与类黄酮物质合成相关。在低温和干旱胁迫下, *GsEXPA3* 基因的转录呈显著增加趋势,分别在处理后 12 和 9 h 达到最高点,为对照组的 3.27 倍和 2.09 倍。*GsEXPA3* 基因的过表达显著促进了转基因大豆毛状根的生长,毛状根数量、总根长和总根重,与对照组相比分别提高了 56.83%、53.19% 和 53.35%。结果说明野生大豆扩展蛋白基因 *GsEXPA3* 对于栽培大豆的分子育种具有良好的应用价值。

关键词:野生大豆;扩展蛋白; *GsEXPA3*;栽培大豆;毛状根

Bioinformatics, Stress Transcript and Hairy Root Transformation Analysis of *GsEXPA3* Gene in *Glycine soja*

LI Cui-ting¹, WANG Lin-lin¹, LI Feng-lan¹, HE Fu-meng¹, WANG Xue¹, LI Li¹, WANG Li-juan¹, FENG Xu^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To further explore the superior stress resistance genes in wild soybean for germplasm improvement in soybean, the expansin genes that are actively involved in regulating plant growth and abiotic stress resistance were selected for this study. This study cloned the *GsEXPA3* gene from wild soybean, and performed bioinformatics analysis. We detected the transcription of this gene under stress by qRT-PCR, and carried out the hairy root transformation test of soybean to analyze its regulatory effect on root growth. The results were as follows, promoter analysis revealed that transcription of *GsEXPA3* gene may be involved in light, abscisic acid and drought stress responses and correlated with flavonoid synthesis. The transcription of *GsEXPA3* gene showed a significant increasing trend under low temperature and drought stress, reaching its highest levels at 12 and 9 h after treatment, respectively, which were 3.27 and 2.09 fold of the control. Overexpression of *GsEXPA3* significantly enhanced hairy root growth in transgenic soybeans, with the number of hairy roots, total root length, and total root weight increased by 56.83%, 53.19%, and 53.35%, respectively, compared with the control. The results indicate that wild soybean expansin gene *GsEXPA3* has good application value for molecular breeding of cultivated soybean.

Keywords: *Glycine soja*; expansin; *GsEXPA3*; cultivated soybean; hairy roots

大豆(*Glycine max*)是植物油和植物蛋白的主要来源,也是我国重要的经济作物。但近年来我国的大豆产量无法满足国内的需求,每年均需进口大量大豆,因此培育高产高抗的优质大豆品种具有重要的实际意义^[1]。在长期的人为选择进化和育种驯化过程中,栽培大豆的遗传多样性不断减少,对环境胁迫的抗性逐渐减弱^[2]。将野生物种的高质量基因引入到栽培种中是作物品种改良的快捷手段,在多种作物的育种工作中已经获得了成功^[3-4]。野生大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆的祖先和近缘种,具有丰富的遗传基因资源,发掘野生大豆中的优质

基因,并应用于大豆的种质改良中不仅能够提高大豆的产量和品质,且有效解决了大豆遗传基础窄、环境适应能力差的问题^[5-6]。

随着野生大豆基因组的解析及扩展蛋白家族全基因组鉴定工作的完成,发掘野生大豆中优质的扩展蛋白家族成员,并应用于栽培大豆的种植改良工作得以开展^[7]。前期研究发现扩展蛋白基因 *GsEXPA3* 在野生大豆中具有较高的基础转录水平。扩展蛋白是普遍存在于植物中的一类细胞壁松弛蛋白,于 1992 年在黄瓜(*Cucumis sativus*)的下胚轴中首次被发现,家族成员涵盖 EXPA、EXPB、EXLA

收稿日期:2022-11-15

基金项目:国家自然科学基金青年基金(32201717);国家大豆产业技术体系岗位科学家(CARS-04-PS21);中国博士后科学基金(2022MD713729);黑龙江省博士后基金(LBH-Z21008);东北农业大学青年才俊人才项目(54982912)。

第一作者:李翠婷(1995—),女,硕士研究生,主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail:licuiting123789@163.com。

通讯作者:王丽娟(1967—),女,博士,副研究员,主要从事植物学研究。E-mail:331606615@qq.com;

冯旭(1993—),男,博士,讲师,硕导,主要从事栽培大豆抗性育种研究。E-mail:18045043687@163.com。

和 EXLB 等 4 个亚家族^[8]。因其在细胞壁松弛的进程中执行关键功能,所以几乎参与了植物包括营养生长和生殖生长的全过程^[9]。由扩展蛋白介导的细胞壁形态结构改变是植物进行生长发育和适应外界环境变化的重要途径^[10]。在小麦 (*Triticum aestivum*) 中,扩展蛋白被证实参与调控叶片的生长并响应水分胁迫^[11]。*TaEXPA2* 基因的转录在 H₂O₂ 处理下显著增加,通过调控细胞壁过氧化物酶的活性调节植物的抗氧化能力^[12]。冬小麦中 *TaEXPB7-B* 基因的过表达显著促进了转基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的生长、结实量及对低温胁迫的耐受性^[13]。番茄 (*Solanum lycopersicum*) 扩展蛋白 *SlEXPI* 的表达同果实成熟期间果实软化的程度密切相关^[14];榴莲 (*Durio zibethinus*) 果实中的扩展蛋白 *DzEXPI-3* 基因也在果实的开裂进程中执行重要功能^[15]。扩展蛋白的表达受外界生物胁迫及温度、水分、重金属等非生物胁迫所调控,通常在胁迫响应中执行正向的积极功能,在作物分子育种中也有广泛的应用^[16-19]。

大豆扩展蛋白家族的全基因组鉴定显示共存在 75 个扩展蛋白基因,与野生大豆中的数量相同^[20]。大豆中扩展蛋白基因参与了叶片伸展的调控进程^[21]。*GmEXLB1* 基因与侧根的生长相关并受低磷条件所诱导^[22]。现阶段有关野生大豆扩展蛋白家族的研究较少,仅报道 *GsEXPB1* 基因的表达与根系生长及植株耐盐性相关^[7]。本研究对野生大豆 *GsEXPA3* 基因进行克隆,以栽培大豆毛状根遗传转化体系初步分析该基因的功能,为野生大豆扩展蛋白基因在大豆分子育种工作的应用提供候选基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

野生大豆 (W05) 及栽培大豆 (东农 50) 种子,均由大豆生物学教育部重点实验室提供。总 RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、T₃ 克隆载体和 qRT-PCR 试剂盒,均为北京全式金生物技术有限公司生产。限制性内切酶及 DNA 连接酶,由 New England Biolabs 公司生产。大肠杆菌感受态 Trans1-T1,由北京全式金生物技术有限公司生产。K599 感受态细胞,由上海唯地生物技术有限公司生产。基因克隆、阳性菌落 PCR 及转基因毛状根 RT-PCR 鉴定所用试剂盒由南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 *GsEXPA3* 基因的克隆 使用 98% H₂SO₄ 打破野生大豆种皮,播种于蛭石营养钵中,于昼夜温度 25 ℃/22 ℃、光照周期 16 h/8 h 条件下培养,30 d 后采集茎部,使用北京全式金生物技术有限公司的试剂盒提取总 RNA 并合成 cDNA。依据 Feng 等^[7]对野生大豆扩展蛋白家族的全基因组鉴定结果,利用Primer Premier 5 软件设计 *GsEXPA3* 基因 PCR 扩增引物 (表 1)。基因克隆所用试剂为 2 × *Taq* Master Mix (Dye Plus),反应程序为:95 ℃、3 min 预变性,35 个循环 (95 ℃、15 s, 58 ℃、15 s, 72 ℃、1 min), 72 ℃、5 min 延伸。将 PCR 产物连接至 T₃ 克隆载体,送交吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

表 1 供试引物
Table 1 Primers used in the experiment

序号 Number	序列 Sequence (5'-3')	长度 Length/bp	产物大小 Product size/bp	用途 Purpose
1	F: AAGCACTTTTACCTCACAGCAGA	22	966	<i>GsEXPA3</i> 基因克隆
	R: GACACTTTTAATGGTTCTTCCAAT	24		
2	F: CTTTGATATGGCTGAACCTGC	21	211	<i>GsEXPA3</i> 基因 qRT-PCR
	R: CCACCCAGTTTTGGACCC	18		
3	F: CTTACATTGCCCTTGACTACG	21	131	野生大豆内参基因 <i>Actin</i>
	R: AACCTCTGGACATCTGAAACG	21		
4	F: TTTACTAGTATGACACACAAGGAAT	25	783	<i>GsEXPA3</i> 基因 <i>Spe</i> I 酶切位点添加
	R: AAAACTAGTGAATTGGCCTCCTTGG	25		
5	F: AACACGGGGGACTCTTGAC	19	809	<i>GsEXPA3</i> 表达载体鉴定
	R: ACTAGTGAATTGGCCTCCTTGG	22		

表 1(续)

序号	序列	长度	产物大小	用途
Number	Sequence (5'-3')	Length/bp	Product size/bp	Purpose
6	F:GTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCC	25	315	转基因毛状根的鉴定
	R:CGATGTTGTGGCGGTCTT	19		
7	F:AGGATTTGCTGCTGACGATG	20	92	大豆内参基因 <i>Actin</i>
	R:TTTGACCCATCCCAACCAT	19		

1.2.2 *GsEXPA3* 基因的生物信息学分析 通过 DNAMAN 软件对测序结果序列进行比对;利用 Expasy 在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *GsEXPA3* 基因所编码蛋白的理化性质,使用 SWISS-MODEL 在线软件 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测 *GsEXPA3* 蛋白的三级结构模型;使用 PlantCARE 在线软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 *GsEXPA3* 基因 ATG 前 2 000 bp 启动子序列;利用 MEGA 7.0 软件构建栽培大豆扩展蛋白家族成员和 *GsEXPA3* 蛋白进化树^[20]。

1.2.3 非生物胁迫及 qRT-PCR 检测 以蛭石为基质,按同上条件培养野生大豆,每隔 5 d 浇灌适量的霍格兰营养液,培养 30 d 后进行非生物胁迫处理。非生物胁迫处理:(1)盐胁迫,以 150 mmol·L⁻¹ NaCl 模拟盐胁迫;(2)低温胁迫,将植株置于 4 ℃ 光照培养箱中;(3)干旱胁迫,以 100 mmol·L⁻¹ 甘露醇模拟干旱胁迫。分别于处理 0,4,9,12 和 24 h 后取全株大豆幼苗。RNA 提取及 cDNA 合成方法同上,使用 TransStart[®] Green qPCR SuperMix 进行 qRT-PCR,参照 Willems 等^[23]的方法分析数据。

1.2.4 基因过表达载体构建 以植物双元表达载体 pCAMBIA1302 为基础,构建 *GsEXPA3* 基因过表达载体。在 *GsEXPA3* 基因 PCR 扩增的正向和反向引物分别设计 *Spe* I 酶切位点,PCR 产物与 pCAMBIA1302 表达载体单酶切后以 T₄ DNA 连接酶进行连接,连接产物转化至大肠杆菌中。转化后的单菌落通过 PCR 鉴定是否连接成功及连接方向,引物详见表 1,上述 PCR 所用试剂和体系同 1.2.1,将正向连接的菌株送交吉林省库美生物科技有限公司测序,重组载体命名为 pCAMBIA1302-*GsEXPA3*。

1.2.5 基因过表达载体转化栽培大豆毛状根及表型观察 将 pCAMBIA1302-*GsEXPA3* 表达载体以冻融法转化至发根农杆菌 K599 中^[24]。参照 Li 等^[25]的农杆菌介导的栽培大豆毛状根遗传转化体系将 pCAMBIA1302-*GsEXPA3* 载体转化至大豆毛状根

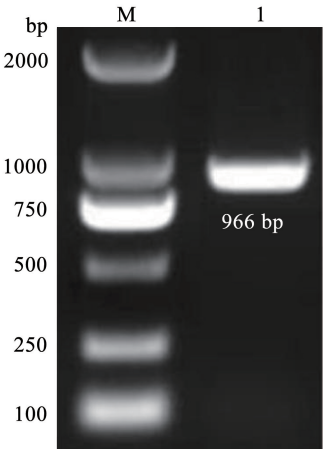
中。侵染后 12 d 对大豆毛状根进行 RT-PCR 鉴定并计算转化率,试剂采用 HiScript II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus),方法及体系参照 Feng 等^[7]进行。以 *Actin* 基因为参考基因,转基因毛状根的鉴定引物详见表 1。将鉴定为阳性的大豆毛状根移栽至新的培养基中进行培养,分别在第 0 和 7 天拍照,观察并统计毛状根数量、根长和根重,计算相对增长量。

1.2.6 数据分析 所有试验均至少重复 3 次,结果记为平均值 ± 标准差 (Mean ± SD),使用 GraphPad Prism 8 软件进行差异显著性分析及制图。

2 结果与分析

2.1 *GsEXPA3* 基因扩增

如图 1 所示,以野生大豆的 cDNA 为模板,对 *GsEXPA3* 基因进行 PCR 扩增,产物的电泳条带大小与预期相符合。对测序结果序列进行比对表明,基因 CDS 序列为 966 bp,与 Feng 等^[7]所鉴定的 *GsEXPA3* 基因的 CDS 序列比对率为 100% (图 2),证明已成功扩增获得该基因。



注:M. Marker DL2000;1. *GsEXPA3* 的 PCR 产物。
Note:M. Marker DL2000; 1. PCR production of *GsEXPA3*.

图 1 *GsEXPA3* 基因 PCR 扩增产物电泳检测结果
Fig.1 Results of electrophoresis detection of PCR amplification products of *GsEXPA3* gene

GsEXPA3.txt	ATGACACACAAGGAATTTTCATTGCTCTAGTGACTCTCATTGTTGTTCTCTTTGTCAACATGAACATCCAAGTGCCACTGCTGACTATGGTAGTTGGC	100
测序结果.txt	ATGACACACAAGGAATTTTCATTGCTCTAGTGACTCTCATTGTTGTTCTCTTTGTCAACATGAACATCCAAGTGCCACTGCTGACTATGGTAGTTGGC	100
Consensus	atgacacacaaggaattttccattgctctagtgactctcattgtgttctctttgtcaacatgaacatccaagtgccactgctgactatggtagttggc	
GsEXPA3.txt	AGAGTGTCTATGCCACTTTTATGGCGGGGTGATGCTTCTGGCACAATGGGTGGAGCATGTGGGTATGAAATTTGTATAGCCAGGGCTATGGAAGTGA	200
测序结果.txt	AGAGTGTCTATGCCACTTTTATGGCGGGGTGATGCTTCTGGCACAATGGGTGGAGCATGTGGGTATGAAATTTGTATAGCCAGGGCTATGGAAGTGA	200
Consensus	agagtgtctatgccacttttatggcgggggtgatgcttctggcacaatgggtggagcatgtgggtatgaaatttgtatagccagggtatggaactga	
GsEXPA3.txt	CACGTGGCTCTAAGCACTGCTTTCCTCAACAATGGCTTAAGCTGTGGATCTTGCTATGAAATGAGATGTGATGATGACCCAAAGATGGTGCAAACTTGGC	300
测序结果.txt	CACGTGGCTCTAAGCACTGCTTTCCTCAACAATGGCTTAAGCTGTGGATCTTGCTATGAAATGAGATGTGATGATGACCCAAAGATGGTGCAAACTTGGC	300
Consensus	cactgtggctctaagcactgctttgttccaacaatggcttaagctgtggatctctgctatgaaatgagatgtgatgatgacccaagatgggtgcaaacctggc	
GsEXPA3.txt	TCCATTACTGTAAGTCCCACTAACTCTGCCCCCAAAACCTTCTTTGCTCAACAACAATGGGGTTGGTGCAACCTCCTTTGCAACACTTTGATATGG	400
测序结果.txt	TCCATTACTGTAAGTCCCACTAACTCTGCCCCCAAAACCTTCTTTGCTCAACAACAATGGGGTTGGTGCAACCTCCTTTGCAACACTTTGATATGG	400
Consensus	tccattactgtaactgccactaactcttgcggcccaaaccttctttgctcaacaacaatgggggttgggtgcaaacctccttgcgaactttgatatgg	
GsEXPA3.txt	CTGAACCTGCCTTCTTGCAAAATGCTGAATATAGAGCTGGAATTGCGCTGTTCCTTTAGGAGGGTTCCTTGTGTGAAAAGGGGGGAATAAGGTTAC	500
测序结果.txt	CTGAACCTGCCTTCTTGCAAAATGCTGAATATAGAGCTGGAATTGCGCTGTTCCTTTAGGAGGGTTCCTTGTGTGAAAAGGGGGGAATAAGGTTAC	500
Consensus	ctgaacctgccttcttgcaaaattgctgaatatagagctggaattgtgcctgttgcccttaggaggggtcccttgtgtgaaaaggggggaataaggttcac	
GsEXPA3.txt	AATCAATGGCCACTCATACTTCAACCTAGTTTGTATCACCAGTGGGTGGAGCTGGTGATGTGAATTCAGTGTCCATCAAAGGTCCTCAAACTGGGTGG	600
测序结果.txt	AATCAATGGCCACTCATACTTCAACCTAGTTTGTATCACCAGTGGGTGGAGCTGGTGATGTGAATTCAGTGTCCATCAAAGGTCCTCAAACTGGGTGG	600
Consensus	aatcaatggccactcatacttcaacctagttttgatcaccagtgggtggagctgggtgatgtgaattcagtgctccatacaagggtccaaaactgggtgg	
GsEXPA3.txt	CAACCCATGTCAAGGAATTGGGGGCAAAATGGCAGAGCACTCATACCTCAATGGACAATCCCTCTCTTTTCAAGTCACCAACCAAGTATGGCAGAACTG	700
测序结果.txt	CAACCCATGTCAAGGAATTGGGGGCAAAATGGCAGAGCACTCATACCTCAATGGACAATCCCTCTCTTTTCAAGTCACCAACCAAGTATGGCAGAACTG	700
Consensus	caaccatgtcaagggaattgggggcaaaattggcagagcaactcatacctcaatggacaatccctctctttcaagtcaaccaccagtgtggcagaactg	
GsEXPA3.txt	TGACAAGCTTCAATGTGGCACCAGCCAATTGGCAATTGGCCAGACCTTCCAAGGAGGCCAATTCTA	767
测序结果.txt	TGACAAGCTTCAATGTGGCACCAGCCAATTGGCAATTGGCCAGACCTTCCAAGGAGGCCAATTCTA	767
Consensus	tgacaagcttcaatgtggcaccagccaattggcaatttggccagaccttccaaggaggccaattcta	

注:参考序列为 Feng 等^[7]所鉴定的 *GsEXPA3* 基因的 CDS 序列。

Note:The reference sequence is the CDS sequence of the *GsEXPA3* gene identified by Feng et al^[7].

图 2 目的基因 PCR 扩增序列测序结果比对

Fig.2 Sequences comparison of PCR production of the target gene

2.2 基因生物信息学分析

分析结果表明, *GsEXPA3* 基因编码的蛋白由 255 个氨基酸构成, 相对分子质量为 27 437. 70, 等电点为 7. 55, 蛋白质分子式为 C₁₂₁₆H₁₈₂₁N₃₃₅O₃₆₆S₁₄, *GsEXPA3* 蛋白的三级结构模型如图 3 所示。

通过 PlantCARE 在线软件对 *GsEXPA3* 基因的启动子序列进行分析的结果如表 2 所示, *GsEXPA3* 基因启动子区域存在多个顺式作用元件, 功能涵盖脱落酸响应、光响应、干旱胁迫、类黄酮生物合成调控等方面, 表明该基因的转录可能受植物激素 ABA 和干旱胁迫所诱导, 同时参与类黄酮的生物合成。

表 2 *GsEXPA3* 基因的启动子分析结果

Table 2 Promoter analysis results of *GsEXPA3* gene

序号 Number	元件名称 Element name	位置 Position	序列 Sequence (5'-3')	功能 Function
1	ABRE	587 (-)	ACGTG	脱落酸顺式作用元件
2	ARE	29 (+)	AAACCA	厌氧诱导所需顺式元件
		442 (+)		
		257 (-)		
3	Box 4	164 (+)	ATTAAT	参与光响应的保守 DNA 模块
		1014 (-)		
4	G-Box	587 (+)	CACGTT	光响应顺式作用元件
5	MBS	478 (+)	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点
6	MBSI	140 (-)	aaaAaaC(G/C)GTTA	类黄酮生物合成基因调控中的 MYB 结合位点
7	TCCC-motif	59 (-)	TCTCCCT	光响应元件的一部分
8	TCT-motif	1373 (-)	TCTTAC	光响应元件的一部分
9	chs-CMA1a	175 (-)	TTACTTAA	光响应元件

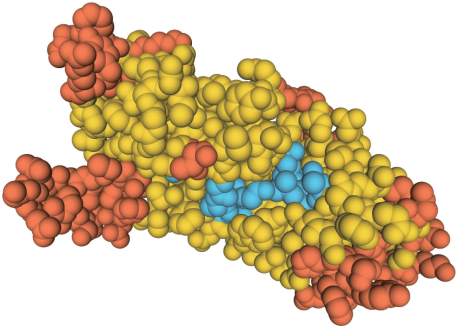


图 3 *GsEXPA3* 蛋白的三级结构预测模型

Fig.3 Tertiary structure prediction model of the *GsEXPA3* protein

以栽培大豆的扩展蛋白家族成员为基础所构建的 *GsEXPA3* 氨基酸进化树如图 4 所示, *GsEXPA3*

蛋白与栽培大豆中的 *GmEXPA25* 和 *GmEXPA40* 位于同一进化分支上, 具有较近的亲缘关系。

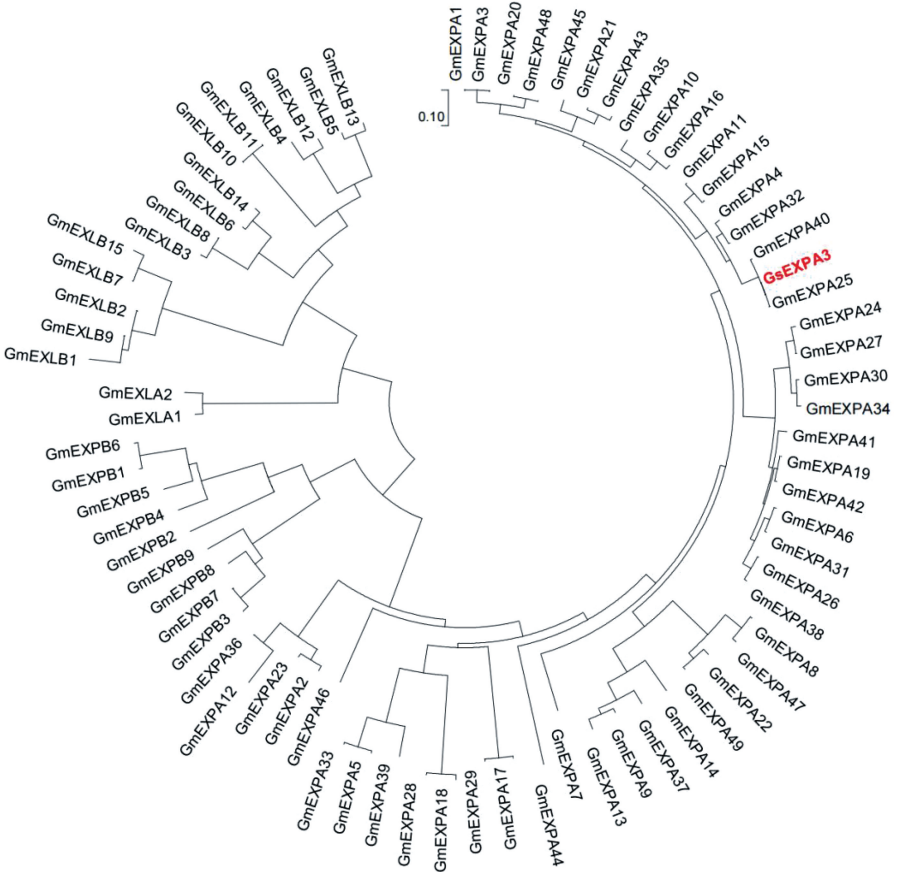


图 4 *GsEXPA3* 蛋白与栽培大豆扩展蛋白家族成员的氨基酸进化树

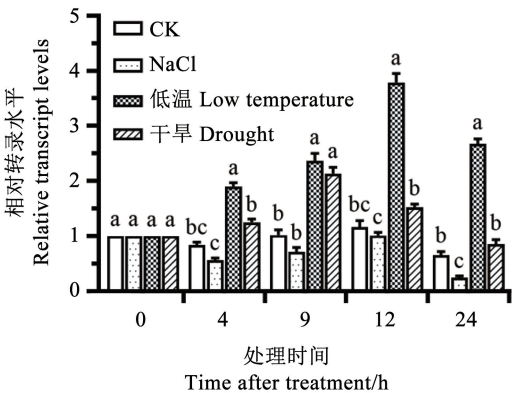
Fig. 4 Amino acid evolution tree of *GsEXPA3* protein and members of the expansin protein family in cultivated soybean

2.3 非生物胁迫下基因转录模式分析

如图 5 所示:在盐胁迫处理 4、9 和 12 h 后, *GsEXPA3* 基因的转录水平与对照组无显著差异,但在处理 24 h 时该基因的转录水平显著下调; *GsEXPA3* 基因的转录对低温处理呈现较为强烈的响应,在处理 4、9、12 及 24 h 均显著高于对照组,分别是对照组的 2.27、2.33、3.26 及 4.08 倍,且处理后 12 h 的相对转录水平最高;干旱胁迫同样导致该基因的转录水平上调,相比于对照组,干旱处理 9 h 该基因的转录显著上调,为对照组的 2.1 倍,但随后逐渐下降。上述结果显示, *GsEXPA3* 基因的转录受低温和干旱胁迫所诱导。

2.4 过表达 *GsEXPA3* 基因对栽培大豆毛状根生长的影响

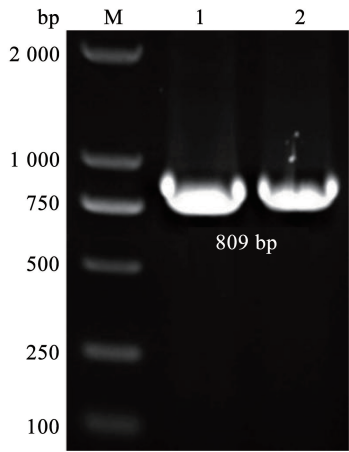
如图 6 所示,PCR 鉴定结果表明,获得了含有重组表达载体 (CaMV35S 启动子驱动 *GsEXPA3* 基因表达的 pCambia1302 载体) 的 K599 发根农杆菌阳性菌液,可用于栽培大豆毛状根诱导转化试验。



注:不同小写字母表示 *GsEXPA3* 基因在同一时间点不同处理之间的转录水平存在显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase indicate significant differences in transcript levels of *GsEXPA3* gene at the same time point under different treatments ($P < 0.05$).

图 5 不同非生物胁迫下 *GsEXPA3* 基因的转录水平分析
Fig. 5 Analysis on transcript level of *GsEXPA3* gene under different abiotic stresses



注:M. Marker DL2000;1 和 2. 阳性菌株菌液 PCR 鉴定结果。

Note: M. Marker DL2000; 1 and 2. PCR identification results of positive strains.

图 6 转化 pCAMBIA1302-*GsEXPA3* 表达载体 K599 发根农杆菌 PCR 鉴定结果

Fig. 6 PCR identification results of *Agrobacterium rhizogenes* K599 transformed with pCAMBIA1302-*GsEXPA3* expression vector

如图 7 所示,RT-PCR 试验逐一鉴定及计算表明,转基因大豆毛状根转化率为 82% (n = 50)。如图 8 和表 3 所示,相比于 K599 空菌对照组,过表达 *GsEXPA3* 基因对大豆毛状根的生长表现出显著促进作用,毛状根数目、总根长与总根重的相对增长量均显著高于对照组,分别提高了 56.83%、53.19% 和 53.35%。

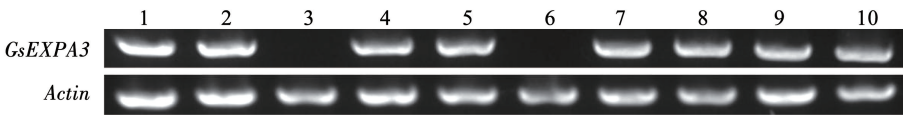


图 7 过表达 *GsEXPA3* 基因大豆毛状根的 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 7 RT-PCR identification results of soybean hairy roots overexpressing *GsEXPA3* gene

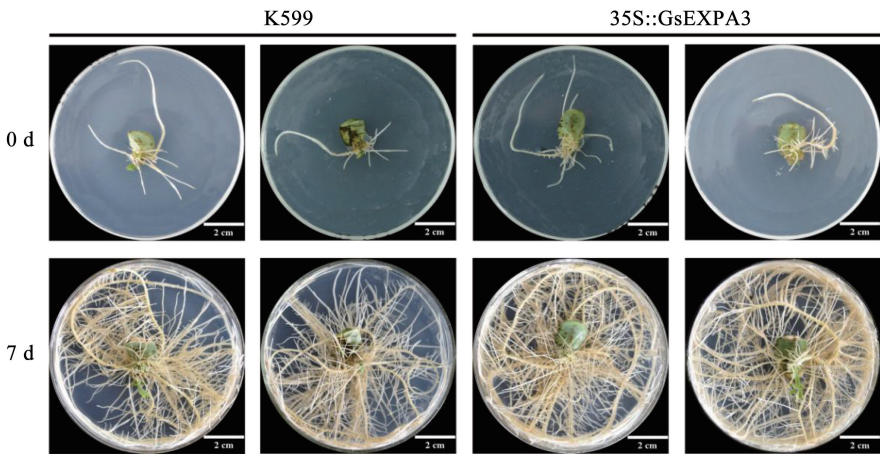


图 8 过表达 *GsEXPA3* 基因大豆毛状根的表现型

Fig. 8 Phenotype of soybean hairy roots overexpressing the *GsEXPA3* gene

表 3 过表达 *GsEXPA3* 基因大豆毛状根的表型量化结果

Table 3 Phenotypic quantification results of soybean hairy roots overexpressing the *GsEXPA3* gene

转化组 Transformation group	根数相对增长量 Relative growth of root number/个	根长相对增长量 Relative growth of root length/cm	根重相对增长量 Relative growth of root weight/g
CK(K599)	25.32 ± 4.79	170.53 ± 31.44	5.23 ± 1.09
35S ₊ : <i>GsEXPA3</i>	39.71 ± 5.17 *	261.24 ± 29.11 **	8.02 ± 1.24 *

注: * 和 ** 分别表示 K599 与 35S₊:*GsEXPA3* 毛状根同一表型存在显著 ($P < 0.05$) 或极显著差异 ($P < 0.01$)。
Note: * and ** indicate significant ($P < 0.05$) or extremely significant difference ($P < 0.01$) between K599 and 35S₊:*GsEXPA3* hairy root in the same phenotype, respectively.

3 讨论

植物的生长主要分为两个途径,分别是细胞数量的增多及细胞体积的变大,而扩展蛋白通常是在后者中发挥作用,这也决定了其参与调控植物生长发育的功能。此外,植物的细胞壁是响应及抵御外界环境胁迫的第一道屏障,细胞壁结构或组成的改变也是植物快速适应外界环境变化的机制之一。扩展蛋白因直接参与调控植物细胞的生长及胁迫响应进程,可作为抗性分子育种工作中良好的备选基因资源,在多种作物的分子育种工作中均获得了成功^[26]。

在抗逆性较好的野生大豆材料中,*GsEXPA3* 基因的基础转录水平较高^[7],表明该基因可能在野生大豆优良环境适应能力的调控途径中执行重要功能,且启动子分析结果显示其可能参与植物对环境胁迫的响应进程。qRT-PCR 试验的结果也进一步证明了该猜测,即 *GsEXPA3* 基因的转录本在低温和干旱胁迫下显著增加,但有关其在这两方面胁迫抗性进程中是否发挥作用和相关的机制还是未知的,将在后续研究中进行系统的揭示。此外,该基因的启动子区域存在类黄酮生物合成调控基因相关的 MYB 结合位点,表明 *GsEXPA3* 可能与黄酮类化合物的合成相关。扩展蛋白通常被认知的功能主要在细胞壁修饰方面,有关其与植物次生代谢产物关联的报道较少^[27]。大豆的种子中富含异黄酮,且具有较高的价值^[28],如能明晰扩展蛋白与黄酮类化合物合成之间的调控机制,则对于扩展蛋白相关的理论研究及大豆的分子育种均具有重要的意义,这也是本研究后续相关工作的重点。

为鉴定 *GsEXPA3* 基因的功能,本研究选择了大豆毛状根为植物材料并检测了过表达该基因对毛状根生长的影响。扩展蛋白与植物根系的发育密切相关,而根系作为植物重要的营养器官,直接决

定植株的生长状况与应对外界水分胁迫的能力^[29]。在本研究中,*GsEXPA3* 基因同样参与了栽培大豆根系的生长调控,过表达该基因毛状根的生长状态显著优于野生型,毛状根数量、根长及根重均增加明显。植物根系的生长涉及细胞分裂、细胞伸长等进程,而扩展蛋白通常被认知为在细胞伸长过程中发挥作用。扩展蛋白的过度表达会显著促进细胞壁的松弛程度,进而增加原生质体或液泡在膨压驱动下对水分的吸收^[30],这可能是 *GsEXPA3* 基因促进大豆毛状根生长的原因,但仍需后续的试验加以验证。发达的根系有助于植物对水分的吸收,进而增强在干旱、盐等胁迫下的生存能力,*GsEXPA3* 基因在干旱胁迫下转录本的增加也可能是野生大豆通过调控根系生长以适应干旱胁迫的机制之一。尽管 *GsEXPA3* 发挥功能的详细途径还未清楚,但其仍可作为栽培大豆抗性种质改良的候选基因进行下一步的研究,以推动其在栽培大豆的分子育种工作中的应用。

4 结论

本研究对野生大豆扩展蛋白基因 *GsEXPA3* 进行了克隆,该基因编码的蛋白由 255 个氨基酸构成,其转录水平在低温和干旱胁迫下显著上调。过表达 *GsEXPA3* 基因能够显著促进栽培大豆毛状根的生长,毛状根数量、根长与根重的相对增长量均高于对照组,表明 *GsEXPA3* 基因对栽培大豆的种质改良有较好的应用价值。

参考文献

[1] LIU S L, ZHANG M, FENG F, et al. Toward a “Green Revolution” for soybean[J]. Molecular Plant, 2020, 13(5): 688-697.
[2] KOFSKY J, ZHANG H Y, SONG B H. The untapped genetic reservoir: The past, current, and future applications of the wild soybean (*Glycine soja*)[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9:

949.

[3] SHIM K C, KIM S H, LEE H S, et al. Characterization of a new qLTG3-1 allele for low-temperature germinability in rice from the wild species *Oryza Rufipogon*[J]. *Rice*, 2020, 13(1): 10.

[4] WALKOWIAK S, GAO L L, MONAT C, et al. Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding[J]. *Nature*, 2020, 588(7837): 277-283.

[5] YOU H G, LIU Y M, MINH T N, et al. Genome-wide identification and expression analyses of nitrate transporter family genes in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2020, 61(4): 489-501.

[6] XIE M, CHUNG Y L, LI M W, et al. A reference-grade wild soybean genome [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1216.

[7] FENG X, LI C T, HE F M, et al. Genome-wide identification of expansin genes in wild soybean (*Glycine soja*) and functional characterization of *Expansin B1* (*GsEXPB1*) in soybean hair root [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5407.

[8] MCQUEEN-MASON S, DURACHKO D M, COSGROVE D J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants [J]. *The Plant Cell*, 1992, 4(11): 1425-1433.

[9] HAN Z S, LIU Y L, DENG X, et al. Genome-wide identification and expression analysis of expansin gene family in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 101.

[10] NARVÁEZ-BARRAGÁN D A, TOVAR-HERRERA O E, SEGOVIA L, et al. Expansin-related proteins: Biology, microbe-plant interactions and associated plant-defense responses [J]. *Microbiology*, 2020, 166(11): 1007-1018.

[11] ZHOU S, HAN Y Y, CHEN Y H, et al. The involvement of expansins in response to water stress during leaf development in wheat[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 183: 64-74.

[12] CHEN Y H, REN Y Q, ZHANG G Q, et al. Overexpression of the wheat expansin gene *TaEXPA2* improves oxidative stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 124: 190-198.

[13] FENG X, XU Y Q, PENG L N, et al. *TaEXPB7-B*, a β -expansin gene involved in low-temperature stress and abscisic acid responses, promotes growth and cold resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 240: 153004.

[14] MINOIA S, BOUALEM A, MARCEL F, et al. Induced mutations in tomato *SlExp1* alter cell wall metabolism and delay fruit softening[J]. *Plant Science*, 2016, 242: 195-202.

[15] PALAPOL Y, KUNYAMEE S, THONGKHUM M, et al. Expression of expansin genes in the pulp and the dehiscence zone of ripening durian (*Durio zibethinus*) fruit [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 182: 33-39.

[16] CHEN Y H, HAN Y Y, KONG X Z, et al. Ectopic expression of wheat expansin gene *TaEXPA2* improved the salt tolerance of transgenic tobacco by regulating Na^+/K^+ and antioxidant competence [J]. *Physiologia Plantarum*, 2017, 159(2): 161-177.

[17] JADAMBA C, KANG K, PAEK N C, et al. Overexpression of rice *Expansin7* (*Osexpa7*) confers enhanced tolerance to salt stress in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2): 454.

[18] PENG L N, XU Y Q, WANG X, et al. Overexpression of paralogues of the wheat expansin gene *TaEXPA8* improves low-temperature tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Biology*, 2019, 21(6): 1119-1131.

[19] REN Y Q, CHEN Y H, AN J, et al. Wheat expansin gene *TaEXPA2* is involved in conferring plant tolerance to Cd toxicity [J]. *Plant Science*, 2018, 270: 245-256.

[20] ZHU Y, WU N N, SONG W L, et al. Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: Segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 93.

[21] DEVI M J, TALIERCIO E W, SINCLAIR T R. Leaf expansion of soybean subjected to high and low atmospheric vapour pressure deficits[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(7): 1845-1850.

[22] KONG Y, WANG B, DU H, et al. *GmEXLB1*, a soybean expansin-like b gene, alters root architecture to improve phosphorus acquisition in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 808.

[23] WILLEMS E, LEYNS L, VANDESOMPELE J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates [J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 379(1): 127-129.

[24] SONG J, TÓTH K, MONTES-LUZ B, et al. Soybean hairy root transformation: a rapid and highly efficient method [J]. *Current Protocols*, 2021, 1(7): e195.

[25] LI C F, ZHANG H Y, WANG X R, et al. A comparison study of Agrobacterium-mediated transformation methods for root-specific promoter analysis in soybean [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(11): 1921-1932.

[26] SUN Q, LI Y, GONG D, et al. A NAC-EXPANSIN module enhances maize kernel size by controlling nucellus elimination [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 5708.

[27] ARSLAN B, İNCİLİ Ç Y, ULU F, et al. Comparative genomic analysis of expansin superfamily gene members in zucchini and cucumber and their expression profiles under different abiotic stresses[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 27(12): 2739-2756.

[28] QU S S, KWON S J, DUAN S C, et al. Isoflavone changes in immature and mature soybeans by thermal processing [J]. *Molecules*, 2021, 26(24): 7471.

[29] MUTHUSAMY M, KIM J Y, YOON E K, et al. *BrEXLB1*, a *Brassica rapa* Expansin-like *BI* gene is associated with root development, drought stress response, and seed germination[J]. *Genes*, 2020, 11(4): 404.

[30] COSGROVE D J. Expanding wheat yields with expansin[J]. *The New Phytologist*, 2021, 230(2): 403-405.