

大豆 MYB 转录因子 *GmPHR1* 转化及功能研究

吴冰,李喜焕,刘翠,王运杰,李文龙,常文锁,张彩英

(河北农业大学/教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室,河北保定 071001)

摘要:在克隆获得 MYB 转录因子 *GmPHR1* 基础上,构建基因超表达载体,采用农杆菌介导子叶节转化技术将其转入冀豆 12,获得 *GmPHR1* 高效表达转基因新材料,并分析基因在耐低磷和低磷敏感品种中的表达差异。结果表明:成功构建了目的基因超表达载体 pBI121-*GmPHR1*,获得了经 PCR 验证为阳性的 T₄转基因新材料;荧光实时定量 PCR 检测发现,其中 4 个株系的 *GmPHR1* 表达量达到野生型对照的 2 倍以上,说明 *GmPHR1* 能够在转基因新材料中高效表达;进一步分析低磷胁迫下不同耐低磷特性品种的基因表达量,发现 *GmPHR1* 在耐低磷品种中呈现快速诱导、持续表达与高表达量的模式,而在低磷敏感品种中则表现缓慢诱导、迅速下降和低表达量的模式。

关键词:大豆;MYB 转录因子;载体构建;农杆菌转化;高效表达

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)03-0302-04

Genetic Transformation and Function Analysis of Transcription Factor *GmPHR1* in Soybean

WU Bing, LI Xi-huan, LIU Cui, WANG Yun-jie, LI Wen-long, CHANG Wen-suo, ZHANG Cai-ying

(North China Key Laboratory of Crop Germplasm Resources, Education Ministry of China/Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: To develop new transgenic soybean materials with MYB transcription factor *GmPHR1*, and to study the expression patterns of *GmPHR1* in different low-P tolerant soybean varieties, a over-expression vector pBI121-*GmPHR1* was constructed and introduced into Jidou12 by *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node transformation method. PCR and real-time quantitative PCR analysis results of the transformed T₄ plants showed that the *GmPHR1* was successfully incorporated into the soybean genome and expressed at a higher level than the wild-type. Expression patterns assayed by real-time quantitative PCR revealed that the expression level of *GmPHR1* in low-P tolerant variety NF37 was induced quickly for a longer period at a higher level than that in sensitive variety Niumaohuang under phosphate starvation condition.

Key words: Soybean; MYB transcription factor; Vector construction; *Agrobacterium*-mediated transformation; Highly expressed

大豆是蛋白质、油脂及多种保健活性物质重要来源,具有广阔的市场。自 1994 年抗除草剂转基因大豆推广以来,美国、巴西、阿根廷等国的大豆市场占国际份额不断扩大,而我国大豆种植面积逐年递减,市场竞争力下降,面临国际市场廉价大豆产品大量进口的压力与挑战,严重影响了大豆产业发展的掌控权^[1]。因此,大力发展我国具有自主知识产权的转基因大豆迫在眉睫^[2]。

磷素作为植物生长发育必需营养元素之一,既是植物体内许多重要有机化合物的组分,同时又以多种方式参与各种代谢过程,在农业生产中起着极其重要作用。但世界范围内的绝大部分土壤严重缺磷,因而人们普遍采用增施磷肥的方法保证作物产量^[3]。随着磷矿资源日益匮乏,加之目前还未发现任何一种可取代磷的元素,使得人类正面临着比能源危机更加严峻的磷资源枯竭的挑战^[4]。因此,通过发掘和利用植物磷高效相关基因,进而创制磷

高效利用作物新品种就成为解决上述问题的最新途径。

有学者在研究拟南芥和水稻等模式植物时指出,基因转录激活或抑制作用是植物应对环境逆境胁迫的重要步骤。转录因子作为基因表达的总调控者,在植物生长发育和应对生物及非生物胁迫过程中有重要作用^[5-9]。因此,人们提出了采用转录因子基因改良植物耐逆性的全新途径。吴忠长等^[10]通过克隆与转化 bHLH 类型转录因子 *Os-PTF1*,在低磷条件下使得转基因水稻植株的干物重和磷含量分别高出野生型 30% 以上;苗鸿鹰等^[11]通过克隆与转化 WRKY 类转录因子 *TaWRKY72b-1* 发现,在低磷胁迫下可使转基因烟草的磷吸收状况明显改善,植株在低磷条件下的生长状况也明显优于对照。Rubio 等^[7]通过克隆与转化 MYB 类转录因子基因 *AtPHR1* 发现,该基因发生突变,可导致一系列磷代谢相关基因的表达量降低,且引起了转基

收稿日期:2013-01-14

基金项目:国家转基因重大专项(2009ZX08004-004B);国家自然科学基金(31071441);河北省自然科学基金(C2010000749);河北省教育厅科学研究项目(2009)。

第一作者简介:吴冰(1987-),女,在读硕士,主要从事大豆分子生物学与转基因研究。E-mail: bingmisswu@126.com。

通讯作者:张彩英(1960-),女,研究员,博士生导师,主要从事大豆遗传育种与转基因研究。E-mail: zhangcaiying@hebau.edu.cn。

因拟南芥耐低磷能力的下降。

另外, Oswaldo 等^[12]分离得到了菜豆中的 *AtPHR1* 同源基因 *PvPHR1*, RNAi 表明该基因编码蛋白是一个参与植物磷素运输、再利用的正向调控因子。Zhou 等^[13]通过同源基因克隆技术分离得到了水稻中的 *AtPHR1* 同源基因 *OsPHR1* 和 *OsPHR2*, 结果发现这 2 个基因均与磷胁迫信号途径有关。本课题组在前期工作中克隆获得了大豆中的 *AtPHR1* 同源基因 *GmPHR1* (GenBank No. HQ007311), 经超表达转基因拟南芥耐低磷试验表明, *GmPHR1* 基因能够提高拟南芥在低磷条件下的耐低磷能力^[14]。为进一步探讨 *GmPHR1* 在来源物种大豆中的功能及其调控机制, 以转录因子 *GmPHR1* 为材料, 构建其超表达载体, 转化大豆品种, 获得转基因大豆新材料; 分析 *GmPHR1* 在转基因植株中的表达及在低磷胁迫下不同磷效率大豆品种中的差异表达, 为基因作用机制的研究及培育磷高效利用转基因大豆提供中间材料。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用植物表达载体为 pBI121, 农杆菌菌株为 EHA105, 转化受体为冀豆 12; 实时定量 PCR 分析所用材料为课题组前期鉴定的耐低磷品种 NF37 和低磷敏感品种牛毛黄, 均由河北农业大学大豆遗传育种研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 超表达载体 pBI121-*GmPHR1* 的构建 将 pGEM-*PHR1* 和 pBI121 载体进行 *Sma* I / *Sac* I 双酶切, 回收目的片段, T_4 -DNA 连接酶进行连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 和酶切双重检测, 阳性克隆进行测序, 提取质粒用于转化农杆菌菌株 EHA105。

1.2.2 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化 参照刘翠等^[15]的方法进行农杆菌介导子叶节遗传转化。

1.2.3 转化大豆植株 PCR 检测 采用 CTAB 法提取大豆基因组 DNA, 设计跨载体引物: F1: 5'-CCG-GAATTCGAGAAGAGGATGTCTGGGGA-3', R1: 5'-GATAGGGTTGACTGTTGTTCCAGT-3', 扩增片段长度 1 163 bp。PCR 反应程序为: 95℃ 10 min, 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.2 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 转基因 T_4 植株 Real-Time PCR 分析 将转基因植株自交, 结合 PCR 检测获得 T_4 转基因材料, 对 T_4 材料采用 Real-Time PCR 进行目的基因表达量分析, 步骤如下: 提取野生型与阳性材料 RNA, 反转录 cDNA; 以 *actin11* 为内参, 设计引物 F2/R2 (内参

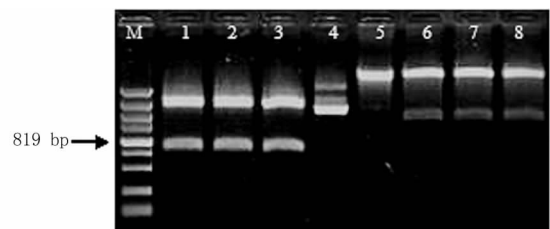
引物), F3/R3 (目的基因引物), 序列依次为: 5'-TTTCCGAGGTTGTCAAGGTA-3', 5'-CTAAGAATGC-AGATGGAG-3', 5'-CTTGACTGAGCGTGTTATTCC-3', 5'-TGTCCTGGCTGTCTCC-3'; 实时定量 PCR 程序为: 95℃ 30 s, 95℃ 15 s, 58℃ 15 s, 72℃ 15 s, 40 个循环; 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因相对表达量。

1.2.5 *GmPHR1* 在不同耐低磷大豆品种中的 Real-Time PCR 分析 选取耐低磷大豆品种 NF37 和低磷敏感牛毛黄的种子播种于蛭石, 待第 1 片复叶展开进行 2 种磷浓度处理 (Hoagland 营养液, 适磷处理为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 低磷处理为 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 随后在处理 0.5, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h 分别取样, 进行实时定量 PCR 分析, 方法与转基因材料 Real-Time PCR 分析方法相同。

2 结果与分析

2.1 超表达载体 pBI121-*GmPHR1* 的构建

通过检测 *Sma* I / *Sac* I 酶切后的 pGEM-*PHR1* 发现 (图 1), 可以切出目的条带 (约 819 bp), 将目的条带回收, 并与酶切后的表达载体 pBI121 进行连接; 经转化大肠杆菌 DH5 α , 对转化后的单克隆进行菌液 PCR 和 *Sma* I / *Sac* I 酶切, 获得了阳性克隆 (图 2)。将阳性克隆进行测序, 分析测序结果获得了序列正确的目的基因超表达载体 pBI121-*GmPHR1*。



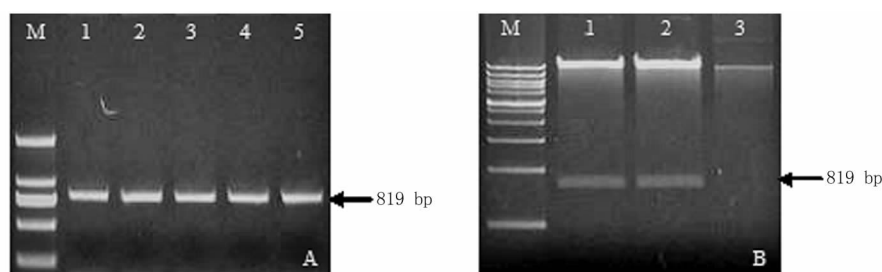
M: DNA marker; 1 ~ 4: pGEM-*PHR1* 酶切与对照; 5 ~ 8: pBI121 酶切与对照

M: DNA marker; 1 ~ 4: Digested pGEM-*PHR1* and CK; 5 ~ 8: Digested pGEM-*PHR1* and CK

图 1 pGEM-*PHR1* 和 pBI121 的 *Sma* I / *Sac* I 酶切
Fig. 1 Digested pGEM-*PHR1* and pBI121 by *Sma* I / *Sac* I

2.2 转 *GmPHR1* 大豆植株及其后代 PCR 检测

将构建完成的超表达载体 pBI121-*GmPHR1* 采用农杆菌介导转化技术转入冀豆 12。经 PCR 检测获得阳性植株, 将阳性植株进行自交纯合, 并逐代进行目的基因检测, 获得了转有 *GmPHR1* 的 T_4 材料。对 T_4 材料采用跨载体引物 (F1/R1) 进行 PCR 检测, 可以扩增出约 1 163 bp 的预期片段 (图 3), 说明 *GmPHR1* 已整合到冀豆 12 基因组中, 且可以通过自交遗传给子代。



A: 菌液 PCR 鉴定, M: DNA marker; 1 ~ 5: pBI121-*GmPHR1* 扩增产物

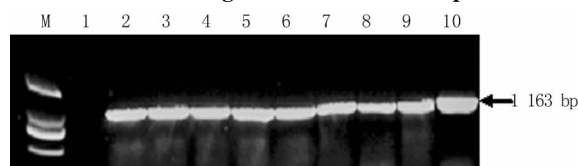
B: 酶切鉴定, M: DNA marker; 1 ~ 3: pBI121-*GmPHR1* 酶切与对照

A: PCR identification, M: DNA marker; 1 ~ 5: PCR product of pBI121-*GmPHR1*

B: Restriction enzyme digestion, 1 ~ 3: Digested of pBI121-*GmPHR1* and CK

图2 超表达载体 pBI121-*GmPHR1* 菌液 PCR 与酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pBI121-*GmPHR1* by PCR and restriction enzyme digestion



M: DNA Marker; 1: 野生型对照; 2 ~ 9: T_4 代阳性植株; 10: 质粒对照

M: DNA Marker; 1: Wild control; 2 ~ 9: Transformed plants; 10: Plasmid control

图3 转 PBI121-*GmPHR1*

大豆阳性植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR assay of transformed

soybean plants with PBI121-*GmPHR1*

2.3 *GmPHR1* 高效表达 T_4 转基因新材料获得

利用 PCR 鉴定为阳性的 T_4 植株为材料, 采用荧光实时定量 PCR 技术分析其目的基因的表达情况。与野生型对照 (冀豆 12) 相比, 4 个转基因株系 L_2 、 L_3 、 L_5 、 L_7 的 *GmPHR1* 表达量达到了对照 2 倍以上, 分别为对照的 2.2 倍、2.9 倍、5.0 倍和 8.0 倍 (图 4), 说明这些转基因株系中的目的基因 *GmPHR1* 不仅稳定整合在基因组中, 还能够在转录水平高效表达, 具有提高磷利用效率的潜力。

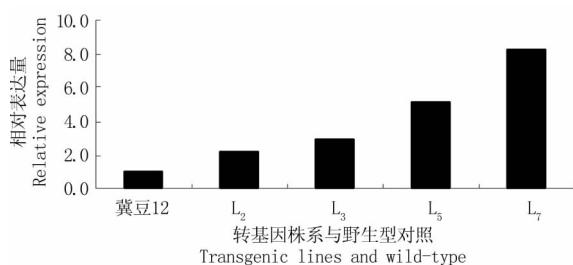


图4 转基因阳性植株的 *GmPHR1* 表达量分析

Fig. 4 Relative expression level of transgenic plants and wild-type

2.4 *GmPHR1* 在不同耐低磷类型品种中的差异表达

利用课题组已鉴定的耐低磷 NF37 和低磷敏感牛毛黄为材料, 采用荧光实时定量 PCR 技术分析

GmPHR1 在耐低磷与低磷敏感品种中的差异表达, 结果发现 (图 5), NF37 的 *GmPHR1* 在低磷处理 3 h 出现表达高峰, 且持续到 6 h, 随后表达量开始降低, 但在 48 h 又出现第 2 次表达高峰; 而牛毛黄的 *GmPHR1* 在低磷处理 6 h 才出现表达高峰, 随后表达量迅速下降, 直至 48 h 达到最低, 未能出现第 2 次表达高峰。更重要的是, *GmPHR1* 在 NF37 中的表达量始终高于牛毛黄。由此可见, 该转录因子基因在耐低磷品种中呈现出快速诱导、持续表达与高表达量的模式, 而在低磷敏感品种中则表现出缓慢诱导、迅速下降和低表达量的模式, 表明基因与 NF37 的耐低磷特性密切相关。

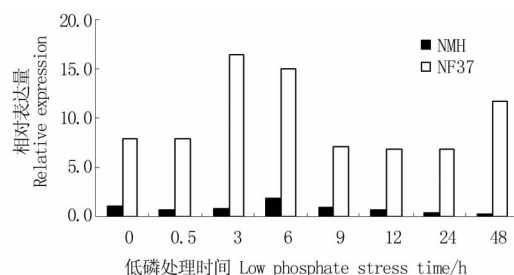


图5 低磷处理条件下的 NF37 与牛毛黄 (NMH) *GmPHR1* 表达差异

Fig. 5 Relative expression of NF37 and Niumaohuang (NMH) under low phosphate stress

3 讨论

MYB 转录因子是目前发现数量最多、功能最多样化的一类转录因子。它不仅参与了细胞分化、细胞周期调节, 激素和环境因子应答, 而且对植物次生代谢以及叶片等器官形态建成具有重要调节作用^[16]; 植物体内由不同的生物或非生物胁迫诱导 MYB 基因表达后, MYB 再与相关的转录因子协同地激活某些特异的防御相关基因的表达, 使植物对环境胁迫因子产生相应的防御反应^[17-18]。

目前已克隆了一些参与调控真核生物磷素代谢途径基因表达的转录因子, 如拟南芥和衣藻中参

与高等植物及单细胞藻类磷酸盐饥饿应答信号传导途径的 MYB 成员 PHR1、PSR1 以及涉及氮缺乏调控和色氨酸饥饿应答的一些 MYB 成员 ATR1 和 ATR2 等。Hernández 等^[19]通过分析菜豆在磷缺乏时相关基因表达情况发现,在菜豆根中受磷诱导的转录因子大部分为 MYB 转录因子,说明该类转录因子参与了菜豆的缺磷应答反应。AtPHR1 作为第一个在高等植物中报道的与磷营养代谢相关的转录因子,已被证明是高等生物磷饥饿信号的核心调控因子,因而利用该基因及其编码蛋白序列,克隆该转录因子在其它高等植物中的同源基因,目前已有一些报道,其中包括水稻中的 *OsPHR1* 和 *OsPHR2*, 菜豆中的 *PvPHR1* 等。

但是,到目前为止,有关大豆 MYB 转录因子与磷营养代谢间的关系研究尚未见报道。本课题组利用磷高效大豆品种为材料,得到了 MYB 转录因子基因 *GmPHR1*^[20]。本研究在此基础上,通过农杆菌介导转化技术将其转入冀豆 12 中,获得了高效表达的转基因新材料;通过实时定量 PCR 分析检测转基因植株中目的基因表达量,证实了该基因在正常磷条件下可以高效表达;低磷处理下,耐低磷大豆品种中该基因的表达被快速诱导,且持续时间较长,表达量较高,而在低磷敏感品种牛毛黄中该基因被缓慢诱导,且持续时间较短,表达量较低。研究结果为揭示该类转录因子在磷代谢通路中的地位与作用,并解析高等植物的磷营养代谢分子机制提供了理论依据和试验材料。

参考文献

- [1] 余永亮,梁慧珍,王树峰,等. 中国转基因大豆的研究进展及其产业化[J]. 大豆科学,2010,29(1):143-150. (Yu Y L, Liang H Z, Wang S F, et al. Research progress and commercialization on transgenic soybean in China[J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 143-150.)
- [2] 季志强,盖颜欣,王奇. 国内外大豆生产概况及大豆育种的发展方向[J]. 农业科技通报,2010(7):8-9. (Ji Z Q, Gai Y X, Wang Q. Soybean production situation at home and abroad and the development direction of soybean breeding[J]. Report of Agricultural Science and Technology, 2010(7):8-9.)
- [3] Ragothama K. G. Phosphate acquisition[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 50:665-693.
- [4] Runge-Metzger A, Tiessen H. Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global security. Phosphorus in the global environment: transfers, cycles and management [M]. New York: John Wiley & Sons, 1995:27-42.
- [5] Chen W, Provart N J, Glazebrook J, et al. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggest their putative function in response to environmental stresses[J]. Plant Cell, 2002, 14:559-574.
- [6] Wu P, Ma L, Hou X, et al. Phosphate starvation triggers distinct alternations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves [J]. Plant Physiology, 2003, 132:1260-1271.
- [7] Rubio V, Linhares F, Solano R, et al. A conserved myb transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae [J]. Genes & Development, 2001, 15:2122-2133.
- [8] Tang Z, Sadka A, Morishige D T, et al. Homeodomain leucine zipper proteins bind to the phosphate response domain of the soybean VspB tripartite promoter [J]. Plant Physiology, 2001, 125: 797-809.
- [9] Singh K B, Foley R C, Oñate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5:430-436.
- [10] 吴忠长. 水稻耐低磷胁迫相关转录因子 OsPTF1 研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2004. (W Z C. OsPTF1: a novel phosphorus-starvation induced transcription factor involved in tolerance for phosphorus starvation in rice (*Oryza sativa* L.) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004.)
- [11] 苗鸿鹰,赵金峰,李小娟,等. 转录因子基因 *TaWRKY72b-1* 的克隆、表达及在烟草中表达对植株磷效率的影响 [J]. 作物学报, 2009, 35(11):2029-2036. (Miao H Y, Zhao J F, Li X J, et al. Cloning and expression of wheat transcription factor gene *TaWRKY72b-1* and its effect on phosphorus use efficiency in transgenic tobacco plants [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(11): 2029-2036.)
- [12] Oswaldo V L, Catalina A H, Mario R, et al. Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots [J]. Plant, Cell & Environment, 2008, 31, 834-843.
- [13] Zhou J, Jiao F C, Wu Z C, et al. OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants [J]. Plant Physiology, 2008, 146:1673-1686.
- [14] 王运杰. 大豆 MYB 转录因子 *GmPHR1* 的基因克隆与功能研究 [D]. 保定:河北农业大学, 2010. (Wang Y J. Molecular cloning and function analysis of MYB transcription factor *GmPHR1* in soybean [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2010.)
- [15] 刘翠,李喜焕,常文锁,等. 农杆菌介导大豆不同外植体遗传转化研究 [J]. 华北农学报, 2012, 27(3):35-40. (Liu C, Li X H, Chang W S, et al. Studies of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation by different explants in soybean (*Glycine max.* L) [J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica, 2012, 27(3):35-40.)
- [16] 杨致荣,王兴春,李西明. 高等植物转录因子的研究进展 [J]. 遗传, 2004, 26(3):403-408. (Yang Z R, Wang X C, Li X M. Research advance on the transcription factors in higher plants [J]. Hereditas, 2004, 26(3):403-408.)
- [17] Iwasaki T K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis [J]. Molecular and General Genetics, 1995, 247(4):391-398.
- [18] Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Shinozaki K. Regulation of genes that are induced by drought stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Plant Research, 1995, 108(16):126-136.
- [19] Hernández G, Ramírez M, Valdés-López O, et al. Phosphorus stress in common bean; root transcript and metabolic responses [J]. Plant Physiology, 2007, 144:752-767.
- [20] 张彩英,李喜焕,常文锁,等. 大豆 *GmPHR1* 基因及其编码的蛋白和应用: 中国, ZL 201010528355. X [P]. 2012-09-05. (Zhang C Y, Li X H, Chang W S, et al. Application of *GmPHR1* and its encoding protein in soybean; China, ZL 201010528355. X [P]. 2012-09-05.)