



大豆 *GmAMS* 基因及其启动子的克隆和表达分析

金 玲, 张 浩, 王松明, 李 强, 丁先龙, 杨守萍

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室(综合)/作物遗传与种质创新国家重点实验室/江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏 南京 210095)

摘 要: bHLH(basic Helix-Loop-Helix) 转录因子在植物雄配子发育中具有重要的调控作用。为探究 bHLH 转录因子在大豆花发育中的作用, 以大豆细胞质雄性不育系 NJCMS5A 的花芽 cDNA 和叶片 DNA 为模板, 通过 RT-PCR 克隆得到具有典型 bHLH 结构域的 *GmAMS* 基因及其启动子区域, 并进行生物信息学分析和时空表达分析。生物信息学分析结果显示 *GmAMS* 基因的编码区序列全长为 1 716 bp, 编码 571 个氨基酸。亚细胞定位预测 *GmAMS* 位于细胞核中。荧光定量分析结果显示, 相对于保持系 NJCMS5B, 在不育系 NJCMS5A 的花芽中 *GmAMS* 基因的表达水平显著下调。组织化学染色结果表明 *GmAMS* 启动子驱动的 GUS 蛋白主要集中在转基因拟南芥的幼小花药中表达。研究结果为进一步探究 *GmAMS* 在大豆花发育中的生物学功能和调控机制奠定了基础。

关键词: 大豆; *GmAMS* 基因; 启动子; 基因克隆; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of *GmAMS* Gene and Its Promoter in Soybean

JIN Ling, ZHANG Hao, WANG Song-ming, LI Qiang, DING Xian-long, YANG Shou-ping

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean(General), Ministry of Agriculture/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Jiangsu Modern Crop Production Collaborative Innovation Center, Nanjing 210095, China)

Abstract: The basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor plays an important role in the regulation of male gamete development in plants. In order to explore the role of bHLH transcription factor in the flower development of soybean, the transcription factor *GmAMS* gene with typical bHLH domain and its promoter were cloned by RT-PCR using cDNA from the flower bud and DNA from the leaf of soybean cytoplasmic male sterile line NJCMS5A as the template. Bioinformatics analysis and spatiotemporal expression analysis of *GmAMS* gene were conducted. The results of bioinformatics analysis showed that the coding region sequence (CDS) of *GmAMS* gene was 1 716 bp in length, encoding 571 amino acids. Subcellular localization prediction results showed that *GmAMS* was localized in the nucleus. Real-time fluorescence quantification analysis showed that the expression level of *GmAMS* gene in the flower bud of NJCMS5A was significantly downregulated compared with the maintainer line NJCMS5B. Histochemical staining results showed that the GUS protein driven by *GmAMS* promoter was mainly expressed at the early anther development stage. The above results provided the foundation for further study on the biological function and regulation mechanism of *GmAMS* gene in the flower development of soybean.

Keywords: Soybean; *GmAMS* gene; Promoter; Gene cloning; Expression analysis

植物 bHLH(basic Helix-Loop-Helix) 家族是真核生物中发现的第二大转录因子家族, 通过与靶基因的特定序列专一性结合调控基因的特异表达, 广泛参与植物生长发育和应对环境刺激的多种过程^[1]。目前已经对多个物种的 bHLH 转录因子家族进行了系统分析, 包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、玉米 (*Zea mays*)、大豆 (*Glycine max*) 和藻类 (*Algae*) 等^[2-6]。有研究表明 bHLH 转录因子可通过影响花发育相关基因的表达, 参与拟南芥、水稻、辣椒 (*Capsicum annuum*) 等植物的花药与雄配子的发育过程^[7-9]。

最初在拟南芥中鉴定到 1 个 bHLH 转录因子功

能异常的雄性不育突变体 *ams*, 其小孢子败育发生在四分体和有丝分裂之间, 成熟花药中没有花粉, 且突变体植株的雄蕊变短。*ABORTED MICRO-SPORE(AMS)* 启动子 *GUS* 融合表达分析表明, *AMS* 在绒毡层和小孢子中特异表达, 而且是绒毡层发育和小孢子形成所必须的^[7]。随着 *DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1(DYT1)*^[10]、*Male Sterile 188(MS188)*^[11]、*DEFECTIVE IN TAPETAL DEVELOPMENT AND FUNCTION 1(TDF1)*^[12]、*MALE STERILITY 1(MS1)*^[13] 等绒毡层发育所必需转录因子的发现, Zhu 等^[14] 提出调控绒毡层发育的核心调控网络 (*DYT1-TDF1-AMS-MS188-MS1*)。在水稻中已鉴定出 4 个参与调控花粉正常发育的 bHLH 转录因子, 包括 *Undeveloped*

收稿日期: 2019-04-30

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0101500, 2016YFD0101504); 中央高校基本科研业务费专项资金 (KYT201801); 长江学者和创新团队发展计划 (PCSIRT_17R55)。

第一作者简介: 金玲 (1993-), 女, 硕士, 主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail: msjinling@163.com。

通讯作者: 杨守萍 (1967-), 女, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: spyung@126.com。

Tapetum1 (*UDT1*)、*bHLH42*、*TAPETUM DEGENERATION RETARDATION* (*TDR1*)、*ETERNAL TAPETUM 1* (*EAT1*)，它们之间通过相互协作，共同影响水稻绒毡层细胞的正常发育和 PCD (programmed cell death) 过程^[8, 15-17]。近期,Guo 等^[9]对辣椒小孢子败育基因 *CaAMS* 进行了鉴定,发现其对辣椒绒毡层和花粉发育具有重要作用。

Cheng 等^[18]分析大豆 *bHLH* 基因家族发现有 340 个非冗余的 *bHLH* 成员,隶属于 24 个家族,不均匀地分布在大豆 20 条染色体上,多数成员在大豆根及花发育的时期特异表达。相比拟南芥、水稻等模式植物,大豆上 *bHLH* 转录因子的研究进展较为滞后。因此,挖掘与大豆花粉正常发育相关的 *bHLH* 转录因子具有重要意义。前期以大豆细胞质雄性不育系 NJCMS5A 与其保持系 NJCMS5B 的花芽为材料进行转录组测序,挖掘得到大量与育性相关的差异编码基因,查询植物转录因子数据库 Plant Transcription Factor Database V 4.0 发现 1 个编码拟南芥 *AMS* 的同源基因 Glyma. 10g281800,并命名为 *GmAMS*。已有报道显示拟南芥 *AMS* 转录因子是孢粉素生物合成、分泌和花粉壁形成的主要调节因子,其过表达和缺失均导致花粉异常^[7,19]。在大豆中对该基因的相关报道还未出现,因此,本研究拟克隆编码 *bHLH* 转录因子的 *GmAMS* 基因并分析其在大豆细胞质雄性不育系 NJCMS5A 和保持系 NJCMS5B 花芽中的表达情况,为进一步揭示 *GmAMS* 在大豆花发育中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆细胞质雄性不育系 NJCMS5A 与其保持系 NJCMS5B 由南京农业大学国家大豆改良中心提供,于 2017 年夏种植在南京农业大学国家大豆改良中心当涂实验站。在大豆盛花期分别采集不育系

NJCMS5A 和保持系 NJCMS5B 的叶片和不同大小花芽,经液氮速冻后于 -80℃ 冰箱中保存备用。植物过表达载体 pCAMBIA-3301 和根癌农杆菌 EH105 菌株由本实验室提供。大肠杆菌感受态细胞 DH5α 购自阿恩地生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA、RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (PD Biotech,上海) 提取大豆叶片 DNA。采用 RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒 (TIANGEN,北京) 提取大豆花芽总 RNA,并使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒 (TaKaRa,日本) 合成 cDNA 第一链。

1.2.2 基因和启动子的克隆

根据 Phytozome V 12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 上的大豆基因组数据,在线获取 *GmAMS* 的 CDS 序列,选取 *GmAMS* 起始密码子上游 2 096 bp 左右的序列作为启动子序列。依据同源重组原理,使用 Primer Premier 5 软件分别设计 *GmAMS* 基因及其启动子的特异性引物 *GmAMS*-F/*GmAMS*-R 和 *GmAMS Pro*-F/*GmAMS Pro*-R (表 1)。以大豆细胞质雄性不育系 NJCMS5A 与其保持系 NJCMS5B 的花芽 cDNA 第一链为模板,使用高保真酶 KOD-Plus (TOYOBO) (50 μL 扩增体系) 扩增 *GmAMS* 基因,PCR 程序为 94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 15 s,62℃ 退火 30 s,68℃ 延伸 2.5 min,36 个循环,68℃ 延伸 10 min。以大豆细胞质雄性不育系 NJCMS5A 的叶片 DNA 为模板,使用 1-5™ 2X High-Fidelity Master Mix 高保真酶 (TSINGKE,南京) 扩增 *GmAMS* 基因的启动子,PCR 程序为 98℃ 预变性 2 min,98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 30 s,36 个循环,72℃ 延伸 5 min。采用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测,并使用 DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen,美国) 纯化回收目的产物。

表 1 克隆和 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers used in cloning and qRT-PCR

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物大小 Product size/bp
<i>GmAMS</i> -F	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGAACATCAGCATGCAACACTTAG	1716
<i>GmAMS</i> -R	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCACTATGAACTGCTCGGGCTAGG	
<i>GmAMS Pro</i> -F	GACCTGCAGGCATGCAAGCTTCTAGTGGAATAAACAATGAAGTC	2096
<i>GmAMS Pro</i> -R	TTACCCTCAGATCTACCATGGCTCACCTGAAATTAATAATTGG	
<i>qRT-PCR-AMS</i> -F	TCGGCATAAGTCAAAGGAAGTAAC	132
<i>qRT-PCR-AMS</i> -R	CACGAGGGGCTTAGTCTCTCTC	
<i>Tubulin</i> -F	GGAGTTCACAGAGGCAGAG	189
<i>Tubulin</i> -R	CACTTACGCATCACATAGCA	

1.2.3 生物信息学分析 通过 ExPASy ProtPara 在线分析 *GmAMS* 的氨基酸个数、分子量、等电点和二

级结构。使用 SMART 分析 *GmAMS* 氨基酸序列中的保守结构域。通过 ProtComp V 9.0 和 Plant-

mPLoc 进行亚细胞定位预测^[20]。使用 SOPMA 预测 *GmAMS* 蛋白的二级结构。利用 BLAST 对 *GmAMS* 序列进行同源比对,并利用 MEGA 7.0 绘制系统进化树,使用邻接法(NJ)进行亲缘关系分析^[21]。使用 STRING 数据库预测 *GmAMS* 的互作蛋白。

通过 SoftBerry TSSP 对 *GmAMS* 的启动子序列进行预测,并利用 Plant CARE 分析 *GmAMS* 启动子序列中的顺式作用元件。

1.2.4 植物过表达载体构建和拟南芥遗传转化
使用 *Bam*H I (NEB, 北京)单酶切植物过表达载体 pCAMBIA-3301 获得线性化载体。采用 *Hind* III (NEB, 北京)和 *Nco* I (NEB, 北京)双酶切 pCAMBIA-3301 质粒,用 *GmAMS* 启动子定向替换植物表达载体 pCAMBIA3301 的 CaMV35S 组成型启动子。将带有特异性接头的 PCR 扩增产物和线性化载体按比例混合,使用同源重组克隆试剂盒(Vazyme, 南京)进行重组,并采用热激法转化 DH5 α (TIANGEN, 北京)。经菌液 PCR 检测为阳性的克隆送通用生物系统(安徽)有限公司进行测序验证。获得阳性克隆后,通过冻融法将 pCAMBIA-3301 载体和 *GmAMS* 启动子 GUS 融合表达载体分别转化根癌农杆菌 *EHA105*,并采用浸花法转化野生型(Columbia)拟南芥^[22]。

1.2.5 组织化学染色 通过抗性筛选种植转基因拟南芥至 T₃ 代。参照 Jefferson 等^[23]的方法,使用 X-Gluc 配置染色液(1 mg·mL⁻¹),对 T₃ 代转基因拟南芥植株苗期的莲座叶以及开花期的茎、叶、花簇、角果和种子进行组织化学染色,37 ℃避光孵育 24 h,75% 酒精脱色 2 次后,置于 OLYMPUS SZ61 体视显微镜下观察,并使用 OLYMPUS DP27 系统进行拍照。

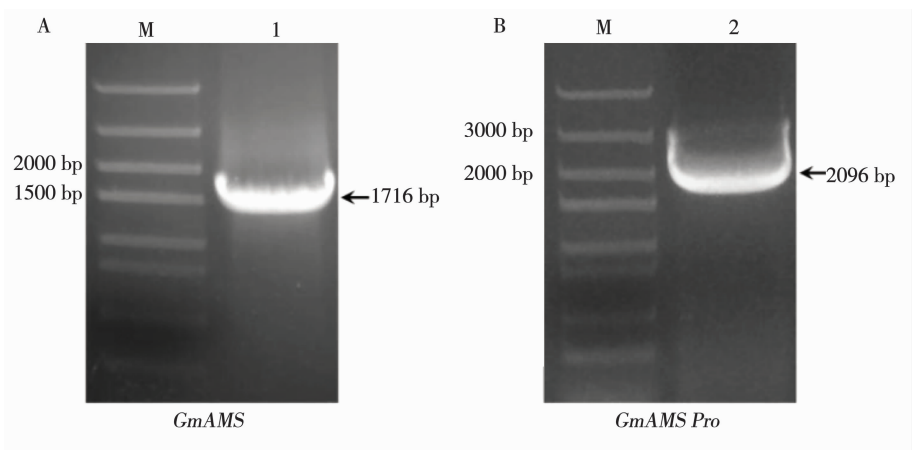
1.2.6 qRT-PCR 分析 将不育系 NJCMS5A 和保

持系 NJCMS5B 的花芽按大小分为 3 个阶段,从小到大依次为包括第 I 阶段(小孢子母细胞至四分体期)、第 II 阶段(单核小孢子期)和第 III 阶段(二胞花粉早期),分别提取 3 个阶段花芽的总 RNA,并反转录合成 cDNA 进行实时荧光定量分析。以大豆 *Tubulin* 基因为内参,使用 Primer Premier 5 软件分别设计 *GmAMS* 和 *Tubulin* 的荧光定量引物 qRT-PCR-*AMS*-F/qRT-PCR-*AMS*-R 和 *Tubulin*-F/*Tubulin*-R(表 1)。PCR 程序为 95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火延伸 1 min,40 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和溶解曲线。每个反应 3 次生物学重复,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算相对表达量,用 Excel 2013 软件进行数据分析,采用 T 检验进行显著性分析,使用 GraphPad Prism 6 绘图。

2 结果与分析

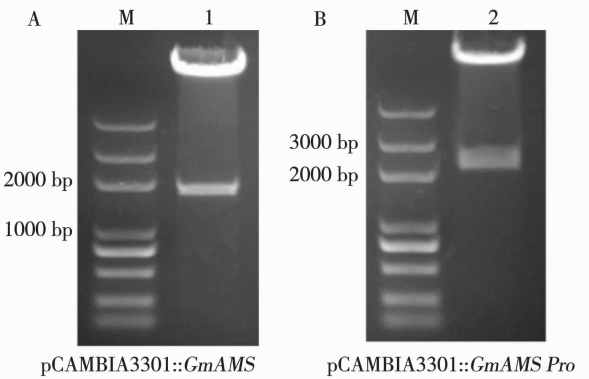
2.1 基因过表达载体和启动子融合表达载体的构建

分别以大豆细胞质雄性不育系 NJCMS5A 的花芽 cDNA 和叶片总 DNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增获得 *GmAMS* 基因及其启动子的特异性片段。测序分析表明:*GmAMS* 基因 CDS 全长 1 716 bp(图 1A),测序所得的碱基序列与 Phytozome 数据库中的一致。克隆得到 *GmAMS* 序列 ATG 前面大小为 2 096 bp 的启动子片段(图 1B),序列也与 Phytozome 数据库中的一致,命名为 *GmAMS Pro*。进行酶切位点分析和多克隆位点查询,*Sma* I 和 *Xba* I 双酶切验证结果表明植物过表达载体 pCAMBIA3301::*GmAMS* 构建成功(图 2A),*Bam*H I 和 *Nco* I 双酶切验证结果表明启动子融合表达载体 pCAMBIA3301::*GmAMS Pro*::GUS构建成功(图 2B)。



M: DL 5000 DNA Marker; 1-2: *GmAMS* 和 *GmAMS* 启动子 PCR 扩增产物。
M: DL 5000 DNA Marker; 1-2: PCR amplification products of *GmAMS* and its promoter

图 1 *GmAMS* 基因及其启动子克隆
Fig. 1 Cloning of *GmAMS* and its promoter



M;DL 5000 DNA marker;1 和 2;pCambia3301:: *GmAMS* 和 pCambia3301:: *GmAMSPro*::GUS 载体酶切验证。
M; DL 5000 DNA marker; 1 and 2; Enzyme digestion identification of pCambia3301:: *GmAMS* and pCambia3301:: *GmAMS Pro*::GUS.

图2 植物表达载体 pCambia3301::*GmAMS* 和 pCambia3301::*GmAMSPro*::GUS 的酶切验证
Fig.2 Enzyme digestion identification of plant expression vector pCambia3301::*GmAMS* and pCambia3301::*GmAMS Pro*::GUS

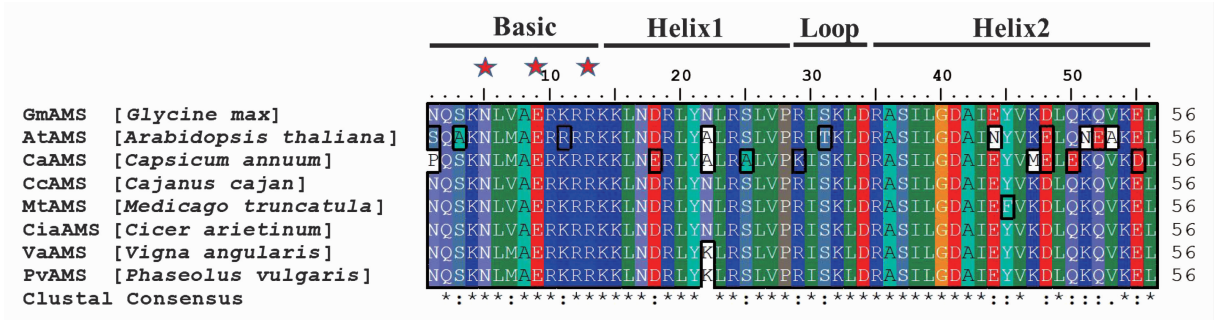
2.2 生物信息学分析

序列分析结果表明:*GmAMS* 基因包含 7 个外显子(图 3), 编码 571 个氨基酸, 蛋白质分子量为 64 915. 79 Da, pI 为 5. 05, 不稳定指数为 36. 86, 为稳定蛋白。蛋白质疏水性分析结果表明: *GmAMS* 为疏水蛋白。SMART 分析显示 *GmAMS* 蛋白包含 1 个典型的 basic helix-loop-helix 结构域, 位于第 336 ~ 385 位氨基酸, 隶属于 MYC 亚家族(图 3)。多序列比对结果显示: *GmAMS* 与蝶形花亚科的红豆、木豆、苜蓿、鹰嘴豆 AMS 蛋白的 bHLH 结构域具有较高的保守性, 与拟南芥和辣椒 AMS 蛋白的 bHLH 结构域也有较高的相似性(图 4)。亚细胞定位预测结果显示: *GmAMS* 定位在细胞核中。SOPMA 蛋白质二级结构预测显示 *GmAMS* 具有 53. 59% 无规则卷曲、32. 75% α -螺旋、9. 81% 衍生链和 3. 85% β -转角。



黑色方框:外显子;白色方框:非编码区;红色方框:bHLH 结构域;标尺长度:100 bp。
Black boxes;Exons; White boxes;Untranslated regions; Red boxes; bHLH domain; Scale bar: 100 bp.

图3 *GmAMS* 基因结构示意图
Fig.3 *GmAMS* gene structure diagram



氨基酸登录号依次为: 大豆, *GmAMS*, KRH36073. 1; 拟南芥, *AtAMS*, NP_179283. 2; 辣椒, *CaAMS*, AYA60478. 1; 木豆, *CcAMS*, KYP69184. 1; 苜蓿, *MtAMS*, XP_013470329. 1; 鹰嘴豆, *CiaAMS*, XP_004497179. 1; 红豆, *VaAMS*, XP_017413235. 1; 菜豆, *PvAMS*, XP_007142813. 1。红星表示碱性区域的第 5、9、13 位氨基酸。
Amino accession numbers: *Glycine max*, *GmAMS*, KRH36073. 1; *Arabidopsis thaliana*, *AtAMS*, NP_179283. 2; *Capsicum annuum*, *CaAMS*, AYA60478. 1; *Cajanus cajan*, *CcAMS*, KYP69184. 1; *Medicago truncatula*, *MtAMS*, XP_013470329. 1; *Cicer arietinum*, *CiaAMS*, XP_004497179. 1; *Vigna angularis*, *VaAMS*, XP_017413235. 1; *Phaseolus vulgaris*, *PvAMS*, XP_007142813. 1. Red star represents the 5th, 9th and 13th amino acids in the basic region.

图4 *GmAMS* 与其它物种同源蛋白质 bHLH 保守结构域的多序列对比
Fig.4 Multi-sequence comparison of bHLH conserved domains between *GmAMS* and its homologous proteins with other species

GmAMS 及其同源氨基酸序列的系统进化树分析表明:*GmAMS* 与木豆 (*Cajanus cajan*)、辣椒 (*Capsicum annuum*) 等植物的亲缘关系较近,与水稻 (*Oryza sativa*) 的亲缘关系较远(图 5)。

STRING 数据库预测 *GmAMS* 蛋白的互作网络,发现 *GmAMS* 蛋白可与 10 个大豆蛋白发生互作,它们

是 GLYMA12G18960. 1、GLYMA20G29600. 2、GLYMA-18G07960. 1、GLYMA16G07850. 2、GLYMA13G32360. 1、GLYMA10G38255. 1、GLYMA08G44950. 2、GLYMA-06G29960. 2、GLYMA03G41800. 1 和 GLYMA08G36320. 2 (图 6)。

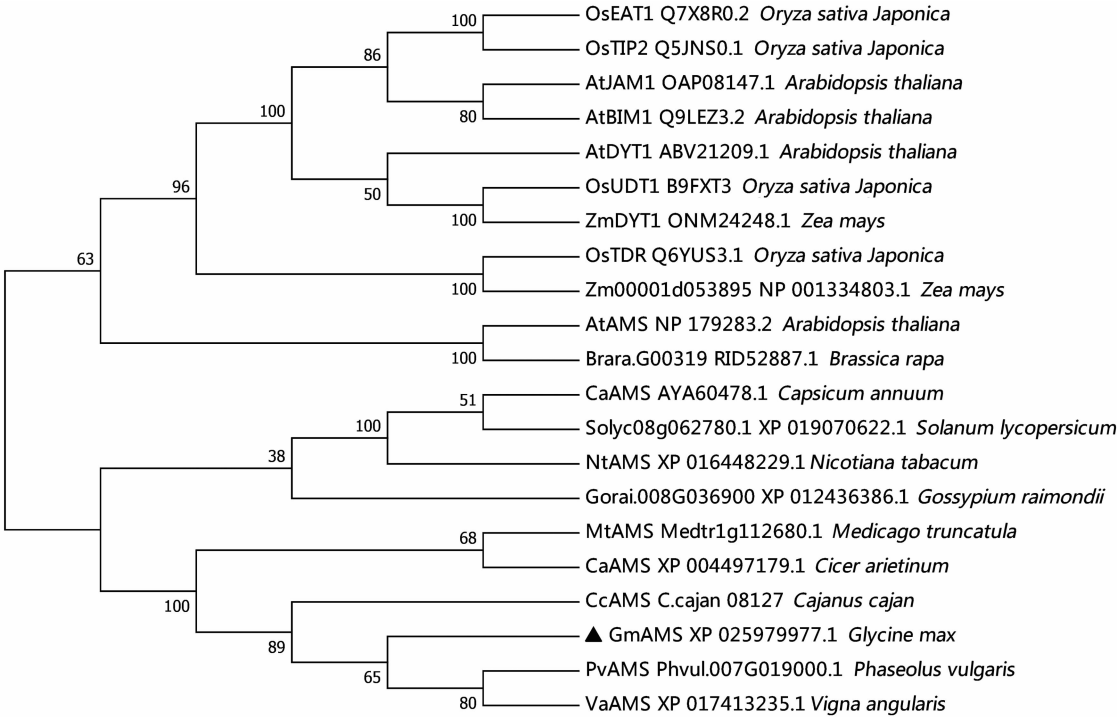


图 5 *GmAMS* 的系统进化分析
Fig. 5 Phylogenetic analysis of *GmAMS*

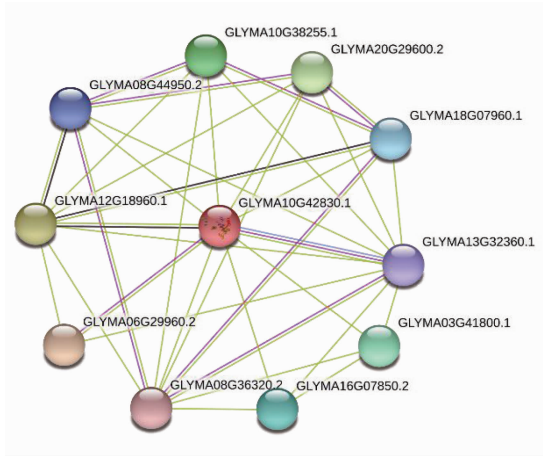


图 6 *GmAMS* 互作蛋白网络预测
Fig. 6 Prediction of protein interaction network of *GmAMS*

2.3 *GmAMS* 启动子序列分析

将 *GmAMS* 上游2 096 bp 的启动子序列在 TSSP 和 PlantCARE 上进行预测和分析。TSSP 预测结果显示:在1 433和1 850 bp 处各包含 1 个启动子,在 1 266 bp 处包含 1 个增强子。PlantCARE 预测结果

显示:*GmAMS* 启动子序列含有大量真核生物转录时 RNA 结合酶结合和转录调控所必需的核心启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box,同时还含有 MYB 结合位点、MYC 结合位点、逆境响应元件 TC-rich repeats、水杨酸反应响应元件 TCA-element、低温反应响应元件 LTR、分生组织表达响应元件 CAT-box、细胞周期响应元件 MSA-like、厌氧诱导响应元件 ARE 等多种调控元件(表 2)。

2.4 *GmAMS* 启动子时空表达模式分析

组织化学染色结果显示:野生型拟南芥植株各组织均未染色,未检测到 GUS 表达;阳性对照载质粒 35S:: GUS 转基因拟南芥植株的各组织均被染色;*GmAMS Pro*::GUS 转基因拟南芥植株苗期的根、下胚轴和叶片中均未检测到 GUS 蛋白的表达,开花期 GUS 蛋白在幼小的花药中被检测到,而在花簇、茎、叶、角果和种子中未检测到 GUS 蛋白的表达(图 7)。结果说明由 *GmAMS* 启动子驱动 GUS 蛋白主要在幼小的花药中表达,且表达强度随着花药发育而减弱。

表 2 *GmAMS* 启动子顺式作用元件的预测

Table 2 Prediction of cis-acting elements of *GmAMS* promoter

顺式作用元件 Cis-acting element	核心序列 Core sequence	功能 Function
Unnamed__1	GAATTTAATTAA	60K 蛋白结合位点
MSA-like	TCAAACGGT	细胞周期调控元件
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	逆境响应元件
A-box	CCGTCC	顺式作用调节元件
ARE	TGCTTT	厌氧诱导响应元件
circadian	CAANNNNATC	昼夜节律调控元件
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯响应元件
CAT-box	GCCACT	分生组织表达响应元件
Skn-1_motif	GTCAT	胚乳表达元件
CAAT-box	CAAT	启动子和增强子区域常见顺式作用元件
TATA-box	TATA	转录起始 - 30 bp 左右核心启动子元
Box-W1	TTGACC	真菌诱导响应元件
GT1-motif	GGTTAAT	光响应元件
Sp1	CC(G/A)CCC	光响应元件
MBS	TAACTG	干旱诱导相关的 MYB 结合位点
MBSII	AAAAAGTTAGTTA	类黄酮生物合成基因调控的 MYB 结合位点
CATT-motif	GCATTC	部分光响应元件
I-box	GGATAAGGTG	部分光响应元件
TCT-motif	TCTTAC	部分光响应元件
AE-box	AGAAACAA	部分光响应模块
Box 4	ATTAAT	参与光响应的部分保守 DNA 模块
TCA-element	TCAGAAGAGG	水杨酸反应顺式作用元件
LTR	CCGAAA	低温反应顺式作用元件

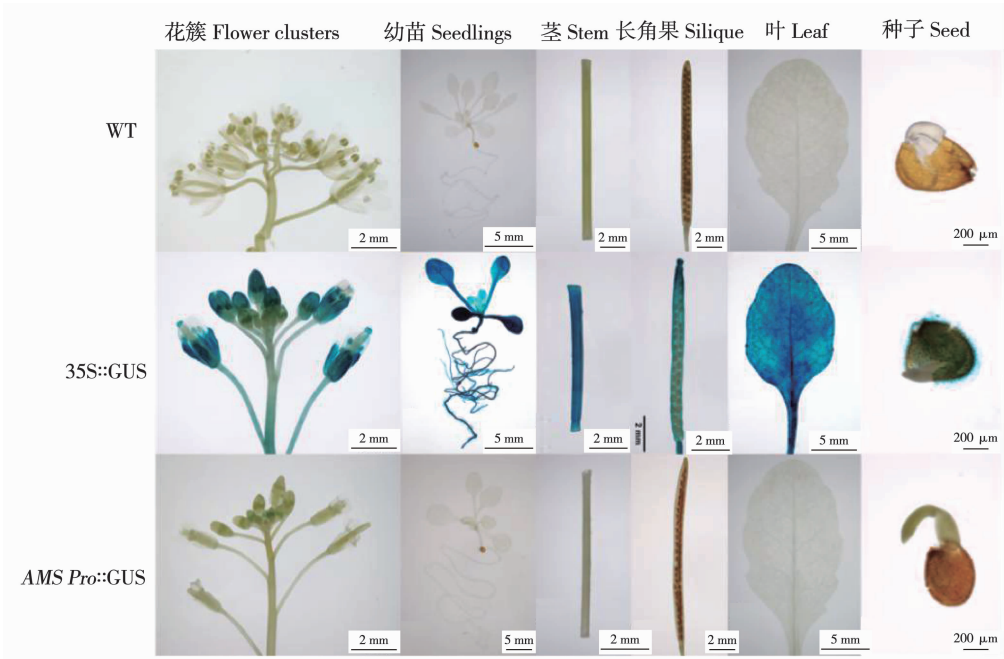


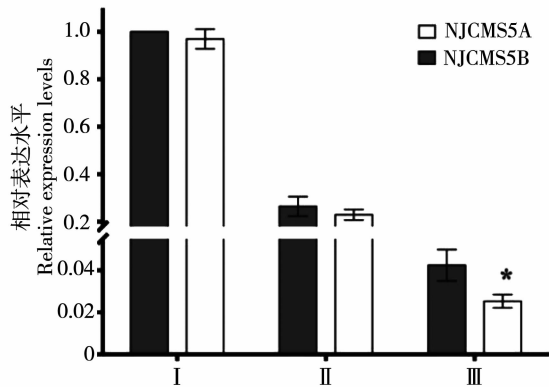
图 7 拟南芥组织化学染色分析

Fig.7 Comparison of histochemical staining in *Arabidopsis thaliana*

2.5 *GmAMS* 在大豆不育系和保持系的花芽组织中的时间表达分析

按花芽大小将采集的花芽分为第 I 阶段(小孢子母细胞至四分体期)、第 II 阶段(单核小孢子期)和第 III 阶段(二胞花粉早期),分别提取这 3 个阶段的花芽总 RNA 进行实时荧光定量分析。qRT-PCR

结果显示, *GmAMS* 在不育系 NJCMS5A 和保持系 NJCMS5B 花芽发育 3 个阶段中均有表达,其中 *GmAMS* 在花芽发育第 I 和 II 阶段表达水平差异不显著,而在花芽发育第 III 阶段的表达水平差异显著。在第 III 阶段,与 NJCMS5B 相比, *GmAMS* 在 NJCMS5A 中下调表达 0.60 倍(图 8)。



*:处理间在 $P < 0.05$ 水平存在显著性差异。
*:Thereis significant difference at $P < 0.05$ level between NJCMS5A and NJCMS5B.

图 8 *GmAMS* 在 NJCMS5A 和 NJCMS5B 花芽发育不同阶段的表达分析

Fig.8 Analysis of expression patterns of *GmAMS* in flower buds at different development stage between NJCMS5A and NJCMS5B

3 讨论

植物生殖发育过程涉及复杂的转录调控网络,特定的转录因子在特定的时间和空间的表达是正常发育所必需的,任何一个环节的异常都将导致生殖系统发育异常。植物 bHLH 转录因子家族通过转录激活或转录抑制等方式,广泛地参与植物雄配子发育、开花时间调控、根毛形成、逆境胁迫等过程^[8,10,24-27]。植物 bHLH 转录因子表达异常导致植物生殖发育过程紊乱已在拟南芥、水稻、玉米、番茄、大白菜等多个物种中报道^[8,9,28-30]。但关于大豆 bHLH 在花发育上的研究还比较滞后。前期组学和克隆获得 1 个在大豆花芽中差异表达的 bHLH 转录因子 *GmAMS*,并构建植物过表达载体。本研究通过将其启动子序列和 GUS 基因进行融合表达,分析 *GmAMS* 的时空表达模式。

目前对植物 bHLH 结构域的碱基组成,已经进行系统的分析和比较。bHLH 蛋白 N 端的碱性区域通常由 13 ~ 17 个碱性氨基酸组成,且超过 50% 的植物 bHLH 成员的碱性区域具有保守的 HER motif (His5-Glu9-Arg13,即第 5、9 和 13 号位置通常为组氨酸 H、谷氨酸 E 和精氨酸 R),其通过结合下游基因启动子区的 E-BOX 元件,调控下游基因的表达^[31-32]。本研究的多序列比对发现,大豆 *GmAMS* 第 9 和 13 号位置为谷氨酸(E)和精氨酸(R),而第

5 号位置为天冬酰胺(N),而非组氨酸(H)。进一步比较发现,在拟南芥 *AtAMS* 和辣椒 *CaAMS* 的 5 号位置也为天冬酰胺(N)^[9]。这种氨基酸的组成可能有助于其结合特定的靶基因,调控花发育相关基因的表达。此外,bHLH 主要通过同源或异源二聚体的形式发挥作用,而在 HLH 区高度保守的 23 位亮氨酸对于二聚体的形成是十分重要的^[32]。比对应后发现 23 位保守的亮氨酸,根据 Cheng 等^[18]对大豆 bHLH 转录因子家族的系统进化分析,*GmAMS* 属于 bHLH 家族第三组的第二亚家族(IIIb)。

植物中多数 bHLH 转录因子的表达具有组织与时空特异性,在不同的发育过程发挥重要作用^[5,17]。拟南芥 *AMS* 的 GUS 融合表达分析表明,*AtAMS* 主要在 0.6 ~ 1.1 mm 花芽的小孢子母细胞和绒毡层细胞中表达^[7]。原位杂交显示辣椒 *CaAMS* 主要在四分体到单核时期的绒毡层表达^[9]。本研究 GUS 融合表达载体转化拟南芥的分析发现大豆 *GmAMS* 的表达与拟南芥 *AtAMS*、辣椒 *CaAMS* 等基因的表达模式相似,主要在花药早期表达,推测 *GmAMS* 转录因子对大豆雄蕊的早期发育也起重要的调控作用。

Xu 等^[33]鉴定出 *AtAMS* 的 23 个靶标基因,它们主要参与胍胍质解离、脂肪酸延伸和合成、酚类化合物的形成和脂类转运等。对 STRING 预测的 *GmAMS* 的互作蛋白注释发现,其中的 5 个蛋白 (GLYMA12G18960、GLYMA20G29600、GLYMA13G32360、

GLYMA10G38255、GLYMA08G44950)注释的拟南芥同源基因都是参与拟南芥花粉发育的重要基因。*GLYMA12G18960* 是拟南芥 *CYP703A2* (AT1G01280) 的同源基因。*CYP703A2* 参与拟南芥花粉孢粉素的合成,敲除 *CYP703A2* 后拟南芥花粉外壁发育受损,花粉育性降低^[34]。*GLYMA20G29600* 和 *GLYMA10G38255* 编码富亮氨酸重复受体蛋白激酶(LRR-RPK),拟南芥 *ems1* 突变体产生多余的小孢子,缺少绒毡层细胞和异常发育的中层细胞,导致小孢子败育^[35]。此外,多转录因子间的组合调控是大量生物细胞过程调节的核心^[36]。bHLH 和 MYB 转录因子间的协同作用、组合调控植物的多个生物过程,如类黄酮生物的合成、花青素合成和孢粉素合成等过程^[37-39]。*GLYMA18G07960* 和 *GLYMA08G44950* 编码 MYB 转录因子 *AtMYB103*。*AtMYB103* 定位于细胞核,编码 R2R3 MYB 转录因子,其表达下调导致绒毡层提前降解和花粉畸形^[11]。推测 *GmAMS* 的异常表达影响其他花发育关键基因的表达,继而影响大豆花粉的正常发育。

随着转基因和基因编辑技术在大豆中的发展和利用,未来将获得过表达和敲除大豆植株,结合表型和生理指标分析可全面系统地挖掘 *GmAMS* 在大豆花发育上的功能及其调控网络。

4 结 论

本研究基于前期的转录组数据,从大豆中克隆出 1 个长度为1 716 bp、编码 571 个氨基酸、具有典型 bHLH 结构域的大豆 *GmAMS* 基因。启动子 GUS 融合表达分析显示,由 *GmAMS* 启动子驱动的 GUS 蛋白主要在幼小的花药中表达。荧光定量结果表明,对比保持系 NJCMS5B, *GmAMS* 在细胞质雄性不育系 NJCMS5A 中显著下调。STRING 蛋白互作分析推测 *GmAMS* 在不育系 NJCMS5A 的异常表达影响花发育相关重要基因的表达,造成大豆花粉发育异常。由于 bHLH 作用机制多样,仍需通过进一步试验验证 *GmAMS* 基因的功能,揭示 *GmAMS* 在大豆花发育过程的调控机制。

参考文献

[1] 刘永明,张玲,周建瑜,等. 植物细胞核雄性不育相关 bHLH 转录因子研究进展[J]. 遗传, 2015, 37(12):1194-1203. (Liu Y M, Zhang L, Zhou J Y, et al. Research progress of the bHLH transcription factors involved in genic male sterility in plants [J]. Hereditas, 2015,37(12):1194-1203.)

[2] Carretero P L, Galstyan A, Roig V I, et al. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae[J]. Plant

Physiology, 2010, 153(3):1398-1412.

[3] Sun H, Fan H J, Ling H Q. Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato[J]. BMC Genomics, 2015, 16:9.

[4] Jiang Y, Zeng B, Zhao H, et al. Genome-wide transcription factor gene prediction and their expressional tissue-specificities in maize [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(9):616-630.

[5] Hudson K A, Hudson M E. A classification of basic helix-loop-helix transcription factors of soybean[J]. International Journal of Genomics, 2015:603182.

[6] Song X M, Huang Z N, Duan W K, et al. Genome-wide analysis of the bHLH transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2014, 289(1):77-91.

[7] Sorensen A M, Krober S, Unte U S, et al. The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor[J]. Plant Journal, 2003, 33(2):413-423.

[8] Li N, Zhang D S, Liu H S, et al. The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development[J]. Plant Cell, 2006, 18(11):2999-3014.

[9] Guo J J, Liu C, Wang P, et al. The *Aborted Microspores (AMS)*-like gene is required for anther and microspore development in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(5):1341.

[10] Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, et al. Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *DYSFUNCTIONAL TAPE-TUMI (DYTI)* encoding a putative bHLH transcription factor[J]. Development, 2006, 133(16):3085-3095.

[11] Zhang Z B, Zhu J, Gao J F, et al. Transcription factor *AtMYB103* is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2007, 52(3):528-538.

[12] Zhu J, Chen H, Li H, et al. *Defective in Tapetal Development and Function 1* is essential for anther development and tapetal function for microspore maturation in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2008, 55(2):266-277.

[13] Yang C Y, Vizcay B G, Conner K, et al. *MALE STERILITY1* is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis[J]. Plant Cell, 2007, 19(11):3530-3548.

[14] Zhu J, Lou Y, Xu X, et al. A genetic pathway for tapetum development and function in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(11):892-900.

[15] Jung K H, Han M J, Lee Y S, et al. Rice *Undeveloped Tapetum1* is a major regulator of early tapetum development[J]. Plant Cell, 2005, 17(10):2705-2722.

[16] Niu N, Liang W, Yang X, et al. EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice[J]. Nature Communications, 2013, 4:1445.

[17] Li X, Duan X, Jiang H, et al. Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2006, 141(4):1167-1184.

[18] 程琳,薛亚杰,付觉民,等. 大豆 bHLH 转录因子家族成员的进化及功能分化研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2019, 32(1):27-38. (Cheng L, Xue Y J, Fu J M, et al. Evolu-

- tion and function divergence analysis of the bhlh transcription factor family in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2019, 32 (1): 27-38.)
- [19] Ferguson A C, Pearce S, Band L R, et al. Biphasic regulation of the transcription factor *ABORTED MICROSPORES* (*AMS*) is essential for tapetum and pollen development in *Arabidopsis* [J]. New Phytologist, 2017, 213(2):778-790.
- [20] Chou K C, Shen H B. Plant-mPLOC: A top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization [J]. PLoS One, 2010, 5(6):e11335.
- [21] van Bel M, Diels T, Vancaester E, et al. PLAZA 4.0: An integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46 (D1): D1190-D1196.
- [22] Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 1998, 16(6):735-743.
- [23] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. Gus fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO Journal, 1987, 6(13):3901-3907.
- [24] Heim M A, Jakoby M, Werber M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(5):735-747.
- [25] Menand B, Yi K, Jouannic S, et al. An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants [J]. Science, 2007, 316(5830):1477-1480.
- [26] Colangelo E P, Gueriot M L. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response [J]. Plant Cell, 2004, 16(12):3400-3412.
- [27] Li F, Guo S Y, Zhao Y, et al. Overexpression of a homopeptide repeat-containing bHLH protein gene (*OrbHLH001*) from Dongxiang wild rice confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(9):977-986.
- [28] Moon J, Skibbe D, Timofejeva L, et al. Regulation of cell divisions and differentiation by MALE STERILITY32 is required for anther development in maize [J]. Plant Journal, 2013, 76(4):592-602.
- [29] Jeong H J, Kang J H, Zhao M, et al. Tomato Male sterile 1035 is essential for pollen development and meiosis in anthers [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(22):6693-6709.
- [30] Liu T, Li Y, Zhang C, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor BcbHLHpol functions as a positive regulator of pollen development in non-heading Chinese cabbage [J]. Functional and Integrative Genomics, 2014, 14(4):731-739.
- [31] Feller A, Machemer K, Braun E L, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. Plant Journal, 2011, 66(1):94-116.
- [32] Heim M A, Jakoby M, Werber M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(5):735-747.
- [33] Xu J, Ding Z, Vizcay B G, et al. *ABORTED MICROSPORES* acts as a master regulator of pollen wall formation in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2014, 26(4):1544-1556.
- [34] Morant M, Jorgensen K, Schaller H, et al. CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen [J]. Plant Cell, 2007, 19(5):1473-1487.
- [35] Zhao D Z, Wang G F, Speal B, et al. The *EXCESS MICROSPO-ROCYTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther [J]. Genes and Development, 2002, 16 (15):2021-2031.
- [36] Istrail S, Davidson E H. Logic functions of the genomic cis-regulatory code [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(14):4954-4959.
- [37] Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(5):236-242.
- [38] Hichri I, Barrieu F, Bogs J, et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(8):2465-2483.
- [39] Xiong S X, Lu J Y, Lou Y, et al. The transcription factors MS188 and AMS form a complex to activate the expression of CYP703A2 for sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 2016, 88(6):936-946.