



大豆 *GmMADS* 基因的克隆及表达分析

任秋燕, 盖钧镒, 李 凯

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

摘要:为了探究大豆 MADS-box 编码基因在生物和非生物胁迫中的调控作用,以 SMV 抗感大豆品种为试验材料,从大豆中克隆 *GmMADS* 基因 Glyma.02g121500,进行生物信息学分析和表达特点分析,同时检测不同逆境胁迫下 *GmMADS* 基因表达量变化情况。结果表明:*GmMADS* 基因完整 ORF 长度为 735 bp,编码 244 个氨基酸,pI 6.68,相对分子质量为 28.2 kD。抗感品种间基因 CDS 序列存在 1 个 SNP 差异,氨基酸序列无差异。启动子序列包含防卫和胁迫响应元件、植物激素应答元件、光应答元件等许多顺式作用元件。*GmMADS* 与木豆、花生、豇豆、羽扇豆等物种中的同源基因亲缘关系较近。亚细胞定位结果显示 *GmMADS* 在细胞核上表达。组织特异性表达分析显示 *GmMADS* 在花中的表达量最高。接种大豆花叶病毒后,抗病品种科丰 1 号 *GmMADS* 在 2 h 表达最高且显著高于感病品种南农 1138-2;低温胁迫时,*GmMADS* 表达在 2 h 上调;盐胁迫时,*GmMADS* 表达在 1 h 下调;干旱胁迫时,*GmMADS* 表达在 2 h 下调。本研究对下一步分析该基因功能、阐明该基因在调控大豆抗病和耐逆的分子机制具有重要意义。

关键词:大豆;*GmMADS*;顺式作用元件;亚细胞定位;大豆花叶病毒(SMV);非生物胁迫

Cloning and Expression Analysis of Soybean Stress-tolerant Gene *GmMADS*

REN Qiu-yan, GAI Jun-yi, LI Kai

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

Abstract: In order to explore the regulatory role of soybean *GmMADS* gene in biotic and abiotic stresses, we cloned gene glyma.02g121500 from SMV resistant and susceptible soybean varieties. We analyzed the gene structure with bioinformatics, analyzed the expression characteristics, at the same time, we detected the expression of the gene under different stress. The results revealed: Gene glyma.02g121500 consisted a complete ORF of 735 bp encoding 244 amino acids. The theoretical isoelectric point is 6.68 and the relative molecular mass is 28.2 kD. The sequence alignment showed that there was one SNP difference in the CDS sequence between the resistant and susceptible varieties, and there was no difference in the amino acid sequence. Its promoter sequence contains a number of cis-acting elements such as defense and stress response elements, plant hormone response elements, photo responsive elements, and so on. The homologous genes in the species such as pigeonpea, peanut, cowpea and lupin were closely related. Subcellular localization results showed that *GmMADS* was expressed on the nucleus. Tissue-specific expression analysis showed that *GmMADS* had the highest expression in flowers. After soybean mosaic virus inoculation, the expression of *GmMADS* in resistant Kefeng 1 was highest at 2 h and significantly higher than the susceptible Nannong 1138-2. The expression of *GmMADS* was up-regulated at 2 h at low temperature stress, the expression of *GmMADS* was down-regulated at 1 h under salt stress and down-regulated at 2 h under drought stress. This study is important for the next step in analyzing the function of this gene and elucidating its molecular mechanism for regulating soybean disease resistance and tolerance.

Keywords: Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]; *GmMADS*; Cis-acting element; Subcellular localization; Soybean mosaic virus (SMV); Abiotic stress

收稿日期:2019-08-02

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0101504);国家自然科学基金(31671718);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04);江苏省现代作物生产协同创新(JCIC-MCP)。

第一作者简介:任秋燕(1994-),女,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: 2017101064@njau.edu.cn。

通讯作者:盖钧镒(1936-),男,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: sri@njau.edu.cn;

李凯(1979-),男,博士,副教授,硕导,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: kail@njau.edu.cn。

大豆是世界上食用油和植物蛋白的主要来源,大豆的生长发育受到干旱、盐碱和极端温度等非生物胁迫以及病虫害等生物胁迫的影响。MADS-box 转录因子家族在动物、植物及微生物的生长发育中都有重要的作用^[1-2],主要参与调控植物的非生物胁迫、花器官的生长发育、根的发育、胚胎以及果实的发育等^[3-6]。MADS-box 有 4 个特征功能域,从 N 末端到 C 末端,它们是 MADS-box (M)、intervening (I)、keratin-like (K)、和 C-terminal (C) 结构域(图 1)。MADS-box 基因的特征在于存在强保守的 DNA 结合结构域 MADS-box(M),M 结构域负责 DNA 与其靶基因调控区域中的 CC(A/T)GG 盒的结合,与其它 MADS-box 蛋白的二聚化以及核定位特性^[7-10]。

一些 MADS-box 基因的表达可能受到盐、干旱和寒冷胁迫等非生物胁迫的影响^[11-13]。例如,在番茄中,MADS-box 基因 TM4、TM5、TM6 和 TAG1 的表达在低温下大幅增加^[11]。在拟南芥中,AGL91 基因在经过冷胁迫后表达上调^[14]。在水稻中,7 个 MADS-box 基因在冷、盐、干旱胁迫下表现出差异表达,其中 3 个在脱水和盐胁迫下表现下调^[12]。此外,OsMADS26 的过表达会引起严重的干旱表型进而导致植物死亡,进一步研究表明 OsMADS26 参与抗病和耐旱的负调控^[15-16]。Zhang 等^[17]证明了烟草中 MADS1-H₂O₂-NO 途径介导多种 harpinXoo 触发的反应,包括气孔关闭、过敏性细胞死亡和防御相关基因表达,表明 MADS1 在其中起重要作用,调节烟草对 harpinXoo 的防御反应。这些结果表明 MADS-box 基因可能在植物对生物和非生物胁迫的抗、耐性中起关键作用。

大豆品种科丰 1 号是大豆抗大豆花叶病毒(SMV)病的优良材料。Wang 等^[18]以科丰 1 号×南农 1138-2 的 F₂ 群体(156 个单株),RIL 群体(184 个家系)和次级 F₂ 群体(181 个剩余杂合单株)为材料,将科丰 1 号对 SC8 的抗性基因 Rsc8 精细定位在大豆的 2 号染色体上约 200 kb 的区间内,GmMADS 位于该抗性基因区段内。Zhao 等^[19]以科丰 1 号、南农 1138-2 的 F₂ 群体(2 122 个单株)为材料,将该抗性基因进一步精确定位在大豆 2 号染色体上约 40 kb 的区间,GmMADS 是其中两个候选基因之一。推测大豆 GmMADS 基因极可能在大豆抗病、耐逆过程中发挥重要作用。

本研究从科丰 1 号和南农 1138-2 中克隆了 GmMADS 基因,并进行生物信息学分析、亚细胞定位和生物(SMV)及非生物胁迫下的表达分析,探究

大豆 GmMADS 基因在大豆抗病及耐非生物胁迫过程中的功能。

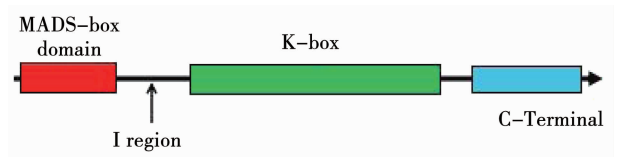


图 1 MADS 基因结构域示意图
Fig. 1 Domains of the gene MADS

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料与 SMV 株系 大豆抗 SMV 品种科丰 1 号、感 SMV 品种南农 1138-2、烟草本氏烟(Nicotiana benthamiana)和 SMV 株系 SC8 均由南京农业大学国家大豆改良中心提供。

1.1.2 载体与菌株 TA 克隆载体 pMD19-T Vector 购自 Takara 公司;入门载体 pDONR221 和终端载体 pGWB5::GFP Vector(瞬时表达载体)由本实验室保存;大肠杆菌(Escherichia coli)DH5α 感受态细胞购自 Tiangen 公司;根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)EHA105 感受态细胞由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 大豆 GmMADS 基因的克隆 用 Total RNA Kit(康为世纪)提取植物总 RNA;用 Oligo(dT) primers 和 PrimeScript TM II 1st strand cDNA Synthesis Kit(Takara)进行 cDNA 第一链的合成。根据前人精细定位结果^[18-19]检索参考基因组注释数据库 soybase(<https://soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/>)候选基因序列信息,利用软件 Primer Premier 5.0 在 UTR 区设计特异引物(表 1),对照菌株为 Tubulin,以科丰 1 号和南农 1138-2 cDNA 为模板,用 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase(Takara)扩增 GmMADS(Glyma.02g121500)编码区序列,将扩增的 PCR 产物连接到 T 载体并转化到大肠杆菌 DH5α 上,挑取单克隆进行 PCR 检测并在通用生物公司测序验证。

1.2.2 大豆 GmMADS 基因序列的生物信息学分析

使用 Bioxm2.7 对克隆的 GmMADS 进行序列比对,分析抗、感品种之间基因 CDS 序列及氨基酸序列差异;用 ProtParam 在线软件(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)分析 GmMADS 基因所编码蛋白质的理化性质;用 DNAMANTM 软件(LynnonBio-software version 8.0, Pointe-Claire, Canada)进行氨基酸序列比对;用 MEGA 7.0 软件进行系统进化分析,使用 neighbor-joining 搜索选项构建有根的基因树(来自 1 000 个引导重复的多数规则共识);选取 Gm-

MADS 基因起始密码子(ATG) 上游2 000 bp 的 DNA 序列, 用 PlantCARE 在线软件(<http://bioinformatics.psib.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子序列分析。

表 1 基因克隆、亚细胞定位、qRT-PCR 引物

Table 1 Primers of gene cloning, subcellular localization, qRT-PCR

用途 Useage	方向 Direction	序列(5′-3′) Sequence(5′-3′)
基因克隆 Gene cloning	F	ACAAATAAGAGGGCAGAAGGG
	R	GCCTGTTCTTGTAGGCCAAG
亚细胞定位 Sub-localization	F	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGGGTAGGGGAAAGGTGGAGC
	R	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTC</u> ATCCATCCATTTCATGAAT
荧光定量 PCR qRT-PCR	F	TAGGGGAAAGGTGGAGCTGA
	R	TCAGGTTGGTGCTGGACTTC
<i>Tubulin</i>	F	GGAGTTCACAGAGGCAGAG
	R	CACTTACGCATCACATAGCA

下划线表示 Gateway 方法接头序列。
The underline indicates the joint sequence of Gateway.

1.2.3 大豆 *GmMADS* 的亚细胞定位 利用 Gateway 方法,使用终端载体 pGWB5::GFP 构建亚细胞定位融合表达载体。在 *GmMADS* 的两端加上与载体酶切位点两侧序列一致的接头,去除终止子后设计扩增引物(表 1),将构建好的载体采用冻融法转入农杆菌 EHA105 感受态细胞中,于含有 25 mg·L⁻¹利福平和 50 mg·L⁻¹卡那霉素的 YEB 平板上培养单克隆,鉴定为阳性的单克隆经测序验证正确后,将菌株在含有卡那霉素以及利福平抗生素(100 mg·L⁻¹)的 YEB 液体培养基中,培养至对数期(OD₆₀₀ = 0.2 ~ 0.6)。离心去上清,加入 5 mL 渗透液悬浮菌体,避光常温条件下放置 2 ~ 3 h。选择生长健康的烟草放置于白炽灯下 2 h,使烟草叶片气孔打开。针头刺穿烟草的倒三叶或倒四叶,用 1 mL 注射器吸取的悬浮菌液,轻轻的从烟草背面注射入烟草叶片。将注射区域标注好,然后放在培养室中 48 ~ 72 h 在激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM780)下进行观察并拍照记录。

1.2.4 大豆 *GmMADS* 基因的组织特异性表达分析 在盛花期取南农 1138-2 的根、茎、叶、花和幼荚组织,3 个生物学重复,液氮速冻后冻存于 -80 ℃冰箱备用。提取所采组织的总 RNA,用总 RNA 反转试剂盒(康为世纪)进行第一链 cDNA 的合成(Vazyme),采用 qRT-PCR 方法,以 cDNA 为模板,设计 *GmMADS* 和内参基因 *Tubulinα*(GenBank 登录号:AY907703)的特异性引物(表 1),分析 *GmMADS* 在不同组织间的表达水平。荧光定量 PCR 反应体系为(20 μL):2.0 μL cDNA,10.0 μL 2 × SYBR qPCR

Master Mix,F-primer 和 R-primer 各 1.0 μL,6.0 μL ddH₂O。反应程序为:95 ℃预变性 3 min;98 ℃变性 15 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,39 个循环。每个样本进行 3 次重复。所使用的 PCR 仪器型号为 Bio-Rad CFX96,SYBR qPCR Master Mix 购于 Vazyme。使用相对定量(2^{-ΔΔCT})方法计算 qRT-PCR 结果,下同。

1.2.5 大豆抗感品种 *GmMADS* 响应 SMV 诱导的表达分析 将抗、感品种分别盆播于防虫网室中,待真叶展开后接种 SMV 株系 SC8,以未处理和接种磷酸缓冲液处理为对照,接种后在不同时间点(0,1,2,4,8,12,24,48,72 和 168 h)采集适量叶片;3 个生物学重复,分别提取总 RNA,进行第一链 cDNA 合成。利用 qRT-PCR 方法,以 *Tubulinα* 为内参基因,分析 *GmMADS* 在抗感品种中不同时间点的表达量。

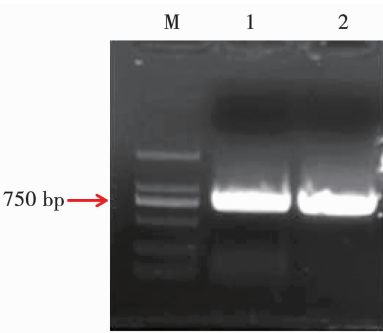
1.2.6 大豆 *GmMADS* 响应非生物胁迫的表达分析 将南农 1138-2 播种在营养基质:蛭石为3:1 的塑料盆(直径 10 cm)中。置于光照培养箱中生长,条件为昼 25 ℃/夜 21 ℃温度循环,75%相对湿度和 16 h 光照/8 h 黑暗光周期循环。设置 3 种非生物胁迫处理:冷处理,将三出复叶植株置于 4 ℃培养箱;盐处理,取三出复叶植株置于改良后的 1/2 Hoagland 中培养,加入 200 mmol · L⁻¹ NaCl 溶液;干旱处理,取三出复叶植株置于改良后的 1/2 Hoagland 中培养,然后加入 20% PEG-6000。3 种处理分别于 0,0.5,1,2,4,8,12,24 h 取样,3 次重复;以 0 h 处理作为对照。提取所采组织的总 RNA,进行第一

链 cDNA 的合成。以 cDNA 为模板,设计 *GmMADS* 和内参基因 *Tubulin α* 的特异性引物(表 1),利用 qRT-PCR 方法分析 *GmMADS* 在不同时间点的表达情况。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmMADS* 基因的克隆及序列比对

科丰 1 号和南农 1138-2 *GmMADS* 基因完整 ORF 的 cDNA 片段 PCR 扩增电泳结果如图 2 所示, CDS 全长 735 bp,编码 244 个氨基酸,pI 6.68,相对分子质量为 28.2 kD。科丰 1 号与南农 1138-2 CDS 序列在 324 bp 处存在 1 个 SNP 差异,由红色框标出(图 3),编码苏氨酸。存在差异的碱基是编码氨基酸的第 3 个密码子,所以最终编码的氨基酸序列无差异(图 4)。



M:Marker DL2000;1:科丰 1 号;2:南农 1138-2。
M: Marker DL2000; 1: Kefeng 1; 2: Nannong 1138-2.

图 2 大豆 *GmMADS* 基因 PCR 扩增条带
Fig. 2 PCR amplification products of soybean *GmMADS* gene

Kefeng 1	ATGGGTAGGGGAAAGGTGGAGCTGAAGAGGATTGAGAACAAGATAAACCGTCAAGTGACATTGCAAGAGGAGGAATGGTTGCTCAAAAAGGC	
NN1138-2	ATGGGTAGGGGAAAGGTGGAGCTGAAGAGGATTGAGAACAAGATAAACCGTCAAGTGACATTGCAAGAGGAGGAATGGTTGCTCAAAAAGGC	
Kefeng 1	TTATGAACCTCTCTGCTCTGTGTGCTGAGGTTGCCCTTATTATCTTCTCCAACCGTGGCAAGGTGTATGAGTTCTGCAGCGGCCATAGCATGG	
NN1138-2	TTATGAACCTCTCTGCTCTGTGTGCTGAGGTTGCCCTTATTATCTTCTCCAACCGTGGCAAGGTGTATGAGTTCTGCAGCGGCCATAGCATGG	
Kefeng 1	CCAAGACACTTGAACGGTATCACAGATGCAGTTATGGAGCCTTGGAAAGTCCAGCACCAACCTGAAATAGAGACACAGAGGCGCTACCAAGAGTAC	
NN1138-2	CCAAGACACTTGAACGGTATCACAGATGCAGTTATGGAGCCTTGGAAAGTCCAGCACCAACCTGAAATAGAGACACAGAGGCGCTACCAAGAGTAC	
Kefeng 1	CTGAAGCTAAAAATCCAGAGTTGAGGCACTACAGCAAAACCAAAAGAAACCTCCTTGGGGAAGAATTGGAGCACTTAGACGTTAAGGACCTTGAGCA	
NN1138-2	CTGAAGCTAAAAATCCAGAGTTGAGGCACTACAGCAAAACCAAAAGAAACCTCCTTGGGGAAGAATTGGAGCACTTAGACGTTAAGGACCTTGAGCA	
Kefeng 1	GCTTGAACGTCAGCTGGACTCTTCCCTGAAGCAAAATCAGGTCAAACAAGACACAACAAATGCTCGATCAACTCGCTGATTTCATAGAAAAGGAAG	
NN1138-2	GCTTGAACGTCAGCTGGACTCTTCCCTGAAGCAAAATCAGGTCAAACAAGACACAACAAATGCTCGATCAACTCGCTGATTTCATAGAAAAGGAAG	
Kefeng 1	AGATGCTACTGGAGACTAACAATATCTTGAGGAACAAGTTGGAGGAAATCAATGTAGCCCTTCAACCAACATGGGAAACTAGGGAGCAAAATGCT	
NN1138-2	AGATGCTACTGGAGACTAACAATATCTTGAGGAACAAGTTGGAGGAAATCAATGTAGCCCTTCAACCAACATGGGAAACTAGGGAGCAAAATGCT	
Kefeng 1	CCATACAATTACCACCCTTCCCAATCAGAGGGATATTATGAGACAGCACATTGCAACAGTACATTGCGAATTGGCTATGATTCTTCAGGGTTAAA	
NN1138-2	CCATACAATTACCACCCTTCCCAATCAGAGGGATATTATGAGACAGCACATTGCAACAGTACATTGCGAATTGGCTATGATTCTTCAGGGTTAAA	
Kefeng 1	TGAAGCAGGAGGAGCTGCAGGAACCTCAGCCCAAAATGCTAGTGAATTCATGAATGGATGGATGAACATAA	735
NN1138-2	TGAAGCAGGAGGAGCTGCAGGAACCTCAGCCCAAAATGCTAGTGAATTCATGAATGGATGGATGAACATAA	735

图 3 抗感品种间 *GmMADS* CDS 序列比对

Fig. 3 Sequence alignment of the *GmMADS* CDS between resistant and susceptible varieties

Kefeng 1	MGRGKVELKRIENKINRQVTFKRNRGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYEFCSGHSMAKTLERY	70
NN1138-2	MGRGKVELKRIENKINRQVTFKRNRGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYEFCSGHSMAKTLERY	70
Kefeng 1	HRCSYGALEVQHQPETETQRRYQEYLLKLSRVEALQQTQRNLLGEELEHLVDKLEQLERQLDSSLKQIR	140
NN1138-2	HRCSYGALEVQHQPETETQRRYQEYLLKLSRVEALQQTQRNLLGEELEHLVDKLEQLERQLDSSLKQIR	140
Kefeng 1	SNKTQQMLDQLADLHRKEEMLLETNNILRNKLEEINVALQPTWETREQNAPYNYHFSQSEGYETAH CNS	210
NN1138-2	SNKTQQMLDQLADLHRKEEMLLETNNILRNKLEEINVALQPTWETREQNAPYNYHFSQSEGYETAH CNS	210
Kefeng 1	TLRIGYDSSGLNEAGGAAGTSAQNASEFMNGWMN	244
NN1138-2	TLRIGYDSSGLNEAGGAAGTSAQNASEFMNGWMN	244

图 4 抗感品种间 *GmMADS* 氨基酸序列比对

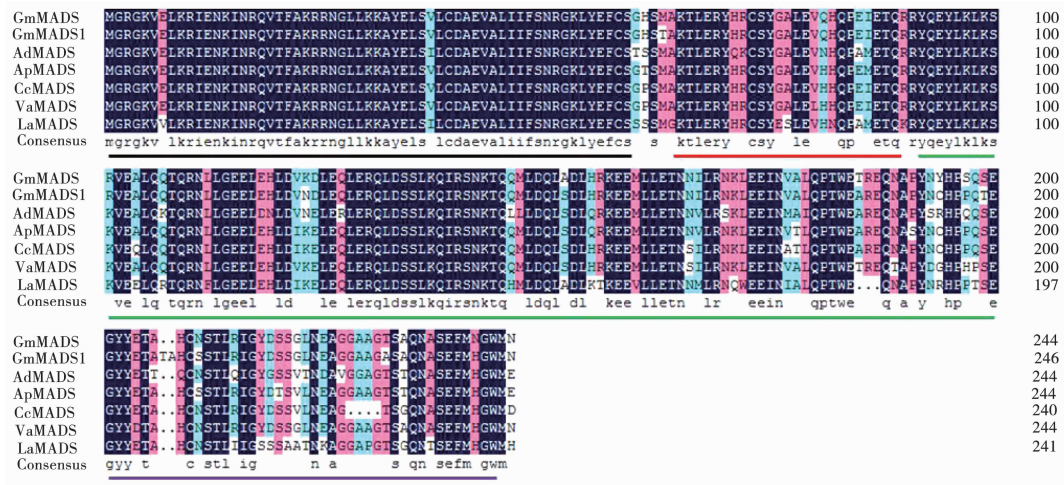
Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of the *GmMADS* between resistant and susceptible varieties

2.2 大豆 *GmMADS* 基因的生物信息学分析

2.2.1 大豆 *GmMADS* 同源基因的氨基酸序列比对

对 NCBI 数据库的 Blastp 进行搜索, *GmMADS* 氨基酸序列与来自大豆的 *GmMADS1* (GenBank 登录号: XP_003518786.1) 相似度为 95.12%, 与花生 *AdMADS* (GenBank 登录号: XP_015965820.1) 相似度为 84.36%; 与鸡骨草 *ApMADS* (GenBank 登录号: XP_027362769.1) 相似度为 92.18%; 与木豆 *Cc-*

MADS (GenBank 登录号: XP_020213192.1) 相似度为 91.39%; 与豇豆 *VaMADS* (GenBank 登录号: XP_017426583.1) 相似度为 94.26%; 与羽扇豆 *LaMADS* (GenBank 登录号: XP_019461015.1) 相似度为 81.97%。将 *GmMADS* 序列与 *MADS* 蛋白家族的其它成员进行比较, 发现 *GmMADS* 含有特征性 *MADS-box* 结构域以及 I、K 和 C 结构域(图 5)。



黑色下划线: *MADS-box* 结构域; 红色下划线: I 结构域; 绿色下划线: K-box 结构域; 紫色下划线: C 结构域。

Black underline: *MADS-box* domain; Red underline: I region domain; Green underline: K-box domain; Purple underline: C region domain.

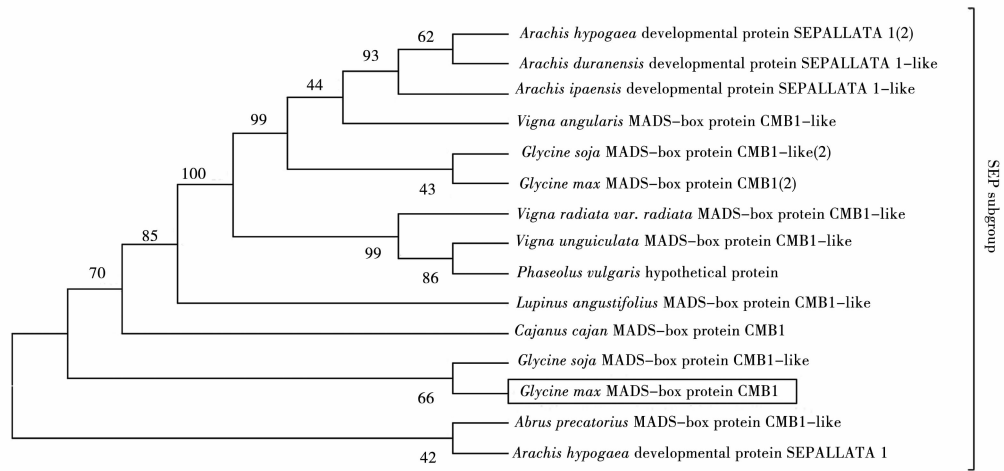
图 5 *GmMADS* 与大豆及其它物种同源基因的氨基酸序列比对

Fig. 5 Alignment of amino sequences of the *GmMADS* with its homologous in soybean and other species

2.2.2 大豆 *GmMADS* 同源基因的系统进化分析

构建系统发育树, 评估 *GmMADS* 与其它植物 *MADS* 组蛋白之间的分子进化关系, 结果显示: *GmMADS* 属于 *MADS-box* 转录因子家族的 SEP 亚组(图 6),

SEP 是与 ABCDE 模型相关的亚家族^[20]。 *GmMADS* 除了与大豆中同源基因亲缘关系非常接近以外, 还与木豆、花生、豇豆、羽扇豆等物种中的同源基因亲缘关系较近。



在每个分支节点处指示 Bootstrap 值。
Bootstrap values are indicated at each branch node.

图 6 *GmMADS* 蛋白系统发育进化树

Fig. 6 Phylogenetic analysis of *GmMADS* with its homologous in soybean and other species

2.2.3 大豆 *GmMADS* 基因的启动子序列分析 启动子序列分析结果如表 2 所示:该启动子序列不仅包含必须的起始转录位点、TATA-BOX 等,而且还包含许多与基因功能相关的顺式作用元件,如防卫和胁迫响应元件 TC-rich repeats 和 ARE,植物激素应答元件 ABRE、P-box 和 TCA-element,光应答元件

AE-box、AT1-motif、ATC-motif、Box 4、G-Box、GA-motif、GATA-motif、I-box、MRE、chs-CMA2a 和 TCT-motif,以及基因表达和生理调控元件 GCN4-motif。由此可见,*GmMADS* 很有可能参与大豆防卫和胁迫反应以及生长发育过程。

表 2 *GmMADS* 基因启动子顺式调控元件及其功能预测
Table 2 The cis-regulatory sequence and function prediction in the promoter of *GmMADS* gene

调控元件 Regulatory sequence	位置 Position	核心序列 Core sequence	预测功能 Predicted Functions
ABRE	+ 834 , - 1080	ACGTG	脱落酸响应元件
AE-box	+ 1469	AGAAACAA	光响应模块
ARE	+ 826 , + 1380	AAACCA	低氧胁迫诱导元件
AT1-motif	- 1127	AATTATTTTTTATT	光响应模块
ATC-motif	- 1617	AGTAATCT	光应答元件
Box 4	+ 206 , + 1124 , + 309 , - 239	ATTAAT	光应答元件
G-Box	+ 1080 , - 833	CACGTT	光应答元件
GA-motif	+ 11	ATAGATAA	光响应模块
GATA-motif	+ 1881	GATAGGA	光响应模块
GCN4-motif	+ 1609	TGAGTCA	胚乳表达所需的调节元件
I-box	- 943	TGATAATGT	光响应模块
MRE	+ 159	AACCTAA	光反应 MYB 结合位点
P-box	- 2120	CCTTTTG	赤霉素响应元件
TC-rich repeats	- 46	ATTCTCTAAC	防卫和胁迫响应元件
TCA-element	- 150	TCAGAAGAGG	水杨酸应答元件
TCT-motif	+ 1659	TCTTAC	光响应模块
chs-CMA2a	- 1931	TCACTTGA	光响应模块

2.3 大豆 *GmMADS* 的亚细胞定位

采用冻融法将重组质粒转化到农杆菌中,在本氏烟叶肉表皮细胞中进行融合蛋白的瞬时表达,激光共聚焦显微镜观察显示:融合蛋白 pGWB5::Gm-

MADS 在细胞核上显示出荧光信号,而空载 pGWB5::GFP 表达的 GFP 蛋白在整个细胞(细胞膜、细胞质和细胞核)中都有表达,说明 *GmMADS* 基因在细胞核上表达(图 7)。

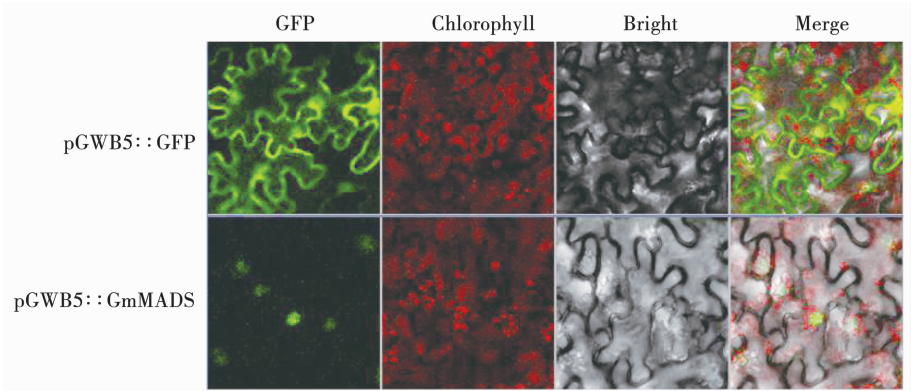


图 7 大豆 *GmMADS* 的亚细胞定位
Fig. 7 Subcellular localization of the *GmMADS*

2.4 GmMADS 基因的组织特异性表达分析

为进一步探究该基因的空间表达模式,分析南农 1138-2 品种 *GmMADS* 基因在根、茎、叶、花、幼荚等器官中的特异性表达模式,结果表明:*GmMADS* 在各组织中表达差异显著,其中在花中表达最高,其次是荚,且明显高于其它组织,根中表达量最低(图 8)。

2.5 大豆抗感品种 GmMADS 响应 SMV 诱导的表达分析

如图 9 所示,科丰 1 号中初始 *GmMADS* 的表达量高于南农 1138-2,接种 SMV 之后,科丰 1 号中 *GmMADS* 的表达量在 2 h 达到最高且显著高于其它时间点,而南农 1138-2 中各时间点无显著变化;接种 2 h 抗、感品种表达差异显著,科丰 1 号显著高于南农 1138-2,表明科丰 1 号能快速响应 SMV 的侵

染,增加 *GmMADS* 的表达量。

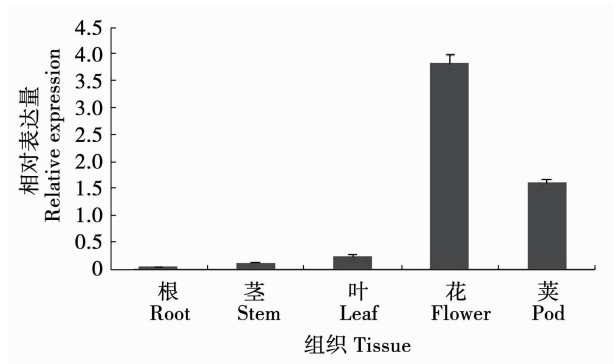
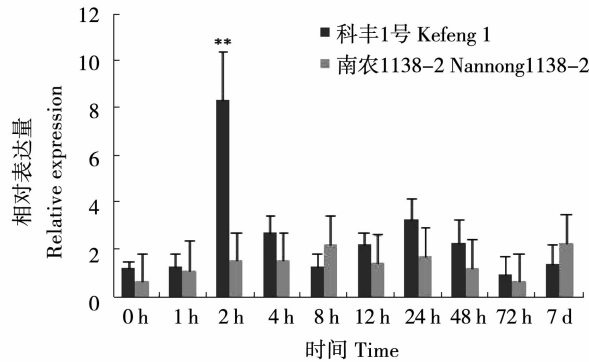


图 8 *GmMADS* 基因的组织特异性表达分析
Fig. 8 Tissue-specific expression analyses of the *GmMADS*



** 表示 $P < 0.01$ 水平的极显著差异。
** indicates extremely significant difference at $P < 0.01$ level.

图 9 SMV 诱导下抗感品种 *GmMADS* 的表达分析
Fig. 9 Expression analyse of the *GmMADS* between resistant and susceptible varieties

2.6 大豆 GmMADS 响应非生物胁迫的表达分析

低温处理后,科丰 1 号 *GmMADS* 的表达在 2 h 达到最高,随后又开始下调,24 h 又开始上调;盐处理后,*GmMADS* 的表达先下调,1 h 达到最低,然后逐渐趋于稳定,最后略高于正常值;干旱处理后,

GmMADS 的表达在 2 h 达到最低,之后逐渐升高,12 h 达到表达峰值,随后再次下降。以上结果说明 *GmMADS* 在进行非生物胁迫后,其表达量会出现显著变化,表明该基因能够响应非生物胁迫,在参与大豆抗逆调控网络中具有重要作用(图 10)。

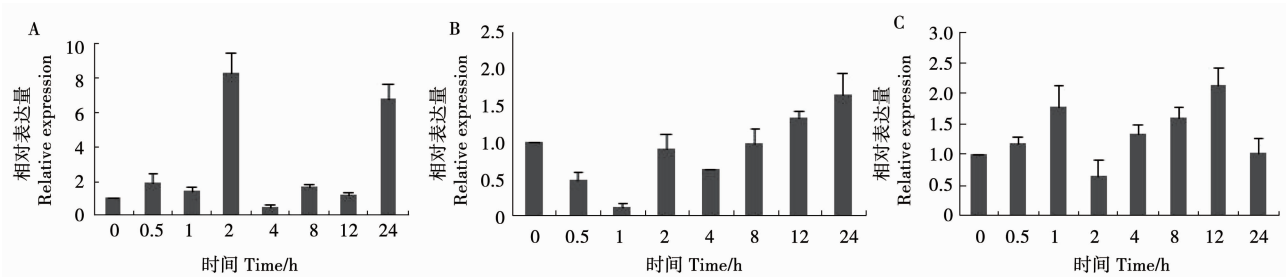


图 10 *GmMADS* 响应冷 (A)、盐 (B)、干旱 (C) 胁迫处理的表达分析
Fig. 10 Expression analyse of the *GmMADS* in cold (A), salt (B) and drought (C) treatments

3 讨 论

与所有植物一样,大豆在环境中不断受到各种非生物和生物胁迫。植物防御对非生物和生物胁迫反应的一个共同特征是对受到各种应激反应后基因表达的转录水平控制。转录因子被认为在响应干旱,高盐,极端温度,氧化应激和病原体攻击等不利条件时,能够调节相关基因的表达^[21]。在植物中,MADS-box 基因以其在生长发育过程中的所起的重要作用而闻名。然而,进一步的深入研究表明,MADS-box 基因的表达也受到盐,干旱和低温等非生物胁迫的影响^[11-13],Guo 等^[22]发现 *Solanum lycopersicum* agamous-like MADS-box 蛋白 *AGLI5* 基因 *SIMBP11* 受非生物胁迫如盐,脱水和伤口的迅速诱导,*SIMBP11* 也被许多植物激素诱导,该基因通过 ABA 非依赖性信号网络在正向调节耐盐胁迫。从辣椒 (*Capsicum annuum*) 中分离出的 MADS-box 转录因子基因 *CaMADS* 的表达由低温和高温、盐和渗透胁迫诱导,经过 VIGS 和过表达验证,表明 *CaMADS* 在冷、盐和渗透胁迫信号通路中起到正向调控的作用^[23]。在羊草 [*Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel] 中的 11 个 MADS-box 基因中,冷处理能够诱导 *LcMADS1* 和 *LcMADS2* 的表达,NaCl 可以显著上调 *LcMADS9* 的表达^[24]。RNA-seq 分析显示水稻 *MADS26* 基因 (LOC_Os08g02070) 在转基因水稻中下调^[25],而该基因的下调表达显示出对稻瘟病和细菌性枯萎病的抗性增强,这一结果表明 *OsMADS26* 可作为对病原体抗性的负调节因子^[26]。由此可见,MADS-box 基因在植物参与调控耐非生物和生物胁迫中具有重要作用。

在本研究中,*GmMADS* 在大豆叶片中的表达量很低,并且在接种 SMV 之前,其表达量非常低,接种 SMV 后表达量显著上升。这可能说明 *GmMADS* 是一种诱导型基因,在正常情况下,该基因表达很少,在特定生长发育时期或者遇到外界不利条件攻击时,表达量显著上调。*GmMADS* 在大豆的花和莢表达较高,表明该基因是调控大豆生殖生长过程中非常重要的组织特异性基因。

本研究发现,低温处理后,*GmMADS* 的表达在 2 h 达到最高,表明 *GmMADS* 可能是调控耐低温的正转录因子;盐处理后,*GmMADS* 的表达先下调,1 h 达到最低,然后逐渐趋于稳定最后略高于正常值;干旱处理后,*GmMADS* 的表达在 2 h 达到最低,表明 *GmMADS* 可能负向调控大豆耐盐和耐旱。除此之

外,在各种非生物胁迫下,*GmMADS* 表达量短时间内(1~2 h)发生很大变化。*GmMADS* 是一种转录因子,能在细胞核中表达,这可能说明大豆中其它 MADS-box 转录因子在响应外界不利条件时,也能快速响应并表达,该推测有待于深入研究。

本研究发现抗病品种科丰 1 号与感病品种南农 1138-2 的 *GmMADS* 氨基酸序列并无差异。SMV 接种试验中,科丰 1 号中初始 *GmMADS* 的表达量高于南农 1138-2,且科丰 1 号中 *GmMADS* 的表达量在短时间内迅速上升,而南农 1138-2 中各时间点无显著变化,抗病品种中导致 *GmMADS* 的表达量较高的原因有待进一步研究,启动子等调控序列差异、抗感品种间 *GmMADS* 存在蛋白水平的修饰、与大豆中其他 MADS-box 蛋白形成同源二聚体和异源二聚体影响其它抗病基因的表达,这些原因都有可能导导致抗感差异。

4 结 论

本研究从大豆中克隆了 *GmMADS* 基因,其完整 ORF 长度为 735 bp,编码 244 个氨基酸。其启动子序列包含许多防卫和胁迫响应元件、植物激素应答元件和光应答元件等顺式调控元件,可能参与大豆抗病、耐胁迫以及生长发育过程。*GmMADS* 与木豆、花生等的 MADS-Box 基因编码蛋白亲缘关系较近。该基因定位于细胞核,在花中表达最高,且能快速响应 SMV 诱导及低温、盐、干旱等非生物胁迫,表明其可能在大豆抗病耐逆过程中发挥重要作用,本研究为进一步阐明 *GmMADS* 基因在大豆抗 SMV 和耐非生物胁迫过程中的作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Shore P, Sharrocks A D. The MADS-box family of transcription factors[J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 229(1): 1-13.
- [2] Messenguy F, Dubois E. Role of MADS box proteins and their co-factors in combinatorial control of gene expression and cell development[J]. Gene, 2003, 316(1):1-21.
- [3] Dong T, Hu Z, Deng L, et al. A tomato MADS-Box transcription factor, SIMADS1, acts as a negative regulator of fruit ripening [J]. Plant Physiology, 2013, 163(2):1026-1036.
- [4] Dornelas M C, Patreze C M, Angenent G C, et al. MADS: The missing link between identity and growth? [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(2): 89-97.
- [5] Lu S J, Wei H, Wang Y, et al. Overexpression of a transcription factor OsMADS15 modifies plant architecture and flowering time in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Molecular Biology Reporter,

2012, 30(6):1461-1469.

[6] Masiero S, Colombo L, Grini P E, et al. The emerging importance of Type I MADS Box transcription factors for plant reproduction [J]. The Plant Cell, 2011, 23(3):865-872.

[7] Zhu C, Perry S E. Control of expression and autoregulation of AGL15, a member of the MADS-box family[J]. The Plant Journal, 2005, 41(4): 583-594.

[8] Yang Y, Fanning L, Jack T. The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA[J]. The Plant Journal, 2003, 33(1): 47-59.

[9] Riechmann J L, Meyerowitz E M. MADS domain proteins in plant development [J]. Biological Chemistry, 1997, 378 (10): 1079-1102.

[10] Cho S, Jang S, Chae S, et al. Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* APETALA1 as a transcription activation domain[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 40(3):419-429.

[11] Lozano R. Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-Box genes [J]. Plant Physiology, 1998, 117(1): 91-100.

[12] Arora R, Agarwal P, Ray S, et al. MADS-box gene family in rice: Genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress[J]. BMC Genomics, 2007, 8(1): 242.

[13] Tardif G, Kane N A, Hélène Adam, et al. Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(5): 703-718.

[14] Lee B H , Henderson D A , Zhu J K . The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1[J]. Plant Cell, 2005, 17(11):3155-3175.

[15] Lee S, Woo Y M, Ryu S I, et al. Further characterization of a rice AGL12 group MADS-Box gene, *OsMADS26*[J]. Plant Physiology, 2008, 147(1):156-168.

[16] Khong G N, Pati P K, Richaud F, et al. OsMADS26 negatively regulates resistance to pathogens and drought tolerance in rice[J]. Plant Physiology, 2015, 169(4): 2935-2949.

[17] Zhang H, Teng W, Liang J, et al. MADS1, a novel MADS-box protein, is involved in the response of *Nicotiana benthamiana* to bacterial harpinXoo[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 67(1):131-141.

[18] Wang D, Ma Y, Yang Y, et al. Fine mapping and analyses of RSC8 resistance candidate genes to soybean mosaic virus in soybean [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2011, 122 (3): 555-565.

[19] Zhao L, Wang D, Zhang H, et al. Fine mapping of the RSC8 locus and expression analysis of candidate SMV resistance genes in soybean[J]. Plant Breeding, 2016, 135(6):701-706.

[20] TheiBen G, Saedler H. Floral quartets[J]. Nature, 2001, 409: 469-471.

[21] Rushton P J, Somssich I E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens [J]. Current Opinion in Plant Biology, 1998, 1(4): 311-315.

[22] Guo X, Chen G, Cui B, et al. *Solanum lycopersicum* agamous-like MADS-box protein *AGLI5*-like gene, *SIMBP11*, confers salt stress tolerance[J]. Molecular Breeding, 2016, 36(9):125.

[23] Chen R, Ma J, Luo D, et al. CaMADS, a MADS-box transcription factor from pepper, plays an important role in the response to cold, salt, and osmotic stress [J]. Plant Science, 2019, 280: 164-174.

[24] Jia J, Zhao P, Cheng L, et al. MADS-box family genes in sheepgrass and their involvement in abiotic stress responses [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 42.

[25] Qi Z, Yu J, Shen L, et al. Enhanced resistance to rice blast and sheath blight in rice (*Oryza sativa* L.) by expressing the oxalate decarboxylase protein Bacisubin from *Bacillus subtilis* [J]. Plant Science, 2017, 265:51-60.

[26] Khong G N, Pati P K, Richaud F, et al. OsMADS26 negatively regulates resistance to pathogens and drought tolerance in rice[J]. Plant Physiology, 2015, 169(4): 2935-2949.