



核糖体基因 *GmRPL12* 对大豆低硫耐性的调控作用研究

陈燕宁,吴志医,元文杰,阚贵珍,黄 方,喻德跃,王 慧

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

摘 要:为研究大豆中核糖体基因对大豆耐低硫胁迫功能的调控作用,从科丰 1 号根中克隆 1 个大豆核糖体蛋白编码基因 *GmRPL12*。分析基因结构和低硫胁迫下不同组织中的表达情况,将基因过表达载体和干扰载体转化科丰 1 号毛状根,获得转基因嵌合体,并进行基因表达分析和植株表型分析。序列分析结果表明:基因编码区全长 576 bp,预测蛋白 C 端包含 1 个核糖体蛋白 L7/L12 保守结构域 RPL12。该基因在根中表达量较高,表达水平受低硫诱导,不同品种中该基因对低硫响应的模式不同。通过毛状根遗传转化获得 *GmRPL12* 基因过表达、RNA 干扰以及空载体对照的大豆嵌合体。低硫处理与正常硫水平处理相比,*GmRPL12* 基因过表达的大豆嵌合体植株倒一叶和倒二叶 SPAD、株高、地上部鲜重和干重、地下部鲜重和干重显著增加,RNA 干扰下调大豆嵌合体植株的以上指标。*GmRPL12* 基因的过量表达能显著增加低硫处理时地上部、地下部的无机硫含量,以及正常硫水平处理时地上部的无机硫含量。研究结果暗示 *GmRPL12* 基因可能参与大豆对低硫耐性和大豆硫代谢的调控。

关键词:大豆;核糖体;基因;硫;*GmRPL12*

Research on the Regulation Effect of Ribosomal Gene *GmRPL12* on Low Sulfur Tolerance in Soybean

CHEN Yan-ning, WU Zhi-yi, YUAN Wen-jie, KAN Gui-zhen, HUANG Fang, YU De-yue, WANG Hui

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

Abstract: In order to investigate the regulation of ribosomal genes on soybean tolerance to low sulfur stress, this study cloned a soybean ribosomal gene *GmRPL12* from the root of Kefeng 1. We analysed the gene structure and expression in different tissues under low sulfur stress. The gene overexpression vector and interference vector were transformed into hairy root of Kefeng 1 to obtain transgenic chimeras, and then we analysed the expression of the gene and the phenotype of the chimera plant. The results of sequence analysis showed that, the total length of the gene code region was 576 bp. There was a ribosomal protein L7/L12 C-terminal domain RPL12 in its predicted protein. The gene was highly expressed in roots and was induced by low sulfur, and showed different expression patterns in two materials. Soybean chimeras with gene overexpression (OE), RNA interference (Ri), and two empty vectors (OE-EV and Ri-EV) were obtained by genetic transformation of hairy roots. Compared with that under the +S condition, SPAD value, the plant height, the fresh weight and dry weight of aboveground, the fresh weight and dry weight of root increased significantly in the *GmRPL12* gene-overexpressed soybean chimera under the -S condition, and these indicators decreased significantly in the soybean Ri chimera under the -S condition. Furthermore, the inorganic sulfur contents of soybean OE chimeras increased significantly in the above ground and under ground plant under -S, and in the above ground plant under +S. These results suggest that *GmRPL12* gene may be involved in soybean tolerance to low sulfur and soybean sulfur metabolism.

Keywords: Soybean; Ribosomal; Gene; Sulfur; *GmRPL12*

大豆[*Glycine Max* (L.) Merr.]在中国有着悠久的种植和食用历史,是人类和其它动物的主要蛋白质来源,世界上 70% 的蛋白质食物来自大豆^[1]。硫元素(S)虽然仅占大豆干重的不到 0.1%,但却有着无可替代的功效。硫是植物生长发育必需的第四大营养元素,是形成氨基酸和蛋白质所必须的组分。硫既可直接作为植物养分,又参与调控植物的光合作用、产量形成、品质、耐逆性以及氮和磷的利用^[2]。

植物主要以硫酸根的形式从土壤中获得硫元素^[2]。然而,中国大约五分之一的耕地表现为缺硫或潜在性缺硫^[3,4],包括大豆主产区的东北三省、山东和山西等地。随着农业生产率的提高,作物高产品种的广泛应用,复种指数的提高和工业含硫废气排放的严格控制等,土壤中有效硫含量越来越低。2018 年,钱晓华等^[5]对安徽省的土壤样本含硫量的研究发现 13.76%、20.91% 和 18.43% 样本的有效

收稿日期:2020-04-12

基金项目:国家自然科学基金(31671715);国家重点研发计划(2016YFD0101005)。

第一作者简介:陈燕宁(1995-),女,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:yanningchen_916@163.com。

通讯作者:王慧(1977-),女,博士,副教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wanghui0@njau.edu.cn。

硫含量分别表现为极缺、缺乏和较缺乏水平。因此,为培育硫高效利用的大豆品种、应对土壤缺硫,亟需探索大豆硫利用的机制、提高大豆硫利用效率。

植物硫代谢研究以模式植物拟南芥为主,已明确了植物硫代谢的基本过程及其关键酶、植物硫转运体系、部分参与植物硫代谢调控的激素和转录因子等^[6]。在大豆中,已克隆和鉴定了多个硫转运蛋白和硫代谢途径关键酶的编码基因。其中,高亲和的硫转运蛋白编码基因 *GmSULTR1;2b* 在根中特异表达,受低硫诱导,能弥补硫转运蛋白酵母突变体的表型,在烟草中异源表达显著增加植株的含硫量、不同硫水平下硫的吸收、干物质重量等,引起 515 个基因差异表达,涉及光合作用,半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、VB2 代谢、淀粉和糖代谢等 123 个过程^[7]。ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase, ATPS)是硫代谢途径途径的第一个关键酶,大豆基因组中有 4 个 *GmATPS* 基因^[8]。*GmATPS1* 与拟南芥、土豆的 ATP 硫酸化酶基因同源性较高,在大豆所有组织中都有表达,根中表达量最为丰富,基因的转录水平及酶的活性受冷害诱导,种子中 *GmATPS1* 基因的转录水平随着种子发育进程而下降^[9]。大豆中有 3 个 APS 还原酶(APS reductase, APSR)基因^[8]。*GmAPSR1* 在大豆所有组织中都有表达,基因表达量和总酶活性在大豆种子的早期发育阶段较高,但随着种子的成熟而下降,硫、磷的缺乏以及冷处理会增加 *GmAPSR1* 的表达水平,而氮饥饿抑制基因的转录和蛋白质积累^[8,10]。丝氨酸乙酰转移酶(serine acetyltransferase, SATase/SERAT)是催化丝氨酸生物合成半胱氨酸的第一个关键酶,大豆有 8 个 *GmSATase* 基因, *GmSATase* (也称为 *GmSERAT1;1*)能弥补大肠杆菌 SATase 基因突变体的表型,在大豆种子发育过程中低水平表达,大豆叶片和种子中 SATase 酶活性较低^[8,11]。O-乙酰胆碱(硫醇)裂解酶(O-acetylserinesulfhydrylase, OASS/OAS-TL)是催化产生半胱氨酸的最后一个关键酶,属于 β 代丙氨酸合成酶(β -substituted alanine synthase)家族^[12]。大豆中有 6 个 *GmOASS* 基因,不同基因在种子不同的发育阶段高表达^[13]。和 *GmAPSR1* 一样, *GmOASS* 基因的表达量和酶活性随着种子发育而逐渐下降。*GmOASS1* 能弥补大肠杆菌半胱氨酸营养突变体的功能^[14]。在转 OASS 基因大豆中, OASS 酶活性增加了 4~10 倍,且在种子各发育阶段均显著提高,游离半胱氨酸水平增加了 22%~32%,富含半胱氨酸的 Bowman-Birk 蛋白酶

抑制剂的含量显著增加,尽管 OASS 基因的过表达提高了转基因大豆中含硫氨基酸的含量,但转基因大豆的产量较低^[8,15]。

近来,对拟南芥的转录谱分析发现,在低硫条件下,除了以上基因外,还有大量的核糖体蛋白基因响应低硫诱导,其中核糖体基因 *RPS6* 与低硫响应基因 *NBR1* 直接互作^[16],这说明核糖体基因有可能参与植物硫的吸收和代谢,但相关的报道较少。在大量的核糖体基因中,核糖体亚基 L12 的编码基因(*AT4G36420*)在野生型和过表达 *NBL1* 基因的拟南芥中都强烈响应低硫诱导^[16],本研究从大豆中克隆 *AT4G36420* 基因的同源基因 *GmRPL12*,该基因编码 1 个 50S 核糖体蛋白 L12,进一步利用毛状根瞬时表达系统对该基因的功能进行了初步研究,以期为大豆耐低硫和硫利用研究提供新的基因。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种科丰 1 号和南农 1138-2 由南京农业大学国家大豆改良中心种子资源库提供。

1.2 试验设计

以 SoyBase (<https://www.soybase.org/>) 中核糖体蛋白 L12 亚基编码基因(*Glyma.09G029000*)的 mRNA 序列为参考克隆大豆科丰 1 号根中的基因序列。

用实时定量 PCR(qRT-PCR)方法,以茎相对于内参基因(*Tubulin*)的表达量作为对照,分析目的基因在科丰 1 号不同组织(V4 期的根、茎、叶、R2 期的花以及开花后 15 和 45 d 的荚和种子)中的表达情况。

挑选科丰 1 号和南农 1138-2 大小均一、表面光滑、无病斑的种子,将其播种在蛭石中育苗。4 d 后移苗至装有自来水的水培箱中适应培养 4 d(第一对真叶完全展开),去掉子叶进行低硫诱导。试验在人工气候室内进行,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。设置正常硫水平处理(+S)为对照处理,即 1/2 浓度 Hoagland 完全营养液培养;将 1/2 浓度 Hoagland 营养液培养中的 MgSO_4 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 分别用 MgCl_2 、 ZnCl_2 、 CuCl_2 代替即为无硫处理(-S)(表 1)。营养液每 2 d 更换 1 次。处理 10 d 后,取植株的根、茎、叶置于液氮中速冻,提取 RNA 及反转成 cDNA,采用 qRT-PCR 方法检测不同硫水平处理下目的基因的诱导表达情况。

表 1 1/2 Hoagland 平衡溶液配方

Table 1 The composition of 1/2 Hoagland balanced nutrient solution

分类	组分	含量	分类	组分	含量
Category	Compound	Content/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Category	Compound	Content/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
大量元素	$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	500	微量元素	H_3BO_3	23.000
Macroelement	$\text{KNO}_3/\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2500	Microelement	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.573
	MgSO_4	1000		$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.380
铁盐	$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10		$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.160
Ferric salts	$\text{EDTA}\cdot\text{Na}$	10		$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.008

将目的基因过表达载体 pMDC83-*GmRPL12* (OE)、过表达空载体 pMDC83 (OE-EV)、干扰载体 *GmRPL12*-RNAi (Ri) 和干扰空载体 pB7GWIWG2 (II) (Ri-EV) 分别转化到科丰 1 号, 获得转基因嵌合体, 分析不同硫水平下转基因嵌合体的基因表达量, 进一步评价转基因阳性嵌合体的根重、SPAD、株高、鲜重、植株含硫量等表型。

1.3 方法

1.3.1 大豆核酸提取及 cDNA 第一链的合成 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 提取大豆毛状根的基因组 DNA。采用总 RNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 提取大豆各组织的总 RNA。使用反转录试剂盒 (去除基因组 DNA) [PrimeScript™ RT

reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)] 合成 cDNA 第一链。

1.3.2 基因克隆 利用 Primer-Premier 5 (Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA) 设计特异引物 (表 2), 引物序列由南京金斯瑞生物公司合成。使用高保真酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (诺唯赞) 从科丰 1 号根 cDNA 中扩增 *GmRPL12* 基因。PCR 反应程序为: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 条带大小正确后送南京擎科生物公司测序。使用 T 载体 (擎科) 构建含有 *GmRPL12* 基因 ORF 的重组 T 载体。

表 2 引物信息

Table 2 The information of primers

名称	序列(5′-3′)	用途
Name	Sequence (5′-3′)	Function
<i>GmRPL12</i> (Clone)	F: TTAGTTCGCCATTTTCACC R: ACAGTCATTGCGCAAGC	基因克隆
<i>Tublin</i>	F: GGAGTTCACAGAGGCAGAG R: CACTTACGCATCACATAGC	qRT-PCR
<i>GmRPL12</i>	F: CAATCTCGTGCCTTACAG R: TTCTTCCGATAGTGCTCC	qRT-PCR
pMDC83- <i>GmRPL12</i>	F: CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCCACCATGAGGTTTATGCCCTTTCCAGAT R: GGGAAATTGCGAGCTCGGTACCCTACTCCATGACTGCAACTC	表达载体构建
<i>GmRPL12</i> -RNAi	F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCAATCTCGTGCCTTACA R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTGGCCTCTTTCAATCCT	干扰载体构建

1.3.3 生物信息学分析 在 ExPASyProtParam 网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线预测 *GmRPL12* 基因的氨基酸个数、分子量、等电点等。用 Pfam 32.0 (<http://pfam.xfam.org/>) 在线程序分析结构域。用 GSDS 2.0 软件绘制基因结构和蛋白质结构域示意图^[17]。

1.3.4 实时定量 PCR 利用 Primer-Premier 5 设计内参基因 *Tubulin* (GenBank: AY907703.1) 及 *GmRPL12* 基因荧光定量 PCR 引物 (表 2), 使用 ChamQ

SYBR qPCR Master Mix (Low ROX Premixed) (诺唯赞) 试剂盒进行定量检测。qRT-PCR 反应循环程序为: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环。熔解曲线的扩增反应程序为: 95 ℃, 15 s; 60 ℃, 60 s; 95 ℃, 15 s。qRT-PCR 反应在 ABI 7500 system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 中进行。根据扩增曲线和熔解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算基因的相对表达量^[18]。采用双尾 t 测验对基因表达量进行显著性分析。

1.3.5 过表达载体与干扰载体的构建 利用 Primer-Premier 5 设计含有 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切位点接头和仅包含候选基因全长的引物,以含有目的基因的 T 质粒为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系和程序同 1.3.2。使用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 对扩增产物和 pMDC83 空载体 (Thermo Fisher Scientific) 进行双酶切,使用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒 (Vazyme) 纯化酶切后的载体。使用一步法试剂盒 (ClonExpress® Entry One Step Cloning Kit, Vazyme) 将 PCR 产物与酶切后的 pMDC83 线性载体相连,构建含有目的基因的过表达载体 pMDC83-*GmRPL12*。

干扰载体的构建采用同源重组法。以候选基因 CDS 全长序列为模板,利用 Primer 5.0 设计含有 attB1 和 attB2 的特异引物 (表 2),PCR 扩增候选基因干扰片段,片段长度为 389 bp,PCR 扩增程序为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。利用 Gateway® Technology with Clonase™ II 试剂盒 (Invitrogen) 进行 BP 和 LR 反应,得到干扰重组载体 *GmRPL12*-pB7GWIWG2 (II)。

1.3.6 转化毛状根 采用冻融法将构建好的过表达载体 pMDC83-*GmRPL12* (OE)、空载体 pMDC83 (OE-EV)、干扰载体 *GmRPL12*-RNAi (Ri) 和空载体 pB7GWIWG2 (II) (Ri-EV) 分别转化到农杆菌 K599 感受态中^[19]。挑单克隆进行菌检,将阳性菌落摇菌悬浮,3 000 r·min⁻¹ 离心 2 min 后,吸取一部分上清弃掉,余 200 μL 左右重悬涂布在对应抗生素的 YEB 固体培养基上,卡那霉素和壮观霉素分别用于筛选过表达和干扰重组体,28 ℃ 倒置培养 36~48 h 后,待平板长满农杆菌即可用于侵染植株诱发发状根。

根据 Kereszt 等^[20] 提出的大豆毛状根转化方法,用含有 4 种不同载体的发根农杆菌分别侵染科丰 1 号幼苗的子叶节,诱发毛状根,当毛状根长至 5~10 cm 时,剪去幼苗主根,获得大豆幼苗嵌合体。选长势一致的嵌合体分别放入 +S 和 -S 的营养液

中培养,每个株系重复 10 次,营养液每 2 d 更换 1 次,处理 10 d 后取样。取每一个嵌合体部分根样品,提取基因组 DNA 和总 RNA,通过 PCR 和 qRT-PCR 方法鉴定阳性嵌合体。方法同上。

1.3.7 转基因嵌合体表型指标测定 测量嵌合体植株的倒一叶和倒二叶的 SPAD、株高、地上部鲜重、地下部鲜重 (即毛根鲜重)。用叶绿素仪 (Soil and Plant Analyzer Development 502) 测量叶绿素含量。把植株的地上部和地下部分别装入牛皮纸袋中,放入预热好的烘箱内,105 ℃ 杀青 30 min,75 ℃ 烘干至恒重,测量地上部干重和地下部干重。

将称重后的地上部和地下部干样研磨成粉末,称取约 0.1 g 转移至消煮管中,加入 5 mL HNO₃,在微波消解系统 (Milestone ETHOS) 中 150 ℃ 消煮 30 min,冷却至 50 ℃ 以下后开盖,用超纯水定容至 50 mL。用等离子体发射光谱仪 (Perkin Elmer Optima 2100DV ICP-OES system) 测定样品中的无机硫浓度。

1.4 数据分析

使用 SPSS 22.0 对数据进行显著性测验,使用 Excel 2010 进行数据处理及制图。

2 结果与分析

2.1 *GmRPL12* 基因的克隆

从科丰 1 号根 cDNA 中扩增得到约 600 bp 的目的基因片段,测序结果显示,该基因在科丰 1 号和 Williams 参考基因组中的序列相同,命名为 *GmRPL12*。

在 Williams 参考基因组中,*GmRPL12* 基因在 5'UTR 区有 1 个内含子,CDS 全长为 576 bp,编码 191 个氨基酸,预测蛋白质分子量为 46.64 kDa,pI5.02,预测蛋白 C 端包含 1 个保守的结构域 RPL12 (图 1),为核糖体蛋白 L7/L12 亚基特有的结构域。

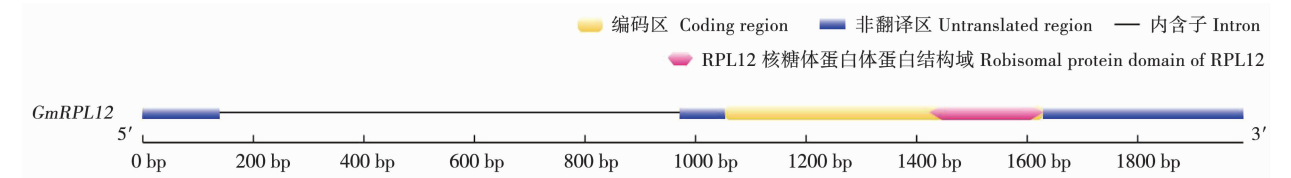


图 1 *GmRPL12* 基因结构及蛋白结构域预测

Fig. 1 The structure of *GmRPL12* and prediction of its conservative domain

2.2 大豆 *GmRPL12* 基因的表达分析

2.2.1 不同组织中 *GmRPL12* 基因的表达分析 科丰 1 号不同组织中 *GmRPL12* 基因的表达分析结果显

示:在 45 d 的种子中基因表达量最高,在根、茎、叶、花、荚中都有一定表达量,在 15 d 的荚中表达量最低 (图 2)。

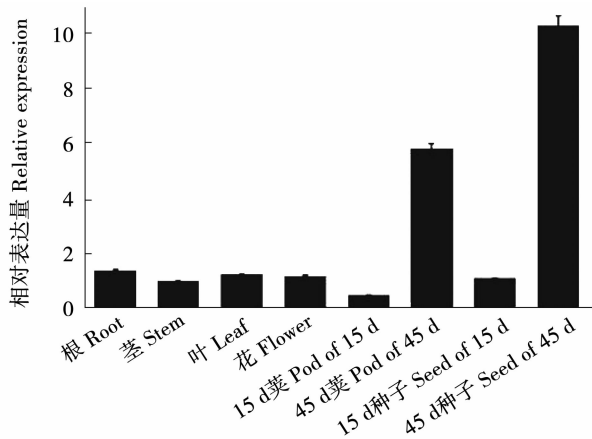
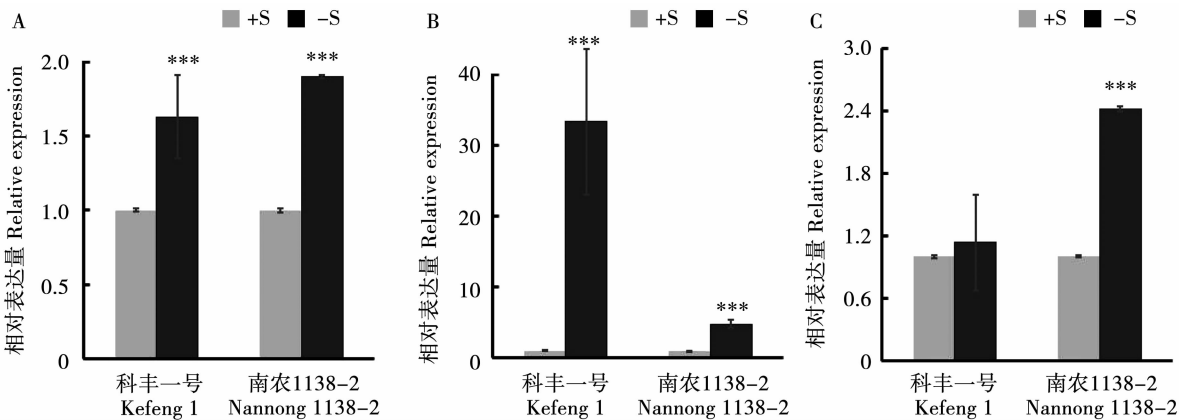


图2 *GmRPL12* 基因的组织表达分析
Fig. 2 Tissue expression analysis of *GmRPL12*

2.2.2 不同硫水平下 *GmRPL12* 基因表达分析 与正常硫水平相比,低硫水平下科丰1号根和茎中的基因表达量显著上调,叶中也上调表达,但没有达到显著水平。而在南农1138-2的根、茎和叶中,*GmRPL12* 基因受到低硫处理的显著诱导(图3)。总之,在低硫水平诱导下2个品种的根和茎中 *GmRPL12* 基因均上调表达,说明 *GmRPL12* 是能够响应低硫诱导的基因,并且在不同大豆品种中该基因对低硫的响应模式存在差异。

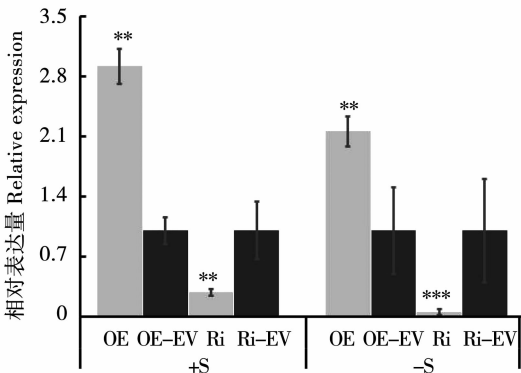


A: 根; B: 茎; C: 叶; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$ 。下同。
A: Root; B: Stem; C: Leaf; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$. The same below.

图3 不同硫水平下 *GmRPL12* 基因的相对表达量
Fig. 3 The relative expression of *GmRPL12* under different S supply levels

2.3 转基因嵌合体的低硫诱导分析

2.3.1 不同硫水平下转基因大豆嵌合体中 *GmRPL12* 基因表达分析 在正常硫水平下,*GmRPL12* 基因在过表达毛状根中的表达量是过表达空载体对照的2.92倍;在低硫水平下,其在过表达毛状根中表达量是其在过表达空载体对照中的2.16倍。即无论正常硫水平还是低硫水平下,基因的表达量都显著上升,说明外源 *GmRPL12* 基因已整合到大豆毛状根的基因组中且能正常表达。反过来,对于 *GmRPL12* 基因干扰毛状根,在正常和低硫水平下的基因表达量分别是其在干扰空载体对照中的0.28和0.05倍,即基因的表达量相对于干扰空载体对照植株都显著降低(图4)。说明大豆毛状根内源 *GmRPL12* 基因的表达量受干扰而显著降低。



OE: *GmRPL12* 基因过表达嵌合体; OE-EV: 过表达空载体嵌合体; Ri: *GmRPL12* 基因干扰嵌合体; Ri-EV: 干扰空载体嵌合体。
OE: Soybean chimera with the overexpression of *GmRPL12*; OE-EV: Soybean chimera with overexpression empty vector; Ri: Soybean chimera with the RNA interference of *GmRPL12*; Ri-EV: Soybean chimera with interference empty vector.

图4 不同硫水平下转基因大豆嵌合体中 *GmRPL12* 基因的相对表达量
Fig. 4 The relative expression of *GmRPL12* in soybean transgenic chimeras under different S supply levels

2.3.2 不同硫水平下转基因嵌合体的根量分析

进一步利用水培试验评价 *GmRPL12* 基因过表达和干扰嵌合体对低硫的耐性的结果表明:与正常硫水平相比,过表达空载体嵌合植株在低硫水平下根量减少,而 *GmRPL12* 基因过表达嵌合体根量增加。而

无论 *GmRPL12* 基因干扰嵌合体还是干扰空载体嵌合体,在低硫水平下的根量都低于其在正常硫水平下的根量(图 5)。总之,根中过表达 *GmRPL12* 基因增加了低硫水平下过表达嵌合体的根量。

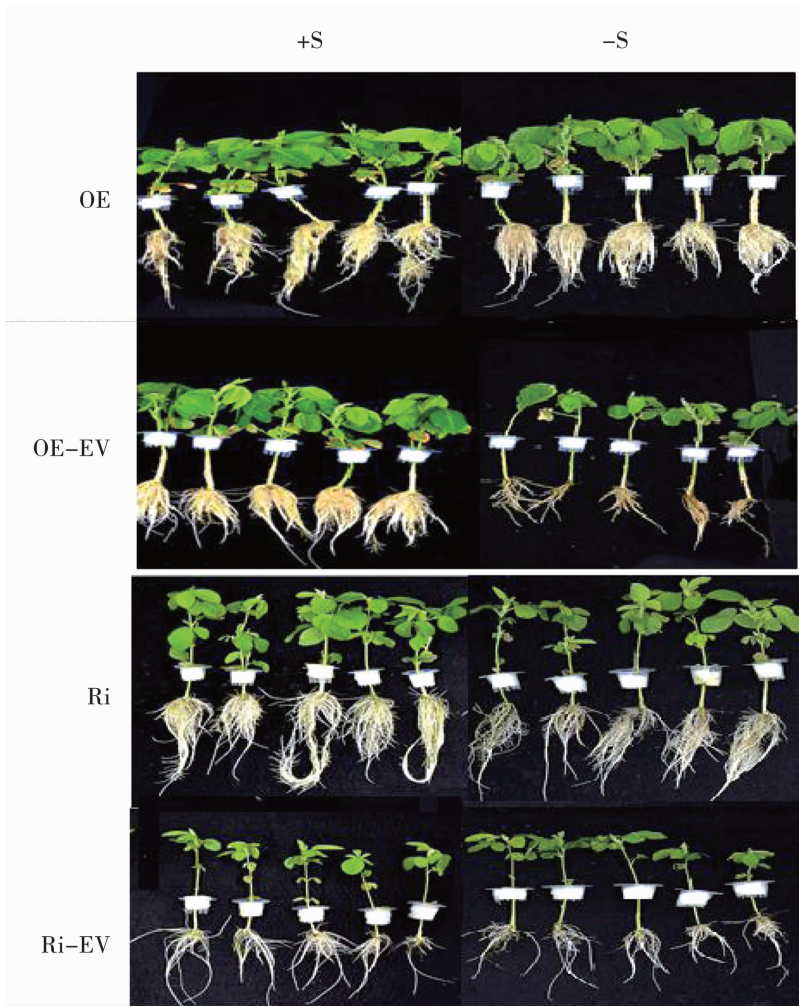


图 5 不同硫水平下大豆嵌合体株系表型

Fig. 5 Phenotype of the soybean chimeras under different S supply levels

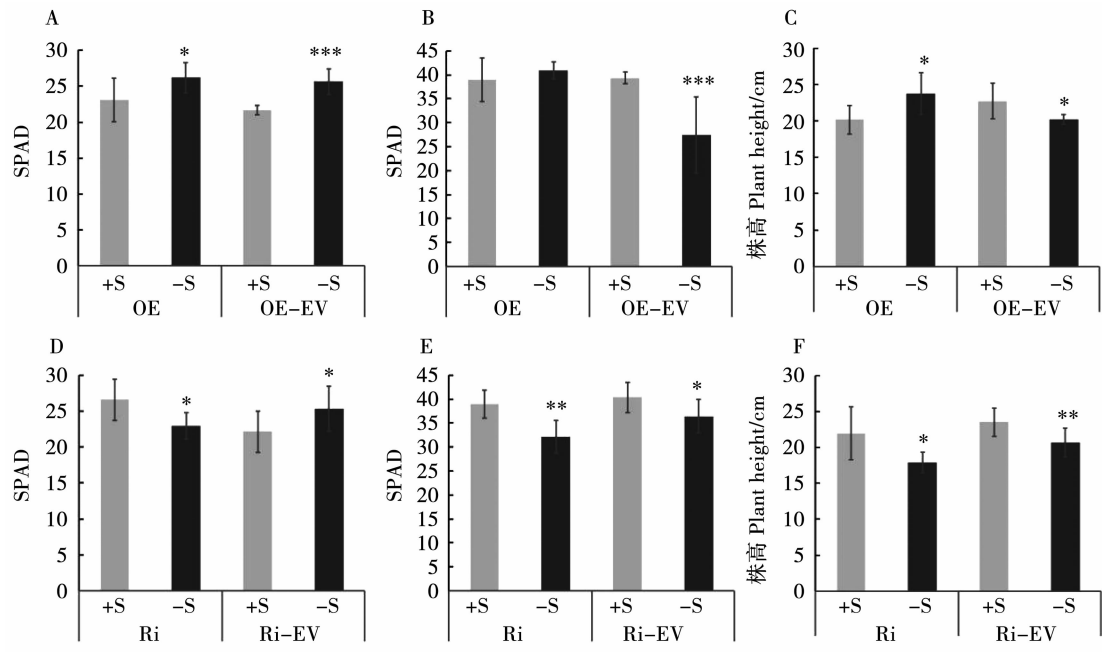
2.3.3 不同硫水平下转基因嵌合体植株的 SPAD 和株高分析

与正常硫水平相比,在低硫条件下, *GmRPL12* 基因过表达嵌合体植株的倒一位叶的 SPAD 显著增加,株高显著升高,倒二位叶 SPAD 也表现为增加,但没有达到显著水平。RNA 干扰下调 *GmRPL12* 基因表达量的嵌合体植株中,3 个指标在低硫水平下的表现均显著或极显著低于正常硫水平。2 种空载体嵌合体植株中,除了倒一位叶的叶绿素含量显著增加外,其它 2 个指标在低硫下的表现都显著或极显著低于在正常硫水平下的表现(图 6)。这些结果说明改变根中 *GmRPL12* 基因的表达量影响低硫水平下嵌合体植株地上部性状,过量表达时

为促进作用,表达受到抑制时为减弱作用。

2.3.4 不同硫水平下转基因嵌合体植株地上部和地下部鲜重、干重分析

在低硫处理条件下, *GmRPL12* 基因过表达植株的地上部鲜重和干重、地下部鲜重和干重都显著增加。相反的,在低硫水平下 *GmRPL12* 基因干扰嵌合体植株的 4 个指标都显著低于正常硫水平处理。对于 2 种空载体嵌合体植株,在低硫水平下的地上部和地下部鲜重、干重也都显著或极显著低于正常硫水平下的测定结果(图 7)。说明 *GmRPL12* 基因正调控大豆在低硫胁迫下的地上部和地下部干物质积累。

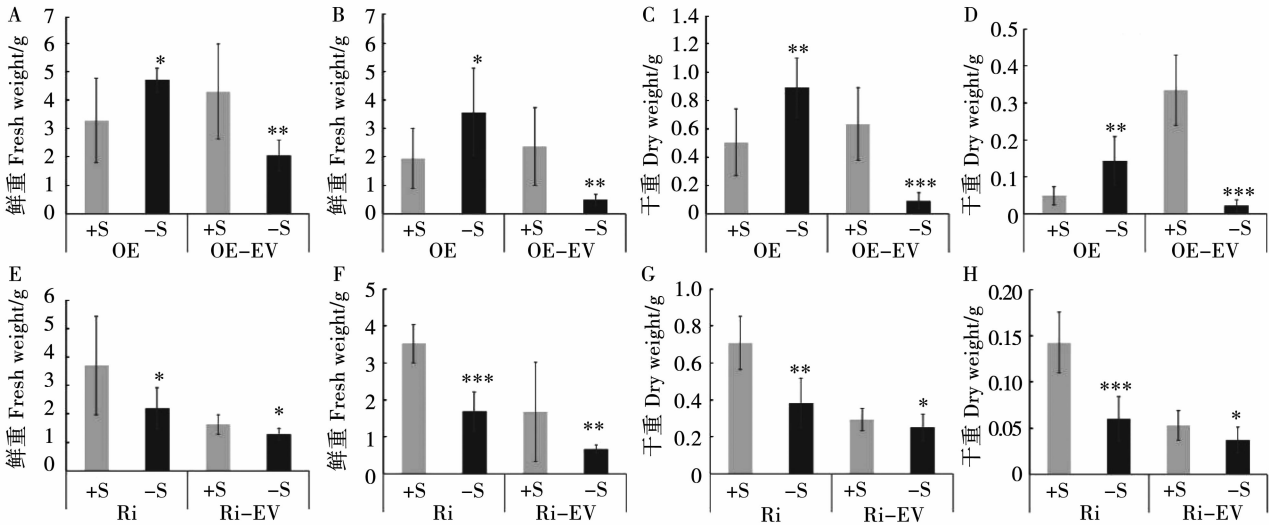


A 和 D:倒一叶 SPAD; B 和 E:倒二叶 SPAD; C 和 F:株高。

A and D: SPAD of the first leaves from the top to the down; B and E: SPAD of the second leaves from the top to the down; C and D: Plant height.

图 6 不同硫水平下大豆嵌合体植株叶片 SPAD 和株高

Fig. 6 The SPAD of the leaves and plant heights under different S supply levels



A、C、E、G:地上部; B、D、F、H:地下部。

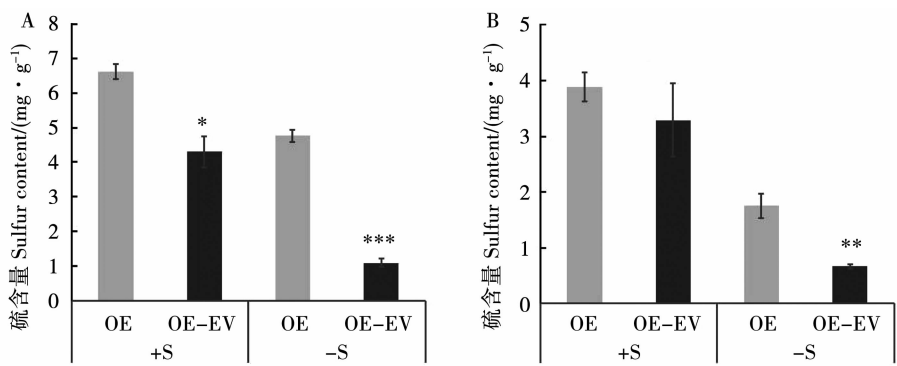
A, B, E, G: Aboveground; B, D, F, H: Underground.

图 7 大豆嵌合体植株地上部和地下部鲜重、干重

Fig. 7 Fresh weight and dry weight of soybean chimeras

2.3.5 过表达 *GmRPL12* 基因嵌合体植株不同硫水平下植株无机硫含量 无论正常硫水平还是低硫水平下,过表达嵌合体植株地上部无机硫含量均显著或极显著高于过表达空载体嵌合体植株中的无机硫含量。正常硫水平下过表达嵌合体植株的地下

部无机硫含量略高于空载体嵌合体植株,但未达到显著水平,在低硫水平下,过表达嵌合体植株地下部无机硫含量极显著高于空载体嵌合体植株(图 8)。说明 *GmRPL12* 基因参与调控大豆对硫的吸收和转运,且在低硫水平下促进吸收。



A:地上部; B:地下部。
A: Aboveground; B: Underground.

图 8 过表达 *GmRPL12* 基因及空载体对照嵌合体植株中无机硫含量
Fig. 8 The sulfur content in the *GmRPL12* over expression chimeras and the control soybean plants

3 讨 论

植物中核糖体蛋白的数量众多,种类丰富,对应的核糖体基因更是数量庞大^[21]。越来越多研究证明,核糖体蛋白除了作为核糖体的组成部分参与细胞中蛋白质的合成外,还执行多种其它功能。这些功能包括直接参与植物的生长发育,比如拟南芥 *RPL14B* 基因与花粉育性相关,该基因缺失降低花粉粒大小,削弱花粉管竞争力^[22],大豆 *RPS4* 参与开花调控^[23]。核糖体蛋白还参与胁迫反应,受多种发育和环境因素的调控。比如拟南芥的 *S5* 参与植物光合作用、生长发育和冷害胁迫^[24],水稻的叶绿体核糖体 *ASL2* 基因的表达受到光调控,突变体表现为白化叶、叶绿素含量以及叶绿体发育异常,幼苗死亡^[25],大豆核糖体蛋白 *RPL2* 参与大豆对病害的抗性,*GmRPS13*、*GmRPS6* 和 *GmRPL37* 基因应答大豆对低温的胁迫反应^[26-27],小麦 15 个核糖体基因在杂种 *F₁* 和亲本中表达模式不同^[28]。近来的研究显示,核糖体蛋白还可能参与植物对营养元素的吸收和代谢,比如拟南芥核糖体基因 *LEP2* 缺失改变碳和氮平衡反应基因的表达^[29],在低硫胁迫下 134 个拟南芥核糖体蛋白基因上调表达,几乎涉及了所有的大、小亚基^[16],目前对于植物核糖体基因功能的认识仍然不足,有待进一步深入研究。本研究所克隆的大豆 *GmRPL12* 基因能够响应低硫胁迫诱导,在低硫环境下促进大豆对硫元素的吸收,影响大豆地上部和地下部的物质积累,表明该核糖体蛋白基因在硫代谢中可能发挥功能。

本研究利用毛状根瞬时表达系统对 *GmRPL12* 基因的功能进行了初步鉴定。大豆植株遗传转化效率较低,获得稳定大豆转化体需要的时间较长,而毛状根瞬时表达系统是一个非常有效的初步验

证基因功能的方法。该方法已成功用于评价多个大豆基因的功能,包括异黄酮代谢相关的转录因子 *GmMYB29* 基因^[30],大豆耐盐相关基因 *GmCDF1*^[31],磷饥饿相关基因 *GmPHR25*^[32]。本研究中,在低硫水平下,过表达 *GmRPL12* 基因的大豆嵌合体地上部和地下部的鲜重、干重、无机硫含量显著增加。通过 RNA 干扰降低该基因的表达以后,大豆嵌合体地上部和地下部的鲜重、干重显著降低。从而初步证明 *GmRPL12* 基因可能与大豆对低硫的耐性有关,为后续通过遗传转化获得稳定的转基因大豆,深入评价该基因的功能,探索其参与大豆对低硫的耐性、调控硫元素代谢的机理及育种应用研究奠定了基础。

4 结 论

本研究克隆和鉴定了 1 个大豆 50S 核糖体基因 *GmRPL12* 基因,编码区全长为 576 bp,编码 191 个氨基酸,结构域分析发现其预测蛋白包含 1 个保守的核糖体蛋白 L7/L12 结构域,属于核糖体蛋白家族。*GmRPL12* 基因在大豆毛状根中过表达能提高大豆嵌合体植株对低硫的耐性,降低低硫对植株生长发育的影响,RNA 干扰降低 *GmRPL12* 基因在大豆毛状根中的表达,其嵌合体植株对低硫的耐性降低。*GmRPL12* 基因过表达能够提高大豆嵌合体的无机硫含量。

参考文献

[1] Panthee D R, Pantalone V R, Sams C E, et al. Quantitative trait loci controlling sulfur containing amino acids, methionine and cysteine, in soybean seeds[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 546-553.
[2] Kopriva S, Malagoli M, Takahashi H. Sulfur nutrition: Impacts on plant development, metabolism, and stress responses[J]. Journal

- of Experimental Botany, 2019, 70(16): 4069-4073.
- [3] 刘崇群,曹淑卿,陈国安,等. 中国南方农业中的硫[J]. 土壤学报, 1990, 27(4): 398-404. (Liu C Q, Cao S Q, Chen G A, et al. Sulphur in the agriculture of China[J]. Acta Pedologica Sinica, 1990, 27:398-404.)
 - [4] 金继运. 硫、镁和微量元素在作物营养平衡中的作用[C]. 成都:成都科技大学出版社, 1993: 249-254. (Jin J Y. The role of S, Mg and microelement of crops nutrition balance [C]. Chengdu: Chengdu Science and Technology University Press, 1993: 249-254.)
 - [5] 钱晓华, 杨平, 周学军, 等. 安徽省土壤有效硫现状及时空分布[J]. 植物营养与肥料学报, 2018, 24(5): 1357-1364. (Qian X H, Yang P, Zhou X J, et al. Current situation and spatial-temporal distribution of soil available sulfur in Anhui province[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2018, 24(5): 1357-1364.)
 - [6] Zheng Z L, Leustek T. Advances in understanding sulfur utilization efficiency in plants[M]// Hossain M A, Kamiya T, Burritt D Y, et al. In plant macronutrient use efficiency molecular and genomic perspectives in crop plants. USA: Cambridge Academic Press, 2017: 215-232.
 - [7] Ding Y, Zhou X, Zuo L, et al. Identification and functional characterization of the sulfate transporter gene *GmSULTRI;2b* in soybean[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 373.
 - [8] Krishnana H B, Jez J M. Review: The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed [J]. Plant Science, 2018, 272: 14-21.
 - [9] Phartiyal P, Kim W S, Cahoon R E, et al. Soybean ATP sulfurylase, a homodimeric enzyme involved in sulfur assimilation, is abundantly expressed in roots and induced by cold treatment [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2006, 450: 20-29.
 - [10] Phartiyal P, Kim W S, Cahoon R E, et al. The role of 5'-adenylylsulfate reductase in the sulfur assimilation pathway of soybean: Molecular cloning, kinetic characterization, and gene expression[J]. Phytochemistry, 2008, 69: 356-364.
 - [11] Chronis D, Krishnan H B. Sulfur assimilation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.): Molecular cloning and characterization of a cytosolic isoform of serine acetyltransferase[J]. Planta, 2004, 218: 417-426.
 - [12] Yi H, Jez J M. Assessing functional diversity in the soybean β -substituted alanine synthase enzyme family[J]. Phytochemistry, 2012, 83:15-24.
 - [13] Zhang C, Meng Q, Zhang M, et al. Characterization of O-acetylserine (thiol) lyase-encoding genes reveals their distinct but cooperative expression in cysteine synthesis of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2008, 26: 277-291.
 - [14] Chronis D, Krishnan H B. Sulfur assimilation in soybean: Molecular cloning and characterization of O-acetylserine (thiol) lyase (cysteine synthase) [J]. Crop Science, 2003, 43: 1819-1827.
 - [15] Kim W S, Chronis D, Juergens M, et al. Transgenic soybean plants overexpressing O-acetylserine sulfhydrylase accumulate enhanced levels of cysteine and Bowman-Birk protease inhibitor in seeds[J]. Planta, 2012, 235: 13-23.
 - [16] Tarnowski L, Rodriguez M C, Brzywczy J, et al. Overexpression of the selective autophagy cargo receptor *NBR1* modifies plant response to sulfur deficit[J]. Cells, 2020, 9: 669.
 - [17] Hu B, Jin J, Guo A Y, et al. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.
 - [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
 - [19] Holsters M, deWaele D, Depicker A, et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Molecular and General Genetics, 1978, 163(2): 181-187.
 - [20] Kereszt A, Li D X, Indrasumunar A, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology [J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 948-952.
 - [21] Barakat A, Szick-Miranda K, Chang I F, et al. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome [J]. Plant Physiology, 2001, 127: 398-415.
 - [22] Luo A, Zhan H, Zhang X, et al. Cytoplasmic ribosomal protein L14B is essential for fertilization in *Arabidopsis* [J]. Plant Science, 2020, 292: 110394.
 - [23] Sha A H, Chen Y H, Shan Z H, et al. Identification of photoperiod-regulated gene in soybean and functional analysis in *Nicotiana benthamiana*[J]. Journal of Genetics, 2014, 93(1): 43-51.
 - [24] Zhang J, Yuan H, Yang Y, et al. Plastid ribosomal protein S5 is involved in photosynthesis, plant development, and cold stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(9): 2731-2744.
 - [25] Lin D, Jiang Q, Zheng K, et al. Mutation of the rice *ASL2* gene encoding plastid ribosomal protein L21 causes chloroplast developmental defects and seedling death [J]. Plant Biology, 2015, 17(3): 599-607.
 - [26] Ludwig A, Tenhaken R. Suppression of the ribosomal *L2* gene reveals a novel mechanism for stress adaptation in soybean[J]. Planta, 2001, 212(5-6): 792-798.
 - [27] Kim K Y, Park S W, Chung Y S, et al. Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean [J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(399): 1153-1155.
 - [28] Yao Y Y, Ni Z F, Du J K, et al. Isolation and characterization of 15 genes encoding ribosomal proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Science, 2006, 170(3): 579-586.
 - [29] Dong X, Duan S, Wang H B, et al. Plastid ribosomal protein *LPE2* is involved in photosynthesis and the response to C/N balance in *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020. doi: 10.1111/jipb.12907.
 - [30] Chu S, Wang J, Zhu, Y, et al. An R2R3-type MYB transcription factor, *GmMYB29*, regulates isoflavone biosynthesis in soybean [J]. PLoS Genetics, 2017, 13(5): e1006770.
 - [31] Zhang W, Liao X, Cui Y, et al. Acation diffusion facilitator, *GmCDF1*, negatively regulates salt tolerance in soybean[J]. PLoS Genetics, 2019, 15(1): e1007798.
 - [32] Xue Y, Xiao B, Zhu S, et al. *GmPHR25*, a GmPHR member up-regulated by phosphate starvation, controls phosphate homeostasis in soybean[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(17): 4951-4967.