

# 大豆铝激活苹果酸转运家族基因 *GmALMT8* 的 鉴定与功能验证

刘慧<sup>1,2</sup>, 许文静<sup>1,2</sup>, 张红梅<sup>1</sup>, 刘晓庆<sup>1</sup>, 张威<sup>1</sup>, 王琼<sup>1</sup>, 朱月林<sup>2</sup>, 陈华涛<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014; <sup>2</sup>南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

**摘要:** 鲜食风味是影响菜用大豆食味品质的关键因素, 其形成与有机酸有着密切的关联, 研究有机酸合成机制对于菜用大豆的品质改良具有重要的实际意义。本研究利用大豆毛状根系统, 探究与苹果酸含量显著相关的候选基因 *GmALMT8*、*GmIF7GT5* 和 *GmAP* 在调控苹果酸含量方面的功能, 结果表明: 在 *GmALMT8*-OE 毛状根中, *GmALMT8* 基因表达量与苹果酸的含量均显著高于空载对照毛状根, 而 *GmIF7GT5* 和 *GmAP* 毛状根中苹果酸的含量无显著变化。鉴于已经报道的 *ALMT* 家族基因的苹果酸转运功能, 推测大豆中 *GmALMT8* 基因可能具有相似的功能, 在调控苹果酸含量方面发挥重要作用。为验证 *GmALMT8*-OE 毛状根中苹果酸含量的变化是否由 *GmALMT8* 基因表达的改变所引起, 本研究采用蘸花法在拟南芥中过表达 *GmALMT8* 基因。与阳性毛状根中苹果酸测定的结果相类似, 过表达 *GmALMT8* 显著提高了 T<sub>2</sub> 代转基因拟南芥株系种子中的苹果酸含量, 进一步证明 *GmALMT8* 的稳定表达能够提高苹果酸含量, 明确 *GmALMT8* 基因在大豆中具有调控苹果酸含量的生物学功能, 丰富了大豆有机酸的理论研究, 对菜用大豆优质育种具有参考价值。

**关键词:** 菜用大豆; 苹果酸; 候选基因; 功能分析

## Identification and Functional Analysis of Aluminum-Activated Malate Transporter Family Gene *GmALMT8* in Soybean

LIU Hui<sup>1,2</sup>, XU Wenjing<sup>1,2</sup>, ZHANG Hongmei<sup>1</sup>, LIU Xiaoqing<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, WANG Qiong<sup>1</sup>, ZHU Yuelin<sup>2</sup>, CHEN Huatao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; <sup>2</sup>College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** Fresh flavor is the key factor of the taste quality of vegetable soybean, and its formation is closely related to the organic acids. It is of great practical significance to analyze the synthesis mechanism of organic acids in quality improvement of vegetable soybean. In this study, the soybean hairy root system was used to explore the functions of candidate genes *GmALMT8*, *GmIF7GT5* and *GmAP*, which are significantly related to malic acid content, in regulating malic acid content. The transcripts of *GmALMT8* gene and the content of malic acid in *GmALMT8*-OE hairy roots were significantly higher than those in control hairy roots without inserts, while the content of malic acid in *GmIF7GT5* and *GmAP* transformed hairy roots had no significant change. In view of the reported malic acid transport function of *ALMT* family genes, it is speculated that *GmALMT8* gene in soybean may have a similar function and play an important role in regulating malic acid content. In order to verify whether the change of malic acid content in *GmALMT8*-OE hairy roots is caused by the change of *GmALMT8* gene expression, this study overexpressed *GmALMT8* gene in *Arabidopsis thaliana* by dipping flower method. Similar to the results of malic acid determination in positive hairy roots, overexpression of *GmALMT8*

收稿日期: 2023-09-27 网络出版日期: 2023-12-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230927001>

第一作者研究方向为菜用大豆分子遗传, E-mail: 2020104078@stu.njau.edu.cn

通信作者: 陈华涛, 研究方向为大豆分子育种技术及种质创新, E-mail: cht@jaas.ac.cn

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(22)5002)

Foundation project: Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund(CX(22)5002)

significantly increased the malic acid content in seeds of  $T_2$  transgenic *Arabidopsis thaliana*. These results approved that soybean *GmALMT8* gene had biological function in regulating malic acid content, which enriched the theoretical research of soybean organic acid and provided reference value for high-quality breeding of vegetable soybean.

**Key words:** vegetable soybean; malic acid; candidate gene; functional analysis

菜用大豆(*Glycine max*(L.)Merr.)又称毛豆、鲜食大豆,是指在R6(鼓粒盛期)至R7(初熟期)生育期间采青食用的大豆专用型品种<sup>[1]</sup>。鲜食风味是影响菜用大豆食味品质的关键因素,而影响品质的有机酸作为多种氨基酸生物合成的底物,有利于籽粒中氨基酸的积累从而提高菜用大豆的鲜味<sup>[2]</sup>。

在不同的植物中已报道了许多与有机酸含量相关的QTLs。Liebhard等<sup>[3]</sup>研究表明,苹果(*Malus pumila* Mill.)果实中可滴定酸含量的变化几乎完全可以由8号和16号连锁群上的2个主效QTLs位点决定,分别能够解释后代中酸度表型变异的46%和42%,其中位于第16连锁群上的主效基因位置与Maliepaard等<sup>[4]</sup>报道的结果相一致。菜用大豆中的有机酸含量属于多个基因协同控制的数量性状,与传统的连锁定位方法相比,全基因组关联分析(GWAS, genome wide association study)节省了构建群体的时间,能够对不同种质进行遗传结构分析,提高QTL定位的精准性<sup>[5-6]</sup>,已经应用在大豆、小麦(*Triticum aestivum* L.)和水稻(*Oryza sativa* L.)等多种作物中<sup>[7-9]</sup>,并成为快速有效发掘植物数量性状基因的重要手段。

苹果酸作为主要有机酸之一,具有较好的抗氧化能力,能够加速消除机体自由基,并且具有清热、消炎、促进机体代谢的作用<sup>[10]</sup>。而铝激活苹果酸转运蛋白(ALMT, aluminum-activated malate transporters)是植物特有的一类膜蛋白,在苹果酸的积累与运输中起着至关重要的作用。ALMT家族基因在调控果实有机酸含量和果实酸化过程中发挥着重要作用,多项研究证实ALMT家族基因可作为果实品质的关键调节因子。葡萄(*Vitis vinifera* L.)中定位于液泡膜上的VvALMT9蛋白可以介导酒石酸和苹果酸的转运,在葡萄浆果有机酸的积累中起关键作用<sup>[11]</sup>,番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中SLALMT9是影响苹果酸含量变异的重要基因,通过调控果实中苹果酸的积累从而影响果实品质<sup>[12]</sup>。Xu等<sup>[13]</sup>发现白梨(*Pyrus bretschneideri* Rehder)ALMT家族基因Pbr020270.1参与果实发育过程中的苹果酸积累。巫伟峰<sup>[14]</sup>的研究表明在李(*Prunus salicina* Lindl.)

的大多数品种果实中ALMT4-like基因具有促进苹果酸积累的作用。在苹果中,多个研究团队均定位到位于16号染色体上的ALMT家族基因Ma1,推测其可能主导苹果果实中酸度的形成<sup>[15-16]</sup>。以上研究结果均表明多种果实中的ALMT家族基因与苹果酸的转运和积累密切相关,且影响果实酸度的形成和风味品质。

本课题组前期基于GWAS研究结果共挖掘到3个与苹果酸含量显著相关的候选基因,定位于5号染色体上的GmALMT8编码铝激活苹果酸转运家族蛋白,定位于16号染色体上的GmIF7GT5编码异黄酮7-O-葡萄糖基转移酶(IF7GT, isoflavone 7-O-glucosyltransferase),定位于19号染色体上的GmAP编码天冬氨酸蛋白酶家族蛋白(AP, aspartic proteinase 36)。本研究利用菜用大豆毛状根系统探究上述候选基因在调控苹果酸含量方面的功能;并通过拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)遗传转化获得GmALMT8基因过表达拟南芥株系 $T_2$ 代,进一步明确GmALMT8基因在调控菜用大豆苹果酸含量方面的生物学功能,旨在初步解析菜用大豆苹果酸含量的遗传学基础,为调控菜用大豆苹果酸含量的分子机制研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以大豆栽培品种Williams 82作为大豆毛状根系统转化材料,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Columbia-0型)作为遗传转化材料,以上植物材料均由江苏省农业科学院豆类作物研究室提供。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 植物过表达载体的构建

在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取GmALMT8、GmIF7GT5和GmAP基因的CDS序列和过表达载体pCambia1305(本实验室保存)的酶切位点,利用诺唯赞的引物设计软件CE Design V1.04设计包含Xba I和BamH I位点的特异性扩增引物,引物序列见表1。使用RNA提取试剂盒(TIANGEN,北京)提取Williams 82叶片的RNA,利用cDNA第一链合成

试剂盒(TIANGEN,北京)进行cDNA第一链的合成。以Williams 82叶片的cDNA为模板,采用高保真酶KOD-FX(TOYOBO,日本)体系进行PCR扩增。KOD FX反应体系:10  $\mu$ L cDNA,1.5  $\mu$ L上、下游引物,25  $\mu$ L 2 $\times$ PCR Buffer,10  $\mu$ L dNTPs,1  $\mu$ L KOD FX

和1  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,总体系50  $\mu$ L。程序为94  $^{\circ}$ C 2 min 预变性;98  $^{\circ}$ C 变性10 s,56  $^{\circ}$ C 退火30 s,68  $^{\circ}$ C 延伸1 min,循环30次;68  $^{\circ}$ C 延伸5 min,4  $^{\circ}$ C 保存。对PCR产物进行检测,按照AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(CORNING,吴江)的说明书纯化回收目的产物。

表1 植物过表达载体构建的引物

Table 1 Primers constructed from plant overexpression vectors

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
GmALMT8-OE-F	CGGAGCTAGCTCTAGAATGGAAATGGCAATGGCTGAT
GmALMT8-OE-R	TGCTCACCATGGATCCTTCTGCTCCACGAGTAGGT
GmIF7GT5-OE-F	CGGAGCTAGCTCTAGAATGAAAGAAGCTGTAGTTTTC
GmIF7GT5-OE-R	TGCTCACCATGGATCCACTGACACACACTTGTCTC
GmAP-OE-F	CGGAGCTAGCTCTAGAATGCGGGGTGGTGTTCCTG
GmAP-OE-R	TGCTCACCATGGATCCAAAATGGCACTCCATG

将pCAMBIA1305质粒使用 *Xba* I 和 *Bam* H I 限制性内切酶进行双酶切,对酶切后的载体进行纯化回收。通过同源重组法将目的基因和线性化载体构建重组表达载体,反应体系:2  $\mu$ L pCAMBIA1305 线性化载体,1  $\mu$ L 目的基因片段,4  $\mu$ L 5 $\times$ CE II Buffer,2  $\mu$ L Exnase II,11  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,总体系20  $\mu$ L。将得到的重组载体转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ (TIANGEN),菌检正确后的菌液送至南京生工生物工程有限公司进行测序,通过BioXM2.7序列比对软件进行序列比对,将测序结果正确的菌液过夜摇菌12 h后按照AxyPrep质粒DNA小量试剂盒(CORNING,吴江)说明书步骤提取。利用冻融法将构建好的载体 *GmALMT8*、*GmIF7GT5*、*GmAP* 和空载pCAMBIA1305 分别转化到发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) K599 和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 感受态细胞中(TIANGEN),转化方法见说明书。

**1.2.2 发根农杆菌介导转化大豆毛状根** 根据 Kereszt 等<sup>[17]</sup>的大豆毛状根转化方法,分别将携有 pCAMBIA1305-*GmALMT8*、pCAMBIA1305-*GmIF7GT5* 和 pCAMBIA1305-*GmAP* 质粒及相应空载 pCAMBIA1305 质粒的发根农杆菌 K599,注射法侵染 Williams 82 大豆(播种5 d后在大豆子叶节附近位置分别注射4种农杆菌),侵染完成后置于恒温光照培养箱中培养,昼夜温度为28  $^{\circ}$ C/25  $^{\circ}$ C,光周期为16 h光/8 h暗,湿度为70%以上。2~3周后在侵染部位长出的毛状根长度达到5~10 cm时,剪掉幼苗主根并置于霍格兰营养液中培养7 d左右,最终得到大豆幼苗嵌合

体,包括非转基因的地上部以及转基因的毛状根。将具有过表达毛状根的嵌合体称之为 *GmALMT8*-OE、*GmIF7GT5*-OE 和 *GmAP*-OE。

**1.2.3 阳性毛状根鉴定** 转入 pCAMBIA1305-*GmALMT8*、pCAMBIA1305-*GmIF7GT5* 和 pCAMBIA1305-*GmAP* 质粒作为阳性毛状根,转入 pCAMBIA1305 空载质粒作为空载对照,将转化得到的毛状根放在共聚焦显微镜(Zeiss, LSM 780, 德国)下观察,将观察到绿色荧光的毛状根取其中一部分毛状根采用 CTAB 法<sup>[18]</sup>提取 DNA 用于阳性毛状根的 PCR 分子鉴定,方法同 1.2.1;另一部分毛状根快速冷冻于液氮中,保存至-80  $^{\circ}$ C 冰箱备用。鉴定出是阳性的毛状根,除用于检测候选基因的表达外,剩余毛状根全部用于苹果酸含量的检测。

**1.2.4 大豆毛状根中候选基因表达量及苹果酸含量测定** 为检测阳性毛状根中候选基因表达水平,分别提取 *GmALMT8*-OE、*GmIF7GT5*-OE、*GmAP*-OE 和只转入空载体质粒的菜用大豆毛状根的总 RNA 并进行反转录,方法同 1.2.1。采用 ABI 7500 系统(Applied Biosystems)进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR, quantitative real-time PCR)检测,设置3次生物学重复,3次技术重复。候选基因检测所用的引物及内参基因 *Tubulin* 的引物序列见表2。qRT-PCR 反应体系:10  $\mu$ L 2 $\times$ Talent qPCR PreMix,0.6  $\mu$ L 上、下游引物,5  $\mu$ L cDNA 模板,0.8  $\mu$ L 50 $\times$ ROX Reference Dye 和 3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,总体系 20  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95  $^{\circ}$ C 变性 5 s,58  $^{\circ}$ C 退火 10 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s,循环 40 次;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min,

4 °C保存。通过比较CT值对目标基因的表达水平进行分析,并使用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对数据进行处理和分析<sup>[19]</sup>。

表2 大豆毛状根中候选基因表达量测定所用引物

Table 2 Primers for the determination of candidate gene expression in hairy root of soybean

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
GmALMT8-qRT-F	CCATCGGTTTCGAGTCTGTGTT
GmALMT8-qRT-R	GGCGACGGTTCCTATGCTA
GmIF7GT5-qRT-F	GTGCTGGGGTGCCCATGATAGCATG
GmIF7GT5-qRT-R	CGATTCCATCAACTCCCTAA
GmAP-qRT-F	GAATTGGATGGGCCGATTAT
GmAP-qRT-R	GAAAGTGCCTATGTGGGAGC
Tubulin-F	CACCTCTGTTGGCATTGCAC
Tubulin-R	ACAGTGTAGTGTCCCTTGC

将用于苹果酸含量测定的毛状根用烘箱105 °C杀青30 min,再75 °C烘干至恒重后用研钵研磨成粉末(过0.45 mm筛)。苹果酸的提取参考Li等<sup>[20]</sup>的提取方法,并采用高效液相色谱法(HPLC, high performance liquid chromatography)测定大豆毛状根中苹果酸含量,具体试验步骤参考文献<sup>[21]</sup>。

**1.2.5 拟南芥的遗传转化** 为了进一步验证*GmALMT8*的稳定表达是否能够正向调控苹果酸的积累,将pCAMBIA1305-*GmALMT8*过表达载体转化至根癌农杆菌EHA105,通过蘸花法转化拟南芥,培育植株至结荚,收获 $T_0$ 代种子<sup>[22]</sup>。

**1.2.6 转基因拟南芥阳性植株的鉴定** 将 $T_0$ 代拟南芥种子置于2 mL离心管中,加入75%酒精消毒5 min,用无菌水洗涤2次。再加入10%次氯酸钠(活性氯 $\geq 5.5\%$ )对种子消毒5 min后,用无菌水洗涤5次。将清洗好的1 g种子均匀播种在1/2 MS固体培养基上(含15 mg/L潮霉素和16 mg/L特美汀),置于4 °C冰箱中3 d后移至光照培养箱培养14 d左右进行移苗。对筛选出的10株具有潮霉素和特美汀抗性的拟南芥,在培养至真叶长出4~5片时,提取叶片DNA,以pCAMBIA1305-*GmALMT8*质粒作为阳性对照,以空载对照作为阴性对照进行PCR检测,方法同1.2.1。对8株PCR检测均呈阳性的株系收种,即得到 $T_1$ 代种子。将 $T_1$ 代种子按上述方法继续进行阳性筛选获得拟南芥 $T_2$ 代转基因植株,收获 $T_2$ 代种子用于苹果酸含量检测。

**1.2.7 过表达拟南芥植株中*GmALMT8*表达量及苹果酸含量测定** 分别提取野生型拟南芥与转基因拟南芥 $T_2$ 代叶片中的总RNA并反转录,方法同1.2.1。qRT-PCR试验反应体系及程序同1.2.4,3次生物学重复,3次技术重复,候选基因检测所用的引物及内参基因*AtTUB*的引物序列见表3,通过比较CT值对目标基因的表达水平进行分析,并使用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对数据进行处理和分析<sup>[19]</sup>。测定过表达*GmALMT8*基因拟南芥 $T_2$ 代种子中苹果酸含量,共测定3份样品,每份样品1 g,测定方法同1.2.4。

表3 拟南芥中候选基因表达量测定所用引物

Table 3 Primers for the determination of candidate gene expression in hairy root of *Arabidopsis thaliana*

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>GmALMT8</i> -qRT-F	TATTTCCCTGAACCTTTCCCTCTG
<i>GmALMT8</i> -qRT-R	TAGGCTTCATAATCATGTACACCC
<i>AtTUB</i> -F	GTTCTCGATGTTGTTTCGTAAG
<i>AtTUB</i> -R	TGTAAGGCTCAACCACAGTAT

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆阳性毛状根鉴定

分别提取转基因毛状根与空载对照毛状根的基因组DNA,进行PCR检测,结果显示,转基因毛状根中分别有*GmALMT8*、*GmIF7GT5*和*GmAP*基因的存在(图1),条带大小正确,经测序后验证序列与基因组参考序列一致,获得的大豆转基因阳性毛状根用于后续实验。

### 2.2 候选基因在阳性毛状根中的基因表达量及苹果酸含量

qRT-PCR结果显示,与空载对照相比,在*GmALMT8*-OE、*GmIF7GT5*-OE和*GmAP*-OE毛状根中*GmALMT8*、*GmIF7GT5*和*GmAP*基因的表达量均显著增加(图2 A、B、C)。

苹果酸含量检测结果表明,*GmALMT8*-OE毛状根中苹果酸含量为112.8  $\mu\text{g/g}$ ,显著高于空载对照毛状根,是空载对照毛状根的3.77倍。而*GmIF7GT5*-OE和*GmAP*-OE毛状根中苹果酸含量和空载对照毛状根相比均无显著性差异(图2 D)。由上述结果推测*GmALMT8*可能参与菜用大豆苹果酸含量的调控过程。

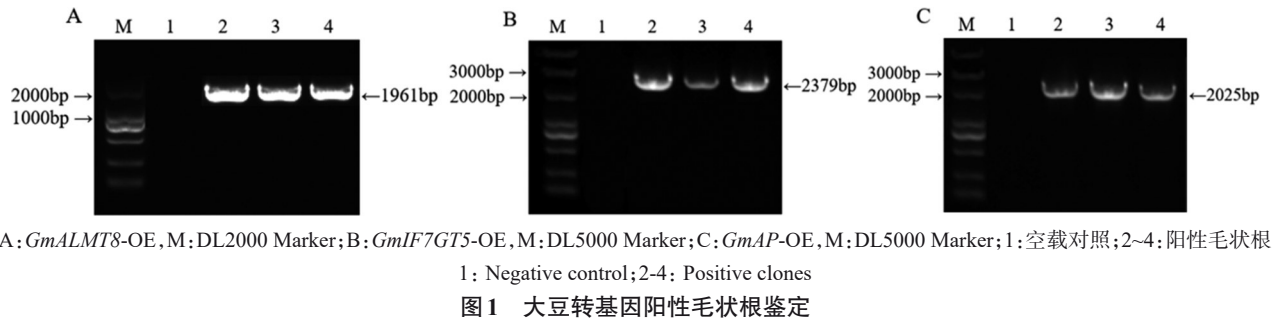
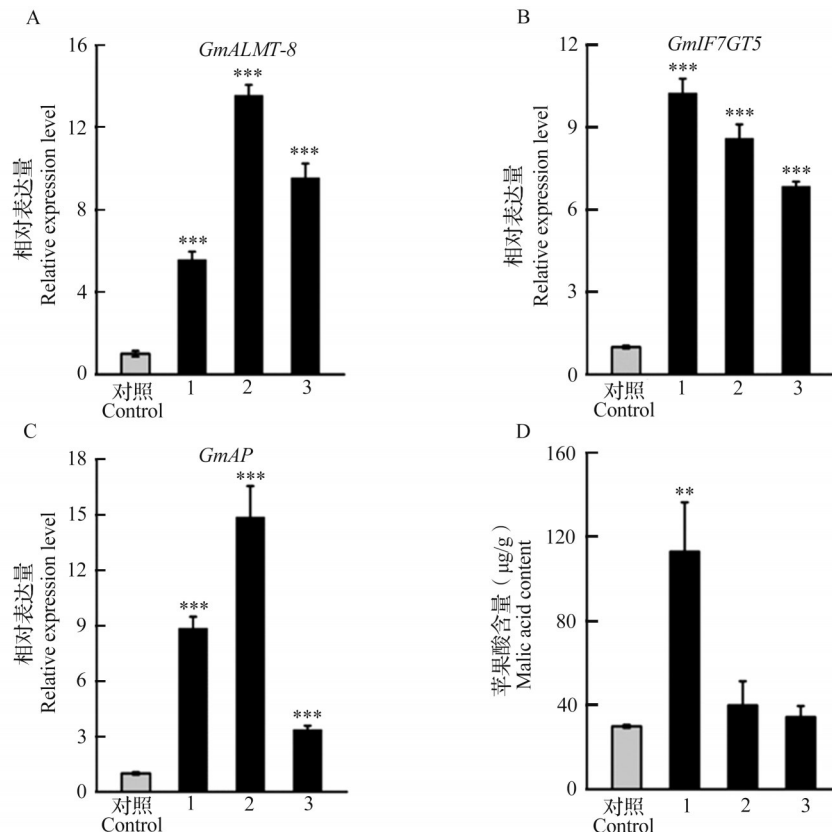


Fig. 1 Identification of transgenic positive hairy roots of soybean



A~D中的对照为空载对照; 1: *GmALMT8*-OE; 2: *GmIF7GT5*-OE; 3: *GmAP*-OE; \*\*, \*\*\*分别表示在  $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$  水平上差异显著, 下同  
The controls in A-D are negative controls; \*\*, \*\*\* indicated significant difference at  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  respectively, the same as below

图 2 候选基因在阳性毛状根中的基因表达量及苹果酸含量

Fig. 2 Gene expression and malic acid content of candidate genes in positive hairy roots

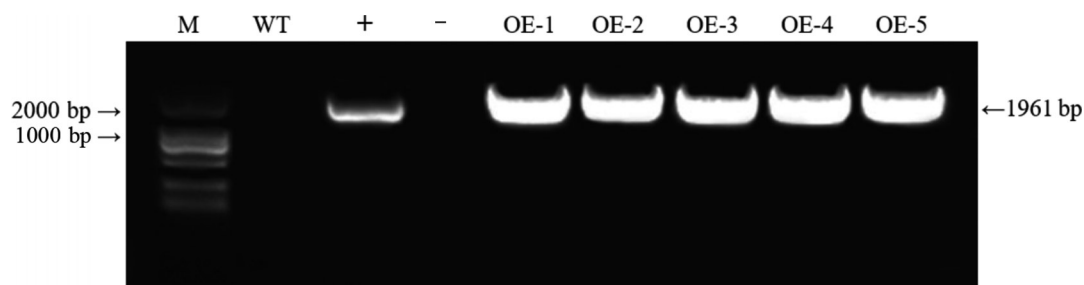
### 2.3 转基因拟南芥的阳性鉴定

对反复筛选后获得的  $T_2$  代转基因拟南芥株系进行 PCR 检测, 结果显示, 扩增条带大小与目的基因 *GmALMT8* 片段大小一致(图 3)。

### 2.4 过表达 *GmALMT8* 促进苹果酸的积累

qRT-PCR 结果显示, 与野生型相比,  $T_2$  代转基因

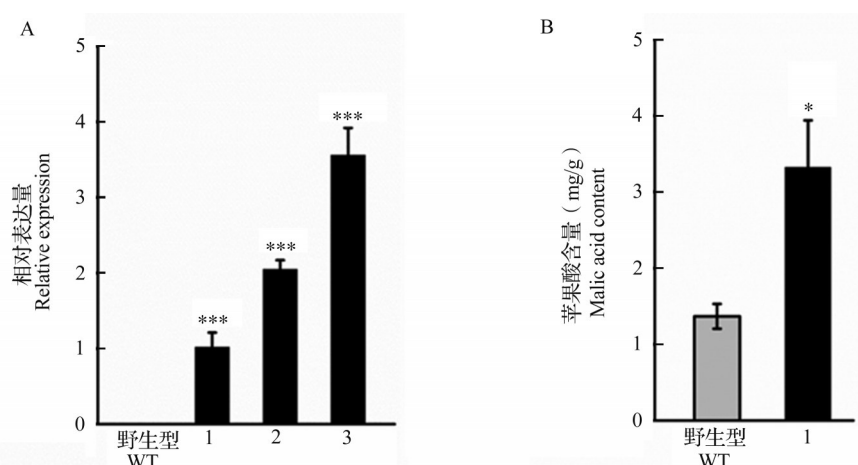
拟南芥株系中 *GmALMT8* 基因的表达量显著提高(图 4A)。此外, 与阳性毛状根中苹果酸测定的结果相类似, 异源过表达 *GmALMT8* 显著提高了苹果酸含量,  $T_2$  代转基因拟南芥株系种子中苹果酸的含量是野生型的 2.43 倍(图 4 B)。



M: DL2000 Marker; +: pCAMBIA1305-*GmALMT8* 质粒; -: 空载对照; OE-1~5: *GmALMT8* 基因成功插入的 5 株阳性拟南芥株系  
+: Positive control, pCAMBIA1305-*GmALMT8* plasmid; -: Negative control, blank control; OE-1-OE-5: Different *GmALMT8* transgenic *Arabidopsis thaliana*

图3 T<sub>2</sub>代转基因拟南芥 *GmALMT8* 基因的PCR检测

Fig. 3 PCR analysis of *GmALMT8* transgenic *Arabidopsis thaliana* from T<sub>2</sub> transgenic lines



A: *GmALMT8* 在野生型拟南芥与过表达拟南芥中的相对表达水平, 1~3: *GmALMT8* 基因在 T<sub>2</sub> 代转基因拟南芥株系中的表达量;

B: 拟南芥株系种子中苹果酸含量, 1: T<sub>2</sub> 代转基因株系; \*表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著

A: Relative expression levels of wild type *Arabidopsis Thaliana* and *GmALMT8* overexpressed *Arabidopsis Thaliana*, 1-3: Expression levels of *GmALMT8* in T<sub>2</sub> transgenic *Arabidopsis Thaliana*; B: Malic acid content in seeds of *Arabidopsis thaliana*, WT: Wild type, 1: T<sub>2</sub> transgenic plant;

\*indicated significant difference at  $P < 0.05$

图4 过表达 *GmALMT8* 对苹果酸含量的影响

Fig. 4 Effect of overexpression of *GmALMT8* on malic acid content

### 3 讨论

果实中有机酸的积累程度在很大程度上取决于有机酸代谢过程中的合成、降解和转化,因此,有机酸转运体的研究对于果实中有机酸积累的机制研究具有重要的意义。

最初研究发现多数 *ALMT* 家族基因与植物耐铝性相关,例如小麦中 *TaALMT1* 和拟南芥中的 *AtALMT1* 等均与耐铝性相关<sup>[23-24]</sup>。随后,越来越多的 *ALMT* 基因家族成员在大豆、玉米和葡萄等物种中被发现<sup>[11,25]</sup>,其功能也不再仅局限于保护植物抵御铝毒的侵害,更多的研究还证实 *ALMT* 与果实风味品质、种子发育和气孔运动的调节等有关<sup>[15,26]</sup>,在不同物种中均证实了 *ALMT* 家族基因能介导植物中苹果酸的转运,且参与果实中苹果酸含量的调控,

在果实酸化过程中发挥着重要作用<sup>[27-28]</sup>。本研究通过大豆毛状根转化系统对 3 个与菜用大豆苹果酸含量相关的候选基因 *GmALMT8*、*GmIF7GT5* 和 *GmAP* 进行功能验证。

Peng 等<sup>[29]</sup> 研究表明,苹果中的转录因子 *MdMYB21* 可以下调编码铝激活苹果酸转运蛋白 *ALMT* 的基因 *MdMal* 的表达从而显著降低了苹果酸含量。玉米 (*Zea mays* L.) 中编码 *ALMT* 的基因 *EAD1* 功能障碍导致顶端部分未成熟穗的苹果酸含量降低,且严重退化,而外源苹果酸注射挽救了 *ead1* 的表型缺陷<sup>[30]</sup>。Ye 等<sup>[12]</sup> 鉴定了番茄中的 *SIALMT9*,它是番茄果实成熟过程中苹果酸积累所必需的,并提高番茄的果实风味和抗铝胁迫能力。本研究同样发现在 *GmALMT8*-OE 毛状根中, *GmALMT8* 基因表达量与苹果酸的含量均显著高于

空载对照毛状根。由此推测菜用大豆中的 *GmALMT8* 基因可能具有参与调控菜用大豆中苹果酸含量的功能。因此选择该基因作为探索菜用大豆苹果酸含量调控机理的主要研究对象,进一步深入研究。

为验证 *GmALMT8*-OE 毛状根中苹果酸含量的变化是否由 *GmALMT8* 基因表达的改变所引起,本研究采用蘸花法在拟南芥中过表达 *GmALMT8* 基因。与阳性毛状根中苹果酸测定的结果相类似,过表达 *GmALMT8* 显著提高了 T<sub>2</sub> 代转基因拟南芥株系种子中的苹果酸含量。

以上结果表明, *GmALMT8* 与大豆有机酸有显著关联,可能通过提高苹果酸积累而影响大豆品质。此外,拟南芥中的 *AtALMT12* 可以调控苹果酸的运输,并且参与调节气孔运动<sup>[31-32]</sup>,同样,在大豆中,前人研究表明低磷条件诱导根部 *GmALMT5* 的上调可以增加根系中苹果酸的外排,从而提高磷的利用效率<sup>[33]</sup>。上述研究表明 *ALMT* 与苹果酸密切相关,包括转运、积累等过程。

#### 参考文献

- [1] Zhang G W, Xu S C, Mao W H, Hu Q Z, Gong Y M. Determination of the genetic diversity of vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) using EST-SSR markers. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2013, 14(4): 279-288
- [2] Hu R, Zhang Y, Chen Y, Lin G Q. Dynamic metabolic profiling in vegetable soybean seed development. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2018, 30(2): 90-98
- [3] Liebhard R, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(8): 1497-1508
- [4] Maliepaard C, Alston F H, Arkel G V, Brown L M, Chevreau E, Dunemann F, Evans K M, Gardiner S, Guilford P, Heusden A W V, Janse J, Laurens F, Lynn J R, Manganaris A G, den Nijs A P M, Periam N, Rikkerink E, Roche P, Ryder C, Sansavini S, Schmidt H, Tartarini S, Verhaegh J J, Vrieling-van Ginkel M, King G J. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 60-73
- [5] Zhang X, Guan Z, Wang L, Fu J, Zhang Y, Li Z, Ma L, Liu P, Zhang Y, Liu M, Li P, Zou C, He Y, Lin H, Yuan G, Gao S, Pan G, Shen Y. Combined GWAS and QTL analysis for dissecting the genetic architecture of kernel test weight in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, 2020, 295(2): 409-420
- [6] Zhang Y, Liu Z, Wang X, Li Y, Li Y, Gou Z, Zhao X, Hong H, Ren H, Qi X, Qiu L. Identification of genes for drought resistance and prediction of gene candidates in soybean seedlings based on linkage and association mapping. *The Crop Journal*, 2022, 10(3): 830-839
- [7] 丁杰荣, 孙炳蕊, 于航, 江立群, 张静, 吕树伟, 陈文丰, 范芝兰, 潘大建, 李晨, 刘清. 广东水稻核心种质耐冷萌发全基因组关联分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(5): 1425-1437
- [8] 梁腾月, 谷勇哲, 马英杰, 王辉, 杨光, 敖雪, 邱丽娟. 大豆耐低磷性全基因组关联分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1): 237-251
- [9] 程宇坤, 董一帆, 耿洪伟, 任毅, 王睿, 张志辉. 小麦籽粒相关性状全基因组关联分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(4): 993-1006
- [10] 南龙伟, 闫小玉, 门靖, 邓洪丽, 李娟, 宋洋. 苹果酸的生理功能及在食品中的应用研究进展. *精细化工中间体*, 2022, 52(5): 26-29, 62
- [11] De Angeli A, Baetz U, Francisco R, Zhang J, Chaves M M, Regalado A. The vacuolar channel VvALMT9 mediates malate and tartrate accumulation in berries of *Vitis vinifera*. *Planta*, 2013, 238(2): 283-291
- [12] Ye J, Wang X, Hu T, Zhang F, Wang B, Li C, Yang T, Li H, Lu Y, Giovannoni J J, Zhang Y, Ye Z. An inDel in the promoter of *Al-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER9* selected during tomato domestication determines fruit malate contents and aluminum tolerance. *The Plant Cell*, 2017, 29(9): 2249-2268
- [13] Xu L L, Qiao X, Zhang M Y, Zhang S L. Genome-Wide analysis of aluminum-activated malate transporter family genes in six rosaceae species, and expression analysis and functional characterization on malate accumulation in Chinese white pear. *Plant Science*, 2018, 274: 451-465
- [14] 巫伟峰. 李果实苹果酸转运体的克隆表达及其有机酸的关联性分析. 福州: 福建农林大学, 2017: 65-67
- Wu W F. Cloning and expression analysis of malate transporter in plum fruit and analysis of the correlation of organic acids.

- Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017: 65-67
- [15] Bai Y, Dougherty L, Li M, Fazio G, Cheng L, Xu K. A natural mutation-led truncation in one of the two aluminum-activated malate transporter-like genes at the Ma locus is associated with low fruit acidity in apple. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(8): 663-678
- [16] Li C, Dougherty L, Coluccio A E, Meng D, El-Sharkawy I, Borejsza-Wysocka E, Liang D, Piñeros M A, Xu K, Cheng L. Apple ALMT9 requires a conserved c-terminal domain for malate transport underlying fruit acidity. *Plant Physiology*, 2020, 182(2): 992-1006
- [17] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, Nguyen C D, Nontachaiyapoom S, Kinkema M, Gresshoff P M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 948-952
- [18] Doyle J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation. *Molecular Techniques in Taxonomy*, 1991
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [20] Li Q, Zhang H H, Claver I P, Zhu K X, Peng W, Zhou H M. Effect of different cooking methods on the flavour constituents of mushroom (*Agaricus bisporus* (Lange) Sing) soup. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46(5): 1100-1108
- [21] 张艳艳, 孙晓康, 张晓元, 袁丹丹, 刘英梅, 赵国敏, 刘飞. 高效液相色谱一步法快速测定 10 种有机酸. *食品与药品*, 2022, 24(1): 44-47
- Zhang Y Y, Sun X K, Zhang X Y, Yuan D D, Liu Y M, Zhao G M, Liu F. Fast and effective determination of ten kinds of organic acids by HPLC. *Food and Drug*, 2022, 24(1): 44-47
- [22] Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743
- [23] Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn S J, Ryan P R, Delhaize E, Matsumoto H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 2004, 37(5): 645-653
- [24] Hoekenga O A, Maron L G, Piñeros M A, Cançado G M, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan P R, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian L V. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(25): 9738-9743
- [25] Liang C, Piñeros M A, Tian J, Yao Z, Sun L, Liu J, Shaff J, Coluccio A, Kochian L V, Liao H. Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1347-1361
- [26] Sasaki T, Tsuchiya Y, Ariyoshi M, Nakano R, Ushijima K, Kubo Y, Mori I C, Higashiizumi E, Galis I, Yamamoto Y. Two members of the aluminum-activated malate transporter family, *SIALMT4* and *SIALMT5*, are expressed during fruit development, and the overexpression of *SIALMT5* alters organic acid contents in seeds in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(11): 2367-2379
- [27] Sauvage C, Segura V, Bauchet G, Stevens R, Do P T, Nikoloski Z, Fernie A R, Causse M. Genome-wide association in tomato reveals 44 candidate loci for fruit metabolic traits. *Plant Physiology*, 2014, 165(3): 1120-1132
- [28] Liu J, Zhou M. The *ALMT* gene family performs multiple functions in plants. *Agronomy*, 2018, 8(2): 20
- [29] Peng Y J, Yuan Y Y, Chang W J, Zheng L T, Ma W F, Ren H, Liu P P, Zhu L C, Su J, Ma F W, Li M J, Ma B Q. Transcriptional repression of MdMa1 by *MdMYB21* in Ma locus decreases malic acid content in apple fruit. *The Plant Journal*, 2023, 115(5): 1231-1242
- [30] Pei Y R, Deng Y N, Zhang H R, Zhang Z G, Liu J, Chen Z B, Cai D R, Li K, Du Y M, Zang J, Xin P Y, Chu J F, Chen Y H, Zhao L, Liu J, Chen H B. EAR APICAL DEGENERATION1 regulates maize ear development by maintaining malate supply for apical inflorescence. *The Plant Cell*, 2022, 34(6): 2222-2241
- [31] Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid K A, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R. AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, 2010, 63(6): 1054-1062
- [32] Sasaki T, Mori I C, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y. Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(3): 354-365
- [33] Peng W T, Wu W W, Peng J C, Li J J, Lin Y, Wang Y N, Tian J, Sun L L, Liang C Y, Liao H. Characterization of the soybean *GmALMT* family genes and the function of *GmALMT5* in response to phosphate starvation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(3): 216-231