

大豆 *GmCWIN3* 基因的克隆及转基因拟南芥株型鉴定

牟可欣, 周芳雪, 冯雯蜜, 于哲, 周丽娟, 曾雨欣, 井妍, 李海燕

(海南大学热带农林学院/南繁学院(三亚南繁研究院), 三亚 572025)

摘要: 植物细胞壁转化酶(CWIN, cell wall invertase)可以催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖,在植物生长发育过程中具有重要作用。为探究 *GmCWINs* 在大豆株高、分枝数等株型发育过程中的功能,本研究克隆到1个该基因家族成员 *GmCWIN3*, 序列分析结果显示, *GmCWIN3* 基因的 CDS 全长为 1728 bp, 其编码 575 个氨基酸。GmCWIN3 蛋白二级结构中无规则卷曲结构占比最大, 为 48.17%; 蛋白质三级结构显示该基因编码了一种细胞壁转化酶。GmCWIN3 基因启动子区具有多个光响应元件, 同时也具有响应生长素、赤霉素及昼夜节律的顺式作用元件。进一步地分析生长素和赤霉素诱导下 *GmCWIN3* 的表达模式, 发现 *GmCWIN3* 基因能在反应初期快速地响应两种激素的诱导。构建 *GmCWIN3* 基因的植物表达载体并完成其在拟南芥中的过表达, 对转基因株系及野生型拟南芥的细胞壁转化酶活性和蔗糖含量进行测定, 结果表明转基因拟南芥中细胞壁转化酶活性显著提高, 且蔗糖含量显著降低。此外, 对植株表型进行观察和统计, 发现与野生型相比, 过表达植株的株高和分枝数均显著增加。综上所述, 本研究推测 *GmCWIN3* 基因可能通过调节体内蔗糖的水解, 从而参与生长素及赤霉素介导的大豆株高及分枝数等性状的形成过程。本研究结果为进一步探究 *GmCWIN3* 基因调控大豆株型相关性状的分子机制研究奠定了基础。

关键词: 大豆; 细胞壁转化酶; 蔗糖; 激素诱导; 株型

Cloning of Soybean *GmCWIN3* Gene and Identification of Plant Architecture in Transgenic *Arabidopsis*

MOU Kexin, ZHOU Fangxue, FENG Wenmi, YU Zhe, ZHOU Lijuan, ZENG Yuxin, JING Yan, LI Haiyan

(College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University/School of Breeding and Multiplication

(Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Sanya 572025)

Abstract: Cell wall invertase (CWIN) is an enzyme that catalyzes sucrose hydrolysis to glucose and fructose, and plays an important role in plant growth and development. To explore the function of *GmCWINs* in plant architecture, particular in plant height and branch number, *GmCWIN3*, a member of *GmCWINs* family was cloned in our study. The sequence analysis results showed that the total CDS length of *GmCWIN3* gene was 1728 bp and it encoded 575 amino acids. The secondary structure of GmCWIN3 protein exhibited that the irregular coil structure accounted for the largest proportion (48.17%), and the tertiary structure of the protein revealed that *GmCWIN3* encoded a cell wall invertase. Except for several photo-responsive *cis*-acting elements, some elements associated with the process of growth and development were also found in the promoter region of *GmCWIN3*, such as auxin responsive element, gibberellin responsive element and circadian rhythm element, etc. Further, through the assay of exogenous spraying different hormones, it was found that *GmCWIN3* gene could rapidly respond to the induction of auxin and gibberellin in the initial reaction period. The *GmCWIN3* gene

收稿日期: 2024-03-08 网络出版日期: 2024-07-19

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240308005>

第一作者研究方向为大豆分子遗传育种, E-mail: 649498699@qq.com

通信作者: 井妍, 研究方向为大豆分子遗传育种, E-mail: yanjing9173@163.com

李海燕, 研究方向为大豆分子遗传育种, E-mail: hyli@hainanu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32171937); 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2022XDNY142); 三亚崖州湾科技城科技专项资助 (SCKJ-JYRC-2023-17)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32171937); Hainan Provincial Key Research and Development Project of China (ZDYF2022XDNY142); Project of Sanya Yazhou Bay Science and Technology City (SCKJ-JYRC-2023-17)

overexpression vector was constructed and the transgenic *GmCWIN3 Arabidopsis* plants were obtained. The cell wall invertase activity and sucrose content of the transgenic *Arabidopsis* and wild type plants were measured. The results showed that the cell wall invertase activity of transgenic plants was significantly higher than that in the wild type plants, and the sucrose content was significantly decreased. Additionally, the phenotype identification exhibited that the plant height and branch number of the transgenic plants were significantly increased compared with the wild type plants. In summary, this study speculated that *GmCWIN3* gene may be involved in the development of regulating soybean plant height and branch number mediated by hormones signaling process through the regulation of sucrose hydrolysis. Our study laid a foundation for further exploring the molecular mechanism of *GmCWIN3* in regulating soybean plant architecture related traits.

Key words: soybean; cell wall invertase; sucrose; hormone induction; plant architecture

大豆(*Glycine max*(L.) Merr)是重要的粮油兼用作物,种子中富含丰富的油脂和蛋白质,对人类的营养健康有着重要作用^[1]。大豆起源于我国,已有5000多年的栽培历史^[2]。然而,近些年来,国内大豆单产低、总产不足,使得我国大豆进口依赖度显著提高^[3],无法有效保障国家大豆的粮食安全。因此,如何提高我国大豆产量是国内育种家亟需解决的难题。大豆产量是一个综合性的复杂性状,受到多种因素的影响,其中株高、分枝数等株型相关性状是决定大豆高产的重要因素。

植物细胞壁转化酶(CWIN/CWI, cell wall invertase)是一种催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖的酶,广泛存在于植物的细胞壁中,参与糖分的运输和信号转导^[4]。研究表明在拟南芥^[5]、水稻^[6]、苹果^[7]、木薯^[8]、葡萄^[9]和番茄^[10]中,分别存在6个、8个、3个、6个、1个和4个CWINs基因,它们在植物的生长发育、逆境响应及果实品质等方面发挥着重要的作用。CWIN催化蔗糖裂解成己糖后,通过来自韧皮部的蔗糖转运蛋白(SUT, sucrose transporters)将其卸载到质外体库细胞中^[11]。库组织中释放的己糖可能进入细胞内区室进行代谢、多糖合成和基因调控,或进入细胞外区室响应真菌定植和防御相关反应^[12-13]。因此,CWIN对库器官的发育会产生重大影响,并在响应环境刺激方面发挥重要作用^[14-15]。研究发现,玉米和水稻CWIN基因沉默的突变体,结出的种子较小^[16-17];在番茄中,通过沉默CWIN的抑制基因提高了CWIN的酶活性,则会导致种子变大^[18]。此外,过表达烟草和番茄的CWIN基因会延缓叶片衰老,并增加植株的抗旱能力^[19-20]。在拟南芥中,CWIN基因被视为病原体诱导的植物防御的必要组成部分^[21]。经预测发现,大豆中的CWINs(CWIs)基因共有12个,且具有不同的组织表达特异性。其中,*GmCWI7*和*GmCWI12*主要在花中

表达,*GmCWI8*、*GmCWI9*和*GmCWI11*在叶中表达较高,*GmCWI1~GmCWI4*、*GmCWI6*、*GmCWI8*和*GmCWI9*等基因在根中表现出高水平的表达^[22];而*GmCWI3*、*GmCWI4*、*GmCWI6*、*GmCWI7*、*GmCWI8*和*GmCWI12*则在发育中的种子中表达较高^[23]。Dimou等^[24]最先报道了*GmCWIN1*在根发育过程中的时空表达模式,并推测GmCWIN1蛋白可能参与了蔗糖在质外空间的部分水解过程。Tang等^[23]研究发现GmCIF1特异性抑制大豆中的CWINs基因,GmCIF1在细胞壁转化酶的翻译后调控中发挥着重要作用,从而在组织特异性水平上影响大豆种子发育和蔗糖水解。综上所述,CWINs基因具有不同的组织特异性表达模式,并且在调控植物种子大小、逆境胁迫等多种生物学过程中具有重要作用。然而,该基因家族调控植株株高、分枝数等株型性状的研究还鲜有报道。

本研究旨在探究*GmCWIN3*基因在调控植物株型发育过程中的作用。首先,克隆*GmCWIN3*基因,并对其进行生物信息学分析及激素诱导的基因表达模式分析。其次,利用农杆菌浸花法转化拟南芥Col-0,测定转基因拟南芥的细胞壁转化酶活性和蔗糖含量;同时,对转基因拟南芥的株高及分枝数进行表型鉴定。本研究将为进一步明确大豆和其他物种CWIN基因家族的功能提供依据,为大豆理想株型相关性状的遗传改良及分子育种提供重要的基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所使用的试验材料包括栽培大豆品种Williams82和拟南芥Col-0,均由本实验室保存。播种所用基质为1:1配比的蛭石和营养土,培养条件分别为12 h光照/12 h黑暗和16 h光照/8 h黑暗,生

长调节温度为 22 ~ 25 °C, 空气湿度 60% ~ 70%。其中, 种植大豆 Williams 82 为 100 株, 用于基因克隆的植株数为 5 株, 其余植株备用于外源激素诱导实验; 种植拟南芥 Col-0 100 株, 用于拟南芥的侵染转化。

1.2 *GmCWIN3* 基因克隆和生物信息学分析

待栽培大豆 Williams 82 第一组三出复叶展开时, 取叶片 100 mg 左右, 使用天根生化科技(北京)有限公司植物组织 RNA 提取试剂盒(DP424)提取大豆叶片总 RNA。测定 RNA 的 OD_{260/280} 值, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 RNA 进行检测后, 对检测合格的 RNA 用聚合美公司的反转录酶 M5 Sprint qPCR RT kit with gDNA remover(聚合美 MF949-01)进行反转录得到 cDNA, 并将 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱。通过

Phytozome 在线数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 获取 *GmCWIN3* (*Glyma.15G024600*) 基因的 CDS 序列, 使用 Primer 5 软件设计 *GmCWIN3* 基因 CDS 区的克隆引物 *GmCWIN3*-F/R (表 1)。利用 TOYOBO 公司 KOD 酶(KMM-201)完成基因的 PCR 克隆, 程序为 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 56 °C 退火 5 s, 68 °C 延伸 10 s, 35 个循环; 68 °C 终延伸 10 min。PCR 体系 (25 μL) 为 KOD One™ PCR Master Mix 12.5 μL; cDNA 1 μL; 正向、反向引物各 1.5 μL; RNase Free H₂O 8.5 μL。待 PCR 程序结束后, 将产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 进一步利用南京诺唯赞生物科技有限公司胶回收试剂盒 (DC301-01) 获得目的片段胶回收产物。

表 1 引物序列汇总

Table 1 Summary of primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Function
<i>GmCWIN3</i> -F	ACTCTTGACCATGGTAGATCTGATGGCCGTATCTCCAATTTTGT	基因克隆
<i>GmCWIN3</i> -R	GTCATCCTTGTAATCACTAGTGTTTATTTTTGCCTTCTCCATG	
q- <i>GmCWIN3</i> -F	GATGGGCTGGAATCCATACT	qRT-PCR
q- <i>GmCWIN3</i> -R	TCACCACCTTTGACCACTTT	
OE-JD-F1	TGACGCACAATCCCACTATC	转基因植株鉴定
OE-JD-R1	AGGCTCAGCCACAATACTTC	
<i>GmEF1a</i> -F	GCTCTTCTTGCTTTCACCCTT	qRT-PCR 大豆内参基因
<i>GmEF1a</i> -R	TTCCTTCAAAATTCATCATAACC	
<i>AtActin</i> -F	GCTAACCGTGAGAAGATGAC	qRT-PCR 拟南芥内参基因
<i>AtActin</i> -R	CTAGCATAAAAGCGACAGGAC	

此外, 通过在线软件 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 对 *GmCWIN3* 蛋白二级结构进行分析, 同时利用在线软件 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对基因启动子区的顺式作用元件进行分析。

1.3 外源激素诱导与荧光定量 PCR 分析

当大豆的两组三出复叶完全展开时, 对 72 株生长状态良好的 Williams 82 大豆叶片进行生长类植物激素的外源喷施处理。设置 20 μmol/L 生长素 (IAA, indole acetic acid)、20 μmol/L 赤霉素 (GA3, gibberellin 3) 和水 (对照) 3 组处理。为了排除光周期的影响, 采取了倒序处理的方式, 即距离最后集中取样的 48、36、24、12、8、4、2、0 h, 共 8 个时间点分别各喷施一次, 至最后 0 h 时同时取样。每个处理每次喷施 3 个单株, 共 72 株, 每个单株取样 3 个叶片, 分别提取不同处理下的叶片总 RNA, 并稀释为

统一浓度 500 ng/μL, 利用聚合美公司的反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 设计实时荧光定量 PCR 引物 q-*GmCWIN3*-F 和 q-*GmCWIN3*-R (表 1)。以大豆 *GmEF1a* 作为内参基因, 运用 2^{-ΔΔCt} 方法分析试验结果。反应程序为 95 °C 3min; 95 °C 5s, 60 °C 30s, 共 40 个循环; 溶解曲线为 95 °C 20s; 60 °C 30s; 95 °C 20s。

1.4 植物表达载体构建与农杆菌转化

提取植物表达载体 pCAMBIA3301 质粒, 使用引物 *GmCWIN3*-F/R 扩增 *GmCWIN3* 基因的 CDS 序列, 利用限制性内切酶 *Spe* I 与 *Bgl* II 对质粒进行双酶切并进行产物纯化 (诺唯赞, DC301-01), 通过同源重组连接目的片段和酶切后的质粒, 并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。挑选单菌落, 利用 *GmCWIN3*-F/R 引物进行菌液 PCR 鉴定, 并进行测序, 得到 pCAMBIA3301-*GmCWIN3* 重组质粒并转

化到农杆菌EHA105中。

1.5 拟南芥的转化及转基因拟南芥鉴定

摇菌培养含有pCAMBIA3301-*GmCWIN3*重组质粒的农杆菌,利用经典浸花法转化拟南芥Col-0。收获单株种子,进行种子平板筛选实验及植株喷施草铵膦筛选。设计基因鉴定引物OE-JD-F1/R1(表1)进行基因组PCR扩增,通过琼脂糖凝胶电泳检测目的扩增条带,完成DNA水平的转基因鉴定。再利用qRT-PCR分析转基因株系的表达水平,完成RNA水平的转基因鉴定。对收获的单株种子进行逐代的草铵膦筛选以及转基因分子鉴定,最终获得T2代高表达且阳性苗占比为3/4的株系OE-1、OE-2、OE-3和OE-4。待单株收种后获得T3代转*GmCWIN3*基因过表达拟南芥纯合株系OE-1和OE-4,进行后续生理指标检测及植株的表型鉴定。

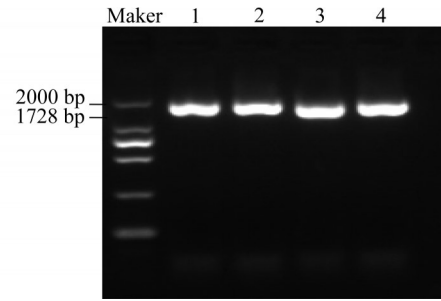
1.6 细胞壁转化酶活性和蔗糖含量测定

选取45 d的T3代转*GmCWIN3*基因过表达拟南芥株系OE-1和OE-4,进行细胞壁转化酶和蔗糖含量测定,对照为45 d的野生型拟南芥,取样部位是莲座叶和茎,分别设置6次生物学重复。依照索莱宝公司细胞壁转化酶试剂盒(BC4325)对植株的酶活性进行检测。实验原理是蔗糖被细胞壁转化酶催化水解生成还原性糖,接着还原糖与 $C_7H_4N_2O_7$ (2-羟基-3,5-二硝基苯甲酸)反应生成棕红色物质,该物质在540 nm有特征性吸收峰。依照索莱宝公司植物蔗糖含量试剂盒(BC2465)对植株叶片等组织部位的蔗糖含量进行检测。首先,利用碱热处理样本,以破坏其中的还原糖。在酸性环境下,将蔗糖分解为葡萄糖和果糖。之后,果糖与间苯二酚进行反应,形成有色物质,该物质在480 nm下展示出特征性吸收峰。通过使用可见分光光度计测定540 nm、480 nm处吸光值的大小变化,最终计算出CWI的活性与蔗糖含量。

2 结果与分析

2.1 *GmCWIN3*基因克隆及生物信息学分析

设计基因克隆引物,利用PCR扩增目的基因*GmCWIN3* (*Glyma.15G024600*)的完整CDS区,使用凝胶电泳检测获得PCR产物,目的片段长1728 bp(图1)。将凝胶电泳中的1500~2000 bp条带纯化回收并进行测序,将测序结果序列与*GmCWIN3*基因的CDS序列进行对比,比对结果表明两者之间能够完全匹配,说明成功克隆了*GmCWIN3*基因。



1~4:4个重复的PCR反应体系

1-4: Four duplicate PCR reaction systems

图1 大豆*GmCWIN3*基因CDS序列扩增

Fig.1 CDS sequence amplification of *GmCWIN3*

生物信息学分析显示,*GmCWIN3*基因的CDS序列全长1728 bp,编码575个氨基酸。*GmCWIN3*蛋白的理论相对分子质量为64.37 kDa,理论等电点为8.75,亲水性平均值为-0.30(负值代表亲水),不稳定指数为 $31.71 < 40$,表明*GmCWIN3*蛋白是稳定的亲水性蛋白。此外,蛋白二级结构显示,*GmCWIN3*中无规则卷曲结构占比最大(48.17%),其次是片层结构(28.35%)、 α 螺旋(17.39%)和 β 转角(6.09%)。蛋白质三级结构显示该基因编码一种细胞壁转化酶。

为了探究*GmCWIN3*基因在生长发育过程中的潜在调节机制,将*GmCWIN3*基因转录起始密码子ATG上游的2000 bp序列作为基因上游启动子区,并输入PlantCARE数据库中进行顺式作用元件分析。结果发现该启动子区包含多种类型的顺式作用元件(图2),其中较多的是光响应元件,同时还有丰富的激素调节响应元件如赤霉素响应元件(TATA-box)及生长素响应元件(TGA-element),除此之外还有参与昼夜节律顺式调控元件(Circadian),这些顺式作用元件是调节植物生长发育的重要响应元件。因此,本研究推测*GmCWIN3*基因可能参与调节影响大豆生长发育相关的生物学反应过程。

2.2 *GmCWIN3*基因受激素调节的表达模式

通过对*GmCWIN3*基因的启动子区进行顺式作用元件分析,发现其中包含生长素和赤霉素响应元件,而生长素和赤霉素在植物生长发育过程中扮演着重要作用。因此,为了探究*GmCWIN3*基因对生长素和赤霉素的响应模式,对生长状态良好的Williams82大豆第二组三出复叶于不同时间点进行外源激素处理,分析*GmCWIN3*基因的表达模式。结果显示,对照组中*GmCWIN3*基因的表达受光周期昼夜节律的影响,而呈规律性变化。相比较于对

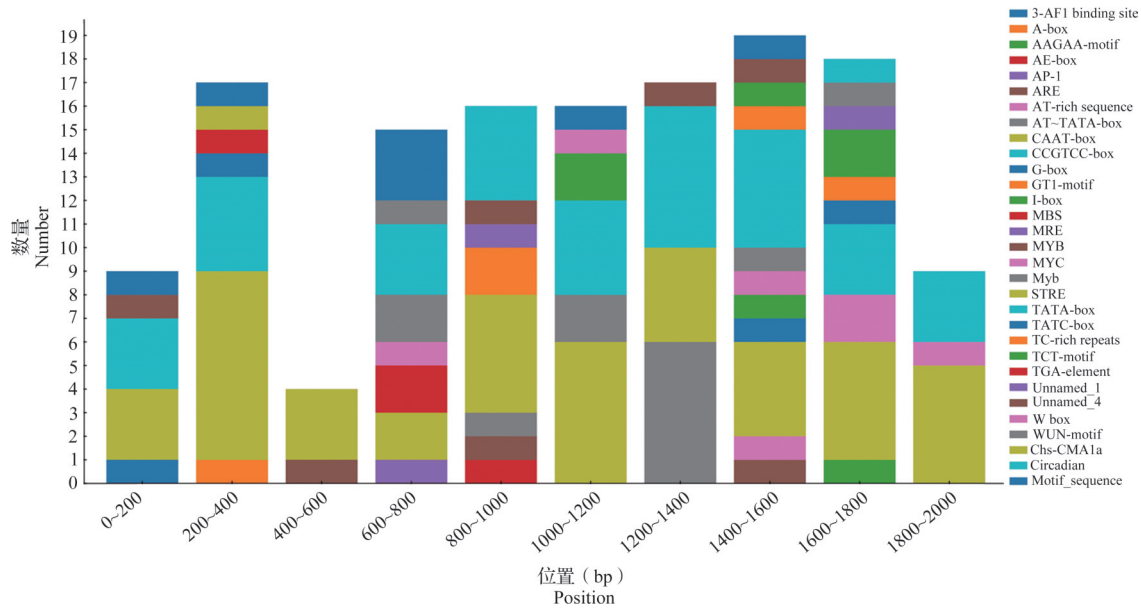


图2 *GmCWIN3* 基因启动子序列中的顺式作用元件
Fig.2 Cis-acting elements in *GmCWIN3* gene promoter sequence

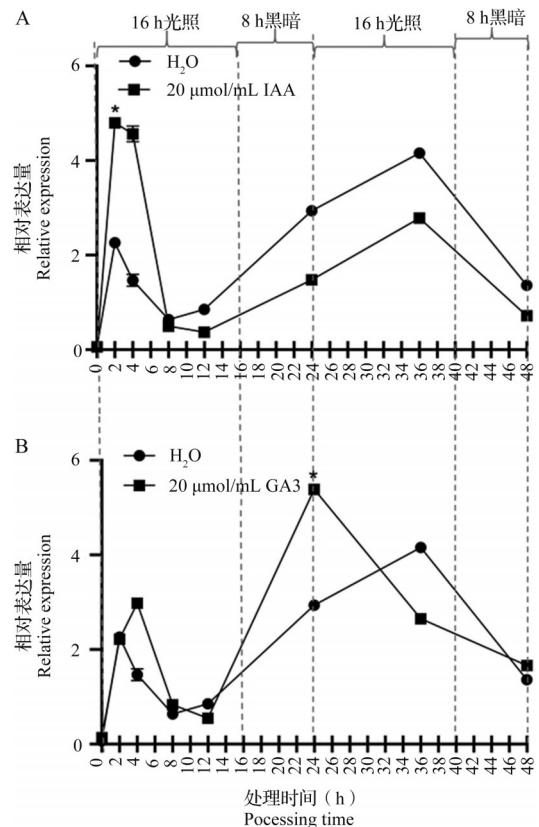
对照组, 喷施了生长素的大豆叶片在处理 2 h 时, *GmCWIN3* 基因表达水平显著上调, 而后表达下降, 直至 8 h 后表达水平逐渐趋同于对照组(图 3A)。喷施了赤霉素的大豆叶片中, *GmCWIN3* 基因在 4 h 时上调表达, 随后又下调表达, 并在 8 h 和 12 h 与对照组表达趋同, 后又上调表达并在 24 h 达到表达水平的峰值(图 3B)。这些结果表明, 喷施生长素和赤霉素的反应初期均可以显著诱导 *GmCWIN3* 基因的上调表达, 且相较于赤霉素, *GmCWIN3* 基因对于生长素的变化更加敏感, 响应时间更为迅速。

2.3 *GmCWIN3* 基因过表达拟南芥的转化及转基因鉴定

利用转基因鉴定引物对获得的植株进行逐代检测。结果显示, 在 T2 代阳性株系中成功扩增到目的片段, 大小为 482 bp(图 4A)。进一步对转基因株系进行基因表达水平的鉴定, 发现在转基因过表达 *OE-1*、*OE-2*、*OE-3* 和 *OE-4* 株系中, *GmCWIN3* 基因的表达水平极显著高于野生型, 说明 *GmCWIN3* 基因在拟南芥中成功过表达(图 4B), 这些株系可用于下一步的功能分析。

2.4 转 *GmCWIN3* 基因拟南芥的 CWI 酶活及蔗糖含量测定

选取两个 T3 代转 *GmCWIN3* 基因高表达且纯合的拟南芥株系(*OE-1* 和 *OE-4*) 进行植株叶片和茎中 CWI 酶活和蔗糖含量的检测。结果显示, 过表达拟南芥植株叶片和茎中的 CWI 酶活性显著高于野生型; 与叶片相比, 茎中的 CWI 酶活性明显更高

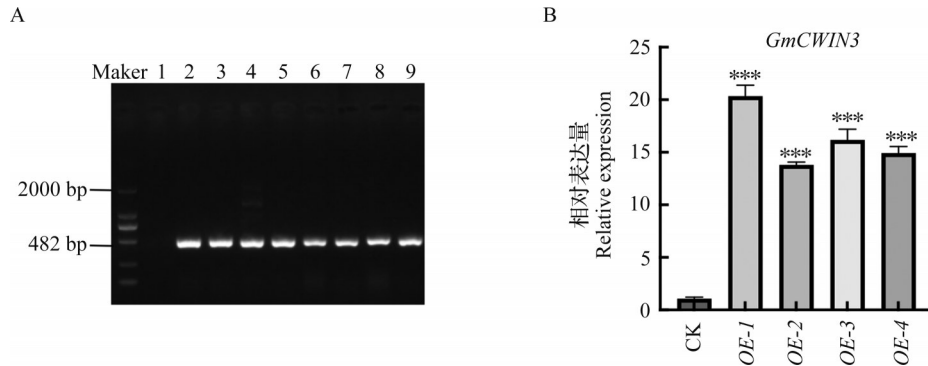


A: IAA 处理下的 *GmCWIN3* 基因表达水平; B: GA 处理下的 *GmCWIN3* 基因表达水平; *: 在 $P < 0.05$ 水平上差异显著; 下同
A: Relative expression of *GmCWIN3* under IAA treatment; B: Relative expression of *GmCWIN3* under GA treatment; *: There is a significant difference at the $P < 0.05$ level; The same as below

图3 生长素和赤霉素处理下大豆叶片中 *GmCWIN3* 的相对表达量
Fig.3 Relative expression of *GmCWIN3* in soybean leaves treated with IAA and GA3

(图5A)。此外,过表达拟南芥叶片和茎中的蔗糖含量均显著低于野生型(图5B)。这些结果表明,过表达 *GmCWIN3* 基因可以显著提高拟南芥中 CWI 酶的活性,而 CWI 酶活性的升高则加快了其

对蔗糖的水解,从而降低了转基因拟南芥叶片和茎中的蔗糖含量。研究结果初步表明 *GmCWIN3* 基因的过表达可加速调节植物体内的蔗糖水解。

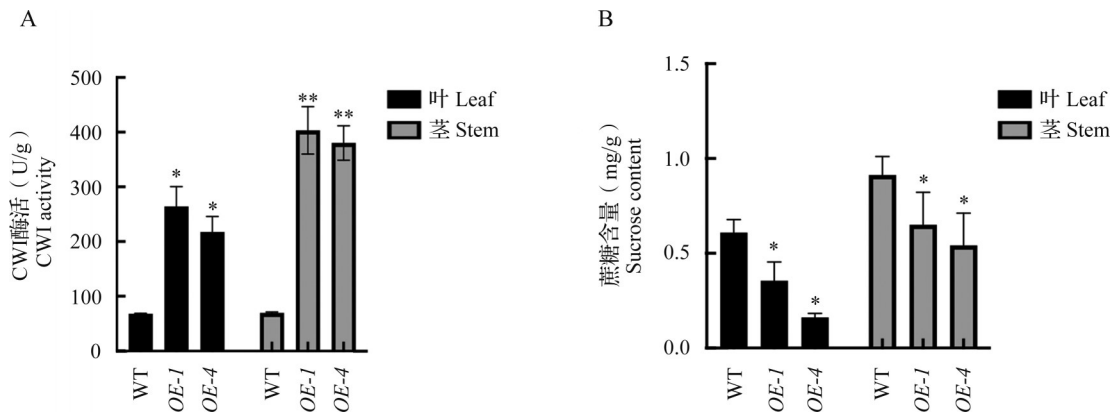


A: T2代转基因拟南芥的PCR鉴定; 1: 野生型拟南芥, 2-9: 4个转基因株系, 每个株系设置两个单株重复; B: T2代转基因拟南芥的qRT-PCR鉴定; CK: 野生型拟南芥, OE-1~OE-4: 转基因拟南芥阳性株系; 下同; ***: 在 $P<0.001$ 水平上差异显著

A: Identification of T2 generation transgenic lines by PCR; 1: Wild type, 2-9: Four transgenic lines with two single repeats per line; B: Identification of T2 generation transgenic lines by qRT-PCR; CK: Wild type, OE-1-OE-4: T2 generation transgenic lines; The same as below; ***: There is a significant difference at the $P<0.001$ level

图4 T2代转 *GmCWIN3* 基因拟南芥的鉴定

Fig. 4 Identification of the T2 generation transgenic Arabidopsis carrying *GmCWIN3*



** : 在 $P<0.01$ 水平上差异显著; 下同

** : There is a significant difference at the $P<0.01$ level; The same as below

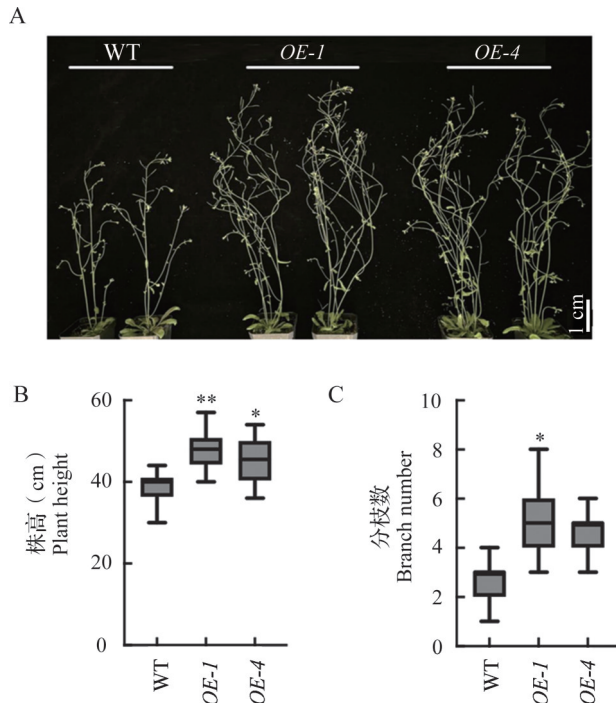
图5 转基因拟南芥叶片和茎的CWI活性及蔗糖含量

Fig.5 CWI activity and sucrose content in leaves and stems of transgenic lines

2.5 转 *GmCWIN3* 基因对拟南芥株高及分枝数的影响

选取两个 T3 代转 *GmCWIN3* 基因高表达且纯合的拟南芥株系(OE-1和OE-4)共50株,即OE-1株系和OE-4株系各25株,并在生长第40天的成熟期进行株高和分枝数的表型测定(图6A)。结果显示,OE-1和OE-4株系的株高均显著高于野生型,其中 *GmCWIN3* 基因表达量最高的OE-1株系株高

也最高(图6B)。此外,转基因株系的分枝数多于野生型,且OE-1株系的差异呈显著水平(图6C)。结果表明,过表达 *GmCWIN3* 基因显著提高了拟南芥的株高,同时增多了植株的分枝数,且 *GmCWIN3* 的表达水平和两者呈现正相关。因此推测 *GmCWIN3* 基因可以通过调节体内蔗糖的水解,从而参与调节植株株高、分枝数等株型性状的生物学过程。



A: 野生型与转基因拟南芥的株高和分枝数表型; B: 野生型与转基因拟南芥的株高; C: 野生型与转基因拟南芥的分枝数

A: Plant height and branch number of wild and transgenic Arabidopsis;

B: Plant height of wild-type and transgenic Arabidopsis;

C: Branch number of wild-type and transgenic Arabidopsis

图 6 转基因拟南芥株高和分枝数表型鉴定

Fig. 6 Phenotype identification of plant height and branch number of transgenic lines

3 讨论

细胞壁转化酶能催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖,在控制植物代谢、生长发育等许多方面发挥着关键作用^[25-26]。植物细胞壁转化酶的活性受到多种因素的影响,基因家族成员在不同组织器官、发育阶段、激素调节及逆境等条件下的表达模式也有较大的差异^[27-28],同时基因表达模式和水平也多受到基因启动子中顺式作用元件的调控^[29],这些因素共同决定了细胞壁转化酶功能的多样性和调控的复杂性。本研究发现,大豆细胞壁转化酶基因 *GmCWIN3* 的启动子区含有多种光响应和激素响应元件,如 G-box、GATA-box、TGA-box 及 AuxRE 等,表明该基因可受到光和生长类激素的综合调控。French 等^[30]研究发现,水稻中生长素相关合成基因 *OsIAA29* 和转化酶抑制剂基因 *OsINVINH3* 在谷粒早期发育过程中共表达,在授粉后的第 7 天显示生长素水平迅速增加,并且植物细胞壁转化酶的活性达到峰值,从而影响水稻籽粒的发育过程。Wu

等^[31]研究表明在使用赤霉素处理 4 h 后豌豆伸长嫩芽中细胞壁转化酶的 mRNA 水平是对照组的 5 倍,处理后 8 h 达到最高。在本研究中,当在大豆叶片上外源喷施生长素和赤霉素时, *GmCWIN3* 基因的表达量在生长素处理反应初期的 2 h 显著上升且达到峰值,而赤霉素处理下的基因在 4 h 显著上升,随后下降,并在 24 h 达到表达峰值,说明相较于赤霉素, *GmCWIN3* 基因对外源生长素的响应更加快速、敏感。生长素和赤霉素是两种重要的植物激素,它们在植物的生长发育和形态建成等方面发挥着重要作用;此外,生长素和赤霉素也可以影响植物的糖代谢和运输,研究表明生长素可以促进蔗糖的合成和分配,赤霉素可以促进糖的利用和消耗^[32-33]。因此,本研究初步表明编码细胞壁转化酶的 *GmCWIN3* 基因可能通过参与生长素和赤霉素的生物学反应过程,影响植物的生长发育。

蔗糖是植物光合产物的主要运输形式,也是重要的信号分子,蔗糖通过韧皮部从源器官(通常为叶片),运输到花朵、种子和根系等库器官中以支持它们的生长和分化,并作为能量来源储存起来^[34]。在韧皮部的运输过程中, SWEET 蛋白家族主要负责将蔗糖装载到韧皮部中^[35],而 SUT/SUC 蛋白家族则可以将蔗糖从韧皮部中卸载出来^[36]。作为运输通道,韧皮部中的蔗糖含量通常是很高的^[37]。在本研究中,将大豆 *GmCWIN3* 基因异源过表达拟南芥后,植株的细胞壁转化酶活性显著提高,而蔗糖含量则显著降低,说明酶活增高后加快了体内蔗糖的有效分解;此外,在转基因和野生型拟南芥植株的茎中的蔗糖含量高于同期叶片中的含量,这可能是由于茎中韧皮部贮存了大量的蔗糖,尚未被完全卸载在库器官中。综上,本研究结果表明过表达 *GmCWIN3* 基因提高了细胞壁转化酶的活性,促进了蔗糖的水解,释放出葡萄糖和果糖,这些单糖可作为能量和碳源,进而影响植物的生长及发育。

CWIN 基因家族在调节植物生长发育过程中的重要作用已多有报道。在拟南芥中,增强细胞壁转化酶基因 *AtCWIN4* 的表达,可以恢复拟南芥转录因子 ARF8 突变体表现出的短小后稷表型^[38]。在荔枝种子的发育过程中, *LcCWIN5* 在细胞分裂阶段酶活升高,进而影响种子的早期发育;而在灌浆期, CWIN 活性主要基于 *LcCWIN2* 的高表达,以此通过形成蔗糖梯度来促进碳吸收^[39]。在大豆中,沉默抑制因子 *GmCIF1* 的表达可以提高 CWIN 的翻译后水平,通过微调蔗糖代谢和沉降强度来协调种子的成

熟过程^[23]。综上所述, *CWINs* 家族调控的植物生长发育相关研究主要集中在调控种子形成等方面,而在调控植株株高、分枝数等株型相关性状的研究还鲜有报道。株型是植物在生长发育过程中所呈现的体形结构和形态特征,它是由植物细胞的分化和组织的生长发育所决定的。植物的株型不仅仅影响植物的生长环境适应性,也是植物生长和繁殖的重要途径,而株型的形成主要取决于植株株高和分枝数^[40]。本研究发现,相较于野生型拟南芥,转 *GmCWIN3* 基因过表达拟南芥的株高和分枝数均显著增加,结合 *GmCWIN3* 基因响应外源生长素和赤霉素的表达模式,本研究推测细胞壁转化酶可能通过调节体内蔗糖的水解,从而参与生长素或赤霉素介导的植物株高及分枝数的形成过程,最终影响了株高和分枝数的性状表型。在植物体内,生长素、独角金内酯和赤霉素等植物激素可以通过与蔗糖的共同作用调控植物的分枝^[41]。研究表明,茎尖通过在相邻茎中产生的生长素基叶流来抑制腋芽分枝生长,并且基于生长素的快速运输加速了营养物质从腋芽中转移出来,进而形成了顶端优势^[42-43]。Bertheloot 等^[44] 研究表明生长对分枝的部分抑制作用是由植物激素独角金内酯介导的,而蔗糖可以通过抑制独角金内酯的感知来拮抗生长素的作用,从而促进分枝芽的生长。此外,在水稻中蔗糖可以拮抗独角金内酯从而促进水稻分蘖数的增加也已经得到了证实^[45]。然而, Yang 等^[46] 通过转录组和代谢组分析发现了多个参与生长素信号转导过程的基因可以促进白千层乔木产生更多的分枝数。总之,蔗糖参与的植物激素调控分枝性状是一个复杂的生物学过程,仍需要进一步的深入研究。

综上所述,本研究初步探究了细胞壁酸性转化酶基因 *GmCWIN3* 的功能,证实了过表达 *GmCWIN3* 基因可以显著影响拟南芥的株高和分枝数,以调控拟南芥的株型,本研究结果可为今后培育具有理想株型及高产的大豆新品种(系)奠定重要的理论基础及基因资源。

参考文献

- [1] Zhang M, Liu S, Wang Z, Yuan Y, Zhang Z, Liang Q, Yang X, Duan Z, Liu Y, Kong F, Liu B, Ren B, Tian Z. Progress in soybean functional genomics over the past decade. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(2): 256-282
- [2] 石慧, 王思明. 大豆在中国的历史变迁及其动因探究. *农业考古*, 2019(3): 32-39
Shi H, Wang S M. Research on historical development and motivations of soybeans in China. *Agricultural Archaeology*, 2019(3): 32-39
- [3] 刘羽诚, 申妍婷, 田志喜. 大豆泛基因组研究进展. *遗传*, 2024, 46(3): 183-198
Liu Y C, Shen Y T, Tian Z X. Frontiers of soybean pan-genome studies. *Hereditas*, 2024, 46(3): 183-198
- [4] Liu Y, Song Y, Ruan Y. Sugar conundrum in plant-pathogen interactions: Roles of invertase and sugar transporters depend on pathosystems. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(7): 1910-1925
- [5] Vargas W, Cumino A, Salerno G L. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol. *Planta*, 2003, 216(6): 951-960
- [6] Ji X, Van den Ende W, Van Laere A, Cheng S, Bennett J. Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of rice. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(5): 615-634
- [7] Li M, Feng F, Cheng L. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33055
- [8] Yao Y, Geng M, Wu X, Liu J, Li R, Hu X, Guo J. Genome-wide identification, expression, and activity analysis of alkaline/neutral invertase gene family from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, 33(2): 304-315
- [9] Nonis A, Ruperti B, Pierasco A, Canaguier A, Adam-Blondon A, Di Gaspero G, Vizzotto G. Neutral invertases in grapevine and comparative analysis with *Arabidopsis*, poplar and rice. *Planta*, 2008, 229(1): 129-142
- [10] Ruan Y. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65: 33-67
- [11] Bihmidine S, Hunter C T, Johns C E, Koch K E, Braun D M. Regulation of assimilate import into sink organs: Update on molecular drivers of sink strength. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 177
- [12] Roitsch T, Balibrea M E, Hofmann M, Proels R, Sinha A K. Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(382): 513-524
- [13] Doidy J, Grace E, Kuhn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(7): 413-422
- [14] Rausch T, Greiner S. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) -Proteins and Proteomics*, 2004, 1696(2): 253-261
- [15] Proels R K, Hüchelhoven R. Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15(8): 858-864
- [16] Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, Zhang L, He W, Lu B, Lin H, Ma H, Zhang G, He Z. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nature Genetics*, 2008, 40(11): 1370-1374

- [17] Miller M E, Chourey P S. The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *The Plant Cell*, 1992, 4 (3) : 297-305
- [18] Jin Y, Ni D, Ruan Y. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *The Plant Cell*, 2009, 21(7):2072-2089
- [19] Balibrea Lara M E, Gonzalez Garcia M, Fatima T, Ehneß R, Lee T K, Proels R, Tanner W, Roitsch T. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell*, 2004, 16(5):1276-1287
- [20] Albacete A, Cantero-Navarro E, Großkinsky D K, Arias C L, Balibrea M E, Bru R, Fagner L, Ghanem M E, González M D L C, Hernández J A, Martínez-Andújar C, van der Graaff E, Weckwerth W, Zellnig G, Pérez-Alfocea F, Roitsch T. Ectopic overexpression of the cell wall invertase gene *CINI* leads to dehydration avoidance in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(3):863-878
- [21] Zhao H, Xu L, Su T, Jiang Y, Hu L, Ma F. Melatonin regulates carbohydrate metabolism and defenses against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Pineal Research*, 2015, 59 (1):109-119
- [22] Su T, Han M, Min J, Chen P, Mao Y, Huang Q, Tong Q, Liu Q, Fang Y. Genome-wide survey of invertase encoding genes and functional characterization of an extracellular fungal pathogen-responsive invertase in *Glycine max*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(8):2395
- [23] Tang X, Su T, Han M, Wei L, Wang W, Yu Z, Xue Y, Wei H, Du Y, Greiner S, Rausch T, Liu L. Suppression of extracellular invertase inhibitor gene expression improves seed weight in soybean (*Glycine max*). *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(3):469-482
- [24] Dimou M, Fletmetakis E, Delis C, Aivalakis G, Spyropoulos K G, Katinakis P. Genes coding for a putative cell-wall invertase and two putative monosaccharide/H⁺ transporters are expressed in roots of etiolated *Glycine max* seedlings. *Plant Science*, 2005, 169(4):798-804
- [25] Koch K. Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(3):235-246
- [26] 李涛涛, 刘溢健, 王仕稳, 殷俐娜, 邓西平. 作物旱后复水补偿效应产生的源-库-流的响应及机制. *水土保持学报*, 2024, 38(2):1-12
- Li T T, Liu Y J, Wang S W, Yin L N, Deng X P. Response and mechanism of source-sink-flow caused by the compensation effect of crop rehydration after drought. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2024, 38(2):1-12
- [27] Nie H, Lee S, Lim S, Park J, Kim J, Bae S H, Lee Y, Shin A, Kwon S. Expression profiles of genes involved in sugar metabolism during fruit development and ripening of paprika (*Capsicum annuum* L.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2023, 64(6):1015-1026
- [28] Li Y, Zhang P, Wang Z, Zhang Y, Zhu F, Liu Y, Jones A, Wu L, Song Y. Coordinated regulation of sucrose and lignin metabolism for arrested silk elongation under drought stress in maize. *Environmental and Experimental Botany*, 2023, 214: 105482
- [29] 张军, 翟莹, 邱爽, 尹珺伊, 张艳, 金振华, 张勇, 王丽坤. 大豆 *GmGols* 基因高温胁迫应答及启动子活性分析. *大豆科学*, 2023, 42(2):188-193
- Zhang J, Zhai Y, Qiu S, Yin J Y, Zhang Y, Jin Z H, Zhang Y, Wang L K. Response of soybean *GmGols* gene to heat stress and promoter activity analysis. *Soybean Science*, 2023, 42(2):188-193
- [30] French S R, Abu-Zaitoon Y, Uddin M M, Bennett K, Nonhebel H M. Auxin and cell wall invertase related signaling during rice grain development. *Plants*, 2014, 3(1):95-112
- [31] Wu L, Mitchell J P, Cohn N S, Kaufman P B. Gibberellin (GA3) enhances cell wall invertase activity and mRNA levels in elongating dwarf pea (*Pisum sativum*) shoots. *International Journal of Plant Sciences*, 1993, 154(2):280-289
- [32] 徐慧芳, 陈栩. 生长素研究现状及其在大豆育种中的应用. *中国科学:生命科学*, 2024, 54(2):247-259
- Xu H F, Chen X. Auxin research status and its application in soybean breeding. *Scientia Sinica Vitae*, 2024, 54(2):247-259
- [33] Zhang Y, Zhen L, Tan X, Li L, Wang X. The involvement of hexokinase in the coordinated regulation of glucose and gibberellin on cell wall invertase and sucrose synthesis in grape berry. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(12):7899-7910
- [34] Yoon J, Cho L, Tun W, Jeon J, An G. Sucrose signaling in higher plants. *Plant Science*, 2021, 302:110703
- [35] Chen L, Qu X, Hou B, Soso D, Osorio S, Fernie A R, Frommer W B. Sucrose efflux mediated by sweet proteins as a key step for phloem transport. *Science*, 2012, 335 (6065) : 207-211
- [36] Bavnhoj L, Driller J H, Zuzic L, Stange A D, Schiott B, Pedersen B P. Structure and sucrose binding mechanism of the plant SUC1 sucrose transporter. *Nature Plants*, 2023, 9 (6) : 938-950
- [37] Lohaus G, Burba M, Heldt H W. Comparison of the contents of sucrose and amino acids in the leaves, phloem sap and taproots of high and low sugar-producing hybrids of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*, 1994, 45 (8):1097-1101
- [38] Li J, Foster R, Ma S, Liao S, Bliss S, Kartika D, Wang L, Wu L, Eamens A L, Ruan Y. Identification of transcription factors controlling cell wall invertase gene expression for reproductive development via bioinformatic and transgenic analyses. *The Plant Journal*, 2021, 106(4):1058-1074
- [39] Zhang J, Wu Z, Hu F, Liu L, Huang X, Zhao J, Wang H. Aberrant seed development in *Litchi chinensis* is associated with the impaired expression of cell wall invertase genes.

- Horticulture Research, 2018,5:39
- [40] 陈晓睿, 王影, 邱丽娟, 陈庆山. 大豆 *GmBASI* 基因的鉴定以及对大豆株型结构的影响. 农业生物技术学报, 2024, 32(1):26-38
- Chen X R, Wang Y, Qiu L J, Chen Q S. Identification of soybean (*Glycine max*) *GmBASI* gene and its effect on soybean plant architecture structure. Journal of Agricultural Biotechnology, 2024,32(1):26-38
- [41] Chen Y, An X, Zhao D, Li E, Ma R, Li Z, Cheng C. Transcription profiles reveal sugar and hormone signaling pathways mediating tree branch architecture in apple (*Malus domestica* Borkh.) grafted on different rootstocks. PLoS ONE, 2020,15(7):e236530
- [42] Barbier F F, Dun E A, Beveridge C A. Apical dominance. Current Biology, 2017,27(17):R864-R865
- [43] Rameau C, Bertheloot J, Leduc N, Andrieu B, Foucher F, Sakr S. Multiple pathways regulate shoot branching. Frontiers in Plant Science, 2015,5:714
- [44] Bertheloot J, Barbier F, Boudon F, Perez-Garcia M D, Péron T, Citerne S, Dun E, Beveridge C, Godin C, Sakr S. Sugar availability suppresses the auxin-induced strigolactone pathway to promote bud outgrowth. New Phytologist, 2020,225(2):866-879
- [45] Patil S B, Barbier F F, Zhao J, Zafar S A, Uzair M, Sun Y, Fang J, Perez-Garcia M, Bertheloot J, Sakr S, Fichtner F, Chabikwa T G, Yuan S, Beveridge C A, Li X. Sucrose promotes D53 accumulation and tillering in rice. New Phytologist, 2022,234(1):122-136
- [46] Yang H, Xu F, Liao H, Pan W, Zhang W, Xu B, Yang X. Transcriptome and metabolite analysis related to branch development in two genotypes of *Eucalyptus urophylla*. Molecular Genetics and Genomics, 2021,296(5):1071-1083