

· 热带植物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240060



主持人:徐 冉

大豆 *GmACBP6* 基因克隆及萌发期耐盐碱功能验证

吴管吉¹, 周勋峻¹, 吴菲菲¹, 张引鹤¹, 黄颖华¹,
李雅忻^{1,2}, 高红桃^{1,2}, 李海燕^{1,2}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570288; 2. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572024)

摘要: 为了明确大豆 (*Glycine max*) 酰基辅酶A结合蛋白 (*GmACBP6*) 是否具有耐盐碱功能, 本研究首先利用荧光定量PCR方法对大豆 *GmACBP6* 萌发期盐碱胁迫下的表达量进行分析, 明确 *GmACBP6* 在大豆萌发期对盐碱胁迫具有响应。在此基础上, 构建 pYES2-*GmACBP6* 重组载体并转化酵母菌株, 观察转 pYES2-*GmACBP6* 酵母菌株及转 pYES2 酵母菌株在盐及盐碱胁迫培养基中的生长情况, 结果表明, 转入 pYES2-*GmACBP6* 酵母菌株在盐及盐碱胁迫长势明显优于转 pYES2 空载体的酵母菌株, 初步确定大豆 *GmACBP6* 基因具有提高酵母细胞盐碱耐受性的功能。同时, 本研究通过创制 *GmACBP6* 回补及超表达拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 材料, 并对其萌发期耐盐碱表型进行鉴定, 结果表明, 在盐及盐碱胁迫下 *GmACBP6* 超表达拟南芥种子的萌发率显著高于 *GmACBP6* 回补材料、*atacbp6* 突变体及野生型拟南芥, 进一步确定了大豆 *GmACBP6* 基因具有耐盐碱功能。

关键词: 大豆; 酰基辅酶A结合蛋白 *GmACBP6*; 耐盐碱性

中图分类号: S565.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054 (2024) 04-0382-09

吴管吉, 周勋峻, 吴菲菲, 等. 大豆 *GmACBP6* 基因克隆及萌发期耐盐碱功能验证 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(4): 382-390. doi:10.15886/j.cnki.rdswwb.20240060

脂质是植物生物膜的主要成分之一, 在多种生物过程中发挥着重要作用, 例如为细胞代谢提供能量以及维持细胞器的完整性。在植物细胞的脂质代谢过程中, 脂质及其衍生物在脂质转移蛋白或酰基辅酶A结合蛋白 (ACBP) 的帮助下在亚细胞区室内或跨亚细胞区室转移, 以维持膜稳定性^[1]。植物 ACBPs 参与多种生物过程, 包括早期胚形成和叶片衰老等^[2-4]。酰基辅酶A结合蛋白 (ACBPs) 在真核生物中构成了一个保守的蛋白质家族, 在植物的脂质生物合成过程中参与维持、运输和保护酰基辅酶A酯, 且对酰基辅酶A酯的亲合力具有差异性, 可以在维持脂质稳态方面发挥关键作用^[5]。

在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中的研究发现, *AtACBP1* 受脱落酸 (ABA) 诱导, 在拟南芥种子萌发和幼苗发育过程中有调节作用^[6]。秦鹏飞^[7]

通过病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 试验表明, 在棉花 (*Gossypium hirsutum*) 中沉默 *GhACBP3* 和 *GhACBP6* 亚类基因会降低棉花植株对干旱和盐的耐性; 玉米 (*Zea mays*) *ZmACBP1* 与 *ZmACBP2* 在拟南芥中的超表达可以提高植株对干旱及盐胁迫的耐受性^[8]; 除此之外, 在盐碱胁迫下, 毛果杨 (*Populus trichocarpa*) *PtACBP1*、*PtACBP4* 等基因在根和叶被显著诱导^[9]。因此, ACBPs 家族基因在植物抗逆性方面具有重要的调节作用。

大豆不仅提供宝贵的蛋白质和油脂资源, 同时也在保障粮食安全和推动农业经济发展方面发挥着至关重要的作用^[10]。但受困于我国目前的耕地限制, 我国大豆进口依赖严重。因此盐碱地的利用是大豆产业发展的必经途径, 而筛选耐盐碱关键基因, 进行大豆耐盐碱育种是大豆产业未来的保障^[11]。ACBPs 家族成员被报道参与多项非生

收稿日期: 2024-04-10

修回日期: 2024-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32171793); 海南大学人才引进启动资金项目 (Y3AZ20024)

第一作者: 吴管吉 (1996-), 男, 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生。E-mail: 18108531479@163.com

通信作者: 李海燕 (1971-), 女, 教授。研究方向: 热带大豆分子育种。E-mail: hyl@hainanu.edu.cn

物胁迫,但在大豆中的耐盐碱功能未被报道,特别是萌发期的耐盐碱性研究。因此,本研究通过对大豆酰基辅酶 A 结合蛋白 *GmACBP6* 进行生物信息学分析及耐盐碱表型鉴定,确定大豆 *GmACBP6* 基因的耐盐碱功能,为培育耐盐碱大豆新品系奠定基础。

1 材料与方

1.1 实验材料 (1)将大豆种子培养土($V_{\text{蛭石}}:V_{\text{表土}}=6:4$)中,并控制其生长环境温度在 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 左右,以施绿肥维持其正常生长。分别在营养生长及生殖生长期取其主根、侧根、茎、叶、花、花苞、种子等组织在液氮中研磨为粉状,以便于提取 RNA 用于 *GmACBP6* 的组织表达量分析。

(2)选取圆润饱满、表皮无损的完整大豆种子,为大豆萌发期进行盐碱胁迫实验做准备。

1.2 *GmACBP6* 信息学分析 (1)使用 TMHMM 软件对 *GmACBP6* 的蛋白质结构进行跨膜区域分析。

(2)通过应用 Neighbor-Joining 法构建了系统进化树,并进行了 motif 和启动子的分析。

1.3 *GmACBP6* 基因的 PCR 扩增 通过网站下载大豆 *GmACBP6* 的基因组序列,并结合 pCAMBIA3301 载体设计 pCAMBIA3301-*GmACBP6* 同源臂引物,引物序列详见表 1,以‘Williams 82’大豆品种叶片 RNA 所反转录的 cDNA 为克隆模板。

表 1 克隆 *GmACBP6* 引物序列

Tab. 1 Clone *GmACBP6* primer sequences

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences
pCAMBIA3301- <i>GmACBP6</i> -F	ACTCTTGACCATGGTAGATCTG ATGCCCGAGTGGCAGTC
pCAMBIA3301- <i>GmACBP6</i> -R	TCATCCTTGTAACTACTAGTAT TTACTTCTCCCCC

1.4 大豆萌发期盐碱胁迫处理 (1)萌发种子的消毒处理:每个大豆品种中精选 90 粒外观相似、颗粒完整、表面无瑕疵的种子,将这些种子封闭于透明干燥的玻璃容器中,采用氯气消毒法消毒 12 h。

(2)实验操作流程:使用无菌的去离子水对种子进行 3 次清洗。将实验分为 2 个处理水平,盐碱胁迫和对照组,且每组设置 3 次重复。最后将消毒处理过的种子以每皿 15 粒的量分配到装有两张滤纸的无菌培养皿中。其中,加入 10 mL 无菌去离子

水到培养皿中作对照组;10 mL 盐碱胁迫液($7.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}+2.52\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaHCO}_3$)为处理组,并在实验第 2、4 天更换滤纸、培养皿、去离子水和盐碱胁迫液。

(3)培养条件:将培养皿放入无光的恒温恒湿培养箱中,控制温度在 $(23\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 左右,湿度约为 45%,进行种子萌发实验,培养至第 6 天取样。

1.5 *GmACBP6* 的酵母功能验证 设计 pYES2-*GmACBP6* 同源臂引物(表 2),以 pCAMBIA3301-*GmACBP6* 质粒为模板,构建 pYES2-*GmACBP6* 表达载体,将构建好的载体转入酵母细胞。

表 2 pYES2-*GmACBP6* 同源臂引物

Tab. 2 Primers for the pYES 2-*GmACBP6* homology arm

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences
pYES2- <i>GmACBP6</i> -F	attaagcttggtaccgagctcATGCCCGAG TGGCAGTC
pYES2- <i>GmACBP6</i> -R	ggatatctgcagaattcTCAATTTACTTC TCCCCC

首先,将 5 μL 酵母菌液加入到 5 mL 的液体培养基中,培养 48 h。以 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度离心 5 min,保留菌体沉淀,用 0.9% 的 NaCl 溶液回溶菌液至 OD_{600} 为 0.5,并进行 10、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 倍稀释,取不同稀释比例的 1 μL 酵母菌液培养于基础培养基(SD-Ura)、盐胁迫培养基(SD-Ura+40.91 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)及盐碱胁迫培养基(SD-Ura+40.6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl+0.42 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3)固体板上观察其生长状况。其次,将 OD_{600} 值为 0.001 的 6 μL 菌液分别加到 6 mL 液体基础培养基、盐胁迫培养基及盐碱胁迫培养基(同上)里培养,在 12、24、36、48、60、72、84、96 h 时间点测其 OD_{600} 值作生长曲线。

1.6 *GmACBP6* 在拟南芥中耐盐碱功能验证

1.6.1 拟南芥材料创制 *atacbp6* 突变体(SALK-206508)在网站(<http://signal.salk.edu/>)上购买,鉴定纯合并收种(表 3)。春化后,播种于土壤与蛭石比(体积比)为 2:8 的基质中。在拟南芥进入盛花期,剪去已经开放的花朵和已经形成的种子荚,仅留下尚未开放的花蕾。同时将含有 pCAMBIA3301-*GmACBP6* 质粒的农杆菌培养后转移到 1 L 的锥形瓶中,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床上培养 24 h, OD_{600} 值在 0.9 ~ 1.2 的范围内,5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,离心后的菌液加入到侵染拟南芥的缓冲液

(2.2 g·L⁻¹MS+50 g·L⁻¹蔗糖+0.24 g·L⁻¹维生素B₅+1 mg·L⁻¹6-BA+100 μL·L⁻¹SilwetL-77+90 μL·L⁻¹NaOH (1mol·L⁻¹)+975 mL·L⁻¹ddH₂O)中,并调整OD₆₀₀值为0.8。将拟南芥花蕾浸入缓冲液中42 s后,在避光条件下平放封闭24 h,最后正常培养至种子成熟收获。将收到的种子种下,待植株发育至4叶阶段时,用1%的Basta溶液分别在第1、3、5天进行3次处喷洒,挑选活力不受影响的植株移栽并收种,将收获的种子扩繁至T₃代,供后续拟南芥萌发实验使用。

表3 *GmACBP6*拟南芥突变体纯杂合鉴定引物序列

Tab. 3 *GmACBP6* Primer sequences for pure heterozygous identification of *Arabidopsis* mutants

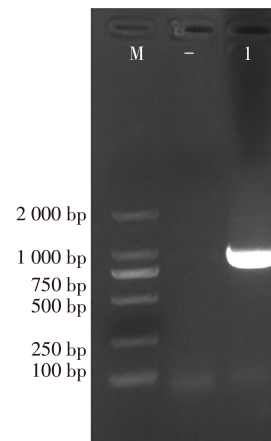
引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences
SALK_206508-LP	TGGAAAGGATTGCTTTTGTG
SALK_206508-RP	CTTCAGCAACGTTAAGATGGC
SALK_206508-BP	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC

1.6.2 拟南芥萌发 将拟南芥种子置于4℃冰箱里进行春化,在超净工作台里将1.5 mL 75%乙醇加入装有拟南芥种子的2 mL离心管中,对拟南芥种子进行1 min杀菌;后用2%次氯酸钠对拟南芥种子消毒10 min,用去离子水清洗4~6次;继而将*atacbp6*突变体、野生型、*GmACBP6*基因回补株系及超表达*GmACBP6*基因的拟南芥种子点种在无胁迫培养基(2.22 g·L⁻¹MS+20 g·L⁻¹蔗糖+8 g·L⁻¹琼脂)、盐胁迫培养基(2.22 g·L⁻¹MS+20 g·L⁻¹蔗糖+8 g·L⁻¹琼脂+10.22 g·L⁻¹NaCl)和盐碱胁迫培养基(2.22 g·L⁻¹MS+20 g·L⁻¹蔗糖+8 g·L⁻¹琼脂+0.25 g·L⁻¹NaHCO₃+10.05 g·L⁻¹NaCl)上,培养皿分为4个区域,分别点种*atacbp6*突变体、野生型、*GmACBP6*基因回补株系以及超表达*GmACBP6*基因的拟南芥种子,且每个区域点种37粒种子,每个处理水平重复3次。随后,观察拟南芥萌发情况及萌发率统计。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmACBP6* 基因的克隆 克隆 *GmACBP6* 基因(*Glyma.04G233600*)的CDS碱基序列区域,根据碱基序列设计该基因的上下游克隆引物。并将‘Williams 82’大豆植株的叶片作为克隆 *GmACBP6*

基因的模板,经过PCR扩增获得 *GmACBP6* 目的基因,经测序可知, *GmACBP6* 基因全长为1 041 bp(图1)。



M: 2 000 bp Marker; 1: 大豆 *GmACBP6* 基因扩增片段; -: 阴性对照。

M: 2 000 bp Marker; 1: amplified fragment of soybean *GmACBP6* gene; -: negative control.

图1 *GmACBP6* 基因扩增

Fig. 1 amplification of the *GmACBP6* gene

2.2 大豆 *GmACBP6* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *GmACBP6* 蛋白质的跨膜结构域分析 为了解 *GmACBP6* (酰基辅酶A结合蛋白)跨膜结构,使用TMHMM软件对 *GmACBP6* 的蛋白质结构进行跨膜区域分析,结果显示(图2),该蛋白包含一个跨膜区域。1~6个氨基酸序列处于膜内,7~29氨基酸片段处于跨膜结构区域,30~346氨基酸片段处于膜外,因此推测 *GmACBP6* 蛋白与跨膜运输相关。

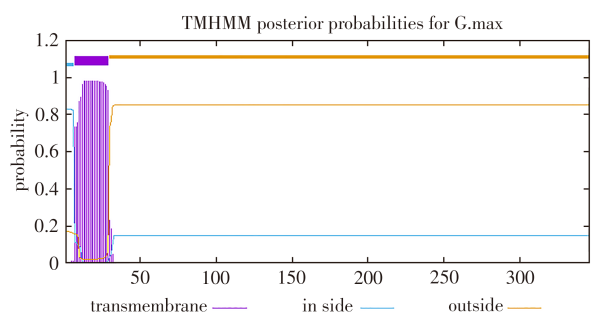


图2 *GmACBP6* 蛋白的跨膜结构分析

Fig. 2 Transmembrane structure analysis of the *GmACBP6* protein

2.2.2 *GmACBP6* 蛋白质同源性分析 本实验选取了大豆、拟南芥、玉米、水稻(*Oryza sativa*)、棉花

以及野生大豆这6个物种中 *ACBP*s 家族所有成员的蛋白序列,通过应用邻接法构建了系统进化树(图3)。进化树分析结果表明, *ACBP*s 基因家族成员被分为4个亚族,其中 *Glyma. 04G233600* (*GmACBP6*) 属于 Class II 亚族,与 *At5g53470* (*AtACBP2*) 基因属于同一亚族,说明2个物种在进化过程中的同源关系近,且在生物学功能上相似性更高。因此,利用拟南芥突变体 *At5g53470* 作为 *GmACBP6* 基因的耐盐碱功能进行鉴定。

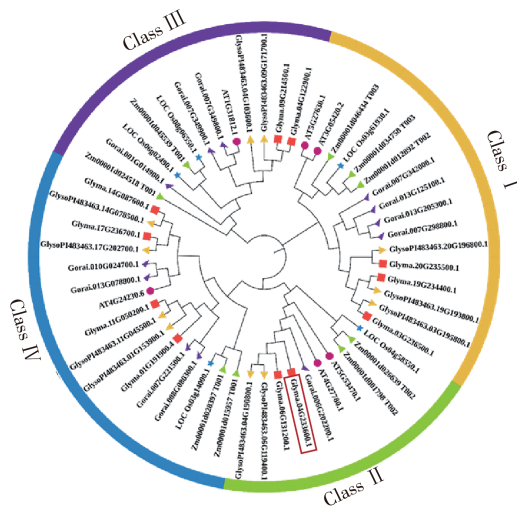


图3 *ACBP*s 基因家族系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of gene families of *ACBP*s

2.2.3 *GmACBP6* 基因家族分析 从图4可知,该家族基因启动子区域包含多个与逆境相关的元件,如 ABA 响应元件(ABRE)、ARE 对厌氧诱导必不可少的顺式调节元件,说明其可以参与到逆境胁迫中。此外,笔者还发现,酰基辅酶 A 结合蛋白(ACBP)具有一个保守的酰基辅酶 A 结合(ACB)结构域,有助于与酰基辅酶 A 酯结合并在真核细胞中运输。除此之外,有研究报道, *ZmACBP* 在非生物和生物胁迫期间表现出时间和空间表达变化,且在拟南芥中 *ZmACBP1* 和 *ZmACBP3* 的表达增强了其对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性^[12]。综合上述,其家族基因在逆境环境下能发挥一定的作用,为进一步明确 *GmACBP6* 基因是否能够提高大豆盐碱耐受性提供了依据。

2.3 *GmACBP6* 基因表达模式分析

2.3.1 *GmACBP6* 基因在大豆各组织中表达分析 本实验以大豆植株的主根、侧根、茎、叶、花、花苞及种子等为材料,提取 RNA 后将其反转录为 cDNA,进一步利用荧光定量 PCR 技术明确

GmACBP6 基因在各组织的表达量。结果表明(图5), *GmACBP6* 在大豆主根、侧根、茎、叶、花、花苞及种子中皆有表达,其中表达量最高的组织为花苞。

2.3.1 *GmACBP6* 基因在大豆萌发期盐碱胁迫下的表达鉴定 本研究在大豆种子进行盐碱胁迫处理第6天,以对照组及盐碱处理组为样本提取 RNA,继而对 *GmACBP6* 进行表达分析。实验结果表明(图6),大豆种子在盐碱胁迫处理后 *GmACBP6* 基因的表达量显著上升,从而推测 *GmACBP6* 基因的表达与大豆萌发期的耐盐碱性相关。

2.4 大豆 *GmACBP6* 基因在酵母中的耐盐碱功能验证

2.4.1 pYES2-*GmACBP6* 表达载体的构建 本研究构建了 pYES2-*GmACBP6* 表达载体,并将其转入 INVSc1 酵母菌株中,通过 *GmACBP6* 基因鉴定引物对转化后的酵母菌液进行 PCR 鉴定,结果表明(图7), pYES2-*GmACBP6* 表达载体已转入酵母细胞中。

2.4.2 大豆 *GmACBP6* 基因在酵母中的耐盐碱表型鉴定 将 pYES2-*GmACBP6* 载体及其空载体转入酵母菌株(INVSc1),并将其在基础培养基、盐胁迫培养基及盐碱胁迫培养基上进行培养,观察酵母菌株的生长情况。结果表明(图8),在盐和盐碱胁迫条件下,含有 pYES2-*GmACBP6* 载体的酵母菌株的生长情况均优于含有空载 pYES2 载体的酵母菌株,说明大豆 *GmACBP6* 基因具有提高酵母耐盐及耐盐碱的能力。

同时,将空载酵母菌和转入 *GmACBP6* 基因的酵母菌在基础培养液(SD-Ura)、盐胁迫培养液及盐碱胁迫培养液中培养,分别在 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h 测其 OD_{600} 的吸光值,并绘制生长曲线。结果表明,在基础培养基中, pYES2 空载和转入 pYES2-*GmACBP6* 载体的酵母菌生长势基本保持一致;但在盐胁迫和盐碱胁迫条件下转入 pYES2-*GmACBP6* 载体的酵母菌生长势优于转入 pYES2 空载的酵母菌,确定了大豆 *GmACBP6* 基因具有增强酵母细胞盐及盐碱耐受性的生物学功能(图9)。

2.5 *GmACBP6* 基因在拟南芥中的耐盐碱性鉴定 本研究将 *atacbp6* 突变体、野生型、*GmACBP6* 基因的超表达及回补拟南芥种子分别点种于 1/2MS 基础培养基、盐及盐碱培养基上,并观察其萌发率。结果表明,在 1/2MS 基础培养基上种

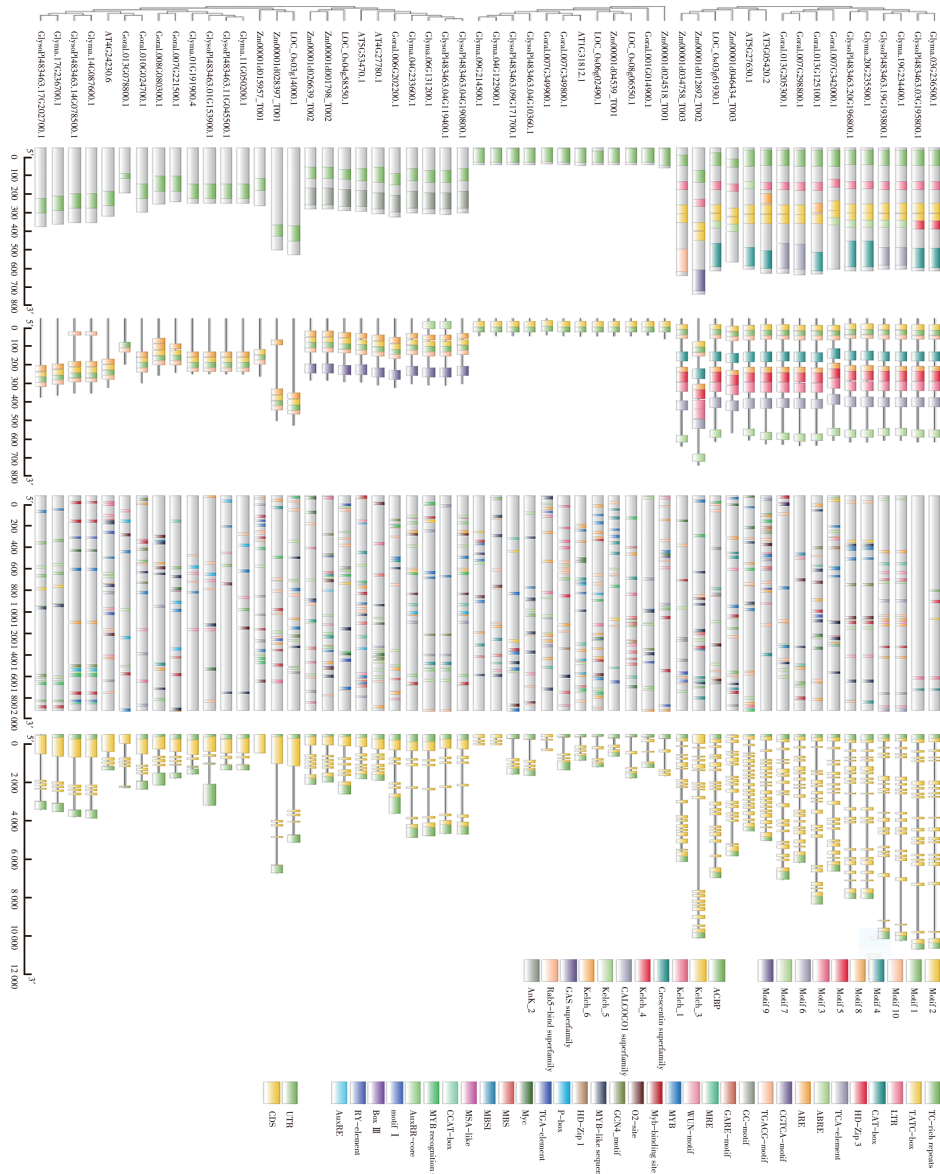


图4 ACBPs 基因家族 motif 及启动子分析

Fig. 4 Gene family motif and promoter analysis of ACBPs

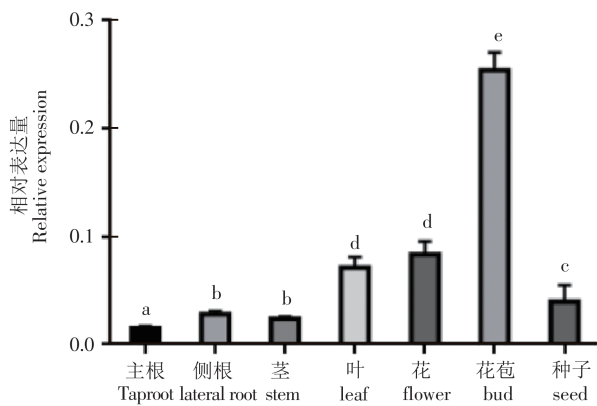


图5 *GmACBP6* 基因的表达模式分析

Fig. 5 Analysis of the expression patterns of the *GmACBP6* genes

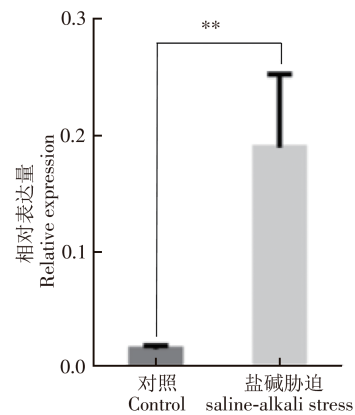
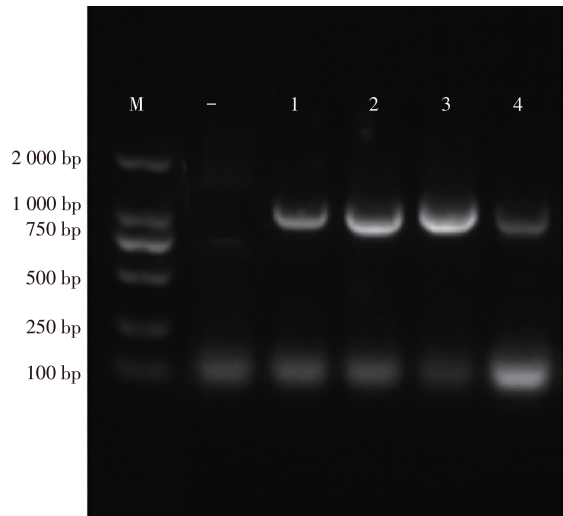


图6 大豆萌发期 *GmACBP6* 的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *GmACBP6* during soybean germination stage



M: 2 000 marker; -: 阴性对照; 1~4: pYES2-GmACBP6 菌株。

M: 2 000 marker; -: Negative control; 1-4: pYES 2-GmACBP6 strain.

图 7 转 pYES2-GmACBP6 表达载体的酵母菌株鉴定

Fig. 7 Identification of the yeast strains transferred to the pYES 2-GmACBP6 expression vector

子的萌发率保持一致(图 10-A),而在盐胁迫和盐碱胁迫培养基中,超表达 *GmACBP6* 基因的拟南芥株系的萌发率明显高于 *atacbp6* 突变体、野生型和 *GmACBP6* 回补株系,并且生长状况非常良好。相比之下, *atacbp6* 突变体的拟南芥种子几乎不萌发(图 10-B、图 10-C)。

通过对上述转基因拟南芥材料的萌发率进行统计并绘制柱形图(图 10-D),结果显示, *atacbp6* 突变体、野生型、超表达 *GmACBP6* 及回补材料的拟南芥种子在 1/2MS 基础培养基中的萌发率都为 100%,说明在拟南芥中超表达或者突变后对拟南芥的萌发未产生任何影响;而在盐胁迫培养基中的发芽率分别为 87%、42%、34%、8%,在盐碱胁迫培养基中的发芽率分别为 62%、7%、6%、1%,说明在拟南芥中表达大豆 *GmACBP6* 基因可以显著提高盐及盐碱胁迫下种子的萌发率,进一步明确了 *GmACBP6* 基因具有提高拟南芥萌发期盐碱耐受性的功能。

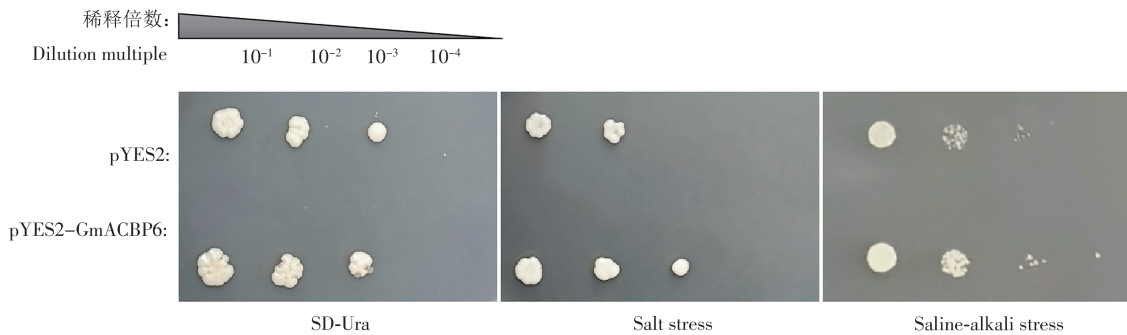


图 8 *GmACBP6* 在酵母体系中耐盐和耐盐碱的表型鉴定

Fig. 8 Phenotypic identification of salt-tolerant and salt-tolerant profiles of *GmACBP6* in the yeast system

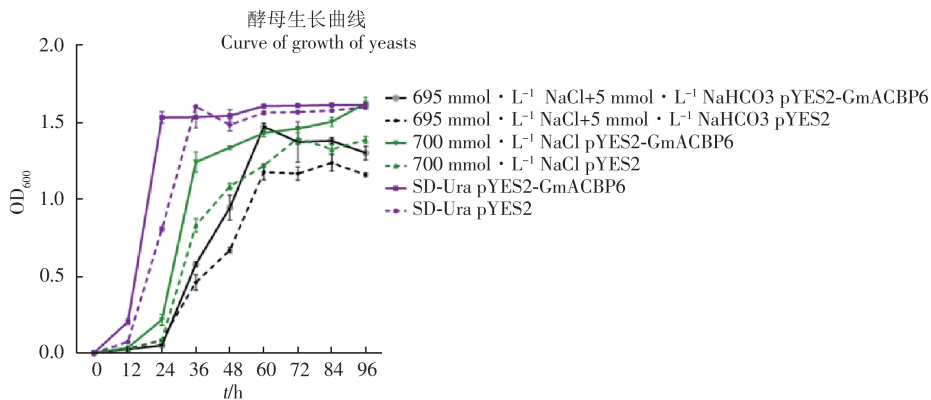
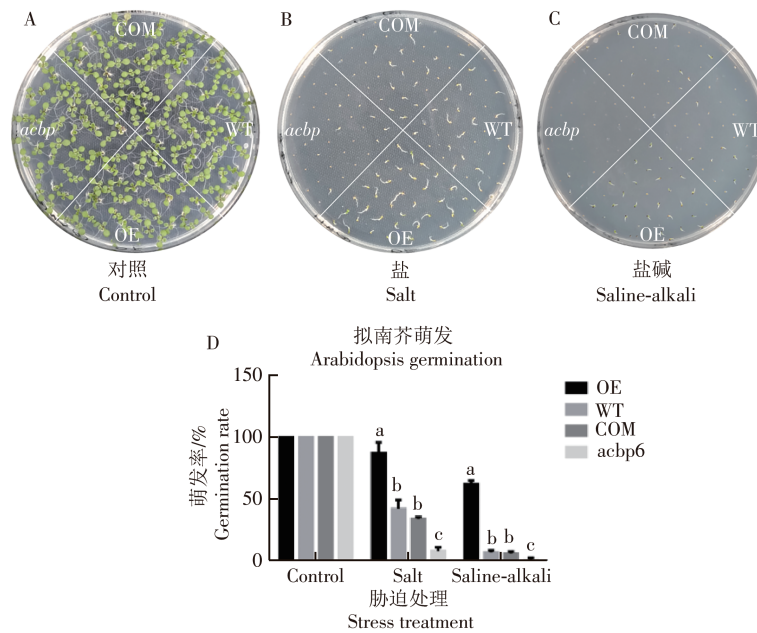


图 9 转 pYES2 和 pYES2-GmACBP6 酵母菌株盐及盐碱胁迫下的生长曲线测定

Fig. 9 Growth curves of pYES 2 and pYES 2-GmACBP6 yeast strains



A. 拟南芥种子在 1/2 MS 培养基上的萌发表型; B. 拟南芥种子在盐胁迫培养基上的萌发表型; C. 拟南芥种子在盐碱胁迫培养基上的萌发表型; D. 拟南芥种子在各处理水平下萌发率分析。

A. Germination phenotype of Arabidopsis seeds on 1/2 MS medium; B. Germination phenotype of Arabidopsis seeds on salt stress medium; C. Germination phenotype of Arabidopsis seeds on saline stress medium; D. Analysis of germination rate of Arabidopsis seeds at each treatment level.

图 10 盐、盐碱胁迫下拟南芥种子萌发表型鉴定及萌发率分析

Fig. 10 Phenotype identification and germination percentage analysis of Arabidopsis seeds under salt and salinity stress

3 讨论

研究表明,植物类ACBP蛋白可参与脂类物质(磷酸酯、卵磷脂和酰基辅酶酯类等)运输、饱和脂肪酸代谢、酰基辅酶A动态平衡、脂肪酸 β 氧化和囊泡运输等多种生理过程,对植物的生长发育与逆境响应具有重要意义^[13]。氧脂蛋白信号传导通过II类酰基辅酶A结合蛋白与脂氧合酶的配体依赖性相互作用进行调节植物脂氧合酶(LOX)氧化亚油酸和亚麻酸,产生氢过氧衍生物,并从中衍生出茉莉酸和其他氧脂蛋白,其中大豆*GmACBP3*和*GmACBP4*两种II类酰基辅酶A结合蛋白通过介导氧脂素信号传导的双重调节机制,从而提高大豆对盐的耐受性^[14]。拟南芥*AtACBP1*至*AtACBP6*中的酰基辅酶A结构域在体外结合长链酰基辅酶A酯,表明其在植物脂质代谢中可能发挥作用^[15]。因此,为了明确*GmACBP6*基因在大豆中的生物学功能,本研究对ACBPs基因家族蛋白序列进行了motif和启动子的分析,结果表明,该蛋白家族的启动子区域含有ABA响应元件(ABRE)和对厌氧诱

导至关重要的顺式调节元件(ARE),且具有一个保守的ACB结构域,该结构域有助于与酰基辅酶A酯结合并在真核细胞中运输,对*GmACBP6*(酰基辅酶A结合蛋白)的蛋白质结构进行了跨膜区域的分析,结果显示该蛋白具有一个跨膜区域,结合*GmACBP6*基因的功能注释推测其与细胞膜磷脂代谢相关。

研究表明,拟南芥中*AtACBP1*和*AtACBP2*在各组织中均可大量表达,且在长角果和成熟种子中的表达量最高,表明这2个基因可能在种子发育、休眠和萌发过程中发挥重要作用^[16-18]。向日葵中*HaACBP6*在营养组织中大量表达,并在发育中的种子和发芽的子叶中表达量最高^[19]。基于以上的研究背景,本研究对*GmACBP6*在大豆各组织中的表达量进行分析,发现其在大豆各组织中均有表达,且*GmACBP6*在种子萌发阶段经盐碱胁迫后表达量显著升高,进一步表明大豆*GmACBP6*对盐碱胁迫具有响应性。

因此,为了明确*GmACBP6*是否具有提高大豆萌发期盐碱耐受性的生物学功能,结合前人使用

酵母异源表达体系对基因功能进行验证的方法^[20]。本研究首先将 *GmACBP6* 转入酵母细胞中, 通过盐、盐碱胁迫培养板及液体培养基培养酵母菌, 并观察各酵母菌株的生长势及不同时间点下的 OD_{600} 值, 结果表明大豆 *GmACBP6* 基因可以提高酵母细胞对盐碱胁迫的耐受性。此外, 为了明确大豆 *GmACBP6* 在植物中是否具有耐盐碱的生物学功能, 本研究通过花序侵染法创制 *GmACBP6* 回补及过表达拟南芥材料, 并对野生型拟南芥、*atacbp6* 突变体、*GmACBP6* 超表达和回补拟南芥种子进行萌发期耐盐碱表型鉴定, 结果发现在拟南芥中表达大豆 *GmACBP6* 能够显著提高拟南芥种子在盐及盐碱胁迫培养基中的萌发率, 最终确定了大豆 *GmACBP6* 具有提高种子萌发期盐碱耐受性的功能, 为培育耐盐碱大豆新品种奠定基础。

参考文献:

- [1] GAO W, XIAO S, LI H Y, et al. *Arabidopsis thaliana* acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with heavy-metal-binding farnesylated protein AtFP6[J]. *The New Phytologist*, 2009, 181(1): 89–102.
- [2] CHEN Q F, XIAO S, QI W, et al. The *Arabidopsis acbp1 acbp2* double mutant lacking acyl-CoA-binding proteins ACBP1 and ACBP2 is embryo lethal[J]. *The New Phytologist*, 2010, 186(4): 843–855.
- [3] XIAO S, GAO W, CHEN Q F, et al. Overexpression of *Arabidopsis* acyl-CoA binding protein ACBP3 promotes starvation-induced and age-dependent leaf senescence[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(5): 1463–1482.
- [4] DU Z Y, CHEN M X, CHEN Q F, et al. Overexpression of *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein ACBP2 enhances drought tolerance[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36(2): 300–314.
- [5] HAMDAN M F, LUNG S C, GUO Z H, et al. Roles of acyl-CoA-binding proteins in plant reproduction[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(9): 2918–2936.
- [6] DU Z Y, ARIAS T, MENG W, et al. Plant acyl-CoA-binding proteins: an emerging family involved in plant development and stress responses[J]. *Progress in Lipid Research*, 2016, 63: 165–181.
- [7] 秦鹏飞. 棉花酰基辅酶A结合蛋白(ACBP)家族基因的发掘及在非生物胁迫抗性中的功能鉴定[J]. *作物学报*, 2016, 42(11): 1577–1591.
- [8] 周远远. *ZmACBP*s 家族的分子鉴定、表达及功能分析[D]. 济南: 济南大学, 2021.
- [9] CHANG Y. Genome-wide identification and characterization of *ACBP* gene family in *Populus* reveal salinity alkali-responsive profiles[J]. *Journal of Forestry Research*, 2023, 34(2): 481–496.
- [10] 滕涛. 中国大豆产业链价值提升策略研究[D]. 大连: 大连海事大学, 2010.
- [11] 张旗, 陶梦慧, 李丹, 等. 盐碱胁迫对野生大豆种子萌发的影响[J]. *畜牧与饲料科学*, 2022, 43(4): 104–108.
- [12] ZHU J, LI W, ZHOU Y, et al. Molecular characterization, expression and functional analysis of acyl-CoA-binding protein gene family in maize (*Zea mays*)[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 94.
- [13] HURLOCK A K, ROSTON R L, WANG K, et al. Lipid trafficking in plant cells[J]. *Traffic*, 2014, 15(9): 915–932.
- [14] LUNG S C, LAI S H, WANG H, et al. Oxylin signaling in salt-stressed soybean is modulated by ligand-dependent interaction of Class II acyl-CoA-binding proteins with lipoxygenase[J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(3): 1117–1143.
- [15] XIAO S, GAO W, CHEN Q F, et al. Overexpression of membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 enhances lead tolerance in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2008, 54(1): 141–151.
- [16] DU Z Y, CHEN M X, CHEN Q F, et al. *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein ACBP1 participates in the regulation of seed germination and seedling development[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2013, 74(2): 294–309.
- [17] XUE Y, XIAO S, KIM J, et al. *Arabidopsis* membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 is involved in stem cuticle formation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(18): 5473–5483.
- [18] ZIMMERMANN P, HIRSCH-HOFFMANN M, HENNIG L, et al. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(1): 2621–2632.
- [19] AZNAR-MORENO J A, VENEGAS-CALERÓN M, DU Z Y, et al. Characterization of a small acyl-CoA-binding protein (ACBP) from *Helianthus annuus* L. and its binding affinities[J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 2016, 102: 141–150.
- [20] 张引鹤, 周永刚, 高红桃, 等. 大豆(*Glycine max*)SUT4基因的克隆、表达及抗逆功能的鉴定[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(17): 5578–5587.

Cloning of soybean *GmACBP6* gene and functional Validation of salinity tolerance during germination

WU Guanji¹, ZHOU Xunjun¹, WU Feifei¹, ZHANG Yinghe¹, HUANG Yinghua¹,
LI Yaxin^{1,2}, GAO Hongtao^{1,2}, LI Haiyan^{1,2}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570288; 2. Nanfan College (Sanya Nanfan Research Institute), Hainan University Sanya, 572024)

Abstract: In order to determine whether soybean (*Glycine max*) acyl-Coenzyme A binding protein (*GmACBP6*) has saline-tolerant function, the expression of *GmACBP6* during the germination period was analyzed by using the real-time PCR, and analysis showed that *GmACBP6* responded to saline-alkali stress in the germination period of soybean. In this context the pYES2-*GmACBP6* recombinant vector was constructed and transformed into the yeast strains, The growth of pYES2-*GmACBP6* yeast strain and pYES2 yeast strain cultured in salt and saline stress mediums were observed. The results show that the pYES 2-*GmACBP6* yeast strain grew significantly better under salt and salt stress than the pYES2 yeast vector. It is preliminarily determined that the soybean *GmACBP6* gene has the function of improving the salt and alkali tolerance of yeast cells. In this study the *A. thaliana* materials with *GmACBP6* knock-in and overexpression were also produced, and their salinity-tolerant phenotype during the germination stage was identified. The results showed that the germination rate of *Arabidopsis* seeds with *GmACBP6* overexpression was significantly higher than that of *GmACBP6* knock-in, *atacbp6* mutant or wild *Arabidopsis thaliana* under salt and salt-alkali stress, which further confirmed the salt-alkali tolerance of the *GmACBP6* gene in the soybean.

Keywords: soybean; acyl-CoA binding protein *GmACBP6*; salt and alkali tolerance

(责任编辑:潘学峰)