

马思宇,肖芳斌,罗雪,等.百脉根不定根发育相关基因*LcC2DP1*的克隆与功能初步分析[J].华中农业大学学报,2023,42(1):42-50.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.01.006

百脉根不定根发育相关基因*LcC2DP1*的 克隆与功能初步分析

马思宇,肖芳斌,罗雪,韦飘,宋莉

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室/
贵州省农业生物工程重点实验室,贵阳550025

摘要 为研究百脉根(*Lotus corniculatus* L.)C2钙依赖蛋白激酶基因*LcC2DP1*在不定根形成过程中的功能,通过RACE法从百脉根中克隆*LcC2DP1*基因,利用qRT-PCR检测其时空表达模式,并通过农杆菌介导的瞬时表达系统在百脉根中过量表达*LcC2DP1*并鉴定其功能。结果显示:*LcC2DP1*基因全长705 bp,编码235个氨基酸,分子质量为25.95 ku,与蒺藜苜蓿同源性最高(82%);在百脉根不定根分化过程中持续表达,表达部位为根、茎和叶片;与野生型亲本(WT)相比,转*LcC2DP1*基因百脉根(TP)的不定根分化提前1~2 d;在不定根分化的9~15 d,其总根长分别是WT的168%、155%,根体积分别是WT的249%、161%,根尖数分别是WT的156%、137%。TP百脉根的总根长($P<0.01$)、根体积($P<0.01$)和根尖数($P<0.05$)表现出一定的发育优势,表明*LcC2DP1*基因可能与百脉根不定根发育调控相关。

关键词 百脉根;不定根分化;钙依赖蛋白激酶;C2结构域蛋白;基因克隆;生长发育调控

中图分类号 S541⁺.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)01-0042-09

植物根系具有固持地上组织和吸收水分、养分的双重功能^[1],在植物生长发育过程中发挥重要作用^[2]。根系的生长状态和分化速度直接影响牧草的长势和产量^[3-4]。牧草根系的发育受多种内外环境因子的影响,由蛋白激酶(protein kinases, PK)介导的激素信号途径是其中的主要调控途径^[5-6]。蛋白激酶是催化蛋白质磷酸化反应的酶,广泛参与细胞信号感知^[7]、传导^[8]、基因表达^[9]、生长发育调控^[10]等过程。根据催化域氨基酸序列的不同,蛋白激酶分为AGC、CaMK、CMGC、PTK和其他共5个类型^[11]。CaMK中的C2钙依赖蛋白激酶(C2 calcium-dependent protein kinase, C2CDPK)是一类含有C2结构域的蛋白。钙依赖蛋白激酶(CDPK)依赖于Ca²⁺催化磷酸化反应^[12],参与细胞信号转导过程^[13]。研究表明,CDPK参与植物根系的生长发育调控,定位于细胞膜的拟南芥CDPK编码基因*CPK29*参与侧根形成调控^[9],苜蓿*MtCDPK1*表达促

进根毛的正常生长^[14],水稻*OsCDPK5*在淹水条件下能保证根系通气组织的正常形成^[15]。C2结构域蛋白主要定位于人类和动物的细胞膜系统,具有参与磷脂第二信号产生、GTP酶激活和控制蛋白质磷酸化等重要功能^[16-17]。近年来,植物C2CDPK的研究已逐渐受到关注^[18-19]。研究发现小麦的C2CDPK基因*TaC2DP1*在干旱、低温和热胁迫中发挥重要作用^[20],旋蒴苜蓿的*BhC2DP1*基因参与脱落酸(abscisic acid, ABA)信号途径调控根的生长^[21]。尽管如此,人们对植物C2CDPK的了解仍极为有限。

百脉根(*Lotus corniculatus* L.)是一种优质的多年生豆科牧草,也是一种良好的蜜源和护坡固土植物,其由匍匐茎发生的不定根所构成的根系系统十分发达。本研究通过RACE扩增法克隆Leo百脉根C2CDPK编码基因*LcC2DP1*,利用qRT-PCR技术检测该基因的组织表达特异性,通过农杆菌介导的瞬时表达系统对其不定根分化调控功能进行初步分

收稿日期:2022-04-07

基金项目:国家自然科学基金项目(32260338;31660685)

马思宇,E-mail:CMMC23@163.com

通信作者:宋莉,E-mail:lpsssl@126.com

析, 以为揭示百脉根根系发育调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

所用植物材料为百脉根 (*Lotus corniculatus* ‘Leo’), 种植于贵州大学贵州省农业生物工程重点实验室试验田。农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 和 pSH737 植物表达载体均保存于笔者所在实验室。

1.2 *LcC2DP1* 基因克隆

笔者所在课题组前期分析百脉根不定根发育转录组数据^[22]中发现, 12个C2结构域激酶基因家族成员在根发育过程中持续上调表达, 其中的 *LcC2DP1* (Lc1g3v0026680) 表达最为显著, 本研究对该基因进行进一步研究, 克隆引物 (表1) 采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 提取百脉根茎、叶、根的总 RNA 混合反转录成 cDNA 后作为模板, 按照

5' RACE 和 3' RACE 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 提供的操作方式进行两轮巢式 PCR 扩增, 首轮 PCR 产物稀释 50 倍后取 1 μ L 作为第二轮 PCR 的模板。50 μ L 反应体系为: cDNA 模板 1 μ L、引物各 2 μ L、Taq 酶 0.5 μ L、Buffer 5 μ L、2H₂O 补足体系; PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 次循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 之后对 PCR 产物进行凝胶分离和回收测序。根据已知序列和 5' RACE、3' RACE 测序结果, 拼接目的基因全长序列, 分析起始和终止密码子位置。根据 RACE 扩增序列设计 2 条全长扩增特异性引物 (表 1), 以百脉根 cDNA 为模板扩增 *LcC2DP1* 基因, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增片段与 pMD18T 载体连接, 热激法转化大肠杆菌 DH5 α 后送生工生物一程 (上海) 公司测序。

表 1 RACE 和全长基因克隆扩增引物序列

Table 1 RACE and full length gene cloning amplification primer sequence

引物 Primer	序列 Sequence	用途 Function
A041-1(GSP1)	CGTAGGGATCTTGCGG	5' RACE 扩增
A041-2(GSP2)	ATCCATTCTGTGTCCTTC	5' RACE amplification
A041-3(GSP3)	TTGGAGCAGGAAACAACAG	
S042-1	CATCGTTTGAACAGCAATACACT	3' RACE 扩增
S042-3	TTCAATCCAAAAGTGGCAGACACGC	3' RACE amplification
LcC2DP1-F	TGTTGAATTGAAAGATCTGC	全长扩增
LcC2DP1-R	GAGGGTGTAGAGGATCCA	Full length amplification

1.3 *LcC2DP1* 基因结构分析

使用相关的生物信息分析在线工具进行 *LcC2DP1* 基因的分子特征分析, 其中, 理化性质 (蛋白质分子质量、等电点、分子式) 采用 ExPASy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)、编码蛋白的亲疏水性采用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)、蛋白结构分析采用 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/>) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行。利用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 对 *LcC2DP1* 基因进行亚细胞定位预测。利用 BEDTools^[23] 获得 *LcC2DP1* 基因上游 2 000 bp 序列 (*Lotus corniculatus* genome assembly build 3.0)^[24], 利用在线网站 PlantCARE 对获得的序列和顺式作用元件进行分析。使用 NCBI 的 BLAST 工具筛选出 *LcC2DP1* 同源序列后用 MEGA X 中邻位相连法构建系统发育进化树。

1.4 *LcC2DP1* 基因表达分析

为探究 *LcC2DP1* 在百脉根不同组织和不同时期中的表达情况, 分别收集 Leo 百脉根的根、茎、叶以及不定根形成过程中 0、3、6、9、12 d 根部组织为样本。以百脉根 *UBI* (DQ249171.1) 作为内参基因, 通过 IDT (<https://sg.idtdna.com/site/home/home/sessiontimeout>) 在线软件设计 *LcC2DP1* 和 *UBI* 的扩增引物 (表 2)。使用实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96) 检测 *LcC2DP1* 基因的时空表达特性, 反应体系和反应程序根据 TIANGEN miRcute miRNA 试剂盒的说明进行。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[25] 分析基因相对表达量。

1.5 植物表达载体构建及遗传转化

利用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I (TaKaRa, 大连) 分别酶切 pSH737 和 pMD18T-*LcC2DP1* 质粒, 酶切片段回收后用 T₄ DNA 连接酶 (TaKaRa, 大连) 4 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建 *LcC2DP1* 基因的植物表达载体, 该基因由 35S 启动子驱动表达, 以 *GUS::NPTII* 作为报告基因和筛选基因。采用 YEP 液体培养基培

表2 qRT-PCR检测引物序列

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	用途 Function
LcUBI-F	CTCACCTTGTCCTTC- GTCTG	内参基因
LcUBI-R	TGGATCTTAGCCTTCAC- GTTG	House-keeping gene
QLc2DP1-F	TTTCACGCCAA- GATCCCTAC	目的基因
QLc2DP1-R	GAGTGTATTGCTGTTTC- CAAACG	Gene of interest

养所获得的阳性工程菌至对数生长期。参照杨少彤等^[26]的方法,通过真空渗透法进行百脉根枝条瞬时转化。转化条件为在12 kPa处理10 min,快速释放压力,再次重复处理1次。每组15株样品,重复3次。以携带GV3101-pSH737质粒转化植株作为对照,分

别采用GUS组织化学染色和RT-PCR进行转化鉴定。采用视显微镜(OOX-86)进行拍照,利用根系扫描仪(Epson)和根系分析软件(Win Rhizo)对总根长、根尖数、根系总表面积、根体积和根平均直径等根系指标进行观察及统计分析。

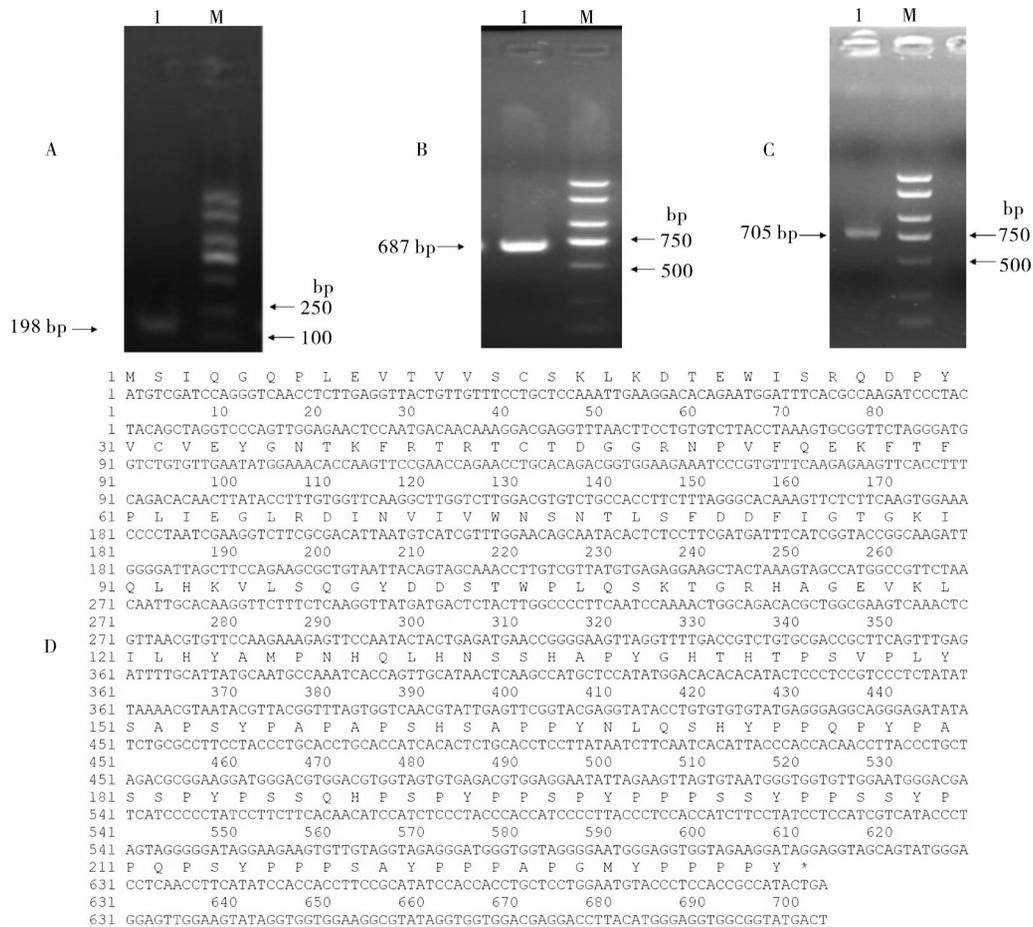
1.6 数据统计与分析

数据统计和显著性分析分别采用Excel 2016软件和DPS 7.05软件,并采用GraphPad Prism 8.2软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 LcC2DP1基因克隆

基于百脉根不定根分化转录组筛选的Lc1g3v00 26680序列,对LcC2DP1基因进行RACE扩增,获得的LcC2DP1全长为705 bp,编码235个氨基酸,该序列上游有起始密码子ATG,下游有终止密码子TGA。为了验证拼接序列的正确性,设计引物对



A: 5' RACE克隆结果; B: 3' RACE克隆结果; C: 全长克隆结果 (1: 阳性单菌落提取的质粒; M: DL2000 Marker); D: 拼接翻译。
 A: 5' RACE cloning results; B: 3' RACE cloning results; C: Full length cloning results (1: Plasmids extracted from positive single colonies; M: DL2000 Marker); D: Mosaic translation.

图1 LcC2DP1基因克隆及拼接翻译

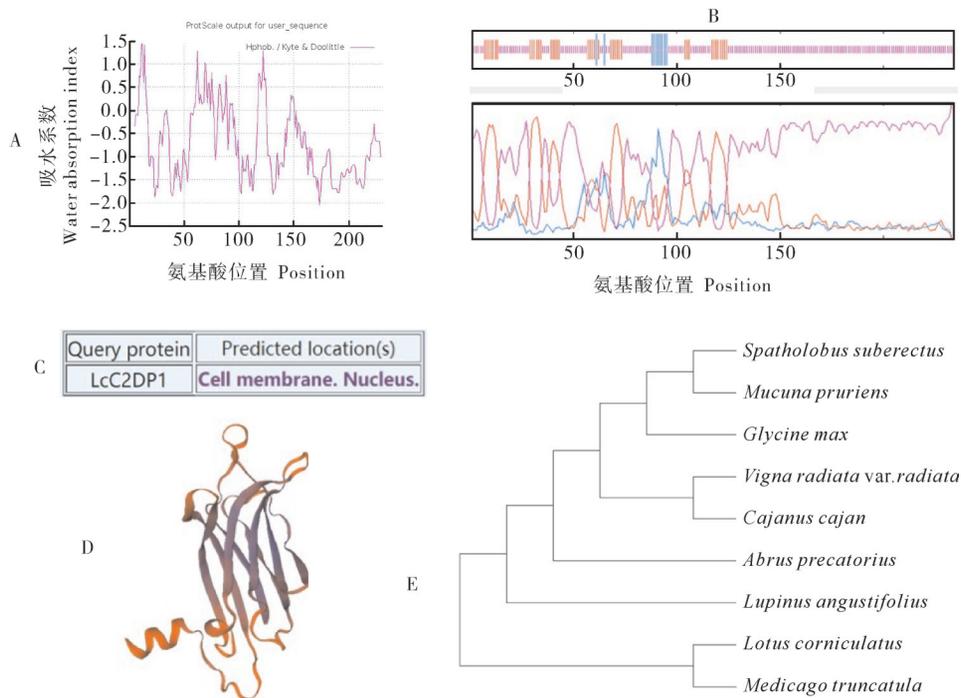
Fig.1 LcC2DP1 gene amplification and mosaic translation

LcC2DP1 编码区进行扩增, 得到1条约700 bp 的 特异性条带, 序列测定结果表明 *LcC2DP1* 编码区与 拼接结果序列完全一致(图1)。

2.2 *LcC2DP1* 的理化性质

对 *LcC2DP1* 基因结构进行分析, 结果显示, 其 编码蛋白含235个氨基酸, 相对分子质量为25 952.03, 理论等电点为7.17, 分子式为 $C_{1185}H_{1737}N_{305}O_{344}S_6$, 脂 肪指数为53.91, 不稳定性指数为85.47, 是一种不 稳定蛋白。对 *LcC2DP1* 蛋白质进一步分析, 发现其 亲水性氨基酸较疏水性氨基酸多(图2A), 推测该 蛋白属于亲水性蛋白。在 *LcC2DP1* 蛋白的二级结 构中, α 螺旋有19个氨基酸(占8.15%), 无规卷曲 有175个氨

基 酸(占75.11%), 延伸链有39个氨基酸(占 16.74%)(图2B), 可确定该蛋白二级结构主要以 无规卷曲为主。利用 Plant-mPLoc 在线分析软件, 对 *LcC2DP1* 进行亚细胞定位预测, 结果显示, *LcC2DP1* 定位在细胞核和细胞膜上(图2C)。用 Swiss model 对 *LcC2DP1* 蛋白进行三级结构预测, 结果显示, *LcC2DP1* 蛋白结构包含大量的无规卷曲(图2D), 这 与预测的二级结构结果一致。对 *LcC2DP1* 的全长 蛋白序列进行 Blast 比对并构建系统进化树, 结果 显示, *LcC2DP1* 与蒺藜苜蓿蛋白同源性最高, 为 82%(图2E), 暗示 C2 结构域在豆科植物中进化 较为保守。



A: *LcC2DP1* 蛋白疏水性; B: *LcC2DP1* 蛋白二级结构预测; C: *LcC2DP1* 的亚细胞定位预测; D: *LcC2DP1* 蛋白三级结构预测; E: 百脉根 *LcC2DP1* 与其他 C2 结构域蛋白的系统进化树。A: *LcC2DP1* protein hydrophobicity analysis; B: *LcC2DP1* protein secondary structure prediction; C: Subcellular localization prediction of *LcC2DP1*; D: Tertiary structure of *LcC2DP1*; E: Phylogenetic tree analysis of *Lotus corniculatus* and other C2 domain protein.

图2 *LcC2DP1* 基因分子特性

Fig.2 Molecular characteristics of *LcC2DP1* gene

2.3 顺式作用元件类型

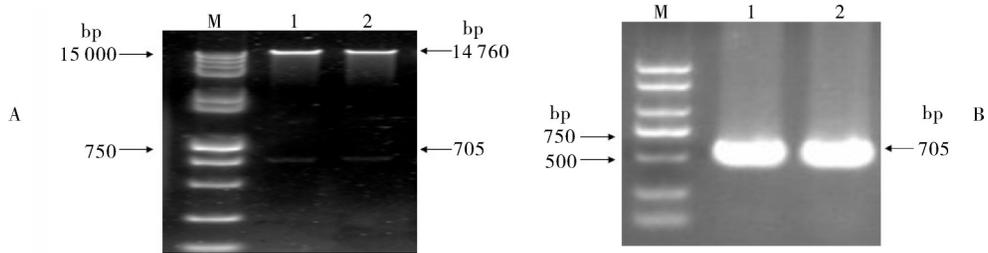
提取百脉根 *LcC2DP1* 基因上游2 000 bp 序列进行顺式作用元件分析, 结果(表3)显示, 百脉根 *LcC2DP1* 基因除了含有启动子和增强子区域最基本的 CAAT-box 元件以外, 还含有光响应元件(Box-4、AT1-motif、GT1-motif)、转录起始核心启动子元件(TATA-box)以及干旱诱导相关(MBS)的多种顺式作用元件。

2.4 植物表达载体构建

扩增 *LcC2DP1* 基因片段, 与 *pSH737* 植物表达载体连接, 双酶切鉴定结果显示, 重组质粒酶切后出现705 bp 的目的基因条带(图3A)。GV3103 农杆菌转化菌株的 PCR 扩增检测显示, 菌体中能扩增出705 bp 的 *LcC2DP1* 基因条带(图3B), 表明植物表达载体 *pSHLcC2DP1* 和携带 *LcC2DP1* 基因的工程菌构建成功。

表 3 *LcC2DP1* 基因的主要顺式调控元件
Table 3 The main *cis*-regulatory elements of *LcC2DP1* gene

元件 Element	位点 Site	功能 Function	数量 Number
CAAT-box	1,233,1 725,1 778,1 799	启动子和增强子区域常见的元件 Common elements in promoter and enhancer regions	5
Box-4	16,1 495	参与光响应顺式作用调节元件 Participate in lighting response clocking components	2
TATA-box	10,11,12,13,1 976,1 977,1 978	转录起始核心启动子元件 Transcription initiation core promoter componentst	7
MBS	1 740	参与干旱诱导的顺式作用元件 Participate in drought -induced custody components	1
AT1-motif	1 370	参与光响应顺式作用调节元件 Participate in lighting response clocking components	1
GT1-motif	175,176	参与光响应顺式作用调节元件 Participate in lighting response clocking components	2



A: 植物表达载体双酶切; B: 农杆菌菌落 PCR(M:DL 2000 Marker;1-2:不同阳性单菌落提取的质粒)。A: Verification of vector double enzyme digestion; B: PCR identification of *Agrobacterium tumefaciens* colony (M: DL 2000 Marker; 1-2: Plasmids extracted from different positive single colonies).

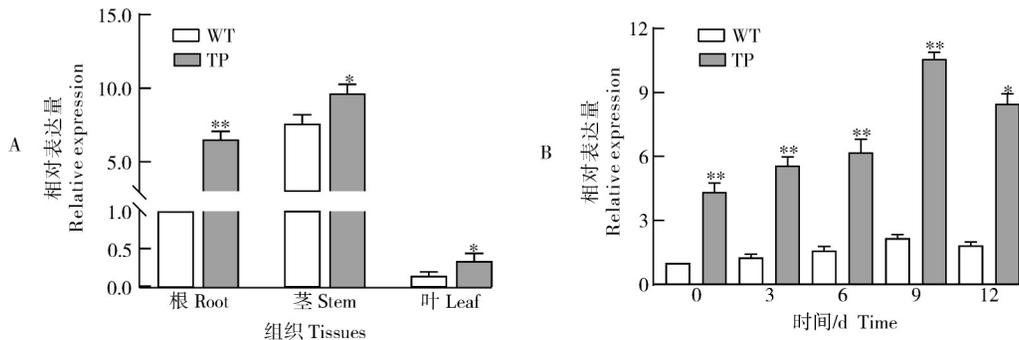
图 3 植物表达载体双酶切及农杆菌 PCR 电泳检测

Fig.3 The electrophoretic detection on double enzyme digestion of plant expression vector and PCR of *Agrobacterium tumefaciens* liquid

2.5 *LcC2DP1* 基因的表达特征

通过 qRT-PCR 分析 *LcC2DP1* 基因在百脉根不同组织及不定根分化期间的差异表达情况,发现相较于内参基因 *UBI*, *LcC2DP1* 基因在根、茎、叶中均有表达,但主要表达部位为根(1.00±0.00)和茎

(7.57±0.36),在叶中表达量(0.15±0.03)最低(图 4A)。当瞬时转化后, *LcC2DP1* 基因在百脉根根(相对表达量为 6.51±0.32)、茎(相对表达量为 9.65±0.35)、叶(相对表达量为 0.34±0.06)中表达量均增加,以根中表达变化量最为显著($P<0.01$)(图 4A);



*和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平上显著性相关;WT:野生型植株;TP:转 *LcC2DP1* 植株;下同。A: *LcC2DP1* 基因在不同组织的表达; B: *LcC2DP1* 基因在不定根分化过程中的差异表达。* and ** indicate significant correlation at the 0.05 and 0.01 levels, respectively; The same as follows. WT: Wild type; TP: Trans *LcC2DP1* gene plants; A: The relative expression level of *LcC2DP1* gene in plant different tissues; B: The expression of *LcC2DP1* gene in the process of adventitious root development.

图 4 *LcC2DP1* 基因表达特异性

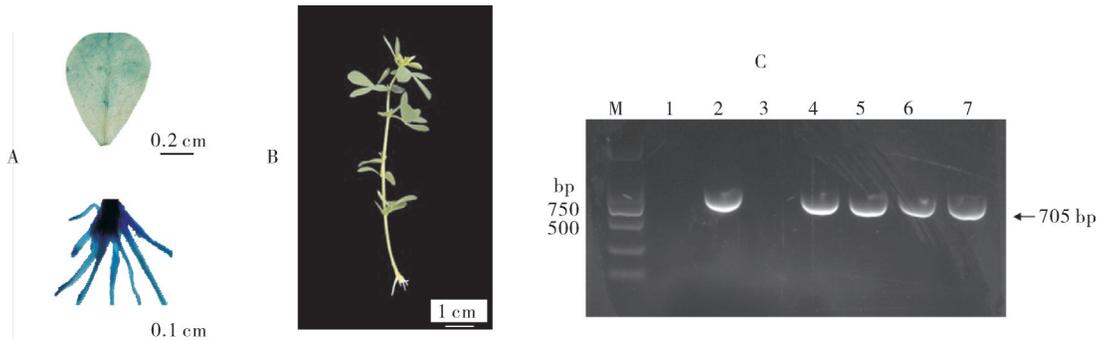
Fig.4 *LcC2DP1* gene expression specificity

不定根分化的0~9 d, 野生型植株(WT)和转 *LcC2DP1* 植株(TP)的 *LcC2DP1* 基因表达量均逐渐上升, 但TP相较于WT变化显著($P < 0.05$), 其中3 d时为 1.26 ± 0.09 , 9 d时表达量最高(2.68 ± 0.35), 之后表达量下降, TP同期表达量均高于WT(图4B)。

2.6 *LcC2DP1* 基因在不定根分化中的作用

采用农杆菌介导的真空渗透法将植物表达载体 *pSHLcC2DP1* 转化到百脉根中。GUS 组织化学染色

显示, 外源基因转化后3~15 d均可观察到百脉根叶片显示蓝色, 外源基因瞬时转化百脉根后可在叶片和根部组织有效表达, 随着时间的延长蓝色逐渐加深, 到第9天时蓝色最深(图5A), 之后蓝色逐渐变浅, 外源基因功能鉴定可在转化后15 d内进行。形态学观察发现第6天时不定根形成, 之后根系逐渐增多(图5B), 利用RT-PCR对转化后9 d *LcC2DP1* 基因转录情况进行检测, 发现外源基因有表达(图5C)。



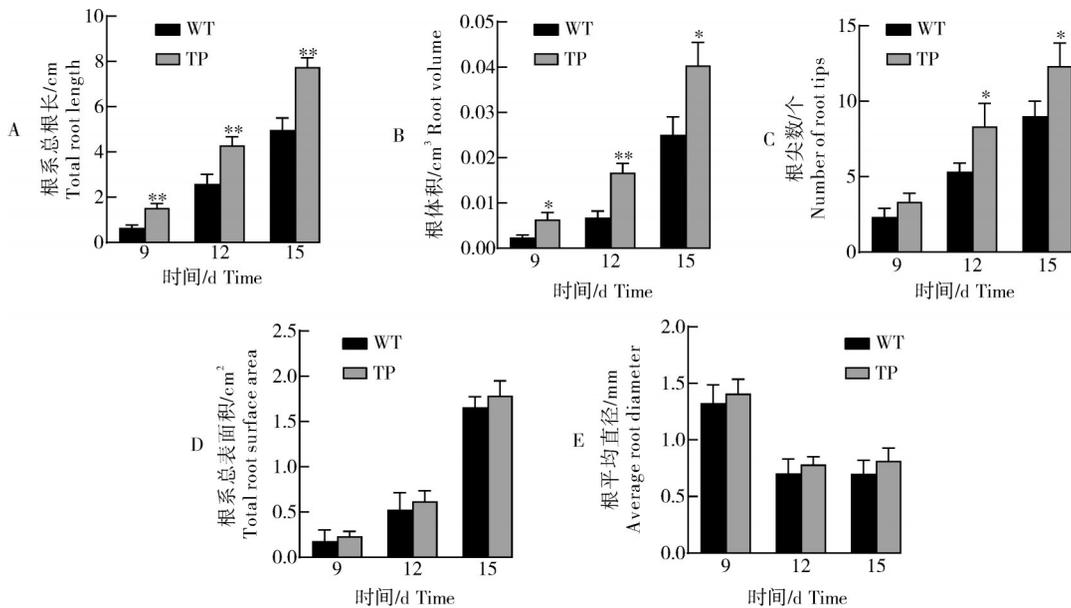
A: GUS 组织化学染色叶片和根部; B: 不定根发育情况; C: RT-PCR 检测(M: DL2000 marker; 1: 水; 2: *pSHLcC2DP1* 质粒; 3: WT; 4~7: 瞬时转化 *LcC2DP1* 第9天的百脉根。A: GUS organizational chemical staining blade and root; B: Adventitious root development; C: Expression in the 9th day RT-PCR detection of transient transformation of *Lotus corniculatus* (M: DL2000 marker; 1: Water; 2: *pSHLcC2DP1* plasmid; 3: WT; 4-7: Instantaneous transformation of *LcC2DP1* *Lotus corniculatus* on the 9th day).

图5 不定根分化9天时的转基因植株观察与鉴定

Fig. 5 Observation and identification of transgenic plants after adventitious root differentiation for 9 days

由图6可见, TP植株在第6天时观察到不定根开始分化, 比野生型亲本(WT)提前1~2 d形成根系。在第12~15天TP植株根系总根长、根尖数、根

体积均显著高于WT植株。12 d时TP植株根系总根长为 (4.28 ± 0.22) cm, 是WT的168%, 15 d为 (7.74 ± 0.23) cm, 是WT的155% (图6A); 12 d时



A: 根系总根长; B: 根体积; C: 根尖数; D: 根系总表面积; E: 根平均直径。A: Total root length; B: Root volume; C: Root number; D: Root total surface area; E: Root average diameter.

图6 百脉根不定根分化9~15 d期间的根系发育指标比较

Fig.6 Comparison of root development indicators of the *Lotus corniculatus* during 9-15 days

TP植株根体积为 $(0.0167 \pm 0.0012) \text{ cm}^3$,是WT的249%,15 d时为 $(0.0403 \pm 0.003) \text{ cm}^3$,是WT的161%(图6B);12 d时TP植株根尖数为 (8.30 ± 0.88) ,是WT的156%,15 d天时为 (12.33 ± 0.88) ,是WT的137%(图6C)。同一时期的TP与WT的根系总表面积(图6D)和根平均直径(图6E)差异不显著。TP百脉根在总根长($P < 0.01$)、根体积($P < 0.05$)和根尖数($P < 0.05$)上表现出一定的根系发育优势,*LcC2DP1*基因的表达可能与百脉根的不定根发育有关。

3 讨论

C2结构域蛋白作为与钙离子结合的一类功能型蛋白,在调控植物生长发育、抗逆性以及信号转导方面起着重要的作用。本研究从Leo百脉根中克隆了*LcC2DP1*基因,序列分析发现该基因具有典型的C2结构域,属于C2域蛋白家族基因^[22,27]。亚细胞定位预测结果显示,*LcC2DP1*蛋白定位于细胞膜和细胞核中,符合大多数C2结构域蛋白的亚细胞定位情况^[10],这是由C2结构域蛋白的结构所决定的,当C2结构域蛋白的N端发生酰基化修饰时,其棕榈酰化位点可与细胞膜形成一种可逆的稳定结合,而其豆蔻酰化位点则形成一种不可逆的松散结合^[28]。

系统进化分析发现*LcC2DP1*基因与狭叶羽扇豆、蒺藜苜蓿、刺毛豇豆等豆科植物具有较高的同源性,其中与蒺藜苜蓿的同源性最高为82%,说明*LcC2DP1*在豆科植物中具有较高的保守性。对该基因进行的组织特异性表达分析表明,*LcC2DP1*基因在百脉根牧草的根、茎和叶片组织中均有表达,但这种组织表达存在着明显的差异,以根和茎组织中的表达量较高,而叶片中的表达量较低。马佛明等^[29]研究表明,巴西橡胶树的C2结构域蛋白编码基因*HbC2*在被检植物组织中均有表达;但辣椒C2结构域蛋白编码基因*CaSRC2-1Kim*却具有显著的组织特异性,仅在根组织中表达^[30]。可以看出,C2结构域蛋白在植物生长发育中有着不同的表达模式,暗示C2结构域蛋白在植物生长发育过程中功能的多样性,包括可能参与根系发育调控过程。

张兰军等^[21]研究发现,复苏植物旋蒴苣苔的C2CDPK蛋白基因*BhC2DP1*参与激素途径调控根系发育。本研究利用农杆菌介导的瞬时表达系统对*LcC2DP1*基因功能进行初步分析,结果显示,转*LcC2DP1*基因植株的不定根分化比野生型早1~

2 d,且根系总根长($P < 0.01$)、根体积($P < 0.05$)、根尖数($P < 0.05$)均高于野生型,*LcC2DP1*基因表达使宿主植物产生一定的根系发育优势,这加深了人们对植物C2CDPK基因功能的认识。C2结构域蛋白可以通过生长素途径调控根系发育^[10,31],本研究中的根系发育优势可能与激素途径有关。光是植物生长发育的重要环境因素之一,光通过调节基因的表达和酶的活性等方式影响了植物的生长发育和根系分化过程^[32],*LcC2DP1*基因顺式作用元件中含有光响应元件Box-4、AT1-motif和GT1-motif,该基因也有可能是通过响应或改变光的敏感性调控植株生长发育,进而影响根系分化。

本研究通过对*LcC2DP1*基因的克隆、生物信息学分析、组织特异性表达、瞬时表达分析,发现*LcC2DP1*基因属于C2蛋白基因,可能参与百脉根不定根发育调控过程,在后续的研究中,将进一步验证*LcC2DP1*是否具有钙依赖蛋白激酶相应的生理功能,进行百脉根稳定遗传转化和创制突变体植株,明确*LcC2DP1*基因在不定根发育过程中的生物学功能。

参考文献 References

- [1] QIN H, MA C, ZHOU Y, et al. Molecular modulation of root development by ethylene[J/OL]. Small methods, 2020, 4(8): 1900067 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1002/smt.201900067>.
- [2] 马旭辉, 陈茹梅, 柳小庆, 等. 褪黑素对玉米幼苗根系发育和抗旱性的影响[J]. 生物技术通报, 2021, 37(2): 1-14. MA X H, CHEN R M, LIU X Q, et al. Effects of melatonin on root growth and drought tolerance of maize seedlings[J]. Biotechnology bulletin, 2021, 37(2): 1-14 (in Chinese with English abstract).
- [3] 李良勇, 崔国贤, 邹喜明, 等. 低钾胁迫对不同钾效率苧麻基因型根系发育及纤维产量品质的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 246-249. LI L Y, CUI G X, ZOU X M, et al. Root growth, fiber yield and quality for difference potassium efficiency ramie genotypes under lower potassium stress[J]. Chinese agricultural science bulletin, 2006, 22(9): 246-249 (in Chinese with English abstract).
- [4] LEMENT C, SLEIDERINK J, SVANE S F, et al. Comparing the deep root growth and water uptake of intermediate wheatgrass (*Kernza*®) to alfalfa[J]. Plant and soil, 2022, 472: 369-390.
- [5] TANG S, SHAHRIARI M, XIANG J, et al. The role of AUX1 during lateral root development in the domestication of the model C₄ grass *Setaria italica*[J]. J Exp Bot, 2022, 73(7): 2021-2034.
- [6] CHEN L, HE F, LONG R, et al. A global alfalfa diversity panel reveals genomic selection signatures in Chinese varieties and genomic associations with root development[J]. Journal of integrative plant biology, 2021, 63(11): 1937-1951.

- [7] 杨乐, 齐妍, 刘生祥, 等. 植物抗逆相关蛋白激酶的结构与功能[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 659-667. YANG L, QI Y, LIU S X, et al. Structure and function of stress-related protein kinases in plants[J]. Journal of plant genetic resources, 2013, 14(4): 659-667 (in Chinese with English abstract).
- [8] CHEN X, DING Y, YANG Y, et al. Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress[J]. Journal of integrative plant biology, 2021, 63(1): 53-78.
- [9] LEE H, GANGULY A, BAIK S, et al. Calcium-dependent protein kinase 29 modulates PIN-FORMED polarity and *Arabidopsis* development via its own phosphorylation code[J]. The plant cell, 2021, 33(11): 3513-3531.
- [10] SHIMIZU Y, SINNETT J, TENGGARA M, et al. Protein kinase D1 (PKD1) signaling induces growth-promoting effects in murine enteroids[J]. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology, 2020, 10(2): 430-433.
- [11] HANKS S K, HUNTER T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification I [J]. The FASEB journal, 1995, 9(8): 576-596.
- [12] 何乐平, 张蕾. 植物钙依赖性蛋白激酶及其相关蛋白激酶(CD-PKs/CRKs)的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(18): 26-31, 51. HE L P, ZHANG L. Research progress of plant calcium-dependent protein kinases (CDPKs) and CDPK-related kinases (CRKs)[J]. Journal of anhui agricultural sciences, 2020, 48(18): 26-31, 51 (in Chinese with English abstract).
- [13] LI A, WANG X, LESEBERG C H, et al. Biotic and abiotic stress responses through calcium-dependent protein kinase (CD-PK) signaling in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant signaling & behavior, 2008, 3(9): 654-656.
- [14] IVASHUTA S, LIU J, LIU J, et al. RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development[J]. The plant cell, 2005, 17(11): 2911-2921.
- [15] YAMAUCHI T, YOSHIOKA M, FUKAZAWA A, et al. An NADPH oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions[J]. The plant cell, 2017, 29(4): 775-790.
- [16] RYUTA N, MASAHIRO E, NAOFUMI F, et al. Protein kinase C iota facilitates insulin-induced glucose transport by phosphorylation of soluble nSF attachment protein receptor regulator (SNARE) double C2 domain protein b[J]. Journal of diabetes investigation, 2019, 10(3): 591-601.
- [17] YOHTA F, TSUYOSHI I. Structural insights into a C2 domain protein specifically found in tardigrades[J]. Protein science, 2020, 30(2): 513-518.
- [18] YE Q, YU J T, ZHANG Z, et al. VvBAP1, a Grape C2 domain protein, plays a positive regulatory role under heat stress[J/OL]. Frontiers in plant science, 2020, 11: 544374 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.544374>.
- [19] HAO P, WANG H, MA L, et al. Genome-wide identification and characterization of multiple C2 domains and transmembrane region proteins in *Gossypium hirsutum* [J]. BMC genomics, 2020, 21(1): 1-16.
- [20] 肖瑞霞, 王新国, 夏国军, 等. 小麦逆境胁迫相关基因 *TaC2DP1* 的克隆及表达分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(8): 1463-1472. XIAO X R, WANG X G, XIA G J, et al. Cloning and expression analysis of a stress-related *TaC2DP1* gene from wheat[J]. Scientia agricultura sinica, 2015, 48(8): 1463-1472 (in Chinese with English abstract).
- [21] 张兰军, 姬飞腾, 王丽丽, 等. 复苏植物旋蒴苣苔 C2 结构域小蛋白 BhC2DP1 参与植物对 ABA 的反应[J]. 植物学报, 2012, 47(1): 11-27. ZHANG L J, JI F T, WANG L L, et al. A small C2-domain protein from the resurrection plant *Boea hygrometrica* promotes plant responses to abscisic acid[J]. Chinese bulletin of botany, 2012, 47(1): 11-27 (in Chinese with English abstract).
- [22] YANG S M, MA S Y, QIU R G, et al. Comparative analysis of RNA-Seq data reveals adventitious root development is mediated by ChIFNa in *Lotus japonicus* [J]. Biotechnology & biotechnological equipment, 2021, 35(1): 179-195.
- [23] QUINLAN A R, HALL I M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features[J]. Bioinformatics, 2010, 26(6): 841-842.
- [24] 杨芳, 杨仕梅, 罗雪, 等. 百脉根 Hsp70s 基因家族的生物信息学分析[J]. 山地农业生物学报, 2020, 39(5): 1-8. YANG F, YANG S M, LUO X, et al. Bioinformatics analysis of Hsp70s gene family in *Lotus japonicus* [J]. Journal of mountain agriculture and biology, 2020, 39(5): 1-8 (in Chinese with English abstract).
- [25] 唐永凯, 贾永义. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨[J]. 生物技术, 2008, 183: 89-91. TANG Y K, JIA Y Y. Method of processing real time PCR data[J]. Biotechnology, 2008, 18(3): 89-91 (in Chinese with English abstract).
- [26] 杨少彤, 刘宗林, 屈申, 等. FmJAZ1 基因瞬时感染水曲柳对 JA 通路相关基因表达的影响[J]. 广西植物, 2021, 41(4): 662-670. YANG S T, LIU Z L, QU S, et al. Effects of transient infection of FmJAZ1 gene on JA pathway related gene expression in *Fraxinus mandshurica* [J]. Guihaia, 2021, 41(4): 662-670 (in Chinese with English abstract).
- [27] 黄桂媛, 鞏克东, 杨财和, 等. 玉米中编码 C2 结构域蛋白基因 *Zmncp1* 的克隆及表达特性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(10): 4647-4655. HUANG G Y, HUI K D, YANG C H, et al. Cloning and expression characteristics of C2 domain protein gene *Zmncp1* in maize [J]. Genomics and applied biology, 2020, 39(10): 4647-4655 (in Chinese with English abstract).
- [28] RESH M D. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins [J]. Nature chemical biology, 2006, 2(11): 584-590.
- [29] 马佛明, 李辉亮, 郭冬, 等. 巴西橡胶树一个编码含有 C2 结构域蛋白 cDNA 的克隆及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1): 150-154. MA F M, LI H L, GUO D, et al. Cloning and expression of a C2-domain protein gene from *Hevea brasili-*

- iensis* [J]. *Genomics and applied biology*, 2010, 29 (1) : 150-154 (in Chinese with English abstract).
- [30] KIM Y C, KIM S Y, CHOI D, et al. Molecular characterization of a pepper C2 domain-containing SRC2 protein implicated in resistance against host and non-host pathogens and abiotic stresses [J]. *Planta*, 2008, 227(5) : 1169-1179.
- [31] HAZAK O, MAMON E, LAVY M, et al. A novel Ca²⁺-binding protein that can rapidly transduce auxin responses during root growth [J/OL]. *PLoS biology*, 2019, 17(7) : e3000085 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000085>.
- [32] 霍艳丽, 曲婷, 高凯, 等. 不同类型的少花蒺藜草种子萌发对水分和光照的响应 [J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(4) : 51-56. HUO Y L, QU T, GAO K, et al. Response of seed germination of different types of *Cenchrus incertus* to water and light [J]. *Journal of anhui agricultural sciences*, 2022, 50(4) : 51-56 (in Chinese with English abstract).

Cloning and function of *LcC2DP1* gene related to the adventitious root development in *Lotus corniculatus* L.

MA Siyu, XIAO Fangbin, LUO Xue, WEI Piao, SONG Li

The Key laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education) / Institute of Agro-bioengineering / College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract The *LcC2DP1* gene was cloned from the *Lotus corniculatus* L. by RACE method to study the function of C2 calcium dependent protein kinase gene *LcC2DP1* of *Lotus corniculatus* L. in the process of adventitious root development. The spatial expression mode of *LcC2DP1* gene was detected with qRT-PCR. The overexpression and function of *LcC2DP1* were identified by *Agrobacterium* mediated transient expression system. The results showed that the full length of *LcC2DP1* gene was 705 bp, encoding 235 amino acids. Its molecular weight was 25.95 ku, with the highest homology of *Medicago truncatula* (82%). It was continuously expressed during the differentiation of adventitious roots in *Lotus corniculatus* L.. The expression sites were roots, stems and leaves. Compared with wild-type parents (WT), the adventitious root differentiation of the *LcC2DP1* transgenic *Lotus corniculatus* L. plants (TP) was 1-2 days earlier. On the 9th to 15th day of adventitious root differentiation, the total root length was 168% and 155% of WT, the root volume was 249% and 161% of WT, and the number of root tips was 156% and 137% of WT, respectively. The total root length ($P < 0.01$), root volume ($P < 0.01$) and number of root tips ($P < 0.05$) of TP root had certain advantages of development, indicating that *LcC2DP1* gene may be related to the regulation of adventitious root development in *Lotus corniculatus* L..

Keywords *Lotus corniculatus* L. ; adventitious root development ; calcium-dependent protein kinase ; C2 domain protein ; gene cloning ; regulation of growth and development

(责任编辑:张志钰)