

大豆转录因子 GmbZIP60 对非生物胁迫的表达模式分析

邢锦城¹, 孙晨曦², 洪立洲¹, 许 玲³, 徐照龙³, 张大勇³

(1. 江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002; 2. 山东省环境规划研究院, 山东 济南 250101; 3. 江苏省农业科学院 农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210094)

摘 要: *bZIP* 基因在植物响应非生物胁迫过程中发挥重要的调控作用。前期试验已经从大豆中克隆到一个 *bZIP* 基因 *GmbZIP60* (Genebank Accession No: DQ787038), 并成功转化到拟南芥中。本研究在此基础上, 利用 qRT-PCR 和 GUS 组织化学染色法研究了高温 (37℃)、低温 (4℃)、干旱 (PEG6000)、NaCl (200 mmol·L⁻¹) 和 ABA (100 mg·L⁻¹) 处理对 *GmbZIP60* 表达的影响。结果表明: 高温、低温、干旱和 NaCl 胁迫处理下, *GmbZIP60* 表达量显著降低, 分别变为对照组的 0.07、0.25、0.36 和 0.13 倍, 而 ABA 处理对 *GmbZIP60* 表达量影响不显著, GUS 染色结果与荧光定量 PCR 结果一致。研究认为, *GmbZIP60* 可能以负调控的方式参与大豆抗高盐、干旱、高温、低温等非生物胁迫的应答反应。本研究为进一步鉴定和克隆大豆逆境应答关键基因、揭示大豆抗逆分子机制和大豆抗逆性基因工程改良提供了有益借鉴。

关键词: 大豆; *bZIP* 转录因子; 非生物胁迫

中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2018.01.0045

Expression Patterns of Soybean Transcription Factor GmbZIP60 in Response to Abiotic Stresses

XING Jin-cheng¹, SUN Chen-xi², HONG Li-zhou¹, XU Ling³, XU Zhao-long³, ZHANG Da-yong³

(1. Institute of Agricultural Sciences in Coastal Area of Jiangsu, Yancheng 224002, China; 2. Shandong Academy for Environmental Planning, Jinan 250101, China; 3. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210094, China)

Abstract: *bZIP* genes play significant roles in the response to abiotic stresses. We have cloned a *bZIP* gene named as *GmbZIP60* (Genebank, Accession, No: DQ787038) from soybean, and transformed it into *Arabidopsis thaliana*. Then on the base of these, this paper studied the *GmbZIP60* gene expression profiling in *Arabidopsis* seedlings under the treatments of PEG, high-temperature (37℃), low-temperature (4℃), high-salt (PEG6000) and ABA (100 mg·L⁻¹) by qRT-PCR and GUS histochemical staining. The fluorescence quantitative RT-PCR results showed that the expression of *GmbZIP60* genes were down-regulated by PEG, high-temperature, low-temperature and salt treatments respectively. The results of GUS staining were agree with fluorescence quantitative RT-PCR. This indicated that *GmbZIP60* might be involved in the responding to abiotic stresses such as high salinity, drought, high temperature and low temperature. This study laid the foundation for revealing the molecular mechanism of soybean resistance and genetic engineering improvement of soybean resistance.

Keywords: Soybean; *bZIP* transcription factor; Abiotic stress

大豆是我国重要的油料作物和经济作物。低温、高温、干旱和盐碱等非生物胁迫是当前导致大豆减产的主要因素。发掘大豆响应低温、高温、干旱和盐碱等非生物胁迫的关键基因, 培育具有综合抗性的优良品种对大豆生产意义重大^[1]。转录因子是非生物胁迫信号转导途径中的重要组成部分, 能够与真核基因启动子区域的顺式作用元件特异结合, 激活或抑制基因的转录与表达, 是植物抗逆性基因工程的重要目的基因^[2]。近年来 AP2/EREBP、MYB、NAC、WRKY 和 *bZIP* 等转录因子在植

物逆境响应中的功能获得广泛关注^[3], 尤其是在真核生物中分布最广、最保守的 *bZIP* 转录因子, 已被证明在植物响应多种逆境胁迫的过程中发挥重要作用^[4]。

目前在许多物种中对于 *bZIP* 转录因子的研究已经比较深入, 已发现拟南芥中含有 *bZIP* 转录因子 75 个^[5], 黄瓜中含有 *bZIP* 转录因子 64 个^[6], 水稻含有 *bZIP* 转录因子 89 个^[7], 高粱含有 *bZIP* 转录因子 92 个^[8], 玉米含有 *bZIP* 转录因子 125 个^[9]。对于 *bZIP* 转录因子功能的研究表明, *bZIP* 除在植物

收稿日期: 2017-08-09
基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目 [CX(15)1005]; 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20151301)。
第一作者简介: 邢锦城 (1983 -), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物逆境生理方面研究。E-mail: sdauxxx@163.com。
通讯作者: 张大勇 (1979 -), 男, 博士, 副研究员, 主要从事植物抗逆功能基因组学研究。E-mail: cotton.z@126.com。

多种发育过程中发挥作用外,也广泛参与了植物对于非生物胁迫的响应。如在拟南芥中过表达大豆 bZIP 转录因子编码基因 *GmbZIP4*、*GmbZIP46*、*GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 提高了转基因植株的耐盐性和抗寒性^[10]。在拟南芥中过表达小麦 bZIP 转录因子 *TabZIP60* 基因增强了转基因植株对干旱、高盐 and 低温的抗性^[12]。在水稻中克隆的 *OsbZIP16* 能够对水稻抗旱性进行正向调控,显著增强转基因水稻的抗寒性^[13]。在水稻中过表达水稻 bZIP 转录因子 *OsbZIP71* 基因,其耐旱、耐盐性均有显著增强,且该基因受干旱和 ABA 诱导,但受盐抑制^[14]。在烟草中过表达刚毛怪柳(*Tamarix hispida*) *ThbZIP*,转基因烟草的耐盐性显著提高^[15]。

课题组在前期研究中克隆到一个大豆 bZIP 基因 *GmbZIP60* (Genbank Accession No: DQ787038), 并成功转化到拟南芥中。本研究在此基础上,利用 RT-PCR 和 GUS 组织化学染色法研究高温、低温、干旱、NaCl 和 ABA 处理对 *GmbZIP60* 表达的影响,期望为进一步鉴定和克隆大豆逆境应答关键基因,揭示大豆抗逆分子机制和大豆抗逆性基因工程改良提供有益借鉴。

1 材料与方法

1.1 植物材料与菌株、试剂

试验使用的转 *GmbZIP60* 的拟南芥种子为江苏省农业科学院农业生物技术研究所在盐土农业研究室保存。

与试验相关的所有引物均由上海英潍生物技术有限责任公司合成, RNA 提取试剂盒购于 Promega 公司;凝胶回收试剂盒、质粒回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒购于上海捷瑞生物工程公司; DNA marker、*Taq* DNA 聚合酶、反转录试剂等其它生物学试剂购自上海皓嘉科技发展有限公司。

1.2 拟南芥幼苗的培养和处理

将拟南芥种子消毒后种于 1/2 MS 培养基中,待其长出 4 片叶子时移栽到含营养土和蛭石(1:2)的花盆中,置于相对湿度 70%,温度 22℃,16 h 光照/8 h 黑暗光周期下培养 7 d 后,选取长势一致的幼苗分别进行胁迫处理,每个处理选取 3 株幼苗。

高温处理:将转 *GmbZIP60* 的拟南芥植株置于温度 37℃ 下培养。低温处理:将转 *GmbZIP60* 的拟南芥植株置于温度 4℃ 下培养。盐处理:用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液浇灌,至盆底有液体渗出。干旱处理:幼苗根部完全放入 20% 的 PEG6000。

ABA 处理:用 100 mg·L⁻¹ ABA 溶液浇灌,至盆底有液体渗出。对照:相对湿度 70%,温度 22℃,16 h 光照/8 h 黑暗光周期下淡水正常浇灌培养。

在处理 0 和 6 h 取对照和处理组拟南芥植株整株放入离心管称重后液氮冻存,放于 -80℃ 冰箱中备用。

1.3 启动子序列作用元件分析

从大豆基因组中查找 *GmbZIP60* 基上游 2 000 bp DNA 序列,利用启动子序列搜索与 Plant CARE 软件分析,查找 *GmbZIP60* 启动子区域与应激反应相关的作用元件。

1.4 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 Promega RNA 提取试剂盒,提取对照和处理组拟南芥植株的总 RNA,按照 TaKaRa(公司) RNase-Free DNase I 试剂盒方法消化基因组 DNA 污染,按照 Promega(公司) M-MLV 反转录试剂盒操作说明合成单链 DNA, -20℃ 保存,用于基因胁迫表达特征分析。

1.5 基因表达分析

用 RT-PCR 的方法分析转基因植株中胁迫相关基因的表达情况,以拟南芥 *Actin* (GenBankNo: NM_115235) 为内参,正向引物:5'-CGAGGGCTGT-GTTTCCAAGT-3',反向引物:5'-TGTCCCATTCAACCATCACT-3'。根据 *GmbZIP60* 序列设计特异性引物,正向引物:5'-ATGGCTTCGATTCAACGCCC-3'和反向引物:5'-TCAAGCAAACAGGCCTTCATT-3',对照和每个胁迫处理分别提取 3 个植株,每个植株样品重复 2 次,采用 TaKaRa 公司购买的 SYBR Green Super Mix,反应程序参照 Roche 2.0 Real-Time PCR Detection System 设计,所有操作均按说明书进行。

1.6 GUS 染色

高温(37℃)、低温(4℃)、干旱(PEG6000)、NaCl(200 mmol·L⁻¹)和 ABA(100 mg·L⁻¹)处理和对照组分别选取 3 株进行 GUS 染色分析。将植株完全浸没在预冷的 90% 丙酮中,室温 20 min。用预冷的去离子水冲洗叶片,将植株浸没于 GUS 染色剂(磷酸钠 0.05 mol·L⁻¹ pH7.2,曲拉通-100 0.2%,亚铁氰化钾 0.005 mol·L⁻¹,铁氰化钾 0.005 mol·L⁻¹,X-Glu 0.002 mol·L⁻¹)中 37℃ 黑暗孵育过夜。处理后的植株分别在浓度为 25%、50% 和 70% 的乙醇洗脱 30 min 后,95% 的乙醇洗脱直至无叶绿素为止。

1.7 数据分析

数据分析采用 SPSS 13.0 进行,方差分析检验 LSD 均值在 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 启动子序列作用元件分析

利用启动子序列搜索和 Plant CARE 软件对

GmbZIP60 基因上游2 000 bp DNA 序列的分析表明,其中含有多个同低温、高温、光信号和 ABA 响应相关的作用元件或结合位点,同时含有与胁迫和防卫反应相关的顺式作用元件(表 1)。这意味着 *GmbZIP60* 可能在大豆响应低温、高温、干旱、ABA 等环境因子的过程中发挥作用。

表 1 与应激响应相关的作用元件
Table 1 Putative stress response-related cis-elements

作用元件名称 Acting element	序列 Sequence	功能 Function
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	与胁迫和防卫反应相关的顺式作用元件
LTR	CCGAAA	与低温胁迫响应相关的顺式作用元件
HSE	AAAAAATTTC	与高温胁迫相关的顺式作用元件
MBS	TAACTG	—
CAACTG	与干旱胁迫响应相关的 MYB 结合位点	—
ABRE	TACGTG	与 ABA 响应相关的顺式作用元件
ACE	AAAACGTTT	与光信号响应相关的顺式作用元件
ARE	TGGTIT	受厌氧环境诱导的顺式作用元件
CCAAT-box	CAACGG	MYBHv1 结合位点
MRE	AACCTAA	与光响应相关的 MYB 结合位点
TGACG-motif	TGACG	受茉莉酸甲酯诱导的顺式作用元件
CGTCA-motif	CGTCA	受茉莉酸甲酯诱导的顺式作用元件

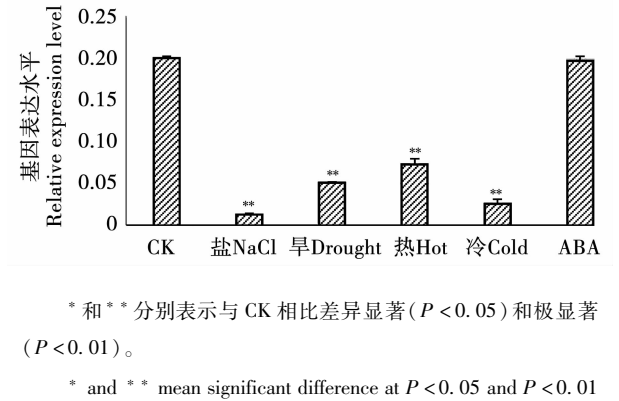
2.2 *GmbZIP60* 非生物胁迫表达分析

为了解 *GmbZIP60* 在不同胁迫处理下的表达水平差异,用 RT-PCR 的方法对处理 6 h 后各处理组和对照组拟南芥进行检测,结果表明,NaCl、干旱、高温和低温胁迫处理下,*GmbZIP60* 表达量显著降低,分别变为对照组的 6.55%、25.5%、36.7% 和 13.0%,而 ABA 处理对 *GmbZIP60* 表达量影响不显著,为对照组的 98.7% (图 1)。表明 *GmbZIP60* 通过负调控的方式参与了拟南芥对盐、旱、高温和低温胁迫的响应,而对 ABA 处理在表达水平上无明显响应。

2.3 GUS 染色结果分析

为进一步验证不同处理条件下 *GmbZIP60* 在拟南芥中的表达情况,利用 GUS 组织化学染色法对处理 6 h 后各处理组和对照组的拟南芥幼苗进行检测 GUS 染色结果(图 2)表明不同处理方式下 *GmbZIP60* 在拟南芥植株中的表达情况同 RT-PCR 结果基本相符,在对照和 ABA 处理下 *GmbZIP60* 在幼苗中的表达部位最多,根、叶柄和幼嫩叶片中都有明显表达;高温和干旱处理下的表达部位次之,高温处理下在根和部分叶柄中表达,干旱处理下 *GmbZIP60*

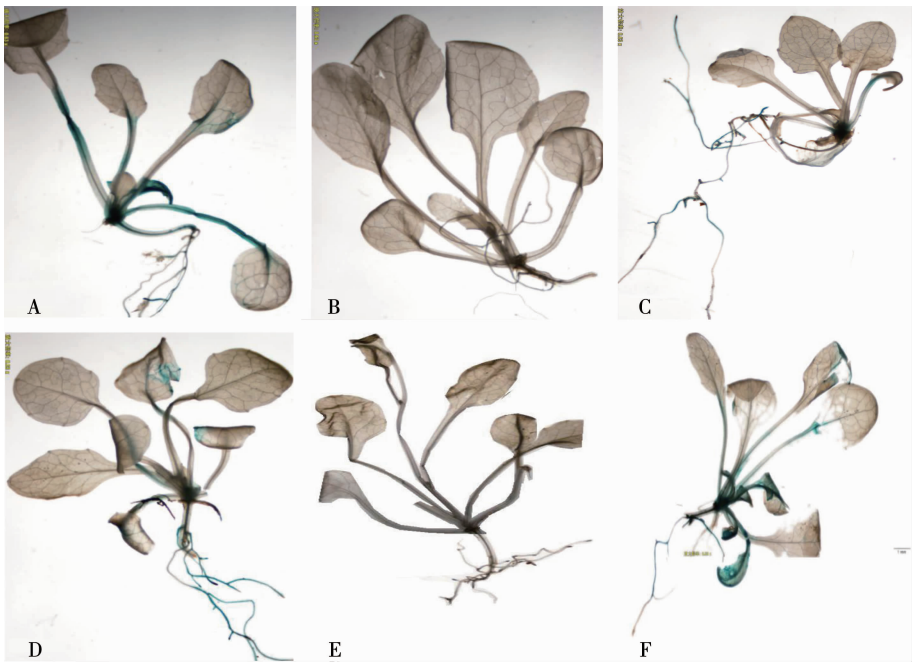
在根和叶柄基部有表达;而在 NaCl 处理和低温处理下,拟南芥幼苗未被染色,表明 *GmbZIP60* 在该处理下的表达水平较低。结果说明转录因子 *GmbZIP60* 通过负调控的方式参与了拟南芥对盐、旱、高温和低温胁迫的响应,而对 ABA 处理在表达水平上无明显响应。



* 和 ** 分别表示与 CK 相比差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。

* and ** mean significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$

图 1 不同非生物胁迫下拟南芥中的 *GmbZIP60* 表达差异
Fig. 1 Expression of *GmbZIP60* transcript abundance in *Arabidopsis thaliana* under different abiotic stresses



A:对照;B:200 mmol·L⁻¹ NaCl;C:干旱;D:高温;E:低温;F:100 mg·L⁻¹ ABA。
A: CK; B:200 mmol·L⁻¹ NaCl; C:PEG 6000; D:37℃; E:4℃; F:100 mg·L⁻¹ ABA.

图2 不同处理下拟南芥幼苗 GUS 染色结果

Fig.2 GUS staining results of *Arabidopsis thaliana* seedlings under different stresses

3 讨论

高温、低温、干旱和盐碱等非生物胁迫因子是影响植物生长发育和制约农作物产量与质量的重要因素^[17]。研究表明,植物在受到非生物胁迫后,可以在生理、生化和细胞分子水平上产生响应,而转录因子是响应过程中的重要环节,它们通过与逆境相关基因启动子区域的作用元件特异性结合,以正向或负向调控的方式影响胁迫相关基因的表达^[18]。bZIP 转录因子是其中一类最分布广泛、保守性强的转录因子基因,参与多种生物学进程^[19],在非生物逆境胁迫响应中发挥重要作用。

目前,国内外学者在大豆中鉴定出 131 个 bZIP 基因,命名为 *GmbZIPs*,其中 1/3 以上的 *GmbZIPs* 对 ABA、高盐、干旱和低温 4 种环境因子中的至少 1 种产生响应。本研究分析 *GmbZIP60* 转录因子在不同胁迫处理下的表达模式,表明该转录因子可以对高盐、干旱、高温、低温等非生物胁迫产生应答,这与国内外学者的研究基本一致。Liao 等^[20]将 *GmbZIP44*, *GmbZIP46*, *GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 转到拟南芥中过度表达,发现 4 种基因均能增强转基因拟南芥对高盐和低温胁迫的抗性,而 *GmbZIP44*, *GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 的过表达则能够减弱转基因拟

南芥对 ABA 的敏感性,意味着这 3 个基因有可能通过上调 *ABI1* 和 *ABI2* 基因的表达来参与对 ABA 信号转导途径的调控,从而对 ABA、盐和低温胁迫产生负调控效应。本研究中发现 *GmbZIP60* 转录因子在胁迫处理条件下表达量均下调,表明该转录因子也是以负调控的形式参与植物对胁迫因子的响应。

此外,对水稻 *bZIP* 基因的研究也表明负调控是 bZIP 转录因子响应环境因子和调控基因表达的重要方式。Liu 等^[21]将转 *OsbZIP52* 基因水稻幼苗和野生型水稻幼苗暴露于空气中 10 h,正常条件恢复 7 d 后,转基因植株中干旱胁迫相关基因如 *OsTPPI* 表达下调,且转基因植株的存活率显著低于野生型植株。Zou 等^[22]用 15% 的 PEG 溶液处理 *OsABI5* 转基因和野生型水稻幼苗各 5 d 后发现,过表达的转基因植株和野生型植株生长无明显差别,而干扰的转基因植株则表现出较高的耐受性;用 250 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 25 d 结果表明,过表达转基因植株萎蔫,而干扰植株生长良好,表现出对盐胁迫的耐受性。本研究对 *GmbZIP60* 响应非生物胁迫的表达模式与上述研究结论相似,*GmbZIP60* 可能通过负调控的方式参与植物对外界环境因子的响应,调控非生物胁迫相关的基因表达,但其调控机制还有待进一步研究。

4 结 论

本研究通过 RT-PCR 和 GUS 组织化学染色法等方法,对大豆 *bZIP* 基因 *GmbZIP60* (Genebank Accession No: DQ787038) 的逆境响应模式进行分析,结果表明:高盐、干旱、高温、低温等非生物胁迫处理条件下 *GmbZIP60* 表达量显著降低,ABA 处理条件下 *GmbZIP60* 表达量无显著变化,GUS 染色结果与荧光定量 PCR 结果一致,这表明 *GmbZIP60* 可能通过负调控的方式参与大豆抗高盐、干旱、高温、低温的应答反应,其调控机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 盖钧镒. 发展我国大豆遗传改良事业解决国内大豆供给问题[J]. 中国工程科学,2003,5(5):1-5. (Gai J Y. Expanding and enhancing the research allocation on soybean breeding and genetics for the establishment of market supply based on domestic production[J]. Engineering Science,2003,5(5):1-5.)
- [2] Perez-Rodriguez P, Riano-Pachon D M, Correa L G, et al. PlnT-FDB: Updated content and new features of the plant transcription factor database[J]. Nucleic Acids Research,2010,38:822-827.
- [3] Xu Z S, Chen M, Li L C, et al. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53: 570-575.
- [4] Kim S, Kang J Y, Cho D I, et al. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its over-expression affects multiple stress tolerance[J]. The Plant Journal, 2004, 40(1): 75-87.
- [5] Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends in Plant Science,2002,7(3): 106-111.
- [6] Baloglu M C, Eldem V, Hajyzadeh M, et al. Genome wide analysis of the bZIP transcription factors in cucumber[J]. PLoS One, 2014,9(4):e96014.
- [7] Nijhawan A, Jain M, Tyagi A K, et al. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice[J]. Plant Physiology, 2008,146(2):330-350.
- [8] Wang J Z, Ghou J X, Zhang B L, et al. Genome-wide expansion and expression divergent of the basic: Leuoine zipper transition factors in higher plants with an emphasis on sorghum[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2011,53(3):212-231.

- [9] Wei K, Chen J, Wang Y, et al. Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize [J]. DNA Research, 2012, 19 (6): 463-476.
- [10] Liao Y, Zou H F, Wei W, et al. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta, 2008,228(2):225-240.
- [11] Zhang L, Zhang L, Xia C, et al. A novel wheat bZIP transcription factor *TabZIP60* confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology,2015,153(4):538-554.
- [13] Chen H, Chen W, Zhou J, et al. Basic leucine zipper transcription factor *OsbZIP16* positively regulates drought resistance in rice [J]. Plant Science,2012,193-194:8-17.
- [14] Liu C, Mao B, Ou S, et al. *OsbZIP71* a bZIP transcription factor confers salinity and drought stress response in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2014,84(12):19-36.
- [15] Wang Y, Gao C, Liang Y, et al. A novel *bZIP* gene from *Tamarix hispida* mediates physiological responses to salt stress in tobacco plants [J]. Journal of Plant Physiology,2010,167: 222-230.
- [16] Xu L, Xu Z L, Liu X Q, et al. The subcellular localization and ectopic expression analysis in *Arabidopsis* of soybean *GmbZIP60* gene [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2015, 24 (1):9-17.
- [17] Zhang X, Wang L, Meng H, et al. Maize *ABP9* enhances tolerance to multiple stresses in transgenic *Arabidopsis* by modulating ABA signaling and cellular levels of reactive oxygen species [J]. Plant Molecular Biology,2011,75(4-5):365-378.
- [18] Zou J, Liu C, Liu A, et al. Overexpression of *OsHsp17.0* and *OsHsp 23.7* enhances drought and salt tolerance in rice [J]. Journal of Plant Physiology, 2012,169:628-635.
- [19] Zhou T, Yang X, Wang L, et al. *GhTZF1* regulates drought stress responses and delays leaf senescence by inhibiting reactive oxygen species accumulation in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 85 (1-2):163-177.
- [20] Liao Y, Zou H F, Wei W, et al. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta,2008, 228:225-240.
- [21] Liu C, Wu Y, Wang X, et al. A bZIP transcription factor *OsbZIP52/RISBZ5*: A potential negative regulator of cold and drought stress response in rice [J]. Planta,2012,235 (6): 1157-1169.
- [22] Zou M, Guan Y, Ren H, et al. A bZIP transcription factor, *OsAB15*, is involved in rice fertility and stress tolerance [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 66 (6):675-683.