



# 大豆 bZIP 转录因子基因 *GmbZIP33* 的克隆与功能分析

张 蕾<sup>1</sup>, 陈昕涛<sup>1,2</sup>, 白丽娟<sup>1,2</sup>, 王志莉<sup>3</sup>, 冯永君<sup>1</sup>, 吴存祥<sup>2</sup>

(1. 北京理工大学 生命学院, 北京 100081; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; 3. 香港中文大学 生命科学学院, 香港 999077)

**摘 要:**碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)蛋白是真核生物所特有的一类转录因子,广泛参与植物生长、发育、生理代谢的调控过程。为探究大豆 bZIP 转录因子的功能,本研究通过 PCR 技术从大豆中克隆 bZIP 转录因子编码基因 *GmbZIP33*(*Glyma.03G219300.1*),利用生物信息学方法对该基因及其编码的蛋白质进行分析,利用荧光定量 PCR 检测该基因的时空表达模式及其对逆境的响应能力,通过创制 *GmbZIP33* 过表达拟南芥植株分析其对植株表型与开花相关基因的影响。结果表明:*GmbZIP33* 基因位于大豆第 3 号染色体上,编码区全长 453 bp。*GmbZIP33* 与 bZIP 转录因子家族的 *GmbZIP41* 序列同源性高达 91.4%,属于 S-bZIPs 亚族成员。*GmbZIP33* 响应高盐、干旱胁迫,其在叶片中表达量最高,且在短日条件下表现出明显的昼夜节律模式,推测其可能参与到光周期调控开花的复杂网络中。通过拟南芥植物异位过表达 *GmbZIP33* 发现,转基因拟南芥植株表现出早花表型且引起 *FT* 等开花相关基因表达量上升,说明 *GmbZIP33* 可参与到拟南芥的开花调控途径中并有效促进植物开花,本研究对深入理解 *GmbZIP33* 转录因子在植物生长发育过程中的多调控性能奠定了基础。

**关键词:**转录因子;*GmbZIP33*;非生物胁迫;开花;拟南芥

## Cloning and Functional Analysis of *GmbZIP33* Encoding bZIP Transcription Factor from Soybean

ZHANG Lei<sup>1</sup>, CHEN Xintao<sup>1,2</sup>, BAI Lijuan<sup>1,2</sup>, WANG Zhili<sup>3</sup>, FENG Yongjun<sup>1</sup>, WU Cunxiang<sup>2</sup>

(1. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; 2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China; 3. School of Life Science, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

**Abstract:** Basic leucine zipper (bZIP) proteins are transcription factors unique to eukaryotes being widely involved in the regulation of plant growth, development and physiological metabolism. To investigate the function of bZIP transcription factors, this study cloned *GmbZIP33*(*Glyma.03G219300.1*) gene encoding the bZIP transcription factor from soybean using PCR. Bioinformatics method was used to analyze the gene and its encoded protein, and qRT-PCR was used to detect the spatiotemporal expression patterns of the gene and its responsiveness to stress. *Arabidopsis thaliana* with heterotopic overexpression of *GmbZIP33* was constructed to analyze the effects of *GmbZIP33* on plant phenotype and the expression of flowering-related genes. The results showed that: *GmbZIP33* is located on the chromosome 3, with an encoding region of 453 bp, and *GmbZIP33* has 91.4% homology with *GmbZIP41* of the S-bZIP transcription factor family, indicating that it belongs to the S-bZIPs subfamily. It was found that *GmbZIP33*, which exhibited the highest expression level in leaves, is responsive to high salt and drought stress. Additionally, *GmbZIP33* was demonstrated an obvious circadian rhythm under short day conditions, suggesting its potential involvement in the photoperiod regulation of the flowering complex network. *A. thaliana* with heterotopic overexpression of *GmbZIP33* was constructed, and the transgenic plants exhibited an early flowering phenotype with increased expression of flowering related genes (such as *FT*, etc.), indicating that *GmbZIP33* is involved in the flowering regulation pathway of *A. thaliana* and effectively promotes plant flowering. This study provides a foundation for further understanding of the multifunctional regulatory role of *GmbZIP33* transcription factor in plant growth and development.

**Keywords:** transcription factor; *GmbZIP33*; abiotic stress; flowering; *Arabidopsis thaliana*

碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子是真核生物中一类分布广范且氨基酸序列较为保守的蛋白质<sup>[1-2]</sup>,包含两个保守结构域:一个是具有二聚体化作用的亮氨酸拉链结构域,另一个是与 DNA 序列特异性结合的碱性区域<sup>[3-4]</sup>。亮氨酸拉链结构域能够形成 1 个具有两亲性的  $\alpha$  螺旋,通过形成二聚体与

DNA 结合,再通过 DNA 结合结构域上 1 个固定的 N-x7-R/K 结构专一性地识别并结合启动子上的顺式作用元件<sup>[3]</sup>。根据碱性结构域的特性,Jakoby 将拟南芥的 75 个 bZIP 转录因子划分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 及 S 亚家族<sup>[2]</sup>,它们参与植物种子发育、病菌防御、光信号转导、器官和组织分化、激素和糖

收稿日期:2022-04-19

基金项目:现代农业产业技术体系专项(CARS-04)。

第一作者:张蕾(1998—),女,硕士,主要从事大豆发育生物学研究。E-mail:15063392588@163.com。

通讯作者:吴存祥(1969—),男,博士,研究员,主要从事大豆栽培、育种研究。E-mail:wucunxiang@caas.cn;

冯永君(1973—),男,博士,教授,主要从事植物内生菌研究。E-mail:fengyj@bit.edu.cn。

信号转导过程以及非生物胁迫响应等多种生理功能的调控<sup>[5-10]</sup>。其中,成员较多的 S 亚族在非生物胁迫响应、病虫害的防御以及糖类信号转导中具有重要作用<sup>[11-13]</sup>,研究最多的 A 亚族成员主要参与 ABA 和逆境胁迫的调控表达<sup>[14-16]</sup>,G 亚族则主要参与光信号调控<sup>[17]</sup>。随着分子生物学和生物信息学研究快速发展,转录组水平的鉴定技术越来越成熟,bZIP 转录因子的相关研究也逐步深入。

大豆[ *Glycine max* (Linn.) Merr. ] 是重要的经济和油料作物,也是人类食用及家畜饲用蛋白质的主要来源。根据生物信息学分析,大豆中存在 143 个 bZIP 基因 (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>), Liao 等<sup>[18]</sup> 根据这些转录因子的保守碱性结构域以及其它结构特征将其中的 131 个 bZIP 转录因子分为 A-I 及 S 共 10 个亚族,其中部分基因已被发现参与了植物对逆境胁迫的响应及生长发育调控。例如,大豆 bZIP 转录因子 GmbZIP132 的转录可以被高盐和干旱诱导<sup>[19]</sup>,而 bZIP 转录因子 GmFDL19 通过与 GmFT2a、GmFT5a 蛋白的互作诱导植物早花<sup>[20]</sup>。Song 等<sup>[21]</sup> 发现过表达 *GmbZIP123* 的转基因拟南芥种子脂质含量升高,同时,在转基因种子中也发现了较高水平的葡萄糖、果糖和蔗糖,这进一步表明 bZIP 基因在植物的代谢过程中具有重要的调节作用。

本研究从大豆克隆了 1 种新型 bZIP 家族转录因子编码基因 *GmbZIP33*,通过非生物胁迫下表达分析、时空表达分析及拟南芥异位表达分析等技术对该基因进行了初步研究,发现 *GmbZIP33* 可能在大豆的非生物胁迫响应与开花调节过程中发挥重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究选用大豆光周期敏感品种自贡冬豆作为研究材料,为本实验室保存。

### 1.2 试验设计

将大豆播种于浸湿水的蛭石中,于长日(16 h 光照/8 h 黑暗)的光照培养箱中培养至子叶展开,选择长势一致的幼苗移入盛有 100 mL Hoagland 培养液的锥形瓶(外包锡箔纸模拟根的生长环境)中继续培养。

高盐与干旱胁迫处理:待自贡冬豆幼苗生长至第一对三出复叶完全展开时,分别移入含有 0,50 和

200 mmol · L<sup>-1</sup> 共 3 种不同浓度 NaCl 和 0%、10%、20% 3 种不同浓度 PEG6000 Hoagland 培养液中,进行高盐和干旱胁迫处理,其中以 0 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 和 0% PEG6000 为对照,光照处理 6 h 后随机选择 3 株长势相同的植株,进行根、茎、叶取样,各组样品用液氮冷冻并于 -70 ℃ 保存。

短日照与长日照条件培养:分别在长日照(16 h 光照/8 h 黑暗)和短日照(12 h 光照/12 h 黑暗)条件下盆栽播种自贡冬豆,待生长至第一对三出复叶完全展开时,一部分光照 6 h 后随机选择 3 株长势相同植株进行根、茎、叶、茎尖、胚轴取样;另一部分从光照开始时随机选择 3 株长势相同植株,每隔 3 h 进行叶片取样,连续取至 48 h,各组样品用液氮冷冻并于 -70 ℃ 保存。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 *GmbZIP33* 基因的克隆与生物信息学分析

以自然培养的自贡冬豆叶片为材料,用 RNA 提取试剂盒(TransZol UP,TransGen Biotech)提取样品总 RNA,并用 DNase I(TransGen Biotech)纯化。使用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(天根生化科技有限公司)合成第一条链 cDNA,作为基因扩增的模板。用基因特异性引物 GmbZIP33-F1 和 GmbZIP33-R1(表 1)和高保真 KOD-plus-Neo 聚合酶(Toyobo)进行基因扩增。反应程序为:94 ℃ 预变性 2 min,之后进入循环程序 98 ℃、10 s,55 ℃、30 s,68 ℃、30 s,循环 35 次,最后 68 ℃ 延伸 10 min。用琼脂糖凝胶(1%)电泳回收目的条带并连接 pLB 载体,转化大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ ,经菌液 PCR 筛选阳性克隆,送至生工生物工程股份有限公司测序验证。

利用大豆基因组数据库 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.Html>) 搜索 *GmbZIP33* 基因及其所编码的蛋白序列;通过 EXPASy 的 ProtParam tool 在线程序预测蛋白的理化性质;使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线软件预测蛋白的保守结构域;使用 NCBI 数据库对 *GmbZIP33* 和其它植物 bZIP 蛋白进行多重比对;使用 MEGA 7.0 构建系统发育进化树。

1.3.2 大豆 *GmbZIP33* 基因表达量分析 采用实时荧光定量 PCR 分析 *GmbZIP33* 基因表达量,在非生物胁迫试验中,以高盐与干旱处理条件下的大豆和对照组的叶片为材料提取 RNA,反转录为 cDNA (方法同上)。

*GmbZIP33* 基因的时空表达模式分析:分别以

长日照与短日照下处理的大豆叶片为材料提取 cDNA。采用 KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Master Mix Universal 系统进行 qPCR 扩增,反应体系含 cDNA 1 μL、qPCR Master Mix 5 μL、引物(10<sup>-6</sup> μmol · μL<sup>-1</sup>) 各 0.2 μL、ddH<sub>2</sub>O 3.6 μL。以大豆基因 *GmACTIN* 为内参基因,以 q-*GmbZIP33*-F1 和 q-*GmbZIP33*-R1 为引物(表 1),用 AppliedBiosystems 公司 Quantstudio 7 Flex PCR 仪检测 *GmbZIP33* 基因表达情况。反应程序为: 95 ℃、3 min;95 ℃、3 s,60 ℃、20 s,共 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法<sup>[22]</sup> 分析基因相对表达量。

1.3.3 *GmbZIP33* 转基因拟南芥纯合株系的获得  
根据 *GmbZIP33* 基因序列,设计引物 *GmbZIP33*-F3 和 *GmbZIP33*-R3(表 1)。以前期测序正确的 pLB-*GmbZIP33* 质粒为模板进行 PCR 扩增,利用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切 pTF-101 载体,回收相应的目标基因和载体骨架,过表达载体植物 pTF101-*GmbZIP33*。构建植物过表达载体转入脓杆菌

GV3101 感受态,得到的脓杆菌阳性菌液,采用花序侵染法侵染野生型拟南芥,收获成熟 T<sub>0</sub>代种子。T<sub>0</sub>种子经消毒后点播在含筛选剂(SPE 抗生素)的 1/2 MS 培养基,种植收获 T<sub>1</sub>代种子。同样方法种植 T<sub>1</sub>代种子,收获分离比为 3:1 的 T<sub>2</sub>代种子,按同样的方法筛选得到不再发生分离的 T<sub>3</sub>纯系,纯合株系用于后续开花表型鉴定。

1.3.4 转基因拟南芥开花表型统计及开花基因表达量检测  
将 T<sub>3</sub>代转 *GmbZIP33* 基因的拟南芥和野生型种子以 70% 酒精 30 s、7% NaClO 15 min 消毒后,播种在不含抗生素的 MS 培养基上,待叶 4 ~ 6 片展开时,移栽至土壤中培养。待植株抽蘖开花时,分别统计各株系的开花时间和莲座叶叶片数。另外,盆栽种植 T<sub>3</sub>代纯合的转 *GmbZIP33* 基因株系和野生型拟南芥,22 ℃培养 20 d 后取样。分别提取样品总 RNA,反转录成 cDNA,采用 qRT-PCR 反应体系及程序检测 *GmbZIP33* 和内源开花基因表达量,以拟南芥 *AtACTIN* 为内参基因(表 1)。

表 1 试验所用引物  
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence (5' - 3')	用途 Application
<i>GmbZIP33</i> -F1	TCTAGAAATGGCATCACCGATCCAA CAACA	基因克隆
<i>GmbZIP33</i> -R1	GAGCTCTCAACGCAGAAACATGTTTGCGG	Gene cloning
q- <i>GmbZIP33</i> -F1	TGGATCTGAAGGAGGAGATCCG	qPCR 表达分析
q- <i>GmbZIP33</i> -R1	GGCCAGTTCCATTTGTCTGTG	Expression analysis of qPCR
<i>At-GmbZIP33</i> -F	TGGATCTGAAGGAGGAGATCCG	
<i>At-GmbZIP33</i> -R	GGCCAGTTCCATTTGTCTGTG	
<i>At-CO</i> -F	CATTAAACCATAACGCATACATTTC A	
<i>At-CO</i> -R	CTCCTCGGCTTCGATTCTC	
<i>At-FT</i> -F	GAACAACCTTTGGCAATGAGA	
<i>At-FT</i> -R	TCTTCTCCGCAGCCACT	
<i>At-SOC1</i> -F	CTAAACGTAAACTCTTGCGA	
<i>At-SOC1</i> -R	CAGAACTTGGGCTACTCTCT	
<i>At-API</i> -F	ATGAGAGGTACTCTTACGCCG	
<i>At-API</i> -R	TTGCTTGCAAGTCTTCCCCA	
<i>At-LFY</i> -F	TAACGGCAACGGAGGTAGTG	
<i>At-LFY</i> -R	CCTTGGTGGGGCATTTTTCG	
<i>GmACTIN</i> -F	CGGTGGTTCTATCTTTGGCATC	qPCR 内参基因
<i>GmACTIN</i> -R	GTCCTTTCGCTTCAATAACCCTA	Reference gene for qPCR
<i>AtACTIN</i> -F	AAGTCTTGTTCACGCCCTCG	
<i>AtACTIN</i> -R	TTTGCTCATACGGTCAGCGA	

2 结果与分析

2.1 *GmbZIP33* 基因克隆与序列分析

以正常培养的自贡冬豆叶片 cDNA 为模板,PCR 扩增得到长度约为 500 bp 的片段(图 1)。经测序验证该片段序列与 *GmbZIP33* (GenBank 登录号:DQ787064.1)一致。

NCBI 数据库等显示,*GmbZIP33* 基因位于大豆第 3 号染色体,编码区全长 453 bp,编码蛋白含有 150 个氨基酸,理论分子量为 17.017 kD。SMART 在线软件分析表明 *GmbZIP33* 编码的氨基酸序列具有 bZIP 转录因子结构特点,其 N 端含有 1 个 BRLZ (the basic region leucin zipper domain) 结构域(图 2A),由位于第 25 位的异亮氨酸(I)和位于第 89 位的任意氨基酸(X)组成。其中,负责与 DNA 结合的碱性结构域有 1 个保守的 N-x7-R/K-x9 基序,能形成二聚化区域的亮氨酸拉链,由 7 个氨基酸组成 1 个重复单位,且该重复单位的第 7 位均是亮氨酸(图 2B)。这些结构都符合已报道的 bZIP 转录因子结构特点。

利用 NCBI 数据库等将 *GmbZIP33* 与其它植物的 bZIP 同源蛋白氨基酸序列进行多重序列比对,发现 *GmbZIP33* 与大豆 S-bZIPs 亚族 *GmbZIP41* 和 *GmbZIP53* 的氨基酸序列同源性分别为 91.4% 和 69.01%,与 *AdbZIP53*、*TcbZIP53*、*GmbZIP60*、*GmbZIP59*、

*CsbZIP53*、*RcbZIP23* 和 *AtbZIP53* 氨基酸序列的同源性分别为 78%、62%、62%、61%、61%、60% 和 51% (图 2B)。系统发育分析也表明,*GmbZIP33* 与 *GmbZIP41*、*GmbZIP53* 的亲缘关系最近(图 3)。综合上述结果,判断 *GmbZIP33* 可能为大豆 S-bZIPs 亚族成员。

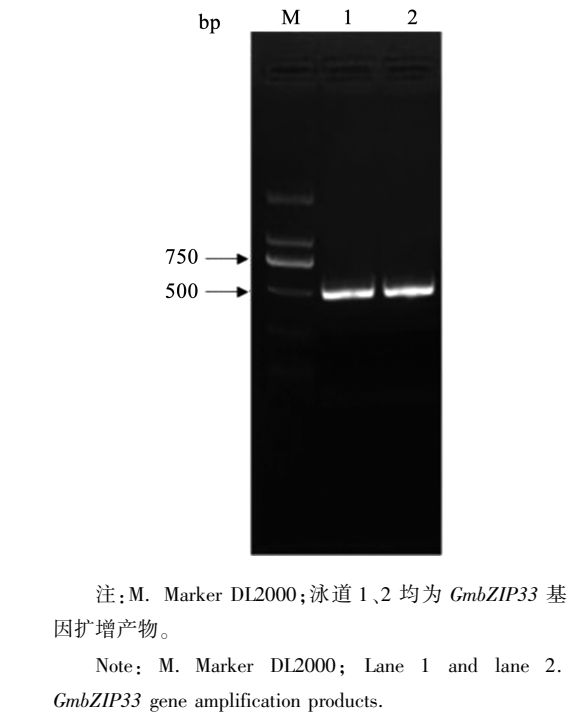


图 1 *GmbZIP33* 基因的克隆  
Fig.1 Cloning of *GmbZIP33*

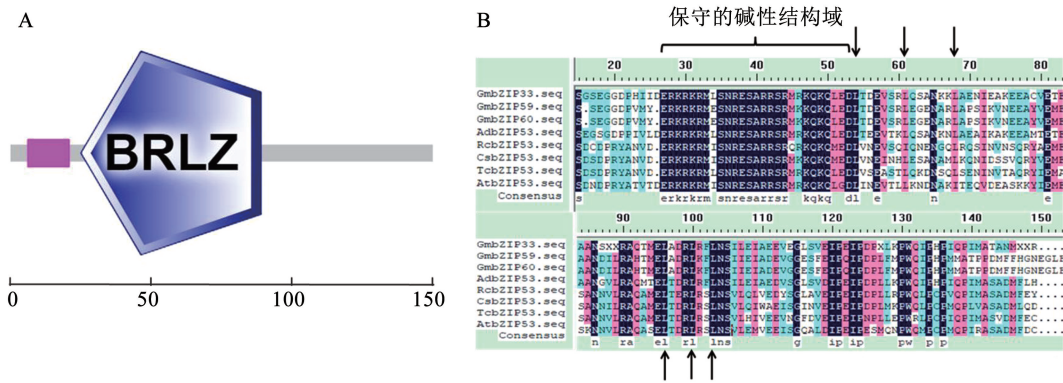


图 2 *GmbZIP33* 结构域及与多种植物 bZIP 蛋白氨基酸序列比对  
Fig.2 *GmbZIP33* domain and amino acid sequence comparison with bZIPs in plants



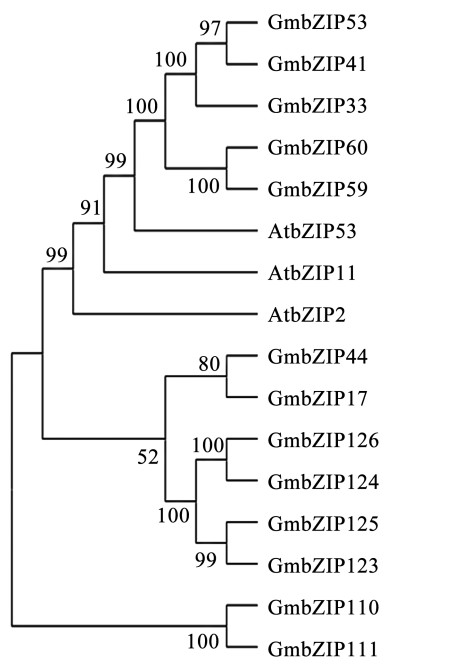
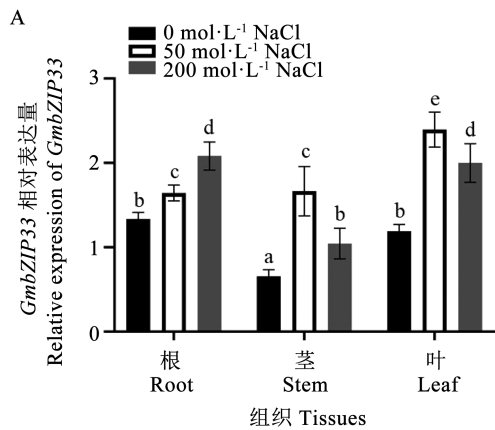


图3 GmbZIP33 和大豆、拟南芥 S-bZIP 亚家族系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of GmbZIP33 with the S-bZIPs subfamily of soybean and *A. thaliana*



2.2 大豆 *GmbZIP33* 基因在胁迫条件下的表达

前期研究中发现 *GmbZIP33* 启动子区存在盐诱导元件 GT1GMSCAM4、脱水应答元件 MYB1AT、渗透胁迫应答元件 MYB2AT 等多个顺式作用元件<sup>[23]</sup>,为探究该基因是否对盐和干旱胁迫产生应答,本研究选择不同浓度 NaCl 与 PEG6000 模拟盐胁迫和干旱条件,处理自贡冬豆幼苗材料。利用 qPCR 分析 *GmbZIP33* 基因对高盐和干旱处理的应答,发现不同胁迫条件处理下,同一组织中 *GmbZIP33* 表达量不同;同一胁迫条件处理下,不同组织中 *GmbZIP33* 响应程度也不同。其中,在 NaCl 处理下,茎和叶较根更为敏感,随着盐浓度的不断增加,茎和叶中 *GmbZIP33* 的表达量先升后降,而根中持续上升。在 PEG6000 处理下, *GmbZIP33* 在根中的响应较茎、叶中更为敏感,随着 PEG6000 浓度的升高, *GmbZIP33* 基因在根中表达变化较茎、叶更为明显(图 4)。说明 *GmbZIP33* 基因能够感受外源高盐和干旱信号,从而调节自身的表达量。

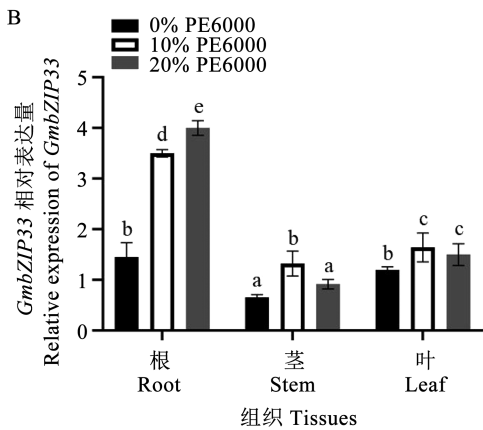


图4 不同浓度 NaCl 和 PEG6000 处理下 *GmbZIP33* 的相对表达量

Fig.4 Relative expression of *GmbZIP33* under different concentrations of NaCl and PEG6000

2.3 *GmbZIP3* 基因的时空表达模式分析

以长日照和短日照处理下的自贡冬豆为材料,利用 qPCR 探究 *GmbZIP33* 在大豆中的时空表达模式的结果显示, *GmbZIP33* 在不同组织中均有一定的表达量,其在叶片中表达量最高(图 5A)。检测 *GmbZIP33* 在 48 h 内的昼夜表达模式发现,长日条件下 *GmbZIP33* 的表达量在前 12 h 呈下降趋势,而后波动趋于平缓,24 h 内的表达出现两次峰值,但由于两天内峰值的出现时间点不同,所以该基因响应昼夜节律不明显。短日条件下的 *GmbZIP33* 表达波动较大,且两天时间内 *GmbZIP33* 的表达规律走

向吻合度高,具有典型的昼夜节律性(图 5B)。上述结果表明, *GmbZIP33* 基因对短日照下昼夜时长的变化更敏感,推测其可能参与到大豆生物钟以及光周期调控开花的复杂网络中。

2.4 *GmbZIP33* 转化拟南芥及相关功能分析

为进一步研究 *GmbZIP33* 转录因子的功能,构建了 *GmbZIP33* 的过表达载体,采用农杆菌转化法转化拟南芥获得纯合单拷贝  $T_3$  代过表达拟南芥株系。观察  $T_3$  代转 *GmbZIP33* 基因拟南芥和野生型拟南芥的表型发现,转 *GmbZIP33* 基因拟南芥比野生型拟南芥更早抽薹且呈早花表型(图 6A)。在植

株抽薹开花时统计开花时间和莲座叶叶片数,发现转基因株系的开花时间均较野生型拟南芥缩短了 18.3%~22.5% (图 6C),且莲座叶叶片数也显著减少(图 6D),说明 *GmbZIP33* 参与拟南芥的开花调控途径并有效地促进其开花。在光周期途径中,作为调控植物开花的关键基因,*CO* 接受光周期信号,激活并促进成花转换,启动花发育过程的 *FT* 基因表达,*FT* 将开花途径中的多种信号整合并上调下游 *SOC1* 和花分生组织特性基因 *API* 的表达,

再由它们调控其他花分生组织特性基因 *LFY* 等,最终促进植物开花<sup>[20]</sup>。qPCR 检测转基因株系以上内源开花相关基因表达量发现,*GmbZIP33* 基因在拟南芥中异位表达后,引起拟南芥内源开花,促进基因 *CO*、*FT*、*SOC1*、*API* 和 *LFY* 表达量升高(图 6B),其中,开花关键基因 *FT* 显著升高了 118.66%,这些基因编码的蛋白在拟南芥自身复杂的开花调控网络中发挥作用,从而使植株表现出早花表型。

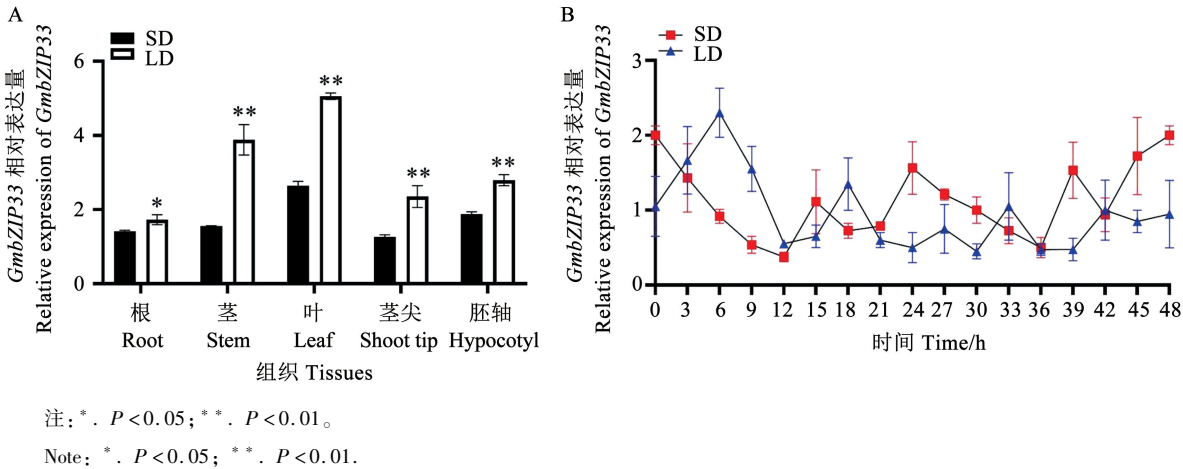
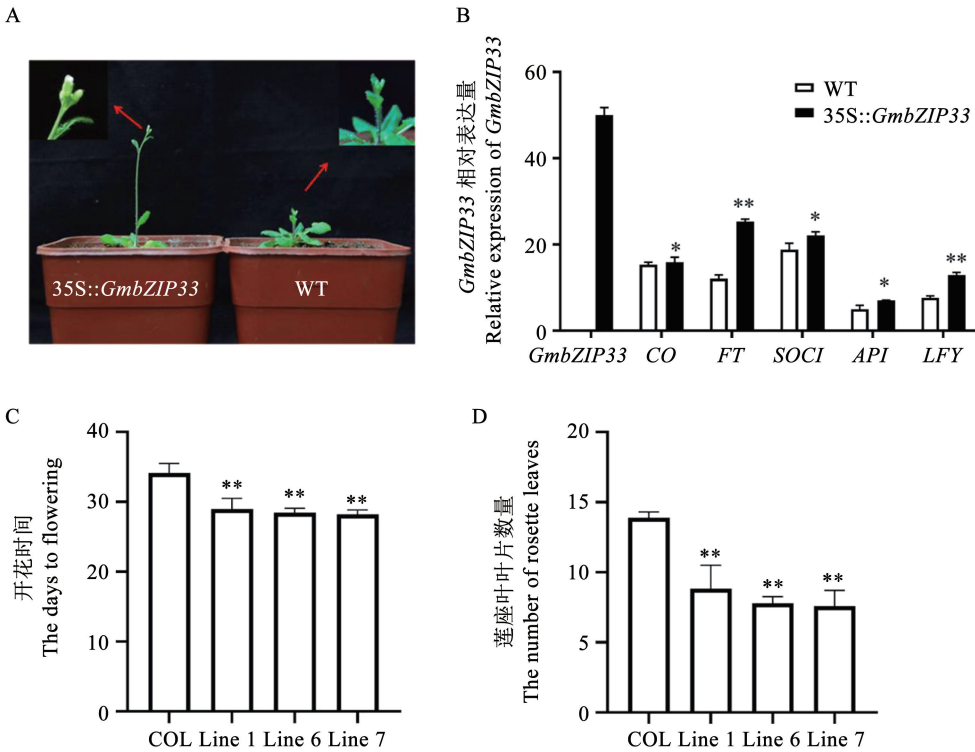


图 5 *GmbZIP33* 基因的时空表达模式  
Fig. 5 Spatiotemporal expression patterns of *GmbZIP33*



注:COL. 野生型拟南芥;Line 1、6、7. 转基因拟南芥; \* .  $P < 0.05$ ; \*\* .  $P < 0.01$ .  
Note:COL. Wild *A. thaliana*; Line 1, 6 and 7. *GmbZIP33* transgenic *A. thaliana*; \* .  $P < 0.05$ ; \*\* .  $P < 0.01$ .

图 6  $T_3$  代转基因拟南芥表型观察与开花相关基因表达量检测  
Fig. 6 Phenotype observation and flowering-related gene expression detection of  $T_3$  transgenic *A. thaliana*

3 讨论

碱性亮氨酸拉链 (bZIP) 家族转录因子在真核生物中广泛分布、相对保守,它们在植物的生长发育、应对胁迫中起到重要作用<sup>[24-25]</sup>。本研究从自贡冬豆中克隆出 1 个新型 bZIP 成员基因 *GmbZIP33*,氨基酸序列分析发现,*GmbZIP33* 蛋白具有保守的 bZIP 结构域,与 S-bZIPs 亚族 *GmbZIP41* 序列同源性最高,推断可能属于大豆 S-bZIPs 亚族成员。目前,大豆中关于 bZIP 转录因子的研究主要集中于响应生物或非生物胁迫应答等方面,研究发现大豆中超过 1/3 的 *GmbZIPs* 基因对 ABA、干旱、高盐和低温等具有应激响应,如 *GmbZIP60* 可能以负调控的方式参与大豆抗高盐、干旱、高温等非生物胁迫的应答反应<sup>[26]</sup>,转 *GmbZIP132* 基因拟南芥对盐胁迫的耐受性提高<sup>[19]</sup>,过表达 *GmbZIP1* 基因的拟南芥对 ABA 的响应强烈,并在胁迫条件下诱导植物气孔的关闭<sup>[27]</sup>。植物在自然环境中生长经常会面对高盐、干旱等非生物胁迫,结合前期研究发现的 *GmbZIP33* 启动子区存在盐诱导元件、脱水应答元件、渗透胁迫应答元件等多个顺式作用元件<sup>[23]</sup>,本研究发现在干旱胁迫条件下,*GmbZIP33* 在大豆的根中可被强烈诱导,同时,不同组织中的 *GmbZIP33* 对 NaCl 的响应更明显,说明 *GmbZIP33* 可能主要参与盐胁迫的信号诱导途径,进一步验证了 *GmbZIP33* 具有干旱、盐胁迫响应能力,说明其在植物抗高盐和干旱胁迫信号调控中具有重要作用。

有研究表明,bZIP 转录因子在开花调控中也具有重要作用,Mitsutomo 等<sup>[28]</sup>发现 bZIP 转录因子 FD 能够促进植物开花,FD 与开花关键调控因子 FT 互作,进一步调控下游花分生组织基因的表达。本研究通过时空表达分析发现 *GmbZIP33* 基因在大豆的根、茎、叶、茎尖、胚轴等不同组织器官中均有表达,不论长日还是短日条件下,*GmbZIP33* 在叶中的表达量最高,同时,由于大豆是短日开花植物,*GmbZIP33* 的表达在短日条件下呈明显的昼夜节律模式,表明其可能参与到大豆生物钟以及光周期调控开花的复杂网络中。为直观了解 *GmbZIP33* 对植物开花的影响,将其在拟南芥中异位过表达,观察到转 *GmbZIP33* 基因拟南芥植株表现出早花表型,证明 *GmbZIP33* 参与到了拟南芥的开花调控途径中并有效地促进了植物开花。

由于拟南芥开花时间受到光周期、春化、年龄、温度变化感知、自主和赤霉素等 6 条途径的调控,在整个调控网络中涉及多个基因的参与<sup>[29-31]</sup>,本研究选择拟南芥开花促进基因 *CO*、*FT*、*SOC1*、*API* 和

*LFY*,探讨 *GmbZIP33* 与开花相关基因之间的调控关系。研究发现转 *GmbZIP33* 基因拟南芥 *CO*、*FT*、*SOC1*、*API* 和 *LFY* 的表达量均显著升高,与观察到的转基因拟南芥株系中的早花表型一致。*FT* 是开花调控网络中重要的整合因子并受 *CO* 调控,它能够多种信号整合在一起,从而促进下游开花通路中相关基因的表达<sup>[28]</sup>,转 *GmbZIP33* 基因拟南芥植株中 *FT* 表达量增加,推测 *GmbZIP33* 很可能位于 *FT* 的上游。有研究表明,FT 可以通过韧皮部维管组织长距离运输到顶端分生组织,与转录因子 FD 互作形成蛋白复合物后进一步激活 *SOC1*、*API* 等的表达,从而促进植物开花<sup>[28]</sup>,本研究所观察到的 *SOC1*、*API* 等表达量的增加,可能与 *GmbZIP33* 激活 *FT* 表达有关。*GmbZIP33* 能够响应高盐、干旱胁迫,又能促进植物开花,表现出同一基因的多功能调控作用,这种现象在大豆发育调控中并不罕见,本课题组前期发现的大豆 MADS-box 转录因子 GmNMH7、GmNMHC5 等同时参与到大豆成花结荚与结瘤固氮调控通路中,表现出典型的双功能协同调控作用<sup>[32-34]</sup>,本研究所揭示的 *GmbZIP33* 基因的多功能性,也表明其在大豆生长发育调控中有重要意义。本研究初步证明 *GmbZIP33* 可能参与植物开花调控通路,考虑到开花调控是由多途径及多信号分子共同参与完成的,因此 *GmbZIP33* 在此调控通路中的具体位置及其作用机制还有待揭示,下一步可以通过创建 *GmbZIP33* 过表达大豆植株和功能缺失突变株,进一步研究并表征其在开花途径中的作用。

4 结论

本研究克隆到 S-bZIP 亚家族的 1 个新型基因 *GmbZIP33*,该基因的表达受高盐、干旱胁迫诱导,可能与植物抗盐、干旱胁迫功能相关,短日下其表达具有明显的昼夜节律,该基因在拟南芥中过表达后使转基因植物表现出早花表型,其开花关键基因表达量显著升高,初步证明 *GmbZIP33* 参与植物开花调控通路中。

参考文献

[1] CORREA L G, RIANO-PACHON D M, SCHRAGO C G, et al. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: Adaptive features emerging from four founder genes [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): 1-14.

[2] JAKOBY M, WEISSHAAR B, DROGE-LASER W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(3): 106-111.

[3] LANDSCHULZ W H, JOHNSON P F, MCKNIGHT S L. The

- leucine zipper; A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins[J]. *Science*, 1988, 240(4860): 1759-1764.
- [4] YUE L, PEI X, KONG F, et al. Divergence of functions and expression patterns of soybean bZIP transcription factors[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1150363.
- [5] ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature*, 2000, 408(6814): 796-815.
- [6] ZHU M, MENG X, CAI J, et al. Basic leucine zipper transcription factor SlbZIP1 mediates salt and drought stress tolerance in tomato[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 83.
- [7] RAQUEI, IGLESIAS-FERNANDEZ, CRISTINA, et al. *Arabidopsis thaliana* bZIP44: A transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase-encoding gene *AtMAN7*[J]. *The Plant Journal*, 2013, 74(5): 767-780.
- [8] HOLM M, MA L G, QU L J, et al. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COPI mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Genes and Development*, 2002, 16(10): 1247-1259.
- [9] LIM C W, BEAK W, LIM S, et al. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor CabZIP2 in enhanced disease resistance to bacterial pathogen infection[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2015, 28(7): 825-833.
- [10] ANJA S, STEFAN F, ULRKE Z. Phosphorylation-Affects DNA-binding of the senescence regulating bZIP transcription factor GBF1[J]. *Plants*, 2015, 4(3): 691-709.
- [11] ROOK F, WEISBEEK P, SMEEKENS S. The light regulated *Arabidopsis* bZIP transcription factor gene *ATB2* encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37(1): 171-178.
- [12] STRATHMANN A, KUHLMANN M, HEINEKAMP T, et al. BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI3 /TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development[J]. *Plant Journal*, 2001, 28(4): 397-408.
- [13] CRAWFORD N M, GLASS A D M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 10(10): 389-395.
- [14] KANG J Y, CHOI H I. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 343-357.
- [15] CHOI H, HONG J, HA J, et al. ABFS a family of ABA responsive element binding factors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 275(3): 1723-1730.
- [16] CLASS S, MICHOEL B. The regulation of transcription activity in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 3(10): 378-383.
- [17] HARDTKE C S, GOHDA K, OSTERLUND M T, et al. HYS stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COPI binding domain[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(18): 4997-5006.
- [18] 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 Berlin*, 2008, 228(2): 225-240.
- [19] LIAO Y, ZHANG J S, CHEN S Y, et al. Role of soybean *GmbZIP132* under abscisic acid and salt stresses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(2): 221-230.
- [20] NAN H, CAO D, ZHANG D, et al. GmFT2a and GmFT5a redundantly and differentially regulate flowering through interaction with and upregulation of the bZIP transcription factor GmFDL19 in soybean[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97669.
- [21] SONG Q X, LI Q T, LIU Y F, et al. Soybean *GmbZIP123* gene enhances lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(14): 4329-4341.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative geneexpression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C (T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] 白丽娟, 刘薇, 王志莉, 等. 大豆 *GmbZIP33* 基因启动子的克隆及瞬时表达分析[J]. *大豆科学*, 2019, 38(4): 511-516. (BAI L J, LIU W, WANG Z L, et al. Cloning of *GmbZIP33* promoter from soybean and its transient expression analysis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Soybean Science*, 2019, 38(4): 511-516.
- [24] KANG J Y, CHOI H I. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 343-357.
- [25] AGNI S P, ESHAN S, NITIN J, et al. A rice bZIP transcription factor, OsbZIP16, regulates abiotic stress tolerance when over-expressed in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 27(4): 393-400.
- [26] XU L, XU Z, LIU X, 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.
- [27] GAO S Q, CHEN M, XU Z S, et al. The soybean *GmbZIP1* transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 75(6): 537-553.
- [28] MITSUTOMO A, YASUSHI K, SUMIKO Y, et al. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex[J]. *Science*, 2005, 309(5737): 1052-1056.
- [29] SRIKANTJ A, SCHMID M. Regulation of flowering time: All roads lead to Rome [J]. *Cellular and Molecular Life Science*, 2011, 68(12): 2013-2037.
- [30] CORBESIER L, VINCENT C, JANG S, et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1030-1033.
- [31] JAEGER K E, WIGGE P A. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2007, 17(12): 1050-1054.
- [32] MA W Y, LIU W, HOU W S, et al. GmNMH7, a MADS-box transcription factor, inhibits root development and nodulation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(3): 553-562.
- [33] WANG W T, WANG Z L, HOU W S, et al. GmNMHC5, a neoteric positive transcription factor of flowering and maturity in soybean[J]. *Plants*, 2020, 9(6): 792.
- [34] WANG W T, WANG Z L, HOU W S, et al. GmNMHC5 may promote nodulation *via* interaction with GmGAI in soybean[J]. *The Crop Journal*, 2021, 10(1): 273-279.