



# 大豆响应涝害 bZIP 基因 *Glyma04g04170* 的生物信息学分析及互作蛋白预测

林延慧<sup>1</sup>,唐力琼<sup>1</sup>,徐靖<sup>1</sup>,朱红林<sup>1</sup>,王新华<sup>1</sup>,王敏芬<sup>1</sup>,徐冉<sup>2</sup>,王效宁<sup>1</sup>

(1. 海南省农业科学院 粮食作物研究所/海南省农作物遗传育种重点实验室/农业部作物基因资源与种质创制海南科学观测实验站, 海口 571100; 2. 山东省农业科学院 作物研究所, 山东 济南 250100)

**摘要:** bZIP 转录因子参与多种非生物胁迫, 为研究涝害胁迫下大豆 bZIP 转录因子的调控作用, 本研究对耐涝性极强大豆品种齐黄 34 进行淹水处理, 对处理不同时间根部组织样品进行转录组测序, 筛选出 1 个响应耐涝的差异表达的 bZIP 转录因子编码基因 *Glyma04g04170*, 其 qRT-PCR 分析结果与转录组测序数据趋势一致, 在 4 个取样时间点都下调表达, 证明该转录组数据具有可靠性, *Glyma04g04170* 可能通过负调控的方式参与大豆耐涝应答反应。 *Glyma04g04170* 蛋白保守结构域分析发现该蛋白内部含有 bZIP 保守结构域。蛋白三级结构中存在参与寡聚化作用的亮氨酸拉链保守结构域, 同时也包含与特异 DNA 序列相结合、起核定位信号作用的 N-x7-R/K 结构。分离鉴定的 *Glyma04g04170* 蛋白是一个结合 AREB/ABF 的 bZIP 转录因子, 预测结果显示, 与该蛋白互作的蛋白主要是丝氨酸/苏氨酸残基蛋白磷酸酶。转录组和 RT-qPCR 数据表明, *Glyma02g37090* 基因在 4 个取样时间点的表达量都呈显著性差异, 处理与对照相比, 表达量升高。

**关键词:** 大豆; 耐涝; 转录组; bZIP 转录因子

## Bioinformatics Analysis and Interacting Protein Prediction of Soybean bZIP Gene *Glyma04g04170* in Response to Submergence Stress

LIN Yan-hui<sup>1</sup>, TANG Li-qiong<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, ZHU Hong-lin<sup>1</sup>, WANG Xin-hua<sup>1</sup>, WANG Min-fen<sup>1</sup>, XU Ran<sup>2</sup>, WANG Xiao-ning<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Crops, Hainan Academy of Agricultural Sciences/Hainan Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding/Hainan Scientific Research Station of Crop Gene Resource and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, Haikou 571100, China; 2. Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

**Abstract:** bZIP transcription factors are involved in a variety of abiotic stresses, in order to study the regulation of bZIP transcription factors in soybean under submergence stress, we flooded the submergence-resistant soybean variety Qihuang 34, and performed transcriptome sequencing on the root tissue samples treated at different times, we finally selected a bZIP transcription factor encoding gene *Glyma04g04170* as the focus of this research. The result of qRT-PCR analysis of *Glyma04g04170* was consistent with the trend of transcriptome data. It suggested that *Glyma04g04170* may response to submergence tolerance through negative regulation. The conserved domain of *Glyma04g04170* protein was analyzed, and it was found that the protein contained a bZIP conserved domain. The tertiary structure of the protein showed the Leu's position of leucine zipper involved in oligomerization in the conserved domain, and the N-x7-R/K structure which was combined with the specific DNA sequence and acted as a nuclear localization signal. In this study, *Glyma04g04170* was isolated and the encoded protein was identified as a bZIP transcription factor binding with AREB/ABF. The proteins which interacted with *Glyma04g04170* were predicted, and they were mainly serine/threonine acid residue protein phosphatase. The expression of *Glyma02g37090* gene was significantly different in transcriptome data and qRT-PCR, and the expression levels in submergence treatment were increased compared with the control group at four time points.

**Keywords:** Soybean; Submergence tolerance; Transcriptome; bZIP transcription factor

收稿日期:2020-05-07

基金项目:2019 年海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC357);山东省农业良种工程项目(2019LZGC004)。

第一作者简介:林延慧(1984-),女,博士,助理研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:lyh\_1012@163.com。

通讯作者:徐冉(1967-),男,博士,研究员,主要从事大豆育种研究。E-mail:soybeanxu@126.com;

王效宁(1973-),男,研究员,主要从事作物分子育种研究。E-mail:wxning2599@163.com。

植物长期暴露于各种非生物环境中,如高盐、寒冷、涝害和干旱等压力下,其生长发育过程会受到严重影响,同时植物会启动生理、细胞及分子水平等多种机制来应对这些不良的环境条件。当植物响应不同非生物胁迫时,转录因子会通过目的基因的顺式作用元件结合来调控基因表达,进而提高植物的耐逆性<sup>[1]</sup>。通过分子遗传和生物化学分析,大量响应胁迫的转录因子被分离鉴定,这些转录因子分属于 bZIP、WRKY、MYB、bHLH 和 NAC 等家族<sup>[2-3]</sup>。

bZIP 是高等植物中一个转录因子大家族,bZIP 家族成员可调控花发育、种子成熟、抵御病原菌感染、响应胁迫、激素和糖信号通路<sup>[4-5]</sup>。植物中,一些与非生物胁迫相关的 bZIP 基因已经被鉴定。拟南芥中,AtbZIP24 是盐胁迫相应的重要调控因子,抑制其表达可以提高拟南芥的耐盐性<sup>[6]</sup>。AtbZIP1 的表达受盐分、渗透和冷胁迫的影响,是一个正调控因子。敲除 AtbZIP1 的拟南芥突变体表现出对盐分和渗透胁迫不敏感<sup>[7]</sup>。水稻中,OsbZIP52 可以结合 G-box 基序,过表达 OsbZIP52 可以增加水稻对冷害和干旱的敏感度,在冷害和干旱胁迫下,OsbZIP52 起负调控作用<sup>[8]</sup>。将玉米 ZmbZIP72 和 ABP9 分别转入拟南芥和棉花中,两者耐盐和耐旱性提高<sup>[9-10]</sup>。将甘薯 IbbZIP1 转入拟南芥中,可以提高拟南芥的耐盐和耐旱性<sup>[11]</sup>。

bZIP 转录因子家族在非生物胁迫的 ABA 信号通路中扮演重要角色。水稻中,OsbZIP23 作为一个转录调节因子能够响应多种非生物胁迫,过表达 OsbZIP23 可以通过调控脱落酸(ABA)信号通路显著提高水稻对于干旱和高盐胁迫的耐受性<sup>[12]</sup>。OsbZIP71 可以结合 G-box 基序,其表达水平可以被干旱、聚乙二醇(PEG)和 ABA 所诱导,但被盐分胁迫所抑制,过表达 OsbZIP71 可以显著提高水稻对于干旱、盐分胁迫的抗性<sup>[13]</sup>。OsbZIP72 是 ABRE 结合因子,过表达 OsbZIP72 使水稻表现出对 ABA 的高度敏感,上调 LEAs 等 ABA 响应基因的表达水平,进而提高水稻的抗旱性<sup>[14]</sup>。OsABF1 和 OsABF2 都是 ABRE 结合因子,能够通过 ABA 信号通路调控非生物胁迫、响应基因的表达。水稻秧苗的嫩枝和根中 OsABF1 可以被缺氧、冷害、盐分、干旱、氧化应激胁迫和 ABA 所诱导,T-DNA 插入突变体 Osabf1-1 和 Osabf1-2 时,与野生型相比,对于干旱和盐胁迫更加敏

感。OsABF2 可以被多种非生物胁迫诱导表达,如干旱、盐分、冷害、氧化应激胁迫和 ABA 激素,OsABF2 的 T-DNA 插入突变体与野生型相比,对盐分、干旱及氧化应激反应更加敏感<sup>[15-16]</sup>。大豆中含有131 个 bZIP 基因家族成员,大于 1/3 的成员至少参与 ABA、盐、干旱和冷害胁迫响应中的一种防御反应。将 GmbZIP44、GmbZIP62 和 GmbZIP78 转入拟南芥,转基因植株与对照相比,对 ABA 的敏感性降低,对盐害、冷害及干旱胁迫的耐受性增强。GmbZIP44、GmbZIP62 和 GmbZIP78 可能通过负调控 ABA 信号通路中的 ABI1 和 ABI2 基因来响应盐害和冷害胁迫<sup>[17]</sup>。GmbZIP1 的表达受 ABA、干旱、高盐及低温的诱导,过表达 GmbZIP1 可以提高转基因植株对 ABA 的响应,引发气孔关闭,提高植株对非生物胁迫的抗性<sup>[18]</sup>。前人的研究表明植物中 bZIP 参与多种非生物胁迫,包括盐害、冷害及干旱胁迫,但其在大豆耐涝胁迫下的生物学功能尚不清楚。

本研究以耐涝性强的大豆品种齐黄 34 为材料,通过分析该品种淹水处理下的转录组测序数据挖掘到耐涝相关的差异表达基因,对从中筛选出的 bZIP 基因 Glyma04g04170 进行生物信息学分析、表达分析及互作蛋白预测。本研究能够为进一步研究大豆的耐涝机制提供理论基础和基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

耐涝性极强的供试大豆品种齐黄 34 由山东省农业科学院作物研究所提供。试验所用引物均由上海生工生物技术有限公司合成,RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、DNA Marker 和 Taq DNA 聚合酶等购于天根公司;荧光定量 PCR 染料 GoTaq qPCR Master Mix containing SYBR Green I 购于 Promega 公司。

1.2 试验设计

将齐黄 34 种植于事先装好沙土(沙:土=85:15)的花盆(180 mm×140 mm×45 mm)中,每盆播种 10 粒大豆种子。待两片真叶完全展开时,每盆挑选 5 株长势一致的幼苗留下,将花盆放入大塑料盒子中,向其中注入水,没顶淹水,设置 3,6,12 和 24 h 4 个取样时间点,,取根部组织样品,选用大豆 Wm82. a2. v1 作为参考基因组,进行转录组测序,每个时间点都相应取不淹水的植株作为对照,每个样

品 3 次重复。

针对 4 个时间点的转录组差异表达基因筛选与耐涝相关的 bZIP 转录因子。采用 qRT-PCR 方法,以 4 个取样时间点 cDNA 为模板,验证转录组测序数据的可靠性。对筛选到的基因进行生物信息学分析并预测互作蛋白,采用 qRT-PCR 方法检测互作蛋白编码基因的表达情况。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取和转录组测序 用 Invitrogen 的 Trizol 提取液提取大豆幼苗根部组织 RNA。通过 Agilent 2100 生物分析仪测定总 RNA。RNA 浓度用 NanoDrop 1000 分光光度计测定。送深圳华大基因科技服务有限公司进行转录组测序。

1.3.2 大豆响应涝害 bZIP 转录因子筛选 针对转录组 4 个时间点的差异表达基因,绘制维恩图 (VENNY2.1),筛选出 4 个时间点交集的差异表达基因 ( $\text{Log}_2\text{Fold Chang} \geq 2$ ;  $\text{Log}_2\text{Fold Chang} \leq -2$ ),在这些差异表达基因中筛选与耐涝相关的 bZIP 转录因子。

1.3.3 qRT-PCR 表达分析 利用 Primer Premier 5 设计引物,以 cDNA 为模板,使用 PCR 仪 (MyGo Pro Real-Time PCR System, IT-IS Life Science, UK) 进行 qRT-PCR,以 *ELF1B* 作为内参基因。扩增程序为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环。10 μL 反应体系为: 模板 2 μL, 引物 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 2 μL, GoTaq qPCR Master Mix containing SYBR Green I (Promega) 5 μL。所用引物为: q*Glyma04g04170*-F ( TGGCGATTCCTCGTCTGT ), q*Glyma04g04170*-R ( TGGTATAAGCCTGTTTGC ); q*Glyma02g37090*-F ( CCAGCAGATCCAAGAAAC ), q*Glyma02g37090*-R ( TCAGGACTTGCCACGAAT ); q*ELF1B*-F ( GTTGAAAAGCCAGGGGACA ), q*ELF1B*-R ( TCTTACCCCTTGAGCGTGG )。

1.3.4 基因理化性质及保守结构域分析 从 Phytozome 数据库 ( <http://phytozome.jgi.doe.gov> ) 下载 *Glyma04g04170* 的蛋白序列,在 ExPASy 网站 ( <http://us.expasy.org/tools/protparam.html> ) 进行理化性质分析,并在 Conserved Domain Database 网站 ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd> ) 进行保守结构域分析。

1.3.5 蛋白高级结构分析 使用 SOMPA ( <https://npsa-prabi.ibcp.fr> ) 预测 *Glyma04g04170* 蛋白二级结构;利用 SWISS-MODEL ( <https://swissmodel.expasy.org/> ) 的在线蛋白数据库比对获得与 *Glyma04g04170* 具有一定一致性的 1jnm. 1. C, 将其作为模板对 *Glyma04g04170* 进行三维同源建模,下载 PDB 格式文件,使用 SPDBV 4. 10 软件绘制三级结构图。

1.3.6 蛋白互作分析 将 *Glyma04g04170* 序列提交至 SMART ( <http://smart.embl-heidelberg.de/> ), 预测与该蛋白互作的蛋白。

2 结果与分析

2.1 转录组数据中差异表达基因分析

通过分析转录组数据,筛选出淹水处理 4 个取样时间点的差异表达基因分别为 7 241, 8 500, 10 407和10 303个。随着淹水时间的延长,差异表达基因的数量先增加后下降,淹水 12 h 差异表达基因的数量最多,淹水 24 h 差异表达基因的数量有所下降。4 个时间点交集的差异表达基因共有3 920 个 (包括上调和下调基因) (图 1)。

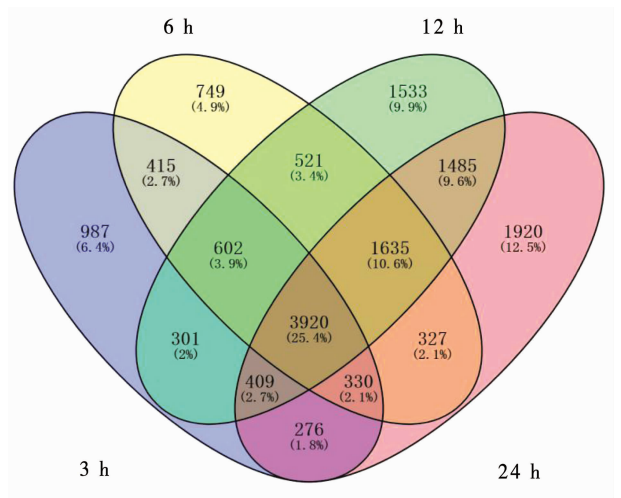


图 1 大豆幼苗淹水处理不同时间点差异表达基因维恩图  
Fig. 1 Venn diagram of common DEGs in soybean seedlings at different time points under submergence treatment

2.2 bZIP 转录因子的筛选与鉴定

针对 4 个取样时间点交集的差异表达基因,筛选出 2 个差异表达的 bZIP 转录因子编码基因 *Glyma04g04170* 和 *Glyma07g02050*,但 *Glyma07g02050* 编码的氨基酸序列很短,因此,本研究以 *Glyma04g04170* 作为研究重点。

对照与处理相比,该基因在 4 个取样时间点的  $\text{Log}_2\text{Fold Change}$  分别为 -2. 62, -2. 24, -2. 25 和 -2. 45。*Glyma04g04170* 基因下调表达,表明其可能通过负调控的方式参与大豆对涝害胁迫的响应。

2.3 Glyma04g04170 表达情况的 qRT-PCR 验证

对 4 个取样时间点大豆 *Glyma04g04170* 基因进行 qRT-PCR 检测,验证转录组测序数据的可靠性。结果显示,qRT-PCR 的结果与转录组测序趋势一致,*Glyma04g04170* 在 4 个时间点的表达量都显著下调表达(图 2),表明该基因持续响应涝害胁迫,证明转录组数据可靠性较高。

2.4 Glyma04g04170 的理化性质和保守结构域分析

Glyma04g04170 的分子质量为 45 245.77 kD,pI9.81。组成 Glyma04g04170 的 19 种氨基酸中,甘氨酸和谷氨酰胺所占比例最高,分别为 11.8% 和 9.8%,色氨酸和酪氨酸所占比例最低,仅为 0.7% 和 1%(表 1)。

表 1 Glyma04g04170 的氨基酸组成及比例

Table 1 Amino acid composition and ratio of Glyma04g04170

名称 Name	数目 Number	占比 Ratio/%	名称 Name	数目 Number	占比 Ratio/%
丙氨酸 Alanine	31	7.4	亮氨酸 Leucine	31	7.4
精氨酸 Arginine	29	7.0	赖氨酸 Lysine	21	5.1
天冬酰胺 Asparagine	26	6.2	蛋氨酸 Methionine	17	4.1
天冬氨酸 Asparticacid	14	3.4	苯丙氨酸 Phenylalanine	11	2.6
谷氨酰胺 Glutamine	41	9.8	脯氨酸 Proline	17	4.1
谷氨酸 Glutamicacid	25	6.0	丝氨酸 Serine	34	8.2
甘氨酸 Glycine	49	11.8	苏氨酸 Threonine	16	3.8
组氨酸 Histidine	7	1.7	色氨酸 Tryptophan	3	0.7
异亮氨酸 Isoleucine	9	2.2	酪氨酸 Tyrosine	4	1.0
缬氨酸 Valine	32	7.7			

将 Glyma04g04170 蛋白序列提交至 NCBI 的 Conserved Domain Database,对其进行保守结构域分

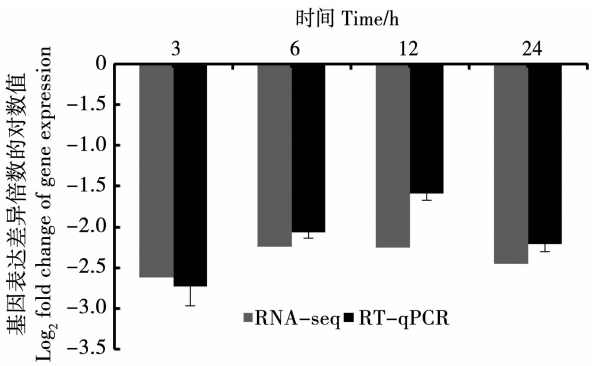


图 2 涝害胁迫不同时间点 *Glyma04g04170* 基因的表达量分析

Fig. 2 Expression patterns of *Glyma04g04170* at different time points under submergence stress

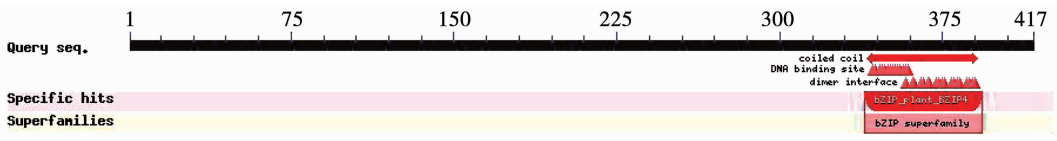


图 3 Glyma04g04170 的保守结构域分析

Fig. 3 Conserved domain analysis of Glyma04g04170

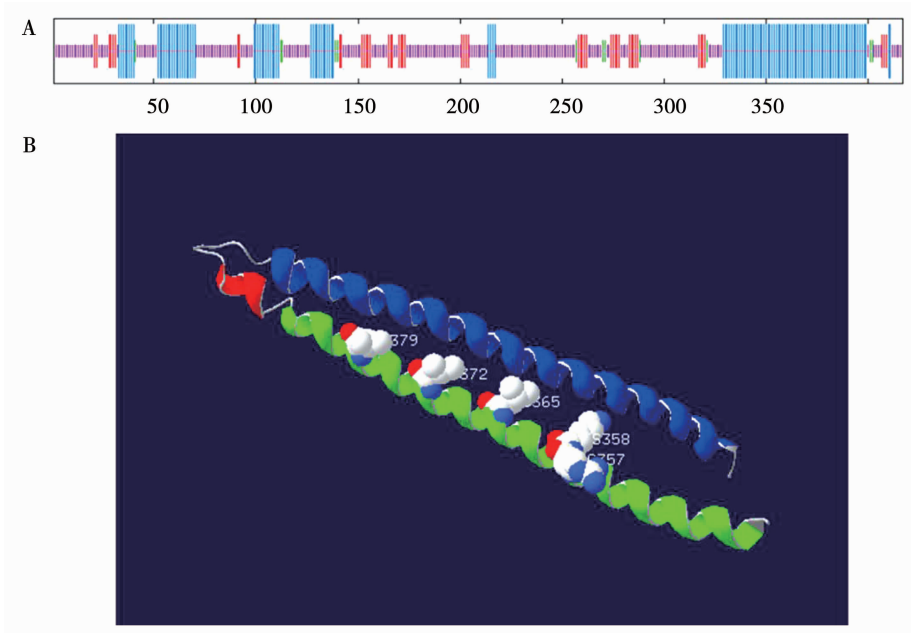
2.5 Glyma04g04170 高级结构预测

二级结构预测分析结果表明,该蛋白主要以  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为主,所占比例分别为 30.94% 和 54.68%,同时存在 11.51% 的延长链和 2.8% 的  $\beta$ -转角(图 4A)。

利用 SWISS-MODEL 在线蛋白数据库比对获得与该蛋白具有 33.93% 一致性的 1jnm.1.C,将其作

析,结果显示该蛋白内部含有 bZIP 结构域(图 3)。

为模板,结合保守结构域分析结果(图 3),对 Glyma 04g04170 进行三维同源建模,结果展示出 bZIP 保守结构域中参与寡聚化作用的亮氨酸拉链区每 7 个氨基酸的第 7 位为亮氨酸,同时也呈现出与特异 DNA 序列相结合、起核定位信号作用的 N-x7-R/K 结构(图 4B)。



A:二级结构预测; 蓝线表示  $\alpha$ -螺旋; 红线表示延长链; 紫线表示无规则卷曲; 绿线表示  $\beta$ -转角。B:三级结构预测。

A: Prediction of secondary structure; The blue lines indicate alpha helix; The red lines indicate the extended strand; The purple lines indicate random coil; The green lines indicate the beta turn. B: Prediction of tertiary structure.

图 4 *Glyma04g04170* 蛋白高级结构预测

Fig. 4 Secondary and tertiary structure prediction analysis of *Glyma04g04170*

2.6 *Glyma04g04170* 蛋白互作分析

互作蛋白的预测结果显示, *Glyma04g04170* 互作的蛋白共有 10 个, 这些蛋白中有 7 个 (*Glyma02g37090*、*Glyma14g35380*、*Glyma17g15860*、*Glyma08g14210*、*Glyma07g33120*、*Glyma05g05540* 和 *Glyma02g15330*) 是丝氨酸/苏氨酸残基蛋白磷酸酶 (图 5), *Glyma11g25680* 和 *Glyma04g16980* 这 2 个蛋白分别是 E3 泛素蛋白连接酶 KEG 和酪氨酸蛋白激酶。

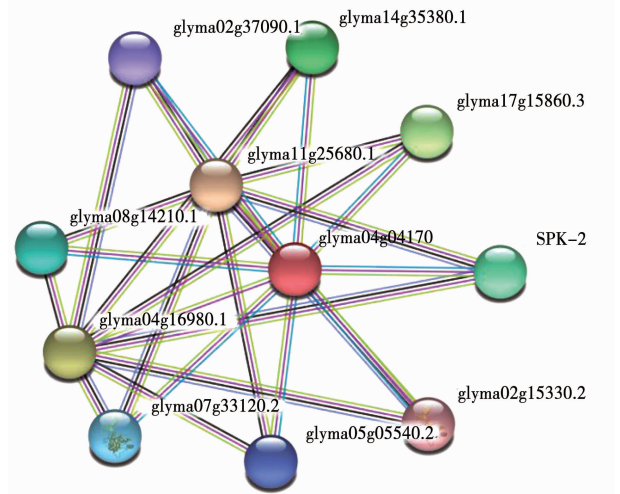


图 5 *Glyma04g04170* 互作蛋白的预测分析

Fig. 5 Prediction and analysis of *Glyma04g04170* interaction protein

*SPK-2* 没有注释基因号, 所以无法对其进行分类。

依据转录组测序数据, 分析编码这些互作蛋白基因的表达量, 其中 *Glyma02g37090* 基因的表达量呈现显著性差异, 4 个取样时间点的  $\text{Log}_2$  Fold Change 分别为 3.82, 3.46, 2.98 和 3.00。qRT-PCR 验证结果与转录组趋势一致, 各处理与对照相比表达量均升高 (图 6)。结果表明 *Glyma02g37090* 在涝害胁迫下表达量上调, 其编码蛋白可能与 *Glyma04g04170* 发生互作, 二者的表达量呈负相关。

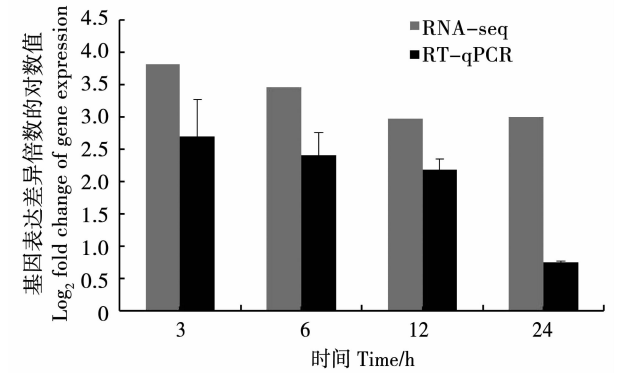


图 6 涝害胁迫下 *Glyma02g37090* 基因不同时间点的表达量分析

Fig. 6 Expression patterns of *Glyma02g37090* at different time points under submergence stress



3 讨论

bZIP 转录因子家族在非生物胁迫的 ABA 信号通路中扮演重要角色。植物中也有很多 bZIP 转录因子参与 ABA 信号通路、响应多种非生物胁迫。大豆中 *GmbZIP1* 的表达受 ABA、干旱、高盐及低温的诱导,过表达 *GmbZIP1* 可以提高转基因大豆对 ABA 的响应,引发气孔关闭,提高对非生物胁迫的抗性<sup>[17]</sup>。本研究分离鉴定的 *Glyma04g04170* 属于 bZIP 转录因子类型中的 ABRE/ABF,其可能通过 ABA 信号通路响应涝害胁迫。

蚕豆中,苏氨酸-丝氨酸蛋白激酶(AAPK)在保卫细胞不依赖  $Ca^{2+}$  的 ABA 信号通路中扮演重要角色,是保卫细胞 ABA 特定激活的酶<sup>[18]</sup>。Li 等<sup>[19]</sup>克隆 AAPK 编码基因,将 AAPK 蛋白的第 43 个赖氨酸变为丙氨酸,气孔对 ABA 的诱导不敏感,消除了 ABA 对质膜阴离子通道的激活。在拟南芥中,蛋白激酶 SRK2C 响应干旱胁迫的诱导,是植物耐干旱胁迫的正向调控因子,激活 SRK2C 可以调节干旱胁迫信号,提高拟南芥的抗旱性<sup>[20]</sup>。p44 被 SRK2E 所编码,在湿度快速降低时,srk2e 突变体内受 ABA 诱导的基因 *rd22* 和 *rd29B* 的表达受到抑制,气孔关闭,出现萎焉症状,SRK2E 在响应水分胁迫的 ABA 信号通路中起重要作用<sup>[21]</sup>。蛋白磷酸化在植物的 ABA 途径及响应非生物胁迫中具有重要作用。拟南芥中,AREB1 蛋白可以在体外被 ABA 活化的 SnRK2s(SRK2D、SRK2E 和 SRK2I)磷酸化<sup>[1]</sup>。在 ABA 信号通路中,SRK2D、SRK2E 和 SRK2I 可以通过调控转录因子(其中包括 AREB1)进一步正向调控下游 PP2Cs 和 LEA 蛋白编码基因的表达,响应水分胁迫<sup>[22-24]</sup>。本研究分离鉴定了 bZIP 转录因子 *Glyma04g04170* 并预测了该蛋白的互作情况,结果表明该蛋白的互作蛋白主要是丝氨酸/苏氨酸酸残基蛋白磷酸酶。转录组和 qRT-PCR 的分析结果显示,与对照相比,处理组 *Glyma02g37090* 基因在 4 个取样时间点的表达量均显著上调,而 *Glyma04g04170* 基因均显著下调,表明 *Glyma04g04170* 和 *Glyma02g37090* 在不同取样时间点的表达量呈现负相关。结合前人的研究进展,推测当涝害发生时,在 ABA 信号通路中,*Glyma02g37090*(SRK2C)的表达量上调,对 bZIP 转录因子 *Glyma04g04170* 进行蛋白磷酸化,调控激活下游 PP2Cs 蛋白编码基因(*ABII* 和 *ABI2*)和 LEA 蛋白编码基因的表达,进而响应涝害胁迫。两个蛋白具体互作情况有待进一步研究。

不同胁迫处理下(盐害、干旱、高温和低温),  
*GmbZIP60* 表达量显著降低,并以负调控的方式参与拟南芥对非生物胁迫的响应<sup>[25]</sup>。将 *GmbZIP44*、*GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 转入拟南芥,转基因植株与对照相比,对 ABA 的敏感性降低,对盐害、冷害及干旱胁迫的耐受性增强。*GmbZIP44*、*GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 可能通过负调控 ABA 信号通路中的 *ABII* 和 *ABI2* 基因来响应盐害和冷害胁迫<sup>[26]</sup>。在涝害胁迫处理的条件下,编码 bZIP 转录因子的 *Glyma04g04170* 基因表达量下调,推测该转录因子以负调控的形式参与植物对非生物胁迫的响应,但其调控机制还有待进一步研究。

4 结论

本研究通过转录组学、生物信息学和 qRT-PCR 分析方法,筛选到大豆耐涝相关 bZIP 基因 *Glyma04g04170*。在 4 个取样时间点,涝害处理与对照相比,*Glyma04g04170* 显著下调表达,qRT-PCR 结果与转录组测序数据一致,表明 *Glyma04g04170* 可能通过负调控的方式参与大豆耐涝应答反应。蛋白互作预测结果表明该蛋白的互作蛋白主要是丝氨酸/苏氨酸酸残基蛋白磷酸酶,转录组和 qRT-PCR 的分析结果显示,该类蛋白编码基因 *Glyma02g37090* 在涝害胁迫下表达量显著上调,因此推测 *Glyma02g37090* 受涝害的调控,表达量上调,进而与 *Glyma04g04170* 发生互作,二者的表达量呈负相关。*Glyma04g04170* 基因编码的 bZIP 转录因子的调控机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2005, 17(12): 3470-3488.

[2] Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures:Towards genetic engineering for stress tolerance[J]. Planta, 2003, 218(1): 1-14.

[3] Golldack D, Lüking I, Yang O. Plant tolerance to drought and salinity:Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(8): 1383-1391.

[4] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W,et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends Plant Science, 2002, 7: 106-111.

[5] Lindemose S, O'Shea C, Jensen M K,et al. Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(3): 5842-5878.

[6] Yang O, Popova O V, Süthoff U, et al. The *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factor AtbZIP24 regulates complex

- transcriptional networks involved in abiotic stress resistance[J]. Gene, 2009, 436(1-2): 45-55.
- [7] Sun X L, Li Y, Cai H, et al. The *Arabidopsis* AtbZIP1 transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses [J]. Journal of Plant Research, 2012, 125(3): 429-438.
- [8] Liu C T, Wu Y B, Wang X P. bZIP transcription factor OsbZIP52/RISBZ5: A potential negative regulator of cold and drought stress response in rice [J]. Planta, 2012, 235(6): 1157-1169.
- [9] Ying S, Zhang D F, Fu J, et al. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta, 2012, 235(2): 453-469.
- [10] Wang C L, Lu G Q, Hao Y Q, et al. ABP9, a maize bZIP transcription factor, enhances tolerance to salt and drought in transgenic cotton [J]. Planta, 2017, 246(3): 453-469.
- [11] Kang C, Zhai H, He S, et al. A novel sweet potato bZIP transcription factor gene, *IbbZIP1*, is involved in salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Reports, 2019: 1-10.
- [12] Xiang Y, Tang N, Du H, et al. Characterization of *OsbZIP23* as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice [J]. Plant Physiology, 2008, 148(4): 1938-1952.
- [13] Liu C T, Mao B G, Ou S J, et al. OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 84(1-2): 19-36.
- [14] Lu G J, Gao C X, Zheng X N, et al. Identification of *OsbZIP72* as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice [J]. Planta, 2009, 229(3): 605-615.
- [15] Hossain M A, Cho J I, Han M, et al. The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(17): 1512-1520.
- [16] Hossain M A, Lee Y, Cho J I, et al. The bZIP transcription factor OsABF1 is an ABA responsive element binding factor that enhances abiotic stress signaling in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2010, 72(4-5): 557-566.
- [17] 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.
- [18] Li J. An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean [J]. The Plant Cell, 1996, 8(12): 2359-2368.
- [19] Li J, Wang X Q, Watson M B. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase [J]. Science, 2000, 287(5451): 300-303.
- [20] Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, et al. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(49): 17306-17311.
- [21] Yoshida R. ABA-Activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(12): 1473-1483.
- [22] Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, et al. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(6): 1988-1993.
- [23] Fujii H, Verslues P E, Zhu J K. Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2007, 19(2): 485-494.
- [24] Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, et al. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(12): 2123-2132.
- [25] 邢锦城, 孙晨曦, 洪立洲, 等. 大豆转录因子 GmbZIP60 对非生物胁迫的表达模式分析 [J]. 大豆科学, 2018, 37(1): 45-49. (Xing J C, Sun C X, Hong L Z, et al. Expression patterns of soybean transcription factor GmbZIP60 in response to abiotic stresses [J]. Soybean Science, 2018, 37(1): 45-49.)
- [26] Liao Y, Zou H, 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.