



大豆 *GmNF-YB2* 基因生物信息学和表达分析及与 *GmNF-YA10* 互作鉴定

赵国勤¹, 王 怡², 于月华², 倪志勇¹

(1. 新疆农业大学 生命科学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要: NF-Y 三聚体复合物是由 NF-YA、NF-YB 和 NF-YC 3 个不同亚基组成, 为探究大豆 *GmNF-YB2* 亚基在 NF-Y 三聚体复合物中的作用及其对于干旱胁迫的响应, 本研究克隆 *GmNF-YB2* 基因, 对其进行生物信息学分析和表达模式分析, 并鉴定 *GmNF-YA10* 与 *GmNF-YB2* 蛋白之间的互作关系。结果表明: *GmNF-YB2* 基因序列全长 1 109 bp, 编码区长 498 bp, 编码 165 个氨基酸。预测该蛋白分子量为 18. 19 kD, 理论等电点 6. 10, 进化树分析发现其与 *AtNF-YB2* 和 *AtNF-YB3* 处于同一分支。转录组数据和组织表达模式分析发现 *GmNF-YB2* 基因在检测的所有组织中均有表达, 其中在子叶和叶片中的表达量较高; 干旱胁迫时叶片中的表达量降低。酵母双杂交分析表明 *GmNF-YA10* 和 *GmNF-YB2* 之间不存在蛋白互作关系。

关键词: 大豆; *GmNF-YB2*; 生物信息学; 组织; 干旱; 表达; 蛋白互作

Bioinformatics and Expression Analysis of Soybean *GmNF-YB2* Gene and Interaction Identification of *GmNF-YA10*

ZHAO Guo-qin¹, WANG Yi², YU Yue-hua², NI Zhi-yong¹

(1. College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: The NF-Y trimer complex is composed of 3 different subunits, NF-YA, NF-YB and NF-YC. In order to explore the interaction between soybean *GmNF-YB2* subunits in the NF-Y trimer complex and the response to drought stress, in this study, we cloned *GmNF-YB2* gene, performed bioinformatics analysis and expression pattern analysis, and identified the protein interaction relationship between *GmNF-YA10* and *GmNF-YB2*. The results showed that *GmNF-YB2* gene was 1 109 bp in length, with a coding region of 498 bp, and encoding 165 amino acids. The molecular weight of the protein was predicted to be 18. 19 kD and the theoretical isoelectric point was 6. 10. The phylogenetic tree analysis showed that the protein was in the same branch with *AtNF-YB2* and *AtNF-YB3*. Transcriptomic data and tissue expression pattern analysis showed that *GmNF-YB2* gene was expressed in all the detected tissues, and the expression level was higher in cotyledons and leaves. The expression of *GmNF-YB2* gene was decreased in leaves under drought stress. Yeast two-hybrid analysis showed that there was no protein interaction between *GmNF-YA10* and *GmNF-YB2*.

Keywords: soybean; *GmNF-YB2*; bioinformatics; tissue; drought; expression; protein interaction

干旱胁迫是各种环境胁迫中最普遍的逆境因子, 它限制了作物的生长发育、生产力和产量^[1-2], 严重限制作物的种植地域及种植面积^[3]。近年来, 随着干旱土地面积的不断扩大, 半干旱与干旱地区已占据中国陆地面积的 45%^[4]。大豆在生长发育过程中经常受干旱胁迫的影响, 转录因子 (Transcription Factors, TFs) 作为一个枢纽, 是调控胁迫响应基因表达的分子开关, 通过改变转录因子的表达活性可修饰植物形态, 是目前提高植物耐逆性的重要手段^[5]。

核因子 Y (Nuclear Factor Y, NF-Y) 又称为血红素结合蛋白 (Heme-Associated Proteins, HAPs) 或 CCAAT-box 结合因子 (CCAAT-box Binding Factors,

CBFs), NF-Y 是由 NF-YA 亚基 (HAP2 或 CBF-B)、NF-YB 亚基 (HAP3 或 CBF-A) 和 NF-YC 亚基 (HAP5 或 CBF-C) 3 个不同亚基组成的三聚体复合物^[6]。NF-Y 转录因子具有多种生物功能, 如调控植物生长发育及抵御非生物逆境等^[7]。在干旱胁迫环境中 NF-Y 转录因子发挥着重要作用, 如过表达拟南芥 NF-YA5 减少了叶片水分流失并提高了对干旱胁迫的抗性, 而 *nf-ya5* 突变体对干旱胁迫更敏感^[8]。除了拟南芥 NF-YA5 外, 其他 NF-Y 转录因子如 *GmNF-YA3*、*PwNF-YB3* 和 *TaNF-YC1* 过表达也可增加植物对干旱的耐受性^[9-11]。对哺乳动物中 NF-Y/CCAAT 复合物的晶体结构分析表明, NF-YA 与 NF-YB/YC 结合并将 α -螺旋插入 DNA 的小沟

收稿日期: 2021-08-13

基金项目: 国家自然科学基金 (32160446, 31860295); 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2021D01A93); 自治区天山创新团队计划 (2020D14002); 天山青年计划 (2018Q018, 2018Q002)。

第一作者: 赵国勤 (1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: 1879029337@qq.com。

通讯作者: 倪志勇 (1981—), 男, 博士, 教授, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: nizhiyong@126.com;

于月华 (1981—), 女, 博士, 高级实验师, 主要从事作物抗逆分子育种研究。E-mail: yuyuehua1213@sina.com。

中,从而使 NF-Y 转录因子能与 CCAAT-box 序列特异性结合^[12]。植物中的 NF-Y 三聚体复合物也具有相同的调控机制,如在热胁迫反应中 AtNF-YC10 亚基与 AtNF-YA1 和 AtNF-YB6 亚基形成转录复合物,并与 DREB2A 协作,促进热胁迫诱导基因的表达^[13]。PvNF-YC1 与 PvNF-YA1 和 PvNF-YB7 亚基形成异源三聚体,参与植物共生根瘤的形成^[14]。NF-Y 三聚体复合物之间的相互作用机制非常复杂,其中 NF-YB 亚基含有高度保守的组蛋白折叠结构域(Histone Fold Domain, HFD),不但在 NF-Y 三聚体复合物之间的相互作用中起重要作用^[12],而且参与调控植物对干旱胁迫的响应,如青杆 PwNF-YB8 参与花粉萌发和花粉管生长过程,并在干旱、盐胁迫响应中发挥作用^[15]。在小麦中,与野生型对照相比,过表达 TaNF-YB4 基因的株系在干旱处理下植株长势增强、干物质质量和叶面积增加、气孔关闭加快,在调控植株抵御干旱逆境过程中发挥重要作用^[16]。

迄今为止,在大豆(*Glycine max*)中共发现了 68 个 NF-Y 转录因子,其中 NF-YB 共有 32 个^[17]。大豆 GmNF-YB1 在长日照和短日照条件下可能起到诱导开花的作用,且 GmNF-YB1 蛋白与 GmNF-YC4、GmNF-YC6 和 GmNF-YC9 蛋白之间能够相互作用^[18-19]。然而大豆中的其他 NF-YB 转录因子、其与大豆 NF-YA 亚基的互作作用及其在抵御干旱逆境过程中发挥的功能尚不清楚。本课题组前期研究发现转 *GmNF-YA10* (Glyma10g10240.1) 基因的拟南芥对干旱胁迫具有较高耐受性^[20],SMART 在线网站预测发现 GmNF-YA10 与 GmNF-YB2 可能存在蛋白互作。因此本研究克隆 GmNF-YB2 基因,对其进行生物信息学分析和表达模式分析并验证 GmNF-YA10 与 GmNF-YB2 蛋白之间的互作关系,旨在为进一步探索 *GmNF-YA10* 基因响应干旱胁迫的调控网络,并为深入研究 *GmNF-YB2* 基因奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆栽培品种 Williams 82,由中国农业科学院作物科学研究所作物种质资源中心抗逆研究课题组提供。

Taq DNA 聚合酶购自北京全式金生物有限公司;限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 和 T4 DNA 连接酶购自于赛默飞公司。引物合成和 DNA 测序由北京博迈德基因技术有限公司完成。酵母 YPDA 培养基粉末、酵母二缺培养基粉末(SD/-Trp/-Leu)及四缺培养基粉末(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)购自北京

泛基诺生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 利用 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取水培至 25 日龄大豆叶片的总 RNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证所提 RNA 完整性,利用 FastKing RT Kit (With gDNase) FastKing cDNA 第一链合成试剂盒将大豆叶片总 RNA 反转录为 cDNA 第一链,保存于 -20 °C 备用。

1.2.2 蛋白互作分析 将 *GmNF-YA10* (Glyma10g10240.1) 基因编码的氨基酸序列提交至 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线网站,预测与该蛋白互作的蛋白,并在 Phytozome V 12.1 数据库(<http://www.Phytozome.net/soybean.php>) 下载 *GmNF-YA10* 基因序列。

1.2.3 *GmNF-YB2* 基因克隆 根据在 Phytozome V 12.1 数据库中得到的大豆 *GmNF-YB2* (Glyma02g300200.1) 基因序列,使用 DNAMAN 8.0 软件设计 1 对特异引物 Glyma02g300200-F (5'-AATGAATTCATGGCTGAGTCGGACAACGA-3') 和 Glyma02g300200-R (5'-ATTGGATCCTCATCTGGGTCTACCAAGGG-3'),下划线表示酶切位点。采用 TransStart Taq DNA 聚合酶,以反转录的大豆叶片 cDNA 第一链为模板,扩增 *GmNF-YB2* 基因 CDS 序列。PCR 反应程序为:94 °C 5 min,94 °C 30 s,58 °C 45 s,72 °C 45 s,35 个循环;72 °C 10 min。

1.2.4 生物信息学分析 在 Phytozome V 12.1 网站中,利用 *GmNF-YB2* 基因的 cDNA 序列作为参考,筛选获得对应的基因组 DNA 序列,并利用该网站获得 *GmNF-YB2* 基因的染色体定位及组织特异性表达模式信息。使用在线软件 ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam>) 分析 GmNF-YB2 蛋白的理化性质,利用在线软件 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 预测其疏水性,并使用 Softberry (<http://www.softberry.com/>) 在线软件预测 GmNF-YB2 蛋白的亚细胞定位。使用 SOMPA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) 在线软件预测 GmNF-YB2 蛋白的二级结构,用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测该蛋白的三级结构。在 Conserved Domain Database 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 进行蛋白质保守结构分析,利用 Phytozome V 12.1 网站获得拟南芥 NF-YB 家族的蛋白序列,利用 ClustalX 1.83 软件和 MEGA 5 软件构建系统进化树。

1.2.5 *GmNF-YB2* 基因表达分析 组织表达分析:选取颗粒饱满的大豆种子种植于土壤中,于 22 ~

25 ℃ 下避光培育,保证充足的水分。4~5 d 后将发芽的大豆移栽至含有 Hoagland 营养液的水培盆中。选取长势良好的 25 日龄的大豆幼苗,取下其根、茎、叶、子叶,提取 RNA 并反转录为 cDNA。

模拟干旱胁迫:使用 20% PEG6000 对 25 日龄的大豆幼苗进行模拟干旱胁迫处理,设置 6 个处理组,分别为胁迫 0,0.5,2,6,12 和 24 h,以未经处理的 25 日龄幼苗作为对照组。取各处理组大豆幼苗叶片,提取 RNA 并反转录为 cDNA,−20 ℃ 保存。

qRT-PCR 分析:使用 DNAMAN8.0 软件设计 *GmNF-YB2* 基因 qRT-PCR 引物 *qGmNF-YB2-F* (5'-CCAGTGGGGTGCCTTACTAC-3') 和 *qGmNF-YB2-R* (5'-CCGCCGGTGCCATAGGAA-3')。设计内参基因 *GmCYP2* 引物 *qGmCYP2-F* (5'-CGGGACCAGTGTGCTTCTTCA-3') 和 *qGmCYP2-R* (5'-CCCCTCCACTACAAAGGCTCG-3')。使用 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR,反应体系为 (20 μL): 2.0 μL cDNA, 10.0 μL 2 × *PerfectStart*TM Green qPCR SuperMix, 上下游引物各 0.4 μL, 0.4 μL Passive Reference Dye (50 ×), 6.8 μL ddH₂O。使用 Thermofisher ABI7500 进行 qRT-PCR,反应程序为:94 ℃ 预变性 30 s;94 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 荧光信号采集 30 s,40 个循环。每份样品 3 次重复。

1.2.6 酵母表达载体构建及蛋白互作分析 将带有酶切位点的 *GmNF-YB2* CDS 序列用限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 进行双酶切,酶切后连接至 pGADT7 载体上。使用北京天根生化公司试剂盒进行 DNA 产物纯化和质粒 DNA 提取。对构建好的 pGBKT7 + *GmNF-YB2*-pGADT7 载体进行测序,验证其正确性。以 pGBKT7 + pGADT7、*GmNF-YA10*-pGBKT7 +

pGADT7^[21]、pGBKT7 + *GmNF-YB2* - pGADT7 质粒共转化酵母菌株 AH109 为阴性对照组,以 *GmNF-YA10*-pGBKT7 和 *GmNF-YB2*-pGADT7 质粒共转化至酵母 AH109 菌株为试验组,转化方法参考 Ni 等^[22]。在 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-Gal 营养缺陷型培养基上分别涂布培养,30 ℃ 培养 2~3 d 后,观察酵母菌落的生长情况。

1.3 数据分析

利用 Excel 2017 和 2^{-ΔΔCT} 方法^[23] 对基因表达数据进行处理分析,使用 IBM SPSS Statistis 19.0 进行统计分析,利用 GraphPad Prism 5 软件进行统计制图,方法参考万会娜等^[24]。

2 结果与分析

2.1 GmNF-YB2 互作蛋白分析

预测结果如图 1 所示,与 *GmNF-YA10* (Glyma10g10240.1) 互作的蛋白共有 10 个 (Glyma10g02480、Glyma04g37291、Glyma02g46970、Glyma08g17630、Glyma06g17780、LOC547959、Glyma12g34510、Glyma07g37840、Glyma15g41486 和 Glyma02g17310),其中 Glyma10g02480、Glyma02g46970、LOC547959、Glyma07g37840、Glyma02g17310 是 NFY 复合物中的 NF-YB 亚基 (HAP3 或 CBF-A), Glyma04g37291、Glyma08g17630、Glyma06g17780、Glyma12g34510、Glyma07g37840 是 NF-Y 复合物中的 NF-YC 亚基 (HAP5 或 CBF-C)。在这些蛋白中,*GmNF-YB1* (Glyma02g17310) 亚基参与植株开花时间调控^[18-19],而大豆中其他的 NF-YB 亚基的功能尚不清楚,因此对 *GmNF-YB2* (Glyma02g46970) 亚基进行分析将为深入研究 *GmNF-YB2* 基因的功能奠定理论基础。

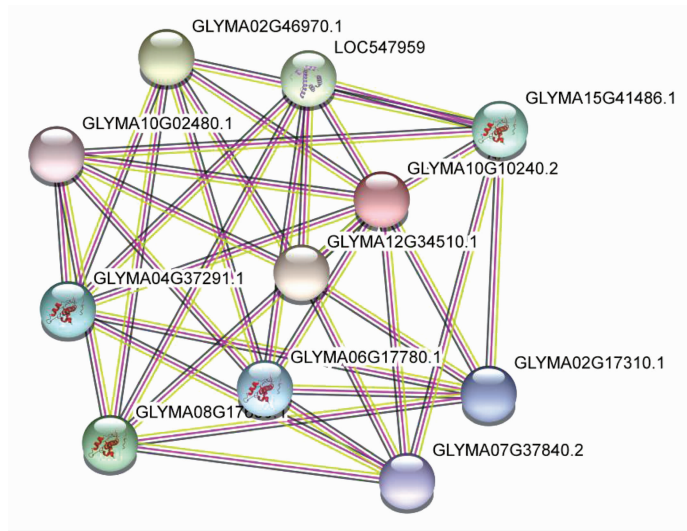


图 1 Glymal0g10240.1 互作蛋白预测分析

Fig.1 The predictive and analysis of Proteins interaction with Glymal0g10240.1

2.2 GmNF-YB2 生物信息学分析

2.2.1 基因克隆及序列分析 在 Phytozome V 12.1 网站中筛选获得 Glyma02g46970 蛋白对应的基因组 DNA 序列,发现该蛋白属于大豆 NF-Y 转录因子家族中的 GmNF-YB2 (GenBank 登录号: NM_001249132)。从大豆叶片中克隆 *GmNF-YB2* 基因,序列分析发现 *GmNF-YB2* 基因被定位于大豆 2 号染色体,物理位置为 Chr02: 47673784.. 47674892 forward。序列全长 1 109 bp,其中 5'-UTR 为315 bp, 3'-UTR 为 296 bp,编码区长为 498 bp,编码 165 个氨基酸。该蛋白分子量 18.19 kD,理论 pI 为 6.10;

在组成 GmNF-YB2 蛋白的 19 种氨基酸中,丝氨酸 (Ser) 所占的比例最高,达到 10.3%,而色氨酸 (Trp) 占比最低,为 0.6%;不稳定指数为 42.80,总平均亲水性 -0.774。疏水性分析显示 GmNF-YB2 蛋白大约在 80 位氨基酸处含有 1 个典型的亲水性区域(图 2),而亚细胞定位分析发现该蛋白定位于细胞核,符合转录因子的特征。

2.2.2 蛋白空间结构预测 蛋白二级结构预测结果显示,GmNF-YB2 蛋白二级结构组分中无规则卷曲、 α -螺旋、延长链和 β -转角占比分别为 45.45%、39.39%、7.88% 和 7.27% (图 3)。

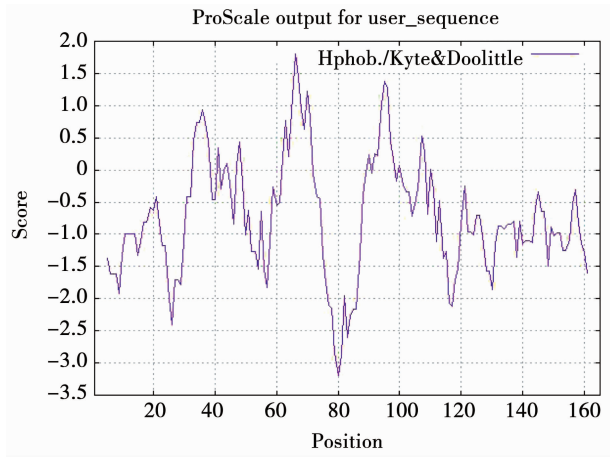
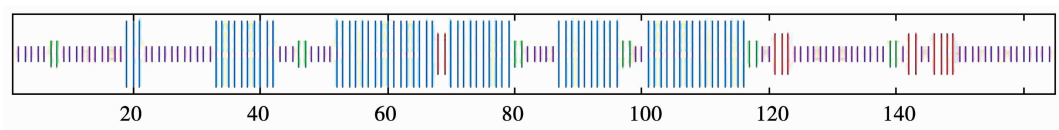


图 2 GmNF-YB2 蛋白的疏水性分析
Fig.2 The hydrophobicity analysis of GmNF-YB2 protein



注:蓝色代表 α -螺旋;红色代表延长链;紫色代表无规则卷曲;绿色代表 β -转角。
Note:Blue indicates alpha helix; Red indicates extended strand; Purple indicates random coil; Green indicates beta turn.

图 3 GmNF-YB2 蛋白的二级结构预测
Fig.3 The secondary structure prediction of GmNF-YB2 protein

利用 SWISS-MODEL 在线蛋白数据库比对获得与该蛋白序列一致性为 92.00% 的 7cvo. 1. B,将其作为模板,对 GmNF-YB2 进行三维同源建模(图 4)。

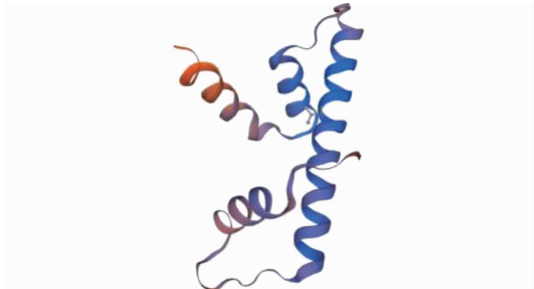


图 4 GmNF-YB2 蛋白的三级结构预测
Fig.4 The prediction of tertiary structure of GmNF-YB2 protein

2.2.3 蛋白保守结构域预测及系统进化分析 保守结构域分析结果显示,该蛋白内部含有 NF-YB 保守结构域(图 5a),结合 GmNF-YB2 蛋白的二级结构和三级结构预测结果分析发现 NF-YB 保守结构域由 4 个 α -螺旋与 2 个环区组成。GmNF-YB2 与拟南芥 NF-YB 家族进行蛋白序列比对发现,它们具有 NF-YB 与 NF-YA 互作的保守氨基酸基序 FISFVTG (图 5b)。

构建进化树结果显示, GmNF-YB2 与 AtNF-YB2、AtNF-YB3 在同一分支,其中 GmNF-YB2 与 AtNF-YB3 的亲缘关系最近,氨基酸一致性为 65.27% (图 6)。

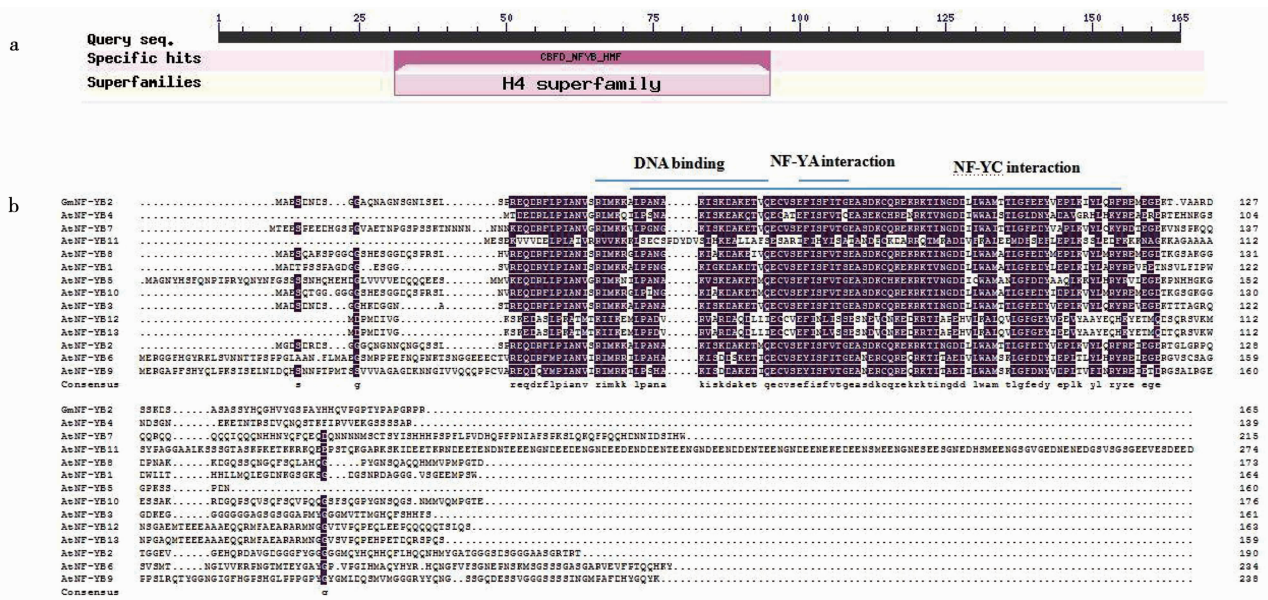


图 5 GmNF-YB2 蛋白保守结构域预测 (a) 及与拟南芥 NF-YB 家族氨基酸序列比对分析 (b)

Fig.5 The prediction of conserved domains of GmNF-YB2 protein(a) and analysis of amino acid sequence alignment with NF-YB family in *Arabidopsis thaliana* (b)

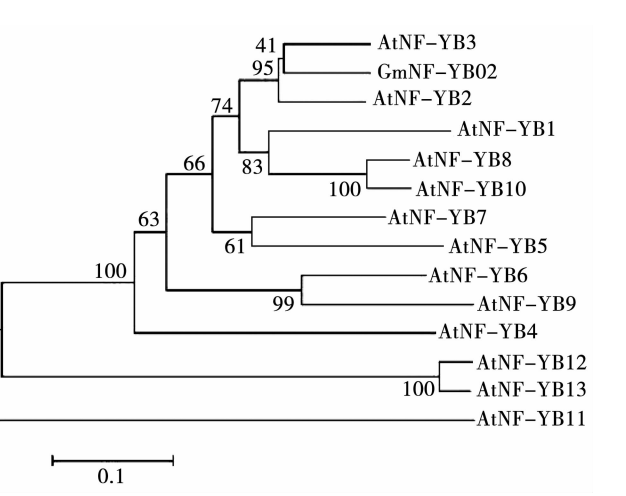


图 6 GmNF-YB2 蛋白与拟南芥 NF-YB 蛋白系统进化树分析

Fig.6 The phylogenetic tree analysis of GmNF-YB2 protein and *Arabidopsis* NF-YB proteins

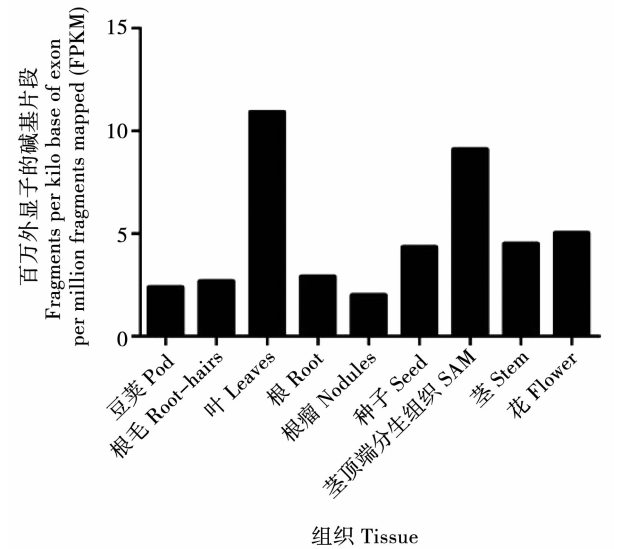


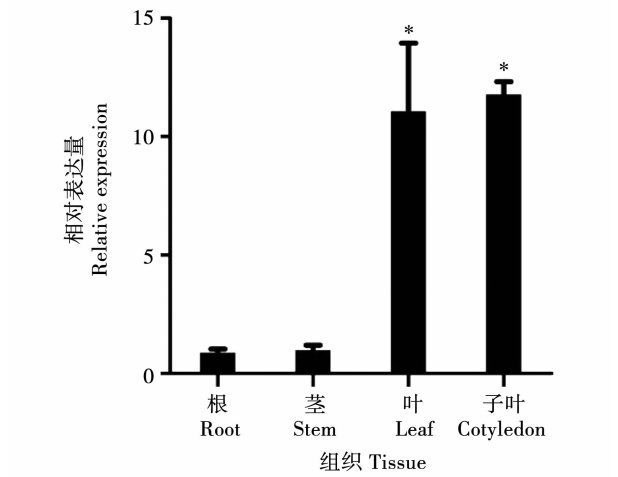
图 7 不同组织中 GmNF-YB2 基因表达模式预测

Fig.7 The prediction of *GmNF-YB2* gene expression patterns in different tissues

2.3 GmNF-YB2 基因的表达分析

2.3.1 组织表达分析 Phytozome V 12.1 预测结果表明:GmNF-YB2 基因在大豆不同组织中均有表达,其中在叶片、茎顶端分生组织中的表达量较高,FPKM 值分别达到 10.914 和 9.100;在根瘤中的表达量最低,FPKM 值为 2.009(图 7)。

qRT-PCR 分析结果表明:GmNF-YB2 基因在大豆根、茎、叶、子叶中均有表达,与表达量预测分析结果趋势相同。其中 GmNF-YB2 基因在子叶中的表达量最高,其次为叶,表达量最低的组织为根(图 8)。结果暗示该基因可能参与调控大豆生长发育。



注: * 表示 $P < 0.05$ 水平存在显著差异。下同。
Note: * mean significant difference at $P < 0.05$ level. The same below.

图 8 *GmNF-YB2* 基因在大豆不同组织中表达量的 qRT-PCR 分析
Fig. 8 The qRT-PCR analysis on expression of *GmNF-YB2* gene in different soybean tissues

2.3.2 模拟干旱胁迫分析 在 20% PEG6000 胁迫下,与未胁迫处理的大豆相比,*GmNF-YB2* 基因在大豆叶片中的表达量降低,并在胁迫 6 h 时该基因表达量最低(图 9)。结果表明:*GmNF-YB2* 基因在 PEG 胁迫下,表达量呈下降趋势。说明 *GmNF-YB2* 受 PEG 干旱胁迫诱导,可能参与调控大豆植株对干旱胁迫的响应。

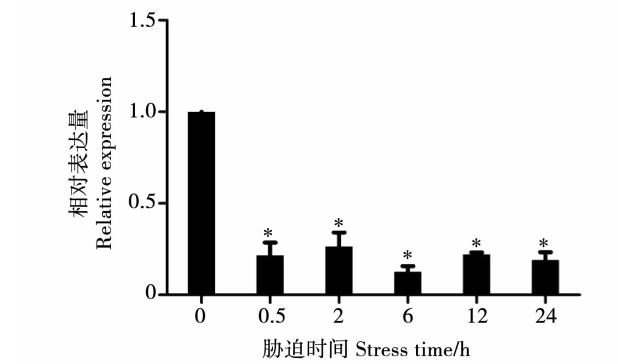


图 9 不同 PEG 胁迫时间 *GmNF-YB2* 基因在叶片中表达量 qRT-PCR 分析
Fig. 9 The qRT-PCR analysis on expression of *GmNF-YB2* gene in leaves under different PEG stress times

2.4 GmNF-YA10 和 GmNF-YB2 蛋白互作分析

酵母双杂交结果显示,在 SD/-Trp/-Leu 固体培养基中,所有共转化组合的酵母菌斑都能正常生长,表明所有组合共转化成功,SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal 固体培养基上阴性对照和 *GmNF-*

YA10-pGBKT7 + *GmNF-YB2*-pGADT7 共转化组合都不能正常生长(图 10)。说明在酵母细胞体系中 *GmNF-YA10* 和 *GmNF-YB2* 蛋白之间不存在相互作用关系。

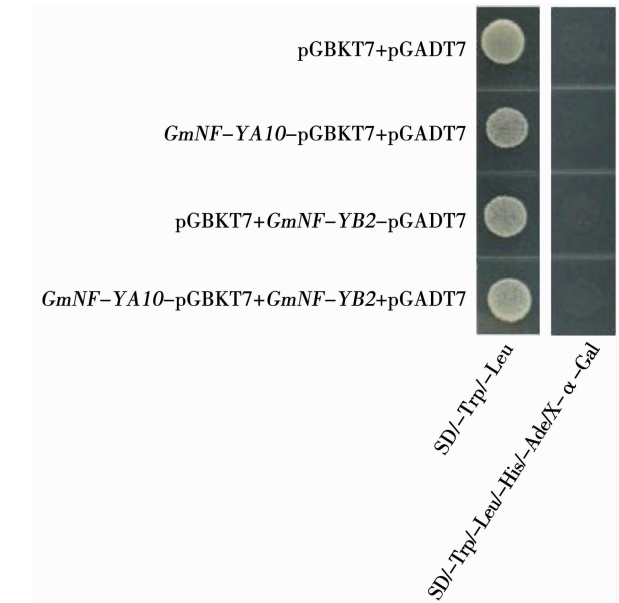


图 10 *GmNF-YA10* 与 *GmNF-YB2* 蛋白互作酵母双杂交分析
Fig. 10 The yeast two-hybrid analysis interaction between *GmNF-YA10* and *GmNF-YB2* proteins

3 讨论

NF-Y 是由 NF-YA、NF-YB 和 NF-YC 3 个不同亚基组成的三聚体复合物,对哺乳动物中 NF-Y/CCAAT 复合物的晶体结构分析表明,NF-YA 与 NF-YB/YC 结合从而使 NF-转录因子能与 CCAAT-box 的序列特异性结合^[6,12]。NF-YB 为核质分布,具有一个保守的中心结构域,由 3 个 α 螺旋和 2 个 β 链环域间隔组成,参与结合 DNA 及与其他蛋白质的相互作用;折叠区外靠近 C 端的 1 个独立 α 螺旋称 Ac^[25-26]。本研究通过生物信息学方法对 *GmNF-YB2* 蛋白进行分析,序列分析表明该蛋白由 165 个氨基酸组成,蛋白内部含有 NF-YB 保守结构域,可能与其他 NF-Y 亚基相互作用。

研究表明 NF-YB 亚基参与调控干旱胁迫,如在小麦中过表达 *TaNF-YB4* 基因使转基因植株长势增强、干质量和叶面积增加、气孔关闭加快,提高了植株对干旱逆境的耐受性^[16]。*TaNF-YB3* 通过调节 ABA 相关信号通路,影响气孔运动、活性氧(ROS)代谢、渗透物质积累等生理过程,对植物抗旱性起着至关重要的作用^[27]。转 *PdNF-YB7* 基因的拟南

芥中水分利用效率增强,具有显著的抗旱性^[28]。本研究发现 *GmNF-YB2* 基因在大豆根、茎、叶、子叶中均可表达,在 20% PEG6000 胁迫下,*GmNF-YB2* 基因在大豆叶片中的表达量降低,并在胁迫 6 h 该基因表达量最低,因此 *GmNF-YB2* 基因可能参与调控植物对干旱胁迫的响应。

系统进化树分析发现 GmNF-YB2 蛋白与 AtNF-YB2 和 AtNF-YB3 蛋白处于同一分支,与 AtNF-YB3 的亲缘关系最近。研究发现在拟南芥中 NF-YB2 与 NF-YB3 序列相似度高达 70%,过表达 *AtNF-YB2* 增强了转基因拟南芥对干旱胁迫的耐受性^[29]。过表达 *AtNF-YB3* 显著增强拟南芥对热胁迫的耐受性,并且 AtNF-YB3 与 AtNF-YA2 和 AtNF-YC10 亚基形成转录复合物,并与 DREB2A 协作,在热胁迫反应中增强热胁迫诱导基因的表达^[13]。这些结果表明,NF-YB2 和 NF-YB3 虽然具有较高的蛋白质序列相似性,但存在功能分化,分别是干旱和热胁迫响应的正调控因子^[29]。研究发现 *GmNF-YA10* 基因的转录水平在 PEG 胁迫 0.5 h 时快速增加到极值,在处理 6 h 后,*GmNF-YA10* 的表达量与对照相比降低,并且在拟南芥中过表达 *GmNF-YA10* 能提高转基因植株的耐旱性^[20]。前期在线网站预测结果显示 GmNF-YA10 和 GmNF-YB2 之间存在蛋白互作关系,而本研究的酵母双杂交试验发现 GmNF-YA10 和 GmNF-YB2 蛋白之间不存在互作关系。大豆 *GmNF-YB1* 基因功能预测及表达分析发现该基因受 PEG 干旱胁迫诱导,作为正调控因子参与大豆植株的抗干旱反应^[30]。同时也有研究发现 *GmNF-YB1* 及其与糖皮质激素受体(GR)的结合可以调控其靶基因,在长日照和短日照条件下可能起到诱导开花的作用^[18]。综上,*GmNF-YB2* 基因可能与其他NF-Y 转录因子相互作用响应干旱胁迫,GmNF-YA10 蛋白与其他预测蛋白的关系需要进一步研究。

4 结论

GmNF-YB2 基因位于大豆 2 号染色体,物理位置为 Chr02: 47673784.. 47674892 forward。该序列全长 1 109 bp,编码区长为 498 bp,编码 165 个氨基酸。预测该蛋白分子量为 18.19 kD,等电点为 6.10,GmNF-YB2 蛋白内部含有 NF-YB 保守结构域。进化树分析发现其与 AtNF-YB2、AtNF-YB3 处于同一分支。转录组数据和组织表达模式分析发现 *GmNF-YB2* 基因在检测的所有组织中均有表达,其中在子叶和叶片中的表达量较高;在干旱胁迫

下,与对照相比,叶片中的 *GmNF-YB2* 基因表达量降低。蛋白互作分析发现 GmNF-YA10 蛋白和 GmNF-YB2 蛋白之间不存在互作关系。

参考文献

[1] FAROOQ M, WAHID A, KOBAYASHI N, et al. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2009, 29(1): 185-212.

[2] THIRUMALAIKUMAR V P, DEVKAR V, MEHTEROV N, et al. NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 enhances drought tolerance in tomato[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(2): 354-366.

[3] 杨如萍,包振贤,陈光荣,等. 大豆抗旱性研究进展[J]. 作物杂志, 2012(5):8-12. (YANG R P, BAO Z X, CHEN G R, et al. Advances in drought resistance of soybean[J]. Crops, 2012(5): 8-12.)

[4] 解玉玲. 干旱胁迫对大豆生理生化影响的研究进展[J]. 长沙大学学报, 2015, 29(2): 26-28. (XIE Y L. Research progress on the impacts of drought stress on soybean physiology and biochemical index[J]. Journal of Changsha University, 2015, 29(2): 26-28.)

[5] 王彬,陈敏氨,林亮,等. 植物干旱胁迫的信号通路及相关转录因子研究进展[J]. 西北植物学报, 2020, 40(10): 1792-1806. (WANG B, CHEN M D, LIN L, et al. Signaling pathways and related transcription factors of drought stress in plants[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2020, 40(10): 1792-1806.)

[6] 张利生,陈大元. RNA 干涉及其应用前景[J]. 遗传, 2003, 25(3): 341-344. (ZHANG L S, CHEN D Y. RNA interference and its promising future [J]. Hereditas, 2003, 25(3): 341-344.)

[7] 宋秋明,李大勇,张慧娟,等. 植物 NF-Y 转录因子的生物学功能及其研究进展[J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 623-632. (SONG Q M, LI D Y, ZHANG H J, et al. NF-Y transcription factors and their biological functions in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(5): 623-632.)

[8] LI W X, OONO Y, ZHU J, et al. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and post transcriptionally to promote drought resistance[J]. Plant Cell, 2008, 20(8): 2238-2251.

[9] NI Z Y, HU Z, JIANG Q Y, et al. *GmNFYA3*, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress [J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82(1-2): 113-129.

[10] ZHANG T, ZHANG D, LIU Y, et al. Overexpression of a NF-YB3 transcription factor from *Picea wilsonii* confers tolerance to salinity and drought stress in transformed *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 94: 153-164.

[11] 马自飞,宋文腾,史美华,等. 小麦 NF-Y 型转录因子基因 *TaNf-YC1* 介导烟草植株抵御渗透胁迫功能研究[J]. 河北农业大学学报, 2020, 43(5): 8-14. (MA Z F, SONG W T, SHI

- M H, et al. Study on the function of wheat NF-Y transcription factor gene *TaNF-YC1* to osmotic stress in tobacco plant [J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2020, 43(5): 8-14.)
- [12] ZHAO H, WU D, KONG F, et al. The *Arabidopsis thaliana* nuclear factor Y transcription factors [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 7: 2045.
- [13] SATO H, MIZOI J, TANAKA H, et al. *Arabidopsis* DPB3-1, a DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y subunits [J]. Plant Cell, 2014, 26(12): 4954-4973.
- [14] RÍPODAS C, CASTAINGTS M, CLÚA J, et al. The PvNF-YA1 and PvNF-YB7 subunits of the heterotrimeric NF-Y transcription factor influence strain preference in the *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium etli* Symbiosis [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 221.
- [15] 苗雅慧, 鞠丹, 梁珂豪, 等. 青杆转录因子基因 PwNF-YB8 的克隆与功能分析 [J]. 林业科学, 2021, 57(5): 77-92. (MIAO Y H, JU D, LIANG K H, et al. Cloning and functional analysis of transcription factor gene *PwNF-YB8* from *Picea wilsoniis* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2021, 57(5): 77-92.)
- [16] 杜萍萍, 赵颖佳, 史桂清, 等. 小麦 NF-YB 型转录基因 *TaNF-YB4* 介导植株抵御干旱功能研究 [J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(2): 1-8. (DU P P, ZHAO Y J, SHI G Q, et al. Characteristics of wheat transcription factor gene *TaNF-YB4* in mediating drought tolerance of plants [J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2021, 44(2): 1-8.)
- [17] QUACH T, NGUYEN H, VALLIYODAN B, et al. Genome-wide expression analysis of soybean NF-Y genes reveals potential function in development and drought response [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(3): 1095.
- [18] MALLANO A I, LI W, TABYS D, et al. The soybean *GmNFY-B1* transcription factor positively regulates flowering in transgenic *Arabidopsis* [J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(2): 1589-1599.
- [19] 李涵哲. 大豆 *GmNFYB1* 互作蛋白分析及与干旱相关下游基因分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016. (LI H Z. Analysis of *GmNFYB1* interaction protein and drought-related downstream genes in soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.)
- [20] YU Y, BAI Y, WANG P, et al. Soybean nuclear factor YA10 positively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 180: 104249.
- [21] 白玉翠, 王萍, 倪志勇, 等. 大豆 *GmNF-YA11* 基因克隆及特征分析 [J]. 大豆科学, 2019, 38(5): 7. (BAI Y C, WANG P, NI Z Y, et al. Cloning and characterization of *GmNF-YA11* gene in soybean [J]. Soybean Science, 2019, 38(5): 7.)
- [22] NI Z Y, LIU N, YU Y H, et al. The cotton 70-kDa heat shock protein GhHSP70-26 plays a positive role in the drought stress response [J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 191: 104628.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] 万会娜, 于月华, 王怡, 等. 大豆 *GmNAC131* 基因的生物信息学及表达分析 [J]. 大豆科学, 2021, 40(2): 9. (WANG H N, YU Y H, WANG Y, et al. [J]. Bioinformatics and expression analysis of *GmNAC131* gene in soybean [J]. Soybean Science, 2021, 40(2): 9.
- [25] LALOUM T, BAUDIN M, FRANCES L, et al. Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2015, 79(5): 757-768.
- [26] 黄俊文, 南建宗, 阳成伟. NF-Y 转录因子调控植物生长发育及胁迫响应的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2020, 56(12): 2595-2605. (HUANG J W, NAN J Z, YANG C W. Research progress of NF-Y transcription factors in plant growth and development and stress response [J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(12): 2595-2605.)
- [27] YANG M, ZHAO Y, SHI S, et al. Wheat nuclear factor Y (NF-Y) B subfamily gene *TaNF-YB3;1* confers critical drought tolerance through modulation of the ABA-associated signaling pathway [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2017, 128(1): 97-111.
- [28] XIAO H, TANG S, AN Y, et al. Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2013(14): 4589-4601.
- [29] SATO H, SUZUKI T, TAKAHASHI F, et al. NF-YB2 and NF-YB3 have functionally diverged and differentially induce drought and heat stress-specific genes [J]. Plant Physiology, 2019, 180(3): 1677-1690.
- [30] 王涛, 李永光, 王英琪, 等. 大豆 *GmNFYB1* 基因功能预测及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(5): 1034-1039. (WANG T, LI Y G, WANG Y Q, et al. Functional prediction and expression analysis of soybean *GmNFYB1* gene [J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(5): 1034-1039.)