



大豆 FAR1/FHY3 基因家族鉴定与表达分析

唐晓飞¹, 薛永国¹, 曹旦¹, 孙建强¹, 刘琦¹, 朱梓菲¹, 栾晓燕¹, 王秀君², 刘鑫磊^{1*}

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 作物资源研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: FAR1/FHY3 转录因子家族是光敏色素 A (phyA) 介导的远红光信号传导的重要因子, 在植物生长发育、光信号转导、植物激素反应和抗逆性中发挥重要作用。为了探究大豆 FAR1/FHY3 基因家族的进化功能, 本研究采用生物信息学方法对大豆中的 FAR1/FHY3 基因进行全基因组鉴定, 对该基因家族的编码蛋白特征、系统发育关系、基因结构、染色体位置、启动子顺式元件以及基因表达模式进行分析。结果表明: 在大豆中共鉴定出 72 个 FAR1/FHY3 成员, 分布在 19 条染色体上。系统发育分析将其与拟南芥和玉米的 FRS 蛋白分为 5 个亚组, 保守蛋白质基序和基因结构分析说明蛋白质之间存在进化关系。共线性分析鉴定表明, 共有 24 对基因存在共线性关系。对启动子中的顺式作用元件以及大豆 FAR1/FHY3 在不同胁迫处理下的表达谱的分析表明, FAR1/FHY3 可能在逆境胁迫反应中具有潜在作用。对低温胁迫下表达量差异显著的 6 个家族成员 (A. *Glyma. 09G012900*; B. *Glyma. 11g088700*; C. *Glyma. 12g052000*; D. *Glyma. 13g211200*; E. *Glyma. 15g125400*; F. *Glyma. 20G156100*) 进行 qRT-PCR 分析表明, 其表达情况与转录组分析的结果一致。本研究结果可为进一步解析大豆 FAR1/FHY3 在大豆生长发育及胁迫应答中的功能奠定理论基础。

关键词: 大豆; FAR1/FHY3; 基因家族; 表达模式

Identification and Expression Analysis of FAR1/FHY3 in Soybean

TANG Xiaofei¹, XUE Yongguo¹, CAO Dan¹, SUN Jianqiang¹, LIU Qi¹, ZHU Zifei¹, LUAN Xiaoyan¹, WANG Xiujuan², LIU Xinlei^{1*}

(1. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Crop Resources Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: The FAR1/FHY3 transcription factor family is an important factor in phytochrome A (phyA)-mediated far-red light signal transduction. They play important roles in plant growth and development, light signal transduction, plant hormone response, and stress resistance. In order to study the evolution and function of the soybean FAR1/FHY3 gene family, this study used bioinformatics methods to identify the entire soybean FAR1/FHY3 gene genome. The characteristics, phylogenetic relationships, genetic structure, chromosomal location, and *cis*-acting promoter elements of the proteins encoded by this gene family were analyzed. A total of 72 FAR1/FHY3 members were identified in soybean, distributed across 19 chromosomes. These members, alongside *Arabidopsis* and maize FAR1/FHY3 proteins, were divided into five subgroups following a phylogenetic analysis. Analyses of conserved protein motifs and genetic structures support evolutionary relationships between proteins. A total of 24 pairs of repeated sequences were identified through homology analysis. qRT-PCR analysis of six family members (A. *Glyma. 09G012900*; B. *Glyma. 1g088700*; C. *Glyma. 12g052000*; D. *Glyma. 13g21200*; E. *Glyma. 15g125400*; F. *Glyma. 20G156100*) that showed significant differences in expression under cold stress revealed that their expression patterns were consistent with the results of the transcriptome analysis. Analysis of the *cis*-acting elements of the soybean FAR1/FHY3 gene promoter and expression profiles under different stress treatments revealed the possible role of the FAR1/FHY3 gene in plant hormones and stress responses. This study can provide a theoretical basis for further analyzing the functions of soybean FAR1/FHY3 in soybean growth and development and stress response.

Keywords: soybean; FAR1/FHY3; genetic family; expression pattern

光是调节植物生长发育的关键环境信号之一^[1]。为了保障正常生长和发育, 高等植物进化出了复杂的多个感光体, 这些感光体可以感知和适应光环境^[2]。FAR1/FHY3 是由转座酶衍生的一类转录因子家族^[3-5], 最初在拟南芥中被鉴定为光敏色素 A (phyA) 介导的远红色 (FR) 光信号的关键成分^[2,6]。FAR1/FHY3 具有同源二聚体或异二聚体

的功能, 结合启动子上的 FBS 顺式作用元件, 以调节下游基因表达^[4,7]。FAR1/FHY3 的 N 端 C2H2 型锌指结构域负责其直接的 DNA 结合, 而核心转座酶结构域和 C 端 SWIM 锌指结构域对其同源或异源二聚化及转录激活至关重要^[8,9]。

FAR1/FHY3 是整合光和各种激素以优化植物发育的调控节点的核心组成部分, FAR1/FHY3 与

收稿日期: 2024-12-05

基金项目: 黑龙江省农业科学院科研项目 (2020FJZX009); 黑龙江省科研业务费 (CZKYF2022-1-B022)。

第一作者: 唐晓飞, 女, 硕士, 副研究员, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: xftang@126.com。

通讯作者: 刘鑫磊, 男, 硕士, 研究员, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: nkyddslxl@163.com。

茉莉酸途径相互作用,以平衡生长和防御^[10,11],并通过 SPL9/SPL15 相互作用和雌内酯信号传导影响分支^[12]。FAR1/FHY3 还通过整合光和乙烯信号在叶绿素产生、叶绿体分裂、ABA 信号传导和延缓叶片衰老中发挥作用^[13]。近年来,FAR1 在非生物胁迫中的作用引起了人们的关注。FAR1 和 FHY3 功能的丧失会导致各种植物的活性氧(ROS)积累增加,对氧化应激的敏感性增加^[14]。在茶叶中,CsFHY3/FAR1 在叶片中强烈表达,大多数基因的表达在盐胁迫下被诱导,在低温胁迫下呈负表达^[15]。在花生中,AhJ11-FAR1-5 的过表达可以通过增强清除 POD、SOD 和 CAT 来提高对于干旱胁迫的耐受性^[16]。目前,FAR1/FHY3 转录因子家族已在多个植物物种中进行了系统的分析,包括拟南芥、番茄、玉米、茶树、桉树、核桃和花生^[6,15,17-21]。

大豆是重要的粮油饲兼用作物,是人类优质植物蛋白和食用油的主要来源。大豆对光照敏感,其在生长发育过程中易遭受高低温、干旱和盐碱等不良影响,进而造成产量损失,降低品质^[22]。FAR1/FHY3 家族已被证明在植物的生长发育中发挥着重要作用。但目前尚鲜见有关大豆 FAR1/FHY3 基因或全基因家族分析的研究。鉴于此,本研究基于已发表的大豆基因组序列,利用生物信息学方法,在大豆基因组中鉴定出 72 个 FAR1/FHY3 家族基因,分析其蛋白的基本特性、序列特征、染色体分布、启动子顺式作用元件以及不同组织部位和非生物胁迫下的基因表达模式,并通过 qRT-PCR 验证大豆 FAR1/FHY3 基因对低温胁迫响应,为进一步研究大豆 FAR1/FHY3 的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为 Williams 82。

1.2 方法

1.2.1 大豆 FAR1/FHY3 家族成员鉴定 从 EnsemblPlants 数据库(<http://plants.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>)下载大豆 FAR1/FHY3 家族基因的鉴定所需基因组序列文件和蛋白质序列文件。在 Pfam 网站(<https://pfam.xfam.org/>)下载 FAR1/FHY3 保守结构域(PF03101、PF10551 和 PF04434)的隐马尔可夫模型文件,利用 TBtools 软件的 HMMsearch 程序,根据大豆氨基酸序列对 FAR1/FHY3 家族基因筛选^[23]。阈值设置为 1.0×10^{-5} ,筛选含有 FAR1/FHY3 结构域的序列。使用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)

和 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行保守结构域验证。利用 ExPASy 数据库(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析大豆 FAR1/FHY3 基因家族成员的氨基酸序列的理化性质。利用 Plant-mPLoc 数据库(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)进行亚细胞定位预测。

1.2.2 系统发育树构建、基因结构及保守基序分析

从 PlantTFDB(<http://planttfdb.gao-lab.org/>)下载拟南芥、玉米的 FAR1/FHY3 转录因子家族蛋白序列。去除拟南芥、玉米的 FAR1/FHY3 转录因子家族蛋白序列的非家族成员和重复序列,并利用 MEGA7.0 软件对大豆、拟南芥和玉米的 FAR1/FHY3 家族蛋白进行序列比对,使用邻接法(Neighbor-Joining),Bootstrap 值设置为 2 000,构建系统发育树。并使用在线软件 iTOL 对系统发育树进行美化处理^[24]。

通过在线软件 MEME 5.5.5(<https://meme-suite.org/meme/>)分析大豆 FAR1/FHY3 的保守基序,基序参数设置为 10,其他参数为默认值。利用 TBtools 软件从基因组文件中提取大豆 FAR1/FHY3 家族基因的内含子和外显子信息。并对氨基酸序列的保守基序(Motif)和基因结构作可视化对比。

1.2.3 基因染色体定位和共线性分析 通过 TBtools 软件获得大豆 FAR1/FHY3 家族成员的位置信息,并对该家族基因绘制染色体定位图。采用 MCScanX 软件进行大豆 FAR1/FHY3 共线性整合分析,采用 TBtools 软件绘制共线性分析结果图。

1.2.4 基因顺式作用元件分析 利用 TBtools 截取从大豆基因组中提取 FAR1/FHY3 家族基因的上游 2 000 bp 序列,通过 PlantCare(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析其顺式作用元件。

1.2.5 基因不同组织和逆境胁迫表达分析 通过 Phytozome 数据库(<https://Phytozome-next.jgi.doe.gov/>)获取大豆 FAR1/FHY3 家族基因在 9 个不同组织的转录组数据^[25]。

并从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)获得盐、干旱、高温和低温条件下大豆转录组的相对表达丰度数据(序列号为 GSE57252、GSE153951 和 GSE117686)。使用 TBtools 软件 HeatMap 程序对数据进行归一化处理,绘制热图。分析 FAR1/FHY3 基因的表达模式,并筛选存在表达差异的候选基因。

1.2.6 低温胁迫下基因表达量 qRT-PCR 检测 将 Williams 82 幼苗于光暗周期 16 h/8 h 的温室中培育。生长至 V1 期,对幼苗进行 4 ℃低温处理,收集

处理 24 h 的叶片。以未处理植株叶片为对照,样品-80 ℃ 保存备用。使用 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA。使用 Primer 5 软件设计基因特异性引物(表 1)。使用 ABI 公司的 Quantstudio 6 pro 进行 qRT-PCR。反应程序为:95 ℃、3 min,95 ℃、10 s,60 ℃、30 s,40 个循环,每个基因 3 次重复。使用 2^{-ΔΔCt} 方法^[2] 计算基因的相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
<i>Glyma. 09g012900</i>	TAGAACCATTTTITTTGGCTGTG	CCAGAGGAGGAGAAAACCAACAG
<i>GLYMA. 11G088700</i>	TTGAGTFTTCTGGTCTAGTTTGATG	ATTGTATCGGATACTTAGGGATTCT
<i>GLYMA. 15G125400</i>	ATCTATGTCGGCATGCACTGTGTG	ATGCGGTCAGTATCATTAACACCA
<i>GLYMA. 20G156100</i>	CAGAGCAAATGGAGGAAAAGACA	ATGAAACATATGCAGATGAGGGG
<i>GLYMA. 13G211200</i>	GATGTGGAAATGATATGGAGAAGC	GTAAGATGTAGCGAGAAGGGACT
<i>GLYMA. 12G052000</i>	CAATGATTATGGTGAGGAAACTTAG	TGTGCTGTATTTTCTTTTGAAAGGTT

2 结果与分析

2.1 大豆 FAR1/FHY3 基因的鉴定与分析

如表 2 所示,从大豆基因组中共检索到 72 个候选大豆 FAR1/FHY3 基因,该家族成员编码的氨基酸数量为 118 ~ 880 个,蛋白分子量为 13. 55 ~ 99. 41 kD,等电点为 4. 55 ~ 9. 24。亚细胞定位预测表明,大多数家族成员位于细胞核和叶绿体。少数基因定位在线粒体、细胞质、液泡、细胞壁和细胞膜。

表 2 大豆 FAR1/FHY3 家族基因基本信息
Table 2 Basic information of soybean FAR1/FHY3 gene family

基因序列号 Gene sequence ID	氨基酸数量 Number of amino acid/aa	蛋白质分子量 Protein molecular weight/kD	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	亲水性 Hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular location
<i>Glyma. 05G072100</i>	816	94. 13	6. 33	49. 97	-0. 496	细胞核
<i>Glyma. 13G211200</i>	762	88. 09	7. 78	49. 23	-0. 472	叶绿体
<i>Glyma. 15G101500</i>	763	88. 47	6. 41	51. 92	-0. 487	叶绿体
<i>Glyma. 11G088700</i>	790	90. 29	6. 40	53. 11	-0. 427	细胞核
<i>Glyma. 01G000600</i>	813	92. 70	6. 04	48. 30	-0. 437	细胞核
<i>Glyma. 14G000400</i>	777	89. 35	5. 90	50. 31	-0. 486	细胞核
<i>Glyma. 11G127400</i>	295	33. 11	5. 33	41. 66	-0. 603	细胞核
<i>Glyma. 12G052000</i>	263	29. 72	6. 21	47. 14	-0. 782	叶绿体/线粒体/细胞核
<i>Glyma. 13G341600</i>	743	85. 23	6. 32	52. 31	-0. 461	细胞核
<i>Glyma. 15G029900</i>	294	33. 13	9. 24	39. 94	-0. 536	叶绿体
<i>Glyma. 04G111200</i>	241	27. 89	5. 91	47. 45	-0. 693	细胞核
<i>Glyma. 06G323400</i>	241	27. 81	6. 09	53. 56	-0. 743	细胞核
<i>Glyma. 20G132100</i>	808	92. 96	7. 11	52. 47	-0. 548	细胞核
<i>Glyma. 10G259000</i>	810	93. 30	7. 15	49. 83	-0. 595	叶绿体/细胞核
<i>Glyma. 15G032800</i>	743	85. 34	6. 47	56. 33	-0. 432	细胞核
<i>Glyma. 18G154100</i>	219	24. 85	8. 47	50. 40	-0. 608	细胞核
<i>Glyma. 03G091500</i>	207	23. 88	7. 62	50. 41	-0. 530	细胞核
<i>Glyma. 15G125500</i>	706	81. 70	5. 56	40. 13	-0. 532	细胞核
<i>Glyma. 15G030200</i>	273	31. 48	6. 04	54. 15	-0. 785	细胞核
<i>Glyma. 09G001300</i>	684	78. 23	8. 27	52. 73	-0. 497	细胞核
<i>Glyma. 13G344100</i>	256	29. 65	6. 10	64. 5	-0. 820	叶绿体/细胞核
<i>Glyma. 06G314300</i>	842	96. 17	6. 77	47. 29	-0. 611	叶绿体
<i>Glyma. 04G124300</i>	843	96. 23	6. 87	47. 68	-0. 632	叶绿体/细胞核
<i>Glyma. 20G024700</i>	668	78. 10	5. 95	40. 79	-0. 414	细胞核
<i>Glyma. 10G238500</i>	859	98. 36	6. 03	41. 84	-0. 578	细胞核

表 2(续)

基因序列号 Gene sequence ID	氨基酸数量 Number of amino acid/aa	蛋白质分子量 Protein molecular weight/kD	等电点 pI	不稳定系数 InstabilityIndex	亲水性 Hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular location
<i>Glyma.06G002400</i>	854	99.01	8.36	45.43	-0.418	细胞核
<i>Glyma.09G012900</i>	691	79.69	5.80	42.32	-0.355	细胞核
<i>Glyma.15G125400</i>	668	77.22	7.01	50.38	-0.344	叶绿体/细胞质/液泡
<i>Glyma.15G002100</i>	630	73.28	6.69	45.10	-0.397	细胞核
<i>Glyma.09G019300</i>	672	77.61	7.48	48.27	-0.355	叶绿体
<i>Glyma.08G342800</i>	142	15.81	5.65	49.64	-0.320	细胞核
<i>Glyma.10G001400</i>	679	77.72	8.09	49.00	-0.385	细胞核
<i>Glyma.09G039300</i>	758	86.85	6.20	54.15	-0.350	细胞核
<i>Glyma.11G165800</i>	617	72.16	9.02	37.05	-0.212	叶绿体
<i>Glyma.18G133900</i>	140	16.52	6.31	38.05	-0.608	细胞核
<i>Glyma.10G121700</i>	759	88.74	6.67	45.47	-0.420	细胞核
<i>Glyma.15G144500</i>	758	86.77	6.29	55.23	-0.351	细胞核
<i>Glyma.20G156100</i>	733	83.98	5.66	48.97	-0.608	细胞核
<i>Glyma.07G224700</i>	580	67.66	6.92	39.28	-0.492	细胞核
<i>Glyma.07G168800</i>	679	79.32	5.39	47.44	-0.383	细胞核
<i>Glyma.20G053500</i>	880	99.41	6.26	43.79	-0.527	细胞壁/叶绿体
<i>Glyma.08G227500</i>	855	97.58	6.27	44.41	-0.482	叶绿体/细胞核
<i>Glyma.13G000700</i>	699	81.83	5.91	40.61	-0.284	细胞核
<i>Glyma.04G144700</i>	149	17.30	4.70	25.26	-1.073	细胞核
<i>Glyma.14G043900</i>	877	98.90	6.56	47.09	-0.442	细胞壁
<i>Glyma.11G126700</i>	675	78.32	6.96	51.08	-0.503	细胞核
<i>Glyma.03G107400</i>	534	62.05	8.60	40.02	-0.196	叶绿体
<i>Glyma.18G179400</i>	769	89.02	6.12	45.53	-0.306	细胞核
<i>Glyma.04G150800</i>	328	38.06	5.38	44.27	-0.406	细胞核
<i>Glyma.18G178700</i>	314	36.81	5.32	38.14	-0.813	叶绿体/细胞核
<i>Glyma.08G172600</i>	688	79.38	7.94	46.89	-0.478	细胞核
<i>Glyma.15G184200</i>	563	65.58	8.59	47.00	-0.516	细胞核
<i>Glyma.18G178200</i>	364	42.55	5.46	31.70	-0.637	叶绿体
<i>Glyma.02G273500</i>	879	98.85	6.41	47.22	-0.425	细胞壁/叶绿体
<i>Glyma.07G194600</i>	323	38.14	9.00	40.63	-0.231	叶绿体
<i>Glyma.06G222900</i>	735	84.99	5.46	43.67	-0.394	细胞核
<i>Glyma.18G132400</i>	203	23.40	8.85	33.85	-0.479	叶绿体
<i>Glyma.18G178400</i>	357	42.12	5.34	30.14	-0.651	叶绿体/细胞核
<i>Glyma.06G247000</i>	218	24.76	5.98	66.18	-0.444	细胞核
<i>Glyma.01G202900</i>	316	36.20	6.23	35.44	-0.322	叶绿体
<i>Glyma.15G222100</i>	369	41.58	5.32	34.63	-0.556	叶绿体
<i>Glyma.12G158200</i>	294	34.75	5.15	48.70	-0.706	细胞核
<i>Glyma.19G139100</i>	658	75.77	6.26	42.83	-0.433	细胞核
<i>Glyma.17G201800</i>	619	71.84	5.99	50.64	-0.380	叶绿体/细胞核
<i>Glyma.09G121900</i>	536	61.25	7.25	45.74	-0.589	叶绿体
<i>Glyma.03G136800</i>	656	75.41	6.48	45.13	-0.464	细胞核
<i>Glyma.06G229800</i>	802	93.04	5.79	46.75	-0.430	叶绿体/细胞核
<i>Glyma.07G158500</i>	242	28.55	7.69	29.14	-0.343	细胞膜/叶绿体/细胞核
<i>Glyma.04G124600</i>	549	64.24	6.76	40.01	-0.498	叶绿体/细胞核
<i>Glyma.03G069500</i>	651	75.31	5.89	42.78	-0.223	细胞核
<i>Glyma.07G227000</i>	118	13.55	4.55	45.31	-0.634	叶绿体/细胞质/细胞核
<i>Glyma.10G124900</i>	143	16.72	4.71	36.98	-0.430	细胞膜/细胞核

2.2 大豆 FAR1/FHY3 基因家族的进化关系

为了揭示大豆 FAR1/FHY3 基因家族和其他物种 FAR1/FHY3 基因家族之间的关系,根据亲缘关系远近,对大豆、拟南芥和玉米 3 个物种共 103 个 FAR1/FHY3 蛋白序列构建家族系统发育树,将这些成员分为 5 个组,72 个大豆 FAR1/FHY3 在 5 个组中均有分布:其中,第 I 组有 10 个成员;第 II 和 III 组各有 3 个成员,且均与玉米 FAR1/FHY3 的

部分成员具有较高相似性;第 IV 组有 25 个大豆 FAR1/FHY3 成员,该组仅与拟南芥 FAR1/FHY3 的部分成员具有较高相似性;第 V 组中分布大豆 31 个 FAR1/FHY3 成员。17 个拟南芥 FAR1/FHY3 仅分布在最大的 3 个组(第 I、IV 和 V 组)中,表明这 3 个组可能比其他组更古老。而 14 个玉米 FAR1/FHY3 则分布于除第 IV 组外的其他 4 个组中(图 1)。

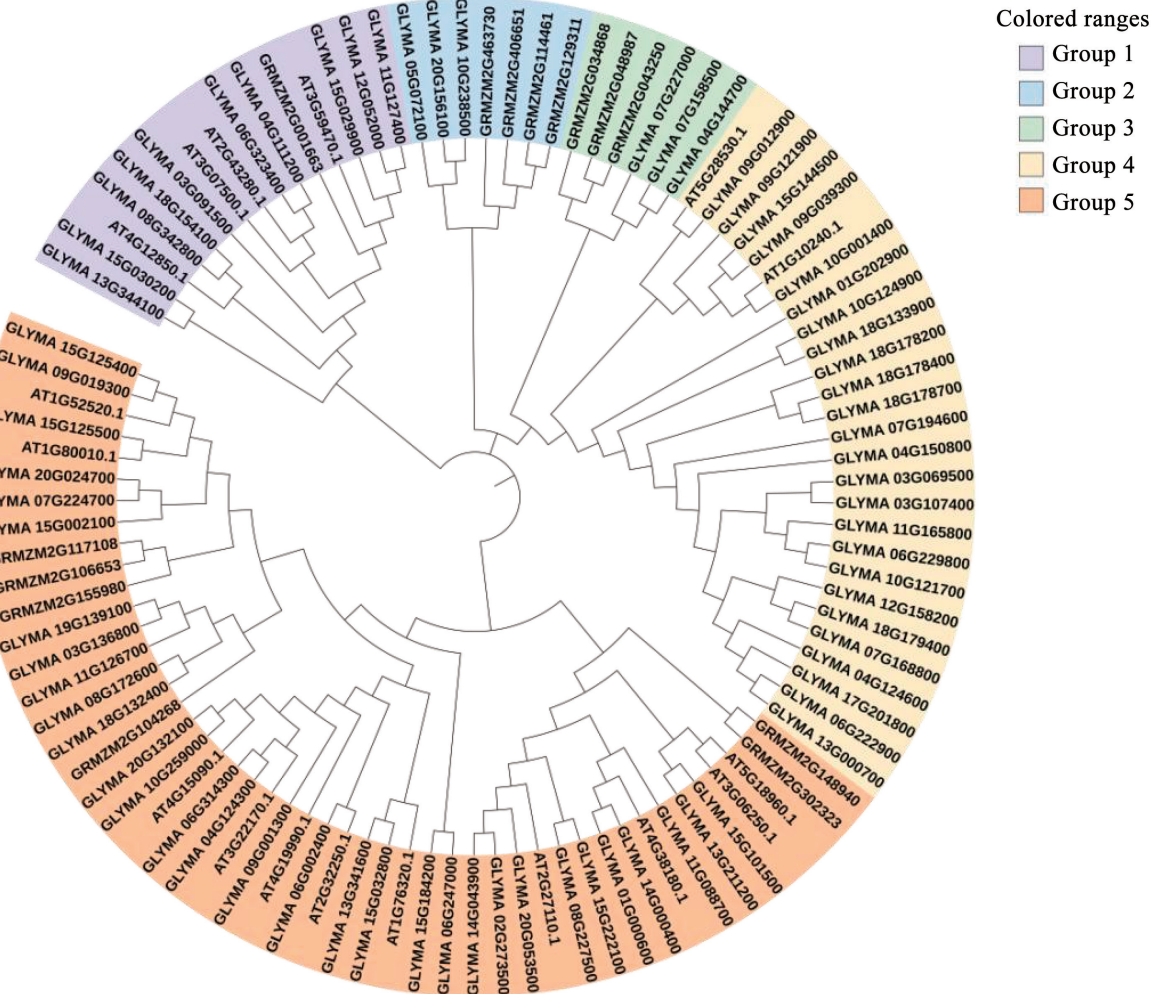


图 1 拟南芥、玉米与大豆 FAR1/FHY3 蛋白序列家族系统进化树
Fig.1 Phylogenetic tree of *Arabidopsis*, corn and soybean FAR1/FHY3 protein sequences

另外,单独构建了 72 个大豆 FAR1/FHY3 基因的进化树,大豆 FAR1/FHY3 转录因子家族可分为 5 个亚家族(I~V):其中,第 I 和 V 亚家族中基因数目最多,分别包含 31 和 23 个成员;第 II 和 IV 亚家族中基因数量最少,分别含有 3 和 5 个成员;第 III 亚家族中有 10 个成员(图 2a)。

2.3 基因结构和保守基序分析

内含子和外显子是基因的两个主要组成部分,它们的数量和长度可以影响基因表达水平和功能。大豆 FAR1/FHY3 基因的结构分析表明,36 个

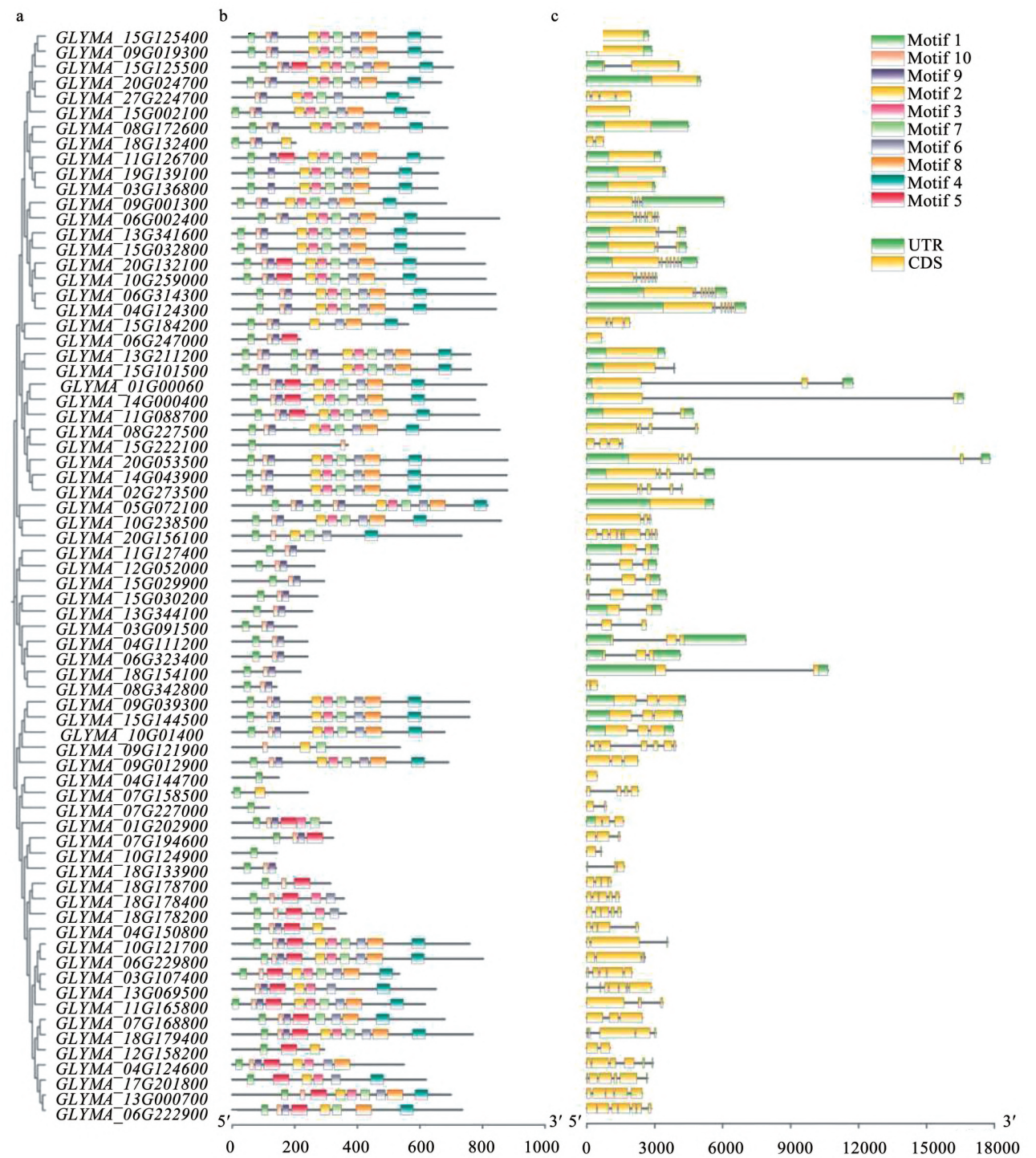
FAR1/FHY3 基因缺少两侧非翻译区,2 个 FAR1/FHY3 基因缺少一侧非翻译区,11 个基因没有内含子,9 个基因只有 1 个内含子(图 2c)。

氨基酸保守基序显示,同一进化分支的基因成员都具有相似的基序数量和位置。表明这些基因在植物生长发育调控中可能具有相似的功能。Motif 1 是大豆 FAR1/FHY3 基因家族中出现次数最多的基序,在 72 个基因中均有出现,说明 Motif 1 是大豆 FAR1/FHY3 基因家族最重要的保守结构(图 2b)。

2.4 基因染色体定位和共线性分析

为了解 FAR1/FHY3 基因在大豆基因组中的分布,根据其基因组数据库中的染色体位置,绘制该家族基因的染色体定位图如图 3 所示;72 个大豆 FAR1/FHY3 基因共定位在 19 条染色体上,其中 15 号染色体上分布最多,有 10 个基因;其次是 18 和 6 号染色体,分别包含 7 和 6 个 FAR1/FHY3 基因;而

2、5、17 和 19 号染色体上均只含有 1 个 FAR1/FHY3 基因。大豆物种内共线性分析表明,共存在 24 个大豆 FAR1/FHY3 同源基因对,其中有 7 个基因分别与两个家族基因形成不同的共线性基因对。这些同源基因的序列相似性表明它们可能具有相似的功能,节段重复可能在 FAR1/FHY3 的进化扩展中发挥重要作用(图 4)。



注:a. 蛋白序列进化关系;b. 保守基序分布;c. 基因内含子—外显子结构分布。
Note: a. Sequence evolution relationship of proteins; b. Conservative motif distribution; c. Gene intron-exon structure distribution.

图2 大豆 FAR1/FHY3 家族基因结构及其蛋白保守基序分析

Fig. 2 The gene structure and protein conserved motif analysis of soybean FAR1/FHY3 gene family members

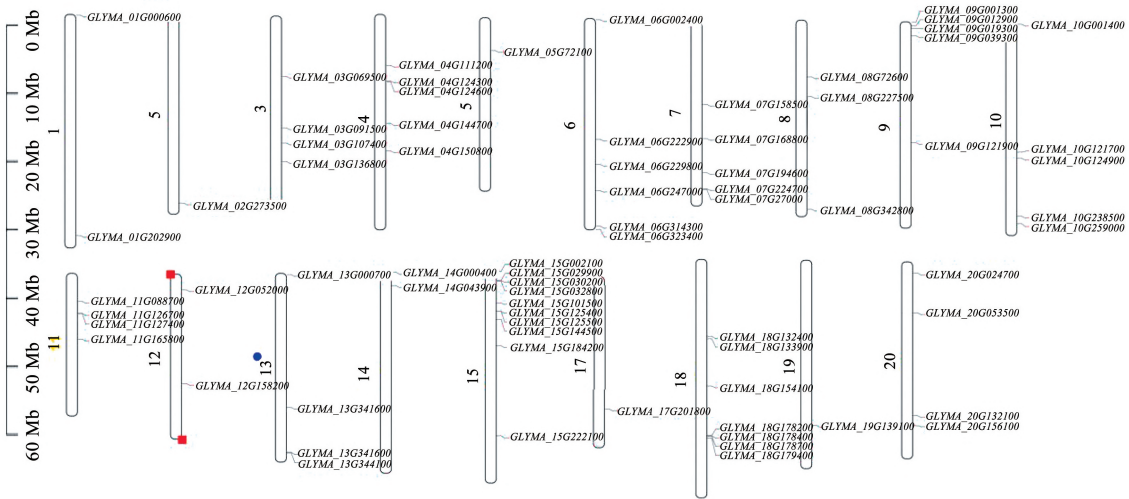


图3 大豆 FAR1/FHY3 基因家族染色体定位

Fig. 3 Chromosome mapping of soybean FAR1/FHY3 gene family

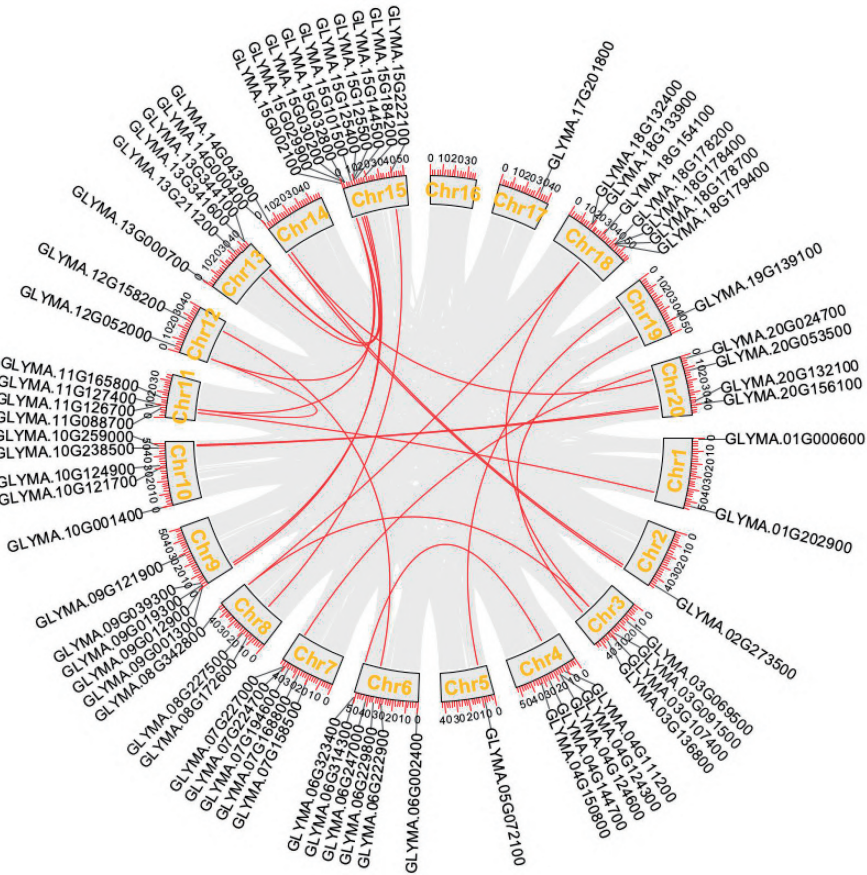


图4 大豆 FAR1/FHY3 基因家族的共线性分析

Fig. 4 The collinearity analysis of soybean FAR1/FHY3 gene family

2.5 基因启动子调控元件分析

对大豆 FAR1/FHY3 起始密码子上游 2 kb 序列中的顺式作用元件进行分析,鉴定到 11 类 72 个参与植物生长和发育的顺式作用元件:70 个大豆 FAR1/FHY3 的启动子含有光照反应元件,只有 *Glyma. 06g323400* 和 *Glyma. 06g222900* 缺乏光照反应元件;68 个 FAR1/FHY3 的启动子均含有 ≥ 1 个

植物激素反应元件,对赤霉素、生长素和水杨酸等多种信号作出反应;只有 *Glyma. 15g125400*、*Glyma. 06g222900*、*Glyma. 12g158200* 和 *Glyma. 17g201800* 缺乏植物激素反应元件;此外,在 FAR1/FHY3 启动子中鉴定出几种非生物和生物胁迫反应元件,如防御应激、干旱和缺氧等响应元件;另外,有少部分基因含有分生组织与胚乳等相关的调控元件(图 5)。

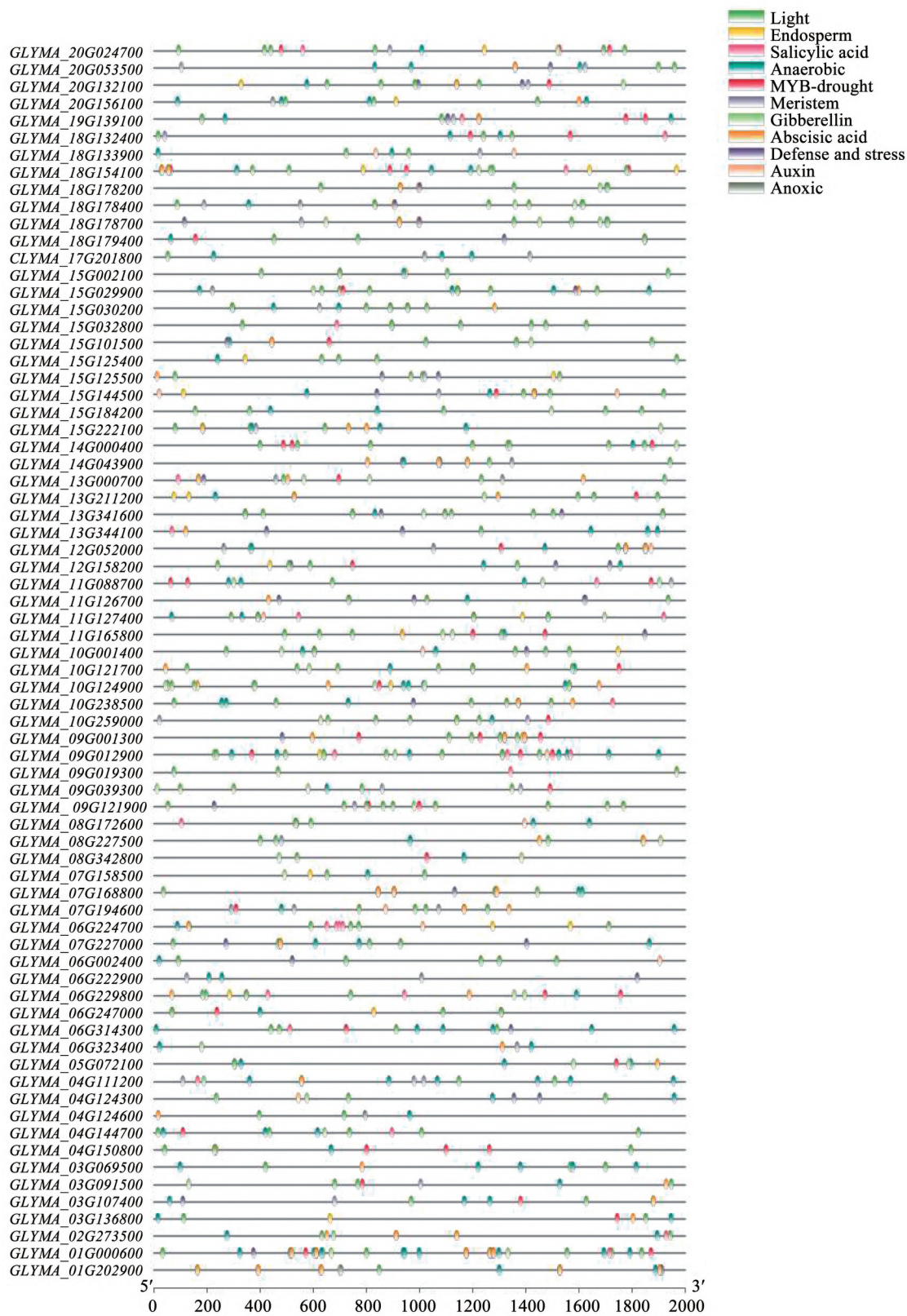


图5 大豆 FAR1/FHY3 家族基因启动子区的顺式作用元件分析

Fig. 5 Cis-acting elements analyses of FAR1/FHY3 family genes in soybean

2.6 基因在不同组织中的表达分析

为了研究 FAR1/FHY3 基因在不同组织的表达模式,对在 Phytozome 数据库检索到的大豆 FAR1/FHY3 家族基因在 9 个组织(花、叶片、根瘤、豆荚、

根、根毛、种子、芽顶端分生组织和茎)中的 RNA 转录数据进行分析表明:21 个 FAR1/FHY3 基因在这些组织中不表达,推测这些基因具有其他特殊的表达模式;51 个 FAR1/FHY3 基因至少在其中的 1 个

大豆组织中特异性表达,其中, *Glyma. 06g314300*、*Glyma. 04g124300*、*Glyma. 20g053500* 和 *Glyma. 10g001400* 在大豆 9 个组织中表达水平均较高; *Glyma. 13g341600* 和 *Glyma. 11g127400* 在花中的表达量较高, *Glyma. 06g323400* 在叶中的表达量较高, *Glyma. 15g002100* 在种子中的表达量较高(图 6)。

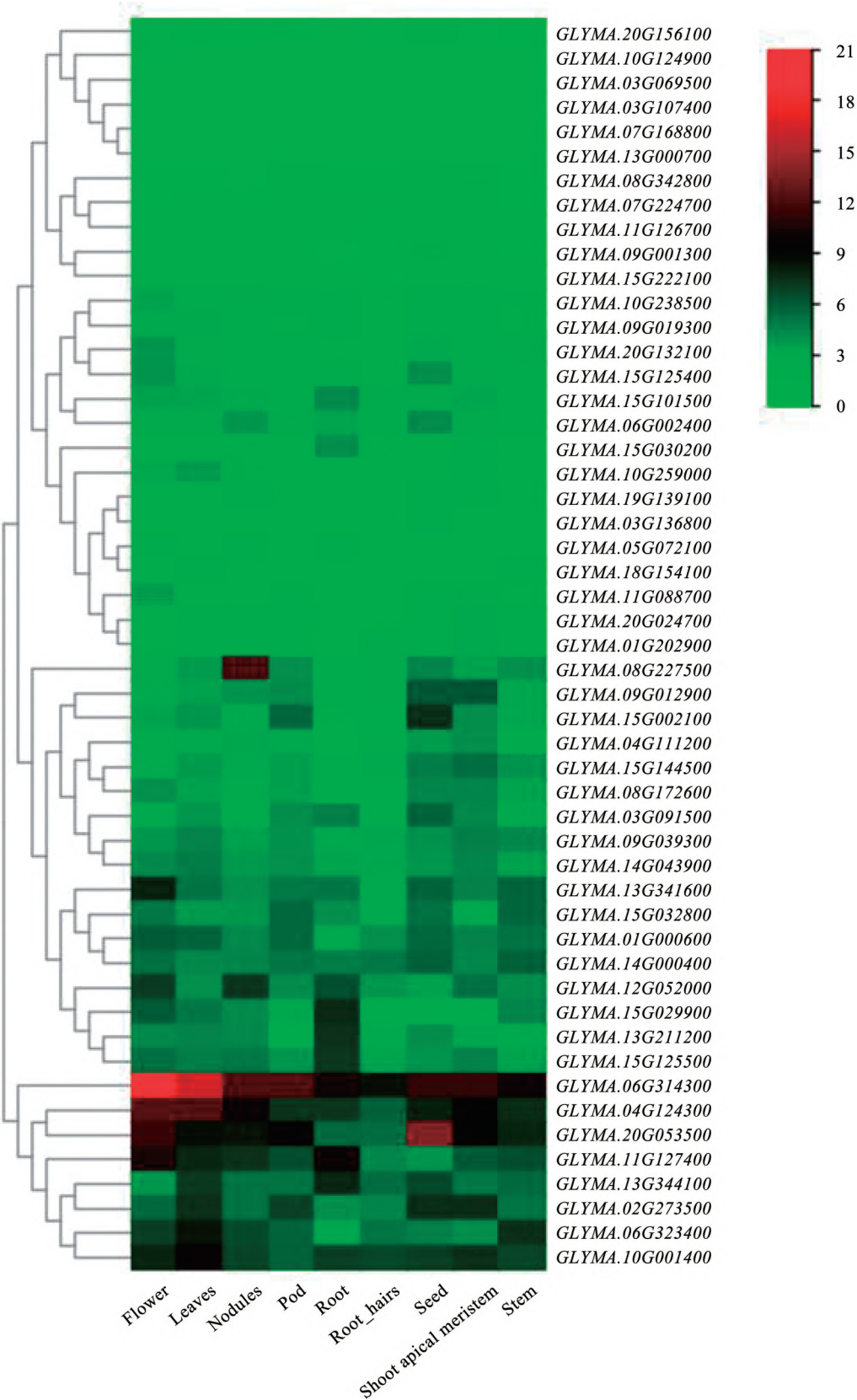


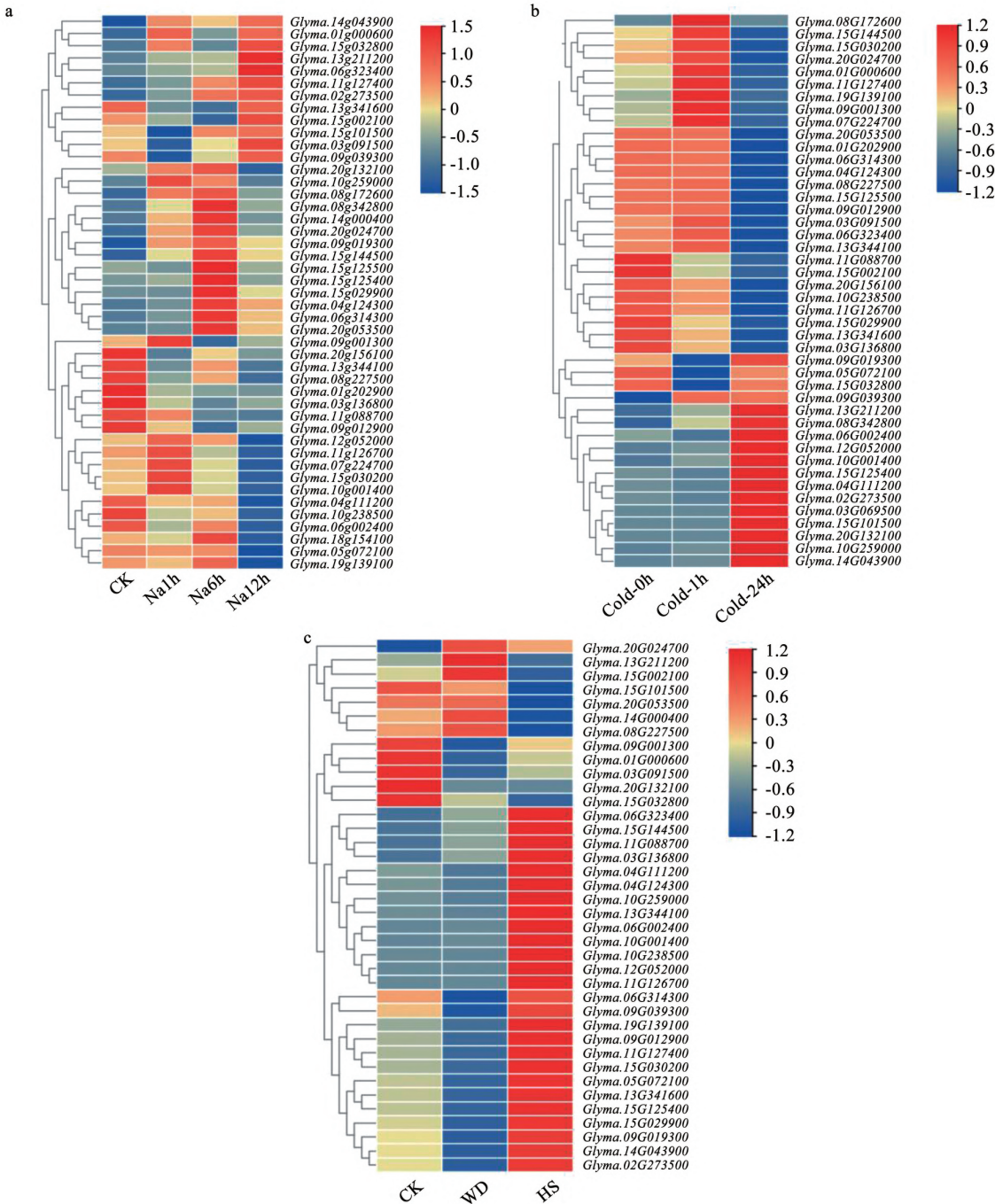
图 6 大豆 FAR1/FHY3 家族基因组织表达特性分析

Fig. 6 Tissue specific expression of the soybean FAR1/FHY3 family genes

2.7 基因在逆境胁迫下的表达分析

根据 GEO 数据库中大豆盐、水分和温度胁迫下的转录组数据分析大豆 FAR1/FHY3 基因成员在逆境下的表达特征表明:在盐胁迫下,2 个 FAR1/FHY3 (*Glyma. 08g342800* 和 *Glyma. 15g144500*) 的表达显著上调,4 个 FAR1/FHY3 的显著下调表达;在低温胁迫下,6 个 FAR1/FHY3 的表达显著上调,

9 个 FAR1/FHY3 显著下调表达;在高温胁迫下,2 个 FAR1/FHY3 的表达显著上调(*Glyma. 11g088700* 和 *Glyma. 12g052000*),其中 *Glyma. 11g088700* 在盐胁迫和低温胁迫中表达量显著下调,*Glyma. 12g052000* 在低温胁迫和高温胁迫中表达量显著上调;而干旱胁迫下,大豆 FAR1/FHY3 家族基因表达量没有显著差异(图 7)。



注:a. V1 期幼苗用 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 0,1,6 和 12 h;b. 14 d 大豆在 4 ℃ 处理 0,1 和 24 h;c. R1 发育期正常供水、干旱胁迫(WD)和热胁迫(HS)20 d 处理大豆样品。
Note: a. Seedlings in the V1 stage treated with 100 mmol·L⁻¹ of NaCl for 0,1,6 and 12 h; b. 14 d soybeans treated at 4 ℃ for 0, 1 and 24 h; c. R1 developmental stage at control (CK),water deficit (WD) and heat stress (HS) for 20 d.

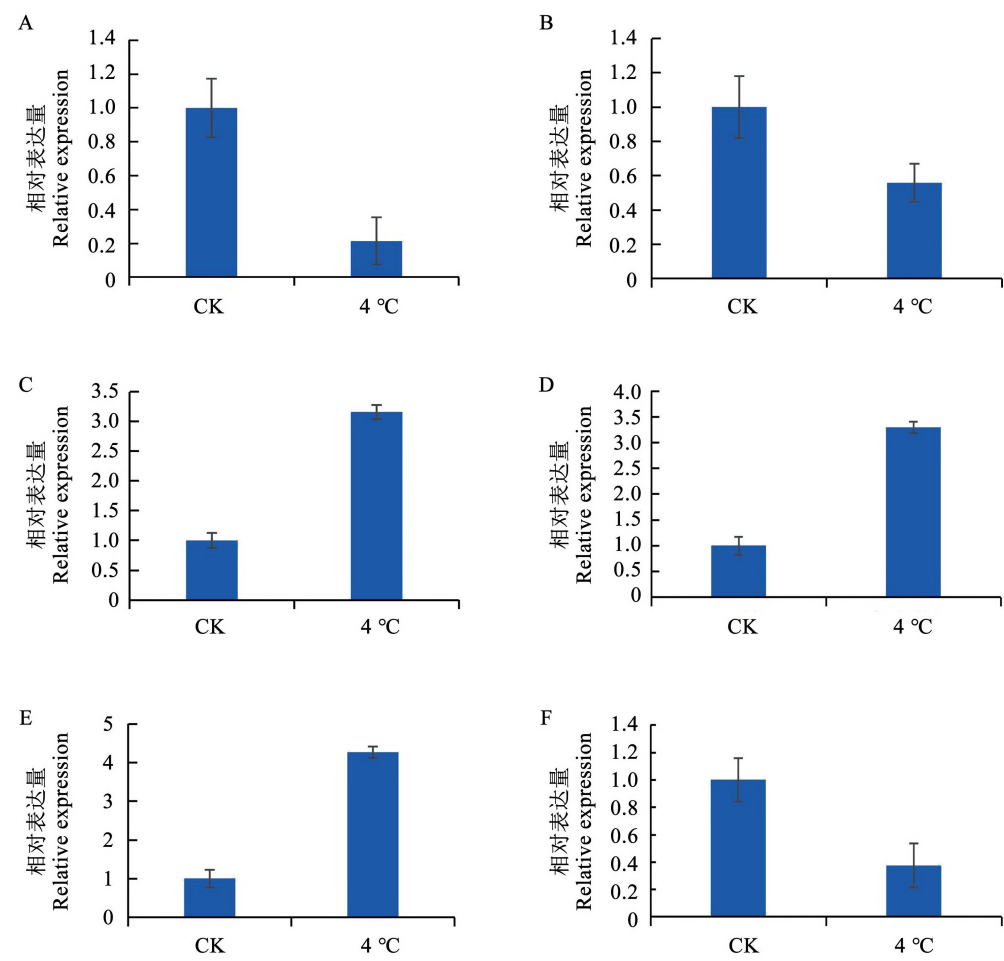
图 7 大豆 FAR1/FHY3 家族基因在盐、低温、干旱和高温胁迫下表达模式分析

Fig. 7 Transcript expression analysis of soybean FAR1/FHY3 genes under stress conditions of salt, low temperature, drought and heat stress

2.8 低温胁迫下基因表达量 qRT-PCR 验证

采用 qRT-PCR 方法对低温胁迫中变化趋势较明显的 6 个基因的表达情况进行验证表明, *Glyma. 13g211200*、*Glyma. 12g052000* 和 *Glyma. 15g125400* 基因表达量在低温胁迫下与对照相比显著上调,而

Glyma. 09G012900、*Glyma. 11g088700* 和 *Glyma. 20G156100* 在低温胁迫下与对照相比显著下调(图 8)。其表达趋势与转录组分析的结果一致,说明部分大豆 FAR1/FHY3 家族成员的表达受低温胁迫影响。



注: A. *Glyma. 09G012900*; B. *Glyma. 11g088700*; C. *Glyma. 12g052000*; D. *Glyma. 13g211200*; E. *Glyma. 15g125400*; F. *Glyma. 20G156100*.

图 8 低温胁迫下大豆 FAR1/FHY3 基因表达 qRT-PCR 分析

Fig. 8 The FAR1/FHY3 expression of soybean by qRT-PCR under low temperature stress

3 讨论

本研究在大豆中共鉴定出 72 个 FAR1/FHY3 基因,对其理化性质和亚细胞定位进行了分析和预测显示,大豆 FAR1/FHY3 蛋白主要定位于叶绿体和细胞核中,同时其他的细胞器中也有少量存在。这与拟南芥、茶树中的报道相似^[6,15]。在拟南芥中,AtFRS1、AtFRS8 和 AtFRS9 也预测到缺乏核定位序列,但它们仍然可以靶向细胞核^[6]。同时,推测 FAR1/FHY3 定位在叶绿体上,可能与该基因家族参与叶绿体生物发生和叶绿素生物合成相关^[26]。

利用系统进化树构建了大豆与拟南芥、玉米

FAR1/FHY3 蛋白的进化关系,根据亲缘关系远近可将这些成员分为 5 个组,除第 II、III 组外,大豆与拟南芥 FAR1/FHY3 基因具有高度相似性,暗示可以基于拟南芥 FAR1/FHY3 的特定功能来推测同组内大豆 FAR1/FHY3 的功能。第 I、II 和 III 组中大豆 FAR1/FHY3 家族成员与玉米 FAR1/FHY3 家族成员具有较近的亲缘关系,表示其可能具有共同的祖先,这可为推测其功能与作用机制提供思路。基因的结构特征是植物适应环境变化的重要分子基础,是不同基因家族群体的重要表现。进一步鉴定了大豆 FAR1/FHY3 家族的保守蛋白基序和基因结构,同一进化分支的成员具有相同或相似的基序分布,表明相同组内的基因具有相似的功能。串联和

节段重复有助于进化过程中的基因家族生成^[27],共线性分析显示,72 个大豆 FAR1/FHY3 基因中,共有 24 个同源基因对,这些同源基因对只存在于同一亚家族内,说明该家族基因片段重复是其家族扩大的主要原因。

启动子顺式作用元件分析表明,大豆 FAR1/FHY3 除了光信号反应元件外,还含有赤霉素、生长素、脱落酸和水杨酸等应答元件以及防御应激响应等元件。光信号调节蛋白在植物的耐逆性中发挥着不可替代的作用^[28-30],为了确保植物在不断变化的环境中生存和适应,光调节过程与内部(激素)和其他外部信息(生物和非生物胁迫)相协调^[31]。大豆 FAR1/FHY3 的组织特异性表达差异较大,表明这些 FAR1/FHY3 可能发挥着不同功能。这与前人的研究是一致的,表明它们参与不同的细胞过程和细胞信号传导^[8,11]。逆境胁迫表达分析表明,部分大豆 FAR1/FHY3 基因受盐和温度胁迫诱导的表达量存在差异,尤其是受低温诱导下调表达的基因数量最多,这与茶叶 FAR1/FHY3 家族基因表达特征相类似^[15]。为了验证大豆 FAR1/FHY3 对低温胁迫的响应,对低温胁迫下表达量差异显著的 6 个家族成员进行 qRT-PCR 分析表明,其表达情况与转录组分析的结果一致。进一步说明 FAR1/FHY3 基因家族在大豆低温胁迫应答方面具有重要功能,但其分子机制还需进一步阐释。

4 结论

本研究通过全基因组分析在大豆中鉴定了 72 个 FAR1/FHY3 基因,并鉴定了基因的染色体位置、系统发育关系、基因结构、保守基序、共线性关系、启动子顺式元件和基因表达模式。大豆 FAR1/FHY3 基因分为 5 个亚家族,在大豆不同组织部位以及非生物胁迫过程差异性表达,广泛参与光信号传导、盐胁迫和温度胁迫的应答,尤其在低温胁迫下,该家族多个基因参与应答。这些发现可以为后续研究大豆 FAR1/FHY3 基因家族功能奠定基础,并将为大豆的遗传改良提供理论和经验依据。

参考文献

[1] DENG X W, QUAIL P H. Signalling in light-controlled development[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1999, 10 (2): 121-129.

[2] HUANG X, OUYANG X, YANG P, et al. *Arabidopsis* FHY3 and HY5 positively mediate induction of COP1 transcription in response to photomorphogenic UV-B light[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24 (11): 4590-4606.

[3] HUDSON M, RINGLI C, BOYLAN M T, et al. The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling [J]. *Genes & Development*, 1999, 13(15): 2017-2027.

[4] WANG H, DENG X W. *Arabidopsis* FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1 [J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21 (6): 1339-1349.

[5] ALBERGHINA L, ROSSI R L, QUERIN L, et al. A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2004, 167(3): 433-443.

[6] LIN R, WANG H. *Arabidopsis* FHY3/FAR1 gene family and distinct roles of its members in light control of *Arabidopsis* development [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(4): 4010-4022.

[7] LIN R, DING L, CASOLA C, et al. Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2007, 318(5854): 1302-1305.

[8] HUDSON M E, LISCH D R, QUAIL P H. The FHY3 and FAR1 genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway[J]. *The Plant Journal*, 2003, 34(4): 453-471.

[9] LIN R, TENG Y, PARK H J, et al. Discrete and essential roles of the multiple domains of *Arabidopsis* FHY3 in mediating phytochrome A signal transduction[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(2): 981-992.

[10] REA A C. Avoiding shade to grow taller but not always stronger: Phytochrome-jasmonic acid interplay[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(9): 1941-1942.

[11] LIU Y, WEI H, MA M, et al. *Arabidopsis* FHY3 and FAR1 regulate the balance between growth and defense responses under shade conditions[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(9): 2089-2106.

[12] XIE Y, LIU Y, MA M, et al. *Arabidopsis* FHY3 and FAR1 integrate light and strigolactone signaling to regulate branching[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1955.

[13] TANG W, JI Q, HUANG Y, et al. Far-red elongated hypocotyl3 and far-red impaired response1 transcription factors integrate light and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 857-866.

[14] LETUNIC I, BORK P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46 (D1): D493-D496.

[15] LIU Z, AN C, ZHAO Y, et al. Genome-wide identification and characterization of the CsFHY3/FAR1 gene family and expression analysis under biotic and abiotic stresses in tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. *Plants*, 2021, 10(3): 570.

[16] 闫彩霞,李春娟,孙全喜,等.花生中 FAR1-5 转录因子的克隆和功能分析[J]. *花生学报*, 2020, 49(2): 16-20.

YAN C X, LI C J, SUN Q X, et al. Cloning and function analysis of FAR1-5 transcription factor in peanut [J]. *Journal of peanut Science*, 2020, 49(2): 16-20.

[17] 陈渝,邓洁,陈君愉,等.番茄 FAR1/FHY3 转录因子家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. *植物生理学报*, 2021, 57 (10): 1983-1995.

CHEN Y, DENG J, CHEN J Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of FAR1/FHY3 transcription factor family in tomato [J]. Plant Physiology Journal, 2021, 57 (10): 1983-1995.

[18] TANG H, JING D, LIU C, et al. Genome-wide identification and expression analyses of the *FAR1/FHY3* gene family provide insight into inflorescence development in maize [J]. Current Issues in Molecular Biology, 2024, 46(1): 430-449.

[19] DAI J, SUN J, PENG W, et al. FAR1/FHY3 transcription factors positively regulate the salt and temperature stress responses in *Eucalyptus grandis* [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 883654.

[20] CHEN S, CHEN Y, LIANG M, et al. Genome-wide identification and molecular expression profile analysis of *FHY3/FAR1* gene family in walnut (*Juglans sigillata* L.) development [J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 673.

[21] 赵小波, 李春娟, 孙全喜, 等. 基于全基因组水平的花生 FAR1 转录因子家族分析[J]. 花生学报, 2024, 53(2): 1-9.

ZHAO X B, LI C J, SUN Q X, et al. Genome-wide analysis of the FAR1 gene family in peanut [J]. Journal of peanut Science, 2024, 53(2): 1-9.

[22] 陈林英, 李佳佳, 王博, 等. WRKY 转录因子在大豆响应生物和非生物胁迫中的功能研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(2): 323-332.

CHEN L Y, LI J J, WANG B, et al. Research progress on the function of wrky transcription factor response to biotic and abiotic stresses in soybean [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(2): 323-332.

[23] CHEN C, WU Y, LI J, et al. TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. Molecular Plant, 2023, 16(11): 1733-1742. [LinkOut]

[24] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v4: Recent updates and new developments [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W256-W259.

[25] SCHMUTZ J, CANNON S B, SCHLUETER J, et al. Genome sequence of the Palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463 (7278): 178-183.

[26] WANG H, WANG H. Multifaceted roles of FHY3 and FAR1 in light signaling and beyond[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20 (7): 453-461.

[27] HERATH V, VERCHOT J. Insight into the bZIP gene family in *Solanum tuberosum*: Genome and transcriptome analysis to understand the roles of gene diversification in spatiotemporal gene expression and function [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(1): 253.

[28] HAN R, MA L, LV Y, et al. SALT OVERLY SENSITIVE2 stabilizes phytochrome-interacting factors PIF4 and PIF5 to promote *Arabidopsis* shade avoidance[J]. The Plant Cell, 2023, 35(8): 2972-2996.

[29] MA L, LI G. *Arabidopsis* FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 negatively regulates carbon starvation responses[J]. Plant, Cell & Environment, 2021, 44(6): 1816-1829.

[30] LIU X, JIANG W, LI Y, et al. *FERONIA* coordinates plant growth and salt tolerance via the phosphorylation of phyB [J]. Nature Plants, 2023, 9(4): 645-660.

[31] ZHENG Y, SUN Y, LIU Y. Emerging roles of FHY3 and FAR1 as system integrators in plant development [J]. Plant and Cell Physiology, 2023, 64(10): 1139-1145.

协办单位

中国作物学会大豆专业委员会
东北农业大学大豆研究所
吉林省农业科学院大豆研究所
南京农业大学大豆研究所
辽宁省农业科学院作物研究所
河北省农林科学院粮油作物研究所