

张 斌. 大豆转录因子基因 *GmbHLH130* 克隆及在干旱胁迫中的功能分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(7): 1441-1448.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.07.001

# 大豆转录因子基因 *GmbHLH130* 克隆及在干旱胁迫中的功能分析

张 斌

(湖南科技学院/湖南省银杏工程技术研究中心, 湖南 永州 425199)

**摘要:** 为了探究大豆 *GmbHLH130* 基因在植物干旱胁迫中的调控功能, 利用生物信息学分析 *GmbHLH130* 与其他物种 bHLH 家族成员的系统进化关系, 检测 *GmbHLH130* 基因及其启动子对干旱胁迫的响应, 对 *GmbHLH130* 蛋白的亚细胞定位和转录激活活性进行分析, 最后初步评估 *GmbHLH130* 基因过表达拟南芥的耐旱性。结果显示, 在进化树中 *GmbHLH130* 与拟南芥 *AtbHLH122* 进化关系最近; *GmbHLH130* 基因受干旱诱导上调表达; *GmbHLH130* 基因启动子也受干旱诱导激活下游报告基因; 烟草叶片瞬时表达分析结果表明 *GmbHLH130* 蛋白定位于细胞核, 并且具有转录激活活性。此外, *GmbHLH130* 基因过表达拟南芥在干旱处理下的绿色子叶率和根长均显著大于野生型。本研究结果初步证明了大豆 *GmbHLH130* 基因在增强植物耐旱方面的功能, 为后续探究其参与耐旱性调控的分子机制提供了理论依据。

**关键词:** 大豆; *GmbHLH130*; 干旱胁迫; 耐旱性

**中图分类号:** S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)07-1441-08

## Cloning and functional analysis of soybean transcription factor *GmbHLH130* gene under drought stress

ZHANG Bin

(Hunan University of Science and Engineering/Hunan Provincial Engineering Research Center for Ginkgo biloba, Yongzhou 425199, China)

**Abstract:** To explore the regulatory function of soybean *GmbHLH130* gene in plant drought stress, bioinformatics was used to analyze the phylogenetic relationship between *GmbHLH130* protein and bHLH members of other species. The response of *GmbHLH130* and its promoter to drought stress was detected, and the subcellular localization and transcriptional activation of *GmbHLH130* protein were analyzed. Finally, the drought tolerance of *Arabidopsis* which overexpressed *GmbHLH130* was preliminarily evaluated. The results showed that *GmbHLH130* protein was closest to *AtbHLH122* protein in the phylogenetic tree. The expression level of *GmbHLH130* gene was up-regulated under drought treatment. The promoter of *GmbHLH130* gene was also induced by drought stress to activate downstream reporter gene. Transient expression of *GmbHLH130* in tobacco leaves indicated that *GmbHLH130* was localized in the nucleus and had transcriptional activation activity. In addition, the green cotyledon percentage and root length of *GmbHLH130* overexpressed *Arabidopsis* were all significantly higher than those of wide type under drought treatment. The results of the study preliminarily proved the function of soybean *GmbHLH130* gene in enhancing plant drought tolerance, and provided theoretical basis for further investigation of its molecular mechanism involved in drought tolerance regulation.

**Key words:** soybean; *GmbHLH130*; drought stress; drought tolerance

收稿日期: 2023-01-16

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30274)

作者简介: 张 斌(1981-), 男, 湖南永州人, 博士, 副教授, 主要从事植物发育生物学和植物耐逆性研究。(E-mail) zhang-bin27104@163.com

植物在生长发育过程中经常会受到多种不利环境因素的影响, 如高盐、干旱、高温和低温等, 其中干旱胁迫是导致农作物减产的重要原因之一<sup>[1]</sup>。植物在长期的进化过程中形成了多种应对干旱胁迫的

方式,如增加叶片蜡质、气孔关闭等生理响应,关键基因的响应引起植物体内渗透调节物质、抗氧化酶活性增加等分子调控<sup>[2]</sup>。转录因子在植物干旱胁迫应答过程中发挥重要作用。目前已知能够参与植物干旱胁迫的转录因子家族包括:MYB<sup>[3]</sup>、bHLH<sup>[4]</sup>、bZIP<sup>[5]</sup>、WRKY<sup>[6]</sup>和AP2/ERF<sup>[7]</sup>等。转录因子发挥作用的分子机制是其结合到胁迫相关基因启动子的特定顺式作用元件上,进而激活或抑制下游基因的表达,最终防止或减少逆境胁迫对植物的伤害。bHLH家族是被子植物中第二大转录因子家族,其广泛分布于所有的真核生物中。bHLH家族蛋白质能够结合到基因启动子区的E-box或G-box元件上调控基因表达<sup>[8]</sup>。bHLH转录因子在植物干旱胁迫响应中的功能及分子机制已有较多报道。例如,过表达拟南芥*AtbHLH112*基因有利于降低植株体内活性氧水平和提高脯氨酸含量,增强转基因拟南芥植株对干旱胁迫的耐受性<sup>[4]</sup>。拟南芥*At-bHLH122*在干旱和渗透胁迫响应过程中均发挥重要作用,过表达*AtbHLH122*基因的转基因拟南芥耐旱性和耐盐性均明显增强<sup>[9]</sup>。bHLH转录因子AmDEL则可通过介导黄酮类物质的大量累积增强植物耐旱性<sup>[10]</sup>。密罗木家族基因*Mf-bHLH38*<sup>[11]</sup>、日本百脉根*LjbHLH34*<sup>[12]</sup>等基因均能正调节植物的耐旱性。转录因子bHLH家族成员在植物耐旱性调控过程中的保守功能使其在作物耐旱性育种改良中具有重大价值。

大豆是中国重要的粮油作物,是食用油、植物蛋白和动物饲料的关键原料,但是其生产也受到干旱胁迫的影响。尽管在大豆耐旱机理研究和品种选育方面已有较多报道<sup>[13-14]</sup>,但至今仍无法阐明大豆应对干旱胁迫的分子调控网络。研究结果表明,大豆中有308个bHLH家族成员,其中GmORG3蛋白能够通过减少根对镉的吸收和向地上部的转运增强转基因大豆的耐镉性<sup>[15]</sup>,GmPIB1能够结合到活性氧(ROS)产生关键酶编码基因*GmSPOD1*启动子上的E-box元件抑制其表达,减少ROS的产生,进而增强对大豆疫霉菌的抗性<sup>[16]</sup>。此外,GmbHLH57和GmbHLH300在大豆铁稳态维持方面发挥重要作用<sup>[17]</sup>。然而,大多数大豆bHLH转录因子家族基因的生物学功能,尤其是在干旱胁迫应答方面的功能和分子机制尚不清楚。本研究前期从大豆中筛选出1个表达受干旱诱导显著上调的bHLH家族基因*Gm-*

*bHLH130*,结合生物信息学技术、亚细胞定位、转录激活活性分析及转基因拟南芥相关试验初步探究了其在植物干旱胁迫中的功能。本研究结果将为进一步解析大豆干旱胁迫应答机制和抗旱品种的分子育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 系统进化树构建

下载已报道的参与植物非生物胁迫(包括干旱胁迫、盐胁迫)调控的bHLH家族成员的氨基酸序列,包括MfbHLH38(MT383747)、GmbHLH300(NP\_001354033)、Os-bHLH148(AK071734)、VvbHLH1(XP\_002270239)、At-bHLH17(At2g46510)、FtbHLH3(KU296217)、TtbHLH1(KM101094)、GmbHLH57(XP\_003540203)、OsbHLH035(AK106292)、AtbHLH122(At1g51140)、AtbHLH68(At4g29100)、OsbHLH068(Os04g0631600)、AtbHLH112(AT1G61660)。将整理好的氨基酸序列与GmbHLH130(LOC100812802)序列使用Clustal X软件进行多重比对,利用MAGA-X软件再次分析氨基酸多重比对结果,然后利用邻接法(Neighbor-joining,NJ)绘制系统进化树,参数设置:泊松模型,Bootstrap=1 000。

### 1.2 大豆种植及模拟干旱处理

试验用栽培大豆品种为Williams 82。将大豆种子在水中浸泡6 h后均匀铺在润湿的滤纸上萌发,待长出胚根(约1.0~1.5 cm)后移至石英砂中,用1/2 Hoagland营养液浇灌,在生长室进行培养,生长环境:温度25℃,空气相对湿度60%~70%,长日照(昼16 h/夜8 h)。待幼苗的第一对真叶展开后,挑选株高一一致的植株放置在黑暗条件下继续培养24 h。用含有20%聚乙二醇(PEG)的1/2 Hoagland营养液(干旱处理)浇灌,分别在0 h、3 h、6 h、12 h和24 h取大豆植株的根和叶,液氮速冻后放于超低温冰箱保存,每个时间点、每个组织均包括3组生物学重复。

### 1.3 总RNA提取和基因表达水平检测

使用RNA提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取大豆根和叶的总RNA,使用Nanodrop 2000测定RNA浓度,根据反转录试剂盒[SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix,赛默飞世尔科技(中国)有限公司]的说明书操作合成cDNA。以合成的cDNA为模板进行半定量PCR分析基因的表达情况,PCR反应总体积为20.0 μl:10.0 μl Taq Mix[翌圣生物科技(上海)股份有限公

司], 8.0  $\mu\text{l}$  去离子水, 正向和反向引物各 0.5  $\mu\text{l}$ , cDNA 模板 1.0  $\mu\text{l}$ , 以大豆 *GmUBI3* 基因作为内参基因, 本研究所用的引物见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因	引物序列(5'→3')	目的
<i>GmUBI3</i>	F:GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC R:ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG	校正基因 表达水平
<i>AtACTIN2</i>	F:CAACTATGTTCTCAGGTATTGCAGA R:GTCATGGAAACGATGCTCTTTAGT	
<i>GmbHLH130</i>	F:GTGCTTCTGGCAGTCTTTTG R:AGGCTTTCATTCCATTTTCGG	基因表达 检测
<i>GmbHLH130</i>	F:ATGAGTGTATGTATAGTCTCTGTTTC R:TCAAGCACAAAGTCTAGTGAAT	CDS 片段 克隆

CDS: 编码序列。

#### 1.4 GUS( $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因) 组织化学染色

以 *GmbHLH130* 基因起始密码子上游 1 500 bp 序列作为启动子区, 以大豆 DNA 为模板克隆启动子片段, 插入双元表达载体 PBI101 获得融合质粒 *P<sub>GmbHLH130</sub>::GUS*。将质粒 *P<sub>GmbHLH130</sub>::GUS* 导入根癌农杆菌 GV3101, 利用浸花转化法获得转基因拟南芥, 并筛选得到 T3 代纯合子。将在正常 MS 培养基上培养 7 d 的拟南芥幼苗分别用去离子水和 20% PEG 处理 24 h, 然后取幼苗浸没到 GUS 染色液 [1.44 ml 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.06 ml 1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、1.00 ml 100 mmol/L  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、1.00 ml 100 mmol/L  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、500  $\mu\text{l}$  500 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA)、50  $\mu\text{l}$  TritonX-100、20 mg 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷 (X-Gluc), 定容至 50.00 ml] 中, 置于 37  $^\circ\text{C}$ , 避光染色 12 h。倒掉 GUS 染色液后, 用 75% 乙醇脱色, 最后观察 GUS 染色情况。

#### 1.5 亚细胞定位检测

将不含终止密码子的编码序列 (CDS) 片段插入 pCAMBIA1300-GFP 载体, 获得重组质粒 35S::*GmbHLH130*::GFP 并导入根癌农杆菌 GV3101。根据已报道的方法<sup>[18]</sup>, 将含有重组质粒的农杆菌菌液注射到生长旺盛的本氏烟草叶片中, 以注射 35S::*GFP* 空载体的叶片为对照, 继续培养 24 h, 使用激光共聚焦显微镜观察烟草叶片细胞中的绿色荧光信号。

#### 1.6 转录激活活性检测

克隆 *GmbHLH130* 基因全长 CDS 插入酵母表达载体 pGBKT7 中, 获得重组质粒 pGBKT7-*GmbHLH130*。分别将空载体 pGBKT7 和重组质粒 pG-

BKT7-*GmbHLH130* 导入酵母菌株 Y2H Gold。经 PCR 检测后, 选取阳性单菌落接种到酵母浸出粉葡萄糖液体培养基 (YPDA) 中, 待  $OD_{600}$  为 0.8~1.0 时, 抽取菌液分别滴到 YPDA、SD/-TRP/-HIS 和 SD/-TRP/-HIS/+X- $\alpha$ -Gal 固体培养基上, 5 d 后根据菌落的生长情况判断转录因子的激活活性。

#### 1.7 *GmbHLH130* 基因过表达拟南芥表型分析

克隆 *GmbHLH130* 基因全长 CDS 插入双元表达载体 pFGC5941 的 35S 启动子下游。利用根癌农杆菌介导的浸花法转化野生型拟南芥, 将收获的 T<sub>0</sub> 代种子播种在含有 5 mg/L 草铵膦的 MS 培养基上筛选抗性植株。此外, 提取 RNA 进行半定量 PCR 检测外源基因是否成功高表达, 选取外源基因高表达的株系, 筛选到 T<sub>3</sub> 代, 获得纯合材料用于初步鉴定 *GmbHLH130* 基因的功能。

取同时期收获的野生型 (Col-0, WT) 和转基因拟南芥种子于 75% 乙醇中灭菌 10 min, 在超净台中吹干种子, 然后均匀播种于 MS 培养基和 20% PEG 处理的 MS 培养基中, 在 4  $^\circ\text{C}$  冰箱中春化 3 d 后移至生长室正常培养 7 d, 然后观察不同材料的长势并统计绿色子叶率 (叶片能正常生长呈现绿色的植株数占播种下去的种子总数比例)。此外, 将表面消毒的拟南芥种子播种并经过 4  $^\circ\text{C}$  春化后, 在生长室垂直放置培养, 7 d 后观察并测定不同材料的根长。

野生型拟南芥和过表达株系 (L1 和 L2) 的种子经 75% 乙醇表面消毒后, 均匀播种于湿润的营养土和蛭石混合 (1:1) 基质上, 于 4  $^\circ\text{C}$  春化 3 d 后转移至植物培养室, 使用自来水浇灌, 保证每盆每次浇水量相同。3 周后取长势一致的拟南芥用于干旱处理, 使其自然干旱, 观察野生型和过表达株系的表型变化。

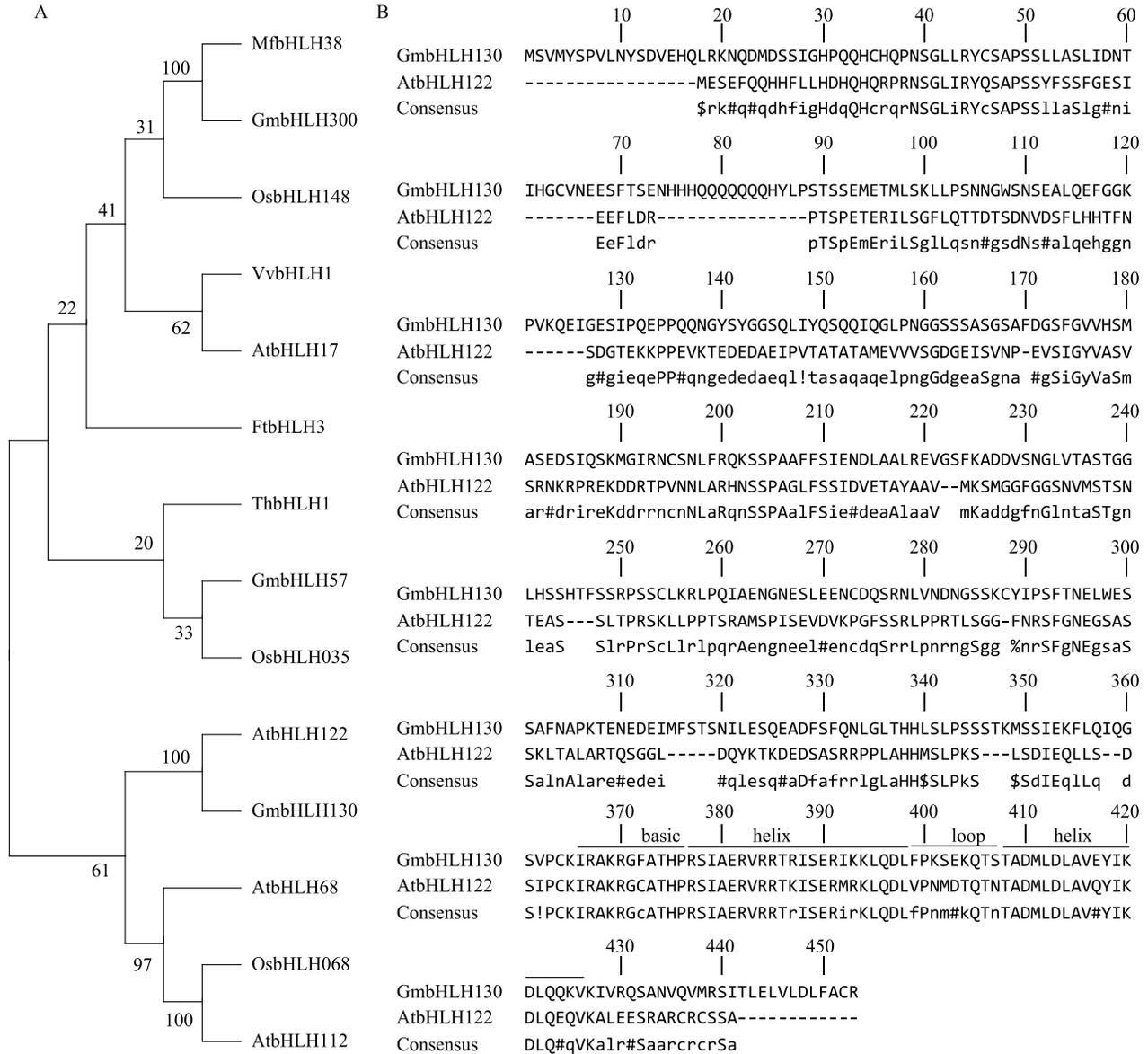
## 2 结果与分析

### 2.1 大豆 *GmbHLH130* 的系统进化树和氨基酸序列分析

根据已知报道, 本研究整理了参与非生物胁迫调控的 bHLH 家族成员的氨基酸序列, 包括 Mf-bHLH38、GmbHLH300、OsbHLH148、VvbHLH1、At-bHLH17、FtbHLH3、ThbHLH1、GmbHLH57、OsbHLH035、AtbHLH122、AtbHLH68、OsbHLH068、At-bHLH112, 与 *GmbHLH130* 构建系统进化树。结果显示, 所选的 bHLH 家族成员分布在 2 个不同分支,

GmbHLH130 与拟南芥 AtbHLH112、AtbHLH122、AtbHLH68 以及水稻 OsbHLH068 在同一分支,并且 GmbHLH130 与 AtbHLH122 进化关系最近(图 1A)。

进一步对比氨基酸序列发现,GmbHLH130 与 AtbHLH122 序列相似度为 48.18%,但 C 端的 bHLH 结构域十分保守(图 1B)。



A:大豆 GmbHLH130 和其他 bHLH 蛋白的系统进化树;B:GmbHLH130 和 AtbHLH122 的氨基酸序列比对。划线部分(basic helix loop helix)为碱性螺旋-环-螺旋。Consensus:一致。

图 1 GmbHLH130 和其他 bHLH 家族蛋白质系统进化分析和氨基酸序列比对

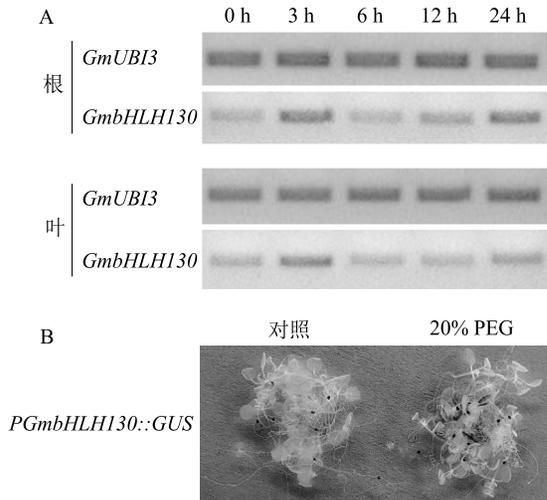
Fig.1 Phylogenetic analysis of GmbHLH130 with other bHLH family proteins and alignment of amino acid sequences

### 2.2 大豆 GmbHLH130 基因对干旱胁迫的响应

利用 PEG 模拟干旱胁迫,检测 GmbHLH130 基因在大豆幼苗中的表达模式。结果显示,干旱处理 3 h 时,GmbHLH130 基因表达水平在根和叶中均明显增加;但随着处理时间增加,表达水平又恢复至与干旱处理前无明显差异(6 h 和 12 h),干旱处理 24

h 时表达水平又增强(图 2A)。进一步克隆了 GmbHLH130 基因起始密码子上游 1 500 bp 的启动子片段,构建 GUS 融合载体,并获得相应的转基因拟南芥植株 P<sub>GmbHLH130</sub>::GUS。在 MS 培养基上生长 2 周的拟南芥 P<sub>GmbHLH130</sub>::GUS 被随机分为 2 组(各 10 株),分别用去离子水和 20% PEG 溶液处理,GUS

染色结果显示对照组未观察到蓝色,而处理组观察到明显的蓝色,说明 *GmbHLH130* 基因启动子受干旱胁迫诱导激活  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因的表达,生成的  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶与染色液中的底物反应生成蓝色物质(图 2B)。



A: 干旱处理下 *GmbHLH130* 基因在大豆根和叶中的表达水平; B: *GmbHLH130* 基因启动子对于干旱胁迫的响应。20% PEG; 20% 聚乙二醇溶液处理。

图 2 *GmbHLH130* 基因及其启动子对于干旱胁迫的响应

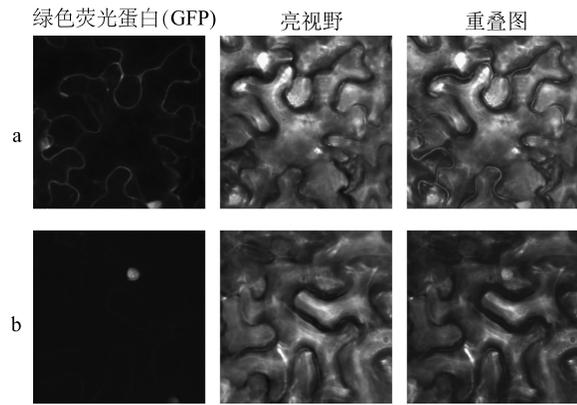
Fig.2 Response of *GmbHLH130* gene and its promoter to drought stress

### 2.3 *GmbHLH130* 蛋白的亚细胞定位

普遍认为转录因子蛋白定位于细胞核内发挥转录调控作用<sup>[18]</sup>。为了研究大豆转录因子蛋白 *GmbHLH130* 的亚细胞定位,将 *GmbHLH130* 基因除终止密码子外的 CDS 插入 pCAMBIA1300-GFP 载体,构建 35S:: *GmbHLH130*:: eGFP 融合表达质粒。通过根癌农杆菌介导的方法在烟草叶片中进行瞬时表达,以转化 pCAMBIA1300-GFP 空载体(35S:: eGFP)的叶片为对照。结果显示,35S:: eGFP 转化的烟草叶片细胞核和细胞膜上均观察到较强的绿色荧光,而仅在 35S:: *GmbHLH130*:: eGFP 融合质粒注射的叶片细胞核中观察到较强的绿色荧光信号,说明转录因子 *GmbHLH130* 蛋白定位在细胞核中(图 3)。

### 2.4 *GmbHLH130* 蛋白具有转录激活活性

利用酵母双杂交系统验证 *GmbHLH130* 转录因子的转录激活活性。结果显示,含有 pGBKT7 空载体或 pGBKT7-*GmbHLH130* 重组质粒的 Y2H 酵母菌株都能在 YPDA 培养基上生长。而在 SD/-TRP/-

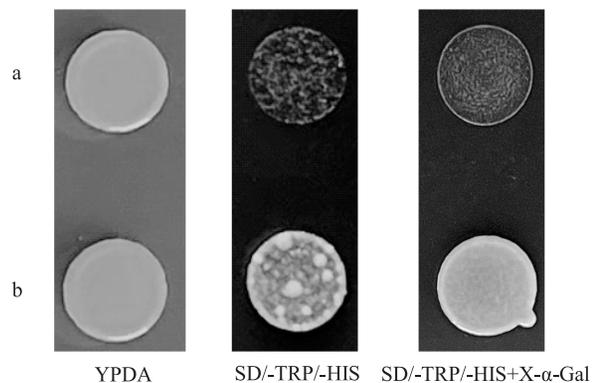


a: 35S::GFP; b: 35S:: *GmbHLH130*::GFP。

图 3 *GmbHLH130* 的亚细胞定位

Fig.3 Subcellular localization of *GmbHLH130* protein

HIS 营养缺陷培养基上,导入 pGBKT7 空载体的酵母菌株不能生长,但含 pGBKT7-*GmbHLH130* 的酵母菌株可在 SD/-TRP/-HIS 培养基上生长,且菌斑在含 X- $\alpha$ -Gal 的 SD/-TRP/-HIS 培养基上变蓝,说明转录因子 *GmbHLH130* 能够激活 Y2HGOLD 菌株中 *HIS*、*MEL1* 基因的表达,具有转录激活活性(图 4)。



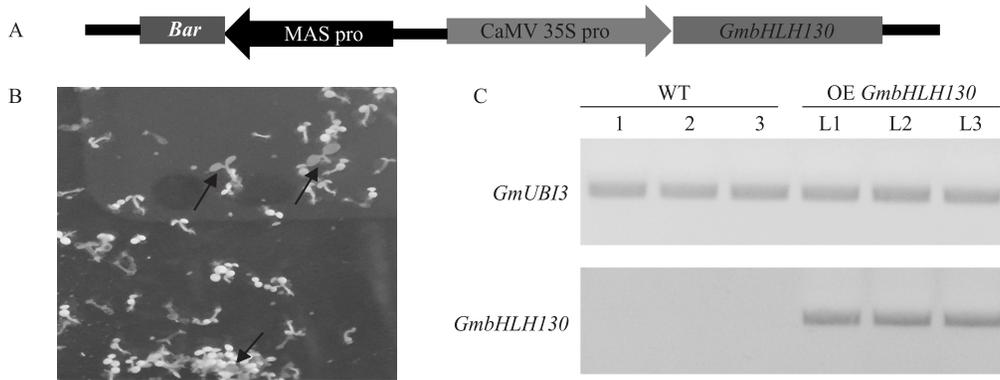
a: pGBKT7; b: pGBKT7-*GmbHLH130*。

图 4 *GmbHLH130* 的转录激活活性

Fig.4 Transcriptional activity of *GmbHLH130* protein

### 2.5 *GmbHLH130* 基因过表达拟南芥的获得及抗旱性分析

为了验证大豆 *GmbHLH130* 基因在植物干旱胁迫响应过程中的功能,本研究构建了该基因的过表达载体(图 5A);通过根癌农杆菌介导的浸花法转化,并在含有草铵膦的 MS 培养基上筛选获得抗性苗(图 5B);进一步提取拟南芥野生型和抗性苗的总 RNA,半定量 PCR 检测结果显示,外源基因 *GmbHLH130* 在拟南芥抗性苗中成功表达(图 5C),说明获得的遗传材料可靠,可用于后续试验。



A: *GmbHLH130* 基因过表达载体构建模式图, *Bar* 表示抗除草剂基因, MAS Pro 和 CaMV 35S pro 均为强启动子, *GmbHLH130* 为目的基因; B: 转基因拟南芥筛选, 箭头所指为拟南芥抗性强苗; C: 转基因拟南芥 PCR 鉴定。

图5 *GmbHLH130* 基因过表达拟南芥的筛选鉴定

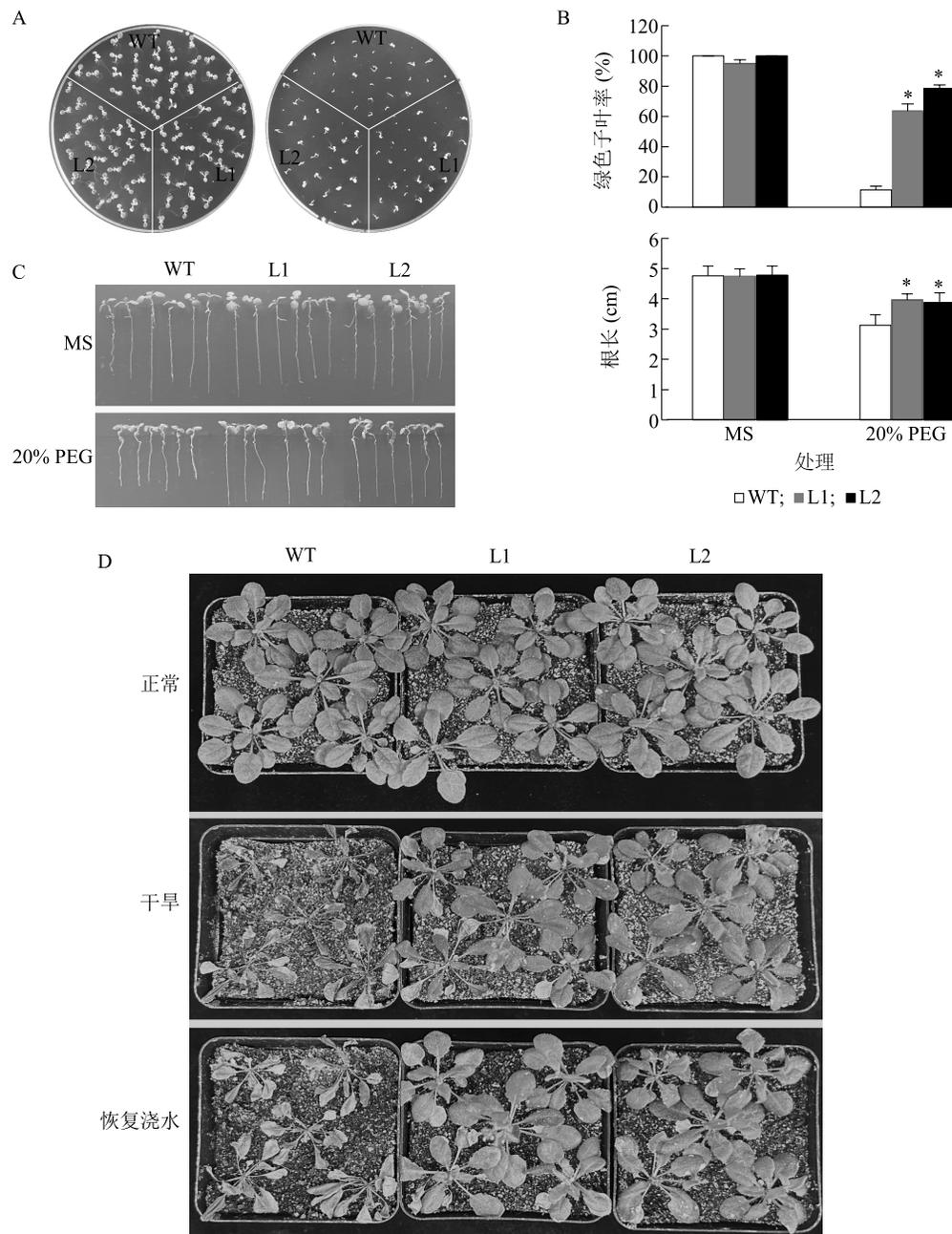
Fig.5 Screening and identification of *GmbHLH130* gene overexpressed *Arabidopsis*

挑选同时期收获的拟南芥种子, 包括野生型 (WT)、转基因拟南芥  $T_3$  代纯合子 (2 个独立株系 L1 和 L2), 均匀播种于正常 MS 培养基和 20% PEG 处理的 MS 培养基上。培养 7 d 后, 观察拟南芥的生长状况, 发现正常培养基上 WT 和转基因拟南芥都能正常生长且子叶几乎都能展开; 而在 20% PEG 处理的 MS 培养基上野生型种子虽然能够萌发, 但是子叶几乎无法正常展开, 即受到严重的抑制, 过表达株系 L1 和 L2 的绿色子叶率则显著高于 WT (图 6A、图 6B)。进一步将在正常 MS 培养基上萌发 2 d 的 WT、过表达株系 L1 和 L2 移至 MS 培养基和 20% PEG 处理的培养基上, 然后将培养基垂直放置培养 7 d, 结果显示正常条件下上述材料的根长无明显差异; 而在 20% PEG 处理条件下, L1 和 L2 的根长显著大于 WT (图 6C)。在盆栽条件下对比过表达 *GmbHLH130* 基因植株与 WT 的耐旱性, 发现正常浇水条件下, 生长表型无明显差异; 而自然干旱导致 WT 植株枯萎死亡, 过表达植株生长虽然受到抑制, 但仍然存活; 恢复浇水后, WT 植株无法复活, 而过表达植株叶片变绿、能够继续生长 (图 6D)。以上结果说明 *GmbHLH130* 基因过表达导致转基因拟南芥植株耐旱性增强。

### 3 讨论

研究结果表明, 植物 *bHLH* 家族基因在植物非生物胁迫逆境响应方面发挥重要作用<sup>[4]</sup>。甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因在高温、低温、干旱、高盐和渗透胁迫下均显著上调, 证明 *BnbHLH122* 基因在植株

抵御逆境胁迫过程中发挥调节作用<sup>[19]</sup>。沈方圆等<sup>[20]</sup>利用全基因组和转录组联合分析在欧洲山杨中鉴定出 4 个潜在的 *bHLH* 抗旱蛋白。本研究通过构建不同植物 *bHLH* 家族成员的系统进化树, 发现大豆 *GmbHLH130* 与拟南芥 *AtbHLH112*、*AtbHLH122*、*AtbHLH68* 及水稻 *OsHLH068* 在同一分支, 并且和 *AtbHLH122* 进化关系最近。对基因家族或同源基因进行系统进化分析时, 一般认为属于同一亚家族或同一进化分支的成员同源性较高, 可能具有类似的生物学功能<sup>[21]</sup>。鉴于拟南芥 *AtbHLH122* 在增强植物耐旱性方面的功能<sup>[9]</sup>, 推测进化关系较近的大豆 *GmbHLH130* 在干旱胁迫响应和适应过程中可能发挥特定功能。本研究结果显示, 20% PEG 模拟处理的大豆根和叶中 *GmbHLH130* 基因的表达水平都显著上调, 且在根中上调更明显, 但是随着处理时间延长基因表达出现上下波动, 这种干旱诱导表达特性可能与其对干旱胁迫的适应有关<sup>[1]</sup>。此外, 克隆 *GmbHLH130* 基因启动子, 构建启动子融合 *GUS* 报告基因的转基因拟南芥  $P_{GmbHLH130}::GUS$ , 通过模拟干旱处理和 *GUS* 染色显示启动子对干旱胁迫的响应, 这一结果也进一步证明 *GmbHLH130* 基因参与干旱胁迫调控过程。通常认为转录因子是核定位蛋白, 在细胞核中结合到目标基因的特定顺式作用元件调控基因表达<sup>[2]</sup>。本研究结果显示, 大豆 *GmbHLH130* 也是核定位转录因子, 在 Y2H 酵母细胞中也能表现明显的转录激活活性, 表明 *GmbHLH130* 作为激活下游靶基因表达的转录因子发挥作用。



A: 正常培养和干旱处理条件下,野生型拟南芥 WT 和过表达株系(L1、L2)的萌发表型比较;B:绿色子叶率;C:拟南芥 WT 和过表达株系(L1、L2)的根长;D:野生型拟南芥 WT 和过表达植株在正常、干旱处理 7 d 和复水 3 d 的表型。20% PEG:20%聚乙二醇溶液处理。

图 6 *GmbHLH130* 基因过表达拟南芥植株的耐旱性分析

Fig.6 Analysis of drought tolerance of *Arabidopsis* plants overexpressing *GmbHLH130* gene

有报道称外源基因在组成型启动子控制下的表达会对转基因拟南芥的正常生长、发育过程产生不利影响<sup>[22]</sup>。本研究通过农杆菌浸花转化法获得了 *GmbHLH130* 基因过表达拟南芥植株。比较拟南芥野生型 WT 和 *GmbHLH130* 过表达株系(L1 和 L2)在正常培养基和栽培基质上的生长表型,发现过表达植株和 WT 表型无明显差异,说明大豆基因的异

源表达未对拟南芥的生长发育产生不利影响。而在干旱条件下,所有材料的生长均受到抑制,绿色子叶率降低,但是过表达植株的绿色子叶率明显高于 WT;此外,模拟干旱条件下,过表达株系的根长也显著大于 WT;盆栽自然干旱条件下过表达植株也表现出较 WT 植株更强的耐旱性。研究结果证明, *GmbHLH130* 基因过表达在不影响植株正常生长过

程的前提下增强了拟南芥的耐旱性,这对大豆等作物耐旱性分子育种具有重要意义。本研究筛选到1个受干旱诱导表达上调的bHLH转录因子家族基因*GmbHLH130*,通过系统进化、亚细胞定位、转录激活活性以及干旱处理的转基因拟南芥表型分析,初步证明了*GmbHLH130*可增强转基因植株的耐旱性。但是转录因子*GmbHLH130*参与植物干旱胁迫响应和适应的分子机制仍需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] LIANG Y F, MA F, LI B Y, et al. A bHLH transcription factor, SlbHLH96, promotes drought tolerance in tomato[J]. Horticulture Research, 2022, 9: 198.
- [2] LIANG B B, WAN S G, MA Q L, et al. A novel bHLH transcription factor PtrbHLH66 from trifoliate orange positively regulates plant drought tolerance by mediating root growth and ROS scavenging[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15053.
- [3] WANG X P, NIU Y L, ZHENG Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 6125.
- [4] LIU Y J, JI X Y, NIE X G, et al. *Arabidopsis* AtbHLH112 regulates the expression of genes involved in abiotic stress tolerance by binding to their E-box and GCG-box motifs[J]. The New Phytologist, 2015, 207(3): 692-709.
- [5] JOO H, BAEK W, LIM C W, et al. Post-translational modifications of bZIP transcription factors in abscisic acid signaling and drought responses[J]. Current Genomics, 2021, 22(1): 4-15.
- [6] KHOSO M A, HUSSAIN A, RITONGA F N, et al. WRKY transcription factors (TFs): molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1039329.
- [7] DEBBARMA J, SARKI Y N, SAIKIA B, et al. Ethylene response factor (ERF) family proteins in abiotic stresses and CRISPR-Cas9 genome editing of ERFs for multiple abiotic stress tolerance in crop plants: a review[J]. Molecular Biotechnology, 2019, 61(2): 153-172.
- [8] BABITHA K C, RAMU S V, PRUTHVI V, et al. Co-expression of AtbHLH17 and AtWRKY28 confers resistance to abiotic stress in *Arabidopsis*[J]. Transgenic Research, 2013, 22(2): 327-341.
- [9] LIU W W, TAI H H, LI S S, et al. bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism[J]. The New phytologist, 2014, 201(4): 1192-1204.
- [10] WANG F B, ZHU H, KONG W L, et al. The *Antirrhinum* *AmDEL* gene enhances flavonoids accumulation and salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Planta, 2016, 244(1): 59-73.
- [11] QIU J R, HUANG Z, XIANG X Y, et al. MbHLH38, a *Myrothamnus flabellifolia* bHLH transcription factor, confers tolerance to drought and salinity stresses in *Arabidopsis*[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 542.
- [12] 刘福,陈诚,张凯旋,等.日本百脉根*LjβHLH34*基因克隆及耐旱功能鉴定[J].草业学报,2023,32(1):178-191.
- [13] VALLIYODAN B, YE H, SONG L, et al. Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(8): 1835-1849.
- [14] 李文滨,宋春晓,苒兴超,等.干旱胁迫下20个大豆品种抗旱性评价[J].东北农业大学学报,2019,50(4):1-10.
- [15] XU Z L, LIU X Q, HE X L, et al. The soybean basic Helix-Loop-Helix transcription factor ORG3-like enhances cadmium tolerance via increased iron and reduced cadmium uptake and transport from roots to shoots[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:1098.
- [16] CHENG Q, DONG L D, GAO T J, et al. The bHLH transcription factor GmPIB1 facilitates resistance to *Phytophthora sojae* in *Glycine max*[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(10): 2527-2541.
- [17] LI L, GAO W W, PENG Q, et al. Two soybean bHLH factors regulate response to iron deficiency[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(7): 608-622.
- [18] KU Y S, NI M, MUNOZ N B, et al. ABAS1 from soybean is a 1R-subtype MYB transcriptional repressor that enhances ABA sensitivity[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(10): 2970-2981.
- [19] 唐佳佳,万云宝,王茂林.甘蓝型油菜*BnbHLH122*基因的克隆、表达模式及胁迫响应分析[J].四川大学学报(自然科学版),2021,58(2):180-188.
- [20] 沈方圆,王岚春,李校.欧洲山杨bHLH转录因子家族全基因组分析[J].四川大学学报(自然科学版),2021,58(3):179-187.
- [21] CHEN Y, ZHU P P, WU S Y. Identification and expression analysis of GRAS transcription factors in the wild relative of sweet potato *Ipomoea trifida*[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 911.
- [22] LI P, ZHANG B, SU T, et al. BrLAS, a GRAS transcription factor from *Brassica rapa*, is involved in drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1792.

(责任编辑:陈海霞)