

张 斌. 大豆转录因子 GmMYC2L 参与植物耐盐性调控[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(7): 1182-1190.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.07.004

大豆转录因子 GmMYC2L 参与植物耐盐性调控

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: 转录因子在植物应对逆境胁迫的响应和调节过程中起着十分重要的作用。为探究大豆 bHLH 转录因子家族成员 GmMYC2L 在植物耐盐胁迫中的功能,本研究利用序列同源比对分析大豆 GmMYC2L 蛋白与三裂叶薯、番茄、芝麻、本氏烟草和拟南芥 MYC2 蛋白的保守结构域,利用半定量 PCR 检测盐胁迫对大豆 *GmMYC2L* 基因表达模式的诱导作用,通过烟草叶片瞬时表达分析 GmMYC2L 蛋白的亚细胞定位,利用浸花法获得转 *GmMYC2L* 基因拟南芥植株,并分析野生型和转基因拟南芥植株对盐胁迫的响应及机制。结果表明,大豆 GmMYC2L 蛋白具有 bHLH 家族典型的保守结构域且定位于细胞核;盐胁迫下,大豆根和叶中 *GmMYC2L* 基因表达量明显上调。盐胁迫下,*GmMYC2L* 基因过表达拟南芥植株叶片中丙二醛含量和过氧化氢含量显著低于野生型拟南芥植株,叶片中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和过氧化物酶 (POD) 活性显著增加;抗氧化酶基因 *AtSOD* 和 *AtPOD* 的相对表达量亦显著上调。以上结果说明大豆 *GmMYC2L* 基因能通过抗氧化途径增强植物的耐盐性。本研究结果为大豆等作物的耐盐性遗传改良提供候选基因。

关键词: 大豆; 转录因子; *GmMYC2L*; 耐盐性

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)07-1182-09

Soybean transcription factor GmMYC2L is involved in the regulation of plant salt tolerance

ZHANG Bin

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

Abstract: Transcription factors play an important role in the response and regulation of plants to adversity stress. In order to explore the function of soybean bHLH transcription factor family member GmMYC2L in plant salt tolerance, the conserved domains of soybean GmMYC2L protein and MYC2 proteins of sweet potato, tomato, sesame, *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* were analyzed by sequence homology comparison. The expression pattern of soybean *GmMYC2L* gene induced by salt stress was detected by semi-quantitative PCR. The subcellular localization of GmMYC2L protein was analyzed by transient expression in tobacco leaves. *GmMYC2L* gene transgenic *Arabidopsis thaliana* plants were obtained by floral dip method. The response and mechanism of wild-type and transgenic *Arabidopsis thaliana* plants to salt stress were analyzed. The results showed that soybean GmMYC2L protein had a typical conserved domain of the bHLH family and the protein was localized in the nucleus. Under salt stress, the expression of *GmMYC2L* gene in soybean roots and leaves was significantly up-regulated. Under salt stress, the contents of malondialdehyde and hydrogen peroxide in the leaves of *GmMYC2L* overexpressing *Arabidopsis thaliana* plants were significantly lower than those of wild-type *Arabidopsis thaliana* plants, and the superoxide dismutase (SOD) activity and peroxidase (POD) activity in the leaves were significantly increased. The relative expression levels of antioxidant enzyme genes *AtSOD* and *AtPOD* were also significantly up-regulated. The above results indicated that soybean *GmMYC2L* gene could enhance salt tolerance of

收稿日期: 2024-03-24

基金项目: 永州市指导性科技计划项目 (2020-YZKJ-001); 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

plants through antioxidant pathway. The results of this study provide candidate genes for genetic improvement of salt tolerance in soybean and other crops.

Key words: soybean; transcription factor; *GmMYC2L*; salt tolerance

植物生长过程中容易受到不利环境因素的影响,包括极端温度、干旱和盐渍化等非生物胁迫及病虫害等生物胁迫^[1]。其中,土壤盐渍化会加剧植物体内活性氧过量积累,破坏 Na⁺ 和 K⁺ 离子平衡,抑制光合作用,进而导致植物生长受阻甚至死亡^[2]。为了在逆境下生长,植物通常会在生理、生化和分子水平上形成应对策略^[3]。分子层面上转录因子是一类可以结合到下游基因启动子元件上调控基因表达水平的蛋白质家族,在植物的耐盐性调控中起重要作用^[4]。目前 WRKY^[5]、ERF^[6]、MYB^[7]、NAC^[8]、ARF^[9]、bZIP^[10] 和 bHLH^[3] 等转录因子参与植物耐盐胁迫调控已得到证实。

转录因子 bHLH 家族成员较多,是植物中的第二大转录因子家族,通常含有两个高度保守的结构域,即基本结构域和 HLH 结构域^[3]。基本结构域位于 N 端,能够结合下游基因启动子上的 G-box 或 E-box 元件;HLH 结构域主要位于 C 端,在蛋白质间相互作用时发挥作用。bHLH 家族成员参与植物耐盐胁迫调控已有较多研究。拟南芥 *AtbHLH122* 基因的表达水平受盐胁迫诱导上调,拟南芥 *AtbHLH122* 突变体对盐胁迫更敏感,而 *AtbHLH122* 基因过表达植株的耐盐性明显增强^[11]。番茄 bHLH 家族成员 Sl-bHLH22 则可通过激活抗氧化系统,清除多余活性氧,增强植株耐盐性^[12]。花生 *AhbHLH121* 蛋白可以直接结合 *AhPOD*、*AhCAT* 和 *AhSOD* 等基因启动子的 G-box/E-box 区域,从而提高上述基因的表达水平;此外,*AhbHLH121* 基因过表达的转基因花生植株在盐处理下的抗氧化酶活性显著上升,活性氧积累量明显减少,即转基因植株对盐胁迫的耐受性明显增强^[13]。编码水稻 bHLH 家族成员 *OrbHLH001* 基因过表达则可激活 K⁺ 通道基因 *OsAKT1* 的表达,进而促进盐胁迫下根和茎中的 K⁺ 向叶片的运输,同时减少根对 Na⁺ 的吸收,维持水稻植株 Na⁺ 含量/K⁺ 含量处于正常水平,减轻盐胁迫对水稻植株造成的损伤^[14]。盐诱导下,大豆 *bHLH* 家族基因 *GmbHLH3* 的表达上调,其编码蛋白质可结合到氯离子通道蛋白质基因 *GmCLC1* 的启动子上并上调其表达水平,进而介导大豆毛状根对 Cl⁻、NO₃⁻ 等离子的吸收并限

制其向地上部的转运,维持 *GmbHLH3* 过表达大豆植株较低的 Cl⁻ 含量/NO₃⁻ 含量和 Na⁺ 含量/K⁺ 含量,增强其耐盐性^[15]。MYC2 属于 bHLH 转录因子,能够响应植物生长发育相关的多种内源和外源信号,在信号转导途径中发挥核心作用^[16]。盐处理可以诱导丹参 *SmMYC2* 基因的表达,过表达该基因可以提高转基因植株体内超氧化物歧化酶(*SOD*)、过氧化物酶(*POD*)和过氧化氢酶(*CAT*)等抗氧化酶活性,增加脯氨酸含量,导致转基因拟南芥植株对盐胁迫的耐受性明显增强^[17]。盐胁迫下,甘薯 *IbMYC2* 基因的表达水平显著上调,*IbMYC2* 基因过表达植株的花青素含量显著增加;同时,盐胁迫还能激活抗氧化酶和脯氨酸合成酶编码基因,增强活性氧清除能力,赋予植株更强的耐盐性能^[4]。

大豆(*Glycine max*)是中国重要的粮油作物,富含蛋白质,是食用油、植物蛋白质和动物饲料的关键原料。Xu 等^[18]从栽培大豆基因组中筛选鉴定出 308 个 *bHLH* 家族基因;其中,该家族成员 *GmPIB1* 能抑制活性氧产生的关键酶编码基因 *GmSPD1* 的表达,减少活性氧(ROS)的积累,增强大豆疫霉菌抗性^[19]。大豆 *GmMYC2* 基因参与盐胁迫适应过程调控,*GmARF16* 转录因子可以直接激活 *GmMYC2* 的表达,*GmMYC2* 负向调控脯氨酸的合成,增强大豆对盐胁迫的敏感性^[20]。本研究团队在前期的研究中筛选到 1 个 *GmMYC2* 的同源基因 *GmMYC2L*,为明确其在盐胁迫应答过程中的功能机理,本研究通过转基因、生理生化测定和分子生物学技术,分析 *GmMYC2L* 基因在盐胁迫下的表达模式及其编码蛋白质的亚细胞定位,探究野生型和转 *GmMYC2L* 基因拟南芥植株在耐盐性方面的差异及机制,为大豆的耐盐品种选育提供理论依据和重要基因资源。

1 材料与方法

1.1 不同植物 MYC2 蛋白质氨基酸序列分析

从大豆基因组参考数据库(<https://soykb.org/>)下载 *GmMYC2L* 氨基酸序列(登录号: Glyma.01G096600),从美国国家生物信息中心(NCBI)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载三裂叶薯

(*Ipomoea triloba*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、本氏烟草(*Nicotiana tabacum*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 MYC2 氨基酸序列,数据库登录号分别为 XP_031095962.1(三裂叶薯)、XP_004244656.1(番茄)、XP_011081344.1(芝麻)、XP_016500166.1(本氏烟草)和 NP_174541.1AtMYC2(拟南芥)。利用 DNAMAN 软件对 GmMYC2L 和 ItMYC2、SiMYC2、SiMYC2、NtMYC2、AtMYC2 的氨基酸序列进行对比。

1.2 组织 RNA 提取和基因表达检测

大豆盆栽试验于 2023 年 3 月在湖南科技学院植物生长室进行。将大豆种子(品种为中黄 13)播种于直径 20 cm、高 30 cm 装有 5 kg 营养土的花盆中,每盆播种 6 颗种子,共 12 盆,于植物生长室进行培养。生长室内温度恒定 20 ℃,相对湿度 60%~70%,日照时间 16 h/d,白天光照度为 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。待大豆幼苗的真叶完全展开后,使用 150 mmol/L NaCl 溶液浇灌,以清水浇灌作为对照(CK),各 6 盆,分别在 0 h、3 h、6 h 和 12 h 时取大豆根和叶各 1 g,液氮速冻后在 -80 ℃ 冰箱中保存。

在研钵中加入液氮和植物组织样品,将样品充分研磨后使用植物 RNA 提取试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司产品]提取总 RNA,取 2 μg RNA 使用反转录试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司产品]合成 cDNA。以 *GmUBI3* 为内参基因,利用 2 \times Hieff Canace[®] PCR Master Mix 高保真酶和 PCR 仪(德国 Biometra 公司产品)进行半定量 PCR,明确大豆幼苗根和叶中 *GmMYC2L* 基因的相对表达水平。所用引物如表 1 所示。

1.3 大豆 GmMYC2L 的亚细胞定位

以大豆 cDNA 为模板,克隆不含终止密码子的 *GmMYC2L* 基因编码序列,并连接到 pCAMBIA1300-GFP 表达载体(上海百风生物科技有限公司产品)35S 启动子下游,获得融合质粒 35S-*GmMYC2L*-GFP。使用农杆菌介导的方法将融合质粒 35S-*GmMYC2L*-GFP 和 pCAMBIA1300-GFP 载体分别转化本氏烟草叶片。其中,转化 pCAMBIA1300-GFP 空载体的烟草叶片为对照。转化后的烟草转移到植物生长室避光培养 1 d,再按 16 h/d 的光照条件培养 1 d,使得外源基因在烟草叶片中产生相应蛋白质。使用 Ultra VIEW VoX 激光共聚焦显微镜(美国 PerkinElmer 公司产品)观察绿色荧光在烟草叶片细

胞中的位置进行 GmMYC2L 蛋白的亚细胞定位。

1.4 载体构建和转基因植株筛选

以大豆 cDNA 为模板,克隆 *GmMYC2L* 基因编码序列,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,切下含有目的条带的凝胶进行片段回收,然后将回收片段插入双元表达载体 pFGC5941 的 35S 启动子下游,获得重组质粒 35S-*GmMYC2L*,并将其转入 GV3101 根癌农杆菌。利用浸花法转化野生型拟南芥,收获 T_0 代种子。将 T_0 代种子经 75% 乙醇消毒 5 min 后均匀撒在含 25 mg/L 潮霉素(HYG)的 MS 培养基上,筛选得到能正常生长的抗性幼苗。进一步提取野生型拟南芥和抗性幼苗的 DNA 和 RNA,通过荧光定量 PCR 检测抗性植株中 *Hyg* 基因(所用引物见表 1)是否存在以及 *GmMYC2L* 的相对表达水平,得到过表达转基因植株(OE),将转基因植株继续培养,收获相应的种子用于后续试验。荧光定量 PCR 所用引物见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'→3')	目的
<i>GmUBI3</i> -F	GTGTAATGTTCGATGTGTTCCC	校正基因表达水平
<i>GmUBI3</i> -R	ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG	校正基因表达水平
<i>AtACTIN2</i> -F	CAACTATGTTCTCAGGTATTGCAGA	校正基因表达水平
<i>AtACTIN2</i> -R	GTCATGGAACGATGTCTCTTTAGT	校正基因表达水平
<i>GmMYC2L</i> -F	CTCACTCTGGCTCAACCCCTG	基因表达检测
<i>GmMYC2L</i> -R	CAGCAGCACTAGGGGTATCG	基因表达检测
<i>AtSOD</i> -F	TGGAAGTCCACCTTCACAA	基因表达检测
<i>AtSOD</i> -R	TTCCGAGGTCATCAGGCTCT	基因表达检测
<i>AtPOD</i> -F	TAACCAACCAGACGAGACGC	基因表达检测
<i>AtPOD</i> -R	TGGAATCTTCAGGAGAGGC	基因表达检测
<i>Hyg</i> -F	CCGCTCGAAGTAGCGCTCT	基因表达检测
<i>Hyg</i> -R	TTGACTGGAGCGAGCGATG	基因表达检测
<i>GmMYC2L</i> -F	ACTAGTATGACCGAGTACCGGATGA	基因序列克隆
<i>GmMYC2L</i> -R	ACTAGTCTATCGTTGTTTCATCGCCA	基因序列克隆

拟南芥野生型和转基因植株中 *Hyg* 基因检测方法:将能够生长的抗性幼苗移栽到营养土中继续培养,21 d 后剪取植株叶片,使用植物 DNA 提取试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司产品]提取 DNA,利用 20.0 μL PCR 反应体系(2 \times Hieff Canace[®] PCR Master Mix 高保真酶 10.0 μL 、无菌水 8.0 μL 、*Hyg* 正向引物和反向引物各 0.5 μL 、DNA 模板 1.0

μL)进行扩增,即利用 PCR 仪(德国 Biometra 公司产品)进行半定量 PCR,PCR 产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳以检测植株中 *Hyg* 基因表达情况。

拟南芥野生型和转基因植株中 *GmMYC2L* 基因的相对表达水平检测:拟南芥野生型和抗性幼苗培养 21 d 后,利用拟南芥野生型和转基因植株叶片提取 RNA,以 *AtACTIN2* 基因作为内参基因,2×SYBR Green Mix[翌圣生物科技(上海)股份有限公司产品]为荧光染料,参照 Xu 等^[18]方法,利用荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司产品)进行拟南芥野生型和转基因植株的 *GmMYC2L* 基因表达水平检测。

1.5 拟南芥耐盐性评价和生理生化指标测定

将 *GmMYC2L* 过表达拟南芥种子(OE)和野生型拟南芥种子(WT)消毒后均匀播在常规 MS 培养基和含 150 mmol/L NaCl 的 MS 培养基中,每个培养皿播 30 粒种子,4℃放置 3 d 后转移到植物生长室[恒定温度 20℃,相对湿度 60%~70%,日照时间 16 h/d,光照度 100 μmol/(m²·s)]垂直放置,7 d 后观察种子的萌发和根的生长情况,测量并统计平均根长。

将 *GmMYC2L* 过表达拟南芥种子(OE)和野生型拟南芥种子(WT)播种于面积 36 cm²、高 5 cm 装有 100 g 营养土的塑料钵中,每钵播种 6 粒种子,4℃黑暗放置 3 d 后移至植物生长室[恒定温度 20℃,相对湿度 60%~70%,日照时间 16 h/d,光照度为 100 μmol/(m²·s)]培养。21 d 后挑选长势一致的植株分成 2 组,各 12 株,以 150 mmol/L NaCl 水溶液浇灌作为处理,以清水浇灌作为对照,处理 7 d 后观察植株生长状况。参照文献[21]的方法测定不同处理下拟南芥植株叶片的丙二醛(MDA)含量,利用过氧化氢测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司产品)测定拟南芥叶片中的 H₂O₂ 含量。利用总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒和过氧化物酶(POD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司产品),按照试剂盒使用说明书进行不同处理下拟南芥植株(WT 和 OE)叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)的活性测定。以 *AtACTIN2* 为内参基因,2×SYBR Green Mix[翌圣生物科技(上海)股份有限公司产品]为荧光染料,参照 Xu 等^[18]方法,利用荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司产品)进行拟南芥野生型和转基因植株的 *AtSOD* 和 *AtPOD* 基因的相对表达量测定。

上述测定均设 3 个重复,利用 SPSS v20 软件进

行差异显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 大豆转录因子 GmMYC2L 鉴定及 GmMYC2L 基因表达模式

大豆 *GmMYC2L* 的氨基酸序列与三裂叶薯、番茄、芝麻、本氏烟草和拟南芥的 MYC 氨基酸序列比对结果如图 1 所示。从图中可以看出,大豆 *GmMYC2L* 与其他物种 MYC2 的氨基酸序列均具有典型的 bHLH-MYC 结构域和 HLH 结构域。

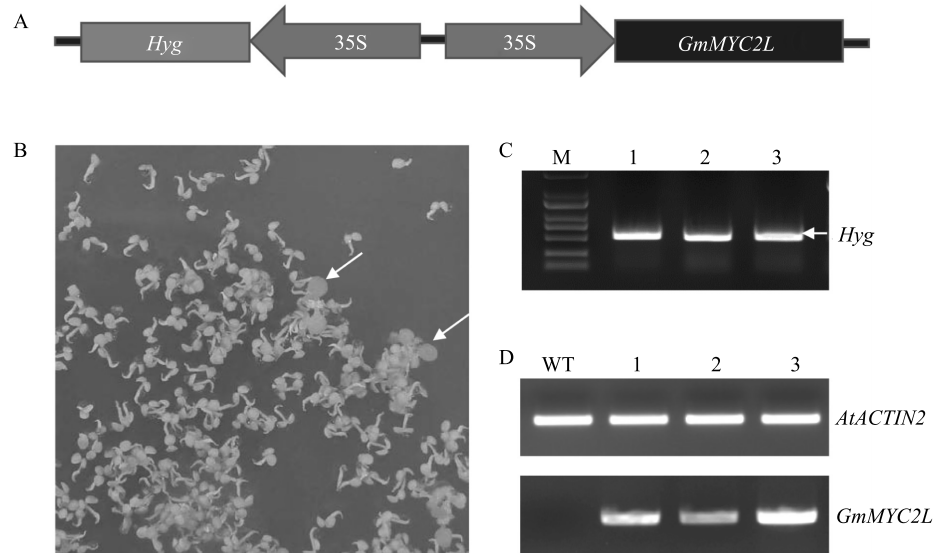
盐胁迫及 CK 处理下大豆幼苗中 *GmMYC2L* 基因的表达情况如图 2 所示。从图可以看出,盐胁迫 3 h,大豆根中 *GmMYC2L* 的表达量明显增加;6 h 时表达量略有降低,但仍明显高于无盐胁迫对照;盐胁迫 3 h,大豆叶中 *GmMYC2L* 的表达水平也呈上调趋势,上述结果说明 *GmMYC2L* 基因参与大豆对盐胁迫的响应过程。

2.2 大豆 GmMYC2L 蛋白的亚细胞定位

分别转化融合质粒 35S-*GmMYC2L*-GFP 和 pCAMBIA1300-GFP 空载体的本氏烟草叶片细胞绿色荧光特征如图 3 所示。从图中可以看出,转化 pCAMBIA1300-GFP 空载体的烟草叶片细胞细胞膜和细胞核中都能够观察到明显的绿色荧光,而转化重组质粒 35S-*GmMYC2L*-GFP 的烟草叶片细胞仅细胞核中有荧光信号分布,说明大豆 *GmMYC2L* 蛋白定位于细胞核。

2.3 外源大豆基因 GmMYC2L 过表达拟南芥植株的筛选鉴定

克隆 *GmMYC2L* 基因全长序列,插入 pFGC5941 载体 35S 启动子下游,获得基因过表达载体 35S-*GmMYC2L*(图 4A)。含有潮霉素抗性的拟南芥幼苗能够正常生长,即子叶正常展开,不含有潮霉素抗性的幼苗则在萌发后生长受到抑制(图 4B)。含有潮霉素抗性的拟南芥幼苗生长 21 d 后叶片 PCR 检测结果显示其含有外源 *Hyg* 基因(图 4C)。含有潮霉素抗性的拟南芥幼苗生长 21 d 后叶片半定量 PCR 分析结果显示内参基因(*AtACTIN2*)在野生型拟南芥(WT)和抗性幼苗均有表达,证明 RNA 提取无误。野生型拟南芥中大豆 *GmMYC2L* 基因不表达,而抗性幼苗中外源大豆基因 *GmMYC2L* 正常表达(图 4D),说明本研究建立的外源大豆基因 *GmMYC2L* 过表达拟南芥植株(OE)是可靠的。



A, 载体构建示意图; B, 箭头所指为具有潮霉素抗性的幼苗, 其余为不具有潮霉素抗性的幼苗; C, M: DNA marker; 1~3 均为具有潮霉素抗性的拟南芥幼苗样本; D, WT 为野生型拟南芥植株; 1~3 为转基因拟南芥植株。

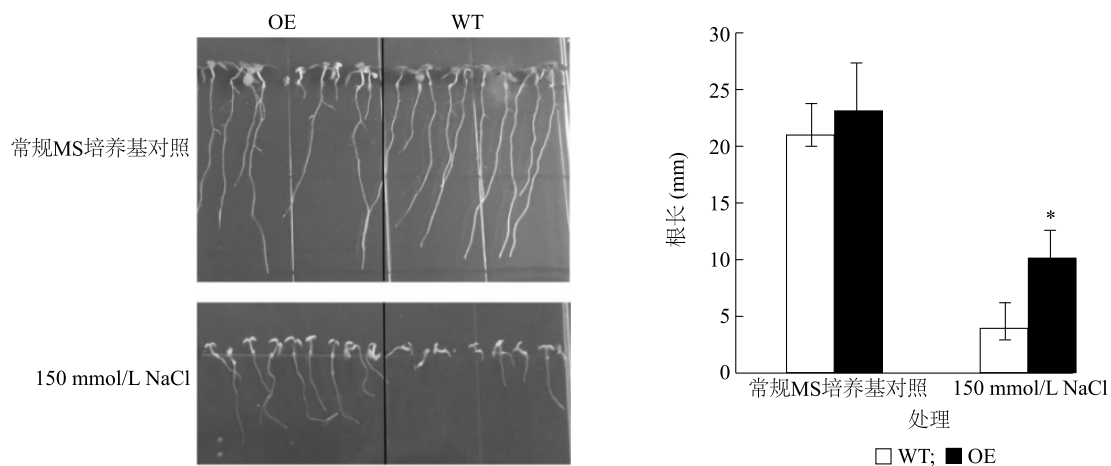
图4 *GmMYC2L* 基因表达载体构建模式及转基因植株筛选与鉴定

Fig.4 Construction mode of *GmMYC2L* gene expression vector and screening and identification of transgenic plants

2.4 过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株的耐盐性

常规 MS 培养基上野生型拟南芥植株 (WT) 和过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (OE) 的根长无显著

差异; 150 mmol/L 盐胁迫下, 过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (OE) 的根长显著长于 WT (图 5)。



图柱上 * 表示相同处理下过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (OE) 和野生型拟南芥植株 (WT) 根长存在显著差异。

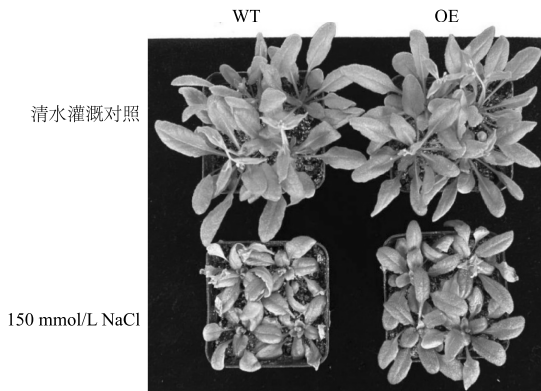
图5 盐胁迫对不同拟南芥植株的根生长影响

Fig.5 Effects of salt stress on root growth of different *Arabidopsis thaliana* plants

清水灌溉对照, 过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (OE) 和野生型拟南芥植株 (WT) 的长势差异不大, 单株鲜重无显著差异; 而 150 mmol/L NaCl 水溶液浇灌处理, 过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (OE) 的长

势明显好于 WT 植株, 单株鲜重显著高于 WT 植株 (图 6, 表 2)。同样, 清水灌溉对照, 过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (OE) 和野生型拟南芥植株 (WT) 叶片中 MDA 含量和 H_2O_2 含量亦无显著差异,

而 150 mmol/L NaCl 水溶液浇灌处理,过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (OE) 和野生型拟南芥植株 (WT) 叶片中 MDA 含量和 H_2O_2 含量均显著增加,且野生型拟南芥植株 (WT) 叶片中 MDA 含量和 H_2O_2 含量显著高于过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (表 2),上述结果说明过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株对盐胁迫的耐受性增强。



WT:野生型拟南芥植株;OE:过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株。

图 6 盐胁迫下不同拟南芥植株的耐盐性表现

Fig.6 The performance of salt tolerance of different *Arabidopsis thaliana* plants under salt stress

表 2 盐胁迫下不同拟南芥植株叶片丙二醛含量和过氧化氢含量
Table 2 Malondialdehyde content and hydrogen peroxide content in leaves of different *Arabidopsis thaliana* plants under salt stress

材料	处理	MDA 含量 (nmol/g)	H_2O_2 含量 (μ mol/g)	单株鲜重 (g)
WT	CK	2.34c	3.12c	0.56a
	NaCl	9.21a	6.45a	0.24c
OE	CK	2.37c	2.99c	0.57a
	NaCl	4.13b	4.88b	0.38b

WT:野生型拟南芥植株;OE:过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株。CK:清水灌溉处理;NaCl:150 mmol/L NaCl 水溶液浇灌处理。同一列数据后不同小写字母表示处理间存在显著差异 ($P<0.05$)。

2.5 *GmMYC2L* 对抗氧化酶活性及其基因表达量的影响

清水灌溉对照,拟南芥 WT 和 OE 叶片中 SOD 活性和 POD 活性均无明显差异;盐胁迫处理,OE 叶片中 SOD 活性和 POD 活性高于野生型植株。与酶活性相对应,盐胁迫处理,过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株 (OE) 叶片中 *AtSOD* 基因和 *AtPOD* 基因的相对表达量显著高于野生型拟南芥植株 (WT) (表 3)。

表 3 拟南芥 WT 和 OE 叶片中超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性及其基因相对表达量

Table 3 Activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) and relative expression levels of their genes in the leaves of WT and OE *Arabidopsis thaliana* plants

材料	处理	SOD 活性 (U/g)	POD 活性 (U/g)	<i>AtSOD</i> 基因 相对表达量	<i>AtPOD</i> 基因 相对表达量
WT	CK	178.88c	41 550c	1.00c	1.00c
	NaCl	222.90b	51 100b	2.51b	5.25b
OE	CK	182.05c	41 240c	1.26c	1.35c
	NaCl	249.90a	58 540a	5.93a	11.43a

WT:野生型拟南芥植株;OE:过表达 *GmMYC2L* 拟南芥植株。CK:清水灌溉处理;NaCl:150 mmol/L NaCl 水溶液浇灌处理。同一列数据后不同小写字母表示处理间存在显著差异 ($P<0.05$)。

3 讨论

盐胁迫已成为农作物生长的主要限制因素之一^[22-25],且中国盐渍化耕地面积呈扩大趋势^[1]。挖掘作物耐盐基因并进行耐盐性品种选育已成为保障作物生产的重要手段。国内外学者在作物耐盐性调控的生理机理、关键基因的挖掘和分子调控网络解析方面已有较多成果^[1]。转录因子在作物耐盐性调控中处于核心位置^[5-10]。转录因子 MYC2 参与植物生长调节、信号传导、激素相互作用及多种非生物胁迫应答等过程^[3,11]。茉莉酸处理条件下,拟南芥 *AtMYC2* 基因过表达,能促进拟南芥花青素的积累,但抑制根系生长^[26]。*l*bMYC2 基因的过表达能增强甘薯植株的耐盐性^[4]。大豆 *bHLH* 家族基因在调节金属离子运输和提高植株耐受生物胁迫方面的作用已有报道^[18-19]。本研究发现大豆 *GmMYC2L* 蛋白也包含与其他植物类似的 bHLH-MYC 和 HLH 保守结构域,无盐胁迫对照大豆根和叶中 *GmMYC2L* 基因表达水平较低,但盐胁迫处理,大豆根和叶中 *GmMYC2L* 基因表达水平平均明显上调,且根中更加明显。根是作物响应盐胁迫最早的器官,*GmMYC2L* 基因在根中迅速上调是作物根系对盐胁迫响应的具体表现。

甘蓝型油菜 *BnMYC2* 基因能调节气孔开闭,进而提高油菜的耐旱性^[27]。Deng 等^[17]发现过表达丹参 *SmMYC2* 的转基因拟南芥和丹参毛状根的耐盐性更强,主要原因是转基因植株在盐胁迫处理下比野生型植株具有更高的抗氧化酶活性以及更低的 MDA 含量和活性氧 (ROS) 含量^[17]。但拟南芥 *At-*

MYC2 基因过表达则导致转基因植株耐盐性明显降低^[16]。因此,不同植物的 MYC2 基因功能是不保守的。本研究通过构建 *GmMYC2L* 基因过表达载体并获得转 *GmMYC2L* 基因拟南芥植株(OE),发现 *GmMYC2L* 基因过表达不影响拟南芥植株的正常生长,在培养基和营养土上拟南芥野生型和转基因植株的生长状况无明显差异;而在盐胁迫处理下,转基因植株的幼苗根长显著长于野生型植株,拟南芥幼苗地上部的单株鲜重亦明显优于野生型植株,说明 *GmMYC2L* 基因过表达赋予拟南芥植株更强的盐胁迫适应能力。但是,Wang 等^[20] 研究显示大豆 *GmMYC2* 负调控植物耐盐性,分析发现其报道的 *GmMYC2* 基因(Glyma.08G271900)与本研究基因 *GmMYC2L* 均被注释为 MYC2,二者相似性为 87.37%,进一步证明植物 MYC2 同源基因功能的多样性。通常非生物胁迫会导致活性氧(ROS)在植株中过量积累,造成细胞的氧化伤害,进而降低酶活性,抑制植物生长^[28]。植物可以通过激活抗氧化酶(如 *SOD* 和 *POD*)活性,维持细胞 ROS 稳态,减少对植株的损害^[29]。脯氨酸是重要的渗透调节物质,可降低逆境下细胞的渗透电位,增强细胞吸水量,减轻逆境对植物生长的影响^[30]。本研究发现大豆 *GmMYC2L* 调节植物耐盐性的生理机制与丹参 *SmMYC2* 类似,过表达 *GmMYC2L* 植株在盐胁迫下积累更少的 MDA 和 H_2O_2 ,同时 *SOD* 和 *POD* 活性增强;对应的基因 *AtSOD*、*AtPOD* 也在盐胁迫处理的 OE 中表现出更高的表达水平。即大豆 bHLH 家族转录因子 *GmMYC2L* 能够通过激活抗氧化途径,提高抗氧化酶活性,清除盐胁迫导致的过量活性氧,从而增强植物的耐盐性。本研究结果为大豆和其他作物耐盐性遗传改良提供依据和基因资源。

参考文献:

- [1] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167:313-324.
- [2] TAYLOR N L, TAN Y F, JACOBY R P, et al. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes[J]. Journal of Proteomics, 2009, 72(3):367-378.
- [3] 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]. New Phytologist, 2015, 207:692-709.
- [4] HU Y F, ZHAO H Y, XUE L Y, et al. *lMYC2* contributes to salt and drought stress tolerance via modulating anthocyanin accumulation and ROS-scavenging system in sweet potato[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(4):2096.
- [5] PHUKAN U J, JEENA G S, SHUKLA R K. WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:760.
- [6] ZHANG G, CHEN M, LI L, et al. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60:3781-3796.
- [7] CUI M H, YOO K S, HYOUNG S J, et al. An *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factor, AtMYB20, negatively regulates type 2C serine/threonine protein phosphatases to enhance salt tolerance[J]. FEBS Lett, 2013, 587(12):1773-1778.
- [8] WANG Y X, LIU Z W, WU Z J, et al. Transcriptome-wide identification and expression analysis of the *NAC* gene family in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze][J]. PLoS One, 2016, 11:e0166727.
- [9] ZHANG M J, XUE Y Y, XU S, et al. Identification of *ARF* genes in *Cucurbita pepo* L. and analysis of expression patterns, and functional analysis of *CpARF22* under drought, salt stress[J]. BMC Genomics, 2024, 25(1):112.
- [10] YANG Y, YU T F, MA J, et al. The soybean bZIP transcription factor gene *GmbZIP2* confers drought and salt resistances in transgenic plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(2):670.
- [11] 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]. New Phytologist, 2014, 201(4):1192-1204.
- [12] WASEEM M, RONG X Y, LI Z G. Dissecting the role of a basic Helix-Loop-Helix transcription factor, *SlbHLH22*, under salt and drought stresses in transgenic *Solanum lycopersicum* L. [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10:734.
- [13] ZHAO X B, WANG Q, YAN C X, et al. The bHLH transcription factor *AhbHLH121* improves salt tolerance in peanut[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 256(2):128492.
- [14] CHEN Y, LI F, MA Y, et al. Overexpression of *OrbHLH001*, a putative helix-loop-helix transcription factor, causes increased expression of AKT1 and maintains ionic balance under salt stress in rice[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(1):93-100.
- [15] LIU X, PI B Y, DU Z Y, et al. The transcription factor *GmbHLH3* confers Cl^- /salt tolerance to soybean by upregulating *GmCLC1* expression for maintenance of anion homeostasis[J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 194:104755.
- [16] VERMA D, JALMI S K, BHAGAT P K, et al. A bHLH transcription factor, MYC2, imparts salt intolerance by regulating proline biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. FEBS Journal, 2020, 287(12):2560-2576.

- [17] DENG H Y, QI L, CAO R Z, et al. Overexpression of *SmMYC2* enhances salt resistance in *Arabidopsis thaliana* and *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2023, 280: 153862.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] WANG C F, LI X M, ZHUANG Y B, et al. A novel miR160a-GmARF16-GmMYC2 module determines soybean salt tolerance and adaptation [J]. *New Phytologist*, 2024, 241 (5): 2176-2192.
- [21] LIU X, YANG X X, ZHANG B. Transcriptome analysis and functional identification of *GmMYB46* in soybean seedlings under salt stress [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e12492.
- [22] 赵欣, 卢海峰, 钱程, 等. 紫花苜蓿叶面积和叶解剖结构对盐胁迫的响应 [J]. *江苏农业科学*, 2023, 51 (19): 145-152.
- [23] 徐文清, 李少楠, 方啸宇, 等. 盐胁迫对2个葡萄品种扦插苗光合特性及抗氧化能力的影响 [J]. *南方农业学报*, 2023, 54 (10): 3000-3009.
- [24] 陈星星, 刘新社, 王盛荣. 腐殖酸对盐胁迫下土壤理化性质、微环境及苦瓜生长的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2023, 51 (17): 138-144.
- [25] 陈亚辉, 张师, 杨庆山, 等. 多枝怪柳叶片响应 NaCl 胁迫的转录组分析 [J]. *江苏农业学报*, 2022, 38 (5): 1188-1202.
- [26] LORENZO O, CHICO J M, SÁNCHEZ-SERRNO J J, et al. Jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (7): 1938-1950.
- [27] WANG W, SHI X, CHEN D, et al. The *Brassica napus* MYC2 regulates drought tolerance by monitoring stomatal closure [J]. *European Journal of Horticultural Science*, 2020, 85: 226-231.
- [28] ZHU J K. Plant salt tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6: 66-71.
- [29] AI HASSAN M, CHAURA J, DONAT-TORRES M P, et al. Antioxidant responses under salinity and drought in three closely related wild monocots with different ecological optima [J]. *AoB Plants*, 2017, 9 (2): plx009.
- [30] KRASENSKY J, JONAK C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63 (4): 1593-1608.

(责任编辑:石春林)