

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.09.003

乔志清, 邱宇姗, 高映慧, 等. 干旱响应的大豆 G-box 结合因子 *GmDIBL1* 的克隆和功能鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(9): 35-44.

干旱响应的大豆 G-box 结合因子 *GmDIBL1* 的克隆和功能鉴定

乔志清^{1,2}, 邱宇姗^{1,2}, 高映慧^{1,2}, 黎焯村³,
刘菲^{1,2}, 张宏菊^{1,2}, 田惠丹^{1,2}, 王巧玲^{1,2},
柳宁^{1,2}, 谭娉婷^{1,2}, 刘晨^{1,2}, 罗明^{1,2}

1. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400715; 2. 南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400715;
3. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715

摘要: 干旱是典型的非生物逆境之一, 严重影响作物的产量品质. 鉴定作物抗/耐旱关键基因功能, 解析其调控机制, 对于培育抗/耐旱作物新种质、保障粮食安全具有重要意义. 大豆是对干旱逆境较敏感的作物, 挖掘寻找大豆抗/耐旱基因、鉴定其功能、明确其调控机制是大豆抗逆研究领域的热点. 通过分析干旱处理的大豆根转录组数据, 获得一个受干旱诱导的 G-box 结合蛋白基因 *GmDIBL1* (*Drought Induced B12D Like 1*), 克隆的 cDNA 序列包含 1 个长 261 bp 的开放阅读框, 编码 86 个氨基酸残基, 推导的分子量为 10.1 kD, 等电点为 9.647. *GmDIBL1* 蛋白质序列与其他物种的 G-box 结合蛋白之间具有较高的保守性, 包含 B12D 结构域(6~73 个氨基酸残基)和跨膜螺旋, N-端具有信号肽, C-端构成非胞质区域(34~86 氨基酸残基), 该蛋白定位于细胞核. *GmDIBL1* 基因在根瘤中的表达水平最高, 根中次之. 干旱处理 12 h 后, 其表达水平显著升高. 在耐旱性较强的‘晋豆 21’根中的表达水平显著高于干旱敏感的‘绥农 26’中的表达水平. 进一步通过在大豆毛状根中超量表达和敲除 *GmDIBL1* 基因, 鉴定了转基因材料对干旱的响应, 证明超量表达 *GmDIBL1* 基因显著提高毛状根复合体的抗旱性. 这些结果说明 *GmDIBL1* 基因是大豆中一个响应干旱胁迫的基因, 在大豆抗/耐干旱逆境中具有重要作用.

关键词: 干旱响应; 大豆; G-box 结合蛋白; *GmDIBL1* 基因;

克隆; 毛状根; 基因编辑

中图分类号: S565.1

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1673-9868(2024)09-0035-10



Cloning and Functional Identification of Drought Responsive G-box Binding Factor *GmDIBL1* in Soybean

收稿日期: 2024-06-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31971984); 重庆市技术创新与应用发展专项一重点项目(cstc2021jscx-gksbx0011); 重庆市科企联合体种质资源收集利用与品种试验项目(cqnynew-kqltxm).

作者简介: 乔志清, 硕士研究生, 主要从事基因功能研究.

通信作者: 罗明, 博士, 研究员, 博士研究生导师.

QIAO Zhiqing^{1,2}, QIU Yushan^{1,2}, GAO Yinghui^{1,2}, LI Yangcun³,
LIU Fei^{1,2}, ZHANG Hongju^{1,2}, TIAN Huidan^{1,2}, WANG Qiaoling^{1,2},
LIU Ning^{1,2}, TAN Pingting^{1,2}, LIU Chen^{1,2}, LUO Ming^{1,2}

1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;

3. College of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Drought is one of the typical abiotic stresses that seriously affect the yield and quality of crops. Identifying the functions of key genes for the drought resistance/tolerance of crop and analyzing their regulatory mechanisms are of great significance for developing new drought resistant germplasm of crops and ensuring food security. Soybean is a crop that is more sensitive to drought stress. Exploring and searching for soybean drought resistance/tolerance genes, identifying their functions, and revealing their regulatory mechanisms are hot topics in the field of soybean stress resistance research. This study analyzed transcriptome data of drought treated soybean roots and obtained a drought induced G-box binding protein gene *GmDIBL1* (*Drought Induced B12D Like 1*). The cloned cDNA contained an open reading frame of 261 bp length, which encoded 86 amino acid residues. The molecular weight and isoelectric point of *GmDIBL1* was 10.1 kD and 9.647, respectively. The *GmDIBL1* protein sequence exhibits a high conservation with G-box binding proteins from other species, including the B12D domain (6-73 amino acid residues) and transmembrane helix. The N-terminus has a signal peptide, while the C-terminus forms a non-cytoplasmic region (34-86 amino acid residues). *GmDIBL1* is located in the nucleus. The expression level of *GmDIBL1* gene in root nodules is the highest, followed by roots. After drought treatment for 12 h, *GmDIBL1* expression level significantly increased. The expression level of *GmDIBL1* was much higher in the root of ‘Jindou 21’ (a drought resistant variety) than in that of ‘Suinong 26’ (a drought sensitive variety). Furthermore, the response of this gene to drought was identified by overexpressing and knocking out the *GmDIBL1* gene in soybean. Overexpressing *GmDIBL1* gene significantly enhanced the drought resistance of the hairy roots complex. These results indicated that the *GmDIBL1* gene is a drought stress responsive gene in soybeans and plays an important role in resistance/tolerance to drought stress.

Key words: drought response; soybean; G-box binding protein; *GmDIBL1* gene; cloning; hairy roots; gene editing

干旱胁迫是全球农业生产力的严重制约因素,对农业生产构成持续威胁,干旱的强度和严重程度预计在不久的将来会持续增加。农业生产中日益严重的缺水和频繁的干旱已经在世界范围内造成巨大的灾害,导致许多作物减产^[1]。大豆(*Glycine max*)是重要的油料作物、经济作物及饲料作物,在我国国民经济中占有重要地位。然而大豆是一个对水分亏缺敏感的作物,在干旱胁迫下,大豆的产量损失可能高达 40%,而长期或严重的干旱胁迫甚至会完全破坏种子生产^[2-4]。因此筛选挖掘大豆抗旱相关基因,解析其在大豆抗/耐旱中的功能和调控网络,将为培育抗/耐旱大豆新种质或新品种提供理论依据和有效基因,具有重要的科学意义和应用价值。

植物抵抗非生物胁迫是一个复杂的协调过程,涉及许多转录调控因子。在这些转录调节因子中,G-box 结合因子(G-box Binding Factor,简称 GBF)能够通过识别靶基因启动子中的顺式作用调节元件 G-box (CACGTG 或 CANNTG),进而调节靶基因的表达^[5]。已有研究表明 G-box 结合蛋白参与了多种细胞过程,在植物生长发育和抗/耐生物和非生物逆境方面具有重要作用^[6-8]。B12D 是一个 G-box 结合蛋白,该基

因家族在植物发育和应激反应的各个方面中对细胞运输和代谢的调节起着重要作用^[8-11]。B12D 家族包含多个成员, B12Dg 是该家族成员之一, 最早在筛选大麦糊粉层和胚胎的转录组中发现, 该基因启动子中含有赤霉素识别元件, 在大麦种子发芽时期优势表达^[8-9, 12]。红薯的同源基因在衰老叶片中表达上调^[13]。拟南芥的 B12Dg 在种子萌发、植株生长、开花和荚果发育中均有表达^[14]。地黄(*Rehmannia glutinosa*)的 B12Dg 基因受钼、GA 和盐胁迫诱导表达^[11]。小麦 B12Dg 在干旱胁迫下下调^[15]。甜菜(*Beta vulgaris*) B12Dg 能够响应盐胁迫^[16]。多种基因型水稻, 在水淹胁迫条件下都能检测到 B12Dg 基因的诱导表达, 而且水淹诱导的基因启动子序列中含有 G-box 位点^[17]。Almutairi^[18]分析了 14 个物种中 66 个 B12D 蛋白, 在预测的 B12D 启动子中发现了对光、脱落酸、茉莉酸甲酯、细胞分裂素、干旱和热响应的顺式调控元件。这些研究说明 GBF 基因在植物响应非生物胁迫中具有重要作用。

为了筛选大豆抗/耐旱相关基因, 本研究对大豆幼苗进行了干旱处理并对处理样品进行了转录组分析。Glyma. 08G250300 基因在干旱处理样品中显著上调, 是一个干旱诱导基因(命名为 *GmDIBL1*, *Drought Induced B12D Like 1*), 可能在大豆抗/耐干旱胁迫中具有作用。本研究进一步克隆了 *GmDIBL1* 基因的基因组序列和互补 DNA(complementary DNA, cDNA)序列, 分析了其序列特征, 检测了该基因在大豆不同组织器官以及不同处理下的表达特性, 进而通过构建过表达和基因编辑载体并进行大豆毛状根遗传转化, 鉴定了 *GmDIBL1* 在大豆耐旱中的功能, 以期为深入研究 *GmDIBL1* 在大豆抗/耐旱中的生物功能和调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与菌株

试验用大豆品种为‘Williams 82’‘晋豆 21’和‘绥农 26’。使用的菌株有大肠杆菌菌株感受态细胞 DH5 α 、根癌农杆菌感受态 GV3101 和发根农杆菌感受态 K599。

1.2 大豆种植及模拟干旱处理

挑选大小和活力一致的‘晋豆 21’和‘绥农 26’种子于培养箱萌发、生长, 生长环境为温度 25 °C, 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, 将大豆幼苗从土壤中轻轻拔出根部, 用自来水冲洗根部表面泥土, 再用滤纸吸干根部表面水分, 用于干旱处理。干旱处理首先将大豆根部的营养土清洗干净, 置于 15% PEG6000 的 1/2MS 营养液中进行干旱胁迫。分别在处理后 0 h、6 h、12 h 的时间点取植株根样品, 做好样品编号。每个取样时间点取 3 个生物学重复。所有样品均用液氮快速冷冻, 并在-80 °C 保存备用。

1.3 植物 RNA 的提取

挑选大小和活力一致的‘Williams 82’大豆种子于自然条件下萌发、生长, 取其根、茎、叶、花、根瘤、荚样品, 取 3 个生物学重复。使用 Trizol 方法, 提取大豆不同组织以及干旱处理样品的总 RNA, 并进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 大豆 *GmDIBL1* 的扩增

提取得到的 RNA 样品按照反转录试剂盒(TaKaRa, 北京)说明书的具体操作步骤, 合成大豆 cDNA, -20 °C 保存。以大豆根 cDNA 为模板, DIBL1-F/DIBL1-R 为引物(DIBL1-F: 5'-ttggagaggacagggtaccATGGGGCGTTGGATGAAACCA-3', DIBL1-R: 5'-gccatggatccccgggtaccTTTATCCTCGCTGAAGAAGT-3'), 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, 简称 PCR)扩增得到 *GmDIBL1*。

1.5 基因的生物信息学分析

以大豆 *GmDIBL1* 编码的蛋白为检索序列, 利用 TBtools 软件进行序列同源性比对和相似性搜索。根据 InterPro 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/>)预测 *GmDIBL1* 编码蛋白的结构域。根据 Panther 数据库分析 *GmDIBL1* 编码蛋白的蛋白质家族类型。利用跨膜结构域分析(TM-

HMM) 预测 *GmDIBL1* 编码蛋白的跨膜结构域. 根据 Phobius 预测 *GmDIBL1* 编码蛋白的蛋白结构. 选择与大豆 *GmDIBL1* 编码蛋白的高度同源序列, 利用 MEGA11 构建进化树.

1.6 基因表达分析

运用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR, 简称 RT-PCR) 扩增分析 *GmDIBL1* 在不同组织以及干旱处理下的表达水平. 用大豆 *Actin* 作内参基因, *Actin* 引物为 *GmActin*-F(5'-CCGGTCGTGAC-CTCACTGATTTCT-3')和 *GmActin*-R(5'-CATCAGGCAACTCGTAGCTCTTCT-3'), *GmDIBL1* 的引物为 *GmDIBL1*-qRT-F(5'-GGGCGTTGGATGAAACCAGA-3')和 *GmDIBL1*-qRT-R(5'-TCTCTGGTG-GTCGAGTACGA-3').

1.7 过表达载体的构建

选择限制性内切酶 *Kpn* I 对载体 pCAMBIA2300-35s-dsred-eGFP 进行酶切, 并对酶切后的产物进行胶回收, 将 *GmDIBL1* 基因片段的回收产物与酶切线性化 pCAMBIA2300-35s-dsred-eGFP 载体片段的回收产物进行重组反应.

1.8 基因编辑载体的构建

以 pTX2262 为模板, KO-DIBL1-F/KO-DIBL1-R 为引物, 通过 PCR 得到双靶点目的片段, 并使用 Golden Gate 连接方式与骨架载体 pTX2262 连接.

1.9 亚细胞定位检测

将不含终止密码子的编码序列(Coding sequence, 简称 CDS)片段插入 pCAMBIA2300-35S-GFP 载体, 获得重组质粒 35S::*GmDIBL1*::GFP 并导入根癌农杆菌 GV3101. 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, 暗培养过夜后正常光照培养 1 d, 使用 DAPI 染料对烟草叶片染色 10~20 min, 使用激光共聚焦显微镜观察烟草叶片细胞中的荧光信号.

1.10 大豆毛根转化复合体植株的产生

将大豆种子种入土中大约生长 1 周龄左右, 对大豆幼苗进行农杆菌侵染. 在大豆种子萌发生长期间准备农杆菌材料, 将构建好的过表达载体和基因编辑载体以及对应空载体转入发根农杆菌 K599 的感受态细胞中, 并将其涂于含有卡那霉素和链霉素的固体培养基中让其生长 1~2 d. 用枪头挑取在上述培养基中生长的农杆菌菌落并活化 1 d, 吸取活化后的菌液 300 μ L 涂在上述培养基上, 于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 1~2 d 后可长成菌膜, 平板上的菌膜用刀片刮成菌堆. 将大豆幼苗在子叶下 1 cm 处沿 45 $^{\circ}$ 斜切, 切口从菌堆中蘸取转入不同质粒的 K599 菌, 将蘸取 K599 菌的大豆幼苗直接插入蛭石中, 放入培养箱中培养 10~14 d, 培养条件为温度 26 $^{\circ}$ C, 空气相对湿度 60%, 长日照(昼 16 h/夜 8 h).

1.11 *GmDIBL1* 大豆毛根转化复合体植株的表型鉴定

两周后, 取出植株, 在双波长激发光源下检测阳性根, 每个植株只留 1 条健壮的阳性根, 其他阳性根和阴性根剔除干净. 同时提取过表达毛状根的 RNA 进行 RT-PCR 以确保该基因在根中过量表达, 提取基因编辑毛状根的 DNA 并测序验证以确保该基因被敲除. 使用 15%PEG6000 处理大豆毛根转化复合体, 随时观察其在 15% PEG6000 处理下的表型. 干旱处理 24 h 后拍照收集大豆植株表型.

2 结果与分析

2.1 *GmDIBL1* 基因受干旱处理诱导表达

为了筛选大豆的干旱胁迫相关基因, 利用 PEG6000 处理大豆‘绥农 26’幼苗, 分别取处理 0 h、6 h 和 12 h 的根进行转录组测序分析. 结果表明, *GmDIBL1* (*Drought Induced B12D Like 1*) 基因在干旱处理的根中表达水平显著增加(图 1a), 该基因在干旱处理 6 h 和 12 h 的根中表达水平分别增加了 477 倍和 705 倍(图 1b). 这一结果说明 *GmDIBL1* 基因是一个受干旱诱导的基因, 可能在大豆响应干旱胁迫中具有重要作用.

2.2 *GmDIBL1* 的克隆和序列分析

为了获得 *GmDIBL1* 基因的序列, 以公共数据库(<https://www.soybase.org/>)中 *Glyma.08G250300* 基因的序列为参考序列, 设计扩增该基因 CDS 的引物. 进而以大豆 ‘williams 82’ 的根 cDNA 为模板进行扩增, 结果获得长 261 bp 的 cDNA 序列, 该序列编码 86 个氨基酸残基(图 2), 推导的分子量为 10.1 kD, 等电点为 9.647. 根据 InterPro 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/>)预测, 结果显示 *GmDIBL1* 的蛋白质序列包含 B12D 结构域(IPR010530 和 PF06522, 从氨基酸残基 6-73)(图 2a), 根据 Panther 分析, *GmDIBL1* 是 G-box 结合蛋白(PTHR33417). TMHMM 分析显示该蛋白质序列中含有一个跨膜结构域(氨基酸残基 10~32), *GmDIBL1* 含有信号肽序列(1~33 AA), 包含信号肽 N-区(1~11 AA), 信号肽 H-区(12~25 AA)和信号肽 C-区(26~33 AA). 根据 Phobius 预测结果显示 34~86 氨基酸残基构成非胞质区域(non-cytoplasmic region). 整个 *GmDIBL1* 蛋白质序列都比较保守, 其中 N-端和 C-端的保守性更高(图 2b). 系统进化分析结果显示 *GmDIBL1* 与棉花、拟南芥的亲缘关系较近, 而与水稻、玉米等单子叶植物的 B12D 的亲缘关系较远(图 3). 这些结果说明 *GmDIBL1* 是植物中 G-box 结合蛋白基因的同源基因, 高度的序列保守性暗示其具有相似的生物功能.

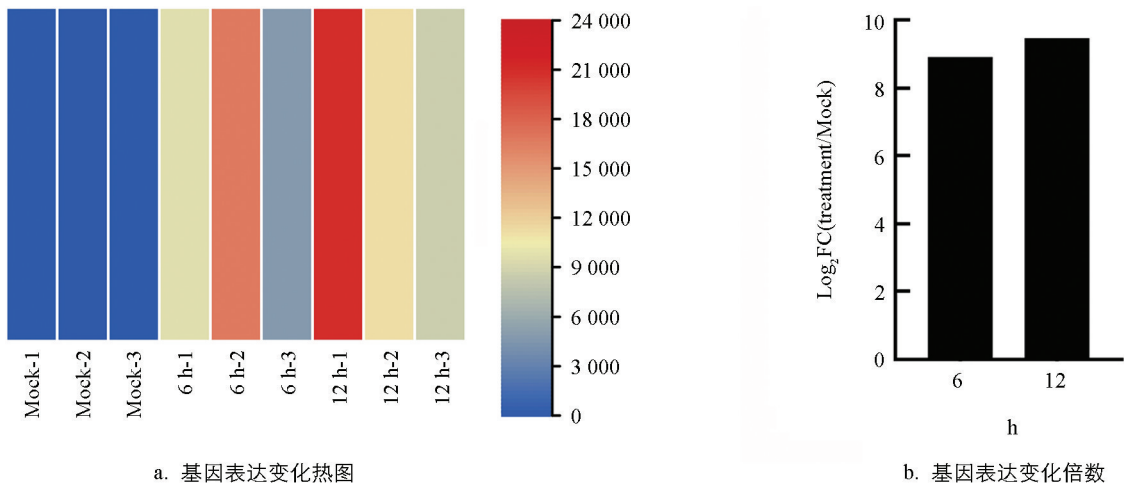


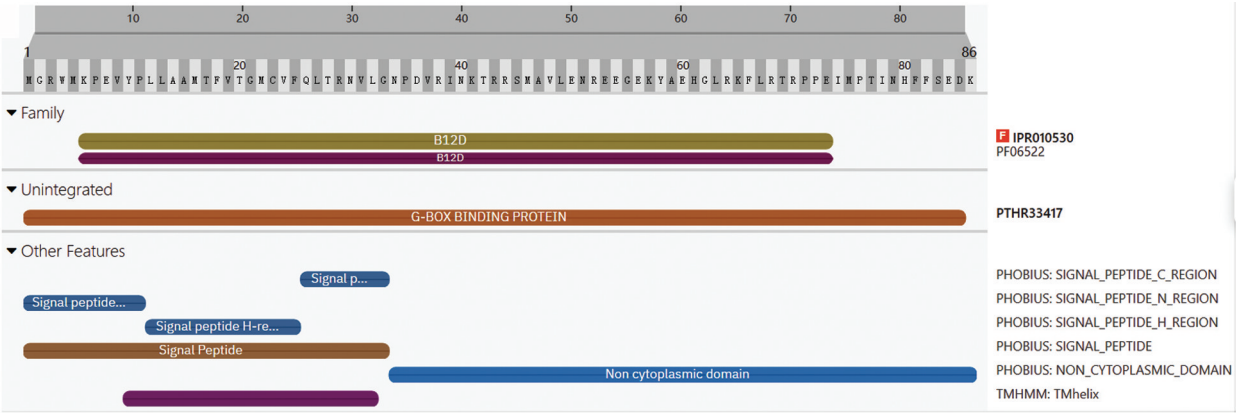
图 1 *GmDIBL1* 基因在 PEG6000 处理的 ‘绥农 26’ 大豆幼苗根中的表达变化

2.3 *GmDIBL1* 的表达分析

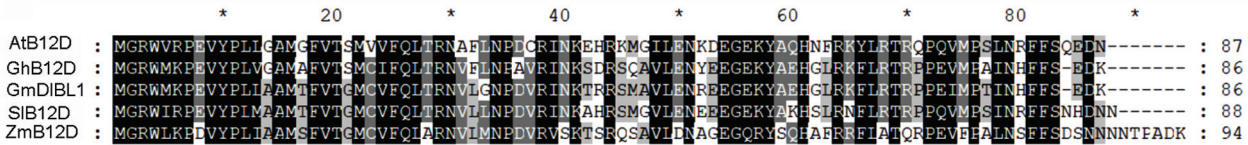
基因的表达特征是分析基因功能的重要数据. 为了明确 *GmDIBL1* 基因的表达特征, 利用 RT-qPCR 检测了该基因在大豆不同组织器官中的表达水平、在干旱处理后的表达变化以及耐旱大豆品种(‘晋豆 21’)^[19] 和不耐旱大豆品种(‘绥农 26’)^[20] 中的表达差异. 结果如图 4 所示, *GmDIBL1* 基因在大豆的各个组织器官都有表达, 在根瘤中的表达水平远远高于其他组织和器官, 其次在根和莢中的表达水平较高, 在茎、叶、花中的表达水平较低(图 4a). PEG6000 处理 6 h 后, 该基因在根中的表达水平有所上升, 在处理 12 h 后, 该基因的表达水平显著提高(图 4b). ‘晋豆 21’ 是一个耐旱性较强的大豆品种, 而且是一个对于干旱比较敏感的品种, *GmDIBL1* 基因在 ‘晋豆 21’ 根中的表达水平显著高于 ‘绥农 26’ 根中的表达水平(图 4c). 这些结果说明 *GmDIBL1* 基因是一个根、根瘤和莢优势表达基因, 受干旱诱导表达, 可能在抗/耐干旱胁迫中具有重要作用.

2.4 *GmDIBL1* 亚细胞定位分析

为了分析 *GmDIBL1* 的亚细胞定位特征, 构建了超量表达 *GmDIBL1::eGFP* 融合基因的植物表达载体并进行了烟草叶片瞬时表达实验, 利用激光共聚焦显微镜观测了 GFP 信号的定位情况. 结果显示, *GmDIBL1::GFP* 信号与 DAPI 染色信号重叠, DAPI 为细胞核染料, 说明 *GmDIBL1* 具有细胞核定位(图 5).



a. InterPro预测的GmDIBL1蛋白中的结构域



b. GmDIBL1与拟南芥、棉花、番茄和玉米中B12D蛋白的多重序列比对

图 2 GmDIBL1 序列分析

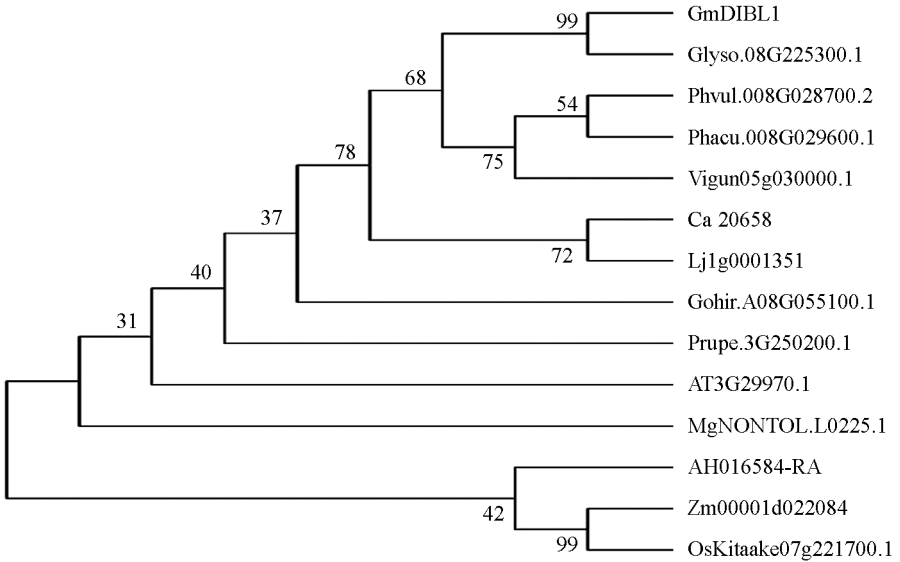


图 3 GmDIBL1 系统进化分析

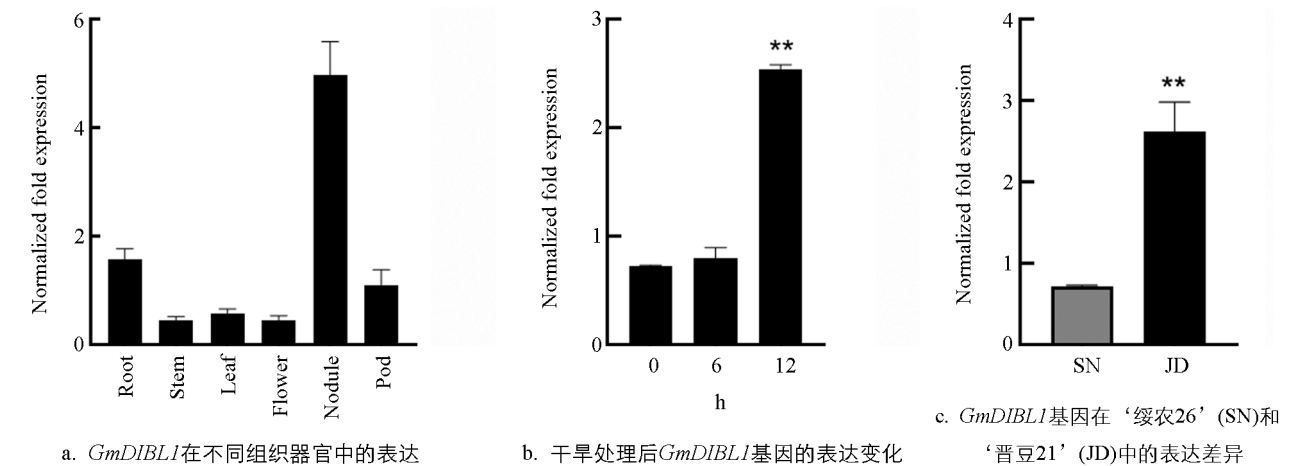
2.5 超量表达 *GmDIBL1* 转基因毛状根的鉴定

为了获得超量表达 *GmDIBL1* 的转基因植物材料，通过构建超量表达 *GmDIBL1* 基因的植物表达载体并转入发根农杆菌 K599，进而进行大豆毛状根遗传转化。由于植物表达载体的 T-DNA 区段中包含 CaMV 35S 启动子控制 *GmDIBL1::eGFP* 融合基因表达单元，因此首先通过荧光信号观测确定转基因毛状根，并保留 1 条转基因毛状根以进行后续的研究，结果显示，转基因毛状根在紫外光下能够看到明显的荧光信号(图 6a、6b)。进一步检测 *GmDIBL1* 基因在转基因毛状根中的表达变化，结果显示，转基因毛状根中 *GmDIBL1* 基因的表达水平都显著高于对照(图 6c)。这些结果说明本研究获得超量表达*GmDIBL1* 基因的转基因毛状根。

2.6 *GmDIBL1* 敲除毛状根的鉴定

为了获得敲除 *GmDIBL1* 的植物材料，通过构建 *GmDIBL1* 基因编辑的植物表达载体并转入发根农杆菌 K599，进而进行大豆毛状根遗传转化。由于该载体 T-DNA 区段内包含 1 个 CaMV35S 启动子控制 eG-

FP 的表达单元, 因此首先观测了毛状根的荧光信号. 结果显示, 部分毛状根有明显的荧光信号, 说明获得 T-DNA 区段整合进大豆基因组并正常表达的转基因毛状根(图 7a、7b). 每个复合体植株保留 1 条转基因毛状根继续培养后进行基因编辑结果分析(图 7c).



误差棒表示 3 次重复的标准差, 数据统计分析使用 student t-test, * * 表示 $p < 0.01$.

图 4 *GmDIBL1* 的表达模式和干旱处理后的表达变化

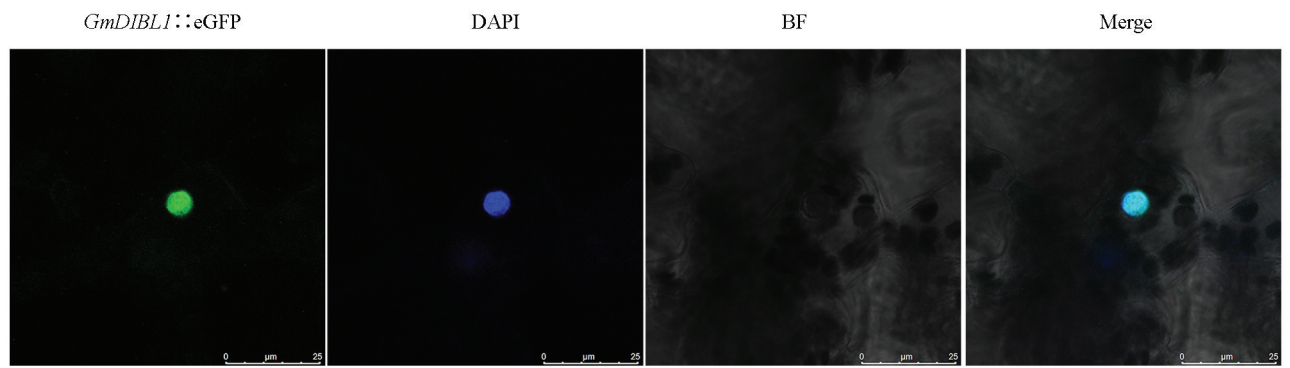


图 5 *GmDIBL1* 的亚细胞定位

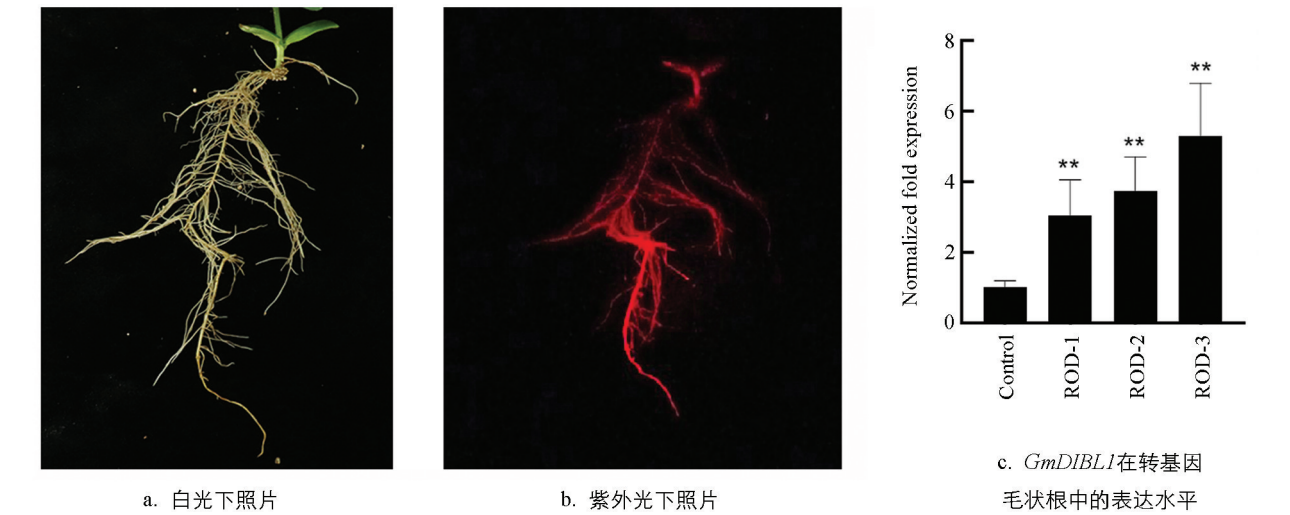


图 c 中 Control 指空载的转基因毛状根; ROD-1~ROD-3 指超量表达 *GmDIBL1* 转基因毛状根 1#~3#. 误差棒表示 3 次重复的标准差, 数据统计分析使用 student t-test, * * 表示 $p < 0.01$.

图 6 超量表达 *GmDIBL1* 转基因毛状根的验证



图中 OB-1 指超量表达 *GmDIBL1* 转基因毛状根复合体 1#; CK1 指空载转基因毛状根复合体; KO-1 指敲除 *GmDIBL1* 基因毛状根复合体 1#; CK2 指基因编辑空载体的转基因毛状根复合体.

图 8 转基因毛状根复合体的耐旱性鉴定

B12D 基因的启动子中存在冷应激、细胞周期、昼夜节律、生长素、水杨酸和赤霉酸的特定元素^[6]. *GmDIBL1* 基因能够响应干旱胁迫而显著上调表达, 与其他物种同源基因的诱导表达特征相似. 这在表达响应水平上进一步说明 *GmDIBL1* 是 *B12D* 的同源基因.

3.2 *GmDIBL1* 在大豆抗/耐干旱胁迫中具有重要作用

现有报道中, 尽管对 *B12D* 基因的诱导表达特征进行了较多的研究, 但对 *B12D* 功能的研究较少. 本研究中, 由于 *GmDIBL1* 基因在根瘤和根中优势表达, 利用大豆毛状根体系检测了该基因在抗/耐旱中的功能. 在根中超量表达 *GmDIBL1* 基因能够显著提高大豆毛状根复合体的抗旱性, 但在敲除该基因的复合体中, 抗旱性的降低不明显, 这一方面可能是 PEG6000 的使用浓度过高, 没有体现出对照和敲除复合体在抗性方面的差异, 另一方面可能是因为大豆是多倍体, 存在基因功能冗余的现象, 单独敲除一个基因难以在表型上出现差异. 本研究正在创制超量表达 *GmDIBL1* 以及敲除多个 *DIBL1* 基因的大豆材料, 以便深入探索该基因的功能和提供抗旱新种质.

4 结论

GmDIBL1 (*Drought Induced B12D Like 1*) 是一个受干旱诱导的 G-box 结合蛋白基因, 该基因编码 86 个氨基酸残基, 推测分子量为 10.1 kD, 等电点为 9.647. 推导蛋白质序列与其他物种的 G-box 结合蛋白之间具有较高的保守性, 包含 B12D 结构域和跨膜螺旋, N-端具有信号肽, C-端构成非胞质区域, 并定位于细胞核. *GmDIBL1* 基因在根瘤和根中优势表达, 在耐旱品种‘晋豆 21’根中的表达水平显著高于干旱敏感品种‘绥农 26’. 超量表达 *GmDIBL1* 基因的毛状根复合体对于干旱胁迫的耐受性增强, 证明 *GmDIBL1* 在大豆抗/耐干旱逆境中具有重要作用. 该研究为深入解析 *GmDIBL1* 介导大豆干旱抗性的调控机制奠定了基础.

参考文献:

[1] 任洪雷, 朱筱, 张丰屹, 等. 干旱胁迫的影响及抗旱性研究进展 [J/OL]. 分子植物育种, 2024: 1-10. (2024-01-22) [2024-03-01]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240119.1548.002.html>.

[2] SHAHEEN T, RAHMAN M U, SHAHIDRIAZ M, et al. Soybean Production and Drought Stress [M] // Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production. Amsterdam: Elsevier, 2016: 177-196.

[3] SPECHT J E, HUME D J, KUMUDINI S V. Soybean Yield Potential-A Genetic and Physiological Perspective [J]. Crop Science, 1999, 39(6): 1560-1570.

- [4] 朱筱, 张丰屹, 马晓宇, 等. 大豆抗旱性的生理和分子机制及其在遗传改良中的应用 [J/OL]. 分子植物育种, 2023: 1-11. (2023-04-23) [2024-03-01]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230421.1701.016.html>.
- [5] GIULIANO G, PICHERSKY E, MALIK V S, et al. An Evolutionarily Conserved Protein Binding Sequence Upstream of a Plant Light-Regulated Gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(19): 7089-7093.
- [6] ALMUTAIRI Z M. Expression Profiling and Characterization of a G-box Binding Protein, *B12Dg*, from Pearl Millet [J]. Journal of King Saud University-Science, 2023, 35(1): 102448.
- [7] SCHINDLER U, BECKMANN H, CASHMORE A R. TGA1 and G-box Binding Factors: Two Distinct Classes of Arabidopsis Leucine Zipper Proteins Compete for the G-box-like Element TGACGTGG [J]. The Plant Cell, 1992, 4(10): 1309-1319.
- [8] STEINUM T M, BERNER H S, STACY R A P, et al. Differential Regulation of the Barley (*Hordeum Vulgare*) Transcripts B22E and B12D in Mature Aleurone Layers [J]. Physiologia Plantarum, 1998, 102(3): 337-345.
- [9] AALEN R B, SALEHIAN Z, STEINUM T M. Stability of Barley Aleurone Transcripts: Dependence on Protein Synthesis, Influence of the Starchy Endosperm and Destabilization by GA3 [J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112(3): 403-413.
- [10] HE D L, ZHANG H, YANG P F. The Mitochondrion-Located Protein *OsB12D1* Enhances Flooding Tolerance during Seed Germination and Early Seedling Growth in Rice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 13461-13481.
- [11] ZHOU Y Q, ZHANG Y H, WEI J, et al. Cloning and Analysis of Expression Patterns and Transcriptional Regulation of RghBNG in Response to Plant Growth Regulators and Abiotic Stresses in *Rehmannia glutinosa* [J]. Springer Plus, 2015, 4: 60.
- [12] AALEN R B. The Transcripts Encoding Two Oleosin Isoforms are both Present in the Aleurone and in the Embryo of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seeds [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 28(3): 583-588.
- [13] HUANG Y J, TO K Y, YAP M N, et al. Cloning and Characterization of Leaf Senescence Up-Regulated Genes in Sweet Potato [J]. Physiologia Plantarum, 2001, 113(3): 384-391.
- [14] ZHU T, BUDWORTH P, HAN B, et al. Toward Elucidating the Global Gene Expression Patterns of Developing Arabidopsis: Parallel Analysis of 8 300 Genes by a High-Density Oligonucleotide Probe Array [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39(3-4): 221-242.
- [15] ERGEN N Z, THIMMAPURAM J, BOHNERT H J, et al. Transcriptome Pathways Unique to Dehydration Tolerant Relatives of Modern Wheat [J]. Functional & Integrative Genomics, 2009, 9(3): 377-396.
- [16] WANG Y G, STEVANATO P, LV C H, et al. Comparative Physiological and Proteomic Analysis of Two Sugar Beet Genotypes with Contrasting Salt Tolerance [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(21): 6056-6073.
- [17] MOHANTY B. Promoter Architecture and Transcriptional Regulation of Genes Upregulated in Germination and Coleoptile Elongation of Diverse Rice Genotypes Tolerant to Submergence [J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 639654.
- [18] ALMUTAIRI Z M. In Silico Identification and Characterization of *B12D* Family Proteins in Viridiplantae [J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2022, 18: 11769343221106795.
- [19] 邓思雪. 干旱胁迫下不同大豆品种萌发特性及其耐旱性评价 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [20] 曹亮, 杜昕, 于高波, 等. 外源褪黑素对于干旱胁迫下绥农 26 大豆鼓粒期叶片碳氮代谢调控的途径分析 [J]. 作物学报, 2021, 47(9): 1779-1790.