

黑龙江八一农垦大学

大学生创新训练项目计划申请书

项目编号			
项目名称	转录因子 <i>GsbZIP67</i> 耐苏打盐碱功能解析		
项目负责人	蒋德丹	联系电话	13595499656
所在学院	农学院		
学号	20214011107	专业班级	农学一班
指导教师	陈茜		
E-mail	3148127151@qq.com		
申请日期	2022 年 6 月 15 日		
项目期限	一年期		

黑龙江八一农垦大学

填写说明

1. 本申请书所列各项内容均须实事求是，认真填写，表达明确严谨，简明扼要。
2. 申请人可以是个人，也可为创新团队，首页只填负责人。“项目编号”一栏不填。
3. 本申请书为大 16 开本（A4），左侧装订成册。可网上下载、自行复印或加页，但格式、内容、大小均须与原件一致。
4. 负责人所在学院认真审核，经初评和答辩，签署意见后，将申请书（一式两份）报送项目管理办公室。

一、基本情况

项目名称	转录因子 GsbZIP67 耐苏打盐碱功能解析						
所属学科	学科一级门：农学 学科二级类：植物生产类						
项目来源	<input type="checkbox"/> A、学生自主选题，来源于自己对课题的长期积累与兴趣 <input checked="" type="checkbox"/> B、学生来源于教师科研项目选题 <input type="checkbox"/> C、学生承担社会、企业委托项目选题 <input type="checkbox"/> D、拔尖专项 <input type="checkbox"/> E、竞赛专项 <input type="checkbox"/> F、研修专项						
申请金额	2 万元	项目期限	1 年	拟申报项目级别		国家级	
负责人	蒋德丹	性别	女	民族	汉族	出生年月	2001 年 6 月
学号	20214011107	联系电话	宅：19845975797 手机：13595499656				
指导教师	陈 茜	联系电话	宅：0459-6819185 手机：18845074415				
项目简介	本项目以课题组前期获得的耐盐碱基因 bZIP67 为研究对象，进一步解析 bZIP67 在苏打盐碱胁迫下的作用机制。本项目首先分析 bZIP67 的转录激活活性、关键激活结构域及盐碱胁迫表达模式，确定其表达特性；然后利用毛状根系统从过表达和基因沉默 2 个角度，分析盐碱胁迫表型、生理指标以及盐碱胁迫响应基因的表达分析，从而解析其耐盐碱功能。为完善大豆 bZIP 转录因子逆境应答分子机制具有重要理论价值，为耐盐碱大豆分子设计育种提供基因资源和理论指导。						
负责人曾经参与科研的情况	无						
指导教师承担科研课题情况	1. 参与国家自然科学基金(面上项目)《GmEIB1/ERF5 复合体调控大豆抗疫霉根腐病菌分子机制》。2. 主持黑龙江八一农垦大学引进人才科研启动计划《GsbZIP67 调控大豆耐盐碱胁迫的分子研究》。						

指导教师对本项目的支持情况		对本项目提出合理方案和建议，使本项目更具有专业性、丰富性、可靠性。对项目组成员分工提出指导性意见，使成员之间分工有序各司其职。对项目实施提供经费、实验平台等其他实验上的支持。				
项目组主要成员	姓名	学号	学院	专业班级	联系电话	项目分工
	孙泽涛	20204013225	农学院	资环二班	18845855437	成员
	高鑫涵	20214011101	农学院	农学一班	13199155147	成员
	胡晓滨	20214011405	农学院	农学四班	18346840903	成员
	承 忻	20204011201	农学院	农学二班	18955332625	成员
指导教师	姓名	工号	学院/单位	职称	联系电话	电子邮件
	陈 茜	002907	农学院	讲师	18845074415	18845074415@163.com

二、 立项依据（可加页）

（一）研究目的

大豆（*Glycine max* [L.] Merr.）是我国重要的粮食兼油料作物，但我国的大豆产量难以满足国内需求。我国大豆产业存在两个问题：一是种植面积不足，二是大豆的亩产量不高。我国耕地面积有限，一直增加大豆种植面积会影响其他作物的产量。因此需要开发利用盐碱地，培育耐盐碱大豆品种对拓大豆种植面积、提高大豆产量和自给率具有重要意义。

本课题组长期致力于作物耐盐碱的分子应答机制研究。课题组前期从吉林白城重度盐碱区采集的 345 份野生大豆材料中，筛选获得了耐盐碱能力最强的株系 G07256。以此为试材，已经获得多个耐盐碱功能显著的关键调控基因。为深入挖掘盐碱胁迫应答的分子调控机制，构建了野生大豆 cDNA 文库，通过含 8 mM NaHCO₃ 的 SD-Leu 培养基筛选获得了 1 个野生大豆 S2 类亚家族的 bZIP 转录因子 bZIP67，并克隆 GsbZIP67 基因全长，进行了生物信息学分析，亚细胞定位的分析等。

为进一步解析 bZIP67 在苏打盐碱胁迫下的作用机制，基于前期研究基础，本项目拟通过分析转录激活活性、确定关键激活结构域区域及验证盐碱胁迫诱导表达，从而确定 GsbZIP67 基因表达特性；进一步利用毛状根系统从过表达和基因沉默 2 个角度，分析盐碱胁迫表型、生理指标及响应盐碱胁迫的基因表达，明确 bZIP67 的靶基因是否调控苏打盐碱耐性，进而解析 bZIP67 参与大豆对苏打盐碱胁迫应答的调控作用。为完善大豆 bZIP 转录因子逆境应答分子机制具有重要理论价值，为耐盐碱大豆分子设计育种提供基因资源和理论指导。

（二）研究内容

本课题组前期研究表明 bZIP67 是一个 bZIP S2 类亚家族转录因子且定位在细胞核。为进一步解析 bZIP67 如何参与植物耐盐碱胁迫的分子机制，本项目将解析 bZIP67 参与苏打盐碱胁迫应答的分子机制，以期为大豆耐逆分子机制提供理论基础。具体研究内容如下：

2.1 bZIP67 转录因子表达特性分析

2.1.1 转录激活活性分析：构建 PCAMBIA3301-bZIP67 表达载体，再将 3 个 G-box 元件构建到 PXGUS-P 载体上，共转化拟南芥原生质体，利用共聚焦显微镜观察原生质体的荧光情况，确定转录激活活性。

2.1.2 转录激活结构域的确定：将 bZIP67 编码区分段，分别构建功能结构域缺失的 BD-bZIP67t (truncated) 酵母表达载体，采用 PEG/LiAc 法转化酵母 AH109 菌株，分析重组酵母菌的生长情况，确定转录激活结构域具体区域。

2.1.3 盐碱胁迫表达模式分析：21 日龄的野生大豆幼苗，分别培养在 200 mM NaCl 和 50 mM NaHCO₃ (pH=8.5) 中，提取处理后第 0、1、3、6、12、24 h 根部 RNA，采用 qRT-PCR 分析其盐碱胁迫表达模式。

2.2 bZIP67 耐苏打盐碱功能分析

2.2.1 大豆毛状根的获得：采用发根农杆菌介导法侵染大豆，通过 PCR 检测以及 Bar 蛋白检测，鉴定获得 bZIP67-OE 及 bZIP67-RNAi 的大豆毛状根。

2.2.2 苏打盐碱胁迫表型及生理指标测定：对比正常培养的长势一致的空载体、bZIP67-OE 及 bZIP67-RNAi 大豆毛状根在苏打盐碱胁迫处理下的表型及形态、NBT 及 DAB 染色、活性氧清除系统酶活、离子渗漏等指标，确定其在苏打盐碱胁迫应答中的功能。

2.2.3 苏打盐碱胁迫响应相关基因的表达分析：设计 NAPD-ME, KIN1, H⁺ATPase, RD29A 等响应相关基因的定量引物，利用 qRT-PCR 检测长势一致的空载体、bZIP67-OE 及 bZIP67-RNAi 大豆毛状根中响应基因表达水平。

(三) 国、内外研究现状和发展动态

3.1 植物响应盐碱胁迫的机理研究

由于土壤的盐化与碱化往往伴随着发生，因此人们经常将土壤可溶性盐分的增加统称为“土壤盐碱化”^[1]。盐胁迫主要由中性盐如 NaCl、Na₂SO₄ 造成，而碱胁迫主要由碱性盐，如碳酸氢盐(HCO₃⁻)和碳酸盐(CO₃²⁻)造成。盐胁迫对植物产生的危害主要包括离子胁迫、渗透胁迫和氧化胁迫，碱胁迫在此基础上增加了由碳酸氢盐或碳酸盐导致的 HCO₃⁻或 CO₃²⁻离子胁迫及高 pH 胁迫。而盐碱胁迫会同时造成高盐和高 pH 值的损害，从而导致高 pH 值胁迫、离子毒害以及渗透胁迫^[2, 3]，可以进一步引起质膜损伤、代谢紊乱和营养吸收不良，严重阻碍作物的生长和发育，导致作物减产^[4]。盐碱胁迫使细胞内的渗透压超过细胞外的渗透压，从而破坏了植物体内的动态离子平衡。Na⁺/K⁺值是衡量植物耐盐碱能力的一个重要依据。高 pH 值破坏了离子平衡，抑制 Na⁺的排出，对植物造成损害^[2]。而高 pH 值胁迫主要作用于植物的根系，使其组织结构受到损伤，从而导致根系细胞失去正常的生理功能^[5, 6]。Wittyngham(2020)发现植物的 Na⁺含量随着土壤盐度的增加而明显增加，而 K⁺含量则明显下降^[7]。在植物中，蛋白激酶，如钙依赖蛋白激酶 (CDPKs)、丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 级联信号途径和类受体蛋白激酶 (RLKs) 在应对非生物胁迫中起重要作用，而这些信号途径作用于各种下游转录因子，随后激活下游的盐碱响应基因^[8]。盐

碱胁迫可以产生自由基或非自由基形式的活性氧（ROS），过多的 ROS 会对植物的蛋白质、脂质、核酸和质膜造成氧化损伤^[9-11]。因此，ROS 清除系统是植物应对盐碱胁迫的一个重要手段。Jia 等人（2019）^[12]发现，盐碱胁迫可以激活植物的 ROS 消除系统，同时上调与氧化有关的各种蛋白质的表达。关于植物的光合细胞，叶绿体对盐碱胁迫很敏感，Na⁺的过度积累会导致二氧化碳通过气孔和间叶扩散，从而破坏光合作用^[13]。在一项关于水稻的耐受性的研究中。在盐碱胁迫下，轻度胁迫对叶绿体的结构没有明显的影响，而中度和重度胁迫则降低了叶绿素的含量，改变了叶绿体的颗粒，并造成不同的影响，导致不同程度的叶绿体膜瓦解^[14, 15]。植物对盐碱胁迫反应的信号转导途径和代谢机制已经有了一定的研究。例如，F-box Triple LRR（FTL）蛋白，它可以识别多种目标基因，参与了许多生命过程，包括对盐胁迫的反应^[16]。然而，在分子、细胞和代谢水平上，复杂的抗盐碱途径的调控网络还没有被系统和全面地阐述。

目前大部分研究多关注中性盐胁迫，对苏打盐碱逆境的研究鲜有报道。而我国东北及内陆地区主要的盐碱土壤是苏打盐碱土，除了中性盐引发的离子毒害、渗透胁迫外，还有碳酸盐和高 pH 胁迫，情况更复杂，对作物生长和产量影响更大。

3.2 大豆耐盐碱关键基因挖掘的研究进展

在大豆耐盐基因发掘研究中，研究人员通过正向遗传学和反向遗传学两种途径鉴定出一批提高大豆耐盐能力的基因或位点^[17]。过去几十年来，利用构建重组家系的连锁分析对大豆耐盐性状进行了大量研究。而近年来，研究人员利用重测序和表型鉴定联合分析的全基因组关联分析技术研究大豆种质耐盐性状，通过定位大豆耐盐数量性状位点（quantitative trait locus, QTL），对主效 QTL 进行精细定位，鉴定耐盐相关基因。通过多年研究，科研人员已鉴定了多个调控大豆耐盐碱性的关键基因，如通过精细定位鉴定到在 3 号染色体上的耐盐相关基因 *GmSALT3*^[18]；利用 RIL 群体 QTL 定位、GWAS 及重测序技术鉴定到在 8 号染色体上的耐盐性相关基因 *GmCDF1*^[19]等。近年来，各类组学技术飞速发展，越来越多的基因被证实参与大豆盐碱胁迫应答过程，如 *GmDREB6*^[20]、*GmTGA26*^[21]、*GmbZIP2*^[22]、*GmNAC06*^[23]。虽然现有研究已挖掘了很多大豆响应盐碱胁迫的相关基因^[24]，但大豆耐盐碱的分子机制还有待研究。

本团队针对苏打盐碱逆境，开展大豆耐苏打盐碱关键基因挖掘及应答机制解析工作。从 300 余份野生大豆品系中，筛选出一个苏打盐碱耐受性最高的品系 G07256，利用高通量组学技术系统分析了野生大豆响应苏打盐碱胁迫的基因调控网络及代谢通路，鉴定出多个耐盐碱蛋白激酶和转录因子如 *GsERF71*^[25]，*Gshdz4*^[26]等，初步建立了类受体激酶调控苏打盐碱应答的信号通路。

3.3 bZIP 转录因子调控大豆耐逆的研究进展

转录因子（TFs）在植物耐盐碱应答中起着很关键的作用，它与目标基因启动子的特定区域结合以激活或抑制下游基因的表达^[27]。如图 1 所示，耐盐相关转录因子调控网络。

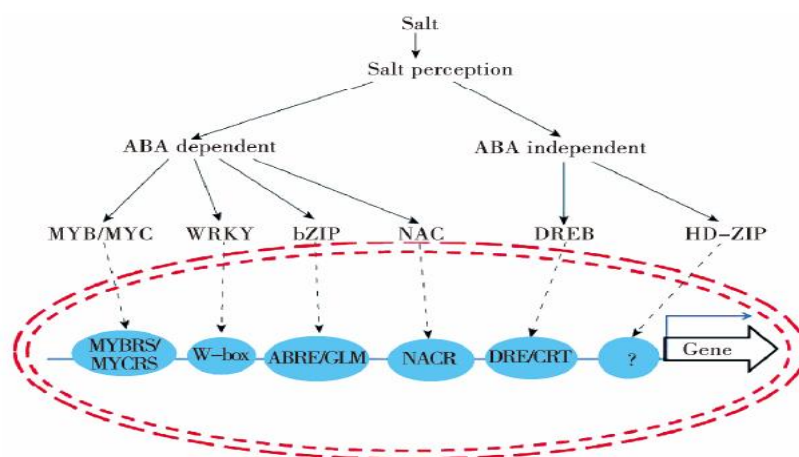


图 1 耐盐相关转录因子调控网络 (引自王楠等^[28]，2016)

Fig. 1 Regulatory net of salt stress tolerance related transcription factors (From Wang, et al. ^[28], 2016)

包括碱性亮氨酸拉链（bZIP）转录因子家族在内，在植物界已发现了 60 多个转录因子家族，bZIP 转录因子通常包含由 40-80 个氨基酸组成的一个高度保守的 bZIP 结构域^[29]，该结构域包括一个高度保守的 DNA 识别结构域，一个保守程度较低的亮氨酸拉链元件，其特点是在连续的 α -螺旋上^[30]。植物 bZIP 蛋白通常可通过与 DNA 元件结合调控下游相关基因表达。bZIP 蛋白优先结合 ACGT 顺式作用元件，如 A-box（TACGTA）、C-box（GACGTC）、G-box（CACGTG）及 ABRE（CCACGTGG）^[31]。

到目前为止，在拟南芥中已经鉴定了 78 个 bZIPs 转录因子，分为 13 个亚家族（A-L，S）^[32]，不同亚族分别行使不同的功能，包括参与逆境胁迫、种子发育、病菌防御、光信号转导、调控维管发育、组织分化、细胞生长、糖代谢等多个生物过程^[33]。其中，A 亚族主要介导 ABA 和逆境胁迫的调控表达，C 亚族主要参与种子发育和病菌防御，D 亚族参与病害防御和生理生长，G 亚族参与光信号调控，H 亚族在光合作用过程中起关键作用，S 亚族在各种非生物胁迫下可以激活转录调控^[34]。

在大豆中发现了 352 个 bZIP 转录因子^[35]，其中研究发现有 31 个基因受盐胁迫诱导表达^[36]。但关于大豆 bZIPs 转录因子在逆境应答中的作用机制研究相对较少，且大多数只在拟南芥受体中研究基因的盐胁迫功能（表 1）。

表 1 大豆中 bZIP 转录因子家族耐盐相关基因

Table 1 Salt tolerance-related genes in the bZIP transcription factor family in soybean

基因名	登录号	转基因受体
<i>GmbZIP44</i>	<i>Glyma.04G029600</i>	拟南芥
<i>GmbZIP62</i>	<i>Glyma.06G079800</i>	拟南芥
<i>GmbZIP78</i>	<i>Glyma.03G255000</i>	拟南芥
<i>GmbZIP132</i>	<i>Glyma.13G269500</i>	拟南芥
<i>GmbZIP1</i>	<i>Glyma.02G131700</i>	拟南芥、烟草
<i>GmbZIP110</i>	<i>Glyma.08G115300</i>	拟南芥、大豆
<i>GmFDL19</i>	<i>Glyma.19G122800</i>	大豆
<i>GmbZIP2</i>	<i>Glyma.14G002300</i>	大豆
<i>GmbZIP60</i>	<i>Glyma.02G012700</i>	拟南芥

可见，大豆 bZIP 家族耐逆，尤其是耐苏打盐碱功能的相关研究报道非常少，亟需对该家族基因的耐逆功能及分子调控机制进行深入研究。此外，多数研究只验证了大豆 bZIP 转录因子受盐诱导表达，具有正、负调控盐胁迫的功能，其逆境应答调控机制研究报道并不多，也并未鉴定出直接调控的下游基因。因此，本项目在团队前期基础上进一步解析 bZIP67 在苏打盐碱胁迫下的作用机制。通过本项目研究对揭示大豆 bZIP 转录因子调控的靶基因，解析 bZIPs 在苏打盐碱应答过程中的作用机制，完善 bZIP 逆境应答分子机制具有重要意义，将为大豆耐盐碱胁迫奠定重要基础，为大豆耐盐碱胁迫分子育种提供基因资源。

参考文献

- [1] Sanderfoot A.A., Kovaleva V., Bassham D.C., *et al.* Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/ prevacuolar system of the Arabidopsis cell. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12(12): 3733-3743.
- [2] Hussain S., Hussain S., Ali B., *et al.* Recent progress in understanding salinity tolerance in plants: story of Na⁺/K⁺ balance and beyond. *Plant Physiol. Biochem.* 2021, 169, 239-256.
- [3] Quintero F.J., Ohta M., Shi H., *et al.* Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2002, 99 (13): 9061-9066.
- [4] Jia X., Zhu Y., Zhang R., *et al.* Ionomics and metabolomics analyses reveal the resistance response mechanism to saline-alkali stress in *Malus halliana* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 2020, 147, 77-90.

- [5] Gong Z., Xiong L., Shi H., *et al.* Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Sci China Life Sci*, 2020, 63 (5): 635-674.
- [6] Jiang Z., Zhou X., Tao M., *et al.* Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca^{2+} influx. *Nature*, 2019, 572 (7769): 341-346.
- [7] Wittingham S.S. Salinity and simulated herbivory influence *Spartina alterniflora* traits and defense strategy. *Estuar. Coast.* 2020, 1-10.
- [8] Guo H., Li T., Zhao Y., *et al.* Role of copper in the enhancement of astaxanthin and lipid coaccumulation in *Haematococcus pluvialis* exposed to abiotic stress conditions. *Bioresour. Technol.* 2021, 335, 5.
- [9] Barbez E., Dünser K., Gaidora A., *et al.* Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2017, 114 (24): E4884-E4893.
- [10] Fuglsang A.T., Guo Y., Cuin T.A., *et al.* Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H^{+} -ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell*, 2007, 19 (5): 1617-1634.
- [11] Yang Y. and Guo Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytol.* 2018, 217 (2): 523-539.
- [12] Jia X.M., Zhu Y.F., Hu Y., *et al.* Integrated physiologic, proteomic, and metabolomic analyses of *Malus halliana* adaptation to saline-alkali stress. *Hortic. Res.* 2019, 6, 91.
- [13] Silveira J.A.G. and Carvalho F.E.L. Proteomics, photosynthesis and salt resistance in crops: an integrative view. *J. Proteomics.* 2016, 30, 24-35.
- [14] Xing W., Wang J., Liu H., *et al.* Influence of natural saline-alkali stress on chlorophyll content and chloroplast ultrastructure of two contrasting rice (*Oryza sativa* L. japonica) cultivars. *Aust. J. Crop. Sci.* 2013, 7, 289-292.
- [15] Ye T., Wang Y., Feng Y.Q., *et al.* Physiological and metabolomic responses of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) to alkali stress. *Physiol. Plantarum.* 2020, 171, 22-33.
- [16] Parida A.P., Srivastva A., Mathur S., *et al.* Identification, evolutionary profiling, and expression analysis of F-box superfamily genes under phosphate deficiency in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 2021, 162, 349-362.
- [17] 田艺心, 高凤菊, 曹鹏鹏, 等. 大豆耐盐基因研究进展[J]. *大豆科学*, 2018, 37 (4): 629-636.
- [18] Guan R.X., Qu Y., Guo Y., *et al.* Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in GmSALT3. *Plant J.* 2014, 80 (6): 937-950.
- [19] Zhang W., Liao X.L., Cui Y.M., *et al.* A cation diffusion facilitator, *GmCDF1*, negatively regulates salt tolerance in soybean. *PLoS Genet.* 2019, 15 (1): e1007798.
- [20] Tan Q., Pva B., Ttml C., *et al.* *GmDREB6*, a soybean transcription factor, notably affects the transcription of the NtP5CS and NtCLC genes in transgenic tobacco under salt stress conditions. *Saudi. J. Biol. Sci.* 2021, 28 (12): 7175-7181.

- [21] 柯丹霞, 霍娅娅, 刘怡, 等. 大豆 TGA 转录因子基因 GmTGA26 在盐胁迫中的功能分析[J]. 作物学报, 2021, 1-14.
- [22] Yang Y., Yu T.F., Ma J., *et al.* The soybean bZIP transcription factor gene *GmbZIP2* confers drought and salt resistances in transgenic plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21 (2): 670.
- [23] Li M., Chen R., Jiang Q., *et al.* *GmNAC06*, a NAC domain transcription factor enhances salt stress tolerance in soybean. *Plant Mol. Biol.* 2020, 105 (3): 333-345.
- [24] Gong Z.Z., Xiong L.M., Shi H.Z., *et al.* Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Sci. China Life Sci.* 2020, 63 (5): 635-674.
- [25] Yu Y., Duan X., Ding X., *et al.* A novel AP2/ERF family transcription factor from *Glycine soja*, *GsERF71*, is a DNA binding protein that positively regulates alkaline stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 2017, 94 (4-5): 509-530.
- [26] Cao L., Yu Y., Duanmu H., *et al.* A novel *Glycine soja* homeodomain-leucine zipper (HD-zip) I gene, *Gshdz4*, positively regulates bicarbonate tolerance and responds to osmotic stress in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 2016, 16 (1): 184.
- [27] Wang L., Qiu T., Yue J., *et al.* Arabidopsis ADF1 is regulated by MYB73 and is involved in response to salt stress affecting actin filament organization. *Plant Cell Physiol.* 2021, 62 (9), 1387-1395.
- [28] 王楠, 赵士振, 吴孟华等. 大豆耐盐相关 QTLs 鉴定和功能基因研究进展[J]. 遗传, 2016, 38 (11): 992-1003.
- [29] Landschulz W., Johnson P. and McKnight S. The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 1988, 240, 1759-1764.
- [30] Niu X.P., Renshaw-Gegg L., Miller L., *et al.* Bipartite determinants of DNA-binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Mol. Biol.* 1999, 41, 1-13.
- [31] Izawa T., Foster R. and Chua N.H. Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J. Mol. Biol.* 1993, 230, 1131-1144.
- [32] 王金英, 丁峰, 潘介春, 等. 植物 bZIP 转录因子家族的研究进展[J]. 热带农业科学, 2019, 36 (6): 7.
- [33] Droge-Laser W. and Weiste C. The C/S1 bZIP network: a regulatory hub orchestrating plant energy homeostasis. *Trends Plant Sci*, 2018, 23 (5): 422-33.
- [34] Dröge-Laser W., Snoek B.L., Snel B., *et al.* The Arabidopsis bZIP transcription factor family-An update. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018, 45, 36-49.
- [35] 崔荣秀, 张议文, 陈晓倩, 等. 植物 bZIP 参与胁迫应答调控的最新研究进展[J]. 生物技术通报, 2019, 35 (2): 143-155.
- [36] 方义生, 曹东, 杨红丽, 等. 大豆耐盐相关基因研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42 (4): 512-526.

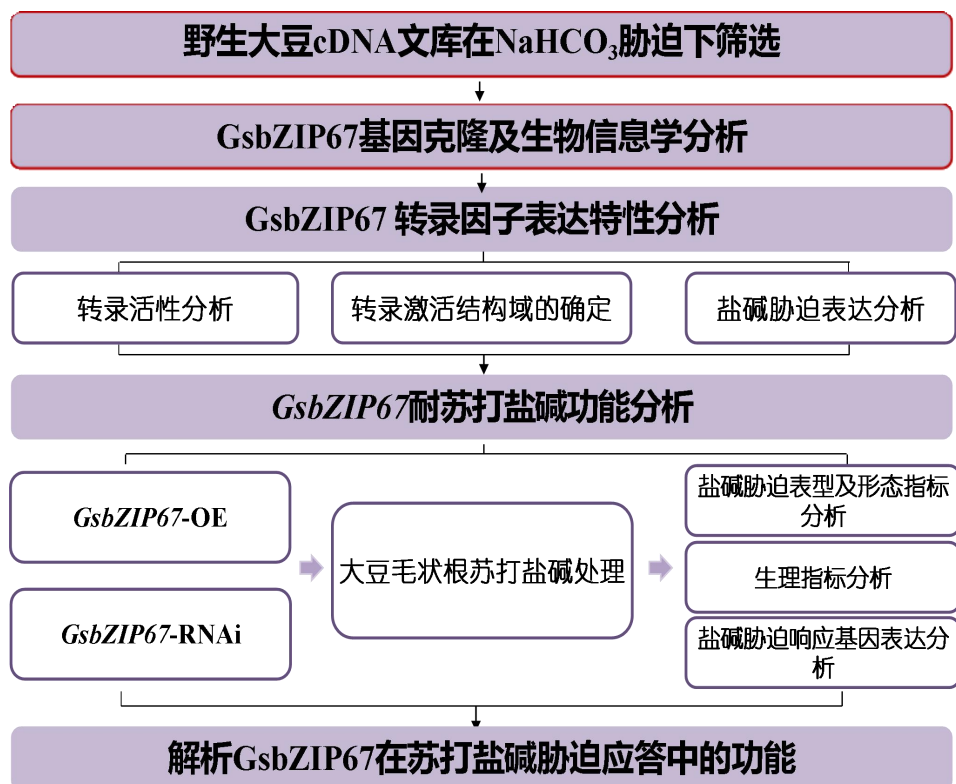
(四) 创新点与项目特色

目前对植物耐盐碱的研究多关注盐胁迫对面积更大、危害更严重的苏打盐碱复合型胁迫研究较少。而我国东北及内陆地区主要的盐碱土壤是苏打盐碱土，除了中性盐引发的离子毒害、渗透胁迫外，还有碳酸盐和高 pH 胁迫，情况更为复杂，对作物生长和产量影响更大。本项目以前期自主筛选的耐苏打盐碱能力极强的野生大豆材料 G07256 为试验材料，以一个耐苏打盐碱功能显著的野生大豆转录因子 *bZIP67* 为切入点，探究 *bZIP67* 参与大豆耐苏打盐碱性的分子机制，为创制耐盐碱大豆新材料，开发利用盐碱地提供理论指导。

虽然 *bZIP* 家族转录因子参与不同的生物学过程，但目前尚未有大豆 *bZIP* S2 亚家族成员的逆境胁迫的分子机制相关报道。本项目将为解析大豆耐盐碱分子机制奠定坚实基础及为大豆 *bZIP* 家族研究提供新思路。

(五) 技术路线、拟解决的问题及预期成果

5.1 技术路线（红色实线内容为课题组前期已完成部分）



5.2 拟解决的关键问题

通过本研究，将明确 *GsbZIP67* 在调控大豆耐苏打盐碱的功能及其育种潜力，获得具

有自主知识产权、耐盐碱功能明确的关键基因，为大豆耐盐碱的分子育种提供理论基础。

5.3 预期成果

通过本研究，将发表学术论文 1 篇，提交结题报告 1 份。

(六) 项目研究进度安排

2022 年 6 月-2022 年 12 月：完成转录激活活性分析；转录激活结构域分析；盐碱胁迫表达模式分析。

2023 年 1 月-2023 年 3 月：完成毛状根盐碱胁迫表型，生理指标分析。

2023 年 4 月-2023 年 6 月：完成盐碱胁迫响应基因的表达分析，完成结题报告撰写。

(七) 已有基础

1.与本项目有关的研究积累和已取得的成绩

(1) bZIP67 编码一个 bZIP S2 亚家族转录因子

bZIP67 含有与其他大豆 bZIP 家族成员序列高度一致的 bZIP 结构域，属于 bZIP 家族。通过系统进化树发现 bZIP67 属于 S2 类亚家族，因此 bZIP67 编码一个 bZIP S2 亚家族转录因子（图 1），bZIP 家族中 S1 类亚家族现有研究参与了大豆逆境胁迫，而 S2 类亚家族并未报道，因此保证了项目的新颖性。

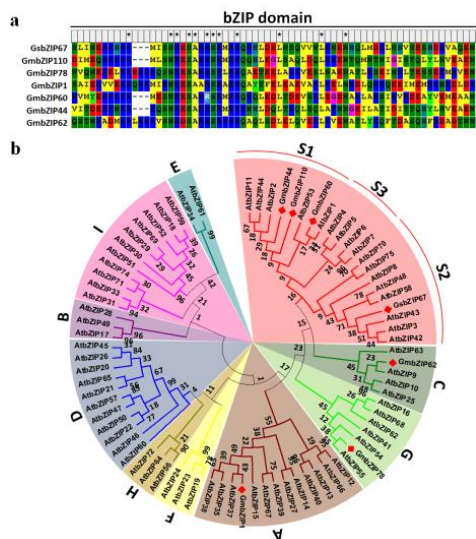


图 1 *bZIP67* 的同源序列比对和系统进化树分析

(2) 亚细胞定位发现 GsbZIP67 蛋白定位于细胞核 (图 2)。

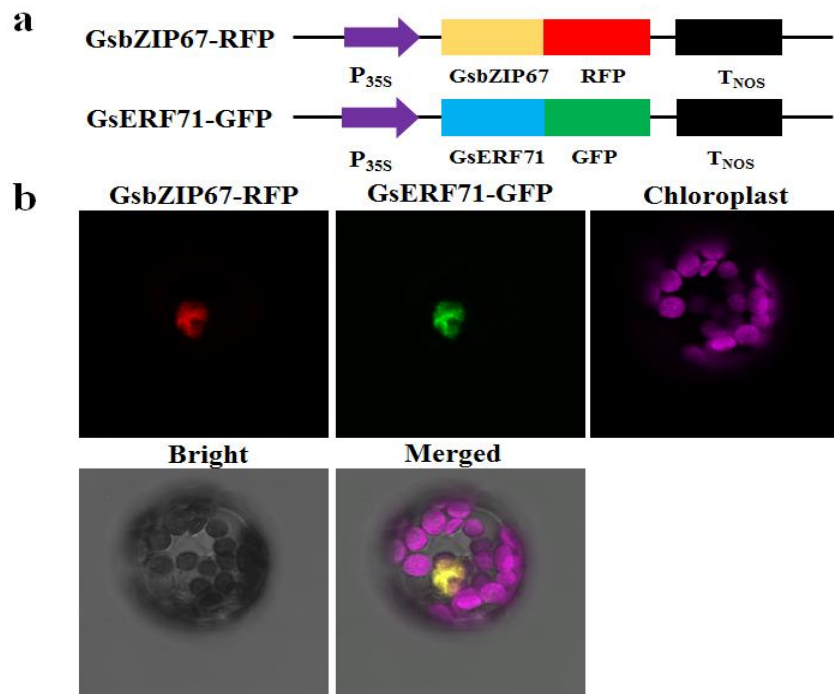


图 2 GsbZIP67 亚细胞定位分析

2. 已具备的条件，尚缺少的条件及解决方法

(1) 国内先进的研究平台。本项目依托的课题组具有 200 m² 独立实验室，具备开展常规分子生物学实验的仪器设备，课题组位于我校生物技术中心，具备校级设备共享平台具备开展本研究的仪器设备和研究平台，能保障项目顺利实施。

(2) 成熟完善的技术体系。本项目依托课题组主攻方向之一是大豆耐盐碱分子机制研究。项目组成员自进入课题组以来，学习并掌握了相关分子和生理实验技术，如 qRT-PCR、生理指标测定等。

三、 经费预算

开支科目	预算经费 (元)	主要用途	阶段下达经费计划 (元)	
			前半阶段	后半阶段
预算经费总额	20000			

开支科目	预算经费 (元)	主要用途	阶段下达经费计划 (元)	
			前半阶段	后半阶段
1. 业务费	15000	主要用于引物合成、测序、 论文出版等费用		
(1) 计算、分析、 测试费	5000	实验开展过程中的引物合 成、测序等费用	3000	2000
(2) 能源动力费				
(3) 会议、差旅费	5000	参加学术交流	5000	0
(4) 文献检索费				
(5) 论文出版费	5000	发表论文所需的版面费	0	5000
2. 仪器设备购置费				
3. 实验装置试制费				
4. 材料费	5000	离心管、限制性内切酶等各 类试剂耗材	3000	2000
学校拨款	0.00			
财政拨款	20000.00			

四、项目组成员签名

五、指导教师意见

<div>导师（签章）： 年 月 日</div>

六、院系推荐意见

<div>盖章： 年 月 日</div>

七、学校推荐意见

<div>盖章： 年 月 日</div>
