

· 热带作物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250007



主持人: 张洪亮, 徐 冉

Open Access



大豆过氧化物酶基因 *GmPOD123* 的功能 鉴定及互作蛋白的筛选

刘笑雨[#], 姚文博, 赵 艳, 裴双康, 张丽娟, 朱梦雪, 王心蕊,
王佳乐, 许 浩, 许克恒, 周永刚*, 李海燕*
(海南大学 南繁学院/三亚南繁研究院, 海南 三亚 572024 中国)

摘 要: 为深入挖掘调控大豆(*Glycine max*)抗旱性的关键基因, 本研究基于前期干旱处理下大豆叶片转录组结果, 筛选出受干旱胁迫显著诱导的过氧化物酶 *GmPOD123* 基因。首先, 为了鉴定 *GmPOD123* 是否响应干旱胁迫, 本研究对大豆叶片 *GmPOD123* 进行干旱胁迫下的表达分析, 结果表明, 其在 3 h 胁迫时被显著诱导。进一步, 通过对转 *GmPOD123* 基因的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)进行干旱胁迫下的表型鉴定, 明确了其具有提高植物抗旱性的功能。同时, 为了解析 *GmPOD123* 调控抗旱的分子机制, 利用大豆 cDNA 酵母文库筛选到互作蛋白果糖 1, 6-二磷酸醛缩酶(GmFBA2), 并通过酵母双杂和双荧光素酶互补实验鉴定了其 *GmPOD123* 互作。研究表明, GmFBA2 可能通过与 *GmPOD123* 的互作参与调控大豆抗旱性的功能。

关键词: 干旱; 大豆; 过氧化物酶; 果糖 1, 6-二磷酸醛缩酶

中图分类号: S565.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)05-0673-09

刘笑雨, 姚文博, 赵艳, 等. 大豆过氧化物酶基因 *GmPOD123* 的功能鉴定及互作蛋白的筛选 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(5): 673-681. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250007

干旱逐渐成为限制作物生长发育的主要灾害, 它不仅导致土壤干燥、养分流失, 还限制了作物的光合作用, 严重时可导致作物减产甚至绝收, 威胁粮食安全^[1]。在干旱胁迫下, 植物细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成量超过正常水平^[2], 会导致细胞严重损伤, 甚至引发死亡^[3]。研究表明, NADPH 氧化酶的信号传导通路、光合作用相关通路及 *FBA*s 家族基因中 *SIFBA4* 和 *SIFBA7* 对逆境的响应等均与 ROS 途径有关^[4], 然而其分子机制却鲜有报道。植物细胞维持 ROS 的稳态依赖于酶促反应和非酶促反应等保护机制^[5], 非酶促反应不依赖酶作为催化剂, 反应的发生通常是由物理化学条件(如温度、压力和浓度等)和其他催化剂(如酸、碱、金属离子等)影响的; 酶促脱毒系

统包括抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)^[6-7]。过氧化物酶家族(*PODs*)成员已被证明在植物生长发育和抗逆过程中发挥着重要的作用, 根据过氧化物酶基因的蛋白结构可将该基因家族成员分为两大类, 分别为血红素类 *PODs* 与非血红素 *PODs*, 在植物中非血红素 *PODs* 类成员还可分为 I 类、II 类和 III 类亚家族^[8]。I 类过氧化物酶广泛存在于除动物以外的大多数生物体中, 主要作用是清除多余的 H₂O₂, 防止细胞受到损伤^[9]。II 类过氧化物酶存在于真菌中, 参与木质素的降解^[10]。III 类过氧化物酶作为

收稿日期: 2025-01-05

修回日期: 2025-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(32201716, 3217150570); 海南省自然科学基金项目(321QN182); 海南大学协同创新项目(XTCX2022NYB01); 海南大学引进人才启动基金项目(Y3AZ20024)

***第一作者:** 刘笑雨(1996—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: xiaoyuli202202@163.com

***通信作者:** 周永刚(1989—), 男, 副教授。研究方向: 热带大豆分子育种。E-mail: yonggang0408@163.com;

李海燕(1971—), 女, 教授。研究方向: 热带大豆分子育种。E-mail: hyl@hainanu.edu.cn

一个多基因家族仅存于各种植物中,近年来,Ⅲ类过氧化物酶家族在许多物种中被广泛研究,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[11]、玉米(*Zea mays*)^[12]、土豆(*Solanum tuberosum*)^[13]、胡萝卜(*Daucus carota*)^[14]和小麦(*Triticum aestivum*)^[15],但大豆中的 *PODs* 基因家族成员及功能研究较少。

大豆(*Glycine max*)是人类蛋白质和食用油脂的重要来源,中国大豆进口量最高达 10 032.7 万 t,而中国自产只有 1 000 多万 t,超 80% 需进口国际市场中的转基因大豆,供需严重不足,极大地影响了中国的粮食安全。另外,大豆对水分亏缺十分敏感^[16],当大豆生长过程中遭遇干旱胁迫,会使大豆单株减产 40%,严重时可达到 80%^[17-18]。然而,关于大豆中 *POD* 基因响应干旱胁迫的研究相对较少。*POD* 可通过清除活性氧(ROS)等自由基,保护细胞免受氧化损伤,从而提高植物的抗逆性,但目前关于大豆 *POD* 基因在干旱胁迫下的作用及其调控机制尚未得到充分的研究。因此,挖掘与大豆抗旱相关的关键候选基因,鉴定大豆 *POD* 基因在干旱胁迫中发挥的作用,对培育大豆抗旱新品种具有重要意义。

本研究通过对干旱胁迫下不同时间点的大豆进行转录组测序(实验室前期工作基础)^[19],筛选到 1 个在干旱处理下表达量增多的Ⅲ类过氧化物酶家族基因 *GmPOD123*,并利用拟南芥进行功能验证,结果显示,在干旱条件下, *GmPOD123* 超表达株系相对 WT 株系长势较好,叶片呈现较深绿色,萎蔫

现象较轻,株高显著升高。在此基础上,本研究通过大豆 cDNA 酵母文库筛选并利用酵母双杂交及萤光素酶蛋白互补(luciferase complementation assay, LCA)实验鉴定出 *GmPOD123* 与 *GmFBA2* 存在相互作用。本研究一方面为后续解析其分子调控机制奠定了基础,另一方面为培育抗旱大豆新品系(种)丰富了候选基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料 大豆材料为‘Williams 82’,对其进行模拟干旱胁迫(w=8% PEG8000 的水培)处理,取 0、3、6 和 12 h 植株的叶片进行液氮磨样备用。拟南芥植物材料选择 Col-0,烟草材料选择本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)。

1.2 *GmPOD123* 基因的表达量分析 利用 Phytozome 13 网站获得 *GmPOD123* 序列,设计 RT-qPCR 引物 q-*GmPOD123*-F 和 q-*GmPOD123*-R(表 1)。取干旱胁迫下不同时间点的‘Williams 82’大豆叶片进行充分研磨,利用 RNAiso Plus 试剂提取不同植株组织 RNA,利用聚合美公司的反转录试剂盒(MF949-T)将 RNA 反转录为 cDNA。以大豆 *GmEF1a* 作为内参基因^[20],反应程序为 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 5 s; 60 ℃ 30 s; 共 40 个循环;溶解曲线为 95 ℃ 20 s; 60 ℃ 30 s; 95 ℃ 20 s。利用 GraphPad Prism 8.0 软件对定量结果进行作图。

1.3 *GmPOD123* 基因的克隆 利用 RNAiso Plus 试剂提取‘Williams 82’叶片的 RNA,利用聚合美公

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequences	产物长度/bp Length/bp
<i>GmPOD123</i> -F	ATGGGTCGGCTTAATCTCC	978
<i>GmPOD123</i> -R	AAGAACAGAACAAATCGGTACG	
<i>pCAMBIA3301-GmPOD123</i> -F	ACACGGGGGACTCTTGACCATGGTAATGGGTCGGCTTAATCTCC	978
<i>pCAMBIA3301-GmPOD123</i> -R	GTCATCCTTGTAATCACTAGTAAGAACAGAACAAATCGGTACG	
<i>AtEF1a</i> -F	CCAGGCTGATTGTGCTGTTC	269
<i>AtEF1a</i> -R	ACCAAGGGTGAAAGCAAGAAA	
<i>GmEF1a</i> -F	GCTCTTCTTGCTTTCACCCCTT	111
<i>GmEF1a</i> -R	TTCCTTCACAATTCATCATACC	
q- <i>GmPOD123</i> -F	ATTAACACTGTCCCTTTATT	181
q- <i>GmPOD123</i> -R	CTGCACAAAGCAATCATGAA	

司的反转录试剂盒(MF949-T)将 RNA 反转录为 cDNA。利用 Phytozome 网站获取 *GmPOD123* 的基因 CDS 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计全长克隆引物 *GmPOD123*-F 和 *GmPOD123*-R (表 1), 利用购买于 TOYOBO 公司的 KOD 酶完成克隆。PCR 程序为 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s; 56 °C 退火 5 s; 68 °C 延伸 6 s; 68 °C 后延伸 10 s。PCR 程序结束后, 将产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 进一步利用诺唯赞公司的产物回收试剂盒(DC301-01)获得胶回收产物, 连接克隆载体 pEASY-T1 生成 pEASY-*GmPOD123* 后进行测序。

1.4 拟南芥遗传转化验证 *GmPOD123* 基因功能 使用 pCambia3301-Flag 载体、引物 pCambia3301-*GmPOD123*-F 和 pCambia3301-*GmPOD123*-R 以及酶 *EcoR* I 和 *Spe* I 构建 pCambia3301-*GmPOD123*-Flag 载体。使用花序侵染法^[21]进行农杆菌介导的拟南芥转化, 并通过草铵膦(Glufosinate ammonium)筛选和基因组 PCR 验证阳性苗。进一步, 将转氧化物酶 *GmPOD123* 基因的高表达 T3 代拟南芥(OE-lines)和野生型拟南芥(WT)种子播种在营养土中, 在正常条件下(22 °C, 16 h/8 h 昼夜, 光照条件 6 000 lx)培养 28 d 后, 分别进行正常培养组(对照)和干旱胁迫组(不浇水), 每组设置 3 次重复。

1.5 酵母双杂交筛选互作蛋白 自激活分析: 构

建酵母表达载体 pGBKT7-*GmPOD123*, 转化到酵母 Y2Hgold 菌株上, 挑选单克隆在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal(SD-TLHA/X- α -gal)培养基上培养, 利用 X- α -gal 显色确定是否具有自激活作用。

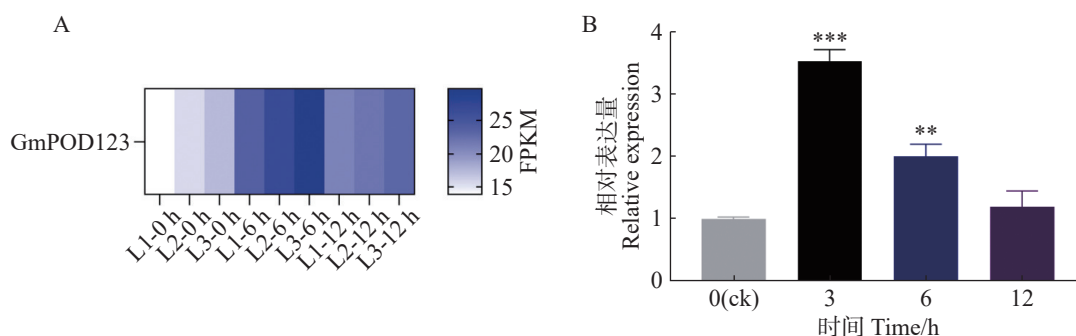
酵母文库筛选: 将 pGBKT7-*GmPOD123* 诱饵质粒和大豆 cDNA 酵母文库菌液用 Mating 法筛选互作蛋白, 利用 SD-TLHA/X- α -gal 培养基筛选, 挑选蓝色单克隆摇菌提取酵母质粒测序。

2 结果与分析

2.1 *GmPOD123* 基因的表达分析及功能鉴定

2.1.1 干旱胁迫下 *GmPOD123* 基因的表达分析

基于本实验室前期干旱胁迫下大豆的转录组测序分析结果发现, *GmPOD123* 基因在干旱胁迫下被显著诱导表达(图 1-A)。因此, 为进一步明确 *GmPOD123* 基因是如何参与抵抗干旱胁迫的过程, 本研究首先鉴定了其在干旱胁迫下的表达模式, 将大豆植株进行模拟干旱胁迫(8% PEG8000, w/w)处理, 于 0、3、6 和 12 h 对大豆的叶片进行取样, 液氮研磨后进行实时荧光定量 PCR 实验。结果显示, 与对照组(0 h)相比, 胁迫处理后 *GmPOD123* 基因的表达量显著高于 0 h, 且在 3 h 表达量最高, 约为对照组的 4 倍(图 1-B)。研究结果表明, *GmPOD123* 基因显著受干旱胁迫诱导以参与调控大豆植物抗旱过程。



A. 大豆叶中 *GmPOD123* 基因干旱胁迫下的转录组结果; B. 大豆叶中 *GmPOD123* 基因干旱胁迫下的 RT-qPCR 结果。**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; T. 误差线。下同。

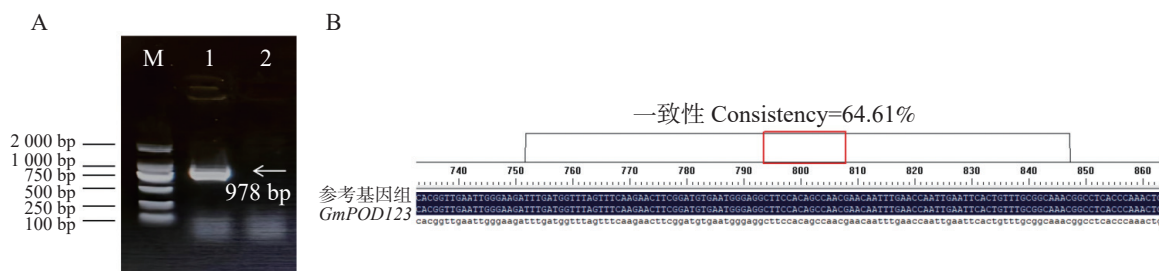
A. Transcriptome results of the *GmPOD123* gene in soybean leaves under drought stress; B. RT-qPCR results of the *GmPOD123* gene in soybean leaves under drought stress. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; T. Error bars. Similarly hereinafter.

图 1 大豆叶中 *GmPOD123* 基因干旱胁迫下的表达分析

Fig. 1 Expression analysis of *GmPOD123* gene in soybean leaves under drought stress

2.1.2 *GmPOD123* 基因的克隆 为了分析大豆过氧化物酶基因 *GmPOD123* 的生物学功能, 本研究首先从 phytozome13 网站中获取 *GmPOD123* 基因的 CDS 序列, *GmPOD123* 基因全长 978 bp, 编码

168 个氨基酸, 进一步设计克隆引物 *GmPOD123*-F 和 *GmPOD123*-R, 并以大豆 'Williams 82' 的 cDNA 为模板进行基因克隆, 电泳条带和测序结果正确, 可以用于后续实验(图 2)。



A. *GmPOD123* 基因的克隆; B. *GmPOD123* 基因序列的对比结果; M. DL 2000。

A. Cloning of *GmPOD123*; B. Sequence alignment of *GmPOD123*; M. DL 2000。

图 2 大豆 *GmPOD123* 基因的克隆及序列比对

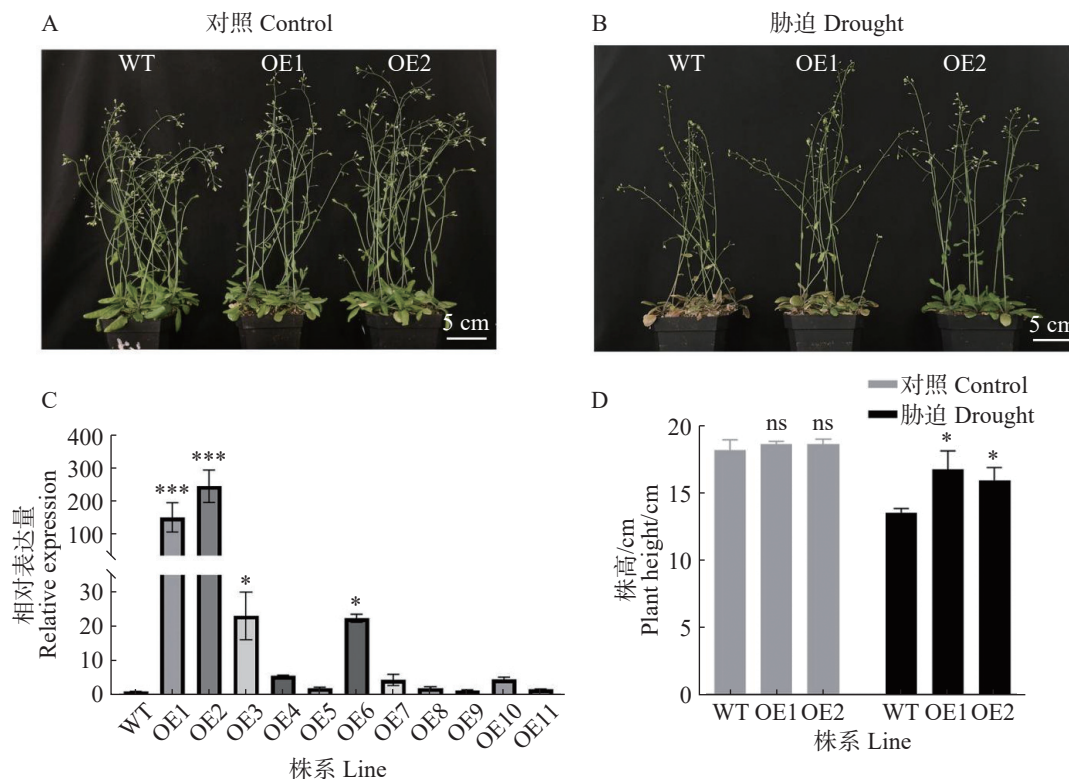
Fig. 2 Cloning and sequence alignment of *GmPOD123*

2.1.3 超表达 *GmPOD123* 拟南芥株系表型 为了验证 *GmPOD123* 基因的抗旱性, 将超表达过氧化物酶基因 *GmPOD123* 的 T3 代拟南芥与野生型拟南芥在人工气候室培养, 生长 28 d 后对照组正常浇水, 胁迫组进行干旱胁迫处理(不浇水), 胁迫 10 d 后观察表型变化。从图 3 可知, 相比对照株系(WT), 2 个超表达株系(OE1、OE2)在干旱处理后长势更好, 株高显著升高, WT 株系叶片出现明显萎蔫, 说明超表达 *GmPOD123* 基因的拟南芥株

系对于干旱胁迫的耐受性增强。实验结果表明, *GmPOD123* 基因在植株中具有抗旱功能。

2.2 *GmPOD123* 的互作蛋白筛选及验证

2.2.1 *GmPOD123* 自激活验证实验 为了研究 *GmPOD123* 基因的抗旱机制, 利用大豆 cDNA 酵母文库筛选可能与 *GmPOD123* 互作的蛋白, 首先通过验证 *GmPOD123* 是否有自激活现象来证明后续实验的准确性。结果显示, 对照菌株阴性对照 pGADT7-T+pGBKT7-Lam 在 SD/-Trp/-Leu



A. 正常培养下的拟南芥表型; B. 干旱胁迫下的拟南芥表型; C. 超表达拟南芥表达量鉴定; D. 野生型 WT 和超表达 *GmPOD123* 拟南芥株高统计; WT. 野生型株系, OE. 超表达株系; *. $P < 0.05$; ns. 无显著差异。

A. Phenotype of *Arabidopsis* under normal cultivation; B. Phenotype of *Arabidopsis* under drought stress; C. Identification of the expression level of overexpressed *Arabidopsis thaliana*; D. Plant height analysis of WT and *GmPOD123* overexpressing *Arabidopsis*; WT. Wild-type line, OE: Overexpression line; *. $P < 0.05$, ns. No significant differences.

图 3 超表达 *GmPOD123* 拟南芥抗旱表型鉴定

Fig. 3 The phenotype identification of *GmPOD123* overexpressing *Arabidopsis* under drought stress

(SD-TH)平板上生长,在 SD/-Trp/-His/-Ade/-Leu+X- α -gal(SD-TLHA/X- α -gal)平板上不能正常生长。自激活验证组 pGADT7-T+pGBKT7-*GmPOD123* 在

SD-TLHA/X- α -gal 不能正常生长,验证组与阴性对照组生长一致(图 4)。因此, pGBKT7-*GmPOD123* 没有自激活现象,可以进行后续酵母文库筛选实验。

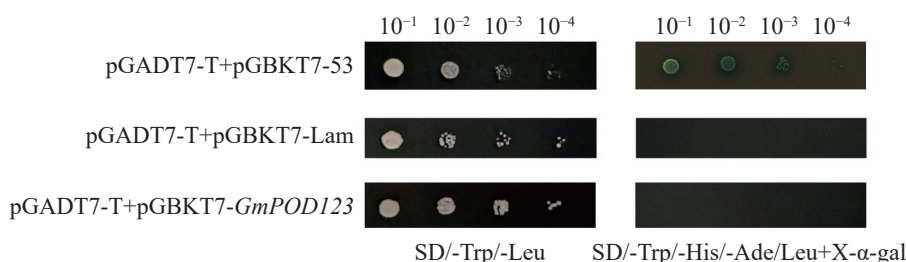
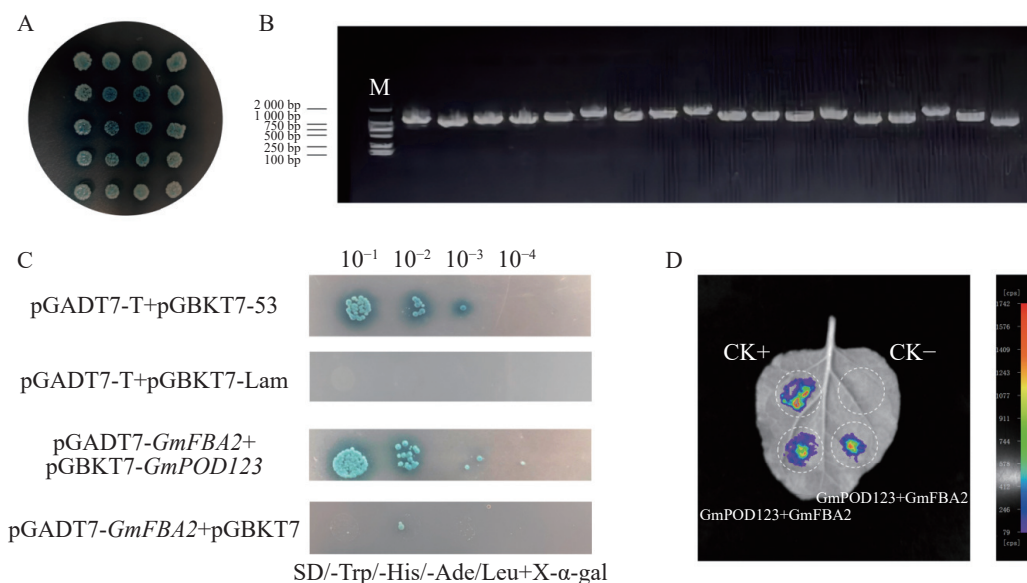


图 4 *GmPOD123* 蛋白自激活验证
Fig. 4 Autonomous activation of *GmPOD123*

2.2.2 *GmPOD123* 互作蛋白的筛选及验证 将 pGBKT7-*GmPOD123* 诱饵质粒和大豆 cDNA 酵母文库菌液用 Mating 法筛选互作蛋白,涂 SD-TH 筛选平板,挑取蓝色单克隆到 SD-TLHA/X- α -gal 平板上,从筛库的 SD-TLHA/X- α -gal 板上菌落中挑取了单克隆进行 PCR 验证(图 5-A—B),经过 BLAST 比对,最终获得 16 个基因序列(表 2),结果表明, *GmPOD123* 与 *GmFBA2* 阳性克隆各 3 个,这些基因均编码果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(FBA, fructose-bisphosphate aldolase)。因此推测, *GmPOD123* 与 *GmFBA2* 可能存在强互作。*FBA* 家族基因,不仅是植物糖酵解、糖异生和卡尔文循环过程中的关键酶,也在生物和非生物胁迫中起

着至关重要的作用^[22]。除 *AtFBA3* 外,大部分 *AtFBA* 基因对根系干旱胁迫均有显著响应;桑树(*Morus alba*)中的 *MaFBA* 可与 *MaRACK1* 基因相互作用来调节干旱和盐胁迫耐受性^[23]。因此,推测 *GmFBA2* 可能会通过与 *GmPOD123* 互作,从而调控大豆抗旱性的关键基因。为了证明 *GmPOD123* 与 *GmFBA2* 的相互作用,首先进行酵母双杂互作验证,结果显示,实验组 pGADT7-*GmFBA2*+pGBKT7-*GmPOD123* 在 SD-TLHA/X- α -gal 能正常生长且变蓝,表明 *GmPOD123* 与 *GmFBA2* 蛋白互作(图 5-B)。为了进一步验证 *GmPOD123* 和 *GmFBA2* 存在互作关系,对 *GmFBA2* 和 *GmPOD123* 进行 LCA 互作验证,结果表明, *GmPOD123* 和



A.SD-TLHA/X- α -gal 筛选结果; B.阳性克隆 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果; C.酵母互作验证; D.LCA 互作验证。

A.SD-TLHA/X- α -gal screening results; B.Result of PCR products from partially positive clonal by agarose gel electrophoresis; C. Yeast interaction validation; D. LCA interaction verification.

图 5 互作蛋白的筛选及互作验证

Fig. 5 Protein interaction screening and validation

表 2 酵母双杂交筛选 pGBKT7-*GmPOD123* 的相互作用蛋白

Tab. 2 Yeast two-hybrid screening of pGBKT7-*GmPOD123* interaction proteins

编号 NO.	Genebank登录号 GenBank accession number	基因注释 Gene annotation
1	KAG4988328.1	
2	NP_001347079.1	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic
3	XP_003544567.1	
4	NP_001239738.1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F-like
5	NP_001237820.2	Putative cysteine protease
6	XP_003530506.1	Transcription factor bHLH68
7	NP_001238359.2	Arginine decarboxylase/L-arginine carboxy-lyase
8	XP_003522659.1	COP9 signalosome complex subunit 5a COP9
9	XP_003526451.1	COP9 signalosome complex subunit 5b COP9
10	NP_001237784.2	Glutamine synthetase precursor
11	XP_006588591.1	ATP-binding cassette transporter, ABC
12	XP_003528556.1	Linoleate 13S-lipoxygenase 3-1
13	XP_003534305.1	Phosphoribulokinase
14	XP_003547867.1	Mitochondrial/chloroplast ribosomal protein
15	XP_003526673.1	Alcohol dehydrogenase
16	NP_001276147.1	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase

GmFBA2 存在互作关系(图 5-C)。因此,GmPOD123 与 GmFBA2 之间存在相互作用关系,本实验结果为进一步研究 *GmPOD123* 基因在大豆抗旱调控中的作用夯实了理论基础。

3 讨 论

植物 *PODs* 基因家族主要作为电子受体参与催化过氧化氢(H₂O₂)的氧化反应^[24]。目前,研究者已围绕不同物种中的 *PODs* 家族成员展开了相关基础性研究工作,尤其是针对 *PODs* 基因家族成员的共同特征,如植物响应生物或非生物胁迫、参与木质素的形成及清除活性氧(ROS)等生物学功能^[25],以减轻活性氧对植物造成的氧化损伤,提高植物对逆境胁迫的耐受性。为了深入解析 *GmPOD123* 基因的功能,本研究对 *GmPOD123* 基因干旱胁迫下的表达模式以及抗旱性进行了鉴定,结果均证实了 *GmPOD123* 基因显著受干旱胁迫诱导,且功能鉴定结果表明该基因参与了对大豆抗旱性的调控,为后续解析机制奠定了基础。

PODs 基因家族在不同物种中发挥着不同的

作用,主要集中在清除活性氧、提高对逆境胁迫的耐受性等生物学功能。过表达 *OsPRX38* 基因的水稻植株具有提高自身耐砷性的潜力^[26];有研究通过对 *GmPrx16* 的超表达株系进行干旱胁迫下的表型鉴定,证明 *GmPrx16* 可提高对大豆的耐旱性^[27];当橡胶树(*Hevea brasiliensis*)遭遇干旱胁迫后,会导致 *HbPOD42* 的活性与表达量增加,从而增强自身的抗旱性^[28]。而在大豆中,*GsPOD9* 已被证明可以被盐胁迫所诱导,进一步通过增加大豆体内的抗氧化反应、降低 ROS 积累,从而增强大豆耐盐性^[29];ALEEM 等^[30] 对大豆中 *PODs* 的家族成员进行了基因家族分析,并验证了 *GsPOD40* 在大豆响应干旱胁迫中的生物学功能。本研究的结果表明,干旱胁迫下超表达 *GmPOD123* 拟南芥对比野生型拟南芥增强了植株的抗旱性,并推测其可能通过调节 ROS 通路正向调控植物抵御干旱的能力。

GhPrx14 可与 GhTrxo 蛋白互作通过调控植物叶片活性氧水平来影响植物的防御反应^[31];IbBBX24 和 IbTOE3 分别与 *IbPRX17* 启动子结合

来激活 *IbPRX17* 转录增强甘薯对盐和干旱胁迫的耐受性^[32]。为了进一步解析 *GmPOD123* 基因调控植物抗旱作用的分子机制, 本研究首先通过大豆 cDNA 酵母文库筛选到多个可能与其互作的蛋白, 并采用酵母双杂交及萤光素酶蛋白互补方法证实了 *GmPOD123* 与果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) *GmFBA2* 存在互作关系。近年的研究表明, *FBA*s 家族成员在植物逆境响应中发挥重要作用。如番茄中的 *StFBA*s 基因表达水平受高低温胁迫的显著影响, 低温胁迫下 *SIFBA4* 和 *SIFBA7* 过表达株系的 ROS 含量显著低于野生型^[4]; 水稻中 *FBA* 的活性和表达在干旱胁迫下会发生显著变化, 其活性随干旱胁迫程度的加剧而显著提高, 同时可以通过协调糖代谢和淀粉代谢途径提高水稻的抗旱性^[33]; 此外, 桑树 *MaFBA* 基因在干旱及 H_2O_2 处理下均能上调表达, *MaFBA* 通过与 *MaRACK1* 互作调控植物的耐旱性^[23]。然而, 植物 *FBA*s 是如何参与调控植物 ROS 的机制鲜有报道。因此, 基于上述分析结果, 本研究团队推测, *GmFBA2* 可以通过与 *GmPOD123* 的互作参与维持植物 ROS 的稳态, 从而提高植物的抗旱能力, 为后续解析其机制奠定基础。

综上所述, 本研究首先通过分析干旱胁迫下大豆中 *GmPOD123* 基因的表达模式及其抗旱表型, 初步明确了该基因具有提高大豆抗旱性的功能。同时, 结合该蛋白对大豆 cDNA 酵母文库的筛库结果, 发掘并鉴定了 *GmPOD123* 与 *GmFBA2* 存在相互作用, 并推测 *GmFBA2* 可能通过与 *GmPOD123* 的互作从而维持 ROS 稳态, 进而调控大豆的抗旱能力。本研究成果一方面为解析 *GmPOD123* 基因是如何调控大豆抗旱性的分子机制奠定了理论基础, 另一方面也为培育抗旱大豆新品系(种)提供候选基因资源。

参考文献:

- [1] SALEKDEH G H, REYNOLDS M, BENNETT J, et al. Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding[J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(9): 488 – 496.
- [2] MØLLER I M, SWEETLOVE L J. ROS signalling-specificity is required[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(7): 370 – 374.
- [3] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and anti-oxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909 – 930.
- [4] 蔡冰冰. 番茄果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶基因表达特性及其对光合作用的调控[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [5] COOKE M S, EVANS M D, DIZDAROGLU M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease[J]. *The FASEB Journal*, 2003, 17(10): 1195 – 1214.
- [6] NOCTOR G, FOYER C H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: keeping active oxygen under control[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1998, 49: 249 – 279.
- [7] LIU C, LIN J Z, WANG Y, et al. The protein phosphatase PC1 dephosphorylates and deactivates CatC to negatively regulate H_2O_2 homeostasis and salt tolerance in rice[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(9): 3604 – 3625.
- [8] 马鑫磊, 许瑞琪, 索晓曼, 等. 谷子Ⅲ型 PRX 基因家族全基因组鉴定及干旱胁迫下表达分析[J]. *作物学报*, 2022, 48(10): 2517 – 2532.
- [9] SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1305 – 1319.
- [10] PIONTEK K, SMITH A T, BLODIG W. Lignin peroxidase structure and function[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2001, 29(Pt2): 111–116. doi:10.1042/0300-5127:0290111
- [11] TOGNOLLI M, PENEL C, GREPPIN H, et al. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 2002, 288 (1/2): 129 – 138.
- [12] WANG Y, WANG Q Q, ZHAO Y, et al. Systematic analysis of maize class III peroxidase gene family reveals a conserved subfamily involved in abiotic stress response[J]. *Gene*, 2015, 566(1): 95 – 108.
- [13] YANG X S, YUAN J Z, LUO W B, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the class III peroxidase gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 593577.
- [14] YAN J, SU P S, LI W, et al. Genome-wide and evolutionary analysis of the class III peroxidase gene family in wheat and *Aegilops tauschii* reveals that some members are involved in stress responses[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 666.
- [15] MENG G, FAN W Y, RASMUSSEN S K. Characterisation of the class III peroxidase gene family in carrot taproots and its role in anthocyanin and lignin accumulation[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 167: 245 – 256.
- [16] CONDON A G, RICHARDS R A, REBETZKE G J, et al. Breeding for high water-use efficiency[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(407): 2447 – 2460.
- [17] SPECHT J E, CHASE K, MACRANDER M, et al. Soybean response to water: a QTL analysis of drought toler-

- ance[J]. *Crop Science*, 2001, 41(2): 493 – 509.
- [18] GUIMARÃES-DIAS F, NEVES-BORGES A C, VIANA A A B, et al. Expression analysis in response to drought stress in soybean: shedding light on the regulation of metabolic pathway genes[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35(S1): 222 – 232.
- [19] ZHOU Y G, LIU W C, LI X W, et al. Integration of sRNA, degradome, transcriptome analysis and functional investigation reveals gma-miR398c negatively regulates drought tolerance via *GmCSDs* and *GmCCS* in transgenic Arabidopsis and soybean[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 190.
- [20] 张引鹤, 周永刚, 高红桃, 等. 大豆 (*Glycine max*) *SUT4* 基因的克隆、表达及抗逆功能的鉴定[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(17): 5578 – 5587.
- [21] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735 – 743.
- [22] CAI B B, LI Q, XU Y C, et al. Genome-wide analysis of the fructose 1, 6-bisphosphate aldolase (FBA) gene family and functional characterization of *FBA7* in tomato[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 108: 251 – 265.
- [23] LIU C Y, ZHU P P, FAN W, et al. Functional analysis of drought and salt tolerance mechanisms of mulberry *RACK1* gene[J]. *Tree Physiology*, 2019, 39(12): 2055 – 2069.
- [24] M. -HAMVAS M, MÁTHÉ C, VASAS G, et al. Cylin-dropermopsin and microcystin-LR alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis [J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2010, 61(S1): 35–48.
- [25] WU C L, DING X P, DING Z H, et al. The class III peroxidase (POD) gene family in cassava: identification, phylogeny, duplication, and expression[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2730.
- [26] KIDWAI M, DHAR Y V, GAUTAM N, et al. *Oryza sativa* class III peroxidase (*OsPRX38*) overexpression in *Arabidopsis thaliana* reduces arsenic accumulation due to apoplastic lignification[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 362: 383 – 393.
- [27] ZHANG Z F, MA J K, YANG X, et al. Natural allelic diversities of *GmPrx16* confer drought tolerance in soybean[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(3): 535 – 537.
- [28] WANG L F, WANG J K, AN F, et al. Molecular cloning and characterization of a stress responsive peroxidase gene *HbPRX42* from rubber tree[J]. *Brazilian Journal of Botany*, 2016, 39(2): 475 – 483.
- [29] JIN T, SUN Y Y, ZHAO R R, et al. Overexpression of peroxidase gene *GsPRX9* confers salt tolerance in soybean[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15): 3745.
- [30] ALEEM M, RIAZ A, RAZA Q, et al. Genome-wide characterization and functional analysis of class III peroxidase gene family in soybean reveal regulatory roles of *GsPOD40* in drought tolerance[J]. *Genomics*, 2022, 114(1): 45 – 60.
- [31] 张丽雅. 棉花黄萎病抗性相关基因 *GhPrx14* 的功能分析和棉花 OFP 家族的生物信息学分析[D]. 郑州: 郑州大学, 2022.
- [32] ZHANG H, WANG Z, LI X, et al. The IbBBX24–IbTOE3–IbPRX17 module enhances abiotic stress tolerance by scavenging reactive oxygen species in sweet potato[J]. *New Phytologist*, 2022, 233(3): 1133 – 1152.
- [33] WANG X P, LIU H L, ZHANG D, et al. Photosynthetic carbon fixation and sucrose metabolism supplemented by weighted gene co-expression network analysis in response to water stress in rice with overlapping growth stages[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 864605.

Functional identification of soybean peroxidase *GmPOD123* and screening of interacting proteins

LIU Xiaoyu[#], YAO Wenbo, ZHAO Yan, PEI Shuangkang, ZHANG Lijuan, ZHU Mengxue,
WANG Xinrui, WANG Jiale, XU Hao, XU Keheng, ZHOU Yonggang^{*}, LI Haiyan^{*}
(Nanfan School/Sanya Nanfan Institute, Hainan University Sanya, Hainan 572024, China)

Abstract: To further explore the key genes regulating drought resistance in soybean, the peroxidase gene *GmPOD123*, which is significantly induced under drought stress, was screened based on previous transcriptomic analyses (RNA-Seq) of soybean leaves under drought stress. An expression analysis of the soybean *GmPOD123* gene under drought stress was performed to identify whether *GmPOD123* is involved in response to drought stress, and the results showed that *GmPOD123* was significantly up-regulated after 3 h stress treatment. Moreover, phenotype identification of transgenic *Arabidopsis* plants of overexpressing *GmPOD123* showed that overexpression of *GmPOD123* in *Arabidopsis* could increase the drought tolerance, which was compared to wild type *Arabidopsis*. To further explore the drought-resistant molecular mechanism of *GmPOD123*, fructose-1,6-bisphosphate aldolase (GmFBA2), an interacting protein of *GmPOD123*, was screened from the soybean cDNA yeast library by Mating, and its interaction with *GmPOD123* was identified by yeast two-hybrid system and luciferase complementation assay (LCA). In summary, *GmFBA2* may influence ROS levels by interacting with *GmPOD123*, thereby regulating soybean drought resistance.

Keywords: drought; *Glycine max*; peroxidase; fructose-1, 6-bisphosphate aldolase

(责任编辑: 潘学峰)