

• 药材与资源 •

红花 bZIP20 转录因子基因的克隆、表达分析及植物表达载体构建

官丽莉^{1,2}, 崔 琪¹, 韩怡来¹, 顾天瑶¹, 武云云¹, 胡人阁¹, 杜林娜¹, 李海燕^{1,2*}, 李校堃^{2*}

1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

摘 要: 目的 克隆红花花瓣中 bZIP20 (Basic region/leucine zipper motif) 基因, 研究其在不同组织中的表达量并构建其植物表达载体。方法 根据红花转录组测序结果挑选 bZIP 基因的设计引物, 以红花花瓣总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 法扩增 bZIP20 基因开放阅读框 (ORF) 片段, 利用 RT-PCR 法分析在红花不同组织以及尖孢镰刀菌侵染后红花根部 bZIP20 基因的表达量, 同时构建植物表达载体 pBASTA-bZIP20。结果 bZIP20 基因 ORF 长 981 bp, 编码 326 个氨基酸 (GenBank 登录号为 KT692605)。红花 bZIP20 与其他物种氨基酸具有一定的同源性, 其与芝麻、野茶树的氨基酸序列相似性高达 85.41% 和 83.99%。实时荧光定量 PCR 分析表明, bZIP20 基因在不同组织中的表达水平具有显著差异, 在花中呈现高表达, 而在其他组织中低表达。接种尖孢镰刀菌的红花根部组织中 bZIP20 基因的表达显著上调。结论 成功地对 bZIP20 基因进行克隆及表达分析, 并构建植物表达载体 pBASTA-bZIP20。

关键词: 红花; bZIP20 基因; 表达分析; RT-PCR; 植物表达载体

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)08-1369-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.021

Cloning and expression analysis of CtbZIP20 transcription factor gene from *Carthamus tinctorius* and construction of plant expression vectorGUAN Li-li^{1,2}, CUI Qi¹, HAN Yi-lai¹, GU Tian-yao¹, WU Yun-yun¹, HU Ren-ge¹, DU Lin-na¹, LI Hai-yan^{1,2}, LI Xiao-kun²

1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Bioreactor and Drug Development Research Center, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: **Objective** To clone bZIP20 (basic region/leucine zipper motif) gene from *Carthamus tinctorius*, analyze the expression level in different plant tissues, and construct the plant expression vector. **Methods** The bZIP20 gene was cloned by RT-PCR techniques, and the protein characteristics were analyzed by bioinformatics, and phylogenetic tree was constructed. The expression of bZIP20 gene in different tissues and the roots after inoculated by *Fusarium oxysporum* were analyzed using real time-PCR, and the plant expression vector pBASTA-bZIP20 was constructed. **Results** The ORF sequence of bZIP20 gene was 981 bp, encoded a protein of 326 amino acids (GenBank: KT692605). Sequence alignment and phylogenetic tree analyses showed that bZIP20 had 85.41% and 83.99% of consistency with bZIP of *Sesamum indicum* and *Camellia assamica*. Real-time PCR results showed significant differences, the highest expression level of bZIP20 gene was detected in flower, and was highest in the bud period, bZIP20 gene was significantly increased in root tissue inoculated with *F. oxysporum*. The plant expression vector pBASTA-bZIP20 was obtained. **Conclusion** The bZIP20 gene of safflower is successfully cloned, and the expression is analyzed. The plant expression vector pBASTA-bZIP20 is constructed.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; bZIP20 gene; expression analysis; RT-PCR; plant expression vector

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”) 项目 (2011AA100606); 国家自然科学基金资助项目 (31201237); 吉林农业大学大学生创新创业项目 (201410193045); 吉林省教育厅 “十三五” 科学技术研究项目重点项目 (吉教科合字[2016]179 号); 吉林省科技厅中青年领军人才及优秀创新团队项目 (20111815)

作者简介: 官丽莉 (1982—), 女, 实验师, 主要从事药用植物与生物技术研究。E-mail: guanll2004@163.com

***通信作者** 李海燕 (1971—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物反应器。E-mail: hyl99@163.com

李校堃 (1964—), 男, 教授, 主要从事生物反应器研究。E-mail: xiaokunli@163.net

碱性亮氨酸拉链 (basic region/leucine zipper motif, bZIP) 转录因子广泛存在于动植物和微生物中, 参与多种生物学过程, 由 DNA 结合结构域和亮氨酸拉链二聚体这 2 个基本结构域组成, 是转录因子中较大的基因家族, 同时 bZIP 转录因子是真核生物中广泛存在且结构十分保守的一类转录因子^[1], 主要功能是通过与特定的顺式作用元件的结合来调控下游基因的表达^[2]。拟南芥 bZIP 转录因子研究得比较深入且成果显著, 分别参与调控组织分化、细胞生长、糖代谢、生物和非生物胁迫等多个生物过程。小麦 TabZIP20 转录因子参与小麦对条锈菌的抗病过程^[3], 水稻中的 OsbZIP1 不仅受到 ABA 和 MeJA 等激素诱导而且参与到稻瘟病菌的防御应答^[4]。

红花 *Carthamus tinctorius* L. 是我国传统的中草药, 又叫草红花、金红花, 为 1~2 年生菊科植物红花的管状花, 又是新型的油用植物和工业用植物, 经济价值高, 具有较大的开发潜力, 是我国各地有待开发的经济作物。红花为常用中药, 用量大, 味辛、性温、归心、肝经, 具有活血化淤、止痛的功能, 用于治疗经闭、痛经、跌打损伤、疮疡肿痛等症, 并对冠心病、心绞痛、血管栓塞性疾病、传染性肝炎也有一定疗效^[5-9]。根腐病是红花生产过程中的重大病害之一, 由尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 引起, 危害幼苗、成株和花球, 造成产量和品质下降, 给菜农带来一定的损失^[10-11]。分子育种是培育新品种的重要途径之一, 利用现代分子生物学技术, 挖掘与红花抗病、抗逆以及红花黄色素合成相关的功能基因, 将为分子育种提供重要的目标基因。

本实验室从红花中克隆到 1 个编码 bZIP 蛋白的基因, 命名为 CtbZIP20, 之前的转录组 (SRA047279.2) 研究显示, 红花中有 19 个 bZIP 类转录因子^[12], 这些转录因子很可能参与红花生长发育和次生代谢的调控过程。目前, bZIP 类转录因子在拟南芥中研究较多, 而在红花中只克隆得到 CtbZIP20 基因。本研究从红花转录组中得到了 1 条 bZIP 类转录因子的 unigene, 在序列分析的基础上, 研究了 CtbZIP20 基因在不同组织及尖孢镰刀菌侵染下的表达模式, 同时构建植物表达载体, 以期为该基因功能鉴定和抗逆分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

红花样品采自吉林农业大学种植基地, 发育至

苗期阶段后经由吉林农业大学胡全德教授鉴定为药源植物红花 *Carthamus tinctorius* L.。红花根腐病原菌: 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 由吉林农业大学植物病理系高杰教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 实验设计与处理 组培红花苗栽培在无菌石英砂中, 培养温度为 28 °C, 相对湿度为 (70±10) %, 每天光照时间为 14 h。待红花幼苗长至 5~6 叶期时, 随机选 30 株幼苗在浓度为 1×10⁶ 个/mL 的尖孢镰刀菌悬浮液中浸根 2 h, 另选 30 株幼苗在无菌水中浸根相同时间。试验共计 2 个处理, 即对照 (NI) 和接种病原菌处理 (I)。接种病原菌之后, 于 2 d 采红花根部^[13]。每次样品采集之后液氮冻干, 保存于 -20 °C 冰箱中, 样品采集完成后用于提取总 RNA。同时, 取红花的茎、叶、种子和花, 不同花期的花瓣经液氮速冻, -80 °C 保存, 用于提取总 RNA。

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 合成 取红花组织置于液氮中研碎, 总 RNA 提取方法按照 Trizol 试剂说明书进行; 并于 -80 °C 保存备用。cDNA 合成根据 Biotek 公司反转录试剂盒操作进行, 反转录产物分离纯化后置于 -20 °C 保存备用。

1.2.3 CtbZIP20 基因的克隆及序列分析 根据基因编码区序列特异引物 bZIP20-F、bZIP20-R (表 1), 以红花花瓣 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C、30 s, 62 °C、1 min、72 °C、90 s, 35 个循环; 72 °C、10 min, 4 °C 终止反应。将目的条带切胶回收后克隆到 pEASY-T1 载体并进行测序, 分析测序结果与所拼接得到的全长序列的一致性。

表 1 扩增 CtbZIP20 基因及 qRT-PCR 所用的引物序列
Table 1 Primers used for amplification of CtbZIP20 genes and qRT-PCR

引物用途	引物名称及序列 (5'→3')
CtbZIP20 基因全长	bZIP201-F: ATGACAGAGCTCAGTCCAAG bZIP20-R: TCAATTTTCACGAGGACGTG
CtbZIP20 基因	qbZIP20-F: GCGATAAGTCGAGGGACCAA qbZIP20-R: CACGATTTTGAGCAAGCCG
60 S 基因 qRT-PCR	60 S-F: CATCCATTATCCAACAATC 60 S-R: AAGAGTAATCAGTCTCCA

1.2.4 CtbZIP20 基因的生物信息学分析 ORF Finder 在线软件分析 CtbZIP20 基因相应的氨基酸序列。将获得的 CtbZIP20 基因开放阅读框 (ORF) 序列通过 BLAST 搜索 NCBI 的蛋白质和核苷酸数据库, 并通过 DNAMAN 软件翻译成氨基酸序列, 利用 DNAMAN 软件对来源于各种植物的 bZIP 相关氨基酸序列进行同源比对。相对分子质量与理论等电点 (pI) 预测采用 ExPASy 在线服务器的 Compute Pi/Mw 工具, 二级结构预测使用 Dublin 大学的 Porter 服务器, 三级结构预测使用 Swiss-Model 服务器, 结构功能域分析采用 ExPASy 在线服务器 Prosite Scanprosite。利用 TMHMM Server v. 2.0 在线软件进行跨膜区预测。利用 MEGA5.0 软件中的邻位相连 (Neighbor-Joining, NJ) 法构建系统进化树等。

1.2.5 CtbZIP20 基因表达分析 取红花种子、花、茎、叶、根, 提取 RNA, 并反转录为 cDNA 用于 real-time PCR 分析。定量 PCR 反应体系为: SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2×) 10 μL; 上下游引物 (表 1) 各 0.4 μL; ROX Reference Dye II (50×); DNA 模板 2 μL; ddH₂O 6.8 μL。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。

1.2.6 CtbZIP20 基因植物表达载体的构建 以多克隆位点上游带有 CaMV 35S 启动子的 pBasta 载体为骨架, 在红花 CtbZIP20 基因两侧设计含有 *Xma* I 和 *Eco*R I 酶切位点的引物, 克隆到 pEASY-T1 simple 载体上, 测序正确的基因片段经双酶切后连接到 pBasta 表达载体上, 通过质粒酶切和菌液 PCR 鉴定, 验证表达载体是否构建成功。

2 结果与分析

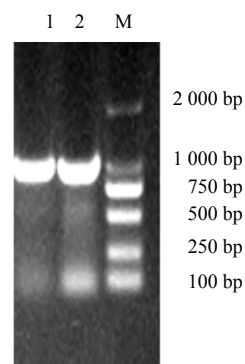
2.1 CtbZIP20 基因 ORF 片段的克隆

根据 CtbZIP20 基因编码区序列特异引物 (bZIP201-F、bZIP201-R), 以红花花瓣 cDNA 为模板扩增出 1 条 981 bp 的条带 (图 1)。经回收纯化后, PCR 产物与 pEASY-T1 载体连接, 通过菌液 PCR 验证及双酶切验证后测序结果正确, 命名该基因为 CtbZIP20 (GenBank 登录号为 KT692605)。

2.2 CtbZIP20 蛋白序列分析

将转录组序列通过电子克隆和序列拼接后得到 1 128 bp 的序列, 经 ORF Finder 预测, 该序列具有

完整的 ORF。利用 RT-PCR 引物进行扩增, 获得预期长度的产物, 将该序列和拟南芥的数据库比对后, 由于其具有和拟南芥 AtbZIP20 最高的同源性, 故将其命名为 CtbZIP20。与拟南芥 bZIP 转录因子中的 TGA 类相似度最高, 其中和 AtTGA2 (又名 AtbZIP20, 登录号: ABR46126.1) 的相似性达到 59%。CtbZIP20 基因序列具有长为 981 bp 的完整 ORF, 共编码 326 个氨基酸, 分子式 C₁₅₆₂H₂₅₂₆N₄₈₂O₅₀₀S₁₁, 总原子数为 5 081。相对分子质量是 36 410.8; pI: 8.65, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 40, 带负电残基 (Asp+Glu) 为 38。脂肪系数为 79.72, 亲水性系数为 -0.571, 表明 CtbZIP20 是 1 个水溶性蛋白。InterProScan 分析表明 47~71 位氨基酸具有一个保守的 bZIP 结构域, 125~203 位氨基酸具有一个 DOG1 超级家族保守结构域。



M-Marker 1~2-bZIP20 基因 RT-PCR 电泳
M-Marker 1—2-RT-PCR electrophoresis of bZIP20 gene

图 1 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of safflower CtbZIP20 gene

利用 DNAMAN 和 MEGA 5.0 软件对 CtbZIP20 蛋白氨基酸序列与其他物种 bZIP 蛋白进行比对, 结果显示 (图 2、3), 红花 CtbZIP20 与芝麻 *Sesamum indicum* Linn. (XP-011075851.1)、野茶树 (AGD98703.1) 的氨基酸序列相似性高达 85.41% 和 83.99%, 表明它们具有极高的同源性。进一步的进化树分析也表明, 红花 CtbZIP20 与芝麻 (XP-011075851.1)、野茶树 *Camellia assamica* L. (AGD98703.1)、大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. (NP 001237963.1)、可可 *Theobroma cacao* L. (XP 00702814.3) 等亲缘关系较近, 但与拟南芥 (P43273.1) 及大叶藻 *Zostera marina* (KMZ62646.1) 的亲缘关系较远。

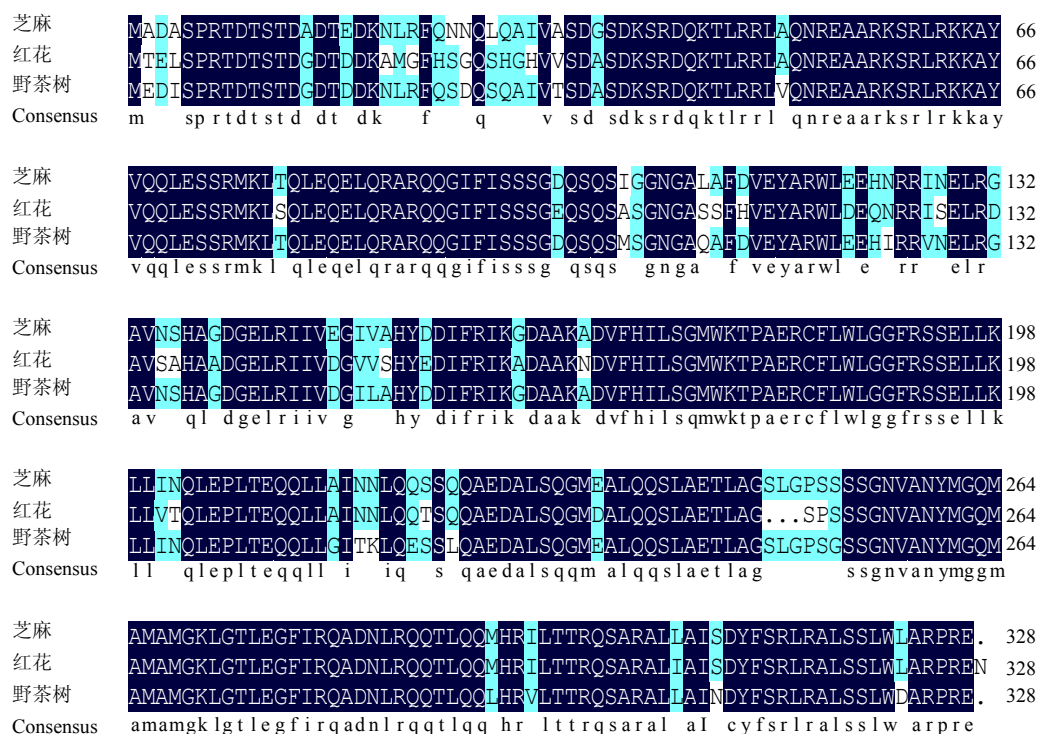
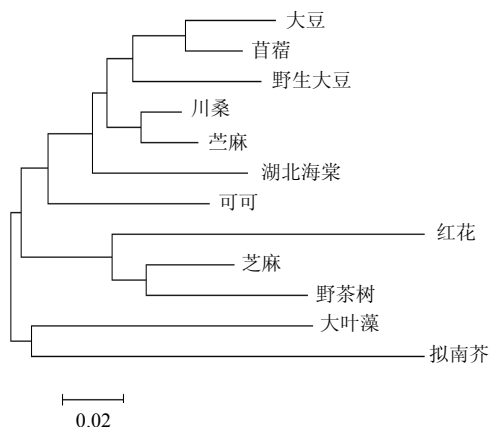


图 2 CtbZIP20 编码蛋白与其他物种 bZIP 的氨基酸序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of CtbZIP20 and bZIP from other species

图 3 CtbZIP20 蛋白与其他 11 种植物 bZIP 蛋白的系统进化分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis on bZIP20 in safflower with other 11 plant bZIPs

2.3 CtbZIP20 基因的表达分析

利用 RT-PCR 技术检测 CtbZIP20 基因在不同组织中的相对表达量。组织差异表达可为研究基因的功能和调控机制提供依据, 本实验选取红花的种子、花、茎、叶和根 5 个组织对 CtbZIP20 基因进行了组织差异表达分析。由图 4 可知, CtbZIP20 在不同组织的表达水平具有显著差异, 在花中呈现高表达, 而在其他组织中低表达。不同花期 CtbZIP20 基因的表达水平随着花期的延长逐渐降低, 花蕾期最高,

衰花期最低 (图 5)。通过对 NI 组和 I 组的花根组织提取 RNA 并进行荧光定量分析, 结果表明 (图 6) 与对照组相比, 接种尖孢镰刀菌的红花根组织中 bZIP20 基因的表达显著上调。

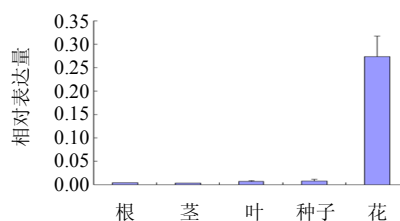


图 4 CtbZIP20 基因的组织表达分析

Fig. 4 Tissue expression analysis on bZIP20 gene in safflower

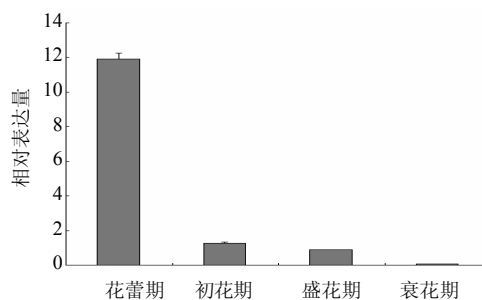


图 5 CtbZIP20 基因在不同花期的表达分析

Fig. 5 Expression analysis on safflower bZIP20 gene in different blossom periods

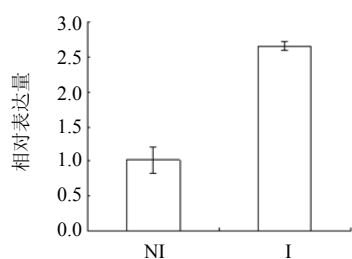


图 6 接种尖孢镰刀菌前后红花根部 CtbZIP20 基因的表达模式
Fig. 6 Transcription pattern of bZIP20 in safflower root pre- and post- incubation with *F. oxysporum*

2.4 CtbZIP20 基因植物表达载体的构建

将植物表达载体 pBASTA 和带有目的基因序列的重组载体 pEASY-T-bZIP20 分别用 *Xma* I 和 *Eco* R I 进行双酶切, 将目的片段与酶切后的 pBASTA 载体用 T4 DNA 连接酶连接后, 获得植物表达载体 pBASTA-bZIP20。将构建好的植物表达载体转化大肠杆菌 DH5 α , 对重组阳性质粒进行菌液 PCR 验证 (图 7) 和双酶切验证 (图 8), 都获得预期大小为 981 bp 的目的片段, 证明该植物表达载体构建正确。

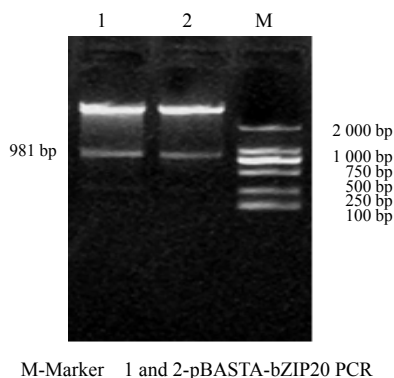


图 7 植物表达载体 pBASTA-bZIP20 菌液 PCR 验证
Fig. 7 PCR verification of bacterium of pBASTA-bZIP20

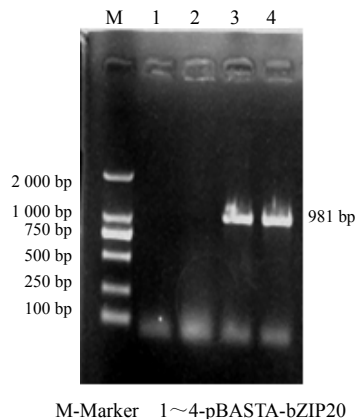


图 8 植物表达载体 pBASTA-bZIP20 双酶切验证
Fig. 8 Enzyme digestion verification of pBASTA-bZIP20

3 讨论

红花在食品、药品领域起着重要作用, 是我国重要的油料和经济作物。红花病害的发生和流行一直是影响红花黄色素及红花油产量的重要因素, 特别是根腐病、锈病等病害严重影响了红花的产量及品质。因此, 通过生物技术手段提高红花品种的抗性, 确保红花食品、药品的安全是十分必要的。本课题组已经对红花中基因的克隆与表达进行了大量研究^[14-16]。

植物 bZIP 转录因子在植物的生命过程中具有非常重要的作用, bZIP 不仅参与调控植物的生长发育过程, 还参与调控植物抵抗恶劣的自然环境, 诸如重金属胁迫、病原菌的入侵、高盐、干旱、寒冷等不利条件^[17-18]。大豆 GmbZIP44、GmbZIP62 和 GmbZIP78 作为 ABA 信号途径中的负调控因子提高转基因拟南芥的耐盐性及耐低温特性; 大豆 GmbZIP132 受到干旱和高盐胁迫的诱导, 过表达 GmbZIP132 的拟南芥表现出低 ABA 敏感性和高失水率; 过表达 GmbZIP1 提高拟南芥和烟草的抗旱性、耐盐性及耐低温的特性; 高表达野生大豆 GsbZIP33 的拟南芥对高盐胁迫的敏感性提高^[19-22]。蛋白质三级结构预测显示, CtbZIP20 蛋白具有高度保守的由 α -螺旋和亮氨酸形成的 bZIP 结构域, 与报道的拟南芥 AtbZIP 蛋白的三级结构模型相似^[18]。

本研究通过对 14 种植物与克隆得到的 CtbZIP20 氨基酸序列进行多重比对发现, 红花与芝麻、野茶树的氨基酸序列相似性高达 85.41% 和 83.99%, 表明它们具有极高的同源性。组织表达分析结果表明, CtbZIP20 基因主要在红花花瓣中高表达, 而在其他组织中低表达, 具有显著的组织表达特异性, 同时不同花期 CtbZIP20 基因的表达水平随着花期的延长逐渐降低, 花蕾期最高, 衰花期最低, 这与刘秀明等^[23]报道的 CHI 基因在不同花期表达趋势相一致, 说明 CtbZIP20 基因很可能参与红花主要药效成分 (红花黄色素、黄酮等) 的合成; 并且接种尖孢镰刀菌的红花根部组织中 CtbZIP20 基因的表达显著上调, 初步说明 CtbZIP20 很可能参与红花抗病性的调控; 同时构建该基因的植物表达载体, 为进一步利用 CtbZIP20 提高红花的抗性研究奠定基础, 以推动红花转基因育种的进程。下一步实验会进一步验证 CtbZIP20 基因在红花花瓣不同发育时期的表达量与红花主要药效成分 (红花黄色素或黄酮等) 之间的关系, 以及将植物表达载体

pBASTA-bZIP20 转化到红花中, 进行 CtbZIP20 基因的表达及功能验证, 期望获得抗病抗逆能力增强或提高红花黄酮类物质质量的转基因植物; 同时, 亦可构建原核表达载体, 获得纯化的 CtbZIP20 蛋白用于 EMSA 来鉴定 CtbZIP20 蛋白与元件的作用情况及植物体内 CtbZIP20 蛋白表达水平的检测, 为后期进一步研究红花转录因子 CtbZIP20 的生物化学和分子生物学功能奠定基础。

参考文献

- [1] Glover J M, Harrison S C. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA [J]. *Nature*, 1995, 373: 257-261.
- [2] Niu X P, Renshaw G L, Miller L. Bipartite determinants of DNA-binding specificity of plant basic leucine zipper protein [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 41(1): 1-13.
- [3] 魏国荣, 张宁宇, 汤春蕾, 等. 小麦转录因子基因 TabZIP20 的克隆及其在小麦一条锈菌互作中的表达 [J]. *西北农业学报*, 2012, 21(12): 20-25.
- [4] Meng X B, Zhao W S, Lin R M, *et al.* Identification of a novel rice bZIP-type transcription factor gene, OsbZIP, involved in response to infection of *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 23(3): 301-313.
- [5] Liu Y N, Zhou Z M, Chen P. Evidence that hydroxyl safflower yellow A protects the heart against ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening [J]. *Clin Exper Pharm Physiol*, 2008, 35(2): 211-216.
- [6] Zhu H B, Zhang L, Wang Z H, *et al.* Therapeutic effects of hydroxyl safflower yellow A on focal cerebral ischemic injury in rats and its primary mechanisms [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(4): 607-613.
- [7] 范莉, 濮润, 赵海誉, 等. 红花抗ADP诱导的血小板聚集活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(9): 1242-1244.
- [8] Tian Y, Yang Z F, Li Y, *et al.* Pharmacokinetic comparisons of hydroxyl safflower yellow A in normal and blood stasis syndrome rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129: 1-4.
- [9] Han B, Hu J, Shen J, *et al.* Neuroprotective effect of hydroxyl safflower yellow A on 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats [J]. *Eur J Pharm*, 2013, 714(2): 83-88.
- [10] 陈招荣, 兰谱, 于玮玮, 等. 天津地区红花病虫害调查研究 [J]. *河南农业科学*, 2014, 43(3): 102-106.
- [11] 翟亚娟, 白庆荣, 高洁, 等. 红花根腐病病原菌鉴定及药剂敏感性研究 [J]. *黑龙江农业科学*, 2013(8): 59-61.
- [12] Li H Y, Dong Y Y, Yang J, *et al.* De novo transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): 1-10.
- [13] 刘喜梅, 许艳丽, 张韧, 等. 大豆根组织受尖孢镰刀菌侵染后基因表达反应的 cDNA-AFLP 分析 [J]. *植物病理学报*, 2008, 2(6): 165-170.
- [14] 官丽莉, 张雪, 韩怡来, 等. 红花转录因子 CtMYB1 基因的克隆及原核表达 [J]. *中草药*, 2015, 46(17): 2603-2609.
- [15] 王艳芳, 张娜, 张玲, 等. 红花天冬氨酸激酶基因片段的分离及表达分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(20): 3065-3070.
- [16] 代斯宁, 王文玲, 韩怡来, 等. 红花 2-甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌甲基转移酶基因的克隆及表达分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(18): 2774-2780.
- [17] Liu L, White M J, MacRae T H. Transcription factors and their genes in higher plants [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 262(2): 247-257.
- [18] Inaba S, Kurata R, Kobayashi M, *et al.* Identification of putative target genes of bZIP19, a transcription factor essential for *Arabidopsis* adaptation to Zn deficiency in roots [J]. *Plant J*, 2015, 26: 12-19.
- [19] Liao Y, Zhang J S, Chen S Y, *et al.* Role of soybean GmbZIP132 under abscisic acid and salt stresses [J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(2): 221-230.
- [20] Liao Y, Zou H F, Wei W, *et al.* Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2008, 228(2): 225-240.
- [21] Gao S Q, Chen M, Xu Z S, *et al.* The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 75(6): 537-553.
- [22] 才华, 朱延明, 柏锡, 等. 野生大豆 GsbZIP33 基因的分离及胁迫耐性分析 [J]. *分子植物育种*, 2011, 9(4): 397-401.
- [23] 刘秀明, 张宇, 姚娜, 等. 红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 不同开花时期的转录组测序及黄酮合成相关基因的验证 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(9): 1207-1215.