

# 大豆混合盐碱胁迫应答基因 *GmDUF247-1* 的克隆及功能分析

谷倩楠, 孔瑞文, 孙明哲, 李建伟, 孙晓丽  
(黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319)

**摘要:** 我国盐碱地分布广、面积大, 是重要的后备耕地资源、粮食增产的“潜在粮仓”。挖掘负调控大豆耐混合盐碱性的基因, 通过基因敲除创制耐混合盐碱大豆新品种, 是合理开发利用盐碱地, 提高我国大豆产量的有效途径之一。课题组前期筛选到 1 个混合盐碱胁迫下调表达的基因 *Glyma.02g271000* (*GmDUF247-1*)。其编码的 *GmDUF247-1* 蛋白包含 1 个 DUF247 结构域和 1 个跨膜结构域, 利用烟草叶片瞬时表达发现 *GmDUF247-1*-GFP 融合蛋白定位在细胞膜上。荧光定量 PCR 显示, *GmDUF247-1* 基因在大豆根中表达量最高, 在混合盐碱处理下显著下调。为研究 *GmDUF247-1* 在大豆混合盐碱胁迫下的功能, 利用大豆毛状根系统过表达 *GmDUF247-1* 基因, 发现混合盐碱胁迫处理后, *GmDUF247-1* 过表达大豆毛状根复合植株叶片萎蔫程度明显高于空载体对照, 存活率、根长和株高显著低于对照。对 *GmDUF247-1* 基因在大豆自然群体中的单倍型分析发现, 其启动子区有 8 个 SNPs 和 4 个 InDels, 可能导致与逆境应答和生长发育相关的转录因子识别元件序列发生改变; CDS 区存在 3 种单倍型, *GmDUF247-1<sup>III</sup>* 基因型受到了明显的人工选择。本研究初步明确了 *GmDUF247-1* 基因负调控大豆混合耐盐碱性, 为系统研究 *GmDUF247-1* 基因功能和育种利用奠定了研究基础。

**关键词:** 大豆; 混合盐碱胁迫; *DUF247*; 功能分析; 单倍型

## Cloning and Functional Characterization of the *GmDUF247-1* Gene in Soybean Response to Saline-alkaline Stress

GU Qiannan, KONG Ruiwen, SUN Mingzhe, LI Jianwei, SUN Xiaoli  
(College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agriculture University, Daqing 163319)

**Abstract:** Saline-alkaline lands, which are found with large area in China, are considered as potential exploitable land resource in agriculture. Breeding of new soybean cultivars showing salt-alkaline tolerance in these regions is a way to improve the soybean production in China. Therefore, identification of the negative regulatory genes to saline-alkaline stress is of interest, and editing of them in elite varieties is able to create new soybean cultivars with salt-alkaline tolerance. Previously, we found that the gene *Glyma.02g271000* (named as *GmDUF247-1*) was down-regulated under mixed salt-alkaline stress condition. *GmDUF247-1* was annotated with one DUF247 (Domain of Unknown Function 247) domain and one transmembrane domain, and the

收稿日期: 2024-01-27 网络出版日期: 2024-04-19

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240127001>

第一作者研究方向为大豆耐盐碱基因功能研究, E-mail: 13206835582@163.com

通信作者: 李建伟, 主要从事作物逆境分子生物学研究, E-mail: 15164526349@163.com

孙晓丽, 主要从事作物逆境分子生物学研究, E-mail: csmb12016@126.com

**基金项目:** 国家自然科学基金(32101672, 32341033); 国家重点研发计划(2021YFF1001100); 黑龙江省自然科学基金(JQ2021C002); 黑龙江省“双一流”学科协同创新成果项目(LJGXCG2023-072); 黑龙江八一农垦大学青年创新人才培养项目(ZRCQC202302); 黑龙江八一农垦大学引进人才科研启动计划(XYB202101); 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2022-Y07)

**Foundation projects:** National Natural Science Foundation of China (32101672, 32341033); National Key Research and Development Program (2021YFF1001100); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (JQ2021C002); Collaborative Innovation Achievement Program for “Double First-class” Disciplines in Heilongjiang Province (LJGXCG2023-072); Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University Young Innovative Talent Cultivation Program (ZRCQC202302); Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University Introducing Talents Research Initiation Program (XYB202101); Innovative Research Program for Graduate Students of Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University (YJSCX2022-Y07)

*GmDUF247-1*-GFP fusion protein was observed on the cell membrane when transiently expressing in tobacco leaves. *GmDUF247-1* was detected with the highest transcripts in roots, and its expression was down-regulated under mixed saline-alkaline treatment. Through generating the hairy root composite plants, the transgenic plants overexpressing *GmDUF247-1* showed more wilted leaves, lower survival rates, shorter roots and shoots if compared with these lines expressing the empty vector. Based on the haplotype analysis of *GmDUF247-1* in soybean population, eight SNPs and four InDels in the promoter region were detected, implying alterations potentially in the binding of growth- and stress-related transcription. Three haplotypes were identified based on the coding sequence variations, and the haplotype *GmDUF247-1<sup>H</sup>* was detected with artificial selection. In summary, we provided the preliminary results on negative regulation of *GmDUF247-1* under mixed salt-alkaline stress treatment, which will facilitate to systematically characterize its function and elucidate its potential in breeding new soybean cultivars with superior tolerance to mixed salt-alkaline stress.

**Key words:** soybean; saline-alkaline stress; *DUF247*; functional analysis; haplotype

盐碱土含有较多的水溶性盐或碱性物质,土壤板结,透水透气性差,影响土壤中功能微生物活性和组成,导致土壤养分利用率、有机质含量和肥力下降,阻碍农作物生长发育,最终影响产量<sup>[1-2]</sup>。我国是世界第三大盐碱地国家,可开发利用的盐碱地约有5.5亿亩,是重要的后备耕地资源<sup>[3-4]</sup>。以松嫩平原为代表的东北苏打盐碱土盐分组成复杂<sup>[5]</sup>。混合盐碱胁迫较单一的盐和碱相比,对作物生长和产量的危害更为严重。因此,培育耐盐碱作物,合理开发利用盐碱地资源,对于保障国家粮食安全和农业可持续发展具有重要意义。

大豆(*Glycine max*)是植物蛋白、食用油和动物饲料的重要来源<sup>[6-7]</sup>,然而我国大豆总产和单产均低于世界平均水平,自给率严重不足<sup>[8]</sup>。自2019年中央一号文件提出实施大豆振兴计划以来,文件连续4年聚焦大豆的种植推广。2023年中央一号文件进一步提出“稳步开发利用盐碱地种植大豆”。因此加强大豆耐盐碱性研究,培育耐盐碱品种,合理利用盐碱地资源迫在眉睫。

耐盐碱大豆新品种培育的关键是挖掘鉴定可供育种利用的耐盐碱基因资源。国内外研究人员通过正向遗传学,定位和克隆到多个调控大豆耐盐性的关键基因,如正调控大豆耐盐基因 *GmSALT3* (*Salt tolerance-associated gene on chromosome 3*)<sup>[9-10]</sup>、*GmCHX1* (*Cation/H exchanger*)<sup>[11]</sup>、*GsERD15B* (*Early responsive to dehydration 15B*)<sup>[12]</sup>、负调控大豆耐盐基因 *GmCDF1* (*Cation diffusion facilitator*)<sup>[13]</sup>等。与中性盐胁迫( $\text{NaCl}$ 和 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )相比,碱性盐胁迫( $\text{NaHCO}_3$ 和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )的调控基因挖掘报道较少,耐混合盐碱胁迫的基因尚未报道。

随着基因编辑技术的迅速发展和应用,挖掘负

调控大豆耐盐碱性的基因,直接通过基因敲除创制耐盐碱大豆新种质,是耐盐碱大豆新品种培育的有效途径。本研究基于前期大豆混合盐碱转录组测序,筛选到1个下调表达基因 *Glyma.02G271000*,包含1个DUF247结构域,命名为 *GmDUF247-1*。DUF(Domain of unknown function)是所有尚未研究清楚功能的结构域统称,DUF247结构域广泛分布在各种植物中<sup>[14-15]</sup>。目前仅少数研究报道了DUF247基因表达响应盐胁迫<sup>[14,16]</sup>,但其调控大豆盐碱胁迫的功能尚未有明确报道。本研究在对*GmDUF247-1*进行亚细胞定位、表达模式分析的基础上,通过大豆毛状根系统进行过表达,初步明确了*GmDUF247-1*负调控混合盐碱耐性,为系统研究*GmDUF247-1*调控大豆耐盐碱的功能及育种利用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大豆品种东农50(DN50)、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)、农杆菌菌株GV3101、载体K599、pGreen II-62-SK-GFP和pCAMBIA1300-3FLAG均由本实验室保存;大肠杆菌DH5 $\alpha$ 菌株购自唯地生物有限公司;限制性内切酶Spe I和EcoR I购自赛默飞世尔科技公司;在生工生物工程有限公司完成测序。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 *GmDUF247-1*基因生物信息学分析** 在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索并下载*GmDUF247-1*和已报道DUF247(拟南芥AtDUF247-1、黑麦草LpSDUF247、拟南芥DLE1、大麦HvSR1)的氨基酸序列。通过NCBI-CDD (<https://www.ncbi>

nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)和SMART(<http://smart.embl.de/index2>)网站分析蛋白结构域。利用Clustal X软件进行氨基酸序列比对。

**1.2.2 *GmDUF247-1* 基因克隆及亚细胞定位分析** 挑选颗粒饱满、大小一致的大豆种子,以蛭石为基质培养至一节期,将根部洗净后液氮研磨成粉末,利用TRIzol法<sup>[17]</sup>提取总RNA。利用诺唯赞公司RT-PCR试剂盒(HiScript II One Step RT-PCR Kit)反转录合成cDNA,方法见说明书。利用基因特异引物 *GmDUF247-1*-GFP-F 和 *GmDUF247-1*-GFP-R (表1),以cDNA为模板进行PCR扩增,PCR总反应体系 15  $\mu$ L: 7.5  $\mu$ L TransStart Top Green qPCR SuperMix (2 $\times$ ), 0.3  $\mu$ L 上下游引物(10  $\mu$ mol/L), 4.9  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L cDNA。反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性 30 s; 94 $^{\circ}$ C变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C延伸 20 s, 40个循环; 72 $^{\circ}$ C终延伸 10 min。回收目的片段并测序。利

用 Cell-Ploc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-Ploc-2/>) 和 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 网站在线工具预测 *GmDUF247-1* 蛋白亚细胞定位。采用 pGreen II-62-SK-GFP 作为 *GmDUF247-1* 蛋白亚细胞定位载体,该载体含有绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein),以组成型启动子 CaMV35s 驱动 *GmDUF247-1* 基因表达。利用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Eco*R I 对 pGreenII-62-SK-GFP 载体双酶切,与 *GmDUF247-1* 基因片段进行连接。将测序正确的重组质粒和细胞膜定位 Marker (AtPI1A-RFP) 转化至 GV3101 农杆菌感受态,挑取阳性单菌落活化后收集菌体,使用侵染液(10 mmol/L MES、150 mmol/L AS、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>)重悬至 OD<sub>600</sub>=1.0。室温静置 2 h 后注射烟草叶片进行瞬时表达,3 d 后通过激光共聚焦显微镜(FV3000)观察 GFP 和 RFP 荧光信号,分析 *GmDUF247-1* 蛋白的定位。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Application
<i>GmDUF247-1</i> -GFP-F	GGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTATGGAAGAAACGAAGTGGGTGG	亚细胞定位载体构建
<i>GmDUF247-1</i> -GFP-R	GCCCTTGCTCACCATGAATTCGGGACGAAACCAAGGTCTTGG	
<i>GmDUF247-1</i> -qF	AGAAACGAAGTGGGTGGTCC	实时荧光定量PCR
<i>GmDUF247-1</i> -qR	GCCTTTTGGTTCAACGCAGT	
SUB-qF	GTGTAATGTTGGATGTGTTCC	内参基因
SUB-qR	ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG	
<i>GmDUF247-1</i> -F	GGGGTACCATGGAAGAAACGAAGTG	过表达载体构建
<i>GmDUF247-1</i> -R	GGACTAGTGGGACGAAACCAAGGTC	
pCAMBIA1300-3FLAGR	TCTAGATCTCAGGCGCC	载体通用引物

**1.2.3 *GmDUF247-1* 基因表达模式分析** 利用 SoyOmics 网站 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/soyomics/index>) 调取 *GmDUF247-1* 在大豆不同组织中的表达数据。分别取大豆根 (Root)、茎 (Stem)、子叶 (Cotyledon)、叶芽 (Leaf bud)、三出复叶 (Leaf 1-3)、2~4 周 (即分别在第 2 周、第 3 周、第 4 周取样) 豆荚 (Pod) 和种子 (seed)、3~10 周种子 (Seed) 等组织,用于 *GmDUF247-1* 基因组织表达分析。将大豆种子以蛭石为基质催芽 5 d,转移至含有 1/4 Hoagland 营养液的水培盒中继续培养至一节期,用 60 mmol/L 混合盐碱 (NaCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub> 和 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 按摩尔比 1:1:9:9 混合, pH=8.9) 处理大豆幼苗,模拟大庆盐碱土成分<sup>[5]</sup>。在处理 0 h、1 h、6 h 分别取根进行混合盐碱胁迫下 *GmDUF247-1* 基因表达分析。利用

TRIzol 法提取总 RNA 并反转录合成 cDNA。利用 *GmDUF247-1* 基因 qRT-PCR 引物 *GmDUF247-1*-qF 和 *GmDUF247-1*-qR (表 1),以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 检测,体系与程序同 1.2.2。设置 3 次技术重复和 3 次生物学重复,以大豆 SUB3 (*Soybean ubiquitin-3*) 作为内参基因<sup>[18]</sup>,利用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算相对表达量<sup>[19]</sup>。

**1.2.4 *GmDUF247-1* 基因植物过表达载体构建** 采用 pCAMBIA1300-3FLAG 作为 *GmDUF247-1* 植物超量表达载体,该载体含有潮霉素 (Hygromycin) 植物选择标记基因,以组成型启动子 CaMV35s 驱动 *GmDUF247-1* 基因表达。利用 Primer 5.0 设计含有酶切位点的基因特异性引物 *GmDUF247-1*-F 和 *GmDUF247-1*-R (表 1)。以 pGreen II-*GmDUF247-1*-

GFP质粒为模板进行PCR扩增,体系与程序同1.2.2,7.5 μL 2×Easy Taq PCR Super Mix,循环数为35;回收 *GmDUF247-1* 基因片段。对 pCAMBIA1300-3FLAG载体双酶切,与 *GmDUF247-1* 基因片段进行连接,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。挑选经PCR鉴定阳性的单菌落,活化后提质粒送交测序,测序正确的质粒(pCAMBIA1300-*GmDUF247-1*-3FLAG)于-20℃保存。

**1.2.5 *GmDUF247-1*-3FLAG 蛋白表达检测** 通过冻融转化法将重组质粒pCAMBIA1300-*GmDUF247-1*-3FLAG转入根癌农杆菌GV3101,注射烟草叶片后于第48 h、60 h和72 h取样,提取总蛋白,采用Anti-Flag抗体进行Western blot检测,丽春红染色用于蛋白浓度检测。

**1.2.6 *GmDUF247-1*过表达大豆毛状根复合体耐盐碱性分析** 通过冻融转化法将重组质粒pCAMBIA1300-*GmDUF247-1*-3FLAG和空载体质粒pCAMBIA1300-3FLAG分别转入发根农杆菌K599,挑取阳性单菌落活化后收集菌体,使用侵染液(10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10 mmol/L MES和150 mmol/L AS)重悬至OD<sub>600</sub>=1.0。通过发根农杆菌介导的毛状根转化法获得转基因毛状根复合植株<sup>[20-22]</sup>。将DN50大豆种子以蛭石为基质培养5 d后剪去主根,使用1 mL注射器吸取侵染液,在大豆幼苗下胚轴靠近子叶节处进行注射,将幼苗在侵染液中浸泡1 min后移至湿润的蛭石中覆膜培养,待伤口处出现愈伤组织后通氧。在高温高湿环境下培养3周后,随机抽取10个植株,通过改良CTAB法<sup>[23]</sup>提取大豆毛状根DNA,利用基因上游特异引物*GmDUF247-1*-F和载体通用引物pCAMBIA1300-3FLAGR(表1)进行PCR鉴定。挑选毛状根数量5~8个、根长9~12 cm、株高14~16 cm的复合植株随机分成两组,移至1/4 Hoagland营养液中适应1 d,在0和60 mmol/L混合盐碱的营养液中培养,6 d后观察大豆毛状根复合植株的叶片受伤情况,以植株顶端生长点失水萎蔫为标准统计大豆毛状根植株的存活情况。测量处理后的大豆毛状根株高和根长,计算根长和株高的相对生长量,根长相对生长量=(处理后根长-处理前根长)/处理前根长×100;株高相对生长量=(处理后株高-处理前株高)/处理前株高×100<sup>[24]</sup>。实验共设置3次生物学重复,每次重复中每个处理每个载体设12个样本。

**1.2.7 *GmDUF247-1*基因在自然群体中的单倍型分析** 利用SoyOmics(<https://ngdc.cncb.ac.cn/soyomics/haplotype/>)数据库在3000份大豆种质资源重测序数据中提取*GmDUF247-1*(*SoyZH13\_02G248900*)基因的SNP/InDel变异数据和对应的品种编号<sup>[25]</sup>。在PlantTFDB网站(<http://planttfdb.gao-lab.org/prediction.php>)预测不同基因型启动子区(5'UTR前2000 bp)转录因子结合位点。提取非同义变异类型,分别统计野生大豆、地方大豆品种和栽培大豆品种的数量,对*GmDUF247-1*基因的单倍型进行分析。

**1.2.8 数据处理** 采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析,利用GraphPad Prism 8软件作图。

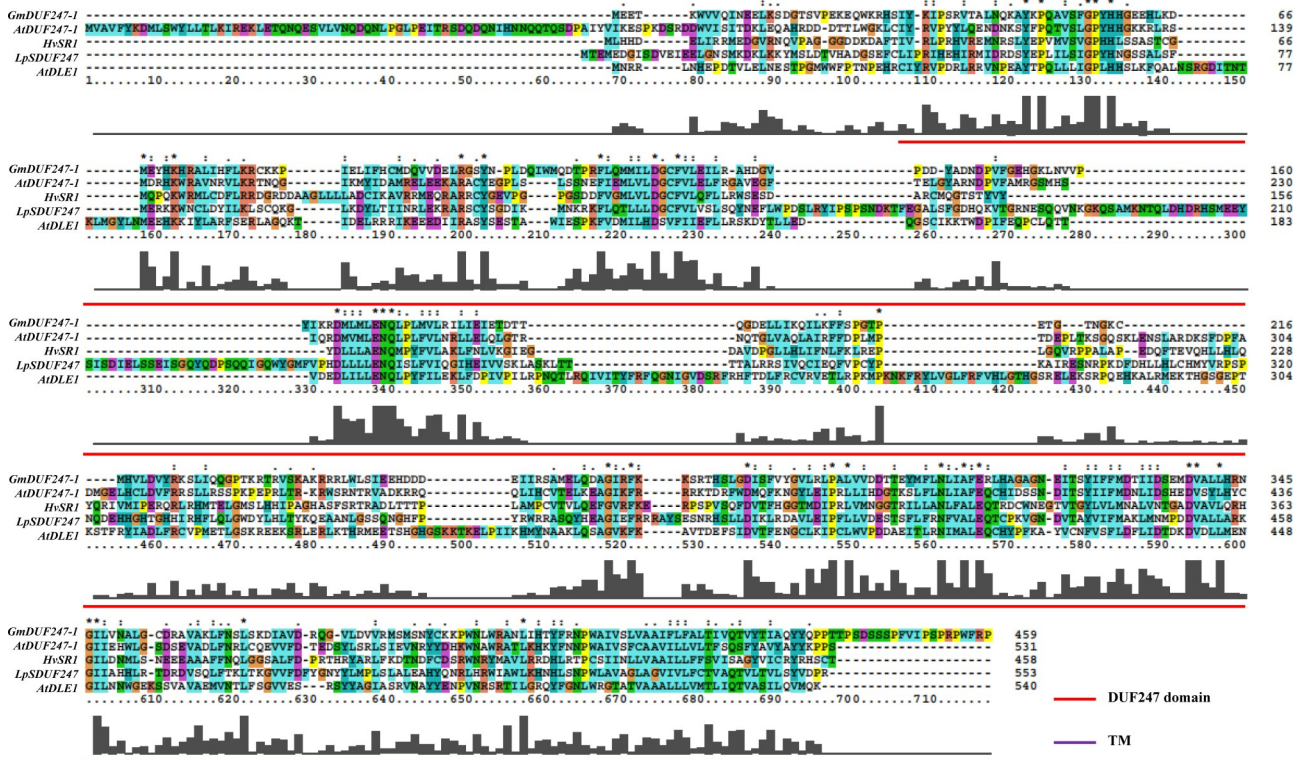
## 2 结果与分析

### 2.1 *GmDUF247-1*蛋白保守结构域分析

通过SMART和NCBI网站分析*GmDUF247-1*和已报道DUF247蛋白AtDUF247-1<sup>[26]</sup>、LpSDUF247<sup>[27]</sup>、AtDLE1<sup>[28]</sup>和HvSR1<sup>[16]</sup>结构,均含有1个DUF247结构域。多重序列比对发现5个蛋白的DUF247结构域序列差异较大,仅30个位点的氨基酸一致。以*GmDUF247-1*蛋白序列为例,在第49~59位、第118~130位、第165~178位、第307~312位氨基酸序列相对保守,推测可能是主要发挥功能的位点。此外,这些DUF247蛋白的C端都含有1个由22个氨基酸组成的跨膜结构域,说明DUF247蛋白定位和功能可能与膜系统相关(图1)。

### 2.2 *GmDUF247-1*基因克隆与蛋白亚细胞定位分析

*GmDUF247-1*基因全长2814 bp, CDS全长1380 bp,编码460个氨基酸。将*GmDUF247-1* CDS全长构建至pGreenII-62-SK-GFP融合表达载体。利用基因特异引物进行PCR扩增,在Marker条带1500 bp左右出现一条扩增条带,与预期目的片段长度1380 bp相符,说明克隆成功(图2A)。菌落PCR分析显示以连接产物作为阳性对照扩增出1380 bp左右条带,以单菌落为模板扩增条带与阳性对照相符,以H<sub>2</sub>O为阴性对照的泳道没有扩增条带(图2B),说明重组质粒构建成功。激光共聚焦显微镜观察结果显示(图2C),带有RFP标签的AtPIP2A蛋白在细胞膜上检测到荧光,*GmDUF247-1*-GFP荧光与RFP荧光高度重合,表明*GmDUF247-1*定位在细胞膜。

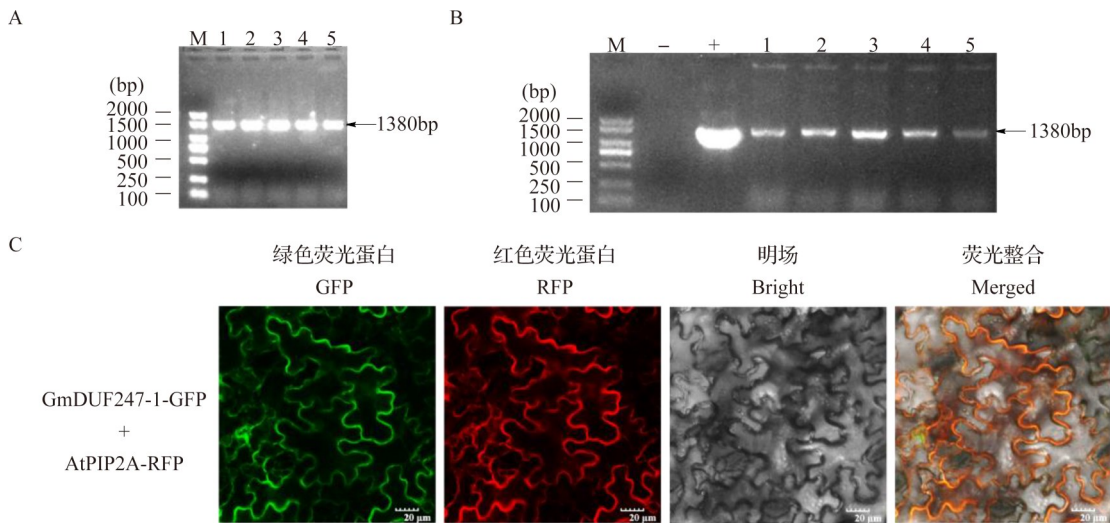


“\*”、“·”以及不同颜色表示氨基酸残基在不同序列中的保守性程度,其中“\*”高度保守,“·”保守性次之

'\*', '.' and 'different colors' indicate the degree of conservation of amino acid residues in different sequences, among which '\*' is highly conserved, followed by '.'

图1 GmDUF247-1和同源蛋白序列比对

Fig.1 Sequence alignment of GmDUF247-1 and homologous proteins



A: *GmDUF247-1* 基因PCR扩增结果, M: DL2000 Marker; 1~5: *GmDUF247-1* 基因扩增产物; B: GmDUF247-1-GFP重组载体菌落PCR鉴定;

-, 阴性H<sub>2</sub>O对照; +, 连接产物对照, 1~5: GmDUF247-1-GFP单菌落; C: GmDUF247-1-GFP与AtPIP2A-RFP蛋白在烟草细胞中的共定位

A: PCR amplification of *GmDUF247-1* gene; 1-5: *GmDUF247-1* PCR amplification product; B: Colony PCR identification of GmDUF247-1-GFP recombinant vector; -, Negative H<sub>2</sub>O control; +: Ligation product control, 1-5: GmDUF247-1-GFP single colony; C: GmDUF247-1-GFP co-localizes with AtPIP2A-RFP in tobacco leaves; GFP: Green fluorescent protein; RFP: Red fluorescent protein; Bright: Bright field; Merged: Merged image

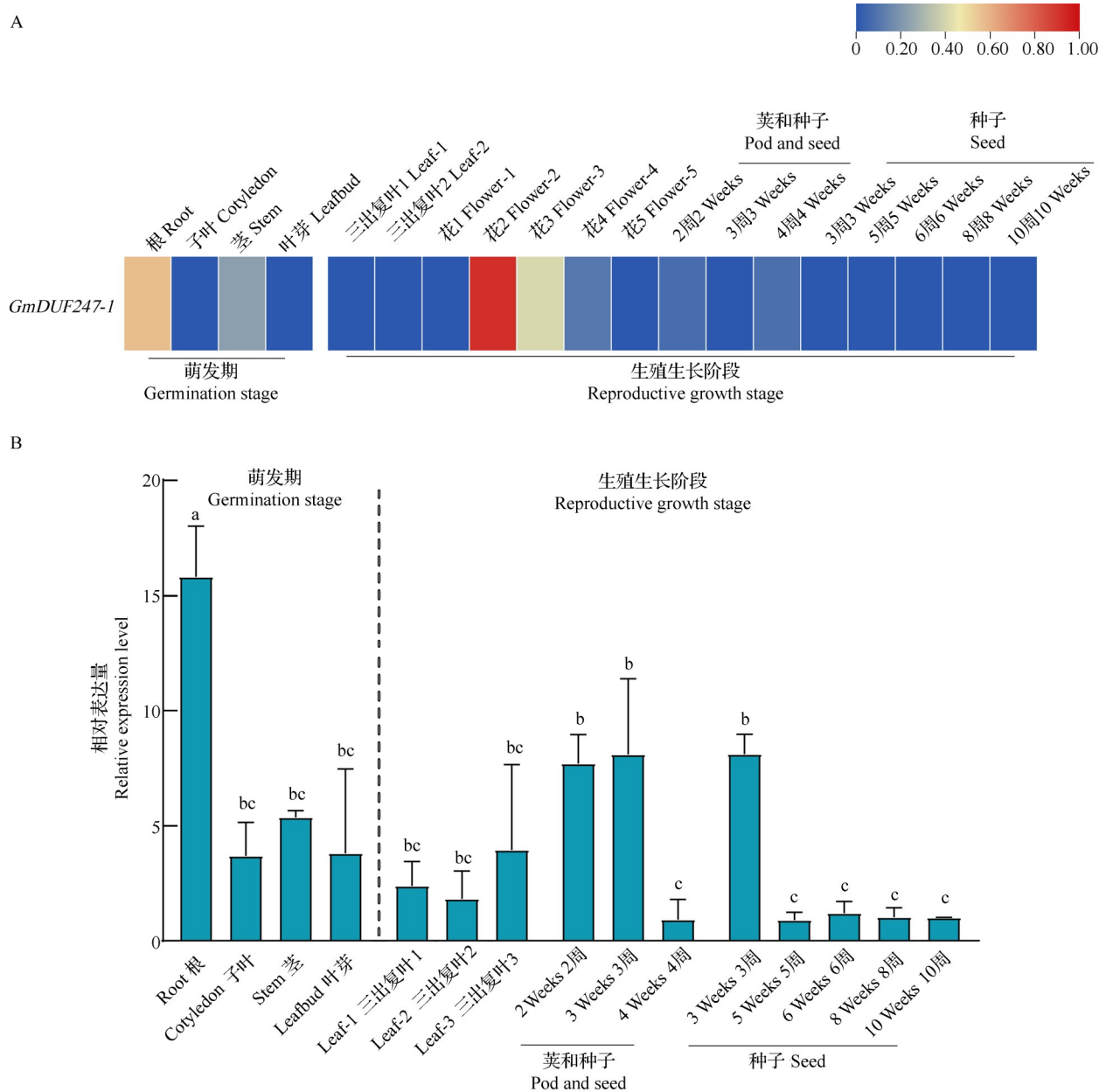
图2 *GmDUF247-1* 基因克隆及 GmDUF247-1-GFP 与 AtPIP2A-RFP 蛋白共定位分析

Fig. 2 Cloning of *GmDUF247-1* and co-localization analysis of GmDUF247-1-GFP with AtPIP2A-RFP

### 2.3 *GmDUF247-1* 基因组织表达模式分析

在 SoyOmics 网站调取 *GmDUF247-1* 基因在大豆不同组织中的转录组数据,发现其在花中表达量最高,其次是萌发期的根(图 3A)。利用 qRT-PCR 技术分析 *GmDUF247-1* 基因在大豆根、茎、叶、荚和种子中的表达情况,结果如图 3B 所示,以 10 周种子中的表达量为 1, *GmDUF247-1* 基因在萌发期的根中

表达量显著高于其他组织,约是 10 周种子的 15.8 倍。表达量较高的组织还有 2 周荚和种子、3 周荚和种子以及 3 周种子,分别为 10 周种子表达量的 7.7、8.1 和 8.12 倍,均达显著差异水平。除在 3 周种子中表达量较高外,其余组织表达模式与转录组测序结果基本一致,由此推测 *GmDUF247-1* 基因可能主要在大豆萌发期的根组织中发挥功能。



A: 转录组测序数据分析 *GmDUF247-1* 基因在大豆不同组织的表达; B: qRT-PCR 验证 *GmDUF247-1* 基因的组织表达模式; 图中不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 下同

A: Expression pattern of *GmDUF247-1* in different tissues of soybean based on RNA-seq data; B: qRT-PCR assays of the tissue expression pattern of *GmDUF247-1* in different tissues of soybean; Different letters in the figure indicate significant differences ( $P < 0.05$ );

The same as below

图3 *GmDUF247-1* 基因在大豆不同组织中的表达模式  
Fig.3 Expression pattern of *GmDUF247-1* in different tissues of soybean

## 2.4 *GmDUF247-1* 基因盐碱胁迫表达模式分析

本研究对 *GmDUF247-1* 基因在 60 mmol/L 混合盐碱 (NaCl:Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 按摩尔比 1:9:9:1 配制, pH=8.9) 处理下的表达量进行分析。结果显示在混合盐碱处理 1 h 时, *GmDUF247-1* 基因的表达量显著下降至未处理时的 0.2 倍, 并且这种下调表达趋势一直持续到胁迫处理的 6 h (图 4)。由此可见, 混合盐碱胁迫抑制了 *GmDUF247-1* 基因表达, 推测 *GmDUF247-1* 基因在大豆盐碱胁迫应答中可能发挥负调控作用。

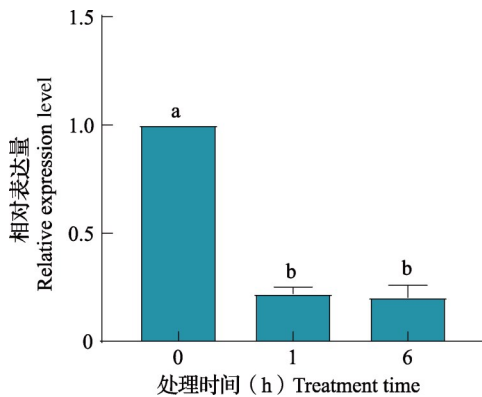


图 4 *GmDUF247-1* 基因在混合盐碱胁迫下的表达模式

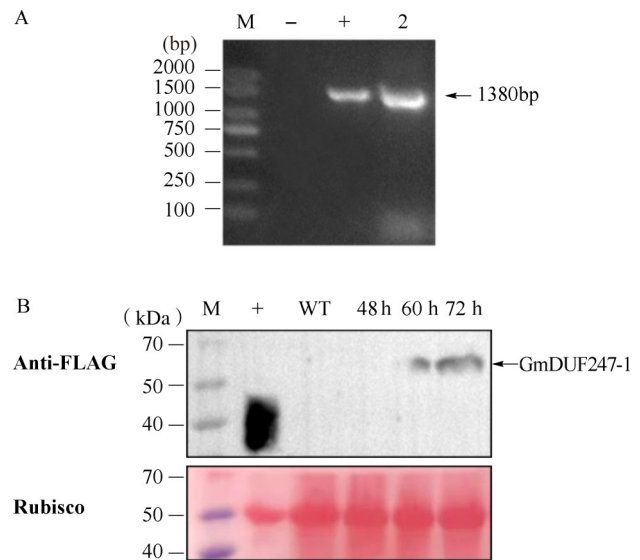
Fig. 4 Expression pattern of *GmDUF247-1* under mixed salt-alkaline treatment

## 2.5 *GmDUF247-1*-3FLAG 植物过表达载体构建和表达检测

为验证 *GmDUF247-1* 基因在盐碱胁迫应答中的功能, 以 pGreenII-*GmDUF247-1*-GFP 质粒为模板, 克隆 *GmDUF247-1* 基因 CDS 区并构建到植物表达载体 pCambia1300-3FLAG (图 5A~B)。采用农杆菌注射烟草叶片 48 h、60 h 和 72 h 后检测 *GmDUF247-1*-3FLAG 蛋白表达。采用 Anti-Flag 抗体进行 Western blot 分析, 在 50 kDa 蛋白 marker 附近检测到清晰的蛋白条带, 与 *GmDUF247-1*-3FLAG 预期大小 59 kDa 相符。丽春红染色结果显示, 在总蛋白浓度基本一致的情况下, 注射烟草叶片 72 h 时蛋白表达量较高, 说明 *GmDUF247-1* 在植物细胞中能够成功表达 (图 5C)。

## 2.6 *GmDUF247-1* 过表达大豆毛状根复合植株耐盐碱性分析

为初步分析 *GmDUF247-1* 基因在调控大豆混合盐碱胁迫耐性中的作用, 本研究通过根癌农杆菌将空载体 (EV, empty vector) 和 *GmDUF247-1*-3FLAG 侵染大豆子叶节获得大豆毛状根复合植株。由图 6A 可知, 以 *GmDUF247-1*-3FLAG 质粒为阳性对照, 经 PCR 检测后, 10 株大豆毛状根中有 9 株检测



A: *GmDUF247-1*-3FLAG 载体菌落 PCR 鉴定; -: 阴性 H<sub>2</sub>O 对照; +: pGreen II-*GmDUF247-1*-GFP 质粒; 2: *GmDUF247-1*-3FLAG 单菌落; B: *GmDUF247-1*-3FLAG 蛋白在烟草叶片中的表达检测, Anti-FLAG: 采用 Anti-FLAG 抗体 Western Blot 检测 *GmDUF247-1* 蛋白表达; Rubisco: 丽春红染色确认总蛋白含量; +: CHYR16-3FLAG 蛋白; WT: 未注射的烟草叶片总蛋白; 48 h, 60 h, 72 h: 注射不同时间点的烟草叶片总蛋白

A: Colony PCR identification of *GmDUF247-1*-3FLAG recombinant vector; -: Negative H<sub>2</sub>O control; +: pGreen II-*GmDUF247-1*-GFP; 2: *GmDUF247-1*-3FLAG single colony; B: Identification of *GmDUF247-1* protein expressed in tobacco leaves, Anti-FLAG: Western Blot assays with the anti-FLAG antibody to detect *GmDUF247-1*-3FLAG protein; Rubisco: Ponceau S staining showing the total protein concentration of different samples; +: CHYR16-3FLAG protein is used as a positive control; WT: Total proteins from un-infiltrated tobacco leaves; 48 h, 60 h, 72 h: Total proteins from infiltrated tobacco leaves at indicated time points

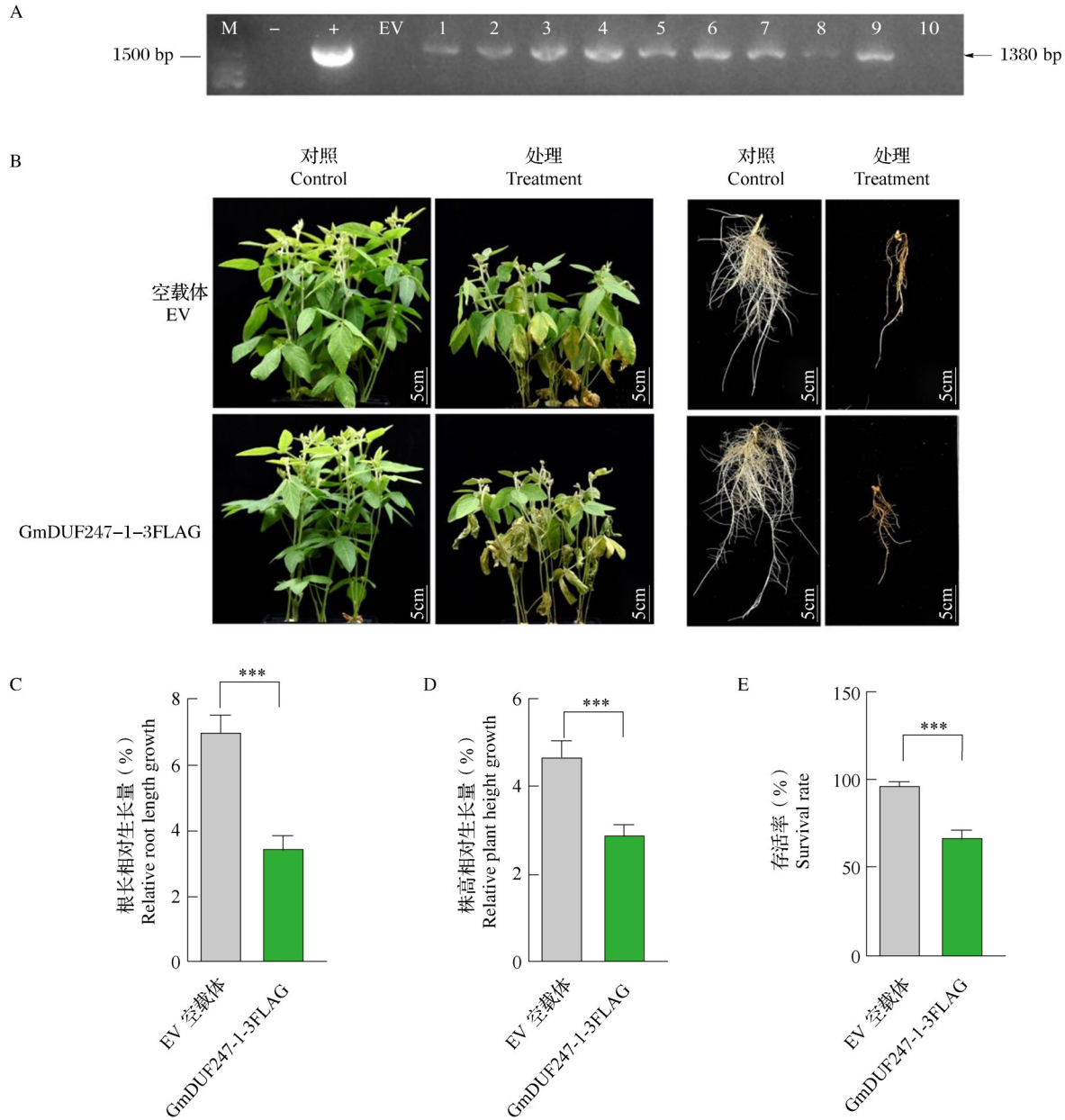
图 5 *GmDUF247-1* 基因过表达载体构建和表达检测  
Fig. 5 Construction of *GmDUF247-1* overexpression vector and detection of *GmDUF247-1*-3FLAG protein expression

到 1380 bp 目的条带, 而水对照和空载体大豆毛状根没有条带, 说明大豆毛状根侵染效率高且空载体不存在污染, 可以进行大豆毛状根耐盐碱表型实验。

将培养 4 周的大豆毛状根复合植株移至含有 1/4 Hoagland 营养液中适应 1 d, 进行 0 和 60 mmol/L 混合盐碱处理。如图 6B 所示, 未进行混合盐碱处理的空载体和 *GmDUF247-1*-3FLAG 对照植株长势正常, 地上部和根系未展示出明显差异。在 60 mmol/L 混合盐碱处理 6 d 后, 植株叶片出现黄化和萎蔫, 但空载体植株长势明显优于 *GmDUF247-1*-3FLAG 毛状根植株; 植株根部颜色变为褐色, 根生长受到抑制, 但空载体植株根部长势明显优于 *GmDUF247-1*-3FLAG 毛状根植株。对比处理下的大豆毛状根复

合植株的根长和株高相对生长量显示,空载体植株的根长相对生长量平均为6.99%,而*GmDUF247-1-3FLAG*植株则为3.44%,极显著低于空载体对照(图6C)。空载体植株的株高相对生长量平均为4.67%,而

*GmDUF247-1-3FLAG*植株则为2.9%,极显著低于空载体对照(图6D)。对60 mmol/L混合盐碱处理6 d后的大豆毛状根复合体植株的存活率进行统计,发现空载体植株存活率为97%,而*GmDUF247-1-*



A: 大豆毛状根复合体植株PCR检测, M: DL2000 marker; -: H<sub>2</sub>O对照; +: *GmDUF247-1-3FLAG*质粒; EV: 空载体大豆毛状根植株; 1~10: 过表达*GmDUF247-1*大豆毛状根植株; B: 大豆毛状根复合体植株盐碱处理前后叶片形态和根部形态, 对照: 0 mmol/L混合盐碱处理, 处理: 60 mmol/L混合盐碱处理; C、D、E: 大豆毛状根60 mmol/L混合盐碱处理下6 d的根长、株高和存活率相对生长量; 本实验共计3次生物学重复, 每次重复每个处理每个载体设置12个样本, \*\*\*表示差异极显著( $P < 0.001$ )

A: PCR identification of soybean hairy root composite plants, M: DL2000 marker; -: H<sub>2</sub>O control; +: *GmDUF247-1-3FLAG* plasmid; EV: Empty vector soybean hairy root plant; 1-10: *GmDUF247-1* overexpression soybean hairy root plants; B: Leaf morphology and root morphology of soybean hairy root composite plants before and after saline-alkali treatment, Control: 0 mmol/L mixed salt-alkaline treatment, Treatment: 60 mmol/L mixed salt-alkaline treatment; C, D, E: The relative growth of root length, plant height and survival rate of soybean hairy root composite plants under 60 mmol/L mixed salt-alkaline treatment for 6 days; Three biological replicates were performed with 12 plants from each vector and each treatment. \*\*\* indicates significant difference ( $P < 0.001$ )

图6 大豆毛状根复合体植株耐盐碱性分析

Fig.6 Salinity tolerance analysis of soybean hairy root composite plants

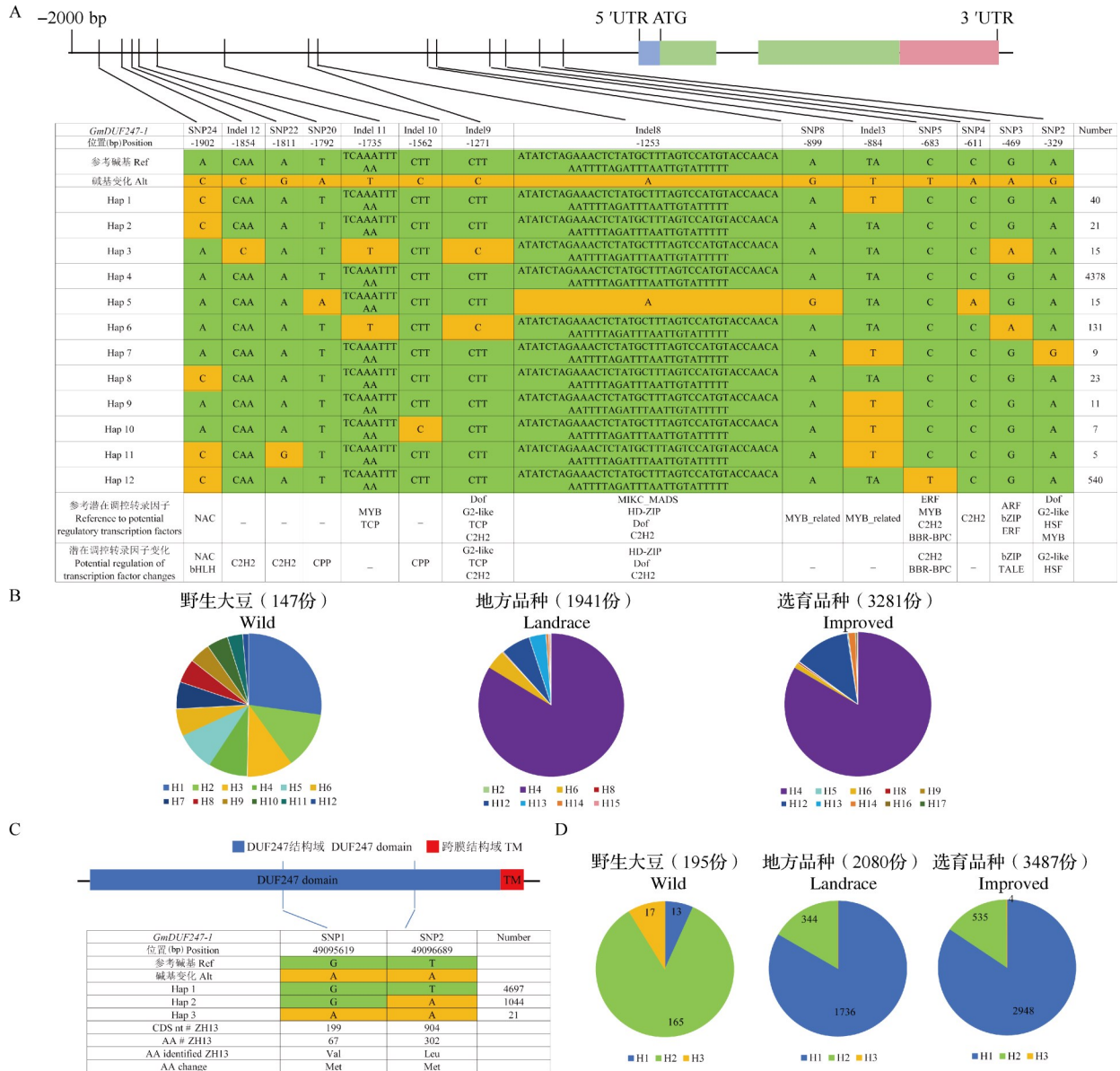


3FLAG 植株则为 67%，极显著低于空载体对照 (图 6E)。以上数据表明 *GmDUF247-1* 负调控大豆毛状根植株对混合盐碱胁迫的耐性。

2.7 *GmDUF247-1* 基因在大豆自然群体中的单倍型分析

在 SoyOmics 数据库检索 3000 份大豆种质中

*GmDUF247-1* 基因 5'UTR 前 2000 bp 启动子区和 CDS 区单倍型。发现 *GmDUF247-1* 启动子存在 8 个 SNPs 和 4 个 InDels 变异导致 bHLH、NAC、CPP、MIKC-MADS 等转录因子识别的元件序列发生改变 (图 7A)。bHLH、NAC 转录因子被报道参与逆境胁迫应答, CPP、MIKC-MADS 转录因子多参与生长



A: *GmDUF247-1* 启动子区单倍型分析, bHLH: 碱性螺旋-环-螺旋转录因子, Dof: 单指结构蛋白, MYB (v-mybavian myeloblastosis viral oncogene homolog), ERF: 乙烯响应因子, TALE: 转录激活因子类效应因子, CPP: 富含半胱氨酸的多梳样蛋白, MIKC\_MADS: MIKC 型 MADS 盒转录因子, ARF: 生长素响应因子; B: *GmDUF247-1* 启动子单倍型分布; C: *GmDUF247-1* CDS 区单倍型分析; D: *GmDUF247-1* CDS 单倍型分布

A: *GmDUF247-1* promoter region haplotype analysis, bHLH: basic helix-loop-helix, Dof: DNA binding with one finger, MYB: v-mybavian myeloblastosis viral oncogene homolog, ERF: Ethylene response factor, NAC: NAM, ATAF1/2, CUC1/2, TALE: Transcription activator-like effector, C2H2: C2H2-type zinc finger transcription factor, CPP: Cysteine-rich polycomb-like protein, MIKC\_MADS: MIKC-type MADS box transcription factor, ARF: Auxin response factor; B: Haplotype distribution in the promoter region of *GmDUF247-1*; C: Analysis of haplotypes in the CDS region of *GmDUF247-1*; D: Haplotype distribution in the CDS region of *GmDUF247-1*

图 7 *GmDUF247-1* 基因在大豆种质中单倍型分析  
Fig.7 Haplotype analysis of *GmDUF247-1* in soybean germplasm

发育调控,推测这些变异可能在大豆逆境胁迫和生长发育过程中发挥不同作用。从不同单倍型在大豆种质分布的饼状图分析可知,野生大豆种质中序列变异较大,栽培大豆中变异较小(图7B)。其中H1单倍型仅存在于野生大豆中,约占野生大豆种质的27.2%。在地方品种和选育品种中则主要为H4单倍型,占比分别为83.72%和83.51%。

*GmDUF247-1* 基因外显子处发生2个非同义突变,形成3种不同单倍型(图7C)。其中SNP1单碱基的改变导致编码氨基酸由缬氨酸(Val)变为甲硫氨酸(Met),SNP2单碱基的改变导致编码氨基酸由亮氨酸(Leu)变为甲硫氨酸(Met)。对不同单倍型在大豆种质中的分布分析发现,野生大豆材料中多为H2单倍型,地方品种和选育品种中则主要为H1单倍型(图7D),表明 *GmDUF247-1* 编码区H1单倍型在驯化过程中受到了强烈人工选择。

### 3 讨论

国内外研究人员已挖掘到多个负调控大豆耐盐性基因 *GmCDF1*<sup>[13]</sup>、*GmMYB3a*<sup>[29]</sup>、*GmERF105*<sup>[30]</sup>。目前对大豆耐盐碱基因的研究多以调控单盐<sup>[11-13, 31-32]</sup>和单碱<sup>[33-34]</sup>耐性为主,对调控混合盐碱胁迫耐性的研究较少<sup>[35]</sup>。在自然生长条件下,土壤盐化和碱化往往相伴发生,对大豆造成的危害相较单一的盐或碱胁迫更为严重<sup>[5]</sup>。随着基因编辑技术的迅速发展和应用,挖掘负调控大豆耐混合盐碱性的基因,利用基因编辑系统对目标基因进行敲除,对于加速大豆耐混合盐碱新品种培育和苏打盐碱地开发利用具有重要意义<sup>[36]</sup>。本研究发掘鉴定的负调控大豆耐盐碱基因 *GmDUF247-1*,将是利用基因敲除改良大豆耐盐碱性的候选靶点。

研究发现含有DUF247结构域的大麦根部特异性基因 *HvSRI* (*Salt responsive gene 1*)<sup>[16]</sup>和中间锦鸡儿 *CiDUF247-1* 基因受中性盐胁迫诱导显著上调表达,可能在中性盐胁迫响应中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。值得注意的是,本研究发现 *GmDUF247-1* 在混合盐碱处理时显著下调,其过表达降低了大豆毛状根复合体植株对混合盐碱胁迫(包括中性盐NaCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和碱性盐Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>)的耐性。混合盐碱的盐分组成复杂,除含有过量Na<sup>+</sup>以外,还含有高浓度HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>。大豆不仅面临离子毒害、渗透胁迫和高pH毒害,还需面对HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>带来的危害。研究发现植物通过不同的途径响应盐胁迫和碱胁迫。例如同源异型亮氨酸拉链蛋白(homeodomain-

leucine ZIPper)家族成员 *Gshdz4* 过表达可提高拟南芥对HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫的耐受性,而在高pH(OH<sup>-</sup>)胁迫下不发挥功能<sup>[37]</sup>。*GmDUF247-1* 如何调控混合盐碱胁迫应答,是否参与盐碱胁迫下离子平衡、高pH调节等生理过程尚不明确。后续将对其在4种单盐处理下的表型、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>含量、抗氧化酶活性等指标进行分析,从生理水平上解析其在盐碱胁迫下的生理功能。此外,本研究通过亚细胞定位发现 *GmDUF247-1* 定位在细胞膜上,但其调控胁迫应答的分子机制还有待进一步解析。

基因序列的多态性导致物种遗传的多样性,是作物改良的关键,其中单碱基的改变是较为常见的遗传变异<sup>[38]</sup>。野生大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆的野生近缘种,耐盐碱性高于栽培大豆<sup>[6]</sup>。本研究发现 *GmDUF247-1* 启动子区存在8个SNPs和4个InDels变异,可能导致与逆境应答和生长发育相关转录因子识别的元件序列发生改变。研究发现,启动子区的序列变异通常影响基因表达水平,造成不同种质中基因功能的变异<sup>[12-13]</sup>。对不同单倍型在大豆种质中的分布进行分析,H1单倍型仅存在于野生大豆中,H4单倍型主要存在于栽培品种中,表明 *GmDUF247-1* 启动子H4受到了人工选择。未来研究中将深入探讨H4单倍型是否导致 *GmDUF247-1* 表达水平高于H1,是否与大豆耐盐碱性状相关。*GmDUF247-1* 基因CDS区存在2个非同义突变,形成3种单倍型。野生大豆中多为H2单倍型,栽培大豆中为H1单倍型,表明 *GmDUF247-1<sup>III</sup>* 受到了人工选择。本研究在栽培大豆DN50中克隆并初步验证 *GmDUF247-1<sup>III</sup>* 负调控大豆毛状根植株耐盐碱性,但野生大豆中 *GmDUF247-1<sup>II</sup>* 基因型在大豆盐碱应答中的功能还不明确,后续将对 *GmDUF247-1<sup>II</sup>* 基因型耐盐碱功能做进一步研究。研究发现,作物生长发育和产量性状与非生物胁迫耐性常常存在权衡折衷trade-off效应<sup>[39-41]</sup>。因此推测 *GmDUF247-1<sup>III</sup>* 虽然负调控大豆耐混合盐碱性,但可能与大豆的生长发育和产量性状有关。下一步本研究将采用基因编辑技术敲除大豆 *GmDUF247*,调查基因敲除株系耐盐碱性、农艺和产量性状等,创制耐盐碱大豆新种质资源。

### 参考文献

- [1] 董红云,朱振林,李新华,杨丽萍,张正.山东省盐碱地分布、改良利用现状与治理成效潜力分析.山东农业科学,2017,49(5):134-139  
Dong H Y, Zhu Z L, Li X H, Yang L P, Zhang Z. Analysis on

- distribution, utilization status and governance effect of saline-alkali soil in Shandong province. *Shandong Agricultural Sciences*, 2017, 49(5): 134-139
- [2] 王世平, 陈月, 潘大伟, 薛文多, 周雷, 赵娜, 巩宗强, 张晓蓉. 盐碱地治理研究综述: 现状、问题与对策. *化工矿物与加工*, 2023, 52(11): 59-68  
Wang S P, Chen Y, Pan D W, Xue W D, Zhou L, Zhao N, Gong Z Q, Zhang X R. Review on salt marshes management: Status, problems and counter measures. *Industrial Minerals and Processing*, 2023, 52(11): 59-68
- [3] 杨久涛, 孙红滨, 王桂峰, 汪丽, 邢晓飞, 杨武杰. 山东盐碱地农业综合开发利用现状与展望. *中国农业综合开发*, 2023, (6): 7-12  
Yang J T, Sun H B, Wang G F, Wang L, Xing X F, Yang W J. Current situation and prospect of comprehensive agricultural development and utilization of saline and alkaline land in Shandong province. *China Comprehensive Agricultural Development*, 2023, (6): 7-12
- [4] Liu L L, Wang B S. Protection of halophytes and their uses for cultivation of saline-alkali soil in China. *Biology: Basel*, 2021, 10(5): 353
- [5] 韩毅强, 高亚梅, 杜艳丽, 张玉先, 杜吉到, 张文慧, 潘绍玉. 大豆耐盐碱种质资源鉴定. *中国油料作物学报*, 2021, 43(6): 1016-1024  
Han Y Q, Gao Y M, Du Y L, Zhang Y X, Du J D, Zhang W H, Pan S Y. Identification of saline-alkali tolerant germplasm resources of soybean during the whole growth stage. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2021, 43(6): 1016-1024
- [6] Sun S L, Liu X, Zhang T L, Yang H, Yu B J. Functional characterisation of the transcription factor *GsWRKY23* gene from *Glycine soja* in overexpressed soybean composite plants and *Arabidopsis* under salt stress. *Plants: Basel*, 2023, 12(17): 3030
- [7] Phang T H, Shao G, Lam H M. Salt tolerance in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(10): 1196-1212
- [8] 胡壮壮, 王路路, 姜雪冰, 尹毛珠, 姜磊, 李进步, 沈维良. 我国大豆产业发展现状分析及对策. *大豆科技*, 2023, (4): 1-11  
Hu Z Z, Wang L L, Jiang X B, Yin M Z, Jiang L, Li J B, Shen W L. Analysis and countermeasure of soybean industry development status in China. *Soybean Science and Technology*, 2023, (4): 1-11
- [9] Guan R X, Qu Y, Guo Y, Yu L L, Liu Y, Jiang J H, Chen J G, Ren Y L, Liu G Y, Tian L G, Jin L, Liu Z X, Hong H L, Chang R Z, Gilliham M, Qiu L J. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in *GmSALT3*. *The Plant Journal*, 2014, 80(6): 937-950
- [10] Liu Y, Yu L L, Qu Y, Chen J J, Liu X X, Hong H L, Liu Z X, Chang R Z, Gilliham M, Qiu L J, Guan R X. *GmSALT3*, which confers improved soybean salt tolerance in the field, increases leaf Cl<sup>-</sup> exclusion prior to Na<sup>+</sup> exclusion but does not improve early vigor under salinity. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1485
- [11] Li Y, Ye H, Vuong T D, Zhou L J, Do T D, Chhapekar S S, Zhao W Q, Li B, Jin T, Gu J B, Li C, Chen Y H, Li Y, Wang Z Y, Nguyen H T. A novel natural variation in the promoter of *GmCHX1* regulates the conditional gene expression to improve salt tolerance in soybean. *Journal of Experimental Botany*, 2023: erad404
- [12] Jin T, Sun Y Y, Shan Z, He J B, Wang N, Gai J Y, Li Y. Natural variation in the promoter of *GsERD15B* affects salt tolerance in soybean. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(6): 1155-1169
- [13] Zhang W, Liao X L, Cui Y M, Ma W Y, Zhang X N, Du H Y, Ma Y J, Ning L H, Wang H, Huang F, Yang H, Kan G Z, Yu D Y. A cation diffusion facilitator, *GmCDF1*, negatively regulates salt tolerance in soybean. *PLoS Genetics*, 2019, 15(1): e1007798
- [14] 杨天瑞. 中间锦鸡儿3个 *DUF* 基因的生物信息学分析和 *CiDUF966-1* 基因功能分析. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018  
Yang T R. Bioinformatic analysis of three *DUF* genes from caragana intermedia and function characterization of *CiDUF966-1*. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018
- [15] Lv P Y, Wan J L, Zhang C T, Hina A, Al Amin G M, Begum N, Zhao T J. Unraveling the diverse roles of neglected genes containing domains of unknown function (DUFs): Progress and perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4187
- [16] 白子彧. 大麦盐诱导根系表达基因 *HvSRI* 的鉴定及其功能分析专用载体的构建. 天津: 天津农学院, 2016  
Bai Z Y. The roots salt-induced genes *HvSRI* identification in barley and construction of vector specially used in gene function analysis. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2016
- [17] 周敏, 付金娥, 韦树根, 潘丽梅. 青蒿不同部位总RNA提取方法比较. *江苏农业科学*, 2017, 45: 31-33  
Zhou M, Fu J E, Wei S G, Pan L M. Comparison of total RNA extraction methods from different parts of *Artemisia annua*. *Jiangsu Agricultural Sciences* 2017, 45: 31-33
- [18] Jia B W, Wang Y, Zhang D J, Li W H, Cui H L, Jin J, Cai X X, Shen Y, Wu S Y, Guo Y X, Sun M Z, Sun X L. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of soybean *CHYR* gene family. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22): 12192
- [19] Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Analytical Biochemistry*, 2008, 379(1): 127-129
- [20] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, Nguyen C D, Nontachaiyapoom S, Kinkema M, Gresshoff P M. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 948-952

- [21] Wei P P, Wang L C, Liu A L, Yu B J, Lam H M. *GmCLC1* confers enhanced salt tolerance through regulating chloride accumulation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1082
- [22] Liu L, Wang J B, Zhang Q, Sun T T, Wang P W. Cloning of the soybean *GmNHL1* gene and functional analysis under salt stress. *Plants: Basel*, 2023, 12(22): 3869
- [23] 魏胜华, 孟娜. 改良 CTAB 法提取大戟属药用植物叶片总 DNA 试验. *湖北农业科学*, 2011, 50: 3418-3420  
Wei S H, Meng N. A modified CTAB method for total DNA extraction from the medicinal herb leaves of *Euphorbia* Linn. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50: 3418-3420
- [24] Xu C J, Shan J M, Liu T M, Wang Q, Ji Y J, Zhang Y T, Wang M Y, Xia N, Zhao L. CONSTANS-LIKE 1a positively regulates salt and drought tolerance in soybean. *Plant Physiology*, 2023, 191(4): 2427-2446
- [25] Liu Y C, Zhang Y, Liu X N, Shen Y T, Tian D M, Yang X Y, Liu S L, Ni L B, Zhang Z, Song S H, Tian Z X. SoyOmics: A deeply integrated database on soybean multi-omics. *Molecular Plant*, 2023, 16(5): 794-797
- [26] Wannitikul P, Wattana-Amorn P, Sathitnaitham S, Sakulkoo J, Suttangkakul A, Wonnapijit P, Bassel G W, Simister R, Gomez L D, Vuttipongchaikij S. Disruption of a DUF247 containing protein alters cell wall polysaccharides and reduces growth in *Arabidopsis*. *Plants: Basel*, 2023, 12(10): 1977
- [27] Rohner M, Manzanares C, Yates S, Thorogood D, Copetti D, Lübberstedt T, Asp T, Studer B. Fine-mapping and comparative genomic analysis reveal the gene composition at the S and Z self-incompatibility loci in grasses. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(1): msac259
- [28] Kondou Y, Noguchi K, Kutsuna S, Kawashima M, Yoneda A, Ishibashi M, Muto S, Ichikawa T, Nakazawa M, Matsui M. Overexpression of *DWARF AND LESION FORMATION 1 (DLE1)* causes altered activation of plant defense system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology*, 2013, 30(4): 385-392
- [29] He Y X, Yang X D, Xu C, Guo D Q, Niu L, Wang Y, Li J W, Yan F, Wang Q Y. Overexpression of a novel transcriptional repressor *GmMYB3a* negatively regulates salt-alkali tolerance and stress-related genes in soybean. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 498(3): 586-591
- [30] Li L, Zhu Z, Liu J, Zhang Y, Lu Y, Zhao J M, Han X, Guo N. Transcription factor *GmERF105* negatively regulates salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plants: Basel*, 2023, 12(16): 3007
- [31] Leung H S, Chan L Y, Law C H, Li M W, Lam H M. Twenty years of mining salt tolerance genes in soybean. *Molecular Breeding*, 2023, 43(6): 45
- [32] Qu Y, Guan R X, Bose J, Henderson S W, Wege S, Qiu L J, Gilliam M. Soybean CHX-type ion transport protein GmSALT3 confers leaf Na<sup>+</sup> exclusion via a root derived mechanism, and Cl<sup>-</sup> exclusion via a shoot derived process. *Plant Cell Environment*, 2021, 44(3): 856-869
- [33] Cai X X, Jia B W, Sun M Z, Sun X L. Insights into the regulation of wild soybean tolerance to salt-alkaline stress. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1002302
- [34] Li J W, Sun M Z, Liu Y, Sun X L, Yin D K. Genome-wide identification of wild soybean mitochondrial calcium uniporter family genes and their responses to cold and carbonate alkaline stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 867503
- [35] Cao Y X, Wang J, Zhao S Q, Fang Q X, Ruan J W, Li S L, Liu T X, Qi Y X, Zhang L, Zhang X M, Meng F L. Overexpression of the aldehyde dehydrogenase *AhALDH3H1* from *Arachis hypogaea* in soybean increases saline-alkali stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1165384
- [36] Saini H, Thakur R, Gill R, Tyagi K, Goswami M. CRISPR/Cas9-gene editing approaches in plant breeding. *GM Crops & Food-Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 2023, 14(1): 1-17
- [37] Cao L, Yu Y, DuanMu H Z, Chen C, Duan X B, Zhu P H, Chen R R, Li Q, Zhu Y M, Ding X D. 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 Biology*, 2016, 16(1): 184
- [38] Piasis M T, Bakala H S, McAlvay A C, Mabry M E, Birchler J A, Yang B, Pires J C. Prospects of feral crop de novo redomestication. *Plant Cell Physiology*, 2022, 63(11): 1641-1653
- [39] Li F F, Chen G P, Xie Q L, Zhou S G, Hu Z L. Down-regulation of *SIGT-26* gene confers dwarf plants and enhances drought and salt stress resistance in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 203: 108053
- [40] Li F F, Chen X Y, Zhou S G, Xie Q L, Wang Y S, Xiang X X, Hu Z L, Chen G P. Overexpression of *SIMBP22* in tomato affects plant growth and enhances tolerance to drought stress. *Plant Science*, 2020, 301: 110672
- [41] Cheng Q, Gan Z R, Wang Y P, Lu S J, Hou Z H, Li H Y, Xiang H T, Liu B H, Kong F J, Dong L D. The soybean gene *J* contributes to salt stress tolerance by pup-regulating salt-responsive genes. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 272