

大豆谷氨酸受体通道蛋白基因家族鉴定与表达分析

李媛¹, 孙志成¹, 王佳¹, 关永旭¹, 孙明哲^{1,2}, 贾博为¹, 孙晓丽¹

(¹黑龙江八一农垦大学农学院/作物逆境分子生物学实验室, 大庆 163319; ²北大荒垦丰种业股份有限公司, 哈尔滨 150090)

摘要: 植物谷氨酸受体通道蛋白(GLRs, Glutamate Receptor-like channels)是一类参与细胞代谢、种子萌发、植物生长发育及长距离信息传递的 Ca²⁺通道蛋白。本研究通过对大豆蛋白组进行全蛋白组鉴定, 共获得 29 个大豆 GLR 成员。系统进化关系表明大豆 GLR 基因分为 Group I-III, 同一亚家族成员基因结构、保守结构域和保守基序分布相对保守。顺式作用元件分析证实大豆 GLRs 启动子区包含与激素、胁迫、光照以及植物生长发育相关调控元件。组织和胁迫表达模式分析表明, GLR 基因在大豆各组织均有较高表达, 且显著受盐碱胁迫诱导表达。qRT-PCR 分析显示 *GmGLR3.13/3.15/4.8/4.9/4.10* 基因盐和碱胁迫下呈现显著差异, 表明其可能在胁迫应答方面具有重要作用。本研究为深入探究大豆 GLR 基因在逆境应答中的作用提供重要的理论依据。

关键词: 大豆; GLR; 全基因组鉴定; 盐碱胁迫

Genome-wide Identification and Expression Analysis of Soybean GLR Gene Family

LI Yuan¹, SUN Zhicheng¹, WANG Jia¹, GUAN Yongxu¹, SUN Mingzhe^{1,2}, JIA Bowei¹, SUN Xiaoli¹

(¹College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agriculture University/ Crop Stress Molecular Biology Laboratory, Daqing 163319; ²Beidahuang Kenfeng Seed Industry Co., Ltd., Harbin 150090)

Abstract: Glutamate receptor like channels (GLRs) are a type of Ca²⁺ channel proteins involved in cellular metabolism, seed germination, plant growth and development, as well as long-distance signal transmission. Here, in this study, a total of 29 soybean GLR members were identified through a comprehensive proteomic identification of soybean. Their phylogenetic relationship suggests that these soybean GLR genes can be classified into three subfamilies, members within the same subfamily exhibits conserved gene structure and motif compositions. *Cis*-acting elements analysis indicates that the promoter regions of soybean GLRs contain a variety of regulatory elements related to hormones, stress, light, and plant growth and development. The analysis of tissue and stress expression patterns shows that GLR genes are highly expressed across various tissues in soybeans and involved in salt and alkaline stress. *GmGLRs* exhibit significant variations under salt and alkaline stress by qRT-PCR analysis, suggesting that *GmGLR3.13/3.15/4.8/4.9/4.10* may play an important role in stress response. In summary, the results of this study provide an important theoretical basis for further investigating the role of soybean GLR genes in stress responses.

Key words: soybean; GLR; whole genome identification; saline and alkaline stress

土壤盐碱化导致土壤渗透压上升, 作物根系无法从土壤中吸收水和养分, 进而造成水分流失, 导致作物脱水、枯萎、甚至死亡, 最终影响产量^[1]。我国是世界第三大盐碱地分布国家, 约有 9913 万 hm² 盐碱地, 是粮食增产的“潜在粮仓”, 是耕地“提质、扩容、增效”的重要战略后备资源^[2]。因此, 加快耐盐

收稿日期: 2025-01-08 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为作物耐逆分子机制和种质创新, E-mail: ly_csmb1@163.com

通信作者: 贾博为, 主要从事作物耐逆分子机制和种质创新, E-mail: jiabowei_paper@163.com

孙晓丽, 主要从事作物耐逆分子机制和种质创新, E-mail: csmb12016@126.com

基金项目: 国家自然科学基金(32341033); 中国博士后科学基金(2024MD753900); 黑龙江省重点研发计划(GZ20230024, GZ20220070); 黑龙江省“双一流”学科协同创新成果项目(LJGXCG2024-F20); 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2023-Y08); 黑龙江八一农垦大学大学生创新创业训练计划项目(202310223159)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32341033); China Postdoctoral Science Foundation(2024MD753900); Key Research and Development Program of Heilongjiang Province(GZ20230024, GZ20220070); Heilongjiang Province "Double First Class" Discipline Collaborative Innovation Achievement Project, LJGXCG2024-F20; Graduate Innovative Research Project of Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University(YJSCX2023-Y08); Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project(202310223159)

碱大豆选育，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战略意义。实现这一目标的关键在于挖掘耐盐碱基因资源，增强大豆在盐碱环境下的生存和生长能力。在植物耐逆机制中，钙信号系统发挥着枢纽作用。钙不仅是植物细胞壁等结构的组分，也作为第二信使参与调控植物生理、生长和发育过程^[3-4]。其中，植物类谷氨酸受体(Glutamate receptor-like, GLR)作为非选择性阳离子通道，通过调控 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 等离子的跨膜运输，特别是介导 Ca^{2+} 动态平衡的精密调控，在信号传导和逆境应答等过程中扮演关键角色^[5]。

自从植物 GLR 蛋白被发现以来，其功能不断被挖掘。目前，已在多种植物中鉴定出 GLR 家族基因，包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[6]、水稻(*Oryza sativa*)^[7]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[8]、苜蓿(*Medicago sativa*)^[9]、油菜(*Brassica napus*)^[10]、甘薯(*Ipomoea batatas*)^[11]、甘蔗(*Saccharum spontaneum*)^[12]等。研究显示植物 GLR 蛋白包括：胞外 N 端结构域(Amino-terminal domain, ATD)、受体家族配体结合结构域(Receptor family ligand binding domain, PF01094)、细菌胞外溶质结合结构域(Bacterial extracellular solute-binding, PF00497)、配体门控离子通道结构域(Ligand-gated ion channel, PF00060)以及多个跨膜结构域^[13-14]。蛋白质结构分析表明，植物 GLR 属于典型的膜蛋白，具有配体门控离子通道活性。当 GLR 被其特定配体激活后，能够促进 Ca^{2+} 跨膜进入细胞，进而触发细胞内一系列与生理和发育相关的 Ca^{2+} 信号传导反应，这些反应在调控植物生理活动和胁迫应答中发挥着关键作用^[15]。例如，在水稻中，*OsGLR3.1* 通过调控水稻幼苗根尖分生组织细胞分裂，正向调节水稻根系的伸长发育^[16]。在白菜型油菜中，*BraGLR1*、*BraGLR8* 和 *BraGLR11* 基因受盐胁迫显著上调表达，暗示它们可能参与油菜盐胁迫应答^[17]。研究发现，拟南芥 *AtGLR3.7* 基因的缺失显著降低了拟南芥种子萌发率。与野生型相比，盐胁迫下 *AtGLR3.7* 过表达拟南芥表现出更高的钙离子响应水平，而 *glr3.7* 突变体的钙离子浓度明显减弱，表明 *AtGLR3.7* 通过影响钙信号传导参与盐胁迫应答^[18]。此外，GLR 通过介导一氧化氮(NO)信号传导途径，在盐胁迫下调节抗氧化酶基因，如超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等的表达及其酶活性，增强植物清除活性氧(ROS)的能力，减轻氧化应激对细胞的损伤。同时，GLR 也参与调节离子通道的活性，影响离子的吸收和转运，维持细胞内离子平衡，进而提升植物在盐胁迫下的生存能力^[19]。综上所述，植物 GLR 蛋白广泛参与调节植物生长发育、信号传导和逆境应答。

大豆(*Glycine max*)作为一种起源于中国的豆科作物，现已成为全球重要的粮、油、饲兼用作物。然而我国大豆总体种植面积和单位面积产量严重不足，难以满足我国对于大豆的生产需求^[20]。2024 年我国进口大豆 8185 万吨，同比增长 8.1%。为保障粮食安全，合理开发后备耕地资源，综合利用盐碱地极为重要^[21]。大豆是中度耐盐作物，土壤盐碱化给大豆生长发育带来许多负面影响，是影响大豆产量的关键非生物胁迫因素之一^[22]。因此探究盐碱胁迫对大豆生长的影响，对在盐碱地种植大豆具有重要意义。目前关于大豆 GLR 基因的相关研究较少。本研究利用生物信息学手段，检索大豆全蛋白组序列，挖掘剖析大豆 GLR

基因家族关键信息，为深入探究大豆 *GLR* 基因家族的功能提供坚实的理论基础，并为利用该家族基因进行遗传改良提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 大豆 *GLR* 基因家族成员鉴定

为鉴定 *GmGLR* 基因家族成员信息，利用 Phytozome(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)下载拟南芥 *GLR* 家族蛋白序列^[6]，并利用 HMMER3.0 构建隐马尔科夫模型。进一步利用该模型对从 Phytozome 获得的大豆蛋白组序列进行比对，获得大豆 *GLR* 蛋白信息^[23]。为进一步确定候选 *GLR* 蛋白，利用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)^[24]和 Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)^[25]对候选蛋白进行保守结构域分析，并剔除低蛋白同源性和不完整结构域的候选基因。采用 ExPasy(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析 *GmGLR* 蛋白等电点和分子量。最后，通过 WoLF PSORT(<https://www.genscript.com/tools/wolf-psort>)分析 *GmGLR* 的亚细胞定位，使用 TMHMM-2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测其跨膜结构域。

1.2 大豆 *GLR* 基因进化关系、基因结构和保守结构域分析

利用 MEGA7 软件内置的 ClustalX 程序对 *GmGLRs* 蛋白序列进行比对，采用邻接法(NJ, Neighbor Joining)构建系统发生树。自展值(bootstrap method)设为 1000，其余参数保持默认设置。通过 Phytozome 获取大豆 GFF3 基因注释文件，利用 Tbttools 提取 *GmGLR* 基因家族 DNA 和 CDS 序列信息，并绘制基因内含子-外显子结构图。利用 MEME(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)预测保守基序(motif)，并将搜索保守基序参数设置为 15。通过 NCBI Batch CD-Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)^[26]分析 *GmGLRs* 家族功能结构域信息，并使用 Tbttools 对 *GmGLRs* 家族成员的保守基序和保守结构域进行可视化处理^[27]。

1.3 大豆 *GLR* 基因的染色体定位及共线性分析

通过 Phytozome 获得大豆基因组及注释文件，利用 Tbttools 软件确定大豆染色体的骨架长度及 *GmGLR* 基因在染色体上具体位置。使用 TBtools 的 MCScanX 功能进行物种间共线性分析，并通过 TBtools 实现可视化处理。

1.4 大豆 *GLR* 基因启动子顺式作用元件分析

利用 TBtools 提取 *GmGLR* 基因家族起始密码子(ATG)上游 2000 bp 序列，并通过 PlantCARE(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测并分析启动子区的顺式作用元件^[28]，利用 Tbttools 进行可视化处理。

1.5 大豆 *GLR* 基因组织表达及胁迫表达模式分析

通过 Soybean eFP Browser(<https://bar.utoronto.ca/efpsoybean/cgi-bin/efpWeb.cgi>)分析 *GmGLR* 基因在大豆不同组织的表达数据。此外，基于测序数据获得大豆 *GLR* 基因在碱^[29]和盐(GSE57252)^[30]胁迫下的表达。图中数据以 $\log_2(\text{fold change})$ 的形式表示表达量的变化，与对照组相比， $\log_2(\text{fold change}) \geq 1.5$ 或 ≤ -1.5 倍数变化的数据表明 *GmGLRs* 基因胁迫反应下存在差异表达。最后利用 TBtools 软件绘制基因表达热图。

1.6 大豆 *GLR* 基因盐碱胁迫表达模式分析

在相对湿度为 60%，温度为 24°C，光照时间为 16h/8h 条件下，将大豆(东农 50，DN50)种植于湿润的蛭石中。当大豆生长至 V2 期(即第二个三出复叶阶段)时，将其转移至 1/8 Hoagland 营养液中继续培养，在达到 V3 期后，对大豆植株施加碱胁迫($50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaHCO}_3$)和盐胁迫($100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$)处理。在胁迫处理 0、3、6、12h 后，取 0.1g 大豆根组织用于 RNA 提取。Trizol 法^[31]提取大豆根部总 RNA，并以此为模板，使用诺唯赞公司 RT-PCR 试剂盒于 50°C 反应 45min，反转录合成 cDNA 第一链，随后在 85°C 下孵育 5s 以灭活反转录酶。选用大豆 ubiquitin 3 基因(*Glyma.20g141600*)作为内参基因^[31]，通过 Phytozome 数据库获取基因 CDS 序列。利用 Primer premier 5.0 设计引物，引物序列见表 1。将 cDNA 稀释 10 倍后作为模版，使用 TransStart Top Green qPCR SuperMix(TransGen Biotech, 中国)配制反应体系，并使用 Bio-Rad CFX96 进行 qRT-PCR 扩增。实验设置 3 次技术重复和 3 次生物学重复， $2^{-\Delta\Delta C}$ 方法^[32]计算基因的相对表达量，以内参基因为参照，获得各基因在每个材料中的相对表达量，利用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析并作图。

表 1 大豆 *GLRs* 基因 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Primer information for quantitative Real-time PCR of soybean *GLRs* gene

引物名称	正向引物序列(5' -3')	反向引物序列(5' -3')
Primer name	Forward primer sequence(5' -3')	Reverse primer sequence(5' -3')
<i>GmGLR3.10</i>	AAGTTCGGGCCTTTACGGTG	CCATGAGAAGCTGTGGGGTCC
<i>GmGLR3.13</i>	AGAGGGTGCAAAACAAGGCA	TGGCCAGCATTGTCTTCCC
<i>GmGLR3.15</i>	TGCTTTCCTCTCTGCTCTGC	GAGCAAGCACATAAACAGTGTGAT
<i>GmGLR4.7</i>	TGGTTACATGACGACCACAACC	GCCACATCATCAGAGGTGCTT
<i>GmGLR4.8</i>	ACTGGCCAGAGACGTGTCAA	TGTCATTGCCTTCTGGTGCC
<i>GmGLR4.9</i>	AGCTGATGATGGCACGCAT	TGTCAGCCACCAAAGTTGTCT
<i>GmGLR4.10</i>	TTACCATTGCCCTCATGCTG	TGCTCGAGATACGTCAATTGCT
<i>GmSUB3</i>	GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC	ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG

2 结果与分析

2.1 大豆 *GLR* 基因家族成员鉴定

为鉴定大豆 *GLR* 基因家族成员，利用已发表的拟南 *GLR* 家族成员的蛋白序列构建隐马尔可夫模型(HMM)。通过 Phytozome 获取大豆蛋白组序列及其注释文件，使用 HMMER3.0 进行搜索比对，初步筛选出 118 个候选大豆 *GLR* 蛋白。进一步利用 Pfam 数据库获得相关的隐马尔可夫模型 PF00060(Ligand-gated ion channel, PF00060)，并以 $\leq e-5$ 为阈值对大豆蛋白质数据库进行检索，保留两种方法的重复序列。基于

SMART 生物信息学工具，对候选大豆 GLR 蛋白序列的保守结构域进行分析，筛选并剔除不含有受体家族配体结合结构域(F01094)、细菌胞外溶质结合结构域(PF00497)、配体门控离子通道结构域(PF00060)以及所含有结构域存在残缺情况的蛋白质序列，同时去除重复冗余的序列，最终确定了 29 个大豆 GLR 家族成员(表 2)。依据这些成员与拟南芥 GLR 蛋白在氨基酸序列上所呈现出的同源性特征，对其进行命名，依次为 GmGLR2.1-GmGLR2.2、GmGLR3.1-GmGLR3.15、GmGLR4.1-GmGLR4.12。理化性质分析表明其氨基酸长度大多在 800~900aa，核苷酸长度主要在 4~10kb。所有成员均含有 3 个以上跨膜结构，大多数成员蛋白定位在细胞膜上，这为 GLR 作为通道蛋白发挥功能提供了前提条件。

表 2 大豆 GLR 家族成员信息

Table 2 Information on *GmGLR* genes

序号 No.	基因名 Gene name	基因 ID Gene ID	序列长度 Sequence length			等电点(pI) Isoelectric point	跨膜结构 Transmembrane	预测蛋白定位 Predicted location
			DNA (bp)	cDNA (bp)	蛋白(aa) Protein			
1	Glyma.07G226400	<i>GmGLR2.1</i>	7842	2463	821	7.84	3	质膜 PM
2	Glyma.07G226500	<i>GmGLR2.2</i>	4898	2559	853	8.26	4	质膜 PM
3	Glyma.14G001100	<i>GmGLR3.1</i>	3739	2748	916	9.01	4	质膜 PM
4	Glyma.06G305000	<i>GmGLR3.2</i>	6594	2790	930	7.34	4	质膜 PM
5	Glyma.04G016000	<i>GmGLR3.3</i>	4733	2778	926	7.75	5	质膜 PM
6	Glyma.12G194200	<i>GmGLR3.4</i>	6305	2844	948	8.53	4	质膜 PM
7	Glyma.12G099500	<i>GmGLR3.5</i>	6221	2775	925	7.4	3	质膜 PM
8	Glyma.16G111700	<i>GmGLR3.6</i>	5472	2751	917	7.35	3	质膜 PM
9	Glyma.12G194100	<i>GmGLR3.7</i>	6096	2730	910	7.99	3	质膜 PM
10	Glyma.06G016000	<i>GmGLR3.8</i>	5293	2790	930	7.98	5	质膜 PM
11	Glyma.13G308400	<i>GmGLR3.9</i>	6058	2844	948	8.59	4	质膜 PM
12	Glyma.13G308500	<i>GmGLR3.10</i>	5825	2730	910	8.29	3	质膜 PM
13	Glyma.01G157900	<i>GmGLR3.11</i>	5252	2817	939	7.23	3	质膜 PM
14	Glyma.09G197100	<i>GmGLR3.12</i>	5263	2928	976	7.58	5	质膜 PM
15	Glyma.09G197200	<i>GmGLR3.13</i>	4458	2793	931	6.68	3	质膜 PM
16	Glyma.09G197400	<i>GmGLR3.14</i>	5280	2793	931	7.47	3	叶绿体 Chl
17	Glyma.11G087100	<i>GmGLR3.15</i>	4982	2817	939	7.41	3	质膜 PM
18	Glyma.06G233600	<i>GmGLR4.1</i>	12297	2577	859	6.68	3	质膜 PM
19	Glyma.06G233900	<i>GmGLR4.2</i>	4438	2511	837	9	3	质膜 PM
20	Glyma.06G234000	<i>GmGLR4.3</i>	6014	2538	846	8.73	3	质膜 PM
21	Glyma.07G203700	<i>GmGLR4.4</i>	4078	2700	900	6.85	3	质膜 PM
22	Glyma.13G172100	<i>GmGLR4.5</i>	4822	2553	851	6.34	4	质膜 PM
23	Glyma.13G233000	<i>GmGLR4.6</i>	4658	2781	927	8.2	4	质膜 PM
24	Glyma.13G233300	<i>GmGLR4.7</i>	6509	2757	919	8.15	3	质膜 PM
25	Glyma.13G233400	<i>GmGLR4.8</i>	5248	2820	940	6.71	4	质膜 PM
26	Glyma.13G272400	<i>GmGLR4.9</i>	5255	2616	872	8.07	3	质膜 PM
27	Glyma.14G083200	<i>GmGLR4.10</i>	7862	2634	878	6.75	3	质膜 PM
28	Glyma.16G061600	<i>GmGLR4.11</i>	8353	2766	922	8.76	4	叶绿体 Chl
29	Glyma.16G061800	<i>GmGLR4.12</i>	6442	2652	884	9.04	4	叶绿体 Chl

2.2 大豆 GLR 家族基因进化关系分析

为深入研究大豆 *GLR* 基因家族的进化关系，本研究选取拟南芥和水稻 *GLR* 家族基因作为参考，以此来构建系统进化树(图 1)，拟南芥、水稻和大豆共 73 个 *GLR* 基因被划分到 4 个亚家族(即 GroupI~IV)，并且各个亚家族内部基因数量呈现不均衡分布状态。GroupII亚家族中 *GmGLRs* 成员数量占据明显优势，多达 15 个(即 *GmGLR3.1*-*GmGLR3.15*)；而 GroupIII亚家族仅包含 *GmGLRs* 和 1 个 *OsGLR* 成员，猜测该亚家族可能具有特殊的进化过程；GroupIV仅有 *OsGLRs* 成员，Singh 等^[16]认为，水稻特有的IV亚家族可能是由于其它 3 个亚家族中的一个基因在复制过程中产生的副本进化产生的。通过对以上三个物种 *GLR* 基因家族进化对比分析发现，大豆 GroupII和 GroupIII亚家族成员较多，可能存在功能冗余和亚功能化现象。

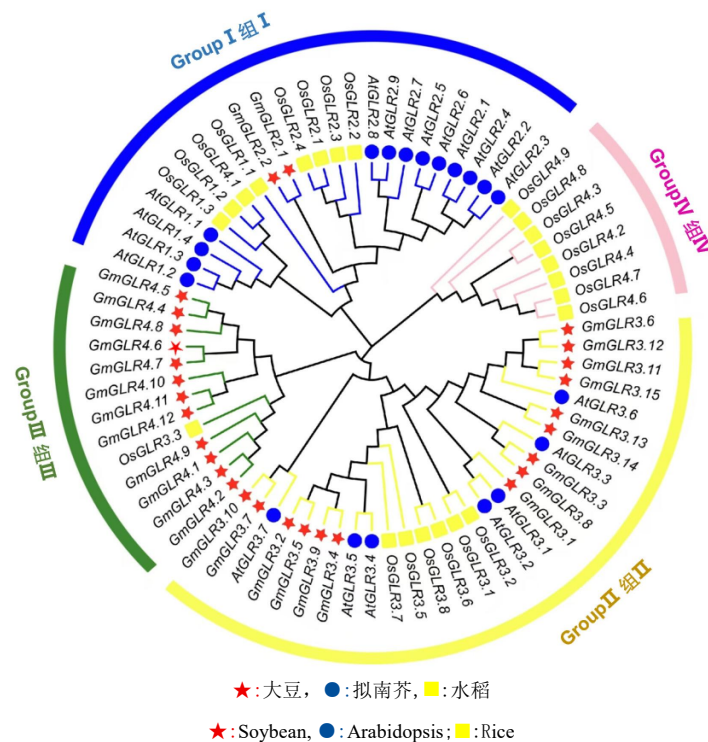
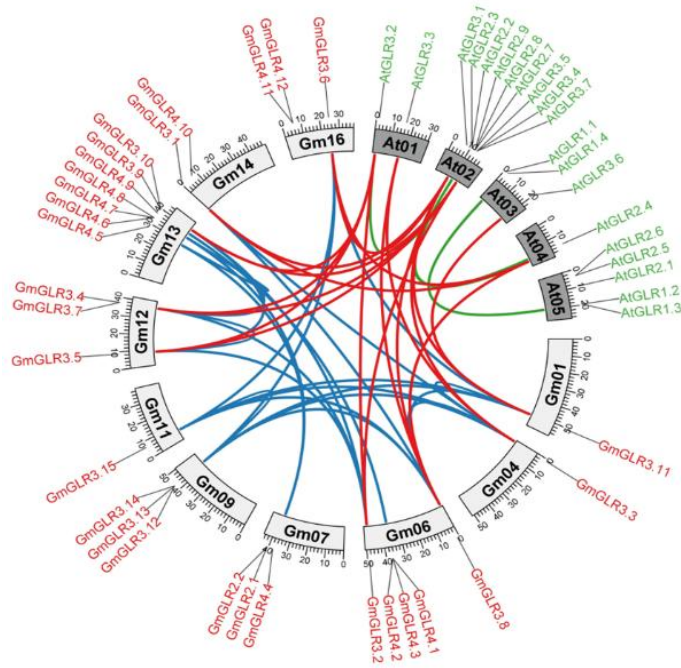


图 1 大豆、拟南芥和水稻 *GLR* 家族成员进化关系分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *GLR* proteins from soybean (*Gm*), Arabidopsis (*At*), and rice (*Os*)

2.3 大豆 *GLR* 基因定位及共线性分析

鉴于大豆和拟南芥 *GLR* 基因在具有相似的进化方向，深入分析 *GLR* 家族基因间的复制关系尤为重要。通过图 2 可知，在拟南芥中有 20 个 *GLR* 基因，离散分布于 5 条不同染色体上；而大豆里存在 29 个 *GLR* 基因，相对均匀的分布在 10 条各异染色体中。推断不同物种间 *GLR* 基因在染色体上的分布差异，与各物种独特的进化关系紧密相关。从拟南芥和大豆中鉴定出 15 对同源基因对(图 2 中的红线)，大豆中有 20 对同源基因(图 2 蓝线)，拟南芥中有 3 对旁系同源基因(图 2 绿线)，猜测是由于大豆全基因组复制过程中的基因扩增，或拟南芥基因丢失导致^[31]。已有研究表明，拟南芥 *AtGLR3.7* 通过调控钙信号通路参与盐胁迫应答^[18]。鉴于同源基因可能具有相似的功能，推测其大豆同源基因 *GmGLR3.7* 和 *GmGLR3.10* 也可能参与盐胁迫应答。



蓝色实线连接表示大豆旁系同源基因，绿色实线连接表示拟南芥旁系同源基因，红色实线连接表示大豆和拟南芥直系同源基因

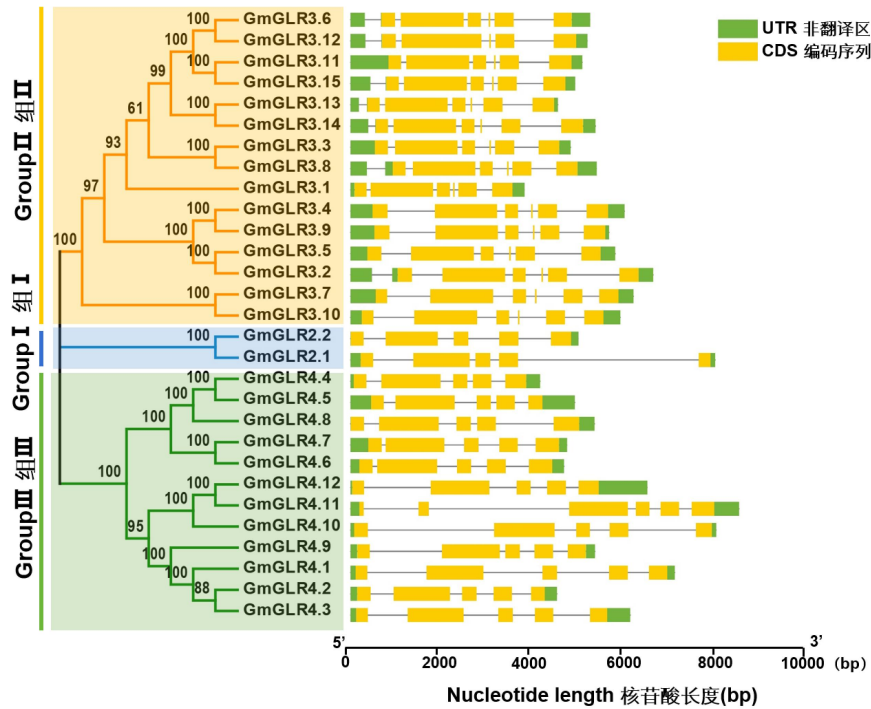
The blue lines connected soybean paralogous genes, the green lines connected Arabidopsis paralogous genes, the red lines indicated orthologous genes between soybean and Arabidopsis

图 2 大豆和拟南芥 *GLR* 基因染色体定位和复制关系

Fig. 2 Chromosome localization and syntenic analysis of soybean and Arabidopsis *GLR* genes

2.4 大豆 *GLR* 基因结构和结构域分析

进一步对大豆 *GLR* 基因结构进行分析(图 3)，在对其外显子与内含子的分析中发现，GroupI 成员均含有 5 个外显子和 4 个内含子，GroupII 成员含有 6 个外显子和 5-6 个内含子，而在 GroupIII 中除 *GmGLR4.11* 外，其余所有的大豆 *GLR* 基因均包含 5 个外显子以及 4 个内含子。保守结构域和蛋白基序分析表明，GroupI 亚家族成员均缺失 Motif10；GroupII 亚家族只有 *GmGLR3.7* 和 *GmGLR3.10* 含有 Motif9；GroupIII 亚家族中 *GmGLR4.10-12* 缺失 Motif12，*GmGLR4.2* 缺失 Motif10，只有 *GmGLR4.12* 具有 Motif11(图 4)。此外，所有 *GmGLR* 家族成员蛋白序列 N 端存在一个信号肽序列，Motif5、Motif8 和 Motif11-13 构成的受体家族配体结合结构域(Receptor family ligand binding domain, PF01094)，Motif2、Motif4 和 Motif9 组成的细菌细胞外溶质结合结构域(Bacterial extracellular solute-binding, PF00497)，Motif1、Motif3、Motif7 和 Motif14-15 组成的配体门控离子通道结构域(Ligand-gated ion channel, PF00060)。值得注意的是，Motif1 中存在由 His-Arg-Glu 组成的选择性过滤器。综上所述，*GmGLR* 各亚家族成员在基因结构、保守结构域和保守基序分布上表现出较高的保守性。



绿色框代表非编码区；黄色框代表外显子；横线代表内含子

The green box represents untranslated regions; The yellow box represents exons; The horizontal line represents introns

图3 大豆 *GLR* 基因结构分析

Fig. 3 Gene structure analysis of *GmGLRs*

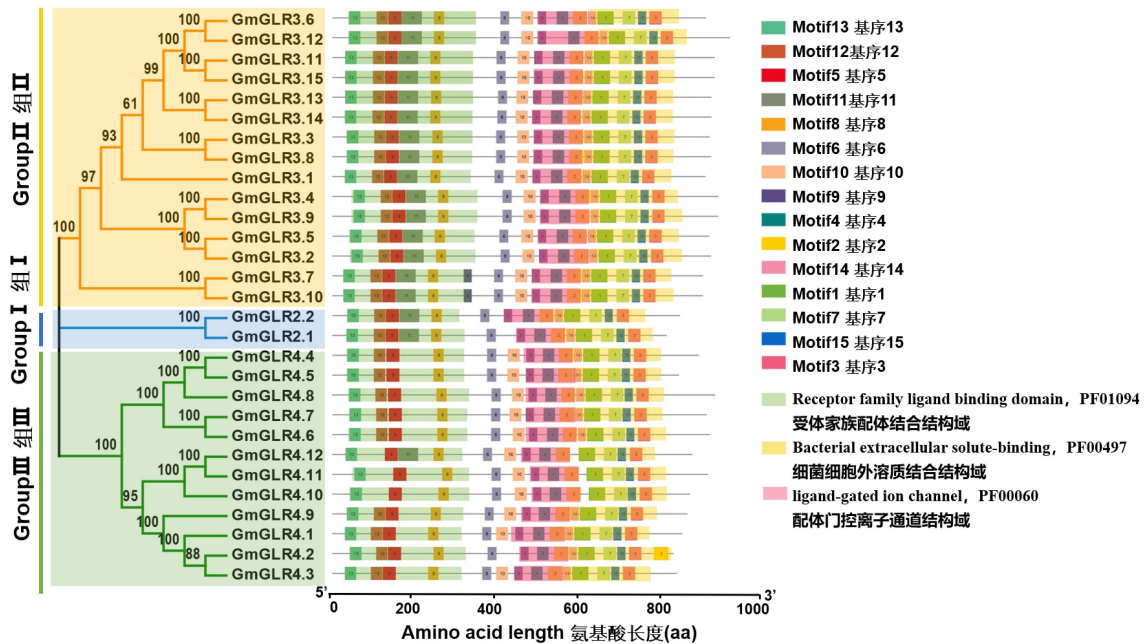


图4 大豆 *GLR* 基因家族的保守结构域和蛋白基序分析

Fig. 4 Conserved motifs and conservative domain analysis of *GmGLRs*

2.5 大豆 *GLR* 基因启动子顺式作用元件分析

通过对大豆 *GLR* 基因启动子区域的顺式作用元件分析发现, *GmGLR3.15*(GroupII)启动子区域包含 8 个 TGACG-motif, 以及多个 CAT-box 元件(如图 5-6)。推测其可能参与激素信号转导通路, 在植物生长发育、

逆境胁迫响应等诸多生物学过程里发挥调控功能。Group III 亚家族成员的启动子区含有厌氧特异性诱导元件 ARE、低温响应元件 LTR、干旱诱导元件 MBS 和防御与应激响应元件 TC-rich repeats 等与胁迫响应紧密相关的顺式作用元件。因此推测其可能参与大豆对各种胁迫条件的响应过程，在增强大豆的胁迫耐受性以及保障大豆在逆境条件下的生存等方面发挥至关重要的作用。

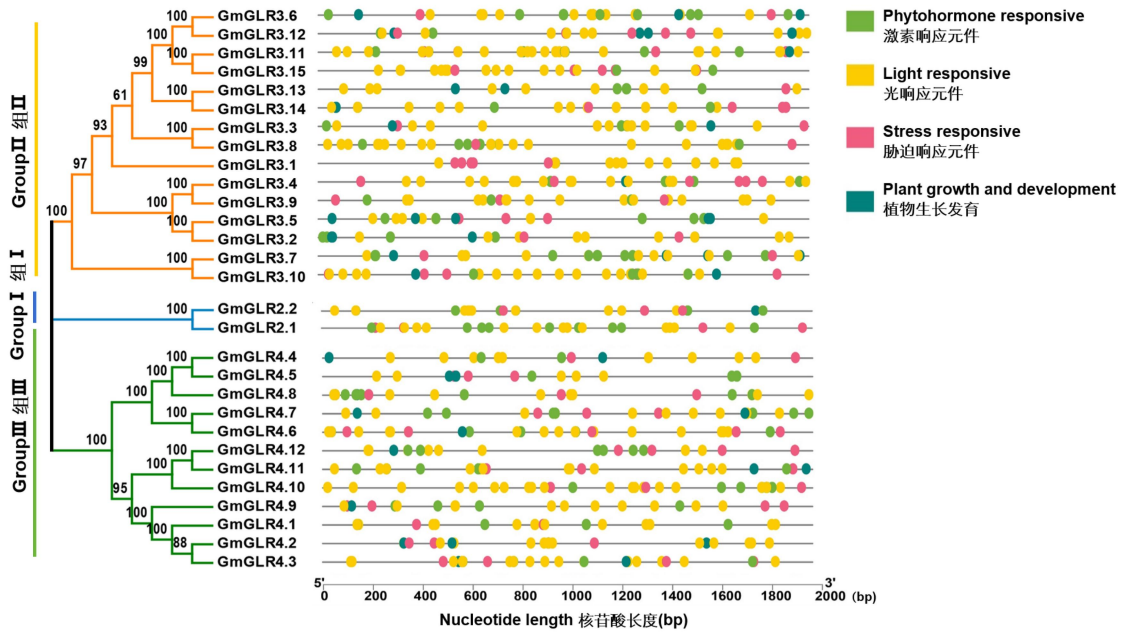
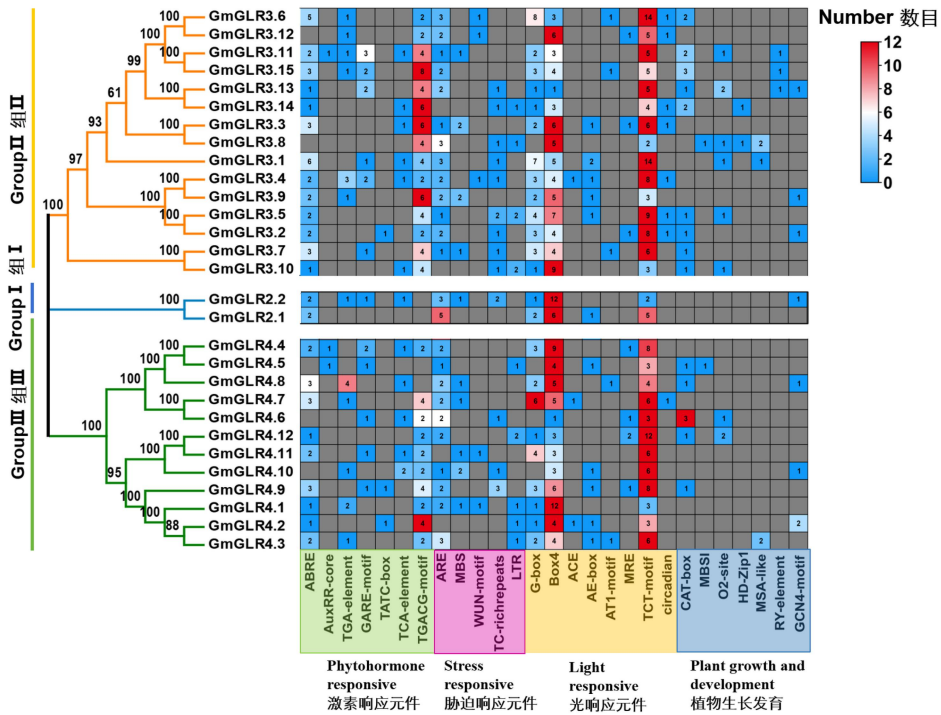


图 5 *GmGLR* 家族基因启动子顺式作用元件分布

Fig. 5 Distribution of the putative *cis*-acting elements in promoters of *GmGLR* genes family



数字表示顺式作用元件的个数

Number represents the number of *cis*-acting elements

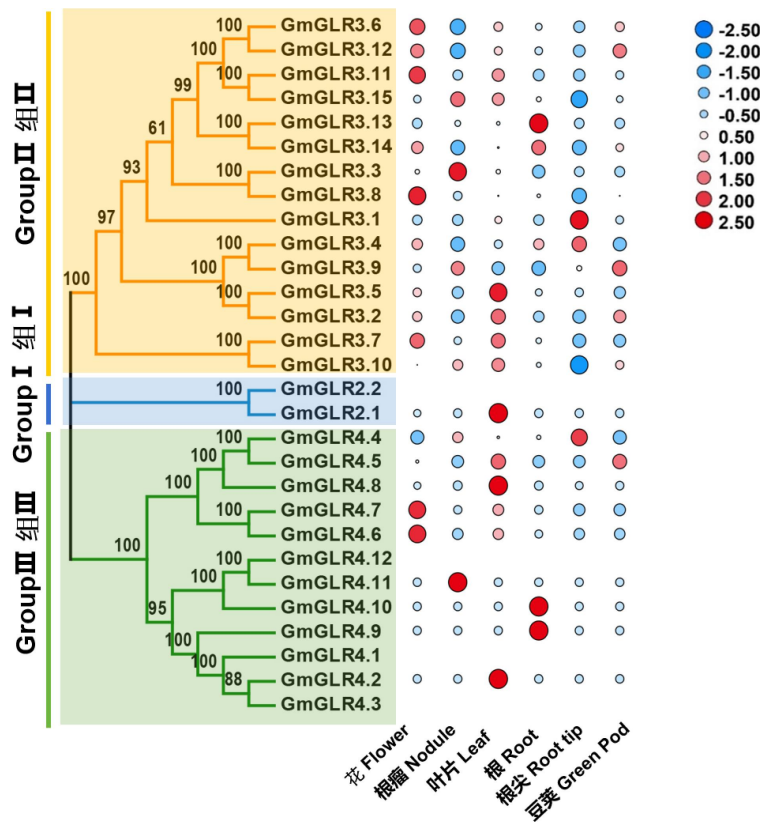
图 6 大豆 *GLR* 基因启动子顺式作用元件数量分析

Fig. 6 The quantity of *cis*-acting elements in promoters of *GmGLR* genes family

2.6 大豆 *GLR* 基因组织表达分析

为深入探究 *GmGLR* 基因的功能机制，本研究对其在花、根瘤、叶片、根、根尖以及豆荚组织中的表达特性进行分析(如图 7 所示)。结果表明 *GmGLRs* 的表达呈现出显著的组织特异性分布，在叶片组织中的表达量最高，暗示 *GmGLR* 基因可能参与大豆营养生长，在维持叶片的正常生理功能以及促进植株整体的营养摄取等方面发挥作用。另外 Group I 亚家族成员组织表达范围广泛且表达水平相对较高，推测 Group I 亚家族成员或许在大豆生理过程和组织发育中承担重要的调控职能。Group III 亚家族成员则表现出相对局限的表达模式，在花、叶及根中的表达量显著高于其他组织，而在其余组织中的表达量则处于较低水平甚至没有表达量。这种表达模式的差异暗示 Group III 亚家族成员的功能可能紧密关联于花、叶及根这些特定组织的发育、生理功能维持以及对外界环境刺激的响应过程。

此外，尽管 *GmGLR3.3* 和 *GmGLR3.8* 是同源基因，但是组织表达模式却存在差异。*GmGLR3.3* 在大豆根瘤中表达量较高，而 *GmGLR3.8* 主要在花中表达。结合基因启动子顺式作用元件的分析，*GmGLR3.8* 基因启动子区存在许多植物生长发育有关元件。因此，推断 *GmGLR3.3* 和 *GmGLR3.8* 在组织表达上的差异是由其启动子区域不同元件的组成和分布所决定。



根据表达值，人为地设置了-2.5到2.5的色阶限制，色阶显示从蓝色到红色的表达水平逐渐增加

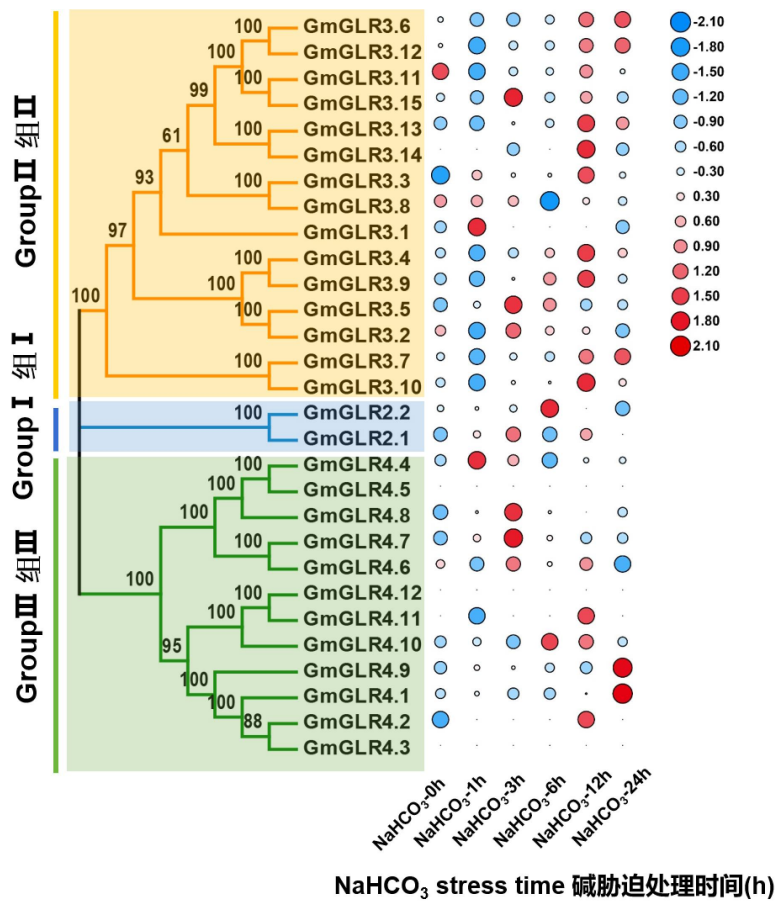
According to the expression values, a color scale limit of -2.5 to 2.5 has been artificially set. The color scale shows increasing expression levels from blue to red

图 7 大豆 *GLR* 基因组织表达模式分析

Fig. 7 Expression pattern analysis of soybean *GLR* genes family in different tissues

2.7 大豆 *GLR* 基因盐碱胁迫表达分析

鉴于 *GLR* 的重要作用，本研究基于转录组数据分析 *GmGLR* 基因在碱胁迫($50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaHCO}_3$)和盐胁迫($100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$)下的表达模式。如图 8-9 所示，*GmGLRs* 对不同的非生物胁迫表现出不同的反应。在盐胁迫下，与对照相比，Group I 亚家族成员均显著上调；Group II 和 III 亚家族中大多数成员保持较高表达量，并且呈现上调趋势。其中 *GmGLR3.13* 基因表达量显著上调，组织表达模式分析表明其在根组织中表达量高，猜测其参与盐胁迫反应。Group II 和 Group III 亚家族大部分成员在碱胁迫下呈上升趋势，其中 *GmGLR4.7*、*GmGLR4.8*、*GmGLR4.9* 表达水平显著上调。推测 *GmGLR* 基因在植物盐碱胁迫应答体系中具有关键作用。



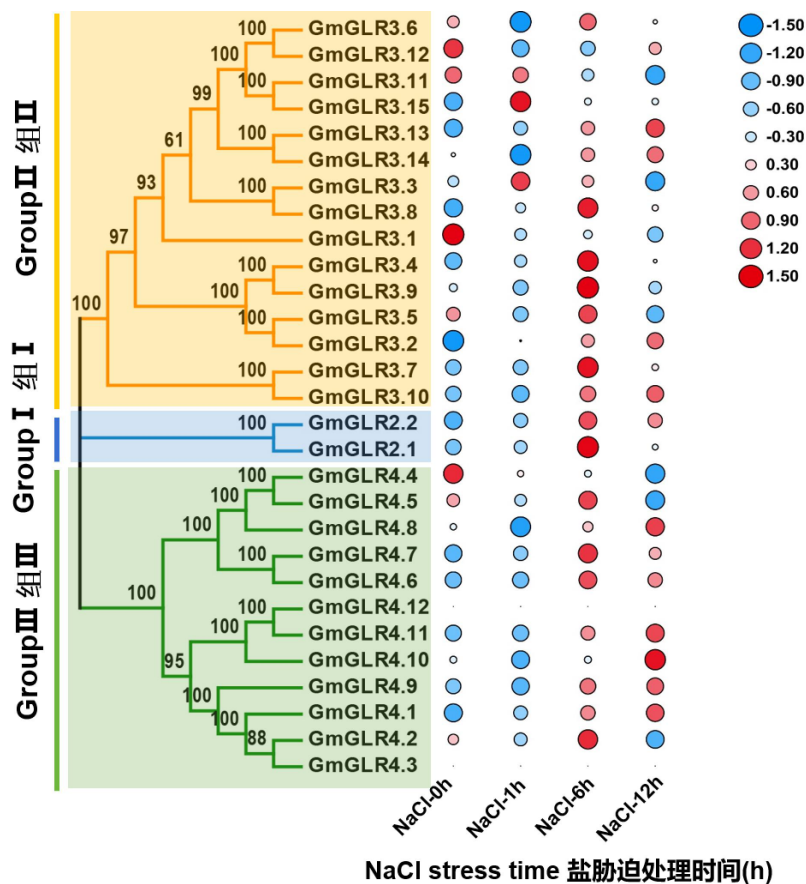
根据归一化值，-2.1 到 2.1 是人工设置的色阶限制。色阶显示表达水平从蓝色到红色逐渐增加。差异表达基因（DEGs）以红色（上调）和蓝色（下调）突出显示。

According to the normalized value, -2.1 to 2.1 was artificially set with the color scale limits. The color scale shows increasing expression levels from blue to red.

The differentially expressed genes (DEGs) were highlighted by red (up-regulation) and blue (down-regulation).

图 8 *GmGLR* 基因在碳酸氢钠胁迫下表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *GmGLR* genes under NaHCO_3 stress



根据归一化值，-1.5 到 1.5 是人工设置的色阶限制。色阶显示表达水平从蓝色到红色逐渐增加。差异表达基因（DEGs）以红色（上调）和蓝色（下调）突出显示。

According to the normalized value, -1.5 to 1.5 was artificially set with the color scale limits. The color scale shows increasing expression levels from blue to red.

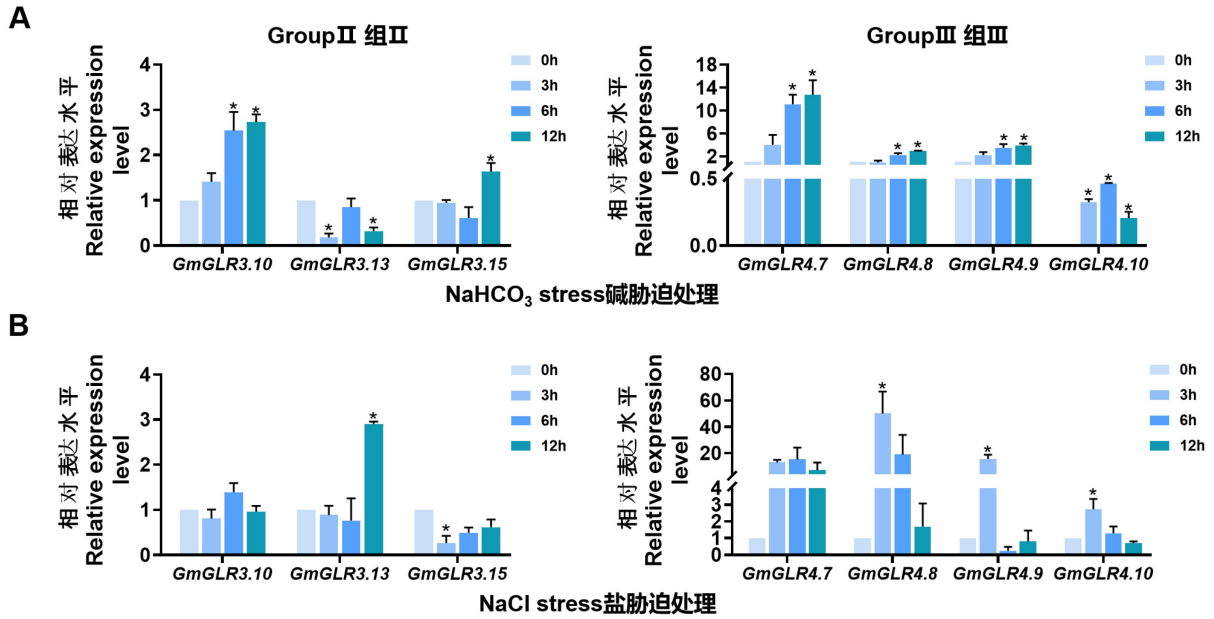
The differentially expressed genes (DEGs) were highlighted by red (up-regulation) and blue (down-regulation).

图 9 GmGLR 基因在氯化钠胁迫下表达分析

Fig. 9 Expression analysis of GmGLR genes under NaCl stress

2.8 大豆 GLR 基因盐和碱胁迫表达模式验证

为进一步探究上述差异表达基因在转录水平是否对盐碱胁迫存在响应机制，通过 qRT-PCR 对 *GmGLR3.10/13/15*(GroupII)、*GmGLR4.7/8/9/10*(GroupIII) 进行验证。如图 10 所示，与对照相比，*GmGLR3.10* 基因表达量在盐和碱胁迫处理后均上调表达；*GmGLR3.13* 在碱胁迫 3h 时表达量显著下降，盐胁迫 12h 时显著上调，表达倍数接近 3；*GmGLR3.15* 基因表达量在碱胁迫后显著上调，盐胁迫后显著下调。在 GroupIII 亚家族中，*GmGLR4.7/8/9* 均受到盐胁迫和碱性胁迫的诱导，表达水平显著上升，且碱胁迫下的表达模式具有相似性；*GmGLR4.10* 在碱胁迫下表达水平显著下降，但是盐胁迫与之相反。综合上述实验结果可以推断，*GmGLR* 基因可能在大豆应对盐胁迫和碱胁迫的应答机制中发挥关键作用。



A: *GmGLR* 基因碱胁迫表达模式验证; B: *GmGLR* 基因盐胁迫表达模式验证; *: 在 $P < 0.05$ 水平差异显著, **: 在 $P < 0.01$ 水平差异显著

A: The expression validation of *GmGLR* genes under alkaline stress; B: The expression validation of *GmGLR* genes under salt stress; *: Significant difference at $P < 0.05$ level; **: significant difference at $P < 0.01$ level

图 10 盐碱胁迫应答中 *GmGLR* 基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 10 qRT-PCR validation of *GmGLR* genes in the response to salt alkali stresses

3 讨论

盐碱胁迫严重制约作物产量和品质,是我国农业发展面临的主要非生物胁迫之一。因此,加强盐碱地的有序开发和综合利用,对保障国家粮食安全、端牢中国饭碗具有重要战略意义^[33]。在当前阶段,盐碱地的开发利用策略已从“治理盐碱地以适应作物生长”转变为“选育耐盐碱植物以适应盐碱地”^[34-35]。随着组学和基因工程技术的迅猛发展,利用生物信息学手段发掘并鉴定功能基因已日趋成熟。自 2010 年大豆基因组测序完成以来,越来越多的大豆基因家族被鉴定,例如 *PDI*^[36]、*CIPK*^[37]、*Whirly*^[38]等,这些研究为筛选耐盐碱关键应答基因、解析耐盐碱分子机制以及培育耐盐碱作物新品种奠定了坚实的基础。

GLRs 不仅参与调节植物的生长发育,在应对多种胁迫应答中也发挥关键作用^[39-40]。现有研究表明,在栽培大豆中已鉴定出 38 个 GLR 家族成员^[41],其中 Glyma.06G233700.1、Glyma.13G093300.1、Glyma.16G061700.1、Glyma.17G067300.1、Glyma.17G241900.1、Glyma.02G311500.1、Glyma.12G000100.1 是由于使用不同的版本导致差异。此外,通过蛋白结构域分析发现 Glyma.17G067200.1 在结构上缺失受体家族配体结合结构域, Glyma.13G165100.1 缺失细菌细胞外溶质结合结构域和配体门控离子通道结构域,所以被剔除。因此本研究在大豆蛋白组水平上共筛选鉴定了 29 个 *GmGLR* 家族成员。这些基因分布在 10 条不同的染色体上。此前研究表明,拟南芥和水稻分别有 20 个和 22 个 *GLR* 基因。相比之下,大豆 *GLR* 基因数量显著增加,这可能是由于大豆基因组扩增导致的。对大豆 *GLR* 蛋白的理化性质分析显示,该基

因家族成员的蛋白分子量以及等电点方面差异不显著，初步推测这些成员在功能上可能具有一定的相似性(表 2)。通过系统进化关系分析(图 2)，可以确定大豆 *GmGLR* 同样分为 3 组，分别是 GroupI、GroupII 以及 GroupIII，这一结果与拟南芥相似。在内含子-外显子结构分析中(图 3)，各组内的大部分成员具有相同数量的内含子和外显子。保守结构域和蛋白基序分析结果显示(图 4)，*GmGLRs* 蛋白基序组成高度相似，表明 *GmGLR* 在进化过程中具备较高的稳定性。研究发现拟南芥 *AtGLR* 家族不同分支(GroupI-III)在进化过程中保留了跨膜结构域(TMD)、配体结合域(LBD)和离子选择性滤器(Selectivity Filter)等核心基序，同时也在这些核心基序的基础上演化出特异性调控基序。拟南芥 *AtGLR1.1*(GroupI)配体结合域中精氨酸(Arg)和天冬氨酸(Asp)残基能够特异性识别谷氨酸配体，激活 Ca^{2+} 通道并介导 Ca^{2+} 内流^[42]。此外，各分支在调控域(如 GroupIII 特异的 CDPK 磷酸化位点)^[18]和通道孔域(如 GroupII 的疏水性基序)^[43]上具有序列差异。由此推测大豆 *GLR* 不同亚家族在信号传导和环境响应特异性上也具有功能分工。亚细胞定位预测结果表明 *GmGLRs* 主要分布于膜系统，这与在拟南芥中所观察到的 *GLR* 蛋白定位结果一致^[44]，为后续深入研究 *GmGLRs* 的生物学功能提供了重要的细胞定位层面的线索和依据。

GmGLR 家族成员启动子元件的分析表明(图 5-6)，不同亚家族间的启动子元件存在显著差异，这可能是由于基因组复制对 *GmGLR* 基因的功能产生了影响，导致它们在生长发育和胁迫应答过程中承担不同角色，进而发生功能分化。研究表明，脱落酸(ABA)处理降低了拟南芥 *GLR3.7* 的表达^[45]，与其同源的 *GmGLR3.10* 在叶片中具有较高的表达量，并且在盐和碱胁迫响应中呈上升趋势，在其启动子区含有大量光和激素响应元件，由此推测二者可能具有相似的功能。拟南芥中 *GLR* 在根、茎、叶、花和角果等器官中均有不同程度的表达^[6]，并且 *AtGLR3.2/AtGLR3.4* 通过调控韧皮部 Ca^{2+} 信号参与侧根发生^[46]。组织表达分析表明 *GmGLR* 具有一定的组织特异性，主要分布在花、叶及根(图 7)，这表明 *GmGLR* 家族基因可能参与植物营养生长过程。胁迫表达分析表明(图 8-9)，在碱胁迫下，GroupII和III亚家族大多数成员表达量上升，而在盐胁迫下，除了 *GmGLR4.4* 外，GroupIII亚家族的其它成员表达量均上升。通过 qRT-PCR 分析证实(图 10)，*GmGLR3.10/15*、*GmGLR4.7/8/9* 碱胁迫下显著上调表达，而在盐胁迫下，*GmGLR3.13*、*GmGLR4.8/9/10* 显著上调表达，上述结果暗示了 *GmGLRs* 基因在响应盐碱胁迫方面可能发挥重要作用。

研究表明，*AtGLR3.7* 通过调控钙信号传导参与拟南芥盐胁迫应答。生化实验结果表明，*AtGLR3.7* 的第 860 位丝氨酸位点受钙依赖的蛋白激酶 CDPK3/16/CDPK34 磷酸化，同时该位点也是 14-3-3 ω 蛋白的结合位点^[18]。在盐胁迫响应中，*AtGLR3.6* 通过 CDPK16 对其第 856 位丝氨酸进行磷酸化，从而调控根系生长。*AtGLR3.6* 过表达株系的根长显著长于野生型，而突变体 *glr3.6* 的根长则显著短于野生型，表明 *GLR3.6* 过表达显著增强拟南芥根系对盐胁迫的耐受性^[47]。此外，*AtGLR3.4* 通过激活 SOS(salt overly sensitive)信号通路调节细胞内 Na^+ 稳态，为种子在盐胁迫环境下的萌发提供稳定的离子环境保障。同时，突变体 *glr3.4* 在盐胁迫下细胞内 Ca^{2+} 活性显著降低，表明 *AtGLR3.4* 在介导盐胁迫下 Ca^{2+} 内流过程中起着

关键作用^[48]。综上所述 GLR 蛋白可能通过 SOS 信号通路和 Ca²⁺传感器/激酶/质膜 H⁺-ATPase 信号通路参与盐碱胁迫应答^[19, 49]。基于序列比对分析发现, GmGLR3.10 与 AtGLR3.7 蛋白序列相似性达 60.35%, 而 GmGLR3.13 与 AtGLR3.6 蛋白序列相似性高达 70.86%, 结合 *GmGLR3.10* 和 *GmGLR3.13* 在盐碱胁迫下的上调表达特征, 推测其可能在盐碱胁迫应答中发挥重要作用。

当植物遭受盐碱胁迫刺激时, GLR 介导 Ca²⁺等阳离子跨膜进入细胞, 激活 SOS 信号通路和 Ca²⁺传感器/激酶/质膜 H⁺-ATPase 信号通路, 进而调控下游 SOS1 和 H⁺-ATPase 活性, 维持细胞内离子平衡和 pH 稳态。综上所述, *GmGLR* 基因家族与植物盐碱胁迫应答存在密切关联。这为深入解析植物适应盐碱胁迫的分子机制及发掘抗逆基因资源提供了重要的理论依据。GLR、SOS1 和 H⁺-ATPase 等膜通道蛋白, 通过协同调控膜两侧离子浓度梯度和电位, 在维持细胞正常生理功能和内环境稳态中发挥关键作用。这种紧密的功能联系不仅对细胞稳态维持具有决定性作用, 也为深入解析植物在盐碱胁迫下的适应机制提供了重要切入点。

4 结论

运用全蛋白组鉴定技术, 成功鉴定出 29 个 *GmGLRs* 基因家族成员, 经染色体定位分析发现, 这些基因分散分布于 10 条不同的染色体上。基于系统进化分析手段, 将上述 29 个 *GmGLRs* 基因家族成员划分为 3 个不同的组, 且在各分组内部, 蛋白序列及基因结构均展现出显著的保守性特征, 此保守性在基因功能及遗传稳定性等方面具有重要意义。进一步对组织表达特性以及非生物胁迫表达特性的分析, 结果表明 *GmGLRs* 在大豆的花、叶以及根等组织中呈现出较为明显的表达优势。除此之外, 面对盐碱胁迫时, 该基因家族能够产生相应的应答反应。综合上述研究发现, 推测 *GmGLRs* 基因家族在植物应对非生物胁迫的复杂应答机制中, 极有可能扮演着不可或缺的关键角色, 发挥着至关重要的作用。

参考文献

- [1] 乔志红. 浅析盐碱地改良利用情况及对策措施. 新农民, 2024, (20): 52-54
Qiao Z H. Analysis of the situation and countermeasures for the improvement and utilization of saline alkali land. New Farmer, 2024, (20): 52-54
- [2] 刘知宜. 藏粮于地化“碱”为粮. 2024-08-01
Liu Z Y. Storing grains in the ground and converting them into grains. August 1, 2024
- [3] Berridge M J, Lipp P, Bootman M D. The versatility and universality of calcium signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2000, 1(1): 11-21
- [4] 晏密, 陈莫, 张薇, 胡彦如, 卢迎春, 和四梅, 王继勇, 杨生超. 灯笼花 *GLRs* 基因家族鉴定及表达特性分析. 分子植物育种, 2022, 20(09): 2842-2853
Yan M, Chen M, Zhang W, Hu Y R, Lu Y C, He S M, Wang J Y, Yang S C. Identification and Expression Characteristics Analysis of *GLRs* Gene Family in Lamplighter. Molecular Plant Breeding, 2022, 20 (09): 2842-2853
- [5] 谭艳秋, 孙姝琛, 董静云, 徐伟, 王玲玲, 王永飞. 植物细胞质膜离子通道研究进展. 植物学报, 2019, 54(01): 102-118
Tan Y Q, Sun S J, Dong J Y, Xu W, Wang L L, Wang Y F. Research progress on plasma membrane ion channels in plant cells. Acta Botanica Sinica, 2019, 54 (01): 102-118
- [6] Chiu J C, Brenner E D, DeSalle R, Nitabach M N, Holmes T C, Coruzzi G M. Phylogenetic and Expression Analysis of the Glutamate-Receptor-Like Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19(7): 1066-1082
- [7] Singh A, Kanwar P, Yadav A K, Mishra M, Jha S K, Baranwal V, Pandey A, Kapoor S, Tyagi A K, Pandey G K. Genome-wide expressional and functional

- analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *The FEBS Journal*, 2014, 281(3): 894-915
- [8] Aouini A, Matsukura C, Ezura H, Asamizu E. Characterisation of 13 *glutamate receptor-like* genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*, 2012, 493(1): 36-43
- [9] Philippe F, Verdu I, Morère-Le Paven M-C, Limami A M, Planchet E. Involvement of *Medicago truncatula* glutamate receptor-like channels in nitric oxide production under short-term water deficit stress. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 236: 1-6
- [10] Gulzar R M A, Ren C X, Fang X, Xu Y P, Saand M A, Cai X Z. Glutamate Receptor-like (GLR) Family in *Brassica napus*: Genome-Wide Identification and Functional Analysis in Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(11):5670
- [11] Hu Y Y, Dai Z R, Huang J, Han M, Wang Z W, Jiao W J, Gao Z Y, Liu X L, Liu L F, Ma Z M. Genome-wide identification and expression analysis of the glutamate receptor gene family in sweet potato and its two diploid relatives. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14:1255805
- [12] Zhang J, Cui T Z, Su Y C, Zang S J, Zhao Z N, Zhang C, Zou W H, Chen Y L, Cao Y, Chen Y, Que Y X, Chen N D, Luo J. Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression Analysis of Glutamate Receptor-like Gene (*GLR*) Family in Sugarcane. *Plants*, 2022, 11(18):2440
- [13] Jia B W, Li Y, Sun X L, Sun M Z. Structure, Function, and Applications of Soybean Calcium Transporters. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22):14220
- [14] Ayalon G, Segev E, Elgavish S, Stern-Bach Y. Two Regions in the N-terminal Domain of Ionotropic Glutamate Receptor 3 Form the Subunit Oligomerization Interfaces That Control Subtype-specific Receptor Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(15): 15053-15060
- [15] Yu B, Liu N, Tang S Q, Qin T, Huang J L. Roles of Glutamate Receptor-Like Channels (GLRs) in Plant Growth and Response to Environmental Stimuli. *Plants (Basel)*. 2022, 11(24):3450
- [16] Singh A, Kanwar P, Yadav AK, Mishra M, Jha SK, Baranwal V, Pandey A, Kapoor S, Tyagi AK, Pandey GK. Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *The FEBS Journal*. 2014, 281(3):894-915
- [17] Yang L, Zhao Y M, Wu X Y, Zhang Y, Fu Y H, Duan Q H, Ma W, Huang J B. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of *BraGLRs* Reveal Their Potential Roles in Abiotic Stress Tolerance and Sexual Reproduction. *Cells*, 2022, 11(23):3729
- [18] Wang P H, Lee C E, Lin Y S, Lee M H, Chen P Y, Chang H C, Chang I F. The Glutamate Receptor-Like Protein GLR3.7 Interacts With 14-3-3 ω and Participates in Salt Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:1169
- [19] Gokce A, Sekmen Cetinel AH, Turkan I. Involvement of GLR-mediated nitric oxide effects on ROS metabolism in Arabidopsis plants under salt stress. *Journal of Plant Research*. 2024 May;137(3):485-503
- [20] 宋朝辉. 浅析我国大豆生产存在的问题及对策. *河北农业*, 2021, (08): 58-59
- Song C H. Analysis of the Problems and Countermeasures in Soybean Production in China Hebei Agriculture, 2021, (08): 58-59
- [21] 朱治佳, 袁明, 韩冬伟, 张笛, 王振, 孙浩月, 王淑荣, 王连霞. 大豆耐盐碱研究进展. *现代化农业*, 2023, (07): 2-5
- Zhu Z J, Yuan M, Han D W, Zhang D, Wang Z, Sun H Y, Wang S R, Wang L X. Research progress on soybean salt alkali tolerance *Modern Agriculture*, 2023, (07): 2-5
- [22] 赵杨, 杨永青, 丁杨林, 张衡, 谢彦杰, 赵春钊, 刘林川, 王鹏程. 植物非生物逆境学科发展综述. *植物生理学报*, 2024, 60(02): 248-270
- Zhao Y, Yang Y Q, Ding Y L, Zhang H, Xie Y J, Zhao C Z, Liu L C, Wang P C. A review of the development of non biological stress in plants . *Journal of Plant Physiology*, 2024, 60 (02): 248-270
- [23] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, Battistuzzi F U. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549
- [24] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D493-D496
- [25] El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy S R, Luciani A, Potter S C, Qureshi M, Richardson L J, Salazar G A, Smart A, Sonnhammer E L L, Hirsh L, Paladin L, Piovesan D, Tosatto S C E, Finn R D. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D427-D432
- [26] Marchler-Bauer A, Bryant S H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(Web Server): W327-W331
- [27] Chen C J, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202
- [28] Lescot M. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325-327
- [29] DuanMu H Z, Wang Y, Bai X, Cheng S F, Deyholos M K, Wong G K-S, Li D, Zhu D, Li R, Yu Y, Cao L, Chen C, Zhu Y. Wild soybean roots depend on

- specific transcription factors and oxidation reduction related genes in response to alkaline stress. *Functional & Integrative Genomics*, 2015, 15(6): 651-660
- [30] Belamkar V, Weeks N T, Bharti A K, Farmer A D, Graham M A, Cannon S B. Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress. *BMC Genomics*, 2014, 15:950
- [31] 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
- [32] Willems E, Leys L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Analytical Biochemistry*, 2008, 379(1): 127-129
- [33] 胡炎, 杨帆, 杨宁, 贾伟, 崔勇. 盐碱地资源分析及利用研究展望. *土壤通报*, 2023, 54(02): 489-494
Hu Y, Yang F, Yang N, Jia W, Cui Y. Outlook on the Analysis and Utilization of Saline alkali Land Resources. *Soil Bulletin*, 2023, 54 (02): 489-494
- [34] 刘小京, 郭凯, 封晓辉, 孙宏勇. 农业高效利用盐碱地资源探讨. *中国生态农业学报(中英文)*, 2023, 31(03): 345-353
Liu X J, Guo K, Feng X H, Sun H Y. Exploration of Efficient Utilization of Saline alkali Land Resources in Agriculture. *Chinese Journal of Ecological Agriculture (Chinese and English)*, 2023, 31 (03): 345-353
- [35] 谷倩楠, 孔瑞文, 孙明哲, 李建伟, 孙晓丽. 大豆混合盐碱胁迫应答基因 *GmDUF247-1* 的克隆及功能分析. *植物遗传资源学报*, 2024, 25(06): 978-989
Gu Q N, Kong R W, Sun M Z, Li J W, Sun X L. Cloning and functional analysis of *GmDUF247-1* gene in response to mixed salt alkali stress in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, 25 (06): 978-989
- [36] 吴金丽, 汤泽洋, 鲁鑫, 周志强, 郭长虹, 李新海. 玉米 *PDI* 基因家族鉴定和表达模式分析. *植物遗传资源学报*, 2024, 25(01): 97-110
Wu J L, Tang Z Y, Lu X, Zhou Z Q, Guo C H, Li X H. Identification and expression pattern analysis of *PDI* gene family in maize *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, 25 (01): 97-110
- [37] 陈小晶, 王东梅, 关红辉, 郭剑, 沙小茜, 李永祥, 张登峰, 刘旭洋, 何冠华, 石云素, 宋燕春, 王天宇, 黎裕, 刘颖慧, 李春辉. 玉米 *CIPK* 基因家族的鉴定及 *ZmCIPK3* 的抗旱性功能研究. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(04): 1064-1075
Chen X J, Wang D G, Guan H H, Guo J, Sha X Q, Li Y X, Zhang D F, Liu X Y, He G H, Shi Y S, Song Y C, Wang T Y, Li Y, Liu Y G, Li C H. Identification of the *CIPK* gene family in maize and study on the drought resistance function of *ZmCIPK3* *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23 (04): 1064-1075
- [38] 梁书卿, 周晓慧, 杨艳, 张静娴, 刘松瑜, 刘军, 庄勇. 茄子 *Whirly* 基因家族鉴定和表达分析. *植物遗传资源学报*, 2024, 25(01): 120-128
Liang S Q, Zhou X H, Yang Yan, Zhang J X, Liu S G, Liu J, Zhuang Y. Identification and expression analysis of *Whirly* gene family in eggplant *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, 25 (01): 120-128
- [39] 何明洁, 孙伊辰, 程晓园, 时冬雪, 李迪秦, 陈益银, 冯永坤, 刘璐, 范腾飞, 杨超, 曹凤秋, 刘来华. 植物谷氨酸受体的研究进展. *植物学报*, 2016, 51(06): 827-840
He M J, Sun Y C, Cheng X Y, Shi D X, Li D Q, Chen Y Y, Feng Y K, Liu L, Fan T F, Yang C, Cao F Q, Liu L H. Research progress on glutamate receptors in plants. *Acta Botanica Sinica*, 2016, 51 (06): 827-840
- [40] 陈梦娇, 李洋洋, 郭倩. 谷氨酸受体蛋白调控植物生长与胁迫应答的研究进展. *生物技术通报*, 2024, 40(10): 62-75
Chen M J, Li Y Y, Wu Q. Research progress on the regulation of plant growth and stress response by glutamate receptor proteins *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(10): 62-75
- [41] Li X R, Zhu T H, Wang X Y, Zhu M. Genome-wide identification of glutamate receptor-like gene family in soybean. *Heliyon*, 2023, 9(11): e21655
- [42] Tapken D, Hollmann M. *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *Journal of Molecular Biology*. 2008, 383(1): 36-48
- [43] Vincill ED, Bieck AM, Spalding EP. Ca²⁺ conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiol*. 2012, 159(1): 40-6
- [44] Teardo E, Carraretto L, De Bortoli S, Costa A, Behera S, Wagner R, Lo Schiavo F, Formentin E, Szabo I. Alternative Splicing-Mediated Targeting of the *Arabidopsis* GLUTAMATE RECEPTOR3.5 to Mitochondria Affects Organelle Morphology. *Plant Physiology*, 2015, 167(1): 216-227
- [45] Chen P Y, Hsu C Y, Lee C E, Chang I F. *Arabidopsis* glutamate receptor *GLR3.7* is involved in abscisic acid response. *Plant Signaling & Behavior*, 2021, 16(12): 1997513
- [46] Vincill E D, Clarin A E, Molenda J N, Spalding E P. Interacting Glutamate Receptor-Like Proteins in Phloem Regulate Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2013, 25(4): 1304-1313
- [47] Silamparasan D, Chang I F, Jinn T L. Calcium-dependent protein kinase CDPK16 phosphorylates serine-856 of glutamate receptor-like GLR3.6 protein leading to salt-responsive root growth in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1093472

- [48] Cheng Y, Zhang X X, Sun T Y, Tian Q Y, Zhang W H. Glutamate Receptor Homolog3.4 is Involved in Regulation of Seed Germination Under Salt Stress in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(5): 978-988
- [49] Yang Y Q, Wu Y J, Ma L, Yang Z J, Dong Q Y, Li Q P, Ni X P, Kudla J, Song C P, Guo Y. The Ca^{2+} Sensor ScaBP3/CBL7 Modulates Plasma Membrane H^{+} -ATPase Activity and Promotes Alkali Tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2019, 31(6): 1367-1384