

大豆 ERF 耐盐基因的鉴定和驯化分析

高超升¹, 袁嘉志¹, 植健怡¹, 程玉汉², 董利东¹, 程群¹

(¹广州大学生命科学学院/广东省植物适应性与分子设计重点实验室, 广州 510006; ²北京中农富通园艺有限公司, 北京 100083)

摘要: 土地盐渍化对大豆的产量和品质产生了极大的负面影响, 培育耐盐大豆品种是改善和提高盐胁迫下大豆产量和品质的有效途径之一。ERF 转录因子对植物响应逆境胁迫十分重要, 但在大豆中相关研究报道较少。基于已报道的盐胁迫处理下的 RNA-seq 数据、549 份大豆重测序数据及耐盐指数数据, 以及 Soybean Expression Atlas 数据库中大豆组织表达数据, 在大豆中鉴定能够响应盐胁迫的 ERF 基因。同时, 在 549 份大豆重测序数据中鉴定响应盐胁迫 ERF 基因的优异等位变异, 并分析其驯化与人工选择规律。对大豆植株盐胁迫下转录组数据分析, 发现 153 个 ERF 基因中有 40 个受到盐胁迫后差异表达, 其中 11 个基因上调表达, 29 个基因下调表达; 11 个上调表达的 ERF 基因中, 有 8 个基因在根中富集表达, 并分布在 6 条染色体上。对 8 个在根中表达的 ERF 基因在 549 份自然群体中鉴定自然等位变异, 发现只有 3 个 ERF 基因产生了自然变异, 其中 ERF158^{H1}, ERF166^{H2}, ERF170^{H1} 单倍型是优异的等位变异, 能够显著促进大豆对盐的耐性。对优异等位变异的核苷酸多态性分析表明, ERF170^{H1} 在大豆驯化的过程中受到了微弱的人工选择, 而 ERF158^{H1} 和 ERF166^{H2} 在驯化的过程中发生了逐渐减少或丢失的现象。因此, 我们的研究鉴定了大豆中响应盐胁迫的 ERF 基因及其优异等位变异, 对丰富和完善大豆响应盐胁迫的分子机制具有重要意义, 为培育耐盐大豆品种提供重要的基因资源和育种方案。

关键词: 大豆; 乙烯响应因子; 耐盐; 生物信息学; 人工选择

Identification and Domestication Analysis of ERF Salt Tolerance Genes in Soybean

GAO Chaosheng¹, YUAN Jiazhi¹, ZHI Jianyi¹, CHENG Yuhan², DONG Lidong¹, CHENG Qun¹

(¹School of Life Sciences, Guangzhou University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Adaptation and Molecular Design, Guangzhou 510006; ²Beijing Zhongnong Futong Horticulture Co., Ltd, Beijing 100083)

Abstract: Soil salinization has a significant negative impact on the yield and quality of soybean. It is one of the effective ways to improve the yield and quality of soybeans under salt stress by breeding salt-tolerant soybean varieties. Plant ERF transcription factors play important roles in responses to biotic and abiotic stresses, whereas there are few relevant studies in soybean. Based on RNA-Seq datasets under salt stress treatment, 549 soybean resequencing data and salt tolerance index data, as well as the soybean tissue expression data in the Soybean Expression Atlas database, the soybean ERF genes responding to salt stress and their elite alleles were identified. Based on the transcriptome data of soybean plants under salt stress treatment, 40 of 153 ERF genes were differentially expressed, among which 11 genes were up-regulated and 29 were down-regulated. Out of the 11 up-regulated ERF genes, eight were enriched in roots and found on six chromosomes. We further analyzed the natural allelic variations of 8 differentially-expressed ERF genes in roots in 549 natural soybean populations. Three ERF genes were identified with natural variations, among which ERF158^{H1}, ERF166^{H2} and ERF170^{H1} haplotypes were elite alleles showing significantly higher salt tolerance. Nucleotide polymorphism analysis of the elite alleles showed that ERF170^{H1} was detected with weakly artificial selection signals during soybean domestication, while

第一作者研究方向为大豆分子遗传育种, E-mail: gcs19990759@163.com

通信作者: 程群, 研究方向为大豆分子遗传学与基因组学, E-mail: chengqun0118@gzhu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32272073)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (32272073)

ERF158^{H1} and *ERF166^{H2}* were gradually reduced or lost during domestication process. Therefore, eight *ERF* genes were identified likely being involved in the response of soybean to salt stress, and three of them were found to have elite alleles that can significantly promote soybean salt tolerance. Our findings provide a great significance to enrich and improve the molecular mechanism of soybean response to salt stress and breeding programs for salt-tolerant soybean varieties.

Key words: Soybean; *ERF*; Salt tolerance; Bioinformatics; Artificial Selection

盐渍化是土地退化的主要形式之一，目前已成为全球性环境问题，我国盐渍化土地面积占全国内总耕地面积的十分之一，其中华北、西北以及沿海地区较为严重^[1]。大豆(*Glycine max* (L.) Merr.) 起源于中国，是重要的油料作物^[2]。随着我国经济的飞速发展和人口的不断增多，对大豆的需求量迅速增加，但受到耕地面积有限和大豆单株产量低的双重限制，导致国内大豆主要依赖于进口，严重地威胁到我国的粮食安全和贸易自主权。我国有超过 1000 万公顷盐渍地被开发为耕地的可能性，大豆作为中度耐盐作物^[3]，鉴定其耐盐基因对培育耐盐大豆品种、扩大大豆的可种植范围，最终增加大豆总产量具有重要的意义。

在高盐的胁迫下，植物会发生多种生理变化，如细胞失水、离子毒性、离子失衡、氧化应激、气孔阻塞等，最终引起植物局部组织损伤甚至产生早衰现象^[4]。高盐对于作物的产量有较大影响，但在相同的盐胁迫条件下，盐耐受品种相较于盐敏感品种的产量约增加 37%，平均种子重量约升高 25%^[5]，说明培育耐盐品种对于作物适应盐渍化土地十分重要。转录因子是植物参与胁迫应答的重要因素，在大豆中，已有多个转录因子能够参与响应盐胁迫的分子机制被证实出来。例如，大豆中 WRKY 转录因子 WRKY27 能够与 MYB 类转录因子 MYB174 相互作用，通过抑制 NAC 转录因子 *NAC29* 的表达，从而提高大豆对盐胁迫的耐性^[6]。

乙烯响应因子 (ERF, Ethylene-responsive factor) 是植物特有的转录因子家族 AP2/ERF (APETALA2/ethylene responsive factor) 中的一个亚家族，其内包含一个 AP2 结构域^[7]。*ERF* 基因在多种植物中可以对不同的非生物胁迫做出应答，如在番茄中过表达 *ERF5* 基因能提高植株对干旱和盐胁迫的耐受性^[8]。在烟草中过表达大豆的 *ERF7* 基因能够显著提高烟草的盐耐受能力^[9]。基于大豆的高质量基因组数据，Wang 等在大豆中鉴定出 153 个 *ERF* 基因^[10]，但无法得知具体哪些 *ERF* 基因能够参与大豆响应盐胁迫，而能够响应盐胁迫的 *ERF* 基因中是否存在优异等位变异，能否进一步被应用到培育耐盐高产大豆新品种中均尚属未知。本研究拟通过结合盐处理下大豆品种的 RNA-seq 数据，筛选出能够响应盐胁迫的 *ERF* 候选基因；同时鉴定候选基因的自然等位变异，结合耐盐指数数据，鉴定响应盐胁迫的 *ERF* 家族成员的优异等位变异，并分析出其驯化与选择规律。为后续深入解析大豆 *ERF* 基因响应盐胁迫的分子机理提供了线索，同时为大豆耐盐性分子育种提供理论基础和有利基因资源。

1 材料与amp;方法

1.1 盐胁迫下 *ERF* 基因的表达

从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中检索 PRJNA797227，并下载 Dong 等对大豆品种

Williams 82 (W82) 盐处理下 RNA-seq 的差异转录基因数据^[11]。利用 Excel 软件, 以 Wang 等鉴定出的 153 个 *ERF* 基因登录号为检索目标^[10], 在所下载的 RNA-seq 差异转录基因数据中进行检索, 鉴定出在盐处理下具有差异表达的 *ERF* 基因。筛选具有差异表达的 *ERF* 基因的 FPKM 值, 利用 TBtools 中的 HeatMap 插件进行基因表达量处理, 生成基因差异表达量热图。

1.2 大豆 *ERF* 基因的组织特异表达

从 Soybean Expression Atlas 数据库 (https://venanciogroup.uenf.br/cgi-bin/gmax_atlas/index.cgi) 中下载 11 个上调表达的 *ERF* (*Glyma.01G224100*, *ERF237*; *Glyma.02G066200*, *ERF218*; *Glyma.03G159800*, *ERF154*; *Glyma.06G290000*, *ERF158*; *Glyma.10G016500*, *ERF196*; *Glyma.11G019000*, *ERF245*; *Glyma.12G117000*, *ERF166*; *Glyma.13G236500*, *ERF170*; *Glyma.13G236600*, *ERF171*; *Glyma.13G274100*, *ERF172*; *Glyma.16G147500*, *ERF232*) 基因在大豆发育的七个关键部位, 子叶、花、叶、荚、根、种子和芽的表达数据, 使用 TBtools 软件绘制 *ERF* 家族基因在大豆不同组织器官中的表达量热图。

1.3 基因的染色体定位

从 Phytozome 网站数据 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 中下载大豆全基因组基本信息 gff3 文件, 利用 TBtools 软件中的 Gene Location Visualize From GTF/GFF 插件, 对 8 个在根中富集的 *ERF* 基因进行染色体可视化定位。

1.4 系统发育树的构建

利用大豆中 8 个 *ERF* 基因的氨基酸序列, 在 Phytozome 数据库中 balst 多个豆科植物的同源氨基酸序列, 包括花生 (*araby.Tifrunner.gnm1.ann1.QGFJ76*)、鹰嘴豆 (*Ca_01387*, *Ca_20544*, *Ca_01387*)、兵豆 (*Lcu.2RBY.3g058850*, *Lcu.2RBY.2g004730*, *Lcu.2RBY.4g046650*, *Lcu.2RBY.3g058850*)、小扁豆 (*Ler.1DRT.3g064870*, *Ler.1DRT.2g005700*, *Ler.1DRT.3g064870*)、蒺藜苜蓿 (*Medtr2g014340*, *Medtr4g078710*)、棉豆 (*PI06G0000303600.v1*, *PI07G0000251100.v1*, *PI11G0000268300.v1*, *PI01G0000301900.v1*)、菜豆 (*Phvul.007G217800*, *Phvul.011G125200*, *Phvul.001G157600*) 以及豇豆 (*Vigun07g122000*, *Vigun06g198800*, *Vigun11g100500*, *Vigun06g199000*), 并导入到 MEGA-X 软件, 生成系统发育树。

1.5 *ERF* 基因的等位变异鉴定及与耐盐指数的关联分析

我们前期已对实验室搜集的 549 份大豆材料 (119 份野生大豆、204 份地方品种和 226 份栽培品种) 的耐盐指数进行分析^[11], 具体为耐盐指数 = $\Sigma(\text{类别数值} \times \text{该类别株数}) / \text{播种粒数} \times 5$ (最高类别数值)。同时, 利用 Linux 系统中的 vcftools 软件, 提取 *ERF* 基因的变异信息, 以 W82 为参考基因组, 对 8 个 *ERF* 基因进行基因型分型。通过 GraphPad Prism 8.0.2 软件, 结合 *ERF* 基因的主要单倍型和耐盐指数数据进行关联分析, 并绘制箱线图, 采用 one-way ANOVA 进行单倍型之间耐盐指数的显著性差异检验。

1.6 *ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 的核苷酸多样性分析

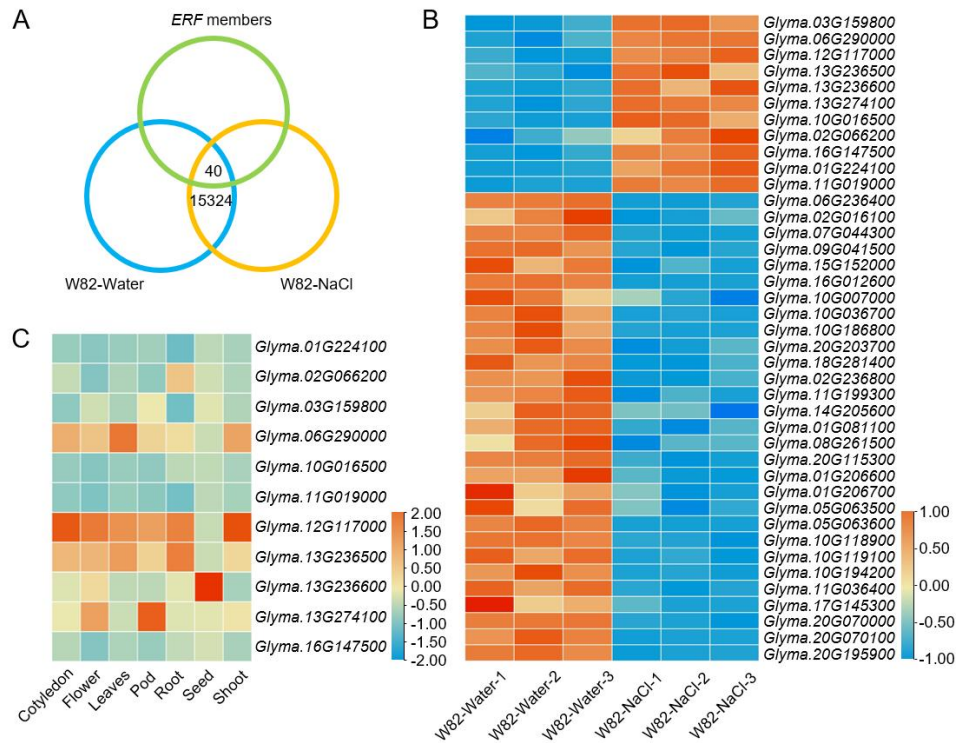
从 549 份大豆材料全基因组数据中获得候选基因 *ERF158* (Chr06:47878147..47879505)、*ERF166* (Chr12:11748442..11749494)、*ERF170* (Chr13:34675712..34677522) 附近 200 kb 的 DNA 序列, (使用 vcftools 软件, 每隔 2000 bp 计算一次 π 值, 选择目的基因附近的 π 值用于核苷酸多样性分析。

2 结果

2.1 响应盐胁迫 *ERF* 基因的鉴定

为了鉴定受盐胁迫诱导表达的关键基因, 我们前期获得了利用 200 mM NaCl 处理栽培大豆品种 W82 的 RNA-seq 数据^[11]。接下来, 我们对 RNA-seq 数据中 153 个大豆 *ERF* 基因的表达情况进行分析, 发现 W82 在受到 NaCl 诱导后, 产生了 15324 个差异表达基因, 其中包含 40 个差异表达的 *ERF* 基因 (图 1A)。对差异表达基因绘制表达热图后发现, 11 个 *ERF* 基因在受到 NaCl 诱导后上调表达, 29 个 *ERF* 基因下调表达 (图 1B)。

由于已报道的 *ERF* 基因大多为响应逆境胁迫的正调控因子^[8-9], 因此 11 个上调表达的 *ERF* 基因被进一步分析。对 11 个上调表达 *ERF* 基因的组织特异性表达进行分析, 结果显示 11 个上调基因在 7 个关键组织部位均有表达, 其中 *ERF158*、*ERF166*、*ERF170* 在子叶中表达量较高; *ERF158*、*ERF166*、*ERF170*、*ERF171*、*ERF172* 在花中表达量较高; *ERF158*、*ERF166*、*ERF170* 在叶中表达量较高; *ERF158*、*ERF166*、*ERF170*、*ERF172* 在荚中表达量较高; *ERF170* 在种子中表达量较高; *ERF158*、*ERF166*、*ERF170*、*ERF172* 在芽中表达量较高; *ERF218*、*ERF158*、*ERF196*、*ERF166*、*ERF170*、*ERF171*、*ERF172*、*ERF232* 在根中表达量较高。根系是植物吸收营养物质的主要器官, 也是植物体感受盐胁迫信号的第一器官^[12]。因此, 接下来将对在根中表达量较高的 8 个基因作进一步分析。



A: W82-Water、W82-NaCl 和 ERF 家族基因之间的重叠基因；B: 40 个差异表达的 ERF 基因热图；C: 11 个上调基因的组织特异性表达

A: Overlap between W82-Water, W82-NaCl and ERF genes; B: Heat map of differentially expressed 40 ERF genes under NaCl treatment; C: Tissue specific expression of 11 up-regulated genes.

图 1 响应盐胁迫 ERF 基因的鉴定

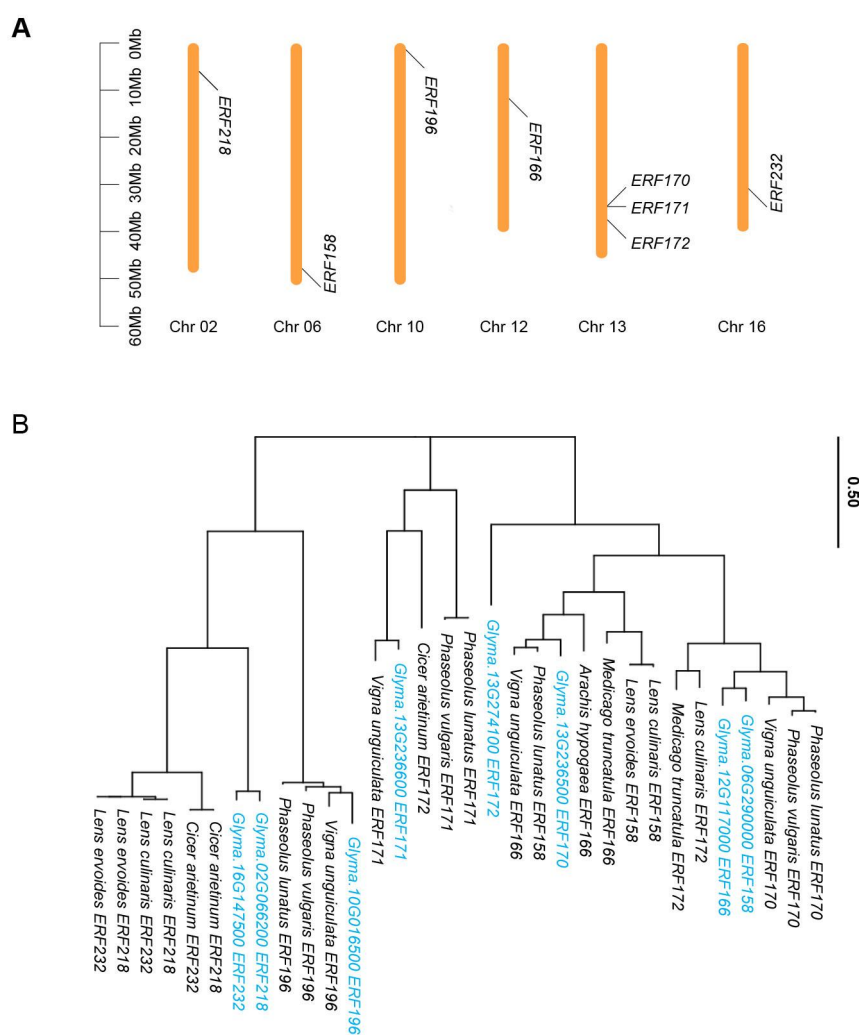
Fig. 1 Identification of ERF genes response to salt stress in soybean

2.2 ERF 基因的染色体定位

对 8 个在根中表达量较高的 ERF 基因，利用基因的位置信息，进行基因的染色体位置可视化，结果显示 8 个 ERF 基因分布在 6 条染色体上，其中 ERF218 在 2 号染色体上，ERF158 在 6 号染色体上，ERF196 在 10 号染色体上，ERF166 在 12 号染色体上，ERF170、ERF171、ERF172 三个基因在 13 号染色体上，ERF232 在 16 号染色体上（图 2A）。

构建了大豆 ERF 蛋白与其他豆科 ERF 蛋白的系统发育树，结果显示，大豆 ERF158 和 ERF166 与棉豆（*Phaseolus lunatus* L.）、菜豆（*Phaseolus vulgaris* L.）和豇豆（*Vigna unguiculata* (Linn.) Walp.）的 ERF170 具有较高的同源性；大豆 ERF170 和 ERF172 与棉豆、兵豆、小扁豆 ERF158 蛋白以及豇豆、蒺藜苜蓿（*Medicago truncatula*）、花生（*Arachis hypogaea* L.）ERF166 蛋白具有较高的同源性；大豆 ERF171 与豇豆、棉豆、菜豆的 ERF171 蛋白以及鹰嘴豆 ERF172 具有较高的同源性；大豆 ERF196 与豇豆、菜豆、棉豆 ERF196 蛋白聚为一支，同源性较高；大豆 ERF218、ERF232 与鹰嘴豆（*Cicer arietinum*）、兵豆（*Lens culinaris* Medic.）、

小扁豆 (*Lens ervoides*) 的 ERF218、ERF232 同源性较高 (图 2B)；ERF 蛋白在不同的豆科作物中较为保守，说明其可能含有相似的功能。



A: 8 个上调基因在染色体上的定位; B: 大豆与其他常见豆科植物 ERF 蛋白的系统发育树, 蓝色代表大豆 ERF 基因。

A: Location of the 8 up-regulated genes on chromosomes; B: Phylogenetic tree of ERF protein of soybean and other common leguminous plants, the blue font represents ERF genes in soybean.

图 2 ERF 基因的染色体定位和系统发育树

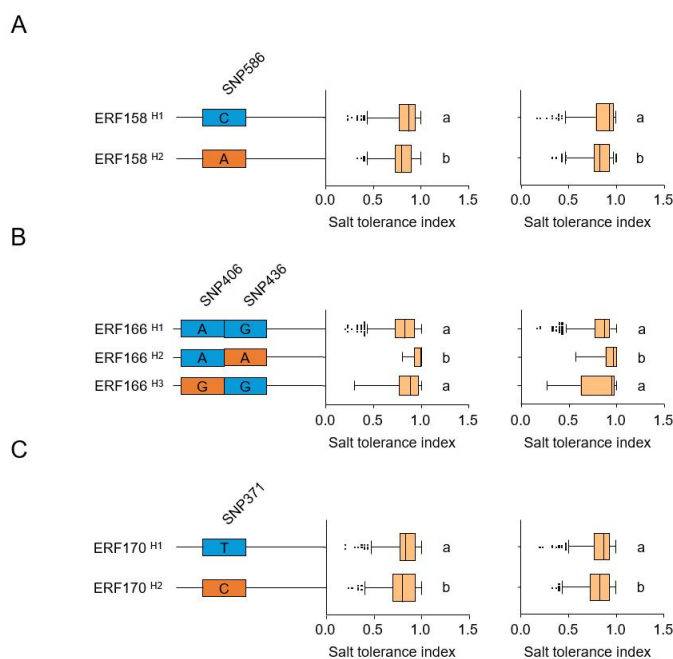
Fig. 2 Chromosome location and phylogenetic tree of ERF genes

2.3 ERF 基因的等位变异筛选及耐盐性分析

为了鉴定 8 个 ERF 基因的优异等位变异, 在 549 份大豆重测序材料中, 对 8 个 ERF 基因进行单倍型分析, 以参考基因组 W82 型作为 H1 型, 结果显示 ERF218、ERF196、ERF171、ERF172 和 ERF232 不存在等

位变异；*ERF158* 有 2 个等位变异，*ERF158^{H2}* 在第 586 个碱基位置发生了单碱基替换，由 C 变成了 A，导致氨基酸由 L 变成 I。*ERF166* 有 3 个等位变异，其中 *ERF166^{H2}* 在第 436 个碱基位置发生了单碱基替换，由 G 变成了 A，导致氨基酸由 V 变成 I；*ERF166^{H3}* 型在第 406 个碱基位置发生了单碱基替换，由 A 变成了 G，导致氨基酸由 I 变成 V。*ERF170* 有 2 个等位变异，*ERF170^{H2}* 在第 371 个碱基位置发生了单碱基替换，由 T 变成了 C，导致氨基酸由 V 变成 A（图 3A-C）。

通过单倍型与耐盐指数的关联结果发现，含有 *ERF158^{H1}* 的大豆品种耐盐指数显著高于含有 *ERF158^{H2}* 的大豆品种；含有 *ERF166^{H2}* 的大豆品种耐盐指数显著高于含有 *ERF166^{H1}* 的大豆品种，而含有 *ERF166^{H3}* 的大豆品种与含有 *ERF166^{H1}* 的大豆品种耐盐指数没有显著差异；含有 *ERF170^{H1}* 的大豆品种耐盐指数显著高于含有 *ERF170^{H2}* 的大豆品种，说明 *ERF158^{H1}*、*ERF170^{H1}*、*ERF166^{H2}* 是优异的等位变异，能够提高大豆对盐的耐性（图 3A-C）。



不同小写字母表示在 0.05 水平显著差异。

Different lowercase above the histogram indicate significant difference at 0.05 level.

图 3 *ERF* 基因等位自然变异与耐盐指数的关联分析

Fig. 3 Association of natural variation in *ERF* gene alleles with salt tolerance

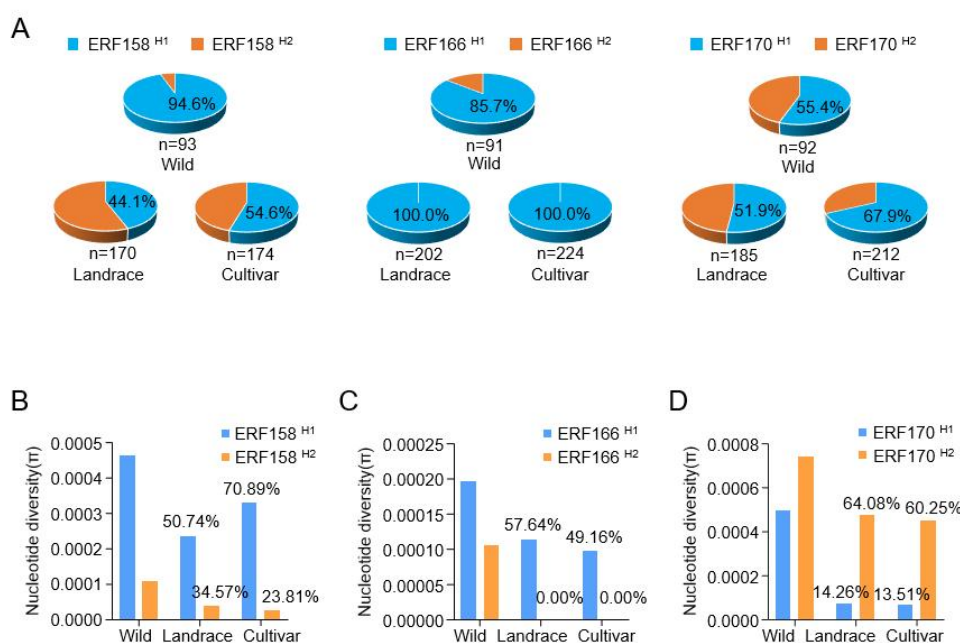
2.4 *ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 不同等位变异的品种分布

为了确定 *ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 三个基因的优异等位变异在驯化的过程中是否经历了人工选择，对 *ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 优异等位变异在大豆品种中的分布进行分析，结果显示，在 94.6% 的野生大

豆中均为 *ERF158^{H1}* 等位基因型，而在栽培大豆中该基因型下降为 54.6%；14.3%的野生大豆中含有 *ERF166^{H2}* 等位基因型，而在栽培品种和地方品种中 *ERF166^{H2}* 完全消失；以上结果表明，*ERF158^{H1}* 和 *ERF166^{H2}* 等位基因型在栽培大豆由野生大豆驯化的过程中逐渐减少或丢失。55.4%的野生大豆中含有 *ERF170^{H1}* 等位基因型，而在栽培大豆中该比例上升为 67.9%，说明 *ERF170^{H1}* 等位基因型可能受到了微弱的人工选择（图 4A）。

2.5 *ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 的驯化轨迹分析

为了进一步确认 *ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 的优异等位变异在大豆驯化的过程中是否丢失或受到人工选择，我们分析了在 549 份大豆重测序数据中，*ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 附近基因组区域的核苷酸多样性。结果显示，携带 *ERF158^{H2}* 等位基因的地方品种保留了野生大豆的 34.57%的核苷酸多样性，栽培品种保留了野生品种的 23.81%的核苷酸多样。携带 *ERF158^{H1}* 等位基因的地方品种保留了野生大豆的 50.74%的核苷酸多样性，而栽培品种则保留了野生品种的 70.89%的核苷酸多样（图 4B）；携带 *ERF166^{H1}* 等位基因的地方品种保留了野生大豆 57.64%的核苷酸多样性，栽培品种仅保留野生大豆 49.16%的核苷酸多样（图 4C），由于栽培大豆和地方品种中不含有 *ERF166^{H2}* 等位基因，无法计算其核苷酸多样性。以上结果表明，*ERF158^{H1}* 和 *ERF166^{H2}* 等位基因确实在大豆驯化的过程中逐渐减少或丢失了。携带 *ERF170^{H2}* 等位基因的地方品种保留了野生大豆的 64.08 %的核苷酸多样性，栽培品种保留了野生品种的 60.25%的核苷酸多样。携带 *ERF170^{H1}* 等位基因的地方品种保留了野生大豆的 14.26%的核苷酸多样性，而栽培品种则保留了野生品种的 13.51%的核苷酸多样（图 4D）。在地方品种和栽培品种中，*ERF170^{H1}* 等位基因的核苷酸多态性显著低于 *ERF170^{H2}* 等位基因的核苷酸多态性，说明 *ERF170^{H1}* 可能受到了人工选择。



A: *ERF158*, *ERF166* 和 *ERF170* 等位基因的比例及其在三个种质组（野生大豆，地方品种和栽培品种）中的共发性；B: 野生大豆、地方品种和栽培品种中 *ERF158^{H1}*、*ERF158^{H2}* 周围区域的核苷酸多样性分析；C: 野生大豆、地方品种和栽培品种中 *ERF166^{H1}*、*ERF166^{H2}* 周围区域的核苷酸多样性分析；D: 野生大豆，地方品种和栽培品种中 *ERF170^{H1}*、*ERF170^{H2}* 周围区域的核苷酸多样性分析

A: Proportions of *ERF158*, *ERF166* and *ERF170* alleles and their co-occurrence with each of the three germplasm groups (wild, landrace, and cultivar); B: Nucleotide diversity analysis of the region surrounding *ERF158^{H1}* and *ERF158^{H2}* in wild, landrace, and cultivated soybean; C: Nucleotide diversity analysis of the region surrounding *ERF166^{H1}* and *ERF166^{H2}* in wild, landrace, and cultivated soybean; D: Nucleotide diversity analysis of the region surrounding *ERF170^{H1}* and *ERF170^{H2}* in wild, landrace, and cultivated soybean

图 4 *ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 不同等位变异的品种分布和核苷酸多态性分析

Fig. 4 Variety distribution and domestication trajectories of different allelic variants of *ERF158*, *ERF166* and *ERF170*

3 讨论

3.1 *ERF* 转录因子参与大豆盐胁迫响应的调控

ERF 转录因子是参与植物应对多种生物和非生物胁迫的重要转录因子^[13]。在茄子中沉默 *ERF1* 基因，盐胁迫防御相关基因 *NCED1* 等转录水平下降，从而降低茄子对盐的耐性^[14]。在烟草中过表达大豆 *ERF7*，能够通过增高可溶性碳水化合物的含量和降低丙二醛含量来增强烟草植株的耐盐性^[9]。目前关于 *ERF* 家族基因参与大豆响应盐胁迫的报道较少。因此，本研究通过分析盐处理 W82 下的 RNA-seq 数据，在大豆中鉴定出 40 个受盐胁迫差异表达的 *ERF* 基因，结合生物信息学分析，鉴定出 3 个 *ERF* 基因产生了自然变异，其中 *ERF158^{H1}*，*ERF166^{H2}*，*ERF170^{H1}* 单倍型是优异的等位变异，这 3 个优异的等位变异能够显著促进大豆对盐的耐性。

3.2 *ERF* 基因在大豆驯化进程中受到人工选择

在早期的作物驯化过程中，为了获得适合种植在田间的作物，农民针对个别性状进行了强烈的选择，导致栽培大豆中保留下来的基因越来越少，使现代育种中产生了遗传瓶颈效应^[15]。如 *G* 基因能够同时控制大豆的种皮颜色和萌发过程，*g* 基因突变后，种子休眠丧失，发芽时间变得统一，为了方便作物管理，人工选择了 *g* 等位基因^[16]。由于 *g* 基因被高度选择，生活中常见的大豆种皮多为黄色，而绿色种皮的大豆则变得不常见。我们通过分析 549 份大豆的品种中 *ERF170* 不同基因型的分布规律及其核苷酸多样性，发现 *ERF170^{H1}* 在驯化的过程中受到了微弱的人工选择。作物的耐逆表型并不是驯化性状，我们推测 *ERF170* 可能在大豆的驯化性状中也具有重要作用，如开花、种子大小等，也有可能是 *ERF170* 与大豆驯化性状基因存在连锁现象，因此导致人们在选择其他基因时，一起选择了 *ERF170^{H1}* 等位基因型。

伴随着驯化基因的强烈选择，大量控制作物优良性状的基因却发生了丢失现象，重新找回丢失的基因可以拓宽和丰富作物的遗传多样性。玉米中控制叶夹角的 *UPA2* 基因起源于玉米祖先大刍草，但在驯化的过程中发生了丢失现象，通过连续回交技术，将大刍草 *UPA2* 等位基因导入到现代玉米中，使玉米的叶夹角变小，能够高密度种植，提高了玉米的总产量^[17]。在本研究中，我们发现 *ERF158^{H1}* 和 *ERF166^{H2}* 等位基因

是优异的等位变异，该变异能够显著促进大豆对盐的耐性，但其却在大豆驯化的过程中逐渐丢失，对该等位基因的挖掘有助于进一步利用分子设计培育耐逆高产大豆新品种，提高大豆在盐碱地下的种植面积，最终提高大豆总产量。

3.3 *ERF* 基因的鉴定和分析为接下来开展研究提供借鉴

由于自然气候以及人类活动等因素的影响，土地盐碱化日益严重，目前已成为全球面临的重大环境问题^[18]，而土地盐碱化带来最直接的问题是农作物减产减收甚至绝产^[19]。因此，植物耐盐性是近年来农作物研究的热点之一，越来越多与植物耐盐性相关的基因被发掘，如拟南芥的 *SPT4-2*^[20]、紫花苜蓿的 *CCD4*^[21] 和大豆的 *DREB3b* 基因^[22]等。充分利用大豆的耐盐基因培育出大豆耐盐品种，可以提高大豆在盐碱地的产量。例如，国审品种“中黄 13”中利用了耐盐基因 *Salt3*^[23]。本文鉴定出的 *ERF158^{H1}*、*ERF166^{H2}* 和 *ERF170^{H1}* 等位变异在大豆应对盐胁迫中发挥重要作用，接下来针对 *ERF158^{H1}*、*ERF166^{H2}* 和 *ERF170^{H1}* 三个优异等位变异进行分子标记开发，结合常规与分子育种的技术手段，将以上等位基因导入到具有其他优良农艺性状但盐不耐受的大豆品种中，可能能够改善和提高盐胁迫下大豆产量和品质。

4 结论

在盐诱导下的转录组数据中鉴定到 11 个上调 *ERF* 基因，其中 8 个 *ERF* 基因在根中表达量较高。*ERF158*、*ERF166* 和 *ERF170* 存在优异等位变异，分别为 *ERF158^{H1}*、*ERF166^{H2}* 和 *ERF170^{H1}*，这 3 种单倍型能够显著提高大豆对盐的耐性。*ERF170^{H1}* 在大豆驯化的过程中受到了微弱的人工选择，*ERF158^{H1}* 和 *ERF166^{H2}* 在驯化的过程中逐渐减少或丢失，重新鉴定出来将为培育耐盐高产大豆新品种提供重要的基因资源。

参考文献

- [1] 范王涛. 土壤盐碱化危害及改良方法研究. 农业与技术, 2020, 40(23): 114-116.
FAN W T. Research on the harm of soil salinization and its improvement methods. Agriculture and Technology, 2020, 40(23): 114-116.
- [2] DONG L D, CHENG Q, FANG C, KONG L P, YANG H, HOU Z H, LI Y L, NAN H Y, ZHANG Y H, CHEN Q S, ZHANG C B, KOU K, SU T, WANG L S, LI S C, LI H Y, LIN X Y, TANG Y, ZHAO X H, LU S J, LIU B H, KONG F J. Parallel selection of distinct *Tof5* alleles drove the adaptation of cultivated and wild soybean to high latitude. Molecular plant, 2021, 15(2): 308-321.
- [3] 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 up-regulating salt-responsive genes. Frontiers in plant science, 2020, 11: 272-272.
- [4] BAHMANI, KAIVAN, NOORI, SEYED A S, DARBANDI, ALI I, AKBARI, AZAM. Molecular mechanisms of plant salinity tolerance: a review. Australian Journal of Crop Science, 2015, 9(4): 321-336.
- [5] PARKER M B, GASCHO G J, GAINES T P. Chloride toxicity of soybeans grown on Atlantic Coast Flatwoods Soils 1. Agronomy Journal, 1983, 75(3): 439-443.
- [6] WANG F, CHEN H W, LI Q T, WEI W, LI W, ZHANG W K, MA B, BI Y D, LAI Y C, LIU X L, MAN W Q, ZHANG J S, CHEN S Y. *GmWRKY27* interacts with *GmMYB174* to reduce expression of *GmNAC29* for stress tolerance in soybean plants. The Plant journal, 2015, 83(2): 224-236.
- [7] MASARU O T, HIDEAKI S. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an Ethylene-responsive element. The Plant Cell, 1995, 7(2): 173-182.

- [8] PAN Y, SEYMOUR G B, LU C, HU Z L, CHEN X Q, CHEN G P. An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant cell reports*, 2012, 31(2): 349-360.
- [9] ZHAI Y, WANG Y, LI Y J, LEI T T, YAN F, SU L T, LI X W, ZHAO Y, SUN X, LI J W, WANG Q Y. Isolation and molecular characterization of *GmERF7*, a soybean ethylene-response factor that increases salt stress tolerance in tobacco. *Gene*, 2013, 513(1): 174-183.
- [10] WANG H T, NI D Q, SHEN J C, DENG S S, XUAN H D, WANG C C, XU J Y, ZHOU L, GUO N, ZHAO J M, XING H. Genome-wide identification of the *AP2/ERF* gene family and functional analysis of *GmAP2/ERF144* for drought tolerance in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 848766-848766.
- [11] DONG L D, HOU Z H, LI H Y, LI Z B, FANG C, KONG L P, LI Y L, DU H, LI T, WANG L S, HE M L, ZHAO X H, CHENG Q, KONG FAN J, LIU B H. Agronomical selection on loss-of-function of *GIGANTEA* simultaneously facilitates soybean salt tolerance and early maturity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(10): 1866-1882.
- [12] MCCORMACK M L, DICKIE I A, EISSENSTAT D M, FAHEY T J, FERNANDEZ C W, GUO D L, HELMISAARI H S, HOBBIE E A, IVERSEN C M, JACKSON R B, JAANA L K, NORBY R J, PHILLIPS R P, PREGITZER K S, PRITCHARD S G, REWALD B, ZADWORNÝ M. Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *The New phytologist*, 2015, 207(3): 505-518.
- [13] WU Y, LI X, ZHANG J N, ZHAO H Q, TAN S L, XU W H, PAN J Q, YANG F, PI E X. ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1042084-1042084.
- [14] SHEN L, ZHAO E P, LIU R E, YANG X. Transcriptome analysis of eggplant under salt stress: AP2/ERF transcription factor *SmERF1* acts as a positive regulator of salt stress. *Plants*, 2022, 11(17): 2205-2205.
- [15] JOHN F D, BRANDON S G, BRUCE D S. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 2006, 127(7): 1309-1321.
- [16] WANG M, LI W Z, FANG C, XU F, LIU Y C, WANG Z, YANG R, ZHANG M, LIU S L, LU S J, LIN T, TANG J Y, WANG Y Q, WANG H R, LIN H, ZHU B G, CHEN M S, KONG F J, LIU B H, ZENG D L, JACKSON S A, CHU C C, TIAN Z X. Parallel selection on a dormancy gene during domestication of crops from multiple families. *Nature Genetics*, 2018, 50(10): 1435-1441.
- [17] TIAN J G, WANG C L, XIA J L, WU L S, XU G H, WU W H, LI D, QIN W C, HAN X, CHEN Q Y, JIN W W, TIAN F. Teosinte ligule allele narrows plant architecture and enhances high-density maize yields. *Science*, 2019, 365(6454): 658-664.
- [18] 李保国. 新时代下盐碱地改良与利用的科学之路. *中国农业综合开发*, 2022(01): 8-9.
LI B G. The scientific road to the improvement and utilization of saline alkali land in the new era. *Agricultural Comprehensive Development in China*, 2022(01): 8-9.
- [19] 高继平, 林鸿宣. 水稻耐盐机理研究的重要进展——耐盐数量性状基因 *SKC1* 的研究. *生命科学*, 2005(06): 563-565.
GAO J P, LIN H X. Important progress in the study of salt tolerance mechanism in rice: Study on the *SKC1* gene for quantitative salt tolerance traits. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2005(06): 563-565.
- [20] LIAQAT A, ALFATHI A, JAN S U, SUN L Q, ZHAO P X, XIANG C B. Transcription elongation factor *AtSPT4-2* positively modulates salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 49-49.
- [21] 陈筱冉, 张铭笑, 严建萍, 刘燕蓉, 张万军. 紫花苜蓿 *MsCCD4* 基因克隆及耐盐功能鉴定. *草地学报*, 2022, 30(10): 2572-2580.
CHEN X R, ZHANG M X, YAN J P, LIU Y R, ZHANG W J. Cloning and identification of salt tolerance function of Alfalfa *MsCCD4*. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(10): 2572-2580.
- [22] HOU Z H, LI Y L, CHENG Y H, LI W W, LI T, DU H, KONG F J, DONG L D, ZHENG D F, FENG N J, LIU B H, CHENG Q. Genome-wide analysis of *DREB* genes identifies a novel salt tolerance gene in wild soybean (*Glycine soja*). *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 821647-821647.
- [23] GUAN R X, YU L L, LI X X, CHANG R Z, GILLIHAM M, QIU L J. Selection of the Salt Tolerance Gene *GmSALT3* During Six Decades of Soybean Breeding in China. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 794241-794241