



# 大豆耐盐基因研究进展

田艺心, 高凤菊, 曹鹏鹏, 高春华

(德州市农业科学研究院, 山东 德州 253015)

**摘要:**大豆是世界上重要的粮食作物和经济作物, 土地盐碱化造成大豆产量大幅度降低。了解大豆耐盐的遗传和分子机制有助于挖掘盐碱地大豆产量潜力。迄今为止从耐盐大豆种质中已分离筛选出一批耐盐相关基因, 其它植物中分离的耐盐基因有些也已被用于大豆耐盐研究, 研究这些基因一方面可以揭示大豆耐盐机理, 另一方面可以提高大豆耐盐性。为此, 从近几年有关大豆耐盐基因的遗传、挖掘与筛选、分子标记、基因定位与克隆、转化及表达等方面的相关研究结果对大豆盐胁迫耐受相关基因进行了综述, 以期为大豆耐盐相关基因的快速准确定位及耐盐高产新种质的发掘利用提供理论依据。

**关键词:**大豆; 盐碱地; 耐盐基因; 分子标记; QTL 定位

## Recent Developments of Salt Tolerance Gene in Soybean

TIAN Yi-xin, GAO Feng-ju, CAO Peng-peng, GAO Chun-hua

(Dezhou Academy of Agricultural Sciences, Dezhou 253015, China)

**Abstract:** Soybean is an important food and cash crop in the world, but the yield of soybean is substantially reduced by salinity-affected soil. Understanding the genetic and molecular mechanisms of salt tolerance will no doubt facilitate the process of overcoming this problem. So far, a batch of salt-tolerant genes has been separated from soybean germplasm resistant to salt, and some salt-tolerant genes from other plants also have been used for salt tolerance of soybean, the express of these genes improved the ability of salt-tolerance in soybean. The significance of studying these genes is that, on one hand it could improve soybean resistance to salt; on the other hand it could contribute to reveal the mechanisms of soybean salt tolerance. Thus, this paper reviewed these salt-tolerant genes of soybean from the aspects of heredity, gene excavation and screening, molecular markers, QTL mapping, gene cloning, transformation and expression in recent years, aiming to provide theoretical basis for gene mapping accuracy and the wide utilization of new soybean germplasm resistant to salt.

**Keywords:** Soybean; Salt-alkali soil; Salt-tolerant genes; Molecular marker; QTL mapping

大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 是世界上重要的粮食作物和经济作物, 因其富含高蛋白质、不饱和脂肪酸和异黄酮、皂苷等多种有益生物活性物质, 在国内外市场一直备受青睐。早在 2013 年, 全世界大豆油消费量已占世界植物油总消费量的 1/3, 全世界对大豆需求迫切增加<sup>[1]</sup>。由于栽培大豆属于中性耐盐植物, 土壤盐含量超过  $5 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$  时, 大豆生长就会受到严重损害, 土地盐碱化严重威胁着大豆生产<sup>[2]</sup>。目前我国盐碱地面积已高达约 4 000 万  $\text{hm}^2$ , 且逐年增加, 耕地面积日益减少, 对我国资源环境产生巨大压力, 开发利用好盐碱地, 提高盐碱地大豆产量和质量对我国乃至世界大豆产业均具有重要意义。

盐碱化是世界范围内植物的主要非生物胁迫形式, 目前在大豆方面主要致力于研究大豆耐盐碱

性, 培育耐盐碱大豆品种、增强大豆抗盐碱性。中国地域辽阔, 地理生态差异较大, 不同大豆品种间存在较大的耐盐性差异, 耐盐大豆种质中存在一些优异等位变异, 因此借助基因工程技术将耐盐大豆优良性状等聚合, 可培育耐盐高产大豆品种。国内外学者对此研究较多, 主要针对逆境胁迫下特异表达的某些基因。迄今为止从耐盐大豆种质中已筛选出一批耐盐相关基因, 其它植物中分离的耐盐基因有些也已被用于大豆耐盐研究。研究这些基因一方面可以提高大豆耐盐性, 另一方面可通过揭示这些基因在大豆耐盐过程中所起的作用阐明大豆的耐盐机理。本文从大豆耐盐基因的遗传、挖掘与筛选、基因定位与克隆、转化及表达等方面对近几年大豆盐胁迫耐受相关基因进行综述, 以期为大豆耐盐相关基因的快速准确定位及耐盐高产新种质

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 山东省重点研发计划 (重大关键技术) (2016ZDJS10A03); 山东省现代农业产业技术体系杂粮创新团队建设项目 (SDAIT-5-01)。

第一作者简介: 田艺心 (1986 -), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事种子科学、大豆栽培育种等研究。E-mail: tyxin213@sina.com。

通讯作者: 高凤菊 (1969 -), 女, 硕士, 推广研究员, 主要从事大豆及杂粮杂豆的栽培育种研究。E-mail: gfg1970@126.com。

的发掘利用提供理论依据。

1 大豆耐盐基因的遗传模式

1.1 单基因控制的遗传模式

为了探索大豆耐盐性状的遗传特性,早在 1969 年,Abel 等<sup>[3]</sup>将不同耐盐性大豆亲本进行杂交,发现 F<sub>2</sub>代中,耐盐植株与非耐盐植株分离比表现为 3:1,测交结果分离比为 1:1;并且盐敏感品种含较高 Cl<sup>-1</sup>,耐盐品种含较低 Cl<sup>-1</sup>,说明大豆耐盐性状可能由几个主要的位点控制,推测其由 1 个显性基因 *Ncl* 和一个隐性基因 *ncl* 控制。邵桂花等<sup>[4]</sup>配制几个大豆耐盐品种与盐敏感品种杂交组合,发现 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 和 F<sub>3</sub>代中,耐盐植株之间组合均为耐盐;盐敏感植株之间组合均为盐敏感;耐盐植株和盐敏感植株组合, F<sub>1</sub> 代为耐盐, F<sub>2</sub> 代耐盐植株与盐敏感植株分离比为 3:1, F<sub>3</sub>代品系纯合耐盐株系和耐盐株系分离比例为 1:2。这些结果均表明大豆的耐盐性可能是受 1 对核基因控制,其中耐盐表现为显性,盐敏感表现为隐性。

1.2 多基因控制的遗传模式

2004 年,罗庆云等<sup>[5]</sup>选取栽培大豆耐盐品种南农 1138-2、较耐盐品种南农 88-31、盐敏感品种 Jackson 分别进行两两杂交组合,对亲本 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 及世代 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 和 F<sub>2:3</sub> 苗期的植株分别进行了耐盐性调查,其遗传数据及遗传规律的分析采用主基因 + 多基因混合遗传模型联合进行,结果发现较耐盐品种南农 88-31 × 盐敏感品种 Jackson 和耐盐品种南农 1138-2 × 较耐盐南农 88-31 杂交组合后代植株的耐盐性遗传符合加性 - 显性 - 上位性多基因遗传模式,不存

在主基因效应。从 F<sub>2</sub> 估计,南农 88-31 × Jackson 组合耐盐微效基因遗传力很低,南农 1138-2 × 南农 88-31 组合耐盐微效基因遗传力为 7.4%。从 F<sub>2:3</sub> 估计,南农 88-31 × 南农 1138-2 组合耐盐微效基因遗传力为 67.47%,南农 88-31 × Jackson 组合的耐盐微效基因遗传力为 82.13%,这说明 F<sub>2:3</sub> 选择耐盐植株的效率高于 F<sub>2</sub>,在高世代选择耐盐性植株较好。

2 大豆耐盐基因的挖掘与筛选

2.1 大豆耐盐基因的挖掘

在盐胁迫条件下,植物抗盐机制的关键途径就是建立体内离子动态平衡,即维持相对稳定的 Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> 比率环境,因此大豆耐盐基因的挖掘主要在参与建立植株离子动态平衡的基因方面进行研究。近几年,一些参与大豆细胞 Na<sup>+</sup> 或 K<sup>+</sup> 转运的基因被陆续发现,包括 *GmNHX1*<sup>[6-7]</sup>、*GmNHX2*<sup>[8]</sup>、*GmNHX3*<sup>[9]</sup>、*GmSOS1*<sup>[10]</sup>、*GmHKT1*、4<sup>[11]</sup>、*GmHKT6*、2<sup>[12]</sup>、*GmCAX1*<sup>[13]</sup>、*GmCHX1*<sup>[14]</sup>、*GmSALT3*<sup>[15]</sup> 等,这些基因在大豆耐盐性的提高中起着重要作用。另外,植物应对盐胁迫的重要途径之一是信号转导的胁迫应答途径,因此对参与胁迫应答途径的基因进行研究是耐盐基因发掘的主要途径之一,研究发现,植物盐胁迫应答基因直接或间接接受 ABA 和 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 信号转导途径中的转录因子调控<sup>[16]</sup> (图 1)。目前,在大豆中已克隆得到一些耐盐相关转录因子编码基因,包括 *GmDREBs*<sup>[17]</sup>、*GmbZIPs*<sup>[18]</sup>、*GmMYBs*<sup>[19]</sup>、*GmNACs*<sup>[20]</sup>、*GmERFs*<sup>[21]</sup>、*GmPHDs*<sup>[22]</sup>、*GmGBPs*<sup>[23]</sup> 和 *GmWRKYs*<sup>[24]</sup> 等。

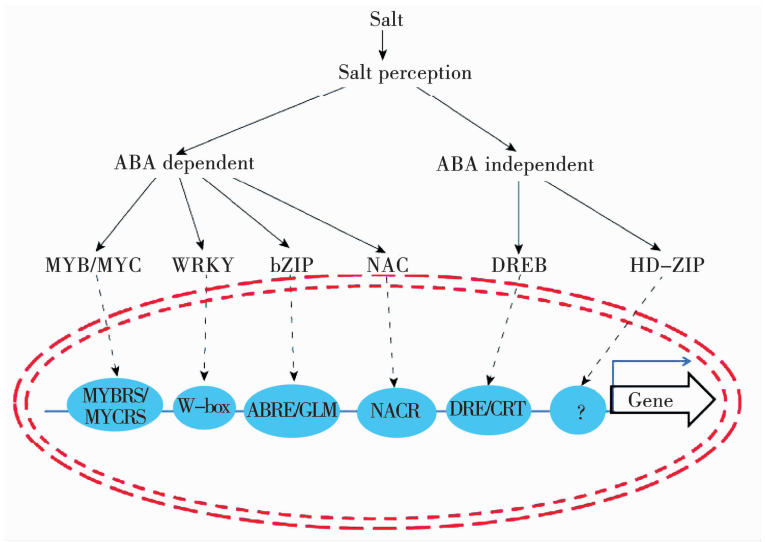


图 1 耐盐相关转录因子调控网络 (引自王楠等<sup>[16]</sup>, 2016)

Fig. 1 Regulatory net of salt stress tolerance related transcription factors  
(From Wang, et al. <sup>[16]</sup>, 2016)

另外,参与大豆盐胁迫的一些其它基因也被发现。有研究者分别将大豆 *Em* (*LEA1*) 和 *PM2* (*LEA3*) 转化进大肠杆菌和烟草,发现转化植株耐盐性显著提高<sup>[25-26]</sup>。有研究发现丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶基因 *GmWINK1* 参与调控侧根发育,可通过调节内源 ABA 含量而增加转基因拟南芥耐盐渗透胁迫<sup>[27]</sup>;谷胱甘肽-硫-转移酶蛋白基因 *GsGST* 在烟草中过表达,可提高植株盐、旱耐受性<sup>[28]</sup>;大豆 cDNA 全长库的泛素缀合酶基因 *GmUBC2* 在转基因植株中过表达,提高了超氧化物歧化酶铜离子伴侣蛋白基因 *AtCCS*、脯氨酸合成关键基因 *AtP5CS*、离子反转运蛋白基因 *AtNHX*、*AtCLCa* 的表达,增加了拟南芥对盐、旱耐受性<sup>[29]</sup>; *GmPIPI1*;6 基因可提高大豆植株盐胁迫耐受性<sup>[30]</sup>。

## 2.2 大豆耐盐基因的筛选

分离关键耐盐基因的研究通常利用酵母或大肠杆菌表达体系,采取筛选盐敏感突变株、植株组织器官特异表达的 mRNA 及功能进行鉴定和筛选。孙海丹<sup>[31]</sup>利用高盐筛选法和 PCR 鉴定,将耐盐大豆未成熟种子的 cDNA 文库转化大肠杆菌,从筛选出的重组耐盐候选菌株中分离出重组质粒,经重新转化大肠杆菌,筛选出 2 个耐盐性强的相关基因片段 *XLOR/PBK-GmA3* 和 *XLOR/PBK-GmA5*。另外,基因表达谱芯片 (gene expression profiling) 可以高通量地分析基因表达量,挖掘关键基因,阐述代谢途径,利用芯片筛选基因也是目前相关领域研究的热点。吴振敏等<sup>[32]</sup>将抗盐碱野生大豆与大豆基因组芯片杂交,获得 5 573 个耐盐碱大豆候选基因,并且获得的基因 *SRC2* 均通过定量 PCR 和 Northern 杂交印证。

## 3 大豆耐盐基因的分子标记

分子标记技术具有标记位点多、鉴定准确、多态性高等优点,且不受环境条件影响,已被广泛应用到盐胁迫相关研究过程中。目前在大豆耐盐中常用的分子标记为 RAPD (random amplification of polymorphic DNA) 和 SSR (simple sequence repeats) 标记。

### 3.1 RAPD 标记

RAPD 又称任意引物 PCR,以一系列随机引物对基因组进行检测,因而能检测多个基因位点,覆盖面比较大,并且引物越多,覆盖面越广,遗传信息也越多。在 20 世纪 90 年代初就被广泛应用于品种鉴定及标记。

王洪新等<sup>[33]</sup>发现黄河三角洲野生大豆盐渍群体具有超高耐盐性,个体间耐盐性差异也较大,并

且群体中的高耐盐植株均存在特定的 RAPD 位点,这表明野生大豆群体通过高水平的发育变通性及遗传多样性来适应多变的盐渍环境。Zhong 等<sup>[34]</sup>对耐盐品种 Morgan 和 Wenfeng 7 进行 RAPD 鉴定,获得特异多态性位点 8-27/240 bp DNA,对其片段克隆测序,结果表明该段序列在耐盐基因转录表达中起着重要的作用。郭蓓等<sup>[35]</sup>通过对耐盐大豆品种、敏感大豆品种、耐盐大豆品种 × 敏感大豆品种组合的 F<sub>2</sub> 群体进行鉴定,获得 1 个共显性 PCR 标记,经证实发现该标记片段紧密连锁大豆耐盐基因位点,进一步利用该标记对国家作物种质库 59 份耐盐和盐敏感种质进行鉴定,鉴定结果与田间耐盐表现一致,说明该 RAPD 标记可靠性较高,可应用于耐盐大豆遗传育种及种质鉴定。

### 3.2 SSR 标记

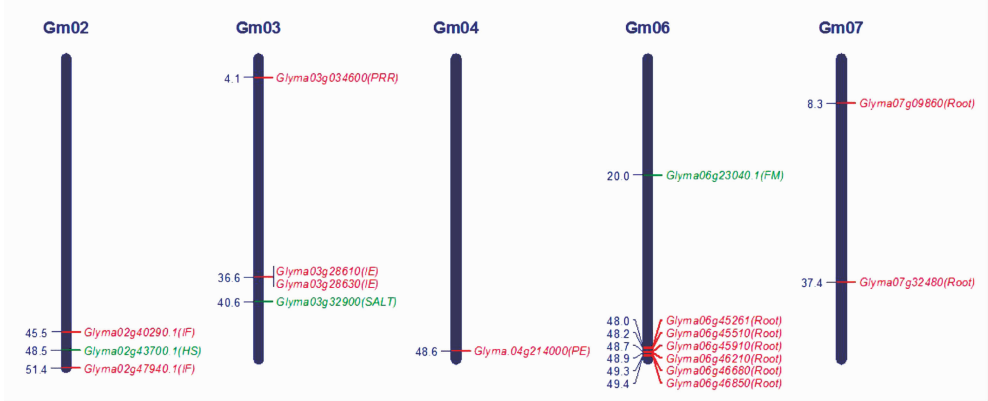
SSR 标记是以核苷酸为单位串联重复的核苷酸序列。SSR 变异位点广泛、多态性丰富、稳定性较好、成本较低,目前在遗传图谱构建及分子标记辅助育种等方面广泛应用。

郭宝生等<sup>[36]</sup>利用 232 对 SSR 引物扩增在 3 个连锁群上发现 3 个差异区段,筛选出 5 个差异位点,利用筛选到的 5 对 SSR 引物对大豆群体 DNA 进行扩增,发现大豆中野 1 号是由同一杂交组合的高代品系姊妹株繁育而成,且姊妹株耐盐性差异与其连锁群上的差异位点有关,这些差异位点分别是连锁群 BZ 上 *Satt601* 到 *Satt556* 之间的 *Satt318* 和 *Set094*;连锁群 DZ 上 *Satt301* 到 *Satt031* 之间的 *Sattl86* 和 *Satt310*;连锁群 N 上 *Sat091* 到 *Satt022* 之间的 *Satt257*,从而揭示了群体内单株间耐盐性差异的遗传因素。张海燕等<sup>[37]</sup>筛选到 10 个与大豆耐盐基因连锁的 SSR 标记,发现大豆耐盐基因定位于 N 连锁群的 *Satt339* 与 *Sat304* 之间,为分子标记辅助选择育种提供了条件。田蕾等<sup>[38]</sup>用 6 对 SSR 引物对 55 份耐盐和 90 份盐敏感种质资源进行检测,得到了 2 两个耐盐种质类群和 3 个盐敏感种质类群,共检测到 106 个等位变异,其中耐盐种质特有等位变异数 16 个,盐敏感种质特有等位变异数 26 个,为下一步耐盐基因的精细定位提供可靠的遗传材料。李兆南等<sup>[39]</sup>通过对大豆种质资源 68 个 SSR 位点分析发现,与耐盐性相关联的位点为 3 个,分别为 *Satt045*、*Satt168*、*Satt557*,其中耐盐性表型解释率最高的位点是 *Satt577*,其次为 *Satt045*;将表型效应最大的等位变异 *Satt168-A38* 与 *Satt045-A124* 进行杂交重组,可聚合多个有利等位变异,培育出更高耐盐性的新品种。

4 大豆耐盐基因的 QTL 定位

近年来,国内外应用定位克隆 (positional cloning) 和全基因组关联技术 (genome-wide association

study, GWAS),通过连锁分析对大豆耐盐相关基因进行了广泛的数量性状位点 (quantitative trait locus, QTL) 定位研究,发现大豆耐盐相关基因主要定位在 3 号染色体上<sup>[40]</sup> (图 2)。



绿色标记表示特征基因,红色标记表示重要候选基因。IF:大豆异黄酮含量;HS:硬实种子;PRR:大豆疫霉根腐病;IE:铁效率;SALT:耐盐性;PE:磷效率;FM:开花和成熟;Root 表示根部耐旱性状。  
Characterized genes are code in green colour and important candidate genes are coded in red colour.  
IF: Isoflavone content; HS: Hard-seededness; PRR: Phytophthora root rot; IE: Iron efficiency; SALT: Salt tolerance; PE: Phosphorous efficiency; FM: Flowering and maturity; Root: Root traits for drought toleatance.

图2 大豆数量性状下特异基因和重要候选基因定位(引自 kumawat 等<sup>[40]</sup>,2016)  
Fig. 2 Map positions (Mbp) of characterized genes and important candidate genes underlying quantitative traits in soybean (From kumawat, et al. <sup>[40]</sup>,2016)

Lee 等<sup>[41]</sup>对耐盐大豆品种 S-100 与盐敏感品种 Tokyo 杂交后衍生的重组自交系 (RILs) F<sub>2:5</sub> 应用 RFLP 技术进行 QTL 定位分析,在 N 连锁群 *Sat\_091* 附近定位一个与耐盐相关的 QTL。Hamwieh 等<sup>[42]</sup>对大豆耐盐品种 JWS156-1 和盐敏感品种 Jackson-PI548657 杂交获得的 225 个 F<sub>2</sub> RILs 进行盐胁迫,发现在大豆 N 连锁群上对耐盐起主效作用的 QTL 占耐盐总变异的 68.7%;耐盐品系 JindouNo.6 与盐敏感品系 0197 杂交获得的 81 个 F<sub>6</sub> 代 RILs,对耐盐起主效作用的 QTL 占耐盐总变异的 47.1%;耐盐品系 FT-Ab-yara9 与盐敏感品系 C01 杂交获得的 96 个 F<sub>7</sub> 代 RILs,对耐盐起主效作用的 QTL 占耐盐总变异的 44.0%,其中 3 个 RILs 中耐盐位点为杂合,杂合体自交获得的 3 个近等基因系中含 *FTAbyara* 染色体片段的单株表现出较强的耐盐性。向东等<sup>[43]</sup>通过遗传基因组学分析,将大豆耐盐主效 QTL 定位于 3 号染色体的 39.69 ~ 44.06 Mbp 区间,利用 Softberry 预测出该区段包含约 746 个 ORF;由 BLAST 对所有 ORF 进行功能分析,发现该区段包含 19 个耐盐相关基因。利用实时荧光定量 PCR 对这 19 个候选基因进行时空表达模式分析,发现盐胁迫后有 4 个候选基因变化明显:4-442 在根和叶中表达均显著上调,7-31、17-641、19-737 等候选基因在根中表达显著上调,而在叶中表达显著下调,这为下一步耐盐基因功能验证奠定了基础。陈华涛等<sup>[44]</sup>对科丰 1

号和南农 1138-2 的重组自交系群体 NJRIKY 进行苗期耐盐 QTL 定位分析,检测到 3 个耐盐 QTL,分别位于 B1、G 和 K 3 个连锁群上,分别解释 8.4%、17.9% 和 11.3% 的表型变异。闫玮雯等<sup>[45]</sup>对冀豆 12 和冀 nf58 的重组自交系群体株系进行耐盐 QTL 定位,以耐盐性为指标检测到一个位于 N 连锁群上标记 *Sat\_285* 和 *Satt660* 之间的主效耐盐 QTL,贡献率为 30.0%;以 SPAD 值为指标检测到一个位于 N 连锁群上标记 *Satt312* 和 *Sat\_091* 之间的耐盐 QTL,贡献率为 18.1%。两个性状均在 N 连锁群上检测到一个 QTL,结果具有较好的一致性。杨燕等<sup>[46]</sup>对包含 427 个家系的重组自交系群体 NJRIKY (科丰 1 号 × 南农 1138-2) 进行苗期耐盐 QTL 定位,以相对根长 (RRL) 及相对干重 (RDW) 作为耐盐指标共检测到 16 个与幼苗期耐盐性相关的加性 QTL 定位点,可解释的总遗传率为 25.8%;以相对根长 (RRL) 为指标共检测到 4 对上位性互作 QTL,且这些互作的 5 个 QTL (有 3 对重复的) 均在 QTL 位点中检测到;通过 QTL 定位预测到 81 个基因,其中 51 个基因在科丰 1 号和南农 1138-2 存在 SNP/Indel 差异。通过功能注释及半定量相关实验,确定 2 个耐盐应答基因,分别为 *GmRP123* 和 *GmARK*。Ha 等<sup>[47]</sup>发现野生大豆品种 PI4-83463 与 Hutcheson 杂交获得的 106 个 RILs,其 F<sub>2:6</sub> 连锁群上与耐盐相关的 QTL 基因定位在 3 号染色体上,*Satt255* 与 *BARC-*

038333-10036 之间。Guan 等<sup>[48]</sup>利用 Tiefeng8 与 85-140 杂交衍生的 367 个重组自交系在  $F_{2:3}$  连锁群上检测到耐盐相关的基因 *GmSALT3*, 该基因定位在大豆基因组的 3 号染色体上, 编码阳离子/质子转运体, *GmSALT3* 定位在细胞内的内质网, 主要在根中表达。

## 5 大豆耐盐基因的克隆

对在多个环境下稳定表达的主效耐盐 QTL 精细定位后进行基因克隆, 可获得耐盐基因。李莹等<sup>[49]</sup>应用电子克隆技术和同源克隆技术分别在耐盐野生大豆中共克隆了 6 个 DREB 类转录因子基因, 分别命名为 *GsDREB1*、*GsDREB2*、*GsDREB3*、*GsDREBa*、*GsDREBb*、*GsDREBc*, 这些基因均含有 AP2 结构域, 且经 SMART 和 InterProScan 预测表明, *GsDREB1* 与 *GmDREB1*、*GsDREB2* 与 *GmDREB2*、*GsDREB3* 与 *GmDREB3*、*GsDREBa* 与 *GmDREBa*、*GsDREBb* 与 *GmDREBb*、*GsDREBc* 与 *GmDREBc* 基因序列相似性分别达到 99.71%、95.60%、100%、93.08%、97.44%、99.33%。马强等<sup>[50]</sup>应用 RT-PCR 扩增技术, 将角碱蓬耐盐基因 *SeNHX1* 进行了克隆, 所得序列与 GenBank 中的基本一致, 含有所必须的功能区域, 同时构建了植物表达载体 pBIGF-PSeNHX1。刘晓丽等<sup>[51]</sup>对 *GmSLT* 克隆并导入酿酒酵母 W303-1A 中异源过量表达, 发现 W303-1A 的氯化钠耐受性提高了 5 倍, 证明 *GmSLT* 的功能与耐盐相关。曹凌雪等<sup>[52]</sup>对大豆盐胁迫表达相关基因 *GmDREB1D* 和 *GmRF* 进行了克隆及拟南芥表达, 发现 *GmDREB1D* 和 *GmRF* 对盐、干旱、冷都有一定的响应, 推测此类基因广泛参与激素及非生物信号传导和调控过程。罗晓等<sup>[53]</sup>应用同源克隆技术从野生大豆中克隆得到 *GsZFP1* 基因, 生物信息学分析表明该基因锌指结构受碱胁迫诱导表达, 具有潜在的抗盐碱功能, 是野生大豆中首次被发现的不含 *QALGGH motif C2H2* 类型的锌指蛋白新基因。朱丹等<sup>[54]</sup>以耐盐碱野生大豆为材料, 采用同源克隆方法和 RT-PCR 技术获得一个 TIFY 类基因的全长 cDNA (命名为 *GsTIFY11b*), 分析表明 *GsTIFY11b* 可以调控 *RD29B*、*KIN1*、*DREB* 等基因的转录, 可调控盐胁迫信号通路中的关键基因的表达, 进而改变植物耐盐性。

## 6 大豆耐盐转基因研究

通过基因工程的方法可获得耐盐性较高大豆株系。刘晓丽等<sup>[55]</sup>首次将角碱蓬耐盐基因 *SeNHX1* 通过根瘤农杆菌介导转入大豆, 获得高耐盐抗性大

豆植株。Cao 等<sup>[56]</sup>将小麦 *TaNHX2* 基因导入大豆中获得了耐盐性较高的转基因大豆株系。Liu 等<sup>[57]</sup>发现过表达盐芥 *ThIPK2* 基因的大豆株系叶片耐盐性均比野生型大豆株系要高。Subramanyam 等<sup>[58]</sup>获得的转 *Tbosm* 基因大豆株系在高盐胁迫下均能正常开花结荚。于崧等<sup>[59]</sup>将甜菜碱醛脱氢酶 (*BADH*) 基因导入栽培大豆黑农, 培育得到的转基因大豆能够在盐碱土壤中生长正常。曹甜甜等<sup>[60]</sup>将碱菀 *TvNHX1* 基因转入大豆, 对转基因大豆  $T_5$  代种子进行盐碱胁迫, 植株体内离子平衡, 该基因对植株抗盐碱起到很好的效果。另外, 通过耐盐性转基因大豆株系也可通过胁迫相关转录因子的过表达获得。大豆中拟南芥 *AtMYB44*<sup>[61]</sup>、水稻 *OsDREB2A*<sup>[62]</sup> 和大豆 *GmWRKY111*<sup>[63]</sup> 的过表达均能提高转基因植株的耐盐性。王玥等<sup>[64]</sup>将碱蓬 *SsNHX1* 基因 ( $Na^+/H^+$  逆向转运蛋白基因) 利用农杆菌介导转入大豆胚尖可有效提高大豆植株的耐盐性。林抗雪等<sup>[65]</sup>研究表明, 转 *TaNHX2* 基因 (小麦  $Na^+/H^+$  转运蛋白编码基因) 大豆株系盐害程度较低, 光合作用受盐胁迫影响较小, 株高、单株荚数、单株粒数、单株粒重和产量明显高于野生型大豆。

## 7 结 语

中国大豆种质资源丰富, 已筛选出大批较高耐盐性种质。利用这些种质, 一方面可以进行耐盐基因克隆及功能分析方面的研究, 加快开展大豆耐盐机制的解析; 另一方面, 可将这些耐盐品种作为中间材料或耐盐基因的直接供体, 借助基因工程等分子育种手段, 将耐盐基因导入到具有应用价值的推广品种中, 育成综合性状优良的新品种 (系), 这对于大豆生产具有重要意义。

大豆耐盐机制非常复杂, 耐盐性状属于多基因控制的数量性状。虽然研究者们对其已进行了大量研究, 但到目前为止, 大豆抗盐机制中的重要问题仍未解决, 如大豆耐盐的分子机理并不是十分清楚; 抗盐关键因子仍未找到; 耐盐基因转化植株其抗盐表达有限, 离生产应用还有一定距离。对于耐盐生物工程研究而言, 获得关键的耐盐基因尤为重要, 因此, 大豆耐盐性还需进行多方面综合、系统的研究。

目前, 大豆耐盐相关的 QTL 定位工作刚刚起步, 不同大豆群体、定位指标及方法通过耐盐 QTL 定位亟待发掘。2010 年第一个栽培大豆基因组组装公布, 以及大豆基因组测序工作的完成成为大豆耐盐 QTL 提供了丰富的分子基础<sup>[66]</sup>。另外, 在大豆耐盐分子标记辅助育种中, 对基因与基因、基因与

环境之间的互作等也应加以考虑;同时也应采用不同的研究材料对同一定位区间进行功能验证研究,以提高育种辅助选择中所用标记的准确性及可靠性。2014年,Deshmukh等<sup>[67]</sup>描述了大豆耐逆研究的组学应用及工具,为大豆耐盐机理的深入分析提供了快捷有效的手段。随着功能基因组学的开展,利用cDNA微列阵、cDNA芯片、蛋白组技术、基因转座子标签和T2DNA标签的反向遗传学技术等,可以对大量的基因进行全面系统地分析,通过这些技术获得大豆关键耐盐基因,提高大豆耐盐性,必将具有广泛的实际应用前景。

参考文献

[1] American Soybean Association, 2014 [EB/OL]. <http://soys-tats.com>.

[2] Ashraf M, Wu L. Breeding for salinity tolerance in plants [J]. Critical Reviews in Plant Science, 1994,13(1): 17-42.

[3] Abel G H. Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybeans [J]. Crop Science, 1969, 9(6): 697- 698.

[4] 邵桂花,常汝镇,陈一舞. 大豆耐盐性遗传的研究[J]. 作物学报,1994. 20(6):721-726. (Shao G H, Chang R Z, Chen Y W. Study on inheritance of salt tolerance in soybean [J]. Acta Agonomica Sinica, 1994,20(6):721-726. )

[5] 罗庆云,於丙军,刘友良,等.栽培大豆耐盐性的主基因+多基因混合遗传分析[J]. 大豆科学,2004, 23(4):239-244. (Luo Q Y, Yu B J, Liu Y L, et al. The mixed inheritance analysis of salt tolerance in cultivars of *Glycine max* [J]. Soybean Science, 2004, 23(4):239-244. )

[6] 范龙,孙天杰,杨郡,等. 大豆 *GmNHX1* 基因克隆及其在酵母中的耐盐性分析[J]. 河北农业大学学报,2015,38(6):8-12, 24. (Fan L, Sun T J, Yang J, et al. Cloning and functional characterization of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene (*GmNHX1*) from soybean [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2015,38(6):8-12, 24. )

[7] 唐晓飞,董兴月,魏嵘,等. 转大豆 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白 *GmNHX1* 基因植株的获得[J]. 分子植物育种,2016,14(4): 904-909. (Tang X F, Dong X Y, Wei L, et al. Obtaining transgenic soybean plants with Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (*GmNHX1*) [J]. Molecular Plant Breeding, 2016,14(4):904-909. )

[8] 周国安,关荣霞,李英慧,等. 异源表达一个大豆 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因 *GmNHX2* 提高拟南芥的耐盐性[J]. 科学通报, 2009,54(17):2508-2516. (Zhou G A, Guan R X, Li Y H, et al. Molecular characterization of *GmNHX2*, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene homolog from soybean, and its heterogenous expression to improve salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(17):2508-2516. )

[9] 张继星,王晓宇,陈永胜,等. 大豆 *GmNHX3* 基因克隆及遗传转化载体的构建[J]. 吉林大学学报,2012,50(2): 365-370. (Zhang J X, Wang X Y, Chen Y S, et al. Cloning of *GmNHX3* gene from *Glycine max* L Merr and construction of its genetic transformation vector [J]. Journal of Jilin University ( Science Edi-

tion), 2012, 50(2):365-370. )

[10] Phang T H, Shao G, Lam H M. Salt tolerance in soybean [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(10): 1196-1212.

[11] Chen H, Chen X, Gu H P, et al. *GmHKT1;4*, a novel soybean gene regulating Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio in roots enhances salt tolerance in transgenic plants [J]. Plant Growth Regulation, 2014, 73(3): 299-308.

[12] 陈华涛,陈新,顾和平,等. 大豆 *GmHKT6;2* 基因的克隆与表达特性分析[J]. 华北农学报,2012, 27(3):1-5. (Chen H T, Chen X, Gu H P, et al. Cloning and expression pattern analysis of *GmHKT6; 2* in soybean [J]. Acta Agriculturae Boreali Sinica, 2012, 27(3):1-5. )

[13] Luo G Z, Wang H W, Huang J, et al. A putative plasma membrane cation/proton antiporter from soybean confers salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59(5): 809-820.

[14] Qi X P, Li M W, Xie M, et al. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole genome sequencing [J]. Nature Communications, 2014, 5:43-49.

[15] Guan R X, Qu Y, Guo Y, et al. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in *GmSALT3* [J]. The Plant Journal, 2014, 80(6): 937-950.

[16] 王楠,赵士振,吴孟华,等. 大豆耐盐相关 QTLs 鉴定和功能基因研究进展[J]. 遗传,2016,38(11):992-1003. (Wang N, Zhao S Z, Wu M H, et al. Research progress on identification of QTLs and functional genes involved in salt tolerance in soybean [J]. Hereditas, 2016, 38(11):992-1003. )

[17] Jin T C, Chang Q, Li W F, et al. Stress inducible expression of *GmDREB1* conferred salt tolerance in transgenic alfalfa [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 100(2): 219-227.

[18] Xu Z L, Ali Z, Xu L, et al. The nuclear protein *GmbZIP110* has transcription activation activity and plays important roles in the response to salinity stress in soybean [J]. Science Report, 2016, 6: 20366.

[19] Rao S S, Habbak M H, Havens W M, et al. Over expression of *GmCaM4* in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress [J]. Molecular Plant Pathology, 2014, 15(2): 145-160.

[20] Quach T N, Tran L S P, Valliyodan B, et al. Functional analysis of water stress responsive soybean *GmNAC003* and *GmNAC004* transcription factors in lateral root development in *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84886.

[21] Zhai Y, Wang Y, Li Y J, et al. Isolation and molecular characterization of *GmERF7*, a soybean ethylene response factor that increases salt stress tolerance in tobacco [J]. Gene, 2013, 513(1): 174-183.

[22] Wei W, Huang J, Hao Y J, et al. Soybean *GmPHD* type transcription regulators improve stress tolerance in transgenic arabidopsis plants [J]. PLoS One, 2009, 4(9): 201-209.

[23] Zhang Y W, Zhao L, Li H Y, et al. *GmGBPI*, a homolog of human ski interacting protein in soybean, regulates flowering and stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13: 21.

[24] Wang F, Chen H W, Li Q T, et al. *GmWRKY27* interacts with *GmMYB174* to reduce expression of *GmNAC29* for stress tolerance



- in soybean plants [J]. *Plant Journal*, 2015, 83(2): 224-236.
- [25] 蔡丹,郑易之,兰英. 大豆 LEA 蛋白 Em 的表达可提高大肠杆菌和烟草耐盐性[J]. *深圳大学学报(理工版)*, 2006, 23(3): 230-236. (Cai D, Zheng Y Z, Lan Y. Expression of *Em* gene (*LEA*) from soybean immature seeds confers salt tolerance to *Escherichia coli* and tobacco plants [J]. *Journal of Shenzhen University (Science and Engineering)*, 2006, 23(3): 230-236.)
- [26] 刘昀,李冉辉,郑易之,等. 大豆 PM<sub>2</sub> 蛋白及其结构域可提高烟草耐盐性[J]. *深圳大学学报(理工版)*, 2007, 24(1): 95-101. (Liu Y, Li R H, Zheng Y Z, et al. Soybean PM<sub>2</sub> protein and its 22-mer region enhance salt tolerance of tobacco plants [J]. *Journal of Shenzhen University (Science and Engineering)*, 2007, 24(1): 95-101.)
- [27] Wang Y X, Suo H C, Zheng Y, et al. The soybean root specific protein kinase GmWNK1 regulates stress responsive ABA signaling on the root system architecture [J]. *Plant Journal*, 2010, 64(2): 230-242.
- [28] Ji W, Zhu Y M, Li Y, et al. Over expression of a glutathione S transfer gene, *GsGST*, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco [J]. *Biotechnology Letter*, 2010, 32(8): 1173-1179.
- [29] Zhou G A, Chang R Z, Qiu L J. Over expression of soybean ubiquity conjugating enzyme gene *GmUBC2* confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress responsive gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72(4-5): 357-367.
- [30] Zhou L, Wang C, Liu R F, et al. Constitutive over expression of soybean plasma membrane intrinsic protein GmPIP1; 6 confers salt tolerance [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 181.
- [31] 孙海丹. 大豆耐盐相关基因 *GmA3* 和 *GmA5* 的筛选及其功能鉴定 [D]. 长春: 东北师范大学, 2004. (Sun H D. Isolation and functional identification of salt tolerance related-genes *GmA3* and *GmA5* from soybean [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2004.)
- [32] 吴振敏. 利用基因芯片技术筛选野生大豆耐盐碱基因及功能研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2008. (Wu Z M. Screening and function identification of the genes response to alkaline stress in soja by DNA chip [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2008.)
- [33] 王洪新,胡志昂,钟敏,等. 盐渍条件下野大豆群体的遗传分化和生理适应:同工酶和随机扩增多态 DNA 研究[J]. *植物学报*, 1997, 39(1): 34-42. (Wang H X, Hu Z A, Zhong M, et al. Genetic differentiation and physiological adaptation of wild soybean (*Glycine Soja*) populations under saline conditions: Isozymatic and random amplified polymorphic DNA study [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1997, 39(1): 34-42.)
- [34] Zhong M, Hu Z A, Gressh P M. Search for molecular markers of salt tolerance of soybean by DNA amplification finger printing [J]. *Soybean Genetics Newsletter*, 1997, 24: 81-82.
- [35] 郭蓓,邱丽娟,邵桂花,等. 大豆耐盐基因的 PCR 标记[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(1): 10-16. (Guo B, Qiu L J, Shao G H, et al. Tagging salt tolerant gene using PCR markers in soybean [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33(1): 10-16.)
- [36] 郭宝生. 中野 1 号大豆耐盐生理及遗传差异分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2004. (Guo B S. Physiology and genetic diversity analysis of salt-tolerance in soybean cultivar Zhongye 1 [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2004.)
- [37] 张海燕. 大豆耐盐基因定位及耐盐相关基因分子标记的开发 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2005. (Zhang H Y. Mapping the salt tolerant gene and development of salt tolerant gene markers in soybean [D]. Urumchi: Xinjiang Agricultural University, 2005.)
- [38] 田蕾. 大豆耐盐基因定位及耐盐种质资源分子标记选择效率分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2008. (Tian L. Mapping of salt tolerance gene and marker assisted selection analysis of soybean germolasm [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2008.)
- [39] 李兆南. 大豆抗旱、耐盐性鉴定及其与 SSR 标记的关联分析 [D]. 长春: 吉林大学, 2011. (Li Z N. Association analysis of genotyping data uncovered strong relationship between draught, salt tolerance identification in collected soybean (*Glycine max*) cultivars and selected SSR makers [D]. Changchun: Jilin University, 2011.)
- [40] Kumawat G, Gupta S, Ratnaparkhe M B, et al. QTLomics in soybean: A way forward for translational genomics and breeding [J]. *Front Plant Science*, 2016, 7: 1-26.
- [41] Lee G J, Boerma H R, Villagarcia M R, et al. A major QTL conditioning salt tolerance in S100 soybean and descendent cultivars [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(8): 1610-1619.
- [42] Hamwieh A, Tuyen D D, Cong H, et al. Identification and validation of a major QTL for salt tolerance in soybean [J]. *Euphytica*, 2011, 179(3): 451-459.
- [43] 向东. 大豆耐盐主效 QTL 相关基因的遗传基因组学研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2010. (Xiang D. Study on candidate genes of a major QTL for salt tolerance by genetical genomics in soybean (*Glycine max*) [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2010.)
- [44] 陈华涛,陈新,喻德跃. 大豆苗期耐盐性的遗传及 QTL 定位分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(3): 231-234. (Chen H T, Chen X, Yu D Y. Inheritance analysis and mapping quantitative trait loci (QTLs) associated with salt tolerance during seedling growth in soybean [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2011, 33(3): 231-234.)
- [45] 闫玮雯. 大豆耐盐 QTL 定位及耐盐相关基因克隆 [D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2012. (Yan W W. QTL mapping and related gene cloning for salt tolerance in soybean [D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University Of Science & Technology, 2012.)
- [46] 杨燕. 大豆幼苗期耐盐 QTL 的定位及候选基因的克隆 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013. (Yang Y. Mapping QTL conferring salt tolerance at seedling stage and cloning of candidate genes in soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.)
- [47] Ha B K, Vuong T D, Velusamy V, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci conditioning salt tolerance in wild soybean (*Glycine soja*) PI483463 [J]. *Euphytica*, 2013, 193(1): 79-88.
- [48] Guan R, Chen J, Jiang J, et al. Mapping and validation of a dominant salt tolerance gene in the cultivated soybean (*Glycine max*) variety Tiefeng 8 [J]. *The Crop Journal*, 2014, 2(6): 358-365.
- [49] 李莹. 耐盐野生大豆 DREB 类转录因子基因的克隆与分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008. (Li Y. Cloning and analysis

of DREB transcription factor gene in salt tolerance wild soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008. )

[50] 马强. 农杆菌介导耐盐碱基因 *ScNHX1* 在大豆中的转化和表达 [D]. 长春: 东北师范大学, 2008. ( Ma Q. The transformation and expression of a salt tolerant gene *ScNHX1* via agrobacterium tumefaciens in soybean [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2008. )

[51] 曹凌雪. *AtNLT5* 过表达高羊茅耐盐性分析及大豆耐盐相关基因 *GmDREB1D* 及 *GmRF* 功能的初步分析 [D]. 济南: 山东大学, 2012. ( Cao L X. Salt tolerance analysis of *AtNLT5* transgenic festuca arundinacea and primarily functional analysis of soybean salt tolerance responsive genes *GmDREB1D* and *GmRF* [D]. Jinan: Shandong University, 2012. )

[52] 刘晓丽. 大豆钠锂离子耐受基因( *GmSLT* )的克隆与功能研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2011. ( Liu X L. Clone and functional analysis of *Glycine max* Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup> tolerant gene ( *GmSLT* ) [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2011. )

[53] 罗晓, 曹蕾, 王明超, 等. 野生大豆盐碱胁迫响应基因 *GsZFPI* 的克隆及序列分析 [J]. 东北农业大学学报, 2012, 43 (4): 20-26. ( Luo X, Cao L, Wang M C, et al. Isolation and sequence analysis of alkali stress related gene *GsZFPI* [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2012. 43 (4): 20-26. )

[54] 朱丹, 柏锡, 朱延明, 等. 野生大豆盐碱胁迫相关 *GsTIFY11b* 的克隆与功能分析 [J]. 遗传, 2012, 34 (2): 230-239. ( Zhu D, Bai X, Zhu Y M, et al. Isolation and functional analysis of *GsTIFY11b* relevant to salt and alkaline stress from *Glycine soja* [J]. Hereditas, 2012, 34 (2): 230-239. )

[55] 刘晓丽. *SeNHX1* 转入大豆的遗传转化及耐盐性研究 [D]. 天津: 天津大学, 2009. ( Liu X L. The genetic transformation and study on salt-tolerance of soybean transformed by *SeNHX1* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2009. )

[56] Cao D, Hou W S, Liu W, et al. Over expression of TaNHX2 enhances salt tolerance of ‘composite’ and whole transgenic soybean plants [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 107: 541-552.

[57] Liu M, Li D M, Wang Z K, et al. Transgenic expression of *ThIPK2* gene in soybean improves stress tolerance, oleic acid content and seed size [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2012, 111: 277-289.

[58] Subramanyam K, Arun M, Mariashibu T S, et al. Over expression of tobacco osmotin ( Tbosm ) in soybean conferred resistance to salinity stress and fungal infections [J]. Planta, 2012, 236 (6): 1909-1925.

[59] 于崧. 转 BADH 基因大豆对盐碱土壤磷素转化的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013. ( Yu S. Effects of transgenic BADH soybean on the phosphorous transformation in saline alkaline soil [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013. )

[60] 曹甜甜. 转 *TvNHX1* 基因大豆后代的检测及其耐盐碱性分析 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2014. ( Cao T T. Detection of transgenic *TvNHX1* soybean progenies and analysis of salt and alkali tolerance in soybean [D]. Harbin: Harbin Normal University, 2014. )

[61] Seo J S, Sohn H B, Noh K, et al. Expression of the *Arabidopsis* at *MYB44* gene confers drought/salt-stress tolerance in transgenic soybean [J]. Molecular Breeding, 2012, 29 (3): 601-608.

[62] Zhang X X, Tang Y J, Ma Q B, et al. OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean [J]. PLoS One, 2013, 8 (12): 83-91.

[63] Xu Z L, Ali Z, Yi J X, et al. Over expression of *GmWRKY111* enhances NaCl tolerance of salt sensitive genotype of *Glycine max* [C]. 南京: 全国植物基因组学大会, 2013, 16 (1): 153-159.

[64] 王玥. *SsNHX1* 转基因大豆的选育与耐盐性分析 [D]. 长春: 东北师范大学, 2012. ( Wang Y. Cultivation of transgenic soybean plants with *SsNHX1* gene and its salt tolerance [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2012. )

[65] 林抗雪. 转 *TaNHX2* 基因大豆的耐盐性分析及转 *NTHK1* 基因大豆表型的初步鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015. ( Lin K X. Salt tolerance analysis of *TaNHX2* over-expression transgenic soybean and preliminary phenotype identification of *NTHK1* over-expression transgenic soybean [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2015. )

[66] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463 (7278): 178-183.

[67] Deshmukh R K, Sonah H, Patil G, et al. Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean [J]. Plant Genetics and Genomics, 2014, 5: 244.