

**HỆ GEN HỌC CHUYỂN DỊCH TÍCH HỢP CỦA SIÊU HỌ GA OXIDASE  
XÁC ĐỊNH KIỂU GEN *GmGA2ox16* ĐƯỢC CHỌN LỌC TRONG QUÁ TRÌNH  
THUẦN HÓA ĐỂ PHỤC VỤ CÔNG TÁC CHỌN GIỐNG  
ĐẬU TƯƠNG CHỊU MẶN**

**Ke Zhao<sup>a,c</sup>, Dandan Guo<sup>a</sup>, Longji Shan<sup>a,c</sup>, Yanting Dong<sup>a,c</sup>, Xiaohong Liu<sup>b</sup>,  
Chunmei Zong<sup>d</sup>, Shuang Jiao<sup>a</sup>, Xianzhong Feng<sup>a</sup>, Hong Zhai<sup>a,c</sup>  
*Võ Như Cẩm biên dịch***

<sup>a</sup> Phòng thí nghiệm chọn giống Thiết kế Phân tử Đậu tương, Phòng thí nghiệm trọng điểm quốc gia về Bảo tồn và Sử dụng Đất đen, Viện Địa lý và sinh thái học nông nghiệp Đông Bắc, Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, Cáp Nhĩ Tân, Trung Quốc

<sup>b</sup> Trường Khoa học cuộc sống, Đại học Nông nghiệp Đông Bắc, Cáp Nhĩ Tân, Trung Quốc

<sup>c</sup> Đại học Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, Bắc Kinh, Trung Quốc

<sup>d</sup> Chi nhánh Mudanjiang của Viện Hàn lâm Khoa học Nông nghiệp Hắc Long Giang, Mudanjiang, Trung Quốc

## **TÓM TẮT**

Độ mặn của đất gây hạn chế nghiêm trọng năng suất đậu tương toàn cầu, tuy nhiên việc phát hiện gen theo phương pháp truyền thống vẫn bị tắc nghẽn bởi tốc độ chậm chạp của di truyền học tiến bộ và tính ứng dụng hạn chế của di truyền học ngược trong chọn giống. Ở đây, chúng tôi thiết lập một mô hình hệ gen học chuyển dịch tích hợp đặc điểm họ gen có hệ thống với khai thác quần thể quy mô lớn để nhanh chóng xác định các alen sẵn sàng cho lai tạo giống. Đầu tiên, chúng tôi đã phân tích toàn diện siêu họ GA oxidase (*GmGAox*) của đậu tương, phát hiện 48 gen được mở rộng thông qua sao chép toàn bộ hệ gen và sao chép song song thành bốn nhánh phụ với cấu trúc điều hòa khác biệt, giàu các yếu tố cis phản ứng với stress và hormone. Phân tích biểu hiện gen và xác nhận chức năng đã xác định sáu thành viên *C19-GmGA2ox*, đặc biệt là *GmGA2ox16*, là các gen cảm ứng muối nhanh chóng giúp tăng cường khả năng chống oxy hóa và mang lại khả năng chịu stress ở nấm men và rễ tơ đậu tương. Bằng cách phân tích lại 2898 mẫu được giải trình tự, chúng tôi đã phát hiện ra hai kiểu gen *GmGA2ox16* được xác định bởi các SNP không đồng nghĩa (N31D, A182P) trong các vùng xúc tác được bảo tồn. Allele *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> vượt trội thể hiện dấu hiệu chọn lọc thuần hóa mạnh mẽ (71,17% ở giống địa phương đến 78,10% ở giống cải tiến). Phân tích kiểu hình 102 mẫu bằng chỉ số héo rũ cho thấy các cá thể mang allele *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> thể hiện khả năng chịu mặn vượt trội hơn đáng kể so với *GmGA2ox16*<sup>-Hap2</sup>. Nghiên cứu này cung cấp một dấu hiệu chức năng có thể triển khai, giúp rút ngắn quá trình lập bản đồ chi tiết tốn nhiều thời gian cần thiết cho việc nhân bản QTL truyền thống, chứng minh một khuôn khổ dựa trên dữ liệu để đẩy nhanh quá trình chọn giống cây trồng thích ứng với biến đổi khí hậu. Công trình của chúng tôi thiết lập một mô hình để nhanh chóng chuyển đổi dữ liệu omics công cộng thành nguồn gen có liên quan đến nông học, đẩy nhanh quá trình phát triển các giống đậu tương thích ứng với biến đổi khí hậu.

**Từ khóa:** Soil salinity, GA oxidase, *GmGA2ox16*, Soybean

## 1. GIỚI THIỆU

Gibberellin (GA) là một phytohormone quan trọng điều chỉnh sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng và phản ứng với các tác động từ môi trường (Gao và Chu, 2020b). Nồng độ hoạt động của chúng được duy trì bởi hoạt động đối lập của các enzyme sinh tổng hợp (GA20ox, GA3ox) và các enzyme dị hóa (GA2ox) (Chiang và cộng sự, 1995; Xu và cộng sự, 1995; Thomas và cộng sự, 1999). Dựa trên số lượng nguyên tử carbon trong cấu trúc vòng, gibberellin có thể được chia thành hai loại chính: gibberellin C20 và gibberellin C19 (Hedden, 2001). Theo hoạt tính của chúng, các gibberellin này có thể được phân loại tiếp thành dạng hoạt động và không hoạt động. Trong số đó, chỉ có gibberellin C19, bao gồm GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> và GA<sub>7</sub>, mới có hoạt tính sinh học (Hedden và Thomas, 2012). GA20ox xúc tác bước oxy hóa quan trọng trong con đường sinh tổng hợp gibberellin, chuyển đổi các tiền chất không hoạt động GA<sub>12</sub> hoặc GA<sub>53</sub> thành GA<sub>9</sub> hoặc GA<sub>20</sub> (Olszewski và cs, 2002). Trong bước cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp gibberellin, GA3ox xúc tác quá trình hydroxyl hóa 3β của GA<sub>9</sub> hoặc GA<sub>20</sub> để tạo ra GA<sub>4</sub> hoặc GA<sub>1</sub> có hoạt tính sinh học (Tajti và cs, 2019). GA2ox được chia thành hai lớp chính: C19-GA2ox và C20-GA2ox (Lange và cs, 2020). C19-GA2ox đưa nhóm hydroxyl vào vị trí C-2 của gibberellin hoạt động (ví dụ: GA<sub>1</sub> và GA<sub>4</sub>), chuyển đổi chúng thành dạng không hoạt động như GA<sub>8</sub> và GA<sub>34</sub> (Betts và cs, 2020), trong khi C20-GA2ox tác động lên tiền chất C20, do đó gián tiếp điều chỉnh mức độ GA hoạt tính sinh học.

Dưới điều kiện stress muối, thực vật điều chỉnh lại quá trình chuyển hóa GA để cân bằng giữa tăng trưởng và khả năng chống chịu stress, với họ enzyme GA2ox đóng vai trò là các enzyme phân giải GA quan trọng trong quá trình thích nghi này. *OsGA2ox5* góp phần vào khả năng chịu mặn bằng cách tinh chỉnh quá trình chuyển hóa gibberellin và ức chế mức độ GA hoạt động (Shan và cs, 2014a). Ở cây lúa, *GA2ox6* làm giảm stress do muối bằng cách làm suy giảm các GA hoạt tính sinh học, giúp ổn định protein DELLA và sau đó kích hoạt các yếu tố phiên mã phản ứng với stress (ví dụ: AP2/EREBP, WRKY, NAC) và các gen enzyme chống oxy hóa (ví dụ: CAT, APX), dẫn đến tăng tích lũy proline và cải thiện khả năng loại bỏ ROS (Lo và cs, 2017b). Tương tự, biểu hiện lạc chỗ của *StGA2ox1* trong khoai tây làm giảm các GA hoạt tính nội sinh, điều chỉnh tăng các gen liên quan đến stress (*RD28*, *DREB1*, *WRKY1*, *SnRK2*), tăng hàm lượng proline, giảm thiểu sự phân hủy chất diệp lục và carotenoid, và duy trì hàm lượng nước tương đối, từ đó cải thiện khả năng chịu mặn (Shi và cs, 2019a). Ở cây bông, *GhGA2ox1* ức chế hoạt động của GA, ổn định protein DELLA và kích hoạt các yếu tố phiên mã phản ứng với stress (*GhDREB1*, *GhEREB2*, *GhWRKY5*) cùng với gen tổng hợp proline *GhP5CS*, dẫn đến nồng độ proline tăng cao, hàm lượng diệp lục được bảo tồn và trạng thái nước được duy trì dưới điều kiện mặn (Shi và cs, 2019c). *OsGA2ox8* bảo tồn năng lượng dưới điều kiện stress mặn bằng cách ức chế sự phát triển thông qua sự suy giảm GA, đồng thời tăng cường chất chống oxy hóa (anthocyanin, flavonoid, GSH, AsA) và chất thẩm thấu (sucrose, proline), do đó tăng cường giải độc ROS và điều chỉnh thẩm thấu (Wang và cs, 2021b). Ở *Poa pratensis*, *PpGA2ox8* làm bất hoạt C19-GA, làm giảm nồng độ GA<sub>4</sub> và gây ra hiện tượng lùn, lá ngắn và rộng hơn, đồng thời làm tăng hàm lượng diệp lục, từ đó làm giảm mất nước và cải thiện khả năng điều chỉnh thẩm thấu, gián tiếp tăng cường khả năng chịu mặn (Su và cs, 2024a). Ở *Sesuvium portulacastrum*, tất cả các gen *SpGA2ox* đều được điều chỉnh tăng đáng kể dưới điều kiện stress mặn và bị ức chế bởi xử lý GA<sub>3</sub>, trong đó *SpGA2ox3* và *SpGA2ox8* cho thấy sự thay đổi biểu hiện rõ rệt nhất, cho thấy vai trò quan trọng trong phản ứng stress mặn do GA điều hòa (Ruan và cs, 2025). Nhìn chung, những phát hiện này nhấn mạnh quá trình dị hóa GA do GA2ox điều hòa là một

ơ chế được bảo tồn và là trung tâm trong sự thích nghi của thực vật với muối. Bằng cách làm giảm nồng độ GA hoạt động, các gen GA2ox kích hoạt các mạng lưới phản ứng với stress và cùng nhau tăng cường khả năng chịu mặn. Các nghiên cứu trong tương lai nên hướng đến việc làm sáng tỏ sự tương tác phức tạp giữa các enzyme chuyển hóa GA, hormone, tín hiệu ROS và điều hòa phiên mã để xác định các mục tiêu mới cho việc tạo ra các giống cây trồng chịu mặn.

Là một trong những cây trồng lấy dầu và mang lại thu nhập quan trọng nhất thế giới, năng suất và chất lượng đậu tương ảnh hưởng trực tiếp đến an ninh lương thực toàn cầu và nền nông nghiệp bền vững. Tuy nhiên, hiện tượng nhiễm mặn đất đã trở thành một yếu tố gây căng thẳng phi sinh học chính hạn chế sản xuất đậu tương (Feng và cs, 2014; Sun và cs, 2019). Do đó, việc sàng lọc và xác định có hệ thống các gen chịu mặn quan trọng dưới điều kiện stress mặn có giá trị to lớn trong việc phát triển các giống đậu tương mới có khả năng chịu mặn cao hơn và thích nghi rộng rãi hơn. Những nỗ lực như vậy không chỉ giúp ổn định năng suất trên đất nhiễm mặn mà còn mở rộng diện tích canh tác và thúc đẩy việc sử dụng hiệu quả đất kém chất lượng. Mặc dù vai trò của các enzyme gibberellin oxidase trong đậu tương đã được nghiên cứu rộng rãi (Wang và cs, 2021a; Li và cs, 2023; Sun và cs 2023, 2025; Su và cs, 2024b), nhưng việc xác định toàn bộ hệ gen của các gen *GmGA20ox*, *GmGA3ox* và *GmGA2ox*, cũng như chức năng của phân nhóm *GmGA2ox* dưới điều kiện stress muối, vẫn chưa được báo cáo ở đậu tương.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày phân tích toàn diện đầu tiên trên toàn bộ hệ gen của họ gen gibberellin oxidase trong đậu tương, bao gồm các phân nhóm *GmGA20ox*, *GmGA3ox*, *C19-GmGA2ox* và *C20-GmGA2ox*. Một phương pháp kết hợp bao gồm phân tích phát sinh chủng loại, hệ gen tiến hóa và phân tích biểu hiện gen đã được sử dụng để mô tả đặc điểm của họ gen này và xác định các thành viên phản ứng với stress muối. Từ đó, các gen *C19-GmGA2ox* quan trọng (*GmGA2ox16/17/20*), được điều hòa tăng mạnh dưới tác động của stress NaCl, đã được chọn để xác nhận chức năng chuyên sâu. Chúng được định vị ở cả nhân và tế bào chất, và biểu hiện dị loại của chúng trong nấm men làm tăng đáng kể khả năng chịu mặn. Thử nghiệm chuyển gen với rễ lông đậu tương biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* đã chứng minh rằng gen này làm tăng đáng kể khả năng chịu mặn. Hơn nữa, phân tích kiểu gen của ứng cử viên triển vọng nhất, *GmGA2ox16*, cho thấy sự chọn lọc của nó trong quá trình thuần hóa và mối liên hệ với sự biến dị tự nhiên về khả năng chịu mặn. Phát hiện của chúng tôi xác lập *GmGA2ox16* là yếu tố di truyền quan trọng quyết định khả năng chống chịu stress mặn và cung cấp nguồn gen quý giá cho công tác chọn giống phân tử đậu tương chịu mặn.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu thực vật

Tất cả các giống đậu tương được sử dụng trong nghiên cứu này đều được thu thập và duy trì bởi phòng thí nghiệm của chúng tôi, và chúng tôi đã cung cấp thông tin chi tiết về môi trường sống ban đầu trong Bảng bổ sung 1.

**Bảng bổ sung 1.** Thông tin về môi trường sống ban đầu của tất cả các giống đậu tương tại Trung Quốc

Tên giống	Loại	Địa phương	Mã phân phối	Tên giống	Loại	Địa phương	Mã phân phối
Zhangnong21	Cải tiến	Sơn Tây	C.II	Heinong44	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Jilinxiaolidou	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Heinong48	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Zhangnong19	Cải tiến	Sơn Tây	C.II	Beifeng14	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I

Hefeng52	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Heinong37	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Nenfeng11	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Qingpidou	Địa phương	Cát Lâm	C.I
Zhangnong14	Cải tiến	Sơn Tây	C.II	Heihe18	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Jiyu76	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Jiunong21	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Qinganheidou	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I	Suinong1	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Jiyu71	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Jiyu88	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Hefeng.37	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Liaoxian1	Cải tiến	Liêu Ninh	C.I
Jiyu57	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Jilin3	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Yuanbaojin	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I	Dongnong	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Tiefeng8	Cải tiến	Liêu Ninh	C.I	Liaodou30	Cải tiến	Liêu Ninh	C.I
Qunxuan1	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Suinong10	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Heinong31	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Dongda2	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Xindadou1	Địa phương	Tân Cương	C.I	Heihe14	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Shidadou1	Địa phương	Tân Cương	C.I	Silihuang	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I
Jiyu47	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Heihe43	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Gongye03-	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Heinong69	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Huangqi	Địa phương	NA	NA	Jiyu72	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Gongye04-L15	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Baimei	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I
Longquandado	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I	Jiyu67	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Zihua4	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I	Tiejiazi	Địa phương	Liêu Ninh	C.I
Heihe25	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Dongnong	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Gongye04L-	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Heihe4	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Heihe35	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Suinong15	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Mengdou14	Cải tiến	Nội Mông Cổ	C.I	Jilin36	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Heinong2	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Dongnong	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Heihe44	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Hefeng55	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Jiyu66	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Hefeng35	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Dongnong59	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Tiejiahei	Địa phương	Hà Bắc	C.II
Tiejiasilihuang	Địa phương	Cát Lâm	C.I	Liaodou32	Cải tiến	Liêu Ninh	C.I
Changnong26	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Dahuangd	Địa phương	Tứ Xuyên	C.IV
Mengdou9	Cải tiến	Nội Mông Cổ	C.I	Jilin35	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Tianerdan	Địa phương	Sơn Đông	C.II	Changjihu	Địa phương	Tân Cương	C.I
Jiyu67	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Baichengm	Địa phương	Cát Lâm	C.I
Dalihuang	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I	Huangbaoz	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I
Mancangjin	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I	Jilin30	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Jiyu69	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Xiaobaiqi	Địa phương	Nội Mông Cổ	C.I
Tiefeng29	Cải tiến	Liêu Ninh	C.I	Maoyando	Địa phương	Liêu Ninh	C.I
Longpin03-311	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Mengdou1	Cải tiến	Nội Mông Cổ	C.I
Mufeng1	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Tiedou43	Cải tiến	Liêu Ninh	C.I
Jilinchalhua	Cải tiến	Cát Lâm	C.I	Fangzheng	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I
Heihe13	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Liushitianh	Địa phương	Liêu Ninh	C.I
Dongnong46	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Baikehuan	Địa phương	Sơn Tây	C.II
Suinong14	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Gongye50	Cải tiến	Cát Lâm	C.I
Suoyiling	Địa phương	Hắc Long Giang	C.I	Niumaohu	Địa phương	NA	NA
Helongyoutai	Địa phương	Cát Lâm	C.I	Heihe11	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I
Xiaobaidou	Địa phương	Sơn Tây	C.II	Qingpidou	Địa phương	Cát Lâm	C.I
Dongnong44	Cải tiến	Hắc Long Giang	C.I	Baimaodo	Địa phương	Quý Châu	C.V
Huaidebaihuad	Địa phương	Cát Lâm	C.I				

## 2.2. Xác định họ gen GmGAox

Bộ gen đậu tương (Gmax\_880\_v6.0.fa) được tải xuống từ cơ sở dữ liệu Phytozome v14 (Goodstein và cs, 2012) (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Để xác định tất cả các thành viên của họ gen *GmGAox* trong bộ gen đậu tương (*Glycine max*), chúng tôi đã sử dụng 5 trình tự protein AtGA20ox và 7 trình tự protein AtGA2ox cũng như 4 trình tự protein AtGA3ox từ *Arabidopsis thaliana* làm truy vấn. Hồ sơ Mô hình Markov ẩn (HMM) của 2OG-FeII\_Oxy (PF03171) được lấy từ cơ sở dữ liệu Pfam (Mistry và cs, 2020) (<http://pfam.janelia.org>). Các thành viên của họ gen *GmGAox* trong bộ gen đậu tương được tìm thấy bằng cách chạy tìm kiếm BLASTP và HMM trong TBtools-II (Chen

và cs, 2023), và kết quả của hai phương pháp tìm kiếm được giao nhau. Cuối cùng, một cây phát sinh chủng được xây dựng bằng cách sử dụng trình tự protein của các gen giao nhau và protein AtGAox từ *Arabidopsis thaliana*, cho phép xác định chính xác các gen ứng cử viên.

### 2.3. Tính chất lý hóa của protein và cấu trúc bậc hai, bậc ba

Các tính chất lý hóa của 48 chuỗi protein GmGAox đã được phân tích bằng công cụ trực tuyến ExPasy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Các thông số được tính toán cho mỗi protein bao gồm chiều dài protein, trọng lượng phân tử, điểm đẳng điện lý thuyết (pI), chỉ số không ổn định, chỉ số béo và giá trị trung bình của tính kỵ nước. Kết quả được tóm tắt trong Bảng bổ sung 2.

**Bảng bổ sung 2.** Phân tích các đặc tính lý hóa của 48 gen GmGAox

Địa chỉ Gene	Tên Gene	Chiều dài Protein	Khối lượng phân tử	pI	Chỉ số bất ổn định	Chỉ số béo	Trung bình tổng thể của tính kỵ nước
Glyma.03G019800	GmGA20ox1	382	43484.61	6.15	38.26	73.51	-0.382
Glyma.04G211100	GmGA20ox2	392	44574.45	6.28	38.21	75.36	-0.471
Glyma.04G244200	GmGA20ox3	358	40823.52	7.09	29.65	75.98	-0.393
Glyma.06G119102	GmGA20ox4	193	22043.39	8.66	39.18	84.87	-0.318
Glyma.06G155000	GmGA20ox5	396	45301.43	6.43	40.9	76.31	-0.493
Glyma.07G081700	GmGA20ox6	396	44987.53	6.5	37.26	74.82	-0.343
Glyma.09G149200	GmGA20ox7	382	43363.39	5.63	41.44	75.29	-0.325
Glyma.10G241100	GmGA20ox8	382	43219.38	5.85	41.09	74.03	-0.302
Glyma.13G035600	GmGA20ox9	375	42797.56	6.27	42.45	74.05	-0.374
Glyma.14G157400	GmGA20ox10	376	42748.65	6.13	41.97	76.44	-0.316
Glyma.16G200800	GmGA20ox11	382	43271.23	5.69	39.53	75.29	-0.316
Glyma.20G153400	GmGA20ox12	383	43327.47	5.85	39.48	74.6	-0.307
Glyma.02G010100	GmGA2ox1	356	40017.87	8.83	39.93	80.79	-0.392
Glyma.03G221600	GmGA2ox2	342	38355.32	9	42.02	83.19	-0.263
Glyma.05G081600	GmGA2ox3	326	37622.72	8.62	39.15	75.34	-0.431
Glyma.05G130600	GmGA2ox4	341	38675.37	6.27	37.56	82.29	-0.298
Glyma.07G236100	GmGA2ox5	333	36806.08	6.32	38.29	90.42	-0.101
Glyma.08G085400	GmGA2ox6	345	38615.15	5.48	33.24	85.57	-0.275
Glyma.09G032200	GmGA2ox7	323	36118.58	6.15	46.52	85.98	-0.098
Glyma.10G010700	GmGA2ox8	356	40183.98	8.18	39.19	79.66	-0.402
Glyma.10G123000	GmGA2ox9	327	36992.23	5.23	35.05	89.97	-0.269
Glyma.11G003200	GmGA2ox10	339	38814.05	5.9	43.9	75.93	-0.381
Glyma.11G104800	GmGA2ox11	338	38177.7	6.86	37.67	83.4	-0.291
Glyma.12G029800	GmGA2ox12	405	45848.65	6.02	40.55	87.19	-0.114
Glyma.12G213700	GmGA2ox13	323	37301.96	9.12	40.04	84.49	-0.33
Glyma.12G214000	GmGA2ox14	338	38759.35	7.74	48.41	88.82	-0.243
Glyma.13G218200	GmGA2ox15	333	37453	8.12	31.52	81.65	-0.271
Glyma.13G259400	GmGA2ox16	327	37294.94	8.88	37.17	79.88	-0.324
Glyma.13G259500	GmGA2ox17	326	36911.5	9.15	41.51	80.74	-0.269
Glyma.13G287600	GmGA2ox18	337	38344.76	6.72	47.41	84.78	-0.241
Glyma.13G288000	GmGA2ox19	319	36892.4	8.95	41.94	87.99	-0.321
Glyma.15G093900	GmGA2ox20	333	37304.85	7.57	29.25	81.35	-0.247
Glyma.15G137201	GmGA2ox21	330	36854.57	7.62	49.21	85.33	-0.107
Glyma.15G248402	GmGA2ox22	326	37036.69	9.04	35.69	80.67	-0.276
Glyma.15G252100	GmGA2ox23	389	43954.63	8.95	40.24	85.66	-0.312
Glyma.17G037300	GmGA2ox24	329	36401.69	6.46	40.82	92.4	-0.063
Glyma.17G145200	GmGA2ox25	348	39906.51	8.79	45.81	78.16	-0.446
Glyma.17G178300	GmGA2ox26	328	37922.12	8.42	43.17	73.72	-0.467
Glyma.19G218700	GmGA2ox27	343	38283.06	8.69	41.94	82.36	-0.25
Glyma.20G141200	GmGA2ox28	366	41575.32	6.03	36.77	76.97	-0.321
Glyma.04G071000	GmGA3ox1	341	38420.91	6.62	44.58	81.26	-0.238
Glyma.06G072600	GmGA3ox2	347	39059.39	6.18	40.6	79.57	-0.283

Glyma.07G033800	GmGA3ox3	378	42075.24	7.73	35.39	92.88	-0.147
Glyma.08G208300	GmGA3ox4	375	41669.76	8.41	34.25	91.52	-0.19
Glyma.13G361700	GmGA3ox5	352	39245.13	8.52	39.27	89.2	-0.256
Glyma.14G128400	GmGA3ox6	347	38768.46	6.45	46.14	85.53	-0.175
Glyma.15G012100	GmGA3ox7	353	39313.07	7.72	39.38	88.64	-0.264
Glyma.17G205300	GmGA3ox8	350	39126.85	6.65	43.76	87.83	-0.246

Thành phần cấu trúc bậc hai (phần trăm của xoắn  $\alpha$ , chuỗi kéo dài và cuộn ngẫu nhiên) cho mỗi protein GmGAox được dự đoán bằng công cụ trực tuyến SOPMA ([https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)).

Kết quả được trình bày trong Bảng bổ sung 3. Cấu trúc bậc ba dự đoán của các protein, thu được bằng cách sử dụng AlphaFold3 Server (Abramson và cs, 2024) (<https://alphafoldserver.com/welcome>), phù hợp với các dự đoán cấu trúc bậc hai, xác nhận một tổ chức cấu trúc mạch lạc trên các cấp độ dự đoán khác nhau.

**Bảng bổ sung 3.** Phân tích cấu trúc bậc hai của 48 gen GmGAox

Địa chỉ Gene	Tên Gene	Xoắn $\alpha$ (%)	Chuỗi kéo dài (%)	Cuộn ngẫu nhiên (%)
Glyma.03G019800	GmGA20ox1	34.55	15.18	50.26
Glyma.04G211100	GmGA20ox2	32.40	15.05	52.55
Glyma.04G244200	GmGA20ox3	34.08	15.64	50.28
Glyma.06G119102	GmGA20ox4	35.23	20.21	44.56
Glyma.06G155000	GmGA20ox5	30.30	14.14	55.56
Glyma.07G081700	GmGA20ox6	34.60	15.15	50.25
Glyma.09G149200	GmGA20ox7	34.29	14.40	51.31
Glyma.10G241100	GmGA20ox8	34.29	15.71	50.00
Glyma.13G035600	GmGA20ox9	39.20	15.20	45.60
Glyma.14G157400	GmGA20ox10	33.78	15.69	50.53
Glyma.16G200800	GmGA20ox11	34.82	15.45	49.74
Glyma.20G153400	GmGA20ox12	33.68	14.88	51.44
Glyma.02G010100	GmGA2ox1	29.21	15.17	55.62
Glyma.03G221600	GmGA2ox2	33.33	16.96	49.71
Glyma.05G081600	GmGA2ox3	33.44	17.48	49.08
Glyma.05G130600	GmGA2ox4	29.03	16.72	54.25
Glyma.07G236100	GmGA2ox5	32.13	15.02	52.85
Glyma.08G085400	GmGA2ox6	29.57	16.52	53.91
Glyma.09G032200	GmGA2ox7	31.58	16.10	52.32
Glyma.10G010700	GmGA2ox8	28.65	14.61	56.74
Glyma.10G123000	GmGA2ox9	32.72	17.43	49.85
Glyma.11G003200	GmGA2ox10	34.81	15.34	49.85
Glyma.11G104800	GmGA2ox11	33.43	17.16	49.41
Glyma.12G029800	GmGA2ox12	30.62	15.80	53.58
Glyma.12G213700	GmGA2ox13	35.60	17.03	47.37
Glyma.12G214000	GmGA2ox14	34.02	17.16	48.82
Glyma.13G218200	GmGA2ox15	31.53	17.12	51.35
Glyma.13G259400	GmGA2ox16	33.64	18.04	48.32
Glyma.13G259500	GmGA2ox17	32.21	16.56	51.23
Glyma.13G287600	GmGA2ox18	31.75	17.21	51.04
Glyma.13G288000	GmGA2ox19	36.36	16.30	47.34
Glyma.15G093900	GmGA2ox20	30.33	16.82	52.85
Glyma.15G137201	GmGA2ox21	33.03	15.76	51.21
Glyma.15G248402	GmGA2ox22	34.05	17.18	48.77
Glyma.15G252100	GmGA2ox23	29.05	15.17	55.78
Glyma.17G037300	GmGA2ox24	31.91	16.72	51.37
Glyma.17G145200	GmGA2ox25	33.33	15.80	50.86
Glyma.17G178300	GmGA2ox26	32.62	16.77	50.61
Glyma.19G218700	GmGA2ox27	30.61	16.33	53.06
Glyma.20G141200	GmGA2ox28	31.69	15.03	53.28
Glyma.04G071000	GmGA3ox1	32.55	17.01	50.44

Glyma.06G072600	GmGA3ox2	33.72	15.56	50.72
Glyma.07G033800	GmGA3ox3	34.55	14.29	51.06
Glyma.08G208300	GmGA3ox4	32.40	15.73	52.27
Glyma.13G361700	GmGA3ox5	34.08	16.48	52.27
Glyma.14G128400	GmGA3ox6	35.23	17.00	49.28
Glyma.15G012100	GmGA3ox7	30.30	16.43	51.27
Glyma.17G205300	GmGA3ox8	34.60	15.14	52.29

## 2.4. Vị trí nhiễm sắc thể và xây dựng cây phát sinh chủng loại của các gen *GmGAox*

Vị trí nhiễm sắc thể của các gen *GmGAox* được lấy từ cơ sở dữ liệu Phytozome và được hiển thị bằng TBtools-II. ClustalW được sử dụng để căn chỉnh trình tự đa chuỗi của tất cả các protein *GmGAox*, và một cây phát sinh chủng loại của các protein *GmGAox* được xây dựng bằng MEGA 11.0 (Tamura và cs, 2021). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng thuật toán Neighbor-Joining (NJ) với 1000 lần lặp lại Bootstrap.

## 2.5. Đặc điểm cấu trúc, phân tích mô típ bảo tồn và các yếu tố tác động cis

Cấu trúc exon/intron của từng gen *GmGAox* được phân tích bằng TBtools-II. Các mô típ bảo tồn của tất cả các protein *GmGAox* được phân tích bằng công cụ MEME (Bailey và cs, 2015) (<http://meme-suite.org/tools/meme/>). Các miền bảo tồn trong tất cả các protein *GmGAox* được xác định bằng công cụ CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) từ cơ sở dữ liệu NCBI. Các yếu tố tác động cis trong trình tự promoter (2000 bp) của họ gen *GmGAox* được dự đoán bằng trang web PlantCare (Lescot và cs, 2002) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). TBtools-II được sử dụng để trực quan hóa kết quả.

## 2.6. Phân tích tương đồng trình tự gen

Phân tích tương đồng trình tự gen nội bộ được tiến hành để khám phá các cơ chế nhân đôi góp phần vào sự mở rộng của họ gen *GmGAox* trong bộ gen đậu tương (*Gmax\_880\_v6.0.fa*). Phân tích được thực hiện bằng phần mềm TBtools-II. Trình tự protein hoàn chỉnh và tệp chú thích bộ gen tương ứng ở định dạng GFF3 được sử dụng làm đầu vào. Đầu tiên, một phép so sánh BLASTP toàn diện được thực hiện với ngưỡng giá trị E được đặt thành  $1e-10$  để xác định các trình tự protein tương đồng. Tệp đầu ra BLAST và tệp chú thích GFF3 sau đó được xử lý bằng tiện ích “One Step MCScanX” trong TBtools để xác định các khối thẳng hàng trên tất cả các nhiễm sắc thể đậu tương. Để hình dung các mối quan hệ tương đồng cụ thể xung quanh *GmGAox*, chức năng “Advanced Circos” trong TBtools đã được sử dụng. Tệp thẳng hàng được xác định và tệp chú thích gen đã được tải. Vị trí gen của tất cả các gen *GmGAox* đã được xác định đều được đánh dấu trên biểu đồ Circos để minh họa các cặp gen tương đồng và các vùng gen thẳng hàng mà chúng bắt nguồn từ đó.

## 2.7. Phân tích biểu hiện gen đặc hiệu mô và phân tích biểu hiện gen dưới tác động của stress muối

Để phân tích biểu hiện gen đặc hiệu mô, dữ liệu transcriptome công khai đã được lấy từ Soybean Expression Atlas v2 (Almeida-Silva và cs, 2023) (<https://soy atlas.venanciogroup.uenf.br/>). Hồ sơ biểu hiện của các gen *GmGAox* ở đậu tương đã được nghiên cứu trên 12 mô, bao gồm chồi, rễ, lá, phôi, hạt, hoa, vỏ hạt, nốt sần, trụ mầm, quả, thân mầm và cuống lá. Một bản đồ nhiệt đã được tạo ra bằng cách sử dụng các giá trị biểu hiện được chuyển đổi  $\log_2$ , sau đó được chuẩn hóa theo hàng.

Để phân tích biểu hiện gen dưới tác động của stress muối, dữ liệu RNA-seq công khai từ Liu (Liu và cs, 2019) đã được phân tích lại. Trong bộ dữ liệu này, các mẫu lá và rễ chính từ giống đậu tương C08 (Lam và cs, 2010) được thu hoạch ở các thời điểm 0, 1, 2, 4, 24 và 48 giờ sau khi xử lý bằng dung dịch NaCl 0,9%, với ba lần lặp lại sinh học cho mỗi thời điểm. Các quy trình thí nghiệm chi tiết được mô tả trong Liu (Liu và cs, 2019). Các giá trị biểu hiện được chuyển đổi  $\log_2$  được sử dụng để tạo ra bản đồ nhiệt mô tả các mô hình biểu hiện theo thời gian của 12 gen *GmGA20ox*, 28 gen *GmGA2ox* và 8 gen *GmGA3ox* trong suốt quá trình chịu stress muối.

## 2.8. Phân tích PCR định lượng thời gian thực

Phân tích PCR định lượng thời gian thực (RT-qPCR) được thực hiện như đã mô tả trước đây (Zhai và cs, 2014). Tổng RNA được chiết xuất bằng TransZol up (Transgen, Mã số: ET111). RNA được phiên mã ngược thành cDNA bằng cách sử dụng bộ kit All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (Transgen, Mã số: AU341). PCR định lượng thời gian thực (RT-qPCR) được thực hiện trên hệ thống phát hiện PCR thời gian thực LightCycler® 96 (Roche, Thụy Sĩ) và sử dụng SYBR Green Master Mix (Transgen, Mã số: AQ131). *TUA5* (*Glyma.05G157300*) được sử dụng làm gen tham chiếu để chuẩn hóa RT-qPCR, dựa trên tính ổn định đã được xác nhận của nó dưới điều kiện stress muối. Tất cả các môi được liệt kê trong Bảng bổ sung 4. Ba mẫu sinh học hoàn toàn độc lập ( $n = 3$  cây) đã được thu thập và tiến hành RT-qPCR.

**Bảng bổ sung 4.** Trình tự môi được sử dụng trong nghiên cứu này

Tên môi	Trình tự (5'-3')
GmGA2ox16-GFP-S	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGGTGTTGTTGTCCAAAG
GmGA2ox16-GFP-AS	CACCATGGTGTGCGACTCTAGACGAAGCTGCAATTCTTTCA
GmGA2ox17-GFP-S	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGGTGTTGCTGTCCAAAG
GmGA2ox17-GFP-AS	CACCATGGTGTGCGACTCTAGAAGCAACAATTCTCTCAAAT
GmGA2ox20-GFP-S	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGGTGTTCTGTCTCAGC
GmGA2ox20-GFP-AS	CACCATGGTGTGCGACTCTAGAATCAGCAGCAGATTTCTCAA
GmGA2ox16-pYES2-S	GAGGCCAGTGAATTCATGGTGTTGTTGTCCAAAG
GmGA2ox16-pYES2-AS	ACCCGGGTGGAATTCTTACGAAGCTGCAATTCTT
GmGA2ox17-pYES2-S	GAGGCCAGTGAATTCATGGTGTTGCTGTCCAAAG
GmGA2ox17-pYES2-AS	ACCCGGGTGGAATTCTCAAGCAACAATTCTCTCA
GmGA2ox20-pYES2-S	GAGGCCAGTGAATTCATGGTGTTCTGTCTCAGC
GmGA2ox20-pYES2-AS	ACCCGGGTGGAATTCTTAATCAGCAGCAGATTTCTCAA
TUA5-q-S	TGCCACCATCAAGACTAAGAGG
TUA5-q-AS	ACCACCAGGAACAACA GAAGG
GmGA2ox1-q-S	AATGATGGTGACACCCCACA
GmGA2ox1-q-AS	AGCAGGTGCGAGATGGGTA
GmGA2ox8-q-S	CACTGCCGAAGATGGTGACA
GmGA2ox8-q-AS	CAGGTGCGATGAGATGGGTA
GmGA2ox15-q-S	CAACCCTGACGTCATCTCCC
GmGA2ox15-q-AS	AGTTATTCCCAAGCCCTCCG
GmGA2ox16-q-S	CCAACAACACTTCAGGCCTTC
GmGA2ox16-q-AS	AAAGCCTGGACTTGAACCCA
GmGA2ox17-q-S	TTGTCCTGAACTTGCCGTGA
GmGA2ox17-q-AS	GCCTGAAGTGTTGTTGGACC
GmGA2ox20-q-S	CCTCAGAATTTCAAGGCGGT
GmGA2ox20-q-AS	TATCCCCAATCCCTCAGCCA

## 2.9. Định vị nội bào của các gen GmGA2ox

Để biểu hiện tạm thời trong các tế bào biểu bì lá *N. benthamiana*, trình tự mã hóa đầy đủ (không có codon kết thúc) của *GmGA2ox16*, *GmGA2ox17* và *GmGA2ox20* được khuếch đại bằng các cặp mồi được liệt kê trong Bảng bổ sung 4 và được nhân bản nối tiếp sau vùng mã hóa GFP của vector pCAMBIA1300-GFP, tạo ra các protein lai GFP ở đầu N (pCAMBIA1300-*GmGA2ox16*-GFP, pCAMBIA1300-*GmGA2ox17*-GFP và pCAMBIA1300-*GmGA2ox20*-GFP). Các cấu trúc thu được sau đó được chuyển nạp riêng lẻ vào chủng *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Các mẫu nuôi cấy qua đêm được thu hoạch bằng phương pháp ly tâm và huyền phù lại trong dung dịch đệm thẩm thấu (0,2% [w/v] MgCl<sub>2</sub>, 100 μM acetosyringone, 10 mM MES, pH 5,6) đến mật độ quang học (OD<sub>600</sub>) là 1,0. Huyền phù *Agrobacterium* được thẩm thấu vào lớp biểu bì mặt dưới của lá *N. benthamiana* 4-5 tuần tuổi. Ít nhất năm lá từ các cây độc lập được sử dụng cho mỗi cấu trúc, và thí nghiệm được thực hiện hai lần. Huỳnh quang GFP được quan sát bằng kính hiển vi confocal (Zeiss LSM 700) với laser argon 488 nm 48 giờ sau khi thẩm thấu.

## 2.10. Phân tích khả năng chịu stress ở nấm men

Trình tự mã hóa của *GmGA2oxs* được khuếch đại bằng PCR với các cặp mồi được liệt kê trong Bảng bổ sung 4. Sau đó, các sản phẩm PCR được chèn vào vector pYES2. Cấu trúc thu được sau đó được đưa vào chủng nấm men INVScI bằng phương pháp PEG/LiAc. Thử nghiệm khả năng chịu stress ở nấm men được thực hiện theo Gautam (Gautam và cs, 2019). Sau khi nuôi cấy các thể chuyển gen trên đĩa SD/-Ura ở 28°C trong 5 ngày, một khuẩn lạc đơn được chọn và nuôi cấy trong môi trường lỏng SD/-Ura trong 24 giờ và cảm ứng bằng galactose trong 36 giờ. Đối với thử nghiệm stress muối, 1 μL mỗi dung dịch nuôi cấy pha loãng được nhỏ lên môi trường SD/-Ura bổ sung 0, 0,4, 0,8 và 1,5 M NaCl. Nấm men chuyển gen mang vector rỗng pYES2 được sử dụng làm đối chứng.

## 2.11. Phân tích khả năng chịu stress ở rễ tơ đậu tương chuyển gen

Vector pCAMBIA1300-*GmGA2ox16*-GFP đã được tạo ra và vector rỗng pCAMBIA1300-GFP sau đó được chuyển nạp vào chủng *A. rhizogenes* K599. Để tạo ra rễ tơ đậu tương chuyển gen, giống đậu tương Williams 82 được sử dụng để chuyển nạp qua trung gian *A. rhizogenes* theo phương pháp của Kereszt (Kereszt và cs, 2007). Hạt được nảy mầm dưới chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/tối 8 giờ ở 28°C trong buồng ẩm. Sau một tuần, các cây khỏe mạnh được tiêm chủng bằng chủng *A. rhizogenes* K599 mang vector cấu trúc pCAMBIA1300-*GmGA2ox16*-GFP, và vector rỗng pCAMBIA1300-GFP được dùng làm đối chứng. Các cây bị nhiễm bệnh sau đó được chuyển vào buồng thí nghiệm và giữ ở độ ẩm cao cho đến khi rễ tơ mọc ra từ vị trí nhiễm bệnh dài 2–5 cm như mô tả trong Shi (Shi và cs, 2018). Rễ tơ chuyển gen được xác minh bằng phương pháp phát hiện dải LibertyLink để kiểm tra biểu hiện gen bar ở cấp độ dịch mã. Trước khi tiến hành xử lý gây stress, rễ ban đầu được loại bỏ, sau đó các cây con có rễ tơ dài 2–5 cm được chuyển vào dung dịch chứa 200 mM NaCl để xử lý stress muối trong 0, 6, 24 giờ. Tỷ lệ sống sót (%) được tính bằng tỷ lệ cây sống sót trên tổng số cây được thử nghiệm. Ba thí nghiệm độc lập đã được tiến hành, mỗi mẫu chứa ít nhất 18 cây. Tỷ lệ sống sót (%) được tính bằng tỷ lệ cây sống sót trên tổng số cây được thử nghiệm sau 24 giờ kể từ khi bắt đầu xử lý NaCl và sau 1 ngày nuôi cấy phục hồi. Ba thí nghiệm độc lập đã được tiến hành, mỗi mẫu chứa ít nhất 18 cây. Tiêu chí sống sót được định nghĩa là: cây duy trì ít nhất một lá xanh với độ căng bình thường, và không có hiện tượng hoại tử hoàn toàn hoặc héo rũ không thể phục hồi. Nồng độ các chất nội sinh (POD, SOD, MDA) được xác

định bằng phương pháp đo quang phổ với bộ dụng cụ xét nghiệm tương ứng (Beijing Boxbio Science Technology, Bắc Kinh, Trung Quốc).

## 2.12. Phân tích kiểu gen của GmGA2ox16 trong quần thể đậu tương đa dạng

Các đa hình đơn nucleotide (SNP) và đa hình chèn/xóa (InDel) trong vùng mã hóa gen của *GmGA2ox16* từ 2898 mẫu đậu tương được lấy từ bộ dữ liệu SNP và InDel đã được công bố trước đó (Liu và cs, 2020a). Các SNP và InDel được lọc bằng cách yêu cầu tần số alen nhỏ >5% và tỷ lệ thiếu <10%. Các mẫu có kiểu gen dị hợp tử hoặc thiếu dữ liệu tại các vị trí đó đã bị loại bỏ. Các giá trị phân hóa bộ gen như chỉ số cố định ( $F_{st}$ ) và giảm tính đa dạng (ROD) đối với đậu tương hoang dại (*G. soja*), giống địa phương và giống cải tiến được tính toán cho các cửa sổ 400 kb với bước 2 kb bằng công cụ trực tuyến có sẵn tại cơ sở dữ liệu SoyOmics (Liu và cs, 2023).

## 2.13. Định lượng khả năng chịu mặn bằng chỉ số héo rũ

Để đánh giá định lượng khả năng chịu mặn của các dòng đậu tương ở giai đoạn cây con, chỉ số héo rũ được tính toán dựa trên các triệu chứng căng thẳng do muối gây ra được chấm điểm bằng mắt thường. 102 giống được trồng thủy canh và chịu stress muối bằng cách xử lý với 150 mM NaCl trong 10 ngày. Quy trình thí nghiệm chi tiết như sau: hạt được nảy mầm trong nước vô trùng và sau đó được chuyển vào khay cắm 50 ô (mỗi ô có đường kính trên 48 mm, đường kính dưới 23 mm và độ sâu 40 mm) chứa đầy vermiculite. Các khay được đặt trong một bể chứa lớn có dung dịch dinh dưỡng Hoagland, mực dung dịch được duy trì để cho phép tưới ngầm bằng hiện tượng mao dẫn. Dung dịch dinh dưỡng được tuần hoàn liên tục bằng máy bơm nước để đảm bảo phân bố dinh dưỡng và oxy hóa đồng đều, và được thay thế hàng tuần để duy trì điều kiện sinh trưởng tối ưu. Khi lá ba lá đầu tiên xuất hiện, dung dịch Hoagland được thay thế bằng dung dịch Hoagland bổ sung 150mM NaCl để tạo điều kiện stress muối. Sau thời kỳ stress, mỗi cây được đánh giá riêng lẻ và được xếp hạng khả năng chịu mặn theo thang điểm từ 1 đến 5, theo các tiêu chí chi tiết được cung cấp trong Bảng bổ sung 5. Cấp độ 1 thể hiện khả năng chịu đựng cao nhất (triệu chứng tối thiểu hoặc không có triệu chứng), trong khi cấp độ 5 thể hiện độ nhạy cảm cao nhất (héo úa nghiêm trọng hoặc cây chết).

**Bảng bổ sung 5.** Tiêu chí phân loại khả năng chịu mặn của đậu tương (Dựa trên các triệu chứng căng thẳng do muối)

Mức độ chịu mặn	Mô tả cấp độ	Các triệu chứng cụ thể của stress do muối (giai đoạn cây con)
Mức độ 1	Khả năng chống chịu cao (High Tolerance - HT)	Không có triệu chứng hoặc triệu chứng rất nhẹ. Màu lá bình thường, sự phát triển về cơ bản không bị ức chế, và không có sự khác biệt so với cây bình thường.
Mức độ 2	Chống chịu (Tolerance - T)	Triệu chứng nhẹ. Chỉ phần ngọn và mép của những lá già phía dưới có biểu hiện khô héo nhẹ hoặc hơi vàng. Cây phát triển chậm hơn một chút.
Mức độ 3	Khả năng chống chịu vừa phải (Moderate Tolerance - MT)	Triệu chứng ở mức độ trung bình. Lá ở giữa và phía dưới có biểu hiện vàng úa rõ rệt, kèm theo một số lá bị nâu và xoắn lại. Cây bị còi cọc đáng kể.
Mức độ 4	Mẫn cảm (Sensitivity - S)	Triệu chứng nghiêm trọng. Hầu hết các mép và đầu lá đều bị úa vàng và xoắn tít. Lá non bị xoắn và héo rũ nghiêm trọng, sự phát triển của cây bị ức chế nghiêm trọng, và cây trở nên rất còi cọc.

Số lượng cây được phân loại vào các mức độ chịu đựng từ 1 đến 5 được ký hiệu lần lượt là  $n_1$  đến  $n_5$ . Chỉ số héo rũ của mỗi giống cây trồng sau đó được tính bằng công thức sau:

$$Wilting\ index = \frac{n_1 * 0 + n_2 * 1 + n_3 * 2 + n_4 * 3 + n_5 * 4}{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5) * 4}$$

Công thức này về cơ bản tính toán trung bình có trọng số của điểm số căng thẳng, sau đó được chuẩn hóa bằng điểm số tối đa có thể (giả sử tất cả các cây đều được xếp hạng 4) để tạo ra chỉ số từ 0 (tất cả các cây đều hoàn toàn chịu được, Cấp 1) đến 4 (tất cả các cây đều chết hoặc héo rũ nghiêm trọng, Cấp 5). Chỉ số héo rũ thấp hơn cho thấy khả năng chịu mặn tốt hơn ở giai đoạn cây con.

### 3. KẾT QUẢ

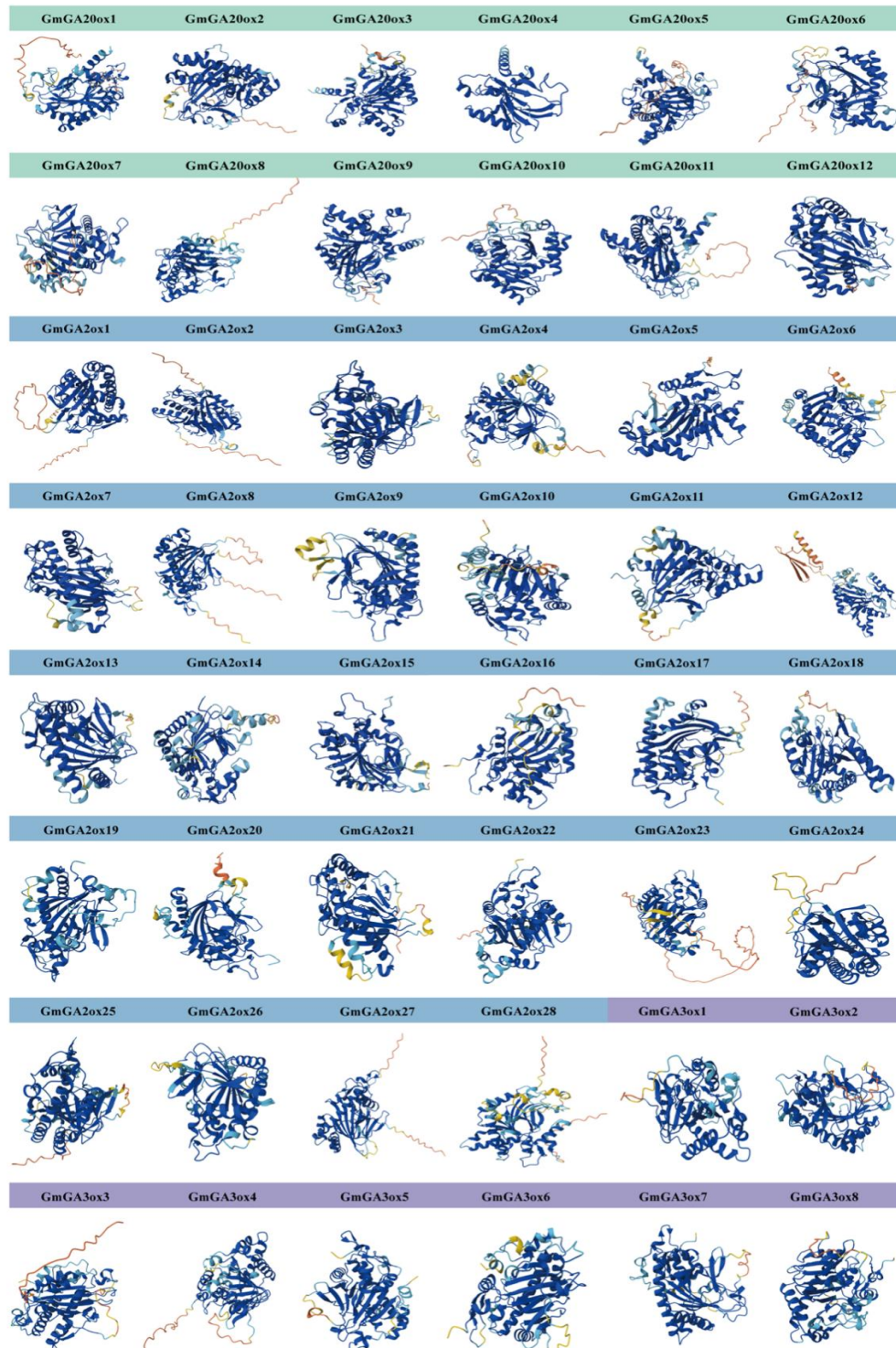
#### 3.1. Xác định gen GmGAox trong đậu tương

Dựa trên trình tự protein AtGAox từ *Arabidopsis thaliana*, các tìm kiếm BLASTP và HMM đã được thực hiện trong bộ gen đậu tương để xác định các thành viên của họ gen *GmGAox*. Kết quả giao nhau từ hai phương pháp này sau đó được sử dụng, kết hợp với phân tích cây phát sinh chủng loại, để cuối cùng xác định tổng cộng 48 gen thuộc họ *GmGAox* từ bộ gen đậu tương (Wm82.a6.v1). Dựa trên vị trí nhiễm sắc thể của chúng, các gen được đặt tên một cách có hệ thống trong mỗi phân nhóm: 12 gen *GmGA20ox* được đặt tên là *GmGA20ox1* đến *GmGA20ox12*; 28 gen *GmGA2ox* là *GmGA2ox1* đến *GmGA2ox28*; và 8 gen *GmGA3ox* là *GmGA3ox* đến *GmGA3ox8*. Các tính chất lý hóa của 48 protein *GmGAox* được xác định đã được phân tích toàn diện, với kết quả chi tiết được trình bày trong Bảng bổ sung 2. Các protein này thể hiện sự biến đổi trong các thông số sinh hóa chính của chúng. Các protein GmGAox có chiều dài từ 193 đến 405 axit amin, tương ứng với khối lượng phân tử khoảng từ 22,0 - 45,8 kDa. Điểm đẳng điện (pI) lý thuyết cho thấy một phổ rộng từ 5,23 - 9,15, cho thấy sự khác biệt về phân bố điện tích giữa các thành viên trong họ. Giá trị chỉ số không ổn định, cung cấp ước tính về độ ổn định của protein trong ống nghiệm, dao động từ 29,25 - 49,21, cho thấy hầu hết các thành viên đều ổn định. Chỉ số béo, một thước đo độ bền nhiệt, dao động từ 73,51 - 92,88, cho thấy độ ổn định nhiệt tốt nói chung trong toàn bộ họ. Hơn nữa, tất cả các protein GmGAox đều được dự đoán là ưa nước, bằng chứng là các giá trị trung bình lớn về tính ưa nước (GRAVY) âm, dao động từ -0,493 đến -0,063. Tóm lại, các phân tích này cho thấy sự đa dạng đáng kể về đặc điểm lý hóa giữa các protein GmGAox, điều này có thể phản ánh sự phân kỳ chức năng trong họ gen này.

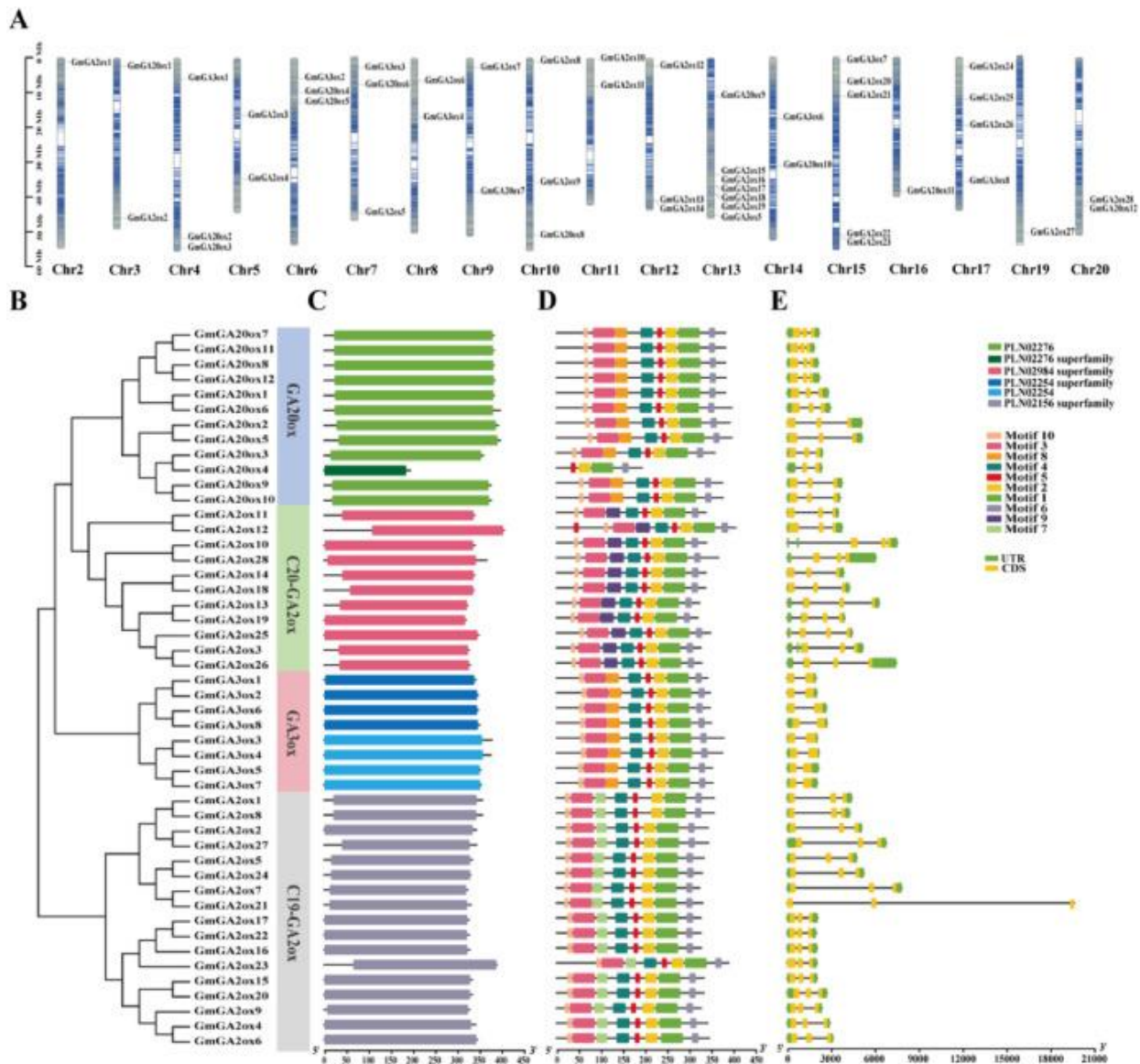
Các protein GmGAox được phát hiện bao gồm các yếu tố cấu trúc thứ cấp dạng xoắn  $\alpha$ , chuỗi kéo dài và cuộn ngẫu nhiên, như đã dự đoán và được thể hiện trong Bảng bổ sung 3. Hàm lượng cuộn ngẫu nhiên là cao nhất, chiếm 44,56-56,74%, tiếp theo là xoắn  $\alpha$ , chiếm 28,65-39,20%, trong khi chuỗi kéo dài là thấp nhất, chiếm 14,14-20,21%. Dự đoán bằng công cụ AlphaFold3 Server cho thấy cấu trúc bậc ba của các protein GmGAox cùng phân nhóm phần lớn là tương tự nhau (Hình bổ sung 1), điều này phù hợp với kết quả phân tích cấu trúc gen.

### 3.2. Vị trí gen, phân tích phát sinh chủng loài, cấu trúc gen và mô típ protein

Phần mềm TBtools-II được sử dụng để minh họa vị trí vật lý của các gen *GmGAox* trên nhiễm sắc thể đậu tương. Mười hai thành viên của họ gen *GmGA20ox* được phân bố trên 10 nhiễm sắc thể, hai mươi tám thành viên *GmGA2ox* được phân bố trên 14 nhiễm sắc thể (với nhiễm sắc thể 13 chứa số lượng thành viên cao nhất là năm), và tám thành viên *GmGA3ox* được phân bố trên tám nhiễm sắc thể (Hình 1A). Nhiễm sắc thể 1 và 18 không có bất kỳ thành viên nào của các họ này. Những kết quả này cho thấy các mô hình phân bố khác biệt của các gen *GmGAox* trên toàn bộ bộ gen đậu tương, điều này có thể có ý nghĩa đối với sự chuyên môn hóa chức năng của chúng.



**Hình bổ sung 1.** Mô hình cấu trúc bậc ba của protein GmGAox. Các mô hình được tạo ra bằng AlphaFold3 và được tô màu theo độ tin cậy trên mỗi dư lượng (pLDDT): xanh đậm (rất cao, >90), xanh nhạt (tin cậy, 70-90), vàng (thấp, 50-70) và cam (rất thấp, <50). Các cấu trúc, chủ yếu bao gồm các cuộn ngẫu nhiên với các xoắn  $\alpha$  xen kẽ, thể hiện sự gấp nếp được bảo tồn trong các phân nhóm, hỗ trợ mối quan hệ chức năng. Hình thái cấu trúc của mô hình phù hợp với thành phần cấu trúc bậc hai: các vùng xoắn xuất hiện dưới dạng các dải xoắn ốc chặt (chủ yếu ở màu xanh đậm có độ tin cậy cao), các sợi kéo dài tạo thành các tấm  $\beta$  (như các mũi tên liền kề), và các cuộn ngẫu nhiên chiếm ưu thế được mô tả dưới dạng các vùng vòng xoắn hoặc dây lỏng lẻo (chủ yếu ở màu xanh nhạt hoặc vàng có độ tin cậy trung bình đến thấp).



**Hình 1.** Phân bố bộ gen, cây phát sinh chủng loại, miền bảo tồn, mô típ bảo tồn và phân tích cấu trúc gen của các gen *GmGAox* trong đậu tương. (A) Phân bố nhiễm sắc thể của 48 gen *GmGAox*. Số nhiễm sắc thể được chỉ ra ở đầu mỗi thanh, và thang đo bên trái biểu thị chiều dài nhiễm sắc thể tính bằng megabase (Mb). (B) Cây phát sinh chủng loại của protein GmGAox được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining với 1000 lần lặp lại bootstrap. Cây này phân tách rõ ràng họ gen thành bốn nhánh chính: *GA20ox*, *GA3ox*, *C19-GA20ox* và *C20-GA20ox*. (C) Các miền protein bảo tồn được xác định bằng CD-Search. Các miền khác nhau được biểu thị bằng các ô màu. (D) Các mô típ bảo tồn được xác định bằng bộ công cụ MEME. Mười mô típ được mô tả trong các ô màu khác nhau. (E) Cấu trúc exon-intron của các gen *GmGAox*. Các hình chữ nhật

màu xanh lá cây biểu thị các vùng không được dịch mã (UTR), các hình chữ nhật màu vàng biểu thị các exon, và các đường màu xám biểu thị các intron.

Các gen *GmGAox* có thể được phân chia rõ ràng thành bốn nhóm, là các phân nhóm *GmGA20ox*, *GmGA3ox*, *C19-GmGA20ox* và *C20-GmGA20ox* (Hình 1B). Phân tích miền CD-Search cho thấy mỗi phân nhóm sở hữu một tập hợp các miền bảo tồn riêng biệt (Hình 1C). Để làm rõ hơn sự đa dạng cấu trúc của các protein GmGAox, chúng tôi đã xác định tổng cộng 10 mô típ bảo tồn bằng cách sử dụng bộ công cụ MEME (Hình 1D). Kết quả cho thấy mô típ 1, 2, 5 và 6 có mặt trong tất cả các protein GmGAox. Ngoài trừ *GmGA20ox4*, mô típ 3, 4 và 10 cũng được bảo tồn trong mọi protein GmGAox. Ngoài ra, mô típ 7 là duy nhất đối với protein *C19-GmGA20ox*, mô típ 8 đặc trưng cho protein *GmGA20ox* và *GmGA3ox*, và mô típ 9 là đặc trưng của protein *C20-GmGA20ox* (Hình 1D, Hình bổ sung 2). Cấu trúc gen *GmGAox* được hình dung dựa trên các tệp chú thích GFF3, chúng tôi đã phân định cấu trúc gen cho họ *GmGAox* (Hình 1E). Số lượng exon trong các gen *GmGAox* dao động từ 2 đến 3. Cụ thể, ngoại trừ *GmGA20ox4* có hai exon, tất cả các gen *GmGA20ox* đều chứa ba exon. Điều thú vị là, mỗi gen *GmGA20ox* đều có ba exon, trong khi tất cả các gen *GmGA3ox* đều có hai exon. Tóm lại, các thành viên của cùng một phân nhóm thể hiện cấu trúc tương tự và các mô típ được bảo tồn, do đó củng cố độ tin cậy của cây phát sinh chủng loại được xây dựng.

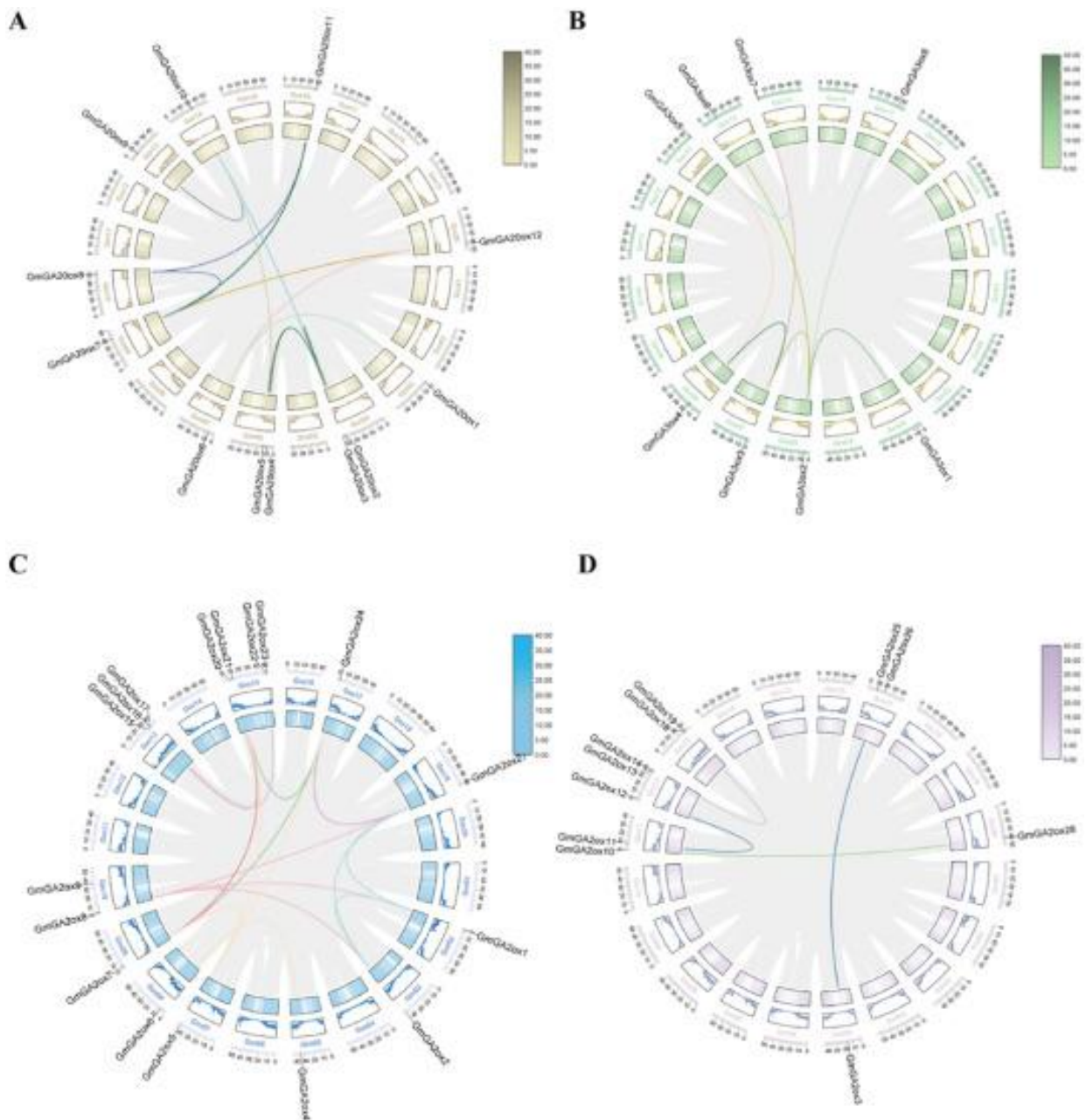


### 3.3. Phân tích liên kết gen của protein GmGAox trong đậu tương

Đậu tương (*Glycine max*) đã trải qua ít nhất hai vòng nhân đôi toàn bộ bộ gen (WGD) trong suốt lịch sử tiến hóa của nó, đây là động lực chính thúc đẩy sự mở rộng họ gen và định hình cấu trúc bộ gen hiện tại (Schmutz và cs, 2010). Để làm sáng tỏ các cơ chế nhân đôi gen dẫn đến sự mở rộng họ gen *GmGAox*, một phân tích liên kết gen toàn diện trong bộ gen đã được tiến hành. Hình ảnh trực quan hóa các mối quan hệ liên kết gen bằng Circos (Hình 2) cho thấy các mô hình nhân đôi gen đặc trưng cho từng phân nhóm.

Phân nhóm *GmGA20ox* thể hiện cơ chế mở rộng phức tạp nhất. Cụ thể, các cặp gen *GmGA20ox2/3* và *GmGA20ox4/5* phát sinh từ các sự kiện nhân đôi liên tiếp. Ngược lại,

nhiều nhóm gen bao gồm *GmGA20ox1/6*, *GmGA20ox3/4*, *GmGA20ox7/8/11*, *GmGA20ox9/10* và *GmGA20ox6/12* được khuếch đại thông qua nhân đôi phân đoạn, cho thấy nhân đôi phân đoạn đóng vai trò là cơ chế chính cho sự mở rộng *GmGA20ox* trong bộ gen đậu tương (Hình 2A). Phân nhóm *GmGA3ox* thể hiện mô hình nhân đôi toàn bộ bộ gen (WGD) rõ ràng hơn, với tất cả các nhóm gen được xác định (*GmGA3ox1/2/3/4*, *GmGA3ox4/5*, *GmGA3ox2/6*, *GmGA3ox3/7*, *GmGA3ox2/8* và *GmGA3ox5/7*) đều bắt nguồn từ các sự kiện nhân đôi phân đoạn, phù hợp với đặc điểm đặc trưng của quá trình đa bội hóa cổ đại (Hình 2B). Phân nhóm *C19-GmGA2ox* thể hiện sự phức tạp hơn, sử dụng cả hai chiến lược nhân đôi. Trong khi các cặp gen *GmGA2ox16/17* và *GmGA2ox22/23* được khuếch đại thông qua quá trình nhân đôi liên tiếp, một tập hợp lớn hơn các nhóm gen khác lại xuất hiện thông qua quá trình nhân đôi từng đoạn, bao gồm *GmGA2ox4/6*, *GmGA2ox7/8*, *GmGA2ox15/20*, *GmGA2ox16/22*, *GmGA2ox24/27*, *GmGA2ox1/2/8/27* và *GmGA2ox5/7/21/24* (Hình 2C). Ngược lại, phân nhóm *C20-GmGA2ox* lại thể hiện lịch sử nhân đôi tương đối đơn giản hơn. Các sự kiện nhân đôi liên tiếp đã tạo ra các cặp gen *GmGA2ox13/14* và *GmGA2ox18/19*, trong khi sự nhân đôi phân đoạn chịu trách nhiệm cho các cặp gen *GmGA2ox3/25*, *GmGA2ox10/28*, *GmGA2ox11/28* và *GmGA2ox13/18* (Hình 2D).

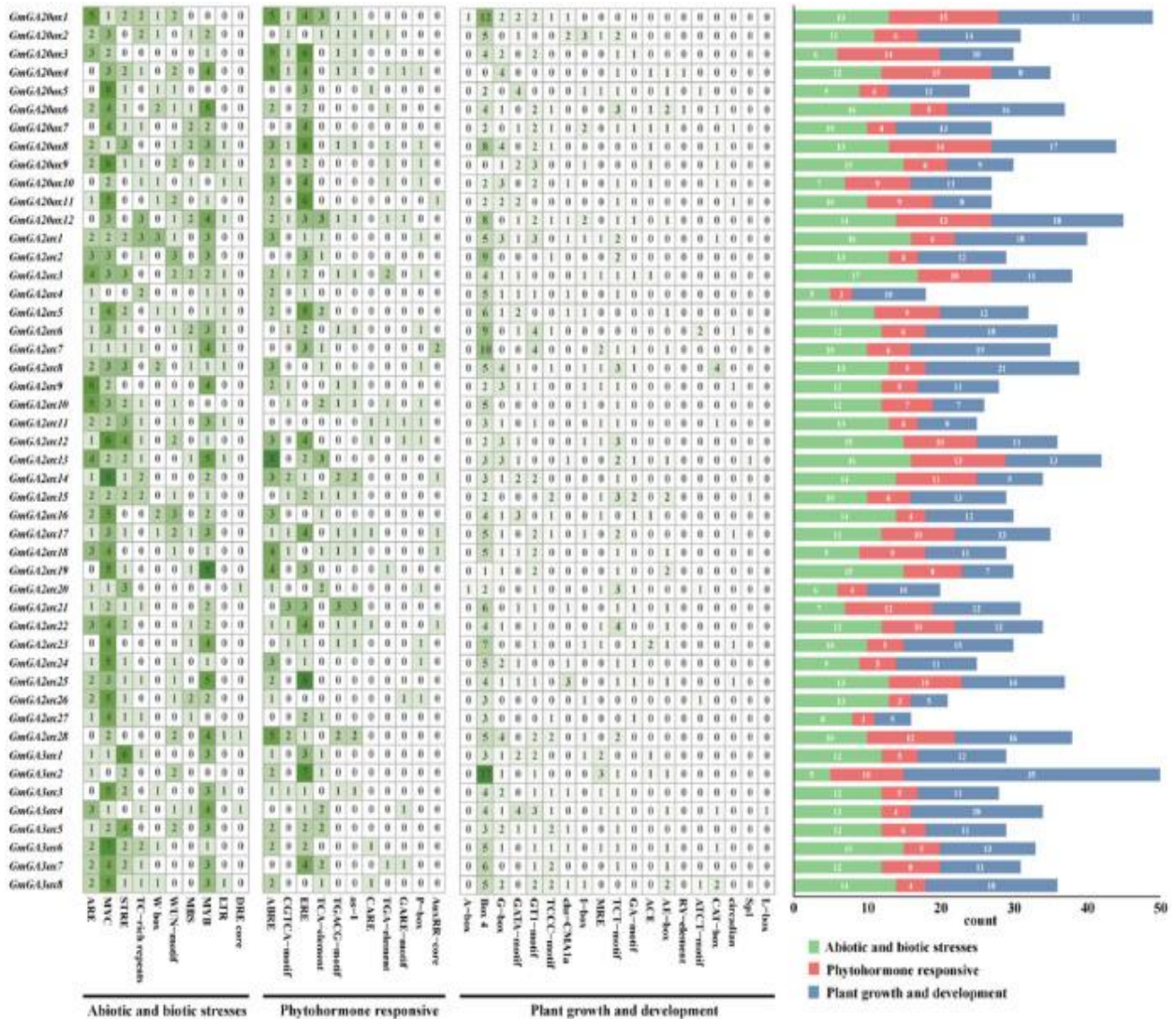


**Hình 2.** Phân tích tính tương đồng trình tự của protein GmGAox trong đậu tương. (A) Phân tích tính tương đồng trình tự của phân nhóm *GmGA20ox*. (B) Phân tích tính tương đồng trình tự của phân nhóm *GmGA3ox*. (C) Phân tích tính tương đồng trình tự của phân nhóm *C19-GmGA2ox*. (D) Phân tích tính tương đồng trình tự của phân nhóm *C20-GmGA2ox*. Các nhiễm sắc thể của đậu tương được đánh số khác nhau, và thang đo biểu thị chiều dài nhiễm sắc thể tính bằng megabase (Mb). Các đường cong được tô sáng biểu thị các vùng tương đồng trình tự của gen *GmGAox*, trong khi các đường cong màu xám biểu thị tính tương đồng trình tự toàn bộ hệ gen trong đậu tương. Chú thích ở bên phải biểu thị mật độ gen.

Tóm lại, phân tích tính tương đồng của chúng tôi cho thấy lịch sử đa bội hóa cổ đại của đậu tương là động lực cốt lõi đằng sau sự mở rộng của siêu họ *GmGAox*. Tuy nhiên, sự đóng góp tương đối của nhân đôi liên tiếp và nhân đôi phân đoạn khác nhau đáng kể giữa các phân họ. Sự đóng góp của các cơ chế nhân đôi tiếp theo cũng khác nhau đáng kể giữa các phân họ. Phân họ *GmGA3ox* thể hiện mô hình rõ ràng nhất, với sự mở rộng được thúc đẩy hoàn toàn bởi sự nhân đôi phân đoạn phù hợp với WGD. Ngược lại, phân họ *GmGA20ox* trải qua một con đường tiến hóa phức tạp hơn, chủ yếu thông qua sự nhân đôi phân đoạn nhưng được bổ sung bởi các sự kiện nhân đôi liên tiếp gần đây. Phân

nhóm *GmGA2ox* cũng sử dụng cả hai chiến lược, nhưng với các mô hình khác biệt giữa hai lớp chức năng của nó: các gen *C19-GmGA2ox* trải qua sự mở rộng đáng kể thông qua cả các sự kiện phân đoạn và song song, trong khi các gen *C20-GmGA2ox* cho thấy lịch sử nhân đôi hạn chế hơn. Những phát hiện này đã làm sáng tỏ lịch sử bộ gen của họ gen quan trọng này, đồng thời cung cấp một khuôn khổ để hiểu được sự đóng góp khác biệt của các cơ chế nhân đôi khác nhau đối với sự đa dạng hóa chức năng trong bộ gen đa bội.

### 3.4. Các yếu tố tác động cis trong vùng promoter của *GmGAox*



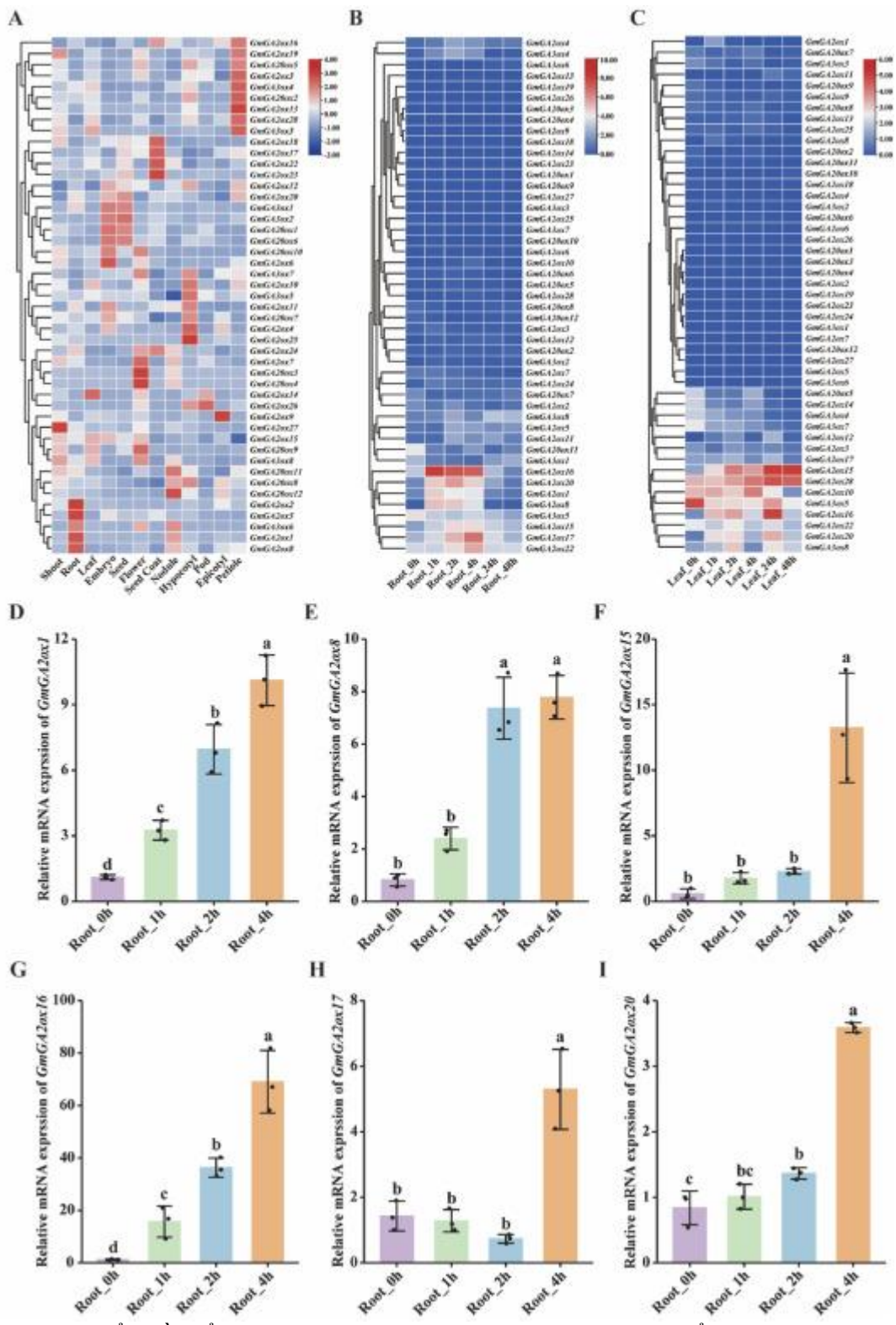
**Hình 3.** Phân tích các yếu tố điều hòa tác động cis trong vùng promoter của các gen *GmGAox*. Các con số trong bản đồ nhiệt thể hiện số lượng các yếu tố cis khác nhau trong vùng promoter 2,0 kb phía thượng nguồn của mỗi gen. Biểu đồ cột chồng tóm tắt tổng số lượng các yếu tố cis được nhóm thành ba loại chức năng: phản ứng với stress phi sinh học/sinh học, phản ứng với phytohormone và sinh trưởng, phát triển của cây. Phân tích promoter cho thấy các gen *GmGAox* tham gia vào các mạng lưới điều hòa phức tạp tích hợp các tín hiệu môi trường và hormone. Các yếu tố tác động cis trong vùng promoter đóng vai trò quan trọng trong cách thực vật phản ứng với các yếu tố tăng trưởng và các tác động môi trường bằng cách điều hòa biểu hiện gen thông qua phiên mã. Để nghiên cứu các cơ chế điều hòa của các phân nhóm gen *GmGA20ox*, *GmGA3ox*, *C19-GmGA2ox* và *C20-GmGA2ox*, chúng tôi đã sử dụng công cụ web PlantCARE để phân tích các yếu tố điều hòa tác động cis trong vùng promoter 2,0 kb của tất cả các gen. Các yếu tố cis được xác định tiếp tục được phân loại thành ba loại theo Mengarelli và Zanor (2021): căng thẳng phi sinh học và sinh học, phản ứng với phytohormone và sinh trưởng và phát triển của cây (Hình 3).

Trong nhóm các yếu tố gây stress phi sinh học và sinh học, các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng các yếu tố ARE, MYC, MYB và STRE đóng vai trò là các chất điều hòa cis quan trọng trong việc ứng phó với hạn hán, độ mặn và các loại stress phi sinh học/sinh học khác ở thực vật (Abe và cs 1997, 2003; Wang và cs, 2014; Ain-Ali và cs, 2021). Vùng promoter của các gen này chứa nhiều yếu tố cis ARE, MYC, MYB và STRE, cho thấy chúng có thể đóng vai trò trong việc phản ứng với các loại stress như hạn hán và độ mặn. Trong nhóm phản ứng với phytohormone, các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các yếu tố cis ABRE và ERE hoạt động như "công tắc phân tử" cho tín hiệu ABA và ethylene, tương ứng, tích hợp mạng lưới điều hòa phiên mã của nhiều phytohormone (Bhuria và cs, 2016; Waseem và cs, 2021; Zhao và cs, 2025). Sự cùng tồn tại của nhiều yếu tố ABRE và ERE cho thấy các gen này đóng vai trò là các nút giao tiếp giữa các con đường tín hiệu axit abscisic và ethylene, cân bằng động giữa thích ứng với stress và phát triển bằng cách phản ứng với cả hai hormone. Trong nhóm sinh trưởng và phát triển của cây, hầu hết các gen *GmGAox* đều chứa yếu tố Box 4 (một mô-đun DNA được bảo tồn liên quan đến khả năng phản ứng với ánh sáng) (Ahmad và cs, 2024), cho thấy chúng có thể đóng vai trò trong điều hòa phản ứng với ánh sáng. Những kết quả này cho thấy các gen *GmGAox* có thể đóng vai trò quan trọng trong phản ứng với stress phi sinh học và sinh học, tín hiệu phytohormone và điều hòa sinh trưởng và phát triển của cây.

### **3.5. Mô hình biểu hiện của các gen *GmGAox* trong các mô khác nhau của đậu tương và dưới điều kiện stress muối**

Để kiểm tra hồ sơ biểu hiện đặc hiệu theo mô của các gen *GmGAox* đậu tương, chúng tôi đã phân tích mức độ phiên mã của chúng trong 12 mô và cơ quan, bao gồm chồi, rễ, lá, phôi, hạt, hoa, nốt sần, trụ mầm, quả, thân mầm và cuống lá (Hình 4A). Các thành viên của họ *GmGAox* được biểu hiện đặc hiệu trong hầu hết các mẫu, cho thấy các gen *GmGAox* này hoạt động trong suốt quá trình sinh trưởng và phát triển của đậu tương.

Để mô tả đặc điểm biểu hiện của các gen *GmGAox* đáp ứng với stress muối, chúng tôi đã phân tích dữ liệu transcriptome để đánh giá mức độ phiên mã của các gen *GmGAox* trong rễ và lá đậu tương ở các thời điểm 0, 1, 2, 4, 24 và 48 giờ sau khi xử lý NaCl (Hình 4B và C). Kết quả cho thấy bảy thành viên của phân nhóm *C19-GmGA2ox* (*GmGA2ox1*, *GmGA2ox8*, *GmGA2ox15*, *GmGA2ox16*, *GmGA2ox17*, *GmGA2ox20* và *GmGA2ox22*) đã được điều chỉnh tăng đáng kể sau 1, 2 và 4 giờ xử lý stress muối ở rễ. Ở lá, các gen *GmGA2ox15*, *GmGA2ox16*, *GmGA2ox20* và *GmGA2ox22* thuộc phân nhóm *C19-GmGA2ox*, cũng như *GmGA2ox10* và *GmGA2ox28* thuộc phân nhóm *C20-GmGA2ox*, đều được điều chỉnh tăng lên để đáp ứng với stress muối. Ngoài ra, *GmGA3ox5* thể hiện sự biểu hiện khác biệt ở cả lá và rễ, cho thấy nó cũng có thể tham gia vào phản ứng với stress muối. RT-qPCR được thực hiện trên sáu gen *C19-GmGA2ox* được điều chỉnh tăng lên do stress muối (*GmGA2ox1*, *GmGA2ox8*, *GmGA2ox15*, *GmGA2ox16*, *GmGA2ox17* và *GmGA2ox20*) trong rễ bị stress muối (Hình 4D–I). Kết quả phù hợp với dữ liệu transcriptome, chứng thực độ tin cậy của hồ sơ transcriptome. Những kết quả này cho thấy các gen *GmGAox* tham gia vào phản ứng với stress muối, với các thành viên của phân nhóm *C19-GmGA2ox* đóng vai trò chủ đạo, mặc dù sự đóng góp của chúng khác nhau giữa các mô khác nhau.



**Hình 4.** Biểu đồ biểu hiện của họ gen *GmGAox* và xác nhận biểu hiện gen *GmGA2ox* đáp ứng với muối bằng RT-qPCR. (A) Hồ sơ biểu hiện đặc hiệu mô ở đậu tương; thang màu =  $\log_2(\text{TPM}+1)$  với chuẩn hóa hàng. (B, C) Động thái theo thời gian dưới điều kiện stress muối ở rễ (B) và lá (C); thang màu như trong (A). Trong (D-I), mức độ biểu hiện tương đối của *GmGA2ox1* (D), *GmGA2ox8* (E), *GmGA2ox15* (F), *GmGA2ox16* (G), *GmGA2ox17* (H) và *GmGA2ox20* (I) trong rễ đậu tương ở các thời điểm 0, 1, 2 và 4 giờ sau khi xử lý NaCl. Mức độ phiên mã được chuẩn hóa theo TUA5; tất cả các giá trị đại diện cho giá trị trung bình của ba lần lặp lại độc lập về mặt sinh học ( $n = 3$  cây); thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn. Các thanh màu khác nhau biểu thị các thời điểm điều trị khác nhau: màu tím cho nhóm không điều trị (đối chứng), màu xanh lá cây cho nhóm điều trị bằng NaCl trong 1 giờ, màu xanh lam cho nhóm điều trị bằng

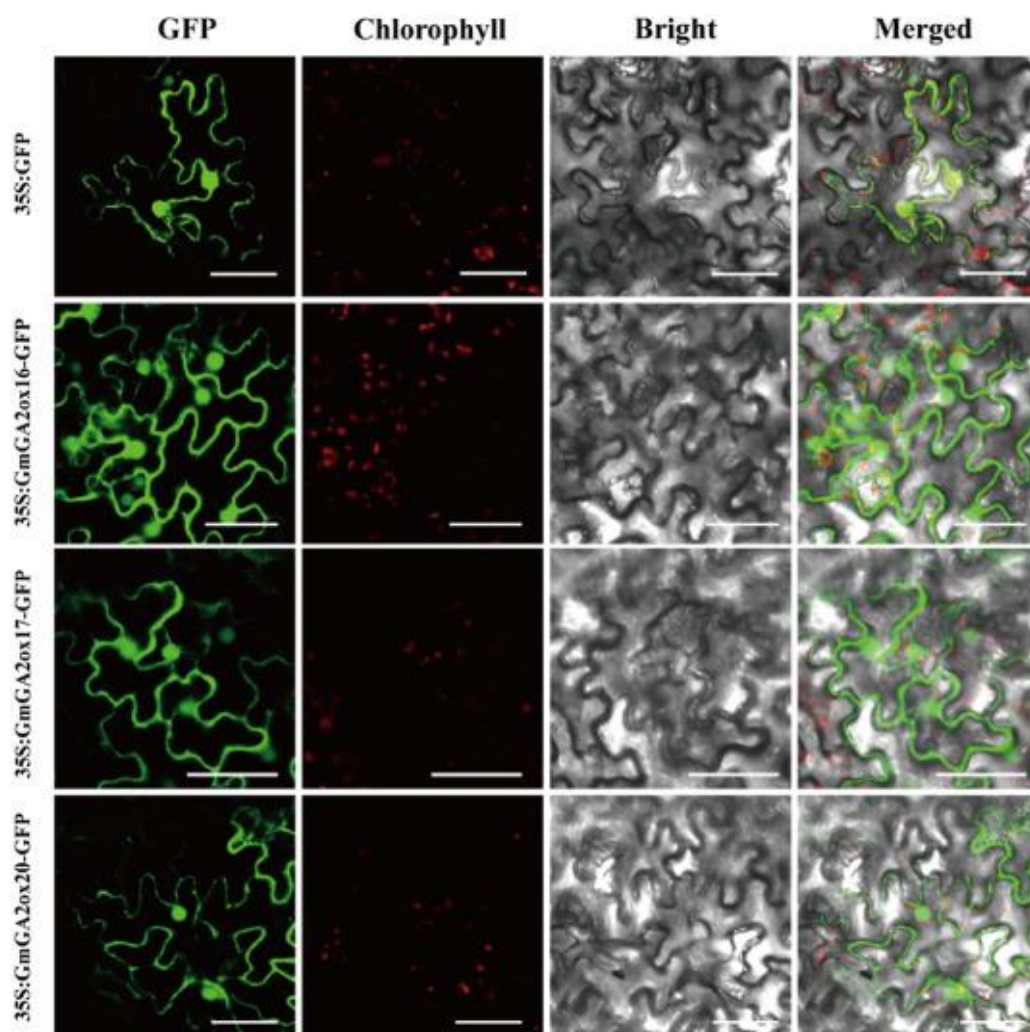
NaCl trong 2 giờ và màu cam cho nhóm điều trị bằng NaCl trong 4 giờ. Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$  bằng phân tích phương sai một chiều (ANOVA) với kiểm định hậu Tukey.

### 3.6. Định vị dưới tế bào của protein GmGA2ox và phân tích chức năng khả năng chịu stress muối của chúng trong tế bào nấm men

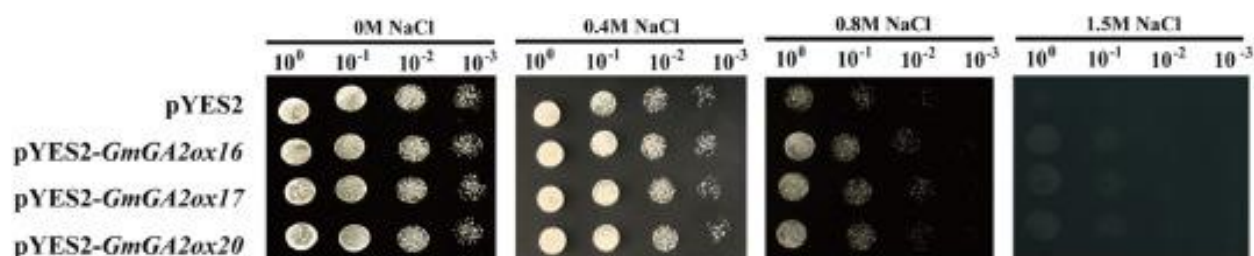
Để xác định các gen ứng cử viên tham gia vào phản ứng stress muối, chúng tôi đã chọn ba thành viên *GmGA2ox* để phân tích chức năng chi tiết dựa trên mô hình biểu hiện và mối quan hệ phát sinh loài của chúng. *GmGA2ox16* thể hiện sự điều hòa tăng mạnh nhất do stress muối gây ra trong số tất cả các thành viên trong họ và được chọn làm ứng cử viên chính. Phân tích phát sinh loài cho thấy *GmGA2ox17*, *GmGA2ox22*, *GmGA2ox23*, *GmGA2ox15* và *GmGA2ox20* có độ tương đồng cao nhất với *GmGA2ox16* trong cùng một nhánh. Trong số này, *GmGA2ox23* không cho thấy phản ứng đáng kể với stress muối và đã bị loại khỏi nghiên cứu tiếp theo. *GmGA2ox15* và *GmGA2ox20* tạo thành một cặp gen tương đồng, có khả năng phát sinh từ sự nhân đôi gen, tương tự như *GmGA2ox17* và *GmGA2ox22*. Để tối đa hóa phạm vi chức năng đồng thời giảm thiểu sự dư thừa, chúng tôi đã chọn một đại diện từ mỗi cặp gen tương đồng: *GmGA2ox17* (từ cặp *GmGA2ox17/22*) và *GmGA2ox20* (từ cặp *GmGA2ox15/20*), cả hai đều thể hiện sự biểu hiện cảm ứng muối đáng kể.

Để xác định vị trí nội bào của chúng, trình tự mã hóa của *GmGA2ox16*, *GmGA2ox17* và *GmGA2ox20* được ghép nối cùng khung với trình tự của protein huỳnh quang xanh (GFP), tạo ra các cấu trúc lai *GmGA2ox16-GFP*, *GmGA2ox17-GFP* và *GmGA2ox20-GFP*. Các cấu trúc này được biểu hiện tạm thời trong lá *N. benthamiana* thông qua chuyển đổi trung gian *Agrobacterium*, với GFP tự do làm đối chứng. Quan sát huỳnh quang cho thấy các protein dung hợp *GmGA2ox16-GFP*, *GmGA2ox17-GFP* và *GmGA2ox20-GFP* được phân bố cả trong nhân và tế bào chất (Hình 5), cho thấy khả năng chúng tham gia vào cả các quá trình trong nhân và trong tế bào chất.

Để phân tích xem ba gen *GmGA2ox* đáp ứng với muối này có liên quan đến khả năng chịu đựng stress muối hay không, *GmGA2ox16*, *GmGA2ox17* và *GmGA2ox20* được nhân bản riêng lẻ vào vector pYES2 và biểu hiện quá mức trong tế bào nấm men. Tế bào nấm men được biến đổi với vector pYES2 trống được dùng làm đối chứng. Khi sử dụng NaCl để mô phỏng stress muối, chúng tôi quan sát thấy hầu như không có sự khác biệt về tăng trưởng giữa các chủng được biến đổi với ba gen *GmGA2ox* và đối chứng trên đĩa không có NaCl. Trên đĩa có 0,4 M hoặc 0,8 M NaCl, sự biểu hiện của ba gen *GmGA2ox* đã tăng cường đáng kể khả năng chịu đựng muối của tế bào nấm men. Tuy nhiên, ở nồng độ NaCl 1,5 M, sự phát triển bị ức chế hoàn toàn ở tất cả các dòng biến đổi gen, cho thấy nồng độ này vượt quá khả năng bảo vệ của các gen được biểu hiện (Hình 6). Những kết quả này chứng minh rõ ràng rằng *GmGA2ox16*, *GmGA2ox17* và *GmGA2ox20* mang lại khả năng chịu mặn trong hệ thống nấm men dị loại.



**Hình 5.** Vị trí nội bào của protein GmGA2ox. Protein dung hợp GmGA2ox-GFP được biểu hiện tạm thời trong lá *N. benthamiana*. Kênh GFP; Kênh huỳnh quang tự nhiên của diệp lục; Kênh trường sáng; Hình ảnh kết hợp. Thanh tỷ lệ, 40  $\mu\text{m}$ .

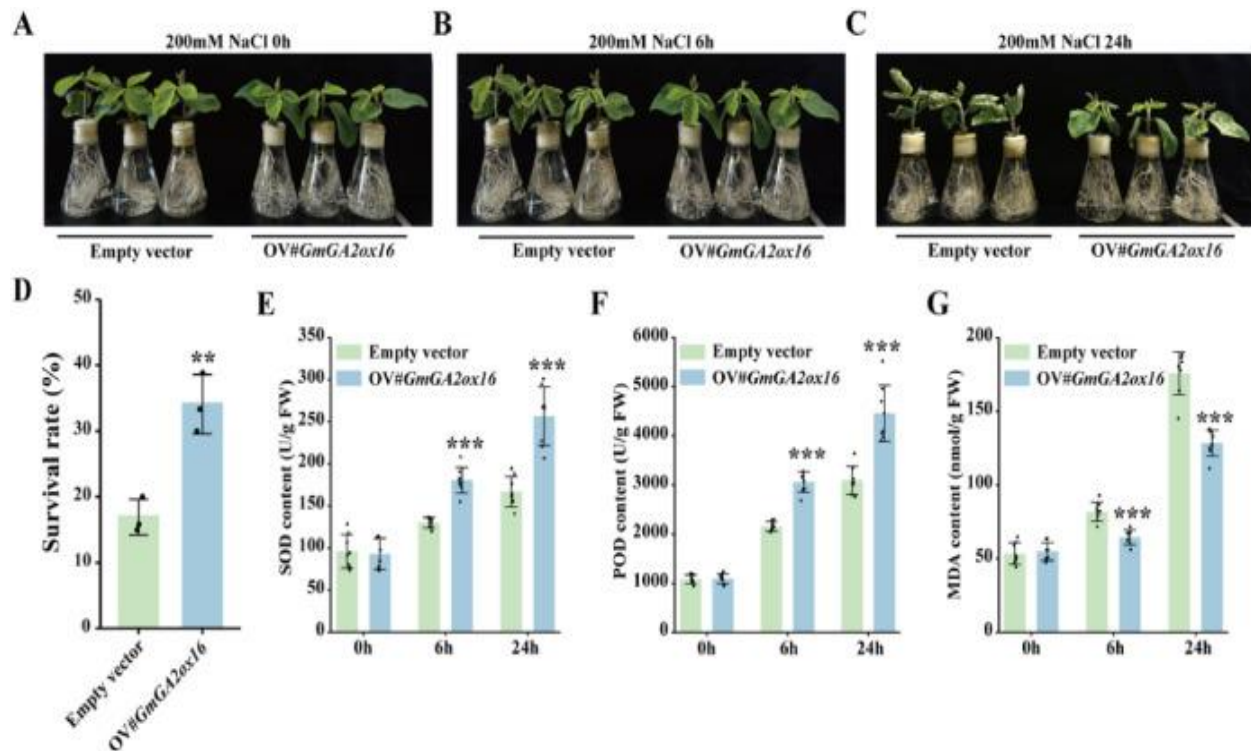


**Hình 6.** Thử nghiệm tại chỗ các chủng nấm men tái tổ hợp dưới điều kiện stress muối. Các tế bào nấm men được biến đổi gen với vector pYES2 rỗng (đôi chứng) hoặc pYES2 biểu hiện quá mức *GmGA2ox16*, *GmGA2ox17* hoặc *GmGA2ox20* được chấm theo dãy pha loãng 10 lần (từ  $10^0$  đến  $10^{-3}$ , từ trái sang phải) lên môi trường chứa 0, 0,4, 0,8 hoặc 1,5 M NaCl.

### 3.7. GmGA2ox16 tăng cường khả năng chịu hạn ở rễ lông đậu tương chuyển gen

Vì *GmGA2ox16* thể hiện sự điều hòa tăng mạnh nhất trong số ba gen *GmGA2ox* dưới điều kiện stress muối (Hình 4D–I), chúng tôi đã nghiên cứu vai trò chức năng của nó bằng cách sử dụng hệ thống chuyển gen rễ lông đậu tương. Các cây con ghép mang rễ lông biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* hoặc rễ lông được biến đổi gen bằng vector rỗng được xử lý bằng 200 mM NaCl và theo dõi ở các thời điểm 0, 6 và 24 giờ. Trước khi xử lý bằng muối (0 giờ), không quan sát thấy sự khác biệt về kiểu hình giữa cây con đối chứng và cây con có rễ lông biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* (Hình 7A). Sau 6 giờ xử lý, cây con đối chứng bắt đầu có triệu chứng héo rũ, trong khi cây con có rễ lông biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* vẫn giữ được độ căng mọng và không biểu hiện bất kỳ dấu hiệu

căng thẳng nào (Hình 7B). Sau 24 giờ chịu stress muối, cây con đối chứng bị héo rũ nghiêm trọng và mất nước đáng kể ở lá; ngược lại, cây con có rễ lông biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* chỉ bị héo rũ nhẹ với mức độ nghiêm trọng của triệu chứng giảm đáng kể (Hình 7C). Phân tích kiểu hình được củng cố bằng định lượng tỷ lệ sống sót, cho thấy cây con có rễ lông biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* có tỷ lệ sống sót cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng mang vector rỗng sau khi xử lý stress muối (Hình 7D).

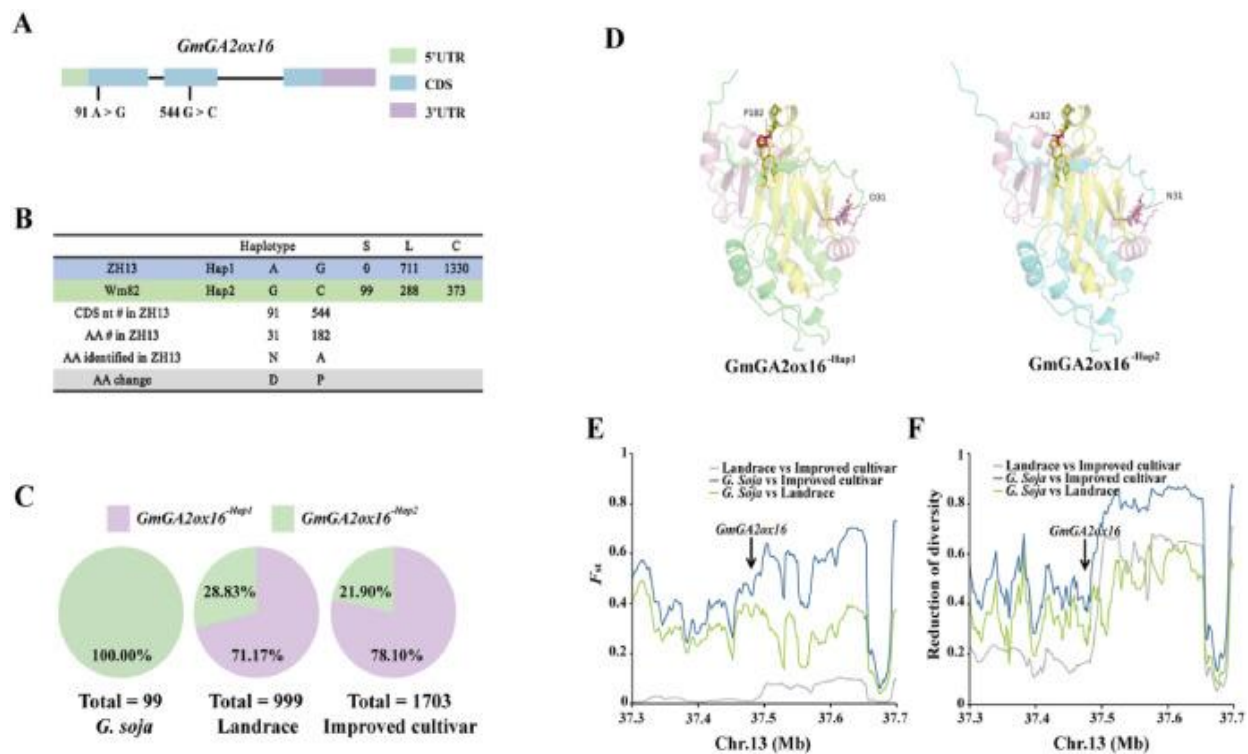


**Hình 7.** Sự biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* tăng cường khả năng chịu mặn ở rễ tơ đậu tương. (A–C) Các kiểu hình đại diện của cây con ghép có rễ tơ được biến đổi gen bằng vector rỗng (EV) hoặc biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* dưới điều kiện stress 200 mM NaCl ở các thời điểm 0, 6 và 24 giờ. (D) Tỷ lệ sống sót của cây con sau khi xử lý 200 mM NaCl. Tỷ lệ sống sót được đánh giá trong ba thí nghiệm độc lập, mỗi thí nghiệm gồm 18 cây con trên mỗi kiểu gen. Dữ liệu là giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn.  $**P < 0,01$  (kiểm định t một phía của Student). (E) Hoạt tính superoxide dismutase (SOD), (F) hoạt tính peroxidase (POD) và (G) hàm lượng malondialdehyde (MDA) trong rễ tơ dưới điều kiện stress mặn. Dữ liệu là giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn của tám lần lặp lại sinh học ( $n = 8$  cây con trên mỗi kiểu gen).  $***P < 0,001$  (kiểm định t một phía của Student).

Để điều tra các cơ chế sinh lý học nằm dưới sự khác biệt kiểu hình quan sát được, chúng tôi đã định lượng hoạt động của các enzyme chống oxy hóa và các dấu hiệu tổn thương oxy hóa trong rễ tơ. Superoxide dismutase (SOD) và peroxidase (POD) là các enzyme chống oxy hóa quan trọng giúp loại bỏ các gốc oxy hoạt tính, trong khi malondialdehyde (MDA) là sản phẩm peroxy hóa lipid đóng vai trò là chỉ báo về mức độ nghiêm trọng của stress oxy hóa. Phù hợp với các quan sát kiểu hình, sau 6 giờ xử lý, hoạt động của SOD và POD trong rễ tơ biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* tăng lên đáng kể so với nhóm đối chứng mang vector rỗng, trong khi hàm lượng MDA giảm rõ rệt (Hình 7E–G). Khi stress muối kéo dài đến 24 giờ, những khác biệt này trở nên rõ rệt hơn, với rễ biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* duy trì hoạt động của các enzyme chống oxy hóa cao hơn đáng kể và tích lũy MDA thấp hơn, tương ứng với kiểu hình héo rũ giảm nhẹ. Những kết quả này chứng minh rằng *GmGA2ox16* tăng cường khả năng chịu mặn bằng cách tăng cường hệ thống phòng vệ chống oxy hóa và giảm thiểu tổn thương oxy hóa ở rễ dưới stress muối.

### 3.8. Phân tích kiểu gen của *GmGA2ox16*

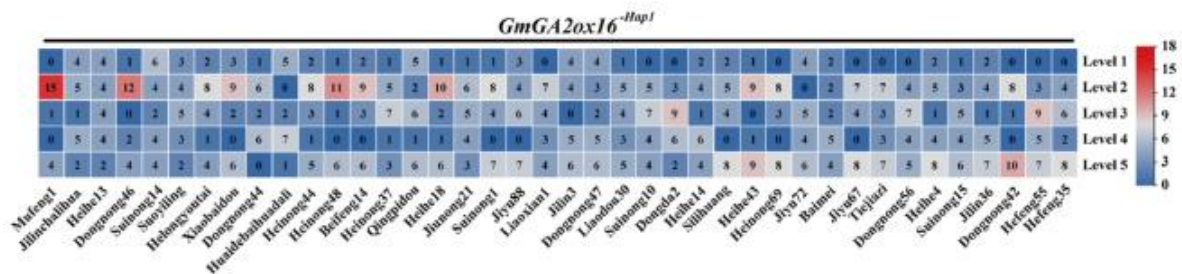
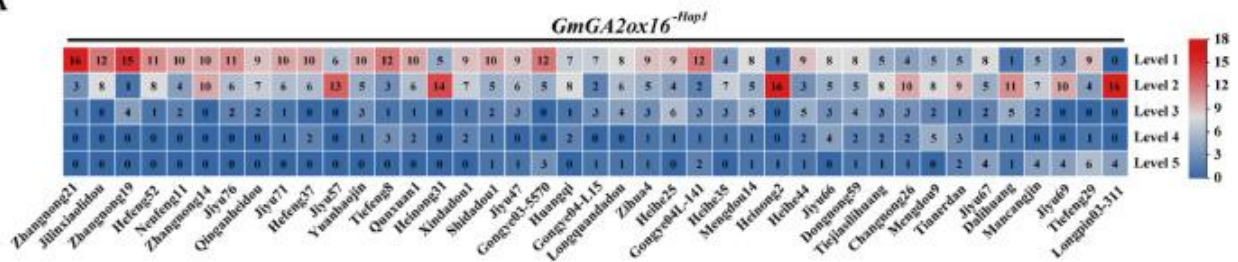
Để tìm hiểu xem liệu sự biến dị alen tại locus *GmGA2ox16* có bị chọn lọc nhân tạo trong quá trình thuần hóa đậu tương hay không, chúng tôi đã thực hiện phân tích kiểu gen trên các giống đậu tương hoang dã (*Glycine soja*), giống địa phương và giống cải tiến bằng cách sử dụng 2898 mẫu được giải trình tự lại. Chúng tôi đã phát hiện hai đa hình đơn nucleotide (SNP) không đồng nghĩa trong exon thứ nhất và thứ hai của *GmGA2ox16*, gây ra sự thay thế N31D và A182P tương ứng (Hình 8A và B). Hai đa hình này xác định hai kiểu gen, được đặt tên là *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> và *GmGA2ox16*<sup>-Hap2</sup>. Đáng chú ý, *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> chiếm ưu thế ở các giống địa phương và giống cải tiến, chiếm lần lượt 71,17% ở giống địa phương và 78,10% ở giống cải tiến (Hình 8C). Mô hình ba chiều so sánh cho thấy cả hai sự thay thế đều nằm trong các miền DIOX\_N và 2OG-FeII\_Oxy được bảo tồn, cho thấy sự phân kỳ chức năng giữa các haplotype (Hình 8D). Để kiểm tra dấu hiệu chọn lọc tại locus *GmGA2ox16*, chúng tôi đã kiểm tra sự đa dạng nucleotide trên vùng gen 400 kb. Phân tích chỉ số cố định (Fst) cho thấy giá trị cao hơn giữa *G. soja* và các giống địa phương (0,36) và giữa *G. soja* và các giống cải tiến (0,45) (Hình 8E). Phân tích ROD cho thấy sự đa dạng nucleotide cao hơn đáng kể ở *G. soja* so với các dòng thuần hóa (Hình 8F), phù hợp với quá trình chọn lọc mạnh trong quá trình thuần hóa. Những kết quả này chứng minh rằng *GmGA2ox16* đã trải qua quá trình chọn lọc nhân tạo mạnh mẽ, nhấn mạnh tầm quan trọng của nó trong các chương trình lai tạo hiện đại.



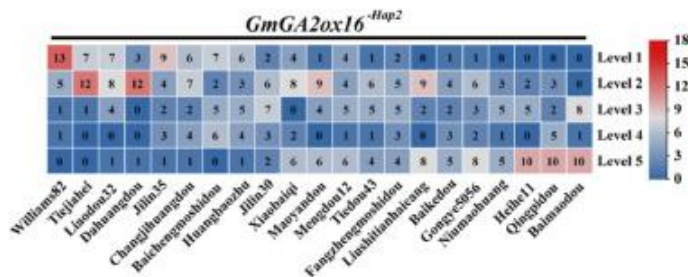
**Hình 8.** Biến dị kiểu gen và tiến hóa di truyền của gen *GmGA2ox16*. (A) Biến dị trình tự kiểu gen trong trình tự CDS của *GmGA2ox16*. (B) Sơ đồ minh họa sự phân bố các biến thể DNA được xác định trong trình tự CDS của *GmGA2ox16*. Số lượng mẫu mang kiểu gen tương ứng và phân loại phân loài được ghi chú bên cạnh bảng. S đại diện cho *G. soja*; L đại diện cho giống địa phương; C đại diện cho giống cải tiến. (C) Phân bố tần suất kiểu gen. Biểu đồ hình tròn thể hiện tỷ lệ của mỗi kiểu gen trong *G. soja* (n = 99), giống địa phương (n = 999) và giống cải tiến (n = 1703). (D) Cấu trúc ba chiều của *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> và *GmGA2ox16*<sup>-Hap2</sup>. Vùng DIOX\_N được hiển thị màu hồng, vùng 2OG-FeII\_Oxy được hiển thị màu vàng, và các gốc axit amin ở vị trí 31 và 182 được hiển thị màu đỏ. (E) và (F) Giá trị  $F_{st}$  và ROD ở đậu tương hoang dã, giống địa phương và giống cải tiến trên các vùng gen 400 kb xung quanh *GmGA2ox16*. Mũi tên màu đen chỉ vị trí vật lý của *GmGA2ox16*.

Để xác định xem hai kiểu gen của *GmGA2ox16* có mang lại khả năng chịu mặn khác nhau hay không, chúng tôi đã tiến hành phân tích kiểu hình 102 mẫu đậu tương (81 mẫu mang *GmGA2ox16*<sup>Hap1</sup> và 21 mẫu mang *GmGA2ox16*<sup>Hap2</sup>) dưới điều kiện stress mặn và định lượng khả năng chịu mặn bằng chỉ số héo rũ. Sau khi xử lý bằng stress mặn, tỷ lệ các dòng mang *GmGA2ox16*<sup>Hap1</sup> được phân loại là có khả năng chịu mặn cấp 1 cao hơn đáng kể so với các dòng mang *GmGA2ox16*<sup>Hap2</sup> (Hình 9A và B). Phân tích chỉ số héo rũ cho thấy các dòng mang *GmGA2ox16*<sup>Hap1</sup> thể hiện khả năng chịu mặn vượt trội hơn so với các dòng mang *GmGA2ox16*<sup>Hap2</sup> (Hình 9C). Những kết quả này chứng minh rằng *GmGA2ox16*<sup>Hap1</sup> có liên quan đến khả năng chịu mặn được tăng cường ở đậu tương.

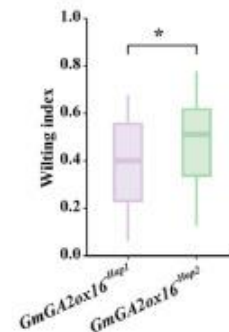
A



B



C



**Hình 9.** Hai kiểu gen của *GmGA2ox16* khác nhau về chỉ số héo rũ dưới điều kiện stress mặn. (A, B) Bản đồ nhiệt phân loại khả năng chịu mặn của 102 giống đậu tương. Hai mươi cây mỗi giống (cột) được chấm điểm sau 10 ngày chịu stress mặn và được phân loại vào năm mức độ nghiêm trọng (hàng; 1–5) theo Bảng bổ sung 5. Các con số biểu thị số lượng cây. (C) Phân tích mối liên hệ giữa hai kiểu gen *GmGA2ox16* và chỉ số héo rũ. Chỉ số héo rũ được tính toán dựa trên số lượng của mỗi giống ở các mức độ chịu mặn tương ứng. \* $P < 0,05$ , được xác định bằng phép thử t một phía của Student.

#### 4. THẢO LUẬN

Hiện tượng nhiễm mặn đất là một yếu tố gây stress phi sinh học chính, hạn chế nghiêm trọng sản lượng đậu tương toàn cầu (Feng và cs, 2015; Sun và cs, 2019). Gibberellin (GA), các phytohormone quan trọng, đóng vai trò trung tâm trong việc điều phối sự sinh trưởng của cây và phản ứng với stress (Gao và Chu, 2020a), với quá trình khử hoạt GA do GA2ox điều hòa là một quá trình then chốt trong việc cân bằng sự đánh đổi này (Shan và cs, 2014b; Lo và cs, 2017a; Shi và cs, 2019b). Nghiên cứu này cung cấp phân tích toàn

diện trên toàn bộ hệ gen của toàn bộ họ gen gibberellin oxidase ở đậu tương, bao gồm các phân nhóm *GmGA20ox*, *GmGA3ox*, *C19-GmGA20ox* và *C20-GmGA20ox*. Ngoài việc lập danh mục các gen này, chúng tôi đã mô tả sự mở rộng tiến hóa của chúng và, quan trọng hơn, đã xác định một nhóm cốt lõi các gen *C19-GmGA20ox* là các chất trung gian chính của khả năng chịu đựng stress mặn, nhân mạnh tiềm năng của chúng trong công tác chọn giống đậu tương.

Chúng tôi đã tiến hành phân tích tin sinh học có hệ thống đối với 48 gen *GmGAox*. Phân tích tính tương đồng trình tự cho thấy lịch sử đa bội cổ đại của đậu tương là động lực cốt lõi thúc đẩy sự mở rộng của siêu họ *GmGAox* (Schmutz và cs, 2010), trong khi các phân họ khác nhau thể hiện các chiến lược mở rộng riêng biệt (Hình 4). Sự mở rộng của phân họ *GmGA3ox* được thúc đẩy hoàn toàn bởi sự nhân đôi đoạn gen phù hợp với sự nhân đôi toàn bộ bộ gen (WGD). Ngược lại, phân họ *GmGA20ox* trải qua một con đường tiến hóa phức tạp hơn, chủ yếu thông qua sự nhân đôi đoạn gen nhưng được bổ sung bởi các sự nhân đôi liên tiếp gần đây. Toàn bộ phân họ *GmGA20ox* sử dụng cả hai chiến lược, nhưng hai lớp chức năng của nó phân hóa: các gen *C19-GmGA20ox* mở rộng thông qua sự kết hợp giữa các sự kiện nhân đôi đoạn gen và nhân đôi liên tiếp, trong khi các gen *C20-GmGA20ox* tuân theo một lịch sử nhân đôi tương đối đơn giản hơn liên quan đến cả hai cơ chế. Phân tích yếu tố cis của vùng khởi động cho thấy thêm rằng vùng khởi động của các gen *GmGAox* được làm giàu với nhiều yếu tố liên quan đến stress phi sinh học (ví dụ: MYB, MYC) (Abe và cs 1997, 2003; Wang và cs, 2014), phản ứng hormone (ví dụ: ABRE, ERE) (Bhuria và cs, 2016; Waseem và cs, 2021; Zhao và cs, 2025) và khả năng phản ứng với ánh sáng (ví dụ: Hộp 4) (Hình 3). Điều này cung cấp cơ sở điều hòa phiên mã, cho thấy các gen *GmGAox* có thể tích hợp nhiều tín hiệu môi trường khác nhau (ví dụ: stress muối, hạn hán) và tín hiệu hormone nội sinh (ví dụ: ABA, ethylene), do đó hoạt động như các trung tâm cân bằng sự sinh trưởng và khả năng phòng vệ trước stress của đậu tương.

Các mô hình biểu hiện gen thường báo trước các chức năng tiềm năng của chúng. Các hồ sơ biểu hiện đặc hiệu mô của chúng tôi cho thấy các gen *GmGAox* được biểu hiện trong nhiều mô đậu tương khác nhau, ngụ ý vai trò của chúng trong suốt vòng đời của cây đậu tương (Hình 4A). Quan trọng hơn, dữ liệu transcriptome và RT-qPCR dưới điều kiện stress muối cho thấy một tập hợp cốt lõi các gen *C19-GmGA20ox* (bao gồm *GmGA20ox1*, 8, 15, 16, 17 và 20) đã được điều chỉnh tăng đáng kể và nhanh chóng trong mô rễ (Hình 4B–D–I). Mô hình này rất phù hợp với các quan sát về sự cảm ứng gen *GA2ox* dưới điều kiện stress ở các loài như lúa (Shan và cs, 2014b) và bông (Shi và cs, 2019b). Điều này cho thấy mạnh mẽ rằng việc điều chỉnh tăng biểu hiện *GA2ox* để giảm mức GA hoạt động là một cơ chế thích nghi được bảo tồn đối với stress muối ở thực vật.

Để xác nhận chức năng của các gen phản ứng với muối này, chúng tôi tập trung vào *GmGA20ox16*, 17 và 20. Định vị dưới tế bào cho thấy sự hiện diện của chúng cả trong nhân và tế bào chất (Hình 5), phù hợp với chức năng enzym và khả năng tham gia vào các quá trình sinh học đa dạng. Biểu hiện dị loại trong nấm men đã xác nhận rằng cả ba gen *GmGA20ox* đều có thể tăng cường khả năng chịu mặn (Hình 6). Phát hiện này được chứng thực thêm trong một hệ thống thực vật phức tạp hơn: rễ lông đậu tương chuyển gen biểu hiện quá mức *GmGA20ox16* cho thấy tỷ lệ sống sót cao hơn đáng kể và duy trì vẻ ngoài khỏe mạnh hơn dưới điều kiện stress muối so với nhóm đối chứng (Hình 7A–C). Cơ chế sinh lý cơ bản có thể liên quan đến sự cân bằng các loại oxy hoạt tính (ROS). Chúng tôi nhận thấy rằng hoạt động của superoxide dismutase (SOD) và peroxidase (POD) cao hơn đáng kể, trong khi hàm lượng sản phẩm peroxy hóa lipid

malondialdehyde (MDA) thấp hơn đáng kể ở rễ biểu hiện quá mức *GmGA2ox16* so với nhóm đối chứng (Hình 7E–G). Những dữ liệu này cùng nhau hỗ trợ một mô hình trong đó *GmGA2ox16* làm bất hoạt các GA hoạt động, có khả năng ổn định protein DELLA, và sau đó lập trình lại mạng lưới phiên mã để tăng cường hệ thống phòng vệ chống oxy hóa, từ đó làm giảm tổn thương oxy hóa do stress muối gây ra - một cơ chế cũng được hỗ trợ bởi các nghiên cứu trên lê (Guo và cs, 2024) và lúa (Lo và cs, 2017a).

Phân tích kiểu gen đã cung cấp bằng chứng di truyền tiến hóa về tầm quan trọng sinh học của *GmGA2ox16*. Phân tích 2898 mẫu đậu tương cho thấy sự thay đổi mạnh mẽ về tần số kiểu gen, cùng với giá trị  $F_{st}$  và ROD cao đáng kể trong các quần thể được canh tác, cho thấy rằng *GmGA2ox16* đã trải qua quá trình chọn lọc nhân tạo mạnh mẽ trong quá trình thuần hóa (Liu và cs, 2020b). Chúng tôi đã phát hiện hai kiểu gen chính trong quần thể, trong đó kiểu gen *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> được phát hiện chủ yếu ở các giống địa phương và giống cải tiến, chiếm lần lượt 71,17% và 78,10% số mẫu (Hình 8C). Giá trị  $F_{st}$  cao đáng kể giữa đậu tương hoang dã (*G. soja*) và các giống địa phương (0,36), và giữa *G. soja* và các giống cải tiến (0,45), cùng với sự đa dạng nucleotide giảm rõ rệt trong các quần thể được canh tác, cho thấy sự chọn lọc mạnh mẽ tại locus này trong quá trình thuần hóa và cải tiến (Hình 8E và F). Hai SNP không đồng nghĩa phân biệt các kiểu gen (N31D và A182P) nằm trong các vùng DIOX\_N và 2OG-FerII Oxy được bảo tồn (Hình 8D), cho thấy sự khác biệt chức năng tiềm tàng giữa các kiểu gen. Những phát hiện này khẳng định vai trò quan trọng của locus này trong quá trình thuần hóa và cung cấp bằng chứng trực tiếp về giá trị của nó trong các chương trình lai tạo hiện đại (Liu và cs, 2023).

Đậu tương trồng trọt có khả năng chịu mặn kém hơn so với đậu tương hoang dã (Kofsky và cs, 2018), phản ánh sự đánh đổi kinh điển trong quá trình thuần hóa. Việc chọn lọc nhân tạo mạnh mẽ đối với các đặc điểm năng suất cao và hàm lượng dầu cao, kết hợp với hiệu ứng "hitchhiking", thúc đẩy các alen có lợi và có hại liên kết chặt chẽ, vô tình loại bỏ nhiều locus thích nghi với stress khỏi nguồn gen của cây trồng (Zhu và cs, 2025). Ở đây, chúng tôi tiết lộ rằng *GmGA2ox16*<sup>-Hap2</sup> chỉ có ở các giống hoang dã, trong khi *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> vượt trội hơn lại chiếm ưu thế ở các giống địa phương và giống cải tiến. Chúng tôi giả thuyết rằng mô hình này bắt nguồn từ một đột biến de novo sau quá trình thuần hóa mang lại khả năng chịu mặn được tăng cường, với *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> sau đó được giữ lại và lan truyền tích cực thông qua chọn lọc nhân tạo. Phân tích kiểu hình trực tiếp của 102 dòng giống dưới điều kiện stress muối đã xác nhận giả thuyết này - các dòng mang *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> thể hiện chỉ số héo rũ thấp hơn đáng kể và tỷ lệ cây chịu mặn cấp 1 cao hơn so với các dòng mang *GmGA2ox16*<sup>-Hap2</sup> (Hình 9). Dữ liệu sinh lý này xác nhận rằng *GmGA2ox16*<sup>-Hap1</sup> là một kiểu gen ưu tú được nâng cao nhờ chọn lọc tích cực, dung hòa thành công khả năng thích ứng với stress với hiệu suất của giống cây trồng.

Dữ liệu chức năng của chúng tôi cho thấy rõ ràng rằng khả năng chịu mặn do *GmGA2ox16* mang lại đạt được thông qua việc điều chỉnh tinh tế mức độ GA nội sinh. Phát hiện này phù hợp mạnh mẽ với khái niệm mới nổi về "mức GA tối ưu" để cân bằng sự phát triển của cây và khả năng thích ứng với stress, như đã được làm rõ gần đây ở cây lúa (Guo và cs, 2025). Trong mô hình đó, cả nồng độ GA quá cao hoặc quá thấp đều có hại: GA cao thúc đẩy sự tích lũy ROS, trong khi GA thấp dẫn đến sự ức chế các gen phản ứng với stress thông qua con đường H3K27me3 do DELLA-NGR5-LC2 điều hòa. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự biểu hiện của *GmGA2ox16* do muối gây ra có khả năng làm giảm hàm lượng GA hoạt động, do đó chuyển dịch cân bằng hormone ra khỏi trạng thái GA cao, nhạy cảm với stress, và hướng tới mức độ trung gian, bảo vệ. Sự điều chỉnh này có khả năng ổn định các protein DELLA, từ đó có thể điều phối phản ứng chống oxy hóa

được tăng cường quan sát thấy ở rễ cây chuyển gen, dẫn đến khả năng chịu mặn được cải thiện.

Tóm lại, chúng tôi đề xuất một mô hình hoạt động minh họa vai trò của *GmGA2ox16* trong phản ứng của đậu tương đối với stress mặn. Stress mặn, thông qua các tín hiệu thượng nguồn chưa được làm rõ hoàn toàn, gây ra sự biểu hiện của *GmGA2ox16*. Enzyme GA2ox được mã hóa sẽ làm bất hoạt các GA hoạt tính sinh học (ví dụ: GA4), làm giảm mức độ tín hiệu GA, điều này có thể dẫn đến sự ổn định của protein DELLA. Các protein DELLA được ổn định hoạt động như các trung tâm phiên mã, có khả năng kích hoạt trực tiếp hoặc gián tiếp một loạt các gen phản ứng với stress (ví dụ: gen enzyme chống oxy hóa) và tương tác với các con đường tín hiệu hormone khác (ví dụ: ABA), cùng nhau phối hợp một trạng thái phòng vệ stress được tăng cường, bao gồm khả năng loại bỏ ROS được cải thiện và duy trì cân bằng nội môi tế bào, cuối cùng mang lại khả năng chịu stress mặn cao hơn cho đậu tương. Nghiên cứu của chúng tôi không chỉ cung cấp các nguồn gen ứng cử viên có giá trị (đặc biệt là *GmGA2ox16*) cho việc chọn giống đậu tương kháng stress mà còn đặt nền tảng cho việc giải mã sâu hơn mạng lưới điều hòa tinh tế của quá trình chuyển hóa gibberellin trong thích ứng môi trường của thực vật. Nghiên cứu trong tương lai nên tập trung vào việc xác định các yếu tố phiên mã thượng nguồn chịu trách nhiệm gây ra biểu hiện *GmGA2ox* dưới điều kiện stress muối và điều tra sâu sắc sự khác biệt về chức năng giữa các haplotype protein.

## 5. KẾT LUẬN

Chúng tôi cung cấp một bản đồ toàn diện về họ gen GA-oxidase của đậu tương và tái tạo lịch sử mở rộng của nó thông qua các lần sao chép phân đoạn và sao chép song song lặp đi lặp lại. Phân tích chức năng cho thấy các thành viên *C19-GA2ox* - đặc biệt là *GmGA2ox16* - là những yếu tố điều hòa quan trọng về khả năng chịu mặn, giúp tăng cường khả năng chống oxy hóa và hạn chế tổn thương oxy hóa. Đáng chú ý, alen *GmGA2ox16<sup>Hapl1</sup>* ưu việt đã được chọn lọc nhân tạo với tần suất cao, nhấn mạnh giá trị nông học của nó. Những phát hiện này xác định *GmGA2ox16* và các biến thể kiểu gen của nó là những mục tiêu hàng đầu, sẵn sàng cho việc chọn giống nhằm phát triển các giống đậu tương chịu mặn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15 (1), 63–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.006130>.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K., 1997. Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9 (10), 1859–1868. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.10.1859>.
- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A.J., Bambrick, J., Bodenstern, S.W., Evans, D.A., Hung, C.C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Zengulyte, A., Arvaniti, E., Beattie, C., Bertolli, O., Bridgland, A., Cherepanov, A., Congreve, M., Cowen-Rivers, A.I., Cowie, A., Figurnov, M., Fuchs, F.B., Gladman, H., Jain, R., Khan, Y.A., Low, C.M.R., Perlin, K., Potapenko, A., Savy, P., Singh, S., Stecula, A., Thillaisundaram, A., Tong, C., Yakneen, S., Zhong, E.D., Zielinski, M., Zidek, A., Bapst, V., Kohli, P.,

- Jaderberg, M., Hassabis, D., Jumper, J.M., 2024. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 630 (8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
- Ahmad, R., Ullah, I., Ullah, Z., Alam, S., Rady, A., Khan, S.S., Durrani, I.S., 2024. Genomic exploration: unraveling the intricacies of indica rice *Oryza sativa* L. germin-like protein gene 12-3 (OsGLP12-3) promoter via cloning, sequencing, and in silico analysis. *ACS Omega* 9 (13), 15271–15281. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09670>.
- Ain-Ali, Q.U., Mushtaq, N., Amir, R., Gul, A., Tahir, M., Munir, F., 2021. Genome-wide promoter analysis, homology modeling and protein interaction network of dehydration responsive element binding (DREB) gene family in *Solanum tuberosum*. *PLoS One* 16 (12), e0261215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261215>.
- Almeida-Silva, F., Pedrosa-Silva, F., Venancio, T.M., 2023. The soybean expression atlas v2: a comprehensive database of over 5000 RNA-seq samples. *Plant J.* 116 (4), 1041–1051. <https://doi.org/10.1111/tpj.16459>.
- Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E., Noble, W.S., 2015. The MEME suite. *Nucleic Acids Res.* 43 (W1), W39–W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.
- Betts, N.S., Dockter, C., Berkowitz, O., Collins, H.M., Hooi, M., Lu, Q., Burton, R.A., Bulone, V., Skadhauge, B., Whelan, J., Fincher, G.B., 2020. Transcriptional and biochemical analyses of gibberellin expression and content in germinated barley grain. *J. Exp. Bot.* 71 (6), 1870–1884. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz546>.
- Bhuria, M., Goel, P., Kumar, S., Singh, A.K., 2016. The promoter of AtUSP is Co-regulated by phytohormones and abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 7, 1957. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01957>.
- Chen, C., Wu, Y., Li, J., Wang, X., Zeng, Z., Xu, J., Liu, Y., Feng, J., Chen, H., He, Y., Xia, R., 2023. TBtools-II: a "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining. *Mol. Plant* 16 (11), 1733–1742. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.09.010>.
- Chiang, H.H., Hwang, I., Goodman, H.M., 1995. Isolation of the arabidopsis GA4 locus. *Plant Cell* 7 (2), 195–201. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.2.195>.
- Feng, L., Chen, Z., Ma, H., Chen, X., Li, Y., Wang, Y., 2015. The IQD gene family in soybean: structure, phylogeny, evolution and expression (vol 9, e110896, 2014). *PLoS One* 10 (3), 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119318>.
- Feng, L., Chen, Z., Ma, H., Chen, X., Li, Y., Wang, Y., Xiang, Y., 2014. The IQD gene family in soybean: structure, phylogeny, evolution and expression. *PLoS One* 9 (10), e110896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110896>.
- Gao, S., Chu, C., 2020a. Gibberellin metabolism and signaling: targets for improving agronomic performance of crops. *Plant Cell Physiol.* 61 (11), 1902–1911. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa104>.
- Gao, S., Chu, C., 2020b. Gibberellin metabolism and signaling: targets for improving agronomic performance of crops. *Plant Cell Physiol.* 61 (11), 1902–1911. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa104>.
- Gautam, R., Ahmed, I., Shukla, P., Meena, R.K., Kirti, P.B., 2019. Genome-wide characterization of ALDH superfamily in *Brassica rapa* and enhancement of stress

tolerance in heterologous hosts by BrALDH7B2 expression. *Sci. Rep.* 9 (1), 7012. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43332-1>.

Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D.S., 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40, D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>. Database issue.

Guo, G., Zhang, H., Dong, W., Xu, B., Wang, Y., Zhao, Q., Liu, L., Tang, X., Liu, L., Ye, Z., Heng, W., Zhu, L., Jia, B., 2024. Overexpression of PbrGA2ox1 enhances pear drought tolerance through the regulation of GA3-inhibited 3-inhibited reactive oxygen species detoxification and abscisic acid signaling. *J. Integr. Agric.* 23 (9), 2989–3011. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2024.01.012>.

Guo, S.Q., Chen, Y.X., Ju, Y.L., Pan, C.Y., Shan, J.X., Ye, W.W., Dong, N.Q., Kan, Y., Yang, Y.B., Zhao, H.Y., Yu, H.X., Lu, Z.Q., Lei, J.J., Liao, B., Mu, X.R., Cao, Y.J., Guo, L., Gao, J., Zhou, J.F., Yang, K.Y., Lin, H.X., Lin, Y., 2025. Fine-tuning gibberellin improves rice alkali-thermal tolerance and yield. *Nature* 639 (8053), 162–171. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08486-7>.

Hedden, P., 2001. Gibberellin metabolism and its regulation. *J. Plant Growth Regul.* 20 (4), 317–318. <https://doi.org/10.1007/s003440010039>.

Hedden, P., Thomas, S.G., 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444 (1), 11–25. <https://doi.org/10.1042/bj20120245>.

Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C.D., Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., Gresshoff, P.M., 2007. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat. Protoc.* 2 (4), 948–952. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.141>.

Kofsky, J., Zhang, H., Song, B.H., 2018. The untapped genetic reservoir: the past, current, and future applications of the wild soybean (*Glycine soja*). *Front. Plant Sci.* 9, 949. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00949>.

Lam, H.M., Xu, X., Liu, X., Chen, W., Yang, G., Wong, F.L., Li, M.W., He, W., Qin, N., Wang, B., Li, J., Jian, M., Wang, J., Shao, G., Wang, J., Sun, S.S., Zhang, G., 2010. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nat. Genet.* 42 (12), 1053–1059. <https://doi.org/10.1038/ng.715>.

Lange, T., Kramer, C., Pimenta Lange, M.J., 2020. The class III gibberellin 2-Oxidases AtGA2ox9 and AtGA2ox10 contribute to cold stress tolerance and fertility. *Plant Physiol.* 184 (1), 478–486. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00594>.

Lescot, M., D'éhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Rombauts, S., 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 30 (1), 325–327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>.

Li, S., Sun, Z., Sang, Q., Qin, C., Kong, L., Huang, X., Liu, H., Su, T., Li, H., He, M., Fang, C., Wang, L., Liu, S., Liu, B., Liu, B., Fu, X., Kong, F., Lu, S., 2023. Soybean reduced internode 1 determines internode length and improves grain yield at dense planting. *Nat. Commun.* 14 (1), 7939. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42991-z>.

- Liu, A., Xiao, Z., Li, M.W., Wong, F.L., Yung, W.S., Ku, Y.S., Wang, Q., Wang, X., Xie, M., Yim, A.K., Chan, T.F., Lam, H.M., 2019. Transcriptomic reprogramming in soybean seedlings under salt stress. *Plant Cell Environ.* 42 (1), 98–114. <https://doi.org/10.1111/pce.13186>.
- Liu, Y., Du, H., Li, P., Shen, Y., Peng, H., Liu, S., Zhou, G.A., Zhang, H., Liu, Z., Shi, M., Huang, X., Li, Y., Zhang, M., Wang, Z., Zhu, B., Han, B., Liang, C., Tian, Z., 2020b. Pan-genome of wild and cultivated soybeans. *Cell* 182 (1), 162–176.e113. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.023>.
- Liu, Y., Zhang, Y., Liu, X., Shen, Y., Tian, D., Yang, X., Liu, S., Ni, L., Zhang, Z., Song, S., Tian, Z., 2023. SoyOmics: a deeply integrated database on soybean multi-omics. *Mol. Plant* 16 (5), 794–797. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.03.011>.
- Lo, S., Ho, T., Liu, Y., Jiang, M., Hsieh, K., Chen, K., Yu, L., Lee, M., Chen, C., Huang, T., Kojima, M., Sakakibara, H., Chen, L., Yu, S., 2017a. Ectopic expression of specific GA2 oxidase mutants promotes yield and stress tolerance in rice. *Plant Biotechnol. J.* 15 (7), 850–864. <https://doi.org/10.1111/pbi.12681>.
- Lo, S.F., Ho, T.D., Liu, Y.L., Jiang, M.J., Hsieh, K.T., Chen, K.T., Yu, L.C., Lee, M.H., Chen, C.Y., Huang, T.P., Kojima, M., Sakakibara, H., Chen, L.J., Yu, S.M., 2017b. Ectopic expression of specific GA2 oxidase mutants promotes yield and stress tolerance in rice. *Plant Biotechnol. J.* 15 (7), 850–864. <https://doi.org/10.1111/pbi.12681>.
- Mengarelli, D.A., Zanol, M.I., 2021. Genome-wide characterization and analysis of the CCT motif family genes in soybean (*Glycine max*). *Planta* 253 (1), 15. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03537-5>.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar Gustavo, A., Sonnhammer, E.L.L., Tosatto, S.C.E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L.J., Finn, R.D., Bateman, A., 2020. Pfam: the protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49 (D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.
- Olszewski, N., Sun, T.P., Gubler, F., 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14 (Suppl. 1), S61–S80. <https://doi.org/10.1105/tpc.010476>.
- Suppl. Ruan, X., Zhang, M., Ling, T., Hei, X., Zhang, J., 2025. The GA2ox gene family in *Solanum pennellii*: genome-wide identification and expression analysis under salinity stresses. *Genes* 16 (2). <https://doi.org/10.3390/genes16020158>.
- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.C., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A., 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463 (7278), 178–183. <https://doi.org/10.1038/nature08670>.
- Shan, C., Mei, Z., Duan, J., Chen, H., Feng, H., Cai, W., 2014a. OsGA2ox5, a gibberellin metabolism enzyme, is involved in plant growth, the root gravity response and salt stress. *PLoS One* 9 (1), e87110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087110>.

- Shan, C., Mei, Z., Duan, J., Chen, H., Feng, H., Cai, W., 2014b. OsGA2ox5, a Gibberellin metabolism enzyme, is involved in plant growth, the root gravity response and salt stress. *PLoS One* 9 (1), 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087110>.
- Shi, J., Wang, J., Wang, N., Zhou, H., Xu, Q., Yan, G., 2019a. Overexpression of StGA2ox1 gene increases the tolerance to abiotic stress in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 187 (4), 1204–1219. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2848-6>.
- Shi, J.-B., Wang, N., Zhou, H., Xu, Q.-H., Yan, G.-T., 2019b. The role of gibberellin synthase gene GhGA2ox1 in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) responses to drought and salt stress. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 66 (3), 298–308. <https://doi.org/10.1002/bab.1725>.
- Shi, J.B., Wang, N., Zhou, H., Xu, Q.H., Yan, G.T., 2019c. The role of gibberellin synthase gene GhGA2ox1 in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) responses to drought and salt stress. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 66 (3), 298–308. <https://doi.org/10.1002/bab.1725>.
- Shi, W.Y., Du, Y.T., Ma, J., Min, D.H., Jin, L.G., Chen, J., Chen, M., Zhou, Y.B., Ma, Y.Z., Xu, Z.S., Zhang, X.H., 2018. The WRKY transcription factor GmWRKY12 confers drought and salt tolerance in soybean. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms19124087>.
- Su, H., Qi, H., Yin, S., 2024a. Overexpression of the *Poa pratensis* GA2ox gene family significantly reduced the plant height of transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Poa pratensis*. *Plant Physiol. Biochem.* 216, 109154. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.109154>.
- Su, T., Liu, H., Wu, Y., Wang, J., He, F., Li, H., Li, S., Wang, L., Li, L., Cao, J., Lu, Q., Zhao, X., Xiang, H., Lin, C., Lu, S., Liu, B., Kong, F., Fang, C., 2024b. Soybean hypocotyl elongation is regulated by a MYB33-SWEET11/21-GA2ox8c module involving long-distance sucrose transport. *Plant Biotechnol. J.* 22 (10), 2859–2872. <https://doi.org/10.1111/pbi.14409>.
- Sun, J., Huang, S., Lu, Q., Li, S., Zhao, S., Zheng, X., Zhou, Q., Zhang, W., Li, J., Wang, L., Zhang, K., Zheng, W., Feng, X., Liu, B., Kong, F., Xiang, F., 2023. UV-B irradiation-activated E3 ligase GmILPA1 modulates gibberellin catabolism to increase plant height in soybean. *Nat. Commun.* 14 (1), 6262. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41824-3>.
- Sun, J., Zhang, X., Feng, J., Ma, X., Ji, Y., Chen, S., Li, J., Li, D., Wang, X., Zhao, L., 2025. The transcription factor GmFULc regulates soybean plant height by binding the promoter of a gibberellin-responsive gene. *Plant Physiol.* 197 (2). <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaf021>.
- Sun, L., Song, G., Guo, W., Wang, W., Zhao, H., Gao, T., Lv, Q., Yang, X., Xu, F., Dong, Y., Pu, L., 2019. Dynamic changes in genome-wide Histone3 Lysine27 trimethylation and gene expression of soybean roots in response to salt stress. *Front. Plant Sci.* 10, 1031. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01031>.
- Tajti, J., Hamow, K., Majl'ath, I., Gierczik, K., N' emeth, E., Janda, T., P' al, M., 2019. Polyamine-induced hormonal changes in eds5 and sid2 mutant arabidopsis plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225746>.

- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38 (7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Thomas, S.G., Phillips, A.L., Hedden, P., 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (8), 4698–4703. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4698>.
- Wang, R.K., Cao, Z.H., Hao, Y.J., 2014. Overexpression of a R2R3 MYB gene MdSIMYB1 increases tolerance to multiple stresses in transgenic tobacco and apples. *Physiol. Plantarum* 150 (1), 76–87. <https://doi.org/10.1111/ppl.12069>.
- Wang, X., Li, M.W., Wong, F.L., Luk, C.Y., Chung, C.Y., Yung, W.S., Wang, Z., Xie, M., Song, S., Chung, G., Chan, T.F., Lam, H.M., 2021a. Increased copy number of gibberellin 2-oxidase 8 genes reduced trailing growth and shoot length during soybean domestication. *Plant J.* 107 (6), 1739–1755. <https://doi.org/10.1111/tpj.15414>.
- Wang, Y., Du, F., Wang, J., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, X., Zheng, T., Li, Z., Xu, J., Wang, W., Fu, B., 2021b. Molecular dissection of the gene OsGA2ox8 conferring osmotic stress tolerance in rice. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179107>.
- Waseem, M., Aslam, M.M., Shaheen, I., 2021. The DUF221 domain-containing (DDP) genes identification and expression analysis in tomato under abiotic and phytohormone stress. *GM Crops Food* 12 (1), 586–599. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1962207>.
- Xu, Y.L., Li, L., Wu, K., Peeters, A.J., Gage, D.A., Zeevaart, J.A., 1995. The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (14), 6640–6644. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6640>.
- Zhai, H., Lü, S., Liang, S., Wu, H., Zhang, X., Liu, B., Kong, F., Yuan, X., Li, J., Xia, Z., 2014. GmFT4, a homolog of FLOWERING LOCUS T, is positively regulated by E1 and functions as a flowering repressor in soybean. *PLoS One* 9 (2), e89030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089030>.
- Zhao, Y., Liu, Y., Chai, Y., Zhang, H., Wei, M., Li, C., 2025. Genome-wide identification and characterization of the growth-regulating factor gene family responsive to abiotic stresses and phytohormone treatments in *Populus ussuriensis*. *Int. J. Mol. Sci.* 26 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms26073288>.
- Zhu, Z., Wang, Y., Liu, S., Wang, S., Li, J., Fang, C., Liu, Y., Yang, X., Tian, D., Song, S., Tian, Z., 2025. Genomic atlas of 8,105 accessions reveals stepwise domestication, global dissemination, and improvement trajectories in soybean. *Cell* 188 (23), 6519–6535.e6515. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2025.09.007>.