



基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术创制大豆 *gmⁿark* 超结瘤突变体

柏梦焱^{1,2}, 袁珏慧^{1,2}, 孙嘉丰^{1,2}, 厉苏宁^{2,3}, 关跃峰²

(1. 福建农林大学 资源与环境学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 海峡联合研究院园艺植物生物学与代谢组学研究中心, 福建 福州 350002; 3. 福建农林大学 生物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 为研究豆科作物结瘤自我调节机制 (autoregulation of nodulation, AON) 的作用机理, 运用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术创制大豆品种华春 6 号超结瘤 *gmⁿark* 突变体, 设计 3 条靶向目的基因 *GmNARK* 的特异 sgRNA, 构建 CRISPR-Cas9 敲除载体。通过毛根转化试验选取 sgRNA-B 和 sgRNA-C 两条编辑效率较高的 sgRNA 用于大豆稳定转化, 在 T₁ 代筛选出 8 种不同突变类型的突变体, 在 T₂ 代通过营养液水培试验证明其中 5 种突变体有超结瘤的表型。选取 *gmⁿark-A* 突变体作进一步表型分析, 发现其具有超结瘤、植株矮小和叶片深绿的表型。本研究所创制的 *gmⁿark* 突变体是研究 AON 途径作用机制与根瘤发育的重要遗传材料, 同时此新种质资源具有作为“绿肥”与其它作物进行间作或轮作的巨大潜力。

关键词: 大豆; 基因编辑; 结瘤自我调节机制; 移码突变

Generation of *gmⁿark* Mutant with Supernodulation via CRISPR-Cas9 in Soybean

BAI Meng-yan^{1,2}, YUAN Jue-hui^{1,2}, SUN Jia-feng^{1,2}, LI Su-ning^{2,3}, GUAN Yue-feng²

(1. College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. FAFU-UCR Joint Center for Horticultural Biology and Metabolomics, Haixia Institute of Science and Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In order to study the mechanism of the autoregulation of nodulation (AON) in the legumes, the gene editing technology of CRISPR-Cas9 system was used to create the *gmⁿark* mutant of the soybean variety Huachun 6, and three specific sgRNAs were designed to locate the targeted gene *GmNARK* and constructed into a CRISPR-Cas9 knockout vector. Two sgRNAs with high editing efficiency, sgRNA-B and sgRNA-C, were selected for stable transformation through hairy root transformation experiments. Furthermore, eight mutants of different mutation types were screened in T₁ generation and five of them had the phenotype of supernodulation which is verified by hydroponic experiment. In the further phenotypic analysis of *gmⁿark-A* mutant, it was found that *gmⁿark-A* owned a larger number of nodules, smaller shoot and root and greener leaves than WT. These data proved that the *gmⁿark* mutant created in the study is an important genetic material for studying the mechanism of AON pathway and the development of nodule. At the same time, this new germplasm resource has great potential in intercropping with other crops as ‘green manure’.

Keywords: Soybean; Genome editing; Autoregulation of nodulation; Frameshift mutation

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是我们重要的粮食和油料作物, 是人类获取油脂和蛋白质的主要来源之一, 同时大豆的生物固氮作用为农业的可持续发展提供了重要保证。根瘤是豆科植物与根瘤细菌的共生体, 可以将大气中的氮气固定成氨, 氨又转化为各种固定产物, 如尿素、尿囊素、尿囊酸等^[2]。豆科作物的共生固氮每年向农业系统输出约 4 000 万 t 氮^[2], 因此研究豆科作物的生物固氮机

理及提高其生物固氮能力对全球农业的发展起到至关重要的作用。

根瘤的发育可分为 3 个过程: 首先起始于根瘤菌的结瘤因子被豆科植物的结瘤因子受体所识别; 第二步根瘤菌附着在根毛上, 诱导根毛卷曲, 使附着的根瘤菌进入根毛, 进而形成侵染线 (infection thread, IT); 第三步是根瘤器官的发育, 从根瘤原基逐渐发育成具有固氮能力的成熟根瘤^[3,4]。根瘤的

收稿日期: 2019-02-25

基金项目: 国家十三五重大研发计划 (2016YFD0100700)。

第一作者简介: 柏梦焱 (1993 -), 男, 硕士, 主要从事 CRISPR-Cas9 技术研发与分子育种研究。E-mail: 461326458@qq.com。

通讯作者: 关跃峰 (1981 -), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆碳氮代谢调控及基因编辑研究。E-mail: guan@fafu.edu.cn。

形成虽然可以为植物生长提供氮营养,但生物固氮本身是一个耗能的过程,根瘤数目过多并不利于植物的生长,因此豆科植物在长期进化中发展出一种负反馈调节机制-结瘤自主调控机制(AON):主要通过根-茎-根之间的长距离信号交流实现对根瘤数量的控制^[5],受结瘤因子(nodule factor)的刺激后根部产生的信号分子被运输到地上部分^[6-7],地上部分识别此信号分子后激活下游基因的表达^[8],合成新的结瘤抑制因子再运输到根部^[9-10],被根部接收后抑制结瘤相关基因的表达^[11],从而实现对根瘤数量的调控。研究表明,识别和接收来自根部信号分子的是一类富含亮氨酸的类受体激酶 CLAVATA1 (CLV1)^[8]。CLV1 在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中,通过与经由 CLV3 加工而来的小分子多肽相结合,以细胞-细胞的短距离信号传递方式,调控着茎和花顶端分生组织细胞的增殖,CLV3 属于 CLE 家族 (CLAVATA3/ESR-related family) 成员,研究表明,CLE 家族所编码的蛋白或加工后的小分子多肽常作为胞外多肽激素发挥作用^[12],在大豆中类受体激酶为 GmNARK^[8],为进一步阐明大豆中的 AON 作用机制,十分有必要获取大豆 *gmnrnk* 突变体。

基因组编辑技术 (genome editing) 是一种可以在基因组水平上对 DNA 序列进行改造的遗传操作技术,目前已成为研究基因功能的最重要手段之一。2013 年,一种全新的 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas9) 基因组定点改造技术的出现使基因编辑技术得到广泛应用^[13],此系统只需 1 个 20 bp 的 sgRNA 短链来引导 cas9 蛋白就可以在生物体内特定靶位点进行有效地切割,引起 DNA 双链断裂 (DSB),并通过非同源末端连接 (NHEJ) 和同源重组 (HDR) 的方式对断裂的 DNA 双链进行修复,形成碱基插入、缺失、替换等突变类型^[14-15]。与之前的技术相比,CRISPR-Cas9 系统的靶位点选择范围要比 ZFN 或 TALEN 大得多,基本可以在任意 DNA 位点进行有效断裂,且避免了 ZFN 和 TALEN 的难以组装、脱靶等问题,能实现更精确的基因编辑修饰^[16]。随着 CRISPR-Cas9 技术的不断成熟,现在已经应用到动植物、微生物等领域。在植物界已广泛应用于拟南芥、水稻、小麦、番茄等^[17-22]。在大豆中也有较多关于 CRISPR-Cas9 技术应用的相关报道^[23-25]。因此为进一步研究 AON 调控机制及根瘤发育机理、根瘤与植物之间的碳氮代谢平衡,本研究利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术创制 *gmnrnk* 超

结瘤突变体,为大豆结瘤固氮的研究提供重要的遗传材料,同时为大豆分子育种提供新型种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用大豆品种为华春 6 号,由福建农林大学海峡联合研究院根系中心提供;CRISPR-Cas 载体 pGES201、大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 K599 和 GV3101 由福建农林大学海峡联合研究院园艺植物生物学及代谢组学研究中心提供。

1.2 试验设计

根据目的基因 *GmNARK* 序列设计 3 条 sgRNA,构建 CRISPR-Cas9 敲除载体。通过大豆毛根转化试验选取 20 条阳性毛根,Sanger 测序(擎科生物技术有限公司)鉴定不同 sgRNA 的基因编辑效果,从中筛选出高效 sgRNA 进行大豆的稳定转化。 T_0 代 PCR 鉴定阳性植株,并初步检测基因编辑情况;在 T_1 代和 T_2 代鉴定纯合编辑的 *gmnrnk* 突变植株,并分析突变类型; T_3 代水培统计不同 *gmnrnk* 纯合突变类型和野生型的根瘤数量、植株根部和地上部分长度和干重等表型。最后通过 *gmnrnk* 表型统计与分析筛选出适合作为遗传材料的超结瘤 *gmnrnk* 突变体。

1.3 方法

1.3.1 sgRNA 的设计 根据 Wm82. a2. v1 基因组中目的基因 *GmNARK* (Glyma. 12G040000) 的 DNA 序列设计 sgRNA,设计原则为:第一,保证 sgRNA 位于基因外显子上,其 PAM 序列为 NGG;第二,sgRNA 的 GC 含量为 25% ~ 80%;第三,sgRNA 靶向位点靠近基因的上游;第四,sgRNA 序列与脱靶位点至少有 1 个碱基不同。

1.3.2 CRISPR-Cas9 表达载体的构建 本研究使用的 CRISPR-Cas9 载体具有 2 个 *Bsa* I 内切酶粘性末端,合成 sgRNA 寡核苷酸链时需要在 sgRNA 正义链和反义链添加相应接头。在 sgRNA 正义链的 5' 端加“GGATT”,在 sgRNA 反义链的 5' 端加“AAAC”,并在其 3' 端加“A”。退火反应体系为 (50 μ L): 正义寡核苷酸 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 5 μ L,反义寡核苷酸 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 5 μ L,NaCl 终浓度为 0.1 μ mol \cdot L⁻¹,Tris-HCl (pH7.4) 终浓度为 50 mmol \cdot L⁻¹。将配制好的退火反应缓冲液混合,短暂离心后放置 PCR 仪上,运行程序为:95 $^{\circ}$ C 4 min,以 0.1 $^{\circ}$ C \cdot s⁻¹ 的速度降至 16 $^{\circ}$ C,退火后的双链产物可以立刻使用或者在 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。之后使用 *Bsa* I 对载体进行酶

切,并用 T4 连接酶连接后利用热激法转化 DH5 α 。用各自 sgRNA-F 作为正向引物,CRISPR-R (5'-GGCTCACGTTCAAACGTGGC-3') 作为反向引物,PCR 鉴定阳性克隆。将正确的阳性菌液提取质粒(所用试剂盒为天根质粒小提试剂盒),采用冻融法转化农杆菌 K599 和农杆菌 GV3101。

1.3.3 大豆转化

(1)大豆毛根转化

首先种子用氯气进行表面消毒,100 mL 次氯酸钠和 10 mL 浓盐酸混合。将 12 颗消毒后的种子种脐朝下放置在装有 1/2MS 培养基的 120 mm \times 25 mm 培养皿中(每 6 颗种子 1 排),将培养皿垂直放置在光照培养箱中,28 $^{\circ}$ C 光照培养 5~7 d(25 $^{\circ}$ C,18 h 光照,光强 140 moles \cdot m $^{-2}\cdot$ s $^{-1}$),直到子叶竖起,种皮大部分脱落。用解剖刀从根系上切下发芽的种子,切口在离子叶节大约 0.5 cm 的下胚轴区域。沿着子叶下胚轴垂直剖开种子,并去除子叶上胚轴(幼芽)及轴上的茎和芽。然后用解剖刀蘸取菌液,在子叶节附近制造 7~8 个切口,将切好的外植体放在装有无菌水润湿的双层滤纸的培养皿中,封口。25 $^{\circ}$ C 光照培养 4~5 d,然后转到含抑菌剂羧苄青霉素和筛选剂除草剂(草铵膦)的发根诱导培养基(MS + 1%~1.5% 蔗糖 + 500 mg \cdot L $^{-1}$ 羧苄青霉素 + 5 mg \cdot L $^{-1}$ 除草剂,pH5.8)上 25 $^{\circ}$ C 暗培养 10 d。

(2)大豆稳定转化

大豆稳定转化试验采用农杆菌介导的子叶节转化法^[26]。

1.3.4 基因编辑类型的鉴定 采用 PCR 扩增目的片段后利用一代测序的方法检测基因编辑的类型。基因编辑的判定结果可分为 4 种:未编辑、杂合编辑、双等位编辑和纯合编辑。确定发生基因编辑的判断标准为:测序结果与参考基因组序列一致,同时峰图并未从 sgRNA 位置处出现双峰则认定为未

发生基因编辑;测序结果与参考基因组相比在 sgRNA 位置处出现不同,如缺失、插入或者替换 <100 bp,同时峰图未出现双峰,则认定为纯合编辑;测序结果与参考基因组一致,但峰图在 sgRNA 位置处出现双峰,则认定为杂合编辑(杂合编辑为二倍体植物中目的基因发生基因编辑但等位基因未发生基因编辑);测序结果与参考基因组序列从 sgRNA 位置处开始不一致,并峰图从 sgRNA 位置处开始出现双峰,则认定为双等位编辑或者为杂合编辑(双等位编辑为二倍体植物中目的基因发生基因编辑,同时其等位基因也发生基因编辑,但是编辑类型不同)。

1.3.5 突变体表型统计与分析 突变体表型统计与分析采用大豆营养液水培的方式,将纯合突变体种子与野生型种子在蛭石中萌发 7 d 后在根瘤菌液中浸泡 1 h,将接种后的植株移植到同一个水培箱中,每个水培箱中突变体和野生型各 4 棵,3 个水培箱为 1 个处理(突变体和野生型各 12 棵)。大豆水培营养液每 7 d 更换一次,在种子萌发 42 d 后收样,对突变体和野生型的植株高度、根长以及根瘤数量等性状进行统计与分析,其中根瘤分为大根瘤(直径 \geq 2 mm)和小根瘤(直径<2 mm)。

1.4 数据分析

采用 Excel 2019 整理和分析数据;采用 SPSS 19.0 进行显著性分析;采用 Photoshop CC 2019 整理图片。

2 结果与分析

2.1 sgRNA 的设计与高效 sgRNA 筛选

GmNARK 基因全长 3 431 bp,共有 2 个外显子和 1 个内含子。根据 1.2.1 的 sgRNA 设计原则设计 3 条 sgRNA,均位于第一个外显子上,分别命名为 sgRNA-A、sgRNA-B 和 sgRNA-C(图 1)。

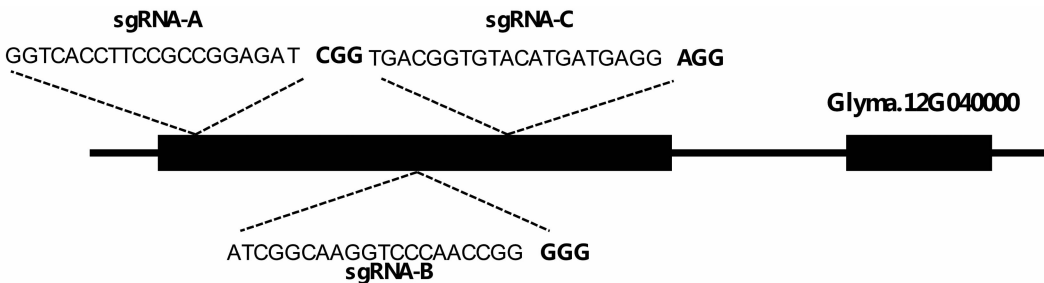


图 1 *GmNARK* 基因结构及 sgRNA 靶向位点示意图

Fig. 1 The gene structure of *GmNARK* and target sites of designed sgRNAs

通过阳性毛根检测基因编辑效果显示:sgRNA-A 的编辑效率为 30%, sgRNA-B 的编辑效率为 95%, sgRNA-C 的编辑效率为 85%。sgRNA-B 和 sgRNA-C 较 sgRNA-A 有较高的基因编辑效率,因此选择 sgRNA-B 和 sgRNA-C 进行大豆稳定转化。

2.2 大豆稳定转化苗中纯合突变体的筛选与鉴定

T₀ 代稳转苗经过 Basta 除草剂筛选后获得阳性植株,在 T₂ 代进行纯合突变体的筛选,由峰图和 DNA 序列对比结果可知,共筛选到 8 种不同突变类型的纯合突变体,其中由 sgRNA-B 介导的纯合突变体有 *gmⁿark-D*(+12 bp & -47 bp)、*gmⁿark-E*(-1 bp)、*gmⁿark-F*(+1 bp)、*gmⁿark-G*(+1 bp)、*gm-*

nark-H(-36 bp),由 sgRNA-C 介导的纯合突变体有 *gmⁿark-A*(-4 bp)、*gmⁿark-B*(-6 bp) 和 *gmⁿark-C*(-5 bp)(图 2)。这 8 种纯合突变体均有 sgRNA 靶点范围内不同数量的碱基插入或缺失、为进一步确认这 8 种突变类型的蛋白序列是否存在移码突变而导致其功能丧失,对其突变后的蛋白序列进行预测,结果表明与 GmNARK 野生型蛋白序列相比,*gmⁿark-A*、*gmⁿark-C*、*gmⁿark-D*、*gmⁿark-E*、*gmⁿark-F*、*gmⁿark-G* 6 种突变类型均为移码突变,并导致蛋白翻译过程提前终止,而 *gmⁿark-B* 和 *gmⁿark-H* 仅删除 2 个和 12 个氨基酸,并未造成移码突变,因此其蛋白并不一定会丧失功能(图 3)。

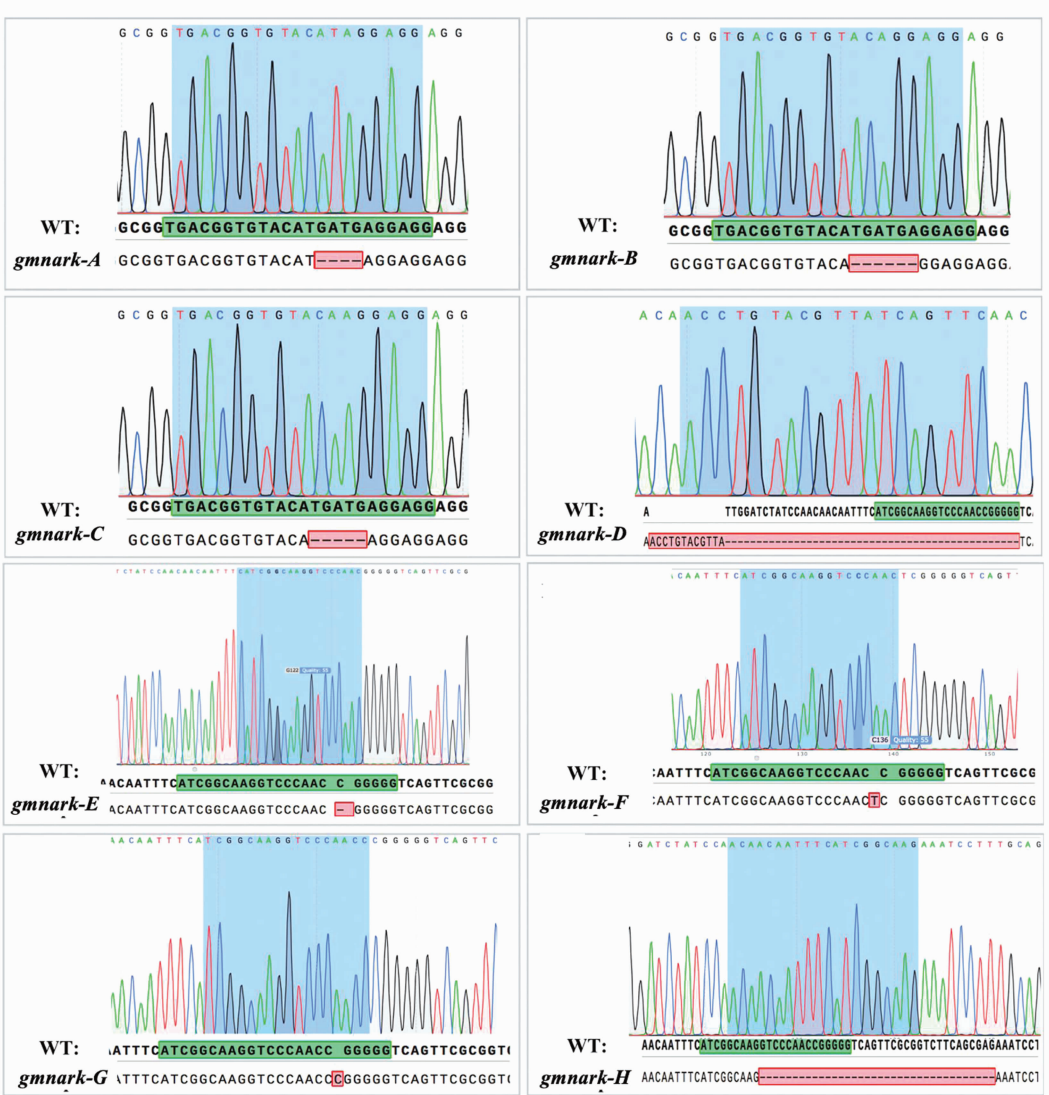
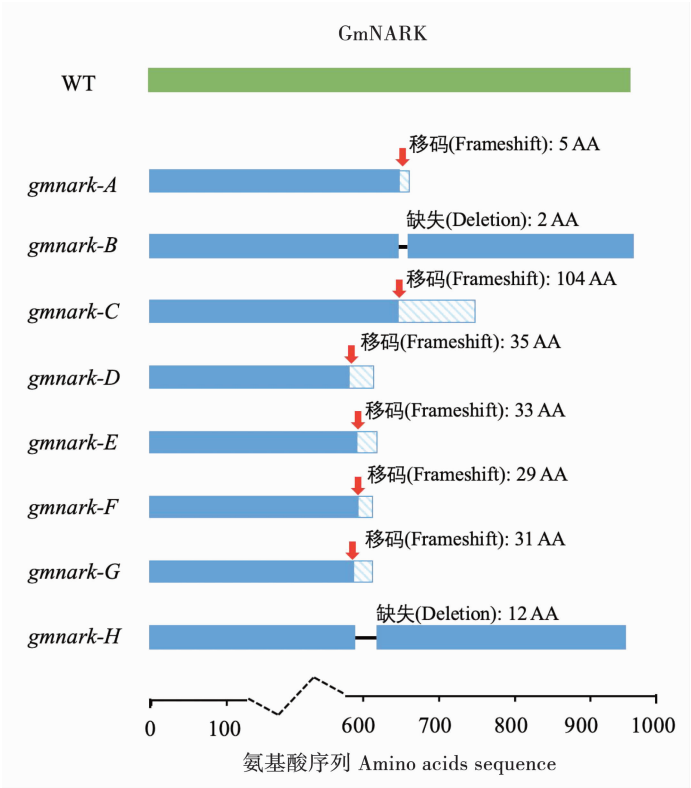


图 2 8 种不同类型的 *gmⁿark* 纯合突变体序列对比与测序峰图

Fig. 2 The chromatograms and sequence alignment of 8 different homogenous mutants of *gmⁿark*



红色箭头表示移码突变起始位点;蓝色虚线条框表示移码突变蛋白序列量;“-”表示氨基酸的缺失;数字为移码或缺失的氨基酸数量。

The positions of frameshift mutations are indicated by red arrows and hatched areas represent potentially translated regions until the next predicted termination codon; ‘-’ means deletion of amino acids; digit means number of amino acids with frameshift or deletion mutation.

图 3 8 种不同类型的 *gmⁿark* 纯合突变体蛋白序列预测

Fig. 3 The protein sequence prediction of *gmⁿark* homogenous mutants with 8 different types

2.3 不同突变类型的 *gmⁿark* 纯合突变体的表型分析

如图 4 所示, *gmⁿark-A*、*gmⁿark-C*、*gmⁿark-D*、*gmⁿark-F*、*gmⁿark-G* 5 种突变类型的突变体小根瘤、大根瘤和总的根瘤数量均显著性增加(其中总根瘤数量 $P < 0.01^{**}$), 而 *gmⁿark-B*、*gmⁿark-E* 和 *gmⁿark-H* 3 种突变体无论是小根瘤、大根瘤还是总根

瘤数量与野生型相比均未有显著性差异,其中 *gmⁿark-B* 和 *gmⁿark-H* 根瘤数量结果与其蛋白序列预测结果相一致,并未导致 *GmNARK* 功能丧失;而 *gmⁿark-E* 蛋白序列显示虽然已经造成移码突变导致蛋白翻译提前终止,但是其根瘤数量与野生型相比未形成显著性差异。

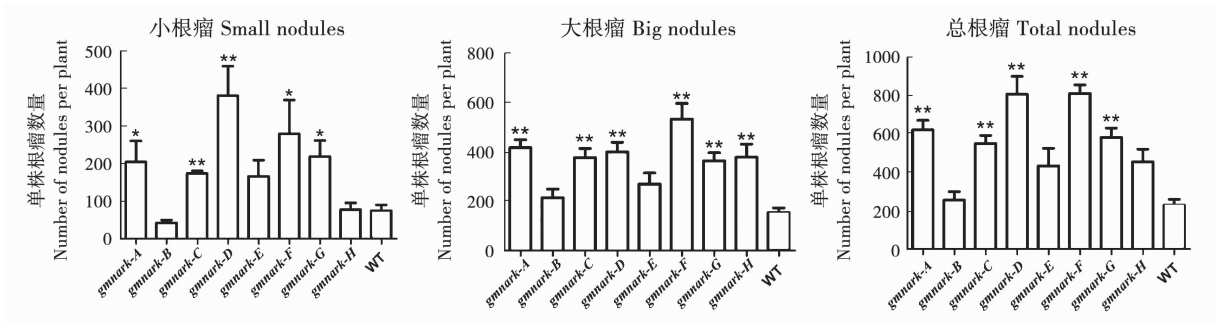


图 4 8 种不同类型的 *gmⁿark* 纯合突变体根瘤数量统计图

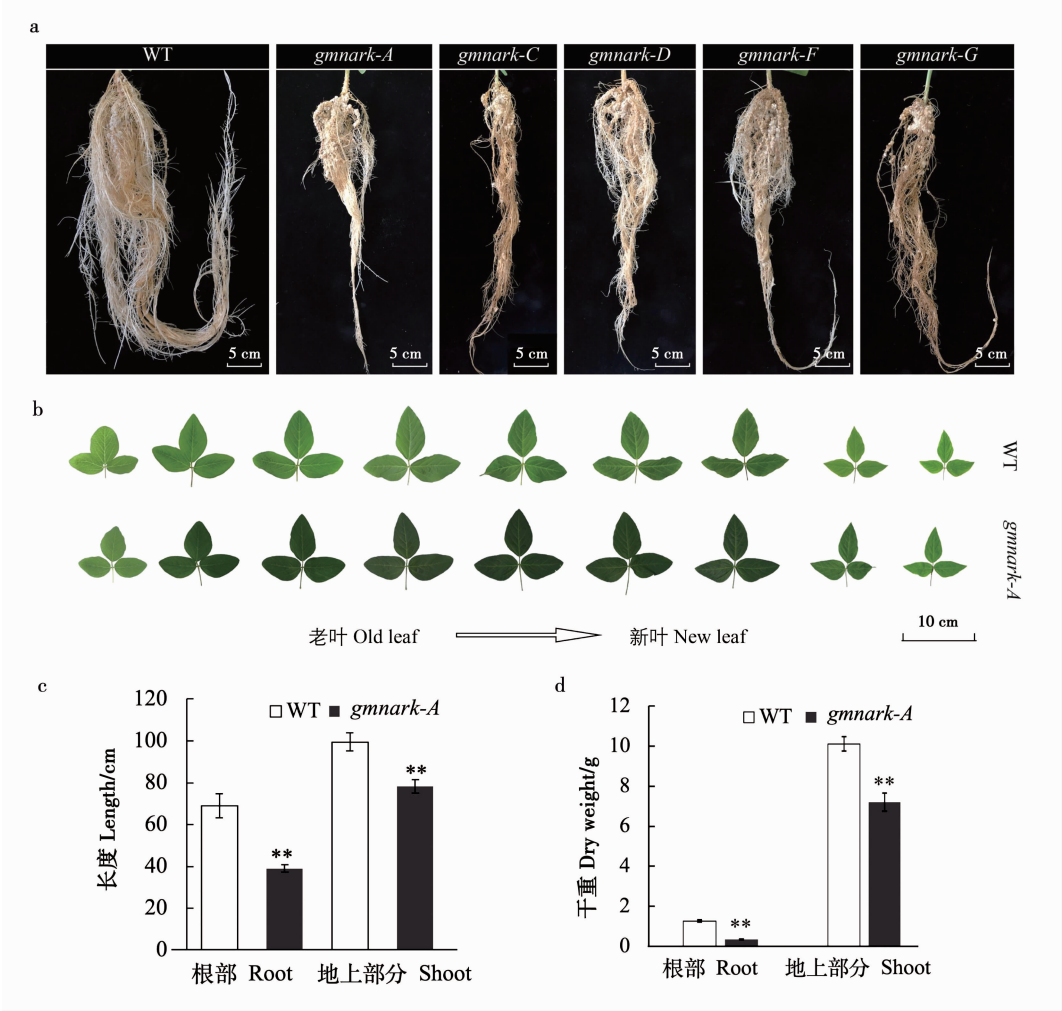
Fig. 4 The histogram of nodule number of *gmⁿark* homogenous mutants with 8 different types

由图 4 和图 5a 可知, *gmⁿark-A*、*gmⁿark-C*、*gmⁿark-D*、*gmⁿark-F*、*gmⁿark-G* 5 种突变类型均具有超

结瘤的表型。接下来选取 *gmⁿark-A* 进行更加详细的表型统计, 由图 5b 可知 *gmⁿark-A* 的叶片颜色较

野生型更深;由图 5c 和图 5d 可知 *gm-nark-A* 根长较短,与野生型相比有极显著差异($P < 0.01^{**}$);*gm-nark-A* 的株高较小($P < 0.01^{**}$),同时 *gm-nark-A* 超

结瘤突变体的生物量较野生型更低。因此本研究所创制的 *gm-nark* 超结瘤突变体具有植株矮小、叶片深绿、根部较短、根瘤数量增多的表型特点。



a: *gm-nark* 与野生型根瘤表型图; b: *gm-nark-A* 与野生型叶片表型图; c: *gm-nark-A* 与野生型根部和地上部分长度统计; d: *gm-nark-A* 与野生型根部和地上部分干重统计。

a: The nodule phenotype of *gm-nark* and wild type; b: The leaf phenotype of *gm-nark-A* and wild type; c: The histogram of root and shoot length of *gm-nark* and wild type; d: The histogram of root and shoot dry weight of *gm-nark-A* and wild type.

图5 营养液水培 42 d 后 *gm-nark* 纯合突变体根瘤及叶片表型统计

Fig. 5 The nodule and leaf phenotypes of *gm-nark-A* cultured by nutrient solution after 42 d

3 讨论

由于不同的 sgRNA 具有不同的基因编辑效率^[16],本研究先利用大豆毛根试验验证 sgRNA 的基因编辑效率,筛选出效率较高的 sgRNA 用于大豆的稳定转化,以保证其在大豆稳定转化植株中也具有较高的基因编辑效率。

在大豆稳定转化植株中,在 T₂ 代共筛选到 8 种不同类型的纯合突变体,其中由 sgRNA-B 介导的纯合突变体有 5 种,由 sgRNA-C 介导的纯合突变体有 3 种。其中 6 种为移码突变,2 种为氨基酸缺失突

变。结合根瘤数量的统计数据可知 2 种氨基酸缺失的突变为无效突变,其表型与野生型无显著差别,因此说明利用 CRISPR-Cas9 进行纯合突变体筛选的过程中尽量不要选择缺失或插入 3 或 3 的倍数核苷酸数量的突变类型,此突变类型很可能为无效突变。在本次试验中 *gm-nark-E* 较特殊,虽然缺失 1 bp 造成了移码突变,并使蛋白翻译过程提前终止,但是其根瘤数量并未与野生型形成显著型差异,因此在利用 CRIPSR-Cas9 基因编辑技术创制突变体筛选表型过程中要选取至少两种不同的突变类型的突变体来确认此表型。同时 5 种具有超结瘤表型的突

变体根瘤数量也有一定差异,因此说明基因不同的突变类型对目的基因功能的影响存在一定的差异。

从 2015 年 Cai 等^[27]首次实现大豆中 CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑开始,利用 CRISPR-Cas9 创制大豆突变体用于遗传研究和种质创新等得到快速发展。在 2016 年 Du 等^[24]使用大豆内源的 *GmU6-I6-1* 启动子来介导 *Cas9* 的表达,获得了高于 *AtU6-6* 启动子介导 *Cas9* 表达的基因编辑效率;Tang 等^[28]通过敲除使结瘤限制因子的基因 *Rj4* 表达,揭示了其发挥作用是通过抑制许多根瘤菌 (*Bradyrhizobium elkanii*) 结瘤作用。CRISPR 也被用于破坏大豆疫霉菌中的病原体毒力基因 (*Avr4/6*),以便获得带有疫霉菌抗性的大豆^[29];2018 年 Cai 等^[30]利用 CRISPR-Cas9 技术敲除大豆开花基因 *GmFT2*,在 T₂ 代获得了可以稳定遗传的 *GmFT2* 缺失的纯合突变体,并揭示此突变体在长日照和短日照均具有晚花的表型。以上研究表明运用基因编辑技术可快速创造目的基因突变体。而本研究也通过靶向 *GmNARK* 基因,快速获得不同基因型突变体,为开展大豆结瘤固氮研究提供了新的遗传材料。本研究中 *GmNARK* 的单基因编辑即获目的性状。但大豆为古四倍体,基因组中 75% 以上基因具有冗余性^[31],而基因编辑可同时靶向多个同源基因。因此基因编辑将有望成为大豆遗传研究的重要手段。

从 2003 年 *GmNARK* 基因首次被发现以来^[8], *gmanrk* 突变体的研究主要集中在 AON 途径中其上下游基因的调控基因的挖掘,如其上游信号分子 GmRIC1/GmRIC2 被认为是 *GmNARK* 激活下游结瘤抑制因子表达的配体^[7],GmKAPP1/GmKAPP2 被认为是 *GmNARK* 的互作蛋白,在 *GmNARK* 调控根瘤数量的作用中扮演十分重要的角色^[32]。因此对于 *gmnark* 其它相关研究较少,本研究创制的 *gmnark* 突变体发现其具有叶片深绿色的表型,暗示着其较野生型相比具有更多的叶绿素积累,进一步暗示其具有更强的光合作用和碳的积累能力,而植物中碳代谢依靠氮代谢提供酶和光敏色素,氮代谢也需要碳代谢提供碳源与能量,二者协调平衡,因此也暗示着此突变体可能有更多的氮积累^[33],可进一步暗示此突变体较野生型相比有更强的生物固氮能力,同时此植株矮小,因此是作为绿肥用于与其它作物套作的理想植株,其可能具有更强的固氮能力,并且植株矮小不会对其它作物造成遮盖,影响其它作物的生长。因此本研究所创制出的 *gmnark*

突变体在作为豆科绿肥用于实际的生产应用方面具有巨大潜力,但其整株的生物固氮量有待进一步研究。

4 结 论

本研究运用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术创制了大豆 *gmnark* 的 8 种突变类型的纯合突变体,其中 5 种突变类型的突变体有超结瘤的表型,且发现这些突变体叶片颜色为深绿色并且植株矮小,可作为研究 AON 途径作用机制与根瘤发育的重要遗传材料,同时在作为“绿肥”与其它作物间作或轮作方面有巨大应用潜力。此外,研究证明运用 CRISPR-Cas 基因编辑技术构建突变体时要至少选取两个不同突变类型的突变体,且突变类型不是缺失型或插入 3 或 3 的倍数核苷酸数量的突变类型。

参考文献

[1] Collier R, Tegeder M. Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export[J]. The Plant Journal, 2012, 72(3): 355-367.

[2] Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. Plant Soil, 2008, 311(1-2): 1-18.

[3] Oldroyd G E, Downie J A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 519-546.

[4] Oldroyd G E, Murray J D, Poole P S, et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis[J]. Annual Review of Genetics, 2012, 45: 119-144.

[5] Brett J F, Arief I, Satomi H, et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(1): 61-76.

[6] Okamoto S, Shinohara H, Mori T, et al. Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase[J]. Nature Communication, 2013, 4: 2191.

[7] Reid D E, Ferguson B J, Gresshoff P M, et al. Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013, 24(5): 606-618.

[8] Searle I R, Men A E, Laniya T S, et al. Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase[J]. Science, 2003, 299(5603): 109-112.

[9] Sasaki T, Suzuki T, Soyano T, et al. Shoot- derived cytokinins systemically regulate root nodulation[J]. Nature Communication, 2014, 5: 4983.

[10] Daniela T, Zhe Y, Dennis B, et al. Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA[J]. Science, 2018, 362(6411): 233-236.

- [11] Takahara M, Magori M, Soyano T, et al. Too much love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-*Rhizobium* symbiosis[J]. *Plant Cell Physiology*, 2013, 54(4): 433-447.
- [12] Ogawa M, Shinohara H, Sakagai Y, et al. *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain[J]. *Science*, 2008, 319(5861): 294.
- [13] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [14] Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system[J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [15] Ma X L, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [16] Burgess. Technology: A CRISPR/Cas9 genome editing tool[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(2): 80.
- [17] Fu Y, Foden J A, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 822-826.
- [18] Miao J, Guo D, Zhang J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system[J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1233-1236.
- [19] Duan J, Lu G, Xie Z, et al. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome[J]. *Cell Research*, 2014, 24(8): 1009-1012.
- [20] Liang Z, Zhang K, Chen K, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TA1LENs and the CRISPR[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2014, 41(2): 63-68.
- [21] Masafumi M, Toki S, Endo M. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(10): 1807-1815.
- [22] Sun Y, Zhang X, Wu C, et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(4): 628-631.
- [23] Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9[J]. *BMC Biotechnology*, 2015, 15(1): 16.
- [24] Du H, Zeng X, Zhao M, et al. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 217: 90-97.
- [25] Kanazashi Y, Hirose A, Takahashi I, et al. Simultaneous site-directed mutagenesis of duplicated loci in soybean using a single guide RNA[J]. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(3): 553-563.
- [26] Song S, Hou W, Godo I, et al. Soybean seeds expressing feed-back-insensitive cystathionine gamma-synthase exhibit a higher content of methionine[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(7): 1917-1926.
- [27] Cai Y, Chen L, Liu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136064.
- [28] Tang F, Yang S, Liu J, et al. Rj4, a gene controlling nodulation specificity in soybeans, encodes a thaumatin-like protein but not the one previously reported[J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(1): 26-32.
- [29] Fang Y, Tyler B M. Efficient disruption and replacement of an effector gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(1): 127-139.
- [30] Cai Y, Chen L, Liu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 176-185.
- [31] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. *Nature*, 2010, 463(7278): 178-183.
- [32] Miyahara A, Hirani T A, Oakes M, et al. Soybean nodule autoregulation receptor kinase phosphorylates two kinase-associated protein phosphatases *in vitro*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(37): 25381-25391.
- [33] Liu L, Lei X L, Huang G Z, et al. Influences of mechanical sowing and transplanting on nitrogen accumulation, distribution and C/N of hybrid rice cultivars[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(4): 831-844.