



大豆 *GmSPL3* 基因家族功能初探

吴 艳, 侯智红, 程 群, 董利东, 芦思佳, 南海洋, 甘卓然, 林永波

(广州大学 生命科学院, 广东 广州 510006)

摘 要:为研究大豆中拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 重要开花调控 *AtSPL3* 同源基因的作用, 本研究利用生物信息学方法分析大豆的 RNA-seq 基因表达谱数据, 对绥农 14 根、茎、子叶、初生叶、三出复叶、花、生长点、荚、胚和下胚轴 10 个组织进行 *GmSPL3* 基因的组织特异性表达分析, 并利用 CRISPR/Cas9 的方法构建大豆 *GmSPL3* 基因的四突变体并对比其表型。结果显示: *GmSPL3* 基因在大豆的根、子叶、花和种子中有着明显的表达差异; *GmSPL3a* 在各组织中的表达量都非常低, 而 *GmSPL3(b, c, d)* 在不同组织中存在明显的组织特异性表达; 在 *GmSPL3* 基因敲除突变体中研究发现, 短日照条件下, *spl3abcd* 突变体表现出叶片变小、节数减少、节间缩短、株高降低的表型, 表明 *GmSPL3* 在调控大豆植株形态方面发挥重要功能。

关键词: 大豆; SPL; 表达谱; 组织特异性表达分析; CRISPR/Cas9; 株高

Preliminary Study on the Function of *GmSPL3* Gene Family in Soybean

WU Yan, HOU Zhi-hong, CHENG Qun, DONG Li-dong, LU Si-jia, NAN Hai-yang, GAN Zhuo-ran, LIN Yong-bo
(School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The gene *AtSPL3* plays an important role in regulating the flowering process of *Arabidopsis thaliana*. In this study, we analyzed the gene expression differences in the root, nodule, cotyledon, flower, stem, shoot apex and seed of soybean with digital expression profile, qRT-PCR showed that the expression of *GmSPL3a* in flower and shoot apex was higher, *GmSPL3(b, c)* was highly expressed in leaves, and *GmSPL3d* was mainly expressed in trifoliolate leaf and shoot apex. It was suggested that the *GmSPL3* genes may be involved in the growth and development of soybean. Then, we generated *GmSPL3* mutant in Williams 82 (W82) background by gene editing, and investigated the phenotype cause by *GmSPL3* loss-of-function. In *GmSPL3* knockout mutants, it was found that *spl3abcd* mutants showed the fewer nodes, shorter internode length and lower plant height under SD, indicating that *GmSPL3* played an important role in regulating the plants morphology of soybean.

Keywords: Soybean; SPL; Digital expression profile; Tissue-specific expression analysis; CRISPR/Cas9; Plant height

大豆 (*Glycine max*) 是世界主要的经济作物之一, 作为油脂、蛋白质的重要来源, 以及食品、家禽家畜的饲料等多种加工工业的原料, 发展潜力巨大^[1-3]。随着大豆全基因组测序的完成, 在基因水平对大豆的重要功能基因进行挖掘和分析将为功能基因组学和大豆的分子遗传育种提供理论指导。转录因子是真核生物中能够与某些特定基因启动子区域的顺式元件发生特异性互作的 DNA 结合蛋白, 激活或抑制基因转录, 进而调控目标基因的表达^[4]。SPL (SQUAMOSA promoter binding protein-like) 是一类重要的植物特异性转录因子, 大多数 SPL 基因都具有被 *miR156/157* 识别的位点, *miR156/157* 可通过转录后剪切来调控 SPL 基因的表达^[5-7]。SPL 转录因子的功能研究表明: 其在调控植物的生长发育^[8-9]、信号转导^[10]、花青素合成及应答生物^[11]和非生物胁迫反应^[12-13]中扮演着重要的角色。模式植物拟南芥的研究表明, *AtSPL3* 是 *miR156* 的

靶基因, 在开花和株型调控中起重要作用^[14]。SPL 转录因子在模式植物水稻 (*Oryza sativa*) 中能调控水稻株型, *miR156* 结合 *OsSPL14* 的基因序列后, *OsSPL14* 在转录水平上的表达被抑制, 导致水稻的分蘖减少, 植株变高, 穗长和穗枝增加, 水稻产量降低。而当 *OsSPL14* 过表达后, 它通过结合下游株型相关基因 *DEP1* 和 *OsTB1* 的启动子区的 GTAC 元件, 使水稻茎尖分化相关基因的表达升高, 穗发育相关基因的表达降低, 导致水稻分蘖减少, 植株变矮, 抗倒伏能力增强, 产量升高^[15-16]。

大豆中研究发现, *GmMiR156b* 过表达导致叶片生长间隔期缩短、结荚习性改变、植株变矮、节间变短、叶片变小、主茎节数增加和主茎变粗等。推测 *GmMiR156b* 可能通过抑制其下游靶基因 *GmSPL3* 的表达实现上述功能^[17]。前期关于 SPL 转录因子在模式植物拟南芥中的研究已经比较清楚, 但是在大豆中的研究还较少, 仅发现 *GmSPL9* 基因调控大

收稿日期: 2019-04-10

基金项目: 国家自然科学基金 (31771815, 31701445, 31801384)。

第一作者简介: 吴艳 (1993-), 女, 硕士, 主要从事大豆光周期调控开花研究。E-mail: 15367613473@163.com。

通讯作者: 林永波 (1966-), 男, 博士, 副教授, 硕导, 主要从事大豆光周期调控开花研究。E-mail: linyongbo1966@aliyun.com。

豆分枝数^[18],对大豆 *SPL* 家族的其它基因功能研究鲜有报道。因此,本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对大豆 *GmSPL3* 家族基因进行编辑,以期更为深入了解 *GmSPL3* 家族基因在短日照作物大豆中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆绥农 14(以下简称为 SN14)品种和 Williams 82(以下简称为 W82)由本实验室保存。

1.2 试验设计

采用盆栽方法培养绥农 14 幼苗,置于培养箱(CONVIRON)培养,光照条件为短日照(SD:12 h 光照/12 h 黑暗)和长日照(LD:16 h 光照/8 h 黑暗),恒温 25 ℃,湿度为 60%。取材条件:一批材料生长至第二片三出复叶展开后取子叶、初生叶和三出复叶,花完全展开时取花,大豆结荚后取鲜嫩的荚、根、茎和生长点,另一批材料发芽长出下胚轴后取胚和下胚轴。取材方法:大豆材料取样时每一器官都分别取 3 株,然后将样品混合收袋,迅速置于液氮中,−80 ℃保存,以备提取各组织的总 RNA。

首先对 *GmSPL3* 家族基因进行聚类分析,构建在不同组织的数字表达谱并分别提取 LD 和 SD 条件下绥农 14 各组织中的 RNA,反转录成 cDNA,进行不同组织的 qRT-PCR 分析,分析 *GmSPL3* (*a*,*b*,*c*,*d*)在不同组织中的转录水平,并重点分析 *GmSPL3* (*a*,*b*,*c*,*d*)在不同时期叶片中的表达,进一步分析 *GmSPL3* 基因在大豆同组织中的表达特性。

根据 CRISPR/Cas9 技术的原理,人工合成靶位点的表达盒,将重组 pYLCRISPR/Cas9-*GmSPL3*-gRNA 载体转化到根癌农杆菌 *EHA101* 中。以 W82 为大豆遗传转化的受体材料。利用农杆菌侵染大豆的子叶节获得转基因植株。从筛选得到的转基因植株的 T₅ 代中挑选 *GmSPL3* 的纯合四突变体与野生型 W82 共同种植于短日照培养箱中,进行开花期,发育期和株高等表型的观察和统计。

1.3 方法

1.3.1 *GmSPL3* 的数字表达谱构建 在 phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 数据库中,以拟南芥 *AtSPL3* (AT2G33810.1)序列检索获得 *GmSPL3a* (Glyma.13G237400.1)、*GmSPL3b* (Glyma.15G076200.1)、*GmSPL3c* (Glyma.13G177400.1)和 *GmSPL3d* (Glyma.07G199000.1)氨基酸序列序列。

利用 ClustalX 1.83 软件对氨基酸序列进行比对,利用 MEGA 7.0 软件通过选用 Phylogeny 参数中的邻接法(neighbor-Joining method)构建系统发育进

化树,并用 Bootstrap 进行系统进化树的矫正,重复次数(replications)设置为1 000,其余参数设置均为默认值,生成最终的系统进化树。通过已经构建成功的系统发育进化树与 R studio 软件构建数字表达谱,R studio 软件指利用 R 语言基于公共数据库的 RNA-seq 数据绘制热图,R 语言包如表 1 所示,其中 RPKM(reads per kilobase per million mapped readers)用 log₁₀ 标准化,进而分析 *GmSPL3* 家族基因的表达情况。

表 1 R 语言包
Table 1 R language pack

install.packages("phytools")	#安装包
require(phytools)	
setwd("D:/tree/")	
tree <- read.tree("tree.nwk")	
tree <- as.phylo(tree)	
plot(tree)	
exp <- read.csv("ckx.csv",head=T,row.names = 1)	
exp <- as.matrix(exp)	
exp <- log10(exp + 1)	
phylo.heatmap(tree,fsize = 1,exp = [1,(1:5)])	

1.3.2 *GmSPL3* 基因组织特异性表达分析 用 RNA 提取试剂盒(购自康为世纪生物公司)提取 SD、LD 条件下培养的 SN14 植株的根、茎、子叶、初生叶、三出复叶、花、生长点、荚、胚和下胚轴 10 处组织的 RNA,用 DeNoviX (DS-11 FX)测定总 RNA 浓度。

取 2 μg RNA 为模板进行反转录,反转录所用试剂盒购自 TaKaRa 公司。*GmSPL3a*、*GmSPL3b*、*GmSPL3c* 和 *GmSPL3d* 引物序列参见 Cao 等^[17]。用内参基因 *tubulin* 作为对照,引物序列如表 2 所示,3 次生物学重复,在冰上配置荧光定量 PCR 反应体系(20 μL):qPCR Master Mix 10 μL,正向和反向引物各 1.5 μL,cDNA 模板 2 μL,ddH₂O 5 μL。分装至 96 孔板中,每个样品设置 3 次重复。使用 Lightcycler 480 荧光定量 PCR 仪进行试验,数据使用 Lightcycler 480 软件分析,采用 2^{−ΔΔCt} 法计算相对表达量,即 ΔΔCt = ΔCt(实验样品) − ΔCt(基准样品)。

1.3.3 *GmSPL3* 敲除突变体的构建和基因型检测

(1) 根据 CRISPRdirect 网站(<http://crispr.dbcls.jp/>)中 4 个 *GmSPL3* 基因外显子的保守序列寻找 CRISPR/Cas9 潜在靶向位点,设计 *GmSPL3* (*a*,*b*,*c*,*d*) 基因的 gRNA 靶点,其靶点名称分别为 T1-AtU3b、T2-AtU3d、T3-AtU6-1 和 T4-AtU6-29(表 1)。将该段序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对,排除非特异性的靶点。

(2) 根据华南农业大学刘耀光研究员提供的方

法^[19],构建多靶点 pYLCRISPR/Cas9-GmSPL3-gRNA 克隆载体,转化 *DH5α* 感受态细胞,挑取单克隆接种培养,使用康为试剂公司 Plasmid midi kit 试剂盒提取质粒后进行酶切鉴定,并挑取验证成功的单克隆送至北京瑞博兴科生物技术有限公司测序,将构建成功的载体转入根癌农杆菌 EHA101。

(3)采用农杆菌介导大豆子叶节遗传转化法构建大豆遗传转化材料^[20],首先用氯气对 W82 大豆种子表面进行灭菌,将种子接种于萌发培养基 1~3 d 进行种子萌发,在子叶节处用手术刀片创造伤口,用携带目的载体的菌液去侵染子叶并在共培养培养基上进行共培养,芽诱导长出不定芽,在继代培养基中培养使芽伸长至 5~7 cm 时,切取外植体进

行生根培养,当根系强壮时移栽到小盆中进行培养。

(4)按照康为试剂公司 plant DNA extraction 的要求提取质粒后提取 T1 代植株和 W82 的 DNA,用 Primer primer 5 设计载体特异引物(表 1)进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测筛选转基因大豆早敏磷抗性阳性苗。提取 T₁ 代转基因大豆叶片的总 DNA,以 CRISPR/Cas9 载体上含有的外源标记特异的靶点 *Bar* 基因引物对转基因大豆植株进行 PCR 扩增,引物序列如表 2 所示,PCR 扩增后产物送北京瑞博兴科生物技术有限公司测序,筛选得到基因型为 *spl3a*(-/-)*spl3b*(-/-)*spl3c*(-/-)*spl3d*(-/-)的 *GmSPL3* 基因的纯合四突变体 *spl3abcd*。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物 Primer	基因序列(5'-3') Oligonucleotide sequences(5'-3')	功能 Function
SPL3-AtU3b-F1	GTCAAGTTATTATGGACACAAGC	CRISPR/Cas9
SPL3-AtU3b-R1	AAACGCTTGTGTCCATAATAACT	CRISPR/Cas9
SPL3-AtU3d-F2	GTCAAAGTTGGAGTGAGGGA	CRISPR/Cas9
SPL3-AtU3d-R2	AAACTTTTCCTCACTCCAACCTT	CRISPR/Cas9
SPL3-AtU6-1-F3	ATTGCAGTACCACAGAAGACACA	CRISPR/Cas9
SPL3-AtU6-1-R3	AAACTGTGCTTCTGTGGTACTG	CRISPR/Cas9
SPL3-AtU6-29-F4	ATTGCCCTACCATAGGCGTCACA	CRISPR/Cas9
SPL3-AtU6-29-R4	AAACTGTGACGCCATATGTTAGG	CRISPR/Cas9
B1'	TTCAGAGGTCTCTCTCGCACTGGAATCGGCAGCAAAGG	CRISPR/Cas9
B2	AGCGTGGGTCTCGTCAGGTCATCCACTCCAAGCTC	CRISPR/Cas9
B2'	TTCAGCGGTCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG	CRISPR/Cas9
B3	AGCGTGGGTCTCGTCTTGGTCCATCCACTCCAAGCTC	CRISPR/Cas9
B3'	TTCAGAGGTCTCTAAGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG	CRISPR/Cas9
B4	AGCGTGGGTCTCGAGTCGGTCCATCCACTCCAAGCTC	CRISPR/Cas9
B4'	TTCAGAGGTCTCTGACTCACTGGAATCGGCAGCAAAGG	CRISPR/Cas9
BL	AGCGTGGGTCTCCGACCGGTCCATCCACTCCAAGCTC	CRISPR/Cas9
vU-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG	CRISPR/Cas9
gRNA-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC	CRISPR/Cas9
Bar-s	TGCCAGTTCCTGCTTGAA	CAS9 骨架检测
Bar-AS	CTGCACCATCGTCAACCACTA	CAS9 骨架检测
GmSPL3a F2	TTGAACCTATGGACGGAAGT	测序
GmSPL3a R2	GTGCTAGGTAGAAGTGAATGA	测序
GmSPL3b F1	CCTATGTCGTCCACACTATTCT	测序
GmSPL3b R1	TTTAGACACGTTGTCGCTAGTA	测序
GmSPL3c F4	AGACCAAGAAGACCCTATGTGG	测序
GmSPL3c R4	ATTTCCCTTCCAATCATAAGCC	测序
GmSPL3d target1 F3	GTTTTCTTATGTAACCTCTGAGCC	测序
GmSPL3dtarget1 R3	TTGAGCCTCCACCTTTGGAC	测序
GmSPL3d target1 F4	GGTGGGTTTGGAGCAGACAG	测序
GmSPL3dtarget1 R4	CCTTGGCGCAAGACACAAG	测序
Tubulin F	GAGAAGAGTATCCGATAGG	qRT-PCR
Tubulin R	GTTTCCGAACACTCAAGCTC	qRT-PCR

1.3.4 *GmSPL3* 敲除突变体的表型观察 挑选 *GmSPL3* 纯合四突变体的 2 个株系 *spl3abcd* mutant-1 和 *spl3abcd* mutant-2 (基因型均为 *spl3a* (- / -) *spl3b* (- / -) *spl3c* (- / -) *spl3d* (- / -)) T_2 种子进行发芽,黑暗条件下培养 3 ~ 5 d。待种子发芽后,将同时发芽的植株转移至大花盆中培养,并将花盆置于同一培养箱中培养,短日照培养条件下观察植株的株高,节间距,花期,生育期等农艺形状。表型观察试验每次在同一大花盆中同时种植 4 棵植株,3 次生物学重复。突变体计算 8 个样本的标准误差,野生型计算 4 个样本的标准误差,统计数据经 T 检验, $0.01 < P < 0.05$,差异显著; $P < 0.01$,差异极显著。

1.4 数据分析

数字表达谱用 R studio 软件进行分析,组织特异性表达使用 Lightcycler 480 软件分析,*GmSPL3* 基因的 gRNA 设计由 CRISPRdirect 网站和 NCBI 网站共同进行分析设计,测序结果用 Bioedit 软件分析,

表型数据经由 Word 2017 和 Excel 2017 软件进行分析和整理。

2 结果与分析

2.1 数字表达谱分析

GmSPL3 (*a* , *b* , *c* , *d*) 在不同组织中转录水平的表达分析结果如图 1 所示:*GmSPL3a* 在未展开和正在展开的花、茎、和顶端分生组织中出现大量表达,而在不同时期的根中未检测到转录表达;*GmSPL3b* 在叶片中有大量表达,但在其它不同时期的叶中表达较低;*GmSPL3c* 在大豆各组织中均有转录表达,其中在叶片和荚中的表达量较高,在其它部位仅有少量转录表达;同样的, *GmSPL3d* 在各组织中均有转录表达,但在不同时期叶片中的表达量整体较低。表明 *GmSPL3* 可能参与大豆的叶片的生长、开花和结荚过程。此外, *GmSPL3c* 和 *GmSPL3d* 还可能参与大豆的结瘤和根的生长 。

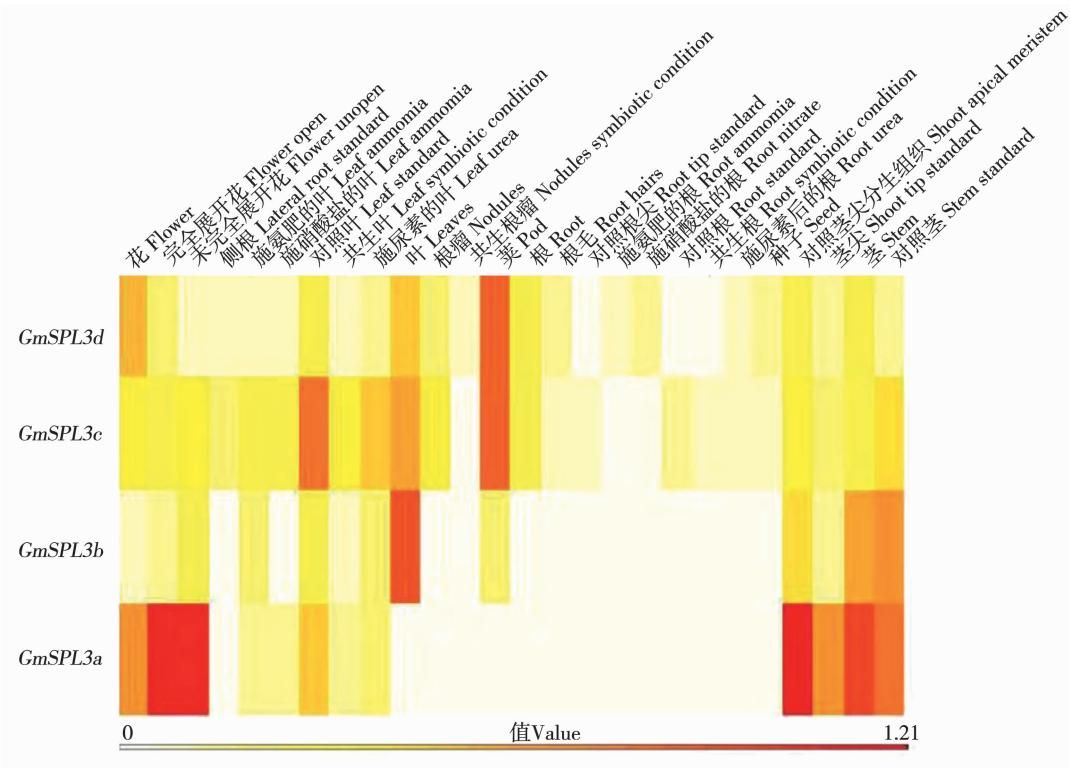


图 1 不同组织中 *GmSPL3* 基因的数字表达谱

Fig. 1 Digital expression profile for *GmSPL3* genes in various tissues

2.2 长短日照下 *GmSPL3* 组织特异性表达分析

对 *GmSPL3* 基因进行组织特异性表达模式分析, qRT-PCR 分析结果显示: LD、SD 条件下, *GmSPL3a* 在花和茎尖的表达较高, 在子叶、初生叶、三出复叶、胚、下胚轴中没有表达。 *GmSPL3b* 在 LD 条件下, 初生叶和胚中的表达较高, 在根和茎中表达较低; 在 SD 条件下, 胚、子叶和花中表达较高。

GmSPL3c 在 LD 条件下, 主要在三出复叶、茎、生长点、荚和根中表达, 在初生叶和下胚轴中表达较低; SD 条件下, 主要在茎尖和根中表达, 但在三出复叶和荚中表达较低。 *GmSPL3* 在 LD 条件下, 主要在茎和三出复叶中表达, 在初生叶和下胚轴中表达较低; SD 条件下, *GmSPL3d* 主要在生长点表达、茎和三出复叶中的表达较高, 在根和下胚轴中表达较低

(图2)。*GmSPL3* 家族基因表现出的不同的组织特异性表达模式表明大豆 *GmSPL3* (*a*, *b*, *c*, *d*) 在功能上可能有分化。

2.3 CRISPR/Cas9 基因编辑载体的构建

根据 CRISPR/Cas9 技术的原理,人工合成靶位点的表达盒,其中 *GmSPL3a* 和 *GmSPL3b* 共用靶点

T1-AtU3b-gRNA 和 T2-AtU3d-gRNA; *GmSPL3c* 和 *GmSPL3d* 共用靶点 T3-AtU6-1-gRNA 和 T4-AtU6-29-gRNA,靶点设计如图3。将设计好的靶点连接 CRISPR/Cas9 载体,得到 pYLCRISPR/Cas9-*GmSPL3*-gRNA 重组载体。

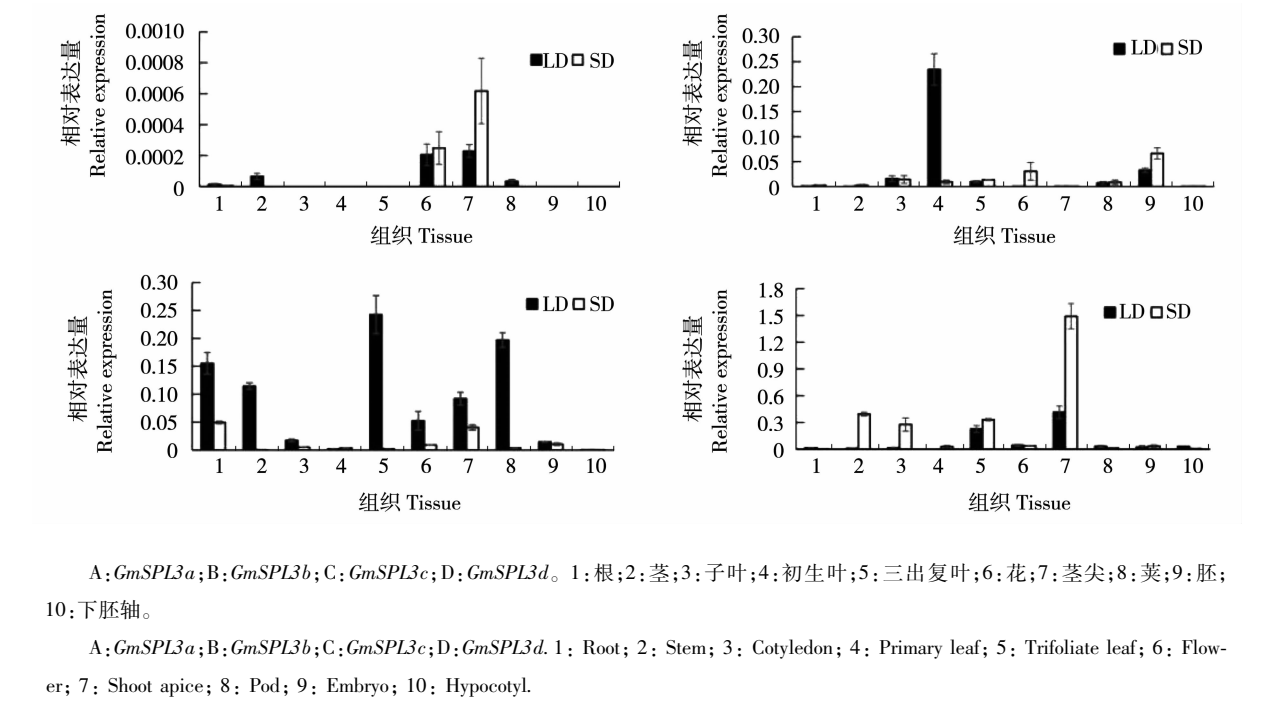
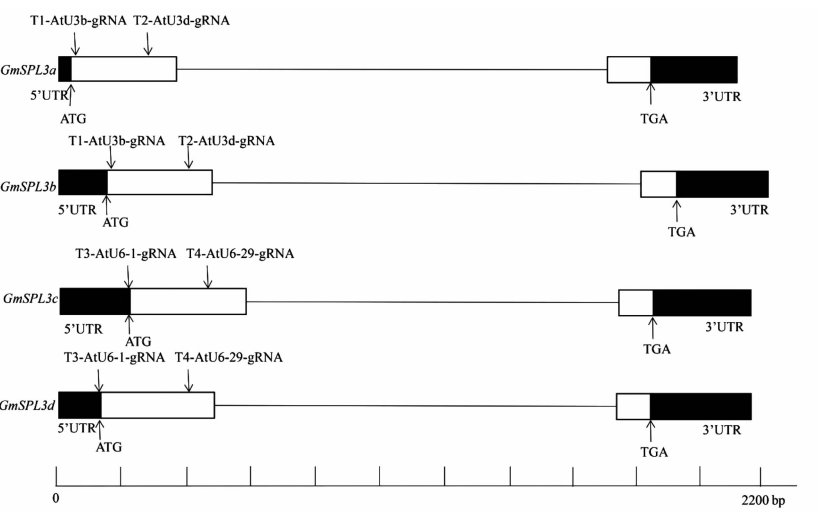


图2 *GmSPL3* 基因的组织特异性表达分析

Fig. 2 The tissue specific expression pattern of *GmSPL3* genes



黑色方框表示 5'和 3'非编码区;白色框表示 CDS 区;直线表示内含子。

The black box represents the 5' and 3' non-coding regions; The white box indicates the CDS region; The straight line indicates the intron.

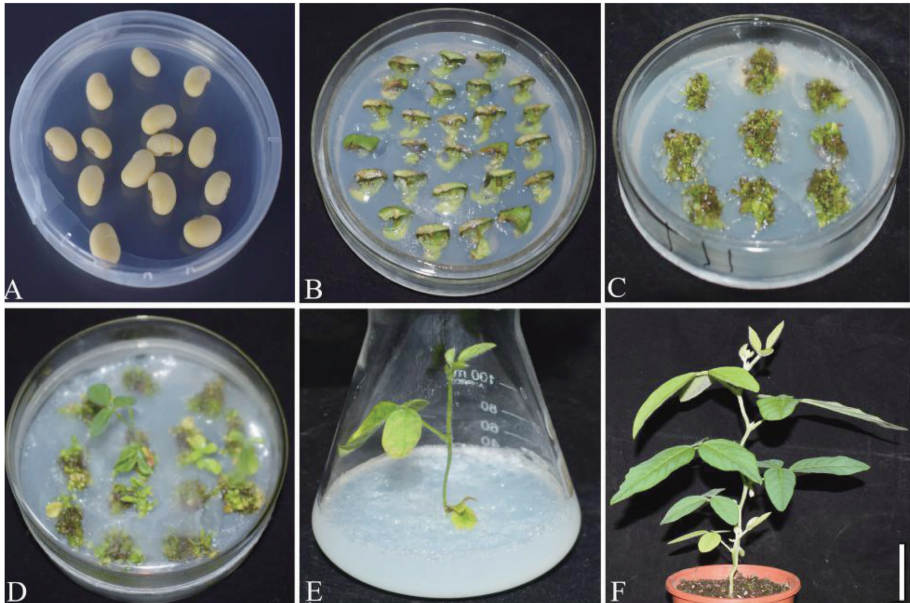
图3 *GmSPL3* 基因的 gRNA 设计信息

Fig. 3 gRNA design information of *GmSPL3* gene

2.4 转基因植株的获得

将重组 pYLCRISPR/Cas9-*GmSPL3*-gRNA 载体转化到根癌农杆菌 *EHA101* 中,并利用根癌农杆菌侵染大豆的子叶节,经种子萌发培养、丛生芽诱导、

继代培养、生根培养和盆栽种植驯化等环节(图 4)后移入无菌土中保温保湿培养,获得 9 株转基因植株。



A: 种子萌发培养;B 和 C:丛生芽诱导;D:继代培养;E:生根培养;F:盆栽种植进行驯化。F 中比例尺为 4 cm。

A: Seed germination culture; B and C: Bud induction culture; D: Subculture culture; E: Rooting culture; F: Domestication of potted plants. The scale in F was 4 cm.

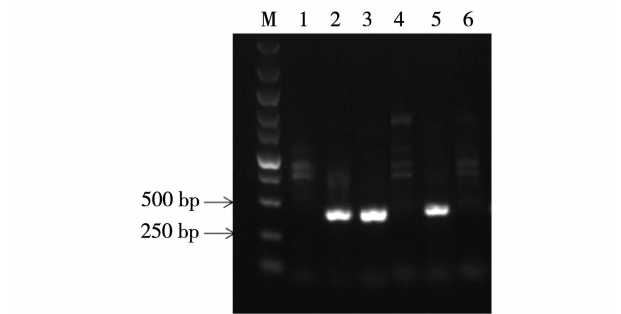
图 4 大豆的遗传转化

Fig. 4 Process of soybean genetic transformation

2.5 转基因植株后代基因型检测

经检测 T_1 代 9 株转基因植株中有 2 株阳性植株(图 5)。利用靶点筛选引物 F1/R1、F2/R2、TARGET3 F3/R3、TARGET3 F4/R4 和 F4/R4 扩增 *GmSPL3*(*a*, *b*, *c*, *d*) 基因,测序获得 *GmSPL3* 的基因型 [*spl3a* (+ / -) *spl3b* (+ / -) *spl3c* (- / -) *spl3d* (+ / -)]。测序峰图均为双峰(图 6),表明 *GmSPL3*(*a*, *b*, *d*) 基因在 T_1 和 T_3 靶点处进行了编辑,在 T_2 和 T_4 靶点处未编辑,而 *GmSPL3c* 基因 T_3 和 T_4 靶点都没有编辑,将 *GmSPL3* 基因编辑阳性株系种植于 SD 条件下进行繁种收获 T_1 代种子。

对每一世代的植株提取 DNA,利用靶点筛选引物对进行测序,对比转化植株与野生植株的测序结果,在 T_5 代种子中筛选到 2 株 *GmSPL3* 四突变体 *spl3abcd*,基因型为 *spl3a* (- / -) *spl3b* (- / -) *spl3c* (- / -) *spl3d* (- / -),将其命名为 *spl3abcd* mutant-1 和 *spl3abcd* mutant-2。并发现 *GmSPL3a* 的靶点 1 存在 2 种编辑方式,一种为靶位点上连续 7 个碱基缺失,另一种编辑方式为靶位点后存在连续 13 个碱基的缺失,*GmSPL3a* 的靶点 2 在靶点上



M: 核酸分子量标准 (DS 2000 bp);1: W82 (阴性对照);2: DNA 混合物 (阳性对照);3 ~ 6: 转基因植株。

M: DNA Marker (DS 2000 bp); 1: W82 (negative control); 2: DNA mix (positive control); 3-6: Transgenic plant.

图 5 T_1 代转基因大豆植株的 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection of T_1 transgenic soybean

有 1 个碱基的插入;*GmSPL3b* 的靶点 1 上有连续 20 个碱基缺失,*GmSPL3b* 靶点 2 的编辑方式为靶位点上有 1 个碱基的插入;*GmSPL3c* 靶点 1 在靶点上有 1 个碱基的缺失,靶点 2 没有编辑;*GmSPL3d* 的靶点 1 有 7 个碱基的敲除,靶点 2 没有编辑(图 7)。蛋白质序列比对结果显示:*GmSPL3* 基因的所有编辑方式均造成翻译提前终止。

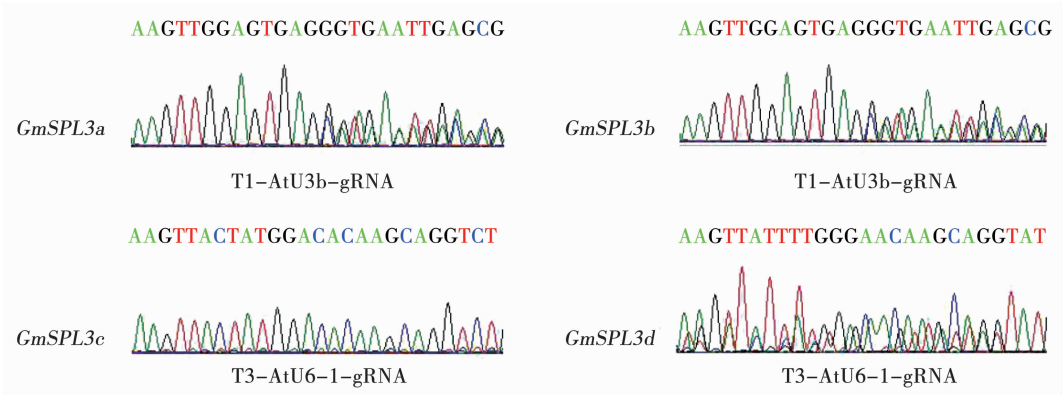
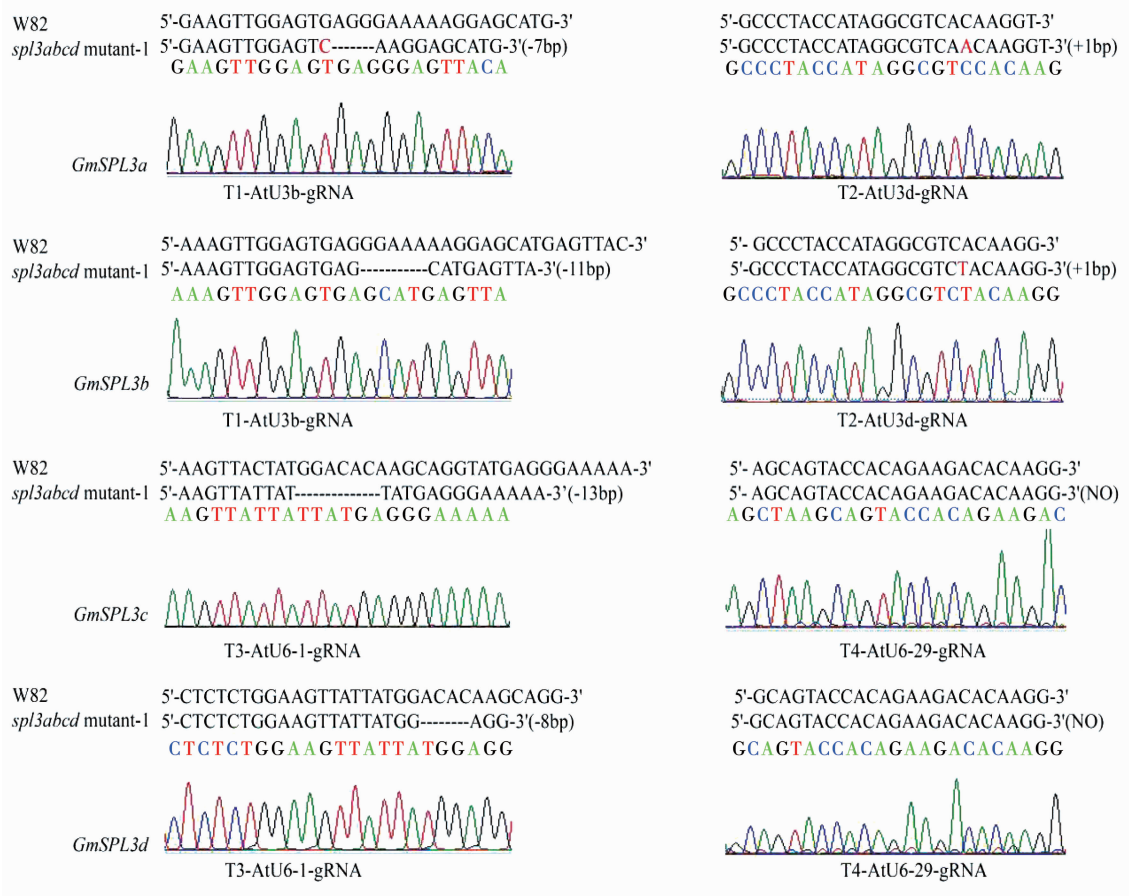


图 6 T₀ 代植株测序分析

Fig. 6 Sequencing analysis of T₀-generation plants



红色表示碱基插入位点;“-”表示碱基缺失位点。

Red indicates the base insertion site; ‘-’ indicates the base deletion site.

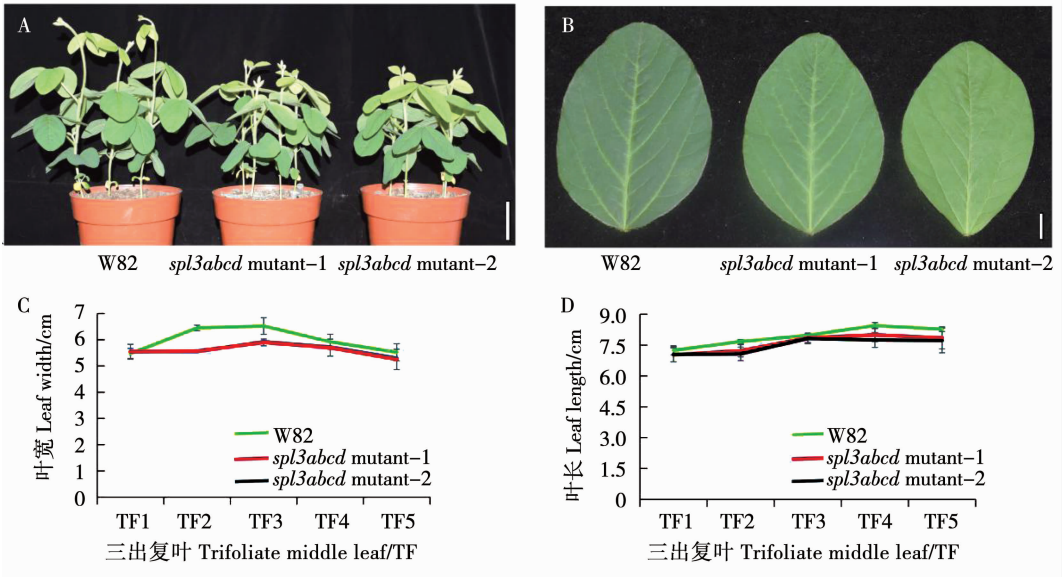
图 7 W82 与 *GmSPL3* 转基因植株测序峰值图

Fig. 7 Sequence peaks of wild-type and *GmSPL3* edited plants

2. 6 转基因植株表型分析

对筛选得到的 *GmSPL3* 基因的基因编辑植株进行表型观察,在 SD 条件下观察 *spl3abcd* 突变体株系与野生型 W82 发芽后 45 d 每株植株从下往上数前五片三出复叶的中间叶片的长度和宽度,分析结果如图 8 所示:*spl3abcd* 突变体株系的叶片长度和宽度比野生型小,进而导致叶片的大小比野生型小。突变体与野生型 W82 相比植株生长早期株高差异较大,因此对其发芽后 20 d 的株高进行对比分析,

结果表明:*spl3abcd* 突变体的主茎节数比野生型少 1 节,节间距比野生型缩短 2 cm,株高比野生型矮 18 cm,两者之间存在极显著差异(图 9)。表明 SD 条件下 *GmSPL3* 通过调控节间距进而调控大豆株高;但 LD 条件下突变体株系与野生型相比没有明显的表型变化(图 10)。以上形态特征使 *Gmspl3* 基因编辑株系获得理想植株形态的潜力:节间距缩短,植株变矮,叶片变小,从而抗倒伏能力增强,能够适应环境压力,可能有助于增加大豆产量。



A: 植株, 比例尺为 13 cm; B: 第一片三出复叶中间叶的叶片, 比例尺为 0.8 cm; TF1 ~ TF5 分别表示第 1 至第 5 片三出复叶。
A: Plants, the scale was 13 cm; B: The leaf size of first trifoliate middle leaf, the scale was 0.8 cm; TF1-TF5: First trifoliate to fifth trifoliate leaf.

图 8 短日照条件下发芽 45 d *spl3abcd* mutant-1 和 *spl3abcd* mutant-2 与 W82 表型对比
Fig. 8 Comparison on phenotype of *spl3abcd* mutant-1 and *spl3abcd* mutant-2 with W82 of germinated 45 d at SD

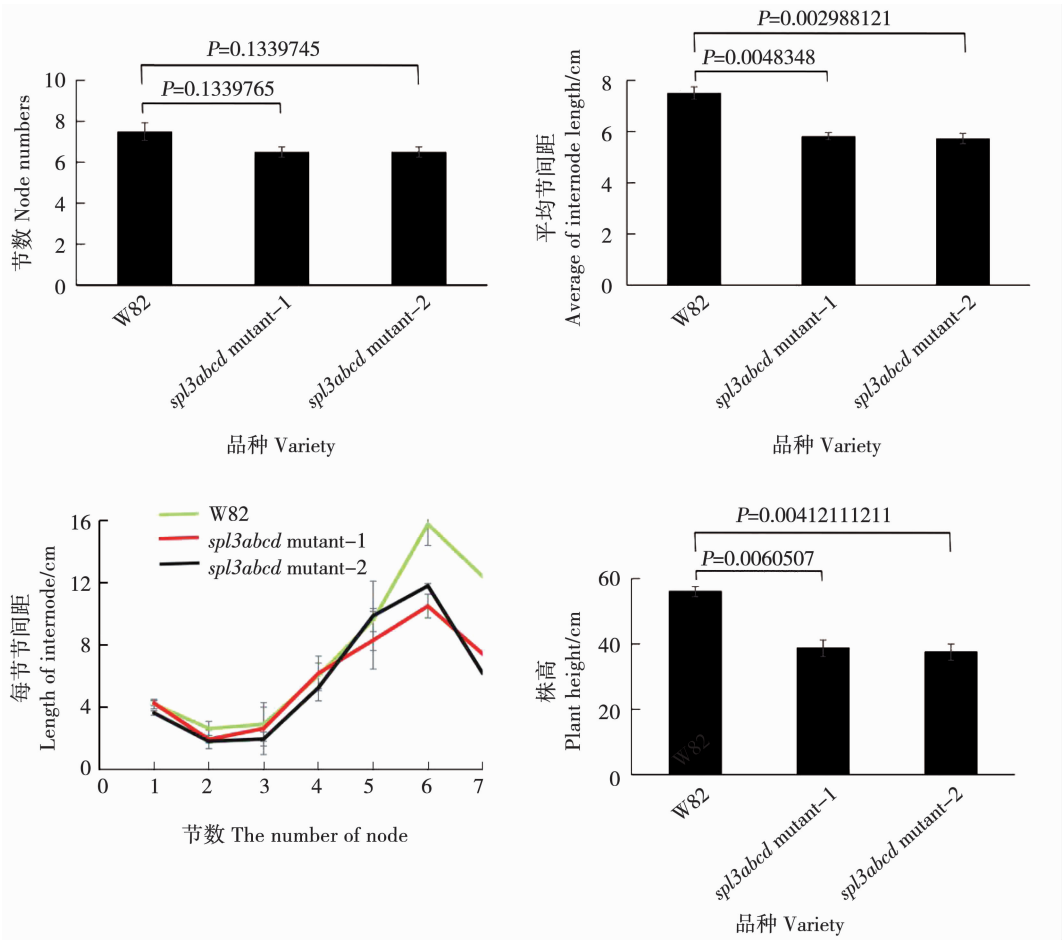


图 9 短日照条件发芽 20 d *spl3abcd* 突变体和 W82 表型对比
Fig. 9 Comparison on phenotype of *spl3abcd* mutant and W82 of germinated 20 d at SD

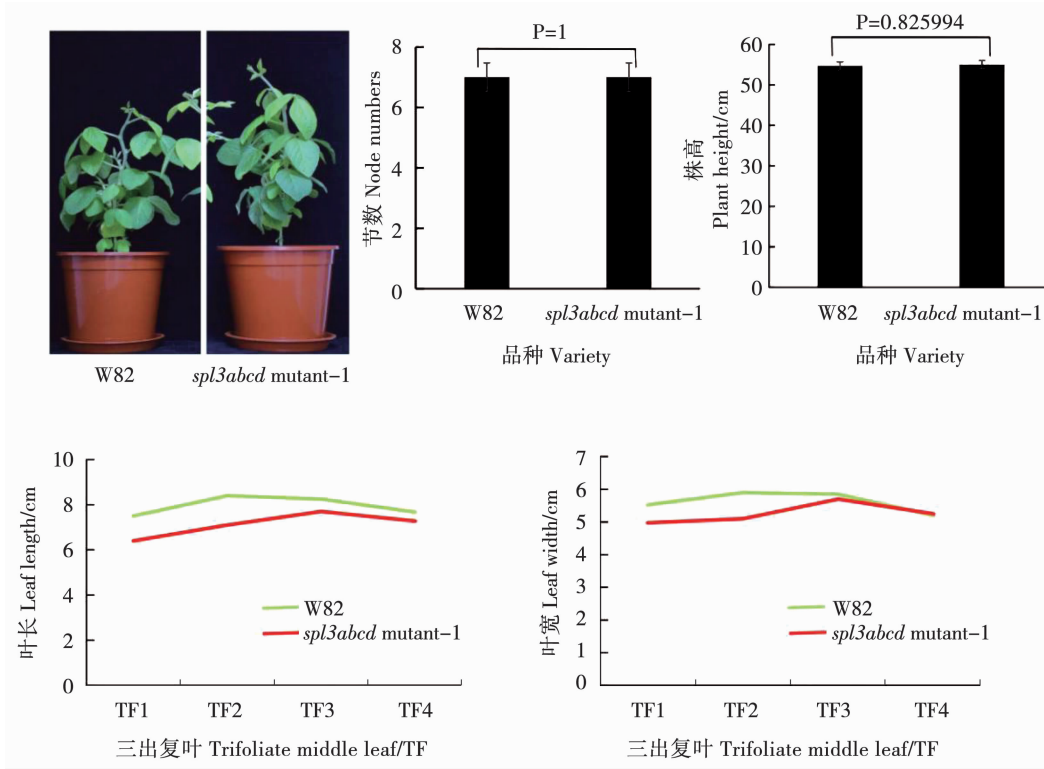


图 10 长日照条件下发芽 45 d *spl3abcd* 突变体和 W82 表型对比

Fig. 10 Comparison on phenotype of *spl3abcd* mutant and W82 of germinated 45 d at LD

3 讨 论

SPL 转录因子是植物特异的一类转录因子,在拟南芥中,*miR156* 的过表达后通过 SPL 转录因子除调控拟南芥的花期外,还参与调控株型,出现植株矮化和叶片数增多以及生物量增加等现象^[21]。株型是大豆重要的农艺性状,也是影响产量的主要因子之一。在水稻中,*miR156* 通过抑制 *OsSPL14* 的表达,使水稻分蘖增加,茎秆变细,穗枝变少。小麦的 *TaSPL17* 是 *OsSPL14* 的同源基因,与水稻类似, *TaSPL17* 能被 *miR156* 调控,并能抑制下游分蘖相关基因 *TB1* 的表达,参与调控小麦的植株形态建成,且 *TaSPL17* 过表达导致小麦植株变矮^[22]。本研究的表型观察结果显示 *spl3abcd* 突变体株系的叶片变小,节数变少,节间距缩短,植株变矮。表明 *GmSPL3* 在大豆中能参与调控植株形态建成,但 *GmSPL3* 调控植株形态建成的分子机制目前尚未清楚。推测 *GmSPL3* 调控株型的分子机制可能与水稻类似。在大豆中, *TCP* 是水稻株型相关基因 *DEP1* 的同源基因,因此推测 *GmSPL3* 可能通过直接结合下游株型重要基因 *TCP* 调控大豆株型,但其中的分子机制有待进一步研究。

研究表明大豆中存在许多调控长短日照下表型差异的基因,如大豆开花关键基因 *E1* 在长日照

条件下表达量较高,它通过调控下游开花关键基因 *FT2a* 和 *FT5a* 基因进而推迟大豆的开花时间,而短日照条件下, *E1* 的表达量极低,因此不能调控 *FT2a* 和 *FT5a* 的表达进而调控大豆的开花时间^[23]。在本研究中,虽然组织特异性表达分析结果显示 *GmSPL3* 家族基因在长日照和短日照条件下表达量较低,但表型分析发现,长日照条件下 *GmSPL3* 不影响大豆的株型,而在短日照条件下,突变体植株株型发生变化,说明 *GmSPL3* 参与调控大豆植株形态建成。

推测 *GmSPL3* 除调控大豆株型外,还可能参与调控其它性状,本研究中获得的突变体类型 *spl3abcd* 的株高、株型和叶形与 W82 相比存在差异,后续试验将研究突变体的产量变化,探索 *GmSPL3* 基因对大豆产量的影响。更多的突变体类型,如单突变体、双突变体和三突变体有待获得,以便更加深入了解 *GmSPL3* 基因在大豆中发挥的功能。

4 结 论

数字表达谱分析表明 *GmSPL3* (*a, b, c, d*) 在不同组织中均有表达,可能参与大豆的叶片的生长、开花和结荚过程。进一步的组织特异性表达分析发现, *GmSPL3a* 在花和茎尖的表达较高, *GmSPL3* (*b, c*) 在叶中表达较高, *GmSPL3d* 主要在三出复叶

和茎尖表达。通过 *CRISPR/Cas9* 基因编辑系统构建 *GmSPL3* 基因编辑株系,经大量的基因型筛选后成功获得了 *spl3abcd* 突变体,表型研究发现短日照条件下,*spl3abcd* 突变体表现出叶片变小、节数减少、节间距缩短、株高降低的表型,表明 *GmSPL3* 在调控大豆植株形态方面发挥重要功能。

参考文献

[1] 孙天宇. 大豆开花期相关数量性状位点 (QTL) 的定位 [D]. 哈尔滨:中国科学院东北地理与农业生态研究所, 2017:12-21. (Sun T Y. QTL mapping of flowering period interrelated in soybean [D]. Harbin: Northeast Institute of Geography and Agroecology Chinese Academy of Science, 2017:12-21.)

[2] 徐豹. 作物育种研究与进展 [M]. 北京:农业出版社, 1993: 122-137. (Xu B. Research and development of crop breeding, the first volume [M]. Beijing: Agriculture Press, 1993:122-137.)

[3] 王金陵. 大豆性状之演化 [J]. 农报, 1947, 12 (5): 6-11. (Wang J L. Evolution of soybean trait [J]. Agriculture Press, 1947, 12(5): 6-11.)

[4] 何炜,叶冰莹,周平,等. 转录因子 NAC 的研究进展 [J]. 亚热带作物学报, 2008, 4(4):311-315. (He W, Ye B Y, Zhou P, et al. Research of NAC transcription factor [J]. Journal of Subtropic Crop, 2008, 4(4):311-315.)

[5] Wu G, Park M Y, Conway S R, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2009, 138: 750-759

[6] Ayako Y, Wu M F, Li Y, et al. The MicroRNA-regulated *SBP-Box* transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1* [J]. Developmental Cell, 2009, 17: 268-278.

[7] Ling L Z, Zhang S D. Exploring the evolutionary differences of *SBP-box* genes targeted by miR156 and miR529 in plants [J]. Genetica, 2012, 140: 317-324.

[8] Xu M L, Hu T Q, Zhao J F, et al. Developmental functions miR156-regulated *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. Public Library of Science Genetics, 2016, 12(8): e4006263.

[9] Gao R M, Wang Y, Gruber M Y, et al. MiR156/*SPL10* modulate lateral root development, branching and leaf morphology in *Arabidopsis* by silencing *AGAMOUS 79* [J]. Frontier in Plant Science, 2018, 8: 22-26.

[10] Lu M C, Liu Y Q, Chen D Y, et al. *Arabidopsis* transcription factors *SPL1* and *SPL12* confer plant thermotolerance at reproductive stage [J]. Molecular Plant, 2017, 10: 735-748.

[11] Meenu S P, Ma S S, Tessa M B, et al. Novel positive regulatory role for the *SPL6* transcription factor in the N TIR-NB-LRR receptor-mediated plant innate immunity [J]. Public Library of Science, 2013, 9(3): e1003235.

[12] Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, et al. *SQUAMOSA* promoter binding protein like-7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2009, 21: 347-361.

[13] Cui L G, Shan J X, Shi M, et al. The miR156-*SPL9*-*DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plant [J]. The Plant Journal, 2014, 80: 1108-1117.

[14] Jung J H, Hee H J, Ryu J Y, et al. *SPL3/4/5* integrate developmental aging and photoperiodic signals into the FT-FD module in *Arabidopsis* flowering [J]. Molecular Plant, 2016, 9:1647-1659.

[15] Jiao Y Q, Wang Y H, Xue D W, et al. Regulation of *OsSPL14* by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice [J]. Nature Genetics, 2010, 42:541-591.

[16] Lu Z F, Yu H, Xiong G S, et al. Genome-wide binding analysis of the transcription activator ideal plant architecture1 reveals a complex network regulating rice plant architecture [J]. The Plant Cell, 2013, 25(10): 3743-3759.

[17] Cao D, Li Y, Wang J, et al. GmmiR156b overexpression delay flowering time in soybean [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 89 (4-5): 353-363.

[18] Bao A L, Chen H F, Chen L M, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19:131-143.

[19] Li X T, Xie Y Y, Zhu Q L, et al. Targeted genome editing in genes and cis-regulatory regions improves qualitative and quantitative traits in crops [J]. Molecular Plant, 2017, 10 (11): 1368-1370.

[20] Olhoft P M, Donovan C M, Somers D A. Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants [J]. Methods Molecular Biology, 2006, 343: 385-96.

[21] Schwab R, Palatnik J F, Riester M, et al. Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome [J]. Developmental Cell, 2005, 8: 517-527.

[22] 高新梅. 小麦 *SPL* 家族基因 *TaSPL17* 的功能研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2018: 23-29. (Gao X M. Function study on *SPL* family gene *TaSPL17* in wheat [D]. Xianyang: Northwest Agriculture & Forest University, 2018: 23-29.)

[23] Xia Z J, Watanabe S, Yamada T, et al. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109: E2155-E2164.