

# 基因编辑技术在大豆基因功能鉴定及遗传改良上的应用

刘佳瑞, 张 钰, 彭国庆, 齐照明, 陈庆山, 辛大伟, 胡利民  
(东北农业大学智慧农场技术与系统全国重点实验室/大豆生物学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 大豆作为重要的粮食作物和油料作物, 在人类生产生活中扮演着十分重要的角色。近年来国内大豆供给孱弱, 对外依存度过高, 使国内大豆市场受到严重冲击, 并给国家粮食安全带来一定隐患, 因此培育优质高产的大豆品种是当前国内大豆育种的重要目标。目前, 大豆中一批控制重要性状的关键基因已经被克隆和解析, 为开展分子设计育种提供了重要的理论支撑。传统育种周期长、效率较低, 基因编辑技术为生物育种提供了新的途径和工具, 可以加速育种进程。以CRISPR/Cas9技术为代表的基因编辑技术已经快速发展成为大豆基因功能研究、改造及农艺性状遗传改良的重要工具。本文介绍了基因编辑技术的类型、特点及其在植物中的应用概况, 并综述了其在大豆产量、品质、抗病、抗逆、开花期、共生固氮和育性等农艺性状研究中的最新研究进展, 为开展大豆基因编辑育种提供了一定的依据和借鉴。此外, 本文还探讨了基因编辑技术在大豆遗传改良中存在的问题, 并对其应用前景进行了展望。

**关键词:** 大豆; 基因编辑技术; 遗传改良; 育种

## The Application of Gene Editing Technology to Soybean in Gene Function Identification and Genetic Improvement

LIU Jiarui, ZHANG Yu, PENG Guoqing, QI Zhaoming, CHEN Qingshan, XIN Dawei, HU Limin  
(National Key Laboratory of Smart Farm Technology and System, Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Education Ministry, Harbin 150030)

**Abstract:** Soybean serves as an essential food and oil crop, and plays a crucial role in people's livelihoods. However, in recent years, domestic soybean supply has been insufficient, and there is a high dependency on imports. This situation has seriously impacted the domestic soybean market and brought some hidden dangers to the national food security. Hence, enhancing yield and improving seed quality are major goals in current soybean breeding programs in China. At present, a number of key genes controlling important traits in soybean have been cloned and analyzed, which provides important theoretical support for molecular design breeding. The traditional breeding is time-consuming and low efficiency. Gene editing technology provides a new way and tool for biological breeding, which can accelerate the breeding process. Gene editing technologies, represented by CRISPR/Cas9, have rapidly developed into important tools for studying soybean gene functions, genetic modifications, and improving agronomic traits. This article provides an overview of gene editing technology types, features, and their utilization in plants. It also reviews the latest research progress of gene editing technology in enhancing agronomic traits related to soybean yield, quality, stress resistance, disease resistance, flowering time, symbiotic nitrogen fixation, fertility and other traits, providing a theoretical basis and reference for soybean gene editing breeding. Furthermore, this paper also discusses the challenges of gene editing technology in soybean genetic improvement and presents its promising future applications.

**Key words:** soybean; gene editing technology; genetic improvement; breeding

收稿日期: 2023-11-13 网络出版日期: 2023-12-01

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231113003>

第一作者研究方向为大豆遗传改良, E-mail: ljriui@163.com

通信作者: 胡利民, 研究方向为大豆遗传改良, E-mail: hulimin@neau.edu.cn

辛大伟, 研究方向为大豆遗传改良, E-mail: xdawei@163.com

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32301785)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China Youth Science (32301785)

大豆(*Glycine max*)起源于中国,并在世界范围内传播,是重要的粮食作物和油料作物。作为世界五大作物之一,大豆是人类摄取植物蛋白和油脂的重要来源,其蛋白质含量较谷类和薯类食物高出2.5~8倍,是一种理想的优质植物蛋白食物。大豆含油量约为20%,是三大油料作物之一。大豆中还含有卵磷脂、异黄酮、皂苷以及多种生理活性物质,对人体营养与保健极为有利<sup>[1-2]</sup>。根据国家统计局2022年底数据(<https://data.stats.gov.cn/>)显示,我国具有大约1.5亿亩的大豆播种面积,常年可生产1500万~2000万吨的大豆用于食用,但仍需进口9000万~1亿吨转基因大豆用于粮油加工和蛋白质饲用。近年来我国大豆进口常年保持80%以上的高位,过度依赖进口会对国内大豆市场造成冲击,供求矛盾激化,给国内农业发展和国家粮食安全带来一定隐患<sup>[3]</sup>。因此加快大豆的遗传改良,促进大豆品种的迭代更新是解决我国大豆产业问题的关键途径。

遗传变异是作物改良的基础,植物育种的目的是创造和利用这些遗传变异,从而选育出适合农业生产的性状。在漫长的植物育种历史中先后出现了四种育种方法,分别为传统育种、突变育种、转基因育种和基因编辑育种。传统育种虽然可以将各种有利于提高粮食产量和品质的优良基因聚集到某个品种中,但该方法时间长、效率低,需要投入大量的时间和人工。突变育种通过人工诱变的方法获得生物新品种,这种方法可大幅度改良作物的某些性状,并且变异范围广,但其诱变的方向不可控,且有利变异少,须大量处理材料<sup>[4]</sup>。转基因育种可以使受体生物在原有遗传特性基础上增加新的功能特性,培育新的品种,与传统育种相比,具有准确、直接、效率高和针对性强等特点,但转基因育种存在一定的风险隐患以及生态安全等问题<sup>[5]</sup>。基因编辑技术是在生物自身基因组上进行改造,定向地修饰DNA序列,进而使得生物体目标性状发生改变的技术手段,其优点在于成本低、速度快、操作精准、改良效果明显。

大豆作为古源四倍体,其约75%的基因存在高度冗余性<sup>[6]</sup>,化学诱变、转座子插入等传统突变体筛选手段无法针对特定目标,需要大规模的筛选,费时费力,在多倍体物种遗传研究中效率较低。这一瓶颈严重制约了大豆基因功能研究,也影响了大豆的遗传改良进程。基因编辑技术是将精确和可预测的基因变异引入植物,以获得理想的性状改变,

由此揭开了精准育种的新篇章<sup>[7]</sup>。近年来,多国已将基因编辑育种应用于农作物的商业化生产之中,如美国、瑞典、芬兰、俄罗斯和巴西等。目前在大豆中已有大量借助基因编辑技术获得的研究成果,这些研究证实了基因编辑技术应用于大豆基因编辑的可能性。本文介绍了基因编辑技术的发展和原理,对近年来利用基因编辑技术对大豆农艺性状的改良应用进行了综述,并探讨了当前大豆基因编辑体系中存在的问题和未来的展望,以期利用基因编辑技术加快大豆遗传改良提供借鉴。

## 1 基因编辑技术的类型和特点

植物基因编辑是利用特异性人工核酸酶(SSNs, sequence specific nucleases)对基因组靶点序列进行切割,进而引起DNA双链断裂(DSB, double-strand break),通过生命体的非同源末端连接(NHEJ, nonhomologous end-joining)或同源重组修复(HDR, homologydirected repair)这两种修复途径达到基因敲除或基因编辑的目的。NHEJ修复途径发生在高等真核生物的整个细胞周期中,通常在没有模板的情况下对DSB进行修复,导致断裂部位一些序列的插入或缺失,进而造成靶基因的功能丧失。HDR修复途径只能发生在细胞的G2和S期,对DSB进行修饰需要有同源序列模板的存在,这种方法可以产生靶向基因敲入或其他特定突变,HDR的精确性比NHEJ高,但修复效率低<sup>[8-10]</sup>。SSNs包括改造的导向外切酶和核酸酶,主要包括锌指核酸酶(ZFNs, zinc finger nucleases)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN, transcription activator-like effector nucleases)和规律性重复短回文序列簇(CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats) Cas 核酸酶(Cas associated endonuclease)。

ZFN和TALEN是最先发展起来的基因编辑技术,两者结构相似,都是由可以识别并且与DNA结合的结构域及Fok I核酸内切酶的切割结构域组成。目前这两种基因编辑技术已在多种植物中被广泛应用,但由于存在模块组装过程繁琐等问题,新的基因编辑技术如CRISPR/Cas也逐渐被开发。CRISPR/Cas系统主要分为两大类,6种类型及多种亚型:第一类包括利用多个Cas蛋白复合物切割外源核酸的I型、III型和IV型,第二类是使用单个Cas蛋白切割外源核酸的II型、V型和VI型<sup>[11-12]</sup>。目前第二类系统研究的相对较多,第二类系统主要包括II型的Cas9、V型的Cas12、VI型的Cas13。

此外,基于CRISPR/Cas的新型编辑系统陆续被开发与改良,包括碱基编辑器(BE, base editor)<sup>[13-15]</sup>、引导编辑器(PE, prime editor)<sup>[16]</sup>、CRISPR激活<sup>[17-19]</sup>(CRISPRa, CRISPR activation)和CRISPR抑制(CRISPRi, CRISPR interference)<sup>[20-21]</sup>等。其中碱基编辑器主要包括胞嘧啶碱基编辑器(CBE, cytosine base editors)<sup>[14]</sup>、腺嘌呤碱基编辑器(ABE, adenine base editors)<sup>[15]</sup>、糖基化酶碱基编辑器(GBE, glycosylase base editors)<sup>[22-23]</sup>和双碱基编辑器(DBE, dual base editors)<sup>[22-24]</sup>。尽管各种基因编辑技术在作物中取得了重大进展,但各种方法在不同植物物种之间的编辑效率存在较大差异。大豆作为一种全球重要作物,总结基因编辑技术在大豆基因功能鉴定及遗传改良上的应用,有助于未来更加高效地利用该技术对大豆进行遗传改良。

## 2 基因编辑技术在大豆改良中的应用

### 2.1 基因编辑技术在大豆产量性状改良中的应用

大豆是一种理想的蛋白来源,伴随着人们收入水平的提高和消费理念的变化,中国居民对大豆蛋白消费需求逐年提升,因此,提高大豆产量满足人们的日常需求是目前大豆产业亟待解决的问题。单株产量与单株粒数、有效荚数、每荚粒数和百粒重等性状都呈现出显著相关性。单株粒数和百粒重是重要的产量因子,研究人员通过CRISPR/Cas9创建的*Gmga3ox1*突变体百粒重减少,但通过增加单株粒数提高了单株产量,*Gmga3ox1*突变体中大量光合作用相关基因上调表达,同时赤霉素的生物合成降低,证明了赤霉素合成途径中的关键酶赤霉素3 $\beta$ -羟化酶基因*GmGA3ox1*在大豆产量中发挥重要的作用<sup>[25]</sup>。此外荚粒数也是影响大豆产量的关键因素之一,通过CRISPR/Cas9技术对高产高蛋白大豆品种华春6号的*GmJAGGED1*及其同源基因进行定点编辑,研究发现敲除植株与对照相比在三粒荚数、四粒荚数、每荚粒数和单株产量上均显著提高<sup>[26]</sup>。通过连续两年对2400多份大豆自然种质资源的分枝数进行表型鉴定,研究人员利用全基因组关联分析(GWAS, genome-wide association study)挖掘到大豆分枝数主效控制基因*Dt2*<sup>[27]</sup>。遗传分析发现,*Dt2*负调控大豆分枝数,利用CRISPR/Cas9技术创建基因敲除株系的分枝数明显增多,小区产量明显提高<sup>[27]</sup>。Cheng等<sup>[28]</sup>构建了1个包含15个sgRNA片段的pYLCRISPR-Cas9载体,并用于编辑15个乙烯信号转导途径相关基因*EIN2*、*EIN3*和

*EIL*。在编辑单株后代中筛选获得*EIL3*、*EIL4*、*EIL2L*三基因突变体,该突变体植株生长速度显著加快,植株顶部荚果增加,单株粒数增加,进而显著提高了产量。荚果开裂是大豆驯化和育种中的重要性状,直接影响大豆产量。Zhang等<sup>[29]</sup>利用CRISPR/Cas9技术对荚果开裂关键基因*PDH1*进行基因编辑,结果显示*pdh1*突变体的抗炸荚性显著提高,这与豆荚内部厚壁组织中木质素分布有关。综上所述,通过基因编辑有望提高大豆产量,并且该技术在揭示大豆产量性状调控机制过程中起到重要作用。

### 2.2 基因编辑技术在大豆品质性状改良中的应用

大豆种子中的蛋白质含量和油分含量是决定大豆营养品质和经济价值的重要性状,大豆种子中含有大约40%的蛋白质和20%的油分,是人类食用植物蛋白质和植物油的重要来源<sup>[30]</sup>。AIP2是一种E3-RING泛素连接酶,其靶向种子特异性转录因子ABI3, Shen等<sup>[31]</sup>通过CRISPR/Cas9突变2个*AIP2*基因(*AIP2a*和*AIP2b*),发现*AIP2*的缺失可以调节ABI3转录因子蛋白的活性,并且ABI3能够改变大豆球蛋白、伴大豆球蛋白、2S白蛋白和油体蛋白基因的表达,进而增加种子蛋白质含量。7S与11S球蛋白含量与大豆加工品质密切相关,培育7S蛋白(高乳化性)或11S蛋白(高凝胶性)亚基缺失新品种能改变大豆加工特性。研究人员利用多基因编辑载体pGES401,对齐黄34创制了7S亚基全缺的七基因突变体(7s-null)和11S亚基缺失的五基因突变体(11s-null)。两个突变体均没有影响产量、油分和蛋白质等性状,但是分别影响了乳化性和凝胶性,这有助于针对大豆加工进行精准育种<sup>[32]</sup>。大豆第5号染色体末端有1个控制大豆品质和产量性状的经典位点,研究人员利用自然群体和双亲群体精细定位克隆到MOTHER-OF-FT-AND-TFL1(*GmMFT*)。通过CRISPR/Cas9技术敲除*GmMFT*基因,突变体株系的种子含油量和粒重减少,蛋白质含量增加。此外,研究人员还发现拟南芥*mft*突变体也表现出类似的表型,这些结果证实了*GmMFT*调控大豆种子油脂、蛋白质含量和粒重<sup>[33]</sup>。

此外,大豆的品质改良还体现在提高某些营养成分的含量,如具有保健功能的脂肪酸或氨基酸。大豆油的主要成分是脂肪酸,其中不饱和脂肪酸占比较高,饱和脂肪酸占比相对较低,与饱和脂肪酸相比,适量摄入不饱和脂肪酸对人体健康更有好处。Qu等<sup>[34]</sup>创建了大豆油酸相关基因*Gm15G117700*

过表达植株和基于 CRISPR/Cas9 技术的突变体植株,发现过表达植株油酸含量降低了 3.94%,突变体植株油酸含量增加了 3.49%,实验证明 *Gm15G11770* 基因可能是一个负向调节大豆油酸合成代谢的微效基因。Ma 等<sup>[35]</sup>通过 CRISPR/Cas9 技术获得了 *GmFATB1a* 和 *GmFATB1b* 单基因和双基因敲除突变体,研究表明 *FATB* 的突变体减少了棕榈酸和硬脂酸两种饱和脂肪酸的含量,为大豆油分品质改良提供了新的方向。*FAD2* 是催化油酸生成亚油酸的关键酶,Xiao 等<sup>[36]</sup>通过 CRISPR/Cas9 技术分别创建了 *Gmfad2-1B* 和 *Gmfad2-2C* 的单基因和双基因敲除突变体,结果发现 *FAD2* 基因的失活可以增加大豆油酸和亚油酸的含量,并且双基因敲除突变体的植株油酸含量显著高于单基因敲除突变体。Jiao 等<sup>[37]</sup>创建 *GmFAD3C-1* 过表达及基因敲除植株,发现 *GmFAD3C-1* 基因影响脂肪酸脱氢酶活性,脂肪酸相对含量测定表明 *GmFAD3C-1* 基因与植物亚麻酸含量密切相关。Zhou 等<sup>[38]</sup>通过 CRISPR/Cas9 对大豆 *FAD2* 基因家族的 5 个关键酶基因 (*GmFAD2-1A*、*GmFAD2-1B*、*GmFAD2-2A*、*GmFAD2-2B* 和 *GmFAD2-2C*) 进行基因编辑,发现 5 个突变体株系通过影响亚油酸的产生提高了油酸含量。磷脂酰胆碱甘油二酯胆碱磷酸转移酶 (PDCT, phosphatidylcholine diglyceride choline phosphotransferase) 是磷脂酰胆碱 (PC, phosphatidylcholine) 和二酰甘油 (DAG, diacylglycerol) 相互转化的催化剂,Li 等<sup>[39]</sup>在大豆基因组中鉴定了两个与拟南芥 *AtPDCT* 相近的同源基因 *GmPDCT1* 和 *GmPDCT2*,通过 CRISPR/Cas9 技术敲除这两个基因,发现突变体油酸含量是野生型的 2.49 倍,亚油酸含量较野生型降低了约 38%,说明敲除 *GmPDCTs* 会降低磷脂酰胆碱衍生的二酰甘油,进而抑制磷脂酰胆碱修饰后的多不饱和脂肪酸进入三酰甘油的合成途径。此外,研究人员通过全基因组关联分析鉴定到了 1 个控制大豆种子脂肪酸的主效位点 *FA9*,位于第 9 号染色体,候选基因编码 1 个 SEIPIN 蛋白<sup>[40]</sup>。通过基因编辑创制该基因突变体,发现 *fa9* 突变体种子的亚油酸和油分积累显著减少,油酸含量增加,同时伴随着蛋白质含量的增加。此外,该基因突变也会造成大豆种子大小的改变<sup>[40]</sup>。

### 2.3 基因编辑技术在大豆抗病性状改良中的应用

病虫害是导致大豆连作减产的主要因素之一。大豆主要病害有大豆花叶病 (SMV, soybean mosaic virus)、大豆白粉病 (SPM, soybean powdery mildew)、

大豆疫霉根腐病 (PRR, phytophthora root rot) 等。针对这些病害,基因编辑技术在大豆抗病性状的改良中发挥了重要作用,为大豆优良品种的培育提供了研究基础。大豆花叶病是全世界各地大豆普遍发生的一种病毒病害。Zhang 等<sup>[41]</sup>采用 CRISPR/Cas9 介导的多基因编辑技术同时靶向大豆中 *GmF3H1*、*GmF3H2* 和 *GmFNSII-1* 基因;与野生型相比,纯合三基因突变体叶片的异黄酮含量约为对照的 2 倍,大豆花叶病毒外壳蛋白质含量在感染株系 SC7 中显著降低了 1/3,证明异黄酮含量增强了叶片对 SMV 的抵抗力,此研究为提高大豆异黄酮含量和抗 SMV 提供了材料和基础。此外,生物钟基因 *TIMING OF CAB EXPRESSION 1b* (*GmTOC1b*) 也影响大豆对 SMV 的抗性作用。利用 CRISPR/Cas9 技术创建的 *Gmtoc1b* 突变体表现出对 SMV 菌株的耐受性加强,同时证实了 *GmTOC1b* 通过直接抑制 *GmWRKY40* 的表达,间接调控水杨酸介导的防御相关基因的表达,最终导致寄主植物对 SMV 的抗性降低<sup>[42]</sup>。白粉病是大豆的一种主要病害之一,研究人员利用 CRISPR/Cas9 系统诱导大豆 *GmMLO* 基因的靶向突变,获得了 *Gmmlo02*、*Gmmlo19*、*Gmmlo23* 三基因敲除突变体和 *Gmmlo02*、*Gmmlo19*、*Gmmlo20*、*Gmmlo23* 四基因敲除突变体,结果显示所有突变体植株都表现出对病原菌抗性的增强<sup>[43]</sup>。作为大豆疫霉 (*P. sojae*, *Phytophthora sojae*) 关键效应因子之一, *PsAvh52* 通过靶向 *GmTAP1* 抑制大豆免疫,从而增强大豆对 *P. sojae* 的感病性。Liu 等<sup>[44]</sup>通过 CRISPR/Cas9 基因编辑系统敲除大豆中的 *GmTAP1* 基因,发现 *GmTAP1* 功能丧失对植物基础免疫的影响较小,并且 *tap1* 突变体田间的农艺性状无显著变化,但却使大豆对 3 种 *P. sojae* 菌株 (P231、P233 和 P234) 的抗性增强。Zhang 等<sup>[45]</sup>利用 CRISPR/Cas9 和 RNAi 技术对 *Glyma05g29080* 基因在抗白霉病和结瘤中的作用进行了研究,结果表明该基因突变体植株及其后代对菌核侵染的敏感性显著提高,结瘤显著减少,证实了该基因在抗白霉病中的作用。

### 2.4 基因编辑技术在大豆抗逆性状改良中的应用

逆境是大豆高产稳产的另一重要限制因子。全球生态环境逐渐恶化,不同灾害频繁发生,雨水分布不均造成淹水或者干旱的现象很常见,并且我国盐碱地面积呈逐年增加趋势。随着全球生态条件与环境的恶化加剧,抗逆育种将越来越重要,抗逆性品种的推广应用对于合理利用自然资源,保持农业生产可持续发展有重要意义。Wang 等<sup>[46]</sup>通过

CRISPR/Cas9技术创建的*LHY1a*、*LHY1b*、*LHY2a*和*LHY2b*四基因突变体表现出显著的耐旱性,证明了*GmLHYs*负调控大豆耐旱性;其中*LHY1a*和*LHY1b*在大豆干旱响应中起着重要的调控作用,并且这两个拷贝功能冗余。此外通过转录组分析发现该基因可以通过ABA信号通路介导大豆的干旱反应,该研究为通过基因编辑提高大豆的抗旱性提供了潜在靶点。Wang等<sup>[47]</sup>通过CRISPR/Cas9同时靶向6个*GmAITR*拷贝,生成了*Gmaitr3*、*Gmaitr6*双基因突变体和*Gmaitr2*、*Gmaitr3*、*Gmaitr4*、*Gmaitr5*、*Gmaitr6*五基因纯和突变体,这两种突变体都表现出耐盐性增强,该研究表明*GmAITR*基因的缺失是提高大豆耐盐性的有效途径。此外,为探究*GmHdz4*基因对聚乙二醇模拟干旱胁迫的响应,研究人员创建了*GmHdz4*过表达植株(*GmHdz4-OE*)和基于CRISPR/Cas9技术的敲除植株(*Gmhdz4*)并进行干旱胁迫实验,结果证明*Gmhdz4*具有比*GmHdz4-OE*更高的耐旱性<sup>[48]</sup>。大豆*E2*基因是拟南芥*GIGANTEA (GI)*的同源基因,研究人员基于CRISPR/Cas9系统创建*e2*突变体,结果表明*E2*功能的丧失不仅缩短了大豆的开花时间和成熟度,而且增强了大豆的耐盐性<sup>[49]</sup>。分子和遗传分析表明,*E2*通过促进大豆核心开花抑制因子*E1*的转录,抑制参与ROS清除的基因表达,使大豆更容易受到盐胁迫的影响,同时也延迟开花和成熟<sup>[49]</sup>。Wang等<sup>[50]</sup>研究表明通过CRISPR/Cas9技术敲除*GmERF1*基因会导致根对磷的吸收效率显著增加,而*GmERF1*的过表达则会影响6个低磷胁迫相关基因的表达。进一步研究表明*GmERF1*与*GmWRKY6*直接互作,抑制*GmPT5*、*GmPT7*和*GmPT8*的转录,从而影响低磷胁迫下植物对磷的吸收和利用效率。以上研究为通过基因编辑提高大豆抗旱性、耐盐碱等性状提供了潜在靶点。

## 2.5 基因编辑技术在大豆开花期相关性状中的应用

开花是大豆从营养生长向生殖生长过渡的关键阶段之一。大豆是一种典型的短日照作物,对光周期极其敏感,花期会影响大豆的产量、种子质量和种植区域。突破作物种植的纬度界限、减少区域环境和季节气候的限制都高度依赖于作物的早熟性。对大豆的开花期进行改良对提高大豆产量至关重要,也是大豆育种的重点性状之一。Li等<sup>[51]</sup>利用基因编辑、多组学、遗传多样性和进化分析证实了钙依赖蛋白激酶基因*GmCDPK38*在调节大豆开花时间和抗虫性方面起着双重作用,敲除

*GmCDPK38*单倍型III基因型会导致大豆的晚花,并增强大豆对斜纹夜蛾的抗食性。Lin等<sup>[52]</sup>通过全基因组关联分析在大豆中鉴定出1个促进开花并增强栽培大豆区域适应性的位点*Tof8*,并证明*Tof8*候选基因为拟南芥*FKF1*的同源基因。利用CRISPR/Cas9技术成功获得*FKF1a*和*FKF1b*的单基因突变体和双基因突变体,在长日照与短日照条件下,对突变体的花期进行调查,发现*FKF1a*和*FKF1b*之间存在功能冗余,*FKF1b*是*Tof8*基因座的关键基因。AP3已被报道影响多种植物花器官的结构变化,对大豆MADS转录因子家族成员*GmAP3*进行研究,发现*GmAP3*的表达与花发育相关的必需酶基因的表达密切相关,并且*GmAP3*基因的过表达植株开花时间提前,并导致花器官形态发生改变<sup>[53]</sup>。通过CRISPR/Cas9基因编辑技术创建的大豆突变体植株开花时间延迟,因此*GmAP3*可能直接或间接影响大豆花发育进而影响大豆开花时间<sup>[53]</sup>。

## 2.6 基因编辑技术在大豆共生固氮相关性状中的应用

豆类和根瘤菌之间的共生关系可以提高作物产量,减少氮肥的使用,对可持续农业发展至关重要。大豆作为根瘤菌寄主,其相关基因可以调控共生固氮过程,如根瘤菌识别、根瘤数量的正负调节、根瘤信号传导和发育等。*NIN*是豆类结瘤的协调因子,*NSP1*可以调控*NIN*的表达<sup>[54-55]</sup>,Chen等<sup>[56]</sup>使用CRISPR/Cas9技术证明了*NSP1*对结瘤数起正调控作用,并筛选*NSP1*直向同源基因的互作基因*GmRR11d*。利用RNAi和CRISPR/Cas9对*GmRR11d*进行了功能探究,结果发现*GmRR11d*的功能缺失突变导致了结瘤数量的显著增加,证实了*GmRR11d*是大豆结瘤的关键负调控因子,并且发现*GmRR11d*可以抑制*GmNIN1a*的表达,从而抑制大豆结瘤。共生固氮是有时间限制的,因此根瘤的衰老严重影响大豆的生长发育。研究人员确定了两个结节衰老的主要调节因子*GmNAC039*和*GmNAC018*,发现*GmNAC039*和*GmNAC018*直接激活*GmCYP*基因的表达以促进结节衰老,任何一个基因的过表达都会诱导大豆根瘤衰老并且增加细胞的死亡,而敲除植株则延迟了根瘤衰老并增加了固氮酶活性<sup>[57]</sup>。Wang等<sup>[58]</sup>发现一类高氮诱导的NAC家族转录因子*SNAPs*是大豆成熟根根瘤氮素响应共表达网络的核心枢纽,通过CRISPR/Cas9技术创制了*SNAP1*、*SNAP2*、*SNAP3*、*SNAP4*四基因突变体,发现突变体

根瘤发育正常,高氮处理后对氮阻遏相对不敏感,可维持较高的固氮酶活性并延迟根瘤衰老。铁在根瘤菌共生固氮中发挥十分重要的作用,Wu等<sup>[59]</sup>通过CRISPR/Cas9系统敲除*GmYSL7*的转基因株系中根瘤铁响应所需的转录因子*GmbHLH300*的表达量提高,而过表达*GmbHLH300*则会降低根瘤数量、固氮酶活性和根瘤中铁含量,证明了*GmYSL7*是控制铁从根到根瘤的运输和在大豆根瘤中分布的关键调节因子,揭示了铁影响根瘤数量和固氮酶活性的分子机制。

## 2.7 基因编辑技术在大豆育性相关性状中的应用

杂种优势利用是提高作物产量的有效途径之一,其中不育系的创制与利用对大豆杂交种的选育及生产起着至关重要的作用。目前已知大豆雄性不育突变体*ms1*、*ms2*、*ms3*、*ms4*和*ms6*已被研究。其中,*MS1*基因编码1个微管马达驱动蛋白NACK2,在花药减数分裂末期参与细胞板的形成<sup>[60]</sup>。通过CRISPR/Cas9基因敲除*MS1*后,*ms1*突变体的花粉粒变大并呈败育表型<sup>[61]</sup>。此外,研究人员发现*MS2*编码bHLH转录因子,通过直接调控次生代谢物的生物合成和脂质代谢相关基因发挥作用,并且利用CRISPR/Cas9技术证实了导致*ms2*突变体雄性不育表型的基因是*Glyma.10G281800*,在相同遗传背景下与其他雄性不育突变体的异交率比较表明,*ms2*突变体的异交率最高,是杂交大豆种子生产的理想工具<sup>[62]</sup>。Hou等<sup>[63]</sup>鉴定到1个含有PHD-finger结构域的基因*MALE STERILITY 3 (MS3)*,*MS3*的自发突变导致翻译提前终止和PHD-finger结构域部分缺失,进而使*ms3*突变体产生雄性不育的表型。通过CRISPR/Cas9技术创建*ms3*突变体,进一步验证了雄性不育的表型是由*ms3*基因突

变引起的。此外研究发现*ms3*突变体的育性可以在长日照条件下恢复。因此,*ms3*突变体可用于创建新的、更稳定的光敏核不育系,用于两系杂交制种,这对杂交育种具有十分重要的意义<sup>[63]</sup>。Yu等<sup>[64]</sup>在大豆中通过图位克隆法克隆了1个编码R2R3-MYB转录因子的细胞核雄性不育基因*MS6*。进一步利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,验证了*MS6*基因调控大豆花粉形成及雄性育性的功能,并最终获得稳定遗传的大豆无花粉型*ms6*核不育新种质<sup>[65]</sup>。基于大豆中已克隆的细胞核雄性不育基因,结合CRISPR/Cas9基因编辑技术有望实现大豆第三代杂交育种技术系统的建立与大豆杂种优势的利用。

## 2.8 基因编辑技术在大豆其他性状改良中的应用

在生产中杂草会和大豆竞争养分,进而造成产量的严重损失,因此培育抗除草剂大豆是解决田间草害的有效方法之一。Wei等<sup>[66]</sup>通过BE3系统在*GmAHAS4*中成功引入碱基替换,获得了*GmAHAS4*纯合且可遗传的P180S突变,从而获得新型抗除草剂大豆,*GmAHAS4* P180S突变体对氯磺隆、氟唑磺隆和氟唑磺草胺具有明显的抗性。株型可以影响植物的光合面积,进而影响光合利用率,因此株型对产量形成和品质改良等具有重要意义。Kong等<sup>[67]</sup>前期鉴定了1个株型紧凑的大豆突变体(*T4219*),并通过图位克隆定位到1个候选基因*GmVPS8a (Glyma.07g049700)*,进一步发现在*T4219*突变体中,*GmVPS8a*第一个外显子上的两个核苷酸缺失导致编码蛋白提前终止,并利用CRISPR/Cas9技术对*GmVPS8a*基因进行定点突变,进而获得了与*T4219*突变体表型一致的突变体。该研究为大豆理想育种株型的遗传改良提供了新的靶基因(表1)。

表1 基因编辑技术在大豆中的应用

Table 1 Application of gene editing technology in soybean

性状 Characters	靶基因 Target gene	编辑系统 Editing systems	参考文献 Reference
产量 Yield	<i>GmGA3ox1</i>	CRISPR/Cas9	[25]
	<i>GmJAGGED1</i>	CRISPR/Cas9	[26]
	<i>Dt2</i>	CRISPR/Cas9	[27]
	<i>EIL3</i> 、 <i>EIL4</i> 、 <i>EIL2L</i>	CRISPR/Cas9	[28]
角果开裂 Pod shattering	<i>PDHI</i>	CRISPR/Cas9	[29]

表 1 ( 续 )

性状 Characters	靶基因 Target gene	编辑系统 Editing systems	参考文献 Reference
品质 Quality	<i>AIP2</i>	CRISPR/Cas9	[31]
	<i>7S α1、α2、α'1、α'2、7S α'3、β1、β2、11S A1ab2、 A2B1a、A1ab1、A5A4B3、A3B4、Gy7</i>	CRISPR/Cas9	[32]
	<i>GmMFT</i>	CRISPR/Cas9	[33]
	<i>Gm15G117700</i>	CRISPR/Cas9	[34]
	<i>GmFATB1a、GmFATB1b</i>	CRISPR/Cas9	[35]
	<i>GmFAD2-1B、GmFAD2-2C</i>	CRISPR/Cas9	[36]
	<i>GmFAD3C-1</i>	CRISPR/Cas9	[37]
	<i>GmFAD2-1A、GmFAD2-1B、GmFAD2-2A、GmFAD2-2B、GmFAD2-2C</i>	CRISPR/Cas9	[38]
	<i>GmPDCT1、GmPDCT2</i>	CRISPR/Cas9	[39]
	<i>FA9</i>	CRISPR/Cas9	[40]
抗病 Disease resistance	<i>GmF3H1、GmF3H2、GmFNSII-1</i>	CRISPR/Cas9	[41]
	<i>GmTOC1b</i>	CRISPR/Cas9	[42]
	<i>GmMLO</i>	CRISPR/Cas9	[43]
	<i>GmTAP1</i>	CRISPR/Cas9	[44]
	<i>Glyma05g29080</i>	CRISPR/Cas9	[45]
抗逆 Stress resistance	<i>GmLHY</i>	CRISPR/Cas9	[46]
	<i>GmA1TR</i>	CRISPR/Cas9	[47]
	<i>GmHdz4</i>	CRISPR/Cas9	[48]
	<i>E2</i>	CRISPR/Cas9	[49]
	<i>GmERF1</i>	CRISPR/Cas9	[50]
开花期 Flowering date	<i>GmCDPK38</i>	CRISPR/Cas9	[51]
	<i>FKF1</i>	CRISPR/Cas9	[52]
	<i>GmAP3</i>	CRISPR/Cas9	[53]
	<i>GmFT2a、GmFT4</i>	CBE	[94]
根瘤固氮 Root nodule nitrogen fixation	<i>GmRR11d</i>	CRISPR/Cas9	[56]
	<i>GmNAC039、GmNAC018</i>	CRISPR/Cas9	[57]
	<i>SNAP</i>	CRISPR/Cas9	[58]
	<i>GmYSL7</i>	CRISPR/Cas9	[59]
雄性不育 Male sterility	<i>MS1</i>	CRISPR/Cas9	[61]
	<i>MS2</i>	CRISPR/Cas9	[62]
	<i>MS3</i>	CRISPR/Cas9	[63]
	<i>MS6</i>	CRISPR/Cas9	[65]
抗除草剂 Herbicide resistance	<i>GmAHAS4</i>	CBE	[66]
株型 Plant type	<i>GmVPS8a</i>	CRISPR/Cas9	[67]

### 3 挑战与展望

#### 3.1 基因编辑技术有助于解析大豆复杂基因组

大豆作为由古四倍体进化而来的二倍体植物,栽培大豆基因组大小为1.1 Gb~1.15 Gb( $n=20$ )<sup>[68]</sup>。基因组高度重复,其中约有75%的预测基因均具有多个拷贝。由于大豆基因组的复杂性,使得其功能基因组研究落后于其他模式物种。大豆中首个参考基因组 Williams 82 于2010年发表。随着测序技术的发展和测序费用的降低,近年来在大豆中先后解析了一系列参考基因组,包括日本栽培种 Enrei<sup>[69]</sup>、美国栽培种 Lee<sup>[70]</sup>、中国栽培种中黄13<sup>[71]</sup>和冀豆17<sup>[72]</sup>。但是,高度重复的基因组区域如端粒和着丝粒,难以精确地被注释,导致现有参考基因组中仍然存在几百个空白区域。近期,Wang等<sup>[73]</sup>采用了PacBio HiFi,ONT超长测序和Hi-C技术,成功组装了第一个端粒到端粒(T2T)无缺口的大豆基因组 Wm82-NJAU。随后两个研究团队陆续发布了中国大豆品种中黄13(ZH13)的T2T完整基因组,并公布了首个大豆表观遗传修饰图谱<sup>[74-75]</sup>。这些基因组的揭示有利于通过同源基因克隆的技术手段来鉴定调控重要农艺性状的关键基因。随后通过基因编辑技术实现多重基因编辑,为鉴定具有功能冗余的同源基因功能提供了一个有力的工具。

#### 3.2 提高大豆转化效率和基因编辑效率

大豆遗传转化的方法主要是农杆菌介导的大豆子叶节转化方法,具有经济、操作简单等特点<sup>[76]</sup>。但大豆的转化效率较低,大豆遗传转化中存在基因型依赖难题,是制约大豆基因编辑研究及应用的主要障碍。与子叶节转化方法相比,基于发根农杆菌的根毛转化是一种简单且高效的实现转基因根的转化系统,可用于如大豆等难于通过根癌农杆菌转化的物种<sup>[77-78]</sup>。大豆毛状根转化系统被广泛认可<sup>[79]</sup>,目前已应用在代谢、盐胁迫、干旱胁迫、病原体和结瘤等研究中<sup>[79-83]</sup>。利用该方法可以显著提高转化效率,大约30~45 d完成一个流程<sup>[84]</sup>。目前,已有多种改进方法被开发应用<sup>[85-86]</sup>,例如在改造后利用大豆毛状根转化系统在14 d内评估CRISPR/Cas载体中sgRNA的编辑效率<sup>[86]</sup>。因此借助毛状根转化系统进行编辑效率的评价对后期进行大豆子叶节转化具有参考作用。除了提高遗传转化效率外,研究人员还积极探究提高大豆基因编辑效率的方法。高彩霞团队基于结构的聚类方法,发现并提出了一套具有不同特性的脱氨酶,可以在植物和哺乳

动物细胞中起作用,在人工智能理性发现和设计的脱氨酶中,Sdd7和Sdd6在疾病治疗和农业应用中具有应用潜力,其中Sdd7能够有效地介导大豆植株发生编辑<sup>[87]</sup>。

#### 3.3 全新基因编辑技术体系助力大豆遗传改良

SNP变异广泛存在于大豆基因组中,并且许多大豆重要农艺性状均与SNP变异有关,因此,开发出精确诱导目标基因点突变的单碱基编辑技术对改善作物农艺性状也极为重要。目前,大豆基因编辑较多使用CRISPR/Cas9技术,新出现的CRISPR/Cas工具,如BE、PE、Cas12a和Cas13等正在被应用于各种作物基因编辑,但上述方法用于编辑大豆基因组还处于起步阶段。目前仅有一篇报道是利用Cpf1介导的大豆植物基因编辑,该试验还是在原生质体中进行,并未获得稳定遗传的编辑单株,编辑效率在10%左右<sup>[88]</sup>。其次,在基因组精准编辑方面,碱基编辑已被广泛应用于多种农作物性状改良的研究和应用中,特别是在水稻中已经成功开发出高效成熟的CBE、ABE和PE系统,可以实现任意碱基的替换和小片段的插入<sup>[89-93]</sup>。在大豆中目前仅有4篇关于大豆CBE系统的报道。Cai等<sup>[94]</sup>首次报道利用CBE体系对*GmFT2a*和*GmFT4*基因进行单碱基编辑,编辑效率为6.0%~18.2%,但在基因型检测结果中发现部分C-G的突变形式,研究者认为C-T或C-G的碱基突变频率的变化可能取决于序列背景或物种。Wei等<sup>[66]</sup>利用BE3对*GmAHAS3*和*GmAHAS4*基因进行单碱基编辑, $T_0$ 代编辑检测结果表明*GmAHAS3*和*GmAHAS4*基因编辑效率分别为0和33.3%,而最后只有1个编辑单株遗传给下一代。Huang等<sup>[87]</sup>通过基于人工智能辅助的结构预测,发现并评估了一套具有不同特性的脱氨酶,其中Sdd7在大豆的5个位点的编辑效率相比于脱氨酶rAPOBEC1、hA3A和hAID分别提高26.3倍、28.2倍和10.8倍,在大豆中实现22%(34/154)的编辑效率。Bai等<sup>[95]</sup>通过加入大豆内源*GmRAD51a*的ssDBD linker,在大豆中开发了基于胞嘧啶脱氨酶PmCDA1的高效CBE碱基编辑工具ChyCBE。该工具在稳定转化的 $T_0$ 代大豆中碱基编辑效率最高,达79%, $T_0$ 代即可获得目标基因型的纯合突变体。目前,大豆的单碱基编辑工具仍然面临编辑效率低、脱靶和有限的活性窗口等问题,需要继续优化改良。此外,一些新型编辑工具,例如引导编辑、转录激活工具等需要开发适用于大豆的高效、精准且稳定的编辑体系,逐步实现大豆精准编辑,为培育



高产优质大豆品种提供技术支持。

### 3.4 基因编辑技术助力大豆高产优质育种

基因编辑育种相较于传统诱变育种效率高,可以避免多次的回交转育流程,在优异底盘品种中引入理想表型。转基因育种虽然也能快速引入外源基因,但受限于人们对转基因的认知、科学防范和生物安全风险,在大豆中尚未推广转基因大豆品种。而基因编辑育种可以规避转基因问题,通过杂交技术,很容易将转基因外源片段分离出来,实现快速、精确并不引入外源基因的情况下对生物体基因组的改造,但基因编辑育种仍然需要被监管。目前大豆育种仍处于传统育种向分子育种的过渡阶段,在这个阶段亟需加快对调控大豆重要农艺性状的关键基因及其调控网络的认识。通过对品质、产量、抗病和抗逆等重要农艺性状的关键节点基因进行多重定点编辑,实现在短时间内创制不含转基因成分的优异种质资源,加快大豆分子设计育种进程。

#### 参考文献

- [1] Bellaloui N, Bruns H A, Abbas H K, Mengistu A, Fisher D K, Reddy K N. Agricultural practices altered soybean seed protein, oil, fatty acids, sugars, and minerals in the Midsouth USA. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 31
- [2] Ma L, Li B, Han F, Yan S, Wang L, Sun J. Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk. *Food Chemistry*, 2015, 173: 694-701
- [3] Fang C, Kong F. Soybean. *Current Biology*, 2022, 32 (17): R902-R904
- [4] Segal G A. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 1984, 134: 113-142
- [5] Anwar A, Kim J K. Transgenic breeding approaches for improving abiotic stress tolerance: Recent progress and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 2695
- [6] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten D L, Song Q, Thelen J J, Cheng J. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 2010, 463: 178-183
- [7] Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 2021, 184: 1621-1635
- [8] Burma S, Chen B P, Chen D J. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair*, 2006, 5: 1042-1048
- [9] Fu Y W, Dai X Y, Wang W T, Yang Z X, Zhao J J, Zhang J P, Wen W, Zhang F, Oberg K C, Zhang L. Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49: 969-985
- [10] Liu M, Rehman S, Tang X, Gu K, Fan Q, Chen D, Ma W. Methodologies for improving HDR efficiency. *Frontiers in Genetics*, 2019, 9: 691
- [11] Liu G, Lin Q, Jin S, Gao C. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular Cell*, 2021, 82: 333-347
- [12] Yin L, Man S, Ye S, Liu G, Ma L. CRISPR-Cas based virus detection: Recent advances and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 193: 113541
- [13] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, Zuris J A, Liu D R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-424
- [14] Komor A C, Zhao K T, Packer M S, Gaudelli N M, Waterbury A L, Koblan L W, Kim Y B, Badran A H, Liu D R. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T: A base editors with higher efficiency and product purity. *Science Advance*, 2017, 3: eaao4774
- [15] Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, Packer M S, Badran A H, Bryson D I, Liu D R. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464-471
- [16] Lu C, Kuang J, Shao T, Xie S, Li M, Zhu L, Zhu L. Prime editing: An all-rounder for genome editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23: 9862
- [17] Xiong X, Liang J, Li Z, Gong B Q, Li J F. Multiplex and optimization of dCas9-TV-mediated gene activation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63: 634-645
- [18] Selma S, Sanmartín N, Espinosa-Ruiz A, Gianoglio S, Lopez-Gresa M P, Vázquez-Vilar M, Flors V, Granell A, Orzaez D. Custom-made design of metabolite composition in *N. benthamiana* leaves using CRISPR activators. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20: 1578-1590
- [19] Yu L, Li Z, Ding X, Alariqi M, Zhang C, Zhu X, Fan S, Zhu L, Zhang X, Jin S. Developing an efficient CRISPR-dCas9-TV-derived transcriptional activation system to create three novel cotton germplasm materials. *Plant Communications*, 2023, 4: 100600
- [20] Karlson C K S, Mohd Noor S N, Khalid N, Tan B C. CRISPRi-mediated down-regulation of the cinnamate-4-hydroxylase (*C4H*) gene enhances the flavonoid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Biology*, 2022, 11: 1127
- [21] 周华杰. CRISPR/dCas9转录激活和抑制系统在小麦中的研究. 济南: 山东师范大学, 2021
- [22] Zhou H J. Study on CRISPR / dCas9 transcriptional activation and suppression system in wheat. Jinan: Shandong Normal University, 2021
- [22] Kurt I C, Zhou R, Iyer S, Garcia S P, Miller B R, Langner L M, Grünwald J, Joung J K. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nature*

- Biotechnology, 2021, 39: 41-46
- [23] Zhao D, Li J, Li S, Xin X, Hu M, Price M A, Rosser S J, Bi C, Zhang X. New base editors change C to A in bacteria and C to G in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2021, 39: 35-40
- [24] Grünewald J, Zhou R, Lareau C A, Garcia S P, Iyer S, Miller B R, Langner L M, Hsu J Y, Aryee M J, Joung J K. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 861-864
- [25] Hu D, Li X, Yang Z, Liu S, Hao D, Chao M, Zhang J, Yang H, Su X, Jiang M, Lu S, Zhang D, Wang L, Kan G, Wang H, Cheng H, Wang J, Huang F, Tian Z, Yu D. Downregulation of a gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase enhances photosynthesis and increases seed yield in soybean. *New Phytologist*, 2022, 235: 502-517
- [26] Cai Z, Xian P, Cheng Y, Ma Q, Lian T, Nian H, Ge L. CRISPR/Cas9-mediated gene editing of *GmJAGGED1* increased yield in the low-latitude soybean variety Huachun 6. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(10): 1898-1900
- [27] Liang Q, Chen L, Yang X, Yang H, Liu S, Kou K, Fan L, Zhang Z, Duan Z, Yuan Y, Liang S, Liu Y, Lu X, Zhou G, Zhang M, Kong F, Tian Z. Natural variation of *Dt2* determines branching in soybean. *Nature Communications*, 2022, 13: 6429
- [28] Cheng Y, Li Y, Yang J, He H, Zhang X, Liu J, Yang X. Multiplex CRISPR-Cas9 knockout of *EIL3*, *EIL4*, and *EIN2L* advances soybean flowering time and pod set. *BMC Plant Biology*, 2023, 23: 519
- [29] Zhang Z, Wang J, Kuang H, Hou Z, Gong P, Bai M, Zhou S, Yao X, Song S, Yan L. Elimination of an unfavorable allele conferring pod shattering in an elite soybean cultivar by CRISPR/Cas9. *Abiotech*, 2022, 3: 110-114
- [30] Bhanu R, Virk H K. Nitrogen management in soybean: A review. *Agricultural Reviews*, 2019, 40: 129-135
- [31] Shen B, Schmidt M A, Collet K H, Liu Z B, Coy M, Abbitt S, Molloy L, Frank M, Everard J D, Booth R. RNAi and CRISPR-Cas silencing E3-RING ubiquitin ligase *AIP2* enhances soybean seed protein content. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73: 7285-7297
- [32] Bai M, Yuan C, Kuang H, Sun Q, Hu X, Cui L, Lin W, Peng C, Yue P, Song S. Combination of two multiplex genome-edited soybean varieties enables customization of protein functional properties. *Molecular Plant*, 2022, 15: 1081-1083
- [33] Cai Z, Xian P, Cheng Y, Zhong Y, Yang Y, Zhou Q, Lian T, Ma Q, Nian H, Ge L. *MOTHER-OF-FT-AND-TFL1* regulates the seed oil and protein content in soybean. *New Phytologist*, 2023, 239: 905-919
- [34] Qu S, Jiao Y, Abraham L, Wang P. Correlation analysis of new soybean [*Glycine max* (L.) Merr] gene *Gm15G117700* with oleic acid. *Phyton*, 2021, 90: 1177-1192
- [35] Ma J, Sun S, Whelan J, Shou H. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *GmFATB1* significantly reduced the amount of saturated fatty acids in soybean seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 3877
- [36] Xiao Z, Jin Y, Zhang Q, Lamboro A, Dong B, Yang Z, Wang P. Construction and functional analysis of CRISPR/Cas9 vector of *FAD2* gene family in soybean. *Phyton*, 2022, 91: 349
- [37] Jiao S Q, Zhou J M, Shang Y Q, Wang J X, Zhang A J, He H B, Zhao Q Z, Li Y, Yao D. Cloning and genetic transformation of soybean fatty acid dehydrogenase *GmFAD3C-1* gene. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2022, 44: 1006
- [38] Zhou J, Li Z, Li Y, Zhao Q, Luan X, Wang L, Liu Y, Liu H, Zhang J, Yao D. Effects of different gene editing modes of CRISPR/Cas9 on soybean fatty acid anabolic metabolism based on *GmFAD2* family. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24: 4769
- [39] Li H, Zhou R, Liu P, Yang M, Xin D, Liu C, Zhang Z, Wu X, Chen Q, Zhao Y. Design of high-monounsaturated fatty acid soybean seed oil using *GmPDCT3* knockout via a CRISPR-Cas9 system. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21: 1317-1319
- [40] Qi Z, Guo C, Li H, Qiu H, Li H, Jong C, Yu G, Zhang Y, Hu L, Wu X, Xin D, Yang M, Liu C, Lv J, Wang X, Kong F, Chen Q. Natural variation in *Fatty Acid 9* is a determinant of fatty acid and protein content. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(3): 759-773
- [41] Zhang P, Du H, Wang J, Pu Y, Yang C, Yan R, Yang H, Cheng H, Yu D. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18: 1384-1395
- [42] Zhang Y, Du H, Zhao T, Liao C, Feng T, Qin J, Liu B, Kong F, Che Z, Chen L. *GmTOC1b* negatively regulates resistance to Soybean mosaic virus. *The Crop Journal*, 2023, 11(6): 1762-1773
- [43] Bui T P, Le H, Ta D T, Nguyen C X, Le N T, Tran T T, Van Nguyen P, Stacey G, Stacey M G, Pham N B, Chu H H, Do P T. Enhancing powdery mildew resistance in soybean by targeted mutation of *MLO* genes using the CRISPR/Cas9 system. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 533
- [44] Liu T, Ji J, Cheng Y, Zhang S, Wang Z, Duan K, Wang Y. CRISPR/Cas9-mediated editing of *GmTAP1* confers enhanced resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65: 1609-1612
- [45] Zhang Y, Blahut-Beatty L, Zheng S, Clough S J, Simmonds D H. The role of a soybean 14-3-3 gene (*Glyma05g29080*) on white mold resistance and nodulation investigations using CRISPR-Cas9 editing and RNA silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2023, 36: 159-164
- [46] Wang K, Bu T, Cheng Q, Dong L, Su T, Chen Z, Kong F, Gong Z, Liu B, Li M. Two homologous LHY pairs negatively control soybean drought tolerance by repressing the abscisic acid responses. *New Phytologist*, 2021, 229: 2660-2675

- [47] Wang T, Xun H, Wang W, Ding X, Tian H, Hussain S, Dong Q, Li Y, Cheng Y, Wang C. Mutation of *GmA1TR* genes by CRISPR/Cas9 genome editing results in enhanced salinity stress tolerance in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 779598
- [48] Zhong X, Hong W, Shu Y, Li J, Liu L, Chen X, Islam F, Zhou W, Tang G. CRISPR/Cas9 mediated gene-editing of *GmHdz4* transcription factor enhances drought tolerance in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 988505
- [49] Dong L, Hou Z, Li H, Li Z, Fang C, Kong L, Li Y, Du H, Li T, Wang L. Agronomical selection on loss-of-function of GIGANTEA simultaneously facilitates soybean salt tolerance and early maturity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64: 1866-1882
- [50] Wang R, Liu X, Zhu H, Yang Y, Cui R, Fan Y, Zhai X, Yang Y, Zhang S, Zhang J. Transcription factors *GmERF1* and *GmWRKY6* synergistically regulate low phosphorus tolerance in soybean. *Plant Physiology*, 2023, 192: 1099-1114
- [51] Li X, Hu D, Cai L, Wang H, Liu X, Du H, Yang Z, Zhang H, Hu Z, Huang F. *CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE38* regulates flowering time and common cutworm resistance in soybean. *Plant Physiology*, 2022, 190: 480-499
- [52] Li H, Du H, He M, Wang J, Wang F, Yuan W, Huang Z, Cheng Q, Gou C, Chen Z. Natural variation of *FKF1* controls flowering and adaptation during soybean domestication and improvement. *New Phytologist*, 2023, 238: 1671-1684
- [53] Zhang A, He H, Li Y, Wang L, Liu Y, Luan X, Wang J, Liu H, Liu S, Zhang J. MADS-Box subfamily gene *GmAP3* from *Glycine max* regulates early flowering and flower development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24: 2751
- [54] Soyano T, Hirakawa H, Sato S, Hayashi M, Kawaguchi M. Nodule inception creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111: 14607-14612
- [55] Hirsch S, Kim J, Munoz A, Heckmann A B, Downie J A, Oldroyd G E. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 2009, 21: 545-557
- [56] Chen J, Wang Z, Wang L, Hu Y, Yan Q, Lu J, Ren Z, Hong Y, Ji H, Wang H. The B-type response regulator *GmRR11d* mediates systemic inhibition of symbiotic nodulation. *Nature Communications*, 2022, 13: 7661
- [57] Yu H, Xiao A, Wu J, Li H, Duan Y, Chen Q, Zhu H, Cao Y. *GmNAC039* and *GmNAC018* activate the expression of cysteine protease genes to promote soybean nodule senescence. *Plant Cell*, 2023, 35(8):2929-2951
- [58] Wang X, Qiu Z, Zhu W, Wang N, Bai M, Kuang H, Cai C, Zhong X, Kong F, Lü P, Guan Y. The NAC transcription factors *SNAP1/2/3/4* are central regulators mediating high nitrogen responses in mature nodules of soybean. *Nature Communication*, 2023, 14(1):4711
- [59] Wu X, Wang Y, Ni Q, Li H, Wu X, Yuan Z, Xiao R, Ren Z, Lu J, Yun J. *GmYSL7* controls iron uptake, allocation, and cellular response of nodules in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65: 167-187
- [60] Nadeem M, Chen A D, Hong H L, Li D D, Li J J, Zhao D, Wang W, Wang X B, Qiu L J. *GmMs1* encodes a kinesin-like protein essential for male fertility in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(6):1054-1064
- [61] Jiang B J, Chen L, Yang C Y, Wu T T, Yuan S, Wu C X, Zhang M C, Gai J Y, Han T F, Hou W S, Sun S. The cloning and CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of a male sterility gene *MS1* of soybean. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(6):1098-1100
- [62] Fang X, Feng X, Sun X, Yang X, Li Q, Yang X, Xu J, Zhou M, Lin C, Sui Y, Zhao L, Liu B, Kong F, Zhang C, Li M. Natural variation of *MS2* confers male fertility and drives hybrid breeding in soybean. *Plant Biotechnol Journal*, 2023, 21(11):2322-2332
- [63] Hou J, Fan W, Ma R, Li B, Yuan Z, Huang W, Wu Y, Hu Q, Lin C, Zhao X. *MALE STERILITY 3* encodes a plant homeodomain-finger protein for male fertility in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64: 1076-1086
- [64] Yu J, Zhao G, Li W, Zhang Y, Wang P, Fu A, Zhao L, Zhang C, Xu M. A single nucleotide polymorphism in an R2R3 MYB transcription factor gene triggers the male sterility in soybean *ms6* (*Ames1*). *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(11):3661-3674
- [65] 张万年, 杨静, 杨绪磊, 高萌萌, 林春晶, 刘鹏, 李志刚, 杨向东, 张春宝. 大豆细胞核雄性不育基因 *MS6* 的功能验证及不育新种质创制. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(3): 801-807
- Zhang W N, Yang J, Yang X L, Gao M M, Lin C J, Liu P, Li Z G, Yang X D, Zhang C B. Functional verification of soybean nuclear male sterile gene *MS6* and creation of new sterile germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(3): 801-807
- [66] Wei T, Jiang L, You X, Ma P, Xi Z, Wang N N. Generation of herbicide-resistant soybean by base editing. *Biology*, 2023, 12: 741
- [67] Kong K, Xu M, Xu Z, Lv W, Lv P, Begum N, Liu B, Liu B, Zhao T. Dysfunction of *GmVPS8a* causes compact plant architecture in soybean. *Plant Science*, 2023, 331: 111677
- [68] Arumuganathan K, Earle E D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1991, 9: 229-241
- [69] Shimomura M, Kanamori H, Komatsu S, Namiki N, Mukai Y, Kurita K, Kamatsuki K, Ikawa H, Yano R, Ishimoto M. The *Glycine max* cv. Enrei genome for improvement of Japanese soybean cultivars. *International Journal of Genomics*, 2015, 2015: 358127
- [70] Valliyodan B, Cannon S B, Bayer P E, Shu S, Brown A V, Ren L, Jenkins J, Chung C Y L, Chan T F, Daum C G.

- Construction and comparison of three reference-quality genome assemblies for soybean. *The Plant Journal*, 2019, 100: 1066-1082
- [71] Shen Y, Du H, Liu Y, Ni L, Wang Z, Liang C, Tian Z. Update soybean Zhonghuang 13 genome to a golden reference. *Science China Life Sciences*, 2019, 62: 1257-1260
- [72] Yi X, Liu J, Chen S, Wu H, Liu M, Xu Q, Lei L, Lee S, Zhang B, Kudrna D. Genome assembly of the JD17 soybean provides a new reference genome for comparative genomics. *G3 (Bethesda)*, 2022, 12: jkac017
- [73] Wang L, Zhang M, Li M, Jiang X, Jiao W, Song Q. A telomere-to-telomere gap-free assembly of soybean genome. *Molecular Plant*, 2023, 16(11):1711-1714
- [74] Zhang C, Xie L, Yu H, Wang J, Chen Q, Wang H. The T2T genome assembly of soybean cultivar ZH13 and its epigenetic landscapes. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1715-1718
- [75] Zhang A Q, Kong T C, Sun B Q, Qiu S Z, Guo J H, Ruan S Y, Guo Y, Guo J R, Zhang Z S, Liu Y, Hu Z, Jiang T, Liu Y D, Cao S Q, Sun S, Wu T T, Hong H L, Jiang B J, Yang M X, Yao X Y, Wang Y D. A telomere-to-telomere genome assembly of Zhonghuang 13, a widely-grown soybean variety from the original center of *Glycine max*. *The Crop Journal*, 2024, 12(1):142-153
- [76] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, Fonger T M, Wang K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Reports*, 2006, 25: 206-213
- [77] Chilton M D, Tepfer D A, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 1982, 295: 432-434
- [78] Collier R, Fuchs B, Walter N, Kevin Lutke W, Taylor C G. *Ex vitro* composite plants: An inexpensive, rapid method for root biology. *The Plant Journal*, 2005, 43: 449-457
- [79] Ma Z, Zhu L, Song T, Wang Y, Zhang Q, Xia Y, Qiu M, Lin Y, Li H, Kong L. A paralogous decoy protects *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a host inhibitor. *Science*, 2017, 355: 710-714
- [80] Lozovaya V V, Lygin A V, Zernova O V, Ulanov A V, Li S, Hartman G L, Widholm J M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. *Planta*, 2007, 225: 665-679
- [81] Wang F, Chen H W, Li Q T, Wei W, Li W, Zhang W K, Ma B, Bi Y D, Lai Y C, Liu X L. *GmWRKY27* interacts with *GmMYB174* to reduce expression of *GmNAC29* for stress tolerance in soybean plants. *The Plant Journal*, 2015, 83: 224-236
- [82] Liu S, Kandath P K, Warren S D, Yeckel G, Heinz R, Alden J, Yang C, Jamai A, El-Mellouki T, Juvale P S. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature*, 2012, 492: 256-260
- [83] Savka M, Ravillion B, Noel G, Farrand S. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. *Phytopathology*, 1990, 80: 503-508
- [84] Xu X, Yu T F, Ma J, Chen J, Zhou Y B, Chen M, Chen Z Y, Ma Y Z, Xu Z S, Zhang Z A. Transformation and detection of soybean hairy roots. *Bio-Protocol*, 2023, 13(11): e4691
- [85] Cheng Y, Wang X, Cao L, Ji J, Liu T, Duan K. Highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation for gene functional and gene editing analysis in soybean. *Plant Methods*, 2021, 17: 1-12
- [86] Kong Q, Li J, Wang S, Feng X, Shou H. Combination of hairy root and whole-plant transformation protocols to achieve efficient CRISPR/Cas9 genome editing in soybean. *Plants*, 2023, 12: 1017
- [87] Huang J, Lin Q, Fei H, He Z, Xu H, Li Y, Qu K, Han P, Gao Q, Li B, Liu G, Zhang L, Hu J, Zhang R, Zou E, Luo Y, Ran Y, Qiu J, Zhao K, Gao C. Discovery of deaminase functions by structure-based protein clustering. *Cell*, 2023, 186: 3182-3195
- [88] Kim H, Kim S T, Ryu J, Kang B C, Kim J S, Kim S G. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nature Communications*, 2017, 8: 14406
- [89] Yarra R, Sahoo L. Base editing in rice: Current progress, advances, limitations, and future perspectives. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(4):595-604
- [90] Wang S, Zong Y, Lin Q, Zhang H, Chai Z, Zhang D, Chen K, Qiu J L, Gao C. Precise, predictable multi-nucleotide deletions in rice and wheat using APOBEC-Cas9. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(12):1460-1465
- [91] Wang M, Wang Z, Mao Y, Lu Y, Yang R, Tao X, Zhu J K. Optimizing base editors for improved efficiency and expanded editing scope in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(9): 1697
- [92] Sun C, Lei Y, Li B, Gao Q, Li Y, Cao W, Yang C, Li H, Wang Z, Li Y. Precise integration of large DNA sequences in plant genomes using PrimeRoot editors. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(2): 316-327
- [93] Jin S, Lin Q, Gao Q, Gao C. Optimized prime editing in monocot plants using PlantPegDesigner and engineered plant prime editors (ePPEs). *Nature Protocols*, 2023, 18(3): 831-853
- [94] Cai Y, Chen L, Zhang Y, Yuan S, Su Q, Sun S, Wu C, Yao W, Han T, Hou W. Target base editing in soybean using a modified CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18: 1996
- [95] Bai M, Hu X, Lin W, Peng C, Kuang H, Zhong X, Li Y, Chen B, Wang J, Li H. Development of PmCDA1-based high-efficiency cytidine base editors (ChyCBEs) incorporating a *GmRad51* DNA-binding domain in soybean. *New Crops*, 2024, 1: 39-42