

基因编辑技术在大豆种质资源研究中的利用

王超凡, 张大健

(山东农业大学 / 作物生物学国家重点实验室, 泰安 271000)

摘要: 大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 是一种重要的经济作物, 为人类和动物提供了丰富的蛋白质和油分, 在我国作物结构中占有重要地位。但是目前我国对大豆进口的依赖性很高, 自给率不到 30%, 并且产量、品质与进口大豆均存在较大差距。我国作为大豆的起源中心, 已有 5000 多年的种植历史。中国大豆种质资源丰富, 如何高效利用丰富多样的大豆种质资源来提高产量和品质是科学家们关注的重点问题。近几年来, 基因编辑技术迅速发展, 与传统技术手段相比, 它操作简单、用时短、效率高, 目前被广泛地应用到植物基因功能研究和植物性状改良等方面。本文对近年来大豆种质资源的利用及基因编辑技术在大豆中的应用进行了总结, 以期为未来更加高效地利用大豆种质资源提供参考。

关键词: 大豆; 种质资源; 基因编辑

Application of Gene Editing in Studies of Soybean Germplasm Resources

WANG Chao-fan, ZHANG Da-jian

(Shandong Agricultural University / State Key Laboratory of Crop Biology, Taian 271000)

Abstract: Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) serves as an important economical crop in world and also China, and provides abundant protein and oil in human and animal diets. However, China is ranging first worldwide on import of soybean products, and domestic soybean production only occupies <30% on industry demand. Furthermore, the yield and quality of imported soybeans is much better than these of national products. Soybean is a native crop species of China with over 5000 years of planting history. Although there are abundant soybean germplasm resources in China, how to efficiently use them for high-yield and high-quality breeding remained to be concerned for soybean geneticists and breeders. Compared with traditional technology, gene editing technology is an easy-to-hand, fast and efficient transgenic approach. In this paper, we summarized recent progresses on studies of soybean germplasm resources and the application of gene editing technology, and we expect to provide insights for efficient utilization of soybean germplasm resources in the future.

Key words: soybean; germplasm resources; gene editing

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 起源于约 5000 年之前的中国, 由其近缘祖先种野生大豆 (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) 驯化而来, 是一种重要的油料作物和粮饲兼用作物。历史上, 我国曾经是最大大豆生产国和出口国, 但近年来, 我国的大豆生产停滞不前, 进口量急剧攀升, 对外依存度高达 80%, 使我

国失去了大豆产业发展的掌控权, 成为我国供需矛盾最为突出的农作物。

我国作为大豆的起源中心, 大豆栽培历史悠久, 拥有丰富的种质资源, 其主要包括栽培大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 和野生大豆 (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.)。栽培大豆由祖先野生大豆长期定向

收稿日期: 2019-10-28 修回日期: 2019-11-14 网络出版日期: 2019-12-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191028004>

第一作者研究方向为大豆分子育种, E-mail: nxywangchaofan@163.com

通信作者: 张大健, 研究方向为大豆种质资源利用及控制重要性状基因的挖掘, E-mail: dajianzhang@sdau.edu.cn

基金项目: 山东省农业良种工程项目 (2019LZGC003)

Foundation project: Shandong Agricultural Seed Improvement Project (2019LZGC003)

选择、改良驯化而成。在驯化过程中的遗传瓶颈限制了其遗传多样性,大约有一半的遗传多样性在驯化过程中丢失^[1-3]。而野生大豆在遗传上并未受到人类选择的影响,因此许多控制重要农艺性状的功能基因被保留了下来,成为研究大豆的重要资源。近年来,研究人员利用这些种质资源在大豆分子育种上取得了一系列成果。

基因编辑技术是最近几年兴起的一种新的生物技术工具,该技术使研究人员能够突变特定基因、改变特定的核苷酸以及将 DNA 序列插入到基因组的特定位置^[4-5],不仅能够进行植物基因功能研究,而且理论上能够创造无限的遗传多样性,因此越来越多地运用到作物育种当中。将大豆的种质资源库与基因编辑技术有效地结合在一起,成为近年来的研究热点。

1 大豆种质资源研究进展

目前人们对大豆种质资源的收集越来越重视,全世界收集了包括栽培大豆和野生大豆在内的约 18 万份大豆种质资源^[6]。表型各异的大豆种质资源具有丰富的遗传多样性,含有许多控制重要农艺性状的功能基因,如何利用这些丰富多样的大豆种质资源来进行遗传育种和种质改良一直是研究人员关注的重点。特别是近年来随着基因组测序技术的不断发展,研究人员对这些性状各异的大豆种质资源进行了深入研究,在种质资源遗传多样性研究、控制重要农艺性状基因的克隆等方面取得了一系列进展。

1.1 大豆种质资源遗传多样性研究进展

野生大豆是栽培大豆的近缘野生祖先,抗逆性好,并且在遗传上并未受到人类选择的影响,具有丰富的遗传多样性,而栽培大豆在驯化过程中的遗传瓶颈限制了其遗传多样性。2010 年, Lam 等^[7]通过对 31 个野生大豆和栽培大豆进行重测序结果也证实了这一结论,即野生大豆具有较高的等位基因多样性。由于其存在丰富的遗传资源,近年来,对野生大豆种质资源的利用不断增多。2014 年,邱丽娟团队对 7 种野生大豆材料进行基因组测序和组装,鉴定出大量与抗逆、抗病、花期、品质和株型等重要农艺性状相关的基因,为充分利用野生大豆种质资源奠定了基础^[8]。随着基因组技术的不断发展,2019 年 3 月,由香港中文大学林汉明教授主导的全球首个高质量的野生大豆 W05 参考基因组组装完成,这为充分挖掘野生大豆丰富的遗传资源来进行大豆

种质的遗传改良及新品种的培育提供了一个重要依据^[9]。

为了更好地对大豆进行遗传改良,研究人员对不同大豆种质资源所包含的遗传信息进行了解析。2015 年, Zhou 等^[10]通过对 302 份野生大豆、地方品种和驯化品种材料进行高通量测序,并分析了在大豆驯化、改良和育种过程中的基因组动态变化,发现多个遗传变异位点与驯化性状相关,并识别了 13 个新的与含油量、株高等重要农艺性状相关的遗传位点;2017 年, Fang 等^[11]利用收集到的 809 份大豆种质资源,结合表型与 GWAS 数据,识别到与重要农艺性状显著相关的遗传位点 245 个,并且发现其中的一些遗传位点存在多效性,形成了一个复杂的多性状多位点调控网络;2019 年 7 月, Li 等^[12]利用 1938 份大豆地方品种和 97 份大豆栽培种野生祖先材料,以 99085 个高质量的单核苷酸多态性 (SNPs) 为基础,并结合 GWAS 分析,鉴定出了 17 个与开花性状相关的 SNPs 以及 27 个与温度、光照和降水相关的 SNPs。

这些研究发现中国地方品种存在着丰富的遗传多样性,具有丰富的基因资源,但同时也发现控制不同性状的基因相互关联,给优良新品种的培育造成了一定挑战。研究人员通过比较栽培大豆和野生大豆的基因组差异,为找回在人工选择过程中丢失的重要基因提供了良好的基础。

1.2 控制大豆重要农艺性状基因的克隆

大豆是中国和亚洲地区的重要传统作物,含有丰富的营养物质。近年来我国在大豆分子设计育种方面取得了一系列成果,识别并克隆了众多控制大豆重要农艺性状的基因^[13]。

栽培大豆由祖先野生大豆长期定向选择、改良驯化而成,许多控制大豆优良性状的基因在驯化过程中丢失。因此,识别与克隆大豆基因组中受驯化基因对于大豆优良新品种的培育具有重要作用。大豆结荚习性是一种重要的形态、生态和育种习性,直接影响植株株高、耐旱性、节数、叶片大小和开花时间等多种表型,是最重要的株型性状之一。大豆结荚习性主要是由两个相互作用的位点 *Dt1/dt1* 和 *Dt2/dt2* 决定的。2010 年、2014 年 Tian 等^[14]和 Ping 等^[15]分别识别和克隆到了控制大豆结荚习性的基因 *DT1* 和 *DT2*,通过对结荚习性调控基因、等位位点及其调控网络的研究,为今后大豆株型育种和遗传改良奠定坚实基础。2015 年, Sun 等^[16]识别并克隆了控制大豆种子硬实性

的基因 *GmHs1-1*。种子硬实性在许多恶劣的条件下能够保护种子,让它们一直保持休眠状态直至出现适合萌芽的条件。研究人员将 *GmHs1-1* 突变后,发现野生大豆的硬种皮变得具有通透性,进一步研究发现, *GmHs1-1* 基因中的一对核苷酸发生了改变,导致种皮具有透性。热带地区大豆在收获后种皮变软,种子活力降低,突变这个基因后可以使热带地区大豆种皮变硬、种子活力增强,为热带地区培育优良大豆品种奠定了理论基础。大豆是一种对光周期敏感的作物,不同地区间的引种相对比较困难,2017年, Lu 等^[17]克隆了大豆长童期基因 *J*,突变该基因后可以推迟大豆在低纬度条件下的开花时间,提高大豆产量,这为高纬度条件下的优良大豆品种引种到低纬度地区生产奠定了基础。2018年, Zhang 等^[18]发现控制野生大豆种皮泥膜的基因 *Bloom1* (*B1*),它编码一个跨膜转运蛋白,突变该基因后不仅使种子表面有光泽,而且提高了栽培大豆的种子含油量;2018年, Wang 等^[19]通过 GWAS 分析,识别到一个控制大豆绿色的基因 *G*,该基因不仅控制大豆种皮绿色还参与大豆种子休眠的调控, *G* 及其同源基因在大豆、番茄和水稻的驯化过程中均受到强烈选择,并且在大豆、拟南芥和水稻中均参与对休眠的调控。

培育高产、抗逆、品质优良的大豆品种一直是科学家们努力的方向。近年来,基因组学技术的快速发展为控制这些重要农艺性状的基因的克隆提供了良好的工具。土壤盐渍化是影响全球农业生产最主要的因子之一,我国次生盐渍地超过 6×10^6 hm^2 ,占全国耕地面积的 25%^[20]。2014年, Qi 等^[21]利用对盐胁迫敏感的栽培大豆 C08 和耐盐野生大豆 W05 构建的重组自交系群体进行全基因组测序和表型分析,并结合大豆种质资源的重测序数据,鉴定并克隆了一个耐盐基因 *GmCHX1*,功能验证结果显示, *GmCHX1* 对盐胁迫具有保护作用;同年, Guan 等^[22]利用铁丰 8 号和 85-140 杂交衍生的 367 个重组自交系识别了一个耐盐相关基因 *GmSALT3*,结果表明, *GmSALT3* 和 *GmCHX1* 位于同一基因座位。2019年, Zhang 等^[23]利用科丰一号与南农 1138-2 杂交衍生的 184 个重组自交系,并结合全基因组关联分析、基因表达分析等鉴定出一个大豆芽期耐盐负调控基因 *GmCDF1*,在大豆毛状根中过表达该基因导致其耐盐性降低,抑制该基因的表达导致其芽期耐盐性提高,试验结果表明,该基因通过调节细胞中的 Na^+ - K^+ 稳态来负调节大豆芽期耐盐性。种

子大小是大豆产量的重要构成因素之一。2017年, Lu 等^[24]通过对野生大豆 ZYD7 和栽培大豆 HN44 衍生来的重组自交系群体进行全基因组测序,识别到控制种子大小的基因 *PP2C-1*,进一步研究发现,野生大豆的 *PP2C-1* 等位基因通过与 *GmBZR1* 的结合来增加种子大小,将这一优良等位基因导入缺少这一基因的大豆品种,可能有助于增加种子大小,提高大豆产量。大豆叶柄夹角是影响种植密度、冠层结构、光合效率并最终影响大豆产量的重要农艺性状。Gao 等^[25]利用夹角增大的突变体和 Williams 82 进行杂交,创建了一份包括 891 个单株的 F_2 群体,利用该群体,识别了一个控制叶柄夹角的基因 *GmLLPA1*,该基因编码 APC8-like 蛋白,并通过与 *GmAPC13a* 蛋白互作形成复合体来发挥作用,该基因的克隆为大豆株型改造提供了基础。大豆孢囊线虫病是影响大豆生产的重要病虫害之一。20世纪 50 年代,美国爆发大规模的大豆孢囊线虫病,给美国的大豆生产带来了致命性打击,抗病种质北京小黑豆的发现有效地缓解了这种现状;20世纪 60 年代,研究人员识别了分别位于 8 号和 18 号染色体上的 2 个主效 QTL;近年来,对大豆孢囊线虫病的研究不断深入,2012年, Liu 等^[26]利用包含 355 个单株的重组自交系,成功克隆了位于 8 号染色体上的抗大豆孢囊线虫基因 *SHMT*,并通过一系列试验证明其能够提高大豆对孢囊线虫的抗性,为大豆抗病育种提供重要的基因资源。

这些新基因的识别与克隆,有效地推动了大豆分子设计育种体系的建设,为培育高产、优质、抗逆性强的大豆新品种提供了理论基础。

2 基因编辑系统在大豆中的应用

2.1 基因编辑技术简介

CRISPR/Cas 系统是一个用来在基因组特定位置进行切割的工具,其存在于细菌的免疫系统中。该技术主要是利用位点特异性核酸酶 (SSNs, site-specific nucleases) 来切割 DNA 双链,在基因组的特定位置形成 DNA 双链断裂 (DSBs, double-stranded breaks),诱发细胞产生非同源末端连接 (NHEJ, non-homologous end joining) 或同源重组 (HR, homologous recombination) 修复机制对受损 DNA 实现修复。目前常见的 SSNs 包括锌指核酸酶 (ZFNs, zinc finger nucleases)、类转录激活因子效应物核酸酶 (TALENs, transcription activator-like effector nucleases) 以及规律成簇的间隔短回文重复

序列 (CRISPR/Cas, Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated protein)^[27]。

研究人员对 CRISPR/Cas 系统的研究从 20 世纪 80 年代就已经开始, 1987 年日本大阪大学的吉助石野教授在研究大肠杆菌碱性磷酸酶的基因编辑序列时, 在 3'UTR 区发现了 5 个高度同源的重复序列, 这些重复序列由长度为 32 bp 的间隔序列隔开^[28]。重复序列的长度为 25~50 bp, 间隔序列的长度为 14~84 bp。2002 年西班牙学者 Mojica 等^[29-31] 和荷兰学者 Jansen 等^[32] 将具有这一特征的重复序列统一命名为成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats), 与此同时, Jansen 等^[32] 在不同生物中发现了与 CRISPR 相关联的一系列基因, 统称为 Cas 基因。2007 年, 美国学者 Barrangou 等^[33] 证实 CRISPR/Cas 系统是一种适应性免疫系统, 即针对外源入侵者做出的一种免疫应答反应。

随着研究的不断深入, CRISPR/Cas 系统作用机制的神秘面纱也不断被揭开。它是以细菌保护自身不受病毒感染为基础, 当细菌检测到病毒入侵时, 它会产生两种较短的 RNA——crRNAs (CRISPR RNAs) 和 tracrRNA (trans-activating crRNA), 可以引导 Cas9 蛋白切割特定位置的双链 DNA 片段^[34]。后来研究人员利用这一原理, 将 crRNAs 和 tracrRNA 的核心序列连接到一起, 形成长度为 20 bp 左右的导向 RNA (sgRNA, single guide RNA), 引导 Cas 蛋白在含有保守的 PAM (protospacer adjacent motif) 的靶 DNA 序列上切割双链 DNA 分子形成 DSBs, 随后利用体内的 NHEJ 和 HR 修复机制进行修复, 在修复过程中引入突变。由于其操作简单、效率较高, 目前被广泛应用到各种基因组编辑中。

近年来, CRISPR/Cas 系统介导的基因组编辑技术得到了飞速的发展, 并已应用于包括大豆在内的多种植物。据报道, 在 50% 的细菌和 90% 的古细菌基因组中均发现了 CRISPR/Cas 系统, 在 CRISPR 序列周围可以发现编码 Cas 蛋白的小簇基因。根据 Cas 蛋白的组合以及作用机制的不同, 将其分为 2 大类 5 小类 (I ~ V) 16 种亚型, 其中 I、III 和 IV 型属于第 1 大类, 它们在切割靶基因 DNA 双链的过程中需要多种靶基因的参与, II 和 V 型属于第 2 大类, 它们只需要 1 个蛋白就能完成靶基因双链 DNA 的切割, 因而在应用中更具有优势。目前应用较多的 CRISPR/Cas9 系统属于 II 型, 新一代 CRISPR 基因编辑工具 CRISPR/Cpf1 (Cas12a) 系统属于 V 型^[34-38]。

2019 年 7 月, Qu 等^[38] 研究发现, 只需向细胞中导入导向 RNA 就能招募细胞内源脱氨酶 (ADAR, adenosine deaminase acting on RNA) 实现靶向目标 RNA 的编辑。与 CRISPR/Cas 系统相比, 不需要引入任何外源蛋白, 更加安全高效。

2.2 基因编辑技术相对于传统转基因技术的优点

与传统转基因技术相比, CRISPR/Cas9 基因编辑技术存在许多优点。传统转基因技术是将外源目的基因导入目的生物体中, 从而改变植物性状, 目的基因在受体基因组中的插入位置是随机的, 而 CRISPR/Cas9 基因编辑技术没有外源基因的导入, 只对内源基因进行修饰, 其更加安全、高效; 其次, CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以实现同时对多个位点进行编辑, 并能够对突变或插入位点实现精确调控, 这是传统转基因技术所无法完成的; 另外, 传统转基因技术只能在 RNA 水平上下调目的基因的表达, 并不能完全抑制其转录, 且遗传不稳定, 而 CRISPR/Cas9 基因编辑技术能够实现靶基因的突变, 更加稳定可靠^[39]。

2.3 基因编辑技术在大豆中的应用

基因编辑的实现依赖于遗传转化技术的应用。因此, 建立稳定高效的大豆遗传转化体系是大豆基因编辑技术应用的前提。目前, 常用的大豆遗传转化体系主要有农杆菌介导法、电击法、基因枪法、花粉管通道法等。农杆菌转化法由于其操作简单、成本低而备受人们关注, 成为大豆遗传转化应用最为广泛的方法。农杆菌转化法在大豆中的应用主要有两方面: (1) 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化, 该方法能够获得稳定遗传的大豆转基因植株, 但是转化效率较低, 过程复杂, 周期长; (2) 农杆菌介导的毛状根遗传转化, 该方法操作简单、实验周期短、效率高, 用发根农杆菌 K599 侵染大豆子叶节后形成大豆嵌合体植株。目前 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在大豆子叶节遗传转化及毛状根遗传转化中均得到成功应用。在子叶节遗传转化中突变率为 10%~20%, 而在毛状根中的转化效率最多可到 77%。2015 年, Li 等^[5] 利用 CRISPR/Cas9 系统对大豆 *GmALS1* 基因进行编辑, 获得了抗氯磺隆大豆; 2017 年, 李明^[40] 利用毛状根遗传转化体系, 通过利用 CRISPR/Cas9 系统敲除基因 *GmNAC06*、*GmNAC08*、*GmNAC15* 来快速验证其功能, 缩短了验证周期, 提高了转化效率; 2018 年, Cai 等^[41] 利用基因组编辑技术, 特异性地对大豆开花关键基因 *GmFT2a* 和 *GmFT5a* 进行突变, 创

制出更适合在低纬度地区种植的突变体材料。在 *GmFT2a* 突变体中,删除片段的长度在 599~1618 bp 时的效率为 15.6%;在 *GmFT5a* 突变体中,删除片段长度在 1069~1161 bp 时效率为 15.8%,并且还证明,CRISPR/Cas 系统介导的大片段缺失可以遗传。2019 年, Bao 等^[42]通过 CRISPR/Cas9 系统介导的 *GmSPL9* 基因靶向突变改变了植株结构。研究人员在 *GmSPL9a* 和 *GmSPL9b* 靶位点分别检测到 1 bp 的缺失,在稳定遗传的突变后代中发现主茎和分支节数增加,导致植株结构改变。

基因编辑技术在大豆中的应用,为解析大豆基因功能及其分子机理提供了重要的工具。由于该技术本身所具有的优势,使其不仅能够对植物体内的重要基因进行敲除、插入或替换,而且可以实现对植物性状或品种的精确改良,培育出适合各种不同的地理环境条件以及满足人们不同需求的大豆新品种,对于缓解我国目前存在的大豆困境,促进农业生产的发展将会起到重要的推动作用。

3 问题与展望

分子生物技术与基因组学的快速发展,为大豆种质资源的开发与利用提供了便捷的条件。日益成熟的大豆遗传转化体系,为利用基因编辑技术对大豆基因组进行编辑提供了良好的基础。然而,当前基因编辑在大豆种质资源中的利用也存在诸多问题:首先,大豆种质资源的利用还不够充分,目前仅有较少的优良性状得到解析;其次,大豆转化效率依然较低,想要得到稳定可遗传的基因编辑材料,工作量大;另外,CRISPR/Cas 系统存在脱靶效应。因此,更加广泛地收集大豆种质资源,充分利用具有优良性状的野生大豆材料,发展更加高效简捷的基因编辑系统仍是科研人员努力的方向。

随着基因编辑技术的不断进步和大豆种质资源的利用越来越多,大豆分子设计育种迎来高速发展的阶段。因此,我们应当把握机遇,充分利用丰富的种质资源去解析遗传调控网络、克隆功能基因,运用基因编辑技术来对基因进行定点修饰及编辑,验证其功能,并最终实现大豆品种以及重要农艺性状的精确改良,为大豆新品种的培育及遗传改良奠定坚实基础。

参考文献

[1] Benjamin W C, Robert M S. Soybean (*Glycine max*) mutant and germplasm resources: current status and future prospects. *Current Protocols in Plant Biology*, 2016, 1: 307-327

[2] Jeong S C, Moon J K, Park S K, Kim M S, Lee K, Lee S R, Jeong N, Choi M S, Kim N, Kang S T, Park E. Genetic diversity patterns and domestication origin of soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2019, 132(4): 1179-1193

[3] Zhao S, Zheng F, He W, Wu H, Pan S, Lam H M. Impacts of nucleotide fixation during soybean domestication and improvement. *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 81

[4] Meng Y Y, Hou Y L, Wang H, Ji R H, Liu B, Wen J Q, Niu L F, Lin H. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports*, 2016, 36(2): 371-374

[5] Li Z S, Liu Z B, Xing A Q, Moon B P, Koellhoffer J P, Huang L X, Ward R T, Clifton E, Falco S C, Cigan A M. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 960-970

[6] 何真, 韵晓东, 武凯, 姬虎太, 常建忠, 乔麟轶, 郑军. 大豆种质资源遗传多样性研究进展. *生物技术进展*, 2015, 5(2): 103-108

He Z, Yun X D, Wu K, Ji H T, Chang J Z, Qiao L Y, Zheng J. Progress on germplasm resources genetic diversity of soybean. *Current Biotechnology*, 2015, 5(2): 103-108

[7] Lam H M, Xu X, Liu X, Chen W B, Yang G H, Wong F L, Li M W, He W M, Qin N, Wang B, Li J, Jian M, Wang J, Shao G H, Wang J, Sun S M, Zhang G Y. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nature Genetics*, 2010, 42(12): 1053-1062

[8] Li Y H, Zhou G Y, Ma J X, Jiang W K, Jin L G, Zhang Z H, Guo Y, Zhang J B, Yi S, Zheng L T, Zhang S S, Zuo Q Y, Shi X H, Li Y F, Zhang W K, Hu Y Y, Kong G Y, Hong H L, Tan B, Song J, Liu Z X, Wang Y S, Ruan H, Yeung C K L, Liu J, Wang H L, Zhang L J, Guan R X, Wang K J, Li W B, Chen S Y, Chang R Z, Jiang Z, Jackson S A, Li R Q, Qiu L J. *De novo* assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(10): 1045-1052

[9] Xie M, Chung C Y L, Li M W, Wong F L, Wang X, Liu A, Wang Z L, Leung A K Y, Wong T H, Tong S W, Xiao Z X, Fan K J, Ng M S, Qi X P, Yang L F, Deng T Q, He L J, Chen L, Fu A, Ding Q, He J X, Chung G, Isobe S, Tanabata T, Valliyodan B, Nguyen H T, Cannon S B, Foyer C H, Chan T F, Lam H M. A reference-grade wild soybean genome. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-12

[10] Zhou Z K, Jiang Y, Wang Z, Gou Z H, Lyu J, Li W Y, Yu Y J, Shu L P, Zhao Y J, Ma Y M, Fang C, Shen Y T, Liu T F, Li C C, Li Q, Wu M, Wang M, Wu Y S, Dong Y, Wan W T, Wang X, Ding Z L, Gao Y D, Xiang H, Zhu B G, Lee S H, Wang W, Tian Z X. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. *Nature Biotechnology*, 2015, 4(33): 408-414

[11] Fang C, Ma Y M, Wu S W, Liu Z, Wang Z, Yang R, Hu G H, Zhou Z K, Yu H, Zhang M, Pan Y, Zhou G A, Ren H X, Du W G, Yan H R, Wang Y P, Han D Z, Shen Y T, Liu S L, Liu T F, Zhang J X, Qin H, Yuan J, Yuan X H, Kong F J, Liu B H, Li J Y, Zhang Z W, Wang G D, Zhu B G, Tian Z X. Genome-wide association studies dissect the genetic networks underlying agronomical traits in soybean. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 161

- [12] Li Y H, Li D L, Jiao Y Q, Schnable J C, Li Y F, Li H H, Chen H Z, Hong H L, Zhang T, Liu B, Liu Z X, You Q B, Tian Y, Guo Y, Guan R X, Zhang L J, Chang R Z, Zhang Z W, Reif J, Zhou X A, Schnable P S, Qiu L J. Identification of loci controlling adaptation in chinese soybean landraces via a combination of conventional and bioclimatic GWAS. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, DOI: 10.1111/pbi. 13206
- [13] 吕慧颖, 王道文, 葛毅强, 魏珣, 邓向东, 杨维才, 田志喜. 大豆育种行业创新动态. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(3): 464-467
Lv H Y, Wang D W, Ge Y Q, Wei X, Deng X D, Yang W C, Tian Z X. Innovation of soybean breeding industry. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(3): 464-467
- [14] Tian Z X, Wang X B, Lee R, Li Y H, Specht J E, Nelson R L, McClean P E, Qiu L J, Ma J X. Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *PNAS*, 2010, 107: 8563-8568
- [15] Ping J Q, Liu Y F, Sun L J, Zhao M X, Li Y H, She M Y, Sui Y, Lin F, Liu X D, Tang Z X, Nguyen H, Tian Z X, Qiu L J, Nelson R L, Clemente T E, Specht J E, Ma J X. *Dt2* is a gain-of-functions MADS-domain factor gene that specifies semideterminancy in soybean. *The Plant Cell*, 2014, 26(7): 2831-2842
- [16] Sun L J, Miao Z Y, Cai C M, Zhang D J, Zhao M X, Wu Y Y, Zhang X L, Swarm S A, Zhou L W, Zhang Z J, Nelson R L, Ma J X. *GmHs1-1*, encoding a calcineurin-like protein, controls hard-seededness in soybean. *Nature Genetics*, 2015, 47(8): 939-943
- [17] Lu S J, Zhao X H, Hu Y L, Liu S L, Nan H Y, Li X M, Fang C, Cao D, Shi X Y, Kong L P, Su T, Zhang F G, Li S C, Wang Z, Yuan X H, Cober E R, Weller J L, Liu B H, Hou X L, Tian Z X, Kong F J. Natural variation at the soybean *J* locus improves adaptation to the tropics and enhances yield. *Nature Genetics*, 2017, 49: 773-779
- [18] Zhang D J, Sun L J, Li S, Wang W D, Ding Y H, Swarm S A, Li L H, Wang X T, Tang X M, Zhang Z F, Tian Z X, Brown P J, Cai C M, Nelson R L, Ma J X. Elevation of soybean seed oil content through selection for seed coat shininess. *Nature Plants*, 2018, 4: 30-35
- [19] Wang M, Li W Z, Fang C, Xu F, Liu Y C, Wang Z, Yang R, Zhang M, Liu S L, Lu S J, Lin T, Tang J Y, Wang Y Q, Wang H R, Lin H, Zhu B G, Chen M S, Kong F J, Liu B H, Zeng D L, Jackson S A, Chu C C, Tian Z X. Parallel selection on a dormancy gene during domestication of crops from multiple families. *Nature Genetics*, 2018, 50(10): 1435-1441
- [20] 蔡晓锋, 胡体旭, 叶杰, 张余洋, 李汉霞, 叶志彪. 植物盐胁迫抗性的分子机制研究进展. *华中农业大学学报*, 2015, 34(3): 134-141
Cai X F, Hu T X, Ye J, Zhang Y Y, Li H X, Ye Z B. Advances in molecular mechanisms of plant salt stress resistance. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2015, 34(3): 134-141
- [21] Qi X P, Li M W, Xie M, Liu X, Ni M, Shao G H, Song C, Yim A K Y, Tao Y, Wong F L, Isobe S, Wong C F, Wong K S, Xu C Y, Li C Q, Wang Y, Guan R, Sun F M, Fan G Y, Xiao Z X, Zhou F, Phang T H, Liu X, Tong S W, Chan T F, Yiu S M, Tabata S, Wang J, Xu X, Lam H M. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing. *Nature Communications*, 2014, doi: 10.1038/ncomms5340
- [22] Guan R X, Qu Y, Guo Y, Yu L L, Liu Y, Jiang J H, Chen J G, Ren Y L, Liu G Y, Tian L, Jin L G, Liu Z X, Hong H L, Chang R Z, Gilliam M, Qiu L J. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in *GmSALT3*. *The Plant Journal*, 2014, 80(6): 937-950
- [23] Zhang W, Liao X L, Cui Y M, Ma W Y, Zhang X N, Du H Y, Ma Y J, Ning L H, Wang H, Huang F, Yang H, Kan G Z, Yu D Y. A cation diffusion facilitator, *GmCDF1*, negatively regulates salt tolerance in soybean. *PLoS Genetics*, 2019, 15(1): e1007798
- [24] Lu X, Xiong Q, Cheng T, Li Q T, Liu X L, Bi Y D, Li W, Zhang W K, Ma B, Lai Y C, Du W G, Man W Q, Chen S Y, Zhang J S. A *PP2C-1* allele underlying a quantitative trait locus enhances soybean 100-seed weight. *Molecular Plant*, 2017(10): 670-684
- [25] Gao J S, Yang S X, Cheng W, Fu Y F, Leng J T, Yuan X H, Jiang N, Ma J X, Feng X Z. *GmILPA1*, encoding an APC8-like protein, controls leaf petiole angle in soybean. *Plant Physiology*, 2017, 174: 1167-1176
- [26] Liu S M, Kandath P K, Warren S D, Yecke G, Heinz R, Alden J, Yang C L, Jamai A, El-Mellouki T, Juvalle P S, Hill J, Baum T J, Cianzio S, Whitham S A, Korkin D, Mitchum M G, Meksem K. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature*, 2012, 492(7428): 256-260
- [27] 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 陈乐天. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 1-12
Liu Y G, Li G S, Zhang Y L, Chen L T. Current advances on CRISPR/Cas genome editing technologies in plants. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40(5): 1-12
- [28] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433
- [29] Mojica F J, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(1): 244-246
- [30] Mojica F J, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloflex mediterranei* and *Haloflex volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, 1995, 17(1): 85-93
- [31] Mojica F J, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(2): 174-182
- [32] Jansen R, Embden J D A V, Gaastra W, Gaastra W, Schouls L M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575
- [33] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero D A, Horvath P. CRISPR provides

- acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315 (5819): 1709-1712
- [34] 郑红艳,王磊. CRISPR/Cas 基因编辑技术及其在作物育种中的应用. *生物技术进展*, 2018, 8 (3): 185-190
Zheng H Y, Wang L. The CRISPR/Cas gene editing technology and application in crop breeding. *Current Biotechnology*, 2018, 8 (3): 185-190
- [35] Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, Costa F, Shah S A, Saunders S J, Barrangou R, Brouns S J J, Charpentier E, Haft D H, Horvath P, Moineau S, Mojica F J M, Terns R M, Terns M P, White M F, Yakunin A F, Garrett R A, Oost J, Backofen R, Koonin E V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13 (11): 722-736
- [36] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Slaymaker I M, Makarova K S, Essletzbichler P, Volz S E, Joung J, Oost J, Regev A, Koonin E V, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163 (3): 759-771
- [37] Knott G J, Doudna J A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 2018, 361 (6405): 866-869
- [38] Qu L, Yi Z Y, Zhu S Y, Wan C H, Cao Z Z, Zhou Z, Yuan P, Yu Y, Tian F, Liu Z H, Bao Y, Zhao Y X, Wei W S. Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs. *Nature Biotechnology*, 2015, DOI: 10.1038/s41587-019-0178-z
- [39] 姚祝平,程远,万红建,李志邈,叶青静,阮美颖,王荣青,周国治,杨悦俭. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物基因工程育种中的应用. *分子植物育种*, 2017, 15 (7): 2647-2655
Yao Z P, Cheng Y, Wan H J, Li Z M, Ye Q J, Ruan M Y, Wang R Q, Zhou G Z, Yang Y J. Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in plant genetic engineering breeding. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15 (7): 2647-2655
- [40] 李明. 通过大豆毛状根体系快速验证 *GmNAC08*、*GmNAC06* 和 *GmNAC15* 的基因功能. 石河子: 石河子大学, 2017
Li M. Rapid function validation of *GmNAC08*, *GmNAC06* and *GmNAC15* by soybean hairy root. Shihezi: Shihezi University, 2017
- [41] Cai Y P, Chen L, Sun S, Wu C X, Yao W W, Jiang B J, Han T F, Hou W S. CRISPR/Cas9-mediated deletion of large genomic fragments in soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (12): 3835
- [42] Bao A L, Chen H F, Chen L M, Chen S L, Hao Q N, Guo W, Qiu D Z, Shan Z H, Yang Z L, Yuan S L, Zhang C J, Zhang X J, Liu B H, Kong F J, Li X, Zhou X N, Phan T L, Cao D. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biology*, 2019, 19 (1): 131