

百脉根 *LjSERKs* 基因家族在根瘤共生中的功能鉴定

汪涛 冯勇 张忠明

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为探索百脉根中的体细胞胚胎发生受体类蛋白激酶基因(somatic embryogenesis receptor-like kinases, *SERKs*)家族在根瘤共生过程中的功能和作用机制, 根据拟南芥 *AtSERKs* 基因序列, 从百脉根基因组中鉴定到 8 个同源基因(*LjSERKs*)。利用 CRISPR-Cas9 基因组编辑和毛根转化技术, 分别敲除 *LjSERKs* 家族不同基因, 观察并分析其对共生结瘤表型的影响。结果显示: 敲除 *LjSERK2*、*LjSERK3*、*LjSERK6* 和 *LjSERK7* 后, 其植株结瘤数与对照植株相比均无明显差异; 敲除 *LjSERK8* 后, 植株结瘤数显著减少。这些结果表明 *LjSERK8* 参与根瘤共生过程, 而该家族其他基因间可能存在功能冗余现象。

关键词 百脉根; *SERKs* 基因家族; CRISPR-Cas9 技术; 共生结瘤

中图分类号 S 182; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)02-0009-07

植物体拥有丰富多样的受体类蛋白激酶, 其中的典型代表就是富含亮氨酸重复序列的受体蛋白激酶(leucine-rich repeat receptor-like kinases, LRR-RLKs)^[1]。依据胞外 LRR 数量与结构上的差异特征, 将 LRR-RLKs 划分为 13 大亚家族, 其中体细胞胚胎发生受体类蛋白激酶基因 *SERKs* (somatic embryogenesis receptor-like kinases, *SERKs*) 从属于第二大亚家族^[2]。*SERKs* 最早发现于胡萝卜中, 是作为体细胞向胚性细胞过渡时期表达的关键基因^[3]。随后, 研究者又在苜蓿、可可、柑橘、拟南芥等多种植物中发现 *SERKs* 基因。目前, 研究最多的是拟南芥的 *SERKs* 基因^[4]。在拟南芥中, 共鉴定了 5 个 *SERKs* 基因, 分别命名为 *AtSERK1*、*AtSERK2*、*AtSERK3*、*AtSERK4*、*AtSERK5*。虽然不同物种的 *SERK* 基因来源不同, 但是其基本结构大致相似, 具有典型的胞外结构域、跨膜结构域和胞内激酶结构域的 LRR-RLKs 结构特征^[5]。研究表明, *AtSERK1* 和 *AtSERK2* 参与孢子体的发育, 而且彼此可能存在相互作用或功能互补的情况^[6-7]。*AtSERK1*、*AtSERK2*、*AtSERK3*、*AtSERK4* 是促进气孔形成过程所必需的基因^[8]。而且, *AtSERK3* 还与油菜素内酯(brassinosteroid, BR)信号转导紧密相关^[9], 体外生化试验和磷酸化试验证实, *At-*

SERK3 可以与 *BRI1* 相互作用, 且彼此可相互磷酸化^[10-12]。此外, *SERK3* 与 *FLS2* (flagellin-sensing 2) 形成复合物^[13], 参与植物的免疫应答反应^[14]。

为探索百脉根中的 *SERKs* 基因家族在根瘤共生中的功能与作用机制, 本研究从百脉根数据库中鉴定得到 8 个 *SERKs* 基因。利用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术, 分别定向编辑 8 个 *SERKs* 基因, 经过毛根转化实验体系, 统计百脉根根上的结瘤数, 分析共生结瘤表型, 旨在为进一步阐明百脉根 *SERKs* 基因家族在根瘤菌侵染、根瘤发生和发育过程中的功能和作用机制提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料及载体

百脉根(*Lotus japonicus*) MG20 生态型种子由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。百脉根野生型根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 由中国科学院华南植物园提供, 保存于 -80 °C 超低温冰箱中。pBluescript-*LjU6* 中间载体和 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9 骨架载体由笔者所在实验室改造而来^[15]。

1.2 百脉根 *SERKs* 基因的 sgRNA 设计

根据百脉根的 *SERKs* 基因序列, 在 CRISPR-P

收稿日期: 2017-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670240)

汪涛, 硕士研究生, 研究方向: 根瘤菌分子生物学。E-mail: 15392909638@163.com

通信作者: 张忠明, 教授, 研究方向: 共生固氮。E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

(<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>) 软件^[16]上分析,寻找合适的基因靶位点。结合软件预测、GC 含量和靠前外显子区域考虑,对每个基因选择 2~3 个靶位点,设计对应的 sgRNA 序列。

1.3 CRISPR-Cas9 体系敲除靶基因载体的构建

以 PTG (polycistronic tRNA-gRNA) 为模板,设计特异性引物,PCR 扩增得到 3 个含 tRNA-gRNA 的 PTG 序列,这是在原来设计 1 个 sgRNA 的基础上^[15]改进而来,以提高对靶基因的编辑效率。将中间载体 pBluescript-LjU6 经 *Bbs* I 酶切线性化,与 tRNA-gRNA 序列连接,之后经过 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切,将 *LjU6*-tRNA-sgRNA 特异结构单元,酶连到经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切的 pCAMBIA1300-sGFP-Cas9 骨架载体上,完成 CRISPR-Cas9 系统毛根转化载体的构建。

1.4 百脉根毛根转化体系

百脉根毛根转化方法主要参考 *Lotus japonicus* 手册,并作少量修改。百脉根 MG20 种子用浓硫酸处理 8~12 min,无菌水漂洗 3~4 次,再用 NaClO 消毒 10~15 min。再加少许水浸没种子,4 °C 暗处理 2~3 d 使种子充分吸胀,然后置于 MS 培养基上。22 °C 条件下,正置暗培养 2 d 至下胚轴生长到合适长度,光照培养(光/暗,16 h/8 h)2~3 d 至子叶撑开。用活化的发根农杆菌 LBA1334 侵染下胚轴剪切的幼苗 30 min 后,将幼苗置于 MS 上暗培养 2 d,光照培养(光/暗,16 h/8 h)3 d。随后,幼苗在 HRE 培养基上生根 10~15 d。荧光显微镜下,通过 GFP 筛选标记鉴定阳性苗后,室温炼苗 1 d。将幼苗移栽到经过高温高压灭菌的珍珠岩+蛭石 ($V_{\text{珍珠岩}}:V_{\text{蛭石}}=1:2$) 的基质中,并施以无氮营养液。栽培 5 d 之后,接种野生型根瘤菌 *M. loti* MAFF303099。3 周后,观察并统计结瘤数,分析共生结瘤表型。

1.5 基因组的提取及靶基因位点的突变检测

取毛根转化植株的阳性根为材料,液氮研磨抽提基因组 DNA,具体操作参考 TIANGEN 公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305) 说明书。以抽提的植物根基因组 DNA 为模板,设计靶基因的特异引物,PCR 扩增目的片段,酶连单克隆载体 pEASY-Blunt,转化大肠杆菌后,挑取单菌落送测序。利用 SnapGene 软件,比对测序结果与靶基因

序列,分析基因组编辑情况。

1.6 数据处理与分析

所有植株结瘤数据是以转入了空载体的百脉根 MG20 植株为对照,采用双尾卡方检验以及 Student's *t*-test 分析方法进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 百脉根 SERKs 基因的结构特征

利用百脉根数据库信息进行 Blast 序列比对分析,鉴定得到 8 个与拟南芥 *SERK* 同源性高的基因,并分别命名为 *LjSERK1*、*LjSERK2*、...*LjSERK8*。为深入了解并确认百脉根的 *SERKs* 基因与 *AtSERKs* 基因的同源关系,采用 Mega5.1 软件构建系统进化树。从进化树上看出,百脉根 8 个 *SERK* 基因位于不同染色体上,并分为 2 个大类,其中 *LjSERK1*、*LjSERK2*、*LjSERK3* 与拟南芥 *AtSERK1*、*LjSERK2*、*LjSERK3*、*LjSERK4*、*LjSERK5* 分在一类,而 *LjSERK4*、*LjSERK5*、*LjSERK6*、*LjSERK7*、*LjSERK8* 在另一类(图 1)。选取其中的 *LjSERK2* 和 *LjSERK3* 为代表进行基因结构分析,其中 *LjSERK2* 基因定位在第 5 号染色体上,全长 6 742 bp,有 12 个外显子,含有 669 个氨基酸;而 *LjSERK3* 则定位在第 6 号染色体上,全长为 8 064 bp,有 11 个外显子,含有 616 个氨基酸。

2.2 CRISPR-Cas9 系统毛根转化载体的构建

为了获得 *LjSERKs* 的功能缺失突变体,利用 CRISPR-Cas9 系统对 *LjSERKs* 基因家族进行编辑,构建 CRISPR-Cas9 敲除的毛根转化载体。首先完成 *LjU6* 启动 sgRNA 结构单元(图 2A),通过酶切与酶连的途径,将 *LjU6*-tRNA-sgRNA 元件连接到空载体 pCAMBIA1300-sGFP-2 × 35S-Cas9 上(图 2B),并进行 PCR 鉴定(图 2C)。构建完成 8 个 *SERKs* 基因的毛根转化载体,分别为 p1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK1*、p1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK2*(图 3)、p1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK3*、p1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK4*、p1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK5*、p1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK6*、p1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK7*、p1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK8*。

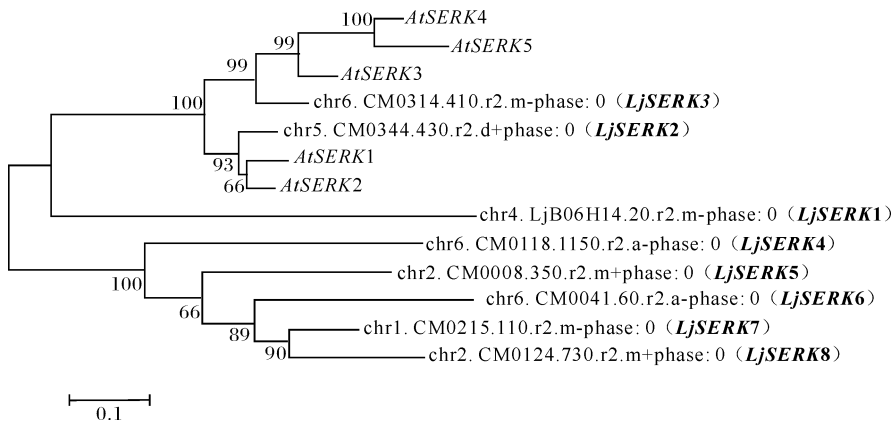
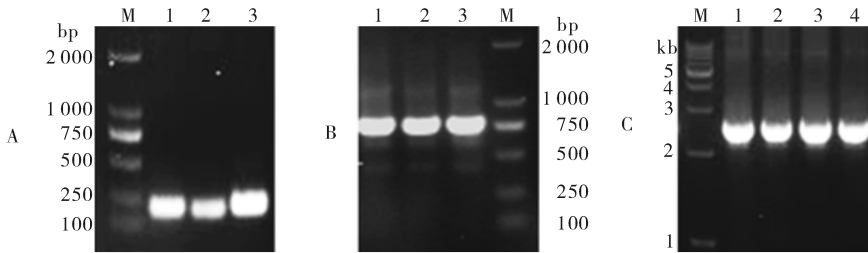


图 1 SERK 系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic tree analysis of *LjSERKs* and *AtSERKs*



A:PCR 扩增 *LjSERK2* 的 tRNA-sgRNA 结构单元; B:从 pBluescript SK(+)-*LjU6*-*LjSERK2* 载体扩增 *LjU6*-tRNA-sgRNA 结构单元; C:PCR 鉴定 pC1300-sGFP-2 × 35S-Cas9-*LjU6*-*LjSERK2* 载体。A: PCR amplification products. Lane 1-3: The tRNA-sgRNA unit of *LjSERK2*; B:PCR amplification products. Lane 1-3: The *LjU6*-tRNA-sgRNA products from pBluescript SK(+)-*LjU6*-*LjSERK2* vector; C:PCR amplification products. Lane 1-4: The *LjU6*-tRNA-sgRNA products from pC1300-sGFP-2 × 35S-Cas9- *LjU6*-*LjSERK2* vector.

图 2 CRISPR-Cas9 系统毛根转化载体的构建与鉴定

Fig.2 Construction and identification of CRIPR-Cas9 hair root transformation vectors

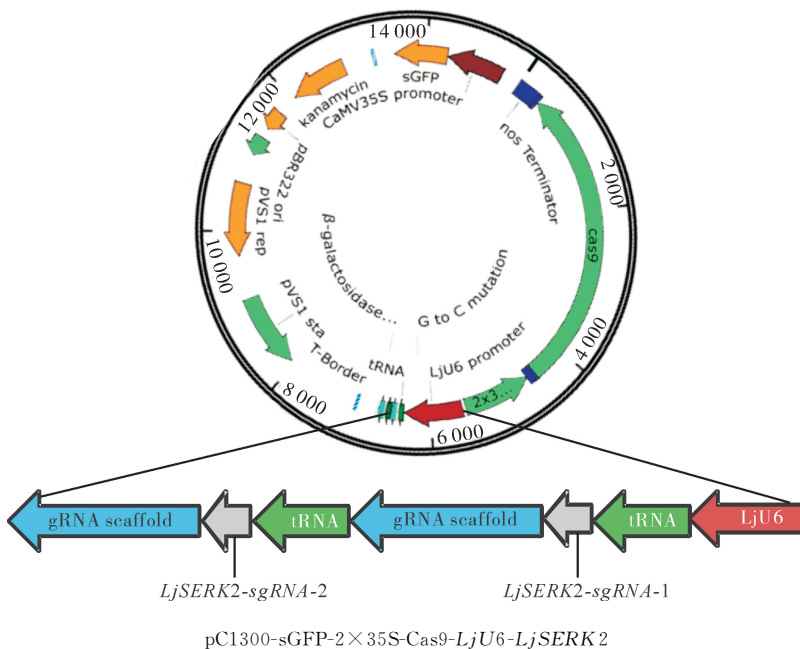


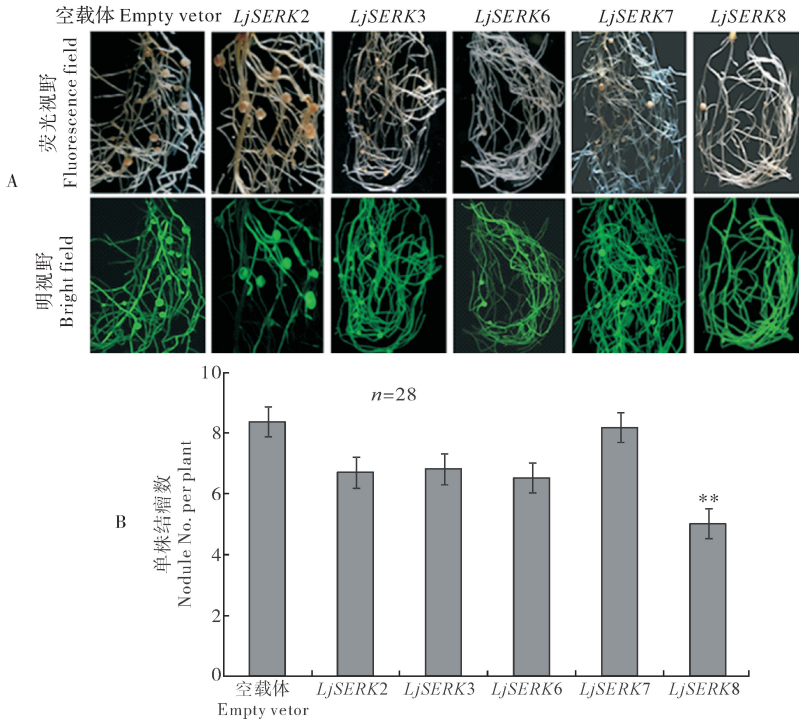
图 3 CRISPR-Cas9 系统介导的基因编辑载体

Fig.3 The vector of CRISPR-Cas9 system-mediated gene editing

2.3 毛根转化共生结瘤表型的分析

为研究 *LjSERKs* 基因家族在百脉根根瘤共生过程中对共生结瘤表型的影响,采用百脉根毛根转化技术对植株结瘤表型进行深入分析。将空载体 pCAMBIA1300-sGFP 和构建的相应 *SERKs* 基因的 CRISPR-Cas9 载体通过发根农杆菌 *A. rhizogenes* LBA1334 介导的转化方式,侵染经过剪切的下胚轴的百脉根 MG20 幼苗,经过 10~15 d 生根培养,得到转基因植株,再经过 GFP 荧光标记鉴定之

后,种植转基因阳性植株,5 d 后接种野生型根瘤菌 MAFF303099,观察接种 3 周后的结瘤情况,并对结瘤数进行统计分析。结果显示:与对照植株相比,单敲除 *SERK8* 基因,结瘤数显著减少(图 4A),表明 *SERKs* 家族中的 *SERK8* 基因可能参与根瘤共生过程,在共生信号转导过程的晚期阶段,影响了共生结瘤表型,导致结瘤数发生显著性变化;单敲除百脉根的 *SERK2*、*SERK3*、*SERK6*、*SERK7* 基因后,其植株的结瘤数均没有发生显著性变化(图4B),表



A:空载体 p1300 与 CRISPR-Cas9 介导的 *LjSERK2*、*LjSERK3*、*LjSERK6*、*LjSERK7*、*LjSERK8* 的毛根转化结瘤表型; B:空载体 p1300 与 *LjSERK2*、*LjSERK3*、*LjSERK6*、*LjSERK7*、*LjSERK8* 转基因单株苗的毛根结瘤数统计, ** 表示经 Student's *t*-test 检验,CRISPR-Cas9-*LjSERK8* 与空载体相比,具有显著性差异(** : $P < 0.01$)。A: Nodulation phenotypes of empty vector p1300 and CRISPR-Cas9 transgenic hairy roots of *LjSERK2*、*LjSERK3*、*LjSERK6*、*LjSERK7*、*LjSERK8*; B: The nodule numbers per plant on empty vector and transgenic hairy roots of *LjSERK2*、*LjSERK3*、*LjSERK6*、*LjSERK7*、*LjSERK8*. Asterisks ** indicated statistically significant differences ($P < 0.01$) between CRISPR-Cas9-*LjSERK8* and empty vector as determined by Student's *t*-test.

图 4 CRISPR-Cas9 系统介导的百脉根 *SERK* 基因的编辑对植株结瘤的影响

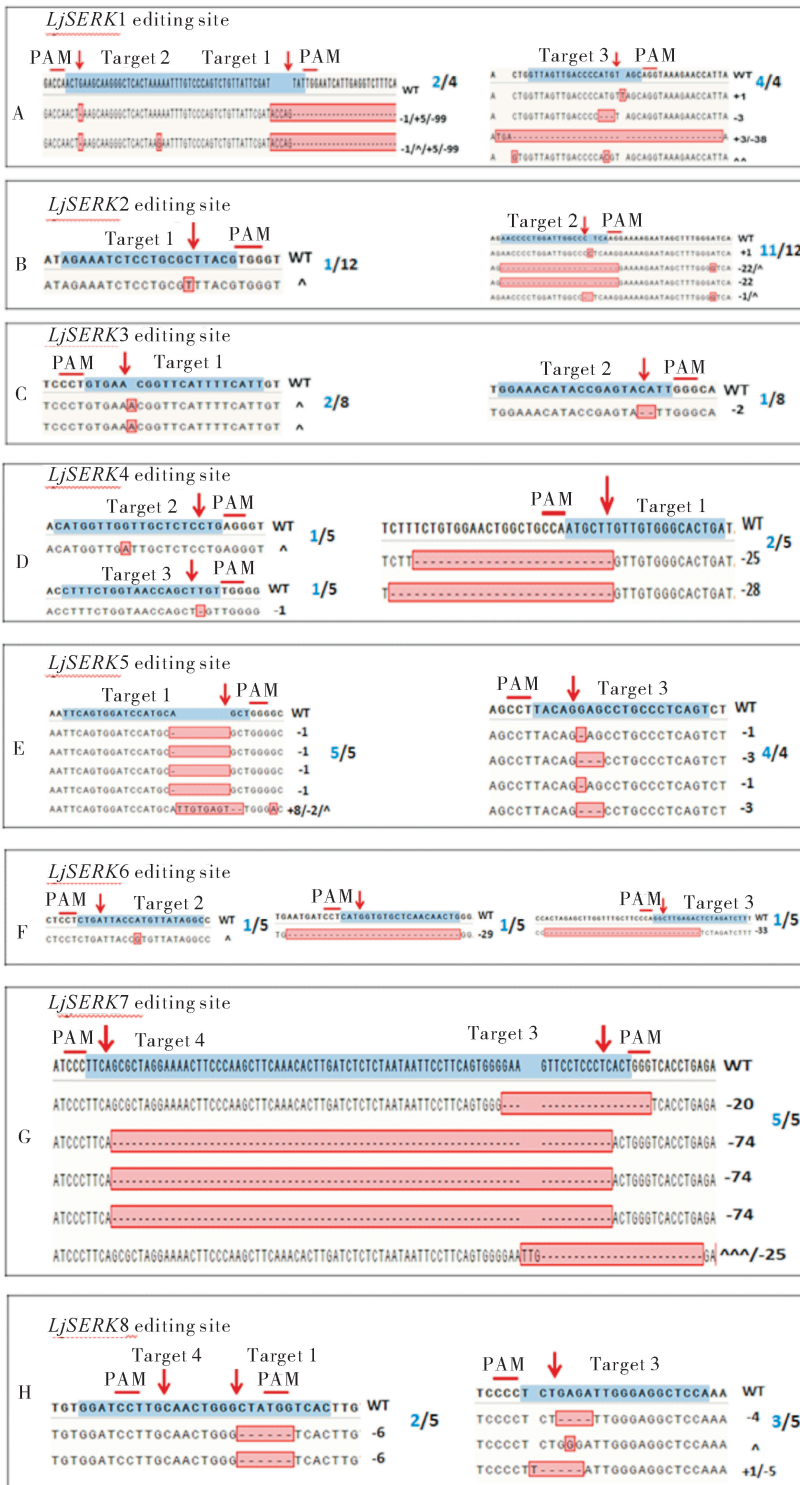
Fig.4 CRISPR-Cas9 system-mediated mutagenesis of *LjSERKs* effects nodule formation

明可能基因之间存在功能冗余的现象,具有互补彼此功能缺失表型的作用,导致未产生结瘤表型的显著性差异。

2.4 CRISPR-Cas9 系统定点编辑百脉根 *SERKs* 基因

为了确认 *LjSERKs* 基因家族毛根转化的结瘤表型是由 CRISPR-Cas9 系统敲除基因后而造成的,从每个 *SERK* 基因通过毛根转化体系获得的转基因阳性植株中,随机挑选出 2 株,剪下带 GFP 荧光

筛选标记的阳性根,抽提根的基因组 DNA,通过设计的特异性靶位点引物,PCR 扩增特定的靶基因片段,酶连到 pEASY-Blunt 克隆载体,挑取单菌落送公司测序。利用 SnapGene 软件,比对测序结果与靶基因序列,分析基因组编辑情况。结果发现,这 8 个 *SERK* 基因都发生了比较显著的基因突变,其中以缺失突变为主要突变形式,并伴随有插入突变和单碱基突变,每个靶基因的各个靶位点的编辑效率也各有差异(图5)。其中,*LjSERK1*、*LjSERK2*、



A-H: 由 pCas9-*LjU6*-sgRNA 载体引发百脉根的 *SERK1*、*SERK2*、*SERK3*、*SERK4*、*SERK5*、*SERK6*、*SERK7*、*SERK8* 的基因编辑。红色区域表示突变类型(“-”代表 DNA 缺失;“+”代表插入突变;“^”代表单碱基突变)。突变比例显示在右边。A-H: The gene editing of *LjSERK1*、*LjSERK2*、*LjSERK3*、*LjSERK4*、*LjSERK5*、*LjSERK6*、*LjSERK7*、*LjSERK8* induced by pCas9-*LjU6*-sgRNA vectors. Red section means the type of mutation (“-” indicates DNA deletion; “+” represents insertion mutation; “^” represents single base mutation). The mutant rate are shown in right side.

图 5 CRISPR-Cas9 系统介导的 *LjSERKs* 的基因编辑

Fig.5 CRISPR-Cas9 system-mediated gene editing of *SERK* in *Lotus japonicus*

LjSERK5 和 *LjSERK8* 同时发生缺失突变、插入突变和单碱基突变,编辑效率也较高(图 5A、B、E、H)。对于 *LjSERK1* 和 *LjSERK7*,由于靶基因对应的 2 个 sgRNA 相距很近,同时引导 Cas9 蛋白行使切割功能,编辑效果尤为显著(图 5A、G)。相对于其他基因,对于 *LjSERK3* 的编辑水平较低(图 5C),可能主要与 sgRNA 结合靶序列特异性和一定程度的脱靶效应有关。总体而言,每个基因都被不同程度地编辑而发生基因突变,而造成编辑水平高低的主要原因可能与 sgRNA 的碱基组成分布、GC 含量、对靶基因位点亲和性等因素相关。因此,对靶标基因同时设计多个相应的 sgRNA,以确保提高编辑效果。结合毛根转化结瘤表型结果分析,表明 *LjSERKs* 家族基因被编辑后发生了基因突变,影响根瘤共生过程,产生了基因功能缺失的结瘤表型。

3 讨 论

作为研究基因功能的重要手段,CRISPR-Cas9 基因组编辑技术以其系统优越性和高效性被越来越多的研究者所采用^[17-18]。目前,拟南芥 *AtSERKs* 基因研究得最多也最为透彻,*AtSERKs* 参与体细胞胚的发育、孢子体的形成、病原体的防御、气孔形成和油菜素内酯信号转导等生理活动。本研究以 *AtSERKs* 功能研究为基础,鉴定了百脉根中与拟南芥同源的 *SERKs* 基因,运用百脉根毛根转化体系,采用 CRISPR-Cas9 技术定向编辑 *SERKs* 基因,获得了基因功能缺失突变体,研究 *SERKs* 基因在百脉根根瘤共生中的功能,结果显示:单敲除 *LjSERK8*,与对照植株相比,其共生结瘤数显著减少,表明该基因极有可能参与共生信号转导途径,且是根瘤器官发生时期所必不可少的关键基因,作为正调控子发挥作用。*LjSERK2*、*LjSERK3*、*LjSERK6*、*LjSERK7* 功能缺失后,并没有产生共生结瘤表型上的差异,说明这些基因可能不参与根瘤共生过程,也有可能存在基因功能冗余的现象。有研究表明,在其他植物中,2 个或者多个 *SERKs* 基因同时某项生理活动中行使功能,当其中一个基因功能缺失,不影响其相应的表型^[19]。关于豆科植物的 *SERKs* 基因是否也存在类似的情况,在共生信号转导途径中是否存在基因功能冗余,需要分析将百脉根的多个 *SERK* 基因同时敲除后对根瘤共生表型的影响。此外,通过 CRISPR-Cas9 技术的

毛根转化体系获得的突变株虽然可以快速检测突变体的表型,但依然存在嵌合体的情形,一定程度上会干扰表型的观测。若要深入研究 *LjSERKs* 敲除后对根瘤共生表型的影响,还需要通过稳定转化体系,获得基因完全敲除的转基因突变体来分析。

有研究表明,*AtSERK3* 还参与调控植物的免疫防御反应,*LjSERK3* 是否也具有类似功能,二者具有较高的同源性,基因结构组成也极为相似。在豆科植物中,根瘤菌不被当作病原体被免疫,反而与其形成根瘤器官,行使固氮功能,一定程度上可能是植物对根瘤菌的免疫防御被抑制。有报道指出豆科植物免疫防御在根瘤菌入侵百脉根的起始阶段是先上调的,随后又下调^[20-22],推测 *LjSERK3* 可能是豆科植物根瘤共生中的免疫抑制的一个重要因素,其机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] BELKHADIR Y, YANG L, HETZEL J, et al. The growth-defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors[J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39: 447-456.
- [2] SHIUS H, BLEECKER A B. Receptor-like kinase from *Arabidopsis* from a moohyletic gene family related to animal receptor kinases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 10763-10768.
- [3] SCHMIDTE D L, GUZZO F, TOONEEM A, et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos[J]. Development, 1997, 124: 2049-2062.
- [4] HECHT V, VIELLE-CALZADE J P, HARTOG M V, et al. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture[J]. Plant physiology, 2001, 127: 803-816.
- [5] SHIU S H, BLEECKER A B. Expansion of the receptor-like kinase/pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2003, 132: 530-543.
- [6] COLCUMBET J, BOISSON-DERNIER A, ROS-PALAU R, et al. *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinases 1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation[J]. The plant cell, 2005, 12: 3350-3361.
- [7] CATHERINE A, EUGENIA R, VALERIE H, et al. The *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-kinases 1 and 2 control male sporogen[J]. The plant cell, 2005, 12: 3337-3349.
- [8] MENG X Z, CHEN X, MANG H, et al. Differential function of *Arabidopsis* SERK family receptor-like kinases in stomatal patterning[J]. Current biology, 2015, 25: 2361-2372.

- [9] LI J, WEN J Q, LEASE K A, et al. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, 110: 213-222.
- [10] NAM K H, LI J M. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, 110: 203-212.
- [11] WANG Z Y, SETO H, FUJIOKA S, et al. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids[J]. *Nature*, 2001, 410: 380-383.
- [12] RUSSINOVA E, BORST J W, KWAAITAAL M, et al. Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1) [J]. *The plant cell*, 2004, 16: 3216-3229.
- [13] SCHULZE B, MENTZEL T, JEHLE A K, et al. Rapid heterodimerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1[J]. *The journal of biological chemistry*, 2010, 285: 9444-9451.
- [14] YANG D H, HETTENHAUSEN C, BALDWIN I T, et al. The multifaceted function of BAK1/SERK3 plant immunity to pathogens and responses to insect herbivores[J]. *Plant signaling & behavior*, 2011, 6: 1322-1324.
- [15] WANG L X, WANG L L, TAN Q, et al. Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in *Lotus japonicus* using CRISPR-Cas9[J]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 1333-1346.
- [16] LEI Y, LU L, LIU H Y, et al. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plant[J]. *Molecular plant*, 2014, 7: 1494-1496.
- [17] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system [J]. *Nature protocols*, 2014, 9: 2395-2410.
- [18] 谭茜, 王龙祥, 张先鹏, 等. CRISPR/Cas9 在豆科植物毛根转化中的应用及共生基因的编辑[J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(5): 45-51.
- [19] PENG H C, KALOSHIAN I. The tomato leucine-rich repeat receptor-like kinases S1SERK3A and S1SERK3B have overlapping functions in bacterial and nematode innate immunity[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9: 1371-1383.
- [20] KOUCHI H, SHIMOMURA K, HATA S, et al. Large-scale analysis of gene expression profiles during early stage of root nodule formation in a model legume[J]. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on gene and genomes*, 2004, 11: 263-274.
- [21] 李文清, 曹文刚, 李豪, 等. 百脉根 4 个共生基因在水稻中的共表达及其对水稻转录组的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(4): 55-61.
- [22] LOHAR D P, SHAROPOVA N, ENDRE G, et al. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 221-234.

Identifying the function of *LjSERKs* gene family in root nodule symbiosis

WANG Tao FENG Yong ZHANG Zhongming

State Key Laboratory Agricultural Microbiology/College of Life Science & Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Somatic embryogenesis receptor protein kinase gene (*SERKs*) belongs to the family of genes encoding LRR receptor kinase and participates in multiple life activities including plant growth, development and immunity. Eight homologous genes (*LjSERKs*) were identified from *Arabidopsis thaliana* *AtSERKs* gene sequence to explore the function and mechanism of *SERKs* gene family in the process of nodule symbiosis. Using the CRISPR-Cas9 genome editing and hair root transformation technique, the different genes of the *LjSERKs* family were knocked out separately. The effects on the symbiotic nodule phenotype were observed and analyzed. The results showed that the number of nodules was not different significantly from that of the control plants after knocking out *LjSERK2*, *LjSERK3*, *LjSERK6* and *LjSERK7*. The number of nodules was significantly decreased after knocking out *LjSERK8*. It is indicated that *LjSERK8* is involved in the nodule symbiosis process and there may be functional redundancy between other genes in the family.

Keywords *Lotus japonicus*; *SERKs* gene family; CRISPR-Cas9 technology; symbiotic nodules