

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.02.006

引用格式:黄扬洁,滕珂,范希峰,等.青绿苔草*CbSH4*基因克隆及基因编辑靶点筛选[J].草地学报,2026,34(2):437-446
HUANG Yang-jie, TENG Ke, FAN Xi-feng, et al. Molecular Cloning and Gene Editing Targets Screening of *CbSH4* in *Carex breviculmis*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(2):437-446

青绿苔草*CbSH4*基因克隆及基因编辑靶点筛选

黄扬洁¹, 滕珂², 范希峰², 岳跃森², 张辉², 温海峰², 尹淑霞^{1*}, 刘凌云^{2*}

(1. 北京林业大学草业与草原学院, 北京 100083; 2. 北京市农林科学院草业花卉与景观生态研究所, 北京 100097)

摘要:青绿苔草(*Carex breviculmis*)是一种节水抗旱的重要乡土物种,具有绿期长、耐阴、结实率高等优点。但在实际采收过程中,种子极易落粒的问题限制了种子机械化收获和大规模生产应用。为探究*SH4*基因在青绿苔草落粒过程中的功能,进一步利用基因编辑技术创制低落粒新种质,本研究克隆青绿苔草*CbSH4*基因并进行基因编辑靶点筛选。结果表明,*CbSH4*编码319个氨基酸残基,其编码产物是亲水性蛋白,与康藏嵩草(*Carex littledalei*)亲缘关系最近。*CbSH4*含有1个高度保守的Myb4 DNA结合域,属于典型的MYB转录因子。烟草瞬时表达结果显示,*CbSH4*定位于细胞核和细胞质。实时荧光定量结果表明,*CbSH4*在穗中的相对表达量显著高于根和叶,在不同发育时期的离区中均有表达。同时,为了在青绿苔草中实现高效的基因编辑,本研究设计了3个特异性靶点,利用sgRNA体外转录和筛选,获得切割效率58.3%的sgRNA1,可用于后续青绿苔草基因编辑。本研究成功克隆了*CbSH4*并完成初步功能分析,筛选出了高效基因编辑靶点,为创制低落粒的青绿苔草新种质提供了基础。

关键词:青绿苔草; *SH4*基因; 亚细胞定位; 表达分析; 靶点筛选; 落粒性

中图分类号:S688.4; Q943.2

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)02-0437-10

Molecular Cloning and Gene Editing Targets Screening of *CbSH4* in *Carex breviculmis*

HUANG Yang-jie¹, TENG Ke², FAN Xi-feng², YUE Yue-sen², ZHANG Hui², WEN Hai-feng²,
YIN Shu-xia^{1*}, LIU Ling-yun^{2*}

(1. School of Grassland Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Institute of Grassland, Flowers, and Ecology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: *Carex breviculmis* is an important native species that is water-saving and drought resistant, with advantages such as long green period, shade tolerance, and high fruiting rate. However, in the actual harvesting process, the problem of seeds easily falling off limits the mechanization of seed harvesting and large-scale production applications. In order to explore the function of *SH4* gene in the process of seed-shattering in *C. breviculmis* and further use gene editing technology to create new germplasm resistant to seed shattering, the *CbSH4* gene was cloned and the gene editing target was screened. The *CbSH4* encoded 319 amino acid residues, was a hydrophilic protein, and was most closely related to *Carex littledalei*, containing a highly conserved Myb4 DNA-binding domain, which belonged to a typical MYB transcription factor. The transient expression results of *Nicotiana benthamiana* showed that *CbSH4* protein was localized in the nucleus and cytoplasm. The real-time fluorescence quantification results showed that the relative expression level of *CbSH4* in the spike was significantly higher than that in the roots and leaves, and it was expressed in the abscission zone at different developmental stages. At the same time, in order to achieve efficient gene editing in *C. breviculmis*, three specific targets were designed in this study, and sgRNA1 was obtained by sgRNA transcription and

收稿日期:2025-08-12;修回日期:2025-10-20

基金项目:雄安新区科技创新专项(2022XAGG0100);北京市农林科学院科技创新专项(KJCX20250917, KJCX20251208);国家自然科学基金项目(U20A2005, 32573613)资助

作者简介:黄扬洁(2001-),女,汉族,湖南永州人,硕士研究生,主要从事草坪草遗传育种研究, E-mail: Younge0712@163.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail: yinsx369@163.com; liulingyun01@163.com

screening in vitro with a cleavage efficiency of 58.3%, which could be used for subsequent gene editing of *C. breviculmis*. In this study, *CbSH4* was successfully cloned and the preliminary functional analysis was completed, and the high-efficiency gene editing targets were screened, which provided a basis for the creation of new germplasm with low seed shattering.

Key words: *Carex breviculmis*; *SH4* gene; Subcellular localization; Expression analysis; Gene target screening; Seed shattering

青绿苔草(*Carex breviculmis*)为莎草科苔草属多年生草本,具有自繁能力强、耐阴、耐旱、耐瘠薄等优点,可作优良牧草和草坪地被植物^[1-2]。青绿苔草形态低矮、纤细,与各种观赏草、花卉相结合,在干旱贫瘠生境中仍能维持景观效果,已作为特色地被植物应用于城市园林绿化^[2]。此外,青绿苔草具有极强的生态适应性,因其低矮耐践踏、地下根茎发达和覆盖度好的特点,具有开发成草坪的潜力,为国产草坪草种选育提供了重要种质资源。在高海拔地区也可以用作牧草,是一种适口性好、营养丰富的牲畜饲料^[2]。与主要进口冷季型草坪草相比,青绿苔草具有节水优势,人工补充较少灌溉量即可达到最佳生长状态和景观效果,对于缓解城市水资源压力,推动低维护园林建设具有重要意义,市场应用前景广阔^[3]。但是在青绿苔草的实际采收过程中,其种子极易落粒,导致种子产量显著减少,严重制约了种子收获和产业化应用,已成为青绿苔草大面积推广应用的瓶颈。目前,青绿苔草种子落粒性相关研究鲜有报道。因此,明确青绿苔草种子落粒机制,降低青绿苔草种子的落粒性,是推动草种产业化进程中一项亟待解决的问题,具有重要应用意义^[4]。

植物种子落粒指的是种子达到成熟阶段后自然脱离母体的过程^[5]。在作物驯化过程中,减少种子落粒性成为了育种工作的一个关键目标^[6]。在模式植物水稻(*Oryza sativa*)中,*SH4*是首批被鉴定的主要影响落粒性的基因之一。水稻*sh4*基因第1个外显子的237位点发生G/T单碱基替换,致使基因功能和表达改变,阻碍离层完整发育,影响种子落粒性^[7]。研究进一步发现粳稻(*Oryza sativa* subsp. *japonica*)*SH4*基因正调控*SHAT1*基因的表达,两者共同调控离层的形成,并与*qSH1*具有协同作用^[8]。野生稻的*SH4*等位基因通常表现为显性落粒表型,研究揭示该基因的显性功能依赖于两个协同作用的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)位点:G237T和C760T,仅当两个SNP同时存在时,*SH4*蛋白才能维持MYB结构域稳定性及DNA结合活性,进而激活离层发育并诱导落粒^[9]。

对杂草稻(*Oryza sativa* f. *spontanea*)进行*SH4*基因编辑,研究发现其种子落粒性显著降低与脱落酸(ABA)减少、离层变弱紧密相关,且突变体在田间环境中低落粒表型稳定,未干扰其他产量相关性状^[10]。

此外,研究模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)果荚开裂和种子脱落的相关基因,发现*SHP1*和*SHP2*共同控制拟南芥的荚果开裂,并且在果实发育后期进行表达,促进离区的发育^[11]。除了这两种模式植物外,其他植物落粒的分子机制也逐步被探究。例如,小麦(*Triticum aestivum*)落粒相关的重要基因是*Q*,研究发现小麦基因*Q*导致颖片和穗部结构的变化使得小麦更容易脱粒^[12]。大麦(*Hordeum vulgare*)的落粒性依赖穗轴的脆性,野大麦和驯化大麦之间穗轴脆性的差异由*Btr1*和*Btr2*基因控制,驯化过程中基因序列分别发生了1 bp和11 bp缺失,抑制了种子落粒^[13]。从野生高粱(*Sorghum bicolor*)中克隆出的*Sh1*基因,与水稻*OsSh1*和玉米*ZmSh1-1*基因直系同源,*Sh1*位点的突变降低了种子落粒性^[14]。此外,关于草类植物落粒的基因也逐步被挖掘。研究人员在狗尾草(*Setaria viridis*)里鉴定出*SvLES1*基因,该基因在调控离区发育方面发挥着关键作用^[15]。在老芒麦(*Elymus sibiricus*)中,研究者通过筛选确定了与种子落粒紧密相关的*Es-BEL1*基因^[16]。在多年生黑麦草(*Lolium perenne*)中,研究者也成功挖掘出*LpqSH1*基因和*LpSH1*基因,这两个基因同样参与了离区发育的调控过程,影响种子落粒^[17]。目前,针对青绿苔草种子落粒相关基因的研究仍处于空白状态,种子强落粒是亟待攻克的关键问题。

随着基因编辑技术的不断发展,通过精准编辑植物基因组中的特定基因,可以实现对植物性状的定向改良^[18]。在鉴定落粒关键基因的基础上,通过基因编辑创制低落粒性种质在水稻中实现了应用^[19]。利用CRISPR/Cas9技术对水稻*qSH1*基因进行定点编辑,获得的*qsh1*纯合突变系落粒性显著降低,同时编辑*SH4*和*qSH1*基因均能减少杂草稻植物的种子落粒,种子更紧密地附

着在稻穗上,不易脱落,有效实现了降低落粒性的预期目标^[9]。在草类植物中,狗尾草^[15]、多年生黑麦草^[20]、苜蓿^[21]、结缕草^[22]等也进行了优质性状的改良及基因编辑工作,为相关基因功能解析及其分子育种提供了有效策略。但是,青绿苔草落粒基因研究及基因编辑改良的研究目前尚未有相关报道,因此,本研究通过克隆青绿苔草 *CbSH4* 基因,利用生物信息学分析该基因的特征,明确其亚细胞定位和基因表达特征,筛选基因编辑靶点,以期通过基因编辑技术进一步创制低落粒性新种质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所选用的试验材料为‘四季’青绿苔草(国S-SV-CL-006-2010)。将其种植在人工气候箱内,昼夜温度28℃/24℃,相对湿度维持在60%,光周期设置为14 h光照,光照强度约为400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)的种植,先播种于MS培养基上,在7至10天后,对长出的幼苗进行移栽操作。待烟草植株生长至叶片数量为4~5片时,开展后续的相关实验。培养本氏烟的环境条件为,昼夜

温度24℃/22℃,湿度保持在50%~80%。

试验所用菌株包括大肠杆菌‘DH5 α ’克隆菌株、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株‘GV3101’和‘EHA105’。所用载体包括克隆载体pMD-19T(TAKARA,大连)、植物双元表达载体3302Y3^[23]和pHSG298_sgRNA克隆载体(本实验室保存)。实验所用的酶包括限制性内切酶 *Bgl* II、*Nco* I、*Bam*HI、*Sal* I、*Dra* I、*Sap* I、*Bap*Q I、体外转录试剂盒(In vitro Transcription T7 Kit),筛选试剂盒(Guide-it sgRNA Screening Kit)均购于Takara公司。In-Fusion连接酶、反转录试剂盒、纯化试剂盒购于诺唯赞公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 依据实验室前期对青绿苔草全基因组测序的结果,以参考基因组序列为模板设计引物(如表1),其中 *CbSH4*-F/R用于 *CbSH4* 基因克隆,植物双元载体3302Y3用于亚细胞定位观察。以克隆载体pMD19-*CbSH4*为模板,设计Y3-*CbSH4*-F/R引物,构建3302Y3-*CbSH4*的亚细胞定位载体;*UBQ*-qPCR-F/R和 *CbSH4*-qPCR-F/R分别用于内参基因 *UBQ*及目的基因 *CbSH4*的荧光定量PCR检测。

表1 用于基因克隆、表达分析和载体构建的引物

Table 1 Primers used for gene cloning, expression analysis and plasmids construction

引物 Primer	序列 Sequence (5'—3')
<i>CbSH4</i> -F	GTCGCAACTCGCAAAAAATGGAC
<i>CbSH4</i> -R	ACTTGAACAGCACTTGAGAAAATTACT
Y3- <i>CbSH4</i> -F	CCTACTAGTCCTAGGGACGTCAATGGACCCAACACTTCCGTG
Y3- <i>CbSH4</i> -R	TGCTCACCATACGCGTTACAGACATAGGAGAATAAGAGTTAA
<i>UBQ</i> -qPCR-F	CACCTTGTCTCTGCGTCTCCG
<i>UBQ</i> -qPCR-R	GCGACCATCCTCCAACCTGCT
<i>CbSH4</i> -qPCR-F	GATGGGAGACAATGAGGAACAGC
<i>CbSH4</i> -qPCR-R	TCAATGGGACCTATGACAAGCAA

1.2.2 *CbSH4* 基因克隆 选取生长状态良好的青绿苔草叶片,参照诺唯赞RNA提取试剂盒RNA-easy Isolation Reagent(R711-01)方法提取RNA。测定提取的RNA浓度,若RNA的OD_{260/280}值在1.9到2.2之间则可用于后续实验。反转录得到cDNA,以设计好的特异性引物用高保真酶Ex Primer DNA Polymerase(Takara,大连)进行PCR扩增,扩增程序为94℃ 1 min;98℃ 10 s,55℃ 15 s,68℃ 30 s,30个循环;72℃ 5 min。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行纯化。纯化后连接克隆载体pMD-19T,转化到大肠杆菌‘DH5 α ’中,过夜培养

后,挑取菌落进行菌落PCR鉴定,琼脂糖凝胶电泳检测具有阳性条带的菌液送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序鉴定,测序正确的进行保菌,提取质粒。

1.2.3 生物信息学分析 对 *CbSH4*的蛋白序列保守结构域(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>)、一级结构及亲/疏水性(<https://web.expasy.org/protparam/>)、二级结构SOPMA(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)、三级结构(<https://swissmodel.expasy.org/>)、跨膜结构

(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)及信号肽(<https://dtu.biolib.com/SignalP-6>)进行预测分析、Cell-Ploc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-Ploc-2/>)在线预测 *CbSH4* 亚细胞定位情况。应用NCBI网站的CD-Search工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测蛋白结构域。应用NCBI网站的Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)功能,对编码氨基酸序列进行同源比对。利用MEGA 11,选用邻接法构建系统发育树。

1.2.4 青绿苔草 *SH4* 基因表达模式分析 分别提取青绿苔草的根、茎、穗和叶的RNA,反转录获得不同样本的cDNA。用Primer Premier 5.0设计qRT-PCR的引物扩增青绿苔草cDNA(表1),并以青绿苔草 *UBQ* 为内参基因,设计引物进行荧光定量PCR检测,分析 *CbSH4* 在不同组织的定量表达情况。

采用Bio-Rad CFX96孔荧光定量分析仪,以SYBR Green为反应Mix进行实时荧光定量分析。每个样本进行4个生物重复和4个技术重复。以青绿苔草 *UBQ* 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算所选基因的相对表达量^[8]。通过SPSS18.0软件进行单因素方差分析(ANOVA),在 $P<0.05$ 水平进行差异显著性检验,利用GraphPad Prism 9作图。

1.2.5 亚细胞定位 采用瞬时表达烟草的方法进行亚细胞定位。为构建3302Y3-CbSH4的亚细胞定位载体,利用上述构建好的克隆载体为模板,设计引物进行PCR扩增,获得扩增产物。将3302Y3载体酶切及产物纯化,连接转化大肠杆菌,过夜培养挑取单菌落,PCR测序鉴定获得35S::CbSH4:YFP载体的菌液。转化农杆菌EHA105感受态,转化后涂板至含利福平和卡那霉素的LB平板,28℃避光培养,挑取单菌落,PCR验证阳性转化。参照Sparkes等^[24]的方法将构建成功的35S::CbSH4:YFP载体的菌液注射至本生烟草叶片,以空载35S::YFP为对照。将100 μL菌液震荡培养至OD₆₀₀约0.6~0.8,5000 r·min⁻¹离心10 min,去除上清液后,用新鲜培养基重悬菌体,并按1 μL·mL⁻¹的比例加入100 mg·L⁻¹的乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS)震荡培养至OD₆₀₀约0.6,注射本生烟草并且标记。将注射后的烟草植株在黑暗条件下培养2~3 d后,使用激光共聚焦显微镜LeicaSP-8观察YFP的荧光信号在烟草叶片中的分布情况。

1.2.6 sgRNA体外转录和筛选 制备sgRNA:先酶切pHSG298_sgRNA,回收载体片段备用。参考CONCORDET等人^[25]的实验方法,以5'-N(20)-NGG-PAM-3'的结构为原则设计目标靶点,为降低CRISPR/Cas9系统的脱靶效应,选择专业在线预测平台(如<http://www.clontech.com/sgRNA-design-tools>)进行全基因组脱靶位点分析,优化sgRNA设计方案。在*CbSH4*的CDS区域设计3个靶点,设计的正向引物用于体外转录sgRNA模板。该引物包含T7启动子序列、sgRNA目标序列和Guide-it支架模板特异性序列。合成引物*CbSH4* Target1-F/R, *CbSH4* Target2-F/R, *CbSH4* Target3-F/R(如表2),制备含sgRNA的片段,反应体系如下:PrimeSTAR Max Premix (2×) 25 μL, *CbSH4* Target-F/R 各1 μL, dNTP 4 μL, DNA polymerase 0.5 μL, ddH₂O 18.5 μL;PCR扩增程序为98℃ 10 s, 68℃ 30 s,共8个循环。将纯化后的产物连接到上述回收的载体上,转化大肠杆菌,菌落PCR送测阳性转化的菌液,测序对比成功,保存菌液,得到克隆质粒。

体外转录:得到上述克隆质粒之后,进行*Sap* I酶切线性化,纯化线性载体,在无RNA酶的环境下,按照试剂盒In vitro Transcription T7 Kit(for siRNA Synthesis)(Takara Code:6140)进行体外转录,转录RNA精制用苯酚/氯仿抽提、异丙醇沉淀。

sgRNA体外筛选:首先进行目的DNA的PCR扩增,设计引物扩增CRISPR/Cas9靶向区域,反应体系如下:2×Terra PCR Direct Buffer 25 μL, Gene SH4-F/R 各1 μL, Terra PCR Direct Polymerase Mix 1 μL, ddH₂O 19 μL, DNA模板2 μL;扩增程序为94℃ 2 min; 98℃ 10 s, 60℃ 15 s, 68℃ 30 s, 30个循环; 72℃ 5 min。得到最佳扩增子长度为600~800 bp,切割后片段大小差异大于100 bp。利用CTAB法提取青绿苔草DNA,并以gDNA为模板,设计3个切割靶点的引物,分别为Gene SH4-1-F/R, Gene SH4-2-F/R和Gene SH4-3-F/R。利用筛选试剂盒(Guide-it sgRNA Screening Kit)进行Cas9裂解实验,sgRNA 1 μL与重组Cas9核酸酶0.5 μL,反应程序37℃, 5 min,反应结束直接加入15× Cas 9 Reaction Buffer 1 μL, 15× BSA 1 μL, ddH₂O 6.5 μL,反应体系37℃ 1 h, 80℃ 5 min。最后通过1%琼脂糖凝胶电泳分析检测不同sgRNAs裂解的有效性。凝胶成像仪配备有分析软件,通过软件分析,可以得

到各条带的光密度值(OD 值)或累积光密度值 (IOD 值),并计算裂解效率的相对值。裂解效率= (裂解片段条带的 IOD 值/(完整蛋白条带的 IOD 值+裂解片段条带的 IOD 值)× 100%。

表 2 sgRNA 体外转录和筛选试验所用引物

Table 2 Primers used for sgRNA in vitro transcription and screening

引物 Primer	序列 Sequence (5'—3')
<i>CbSH4</i> Target 1-F	GCATGCCTGCAGGTCGACCTCTAATACGACTCACTATAGGTCCGATAACTGCGCTCAGAT
<i>CbSH4</i> Target 1-R	AACGGACTAGCCTTATTTAAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTTAAACATCTGAGCGCAGTTATCGGACC
<i>CbSH4</i> Target 2-F	GCATGCCTGCAGGTCGACCTCTAATACGACTCACTATAGGAGGTTGGATCCAGATAGG
<i>CbSH4</i> Target 2-R	AACGGACTAGCCTTATTTAAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTTAAACCCTATCTGGATCCAACCTCC
<i>CbSH4</i> Target 3-F	GCATGCCTGCAGGTCGACCTCTAATACGACTCACTATAGGAAGCGTTGCAATCAAACG
<i>CbSH4</i> Target 3-R	AACGGACTAGCCTTATTTAAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTTAAACCGTTTGATTGCAACGCTTCC
Gene <i>SH4</i> -1-F	GCAACTCGCAAAAAATGGACCCA
Gene <i>SH4</i> -1-R	CTCAGCTGGAATTGCCAGTACAG
Gene <i>SH4</i> -2-F	GAACTCTGGTCCAAGTCCCTCTC
Gene <i>SH4</i> -2-R	CTTTGCACAAGGCCTCCTAAAGA
Gene <i>SH4</i> -3-F	GGTTCAGGTTTCGGTTTCTTAT
Gene <i>SH4</i> -3-R	ACCTACTAAGATACCTAAATATCCA

2 结果与分析

2.1 *CbSH4* 基因克隆

提取青绿苔草叶片 RNA,反转录得到 cDNA(图 1),用内参基因 *UBQ* 验证 cDNA 的质量和可信度之后,以青绿苔草 cDNA 为模板,使用 *CbSH4*-F/R 进行 PCR 扩增。经 1% 的琼脂糖凝胶电泳显示,获得了单一且清晰的 PCR 扩增产物条带,长度为 1010 bp,与目标片段大小相符(图 2)。将 PCR 产物送至北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序,测序结果表明所获得的碱基序列与青绿苔草的 *CbSH4* 序列完全一致,证实成功克隆到青绿苔草的 *CbSH4* 基因。

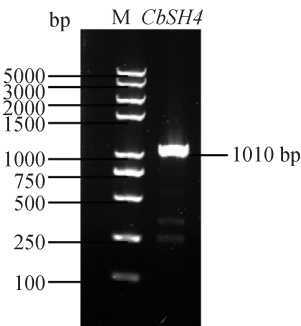


图 1 *CbSH4* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *CbSH4* gene

注:M 为分子量标记, *CbSH4* 代表青绿苔草 *SH4* 全长克隆产物
Note: M, marker. *CbSH4*, full-length cloning PCR products of *SH4* from *C. breviculmis*

2.2 生物信息学分析

克隆所获 *CbSH4* 基因编码区全长 960 bp,共编码 319 个氨基酸,理论等电点为 4.83,分子量为

34.559 kDa。不稳定系数为 44.07,亲水性系数为 -0.291,该蛋白为亲水性蛋白。TMHMM-2.0 预测 *CbSH4* 没有跨膜结构域,经 Signal P 预测 *CbSH4* 是信号肽的可能性为 0.0033,无信号肽区域及剪切位点,推测其不属于膜蛋白或分泌蛋白。*SH4* 蛋白的二级结构由 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链组成(图 2A),这些特征占比分别为 50.78%,47.34%,1.88%。随后运用 SWISS 在线软件预测 *SH4* 蛋白三级结构,发现其特征与二级结构一致,均以 α -螺旋和无规则卷曲为主要结构(图 2B)。Cell-Ploc 在线预测 *CbSH4* 亚细胞定位在细胞质和细胞核。保守结构预测分析显示 *CbSH4* 属于 Myb_DNA-bind4 超家族(图 2C)。利用 NCBI 网站 Blastp 功能对 *CbSH4* 编码蛋白序列进行比对,选取同源性较高的序列,系统进化分析显示青绿苔草 *CbSH4* 与康藏嵩草 (*Carex littledalei*) 的亲缘关系最近(图 3)。

2.3 亚细胞定位

通过在烟草叶肉细胞中瞬时表达 35S:: *CbSH4*:YFP 融合蛋白,使用激光共聚焦显微镜分析发现,表达融合蛋白的烟草叶肉细胞,在细胞核和细胞质部位观察到了 YFP 信号。在对照中仅表达 YFP 蛋白质,在整个细胞中均能观察到明显的荧光(图 4)。该结果表明, *CbSH4* 蛋白定位在细胞核和细胞质中。

2.4 *CbSH4* 基因的时空表达分析

为了分析 *CbSH4* 基因在青绿苔草不同组织器官的

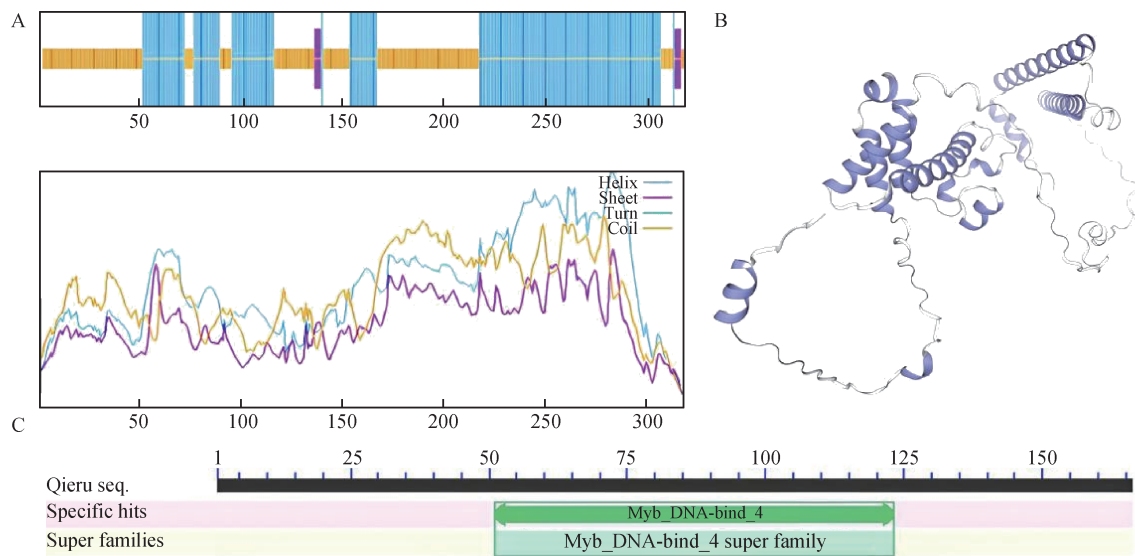


图2 青绿苔草 *CbSH4* 生物信息学分析

Fig. 2 Bioinformatics analysis of *CbSH4* gene

注: A 为二级结构预测, B 为三级结构预测, C 为保守结构域预测

Note: A represents predicted secondary structures of *CbSH4*. B represents predicted tertiary structure of *CbSH4*. C represents conserved domain prediction of *CbSH4*

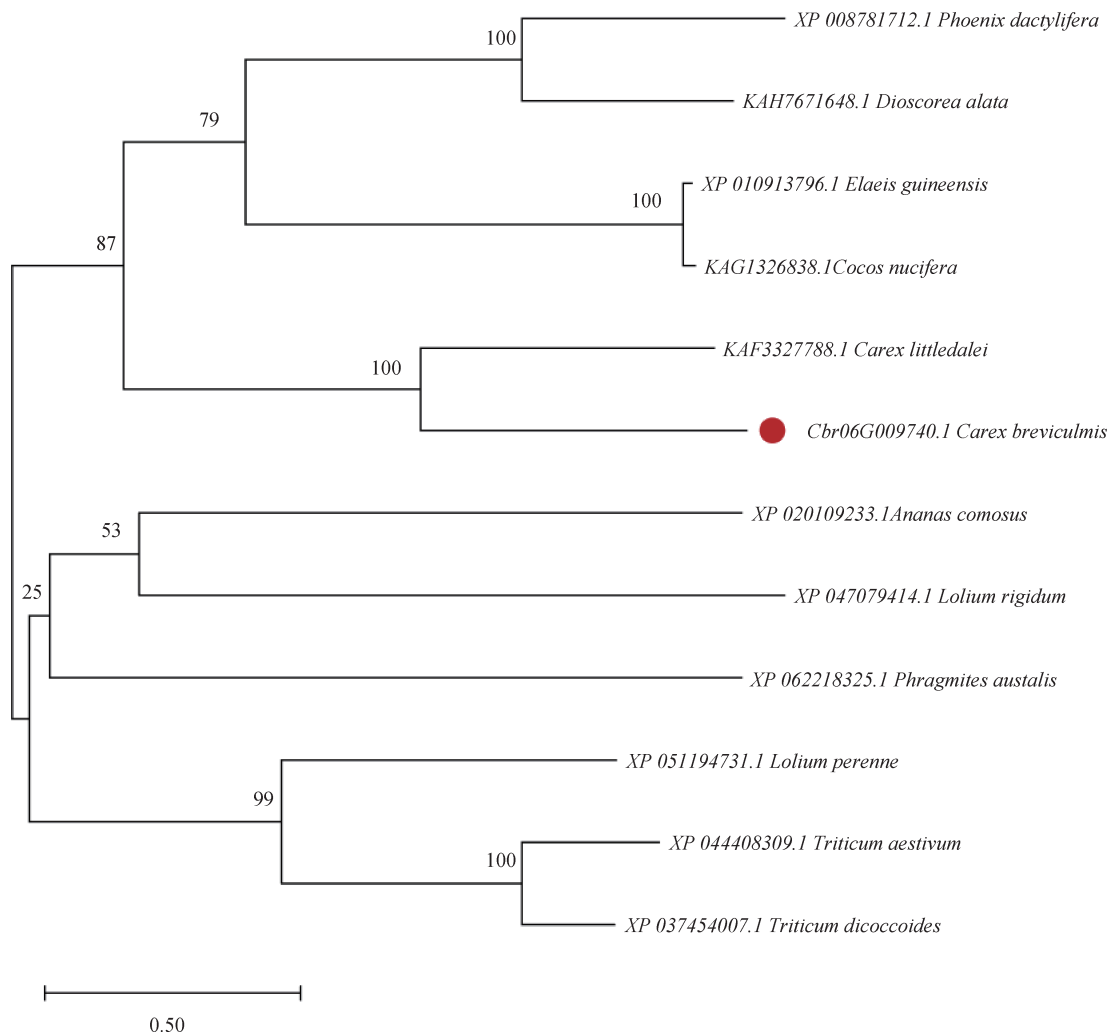


图3 基于邻接法构建 *CbSH4* 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Construction of phylogenetic tree based on Neighbor-Joining method

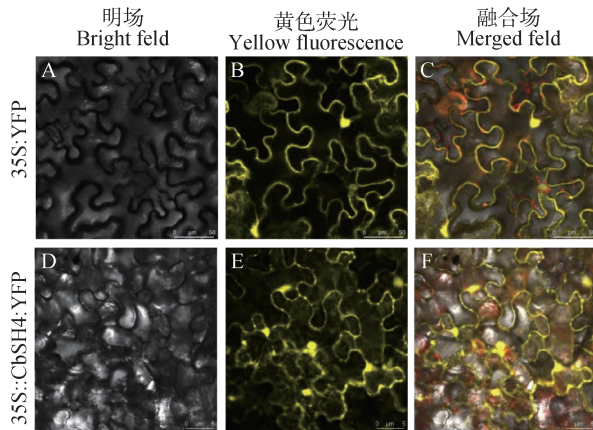


图4 CbSH4蛋白的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of CbSH4 protein

注:A表示35S::YFP空载体明场,B表示35S::YFP黄色荧光,C表示35S::YFP融合场,D表示35S::CbSH4::YFP明场,E表示35S::CbSH4::YFP荧光场,F表示35S::CbSH4::YFP融合场

Note: A represents the bright field of 35S::YFP, B represents the yellow fluorescence field of 35S::YFP, C represents the merged field of 35S::YFP, D represents the bright field of 35S::CbSH4::YFP, E represents the yellow fluorescence field of 35S::CbSH4::YFP, F represents the merged field of 35S::CbSH4::YFP

表达情况,分别取样青绿苔草根、茎、叶以及穗子,利用荧光定量PCR技术对目标基因表达情况进行检测,结果表明*CbSH4*基因在青绿苔草多个组织中均有表达,但不同部位表达量有所差异,*CbSH4*在穗中的相对表达量显著高于根和叶($P < 0.05$,图5A)。为了进一步验证*CbSH4*在离区组织部位的表达量,在青绿苔草返青时期,我们集中收集青绿苔草抽穗、开花、灌浆、乳熟、蜡熟的不同发育时期的离区部位(种子与花梗的连接处)。结果发现,青绿苔草*CbSH4*基因在不同发育时期的离区中均有表达,其表达量在不同时期之间无显著差异(图5B)。

2.5 sgRNA体外转录和筛选

以青绿苔草*CbSH4*为靶序列,设计合成了3个间隔不同的sgRNAs,电泳回收112 bp待用(图6)。设计引物 Gene *SH4*-1-F/R, Gene *SH4*-2-F/R, Gene *SH4*-3-F/R(如表2)扩增CRISPR/Cas9靶向区域,得到扩增子长度为600~800 bp。实验设计三个靶向分别为*SH4*-1,*SH4*-2和*SH4*-3,进行目的DNA的PCR扩增之后,获得清晰准确的条带(图7)。

得到的克隆质粒通过*BapQ*I酶切线性化,体外转录得到T7转录产物,约112 bp。进行体外裂解反应,

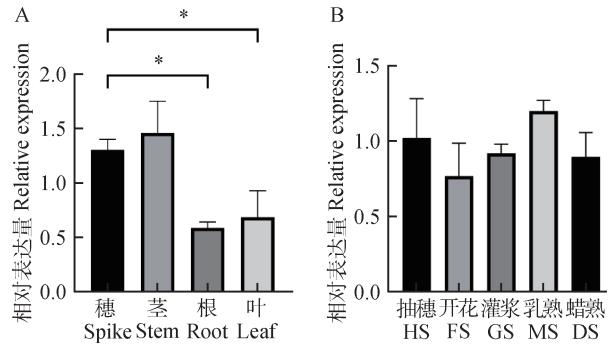
图5 *CbSH4*基因的时空表达分析

Fig. 5 Spatio-temporal expression analysis of *CbSH4*

注:A代表*CbSH4*基因在青绿苔草不同组织部位表达特异性分析,*表示在 $P < 0.05$ 水平具有显著性差异;B代表*CbSH4*基因在青绿苔草不同发育时期的离区表达。柱状图表示相对表达量的平均值±标准偏差

Note: A represents relative expression analysis of *CbSH4* in different tissue from *C. breviculmis*, * indicates significant differences at $P < 0.05$; B represents relative expression of *CbSH4* at different developmental stages in abscission zone. Bar graphs represent the mean±standard deviation of relative expression levels

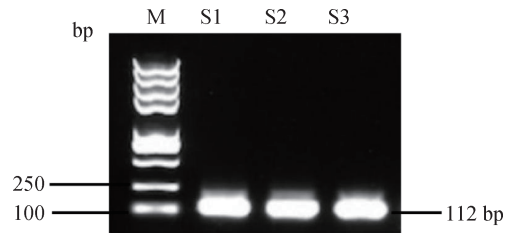


图6 sgRNA模板的PCR扩增

Fig. 6 PCR amplification of sgRNA template

注:M为分子量标记,S1,S2和S3分别代表三个靶点sgRNA1、sgRNA2和sgRNA3的PCR扩增产物

Note: M, marker. S1, S2 and S3 represent the PCR amplification products of the three targets sgRNA1, sgRNA2 and sgRNA3, respectively

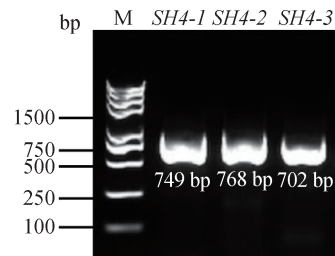


图7 目标DNA的PCR扩增

Fig. 7 PCR amplification of target DNA

注:M为分子量标记,*SH4*-1,*SH4*-2和*SH4*-3分别代表目标DNA的PCR扩增产物

Note: M, marker. *SH4*-1, *SH4*-2 and *SH4*-3 separately represent the PCR amplification of target DNA

琼脂糖凝胶的电泳结果分析表明,相较于sgRNA2和sgRNA3,sgRNA1引导CRISPR/Cas9介导的靶标裂解效率最高。凝胶成像软件分析表明sgRNA1切割效率为58.3%(图8)。因此,筛选出的sgRNA1可用于构建青绿苔草基因编辑载体。

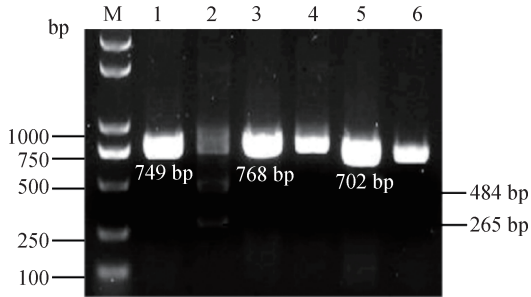


图8 CRISPR/Cas9的裂解实验

Fig. 8 CRISPR/Cas9 cleavage assay

注:M为分子量标记,泳道1,3,5分别代表未处理的靶标片段,第2,4,6泳道显示处理后的靶标片段。琼脂糖凝胶的密度分析表明,该sgRNA1指导的Cas9介导的靶标切割效率为58.3%(第2泳道),裂解片段为484 bp和265 bp

Note: M, marker. Lane 1, 3, 5 represent the untreated target fragment, and Lane 2, 4, 6 represent the treated target fragment. Densitometer analysis of the agarose gel indicates that sgRNA1 directs Cas9-mediated cleavage of the target with 58.3% efficiency (Lane 2). The cleaved fragments are 484 bp and 265 bp

3 讨论

3.1 *CbSH4*基因的表达特征

目前关于*SH4*基因落粒性相关研究主要集中在水稻中,在青绿苔草上的研究鲜有报道。本研究以青绿苔草cDNA为模板,克隆得到了*CbSH4*基因。蛋白保守结构域分析表明,*CbSH4*属于MYB转录因子家族,拥有典型的DNA结合域(DNA-binding domain),可通过识别靶基因启动子顺式元件或与其他蛋白互作,调控下游转录过程^[26]。相关研究在番茄、草莓等作物中证实,MYB转录因子可调控果实软化及细胞壁降解,与脱落过程密切相关^[27-28]。

通常情况下,转录因子的亚细胞定位于细胞核,但也有部分转录因子能够在细胞膜或细胞壁处发挥功能。有研究指出某些转录因子会暂存于细胞膜中,只有在接收特定信号并历经修饰后,才会从细胞膜中释放出来^[29]。在本研究中所克隆的青绿苔草*CbSH4*,不仅具有细胞核定位信号,还具有细胞质定位信号,这暗示其或许参与了其他生理响应的调控过程。在水稻中,研究人员发现水稻*SH4*

基因编码一个MYB家族转录因子,该蛋白定位在细胞核上^[30]。高粱(*Sorghum bicolor*)三螺旋*SbTH*基因家族之一的*SH4*基因成员定位于细胞核,与青绿苔草*CbSH4*亚细胞定位在细胞核一致^[31]。尽管转录因子以核定位为主,但近年研究发现部分成员也定位于细胞质。拟南芥*bHLH039*的亚细胞定位受FIT蛋白互作调控,FIT结合*bHLH039*触发其核质穿梭,导致核内荧光信号显著减弱并伴随细胞质定位比例增加,该动态定位机制精准调控铁吸收相关基因的转录活性,从而避免铁离子过度积累引发毒性^[32]。水稻MYB转录因子*ARE4*在细胞质中与葡萄糖传感蛋白OsHXK7结合,当细胞感受到葡萄糖信号变化时,复合物解离并释放*ARE4*转移到细胞核发挥作用,避免转录因子在核内持续激活靶基因,减少非特异性表达,使细胞对环境信号能做出精准且及时的反应^[33]。青绿苔草*SH4*基因细胞质定位信号,也可能存在类似受特定信号激活后进入细胞核调控基因表达的机制,从而精细调控青绿苔草落粒相关基因在合适的时间和空间表达。

不同组织部位表达模式分析表明*CbSH4*基因在青绿苔草根、茎、叶和穗中多组织表达,这种多重组织特异性表达模式表明*CbSH4*基因除了调控种子落粒性,还可能在青绿苔草的生长和发育中发挥多种作用。在其他作物中,通过qRT-PCR发现高粱*SH4*基因成员在根、茎、叶、果皮、雄蕊和雌蕊中均有多组织表达,根中相对表达量较低,与本研究结果类似^[29]。研究发现水稻*SH4*基因的启动子*pSH4*驱动*SH4*基因在不同水稻组织中的表达,对转基因植物GUS活性的组织化学位置和荧光分析表明,*pSH4*在成熟花序中表达量最高,在茎、发芽种子的胚芽鞘和成熟种子盾片中有多种组织特异性表达^[34]。值得注意的是,种子-花梗交界处区域包括离区,研究揭示了离区作为核心调控位点的分子特征,基因表达模式具有离区特异性,水稻*SH4*基因在离区中高表达并受激素诱导,通过调控离区发育或信号响应抑制脱落^[35]。

3.2 *CbSH4*基因的编辑靶点筛选

CRISPR/Cas9作为一项具有突破性意义的基因组编辑技术,能够实现对DNA的位点特异性切割,可作用于各类生物体基因组中的特定靶点^[36]。特异性的sgRNA是有效利用CRISPR-Cas9系统的重要组成部分,尽管很多研究优化了Cas9,但其他主要问题是靶向效率和脱靶活性,这些活动主要取决于靶向特

异性 sgRNA 的序列^[37]。不同 sgRNA 引导的编辑效率有明显差别,筛选高效率的靶点对于提高基因编辑效率具有重要意义^[38]。在体外筛选 sgRNA 之后,构建基因编辑载体进行遗传转化,可有效提高基因编辑育种工作效率^[39]。针对小麦 *TaMLO* 基因家族的3个同源基因设计 sgRNA,体外转录并筛选编辑效率不同的靶点,编辑效率最高可达41.7%,筛选 sgRNA 后成功在小麦中实现了对 *TaMLO* 基因的靶向编辑,获得抗白粉病的编辑植株并在 T₁代稳定遗传^[39]。对于实际稳定遗传转化耗时长的青绿苔草,sgRNA 的筛选尤为重要,前期设计多个 sgRNAs,在不同区域进行筛选和验证后,可实现更高的基因敲除效率,节约成本。本研究设计了 *CbSH4* 的3个特异性靶点,筛选出了高效率靶点 sgRNA1,其切割效率为58.3%,用于构建青绿苔草基因编辑载体。

CRISPR/Cas9 系统在不同物种中的基因编辑效率存在差异,研究人员利用多顺反子 tRNA-sgRNA 盒(PTG)进行基因组编辑,能成功诱导猕猴桃植株出现白化表型,值得注意的是,PTG/Cas9 系统的突变频率是 CRISPR/Cas9 系统的10倍^[40]。该策略与本实验一样,仅需合成两个含 gRNA 的引物,可以大大降低成本。在多年生黑麦草原生质体中也验证了 PTG/Cas9 基因编辑系统^[41]。由此,在后续的研究中,尝试多重靶点编辑青绿苔草的落粒相关基因,将 sgRNA 的筛选和 PTG/Cas9 系统结合起来,提高 CRISPR 在青绿苔草中的编辑效率。获得基因编辑植株,观察其与野生型落粒性状差异,并构建过表达载体探究其反向作用,结合蛋白组学分析作用靶点。基于对 *CbSH4* 基因功能的深入理解,结合其他已知与落粒相关基因进行多基因协同编辑,优化基因编辑体系,提高编辑效率和准确性。探索不同基因组合对低落粒性的协同调控效果,创制落粒性更低且综合性状优良的青绿苔草新种质。

4 结论

研究成功克隆了青绿苔草 *CbSH4* 基因,系统进化分析发现 *CbSH4* 与康藏嵩草(*C. littledalei*)亲缘关系最近。*CbSH4* 在穗中的相对表达量显著高于根和叶,在不同发育时期的离区中均有表达,亚细胞定位预测显示该蛋白位于细胞核和细胞质。本研究首次利用 sgRNA 体外转录和筛选出高效率编辑靶点 sgRNA1,切割效率58.3%,为青绿苔草落粒性研究和遗传改良提供了基础。

参考文献

- [1] LIU L Y, FAN X F, TAN P H, et al. The development of SSR markers based on RNA-sequencing and its validation between and within *Carex* L. species[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 1-15
- [2] 刘凌云, 范希峰, 滕珂, 等. 苔草属植物遗传多样性研究进展[J]. 草地学报, 2021, 29(6): 1148-1157
- [3] 袁小环, 武菊英, 滕文军, 等. 青绿苔草蒸散特性及与其他草坪地被的比较研究[J]. 草地学报, 2018, 26(1): 40-44
- [4] YUAN X H, WU J Y, TENG W J, et al. Evapotranspiration characteristics of *Carex leucochlora* and comparison with other turfs and groundcovers[J]. Acta Agrestia Sinica, 2018, 26(1): 40-44
- [5] TENG K, TENG W, WEN H, et al. PacBio single-molecule long-read sequencing shed new light on the complexity of the *Carex breviculmis* transcriptome[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 1-15
- [6] THURBER C, REAGON M, Gross B, et al. Molecular evolution of shattering loci in U. S. weedy rice[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(16): 3271-3284
- [7] WU W, LIU X, WANG M, et al. A single-nucleotide polymorphism causes smaller grain size and loss of seed shattering during African rice domestication[J]. Nature Plants, 2017, 3(6): 1-7
- [8] LI C, ZHOU A, SANG T, et al. Rice domestication by reducing shattering[J]. Science, 2006, 311(5769): 1936-1939
- [9] ZHOU Y, LU D, LI C, et al. Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor *SHATTERING ABORTION1*[J]. The Plant Cell, 2012, 24(3): 1034-1048
- [10] ZHANG Y, ZHOU J, YANG Y, et al. Two SNP mutations turned off seed shattering in rice[J]. Plants, 2019, 8(11): 475
- [11] ZHANG Y, XIA Q, JIANG X, et al. Reducing seed shattering in weedy rice by editing *SH4* and *qSH1* genes: Implications in Environmental Biosafety and Weed Control through Transgene Mitigation[J]. Biology, 2022, 11(12): 1823
- [12] LILJEGREN S, ROEDE A, KEMPIN S, et al. Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by INDEHISCENT[J]. Cell, 2004, 116(6): 843-853
- [13] MAGSEN C, BRINCH PEGERSEN H. A novel wheat q' allele identified by forward genetic in silico TILLING[J]. Journal of Plant Physiology, 2020, 251: 153221
- [14] POURKHEIRANDISH M, HENSEL G, KILIAN B, et al. Evolution of the grain dispersal system in Barley[J]. Cell, 2015, 162(3): 527-539
- [15] LIN Z, LI X, SHANNON L M, et al. Parallel domestication of the *Shattering 1* genes in cereals[J]. Nature Genetics, 2012, 44(6): 720-724
- [16] MAMIDI S, HEALEY A, HUANG P, et al. A genome

- resource for green millet *Setaria viridis* enables discovery of agronomically valuable loci[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(10):1203-1210
- [16] ZHAO Y, ZHANG J, ZHANG Z, et al. *Elymus nutans* genes for seed shattering and candidate gene-derived EST-SSR markers for germplasm evaluation[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19:1-15
- [17] FU Z, SONG J, ZHAO J, et al. Identification and expression of genes associated with the abscission layer controlling seed shattering in *Lolium perenne* [J]. *AOB Plants*, 2019, 11(1):ply076
- [18] CHEN K, WANG Y, ZHANG R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70(1):667-697
- [19] SHENG X, SUN Z, WANG X, et al. Improvement of the rice "Easy-to-Shatter" trait via CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *qSH1* gene[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11:619
- [20] GROGG D, ROHNER M, YATES S, et al. Callus induction from diverse explants and genotypes enables robust transformation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Plants*, 2022, 11(15):2054
- [21] ZHAO H, ZHAO S, CAO Y, et al. Development of a single transcript CRISPR/Cas9 toolkit for efficient genome editing in autotetraploid alfalfa[J]. *Crop Journal*, 2024, 12(3):788-795
- [22] NG H, GONDO T, TANAKAH, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *NYC1* gene enhances chlorophyll retention and reduces tillering in *Zoysia matrella* (L.) Merrill[J]. *Plant Cell Reports*, 2024, 43(2):50
- [23] JIA N, LIU X, GAO H A. DNA2 homolog is required for DNA damage repair, cell cycle regulation, and meristem maintenance in plants[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(1):318-333
- [24] SPARKES I, RUNIONS J, KEARNSA, et al. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(4):2019-2025
- [25] CONCORDET J P, HAEUSSLER M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46 (W1) : W242-W245
- [26] LUAN X, XU W, ZHANG J, et al. Genome-Scale Identification, Classification, and Expression Profiling of MYB Transcription Factor Genes in *Cinnamomum camphora* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22) :14279
- [27] LOCKHART J. Ripe for the picking: finding the gene behind variation in strawberry fruit color[J]. *Plant Cell*. 2020, 32(12):3650-3651
- [28] DONG X, LIU X, CHENG, L, et al. SIBEL11 regulates flavonoid biosynthesis, thus fine-tuning auxin efflux to prevent premature fruit drop in tomato[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(4):749-770
- [29] SEO P. Recent advances in plant membrane-bound transcription factor research: Emphasis on intracellular movement[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(4):334-342
- [30] LI J, HAN G, SUN C, et al. Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2019, 14(8):1613131
- [31] LI K, DUAN L, ZHANG Y, et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of trihelix transcription factor family genes in response to abiotic stress in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1):1-17
- [32] TROFIMOV K, IVANOV R, EUTEBACH M, et al. Mobility and localization of the iron deficiency-induced transcription factor bHLH039 change in the presence of FIT [J]. *Plant Direct*, 2019, 3(12):e00190
- [33] MA X, NIAN J, YU H, et al. Linking glucose signaling to nitrogen utilization by the OsHXK7-ARE4 complex in rice[J]. *Developmental Cell*, 2023, 58(16):1489-1501
- [34] YAN H, MA L, WANG Z, et al. Multiple tissue-specific expression of rice seed-shattering gene *SH4* regulated by its promoter *pSH4*[J]. *Rice*, 2015, 8:1-10
- [35] WU G, LI Q, TAN Y, et al. Advances in understanding the mechanisms of organ abscission in vivo and in vitro plants[J]. *Plant Growth Regulation*, 2024, 103(2):293-306
- [36] CONG L, RAN F, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823
- [37] UNIYAL A, MANSOTRA K, YADAV S, et al. An overview of designing and selection of sgRNAs for precise genome editing by the CRISPR-Cas9 system in plants[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(6):223
- [38] DOENCH J, FUSI N, SULLENDER M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(2):184-191
- [39] LIANG Z, CHEN K, LI T, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):14261
- [40] WANG Z, WANG S, LI D, et al. Optimized paired-sgRNA/Cas9 cloning and expression cassette triggers high-efficiency multiplex genome editing in kiwifruit[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(8):1424-1433
- [41] 姚佳明, 郝欢欢, 张敬, 等. tRNA-sgRNA/Cas9 系统介导多年生黑麦草原生质体的基因编辑[J]. *草业学报*, 2023, 32(4):129-141
- YAO J M, HAO H H, ZHANG J, et al. The use of the tRNA-sgRNA/Cas9 system for gene editing in perennial ryegrass protoplasts[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2023, 32(4):129-141

(责任编辑 付 宸)