

YẾU TỐ PHIÊN MÃ G_mERFA TƯƠNG TÁC VỚI G_mNFYA VÀ HOẠT ĐỘNG NHƯ MỘT CHẤT ĐIỀU HÒA ÂM TÍNH ĐỐI VỚI SỰ TÍCH LŨY AXIT BÉO TRONG HẠT ĐẬU TƯƠNG

Yue Liu^{1,2}, Yang Hu³, Jun-Jie Wei^{1,2}, Zhi-Hao Jiang^{1,2}, Jia-Qi Han¹, Meng Jin¹, Lu-Yao Zhang^{1,2}, Ling-Yi Zheng^{1,2}, Wei Li⁴, Ying-Dong Bi⁴, Yong-Cai Lai⁴, Bin Zhou⁵, De-Yue Yu⁶, Feng-Xia Zhang¹, Guo-Dong Wang^{1,2}, Cui-Cui Yin¹, Jian-Jun Tao¹, Shou-Yi Chen¹, Wan-Ke Zhang¹, Wei Wei¹, Jin-Song Zhang^{1,2}

Võ Như Cẩm biên dịch.

1. Phòng thí nghiệm trọng điểm quốc gia về cải tiến hạt giống, Viện Di truyền và Sinh học phát triển, Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, Bắc Kinh, Trung Quốc.
2. Trường Cao đẳng Khoa học Nông nghiệp Tiên tiến, Đại học Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, Bắc Kinh, Trung Quốc.
3. Viện Y học Hàng Châu, Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, Hàng Châu, Trung Quốc.
4. Viện Canh tác và Trồng trọt, Học viện Khoa học Nông nghiệp Hắc Long Giang, Cáp Nhĩ Tân, Trung Quốc.
5. Viện Nghiên cứu Cây trồng thuộc Học viện Khoa học Nông nghiệp An Huy, Hợp Phì, Trung Quốc.
6. Trung tâm Cải tiến Đậu tương Quốc gia, Phòng thí nghiệm trọng điểm quốc gia về Di truyền và Nâng cao Nguồn gen Cây trồng, Trung tâm Đổi mới Hợp tác Giang Tô về Sản xuất Cây trồng Hiện đại, Đại học Nông nghiệp Nam Kinh, Nam Kinh, Trung Quốc.

TÓM TẮT

Đậu tương là một trong những cây trồng lấy hạt có dầu quan trọng nhất, và hàm lượng dầu trong hạt quyết định trực tiếp giá trị kinh tế và khả năng ứng dụng công nghiệp trên toàn thế giới. Tuy nhiên, cơ chế điều hòa sự tích lũy dầu trong hạt đậu tương vẫn chưa được hiểu rõ. Ở đây, thông qua phân tích RNA-seq và sàng lọc các protein tương tác với yếu tố điều hòa tích cực quá trình tích lũy dầu *GmNFYA*, chúng tôi đã xác định được yếu tố phiên mã loại AP2/ERF *GmERFA*, hoạt động như một yếu tố điều hòa tiêu cực quá trình tích lũy dầu. Việc loại bỏ *GmERFA* và chất tương đồng của nó bằng phương pháp chỉnh sửa gen đã làm tăng tổng hàm lượng axit béo trong hạt, trong khi việc biểu hiện quá mức *GmERFA* dẫn đến giảm mức axit béo trong đậu tương chuyển gen. *GmERFA* tương tác với *GmNFYA* để ức chế sự hoạt hóa phiên mã của *GmbZIP123* và *GmZF392*, cả hai đều thúc đẩy sự tích lũy dầu trong hạt. *GmERFA* cũng liên kết trực tiếp với vùng promoter của *GmbZIP123* và *GmZF392*, và ức chế sự biểu hiện gen của chúng. Thông qua phân tích sâu hơn 300 mẫu đậu tương, một alen ưu tú của *ERFA* với promoter Hap3 được xác định có mối tương quan với hoạt động promoter thấp hơn, biểu hiện gen thấp hơn nhưng hàm lượng dầu trong hạt cao hơn. Hap3 *ERFA* có thể được chọn

lọc và cô định trong quá trình thuần hóa đậu tương. Nhìn chung, nghiên cứu của chúng tôi phát hiện ra một gen kìm hãm sự tích lũy dầu và có thể hoạt động trong một mạng lưới phân tử mới *GmERFA-GmNFYA-GmbZIP123/GmZF392* ở giai đoạn sau của quá trình phát triển hạt đậu tương. Việc thao tác gen, alen ưu tú của nó và toàn bộ con đường sinh tổng hợp sẽ có lợi cho việc lai tạo các giống đậu tương có hàm lượng dầu cao.

1. GIỚI THIỆU

Đậu tương (*Glycine max*) là loại cây trồng có giá trị, giàu dầu và protein trên toàn thế giới, đóng góp đáng kể vào sức khỏe và dinh dưỡng tổng thể của chế độ ăn uống của con người và thức ăn chăn nuôi (Wang và cs, 2020). Dầu đậu tương chiếm hơn một nửa sản lượng hạt có dầu toàn cầu và là nguồn cung cấp quan trọng cả dầu ăn và nguyên liệu thô công nghiệp, mang lại giá trị kinh tế đáng kể (Duan và cs, 2023). Dữ liệu thống kê cho thấy dầu đậu tương đã liên tục tăng tỷ trọng trong sản lượng hạt có dầu toàn cầu trong thập kỷ qua, đạt mức thống trị 60,72% vào năm 2023/2024 (www.statista.com). Những dữ liệu này cho thấy dầu đậu tương đóng vai trò then chốt trong việc đáp ứng nhu cầu lipid toàn cầu trong cả lĩnh vực thực phẩm và phi thực phẩm.

Axit béo (FAs) trong đậu tương thường được lưu trữ dưới dạng triacylglycerol (TAGs) chứa các axit béo bão hòa (axit palmitic [16:0], axit stearic [18:0]) và các axit béo không bão hòa (axit oleic [18:1], axit linoleic [18:2] và axit linolenic [18:3]) trong hạt (Lee và cs, 2007). Ở thực vật, acetyl-CoA là chất nền ban đầu cho quá trình tổng hợp tất cả các axit béo. Trong lục lạp, acetyl-CoA được tạo ra từ pyruvate sinh ra trong quá trình đường phân. Là tiền chất trung tâm cho quá trình tổng hợp axit béo de novo, acetyl-CoA được carboxyl hóa bởi acetyl-CoA carboxylase để tạo thành malonyl-CoA. Tiếp theo, hệ thống enzyme tổng hợp axit béo xúc tác tuần tự một loạt các phản ứng bao gồm ngưng tụ, khử, khử nước và khử, cuối cùng kéo dài chuỗi carbon và tạo ra axit palmitic (C16:0) và axit stearic (C18:0). Các axit béo được tổng hợp sau đó được vận chuyển đến lưới nội chất để tham gia vào quá trình lắp ráp TAG (Li, Jin và cs, 2017). Cuối cùng, TAG được lưu trữ trong các thể dầu trong tế bào chất được bao quanh bởi một lớp màng phospholipid chứa các oleosin, caleosin và steroleosin (Manan và cs, 2017).

Như đã được biết rộng rãi, quá trình phát triển của hạt luôn đi kèm với sự tích lũy các chất dự trữ (Ruuska và cs, 2002). Các hợp chất dự trữ được tìm thấy trong hầu hết các loại hạt, chiếm hơn 90% trọng lượng khô của hạt, chủ yếu bao gồm tinh bột, protein dự trữ và dầu. Ở cây *Arabidopsis*, hàm lượng dầu tích lũy dần từ giai đoạn phôi thai sớm đến giai đoạn trưởng thành, với xu hướng giảm dần ở các giai đoạn trưởng thành sau (Baud và cs, 2002). Trong quá trình thuần hóa đậu tương, hàm lượng dầu trong hạt cho thấy xu hướng tăng đáng kể. Hàm lượng dầu tăng từ 8 – 10% ở đậu tương hoang dã lên 18 – 22% ở các giống đậu tương được trồng trọt (Patil và cs, 2018). Trong giai đoạn trưởng thành sớm của quá trình phát triển hạt đậu tương, sự tích lũy dầu bắt đầu được quan sát thấy, tiếp theo là tốc độ tích lũy cao nhất ở giai đoạn trưởng thành giữa, với sự suy giảm dần ở giai đoạn trưởng thành muộn (Collakova và cs, 2013).

Ở cây *Arabidopsis*, các yếu tố phiên mã chính điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp lipid bao gồm *LEC2*, *LEC1*, *LIL*, *ABI3*, *FUS3* và *WR11*, v.v. Sự biểu hiện quá mức của *LEC2* làm tăng mức độ biểu hiện của *LEC1*, *ABI3*, *FUS3* và *WR11*, từ đó tăng cường sự tích lũy TAGs (Kim và cs, 2013). *WR11* là một yếu tố điều hòa quan trọng của quá trình sinh tổng hợp lipid trong hạt và hoạt động như một gen đích trực tiếp của *LEC1* để điều chỉnh sự tích lũy axit béo trong hạt *Arabidopsis* (Baud và cs, 2009). Các yếu tố phiên mã thuộc họ MYB, TT2, ức chế quá trình sinh tổng hợp axit béo trong hạt bằng cách ngăn chặn sự biểu hiện của *FUS3* (Wang và cs, 2014).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các yếu tố phiên mã đóng vai trò không thể thiếu trong quá trình sinh tổng hợp lipid của đậu tương (Hu, Liu, Wei, và cs, 2023; Wei và cs, 2025). *GmDof4* và *GmDof11* có thể cải thiện hàm lượng FAs thông qua việc kích hoạt các gen *accD* và long-chain acyl-CoA synthetase (Wang và cs, 2007). *GmMYB73* tương tác với *GL3* và *EGL3* để ức chế biểu hiện của *GL2*, do đó thúc đẩy quá trình chuyển đổi phosphatidylcholine (PC) thành TAG (Liu và cs, 2014). *GmDREBL* kích hoạt biểu hiện của *WR11* bằng cách liên kết trực tiếp với vùng khởi động của nó, do đó thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp axit béo (Zhang và cs, 2016). Sự biểu hiện quá mức của *GmbZIP123* làm tăng hàm lượng dầu thông qua việc kích hoạt biểu hiện của các gen *SUC* và *cwINV* (Song và cs, 2013). *GmNFYA* làm tăng hàm lượng axit béo bằng cách kích hoạt biểu hiện của *WR11* và các gen tổng hợp lipid *FatA*, *SAD* và *KASI* (Lu và cs, 2016). *GmZF351*, một chất hoạt hóa quá trình tích lũy dầu đậu tương, thúc đẩy trực tiếp sự biểu hiện gen *WR11* và các gen được điều hòa bởi *WR1* (Li, Lu, và cs, 2017). *GmZF392* thúc đẩy sự tích lũy axit béo bằng cách hoạt hóa sự biểu hiện gen hạ nguồn liên quan đến quá trình sinh tổng hợp lipid (Lu, Wei, Li, và cs, 2021). Nghiên cứu này cũng tiết lộ một mạng lưới phân tử đặc trưng theo giống mới liên quan đến ba yếu tố phiên mã *GmNFYA-GmZF392-GmZF351*, đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa con đường sinh tổng hợp lipid đậu tương. *GmZF392* tương tác vật lý với *GmZF351*, và cả hai sự biểu hiện gen đều được điều hòa tích cực bởi *GmNFYA*.

Các nguồn carbon là chất nền cơ bản cho quá trình sinh tổng hợp cả axit béo và protein (Nguyen và cs, 2016). Trong khi đó, nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng hàm lượng dầu trong hạt đậu tương và hàm lượng protein có mối tương quan nghịch (Huynh và cs, 2024; Yang và cs, 2024). Điều thú vị là nhiều gen ảnh hưởng đến hàm lượng dầu hoặc protein cũng ảnh hưởng đến kích thước/khối lượng hạt (Hu, Liu, Wei, và cs, 2023). *GmJAZ3*, một chất ức chế phiên mã, làm giảm hàm lượng axit béo, trong khi làm tăng hàm lượng protein và kích thước/khối lượng hạt, có thể bằng cách ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển đường (Hu, Liu, Tao, và cs, 2023). Sự biểu hiện quá mức của *GmOLEO1* cải thiện hàm lượng lipid, trong khi làm giảm hàm lượng protein và kích thước/khối lượng hạt (Zhang và cs, 2019). *GmSWEET10a* và *GmSWEET10b* được xác định là làm tăng hàm lượng dầu và kích thước/khối lượng hạt, nhưng làm giảm hàm lượng protein trong hạt đậu tương (Wang và cs, 2020). Những phát hiện này cho thấy có nhiều gen đa hiệu phối hợp điều chỉnh các đặc điểm quan trọng của hạt, bao gồm hàm lượng axit béo, hàm lượng protein và kích thước/khối lượng hạt ở đậu tương.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các yếu tố phiên mã AP2/ERF đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh nhiều quá trình phát triển ở thực vật, bao gồm sự hình thành và lão hóa cơ quan hoa, duy trì mô phân sinh bông, sự kéo dài và hình thái rễ, xác định kích thước lá và sự phát triển và chín của hạt (Cheng và cs, 2025; Guo và cs, 2022; Neogy và cs, 2019; Teng và cs, 2024; Zhou và cs, 2025). Ngoài ra, các nghiên cứu khác đã chứng minh rằng thực vật chuyển gen biểu hiện quá mức các yếu tố phiên mã AP2/ERF có khả năng chịu đựng tốt hơn đối với cả stress phi sinh học và sinh học (Ding và cs, 2022; Huang và cs, 2016; Kai và cs, 2022; Li và cs, 2022). Tuy nhiên, liệu yếu tố phiên mã loại AP2/ERF có tham gia vào việc điều chỉnh sự tích lũy lipid hay không vẫn chưa được hiểu rõ, đặc biệt là ở đậu tương.

Tại đây, chúng tôi đã xác định một yếu tố phiên mã mới thuộc họ AP2/ERF là *GmERFA* thông qua phân tích transcriptome và sàng lọc thư viện lai tạo hai gen nắm men của các protein tương tác với *GmNFYA*, một chất điều hòa dầu tích cực. Sự biểu hiện quá mức của *GmERFA* dẫn đến giảm mức FAs trong hạt đậu tương chuyển gen. Ngược lại, việc chỉnh sửa bộ gen của *GmERFA* và gen tương đồng *GmERFB* bằng hệ thống CRISPR/Cas9 đã làm tăng đáng kể hàm lượng dầu trong hạt đậu tương. *GmERFA* có thể tương tác và ức chế *GmNFYA* để giảm biểu hiện gen của các chất điều hòa dầu tích cực *GmbZIP123* và *GmZF392*, hoạt động như một phanh hãm sự tích lũy dầu ở giai đoạn sau của quá trình phát triển hạt. Đồng thời, *GmERFA* cũng ức chế biểu hiện của *GmbZIP123* và *GmZF392* thông qua liên kết trực tiếp với các promoter của chúng. Nghiên cứu của chúng tôi làm sâu sắc thêm sự hiểu biết về mối liên hệ giữa các chất điều hòa dầu khác nhau và sẽ cung cấp các nguồn gen và chiến lược quan trọng cho việc lai tạo giống đậu tương hàm lượng dầu cao.

2. KẾT QUẢ

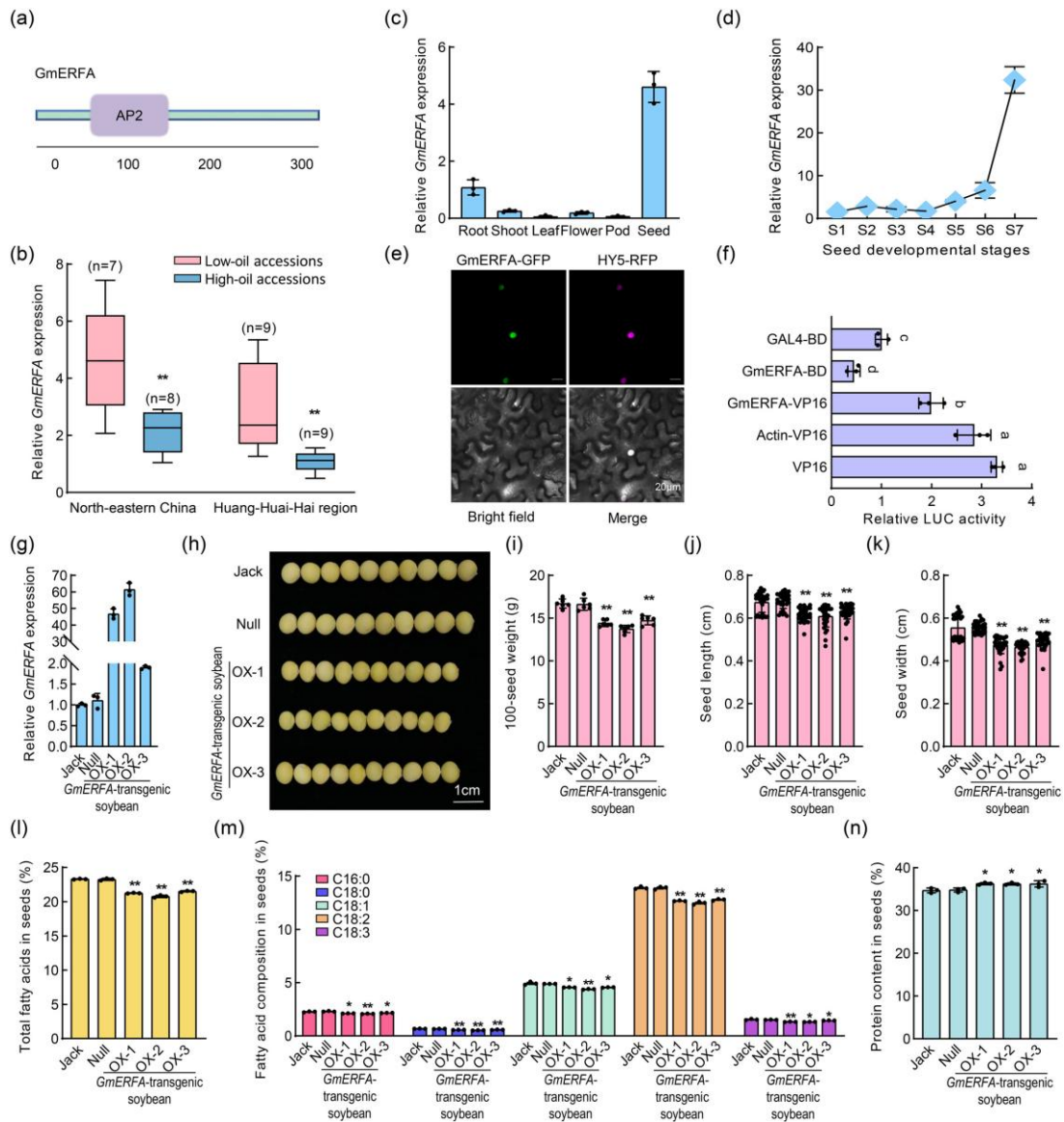
2.1. Xác định gen điều hòa dầu *GmERFA*

Để xác định các gen mới điều hòa hàm lượng dầu trong hạt đậu tương, chúng tôi đã thực hiện phân tích mạng liên quan đến dầu bằng cách sử dụng dữ liệu giải trình tự RNA trước đây của chúng tôi từ 33 giống đậu tương (Hu, Liu, Lu, và cs, 2023). Nhìn chung, các giống có hàm lượng dầu lớn hơn 22% được coi là giống có hàm lượng dầu cao, trong khi những giống có hàm lượng dầu dưới 20% được phân loại là giống có hàm lượng dầu thấp. 33 giống đậu tương bao gồm 15 giống (7 giống có hàm lượng dầu thấp và 8 giống có hàm lượng dầu trung bình đến cao) từ vùng Đông Bắc Trung Quốc (NEC) và 18 giống (9 giống có hàm lượng dầu thấp và 9 giống có hàm lượng dầu cao) từ vùng Hoàng-Hoài-Hải (HHHR – là một vùng đồng bằng lớn ở miền Bắc Trung Quốc, được đặt tên theo ba hệ thống sông chính chảy qua khu vực này: sông Hoàng Hà, sông Hoài, sông Hải) (Hình S1a và Bảng S1). Các gen có giá trị trên phần triệu kilobase (fragment per kilobase million – FPKM) > 0,5 được định nghĩa là gen biểu hiện. Các gen biểu hiện khác biệt (Differentially expressed genes – DEGs) được xác định dựa trên sự thay đổi gấp > 2 giữa mức độ biểu hiện tối đa và tối thiểu ở các dòng có hàm lượng dầu thấp và cao, với FPKM trung bình > 0,5 trên tất cả các dòng. So sánh từng cặp được thực hiện giữa mỗi dòng có hàm lượng dầu thấp và mỗi dòng có hàm lượng dầu cao ở

NEC và HHR. Các gen được xếp hạng trong ngưỡng tần suất 4% cao nhất được chọn, dẫn đến việc xác định 168 DEGs ở các dòng NEC và 296 DEGs ở các dòng HHR, với 76 DEGs trùng lặp giữa các dòng của cả hai vùng (Hình S1b và Bảng S2). Chúng tôi cũng đã xác định hơn 200 protein ứng cử viên tương tác với *GmNFYA*, một chất điều hòa dầu được tìm thấy trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Lu, Wei, Li, và cs, 2021; Lu và cs, 2016), thông qua sàng lọc thư viện nấm men (Bảng S3). Từ hai phân tích trên, chúng tôi đã xác định được một yếu tố phiên mã loại AP2/ERF chung và đặt tên là *GmERFA* (*Glyma.02G016100*) để nghiên cứu sâu hơn nhằm làm sáng tỏ chức năng của nó trong việc điều chỉnh sự tích lũy dầu đậu tương.

GmERFA mã hóa một protein gồm 300 axit amin với miền AP2 (Hình 1a). Phân tích biểu hiện gen cho thấy các giống đậu tương có hàm lượng dầu thấp thể hiện mức độ biểu hiện *GmERFA* cao hơn, trong khi các giống có hàm lượng dầu cao cho thấy mức độ biểu hiện thấp hơn đáng kể ở cả giống NEC và HHR (Hình 1b). Biểu hiện *GmERFA* được phát hiện ở tất cả các cơ quan của đậu tương và cao nhất ở hạt đậu tương (Hình 1c). Hơn nữa, nó được biểu hiện ổn định trong quá trình phát triển hạt đậu tương và tăng mạnh ở giai đoạn chín muộn hơn (S6–S7) (Hình 1d). *GmERFA* nằm trong nhân tế bào và hoạt động như một chất ức chế phiên mã (Hình 1e,f).

Để nghiên cứu chức năng của *GmERFA*, trình tự mã hóa (coding sequence – CDS) của *GmERFA* được hợp nhất vào vectơ biểu hiện pBI121, được điều khiển bởi promoter 35S và được chuyển vào *Arabidopsis* Columbia-0 (Col-0). So với Col-0, ba dòng *Arabidopsis* biểu hiện quá mức *GmERFA* (OX) cho thấy kích thước tán lá giảm và hạt nhỏ hơn (Hình S2a–c). Khối lượng 1000 hạt, chiều dài hạt và chiều rộng hạt của cây *Arabidopsis GmERFA*-OX đều thấp hơn đáng kể so với cây Col-0 (Hình S2d–f). Hơn nữa, tổng hàm lượng axit béo và thành phần của từng loại axit béo trong hạt của cây *Arabidopsis GmERFA*-OX đều giảm đáng kể (Hình S2g,h). Ngược lại, hàm lượng protein tăng lần lượt 17,6%, 11,2% và 3,3% (Hình S2i). Những kết quả này cho thấy *GmERFA* có thể kiểm soát tiêu cực hàm lượng dầu trong hạt và kích thước/khối lượng hạt, nhưng lại điều chỉnh tích cực mức độ protein trong hạt.



Hình 1. Nhận dạng, đặc trưng hóa và phân tích chức năng của *GmERFA*. (a) Cấu trúc miền của *GmERFA*. Các chữ số dưới đường kẻ đen chỉ vị trí của các axit amin. (b) Phân tích biểu hiện gen của *GmERFA* trong các giống đậu tương ít dầu và nhiều dầu từ vùng NEC và vùng HHR. (c) Mức độ biểu hiện của *GmERFA* trong các cơ quan khác nhau của cây đậu tương. Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). (d) Mức độ biểu hiện của *GmERFA* trong hạt ở bảy giai đoạn phát triển. Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). (e) Thí nghiệm biểu hiện tạm thời cho thấy sự định vị hạt nhân của *GmERFA* trong tế bào biểu bì *Nicotiana benthamiana*. *Arabidopsis* HY5 được sử dụng làm dấu hiệu hạt nhân. Thanh tỷ lệ = 20 μm . (f) Phân tích hoạt động điều hòa phiên mã của *GmERFA* trong nguyên sinh chất *Arabidopsis*. Các vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). Vector VP16 được sử dụng làm đối chứng dương, trong khi vector BD được sử dụng làm đối chứng âm. Actin-VP16 được sử dụng làm đối chứng không tương tác. (g) Phân tích biểu hiện của *GmERFA* trong cây Jack, Null và cây biểu hiện quá mức *GmERFA*. Các vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). (h) Kiểu hình hạt của cây Jack, Null và cây biểu hiện quá mức *GmERFA* sau khi thu hoạch. Thanh tỷ lệ = 1 cm. (i, k) So sánh khối lượng 100 hạt (i), chiều dài hạt (j) và chiều rộng hạt (k) của cây Jack, Null và cây

biểu hiện quá mức *GmERFA*. Các vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 6$ đối với khối lượng hạt và $n = 30$ đối với kích thước hạt). (l-n) So sánh tổng hàm lượng axit béo (l), thành phần axit béo (m) và hàm lượng protein (n) của cây Jack, Null và cây biểu hiện quá mức *GmERFA*. Vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). Phép kiểm t hai phía được sử dụng để phân tích thống kê. Các chữ cái viết thường từ “a” đến “d” biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

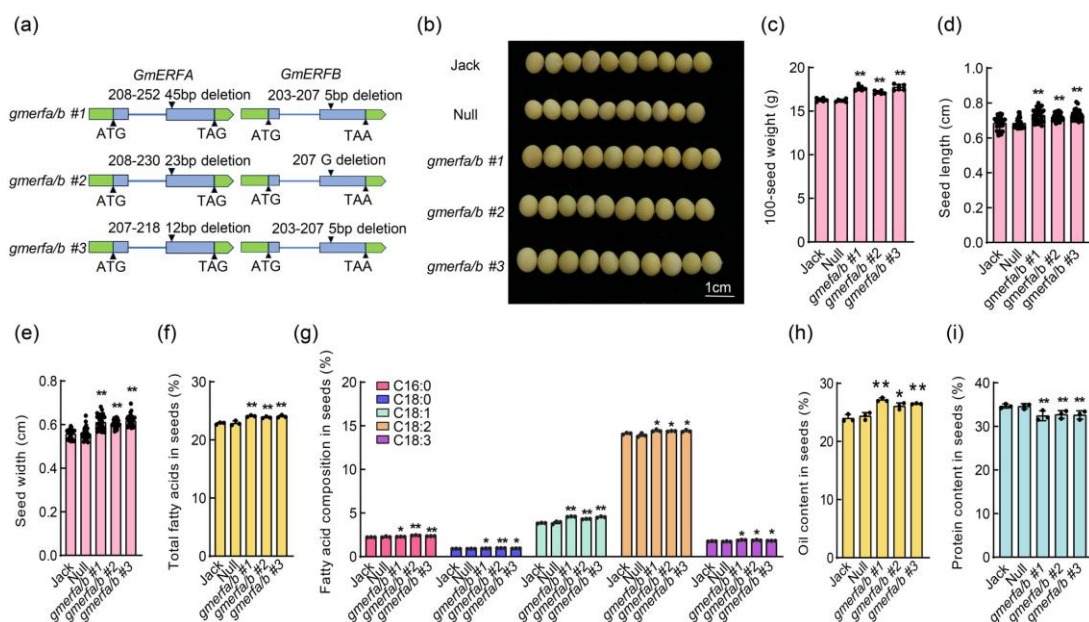
2.2. *GmERFA* điều chỉnh tiêu cực hàm lượng dầu trong hạt đậu tương

Để đánh giá chức năng của *GmERFA* trong đậu tương, chúng tôi đã tạo ra các cây đậu tương chuyển gen ổn định mang *35Spro:GmERFA*, và đã xác định được ba dòng chuyển gen đồng hợp tử có biểu hiện gen chuyển cao hơn (Hình 1g). Cả cây Jack và cây Null, được phân lập mà không có sự chèn T-DNA từ cây chuyển gen, đều được sử dụng làm cây đối chứng. Hơn nữa, khuếch đại PCR được thực hiện để xác nhận các dòng *GmERFA*-OX. Các môi xuôi được thiết kế trong vùng mã hóa (CDS) của *GmERFA*, và các môi ngược được thiết kế trên vector biểu hiện (Hình S3a). Kết quả cho thấy cả ba dòng chuyển gen đồng hợp tử đều tạo ra các dải tương ứng với kích thước mục tiêu, trong khi không có dải nào được phát hiện ở cây đối chứng (Hình S3b). Phân tích kiểu hình cho thấy hạt của cây đậu tương *GmERFA*-OX nhỏ hơn hạt của cây Jack và Null (Hình 1h). Ở những cây đậu tương *GmERFA*-OX này, khối lượng 100 hạt, chiều dài hạt và chiều rộng hạt giảm đáng kể (Hình 1i-k). Đồng thời, tổng lượng axit béo (FA) và thành phần axit béo trong hạt đậu tương *GmERFA*-OX cũng giảm đáng kể (Hình 1l,m). Tuy nhiên, hàm lượng protein trong hạt đã tăng đáng kể lần lượt là 4,5%, 4,4% và 4,4% (Hình 1n). Những kết quả này cho thấy sự biểu hiện quá mức của *GmERFA* ức chế kích thước/khối lượng hạt và sự tích lũy axit béo nhưng lại thúc đẩy mức độ protein.

Chúng tôi tiếp tục sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen *GmERFA* và gen tương đồng *GmERFB*. Ba đột biến kép loại bỏ gen trên nền Jack, được đặt tên là *gmerfa/b #1*, *gmerfa/b #2* và *gmerfa/b #3*, với các đột biến xóa khác nhau trong trình tự gen của *GmERFA* và *GmERFB* đã được xác định thông qua khuếch đại PCR tiếp theo là giải trình tự (Hình 2a). Biểu đồ sắc ký giải trình tự và các thay đổi nucleotide cụ thể đã chứng minh thêm các kiểu chỉnh sửa khác nhau trong ba dòng đột biến (Hình S3d,e). Biểu hiện *GmERFA* trong các đột biến *gmerfa/b* thấp hơn nhiều so với Jack và Null (Hình S3c). Các đột biến *gmerfa/b* tạo ra hạt lớn hơn (Hình 2b). So với cây Jack và cây Null, ba đột biến *gmerfa/b* cho thấy khối lượng 100 hạt tăng đáng kể lần lượt là 8,2%, 5,3% và 8,8% (Hình 2c). Chiều dài và chiều rộng hạt của các đột biến *gmerfa/b* cũng lớn hơn so với cây đối chứng (Hình 2 d,e). Tất cả các đột biến đều cho thấy mức axit béo tổng cộng tăng đáng kể so với cây đối chứng, với mức tăng từ 4,4% đến 5,4% (Hình 2f). Đồng thời, hàm lượng các axit béo chính trong hạt của ba đột biến *gmerfa/b* cũng tăng đáng kể (Hình 2g). Hơn nữa, tổng hàm lượng dầu tăng đáng kể lần lượt là 13,3%, 8,7% và 10,4% (Hình 2h). Cần lưu ý rằng hàm lượng protein giảm ở các đột biến *gmerfa/b* (Hình 2i). Tóm lại, những kết quả này cho thấy rằng đột biến *GmERFA* tạo ra hạt lớn hơn với nhiều dầu và trọng lượng hơn, nhưng ít protein hơn ở đậu tương.

2.3. *GmERFA* tương tác với *GmNFYA* để điều chỉnh sự tích lũy dầu hạt ở đậu tương

Trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi, chất hoạt hóa phiên mã *GmNFYA* đã được tìm thấy có tác dụng thúc đẩy sự tích lũy dầu hạt ở cả *Arabidopsis* và đậu tương (Lu, Wei, Li, và cs, 2021; Lu và cs, 2016). *GmERFA* hiện tại cũng được xác định từ quá trình sàng lọc các protein tương tác với *GmNFYA* (Bảng S3). Chúng tôi đã chứng minh sự tương tác giữa *GmERFA* và *GmNFYA* bằng hệ thống lai tạo hai gen nấm men và xét nghiệm bổ sung luciferase phân tách (Split-LUC) (Hình 3a,b). Trong khi đó, chúng tôi đã xác nhận sự tương tác giữa *GmERFA* và *GmNFYA* bằng phương pháp bổ sung huỳnh quang lưỡng phân tử (BiFC) và phương pháp đồng kết tủa miễn dịch (Co-IP) sử dụng hệ thống biểu hiện protein mầm lúa mì để biểu hiện hai protein trong cùng một phản ứng (Hình 3c,d). Nhìn chung, những kết quả này chứng minh rằng *GmERFA* tương tác vật lý với *GmNFYA* để có thể điều chỉnh lượng dầu hạt trong đậu tương.



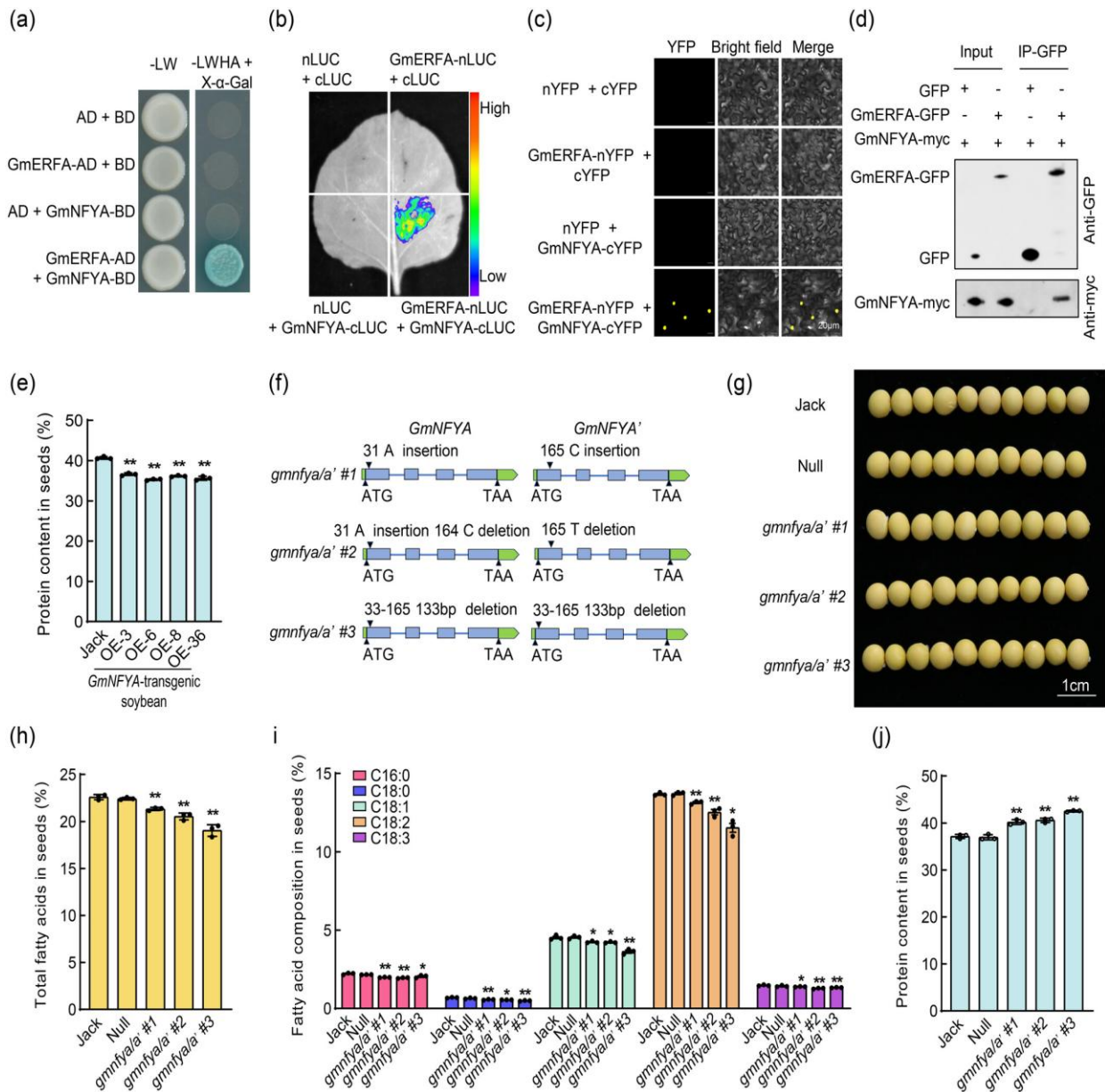
Hình 2. Phân tích đặc điểm hạt của các đột biến *gmerfa/b*. (a) Kiểu gen của các đột biến *gmerfa/b* được chỉnh sửa bằng hệ thống CRISPR/Cas9. (b) Hạt của các giống Jack, Null và các đột biến *gmerfa/b*. Thanh tỷ lệ = 1 cm. (c–e) Khối lượng 100 hạt (c), chiều dài hạt (d) và chiều rộng hạt (e) của các giống Jack, Null và các đột biến *gmerfa/b*. Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 6 đối với khối lượng hạt và n = 30 đối với kích thước hạt). (f–i) So sánh tổng hàm lượng axit béo (f), thành phần axit béo (g), hàm lượng dầu (h) và hàm lượng protein (i) của các giống Jack, Null và các đột biến *gmerfa/b*. Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 3). Phép kiểm t hai phía được sử dụng để phân tích thống kê. Dấu hoa thị cho biết sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng tương ứng (*p < 0,05, **p < 0,01).

Xét rằng *GmERFA* là chất điều hòa dầu âm tính (Hình 1 và 2) trong khi *GmNFYA* là chất điều hòa dầu dương tính (Lu, Wei, Li, và cs, 2021), và *GmERFA* tương tác với *GmNFYA*, có khả năng *GmERFA* sẽ ức chế chức năng của *GmNFYA* để giảm mức độ FA. Sau đó, chúng tôi tiếp tục kiểm tra vai trò của *GmNFYA* trong việc

kiểm soát đặc điểm hạt giống. Mặc dù *GmNFYA* thúc đẩy sự tích lũy axit béo và TAG trong đậu tương *GmNFYA*-OE (Lu, Wei, Li, và cs, 2021), hàm lượng protein trong các cây chuyển gen này thấp hơn đáng kể so với cây đối chứng (Hình 3e). Chúng tôi tiếp tục tạo ra các đột biến loại bỏ kép của *GmNFYA* và chất tương đồng của nó là *GmNFYA'* trên nền Jack. Ba dòng loại bỏ đồng hợp tử, được đặt tên là *gmnfya/a' #1*, *gmnfya/a' #2* và *gmnfya/a' #3*, đã được xác định thông qua khuếch đại PCR và giải trình tự (Hình 3f). Hơn nữa, chúng tôi đã chứng minh các mô hình chỉnh sửa khác biệt trên ba dòng đột biến thông qua biểu đồ sắc ký trình tự và các biến đổi nucleotide cụ thể (Hình S4a,b). Trong ba dòng đột biến *gmnfya/a'*, biểu hiện của *GmNFYA* giảm rõ rệt so với dòng Jack và Null (Hình S4c). Kích thước/khối lượng hạt của các hạt đột biến này cũng được đo và không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể (Hình 3g và Hình S4d–f).

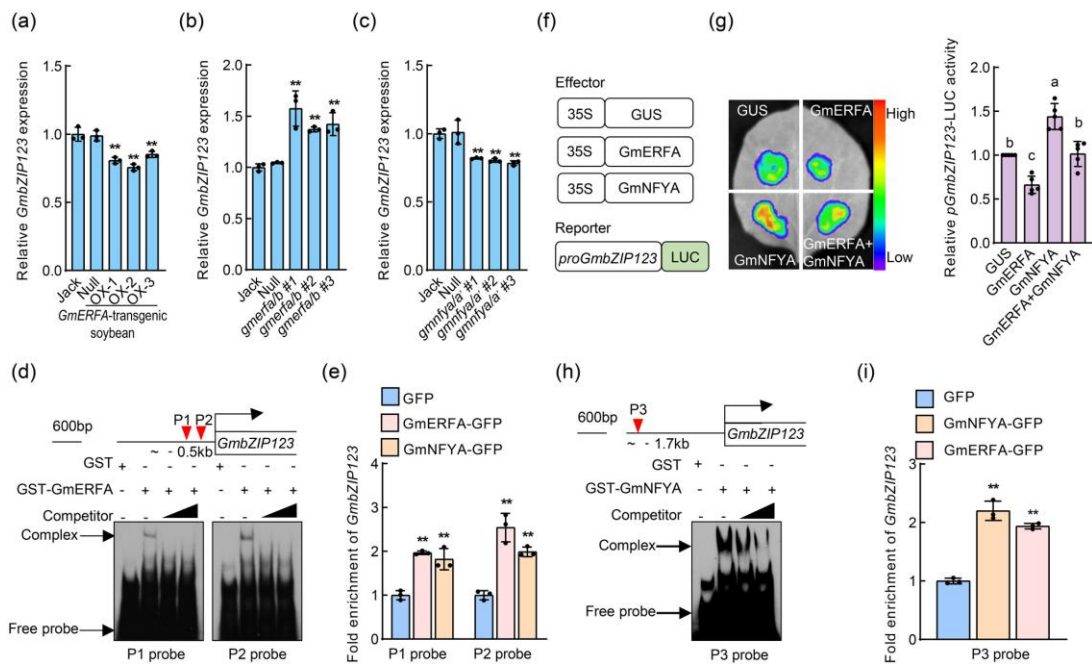
Để kiểm tra thêm vai trò của *GmNFYA* trong quá trình tích lũy dầu, chúng tôi đã đo và so sánh mức độ FA giữa các dòng đột biến *gmnfya/a'* và cây đối chứng. So với Jack và Null, hạt đột biến *gmnfya/a'* chứa tổng mức FA thấp hơn (Hình 3h). Thành phần của mỗi FA cũng giảm đáng kể ở những hạt đột biến này (Hình 3i). Không có gì đáng ngạc nhiên, sự giảm hàm lượng dầu ở các dòng đột biến *gmnfya/a'* dẫn đến sự gia tăng đáng kể hàm lượng protein. Hàm lượng protein trong hạt của ba đột biến *gmnfya/a'* tăng đáng kể lần lượt là 8,2%, 9,3% và 14,5% (Hình 3j).

Nhìn chung, những phát hiện này chứng minh rằng *GmNFYA* là cần thiết cho sự tích lũy FA trong hạt đậu tương, và mức độ FA có tương quan nghịch với mức độ protein.



Hình 3. *GmERFA* tương tác với *GmNFYA* và *GmNFYA* ảnh hưởng đến hàm lượng dầu và hàm lượng protein trong hạt. (a) Thí nghiệm lai tạo hai gen nấm men cho thấy sự tương tác giữa *GmERFA* và *GmNFYA*. “-LW” biểu thị môi trường tổng hợp nấm men thiếu leucine và tryptophan (SD/-Leu/-Trp), và “-LWHA + X α -Gal” biểu thị môi trường SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade cộng với X α -Gal. (b) Thí nghiệm bổ sung luciferase phân tách cho thấy sự tương tác của *GmERFA* và *GmNFYA* trong lá thuốc lá bằng cách sử dụng biểu hiện tạm thời qua trung gian *Agrobacterium* của các vector được chỉ định. (c) Phân tích bổ sung huỳnh quang lưỡng phân tử cho thấy sự tương tác giữa *GmERFA* và *GmNFYA*. Thanh tỷ lệ = 20 μ m. (d) Thí nghiệm đồng kết tủa miễn dịch về sự tương tác giữa *GmERFA* và *GmNFYA* bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện protein mầm lúa mì. (e) Hàm lượng protein của cây đậu tương chuyển gen Jack và *GmNFYA*. Vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 3). (f) Kiểu gen của các đột biến *gmnfy/a'* được chỉnh sửa bằng hệ thống CRISPR/Cas9. (g) Kiểu hình hạt của các đột biến Jack, Null và *gmnfy/a'*. Thanh tỷ lệ = 1 cm. (h-j) So sánh tổng hàm lượng axit béo (h), thành phần axit béo (i) và hàm lượng protein (j) của các đột biến Jack, Null và *gmnfy/a'*.

Vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 3). Phép kiểm t hai phía được sử dụng để phân tích thống kê. Dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa so với nhóm đối chứng tương ứng (*p < 0,05, **p < 0,01).



Hình 4. *GmERFA* liên kết với vùng khởi động và ức chế biểu hiện *GmbZIP123*. (a–c) Phân tích biểu hiện của *GmbZIP123* trong cây đậu tương Jack, Null, chuyển gen *GmERFA* (a), đột biến *gmerfa/b* (b) và đột biến *gmnfya/a'* (c). Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 3). (d) Thí nghiệm dịch chuyển điện di (EMSA) cho thấy *GmERFA* liên kết trực tiếp với các đoạn vùng khởi động của *GmbZIP123* trong ống nghiệm. (e) Phân tích CHIP-qPCR (miễn dịch kết tủa chromatin – phản ứng chuỗi polymerase định lượng) của *GmbZIP123* trong rễ tơ đậu tương chuyển gen *GmERFA* và rễ tơ đậu tương chuyển gen *GmNFYA*. Độ làm giàu được tính toán dựa trên sự thay đổi tương đối trong các mẫu kháng GFP so với các mẫu không có kháng thể. Biểu hiện quá mức GFP được sử dụng làm đối chứng âm. Các vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 3). (f) Các tác nhân và chất báo cáo được sử dụng trong thí nghiệm chuyển gen tạm thời trên lá thuốc lá. (g) Hoạt tính luciferase trong lá thuốc lá với các cấu trúc trong (f) và phân tích định lượng cường độ phát quang. Các vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 5). (h) Thí nghiệm EMSA cho thấy *GmNFYA* liên kết với các đoạn promoter của *GmbZIP123* trong ống nghiệm. (i) Sự làm giàu các vùng promoter của *GmbZIP123* bởi *GmNFYA* và *GmERFA* trong cơ thể sống bằng cách sử dụng rễ lông đậu tương chuyển gen *GmNFYA* và rễ lông đậu tương chuyển gen *GmERFA*. Mức độ làm giàu được tính toán dựa trên sự thay đổi tương đối trong các mẫu kháng GFP so với các mẫu không có kháng thể. Sự biểu hiện quá mức của GFP được sử dụng làm đối chứng âm. Các vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 3). Các kiểm định *t-test* hai phía được sử dụng để phân tích thống kê. Các chữ cái viết thường từ “a” đến “c” biểu thị sự khác biệt đáng kể (p < 0,05). Dấu * biểu thị sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng tương ứng (**p < 0,01).

2.4. *GmERFA* điều chỉnh biểu hiện của *GmbZIP123* thông qua cả cơ chế trực tiếp và gián tiếp

Để làm rõ hơn các cơ chế phân tử cụ thể mà *GmERFA* điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp lipid, chúng tôi đã nghiên cứu các gen mục tiêu tiềm năng liên quan đến quá trình điều chỉnh này. *GmbZIP123* hoạt động như một chất kích hoạt phiên mã để thúc đẩy hàm lượng dầu trong hạt trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Song và cs, 2013), và phân tích RT-qPCR cho thấy sự giảm đáng kể biểu hiện của *GmbZIP123* ở cây đậu tương *GmERFA*-OX so với giống Jack và Null (Hình 4a). Ngược lại, các đột biến *gmerfa/b* cho thấy mức độ phiên mã *GmbZIP123* tăng cao (Hình 4b). Hơn nữa, biểu hiện *GmbZIP123* ở các đột biến *gmnfy/a'* thấp hơn so với cây đối chứng (Hình 4c). Sự ức chế đồng thời của *GmbZIP123* ở cả cây đậu tương *GmERFA*-OX và đột biến *gmnfy/a'* cho thấy sự điều hòa đối kháng giữa *GmERFA* và *GmNFYA* đối với mục tiêu hạ nguồn *GmbZIP123*.

Để xác định thêm liệu *GmERFA* có liên kết trực tiếp với vùng promoter của *GmbZIP123* hay không, chúng tôi đã thực hiện xét nghiệm dịch chuyển điện di (EMSA). Trong các nghiên cứu trước đây, hộp GCC và motif TTG đã được xác định là các vị trí liên kết của các yếu tố phiên mã AP2/ERF (Hao và cs, 2002; Wang và cs, 2015). Trong vùng promoter của *GmbZIP123*, chúng tôi đã xác định hai đoạn dò P1 và P2 (mỗi đoạn 59 bp), lần lượt chứa motif TTG và hộp GCC (Bảng S4). Phân tích EMSA cho thấy *GmERFA* liên kết trực tiếp và đặc hiệu với các đoạn P1 và P2 trong vùng promoter của *GmbZIP123* trong ống nghiệm (Hình 4d). Trong khi đó, phương pháp định lượng phản ứng chuỗi polymerase kết hợp miễn dịch chromatin (ChIP-qPCR) được sử dụng để phát hiện khả năng liên kết của *GmERFA* với vùng khởi động của *GmbZIP123* in vivo. Rễ lông chuyển gen biểu hiện quá mức *GFP*, *GmERFA-GFP* và *GmNFYA-GFP* được tạo ra ở giống đậu tương Kefeng1 bằng hệ thống chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium rhizogenes*. Các đầu dò P1 và P2 của *GmbZIP123* được làm giàu ở mức độ cao hơn trong rễ lông đậu tương *GmERFA-GFP*-OX (Hình 4e). Trong rễ lông đậu tương *GmNFYA-GFP*-OX, cả hai đầu dò cũng được làm giàu ở mức độ cao (Hình 4e). Những kết quả này cho thấy *GmERFA* liên kết trực tiếp với vùng khởi động của *GmbZIP123* và cả *GmERFA* và *GmNFYA* đều liên kết với vùng khởi động của gen có thể thông qua tương tác vật lý.

Để nghiên cứu sâu hơn chức năng của *GmbZIP123* trong việc điều chỉnh hàm lượng FAs, hai cấu trúc pBIN438-*GmbZIP123* và pZH01-*GmbZIP123*-RNAi đã được tạo ra và sử dụng để tạo ra rễ lông chuyển gen đậu tương *GmbZIP123*-OX và *GmbZIP123*-RNAi tương ứng (Hình S5a,c). Rễ lông đậu tương được tạo ra từ chủng *A. rhizogenes* K599 được sử dụng làm rễ đối chứng. So với rễ đối chứng, hàm lượng FAs trong rễ lông đậu tương *GmbZIP123*-OX cho thấy sự gia tăng đáng kể, trong khi rễ lông *GmbZIP123*-RNAi có hàm lượng FAs tương đối thấp hơn (Hình S5b,d). Tóm lại, những kết quả này cho thấy *GmbZIP123* thúc đẩy sự tích lũy FAs trong đậu tương và được điều chỉnh trực tiếp bởi *GmERFA*.

Vì *GmERFA* liên kết trực tiếp với vùng khởi động của *GmbZIP123* và tương tác với *GmNFYA*, chúng tôi đã kiểm tra tác động của *GmERFA* và *GmNFYA* lên hoạt

động của vùng khởi động *GmbZIP123*. Đối với plasmid báo cáo, trình tự vùng khởi động ~2Kb của *GmbZIP123* được ghép nối với gen *LUC* trong vector pCAMBIA2300. Đối với plasmid tác động, CDS của *GUS*, *GmERFA* và *GmNFYA*, được điều khiển bởi vùng khởi động 35S, cũng được nhân bản vào pCAMBIA2300 (Hình 4f). 35S:*GUS* được sử dụng làm đối chứng âm. Kết quả cho thấy *GmERFA* ức chế đáng kể hoạt động của vùng khởi động *GmbZIP123*, trong khi *GmNFYA* kích hoạt mạnh mẽ hoạt động của vùng khởi động này. Hơn nữa, *GmERFA* ức chế sự hoạt hóa phiên mã của vùng khởi động *GmbZIP123* do *GmNFYA* gây ra (Hình 4g).

Khả năng liên kết của *GmNFYA* với promoter *GmbZIP123* đã được phân tích thêm vì *GmNFYA* làm tăng hoạt động của gen báo cáo *pGmbZIP123:LUC*. Phân tích EMSA cho thấy *GmNFYA* liên kết trực tiếp với promoter của *GmbZIP123* trong ống nghiệm (Hình 4h). Hơn nữa, tín hiệu ChIP cho các đoạn P3 (59 bp) của promoter *GmbZIP123* trong rễ tơ đậu tương chuyển gen 35S-*GmNFYA*-*GFP* được làm giàu đáng kể (Hình 4i và Bảng S4). Trong khi đó, trong rễ tơ đậu tương *GmERFA*-*GFP*-OX, các đoạn P3 của *GmbZIP123* cũng được làm giàu cao (Hình 4i). Tóm lại, tất cả các kết quả này cho thấy *GmERFA* ức chế sự tích lũy FAs bằng cả cách liên kết trực tiếp với promoter *GmbZIP123* để ức chế hoạt động phiên mã của nó và bằng cách tương tác với *GmNFYA* để ngăn chặn sự hoạt hóa phiên mã *GmbZIP123* do *GmNFYA* thúc đẩy.

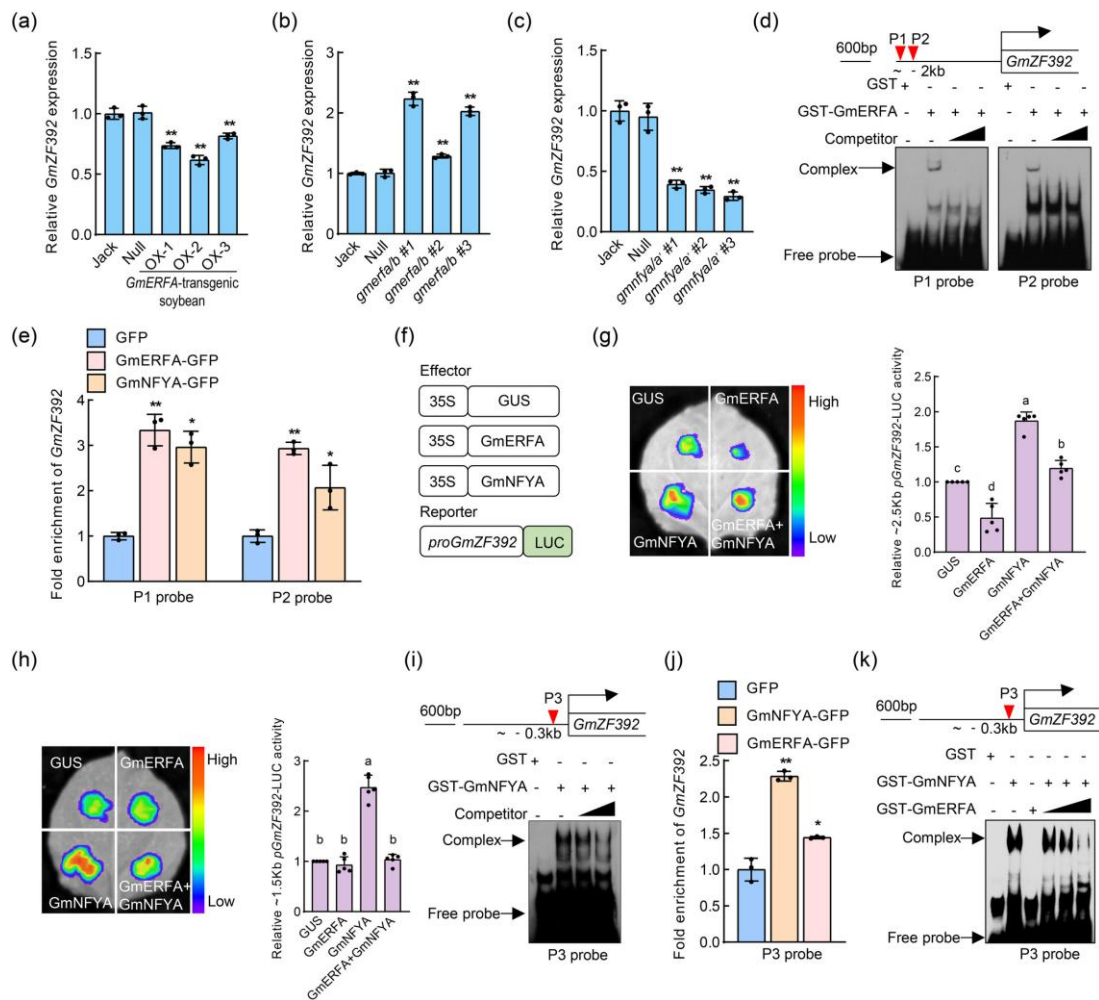
2.5. *GmERFA* ức chế sự hoạt hóa phiên mã *GmZF392* do *GmNFYA* điều hòa

GmZF392 được xác định là một yếu tố phiên mã ưu tiên hạt giống, điều hòa tích cực sự tích lũy dầu trong cây đậu tương, và *GmNFYA* liên kết trực tiếp với vùng promoter của *GmZF392* để kích hoạt quá trình phiên mã của nó trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Lu, Wei, Li, và cs, 2021). Vì *GmERFA* tương tác với *GmNFYA*, chúng tôi đã điều tra xem liệu *GmERFA* có thể kiểm soát sự biểu hiện của *GmZF392* hay không. *GmZF392* giảm đáng kể ở cây đậu tương *GmERFA*-OX nhưng tăng lên ở đột biến *gmerfa/b* so với cây đối chứng (Hình 5a,b). Hơn nữa, sự biểu hiện của *GmZF392* rõ ràng bị giảm ở đột biến *gmnfya/a'* (Hình 5c). Vì *GmZF392* kích hoạt sự biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp lipid ở hạ nguồn, bao gồm *GmBCCP2*, *GmKASIII*s, *GmTAG*s, *GmOLEO1*s và *GmWRI1*s trong đậu tương *GmZF392*-OX (Lu, Wei, Li, và cs, 2021), chúng tôi đã kiểm tra sự biểu hiện của tất cả các gen này trong cây đậu tương *GmERFA*-OX, đột biến *gmerfa/b* và đột biến *gmnfya/a'*. Một xu hướng nhất quán đã được quan sát thấy giữa sự biểu hiện của *GmZF392* và các gen hạ nguồn này trong đậu tương *GmERFA*-OX, đột biến *gmerfa/b* và đột biến *gmnfya/a'* (Hình S6a–c).

Chúng tôi đã thực hiện EMSA và ChIP-qPCR để điều tra thêm xem *GmERFA* có thể liên kết với promoter của *GmZF392* hay không. Các probe P1 và P2 (mỗi probe 59 bp) chứa hộp GCC của vùng promoter *GmZF392* đã được kiểm tra khả năng liên kết của *GmERFA* (Bảng S4). So với protein GST đối chứng, protein GST-*GmERFA* được phát hiện liên kết đặc hiệu với hai probe (Hình 5d). Hơn nữa, hai đoạn của *GmZF392* được làm giàu đáng kể trong cả rễ tơ đậu tương *GmERFA*-*GFP*-OX và *GmNFYA*-*GFP*-OX (Hình 5e). Những kết quả này chứng minh rằng

GmERFA liên kết trực tiếp với vùng khởi động của *GmZF392* trong ống nghiệm và trong cơ thể sống và có liên quan đến *GmNFYA*.

Chúng tôi tiếp tục đánh giá xem *GmERFA* có thể ảnh hưởng đến hoạt động của vùng khởi động *GmZF392* hay không. Các plasmid *35S:GUS*, *35S:GmERFA* và *35S:GmNFYA* được xây dựng làm tác nhân, và *pGmZF392:LUC* được nhân bản vào pCAMBIA2300 làm gen báo cáo (Hình 5f). Hoạt động LUC được điều khiển bởi *pGmZF392* ~2,5Kb, chứa vị trí liên kết của *GmERFA* và *GmNFYA*, đã giảm đáng kể khi *GmERFA* được biểu hiện quá mức trong lá thuốc lá. Trong khi đó, hoạt động LUC được điều hòa tăng lên bởi *GmNFYA*, và sự biểu hiện đồng thời của *GmERFA* đã làm gián đoạn sự kích hoạt phiên mã này (Hình 5g). Để điều tra thêm xem hiệu ứng can thiệp này là do sự tương tác giữa *GmERFA* và *GmNFYA* hay là kết quả của tác dụng cộng gộp từ khả năng liên kết của chúng, chúng tôi đã xây dựng plasmid báo cáo ~1,5 Kb *pGmZF392:LUC*. Vùng promoter ~1,5 Kb của *GmZF392* chỉ chứa vị trí liên kết của *GmNFYA*. Điều thú vị là, hoạt động LUC được điều khiển bởi ~1,5 Kb *pGmZF392* đã tăng lên đáng kể bởi *GmNFYA*, trong khi *GmERFA* không thể hiện tác dụng đáng kể nào (Hình 5h). Sự biểu hiện đồng thời của *GmERFA* với *GmNFYA* đã chặn hoàn toàn khả năng kích hoạt của *GmNFYA*, cho thấy rằng *GmERFA* có thể gây ra tác động tiêu cực lên *GmZF392* thông qua tương tác với *GmNFYA* (Hình 5h). Những kết quả này chứng minh rằng *GmERFA* ức chế sự biểu hiện của *GmZF392* bằng cách liên kết trực tiếp với vùng promoter của nó và bằng cách ức chế sự hoạt hóa của *GmNFYA* trên vùng promoter *GmZF392* thông qua tương tác vật lý.



Hình 5. *GmERFA* điều chỉnh giảm biểu hiện *GmZF392* thông qua liên kết trực tiếp với vùng promoter của nó hoặc tương tác với *GmNFYA*. (a–c) Mức độ biểu hiện của *GmZF392* trong cây đậu tương Jack, Null, chuyển gen *GmERFA* (a), đột biến *gmerfa/b* (b) và đột biến *gmnfya/a'* (c). Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 3). (d) *GmERFA* liên kết với các đoạn promoter của *GmZF392* trong ống nghiệm. (e) Phân tích ChIP-qPCR của *GmZF392* trong rễ tơ đậu tương chuyển gen *GmERFA* và rễ tơ đậu tương chuyển gen *GmNFYA*. Độ làm giàu được tính toán dựa trên sự thay đổi tương đối trong các mẫu kháng GFP so với các mẫu không có kháng thể. Sự biểu hiện quá mức của GFP được sử dụng làm đối chứng âm. Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 3). (f) Các tác nhân gây ảnh hưởng và chất báo cáo được sử dụng trong thử nghiệm chuyển gen tạm thời trên lá thuốc lá. (g, h) Hoạt tính luciferase trong lá thuốc lá với các cấu trúc trong (f) và phân tích định lượng cường độ phát quang. Đoạn ~2,5 kb của *pGmZF392* bao gồm các vị trí liên kết của cả *GmERFA* và *GmNFYA* (g). Đoạn ~1,5 kb của *pGmZF392* chỉ bao gồm vị trí liên kết của *GmNFYA* (h). Vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 5). (i) Phân tích EMSA cho thấy *GmNFYA* liên kết trực tiếp với các đoạn promoter của *GmZF392* trong ống nghiệm. (j) Sự làm giàu các vùng promoter của *GmZF392* bởi *GmNFYA* và *GmERFA* trong cơ thể sống bằng cách sử dụng rễ lông đậu tương chuyển gen *GmNFYA* và rễ lông đậu tương chuyển gen *GmERFA*. Mức độ làm giàu được tính toán dựa trên sự thay đổi tương đối trong các mẫu kháng GFP so với các mẫu không có kháng thể. Sự biểu hiện quá mức của GFP được sử dụng làm đối chứng

âm. Các vạch lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). (k) EMSA chứng minh rằng *GmERFA* ức chế sự gắn kết của *GmNFYA* trên promoter *GmZF392*. Các kiểm định *t-test* hai phía được sử dụng để phân tích thống kê. Các chữ cái viết thường từ “a” đến “d” biểu thị sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$). Dấu * biểu thị sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng tương ứng (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Kết quả tổng hợp từ EMSA và ChIP-qPCR cho thấy *GmNFYA* liên kết trực tiếp với đoạn P3 (59 bp) của vùng promoter *GmZF392* trong ống nghiệm và được tuyển chọn đặc hiệu đến vùng gen này trong cơ thể sống ở rễ tơ chuyển gen *GmNFYA*-GFP (Hình 5i,j và Bảng S4). Đồng thời, đoạn P3 của *GmZF392* cũng được làm giàu đáng kể trong rễ tơ đậu tương chuyển gen *GmERFA*-GFP (Hình 5j). Hơn nữa, phân tích EMSA cho thấy *GmERFA* ức chế sự liên kết của *GmNFYA* với đoạn P3 của vùng promoter *GmZF392* (Hình 5k). Do đó, chúng tôi đề xuất rằng *GmERFA* ức chế chức năng hoạt hóa phiên mã của *GmNFYA* bằng cách làm suy yếu ái lực liên kết DNA của nó với các yếu tố promoter mục tiêu.

Chúng tôi tiếp tục tạo ra rễ tơ đậu tương *GmZF392*-RNAi để kiểm tra xem hàm lượng axit béo (FA) có bị thay đổi hay không. Kết quả cho thấy sự giảm đáng kể hàm lượng FAs trong rễ tơ *GmZF392*-RNAi (Hình S5e,f), phù hợp với vai trò tích cực của *GmZF392* trong việc tích lũy dầu đậu tương (Lu, Wei, Li, và cs, 2021). Tóm lại, những kết quả này cung cấp bằng chứng cho thấy *GmNFYA* cũng liên kết trực tiếp với vùng khởi động của *GmZF392* để tích lũy FA khi phối hợp với *GmERFA*.

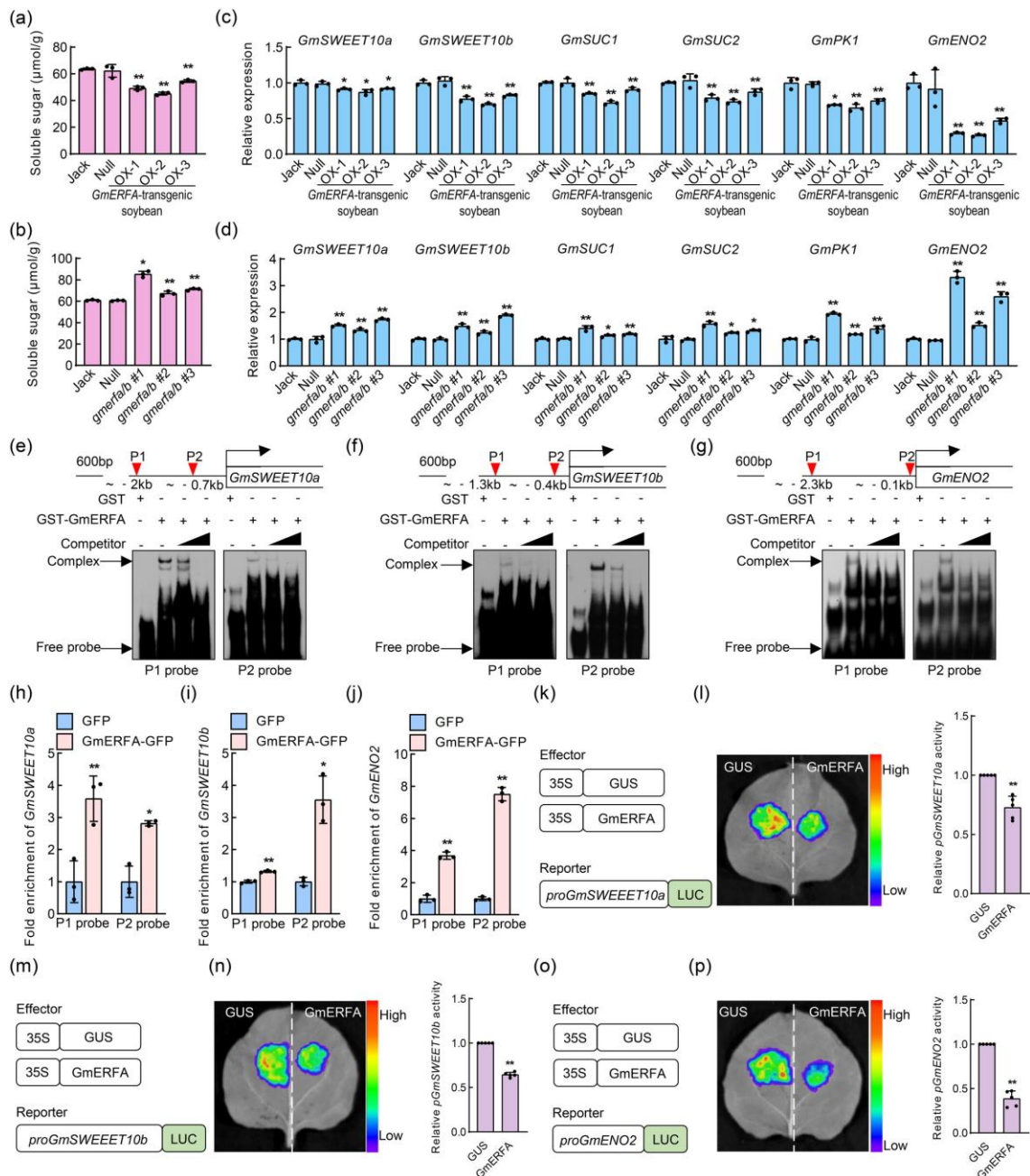
Chúng tôi đã phân tích mức độ biểu hiện của *GmERFA*, *GmNFYA*, *GmZF392* và *GmbZIP123* ở các giai đoạn khác nhau (S1–S7) của quá trình phát triển hạt đậu tương. So với *GmNFYA*, *GmZF392* và *GmbZIP123*, biểu hiện của *GmERFA* tăng mạnh ở các giai đoạn trưởng thành muộn hơn (S6–S7) của quá trình phát triển hạt (Hình S7). Do đó, chúng tôi đưa ra giả thuyết rằng *GmERFA* có thể hoạt động như một gen hãm ở giai đoạn trưởng thành muộn hơn của quá trình phát triển hạt để ức chế biểu hiện của *GmZF392* và *GmbZIP123* nhằm chấm dứt quá trình sinh tổng hợp dầu, phối hợp với *GmNFYA*.

2.6. *GmERFA* điều chỉnh tiêu cực hàm lượng đường hòa tan trong hạt đậu tương

Vì sucrose đóng vai trò là nguồn carbon chính cho quá trình tổng hợp axit béo trong thực vật (Haslam và cs, 2016), và gen *GmbZIP123* nằm ở hạ nguồn của *GmERFA* tham gia vào việc điều chỉnh vận chuyển đường (Song và cs, 2013), chúng tôi đã tiếp tục kiểm tra hàm lượng đường hòa tan trong hạt của cây đậu tương *GmERFA*-OX và đột biến *gmerfa/b*. So với giống Jack và Null, hàm lượng đường hòa tan trong hạt đậu tương *GmERFA*-OX giảm đáng kể (Hình 6a). Ngược lại, ba dòng đột biến *gmerfa/b* cho thấy sự gia tăng đáng kể lần lượt là 40,1%, 10,4% và 16,7% về hàm lượng đường hòa tan (Hình 6b). Hơn nữa, chúng tôi cũng đo hàm lượng các monosaccharide riêng lẻ trong hạt đậu tương. Kết quả cho thấy hàm lượng fructose và glucose giảm đáng kể ở cây đậu tương *GmERFA*-OX nhưng tăng mạnh ở các dòng đột biến *gmerfa/b* so với giống đối chứng Jack (Hình S8). Ngoài ra, sự biểu hiện của các gen liên quan đến vận chuyển đường

(*GmSWEET10a*, *GmSWEET10b*, *GmSUC1* và *GmSUC2*) và các gen liên quan đến quá trình đường phân (*GmPK1* và *GmENO2*) cũng được phát hiện. Điều thú vị là, các gen này cho thấy sự giảm biểu hiện đáng kể ở cây *GmERFA*-OX nhưng tăng biểu hiện rõ rệt ở các dòng đột biến *gmerfa/b* (Hình 6c,d). Những kết quả này cho thấy *GmERFA* có thể điều hòa tiêu cực con đường vận chuyển đường và đường phân, do đó làm giảm nguồn cung cấp carbon và sau đó ức chế sự tích lũy FAs trong hạt đậu tương.

Chúng tôi tiếp tục nghiên cứu xem liệu *GmERFA* có thể kiểm soát trực tiếp các gen vận chuyển đường và gen đường phân hay không. Trong vùng khởi động của *GmSWEET10a*, *GmSWEET10b* và *GmENO2*, chúng tôi đã xác định được hai đoạn dò (mỗi đoạn 59 bp) chứa hộp GCC (Bảng S4). Phân tích EMSA cho thấy *GmERFA* liên kết trực tiếp với vùng khởi động của *GmSWEET10a*, *GmSWEET10b* và *GmENO2* trong ống nghiệm (Hình 6e–g). Hơn nữa, vùng khởi động của *GmSWEET10a*, *GmSWEET10b* và *GmENO2* cũng được làm giàu đáng kể bởi *GmERFA*-GFP trong rễ lông đậu tương chuyển gen *GmERFA*-GFP-OX so với rễ lông đối chứng (Hình 6h–j).



Hình 6. *GmERFA* điều hòa âm tính hàm lượng đường hòa tan trong hạt đậu tương. (a, b) Phân tích hàm lượng đường hòa tan trong hạt ở cây đậu tương Jack, Null, cây đậu tương chuyển gen *GmERFA* (a) và đột biến *gmerfa/b* (b). Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). (c, d) Phân tích biểu hiện của *GmSWEET10a*, *GmSWEET10b*, *GmSUC1*, *GmSUC2*, *GmPK1* và *GmENO2* ở cây đậu tương Jack, Null, cây đậu tương chuyển gen *GmERFA* (c) và đột biến *gmerfa/b* (d). Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). (e–g) Phân tích EMSA cho thấy *GmERFA* liên kết trực tiếp với các đoạn promoter của *GmSWEET10a* (e), *GmSWEET10b* (f) và *GmENO2* (g) trong ống nghiệm. (h–j) Sự làm giàu vùng promoter của *GmSWEET10a* (h), *GmSWEET10b* (i) và *GmENO2* (j) bởi *GmERFA* in vivo sử dụng rễ tơ đậu tương chuyển gen *GmERFA*. Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 3$). (k–p) Ảnh hưởng của *GmERFA* đến hoạt động promoter của *GmSWEET10a* (l), *GmSWEET10b* (n) và *GmENO2* (p) được xác định bằng các cấu trúc trong (k), (m) và (o) tương ứng. Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn ($n = 5$). Kiểm định *t-test* hai phía được sử dụng để

phân tích thống kê. Dấu * biểu thị sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng tương ứng (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Đồng thời, *GmERFA* đã trực tiếp ức chế hoạt động của vùng khởi động của *GmSWEET10a*, *GmSWEET10b* và *GmENO2* trong thí nghiệm tạm thời (Hình 6k–p). Kết quả này chứng minh rằng *GmERFA* ức chế sự biểu hiện của *GmSWEET10a*, *GmSWEET10b* và *GmENO2* bằng cách liên kết trực tiếp với các đoạn promoter của chúng, do đó ức chế vận chuyển đường và quá trình đường phân.

2.7. *GmERFA* chịu sự chọn lọc trong quá trình thuần hóa

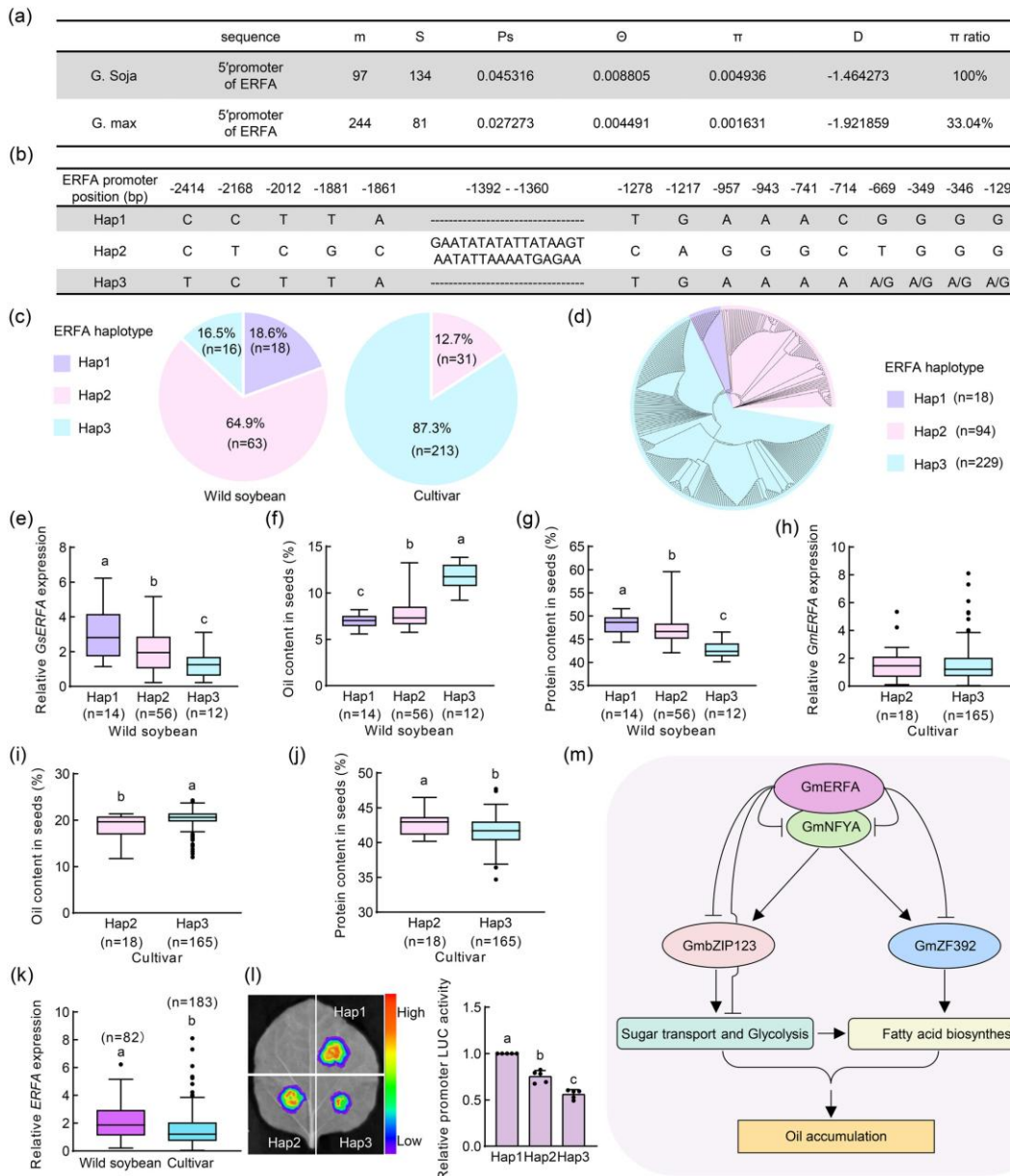
Sự biến dị tự nhiên của promoter *ERFA* đã được phân tích thông qua khuếch đại PCR và giải trình tự vùng promoter ~2,5 Kb của nó ở 97 giống đậu tương hoang dã và 244 giống đậu tương trồng trọt (Hình 7a và Bảng S5). Tổng cộng, 134 nucleotide khác biệt đã được phát hiện ở 97 giống đậu tương hoang dã và 81 nucleotide khác biệt đã được phát hiện ở 244 giống đậu tương trồng trọt (Hình 7a). Độ đa dạng nucleotide (π) được tính toán bằng MEGA7 cho thấy sự biến dị di truyền cao hơn nhiều ở đậu tương hoang dã ($\pi = 0,004936$) so với đậu tương trồng trọt ($\pi = 0,001631$), trong đó đậu tương trồng trọt chỉ giữ lại khoảng 33,04% biến dị quan sát được ở đậu tương hoang dã (Hình 7a). Phân tích D của Tajima đối với vùng promoter cho thấy *ERFA* có khả năng chịu tác động của chọn lọc tự nhiên ở đậu tương hoang dã và trải qua chọn lọc nhân tạo ở đậu tương trồng trọt (Hình 7a). Những kết quả này cho thấy gen *ERFA* có thể được chọn lọc trong quá trình thuần hóa đậu tương.

Sự biến dị tự nhiên của promoter *ERFA* đã được phân tích, với các promoter được phân loại thành ba kiểu gen dựa trên sự biến đổi trình tự (Hình 7b). Ở đậu tương hoang dã, 64,9% số mẫu được xác định là Hap2. Ở đậu tương trồng trọt, kiểu gen chủ yếu là Hap3 (Hình 7c và Bảng S5). Phân tích phát sinh chủng loại của tất cả các trình tự promoter *ERFA* cho thấy ba kiểu gen này tập hợp thành các nhóm riêng biệt, với mỗi kiểu gen tạo thành một cụm đơn ngành, hỗ trợ mạnh mẽ sự phân kỳ di truyền giữa các kiểu gen này (Hình 7d). Những kết quả này cho thấy kiểu gen Hap3 của gen *ERFA* có thể trải qua quá trình chọn lọc trong quá trình thuần hóa đậu tương.

Chúng tôi tiếp tục định lượng biểu hiện của *ERFA* trong giai đoạn chín giữa của hạt đậu tương và thực hiện phân tích mối liên hệ giữa các haplotype khác nhau và mức độ biểu hiện. Mối tương quan giữa hàm lượng dầu và hàm lượng protein trong hạt với các haplotype khác nhau cũng được so sánh (Hình 7e–j). Ở đậu tương hoang dã, Hap1 tương quan với biểu hiện gen cao, hàm lượng dầu thấp nhưng hàm lượng protein cao. Ngược lại, Hap3 tương quan với biểu hiện gen thấp, hàm lượng dầu cao nhưng hàm lượng protein thấp trong hạt (Hình 7e–g). Ở đậu tương trồng trọt, chỉ có Hap2 và Hap3 được xác định. Hap2 tương quan với mức độ biểu hiện *ERFA* trung bình cao hơn một chút, hàm lượng dầu thấp hơn (trung bình 18,37%) nhưng hàm lượng protein cao hơn. Ngược lại, Hap3 tương quan với mức độ biểu hiện *ERFA* trung bình thấp hơn, hàm lượng dầu cao hơn (trung bình 20,27%)

nhưng hàm lượng protein thấp hơn (Hình 7h–j). Các giống Hap3 cho thấy mức tăng trung bình 10,34% về hàm lượng dầu so với các giống Hap2 (Hình 7i). Chúng tôi cũng đã phân tích mối tương quan giữa ba kiểu gen và khối lượng 100 hạt, và nhận thấy rằng kiểu gen Hap3 tương quan với khối lượng hạt trung bình cao hơn ở cả đậu tương trồng trọt và đậu tương hoang dã (Hình S9). Những phát hiện này cho thấy kiểu gen Hap3 của gen *ERFA* tương quan với hàm lượng dầu cao hơn, khối lượng hạt cao hơn nhưng hàm lượng protein thấp hơn trong hạt đậu tương.

Sự biểu hiện gen *ERFA* tiếp tục được so sánh giữa 82 mẫu đậu tương hoang dã và 183 mẫu đậu tương trồng trọt. Quan sát thấy sự biểu hiện *ERFA* thấp hơn đáng kể ở đậu tương trồng trọt so với đậu tương hoang dã, phần lớn tương quan với hàm lượng dầu cao ở đậu tương trồng trọt nhưng hàm lượng dầu thấp ở đậu tương hoang dã (Hình 7k). Hoạt động của vùng khởi động (promoter) của ba kiểu gen *ERFA* cũng được nghiên cứu thêm. Kết quả cho thấy hoạt động của vùng khởi động giảm dần từ Hap1 đến Hap2 và đến Hap3 (Hình 7l), phần lớn phù hợp với mức độ biểu hiện của *ERFA* (Hình 7e,h). Nhìn chung, những kết quả này cho thấy kiểu gen *ERFA* Hap3 tương quan với hoạt động của vùng khởi động thấp, biểu hiện gen thấp, nhưng hàm lượng dầu trong hạt cao.



Hình 7. Phân tích liên kết của các kiểu gen vùng promoter *ERFA* với biểu hiện gen, hàm lượng dầu, hàm lượng protein và hoạt động của promoter. (a) Tóm tắt sự đa dạng nucleotide của *ERFA* trong *Glycine soja* và *Glycine max*. (b) Biến dị alen trong các promoter *ERFA*. (c) Phân bố kiểu gen trong đậu tương hoang dã và đậu tương trồng trọt. (d) Phân tích phát sinh chủng loài của trình tự promoter *ERFA*. (e–g) Phân tích liên kết của ba kiểu gen với biểu hiện *GsERFA* (e), hàm lượng dầu (f) và hàm lượng protein (g) trong đậu tương hoang dã. (h–j) Phân tích liên kết của hai kiểu gen với biểu hiện *GmERFA* (h), hàm lượng dầu (i) và hàm lượng protein (j) trong đậu tương trồng trọt. (k) So sánh biểu hiện *ERFA* giữa đậu tương hoang dã và đậu tương trồng trọt. (l) So sánh hoạt động của ba promoter kiểu gen trong tế bào biểu bì *Nicotiana benthamiana* và phân tích định lượng cường độ phát quang. Thanh lỗi biểu thị độ lệch chuẩn (n = 5). (m) Mô hình hoạt động của *GmERFA* trong việc kiểm soát sự tích lũy dầu trong hạt đậu tương. Đối với (e–k), các đường ngang trong biểu đồ hộp biểu thị giá trị trung vị. Kiểm định *t-test* hai phía được sử dụng để phân tích thống kê. Các chữ cái viết thường từ “a” đến “c” biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3 THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định một chất điều hòa dầu hạt mới là *GmERFA*, hoạt động như một chất ức chế phiên mã đối với sự tích lũy dầu hạt ở đậu tương. *GmERFA* tương tác với *GmNFYA* và ức chế tác dụng kích hoạt của *GmNFYA* lên *GmbZIP123* và *GmZF392*. Đồng thời, *GmERFA* cũng liên kết trực tiếp với các vùng khởi động của *GmbZIP123* và *GmZF392* để ức chế sự biểu hiện của chúng. Hơn nữa, *GmERFA* làm giảm nguồn cung cấp carbon cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp FAs bằng cách nhắm mục tiêu trực tiếp vào các con đường vận chuyển đường và đường phân, do đó ức chế sự tích lũy dầu (Hình 7m). *GmNFYA*, *GmbZIP123* và *GmZF392* đều là các chất điều hòa dầu tích cực (Hình 3 và Hình S5) (Lu, Wei, Li, và cs, 2021; Lu và cs, 2016; Song và cs, 2013). Nghiên cứu của chúng tôi tiết lộ một mô-đun mới *GmERFA-GmNFYA-GmbZIP123/GmZF392* cho quá trình tích lũy dầu, cung cấp các mục tiêu đầy hứa hẹn cho thiết kế phân tử nhằm lai tạo giống đậu tương có hàm lượng dầu cao.

Trong quá trình thuần hóa đậu tương, sự gia tăng hàm lượng dầu trong hạt thường đi kèm với sự giảm hàm lượng protein, và nhìn chung, hàm lượng dầu trong hạt có tương quan thuận với kích thước/khối lượng hạt (Hu, Liu, Wei, và cs, 2023). Quá trình sinh tổng hợp lipid ở thực vật được điều chỉnh bởi nhiều yếu tố (Wei và cs, 2025), và chỉ có một số ít nghiên cứu báo cáo rằng các yếu tố phiên mã AP2/ERF tham gia vào quá trình này. WRI1, thuộc loại yếu tố phiên mã này, đã được ghi nhận rộng rãi là có khả năng tăng cường hàm lượng axit béo trong hạt ở nhiều loài thực vật khác nhau, bao gồm *Arabidopsis*, lúa mì, gạo, ngô và đậu tương (Baud và cs, 2009; Duan và cs, 2022; Shen và cs, 2010; Snell và cs, 2022; Wang và cs, 2022). Trong nghiên cứu này, *GmERFA* được xác định là chất điều hòa âm tính đối với sự tích lũy dầu trong đậu tương. Bằng cách chỉnh sửa gen *GmERFA* và gen tương đồng *GmERFB* bằng công nghệ CRISPR/Cas9, hàm lượng dầu trong hạt đậu tương có thể được tăng cường từ 4,4% đến 5,4%, kèm theo sự gia tăng từ 5,3% đến 8,8% khối lượng 100 hạt (Hình 2). Ở cây đậu tương *GmERFA-OX*, hàm lượng protein trong hạt tăng bù trừ từ 4,4 – 4,5% (Hình 1n). Những phát hiện này chứng minh rằng *GmERFA* thể hiện tác động điều hòa đa dạng lên quá trình sinh tổng hợp lipid, tích lũy protein và kiểm soát kích thước/khối lượng hạt. Việc chỉnh sửa gen *GmERFA* bằng các phương pháp di truyền, kết hợp với phương pháp lai tạo truyền thống, được kỳ vọng sẽ tạo ra các giống đậu tương có hàm lượng dầu cao và năng suất cao.

Mạng lưới NF-Y và sự điều hòa vận chuyển đường đã được chứng minh là có ảnh hưởng quan trọng đến quá trình sinh tổng hợp dầu (Wei và cs, 2025). Mô-đun điều hòa *GmNFYA-GmZF392-GmZF351* đã được chứng minh là có ý nghĩa rất quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp dầu đậu tương trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Lu, Wei, Li, và cs, 2021). Công trình nghiên cứu trước đây của chúng tôi cũng tiết lộ rằng *GmbZIP123* thúc đẩy hàm lượng FAs bằng cách điều hòa sự vận chuyển đường thông qua việc nhắm mục tiêu trực tiếp vào các gen *SUC* và *cwINV* (Song và cs, 2013). Trong nghiên cứu hiện tại, chúng tôi tiếp tục chứng

minh rằng *GmNFYA*, *GmbZIP123* và *GmZF392* là cần thiết để tăng mức FAs bằng cách sử dụng phương pháp chỉnh sửa gen và/hoặc thử nghiệm rẽ tơ chuyển gen (Hình 3 và Hình S5). Nghiên cứu của chúng tôi kết nối *GmERFA* với con đường trung gian *GmNFYA*, thiết lập một mạng lưới phân tử mới *GmERFA-GmNFYA-GmZF392/GmbZIP123* liên quan đến bốn yếu tố phiên mã. Cần lưu ý rằng, trong khi *GmERFA* có thể thực hiện chức năng của nó thông qua tương tác vật lý với *GmNFYA*, nó cũng trực tiếp ức chế sự biểu hiện của các gen trung tâm *GmbZIP123* và *GmZF392*, từ đó ảnh hưởng đến các gen hạ nguồn khác như *GmSWEET10a/b*, *GmSUC1/2*, *GmPK1*, *GmENO2*, *GmKASIII-1/2/3*, *GmBCCP2*, *GmTAG1-1/2*, *GmOLEO2-1/2* và *GmWR11-1/2*, tham gia vào các quá trình từ vận chuyển đường, đường phân, đến sinh tổng hợp axit béo, lắp ráp TAG và hình thành thể dầu.

Trong quá trình phát triển hạt đậu tương, sự tích lũy dầu bắt đầu ở giai đoạn chín sớm, đạt đỉnh điểm ở giai đoạn chín giữa và giảm dần ở giai đoạn chín muộn (Collakova và cs, 2013). Sự suy giảm này cho thấy sự tồn tại của các chất điều hòa âm tính hoạt động như một phanh hãm đối với sự tích lũy dầu. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, để thực hiện hiệu quả việc “hãm” quá trình sinh tổng hợp dầu, điều cần thiết không chỉ là ức chế các gen liên quan đến tổng hợp dầu mà còn phải giảm lượng tiền chất bằng cách hạn chế vận chuyển đường và ức chế quá trình chuyên hóa đường (Hình 6). Biểu hiện của *GmERFA* hiện tại cho thấy xu hướng tăng dần và tăng mạnh ở giai đoạn sau của quá trình phát triển hạt (Hình 1d), phù hợp với vai trò ức chế của nó trong quá trình tích lũy dầu trong hạt, có thể đại diện cho một gen hãm để kiểm soát dầu. Cần lưu ý rằng, trong khi *GmERFA* cho thấy sự gia tăng rõ rệt ở giai đoạn sau của quá trình phát triển hạt, các gen hạ nguồn *GmbZIP123* và *GmZF392* lại thể hiện sự giảm và/hoặc biểu hiện thấp (Hình S7), có lẽ phản ánh vai trò ức chế đối với biểu hiện của hai gen này. Cần đề cập rằng, mặc dù biểu hiện của gen điều hòa dầu tích cực *GmNFYA* cũng cho thấy sự gia tăng vừa phải, nhưng các protein *GmERFA* được biểu hiện cao có thể tương tác và ức chế hoạt động của *GmNFYA*, do đó dẫn đến sự điều hòa giảm cuối cùng của *GmbZIP123* và biểu hiện thấp của *GmZF392* đối với việc điều hòa dầu. Gen *GmERFA* có khả năng hoạt động chủ yếu ở giai đoạn chín muộn của quá trình phát triển hạt đậu tương, ức chế sự tích lũy dầu và do đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc hoàn thành toàn bộ vòng đời của hạt đậu tương. Xét rằng chúng ta đã xác định được một số yếu tố phiên mã bao gồm các chất điều hòa tích cực *GmDOF4/11* (Wang và cs, 2007), *GmbZIP123* (Song và cs, 2013), *GmMYB73* (Liu và cs, 2014), *GmDREBL* (Zhang và cs, 2016), *GmNFYA* (Lu, Wei, Li, và cs, 2021), *GmZF351* (Li, Lu, và cs, 2017) và *GmZF392* (Lu, Wei, Li, và cs, 2021), cũng như chất điều hòa âm tính hiện tại *GmERFA*, vẫn chưa rõ tại sao đậu tương cần nhiều yếu tố để kiểm soát hàm lượng dầu. Có thể các yếu tố này hoạt động ở các giai đoạn và/hoặc quá trình khác nhau, riêng lẻ hoặc kết hợp, để phân bổ nguồn/dịch hợp hợp lý và đạt được mức dầu/protein phù hợp, tạo ra hạt giống giúp sinh sản và tồn tại tốt hơn trong môi trường. Trên thực tế, một vài gen trong số này cũng tham gia vào khả năng chịu đựng stress phi sinh học (Lu, Wei, Tao, và cs, 2021; Wei và cs, 2023).

Đậu tương trồng trọt hiện đại được thuần hóa từ loài tổ tiên hoang dã *Glycine soja* ở Trung Quốc khoảng 6.000 – 9.000 năm trước, trải qua những thay đổi đáng kể về

hình thái và sinh lý (Zhou và cs, 2015). Mặc dù khối lượng hạt và hàm lượng dầu trong hạt đậu tương rất khác nhau, nhưng nhìn chung đậu tương trồng trọt tạo ra hạt lớn hơn với hàm lượng dầu cao hơn so với đậu tương hoang dã (Kim và cs, 2012). Một số gen đậu tương được thuần hóa góp phần làm tăng hàm lượng dầu trong hạt đã được xác định, chẳng hạn như *GmDREBL*, *GmZF351* và *GmZF392* (Li, Lu, và cs, 2017; Lu, Wei, Li, và cs, 2021; Zhang và cs, 2016). Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy rằng *GmERFA* đã trải qua quá trình chọn lọc mạnh mẽ trong quá trình thuần hóa đậu tương. Điều thú vị là, alen ưu tú Hap3 của *ERFA* thể hiện hoạt động của promoter và biểu hiện gen giảm nhưng hàm lượng dầu trong hạt và khối lượng hạt tăng đáng kể (Hình 7 và Hình S9). Alen này có thể đã chịu sự chọn lọc tích cực trong quá trình thuần hóa đậu tương và trở nên cố định trong các giống đậu tương trồng trọt.

Mặc dù *GmERFA* hiện tại tương tác và ức chế chức năng của *GmNFYA* để ảnh hưởng đến sự tích lũy dầu trong cùng một con đường, nhưng vai trò của chúng trong việc kiểm soát kích thước/khối lượng hạt là khác nhau. Cây đậu tương chuyển gen *GmERFA*-OX tạo ra hạt nhỏ hơn trong khi các đột biến của nó tạo ra hạt lớn hơn so với cây đối chứng (Hình 1 và 2). Ngược lại, hạt đậu tương chuyển gen *GmNFYA*-OE (Lu, Wei, Li, và cs, 2021) và hạt đột biến của nó rất giống với hạt đậu tương kiểu hoang dại (WT) (Hình 3g và Hình S4d-f). Cây đậu tương mang gen hạ nguồn *GmZF392*-OX không cho thấy sự khác biệt đáng kể về kích thước/khối lượng hạt so với nhóm đối chứng (Lu, Wei, Li, và cs, 2021). Những dữ kiện này cho thấy *GmERFA* có thể điều chỉnh kích thước/khối lượng hạt thông qua các con đường thay thế chứ không phải thông qua con đường *GmNFYA*. Nghiên cứu sâu hơn có thể làm sáng tỏ các thành phần và cơ chế liên quan.

Tóm lại, chúng tôi đã xác định được yếu tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF là *GmERFA*, điều hòa tiêu cực sự tích lũy dầu trong hạt đậu tương thông qua con đường điều hòa *GmERFA*-*GmNFYA*-*GmZF392*/*GmbZIP123*. Gen *GmERFA* tương tác với *GmNFYA* để ức chế sự hoạt hóa phiên mã do *GmNFYA* điều hòa của các gen điều hòa dầu tích cực *GmZF392* và *GmbZIP123*, dẫn đến giảm mức dầu. *GmERFA* cũng có thể trực tiếp ức chế sự biểu hiện của *GmZF392* và *GmbZIP123* để ức chế quá trình sinh tổng hợp dầu. Nghiên cứu của chúng tôi tìm ra một gen hãm kiểm soát dầu. Việc thao tác gen này, alen ưu tú của nó và toàn bộ con đường điều hòa có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc lai tạo giống đậu tương và/hoặc các loại cây họ đậu và cây trồng khác có hàm lượng dầu cao và/hoặc năng suất cao.

4.1. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

4.1. Các dòng đậu tương được sử dụng trong nghiên cứu này

Mười lăm giống đậu tương có nguồn gốc từ vùng Đông Bắc Trung Quốc, bao gồm 11-1615, 15-2293, KD48, KD57, C14-546-1, 17-2220, 11-1669, HN75, KN23, KN18, HF52, HN68, HN66, HF50 và BD5. Mười tám giống đậu tương khác có nguồn gốc từ vùng Hoàng-Hoài-Hải, bao gồm YD12, KX3, XJ2, MC6, JD38, Z92116, GY3, Z8904, SD288, JH13, QH33, ZH35, KD4, ZH45, 92-88, HB-3, WX2 và M9449.

4.2. Vật liệu thực vật

Cây đậu tương được trồng trong chậu/trên ruộng ở Bắc Kinh, Trung Quốc, từ tháng 5 đến tháng 10, hoặc trồng trong nhà kính từ tháng 12 đến tháng 5. Cây *Arabidopsis thaliana* và *Nicotiana benthamiana* được trồng trong nhà kính ở nhiệt độ 22°C với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối.

4.3. Biến đổi gen cây *Arabidopsis* và đậu tương

Việc tạo ra cây *Arabidopsis* biểu hiện quá mức *GmERFA* được thực hiện trên giống Col-0 thông qua phương pháp nhúng hoa như đã mô tả trước đây (Hu, Liu, Lu, và cs, 2023). Vùng mã hóa (CDS) của *GmERFA* được chèn vào phía hạ lưu của promoter CaMV 35S trong vector pBI121. Giống đậu tương Jack được sử dụng làm cây chuyển gen để tạo ra tất cả các cây đột biến và đậu tương chuyển gen. Cây đậu tương biểu hiện quá mức gen *GmERFA* được tạo ra từ Bio Run Group (<http://admin.biorun.com>) bằng phương pháp chuyển đổi gen qua đốt lá mầm nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Các đột biến *gmerfa/b* và *gmnfya/a'* được tạo ra bằng hệ thống CRISPR/Cas9 tại Wei Mi Group (<http://www.wimibio.com>). Rễ lông chuyển gen ở giống đậu tương Kefeng1 được tạo ra thông qua phương pháp chuyển đổi gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogene* K599 như đã mô tả trước đây (Wei và cs, 2023).

4.4. Sàng lọc thư viện gen trong nấm men

Việc sàng lọc thư viện gen trong nấm men được thực hiện bằng hệ thống Y2HGold-GAL4 với bộ kit sàng lọc thư viện gen lai tạo hai gen trong nấm men (Coolaber YH2010-1T). Các gen từ các bộ phận khác nhau của cây đậu tương, chẳng hạn như rễ, lá và hạt, được đưa vào thư viện cDNA và được sử dụng để sàng lọc thư viện gen trong nấm men.

4.5. Thử nghiệm tương tác hai gen nấm men

Thử nghiệm tương tác hai gen nấm men được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống chuyển đổi gen nấm men Yeast-maker™ Yeast Transformation System 2 (Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các plasmid lai ghép được đồng chuyển vào tế bào chủng nấm men AH109.

4.6. Thử nghiệm bổ sung luciferase phân tách (Split-LUC)

Các cấu trúc *GmERFA*-nLUC và *GmNFYA*-cLUC được chuyển vào chủng *A. tumefaciens* EHA105, và sau đó được đồng xâm nhiễm vào lá thuốc lá. Hoạt tính LUC được phân tích 48 giờ sau khi xâm nhiễm bằng hệ thống hình ảnh Night-SHADE LB 985 (Berthold, Rừng Đen, Đức).

4.7. Thử nghiệm bổ sung huỳnh quang lưỡng phân tử (BiFC)

Vùng mã hóa (CDS) của *GmERFA* và *GmNFYA* được nhân bản vào vector pCAMBIA2300-nYFP và vector pCAMBIA2300-cYFP tương ứng. Tất cả các vector được đưa vào chủng *A. tumefaciens* EHA105 và tiếp tục được biểu hiện tạm thời trong lá *Nicotiana benthamiana*. Tín hiệu huỳnh quang được quan sát bằng kính hiển vi quét laser confocal (Zeiss; LSM710).

4.8. Thử nghiệm đồng kết tủa miễn dịch (Co-IP)

Thử nghiệm Co-IP được thực hiện như mô tả trước đây (Hu, Liu, Tao, và cs, 2023) sử dụng hệ thống biểu hiện protein mầm lúa mì năng suất cao TNT® SP6 (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự mã hóa của GmERFA được ghép nối với gen GFP trong vector pF3 WG (BYDV) Flexi®, và trình tự mã hóa (CDS) của GmNFYA được ghép nối với trình tự thẻ 3×myc trong vector pF3 WG (BYDV) Flexi®. Các hạt anti-GFP (Chromotek) được sử dụng cho xét nghiệm Co-IP, và kháng thể anti-myc (Abmart) và kháng thể anti-GFP (Abmart) được sử dụng để phát hiện thêm.

4.9. Xét nghiệm RT-qPCR

Tổng RNA được chiết xuất bằng phương pháp thuốc thử TRIzol (Ambion) cho mô *Arabidopsis* hoặc dung dịch đệm CTAB cho mô đậu tương. Hỗn hợp SYBR Green PCR Master Mix (Takara, Maebashi, Nhật Bản) và máy Roche LightCycler 480 II được sử dụng cho phân tích RT-qPCR. Biểu hiện gen của *GmTubulin* (*Glyma.17G258300*) và *AtActin* (*AT3G18780*) được sử dụng làm đối chứng nội bộ cho đậu tương và *Arabidopsis*, tương ứng. Các mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê trong Bảng S6.

4.10. Định vị dưới tế bào

Các cấu trúc GmERFA-GFP và GmHY5-RFP được chuyển nạp vào chủng *A. tumefaciens* EHA105 và được đồng thời thâm thấu vào lá thuốc lá. GmHY5-RFP được sử dụng làm chất marker nhân. Tín hiệu huỳnh quang được quan sát bằng kính hiển vi quét laser confocal (Zeiss; LSM710).

4.11. Đo lường hoạt động điều hòa phiên mã

Thí nghiệm đo hoạt động điều hòa phiên mã được thực hiện trên tế bào trần *Arabidopsis* và lá *Nicotiana benthamiana* như đã mô tả trước đây (Bian và cs, 2019). Vi khuẩn *Agrobacterium* EHA105 mang vector pCAMBIA2300-GUS được sử dụng làm đối chứng âm cho *Nicotiana benthamiana*. Gen Renilla LUC được sử dụng làm đối chứng nội bộ cho thí nghiệm trên tế bào trần *Arabidopsis*.

4.12. Thí nghiệm ChIP-qPCR (Kết tủa miễn dịch chromatin - Phản ứng chuỗi polymerase định lượng)

Thí nghiệm ChIP-qPCR được thực hiện như đã mô tả trước đây (Hu, Liu, Tao, và cs, 2023). Kháng thể chống GFP (MBL, Tokyo, Nhật Bản) được sử dụng để kết tủa miễn dịch phức hợp protein-DNA. Phản ứng qPCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn DNA đã được kết tủa miễn dịch. Các mẫu được sử dụng trong thí nghiệm qPCR được liệt kê trong Bảng S6.

4.13. Thử nghiệm dịch chuyển điện di (EMSA)

Thử nghiệm EMSA được thực hiện như mô tả trước đây (Hu, Liu, Lu, và cs, 2023) bằng cách sử dụng bộ kit EMSA phát quang hóa học dịch chuyển ánh sáng (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.14. Đo hàm lượng axit béo và protein

Hàm lượng axit béo được đo như mô tả trước đây (Lu, Wei, Li, và cs, 2021). Hệ thống sắc ký khí (GC) (GC-2014; Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản) được sử dụng để phân tích FA. Axit heptadecanoic (Sigma) được sử dụng làm chất đối chứng nội bộ. Hàm lượng protein được phân tích bằng phương pháp đốt cháy Dumas. Tổng lượng nitơ được đo và sau đó được chuyển đổi thành tổng hàm lượng protein (Miller và cs, 2007).

4.15. Đo tổng hàm lượng dầu

Tổng hàm lượng dầu được đo như mô tả trước đây (Yuan và cs, 2024) với một số sửa đổi ngắn gọn. Thêm 100 mg bột hạt khô vào 650 μ L hexane và trộn đều. Ủ hỗn hợp qua đêm trong tủ âm lạnh ở 37°C, sau đó ly tâm. Hàm lượng lipid tổng được xác định bằng cách tính toán sự thay đổi trọng lượng của ống ly tâm và chuẩn hóa theo trọng lượng ban đầu của bột hạt.

4.16. Đo hàm lượng đường hòa tan

Hàm lượng đường hòa tan được đo như mô tả trước đây (Lu, Wei, Li, và cs, 2021). Phương pháp axit thiobarbituric (TBA) được sử dụng để đo hàm lượng đường hòa tan.

4.17. Đo các thành phần đường hòa tan riêng lẻ

Hàm lượng đường hòa tan riêng lẻ được đo như mô tả trước đây với một số sửa đổi ngắn gọn (Fiehn và cs, 2000). Khoảng 6 mg hạt đậu tương sấy đông khô được sử dụng để chiết xuất. Nồng độ các chất chuyển hóa được tính toán bằng phương pháp chuẩn nội và chuẩn hóa theo trọng lượng khô đơn vị của mẫu.

4.17.1 Số hiệu truy cập

GmERFA (*Glyma.02G016100*), *GmERFB* (*Glyma.10G016500*), *GmNFYA* (*Glyma.02G303800*), *GmNFYA'* (*Glyma.14G010000*), *GmZF392* (*Glyma.12G205700*), *GmbZIP123* (*Glyma.06G010200*), *GmKASIII-1* (*Glyma.15G003100*), *GmKASIII-2* (*Glyma.18G211400*), *GmKASIII-3* (*Glyma.09G277400*), *GmBCCP2* (*Glyma.19G028800*), *GmTAG1-1* (*Glyma.13G106100*), *GmTAG1-2* (*Glyma.17G053300*), *GmOLEO2-1* (*Glyma.16G071800*), *GmOLEO2-2* (*Glyma.19G063400*), *GmWR11-1* (*Glyma.15G221600*), *GmWR11-2* (*Glyma.08G227700*), *GmSWEET10a* (*Glyma.15G049200*), *GmSWEET10b* (*Glyma.08G183500*), *GmSUC1* (*Glyma.16G157100*), *GmSUC2* (*Glyma.20G174100*), *GmPK1* (*Glyma.05G079651*), *GmENO2* (*Glyma.16G204600*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Baud, S., J. P. Boutin, M. Miquel, L. Lepiniec, and C. Rochat. 2002. "An Integrated Overview of Seed Development in *Arabidopsis thaliana* Ecotype WS." *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 151–160.

- Baud, S., S. Wuillème, A. To, C. Rochat, and L. Lepiniec. 2009. "Role of WRINKLED1 in the Transcriptional Regulation of Glycolytic and Fatty Acid Biosynthetic Genes in Arabidopsis." *Plant Journal* 60: 933–947.
- Bian, X. H., W. Li, C. F. Niu, et al. 2019. "A Class B Heat Shock Factor Selected for During Soybean Domestication Contributes to Salt Tolerance by Promoting Flavonoid Biosynthesis." *New Phytologist* 225: 268–283.
- Cheng, Z. H., Y. D. Zhu, X. Y. He, et al. 2025. "Transcription Factor PagERF110 Inhibits Leaf Development by Direct Regulating PagHB16 in Poplar." *Plant Science* 350: 112309.
- Collakova, E., D. Aghamirzaie, Y. Fang, et al. 2013. "Metabolic and Transcriptional Reprogramming in Developing Soybean (*Glycine max*) Embryos." *Metabolites* 3: 347–372.
- Ding, F., C. Wang, N. Xu, and M. Wang. 2022. "The Ethylene Response Factor SIERF.B8 Triggers Jasmonate Biosynthesis to Promote Cold Tolerance in Tomato." *Environmental and Experimental Botany* 203: 105073.
- Duan, Z., Q. Li, H. Wang, X. He, and M. Zhang. 2023. "Genetic Regulatory Networks of Soybean Seed Size, Oil and Protein Contents." *Frontiers in Plant Science* 14: 1160418.
- Duan, Z., M. Zhang, Z. Zhang, et al. 2022. "Natural Allelic Variation of GmST05 Controlling Seed Size and Quality in Soybean." *Plant Biotechnology Journal* 20: 1807–1818.
- Fiehn, O., J. Kopka, R. N. Trethewey, and L. Willmitzer. 2000. "Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* 72, no. 15: 3573–3580.
- Guo, H., M. Mao, Y. Deng, et al. 2022. "Multi-Omics Analysis Reveals That SIERF.D6 Synergistically Regulates SGAs and Fruit Development." *Frontiers in Plant Science* 13: 860577.
- Hao, D. Y., Y. Kazuhiko, S. Akinori, and O.-T. Masaru. 2002. "Determinants in the Sequence Specific Binding of Two Plant Transcription Factors, CBF1 and NtERF2, to the DRE and GCC Motifs." *Biochemistry* 41: 4202–4208.
- Haslam, R. P., O. Sayanova, H. J. Kim, E. B. Cahoon, and J. A. Napier. 2016. "Synthetic Redesign of Plant Lipid Metabolism." *Plant Journal* 87: 76–86.
- Hu, Y., Y. Liu, L. Lu, et al. 2023. "Global Analysis of Seed Transcriptomes Reveals a Novel PLATZ Regulator for Seed Size and Weight Control in Soybean." *New Phytologist* 240: 2436–2454.
- Hu, Y., Y. Liu, J. J. Tao, et al. 2023. "GmJAZ3 Interacts With GmRR18a and GmMYC2a to Regulate Seed Traits in Soybean." *Journal of Integrative Plant Biology* 65: 1988–2000.

- Hu, Y., Y. Liu, J. J. Wei, W. K. Zhang, S. Y. Chen, and J. S. Zhang. 2023. "Regulation of Seed Traits in Soybean." *aBIOTECH* 4: 372–385.
- Huang, Y., B. L. Zhang, S. Sun, et al. 2016. "AP2/ERF Transcription Factors Involved in Response to Tomato Yellow Leaf Curly Virus in Tomato." *Plant Genome* 9: 15.
- Huynh, T., K. Van, M. A. R. Mian, and L. K. McHale. 2024. "Single- and Multiple-Trait Quantitative Trait Locus Analyses for Seed Oil and Protein Contents of Soybean Populations With Advanced Breeding Line Background." *Molecular Breeding* 44: 51.
- Kai, C., T. Wensi, Z. Yongbin, et al. 2022. "AP2/ERF Transcription Factor GmDREB1 Confers Drought Tolerance in Transgenic Soybean by Interacting With GmERFs." *Plant Physiology and Biochemistry* 170: 287–295.
- Kim, H. U., S.-J. Jung, K.-R. Lee, et al. 2013. "Ectopic Overexpression of Castor Bean LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) in Arabidopsis Triggers the Expression of Genes That Encode Regulators of Seed Maturation and Oil Body Proteins in Vegetative Tissues." *FEBS Open Bio* 4: 25–32.
- Kim, M. Y., K. Van, Y. J. Kang, K. H. Kim, and S.-H. Lee. 2012. "Tracing Soybean Domestication History: From Nucleotide to Genome." *Breeding Science* 61: 445–452.
- Lee, J., K. D. Bilyeu, and J. G. Shannon. 2007. "Genetics and Breeding for Modified Fatty Acid Profile in Soybean Seed Oil." *Journal of Crop Science and Biotechnology* 10: 201–210.
- Li, D., C. Jin, S. Duan, et al. 2017. "MYB89 Transcription Factor Represses Seed Oil Accumulation." *Plant Physiology* 173: 1211–1225.
- Li, Q. T., X. Lu, Q. X. Song, et al. 2017. "Selection for a Zinc-Finger Protein Contributes to Seed Oil Increase During Soybean Domestication." *Plant Physiology* 173: 2208–2224.
- Li, Y., K. Liu, G. Tong, et al. 2022. "MPK3/MPK6-Mediated Phosphorylation of ERF72 Positively Regulates Resistance to Botrytis Cinerea Through Directly and Indirectly Activating the Transcription of Camalexin Biosynthesis Enzymes." *Journal of Experimental Botany* 73: 413–428.
- Liu, Y. F., Q. T. Li, X. Lu, et al. 2014. "Soybean GmMYB73 Promotes Lipid Accumulation in Transgenic Plants." *BMC Plant Biology* 14: 73.
- Lu, L., W. Wei, Q. T. Li, et al. 2021. "A Transcriptional Regulatory Module Controls Lipid Accumulation in Soybean." *New Phytologist* 231: 661–678.
- Lu, L., W. Wei, J. J. Tao, et al. 2021. "Nuclear Factor Y Subunit GmNFYA Competes With GmHDA13 for Interaction With GmFVE to Positively Regulate Salt Tolerance in Soybean." *Plant Biotechnology Journal* 19: 2362–2379.

- Lu, X., Q. T. Li, Q. Xiong, et al. 2016. "The Transcriptomic Signature of Developing Soybean Seeds Reveals the Genetic Basis of Seed Trait Adaptation During Domestication." *Plant Journal* 86: 530–544.
- Manan, S., B. Chen, G. She, X. Wan, and J. Zhao. 2017. "Transport and Transcriptional Regulation of Oil Production in Plants." *Critical Reviews in Biotechnology* 37: 641–655.
- Miller, E., A. Bimbo, S. Barlow, and B. Sheridan. 2007. "Repeatability and Reproducibility of Determination of the Nitrogen Content of Fishmeal by the Combustion (Dumas) Method and Comparison With the Kjeldahl Method: Interlaboratory Study." *Journal of AOAC International* 90, no. 1: 6–20.
- Neogy, A., T. Garg, A. Kumar, et al. 2019. "Genome-Wide Transcript Profiling Reveals an Auxin-Responsive Transcription Factor, OsAP2/ERF-40, Promoting Rice Adventitious Root Development." *Plant and Cell Physiology* 60: 2343–2355.
- Nguyen, Q. T., A. Kisiala, P. Andreas, R. J. Neil Emery, and S. Narine. 2016. "Soybean Seed Development: Fatty Acid and Phytohormone Metabolism and Their Interactions." *Current Genomics* 17: 241–260.
- Patil, G., T. D. Vuong, S. Kale, et al. 2018. "Dissecting Genomic Hotspots Underlying Seed Protein, Oil, and Sucrose Content in an Interspecific Mapping Population of Soybean Using High-Density Linkage Mapping." *Plant Biotechnology Journal* 16: 1939–1953.
- Ruuska, S. A., T. Girke, C. Benning, and J. B. Ohlrogge. 2002. "Contrapuntal Networks of Gene Expression During Arabidopsis Seed Filling." *The Plant Cell* 14: 1191–1206.
- Shen, B., W. B. Allen, P. Zheng, et al. 2010. "Expression of ZmLEC1 and ZmWRI1 Increases Seed Oil Production in Maize." *Plant Physiology* 153: 980–987.
- Snell, P., M. Wilkinson, G. J. Taylor, et al. 2022. "Characterisation of Grains and Flour Fractions From Field Grown Transgenic Oil-Accumulating Wheat Expressing Oat WRI1." *Plants* 11: 889.
- Song, Q. X., Q. T. Li, Y. F. Liu, et al. 2013. "Soybean GmbZIP123 Gene Enhances Lipid Content in the Seeds of Transgenic Arabidopsis Plants." *Journal of Experimental Botany* 64: 4329–4341.
- Teng, K., N. Zhao, Y. Xie, R. Li, and J. Li. 2024. "An AP2/ERF Transcription Factor Controls Generation of the Twin-Seedling Rice." *Journal of Advanced Research* 24: 590–593.
- Wang, H. W., B. Zhang, Y. J. Hao, et al. 2007. "The Soybean Dof-Type Transcription Factor Genes, GmDof4 and GmDof11, Enhance Lipid Content in the Seeds of Transgenic Arabidopsis Plants." *Plant Journal* 52: 716–729.

- Wang, L., C. Wang, L. Qin, W. Liu, and Y. Wang. 2015. “ThERF1 Regulates Its Target Genes via Binding to a Novel Cis-Acting Element in Response to Salt Stress.” *Journal of Integrative Plant Biology* 57: 838–847.
- Wang, S., S. Liu, J. Wang, et al. 2020. “Simultaneous Changes in Seed Size, Oil Content and Protein Content Driven by Selection of SWEET Homologues During Soybean Domestication.” *National Science Review* 7: 1776–1786.
- Wang, Z., M. Chen, T. Chen, et al. 2014. “TRANSPARENT TESTA2 Regulates Embryonic Fatty Acid Biosynthesis by Targeting FUSCA3 During the Early Developmental Stage of Arabidopsis Seeds.” *Plant Journal* 77: 757–769.
- Wang, Z., Y. Wang, P. Shang, et al. 2022. “Overexpression of Soybean GmWRI1a Stably Increases the Seed Oil Content in Soybean.” *International Journal of Molecular Sciences* 23: 5084.
- Wei, W., L. Lu, X. H. Bian, et al. 2023. “Zinc-Finger Protein GmZF351 Improves Both Salt and Drought Stress Tolerance in Soybean.” *Journal of Integrative Plant Biology* 65: 1636–1650.
- Wei, W., L. F. Wang, J. J. Tao, et al. 2025. “The Comprehensive Regulatory Network in Seed Oil Biosynthesis.” *Journal of Integrative Plant Biology* 67, no. 3: 649–668.
- Yang, M., C. Du, M. Li, et al. 2024. “The Transcription Factors GmVOZ1A and GmWRI1a Synergistically Regulate Oil Biosynthesis in Soybean.” *Plant Physiology* 197: 485.
- Yuan, X., X. Jiang, M. Zhang, et al. 2024. “Integrative Omics Analysis Elucidates the Genetic Basis Underlying Seed Weight and Oil Content in Soybean.” *The Plant Cell* 36: 2160–2175.
- Zhang, D., H. Zhang, Z. Hu, et al. 2019. “Artificial Selection on GmOLEO1 Contributes to the Increase in Seed Oil During Soybean Domestication.” *PLoS Genetics* 15: e1008267.
- Zhang, Y. Q., X. Lu, F. Y. Zhao, et al. 2016. “Soybean GmDREBL Increases Lipid Content in Seeds of Transgenic Arabidopsis.” *Scientific Reports* 6: 34307.
- Zhou, L., A. Iqbal, M. Yang, and Y. Yang. 2025. “Research Progress on Gene Regulation of Plant Floral Organogenesis.” *Genes* 16: 79.
- Zhou, Z., Y. Jiang, Z. Wang, et al. 2015. “Resequencing 302 Wild and Cultivated Accessions Identifies Genes Related to Domestication and Improvement in Soybean.” *Nature Biotechnology* 33: 408–414.