大豆雄蕊优势表达基因 GmARFA1a

通过调控花粉萌发影响结实率

姚士恩, 王一帆, 王宁, 周铭辉, 陈一飞, 张曼婷, 李嘉欣, 宫雯珺, 方小龙, 李美娜

(广东省植物适应性与分子设计重点实验室/分子遗传与进化创新研究中心/广州大学生命科学学院,广州 510006)

摘要:大豆(Glycine max(L.) Merr.)是自花授粉作物,通过人工去雄的办法生产杂交种,不仅繁琐且成本高。以雄性不 育系为母本,通过虫媒传粉,进行大规模制种可有效解决大豆杂交种生产的难题。雄性不育基因功能的研究是大豆杂种优势 利用的前提之一,大豆雄性不育位点报道较少,定位及功能研究进展缓慢。随着大豆转基因体系的成熟及生物技术的发展, 使得利用反向遗传学的办法研究大豆雄性不育基因的功能变得相对容易。本研究通过转录组数据分析发现大豆中编码小G蛋 白的 GmARFA1a 受到大豆雄性育性控制基因 MS1 (Male Sterile 1)和 MS2 的调控,公共数据库数据表明 GmARFA1a在大豆未 开放的花中表达量最高,而 qRT-PCR 数据进一步明确 GmARFA1a在大豆授粉前雄蕊中优势表达。对获得的 CRISPR/Cas9 基 因敲除 Gmarfa1a 突变体表型进行分析,发现其花粉萌发率及结实率受到明显抑制。本研究对 GmARFA1a 基因功能进行了初 步解析,明确其对大豆雄性育性存在一定影响。这不仅丰富了我们对 GmARFA1a 乃至 ARF 基因家族成员功能的认识,也为后 续深入研究大豆 GmARFA1a 功能及大豆杂种优势利用奠定了基础。

关键词: 大豆; 杂种优势; 雄性不育基因; 基因编辑技术; 花粉活力

The Soybean Stamen-preferentially Expressed Gene GmARFA1a

Regulates Seed Setting Rate by Controlling Pollen Germination

YAO Shien, WANG Yifan, WANG Ning, ZHOU Minghui, CHEN Yifei, ZHANG Manting, LI Jiaxin, GONG

Wenjun, FANG Xiaolong, LI Meina

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Adaptation and Molecular Design/ Innovative Center of Molecular Genetics and Evolution/School of Life

Sciences, Guangzhou University, Guangdong 510006)

Abstract: Soybean (Glycine max (L.) Merr.) is a self-pollinating crop, and producing hybrids through artificial

收稿日期: 修回日期: 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为植物资源利用, E-mail:2278865217@qq.com; 王一帆为共同第一作者

通信作者: 李美娜,研究方向为大豆杂种优势利用和生物钟与环境互作, E-mail: limeina@gzhu.edu.cn

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32072084); National Key Research and Development Program (2021YFF1001200); Guangzhou Basic Research Project Research Project (202201020129); Youth Talent Project (RQ2020029); China Postdoctoral Science Foundation (2022M710873)

基金项目:国家自然科学基金(32072084);国家重点研发计划项目(2021YFF1001200);广州市基础研究计划市校(院)联合资助基础与应用基础研究项目(202201020129);青年人才项目(RQ2020029);中国博士后科学基金(2022M710873)

emasculation is time-consuming and expensive. Large-scale hybrid seed production, based on a male sterile line as the female parent and pollination by insects, provides an effective solution to the challenges. Unlocking the function of the male sterility gene is a prerequisite for harnessing heterosis in soybean. Up to now, only a few loci of male sterility had been reported in soybean, and progress in molecular cloning and functional characterization of related genes lagged behind. Advances in biotechnology and soybean genetic transformation system enabled the possibility to employ reverse genetics methodology for studying the male sterility genes. The transcriptomic data indicated that the small G protein encoding gene *GmARFA1a* was regulated simultaneously by the male sterility gene *MS1 (Male Sterile 1)* and *MS2*; Data from the public library indicated that *GmARFA1a* expression was the highest in unopened soybean flowers; qRT-PCR data demonstrated that *GmARFA1a* was preferentially expressed in stamen before flowering. Functional analysis revealed that the *Gmarfa1a* mutants generated by CRISPR/Cas9 genome editing showed a significant reduction of pollen grain germination and seed setting rate. Collectively, this study identified the *GmARFA1a* and *ARF* gene families but also lay the foundation for further study the function of *GmARFA1a* genes and the utilization of heterosis in soybean.

Key words: Soybean; heterosis; male sterility gene; gene editing technique; pollen viability

大豆含有丰富的蛋白质和油脂,是重要的粮油兼用作物。大豆不仅是人体获取优质蛋白的重要来源, 还是动物饲用蛋白的主要成分^[1,2]。随着经济的发展、居民饮食结构的改变,导致我国大豆消费需求的显著 增加。此外,我国耕作面积有限,加之近年来大豆单产增加缓慢,致使我国大豆生产总量增加幅度较低。 生产量与消费需求间的差值逐年扩大,进一步加剧了大豆的供需矛盾。我国大豆以常规育种为主,制种技 术及单产水平与美国、巴西和阿根廷等国家相比明显落后^[1]。目前,我国大豆产量仅占世界总产量的5%^[3], 该部分占国内消费需求总量比重不足20%,其余部分严重依赖进口。因此,提高我国大豆单产水平、增加大 豆自给率就显得尤为重要。

杂种优势是指两个亲缘关系相近的物种杂交后,所产生的子代在生长势、抗逆性、适应能力和产量等 方面优于亲代的现象^[4-7]。近年来,在全球农作物生产中,对杂种优势的利用取得了巨大经济效益,特别是 玉米(Zea mays L.)、水稻(Oryza sativa L.)等作物,它们一半以上的产量都由杂交品种贡献^[6]。

大豆同样存在杂种优势,其增产幅度可达 20%^[6]。我国大豆杂交育种工作处于世界先进水平,国内育种 家已利用"三系法"育成 42 个大豆杂交种。然而"三系法"育种存在雄性不育性稳定性差和恢复系资源短 缺的问题,此外大豆种子繁殖系数低,这进一步限制大豆杂交种在生产上的大规模推广。新发展的第三代 智能杂交育种技术能够克服上述缺点,给推广大豆杂交种带来了希望。智能杂交育种技术的基本原理是将 花粉育性恢复基因、花粉失活(败育)基因和荧光标记基因作为紧密连锁的元件导入核雄性不育突变体中, 构建含有智能筛选元件 SPT(Seed Production Technology)的保持系,该技术实现了利用转基因手段生产非转基因种子的目的,可以用于大规模的杂交种生产^[7]。

智能杂交育种方法以稳定核雄性不育基因为基础。目前,在大豆中共鉴定到 12 个雄性不育位点(ms1, ms2, ms3, ms4, ms5, ms6, ms7, ms8, ms9, msMOS, msp和 ms_{MJ}),它们分布于 7 条不同的染色体上^[8]。 除 ms3, ms8和 ms9 属于光周期/温度敏感型雄性不育位点外,其余 9 个都是稳定的雄性不育位点。目前 ms1, ms2, ms3, ms4和 ms6 已被成功克隆^[9-15]。其中,Thu 等^[13]成功克隆到 ms4,该基因编码一个具 Plant Homeodomain (PHD)-finger 结构域的转录因子;ms4 与拟南芥中同源基因 MALE MEIOCYTE DEATH 1 (MMD1) 突变后产生的表型一致,表现为四分体退化,花粉败育。2021年,Fang等^[9]通过图位克隆成功 克隆大豆 MS1 基因,发现 MS1 编码一种含马达结构域的驱动蛋白,在减数分裂之后的胞质分裂阶段发挥作用,影响细胞板形成,导致突变体小孢子无法正常分裂。同年,Yu 等^[14]克隆到在大豆花药中高表达的 MS6 基因,MS6 编码一个 MYB 转录因子,转基因实验结果显示大豆 MS6 可以恢复拟南芥 attdf1 突变体不育表型,表明 MS6 与拟南芥 TDF1 之间在调控雄性方面功能保守。Hou 等^[12]在 2022 年成功克隆 MS3,该基因同样编码一个包含 PHD-finger 结构域的核定位蛋白,可以影响碳水化合物代谢相关基因的表达;突变体 ms3 在短日照条件下表现为不育,但是在长日照条件下其育性可以得到恢复。2023 年,Fang 等^[15]又成功对大豆 MS2 进行了克隆,该基因编码在花药中特异表达的 bHLH 转录因子,MS2 在绒毡层和小孢子中发挥作用,直接调控参与次生代谢产物的生物合成和脂质代谢,最终影响小孢子细胞壁形成。通过与同一遗传背景下的 ms1 和 ms6 突变体进行田间实验比较,发现 ms2 突变体的异交率最高^[15]。

ARF(ADP-ribosylation factor)属于小G蛋白超家族的亚家族成员^[16],是二磷酸腺苷核糖基化因子,具 有激活霍乱毒素A亚基(cholera toxin subunit A, CTA)ADP核糖基转移酶活性的能力^[17,18],在调控植物的 雄性育性方面发挥重要作用。2021年,Zhu等^[19]在拟南芥基因组中鉴定了6个*ARFA1s*基因,这些基因均在 发育的花药中表达,其中,*ARFA1b*在小孢子和绒毡层发育过程中表现出优势表达,通过负显性突变(dominant negative, DN)手段干扰*AtARFA1s*功能导致绒毡层功能障碍及花粉败育。Liang等^[20]的研究表明,在拟南芥 中存在3个SAR1蛋白,通过CRISPR/Cas9手段创制*SAR1b*功能缺失突变体,绒毡层细胞程序性死亡延迟, 最终导致植株雄性不育。然而,*SAR1c*的引入能够回补该突变体表型,说明在雄配子体发育过程中*SAR1b* 和*SAR1c*功能存在冗余。Kobayashi-Uehara等^[21]发现,小麦中的*ARF1*主要在花和根中表达。另外,侯磊等 ^[22]在棉花中分离得到的*GhARF1*主要在根、花冠和纤维中表达,而在胚珠、子叶和真叶中表达较弱,推测 其可能参与花粉发育过程。

雄性不育系是重要的作物育种材料,而 ARF 家族在控制植物雄性育性中具有重要作用。为鉴定大豆调 控雄性育性的 ARF 基因,本研究首先利用实验室前期的转录组数据,筛选到受 MSI 和 MS2 共同影响的 GmARFA1a 基因;进一步结合基因表达数据和敲除突变体的表型,明确了 GmARFA1a 调控大豆雄性育性的

功能,这为丰富大豆雄性不育分子机制和开发稳定的雄性不育系统提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

大豆材料 Williams 82(W82)由广州大学分子遗传与进化创新研究中心提供,突变体 *Gmarfala* 及野生型 W82 均种植于广州市(2023 年 7 月至 11 月)。本研究所用的 DH5α大肠杆菌感受态细胞、EHA105 农杆菌感受态细胞均由本实验室制备并保存。用于基因敲除的 pYLCRISPR/Cas9、AtU3d、AtU3b、AtU6-1、AtU6-29 gRNA 均由华南农业大学刘耀光教授惠赠。本研究所用 DNA 提取试剂盒 Nuclean Plant Genomic DNA Kit, RNA 提取试剂盒 MLtrapure RNA Kit 购买于康为世纪生物科技有限公司; 胶回收试剂盒 Easy Pure® Quick Gel Extraction Kit、质粒提取试剂盒以及 PCR 鉴定使用的 2×Taq mix 购买于北京全式金生物技术有限公司; 反转录试剂盒 Easy Pure® Plasmid Mini Prep Kit 购买于 TaKaRa 公司;用于扩增高质量 DNA 片段的 2×Phanta Max Master Mix(Dye Plus)购买于诺唯赞; 用于酶切和连接的限制性内切酶及 T4 DNA ligase 购买于 NEB 公司; 用于荧光定量 PCR 的 SYBR Green I Master 购买于 Roche 公司。

1.2 大豆、拟南芥ARFA1氨基酸序列比对

在 Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/)网站下载王一帆等^[16]报道的 15 条大豆 ARFA1 蛋白 序列及 6 条拟南芥 ARFA1 蛋白序列,利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对分析。

1.3 GmARFA1a在大豆中的表达模式

1.3.1 图形制作

利用实验室的转录组数据以及 Phytozome(https://phytozome-next.jgi.doe.gov/)公共数据库中大豆转录 组数据,使用 TBtools 进行热图绘制,或者使用 WPS 软件中的 Excel 功能进行表达模式柱状图绘制。

1.3.2 荧光定量PCR(qRT-PCR)

取大豆三个时期(早期、将授粉阶段及授粉后阶段)花器官(花萼、花瓣、雄蕊及雌蕊)和成熟叶片, 用液氮研磨至粉末状,参照RNA提取试剂盒MLtrapure RNA Kit说明书提取RNA。取质检合格的RNA,参照 反转录试剂盒RrimeScriptTMRT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)说明书进行反转录。qRT-PCR 的具体步骤参照SYBR Green I Master Mix说明书,反应体系: SYBR Green I Master Mix 5 µL, cDNA 1 µL, q-ARFA1-F/R (10 µM)或F-box-F/R (10 µM)各0.3 µL, ddH₂0 (RNA free)补足10 µL。qRT-PCR结果采用 2^{-ΔΔCt}值进行计算,每个样品进行三次生物学重复。

1.4 Gmarfala转基因植株创制

1.4.1 筛选靶点,设计引物

利用靶点预测网站MMEJ-KO(http://skl.scau.edu.cn/mmejko/)对GmARFA1a基因进行预测,选取四个编

辑效率高的特异性靶点(图4),并分别命名为ARFA1-T1/T2/T3/T4。同时,设计四对引物,它们分别带有 启动子接头AtU3d,AtU3b,AtU6-1和AtU6-29(表1)。

表 1 GmARFA1a 基因编辑靶点及引物序列

 Table 1 Primers and sequences of gene editing targets of GmARFA1a

名称	靶点序列(5`-3`)	正向引物(5`-3`)	反向引物 (5`-3`)
Name	Target sequence (5'-3')	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
ARFA1-T1	GGTACAGCCCAAATAGGTGG	gtcaCCACCTATTTGGGATGTACC	aaacGGTACAGCCCAAATAGGTGG
ARFA1-T2	CTCACACTTATTTCCGATTT	gtcACTCACACTTATTTCCGATTT	aaacAAATCGGAAATAAGTGTGAG
ARFA1-T3	GCACAAGAAACCAACCCTCC	attgGGAGGGTTGGTTTCTTGTGC	aaacGCACAAGAAACCAACCCTCC
ARFA1-T4	CAGATAATGGGGTTGTCCTT	attgCAGATAATGGGGGTTGTCCTT	aaacAAGGACAACCCCATTATCTG

1.4.2 CRISPR/Cas9载体的构建

载体构建过程参考Ma等^[23]和曾栋昌等^[24]的方法。

1.4.3 转化、筛选阳性菌

将1.4.2中连接产物转化DH5α大肠杆菌感受态细胞,具体转化步骤参考DH5α大肠杆菌感受态细胞使用说明书。使用2×Taqmix及引物Cas9F/R(表2)进行菌落PCR及琼脂糖凝胶电泳鉴定,PCR程序的设定参照2×Taqmix使用说明书。选取阳性菌落进行测序。选取测序验证构建成功的菌落,在液态培养基进行扩繁,并随后提取质粒,提取质粒的具体步骤参照质粒提取试剂盒说明书。然后将质粒转化EHA105农杆菌感受态细胞,具体转化步骤参照EHA105农杆菌使用说明书。两天后进行菌落PCR鉴定。挑取筛选到的阳性单克隆菌落,进行摇菌,并采用合适方法进行保存。

1.4.4 转基因植株培养及鉴定

参考杨静等^[25]所用的大豆子叶节农杆菌转化方法进行大豆转化。取转基因植株叶片,用组织研磨仪充 分研磨至粉末状。使用DNA提取试剂盒提取DNA,具体步骤参照DNA提取试剂盒Nuclean Plant Genomic DNA Kit说明书。利用2×Taq mix及SP1/SP3骨架鉴定引物(表2)进行骨架鉴定。在此基础上,利用2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)及靶点检测引物BDJC-ARF-T(表2)对不同靶点进行扩增及测序分析,最后筛选 纯合突变体植株并进行种子的收获。

表 2 本研究用到的扩增引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5`-3`)
Primer name	Primer sequence (5'-3')
Cas9-F2	CAACACCGACCGCCACTC

Cas9-R2	TGCCGCTCTGCTTATCCC	
SP1	CCCGACATAGATGCAATAACTTC	
SP3	GTCGTGCTCCACATGTTGACCGG	
BDJC-ARF-T12-F	ACTTAAGAGAGGATTGTTTGATGC	
BDJC-ARF-T12-R	GGCCGTGTACTGGACTTGAT	
BDJC-ARF-T34-F	CTCCCACCTTAGCTGGTGTT	
BDJC-ARF-T34-R	CATCATGATCTTGCAAGAAG	
q-ARFA1-F	AGGATGCTGAATGAGGACGAA	
q-ARFA1-R	GCTGGCGCAGAGAGTTTAGG	
F-box-F	ATGGTCGCCGTTTAGAACAC	
F-box-R	GGGATAACCAGTGCAGAAGC	

1.5 Gmarfala转基因植株花粉活力鉴定

1.5.1 Gmarfa1a转基因植株花粉I2-KI染色

参照郭凤兰等^[26]和贾顺耕等^[27]实验方法,分别从10株W82、*Gmarfa1a-1*及*Gmarfa1a-2*转基因植株中,选择盛花期的成熟花苞,用75%酒精浸泡2h后,在体式显微镜下使用镊子将花药剥离,然后将其放置于载 玻片上。在花粉粒上滴加100μL7% I₂-KI染液,在染液中将花药夹破,确保花粉充分释放。随后,盖上盖玻 片,放置于荧光显微镜(白光条件)下,使用10倍光学显微镜观察并拍照记录。

1.5.2 Gmarfala转基因植株花粉萌发实验

在上午10点钟左右,分别从W82、*Gmarfa1a-1及Gmarfa1a-2*的转基因植株中取当天开放的花。去除外围 花瓣后,将花粉粒轻轻涂布在萌发培养基上。室温放置一个小时后,使用荧光显微镜(白光条件)观察并 拍照记录。花粉萌发培养基配方: CaCl₂: 0.55 g/L, KCl: 0.373 g/L, H₃BO₃: 10 mg/L, Sucrose: 100 g/L, Agarose: 15 g/L。

1.6 Gmarfala转基因植株结荚及鼓粒情况分析

对于W82、Gmarfa1a-1及Gmarfa1a-2转基因突变体植株,分别选择20个单株进行荚数及结实粒数的统计, 计算结实率(结实率=实际单株种子粒数/理论单株种子粒数)。最后通过GradPad Prism软件绘制柱状图,并 对数据进行单因素方差统计性分析。

2 结果与分析

2.1 大豆 ARFA1 基因家族氨基酸序列特征分析

在大豆中已鉴定出 44 个 ARF 家族成员^[16]。根据其序列特征可将它们分为 8 个亚家族,分别包括 15 个 ARFA1、4 个 ARFB1、2 个 ARF3、4 个 ARFC1、9 个 SARA1、6 个 ARLA1、2 个 ARLB1/GB1 (GTP-binding protein 1) 和 2 个 ARLC1/TTN5 (TITAN5)^[16]。

2005年,Gebbie 等^[28]在拟南芥中鉴定到 6个 *ARFA1* 基因,它们在花药发育过程中表达,且共同参与花的结构发育,并调控育性。为分析大豆 ARFA1 的结构特征,本研究对 6个拟南芥及 15 个大豆 *ARFA1* 基因的氨基酸序列进行比对分析。结果显示,15 个大豆的 ARFA1 结构与其在拟南芥中同源基因结构域基本一致,均具有 1 个位于 N 端的肉豆蔻酰化位点(The myristoylation site),该位点可使其在 N 端形成亲和螺旋结构(图 1)。此外,还有 4 个从 N 端到 C 端依次命名为I-IV的鸟苷酸(GTP/GDP)结合结构域(GTP-binding domains)、2 个与 GEF(guanine nucleotide exchange factors)互作的转换区(Switch I and Switch II)以及 1 个与 GAP(GTPase-activating proteins)互作的结构域(GAP interaction domain)(图 1)。





Fig.1 Amino acid sequence alignment of the ARFA1 gene family in soybean and Arabidopsis

植物中小 G 蛋白依赖分泌途径介导绒毡层与小孢子之间的蛋白质分选^[29,30],这一生物学过程位于前期 研究的 *MS1* 和 *MS2* 基因功能作用的下游^[9,15]。为初步鉴定可能调控大豆雄性育性的 *ARFA1* 基因,本研究利 用实验室的转录组数据,对 15 个大豆 *GmARFA1s* 基因的表达数据进行分析。在这 15 个基因中,只有 *Glyma.09G030900* 基因的表达量在大豆雄性不育突变体 *ms1* 和 *ms2* 花药中显著下调(图 2),提示其可能在 *MS1* 或 *MS2* 基因的下游发挥作用,控制花药发育进而影响育性。为此,本研究将该基因作为调控大豆雄性 育性的候选基因,因其与拟南芥 *ARFA1* 基因同源,于是将其命名为 *GmARFA1a*。



A: GmARFA1a 及同源基因在大豆 MS1/ms1 花药中的表达热图; B: GmARFA1a 及同源基因在大豆 MS2/ms2 花药中的表达热图; C: GmARFA1a 在大豆 MS1/ms1 花药中的表达差异分析; D: GmARFA1a 在大豆 MS2/ms2 花药中的表达差异分析; An1、An2 和 An3 表示花药的三个生物学重复, 柱形图中纵 坐标为三次重复的平均值±标准差; FPKM: 一种用于衡量转录组测序数据中基因表达量的值, 不同颜色及深浅表示不同基因在不同组织表达量的高低; **代表两组数据具有极显著性差异 (P<0.01)

A: Expression heat map of *GmARFA1a* and homologs in anthers of soybean *MS1/ms1*; B: Expression heat map of *GmARFA1a* and homologs in anthers of soybean *MS2/ms2*; C: Expression analysis of *GmARFA1a* in anther of soybean *MS1/ms1* s; D: Expression analysis of *GmARFA1a* in anthers of soybean *MS2/ms2*; C: Expression analysis of *GmARFA1a* in anther of soybean *MS1/ms1* s; D: Expression analysis of *GmARFA1a* in anthers of soybean *MS2/ms2*; C: Expression analysis of *GmARFA1a* in anther of soybean *MS1/ms1* s; D: Expression analysis of *GmARFA1a* in anthers of soybean *MS2/ms2*; C: Expression analysis of *GmARFA1a* in anther of soybean *MS1/ms1* s; D: Expression analysis of *GmARFA1a* in anthers of soybean *MS2/ms2*; An1, An2 and An3 represent three biological replicates of anthers; the ordinate in the histogram is the average of three replicates ± Standard deviation; FPKM: fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, different colors and shades indicate the expression levels of different genes in different

tissues; ** represents a very significant difference between the two sets of data (P<0.01)

图 2 GmARFA1a 及同源基因在 MS1/ms1、MS2/ms2 花药中的表达分析

Fig.2 Expression patterns of GmARFA1a and its homologs in anthers of MS1/ms1 and MS2/ms2

为解析 GmARFA1a 基因功能,本研究首先利用 Phytozome 公共数据库中的大豆表达图谱对 GmARFA1a 基因表达模式进行分析。结果显示,GmARFA1a 基因在大豆未开放的花中表达量最高(图 3A)。为进一步 明确 GmARFA1a 基因发挥功能的时期,本研究将大豆 W82 品种早期、受粉前和授粉后的花苞从外到里分为 花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊四个部分,同时取叶片作为营养生长器官的对照,进行基因表达模式分析。结果 显示,GmARFA1a 在授粉前的雄蕊中表达量最高(图 3B)。以上结果表明 GmARFA1a 基因在授粉前的雄蕊 中优势表达。



A:GmARFA1a 在大豆 W82 不同组织中的表达模式。F-unopen: 未开放的花; F-open: 开放的花; L: 叶片; S: 茎; ST: 茎尖; R: 根; RT: 根尖; LR: 侧根; N: 根瘤; B: qRT-PCR 分析 GmARFA1a 在大豆 W82 不同花器官中的时空表达模式, ES: 早期; BP: 授粉前; PP: 授粉后; Se: 花萼; Pe: 花 瓣; Sta: 雄蕊; Pi: 雌蕊; L: 叶片

A: Expression pattern of *GmARFA1a* in different tissues of soybean W82. F-unopen: unopen flowers; F-open: open flowers; L: leaf; S: stem; ST: shoot tip; R: root; RT: root tip; LR: lateral roots; N: nodule; S: stem; B: qRT-PCR analysis of spatiotemporal expression patterns of *GmARFA1a* in floral organs of soybean W82, ES: Early stage; BP: Before pollination; PP: Post pollination; Se: Sepal; Pe: Petal; Sta: Stamen; Pi: pistil; L: Leaf

图 3 GmARFA1a 在大豆中的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of GmARFA1a in Soybean

2.3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创制 Gmarfa1a 突变体

为探究*GmARFA1a*是否调控大豆雄性育性,根据其基因序列设计四个独立靶点,并构建CRISPR/Cas9基因敲除载体(表1)。将该载体转入大豆栽培品种W82中,并成功获得8株T₀代转基因阳性苗。靶点检测结果显示,T3靶点编辑效率相对较高,而其它3个靶点没有发生编辑。进一步对编号为#3和#7的2株T₀代材料的T3靶点进行筛选,在T₂代获得了分别缺失1和4 bp的纯合突变体,这两种突变形式导致目标基因*GmARFA1a*在翻译时分别终止于第40和第39位氨基酸残基处。随后,本研究在T₃代对这两种编辑形式进行确认,并将这两种突变体分别命名为*Gmarfa1a-1和Gmarfa1a-2*。



黑色方框表示外显子区,灰色方框表示非翻译区,黑色直线表示内含子区,T1、T2、T3和T4表示靶点位置

Black boxes indicate the gene exon, gray boxes indicate untranslated regions, black lines indicate intron, T1, T2, T3 and T4 indicate the target locations.

图 4 大豆 GmARFA1a 基因结构及 CRISPR/Cas9 基因编辑突变体示意图

Fig. 4 Diagram of soybean GmARFA1a genomic sequence and the target base editing in the CRISPR/Cas9 mutants of soybean

2.4 Gmarfa1a 突变体表型观察

突变体 Gmarfala-1 和 Gmarfala-2 与野生型相比,在营养生长阶段没有发现明显差异。在生殖生长阶段, 通过 I₂-KI 染色法^[26,27]对花粉活力进行初步观察,发现突变体与野生型在花粉数量及淀粉填充方面无明显差 异(图 5A 上)。然而,对花粉萌发方面的进一步分析显示,Gmarfala两种突变体花粉萌发率明显低于野 生型 W82(图 5A 下),两个突变体的花粉萌发率均不足 50%,而野生型花粉萌发率超过 80%(图 5B)。 初步推断可能是突变体花粉壁物质存在缺失,导致花粉萌发较差。



A: W82 与 *Gmarfa1a* 花粉 I₂-KI 染色及花粉萌发分析(bar=200 um); B: 大豆花粉萌发率统计, a, b 字母代表两组数据具有显著性差异(P<0.05) A: The pollen I₂-KI staining and the pollen germination analysis of W82 and *Gmarfa1a* (bar=200 um); B: The statistical analysis of soybean pollen germination rate; The letters a and b represent a significant difference between the two sets of data (P < 0.05).

图 5 Gmarfala 突变体花粉萌发率下降

Fig.5 The gemination rate of pollen grains was decreased in Gmarfala mutants

对成熟豆荚数量统计分析,按照豆荚内种子的理论数量将其分为一粒荚、二粒荚、三粒荚和四粒荚四种不同类型,发现突变体中未能正常发育或灌浆的种子数目比例增加(图 6A),导致 *Gmarfala* 结实率显著降低(图 6B),但单株总荚数与野生型相比无显著性差异(图 6C),结合花粉萌发实验结果判断可能是由于花粉活力下降导致。



A:大豆 *Gmarfa1a* 突变体中未正常发育或灌浆种荚展示,白色箭头指示发育缺陷种子位置(bar=50 mm); B: W82 与 *Gmarfa1a* 结实率比较分析; C: W82 与 *Gmarfa1a* 结实率比较分析; d同字母 a 代表两组数据不具有显著性差异; a, b 字母代表两组数据具有显著性差异 (P<0.05)
A: The picture shows the abnormally developed or grain-filled pods of *Gmarfa1a* mutants, and the white arrows indicates the location of the abnormally developed seeds (bar=50 mm); B: The seed setting rate of W82 and *Gmarfa1a*; C: Total number of pods per plant in W82 and *Gmarfa1a*; The same letter a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a and b represent a significant difference between the two sets of data; The letters a and b represent a significant difference between the two sets of data; The letters a and b represent a significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a and b represent a significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant difference between the two sets of data; The letters a means that there is no significant differe

图 6 大豆 Gmarfa1a 突变体结实率下降



3 讨论

对于大豆这类自花授粉作物,无法通过人工去除母本花粉进行大规模杂交制种,因此,利用雄性不育 系作为母本制备杂交种的技术体系成为雌雄同花作物杂种优势利用的有效途径。目前,在大豆中利用"三 系法"虽己育成 42 个审定杂交品种^[6],但是受"三系法"固有缺点以及大豆种子繁殖系数低的限制,导致 至今在大豆杂交种的规模化推广种植方面仍未取得显著突破。随着第三代智能杂交育种系统的发展成熟, 有望突破这一难题。智能杂交育种方法基于核雄性不育基因的功能研究,然而,目前通过正向遗传学的方 法来鉴定雄性不育基因速度较慢。

近年来,随着基因编辑技术的发展,使得越来越多的基因功能得以证实。其中,CRISPR/Cas9技术由于其操作简便性、基因编辑效率高以及周期短等优点,而被广泛用于作物育种。在水稻中,利用 CRISPR/Cas9 技术已获得了直链淀粉含量低或籽粒大的新种质,并成功解决了穗发芽的难题^[31-33]。在大豆中,相关技术 已被用于不育基因的功能鉴定和不育突变体的创制。例如, Fang 等^[9]、Nadeem 等^[10]和 Jiang 等^[11]均使用 CRISPR/Cas9 技术成功创制大豆 MSI 敲除材料,验证了 MSI 基因在调控雄性育性方面的功能。此外,张万 年等^[34]和 Hou 等^[12]同样使用该技术分别获得了 MS6 和 MS3 基因的功能缺失突变体,并进一步验证了相关 基因在调控雄配子形成过程中的作用。而本研究同样从反向遗传学角度出发,使用 CRISPR/Cas9 技术创制 了 Gmarfa1a 的敲除突变体,以此来研究该基因功能是否与雄性育性相关。

进化分析是研究基因家族和同源序列的重要方法,如鉴定菜豆 ANK 和小麦 ARF 基因家族成员^[35,36]。为 了鉴定调控大豆雄性育性的 ARFA1 基因,前期相关研究分析了大豆 ARF 基因家族,共鉴定到 44 个成员, 其中 ARFA1 亚家族成员有 15 个^[16]。氨基酸序列比对分析结果表明,这些成员都具有 ARFA1 亚家族保守的 结构域(图1)。转录组数据分析表明, GmARFA1a (Glyma.09G030900)位于大豆雄性育性调控基因 MS1 和 MS2 的下游(图2)^[9,15]。表达模式分析显示,该基因在授粉前的雄蕊中优势表达(图3)。这些结果暗 示 GmARFA1a 可能在授粉前通过调控雄蕊(花粉)发育过程调控大豆的雄性育性。I₂-KI 染色结果表明 Gmarfa1a 突变体花粉与对照并无明显差异,同样能正常填充淀粉粒。相反,体外萌发实验结果显示,突变 体的花粉萌发受到了显著抑制(图5)。这些结果表明 GmARFA1a 影响淀粉填充后花粉的发育过程。在雄 配子发育早期阶段,绒毡层分泌营养物质和酶,对雄配子(即小孢子)的发育至关重要。在发育后期,绒 毡层启动程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),为发育中的小孢子提供营养物质和信号^[37]。绒毡 层与小孢子之间的蛋白质分选是依赖分泌途径完成的复杂运输过程,小G蛋白在此过程中发挥重要作用^[29, 30]。因此,推测作为小G蛋白家族成员的 GmARFA1a 基因可能在 PCD 阶段调控小孢子细胞壁关键物质的填 充,从而影响花粉萌发。此外,由于突变体较低的花粉萌发率,影响了双受精过程,导致突变体结实率降 低(图6)。

大豆是由古四倍体演变而来的二倍体自交作物,其中有 75%的基因以同源基因的形式存在。拟南芥中 有 6 个 *ARFA1* 基因,而大豆中有 15 个 *ARFA1* 基因。在拟南芥的研究中,突变单个 *ARFA1* 基因并不会对植 物的营养生长或生殖生长造成影响,但通过 *ARFA1b* 负显性抑制 6 个基因表达将导致植物不育^[19]。本研发现, 单独突变 *GmARFA1a* 基因显著抑制了大豆的结实率。这些结果表明,大豆和拟南芥 *ARFA1* 基因在调控植物 雄性育性方面可能发生了功能分化。然而,关于大豆中的 *ARFA1* 同源基因是发生了分化或者冗余,仍需待 进一步研究。因此,在后续工作中,可以在大豆中敲除更多的 *ARFA1* 基因,以研究这些基因在功能上是否 出现了分化或者冗余。*GmARFA1a* 基因突变后没有出现完全雄性不育,导致其并不能直接应用于杂交制种。 如果 *ARFA1* 同源基因间存在功能冗余,还可进一步获得多个 *GmARFA1* 基因功能缺失的完全不育突变体, 并结合异交结实率指标评价其在杂种优势利用中的价值。此外,还可以构建 *GmARFA1a* 基因的大豆过表达 株系,以研究其花粉活力是否提高,结实率是否变化,从而进一步验证 *GmARFA1a* 基因的功能。

本研究首先对大豆 ARFAI 氨基酸保守结构域进行了初步分析,同时结合 qRT-PCR 实验和转录组数据,

揭示大豆 *GmARFA1a* 基因的表达模式。最后,通过对花粉活力的鉴定以及对大豆结实率等农艺性状的统计 学分析,明确了 *GmARFA1a* 基因通过调控花粉萌发而影响大豆结实。这为深入研究大豆 *ARF* 家族成员基因 功能提供了有力参考。本研究从反向遗传学角度,鉴定了候选基因功能,为在大豆中快速鉴定筛选高异交 结实率雄性不育突变体,进一步用于大豆智能杂交育种系统提供了前期基础,助力大豆杂种优势加速利用。

参考文献

- [1] 田志喜,刘宝辉,杨艳萍,李明,姚远,任小波,薛勇彪. 我国大豆分子设计育种成果与展望.中国科学院院刊,2018,33 (09): 915-922
 Tian Z X, Liu B H, Yang Y P, Li M, Yao Y, Ren X B, Xue Y B. Update and perspect of soybean molecular module-based designer breeding in China. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2018, 33 (09): 915-922
- [2] Hwang E-Y, Song Q J, Jia G F, Specht J E, Hyten D L, Costa J, Cregan P B. A genome-wide association study of seed protein and oil content in soybean. BMC Genomics, 2014, 15 (1): 1-12
- [3] 李顺萍. 世界大豆生产布局及中国大豆对外依存度分析. 世界农业, 2018, 11: 108-112

Li S P. Analysis of world soybean production layout and foreign dependence of Chinese soybean. World Agriculture, 2018, 11: 108-112

[4] 刘杰, 黄学辉. 作物杂种优势研究现状与展望. 中国科学:生命科学, 2021, 51 (10): 1396-1404

Liu J, Huang X H. Advances and perspectives in crop heterosis. Scientia Sinica Vitae, 2021, 51 (10): 1396-1404

- [5] Ouyang Y D, Li X, Zhang Q F. Understanding the genetic and molecular constitutions of heterosis for developing hybrid rice. Journal of Genetics and Genomics, 2022, 05: 385-393
- [6] Fang X L, Sun Y Y, Li J H, Li M N, Zhang C B. Male sterility and hybrid breeding in soybean. Molecular Breeding, 2023, 43 (6): 47
- [7] Wu Y Z, Fox T W, Trimnell M R, Wang L J, Xu R J, Cigan A M, Huffman G A, Garnaat C W, Hershey H, Albertsen M C. Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14 (3): 1046-10544
- [8] Nie Z X, Zhao T Z, Liu M F, Dai J Y, He T T, Lyu D, Zhao J M, Yang S P, Gai J Y. Molecular mapping of a novel male-sterile gene *msNJ* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Plant Reproduction, 2019, 32 (4): 371-380
- [9] Fang X L, Sun X Y, Yang X D, Li Q, Lin C J, Xu J, Gong W J, Wang Y F, Liu L, Zhao L M, Liu B H, Qin J, Zhang M C, Zhang C B, Kong F J, Li M N. *MS1* is essential for male fertility by regulating the microsporocyte cell plate expansion in soybean. Science China Life Sciences, 2021, 64 (9): 1533-1545
- [10] Nadeem M, Chen A D, Hong H L, Li D D, Li J J, Zhao D, Wang W, Wang X B, Qiu L J. GmMs1 encodes a kinesin-like protein essential for male fertility in soybean (Glycine max L.). Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63 (6): 1054-1064
- [11] Jiang B J, Chen L, Yang C Y, Wu T T, Yuan S, Wu C X, Zhang M C, Gai J Y, Han T F, Hou W S, Sun S. The cloning and CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of a male sterility gene MS1 of soybean. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19 (6): 1098-1100
- [12] Hou J J, Fan W W, Ma R W, Li B, Yuan Z H, Huang W X, Wu Y Y, Hu Q, Lin C J, Zhao X P, Peng B, Zhao L M, Zhang C B, Sun L J. MALE STERILITY 3 encodes a plant homeodomain-finger protein for male fertility in soybean. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64 (5): 1076-1086

- [13] Thu S W, Rai K M, Sandhu D, Rajangam A, Balasubramanian V K, Palmer R G, Mendu V. Mutation in a PHD-finger protein MS4 causes male sterility in soybean. BMC Plant Biology, 2019, 19 (1): 378
- [14] Yu J P, Zhao G L, Li W, Zhang Y, Wang P, Fu A G, Zhao L M, Zhang C B, Xu M. A single nucleotide polymorphism in an R2R3 MYB transcription factor gene triggers the male sterility in soybean ms6 (Ames1). Theoretical and Applied Genetics, 2021, 134 (11): 3661-3674
- [15] Fang X L, Feng X C, Sun X Y, Yang X D, Li Q, Yang X L, Xu J, Zhou M H, Lin C J, Sui Y, Zhao L M, Liu B H, Kong F J, Zhang C B, Li M N. Natural variation of MS2 confers male fertility and drives hybrid breeding in soybean. Plant biotechnology journal, 2023, 21 (11): 2322-2332
- [16] 王一帆, 王韫慧, 李金红, 蔺佳雨, 曹振林, 冯湘池, 姚士恩, 周铭辉, 马诗卉, 李美娜. 植物 ARF 家族小 G 蛋白研究进展及大豆 ARF 家族初步分析. 植物生理学报, 2022, 58 (12): 2227-2237
 - Wang Y F, Wang Y H, Li J H, Lin J Y, Cao Z L, Feng X C, Yao S E, Zhou M H, Ma S H, Li M N. Research progress of small G-proteins in plant ARF family and preliminary analysis of soybean ARF family. Plant Physiology Journal, 2022, 58 (12): 2227-2237
- [17] Moss J, Vaughan M. Molecules in the ARF orbit. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273 (34): 21431-21434
- [18] Lee M H, Min M K, Lee Y J, Jin J B, Shin D H, Kim D H, Lee K-H, Hwang I. ADP-Ribosylation Factor 1 of Arabidopsis plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in Arabidopsis. Plant Physiology, 2002, 129 (4): 1507-1520
- [19] Zhu R M, Li M, Li S W, Liang X, Li S, Zhang Y. Arabidopsis ADP-RIBOSYLATION FACTOR-A1s mediate tapetum-controlled pollen development. The Plant Journal, 2021, 108 (1): 268-280
- [20] Liang X, Li S W, Gong L M, Li S, Zhang Y. COPII components Sar1b and Sar1c play distinct yet interchangeable roles in pollen development. Plant Physiology, 2020, 183 (3): 974-985
- [21] Kobayashi-Uehara A, Shimosaka E, Handa H. Cloning and expression analyses of cDNA encoding an ADP-ribosylation factor from wheat: tissue-specific expression of wheat ARF. Plant Science, 2001, 160 (3): 535-542
- [22] 侯磊, 李家宝, 罗小英, 王文锋, 肖月华, 罗明, 裴炎. 棉花 ADP-ribosylation factor 基因(GhARF1)的克隆与表达分析. 作物学报, 2007, 33 (8): 1226-1231
 - Hou L, Li J B, Luo X Y, Wang W F, Xiao Y H, Luo M, Pei Y. Cloning, expression and characterization of an ADP-ribosylation factor gene from cotton (Gossypium hirsutum L.). Acta Agronomica Sinica, 2007, 33 (8):1226-1231
- [23] Ma X L, Zhang Q Y, Zhu Q L, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z F, Li H E, Lin Y R, Xie Y Y, Shen R X, Chen S F, Wang Z, Chen Y L, Guo J X, Chen L T, Zhao X C, Dong Z C, Liu Y G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot-plants. Molecular Plant, 2015, 8 (8): 1274-1284
- [24] 曾栋昌,马兴亮,谢先荣,祝钦泷,刘耀光. 植物 CRISPR/ Cas9 多基因编辑载构建和突变分析的操作方法. 中国科学:生命科学, 2018, 48 (7): 783-794

Zeng D C, Ma X L, Xie X R, Zhu Q L, Liu Y G. A protocol for CRISPR/Cas9-based multi-gene editing and sequence decoding

of mutant sites in plants. Scientia Sinica Vitae, 2018, 48 (7): 783-794

[25] 杨静, 邢国杰, 杜茜, 隋丽, 郭东全, 牛陆, 杨向东. 不同大豆基因型对大豆遗传转化效率的影响及外源 T-DNA 插入分析. 大豆科学, 2016, 35 (4):
 562-567

Yang J, Xing G J, Du Q, Sui L, Guo D Q, Niu L, Yang X D. Effects of different soybean genotypes on the transformation efficiency of soybean and analysis of the T-DNA insertions in the soybean genome. Soybean Science, 2016, 35 (4): 562-567

[26] 郭凤兰,林春晶,王鹏年,杨绪磊,吴铮,彭宝,赵丽梅,张春宝.大豆细胞质雄性不育恢复基因 GmRf1 的精细定位. 植物遗传资源学报,2022,23
 (2): 518-526

Guo F L, Lin C J, Wang P N, Yang X L, Wu Z, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Fine mapping of a restorer-of-fertility gene *GmRf1* for the cytoplasmic male sterility in soybean. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23 (2): 518-526

[27] 贾顺耕, 郭凤兰, 林春晶, 孙妍妍, 张颖, 雷蕾, 彭宝, 赵丽梅, 张春宝. 大豆细胞质雄性不育恢复基因 Rf3 的定位. 植物遗传资源学报, 2021, 22 (5): 1411-1417

Jia S G, Guo F L, Lin C J, Sun Y Y, Zhang Y, Lei L, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Mapping of fertility restorer gene *Rf3* of cytoplasmic male sterility in soybean. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22 (5): 1411-1417

[28] Gebbie L K, Burn J E, Hocart C H, Williamson R E. Genes encoding ADP-ribosylation factors in Arabidopsis thaliana L. Heyn.; genome analysis and antisense suppression. Journal of Experimental Botany, 2005, 56 (414): 1079-1091

[29] Bassham D C, Brandizzi F, Otegui M S, Sanderfoot A A. The secretory system of Arabidopsis. The Arabidopsis Book, 2008, 2008 (6): e0116

- [30] Brandizzi F. Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi in plants: Where are we now? Seminars in Cell and Developmental Biology, 2018, 80:94-105
- [31] 毛兴学,柳武革,郑晓钰,范芝兰,陈文丰,潘大建,李晨,王丰. CRISPR/Cas9 技术编辑 MPK7 和 MPK14 基因创制抗穗发芽水稻新种质. 植物遗 传资源学报, 2022, 23 (1): 281-289

Mao X X, Liu W G, Zheng X Y, Fan Z L, Chen W F, Pan D J, Li C, Wang F. Generating pre-harvest sprouting resistant germplasms by editing *MPK7* and *MPK14* via CRISPR/Cas9 technology. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23 (1): 281-289

[32] 毛兴学,郑晓钰,孙炳蕊,李晨,陈文丰,潘大建,柳武革,范芝兰,王丰.应用 CRISPR/Cas9 技术创制低直链淀粉含量水稻种质.植物遗传资源学报,2022,23 (2): 583-591

Mao X X, Zheng X Y, Sun B R, Li C, Chen W F, Pan D J, Liu W G, Fan Z L, Wang F. Creating novel rice germplasms with low amylose content by editing upstream sequence of *Wx* gene coding region via CRISPR/Cas9 technology. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23 (2): 583-591

[33] 赵春芳,梁文化,赫 磊,姚姝,赵凌,周丽慧,赵庆勇,陈涛,朱镇,路凯,王才林,张亚东. CRISPR/Cas9 编辑 GS3 和 qGL3 基因创制大粒水稻新种 质. 植物遗传资源学报, 2022, 23 (6): 1709-1717

Zhao C F, Liang W H, He L, Yao S, Zhao L, Zhou L H, Zhao Q Y, Chen T, Zhu Z, Lu K, Wang C L, Zhang Y D. Creating novel rice germplasms with enlarged grain size by editing *GS3* and *qGL3* genes via CRISPR/Cas9. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23 (6): 1709-1717

[34] 张万年,杨静,杨绪磊,高萌萌,林春晶,刘鹏,李志刚,杨向东,张春宝.大豆细胞核雄性不育基因 MS6 的功能验证及不育新种质创制.植物遗传

资源学报, 2023, 24 (3): 801-807

Zhang W N, Yang J, Yang X L, Gao M M, Lin C J, Liu P, Li Z G, Yang X D, Zhang C B. Functional identification of a nuclear male sterility gene *MS6* and creation of new sterile germplasms in soybean. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24 (3): 801-807

[35] 张婷, 张双喜, 裴丽丽, 于太飞, 陈明, 李连城, 周永斌, 马有志, 徐强, 徐兆师. 菜豆 ANK 基因家族鉴定及 ANK 25 的表达模式分析. 植物遗传资源 学报, 2014, 15 (6): 1334-1341

Zhang T, Zhang S X, Pei L L, Yu T F, Chen M, Li L C, Zhou Y B, Ma Y Z, Xu Q, Xu Z S. Genome-wide analysis of *ANK* gene family and expression pattern of the *ANK25* gene in snap bean. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15 (6): 1334-1341

[36] 孙仁玮, 刘永杰, 王翔, 张荃, 张立平, 孙辉, 王永波, 高建刚, 杨卫兵, 赵昌平, 高世庆, 韩俊. 小麦 ARF 基因家族生物信息学分析及在干旱胁迫 下的表达特性研究. 植物遗传资源学报, 2018, 19 (1): 122-134

Sun R W, Liu Y J, Wang X, Zhang Q, Zhang L P, Sun H, Wang Y B, Gao J G, Yang W B, Zhao C P, Gao S Q, Han J. Bioinformatics identification of auxin response factor genes and expression profiles under drought stress in wheat. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 (1): 122-134

[37] Parish R W, Li S F. Death of a tapetum: A programme of developmental altruism. Plant Science, 2010, 178 (2): 73-89