

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
(广州大学生命科学学院/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 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。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, 利用反向遗传学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。花粉萌发实验及结实率统计发现 *Gmarfa1a* 突变体花粉活力下降导致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。研究结果不仅丰富了对 *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
(School of Life Sciences, Guangzhou University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Adaptation and Molecular Design/Innovative Center of Molecular Genetics and Evolution, Guangdong 510006)

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

收稿日期: 2023-11-30 网络出版日期: 2024-01-04

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231130003>

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

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)

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

The pollen germination experiment and seed setting statistics found that the decrease of pollen viability of *Gmarfa1a* mutant resulted in the significant inhibition of seed setting. Collectively, this study identified the *GmARFA1a* gene and uncovered its function on male fertility. It will not only enhance our understanding of 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,我国大豆消费需求显著增加。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],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50%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,这进一步限制了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_{Nr}),它们分布在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1个具Plant Homeodomain (PHD)-finger结构域的转录因子;*ms4*与拟南芥中同源基因*MMD1* (*MALE MEIOCYTE DEATH 1*)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1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*attf1*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1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。通过对同一遗传背景下的*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(CTA, cholera toxin subunit A)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*ARF1s*基因,这些基因均在发育的花药中表达,其中,*ARF1b*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(DN, dominant negative)手段干扰

AtARF1s 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。

大豆是自花授粉作物,通过人工去雄的方法生产杂交种,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。因此,大豆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 *MS1* 和 *MS2* 共同影响的 *GmARF1a* 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 *GmARF1a* 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,大豆 CRISPR 和 Cas9 敲除得到的突变体 *Gmarf1a*、自然突变产生的大豆雄性不育突变体 *ms1* 和 *ms2* 及野生型 *MS1* 和 *MS2* 均由本实验室提供,以上材料均种植于广州市 (2023 年 7 月至 9 月)。本研究所用的 DH5 α 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 Nucleon 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 \times 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 \times Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 购买于诺唯

赞;用于酶切的 *BsaI*-HFv2 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。本研究所有引物(除带接头的靶点引物)均通过 NCBI 网站设计,由广州天一辉远公司合成。

1.2 材料种植

在广州市从化区田间种植突变体 *Gmarf1a* 及野生型 W82 各 30 株,每行种植 10 棵材料,共 6 行,突变体与野生型相邻而种,行距及株距均为 10 cm 左右。每两周人工除草一次,每两周打一次除虫农药。

1.3 大豆、拟南芥 ARF1 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 ARF1 蛋白序列及 6 条拟南芥 ARF1 蛋白序列,利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对分析。

1.4 *GmARF1a* 在大豆中的表达模式

1.4.1 表达模式分析 利用 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 公共数据库中 Keyword search 功能,选择大豆基因组,输入 *GmARF1a* 基因号查找,下载其在大豆各组织中的 FPKM 值,并进行去重求均值等数据处理,结合实验室的雄性不育突变体 *ms1* 及其野生型 *MS1* 转录组数据,使用 TBtools 的 Heatmap 功能进行热图绘制,使用 WPS 软件中的 Excel 绘制柱状图。

1.4.2 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 本实验室按照花苞发育情况将大豆花苞分为 3 个时期,其长度及花瓣露白(开放)程度为主要的分类标准,花苞长度小于 3 mm 未露白(未出现花瓣)的为早期花苞,3 至 5 mm 露白(已出现花瓣但未开放)的为将授粉花苞,大于 5 mm 已开放的为已授粉花苞,取大豆 3 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 RimeScript[™] RT 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 μ L, cDNA 1 μ L, q-ARF1-F/R (10 μ mol/L) 各 0.3 μ L, ddH₂O (RNA free) 补足 10 μ L, 内参基因为 F-box-F/R (10 μ mol/L) (表 1); 反应程序:95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 10s, 35 个循环。qRT-PCR 结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 值进行计算,每个样品进行 3 次生物学重复。

表 1 本研究所用扩增引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
Cas9-F	CAACACCGACCGCCACTC
Cas9-R	TGCCGCTCTGCTTATCCC
SP1	CCCGACATAGATGCAATAACTTC
SP3	GTCGTGCTCCACATGTTGACCGG
BDJC-ARF-T12-F	ACTTAAGAGAGGATTGTTTGATGC
BDJC-ARF-T12-R	GGCCGTGACTGGACTTGAT
BDJC-ARF-T34-F	CTCCACCTTAGCTGGTGTT
BDJC-ARF-T34-R	CATCATGATCTTGAAGAAG
q-ARFA1-F	AGGATGCTGAATGAGGACGAA
q-ARFA1-R	GCTGGCGCAGAGAGTTTAGG
F-box-F	ATGGTCGCCGTTTGAACAC
F-box-R	GGGATAACCAGTGCAGAAGC

1.5 *Gmarfala* 转基因植株创制

1.5.1 筛选靶点和设计引物 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 4 个编辑效率高的特异性靶点,并分别命名为 ARFA1-T1/T2/T3/T4。同时利用该网站的引物设计功能设计 4 对引物,分别带有启动子接头 AtU3d(gtca)、AtU3b(gtca)、AtU6-1(attg)和 AtU6-29(attg)(表 2)。

1.5.2 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,得到连接产物 Cas9-ARFA1。

1.5.3 转化、筛选阳性菌 将 1.5.2 中连接产物 Cas9-ARFA1 转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,具体转化步骤参考 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞使用说明书。使用 2 \times Taq mix 及引物 Cas9F/R(表 1)进行菌落 PCR 及琼脂糖凝胶电泳鉴定,PCR 程序的设定参照 2 \times Taq mix 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。然后将质粒转化至 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。2 d 后进行菌落 PCR 鉴定,将阳性单克隆菌落保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱内。

表 2 *GmARFA1a* 基因编辑靶点及引物序列Table 2 Primers and sequences of gene editing targets of *GmARFA1a*

名称 Name	靶点序列(5'-3') Target sequence (5'-3')	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
ARFA1-T1	GGTACAGCCCAAATAGGTGG	gtcaCCACCTATTTGGGATGTACC	AAACGGTACAGCCCAAATAGGTGG
ARFA1-T2	CTCACACTTATTTCCGATTT	gtcACTCACACTTATTTCCGATTT	AAACAAATCGGAAATAAGTGTGAG
ARFA1-T3	GCACAAGAAACCAACCCTCC	attgGGAGGGTTGGTTTCTTGTC	AAACGCACAAGAAACCAACCCTCC
ARFA1-T4	CAGATAATGGGGTTGTCCTT	attgCAGATAATGGGGTTGTCCTT	AAACAAGGACAACCCATTATCTG

1.5.4 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,将获得的转化植株置于室内 25 $^{\circ}$ C 的冷光灯下单株培养至收种。每株转化植株取 3 个不同部位叶片各 100 mg,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 \times Taq mix 及 SP1/SP3 骨架鉴定引物(表 2)进行骨架 PCR 鉴定,若出现目的条带说明转化成功,获得了阳性苗。在此基础上,利用 2 \times Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 及靶点检测引物 BDJC-ARF-T-F/R(表 1)对不同靶点进行扩增及测序分析,鉴定 *GmARFA1a* 基因靶点突变情况。最后筛选纯合突变体植株并进行种子的收获。

1.6 *Gmarfala* 转基因植株花粉活力鉴定

1.6.1 *Gmarfala* 转基因植株花粉 I₂-KI 染色 参照郭凤兰等^[26]和贾顺耕等^[27]方法,分别从 10 株 W82、*Gmarfala-1* 及 *Gmarfala-2* 转基因植株中,选择盛花期的成熟花苞,用 75% 酒精浸泡 2 h 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 7% I₂-KI 染液 100 μ L,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。

1.6.2 *Gmarfala* 转基因植株花粉萌发实验 在上午 10 点左右,从 W82、*Gmarfala-1* 及 *Gmarfala-2* 的转基因植株各 3 株中取 5 朵当天开放的花。去除外围花瓣后,将花粉粒轻轻涂布在萌发培养基(配方:CaCl₂: 0.55 g/L, KCl: 0.373 g/L, H₃BO₃: 10 mg/L,

Sucrose: 100 g/L, Agarose: 15 g/L)。室温放置 1 h 后,使用荧光显微镜(白光条件)观察并拍照记录。

1.7 *Gmarfala*转基因植株结荚及鼓粒情况分析

对于 W82、*Gmarfala-1* 及 *Gmarfala-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 GraphPad 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

为分析大豆 *ARFA1* 的结构特征,本研究对 15 条大豆 *ARFA1* 蛋白序列及 6 条拟南芥 *ARFA1* 蛋白序列进行比对分析。结果显示,15 个大豆 *ARFA1* 的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)。

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),推测其可能在 *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*。

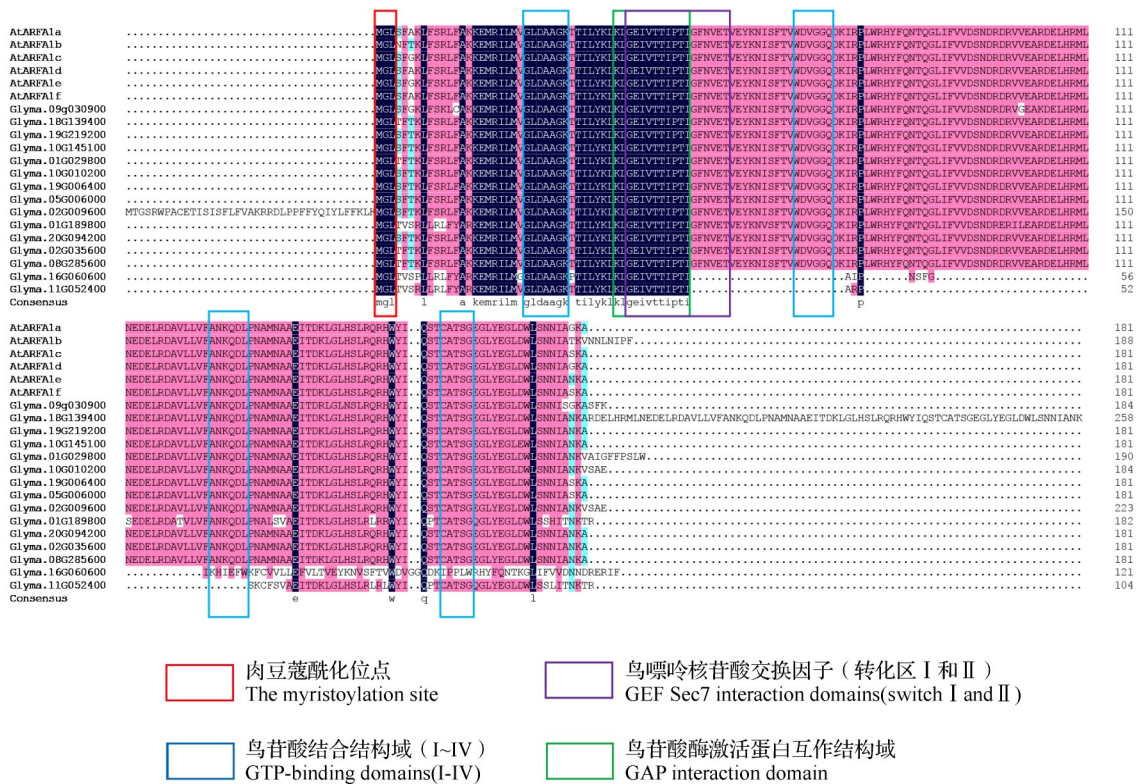
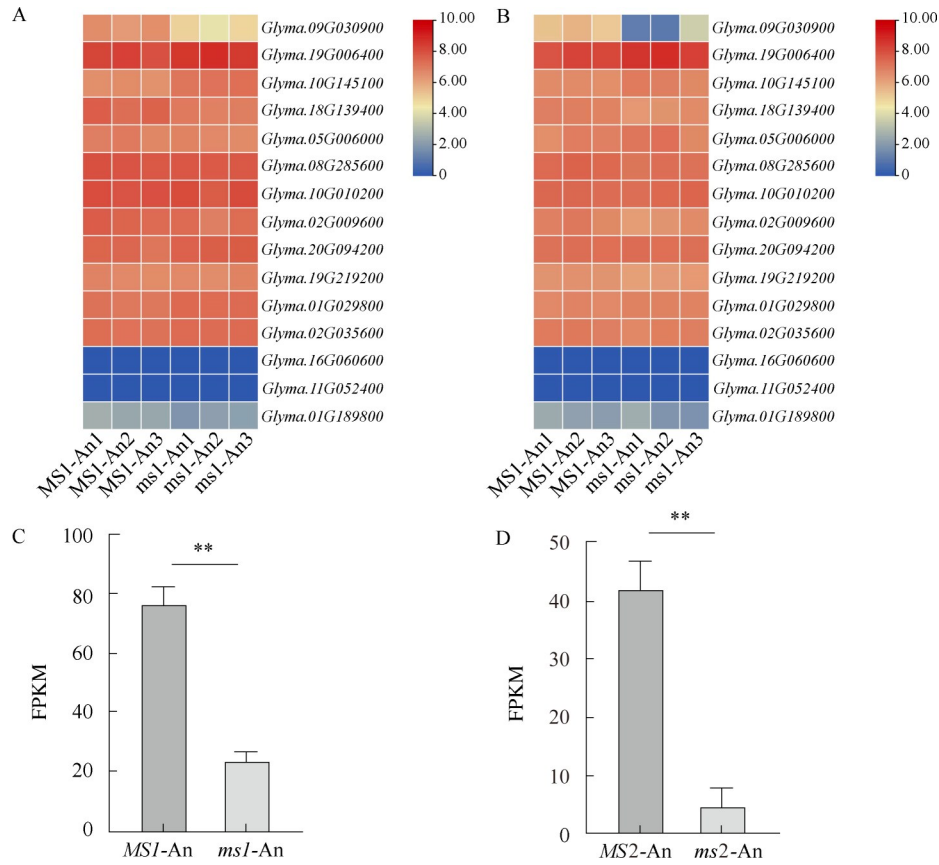


图 1 大豆及拟南芥 *ARFA1* 基因家族氨基酸序列比对

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

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、授粉前和授

粉后的花苞从外到里分为花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊 4 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。

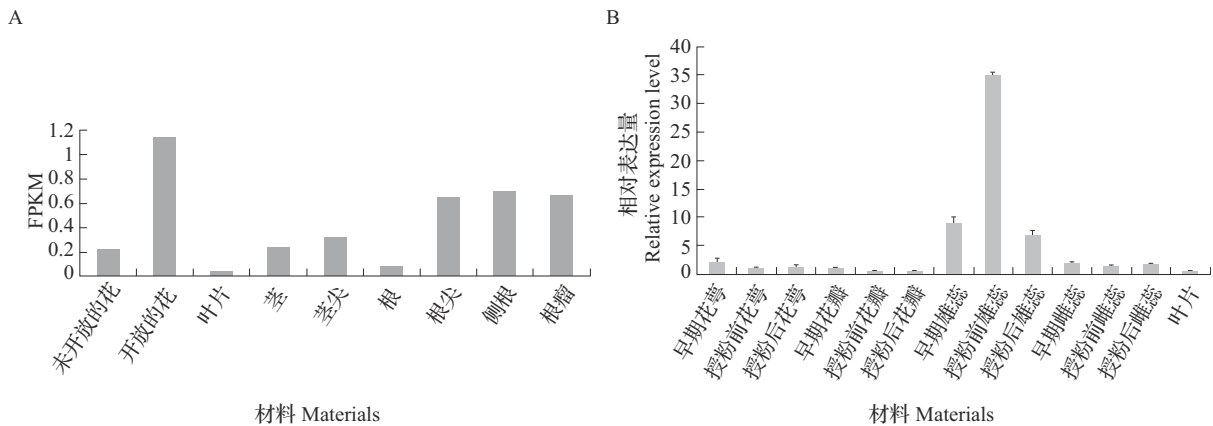


A 和 B 分别为 *GmARF1a* 及同源基因在大豆 *MS1* 和 *ms1*、*MS2* 和 *ms2* 花药 (Anther, An) 中的表达热图; C 和 D 分别为 *GmARF1a* 在大豆 *MS1* 和 *ms1*、*MS2* 和 *ms2* 花药中的表达差异分析; An1、An2 和 An3 表示花药的 3 个生物学重复; 柱形图中纵坐标为 3 次重复的平均值±标准差, **代表两组数据具有极显著性差异 ($P < 0.01$)

A and B: Expression heat map of *GmARF1a* and homologs in anthers of soybean *MS1* and *ms1*, *MS2* and *ms2*; C and D: Expression analysis of *GmARF1a* in anther of soybean *MS1* and *ms1*, *MS2* and *ms2*; An1, An2 and An3 represent three biological replicates of anthers; The ordinate in the histogram is the average of three replicates±standard deviation; ** represents a very significant difference between the two sets of data ($P < 0.01$)

图 2 *GmARF1a* 及同源基因在 *MS1* 和 *ms1*、*MS2* 和 *ms2* 花药中的表达分析

Fig.2 Expression patterns of *GmARF1a* and its homologs in anthers of *MS1* and *ms1*, *MS2* and *ms2*



A: *GmARF1a* 在大豆 W82 花、叶片等组织中的表达模式; B: qRT-PCR 分析 *GmARF1a* 在大豆 W82 花萼、花瓣等花器官中的时空表达模式
A: Expression pattern of *GmARF1a* in tissues of soybean W82, like flowers and leaves et al; B: qRT-PCR analysis of spatiotemporal expression patterns of *GmARF1a* in floral organs of soybean W82, like sepal and petal et al

图 3 *GmARF1a* 在大豆中的表达模式

Fig.3 Expression patterns of *GmARF1a* in Soybean

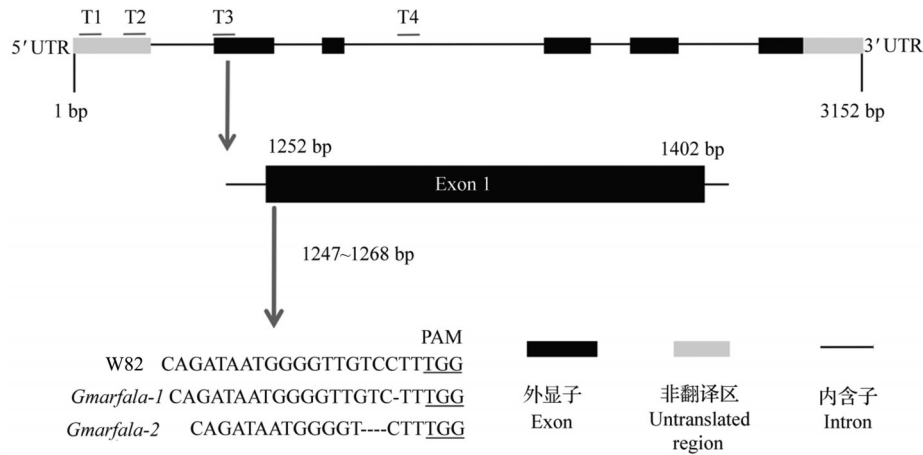
2.3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创制 *Gmarfala* 突变体

为探究 *GmARF1a* 是否调控大豆雄性育性, 根据其基因序列设计 4 个独立靶点, 并构建 CRISPR/Cas9 基因敲除载体 Cas9-ARFA1 (图 4)。将该载体转入大豆栽培品种 W82 中, 并成功获得 8 株 T_0 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, 而其他 3 个靶点没有发生编辑。进一步对编号为 #3 和 #7 的 2 株 T_0 代材料的 T3 靶点进行筛选, 在 T_2 代获得了分别缺失 1 bp 和 4 bp 的纯合突变体, 这两种突变形式导致目标基因 *GmARF1a* 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 T_3 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 *Gmarfala-1* 和 *Gmarfala-2*。

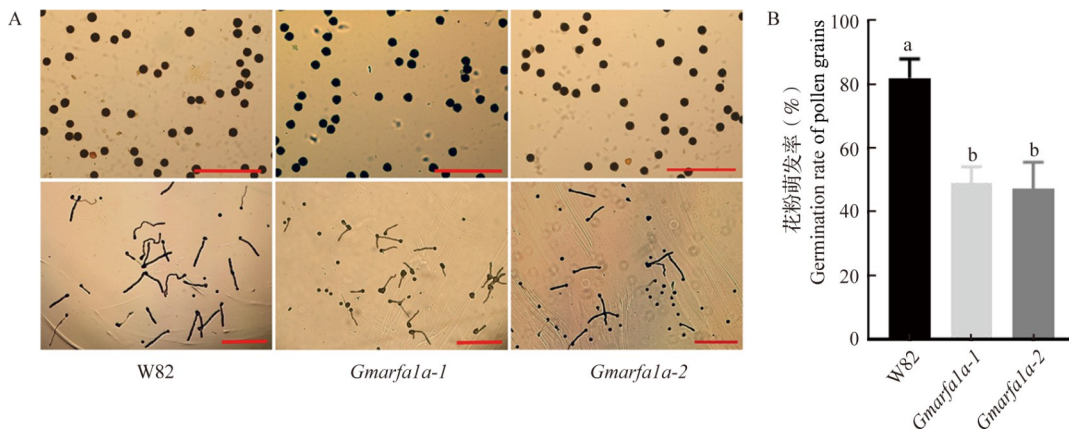
2.4 *Gmarfala* 突变体表型观察

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 I_2 -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。



T1、T2、T3 和 T4 表示靶点位置, TGG 代表嵌合序列邻近基序 (PAM), 确保 CRISPR 识别系统的特异性和准确性
 T1, T2, T3 and T4 indicate the target locations, TGG represents the protospacer adjacent motif, ensuring the specificity and accuracy of the CRISPR recognition system

图 4 大豆 *GmARF1a* 基因结构及 CRISPR/Cas9 基因编辑突变体示意图
 Fig. 4 Diagram of soybean *GmARF1a* genomic sequence and the target base editing in the CRISPR/Cas9 mutants of soybean



A: 大豆 W82 与 *Gmarfala* 花粉 I_2 -KI 染色及花粉萌发分析 (标尺为 200 μ m); B: W82 与 *Gmarfala* 花粉萌发率统计, a, b 字母代表两组数据具有显著性差异 ($P < 0.05$), 下同

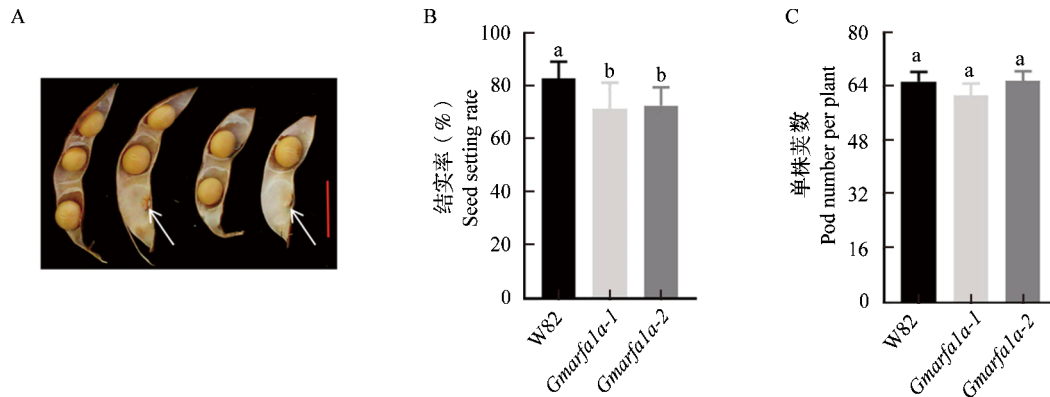
A: The pollen I_2 -KI staining and the pollen germination analysis of W82 and *Gmarfala* (bar=200 μ m); B: The statistical analysis of W82 and *Gmarfala* pollen germination rate; The letters a and b represent a significant difference between the two sets of data ($P < 0.05$), the same as below

图 5 *Gmarfala* 突变体花粉萌发率下降

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

对成熟豆荚数量进行统计分析,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 *Gmarfala* 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,比例尺为 50 mm

A: The picture shows the abnormally developed or grain-filled pods of soybean *Gmarfala* mutants, and the white arrows indicates the location of the abnormally developed seeds, bar=50 mm

图 6 大豆 *Gmarfala* 突变体结实率下降

Fig.6 Seed setting rate decreased in soybean *Gmarfala* mutants

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”虽已育成 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^[28-30]。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 *MS1* 敲除材料,验证了 *MS1* 基因在调控雄性育性方面的功能。此外,张万年等^[31]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 *Gmarfala* 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^[32-33]。为了鉴定调控大豆雄性育性的 *ARF1* 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 *ARF1* 亚家族成员有 15 个^[16]。本研究氨基酸序列比对分析结果表明,这些成员都具有 *ARF1* 亚家族保守的结构域(图 1)。植物中小 G 蛋白依赖分泌途径介导的绒毡层与小孢子之间的蛋白质分选位于 *MS1* 和 *MS2* 基因功能作用的下游^[9, 15, 34-35]。转录组数据分析表明, *GmARF1a* (*Glyma.09G030900*) 位于大豆雄性育性调控基因 *MS1* 和 *MS2* 的下游(图 2),这表明其可能在 *MS1* 或 *MS2* 基因的下游发挥作用,控制花药发育进而影响育性。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)。这些结果表明 *GmARF1a* 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 *Gmarfala* 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 *GmARF1a* 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(PCD, programmed cell death),为发育中的小孢子提供营养物质和信号^[36]。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^[34-35]。因此,推测作为小G蛋白家族成员的 *GmARF1a* 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)。2005年,Gebbie等^[37]在拟南芥中鉴定到6个 *ARF1* 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。大豆中的 *GmARF1a* 经过本研究验证同样调控育性,这说明 *ARF1* 基因功能可能较为保守。

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 *ARF1* 基因,而大豆中有15个 *ARF1* 基因。在拟南芥的研究中,突变单个 *ARF1* 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 *ARF1b* 负显性抑制6个基因表达将导致植物不育^[19]。本研究发现,单独突变 *GmARF1a* 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 *ARF1* 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 *ARF1* 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 *ARF1* 基因,以研究这些基因在功能上是否出现了分化或者冗余。*GmARF1a* 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 *ARF1* 同源基因间存在功能冗余,还可进一步获得多个 *GmARF1* 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 *GmARF1a* 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 *GmARF1a* 基因的功能。

本研究首先对大豆 *ARF1* 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 *GmARF1a* 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 *GmARF1a* 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(9):915-922
Tian Z X, Liu B H, Yang Y P, Li M, Yao Y, Ren X B, Xue Y B. Update and perspective of soybean molecular module-based designer breeding in China. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2018, 33(9): 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 (Vita), 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, 5: 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, Trimmell 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): 1046-1054
- [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 *ms_{NJ}* 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* (*Ame1*). *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, 王韞慧, 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 (Vita)*, 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] 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
- [29] 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
- [30] 赵春芳, 梁文化, 赫磊, 姚妹, 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
- [31] 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
- [32] 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*ANK25*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
- [33] 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
- [34] Bassham D C, Brandizzi F, Otegui M S, Sanderfoot A A. The secretory system of *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, 2008, 2008 (6): e0116
- [35] 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
- [36] Parish R W, Li S F. Death of a tapetum: A programme of developmental altruism. *Plant Science*, 2010, 178 (2): 73-89
- [37] 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