

# 大豆茸毛突变体的鉴定及相关基因表达分析

唐均勇, 杨 静, 洪慧龙, 郭 勇, 邱丽娟

(中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程 /

农业部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

**摘要:** 茸毛是大豆的重要形态性状, 对其自身的生长发育有着重要作用, 也与百粒重等诸多农艺性状相关, 因此对大豆茸毛的研究显得尤为重要。本研究从大豆 EMS 突变体库中筛选到 4 个茸毛发育异常的突变体, 分别是短茸毛突变体 *ddsp1*, 无茸毛突变体 *ddsp2*, 茸毛部分空瘪突变体 *ddsp3* 和茸毛完全空瘪突变体 *ddsp4*。扫描电镜观察结果表明这些突变体中茸毛的长度或形态等都发生了明显的变化, 同时突变体的籽粒大小、百粒重等也发生了明显的改变。选取了 10 个可能与大豆茸毛发育相关的同源基因, 分别是参与正调控茸毛发育起始的基因 *GL1*、*GL2*、*GL3* 和 *TCL1*, 参与核内复制负调控的基因 *RBR1*、*SIM*、*KAK* 和 *SPY* 以及参与核内复制正调控的基因 *CPR5* 和 *RHL*, 通过 qRT-PCR 分析了这 10 个基因在 4 个茸毛突变体和野生型中的表达情况。结果表明, 控制茸毛发育起始的基因除了 *GL1* 和 *GL2* 分别在突变体 *ddsp2* 和 *ddsp4* 中显著下调表达之外, 其余控制茸毛发育起始的基因均显著上调或无显著变化。参与核内复制负调控的基因中, 除了 *RBR1* 基因只在突变体 *ddsp1* 中显著上调表达之外, *SIM*、*KAK* 和 *SPY* 在这 4 个突变体中的表达水平均显著升高。而参与核内复制正调控的基因 *CPR5* 和 *RHL* 在 4 个突变体中的相对表达量均显著增加。本研究通过对茸毛相关基因的表达分析, 为进一步挖掘控制大豆茸毛发育的基因以及研究基因的作用机理和调控模式奠定了基础。

**关键词:** 大豆; 茸毛; 突变体; 表达分析

## Identification of Soybean Pubescence Mutants and Expression Analysis of Related Genes

TANG Jun-yong, YANG Jing, HONG Hui-long, GUO Yong, QIU Li-juan

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Soybean Biology (Beijing), Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

**Abstract:** Pubescence is an important morphological trait in soybean, which plays an important role in growth and development, and which is correlated to many agronomic traits such as 100-seed weight, and deserves investigation. In this study, four soybean mutants with developmental defect in pubescence were selected from EMS mutant library: the mutant *ddsp1* with short pubescence, the glabrous mutant *ddsp2*, the mutant *ddsp3* with partially shrunk pubescence, and the mutant *ddsp4* with fully shrunk pubescence. Scanning electron microscope images showed that the length and morphology of pubescence were significantly altered in these mutants. In addition, the seed size and 100-seed weight were all significantly different from the wild type. Ten soybean orthologous genes, including *GL1*, *GL2*, *GL3* and *TCL1* which act on the initiation of pubescence development, *RBR1*, *SIM*, *KAK* and *SPY* which participate in negative regulation of endoreduplication, and *CPR5* and *RHL* which participate in positive regulation of endoreduplication, were selected for expression

收稿日期: 2019-05-07 修回日期: 2019-06-21 网络出版日期: 2019-07-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190507002>

第一作者主要从事大豆基因资源发掘与利用研究, E-mail: tangjunyong@126.com

通信作者: 郭勇, 研究方向为大豆分子遗传学, E-mail: guoyong@caas.cn

邱丽娟, 研究方向为大豆基因资源, E-mail: qiulijuan@caas.cn

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08009003-003); 中国农业科学院科技创新工程

Foundation project: The National Transgenic Major Program of China (2016ZX08009003-003), the Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP) of Chinese Academy of Agricultural Sciences

analysis in those four mutants and the wild type by qRT-PCR. The results showed that the genes controlling the initiation of pubescence development, except for *GL1* and *GL2* which significantly down-regulated the expression in mutants *ddsp2* and *ddsp4*, up-regulated the expression or had no significant effect. The gene *RBR1* significantly up-regulated the endoreduplication in mutant *ddsp1* only, whereas the genes *SIM*, *KAK* and *SPY* significantly down-regulated the endoreduplication in all the four mutants, and both the genes *CPR5* and *RHL* significantly up-regulated the endoreduplication in all the four mutants. Through the expression analysis of pubescence related genes in soybean, this research has laid a foundation for further searching for the genes controlling the soybean pubescence development and understanding the regulation mechanisms of these genes.

**Key words:** soybean; pubescence; mutant; expression analysis

茸毛是植物地上组织表皮细胞特化出的形态多样的附属物,根据其形态结构特征可分为单细胞和多细胞,有分支和无分支类型,如拟南芥的茸毛为单细胞多分支结构<sup>[1]</sup>。根据有无腺体或生物学功能还可将茸毛分为腺毛和非腺毛类型<sup>[2]</sup>。腺毛不但可以通过分泌一些尼古丁、萜类等生物碱和醛类等来驱逐昆虫的靠近和取食,而且有的腺毛分泌物可以作为访花昆虫的向导,具有重要的生物学意义<sup>[3]</sup>。此外,有的腺毛还是天然的细胞工厂,可以产生一些脂类、黄酮类和萜类等具有重要价值的次生代谢产物<sup>[4-5]</sup>。而非腺毛作为一道天然的物理屏障,不但可以增强植物对高温、干旱及紫外线辐射等非生物胁迫的抗逆性,而且还能防御昆虫等的侵袭及机械损伤<sup>[6-7]</sup>。此外,对于像拟南芥这样的单细胞表皮毛结构,还可作为一个模式系统,用于植物细胞命运决定、细胞周期调控以及细胞极性等与细胞分化相关分子机制的研究<sup>[8-9]</sup>。

茸毛的发育起始于表皮细胞,以拟南芥非腺毛的单细胞茸毛结构为例,当一个表皮细胞受到茸毛起始信号的诱导,就进入到茸毛发育的起始阶段,这个过程受到众多转录因子的调控,如 *GLABRA1* (*GL1*)、*GL2*、*GL3*、*TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*)、*TTG2*、*ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*)、*TRIPTYCHON* (*TRY*)、*TRICHOMELESS1* (*TCL1*)、*TRIPTYCHON* (*TRY*)、*CAPRICE* (*CPC*) 等<sup>[10]</sup>。*GL1* 是最早克隆到的与茸毛起始相关的基因,它编码一个 R2R3 MYB 类型的转录因子, *gli* 突变体的叶片几乎没有茸毛<sup>[11]</sup>。*GL2* 编码一个含亮氨酸拉链结构的转录因子,它能诱导茸毛的发育起始<sup>[12]</sup>。*TTG1* 参与调控花青素的合成和茸毛的分化起始,它编码一个 WD40 重复序列蛋白,该结构域的功能被认为是提高与其他蛋白的相互作用,

该基因在拟南芥中广泛表达<sup>[7,13]</sup>。而 *GL3* 编码 bHLH 类型的转录因子,该蛋白与 *GL1* 和 *TTG1* 形成一个三聚复合体,该复合体正向作用于 *GL2*,从而促进茸毛的起始发育<sup>[14]</sup>。但是这个过程却受到 R3 MYB 家族基因 *TRY* 的竞争性抑制作用, *TRY* 蛋白能移动到邻近细胞,与 *GL1* 竞争性结合 *GL3*,而 *TRY-GL3-TTG1* 复合体或者单独的 *GL1* 均不能促进 *GL2* 的表达,因而不能促成茸毛的发育起始过程<sup>[15]</sup>。

表皮细胞受到茸毛发育的起始诱导之后,该细胞就从有丝分裂过程进入核内复制循环阶段,即只进行 DNA 的复制,但细胞不发生分裂,拟南芥的茸毛细胞通常在经过 4 次核内复制后形成成熟的茸毛细胞,最终细胞内的 DNA 总量达到了 32C (C 代表单倍体细胞核内的 DNA 含量)<sup>[8]</sup>。茸毛细胞在进行第 1 次核内复制时,其细胞极性发生改变,并从表皮细胞中突出出来,第 2 次核内复制伴随着第 1 个分支的发生,第 3 次核内复制伴随着第 2 个分支的起始,在经历最后一次核内复制后形成 3 个分支的成熟茸毛细胞<sup>[16]</sup>。参与核内复制的基因主要有 *RETINOBLASTOMA RELATED1* (*RBR1*)、*KAKTUS* (*KAK*)、*SIAMESE* (*SIM*)、*SPINDLY* (*SPY*)、*CONSTITUTIVE PATHOGEN RESPONSE5* (*CPR5*)、*ROOT HAIRLESS* (*RHL*)、*GLABROUS INFLORESCENCE STEMS* (*GIS*) 等,这些参与核内复制过程的基因也多参与分支的调控<sup>[17]</sup>。拟南芥一般每隔 3 到 4 个表皮细胞就会形成一个茸毛结构。而对于多细胞结构茸毛的发育,其过程与单细胞结构茸毛的发育过程大体相似,也要经历细胞命运决定和核内复制的过程,只是在经历了核内复制循环之后,该细胞又会进入到有丝分裂的过程,且细胞分裂的方向沿着垂直于表皮的方向进行,最后形成一锥型的茸毛结构<sup>[18]</sup>。

植物茸毛的发育是一个极其复杂的调控过程,涉及到众多的调控因子,包括多个基因家族的转录因子,虽然在拟南芥等模式植物中有了大量的研究,但在大豆中的有关研究还很少,主要集中在茸毛性状的作用和影响<sup>[19-20]</sup>,以及相关基因和QTL的定位研究<sup>[21-22]</sup>,相关的分子机制更是知之甚少。茸毛是大豆的一个重要性状,与产量、抗虫和抗病等诸多农艺性状相关<sup>[23-27]</sup>,因此对大豆茸毛进行相关研究具有重要意义。本研究通过对大豆EMS突变体库的筛选,获得4份茸毛发育异常的大豆突变体,对其茸毛和籽粒性状与野生型进行了比较分析,并根据拟南芥等相关研究,选取10个可能与茸毛发育过程相关的大豆同源基因:*GL1*<sup>[28]</sup>、*GL2*<sup>[29-30]</sup>、*GL3*<sup>[31]</sup>、*TCL1*<sup>[32]</sup>、*RBR1*<sup>[33]</sup>、*SIM*<sup>[34]</sup>、*KAK*<sup>[35]</sup>、*SPY*<sup>[36]</sup>、*CPR5*<sup>[37]</sup>和*RHL*<sup>[38]</sup>,其中*GL1*、*GL2*、*GL3*和*TCL1*参与茸毛发育的起始过程,且这4个基因均起正调控作用。而*RBR1*、*SIM*、*KAK*、*SPY*、*CPR5*和*RHL*参与核内复制过程,调控拟南芥茸毛的分支结构,其中*RBR1*、*SIM*、*KAK*和*SPY*起负调控作用,而*CPR5*和*RHL*起正调控作用。通过基因表达分析探索这些茸毛突变体可能参与的调控途径,为解析大豆茸毛的发育过程和明晰茸毛与其他重要农艺性状之间的关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料的野生型为中品661(ZP661),突变型为ZP661经EMS诱变得到的4个茸毛发育异常的突变体*ddsp1*(*developmental defect in soybean pubescence1*)、*ddsp2*、*ddsp3*和*ddsp4*。ZP661是由中国农业科学院作物科学研究所选育的高产优质的春播大豆品种,全生育期140d,植株高大健壮,抗倒伏能力较强,地上组织的茎叶均为棕色茸毛。

### 1.2 茸毛突变体的扫描电镜观察

在培养箱种植野生型ZP661和4个突变型*ddsp1*、*ddsp2*、*ddsp3*和*ddsp4*,在苗期(培养箱种植25d)取茎,利用锋利的刀片将茎横切成5mm左右的茎段,放入多聚甲醛(2%)-戊二醛(2.5%)固定液中固定过夜,扫描电镜观察在中国农业科学院原子能利用研究所进行,经过脱水、置换、干燥、样品表面喷金和粘台等步骤制备样品<sup>[39]</sup>,通过扫描电镜对野生型和突变型的茸毛形态进行观察。对野生型和

突变型扫描电镜图上的茎上茸毛的长度进行测量,根据比例尺换算成实际长度,并在正面图上圈定一定面积的区域(400 μm × 400 μm),数出该区域的茸毛数量并计算单位面积内的茸毛数量,即茸毛密度,每次进行10次独立的统计计数。利用Excel对野生型和突变型的茸毛长度和密度进行差异显著性分析。

### 1.3 RNA提取及反转录

选取用于表型观察同时期的茎组织,采用天根生化科技(北京)有限公司RNAprep Pure植物总RNA提取试剂盒提取RNA,实验按照试剂盒提供的方法进行操作。RNA的质量和浓度分别利用1.5%的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计进行检测。反转录实验取1 μg RNA模板合成cDNA。cDNA合成利用北京聚合美生物科技有限公司的M5 First Strand cDNA Synthesis Kit进行,20 μL的反应体系:5 × RNase Buffer 4.0 μL, Primer Mix 2.0 μL, dNTP Mix 4.0 μL, RNA 1 μg, DTT 2.0 μL, M5 M-MuLV RNase (200 U/μL) 1 μL, DEPC-ddH<sub>2</sub>O补足至20 μL。反应程序:42 °C 50 min,然后85 °C 5 min,反应结束后放于-20 °C保存。反应原液稀释20倍后用于后续表达分析实验。

### 1.4 引物设计

选取了10个与拟南芥茸毛发育相关的基因*GL1*、*GL2*、*GL3*、*TCL1*、*RBR1*、*SIM*、*KAK*、*SPY*、*CPR5*和*RHL*,通过BLSAT找到这些基因在大豆中的同源基因,利用Primer3Web在线网站(<http://primer3.ut.ee/>)设计qRT-PCR引物,并以Actin(*Glyma.18G290800*)作为内参基因。PCR产物大小为140 bp左右,引物序列见表1。

### 1.5 基因表达分析

qRT-PCR实验采用东洋纺生物科技有限公司SYBR Green Realtime PCR Master Mix进行,反应体系为25 μL:2 × Realtime Super Mix 12.5 μL,上下游引物(10 μmol/L浓度)各1 μL, cDNA模板(cDNA原液稀释20倍)1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。qRT-PCR反应程序如下:95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 45 s, 40个循环。利用ABI 7300 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)进行qRT-PCR实验,反应结束后进行相对表达量分析,相对表达量利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。每个反应试验进行3次生物学重复。



表 1 qRT-PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene name	基因编号 Gene-ID	正向引物 (5'-3') Forward primer sequence	反向引物 (3'-5') Reverse primer sequence	扩增长度 (bp) Amplified length
<i>ACTIN</i>	<i>Glyma.18G290800</i>	CGGTGGTTCTATCTTGGCATC	GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA	142
<i>GmGL1</i>	<i>Glyma.13G109100</i>	GTTCGGACCAACCTGATGCCATGTTC	CATTGCACTAGTCATTCTCAG	142
<i>GmGL2</i>	<i>Glyma.15G016500</i>	CTCCCGCTGCCAAGTTAACAATG	GTCTATGACTCTCTATCAAGTG	141
<i>GmGL3</i>	<i>Glyma.08G014900</i>	CTCACAGGACCAAGTGTGCAACA	CTAATGGACTCTCTATGTCACACGG	151
<i>GmTCL1</i>	<i>Glyma.13G314600</i>	GTGAGAGGACAAAAACAAGACAAG	ACACGCAACCTCAAAGGCTAATGC	138
<i>GmRBR1</i>	<i>Glyma.15G230300</i>	CTGCAGAATGGAAGCTGTGCATCA	GGCATTCTACAATCTCACCGCTCA	153
<i>GmSIM</i>	<i>Glyma.03G216100</i>	CCCAGATGAACGGTCAGATTATGAG	GAGAAGCACACAAGTTGGAGGAGAG	141
<i>GmKAK</i>	<i>Glyma.04G004000</i>	GGGCTGGCAGTTCTAAATCCAAAAC	GGTAATTAGCACATGTCATCACAC	139
<i>GmSPY</i>	<i>Glyma.02G201300</i>	GAGTCTTCGAGAGCTCATGTCTAAG	CAGGTTGTTGCAACAGCTCCATGCG	149
<i>GmCPR5</i>	<i>Glyma.06G145800</i>	CCTACGAGCGGATTACTAAAGC	GGCTCATAACTTGAACCTTGACACC	138
<i>GmRHL</i>	<i>Glyma.10G048300</i>	GGCTGAGGATAGGTTCTATAACCGC	GGATCACTGTCAACTAGAGCCAGC	141

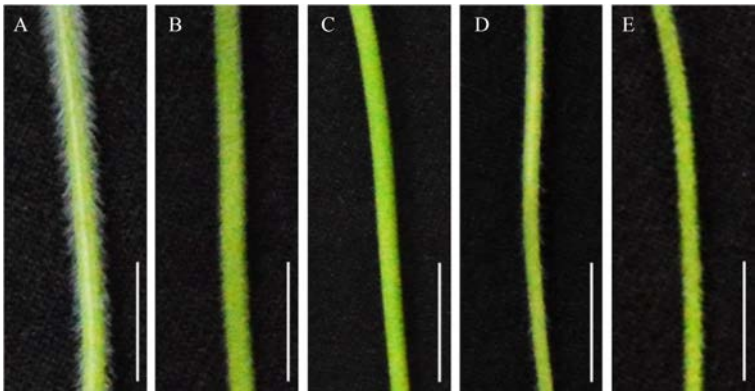
2 结果与分析

2.1 大豆茸毛突变体的表型鉴定

比较野生型和 *ddsp1*、*ddsp2*、*ddsp3* 和 *ddsp4* 4 个突变体的茸毛表型(图 1),可以看出它们之间存在明显差异。野生型的茸毛多而长,*ddsp1* 突变体的茸毛明显变短,*ddsp2* 突变体则看不见茸毛的存在,而 *ddsp3* 和 *ddsp4* 突变体的茸毛显得稀短。除了茸毛上的差异之外,4 个突变体的种子与野生型 ZP661 相比,籽粒大小及百粒重都有显著性变化(图 2)。其中 *ddsp1*、*ddsp2* 和 *ddsp3* 突变体的籽粒明显减小,百粒重显著降低,但 *ddsp4* 突变体的籽粒明显增大,百粒重显著增加。

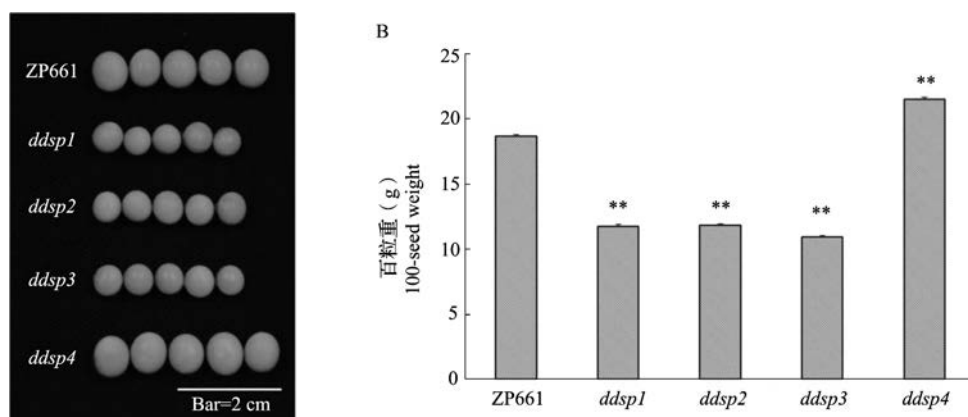
2.2 茸毛突变体的扫描电镜观察

对野生型和 *ddsp1*、*ddsp2*、*ddsp3* 和 *ddsp4* 4 个突变体的苗期茎组织进行扫描电子显微镜观察,与野生型相比,*ddsp1*、*ddsp2*、*ddsp3* 和 *ddsp4* 突变体的茸毛均存在不同程度的变异(图 3,图 4)。与野生型(图 3A、B)相比,*ddsp1* 突变体茸毛长度极显著变短,茸毛的密度没有显著差异(图 3C、D);*ddsp2* 突变体表现出完全没有茸毛的状态(图 3E、F);*ddsp3* 突变体的茸毛与野生型相比,表现出不同茸毛发育异常的类型,有的茸毛完全空瘪,而有的茸毛基部发育正常,但是茸毛顶部却呈现空瘪的状态,且茸毛也变得更加稀疏(图 3G、H);*ddsp4* 突



A~E 分别代表野生型 ZP661,突变型 *ddsp1*、*ddsp2*、*ddsp3* 和 *ddsp4*, bar=1 cm  
A-E represent the wild type ZP661, mutant *ddsp1*, *ddsp2*, *ddsp3* and *ddsp4* respectively, bar = 1 cm

图 1 苗期野生型和突变型的茎上茸毛  
Fig. 1 Pubescence of stems for wild type and mutants at seedling stage



A: 野生型和 4 个突变体的籽粒大小的比较; B: 野生型和 4 个突变体百粒重比较 (n=3);

图中数值均为平均数  $\pm$  标准差, \*\* 代表 0.01 水平下显著, 下同

A: Seed size of wild type and four mutants. B: Comparative analysis of 100-seed weight for wild type and four mutants (n = 3).

All data in the graphs represent means  $\pm$  SD, \*\*:  $P < 0.01$ , the same as below

图 2 野生型 ZP661 和 4 个突变型的籽粒大小和百粒重比较

Fig. 2 Comparison of seed size and 100-seed weight of wild type ZP661 and four mutants

变体的茸毛发育异常,与野生型针状或锥状的茸毛相比, *ddsp4* 突变体的茸毛空瘪,不直立,显得散乱无章,茸毛长度相比于野生型也明显变短(图 3I、J)。进一步对茸毛的长度和密度进行分析,结果表明: *ddsp2* 突变体由于完全没有茸毛,其茸毛的长度和密度都极显著低于野生型; *ddsp4* 突变体的长度和密度也仅有野生型的一半左右;另外两个突变体 *ddsp1* 和 *ddsp3* 尽管茸毛的长度显著低于野生型,茸毛的密度与野生型没有明显差异(图 4A、B)。

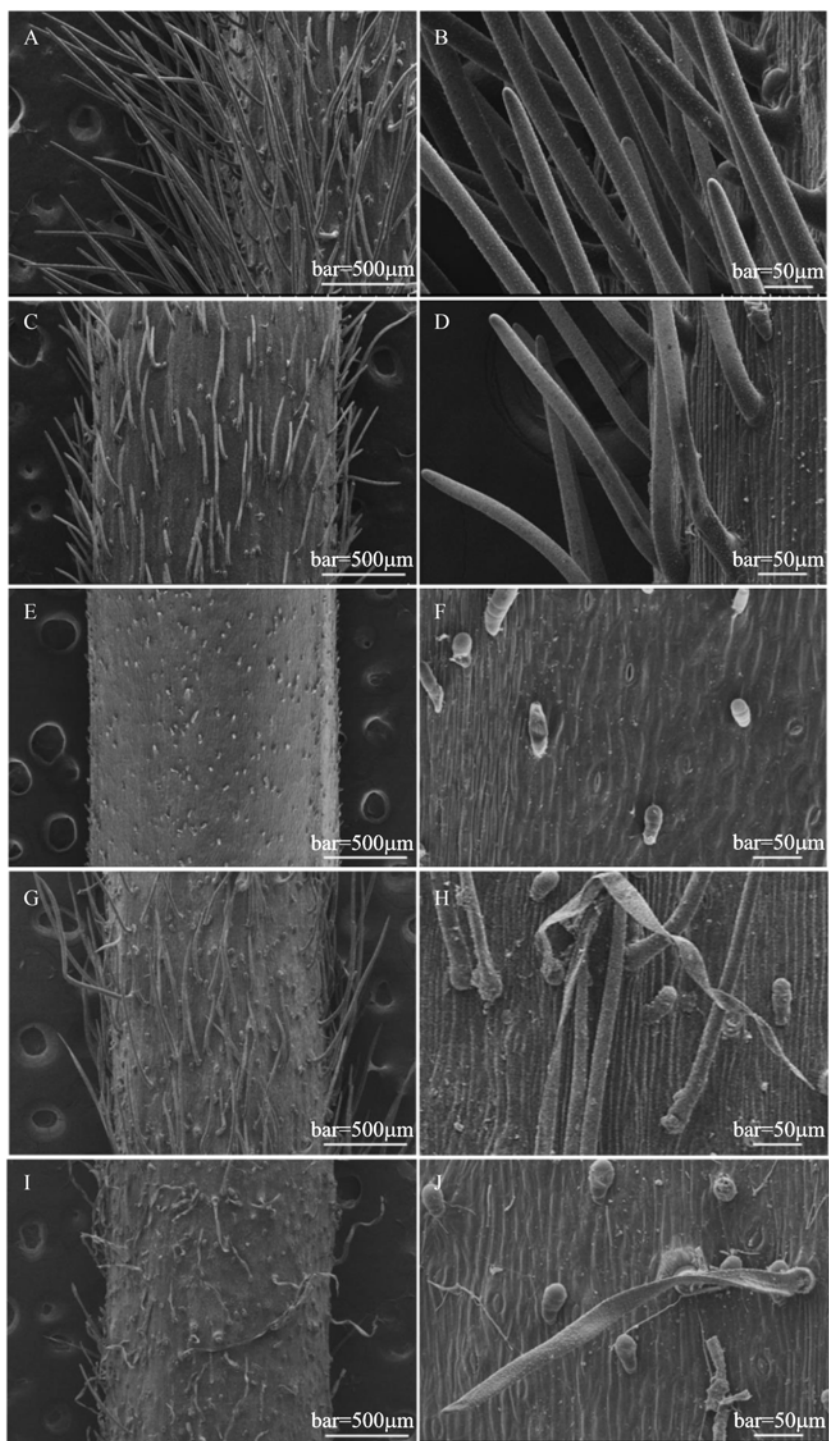
### 2.3 茸毛发育相关基因的表达分析

根据在模式植物拟南芥中的相关研究,选取了 10 个与拟南芥茸毛发育相关的基因 (*GL1*、*GL2*、*GL3*、*TCL1*、*RBR1*、*SIM*、*KAK*、*SPY*、*CPR5* 和 *RHL*),并根据同源序列比对找出大豆中的同源基因。以 Actin 作为内参,利用 qRT-PCR 对野生型和 4 个突变体苗期(培养箱种植 25d)的茎组织进行表达分析(图 5)。结果表明,10 个基因在 4 个突变体中均存在不同程度的表达量变化。在 *GL1* 基因中,突变体 *ddsp2* 的相对表达量相比于野生型 ZP661 显著降低,而突变体 *ddsp4* 的相对表达量升高了 2 倍,突变体 *ddsp1* 和 *ddsp3* 的相对表达量则没有显著变化。在 *GL2* 基因中,突变体 *ddsp1* 的相对表达量相比于野生型 ZP661 显著升高,而突变体 *ddsp4* 的表达量则极显著降低,突变体 *ddsp2* 和 *ddsp3* 的表达量不显著。在 *GL3* 基因中,突变体 *ddsp1* 的相对表达量极显著升高,是野生型 ZP661 的 3 倍,而另外 3 个突变体的相对表达量都没有显著变化。在 *TCL1* 基因中,突变体 *ddsp2* 和 *ddsp4* 的相对表达

量都极显著上升,但突变体 *ddsp1* 和 *ddsp3* 的相对表达量则没有显著改变。在 *RBR1* 基因中,突变体 *ddsp1* 的相对表达量升高了将近 4 倍,而另外 3 个突变体的相对表达量都没有发生显著变化。在 *SIM* 基因中,4 个突变体的相对表达量都极显著升高,且突变体 *ddsp3* 的相对表达量升高了 1 倍以上。在 *KAK* 基因中,4 个突变体的相对表达量也都极显著上升,且表达量都至少升高了 1 倍以上。在 *SPY* 基因中,4 个突变体的相对表达量同样都极显著增加,且都增加了 1~2 倍水平。在 *CPR5* 基因中,4 个突变体的相对表达量也都极显著升高,且表达量增加了 2~5 倍水平。在 *RHL* 基因中,4 个突变体的相对表达量也都是极显著上升,且都至少升高了 3 倍以上。

## 3 讨论

茸毛的细胞结构虽然较为简单,但是其中涉及到的调控网络却是极其复杂的,目前已经至少知道数十个与茸毛发育过程相关的基因,而且涉及到多个不同的信号途径<sup>[8,40]</sup>。大量的遗传与分子研究表明, R2R3 MYB、bHLH (basic helix-loop-helix) 和 WDR (WD40 repeat) 这 3 类转录因子 (TFs) 所构成的调控网络在茸毛发育过程扮演着重要角色<sup>[9]</sup>。还有研究表明赤霉素 (GA)、细胞分裂素 (CK)、茉莉酸 (JA) 等植物激素也都参与了茸毛发育的过程。此外, microRNA 通过影响相关基因的表达水平也可以调控茸毛的发育过程<sup>[41]</sup>,说明茸毛的发育过程涉及到多个信号通路。



A~B: 野生型; C~D: *ddsp1* 突变体; E~F: *ddsp2* 突变体; G~H: *ddsp3* 突变体; I~J: *ddsp4* 突变体

A-B: Wild type, C-D: *ddsp1* mutant, E-F: *ddsp2* mutant, G-H: *ddsp3* mutant, I-J: *ddsp4* mutant

图 3 野生型和突变型茸毛的扫描电镜观察

Fig. 3 SEM analysis of pubescence in mutants and wild type

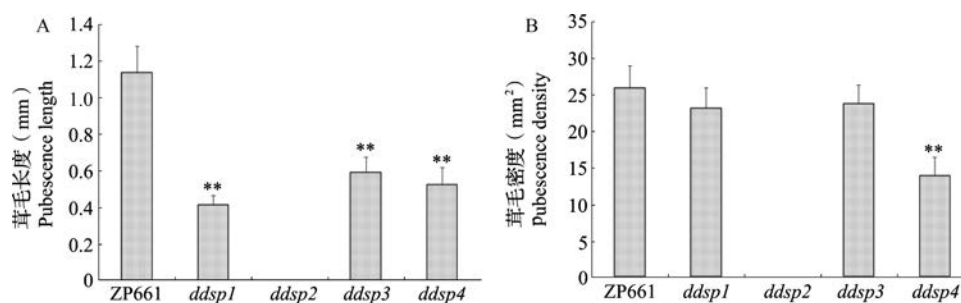


图 4 野生型和 4 个突变型的茸毛长度和密度比较分析

Fig. 4 Comparative analysis of pubescence length and density in wild type ZP661 and four mutants

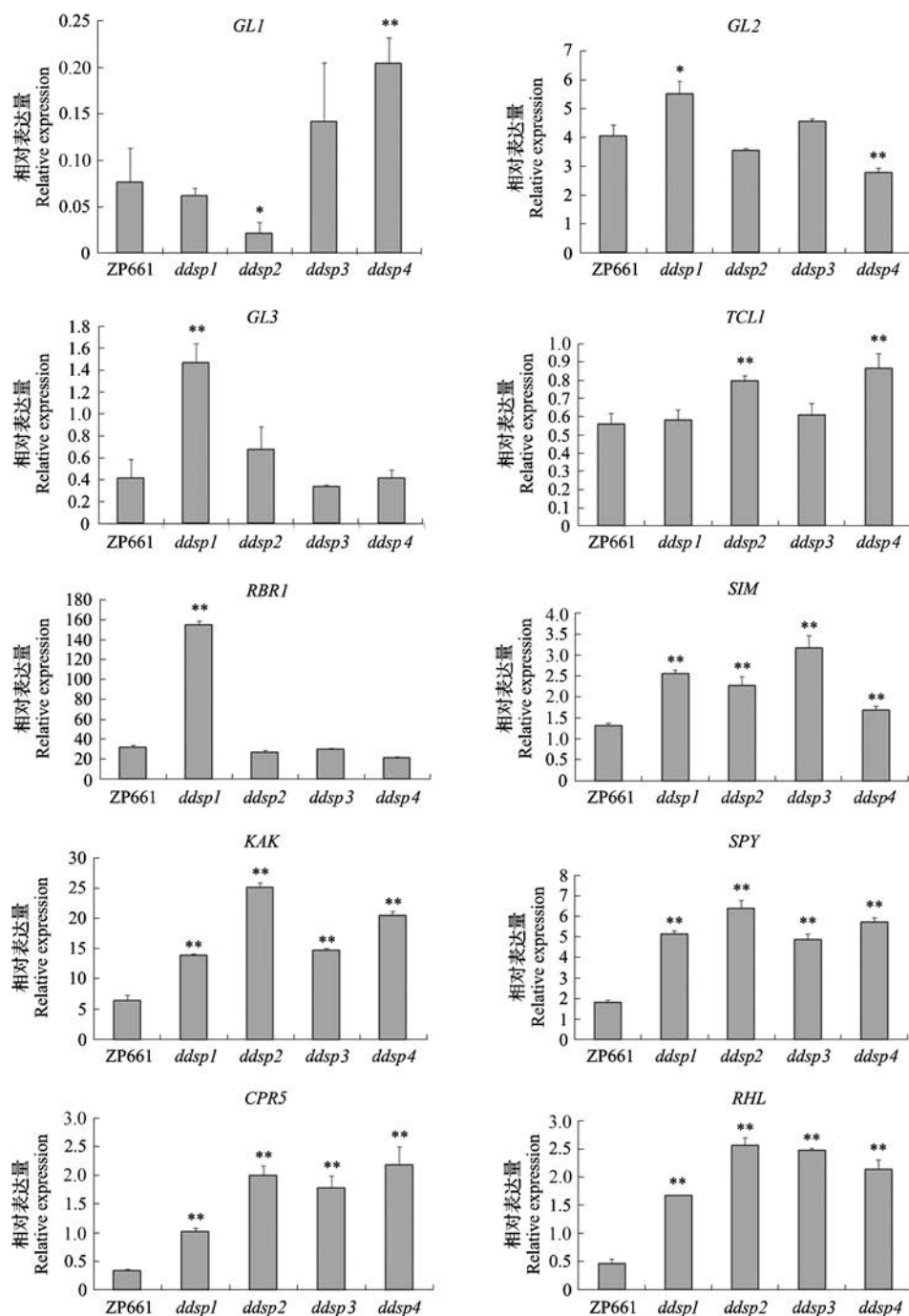


图 5 茸毛发育过程相关基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of genes involved in pubescence development



本研究根据拟南芥中相关研究选取了 10 个可能与大豆茸毛发育相关的基因,通过表达分析探索了这 10 个基因在 4 个茸毛突变体中的表达情况。在短茸毛突变体 *ddsp1* 中,虽然参与正调控茸毛发育起始的基因 *GL2* 和 *GL3* 的相对表达量均升高,但是参与核内复制负调控作用的基因 *RBR1*、*SIM*、*KAK* 和 *SPY* 的相对表达量也都极显著升高,尤其是 *RBR1*,其相对表达量是野生型 ZP661 的 5 倍,从而影响茸毛细胞的伸长扩张。在无茸毛突变体 *ddsp2* 中,参与茸毛发育起始的基因 *GL1* 的相对表达量下降了 2/3 左右,且参与核内复制负调控的基因 *SIM*、*KAK* 和 *SPY* 都极显著升高,说明 *ddsp2* 可能在整个茸毛发育过程都受到抑制作用。在部分茸毛空瘪的突变体 *ddsp3* 中,参与茸毛发育起始作用的基因的相对表达量均没有显著变化,但是 *SIM*、*KAK* 和 *SPY* 的相对表达量都极显著升高,说明核内复制还可能通过影响细胞内容物的含量来影响茸毛的形态结构。而在茸毛完全空瘪的突变体 *ddsp4* 中,虽然 *GL1* 的相对表达量升高了 1 倍,但是 *GL2* 和 *TCL1* 都显著降低,且 *SIM*、*KAK* 和 *SPY* 都极显著升高,表明 *ddsp4* 在茸毛发育的不同阶段都受到了一定的抑制作用。另外,在这 4 个茸毛突变体中,参与核内复制正调控的基因 *CPR5* 和 *RHL* 均存在不同程度的上调表达,说明核内复制过程可能存在某种反馈调节机制且还可能参与了其他生长发育过程。4 个茸毛突变体中参与核内复制调控的基因都显著上调,说明核内复制过程对于维持茸毛结构的正常发育具有重要作用。

茸毛与百粒重及产量等多个农艺性状相关<sup>[23]</sup>,在本研究的 4 个茸毛突变体中,籽粒大小均有所变化,其中 3 个突变体的百粒重减小,1 个突变体的百粒重增加,可能是由于与茸毛发育相关的基因存在一因多效,如拟南芥中的 *CPR5* 是一个典型的一因多效基因<sup>[42]</sup>,除了参与细胞壁的合成,控制拟南芥表皮毛的发育之外<sup>[43]</sup>,还参与了植株衰老的调控过程<sup>[44]</sup>,还可通过 LOX(脂氧合酶)途径和 ABA 信号途径控制种子萌发和萌发后的抑制过程<sup>[45]</sup>,并且还通过对水杨酸和非折叠蛋白的调控来平衡植株的生长发育和对逆境胁迫的响应<sup>[46]</sup>。*CPR5* 基因编码一个跨膜核孔蛋白,是核孔蛋白复合体的重要组成部分,其可通过构想的改变来控制核运输过程,表明 *CPR5* 基因很可能是一个在上游阶段调控多个信号途径的阀门<sup>[47]</sup>。另外,茸毛性状本身也

可影响其他性状,如茸毛可以防御紫外损伤,避免过度的蒸腾作用,防止病虫害的侵害等<sup>[6,23]</sup>。目前,不管是关于大豆茸毛性状本身的研究(如大豆茸毛是单细胞还是多细胞结构,大豆茸毛发育的基本过程及相关基因),还是茸毛性状与其他性状的关系的研究(如茸毛的长短疏密和着生状态对抗病、抗虫及抗旱等的影响,茸毛性状与产量性状之间的关系及内在分子机制),都尚显不足。鉴于此,本研究希望能对大豆茸毛的相关研究提供些许参考和思路。

### 参考文献

- [1] Werker E. Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research*, 2000, 31: 1-35
- [2] Wagner G J, Wang E, Shepherd R W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*, 2004, 93(1): 3-11
- [3] Wagner G J. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*, 1991, 96(3): 675-679
- [4] Choi Y E, Lim S, Kim H J, Han J Y, Lee M H, Yang Y, Kim J A, Kim Y S. Tobacco NtLTP1, a glandular-specific lipid transfer protein, is required for lipid secretion from glandular trichomes. *The Plant Journal*, 2012, 70(3): 480-491
- [5] Huchelmann A, Boutry M, Hachez C. Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest. *Plant Physiology*, 2017, 175(1): 6-22
- [6] Yamasaki S, Murakami Y. Continuous UV-B irradiation induces endoreduplication and trichome formation in cotyledons, and reduces epidermal cell division and expansion in the first leaves of pumpkin seedlings. *Journal of Radiation Research*, 2014, 52: 203-209
- [7] 普莉,索金凤,薛勇彪. 植物表皮毛发育的分子遗传控制. *遗传学报*, 2003, 30(11): 1078-1084
- [8] Pu L, Suo J F, Xue Y B. Molecular control of plant trichome development. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(11): 1078-1084
- [9] Schellmann S, Hülkamp M. Epidermal differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a model system. *International Journal of Developmental Biology*, 2005, 49(5-6): 579-584
- [10] Pattanaik S, Patra B, Singh S K, Yuan L. An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 259
- [11] 肖开转,毛小辉,林悦龙,朱永生,蔡秋华,谢华安,张建福. 植物茸毛形成的分子机制及其生理功能. *科学通报*, 2017, 62(30): 3451-3460
- [12] Xiao K Z, Mao X H, Lin Y L, Zhu Y S, Cai Q H, Xie H A, Zhang J F. Molecular mechanism and physiological function of trichome formation in plant. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(30): 3451-3460
- [13] Oppenheimer D G, Herman P L, Sivakumaran S, Esch J, Marks M D. A *myb* gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell*, 1991, 67(3): 483-493
- [14] Masucci J D, Rerie W G, Foreman D R, Zhang M, Galway M E,



- Marks M D, Schiefelbein J W. The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 1996, 122 ( 4 ): 1253-1260
- [ 13 ] Walker A R, Davison P A, Bolognesi-Winfield A C, James C M, Srinivasan N, Blundell T L, Esch J J, Marks M D, Gray J C. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*, 1999, 11 ( 7 ): 1137-1350
- [ 14 ] Payne C T, Zhang F, Lloyd A M. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics*, 2000, 156 ( 3 ): 1349-1362
- [ 15 ] Ishida T, Kurata T, Okada K, Wada T. A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 365-386
- [ 16 ] Schnittger A, Hulskamp M. Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 2002, 357 ( 1422 ): 823-826
- [ 17 ] 刘艳霞,王娟,兰海燕. 基因调控网络调节植物表皮毛发育的研究进展. *分子植物育种*, 2017, 15 ( 4 ): 1362-1370
- Liu Y X, Wang J, Lan H Y. Advance in gene regulatory network of plant trichome development controlling. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15 ( 4 ): 1362-1370
- [ 18 ] Yang C, Ye Z. Trichomes as models for studying plant cell differentiation. *Cell and Molecular Life Science*, 2013, 70 ( 11 ): 1937-1948
- [ 19 ] 邢光南,赵团结,王柬人,盖钧镒. 大豆叶茸毛着生状态的变异及其与豆卷叶螟抗性的相关性. *大豆科学*, 2009, 28 ( 5 ): 768-773
- Xing G N, Zhao T J, Wang J R, Gai J Y. Variation of leaf pubescence status and its association with resistance to bean pyralid ( *Lamprosema indicata* Fabricius ) in soybean. *Soybean Science*, 2009, 28 ( 5 ): 768-773
- [ 20 ] 邢光南,谭连美,刘泽稀楠,岳汉,张寒竹,史鸿飞,赵团结,盖钧镒. 大豆地方品种叶片叶柄茸毛性状的形态变异及其与豆卷叶螟抗性的相关分析. *大豆科学*, 2012, 31 ( 5 ): 691-696
- Xing G N, Tan L M, Liu Z X N, Yue H, Zhang H Z, Shi H F, Zhao T J, Gai J Y. Morphological variation of pubescence on leaf blade and petiole and their correlation with resistance to bean pyralid ( *Lamprosema indicata* Fabricius ) in soybean landraces. *Soybean Science*, 2012, 31 ( 5 ): 691-696
- [ 21 ] Komatsu K, Okuda S, Takahashi M, Matsunaga R, Nakazawa Y. Quantitative trait loci mapping of pubescence density and flowering time of insect-resistant soybean ( *Glycine max* L. Merr. ). *Genetics and Molecular Biology*, 2007, 30 ( 3 ): 635-639
- [ 22 ] 邢光南,刘泽稀楠,谭连美,岳汉,王宇峰, Kim H J,赵团结,盖钧镒. 大豆叶面茸毛密度和长度的 QTL 定位. *作物学报*, 2013, 39 ( 1 ): 12-20
- Xing G N, Liu Z X N, Tan L M, Yue H, Wang Y F, Kim H J, Zhao T J, Gai J Y. QTL mapping of pubescence density and length on leaf surface of soybean. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39 ( 1 ): 12-20
- [ 23 ] Hunt M, Kaur N, Stromvik M, Vodkin L. Transcript profiling reveals expression differences in wild-type and glabrous soybean lines. *BMC Plant Biology*, 2011, 11 ( 1 ): 145
- [ 24 ] Ren Q, Pfeiffer T W, Ghabrial S A. Relationship between soybean pubescence density and soybean mosaic virus field spread. *Euphytica*, 2000, 111 ( 3 ): 191-198
- [ 25 ] Pfeiffer T, Peyyala R, Ren Q, Ghabrial S. Increased soybean pubescence density: Yield and Soybean mosaic virus resistance effects. *Crop Science*, 2003, 43 ( 6 ): 2071-2076
- [ 26 ] Du W J, Fu S X, Yu D Y. Genetic analysis for the leaf pubescence density and water status traits in soybean [ *Glycine max* ( L. ) Merr. ]. *Plant Breeding*, 2009, 128 ( 3 ): 259-265
- [ 27 ] Oki N, Komatsu K, Sayama T, Ishimoto M, Takahashi M, Takahashi M. Genetic analysis of antixenosis resistance to the common cutworm ( *Spodoptera litura* Fabricius ) and its relationship with pubescence characteristics in soybean ( *Glycine max* ( L. ) Merr. ). *Breeding Science*, 2012, 61 ( 5 ): 608-617
- [ 28 ] Oppenheimer D G, Herman P L, Sivakumaran S, Esch J, Marks M D. A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell*, 1991, 67 ( 3 ): 483-493
- [ 29 ] Caro E, Castellano M M, Gutierrez C. A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in *Arabidopsis*. *Nature*, 2007, 447: 213-217
- [ 30 ] Fornero C, Suo B, Zahde M, Juveland K, Kirik V. Papillae formation on trichome cell walls requires the function of the mediator complex subunit Med25. *Plant Molecular Biology*, 2017, 95 ( 4 ): 389-398
- [ 31 ] Shangguan X X, Yang C Q, Zhang X F, Wang L J. Functional characterization of a basic helix-loop-helix ( bHLH ) transcription factor GhDEL65 from cotton ( *Gossypium hirsutum* ). *Physiologia Plantarum*, 2016, 158 ( 2 ): 200-212
- [ 32 ] Tian H, Wang X, Guo H, Cheng Y, Hou C, Chen J, Wang S. NTL8 regulates trichome formation in *Arabidopsis* by directly activating R3 MYB genes *TRY* and *TCLI*. *Plant Physiology*, 2017, 174 ( 4 ): 2363-2375
- [ 33 ] Desvoyes B, Ramirez-Parra E, Xie Q, Chua N H, Gutierrez C. Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiology*, 2006, 140 ( 1 ): 67-80
- [ 34 ] Kumar N, Harashima H, Kalve S, Bramsiepe J, Wang K, Sizani B L, Bertrand L L, Johnson M C, Faulk C, Dale R, Simmons L A, Churchman M L, Sugimoto K, Kato N, Dassanayake M, Beemster G, Schnittger A, Larkin J C. Functional conservation in the SIAMESE-RELATED Family of cyclin-dependent kinase inhibitors in land plants. *The Plant Cell*, 2015, 27 ( 11 ): 3065-3080
- [ 35 ] Perazza D, Herzog M, Hülkamp M, Brown S, Dorne A M, Bonneville J M. Trichome cell growth in *Arabidopsis thaliana* can be derepressed by mutations in at least five genes. *Genetics*, 1999, 152 ( 1 ): 461-476
- [ 36 ] Perazza D, Vachon G, Herzog M. Gibberellins promote trichome formation by up-regulating *GLABROUS1* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 1998, 117 ( 2 ): 375-383
- [ 37 ] Bowling S A, Clarke J D, Liu Y D, Klessig D F, Dong X N. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *The Plant Cell*, 1997, 9 ( 9 ): 1573-1584