

叶卫军, 吴泽江, 田东丰, 等. 绿豆窄叶突变体 *vrnl9* 基因的精细定位与转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(2): 203-212.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.02.002

绿豆窄叶突变体 *vrnl9* 基因的精细定位与转录组分析

叶卫军, 吴泽江, 田东丰, 张 阴, 张玲玲, 周 斌
(安徽省农业科学院作物研究所, 安徽 合肥 230031)

摘要: 叶片是绿豆最重要的光合作用场所, 其形态结构影响光合作用、群体结构和产量。筛选和鉴定绿豆叶形突变体材料, 为探究叶片发育的分子调控机理和叶形遗传改良奠定基础。在皖科绿 3 号 EMS(Ethyl methyl sulphonate) 诱变突变体库中鉴定出 1 个窄叶突变体 *vrnl9*, 并对该突变体进行表型鉴定、基因定位和转录组分析。表型分析发现, 窄叶突变体 *vrnl9* 叶片宽较野生型皖科绿 3 号显著减小, 叶面积和叶柄长也显著缩减; 突变体主茎退化, 生育期延长 10 d。在突变位点的定位中, 本研究利用苏绿 16-10 与突变体 *vrnl9* 杂交构建的 F_2 群体进行遗传分析和基因精细定位。结果表明, 窄叶突变体 *vrnl9* 的窄叶表型受单个隐性核基因控制 ($\chi^2 = 1.40$)。BSA 测序分析将突变位点定位在第 9 染色体上 0~3.1 Mb 的区间内, 结合图位克隆的方法, 本研究将窄叶基因 *vrnl9* 定位在标记 *NL-15* 和 *NL-28* 之间 354.6 kb 的区间内。转录组学分析发现, 与野生型皖科绿 3 号相比, 突变体 *vrnl9* 中有 182 个基因的表达量发生显著改变, 其中 86 个上调、96 个下调。KEGG 分析结果表明, 差异表达基因显著富集在植物激素信号传导、萜类骨架的生物合成、玉米素的生物合成等代谢通路。这些研究结果为克隆窄叶基因 *vrnl9* 和解析绿豆叶片生长发育的分子调控机理提供理论依据。

关键词: 绿豆; 窄叶; *vrnl9* 基因; 基因定位; 转录组分析

中图分类号: S522 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024) 02-0203-10

Fine mapping and transcriptome analysis of a narrow leaf mutant gene *vrnl9* in mungbean

YE Wei-jun, WU Ze-jiang, TIAN Dong-feng, ZHANG Yin, ZHANG Ling-ling, ZHOU Bin
(Crop Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: Leaf is the most important place for mungbean photosynthesis, and its morphological structure affects photosynthesis, population structure and yield in mungbean. Screening and identification of leaf shape mutants can lay the foundation for studying molecular regulation mechanism of leaf development and genetic improvement of leaf shape in mungbean. A narrow leaf mutant *vrnl9* was identified from an ethyl methyl sulfonate (EMS) induced Wankeliu 3 (WK3) mutant library. Phenotype identification, gene mapping and transcriptome analysis for *vrnl9* were completed. Phenotype analysis showed that the leaf width, leaf area and petiole length of *vrnl9* were significantly decreased compared with wild-type WK3. The main stem of mutant degenerated and the growth period was extended by ten days. In order to map the mutation site, the F_2 population constructed by the cross between Suli16-10 and the mutant *vrnl9* was used for genetic analysis and fine mapping. The narrow leaf trait of *vrnl9* was controlled by a single recessive nuclear gene ($\chi^2 = 1.40$). The BSA sequencing analysis showed that the

mutation site was located within an interval of 0~3.1 Mb on chromosome 9. The narrow-leaf gene *vrnl9* was finally narrowed down to a 354.6 kb region between the markers *NL-15* and *NL-28* by using map-based cloning strategy. Transcriptome analysis revealed that the expression levels of 182 genes in mutant *vrnl9* were significantly changed com-

收稿日期: 2022-12-30

基金项目: 国家食用豆产业技术体系项目 (CARS-08-Z11)

作者简介: 叶卫军 (1988-), 男, 安徽合肥人, 博士, 主要从事食用豆遗传育种和基因挖掘研究。 (E-mail) 963472965@163.com

通讯作者: 周 斌, (E-mail) 18756019871@139.com

pared with wild-type WK3, of which 86 genes were up-regulated and 96 genes were down-regulated. KEGG analysis results showed that the differentially expressed genes were significantly enriched in plant hormone signal transduction, terpenoid backbone biosynthesis, zeatin biosynthesis and other metabolic pathways. These results provide a theoretical basis for cloning *vrnl9* and understanding the molecular regulation mechanism of leaf development in mung bean.

Key words: mungbean; narrow leaf; *vrnl9* gene; gene mapping; transcriptome analysis

绿豆[*Vigna radiata* (L.) Wilczek] 是豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科 (Papilionaceae) 菜豆族 (Phaseoleae) 豇豆属 (*Vigna* L.) 中的一个种, 染色体组为 $2n=2x=22$ 。绿豆具有喜温、耐贫瘠、耐荫、生育期短、适播期长且经济效益高等特点, 在高产、优质、高效农业生产中发挥了重要作用。目前, 绿豆主要种植在亚洲、非洲、南美洲和澳大利亚等国家和地区, 年均种植面积超过 $6 \times 10^6 \text{ hm}^2$ [1]。绿豆作为豆科作物, 具有固氮能力, 可培肥、改良土壤。因此, 绿豆常与水稻、小麦等轮作, 可以减施氮肥, 减轻病、虫危害, 提高作物产量, 增加经济效益 [2-3]。此外, 绿豆籽粒营养丰富, 蛋白质含量高, 可加工成绿豆糕、绿豆汤、绿豆芽菜、绿豆粉丝、绿豆酒等多种产品; 绿豆籽粒还富含多种维生素、矿物质及活性物质, 具有解毒、抗过敏、抗菌抑菌、抗肿瘤等功效, 绿豆属药食两用作物 [4-5]。绿豆籽粒中铁元素含量较高, 被亚洲蔬菜研究与发展中心认定为富含铁食物, 适用于改善缺铁引发的贫血症 [6]。由于绿豆主要种植在发展中国, 常被划为小杂粮, 相关的基础研究较少, 其基因组学和分子遗传学研究水平落后于水稻、玉米等大宗作物 [7]。随着农业种植结构的调整和居民饮食观念的改变, 绿豆等杂粮作物的研究投入加大, 研究水平提高, 研究内容更加深入, 促进了绿豆产业的发展。Kang 等 [8] 率先完成了绿豆全基因组测序工作, 获得第一张绿豆基因组序列草图 (431 Mb), 促进了绿豆遗传学和基因组学的发展。

叶片是绿豆最重要的光合作用场所, 影响群体冠层结构和最终产量。因此, 探究绿豆叶形调控机理不仅具有重要的理论价值, 也有助于叶形和株型的遗传改良。模式植物拟南芥和水稻中叶形调控机理研究已较为清晰, 一些关键调控基因已被克隆。拟南芥中 *PINI* 和水稻中 *NALI* 与生长素极性运输相关, 通过影响生长素的浓度调控叶片形态发育 [9-10]。生长素响应因子基因 *ETT/ARF3* 和 *ARF4* 在拟南芥叶片的背轴面生长发育过程中发挥重要作用 [11-12]。水稻中生长素响应因子基因 *ARF11* 功能缺失后, 叶片变窄 [13]。

此外, *KANADI* 基因家族和 *YABBY* 基因家族在拟南芥和水稻叶片的生长发育中也发挥十分重要的调控作用 [14-16]。目前, 对绿豆复叶形态发育和遗传调控的研究已取得了一定进展。遗传分析结果表明, 绿豆裂叶性状由两对基因控制 [17], 裂叶对卵圆叶表现为半显性, 第 3 染色体上编码 A20/AN1 锌指结构域的转录因子基因 (*Vradi03g04470*) 应为裂叶性状的调控基因 [18]。王洁 [19] 基于大花叶和冀绿 9 号变异株杂交衍生的 RIL 群体, 在第 3 和第 10 染色体上鉴定出多个调控叶片缺刻性状的 QTL, 且第 3 染色体上编码糖基转移酶 (*LOC106757416*) 的基因为最佳候选基因。利用绿豆叶形突变体材料, Jiao 等 [20-21] 克隆了 2 个绿豆叶片发育关键调控基因 *UN* 和 *RRF1*。虽然绿豆叶形调控的分子机理已有报道, 但复叶发育是一个复杂的生物学过程, 有多个调控基因参与。目前绿豆中已克隆的叶形调控基因仍然较少, 其遗传调控网络仍不清晰, 需要定位和克隆更多相关基因。同时, 绿豆叶形遗传调控机理的解析也为绿豆叶形的遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绿豆窄叶突变体 *vrnl9* 为皖科绿 3 号经 EMS 诱变后获得, 经多代自交后, 其窄叶表型稳定。2019 年夏季以 *vrnl9* 为母本, 与正常叶形的苏绿 16-10 (江苏省农业科学院选育) 杂交, 构建遗传分析和定位群体。2020 年夏季和 2021 年夏季分别将 F_1 和 F_2 群体种植在安徽省农业科学院院内基地。

1.2 性状调查与遗传分析

绿豆植株叶长、叶宽等表型性状的调查测量方法按照《绿豆种质资源描述规范和数据标准》[22] 执行, 叶面积检测三出复叶中间小叶的面积。在 F_1 和 F_2 代观察群体叶片表型, F_2 分离群体中统计具有窄叶表型和正常叶片表型的植株数目, 采用卡方检测分离比。数据分析利用 Excel 和 SPSS 软件完成。

1.3 混池测序及数据分析

以 *vrnl9* 和苏绿 16-10 杂交构建的 F_2 群体 (包含

1 293个单株)为定位群体,采用BSA(Bulked segregate analysis)法构建突变体和野生型2个子代DNA混池,各包含30个单株。利用DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司产品,货号DP305]提取单株DNA,每个混池中各单株DNA等量混合。利用第二代测序技术(Next-generation sequencing, NGS),基于Illumina测序Nova Seq平台对混池和双亲进行基因组重测序。测序完成后,去除带接头及低质量的序列。测序数据以Kang等^[8]公布的绿豆基因组信息为参考,将野生型混池、突变混池和双亲一起检测InDel和SNP位点,鉴定覆盖全基因组的InDel和SNP位点。BSA-seq分析采用Fekih等^[23]和Takagi等^[24]提出的基于SNP-index的基因定位方法。以双亲间的SNP为参考,以苏绿16-10的基因型为背景,分别计算两个混池中每1个SNP位点的SNP-index和Delta SNP-index^[23]。SNP-index分布情况以窗口形式展现,窗口大小设置为500 kb,步长为100 kb,计算每个窗口中SNP-index。进行10 000次置换检验,选取95%和99%置信水平作为筛选阈值。

1.4 精细定位

BSA-seq分析完成后,根据双亲核苷酸序列差异,用Primer Premier 5.0软件在窄叶性状连锁的候选区间设计引物,再用F₂群体中隐性单株对BSA-seq的定位结果进行验证和基因精细定位。PCR反应总体系为10.0 μl:DNA模板(50 ng/μl)1.0 μl,2×T5 Super PCR Mix(北京擎科生物科技股份有限公司产品)5.0 μl,上、下游引物(10 μmol/L)各0.5 μl,灭菌双蒸水3.0 μl。PCR扩增反应程序如下:(1)98℃预变性2 min;(2)然后98℃变性10 s,57℃退火10 s,72℃延伸10 s,38个扩增循环;(3)最后72℃充分延伸5 min;(4)8℃保存。InDel标记扩增产物用8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳完成后银染显色,统计分析各单株基因型;SNP标记扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段,DNA测序鉴定基因型。

1.5 转录组分析

野生型和突变体出苗21 d后,取完全展开的复叶中间叶片用于转录组分析,每个样品3次重复。利用Trizol试剂盒提取叶片总RNA,质量检测合格后用Oligo(dT)磁珠从总RNA中富集带有polyA结构的mRNA,经离子打断,得到长度为300 bp左右的RNA片段。以获得的RNA片段为模板,反转录合成cDNA第一链,然后以cDNA第一链为模板完

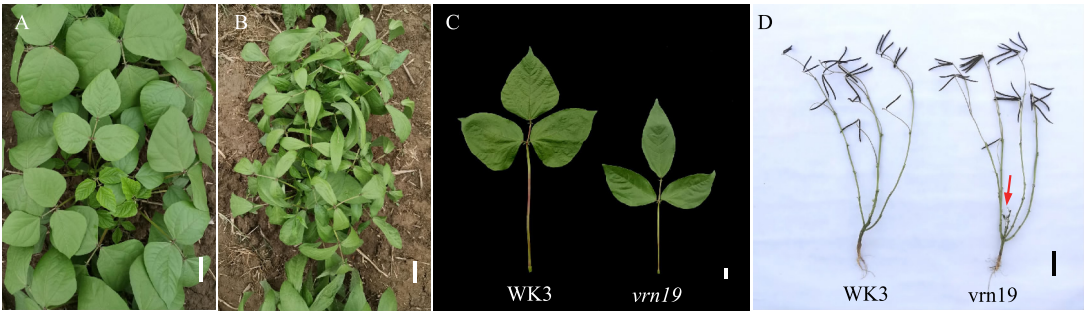
成cDNA第二链的合成。采用PCR扩增的方法完成文库片段富集,文库大小在450 bp,并利用Agilent 2100 Bioanalyzer对文库进行质量检测。构建好的文库采用Novaseq-PE150平台进行测序,测序和数据分析工作由派森诺生物科技有限公司(上海)完成。

首先对原始测序数据进行质量过滤,去除带接头、低质量和较短的Read,用HISAT2软件将筛选后的高质量测序数据(Clean read)比对到绿豆的参考基因组上(<https://data.legumeinfo.org/Vigna/radiata/>)。使用HTSeq统计比对到每1个基因上,得到Read Count值,作为基因的原始表达量,采用FPKM(Fragments per kilo base per million fragments)方法对基因表达量进行标准化^[25]。利用DESeq2软件^[26]对野生型和突变体中基因的表达量进行差异分析,差异表达基因(Differentially expressed genes, DEG)的筛选条件为:基因表达量的倍数变化(Fold change)大于2即 $|\log_2(\text{Fold change})| > 1$,显著性 $P < 0.05$ 。根据DEG分析的结果,使用Blast2 Go软件对DEG进行GO功能注释(<http://www.geneontology.org/>),并利用topGO进行GO富集分析。利用KAAS^[27]对DEG进行KEGG注释(<https://www.kegg.jp/kegg/genome/>),用KOBAS软件进行代谢通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 突变体 *vrrl9* 的表型分析

野生型皖科绿3号和突变体 *vrrl9* 的农艺性状如表1所示。在苗期,与野生型相比, *vrrl9* 的叶片明显变窄(图1A~图1C)。皖科绿3号的叶片宽12.09 cm,而 *vrrl9* 的叶片宽5.86 cm,较野生型减少51.53%,差异达极显著水平。 *vrrl9* 和野生型的叶片长没有显著差异,但叶片变窄导致 *vrrl9* 的叶面积较野生型皖科绿3号减少了34.51%。 *vrrl9* 的叶柄长也显著降低,较野生型减少了48.72%。基因突变显著延长了绿豆的开花期,增加了 *vrrl9* 的全生育期天数。 *vrrl9* 的主茎明显退化(图1D),突变体主茎高(15.20 cm)较野生型(70.60 cm)降低78.47%;主茎节数(6.57)较野生型(11.33)减少42.01%,且差异均达到极显著水平($P < 0.01$)。突变体和野生型其他性状如荚长、荚宽和单株荚数等相比无显著差异。



A: 皖科绿 3 号苗期表型, 标尺=5 cm; B: 突变体 *vrn19* 苗期表型, 标尺=5 cm; C: 皖科绿 3 号 (WK3) 和突变体 *vrn19* 叶片表型, 标尺=2 cm; D: 皖科绿 3 号 (WK3) 和突变体 *vrn19* 成熟植株表型, 红色箭头指示突变体 *vrn19* 主茎, 标尺=10 cm。

图 1 野生型皖科绿 3 号与突变体 *vrn19* 表型
Fig.1 Phenotype of wild-type Wankelü 3 (WK3) and mutant *vrn19*

表 1 皖科绿 3 号和突变体 *vrn19* 农艺性状分析

Table 1 Agronomic traits analysis of WK3 and mutant *vrn19*

农艺性状	皖科绿 3 号	突变体 <i>vrn19</i>
叶片长 (cm)	14.46±0.71	14.86±0.64
叶片宽 (cm)	12.09±0.79	5.86±0.53 **
叶面积 (cm ²)	114.31±12.15	74.86±4.60 **
叶柄长 (cm)	23.91±1.22	12.26±1.14 **
开花期 (d)	35.67±0.58	41.00±1.00 **
全生育天数 (d)	53.67±0.58	63.67±0.58 **
主茎高 (cm)	70.60±1.92	15.20±1.48 **
主茎节数	11.33±0.82	6.57±0.53 **
分枝数	2.50±0.55	3.43±0.53
荚长 (cm)	10.58±0.44	10.13±0.24
荚宽 (cm)	0.53±0.02	0.54±0.03
单株荚数	25.00±4.06	22.83±3.31
单荚粒数	12.00±1.10	11.75±0.46
百粒质量 (g)	5.45±0.07	5.33±0.06

** 表示差异达极显著水平 ($P<0.01$)。

2.2 突变体 *vrn19* 的遗传分析

突变体 *vrn19* 是在皖科绿 3 号 EMS 诱变 M2 代群体中被发现, 子代表型分析发现突变表型植株的后代均表现为窄叶, 与突变体同一个株系的部分正常表型植株后代可分离出窄叶突变体, 表明突变体 *vrn19* 的突变性状由隐性基因控制。以突变体 *vrn19* 为母本, 苏绿 16-10 为父本进行杂交, F_1 代均表现为正常叶片表型, F_2 群体分离出窄叶表型和正常叶形植株。在 F_2 群体中随机调查了 244 个植株的表型,

其中正常表型的植株 191 株, 窄叶表型的植株 53 株。经卡方分析, 正常植株与窄叶植株比例符合 3 : 1 的理论分离比 ($\chi^2 = 1.40 < \chi^2_{0.05} = 3.84$), 表明突变体 *vrn19* 的窄叶表型受 1 对隐性核基因控制 (表 2)。

2.3 窄叶基因 *vrn19* 的精细定位

在突变体 *vrn19* 和苏绿 16-10 杂交的 F_2 代群体中各取 30 个窄叶表型和正常表型的单株叶片, 分别构建突变型和野生型单株的 DNA 混池, 与亲本一起进行基因组重测序。将野生型混池、突变体混池和双亲的测序数据一起检测 InDel 和 SNP 位点, 共检测到 31 033 个 InDel 和 155 978 个 SNP 位点。SNP-index 分析结果显示, 第 9 染色体上 0~3.1 Mb 的区间内 Delta SNP-index 值较基因组其他区域明显增加, 该区间内 1 410 个 SNP 位点的 Delta SNP-index 均值为 0.54, 表明与窄叶性状关联的位点可能位于该区间内 (图 2)。为验证 BSA-seq 定位结果, 在目标区间附近筛选了 10 个分子标记, 获得亲本间多态性表现较好的 InDel 分子标记 A9-2, 位于定位区间的右侧。利用 A9-2 对 F_2 群体中 21 个突变表型的单株进行基因型分析, 结果表明 A9-2 与窄叶基因 *vrn19* 存在连锁关系。根据双亲间的核苷酸序列差异, 在 A9-2 的左翼设计了多个 InDel 标记, 获得多态性 InDel 标记 NL-5 和 NL-15。用这 2 个标记对 21 个窄叶表型的单株进行基因型分析, 结果发现 NL-5 (图 3) 和 NL-15 与 *vrn19* 都表现为连锁关系, 根据交换情况将 *vrn19* 初步定位在这 2 个标记之间。为进一步缩小候选区间, 在 NL-5 和 NL-15 之间又开发了 3 对有多态性的 SNP 标记 (NL-20、NL-28、NL-23)。利用

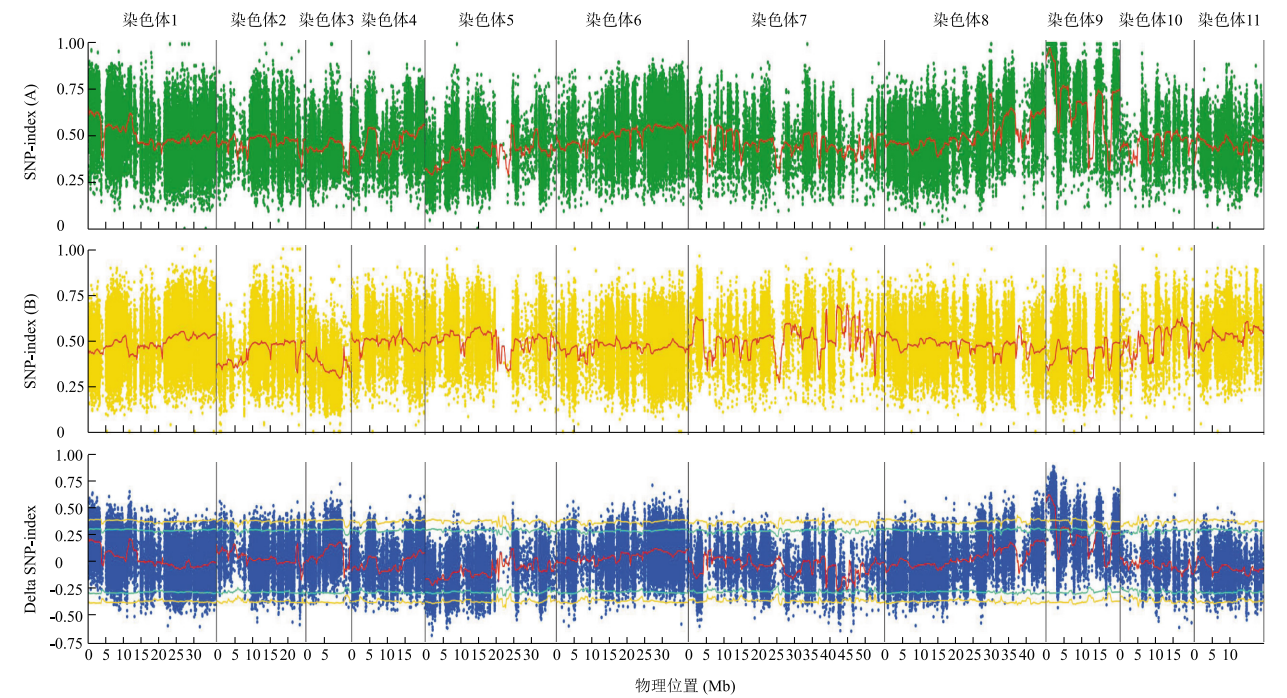
多态性分子标记(表3)对 F_2 群体中 255 个突变表型的单株进行基因型鉴定,结果发现在标记 *NL-15* 和 *NL-28* 处均有交换发生,且两处的交换单株不重复。因此,*vrnl9* 被锚定在这 2 个标记间 354.6 kb 的区间

内(图4)。利用绿豆基因组数据库(<https://legacy.legumeinfo.org/genomes/jbrowse/?data=Vr1.0>)对候选区间的基因进行预测分析,发现区间内共有 38 个注释基因。

表 2 窄叶突变体 *vrnl9* 的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of the narrow leaf mutant *vrnl9*

组合	总株数	正常植株数	窄叶植株数	期望比	$\chi^2_{0.05}$ 值	<i>P</i> 值
突变体 <i>vrnl9</i> ×苏绿 16-10	244	191	53	3 : 1	1.40	0.24



SNP-index (A): 突变体混池的 SNP-index 分布图; SNP-index (B): 野生型混池的 SNP-index 分布图。红线为窗口下 SNP-index 或 Delta SNP-index 的均值; 绿线和橙线分别为 95% 和 99% 置信水平阈值线。

图 2 SNP-index 和 Delta SNP-index 在染色体上的分布

Fig.2 Distribution of SNP-index and delta SNP-index on chromosomes

表 3 窄叶基因 *vrnl9* 精细定位所用分子标记

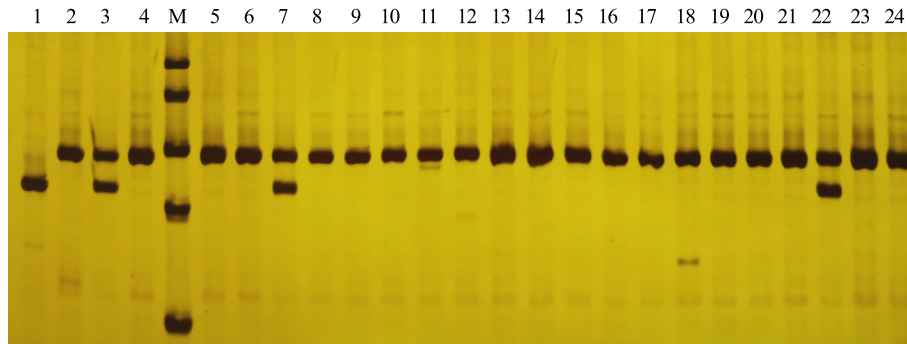
Table 3 Molecular markers used for fine mapping of narrow-leaf gene *vrnl9*

标记	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>NL-15</i>	AGTGTTCCTCTCATTAAATCTTGT	CTTATTGCTCAAATTGTGGATGGT
<i>NL-20</i>	CTGTGCGACCAATAGGATGAAGGAG	AAATGCTGAAAAGGGATTGGGAGAA
<i>NL-28</i>	ATTCTAGTTTACTATCATCTCGGA	GGCTGAGAGGTTAAGGAAGAAGACT
<i>NL-23</i>	TCTAGGGTTATAGGTAAGGATTC	ATGGATTTTGTGCTGTATTGGGA
<i>NL-5</i>	CACACTTATCTGTTCTGAACCTCG	GCATTGAGAAAGTTATCTACCACTG
<i>A9-2</i>	CGAATCAACTCAATCGAGCA	GACACGATCGAGCCAAGTTT

2.4 窄叶基因 *vrnl9* 的转录组分析

2.4.1 差异表达基因的鉴定 转录组测序完成后,

以 $|\log_2(\text{Fold chang})| > 1$, 且 $P < 0.05$ 为差异表达基因的筛选条件, 鉴定在突变体 *vrnl9* 和野生型皖科绿



1: 苏绿 16-10; 2: 突变体 *vrnl9*; 3: F_1 ; M: DNA marker I; 4~24: F_2 群体中突变体表型的单株。

图 3 利用标记 *NL-5* 对 F_2 群体中 21 个突变体单株的基因型分析结果

Fig.3 Genotype analysis for the 21 F_2 plants with mutant phenotype using the marker *NL-5*

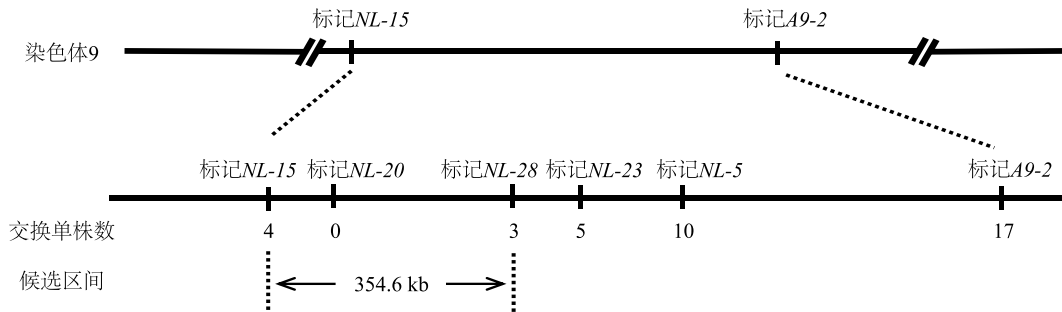


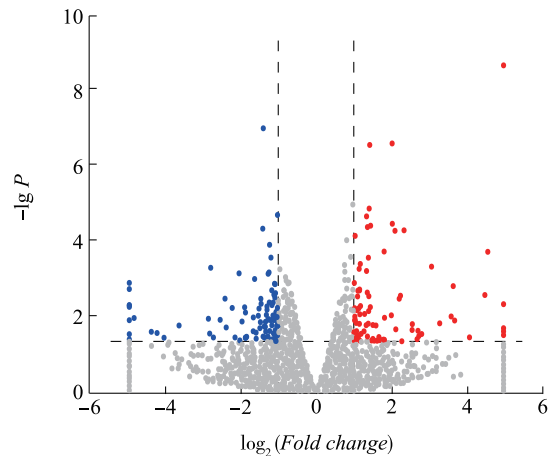
图 4 *vrnl9* 的精细定位

Fig.4 Fine mapping for *vrnl9*

3 号间差异表达的基因。结果共筛选出 182 个差异表达基因。与野生型皖科绿 3 号相比,在突变体 *vrnl9* 中基因表达量上调的有 86 个,表达量下调的有 96 个(图 5)。

2.4.2 差异表达基因的 GO 富集分析 对差异表达的基因 (DEG) 进行 GO 富集分析,按照生物过程 (Biological process)、细胞组分 (Cell component)、分子功能 (Molecular function) 分类和富集分析。每项分类挑选富集最显著的前 10 个 GO term 进行展示 (图 6)。在生物过程类别中 DEG 显著富集在苯丙素响应、细胞对脂质的响应、激素水平调节等生物过程;细胞组分类别中 DEG 显著富集在胞外区、细胞外空间等区域;在分子功能类别中,DEG 显著富集在 RNA 聚合酶 II 转录调节区序列特异性 DNA 结合和双加氧酶活性等功能组中。

2.4.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析 利用 KEGG 数据库对突变体和野生型中的差异表达基因 (DEG) 进行功能分类和 Pathway 注释,有 55 个差异基因可以详细注释到 33 条信号通路中(图 7)。富



红点表示显著上调的基因;蓝点表示显著下调的基因;灰点表示表达量无显著差异的基因。

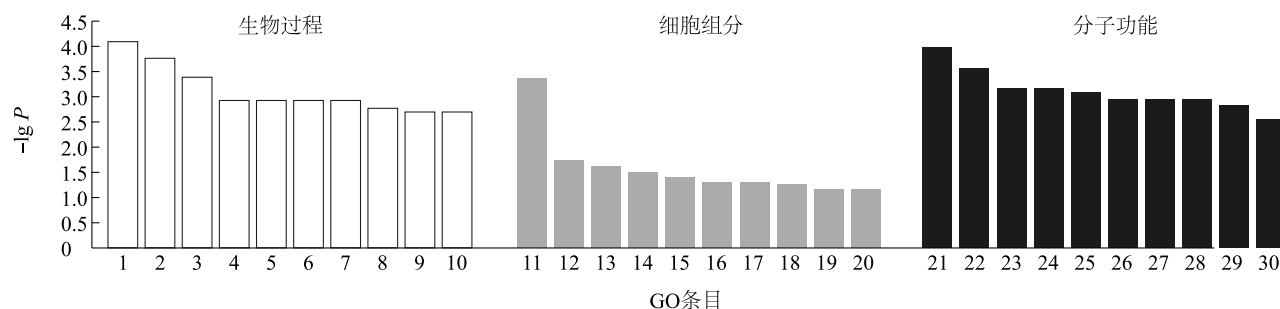
图 5 突变体 *vrnl9* 与皖科绿 3 号叶片中差异表达基因 (DEG) 火山图

Fig.5 Volcano map of differentially expressed genes (DEG) in leaves of *vrnl9* and WK3

集分析结果表明,有 30 个 DEG 显著富集在新陈代谢通路中,如萜类骨架的生物合成、玉米素的生物合

成及角质、木栓质和蜡质的生物合成等;11 个 DEG 显著富集在环境信息处理中,参与激素信号转导和 MAPK 信号通路;5 个 DEG 富集在遗传信息处理,参与核苷酸切除修复、内质网中的蛋白质加工、RNA

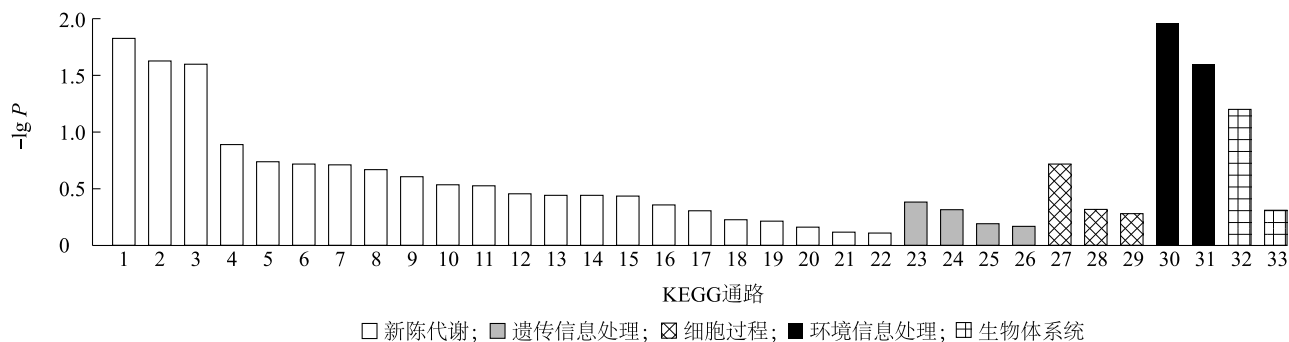
降解和 mRNA 监测途径;5 个 DEG 富集在细胞过程通路中,参与过氧化物酶、胞吞作用和吞噬体途径;4 个 DEG 富集在生物体系统中,参与植物昼夜节律调控及植物-病原体互作。



1: 苯丙素响应;2: 细胞对脂质的响应;3: 激素水平调节;4: 肽类激素的分泌;5: 激素分泌;6: 激素分泌调节;7: 肽类激素分泌调节;8: 类异戊二烯代谢过程;9: 种子休眠过程;10: 休眠过程;11: 胞外区;12: 细胞外空间;13: 核苷酸切除修复因子 1 复合物;14: 磷酸丙酮酸水合酶复合物;15: ERCC4-ERCC1 复合物;16: 细胞壁;17: 外部封装结构;18: 蛋白质储存液泡膜;19: 核苷酸切除修复复合物;20: 甘油-3-磷酸脱氢酶复合物;21: RNA 聚合酶 II 转录调节区序列特异性 DNA 结合;22: 双加氧酶活性;23: 磷酸酶抑制剂活性;24: 2-酮戊二酸-依赖性双加氧酶活性;25: 序列特异性双链 DNA 结合;26: 羧酸结合;27: 有机酸结合;28: 氧化还原酶活性(根据配对的供体,结合或还原氧分子);29: 转录调节区序列特异性 DNA 结合;30: 氧化还原酶活性。

图 6 差异表达基因 GO 功能分类

Fig.6 GO functional classification of differentially expressed genes



1: 萜类骨架的生物合成;2: 玉米素的生物合成;3: 角质、木栓质和蜡质的生物合成;4: 硒化合物的代谢;5: 氨基糖和核苷酸糖代谢;6: 戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化;7: 半胱氨酸和蛋氨酸代谢;8: 托烷、哌啶和吡啶类生物碱的生物合成;9: 二萜类生物合成;10: 类黄酮生物合成;11: 类胡萝卜素的生物合成;12: 脂肪酸生物合成;13: 脂肪酸降解;14: 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成;15: 泛醌和其他萜类醌的生物合成;16: 光合生物中的碳固定;17: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢;18: 丙酮酸代谢;19: 甘油磷脂代谢;20: 糖降解/糖异生;21: 淀粉和蔗糖的代谢;22: 苯丙烷类生物合成;23: 核苷酸切除修复;24: 内质网中的蛋白质加工;25: RNA 降解;26: mRNA 监测途径;27: 过氧化物酶;28: 胞吞作用;29: 吞噬体;30: 植物激素信号转导;31: MAPK 信号通路(植物);32: 昼夜节律(植物);33: 植物-病原体互作。

图 7 差异表达基因 KEGG 通路富集分析

Fig.7 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

3 讨论

EMS 诱变可极大提高基因突变频率,在功能基因组学研究中,常用于突变体的创制。与其他理化剂相比,EMS 诱变引发的变异以点突变为主,染色体畸变较少,且创制的突变体变异类型丰富^[28],在拟南芥^[29]、水稻^[30]、小麦^[31]、大豆^[32]等突变体种质

创制中应用广泛。在之前的研究工作中,本团队利用 EMS 诱变的方法构建皖科绿 3 号突变体库,获得了多个叶形、株高、生育期变异的突变体^[28]。在前人的研究中,绿豆叶形突变体材料在叶片的生长发育调控机理研究中已得到应用。绿豆单叶突变体 un(Unifoliate leaf)的突变表型受单隐性核基因调控,UN 基因编码 1 个 LFY(LEAFY)同源蛋白,该基

因突变后,三出复叶变为单叶^[20]。绿豆 *RRF1* 基因编码 CUC/NAM (CUP-SHAPED COTYLEDON/NO APICAL MERISTEM) 蛋白,该基因突变后绿豆的叶轴变短,三出复叶有变为单片裂叶的趋势^[21]。

叶片的形态结构是重要的育种目标性状之一。多数大豆育种学家认为窄叶有利于提高群体中、下部光照度,增加中、下部叶片的受光面积,从而提升叶片总体光合效率,达到提升产量的目的。皖科绿 3 号突变体库中发现的 1 个窄叶突变体 *vml9*,其叶宽、叶面积和叶柄长度较野生型显著减少,主茎明显退化,主茎节数减少,开花期和全生育期延长,表明 *vml9* 是 1 个多效基因,基因突变后影响绿豆植株整体的形态发育。

随着基因组测序技术的发展,基于测序技术的 BSA-seq 技术被广泛应用于基因定位和克隆^[23],可快速完成目的基因所在候选区间的确定。该方法在水稻^[33]、玉米^[34]、小麦^[35]等作物中应用较多,在花生^[36]、大豆^[37]、绿豆^[38-39]等豆科作物中也有应用。利用 BSA-seq 方法将 *vml9* 定位在第 9 染色体上 0~3.1 Mb 的区间内,并利用分子标记 A9-2 验证了 BSA-seq 的定位结果。基于亲本核苷酸序列差异,在定位区间内设计了多个多态性 InDel 和 SNP 标记,最终将 *vml9* 定位在标记 *NL-15* 和 *NL-28* 之间 354.6 kb 的区间内,该区间包含 38 个预测基因。转录组测序是近年发展起来的用来鉴定差异表达基因的技术,常用于筛选突变体和野生型间的 DEG,有利于解析农艺性状遗传调控网络^[40]。本研究利用转录组测序技术共筛选出 182 个 DEG,未发现叶形调控基因 *UN* 和 *RRF1* 的表达量发生显著改变,说明 *vml9* 独立于这 2 个基因调控绿豆叶形。转录组测序分析没有在候选区间内鉴定到 DEG,表明突变体和野生型中 *vml9* 的表达量无显著差异,推测是突变体中核苷酸的变异引起了蛋白功能的变化,从而导致表型变异。

研究结果表明植物激素如生长素、赤霉素等参与调控植物叶片的生长发育^[41]。本研究中,GO 分析发现多个 DEG 显著富集在激素的分泌和调节类别中,可能影响了突变体 *vml9* 中植物激素的合成和代谢,从而影响了叶片发育。KEGG 富集分析发现,有 30 个 DEG 显著富集在萜类骨架的生物合成、玉米素的生物合成及角质、木栓质和蜡质的生物合成等新陈代谢通路中。玉米素主要参与细胞分裂和组

织分化,角质、木栓质和蜡质也参与植物组织的构建,这些通路中相关基因表达量的改变可能是突变体形态结构改变如叶片变窄、主茎退化的主要原因。此外,其他 DEG 参与的新陈代谢通路如植物激素信号转导通路调控植物的生长发育(如萌发、开花、休眠等)、防御和环境适应等过程^[42-43];植物 MAPK 信号通路参与植物激素信号转导,生物和非生物胁迫等信号转导^[44];植物昼夜节律通路影响植物的开花和成熟,这些通路中的 DEG 表达量的改变也可能影响了突变体 *vml9* 的生育期相关表型。由此可见,DEG 参与的各通路是一个相互联系的整体网络,共同调控突变体 *vml9* 的生长发育。这些研究结果为窄叶基因 *vml9* 的克隆奠定基础,也为解析绿豆叶片发育的分子遗传机理提供参考。

4 结论

本研究从皖科绿 3 号 EMS 诱变突变体库中获得 1 个绿豆窄叶突变体 *vml9*,该突变体的叶片宽较野生型显著减小,叶面积和叶柄长度也显著降低,主茎退化,生育期延长。遗传分析结果表明突变体 *vml9* 的突变表型受单个隐性核基因控制。利用图位克隆的方法,将窄叶基因 *vml9* 定位在第 9 染色体上标记 *NL-15* 和 *NL-28* 之间 354.6 kb 的区间内,包含 38 个注释基因。转录组学分析发现,突变体 *vml9* 中有 182 个基因的表达量发生显著改变,其中 86 个表达量上调,96 个表达量下调。GO 功能富集分析显示,DEG 显著富集在苯丙素响应、细胞对脂质的响应、激素的分泌和调节等生物过程。KEGG 通路富集分析发现,DEG 显著富集在萜类骨架的生物合成、玉米素的生物合成及角质、木栓质和蜡质的生物合成等代谢通路。

参考文献:

- [1] NAIR R M, SCHAFLEITNER R, KENYON L, et al. Genetic improvement of mung bean[J]. SABRAO Journal of Breeding and Genetics, 2012, 44(44): 177-190.
- [2] YAQUB M, MAHMOOD T, AKHTAR M, et al. Induction of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] as a grain legume in the annual rice-wheat double cropping system[J]. Pakistan Journal of Botany, 2010, 42(5): 3125-3135.
- [3] ALAM M K, ISLAM M M, SALAHIN N, et al. Effect of tillage practices on soil properties and crop productivity in wheat-mungbean-rice cropping system under subtropical climatic conditions [J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 1-15.

- [4] 陈 新,袁星星,陈华涛,等. 绿豆研究最新进展及未来发展方向[J]. 金陵科技学院学报,2010,26(2):59-68.
- [5] 王明海,徐 宁,包淑英,等. 绿豆的营养成分及药用价值[J]. 现代农业科技,2012(6):341-342.
- [6] KIM S K, NAIR R M, LEE J, et al. Genomic resources in mungbean for future breeding programs[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015,6:626.
- [7] 赵 丹,程须珍,王丽侠,等. 绿豆基因组研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(5):583-588.
- [8] KANG Y J, KIM S K, KIM M Y, et al. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species[J]. *Nature Communications*, 2014,5:5443.
- [9] GUENOT B, BAYER E, KIERZKOWSKI D, et al. Pin1-independent leaf initiation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(4):1501-1510.
- [10] XU J, WANG L, ZHOU M Y, et al. *Narrow albino leaf 1* is allelic to *CHR729*, regulates leaf morphogenesis and development by affecting auxin metabolism in rice[J]. *Plant Growth Regulation*, 2017,82(1):175-186.
- [11] HUNTER C, WILLMANN MR, WU G, et al. Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2006,133(15):2973-2981.
- [12] 乐丽娜,黄敏仁,陈 英.植物叶形态建成的分子机理研究进展[J].分子植物育种,2016,14(11):3205-3213.
- [13] SAKAMOTO T, MORINAKA Y, INUKAI Y, et al. Auxin signal transcription factor regulates expression of the brassinosteroid receptor gene in rice[J]. *Plant Journal*, 2013,73(4):676-688.
- [14] ZHANG G H, XU Q, ZHU X D, et al. SHALLOT-LIKE1 is a KANADI transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abaxial cell development[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(3):719-735.
- [15] DAI M, HU Y, ZHAO Y, et al. A WUSCHEL-LIKE HOMEODOMAIN BOX gene represses a YABBY gene expression required for rice leaf development[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(1):380-390.
- [16] ESHED Y, IZHAKI A, BAUM S F, et al. Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are mediated by KANADI and YABBY activities[J]. *Development*, 2004, 131(12):2997-3006.
- [17] SINGH V P, YADAR R C, SAHARAN R P, et al. 绿豆裂叶的遗传[J]. 国外农学——杂粮作物,1986(4):50-51.
- [18] JIAO K, LI X, GUO W, et al. Genome re-sequencing of two accessions and fine mapping the locus of *lobed leaflet margins* in mungbean[J]. *Molecular Breeding*, 2016,36:128.
- [19] 王 洁. 绿豆高密度遗传图谱构建及重要农艺性状 QTL 定位[D]. 北京:中国农业科学院,2020.
- [20] JIAO K, LI X, SU S, et al. Genetic control of compound leaf development in the mungbean (*Vigna radiata* L.)[J]. *Horticulture Research*, 2019,6:23.
- [21] JIAO K, LI X, GUO Y, et al. Regulation of compound leaf development in mungbean (*Vigna radiata* L.) by *CUP-SHAPED COTYLEDON/NO APICAL MERISTEM* (*CUC/NAM*) gene[J]. *Planta*, 2019,249(3):765-774.
- [22] 程须珍,王素华,王丽侠. 绿豆种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京:中国农业出版社,2006.
- [23] FEKIH R, TAKAGI H, TAMIRU M, et al. MutMap+: genetic mapping and mutant identification without crossing in rice[J]. *PLoS One*, 2013,8(7):e68529.
- [24] TAKAGI H, UEMURA A, YAEGASHI H, et al. MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F₂ progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*[J]. *New Phytologist*, 2013,200(1):276-283.
- [25] TRAPNELL C, WILLIAMS B A, PERTEA G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. *Nature Biotechnology*, 2010,8(5):511-515.
- [26] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014,15:550.
- [27] MORIYA Y, ITOH M, OKUDA S, et al. KAAS:an automatic genome annotation and pathway reconstruction server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007,35:182-185.
- [28] 叶卫军,杨 勇,张丽亚,等. 绿豆 EMS 诱变突变体库的构建及表型分析[J]. 中国农学通报,2020,36(17):36-41.
- [29] MCCALLUM C M, COMAI L, GREENE E A, et al. Targeted screening for induced mutations[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(4):455-457.
- [30] 杨健源,张少红,姜先芽,等. 三黄占 2 号 EMS 诱变突变体库的构建与稻瘟病抗性初步评价[J]. 广东农业科学,2011,38(16):1-3.
- [31] 张 婷,温宏伟,袁 凯,等. 晋麦 47EMS 突变体库的构建及高代突变材料品质性状的初步分析[J]. 核农学报,2021,35(8):1731-1739.
- [32] ZHANG M, ZHANG X, JIANG X, et al. iSoybean:a database for the mutational fingerprints of soybean[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022,20(8):1435-1437.
- [33] GUO Z, CAI L, CHEN Z, et al. Identification of candidate genes controlling chilling tolerance of rice in the cold region at the booting stage by BSA-Seq and RNA-Seq[J]. *Royal Society Open Science*, 2020,7(11):201081.
- [34] KLEIN H, XIAO Y, CONKLIN P A, et al. Bulk-segregant analysis coupled to whole genome sequencing (BSA-Seq) for rapid gene cloning in maize[J]. *G3 (Bethesda)*, 2018,8(11):3583-3592.
- [35] KLYMIUK V, CHAWLA H S, WIEBE K, et al. Discovery of stripe rust resistance with incomplete dominance in wild emmer wheat using bulked segregant analysis sequencing[J]. *Communications Biology*, 2022,5(1):826.
- [36] ZHANG K, YUAN M, XIA H, et al. BSA-seq and genetic mapping reveals *AhRt2* as a candidate gene responsible for red testa of

- peanut[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2022, 135(5): 1529-1540.
- [37] ZHANG Y, SONG J, WANG L, et al. Identifying quantitative trait loci and candidate genes conferring resistance to *soybean mosaic virus* SC7 by quantitative trait loci-sequencing in soybean[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 843633.
- [38] 关伊宁,邱丹,李信,等. 绿豆荚粒数增多突变体 snpp1 的表型分析及基因定位[J]. 分子植物育种, 2021, 19(15): 5071-5076.
- [39] LIU J, LIN Y, CHEN J, et al. Identification and clarification of *VrCYCA1*; a key genic male sterility-related gene in mungbean by multi-omics analysis[J]. Agriculture, 2022, 12(5): 686.
- [40] 李军,吴霁黄,高广春,等. 番红花多柱头突变体 Cs5 的转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6): 1630-1632.
- [41] ZHAO B, LIU Q, WANG B, et al. Roles of phytohormones and their signaling pathways in leaf development and stress responses[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3566-3584.
- [42] 张林魁,韩忠耀,王传明,等. 阴地蕨全转录组分析及植物激素信号转导相关基因筛选[J]. 广西植物, 2020, 40(4): 536-545.
- [43] DURBAK A, YAO H, MCSTEEN P. Hormone signaling in plant development[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2012, 15(1): 92-96.
- [44] 姜生秀,李德禄. 植物丝裂原活化蛋白激酶级联信号转导通路研究进展[J]. 西北植物学报, 2016, 36(6): 1278-1284.

(责任编辑:成纾寒)