



# 大豆波状卷叶新种质 NWL1 特性鉴定与基因定位

简朴, 王亚琪, 李亚蔚, 孔杰杰, 赵团结

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室(综合)/作物遗传与种质创新国家重点实验室/江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为给大豆叶发育研究及株型改良提供新的基因资源及相关信息, 通过对大豆波状卷叶新材料 NWL1 的性状评价与基因定位, 比较 NWL1 与野生型之间形态农艺性状、光合生理特性的差异, 并对波状卷叶控制基因进行基因定位。结果表明: 突变体 NWL1 植株自第 3 片复叶起叶缘呈波浪状, 切片观测发现其叶脉表皮细胞排列不规则; 农艺性状调查发现杂交后代波状卷叶植株的株高及产量构成因子性状值均低于野生型, 但也存在单株荚、粒数较多的波状卷叶单株可供选择。2 个杂交组合后代的遗传分析表明该波状卷叶性状受两对隐性基因 *wl1*、*wl2* 控制, 还发现所有波状卷叶植株均为灰毛, 表明茸毛色与波状卷叶基因紧密连锁或共分离。利用 W82 × NWL1 群体 F<sub>2</sub> 群体 77 个隐性单株, 将 *wl1* 基因定位在第 6 号染色体上 SSR 标记 BARCSOYSSR\_06\_0971 和 BARCSOYSSR\_06\_1008 之间约 1.0 Mb 区间。从定位区间的 56 个候选基因中选出调控黄酮醇苷表达的茸毛色基因 Glyma.06G202300, 测序发现 NWL1 等突变材料中该基因第三个外显子中第 79 个碱基 A 缺失, 致其后氨基酸序列改变。*wl2* 被定位在第 7 号染色体 SSR 标记 AF186183 和 BARCSOYSSR\_07\_1143 之间, 二者遗传距离为 25.1 cM。

**关键词:** 大豆; 波状叶; 基因定位; 黄酮醇苷

## Characterization and Gene Mapping of A Wavy Leaf Line NWL1 in Soybean

JIAN Pu, WANG Ya-qi, LI Ya-wei, KONG Jie-jie, ZHAO Tuan-jie

(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/ National Center for Soybean Improvement/ Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean (General), Ministry of Agriculture/ National Key Laboratory for Crop Genetic and Germplasm Enhancement/ Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In order to evaluate the characteristics and map the target genes of a new wavy leaf mutant, and to provide new genetic resources and useful information for the deep study on leaf development and plant type breeding in soybean. Performance of morphological and photosynthetic characteristics between NWL1 and its wild type line was investigated, and inheritance and gene mapping work was also conducted. It was showed that the third and late growth trifoliate leaves of mutant line NWL1 appeared wavy margin, and the epidermal cells arranged irregularly in comparison with those in wild type line. The values of plant height and yield component trait of F<sub>2</sub> mutant plants were lower than those of wild type. However, there were some mutant plants with high pod and seed number for selection. Genetic analysis showed that the mutant phenotype was controlled by two pairs of recessive genes, *wl1* and *wl2*, and all mutant plants performed gray pubescence, indicating pleiotropy or tight linkage of these two genes for pubescence color and wavy leaf margin. *wl1* gene was located on chromosome 06 between SSR markers BALCSOYSSR\_06\_0971 and BALCSOYSSR\_06\_1008 with physical distance of about 1.0 Mb using 77 F<sub>2</sub> recessive plants from W82 × NWL population. There were 56 predicted genes in the *wl1* mapping region, and the pubescence gene Glyma.06G202300 involved in the expression of flavonol glycosides was selected to sequence. It was found that a base A deletion appeared to change amino acid sequences at the 79th base position in the third exon of Glyma.06G202300. *wl2* was located on chromosome 07 between the markers AF186183 and BARCSOYSSR\_07\_1143 with genetic distance of 25.1 cM. No wavy leaf locus was previously reported in the mapping region of *wl2*.

**Keywords:** Soybean; Wavy leaf; Gene mapping; Flavone glycosides

叶片是植物进行光合作用的主要场所, 也是株型构成的重要因素。自然界中植物叶片大小、形色各异, 受复杂的遗传体系控制<sup>[1]</sup>。不同的叶形态对光能吸收有不同的影响, 多数植株会伸展叶片以吸收更多的光能<sup>[2]</sup>, 但也发现一些叶片卷曲变异, 包括叶片上卷(偏下性生长)、叶片下卷(偏上性生

长)、叶片卷皱等。研究发现叶肉组织和叶脉生长发育状态的差异会导致叶片卷曲<sup>[3]</sup>。叶片适度的卷曲可以维持叶片挺直, 减少叶片的蒸腾作用, 提高植株在干旱条件下的忍耐力<sup>[4-5]</sup>。卷叶也可能影响植株的光合速率<sup>[6]</sup>。研究表明: 水稻 *nrl7* 突变体叶片卷曲, 突变体的光合速率与野生型相比下降了

收稿日期: 2018-04-27

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0101500); 长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT\_17R55); 中央高校基本科研业务费专项资金(KYT201801); 江苏省现代作物生产协同创新中心项目(JCIC-MCP)。

第一作者简介: 简朴(1991-), 女, 硕士, 主要从事大豆分子育种研究。E-mail: 2015101068@njau.edu.cn。

通信作者: 赵团结(1969-), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: tjzhao@njau.edu.cn。

17%<sup>[7]</sup>,而水稻半卷叶突变体 *rlm1* 光合效率则高于野生型<sup>[8]</sup>。目前已克隆一些植物卷叶基因并揭示了其功能,在水稻中发现了 20 多个控制卷叶的基因,11 个已被克隆<sup>[7]</sup>,玉米 *ROLLED LEAF1* (*RLD1*)、拟南芥 *PHABULOSA* (*PHB*)、*PHAVOLUTA* (*PHV*) 等基因也与卷叶形成有关<sup>[9]</sup>。水稻一些卷叶变异已用于育种,如叶片微卷的 IR8、籼稻卷叶品种密阳 23、及叶片内卷直立的杂交稻组合“协优 9308”、“两优培九”等均得到广泛利用,*rl(t)* 等卷叶基因具有育种利用潜力<sup>[10-11]</sup>。

大豆叶形态多样,即使是同一植株上叶片也可能存在不同形状,这是生态环境和遗传进化作用的产物<sup>[12]</sup>。大豆叶片的叶缘一般表现为全缘平展,遗传材料 T176、T205 的叶片表现出波浪状卷曲,受 2 对隐性重叠基因 *lw1*、*lw2* 控制,并发现杂交后代只有灰色茸毛植株中会出现波状叶性状,棕毛植株则没有<sup>[13-14]</sup>。大豆叶卷曲性状的育种利用潜力仍待研究。本研究拟利用从栽培大豆黄山七月黄 × 野生大豆 N23460 杂交后代获得的波状卷叶突变体材料 NWL1,开展目标性状形态与生理特性鉴定、遗传与基因定位、候选基因发掘等研究,以期为深入揭示大豆叶形态建成分子机理、挖掘特异基因资源提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

波状卷叶突变体材料为黄山七月黄 × 辽宁野生大豆 N23460 组合通过系谱选择获得的 F<sub>7</sub> 代稳定品系,其叶片边缘呈波浪状卷起,命名为 NWL1 (Nanjing wavy leaf 1)。其叶缘正常的姊妹系作为野生型对照,命名为 NWL1-WT。

### 1.2 试验设计

通过形态细胞学观察、杂交后代的农艺性状比较及光合参数的比较分析研究 NWL1 的农艺特性。2015 年 8 月以正常叶形态品种 Williams 82 (简称为 W82)、南农 1138-2 (NN1138-2) 为母本分别与 NWL1 进行杂交组合,同年 11 月在海南加代 W82 × NWL1 组合部分杂交种子;2016 年在南京农业大学江浦农学试验站种植 W82 × NWL1、NN1138-2 × NWL1 组合 F<sub>1</sub> (分别获得 10 株、6 株) 和 W82 × NWL1 组合 F<sub>2</sub> 代 (530 株)。2017 年种植 W82 × NWL1 组合 F<sub>1</sub> (10 株)、F<sub>2</sub> 代 (587 株),同时种植 312 个 F<sub>2</sub> 正常单株衍生的 F<sub>2:3</sub> 群体。种植 NN1138-2 × NWL1 组合 F<sub>1</sub> (6 株)、F<sub>2</sub> 代 (171 株)。这 2 个组合 F<sub>1</sub> ~ F<sub>2:3</sub> 代材料用于遗传与基因定位。田间种植均采用行播,行长 2 m,行距 0.5 m,株距 0.1 m。

### 1.3 测定项目与方法

#### 1.3.1 形态农艺特性鉴定

##### (1) 形态和细胞学观察

2016 年种植 NWL1-WT、NWL1,采用穴播方式每隔 15 d 播种一次,播种 5 期,每期各材料重复 3 次并观察两者之间植株叶形态差异。取生长状态一致的突变体 NWL1 及 NWL1-WT V5 期的倒 4 叶叶片,徒手沿叶缘取适当大小的叶片,用 FAA 固定液 (70% 乙醇 90 mL、40% 甲醛 5 mL 和冰醋酸 5 mL) 进行固定,并用真空泵抽真空,让固定液与叶片充分接触。经脱水、透明、石蜡包埋,取横切片,用番红、固绿染色,在显微镜下观察,比较两者的差异<sup>[15]</sup>。

##### (2) 杂交后代农艺性状比较

成熟期从 W82 × NWL1 组合 F<sub>2</sub> 群体中随机选出正常和突变体植株各 15 株,按照邱丽娟等<sup>[16]</sup>的方法分别调查株高、主茎节数、单株荚数、单株粒数、每荚粒数、百粒重等农艺性状。采用 *t* 测验比较突变体与野生型性状间差异的显著性。

1.3.2 叶光合参数测定 在供试材料开花期,于晴朗无云的中午 11:00 - 14:00 间,选取盆栽的野生型和突变体各 3 株,采用便携式气体交换系统 Li-6400 (LI-COR, USA) 测定突变体 NWL1 及野生型 NWL1-WT V5 期倒三叶叶片的净光合速率 (*P<sub>n</sub>*)、气孔导度 (*G<sub>s</sub>*)、胞间 CO<sub>2</sub> 浓度 (*C<sub>i</sub>*) 和蒸腾速率 (*T<sub>r</sub>*) 等光合参数。测定采用 LED 红蓝光源,设置光强 800 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,叶室温度 20℃,CO<sub>2</sub> 浓度恒定为 400 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。读数稳定后分别读取 3 次,取平均值并采用 *t* 测验比较两者差异。

#### 1.3.3 性状遗传与基因定位

##### (1) 遗传分析

在 R1 期调查 W82 × NWL1、NN1138-2 × NWL1 组合杂交后代植株的叶缘类型,分为正常与波浪卷叶两类。调查 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>2:3</sub> 世代各群体中 2 类性状出现的株数,对群体分离比例进行 χ<sup>2</sup> 适合性测验。

##### (2) 基因定位

采用 CTAB 法提取植株 DNA<sup>[17]</sup>。基因定位先采用 BSA 法<sup>[18]</sup>,从 W82 × NWL1 组合 F<sub>2</sub> 群体中随机挑选突变和正常植株各 5 株提取 DNA,提取的 DNA 分别混合,构成 2 个 DNA 混池。利用 1 015 对公共引物筛选两池间的多态标记,引物序列来自 SoyBase (<http://soybase.org/>),并由英骏 (Invitrogen) 生物技术 (上海) 有限公司合成。多态标记用于对这些个体进行基因型分析,并通过 MapMaker 软件进行连锁分析,初步确定基因所在染色体。利用 W82 × NWL1 所有 F<sub>2</sub> 隐性个体进行进一步定位。

PCR 分析所用 *Taq* DNA Polymerase、dNTP Mix 及 DNA Ladder(50 bp)均购买自天根生化科技(北京)有限公司。PCR 总体系包含:2.0  $\mu\text{L}$  10 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  DNA 模板、5.0  $\mu\text{L}$  2  $\times$  *Taq* Master Mix、1.0  $\mu\text{L}$  PCR Forward Primer、1.0  $\mu\text{L}$  PCR Reverse Primer。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,共 35 次循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。取 2  $\mu\text{L}$  加入溴酚蓝的 PCR 产物点样于 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中,在 220 V 恒定电压下电泳 45 ~ 60 min,硝酸银染色观察分析。

(3) 候选基因筛选与测序

根据 *wll* 基因定位两侧的分子标记,确定定位区间,通过 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 网站查询获得该区段内所有预测基因及其注释信息,选择候选基因。利用 RNA 试剂盒(天根生化科技有限公司)提取 NWL1-WT、NWL1 的 RNA。采用 PCR 酶 KOD FX(TOYOBO 日本公司)扩增突变体的编码序列,通过测序序列确定碱基的差异。利用 Primer Premier 5.0 软件设计候选基因 Glyma.06G202300 的测序引物为:引物 1 F 端,TCGGT-GGAAGCCTCCAAATC,R 端,AGTAACCGATGTGGG-GAGGA;引物 2 F 端,GGCAATGGCAGCATTACGTT,R 端,TAAGCTCTGTGCAGTTACGTT;引物 3 F 端,GAGGGACACATTTGACTTTCCA,R 端,TCATGTTTT-

TGGATCTTCACACACT。  
对 Glyma.06G202400 设计的测序引物为:F 端,TTACCTTGACGGCAAAAGTGG,R 端,GGCACACT-GAAAGAGGCACAT。

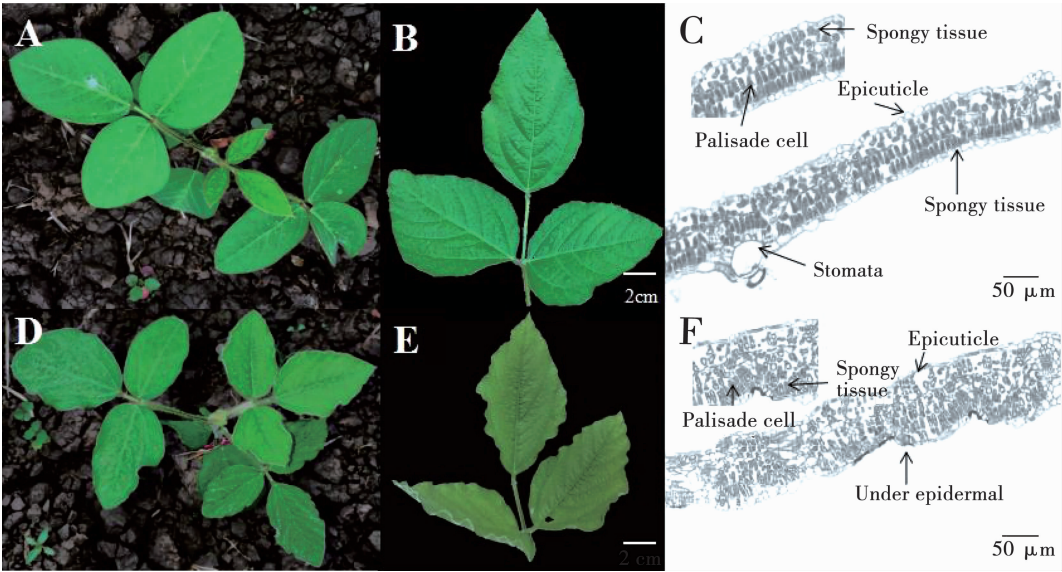
1.4 数据分析

使用 Bioxm 2.7 软件进行序列比对分析,Map-Chart 软件进行遗传连锁图绘制。

2 结果与分析

2.1 植株叶片形态与农艺性状特点

突变体 NWL1 的真叶及随后长出的 2 片复叶小叶叶缘与野生型 NWL1-WT 叶缘一致,都表现出正常叶缘,但之后生长的完全展开复叶的小小叶叶缘则出现卷曲,叶缘似波浪状(图 1A 和 D)。突变体植株因叶边缘表现出明显的波浪状卷曲,极易与正常叶片区分。随着植株生长叶缘卷曲程度越明显,主茎与分枝上的复叶叶缘均呈波浪状,叶面也出现皱缩(图 1B 和 E)。石蜡切片分析可见野生型的叶缘表皮细胞和栅栏组织排列整齐(图 1C),而突变体 NWL1 的表皮细胞排列不规则,出现起伏凹陷现象,栅栏组织在凹陷处也出现不规则排列现象(图 1F)。突变体的叶片上下结构不一致,背面栅栏组织的细胞较野生型明显减少。



A: NWL1-WT 植株叶形态; B: NWL1-WT 第四片复叶; C: NWL1-WT 第四复叶叶缘横切面结构; D: NWL1 植株叶形态; E: NWL1 第四片复叶; F: NWL1 第四复叶叶缘横切面结构。

A: A plant of NWL1-WT; B: The 4th trifoliate of NWL1-WT; C: Section structure of the 4th trifoliate margin of NWL1-WT; D: A plant of NWL1; E: The 4th trifoliate of NWL1; F: Section structure of the 4th trifoliate margin of NWL1.

图 1 野生型 NWL1-WT 和突变系 NWL1 叶形态特点

Fig. 1 Leaf phenotype of wild type NWL1-WT and mutant line NWL1

从表 1 可知, W82  $\times$  NWL1 组合 F<sub>2</sub> 突变体与正常叶缘植株相比,其植株株高、主茎节数、单株荚

数、单株粒数、每荚粒数、百粒重均低于正常叶缘植株,其中株高和单株荚数差异达到显著,其它性状

差异不显著。由于波状卷曲植株各性状均有较大的标准差,说明存在较大的变异可用于选择性状优良的单株。

表 1 W82 × NWL1 组合 F<sub>2</sub> 正常与突变植株 6 个农艺性状表现  
Table 1 Performance of 6 traits of wild-type and mutant plants in W82 × NWL1 F<sub>2</sub> population

类型	株高	主茎节数	单株荚数	单株粒数	每荚粒数	百粒重
Type	Plant height/cm	Node No. on main stem	Pod No. per plant	Seed No. per plant	Seed No. per pod	100-seed weight/g
正常株 Normal	42.58 ± 9.59 a	18.60 ± 3.29 a	44.20 ± 31.66 a	77.00 ± 54.92 a	2.40 ± 0.42 a	17.64 ± 0.32 a
突变株 Mutant	40.10 ± 7.22 b	17.73 ± 1.98 a	40.07 ± 14.80 b	65.47 ± 20.63 a	2.20 ± 0.53 a	17.45 ± 0.43 a

同列不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著。下同。  
Different lowercase in the column indicate significant difference at  $P < 0.05$  level. The same below.

2.2 光合生理特性

叶片光合参数测定结果表明,突变体 NWL1 的净光合速率 ( $P_n$ ) 为  $7.97 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,野生型 NWL1-WT 为  $7.95 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,二者无显著差异(图 2)。胞间二氧化碳的浓度 ( $C_i$ )、NWL1 叶的气孔导度 ( $G_s$ )、蒸腾速率 ( $Tr$ ) 的值分别为 215.71, 0.018, 0.59  $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,均低于野生型 NWL1-WT,但二者之间没有显著差异(表 2)。

表 2 NWL1-WT 和 NWL1 的光合参数的比较  
Table 2 Comparison of photosynthetic parameters between NWL1-WT and NWL1

供试材料	净光合速率	气孔导度	胞间 CO <sub>2</sub> 浓度	蒸腾速率
Tested line	$P_n/(\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$	$G_s/(\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$	$C_i/(\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$	$Tr/(\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$
NWL1-WT	8.21 ± 1.35 a	0.023 ± 0.002 a	278.96 ± 10.17 a	0.63 ± 0.02 a
NWL1	7.97 ± 1.21 a	0.018 ± 0.010 a	215.71 ± 58.77 a	0.59 ± 0.02 a

2.3 性状遗传分析

W82 × NWL1、NN1138-2 × NWL1 组合 F<sub>1</sub> 代植株叶缘为与野生型亲本相同的非卷曲类型,表明波状卷叶性状由隐性基因控制(表 3)。W82 × NWL1 组合 F<sub>2</sub> 共 1 117 株,其中正常单株 1 040 株,突变体 77 株。经卡平方检测,符合 15:1 的表型分离比 ( $P = 0.39$ )。NN1138-2 × NWL1 组合 F<sub>2</sub> 正常单株 171 株,突变体 12 株,也符合 15:1 的分离比 ( $P = 0.76$ )。

2017 年对 W82 × NWL1 组合 312 个 F<sub>2:3</sub> 株行(由 F<sub>2</sub> 正常叶单株衍生)进行性状调查,结果未分离的株行有 149 个,分离的为 163 个,符合 7:8(不分离株行数:出现分离株行数)的理论比例( $\chi^2 = 0.54$ ,  $P = 0.46$ ),表明 NWL1 波状卷叶性状受 2 对隐性基因控制。

调查还发现 F<sub>2</sub> 代所有波状叶均为灰毛,表明茸毛色与波状卷叶基因紧密连锁或共分离。对部分 F<sub>2:3</sub> 株行调查也发现所有波状叶植株,其茸毛色必为灰毛。同时还出现棕毛、正常叶,灰毛、正常叶,灰毛、波状卷叶 3 类植株的 F<sub>2:3</sub> 分离株行的 153 个植株,其分离比为 115:27:11,符合 12:3:1 表型分离比例( $\chi^2 = 0.32$ ,  $P = 0.85$ ),表明棕毛对波状卷叶表现出显性上位基因互作特点。

离株行数:出现分离株行数)的理论比例( $\chi^2 = 0.54$ ,  $P = 0.46$ ),表明 NWL1 波状卷叶性状受 2 对隐性基因控制。

表 3 F<sub>2</sub> 群体波状卷叶性状分离比的  $\chi^2$  适合性测验

Table 3 Tests of goodness of fit for segregation ratio of wavy leaf trait in F<sub>2</sub> populations

组合	世代	植株数 No. of plant			卡平方测验 Chi square test	
		总株数 Total	正常 Normal	突变体 Mutant	$\chi^2(3:1)$	$P$
W82 × NWL1	F <sub>1</sub>	20	20			
	F <sub>2</sub>	1117	1040	77	0.75	0.39
NN1138-2 × NWL1	F <sub>1</sub>	6	6			
	F <sub>2</sub>	183	171	12	0.09	0.76

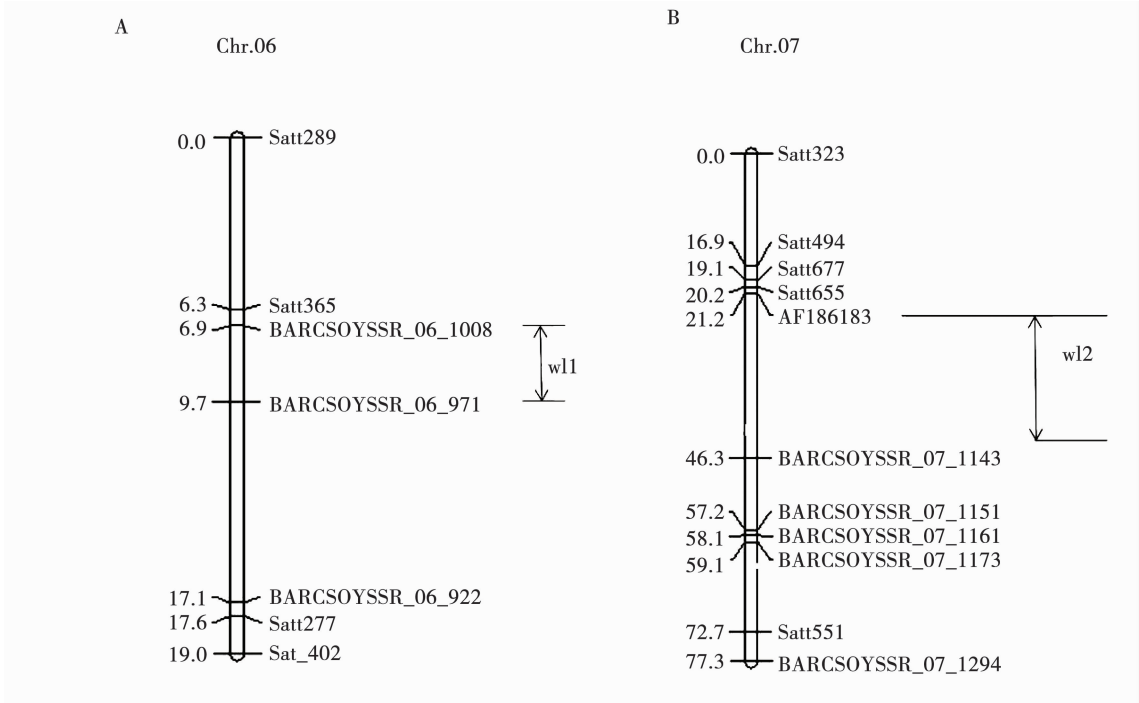
2.4 基因定位

用 W82 × NWL1 组合 F<sub>2</sub> 显性和隐性植株建池筛选可能连锁的多态 SSR 分子标记,结果发现第 06 号染色体(C2 连锁群)上 Satt365、Satt277、Satt286、Satt376 和 07 号染色体(M 连锁群)Satt494、Satt665、

Satt551 存在多态性。用 W82 × NWL1 组合所有隐性单株将 *wl1*、*wl2* 基因分别定位在第 6 号染色体 Satt365、Satt277 之间和第 7 号染色体 Satt665、Satt551 之间。进一步在 Satt365、Satt277 和 Satt665、Satt551 之间加密标记,最终将 *wl1* 基因定位在 06 号

染色体 BARCSOYSSR\_06\_0971 和 BARCSOYSSR\_06\_1008 之间,物理距离约为 1 Mb,遗传距离为 2.8 cM(图 2A)。将 *wl2* 定位在 07 号染色体 AF186183、

BARCSOYSSR\_07\_1143 之间。由于定位区间在着丝粒附近,定位区间为 14.6 Mb,遗传距离 25.1 cM(图 2B)。



A:06 号染色体上的候选基因 *w1* 定位;B:07 号染色体上的候选基因 *w2* 定位。  
A; Location of candidate gene *w1* on chromosome 06; B; Location of candidate gene *w2* on chromosome 07.

图 2 NWL1 波状叶基因 *w1* 和 *w2* 的定位

Fig. 2 Mapping *w1* and *w2* loci for NWL1 mutant

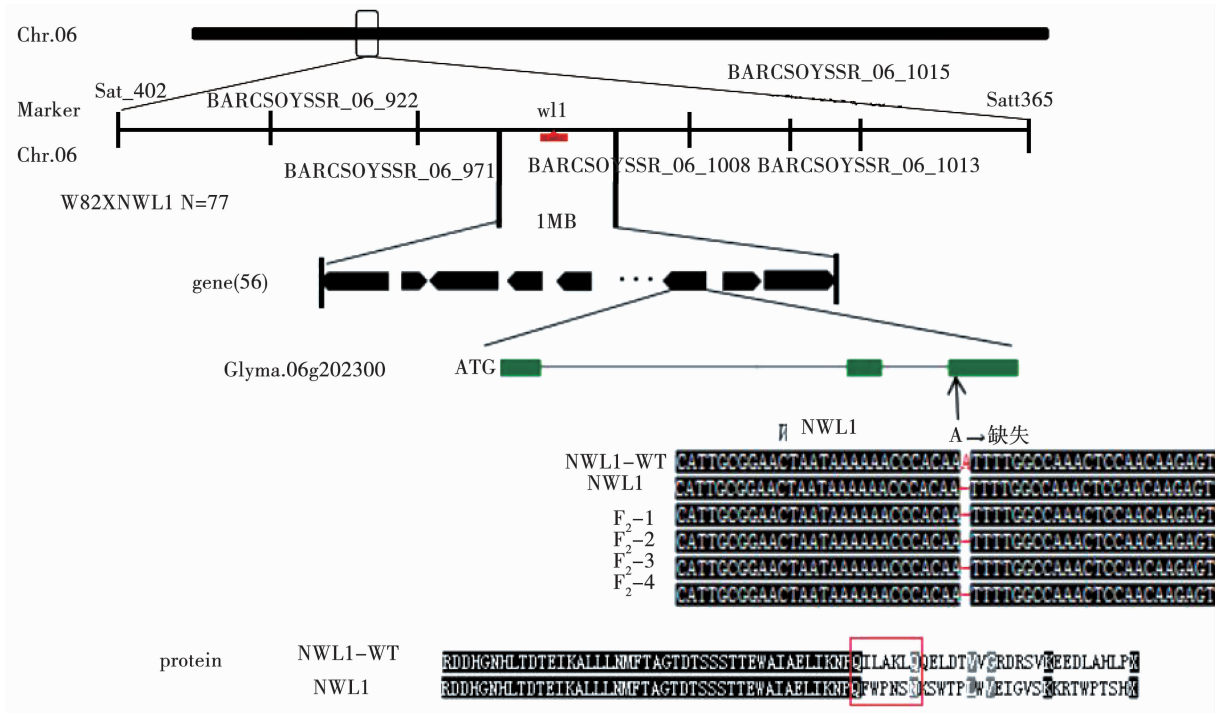


图 3 *w1* 基因在 NWL1-WT 和 NWL1 序列比对结果

Fig. 3 Sequence comparison of *w1* in NWL1-WT and NWL1

2.5 候选基因分析

在 06 号定位区间内有约 56 个基因( <https://>

phytozome.jgi.doe.gov)。前人研究认为波状卷叶可能受黄酮醇苷的影响<sup>[14]</sup>,据此在 *w1* 定位区段进行



筛选,结果发现了两个编码细胞色素 P450 蛋白、与黄酮醇苷合成相关的基因 Glyma. 06G202300 和 Glyma. 06G202400。对 NWL1-WT 和 NWL1 中这 2 个基因的 CDS 序列进行测序,结果发现 Glyma. 06G202300 基因中 NWL1 的第三个外显子中第 79 个碱基 A 发生了缺失,致使其后的氨基酸序列发生了变化(图 3)。进一步随机选择 W82 × NWL1 组合 4 个 F<sub>2</sub> 隐性个体对该基因进行测序,发现突变位置和 NWL1 一致。Glyma. 06G202300 控制茸毛颜色,其与波状卷叶的关系有待进一步研究。Glyma. 06G202400 基因的 CDs 在突变体和野生型序列中没有差异。定位于 7 号染色体的 *wl2* 由于定位区段较大,其中候选基因很多(>300),但对该区段内 *wl1* 的同源基因 Glyma. 07g194300、Glyma. 07g039800 进行测序,发现序列没有差异(数据未列出)。

### 3 讨 论

植物叶形态存在丰富变异,深入揭示不同叶形态突变体形成及调控机理有助于作物株形改良。卷叶是特殊的叶形态变异,与正常材料相比,其在叶片组织结构及生理生化特性可表现出差异<sup>[19]</sup>。本研究发现 NWL1 叶片内部叶肉栅栏组织和海绵组织的排列与正常野生型存在显著差异,可能是由于栅栏组织的排列紊乱,表皮细胞层凹陷,使叶片出现波状叶缘现象,其是否与生长素变化有关也有待进一步研究。此外 NWL1 波状卷叶突变体在田间易于分辨,是较好的形态标记性状。在本研究所用遗传群体中一些波状叶植株农艺性状优良,可用于进一步选育优良波状叶新品系。前人研究发现激素是影响植株叶发育的重要因素。拟南芥 *AS1*、*AS2* 突变体叶片尖端生长素分配不均,进而使内源生长素分配不均,导致细胞的分裂和分化不对称,从而产生 *as1* 和 *as2* 叶的不对称发育现象<sup>[20]</sup>; Qi 等<sup>[21]</sup>发现拟南芥叶片原基中存在生长素浓度差异,近轴面(叶片靠近茎尖一侧)即背面生长素浓度低,远轴面(腹面)生长素浓度高,生长素的不同也使叶片的形态发生差异。拟南芥 *axr2/iaa7* 突变体也是由于生长素途径发生了改变,而使叶片边缘出现褶皱现象<sup>[22]</sup>。进一步对 NWL1 叶组织内源激素含量进行分析将有助于深入揭示大豆波状卷叶形成机理。

前人对大豆 T176、T205 波状叶遗传研究发现其受 2 对重叠隐性基因 *lw1*、*lw2* 控制,同时受茸毛色基因(*t*)作用,表明该性状至少受 3 个不同基因调控<sup>[23]</sup>。大豆黄酮醇糖苷类受 *Fg1*-*Fg4* 基因调控,其中涉及 *Fg1* 和 *Fg3* 编码的生物山奈酚糖苷对 *lw1* 波

状叶有上位作用,即当 *Fg1* 和 *Fg3* 同时作用时在 *lw1* 的调控下大豆叶片会出现波状叶缘,*Fg1* 和 *Fg3* 分开作用会阻碍 *lw1* 引起的波状叶缘,表现出正常叶形<sup>[14,24-25]</sup>。本研究发现新种质 NWL1 的波状卷叶受 2 对隐性重叠基因 *wl1*、*wl2* 控制,分别定位在第 6 和第 7 号染色体上。其中在 *wl1* 基因定位区间发现编码类黄酮 3'-单加氧酶(F3'H)的 Glyma. 06G202300,前人研究发现该基因调控大豆茸毛色<sup>[26-27]</sup> 测序发现 NWL1 及随机选出的波状叶 F<sub>2</sub> 植株的茸毛色基因 Glyma. 06G202300 的第三个外显子中第 79 个碱基 A 发生了缺失<sup>[26-29]</sup>。由此推测 *wl1* 基因为茸毛色基因。*wl2* 基因可能为 *lw1*、*lw2* 中的一个,其被定位在 07 号染色体上,该定位区间未见有相关性状基因定位的报道。综上,NWL1 波状卷叶可能受多个基因构成的复杂遗传体系控制,深入揭示该波状卷叶形成的分子机理有助于了解植物黄酮代谢与叶发育基因间的互作关系,促进相关遗传改良研究。

### 4 结 论

波状卷叶种质 NWL1 叶片栅栏组织和海绵组织排列紊乱,光合参数值均低于野生型。遗传分析发现波状叶是由两对隐性基因 *wl1* 和 *wl2* 控制,将突变基因分别定位在 06 号和 07 号染色体上。在 06 号定位区间内通过测序发现编码类黄酮 3'-单加氧酶的 Glyma. 06g202300 基因存在差异,导致蛋白质翻译发生变化。所得结果为深入揭示大豆波状卷叶形成的分子机理奠定基础。

### 参考文献

- [1] Semiarti E, Ueno Y, Tsukaya H, et al. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves[J]. *Development*, 2001, 128(10): 1771-1783.
- [2] Chen J, Mcconnell D B, Henny R J. Importance of Asia-originated plants to the growth of the foliage plant industry[J]. *Acta Horticulturae*, 2003, 620: 377-382.
- [3] Zhang G H, Qian X, 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.
- [4] Kadioglu A, Terzi R, Saruhan N, et al. Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors. [J]. *Plant Science*, 2012, 182(1):42-48.
- [5] Sarieva G E, Kenzhebaeva S S, Lichtenthaler H K. Adaptation potential of photosynthesis in wheat cultivars with a capability of leaf rolling under high temperature conditions[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, 57(1):28-36.
- [6] Saglam A, Kadioglu A, Demiralay M, et al. Leaf rolling reduces

photosynthetic loss in maize under severe drought[J]. *Acta Botanica Croatica*, 2014, 73(2): 315-332.

[7] 王伟,王嘉宇,杨生龙,等. 水稻窄卷叶突变体 *nrl7* 的鉴定与基因定位[J]. *植物学报*, 2016, 51(3): 290-295. (Wang W, Wang J Y, Yang S L, et al. Identification and gene mapping of the *nrl7* mutant in rice[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2016, 51(3): 290-295.

[8] 申雅君,崔学安,张治国,等. 水稻卷叶突变体 *rlm1* 的基因克隆[J]. *中国农业科技导报*, 2016, 18(2): 25-30. (Shen Y J, Cui X A, Zhang Z G, et al. Gene mapping of a rolled leaf mutant *rlm1* in rice[J]. *Journal of Agricultural Science & Technology*, 2016, 18(2): 25-30.)

[9] Juarez M T, Twigg R W, Timmermans M C. Specification of adaxial cell fate during maize leaf development [J]. *Development*, 2004, 131(18): 4533-4544.

[10] 陈宗祥,左示敏,张亚芳,等. 水稻卷叶性状遗传及育种应用研究进展[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2010, 31(4): 22-27. (Chen Z X, Zuo S M, Zhang Y F, et al. Current progress in genetics research and breeding application of rolled leaf in rice[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2010, 31(4): 22-27.)

[11] Shao Y J, Chen Z X, Chen H Q, et al. Effect of rolled leaf gene *RL<sub>(1)</sub>* on grain quality in hybrid rice[J]. *Rice Science*, 2005, 12(3): 168-172.

[12] Yan X F, Zhao H K, Liu X D, et al. Phenotypic traits and diversity of different leaf shape accessions of the wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) in China[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2014, 94(2): 397-404.

[13] Rode M W, Bemard R L, Cremeens C R, et al. Inheritance of wavy leaf[J]. *Soybean Genetics Newsletter*, 1975, 2: 42-44.

[14] Buzzell R I, Buttery B R. Genetics of leaf waviness in soybean [J]. *Soybean Genetics Newsletter*, 1998, 25: 23-24.

[15] 高伟,陆静梅,牛陆,等. 大豆属 *Soja* 亚属不同进化型植物叶片演化结构研究[J]. *植物科学学报*, 2015, 33(6): 744-748. (Gao W, Lu J M, Niu L, et al. Anatomical structure of leaves of different evolutionary type within subgenus *soja* [J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(6): 744-748.)

[16] 邱丽娟. 大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, 32-48. (Qiu L J. Descriptors and data standard for soybean [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 32-48.)

[17] Doyle J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA Isolation[J]. *Molecular Techniques in Taxonomy*, 1991, 283-293.

[18] Micheltore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9828-9832.

[19] 沈年伟,钱前,张光恒. 水稻卷叶性状的研究进展及在育种中的应用[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(5): 852-860. (Shen N W, Qian Q, Zhang G H. Research progress on rice rolled leaf and its application in breeding program[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(5): 852-860.)

[20] Zgurski J M, Sharma R, Bolokoski D A, et al. Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of *asymmetric leaf1* and *asymmetric leaf2* *Arabidopsis* leaves [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(1): 77-91.

[21] Qi J, Wang Y, Yu T, et al. Auxin depletion from leaf primordia contributes to organ patterning[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(52): 18769-18774.

[22] Nagpal P, Young J S A, Timpte C, et al. *AXR2* encodes a member of the Aux/IAA protein family[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(2): 563-573.

[23] Rojas R F, Rodriguez T O, Murai Y, et al. Linkage mapping, molecular cloning and functional analysis of soybean gene *Fg2* encoding flavonol 3-O-glucoside (1→6) rhamnosyltransferase [J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 84(3): 287-300.

[24] Buttery B R, Buzzell R I. Soybean flavonol glycosides: Identification and biochemical genetics [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1975, 53(2): 219-224.

[25] 许志茹,马静,崔国新,等. 茺菁类黄酮 3'-羟化酶基因的功能鉴定及启动子初步分析[J]. *植物研究*, 2015, 35(4): 572-582. (Xu Z R, Ma J, Cui G X, et al. Functional identification and promoter preliminary analysis of flavonoid 3'-hydroxylase genes in turnip [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2015, 35(4): 572-582.)

[26] Toda K, Yang D, Yamanaka N, et al. A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(2): 187-196.

[27] Nagamatsu A, Masuta C, Matsuura H, et al. Down-regulation of flavonoid 3'-hydroxylase gene expression by virus-induced gene silencing in soybean reveals the presence of a threshold mRNA level associated with pigmentation in pubescence [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(1): 32-39.

[28] Mian K H, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(6): 3106-3112.

[29] Buttery B R, Buzzell R I. Varietal differences in leaf flavonoids of soybeans [J]. *Crop Science*, 1973, 13(1): 103-106.