DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94056

大豆叶柄角的 QTL 定位分析

王存虎 刘东 许锐能 杨永庆* 廖红

福建农林大学资源与环境学院 / 根系生物学研究中心, 福建福州 350002

摘要: 叶柄角是大豆株型的重要构成因素, 影响大豆冠层结构、光合作用效率以及最终产量。解析大豆叶柄角的遗传基础对提升大豆产量具有重要意义。本研究以 2 个叶柄角具有显著差异的亲本 BLA 和 SLA 以及它们衍生的 RIL 群体为材料, 构建高密度的遗传图谱, 对大豆不同部位的叶柄角进行 QTL 分析, 并利用近等基因系验证部分 QTL。遗传分析结果显示, 叶柄角呈连续正态分布, 符合数量性状遗传特征。利用 GBS 技术构建了包含 859 个 Bin 标记的大豆高密度遗传图谱, 总遗传长度为 2326.9 cM, 标记间平均距离为 2.763 cM; 共检测到 14 个调控叶柄角的 QTL, LOD 值在 2.58~4.80 之间, 可解释遗传变异范围在 6.9%~12.4% 之间, 其中 5 个 QTL 定位在第 12 染色体上且成簇存在; 构建的 *qLA12* 和 *qLA18* 的近等基因系表型结果显示, 叶柄角在同一对近等基因家系间差异显著, 表明 *qLA12* 和 *qLA18* 是 2 个可信的 QTL。本研究为进一步克隆调控叶柄角功能基因奠定了基础, 为大豆理想株型育种提供了遗传材料。

关键词: 大豆株型; 叶柄角; QTL 定位; 近等基因系

Mapping of QTLs for leafstalk angle in soybean

WANG Cun-Hu, LIU Dong, XU Rui-Neng, YANG Yong-Qing*, and LIAO Hong

College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University / Root Biology Center, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: Leafstalk angle is one of the most important elements for shoot architecture of soybean, affecting canopy architecture, photosynthetic efficiency and final grain yield. Exploring genetic basis of soybean leafstalk angle is significant to improve soybean yield. In this study, two soybean accessions BLA and SLA, contrasting in leafstalk angle, and their derived RIL population were used for high resolution genetic map construction and QTL detection for leafstalk angle, further the near-isogenic lines (NIL) were constructed to validate partial QTLs. Genetic analysis results showed that values of leafstalk angle performed serial and normal distribution which coincides with genetic characteristics of quantitative traits. Additionally, a high resolution genetic map consisting of 859 bin markers was constructed by using GBS method. The linkage map covered 2326.9 cM of genetic distance and the average distance between two markers was 2.763 cM. A total of 14 QTLs for regulating leafstalk angle were detected, with explained 6.9%–12.4% of genetic variation, and their LOD values varied from 2.58 to 4.80, and five of them were clustered together on Chromosome 12. The phenotype of the NILs for *qLA12* and *qLA18* revealed that leafstalk angle performed significant difference between same pair of NILs which strongly suggested that *qLA12* and *qLA18* are two believable QTLs. In summary, our results lay a foundation for cloning functional genes of regulating leafstalk angle and provide genetic resources for breeding elite soybean varieties with ideal shoot architecture.

Keywords: soybean shoot architecture; leafstalk angle; QTL mapping; near-isogenic lines (NIL)

株型是植株整体特征的集中表现, 由株高、分枝数、叶柄角等多种性状决定。这些器官在空间上的合理分布, 将有利于提高植物的光能利用率, 促进养分

吸收, 调节源–库关系, 进而促进产量提高^[1–4]。对大豆而言, 植株增高, 可以增加单位面积内的空间利用率, 有利于 CO₂ 的扩散, 提高最适叶面积指数和

本研究由国家自然科学基金项目(31830083)和福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2018028)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31830083) and Science and Technology Innovation Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2018028)

* 通信作者(Corresponding author): 杨永庆, E-mail: yyq287346@163.com

第一作者联系方式: E-mail: wcunhu@163.com

Received (收稿日期): 2019-04-12; Accepted (接受日期): 2019-08-09; Published online (网络出版日期): 2019-09-12.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20190912.1510.004.html>

群体光合效率^[5-6], 但植株过高, 抗倒伏性变差, 且不利于下部叶片受光, 影响单个植株的光合效率。有研究表明, 株高在 90 cm 以下时, 株高与产量呈正相关; 当株高在 150 cm 以上时, 株高与产量呈显著负相关^[7-8]。在我国 7 个超高产大豆品种中, 4 个为半矮秆(株高 70~90 cm), 分别为新大豆 1 号、中黄 13、MN413 和 JN96-24342^[9], 这些研究结果表明培育株高适宜的品种是提高大豆产量的重要因素之一。

叶柄角是决定群体透光和受光姿态的重要指标, 是群体叶片空间分布状态的一种衡量。例如水稻叶片挺立、夹角小有利于叶片双面受光, 对光的反射率较小, 可以提高冠层光合效率, 增加干物质的积累, 同时改善群体下层光照, 增强根系活力, 进而提高水稻产量^[10-12]。徐庆章等^[14]测定 5 种不同密度下群体的光合速率表明, 玉米最佳茎叶夹角为 10°。李登海等^[13]认为减小叶夹角会有利于改善如叶宽、叶长等与产量相关的一些性状, 这也是选育紧凑型玉米提高玉米产量的主要原因。在大豆中类似研究结果较少, 但以上研究结果暗示着通过调控大豆叶柄角度, 改良大豆株型, 具有提升大豆产量的空间。因此, 解析大豆叶柄角的遗传机制, 对大豆株型育种具有重要意义。2012 年王吴彬等^[15]利用一个大豆的 CSSL 群体(SojaCSSLP1)对叶柄角进行 QTL 定位, 共检测到 5 个 QTL, 其中与 Sat_286 连锁的 QTL 可被稳定地检测到, 该位点可解释 22% 的遗传变异。然而由于分子标记等原因限制, 遗传位点没有被精细定位和克隆, 在育种过程中的可利用性需进一步验证。Gao 等^[16]利用 165 个 InDel 标记和一个突变体材料将调控大豆叶柄角的 *GmILPA1* 位点定位在第 11 染色体上, 位于标记 MOL1197 和 MOL1233 之间, 进一步通过图位克隆的方式克隆到了 *GmILPA1* 基因, 该基因编码 APC8-like 蛋白, 可以与 *GmAPC13a* 直接相互作用, 通过 APC 复合体行使功能, 突变该基因后可使叶枕发育异常、叶柄角增大。但由于该基因是由突变获得, 在自然界中缺乏等位变异, 这大大限制了该基因的应用。除此之外, 对大豆叶柄角的研究鲜有报道。

总而言之, 大豆叶柄角是大豆株型的重要指标之一, 能够影响冠层结构、光合作用效率, 并最终影响产量。本研究利用 2 个叶柄角具有显著差异的大豆材料以及它们衍生的 RIL 群体, 构建高密度的遗传图谱, 分析大豆叶柄角 QTL, 挖掘调控大豆叶柄

角位点的遗传资源, 以期为今后相关基因的克隆以及大豆株型的分子育种工作奠定材料基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2 个叶柄角具有显著差异的材料是在雄性不育轮回群体中发现的, 经自交加代至 F_5 形成稳定品系材料, 并根据叶柄角的大小将其命名为“大叶柄角”(big leafstalk angle, BLA)和“小叶柄角”(small leafstalk angle, SLA)。以 BLA 和 SLA 为亲本, 采用单粒传法构建了包含 168 个 $F_{9:11}$ 重组自交系(RIL)群体对叶柄角性状进行遗传和 QTL 定位分析。 $F_{5:6}$ 代的 RIL 家系材料用于近等基因系的筛选。

1.2 田间与盆栽试验及表型数据测定

2016 年, 将 $F_{9:11}$ RIL 群体的 168 个家系及亲本种植于福建省尤溪县洋中试验基地。设每个 RIL 家系 1 个小区, 随机排列, 每小区 2 行, 每行 9 穴, 行距 50 cm, 株距离 20 cm, 田间管理同常规生产。播种 45 d 时, 随机选取每个小区中间有代表性的 3 株进行数据统计。田间统计性状为 3 个部位的叶柄角(leafstalk angle, LA), 即倒三叶叶柄与茎垂直线的夹角, 单位用“°”表示^[15]。其中上位叶柄角的选取标准为顶部第一个完全展开叶的叶柄与茎垂直线的夹角, 用 LA-H 表示; 下位叶柄角选用从下往上第一片完整的复叶, 用 LA-L 表示; 中位叶位于下位叶与上位叶之间, 选取与上位叶紧邻的下部功能叶, 用 LA-M 表示。盆栽试验在福建农林大学根系生物学中心楼顶开展, 供试基质为常规营养土。设置每个亲本或近等基因系材料 5 个生物学重复。每盆种 3 粒种子, 待大豆第一片真叶完全展开时, 每盆保留一株长势均一的大豆幼苗, 肥水管理均一致。在自然条件下盆栽, 盆与盆间隔为 50 cm。在播种后 30 d 收集材料表型, 测量方法与田间一致。

1.3 基因分型和遗传连锁图谱的构建

利用 Genotyping-by-Sequencing (GBS) 技术对 168 个 RIL 家系进行基因分型, 具体流程如下。提取亲本与 RIL 群体的基因组 DNA。利用双酶修饰法(*EcoR* I 和 *Nla* II 限制性内切酶)构建 GBS 文库, 然后通过 Hiseq X10 PE150 系统对纯化的文库测序。基于 GBS 测序^[17], 筛选多态性标记并分类。使用卡方检验从原始基因型数据中过滤掉严重偏分离(P 值小于等于 0.05)的多态性标记。采用重组最大简约法, 根据 RIL 群体的基因型推测双亲基因型。根据双亲

SNP 基因型将群体基因型数值化。然后将连续多个 SNP 标记且具有相同的基因型概括为一个区块(Bin), 利用其构建 RIL 群体的重组区块图谱(recombination bin map)^[18]。以每个重组区块作为一个标记, 利用 JoinMap 4.0 软件构建其高密度遗传图谱。

1.4 统计分析

采用软件 IciMapping V4.1 进行方差分析^[19], 方差分析的数据是来源于 168 个 RIL 家系的 3 个代表植株的表型, 广义遗传力 $h^2_b = V_G/(V_G + V_E)$, 其中 V_G 为 RIL 之间的方差, V_E 为 RIL 内的方差。用 SPSS 19 与 Microsoft Excel 2013 内置公式进行显著性分析, 以及基本统计量的计算。

1.5 QTL 定位

利用 Map QTL 6.0 进行 QTL 分析^[20], 以 LOD=2.5 为检测阈值。首先利用区间作图法(IM) 检测 QTL, 当 QTL 的 LOD 值超过 2.5 时, 被认为是初步可信的 QTL。进一步利用与该 QTL 连锁最紧密的标记(LOD 值最高)作为“cofactor”进行多 QTL 复合作图(MQM)的验证, 如果 MQM 检测该 QTL 的 LOD 值仍大于 2.5 则认为是一个可信的 QTL。参考 McCouch 等^[21]的原则命名 QTL, 即 q+目标性状(用 2~5 个英文字母代替)+“-”+所在染色体号数或连锁群代号, 名称用斜体。

1.6 候选 QTL 近等基因系的构建

在初定位的基础上, 利用亲本间 SNP 的变异开发与 QTL 连锁的 dCAPs 标记, 在同一个 $F_{5:6}$ 家系中筛选基因型分别与 BLA 和 SLA 一致的单株, 单株收获后形成一对近等基因型系。具体构建流程方法如下。选取候选 QTL 目标区段, 明确亲本在该目标区段的 SNP 位点, 并利用这些变异位点在 <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html> 网站进行 dCAPs 多态标记开发, 每个候选 QTL 开发 5~10 对 dCAPs 标记, 以确保近等基因系的准确性。利用这些在亲本间表现多态性差异的标记在 RIL 群体的 $F_{5:6}$ 代中进行筛选。当同一个 $F_{5:6}$ 家系中分别筛选到与 BLA 和 SLA 基因型一致的单株时, 进行单株收获形成一对近等基因系。

2 结果与分析

2.1 亲本和 RIL 群体的表型变异和遗传分析

盆栽条件下表型分析显示, BLA 与 SLA 在叶柄角上形成明显对比(图 1-A), SLA 在上(LA-H)、中(LA-M)和下(LA-L)位叶的夹角均显著小于 BLA(图 1-B), BLA 叶柄角变异范围在 $83^\circ \sim 105^\circ$ 角之间, 而 SLA 号变异范围在 $60^\circ \sim 70^\circ$ 之间。表明两亲本衍生的 RIL 群体可用于叶柄角的 QTL 定位分析。

图 1 亲本间叶柄角表型差异(A)及统计分析(B)

Fig. 1 Phenotypic differences in leafstalk angle between parents (A) and statistical analysis (B)

BLA: 大叶柄角; SLA: 小叶柄角。**表示 SLA 和 BLA 的叶柄角在 1% 水平上的差异显著性。LA-H、LA-M 和 LA-L 分别表示上位、中位和下位的叶柄角。

BLA: big leafstalk angle; SLA: small leafstalk angle. ** indicate the significant differences of leaf petiole angle between SLA and BLA at the 1% probability level. LA-H, LA-M, and LA-L represent angles of high (H), middle (M), and low (L) leaves petiole, respectively.

亲本 BLA 和 SLA 衍生的 RIL 群体在田间条件下遗传变异分析显示(表 1), RIL 群体间叶柄角的变异范围为 $20^\circ \sim 110^\circ$, 呈现连续分布的特征, 遗传变异系数在 15.58%~17.64%之间; 群体间上、中和下位的叶柄角均存在超亲分离, 偏度和峰度结果还显示两者绝对值在 0.52~3.16 之间, 符合正

态分布特征, 表明叶柄角属于典型的数量性状; 此外, 遗传力分析结果显示, 上位和中位叶柄角遗传力在 0.70 左右, 下位叶柄角遗传力为 0.90。表明大豆叶柄角的性状主要受到基因控制, 与上位和中位的叶柄角相比, 下位叶柄角受环境因素影响较小。

表 1 亲本和 RIL 群体的表型变异和遗传分析
Table 1 Phenotypic variation and genetic analysis of leafstalk angle traits in soybean RILs

性状 Trait	亲本 Parents		重组自交系群体 RILs							遗传力 h^2_b
	BLA±SE	SLA±SE	均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV (%)	最小值 Min.	最大值 Max.	峰度 Skew.	偏度 Kurt.	
LA-H	36.60±1.36	36.60±2.72	37.25	6.57	17.64	20	75	0.78	2.29	0.70
LA-M	53.30±1.36	51.67±3.60	56.61	8.82	15.58	30	85	0.56	0.52	0.72
LA-L	95.00±2.36	73.30±2.72	74.83	12.17	16.26	20	110	-1.22	3.16	0.90

RILs: 重组自交系; LA-H、LA-M 和 LA-L 分别表示上位、中位和下位的叶柄角。
RILs: recombinant inbred lines; LA-H, LH-M, and LH-L represent angles of high (H), middle (M), and low (L) leaves petiole, respectively.

2.2 遗传图谱构建

为挖掘田间条件下调控叶柄角的 QTL, 用 GBS 技术和包含 168 个家系 RIL 群体, 及滑动窗口法进行基因分型并构建高精度的遗传图谱^[22]。经过严格筛选, 共获得 859 个重组的 Bin 标记, 根据其物理位置预测, 859 个 Bin 标记基本平均分布在 20 条染色体上(表 2),

标记最少的是 10 号染色体, 仅为 25 个, 标记最多的是 11 号染色体, 为 53 个。进一步利用这些 Bin 标记构建了总遗传距离为 2326.9 cM 的遗传图谱(表 2 和图 2), 2 个相邻标记之间的平均距离为 2.763 cM。其中 16 号染色体的平均距离最小, 为 1.62 cM。9 号染色体上的平均距离最大, 为 4.93 cM。

表 2 RIL 群体中 Bin 标记在遗传图谱上的分布
Table 2 Summary of bin marker characteristics of recombinant inbred line population

染色体 Chr.	遗传距离 Genetic distance (cM)	物理长度 Physical length	标记数量 Number of bin markers	平均覆盖距离 Average coverage distance (cM)
Chr01	132.25	56,510,449	45	2.94
Chr02	149.48	47,706,575	39	3.83
Chr03	82.60	45,730,193	38	2.17
Chr04	125.97	51,405,255	50	2.52
Chr05	99.11	41,919,006	34	2.91
Chr06	128.98	50,892,625	44	2.93
Chr07	113.88	43,534,570	44	2.59
Chr08	166.04	47,709,553	45	3.69
Chr09	157.61	50,173,153	32	4.93
Chr10	85.61	51,542,279	25	3.42
Chr11	158.21	34,671,664	53	2.99
Chr12	123.75	40,030,102	47	2.63
Chr13	135.19	45,514,498	45	3.00
Chr14	87.35	47,841,279	44	1.99
Chr15	106.51	51,710,377	48	2.22
Chr16	74.30	37,192,783	46	1.62
Chr17	90.05	41,348,852	45	2.00
Chr18	113.71	57,961,359	46	2.47
Chr19	103.79	50,522,110	46	2.26
Chr20	92.53	47,868,276	43	2.15
合计 Total	2326.90	941,784,958	859	55.26

图 2 高密度的遗传图谱

Fig. 2 High resolution genetic map

左侧比例尺代表遗传距离, 连锁群上不同的颜色表示标记密度的差异。

The left scale represents the genetic distance, and the different colors on the linkage group indicate the marker density.

2.3 RIL 群体中的 QTL 定位分析

利用 MAPQTL6.0 软件的 IM 方法^[20], 对该 RIL 群体中不同部位叶柄角进行 QTL 分析。结果显示 (表 3), 共检测到 5、5 和 4 个 QTL 分别调控上位、中位和下位的叶柄角, LOD 值范围在 2.58~4.80 之间, 可解释遗传变异范围在 6.9%~12.4%之间, 在所有 14 个 QTL 中, 6 个的增效基因来源于 SLA, 其余来源于 BLA。在这些 QTL 中, 5 个被定位在 12 号染色体上, 物理位置相近(<1500 kb)或重叠, 表明这 5 个 QTL 可能由同一个基因或位点调控; 其他 QTL 分布在 1、6、7、9、11、14、15、17 和 18 号染色体上, LOD 最高的 QTL 为 *qLA18*, 位于 18 号染色体, 可解释遗传变异的 12.4%。

2.4 QTL $qLA12$ 和 $qLA18$ 的近等基因系验证

为进一步验证 QTL 结果的准确性, 选取 *qLA12* 和 *qLA18* 两个位点, 并将调控这 2 个位点的增效基因分别命名 *GmLA12* 和 *GmLA18*, 对应的等位基因命名为 *Gmla12* 和 *Gmla18*。根据重测序结果, 在 QTL 区间内或附近开发 dCAPs 标记, 最终针对每个 QTL 分别获得 7 对在亲本间具有多态的 dCAPs

标记(表 4)。进一步利用这些标记在 $F_{5:6}$ RIL 家系中筛选, 最终在 R3、R81、R171 中筛选出 3 对针对 *qLA12* 位点的近等基因系, 在 R6、R198、R138 中筛选出 3 对针对 *qLA18* 位点的近等基因系。

利用近等基因系在盆栽条件下进行表型鉴定, 统计近等基因系的叶柄角结果显示(图 3 和图 4), 3 组 NIL-*GmLA12* 的上、中及下位叶柄角变化范围分别是 40.0°~51.6°、58.3°~78.3°和 86.7°~93.3°, 对应 3 组 NIL-*Gmla12* 的上、中及下位叶柄角变化范围分别是 26.6°~40.0°、36.6°~41.6°和 50.0°~60.0°。差异性显著分析结果显示, NIL-*GmLA12* 在 3 个部位的叶柄角均显著大于 NIL-*Gmla12*。此外, 3 组 NIL-*GmLA18* 的上、中及下位叶柄角变化范围分别是 52.3°~61.2°、73.3°~84.1°和 83.8°~89.5°, 对应 3 组 NIL-*Gmla18* 的上、中及下位叶柄角变化范围分别是 39.1°~51.4°、39.2°~52.2°和 48.6°~60.9°。进一步差异性显著分析结果显示 NIL-*GmLA18* 在 3 个部位的叶柄角均显著大于 NIL-*Gmla18*。以上结果表明, *GmLA12* 和 *GmLA18* 可以显著增大叶柄夹角, 证实 *qLA12* 和 *qLA18* 是 2 个真实存在 QTL。

表 3 大豆 RIL 群体叶柄角的 QTL 定位

Table 3 Putative QTLs for leafstalk angle traits in soybean RILs in the field

性状 Trait	QTL	染色体 Chr.	标记区间 Markers interval	遗传位置 Genetic position (cM)	LOD	加性效应 Add	表型变异 PVE (%)
上位 LA-H	<i>qLA12a</i>	Gm12	Chr12.3021337–Chr12.4783251	20.466	3.55	1.76	9.3
	<i>qLA12b</i>	Gm12	Chr12.6175142–Chr12.6947560	32.213	3.43	1.61	9.0
	<i>qLA12c</i>	Gm12	Chr12.2086945–Chr12.2529118	7.231	2.70	1.46	7.2
	<i>qLA01</i>	Gm01	Chr01.55523848–Chr01.56419281	131.054	3.85	–1.67	10.1
	<i>qLA11</i>	Gm11	Chr11.10213098–Chr11.24373759	57.808	2.58	1.55	6.9
中位 LA-M	<i>qLA09</i>	Gm09	Chr09.4074635–Chr09.4606081	34.147	3.97	–2.36	10.4
	<i>qLA12d</i>	Gm12	Chr12.1868502–Chr12.2529118	6.231	3.86	2.30	10.1
	<i>qLA12a</i>	Gm12	Chr12.3021337–Chr12.4783251	17.466	3.19	2.33	8.4
	<i>qLA14</i>	Gm14	Chr14.6976251–Chr14.43836321	60.580	2.70	–2.70	7.2
	<i>qLA17</i>	Gm17	Chr17.37570037–Chr17.36696957	49.792	2.62	–1.87	7.0
下位 LA-L	<i>qLA18</i>	Gm18	Chr18.46032220–Chr18.47375074	63.343	4.80	3.98	12.4
	<i>qLA06</i>	Gm06	Chr06.11495976–Chr06.15321801	70.098	4.21	–4.69	11.0
	<i>qLA15</i>	Gm15	Chr15.11748320–Chr15.47611763	83.523	2.94	–3.20	7.8
	<i>qLA07</i>	Gm07	Chr07.7016819–Chr07.8103486	29.912	2.71	3.02	7.2

LA-H、LA-M 和 LA-L 分别表示上位、中位和下位的叶柄角。其中加性效应值 > 0 或者 < 0 分别代表从 BLA 和 SLA 获得的 QTL 的累计增加效应。

LA-H, LA-M, and LA-L represent angles of high (H), middle (M), and low (L) leaves petiole, respectively. Add value > 0 and < 0 stand for increasing effects of the QTLs derived from BLA and SLA, respectively.

表 4 本研究中使用的 dCAPS 标记

Table 4 dCAPS markers used in this study

引物编号 Primer name	SNP 位点 SNP loci	内切酶 Enzyme	引物序列 Primer sequence (5'–3')	预期片段大小 Expected product size (bp)
dCAPS-Chr12-1	3465298	<i>Spe</i> I	F: AGTGCTAAAAACAATCCCCG R: GAGCCCGAATGAAGTGGGTGAGGAC <u>TA</u> G	250/(226+24)
dCAPS-Chr12-2	3513670	<i>Bsm</i> I	F: GCATAGCCTCTCCAATCCAT R: GCATTTGAATGAAGACTTGTGGAGGAATG	229/(198+31)
dCAPS-Chr12-3	3577958	<i>Bmr</i> I	F: CTGAGGATGTGATCCTGAGAAATGCTA <u>CT</u> G R: CTCCACCCATCATCAAAATA	194/(161+33)
dCAPS-Chr12-4	3593743	<i>Acl</i> I	F: TGCCAACATTCCTCATCAG R: TTAGATGAAGCAAATGATTCAAATAAC <u>GT</u>	186/(160+26)
dCAPS-Chr12-5	3953314	<i>Sna</i> B I	F: CTAAACCACCCGGTGTCTCTTGCGGTAC <u>G</u> R: GTGTGTTACTATCTCTCTCT	234/(205+29)
dCAPS-Chr12-6	4183623	<i>Bsm</i> I	F: GGAAACTTGGTTAATAGCTAAGATCCTT <u>GA</u> R: GATTGGAGGAAAGTGGAAGA	215/(183+32)
dCAPS-Chr12-7	4546007	<i>Sma</i> I	F: ACTCCCTTCTGTGCTTG R: AATTGCTTGATAAGTCTGCTAGGC <u>CCG</u>	169/(141+28)
dCAPS-Chr18-1	45231954	<i>Taq</i> I	F: CTCTCATCTCAAACAAGTCT R: GAGTTAATCCTAGTTTAAAATGTCATTTC <u>G</u>	209/(181+28)
dCAPS-Chr18-2	46986384	<i>Sna</i> I	F: GAAGTAACAACAGACTACGACGGTTGT <u>AT</u> R: CTAAGACGGACCTACAAAGC	230/(205+25)
dCAPS-Chr18-3	47034338	<i>Asu</i> I	F: GTAGACACCGCGATCGGGACTTTGGT <u>C</u> R: CAGCAAGTCCACCAGCATCT	204/(181+23)

(续表 4)

引物编号 Primer name	SNP 位点 SNP loci	内切酶 Enzyme	引物序列 Primer sequence (5'-3')	预期片段大小 Expected product size (bp)
dCAPS-Chr18-4	48080921	<i>Taq</i> II	F: GTCGTGAAATTTGAGCACCACGTTCGC <u>CA</u> R: TATCTCGCAAATCCCAACGT	247/(221+26)
dCAPS-Chr18-5	48514645	<i>Mnl</i> I	F: TGGTTGTTCTGTTTTCTTTGTTCTAC <u>CT</u> R: GTCGACTTCTATCTACAAAC	244/(215+29)
dCAPS-Chr18-6	50618122	<i>Xmn</i> I	F: CTATACTCGGTCACCTTATTG R: CTTCTTAGTAACCCCTTCCAAGTGA <u>AA</u> ACA	195/(167+28)
dCAPS-Chr18-7	51595218	<i>Dpn</i> I	F: GGTCACGTTGTTTGTGAAGAATGTTCC <u>GA</u> R: AACCACAAGCGTAATGAGAT	242/(213+29)

带下画线的字符表示引入 SNP 变异的位置。
The underlined bold font indicates the position of introduced SNP variation.

图 3 *qLA12* 近等基因系间的叶柄角表型差异(A)及统计分析(B)
Fig. 3 Phenotypic differences in leafstalk angle between near isogenic lines *qLA12* (A) and statistical analysis (B)
花盆上相同的黄色字母表示来源于同一个 F_{5,6} 家系的 1 对近等基因。红色方框和弧形箭头表示观测点。
The consistent yellow alphabet on the pots indicates a pair of isogenic line from the same F_{5,6} family. The red box and curved arrows indicate the observed location.

3 讨论

3.1 环境和生育期对大豆叶柄角的影响

作物产量是一个复杂性状的集合体, 其中株型性状涉及到群体密植性、受光姿态、通风环境和源

库流结构等, 这些因素都与产量密切相关^[23-24], 因此株型对作物的产量性状有至关重要的意义, 但株型本身也受环境因素、植株发育状态或种植方式的影响, 李灿东等^[24]研究发现随着大豆种植密度的增加, 株型发生显著变化, 表现为株高增加、茎粗下降

图 4 *qLA18* 近等基因系间的叶柄角表型差异(A)及统计分析(B)

Fig. 4 Phenotypic differences in leafstalk angle between near isogenic lines *qLA18* (A) and statistical analysis (B)

花盆上相同的黄色字母表示来源于同一个 $F_{5,6}$ 家系的 1 对近等基因。红色方框和弧形箭头表示观测点。

The consistent yellow alphabet on the pots indicates a pair of isogenic line from the same $F_{5,6}$ family. The red box and curved arrows indicate the observed location.

等。在本研究中,盆栽条件下,前期观察发现大豆苗期到开花期其叶柄角变化不大,推测是由于其整个生育期生长空间充足,植株间相互影响较小,因此叶柄角变化不大;但田间条件下,随着植株发育,在开花期前后,植株生长空间逐渐受限,植株会逐渐调整其叶柄角变小,使其利于获得更多光。在大豆生产上,开花时期的株型与产量关系更为密切,因此在田间试验中选取大部分 RIL 家系的开花期(约 45 d)时进行测量;盆栽条件下,叶柄角苗期和开花期变化不大,选取种植后 30 d 进行测量。此外,通过对比盆栽和田间条件下亲本间叶柄的夹角,也发现种植模式对不同部位的叶柄角具有不同的影响。盆栽条件下,BLA 的上、中和下位叶柄角均显著大于 SLA (图 1),但田间条件下 BLA 仅在下位叶柄角上显著大于 SLA (表 1),在上和中位叶柄角上两者

差异不显著。此外,盆栽条件下两亲本在上、中位叶柄的夹角均显著大于田间条件的夹角,但下位叶柄角差异不显著。分析原因认为,这可能主要是种植密度的差异所致,盆栽条件下大豆植株具有充足的生长空间,较大的叶柄角有利于植株获得更多的光。在田间密植条件下,植株生长空间有限,较小的叶柄角可使叶片处于上层空间,增加获得光的机会。这暗示着,大豆在不同的生长条件下能够通过调整自身株型使其更适应周围环境。另外,从不同部位叶柄角的遗传力上分析,上、中位叶柄角的遗传力小于下位叶柄角的遗传力,表明上、中位叶柄角具有很大的可塑性,密植条件下受影响的主要是上、中位的叶柄角,下位叶柄角受影响较小,这可能是由于下位叶发育时处于幼苗期,周围生长空间较大,因此夹角大小主要受遗传调控。但大豆的功能

叶位主要集中在植株中上部, 因此中上部叶柄角(株型)可能对生产具有更重要的意义。

3.2 叶柄角 QTL 簇分析

QTL 簇是指在对一个或多个性状进行 QTL 定位时, 在相同或相近的位置可以检测到多个 QTL, 表现为成簇分布。本研究对 QTL 的检测均在田间条件下进行。在 BLA 和 SLA 的 RIL 群体中共检测到 14 个与叶柄角相关的 QTL, 其中 5 个被定位在 12 号染色体上(表 3), 物理位置相近(<1500 kb)或重叠, 形成一个 QTL 簇。分析造成这个 QTL 簇出现的原因可能是: (1)双交换的出现, 由于该位点位于染色体一端, 发生交换的概率非常高, GBS 覆盖密度不够, 导致一些双交换位点未被检测到, 因此检测到了多个紧密连锁的 QTL; (2)环境因素, 试验完全在田间条件下开展, 存在一些不可控的因素, 例如缺苗、病害、养分不均匀等。而利用高密度遗传图谱对 QTL 进行检测时, 一个单株表型的误判虽然不会导致该 QTL 的消失, 但可能导致连锁位置的错位; (3)参考基因组的质量, 基于 GBS 技术遗传图谱的构建, 其 SNP 的变异位点需要通过参考基因组确定。目前参考基因组 *Wm82.a2.v1* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 上仍有数百个骨架(Scaffold)序列未被拼接到染色体上, 甚至一些序列被错误拼接, 这都可能造成遗传错位。不论如何, 这些 QTL 仍需要进一步确认或精细定位。

此外, 对不同部位叶柄角进行定位时发现, 除了 *qLA12* 在上、中位叶柄夹角中检测到外, 其他位点均只在一个部位被检测到, 但近等基因系结果显示, *GmLA12* 和 *GmLA18* 均可显著增大上、中及下位叶柄角度。推测可能是由于 RIL 群体遗传背景比较复杂, 影响叶柄角的因素较多, 一些非主效 QTL 不能被检测到, 相反由于近等基因系具有较为纯合的遗传背景, 即使效应较小的 QTL 也能表现出来。此外, 同一个 QTL 对不同部位的叶柄角的贡献率存在差异。例如, 在近等基因系 NIL-*GmLA12* 的 a 组材料间, *GmLA12* 可以显著增加中、下位叶柄角, 但对上位叶柄角增加效应不明显。但由于盆栽试验统计的 5 棵植株不排除是环境和偶然因素导致这种差异不显著现象, 因此需要进一步验证。在后续研究中, 考虑到中、上部对大豆株型影响较大, 对种植密度具有决定性作用, 因此需侧重解析 *GmLA12* 或 *GmLA18* 在大豆植株中、上位叶柄角的遗传机制。

3.3 QTL 的验证与关联性状分析

以往的研究结果^[15]和本研究结果都表明大豆叶柄角受数量性状位点调控, 数量性状在定位过程中遗传背景^[25-26]和环境^[27-28]对特定 QTL 的定位均有较大影响, 尤其是对微效 QTL 的检测。通过构建特定 QTL 的近等基因系能够最大限度地降低遗传背景的影响, 从而提高 QTL 的定位和检测效率, 对微效 QTL 的检测尤为有效。针对环境因素的影响一般采用多年多点重复验证的策略, 但这主要针对初定位而言。在本研究中, 尽管初定位仅采用了一年的田间试验, 但针对 2 个主效 QTL 构建了近等基因系, 通过盆栽试验验证了其真实性, 而近等基因系也为后续的精确定位、图位克隆等研究提供了很好的材料基础。

一般来说一个重要基因影响的性状是多方面的, 即一因多效现象^[29-30]。这主要是因为植物的发育是一个整体, 性状之间是相互联系、相互依赖的关系, 一个性状的变化就可能引起一系列的性状变化。因此, 在 QTL 定位时经常会发现不同性状定位到相同位置的现象。本研究中, 在对来源(遗传背景)不同的 3 对 *qLA12* 的近等基因系进行观察时发现, NIL-*GmLA12* 均表现为早花, 且植株叶片数和株高均显著高于 NIL-*GmLA12* (图 3), 推测调控叶柄角的基因同时调控开花等性状。如果后续研究能够证实这些关联性状, 将对阐述调控基因的功能具有重要的作用。

4 结论

构建了包含 859 个 Bin 标记的大豆高密度遗传图谱, 总遗传长度为 2326.9 cM, 标记间平均距离为 2.763 cM; 检测到 14 个调控大豆叶柄角的 QTL, 分布在 10 条染色体上, 其中 12 号染色体上存在一个包含 5 个 QTL 的 QTL 簇; 通过近等基因系材料验证了 *qLA12* 和 *qLA18* 位点的真实性。本研究为进一步图位克隆调控大豆叶柄角功能基因奠定了基础, 为大豆株型育种提供了遗传资源材料。

References

- [1] Reinhardt D, Kuhlemeier C. Plant architecture. *EMBO Rep*, 2002, 3: 846-851.
- [2] Wilcox J R, Sedyama T. Interrelationships among height, lodging and yield in determinate and indeterminate soybeans. *Euphytica*, 1981, 30: 323-326.
- [3] Wang D, Graef G L, Procopiuk A M, Diers B W. Identification of putative QTL that underlie yield in interspecific soybean

- backcross populations. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 458–467.
- [4] Gowda C L L, Upadhyaya H D, Dronavalli N, Singh S. Identification of large-seeded high-yielding stable Kabuli chickpea germplasm lines for use in crop improvement. *Crop Sci*, 2011, 51: 198–209.
- [5] 王昱, 范杰英, 王玮, 姜晓丽, 张世忠. 不同密度对大豆生理特性的影响. *黑龙江农业科学*, 2012, (8): 38–40.
Wang Y, Fan J Y, Wang W, Jiang X L, Zhang S Z. Effect of different density on the soybean physiological characteristics. *Heilongjiang Agric Sci*, 2012, (8): 38–40 (in Chinese).
- [6] 刘岩, 周勋波, 陈雨海, 齐林, 崔兆韵, 杨荣光, 徐德力. 底墒和种植方式对夏大豆光合特性及产量的影响. *生态学报*, 2010, 31: 3478–3487.
Liu Y, Zhou X B, Chen Y H, Qin L, Cui Z Y, Yang R G, Xu D L. Effects of pre-sowing soil moisture and planting patterns on photosynthetic characteristics and yield of summer soybean. *Acta Ecol Sin*, 2011, 31: 3478–3487.
- [7] 刘春全, 毕一立, 王孝忠. 大豆农艺性状与籽粒产量关系研究进展. *现代农业科技*, 2009, (23): 39–40.
Liu C Q, Bi Y L, Wang X Z. Advances in the relationship between agronomic traits and grain yield of soybean. *Modern Agric Sci Technol*, 2009, (23): 39–40 (in Chinese).
- [8] 董丽华. 大豆产量构成因素及其相互关系. *大豆科技*, 1996, (1): 15.
Dong L H. Factors affecting soybean yield and their relationships. *Soybean Bull*, 1996, (1): 15 (in Chinese).
- [9] 杜维广, 盖钧镒. 大豆超高产育种研究进展的讨论. *土壤与作物*, 2014, 3(3): 81–92.
Du W G, Gai J Y. A discussion on advances in breeding for super high-yielding soybean cultivars. *Soil Crop*, 2014, 3(3): 81–92 (in Chinese with English abstract).
- [10] Lu M, Zhou F, Xie C X, Li M S, Xu Y B, Marilyn W, Zhang S H. Construction of a SSR linkage map and mapping of quantitative trait loci (QTL) for leaf angle and leaf orientation with an elite maize hybrid. *Hereditas*, 2007, 29: 1131–1138.
- [11] Ning J, Zhang B C, Wang N L, Zhou Y H, Xiong L Z. Increased leaf angle1, a raf-like MAPKKK that interacts with a nuclear protein family, regulates mechanical tissue formation in the lamina joint of rice. *Plant Cell*, 2011, 23: 4334–4347.
- [12] 廖慧敏, 张启军, 秦海龙, 夏士健, 宗寿余, 高艳红. 一个水稻叶夹角新基因的激素敏感性分析和基因定位. *江苏农业学报*, 2014, 30: 1198–1203.
Liao H M, Zhang Q J, Qin H L, Xia S J, Zong S Y, Gao Y H. Hormone sensitivity and genetic mapping of a new leaf angle gene in rice. *Jiangsu J Agric Sci*, 2014, 30: 1198–1203 (in Chinese with English abstract).
- [13] 李登海, 张永慧, 杨今胜, 柳京国. 育种与栽培相结合紧凑型玉米创高产. *玉米科学*, 2004, 12(1): 69–71.
Li D H, Zhang Y H, Yang J S, Liu J G. Combination of breeding and cultivation, compact corn, high yield. *J Maize Sci*, 2004, 12(1): 69–71 (in Chinese with English abstract).
- [14] 徐庆章, 王庆成, 牛玉贞, 王忠孝, 张军. 玉米株型与群体光合作用的关系研究. *作物学报*, 1995, 21: 492–496.
Xu Q Z, Wang Q C, Niu Y Z, Wang Z X, Zhang J. Study on the relationship between maize plant type and population photosynthesis. *Acta Agron Sin*, 1995, 21: 492–496 (in Chinese with English abstract).
- [15] 王吴彬, 何庆元, 杨红燕, 向仕华, 赵团结, 邢光南, 盖钧镒. 大豆分枝数和叶柄夹角的相关野生片段分析. *中国农业科学*, 2012, 45: 4749–4758.
Wang W B, He Q Y, Yang H Y, Xiang S H, Zhao T J, Xing G N, Gai J Y. Detection of wild segments associated with number of branches on main stem and leafstalk angle in soybean. *Sci Agric Sin*, 2012, 45: 4749–4758 (in Chinese with English abstract).
- [16] Gao J S, Yang S X, Cheng W, Fu Y F, Leng J T, Yuan X H, Jiang N, Ma J X, Feng X Z. GmILPA1, Encoding an APC8-like protein, Controls leaf petiole angle in soybean. *Plant Physiol*, 2017, 174: 1167–1176.
- [17] Elshire R J, Glaubitz J C, Sun Q. A Robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One*, 2011, 6: e19379.
- [18] Huang X, Feng Q, Qian Q. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res*, 2009, 19: 1068–1076.
- [19] Meng L, Li H H, Zhang L Y, Wang J K. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *Crop J*, 2015, 3: 269–283.
- [20] Van Ooijen J W. Map QTL 6, software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Wageningen, Netherlands: Kyazma B V, 2009. <https://www.kyazma.nl/index.php/MapQTL/>
- [21] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, Paul E, Blinstrub M. Report on QTL nomenclature. *Rice Genet NewsL*, 1997, 14: 11–13.
- [22] Chang J H, Lee W S. A sliding window method for finding recently frequent itemsets over online data streams. *J Inf Sci Eng*, 2004, 20: 753–762.
- [23] 蔡星星, 张盛, 王欢, 吕锐玲, 李兴华, 周强. 水稻株型基因的研究现状及应用前景. *分子植物育种*, 2017, 15: 2809–2814.
Cai X X, Zhang S, Wang H, Lyu R L, Li X H, Zhou Q. The present research situation and application prospect of rice plant type genes. *Mol Plant Breed*, 2017, 15: 2809–2814 (in Chinese with English abstract).
- [24] 李灿东, 赵建有, 郭泰, 王志新, 郑伟, 张振宇, 郭美玲, 刘忠堂. 不同密度下主茎亚有限型大豆株型及产量的变化规律. *中国农学通报*, 2014, 30(30): 164–167.
Li C D, Zhao J Y, Guo T, Wang Z X, Zheng W, Zhang Z Y, Guo M L, Liu Z T. Effects of planting density on plant type and yield of main emi-determinate soybean. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, 30(30): 164–167 (in Chinese with English abstract).
- [25] 胡霞. 利用回交导入系剖析水稻产量与品质 QTL 及其表达的遗传背景效应. 中国农业科学院博士学位论文, 北京, 2011.
Hu X. Dissection of QTLs for Yield and Grain Quality and Genetic Background Effect on Their Expression Using Backcross Introgression Lines of Rice. PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [26] Cao Y L, Ding X H, Cai M, Zhao J, Lin Y J, Li X H, Xu C G, Wang S P. The expression pattern of a rice disease resistance gene *xa3/xa26* is differentially regulated by the genetic backgrounds and developmental stages that influence its function. *Genetics*, 2007, 177: 523–533.
- [27] Li Z K, Yu S B, Lafitte H R, Huang N, Courtois B, Hittalmani S,

- Vijayakumar C H M, Liu G F, Wang G C, Shashidhar H E, Zhuang J Y, Zheng K L, Singh V P, Sidhu J S, Srivantaneeyakul S, Khush G S. QTL $\times$ environment interactions in rice: I. Heading date and plant height. *Theor Appl Genet*, 2003, 108: 141–153.
- [28] Zhuang J Y, Lin H X, Qian G R, Hittalmani S, Huang N, Zheng K L. Analysis of QTL $\times$ environment interaction for yield components and plant height in rice. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 799–808.
- [29] Shen X H, Cao L Y, Shao G S, Zhan X D, Chen S G, Wu W M, Cheng S H. QTL Mapping for the content of five trace elements in brown rice. *Mol Plant Breed*, 2008, 6: 1061–1067.
- [30] 张坤普, 徐宪斌, 田纪春. 小麦籽粒产量及穗部相关性状的 QTL 定位. *作物学报*, 2009, 35: 270–278.
- Zhang K P, Xu X B, Tian J C. QTL mapping for grain yield and spike related traits in common wheat. *Acta Agron Sin*, 2009, 35: 270–278 (in Chinese with English abstract).