

大豆生育期相关的 QTL 分析

孙德生^{1,2}, 李文滨¹, 张忠臣¹, 陈庆山¹

(1. 东北农业大学 大豆研究所, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省绿色食品发展中心, 哈尔滨 150006)

摘要:采用来自 Charleston × 东农 594 的 143 个重组自交系(RILs), 构建了 1 个含有 20 条连锁群的大豆遗传连锁图谱, 对大豆营养生长期、生殖生长期、发育期进行 QTL 分析, 以期探索大豆生育期相关基因的遗传机理。结果表明: 采用复合区间作图法共定位了 6 个显著影响营养生长期的 QTL 位点, 分布在 A1、H、K、N 连锁群上; 定位了 6 个显著影响大豆生殖生长期的 QTL 位点, 其中 4 个, reA1-2、reH、reK、reN 也同时控制营养生长期的长短; 在整个生育期定位到 8 个 QTL 位点, 有 5 个位点能解释 20% 以上的表型变异。

关键词:大豆; 营养生长期; 生殖生长期; QTL 分析

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)06-0976-05

Analysis of QTL for Growth Period in Soybean

SUN De-sheng^{1,2}, LI Wen-bin¹, ZHANG Zhong-chen¹, CHEN Qing-shan¹

(1. Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Green food developmental center in Heilongjiang province, Harbin 150006, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to study on genetic mechanism of growth period in soybean, a genetic linkage map of 20 linkage groups was constructed using 143 recombinant inbred lines (RILs) from soybean. Charleston × Dongnong 594. Combining the map with composite interval mapping method, 6 QTLs controlling vegetative period were mapped on linkage groups A1, H, K, N; 6 QTLs for reproductive period were identified, of these, reA1-2, reH, reK, reN also affecting vegetative growth; in whole growth period, 8 QTLs significantly affecting maturity were identified, among them, 5 QTLs could explain more than 20% phenotypic variation.

Key words: Soybean; Vegetative period; Reproductive period; QTL analysis

大豆生育期对产量的形成有重要的影响, 一般来说, 生育期较长的大豆品种, 产量较高, 所以, 研究大豆生育期的遗传规律有助于更加清楚地了解产量形成的机制。大豆生育期也是确定大豆生态适应性的重要性状, 了解其遗传规律可以指导品种的合理选择和不同积温区的生态布局。大豆的生育期根据其生长发育阶段还可划分为营养生长期(出苗到开花的天数)和生殖生长期(开花到成熟的天数)。应用传统的统计分析方法, 很多人对它的遗传规律进行了研究, 大豆生育期在遗传上主要是以加性为主的数量性状, 变异广、变异的连续性强。王金陵等^[1]研究表明, 大豆 F₂ 代营养生长期的遗传力达 60%, 生殖生长期遗传力达 40% 左右, 生育期达 50% 左右。大多数研究者认为正常成熟情况下, 生

育期与产量正相关, 赵福林、徐豹等^[2]指出, 营养期的长度占生育期的比值与产量相关不显著, 而生殖期的长度占生育期的比值与产量的正相关可达显著水平, 尤其是成熟阶段。

分子标记技术的发展大大促进了数量性状的遗传研究。通过构建分子遗传连锁图谱, 在大豆上很多重要的数量性状都被定位, 现在 48 个控制大豆成熟期的 QTL 被定位, 其中, 7 个 QTL 解释的表型变异达到 10% 以上^[3-12]。32 个控制花期的 QTL 被定位, 4 个解释表型变异达到 10% 以上^[12-15], 13 个控制大豆生殖生长期的 QTL 被定位^[7, 10]。利用中美地理远源亲本杂交获得的 RIL 群体, 通过构建分子遗传连锁图谱, 对大豆营养生长期、生殖生长期、生育期进行了 QTL 分析, 旨在分子水平探索与

收稿日期: 2009-03-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(2004AA211111-1)。

第一作者简介: 孙德生(1979-), 男, 在读博士, 农艺师, 研究方向为分子数量遗传学。E-mail: sds79@163.com。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

大豆生育期相关基因的遗传机理。

1 材料与方法

1.1 供试材料

美国半矮秆有限性品种 Charleston 和亚有限性品种东农 594 杂交的重组自交系被用来进行遗传图谱的构建。143 个重组自交系与其亲本于 2004 年在东北农业大学香坊实验站种植,行长 5 m,3 次重复,随机区组设计,管理同一般大田。记录每一个株系的出苗日期、开花日期、成熟日期,从出苗到开花为营养生长期的天数,开花到成熟为生殖生长期的天数,出苗到成熟为整个生育期的天数。

1.2 DNA 分析

1.2.1 RAPD 分析 采用 CTAB 法提取叶片总 DNA,稀释到 $10\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。1 200 条 RAPD 引物由上海博亚公司合成。

RAPD 的分析采用 $20\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系,包括 30 ng 模板 DNA, 15 pmol 引物, $2\text{ }\mu\text{L}$ $1 \times$ reaction Buffer, $1.6\text{ }\mu\text{L}$ $25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.4\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 1 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应是, 94°C 变性 2 min , 然后进入 41 个循环: 94°C 1 min , 36°C 1 min , 72°C 1 min , 最后 72°C 延伸 10 min 。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 SSR 分析 按照 Soybase 网址上提供的大豆微卫星序列合成 SSR 引物。扩增体系包括:模板 $2.5\text{ }\mu\text{L}$, 超纯水 $12.0\text{ }\mu\text{L}$, 缓冲液 $2.0\text{ }\mu\text{L}$, 引物 $1.5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP $1.5\text{ }\mu\text{L}$, Taq 酶 1.5 U 。

反应在 95°C 预变性 5 min , 然后进入循环: 94°C 变性 30 s ; 47°C 复性 30 s ; 72°C 延伸 30 s ; 循环 20 次后在 72°C 延伸 5 min , 置于 4°C 下保存。PCR 产物的每个 SSR 体系加上 $8\text{ }\mu\text{L}$ 甲酰胺双色 Loading Buffer, 置于 PCR 仪中变性 10 min , 然后放入冰水混合物中冷却。在 6% 的聚丙烯酰胺标准测序胶上分离, 在 100 W 恒功率下电泳 2 h , 然后用快速银染法对凝胶进行染色, 统计带型并照相。

1.3 统计分析

使用 Mapmaker/EXP version 3.0 进行标记间的遗传连锁分析, 使用 Mapchart 2.1 进行遗传连锁图谱的绘制。WinQTLcart 2.0 被用来进行 QTL 的定位, LOD 值大于 2.5 指示 QTL 的存在。利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传图距 (cM)。

2 结果与分析

2.1 遗传连锁图谱的构建

共筛选了 500 对 SSR 引物和 1 200 个 RAPD 引物, 其中 164 个 SSR 标记和 35 个 RAPD 标记被筛选出在亲本之间存在多态性, 5 个标记 (GMENOD2B, satt538, satt094, OPF07_900, OPD16_600) 是不连锁的, 不能被整合到连锁群上。余下的 194 个标记被构建成一个 20 条连锁群的遗传图谱 (图 1), 连锁群的命名与 Cregan 等^[16]的一致。遗传连锁图谱全长 3067.28 cM , 标记间平均距离 15.81 cM , 最远的 48.8 cM , 最近的 0.5 cM 。标记在连锁群上的分布是不同的, 最多的 D1a 有 22 个标记, 最少的 C1 有 2 个标记。大多数标记表现了孟德尔分离。

2.2 表型值的统计分析

不同生育期 RIL 群体和亲本的统计见表 1。从表中可以看出营养生长期、生殖生长期、生育期在亲本之间有明显的差异。由于母本 Charleston 的生育期较东农 594 长, 导致营养生长和生殖生长的时间都比东农 594 长。从不同发育时期群体的变化范围可以看出, 在每个时期都有超亲的株系。不同时期株高的偏度和峰值都小于 1.0, 表明接近正态分布, 可以进行 QTL 分析。

2.3 QTL 定位分析

通过复合区间作图法, 共检测到 6 个与营养生长期有关的 QTL 位点 veA1 (Satt390- Satt270)、veH-1 (Satt191- OPM17_700)、veH-2 (OPM17_700- Sat_117)、veK (Satt521- Satt555)、veN-1 (GMABAB-Sat_095)、veN-2 (Sat_095- OPBA08_500), 分别定位在 A1、H、K、N 连锁群上, 它们的 LOD 值在 $2.76 \sim 7.1$ 之间, 其中 veH-2、veN-1、veN-2 的加性效应为负, 来自于亲本东农 594。这几个位点解释的表型变异在 $7 \sim 20.27$ 之间, 最大的为 veK, 6 个位点一起能解释 50% 以上的总变异。

控制生殖生长期的 6 个 QTL 位点被检测, reA1-1 (Sat_105- Satt390)、reA1-2 (Satt390- Satt270)、reG (Satt570- Satt394)、reH (OPM17_700- Sat_117)、reK (Satt521- Satt555)、reN (GMABAB- Sat_095) 被分别定位在 A1、G、H、K、N 连锁群上。它们的 LOD 值在 $2.95 \sim 8.47$ 之间, 这几个位点解释的表型变异在 $7.23 \sim 21.6$ 之间, 最大的为 reA1-2, 6 个位点能解释 70% 以上的总变异。其中, reA1-2、reH、reK、reN 也作为与营养生长期有关的 QTL 被检

测到,说明这几个基因位点即控制大豆前期的生长也控制大豆后期的生长。

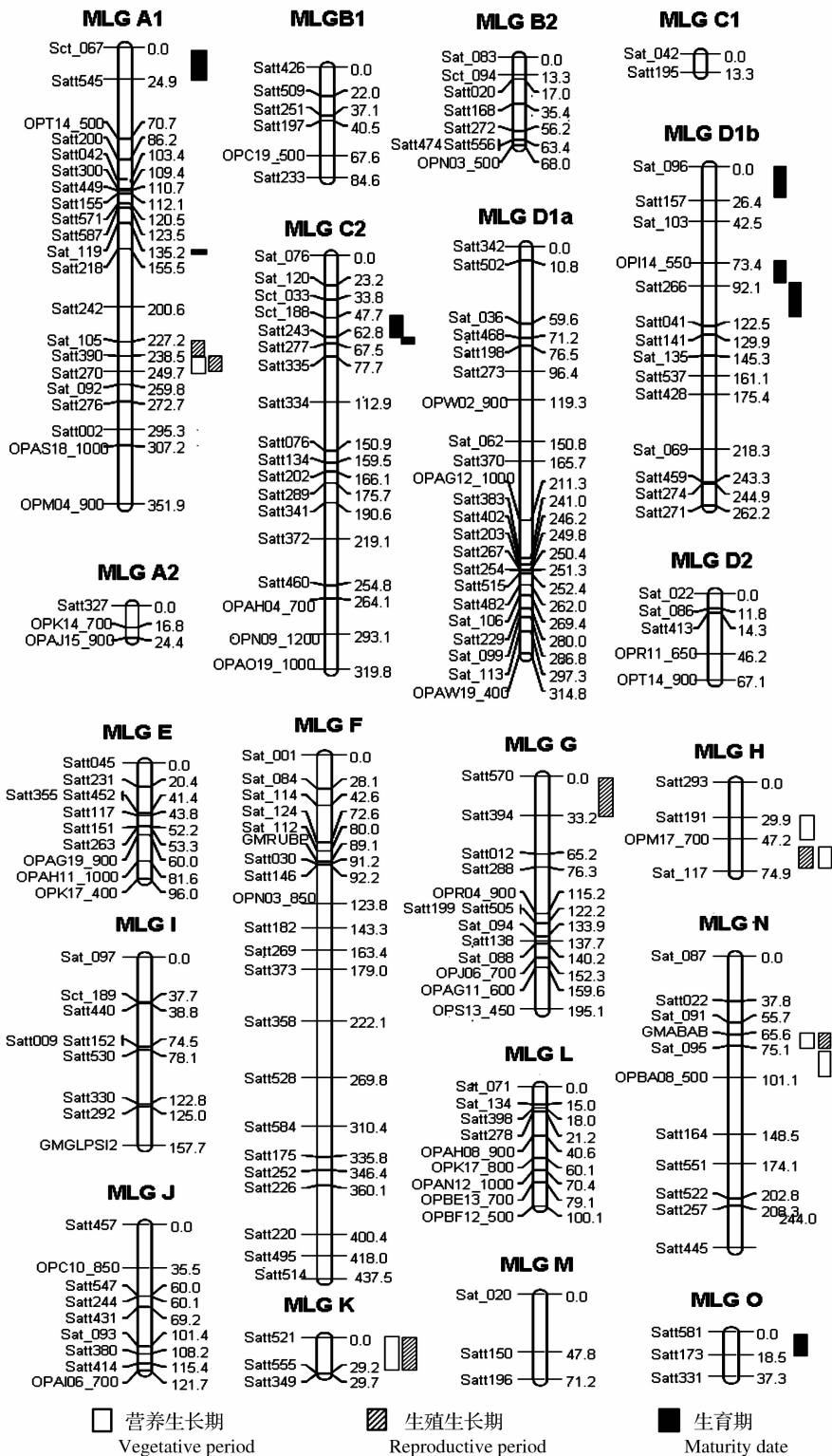


图1 大豆遗传连锁图谱框架图

Fig. 1 Scheme of genetic linkage map in soybe

表 1 各生育期的表型统计
Table 1 Phenotypic statistics of every period/d

时期 Period	亲本 Parents		RIL 群体 RIL population			
	Charleston	东农 594 Dongnong 594	均值 Mean	范围 Range	偏度 Skew	峰值 Kurtosis
营养生长期 Vegetative period	53.00	51.33	54.61 ± 3.61	42.00 – 62.00	– 0.34	0.09
生殖生长期 Reproductive period	82.00	76.00	74.95 ± 4.40	63.33 – 84.00	– 0.82	– 0.24
生育期 Maturity date	135.00	127.33	129.56 ± 6.56	111.67 – 138.00	– 0.84	– 0.33

共检测到 8 个与大豆生育期有关的 QTL 位点 maA1- 1 (Sct _ 067- Satt545) 、 maA1- 2 (Sat _ 119- Satt218) 、 maC2- 1 (Sct _ 188- Satt243) 、 maC2- 2 (Satt243- Satt277) 、 maD1b- 1 (Sat _ 096- Satt157) 、 maD1b- 2 (OPI14 _ 550- Satt266) 、 maD1b- 3 (Satt266- Satt041) 、 maO (Satt581- Satt173) , 分别定位在 A1、C2、D1b、O 上, 其中, D1b 连锁群上定位到 3 个位点。它们的 LOD 值在 2.51 ~ 10.38 之间, 这几个位点解释的表型变异在 5.79 ~ 26.08 之间, 最大的为 maC2- 1, 其中, maC2- 1、maD1b- 1、maD1b- 2、maD1b- 3、maO 5 个位点每个都解释 20% 以上的总变异。

表 2 各生育时期定位的 QTL
Table 2 Mapping QTLs of every period

时期 Period	QTL	连锁群 Linkage group	标记区间 Marker interval	LOD 值 LOD value	加性效应 Additive effect	解释变异 Explainable variation/%
营养生长期 Vegetative period	veA1	A1	Satt390-Satt270	7.10	1.55	14.99
	veH-1	H	Satt191-OPM17_700	2.76	1.06	7.00
	veH-2	H	OPM17_700-Sat_117	7.03	-1.63	14.85
	veK	K	Satt521-Satt555	9.30	1.83	20.27
	veN-1	N	GMABAB-Sat_095	5.13	-1.34	10.46
	veN-2	N	Sat_095-OPBA08_500	3.00	-1.14	8.91
	reA1-1	A1	Sat_105-Satt390	8.27	2.29	20.22
生殖生长期 Reproductive period	reA1-2	A1	Satt390-Satt270	8.47	2.38	21.60
	reG	G	Satt570-Satt394	2.97	-2.17	19.71
	reH	H	OPM17_700-Sat_117	3.29	-1.3	7.81
	reK	K	Satt521-Satt555	6.99	2.08	17.64
	reN	N	GMABAB-Sat_095	2.95	-1.38	7.23
生育期 Maturitydate	maA1-1	A1	Sct_067-Satt545	2.94	1.81	6.68
	maA1-2	A1	Sat_119-Satt218	3.34	-1.83	5.79
	maC2-1	C2	Sct_188-Satt243	9.08	4.53	26.08
	maC2-2	C2	Satt243-Satt277	10.38	4.16	19.70
	maD1b-1	D1b	Sat_096-Satt157	5.39	4.24	23.48
	maD1b-2	D1b	OPI14_550-Satt266	8.06	3.65	20.47
	maD1b-3	D1b	Satt266-Satt041	6.38	3.74	21.19
	maO	O	Satt581-Satt173	2.51	4.21	20.70

3 讨论

生育期是影响产量的重要农艺性状之一, 生育期长短差别的生理本质主要是大豆对光温条件反应

的差别, 在分子水平上就是相应基因表达的结果。利用分子标记构建的遗传连锁图谱对大豆生育期相关性状进行 QTL 分析, 可以在分子水平上阐述控制大豆生长发育相关基因系统的表达规律。

研究得到的包括 20 个连锁群的大豆分子遗传连锁图谱,与 Cregan 等^[16]整合的图谱是一致且对应的。虽然大于 20 cM 空隙在连锁群上广泛存在,但可以满足 QTL 定位的需要。研究利用的亲本材料是美国半矮秆大豆品种 Charleston 和国内的高蛋白大豆品系东农 594,与国内外的其它群体亲本相比,Charleston 和东农 594 在生育期性状具有更大的差异,因此在 QTL 定位上具有更多的优势,能更好地揭示影响性状的 QTL 位点。

在 C2 连锁群上检测到的与控制生育期基因紧密连锁的分子标记 Satt277,通过在大豆公共遗传图谱上比较发现其与 Orf 等^[10]在该连锁群上检测到的标记 Satt365 仅相差 0.9 cM,与 Specht 等^[12]发现的连锁标记 Satt557 相隔 3.9 cM,与 Mansur 等^[7]定位的标记 Satt079 相差 7.2 cM,且该标记位点能解释接近 20% 的表型变异,可见这是一个定位比较一致的控制生育期的标记位点。Satt390- Satt270、OPM17_700- Sat_117、Satt521- Satt555、GMABAB- Sat_095 4 个区间作为控制营养生长期、生殖生长期的位点被同时检测到,说明这几个位点在大豆的生长发育中可以连续表达。但这几个位点在整個生育期检测中没有被发现,这可能是后期不同位点之间的相互作用或基因效应的消减作用等掩盖了该位点的表达效应。

4 结论

通过对大豆生育期相关 QTL 分析,定位了 6 个显著影响营养生长期的 QTL 位点,分布在 A1、H、K、N 连锁群上;定位了 6 个显著影响大豆生殖生长期的 QTL 位点,其中 4 个, reA1-2、reH、reK、reN 也同时控制营养生长期的长短;在整个生育期定位到 8 个 QTL 位点,有 5 个位点能解释 20% 以上的表型变异。

参考文献

[1] 王金陵,杨庆凯,吴宗璞. 中国东北大豆[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1999:130-131. (Wang J L, Yang Q K, Wu Z P. Soybean in northeast of China[M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press,1999:130-131.)
[2] 王连铮,王金陵. 大豆遗传育种学[M]. 北京:科学出版社,1990:60-65. (Wang L Z, Wang J L. Genetics and breed in soybean[M]. Beijing: Science Press,1990:60-65.)

[3] Keim P, Diers B W, Olson T C, et al. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits [J]. Genetics. 1990,126:735-742.
[4] Lark K G, Orf J H, Mansur L M. Epistatic expression of quantitative trait loci (QTL) in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] determined by QTL association with RFLP alleles [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88 :486-489.
[5] Lee S H, Bailey M A, Mian M A R, et al. Identification of quantitative trait loci for plant height, lodging, and maturing in a soybean population segregation for growth habit [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92 :516-523.
[6] Lee S H, Bailey M A, Mian M A R, et al. Molecular markers associated with soybean plant height , lodging, and maturity across locations [J]. Crop Science , 1996, 36 (3) :728-735.
[7] Mansur L M, Orf J H, Chase K, et al. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean [J]. Crop Science, 1996, 36 (5) :1327-1336.
[8] Mansur L M, Orf J H, Lark K G. Determining the linkage of quantitative trait loci to RFLP markers using extreme phenotypes of recombinant inbreds of soybean (*Glycine max* L. Merr) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 86 :914-918.
[9] Mansur L M, Lark K G, Kross H, et al. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological and seed traits of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics 1993, 86 :907-913.
[10] Orf J H, Chase K, Jarvik T, et al. Genetic of soybean agronomic traits: I . Comparison of three related recombinant inbred populations [J]. Crop Science, 1999, 39 (6) :1642-1651.
[11] Sebolt A M, Shoemaker R C, Diers B W. Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration in soybean [J]. Crop Science, 2000, 40 (5) : 1438-1444.
[12] Specht J E, Chase K, Macrander M, et al. Soybean response to water: A QTL Analysis of drought tolerance [J]. Crop Science, 2001, 41 :493-509.
[13] Yamanaka N, Nagamura Y, Tsubokura Y, et al. Quantitative trait locus analysis of flowering time in soybean using a RFLP linkage map [J]. Breeding Science, 2000, 50 (2) :109-115.
[14] Yamanaka N, Ninomiya S, Hoshi M, et al. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion [J]. DNA Research, 2001, 8 (2) :61-72.
[15] Tasma I M, Lorenzen L L, Green D E. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean [J]. Molecular Breeding, 2001, 8 (1) :25-35.
[16] Cregan P B, Jarvik T, Bush A L, et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome [J]. Crop Science, 1999, 39 :1464-1490.