



栽培大豆二列状互生叶序基因初步定位

徐唯佳¹ 路 锦¹ 高慧慧¹ 万明月¹ 李佳佳¹ 苗 龙¹ 王晓波¹ 邱丽娟²

(1. 安徽农业大学 农学院, 安徽 合肥 230036; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/农业部作物基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部作物基因资源与种质创制重点实验室, 北京 100081)

摘 要: 二列状互生叶序表现为所有三出复叶呈平面状排列, 为栽培大豆 (*Glycine max*) 二列状互生叶序的形成机理解析提供参考, 促进大豆密植条件下株型研究和分子遗传改良, 本研究利用大豆品种中品 661 经 EMS 诱变获得的二列状互生叶序新种质皖中黄 601 与中黄 13 配置杂交组合, 调查 F₅ 植株株型, 利用 F₅ 交互互生性状和二列状互生性状分别构建混池, 采用 BSA-seq 方法进行基因定位, 并进行 GO 功能注释分析。结果表明: BSA-seq 测序结果与参考基因组平均比对效率为 94.30%, 平均覆盖深度为 38.01 ×。SNP-index 和 Indel-index 方法关联分析, 在 14 和 15 号染色体定位到 4 个候选区域, 区内共包含 216 个基因, GO 分析表明其中 4 个基因响应细胞分裂素, 4 个基因响应乙烯, 1 个基因响应赤霉素, 8 个基因响应生长素。不同类型二列状互生叶序顶端分生组织和叶节的细胞分裂素含量显著低于交互互生叶序, 与交互互生大豆不同的是, 二列状互生大豆顶端分生组织的细胞分裂素含量明显低于叶节部位, 说明细胞分裂素分布的差异可能是二列状互生叶序形成的重要原因。

关键词: 大豆; 株型; 二列状互生叶序; BSA-seq; 突变体; 细胞分裂素

Mapping of Distichous Alternate Phyllotaxis Gene in Cultivated Soybean

XU Wei-jia¹, LU Jin¹, GAO Hui-hui¹, WAN Ming-yue¹, LI Jia-jia¹, MIAO Long¹, WANG Xiao-bo¹, QIU Li-juan²

(1. College of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI)/Key Laboratory of Crop Gene Resource and Germplasm Enhancement (MOA), Beijing 100081, China)

Abstract: The distichous alternate phyllotaxis was a plane arrangement of all three compound leaves. In order to provide a reference for the formation mechanism of distichous alternate phyllotaxis in cultivated soybean (*Glycine max*), and promote the plant type research and molecular genetic improvement of soybean under dense condition, this study investigated a distichous phyllotaxis novel germplasm (Wanzhonghuang 601) obtained by EMS mutagenesis of soybean cultivar Zhongpin 661. We used this mutant in combination with the Zhonghuang 13 configuration, and investigated the type of F₅ plants. And then we constructed the mixed pools by using F₅ decussate alternate and distichous alternate traits, respectively, and performed the gene mapping by BSA-Seq method, and took on the GO functional annotation analysis. The results showed that, the average comparison efficiency between the BSA-Seq and the reference genome was 94.30%, and the average coverage depth was 38.01 ×. According to the SNP-index and Indel-index association analysis, four regions were mapped on chromosomes 14 and 15, comprising a total of 216 genes. Through GO analysis, there were five genes responding to cytokinin, four genes responding to ethylene, one gene responding to gibberellin, and eight genes responding to auxin. Meanwhile, the content of CTK in SAM (shoot apical meristem) and leaf segment of distichous phyllotaxis soybean were significantly lower than that of alternate phyllotaxis soybean, as well as the CTK content of SAM in distichous phyllotaxis soybean was lower than leaf segment, however, it was opposite in alternate phyllotaxis soybean. These results indicated that the difference of cytokinin distribution may be an important reason for the formation of distichous alternate phyllotaxis.

Keywords: Soybean; Plant architecture; Distichous alternate phyllotaxis; BSA-Seq; Mutant; Cytokinin

收稿日期: 2021-03-08

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0100201); 国家自然科学基金(31771819); 安徽省学术和技术带头人及后备人选科研活动经费(2020H236)。

第一作者: 徐唯佳(1995—), 女, 在读硕士, 主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail: 1206165984@qq.com。

通讯作者: 王晓波(1982—), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail: wxbphd@163.com;

邱丽娟(1963—), 女, 博士, 研究员, 主要从事大豆种质资源研究。E-mail: qulijuan@caas.cn。

大豆(*Glycine max*)是植物蛋白、食用油和动物饲料的重要来源,也是我国重要的经济作物之一^[1]。但是,目前我国大豆的产量无法满足社会需求。因此,提高大豆产量是当下大豆育种工作所面临的一项重要任务。大豆产量与植株形态、生理结构以及多数农艺性状关系密切^[2]。越来越多科学家认为可以通过培育源库关系合理、株型协调并且生物产量高的作物实现产量性状的遗传改良,从而使作物单位面积产量得到提高。植株各个器官空间结构的合理分布有利于群体光合产物的高效分配,合理的空间分配、养分的吸收和调节源库间关系有利于植株光能利用率的提高,可使产量在群体水平上得到充分体现^[3]。株型是大豆群体光能利用率的重要限制因子之一,合理的株型能使大豆群体的光能利用率得到提高,进而实现大豆产量的进一步提高^[3-5],因此改良株型成为大豆高产育种需要完成的一项重要任务^[6]。大豆株型相关遗传材料的发掘和利用、完善大豆理想株型的概念对加快大豆高产育种进程具有重要意义。

目前关于大豆理想株型育种的研究多数针对株高、分枝数和节数等^[7-10]。大豆对光合产物的分配很大程度上由大豆株型相关性状包括株高、节数、分枝数、分枝或叶柄长度及角度、叶层分布等决定。Cheng等^[11-13]提出具有理想植株结构的大豆品种应具有优化的株高、较短的节间长度、较多的节间、较少或无分枝、适中的结荚数、较高的结荚率、较高的四粒/荚比、适中的百粒重、较小的叶柄角和较短的叶柄。目前在作物理想株型研究领域,水稻理想株型的研究最为透彻,在推动水稻高产高效方面取得了许多重大突破。对于水稻叶夹角的研究表明,叶夹角小有利于叶片接收光照,从而提高群体冠层光合速率,增加产量^[14]。水稻理想株型结构包括分蘖数减少、茎秆粗壮、穗变大并最终提高产量^[15-16]。大豆植株空间合理配置同样可以提高植株的光能利用率,促进大豆对养分的吸收,调节库源关系,提高产量并改善品质^[17]。同时,密植和间套作是提高大豆单产和有效利用种植空间的重要手段。然而,植株之间的相互遮挡会引起周围光环境发生显著变化,导致大豆出现明显的避阴反应,包括徒长、倒伏、早衰以及抗虫能力下降等。因此,迫切需要株形紧凑、耐密抗倒、高群体光合效率的大豆新种质。对大豆株型的研究有助于实现密植条件下产量的提高,扩大大豆适应范围,并为培育适合耐密抗倒高产大豆新品种提供重要靶基因和育种新材料。

突变体是挖掘特殊株型的重要材料。目前,在

水稻、小麦、玉米等作物株型突变体中鉴定、遗传分析和基因挖掘方面已取得了较大的进展。玉米中发现的*abp1*突变体,表达受内源细胞分裂素的诱导,并在其作用下迅速改变空间表达位置,进而导致叶原基排布的改变,使其叶序由互生转变为对生,形成了规则的叶序改变^[18]。在番茄和拟南芥的*pin1-1*突变体中,生长素积累抑制叶原基分化会导致分生组织缺乏叶原基,叶形成受阻^[19-21]。近年来对大豆半矮秆突变体的研究促进了大豆植株矮化和抗倒伏能力的提高^[22]。

BSA(Bulk Segregation Analysis)重测序是广泛应用于各种作物不同性状相关基因定位的一种有效、可靠、成熟的技术手段。陈静静等^[23]通过BSA重测序挖掘出影响大豆种子硬实性的候选基因。张之昊等^[24]利用BSA重测序方法挖掘出大豆多小叶基因。

互生叶序为叶序的一种,分为二列状互生,交互互生、常山型、水青冈型和双螺旋线型^[25]。目前在作物中尚鲜见关于二列状互生叶序的报道。皖中黄601为从中品661种子经甲基磺酸乙酯(EMS)处理的突变体库中鉴定并培育而来。本研究以通过叶序排列改良株型为目标,以二列状互生叶序新种质皖中黄601为供试突变体材料,以皖中黄601与优良品种中黄13配置杂交组合,种植于合肥、海南并调查其株型性状。采用BSA重测序方法进行基因初定位和挖掘,运用群体分离分析法^[26]将分离群体中表现出二列状互生叶序和交互互生极端性状的个体混合起来构建混池,比较不同混池间的序列差异,从中筛选与大豆二列状互生叶序性状紧密连锁的染色体区段并进行基因功能注释。玉米中研究发现,细胞分裂素含量的高低影响叶序的排列方式^[10],因此本研究对二列状互生叶序和交互互生叶序的大豆顶端分生组织和叶节的细胞分裂素细胞分裂素含量进行分析,旨在为大豆叶序发生调控模式研究和株型遗传改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

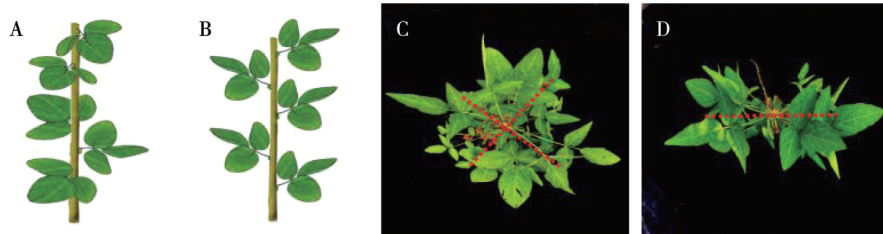
从EMS诱变后的中品661突变体库中发现1个二列状互生叶序突变体(命名为皖中黄601)。2017年将皖中黄601(母本)和中黄13(父本)杂交,获得F₁。2018年6月在合肥高新技术农业园种植F₁,10月田间收获,11月在三亚种植F₂群体。2019年6月在合肥种植F₃群体,并在幼苗期观察F₃群体791株植株表型,记录群体中单株株型。2019年

10 月收获 F_3 中为二列状互生叶序的单株种子并于 11 月在海南种植 F_4 。2020 年 6 月在合肥种植 F_5 群体, 于幼苗期观察并记录群体中 1 831 株单株表型, 并作为本研究的供试材料。

1.2 方法

1.2.1 表型鉴定 观察群体 F_5 分离情况及分析表型的稳定性。通过俯视和侧面角度观察单株, 根据

叶序生长方式分为两种类型: (1) 交互互生, 植株每个节上生长 1 片叶片, 三出复叶之间以等距离规律交互排列(图 1A、C), 与中黄 13 表型相同; (2) 二列状互生叶序, 植株每个茎节上着生 1 片叶, 叶柄在茎上呈螺旋状排列, 即所有三出复叶呈平面状排列(图 1B、D), 与皖中黄 601 表型相同。



A - 互生叶序示意图; B - 二列状互生叶序示意图; C - 中黄 13 互生叶序俯视图; D - 皖中黄 601 二列状互生叶序俯视图。

A - Schematic diagram for decussate phyllotaxis; B - Schematic diagram for distichous alternate phyllotaxis; C - Top view for decussate phyllotaxis of Zhonghuang 13; D - Top view for distichous alternate phyllotaxis of Wanzhonghuang 601.

图 1 植株叶序表型示意图

Fig. 1 The phenotypic schematic of plant phyllotaxis

1.2.2 BSA 重测序及群体 SNP 检测 统计亲本中黄 13、皖中黄 601 和 F_5 植株表型, 并根据调查的结果提取相应单株 DNA, 构建亲本池和极端表型混池。亲本池中黄 13 和新种质皖中黄 601 各 1 株, 在 F_5 植株中选择 30 个符合二列状互生叶序的单株构建二列状互生混池, 交互互生叶序中选择 30 个构建交互互生混池。构建过程为: 首先选取大豆盛花期从子叶向上数的第 6 片三出复叶, 快速放入液氮, -80°C 保存。采用 DNA 纯化试剂盒(Genomic DNA Purification Kit, TIANGEN) 分别提取以上 62 个单株样品的 DNA, 采用电泳检测方法以及核酸测定仪(ND-4000, 美国 NanoDrop) 检测纯度和浓度, 所有样品检测无杂质且浓度满足建库条件后(DNA 浓度 $\geq 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 送至南京集思慧远生物科技有限公司进行测序分析。采用双端 150 bp 测序策略进行基因组测序, 使用软件 Illumina Casava 1.8 进行碱基识别分析。亲本池测序深度为 $10 \times$; 后代混池测序深度为 $30 \times$ 。参考基因组为 Wm82. a2. v1。通过 GATK 工具包和 SnpEff 软件^[27-28] 进行 SNP 检测和变异注释并预测变异影响。

1.2.3 测序数据关联分析 SNP-index 关联分析: 使用 SNP 过滤获得 576 941 个高质量的可信 SNP 位点, 计算两个极端混池之间的 $\Delta\text{SNP-index}$, 筛选的阈值为 99% 置信水平^[29], 全基因组上以 20 kb 作为窗口, 统计窗口内 SNP 位点的 $\Delta\text{SNP-index}$ 平均值, 绘制 $\Delta\text{SNP-index}$ 染色体分布图, 寻找混池间基因型

频率显著差异^[17]。混池之间用 loess 回归拟合方法分析样品的 $\Delta\text{SNP-index}$ 值在全基因组上的分布。

Indel-index 关联分析: 对 InDel 获得的 86 176 个高质量可信 InDel 位点进行 InDel-index 关联分析, 方法同上。混池之间用 loess 拟合方法分析样品的 $\Delta\text{InDel-index}$ 值在全基因组上的分布。

1.2.4 GO 功能基因注释 使用 blastall 2.2.26 软件比对 GO 数据库(<http://geneontology.org/>), e value 为 10^{-5} , 获取候选区段内基因的功能信息。

1.2.5 细胞分裂素(CTK)含量测定 温室种植 F_5 单株, 植株长至第五对三出复叶时开展表型鉴定并取样, 对二列状互生表型和交互互生表型植株分别取顶端分生组织和叶节(第 3 至第 5 对三出复叶) 部位作为供试材料, 测定细胞分裂素含量, 每个表型材料 3 次重复。

使用酶联免疫试剂盒(南京建成生物研究所), 采用酶联免疫法提取和测定细胞分裂素含量。将标准品溶液($800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 稀释为 400, 200, 100, 50 和 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 制作 CTK 标准曲线。具体步骤为: 将稀释完的标准品溶液分别加入酶标板中的标准品孔, 空白孔用于调零, 暂不加溶液; 向标准品孔中添加 HRP 溶液, 混匀后 37°C 恒温箱中显色 60 min; 显色完毕后, 标准品孔和空白孔加入 $300 \mu\text{L}$ Wash solution, 反复洗板 5 次后晾干; 向标准品孔和样品孔分别加入显色剂 A 和显色剂 B 各 $50 \mu\text{L}$, 混匀后 37°C 恒温箱避光显色 10 min; 加入 $50 \mu\text{L}$ 终止液,

反应停止;使用酶标仪测定 OD 值,波长设定为 450 nm;运用 Excel 2013 制作标准曲线方程。

2 结果与分析

2.1 BSA 重测序数据分析

2.1.1 数据质量评估 亲本中黄 13、皖中黄 601、二列状互生 30 个单株和交互互生 30 个单株分别构建 4 个混合池,进行 Illumina HiSeq2500 重测序,对得到的测序数据过滤,获得的碱基数量为 103.01 Gb,

其中插入片段长度峰值 300 bp 左右,符合正态分布。对原始数据过滤得到的读段数分别为 80 522 682 96 495 796 231 508 028 和 278 195 816 , $Q30 > 92.64\%$,GC 含量大于 37.21% ,样品与参考基因组的比对效率为 94.30% ,样品与基因组的平均覆盖深度为 $38.01 \times$,基因组的覆盖度为 95.32% (至少 1 个碱基覆盖) (表 1) ,说明测序数据数量和质量可以满足后续分析的要求。

表 1 样品测序数据评估

Table 1 The evaluation of sample sequencing data

样品 Sample	过滤后读段数 Clean reads	过滤后碱基数 Base number	GC/%	Q30/%	比对上的序列 Mapped reads/%
中黄 13(父本) Zhonghuang 13(Male parent)	80522682	12078402300	39.27	93.27	94.15
皖中黄 601(母本) Wanzhonghuang 601(Female parent)	96495796	14474369400	38.74	93.16	95.22
交互互生混池 Alternate bulked pool	231508028	34726204200	37.21	92.64	96.64
二列状互生混池 Distichous alternate bulked pool	278195816	41729372400	37.29	92.73	97.50

2.2.2 群体 SNP 检测 SNP 类型的变异有两类,分别是转换和颠换。二列状互生叶序皖中黄 601 的 F_5 群体的 BSA 重测序结果显示,检测到的群体内

SNP 数量为 2 029 370 ,其中发生转换的 SNP 数量为 1 304 274 ,颠换 SNP 数量为 725 096 ,转换/颠换比为 1.80(表 2)。

表 2 群体 SNP 数量统计

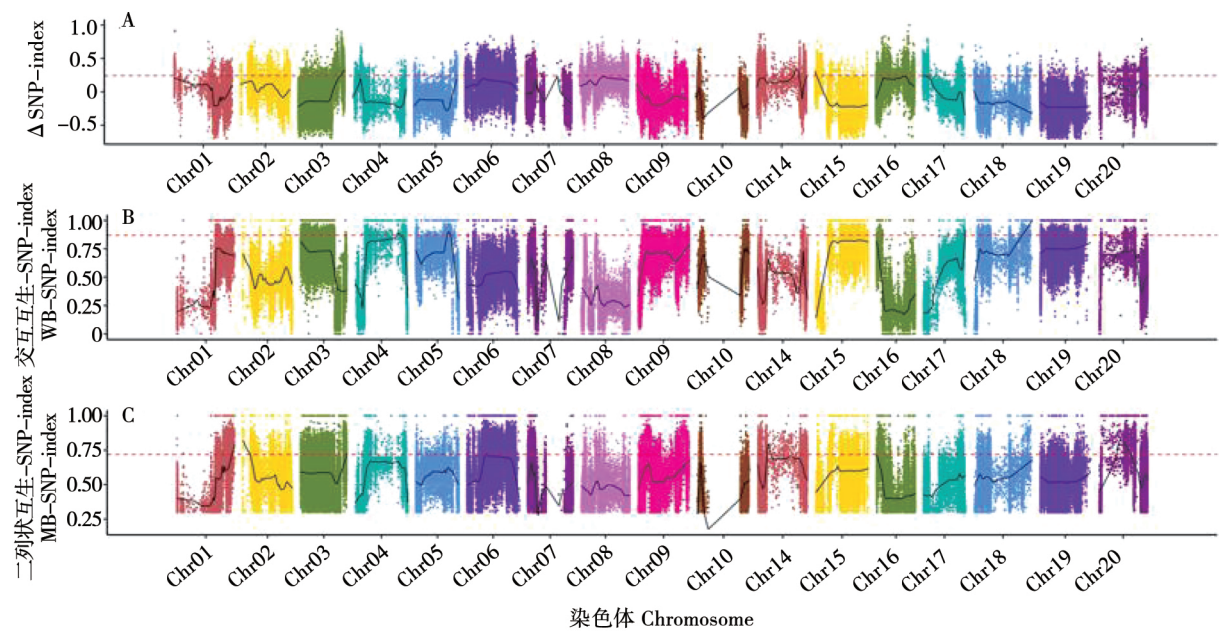
Table 2 The quantitative statistics on the population SNP

样品 Sample	总 SNP Total SNP	转换 Transition	颠换 Transversion	转换/颠换 Ti/Tv	杂合 Heterozygosity	纯和 Homozygosity
中黄 13(父本) Zhonghuang 13(Male parent)	2029370	1304274	725096	1.80	1813931	215439
皖中黄 601(母本) Wanzhonghuang 601(Female parent)	2155125	1395946	759179	1.84	513752	1641373
交互互生混池 Alternate bulked pool	1988146	1276866	711280	1.80	1776486	211660
二列状互生混池 Distichous alternate bulked pool	413489	244070	169419	1.44	238881	174608

2.3 BSA 重测序关联分析及基因注释

2.3.1 二列状互生叶序群体 Δ SNP-index 分析结果 二列状互生叶序皖中黄 601 的 F_5 群体 Δ SNP-index 在染色体上的分布如图 2 所示。在全基因组上以 20 kb 为 1 个窗口,以 99% 阈值线以上的区域作为与性状相关的候选区域关联到的候选区域范

围,当置信水平为 99% 时,二列状互生群体 F_5 的 Δ SNP-index 分布在 3、14、15 和 17 号染色体,其中 Δ SNP-index 主要集中在 3 号和 15 号染色体总长为 4.31 和 1.68 Mb 候选区域内,同时在这两个候选区域内分别筛选出 578 和 217 个基因(表 3)。



A – 二列状互生叶序 Δ SNP-index 拟合图; B – 交互互生性状 SNP-index 拟合图; C – 二列状互生性状 SNP-index 拟合图; 图中散点表示计算得到 Δ SNP-index 和 SNP-index 值; 黑色曲线表示相应的拟合值; 粉色虚线表示 loess 拟合值为 99% 的阈值线。
A – The Δ SNP-index fitting graph of the reciprocal and alternate traits sample; B – The SNP-index fitting graph of the reciprocal and alternate traits sample; C – The SNP-index fitting graph of the distichous alternate traits; The scattered points in the figure represent the calculated Δ SNP-index and SNP-index values; The black curve represents the corresponding fitting value; The pink dotted line represents the threshold line with a loess fitting value of 99%.

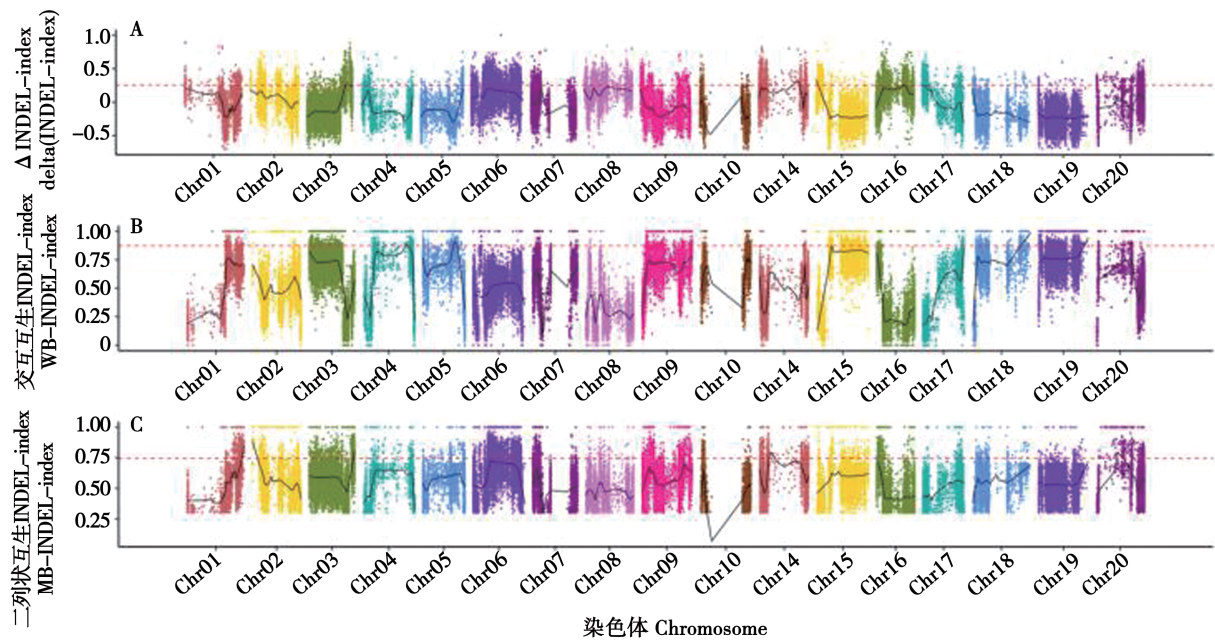
图 2 SNP-index 在全基因组上的分布图
Fig. 2 The distribution of SNP-index in the whole genome

表 3 SNP 关联区域统计
Table 3 The statistics of SNP associated region

染色体编号 Chromosome No.	起始位置 Start region	终止位置 End region	区域大小 Size /Mb	区域内基因数量 Gene number in region
3	41435520	45749041	4. 31	578
14	36185701	41474926	5. 29	77
15	4192	1683933	1. 68	217
17	24779	481381	0. 46	47

2. 3. 2 二列状互生群体 Δ InDel-index 分析结果
二列状互生叶序皖中黄 601 的 F_5 群体 Δ InDel-index 沿染色体分布情况如图 3 所示,在大豆全基因组上以 20 kb 为 1 个窗口,将 99% 置信水平下超过阈值的连续区域作为性状关联的候选区域。 Δ InDel-index 分析得到的候选区域范围如表 4 所示,二列状互生叶序皖中黄 601 的 F_5 群体的 Δ InDel-index 关联到的区段主要分布在 3、14 和 15 号染色体,其中

和二列状互生叶序相关联的 Δ InDel-index 主要集中在 3 号和 15 号染色体,总长分别为 2. 23 和 1. 88 Mb,在这两个候选区域内筛选出 279 和 239 个基因。
2. 3. 3 BSA 筛选区段定位分析结果 当置信水平为 99% 时,选取 InDel 和 SNP 关联方法交集,共筛选出 216 个候选基因,其中 15 个基因位于 14 号染色体,201 个基因位于 15 号染色体(表 5)。



A – 二列状互生叶序 Δ InDel-index 拟合图；B-交互互生性状InDel-index 拟合图；C-二列状互生性状InDel-index 拟合图；图中散点表示计算得到 Δ InDel-index 和InDel-index 值；黑色曲线表示相应的拟合值；粉色虚线表示loess 拟合值为99%的阈值线。
A-The Δ InDel-index fitting graph of the reciprocal and alternate traits; B-The InDel-index fitting graph of the reciprocal and alternate traits sample; C-The InDel-index fitting graph of the distichous alternate traits; The scattered points in the figure represent the calculated Δ InDel-index and InDel-index values; The black curve represents the corresponding fitting value; The pink dotted line represents the threshold line with a loess fitting value of 99%.

图3 InDel-index 在全基因组上的分布图
Fig. 3 The distribution of InDel-index in the whole genome

表4 InDel 关联区域统计
Table 4 The statistics of InDel associated region

染色体编号 Chromosome No.	区域起始位置 Start region	区域终止位置 End region	区域大小 Size /Mb	区域内基因数量 Gene number in the region
3	38732057	40961957	2. 23	279
14	34545893	37140469	2. 59	32
14	38652414	39385564	0. 73	7
14	40874059	40891401	0. 02	1
15	190788	2072439	1. 88	239

表5 基于 SNP 和 InDel 筛选候选区域
Table 5 The screening candidate regions based on SNP and InDel

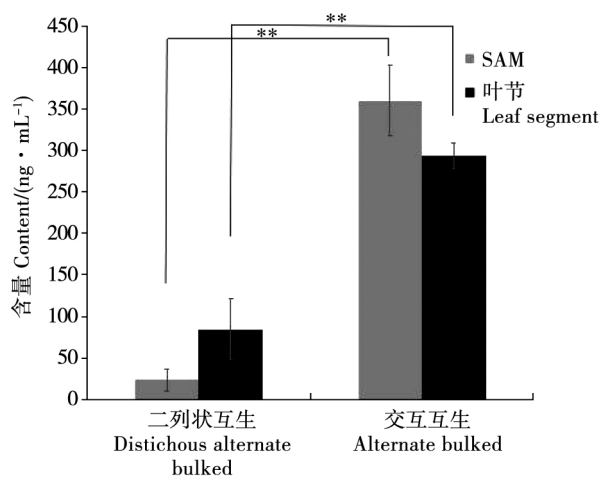
染色体编号 Chromosome No.	区域起始位置 Start region	区域终止位置 End region	区域大小 Size /Mb	区域内基因数量 Gene number in the region
14	36231769	36992745	0. 76	7
14	38652414	39385564	0. 73	7
14	40874059	40891401	0. 02	1
15	190788	1690410	1. 50	201

2.3.4 GO 功能基因注释 为解析大豆二列状互生叶序形成的分子基础,在 GO 数据库(<http://geneontology.org/>)中查找基因注释。216 个候选基因中共预测到 15 个蛋白编码基因位于 14 号染色体,其中 10 个基因是假定蛋白(hypothetical protein)基因,12 个基因在 GO 数据库中有注释,其中 Glyma.14G162300 与调控细胞分裂素相关, Glyma.14G161900 是包含 AP2 domain 的转录调控因子。

在 216 个候选基因中,位于 15 号染色体上的 146 个基因在 GO 数据库上有注释,其中 Glyma.15G003200、Glyma.15G007400、Glyma.15G019500 和 Glyma.15G013300 参与细胞分裂素调控途径及生物信号转导过程; Glyma.15G004200、Glyma.15G008600、Glyma.15G018400、Glyma.15G019400 参与植物对乙烯的反应; Glyma.15G012100 参与调控赤霉素生物合成过程; Glyma.15G006100、Glyma.15G010400、Glyma.15G012800、Glyma.15G017500、Glyma.15G012700、Glyma.15G020100、Glyma.15G014200 和 Glyma.15G020300 共 8 个基因参与生长素反应及相关调控途径。

2.4 细胞分裂素对二列状互生叶序的影响分析

方差分析结果显示,二列状互生叶序顶端分生组织和叶节的细胞分裂素含量均显著低于交互互生顶端分生组织和叶节,并且在二列状互生大豆中,顶端分生组织的细胞分裂素含量低于叶节,但在交互互生大豆中,顶端分生组织的细胞分裂素含量高于叶节(图 4)。说明该表型可能由细胞分裂素含量差异导致。



** - 存在极显著差异($P < 0.01$)。

** - There is extremely significant difference($P < 0.01$) .

图 4 不同叶序表型大豆间细胞分裂素含量比较

Fig. 4 The comparison of CTK between soybeans of different leaf orders

3 讨论

目前在调控大豆株型相关基因方面已经取得一些重要研究进展,大豆 *GmMYB14* 的过表达植株内源油菜素内脂含量下降,导致株高降低、叶柄缩短、叶柄与主茎夹角变小、叶面积缩小、株型紧凑等表型,从而提高了大豆的耐密植特性,并改善了大豆对干旱或渗透胁迫的抗性^[30]。超表达 *GmmiR156b* 基因的两个转基因株系植株分枝增加,茎秆明显更结实,并且不同表达水平的植株表型不同且超表达株系产量也明显提高^[31]。但目前还没有关于大豆二列状互生新种质的报道,而利用二列状互生突变体研究大豆叶序相关性状遗传特点及其调控基因克隆,对于了解大豆叶序形成的分子机制,加快大豆株型的遗传改良进程具有重要意义。

叶柄和分枝着生角度影响大豆的产量,低红光/远红光显著诱导大豆叶夹角变小以及叶柄伸长,而弱蓝光主要促进茎秆伸长。例如大豆隐花色素基因 *GmCRY1s* 介导弱蓝光信号调控赤霉素代谢和避阴反应的机制。*GmCRY1s* 四突变体即使在正常光照条件下也表现出明显的茎秆徒长,被蓝光激活的 *GmCRY1s* 显著诱导 STFs 蛋白积累,STFs 结合 *GmGA2ox* 基因启动子的 G-box 基序并促进其表达,从而降低内源赤霉素 GA1 的含量并抑制大豆茎秆的伸长^[32]。由此可见光环境在调控作物株型生长发育中具有重要作用,而光照是否会参与调节大豆二列状互生性状的形成有待进一步研究。

叶序是株型构成的重要结构,对植物的生长发育有重要影响,一直是生物学领域的热点之一。目前,关于植物叶序研究已鉴定出多个影响叶序发育的关键基因,例如拟南芥的 *stm-10* (AT1G62360) 突变体植株表现出异常叶序^[33], *BELL* (AT5G41410) 基因通过影响拟南芥顶端分生组织细胞的传输动力,及对器官形成信号的敏感性,从而在不改变其分生组织大小的基础上改变叶序的形成方式^[34]。在玉米(*Zea mays*) 叶序趋同突变体(*abph1*) 的研究表明,生长素通过 *PIN1* 极性运输来调控叶序趋同模式,生长素和细胞分裂素在控制叶序趋同模式方面具有重要作用^[18]。Smith 等^[19] 分别提出了基于生长素运输的叶序发育模型,这一模型的核心是 4 个因素: *PIN1* 在细胞中的浓度; *PIN1* 在细胞膜上的极性定位; IAA(生长素)的极性运输; IAA 的浓度。叶序发生和调控的复杂网络是四者相互作用和调节的结果。研究表明,叶序的发育类型在一定程度上是由植物激素决定的,例如玉米中细胞分裂

素含量变化会造成顶端分生组织大小的改变,使得叶序由互生变为对生^[4]。巧合的是,本研究在大豆二列状互生新种质皖中黄 601 的定位区间内也发现多个参与细胞分裂素调控途径的基因,这些基因的鉴定及其功能的解析对于大豆二列状互生突变体叶序发育特性的遗传解析具有重要参考意义。同时,大豆二列状互生新种质皖中黄 601 叶序的空间结构分布在一定程度上改变了光合产物的分配,进一步的研究将有助于植株在空间合理配置,并提高大豆群体光能利用率和调节库源间关系,进而提高大豆产量和改善大豆品质。

4 结 论

本研究从中品 661 突变体库中鉴定并培育得到二列状互生叶序新种质皖中黄 601,利用该种质与中黄 13 配置杂交组合构建分离群体。通过对群体中二列状互生叶序和交互互生叶序的植株进行混池 BSA 重测序、SNP-index 和 InDel-index 分析,将该性状控制基因定位于 14 和 15 号染色体上。对区间内候选基因功能注释分析发现 4 个细胞分裂素、4 个乙烯、1 个赤霉素和 8 个生长素调控途径相关基因。二列状互生叶序顶端分生组织和叶节的 CTK 含量显著低于交互互生大豆,且 CTK 含量在二列状互生大豆和交互互生大豆中的分布模式存在差异,说明该表型可能由细胞分裂素组织分布差异导致。研究结果可为进一步开展大豆叶序基因调控分子机理研究提供参考,并为大豆株型遗传改良研究提供材料基础和理论依据。

参考文献

- [1] Wu W, Zhang Q, Zhu Y M, et al. Comparative metabolic profiling reveals secondary metabolites correlated with soybean salt tolerance [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(23): 118-132.
- [2] Wilcox J R. Soybeans: Improvement, production and uses [J]. Agricultural Systems, 2005, 83(1): 110-111.
- [3] 王金陵. 东北地区大豆株型的演变 [J]. 大豆通报, 1996(1): 5-7. (Wang J L. Evolution of soybean plant type in Northeast China [J]. Soybean Bulletin, 1996(1): 5-7.)
- [4] Giuliani A, Wang J, Jackson D. Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue *ABPHYL1* [J]. Nature, 2004, 430: 1031-1034.
- [5] 张学英, 侯雪琪, 周淑芹, 等. 浅谈大豆理想株型育种 [J]. 大豆通报, 1994(4): 15-16. (Zhang X Y, Hou X Q, Zhou S Q, et al. Discussion on soybean ideal plant type breeding [J]. Soybean Bulletin, 1994(4): 15-16.)
- [6] 王金陵. 中国大豆主产区主要推广品种株型变化的回顾 [J]. 东北农学院学报, 1993(3): 209-213. (Wang J L. Review of plant type changes of main soybean varieties in China [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 1993(3): 209-213.)
- [7] 薛红, 宁海龙, 杨兴勇, 等. 大豆产量相关性状的遗传分析 [J]. 黑龙江农业科学, 2020(2): 1-8. (Xue H, Ning H L, Yang X Y, et al. Genetic effects analysis of yield-related traits in soybean [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2020(2): 1-8.)
- [8] 李灿东, 郭泰, 王志新, 等. 大豆耐密性状与产量的相关分析 [J]. 大豆科学, 2019, 38(6): 862-867. (Li C D, Guo T, Wang Z X, et al. Correlation analysis of density tolerance traits and yield on soybean [J]. Soybean Science, 2019, 38(6): 862-867.)
- [9] 樊海潮, 张继雨, 王俊涛, 等. 种植密度对大豆新品种产量及农艺性状的影响 [J]. 山东农业科学, 2020, 52(2): 38-42. (Fan H C, Zhang J Y, Wang J T, et al. Effect of different planting densities on yield and agronomic characters of new soybean varieties [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2020, 52(2): 38-42.)
- [10] 吴海涛, 张勇, 苏伯鸿, 等. 大豆分枝数相关分子标记开发及 qBN-18 位点精细定位 [J]. 作物学报, 2020, 46(11): 1667-1677. (Wu H T, Zhang Y, Su B H, et al. Development of molecular markers and fine mapping of qBN-18 locus related to branch number in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2020, 46(11): 1667-1677.)
- [11] Cheng Q, Dong L, Su T, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmLHY* genes alters plant height and internode length in soybean [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 562.
- [12] Gao J, Yang S, Cheng W, et al. *GmLPA1*, encoding an APC8-like protein, controls leaf petiole angle in soybean [J]. Plant Physiology, 2017, 174(2): 1167-1176.
- [13] Fang C, Ma Y, Wu S, et al. Genome-wide association studies dissect the genetic networks underlying agronomical traits in soybean [J]. Genome Biology, 2017, 18(1): 161.
- [14] 晏静, 任永泉. 水稻理想株型研究综述 [J]. 北方水稻, 2010, 40(2): 68-71. (Yan J, Ren Y Q. Review on ideal plant type research in rice [J]. North Rice, 2010, 40(2): 68-71.)
- [15] Khush G S. Breaking the yield frontier of rice [J]. Geosciences Journal, 1995, 35(3): 329-332.
- [16] Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, et al. Cytokinin in rice grain production [J]. Science, 2005, 309(5735): 741-745.
- [17] 郁晓敏, 金杭霞, 杨清华, 等. 利用 SLAF-seq 结合 BSA 方法发掘大豆种皮色相关基因 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(2): 385-391. (Yu X M, Jin H X, Yang Q H, et al. Mapping of soybean genes related to seed-coat color using SLAF-seq and BSA methods [J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(2): 385-391.)
- [18] Jackson D, Hake S. Control of phyllotaxis in maize by the *abp11* gene [J]. Development, 1999, 126: 315-323.
- [19] Smith R S, Guyomarc'h S, Mandel T, et al. A plausible model of phyllotaxis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(5): 1301-1306.
- [20] Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs [J]. The Plant

- Cell ,2000 ,12(4) : 507-518.
- [21] Martinez C C , Chitwood D H , Smith R S , et al. Left-right leaf asymmetry in decussate and distichous phyllotactic systems [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London , 2011 , 371(1710) : 20150412.
- [22] Liu S L , Zhang M , Feng M , et al. Toward a “Green Revolution” for soybean [J]. Molecular Plant , 2020 , 13(5) : 688-697.
- [23] 陈静静,刘谢香,于莉莉,等. 利用BSA法发掘野生大豆种子硬实性相关QTL[J]. 中国农业科学,2019,52(13): 2208-2219. (Chen J J, Liu X X, Yu L L, et al. QTL mapping of hard seededness in wild soybean using BSA method [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(13): 2208-2219.)
- [24] 张之昊,王俊,刘章雄,等. 基于BSA-Seq技术挖掘大豆中黄622的多小叶基因[J]. 作物学报,2020,46(12): 1839-1849. (Zhang Z H, Wang J, Liu Z X, et al. Mapping of an incomplete dominant gene controlling multifoliate leaf by BSA-Seq in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2020, 46(12): 1839-1849.)
- [25] 王全喜,张小平. 植物学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2004: 363-365. (Wang Q X, Zhang X P. Botany [M]. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 2004: 363-365.)
- [26] Michelmore 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.
- [27] McKenna A , Hanna M , Banks E , et al. The genome analysis toolkit: A map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. Genome Research , 2010 , 20(9) : 1297-1303.
- [28] Cingolani P , Platts A , Wang L L , et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms , SnpEff: SNPs in the genome of drosophila melanogaster strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3 [J]. Fly , 2012 , 6(2) : 80-92.
- [29] Deng Y , Li J Q , Wu S F , et al. Integratednr database in protein annotation system and its localization [J]. Computer Engineer , 2006 , 32(5) : 71-73 , 76.
- [30] Chen L , Yang H , Fang Y , et al. Overexpression of *GmMYB14* improves high-density yield and drought tolerance of soybean through regulating plant architecture mediated by the brassinosteroid pathway [J/OL]. Plant Biotechnology Journal , 2020. <https://doi.org/10.1111/pbi.13496>.
- [31] Sun Z , Su C , Yun J , et al. Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soybean plants *via* the manipulation of *GmmiR156b* [J]. Plant Biotechnology Journal , 2019 , 17: 50-62.
- [32] Lyu X G , Cheng Q C , Qin C , et al. *GmCRY1s* modulate gibberellin metabolism to regulate soybean shade avoidance in response to reduced blue light [J]. Molecular Plant , 2020 , 14(2) : 298-314.
- [33] Byrne M E , Groover A T , Fontana J R , et al. Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the *Arabidopsis* homeobox gene *BELLRINGER* [J]. Development , 2003 , 130: 3941-3950.
- [34] Kanrar S , Onguka O , Smith H M S. *Arabidopsis* inflorescence architecture requires the activities of *KNOX-BELL* homeodomain heterodimers [J]. Planta , 2006 , 224: 1163-1173.

协 办 单 位

中国作物学会大豆专业委员会
黑龙江省农业科学院大豆研究所
东北农业大学大豆研究所
吉林省农业科学院大豆研究所
南京农业大学大豆研究所
辽宁省农业科学院作物研究所
河北省农林科学院粮油作物研究所