

大豆苗期固氮相关性状的 QTL 分析

张永芳^{1,3}, 黄 昆², 马中雨⁴, 范 海¹, 李 俊⁴, 常汝镇², 邱丽娟²

(¹ 山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250014; ² 中国农业科学院作物科学研究所 国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程 农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081; ³ 山西大同大学, 山西 大同 037009; ⁴ 中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京 100081)

摘 要:大豆与根瘤菌共生固氮是大豆生长发育所需氮素的主要来源。由于根瘤菌与大豆两者基因型的不同, 接种根瘤菌后大豆固氮能力也不同。以合丰 25 × 固新野生大豆杂交组合的重组自交系 (RIL) 群体 F₁₁ 的 104 个株系为材料, 在严格控菌条件下, 用固氮菌株 2178 进行结瘤匹配鉴定, 测定 RIL 群体及其亲本的固氮酶活性、结瘤数目、侧根数目、根瘤鲜重、茎干重 5 个指标, 对所得数据进行正态分布检验, 结合 SSR 分子数据利用复合区间作图法对其 QTL 定位分析。结果表明: RIL 群体各性状均表现超亲分离, 均值介于双亲之间, 其偏度和峰度均较小, 符合正态分布。这表明所考察性状均为数量性状遗传。应用复合区间作图法进行固氮性状的 QTL 定位, 在 A1、L、O、D1b、D2、C2、I 连锁群, 检测控制固氮的 QTL 有 8 个, 解释表型变异的 7.65% ~ 15.05%, 这些 QTL 及分子标记位点可用于大豆固氮性状的分子标记选择。

关键词:大豆; 生物固氮; QTL

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-9841(2009)04-0583-05

Mapping of QTL for Controlling Nitrogen Fixation in Soybean Cultivars at Seedling Stage

ZHANG Yong-fang^{1,3}, HUANG Kun², MA Zhong-yu⁴, FAN Hai¹, LI Jun⁴, CHANG Ru-zhen², QIU Li-juan²

(¹ Life Science College of Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong; ² The National Key Facility for Crop Gene Resource and Genetic Improvement (NFCRI)/Key Lab of Germplasm & Biotechnology (MOA)/Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Beijing 100081; ³ Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi; ⁴ Institute of Agricultural resources and Agricultural Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Nitrogen demand of soybean can be supplied via biological nitrogen fixation. Because genotype of soybean and soybean rhizobium is different, the symbiotic ability is significantly different among soybeans after inoculation. In this study, the F₁₁ populations derived from *G. max* Hefeng 25 × *G. soja* Guxin were inoculated with *B. japonicum* strain 2178, and five indexes of RILs population and parents, including activity of nitrogen fixation, No. of nodulation, No. of lateral root, weight of nodulation and weight of stem, were identified at seedling stage. QTL mapping was performed by characteristics of nitrogen fixation trait combined with the composite interval mapping. All the nitrogen fixation traits at seedling stage showed a normal distribution in RIL population, which were suitable to QTL mapping analysis. Eight QTLs on chromosomes A1, L, D1b, D2, C2, I and O associated with nodulation traits at seedling stage were detected, which explained the range of the observed phenotypic variance from 7.65% to 15.05%. These markers can be used in molecular marker selection of soybean nitrogen fixation traits.

Key words: Soybean; Nitrogen fixation; Quantitative trait loci (QTL)

大豆与根瘤菌共生固氮是生长发育所需氮素的主要来源。然而, 随着氮肥施用量的增加, 不仅抑制了豆科植物一根瘤菌共生固氮作用, 而且给生态环境带来了不利的影响^[1]。提高豆科植物固氮效率, 对于实现农业、环境和生态的可持续利用、发展具有

重要意义。

有关控制结瘤固氮能力遗传机制的研究, 集中在共生体系的表型鉴定上, 主要包括植株根瘤数目、根瘤鲜重、固氮酶活性、侧根数、茎干重这 5 个重要指标^[2-3]。研究表明, 豆科作物固氮效率在不同品

收稿日期: 2009-03-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2006AA100104); 国家科技支撑资助项目 (2006BAD13B05)。

作者简介: 张永芳 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生理及分子生物学。黄昆为共同第一作者。

通讯作者: 邱丽娟, 博士, 研究员。E-mail: qiu_lujuan@263.net。

种和不同菌系间差异很大。Nutman^[4]指出,共生固氮的不同阶段是由植物与根瘤菌两方面的基因共同控制的。目前对二者分子信号之间的交换(分子对话)、生理代谢机理研究有了重大进展^[5],如结瘤共生固氮早期,根瘤与根中差异表达基因的研究^[6],结瘤突变体与野生型大豆共生相关差异表达基因的研究^[7];类菌体和根瘤之间物质代谢的研究^[8-9]等;部分根瘤菌株基因序列以及 BAC 文库已经获得或构建^[10-11];许多植物结瘤素基因、耐氮基因已被分离、鉴定,如 *ENOD2*^[12]、*ENOD5*^[13]、*ENOD12*^[14]、*ENOD40*^[15] 以及 *Nts*^[16] 等;在结瘤因子信号的接受、传导和根瘤的反馈控制机制中具有关键性作用激酶已有报道,如从百脉根(*Lotus japonicus*)和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中克隆的 *LysM* 类结瘤因子受体激酶 *NFR1/NFR5*^[17-18] 和 *LYK3*^[19],豌豆(*Pisum sativum*)蛋白激酶 SYMRK (symbiosis receptor - like kinase),紫花苜蓿、蒺藜苜蓿和豌豆的 NORK (nodulation receptor kinase)^[20-21],百脉根的 HAR1^[22-23],大豆(*Glycine max*)结瘤介导的长距离信号类受体激酶 CLAVATA1^[24]。Kim 等利用 SNP 鉴定的方法用超结瘤突变体对控制大豆结瘤的基因-*GmNARK* 进行鉴定和开发^[25]。但对如何利用其复杂的机理提高结瘤及固氮还是未知的。在控制共生结瘤固氮定位方面,Kilen 等^[26]将控制大豆结瘤的基因(*Rj1*, *Rj2*)分别定位到 D1b、J 连锁群上;Landau 等利用 RFLP 方法表明控制大豆结瘤、超结瘤位点与分子标记 pA - 132 紧密连锁,并将耐硝酸盐结瘤基因 *Nts* 定位到 E 连锁群^[27]。有关大豆固氮基因的定位仅巴西 Nicolás 等用 Embrapa 20 (medium) × BRS 133 (low) 组合 F_{2,3} 接种菌株 USDA110 进行研究。与 F₂ 群体相比,RIL 为永久性群体,可以进行多年多点的重复试验,是研究 QTL 作图、基因与环境互作的理想材料^[28]。利用已经建立遗传图谱的合丰 25 × 固新野大豆 RIL 群体 F₁₁ 为材料,对其进行结瘤固氮性状鉴定和 QTL 分析,旨在揭示控制大豆与根瘤菌株固氮能力的遗传基础,为利用分子标记辅助选择高固氮品种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 所用的群体为合丰 25 × 固新野生大豆 F₁₁ RIL 群体 104 个株系。

1.1.2 根瘤菌株 利用的根瘤菌株为在亲本中结

瘤性状有明显差异的黑龙江省慢生根瘤菌株 2178,分离自黑龙江省佳木斯市,寄主为大豆栽培品种 627。经鉴定为革兰氏阴性菌,菌落在含刚果红 YMA 培养基上 5 ~ 7 d 生长出乳白色圆形菌落。直径 2 ~ 4 μm,菌体长杆菌(0.5 ~ 0.6) × (3 ~ 5) μm,回接后可在大豆上结瘤,确定为一株慢生大豆根瘤菌。该菌株具有广谱的特点。菌株用 YMA 培养。(其成分及浓度为:甘露糖醇 10 g · L⁻¹, K₂HPO₄ 0.5 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g · L⁻¹, NaCl 0.1 g · L⁻¹, 酵母粉 0.8 g · L⁻¹, CaCO₃ 1.5 g · L⁻¹, 超纯水)。

1.2 方法

1.2.1 水培法结瘤鉴定 选择均匀一致的种子 20 粒用 75% 酒精消毒 5 min, 冲洗干净并吸胀后于无菌操作间装入盛有灭菌蛭石的瓷钵中,种脐朝下,上面覆盖一张厚滤纸,于 25℃ 培养箱中催芽。胚根长出约 4 cm 左右侧根还未出现时,小心从蛭石中取出长势一致的幼苗,用灭菌蒸馏水冲洗干净,用浸根法接种根瘤菌,将其移于装有灭菌无氮培养液、滤纸条直径大约为 2.5 cm 的试管中,设两个处理,接菌和不接菌,每个处理 5 株,用耐高温灭菌塑料薄膜覆盖,两天后移去塑料薄膜,用封口膜封口,仅留一小口,每两天浇一次灭菌营养液。营养液成分及浓度为 I: KH₂PO₄ 1.1 g · L⁻¹, KCl 7.25 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 12.5 g · L⁻¹; II: CaCl₂ · 2H₂O 21.5 g · L⁻¹; III: MnSO₄ · H₂O 0.01 g · L⁻¹, ZnSO₄ · 7H₂O, 25 mg · L⁻¹, H₃BO₃, 25 mg · L⁻¹, CuSO₄ · 5H₂O, 25 mg · L⁻¹, Na₂MoO₄ · 2H₂O 5 mg · L⁻¹; IV: FeC₆H₅O₇ · 5H₂O 6.0 g · L⁻¹, NaNO₃ 6.0 g · L⁻¹。40 d 后统计结瘤数目、侧根数目、茎重、固氮酶活性等指标。

由于根瘤菌的共生固氮效率不仅与根瘤菌和寄主植物的基因有关,又与生态环境有关。表型鉴定均在严格控菌的可控温温室中进行,基本保证鉴定时的外界环境一致。

1.2.2 根瘤固氮酶活性测定 利用乙炔还原法,安捷伦厂生产的气相色谱仪测定固氮酶活性。在大豆第三片复叶期,把根(连同根瘤)剪下,放到 3 mL 小瓶中,橡皮塞密闭,用注射器注入 3 mL 乙炔气体,28℃ 温育培养 1 h。从各培养瓶中取气样 50 μL,用安捷伦 6900 型气相色谱仪测定乙烯生成量,色谱条件为玻璃柱长 30 m,内径 0.45 mm,担体为 GDX-502,柱温为 60℃,检测器温度为 250℃,进样器温度为 100℃,气体流量为 H₂ 60 mL · min⁻¹, N₂ 30 mL ·

min⁻¹,空气 400 mL·min⁻¹,检测器为火焰离子发生器(FID),外标法计算结果,以 C₂H₄ μL(g·h)⁻¹表示固氮酶活性。

乙烯浓度 = (0.5053 + 峰高)/1.1618 (外标法 - 标准曲线:Y = 1.1618X - 0.5053 R² = 0.9962)

乙烯含量 = 乙烯浓度 × 25

固氮酶活性 = 乙烯含量/ (根瘤质量 × 时间)

1.2.3 DNA 提取与 PCR 扩增 按照天根公司快捷型植物基因组 DNA 提取系统(非离心柱型)试剂盒提取叶片总 DNA。PCR 反应体系含 8.1 μL ddH₂O 100 ng 模板 DNA 2 × PCR 缓冲液、3 mmol dNTP、6 pm SSR 引物、1 U Taq DNA 聚合酶。所用引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,47℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 30 s,共运行 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,分离过程中保持 100 W 恒定功率,银染检测。

表 1 RIL 亲本及 RIL 群体结瘤固氮性状表现

Table 1 The nitrogen fixation traits of Hefeng 25 ,Guxin and RIL

性状 Trait	亲本 Parents		重组自交系群体 RIL					
	合丰 25	固新野生	平均值	变幅	变异系数	标准差	峰度	偏斜度
	Hefeng 25	Guxin	Mean	Range	CV	Se	Kurtosis	Skewness
固氮酶活性 ANF/μmol(g·h) ⁻¹	1180.81B	4744.596A	3228.88	364.46 – 6881	0.42	1383.62	0.23	0.41
瘤鲜重 NFW/g	0.14B	0.09A	0.1	0.025 – 0.311	0.5	2.33	2.903	0.91
结瘤数目 NN	2B	6A	4.55	1 – 15	0.48	0.05	0.61	0.78
侧根数目 NLR	60B	44A	47.04	8 – 77	0.23	1.08	0.88	– 0.29
茎干重 DWS/g	0.13	0.08	0.12	0.013 – 0.288	0.44	0.05	0.33	0.809

同一行中标有不同大写字母的值在 0.01 水平上差异显著

ANF, Activity of nitrogen fixation. NFW, Nodule fresh weight, NN, No. of nodulation; NLR, Number of lateral root; DWS, Dry weight of stem. Values followed by a different capital letter within a line are significantly different at 0.01 probability level.

2.2 大豆结瘤相关性状的 QTL 分析

利用 Mapmaker 软件构建了包含 158 个 SSR 标记的连锁图谱,图谱总长 581.9 cM,标记间平均距离为 3.68 cM。应用复合区间作图法,进行结瘤性状的 QTL 定位分析,共检测到 8 个与固氮相关的 QTL,其中,影响固氮酶活性的有 2 个 QTL,位于 satt050 ~ satt717 和 satt498 ~ satt486 区间,可解释表型方差的 7.65% 和 9.2%,影响根瘤鲜重的有 2 个 QTL,分别位于 satt162 ~ satt292 和 satt376 ~ satt256 区间,可解释表型方差的 15.05% 和 9.82%,影响侧根数的有 3 个 QTL,分别位于 satt418 ~ satt523、satt633 ~ satt679、satt050 ~ satt073 区间,可以解释表型方差的 9.3%、7.26%、11.8%。固氮相关 QTL 定位于 7 个连锁群,分别为 A1、L、O、D1b、D2、C2、I,这些 QTL 对结瘤起增效或者减效作用。根瘤数没有

1.2.4 QTL 定位及方差显著性分析 应用 Mapmaker3.0 对筛选的 158 个 SSR 分子标记构建遗传连锁图谱(LOD 值为 3.0)。利用 QTL Cartographer1.1 复合区间作图法对 QTL 进行定位分析(LOD 值为 2.0)。正态分布检验利用 SAS 9.0 分析。

2 结果与分析

2.1 接种根瘤菌对亲本品种及群体的影响

亲本及 RIL 群体 104 个株系对照未接种材料均未结瘤,说明已达到严格控菌,接菌材料数据可靠。由表 1 可以看出,除茎干重外,合丰 25 与固新野大豆在固氮酶活性、根瘤鲜重、结瘤数目、侧根数目均存在显著的差异。在 RIL 群体中均表现出超亲分离。对 RIL 群体结瘤数目等四个指标进行正态分布检验,除结瘤数目峰值大于 1 外,其余峰值、偏斜度均小于 1,表现出正态分布的特点。该群体适合 QTL 分析。

相关标记与其连锁(表 2)。

表 2 合丰 25 × 固新野大豆接种根瘤菌株 2178 固氮性状的 QTLs 及其遗传效应

Table 2 QTLs and their genetic effects for nodulation traits in RIL poplation

表型性状 Trait	连锁群 Linkage group	标记区间 Marker interval	阈值 LOD	贡献率 Variation/%	加性效应值 Additive
固氮酶活 ANF	A1	satt050- satt717	2.13	7.65	– 598.9920
	D2	Satt498- satt486	2.67	9.20	4240.9420
瘤鲜重 NFW	I	Satt162- satt292	4.55	15.05	– 0.0203
	C2	Satt376- satt256	2.06	9.82	0.0173
侧根数目 NLR	L	satt418- satt523	2.30	9.30	– 4.6094
	O	satt633- satt679	2.02	7.26	– 4.1390
茎干重 DWS	A1	satt073- satt050	3.30	11.80	– 5.7159
	D1b	satt005- satt600	2.62	9.21	– 0.1612

2.3 分子标记与表型的回归分析

标记位点与表型性状一元回归分析结果表明,固氮酶活性与标记位点 *satt*292、*satt*461、*satt*545 有极显著的回归相关 ($P < 0.01$)。决定系数分别为 0.87、1.00、1.00,结瘤数目与标记 *satt*231 和 *satt*332 极显著相关 ($P < 0.05$),决定系数分别为 0.84 和 0.99。茎重与 *satt*564、*satt*080 和 *satt*239 呈极显著相关,决定系数分别为 0.92、0.99 和 1.00。

表3 分子标记与表型线性回归分析
Table 3 Regression coefficient of markers and phenotypic

连锁群 Linkage group	标记 Marker	决定系数 R ²		
		固氮酶活 NFA	结瘤数目 NN	茎干重 DWS
MLG I	<i>satt</i> 292	0.87	—	—
MLG D2	<i>satt</i> 461	1.00	—	—
MLG A1	<i>satt</i> 545	1.00	—	—
MLG E	<i>satt</i> 231	—	0.84	—
MLG B1	<i>satt</i> 332	—	0.99	—
MLG G	<i>satt</i> 564	—	—	0.92
MLG N	<i>satt</i> 080	—	—	0.99
MLG I	<i>satt</i> 239	—	—	1.00

3 讨论

重组自交系(RIL)群体是经过多代连续自交获得,家系内基因型纯合,稳定一致,不存在分离,适合进行多年、多点、多重复试验,是研究 QTL 作图、基因与环境互作的理想材料。利用的群体是本实验室利用 SSR 标记构建好遗传图谱的永久性群体(*F*₁₁代 RIL),适于进行 QTL 分析。通过作图,和定位研究结果显示,存在 8 个具有加性效应的结瘤固氮 QTL,表明大豆苗期固氮性状是由不同的基因控制的。用常规有性杂交技术难于将这些分散的有利基因集中起来而达到选育高固氮品种的目的,而分子标记辅助选育技术为选育高固氮品种提供了一种有效手段。通过表型与分子标记的关联分析表明固氮酶活性、结瘤数目、侧根数目与 8 个分子标记显著相关。这几个标记有利于下一步在此区间进行精细定位或者遗传分析。

研究定位的与固氮酶活性相关的 *satt*050 也与种子产量相关^[29];而与根瘤鲜重相关的 *satt*162 和 *satt*292 分别与抗大豆胞囊线虫^[30]及 β 球蛋白低含量^[31]相关;与茎干重相关的 *satt*239 也与高蛋白、低脂肪含量相关^[32];结果表明,一方面可能是与标记连锁的基因具有一因多效的功能;另一方面,这些性状的功能基因可能成簇存在。

研究定位的与根瘤鲜重相关的 *satt*292 在回归分析中得出也与固氮酶活性相关,同时也与 Nicolás 等^[28]定位结果一致。定位涉及的连锁群 D1b、E、B1 与大豆结瘤基因 *R_{jl}* (D1b)^[26]、耐硝酸盐结瘤基因 *nts* (E)^[27]、茎干重 (B1)^[28] 所在连锁群相一致,但标记与基因在连锁群上的位置不同。应加强对这些连锁群 QTL 进一步检测,分析其在结瘤固氮性状中的作用。

研究所定位性状标记与 Nicolás 等^[28]定位结果相一致的较少。一方面,可能与所用的亲本或根瘤菌株不同有关,另一方面可能与遗传图谱的标记密度不够有关。另外,结瘤易受光照等条件的影响。因此,鉴定可重演 QTL 对于大豆固氮基因发挥具有重要意义。

Nicolás 等^[28]利用回归分析表明 3 个连锁群上 6 个分子标记 MLGB1 (*Satt*197、*Satt*251、*Satt*509)、MLGB2 (*Satt*066)、MLGH/J (*Satt*192) 与结瘤固氮性状相关。这与本研究指出的标记 *Satt*332 所在连锁群 MLGB1 一致,但标记与基因在连锁群上的位置不同,说明 MLGB1 是值得加强检测的连锁群,其区域的标记可能有利于图位克隆和序列分析。

与大豆共生的根瘤菌株分为快生型根瘤菌和慢生型根瘤菌,它们与大豆品种共生效应有很大差异,所以选择合适的根瘤菌菌株和大豆品种进行研究对于提高共生固氮效率是非常重要的。前人研究表明快生根瘤菌对大豆品种选择性强于慢生型根瘤菌,适应性窄^[33-35],所以慢生性根瘤菌的应用及研究相对较多。Nicolás 定位所用根瘤菌株是慢生根瘤菌株 USDA110^[28]。2178 是分离自黑龙江省佳木斯市的一株慢生大豆根瘤菌,该菌株为土壤中稳定性较强且具有广谱性的根瘤菌菌株,是我国大豆的优良共生体^[33-35]。研究也表明该菌株结瘤性能好,且能在合丰 25 \times 固新野生大豆衍生的 RILs 群体上形成结瘤固氮差异。其中,大豆品种合丰 25 是全国种植时间最长 (20 多年)且累计种植面积最大的栽培大豆品种,固新野生大豆是结荚较多的野生大豆。因此,所选择的结瘤固氮有差异的品种也为利用基因组学先进的分子生物技术手段揭示共生固氮过程中根瘤菌与其宿主的分子应答机制提供了良好的材料。

参考文献

[1] 沈世华,荆玉祥. 中国生物固氮研究现状和展望[J]. 科学通报,2003,48(6):535-540. (Shen S H, Jin Y X. Research and

- prospect of Chinese nitrogen fixation[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(6): 535-540.)
- [2] 谭娟. 接种俄罗斯大豆根瘤菌对大豆生长和产量的影响[J]. 作物杂志, 2007, 4: 36-37. (Tan J. Influence on growth and yield of soybeans after Russia's Rhizobia inoculation[J]. Crops, 2007, 4: 36-37.)
- [3] 王卫卫, 胡正海. 几种生态因素对西北干旱地区豆科植物结瘤固氮的影响[J]. 西北植物学报, 2003, 23(7): 1163-1168. (Wang W W, Hu Z H. Characteristics related to symbiotic nitrogen fixation of legumes in northwest arid zone of China[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2003, 23(7): 1163-1168.)
- [4] Nutman P S. Varietal differences in the nodulation of subterranean clover[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1967, 18(3): 381-425.
- [5] Hungria M, Stacey G. Molecular signal exchange between host plant and rhizobia; basic aspects and potential application in agriculture [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1997, 29(5-6): 819-830.
- [6] 谢荣, 何志水, 刘芳华, 等. 应用 cDNA-AFLP 技术鉴定紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 根瘤发育相关基因[J]. 科学通报, 2006, 51(15): 1794-1801. (Xie R, He Z S, Liu F H, et al. Identification of gene in *Medicago sativa* during root nodule formation by cDNA-AFLP technique [J]. Chinese Science Bulletin, 2006, 51(15): 1794-1801.)
- [7] Puji L, Kyujung V, Moon Y, et al. Differentially expressed genes related to symbiotic association in a supernodulation soybean mutant and its wild types[J]. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(4): 235-247.
- [8] Stougaard J. Regulators and regulation of legume root nodule development[J]. Plant Physiology, 2000, 124(2): 531-540.
- [9] Colebatch G, Kloska S, Trevaskis B, et al. Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15: 411-420.
- [10] Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110[J]. DNA Research, 2002, 9: 189-197.
- [11] Shoemaker R C, Schlueter J A, Cregan P, et al. The status of soybean genomics and its role in the development of soybean biotechnologies[J]. AgBioForum, 2003, (1&2): 4-7.
- [12] Wiel C, Scheres B, Franssen H, et al. The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules[J]. The EMBO Journal, 1990, 9(1): 1-7.
- [13] Scheres B, Engelen F, Knaap E, et al. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule [J]. Plant Cell, 1990, 2(8): 687-700.
- [14] Pichon M, Jourmet E P, Dedieu A, et al. Rhizobium meliloti elicits transient expression of the early nodulin gene ENOD12 in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa [J]. Plant Cell, 1992, 4(10): 1199-1211.
- [15] Charon C, Johansson C, Kondorosi E, et al. Enod40 induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes[J]. Plant Biology, 1997, 94: 8901-8906.
- [16] Carroll B J, McNeil D L, Gresshoff P M. A super nodulating and nitrate-tolerant symbiotic (nts) soybean mutant[J]. Plant Physiology, 1985, 78: 34-40.
- [17] Radutoiu S, Madsen L H, Madsen E B, et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases[J]. Nature, 2003, 425: 585-592.
- [18] Madsen E B, Madsen L H, Radutoiu S, et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals[J]. Nature, 2003, 425: 637-640.
- [19] Limpens E, Franken C, Smit P, et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection[J]. Science, 2003, 302: 630-633.
- [20] Stracke S, Kistner C, Yoshida S, et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis[J]. Nature, 2002, 417: 959-962.
- [21] Endre G, Kereszt A, Kevei Z, et al. A receptor kinase regulating symbiotic nodule development[J]. Nature, 2002, 417: 962-966.
- [22] Krusell L, Madsen L H, Sato S, et al. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase[J]. Nature, 2002, 420: 422-425.
- [23] Nishimura R, Hayashi M, Wu G J, et al. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development[J]. Nature, 2002, 420: 426-429.
- [24] Searle I R, Men A E, Laniya T S, et al. Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase[J]. Science, 2003, 299: 109-112.
- [25] Kim M Y, Van K, Lestari P, et al. SNP identification and SNP marker development for a GmNARK gene controlling supernodulation in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110: 1003-101.
- [26] Kilen C, Palmer R G. Qualitative genetics and cytogenetics[J]. Agronomy, 1987, 16: 135-209.
- [27] Landau-Ellis D, Angermüller S, Shoemaker R, et al. The Genetic locus controlling supernodulation in soybean (*Glycine max* L.) cosegregates tightly with a cloned molecular marker[J]. Molecular and General Genetics, 1991, 228(1-2): 21-226.
- [28] Nicolás M F, Hungria M, Arias C A A. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars[J]. Field Crops Research, 2006, 95(2-3): 355-366.
- [29] Dandan Li, Pfeiffer T W, Cornelius P L. Soybean QTL for yield and yield components associated with *Glycine soja* alleles[J]. Crop Science, 2008, 48: 571-581.
- [30] 蒙忻, 刘学义, 方宜钧. 利用大豆分子连锁图定位大豆孢囊线虫 4 号生理小种抗性 QTL[J]. 分子植物育种, 2003, 1(1): 6-21. (Meng X, Liu X Y, Fang X J. QTL Mapping genes conferring resistance to race 4 of SCN[J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(1): 6-21.)

[9] Fujii H, Chiou T J, Lin S I, et al. A miRNA Involved in phosphate-starvation response in arabidopsis[J]. Current Biology, 2005, 15: 2038-2043.

[10] Senthil S, Yan F, Ramanjulu S, et al. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 160 doi: 10. 1186/1471-2174-9/160.

[11] Zhang B H, Pan X P, Edmund J S, et al. Identifcation of soybean microRNAs and their targets[J]. Planta, 2008, DOI 10. 1007/s00425-008-0818-x.

[12] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: e179.

[13] Raymond C K, Roberts B S. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs[J]. RNA, 2005, 11: 1737-1741.

[14] Shi R, Chiang V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR[J]. Biotechniques, 2005, 39: 519-525.

(上接第 587 页)

[31] Panthee D R, Kwanyuen P, Sams C E, et al. Quantitative trait loci for β -conglycinin (7S) and glycinin (11S) fractions of soybean storage protein[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2004, 81 (11): 1005-1012.

[32] Teuku T, Satosh W, Naoki Y, et al. Analysis of quantitative trait loci for protein and lipid contents in soybean seeds using recombinant inbred lines[J]. Breeding Science, 2003, 53 (2): 133-140.

[33] 葛诚, 徐玲攻, 樊蕙, 等. 快生型大豆根瘤菌的抗原分析[J]. 大豆科学, 1984, 3 (3): 237-242. (Ge C, Xu L M, Fan H. Analysis of antigens for fast growing *R. japonicum* [J]. Soybean Science,

(上接第 599 页)

[13] 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. Mer.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993b, 86: 907-913.

[14] Lark M L. Interactions between quantitative trait loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 92: 4656-4660.

[15] Lee S H, Bailey M A, Mian M A R. Molecular markers associated with soybean plant height lodging and maturity across locations[J]. Crop Science, 1996, 36 (3): 728-735.

[16] Lee S H, Bailey M A, Mian M A R. 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.

[17] Mian M A R. QTLs conditional early growth in a soybean popula-

[15] 张旗, 何湘君, 潘秀英. RNA 加尾和引物延伸 RT-PCR 法实时定量检测 microRNA[J]. 北京大学学报(医学版), 2007, 39 (1): 78-82. (Zhang Q, He X J, Pan X Y. Real-time quantification of microRNAs by RNA-tailing and primer-extension RT-PCR [J]. Journal of Peking University (Healthy Sciences), 2007, 29 (1): 78-82.)

[16] 邹权, 郭茂祖, 张涛涛. RNA 二级结构预测方法综述[J]. 电子学报, 2008, 36 (2): 332-338. (Zou Q, Guo M Z, Zhang T T. A review of RNA secondary structure prediction algorithms[J]. Acta Electronica Sinica, 2008, 36 (2): 332-338.)

[17] 张涛涛, 郭茂祖, 邹权. 参数序列比对算法研究[J]. 生物信息学, 2008, 6 (2): 74-77. (Zhang T T, Guo M Z, Zou Q. Research of parametric sequence alignment algorithm[J]. China Journal of Bioinformatics, 2008, 6 (2): 74-77.)

[18] 郑晓飞. RNA 实验技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 15-16. (Zheng X F. RNA experimental technical manuals[M]. Beijing: Science Press, 2004: 15-16.)

1994, 13 (4): 331-335.)

[34] 葛诚, 李俊, 樊蕙等. 大豆三类共生体的生态学研究[J]. 大豆科学, 1994, 13 (4): 331-335. (Ge C, Li J, Fan H. Studies on ecology of the three groups of soybean rhizobia[J]. Soybean Science, 1994, 13 (4): 331-335.)

[35] 樊蕙, 徐玲攻, 葛诚等. 大豆根瘤菌优良菌株与春大豆品种的亲合性研究[J]. 大豆科学, 1992, 11 (2): 139-145. (Ge C, Xu L M, Fan H. Studies on compatibility between superior indigenous soybean Rhizobial strains and soybean cultivars[J]. Soybean Science, 1992, 11 (2): 139-145.)

tion segregation for growth habit[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97 (8): 1210-1216.

[18] Orf J H. Genetic of soybean agronomic traits; I. comparison of three related recombinant inbred populations[J]. Crop Science, 1999, 39 (6): 1642-1651.

[19] Yuan J N. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance[J]. Crop Science, 2002, 42: 271-277.

[20] 魏燮中, 吴兆苏. 小麦植株高度的结构分析[J]. 南京农学院学报, 1983, 1: 14-21. (Wei X Z, Wu Z S. Architectural analysis of plant height of common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1983, 1: 14-21.)

[21] 刘兆晔, 于经川, 牟春生, 等. 小麦株高构成指数的研究[J]. 莱阳农学院学报, 2000, 17 (2): 120-123. (Liu Z Y, Yu J C, Mu C S, et al. A study on the plant height component indexes of wheat [J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 2000, 17 (2): 120-123.)