



大豆 PRR 家族基因 KASP 标记的开发

王培国^{1,2,3}, 张君权³, 贾鸿昌^{2,3}, 孙石³, 王立伟³, 白江平^{1,2}, 韩天富^{1,3}

(1. 甘肃农业大学 农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 省部共建旱生境作物学国家重点实验室/甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 3. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 伪响应调节因子 (*Pseudo-Response Regulators*, *PRRs*) 基因是植物光周期开花调控途径中的关键基因。本研究根据前期对 *GmPRR* 家族基因单倍型的鉴定结果, 筛选出在编码区存在变异的 5 个 *GmPRR* 基因, 开发出竞争性等位基因特异性 PCR (Kompetitive Allele Specific PCR, KASP) 分子标记, 即 *GmPRR4*-KASP、*GmPRR8*-KASP、*GmPRR10*-KASP、*GmPRR13*-KASP 和 *GmPRR14*-KASP。利用上述 5 个 KASP 标记对 48 份不同生育期组的大豆种质进行分型, 并与 6 个环境的大豆开花时间进行关联分析, 发现 SNP-Chr05:2178871 (*GmPRR4*)、SNP-Chr10:4326635 (*GmPRR8*)、SNP-Chr12:5520945 (*GmPRR10*) 和 SNP-Chr17:8022010 (*GmPRR13*) 等 4 个位点与大豆开花时间显著关联。本研究开发的 KASP 标记可应用于大豆开花期性状的分子辅助选择和种质资源鉴定, 对促进大豆生态适应性的遗传改良具有一定利用价值。

关键词: 大豆; *GmPRR*; KASP; 分子标记

Development of KASP Markers for Soybean PRR Family Genes

WANG Peiguo^{1,2,3}, ZHANG Junquan³, JIA Hongchang^{2,3}, SUN Shi³, WANG Liwei³, BAI Jiangping^{1,2}, HAN Tianfu^{1,3}

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. State Key Laboratory of Aridland Crop Science/Gansu Key Laboratory of Crop Improvement & Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China; 3. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: *Pseudo-Response-Regulators* (*PRRs*) are key genes in the pathway of photoperiodic flowering in plants. Based on the haplotype identification results in our previous study for soybean *PRR* homologues (*GmPRRs*), we identified 5 *GmPRRs* with mutations in their coding region and developed Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) markers, including *GmPRR4*-KASP, *GmPRR8*-KASP, *GmPRR10*-KASP, *GmPRR13*-KASP and *GmPRR14*-KASP, for the 5 corresponding *GmPRR* genes in the current study. Using the KASP markers, 48 soybean germplasms covering different maturity group (MG) were genotyped, and the association analysis with soybean flowering time in 6 environments were conducted. The results showed that four loci including SNP-Chr05:2178871 (*GmPRR4*), SNP-Chr10:4326635 (*GmPRR8*), SNP-Chr12:5520945 (*GmPRR10*) and SNP-Chr17:8022010 (*GmPRR13*) were significantly correlated with soybean flowering time. The KASP markers developed in this study can be used in molecular Marker-Assisted Selection (MAS) and germplasm identification, which will facilitate the improvement of ecological adaptability of soybean.

Keywords: soybean; *GmPRR*; KASP; molecular marker

大豆 (*Glycine max*) 富含蛋白质和油脂, 是世界上最为重要的大田作物之一。大豆是光周期敏感的短日作物^[1], 光周期是大豆生长发育的重要生态因子。开花期是大豆中受光周期影响最大的性状之一, 对其生态适应性、产量和品质具有重要影响。近十余年来, 随着分子遗传学和生物信息学的快速发展, 已经在大豆中克隆出 *E1* ~ *E4*^[2-5]、*E6*^[6]、*GmFT* 家族基因^[7-15]、*GmPRR3a/3b*^[16-18]、*J*^[19-20]、*GmLHY*^[21]、*GmLUX*^[22,23]、*GmFLC*^[24]、*GmFUL*^[25-27]、*GmSOCI*^[28] 和 *GmEIDI*^[29] 等开花期调控基因, 解析了光周期分子调控网络, 为大豆生态适应性的分子

育种提供了理论依据。

伪响应调节因子 (*Pseudo-Response Regulators*, *PRRs*) 是生物钟振荡器的关键组分, 在植物的多种生长发育过程中发挥着重要的调控作用^[30-31]。*PRR3/7* 的同源基因在大麦^[32]、小麦^[33]、高粱^[34] 和水稻^[35-36] 中参与开花调控。大豆 *PRR3/7* 的同源基因 *GmPRR37/3b*^[14-16] 和 *GmPRR3a*^[14] 参与大豆光周期反应, 并在驯化过程中经历人工选择。前期研究中鉴定出 14 个 *GmPRR* 家族基因, 发现这些基因具有明显的生物钟节律表达, 且其自然变异与大豆开花期显著关联, 这些变异的发现为相关分子标记的

收稿日期: 2022-04-06

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04)。

第一作者: 王培国 (1996—), 男, 硕士研究生, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wpg15101224039@163.com。

通讯作者: 王立伟 (1988—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事作物分子育种研究。E-mail: wangliwei02@caas.cn;

白江平 (1978—), 男, 博士, 教授, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: baijp@gsau.edu.cn;

韩天富 (1963—), 男, 博士, 研究员, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: hantianfu@caas.cn。

开发和辅助育种提供了依据^[37]。

利用传统育种技术选育新品种需要经过多年的表型选择,效率较低。分子标记辅助选择(Marker-Assisted Selection, MAS)可以针对特定的性状和基因进行准确和高效的鉴定和选择,是一种不受环境影响的高效育种技术。随着基因测序技术的发展,分子标记已经发展到第三代即单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)阶段。SNP是指在基因组DNA序列上由单个核苷酸变异引起的多态性,SNP标记具有分布广泛、稳定性高、易于快速且高通量分型等特点^[38],因而在作物遗传图谱构建、关联分析、基因挖掘、种质资源鉴定以及分子标记辅助育种中得到广泛应用^[39]。竞争性等位基因特异性PCR(Kompetitive Allele Specific PCR, KASP)是目前SNP分型的主要方法之一,该技术基于引物3'末端特异性碱基,针对特定位点的SNP和InDel进行精准的双等位基因分型^[40]。KASP分型技术通过检测PCR过程中的荧光信号,可实现低成本、高通量和高准确性的基因分型。田宇等^[41]开发出可应用于大豆胞囊线虫抗性鉴定的KASP标记GmSNAP11-5149;牛付安等^[42]开发出NRT1.1B-KASP标记,可以在回交群体中对水稻氮利用效率基因NRT1.1B进行准确分型;张维军等^[43]开发出3个KASP标记(TaGW2-6B、TaGASR和TaCWI-4A),可较好区分小麦千粒重位点,可应用于群体粒重性状的分子标记辅助选择。

在大豆中,目前已克隆了多个开花调控基因,并可通过重测序技术进行基因分型。刘路平等^[44]对308个分属不同生育期组的大豆品种进行E1~E4基因分型,共鉴定出21个E1~E4的等位基因组合。Khan等^[45]通过对128份大豆品种中21个GmCOL基因的克隆和测序,发现其中15个具有单核苷酸和插入缺失变异。上述结果对大豆品种区域适应性的遗传改良具有重要意义,但是重测序分析方法成本较高。因此,开发基于SNP的KASP标记,有利于提高SNP基因型分型效率,加快大豆品种生态适应性的遗传改良进度。

本研究基于前期对GmPRR家族基因自然变异情况的分析^[37],结合多环境下影响大豆开花期相关位点的效应评估结果,进行GmPRR家族基因KASP分型技术体系的构建,开发与大豆开花时间紧密连锁的GmPRR基因多态性分子标记,并在不同生育期组大豆品种中进行验证,以期对大豆开花期相关性状的遗传改良提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

选用48份来自我国不同省份、分属不同生育期组的大豆品种(表1),其中19份来自东北地区,22份来自黄淮海流域,7份来自南方地区。上述材料于2016年种植在海南三亚(18°18'N, 112°39'E)和山东济宁(35°27'N, 116°34'E),2017年种植在河南新乡(35°08'N, 113°45'E)、北京顺义(40°13'N, 116°33'E)、吉林长春(43°50'N, 124°82'E)和黑龙江黑河(50°15'N, 127°27'E)^[17,37],上述试验分别命名为SY2016、JN2016、XX2017、BJ2017、CC2017和HH2017。田间试验采用随机区组设计,1行区,两次重复;行长1.5 m,行距设置为0.5 m,株距为0.1 m。按Fehr等^[46]提出的大豆生育时期划分标准,调查记录每小区中间连续10株材料的出苗期和初花期(R1),以出苗至初花日数作为开花时间。

1.2 大豆PRR蛋白同源性比对与结构域预测

从TAIR数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)获得模式植物拟南芥的5条PRR家族蛋白序列,作为搜索大豆同源基因的探针序列,使用TBtools的BLAST功能,检索大豆基因组,获得GmPRR蛋白序列^[48]。使用DNAMAN软件对大豆与模式植物拟南芥的PRR蛋白进行同源比对,利用NCBI在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi/>)对大豆PRR家族蛋白进行结构域预测。

1.3 DNA提取

将大豆材料播种在花盆中(营养土:蛭石=3:1),待生长到10~11 d时,取最新展开的三出复叶,用植物基因组DNA提取试剂盒(北京天根)提取DNA。随后用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定DNA的完整性,并使用紫外分光光度计测定DNA浓度和A260/A280吸光值,质量达标(A260/A280吸光值介于1.7~2.0之间)的样品,置于-80℃冰箱中保存备用。

1.4 KASP引物设计及基因分型

使用TBtools的BLAST功能,获取GmPRR家族基因序列。根据前期单倍型分析鉴定出的多态性位点^[37],选择其中发生非同义突变的5个基因(GmPRR4、GmPRR8、GmPRR10、GmPRR13和GmPRR14),在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)网站上对每个基因设计特异的KASP引物。每对KASP引物包含2条特异性

引物和 1 条通用引物。2 条特异性引物的 5'端带有 FAM (5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3') 和 HEX (5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3') 荧光标签序列,3'端携带不同等位基因的 SNP 位点。通用引物

设计时,在距 SNP 位点 100 ~200 bp 左右的位置,设计包含与同源基因不同的特异位点(表 2)。KASP 引物均在北京擎科生物科技有限公司合成。

表 1 48 份大豆品种来源地及生育期组信息

Table1 The information for the original sites and maturity groups (MG) of 48 soybean varieties

品种 Variety	生态型 Ecotype	来源地 Origin	生育期组 MG	品种 Variety	生态型 Ecotype	来源地 Origin	生育期组 MG
丰收 12 Fengshou 12	北方春播	黑龙江	MG 0	诱变 30 Youbian 30	北方春播	河北	MG IV
丰收 17 Fengshou 17	北方春播	黑龙江	MG 0	鲁豆 11 Ludou 11	黄淮夏播	山东	MG II
丰收 19 Fengshou 19	北方春播	黑龙江	MG 0	齐黄 10 Qihuang 10	黄淮夏播	山东	MG II
黑河 3 Heihe 3	北方春播	黑龙江	MG 0	河南早丰 1 号 He' nanzaofeng 1	黄淮夏播	河南	MG II
黑河 9 Heihe 9	北方春播	黑龙江	MG 0	中黄 13 Zhonghuang 13	黄淮夏播	河北	MG III
黑河 27 Heihe 27	北方春播	黑龙江	MG 0	中黄 37 Zhonghuang 37	黄淮夏播	河北	MG III
黑龙江 41 Heilongjiang 41	北方春播	黑龙江	MG 0	菏豆 13 Hedou 13	黄淮夏播	山东	MG III
疆莫豆 1 号 Jiangmodou 1	北方春播	黑龙江	MG 0	菏泽牛毛黄 Hezeniumaohuang	黄淮夏播	山东	MG III
克系 283 Kexi 283	北方春播	黑龙江	MG 0	鲁豆 4 号 Ludou 4	黄淮夏播	山东	MG III
满仓金 Mancangjin	北方春播	黑龙江	MG 0	兗黄 1 号 Yanhuang 1	黄淮夏播	山东	MG III
黑农 48 Heinong 48	北方春播	黑龙江	MG I	益都平顶黄 Yidupingdinghuang	黄淮夏播	山东	MG III
米泉黄豆 Miquanhuangdou	北方春播	新疆	MG I	文丰 7 号 Wenfeng 7	黄淮夏播	山东	MG III
丰地黄 Fengdihuang	北方春播	吉林	MG II	上蔡二糙平顶式 Shangcaiercaopingdingshi	黄淮夏播	河南	MG III
吉林 3 号 Jilin 3	北方春播	吉林	MG II	耐阴黑豆 Naiyinheidou	黄淮夏播	河北	MG IV
吉林 6 号 Jilin 6	北方春播	吉林	MG II	豫豆 2 号 Yudou 2	黄淮夏播	河南	MG IV
铁丰 3 号 Tiefeng 3	北方春播	辽宁	MG II	豫豆 8 号 Yudou 8	黄淮夏播	河南	MG IV
铁丰 18 Tiefeng 18	北方春播	辽宁	MG II	皖豆 24 Wandou 24	黄淮夏播	安徽	MG IV
晋豆 3 号 Jindou 3	北方春播	山西	MG II	天隆 1 号 Tianlong 1	南方春播	湖北	MG II
铁丰 31 Tiefeng 31	北方春播	辽宁	MG III	桂春 1 号 Guichun 1	南方春播	广西	MG III

表 1 (续)

品种 Variety	生态型 Ecotype	来源地 Origin	生育期组 MG	品种 Variety	生态型 Ecotype	来源地 Origin	生育期组 MG
中黄 30 Zhonghuang 30	北方春播	北京	MG III	自贡青皮豆 Zigongqingpidou	南方春播	四川	MG IV
中黄 35 Zhonghuang 35	北方春播	北京	MG III	晋江大青仁 Jinjiangdaqingren	南方春播	福建	MG IV
晋豆 19 Jindou 19	北方春播	山西	MG III	浙春 3 号 Zhechun 3	南方春播	浙江	MG III
晋豆 21 Jindou 21	北方春播	山西	MG III	陈留牛毛黄 Chenliuniумаohuang	黄淮夏播	河南	MG IV
霸红 1 号 Banghong 1	北方春播	河北	MG IV	滇 86 - 4 Dian 86 - 4	南方夏播	云南	MG IV

Note; MG. Maturity group.

表 2 KASP 标记的引物序列
Table 2 Primer sequences for KASP assays

基因 Gene	FAM 引物 (5' - 3') FAM primer (5' - 3')	HEX 引物 (5' - 3') HEX primer (5' - 3')	通用引物 (5' - 3') Common primer (5' - 3')
<i>GmPRR4</i>	TCCATAATTTTGCAGGACATTTTIT	TCCATAATTTTGCAGGACATTTTTC	TGTGTTTTAAGGTCATTACCCCC
<i>GmPRR8</i>	AAGATTGCTGCTGGGGAGCA	AAGATTGCTGCTGGGGAGCG	TGCAGTGACAACATGACGGGT
<i>GmPRR10</i>	CCATAAAGCTGCAGTAGATCCCT	CCATAAAGCTGCAGTAGATCCCC	AGCAGCCACATTTCCGTTTTC
<i>GmPRR13</i>	GATGGAAGATATGAATCAAGCATGTAT	GATGGAAGATATGAATCAAGCATGTAC	TTCCATCGATGCAGGTGGAG
<i>GmPRR14</i>	CTAGGTCAAAGCTATGAGTGCCA	CTAGGTCAAAGCTATGAGTGCCG	TGTAGCAATCAAGTCAATGGCG

1.5 KASP 基因分型

采用 HiGeno 2 × Probe Mix A 试剂盒(北京嘉程生物科技有限公司)进行 KASP 基因分型。KASP 引物体系为:特异性引物各 12 μL,通用引物 30 μL, 46 μL ddH₂O。试验采用 384 孔板、每孔为 5 μL 反应体系(2.5 μL 稀释后的 DNA,2.5 μL HiGeno 2 × Probe Mix A,0.07 μL 引物混合物)。PCR 仪器型号为 QuantStudio™ 7 Flex,反应程序为:(1) KASP 循环:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 20 s;61 ~ 55 ℃ 退火/延伸 40 s,10 个循环(每个循环下降 0.6 ℃);95 ℃ 变性 20 s;55 ℃ 退火/延伸 40 s,30 个循环;37 ℃,1 min。

1.6 数据分析

用 IBM SPSS Statistics 21 (SPSS 21)对数据进行描述性统计分析和 Student's t 测验。

2 结果与分析

2.1 *GmPRR* 基因家族保守结构域的鉴定

在大豆基因组序列上,共鉴定到 14 个 *GmPRR*

家族基因,分布在 12 条染色体上。基于前期发现的 *GmPRR* 家族基因的自然变异位点与多环境下对开花期的效应评估^[33],发现编码区的变异尤其是蛋白保守区域的变异很有可能会影响大豆的开花时间。因此我们鉴定了该家族在编码区发生变异的 5 个基因 *GmPRR4*、*GmPRR8*、*GmPRR10*、*GmPRR13* 和 *GmPRR14*。使用 TBtools 获取了 5 个 *GmPRR* 家族基因的蛋白信息,通过 DNAMAN 进行序列比对发现,PR 和 CCT 结构域在 PRR 蛋白中比较保守(图 1)。

2.2 大豆品种开花时间变异情况分析

从表 3 结果可看出,供试 48 份大豆品种的开花时间在 6 个环境下的变异系数为 6.90% ~ 48.52%,表明该群体的开花时间存在较大差异,且随着试验地点纬度的升高,变异系数呈现增大的趋势。频率分布显示,除黑河外其他环境下该群体的开花时间存在连续性变异,呈现典型的数量性状分布特征(图 2)。在黑河,部分大豆品种未开花,因此统计分析时可能会存在偏差。

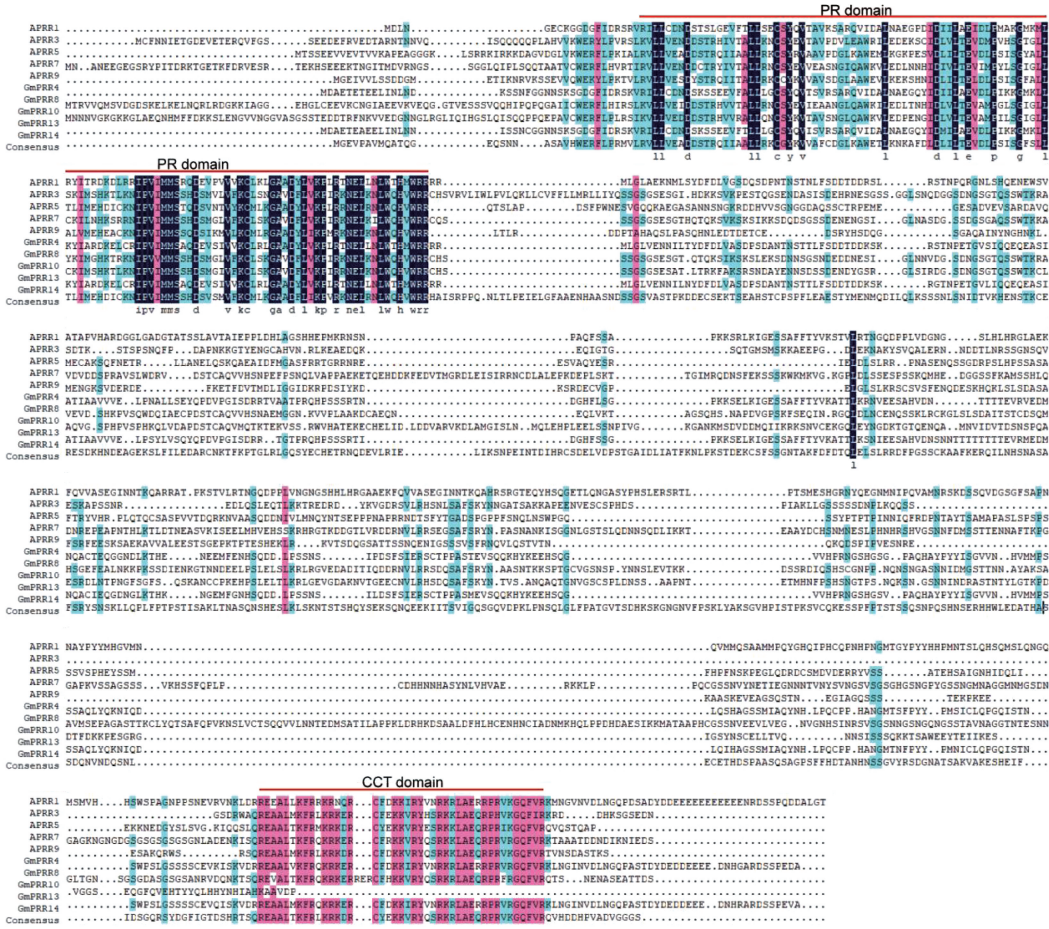


图 1 大豆和拟南芥 PRR 家族基因的同源性比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignments of the PRR genes in soybean and *Arabidopsis*

表 3 不同生态类型大豆品种在 6 个环境下开花时间的表型变异

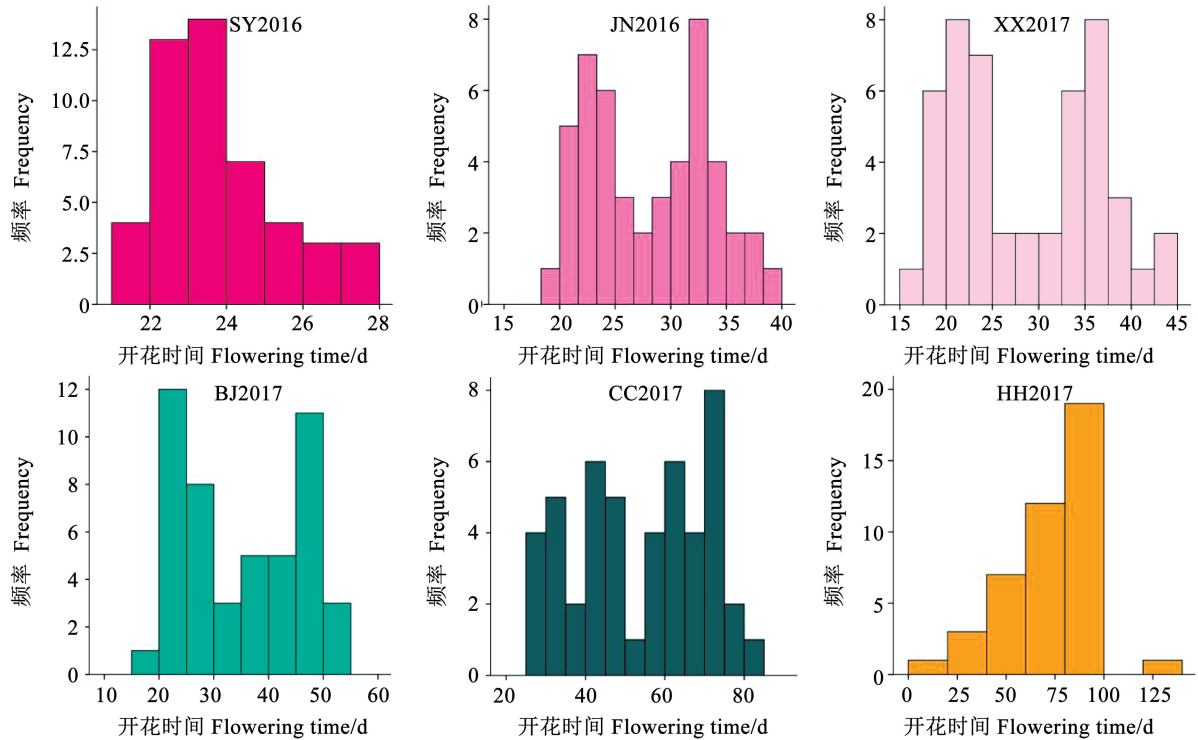
Table 3 Phenotypic variation of flowering time in different ecotypes of soybean varieties under 6 environments

年份	地点	品种数目	最小值	最大值	平均值	标准差	偏度	峰度	变异系数
Year	Location	Variety number	Min. /d	Max. /d	Mean/d	SD	Skew	Kurt	CV/%
2016	三亚	48	21.3	28.0	23.8	1.64	0.869	0.138	6.90
	济宁	48	20.0	39.5	28.1	5.40	0.205	-1.173	19.21
2017	新乡	48	16.1	44.4	28.5	7.97	0.181	-1.382	27.94
	北京	48	19.5	53.9	35.2	11.04	0.105	-1.551	31.35
	长春	48	28.8	84.7	54.1	15.92	-0.105	-1.232	29.42
	黑河	48	35.9	125.0	65.7	31.88	-0.845	0.034	48.52

2.3 KASP-SNP 多态性标记的开发

基于 207 份大豆材料的重测序数据^[11,17],研究前期以 Williams 82. a2. v1 为参考基因组对 14 个 *GmPRR* 家族基因进行了单倍型分析,获取了各个基因的变异位点^[37]。通过与大豆开花时间的关联分析,筛选到与开花时间紧密关联的位点作为潜在的功能性位点(详细信息参见 <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/9970>)。本研究中,选择 5 个编码区存在变异位点的 *GmPRR* 基因,包括

GmPRR4、*GmPRR8*、*GmPRR10*、*GmPRR13* 和 *GmPRR14*,其中 *GmPRR10* 的变异发生在 CCT 结构域(图 1)。在此基础上,筛选到 SNP-Chr05:2178871 (*GmPRR4*)、SNP-Chr10:4326635 (*GmPRR8*)、SNP-Chr12:5520945 (*GmPRR10*)、SNP-Chr17:8022010(*GmPRR13*)和 SNP-Chr19:50367303 (*GmPRR14*) 等 5 个在多个环境中与花期紧密关联的 SNP 位点。对群体进行分型发现,5 个标记均有较好的分型结果(图 3 ~ 图 7)。



注:SY2016、JN2016、XX2017、BJ2017、CC2017 和 HH2017 分别表示三亚 2016、济宁 2016、新乡 2017、北京 2017、长春 2017 和 2017 在黑河。

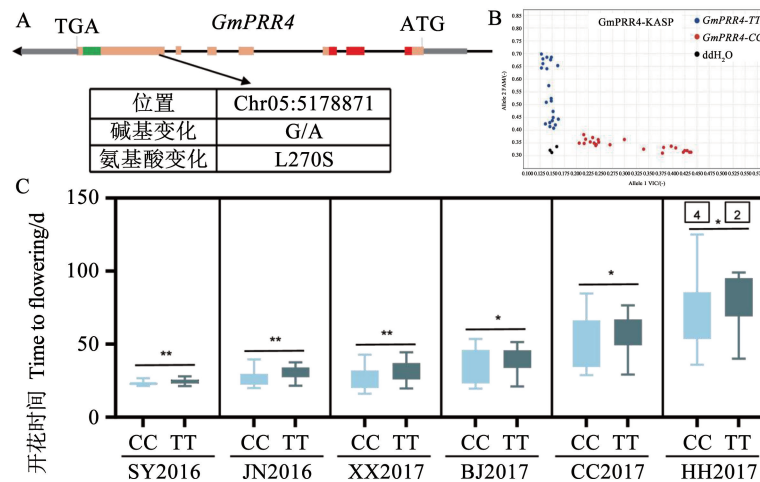
Note:SY2016, JN2016, XX2017, BJ2017, CC2017 and HH2017 represented the results of 2016 in Sanya, 2016 in Jining, 2017 in Xinxiang, 2017 in Beijing, 2017 in Changchun and 2017 in Heihe, respectively.

图 2 不同生态类型大豆品种在 6 个环境中开花时间的频率分布

Fig. 2 Frequency distribution of flowering time among 48 soybean varieties in six environments

针对 *GmPRR4* 编码区第 809 个碱基 (Chr05: 2178871) T 到 C 的非同义突变 (图 3A) 开发 *GmPRR4*-KASP 标记,分型结果如图 3B 所示。结果显示,靠近 X 轴的红点代表基因型为 CC 的材料,共有 22 份;靠近 Y 轴的蓝点代表基因型为 TT 的材料,共有 24 份;黑点的代表 NTC 空白对照 (图 3B)。

分型结果较好,说明该标记在群体中具有 DNA 多态性。利用群体在 6 个环境中的开花时间分析显示,携带 TT 基因型材料的开花时间均显著晚于携带 CC 基因型的材料,说明 TT 基因型可能对大豆晚花起正向作用 (图 3C)。



注:A. *GmPRR4* 的变异位点及变异类型;B. KASP 分型结果,每个圆点代表 1 个材料,红点和蓝点分别表示 TT 和 CC 纯合基因型,黑点为空白对照;C. 等位基因对大豆开花期时间的效应,* 和 ** 分别表示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

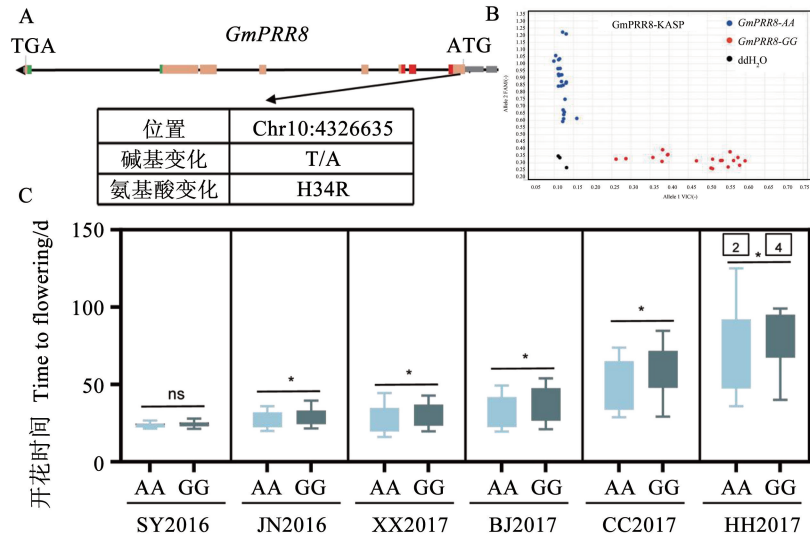
Note: A. Natural variation in nucleotide and amino acid (aa) sequences of *GmPRR4*; B. Genotyping results of 48 soybean varieties, each dot represents one material, red and blue dots represent TT and CC homozygous genotypes respectively, and black dots represents non-template control; C. Allelic effect on soybean flowering, * and ** indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

图 3 *GmPRR4*-KASP 的分型结果及对大豆开花时间的效应

Fig. 3 Genotyping results of *GmPRR4*-KASP and allelic effects on soybean flowering time

对 *GmPRR8* 编码区第 101 个碱基 (Chr10: 4326635) A 到 G 的非同义突变 (图 4A) 开发 *GmPRR8*-KASP 标记,分型结果如图 4B。靠近 X 轴的红点代表基因型为 AA 的材料,共 18 份;靠近 Y

轴的蓝点代表基因型为 GG 的材料,共 27 份。对效应位点分析发现,除了 SY2016 外,在其他 5 个环境中,基因型为 AA 的材料开花显著早于基因型为 GG 的材料 (图 4C)。



注:A. *GmPRR8* 的变异位点及变异类型;B. KASP 分型结果,每个圆点代表 1 个材料,红点和蓝点分别表示 GG 和 AA 纯合基因型,黑点为空白对照;C. 等位基因对大豆开花时间的效应,ns 表示无显著差异,*表示 $P < 0.05$ 。

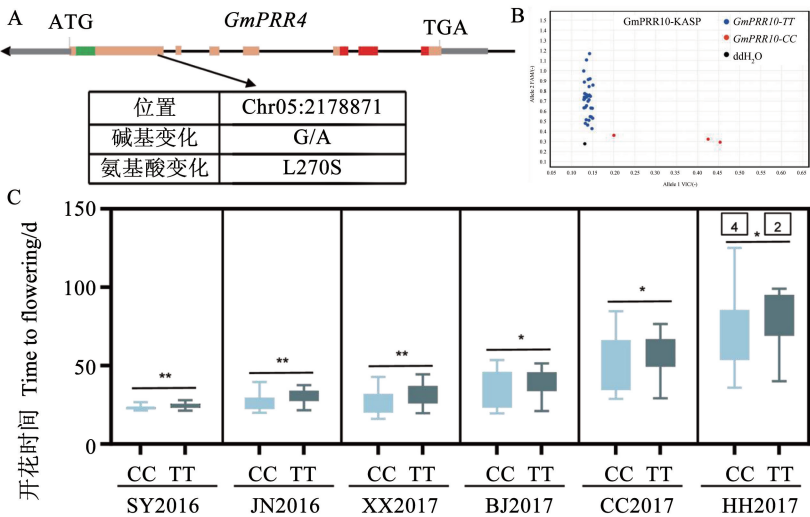
Note: A. Natural variation in nucleotide and amino acid (aa) sequences of *GmPRR8*; B. Genotyping results of 48 soybean varieties, each dot represents one material, red and blue dots represent GG and AA homozygous genotypes respectively, and black dots represent non-template control; C. Allelic effect on soybean flowering, ns indicates not significant, and * indicates $P < 0.05$.

图 4 *GmPRR8*-KASP 的分型结果及对大豆开花时间的效应

Fig. 4 Genotyping results of *GmPRR8*-KASP and allelic effects on soybean flowering time

在 *GmPRR10* 的编码区,第 1 879 个碱基 (Chr12:5520945) 出现 C 到 T 的非同义突变,发生在保守结构域内 (图 1,图 5A),导致该基因提前终止,部分 CCT 结构域缺失。针对这一变异位点,开发了 *GmPRR10*-KASP 标记,进行基因分型。其中靠近

X 轴的红点代表基因型为 CC 的材料,共 3 份;靠近 Y 轴的蓝点代表基因型为 TT 的材料,共 44 份 (图 5B)。开花表型与基因型显著关联;基因型为 TT 的材料显著早花于基因型为 CC 的材料 (图 5F)。因此, *GmPRR10*-KASP 标记可用于分子标记辅助育种。



注:A. *GmPRR10* 的变异位点及变异类型,@ 表示终止密码子;B. KASP 分型结果,每个圆点代表 1 个材料,红点和蓝点分别表示 CC 和 TT 纯合基因型,黑点为空白对照;C. 等位基因对大豆开花时间的效应,ns 表示无显著差异,*表示 $P < 0.05$ 。

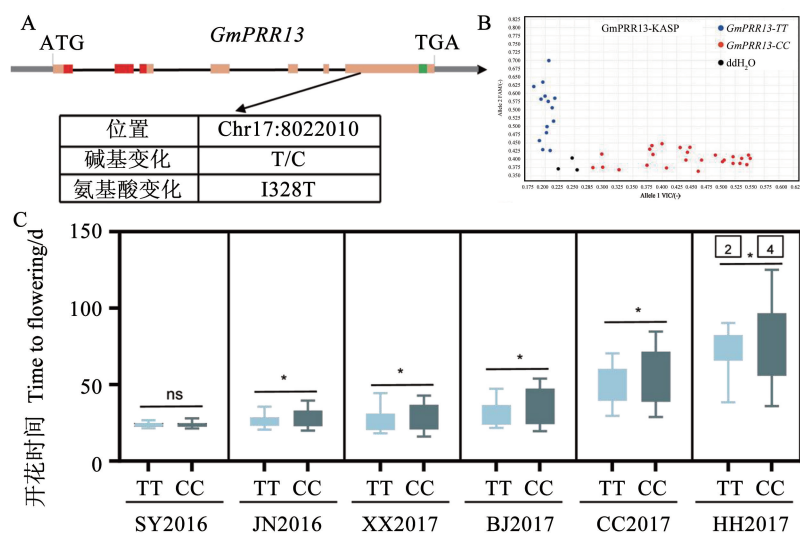
Note: A. Natural variation in nucleotide and amino acid (aa) sequences of *GmPRR10*, @ indicates stop codon; B. Genotyping results of 48 soybean varieties, each dot represents one material, red and blue dots represent CC and TT homozygous genotypes respectively, and black dots represent non-template control; C. Allelic effect on soybean flowering, ns indicates not significant, and * indicates $P < 0.05$.

图 5 *GmPRR10*-KASP 的分型结果及对大豆开花时间的效应

Fig. 5 Genotyping results of *GmPRR10*-KASP and allelic effects on soybean flowering time

针对 *GmPRR13* 编码区第 983 个碱基 (Chr17:8022010) T 到 C 的非同义突变 (图 6A) 设计标记 *GmPRR13*-KASP。该标记在供试材料中表现出良好的分型结果, 分别为 TT 和 CC 两种基因型, 分别有 14 和 26 份材料 (图 6B)。利用 6 个环境开花时间对位点效应进行评价, 结果显示, 除 SY2016 和

JN2016 环境外, 基因型为 TT 的材料与基因型为 CC 的材料均与表型显著关联 (图 6C)。标记 *GmPRR14*-KASP 也表现出良好的分型结果, AA 和 GG 两种基因型分别有 36 和 10 份材料 (图 7B), 但是与大豆开花时间并不关联 (图 7C), 因此推测该位点为非功能性位点。

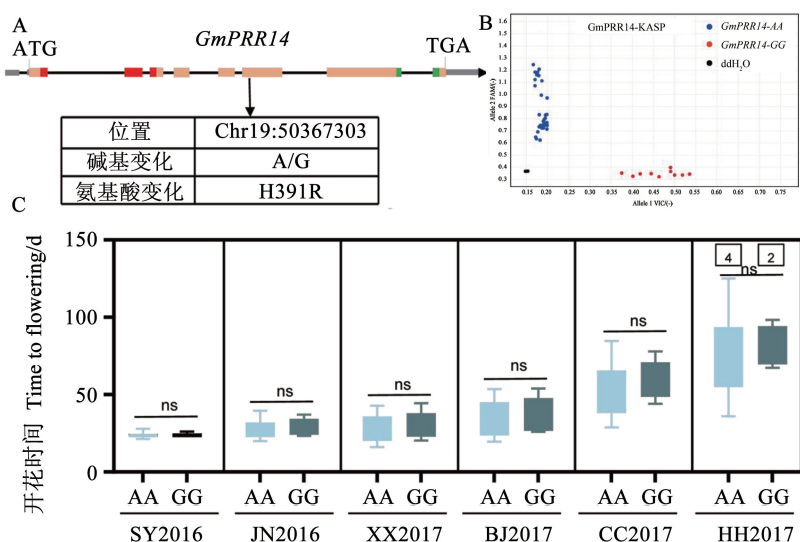


注: A. *GmPRR13* 的变异位点及变异类型; B. KASP 分型结果, 每个圆点代表 1 个材料, 红点和蓝点分别表示 CC 和 TT 纯合基因型, 黑点为空白对照; C. 等位基因对大豆开花时间的效应, ns 表示无显著差异, * 表示 $P < 0.05$ 。

Note: A. Natural variation in nucleotide and amino acid (aa) sequences of *GmPRR13*; B. Genotyping results of 48 soybean varieties, each dot represents one material, red and blue dots represent CC and TT homozygous genotypes respectively, and black dots represent non-template control; C. Allelic effect on soybean flowering, ns indicates not significant, and * indicates $P < 0.05$.

图 6 *GmPRR13*-KASP 的分型结果及对大豆开花时间的效应

Fig. 6 Genotyping results of *GmPRR13*-KASP and allelic effects on soybean flowering time



注: A. *GmPRR14* 的变异位点及变异类型; B. KASP 分型结果, 每个圆点代表 1 个材料, 红点和蓝点分别表示 GG 和 AA 纯合基因型, 黑点为空白对照; C. 等位基因对大豆开花时间的效应, ns 表示无显著差异。

Note: A. Natural variation in nucleotide and amino acid (aa) sequences of *GmPRR14*; B. Genotyping results of 48 soybean varieties, each dot represents one material, red and blue dots represent GG and AA homozygous genotypes respectively, and black dots represent non-template control; C. Allelic effect on soybean flowering, ns indicate not significant.

图 7 *GmPRR14*-KASP 的分型结果及对大豆开花时间的效应

Fig. 7 Genotyping results of *GmPRR14*-KASP and allelic effects on soybean flowering time

3 讨论

PRR 家族基因在维持生物钟稳定性方面发挥着重要作用,并影响植物的生长和发育过程,如开花时间、光合作用、冷热反应、氧化应激反应、气孔导度和线粒体代谢等^[48]。许多物种的 PRR 基因均已被证明通过光周期途径调控开花^[26-32]。目前,在大豆中共鉴定到 14 个 PRR 家族基因,并且通过单倍型与开花时间的关联分析初步确认了 GmPRR 家族部分成员能调控大豆开花^[37]。其中,*GmPRR37*/*GmPRR3b* 和 *GmPRR3a* 已被证明影响开花,而且在大豆驯化过程中被选择,促进大豆适应不同的生态环境^[16-18]。

开花时间是决定大豆品种地理分布和生态适应性的重要性状。在适当时间开花,对于大豆繁殖和产量至关重要。如果一个大豆品种在一个区域过早开花,会导致光热利用不足,进而导致产量和品质下降;如果开花太晚,则不能在下霜前正常成熟,会导致减产。大豆是光周期敏感的短日作物,通常单一品种只能适应相对狭窄的区域,在适当时间开花从而获得高产。因此,解析大豆光周期调控开花的遗传基础,对大豆的区域适应性遗传改良具有重要意义。目前已有许多大豆光周期相关基因被克隆^[2-29],同时鉴定出大量与大豆开花时间显著相关的 SNP 以及 Indel^[49-52]。将这些与大豆花时间显著相关的 SNP 以及 Indel 开发成分子标记必将加速分子育种的发展。

基因型鉴定在未来分子育种方面有很大的应用潜力。KASP 是一种具有高稳定性、高准确性和低成本的 SNP 标记分型技术。高通量基因特异性分子标记的开发与利用可有效提升分子标记辅助育种效率。该技术在水稻、小麦、大豆等作物的资源鉴定和分子标记辅助选择^[41,43,54]中得到了一定范围的应用。水稻高抗性淀粉含量基因 KASP 标记可实现对杂交和回交后代的精确分型,且分型结果与抗性淀粉含量测定结果完全符合^[55]。小麦适应性、产量、品质和抗逆等相关性状的 KASP 标记极大提高了对目标性状的选择精度和效率,可促进小麦育种遗传增益的最大化^[56]。大豆抗胞囊线虫 SCN-11 位点的 KASP 标记对抗病材料的选择效率达到 92%^[41]。大豆耐盐基因 *GmCHX1* 的 KASP 分子标记,对耐盐性状的表型鉴定效率达 91%^[57]。分子标记辅助育种能够直接选择基因型,在相关性状的改良方面起到了推动作用。

本研究基于前期鉴定出 *GmPRR* 家族基因序列中与大豆花期显著相关的 SNP 和 Indel^[37],并利用

KASP 分型技术验证了 5 个与大豆开花相关的 SNP 标记,并将其开发为 KASP 标记,包括 GmPRR4-KASP、GmPRR8-KASP、GmPRR10-KASP、GmPRR13-KASP 和 GmPRR14-KASP。其中,4 个 SNP 位点 SNP-Chr05: 2178871 (*GmPRR4*)、SNP-Chr10: 4326635 (*GmPRR8*)、SNP-Chr12: 5520945 (*GmPRR10*) 和 SNP-Chr17: 8022010 (*GmPRR13*) 与大豆开花时间显著关联。SNP-Chr12: 5520945 (*GmPRR10*) 发生在 CCT 保守结构域中(图 1),前人对该变异位点进行功能验证^[14-16]。这种功能标记与表型性状关联度更高,并且能准确跟踪和定位目标基因,高效地筛选目标性状,进而可用于分子设计育种。而 GmPRR4-KASP、GmPRR8-KASP 和 GmPRR13-KASP 这 3 个标记虽然也有较好的分型结果,但其功能机制尚不清楚,进一步开展对应基因的功能验证,才可能成为大豆分子标记辅助选择过程中实用的标记。此外,大豆开花期是复杂的数量性状,这种性状不可能像质量性状一样明确的表型分型,因此继续进行大豆开花期调控基因的克隆和功能验证,进一步开发更多的 KASP 分子标记,才能通过分子标记辅助选择高效地鉴定出在特定区域适时开花而获得高产的大豆品种。

参考文献

- [1] GARNER W W, ALLARD H A. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants [J]. Monthly Weather Review, 1920, 48 (7): 415-415.
- [2] XIA Z J, WATANABE S, YAMADA T, et al. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(32): E2155-2164.
- [3] WATANABE S, XIA Z J, HIDEISHIMA R, et al. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering [J]. Genetics, 2011, 188(2): 395-407.
- [4] WATANABE S, HIDEISHIMA R, XIA Z J, et al. Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3* [J]. Genetics, 2009, 182(4): 1251-1262.
- [5] LIU B H, KANAZAWA A, MATSUMURA H, et al. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome *a* gene [J]. Genetics, 2008, 180(2): 995-1007.
- [6] BONATO E R, VELLO N A. *E6*, a dominant gene conditioning early flowering and maturity in soybeans [J]. Genetics & Molecular Biology, 1999, 22(2): 229-232.
- [7] LIU W, JIANG B J, MA L M, et al. Functional diversification of Flowering Locus T homologs in soybean: *GmFT1a* and *GmFT2a/5a* have opposite roles in controlling flowering and maturation [J].

- New Phytologist, 2018, 217(3): 1335-1345.
- [8] SUN H B, JIA Z, CAO D, et al. *GmFT2a*, a soybean homolog of *FLOWERING LOCUS T*, is involved in flowering transition and maintenance [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29238.
 - [9] SAMANFAR B, MOLNAR S J, CHARETTE M, et al. Mapping and identification of a potential candidate gene for a novel maturity locus, *E10*, in soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2017, 130(2): 377-390.
 - [10] TAKESHIMA R, HAYASH T, ZHU J H, et al. A soybean quantitative trait locus that promotes flowering under long days is identified as *FT5a*, a *FLOWERING LOCUS T* ortholog [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(17): 5247-5258.
 - [11] CHEN L, CAI Y P, QU M N, et al. Soybean adaption to high-latitude regions is associated with natural variations of *GmFT2b*, an ortholog of *FLOWERING LOCUS T* [J]. Plant Cell Environment, 2020, 43(4): 934-944.
 - [12] SU Q, CHEN L, CAI Y P, et al. Functional redundancy of *FLOWERING LOCUS T3b* in soybean flowering time regulation [J]. International Journal Molecular Science, 2022, 23(5): 2497.
 - [13] YUAN S, WANG Y N, WANG J Y, et al. *GmFT3a* fine-tunes flowering time and improves adaptation of soybean to higher latitudes [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 929747.
 - [14] TIAN Z X, WANG X B, LEE R, et al. Artificial selection for determinate growth habit in soybean [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(19): 8563-8568.
 - [15] WANG L S, LIN C, LI B H, et al. Two soybean homologues of *TERMINAL FLOWER 1* control flowering time under long day conditions [J]. The Crop Journal, 2023, 11(3): 704-712.
 - [16] LU S J, DONG L D, FANG C, et al. Stepwise selection on homeologous *PRR* genes controlling flowering and maturity during soybean domestication [J]. Nature Genetics, 2020, 52(4): 428-436.
 - [17] WANG L W, SUN S, WU T T, et al. Natural variation and CRISPR/Cas9-Mediated mutation in *GmPRR37* affect photoperiodic flowering and contribute to regional adaptation of soybean [J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(9): 1869-1881.
 - [18] LI C, LI Y H, LI Y F, et al. A domestication-associated gene *GmPRR3b* regulates the circadian clock and flowering time in soybean [J]. Molecular Plant, 2020, 13(5): 745-759.
 - [19] YUE Y L, LIU N X, JIANG B J, et al. A single nucleotide deletion in *J* encoding *GmELF3* confers long juvenility and is associated with adaption of tropic soybean [J]. Molecular Plant, 2017, 10(4): 656-658.
 - [20] LU S J, ZHAO X H, HU Y L, et al. Natural variation at the soybean *J* locus improves adaptation to the tropics and enhances yield [J]. Nature Genetics, 2017, 49(5): 773-779.
 - [21] DONG L D, FANG C, CHENG Q, et al. Genetic basis and adaptation trajectory of soybean from its temperate origin to tropics [J]. Nature Communication, 2021, 12(1): 5445.
 - [22] BU T T, LU S J, WANG K, et al. A critical role of the soybean evening complex in the control of photoperiod sensitivity and adaptation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(8): e2010241118.
 - [23] FANG X L, HAN Y P, LIU M S, et al. Modulation of evening complex activity enables north-to-south adaptation of soybean [J]. Science China Life Sciences, 2021, 64(2): 179-195.
 - [24] LYU J, CAI Z D, LI Y H, et al. The floral repressor *GmFLC-like* is involved in regulating flowering time mediated by low temperature in soybean [J]. International Journal of Molecular Science, 2020, 21(4): 1322.
 - [25] JIA Z, JIANG B J, GAO X W, et al. *GmFULa*, a *FRUITFULL* homolog, functions in the flowering and maturation of soybean [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(1): 121-132.
 - [26] SUN J Z, WANG M Y, ZHAO C L, et al. *GmFULc* is induced by short days in soybean and may accelerate flowering in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. International Journal of Molecular Science, 2021, 22(19): 10333.
 - [27] DONG L D, CHENG Q, FANG C, et al. Parallel selection of distinct *Tof5* alleles drove the adaptation of cultivated and wild soybean to high latitudes [J]. Molecular Plant, 2022, 15(2): 308-321.
 - [28] KOU K, YANG H, LI H Y, et al. A functionally divergent *SOCI* homolog improves soybean yield and latitudinal adaptation [J]. Currently Biology, 2022, 32(8): 1728-1742.
 - [29] QIN C, LI H Y, ZHANG S R, et al. *GmEID1* modulates light signaling through the Evening Complex to control flowering time and yield in soybean [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(15): e2212468120.
 - [30] GIL K E, PARK C M. Thermal adaptation and plasticity of the plant circadian clock [J]. New Phytologist, 2019, 221(3): 1215-1229.
 - [31] SALOMÉP A, MCCLUNG C R. *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7* and *9* are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock [J]. Plant Cell, 2005, 17(3): 791-803.
 - [32] TURNER A, BEALES J, FAURE S, et al. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley [J]. Science, 2005, 310(5750): 1031-1034.
 - [33] BEALES J, TURNER A, GRIFFITHS S, et al. A *pseudo-response regulator* is mis-expressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(5): 721-733.
 - [34] MURPHY R L, KLEIN R R, MORISHIGE D T, et al. Coincident light and clock regulation of *pseudo-response regulator protein 37* (*PRR37*) controls photoperiodic flowering in sorghum [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(39): 16469-16474.
 - [35] KOOB H, YOO S C, PARK J W, et al. Natural variation in *OsPRR37* regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes [J]. Molecular Plant, 2013, 6(6): 1877-1888.
 - [36] YAN W H, LIU H Y, ZHOU X C, et al. Natural variation in *Ghd7.1* plays an important role in grain yield and adaptation in rice [J]. Cell Research, 2013, 23(7): 969-971.
 - [37] WANG P G, WANG L W, ZHANG L X, et al. Genomic dissection and diurnal expression analysis reveal the essential roles of the *PRR* gene family in geographical adaptation of soybean [J]. International Journal Molecular Science, 2022, 23(17): 9970.

- [38] 李丽花, 孙正文, 柯会锋, 等. 陆地棉纤维强度 KASP-SNP 标记的开发及效应评价[J/OL]. 中国农业科技导报;1-10[2023-06-05]. <http://doi.org/10.13304/j.nykjbd.2002.0818>. (LI L H, SUN Z W, KE H F, et al. Development and effect evaluation of KASP markers for fiber strength in *Gossypium hirsutum* L. [J/OL]. Journal of Agricultural Science and Technology;1-10[2023-06-05]. <http://doi.org/10.13304/j.nykjbd.2002.0818>.)
- [39] 谭建萍, 李映萍, 余江勇, 等. 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 绿色科技, 2015(10): 65-67. (TAN J P, LI Y P, YU J Y, et al. (Applications of molecular markers in crop genetics and breeding [J]. Journal of Green Science and Technology, 2015(10): 65-67.)
- [40] SEMAGN K, BABU R, HEARNE S, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement [J]. Molecular Breeding, 2014, 33(1): 1-14.
- [41] 田宇, 杨蕾, 李英慧, 等. 抗大豆胞囊线虫 SCN3-11 位点的 KASP 标记开发和利用[J]. 作物学报, 2018, 44(11): 1600-1611. (TIAN Y, YANG L, LI Y H, et al. Development and utilization of KASP marker for SCN3-11 locus resistant to soybean cyst nematode [J]. The Crop Journal, 2018, 44 (11): 1600-1611.)
- [42] 牛付安, 周继华, 程灿, 等. 水稻氮高效基因 NRT1.1B 的 KASP 标记开发与利用[J]. 分子植物育种; 1-7. [2023-07-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210928.1411.031.html>. (NIU F A, ZHOU J H, CHENG C, et al. Development and utilization of KASP marker for nitrogen-use gene NRT1.1B in rice [J]. Molecular Plant Breeding; 1-7. [2023-07-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210928.1411.031.html>.)
- [43] 张维军, 赵俊杰, 何进尚, 等. 宁夏小麦种质资源粒重基因 KASP 标记检测及验证[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(2): 493-507. (ZHANG W J, ZHAO J J, HE J S, et al. Detection and validation of grain weight related genes using KASP assays in Ningxia wheat germplasm [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(2): 493-507.)
- [44] LIU L P, SONG W W, WANG L W, et al. Allele combinations of maturity genes *E1-E4* affect adaptation of soybean to diverse geographic regions and farming systems in China [J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0235397.
- [45] KHAN M A A, ZHANG S, EMON R M, et al. CONSTANS polymorphism modulates flowering time and maturity in soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 817544.
- [46] FEHR W, CAVINESS C, BURMOOD D, et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill [J]. Crop Science, 1971, 11: 929-931.
- [47] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [48] BENDIX C, MARSHALL C M, HARMON F G. Circadian clock genes universally control key agricultural traits [J]. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1135-1152.
- [49] ZHANG J P, SONG Q J, CREGAN P B, et al. Genome-wide association study for flowering time, maturity dates and plant height in early maturing soybean (*Glycine max*) germplasm [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 217.
- [50] ZHOU L, WANG S B, JIAN J B, et al. Identification of domestication-related loci associated with flowering time and seed size in soybean with the RAD-seq genotyping method [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9350.
- [51] MAO T T, LI J Y, WEN Z X, et al. Association mapping of loci controlling genetic and environmental interaction of soybean flowering time under various photo-thermal conditions [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 415.
- [52] FANG C, MA Y M, WU S W, et al. Genome-wide association studies dissect the genetic networks underlying agronomical traits in soybean [J]. Genome Biology, 2017, 18(1): 161.
- [53] STEELE K A, QUINTON-TULLOCH M J, AMGAI R B, et al. Accelerating public sector rice breeding with high-density KASP markers derived from whole genome sequencing of indica rice [J]. Molecular Breed, 2018, 38(4): 38.
- [54] UR REHMAN S, WANG J Y, CHANG X P, et al. A wheat protein kinase gene *TaSnRK2. 9-5A* associated with yield contributing traits [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2019, 132(4): 907-919.
- [55] 白建江, 汤剑豪, 朴钟泽, 等. 水稻高抗性淀粉含量基因 *sbe3-rs* 的 KASP 分子标记开发与利用[J/OL]. 分子植物育种; 1-12 [2023-06-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220209.1008.004.html>. (BAI J J, TANG J H, PU Z Z, et al. Development and utilization of KASP molecular marker for high resistant starch gene, *sbe3-rs* in rice (*Oryza sativa* L.) [J/OL]. Molecular Plant Breeding; 1-12 [2023-06-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220209.1008.004.html>.)
- [56] RASHEED A, WEN W E, GAO F M, et al. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(10): 1843-1860.
- [57] PATIL G, DO T, VUONG T D, et al. Genomic-assisted haplotype analysis and the development of high-throughput SNP markers for salinity tolerance in soybean [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 19199.