



大豆种子耐储藏性相关 QTL 分析及候选基因挖掘

战宇航, 吴旭, 赵雪, 李文滨

(东北农业大学 农学院, 大豆生物学教育部重点实验室/农业农村部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:大豆种子在长期储存条件下发生老化, 导致种子的品质降低、萌发力下降、幼苗活力变差, 最终造成大豆大规模减产。种子耐储藏性是一个复杂的数量性状, 受多基因控制。为了探究大豆种子耐储藏性机理, 挖掘相关基因, 以中豆 27 和九农 20 及其杂交衍生的 112 份重组自交系 (Recombinant Inbred Lines, RIL) 群体为材料, 评价大豆种子耐储藏性, 利用 343 907 个高质量的 SNPs 标记构建 Binmap, 定位大豆种子耐储藏相关性状的 QTLs, 并利用基因组、转录组、代谢组进一步分析。结果显示: 本研究共得到 31 个 QTLs, 分布于大豆的 10 条染色体上。多组学联合分析共发现与种子耐储藏性相关的 3 个候选基因, 并发现种子耐储藏性相关的通路包括黄酮类生物合成途径和亚油酸代谢等。研究结果为深入解析大豆种子耐储藏遗传本质和大豆耐储藏品种的培育提供理论依据和技术支持。

关键词:大豆; 耐储藏性; QTL; 转录组; 代谢组; 候选基因

Identification of QTLs and Candidate Genes Underlying Storage-tolerance of Soybean Seed

ZHAN Yuhang, WU Xu, ZHAO Xue, LI Wenbin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The aging of soybean seeds under long-term storage conditions leads to the reduction of seed quality, germination ability and seedling vitality, and finally leads to the large-scale yield reduction of soybean. Seed storage-tolerance is a complex quantitative trait controlled by multiple genes. In order to explore the mechanism of soybean seed storage tolerance, the relevant genes were mined. In this study, 112 recombinant inbred lines derived from the cross of Zhongdou 27 and Jiunong 20 were used as materials to evaluate the storage-tolerance of soybean seeds. Binmap was constructed using 343 907 high-quality SNPs markers, QTLs for storage related traits of soybean seeds were mapped and further analyzed by genome, transcriptome and metabolome. A total of 31 QTLs were obtained in this experiment, distributed on 10 chromosomes of soybean. Through the combined analysis of genome, transcriptome and metabolome, 3 candidate genes related to seed storage tolerance were found, covering 19 metabolic pathways including flavonoid biosynthesis pathways and linoleic acid metabolism etc. The results provided theoretical basis and technical support for further analyzing the genetic architecture of soybean seed storage tolerance and breeding soybean storage tolerance varieties.

Keywords: soybean; storability; QTL; transcriptome; metabolome; candidate gene

大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 是我国重要的经济作物和粮食作物, 大豆种子内蛋白质含量占比 40%、脂肪含量占比 20%、各类碳水化合物占比 30%, 是植物油脂和蛋白质的主要来源^[1]。大豆内含有多种生理活性物质, 且种子内部组织疏松, 在储藏过程中, 内含物容易发生变化, 营养物质含量降低, 从而影响大豆的品质, 进而严重影响大豆的加工利用。大豆种子在豆类中属于中等寿命作物, 在较好的储存条件下, 大豆种子的生活力最多可延长至 15 年^[2]。在自然条件下, 随着储存时间的延长, 种子劣化现象严重, 同时许多生物化学和植物生理变化中, 包括酶活性的丧失, 膜完整性的改变和遗传性的变化^[3], 导致出苗率降低、生长势下

降、抗逆能力差, 造成大规模减产和经济损失。因此深入了解大豆的耐储藏机制, 挖掘与抗老化相关的主效基因, 解析大豆自然老化的遗传基础, 对培育新的耐储藏大豆品种, 提高农业生产效率具有重要意义^[4]。

国内外学者对于老化的研究主要包括种子的自然老化和人工老化^[5], 其中自然老化是将种子存放于自然环境下储藏, 或在种质保存环境中储藏; 人工老化是通过模拟极端环境, 加快种子老化的自然过程和劣变速度, 是利于快速分析种子内含物变化的方法。影响大豆种子老化的因素包括储藏条件和种子自身因素, 其中高温高湿是加速种子老化重要的非生物因素, 采用高温高湿的方法可以短期

收稿日期: 2023-06-09

基金项目: 黑龙江省科学基金 (ZD2022C002)。

第一作者: 战宇航 (1987—), 女, 博士, 实验师, 主要从事大豆基因组学与分子育种研究。E-mail: zyhsoybean@163.com。

通讯作者: 李文滨 (1958—), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆基因组学与分子育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

内加速种子老化,因而常被用于人工种子老化^[6]。大豆种质之间存在较大的耐储藏性差异,不同大豆品种在相同条件下储藏时的老化程度不同,对不利储藏条件表现出的抗性水平也不同。分子标记辅助育种和基因组学的发展,使数量性状的遗传解析和高效育种成为可能。种子的耐储藏性属于复杂数量性状,受多基因控制^[7]。到目前为止,基于 SSR (Simple Sequence Repeats) 分子标记技术检测到的大豆种子耐储藏 QTL (Quantitative Trait Locus) 仅有 17 个,分布在大豆的 15 条染色体上^[8]。Singh 等^[9]利用种皮渗透性和种子浸泡液电导率为指标,鉴定出 21 个多态性位点,其中 Sat281 标记与种皮渗透率和电导率显著相关。Zhang 等^[10]针对两个重组自交系群体,利用 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 标记进行连锁分析,检测到两个共有的 QTL,筛选出 19 个与大豆耐储藏性相关的候选基因。还有研究表明,一些参与种子萌发和休眠,以及种皮形成和脂质代谢等生物过程的相关基因也会影响大豆种子的耐储藏性^[11]。然而,目前关于大豆种子老化的研究多集中于其生理指标变化,基于代谢和转录层面对种子耐储藏性的研究鲜有报道,基于测序技术鉴定大豆种子耐贮性相关性状的 QTL 还未被完全发掘。

随着组学研究的不断发展,利用单一组学进行种子老化研究的局限性愈发明显,多组学联合分析可以更加全面、系统解释种子老化的内部机制,多维度解析种子耐储存的遗传机理,本研究利用耐储藏性差异较大的种质中豆 27 和九农 20 作为亲本,两者杂交衍生的 112 份 F₁₇、F₁₈、F₁₉ 代重组自交系群体 (Recombinant Inbred Lines, RIL) 材料和 343 907 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点建立高密度遗传连锁图谱,结合耐储藏表型鉴定数据,定位种子耐储藏性相关的 QTL。同时利用代谢组和转录组数据联合分析,筛选显著差异代谢物和差异基因,深度挖掘与大豆耐储藏性相关的代谢途径和候选基因,为进一步解析大豆种子耐储藏性的遗传本质提供理论基础,同时为大豆种子耐储藏性研究提供新的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究利用中豆 27 和九农 20 杂交构建的 112 份 F₁₇、F₁₈、F₁₉ 代 RIL 群体材料,分别于 2016、2017 和 2018 年春季播种于东北农业大学向阳基地,采用

随机区组设计,3 次重复。田间设计为行长 2 m,行距 70 cm,株距 6 cm。其它同常规大田管理。当年收获的种子置于东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室恒温种子库中保存(温度 4℃,湿度 40%)。

1.2 方法

1.2.1 种子自然老化大豆材料的构建 利用自然老化的策略评价大豆种子的耐储藏特性,于 2016、2017 和 2018 年 11 月份将当年收获的中豆 27 和九农 20 杂交衍生的 F₁₇、F₁₈、F₁₉ 代 RIL 群体材料,储藏于东北农业大学大豆研究所恒温种子库,至 2021 年 1 月取出,用于鉴定种子耐储藏性,2016、2017 和 2018 年的大豆种子自然老化处理时间分别为 50、38 和 26 个月。

1.2.2 种子耐储藏性评价 参照 GB/T3543-1995《农作物种子检验规程》对自然老化的大豆种子进行发芽测试,以种子发芽势 (Germinability, G)、发芽率 (Germinability Rate, GR)、发芽指数 (Germinability Index, GI)、活力指数 (Vital Index, VI) 作为衡量种子耐储藏性的指标。其中,将胚芽长度超过种子纵直径作为种子发芽标准,胚根呈螺旋状盘绕者不计。每份材料随机挑选 50 粒饱满且完整的种子用于单次试验,共 3 次重复。

测试种子经 70% 的乙醇溶液杀菌,无菌水清洗干净后用于试验。将 3 层滤纸置于培养皿内,润湿滤纸,用作发芽床。将种子放置培养皿内,培养皿置于 25℃ 人工气候培养箱中,进行发芽试验,期间保持含水量一致。每天统计种子的发芽情况,在第 4 天时统计种子发芽势,第 7 天时统计种子发芽率,并对幼苗置于烘箱中烘干,测定其干重,计算发芽指数和活力指数^[12]。发芽势 ($G/\%$) = (发芽初期的发芽数/供试种子数) × 100%。发芽率 ($GR/\%$) = (发芽终期的发芽数/供试种子数) × 100。发芽指数 (GI) = $\sum (G_t/D_t)$, 其中, G_t 代表第 t d 发芽数, D_t 代表相应发芽天数。活力指数 (VI) = $GI \times S$, 其中, GI 代表发芽指数, S 代表单株幼苗干重 (g)。

1.2.3 遗传连锁图谱的构建 基于 Illumina HiSeq 2500 测序平台对中豆 27、九农 20 及 112 份 RIL 群体材料进行基因组重测序,亲本平均测序深度为 20 ×, 群体后代的平均测序深度为 3 ×。使用 SOAP2 软件将样本的 reads 与大豆参考基因组进行比对,利用 GATK 鉴定群体和亲本之间的多态性 SNPs^[12]。利用 JoinMap 4.0 构建高密度分子遗传图谱。

1.2.4 大豆种子耐储藏性相关性状的连锁分析

利用 IciMapping 4.2 软件中的完备区间作图法 (ICIM), 进行 QTL 分析。每个性状进行 1 000 次 permutation 模拟, 显著水平为 0.05, 以 $LOD \geq 2.5$ 为阈值。QTL 以“q + 性状名称 + 染色体 + 序号”进行命名。

1.2.5 不同耐储藏性大豆品系代谢组和转录组分析

从 112 份 RIL 群体材中选择耐储藏大豆品系和不耐储藏大豆品系各 10 份, 对 20 份大豆品系的种子进行非靶向代谢组学检测, 对上述材料的 R7 期未成熟籽粒进行转录组测序。

使用 Agilent Profinder 软件将质谱原始数据进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等, 最后输出 CEF 文件。利用 Agilent Massive Parallel Processor 软件进行统计学处理, 并配合关联 Metlin 数据库进行物质鉴定。将这 20 份材料平均分成两个小组, 以是否耐储藏为标准进行区分, 对 2 个组成熟籽粒中的代谢物进行比较分析。将不同组之间每个代谢物的平均值差数大于 1.5 的视为差异代谢物, 并对其进行进一步分析^[8]。

对代谢组数据进行 KEGG 通路分析, 利用代谢组数据的差异性, 寻找与耐储藏性相关途径的差异代谢物质, 并进一步富集代谢通路。

利用 Trizol 法^[6]提取 20 份大豆籽粒总 RNA, 并进行转录组测序分析, 获得不同品系的转录本及基因的表达情况。通过转录组学分析, 利用方差和均值计算获得与耐储藏品系和不耐储藏品系相关的表达基因, 再将耐储藏品系和不耐储藏品系合并计算方差, 利用 $VAR > 400$ 筛选差异表达基因, 对差异表达基因进行 KEGG 富集分析, 将富集到的通路 with 差异代谢物富集的代谢通路进行比较获得与差异代谢物相关的差异基因。

1.2.6 耐储藏候选基因挖掘 通过多组学联合分析, 筛选与耐储藏性相关的代谢通路和差异表达基因, 与 QTL 定位出的候选基因相互比对, 获得重叠的候选基因作为耐储藏性相关的目的基因, 从数据库 (bar.utoronto.ca) 中获得大豆籽粒发育过程中的表达量数据, 并基于此预测大豆种子耐储藏相关候选基因^[13]。

2 结果与分析

2.1 连锁分析群体的表型变异分析

在不同的处理时间下 RIL 群体耐储藏性的性状表现不同, 种子耐储藏性相关性状均符合正态分布 (图 1 和表 1), 这表明种子耐储藏性相关的 4 个性状均为多基因控制的数量性状。

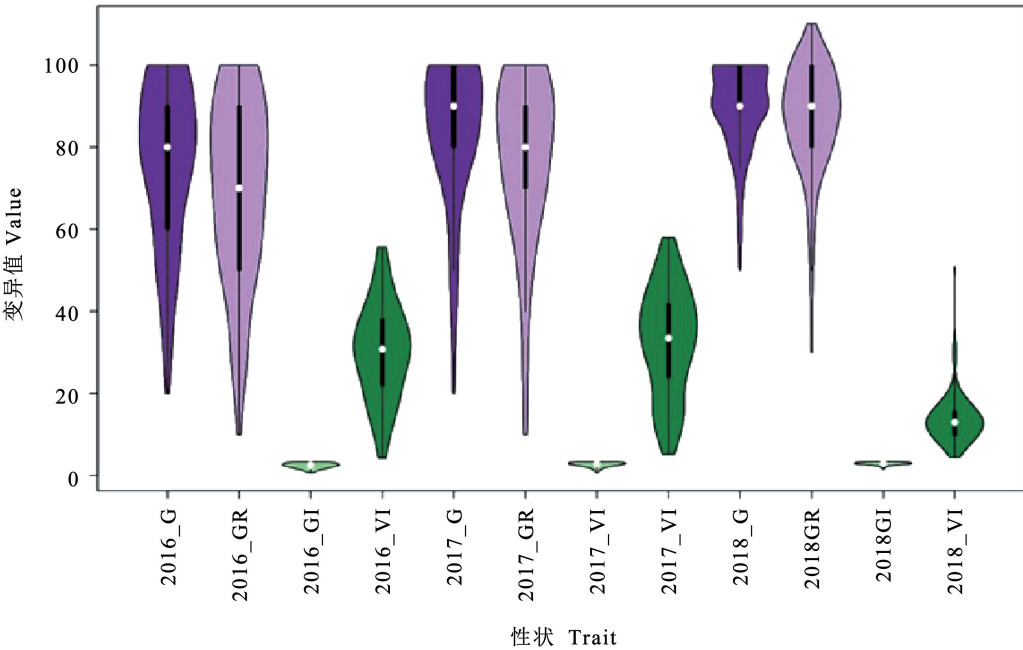


图 1 不同处理时间 RIL 群体种子耐储藏相关性状分布

Fig. 1 Distribution of traits related to seed storage tolerance of population RIL under different storage times

表 1 不同处理时间 RIL 群体种子耐储藏相关性状变异分析

Table 1 Variation analysis of traits related to storage tolerance of population RIL resources under different storage times

性状	年份	平均值	标准差	方差	峰度	偏度	变异系数	变异范围
Trait	Year	Mean	Standard deviation	Variance	Kurtosis	Skewness	CV/%	Range
发芽势 G	2016	75.77	19.84	393.78	-0.18	-0.72	26.18	20-100
	2017	83.60	17.23	296.92	1.87	-1.38	20.61	20-100
	2018	90.09	10.53	110.80	1.91	-1.29	11.69	50-100
发芽率 GR	2016	69.82	22.10	488.26	-0.46	-0.51	31.65	10-100
	2017	76.85	20.88	436.00	1.27	-1.17	27.17	10-100
	2018	86.58	13.72	188.28	3.00	-1.40	15.85	30-110
发芽指数 GI	2016	2.39	0.65	0.42	-0.33	-0.59	27.20	0.65-3.25
	2017	2.63	0.57	0.32	1.31	-1.20	21.67	0.65-3.25
	2018	2.88	0.36	0.13	2.15	-1.29	12.50	1.58-3.38
活力指数 VI	2016	30.09	11.54	133.12	-0.39	-0.01	38.35	4.29-55.67
	2017	32.64	13.14	172.77	-0.81	-0.20	40.26	5.18-58.06
	2018	13.75	6.04	36.45	13.06	2.73	43.93	4.44-50.80

F₁₇、F₁₈、F₁₉代 RIL 群体的表型变异分析的结果表明发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数这 4 个性状的变异较为广泛。种子发芽势、发芽率及发芽指数均随着处理时间的延长呈下降趋势,但是对于种子活力指数这一性状并非与其他 3 个性状表现趋势相一致,处理 26 个月大豆种子的活力指数最低,处理 38 个月大豆种子的活力指数最高。方差分析结果表明种子耐储藏相关性状在不同处理时间的差

异均达到极显著水平,这表明 RIL2720 群体的 4 个种子耐储藏相关性状的变异较广泛(表 1)。

2.2 大豆种子耐储藏性相关性状的连锁分析

对 RIL2720 群体亲本及后代基因分型,共获得 343 907 个高质量的 SNPs 标记和 4 412 个 Bin 标记,连锁图谱的总长度为 2 103.51 cM,标记之间的平均间隔为 0.51 cM(表 2)。

表 2 遗传连锁图谱信息
Table 2 Information of genetic linkage map

染色体	SNP 数目	Bin 标记数目	总长度	平均长度
Chromosome	SNP number	Bin marker number	Total distance/cM	Average distance/cM
Chr01	11948	253	105.63	0.42
Chr02	6489	276	131.75	0.48
Chr03	43281	285	95.60	0.34
Chr04	8831	193	79.71	0.41
Chr05	7405	191	98.44	0.52
Chr06	39287	331	126.30	0.38
Chr07	17856	232	108.79	0.47
Chr08	4733	148	86.96	0.59
Chr09	24652	300	96.84	0.32
Chr10	34569	232	131.33	0.57
Chr11	4684	197	109.39	0.56
Chr12	3281	148	92.23	0.62
Chr13	28289	373	126.47	0.34
Chr14	11968	209	95.81	0.46
Chr15	4899	150	118.15	0.79
Chr16	5968	158	105.34	0.67
Chr17	11089	143	136.80	0.96
Chr18	40714	269	94.03	0.35
Chr19	24037	163	88.80	0.54
Chr20	9927	161	75.16	0.47
总数 Total	343907	4412	2103.53	0.51

本研究通过连锁分析共检测到 31 个 QTLs 与耐储藏性相关性状(发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数)有关,覆盖大豆的 10 个染色体。其中与种子发芽势相连锁的 QTL 有 10 个(qG2_1、qG3_1、qG4_1、qG7_2、qG8_1、qG8_2、qGR11_1、qG15_1、qG16_1、qG19_1);与发芽率相连锁的 QTL 有 7 个(qGR2_1、qGR2_2、qGR4_1、qGR8_1、qGR11_1、qGR15_1、qGR16_1);与发芽指数相连锁的 QTL 有 7 个(qGI2_1、

qGI3_1、qGI7_1、qGI8_1、qGI11_1、qGI15_1、qGI16_1);与活力指数相连锁的 QTL 有 7 个(qVII_1、qVI3_1、qVI4_1、qVI7_1、qVI8_1、qVII5_1、qVII9_1)。检测到的连锁 QTL 的 LOD 值为 2.51 ~ 7.14,表型贡献率为 6.61% ~ 30.61%。与种子活力指数关联 QTL 的表型贡献率范围最广,同时与种子活力指数显著关联的 QTL(qVII_1)表型贡献率最大(表 3)。

表 3 大豆种子耐储藏性相关性状相关的 QTL 位点

Table 3 QTLs associated with traits related to storage tolerance of soybean seed

QTL 名称 QTL ID	年份-性状 Year-trait	染色体 Chr.	标记区间 Marker-interval	物理位置 Physical position	LOD 值	表型贡献率 PVE/%	加性效应 Additive effect
qVII_1	16-VI	1	Block31-Block32	3169523-3255998	7.14	30.61	5.91
	17-VI	1	Block31-Block32	3169523-3255998	6.05	15.17	4.96
	18-VI	1	Block31-Block32	3169523-3255998	5.00	10.00	5.04
qG2_1	17-G	2	Block459-Block460	39507382-39849539	4.53	12.66	6.84
	18-G	2	Block459-Block460	39507382-39849539	3.44	16.13	4.41
qGR2_1	16-GR	2	Block459-Block460	39507382-39849539	3.08	10.29	-6.09
	18-GR	2	Block459-Block460	39507382-39849539	3.15	8.64	3.43
qGI2_1	17-GI	2	Block465-Block466	40029777-40249992	3.11	10.53	-0.24
	18-GI	2	Block465-Block466	40029777-40249992	2.89	13.60	0.14
qGR2_2	18-GR	2	Block465-Block466	40029777-40249992	2.59	10.06	6.59
qG3_1	16-G	3	Block534-Block535	324448-3579460	3.22	9.24	5.11
	17-G	3	Block534-Block535	324448-3579460	3.27	10.37	6.45
qGI3_1	16-GI	3	Block534-Block535	324448-3579460	4.48	10.80	0.30
	17-GI	3	Block534-Block535	324448-3579460	5.16	12.81	0.26
qVI3_1	16-VI	3	Block534-Block535	324448-3579460	3.01	10.02	-5.16
qG4_1	17-G	4	Block903-Block904	39029433-43776374	6.09	14.47	6.21
qGR4_1	18-GR	4	Block903-Block904	39029433-43776374	4.02	9.07	4.39
qVI4_1	16-VI	4	Block903-Block904	39029433-43776374	5.12	14.39	6.68
	18-VI	4	Block903-Block904	39029433-43776374	3.27	11.35	5.75
qG7_2	16-G	7	Block1720-Block1721	37086249-37775286	4.86	13.71	7.68
	17-G	7	Block1720-Block1721	37086249-37775286	2.66	13.26	6.23
qGI7_1	18-GI	7	Block1720-Block1721	37086249-37775286	3.07	7.29	-0.12
qVI7_1	17-VI	7	Block1720-Block1721	37086249-37775286	2.63	7.90	5.77
	18-VI	7	Block1720-Block1721	37086249-37775286	3.31	8.44	7.65
qG8_1	16-G	8	Block1856-Block1857	18529941-19397321	2.91	10.03	-6.01
	17-G	8	Block1856-Block1857	18529941-19397321	2.77	9.45	-5.81
qGI8_1	16-GI	8	Block1856-Block1857	18529941-19397321	2.70	11.28	-0.20
	17-GI	8	Block1856-Block1857	18529941-19397321	2.62	10.62	-0.20
	18-GI	8	Block1856-Block1857	18529941-19397321	2.56	10.77	-0.20
qGR8_1	16-GR	8	Block1856-Block1857	18529941-19397321	2.78	11.33	-6.96
	17-GR	8	Block1856-Block1857	18529941-19397321	2.53	10.62	-6.76
	18-GR	8	Block1856-Block1857	18529941-19397321	2.66	10.95	-6.82
qG8_2	16-G	8	Block1874-Block1875	22703837-22738307	4.36	15.82	-6.48
	18-G	8	Block1874-Block1875	22703837-22738307	3.16	9.99	-8.16
qVI8_1	16-VI	8	Block1874-Block1875	22703837-22738307	3.37	12.47	-3.78
qGI11_1	16-G	11	Block2504-Block2505	5590002-5940355	2.62	12.40	6.67
	17-G	11	Block2504-Block2505	5590002-5940355	2.51	11.08	6.26
	18-G	11	Block2504-Block2505	5590002-5940355	2.98	11.79	9.50
qGI11_1	16-GI	11	Block2504-Block2505	5590002-5940355	4.77	20.44	0.27
	17-GI	11	Block2504-Block2505	5590002-5940355	4.99	21.32	0.28
	18-GI	11	Block2504-Block2505	5590002-5940355	4.28	18.74	0.26
qGR11_1	16-GR	11	Block2504-Block2505	5590002-5940355	4.64	20.77	9.40
	17-GR	11	Block2504-Block2505	5590002-5940355	5.43	23.58	9.95

表 3 (续)

QTL 名称	年份-性状	染色体	标记区间	物理位置	LOD 值	表型贡献率	加性效应
QTL ID	Year-trait	Chr.	Marker-interval	Physical position		PVE/%	Additive effect
qG15_1	17-G	15	Block3369-Block3371	2478191-3704354	3.02	10.08	9.54
qGI15_1	17-GI	15	Block3369-Block3371	2478191-3704354	4.00	9.00	0.20
	18-GI	15	Block3369-Block3371	2478191-3704354	3.33	10.42	0.15
qGR15_1	16-GR	15	Block3369-Block3371	2478191-3704354	2.65	12.41	7.40
	17-GR	15	Block3369-Block3371	2478191-3704354	3.21	10.06	-6.56
	18-GR	15	Block3369-Block3371	2478191-3704354	2.52	8.57	5.51
qVII5_1	16-VI	15	Block3369-Block3371	2478191-3704354	3.50	9.66	6.49
	18-VI	15	Block3369-Block3371	2478191-3704354	3.20	7.02	7.69
qG16_1	16-G	16	Block3577-Block3578	7410540-7527438	2.51	7.40	-5.92
	17-G	16	Block3577-Block3578	7410540-7527438	3.09	9.85	-7.27
	18-G	16	Block3577-Block3578	7410540-7527438	3.01	10.05	-7.24
qGI16_1	16-GI	16	Block3577-Block3578	7410540-7527438	2.93	6.61	-0.21
	17-GI	16	Block3577-Block3578	7410540-7527438	2.78	8.14	-0.22
	18-GI	16	Block3577-Block3578	7410540-7527438	2.64	7.28	-0.22
qGR16_1	16-GR	16	Block3577-Block3578	7410540-7527438	3.47	8.44	-7.79
qG19_1	16-G	19	Block4230-Block4231	42528911-42584980	4.43	9.91	5.58
qVII9_1	16-VI	19	Block4230-Block4231	42528911-42584980	3.01	8.02	-6.14
	17-VI	19	Block4230-Block4231	42528911-42584980	4.52	12.62	-8.12
	18-VI	19	Block4230-Block4231	42528911-42584980	2.81	10.04	-7.28

2.3 大豆耐储藏性差异品系代谢组分析

通过非靶向代谢组学检测,得到 11 672 种差异代谢物,将差异代谢物进行归一化数据处理,并利用平均值和方差进行筛选,经筛选,在耐储与不耐储大豆品系间存在 252 种差异代谢物,对代谢产物进行代谢途径分析,并将差异代谢物在 KEGG 数据

库中进行功能注释,发现 98 个差异代谢物在 3 个代谢通路得到富集。其中,差异代谢物较多的 3 个代谢途径分别是黄酮类生物合成途径、亚油酸代谢、花青素生物合成途径(图 2)。推测这些代谢途径与大豆耐储藏性有关。

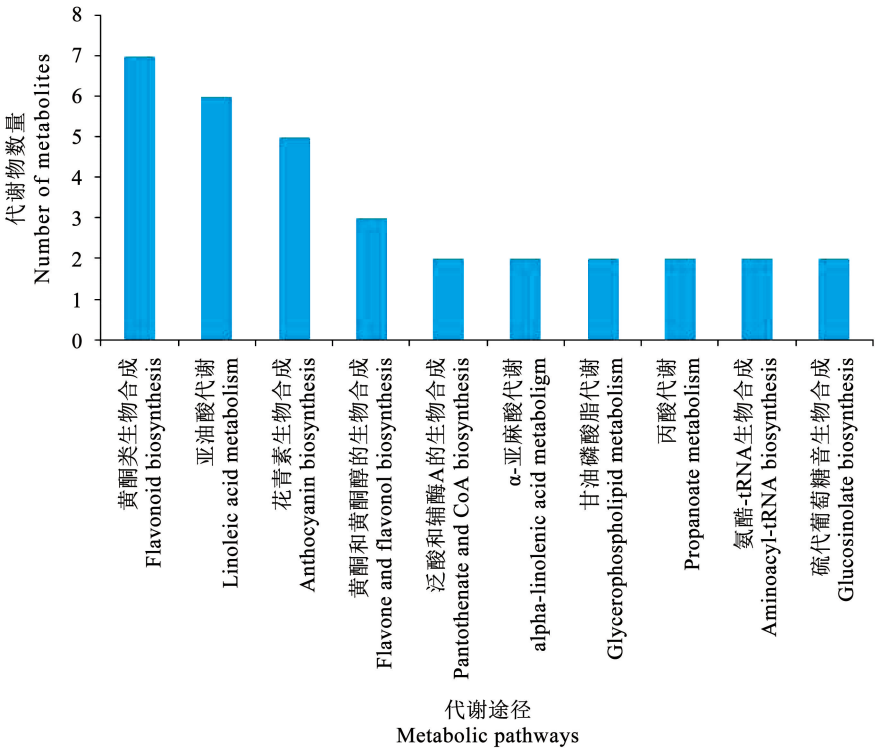


图 2 差异代谢物的富集

Fig. 2 Enrichment of differential metabolites

2.4 大豆耐储藏性差异品系转录组分析

耐储藏和不耐储大豆品系的差异转录组分析获得 91 个组间显著差异表达基因,对筛选的差异基因进行 KEGG 富集分析发现差异基因覆盖 19 个代

谢途径相关,包括细胞成分、氨基酸代谢途径、异黄酮生物合成途径、亚油酸代谢等(图 3)。上述基因将作为研究种子耐储藏的候选基因进一步研究。

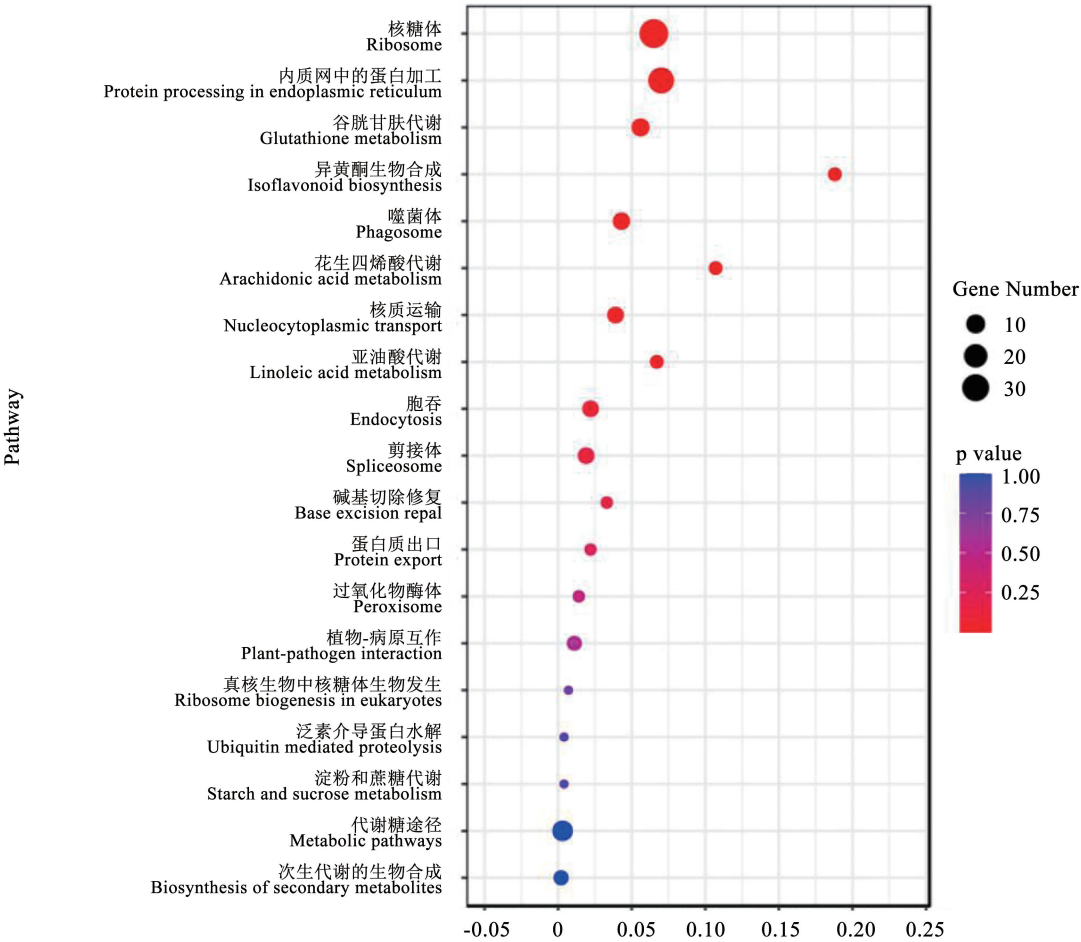


图 3 前 25 个显著富集的 KEGG 通路
Fig. 3 Top 25 of KEGG Enrichment

利用 bar. utoronto. ca 数据库分析候选基因在籽粒发育过程中的表达量变化,根据代谢组富集的黄酮类生物合成途径和亚油酸代谢途径,选择转录组涉及相关 15 个候选基因进行表达量预测表明:除 1 个候选基因在样本数据库中没有任何信息 (*Glyma. 16G149300*),其余 14 个候选基因在籽粒中均特异表达,其中候选基因 *Glyma. 15G026300* 在发育后期籽粒中的表达量明显高于其它候选基因,且该基因在发育 42 d 的籽粒中达到最高值;与 QTL 重叠的候选基因 *Glyma. 07G202300* 在发育 25 和 28 d 的籽粒中表达量一致,在发育 42 d 籽粒中表达量达

到最高值;6 个候选基因在籽粒发育 42 d 的表达量最高,4 个候选基因在籽粒发育 35 d 的表达量最高;大部分候选基因都随籽粒发育时间的延长,呈现逐渐升高的趋势(图 4)。

2.5 多组学联合挖掘大豆耐储藏性候选基因

通过转录组与代谢组联合分析,获得黄酮类生物合成通路的差异基因可能与大豆种子耐储藏有关并筛选出候选基因 *Glyma. 15G026300*、*Glyma. 19G077800*,联合 QTL 定位、转录组、代谢组分析发现,候选基因 *Glyma. 07G202300* 位于 qG7_2、qGI7_1、qVI7_1 区间(表 4)。

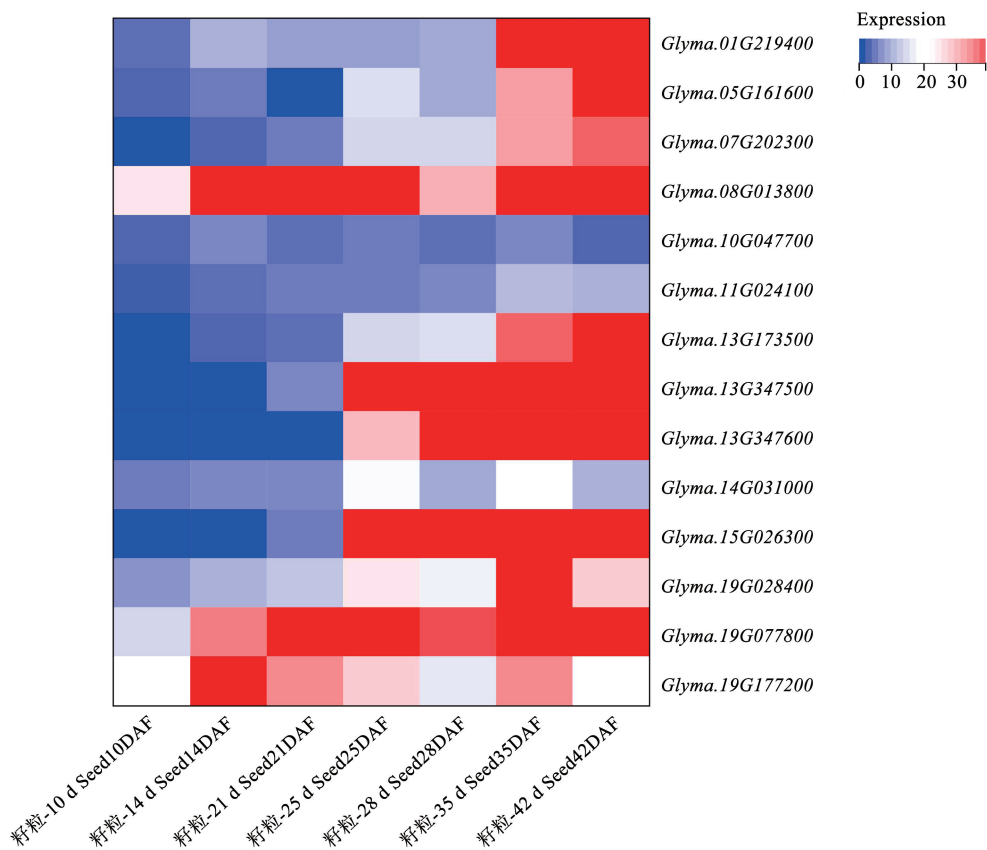


图 4 籽粒发育过程中候选基因表达分析

Fig. 4 Expression analysis of candidate genes during seed development

表 4 重叠区段的候选基因

Table 4 Candidate genes for overlapping segments

染色体 Chr.	QTL	物理位置 Physical position	候选基因 Gene model	起始位置 Start position	终止位置 End position	功能注释 Functional annotation	来源 Source	代谢 通路 Pathway	表达水平 差异 Expression levels difference
7	qG7_2 qGI7_1 qVI7_1	2367	Glyma. 07G202300	37166660	37169027	细胞色素 P450, 家族 93, 亚家族 D, 肽 1 Cytochrome P450, family 93, subfamily D, polypeptide 1	QTL 定位、转录组、代谢组 QTL transcriptome, metabolome	异黄酮生物合成途径 Isoflavone biosynthesis	*
15		4350	Glyma. 15G026300	2123754	2128104	脂质氧合酶 1 Lipoxygenase 1	转录组、代谢组 transcriptome, metabolome	亚油酸代谢途径 Linoleic acid metabolism	***
19		15192	Glyma. 19G077800	27978244	27993436	细胞溶质氨肽酶蛋白家族 Cytosol aminopeptidase family protein	转录组、代谢组 transcriptome, metabolome	谷胱甘肽代谢途径 Glutathione metabolism	*

注：*. $P \leq 0.05$ ；**. $P \leq 0.001$ 。

3 讨论

大豆种子由于富含油脂和植物蛋白,在高温、相对高湿条件下储藏容易变质,经常导致发芽能力下降,种子活力下降,从而影响产量。不同的大豆品种或基因型对不利的储藏条件表现出显著的抗性水平。因此,筛选和培育对不利储藏条件具有抗性的大豆品种是改善大豆种子储藏劣化最有前途的方法。大豆种子的耐储藏性一定程度上决定种子的发芽特性^[14]。因此,一般通过发芽率、种皮通透性和电导率等种子储藏指标检测耐储藏相关 QTL。在基因型分析方面,前人普遍使用 SSR 等低密度分子标记,限制了 QTL 定位的准确性^[15]。同时,本研究以高通量测序为代表的基因分型技术可以极大地提高高密度分子标记 SNP 的检测能力,从而确保大豆耐储藏基因的精细定位和候选基因的鉴定。

在种子形成、收获和储藏过程中,种子耐储藏性是一个受环境因素影响的复杂性状,通常由多个基因共同控制。玉米^[16]、大麦^[17]、小麦^[18]和油菜籽^[19]的种子耐储藏性研究取得了一定的进展,并已鉴定出 QTL,但对大豆种子耐储藏性机理的研究却非常有限。本研究通过对中豆 27 和九农 20 杂交衍生的中国 112 份 RIL 群体材料,得到 31 个与种子耐储藏性相关的 QTL,分布于大豆的 10 条染色体上,其中的 9 个 QTL 在 3 个处理条件下均能够被检测到,为影响种子老化的稳定 QTL。其中,qG3_1 和 qGI3_1 定位在 3 号染色体 24448-3579460 区段内,与 Zhang 等^[20]研究结果有相似的基因组位置;qV14_1 定位在 4 号染色体 39029433-43776374 区段内,其与 Thompson 等^[21]定位的种子发芽率相关 QTL 区间 (Satt476-Satt399) 部分重叠。以上前人研究结果与本研究结果具有一致性,相互验证了结果的可靠性。因此,本研究中报道的 QTL 将有助于大豆耐储藏性种质的分子标记辅助选育。

对筛选出的 10 份耐储藏性和不耐储藏性大豆品系的代谢组和转录组联合分析,筛选到 3 个候选基因,*Glyma. 07G202300* 基因被 Chen 报道^[22]通过编码查尔酮合酶调控异黄酮生物合成,异黄酮代谢途径是黄酮类代谢途径的分支,该基因同时被 QTL 分析、转录组和代谢组分析筛选到,且该基因在籽粒中特异表达,推测其可能与大豆种子老化有关;Cui 等^[23]揭示了 *Glyma. 19G077800* 基因参与叶酸的合成,3 个基因都可能参与调节大豆种子的耐储藏性,而基因的功能机制仍有待进一步研究。

4 结论

本研究通过连锁分析获得 31 个与大豆种子耐储藏性相关 QTL,覆盖大豆 10 个染色体。检测到耐储藏和不耐储藏品系间的 98 个差异代谢物覆盖 19 个代谢途径,基于转录组获得耐储与不耐储组间差异基因 14 个,多组学联合筛选获得与大豆耐储藏性相关的候选基因 3 个,分别为 *Glyma. 07G202300*、*Glyma. 15G026300*、*Glyma. 19G077800*,为大豆耐储藏性遗传基础解析及耐储藏大豆品种的培育奠定基础。

参考文献

[1] EBONE L A, CAVERZAN A, SILVEIRA D C, et al. Biochemical profile of the soybean seed embryonic axis and its changes during accelerated aging[J]. *Biology*, 2020, 9(8): 186.

[2] LIN Y X, XU H J, YIN G K, et al. Dynamic changes in membrane lipid metabolism and antioxidant defense during soybean (*Glycine max* L. Merr.) seed aging[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 908949.

[3] KUREK K, PLITTA-MICHALAK B, RATAJCZAK E. Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process[J]. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2019, 8(6): 174.

[4] 王荣繁, 杨存义. 大豆种子耐储藏的生物学机制研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2020, 42(5): 911-919. (WANG R F, YANG C Y, et al. Research progress on the biological mechanism of soybean seed storage tolerance[J]. *Chinese Journal of Oil Crops*, 2020, 42(5): 911-919.)

[5] 陈小丽, 张茜, 张桂丽, 等. 江淮大豆耐储藏种质筛选与特性研究[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(1): 129-132. (CHEN X L, ZHANG Q, ZHANG G L, et al. Screening and characterization of storage tolerant soybean germplasm in Jianghuai region[J]. *Agricultural Science*, 2016, 44(1): 129-132.)

[6] WANG F, SUN X, LIU B, et al. A polygalacturonase gene *PG031* regulates seed coat permeability with a pleiotropic effect on seed weight in soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(5): 1603-1618.

[7] JIANTAE P, HASHIGUCHI M, LELAPIYAMIT I, et al. QTL analysis for soybean (*Glycine max* L. Merr.) seed storability in high-temperature storage conditions[J]. *Euphytica*, 2022, 218(12): 169.

[8] 刘颖, 田立国, 张卫华, 等. 西瓜幼苗根系响应盐胁迫的代谢组学分析[J/OL]. *分子植物育种*: 1-19. [2023-06-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220614.1139.005.html>. (LIU Y, TIAN L G, ZHANG W H, et al. Metabolomics analysis of root response to salt stress in watermelon seedlings[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*: 1-19. [2023-06-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220614.1139.005.html>.)

[9] MIN C W, LEE S H, CHEON Y E, et al. In-depth proteomic analysis of *Glycine max* seeds during controlled deterioration treatment reveals a shift in seed metabolism[J]. *Journal of*

Proteomics, 2017, 169: 125-135.

[10] CHANDRA S, TAAK Y, RATHOD D R, et al. Genetics and mapping of seed coat impermeability in soybean using inter-specific populations[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2020, 26(11): 2291-2299.

[11] 赵欣欣, 吴依榕, 毛瑞琳, 等. 不同自然老化时间的大豆种子活力及生理差异[J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(3): 283-288. (ZHAO X X, WU Y R, MAO R L, et al. The vitality and physiological differences of soybean seeds with different natural aging times[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2021, 43(3): 283-288.)

[12] 陈泽贤, 袁辉. 种子活力测定方法研究进展[J]. 种子科技, 2019, 37(16): 25-27. (CHEN Z X, YUAN H. Research progress on methods for determining seed vitality [J]. Seed Technology, 2019, 37(16): 25-27.)

[13] 袁明略. 大豆单株粒数与单株粒重的 QTL 定位及候选基因预测[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022. (YUAN M L. QTL mapping and candidate gene prediction of seed number per plant and seed weight per plant in soybean [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022.)

[14] 荐红举, 肖阳, 李加纳, 等. 利用 SNP 遗传图谱定位盐、早胁迫下甘蓝型油菜种子发芽率的 QTL[J]. 作物学报, 2014, 40(4): 629-635. (JIAN H J, XIAO Y, LI J N, et al. Using SNP genetic map to locate QTL for germination rate of *Brassica napus* seeds under salt and drought stress[J]. Journal of Crops, 2014, 40(4): 629-635.)

[15] QIU L J, XING L L, GUO Y, et al. A platform for soybean molecular breeding: the utilization of core collections for food security[J]. Plant Molecular Biology, 2013, 83(1-2): 41-50.

[16] LI T, ZHANG Y, WANG D, et al. Regulation of seed vigor by manipulation of raffinose family oligosaccharides in maize and *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular Plant, 2017, 10(12): 1540-1555.

[17] 王凤, 齐军仓, 林立昊, 等. 人工老化处理对大麦种子萌发早期胚乳内源激素的影响[J]. 作物杂志, 2016(6): 160-167. (WANG F, QI J C, LIN L H, et al. The effect of artificial aging treatment on endogenous hormones in the early endosperm of barley seeds during germination [J]. Crop Journal, 2016(6): 160-167.)

[18] SHARMA S, SINGH V, TANWAR H, et al. Impact of high temperature on germination, seedling growth and enzymatic activity of wheat[J]. Agriculture, 2022, 12(9): 1500.

[19] 许剑锋, 龙艳, 吴建国, 等. 油菜籽含油量和蛋白质含量的种子胚与母体植株 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2014, 47(8): 1471-1480. (XU J F, LONG Y, WU J G, et al. QTL mapping of oil and protein content in rapeseed seed embryo and parent plant [J]. China Agricultural science, 2014, 47(8): 1471-1480.)

[20] ZHANG X, HINA A, SONG S, et al. Whole-genome mapping identified novel " QTL hotspots regions " for seed storability in soybean (*Glycine max* L.) [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 499.

[21] DARGAHI H, TANYA P, SRINIVES P, et al. Mapping of the genomic regions controlling seed storability in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Journal of Genetics, 2014, 93(2): 365-370.

[22] CHEN H, LIU C, LI Y, et al. Developmental dynamic transcriptome and systematic analysis reveal the major genes underlying isoflavone accumulation in soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1014349.

[23] CUI S, LV X, LI W, et al. Folic acid modulates *VPO1* DNA methylation levels and alleviates oxidative stress-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro* [J]. Redox Biology, 2018, 19: 81-91.

协 办 单 位

中国作物学会大豆专业委员会
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