

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00233

大豆[*Glycine max* (L.)]成熟期近等基因系导入片段分析

魏金鹏¹ 鄂文弟^{1,2,**} 刘章雄¹ 关荣霞¹ 常汝镇¹ 邱丽娟^{1,*}

¹ 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利用重点开放实验室, 北京 100081; ² 全国农业技术服务推广中心, 北京 100026

摘要: 选择 243 个多态性 SSR 标记, 分析轮回亲本 Harosoy 及 23 个携带大豆 4 个不同成熟期基因的近等基因系 (near isogenic line, NIL), 共检测出导入片段 266 个, 平均每个 NIL 有导入片段 11.6 个。其中由携带 *E1* 基因的 NIL 检测出导入片段 150 个, 主要集中在第 6 号染色体; 由携带 *E2*、*e3* 和 *E5* 基因的 NIL 各检测出导入片段 55 个、49 个和 73 个, 分别集中在第 20 号、第 12 号和第 20 号染色体, 根据 NIL 的 SSR 分析结果聚类, 具有相同成熟期基因的 NILs 趋向聚在一起。通过对导入片段进行分析, 推测 *E1* 基因与第 6 号染色体的 *satt643*~*sat_312* 区间及第 11 号染色体的 *sat_095* 位点相关, *E2* 和 *E5* 基因与第 20 号染色体的 *satt587*~*satt496* 区间相关, *e3* 与第 12 号染色体的 *satt317*~*satt181* 区间相关。结果表明, 利用近等基因系不仅验证了已知 *E1* 基因所在的染色体区间, 发现了一个新的标记位点与 *E1* 相关, 还鉴定出与 *E2*、*e3* 和 *E5* 基因相关的标记, 明确了轮回亲本中成熟期基因所在导入片段大小及其位置, 为成熟期基因的精细定位和克隆提供了信息。

关键词: 大豆; 近等基因系; 导入片段; 成熟期

Analysis of Introgressed Segments in Near-Isogenic Lines Carrying Soybean Maturity Genes

WEI Jin-Peng¹, E Wen-Di^{2,**}, LIU Zhang-Xiong¹, GUAN Rong-Xia¹, CHANG Ru-Zhen¹, and QIU Li-Juan^{1,*}

¹ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Crop Germplasm Utilization, Ministry of Agriculture / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² China Agricultural Technology Extension Service Center, Beijing 100026, China

Abstract: It is very important to exploit the soybean maturity genes for developing varieties with high-yield and wide adaptability in both theory and practice. The objective of the study was to identify the size and position of introgressed segments associating with maturity genes, which provides information of fine mapping and cloning maturity genes. Twenty-three introgression lines (near isogenic lines, NILs) carrying four soybean maturity genes and their recurrent parent, were analyzed with 243 SSR markers, and 266 introgression segments were found, so each NIL containing 11.6 introgressed segments on average. The majority of 150 introgressed segments with *E1*, were located on chromosome 6, while 55, 49, 73 introgressed segments with *E2*, *e3*, *E5* on chromosomes 20, 12 and 20 respectively. The NILs with the same maturity gene tended to cluster together. The results showed that *E1* was related to the interval of *satt643*~*sat_312* on chromosome 6 and *sat_095* on chromosome 11; both *E2* and *E5* loci associated with the interval of *satt587*~*satt496* on chromosome 20; *e3* was related to the interval of *satt317*~*satt181* on chromosome 12. Therefore, *E1* locus was validated with NILs, and a new marker related to *E1* was detected, and *E2*, *e3*, *E5* gene-related markers were identified.

Keywords: Soybean; Near-isogenic lines; Introgressed segments; Maturity

大豆成熟期是大豆育种最重要的育种目标, 该性状与产量及其适应性关系密切。大豆成熟期是由多基因控制的数量性状, 多数显性基因能使植株延

迟成熟, 并使株高、主茎节数和分枝数增加, 倒伏加重, 进而对大豆产量产生影响。到目前为止, 已检测到 7 个与大豆成熟期有关的基因, 包括 *E1*、*E2*、*E3*、

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA100104, 2006AA10A11D, 2006AA10Z1F1, 2006AA10Z1B3)和国家科技支撑项目(2006BAD13B05)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 邱丽娟, E-mail: qiu_lijuan@263.net; Tel: 010-82105843 **共同第一作者

Received(收稿日期): 2009-05-26; Accepted(接受日期): 2009-10-02.

E4、*E5*、*E6* 和 *E7*。其中, *E1*、*E2*、*E3*、*E4*、*E5* 和 *E7* 与成熟期延长有关, *E6* 与成熟期缩短有关; 进一步的研究表明, *E1*~*E3* 基因在成熟期上的遗传效应具有累加作用。在 Clark 等基因系中, *E1* 显著降低了籽粒大小, *E2* 和 *E3* 对株高增加作用显著; Harosoy 的熟期近等基因系比较发现, 携带 *E1* 和 *E3* 近等基因系之间的倒伏性存在显著差异^[1-9]。目前已克隆了 *E4* 基因^[10], 鉴定出 *E1*、*E3*、*E7* 的分子标记, 其中 *satt365* 与公共图谱上的 *E1* 位点仅相距 1.3 cM, *satt229* 与经典图谱上 *E3* 的位置相距 5.1 cM, *E7* 位于标记 *satt100* 与 *satt460* 之间, 两个标记相距 308 cM, 尚未发现与 *E2*、*E5*、*E6* 连锁的位点^[11]。需要指出的是, 上述基因的定位, 多采用的是传统的分析群体(如 $F_{2,3}$ 家系、重组自交系等), 这些群体遗传背景复杂, 很难对单个 QTL (quantitative trait locus) 进行准确鉴定和定位^[12]。近年来利用分子标记辅助回交构建导入系(introgression lines, IL)群体, 则可以将复杂性状的遗传基础分解为单个孟德尔遗传因子, 准确地分析遗传因子之间的互作效应, 结合高密度

的分子标记对 QTL 进行精细定位和分子克隆^[13-15]。通过分析导入系中导入片段的遗传效应来鉴定 QTL 的方法已在番茄、油菜和水稻等作物中广泛应用^[16-17], 但在大豆中集中在抗性位点^[18-22]研究方面。利用导入系群体进行 QTL 定位, 一方面可以减少遗传背景或遗传噪声的影响, 有利于各性状相关区域的精细定位和深入分析; 另一方面, 可以促进群体内重要基因优异等位变异的富集, 加快种质创新速度^[23]。

本研究利用 SSR 标记对携带 *E1*、*E2*、*E3*、*E5* 的 NILs 进行全基因组扫描及供体亲本导入片段长度分析, 一方面利用已知基因如 *E1* 等位点检验本结果的可靠性, 同时鉴定与 *E2* 和 *E5* 等未知基因位点紧密连锁的分子标记及携带基因的供体片段大小, 为这些成熟期基因克隆和利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用 23 份以 Harosoy 为遗传背景含有 4 个成熟期基因的 NILs 为材料(表 1)。该 NILs 是 Richard

表 1 23 份近等基因系的系谱、基因型和表现型
Table 1 Information and characteristics of 23 materials in experiment

| 编号 Code | 品系 Line | 系谱 Pedigree | 基因型 Genotype | 生育期 ^a Growth period ^a |
|------------|------------|---|--------------------------------------|--|
| 1 | L68-694 | H(6)×PI196.166 | <i>E1</i> | 155 |
| 2 | L67-2324 | H(6)×PI196.166 | <i>E1</i> , <i>T</i> | 152 |
| 3 | L72-1304 | [Harosoy 63×(H(6)×S54-1207)]×(H(6)×PI196.166) | <i>E1</i> , <i>T</i> | 146 |
| 4 | L73-1543 | H(6)×T204 | <i>e3</i> | 124 |
| 5 | L71-802 | (H(6)×T204)×(H(6)×PI196.166) | <i>E1</i> , <i>e3</i> , <i>T</i> | 143 |
| 6 | L64-2511 | H(6)×Columbia | <i>E1</i> , <i>G1 d1</i> , <i>d2</i> | 154 |
| 7 | L71-1116 | (H(6)×PI196.166)×(H(6)×Higan) | <i>dt1</i> , <i>E1</i> , <i>T</i> | 139 |
| 8 | L74-59 | (H(6)×PI196.166)×L67-1397 | <i>Dt2</i> , <i>E1</i> , <i>T</i> | 148 |
| 9 | L62-812 | H(6)×PI80.837 | <i>E5</i> , <i>Dt2</i> | 124 |
| 10 | L64-4103 | H(6)×Columbia | <i>E1</i> | 132 |
| 11 | L64-4584 | H(6)×T117 | <i>E2</i> | 132 |
| 12 | L64-4830 | H(6)×PI80.837 | <i>E5</i> | 140 |
| 13 | L71L-3004 | (H(6)×PI196.166)×(H(6)×T117) | <i>E1</i> , <i>E2</i> , <i>T</i> | 152 |
| 14 | L74-21 | [Harosoy 63×(H(6)×S54-1207)](6)×Clark | <i>E2</i> , <i>T</i> | 130 |
| 15 | L74-27 | [Harosoy 63×(H(6)×S54-1207)](6)×Clark | <i>E2</i> | 137 |
| 16 | L74-66 | (H(6)×T117)×(H(6)×PI80.837) | <i>E2</i> , <i>E5</i> | 152 |
| 17 | L84-307 | (H(6)×T117)×(H(6)×T204) | <i>E2</i> , <i>e3</i> | 121 |
| 18 | L86L-4 | (H(6)×PI80.837)×{[Harosoy 63×(H(6)×S54-1207)](6)×Clark} | <i>E2</i> , <i>E5</i> | 152 |
| 19 | L62-677 | H(6)×T204 | <i>e3</i> | 118 |
| 20 | L71-1106 | (H(6)×Higan)×(H(6)×PI196.166) | <i>E1</i> , <i>T</i> , <i>S</i> | 149 |
| 21 | L84-337 | (H(6)×PI80.837)×(H(6)×T204) | <i>e3</i> , <i>E5</i> | 125 |
| 22 | L71L-3015 | (H(6)×PI196.166)×(H(6)×PI 80.837) | <i>E1</i> , <i>E5</i> , <i>T</i> | 149 |
| 23 | L74-102 | [(H6×T204)×(H6×PI196.166)]×[(H6×PI196.166)×(H6×Higan)] | <i>E1</i> , <i>e3</i> , <i>dt1</i> | 106 |

^a: 生育期数据来源于中国大豆品种资源目录。

^a: the data of growth period are from Chinese Soybean Varieties Resource Directory.

Bernard 博士以美国大豆品种 Harosoy 为受体和轮回亲本, 分别与具有优良性状的不同品种作为供体亲本, 经 6 代或 6 代以上回交培育而成。所有材料经 Randall Nelson 博士从 USDA Soybean Germplasm Collection 引进, 保存在中国农业科学院国家作物种质库。

1.2 SSR 分析

根据 Cregan 等^[24]发表的大豆整合连锁图谱选择均匀分布在 20 条染色体上的 472 对 SSR 引物, 检测导入系与轮回亲本间的多态性。PCR 采用 20 μ L 的反应体系, 包括 40 ng 基因组 DNA, 0.4 U *Taq* 酶, 2 μ L 10 \times buffer (含 Mg^{2+}), 3 μ mol 引物和 1.5 μ L dNTP (2 mmol L⁻¹), 超纯水补齐至 20 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 47 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶检测扩增产物, 电泳结束后经银染显带记录检测结果。

1.3 导入片段分析

以轮回亲本 Harosoy 为对照, 利用在导入系和轮回亲本间呈多态性的 SSR 标记对 23 份导入系进行分析。根据导入系中的标记基因型(带型)是否与 Harosoy 相同确定导入系在标记位点上是否携带供

体亲本的导入片段, 并利用 GGT32 构建图示基因型。根据刘冠明等^[25]的方法确定导入片段的长度, 标记间的遗传距离来源于 Cregan 等^[24]发表的大豆整合连锁图谱。

1.4 聚类分析

以二进制来记录 23 份材料 PCR 凝胶电泳的 SSR 分析结果, 在相同迁移位置有带记为 1, 无带记为 0, 缺失记为 999, 构建所有引物扩增结果数据库。根据分子数据以简单匹配系数(simple match coefficient, SM)为基础, 以不加权重对数平均法(UPGMA)为手段应用 NTSYS-pc2.1 软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 导入系与轮回亲本间的多态性

选用分布在 20 个染色体的 472 个 SSR 位点, 每个染色体标记间的平均距离约为 10 cM。用这些 SSR 标记分析 23 份导入系与轮回亲本 Harosoy, 鉴定出分布于 20 条染色体的多态性 SSR 标记 243 个(表 2)。

2.2 导入片段分析

利用 243 个多态性的 SSR 标记, 以轮回亲本 Harosoy 为对照, 对 23 份成熟期 NIL 进行分析。检

表 2 SSR 标记在染色体上的分布
Table 2 Distribution of SSR markers on chromosomes

| 染色体编号(原编号) Chromosome code (original code) | SSR 标记数目 Number of SSR | 占标记总数比例 Percentage of SSR markers to total markers (%) | LG 上的平均距离 Average distance on link group (cM) | 多态性标记 Polymorphism markers |
|--|---------------------------|--|---|-------------------------------|
| 1 (D1a) | 13 | 3 | 8 | 5 |
| 2 (D1b) | 30 | 6 | 5 | 8 |
| 3 (N) | 15 | 3 | 7 | 7 |
| 4 (C1) | 17 | 4 | 6 | 9 |
| 5 (A1) | 12 | 3 | 11 | 5 |
| 6 (C2) | 33 | 7 | 5 | 17 |
| 7 (M) | 25 | 6 | 4 | 9 |
| 8 (A2) | 39 | 8 | 3 | 19 |
| 9 (K) | 32 | 7 | 5 | 18 |
| 10 (O) | 9 | 2 | 7 | 6 |
| 11 (B1) | 43 | 9 | 3 | 33 |
| 12 (H) | 29 | 6 | 4 | 15 |
| 13 (F) | 18 | 4 | 6 | 13 |
| 14 (B2) | 23 | 5 | 4 | 9 |
| 15 (E) | 15 | 3 | 6 | 12 |
| 16 (J) | 15 | 3 | 7 | 10 |
| 17 (D2) | 21 | 4 | 5 | 11 |
| 18 (G) | 19 | 4 | 7 | 14 |
| 19 (L) | 10 | 2 | 10 | 4 |
| 20 (I) | 54 | 11 | 2 | 19 |
| 总计 Total | 472 | — | — | 243 |

测出导入片段 266 个, 平均每个 NIL 含导入片段 11.6 个, 平均长度为 4.15 cM (图 1)。

不同染色体的导入片段数存在较大的差异。携带 *E1* 基因 NIL 的导入片段分布在 20 个染色体, 以第 6 号染色体上所含的导入片段数最多, 第 4、第 5 和第 15 号染色体上的导入片段最少, 各染色体上所含导入片段数的范围是 1~58 个。携带 *E2* 基因的 NIL 的导入片段分布在除第 3、第 5 和第 19 号之外的 17 个染色体, 第 20 号染色体上最多, 第 4、第 14 和第 15 号染色体上最少, 各染色体上所含导入片段数的范围是 1~19 个。携带 *e3* 基因的 NIL 的导入片段分布在除第 2、3、7、9、13、15 和 18 之外的 13 个染

色体上, 在第 12 号染色体上分布最多, 第 4、第 5、第 8、第 14 和第 16 号染色体上最少, 各染色体上所含导入片段数的范围是 1~15 个。携带 *E5* 基因的 NIL 的导入片段分布在除第 5 和第 7 号之外的 18 个染色体, 其中, 第 20 号染色体导入片段数最多, 第 19 号导入片段数最少, 各染色体上所含导入片段数的范围是 1~18 个。

2.3 聚类分析

利用 23 份材料的多态性 SSR 标记进行聚类分析, 除 L74-66 外, 其他所有参试材料之间都表现较高的相似程度(图 2)。当相似系数为 0.86 时, 所有含 *e3* 的 NILs 被聚为一类, 相似系数为 0.81 时, 含 *E1*

表 3 NIL 中导入片段的数量、长度及分布
Table 3 Number, length, and distribution of introgressed segments in NILs

| 携带基因 Gene | NIL 数 Number of NILs | 导入片段总数 Number of segments | 每个 NIL 的导入片段 Segment per NILs | | | | |
|--------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------|------------------------------|-----------------------------|--|
| | | | 数量范围 Range of number | 平均数 Mean | 长度范围 Range of length (cM) | 平均长度 Average length (cM) | 每个染色体的数量范围 Range of number per chromosome |
| <i>E1</i> | 12 | 150 | 6~30 | 12.5 | 0.1~15.5 | 4.4 | 3~14 |
| <i>E2</i> | 7 | 55 | 3~20 | 7.9 | 0.3~23.6 | 5.6 | 3~13 |
| <i>e3</i> | 6 | 49 | 3~25 | 8.2 | 0.2~15.5 | 3.2 | 3~6 |
| <i>E5</i> | 6 | 73 | 4~30 | 12.2 | 0.2~15.5 | 5.6 | 4~14 |
| 总计 Total | 23 | 266 | 3~30 | 40.8 | 0.1~23.6 | 18.8 | 3~14 |

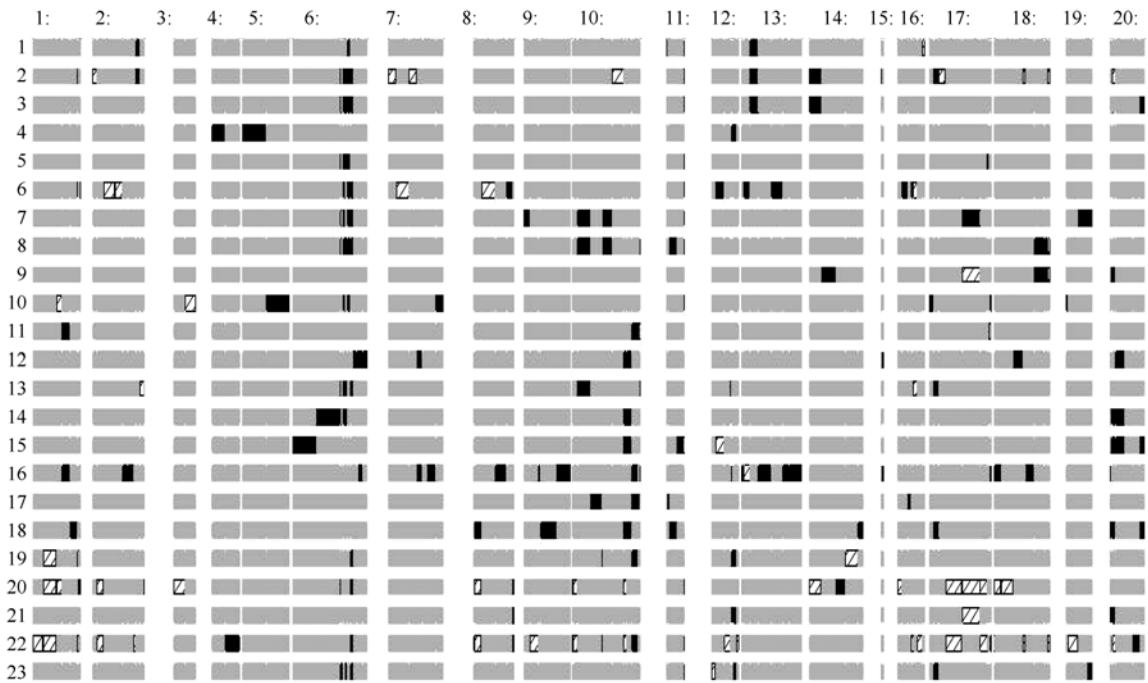


图 1 NIL 中导入片段在染色体上的分布

Fig. 1 Distribution of introgressed segments on chromosomes in 23 NILs

图中灰色部分表示轮回亲本(Harosoy)的基因组, 黑色部分表示纯合导入片段, 斜线表示杂合导入片段。

Gray parts refer to recurrent parent (Harosoy) genome, and black parts refer to homozygous introgressed segments, obliquely lined parts refer to heterozygous introgressed segments.

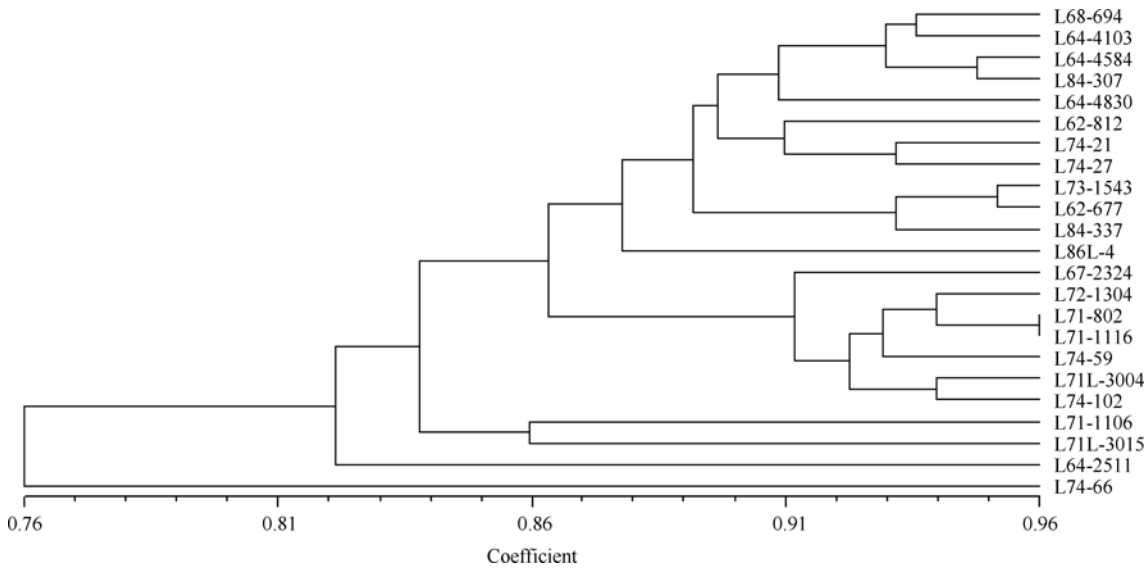


图 2 23 份 NIL 的 UPGMA 聚类
Fig. 2 Dendrograms of 23 NILs by UPGMA

的 NILs 聚在一起。

2.4 熟期基因相关位点的分析

参试材料中有 12 个 NIL 含有 *E1* 基因, 其中第 6 号和第 10 号 NIL 的供体亲本为 Columbia, 其余 NIL 的供体亲本中都含有 PI196.166。这些 NIL 共检测到 150 个导入片段, 有 10 个 NIL 在第 6 号染色体的 *satt*289 (112.4 cM)处发现导入片段, 9 个 NIL 在

*sat*_312 (112.85 cM)处发现导入片段, 8 个 NIL 在 *satt*643 (94.65 cM)、*satt*363 (98.1 cM)、*satt*286 (101.754 cM)和 *satt*557 (112.19 cM)处发现导入片段。在 *satt*643~*sat*_312 的范围内, 共有 58 个导入片段, 占导入片段的 39%。另外, 有 11 个 NIL 在第 11 号染色体的 *sat*_095 (81.3 cM)处检测到导入片段(图 3)。因此, 推断位于第 6 号染色体的 *satt*643~*sat*_312

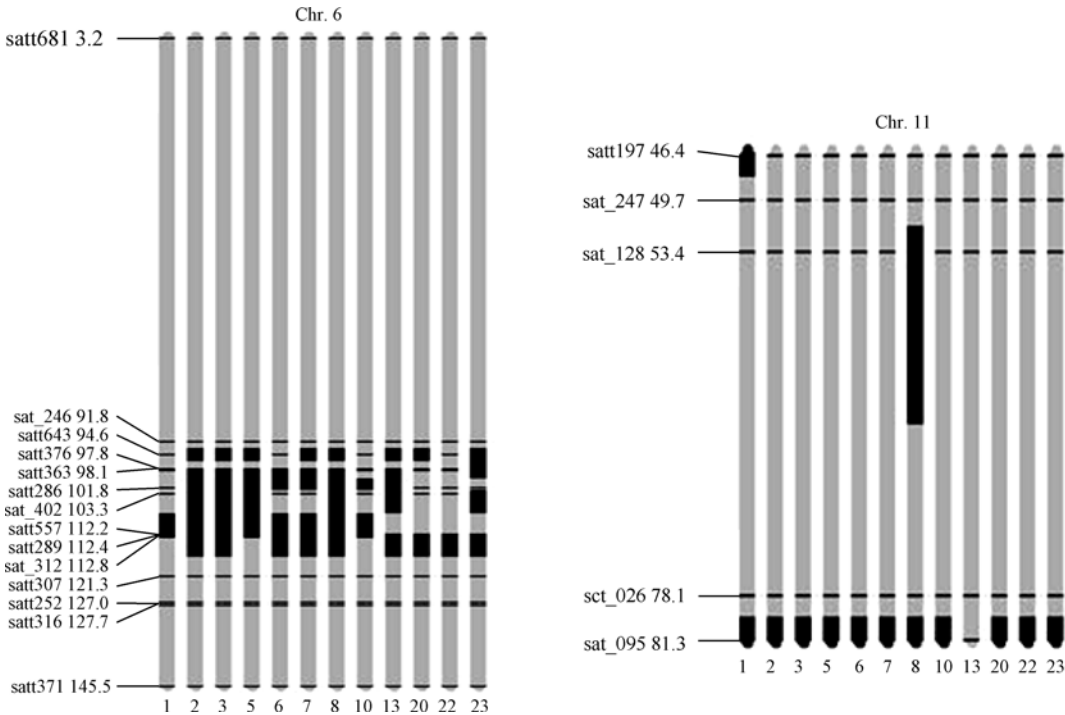


图 3 12 个带有 *E1* 基因的 NIL 在第 6 号和第 11 号染色体的导入片段分布
Fig. 3 Introgressed segments in 12 NILs with *E1* on chromosomes 6 and 11

和第11号染色体的 *sat_095* 可能与 *E1* 基因相关。

共有6个携带 *e3* 基因 NIL, 供体亲本都是 T204, 推测 *e3* 基因来源于 T204。6个 NIL 中共检测到导入片段49个, 其中4个 NIL 在第12号染色体的 *satt317* (89.5 cM) 和 *satt181* (91.12 cM) 位点发现导入片段(图4), 因此推断 *satt317*~*satt181* 区间可能存在 *e3* 基因。

携带晚熟基因 *E5* 的6个 NIL, 其供体亲本中都含有 PI80.837。共检测到导入片段73个, 有4个 NIL 在第20号染色体的 *satt496* (36.4 cM) 处检测到导入片段(图5), 而在其上游的 *satt587* (31.49 cM)、*satt614* (31.94 cM)、*satt700* (35.03 cM) 3个位点上也分别有3个 NIL 检测到导入片段, 在 *satt587*~*satt496* 之间共检测到导入片段15个, 占总数的21%。因此推测 *E5* 基因可能定位在 *satt587*~*satt496* 之间。

另外, 7个 NIL 携带 *E2* 基因, 分别来自 T117 和 Clark 两个供体亲本, 共检测到导入片段55个, 其中有4个 NIL 在第20号染色体的 *satt127* 位点发现导入片段(图6)并且在其上游的 *satt587* (31.49 cM)、*satt700* (35.03 cM) 和下游的 *satt496* (36.40 cM) 3个位点处分别有3个 NIL 检测到导入片段, 在 *satt587*~

satt496 之间检测到15个导入片段, 占总数的27.3%。因此, 推测 *satt587*~*satt496* 之间可能是 *E2* 基因所在的新位置。需要指出的是, 这个区间也是本文推测 *E5* 基因所在的位置。

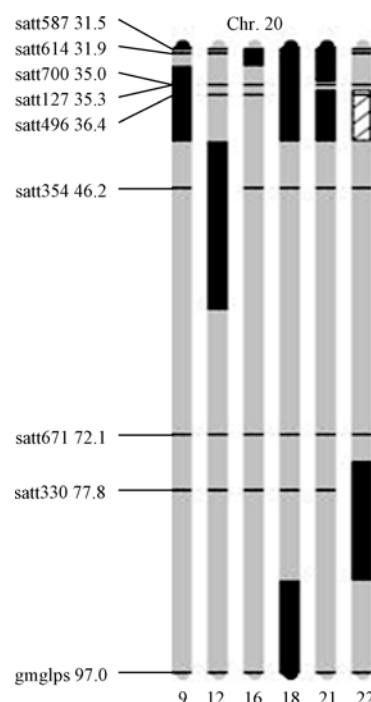


图5 6个携带 *E5* 基因的 NIL 在第20号染色体的导入片段分布
Fig. 5 Introgressed segments in 6 NILs with *E5* on chromosome 20
斜线表示杂合片段。

Obliquely lined parts refer to heterozygous introgressed segments.

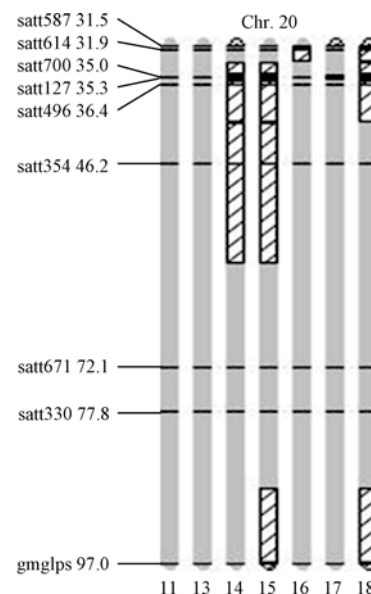


图6 7个携带 *E2* 基因 NIL 在第20号染色体的导入片段分布
Fig. 6 Introgressed segments in 7 NILs with *E2* on chromosome 20
斜线表示杂合片段。

Obliquely lined parts refer to heterozygous introgressed segments.

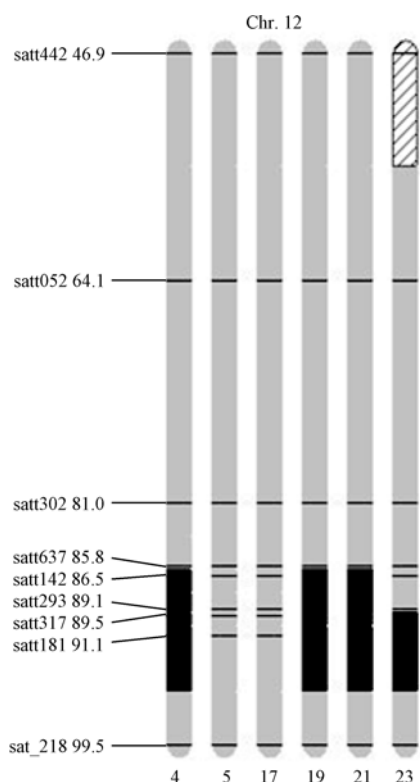


图4 6个携带 *e3* 基因的 NIL 在12号染色体上的导入片段分布
Fig. 4 Introgressed segments in 6 NILs with *e3* on chromosome 12
斜线表示杂合片段。

Obliquely lined parts refer to heterozygous introgressed segments.

3 讨论

自 Keim 等^[26]首次对大豆的开花期和成熟期相关基因进行定位以来, 已在不同的大豆群体中定位到至少与开花期相关的标记位点 42 个, 与成熟期相关的标记位点 46 个^[27-34], 定位所用的群体有 F_2 群体、重组自交系(RIL)、近等基因系(NIL)和由 RIL 衍生的残余杂合系(residual heterozygous line, RHL)等; 鉴定出的分子标记有 RAPD、RFLP、AFLP、SSR 等, 这些标记解释的表型变异范围为 3.8%~69.7%, 与开花期和成熟期有关的标记位点集中在第 6 号、第 7 号、第 11 号和第 13 号染色体上。值得一提的是, Yamanaka 等^[28]利用 F_2 群体在第 6 号染色体定位的标记位点 AG36^d 可解释的表型变异高达 69.7%^[27]。他们利用 RHL 群体, 将标记位点与基因间距离缩小到 0.1 cM, 所得标记 Satt365 恰与 Molnar 等^[29]利用 NIL 定位到 *E1* 位点相同, 因此, Satt365 可作为 *E1* 基因的标记位点。Molnar 等^[29]通过比较标记位点的等位变异与 NIL 群体携带的等位基因间的对应程度, 发现了与 *E1*、*E3*、*E4* 和 *E7* 基因相关的位点, 其中 *E3* 基因被定位在第 19 号染色体 satt229 附近, 这与 2003 年经典图谱(<http://www.soybase.org/>)上的定位结果相一致。宁慧霞等^[35]利用 Clark 和 Harosoy 近等基因系鉴定出与 *E3/e3*、*E4/e4*、*E7/e7* 相关的 8 个标记, 推测出 25 份中国大豆品种的成熟期基因型。Mansur 等^[31]在定位开花期和成熟期基因时发现, 一些与开花期相连锁的标记位点同时与成熟期基因连锁, 但也有一些位点只和其中一个性状有关, 说明控制开花期和成熟期的遗传机制并不完全相同。

本实验构建了图示基因型。在 20 条染色体中共检测导入片段 266 个, 平均每个染色体有 11.6 个。*E1*、*E2*、*e3*、*E5* 基因的 NIL 的导入片段分别主要集中在第 6 号、第 20 号、第 12 号和第 20 号染色体, 这是在培育 NIL 的过程中定向选择的结果。在携带 4 种不同成熟期基因的 NIL 中, 导入片段的平均长度均在 6 cM 以下, 这与李文涛等^[36]的研究结果一致。需要指出的是, 并非所有含相同基因的 NIL 在同一位点检测到导入片段, 例如含有 *E1* 基因的 12 个 NIL, 只有 10 个 NIL 在 6 号染色体的 satt289 (112.4 cM) 处发现导入片段, 9 个 NIL 在 sat_312 (112.85 cM) 处发现导入片段。这可能是由于 NIL 的供体亲本不同或是 NIL 在相同位点上没有多样性所造成的, 也就是检测标记的密度不高造成的。这种情况均见于 4 个成熟期基因的检测中。然而, 具有相同基因的所有

NIL 在聚类分析时都表现出较高的相似程度。当相似系数为 0.86 时, 所有含 *e3* 的材料被聚为一类, 相似系数为 0.81 时, 含 *E1* 的材料可以聚在一起。

通过对携带成熟期相关基因导入系的分析, 既鉴定出已报道成熟期基因的相关标记, 同时也发现了与成熟期基因相关的新标记位点, 证明了利用导入片段分析定位基因是可行的。本研究在第 6 号染色体定位 *E1* 基因相关的 satt643~sat_312 区间, 包括了 Molnar 等^[29]所定位的区间 satt277~satt557 和 Yamanaka 等^[28]定位的 *E1* 基因位点 satt365, 而 Wang 等^[37]和 Orf 等^[32]分别定位的 satt134 和 satt489 则位于 sat_312 两侧。*E1* 基因在 2003 年(<http://www.soybase.org/>)的整合图谱上位于第 6 号染色体 113 cM 处, 与 sat_312 只相差 0.15 cM。因此, 本实验进一步验证了 *E1* 基因所在的位点, 同时, 也检测到一些由于缺乏多态性而未能检测出的 *E1* 基因相关标记, 证明通过分析导入片段进行基因定位是可行的, 并且能够检测到更多的相关标记。本实验发现的另一个与 *E1* 相关的位点是第 11 号染色体上的 sat_095, 但是目前还没有关于 11 号染色体上存在 *E1* 基因的报道, 因此推测 sat_095 可能是一个新的 *E1* 位点。

本研究将 *e3* 基因定位在 12 号染色体的 satt317~satt181 之间, 但研究并没有在经典图谱上 *e3* 基因位于第 19 号染色体的 99.00 cM 附近发现导入片段, 这可能与检测的位点不够密集有关。本实验在第 12 号染色体 satt317~satt181 区间定位的 *e3* 基因, 可能是新的基因位点。第 20 号染色体的 satt587~satt496 同时与 *E2* 和 *E5* 基因相关, 但关于 *E2* 和 *E5* 之间连锁关系尚未见报道。*E2* 基因在 2003 年的整合图谱上被定位在第 10 号染色体上 136.33 cM 处, 但本实验中并没有在此处发现导入片段, 且尚无 *E5* 相关位点的报道, 因此, 推测 satt587~satt496 区间可能存在 *E2* 和 *E5* 基因的新位点。

上述导入片段的分析明确了各 NIL 导入片段的数目和位置, 一方面利用含有 *E1* 基因的 NIL 检验到已发现的相关标记, 证明了本研究方法的可靠性, 另一方面鉴定了与 4 个成熟期基因相关的新标记, 为成熟期基因的研究提供了新的依据。进一步利用分子标记辅助选择便可以在各导入系与轮回亲本回交所构建的分离群体中选育出单片段导入系, 鉴定出与成熟期基因距离更近的连锁标记, 以其对成熟期基因进行精细定位为基因的克隆和功能研究奠定基础^[10,38-41]。

4 结论

利用 243 个多态性 SSR 标记在 23 份成熟期 NIL 中检测出导入片段 266 个, 并且不同染色体间的导入片段数存在较大的差异。在第 6 号和第 11 号染色体上检测到可能与 *E1* 基因相关的基因位点, 在第 12 号染色体上检测到可能与 *e3* 基因相关的位点, 在第 20 号染色体上检测到可能与 *E2* 和 *E5* 基因同时相关的位点。除第 6 号染色体上的 *E1* 基因相关位点与已报道的结果相接近外, 其余的相关位点均与已报道的结果不同, 可能是新发现的基因位点。

References

- [1] McBlain B, Bernard R L. A new gene affecting the time of flowering and maturity in soybean. *J Hered*, 1987, 78: 160–162
- [2] Bernard R L. Two genes for time of flowering and maturity in soybeans. *Crop Sci*, 1971, 11: 242–244
- [3] Buzzell R I. Inheritance of a soybean flowering response to fluorescent-daylength conditions. *Can J Genet Cytol*, 1971, 13: 703–707
- [4] Buzzell R I, Voldeng H D. Inheritance of insensitivity to long daylength. *Soybean Genet News*, 1980, 7: 26–29
- [5] Bonato E R, Vello N A. *E6*, a dominant gene conditioning early flowering and maturity in soybeans. *Genet Mol Biol*, 1999, 22: 229–232
- [6] Cober E R, Voldeng H D. A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to *E1* and *T*. *Crop Sci*, 2001, 41: 698–701
- [7] Ray J D, Hinson K, Mankono J E B, Malo M F. Genetic control of a long-juvenile trait in soybean. *Crop Sci*, 1995, 35: 1001–1006
- [8] Chang R-Z(常汝镇). A genetic analysis on effect of maturity genes in soybeans. *Soybean Sci (大豆科学)*, 1992, 11(2): 127–133 (in Chinese with English abstract)
- [9] Chang R-Z(常汝镇), Li X-H(李星华). Study on effect of maturity genes in soybeans under summer sowing condition. *Chin J Oil Crop Sci (中国油料)*, 1993, 15(3): 15–17 (in Chinese with English abstract)
- [10] Liu B H, Kanazawa A, Matsumura H, Takahashi R, Harada K, Abe J. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome *a* gene. *Genetics*, 2008, 180: 995–1007
- [11] Wang Y(王英), Han T-F(韩天富). Study on the heredity and QTL mapping of growth period traits in soybean. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2008, 36(4): 1391–1393 (in Chinese with English abstract)
- [12] Zhao Y-F(赵永锋), Chen J-T(陈景堂), Zhu L-Y(祝丽英), Jia X-Y(贾晓艳), Huang Y-Q(黄亚群), Liu Z-Z(刘志增). Status of research on application and establishment of SSILs in maize. *J Maize Sci (玉米科学)*, 2006, 14(3): 17–19 (in Chinese with English abstract)
- [13] Paterson A H, Deverna J W, Lanini B, Tanksley S D. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics*, 1990, 124: 735–742
- [14] Yamamoto T, Kuboki Y, Lin S Y, Sasaki T, Yano M. Fine mapping of quantitative trait loci Hd1, Hd2, and Hd3, controlling heading date of rice, as single mendelian factors. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 37–44
- [15] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene, *CONSTANS*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2473–2483
- [16] Eshed Y, Zamir D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, 1995, 141: 1147–1162
- [17] Xu H-S(徐华山), Sun Y-J(孙永建), Zhou H-J(周红菊), Yu S-B(余四斌). Development and characterization of contiguous segment substitution lines with background of an elite restorer Line. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2007, 33(6): 979–986 (in Chinese with English abstract)
- [18] Meksem K, Pantazopoulos P, Njiti V N, Hyten L D, Arelli P R, Lightfoot D A. ‘Forrest’ resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: Saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 710–717
- [19] Maughan P J, Sagllai-Marroof M A, Buss G R, Huestis G M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: Species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 392–401
- [20] Meksem K, Doubler T W, Chancharoenchai K, Nijti N, Chang S J, Rao Arelli A P, Cregan P E, Gray L E, Gibson P T, Lightfoot D A. Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani*, SDS and SCN in near-isogenic lines. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 1131–1142
- [21] Chowdhury A K, Srinives P, Saksoong P, Tongpamnak P. RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean. *Euphytica*, 128: 55–60, 2002
- [22] Cairo C A, Stein J, Delgado L, Bortolotti S, Guelman S A, Ortiz J P A, Morandi E N. Tagging the juvenile locus in soybean (*Glycine max* L. Merr.) with molecular markers. *Euphytica*, 2002, 124: 387–395
- [23] Li Y-X(李永祥), Liu C(刘成), Shi Y-S(石云素), Shen H-B(申海兵), Song Y-C(宋燕春), Wang T-Y(王天宇), Li Y(黎裕). Development and evaluation of maize introgression lines with drought tolerance in flowering-time. *J Plant Genet Resour (植物遗传资源学报)*, 2008, 9(3): 293–296 (in Chinese with English abstract)
- [24] Cregan P B, Jarvik T, Bush A L, Shoemaker R C, Lark K G, Kahler A L, Kaya N, VanToai T T, Lohnes D G, Chung J, Specht J E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome.

- Crop Sci*, 1999, 39: 1464–1490
- [25] Liu G-M(刘冠明), Li W-T(李文涛), Zeng R-Z(曾瑞珍), Zhang G-Q(张桂权). Development of single segment substitution lines (SSSLs) of subspecies in rice. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2003, 17(3): 201–204 (in Chinese with English abstract)
- [26] Keim P, Diemb W, Olson T C, Shoemaker R C. RFLP mapping in soybean association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics*, 1990, 126: 735–742
- [27] Yamanaka N, Ninomiya S, Hoshi M, Tsubokura Y, Yano M, Nagamura Y, Sasaki T, Harada K. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. *DNA Res*, 2001, 8: 61–72
- [28] Yamanaka N, Watanabe S, Toda K, Hayashi M, Fuchigami H, Takahashi R, Harada K. Fine mapping of the *FT1* locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a recombinant inbred line. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 634–639
- [29] Molnar S J, Rai S, Charette M, Cober E. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to *E1*, *E3*, *E4*, and *E7* maturity genes in soybean. *Genome*, 2003, 46: 1024–1036
- [30] Mamsur L M, Orf J H, Chase K, Jarvik T, Cregan P B, Lark K G. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. *Crop Sci*, 1996, 36: 1327–1336
- [31] Mansur L M, Lark K G, Kross H, Oliveira A. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive morphological and seed traits of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 907–913
- [32] Orf J H, Chase K, Jarvik T, Cregan P B, Adler F R. Genetics of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations. *Crop Sci*, 1999, 39: 1642–1651
- [33] Zhang W K, Wang Y J, Luo G Z, Zhang J S, He C Y, Wu X L, Gai J Y, Chen S Y. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) map and their association with EST markers. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1131–1139
- [34] Tasma I M, Lorenzen L L, Green D E, Shoemaker R C. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean. *Mol Breed*, 2001, 8: 25–35
- [35] Ning H-X(宁慧霞), Li Y-H(李英慧), Liu Z-X(刘章雄), Chang R-Z(常汝镇), Guan R-X(关荣霞), Luo S-P(罗淑萍), Qiu L-J(邱丽娟). Deducing maturity genotype of the Chinese soybean varieties. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(3): 382–388 (in Chinese with English abstract)
- [36] Li W-T(李文涛), Zeng R-Z(曾瑞珍), Zhang Z-M(张泽民), Zhang G-Q(张桂权). Analysis of introgressed segments in near-isogenic lines for F_1 pollen sterility in rice. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2003, 17(2): 95–99 (in Chinese with English abstract)
- [37] Wang D, Graef G L, Procopiuk A M, Diers B W. Identification of putative QTL that underlie yield in interspecific soybean backcross populations. *Theor Appl Genet*, 2003, 108: 458–467
- [38] Cober E R, Voldeng H D. A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to *E1* and *T*. *Crop Sci*, 2001, 41: 698–701
- [39] Cober E R, Voldeng H D. Low R: FR light quality delays flowering of *E7E7* soybean lines. *Crop Sci*, 2001, 41: 1823–1826
- [40] Hisakazu M, Liu B H, Jun A, Takahashi R. AFLP mapping of soybean maturity gene *E4*. *J Hered*, 2008: 1–5
- [41] Abe J, Xu D H, Miyano A, Komatsu K, Kanazawa A, Shimamoto Y. Photoperiod-insensitive Japanese soybean landraces differ at two maturity loci. *Crop Sci*, 2003, 43: 1300–1304