

蔡德宝,丁冬会,马 乐,等. 绿豆遗传连锁图谱加密及生育期相关性状的 QTL 定位[J]. 江苏农业科学,2022,50(21):27-35.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.21.004

绿豆遗传连锁图谱加密及生育期相关性状的 QTL 定位

蔡德宝,丁冬会,马 乐,杨树琼,孙新颖,陈吉宝

(南阳师范学院/南水北调中线水源区水安全河南省协同创新中心,河南南阳 473061)

摘要:生育期是决定绿豆熟性的重要农艺性状,对其产量形成有重要的影响。以 VC2917 × 鹦哥绿绿豆 RIL 群体为材料,筛选 SSR 引物,并利用 QTL IciMapping V4.0 软件对现有绿豆遗传连锁图谱进行补充;利用复合区间作图法,通过 1 点 3 年大田试验对生育期相关性状进行 QTL 定位。结果表明,2 个亲本间共筛选出了 20 对新的多态性引物,分布在除 LG4、LG9 外的其余 9 个连锁群上,连锁群总长由原来的 1 010.18 cM 增加至 1417.29 cM,平均图距由原来的 3.37 cM 增加至 4.26 cM。在新的遗传连锁图上共检测到 15 个生育期性状 QTL 位点,分布在 LG1、LG2、LG6、LG9、LG11,其中 LG6 上分布最多,检测到 5 个 QTL 位点,LG9 上分布最少,检测到 1 个 QTL 位点,LG1、LG6、LG11 各检测到 4、2、3 个 QTL 位点。分枝期、始花期、始花期-分枝期、开花期-分枝期 QTL 位点各 1 个,贡献率在 5.95% ~ 11.61% 之间;三叶期、开花期 QTL 位点各 2 个,贡献率在 10.29% ~ 51.30%;出苗期 QTL 位点 3 个,贡献率在 6.97% ~ 63.85% 之间;成熟期 QTL 位点 4 个,贡献率在 6.19% ~ 44.76%。这些 QTL 既可以应用于绿豆育种的分子标记辅助选择,也对深入研究这些性状的遗传奠定了基础。

关键词:绿豆;生育期性状;SSR;遗传连锁图谱;QTL 定位

中图分类号:S522.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)21-0027-09

绿豆(*Vigna radiata*)是豆科(Leguminosae)菜豆族(Phaseoleae)豇豆属(*Vigna*)植物中的一个栽培种,因其相对耐旱性强、具有固氮作用以及较短的生育期等特性而广受欢迎,是豆类植物中重要的作物^[1-2]。生育期是作物高产育种中极为重要的指标,它不仅决定了品种的种植地区与季节适应性,而且与抗逆性、品质以及产量密切相关^[3-7]。绿豆属于短日照作物,其生育期相关性状主要包括始花期、开花期、始熟期、成熟期等,这些性状属于数量性状,受多基因控制,遗传力高且遗传稳定性强,在分离群体中呈连续分布,可以通过数量性状位点(quantitative trait locus,简称 QTL)定位和图位克隆的方法获得这些基因^[8-10]。

获得一张高质量的遗传图谱是基因定位、图位克隆乃至基因组结构与功能研究的基础^[11],在绿豆

中,叶卫军等利用 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SNP 等分子标记和 F₂ 群体、回交群体、重组自交系群体(recombinant inbred line,简称 RIL)等作图群体构建了至少 20 张遗传图谱^[12]。在绿豆转绿组和基因组数据公布之前,可用的分子标记十分有限,前人所绘制的绿豆遗传连锁图谱主要基于栽培绿豆和野生绿豆杂交形成的群体,其主要原因是利用野生绿豆和栽培绿豆的种间杂交更容易筛选到多态性分子标记^[13]。Kang 等公布的首张绿豆基因组序列草图和大量 SSR 分子标记^[1],为利用 2 个栽培绿豆品种杂交构建群体绘制高质量的遗传连锁图谱提供前提^[13-14]。近年来,绿豆生育期相关性状的 QTL 定位也取得一定进展。梅丽等用 RIL 群体在广西壮族自治区和北京 2 个生境下进行绿豆生育期相关性状的 QTL 定位^[7],共鉴定出了 4 个与开花期相关的基因位点,贡献率在 4.95% ~ 34.53% 之间;共鉴定了 4 个成熟期 QTL,分布 LG2、LG9 上。Isemura 等发现了 4 个与初花期紧密相关的 QTL,其中位于 LG2 上的 QTL 贡献率最大^[15]。Kajonphol 等鉴定了 6 个始熟期 QTL 位点,位于第 2、4、6、7、9、11 连锁群上^[16]。Somta 等在雨季和旱季 2 种环境下对绿豆开花期进行 QTL 定位,共检测到 7 个 QTL,其中位于 LG2A 连锁群上的 2 个标记区间在 2 种环境下均检

收稿日期:2021-12-09

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:212102110248);河南省高等学校重点科研项目(编号:20B210015)。

作者简介:蔡德宝(1996—),男,河南信阳人,硕士研究生,主要从事食用豆类作物高产育种及抗逆生理研究。E-mail: 643147683@qq.com。

通信作者:陈吉宝,博士,教授,主要从事食用豆类作物高产育种及抗逆生理研究。E-mail: chenjibao2012@163.com。

测到开花期 QTL^[17]。

尽管对绿豆的生育期相关性状已有大量研究,鉴定出了一些生育期相关 QTL 位点,但是还存在以下问题需要解决:(1)这些研究限于绿豆开花期、成熟期等生殖生长阶段,缺乏对绿豆营养生长阶段的研究,更没有对各生育期相关性状进行系统分析;(2)还有新的生育期相关性状位点没有完全分离出来,需要继续发掘;(3)尽管目前研究者绘制了多张绿豆遗传连锁图谱,但由于标记数量少,分辨率低,不能满足基因图位克隆的条件。本研究以 RIL 群体为材料,在自然条件下通过 3 年的田间表型评价,研究绿豆生育期相关性状的遗传特征,通过对 Liu 等构建的图谱^[14]加密,整合 1 张高密度绿豆遗传连锁图谱,应用新图谱定位绿豆生育期相关性状 QTL,为绿豆生育期研究提供标记信息,推动绿豆熟性分子育种的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用绿豆 RIL 群体由中国农业科学院作物科学研究所食用豆课题组提供,该群体以晚熟材料鹦哥绿和早熟材料 VC2917 为父母本构建而成,包含 261 个株系^[14,18],目前已经繁殖至 F₉ 代。

1.2 田间试验设计与数据分析

大田试验于 2018—2020 年春季在河南省南阳师范学院农田进行,于每年 4 月下旬播种,完熟后收获。绿豆生长期间按照正常田间管理措施进行,于分枝形成前中耕 1 次,并起垄培土,整个生长期不人为浇水。试验采用完全随机区组设计,重复 3 次。

出苗期(GD)、三叶期(TLD)、分枝期(BS)、始花期(FFD)、始花期-分枝期(FFD-BS)、开花期(FD)、开花期-分枝期(FD-BS)、成熟期(MD)严格按照《绿豆种质资源描述规范和数据标准》进行调查统计^[8]。

参照陈吉宝的方法^[19]计算 2018、2019、2020 年 3 个年份 8 个性状的表型数据的 BLUE 值。用 SPSS 24.0 进行描述性统计分析、方差分析(ANOVA)和相关性分析,并计算广义遗传率。

1.3 SSR 分子标记的筛选和基因分型

本研究总计筛选 SSR 引物 275 对,其中 250 对为 Kang 等开发^[1],下载自 NCBI 网站绿豆基因组数据库(GenBank/EMBL/DBJ 数据代码 JJMO000000000),前缀为“Vr”;25 对为 Liu 等从绿豆近源种小豆中筛

选^[14],前缀为“CEDG”。

取绿豆 RIL 群体苗期鲜嫩叶片,用研钵在液氮环境中研磨成粉状,绿豆 RIL 群体单株及亲本基因组 DNA 采用试剂盒(EasyPure® Plant Genomic DNA Kit)提取;PCR 扩增采用 10 μL 反应体系:酶(2 × Easy Taq® PCR SuperMix for PAGE + dye)5 μL,引物 0.5 μL (10 μmol/L),模板 1 μL (50 ng/μL),ddH₂O 3.5 μL。PCR 反应程序及银染检测参考王建花等的方法^[11]。

1.4 遗传连锁图谱的加密

选择 2 个亲本间具有明显多态性的 SSR 标记进行 RIL 群体的基因分型。读板时母本带型记作“A”,父本带型记作“B”,杂合带型记作“H”,空缺或其他带型记作“X”。利用卡平方测验分析每个标记在 0.05、0.01 和 0.001 水平上是否符合 1:1 的分离规律,用于推断标记偏分离情况。

利用 QTL IciMapping V4.0 软件^[20]加密绿豆遗传连锁图谱,加密前遗传连锁图谱由 Liu 等构建^[14]。加密参照软件提供的 Sampledata 进行数据格式化,用 Grouping 命令对所有标记进行分组,比较不同 LOD 值下的分组情况,选择最优分组;运算法则选用“nnTwoOpt”,其他参数采用软件默认值。

1.5 生育期性状的 QTL 分析

本研究基于 Liu 等构建的图谱^[14],利用加密后的图谱进行 QTL 定位,采用 QTL IciMapping V4.0 软件改进复合区间作图法定位^[20],Permutation 次数设置为 1 000 次,LOD 值以大于等于 2.5 为标准。

2 结果与分析

2.1 绿豆生育期性状遗传分析

从表 1 可以看出,RIL 群体内分枝期、始花-分枝期、开花期、成熟期的最大值和最小值均分别高于亲本最大值和小于亲本最小值,群体内除开花期、开花-分枝、成熟期外,其余各性状均值均小于双亲均值。各性状变异系数为 5.01%~28.81%,其中变异系数最小的是分枝期,始花期-分枝期变异系数最大,以上结果说明各性状在群体个体之间均得到较好的分离。8 个性状的遗传力在 42.24%~82.38% 之间,其中三叶期、始花期、始花-分枝期和成熟期的遗传力较高,均大于 70%;分枝期、开花-分枝期的遗传力均小于 50%,表明二者的遗传力较低。除出苗期、三叶期外,其余性状偏度绝对值均小于或近似等于 1,说明这些性状近似符合正态分

布;除分枝期和开花－分枝期外,其余性状偏度均大于 0,分枝期和开花－分枝期表型数据分布向右偏,其他性状表型数据分布向左偏,其中出苗期的偏度为 1.6,呈明显向左偏。除始花期、始花－分枝

外,其他性状峰度的绝对值均大于 0.5;始花期、始花－分枝的峰度小于 0,表明这 2 个性状表型分布不太集中。从图 1 可以看出,群体各性状值均呈连续分布,说明这些性状适合 QTL 分析。

表 1 RIL 群体各生育期性状的分布特征

生育期	亲本			RIL 群体						遗传力 (%)
	VC2917(d)	鹦哥绿(d)	均值(d)	最小值(d)	最大值(d)	均值(d)	偏度	峰度	变异系数 (%)	
出苗期	14.60	14.87	14.73	6.06	8.72	6.49	1.600	2.031	10.12	60.18
三叶期	26.06	27.06	26.56	13.92	25.00	18.19	1.231	2.990	10.97	80.27
分枝期	30.61	31.59	31.10	23.56	32.00	28.12	-0.509	0.965	5.01	48.47
始花期	46.93	47.17	47.05	33.15	46.51	38.01	0.625	-0.053	7.40	77.26
始花－分枝	16.32	15.57	15.95	3.72	19.86	10.67	0.309	-0.361	28.81	82.38
开花期	47.92	55.21	51.57	43.45	66.78	51.10	1.004	1.175	7.76	59.13
开花－分枝	17.32	23.62	20.47	19.89	34.70	27.63	-0.152	1.505	6.73	42.24
成熟期	68.00	73.25	70.63	62.20	89.45	70.73	0.880	0.988	7.13	74.93

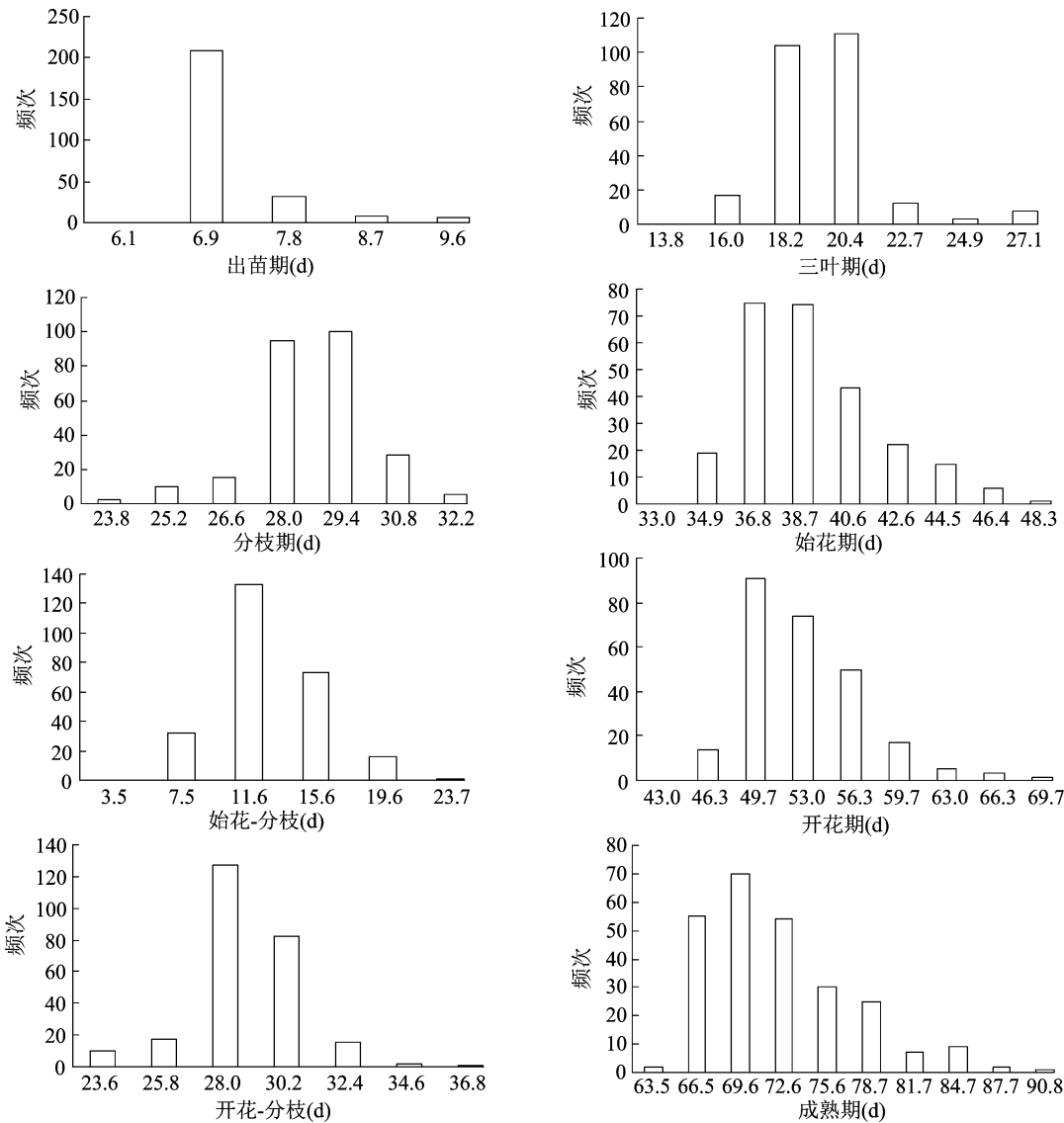


图1 绿豆生育期相关性状频次分布

2.2 绿豆生育期性状相关性分析

依据 8 个性状的 BLUE 数据进行各生育期性状之间的相关分析,结果(表 2)表明,出苗期与分枝期、始花期、开花-分枝间隔期,三叶期与成熟期以及分枝期与成熟期均呈显著正相关;三叶期与分枝期,分枝期与开花-分枝间隔期,始花期与始花-分枝间隔期、开花期、开花-分枝间隔期、成熟期,始花-分枝间隔期与开花期、开花-分枝间隔期、成熟期,开花期与开花-分枝间隔期、成熟期,开花-分枝间隔期与成熟期均呈极显著正相关;其中始花期与始花-分枝间隔期相关性最强(0.861),

表明始花期在决定始花-分枝间隔期起关键性作用,其次为开花期与成熟期(0.737);分枝期与始花-分枝间隔期呈极显著负相关(-0.302),表明分枝期对始花-分枝间隔期起负作用。

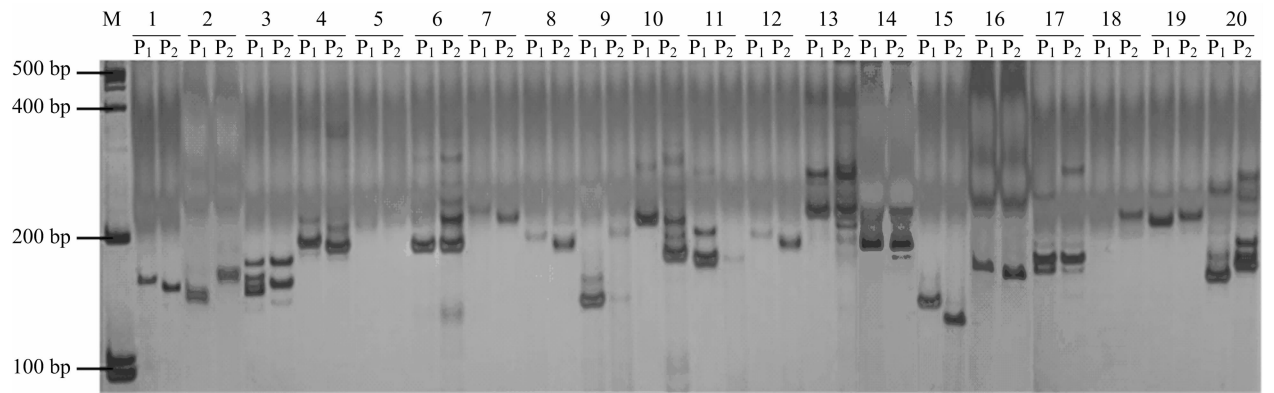
2.3 遗传连锁图谱的构建

共得到亲本间具有多态性且在 RIL 群体中带型清晰的引物 20 对,多态性比率 7.2%(图 2)。这些分子标记连同 Liu 等所使用的 313 个标记^[14],通过 QTL IciMapping V4.0 作图^[20],得到 1 张新的绿豆遗传图谱,加密后图谱的各项特征较原图谱均有所改变(图 3)。

表 2 绿豆生育期相关性状间的相关性分析

生育期	相关系数						
	出苗期	三叶期	分枝期	始花期	始花-分枝	开花期	开花-分枝
三叶期	0.007						
分枝期	0.160 *	0.215 **					
始花期	0.152 *	0.038	0.144 *				
始花-分枝	0.080	-0.074	-0.302 **	0.861 **			
开花期	0.092	0.089	0.123	0.488 **	0.422 **		
开花-分枝	0.158 *	0.117	0.320 **	0.414 **	0.308 **	0.706 **	
成熟期	0.101	0.130 *	0.113	0.431 **	0.376 **	0.737 **	0.610 **

注:**表示在 0.01 水平差异显著;*表示在 0.05 水平差异显著。



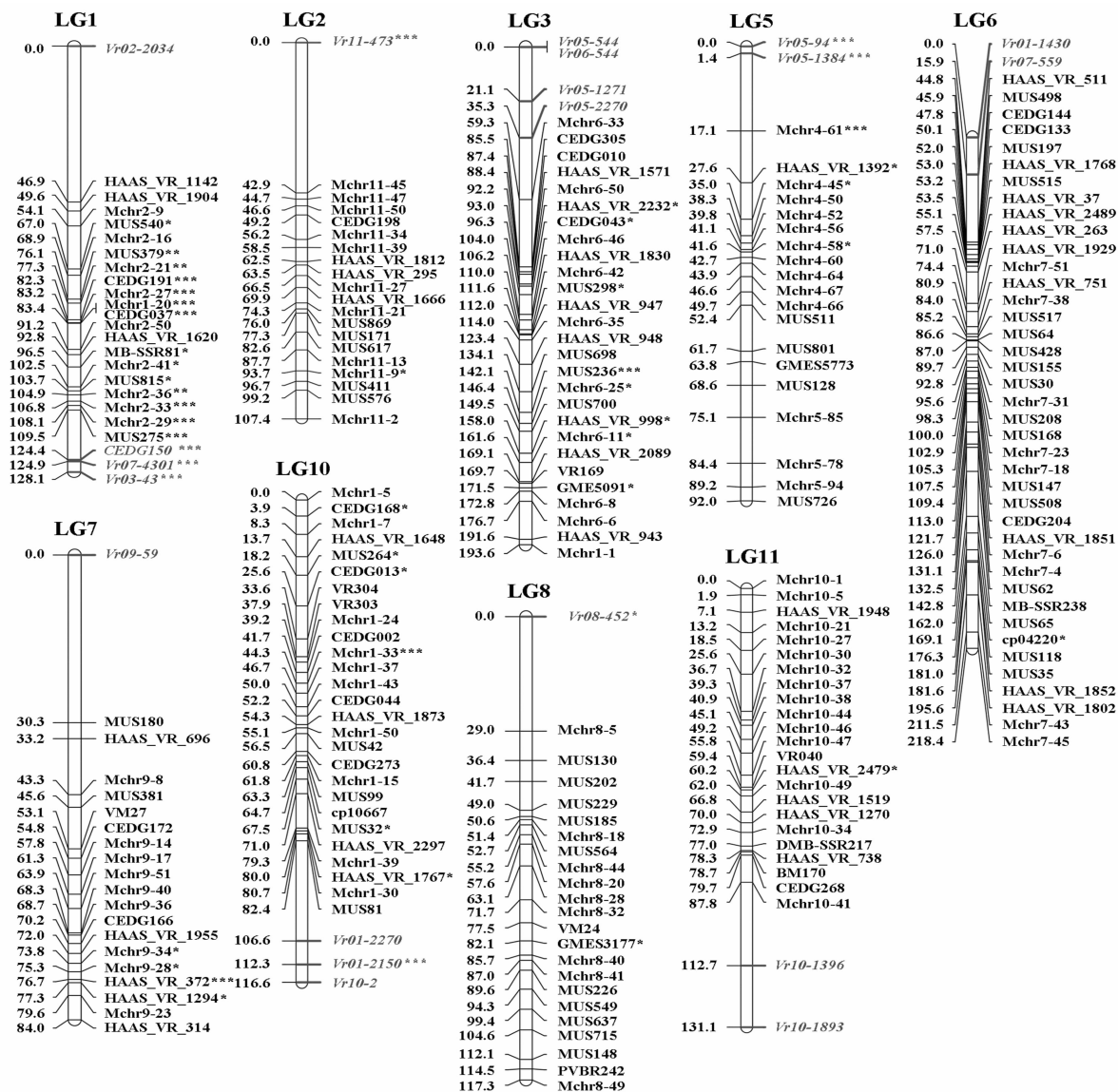
M—标准分子量 DNA; P₁—VC2917; P₂—鹦哥绿

图2 20 对 SSR 引物在亲本 VC2917、鹦哥绿间的多态性

Liu 等的原图谱由 11 个连锁群组成,包含 313 个分子标记,总长为 1 010.18 cM^[14]。新图谱包含 11 个连锁群,333 个标记位点,图谱总长为 1 417.29 cM。原图谱各连锁群标记数为 19~74 个,平均 28.45 个,其中标记最少的是 LG2、LG7,各连锁群平均标记数为 19 个, LG4 标记数最多,包含 74 个标记。各标记间距离在 2.14~4.29 cM 之间,平均 3.37 cM,加密后各连锁群密度为 2.14~6.24 cM,平均密度为 4.26 cM。新图谱标记间平均

距离有所增大,是由于新图谱 LG1、LG2 连锁群中存在 2 个大于 40 cM 的空隙,整合后图谱有所延长,对绿豆基因组的覆盖率也极大增加。除 LG4、LG9 未新加标记外,其余连锁群的长度都发生了较大改变,如 LG1 连锁群新增标记 4 个,长度由 59.74 cM 延长为 128.07 cM; LG10 连锁群新增标记 3 个,长度由 82.42 cM 延长到 116.63 cM; LG5 连锁群新增 2 个标记,长度由 65.46 cM 延长到 91.96 cM。

标记位置随着新标记的加入而有所变动。如



连锁群左边为标记间距离(cM), 右边为标记的名称, 正体字体的标记为 Liu 图谱中的标记, 新添加的标记为斜体字体, 在 0.05、0.01 和 0.001 水平上偏离位点标记分别用 *、**、*** 表示。LG4、LG9 由于未有新标记加入不做展示

图3 加密后的绿豆遗传连锁图谱

第 1 连锁群上 MUS275 ~ HAAS_VR_1620 这 9 个标记、第 6 连锁群 HAAS_VR_2489 ~ CEDG - 144 这 9 个标记在新标记加入后, 标记间的方向、距离均有所改变, 同时相邻标记间的位置也有所改变, 但未发生连锁水平上的改变。新建图谱 333 个标记中, 偏离标记数 72 个 (21.62%, $P < 0.05$), 各连锁群偏离标记数在 1 (LG6、LG10) ~ 17 (LG1) 之间 (表 3)。新加标记中严重偏离 ($P < 0.001$) 的标记主要位于 LG1 上, 且偏离的标记主要偏向于父本, 与 Liu 等的图谱^[14] 类似。

2.4 生育期相关性状的 QTL 分析

本研究对绿豆 8 个生育期相关性状的 BLUE 数

据进行 QTL 分析, 共检测到 15 个 QTL 位点, 成熟期检测到 4 个 QTL 位点, 出苗期检测到 3 个 QTL 位点, 三叶期、开花期各检测到 2 个 QTL 位点, 分枝期、始花期、始花 - 分枝间隔期以及开花 - 分枝间隔期均检测到 1 个 QTL 位点。

共检测到 3 个出苗期 (GD) QTL 位点。其中第 1 连锁群 (LG1) 的 MUS275 ~ CEDG - 150、第 2 连锁群 (LG2) 的 Vr11 - 473 ~ Mchr11 - 45 以及第 6 连锁群 (LG6) 的 MUS118 ~ MUS35 标记之间检测各到 1 个 QTL 位点 (*GD1a*、*GD2a*、*GD6a*), 贡献率分别为 59.24%、63.85%、6.97%, 其中 *GD1a*、*GD2a* 位点对出苗期有较大贡献, 是决定出苗期的大效应位点。3

表 3 图谱加密前后定位的 QTL 比较

连锁群	标记数(个)		连锁群长度(cM)		平均图距(cM)		偏分部标记数(个)	
	旧	新	旧	新	旧	新	旧	新
1	20	24	59.74	128.07	2.99	5.34	14	17
2	19	20	64.49	107.39	3.39	5.37	1	2
3	27	31	104.13	193.56	3.89	6.24	8	8
4	74	74	158.04	158.04	2.14	2.14	11	11
5	19	21	65.46	91.96	3.45	4.38	4	6
6	40	42	171.63	218.40	4.29	5.20	1	1
7	19	20	53.70	83.96	2.83	4.20	4	4
8	22	23	91.94	117.33	4.18	5.10	2	3
9	23	23	70.88	70.88	3.08	3.08	12	12
10	27	30	82.42	116.63	3.05	3.89	6	7
11	23	25	87.75	131.07	3.82	5.24	1	1
总计	313	333	1 010.18	1 417.29	3.37	4.26	64	72

个 QTL 位点加性效应均为负值,平均加性效应为 -0.51,平均可使出苗期减少 0.51 d。

共检测到 2 个三叶期(TLD) QTL 位点。其中 LG1 的 MUS275 ~ CEDG - 150、LG6 的 MUS168 ~ Mchr7 - 23 之间各检测到 1 个 QTL (*TLD1a*、*TLD6a*),贡献率分别为 26.76%、10.29%,表明前者是决定三叶期的大效应位点。*TLD1a* 加性效应为负,可使三叶期减少 1.86 d,*TLD6a* 加性效应为正,可使三叶期增加 0.64 d。

检测到 1 个分枝期(BS) QTL 位点(*BS9a*),位于第 9 连锁群的 Mchr10 - 9 ~ Mchr5 - 37 标记之间,该位点贡献率为 5.95%,可能属于微效基因。该位点加性效应为负,说明该位点可缩短分枝期。

检测到 1 个始花期(FFD) QTL 位点(*FFD2a*),位于第 2 连锁群的 MUS171 ~ MUS617 标记之间,该位点贡献率较大(11.61%),说明该位点对 FFD 的贡献较大,可能属于大效应位点。该位点加性效应为 -0.96,说明该位点可使 FFD 缩短 0.96 d。

检测到 1 个始花 - 分枝间隔期(FFD - BS) QTL 位点(*FFD - BS2a*),位于第 2 连锁群的 MUS171 ~ MUS617 标记之间,该位点贡献率为 10.44%,说明该位点对 FFD - BS 的贡献较大。位点加性效应为负,说明该位点可缩短 FFD - BS。

共检测到 2 个开花期(FD) QTL 位点。其中 LG1 的 MUS275 ~ CEDG - 150、LG2 的 Vr11 - 473 ~ Mchr11 - 45 标记之间各检测到 1 个 QTL 位点(*FD1a*、*FD2a*),单个位点贡献率分别为 36.95%、51.30%,说明二者对 FD 的贡献均较大,均属于大

效应位点。2 个位点加性效应均为负,平均为 -3.56,平均可使 FD 减少 3.56 d。

检测到 1 个开花 - 分枝间隔期(FD - BS) QTL 位点(*FD - BS11a*),位于第 11 连锁群的 Mchr10 - 49 ~ HAAS_VR_1519 标记之间,该位点贡献率为 11.09%,说明该位点对 FD - BS 的贡献较大。该位点加性效应为 0.62,说明该位点可使 FD - BS 增加 0.62 d。

共检测到 4 个成熟期(MD) QTLs 位点。分别为位于第 1 连锁群 MUS275 ~ CEDG - 150 与第 2 连锁群 Vr11 - 473 ~ Mchr11 - 45 标记之间的 *MD1a*、*MD2a*,以及 LG11 Mchr10 - 1 ~ Mchr10 - 5 与 Mchr10 - 27 ~ Mchr10 - 30 标记之间的 *MD11a*、*MD11b*。*MD1a*、*MD2a* 均属于大效应位点(贡献率分别为 37.77%、44.76%),且加性效应均为负,累计可使 MD 减少 8.95 d。*MD11a*、*MD11b* 可能属于微效基因(贡献率分别为 6.19%、8.36%),前者加性效应为负,后者加性效应为正(图 4、表 4)。

3 讨论与结论

3.1 绿豆生育期性状统计学性分析

生育期是豆类作物产量形成的重要因素^[21],研究绿豆生育期相关性状的遗传规律是了解其产量形成机制的重要途径之一。绿豆生育期相关性状主要包括出苗期、三叶期、分枝期、始花期、开花期、始熟期、成熟期^[8]。本研究中,出苗期、三叶期、始花 - 分枝间隔期的变异系数均大于 10%,最高达 28.81%,开花期、成熟期变异系数均小于 10%,说

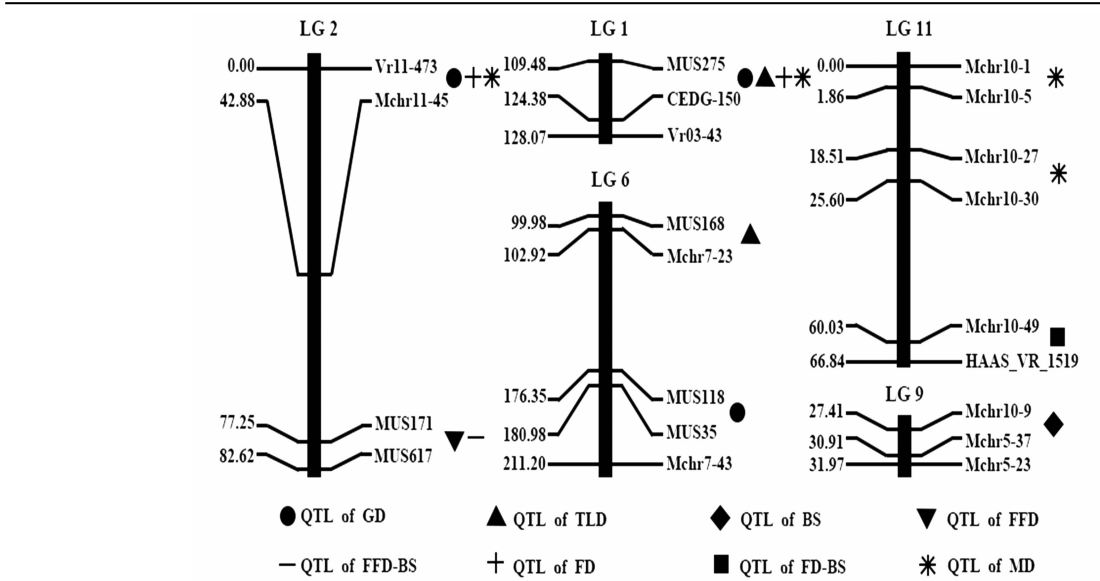


图4 绿豆生育期相关性状的 QTL 在连锁群上的分布

表 4 绿豆生育期相关性状的 QTL

生育期	QTL 位点	连锁群	位置 (cM)	标记区间	LOD 值	贡献率 (%)	加性效应
出苗期	<i>GD1a</i>	1	121.00	MUS275 ~ CEDG - 150	9.87	59.24	-0.69
	<i>GD2a</i>	2	10.00	Vr11 - 473 ~ Mchr11 - 45	16.00	63.85	-0.67
	<i>GD6a</i>	6	178.00	MUS118 ~ MUS35	3.71	6.97	-0.17
三叶期	<i>TLD1a</i>	1	123.00	MUS275 ~ CEDG - 150	2.59	26.76	-1.86
	<i>TLD6a</i>	6	100.00	MUS168 ~ Mchr7 - 23	6.36	10.29	0.64
分枝期	<i>BS9a</i>	9	29.00	Mchr10 - 9 ~ Mchr5 - 37	3.21	5.95	-0.34
始花期	<i>FFD2a</i>	2	78.00	MUS171 ~ MUS617	6.82	11.61	-0.96
始花 - 分枝	<i>FFD - BS2a</i>	2	78.00	MUS171 ~ MUS617	5.81	10.44	-0.99
开花期	<i>FD1a</i>	1	122.00	MUS275 ~ CEDG - 150	4.35	36.95	-3.56
	<i>FD2a</i>	2	12.00	Vr11 - 473 ~ Mchr11 - 45	6.84	51.30	-3.57
开花 - 分枝	<i>FD - BS11a</i>	11	65.00	Mchr10 - 49 ~ HAAS_VR_1519	5.76	11.09	0.62
成熟期	<i>MD1a</i>	1	122.00	MUS275 ~ CEDG - 150	5.83	37.77	-4.55
	<i>MD2a</i>	2	10.00	Vr11 - 473 ~ Mchr11 - 45	6.72	44.76	-4.40
	<i>MD11a</i>	11	0.00	Mchr10 - 1 ~ Mchr10 - 5	3.70	6.19	-1.25
	<i>MD11b</i>	11	24.00	Mchr10 - 27 ~ Mchr10 - 30	4.49	8.36	1.46

明营养生长前期的遗传受环境影响大于生殖生长期,与马乐等的研究结果^[22,6]类似。Sompong 等研究发现,绿豆成熟期与始花期呈极显著正相关^[23,16]。梅丽研究表明,与生育期的关联度由高到低排序为开花期、始花期、出苗期^[6]。绿豆开花期和成熟期遗传力高且遗传稳定性强,Yimram 等对 340 个绿豆种质材料的分析表明,开花期、成熟期广义遗传力分别为 0.75、0.71^[24]。Kajonphol 等研究发现,绿豆始花期、始熟期遗传力分别为 0.89、0.91^[16]。马乐等研究表明,绿豆开花期和成熟期的

广义遗传力在 0.95 以上^[18]。本研究中绿豆始花期、开花期、成熟期遗传力均较高,分别为 0.77、0.59、0.74。以上结果说明,始花期、开花期在影响绿豆生育期中扮演重要角色,育种实践中关注始花期、开花期对选育不同生育期长短的绿豆新品种更有效,开花期、成熟期遗传力高,有利于相关基因的定位和图位克隆^[25,26]。

3.2 遗传连锁图谱的构建

构建高质量的遗传连锁图谱是基因定位前提条件之一^[27]。前人所绘制的绿豆遗传连锁图谱主

要基于栽培绿豆和野生绿豆杂交形成的群体,主要原因是栽培绿豆与栽培绿豆的种间杂交很难筛选出多态性标记^[13]。Chankaew 等利用绿豆的 433 个 SSR 标记对 2 种栽培绿豆 KPS1 和 V4718 之间进行多态性进行评估,结果发现只有 27 个(8.85%) SSR 标记在亲本之间存在多态性^[2];Liu 等使用 Isemura 等的 JP211874 × JP229096(野生绿豆 × 栽培绿豆)绿豆群体中 430 个表现出多态性 SSR 标记,只有 24 个显示出多态性^[14-15]。本研究应用 275 对 SSR 引物对亲本 VC2917 和鹦哥绿进行筛选,亲本间共得到多态性引物 20 对,亲本间多态性为 7.2%,使得本研究设计的多态性 SSR 标记具有价值。

整合后遗传连锁图与 Liu 等的原图谱^[14]基本一致,但也有一些标记位置随着连锁图谱整合发生变动,主要变动为第 1、第 6 连锁群上的位置发生颠倒。赵丹等整合绿豆遗传连锁图谱时也发生类似状况,认为这可能是因标记偏分离现象的影响^[28]。本研究整合的绿豆遗传连锁图谱中有 72 个偏分离标记,偏分离比率为 21.75%,低于赵丹等构建的绿豆遗传连锁图谱^[28-30],高于 Isemura 等构建的绿豆遗传连锁图谱^[15]。这可能是因为本研究所用群体为栽培绿豆 × 栽培绿豆构建的 RIL 群体,避免了野生亲本携带的不利位点,但与回交群体相比,RIL 群体偏分离比率一般更高,主要原因是 RIL 群体构建时人为抽样的偏差以及多代的自然选择^[14,28]。

3.3 生育期相关性状的 QTL 分析

本研究通过 1 点 3 年大田试验,对 8 个生育期相关性状的 BLUE 数据进行 QTL 定位,各性状均检测到 QTL 位点。数量性状的表达极易受环境的影响,在生长环境不同时定位的结果可能不同^[7],本研究与马乐使用相同群体在同一试验地点不同年份进行 QTL 定位,将三叶期 QTL 定位在 LG6 (MUS168 ~ Mchr7 - 23)^[22]。本研究在该区间外检测 1 个 QTL,位于 LG2 的 MUS275 ~ CEDG - 150 标记之间,同时也说明该性状可能为由位于不同染色体的多个 QTL 调控。大效应 QTL 一般是在不同生境下均可以检测到的稳定 QTL,存在相关基因的概率更大,是实现图位克隆的关键区域^[31-32]与梅丽研究结果^[6]类似,本研究将出苗期定位在第 1、第 2 连锁群;本研究将开花期 QTL 定位在 LG1、LG2,与 Isemura 等 (LG2、LG4、LG6 和 LG11)^[15]、梅丽等 (LG2、LG9、和 LG12)^[7]及 Somta 等 (LG2、LG4、LG5

和 LG6)^[17]的研究结果类似,且大效应位点位于 LG2,说明第 2 连锁群上存在决定开花期性状的关键基因;与 Sompong 等的研究结果^[23]相比,本研究在 LG2 检测到 1 个成熟期大效应 QTL,与 Isemura 等类似^[15-16]。上述大效应 QTL 可以为今后该性状进一步研究提供借鉴,可为今后分子标记辅助选育新型早熟绿豆品种提供新的基因位点。

本试验发现 2 个 QTL 富集区,第 1 连锁群的 MUS275 ~ CEDG - 150 标记区间富集了开花期、成熟期 2 个性状的 QTL 位点,第 2 连锁群的 MUS171 ~ MUS617 标记区间检测到控制始花期、始花 - 分枝间隔期的 QTL,这种 QTL 的富集现象在梅丽等的研究中有报道^[6,14,19]。Guan 等认为,QTL 簇(QTL cluster)或 QTL 富集区是一因多效或者多个基因紧密连锁的结果^[33]。本试验还发现,在 QTL 成束的区域,第 2 连锁群 Vr11 - 473 ~ Mchr11 - 45 区间的不同位点检测到控制出苗期、开花期、成熟期关键性状 QTL 位点,Tuberosa 等认为,控制同一性状的 QTL 可能分布于染色体上的一个集中区域,而不是随机分布^[34]。然而目前所用图谱依然无法满足图位克隆的需要,今后有必要借助全基因组关联分析(genome-wide association study)技术,有针对性地进行精细定位。在此基础上,开发与这些生育期性状密切相关的分子标记,通过回交育种与分子标记辅助选择相结合的方法,选育出新的绿豆早熟品种,为绿豆育种创造优异新材料。

参考文献:

- [1] Kang Y J, Kim S K, Kim M Y, et al. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5443.
- [2] Chankaew S, Somta P, Sorajjapinun W, et al. Quantitative trait loci mapping of *Cercospora* leaf spot resistance in mungbean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek [J]. *Molecular Breeding*, 2011, 28(2): 255 - 264.
- [3] Fujino K, Sekiguchi H. Mapping of quantitative trait loci controlling heading date among rice cultivars in the northernmost region of Japan [J]. *Breeding Science*, 2008, 58(4): 367 - 373.
- [4] Cheng L R, Wang J M, Ye G Y, et al. Identification of stably expressed QTL for heading date using reciprocal introgression line and recombinant inbred line populations in rice [J]. *Genetics Research*, 2012, 94(5): 245 - 253.
- [5] 夏正俊. 大豆基因组解析与重要农艺性状基因克隆研究进展 [J]. *植物学报*, 2017, 52(2): 148 - 158.
- [6] 梅 丽. 绿豆 Berken/Acc41 重组近交系豆象抗性及相关农艺性状 QTL 分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.

- [7]梅 丽,程须珍,王素华,等. 绿豆产量相关农艺性状的 QTL 定位[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(6):948–956.
- [8]程须珍,王素华,王丽侠. 绿豆种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京:中国农业出版社,2006.
- [9]韩立杰. 高粱粒重的 QTL 分析及 qGW1 的精细定位[D]. 北京:中国农业大学,2016.
- [10]王飞飞. 大豆生育期基因 *TOF7* 的图位克隆和功能分析[D]. 哈尔滨:中国科学院大学(中国科学院东北地理与农业生态研究所),2019.
- [11]王建华,张耀文,程须珍,等. 绿豆分子遗传图谱构建及若干农艺性状的 QTL 定位分析[J]. 作物学报,2017,43(7):1096–1102.
- [12]叶卫军,杨 勇,周 斌,等. 分子标记在绿豆遗传连锁图谱构建和基因定位研究中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2017,18(6):1193–1203.
- [13]刘长友. 绿豆抗旱相关性状 QTL 定位及 *VrERF1* 基因克隆与功能分析[D]. 北京:中国农业科学院,2017.
- [14]Liu C Y, Wu J, Wang L F, et al. Quantitative trait locus mapping under irrigated and drought treatments based on a novel genetic linkage map in mungbean (*Vigna radiata* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2017, 130(11):2375–2393.
- [15]Isemura T, Kaga A, Tabata S, et al. Construction of a genetic linkage map and genetic analysis of domestication related traits in mungbean (*Vigna radiata*) [J]. PLoS One, 2012, 7(8):e41304.
- [16]Kajonphol T, Sangsiri C, Somta P, et al. SSR map construction and quantitative trait loci (QTL) identification of major agronomic traits in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] [J]. Sabrao Journal of Breeding and Genetics, 2012, 44:71–86.
- [17]Somta P, Chankaew S, Kongjaimun A, et al. QTLs controlling seed weight and days to flowering in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], their conservation in azuki bean [*V. angularis* (Ohwi) Ohwi & Ohashi] and rice bean [*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi] [J]. Agrivita Journal of Agricultural Science, 2015, 37(2):159–168.
- [18]马 乐,蔡德宝,陈吉宝. 绿豆 RIL 群体开花期及成熟期性状的遗传分析[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(12):33–40.
- [19]陈吉宝. 绿豆产量性状的 QTL 定位[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(10):38–48.
- [20]Meng L, Li H H, Zhang L Y, et al. QTL IciMapping: integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations [J]. The Crop Journal, 2015, 3(3):269–283.
- [21]孙德生,李文滨,张忠臣,等. 大豆生育期相关的 QTL 分析[J]. 大豆科学, 2009, 28(6):976–980.
- [22]马 乐. 绿豆生育期相关性状 QTL 定位及遗传分析[D]. 南阳:南阳师范学院, 2019.
- [23]Sompong U, Somta P, Raboy V, et al. Mapping of quantitative trait loci for phytic acid and phosphorus contents in seed and seedling of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] [J]. Breeding Science, 2012, 62(1):87–92.
- [24]Yimram T, Somta P, Srinives P. Genetic variation in cultivated mungbean germplasm and its implication in breeding for high yield [J]. Field Crops Research, 2009, 112(2/3):260–266.
- [25]程须珍,王素华,田 静,等. 绿豆优异种质综合评价[J]. 中国农业科学, 1999, 32(增刊 1):36–39.
- [26]韩粉霞,李桂英. 绿豆数量性状的遗传分析[J]. 核农学通报, 1997, 18(5):16–17, 23.
- [27]宁海龙,吴 昊,李文滨,等. 大豆四向重组自交系群体全生育期 QTL 的单标记分析[J]. 大豆科学, 2015, 34(6):1081–1084, 1089.
- [28]赵 丹,程须珍,王丽侠,等. 绿豆遗传连锁图谱的整合[J]. 作物学报, 2010, 36(6):932–939.
- [29]吴传书,王丽侠,王素华,等. 绿豆高密度分子遗传图谱的构建[J]. 中国农业科学, 2014, 47(11):2088–2098.
- [30]Wang L X, Wu C S, Zhong M, et al. Construction of an integrated map and location of a bruchid resistance gene in mung bean [J]. The Crop Journal, 2016, 4(5):360–366.
- [31]Powder K E. Quantitative trait loci (QTL) mapping [J]. Methods in Molecular Biology, 2020, 2082:211–229.
- [32]Afzal M, Alghamdi S S, Migdadi H H, et al. Legume genomics and transcriptomics: from classic breeding to modern technologies [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(1):543–555.
- [33]Guan P F, Shen X Y, Mu Q, et al. Dissection and validation of a QTL cluster linked to Rht – B1 locus controlling grain weight in common wheat (*Triticum aestivum* L.) using near – isogenic lines [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133(9):2639–2653.
- [34]Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti M C, et al. Mapping QTLs regulating morpho – physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought – stressed maize [J]. Annals of Botany, 2002, 89(7):941–963.