

# 大豆叶柄夹角相关基因 *GmILPA1* 单倍型分析

陈玲玲<sup>1,3</sup>, 刘亭萱<sup>1</sup>, 谷勇哲<sup>3</sup>, 宋健<sup>1,2</sup>, 王俊<sup>1</sup>, 邱丽娟<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> 长江大学农学院, 湖北荆州 434025; <sup>2</sup> 长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025; <sup>3</sup> 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:** *GmILPA1* 是控制大豆叶柄夹角的重要基因, 其主要通过促进细胞的生长和分裂来影响叶枕形成, 该基因突变后可使叶枕发育异常、叶柄夹角增大。然而, 该基因在大豆种质资源的多态性变异与叶柄夹角的关系未见报道。本研究利用 783 份大豆种质资源的重测序数据, 对该基因进行单倍型分析, 挖掘 *GmILPA1* 基因序列的自然变异, 分析与叶柄夹角的关系。结果表明, 在 783 份种质资源中共检测到 32 个多态性位点, 包括 13 个 SNPs 和 19 个 Indel, 频率分别为 1 SNP/285 bp 和 1 Indel/195 bp, 共组成 9 种单倍型, 其中 Hap1 为主要单倍型, Hap3 具有两个非同义突变。分别对 Hap1 和 Hap3 类型的蛋白结构进行预测, 结果表明 Hap1 与 Hap3 蛋白在二级结构上有 3 个  $\alpha$  螺旋结构长度上的差异, 三级结构预测模型几乎一致。对不同单倍型的表型进行观察, 发现叶柄夹角并无显著差异。单倍型分析表明, *GmILPA1* 从地方品种到选育品种的多态性位点数目及单倍型分布类型逐渐减少, 说明 *GmILPA1* 基因由地方方向选育驯化的过程中因正向选择作用而固定了有益变异, 表现出瓶颈效应。

**关键词:** 大豆; 叶柄夹角; *GmILPA1*; 单核苷酸多态性; 单倍型

## Haplotype Analysis of Petiole Angle Related Gene *GmILPA1* in Soybean

CHEN Ling-ling<sup>1,3</sup>, LIU Ting-xuan<sup>1</sup>, GU Yong-zhe<sup>3</sup>, SONG Jian<sup>1,2</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, QIU Li-juan<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> College of Agriculture, Yangtze University, Hubei Jingzhou 434025; <sup>2</sup> College of Life Sciences, Yangtze University, Hubei Jingzhou 434025; <sup>3</sup> Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** *GmILPA1* (*Glyma.11g026400*) is an important gene that controls petiole angle by modulating the formation of leaf pillow by promoting cell growth and division in soybean. The mutation of *GmILPA1* can cause abnormal development of leaf pillow and increase petiole angle. However, whether the polymorphic variations of this gene in soybean germplasm determines the petiole angle remains unknown. In this study, re-sequencing data derived from 783 soybean germplasm accessions was used to analyze the haplotype variation of the *GmILPA1* gene. Thirty-two polymorphic loci including 13 SNPs and 19 Indels were detected, with a frequency of 1 SNP/285 bp and 1 Indel/195 bp, respectively. Out of nine haplotypes, Hap1 was found to be predominant and Hap3 showed two non-synonymous mutations. The results showed that there were three  $\alpha$ -helix differences in the secondary structure between Hap1 and Hap3, whereas there was not detected difference on the stimulated crystal structure.

收稿日期: 2021-04-19 修回日期: 2021-06-04 网络出版日期: 2021-06-28

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210419003>

第一作者研究方向为作物遗传育种, E-mail: 905540072@qq.com

通信作者: 王俊, 研究方向为大豆分子生物学与遗传育种, E-mail: wangjagri@yangtzeu.edu.cn

邱丽娟, 研究方向为大豆基因资源挖掘与利用, E-mail: qiliujuan@caas.cn

宋健, 研究方向为大豆基因资源挖掘与利用, E-mail: songjian@yangtzeu.edu.cn

**基金项目:** 中国农业科学院科技创新工程和大豆种质资源保护与利用项目 (2019NWB036-05); 荆州市科技计划项目 (2020CB21-28); 现代作物生产省部共建协同创新中心

**Foundation projects:** The Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences, and the Protection and Utilization of Soybean Germplasm Resources (2019NWB036-05), Jingzhou Science and Technology Plan Project (2020CB21-28), Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production co-sponsored by Province and Ministry

No significant difference in petiole angle among different haplotypes was observed. The number of polymorphic loci and haplotype diversity of *GmILPA1* were decreased in varieties in relative to the landraces. Collectively, gained from the genetic diversity analysis, this study revealed a fixation (bottleneck) of *GmILPA1* elite allele in varieties due to positive selection in the process of soybean breeding.

**Key words:** soybean; leaf petiole angle; *GmILPA1*; single nucleotide polymorphism; haplotype

单倍型是指在同一染色体上进行共同遗传的多个基因座上等位基因的组合,在遗传变异广泛的自然群体中发掘目标基因的优异等位变异是分子育种应用的重要手段,在玉米<sup>[1-2]</sup>、水稻<sup>[3-4]</sup>、小麦<sup>[5-6]</sup>、大豆<sup>[7-8]</sup>等作物中得到广泛应用。例如柳思思<sup>[2]</sup>通过分析耐旱基因单倍型,挖掘优异单倍型并开发了功能标记,助力了玉米耐旱分子标记辅助育种。水稻粒宽基因 *GS5* 优异单倍型的挖掘为水稻产量和稻米品质育种奠定了一定的基础<sup>[3]</sup>。小麦粒重基因 *TaGW2-6A* 基因编码区和启动子区等位变异之间存在相互作用,TA 单倍型比 TG、-A、-G 单倍型更能增加小麦的粒宽和粒重,是优异的等位变异组合<sup>[6]</sup>。大豆胞囊线虫抗病位点 *rhg1* 和 *Rhg4* 标记的开发为大豆胞囊线虫抗性种质的选择提供了参考<sup>[8]</sup>。

叶柄夹角是决定冠层盖度的关键因素,是群体叶片空间分布状态的一种衡量,同时也是决定群体透光和受光姿态的重要指标,较大的影响了植株地上部分冠层结构的排布以及光能的利用效率,并对植物的产量有巨大的影响。在单子叶模式植物水稻叶夹角的相关报道中,小夹角的植株由于叶片双面受光更加充分,降低了光的反射率,从而提高了植株冠层受光面积,光合效率得以显著提升,有机物的积累也得到大幅度提升。植株下层由于上部冠层的分布,对光能的吸收也更为充分,使根系的活力得到加强,最终使水稻增产<sup>[9-11]</sup>。刘正<sup>[12]</sup>在对玉米叶夹角进行综述总结时,提到玉米上层叶片的叶夹角变小,可为穗三叶让出更多的光照,使得植株的光合作用增强,从而有助于产量的提升。

叶柄夹角是数量性状,受多种因素影响,目前大豆中相关研究多处于 QTL 阶段<sup>[13-15]</sup>,仅 *GmILPA1* 基因被克隆。在该研究中, Gao 等<sup>[16]</sup>利用获得的突变体构建遗传分离群体,通过传统图位克隆的方法克隆到该基因。该基因发生突变(1149 bp 的缺失,包括第 3 内含子末端 23 bp 和第 4 外显子,以及下游侧翼序列)后可使叶枕发育异常、叶柄夹角增大。相较于单一群体,自然群体由于品种间遗传背

景的差异化和基因组序列丰富的多态性变异,能够为基因序列多态性变异研究和单倍型分析提供更好的基础,而通过测序获得的 SNP 和 InDel 多态性位点为更好了解基因变异提供了依据,同时也为大豆分子辅助育种提供了一定的参考。大豆叶柄夹角 *GmILPA1* 基因由突变体中获得,在品种资源中自然变异尚不清楚,本研究利用 783 份大豆种质资源的重测序数据,通过对该基因进行单倍型分析,探索了 *GmILPA1* 基因序列的自然变异与叶柄夹角的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为 783 份地方、选育大豆种质资源和 181 份野生大豆种质资源。地方选育材料种植于海南三亚(18.25°N, 109.51°E),行长 3 米,1 垄 2 行,垄距 70 cm,株距 10 cm,双粒点播,正常水肥管理。783 份材料中包括 685 份(87.48%)中国大豆材料和 94 份(12.01%)国外材料以及 4 份(0.51%)未知来源材料。中国材料中,126 份(18.39%)来自中国东北,99 份(14.45%)为北方材料,黄淮海流域材料有 119 份(17.37%),南方材料为 200 份(29.20%),141 份(20.58%)材料由各省农科院通过有性杂交得来。表型测量时需避开边行优势,每行取 3 株长势一致的植株进行测量,测量部位根据植株的整体节数取顶部节位、中部节位、底部节位进行测量,所用工具为数显角度测量尺。

### 1.2 DNA 提取及 783 份种质重测序

每个品种取新鲜的三出复叶 100 mg 于 2 mL 离心管中(加钢珠),迅速放入液氮冷冻,用打样机(2000 GENO/GRINDER)捣碎叶片后采用 CTAB 小量法<sup>[17]</sup>提取大豆种质基因组,总 DNA 保存于 100  $\mu$ L 去离子水中。所得 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并使用紫外分光光度计(UV-Vis Spectrophotometer Q5000)测其浓度。提取 DNA 后,样品送往北京百迈克生物科技有限公司进行重测序,测序方法参照张之昊等<sup>[18]</sup>的重测序流程。

### 1.3 *GmILPA1* 基因序列多态性分析和蛋白结构预测

*GmILPA1* 基因序列来源于大豆基因组数据库 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=4433&searchText=transcriptid:30531423>)。测序数据返还后,单核苷酸数据由 PilotEdit 软件调取,利用 Excel 进一步筛选 SNP 变异位点,进行数据过滤,去除内含子区域,整合相同基因型,对变异位点进行统计,分析单倍型,其中缺失位点默认为参考基因组。通过 Phytozome 搜索基因,利用 Excel 筛选分析单倍型和表型数据的关联性。序列变异率 = 变异位点个数 / 参考基因组序列长度  $\times 100\%$ 。利用 minitab19 对叶柄夹角数据进行分析。利用 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)

网站进行蛋白的二级和三级结构预测。

## 2 结果与分析

### 2.1 783 份大豆种质资源叶柄夹角表型分析

783 份种质资源材料叶柄夹角表型值都呈现正态分布(图 1),其中顶部叶柄夹角范围为  $17.0^{\circ}\sim 110.6^{\circ}$ ,中部叶柄夹角范围为  $14.6^{\circ}\sim 109.9^{\circ}$ ,底部夹角范围为  $21.7^{\circ}\sim 99.8^{\circ}$ (表 1)。统计分析发现,3 个节位的变异系数均大于 20%,说明研究材料在不同节位之间叶柄夹角都呈现显著差异。相关性分析表明,不同节位之间均存在不同程度的极显著正相关( $P<0.01$ ),相关系数范围是 0.426~0.601。顶部节位与中部节位的相关性 > 中部节位与底部节位的相关性 > 顶部节位与底部节位的相关性(表 2)。

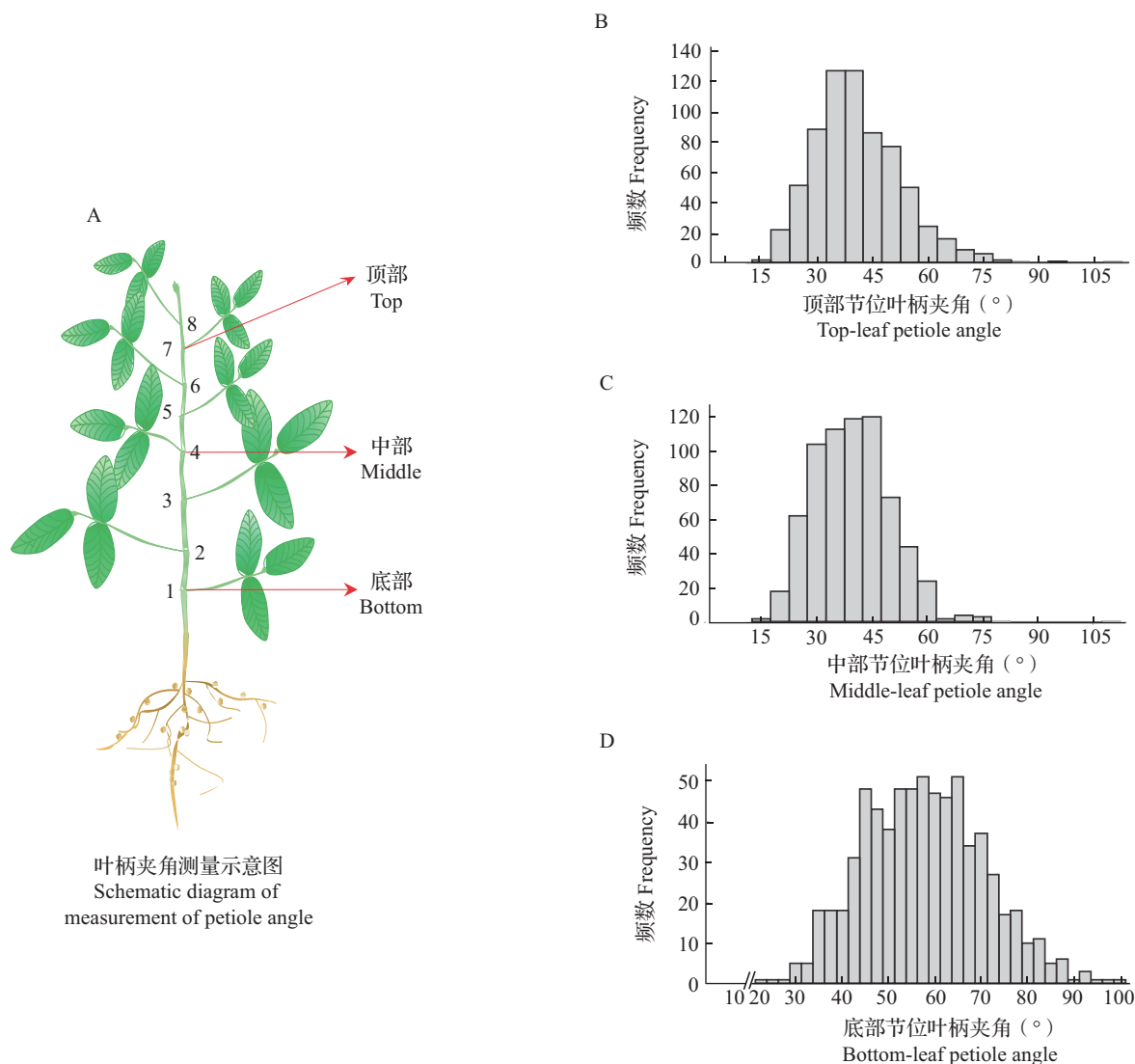


Fig.1 Distribution of petiole angle of 783 soybean materials

表 1 783 份材料叶柄夹角基本数据分析  
Table 1 Basic data analysis of petiole angle of 783 accessions

节位 Location	最大值(°) Max.	最小值(°) Min.	平均值(°) Average	标准差 SD	变异系数(%) CV
顶部 Top	110.6	17.0	41.0	12	29.2
中部 Middle	109.9	14.6	40.0	10.7	26.8
底部 Bottom	99.8	21.7	57.8	12.9	22.3
平均值 Average	104.2	24.4	46.3	9.8	21.2

表 2 不同节位之间相关性分析  
Table 2 Correlation analysis between different nodes

节位 Location	顶部 Top	中部 Middle	底部 Bottom
顶部 Top	1		
中部 Middle	0.601**	1	
底部 Bottom	0.426**	0.584**	1

\*\* 表示  $P<0.01$  水平上差异极显著  
\*\*Represent highly significant variation at  $P<0.01$

2.2 *GmILPA1* 基因序列多态性

*GmILPA1* 基因位于大豆第 11 染色体的第 1877873~1881580 bp 之间,其全长 3708 bp,基本结构由 5'UTR、4 个外显子、3 个内含子、3'UTR 组成,包含一个长度为 1734 bp 的开放阅读框(ORF, open reading frame),编码 577 个氨基酸。

该基因在 783 份大豆种质中共检测到 32 个

多态性位点(表 3),包括 13 个 SNP 和 19 个 Indel(DNA 的插入/缺失突变),二者频率分别为 1 SNP/285 bp 和 1 Indel/195 bp;其中非编码区 SNP 为 6 个,编码区 SNP 有 7 个;非编码区 Indel 出现频率为 1 Indel/108 bp,编码区 Indel 出现频率为 1 Indel/521 bp,Indel 非编码区的变异频率是编码区的 4.8 倍。在检测到的 13 个 SNP 中,8 个 SNP 发生了嘌呤与嘧啶之间的颠换(Transversion),5 个 SNP 发生了嘌呤与嘌呤之间转换(Transition),颠换与转换的计算比率为 1.6。对编码区和非编码区的变异位点进行统计,结果表明两个区域的变异程度无显著性差异。多样性在 *Glyma.11g026400* 基因各区域中呈现不均匀分布。编码区变异位点主要分布在 3'UTR、5'UTR、以及第 3 外显子区域,其中第 3 外显子区域变异最为丰富,包括 4 个 SNP,其中 2 个为非同义突变。

表 3 *GmILPA1* 序列多态性分布  
Table 3 Polymorphism of *GmILPA1* sequence in 783soybean accessions

位置 Location	长度(bp) Length	SNP		Indel		总体 Total	
		数目 Number	频率 (SNP/bp) Frequency	数目 Number	频率 (Indel/bp) Frequency	数目 Number	频率 (SNP+Indel/bp) Frequency
非编码 Noncoding region	1621	6	1/270	15	1/108	21	1/77
编码区 Coding region	2087	7	1/298	4	1/521	11	1/190
基因全长 Complete region	3708	13	1/285	19	1/195	32	1/116

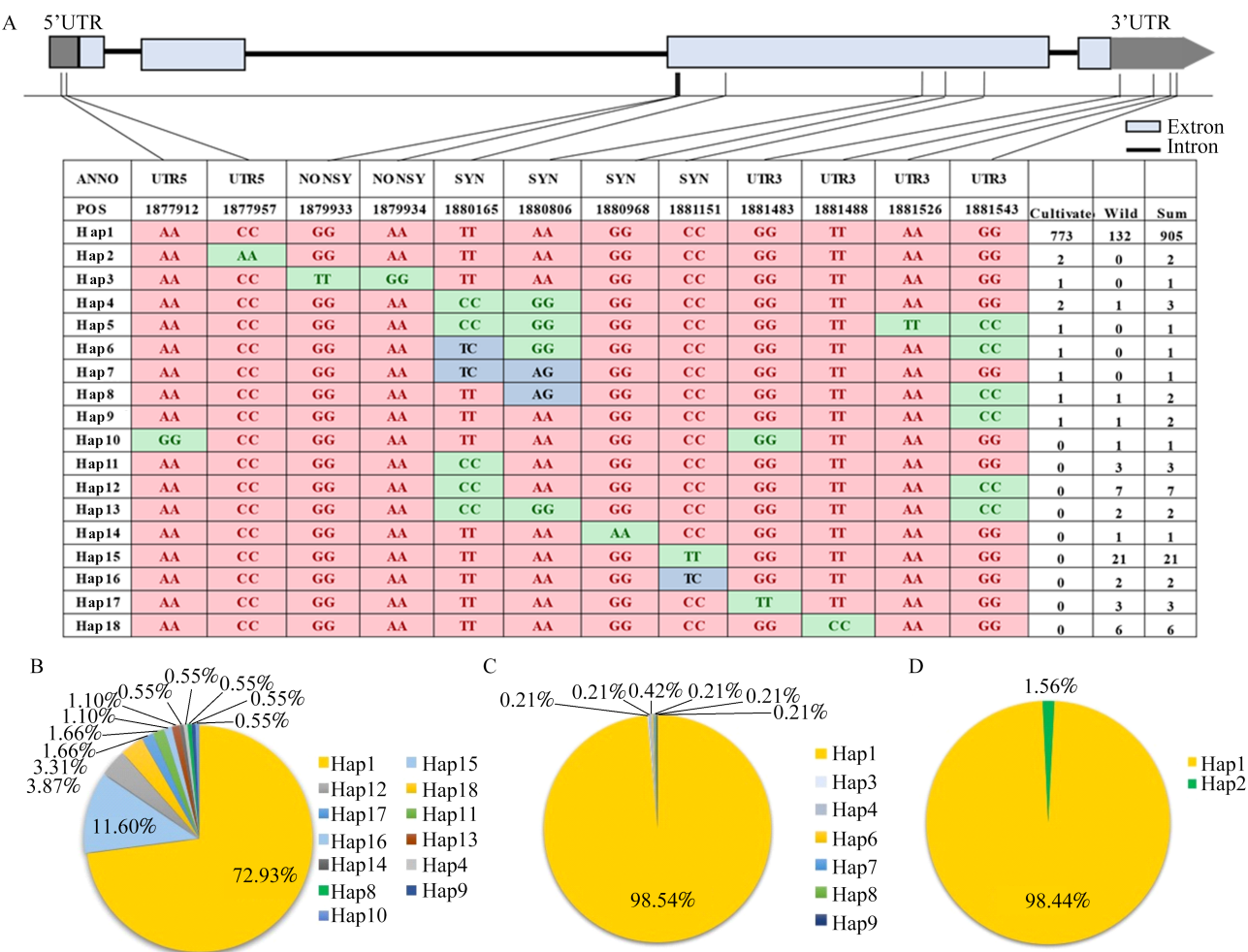
SNP/bp: 间隔多个碱基长度 SNP 出现的频率; Indel/bp: 间隔多个碱基长度 Indel 出现的频率; SNP+Indel/bp: 间隔多个碱基长度 SNP 和 Indel 出现的频率  
SNP/bp: Frequency of SNP in the sequence, Indel/bp: Frequency of Indel in the sequence, SNP+Indel/bp: Frequency of SNP and Indel in the sequence

2.3 *GmILPA1* 序列单倍型分析

利用 783 份资源的重测序结果对该基因进行序列比对并分析其单倍型和变异位点。分析发现共有 7 个 SNP 变异位点,总共有 9 种单倍型。3'UTR 区域包含 2 个变异位点,第 3 外显子区域存在 4 个变异位点,5'UTR 区域存在 1 个变异位点。在 9 种单倍型中,Hap1 单倍型数量最多,共有 773 份。

为了进一步分析挖掘 *GmILPA1* 基因在群体材料中的自然变异情况,将 783 份栽培品种与 181 份野生豆材料重测序数据结合进行分析。单倍型分析结果显示,964 份材料包含 12 个 SNP 位点,共组成了 18 种单倍型(图 2A)。Hap1 为主要单倍型,其中 Hap3、Hap5、Hap6、Hap7、Hap10、Hap14 只有 1 份材料,或许是稀有变异位点。





A: 964 份 ( 783 份栽培品种和 181 份野生豆 ) 自然群体材料分析 *GmILPA1* 基因单倍型,其中 ANNO 表示第一行的位点注释,UTR5 和 UTR3 为基因结构 UTR 区域位点,NONSY 表示非同义突变位点,SYN 表示同义突变位点;POS 表示物理位置;  
B~D: 964 份自然群体材料中野生豆 ( B )、地方品种 ( C )、选育品种 ( D ) 不同类型单倍型的数量分布  
A: 964 natural population materials ( 783 cultivated varieties and 181 wild soybean ) were used to analyze the *GmILPA1* gene haplotypes. Among them, ANNO represents the sites annotation in the first line, UTR5 and UTR3 are the UTR region sites of gene structure, NONSY represents the nonsynonymous mutation sites, SYN represents the synonymous mutation sites, POS indicates the physical location, B-D: Quantitative distribution of different haplotypes in 964 natural population materials of wild bean ( B ), landrace variety ( C ) and breeding variety ( D )

图 2 *GmILPA1* 基因单倍型分析  
Fig.2 Haplotype analysis of *GmILPA1* gene

分别对野生豆、地方品种、选育品种中的不同类型单倍型数量进行统计。结果表明,Hap1 在 3 种类型的资源中所占比例最大,均为主要单倍型(图 2)。野生豆单倍型种类有 13 种,栽培品种中有 7 种,选育品种中只有 2 种,由此可见从野生豆到栽培品种单倍型的丰富度是在逐渐降低的,也进一步说明了从野生豆到选育品种的驯化过程中,变异位点受到了定向选择。

**2.4 *GmILPA1* 基因 Hap1 和 Hap3 的蛋白结构预测**

9 种单倍型中 Hap1 为大多数资源的主要单倍型,与 Hap1 相比,Hap3 有 2 个非同义突变 SNP 位

点,引起了蛋白氨基酸的变化,分别是第 141 处甲硫氨酸变为异亮氨酸,第 142 处异亮氨酸变为缬氨酸(图 3)。为了进一步研究该基因单倍型中的非同义突变是否造成蛋白结构的变化,利用 Phyre 对 Hap1 和 Hap3 进行蛋白二级结构和三级结构预测。

*GmILPA1* 基因全长 3708 bp,其中 CDS 区全长 1734 bp,该基因编码长度为 577 个氨基酸的蛋白序列,该蛋白包含 4 个结构域,1 个 APC-8 结构域、2 个四肽三肽重复序列结构域和 1 个 Tetratricopeptide repeat 结构域。分别对 Hap1 和 Hap3 编码的蛋白进行二级结构预测,结果表明,Hap1 类型的蛋白

具有 30 个  $\alpha$  螺旋, 占序列的 68%。变异类型的蛋白包含 31 个  $\alpha$  螺旋, 也占序列的 68%。如图 4 所示, 2 个变异位点都发生在 APC-8 的结构域上, 2 个蛋白有 3 个  $\alpha$  螺旋结构在长度上有所差异, 分别在第 24~25 氨基酸处、第 74~78 氨基酸处、第 121~153 氨基酸处

的  $\alpha$  螺旋长度发生了变化。这些差异可能是由于非同义突变导致的氨基酸序列的变化引起的(图 4)。与二级结构不同的是, 2 种蛋白的三级结构预测模型几乎一致, 说明 Hap3 单倍型 2 个非同义突变位点引起的氨基酸变化并未造成蛋白质空间结构的变化。

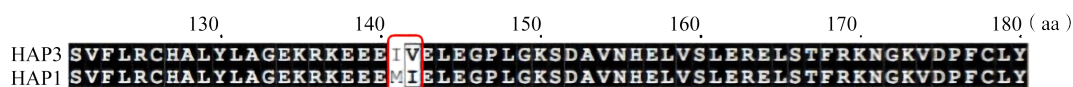
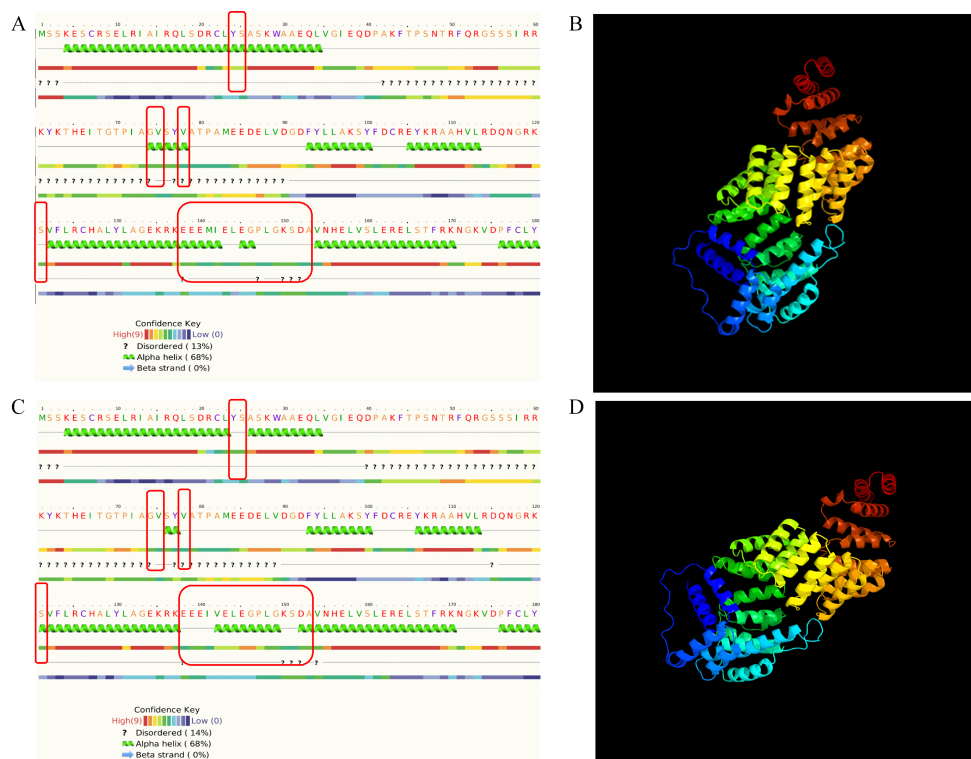


图 3 *GmILPA1* 蛋白两个氨基酸突变位点  
Fig.3 Two amino acid mutation sites of *GmILPA1* protein



A: Hap1 类型编码蛋白的预测二级结构; B: Hap1 类型编码蛋白的预测三级结构;  
C: Hap3 类型编码蛋白的预测二级结构; D: Hap3 类型编码蛋白的预测三级结构  
A: The predicted secondary structure of Hap1 type protein, B: The predicted tertiary structure of Hap1 type protein,  
C: The predicted secondary structure of Hap3 type protein, D: The predicted tertiary structure of Hap3 type protein

图 4 *GmILPA1* 两种类型蛋白结构预测

Fig 4 Structure prediction of two types of *GmILPA1* protein

## 2.5 *GmILPA1* 基因单倍型与叶柄夹角表型关联分析

783 份大豆材料总共有 9 种单倍型, 地方品种包含 7 种单倍型 (Hap1、Hap3、Hap4、Hap6、Hap7、Hap8、Hap9), 选育品种包含 2 种单倍型 (Hap1 和 Hap2), 地方品种到选育品种稀有 SNP 位点的减少可能是在人为选择的过程中被丢失。对 9 种单倍型数量进行统计, 以 Hap1 为主, 所占比例为 98.72%, 3 个节位叶柄夹角的分布范围分别为

17~110°、14.6~109.8°、21.7~99.8°。Hap2 和 Hap4 所占比例均为 0.26%, 分别对 Hap1、Hap2 和 Hap4 进行方差分析, 结果显示只有在中部节位, Hap1 和 Hap4 存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 其他节位 3 种单倍型之间无显著差异 (图 5)。Hap3、Hap5、Hap6、Hap7、Hap8、Hap9 材料只有 1 份, 各个节位叶柄夹角相比, 顶部节位叶柄夹角 Hap5 > Hap3 > Hap9 > Hap6 > Hap7 > Hap8; 中部节位叶柄夹角, Hap5 > Hap9 > Hap3 > Hap6 > Hap7 > Hap8;

底部节位叶柄夹角 Hap5>Hap7>Hap3>Hap9>Hap8>Hap6。其中 Hap2、Hap3、Hap4、Hap6、Hap7、Hap8、Hap9 顶部、中部以及平均节位叶柄夹角受单倍型的影响较小,对底部节位叶柄夹角变化

有一定程度的影响。因此,在本研究中,Hap1、Hap2、Hap4 为主要单倍型,受到了群体驯化的选择,其他单倍型由于样本数量较少,仍需要进一步验证。

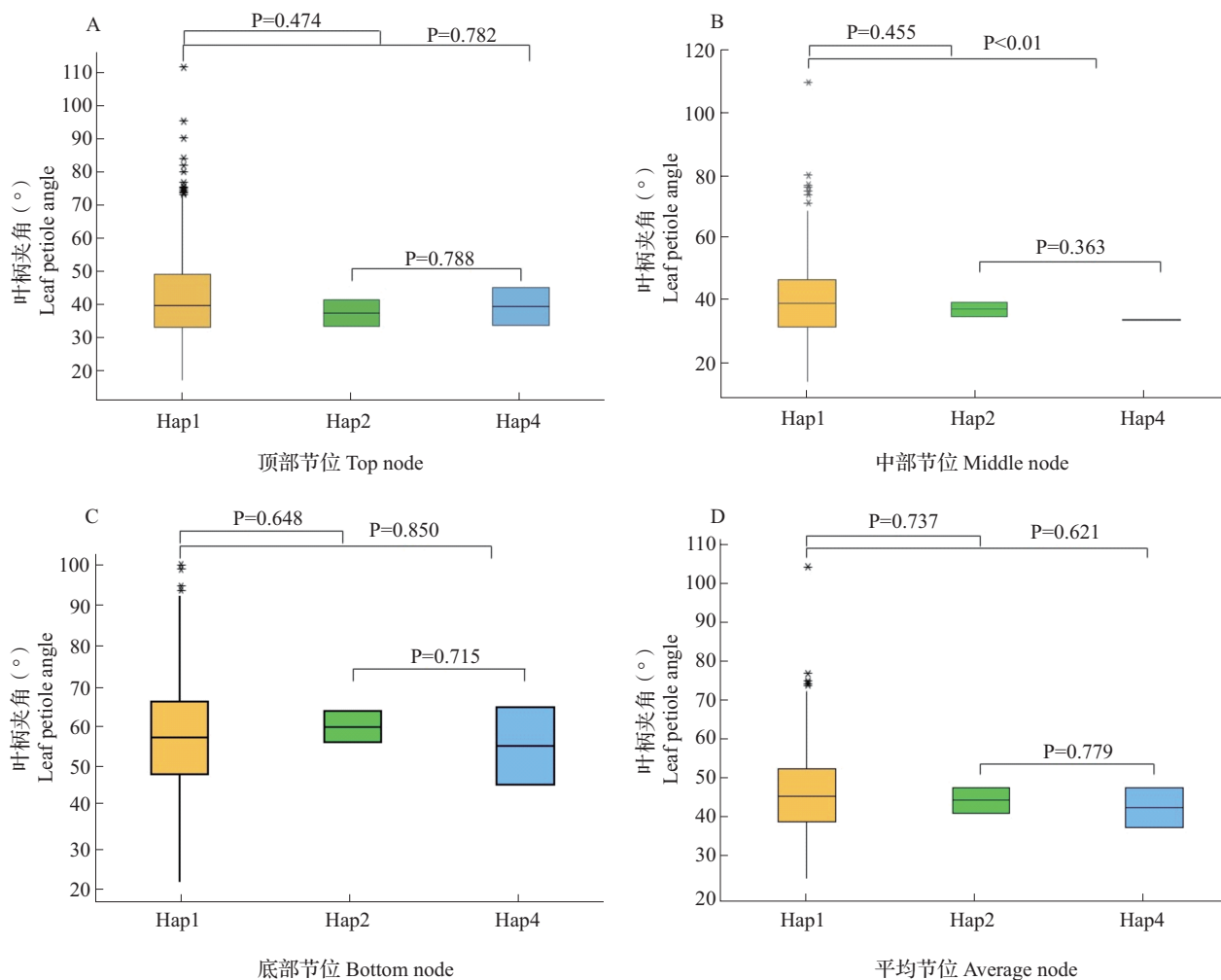


图 5 不同单倍型叶柄夹角分布  
Fig.5 Distribution of petiole angle in different haplotypes

### 3 讨论

#### 3.1 *GmILPA1* 基因序列多态性与自然变异探讨

基因序列的多态性变异造成了物种的遗传多样性,随着环境变化,一些更适应环境的变异位点被保留下来,最常见的序列变异是 SNP 和 InDel<sup>[19]</sup>。检测单核苷酸多态性的方法很多,直接测序法是筛查 SNP 最可靠的方法。本研究中,检测到的 6 个 SNP 几乎都只在 1 个基因型中出现,可能是试验误差造成的假阳性,但也可能是稀有的 SNP,预示着该基因新的突变方向。因为群体遗传理论认为,稀有的变异有可能比共享的变异更晚发生,因而更有可能

代表该群体的特异性<sup>[20]</sup>。

SNP 被认为是植物基因组中发生频率最高的遗传多态性<sup>[21]</sup>。利用 783 份大豆材料的重测序数据对 *GmILPA1* 基因进行核苷酸多态性分析,在检测到的 32 个多态性位点里,包含 13 个 SNP 位点和 19 个 Indel 位点,SNP 和 Indel 的变异频率分别为 1 SNP/285 bp 和 1 Indel/195 bp。与前人报道的 1 SNP/272 bp 的大豆 SNP 频率<sup>[22-23]</sup>和水稻中 1 SNP/154 bp 的频率<sup>[24]</sup>相接近,低于玉米中 1 SNP/57 bp 的频率<sup>[25]</sup>,而远远高于人类基因组 DNA 单核苷酸变异频率 1 SNP/1000 bp<sup>[26]</sup>,说明植物基因组中的具有大量丰富的单核苷酸多态性<sup>[27]</sup>。

此外,不同区域多态性位点存在选择效应,造成 *GmILPA1* 不同区域多态性位点差异化的原因,很可能是由于各个区域所承受的选择压力不同。非编码区一般与其生物学功能关联较小,因而承受了相对较小的选择压力,发生变异的频率相对丰富一点。而编码区则是因为发生变异可能会导致其生物学功能的变化,所以通常只有较少的核苷酸发生变化,这些效应都可根据软件进一步准确计算得到。

### 3.2 *GmILPA1* 基因序列单倍型与叶柄夹角表型的相关性

783 份大豆材料共有 9 种单倍型,地方品种包含 7 种单倍型,选育品种包含 2 种单倍型,地方品种到选育品种稀有 SNP 位点的减少可能是因为人为选择的过程中被丢失了。9 种单倍型中以 Hap1 为主要单倍型,占比为 98.72%,其他单倍型只有极少数量,占比为 1.28%。对比材料占比较小的单倍型(Hap2~Hap9),发现 Hap5 与其它单倍型相比,3 个节位以及 3 个节位叶柄夹角平均值分别为 64.65°、60.20°、86.73°、70.53°,各个节位叶柄夹角大小均高于其他单倍型的最大值 49.78°、49.98°、72.12°、55.48°。此外,Hap5 各个节位叶柄夹角均超过 60°,说明第 3 外显子和 3'UTR 的共同突变可能影响叶柄夹角。此外,Hap3 单倍型虽然存在 2 个非同义突变位点,但表型与其他单倍型相比无明显差异。由于叶柄夹角易受多种环境因素影响,如种植密度<sup>[28-29]</sup>、倒伏性<sup>[30]</sup>、光照<sup>[31]</sup>、光质<sup>[32-33]</sup>等,其中,Hap1 在自然群体中所占的比例相较于其他单倍型数量最多,表明 Hap1 在本研究材料中受到了定向选择,少数材料可能由于自然变异,才产生了新的单倍型。目前大豆叶柄夹角还未有具体的等级划分,若能根据度数细化表型等级,将更利于表型的鉴定,更好阐明不同单倍型间的关系。

本研究结果显示,3 个节位叶柄夹角大小在整体趋势表现为底部节位 > 中部节位 > 顶部节位,与一般植物的株型结构相一致。与前人报道<sup>[14-15]</sup>相比,本研究中 3 个节位叶柄夹角的大小变化范围极少出现夹角超过 90° 的极端表型,差异较大。前人研究表明, *GmILPA1* 突变体中存在大片段的缺失<sup>[16]</sup>,导致了叶柄角度的增大,在针对 783 份大豆资源材料的单倍型分析中并未发现该缺失突变,仅在缺失区域内发现 4 个 SNP 变异位点,涉及 25 份种质资源,同时本研究发现的 2 个非同义突

变位点也未在 *GmILPA1* 的功能位点区域,表明所分析的自然材料中极少出现文献报道的功能变异类型。

因此,进一步扩大资源材料评价范围,将有助于挖掘更多功能基因等位变异类型并明确不同单倍型与叶柄角度调控的关系,从而为基于叶柄角度的理想株型构建和大豆产量提高提供材料基础和基因资源。

## 4 结论

本研究通过分析 783 份大豆种质资源 *GmILPA1* 基因序列的多态性,在 *GmILPA1* 基因序列中共检测到 32 个多态性位点,其中 13 个 SNPs 和 19 个 Indel,二者频率分别为 1 SNP/285 bp 和 1 InDel/195 bp;其中非编码区 SNP 为 6 个,编码区 SNP 有 7 个;非编码区 Indel 出现频率为 1 Indel/108 bp,编码区 Indel 出现频率为 1 Indel/521 bp。单倍型分析共存在 9 种单倍型,Hap1 为主要大多数资源的主要单倍型,Hap3 存在 2 个非同义突变位点,发生在第 3 外显子区域。2 种单倍型蛋白二级结构预测存在 3 个  $\alpha$  螺旋结构长度差异,三级结构预测模型几乎无差异。

### 参考文献

- [1] 柳思思,刘玲玲,许侃,石庆华,张世煌,郝转芳. 玉米耐旱功能标记辅助选择初探. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2): 232-236, 242  
Liu S S, Liu L L, Xu K, Shi Q H, Zhang S H, Hao Z F. An initial analysis of functional marker-assisted selection with drought tolerance in maize. Journal of Plant Genetic Resources. 2013, 14(2): 232-236, 242
- [2] 柳思思. 玉米耐旱功能标记开发及优异单倍型应用. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2012  
Liu S S. The development of functional marker and the application of superior haplotype associated with drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2012
- [3] 裔传灯,王德荣,蒋伟,李玮,成晓俊,王颖,周勇,梁国华,顾铭洪. 水稻粒宽基因 *GS5* 的功能标记开发和单倍型鉴定. 中国水稻科学, 2016, 30(5): 487-492  
Yi C D, Wang D R, Jiang W, Li W, Chen X J, Wang Y, Zhou Y, Lang G H, Gu M H. Development of functional markers and identification of haplotypes for rice grain width gene *GS5*. China Journal Rice Science, 2016, 30(5): 487-492
- [4] 万建民,吴玮勋,陆广文,江玲,郑晓明,钟铮铮. 一组控制水稻抽穗期的 *dth2* 基因及其单倍型和应用. ZL201310549806.1. 2014-04-16  
Wan J M, Wu W X, Lu G W, Jiang L, Zheng X M, Zhong Z Z. A group of *dth2* genes controlling heading date in rice and their haplotypes and application. ZL201310549806.1. 2014-04-16



- [5] 常建忠. 小麦基因 *TaSAP1* 的单倍型及启动子分析. 北京: 中国农业科学院, 2013  
Chang J Z. Haplotype and promoter analysis of *TaSAP1* gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013
- [6] 寇程, 高欣, 李立群, 李扬, 王中华, 李学军. 小麦粒重基因 *TaGW2-6A* 等位变异的组成分析及育种选择. 作物学报, 2015, 41(11): 1640-1647  
Kou C, Gao X, Li L Q, Li Y, Wang Z H, Li X J. Composition and selection of *TaGW2-6A* alleles for wheat kernel weight. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(11): 1640-1647
- [7] 赫卫, 刘林, 关荣霞, 邱丽娟. 大豆耐盐相关基因 *GmNcl1* 的序列单倍型及表达分析. 中国农业科学, 2014, 47(3), 411-421  
Hao W, Liu L, Guan R X, Qiu L J. Haplotypes and expression analysis of salt-tolerant gene *GmNcl1* in soybean. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(3), 411-421
- [8] 盛碧涵, 刘兵, 陈秀兰, 朱治佳, 谭云夫, 李文滨, 赵雪, 韩英鹏. 抗 *SCN* 位点 *rhg1* 与 *Rhg4* 在种质资源中的单倍型分析及分子标记开发. 大豆科学, 2017, 36(3): 345-350  
Sheng B H, Liu B, Chen X L, Zhu Z J, Tan Y F, Li W B, Zhao X, Han Y P. Haplotype analysis and molecular marker development of soybean nematode cyst resistance loci *rhg1* and *Rhg4* in soybean germplasm. *Soybean Science*, 2017, 36(3): 345-350
- [9] Lu M, Zhou F, Xie C X, Li M S, Xu Y B, Marilyn W. Construction of a SSR linkage map and mapping of quantitative trait loci (QTL) for leaf angle and leaf orientation with an elite maize hybrid. *Hereditas*, 2007, 29(9): 1131-1138
- [10] Ning J, Zhang B C, Wang N L, Zhou Y H, Xiong L Z. Increased leaf angle 1, a *Raf-like* MAPKKK that interacts with a nuclear protein family, regulates mechanical tissue formation in the Lamina joint of rice. *The Plant Cell*, 2011, 23(12): 4334-4347
- [11] 廖慧敏, 张启军, 秦海龙, 夏士健, 宗寿余, 高艳红, 吕川根. 一个籼稻叶夹角新基因的激素敏感性分析和基因定位. 江苏农业学报, 2014, 30(6): 1198-1203  
Lao H M, Zhang Q J, Qin H L, Xia S J, Zong S Y, Gao Y H, Lü C G. Hormone sensitivity and genetic mapping of a new leaf angle gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Jiangsu Journal of Agriculture Science*. 2014, 30(6): 1198-1203
- [12] 刘正. 玉米叶夹角 QTL 定位研究综述. 农家参谋, 2019(3): 67, 81  
Liu Z. Review of QTL mapping for leaf angle in maize. *Nong Jia Can Mou*, 2019(3): 67, 81
- [13] 郭晋杰, 陈景堂, 祝丽英, 胡利宗, 张祖新, 黄亚群. 基于玉米导入系群体的 3 个农艺性状 QTL 分析. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 27-31  
Guo J J, Chen J T, Zhu L Y, Hu L Z, Zhang Z X, Huang Y Q. QTL analysis of three agronomic traits by CSILs in maize. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2009, 10(1): 27-31
- [14] 王吴彬, 何庆元, 杨红燕, 向仕华, 赵团结, 邢光南, 盖钧镒. 大豆分枝数和叶柄夹角的相关野生片段分析. 中国农业科学, 2012, 45(23): 4749-4758  
Wang W B, He Q Y, Yang H Y, Xiang S H, Zhao T J, Xing G N, Gai J Y. Detection of wild segments associated with number of branches on main stem and leafstalk angle in soybean. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(23): 4749-4758
- [15] 王存虎, 刘东, 许锐能, 杨永庆, 廖红. 大豆叶柄角的 QTL 定位分析. 作物学报, 2020, 46(1): 9-19  
Wang C H, Liu D, Xu R N, Yang Y Q, Liao H. Mapping of QTLs for leafstalk angle in soybean. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(1): 9-19
- [16] Gao J S, Yang S X, Cheng W, Fu Y F, Leng J T, Yuan X H, Jiang N, Ma J X, Feng X Z. *GmILPA1*, encoding an APC8-like protein, controls leaf petiole angle in soybean. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 1167-1176
- [17] Murray M G, Thompson C L, Wendel J F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325
- [18] 张之昊, 王俊, 刘章雄, 邱丽娟. 基于 BSA-Seq 技术挖掘大豆中黄 622 的多小叶基因. 作物学报, 2020, 46(12): 1839-1849  
Zhang Z H, Wang J, Liu Z X, Qiu L J. Mapping of an incomplete dominant gene controlling multifoliolate leaf by BSA-Seq in soybean (*Glycine max* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(12): 1839-1849
- [19] 张洪映, 毛新国, 景蕊莲, 谢惠民, 昌小平. 小麦 *TaPK7* 基因单核苷酸多态性与抗旱性的关系. 作物学报, 2008, 34(9): 1537-1543  
Zhang H Y, Mao X G, Jing R L, Xie H M, Chang X P. Relationship between single nucleotide polymorphism of *TaPK7* gene and drought tolerance in wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(9): 1537-1543
- [20] Rafaiski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(2): 94-100
- [21] Stephens J C, Schneider J A, Tanguay D A, Choi J, Acharya T, Stanley S E, Jiang R, Messer C J, Chew A, Han J H, Duan J C, Carr J L, Lee M S, Koshy B, Kumar M A, Zhang G, Newell W R, Windemuth A, Xu C B, Kalbfleisch T S, Shaner S L, Arnold K, Schulz V, Drysdale C M, Nandabalan K, Judson R S, Ruano G, Vovis G F. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*, 2001, 293(5529): 489-493
- [22] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, Tassell C V, Matukumalli L K, Grimm D R, Hyatt S M, Fickus E W, Young N D, Cregan P B. Single-Nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*, 2003, 163(3): 1123-1134
- [23] Choi I Y, Hyten D L, Matukumalli L K, Song Q J, Chaky J M, Quigley C V, Chase K, Lark K G, Reiter R S, Yoon M S, Hwang E Y, Yi S I, Young N D, Shoemaker R C, Tassell C P, Specht J E, Cregan P B. A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. *Genetics*, 2007, 176(1): 685-696
- [24] Liu C G, Zhang G Q. Single nucleotide polymorphism (SNP) and its application in rice. *Hereditas*, 2006, 28(6): 737-744
- [25] Carine G C, Christelle B T, Domenica M, Peter M R, Joan R, Alain M, Jean P M, Yves B. Nucleotide diversity of the *ZmPox3* maize peroxidase gene: relationships between a MITE insertion in exon 2 and variation in forage maize digestibility. *BMC Genetics*, 2004, 5(1): 193-228
- [26] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S C, Kakol J M, Stein L D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms.

- Nature, 2001, 409 ( 6822 ): 928-933
- [ 27 ] 裴文东,张仁和,王国兴,雷文妮,雷格丽,高敏,张宏军. 玉米冠层结构和群体光合特性对增密的响应. 玉米科学, 2020, 28 ( 3 ): 96-102
- Pei W D, Zhang R H, Wang G X, Lei W N, Lei G L, Gao M, Zhang H J. Responses of canopy structure and population photosynthetic traits on increased planting density of different maize cultivars. Journal of Maize Sciences, 2020, 28 ( 3 ): 96-102
- [ 28 ] 徐梓乘,杨恒山,张玉芹. 玉米冠层结构对种植密度的响应. 内蒙古民族大学学报:自然科学版, 2016, 31 ( 4 ): 298-301
- Xu Z C, Yang H S, Zhang Y Q. Response of different planting densities to corn canopy structure. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities, 2016, 31 ( 4 ): 298-301
- [ 29 ] 何佳宾,李叶蓓,聂言顺,张萍,郭正宇,张中东,陶洪斌,王璞. 耐密性玉米冠层结构对密度的响应. 玉米科学, 2016, 24 ( 3 ): 69-77
- He J B, Li Y B, Nie Y S, Zhang P, Guo Z Y, Zhang Z D, Tao H B, Wang P. Canopy structure of density-resistant maize cultivars under different plant densities. Journal of Maize Sciences 2016 ( 3 ): 69-77
- [ 30 ] 王永学. 玉米抗倒伏有关性状遗传的初步研究. 郑州:河南农业大学, 2011
- Wang Y X. Primary study of inheritance on lodging resistance traits in maize. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2011
- [ 31 ] Fellner M, Horton L A, Cocke A E, Stephens N R, Ford D E, Volkenburgh E V. Light interacts with auxin during leaf elongation and leaf angle development in young corn seedlings. Planta, 2003, 216 ( 3 ): 366-376
- [ 32 ] 陈志娜. 光信号调控水稻叶片直立性的机制研究. 武汉:华中农业大学, 2018
- Chen Z N. The mechanism research of the regulation of rice leaf erectness by light signaling. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018
- [ 33 ] Asahina M, Tamaki Y, Sakamoto T, Shibata K, Nomura T, Yokota T. Blue light-promoted rice leaf bending and unrolling are due to up-regulated brassinosteroid biosynthesis genes accompanied by accumulation of castasterone. Phytochemistry, 2014, 104: 21-29