

集群分离分析法在大豆性状遗传定位中的研究进展

师立松, 张艺龄, 刘方, 颜硕, 张孟茜, 赵璇, 李红雨, 牛宁, 李占军

(石家庄市农林科学研究院/河北省大豆产业技术研究院, 石家庄 050041)

摘要: 大豆是重要的油料作物, 同时也是人类食用植物蛋白及畜牧业饲料蛋白的主要来源, 在国家粮食结构和粮食安全中占有重要地位。利用简单高效的遗传定位方法, 对大豆主要农艺性状进行相关基因挖掘, 开发紧密连锁分子标记, 有利于加快大豆的分子标记辅助选择及分子设计育种进程。集群分离分析法 (BSA, bulked segregant analysis) 是一种利用样本混池的建库方式对极端性状进行QTL定位的方法, 因其具有“快速、准确、经济、实用”的特点, 已成为当下应用较为广泛的基因定位方法。随着高通量测序技术的兴起, 基于全基因组重测序的BSA方法更为广泛地应用在粮油作物、蔬菜花卉等物种中, 并且成功定位出许多农艺性状相关的基因。本文简要介绍了BSA方法及流程步骤, 总结了BSA在大豆农艺性状、抗逆性状以及雄性不育性状遗传定位中研究进展, 并讨论了下一代测序(NGS, next-generation sequencing)背景下BSA的机遇与挑战, 以及BSA在大豆分子标记辅助选择(MAS)育种中发展趋势, 以期对高产优质大豆品种的选育提供重要的理论基础。

关键词: 大豆; BSA; 遗传定位

Research Progress of Bulk Segregant Analysis in Genetic Mapping in Soybean

SHI Lisong, ZHANG Yiling, LIU Fang, YAN Shuo, ZHANG Mengxi, ZHAO Xuan,

LI Hongyu, NIU Ning, LI Zhanjun

(Shijiazhuang Academy of Agricultural and Forestry Sciences/Hebei Academy of

Provincial Soybean Industry Technology, Shijiazhuang 050041)

Abstract: Soybean is not only an important oil crop, but also the main source of plant protein for human consumption and feed protein for animal husbandry, which plays an important role in the national food structure and food security. By using a simple and efficient genetic mapping method, the related genes of the main agronomic characters of soybean are mined and closely linked molecular markers are developed, which is helpful to speed up the process of molecular marker-assisted selection and molecular design breeding of soybean. Bulk Segregant Analysis (BSA) is a method to identify the gene loci through using the DNA pools with extreme traits. Due to its characteristics of fast, accurate, economical and practical, BSA has become a widely-applied method in genetic mapping. Taking advantage of high-throughput sequencing technology, BSA based on whole-genome resequencing has been widely applied in isolation of many genes underlying agronomic traits in grain and oil crops, vegetables, flowers and other species. This study briefly introduced the methods and procedures of BSA, summarized the research progress in genetic mapping of agronomic traits, stress resistance traits and male sterility traits in soybean, and further discussed the opportunities and challenges of BSA under the background of

收稿日期: 2023-05-10 修回日期: 2023-07-18 网络出版日期: 2023-08-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230510001>

第一作者研究方向为大豆遗传育种, E-mail: shilisongning@163.com

通信作者: 李占军, 研究方向为大豆遗传育种, E-mail: nkylizhj@163.com

牛宁, 研究方向为大豆遗传育种, E-mail: niuning1980@163.com

基金项目: 石家庄市科学技术研究与发展计划项目(221490112A); 河北省大豆产业技术研究院建设补助经费项目(225790287H); 河北省科技计划项目现代种业科技创新专项(21326333D)

Foundation projects: Science and Technology Research and Developmental Program of Shijiazhuang (221490112A); Hebei Provincial Soybean Industry Technology Research Institute Construction Subsidy Funds Project (225790287H); Hebei Province Science and Technology Plan Project Modern Seed Industry Science and Technology Innovation Special Project (21326333D)

NGS, as well as the development trend of BSA in soybean molecular marker assisted selection (MAS) breeding. This study will provide theoretical basis for the cultivation of high quality soybean varieties.

Key words: soybean; BSA; genetic mapping

大豆(*Glycine max*)是世界上种植最广泛的油料作物之一,是植物油和植物蛋白的重要来源^[1]。此外,大豆中的 α -亚麻酸和异黄酮等成分有利于人体健康^[2]。2020年我国大豆进口量首次突破1亿吨,为历史第一高峰,减少国外大豆依赖,大幅度提高大豆自给率是育种家们奋斗的目标。因此,鉴定大豆产量、品质、抗逆等性状的相关基因或位点,揭示基因功能,解析相关性状的遗传基础,结合分子辅助育种技术改善大豆农艺性状,培育出适宜我国种植的高产优质大豆品种是缓解我国大豆供需矛盾的有效途径之一^[3],而集群分离分析(BSA)技术为实现这一目标提供了重要支撑。

与传统的QTL图谱方法相比,BSA只需要考虑群体中的少数极端个体,而不是考虑整个群体,简化了测序过程,显著降低了测序和分析的成本^[4]。1991年,Michelmore等^[5]首次在莠苣霜霉病抗性基因定位中提出了群体分离分析法(BSA法),并成功筛选出了连锁的分子标记。近年来,BSA被广泛应用于拟南芥^[6]、水稻^[7]和玉米^[8]等重要性状的遗传定位。随着栽培大豆基因组的公布^[9],第二代测序(NGS, next-generation sequencing)的飞速发展以及测序成本的不断降低^[10],促进了集群分离法在大豆遗传定位中的应用,并挖掘出了许多重要的遗传位点。本文从大豆农艺性状、抗逆性状、雄性不育等方面综述了集群分离法在遗传定位中的研究进展,探讨了集群分离法存在的问题以及未来的机遇与挑战,旨在为集群分离法在大豆育种的应用提供参考。

1 集群分离分析法

1.1 集群分离分析法定义

集群分离分析法主要是选择具有极端性状的两个亲本,通过杂交在后代的分离群体中筛选具有极端表型的个体,构建两个极端性状的混池,通过比较两个混池之间的差异,从而定位到与相关性状紧密关联的分子标记^[11]。BSA分析最开始使用的都是比较传统的分子标记,但是原来的分子标记在基因组上的密度低,从而导致定位的精度比较差,而且相关的实验操作繁琐,已经逐渐不再使用^[12]。近年来,BSA方法和高通量测序相结合得到了广泛

应用,高通量测序方式以其简单、快速、准确、高性价比的特点受到科研工作者的青睐。

1.2 集群分离分析法的步骤

BSA主要分为以下5个步骤(图1):(1)亲本材料选择。选择的亲本在目标性状上应具有显著差异,但其他性状尽量保持一致,以降低后期定位分析的干扰;亲本要选用尽量纯的个体,可通过自交进行纯化。(2)群体构建。用于BSA分析的遗传分离群体主要包括 F_2 、 $F_{2,3}$ 、BC群体(回交群体)、RIL群体(重组自交系)、DH系(双单倍体)、CSSL系(染色体片段代换系)、NIL群体(近等基因系)等。每个群体在BSA定位过程中有着各自的优点,比如 F_2 群体构建更加容易,但BC群体定位能力优于 F_2 群体。(3)混池样本选择。通过对子代的表型鉴定,选择极端性状的个体构建两个混池,混池的规模建议在30+30以上。(4)基因分型。最开始BSA分析基因分型使用的都是传统的分子标记,比如AFLP、RAPD、SCAR、SSR等。随着高通量测序技术的兴起,高密度标记芯片和基于测序的分子标记系统等用于BSA分析基因分型,而且BSA分析法可以在不同的分子水平上进行,包括DNA、RNA和蛋白质。(5)关联分析。随着BSA分析的发展,关联分析的算法也逐渐演变和分化,针对不同的遗传分离群体有着不同的算法。目前主流的有两种算法,ED(欧氏距离)算法和SNP-index算法。ED算法主要是通过计算不同混池间各突变型的频率距离,采用距离差异来反映标记与目标区域的连锁强度;SNP-index方法主要是通过计算混池间的基因型频率差异进行标记关联分析,寻找混池之间基因型频率的显著差异。

2 BSA在大豆农艺性状中的研究进展

2.1 株型

为了发展大豆高产潜力,我国的大豆育种家们从20世纪80年代就已经开始大豆株型育种,王金陵^[13]提出了“生态型育种原则”,率先提出了大豆株型育种。盖钧镒^[14]解释了大豆理想株型群体的生理基础,并指出大豆理想株型主要由植株受光态势的茎、叶组成。随着国家对大豆支持力度的不断加大以及国内对大豆产量需求的不断增加,大豆迎来

一场“绿色革命”的时机已经成熟, Liu 等^[15]指出要实现大豆生产中的“绿色革命”, 就要培育出适合高密度种植的理想植物结构的品种, 主要包括适宜的高度、较短的节间长度、更多的节间、无分支或较少

的分支、较多的节点荚数、高结荚率、更高的四粒荚比例、合适的百粒重、更小的叶夹角和更短的叶柄。为了加快理想株型育种, 前人们已经利用BSA法定到了许多与株型相关的遗传位点。

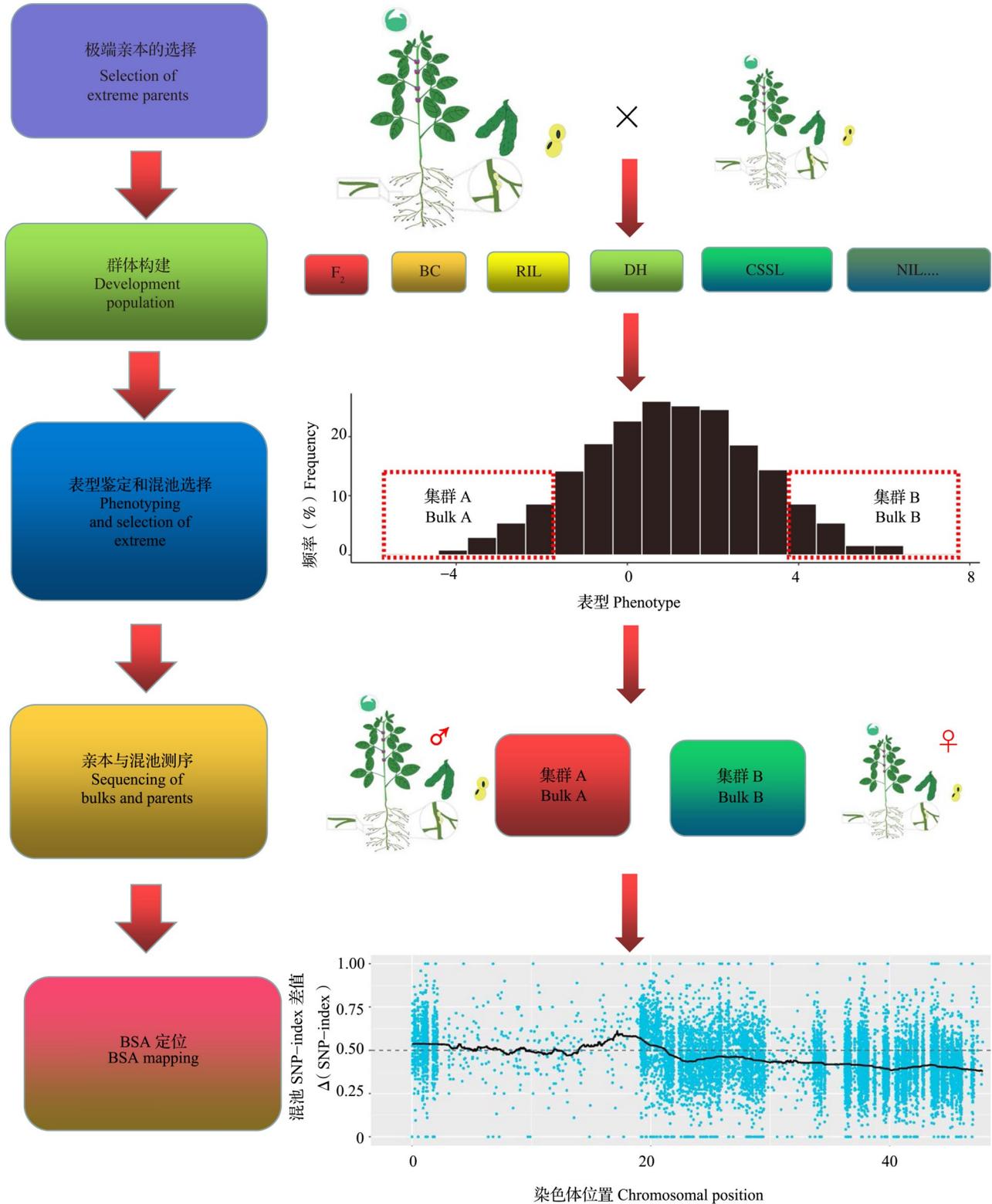


图1 下一代测序背景下BSA流程图

Fig.1 Flow chart of BSA in next-generation sequencing background

半矮化是大豆育种中理想的农艺特征,可以提高抗倒伏能力和太阳辐射利用效率,从而提高大豆产量。张久坤等^[16]利用杂交构建的F₂群体和RIL群体,通过BSA法两个群体共同定位到10个候选区间,结合拟南芥和大豆的基因组注释信息在候选区间内筛选出了18个与大豆株高相关的基因,结合转录组数据推测 *Glyma.03g230000*、*Glyma.04g065600*、*Glyma.04g227700* 3个基因与大豆株高发育紧密相关。Dong等^[17]利用构建的包含213个单株的F_{2:3}家系,采用SLAF-seq测序结合BSA法,成功定位了大豆半矮化位点 *sdf-1*,通过进一步分析推测 *Glyma.19g194800*、*Glyma.19g194500*、*Glyma.19g195200* 为调控大豆株高生长发育的候选基因。Li等^[18]结合连锁分析和BSA分析,对大豆株高进行QTL定位,其中有8个QTL能被重复检测。唐宽强^[19]利用EMS诱变获得的节间增长的突变体,采用BSA定位方法,将 *Gmlim1* 的突变位点定位于13号染色体,并通过进一步的遗传转化实验证明 *Glyma.13g287600* 和 *Glyma.13g288000* 表达可使 *Gmlim1* 株高恢复正常。Zhang等^[20]通过QTL-seq在大豆13号染色体1.73 Mb区域鉴定了一个与株高相关的QTL,并通过基于SSR标记的经典QTL定位得到验证。大豆株高相关位点的成功鉴定和定位有助于揭示大豆半矮化的分子机制,并间接提高大豆产量。

除了在大豆株高上的应用,BSA法在大豆株型其他性状上也有涉及。近年来,大豆机械化收获已经得到大面积推广应用,而大豆底荚高度是关键因素之一。赵圆圆等^[21]结合完备区间作图法和BSA分析法,将与大豆底荚相关的QTL定位到C1和L连锁群上。主茎节数是一个遗传性较高的性状,且与大豆产量呈正相关性。杨玉花等^[22]利用构建的RIL群体,采用BSA和SLAF-seq相结合的方法,检测到5个与大豆主茎节数相关的QTL。大豆叶柄长度与大豆整株的叶层结构和光合作用面积具有重要关系,叶柄较短的大豆品种可以在高密度下种植且不影响光合作用,Wang等^[23]利用大豆短柄突变体 *rlspl*,通过Seq-BSA分析在第3、6、8、13和17号染色体上鉴定了10个与大豆短柄相关的候选区域;Jun等^[24]利用BSA技术将控制大豆短柄的单隐性基因 *lps3* 定位到13号染色体上。叶序是株型构成的重要结构,徐唯佳等^[25]利用二列状互生种质皖中黄601与中黄13构建的F₂,采用BSA-seq方法在14和15号染色体定位到4个候选区域,并通过进一步分析发现二列状互生叶序形成可能是由细胞分裂素

分布差异导致的。大豆叶片除真叶以外,其余叶片一般为三出复叶,大豆复叶数量与大豆对外界环境的适应生存能力呈正相关关系,通过挖掘大豆多小叶相关基因有助于改善大豆产量表现和环境适应能力。张之昊等^[26]利用构建的F₂群体,基于BSA-seq方法将大豆多小叶基因定位到11号染色体上,并在定位区间内确定了6个候选基因。以上研究表明利用BSA法能够有效的定位到大豆理想株型相关性状的遗传位点,为大豆理想株型分子标记辅助育种提供理论基础,并加快育种进程。

2.2 生育期

大豆是光周期敏感的高温短日照作物,但是大豆的种植纬度范围很广,从中国东北等高纬度地区到南美洲等热带地区均有种植。开花时间和成熟期是决定了其对所在地区的适应能力,并且是影响大豆产量和品质的重要因素。生态适应性是由控制开花和成熟的主要基因位点和数量性状位点的遗传变异决定的。孙天宇^[27]将Harosoy与BR121杂交得到F₂,利用BSA法在分子标记ID10403处定位到了与大豆开花期紧密相关的位点,并预测该位点与大豆生育期基因 *E2* 紧密相关。Watanabe等^[28]利用RAD-seq和BSA相结合的方法,在来自日本大豆品种间杂交的分离群体中确定了影响开花时间的QTL,通过比较F₃分离群体早花和晚花群体的基因频率,分别在Gm10和Gm04上定位到一个QTL。Lv等^[29]利用基于下一代重测序的BSA法,定位了两个与长童期性状相关的QTL,命名为LJ32和LJ18,并通过基于标记的经典基因定位方法将它们进一步定位到229 kb和301 kb的两个区间内,转基因分析表明,LJ32和LJ18两个基因座可能与PRR基因 *Time of Flowering 11 (Tof11)* 和 *Glyma.18g298800* 有关。通过定位生育期相关性状的遗传位点,为大豆适应多环境生长以及分子育种提供了重要的理论支撑。

2.3 籽粒和荚果性状

大豆籽粒和荚果性状既影响大豆产量,又影响着商品性。百粒重、荚粒数、结荚率等是大豆产量构成的重要因素。王娟等^[30]开发了更适合利用BSA-seq进行遗传定位的PyBSASeq算法,以构建的RIL群体为材料,挖掘到了11个与大豆百粒重紧密关联的位点,通过后期的表达分析和单倍型分析,获得了两个候选基因 *Glyma.02g075000* 和 *Glyma.04g082500*。陈静静等^[31]利用构建的F₂和F₃群体,采用BSA法检测到5个与大豆籽粒硬实性相

关的QTL。Xie等^[32]以构建的大豆染色体片段置换系为基础,利用QTL-seq法定位3个与大豆两粒角果长度相关的QTL和5个与宽度相关的QTL,在重叠的定位区域通过单倍型分析确定了候选基因 *Glyma.11g051600*。

在农业生产中,农民对大豆的种皮颜色、脐色以及荚色等性状有着其特别的偏好,因此深入研究这些性状的理论基础,有利于大豆高产育种以及后期品种的推广。宋健^[33]利用GWAS和BSA相结合的方法,鉴定了4个与大豆种皮颜色相关的遗传位点,并通过精细定位将 *qSCI* 定位到52 kb区域内。郁晓敏等^[34]利用构建的F₂群体,采用SLAF-seq结合BSA方法,定位到了8个与种皮颜色紧密相关的位点,通过后期的基因功能注释,确定了4个候选基因为 *Glyma.05g005600*、*Glyma.05g009700*、*Glyma.12g006100* 和 *Glyma.12g047300*。利用BSA法定位大豆籽粒和荚果性状的遗传位点将能够为大豆高产育种提供重要理论基础。

3 BSA在大豆抗逆性状中的研究进展

3.1 非生物胁迫

非生物胁迫主要包括盐碱、干旱、荫蔽等,严重影响大豆产量。前人们利用BSA技术定位到了大量与大豆抗逆相关的位点。Guo等^[35]利用高耐盐性野生大豆种质资源NY36-87构建了两个F_{2,3}定位群体,采用SSR标记结合BSA法,分别在第3和18号染色体上定位到两个耐盐位点,并通过进一步验证实验确定了候选基因 *GmSALT3* 和 *GmSALT18*。郑宪彪^[36]利用吉育47与3个耐盐突变体分别构建了F₂群体,并发现后代耐盐表型分离比为3:1,表明3个突变体是由单一隐性基因控制,并利用BSA测序分析,定位了大豆耐盐基因候选区间。李玉卓^[37]利用DA22与合农85杂交获得的包含375个单株的F₂群体,结合QTL-seq、转录组以及变异鉴定技术体系筛选到了2个与大豆耐盐性相关的基因。2022年国家大豆品种试验实施方案中增加了黄淮海滨海盐碱区组,因此要将大豆耐盐性基因定位与常规育种相结合,培育耐盐大豆新品种,为大豆生产提质扩面奠定品种基础。

大豆-玉米带状复合种植技术在保证单位面积玉米基本不减产的情况下,多增加一茬大豆的收入,是稳玉米、扩大豆的有效途径。荫蔽胁迫是制约该种植模式推广的主要因素之一。曾维英等^[38]利用强耐荫材料矮脚早和极不耐荫材料齐佩华杂

交构建的RIL群体,基于BSA-Seq法在1、4、9、18号染色体定位到与大豆耐荫性相关的位点,并通过基因功能注释筛选到5个候选基因,有助于后期分子标记的开发和强耐荫大豆品种的选育。

3.2 生物胁迫

病虫害引起的生物胁迫会导致大豆产量降低、品质受损。因此,研究大豆对非生物胁迫的应答机制对于大豆病虫害预防和抗性育种具有重要意义。BSA分析已经在大豆花叶病毒和疫霉根腐病相关基因、锈病抗性相关基因等大豆病害抗性相关基因的挖掘中得到应用。大豆花叶病毒病是大豆主要的病害之一,严重发生可导致大豆产量降低和品质下降。Li等^[39]采用SSR标记和BSA结合的方法,进行大豆抗花叶病毒初定位,发现5个SSR标记 Sat_297、Sat_234、Sat_154、Sct_033 和 Sat_120 与大豆SC14菌株抗性基因紧密连锁。Wang等^[40]利用BSA定位到5个SSR标记 Satt_534、Satt_063、Satt_424、Satt_726 和 Satt_687 与大豆SC4菌株抗性基因紧密连锁,并通过精细定位和验证筛选到了3个候选基因 *Glyma.14g385100*、*Glyma.14g385600* 和 *Glyma.14g385800*。贾慧颖^[41]利用科丰1号和南农1138-2构建的427个RIL群体,基于BSA-seq方法对Rsc3进行初定位,并通过进一步抗性遗传分析和精细定位筛选到了3个抗病基因 *Glyma.02g100000*、*Glyma.02g105900* 和 *Glyma.02g097400*。

大豆疫霉根腐病是限制大豆生产最主要的土壤传播疾病,前人们利用BSA技术对疫霉根腐病抗性基因进行了大量初定位。Sun等^[42]利用抗疫霉根腐病材料南农10-1与感病材料06-070583杂交得到的231个F₂单株作图群体对*Rps*基因进行了定位。F₂的分离符合3:1的抗感比例,表明南农10-1的抗性是由单个显性基因控制的,命名为*RpsJS*。使用BSA法,18号染色体(MLG G)上的两个SSR标记 Satt472 和 Sat_117 在南农10-1和06-070583之间以及后代中抗性个体和感病个体之间表现出多态性。连锁分析表明,*RpsJS*与这两个SSR标记连锁,并通过进一步分析将*RpsJS*定位到 BArCSOYSSr_18_1859 和 BArCSOYSSr_18_1864之间。Zhang等^[43]利用抗病品种皖豆15与感病品种Williams杂交,通过对102个F_{2,3}家系的大豆疫霉菌株PsMC1进行抗性鉴定,发现皖豆15号的抗性为显性单基因控制,利用BSA分析发现,17号染色体上的26个SSR标记与抗病基因连锁,标记 Sittwd15-24/25 和 Sittwd15-47 分别位于抗性基因两侧,并将该抗性基因命名为*Rps10*。

Ping 等^[44]利用抗病品种 PI 594527 与感病品种 Williams 杂交获得的 58 个 F₂ 单株, 研究大豆对疫霉根腐病的抗性遗传规律。利用包含 7039 个 SNP 标记的 SNP 芯片进行 BSA 分析, 初步将 *Rps11* 基因定位到 7 号染色体开始处一个 5 Mb 的基因组区域, 通过进一步基因分型, 将 *Rps11* 定位到一个 225.3 kb 的基因组区域。Chen 等^[45]对抗病品种 PI340029 与感病品种 Williams 杂交产生的 F₂ 群体的分析发现, 疫霉病抗性是由一个名为 *Rps14* 的单基因控制的, 该基因最初通过 BSA 定位到 3 号染色体短臂上的 4.5 cM 区域, 随后利用 F_{3:4} 家系将其缩小到 1.48 cM 区域。

大豆锈病是由豆薯层锈菌引起的病害, 与化学药物防治相比, 抗锈病品种的培育可以减少病害造成的损失, 而且不会产生杀菌剂的使用费用和环境负面影响。抗锈资源筛选、抗锈基因的挖掘及相关分子标记的开发是开展抗病育种和抗病机理研究的基础。Vuong 等^[46]构建了感病种质 Williams 82 与抗病种质 DT 2000 的 F_{6,7} 重组自交系群体, 利用大豆 SNP 和 SSR 标记进行批量分离分析, 在 6 号染色体 *Rpp3* 位点附近发现了 4 个 BARC_SNP 标记。Bhor 等^[47]以感病品种 NRC7 和抗病品种 EC241780 杂交得到的 F₂ 群体为材料, 利用 25 个 SSR 标记进行 BSA 分析。其中, SCT 187、SSR 1859、Sat 191 和 Sat 215、Sat_361 等 5 个多态 SSR 标记可区分抗病群体和感病群体。赵胜^[48]利用感病品种天隆 1 号、中豆 40 及蒲豆 11 分别与抗锈亲本 SX6907 杂交, 构建了 3 个 F₂ 群体。利用 BSA 法, 进行抗病性多态性筛选及标记连锁分析, 结果发现 18 号染色体上 *Rpp1* 位点标记与抗锈性状连锁。通过进一步分析将抗锈基因定位在标记 BARCSOYSSR_18_1856 和 BARCSOYSSR_18_1864 之间, 且该结果在 3 个群体中均能被检测到。

在大豆生长过程中, 虫害的出现会对大豆的产量和质量产生较大影响。大豆的虫害主要包括蚜虫、卷叶螟、胞囊线虫等。BSA 分析已经在卷叶螟、胞囊线虫等虫害抗性相关基因定位中得到应用。曾维英等^[49]以高抗豆卷叶螟大豆品种赶泰-2-2 和高感豆卷叶螟材料皖 82-178 杂交获得的 F₂ 群体, 利用 BSA 法, 分别在 7、16、18 号染色体上定位到 3 个置信区间, 并结合转录组数据初步定位到了 12 个候选基因。Shaibu 等^[50]基于下一代测序的 BSA 法来定位大豆抗胞囊线虫小种 4 (SCN4) 的基因, 在 11 号染色体定位到与 SCN4 抗性相关的基因组区域 (命

名为 *Rhg1-paralog*), 对该区域的两个候选基因 (*GmPLAC8* 和 *GmSNAP11*) 的过表达和 RNA 干扰分析表明, 只有 *GmSNAP11* 对 SCN4 抗性有显著影响。Schuster 等^[51]利用 BSA 法对 SCN14 号生理小种的抗性 QTL 进行定位, 在 BC₃F_{2,3} 群体中鉴定出 4 个 SSR (Satt082、Sat_001、Satt574 和 Satt301) 和 4 个 RAPD (OpaA-11795、OPae-08837、Opr-07548 和 OPy-072030) 标记, 利用这些标记在 F_{2,3} 家系中扩增, 这些标记被定位到一个占 SCN14 号小种抗性 40% 以上的基因座上。

目前化学防治是控制大豆病虫害的主要手段, 杀菌剂和杀虫剂的使用增加了农民的种植成本, 且对环境产生的负面影响是不可逆的。抗病虫害品种的选育可以有效地解决上述问题, 利用 BSA 可以快速开发相关抗性的分子标记或者定位相关的基因位点, 同时加快大豆抗病虫害分子标记辅助选择 (MAS) 育种。

4 BSA 在大豆雄性不育中的研究进展

大豆是典型的光敏感自花授粉作物, 花器官小, 人工杂交困难, 且成功率低; 不同地理来源品种常因花期不遇进一步限制了品种间的基因交流, 导致大豆育成品种遗传基础狭窄, 遗传改良进度缓慢。利用雄性不育突变体可用于构建异交群体, 而且可以利用大豆细胞质雄性不育进行三系法杂交育种, 雄性不育系的利用拓宽了大豆育种遗传基础, 具有重要的基础研究和育种应用价值。

近年来, 研究者利用 BSA 法对大豆雄性不育基因、不育恢复基因、不育恢复抑制基因进行了定位。李永宽等^[52]利用细胞质雄性不育系 JLCMS89A 与恢复系 JLR92 构建的 BC₁ 群体, 基于高通量测序利用 BSA 法对大豆恢复抑制基因进行了定位, 并利用 SSR 标记进行了分子标记验证。结果发现, 大豆的恢复抑制性状是由一个显性基因 *Rf-1* 控制的, 并将此基因定位到第 9 号染色体末端 1.5 Mb 区间内。郭凤兰等^[53]利用 BSA 法将雄性不育育性恢复基因 *GmRfl* 定位到第 16 号染色体上, 并通过多态性分析和精细定位, 将 *GmRfl* 定位到 16 号染色体 32708896 bp ~ 32932950 bp 之间。贾顺耕等^[54]基于高通量测序利用 BSA 法在第 9 号染色体上定位到一个新的雄性不育育性恢复基因位点 *Rf3*。大豆雄性不育突变体 ms-1 已被广泛用于大豆育种中的轮回选择, Nadeem 等^[55]基于 SLAF_BSA 测序将雄性不育 *MS1* 基因定位在第 13 号染色体上 16.15 kb 的区

域。与可育植物中的相同区域相比,该突变区域缺少一个约 38.7 kb 的序列,最终将 NACK2 的同源基因 *GmMs1* 作为候选基因,通过检测 CRISPR/Cas9 基因编辑技术产生的 *GmMs1* 基因敲除突变体来证实了其功能。Fang 等^[56]以 ms1 两个等位突变体 ms1-2 (Ames) 和 ms1-3 (Urbana) 分别与 Jilin20 (JL20) 和 Jilin21 (JL21) 构建的两组 BC₃F₂ 高世代回交群体为研究对象,利用 BSA-seq 分析将候选基因初步定位于 13 号染色体上,进一步精细定位将候选区间缩小到 182 kb。雄性不育基因及育性恢复基因的克隆有利于大豆育种过程中遗传基础的拓宽,加快遗传改良的进程,将为轮回选择群体的构建以及大豆第三代智能核不育系统的建立提供重要技术支持。

5 问题与展望

5.1 NGS 背景下 BSA 的机遇与挑战

在下一代测序(NGS)应用之前,基于遗传分离群体构建遗传图谱是 QTL 定位的主要方法。随着 NGS 成本的不断降低以及第三代测序(PacBio 或 Nanopore 测序)和 Hi-C 技术的广泛应用,小麦、水稻、玉米、大豆等大田作物参考基因组已逐步发布,

从而为基于 NGS 的 BSA 法基因定位奠定了坚实的基础。BSA 方法是基于通过对 DNA 序列差异进行比较,能够快速高效地定位与特定性状相关的基因,具有时间和空间上的优势。同时,NGS 技术的不断完善和普及,为 BSA 方法提供了更高效、更精准的数据支持。

虽然目前 BSA 法在大豆 QTL 定位中得到了广泛的应用(表 1),但它主要集中在由主效基因控制的相对简单的性状上。对于由不同效应基因控制的数量性状,可以通过精确的表型分析,管理良好的试验来选择哪些性状可以通过 BSA 法进行 QTL 定位。对于由许多基因控制的复杂性状,每个基因的影响是微效的,而且环境的影响是显著的,BSA 尚不能作为整个群体分析的有效方法。同时,BSA 方法也存在一些问题,如:表型数据的准确性、样本数量、测序深度、测序覆盖度等多个因素影响 BSA 分析的准确性。此外,在选择亲本和分离群体、构建 DNA 池、筛选分子标记等方面也需要进行科学合理的设计和科学合理的操作。综上,BSA 方法虽然能够快速定位特定性状相关的基因,但是仍需要通过进一步的验证和功能分析来确定候选基因的作用机制和应用前景。

表 1 利用 BSA 进行遗传定位研究的大豆重要性状

Table 1 BSA-Seq based genetic mapping of soybean important traits

性状 Traits	遗传位点 Genetic locus	候选基因 Traget gene	群体大小 Population size	混池大小 Bulk size	参考文献 Reference
株高 Plant height	—	<i>Glyma.03g230000, Glyma.04g065600, Glyma.04g227700</i>	147	20	[16]
	<i>sdf-1</i>	<i>Glyma.19g194800, Glyma.19g194500, Glyma.19g195200</i>	213	40	[17]
	—	<i>Glyma.04g251900, Glyma.16g156700</i>	208	30	[18]
	<i>Gmlim1</i>	<i>Glyma.13g287600, Glyma.13g288000</i>	432	50	[19]
	—	<i>Glyma.13g249400</i>	349	20	[20]
底荚高 First pod height	—	<i>Glyma.04g162700, Glyma.04g163400, Glyma.04g163900, Glyma.19g185200, Glyma.19g185700</i>	208	30	[21]
主茎节数 Numbers of main stem	—	<i>Glyma.04g162400, Glyma.04g162500, Glyma.04g162600, Glyma.04g162700, Glyma.04g162800</i>	102	30	[22]
叶柄长度 Length of petioles	—	<i>Glyma.03g128600</i>	509	30	[23]
	<i>lps3</i>	—	187	15	[24]
二列状互生叶序 Distichous alternate phyllotaxis	—	—	1831	30	[25]
多叶 Multifoliolate leaf	—	<i>Glyma.11g027100, Glyma.11g034100, Glyma.11g040200, Glyma.11g043100, Glyma.11g045200, Glyma.11g083800</i>	239	10	[26]

表 1 (续)

性状 Traits	遗传位点 Genetic locus	候选基因 Traget gene	群体大小 Population size	混池大小 Bulk size	参考文献 Reference
开花期 Flowering time	—	—	155	12	[28]
	—	<i>Glyma.18g298800</i>	213	30	[29]
百粒重 100-seed weight	—	<i>Glyma.02g075000, Glyma.04g082500</i>	149	30	[30]
种子硬实性 Hard seededness	—	—	203	20	[31]
荚果长度 Pod length	—	<i>Glyma.11g051600</i>	—	30	[32]
种皮颜色 Seed coat color	<i>qSCI</i>	—	171	20	[33]
	—	<i>Glyma.05g005600, Glyma.05g009700, Glyma.12g006100, Glyma.12g047300</i>	129	9	[34]
耐盐 Salt tolerance	—	<i>GmSALT3, GmSALT18</i>	649	20	[35]
	—	—	1022	20	
	—	—	—	30	[36]
	—	<i>Glyma.02g304700</i>	375	15	[37]
耐荫 Shade tolerance	—	—	462	30	[38]
抗大豆花叶病毒 Resistance to soybean mosaic virus	<i>R_{SCI4}</i>	—	—	—	[39]
	<i>R_{SC4}</i>	<i>Glyma.14g385100, Glyma.14g385600, Glyma.14g385800</i>	1047	12	[40]
	<i>R_{SC3}</i>	<i>Glyma.02g100000, Glyma.02g105900, Glyma.02g097400</i>	427	20	[41]
抗疫霉根腐病 Resistance to phytophthora	<i>RpsJS</i>	<i>Glyma.18g519300, Glyma.18g519500, Glyma.18g51960</i>	231	10	[42]
	<i>Rps10</i>	—	102	10	[43]
	<i>Rps11</i>	—	58	10	[44]
	<i>Rps14</i>	—	110	9	[45]
抗锈病 Resistance to soybean rust	<i>Rpp3</i>	—	250	10	[46]
	<i>Rpp1b, Rpp2</i>	—	110	20	[47]
	<i>Rpp6907</i>	—	118	15	[48]
抗豆卷叶螟 Resistance to bean pyralid	—	—	303	30	[49]
抗孢囊线虫 Resistance to soybean cyst nematode	—	<i>GmSNAP11</i>	145	14	[50]
	—	—	126	20	[51]
雄性不育 Male sterility	<i>Rf-I</i>	—	66	20	[52]
	—	<i>GmRfl</i>	243	30	[53]
	<i>Rf3</i>	—	194	30	[54]
	—	<i>GmMs1</i>	892	—	[55]
	—	<i>Glyma.13g114200</i>	—	20	[56]

—: 原始文献中无相关信息描述

—: None valuable information was reported in the original literatures

5.2 BSA 助力实现快速精细定位

BSA 一般只能实现初步定位的目的, 若想继续确定候选基因则需要进一步精细定位, 后期需要结合分子遗传标记分型, 或是各个组学分析来实现精细定位目的基因。以下对结合 BSA 结果实现精细定位的方法进行了总结: (1) 结合传统 QTL 定位方法, 构建遗传图谱, 基于表型数据, 进行 QTL 定位, 与 BSA 结果相结合, 找到共定位区域。(2) 利用 BSA 定位的结果, 构建次级作图群体, 在目标区域内开发 SNP、InDel 或 KASP 分子标记, 通过扩大群体性状与分子标记的共分离缩小候选区间。(3) 结合现代组学, 例如结合 RNA-seq 结果, 在目标区域内选取具有显著差异表达的或某显著富集通路上的基因作为候选基因, 或者通过加权基因共表达网络分析 (WGCNA, weighted correlation network analysis) 挖掘关键作用的核心基因或基因模块。BSA 与 GWAS 相结合的方法在基因定位中也得到了广泛应用。(4) 根据 BSA 定位的结果, 结合已报道的相关性状的文献结果, 基于序列同源、基因的功能确定候选基因。实现精细定位的方法不局限于以上方法, 可以是多种方法的共同结合, 例如 BSA+GWAS+RNA-seq。由于构建的不同群体, 或者目标基因所在染色体位置, 都会影响重组事件频率, 因此没有固定的方法, 这需要根据定位结果与实际情况不断调整方案。

5.3 BSA 助力大豆分子标记辅助选择育种

分子标记辅助选择 (MAS) 育种是利用与目标性状密切相关的分子标记来辅助传统育种方法的一种遗传改良方式。MAS 育种的基本原理是利用已知的分子标记与目标性状之间的相关性, 来预测育种后代的表现情况, 并以此为依据进行杂交和选育。MAS 育种相对于传统育种方法, 具有更高的遗传育种效率、更快的育种进展速度、更少的资源消耗等优点。大豆 MAS 育种中, 常用的分子标记包括 SNP、SSR、AFLP 等, 这些标记广泛分布在大豆基因组中, 并且与大豆许多重要农艺性状相关。通过分析这些标记在不同品种中的多态性, 可以确定与目标性状紧密相关的标记, 并利用这些标记来筛选出具有优良性状的育种后代。BSA 为鉴定和开发重要农艺性状的标记提供了一条捷径, 除了最常用的基于 DNA 的标记外, RNA 和蛋白质分析的结果也可用于开发标记。随着 BSA 分析方法的不断完善, 根据 BSA 分析得到的结果去开发标记, 辅以进行大豆分子标记辅助育种, 将加快高产抗逆广适大豆的

选育进程, 促进我国大豆产业发展, 有力保障国家粮食安全。此外随着大豆基因编辑技术的不断完善, 利用 BSA 快速获得目标基因后, 进行精准编辑, 将极大推动大豆分子设计育种的进程。

参考文献

- [1] Zhang Y H, Liu M F, He J B, Wang Y F, Xing G N, Li Y, Yang S P, Zhao T J, Gai J Y. Marker-assisted breeding for transgressive seed protein content in soybean (*Glycine max*(L.) merr.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, 128 (6) : 1061-1072
- [2] 张玉芹, 陆翔, 李擎天, 陈受宜, 张劲松. 大豆品质调控基因克隆和功能研究进展. *中国农业科学*, 2016, 49(22):4299-4309
Zhang Y Q, Lu X, Li Q T, Chen S Y, Zhang J S. Recent advances in identification and functional analysis of genes responsible for soybean nutritional quality. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(22):4299-4309
- [3] Du H P, Fang C, Li Y R, Kong F J, Liu B H. Understandings and future challenges in soybean functional genomics and molecular breeding. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(2):468-495
- [4] Yang Z M, Huang D Q, Tang W Q, Zheng Y, Liang K J, Cutler A J, Wu W R. Mapping of quantitative trait loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes. *PLoS ONE*, 2013, 8 (7) : e68433
- [5] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(21):9828-9832
- [6] Stewart G C, Roeder A H K, Patrick S, Chris S, Wolfgang L, Hector C. A genetic screen for mutations affecting cell division in the *Arabidopsis thaliana* embryo identifies seven loci required for cytokinesis. *PLoS ONE*, 2016, 11(1):e0146492
- [7] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Cano L, Kamoun S, Terauchi R. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(2): 174-178
- [8] Li C S, Xiang X L, Huang Y, Zhou Y C, An D, Dong J Q, Zhao C X, Liu H J, Li Y B, Wang Q, Du C G, Messing J, Larkins B A, Wu Y R, Wang W Q. Long-read sequencing reveals genomic structural variations that underlie creation of quality protein maize. *Nature Communications*, 2020, 11(1):17
- [9] Shen Y T, Liu J, Geng H Y, Zhang J X, Liu Y C, Zhang H K, Xing S L, Du J C, Ma S S, Tian Z X. De novo assembly of a Chinese soybean genome. *Science China Life Sciences*, 2018, 1(8):871-884
- [10] Liu Y C, Du H L, Li P C, Shen Y T, Peng H, Liu S L, Zhou

- G A, Zhang H K, Liu Z, Shi M, Huang X H, Li Y, Zhang M, Wang Z, Zhu B G, Han B, Liang C Z, Tian Z X. Pan-genome of wild and cultivated soybeans. *Cell*, 2020, 82(1): 162-176
- [11] Zou C, Wang P X, Xu Y B. Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(10):1941-1955
- [12] Sun Y P, Wang J K, Crouch J H, Xu Y B. Efficiency of selective genotyping for genetic analysis of complex traits and potential applications in crop improvement. *Molecular Breeding*, 2010, 26(3):493-511
- [13] 王金陵. 东北地区大豆株型的演变. *大豆通报*, 1996(1):5-7
Wang J L. Evolution of soybean plant shape in northeast China. *Soybean Bulletin*, 1996(1):5-7
- [14] 盖钧镒. 大豆高产理想型群体生理基础的探讨. 南京:江苏科技出版社, 1990: 35-41
Gai J Y. Discussion on the physiological basis of soybean high yield ideal type population. Nanjing: Phoenix Science Press, 1990:35-41
- [15] Liu S L, Zhang M, Feng F, Tian Z X. Toward a "Green Revolution" for soybean. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 688-697
- [16] 张久坤, 齐阳阳, 李立竹, 宁晓霜, 刘志华, 姜振峰, 李文滨. 利用BSA法定位大豆全基因组株高QTL及候选基因分析. *华北农学报*, 2020, 35(S1):1-10
Zhang J K, Qi Y Y, Li L Z, Ning X S, Liu Z H, Jiang Z F, Li W B. Genome-wide mapping of QTLs and candidate genes underlying plant height in soybean using BSA method. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2020, 35(S1):1-10
- [17] Dong Z M, Chen L, Li Z, Liu N X, Zhang S C, Liu J, Liu B Q. Identification and molecular mapping of the semi-dwarf locus (*sdf-1*) in soybean by SLAF-seq method. *Euphytica*, 2020, 216(6):103
- [18] Li R C, Jiang H W, Zhang Z G, Zhao Y Y, Xie J G, Wang Q, Zheng H Y, Hou L L, Xiong X, Xin D W, Hu Z B, Liu C Y, Wu X X, Chen Q S. Combined linkage mapping and BSA to identify QTL and candidate genes for plant height and the number of nodes on the main stem in soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 21(1):42
- [19] 唐宽强. *GmLIM1* 基因调控大豆株高的分子机制. 北京: 中国科学院大学, 2020
Tang K Q. Molecular mechanism of *GmLIM1* gene regulation of soybean plant height. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2020
- [20] Zhang X L, Wang W B, Guo N, Zhang Y Y, Bu Y P, Zhao J M, Xing H. Combining QTL-seq and linkage mapping to fine map a wild soybean allele characteristic of greater plant height. *BMC Genomics*, 2018, 19(1):226
- [21] 赵圆圆, 李瑞超, 蒋洪蔚, 王乔, 谢建国, 刘春燕, 武小霞, 陈庆山. 大豆底荚高度QTL定位及候选基因挖掘. *中国油料作物学报*, 2020, 42(1): 51-60
Zhao Y Y, Li R C, Jiang H W, Wang Q, Xie J G, Liu C Y, Wu X X, Chen Q S. QTL mapping and candidate gene mining for first pod height in soybean. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2020, 42(1): 51-60
- [22] 杨玉花, 白志元, 卫保国, 雷阳, 张瑞军. 基于BSA和SLAF-Seq技术对大豆主茎节数QTL精细定位. *核农学报*, 2021, 35(9): 1953-1963
Yang Y H, Bai Z Y, Wei B G, Lei Y, Zhang R J. Fine mapping of node numbers on the main stem QTLs in soybean based on BSA and SLAF-Seq. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(9): 1953-1963
- [23] Wang X, Liu C K, Tu B J, Li Y S, Chen H, Zhang Q Y, Liu X B. Characterization on a novel rolled leaves and short petioles soybean mutant based on Seq-BSA and RNA-seq analysis. *Journal of Plant Biology*, 2022, 65:261-277
- [24] Jun T H, Kang S T, Van D A E. Genetic map of *lps3*: A new short petiole gene in soybeans. *Genome*, 2012, 55(2):140-146
- [25] 徐唯佳, 路锦, 高慧慧, 万明月, 李佳佳, 苗龙, 王晓波, 邱丽娟. 栽培大豆二列状互生叶序基因初步定位. *大豆科学*, 2021, 40(4):457-465
Xu W J, Lu J, Gao H H, Wan M Y, Li J J, Miao L, Wang X B, Qiu L J. Mapping of distichous alternate phyllotaxis gene in cultivated soybean. *Soybean Science*, 2021, 40(4):457-465
- [26] 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
- [27] 孙天宇. 大豆开花期相关数量性状位点(QTL)的定位. 北京: 中国科学院大学, 2017
Sun T Y. Quantitative trait loci mapping on flowering time of soybean. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2017
- [28] Watanabe S, Tsukamoto C, Oshita T, Yamada T, Anai T, Kaga A. Identification of quantitative trait loci for flowering time by a combination of restriction site-associated DNA sequencing and bulked segregant analysis in soybean. *Breeding Science*, 2017, 67(3):277-285
- [29] Lv T X, Wang L S, Zhang C Y, Liu S, Wang J X, Lu S J, Fang C, Kong L P, Li Y L, Li Y G, Hou X L, Liu B H, Kong F J, Li X M. Identification of two quantitative genes controlling soybean flowering using bulked-segregant analysis and genetic mapping. *Frontiers Plant Science*, 2022, 13: 987073
- [30] 王娟, 张彦威, 焦铸锦, 刘盼盼, 常玮. 利用PyBSASeq算法挖掘大豆百粒重相关位点与候选基因. *作物学报*, 2022, 48(3): 635-643
Wang J, Zhang Y W, Jiao Z J, Liu P P, Chang W. Identification of QTLs and candidate genes for 100-seed weight trait using PyBSASeq algorithm in soybean. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(3): 635-643

- [31] 陈静静, 刘谢香, 于莉莉, 卢一鹏, 张嗣天, 张昊辰, 关荣霞, 邱丽娟. 利用BSA法发掘野生大豆种子硬实性相关QTL. 中国农业科学, 2019, 52(13): 2208-2219
Chen J J, Liu X X, Yu L L, Lu Y P, Zhang S T, Zhang H C, Guan R X, Qiu L J. QTL mapping of hard seededness in wild soybean using BSA method. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(13): 2208-2219
- [32] Xie J G, Wang Q, Zhang Z G, Xin X, Yang M L, Qi Z M, Xin D W, Zhu R S, Sun M M, Dong X H, Jiang H W, Chen Q S. QTL-seq identified QTLs and candidate genes for two-seed pod length and width in soybean (*Glycine max*). *Plant Breeding*, 2021, 140(3): 1-11
- [33] 宋健. 大豆种皮色相关基因的图位克隆及功能解析. 北京: 中国农业科学院, 2019
Song J. Map-based cloning and functional analysis of genes controlling seed coat color in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019
- [34] 郁晓敏, 金杭霞, 杨清华, 傅旭军, 郭丹丹, 吕晓男, 袁凤杰. 利用SLAF-seq结合BSA方法发掘大豆种皮色相关基因. 分子植物育种, 2021, 19(2): 385-391
Yu X M, Jin H X, Yang Q H, Fu X J, Guo D D, Lv X N, Yuan F J. Mapping of soybean genes related to seed-coat color using SLAF-seq and BSA methods. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(2): 385-391
- [35] Guo X Y, Jiang J H, Liu Y, Yu L L, Chang R Z, Guan R X, Qiu L. Identification of a novel salt tolerance-related locus in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.). *Frontiers Plant Science*, 2021, 12: 791175
- [36] 郑宪彪. 大豆突变体耐盐表型鉴定及耐盐基因定位群体遗传分析. 泰安: 山东农业大学, 2020
Zheng X B. Identification of salt tolerance phenotype of soybean mutants and population genetic analysis of salt tolerance gene mapping. Taian: Shandong Agricultural University, 2020
- [37] 李玉卓. 大豆耐盐碱性快速鉴定方法的建立及耐盐碱基因的初步挖掘. 北京: 中国科学院大学, 2021
Li Y Z. Establishment of a rapid screening protocol for identification of saline-alkali tolerance and preliminary cloning of genes underlying saline-alkali tolerance in soybean. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2021
- [38] 曾维英, 苏燕竹, 赖振光, 杨守臻, 陈怀珠, 谭玉荣, 孙祖东, 盖钧镒. 基于BSA-Seq技术鉴定大豆耐荫性状相关候选基因. 中国油料作物学报, 2021, 43(6): 1006-1015
Zeng W Y, Su Y Z, Lai Z G, Yang S Z, Chen H Z, Tan Y R, Sun Z D, Gai J Y. Identification of candidate gene controlling shade-tolerant by BSA-Seq in soybean. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2021, 43(6): 1006-1015
- [39] Li H C, Zhi H J, Gai J Y, Guo D Q, Wang Y W, Li K, Bai L, Yang H. Inheritance and gene mapping of resistance to soybean mosaic virus strain sc14 in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48 (12): 1466-1472
- [40] Wang D G, Ma Y, Liu N, Yang Z L, Zheng G J, Zhi H J. Fine mapping and identification of the soybean R_{SC4} resistance candidate gene to soybean mosaic virus. *Plant Breeding*, 2011, 13(6): 653-659
- [41] 贾慧颖. 大豆对大豆花叶病毒抗病位点 R_{SC3} 的定位及候选基因分析. 南京: 南京农业大学, 2019
Jia H Y. Localization and candidate gene prediction of the locus R_{SC3} resistant to soybean mosaic virus in soybean. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019
- [42] Sun J T, Li L H, Zhao J M, Huang J, Yan Q, Xing H, Guo N. Genetic analysis and fine mapping of $RpsJS$, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 124(4): 913-919
- [43] Zhang J Q, Xia C J, Duan C X, Sun S L, Wang X M, Wu X F, Zhu Z D. Identification and candidate gene analysis of a novel phytophthora resistance gene $RpsI0$ in a Chinese soybean cultivar. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69799
- [44] Ping J Q, Fitzgerald J C, Zhang C B, Lin F, Bai Y H, Wang D C, Aggarwal R, Rehman M, Crasta O, Ma J X. Identification and molecular mapping of $RpsI1$, a novel gene conferring resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(2): 445-451
- [45] Chen L Y, Wang W D, Ping J Q, Fitzgerald J C, Cai G H, Clark C B, Aggarwal R, Ma J. Identification and molecular mapping of $RpsI4$, a gene conferring broad-spectrum resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(12): 3863-3872
- [46] Vuong T D, Walker D R, Nguyen B T, Nguyen T T, Dinh H X, Hyten D L, Cregan P B, Sleper D A, Lee J D, Shannon J G, Nguyen H T. Molecular characterization of resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd.) in soybean cultivar DT 2000 (PI 635999). *PLoS ONE*, 2016, 11 (12): e0164493
- [47] Bhor T J, Chimote V P, Deshmukh M P. Molecular tagging of Asiatic soybean rust resistance in exotic genotype EC 241780 reveals complementation of two genes. *Plant Breeding*, 2015, 134(1): 70-77
- [48] 赵胜. 大豆种质SX6907抗锈性状遗传及基因定位研究. 北京: 中国农业科学院, 2016
Zhao S. Genetic and mapping of resistance gene to rust in soybean germplasm SX6907. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016
- [49] 曾维英, 赖振光, 孙祖东, 杨守臻, 陈怀珠, 唐向民. 基于BSA-Seq和RNA-Seq方法鉴定大豆抗豆卷叶螟候选基因. 作物学报, 2021, 47(8): 1460-1471
Zeng W Y, Lai Z G, Sun Z D, Yang S Z, Chen H Z, Tang X M. Identification of the candidate genes of soybean resistance to bean pyralid (*Lamprosema indicata* Fabricius) by BSA-Seq and RNA-Seq. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(8): 1460-1471
- [50] Shaibu A S, Zhang S R, Ma J K, Feng Y, Huai Y Y, Qi J, Li

- J, Abdelghany A M, Azam M, Htway H T P, Sun J M, Li B. The *GmSNAP11* contributes to resistance to soybean cyst nematode race 4 in *Glycine max*. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:939763
- [51] Schuster I, Abdelnoor R V, Marin S, Carvalho V, Kiihl R, Silva J, Sedyama C, Barros E, Moreirae M. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102(1):91-96
- [52] 李永宽, 张井勇, 赵国龙, 李蓉, 林春晶, 赵丽梅, 彭宝, 张春宝. 大豆RN型细胞质雄性不育育性恢复抑制基因 *Rf-I* 的遗传分析与定位. *农业生物技术学报*, 2020, 28(5): 761-770
- Li Y K, Zhang J Y, Zhao G L, Li R, Lin C J, Zhao L M, Peng B, Zhang C B. Genetic analysis and mapping of *Rf-I*, an inhibitor of fertility restorer gene for CMS-RN in soybean (*Glycine max*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(5): 761-770
- [53] 郭凤兰, 林春晶, 王鹏年, 杨绪磊, 吴铮, 彭宝, 赵丽梅, 张春宝. 大豆细胞质雄性不育恢复基因 *GmRf1* 的精细定位. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(2): 518-526
- Guo F L, Lin C J, Wang P N, Yang X L, Wu Z, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Fine mapping of a restorer-of-fertility gene *GmRf1* for the cytoplasmic male sterility in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2): 518-526
- [54] 贾顺耕, 郭凤兰, 林春晶, 孙妍妍, 张颖, 雷蕾, 彭宝, 赵丽梅, 张春宝. 大豆细胞质雄性不育育性恢复基因 *Rf3* 的定位. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(5):1411-1417
- Jia S G, Guo F L, Lin C J, Sun Y Y, Zhang Y, Lei L, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Mapping of fertility restorer gene *Rf3* of cytoplasmic male sterility in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(5):1411-1417
- [55] Nadeem M, Chen A D, Hong H L, Li D D, Li J J, Zhao D, Wang W, Wang X B, Qiu L J. *GmMs1* encodes a kinesin-like protein essential for male fertility in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(6):1054-1064
- [56] Fang X L, Sun X Y, Yang X D, Li Q, Lin C J, Xu J, Gong W J, Wang Y F, Liu L, Zhao L M, Liu B H, Qin J, Zhang M C, Zhang C B, Kong F J, Li M N. *MS1* is essential for male fertility by regulating the microsporocyte cell plate expansion in soybean. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(9):1533-1545