

# 两种施氮条件下大豆品质性状QTL分析

苏代群<sup>1</sup>, 景琦<sup>2</sup>, 刘春青<sup>2</sup>, 肖长文<sup>1</sup>, 张时轶<sup>1</sup>

<sup>1</sup>黑龙江省种业技术服务中心, 黑龙江 哈尔滨

<sup>2</sup>全国农业技术推广服务中心, 北京

Email: sudaiqun@163.com

收稿日期: 2021年8月25日; 录用日期: 2021年9月20日; 发布日期: 2021年9月27日

## 摘要

大豆是全球范围内食用蛋白和食用油脂的主要来源, 同时也是动物饲料蛋白的最为重要的来源。大豆生长过程中, 氮素的缺乏会严重影响大豆生长和发育, 进而影响大豆产量和品质。目前关于氮素对大豆产量和品质的影响, 已经有了大量研究报道, 但是缺乏不施氮处理下大豆品质性状QTL分析的相关报道。本研究利用杂交组合“东农L13 × 黑河36”、“东农L13 × 合农60”衍生的两个重组自交系群体RIL3613和RIL6013为材料, 在哈尔滨、阿城和双城3个地点进行正常施用氮肥和不施用氮肥两种条件种植, 对大豆品质性状进行加性和上位性QTL定位, 并对各性状进行氮肥响应QTL定位和候选基因预测, 旨在剖析不同氮肥水平下大豆品质性状的遗传基础, 发掘相关基因位点, 为不同氮肥施用条件下的大豆分子设计育种提供技术和理论支撑, 在RIL3613和RIL6013群体中共检出4个蛋白质含量加性QTL、2个油分含量加性QTL, 单个加性QTL可解释0.20%~8.70%、7.23%~7.50%的表型变异。其中有1个油分含量加性QTL是新发现的。在RIL3613和RIL6013群体中共检出4对蛋白质含量上位性QTL, 上位性QTL可解释4.04%~5.50%的表型变异。在RIL3613和RIL6013群体中共检出2个蛋白质含量氮肥响应QTL, 单个氮肥响应QTL可解释8.88%~12.49%的表型变异, 均是新发现的。利用SoyBase在线程序获得的标记信息, 在4个一致QTL区间中, 利用GO和KEGG数据库对1215个候选基因进行了筛选和注释。KEGG通路中, Ko04075参与植物激素信号转导途径, 包括赤霉素、生长素、脱落酸等激素, 在调节茎生长、植物生长和种子发育方面起着重要作用。基于Pathway分析和功能注释, 最终鉴定出15个候选基因, 被注释为囊泡转运v-SNARE家族蛋白基因、带有beta亚基和-2亚基基因的协同分子、SAUR样生长素应答蛋白家族基因、蔗糖非发酵相关蛋白激酶(SnRK)等, 均是植物产量和品质形成等多种发育途径所必需的。

## 关键词

大豆, 品质性状, QTL分析

## QTL Analysis of Soybean Quality Traits under Two Nitrogen Application Conditions

Daiqun Su<sup>1</sup>, Qi Jing<sup>2</sup>, Chunqing Liu<sup>2</sup>, Changwen Xiao<sup>1</sup>, Shiyi Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Heilongjiang Seed Industry Technology and Service Center, Harbin Heilongjiang

<sup>2</sup>National Agro-Tech Extension and Service Center, Beijing

Email: sudaiqun@163.com

Received: Aug. 25<sup>th</sup>, 2021; accepted: Sep. 20<sup>th</sup>, 2021; published: Sep. 27<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

Soybean is the main source of edible protein and edible oil worldwide, and the most important source of animal feed protein. In the process of soybean growth, nitrogen deficiency will seriously affect the growth and development of soybean, and then affect the yield and quality of soybean. At present, there have been a lot of research reports on the effects of nitrogen on soybean yield and quality, but there is a lack of related reports on QTL analysis of soybean quality traits under nitrogen application. In this study, two recombinant inbred lines (RIL3613 and RIL6013) derived from hybrid combinations "Dongnong L13 × Heihe 36" and "Dongnong L13 × Henong 60" were used as materials to plant under two conditions of normal application of nitrogen fertilizer and no application of nitrogen fertilizer at three locations in Harbin, Acheng and Shuangcheng. For soybean quality traits, additive and epistatic QTL mapping, QTL mapping and the various characters are nitrogen response and candidate gene prediction, which aims to analyze the genetic basis of soybean quality traits under different nitrogen levels, explore related gene loci, for different conditions of soybean nitrogen molecular design breeding to provide technical and theoretical support. Four additive QTLs for protein content and two additive QTLs for oil content were detected in RIL3613 and RIL6013 populations, and a single additive QTL could explain 0.20%~8.70% and 7.23%~7.50% of the phenotypic variation. One additive QTL for oil content was newly discovered. A total of 4 pairs of epistatic QTLs for protein content were detected in RIL3613 and RIL6013 populations, and epistatic QTLs could explain 4.04%~5.50% of the phenotypic variation. Two QTLs for nitrogen response to protein content were detected in RIL3613 and RIL6013 populations, and a single QTL for nitrogen response could explain 8.88%~12.49% of the phenotypic variation. Using the tagged information obtained by Soy Base online program, 1215 candidate genes were screened and annotated in four consistent QTL intervals using GO and KEGG databases. In the KEGG pathway, Ko04075 is involved in plant hormone signal transduction pathways, including gibberellin, auxin, abiotic acid and other hormones, and plays an important role in regulating stem growth, plant growth and seed development. Based on Pathway analysis and functional annotation, 15 candidate genes were identified, which were annotated as vesicle-transporter V-SNARE family protein gene, comolecule with Beta subunit and 2 subunit gene, SAUR like auxin response protein family gene, sucrose non-ferment-associated protein kinase (SnRK), etc. are necessary for many developmental pathways such as yield and quality formation.

## Keywords

Soybean, Quality Traits, QTL Analysis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

大豆是重要的油料作物，是榨油及优质饲料的重要原料。大豆籽粒含有丰富的优质食用蛋白，是植物蛋白的重要来源之一。大豆油以其营养均衡全面、口感风味佳等优势一直以来深受人们喜爱。大豆在氮素利用研究方面已有广泛报道，作为自身具有固氮功能的作物，大豆氮素供给、吸收及利用机制复杂，

进行深入研究具有很重要的实际意义。大豆在生长过程中,氮素的缺乏会严重影响大豆生长和发育,进而影响大豆的产量和品质。目前关于大豆氮素对品质的影响相关研究报道较少,缺乏氮素对大豆品质性状影响的分子研究机制。

大豆油分含量和蛋白质含量是重要的品质性状,目前许多关于大豆蛋白质含量和油分含量的 QTL 定位研究在国内外已有报道,并且已有超过 200 个位点被相继报道,广泛分布于大豆的 20 条染色体连锁群上。这些研究利用的作图群体不同,遗传背景具有较大差异,因此研究获得的 QTL 稳定性与重复性较差,仅能适用于特定遗传背景或杂交群体的分子辅助选择。现将关于大豆品质性状,主要包括油分含量及蛋白质含量 QTL 定位研究进展进行如下综述。

1992 年, Diers 等[1]利用 RFLP 标记对 *G. max* 和 *G. soja* 杂交构建  $F_{2,3}$  群体进行品质性状 QTL 分析,共定位了 9 个与油分含量、8 个蛋白质含量相关的 QTL。1999 年, Orf 等[2]在 4 个环境下定位了 6 个油分含量 QTL、5 个蛋白质含量 QTL,所用群体为 3 个重组自交系(RILs)群体,遗传标记为简单序列重复(SSR)标记和扩增片段长度多态性(AFLP)标记,亲本为“Minsoy、Noir1 和 Archer”三个,在两个群体中多数 QTL 只在一个群体中被检测到,不能在三个群体中同时被检测到。2013 年, Pathan 等[3]利用亲本组合为“Magellan × PI438489B”和“Magellan × PI567516C”衍生的两个重组自交系群体(RILs),以 900 个 SSR 和 SNP 标记为基础,在两个环境下检测到了 7 个蛋白质含量 QTL, 6 个油分含量 QTL, 其中有 2 个 QTL 可以同时控制两个性状, 分别分布在第 5 和第 6 号染色体上。2019 年, Karikari 等[5]基于一套高密度遗传图谱,共检测到了与大豆蛋白质含量和油分含量相关的 QTL 44 个,这 44 个 QTL 是在 6 个环境中被检测到的,有 15 个 QTL 是本研究首次发现的,其中 qOil-8-3、qPro-7-1、qOil-15-2 和 qOil-10-4 为多环境下检测到的稳定 QTL,贡献率均大于 10%,并在这 4 个物理区间内筛选出 111 个候选基因直接或间接参与种子蛋白质和油分生物合成或代谢过程,经过进一步 RNA-seq 分析,有 15 个潜在候选基因在种子发育阶段和根瘤期高表达。

近年来,关于大豆油分含量及蛋白质含量 QTL 定位研究中共获得了不同群体及遗传背景间存在的大量 QTL [8] [9],但不同群体间 QTL 稳定性与重复性还是相对较差,需要对众多 QTL 进行进一步整合分析及交互群体验证。本研究以前期创建的大豆重组自交系群体(RILs)为试验材料,在不同氮肥水平下,对大豆品质等相关性状进行了 QTL 定位及候选基因挖掘研究,为进一步开展不同氮肥水平下大豆品质形成的分子网络调控机制以及分子标记辅助选择奠定了理论基础和技术支撑。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 遗传群体

将东农 L13、黑河 36 和合农 60 配置为 2 个杂交组合(见表 1),分别为“东农 L13 × 黑河 36”和“东农 L13 × 合农 60”,  $F_2$  至  $F_6$  在哈尔滨(E128°, N45°)与海南崖城交叉种植,每个世代采用单粒传方法处理,在  $F_{2,6}$  将单株种成株行,在  $F_{2,7}$  剔除混杂株行,形成两个重组自交系群体,各包含 134 个和 156 个株系,分别简称 RIL3613 和 RIL6013。

**Table 1.** Quality traits of three parents in RIL3613 and RIL6013  
**表 1.** RIL3613 和 RIL6013 三个亲本的品质性状

亲本	蛋白质含量(PC)	油分含量(OC)
东农 L13	43.27	18.21
黑河 36	38.83	20.67
合农 60	41.40	21.12

## 2.2. 田间试验设计

田间试验于 2016 年在阿城(E1)、双城(E2)和哈尔滨(E3)三个地点同时进行, 将东农 L13、黑河 36 和合农 60 等 3 个亲本和 2 个 RIL (RIL3613 和 RIL6013)群体在田间种植。田间试验采取裂区设计, 主处理施氮肥处理, 副处理为 RIL 群体。氮肥施用包含两个水平, 一个为正常施氮肥(N<sub>+</sub>, 75 Kg N/ha、150 Kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha、75 Kg K<sub>2</sub>O/ha), 一个为不施氮肥(N<sub>-</sub>, 150 Kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha、75 Kg K<sub>2</sub>O/ha)。种植规格为三行区, 3 m 行长, 0.7 m 行距, 0.07 m 株间距, 两次重复[6]。田间管理同一般大田栽培。

## 2.3. 性状调查

对每个小区种子收获后, 在籽粒含水量达到干重的 10%左右时, 检测其蛋白质含量(PC)和油分含量(OC)。蛋白质和油分含量使用东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室的近红外谷物分析仪(FOSS 1241, 丹麦)进行检测, 该仪器的校正回归系数采用偏最小二乘法(Partial Least Square, PLS), 将光谱数据与实验室数据(Kjeldahl 方法)相结合计算籽粒中的蛋白质和油分含量, 结果以占籽粒重量百分比的形式描述。每个小区随机测定 3 次重复, 测定完成后, 计算出每份材料 3 次重复的平均值, 以此作为该小区的表型数据进行分析。

## 2.4. 遗传图谱的构建

从 2005 年的大豆公共图谱上初步挑选了 838 对 SSR 引物, 大豆公共图谱可在网站上查询(<http://www.soybase.org>), 利用筛选得到的 838 对 SSR 引物在 RIL3613 和 RIL6013 两个群体各自的亲本间进行多态性筛选, 最终在 RIL3613 群体中筛选出 156 对表现好的多态性引物, 在 RIL6013 群体中筛选出 137 对表现好的多态性引物。应用大豆 SSR 序列合成引物, 这些 SSR 序列是由 Soybase 网站提供的, 然后利用筛选出来的 293 对表现良好的多态性引物对亲本及 RIL3613 和 RIL6013 的 290 个后代株系进行 PCR 扩增。

应用 IciMapping 4.0 软件(<http://www.isbreeding.net/software/>)构建大豆的遗传连锁图谱, 首先进行 PCR 产物电泳(使用 6%的聚丙烯酰胺凝胶), 其次记录 SSR 带型(亲本和后代株系的 SSR 带型), 再次录入带型数据, 最后根据两个群体 SSR 标记的基因型构建出大豆的遗传连锁图谱。构建的 RIL3613 群体的遗传图谱含有 156 对 SSR 引物, 包含 20 个连锁群, 该图谱覆盖基因组的遗传距离为 2848.56 cM, 单个连锁群的遗传距离范围为 1.15~283.42 cM, 标记间的平均遗传距离为 18.99 cM, 标记数的范围为 2~13 个; RIL6013 群体的遗传图谱也包含 20 个连锁群且含有 137 对 SSR 引物, 该图谱覆盖基因组遗传距离为 1886.8 cM, 单个连锁群遗传距离范围为 19.68~163.67 cM, 标记间平均遗传距离为 13.77 cM, 标记个数范围为 4~11 个[10]。

## 2.5. 数据统计分析

### 2.5.1. 表型数据的变异分析

应用 Excel2010 软件对每个环境下各氮肥处理不同性状的平均数进行描述性分析, 分析平均数、标准差、偏度、峰度、最小值和最大值。

对每个环境下各性状平均数进行方差分析, 包括氮肥间、基因型效应和基因型 × 氮肥间互作效应的方差分析, 同时估计了方差分量, 并通过下面这个公式进一步估计了遗传率。

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_{GN}^2/n + \sigma^2/(m)}$$

其中  $h^2$  为遗传率,  $\sigma_g^2$  为遗传方差,  $\sigma_{GN}^2$  为基因型  $\times$  氮肥间互作方差,  $\sigma^2$  为误差方差,  $g$  是家系数,  $d$  是氮肥水平数。

在每个环境下分析各氮肥各性状间相关系数。

方差分析及  $\sigma_g^2$ 、 $\sigma_{GN}^2$ 、 $\sigma^2$  的估计通过 SAS V9.2 软件的 PROC Mixed 过程实现。

### 2.5.2. 氮肥响应

为探索大豆各性状对氮肥变化的响应, 针对三个地点的不同氮肥试验数据进行氮肥响应 QTL 分析。氮肥响应(Response to Nitrogen, RN)应用 Zhu 等[11]的条件变量方法分析, 即是施氮肥的性状表型扣除不施氮肥遗传背景后获得的条件变量。具体计算方法如下:

$$RN = T_2 - C_{(1,2)} \cdot (T_1 - \bar{T}_1) / V_1$$

其中  $T_2$  为施氮肥的性状,  $C_{(1,2)}$  为两种氮肥水平下的性状协方差,  $T_1$  为不施氮肥下的性状,  $\bar{T}_1$  为不施氮肥的性状平均值,  $V_1$  为不施氮肥的性状方差。除去基因型遗传背景后的密度效应就是氮肥响应。

### 2.5.3. QTL 作图分析

应用 IciMapping 4.0 软件的完备区间作图法(ICIM-ADD)对各施氮肥水平下的表型数据进行加性 QTL 定位, LOD 阈值设置为 2.5; 应用完备区间作图法(ICIM-EPI)进行上位性 QTL 定位, LOD 阈值设置为 5。对于达到显著水平的上位效应 QTL 和氮肥响应 QTL, 要求能够解释表型变异 2% 以上, 才认为是有效的 QTL。

按照 q + “性状” + “染色体名称” + “顺序号”的方法命名 QTL。用 q 代表 QTL, PH 代表株高, NN 代表主茎节数, PNPP 代表单株荚数, SNPP 代表单株粒数, HSW 代表百粒重, SWPP 代表单株粒重, PC 代表蛋白质含量, OC 代表油分含量。

对于各性状的加性效应 QTL, 直接用数字编号。对于上位性 QTL, 应用“e + 数字”编号。对于氮肥响应 QTL, 应用“r + 数字”编号, 在同一染色体上按照数字编号, 在同一标记区间按照同一个顺序号编号。对于 RIL3613 和 RIL6013 两个群体进行统一编号。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 表型变异分析

#### 3.1.1. 方差与遗传率

从表 2 可以看出, 两个重组自交系群体蛋白质含量与油分含量, 在两个地点下氮肥施用量、基因型  $\times$  氮肥互作效应、基因型效应都达到显著水平, 说明这 2 个品质性状在基因型之间存在极显著差异, 应用这两个群体进行遗传分析是可行的。从表 3 可以看出, 在多个环境联合分析情况下, 基因型、氮肥施用量、基因型  $\times$  氮肥互作效应都达到极显著水平, 并且地点间差异也是极显著的, 说明基因型、氮肥施用量、基因型  $\times$  氮肥互作效应在多种环境条件下都是存在的, 并且其大小受到环境影响。综合多个地点单独分析和多个地点联合分析结果, 可以得出在不同环境条件下, 氮肥对各育种性状影响的遗传基础是不同的。

对于遗传率而言, 在单个环境条件下, 两个群体间同一性状在不同密度下, 其遗传率差异非常大, 说明两个群体各性状对于施肥量响应的遗传基础是不同的, 因此通过两个群体育种性状的氮肥响应遗传分析, 可以增加基因检测能力。各性状在不同地点之间, 其遗传率也有较大差异, 说明地点间基因型效应大小是不同的, 基因型与氮肥的互作效应也是变化的。

**Table 2.** Analysis of variance and heritability of agronomic traits among different nitrogen fertilizers under different environmental conditions**表 2.** 不同环境条件下不同氮肥间品质性状的方差分析及遗传力

性状 Traits <sup>A</sup>	环境 Location <sup>B</sup>	RIL3613						RIL6013					
		F value <sup>C</sup>			$h^{2D}$	F value <sup>C</sup>			$h^{2D}$				
		N	GN	G		N	GN	G					
PC	E1	3.79 *	8.21 **	30.83 **	0.81	1.22	18.22 **	22.08 **	0.26				
	E2	23.58 *	10.88 **	28.43 **	0.71	114.1 **	11.15 **	22.28 **	0.60				
	E3	1.33	21.84 **	35.83 **	0.51	0.19	15.7 **	20.31 **	0.32				
OC	E1	37.71 **	8.09 **	17.05 **	0.62	33.87 **	11.55 **	10.4 **	0.12				
	E2	246.35 **	13.85 **	21.19 **	0.47	349.2 **	15.51 **	16.75 **	0.16				
	E3	5.74 *	7.41 **	14.58 **	0.58	51.05 **	11.75 **	13.03 **	0.17				

A) PC: 蛋白质含量 protein conten; OC: 油分含量 oil content;

B) E1: 阿城; E2: 双城; E3: 哈尔滨;

C) N = 氮肥利用效应(Nitrogen utilization effects); G = 基因型效应(Genotype effects); GN = 氮肥 × 基因互作效应(Nitrogen × Genotype interaction effect);

D) 广义遗传率 Broad-sense heritability。

**Table 3.** Joint analysis of variance of Nitrogen, Genotype and Nitrogen × Genotype interaction effects for eight agronomic traits in two RILs**表 3.** 两个群体 2 个品质性状的氮肥、基因型和基因型 × 氮肥互作效应的 3 个环境联合方差分析

Source <sup>A</sup>	品质性状 Agronomic traits <sup>B</sup>			
	蛋白质含量 PC		油分含量 OC	
	F	Pr > F	F	Pr > F
RIL3613				
地点 L	162.65	<0.0001	339.37	<0.0001
氮肥 N	10.29	0.0014	36.88	<0.0001
基因型 G	19.77	<0.0001	9.24	<0.0001
G × N	4.65	<0.0001	3.42	<0.0001
RIL6013				
地点 L	242.97	<0.0001	364.41	<0.0001
氮肥 N	15.6	<0.0001	110.38	<0.0001
基因型 G	15.1	<0.0001	8.96	<0.0001
G × N	9.71	<0.0001	7.45	<0.0001

A) 地点 L = Location effects; 氮肥 N = Nitrogen utilization effects; 基因型 G = Genotype effects; 基因型 × 氮肥 G × N = Nitrogen × Genotype interaction effect;

B) PC: 蛋白质含量 protein conten; OC: 油分含量 oil content。

### 3.1.2. 表型分离与次数分布

RIL3613 和 RIL6013 两个群体的蛋白质含量、油分含量, 在阿城、双城、哈尔滨等各亲本的表型性

状值均落在后代群体的变异范围之内,说明各性状均存在超亲遗传(见表 2,表 3)。在氮肥施用和不施用情况下,各性状的平均数和标准差均有明显差异,说明氮肥影响每个群体各性状的表现。

在阿城、双城、哈尔滨等三个环境施氮肥与不施氮肥情况下,蛋白质含量在阿城施氮肥、双城不施氮肥、哈尔滨施氮肥环境下表现为偏态分布,在其他环境下表现为正态分布。油分含量在各环境下均表现为正态分布。

对于 RIL6013 群体,蛋白质含量在阿城施氮肥、不施氮肥、哈尔滨不施氮肥环境下表现为正态分布,而在其他三个环境下表现为偏态分布。油分含量在各环境下均表现为近似正态分布,但在哈尔滨不施氮肥环境下表现为偏态分布。

### 3.2. 大豆重要品质性状的加性 QTL 定位

#### 3.2.1. 蛋白质含量加性 QTL 定位

在 RIL3613 和 RIL6013 群体中共检出 4 个控制蛋白质含量的加性 QTL,分布在 D1a、J、G、L 连锁群,单个加性 QTL 可解释 0.20~8.70%的表型变异(见表 4)。qPC-D1a-1、qPC-J-1、qPC-G-1 的正向加性效应来自东农 L13,qPC-L-1 的负向加性效应来自东农 L13。qPC-J-1 在两个环境下被重复检测到。

在 RIL3613 群体中,qPC-D1a-1 所在的基因组区域已经定位了 3 个 QTL (Seed protein 3-4、Seed protein 3-5、Seed protein 40-4),qPC-L-1 所在的基因组区域已经定位了 2 个 QTL (Seed protein 36-31、Seed protein 2-2)。在 RIL6013 群体中,qPC-J-1 所在的基因组区域已经定位了 Seed protein 4-7,在 qPC-G-1 的基因组区域已经定位了 7 个 QTL (Seed protein 34-9、Seed protein 41-3、Seed protein 28-2、Seed protein 3-8、Seed protein 3-9、Seed protein 1-8、Seed protein 3-10)。

**Table 4.** Additive QTL associated with protein content detected in two populations

**表 4.** 两个群体中检测到的蛋白质含量加性 QTL

QTL	连锁群 LG <sup>A</sup>	置信区间 Interval	LOD 值 LOD <sup>B</sup>	贡献率 PVE(%) <sup>C</sup>	加性效应 Add <sup>D</sup>	N 水平 N level	环境 Environment <sup>E</sup>	群体 Population <sup>F</sup>	报道的 QTL Reported QTL
qPC-D1a-1	D1a	Satt198 Sat_413	3.38	5.31	1.48	N <sub>-</sub>	E2	RIL3613	[3]
qPC-J-1	J	Sat_366 sat_228	3.88	0.20	2.65	N <sub>-</sub>	E2	RIL6013	[1]
			2.70	3.32	2.51	N <sub>+</sub>	E3	RIL6013	
qPC-G-1	G	sat_117 satt352	3.19	8.01	0.99	N <sub>-</sub>	E3	RIL6013	[7]
qPC-L-1	L	Sat_099 Satt229	2.51	8.70	-0.72	N <sub>-</sub>	E1	RIL3613	[2]

A) LG: 连锁群 linkage group;

B) LOD: log of odd;

C) PVE: 表型变异解释比率 phenotypic variation explanation ratio;

D) Add: 加性效应 additive effects;

E) AC: 阿城 Acheng; SC: 双城 Shuangcheng; HRB: 哈尔滨 Harbin;

F) RIL3613: 由东农 L13 × 黑河 36 衍生的重组自交系群体 recombinant inbred lines population derived from: Dongnong L13 × Heihe 36; RIL6013: 由东农 L13 × 合农 60 衍生的重组自交系群体 recombinant inbred lines: population derived from Dongnong L13 × Henong 60.

#### 3.2.2. 油分含量加性 QTL 定位

在 RIL6013 群体中共检出 2 个控制油分含量的加性 QTL,分布在 H、J 连锁群,单个加性 QTL 可解释 7.23%~7.50%的表型变异(见表 5)。qOC-H-1、qOC-J-1 的正向加性效应来自东农 L13。

在以往的研究中,qOC-J-1 所在区域定位到 4 个 QTL(Seed oil 37-9、Seed oil 43-19、Seed oil 39-12、Seed oil 5-2)。qOC-H-1 为本研究新发现的 QTL。

**Table 5.** Additive QTL associated with oil content detected in two populations  
**表 5.** 两个群体中检测到的油分含量加性 QTL

QTL	连锁群 LG <sup>A</sup>	置信区间 Interval		LOD 值 LOD <sup>B</sup>	贡献率 PVE(%) <sup>C</sup>	加性效应 Add <sup>D</sup>	N 水平 N level	环境 Environment <sup>E</sup>	群体 Population <sup>F</sup>	报道的 QTL Reported QTL
qOC-H-1	H	Satt181	satt434	2.60	7.50	0.20	N <sub>+</sub>	E1	RIL6013	New
qOC-J-1	J	Sat_255	sat_394	3.44	7.23	0.35	N <sub>-</sub>	E2	RIL6013	[4]

A) LG: 连锁群 linkage group;

B) LOD: log of odd;

C) PVE: 表型变异解释比率 phenotypic variation explanation ratio;

D) Add: 加性效应 additive effects;

E) AC: 阿城 Acheng; SC: 双城 Shuangcheng; HRB: 哈尔滨 Harbin;

F) RIL3613: 由东农 L13 × 黑河 36 衍生的重组自交系群体 recombinant inbred lines population derived from; Dongnong L13 × Heihe 36; RIL6013: 由东农 L13 × 合农 60 衍生的重组自交系群体 recombinant inbred lines; population derived from Dongnong L13 × Henong 60.

### 3.3. 大豆重要品质性状的上位性 QTL 定位

#### 蛋白质含量上位性 QTL 定位

RIL3613 群体和 RIL6013 群体在双城(E2)和哈尔滨(E3)两个环境的两种施氮肥条件下, 共定位到 4 对蛋白质含量上位性 QTL (见表 6), 每对上位性 QTL 可解释 4.04%~5.50%的表型变异, 4 对上位性 QTL 的上位效应均为正值。

**Table 6.** Epistatic effects QTL of additive × additive for protein content

**表 6.** 蛋白质含量加性 × 加性上位互作效应 QTL

QTL1	区间 1 Interval 1	QTL2	区间 2 Interval 2	LOD 值 LOD	贡献率 PVE(%)	加性加性互作效应 AddbyAdd	环境 Env.	施肥方式 Fer.	群体 Popu.
qPC-J-e2	Satt414-Satt596	qPC-I-e3	Satt292-Satt571	5.46	5.50	1.16	E2	N <sub>-</sub>	RIL3613
qPC-J-e2	Satt414-Satt596	qPC-J-e2	Satt414-Satt596	5.04	4.40	0.68	E2	N <sub>-</sub>	RIL3613
qPC-J-e1	Sat_224-Satt654	qPC-D2-e1	GMHSP179-Sct_192	5.17	4.07	1.00	E2	N <sub>-</sub>	RIL3613
qPC-C2-e1	Satt316-Satt202	qPC-C2-e1	Satt316-Satt202	5.33	4.04	1.19	E2	N <sub>-</sub>	RIL3613

在 4 对上位性 QTL 中, 有 3 对上位性 QTL 在不施氮肥(N<sub>-</sub>)处理下被检测到, 1 对上位性 QTL 在施氮肥(N<sub>+</sub>)处理下被检测到。

2 对上位性 QTL 由 1 个显著的加性 QTL 和 1 个不显著的加性 QTL 构成, 其他 2 对由 2 个不显著的加性 QTL 构成。

在构成 4 对上位性 QTL 的 5 个加性 QTL 中, qPC-C2-e1、qPC-J-e1 和 qPC-J-e2 是本研究新发现的。

### 3.4. 大豆重要品质性状氮肥响应的 QTL 分析

在 RIL3613 和 RIL6013 群体中, 阿城和哈尔滨环境下检出 2 个蛋白质含量因施氮肥增加而变化的氮肥响应 QTL, 分布在 J、G 连锁群, 单个氮肥响应 QTL 可解释 8.88%~12.49%的表型变异。2 个 QTL 的母本东农 L13 效应分别为负向和正向效应, 均为本研究新发现的(见表 7)。

### 3.5. 候选基因预测

使用两种类型的 QTL 进行候选基因注释, 确定了 2 个与品质性状和产量性状相关的 QTL 区间, 没



有只与品质性状相关的 QTL 区间。基于使用 SoyBase 在线程序获得的标记信息, 在 4 个一致 QTL 区间中, 利用 GO 注释和 KEGG 数据库对 1215 个候选基因进行了筛选和注释, 其中 344、218、52、205 个基因分别位于一致性 QTL 区域 GM01、GM11、GM12、GM16 内(见表 8)。以下丰富在 GO 类别: GO:0006807 (氮化合物代谢过程), GO:0034641 (细胞氮化合物代谢过程), GO:0006886 (细胞内蛋白质运输), GO:0008565 (蛋白质运输活动), GO:0015031 (蛋白质运输)。在富集 KEGG 通路中, Ko04075 参与植物激素信号转导途径[12], 包括赤霉素、生长素、脱落酸等激素。植物激素在调节茎生长、植物生长和种子发育方面起着重要作用。其他丰富的 KEGG 通路包括 K14484、K14493、K14496、K14486、K14488、K14498、K13946, 参与植物激素信号转导(途径 ID ko04075)。

**Table 7.** QTL for response of agronomic and quality traits to nitrogen change

**表 7.** 大豆 2 个品质性状的氮肥响应 QTL

QTL	性状 Trait <sup>A</sup>	连锁群 LG <sup>B</sup>	置信区间 Interval		染色体位置 Position in GmComposite2003		LOD 值 LOD <sup>C</sup>	贡献率 PVE(%) <sup>D</sup>	加性效 应 Add <sup>E</sup>	环境 Env. <sup>F</sup>	群体 Popu. <sup>G</sup>
qPCEN-J-r2	PCEN	J	Satt654	Sat_350	38.09	55.73	3.03	12.49	-0.71	E1	RIL3613
qPCEN-G-r1	PCEN	G	sat_117	satt352	100	50.52	3.49	8.88	1.07	E3	RIL6013

**Table 8.** Consensus QTLs intervals and candidate genes distribution of related traits on four linkage groups

**表 8.** 4 个相关性状的一致性 QTL 区间的连锁群和候选基因分布

序号 Code	连锁群 Linkage group	QTL 置信区间 Consensus QTL interval (Mbp)	左侧标记 Left maker	右侧标记 Right maker	QTL 数 QTLs number	LOD 值范围 LOD range	加性效应范围 ADDrange	平均贡献率 Mean PVE (%)	候选基因数 Candidate genes number
1	GM01	0.35~53.24	Sat_413	Sat_160	8	2.66 to 16.81	-4.28 to 17.94	2.57	344
2	GM11	8.90~32.19	Sat_123	satt197	9	2.66 to 20.86	-2.84 to 23.84	1.88	218
3	GM12	0.27~1.69	Sat_200	Satt353	9	2.77 to 5.16	3.85 to 8.49	5.16	52
4	GM16	3.05~30.4	sat_228	Sat_366	6	3.13to7.92	-6.86to2.65	0.51	205

基于 Pathway 分析和功能注释, 我们最终鉴定出 15 个候选基因(见表 9), 其中 Glyma.01G052800 被注释为囊泡转运 v-SNARE 家族蛋白基因, 在植物蛋白贮藏液泡的胞内囊泡转运过程中起作用[13] [14]。Glyma.11G118600 被标注为带有 beta 亚基和-2 亚基基因的协同分子, 在非饱和蛋白囊泡介导的细胞内生物合成蛋白运输中发挥作用, 可能与蛋白质积累有关[15]。在候选基因中, 有 3 个被标注为 saur 样生长素应答蛋白家族基因, SAUR 蛋白参与细胞分裂和生长素生物合成[16]。Glyma0.01g004500、Glyma0.01g183500 被标注为蔗糖非发酵相关蛋白激酶(SnRK)基因, 这些基因与糖信号、生物和非生物应激反应、种子萌发、幼苗生长等方面密切相关[17] [18]。

此外, SnRK2 和 SnRK3 与脱落酸信号转导直接相关[19]。Glyma0.01g019400 被标注为吲哚-3-乙酸诱导基因, 吲哚-3-乙酸是植物中普遍存在的内源生长素, 如拟南芥[20]所示。Glyma11 g180900 被标注为编码 nitrilase 4, 该酶可将吲哚-3-乙腈转化为生长素[21]。08g203100 被标注为编码一种与开花[22]相关的植物色素蛋白。将 Glyma.01G103500 标注为编码生长素响应因子, ARF9 在果实发育早期表达, 生长素[23]有应答。6 个候选基因被标注为编码 Adaptin 家族蛋白或具有 gamma 亚基的 Adaptin 家族蛋白, 这些基因参与了细胞内运输囊泡的形成, 并参与了将货物纳入囊泡[24]的选择。01g179300 被标注为网格蛋白重链, 其作用是将高尔基体运输到液泡[25]。g11g215500 被标注为谷氨酰胺合成酶, 是氮代谢[26]核心的高通控

酶。16g082400 被标注为 Sec23/Sec24 蛋白转运家族蛋白, Sec23 亚基是连接 COPII 囊泡形成与顺行运输事件[27]的关键。最后, 将 Glyma.12G018500 注释为 s-1A, 这是植物[28]中多种发育途径所必需的。

**Table 9.** Candidate genes annotated from consensue QTLs

**表 9.** 一致性 QTL 注释的候选基因

基因 ID Gene ID	连锁群 Linkage group	KEGG 注释	GO 注释	功能注释 Functional annotation
Glyma.01G153200	GM 01	K12400	GO:0030117,GO:0016192,GO:0006886	Adaptin family protein
Glyma.12G021600	GM 12	K12392	GO:0030131,GO:0016192,GO:0006886,GO:0030117	Adaptin family protein
Glyma.16G076500	GM 16	K12400	GO:0030117,GO:0016192,GO:0006886	Adaptin family protein
Glyma.16G109200	GM 16	K12400	GO:0030117,GO:0016192,GO:0006886	Adaptin family protein
Glyma.01G032100	GM 01	K12391	GO:0030131,GO:0016192,GO:0006886,GO:0030117	Adaptor protein complex AP-1, gamma subunit
Glyma.01G103500	GM 01	K14486	GO:0006355,GO:0005634,GO:0003677,GO:0009725	auxin response factor 9
Glyma.01G179300	GM 01	K04646	GO:0030132,GO:0030130,GO:0016192,GO:0006886,GO:0005198	Clathrin, heavy chain
Glyma.11G118600	GM 11	K17267	GO:0030126,GO:0016192,GO:0006886,GO:0005198,GO:0030117	coatamer gamma-2 subunit, putative / gamma-2 coat protein, putative / gamma-2 COP, putative
Glyma.12G018500	GM 12	K14290	GO:0008536,GO:0006886	exportin 1A
Glyma.11G215500	GM 11	K01915	GO:0006807,GO:0006542,GO:0004356	glutamine synthase clone R1
Glyma.01G019400	GM 01	K14484	GO:0006355,GO:0005634	indole-3-acetic acid inducible 9
Glyma.11G180900	GM 11	K13035	GO:0016810,GO:0006807	nitrilase 4
Glyma.01G078200	GM 01	K14488	GO:0009733	SAUR-like auxin-responsive protein family
Glyma.01G137500	GM 01	K14488	GO:0009733	SAUR-like auxin-responsive protein family
Glyma.01G167000	GM 01	K14488	GO:0009733	SAUR-like auxin-responsive protein family

## 4. 讨论

为突破重组自交系群体(RIL)中个体不易受环境的影响这一限制, 本文所采用的三亲本联合分析群体为关联重组自交系群体(Associated Recombinant Inbred Line, A-RIL), 运用黑河 36 及合农 60 两个自交系群体分别与东农 L13 杂交所产生的重组自交系群体合并。在构建过程中由于两个重组自交系均含有共同亲本东农 L13, 因此能够突破以往研究中由于亲本单一所造成的限制, 对于后代的多态性及变异率的增加有很多益处[29], 同时由于连锁的不平衡性, 对于该群体的联合连锁分析可以更好地评价较为复杂的性状遗传结构。

氮肥通过影响干物质的积累和分配进而对大豆品质产生影响。郭庆元等[30]学者认为施用氮肥量对大豆产量及品质有着很大影响, 产生这种影响的因素主要有三个, 一是土壤肥力, 二是大豆品种, 三是施肥比例, 这是基于早期研究结果得出的结论。谷秋荣等学者[31]认为, 提高大豆脂肪含量和粗蛋白含量, 需要通过施用铵态氮才能达到最好的效果。此外还有研究表明, 增加叶面积指数和干物质积累[32] [33] [34]可以提高大豆产量, 这是通过增施基肥氮达到的增产效果, 增施基肥氮也可以保持更大的叶片面积,

同时延缓叶片衰老,还可以促进氮素向籽粒分配[35],并促进大豆植株各部分干物质的输出[36]。丁洪等学者认为不同大豆品种对于氮肥的反应有所不同,高蛋白大豆品种对氮肥的反应要优于低蛋白品种[37]。王雪依等学者认为,对于早熟及晚熟品种来说增施氮肥可以提高大豆产量,对于中熟品种来说,增施氮肥可以提高大豆蛋白质含量,但却造成了减产,对于晚熟品种来说,增施氮肥可以提高大豆油分含量[38]。刘波等学者认为在关键生育时期施用氮肥可以提升大豆品质,对大豆籽粒脂肪含量的提高起着关键作用,在大豆分枝末期施用氮肥,可以促进大豆籽粒脂肪含量的提高[39]。赵小铭等学者认为显著提高大豆油分含量需要施用配制比例合理的氮磷钾肥[40]。宁海龙等学者认为提高大豆蛋白质含量需要施用配制比例合理的氮磷钾肥[11]。姜璐等研究结果表明,随着施氮量的增加,大豆产量和蛋白质含量均有提高,而大豆油分含量却有所下降。综合以上研究可以得出,通过调整氮肥施用量可以促进大豆产蛋白质含量的提高。

本研究应用两个重组自交系群体 RIL3613 和 RIL6013 的 290 份材料,分别在磷肥和钾肥正常施用条件下,设置不施用氮肥(N<sub>-</sub>)和施用氮肥下(N<sub>+</sub>)处理,发现在施用氮肥下(N<sub>+</sub>)的蛋白质含量高于不施用氮肥(N<sub>-</sub>),油分含量变化不大,说明施用氮肥下,可提高节间长度,提升蛋白质含量。从群体各性状的表型变异可以得出,两个重组自交系群体 RIL3613 和 RIL6013 的蛋白质含量与油分含量这 2 个品质性状在各地点环境下,基因型 × 氮肥互作效应达到显著水平,并且从不同氮肥处理下的分布和变异幅度可以得出,2 个品质性状对于氮肥变化的响应在基因型之间存在显著差异,氮肥对各育种性状影响的遗传基础是不同的。

本研究在正常使用氮肥(N<sub>+</sub>)和不施氮肥(N<sub>-</sub>)条件下进行 2 个品质性状的 QTL 定位,在正常使用氮肥条件下定位到 45 个 QTL,在氮胁迫条件下定位到 52 个 QTL,在两个环境下同时定位的 QTL 有 8 个,包括 qPH-D1b-e1、qPH-B1-1、qSN-N-e1、qPH-F-1、qPC-J-1、qPH-D1a-e1、qPH-D1a-1、qPH-F-e2。综合本研究和以往研究结果可以得出,在不同氮肥下的特异性 QTL 数量多于多环境通用 QTL 的数量,因此选育适合多种施肥水平的大豆品种比较困难,选育适合某一氮肥水平的大豆品种相对容易,在不施氮肥条件下定位的 QTL 更适用于低氮胁迫的品种改良。

应用连锁分析,在 15 个区域定位了 15 个氮肥响应 QTL,包括 4 个株高、4 个主茎节数、2 个单株荚数、1 个单株粒数、2 个单株粒重、2 个蛋白质含量的氮肥响应 QTL。这些 QTL 中有 9 个 QTL 在不施氮肥条件下被检测到,2 个 QTL 在施氮肥和不施氮肥条件下被同时检测到,说明这些 QTL 控制着氮肥的累积效应。

## 参考文献

- [1] Diers, B.W., Keim, P., Fehr, W.R., *et al.* (1992) RFLP Analysis of Soybean Seed Protein and Oil Content. *Theoretical and Applied Genetics*, **83**, 608-612. <https://doi.org/10.1007/BF00226905>
- [2] Orf, J.H., Chase, K., Jarivk, T., *et al.* (1999) Genetics of Soybean Agronomic Traits: I. Comparison of Three Related Recombinant Inbred Populations. *Crop Science*, **39**, 1642-1651. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.3961642x>
- [3] Pathan, S.M., Vuong, T., Clark, K., *et al.* (2013) Genetic Mapping and Confirmation of Quantitative Trait Loci for Seed Protein and Oil Contents and Seed Weight in Soybean. *Crop Science*, **53**, 765-774. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0153>
- [4] Wang, J., Chen, P., Wang, D., *et al.* (2015) Identification and Mapping of Stable QTL for Protein Content in Soybean Seeds. *Molecular Breeding*, **35**, 92. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0285-6>
- [5] Karikair, B., Li, S., Bhat, J., *et al.* (2019) Genome-Wide Detection of Major and Epistatic Effect QTLs for Seed Protein and Oil Content in Soybean under Multiple Environments Using High-Density Bin Map. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 979. <https://doi.org/10.3390/ijms20040979>
- [6] 宁海龙, 白雪莲, 李文滨, 等. 大豆四向重组自交系群体蛋白质含量与油分含量 QTL 定位[J]. 作物学报, 2016, 42(11): 1620-1628.
- [7] Bertin, P. and Gallais, A. (2001) Genetic Variation for Nitrogen Use Efficiency in Asset of Recombinant Inbred Lines

- II-QTL Detection and Coincidences. *Maydica*, **46**, 53-68.
- [8] Loudet, O., Chaillou, S., Merigout, P., Talbotee, J. and Daniel-Vedele, F. (2003) Quantitative Trait Loci Analysis of Nitrogen Use Efficiency in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **131**, 345-358. <https://doi.org/10.1104/pp.102.010785>
- [9] Coque, M. and Gallais, A. (2006) Genomic Regions Involved in Response to Grain Yield Selection at High and Low Nitrogen Fertilization in Maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 1205-1220. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0222-5>
- [10] Ning, H.L., Yuan, J.Q., Dong, Q.Z., et al. (2018) Identification of QTLs Related to the Vertical Distribution and Seed-Set of Pod Number in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *PLoS ONE*, **13**, e0195830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195830>
- [11] Zhu, J. (1995) Analysis of Conditional Genetic Effects and Variance Components in Developmental Genetics. *Genetics*, **141**, 1633-1639. <https://doi.org/10.1093/genetics/141.4.1633>
- [12] Jiang, H., Li, Y., Qin, H., et al. (2018) Identification of Major QTLs Associated with First Pod Height and Candidate Gene Mining in Soybean. *Frontiers in Plant Science*, **9**, Article No. 1280. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01280>
- [13] Zheng, H., Von Mollard, G.F., Kovaleva, V., et al. (1999) The Plant Vesicle-Associated SNARE AtVTI1a Likely Mediates Vesicle Transport from the Trans-Golgi Network to the Prevacuolar Compartment. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 2251-2264. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.7.2251>
- [14] Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., et al. (1998) Transport of Storage Proteins to Protein Storage Vacuoles Is Mediated by Large Precursor-Accumulating Vesicles. *Plant Cell*, **10**, 825-836. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.5.825>
- [15] Stenbeck, G., Harter, C., Brecht, A., et al. (1993) Beta'-COP, a Novel Subunit of Coatomer. *The EMBO Journal*, **12**, 2841-2845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05945.x>
- [16] Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Montagu, M.V., et al. (2000) CEF, a sec24 Homologue of *Arabidopsis thaliana*, Enhances the Survival of Yeast under Oxidative Stress Conditions. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 1761-1762. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.351.1761>
- [17] Chevalier, D. and Walker, J.C. (2005) Functional Genomics of Protein Kinases in Plants. *Briefings in Functional Genomics*, **3**, 362-371. <https://doi.org/10.1093/bfpg/3.4.362>
- [18] Dong, X.-F., Cui, N., Wang, L., et al. (2012) The SnRK Protein Kinase Family and the Function of SnRK1 Protein Kinase. *International Journal of Agriculture and Biology*, **14**, 575-579.
- [19] Shukla, V. and Mattoo, A.K. (2008) Sucrose Non-Fermenting 1-Related Protein Kinase 2 (SnRK2): A Family of Protein Kinases Involved in Hyperosmotic Stress Signaling. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **14**, 91. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0008-0>
- [20] Li, D., Pfeiffer, W.T., Cornelius, P.L., et al. (2008) Soybean QTL for Yield and Yield Components Associated with *Glycine soja* Alleles. *Crop Science*, **48**, 571-581. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.06.0361>
- [21] Schmidt, R.C., Muller, A., Hain, R., et al. (1996) Transgenic Tobacco Plants Expressing the *Arabidopsis thaliana* Nitrilase II Enzyme. *The Plant Journal*, **9**, 683-691. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9050683.x>
- [22] Lark, K.G., Chase, K., Adler, F., et al. (1995) Interactions between Quantitative Trait Loci in Soybean in Which Trait Variation at One Locus Is Conditional upon a Specific Allele at Another. *PNAS USA*, **92**, 4656-4660. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4656>
- [23] Sebolt, A.M., Shoemaker, R.C., Diers, B.W., et al. (2000) Analysis of a Quantitative Trait Locus Allele from Wild Soybean That Increases Seed Protein Concentration in Soybean. *Crop Science*, **40**, 1438-1444. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051438x>
- [24] Kabelka, E.A., Diers, B.W., Fehr, W.R., et al. (2004) Putative Alleles for Increased Yield from Soybean Plant Introductions. *Crop Science*, **44**, 784-791. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.7840>
- [25] Sun, D., Li, W., Zhang, Z., et al. (2006) Quantitative Trait Loci Analysis for the Developmental Behavior of Soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 665-673. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0169-y>
- [26] Guzma, P.S., Diers, B.W., Neece, D.J., et al. (2007) QTL Associated with Yield in Three Backcross-Derived Populations of Soybean. *Crop Science*, **47**, 111-122. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.01.0003>
- [27] Gai, J., Wang, Y., Wu, X., et al. (2016) A Comparative Study on Segregation Analysis and QTL Mapping of Quantitative Traits in Plants—With a Case in Soybean. *Frontiers of Agriculture in China*, **1**, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s11703-007-0001-3>
- [28] Daniel-Vedele, F., Filleur, S. and Caboche, M. (1998) Nitrate Transport: A Key Step in Nitrate Assimilation. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**, 235-239. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80110-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80110-6)
- [29] 郭庆元, 李志玉, 涂学文. 大豆高产优质施肥研究与应用[J]. 中国农学通报, 2003, 19(3): 89-96, 104.
- [30] 谷秋荣, 郭鹏旭, 薛晓娅, 等. 不同氮肥类型对大豆根瘤生长特性及籽粒产量和品质的影响[J]. 中国农学通报,

- 2010, 26(14): 226-228.
- [31] 倪丽, 章建新, 金加伟, 等. 氮肥施用对高产大豆根系、干物质积累及产量的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 27(2): 36-39.
- [32] 才艳, 郑殿峰, 冯乃杰, 等. 氮肥施用量对大豆生长动态及干物质积累的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(2): 13-16.
- [33] 杜天庆, 苗果园. 氮肥施用量对生土地大豆生物性状和产量的影响[J]. 山西农业科学, 2006, 34(3): 53-55.
- [34] 章建新, 李宁, 薛丽华, 等. 氮肥对菜用大豆产量和品质的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2007, 30(1): 6-10.
- [35] 张含彬, 伍晓燕, 杨文钰. 氮肥对套作大豆干物质积累与分配的影响[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 404-409.
- [36] 丁洪, 郭庆元. 氮肥对不同品种大豆氮积累和产量品质的影响[J]. 土壤通报, 1995, 26(1): 18-21.
- [37] 王雪依, 禹祥, 侯绪明, 等. 氮肥施用量对不同大豆品种产量及品质的影响[J]. 大豆科技, 2010(4): 9-11.
- [38] 刘波, 苗保河, 李向东, 等. 氮磷肥对两种品质类型大豆脂肪及其组分含量的影响[J]. 大豆科学, 2007, 26(5): 736-739.
- [39] 赵小铭, 宋秀吉, 王雪依, 等. 高油大豆东农 46 号脂肪含量的氮磷钾肥效应回归模型[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 332-336.
- [40] 宁海龙, 胡国华, 李文滨, 等. 氮磷钾底肥对大豆蛋白质含量的效应[J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 288-293.