

大豆杂交种及其亲本苗期叶片基因差异表达 与杂种优势的关系

张 君¹,王丕武¹,闫冬生²,杨祥波³,关淑艳¹,马 建¹,姚 丹¹,孙丽芳¹

(1 吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118;2 双辽市职业中等专业学校,吉林 双辽 136400;

3 吉林农业科技学院,吉林 吉林 132101)

【摘 要】 【目的】通过基因差异表达分析揭示大豆杂种优势产生的原因,为探明大豆杂种优势的分子机理提供理论基础。【方法】采用 4×5 NC II 设计,配制 20 个大豆杂交种,以大豆苗期叶片为试验材料,应用 mRNA 差异显示技术,分析杂交种及亲本之间的基因差异表达模式,并分析其与杂种优势的相关性。【结果】大豆杂交种和亲本之间存在着明显的基因差异表达,差异表达模式可分为单亲表达一致一型(110 型)、单亲表达一致二型(011 型)、双亲共沉默型(101 型)、单亲表达沉默一型(100 型)、单亲表达沉默二型(001 型)和杂种特异表达类型(010 型)6 种,其中单亲表达一致一型所占比例最高(13.25%)。差异表达模式与杂种表现的相关分析结果显示,百粒质量与 011 型呈显著负相关,与 101 型呈显著正相关;节数、脂肪含量与 100 型呈显著正相关;差异表达模式与中亲优势(MPH)的相关分析结果显示,分枝数、单株荚数、单株粒数的 MPH 与 110 型呈显著负相关,单株粒质量的 MPH 与 110 型呈极显著负相关;差异表达模式与超亲优势(BPH)的相关分析结果显示,单株荚数的 BPH 与 110 型呈显著负相关,单株粒数和单株粒质量的 BPH 与 110 型、虫食粒率的 BPH 与 101 型均呈极显著负相关。【结论】大豆基因差异表达与杂种优势的形成存在一定程度的相关性。

【关键词】 大豆;杂种优势;mRNA 差异显示

【中图分类号】 S565.103

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)02-0091-10

Relationship between differential gene expression patterns and heterosis in soybean (*Glycine max*) leaves at seedling stage

ZHANG Jun¹,WANG Pi-wu¹,YAN Dong-sheng²,YANG Xiang-bo³,

GUAN Shu-yan¹,MA Jian¹,YAO Dan¹,SUN Li-fang¹

(1 College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China; 2 Shuangliao Vocational

Secondary School, Shuangliao, Jilin 136400, China; 3 Jinlin Agricultural College of Science and Technology, Jilin, Jilin 132101, China)

Abstract: 【Objective】 This study was done to reveal the causes of heterosis from differential gene expression to provide the theoretical basis of heterosis. 【Method】 The patterns of differential gene expression in the leaves at seedling stage of soybean between hybrids and their parents in a 4×5 NC II design were analyzed by using mRNA differential display assay. The correlation was also analyzed between the patterns of differential gene expression and heterosis. 【Result】 Six patterns were found different between hybrids and their parents: bands present in the female parent and the F₁, but absent in the male parent (110); bands present in the male parent and the F₁, but absent in the female parent (011); bands present in both parents but absent in the F₁ (101); bands only present in the female parent (100); bands only present in the male

* 【收稿日期】 2009-08-15

【基金项目】 科技部农业科技成果转化基金项目(2006GB2B00062);教育部博士基金项目(20070193005)

【作者简介】 张 君(1968—),男,吉林双辽人,副教授,主要从事作物遗传育种研究。E-mail: zhangjun969@yahoo.com.cn

【通信作者】 王丕武(1958—),男,吉林蛟河人,教授,博士生导师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail: peiwwu@yahoo.com.cn

parent (001), and bands only present in the F_1 (010). The correlations between the patterns and hybrids performance were analyzed. Among them, the 100-seed weight was negatively correlated with the 011 pattern and positively correlated with 101 pattern. The No. of nodes per stem, oil content was positively correlated with the 100 pattern. 4 correlations between the patterns and the MPH achieved significant or extremely significant level in the correlation analysis. Among them, the number of branches per plant, the number of pods per plant, and the number of seeds per plant were negatively correlated with the 110 pattern. Significantly, the yield per plant was negatively correlated with the 110 pattern. 4 correlations between the patterns and the BPH achieved significant or extremely significant level in the correlation analysis. Among them, the number of pods per plant was negatively correlated with the 110 pattern. Significantly, the number of seeds per plant and the yield per plant were negatively correlated with the 110 pattern; Significantly, the rate of insect food was negatively correlated with the 101 pattern. 【Conclusion】 There is a correlation between the differential gene expression patterns and the formation of heterosis in soybean.

Key words: *Glycine max*; heterosis; mRNA differential display

作物杂种优势是生物界的一种普遍现象,在世界范围内得到了广泛利用。虽然作物杂种优势利用在生产上已经取得很大效益,但对杂种优势机理的研究,特别是对其分子机理的研究还不够深入。过去对于杂种优势遗传机理的研究主要集中在遗传差异与杂种优势的关系方面,这对阐明作物杂种优势机理并无多大推动作用。20 世纪 80 年代后期发展起来的 QTL 定位方法,为探讨 QTL 杂合度及其相互作用方式与杂种优势形成的关系奠定了基础^[1],但仍不能解释杂种优势形成的分子机理。

大豆具有较强的杂种优势,随着大豆杂种优势利用的开展与应用,对大豆杂种优势分子机理的研究变得十分必要。2002 年,王曙明等^[2]从 1 326 个组合中选出 176 个优势较高的组合,经 2 年 3 点的重复产量测定,发现其平均超高亲优势率为 22.5%;同年吉林省农业科学院赵丽梅等^[3]培育出了国际上第一个杂交大豆品种“杂交豆 1 号”,其较“吉林 30”增产 20%,这是大豆杂种优势利用的一个突破。Cerna 等^[4]用 RFLP 标记研究了大豆种子产量杂种优势与分子标记的关系,认为 RFLP 标记预测杂种优势较差。张博等^[5]以取自 6 个省市的 10 个育成大豆品种及其配制杂交的 22 个 F_1 代大豆为材料,利用 SSR 标记来探索根据亲本间分子遗传距离来预测 F_1 代杂种优势的可能性,得出少数具有部分相同遗传背景的 F_1 百粒质量的超中亲、高亲优势与遗传距离呈二次曲线关系,说明利用 SSR 标记来预测大豆杂种优势并不理想。

mRNA 差异显示 (Differential display of mRNA reverse transcription polymerase chain reaction, DDRT-PCR) 技术是由 Liang 等^[6]于 1992 年

首先建立的。DDRT-PCR 是对 RNA 反转录后的 cDNA 模板进行分析,具有能快速有效地鉴定,并克隆 2 个或多个平行材料之间的差异表达基因的优点。该方法具有 DNA 用量少,灵敏度高,操作简单、快速和可分析低丰度 mRNA 等特点,因此被广泛应用于植物的基因分离、克隆和表达研究。王章奎^[7]应用 DDRT-PCR 技术,从基因表达水平上对小麦根系杂种优势进行了初步研究,并获得了一些差异表达的 cDNA 片段。程宁辉等^[8]利用 DDRT-PCR 技术,在光照和黑暗的条件下,对大豆黄化苗和绿苗的基因表达差异进行了研究,认为大豆绿苗中基因特异表达类型较黄化苗多。国外在诱导大豆合成细胞色素 P450s (P450-dependent enzymes, P450s) cDNA 方面^[9],使用了差异显示技术;另外 Vladimir^[10]利用 DDRT-PCR 技术研究了在铝选择压力下,耐铝与不耐铝大豆品系根基因的差异表达,发现 TA52 和 TA22 2 个 cDNA 片段与耐铝性有关。

目前,利用 DDRT-PCR 技术研究大豆杂种优势机理在国内外尚未见报道。为了探讨大豆杂种优势与基因差异表达的内在联系,本研究以国内外 9 个大豆品系(种)及由其配制的 20 个杂交种为材料,采用改进的 DDRT-PCR 技术,系统地研究了大豆杂交种及其亲本苗期叶片基因差异表达与杂种优势的关系,以期为大豆杂种优势分子机理研究奠定基础,为高产、优质大豆新品种的选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以吉林 30、吉林 38、2002 系选、吉林 47 为母本,以意 3、PEMVy、EXP、ARIRA 和 SAPPRO 为

父本,按 NCⅡ 设计配制成 20 个杂交种。按照完全随机区组设计,将 20 个杂交种及 9 个亲本种植于大田,每个品种 3 次重复,在大豆开花前苗期(此期是大豆营养生长的重要时期,杂种较其双亲具有明显的营养优势),采集植株心叶叶片备用。

1.2 大豆叶片总 RNA 的提取与检测

用北京普利莱基因技术有限公司的植物 RNA 提取试剂盒(Plant RNA Extraction kit),提取大豆叶片 RNA,具体操作按试剂盒说明书进行。总 RNA 样品的紫外吸收检测及凝胶检测按 Qligotex 手册(Qiagen 公司)提供的方法进行。

1.3 反转录、PCR 及差异显示

引物根据文献[10]设计,由北京三博远志生物试剂公司合成。3'端锚定引物:R1:5'-AAGCTTTT TTTTTTTTA-3',R2:5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3',R3:5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3';5'端寡核苷酸引物:L1:5'-TGCCGAAGCTTTGGTAGC-3',L2:5'-TGCCGAAGCTTTGGTCAG-3',L3:5'-TGCCGAAGCTTGATTCCG-3',L4:5'-TGCCGAAGCTTTGGTGAC-3',L5:5'-TGCCGAAGCTTTGGTGTC-3'。3 条锚定引物分别与 5 条寡核苷酸引物组成 15 对引物。

以大豆叶片总 RNA 为模板,按 SuperscriptTM Ⅱ 试剂盒(GIBCO BRL 公司产品)说明书进行反转录,合成 cDNA 第一链。再以 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 25 μL:反转录产物 2.5 μL,10×buffer 2.5 μL,dNTP 2 μL,MgCl₂ 2.5 μL,3'端锚定引物和 5'端寡核苷酸引物各 0.5 μL,Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,ddH₂O 14.3 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,40 ℃ 4 min,72 ℃ 1 min;94 ℃ 45 s,60 ℃ 2 min,72 ℃ 1 min,40 个循环;72 ℃ 5 min。将扩增产物在 4%的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,银染检测。应用 Quantity one 4.3.1 分析软件进行数据处理,统计 2 次重复扩增中稳定存在的、长度为 40~1 000 bp 的条带。分别以父本和母本作为比较标准,统计亲本与杂种的差异情况,每个样品的扩增条带按有或无记录,有记为 1,无记为 0。

1.4 农艺性状与品质性状的测定

每小区随机取 5 株考种,调查株高、节数、分枝数、单株荚数、单株粒数、虫食粒率、茎粗、百粒质量、单株粒质量 9 个农艺性状及蛋白质、脂肪含量 2 个品质性状。农艺性状采用测量或称量的方法测定;蛋白质含量采用 K360 凯氏定氮仪测定,脂肪含量

采用 SZF-06C 脂肪测定仪测定。

1.5 杂种优势的计算

$$\text{中亲优势(MPH)} = \frac{(\text{F}_1 \text{ 值} - \text{双亲平均值})}{\text{双亲平均值}} \times 100\%。$$

$$\text{超亲优势(BPH)} = \frac{(\text{F}_1 \text{ 值} - \text{最好亲本值})}{\text{最好亲本值}} \times 100\%。$$

1.6 数据分析

采用唐启义的 DPS 7.05 软件,对基因差异表达模式与杂种表现、杂种优势进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 苗期大豆杂交种叶片基因的差异表达模式分析

杂种与亲本的基因差异表达主要表现在 2 方面,即质的差异和量的差异,质的差异是指电泳条带的有无,量的差异是指条带表达量的多少。由于量的差异很难准确定量,所以本研究只统计质的表达差异。吴利民^[11]将质的差异分为 4 种类型,为便于更细致和深入地观察质的差异规律,本研究又将其中的 2 种类型细分,因此将质的差异分为 6 种类型(图 1):单亲表达一致一型(110 型),即该条带仅在母本和杂种中出现,而在父本中不出现;单亲表达一致二型(011 型),即该条带仅在父本和杂种中出现,而在母本中不出现;双亲共沉默型(101 型),即该条带在双亲中出现,而杂种中不出现;单亲表达沉默一型(100 型),即该条带仅出现在母本中,而在父本和杂种中不出现;单亲表达沉默二型(001 型),即该条带仅出现在父本中,而在母本和杂种中不出现;杂种特异表达型(010 型),即该条带仅在杂种中出现,而在双亲中不出现。

表 1 显示,从大豆苗期叶片中提取总 RNA,用 15 对引物组合共扩增出 27 273 条 cDNA 片段,其中 13 531 条为差异条带,差异条带比例平均为 49.68%;各型平均质差异条带占总质差异条带的比例:110 型为 13.25%(8.84%~16.70%),011 型为 10.07%(6.24%~13.16%),101 型为 9.00%(5.84%~15.32%),100 型为 6.05%(3.64%~9.54%),001 型为 4.92%(1.87%~7.74%),010 型为 6.39%(3.99%~8.96%)。在 6 种类型中,101 和 110 型质差异条带占总质差异条带比例的变化范围较大,而 100 和 001 型的变化范围较小;单亲表达一致一型所占比例最高,单亲表达沉默二型最低。

每对引物组合可以扩增出长度在 40~1 000 bp 的片段 30~160 条,每条片段在理论上可以代表一

种基因的表达产物。

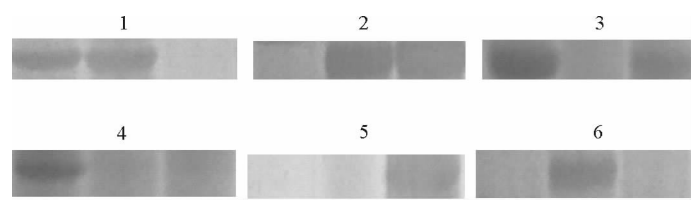


图 1 苗期大豆杂交种与亲本间叶片基因差异表达的类型

1. 单亲表达一致一型(110 型);2. 单亲表达一致二型(011 型);3. 双亲共沉默型(101 型);4. 单亲表达沉默一型(100 型);
5. 单亲表达沉默二型(001 型);6. 杂种特异表达型(010 型)

Fig. 1 Expression pattern of differential genes between hybrids and their parents during the seeding stage in soybean

1. Bands present in the female parent and the F₁ but absent in the male parent (110);2. Bands present in the male parent and the F₁ but absent in the female parent(011);3. Bands present in both parents but absent in the F₁ (101);4. Bands only present in the female parent (100);5. Bands only present in the male parent (001);6. Bands only present in the F₁ (010)

表 1 苗期大豆杂交种叶片基因差异表达的类型、数目及比例

Table 1 Expression pattern,number and proportion of differential genes in the leaves during the seeding stage of soybean hybrids

组合 Combi- nation	无质差异条带数 No. of no differential bands	质差异条带数 No. of differential bands						合计 Subtotal	总条带数 Total number of bands
		110	011	101	100	001	010		
1	703(51.65)	185(13.59)	168(12.34)	87(6.39)	61(4.48)	73(5.36)	84(6.17)	658(48.35)	1 361
2	629(51.73)	142(11.68)	153(12.58)	71(5.84)	85(6.99)	57(4.69)	79(6.50)	587(48.27)	1 216
3	681(52.18)	135(10.34)	157(12.03)	101(7.74)	69(5.29)	82(6.28)	80(6.13)	624(47.82)	1 305
4	627(48.68)	176(13.66)	144(11.18)	132(10.25)	63(4.89)	74(5.75)	72(5.59)	661(51.32)	1 288
5	563(42.81)	217(16.50)	173(13.16)	120(9.13)	73(5.55)	61(4.64)	108(8.21)	752(57.19)	1 315
6	715(52.65)	179(13.18)	133(9.79)	114(8.39)	61(4.49)	68(5.01)	88(6.48)	643(47.35)	1 358
7	699(52.32)	145(10.85)	151(11.30)	106(7.93)	80(5.99)	46(3.44)	109(8.16)	637(47.68)	1 336
8	642(49.81)	129(10.01)	145(11.25)	149(11.56)	80(6.21)	74(5.74)	70(5.43)	647(50.19)	1 289
9	620(48.48)	113(8.84)	85(6.65)	196(15.32)	101(7.90)	99(7.74)	65(5.08)	659(51.52)	1 279
10	573(48.35)	126(10.63)	74(6.24)	154(13.00)	113(9.54)	89(7.51)	56(4.73)	612(51.65)	1 185
11	771(55.91)	126(9.14)	133(9.64)	137(9.93)	80(5.80)	77(5.58)	55(3.99)	608(44.09)	1 379
12	759(53.56)	173(12.21)	122(8.61)	116(8.19)	86(6.07)	34(2.40)	127(8.96)	658(46.44)	1 417
13	813(54.27)	207(13.82)	162(10.81)	96(6.41)	68(4.54)	45(3.00)	107(7.14)	685(45.73)	1 498
14	684(47.37)	211(14.61)	181(12.53)	128(8.86)	98(6.79)	27(1.87)	115(7.96)	760(52.63)	1 444
15	592(43.56)	227(16.70)	127(9.35)	123(9.05)	105(7.73)	67(4.93)	118(8.68)	767(56.44)	1 359
16	812(53.70)	235(15.54)	131(8.66)	114(7.54)	55(3.64)	82(5.42)	83(5.49)	700(46.30)	1 512
17	691(49.32)	232(16.56)	97(6.92)	141(10.06)	91(6.50)	81(5.78)	68(4.85)	710(50.68)	1 401
18	789(51.47)	222(14.48)	181(11.81)	114(7.44)	71(4.63)	64(4.17)	92 (6.00)	744(48.53)	1 533
19	689(49.00)	233(16.57)	134(9.53)	101(7.18)	103(7.33)	60(4.27)	86(6.12)	717(51.00)	1 406
20	690(49.57)	225(16.16)	98(7.04)	136(9.77)	93(6.68)	66(4.74)	84(6.03)	702(50.43)	1 392
平均值 Means	687(50.32)	182(13.25)	137(10.07)	122(9.00)	82(6.05)	66(4.92)	87(6.39)	677(49.68)	1 364
合计 Total	13 742	3 638	2 749	2 436	1 636	1 326	1 746	13 531	27 273

注:括号内的数据为基因差异表达的比例;1. 吉林 30×意 3;2. 吉林 30×PEMVy;3. 吉林 30×EXP;4. 吉林 30×ARIRA;5. 吉林 30×SAP-
PRO;6. 吉林 38×意 3;7. 吉林 38×PEMVy;8. 吉林 38×EXP;9. 吉林 38×ARIRA;10. 吉林 38×SAPPRO;11. 2002 系选×意 3;12.
2002 系选×PEMVy;13. 2002 系选×EXP;14. 2002 系选×ARIRA;15. 2002 系选×SAPPRO;16. 吉林 47×意 3;17. 吉林 47×PEM-
Vy;18. 吉林 47×EXP;19. 吉林 47×ARIRA;20. 吉林 47×SAPPRO. 表 2、表 4、表 6 同。

Note;Data in brackets refer to the proportion of differentially expressed genes;1. Jilin 30×Yi 3;2. Jilin 30×PEMVy;3. Jilin 30×EXP;4.
Jilin 30×ARIRA;5. Jilin 30×SAPPRO;6. Jilin 38×Yi 3;7. Jilin 38×PEMVy;8. Jilin 38×EXP;9. Jilin 38×ARIRA;10. Jilin 38×
SAPPRO;11. 2002 lines×Yi 3;12. 2002 lines×PEMVy;13. 2002 lines×EXP;14. 2000 lines×ARIRA;15. 2002 lines×SAPPRO;
16. Jilin 47×Yi 3;17. Jilin 47×PEMVy;18. Jilin 47×EXP;19. Jilin 47×ARIRA;20. Jilin 47×SAPPRO. With the same meaning of
table 2,table 4 and table 6.

同一引物在 20 个不同杂交种中所扩增基因片段的表达模式大部分是相同的,在不同杂交组合之

间仅有很小的差异(图 2、图 3),这种微小差异可能正是造成不同杂交组合杂种优势不同的原因。

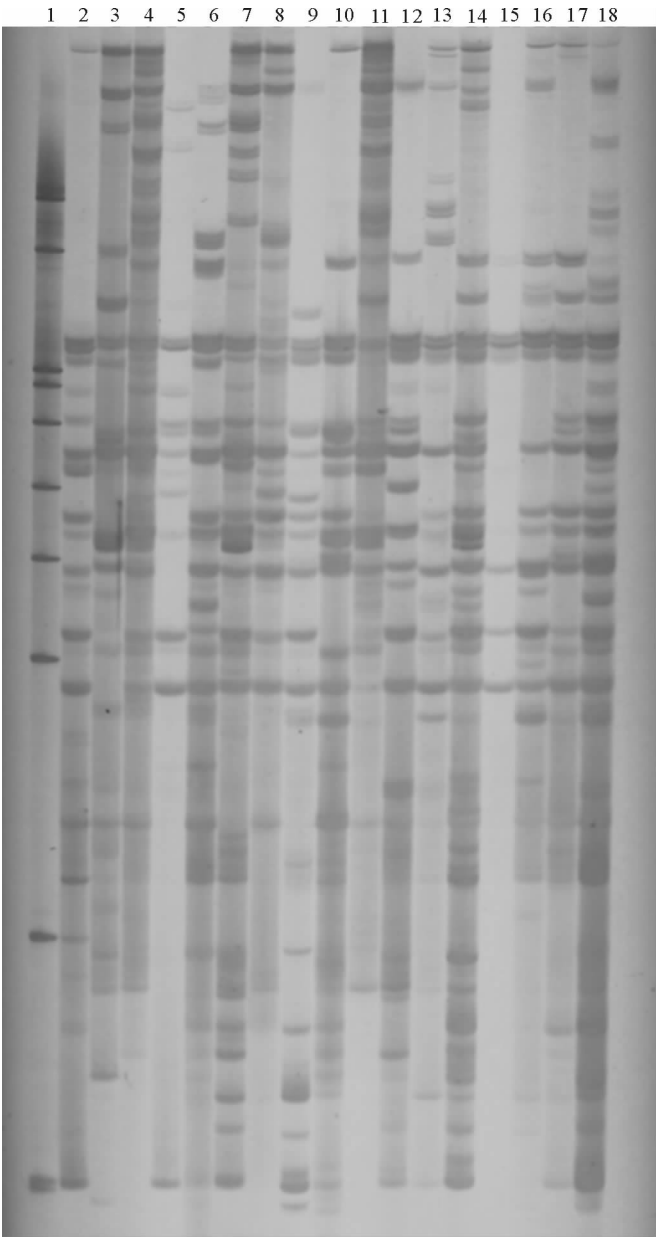


图 2 引物组合 R3L1 所扩增的苗期大豆杂交种的基因差异表达模式(以 2002 系选、吉林 47 为母本的 10 个杂交种)

1. Marker DL 3000;2. 2002 系选;3. 2002 系选×意 3;4. 意 3;5. 2002 系选×PEMVy;6. PEMVy;7. 2002 系选×EXP;
8. EXP;9. 2002 系选×ARIRA;10. ARIRA;11. 2002 系选×SAPPRO;12. SAPPRO;13. 吉林 47;14. 吉林 47×意 3;
15. 吉林 47×PEMVy;16. 吉林 47×EXP;17. 吉林 47×ARIRA;18. 吉林 47×SAPPRO

Fig. 2 Expression pattern of differential genes by the primer combination R3L1 amplification at the seedling stage of soybean (10 hybrids with 2002 lines and Jilin 47 as the female parents)

1. Marker DL 3000;2. 2002 lines;3. 2002 lines×Yi 3;4. Yi 3;5. 2002 lines×PEMVy;6. PEMVy;7. 2002 lines×EXP;
8. EXP;9. 2002 lines×ARIRA;10. ARIRA;11. 2002 lines×SAPPRO;12. SAPPRO;13. Jilin 47;
14. Jilin 47×Yi 3;15. Jilin 47×PEMVy;16. Jilin 47×EXP;17. Jilin 47×ARIRA;18. Jilin 47×SAPPRO

2.2 大豆杂交种基因差异表达模式与杂种表现的相关分析

对 20 个杂交组合的 6 种基因差异表达模式与 11 个性状(表 2)的杂种表现进行相关分析,结果见

表 3。由表 3 可见,百粒质量与 011 型呈显著负相关,与 101 型呈显著正相关;节数、脂肪与 100 型呈显著正相关;其他性状与 6 种差异表达模式间的相关性均未达显著水平。

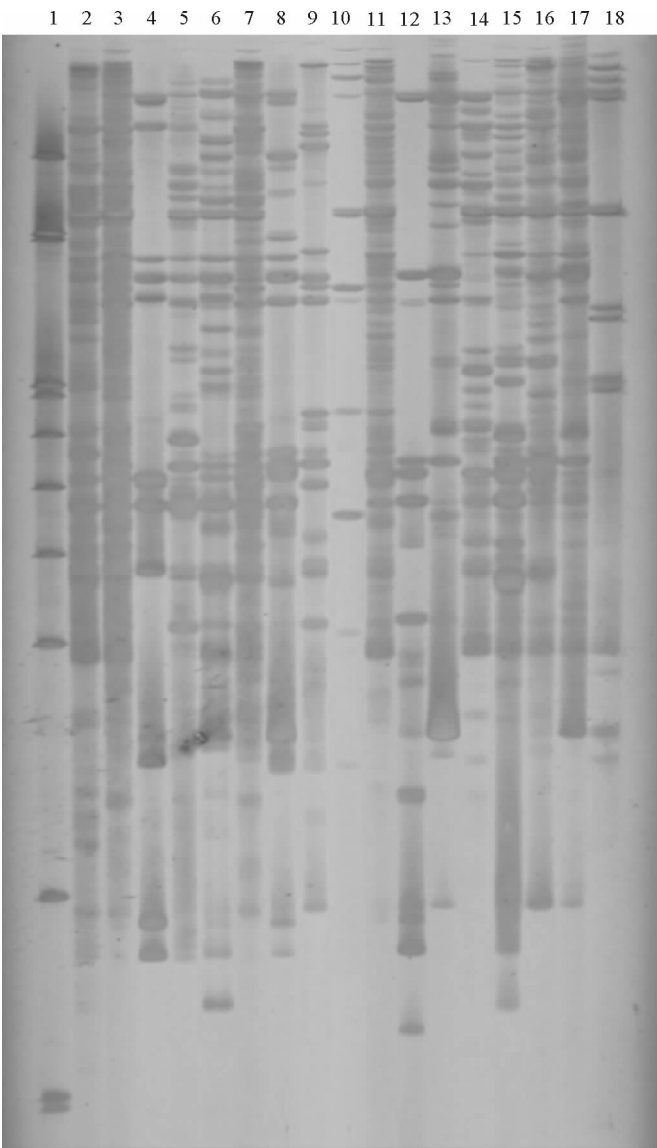


图 3 引物组合 R2L3 所扩增的苗期大豆杂交种的基因差异表达模式(以吉林 30、吉林 38 为母本的 10 个杂交种)

1. Marker DL 3000;2. 吉林 30;3. 吉林 30×意 3;4. 意 3;5. 吉林 30×PEMVy;6. PEMVy;7. 吉林 30×EXP;8. EXP;
9. 吉林 30×ARIRA;10. ARIRA;11. 吉林 30×SAPPRO;12. SAPPRO;13. 吉林 38;14. 吉林 38×意 3;
15. 吉林 38×PEMVy;16. 吉林 38×EXP;17. 吉林 38×ARIRA;18. 吉林 38×SAPPRO

Fig. 3 Expression pattern of differential genes by the primer combination R2L3 amplification at the seedling stage of soybean (10 hybrids with Jilin 30 and Jilin 38 as the female parents)

1. Marker DL 3000;2. Jilin30;3. Jilin 30×Yi 3;4. Yi 3;5. Jilin 30×PEMVy;6. PEMVy;7. Jilin 30×EXP;8. EXP;
9. Jilin 30×ARIRA;10. ARIRA;11. Jilin 30×SAPPRO;12. SAPPRO;13. Jilin 38;14. Jilin 38×Yi 3;
15. Jilin 38×PEMVy;16. Jilin 38×EXP;17. Jilin 38×ARIRA;18. Jilin 38×SAPPRO

表 2 大豆杂交种 F₁ 不同性状的平均值

Table 2 Average of soybean hybrid F₁ traits

组合 Combination	株高/cm Plant height	节数 No. of nodes per stem	分枝数 No. of branches per plant	单株荚数 No. of pods per plant	单株粒数 No. of seeds per plant	虫食粒率/% Rate of insect food	茎粗/mm Stem diameter	百粒质量/g 100-seed weight	单株粒质量/g Yield per plant	脂肪含量/(g·kg ⁻¹) Oil content	蛋白质含量/(g·kg ⁻¹) Protein content
1	85.27	17.87	2.93	112.60	225.60	4.84	1.14	18.79	41.90	191.3	443.5
2	93.41	20.40	3.80	111.80	264.60	6.32	1.12	19.17	49.94	205.3	421.8
3	100.01	21.47	5.07	131.87	284.87	4.58	1.28	17.47	48.65	211.8	399.0

续表 2 Continued table 2

组合 Combination	株高/cm Plant height	节数 No. of nodes per stem	分枝数 No. of branches per plant	单株荚数 No. of pods per plant	单株粒数 No. of seeds per plant	虫食粒率/% Rate of insect food	茎粗/mm Stem diameter	百粒质量/g 100-seed weight	单株粒质量/g Yield per plant	脂肪含量/(g·kg ⁻¹) Oil content	蛋白质含量/(g·kg ⁻¹) Protein content
4	104.14	21.32	4.30	107.82	217.48	4.34	1.06	19.27	46.42	204.8	399.2
5	105.40	20.53	3.00	80.20	190.60	3.78	0.89	19.74	37.34	211.5	399.9
6	79.06	19.78	5.75	164.17	393.85	3.89	1.34	20.48	78.10	204.7	417.7
7	79.97	20.33	4.49	126.98	311.09	6.07	1.35	19.65	61.78	218.9	402.5
8	89.81	21.40	4.87	144.20	326.80	4.42	1.35	19.42	61.37	204.4	384.1
9	103.69	22.53	3.92	132.72	332.81	3.92	1.19	20.32	62.99	207.8	403.3
10	95.32	22.67	5.47	155.00	334.40	5.09	1.29	20.51	69.41	212.4	400.3
11	78.15	18.73	2.80	86.87	188.73	3.96	0.96	19.31	36.53	221.2	428.1
12	90.11	21.00	3.80	116.33	257.20	2.86	1.13	19.53	51.20	207.3	410.7
13	87.43	21.53	5.87	162.40	352.93	5.39	1.30	17.35	62.65	212.3	387.5
14	92.07	21.40	3.67	98.80	230.53	5.71	0.94	19.03	43.75	221.9	389.7
15	103.67	22.40	3.80	104.73	245.00	7.06	1.04	19.85	49.58	221.4	407.5
16	80.26	18.47	3.13	85.53	194.00	4.10	1.15	20.07	39.67	212.7	433.7
17	90.93	20.13	3.33	97.93	216.67	4.30	1.08	19.75	44.61	209.0	421.7
18	103.10	22.60	5.47	126.07	297.60	4.42	1.22	19.42	56.23	204.0	415.4
19	94.69	20.40	4.67	116.93	258.93	5.04	1.31	19.13	49.05	215.6	393.3
20	99.71	20.35	3.33	87.88	185.40	4.63	1.12	19.45	36.94	214.7	404.8

表 3 大豆杂交种和亲本间基因差异表达模式与性状表现的相关性

Table 3 Correlativity of the differential genes expression pattern and hybrids performance among soybean hybrids and their parents

性状 Trait	110	011	101	100	001	010
株高 Plant height	0.13	−0.05	0.27	0.35	0.17	0.05
节数 No. of nodes per stem	−0.16	−0.15	0.40	0.51*	−0.01	0.12
分枝数 No. of branches per plant	−0.18	0.05	−0.07	−0.03	−0.04	0.01
单株荚数 No. of pods per plant	−0.42	−0.09	0.03	−0.01	0.06	−0.08
单株粒数 No. of seeds per plant	−0.42	−0.08	0.08	0.03	0.03	−0.02
虫食粒率 Rate of insect food	0.09	0.18	−0.34	0.34	−0.23	0.22
茎粗 Stem diameter	−0.29	−0.15	−0.09	−0.07	0.14	−0.15
百粒质量 100-seed weight	−0.04	−0.54*	0.52*	0.30	0.31	−0.19
单株粒质量 Yield per plant	−0.40	−0.21	0.16	0.09	0.07	−0.05
脂肪 Oil	0.13	−0.12	0.16	0.47*	−0.25	0.23
蛋白质 Protein	0.09	−0.05	−0.26	−0.37	0.28	−0.21

注:*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ 。下表同。
Note:*, $P<0.05$; **, $P<0.01$. The same as follows.

2.3 大豆杂交种基因差异表达模式与杂种优势的相关分析

在大豆苗期,对 20 个杂交组合的 6 种基因差异表达模式与 11 个性状的 MPH(表 4)进行相关分

析,结果见表 5。从表 5 可以看出,分枝数、单株荚数和单株粒数的 MPH 与 110 型呈显著负相关,单株粒质量的 MPH 与 110 型呈极显著负相关。

表 4 大豆不同杂交组合农艺性状和品质性状的 MPH

Table 4 MPH of agronomic and qualitative traits of soybean different combinations

组合 Combination	株高 Plant height	节数 No. of nodes per stem	分枝数 No. of branches per plant	单株荚数 No. of pods per plant	单株粒数 No. of seeds per plant	虫食粒率 Rate of insect food	茎粗 Stem diameter	百粒质量 100-seed weight	单株粒质量 Yield per plant	脂肪 Oil	蛋白质 Protein
1	6.34	−2.72	−26.67	22.97	2.79	−6.64	8.75	12.55	12.16	−5.95	3.90
2	−0.73	−1.77	6.54	22.81	28.65	8.50	4.90	8.06	36.29	−1.01	1.57
3	3.51	4.21	49.02	65.32	55.41	−5.74	27.11	−1.98	61.65	3.93	−5.17
4	5.79	1.59	20.56	25.17	9.84	4.05	13.92	14.64	39.55	−5.16	−1.03
5	17.22	4.94	−20.35	−28.01	−21.54	−27.13	−17.49	15.88	−10.86	−0.61	−0.53
6	0.59	6.84	78.76	104.10	115.53	−44.74	31.80	11.63	137.67	1.36	−0.11
7	13.54	−2.79	61.28	58.92	84.15	−20.91	30.34	1.33	92.15	6.29	−1.00
8	−5.49	3.13	85.99	110.10	122.97	−34.17	37.91	−0.31	139.73	1.01	−6.78
9	7.07	6.60	40.72	76.96	106.38	−34.89	32.11	10.08	118.97	−3.12	2.19

续表 4 Continued table 4

组合 Combination	株高 Plant height	节数 No. of nodes per stem	分枝数 No. of branches per plant	单株荚数 No. of pods per plant	单株粒数 No. of seeds per plant	虫食粒率 Rate of insect food	茎粗 Stem diameter	百粒质量 100-seed weight	单株粒质量 Yield per plant	脂肪 Oil	蛋白质 Protein
10	7.91	14.96	83.24	54.59	62.17	-27.73	23.15	9.77	85.62	0.50	1.77
11	-2.30	-4.26	-34.38	-21.69	-22.46	-32.49	-8.69	13.04	-15.46	6.65	2.59
12	-4.04	-4.40	-0.87	5.37	12.02	-56.00	4.93	7.75	20.49	-1.94	1.22
13	-9.33	-1.22	60.00	63.82	70.31	-2.89	27.77	-4.75	74.29	2.17	-5.77
14	-6.29	-3.53	-4.35	-6.35	3.88	17.67	0.26	10.66	11.85	0.89	-1.05
15	15.53	7.87	-5.79	-19.91	-8.19	20.12	-3.51	13.98	3.87	2.12	3.82
16	-6.03	-4.97	-25.98	-11.70	-16.09	-24.85	4.28	12.47	-6.04	6.06	2.04
17	-8.44	-7.79	-12.28	1.66	-0.34	-29.58	-3.98	4.52	7.49	2.18	1.99
18	1.23	4.31	50.46	48.20	52.59	-14.05	14.73	2.32	60.87	1.52	-0.85
19	-8.65	-7.48	22.81	27.89	23.46	13.31	32.44	6.49	28.65	1.17	-2.06
20	4.80	-1.37	-16.67	-24.69	-27.20	-15.38	-1.00	6.94	-20.98	2.26	1.14
平均值 Means	0.26	0.61	20.60	28.78	32.72	-15.68	12.99	7.75	43.90	1.02	-0.11

表 5 大豆杂交种和亲本间基因差异表达模式与 MPH 的相关性

Table 5 Correlativity of the expression pattern of differential genes between hybrids and their parents and MPH

性状 Trait	110	011	101	100	001	010
株高 Plant height	-0.02	-0.11	0.22	0.11	0.39	-0.05
节数 No. of nodes per stem	-0.37	-0.22	0.37	0.19	0.40	-0.16
分枝数 No. of branches per plant	-0.44 *	-0.07	0.15	0.05	0.09	-0.13
单株荚数 No. of pods per plant	-0.52 *	-0.01	0.11	-0.15	0.20	-0.24
单株粒数 No. of seeds per plant	-0.54 *	-0.06	0.20	-0.03	0.14	-0.16
虫食粒率 Rate of insect food	0.34	0.40	-0.40	0.17	-0.24	0.20
茎粗 Stem diameter	-0.42	-0.09	0.08	-0.02	0.15	-0.19
百粒质量 100-seed weight	0.13	-0.14	0.18	0.05	0.17	-0.05
单株粒质量 Yield per plant	-0.56 * *	-0.10	0.24	-0.04	0.18	-0.19
脂肪 Oil	0.08	-0.02	-0.07	-0.01	-0.04	0.01
蛋白质 Protein	0.12	-0.40	0.13	0.23	0.23	-0.09

对 6 种基因差异表达模式与 11 个性状的 BPH (表 6)进行相关分析,结果见表 7。从表 7 可以看出,单株荚数的 BPH 与单亲表达一致一型(110 型)呈显著负相关;单株粒数、单株粒质量的 BPH 与单亲表达一致一型(110 型)呈极显著负相关;虫食粒率的 BPH 与双亲共沉默型(101 型)呈极显著负相

关。基因差异表达模式与杂种优势的相关分析结果显示,单亲表达一致一型与和产量构成有关的性状优势间存在一定程度的负相关,此种表达模式在 6 种表达模式中所占比例也最高(表 1),而基因差异表达模式与杂种表现的相关性无明显的规律。

表 6 大豆不同杂交组合农艺性状和品质性状的 BPH

Table 6 BPH of agronomic and qualitative traits of soybean different combinations

组合 Combination	株高 Plant height	节数 No. of nodes per stem	分枝数 No. of branches per plant	单株荚数 No. of pods per plant	单株粒数 No. of seeds per plant	虫食粒率 Rate of insect food	茎粗 Stem diameter	百粒质量 100-seed weight	单株粒质量 Yield per plant	脂肪 Oil	蛋白质 Protein
1	-13.49	-11.26	-42.86	18.78	0.15	55.67	4.16	11.04	10.39	-8.21	3.32
2	-5.23	-4.67	-10.94	19.27	23.84	103.44	-1.58	3.27	31.58	-5.13	-1.74
3	1.47	1.90	28.81	49.28	33.32	47.55	25.54	-6.73	28.17	1.24	-7.05
4	5.66	-2.37	0.78	22.06	1.79	39.70	6.34	13.88	22.29	-12.29	-7.00
5	6.94	1.99	-35.71	-40.36	-29.98	21.75	-22.99	15.11	-18.50	-6.91	-6.84
6	-17.12	-3.18	12.01	73.17	74.84	-42.95	22.69	1.25	112.50	-1.78	-1.58
7	-16.16	-4.98	5.21	35.47	57.38	-10.85	18.93	-2.84	74.84	1.16	-2.27
8	-5.84	1.58	23.73	102.53	113.69	-33.21	32.25	-4.00	111.86	-2.29	-6.83
9	5.48	3.18	-8.20	58.13	82.54	-25.09	26.89	0.46	117.45	-11.01	-2.08
10	-0.07	10.93	17.14	15.27	22.85	-25.27	11.81	1.41	51.50	-6.51	-2.81
11	-20.40	-16.86	-45.45	-31.64	-27.84	-11.58	-11.93	9.13	-26.44	6.14	0.87
12	-8.22	-6.80	-10.94	-8.45	-1.66	-36.03	-0.88	5.21	3.11	-4.21	0.12
13	-10.95	-4.44	49.15	27.81	34.95	20.32	27.10	-7.40	26.16	1.48	-6.00

续表 6 Continued table 6

组合 Combination	株高 Plant height	节数 No. of nodes per stem	分枝数 No. of branches per plant	单株荚数 No. of pods per plant	单株粒数 No. of seeds per plant	虫食粒率 Rate of insect food	茎粗 Stem diameter	百粒质量 100-seed weight	单株粒质量 Yield per plant	脂肪 Oil	蛋白质 Protein
14	-6.34	-5.03	-14.06	-22.25	-11.85	27.62	-7.04	7.55	-11.90	-4.97	-5.00
15	5.59	-0.59	-18.57	-22.11	-9.99	57.62	-9.32	12.22	-0.15	-2.55	-0.66
16	-26.37	-17.07	-38.96	-13.54	-18.19	12.01	3.43	4.39	-16.81	2.06	1.89
17	-16.59	-9.58	-21.88	-1.01	-8.63	17.36	-5.27	2.73	-6.43	-3.42	-0.93
18	-5.42	1.50	38.98	27.43	25.50	20.66	10.35	1.01	17.94	-2.49	-2.41
19	-13.14	-8.38	9.38	18.19	9.19	37.67	17.93	-0.52	2.87	-7.67	-7.60
20	-8.53	-8.61	-28.57	-34.64	-31.89	26.37	-2.87	1.15	-22.53	-5.50	-4.90
平均 Means	-7.44	-4.14	-4.55	14.67	17.00	15.14	7.28	3.42	25.40	-3.64	-2.98

表 7 大豆杂交种和亲本间基因差异表达模式与 BPH 的相关性

Table 7 Correlativity of the expression pattern of differential genes between hybrids and their parents and BPH

性状 Trait	110	011	101	100	001	010
株高 Plant height	-0.20	-0.01	0.30	0.33	0.12	0.08
节数 No. of nodes per stem	-0.35	-0.11	0.33	0.34	0.17	-0.03
分枝数 No. of branches per plant	-0.17	0.15	-0.08	-0.02	-0.11	0.05
单株荚数 No. of pods per plant	-0.51 *	0.01	0.09	-0.20	0.26	-0.29
单株粒数 No. of seeds per plant	-0.57 * *	-0.05	0.21	-0.05	0.18	-0.19
虫食粒率 Rate of insect food	0.33	0.39	-0.59 * *	-0.05	-0.11	0.11
茎粗 Stem diameter	-0.41	-0.08	0.09	-0.12	0.21	-0.22
百粒质量 100-seed weight	0.25	0.12	0.03	-0.04	-0.02	0.13
单株粒质量 Yield per plant	-0.61 * *	-0.19	0.31	0.00	0.26	-0.23
脂肪 Oil	-0.04	0.19	-0.26	-0.29	-0.12	0.08
蛋白质 Protein	-0.02	-0.19	-0.07	-0.13	0.15	-0.04

3 讨 论

分子生物学技术的快速发展,为杂种优势机理研究提供了有力的工具,过去研究者在杂种优势显性和超显性假说的基础上,利用分子生物学手段,从亲本的基因组差异方面进行了研究,但对杂种优势机理研究提供的信息较少。近年来,研究人员利用基因差异显示技术,从作物不同时期基因差异表达的角度,对杂种优势机理进行了探讨。DDRT-PCR 技术是一项比较经济、实用研究基因差异表达的方法,尽管其仍有局限性,假阳性依然存在,但通过优化 PCR 条件、设计合适的引物,可将假阳性降到 10% 以下^[12]。本研究采用改良的 DDRT-PCR 技术,通过重复试验,得到了稳定可重复的差异条带,提高了结果的精确性。

对于同一种作物,一种特定的表达模式所占的比例因杂交组合不同而有很大变化。这说明来源于不同亲本组合的杂交种,其各种差异表达模式所占比例也是特定的,暗示其可能与不同杂交种的杂种优势大小有关。本研究结果表明,单亲表达一致一型(110 型)在 6 种表达模式中所占的比例最高(13.25%),并与中亲、超亲优势均表现一定程度的负相关,与单株荚数、单株粒数和单株粒质量 3 个性

状均达到显著或极显著负相关,表明此种类型的基因不利于杂种优势的形成,这与吴利民^[11]及熊立仲^[13]的研究结果有差异。吴利民^[11]认为,小麦拔节期双亲共沉默型(101 型)与性状杂种优势表现出一定程度的负相关,单亲表达沉默型(100 型或 001 型)与株高、单穗产量、生物学产量等 3 个性状杂种优势呈显著或极显著负相关,杂种特异表达类型(010 型)与穗长、小穗数、单株产量、单穗产量、生物学产量等 5 个性状杂种优势呈显著或极显著正相关,单亲表达一致型(110 型或 011 型)与株高、小穗数等 2 个性状杂种优势呈显著或极显著正相关,类似于基因的显性表达。与本研究结果不一致的原因,可能与小麦和大豆杂种优势形成所需的基因作用模式不同有关。熊立仲^[13]研究认为,水稻杂种优势与单亲表达沉默型(100 型或 001 型)呈显著正相关,而杂种特异表达类型(010 型)与杂种优势呈显著负相关;杂种表现和基因差异表达不相关。本研究发现,有部分性状的杂种表现和基因差异表达模式存在一定程度的相关性,这可能是单子叶和双子叶作物杂种表现在分子机理上存在一定差异造成的。

研究发现,有相同表达模式的基因往往具有相同或相近的代谢功能,而且具有相近生理功能的基因往往趋向于相同的表达模式^[14]。Eisen 等^[15]利

用 DNA 芯片技术,研究了出芽酵母在不同生长时期、不同环境条件下所有基因的表达情况,并进行了聚类分析,结果发现有相似功能的基因聚在一起,并且这些功基因在不同生长时期或不同生长环境下具有相同的表达模式。Laurie 等^[16] 研究认为,功能相关的基因共表达,共表达的基因可能有相同的调控系统。这种表达模式的相似性,可能是基因之间协调发挥作用的最简单有效的方法。本研究暗示,单亲表达一致一型(110 型)是具有相同表达模式的一批基因,而这批基因和杂种优势呈显著负相关则意味着,这些基因包含在不利于杂种优势形成的生理代谢途径中,或是包含在对杂种优势形成有利的生理代谢途径的负调控途径中。

4 结 论

本试验利用 DDRT-PCR 技术,对大豆苗期基因差异表达模式与杂种优势的关系进行了研究,结果显示,杂交种和亲本之间存在明显的基因差异表达,差异表达模式可分为单亲表达一致一型、单亲表达一致二型、双亲共沉默型、单亲表达沉默一型、单亲表达沉默二型和杂种特异表达类型 6 种;单亲表达一致一型与单株荚数、单株粒数和单株粒质量 3 个性状存在显著或极显著负相关关系,表明这类基因不利于产量构成因素杂种优势的形成。

[参考文献]

[1] 李建雄,余四斌,徐才国,等.“汕优 63”的产量及其构成因子的数量性状基因位点分析 [J]. 作物学报,2000,26(6):892-898.
Li J X,Yu S B,Xu C G,et al. Quantitative trait loci(QTLs) analysis of yield and its component traits in “Shanyou 63” hybrid [J]. Acta Agronomica Sincia,2000,26(6):892-898. (in Chinese)

[2] 王曙明,孙 寰,王跃强,等. 大豆杂种优势及其高优势组合选配的研究 I. F₁ 代子粒产量的杂种优势与高优势组合选配 [J]. 大豆科学,2002,21(3):161-167.
Wang S M,Sun H,Wang Y Q,et al. Studies on heterosis and screening of highly heterotic combinations in soybean I. F₁ seed yield heterosis and screening of highly heterotic combinations [J]. Soybean Science,2002,21(3):161-167. (in Chinese)

[3] 赵丽梅,孙 寰,王曙明,等. 大豆杂交种杂交豆 1 号选育报告 [J]. 中国油料作物学报,2004,26(3):15-17.
Zhao L M,Sun H,Wang S M,et al. Breeding of hybrid soybean HybSoy1 [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2004,26(3):15-17. (in Chinese)

[4] Cerna F J,Cianzio S R,Rafalski A,et al. Relationship between seed yield heterosis and molecular marker heterozygosity in soybean [J]. Theor Apple Genet,1997,95(3):460-467.

[5] 张 博,邱丽娟,常汝镇. 利用大豆育成品种的 SSR 标记遗传

距离预测杂种优势的初步研究 [J]. 大豆科学,2003,22(3):166-171.

Zhang B,Qiu L J,Chang R Z. Primary study on predicting heterosis by SSR marker distance among soybean cultivars [J]. Soybean Science,2003,22(3):166-171. (in Chinese)

[6] Liang P,Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science,1992,257(14):967-971.

[7] 王章奎. 普通小麦杂交种与亲本间根系基因表达差异与杂种优势分子机理 [D]. 北京:中国农业大学,2004.
Wang Z K. Differential gene expression between wheat (*Triticum Aestivum* L.) hybrids and their parental inbreds and its relationship to molecular basis of heterosis [D]. Beijing:China Agricultural University,2004. (in Chinese)

[8] 程宁辉,胡建广,赵相山,等. 光照和黑暗条件下大豆和玉米基因表达差异的初步研究 [J]. 复旦大学学报:自然科学版,1997,36(5):524-530.
Cheng N H,Hu J G,Zhao X S,et al. Gene express patterns of light-grown and dark-grown seedlings maize and soybean [J]. Journal of Fudan University:Natural Science,1997,36(5):524-530. (in Chinese)

[9] Schopfer C R,Ebel J. Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA [J]. Mol Gen Genet,1998,258(4):315-322.

[10] Vladimir E. Genes differentially expressed in soybean lines sensitive and tolerant to aluminium stress [D]. Halle-Wittenberg:Martin-Luther-Universität,2001.

[11] 吴利民. 小麦杂交种和亲本间基因差异表达模式与杂种优势关系的研究 [D]. 北京:中国农业大学,2002.
Wu L M. Relationship between differential gene expression patterns and heterosis in a wheat diallel crosses [D]. Beijing: Chinese Agricultural University,2002. (in Chinese)

[12] Heins V K,Claudia A,Manuel M,et al. Identification of genes regulated by muscarinic acetylcholine receptors:application of an improved and statistically comprehensive mRNA differential display technique [J]. Nucleic Acids Research,1999,27(10):2211-2218.

[13] 熊立仲. 基因表达水平水稻杂种优势的分子生物学基础研究 [D]. 武汉:华中农业大学,1999.
Xiong L Z. Studies on molecular basis of rice heterosis at gene expression level [D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University,1999. (in Chinese)

[14] Ewing R M,Alia B K,Olivier P,et al. Large scale statistical analysis of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression [J]. Genome Research,1999,9(10):950-959.

[15] Eisen M B,Paul T S,Patrick O B,et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998,95:14863-14868.

[16] Laurie J H,Semyon K,Shibu Y. Exploring expression data: Identification and analysis of coexpressed genes [J]. Genome Research,1999,9(11):1106-1115.