

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2022.14102

基于 783 份大豆种质资源的叶柄夹角全基因组关联分析

陈玲玲^{1,2} 李 战¹ 刘亭萱¹ 谷勇哲² 宋 健^{1,*} 王 俊^{1,*}
邱丽娟^{1,2,*}

¹ 长江大学, 湖北荆州 434025; ² 农作物基因资源与遗传改良国家重大科学工程 / 农业农村部种质资源利用重点实验室 / 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘 要: 叶柄夹角是影响植株高效受光态势的重要因素, 通过调节叶柄夹角实现大豆株型改良, 对大豆产量提高非常重要。大豆叶柄夹角为数量性状, 目前大多数研究处于 QTL 定位阶段, 已报道的控制叶柄夹角 *GmILPA1* 基因也是从突变体中克隆得到, 因此亟须发掘更多调控基因及优异等位变异, 以促进大豆叶柄夹角调控机制的解析及育种利用。本研究于 2019 年和 2020 年分别在海南、北京种植 783 份和 690 份大豆种质资源并调查叶柄夹角表型, 通过分布于大豆全基因组的单核苷酸多态性(SNP)标记对叶柄夹角进行关联分析。结果表明, 不同节位叶柄夹角呈现正态分布, 属于典型的数量遗传特征。全基因组关联分析共统计到 325 个与叶柄夹角显著相关的 SNP 位点, 在顶部节位关联到 51 个 SNP 位点, 中部节位关联到 230 个 SNP 位点, 底部节位关联到 10 个 SNPs 位点, 3 个节位的平均值关联到 34 个 SNP 位点。显著位点 LD block 进一步分析得到 3 个候选基因, 第 1 个是生长素类调节蛋白相关的基因 *Glyma.05G059700*, 在茎尖分生组织中特异性表达, 第 2 个是生长素反应因子 (AFR) 类蛋白相关基因 *Glyma.06G076900*, 在叶片和茎尖分生组织中高表达; 第 3 个是 COP9 信号体复合物相关的基因 *Glyma.06G076000*, 在叶片、茎尖分生组织以及茎中均高表达。

关键词: 大豆; 叶柄夹角; 全基因组关联分析

Genome wide association analysis of petiole angle based on 783 soybean resources (*Glycine max* L.)

CHEN Ling-Ling^{1,2}, LI Zhan¹, LIU Ting-Xuan¹, GU Yong-Zhe², SONG Jian^{1,*}, WANG Jun^{1,*}, and QIU Li-Juan^{1,2,*}

¹ Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China; ² National Key Facility for Gene Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Crop Germplasm Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Petiole angle is one of the important factors that affects the high-efficiency light posture of plants. It is very important to improve soybean plant architecture by adjusting the leaf angle petioles. Soybean petiole angle is a quantitative trait, which is limited to QTLs mapping for most studies up to date. The reported gene *GmILPA1* controlling leaf petiole angle gene was cloned from mutants. Identification of more regulatory genes and elite alleles is urgent both for the clarification of genetic mechanism for petiole angle and its breeding utilization. In this study, 783 and 690 soybean germplasms were phenotypic for petiole angle in Hainan and Beijing in 2019 and 2020, respectively, and genome-wide associated study (GWAS) were performed using genome-wide distributed SNPs. Results showed that the petiole angle at different nodes (top, middle, and bottom nodes) were in normal distribution, suggesting that the trait of typical quantitative was inheritance. A total of 325 SNPs associated with petiole angle were identified by two-point GWAS analysis in two years, including 51, 230, 10, and 34 SNPs for petiole angles of the top,

本研究由大豆种质资源保存(19211205)和荆州市科技计划项目(2020CB21-28)资助。

This study was supported by the Preservation of Soybean Germplasm Resources (19211205) and the Jingzhou Science and Technology Plan Project (2020CB21-28).

* 通信作者 (Corresponding authors): 宋健, E-mail: songhanxi2013@163.com; 邱丽娟, E-mail: qulijuan@caas.cn; 王俊, E-mail: wangjagri@yangtzeu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 905540072@qq.com

Received (收稿日期): 2021-06-10; Accepted (接受日期): 2021-10-19; Published online (网络出版日期): 2021-11-15.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20211115.1141.002.html>

middle, bottom, and mean value of different nodes, respectively. Three candidate genes (*Glyma.05G059700*: auxin regulatory protein, *Glyma.06G076900*: AFR, and *Glyma.06G076000*: COP9) were obtained by LD block analysis. Transcriptional analysis revealed that all these three candidate genes had high expression level in shoot apical meristem (SAM), however, high expression level were also identified in leaf for *Glyma.06G076900*, leaf and stem for *Glyma.06G076000*.

Keywords: soybean; leaf petiole angle; GWAS

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是重要的粮饲兼用经济作物, 在我国国民经济发展及世界粮油作物中占有重要地位。叶柄夹角是理想株型的重要构成因素, 通过调节叶柄夹角开展高产株型育种是提高产量的重要途径。大豆叶柄夹角 (leaf angle petioles, LPA) 是叶柄与主茎之间的倾斜程度, 决定了植株整体的冠层盖度, 在决定大豆和其他许多植物株型上面具有关键性作用。大豆叶柄夹角受环境影响较大, 到目前为止研究多处于 QTL 定位阶段, 而已报道的控制叶柄夹角 *GmILPA1* 基因也是从突变体中克隆得到^[1]。因此, 发掘更多调控大豆叶柄夹角的基因及优异等位基因, 将为大豆叶柄夹角调控提供新的基因资源, 同时为进一步揭示大豆叶柄夹角调控的遗传与分子机制奠定坚实基础。

株型是植株整体特征的集中表现, 一般分为叶型、茎型、穗型和根型, 而叶型和茎型决定了植株地上的形态, 株型由株高、分枝数、叶(柄)夹角等多种性状决定。自 1968 年 Donald 提出理想株型后, 科研人员就开始对其进行大量的研究。水稻叶夹角的研究发现叶片挺立、夹角小有利于叶片双面受光, 对光的反射率较小, 可以提高冠层光合效率, 增加干物质的积累, 同时改善群体下层光照, 增强根系活力, 进而提高水稻产量^[2-3]。玉米的理想株型可以最大限度的利用光能提高干物质积累量, 进而提高产量, 而叶夹角减少可以改善不同节位叶长和叶宽等叶部性状, 有助于紧凑型玉米的选育, 在密植的条件下, 较小的叶夹角可以减小遮阳维持光捕捉, 提高叶片氮的积累灌浆增产, 从而提高玉米产量^[4-7]。同样, 在大豆中叶柄夹角也是影响光合和密植的主要因素, 是影响产量的关键因素之一^[8-9]。

大豆叶柄夹角相对其他作物研究较缓慢, 2012 年王吴彬等^[10]利用一个大豆的染色体片段置换系 (chromosome segment substitution lines, CSSL) 群体 (SojaCSSLPI) 对叶柄夹角进行 QTL 定位, 共检测到 5 个 QTL, 其中与 Sat_286 连锁的 QTL 可被稳定地检测到, 该位点可解释 22% 的遗传变异。然而由于分子标记等原因限制, 遗传位点没有被精细定位和克隆, 在育种过程中的可利用性需进一步验证。王

存虎等^[9]利用 GBS 技术构建了包含 859 个 Bin 标记的大豆高密度遗传图谱, 总遗传长度为 2326.9 cM, 标记间平均距离为 2.763 cM, 共检测到 14 个调控叶柄角的 QTL, LOD 值在 2.58~4.80 之间, 可解释遗传变异范围在 6.9%~12.4% 之间, 其中 5 个 QTL 定位在 12 号染色体上且成簇存在。这些大豆叶柄夹角功能位点的挖掘鉴定有助于我们了解在选择过程中控制大豆叶柄夹角的分子基础。2017 年 Gao 等^[11]利用 165 个 InDel 标记和一个突变体材料将调控大豆叶柄角的 *GmILPA1* 位点定位在 11 号染色体上, 位于标记 MOL1197 和 MOL1233 之间, 进一步通过图位克隆的方式克隆到 *GmILPA1* 基因, 该基因编码 APC8-like 蛋白, 可以与 GmAPC13a 直接相互作用, 通过 APC 复合体行使功能突变该基因后可使叶枕发育异常、叶柄夹角增大。但由于该基因是在由突变体中获得, 在多数自然群体中缺乏等位变异, 这大大限制了该基因的应用。

迄今, 有关大豆叶柄夹角的全基因组关联分析及候选基因发掘的报道较少, 本研究利用 783 份大豆种质资源通过全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS), 挖掘自然品种中控制大豆叶柄夹角相关基因的位点, 为大豆叶柄夹角相关基因的克隆及遗传研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及表型鉴定

试验材料为 783 份大豆种质资源, 由中国农业科学院作物科学研究所提供。2019 年种植于海南三亚 (18.25°N, 109.51°E), 行长 3 m, 一垄 2 行, 垄距 70 cm, 株距 10 cm, 双粒点播, 正常水肥管理; 2020 年种植于北京顺义 (40.13°N, 116.65°E), 行长 3 m, 株距 10 cm, 行距 50 cm, 双粒点播, 正常水肥管理。材料包括 685 份 (87.48%) 国内大豆材料、94 份 (12.01%) 国外材料以及 4 份 (0.51%) 未知来源材料。国内材料包括东北、北方、黄淮海和南方材料各 126 份 (18.39%)、99 份 (14.45%)、119 份 (17.37%)、200 份 (29.20%), 以及 141 份 (20.58%) 选育品种 (图 1)。R6 鼓粒期进行测量, 参考陈玲玲等^[11]的表型测量方

式, 测量时避开边行优势, 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, 参考平均值用于统计分析, 所用工具为数显角度测量尺。表型分析时, 将 2 年 2 点间叶柄夹角大小

变化划分为 3 个差异等级进行分析: 差异等级 1 为 2 年 2 点间叶柄夹角变化差异为 $0^{\circ}\sim 20^{\circ}$ 的材料, 等级 2 为 2 年 2 点叶柄夹角变化差异为 $21^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 的材料, 等级 3 为 2 年 2 点间叶柄夹角变化超过 40° 的材料。

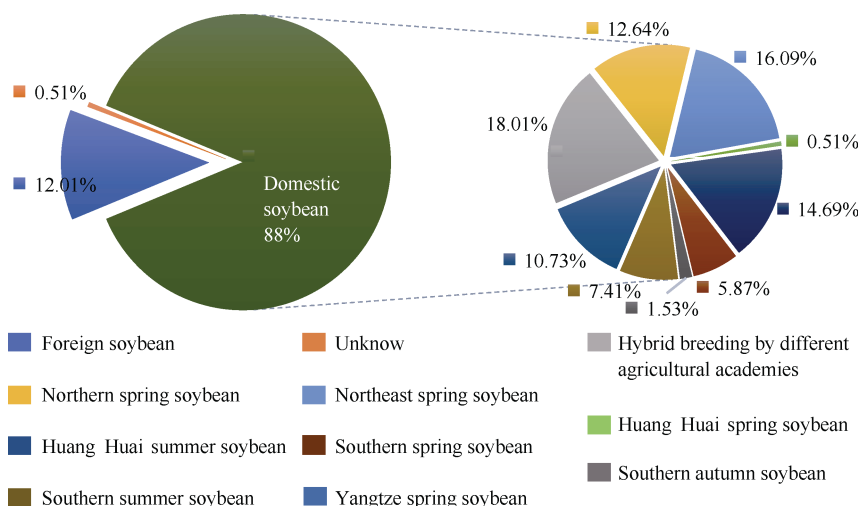


图 1 783 份大豆材料地理分布

Fig. 1 Distribution of 783 soybean resources

1.2 基因型测定

采用改良 CTAB 小量法^[12]提取大豆种质基因组, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计 (UV-Vis Spectrophotometer Q5000) 测其 DNA 质量和浓度, 合格的样品用于 SNP 分型。由北京百迈克生物科技有限公司进行重测序, 试验流程按照 Illumina 公司提供的标准执行, 包括样品检测、文库构建、文库质量检测 and 上机测序。

1.3 GWAS 分析

利用 plink 对测得的 SNP 数据进行基因型过滤 (geno-0.4, maf-0.05), 利用 beagle 进行基因型填补, 排序后利用 TASSEL 进行主成分分析和亲缘关系分析。

使用 TASSEL 5.0 软件和混合线性模型 (MLM) 进行 GWAS 分析。具体分析如下, $y = \mu + Xb + Z\gamma + Mu + P\lambda + e$, 式中, y 为群体数量性状表型观测值向量; μ 为样本均值向量; b 为固定效应向量; γ 为 SNP 效应向量; u 为多基因效应向量; λ 是初生重向量; X 和 Z 是分别对应于固定效应向量 b 和 γ 的关联矩阵; M 为对应于随机效应向量 u 的关联矩阵; P 是对应于初生重向量的关联矩阵, e 为残差。根据标记数和样品数比值计算阈值, 通过关联的显著度 (P -value), 判定 SNP 标记与叶柄夹角关联的显著性。参考 Lyu

等^[13]的研究, 规定在 SNP 附近 200 kb 的范围内至少有 2 个显著性位点作为一个叶柄夹角 QTL 的标准, 取 Peak SNP 上下 200 kb 进行 LD Block 分析, 通过 t 测验来评估 2 个等位基因之间叶柄夹角的显著差异。

1.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2013 进行数据的录入和整理, 使用 Minitab19 对所有表型数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 叶柄夹角表型分析

以 2019 年海南的 783 份、2020 年北京的 690 份种质资源材料 3 个节位叶柄夹角表型值和 3 个节位叶柄夹角表型的平均值进行统计分析, 分别统计了叶柄夹角最大值、最小值、平均值、标准差、变异系数等。结果表明, 大豆种质资源叶柄夹角的变异幅度较大, 在海南三亚测量顶部夹角范围为 $17.0^{\circ}\sim 110.6^{\circ}$, 中部夹角范围为 $14.6^{\circ}\sim 109.9^{\circ}$, 底部夹角范围为 $21.7^{\circ}\sim 99.8^{\circ}$; 北京测量顶部的夹角范围为 $22.0^{\circ}\sim 111.9^{\circ}$, 中部夹角范围为 $22.0^{\circ}\sim 119.5^{\circ}$, 底部夹角范围为 $27.23^{\circ}\sim 108.9^{\circ}$ (表 1)。整体而言, 高纬度地区叶柄角度大于低纬度地区, 可能与光照有关。由性状频率分布图 (图 2) 可知, 3 个节位

叶柄夹角都呈现正态分布, 表明叶柄夹角是一个多基因控制的数量性状。此外, 统计结果发现 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均呈现显著差异。

表 1 690 份材料 2 年 2 点叶柄夹角基本数据分析
Table 1 Basic data of the angle between the petioles of 690 materials in two years

地点 Location	节位 Node	极大值 Max (°)	极小值 Min (°)	均值 Average (°)	标准差 Standard deviation (°)	变异系数 Coefficient of variation(%)
2019 年海南 2019 Hainan	顶部 Top	110.6	17.0	41.0	12.0	29.3
	中部 Middle	109.9	14.6	39.8	10.7	26.9
	底部 Bottom	99.8	21.7	57.6	13.0	22.6
	平均值 Average	104.2	24.4	46.1	9.9	21.5
2020 年北京 2020 Beijing	顶部 Top	111.9	22.0	48.4	14.1	29.1
	中部 Middle	119.5	22.0	49.5	10.3	20.8
	底部 Bottom	108.9	27.2	55.9	11.2	20.0
	平均值 Average	99.1	27.5	51.3	8.4	16.4

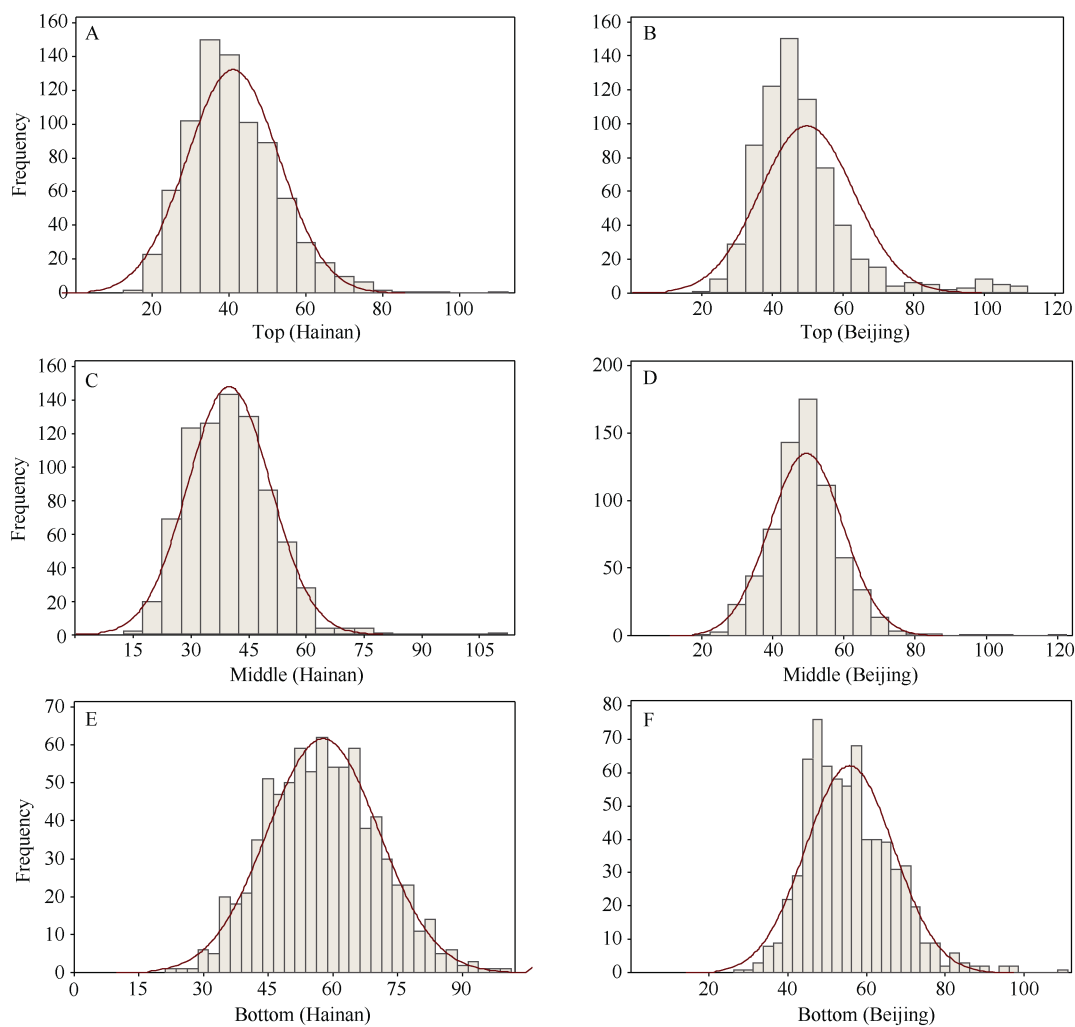


图 2 自然群体叶柄夹角表型分布
Fig. 2 Phenotypic distribution of petiole angle in natural population
A、C、E 为 2019 海南顶部、中部和底部节位叶柄夹角分布频率直方图, 每个样本 3 个重复; B、D、F 为 2020 北京顶部、中部和底部节位叶柄夹角频率分布直方图, 每个样本 3 个重复。
A, C, and E are the distribution frequency histograms of petiole angle at top, middle, and bottom nodes of Hainan in 2019, with three replicates per sample; B, D, and F are the distribution frequency histograms of petiole angle at top, middle, and bottom nodes of Beijing in 2020, with three replicates per sample.

2.2 不同节位叶柄夹角相关性分析

对2年间不同节位叶柄夹角进行相关性分析(表2)表明,同一年不同节位之间表现为极显著的正相关。即2019年海南3个节位叶柄夹角呈现显著正相关;2020年北京3个节位之间呈现显著正相关。此外海南顶部节位叶柄夹角与北京顶部节位、中部节位叶柄夹角均呈显著正相关,海南底部节位叶柄夹角与北京中部节位叶柄夹角之间呈现显著正相关。说明叶柄夹角在不同地点和年份间有较大的影响。

方差分析表明,2年间相同节位叶柄夹角以及3个节位平均值都呈现极显著差异,说明该性状受环境影响较大(图3-A)。统计分析发现,84%的材料在2年2点间的变化幅度较小,15%的材料叶柄夹角变化在20°~40°之间,只有1%极少部分的材料2年间的差异极大(图3-B),说明不同材料叶柄夹角稳定性存在差异。由于多数材料叶柄夹角不同环境间稳定性较好,可用于后续GWAS分析。

进一步对3种差异等级材料的地理分布分析发现,差异等级1的材料主要集中在北方春大豆、东北春大豆、黄淮夏大豆、长江春大豆以及各个研究所杂交的品种中,说明这些品种在2种环境的下的适应能力较强。差异等级2的材料主要集中在南方夏大豆中。差异等级3的材料分布在南方夏大豆和研究院所杂交的品种中,但由于材料数量较少,只在个别品种中出现,其地理分布并不能完全说明这些地方的品种适应能力较弱,受环境影响较大。通过对材料地理分布的分析,有利于筛选更好的对环境适应能力较强的叶柄夹角研究材料,为进一步

研究奠定基础。

2.3 叶柄夹角 GWAS 定位

利用重测序数据对样本 SNP 进行提取,经过筛选过滤,共获得 7,421,695 个 SNP 位点,用于后续分析。通过 TASSEL 进行主成分分析和亲缘关系分析,取前 5 个主成分特征值 PCA 作为群体结构, Kinship 文件为亲缘关系值。对材料进行全基因组关联分析(图4),每个子图左侧为 QQ 图(Quantile-quantile plot),表示实际 P 值和无关联零假设期望 P 值的分布;右侧为曼哈顿图(Manhattan),虚线表示阈值,当 $-\log_{10}(P)$ 值高于虚线时,认为该 SNP 与该性状显著相关,二者均表明在全基因组范围内存在与叶柄夹角显著关联的位点。

2019 年海南,在顶部节位叶柄夹角紧密关联的 SNP 共有 36 个,分布在 6 号和 18 号染色体;中部节位叶柄夹角紧密关联的 SNP 共有 7 个,分布在 4 号和 9 号染色体上;与底部节位叶柄夹角紧密关联的 SNP 共有 5 个,位于 1 号染色体上;GWAS 定位 3 个节位平均值紧密关联的 SNP 共有 3 个,位于 5 号染色体上(表3)。

2020 年北京 GWAS 定位与顶部节位叶柄夹角紧密关联的 SNP 共有 15 个,主要分布在 3 号、7 号、11 号、17 号染色体上;与中部节位叶柄夹角紧密关联的 SNP 共有 223 个,分别分布在 6 号、13 号、14 号、19 号染色体上;与底部节位叶柄夹角紧密关联的 SNP 共有 5 个,主要分布在 3 号和 19 号染色体上。GWAS 定位 3 个节位平均值紧密关联的 SNP 共有 31 个,主要位于 6 号染色体上(表3)。

表 2 2 年 2 点不同节位叶柄夹角相关性分析
Table 2 Correlation analysis of two different nodes in two years

地点 Location	节位 Node	北京 Beijing			海南 Hainan		
		顶部 Top	中部 Middle	底部 Bottom	顶部 Top	中部 Middle	底部 Bottom
北京 Beijing	顶部 Top	1					
	中部 Middle	0.203**	1				
	底部 Bottom	0.142**	0.419**	1			
海南 Hainan	顶部 Top	0.088*	-0.068	-0.119*	1		
	中部 Middle	0.042	-0.014	-0.048	0.601**	1	
	底部 Bottom	0.004	-0.082*	-0.068	0.426**	0.584**	1

通过相关系数 r 的绝对值取值范围来判断变量的相关强度: 0.8~1.0 表示极强相关; 0.6~0.8 表示强相关; 0.4~0.6 表示中等程度相关; 0.2~0.4 表示弱相关; 0~0.2 表示极弱相关或无相关^[13]。*、**分别表示在 0.05 和 0.01 水平相关性显著。

The correlation strength of variables can be judged by the absolute value range of correlation coefficient r : 0.8–1.0 means very strong correlation; 0.6–0.8 means strong correlation; 0.4–0.6 means moderate correlation; 0.2–0.4 means weak correlation; 0–0.2 means very weak correlation or no correlation^[13]. * and ** mean significant correlation at the 0.05 and 0.01 probability levels.

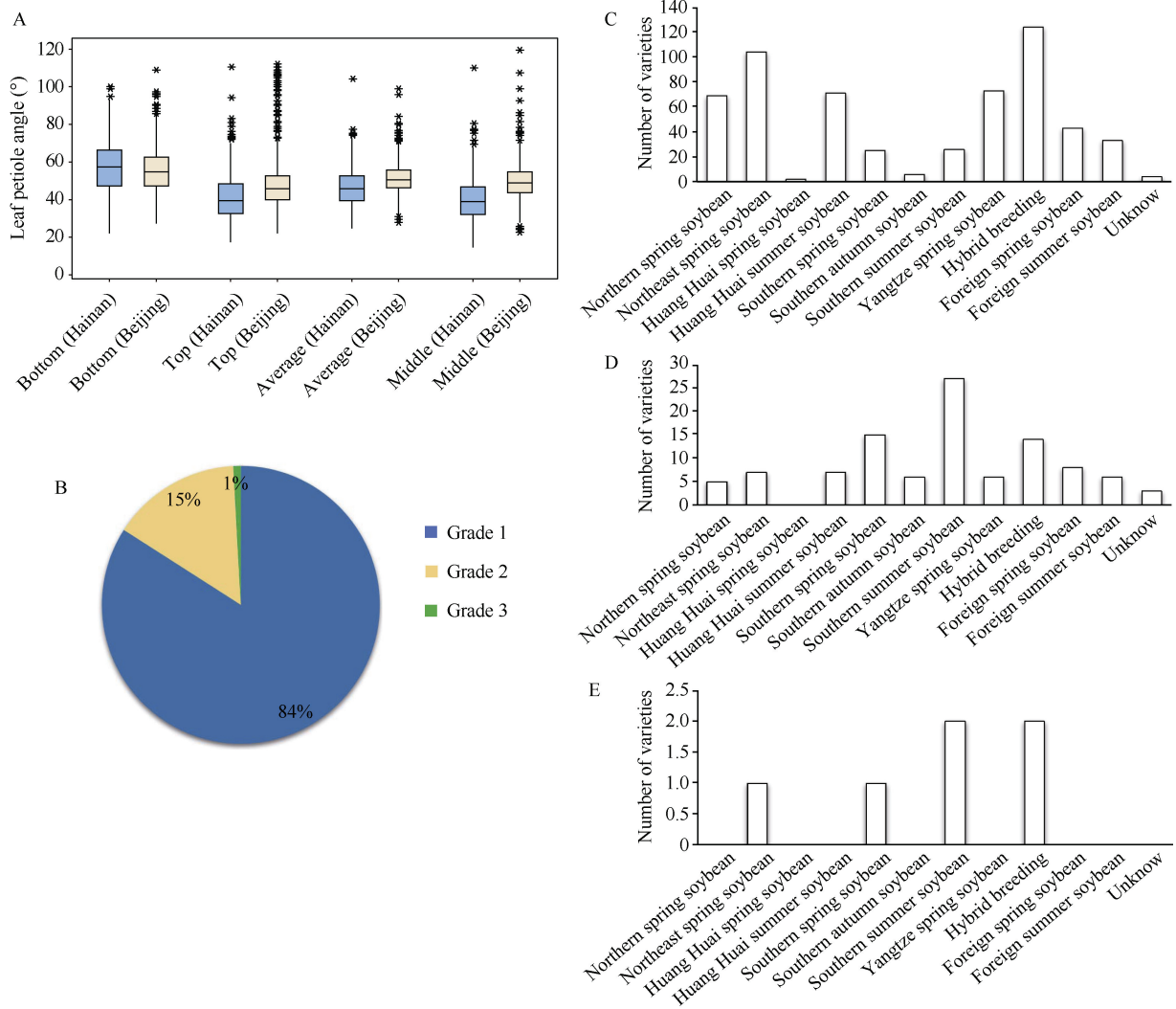
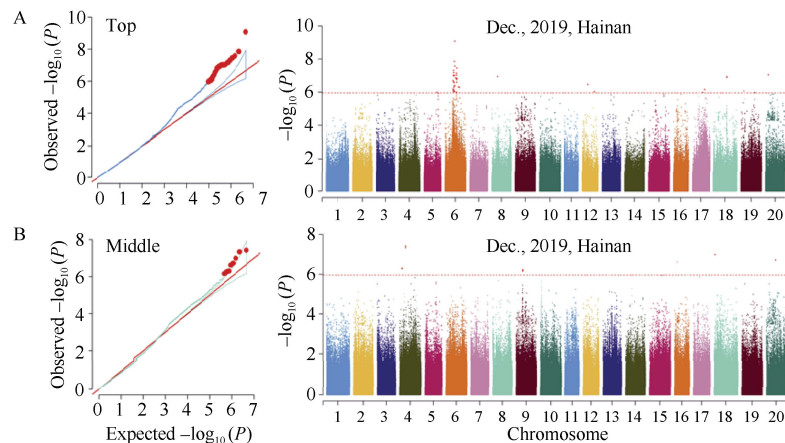


图 3 2 年 2 点表型差异性分析

Fig. 3 Analysis of phenotypic difference between two years

A: 2 年 2 点相同节位表型差异性显著性分析; B: 不同差异等级材料比例分析; C: 2 年表型差异在 0°~20°材料地理分布; D: 2 年表型差异在 21°~40°材料地理分布; E: 2 年表型差异大于 40°材料地理分布。

A: the significance analysis of phenotypic differences at the same node in two years; B: the analysis of the proportion of different grade materials; C: the phenotypic difference between the two years was in the geographical distribution of 0°-20° materials; D: the analysis of the proportion of different grade materials; C: the phenotypic difference between the two years was in the geographical distribution of 21°-40°; E: the difference of phenotype in two years is more than 40° in material geographical distribution.



(图 4)

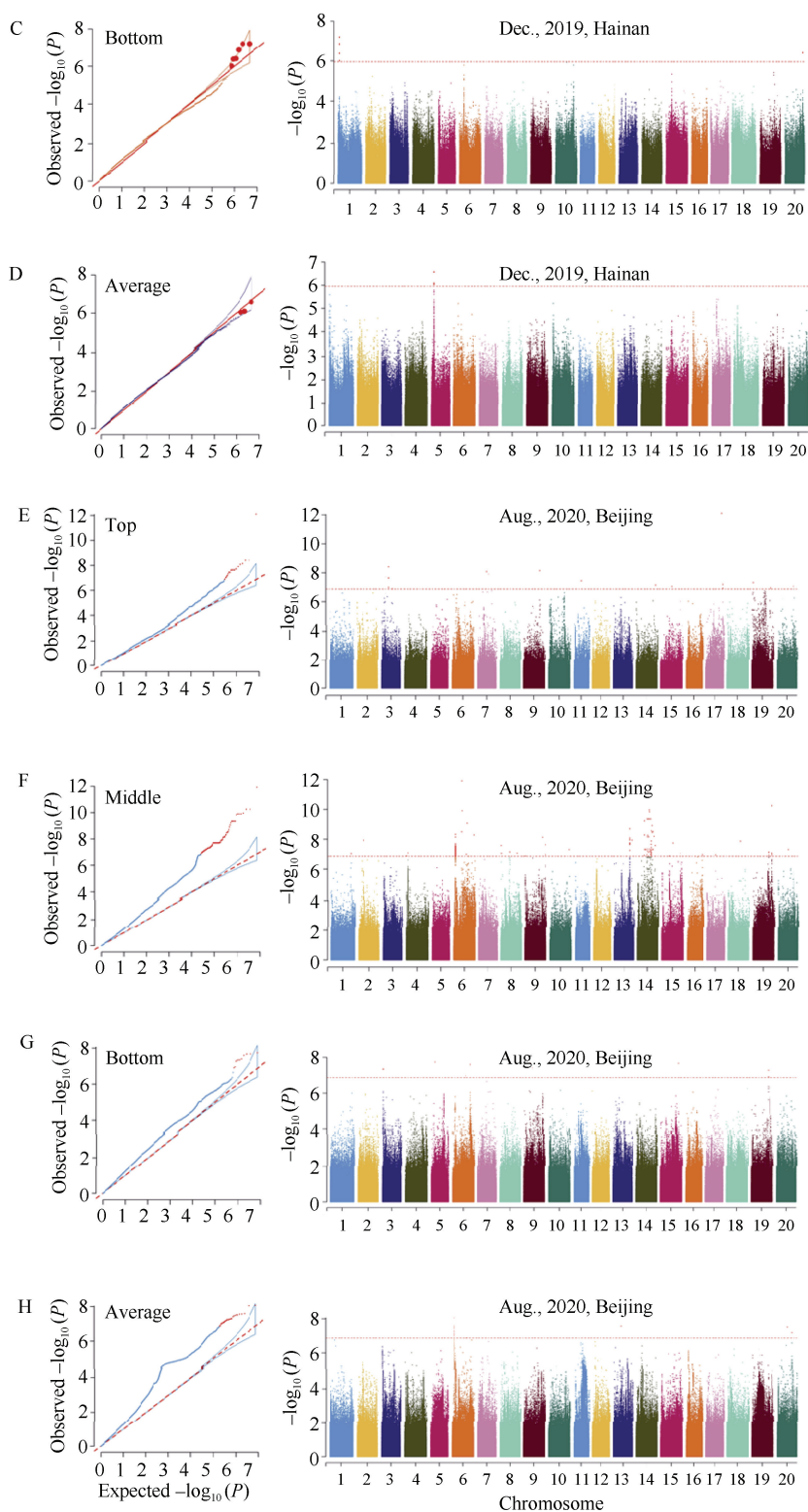


图 4 2 年 2 点各个节位叶柄夹角 GWAS 定位

Fig. 4 Location of petiole angle GWAS at each node in two years

A~D: 海南顶部、中部、底部节位叶柄夹角和 3 个节位叶柄夹角平均值关联分析 Q-Q plot 图和 Manhattan 图; E~H: 北京顶部、中部、底部节位叶柄夹角和 3 个节位叶柄夹角平均值关联分析 Q-Q plot 图和 Manhattan 图。

A~D: the correlation analysis Q-Q plot and Manhattan plot of petiole angle at top, middle, and bottom nodes and average value of petiole angle at three nodes in Hainan; E~H: the correlation analysis Q-Q plot and Manhattan plot of petiole angle at top, middle, and bottom nodes and average value of petiole angle at three nodes in Beijing.

表 3 各个节位叶柄夹角均关联显著 SNP
Table 3 SNPs were significantly associated with leaf petiole angle at each node

地点 Location	节位 Node	染色体 Chr.	SNP 数目 SNP number	区间位置 Position interval	极显著 SNP 位置 Peak SNP position	等位基因型 Alleles	$-\log_{10} P$ 值极大值 ($-\log_{10} P_{\max}$)	已报道区间 Reported interval
海南	顶部 Top	6	34	20081726–29191958	24044918	A/G	9.08	—
Hainan	顶部 Top	18	2	33523827–33523832	33523832	G/T	6.91	—
	中部 Middle	4	4	5596149–15210458	15210440	C/A	7.42	—
	中部 Middle	9	3	17234567–17234585	17234573	T/A	6.23	—
	底部 Bottom	1	5	3190286–3193332	3190286	A/T	7.21	—
	平均值 Average	5	3	5476726–5488204	5476976	A/C	11.37	—
北京	顶部 Top	3	2	10230350–10230362	10230350	A/T	7.72	—
Beijing	顶部 Top	3	6	17497236–17497310	17497236	C/T	8.41	—
	顶部 Top	7	2	21264942–26216740	21264942	G/A	8.08	—
	顶部 Top	11	3	17811042–17811056	17811042	C/T	7.45	[9]
	顶部 Top	17	2	37154449–39977197	37154449	C/A	12.11	[9]
	中部 Middle	6	131	5787577–5947566	5889343	A/G	8.33	—
	中部 Middle	6	5	20003640–20973899	20071106	A/G	11.92	—
	中部 Middle	13	49	37043663–37156881	37117542	A/G	8.71	—
	中部 Middle	14	5	15953346–19558649	15953346	A/G	9.23	[9]
	中部 Middle	14	6	24281424–25306741	24281424	A/G	9.35	[9]
	中部 Middle	14	3	27024699–27783925	27076700	C/T	9.35	[9]
	中部 Middle	14	5	29151458–30357161	29151458	A/G	9.96	[9]
	中部 Middle	14	19	32044124–41988610	32044124	A/G	9.35	[9]
	中部 Middle	19	2	37695290–37695805	37695805	G/T	7.13	—
	中部 Middle	19	3	46080617–46082050	46080617	C/G	10.25	—
	底部 Bottom	3	3	1997994–1998818	1997994	C/G	7.35	—
	底部 Bottom	19	2	41151600–41169499	41169499	C/T	7.27	—
	平均值 Average	6	31	5859032–5958396	5948057	A/G	8.06	—

2.4 候选区间关键位点分析

为进一步确定叶柄夹角的候选基因, 对 *LPA* 相关的等位基因效应进行了评估, 一些 SNP 对 *LPA* 表现出显著的等位基因效应, 表明 *LPA* 的候选基因可能与这些 SNP 相关。通过分析 SNP 等位基因型对应的叶柄夹角的显著差异性, 以及曼哈顿图和 QQ 图关联位点的显著性, 选择对海南 3 个节位叶柄夹角平均值关联到的 5 号染色体位点 *Gm05_5476976* 和北京 3 个节位叶柄夹角平均值关联到的 6 号染色体位点 *Gm06_5948057* 进一步进行分析。其中, *Gm05_5476976* 位点等位基因型对应的叶柄夹角表现极显著差异($P = 1.798 \times 10^{-8} < 0.01$), *Gm06_5948057* 位点等位基因型对应的叶柄夹角也表现极显著差异($P = 3.86 \times 10^{-6} < 0.01$)。通过 LD block 绘图取位点前后 200 kb 表明, *Gm05_5476976* 位点前后 200 kb 内, SNP 位点存在明显的 LD block, *Gm06_5948057* 位点前后 200 kb 内也存在不连续的 LD block (图 5)。其中 *Gm05_5476976* LD block 区间内共有 38 个基因, 有 21 个基因注释为未鉴定蛋白, 1 个基因无功能注释, 其他基因注释还包括疏水种子蛋白、gag-pol 蛋

白、乳酸脱氢酶、囊泡相关蛋白、假定蛋白、天冬氨酸蛋白、精氨酸 N-甲基转移酶、天冬酰胺基 tRNA 合成酶、小亚单位核糖体蛋白、生长素调节蛋白、类 ZAT9 锌指蛋白、类 EamA 运输家族、DUF246 结构域蛋白。*Gm06_5948057* LD block 区间内共有 26 个基因, 其中 10 个基因注释为未鉴定蛋白, 2 个基因功能无注释, 其他基因注释包括阿拉伯半乳聚糖蛋白、COP9 信号体复合物、质膜 ATP 酶、二甲基腺苷转移酶、非活性蛋白激酶、生长素反应因子 (AFR) 类蛋白、tRNA 水解酶、转录因子、离子通道蛋白、木聚糖糖基转移酶、类核溶解素、U-box 结构域蛋白、类核氧还蛋白。其中, *Glyma.05G059700* 基因注释是生长素类调节蛋白, 其同源蛋白 ARG7 在相关的报道中通过 IAA 信号转导调控沙棘的萌蘖生长^[32], *Glyma.06G076900* 基因注释是生长素反应因子 (AFR) 类蛋白, ARF 家族蛋白在之前的报道中参与调控叶夹角和株型^[32-33], *Glyma.06G076000* 基因注释是 COP9 信号体复合物, 其蛋白家族 COP1 负调控水稻叶柄夹角打开^[21], 因此推测这 3 个基因为候选基因。

大豆中相关文献报道^[1]叶柄夹角有关的组织部

位分别是叶枕部位、茎尖分生组织和叶片, 为进一步分析 LD block 区域内的基因, 利用 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 数据库, 查找候选基因在不同组织中的表达量。结果表明, *Glyma.05G059700* 基因只在茎尖分生组织特异性表达, *Glyma.06G076900* 基因虽在各个组织中都有表达, 但在叶片与茎尖分生组织(shoot apical meristem, SAM)中的表达量较高, *Glyma.06G076000* 在叶片、SAM 以及茎尖的表达量都相对较高。

在北京的中部节位和整体平均叶柄夹角都关联到 6 号染色体的同一区域, 共同区间为 5,859,032~5,947,566, 该区间大小为 88.53 kb, 包含 12 个基因,

其中 2 个基因无功能注释, 其他基因注释包括 β 半乳糖蛋白、转运 ATP 酶、质子输出型 ATP 酶、着丝粒蛋白、转录调节因子、锌指蛋白、钙调素结合蛋白、棉纤维表达蛋白, 并未有与激素调控的相关基因。在海南顶部节位和北京中部节位叶柄夹角均关联到 6 号染色体的 20,081,726~20,973,899 区间, 区间大小为 892 kb, 包含 35 个基因。其中 9 个基因功能未知, 其他基因功能注释为 PB1 结构域、过硫酸酶、辅酶 A 连接酶、磷脂转位 ATP 酶、ATP 依赖 RNA 解旋酶、谷胱甘肽转移酶、DNA 解旋酶、镁转运蛋白、钙结合蛋白、天冬氨酸蛋白酶家族蛋白、嘌呤核苷酸水解酶蛋白等, 也未有与激素调控的相关基因。

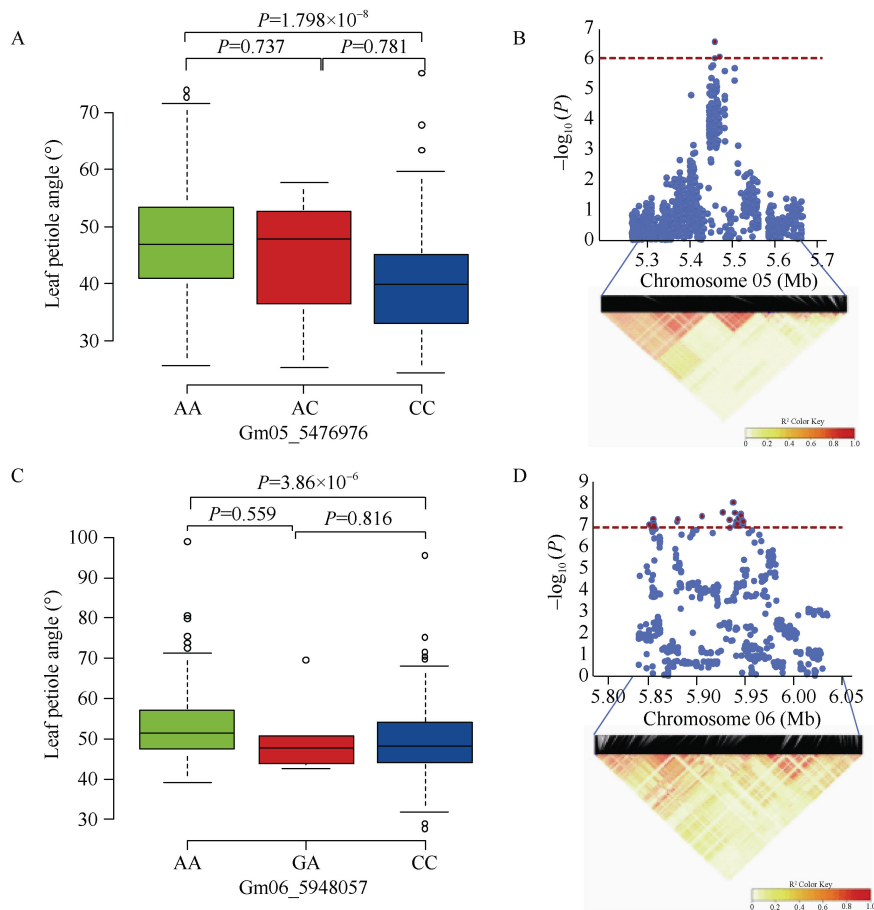


图 5 显著位点分析

Fig. 5 Analysis of significant loci

A: 极显著 SNP 位点 *Gm05_5476976* 等位基因差异显著性分析, 其中 AA 和 CC 表示该位点出现 AA 和 CC 纯合的频率, AC 表示该位点出现 AC 杂合的频率; B: 极显著 SNP 位点 *Gm05_5476976* LD block 分析, 其中红色阈值线上的红点表示在 *Gm05_5476976* LD block 区域内与叶柄夹角性状紧密连锁的位点; C: 极显著 SNP 位点 *Gm06_5948057* 等位基因差异显著性分析, 其中 AA 和 GG 表示该位点出现 AA 和 GG 的频率, GA 表示该位点出现 GA 杂合的频率; D: 极显著 SNP 位点 *Gm06_24044918* LD block 分析, 其中红色阈值线上的红点表示在 *Gm06_24044918* LD block 区域内与叶柄夹角性状紧密连锁的位点。

A: peak SNP site *Gm05_5476976* allele difference analysis, AA and CC represent the frequency of AA and CC homozygosity at this site, AC indicates the frequency of AC heterozygosity at this site; B: peak SNP site *Gm05_5476976* LD block analysis, the red dot on the red threshold line indicates *Gm05_5476976* LD block loci closely linked to petiole angle traits; C: peak SNP site *Gm06_24044918* allele difference analysis, AA and GG represent the frequency of AA and GG homozygosity at this site, GA indicates the frequency of GA heterozygosity at this site; D: peak SNP site *Gm06_5948057* LD block analysis, the red dot on the red threshold line indicates *Gm06_5948057* LD block loci closely linked to petiole angle traits.

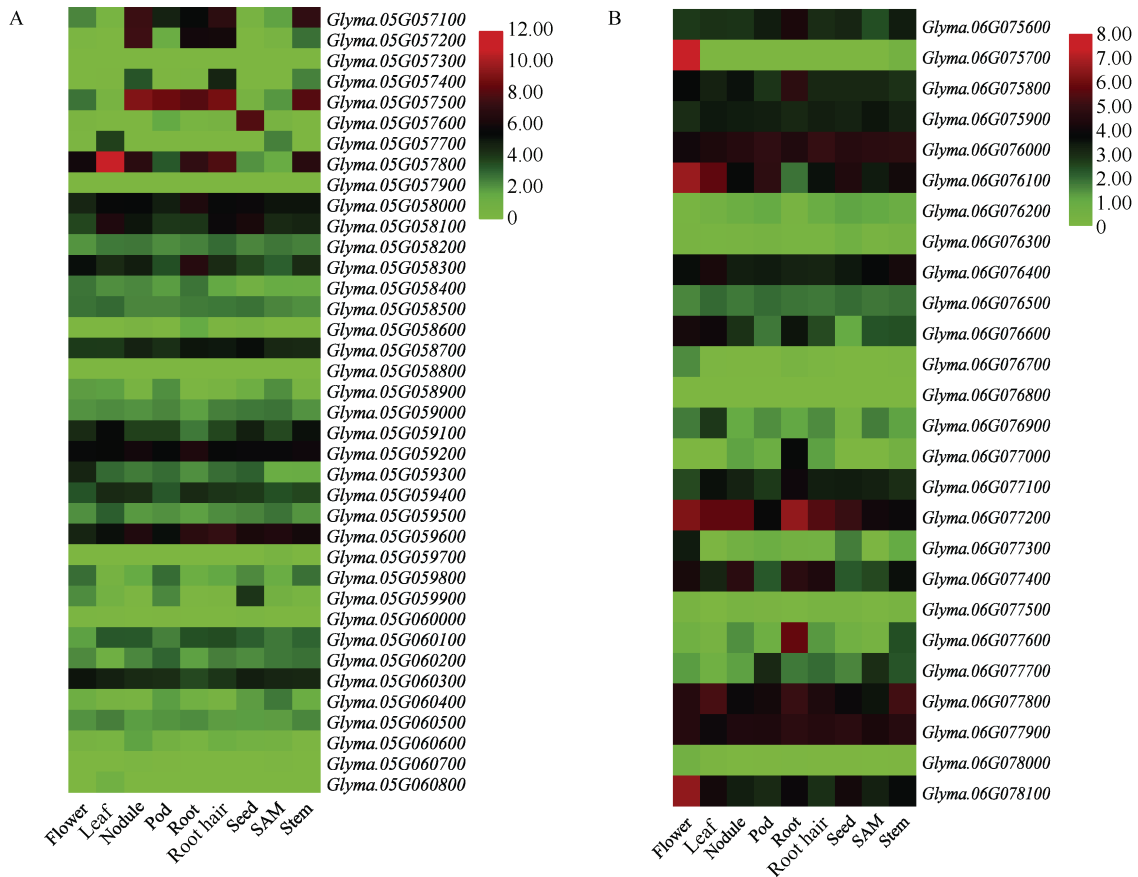


图 6 候选基因表达谱

Fig. 6 Expression profile of candidate genes

A: *Gm05_5476976* LD block 区间内候选基因表达谱; B: *Gm06_24044918* LD block 区间内候选基因表达谱。

A: the relative expression profile of candidate genes in *Gm05_5476976* LD block interval; B: the relative expression profile of candidate genes in *Gm05_5476976* LD block interval.

3 讨论

3.1 环境对叶柄夹角表型的影响

本研究在 2 年 2 点间分别对 783 份和 690 份大豆资源进行表型调查发现, 3 个节位叶柄夹角大小以及 3 个节位叶柄夹角大小的平均值呈正态分布。在进行表型调查时发现, 随着时期的变化, 一些品种叶柄夹角也会发生相应改变, 这与王五宏等^[15]对串番茄株型性状遗传研究相类似, 该研究表明番茄在同一时期不同节位的叶夹角及不同时期同一节位的叶夹角都有变化且存在差异。由于种植密度^[16-18]、倒伏性^[19]、光照^[20]、光质^[21-22]等, 目标性状的准确度易受影响。因此, 在本研究中, 采用不同地点的方式对叶柄夹角性状进行调查分析发现, 尽管两地的纬度差异较大, 光照强度以及光照时长不同, 植株在株高上变化较大, 主茎节数也呈现较大差异, 然而, 仅少数材料叶柄夹角存在较大差异, 大多数材

料在不同地点间叶柄夹角的变化幅度较小, 可用于后续的 GWAS 定位分析。本研究材料来源地丰富多样, 表型分析不同地点间叶柄夹角稳定性较好材料, 可为后续叶柄夹角的材料选则提供一定的参考价值。

3.2 叶柄夹角 GWAS 分析方法探讨

近年来, GWAS 分析广泛用于农作物定位, 其优点是 SNP 标记数量巨大(可达百万级), 因而可以发现许多效应较小的关联位点^[23]。并且, 由于用于 GWAS 的群体具有丰富的自然变异, 使得 GWAS 分析的通量更高^[24]。因此, GWAS 能大大地缩短基因定位的时间, 降低劳动强度, 有效地提高基因定位和克隆的效率。另外, 目标性状 GWAS 提供了大量的结果数据, 可以根据关联到的已知位点对比、整合重复结论进行 Meta 分析, 发现一些多功能的基因, 增加 GWAS 结果的可靠性^[25-30]。GWAS 方法中常使用大豆自然群体, 而传统自然群体中往往会存在群体结构。由于群体结构的存在会引起假阳性问题,

因此在进行 GWAS 时需要设计不同的群体结构分析模型。其次, GWAS 对群体内部低频率的等位基因位点检测效力有限, 而传统的连锁作图对于检测罕见变异十分有效^[31]。

3.3 叶柄夹角相关位点

在本研究中, 共定位与叶柄夹角相关的 QTL 25 个, 分布于 10 条染色体。王存虎等^[9]的研究中, 其上位叶柄夹角 QTL 定位在 1 号、11 号与 12 号染色体上, 中位叶柄夹角 QTL 分别在 9 号、12 号、14 号、17 号染色体上。在本研究中, 顶部节位 11 号染色体上定位到的 QTL 与文献重叠, 且与 *Glyma.11G169200* 基因临近, 该基因目前还未功能注释。中部节位在 9 号染色体定位到 1 个 QTL, 但与文献报道的位置相距较远, 可能是一个新的 QTL。14 号染色体上定位到的 QTL 簇也与文献报道的完全重叠。因此, 可对 14 号染色体上的 QTL 簇进一步去研究。已报道 17 号染色体上的物理位置在 Chr17.37570037~Chr17.36696957 之间, 与本研究 17 号染色体 Chr17.37154449~Chr17.39977197 区间有重叠。与 Gao 等^[1]在 11 号染色体上克隆到的 *GmILPA1* 基因(Chr11.1877873~1881580)相比, 本研究在 11 号染色体上定位到的 QTL 相距较远, 可能是潜在的新 QTL。*Gm05_5476976* 位点 LD block 区域内关联到的 *Glyma.05G059700* 基因功能注释与生长素调节蛋白有关, 其同源基因 *ARG7* 在相关研究中^[32], 在 IAA 信号转导过程中起正调节作用, 并促进沙棘萌蘖生长。*Gm06_5948057* LD block 区域内关联到的 *Glyma.06G076900* 基因和 *Glyma.06G076000* 基因, 其家族基因均被报道与叶夹角和株型调控相关^[10,33-34], 因此推测这 3 个基因很可能也参与叶柄夹角的调控。

通过基因表达谱分析表明, *Glyma.05G059700* 基因在茎尖分生组织(SAM)中特异性表达, *Glyma.06G076900* 在叶片和 SAM 中高表达, 而 *Glyma.06G076000* 在叶片和 SAM 以及茎中均为高表达。此外 *Glyma.05G058000*、*Glyma.05G058100*、*Glyma.05G058700*、*Glyma.05G059100*、*Glyma.05G059200*、*Glyma.05G059600*、*Glyma.05G060300*、*Glyma.06G076400*、*Glyma.06G077200*、*Glyma.06G077800*、*Glyma.06G077900* 这 11 个基因在叶片、SAM 以及茎中的表达量都相对较高, 但 7 个基因注释为未鉴定蛋白, 另外 4 个基因注释与乳糖脱氢酶、小亚基脱氢酶以及囊泡蛋白相关, 在目前的研究中, 还未见有关这 3 种酶与叶柄夹角和株型调控相关的报道。

4 结论

本研究利用 2019 年海南的 783 份、2020 年北京 690 份大豆种质资源 3 个不同节位叶柄夹角表型和叶柄夹角重测序基因型数据进行 GWAS 分析, 其中顶部节位叶柄夹角关联到 51 个相关的 SNP, 中部节位共关联到 230 个与叶柄夹角有关的 SNP, 底部节位共关联到 10 个与叶柄夹角有关的 SNP, 3 个节位叶柄夹角平均值共关联到 34 个与叶柄夹角有关的 SNP。显著位点经过统计分析后, 在 2 年 2 点间共关联到 24 个 QTL, 分别位于 13 条染色体上。其中, *Gm05_5476976* 位点 LD block 区域内关联到 1 个与生长素类调节蛋白相关的基因 *Glyma.05G059700*, 只在茎尖分生组织中特异性表达。*Gm06_24044918* 位点关联到 2 个相关基因, 一个与 AFR (生长素反应因子)类蛋白相关的基因 *Glyma.06G076900*, 在叶片和 SAM 中高表达; 另一个与 COP9 信号体复合物相关的基因 *Glyma.06G076000*, 在叶片、SAM 以及茎中均高表达。

References

- [1] 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 Physiol*, 2017, 174: 1167–1176.
- [2] Ning J, Zhang B C, Wang N L, Zhou Y H, Xiong L Z. Increased leaf angle1, a raf-like MAPKKK that interacts with a nuclear protein family, regulates mechanical tissue formation in the lamina joint of rice. *Plant Cell*, 2011, 23: 4334–4347.
- [3] 廖慧敏, 张启军, 秦海龙, 夏士健, 宗寿余, 高艳红. 一个水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: 1198–1203.
- [4] Liao M H, Zhang Q J, Qin H L, Xia S J, Zong S Y, Gao Y H. Hormone sensitivity and genetic mapping of a new leaf angle gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Jiangsu J Agric Sci*, 2014, 30: 1198–1203 (in Chinese with English abstract).
- [4] 徐庆章, 王庆成, 牛玉贞, 王忠孝, 张军. 玉米株型与群体光合作用的关系研究. *作物学报*, 1995, 21: 492–496.
- [5] Xu Q Z, Wang Q C, Niu Y Z, Wang Z X, Zhang J. Study on the relationship between plant type and population photosynthesis in maize. *Acta Agron Sin*, 1995, 21: 492–496 (in Chinese with English abstract).
- [5] 李登海, 张永慧, 杨今胜, 柳京国. 育种与栽培相结合紧凑型玉米创高产. *玉米科学*, 2004, 12(1): 69–71.
- [6] Li D H, Zhang Y H, Yang J S, Liu J G. High yield of compact maize by combination of breeding and cultivation. *J Maize Sci*, 2004, 12(1): 69–71 (in Chinese with English abstract).
- [6] Stewart D W, Costa C, Dwyer L M, Smith D L, Hamilton R I, Ma B L. Canopy structure, light interception, and photosynthesis in maize. *Agron J*, 2003, 95: 1465–1474.

- [7] Lu M, Zhou F, Xie C X, Li M S, Xu Y B, Marilyn W, Zhang S H. 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: 1131–1138.
- [8] Liu S L, Zhang M, Feng F, Tian Z X. Toward a “green revolution” for soybean. *Mol Plant*, 2020, 13: 688–697.
- [9] 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: 9–19.
Wang C H, Liu D, Xu R N, Yang Y Q, Liao H. Mapping of QTLs for leafstalk angle in soybean. *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 9–19 (in Chinese with English abstract).
- [10] 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: 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. *Sci Agric Sin*, 2012, 45: 4749–4758 (in Chinese with English abstract).
- [11] 陈玲玲, 刘亨萱, 谷勇哲, 宋健, 王俊, 邱丽娟. 大豆叶柄夹角相关基因 *GmILPA1* 单倍型分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22: 1693–1702.
Chen L L, Liu L X, Gu Y Z, Song J, Wang J, Qiu L Y. Haplotype analysis of petiole angle related gene *GmILPA1* in soybean. *J Plant Genet Resour*, 2021, 22: 1693–1702.
- [12] Murray M G, Thompson C L, Wendel J F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321–4325.
- [13] Lyu Y, Guo Z L, Li X K, Ye H Y, Li X H, Xiong L Z. New insights into the genetic basis of natural chilling and cold shock tolerance in rice by genome-wide association analysis. *Plant Cell Environ*, 2016, 39: 556–570.
- [14] 葛芳君, 赵磊, 刘俊, 周旻馨, 郭毅, 张庆军. 基于 Pearson 相关系数的老年人社会支持与心理健康相关性研究的 Meta 分析. *中国循证医学杂志*, 2012, 12: 1320–1329.
Ge F J, Zhao L, Liu J, Zhou M X, Guo Y, Zhang Q J. Correlation between social support and mental health of the aged based on pearson correlation coefficient: a meta-analysis. *Chin J Evidence-Based Med*, 2012, 12: 1320–1329 (in Chinese with English abstract).
- [15] 王五宏. 串番茄株型性状遗传及与耐弱光性关系的研究. 沈阳农业大学博士学位论文, 辽宁沈阳, 2008.
Wang W H. Inheritance of Plant Type Characteristics and the Relationship Between Plant Type and Low Light Density Tolerance in Truss Tomato. PhD Dissertation of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, China, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [16] 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): 92–98.
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. *J Maize Sci*, 2020, 28(3): 92–98 (in Chinese with English abstract).
- [17] 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: 298–301.
Xu Z C, Yang H S, Zhang Y Q. Response of different planting densities to corn canopy structure. *J Inner Mongolia Univ Nat*, 2016, 31: 298–301 (in Chinese with English abstract).
- [18] 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. *J Maize Sci*, 2016, 24(3): 69–77 (in Chinese with English abstract).
- [19] 王永学. 玉米抗倒伏有关性状遗传的初步研究. 河南农业大学硕士学位论文, 河南郑州, 2011.
Wang Y X. Primary Study of Inheritance on Lodging Resistance Traits in Maize. MS Thesis of Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [20] Martin F, Lindsey A H, Allison E C, Nicholas R S, David E F, Elizabeth V V. Light interacts with auxin during leaf elongation and leaf angle development in young corn seedlings. *Planta*, 2003, 216: 366–376.
- [21] 陈志娜. 光信号调控水稻叶片直立性的机制研究. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2018.
Chen Z N. The Mechanism Research of the Regulation of Rice Leaf Erectness by Light Signaling. MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [22] 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.
- [23] Zhang Z W, Ersoz E, Lai C Q, Todhunter R J, Tiwari H K, Gore M A, Bradbury P J, Yu J. M, Arnett D K, Ordovas J M, Buckler E S. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat Genet*, 2010, 42: 355–360.
- [24] Cordell H J, Clayton D G. Genetic association studies. *Lancet*, 2005, 366: 1121–1131.
- [25] Nordborg M, Weigel D. Next-generation genetics in plants. *Nature*, 2008, 456: 720–723.
- [26] Franke A, McGovern D P, Barrett J C, Wang K, Radford-Smith G L, Ahmad T, Lees C W, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson C A, Bis J C, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen E M, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew C G, Montgomery G W, Prescott N J, Raychaudhuri S, Rotter J I, Schumm P, Sharma Y, Simms L A, Taylor K D, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano R N, Barclay M, Bayless T M, Brand S, Büning C, Cohen A, Colombel J F, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D’Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Gearry R, Glas J, Van Gossom A, Guthery S L, Halfvarson J, Versapag H W, Hugot J P, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panés J, Phillips A, Proctor D D, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhardt A H, Stokkers P C, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan S R, Brant S R, Rioux J D, D’Amato M, Weersma R K, Kugathasan S, Griffiths A M, Mansfield J C, Vermeire S, Duerr R H, Silverberg M S,

- Satsangi J, Schreiber S, Cho J H, Annese V, Hakonarson H, Daly M J, Parkes M. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 2010, 42: 1118–1125.
- [27] Chasman D I, Schürks M, Anttila V, de Vries B, Schminke U, Launer L J, Terwindt G M, van den Maagdenberg A M, Fendrich K, Völzke H, Ernst F, Griffiths L R, Buring J E, Kallela M, Freilinger T, Kubisch C, Ridker P M, Palotie A, Ferrari M D, Hoffmann W, Zee R Y, Kurth T. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet*, 2011, 43: 695–698.
- [28] Andreassen O A, Djurovic S, Thompson W K, Schork A J, Kendler K S, O'Donovan M C, Rujescu D, Werge T, van de Bunt M, Morris A P, McCarthy M I. Improved detection of common variants associated with schizophrenia by leveraging pleiotropy with cardiovascular-disease risk factors. *Am J Human Genet*, 2013, 92: 197–209.
- [29] Evangelou E, Ioannidis J P A. Meta-analysis methods for genome-wide association studies and beyond. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 379–389.
- [30] Pickrell J K, Berisa T, Liu J Z, Séguire L, Tung J Y, Hinds D A. Detection and interpretation of shared genetic influences on 42 human traits. *Nat Genet*, 2016, 48: 709–717.
- [31] 万何平, 陈禅友, 陈高, 曹新华, 夏明. 全基因组关联分析在大豆遗传学上的研究进展. 江汉大学学报(自然科学版), 2019, 47(3): 197–203.
- Wan H P, Chen C Y, Chen G, Cao X H, Xia M. Research status of genome-wide association study in soybean. *J Jiangnan Univ (Nat Sci Edn)*, 2019, 47(3): 197–203 (in Chinese with English abstract).
- [32] 曹子林. 中国沙棘平茬萌蘖内源激素调控的分子机制. 北京林业大学博士学位论文, 北京, 2019.
- Cao Z L. Molecular Mechanisms of Endogenous Hormone Regulation in Stump Sprouting of *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis*. PhD Dissertation of Beijing Forestry University, Beijing, China, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [33] 海日汗. *OsARF6* 调控水稻叶夹角的分子机制研究. 内蒙古师范大学硕士学位论文, 内蒙古呼和浩特, 2015.
- Hai R H. Study on the Mechanism of *OsARF6* Controlling Leaf Angle in Rice (*Oryza sativa* L.). MS Thesis of Inner Mongolia Normal University, Hohhot, Inner Mongolia, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [34] 张赛娜. *OsARF19* 调控水稻叶夹角的分子机制. 浙江大学博士学位论文, 浙江杭州, 2014.
- Zhang S N. Molecular Mechanism of *OsARF19* Controlling Leaf Angle in Rice (*Oryza sativa*). PhD Dissertation of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China, 2014 (in Chinese with English abstract).