

LẬP BẢN ĐỒ QTL CHO CHIỀU CAO CÂY TRONG ĐẬU TƯƠNG [*Glycine max* (L.) MERR.] BẰNG CÁCH SỬ DỤNG QUẦN THỂ DÒNG LAI TÁI TỔ HỢP THEO 4 CHIỀU

Hong Xue, Xiaocui Tian, Kaixin Zhang, Wenbin Li, Zhongying Qi, Yanlong Fang, Xiyu Li, Yue Wang, Jie Song, Wen-Xia Li, Hailong Ning.

Võ Như Cầm biên dịch.

TÓM TẮT

Chiều cao cây (PH) là một đặc điểm quan trọng ở đậu tương, vì những cây cao hơn có thể cho năng suất cao hơn nhưng cũng có thể có nguy cơ chết cây. Nhiều gen cùng tác động để ảnh hưởng đến PH trong suốt quá trình phát triển.

Để lập bản đồ các locus tính trạng định lượng (QTL) kiểm soát PH, chúng tôi đã sử dụng phương pháp biến vô điều kiện (UVM) và phương pháp biến có điều kiện (CVM) để phân tích dữ liệu PH cho quần thể dòng lai tái tổ hợp theo bốn cách (FW-RIL) bắt nguồn từ tổ hợp lai của (Kenfeng14 × Kenfeng15) × (Heinong48 × Kenfeng19). Chúng tôi đã xác định được 7, 8, 16, 19, 15, 27, 17, 27, 22 và 24 QTL liên quan đến PH ở 10 giai đoạn phát triển tương ứng. Các QTL này được lập bản đồ tới 95 vùng gen. Trong số QTL này, 9 được phát hiện bằng UVM và CVM, và 89 và 66 chỉ được phát hiện bằng UVM hoặc CVM tương ứng. Tổng cộng, 36 QTL kiểm soát PH đã được phát hiện ở nhiều giai đoạn phát triển và những điều này đóng góp không đều vào sự biến đổi di truyền trong suốt quá trình phát triển. Trong số 19 vùng mới được phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi, 7 vùng có thể giải thích hơn 10% sự biến đổi kiểu hình và chỉ chứa một QTL duy nhất.

QTL không điều kiện và có điều kiện được phát hiện ở đây có thể được sử dụng trong chọn giống mẫu phân tử trong toàn bộ quá trình phát triển.

GIỚI THIỆU

Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merri.] Là một nguồn protein và dầu ăn quan trọng [1]. Trong số tất cả các đặc điểm chọn giống, chiều cao cây (PH) có ý nghĩa quan trọng vì nó giúp tăng năng suất hạt bằng cách tăng khả năng mang quả và giảm mức độ cạnh tranh về không gian. Về mặt di truyền, PH là một tính trạng định lượng được kiểm soát bởi nhiều gen [2]. Trong những thập kỷ qua, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc lập bản đồ các locus tính trạng định lượng (QTL) liên quan đến PH trong đậu tương [3–18]. Hiện tại, 255 QTL PH cơ bản đã được tích hợp trên bản đồ liên kết di truyền công khai (<http://www.soybase.org/>). QTL trong đậu tương được xác định chủ yếu dựa trên các giá trị kiểu hình ở giai đoạn trưởng thành [2-7], trong khi chỉ có 22 QTL được lập bản đồ dựa trên sự phát triển của PH trong suốt mùa sinh trưởng [8]. PH tiếp tục phát triển từ khi xuất hiện hoa đến khi kết thúc ra hoa và liên quan đến nhiều gen. Vì vậy, để có được sự hiểu biết toàn diện về cơ sở di truyền của một tính trạng như PH, cần phải hiểu động lực biểu hiện của gen đối với tính trạng ở các giai đoạn phát triển khác nhau [19]. Thật vậy, lập bản đồ QTL dựa trên giai đoạn phát triển cuối cùng có thể không bao gồm nhiều QTL kiểm soát PH trong các giai đoạn phát triển trước đó và có thể không cho thấy các tác động di truyền trong một giai đoạn phát triển cụ thể của cây trồng [20].

Việc phát hiện QTL động trong suốt quá trình phát triển có thể dẫn đến hiểu biết tốt hơn về tác động phát triển của các tính trạng định lượng, và QTL như vậy sẽ hữu ích cho các chương trình chọn lọc có sự hỗ trợ của marker [21]. Sự phát triển của các tính trạng hình thái xảy ra thông qua hoạt động của các gen riêng lẻ và sự tương tác của nhiều gen [22]. Sự biểu hiện gen khác nhau trong các giai đoạn tăng trưởng khác nhau và được thay đổi bởi tương tác gen cũng như tương tác giữa gen và môi trường [23]. Để chứng minh quá trình phức tạp của sự phát triển tính trạng, một mô hình di truyền đã được thiết lập để đánh giá tác động di truyền thuần của các tính trạng định lượng trong các giai đoạn phát triển cụ thể [24]. Gần đây, lập bản đồ QTL động đã được sử dụng thành công để phân tích ảnh hưởng của các tính trạng định lượng ở bông vải (*Gossypium sp.*) [25], lúa (*Oryza sativa*) [26-31], ngô (*Zea mays*) [32] và lúa mì (*Triticum sp.*) [33-35] trong suốt quá trình phát triển. Trong đậu tương, QTL động cơ bản PH [8], thành phần hạt [36], giai đoạn phát triển sinh sản [37], trọng lượng hạt [38-39], hàm lượng protein hạt [21], hàm lượng axit linolenic [40] và tỷ lệ hạt chắc [19] đã được điều tra.

Tất cả những phát hiện trên thu được dựa trên các dòng bắt nguồn từ phép lai ban đầu giữa hai dòng lai. Trong một quần thể lập bản đồ hai dòng bố mẹ, một locus duy nhất chỉ có hai alen và chỉ QTL đang phân ly giữa hai dòng bố có thể được phát hiện, và do đó, không gian suy luận thống kê hẹp hơn [41]. Do đó, hiệu quả phát hiện QTL của các phép lai giữa bố và mẹ thấp hơn đáng kể so với các quần thể đa bố mẹ vì thiếu đa dạng di truyền và các hạn chế khác [42-46]. Ngược lại, phép lai bốn chiều (FWC) liên quan đến bốn dòng lai, có thể được suy ra trên một không gian suy luận thống kê rộng hơn so với phép lai hai dòng đơn giản, và do đó cải thiện hiệu quả phát hiện QTL [44-48]. Trong chọn giống cây trồng, phép lai kép, lai ba và các phương pháp lai khác bao gồm nhiều cặp bố mẹ thường được sử dụng để tạo giống hoặc các dòng bố mẹ. Một FWC bao gồm bốn dòng lai (L1, L2, L3 và L4) và có thể được biểu thị bằng $(L1 \times L2) \times (L3 \times L4)$. Xu (1996) đã báo cáo một phương pháp lập bản đồ QTL sử dụng FWC, giúp cải thiện hiệu quả phát hiện QTL [43]. Các quần thể FWC đã được nghiên cứu trên bông vải [48], *Arabidopsis thaliana* [49], chuột [50] và lợn [51].

Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã tạo ra một quần thể dòng lai tái tổ hợp (FW-RIL) bốn chiều và lập bản đồ QTL cho các đặc điểm chất lượng và số quả ở đậu tương [52-53]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát PH trong đậu tương trong suốt quá trình phát triển của nó để phát hiện QTL có điều kiện và không điều kiện dựa trên bốn môi trường (bốn ngày gieo hạt khác nhau) bằng cách sử dụng quần thể FW-RIL của chúng tôi bao gồm 160 cá thể $F_{2:7}$ và $F_{2:8}$ có nguồn gốc từ phép lai (Kenfeng14 \times Kenfeng15) \times (Heinong48 \times Kenfeng19). Mục tiêu của nghiên cứu của chúng tôi là xác định QTL đối với PH trong suốt quá trình phát triển ở đậu tương và đề xuất một mẫu phân tử để cải thiện PH.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Quần thể di truyền

Bốn giống đậu tương là Kenfeng14, Kenfeng15, Heinong48 và Kenfeng19 đã được sử dụng để sản xuất quần thể FWC. Nguồn gen của bốn cặp bố mẹ này cho thấy sự biến đổi di truyền rộng rãi và sự biến đổi kiểu hình đáng kể đối với PH (Bảng S1). Hai phép lai đơn, Kenfeng14 × Kenfeng15 và Heinong48 × Kenfeng19 được thực hiện vào mùa xuân năm 2008 ở Cáp Nhĩ Tân, 21 và 32 hạt lai F₁ được thu hoạch từ hai phép lai tương ứng. Tất cả các hạt F₁ của hai phép lai được gieo và lai với nhau để tạo ra phép lai kép (Kenfeng14 × Kenfeng15) × (Heinong48 × Kenfeng19) vào năm 2009 và thu được 175 hạt F₁. Tất cả các hạt giống đã được gieo và tự sinh trong 5 thế hệ liên tục từ năm 2010 đến năm 2013 gần Cáp Nhĩ Tân (126,63°E, 45,75°N), tỉnh Hắc Giang và gần Yacheng (109,00°E, 17,5°N), tỉnh Hải Nam, Trung Quốc, từng cá thể được chọn bằng phương pháp một hạt ở giai đoạn trưởng thành. Cuối cùng, đã thu được 160 FW-RIL và sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết di truyền và xác định QTL.

Ngày gieo hạt, thiết kế thí nghiệm và thí nghiệm đồng ruộng

Các dòng RIL và dòng bố mẹ được trồng theo thiết kế tuần tự với hai lần lặp lại tại Cáp Nhĩ Tân thuộc tỉnh Hắc Long Giang, Trung Quốc. Hạt được gieo vào ngày 3 tháng 5 (E1) và 25 tháng 5 (E2) năm 2014 và ngày 9 tháng 5 (E3) và 25 tháng 5 (E4) trong năm 2015. Hạt giống được gieo dọc theo một hàng trong mỗi ô ba hàng dài 5 m, khoảng cách giữa các hàng 0,67 m và khoảng cách giữa các cây trong hàng là 0,07 m. Thực hành quản lý đồng ruộng tương tự như thực hành sản xuất đậu tương địa phương. Loại đất là đất chernozem mịn, chứa 199 ± 23,0 mg/kg kali, 52 ± 1,9 mg/kg phốt pho, 116 ± 6,8 mg/kg đạm, độ pH là 6,8.

Thu thập dữ liệu kiểu hình

Cứ mỗi kỳ gieo, người ta lấy mẫu liên tiếp 5 cây ở hàng giữa của ô có kiểu gen giống nhau để làm thí nghiệm. PH (chiều dài từ nút lá mầm đến ngọn cây) được đo bảy ngày một lần cho đến khi PH đạt tối đa, từ 7 đến 70 ngày sau mọc (DAE) cho lần gieo đầu tiên (E1) và cho lần gieo thứ hai (E2) vào năm 2014, 14 đến 70 DAE cho lần gieo đầu tiên (E3) và 14 đến 63 DAE cho lần gieo thứ hai (E4) vào năm 2015. Mức độ xuất hiện được xác định, là ngày trong đó trên 50% cây mọc trong ô.

Phân tích dữ liệu

Phân tích các biến có điều kiện

Phương pháp biến vô điều kiện (UVM) và phương pháp biến có điều kiện (CVM) được sử dụng để phân tích tác động tích lũy từ giai đoạn đầu đến giai đoạn thứ t và ảnh hưởng thuần từ giai đoạn t - 1 đến giai đoạn thứ t. Các giá trị biến vô điều kiện là kiểu hình, và các giá trị có điều kiện dùng để chỉ hiệu ứng thuần từ giai đoạn (t-1) đến giai đoạn thứ t. Cụ thể, việc phân tích các giá trị vô điều kiện được thực hiện tùy thuộc vào giá trị trung bình trong mỗi ô. Các giá trị có điều kiện được ước tính thông qua phương pháp do Zhu [24] đề xuất với công thức sau:

$$y_{i|t-1} = y_t - C_{t,t-1} \cdot (y_{t-1} - \bar{y}_{t-1}) / V_{t-1}$$

Trong đó, $y_{t|t-1}$ là giá trị có điều kiện của kiểu hình của giai đoạn thứ t vào ngày $t-1$. y_t và y_{t-1} lần lượt là kiểu hình của cá thể ở giai đoạn t và $t-1$, trong khi là giá trị trung bình của kiểu hình ở giai đoạn $t-1$. $C_{t,t-1}$ là hiệp phương sai giữa kiểu hình ở giai đoạn t và $t-1$. V_{t-1} là phương sai của kiểu hình ở giai đoạn $t-1$. Việc tính toán các giá trị có điều kiện được thực hiện thông qua công thức này trong Microsoft Excel 2010.

Phân tích sự biến dị và sự di truyền của các tính trạng kiểu hình.

Dựa trên các giá trị vô điều kiện và có điều kiện của ba lần lặp lại cho mỗi dòng trong mỗi ngày gieo, tổng hợp, phân tích phương sai (ANOVA), phân tích tương quan và hệ số di truyền cho từng môi trường đã được tiến hành.

ANOVA cho từng môi trường được thực hiện dựa trên mô hình thống kê sau:

$$x_{ij} = \mu + G_i + R_j + \varepsilon_{ij}$$

Trong đó, x_{ij} là giá trị quan sát được của kiểu gen thứ i ở khối thứ j trong một số môi trường, μ là giá trị trung bình lớn, G_i là ảnh hưởng của kiểu gen thứ i , R_j là ảnh hưởng của khối thứ j và ε_{ij} là sai số còn lại của kiểu gen thứ i trong khối thứ j , $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$.

Hệ số di truyền cho mỗi môi trường được ước tính thông qua công thức sau:

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_\varepsilon^2}$$

Trong đó, h^2 cho biết hệ số di truyền theo nghĩa rộng, cho biết phương sai di truyền, cho biết phương sai dư. Tất cả các tính toán được thực hiện bằng phần mềm SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Hoa Kỳ).

Bản đồ QTL

Dựa trên bản đồ liên kết lặp lại trình tự đơn giản (SSR) được xây dựng trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi [52–53], dữ liệu không điều kiện và có điều kiện của bốn ngày gieo khác nhau được sử dụng để tiến hành phân tích QTL bằng phương pháp lập bản đồ khoảng tổng hợp (ICIM) [54]. Việc xây dựng nhóm liên kết và lập bản đồ QTL được thực hiện thông qua phần mềm GAPL V1.0 (www.isbreeding.net). Xác suất để việc chọn các marker để sửa lỗi nền được đặt là 0,0001; bước quét một chiều cho QTL được đặt ở 1 cM. Nhật ký (LOD) được tạo ra bằng phương pháp hoán vị (1000 lần lặp và xác suất lỗi loại đầu tiên là 0,05) và giá trị nhỏ nhất được đặt là 2,5 để khai báo sự tồn tại của QTL.

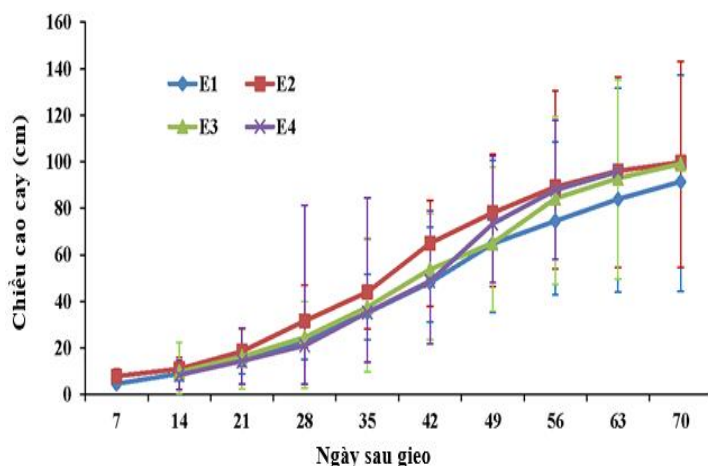
QTL được đặt tên theo phương pháp do McCouch đề xuất [55].

KẾT QUẢ

Sự biến đổi kiểu hình

Ở mỗi giai đoạn phát triển và bốn ngày gieo hạt khác nhau trong khoảng thời gian hai năm, tần suất PH của FW-RILs tuân theo một phân phối chuẩn. Hơn nữa, các giá trị PH của bốn cặp bố mẹ được bao gồm trong phạm vi của FW-RILs, cho thấy sự phân ly mạnh mẽ trong PH (Hình S1). Trung bình và phạm vi PH tăng dần trong FW-RIL trong suốt

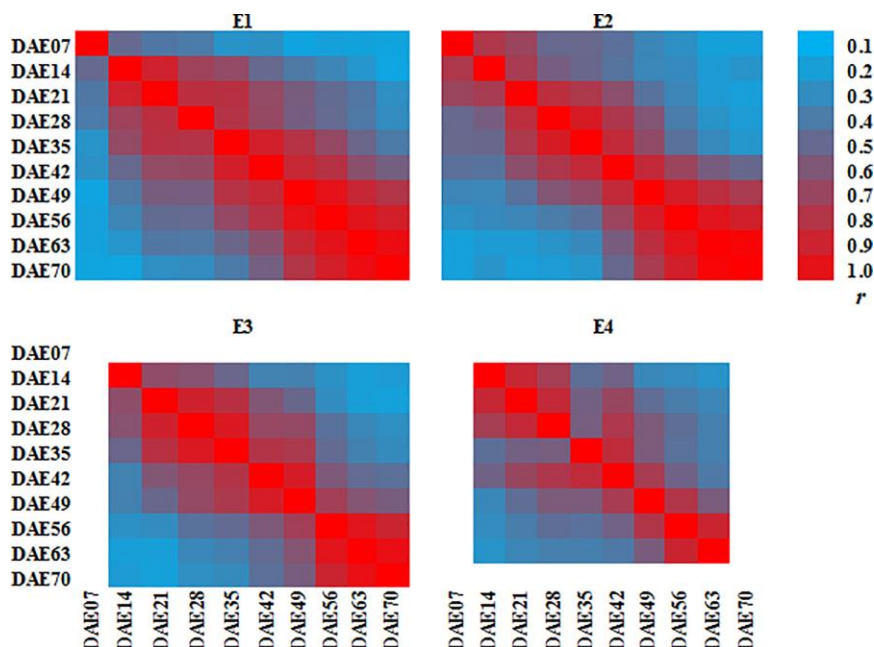
thời kỳ tăng trưởng (Hình 1), PH thể hiện đường cong “S” gần đúng và dừng lại ở 70 DAE cho tất cả 160 dòng trong mỗi môi trường. Có sự khác biệt đáng kể giữa các tác động tương tác với môi trường, kiểu gen và kiểu gen × môi trường ở mỗi giai đoạn (Bảng 1), cho thấy sự thay đổi cơ sở di truyền của PH trong toàn bộ quá trình phát triển.



Hình 1. Sự phát triển chiều cao của cây trong bốn môi trường.

E1 đại diện cho ngày gieo 3/5/2014; E2 đại diện cho ngày gieo 25/5/2014; E3 đại diện cho ngày gieo hạt ngày 9/5/2015; E4 đại diện cho ngày gieo 25/5/2015; Thanh trên cùng, giữa và dưới cùng có cùng màu hiển thị các giá trị lớn nhất, trung bình và nhỏ nhất cho một giai đoạn

Sự vượt quá phương sai di truyền và hệ số di truyền của các biến không điều kiện so với các biến có điều kiện cho thấy rằng các biến thể của PH ở một số giai đoạn đã tăng lên so với giai đoạn trước (Bảng 1). Ngoài ra, tồn tại mối tương quan thuận giữa PH ở các giai đoạn khác nhau và giá trị của hai giai đoạn được kết nối cao hơn giá trị giữa các khoảng thời gian tăng trưởng, điều này cho thấy PH ở giai đoạn (t-1) sẽ tăng cường ở giai đoạn thứ t (Hình 2).



Hình 2. Hệ số tương quan kiểu hình giữa chiều cao cây ở các giai đoạn.

E1 đại diện cho ngày gieo 3/5/2014; E2 đại diện cho ngày gieo 25/5/2014; E3 đại diện cho ngày gieo hạt ngày 9/5/2015; E4 đại diện cho ngày gieo 25/5/2015; DAE đại diện cho chiều cao của cây ở những ngày sau mọc.

Sự khác biệt rộng rãi giữa các giai đoạn khác nhau cho thấy rằng cần phải khám phá cơ sở di truyền của PH trong toàn bộ thời kỳ sinh trưởng. Hơn nữa, phương sai có điều kiện thấp hơn và các mối tương quan chặt chẽ giữa hai giai đoạn liền kề cho thấy rằng chúng ta nên giải thích tính di truyền theo sự biến đổi tích lũy từ giai đoạn đầu đến giai đoạn thứ t và sự biến đổi thuần từ giai đoạn (t-1) đến giai đoạn thứ t.

Bảng 1. Phân tích phương sai và hệ số di truyền của từng giai đoạn dựa trên các biến không điều kiện và có điều kiện qua bốn môi trường

Môi trường ^a	Tham số ^b	Đặc điểm ^c																			
		DAE07		DAE14		DAE21		DAE28		DAE35		DAE42		DAE49		DAE56		DAE63		DAE70	
E1	VG	0,49	**d	1,85	**	5,35	**	15,05	**	34,33	**	68,54	**	97,57	**	156,23	**	225,70	**	324,65	**
	h ²	0,53		0,88		0,89		0,85		0,90		0,88		0,90		0,95		0,96		0,97	
E2	VG	1,46	**	3,47	**	8,95	**	26,61	**	48,23	**	65,33	**	86,09	**	151,56	**	195,04	**	260,44	**
	h ²	0,77		0,93		0,91		0,92		0,92		0,86		0,91		0,94		0,95		0,97	
E3	VG			2,88	**	12,36	**	19,14	**	46,97	**	101,12	**	114,68	**	158,00	**	208,97	**	306,14	**
	h ²			0,92		0,94		0,88		0,92		0,91		0,92		0,95		0,94		0,97	
E4	VG			3,89	**	6,64	**	14,61	**	81,55	**	68,95	**	130,76	**	126,04	**	159,84	**		
	h ²			0,94		0,91		0,86		0,95		0,88		0,94		0,93		0,94			
Com.	VE	5,16	**	1,31	**	3,95	**	20,95	**	17,12	**	60,34	**	40,89	**	42,68	**	34,40	**	19,10	**
	VG	0,27	**	0,77	**	2,30	**	5,41	**	10,66	**	15,82	**	26,01	**	63,23	**	92,76	**	193,27	**
	VGE	0,73	**	2,25	**	6,03	**	13,44	**	42,11	**	60,21	**	81,25	**	84,71	**	104,61	**	103,81	**
	h ²	0,32		0,55		0,58		0,58		0,48		0,47		0,53		0,71		0,76		0,84	
				DAE14 07		DAE21 14		DAE28 21		DAE35 28		DAE42 35		DAE49 42		DAE56 49		DAE63 56		DAE70 63	
E1	VG			1,49		1,80		6,34		17,45	**	18,01	**	39,37	**	30,33	**	44,07	**	42,53	**
	h ²			0,84		0,74		0,76		0,84		0,70		0,87		0,83		0,89		0,93	
E2	VG			1,87		4,92		12,20		14,13	**	27,95	**	41,42	**	44,95	**	45,22	**	12,91	**
	h ²			0,85		0,90		0,85		0,82		0,79		0,89		0,88		0,89		0,77	
E3	VG					8,08		6,54		12,53	**	60,18	**	37,21	**	95,71	**	48,35	**	44,67	**
	h ²					0,93		0,75		0,81		0,89		0,86		0,95		0,89		0,93	
E4	VG					2,56		5,65		45,62	**	37,40	**	74,77	**	62,93	**	59,41	**		
	h ²					0,83		0,70		0,94		0,85		0,93		0,91		0,93			
Com.	VE			2,15		3,95		21,44		17,63	**	63,14	**	44,17	**	43,56	**	32,16	**	18,97	**
	VG			0,03		0,28		0,35		2,14	**	0,00	**	8,98	**	16,41	**	10,53	**	8,86	**
	VGE			1,66		4,06		7,31		20,29	**	36,12	**	39,32	**	42,04	**	38,73	**	24,50	**
	h ²			0,05		0,19		0,13		0,27		0,00		0,44		0,58		0,49		0,81	

^a E1 đại diện cho ngày 5/3/2014, E2 đại diện cho ngày 25/5/2014, E3 đại diện cho ngày 5/9/2015; E4 đại diện 25/5/2015; Com. đại diện cho sự kết hợp của bốn môi trường.

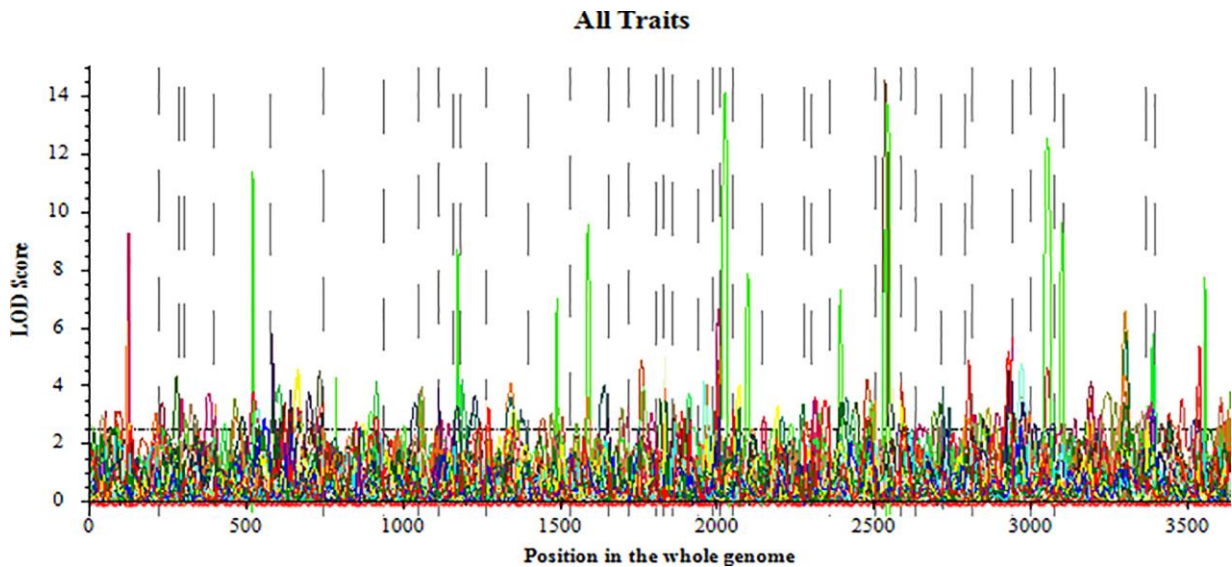
^b V_G, V_E và V_{GE} lần lượt biểu thị phương sai của kiểu gen, môi trường và tương tác giữa kiểu gen × môi trường; h² khả năng di truyền.

^c DAE đại diện cho chiều cao của cây vào những ngày sau khi xuất hiện.

^d ** thể hiện ý nghĩa ở mức <0,0001.

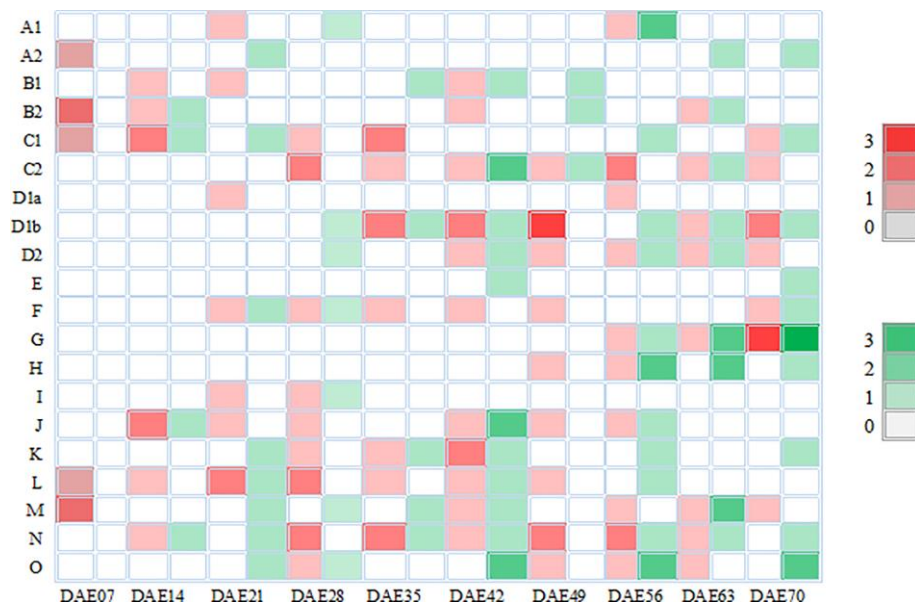
Phân tích QTL

Tổng cộng 161 QTL có PH cơ bản với LOD trên 2,5 (Hình 3) được xác định ở 10 giai đoạn ở 95 vùng trên tất cả 20 nhóm liên kết (LG) (Bảng S2, Hình S2).

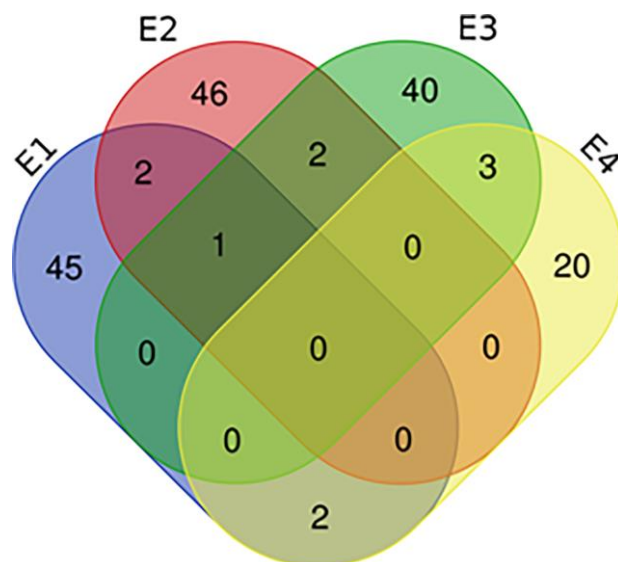


Hình 3. QTL cho chiều cao cây trên 20 nhiễm sắc thể ở dòng lai tái tổ hợp 4 chiều

Trong số tất cả các QTL đối với PH, 89 chỉ được phát hiện bằng UVM ở 52 vùng, điều này cho thấy rằng sự biểu hiện của các QTL này hoạt động trong PH liên tục từ khi xuất hiện. Sáu mươi sáu QTL trong 57 khoảng thời gian đã được xác định riêng lẻ bởi CVM, điều này cho thấy rằng những QTL này chỉ đóng một vai trò trong một giai đoạn cụ thể và hoàn toàn bị ảnh hưởng bởi các giai đoạn liền kề. 9 QTL còn lại được xác định đồng thời bằng UVM và CVM, điều này chỉ ra rằng các QTL này thể hiện tác dụng trong một số giai đoạn dưới ảnh hưởng một phần của giai đoạn trước. Khi thực vật phát triển, số lượng QTL tăng dần (Hình 4). Con số đạt đến mức tối đa ở giai đoạn DAE56, sau đó giảm xuống. Có 50, 51, 46 và 25 QTL được phát hiện lần lượt trong E1, E2, E3 và E4, và 10 QTL được xác định trong nhiều môi trường (Hình 5).



Hình 4. Tần số QTL đối với chiều cao thực vật ở 20 nhóm liên kết.

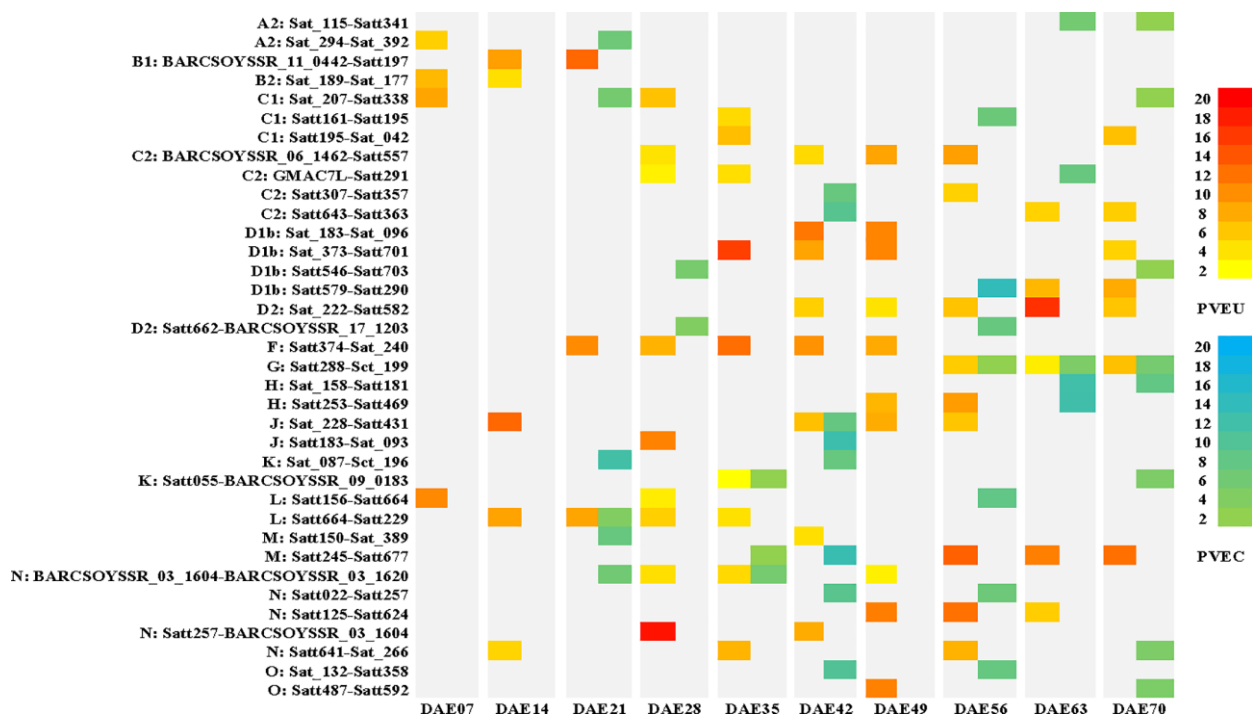


Hình 5. Tần số của QTL trong bốn môi trường.

E1 đại diện cho ngày gieo 3/5/2014; E2 đại diện cho ngày gieo 25/5/2014; E3 đại diện cho ngày gieo hạt ngày 9/5/2015; E4 đại diện cho ngày gieo 25/5/2015

Chúng tôi đã phát hiện 7, 8, 16, 19, 15, 27, 17, 27, 22 và 24 QTL đối với PH trong FW-RIL ở mười giai đoạn tăng trưởng, tương ứng với tỷ lệ phương sai kiểu gen được giải thích bởi một QTL duy nhất là 5,44–14,56%, 2,42–12,73%, 3,43–12,76%, 3,01–18,68%, 1,17–15,57%, 3,13–13,01%, 3,07–12,08%, 1,79–14,82%, 2,82–16,57% và 1,10–12,11%. Có 2, 2, 3, 3, 2, 3, 5, 4, 5 và 1 QTL với hơn 10% phương sai được giải thích (PVE) trong mười giai đoạn tương ứng. Điều này chỉ ra rằng PH được kiểm soát bởi QTL tác dụng lớn (PVE > 10%) và QTL tác dụng nhỏ (PVE ≤ 10%), và số QTL tác dụng lớn thấp hơn QTL tác dụng nhỏ. Trong số 30 QTL có tác dụng chính, chỉ có một QTL có tác dụng chính (qPH70-G-1) được phát hiện ở giai đoạn cuối, trong khi 29 QTL khác được xác định trong suốt thời kỳ sinh trưởng.

Tổng số 36 QTL kiểm soát PH được phát hiện trong nhiều giai đoạn (2–5 giai đoạn; Hình 6). Sự khác biệt rất lớn của PVE giữa các giai đoạn khác nhau chỉ ra rằng các vùng gen này ảnh hưởng đáng kể đến sự biến đổi kiểu hình trong quá trình phát triển. Vùng Sat_373-Satt701 trong LG D1b đã đóng góp sự biến đổi kiểu hình đáng kể ở DAE35, DAE42, DAE49 và DAE70. Khoảng Satt374-Sat_240 trong LG F kiểm soát PH liên tục từ DAE21 đến DAE49. QTL trong Sat_228-Satt431 của LG J đã giải thích sự biến đổi kiểu hình đáng kể ở DAE14, DAE42, DAE49 và DAE56. QTL được phát hiện trong khoảng Satt245-Satt677 của LG M ở năm giai đoạn và cho thấy PVE hơn 10% ở DAE42, DAE56, DAE63 và DAE70. Trong khoảng thời gian BARCSOYSSR_11_0442-Satt197 trong LG B1 và Satt257-BARCSOYSSR_03_1604 trong LG N, hai QTL đã được xác định và đóng vai trò tại DAE21 và DAE28 với PVE trên 10%. Hai QTL từ khoảng Sat_087-Sct_196 trong LG K và Satt579-Satt290 trong LG D1b tương ứng thể hiện các hiệu ứng cộng thực tại DAE21 và DAE56.



Hình 6. Sự biến đổi kiểu hình theo thời gian giải thích tỷ lệ của chức năng QTL trên PH ở nhiều giai đoạn.

PVEU: tỷ lệ giải thích biến dị kiểu hình của QTL không điều kiện; PVEC: tỷ lệ giải thích biến dị kiểu hình của QTL có điều kiện; DAE x: x ngày sau mọc.

THẢO LUẬN

Phân tích hoàn thiện đã khám phá ra cơ sở di truyền của PH trong toàn bộ thời kỳ tăng trưởng và nâng cao khả năng phát hiện QTL

Nhiều QTL cho PH đã được xác định dựa trên các giá trị kiểu hình ở giai đoạn thu hoạch [7, 9–11, 16–18, 56–59]. Tuy nhiên, sự phát triển của các tính trạng hình thái được xác định bởi các hoạt động và tương tác của nhiều gen được biểu hiện khác nhau trong các giai đoạn tăng trưởng khác nhau [23] và việc lập bản đồ QTL sử dụng dữ liệu kiểu hình được đo ở giai đoạn trưởng thành không thể tiết lộ tất cả các gen liên quan đến mục tiêu các tính trạng định lượng trong suốt quá trình phát triển [60–62]. Cần phải tiến hành phân tích di truyền trong toàn bộ thời kỳ phát triển, điều này không chỉ giúp hiểu sâu hơn về cơ chế di truyền đằng sau sự phát triển của cây mà còn có thể tăng khả năng phát hiện QTL PH cơ bản để chọn tạo giống có hỗ trợ marker thực tế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ phát hiện được tám QTL không điều kiện liên quan đến PH trong thời kỳ tăng trưởng cuối cùng, nhưng bằng cách kiểm tra toàn bộ thời kỳ phát triển, chúng tôi đã xác định được tổng số 89 QTL không điều kiện có liên quan đến PH. Tương tự, trong một nghiên cứu khác, Sun và cộng sự (2006) đã phát hiện ra 7 QTL đối với PH ở giai đoạn cuối (DAE80) và 28 trong toàn bộ thời kỳ tăng trưởng [8]. Do đó, điều quan trọng là phát hiện QTL kiểm soát PH trong toàn bộ thời kỳ tăng trưởng.

Sự khác biệt và ưu điểm của lập bản đồ QTL không điều kiện và có điều kiện

Trong quá trình phát triển PH ở đậu tương, bắt đầu từ khi nảy mầm và kết thúc ở giai đoạn làm đầy hạt, một số gen chỉ hoạt động trong một giai đoạn cụ thể, nhưng hầu hết các gen hoạt động phối hợp trong một thời gian dài dẫn đến mối tương quan chặt chẽ giữa các giai đoạn liên kế (Hình 2). Để đánh giá vai trò di truyền của các gen trên, Zhu [24] đã đề xuất UVM để phản ánh các hiệu ứng di truyền tích lũy (từ giai đoạn ban đầu đến một số giai đoạn khác), và CVM để tiết lộ biểu hiện gen thực xảy ra trong một giai đoạn cụ thể sự phát triển của cây (giữa hai giai đoạn liên kế) bằng cách loại trừ ảnh hưởng của giai đoạn sinh trưởng trước đó. Nói chung, QTL không điều kiện có thể được sử dụng trong chọn giống có sự hỗ trợ của marker với việc xem xét sự tương tác của nhiều gen trong một thời gian phát triển dài hơn, trong khi QTL có điều kiện được áp dụng để tìm một gen chính biểu hiện ở giai đoạn cụ thể.

Có hai ưu điểm của phân tích QTL có điều kiện. Đầu tiên, phân tích QTL có điều kiện có thể làm tăng số lượng QTL được xác định. Trong nghiên cứu này, 66 QTL liên quan đến PH chỉ được phát hiện bằng các phương pháp biến có điều kiện. Một số QTL kiểm soát PH, kích thước hạt và hàm lượng axit linolenoyl trong quá trình phát triển của đậu tương đã được tìm thấy bằng cách sử dụng phương pháp này [8, 20, 40]. Thứ hai, phân tích có điều kiện có thể hiệu chỉnh ước tính của các hiệu ứng cộng thêm và xác nhận tính xác thực của QTL đã xác định. Trong nghiên cứu này, 9 QTL được tìm thấy bằng các phương pháp vô điều kiện và có điều kiện, và các tác động cộng gộp ròng được ước tính sau khi loại trừ ảnh hưởng của giai đoạn tăng trưởng trước đó. Đồng thời, việc phát hiện lặp lại đã hỗ trợ tiện ích của các QTL này.

Sử dụng FW-RIL làm tăng hiệu quả phát hiện QTL

Các nghiên cứu lập bản đồ QTL trước đây chủ yếu dựa trên phép lai giữa hai bố mẹ.

Xu và cộng sự. (1996) đề xuất rằng QTL mới có thể được phát hiện bằng cách tăng số lượng bố mẹ trong các nghiên cứu lập bản đồ [43]. Hayashi và cs lưu ý rằng các RIL do FWC sẽ cho phép chúng tôi nghiên cứu các mối quan hệ giữa bốn alen của bố mẹ và do đó hữu ích hơn trong việc cải thiện hiệu quả phát hiện QTL so với RIL của bố mẹ [46]. Ngoài ra, quần thể có nguồn gốc từ FWC có thể phản ánh sự đa dạng di truyền có trong nhiều dòng bố mẹ hơn, do đó, nhiều QTL có thể được phát hiện từ FWC hơn là phép lai giữa hai bố mẹ [44–45, 48]. Ví dụ: qPH21-I-1 cho thấy các tác động cộng gộp gần như bằng nhau giữa các kiểu gen alen được thực hiện bởi Kenfeng14 và Heinong 48, Kenfeng 15 và Kenfeng 19 đối với DAE21 trong E3, điều này cho thấy rằng QTL này sẽ không được phát hiện dựa trên các quần thể RIL hai bố mẹ bắt nguồn từ phép lai giữa Kenfeng14 × Heinong 48 hoặc Kenfeng 15 × Kenfeng 19 vì không có đủ sự khác biệt về hiệu ứng alen giữa hai bố mẹ trong các tổ hợp bố mẹ này. Tương tự, sự giống nhau về hiệu ứng cộng gộp giữa các kiểu gen alen được mang bởi Heinong 48 và Kenfeng 19 của qPH21-N-1 đối với DAE21|14 trong E3 cũng cho thấy không thể phát hiện QTL này dựa trên các RIL có nguồn gốc từ Heinong 48 × Kenfeng 19. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng FWC để điều tra QTL có điều kiện và không điều kiện liên quan đến PH trong đậu tương, và để làm rõ các đặc điểm biểu hiện gen của PH ở đậu tương trong các thời kỳ sinh trưởng khác nhau.

Cơ sở di truyền cho sự phát triển của PH

Phương pháp cố định QTL được tìm thấy trong các nghiên cứu trước đây và hiện tại trong một bản đồ công khai [63], chúng tôi đã phân tích tính mới và sự tồn tại của QTL đã được xác định (Hình S3). Chúng tôi nhận thấy rằng 76 vùng gen liên quan đến PH được phát hiện trong nghiên cứu hiện tại đã được xác định trong các nghiên cứu trước đây, trong khi 19 vùng còn lại mới được phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi. Đối với 30 QTL có tác dụng chính, 23 khoảng có QTL đã được phát hiện trong các nghiên cứu trước đó và bảy QTL còn lại độc lập với các khoảng đã được xác định. Khoảng thời gian dài hơn của qPH28-A1-1, qPH49-B1-1, qPH49-C2-2, qPH56-D1b-1, qPH49-D1b-1, qPH70-G-1, qPH63-H-2, qPH56-H-1, qPH28-I-1, qPH14-J-1, qPH21-K-1, qPH56-K-1, qPH49-L-1, qPH07-L-1, qPH56-L-1, qPH21-M-1, qPH42-M-2, qPH63-M-3, qPH07-M-1, qPH35-N-1, qPH63-N-2, qPH21-O-1 và qPH70-G-1 chứa nhiều QTL được phát hiện trong hiện tại và các nghiên cứu trước đây, và sự đóng góp của chúng vào sự biến đổi gen có thể là tổng hợp của nhiều gen. Trong vùng ngắn hơn của qPH49-B2-1, qPH35-D1b-2, qPH63-H-3, qPH28-I-1, qPH42-J-2, qPH14-J-2, qPH28-O-1 và qPH42-O-1 chỉ có thể tìm thấy một QTL, hoạt động độc lập trên PH. qPH63-C2-1 và qPH49-C2-2 nằm ở hai vùng lân cận với các PVE tương tự, điều này chỉ ra rằng hai QTL này có thể là một QTL mới. Hơn nữa, qPH49-B2-1, qPH35-D1b-2, qPH63-H-3, qPH42-J-2, qPH28-O-1, qPH42-O-1 và qPH63-C2-1 kiểm soát PH ở các giai đoạn khác, và lần đầu tiên được xác định trong nghiên cứu này. Do đó, bảy QTL này có thể có giá trị trong việc nhân bản gen và chọn giống phân tử để cải thiện cấu trúc thực vật ở đậu tương.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, thế hệ con cháu của một quần thể FWC được sử dụng để đánh giá PH của đậu tương trong toàn bộ thời kỳ phát triển trong bốn môi trường (ngày gieo hạt) bằng phương pháp lập bản đồ QTL không điều kiện và có điều kiện. Có tới 85 QTL liên quan đến PH được phát hiện. Trong số đó, 65 QTL liên kết với PH đã được xác nhận về tính dễ hiểu. Về mặt lý thuyết, nghiên cứu của chúng tôi đã xây dựng một phương thức biểu hiện động theo thời gian và không gian, điều này kiểm soát sự phát triển của PH.

Thông tin bổ sung (Hình và bảng)

Hình bổ sung S1. Sự phân bố tần số của chiều cao cây trong hai giai đoạn gieo hạt trên hai môi trường theo kiểu lai bốn chiều (Kenfeng 14 × Kenfeng 15) × (Heinong 48 × Kenfeng 19). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224897.s001>

Hình bổ sung S2. Bản đồ di truyền nhiễm sắc thể biểu thị QTL cho các locus tính trạng định lượng động đối với chiều cao cây ở đậu tương với các dòng tái tổ hợp bốn chiều. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224897.s002>

Hình bổ sung S3. QTL cho chiều cao cây được phát hiện trong nghiên cứu hiện tại và các báo cáo trước đây. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224897.s003>

Bảng bổ sung S1. So sánh các đặc điểm cơ bản giữa bốn bố mẹ. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224897.s004>

Bảng bổ sung S2. QTL đối với PH ở 10 giai đoạn được phát hiện dưới hai ngày gieo trong hai năm. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224897.s005>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lee S, Jun TH, Michel AP, Mian, MR. SNP markers linked to QTL conditioning plant height, lodging, and maturity in soybean. *Euphytica*. 2015;203: 521–532. PMID: 24166318
2. Zhang WK, Wang YJ, Luo GZ, Zhang JS, He CY, Wu XL, et al. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. *Theor. Appl. Genet.* 2004;108: 1131–1139. pmid:15067400
3. Orf JH, Chase K, Adler FR, Mansur LM, Lark KG. Genetics of soybean agronomic traits: II. Interactions between yield quantitative trait loci in soybean. *Crop Sci.* 1999; 39(6):1652–57.
4. Specht JE, Chase K, Macrander M, Graef GL, Chungd J, Markwella JP, et al. Soybean response to water. *Crop Sci.* 2001; 41(2):493–509.
5. Yuan J, Njiti VN, Meksem K, Iqbal MJ, Triwitayakorn K, Kassem MA, et al. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance. *Crop Sci.* 2002;42(1):271–7. pmid:11756285
6. Wang D, Graef GL, Procopiuk AM, Diers BW. Identification of putative QTL that underlie yield in interspecific soybean backcross populations. *Theor App Genet.* 2004;108(3):458–67. pmid:14504749
7. Kabelka EA, Diers BW, Fehr WR, LeRoy AR, Baianu IC, You T, et al. Putative alleles for increased yield from soybean plant introductions. *Crop Sci.* 2004; 44(3):784–91.
8. Sun D, Li W, Zhang Z, Chen Q, Ning H, Qiu L, et al. Quantitative trait loci analysis for the developmental behavior of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor. Appl. Genet.* 2006;112(4):665–73. pmid:16365761
9. Reinprecht Y, Poysa VW, Yu K, Rajcan I, Ablett GR, Pauls KP. Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase-free soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm. *Genome.* 2006; 49(12):1510–27. pmid:17426766
10. Alcivar A, Jacobson J, Rainho J, Meksem K, Lightfoot DA, Kassem M A. Genetic analysis of soybean plant height, hypocotyl and internode lengths. *J. Agric. Food. Environ. Sci.* 2007;1(1):1–20.
11. Chen Q, Zhang Z, Liu C, Xin D, Qiu H, Shan D, et al. QTL analysis of major agronomic traits in soybean. *Agric. Sci. in China.* 2007;6(4):399–405.
12. Guzman PS, Diers BW, Neece DJ, St Martin SK, LeRoy AR, Grau CR, et al. QTL associated with yield in three backcross-derived populations of soybean. *Crop Sci.* 2007;47(1):111–22.
13. Li W, Zheng DH, Van K, Lee SH. QTL mapping for major agronomic traits across two years in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Crop Sci. Biotechnol.* 2008; 11:171–90.
14. Palomeque L, Liu LJ, Li W, Hedges BR, Cober ER, Smid MP, et al. Validation of mega-environment universal and specific QTL associated with seed yield and agronomic traits in soybeans. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120(5):997–1003. pmid:20012262
15. Liu W, Kim MY, Van K, Lee YH, Li H, Liu X, et al. QTL identification of yield-related traits and their association with flowering and maturity in soybean. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 2011;14(1):65–70.

16. Kim KS, Diers BW, Hyten DL, Mian MR, Shannon JG, Nelson RL. Identification of positive yield QTL alleles from exotic soybean germplasm in two backcross populations. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(6):1353–69. pmid:22869284
17. Eskandari M, Cober ER, Rajcan I. Genetic control of soybean seed oil: II. QTL and genes that increase oil concentration without decreasing protein or with increased seed yield. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(6):1677–87. pmid:23536049
18. Rossi ME, Orf JH, Liu LJ, Dong Z, Rajcan I. Genetic basis of soybean adaptation to North American vs. Asian mega-environments in two independent populations from Canadian × Chinese crosses. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(7):1809–23. pmid:23595202
19. Xu Y. Quantitative trait loci: separating, pyramiding, and cloning. *Plant Breed. Rev.* 1997;15:85–139.
20. Jiang Z, Ding J, Han Y, Teng W, Zhang Z, Li W. Identification of QTL underlying mass filling rate at different developmental stages of soybean seed. *Euphytica.* 2013;189(2):249–60.
21. Jiang Z, Han Y, Teng W, Zhang Z, Sun D, Li Y, et al. Identification of QTL underlying the filling rate of protein at different developmental stages of soybean seed. *Euphytica.* 2010;175(2):227–36.
22. Le BH, Wagmaister JA, Kawashima T, Bui AQ, Harada JJ, Goldberg RB. Using genomics to study legume seed development. *Plant Physiol.* 2007;144(2):562–74. pp. 107. 100362 pmid:17556519
23. Atchley WR, Zhu J. Developmental quantitative genetics, conditional epigenetic variability and growth in mice. *Genetics.* 1997;147(2):765–76. pmid:9335611
24. Zhu J. Analysis of conditional genetic effects and variance components in developmental genetics. *Genetics.* 1995;141(141):1633–39. pmid:8601500
25. Ye Z, Lu Z, Zhu J. Genetic analysis for developmental behavior of some seed quality traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica.* 2003;129(2):183–91.
26. Yan J, Zhu J, He C, Benmoussa M, Wu P. Quantitative trait loci analysis for the developmental behavior of tiller number in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1998;97(1):267–74. PMID:20623365
27. Yan J, Zhu J, He C, Benmoussa M, Wu P. Molecular dissection of developmental behavior of plant height in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics.* 1998;150(3):1257–65. pmid:9799277
28. Wu W, Li W, Tang D, Lu H, Worland AJ. Time-related mapping of quantitative trait loci underlying tiller number in rice. *Genetics.* 1999;151(1):297–303. pmid:9872968
29. Cao G, Zhu J, He C, Gao Y, Yan J, Wu P. Impact of epistasis and QTL × environment interaction on the developmental behavior of plant height in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2001;103(1):153–60.
30. Yang G, Xing Y, Li S, Ding J, Yue B, Deng K, et al. Molecular dissection of developmental behavior of tiller number and plant height and their relationship in rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditas.* 2006;143(2006):236–45. pmid:17362360
31. Liu G, Zeng R, Zhu H, Zhang Z, Ding X, Zhao F, et al. Dynamic expression of nine QTL for tiller number detected with single segment substitution lines in rice. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(3):443–53. pmid:18949451
32. Liu Z, Tang J, Wang C, Tian G, Wei X, Hu Y, et al. QTL analysis of plant height under N-stress and N-input at different stages in maize. *Acta Agron. Sin.* 2007;5:782–9.

33. Yang J, Zhang J, Liu K, Wang Z, Liu L. Abscisic acid and ethylene interact in wheat grains in response to soil drying during grain filling. *New Phytol.* 2006;171(2):293–303. pmid:16866937
34. Wang Z, Wu X, Qian R, Chang X, Li R, Jing R. QTL mapping for developmental behavior of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica.* 2010;174(3):447–58.
35. Wu X, Wang Z, Chang X, Jing R. Genetic dissection of the developmental behaviors of plant height in wheat under diverse water regimes. *J. Exp. Bot.* 2010;61(11): 2923–37. pmid:20497970
36. Li W, Sun D, Du Y, Chen Q, Zhang Z, Qiu L, et al. Quantitative trait loci underlying the development of seed composition in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Genome.* 2007; 50(50):1067–77. pmid:18059535
37. Xin D, Qiu H, Shan D, Shan C, Liu C, Hu G, et al. Analysis of quantitative trait loci underlying the period of reproductive growth stages in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Euphytica.* 2008;162(2):155–65.
38. Han Y, Teng W, Sun D, Du Y, Qiu L, Xu X, et al. Impact of epistasis and QTL x environment interaction on the accumulation of seed mass of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Genet. Res.* 2008;90(6):481–91. pmid:19123966
39. Teng W, Han Y, Du Y, Sun D, Zhang Z, Qiu L, et al. QTL analyses of seed weight during the development of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Heredity.* 2009;102(4):372–80. pmid:18971958
40. Han Y, Xie D, Teng W, Zhang S, Chang W, Li W. Dynamic QTL analysis of linolenic acid content in different developmental stages of soybean seed. *Theor. Appl. Genet.* 2011; 122(8):1481–88. pmid:21344183
41. Blanc G, Charcosset A, Mangin B, Gallais A, Moreau L. Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis: an application in maize. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113(2):206–24. pmid:16791688
42. Muranty H. Power of tests for quantitative trait loci detection using full-sib families in different schemes. *Heredity.* 1996;76(2):156–65.
43. Xu S. Mapping quantitative trait loci using four-way crosses. *Genet. Res.* 1996;68(2):175–81.
44. Qin H, Guo W, Zhang Y M, Zhang T. QTL mapping of yield and fiber traits based on a four-way cross population in *Gossypium hirsutum* L. *Theor. Appl. Genet.* 2008;117(6):883–94. pmid:18604518
45. Takavar S, Rahimian H, Kazemitabar K. Agrobacterium mediated transformation of maize (*Zea mays* L.). *J Sci Islam Repub Iran.* 2010;21:21–9. Agrobacterium mediated transformation of maize (*Zea mays* L.)
46. Hayashi T, Ohyama A, Iwata H. Bayesian QTL mapping for recombinant inbred lines derived from a four-way cross. *Euphytica.* 2012;183(3):277–87.
47. Rao S, Xu S. Mapping quantitative trait loci for ordered categorical traits in four-way crosses. *Heredity.* 1998;81(2):214–24. pmid:9750263
48. Qin H, Zhang T. Genetic linkage mapping based on SSR marker with a four-way cross population in *Gossypium hirsutum* L. *J. Nanjing Agric. Univ.* 2008; 31(4):13–9.

49. Paulo MJ, Boer M, Huang X, Koornneef M, Van Eeuwijk F. A mixed model QTL analysis for a complex cross population consisting of a half diallel of two-way hybrids in *Arabidopsis thaliana*: analysis of simulated data. *Euphytica*. 2008;161(1–2):107–14.
50. Bohlen M, Bailoo J, Jordan R, Wahlsten D. Hippocampal commissure defects in crosses of four inbred mouse strains with absent corpus callosum. *Genes, Brain Behav.* 2012;11(7):757–66. pmid:22537318
51. Harmegnies N, Davin F, De S, Buys N, Georges M, Coppieters W. Results of a whole-genome quantitative trait locus scan for growth, carcass composition and meat quality in a porcine four-way cross. *Anim. Genet.* 2006;37(6):543–53. pmid:17121599
52. Ning H, Bai X, Li W, Xue H, Zhuang X, Li W-X, and Liu C. Mapping QTL protein and oil contents using population from four-way recombinant inbred lines for soybean (*Glycine max* L. Merr.). *ACTA AGRONOMICA SINICA* 2016;42(11): 1609–1617
53. Liu S, Xue H, Zhang K, Wang P, Su D, Li W, et al. Mapping QTL affecting the vertical distribution and seed set of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] pods. *The Crop Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.04.004>
54. Zhang S, Meng L, Wang J, Zhang L. Background controlled QTL mapping in pure-line genetic populations derived from four-way crosses. *Heredity*. 2017; 119:256–264; pmid:28722705
55. McCouch SR, Cho YG, Yano PE, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T. Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newslett.* 1997;14:11–13.
56. Lee SH, Bailey MA, Mian MAR, Carter TE, Ashley DA, Hussey RS, et al. Molecular markers associated with soybean plant height, lodging, and maturity across locations. *Crop Sci.* 1996;36(3):728–35.
57. Palomeque L, Liu LJ, Li WB, Hedges B, Cober ER, Rajcan I. QTL in mega-environments: II. Agronomic trait QTL co-localized with seed yield QTL detected in a population derived from a cross of high-yielding adapted × high-yielding exotic soybean lines. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(3):429–36. pmid:19462149
58. Pathan SM, Vuong T, Clark K, Lee JD, Shannon JG, Roberts CA, et al. Genetic mapping and confirmation of quantitative trait loci for seed protein and oil contents and seed weight in soybean. *Crop Sci.* 2013;53(3):765–74.
59. Yao D, Liu Z, Zhang J, Liu S, Qu J, Guan S, et al. Analysis of quantitative trait loci for main plant traits in soybean. *Genet. Mol. Res.* 2015;14(2):6101–9. pmid:26125811
60. Peat WE, Whittington WJ. Genetic analysis of growth in tomato: segregating generations. *Ann. Bot.* 1965;29(4):725–38.
61. Wu G. Analyses of gene effects for three quantitative characters at different developmental stages in maize. *J. Acta Genet. Sin.* 1987;14(5):363–9.
62. Xu Y, Shen Z. Diallel analysis of tiller number at different growth stages in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1991;83(2):243–9. pmid:24202365
63. Song Q, Marek LF, Shoemaker RC, Lark KG, Concibido VC, Delannay X, Specht JE, Cregan PB. A new integrated genetic linkage map of the soybean, *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:122–128. pmid:14991109