

LẬP BẢN ĐỒ QŨY TÍCH CÁC TÍNH TRẠNG SỐ LƯỢNG VỀ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN TRONG QUẦN THỂ DÒNG LAI TÁI TỔ HỢP ĐẬU TƯƠNG

Sanjeev Kumar Dhungana¹, Ji-Hee Park^{1,*}, Jae-Hyeon Oh², Beom-Kyu Kang¹,
Jeong-Hyun Seo¹, Jung-Sook Sung¹, Hong-Sik Kim³, Sang-Ouk Shin¹,
In -Youl Baek¹ và Chan-Sik Jung¹

1 Bộ phận Khoa học Cây trồng miền Nam, Phòng Nghiên cứu Giống cây trồng cận, Viện Khoa học Cây trồng Quốc gia, Cục Phát triển Nông thôn, Miryang 50424, Hàn Quốc

2 Phòng Công nghệ Sinh học Nông nghiệp, Khoa Kỹ thuật Gen, Viện Khoa học Nông nghiệp Quốc gia, Cục Quản lý Phát triển Nông thôn, Jeonju 54874, Hàn Quốc

3 Bộ phận Khoa học Cây trồng miền Trung, Khoa Công nghệ sau thu hoạch cây trồng, Viện Khoa học Cây trồng Quốc gia, Cục Quản lý Phát triển Nông thôn, Suwon 16429, Hàn Quốc

TÓM TẮT

Cải thiện khả năng chịu hạn của đậu tương có thể là một cách hiệu quả để giảm thiểu việc giảm năng suất ở các vùng thường xuyên bị hạn hán. Việc xác định quỹ tích các tính trạng số lượng (QTLs) liên quan đến khả năng chịu hạn rất hữu ích để tạo điều kiện phát triển các giống chịu được điều kiện bất thuận. Nghiên cứu này nhằm xác định các QTL về khả năng chịu hạn ở đậu tương bằng cách sử dụng quần thể dòng lai tái tổ hợp (RIL) được phát triển từ phép lai giữa giống cây PI416937 chịu hạn và cây trồng Cheonsang mẫn cảm. Việc xác định kiểu hình được thực hiện với một hệ số hạn hán có trọng lượng bắt nguồn từ các đặc điểm sinh dưỡng và sinh sản. Bản đồ di truyền được xây dựng bằng cách sử dụng 2.648 marker SNP đa hình phân bố trên 20 nhiễm sắc thể với khoảng cách di truyền trung bình giữa các marker là 1,36cM. Tổng số 10 QTL có giá trị chênh lệch logarit 3,52–4,7 chiếm tới 12,9% biến thiên kiểu hình đã được xác định trên bảy nhiễm sắc thể. Năm nhiễm sắc thể — 2, 7, 10, 14 và 20 — mỗi nhiễm sắc thể chứa một QTL, nhiễm sắc thể 1 và 19 chứa hai và ba QTL, tương ứng. Vị trí nhiễm sắc thể của bảy QTL chòng chéo hoặc nằm gần với các QTL có liên quan và/hoặc các gen ứng viên tiềm năng đã được báo cáo trước đó. Các QTL và các marker liên kết chặt chẽ có thể được sử dụng trong quá trình lựa chọn có sự hỗ trợ của marker để đẩy nhanh quá trình chọn giống đậu tương chịu hạn.

Từ khóa: gen ứng viên; quỹ tích tính trạng số lượng; dòng lai tái tổ hợp; đậu tương chịu hạn; hệ số hạn có trọng lượng

1. GIỚI THIỆU

Đậu tương (*Glycine max* [L.] Merr.) Là một trong những cây hàng hóa chính trên toàn thế giới để làm nguồn thực phẩm (<http://faostat.fao.org/>). Tăng sản lượng là yếu tố quan trọng đối với an ninh lương thực toàn cầu. Tuy nhiên, năng suất của nhiều loại cây trồng, bao gồm cả đậu tương, đang bị thách thức bởi biến đổi khí hậu toàn cầu [1]. Biến đổi khí hậu làm nghiêm trọng thêm tỷ lệ các kiểu thời tiết khắc nghiệt, chẳng hạn như lượng mưa thất thường, nhiệt độ tăng cao và hậu quả là hạn hán, làm giảm đáng kể sản lượng trồng trọt [2]. Căng thẳng do hạn là một tác nhân phi sinh học làm giảm hơn 50% năng suất đậu tương [3]. Sự mẫn cảm của cây đậu tương đối với hạn hán ảnh hưởng đến năng suất đậu tương toàn cầu vì gần 41% diện tích đất trên thế giới là đất khô [4], và sự biến đổi khí hậu không thể đoán trước, bao gồm cả các đợt hạn hán gia tăng, có thể xảy ra ở nhiều nơi [5, 6]. Mặc dù ảnh hưởng tiêu cực của hạn hán đối với cây đậu tương phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng, thời gian và thời điểm bị căng

thăng về giai đoạn sinh trưởng, giai đoạn dễ bị hạn hán nhất là giai đoạn sinh sản [7, 8]. Vì vậy, việc thu thập thông tin di truyền về khả năng chịu hạn ở các giai đoạn sinh sản của cây đậu tương là rất quan trọng.

Khả năng cung cấp nước trong đất thấp mang đến một số thay đổi sinh lý và sinh hóa ở cây đậu tương có thể gây ra một loạt các triệu chứng tổn thương, chẳng hạn như giảm quang hợp [9, 10], tăng căng thẳng oxy hóa [11] và thay đổi trong quá trình trao đổi chất [12]. Những thay đổi này được tái hiện ở nhiều đặc điểm dễ nhận thấy, bao gồm giảm chiều cao cây, số lượng đốt, cành và quả, sinh khối và diện tích lá ở đậu tương [13, 14, 15]. Vì khả năng chịu hạn là một tính trạng số lượng phức tạp được kiểm soát bởi nhiều gen [16], có thể cho rằng một số đặc điểm và locus có liên kết với khả năng chịu hạn của đậu tương. Do đó, những nghiên cứu QTL tính chống chịu bao gồm các đặc điểm như chiều cao cây, số lượng đốt, cành và quả, sinh khối và diện tích lá có thể có tỷ lệ cao.

Việc xác định đặc điểm của các vùng gen liên quan đến khả năng chịu hạn có thể giúp thúc đẩy quá trình nghiên cứu di truyền và cải tiến giống đậu tương. Một số nghiên cứu lập bản đồ liên kết đã được thực hiện để xác định các QTL liên quan đến khả năng chịu hạn ở đậu tương xét các tính trạng khác nhau. Ví dụ, các QTL đã được phát hiện bằng cách sử dụng năng suất hạt và tính miễn cảm với hạn hán [17], hiện tượng héo lá, mất nước ở lá, hàm lượng nước tương đối và năng suất hạt [18], sự điều hòa của rễ cây có liên quan đến tránh hạn [19], hiệu suất sử dụng nước và cháy lá [20, 21], phân biệt đồng vị carbon và beta [22], sự héo rũ của tán cây [23], chiều cao cây và năng suất hạt [24]. Gần đây, Wang và cs [25] đã sử dụng một nghiên cứu liên kết trên toàn bộ bộ gen để xác định QTL về khả năng chịu hạn xem xét sự cân đối chiều cao và trọng lượng của cây.

Một trong những yếu tố hạn chế chính trong nghiên cứu di truyền về khả năng chịu hạn là sự sẵn có của các chỉ thị mật độ thấp, do đó làm giảm hiệu quả và độ chính xác của việc lập bản đồ QTL. Tuy nhiên, sự phát triển nhanh chóng của các kỹ thuật giải trình tự đã cung cấp sự phân loại kiểu gen mạnh mẽ (SNP), cho phép phát triển độ phân giải bản đồ cao nhất so với các hệ thống marker khác [26, 27]. Các marker SNP đã được sử dụng để phát hiện ra QTL trong nhiều loại cây trồng, bao gồm lúa, ngô, lúa mì, đậu tương, cải dầu, lúa mạch, củ cải đường và đậu đũa [28]. Tương tự, việc lựa chọn và đo lường các đặc điểm có liên quan cũng quan trọng không kém để xác định chính xác các QTL về khả năng chống chịu căng thẳng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xem xét một số đặc điểm sinh dưỡng cũng như sinh sản, chẳng hạn như chiều cao cây (PH), số lượng đốt trên thân chính (NN), cành (BN), quả (PN), sinh khối (BM) và diện tích lá (LA) để xác định kiểu hình và marker SNP xác định kiểu gen của quần thể RIL để xác định QTL về khả năng chịu hạn. Vì sáu tính trạng này được coi là những tính trạng bị ảnh hưởng nhiều do hạn hán [13, 14, 15], nghiên cứu này cung cấp thông tin có giá trị về kiến thức di truyền và chọn giống đậu tương chịu hạn.

2. KẾT QUẢ

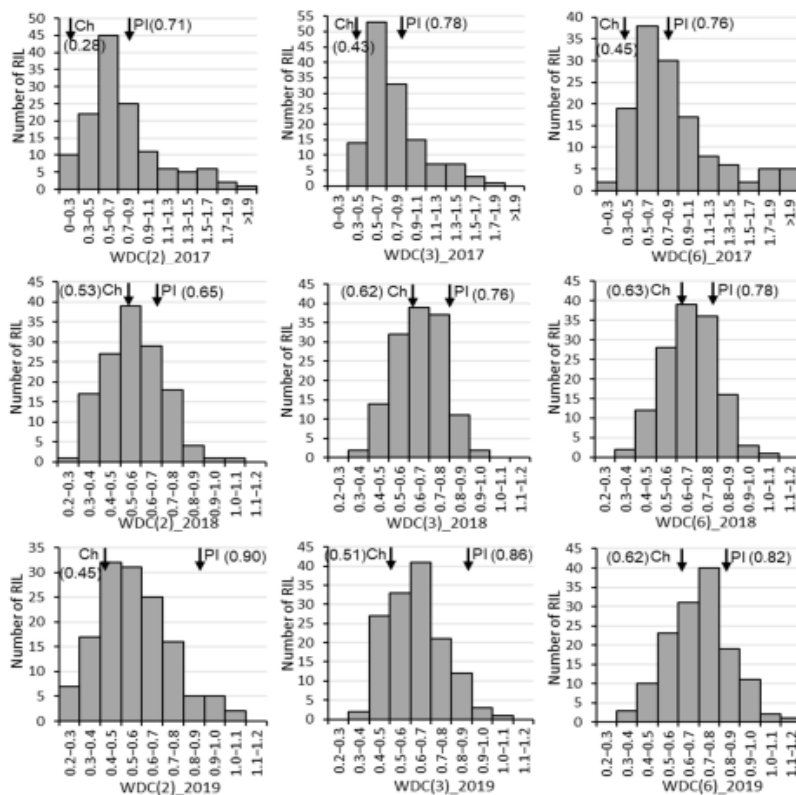
2.1. Độ ẩm của đất

Độ ẩm của đất ở các ô đối chứng và xử lý khác nhau trong ba năm tùy theo lượng nước tưới được áp dụng cho các ô. Trung bình, các ô đối chứng có 10–13% và các ô xử lý khô hạn có độ ẩm đất 3–10%. Trong năm 2017, độ ẩm trung bình của ô đối chứng là 11% và của ô xử lý là 7%. Năm 2018, độ ẩm đất ở ô đối chứng và ô xử lý

khô hạn lần lượt là 12,7% và 9,7%. Tương tự, ô đối chứng là 10% và ô xử lý là 3% vào năm 2019.

2.2. Phân tích kiểu hình của bố mẹ và 140 RIL

Bố mẹ chịu hạn PI416937 có tỷ lệ chịu hạn (WDC) cao hơn liên tục so với bố mẹ mẫn cảm Cheonsang đối với cả ba tổ hợp tính trạng (Bảng 1). WDC trung bình, được tính bằng cách sử dụng hai, ba và sáu đặc điểm, của PI416937 lần lượt là 0,76, 0,80 và 0,79 và của Cheonsang lần lượt là 0,42, 0,52 và 0,57. WDC cao nhất cho PI416937 và Cheonsang lần lượt vào năm 2019 và 2018. Mặt khác, WDC cao nhất cho các RIL vào năm 2017. Phân bố RIL cho WDC trong ba năm cho thấy phân bố bình thường với sự phân tích ngược lại (Hình 1).



Hình 1. Tần số trong các RIL cho hệ số hạn có trọng số (WDC) từ năm 2017 đến năm 2019. Ch và PI bên cạnh mũi tên ngược (↓) với giá trị WDC bên trong dấu ngoặc đơn được viết tắt tương ứng cho bố mẹ Cheonsang và PI416937. Các giá trị trong ngoặc đơn sau WDC cho biết số đặc điểm được xem xét để tính WDC: 2 (sinh khối và diện tích lá), 3 (chiều cao cây, sinh khối và diện tích lá) và 6 (chiều cao cây, số đốt, số nhánh, số quả, sinh khối và diện tích lá).

Bảng 1. Hệ số hạn có trọng lượng (WDC) của bố mẹ và các dòng lai tái tổ hợp (RIL) cho ba năm (2017–2019) và trung bình của chúng.

Tính trạng	Năm	Bố mẹ		RILs	
		PI 416937	Cheonsang	Mean	Range
WDC (2)	2017	0,71	0,28	0,73	0,12 - 2,16
	2018	0,65	0,53	0,57	0,23 - 1,01
	2019	0,90	0,45	0,56	0,23 - 1,04
	Mean ¹	0,76	0,42	0,62	0,12 - 1,04
WDC (3)	2017	0,78	0,43	0,77	0,32 - 1,87
	2018	0,76	0,62	0,65	0,36 - 0,99
	2019	0,86	0,51	0,62	0,31 - 1,02
	Mean	0,80	0,52	0,68	0,31 - 1,87
WDC (6)	2017	0,76	0,45	0,86	0,22 - 3,06
	2018	0,78	0,63	0,67	0,38 - 1,01
	2019	0,82	0,63	0,70	0,33 - 1,15

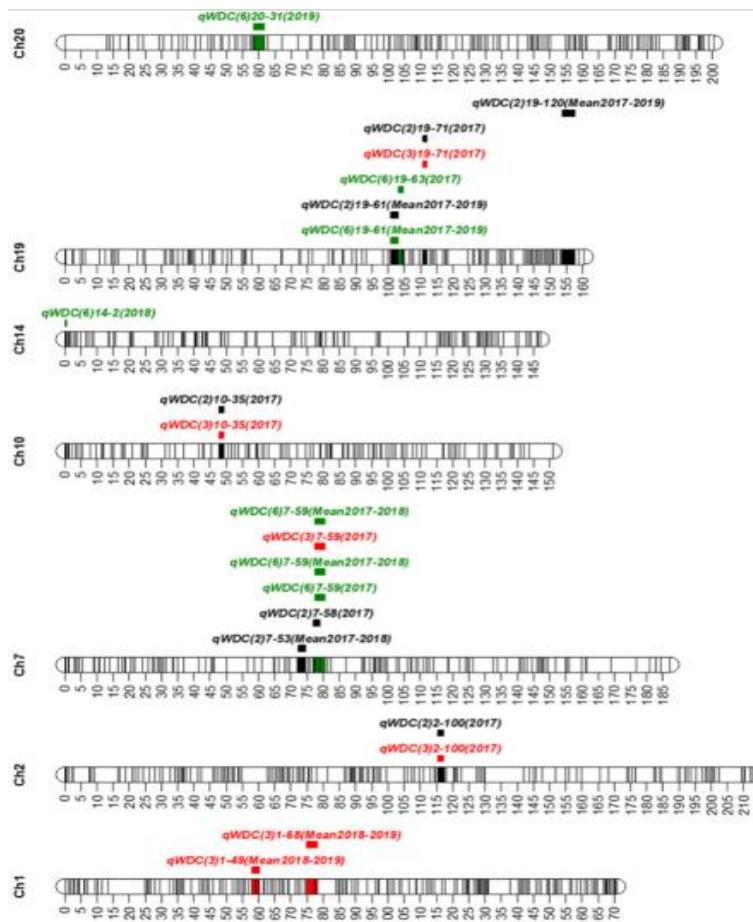
Mean	0,79	0,57	0,74	0,22 - 3,06
------	------	------	------	-------------

1 Giá trị trung bình của ba năm. Các giá trị trong ngoặc đơn sau WDC cho biết số đặc điểm được xem xét để tính WDC: 2 (sinh khối và diện tích lá), 3 (chiều cao cây, sinh khối và diện tích lá) và 6 (chiều cao cây, số đốt, số nhánh, số quả, sinh khối và diện tích lá).

2.3. Lập bản đồ liên kết và Phân tích QTL

19.259 marker đa hình đã được phân loại (phân ly không chính xác $p < 0,001$ và dữ liệu bị thiếu với $> 15\%$) để loại bỏ các marker dư thừa. Sau khi phân loại, còn lại 2.702 marker, trong đó 54 marker có khoảng bản đồ và tần số tái tổ hợp cao cũng bị loại bỏ. 54 marker bị loại bỏ có khoảng bản đồ cao tới 63,34cM và/hoặc tần số kết hợp là 0,6712. Tổng cộng 2.648 SNP đã được sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết của 20 nhiễm sắc thể (Bảng bổ sung S1) và phân tích QTL. Tổng số bản đồ liên kết trải dài 3.608,4cM với giá trị trung bình giữa các marker là 1,36cM. Nhiễm sắc thể 13 (262,44cM) và 15 (145,71cM) lần lượt có bản đồ liên kết lớn nhất và ngắn nhất.

Tổng số 10 QTL với phạm vi từ 3,52 đến 4,71 LOD và 8,1 đến 12,9% PVE đã được xác định trên bảy nhiễm sắc thể (1, 2, 7, 10, 14, 19 và 20). Một QTL được tìm thấy trên năm nhiễm sắc thể 2, 7, 10, 14 và 20; hai QTL trên nhiễm sắc thể số 1 và ba QTL trên nhiễm sắc thể số 19 (Hình 2 và Bảng 2). Năm QTL — qWDC2-1, qWDC7-1, qWDC10-1, qWDC19-1 và qWDC19-2 đã được phát hiện trên các tổ hợp tính trạng khác nhau. Các QTL này được coi là các QTL ổn định về khả năng chịu hạn. Điều thú vị là qWDC7-1 được phát hiện trên cả ba tổ hợp tính trạng qWDC2-1 (LOD = 4,68, PVE = 10,6%), qWDC7-1 (LOD = 4,44, PVE = 10,3%) và qWDC19-2 (LOD = 4,57, PVE = 10,3%) được xác định trên nhiều hơn hai tổ hợp tính trạng và có hơn 10% PVE được coi là ổn định và QTL chủ yếu cho khả năng chịu hạn.



Hình 2. Vị trí của các QTL đối với khả năng chịu hạn trên 7 nhiễm sắc thể (Ch). q: QTL, WDC: hệ số khô hạn gia quyền. Trong tên các QTL, số đầu tiên trong ngoặc đơn sau WDC đại diện cho số lượng tính trạng được coi là để tính WDC (màu đen, đỏ và xanh lục tương ứng cho 2, 3 và 6 tính trạng; số thứ hai là tên nhiễm sắc thể; số lượng sau dấu gạch ngang (-) đại diện cho số thứ tự của marker trên bản đồ liên kết; và mean biểu thị giá trị trung bình của các tính trạng trong các năm khác nhau (2017–2019). Các dòng bên trong nhiễm sắc thể biểu thị vị trí của các marker được sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết. Các thanh màu biểu thị vùng QTL. Các số tỉ lệ bên cạnh nhiễm sắc thể cho biết chiều dài di truyền (cM) của nhiễm sắc thể.

Bảng 2. Các QTL về chịu hạn được xác định trong quần thể dòng lai tái tổ hợp có nguồn gốc từ bố mẹ PI416937 chống chịu và Cheonsang mẫn cảm với khô hạn.

QTL Name ¹	Traits ²	Chr(LG) ³	Genetic Position (cM)	Year	Marker Interval	Physical Position of Markers ⁴ (bp)	LOD ⁵	PVE ⁶ (%)	Add ⁷
qWDC1-1	3	1(D1a)	59.0	Mean (2018–2019)	AX-90430153–AX-90472468	4,523,676–5,311,697	3.59	9.0	0.0299
qWDC1-2	3	1(D1a)	77.5	Mean (2018–2019)	AX-90491463–AX-90348846	8,574,531–12,537,020	3.88	9.5	0.0303
qWDC2-1	3	2(D1b)	116.3	2017	AX-90446012–AX-90363541	14,349,986–14,561,578	4.53	10.3	0.0998
qWDC2-1	2	2(D1b)	116.3	2017	AX-90446012–AX-90363541	14,349,986–14,561,578	4.68	10.6	0.1276
qWDC7-1	2	7(M)	73.1	Mean (2017–2018)	AX-90361948–AX-90313028	8,428,091–8,490,557	3.51	8.2	-0.0539
qWDC7-1	2	7(M)	78.3	2017	AX-90524222–AX-90514687	8,678,861–9,630,217	3.90	8.7	-0.1102
qWDC7-1	6	7(M)	78.9	2017	AX-90395090–AX-90450726	9,458,480–10,232,736	3.58	8.5	-0.1403
qWDC7-1	6	7(M)	78.9	Mean (2017–2018)	AX-90395090–AX-90450726	9,458,480–10,232,736	3.57	8.7	-0.0711
qWDC7-1	3	7(M)	78.9	2017	AX-90395090–AX-90450726	9,458,480–10,232,736	4.44	10.0	-0.0935
qWDC7-1	3	7(M)	78.9	Mean (2017–2018)	AX-90395090–AX-90450726	9,458,480–10,232,736	4.42	10.3	-0.0489
qWDC10-1	3	10(O)	48.5	2017	AX-90408464–AX-90377420	38,465,737–38,164,877	4.14	9.2	-0.0910
qWDC10-1	2	10(O)	48.5	2017	AX-90408464–AX-90377420	38,465,737–38,164,877	4.47	9.9	-0.1189
qWDC14-1	6	14(B2)	0.4	2018	AX-90403945–AX-90517018	241,228–369,721	3.65	9.6	-0.0405
qWDC19-1	6	19(L)	101.5	Mean (2017–2019)	AX-90425812–AX-90334270	41,077,065–41,940,539	3.54	8.4	0.0467
qWDC19-1	2	19(L)	101.5	Mean (2017–2019)	AX-90425812–AX-90334270	41,077,065–41,940,539	3.52	8.1	0.0397
qWDC19-1	6	19(L)	104.2	2017	AX-90334270–AX-90311493	41,940,539–42,045,317	4.03	9.6	0.1491
qWDC19-2	3	19(L)	111.5	2017	AX-90480787–AX-90489545	43,473,467–43,030,013	4.45	10.0	0.0938
qWDC19-2	2	19(L)	111.5	2017	AX-90480787–AX-90489545	43,473,467–43,030,013	4.57	10.3	0.1203
qWDC19-3	2	19(L)	156.9	Mean (2017–2019)	AX-90403789–AX-90364479	49,436,986–49,727,405	3.91	9.1	-0.0425
qWDC20-1	6	20(I)	58.7	2019	AX-90318489–AX-90405719	30,153,192–32,595,196	4.71	12.9	0.0601

1 QTL được phát hiện tại cùng một khoảng marker liền kề hoặc chồng chéo được coi là cùng một QTL. 2 Số lượng các tính trạng (2: sinh khối và diện tích lá, 3: chiều cao cây, sinh khối và diện tích lá, và 6: chiều cao cây, số đốt, số nhánh, số quả, sinh khối và diện tích lá) được xem xét để phân tích QTL. 3 Nhiễm sắc thể (Chr) và nhóm liên kết (LG). 4 Vị trí vật lý của khoảng marker. Bộ gen tham chiếu của đậu tương (*Glycine max* Wm82.a1) được sử dụng để xác định vị trí vật lý của các marker. 5 Lôgarit của giá trị chênh lệch ở khả năng xảy ra cao nhất của QTL. 6 Sự biến đổi kiểu hình được giải thích bằng QTL. 7 Hiệu ứng cộng, giá trị dương chỉ ra rằng PI416937 đã đóng góp alen và giá trị âm cho biết rằng Cheonsang đã đóng góp alen cho PVE.

2.4. Dự đoán gen ứng cử viên

Các gen ứng viên tiềm năng nằm trong phạm vi 200kb của QTL đã được tìm kiếm trên Soybase (www.soybase.org, được truy cập vào ngày 20 tháng 4 năm 2021), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, được truy cập vào ngày 20 Tháng 4 năm 2021), và Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, truy cập vào ngày 20 tháng 4 năm 2021). 12 gen ứng viên tiềm năng được tìm thấy trong 200kb của vùng QTL (Bảng 3). Bốn gen — *Glyma07g10321*, *Glyma07g10340*, *Glyma07g10440* và *Glyma07g11470* — nằm trong một trong những QTL ổn định chính *qWDC7-1*. Chúng có liên quan đến yếu tố phiên mã myeloblastosis (MYB), một tiếp nhận lặp lại làm giàu leucine giống như protein kinase, tương ứng với protein liên kết calmodulin và protein kinase hoạt hóa mitogen. Gene *Glyma01g04710* có liên quan đến glutathione S-transferase (GST). Một số gen, chẳng hạn như *Glyma19g33750*, *Glyma19g34210* và *Glyma20g22311* được tìm thấy có liên quan trực tiếp đến phản ứng với căng thẳng.

Bảng 3. Các gen ứng viên tiềm năng liên quan đến chống chịu căng thẳng nằm trong vùng QTL 200 kb.

SN	Gene Name	Physical Location (bp)	QTL	Gene Description
1	<i>Glyma01g04710</i>	4,323,774–4,325,439	qWDC1-1	Glutathione S-transferase, GST, Superfamily, GST domain containing
2	<i>Glyma01g04750</i>	4,367,349–4,370,072	qWDC1-1	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)
3	<i>Glyma01g09515</i>	11,687,515–11,688,465	qWDC1-2	Growth factor activity
4	<i>Glyma07g10321</i>	8,632,573–8,633,965	qWDC7-1	MYB-like DNA-binding protein MYB
5	<i>Glyma07g10340</i>	8,640,435–8,642,843	qWDC7-1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase
6	<i>Glyma07g10440</i>	8,726,024–8,730,618	qWDC7-1	Calmodulin-binding protein-like
7	<i>Glyma07g11470</i>	9,651,174–9,657,518	qWDC7-1	Mitogen-activated protein kinase
8	<i>Glyma19g33650</i>	41,237,434–41,241,804	qWDC19-1	Glutathione peroxidase
9	<i>Glyma19g33750</i>	41,345,217–41,346,003	qWDC19-1	Salt stress response/antifungal
10	<i>Glyma19g34210</i>	41,826,839–41,830,086	qWDC19-1	Heat shock transcription factor
11	<i>Glyma19g34550</i>	42,144,502–42,144,657	qWDC19-1	Golgi SNARE Bet1-related
12	<i>Glyma20g22311</i>	32,330,953–32,332,259	qWDC20-1	Stress responsive protein

Tên và mô tả của các gen ứng cử viên tiềm năng liên quan đến căng thẳng khô hạn đã được tìm kiếm trong Soybase (www.soybase.org), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) và Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>).

3. THẢO LUẬN

Cơ chế chịu hạn ở thực vật rất phức tạp và là kết quả của mạng lưới phức tạp gồm nhiều gen. Các thay đổi sinh lý và sinh hóa khác nhau do căng thẳng khô hạn, đã được xác định ở cây đậu tương [9, 10, 11, 12] có thể phản ánh rõ ràng ở các tính trạng như PH, NN, BN, PN, BM và LA [13, 14, 15]. Qi và cs [29] đã tìm thấy mối tương quan đáng kể giữa hệ số kháng hạn toàn diện và WDC được tính toán bằng cách xem xét 35 chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa bao gồm chiều cao cây và trọng lượng thân khô (sinh khối), cũng được xem xét trong nghiên cứu này. Hai tính trạng này (chiều cao cây và trọng lượng thân khô (sinh khối) được kết hợp trong báo cáo trước [29] có tương quan đáng kể với các tính trạng khác được xem xét trong nghiên cứu hiện tại. Vì hầu hết sáu tính trạng này đều có tương quan đáng kể (Bảng bổ sung S2), một tổng hợp thông số WDC, bắt nguồn từ những đặc điểm này, có thể đại diện cho chúng một cách thích hợp trong khi phân tích QTL về khả năng chịu hạn. với số quả, số hạt và năng suất hạt [31] đã được báo cáo ở đậu tương trong điều kiện thiếu nước, cho thấy tiềm năng ứng dụng kết quả QTL của nghiên cứu hiện tại đối với năng suất hạt đậu tương trong điều kiện khô hạn.

Giá trị WDC (Bảng 1) của PI416937 cao hơn so với Cheonsang liên tục trong ba năm cho thấy giống bố mẹ trước đây chịu hạn tốt hơn về sau. Phạm vi rộng và biến thiên liên tục về giá trị WDC của RIL trong các môi trường khác nhau (năm) cho thấy bản chất định lượng của WDC, cho thấy sự phù hợp của việc lựa chọn các cặp bố mẹ này để phát triển quần thể RIL cho phân tích QTL. Sự phân ly đột biến của các kiểu gen có WDC ngoài bố hoặc mẹ có thể được khai thác trong chọn giống chịu hạn [32]. Mặc dù tính di truyền theo nghĩa rộng cao đối với sáu tính trạng đã được quan sát trong các năm riêng lẻ (lên đến 0,90), dữ liệu năm trung bình cho thấy tính di truyền tương đối thấp (lên đến 0,42) (Bảng bổ sung S3), cho thấy ảnh hưởng đáng kể của môi trường

phát triển lên các tính trạng. Sự tương tác giữa kiểu gen \times năm có ý nghĩa cao ($p < 0,0001$) cũng chỉ ra ảnh hưởng chính của môi trường lên các tính trạng (Bảng bổ sung S4).

Các vị trí nhiễm sắc thể của bảy QTL được xác định trong nghiên cứu này chồng chéo hoặc liền kề với các QTL liên quan và/hoặc các gen ứng viên tiềm năng được báo cáo trước đó, trong khi hai QTL (*qWDC1-1* và *qWDC1-2*) trên nhiễm sắc thể 1 và một QTL (*qWDC19-3*) trên nhiễm sắc thể 19 là mới. *qWDC2-1* nằm gần Satt266 (<260kb) được liên kết với QTL để làm héo tán cây [19]. Một QTL *MPW2.2* (*Gm02_14594196*) chịu hạn khác [25] cũng nằm gần *qWDC2-1* (<33kb). *qWDC7-1* được chồng lên vị trí của nó với các QTL *qPH28-M-1* và *qPH-B2-1* cho chiều cao cây [33,34] và QTL *qPN-M-1* cho số quả [35]. *qWDC10-1* đã được tô màu vị trí vật lý với QTLs *MPW10.5* (*Gm10_38212261*) cho khả năng chịu hạn [25], *qPH49-O-1* cho chiều cao cây [33] và *qPN-O-1* cho số quả [36]. QTL *qPH-B2-1* cho chiều cao cây [34] nằm trong phạm vi 300kb từ *qWDC14-1* được xác định trên nhiễm sắc thể số 14. *qWDC19-1* và *qWDC19-2* được định vị bằng QTLs tương ứng với *qPH07-L-1* và *qPH-L-2*, đối với chiều cao cây [33, 34] và *qPN-L-1* cho số quả [36] và nằm trong QTL *MPH19.2* về khả năng chịu hạn [25]. Tương tự, QTL *qWDC20-1* trên nhiễm sắc thể 20 được chồng chéo với QTL *qPN-I-1* cho số quả [36].

Một số cơ chế sinh hóa và gen có thể liên quan đến chống chịu căng thẳng ở đậu tương [37]. *Glyma01g04710* liên quan đến GST được tìm thấy nằm trong QTL *qWDC1-1*. GSTs đóng nhiều vai trò trong thực vật bao gồm phản ứng với căng thẳng do khô hạn ở *Arabidopsis* [38], lúa [39] và đậu tương [40]. Sự biểu hiện quá mức của gen GST, GsGST, từ đậu tương đại (*Glycine soja*) giúp tăng cường khả năng chịu hạn và mặn ở thuốc lá chuyển gen [41]. Sự biểu hiện quá mức của hạt đậu tương BiP (protein liên kết), một phân tử đi kèm, tương tự như *Glyma01g04750* trong QTL *qWDC1-1*, có thể tăng cường khả năng chịu hạn ở đậu tương [42].

Các sản phẩm của 4 gen — *Glyma07g10321*, *Glyma07g10340*, *Glyma07g10440* và *Glyma07g11470* — trong vùng QTL của nhiễm sắc thể số 7 có liên quan đến việc điều chỉnh sự căng thẳng khô hạn ở đậu tương và các cây khác. Ví dụ, yếu tố phiên mã gắn với calmodulin của cây *Arabidopsis*, CAMTA1 có liên quan đến phản ứng với khô hạn [43]. *GmMYB84*, một MYB mới đưa ra khả năng chịu hạn ở đậu tương [44]. Sự biểu hiện quá mức của gen tiếp nhận làm giàu leucine giống như kinase, *LRK2* làm tăng khả năng chịu hạn và số nhánh trên lúa [45]. Sự biểu hiện của một protein ERECTA bị cắt ngắn (một họ gen mã hóa tiếp nhận lặp lại giàu leucine giống như kinase) đã sửa đổi khả năng tăng trưởng và khả năng chống chịu căng thẳng phi sinh học ở đậu tương [46]. Hơn nữa, protein kinase được kích hoạt bằng mitogen điều chỉnh tích cực tình trạng căng thẳng do khô hạn ở cà chua [47].

Trong vùng QTL của nhiễm sắc thể số 19, bốn gen ứng cử viên đã được tìm thấy. *Glyma19g33750* có liên quan đến phản ứng căng thẳng với mặn và *Glyma19g34210* có liên quan đến yếu tố phiên mã sốc nhiệt. Hai gen khác — *Glyma19g33650* và *Glyma19g34550* — được liên kết tương ứng với glutathione peroxidase và Golgi SNARE liên quan đến Bet1. Các yếu tố phiên mã căng thẳng nhiệt đóng một vai trò quan trọng trong phản ứng của cây trồng đối với một số căng thẳng phi sinh học bằng cách điều chỉnh sự biểu hiện của các gen phản ứng với căng thẳng, chẳng hạn như protein sốc nhiệt [48]. Sự biểu hiện quá mức của gen glutathione peroxidase 5 (*RcGPX5*) làm tăng khả năng chịu hạn ở *Salvia miltiorrhiza* [49]. Hơn nữa, các hoạt động tìm ra loại phản ứng oxy, bao gồm cả glutathione peroxidase, tăng lên ở cây đậu

tương và có tương quan thuận với năng suất hạt khi bị khô hạn [50]. Tương tự, SNARE được phát hiện có vai trò trong khả năng chịu hạn của cây trồng [51].

Các QTL về chịu hạn, được xác định dựa trên 6 đặc điểm, được định vị hoặc định vị gần với các QTL đã được báo cáo trước đó và/hoặc các gen ứng viên tiềm năng liên quan đến điều kiện bất thuận và/hoặc các đặc điểm cần xem xét. Nó làm tăng độ tin cậy của QTL và kết quả có thể cung cấp tài liệu tham khảo có giá trị cho việc lựa chọn có sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử và lập bản đồ chi tiết hơn nữa của các gen về khả năng chịu hạn.

4. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

4.1. Vật liệu cây trồng và điều kiện trồng trọt

Một quần thể RIL được phát triển thông qua phương pháp một hạt (single seed descent – SSD) từ lai tạo giữa giống chịu hạn PI416937 và giống nhạy cảm Cheonsang đã được sử dụng để phân tích QTL về tính chịu hạn. Các cây bố mẹ và 140 RIL của F_{6:7}, F_{6:8} và F_{6:9} được trồng trong nhà nhựa tại Bộ phận Khoa học Cây trồng miền Nam, Daegu (35°54'24"N, 128°26'51"E) năm 2017 và Miryang (35°29'32"N, 128°44'35"E), Hàn Quốc vào năm 2018 và 2019. Nhà nhựa là một loại nhà che mưa phù hợp với điều kiện môi trường xung quanh. Cây đậu tương được trồng trong khay nhựa ươm cây con và sau đó những cây con đồng đều khỏe mạnh ở giai đoạn ba lá đầu tiên (V1) được cấy trong nhà nhựa. Ba đến năm cây của mỗi kiểu gen được cấy trong nhà nhựa với hàng cách hàng và cây cách cây 30cm trong mỗi lần lặp lại có kiểm soát và khô hạn. Tưới tiêu được áp dụng thông qua tưới nhỏ giọt và khô hạn đã được áp dụng từ giai đoạn V4 đến R4 bằng cách ngừng tưới trong giai đoạn này. Cây trong các ô đối chứng được tưới thường xuyên để tránh bị hạn.

4.2. Đo độ ẩm của đất

Độ ẩm đất của các ô đối chứng và ô bị hạn hán được đo bằng máy đo độ ẩm đất (TDR 300, Spectrum Technologies, Plainfield, IL, USA).

4.3. Đo đếm các đặc điểm và kiểu hình

Chiều cao cây, số đốt và cành trên thân chính, số quả và diện tích lá được đo ở giai đoạn R6, còn sinh khối (bao gồm cả hạt) được đo khi cây được thu hoạch ở giai đoạn R8. Các tính trạng được đo ở ba đến năm cây của mỗi lần lặp lại. Diện tích lá được đo bằng phần mềm Easy Leaf Area [52].

Mỗi giá trị hệ số hạn (DC) của sáu tính trạng được tính bằng tỷ lệ giữa các tính trạng có thể trong điều kiện hạn với điều kiện có kiểm soát theo phương trình dưới đây:

$$DC = \text{Trait}_{\text{Drought}} / \text{Trait}_{\text{Control}}$$

Hệ số hạn có trọng lượng (WDC) được tính toán như sau [29]. Đây là một trong những phương pháp đánh giá toàn diện khả năng chịu hạn của cây đậu tương được xác định từ tám đặc điểm nông học liên quan đến năng suất và các nghiên cứu nghiêm ngặt về các phương pháp đánh giá khác nhau bằng cách thiết lập mối tương quan tương đối với các tính trạng.

$$WDC = \sum_{i=1}^n [DC \times (|ri| \div \sum_{i=1}^n |ri|)]$$

trong đó DC là hệ số hạn trung bình của các tính trạng được xem xét, r là hệ số tương quan giữa DC trung bình của các tính trạng được xem xét và DC của các tính trạng riêng lẻ.

Các QTL về khả năng chịu hạn được phân tích bằng cách xem xét các giá trị WDC được tính toán từ sự kết hợp của hai tính trạng (sinh khối và diện tích lá), ba tính trạng (chiều cao cây, sinh khối và diện tích lá) và sáu tính trạng (chiều cao cây, số đốt, số cành, số quả, sinh khối và diện tích lá).

4.4. Chiết xuất DNA và định dạng kiểu gen

Bộ gen DNA được chiết xuất từ các lá tam thất non bằng bộ kit (Exgene™ Plant SV Miniprep Kit, GeneAll, Seoul, Korea) như được mô tả trong một báo cáo trước đây [53]. Bộ mẹ và RIL được định dạng kiểu gen bằng cách sử dụng mảng 180K Axiom® SoyaSNP [54].

4.5. Xây dựng Bản đồ liên kết và Phân tích QTL

Các marker đa hình giữa bố mẹ được tách ra khỏi 180K SNP và được kiểm tra sự dư thừa. Trong nghiên cứu di truyền, các marker thừa không thể tạo thêm thông tin vì chúng có sự phân ly giống hệt nhau trong quần thể di truyền và thể hiện sự phân nhóm tại một vị trí di truyền trong việc xây dựng bản đồ liên kết [55]. Do đó, các marker dư thừa đã được tách ra bằng cách sử dụng chức năng Bin trước khi xây dựng bản đồ liên kết bằng cách sử dụng chức năng Bản đồ trong IciMapping V4.1 [56]. Các thuật toán được thiết lập cho hàm Bin như sau: sai khác có ý nghĩa của $p < 0,001$ và dữ liệu bị khuyết với $>15\%$. Bản đồ liên kết được xây dựng bằng cách sử dụng bản đồ chức năng Kosambi theo hướng dẫn của nhà sản xuất với các thông số được điều chỉnh: phân nhóm theo ngưỡng chênh lệch (LOD) logarit 3.0, xếp thứ tự theo nnTwoOpt và gấp khúc bằng tổng các phân số tái tổ hợp liên kề. Các SNP với khoảng bản đồ cao và tần số tái tổ hợp được loại bỏ.

Các QTL được phân tích với bản đồ tổng hợp (CIM) bằng QTL Cartographer V2.5 (có tại <https://brewebportal.cos.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>, ngày 5 tháng 3 năm 2021) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với các thông số được điều chỉnh: Mô hình 6, hồi quy tiến và lùi, tốc độ di chuyển là 1,0cM và QTL giả định với kích thước cửa sổ là 10cM. Số lượng marker kiểm soát là 5, là một tham số mặc định. Ngưỡng LOD cho mỗi tính trạng được xác định bằng cách sử dụng 1.000 phép thử hoán vị ở $p < 0,05$. Sau khi hoàn thành phân tích, thông tin QTL được trích xuất bằng cách điều chỉnh khoảng hỗ trợ tối thiểu giữa QTL và 2-LOD là 10cM. Việc trình bày đồ họa của bản đồ liên kết với các QTL được thực hiện bằng cách sử dụng MapChart 2.32 [57].

Các QTL được đặt tên bằng cách kết hợp các chữ cái viết tắt q cho QTL và WDC cho hệ số hạn có trọng lượng, theo sau là tên của nhiễm sắc thể và QTL thứ n trên nhiễm sắc thể. Ví dụ: *qWDC1-2* biểu thị QTL thứ hai được xác định trên nhiễm sắc thể 1.

4.6. Dự đoán về gen ứng viên tiềm năng

Các gen ứng viên tiềm năng được tìm kiếm trong vùng 200kb của các QTL. Các gen, có liên quan trực tiếp đến phản ứng với căng thẳng khô hạn và/hoặc liên quan đến căng thẳng, được coi là gen ứng cử viên. Tên và chức năng của các gen ứng cử viên tiềm năng liên quan đến căng thẳng khô hạn nằm trong các QTL đã được tìm kiếm trong Soybase (www.soybase.org), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) và Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Phiên bản gen *Glyma1.1* được sử dụng để thu thập thông tin gen.

4.7. Phân tích dữ liệu

Phân tích phương sai (ANOVA) và tương quan của Pearson được tính toán bằng SAS 9.4 bằng cách sử dụng PROC GLM và PROC CORR tương ứng. Hệ số di truyền mở rộng (h^2) được xác định là tỷ lệ giữa phương sai kiểu gen (σ^2_G) và phương sai kiểu hình (σ^2_P) như đã mô tả trước đó [58]. Thành phần phương sai kiểu gen (σ^2_G) được ước tính là: $M_3 - M_2/rY$ trong đó M_3 là bình phương trung bình của kiểu gen, M_2 là bình phương trung bình của kiểu gen \times năm, r là số lần lặp lại và Y là số năm. Thành phần phương sai kiểu hình (σ^2_P) được ước tính bằng công thức $\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_{GY}/Y + \sigma^2_e/rY$ trong đó σ^2_{GY} và σ^2_e lần lượt là thành phần của kiểu gen \times năm và phương sai sai số. Thành phần của kiểu gen \times phương sai năm (σ^2_{GY}) được ước tính là: $M_2 - M_1/r$ trong đó M_1 là bình phương sai số trung bình (σ^2_e).

Xem thêm nguyên liệu bổ sung tại <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants10091816/s1>

Tài liệu tham khảo

1. Najafi, E.; Devineni, N.; Khanbilvardi, R.M.; Kogan, F. Understanding the Changes in Global Crop Yields through Changes in Climate and Technology. *Earths Future* **2018**, *6*, 410–427. [Google Scholar] [CrossRef]
2. Lesk, C.; Rowhani, P.; Ramankutty, N. Influence of Extreme Weather Disasters on Global Crop Production. *Nature* **2016**, *529*, 84–87. [Google Scholar] [CrossRef]
3. Wang, W.; Vinocur, B.; Altman, A. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance. *Planta* **2003**, *218*, 1–14. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
4. Reynolds, J.F.; Smith, D.M.S.; Lambin, E.F.; Turner, B.L.; Mortimore, M.; Batterbury, S.P.J.; Downing, T.E.; Dowlatabadi, H.; Fernandez, R.J.; Herrick, J.E.; et al. Global Desertification: Building a Science for Dryland Development. *Science* **2007**, *316*, 847–851. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
5. Cook, E.R.; Seager, R.; Cane, M.A.; Stahle, D.W. North American Drought: Reconstructions, Causes, and Consequences. *Earth-Sci. Rev.* **2007**, *81*, 93–134. [Google Scholar] [CrossRef]
6. Juenger, T.E. Natural Variation and Genetic Constraints on Drought Tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2013**, *16*, 274–281. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
7. Westgate, M.E.; Peterson, C.M. Flower and Pod Development in Water-Deficient Soybeans (*Glycine Max* L. Merr.). *J. Exp. Bot.* **1993**, *44*, 109–117. [Google Scholar] [CrossRef]
8. Wijewardana, C.; Reddy, K.R.; Alsajri, F.A.; Irby, J.T.; Krutz, J.; Golden, B. Quantifying Soil Moisture Deficit Effects on Soybean Yield and Yield Component Distribution Patterns. *Irrig. Sci.* **2018**, *36*, 241–255. [Google Scholar] [CrossRef]
9. Ohashi, Y.; Nakayama, N.; Saneoka, H.; Fujita, K. Effects of Drought Stress on Photosynthetic Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Stem Diameter of Soybean Plants. *Biol. Plant.* **2006**, *50*, 138–141. [Google Scholar] [CrossRef]
10. Tang, Y.; Sun, X.; Wen, T.; Liu, M.; Yang, M.; Chen, X. Implications of Terminal Oxidase Function in Regulation of Salicylic Acid on Soybean Seedling Photosynthetic Performance under Water Stress. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *112*, 19–28. [Google Scholar] [CrossRef]
11. Porcel, R.; Ruiz-Lozano, J.M. Arbuscular Mycorrhizal Influence on Leaf Water Potential, Solute Accumulation, and Oxidative Stress in Soybean Plants Subjected to Drought Stress. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 1743–1750. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
12. Du, Y.; Zhao, Q.; Chen, L.; Yao, X.; Zhang, W.; Zhang, B.; Xie, F. Effect of Drought Stress on Sugar Metabolism in Leaves and Roots of Soybean Seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *146*, 1–12. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
13. Desclaux, D.; Huynh, T.-T.; Roumet, P. Identification of Soybean Plant Characteristics That Indicate the Timing of Drought Stress. *Crop Sci.* **2000**, *40*, 716–722. [Google Scholar] [CrossRef]
14. Cui, Y.; Jiang, S.; Jin, J.; Ning, S.; Feng, P. Quantitative Assessment of Soybean Drought Loss Sensitivity at Different Growth Stages Based on S-Shaped Damage Curve. *Agric. Water Manag.* **2019**, *213*, 821–832. [Google Scholar] [CrossRef]
15. Yan, C.; Song, S.; Wang, W.; Wang, C.; Li, H.; Wang, F.; Li, S.; Sun, X. Screening Diverse Soybean Genotypes for Drought Tolerance by Membership Function Value Based on Multiple Traits and Drought-Tolerant Coefficient of Yield. *BMC Plant Biol.* **2020**, *20*, 321. [Google Scholar] [CrossRef]
16. Maazou, A.-R.S.; Tu, J.; Qiu, J.; Liu, Z. Breeding for Drought Tolerance in Maize (*Zea Mays* L.). *Am. J. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1858–1870. [Google Scholar] [CrossRef]

17. Du, W.; Wang, M.; Fu, S.; Yu, D. Mapping QTLs for Seed Yield and Drought Susceptibility Index in Soybean (*Glycine Max* L.) across Different Environments. *J. Genet. Genom.* **2009**, *36*, 721–731. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Du, W.; Yu, D.; Fu, S. Detection of Quantitative Trait Loci for Yield and Drought Tolerance Traits in Soybean Using a Recombinant Inbred Line Population. *J. Integr. Plant Biol.* **2009**, *51*, 868–878. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Abdel-Haleem, H.; Lee, G.-J.; Boerma, R.H. Identification of QTL for Increased Fibrous Roots in Soybean. *Theor. Appl. Genet.* **2011**, *122*, 935–946. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Mian, M.A.R.; Bailey, M.A.; Ashley, D.A.; Wells, R.; Carter, T.E.; Parrott, W.A.; Boerma, H.R. Molecular Markers Associated with Water Use Efficiency and Leaf Ash in Soybean. *Crop Sci.* **1996**, *36*, 1252–1257. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Mian, M.A.R.; Ashley, D.A.; Boerma, H.R. An Additional QTL for Water Use Efficiency in Soybean. *Crop Sci.* **1998**, *38*, 390–393. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Specht, J.E.; Chase, K.; Macrander, M.; Graef, G.L.; Chung, J.; Markwell, J.P.; Germann, M.; Orf, J.H.; Lark, K.G. Soybean Response to Water: A QTL Analysis of Drought Tolerance. *Crop Sci.* **2001**, *41*, 493–509. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Charlson, D.V.; Bhatnagar, S.; King, C.A.; Ray, J.D.; Sneller, C.H.; Carter, T.E.; Purcell, L.C. Polygenic Inheritance of Canopy Wilting in Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.]. *Theor. Appl. Genet.* **2009**, *119*, 587–594. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Ren, H.; Han, J.; Wang, X.; Zhang, B.; Yu, L.; Gao, H.; Hong, H.; Sun, R.; Tian, Y.; Qi, X.; et al. QTL Mapping of Drought Tolerance Traits in Soybean with SLAF Sequencing. *Crop J.* **2020**, *8*, 977–989. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Wang, W.; Zhou, B.; He, J.; Zhao, J.; Liu, C.; Chen, X.; Xing, G.; Chen, S.; Xing, H.; Gai, J. Comprehensive Identification of Drought Tolerance QTL-Allele and Candidate Gene Systems in Chinese Cultivated Soybean Population. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4830. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bhatramakki, D.; Dolan, M.; Hanafey, M.; Wineland, R.; Vaske, D.; Register, J.C., III; Tingey, S.V.; Rafalski, A. Insertion-Deletion Polymorphisms in 3' Regions of Maize Genes Occur Frequently and Can Be Used as Highly Informative Genetic Markers. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 539–547. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Jones, E.S.; Sullivan, H.; Bhatramakki, D.; Smith, J.S.C. A Comparison of Simple Sequence Repeat and Single Nucleotide Polymorphism Marker Technologies for the Genotypic Analysis of Maize (*Zea Mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* **2007**, *115*, 361–371. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Mammadov, J.; Aggarwal, R.; Buyyarapu, R.; Kumpatla, S. SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. *Int. J. Plant Genom.* **2012**, *2012*, 728398. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Qi, X.; Liu, Z.; Guan, R.; Wang, X.; Gou, Z.; Chang, R.; Qiu, L. Comparison of Evaluation Methods for Drought-Resistance at Soybean Adult Stage. *Acta Agron. Sin.* **2012**, *38*, 665–674. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Rahman, M.M.; Hossain, M.M. Plant Density Effects on Growth, Yield and Yield Components of Two Soybean Varieties under Equidistant Planting Arrangement. *Asian J. Plant Sci.* **2011**, *10*, 278–286. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Feng, Y.-Y.; He, J.; Turner, N.C.; Siddique, K.H.M.; Li, F.-M. Phosphorus Supply Increases Internode Length and Leaf Characteristics, and Increases Dry Matter Accumulation and Seed Yield in Soybean under Water Deficit. *Agronomy* **2021**, *11*, 930. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Rieseberg, L.H.; Archer, M.A.; Wayne, R.K. Transgressive Segregation, Adaptation and Speciation. *Heredity* **1999**, *83*, 363–372. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Xue, H.; Tian, X.; Zhang, K.; Li, W.; Qi, Z.; Fang, Y.; Li, X.; Wang, Y.; Song, J.; Li, W.-X.; et al. Mapping Developmental QTL for Plant Height in Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] Using a Four-Way Recombinant Inbred Line Population. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0224897. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dong, Q.; Zhang, K.; Sun, X.; Tian, X.; Qi, Z.; Fang, Y.; Li, X.; Wang, Y.; Song, J.; Wang, J.; et al. Mapping QTL Underlying Plant Height at Three Development Stages and Its Response to Density in Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.]. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2020**, *34*, 395–404. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. Liu, S.; Xue, H.; Zhang, K.; Wang, P.; Su, D.; Li, W.; Xu, S.; Zhang, J.; Qi, Z.; Fang, Y.; et al. Mapping QTL Affecting the Vertical Distribution and Seed Set of Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] Pods. *Crop J.* **2019**, *7*, 694–706. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Ning, H.; Yuan, J.; Dong, Q.; Li, W.; Xue, H.; Wang, Y.; Tian, Y.; Li, W.-X. Identification of QTLs Related to the Vertical Distribution and Seed-Set of Pod Number in Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.]. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195830. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
37. Deshmukh, R.; Sonah, H.; Patil, G.; Chen, W.; Prince, S.; Mutava, R.; Vuong, T.; Valliyodan, B.; Nguyen, H.T. Integrating Omic Approaches for Abiotic Stress Tolerance in Soybean. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 244. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

38. Xu, J.; Zheng, A.-Q.; Xing, X.-J.; Chen, L.; Fu, X.-Y.; Peng, R.-H.; Tian, Y.-S.; Yao, Q.-H. Transgenic *Arabidopsis* Plants Expressing Grape Glutathione S-Transferase Gene (*VvGSTF13*) Show Enhanced Tolerance to Abiotic Stress. *Biochemistry* **2018**, *83*, 755–765. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Kumar, S.; Asif, M.H.; Chakrabarty, D.; Tripathi, R.D.; Dubey, R.S.; Trivedi, P.K. Differential Expression of Rice Lambda Class GST Gene Family Members during Plant Growth, Development, and in Response to Stress Conditions. *Plant Mol. Biol. Report.* **2013**, *31*, 569–580. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Hasan, M.S.; Islam, S.; Hasan, M.N.; Sajib, S.D.; Ahmed, S.; Islam, T.; Ghosh, A. Genome-Wide Analysis and Transcript Profiling Identify Several Abiotic and Biotic Stress-Responsive Glutathione S-Transferase Genes in Soybean. *Plant Gene* **2020**, *23*, 100239. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Ji, W.; Zhu, Y.; Li, Y.; Yang, L.; Zhao, X.; Cai, H.; Bai, X. Over-Expression of a Glutathione S-Transferase Gene, GsGST, from Wild Soybean (*Glycine Soja*) Enhances Drought and Salt Tolerance in Transgenic Tobacco. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1173–1179. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Valente, M.A.S.; Faria, J.A.Q.A.; Soares-Ramos, J.R.L.; Reis, P.A.B.; Pinheiro, G.L.; Piovesan, N.D.; Morais, A.T.; Menezes, C.C.; Cano, M.A.O.; Fietto, L.G.; et al. The ER Luminal Binding Protein (BiP) Mediates an Increase in Drought Tolerance in Soybean and Delays Drought-Induced Leaf Senescence in Soybean and Tobacco. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 533–546. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pandey, N.; Ranjan, A.; Pant, P.; Tripathi, R.K.; Ateek, F.; Pandey, H.P.; Patre, U.V.; Sawant, S.V. CAMTA1 Regulates Drought Responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 216. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. Wang, N.; Zhang, W.; Qin, M.; Li, S.; Qiao, M.; Liu, Z.; Xiang, F. Drought Tolerance Conferred in Soybean (*Glycine Max. L.*) by GmMYB84, a Novel R2R3-MYB Transcription Factor. *Plant Cell Physiol.* **2017**, *58*, 1764–1776. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kang, J.; Li, J.; Gao, S.; Tian, C.; Zha, X. Overexpression of the Leucine-Rich Receptor-like Kinase Gene *LRK2* Increases Drought Tolerance and Tiller Number in Rice. *Plant Biotechnol. J.* **2017**, *15*, 1175–1185. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Shanmugam, S.; Zhao, S.; Nandy, S.; Srivastava, V.; Khodakovskaya, M. Modification of Soybean Growth and Abiotic Stress Tolerance by Expression of Truncated ERECTA Protein from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0233383. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Muhammad, T.; Zhang, J.; Ma, Y.; Li, Y.; Zhang, F.; Zhang, Y.; Liang, Y. Overexpression of a Mitogen-Activated Protein Kinase SIMAPK3 Positively Regulates Tomato Tolerance to Cadmium and Drought Stress. *Molecules* **2019**, *24*, 556. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Guo, M.; Liu, J.-H.; Ma, X.; Luo, D.-X.; Gong, Z.-H.; Lu, M.-H. The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 114. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Zhang, L.; Wu, M.; Teng, Y.; Jia, S.; Yu, D.; Wei, T.; Chen, C.; Song, W. Overexpression of the Glutathione Peroxidase 5 (*RcGPX5*) Gene from *Rhodiola Crenulata* Increases Drought Tolerance in *Salvia miltiorrhiza*. *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1950. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. Masoumi, H.; Masoumi, M.; Darvish, F.; Daneshian, J.; Nourmohammadi, G.; Habibi, D. Change in Several Antioxidant Enzymes Activity and Seed Yield by Water Deficit Stress in Soybean (*Glycine Max L.*) Cultivars. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2010**, *38*, 86–94. [[Google Scholar](#)]
51. Kwon, C.; Lee, J.-H.; Yun, H.S. SNAREs in Plant Biotic and Abiotic Stress Responses. *Mol. Cells* **2020**, *43*, 501–508. [[Google Scholar](#)]
52. Easlon, H.M.; Bloom, A.J. Easy Leaf Area: Automated Digital Image Analysis for Rapid and Accurate Measurement of Leaf Area. *Appl. Plant Sci.* **2014**, *2*, 1400033. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Dhungana, S.K.; Kim, H.-S.; Kang, B.-K.; Seo, J.-H.; Kim, H.-T.; Shin, S.-O.; Park, C.-H.; Kwak, D.-Y. Quantitative Trait Loci Mapping for Flooding Tolerance at an Early Growth Stage of Soybean Recombinant Inbred Line Population. *Plant Breed.* **2020**, *139*, 626–638. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
54. Lee, Y.-G.; Jeong, N.; Kim, J.H.; Lee, K.; Kim, K.H.; Pirani, A.; Ha, B.-K.; Kang, S.-T.; Park, B.-S.; Moon, J.-K.; et al. Development, Validation and Genetic Analysis of a Large Soybean SNP Genotyping Array. *Plant J.* **2015**, *81*, 625–636. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Meng, L.; Li, H.; Zhang, L.; Wang, J. QTL IciMapping: Integrated Software for Genetic Linkage Map Construction and Quantitative Trait Locus Mapping in Biparental Populations. *Crop J.* **2015**, *3*, 269–283. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
56. Wang, J.; Li, H.; Zhang, L.; Meng, L. *Users' Manual of QTL IciMapping*; The Quantitative Genetics Group, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS): Beijing, China; Genetic Resources Program, International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT): Mexico City, Mexico, 2016. [[Google Scholar](#)]
57. Voorrips, R.E. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *J. Hered.* **2002**, *93*, 77–78. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

58. Toker, C. Estimates of Broad-Sense Heritability for Seed Yield and Yield Criteria in Faba Bean (*Vicia Faba* L.). *Hereditas* **2004**, *140*, 222–225. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]