

LẬP BẢN ĐỒ QTL VÀ PHÂN TÍCH GEN ỨNG CỬ VIÊN CHO TÍNH CHỐNG CHỊU TÁCH QUẢ Ở ĐẬU TƯƠNG (GLYCINE MAX)

Jeong-Hyun Seo¹, Beom-Kyu Kang¹, Sanjeev K. Dhungana¹, Jae-Hyeon Oh², Man-Soo Choi¹, Ji-Hee Park¹, Sang-Ouk Shin¹, Hong-Sik Kim¹, In-Youl Baek¹, Jung-Sook Sung¹, Chan-Sik Jung¹, Ki-Seung Kim³ and Tae-Hwan Jun^{4,5,*}

1 Viện Khoa học Cây trồng Quốc gia, Cục Quản lý Phát triển Nông thôn, Jeonju 55365, Hàn Quốc

2 Viện Khoa học Nông nghiệp Quốc gia, Cục Quản lý Phát triển Nông thôn, Jeonju 55365, Hàn Quốc

3 Công ty TNHH FarmHannong, Daejeon 34115, Hàn Quốc

4 Khoa Khoa học Sinh học Thực vật, Đại học Quốc gia Pusan, Miryang 50463, Hàn Quốc

5 Viện Nghiên cứu Hội tụ Sự sống và Công nghiệp, Đại học Quốc gia Pusan, Miryang 50463, Hàn Quốc

TÓM TẮT

Tách quả là một quá trình sinh sản quan trọng ở nhiều loài hoang dã. Tuy nhiên, vỏ quả bị vỡ ở giai đoạn chín có thể làm giảm năng suất nghiêm trọng. Mục tiêu của nghiên cứu này là phát hiện ra các locus tính trạng số lượng (QTL) đối với hiện tượng tách quả bằng cách sử dụng hai quần thể dòng lai tái tổ hợp (RIL) có nguồn gốc từ một giống cây ưu tú có khả năng chịu tách quả, cụ thể là Daewonkong và đề dự đoán QTL/gen ứng cử viên mới liên quan trong vỏ quả bị vỡ dựa trên các mẫu alen của chúng. Chúng tôi đã tìm thấy một số QTL với hơn 10% phương sai kiểu hình được giải thích (PVE) trên bảy nhiễm sắc thể khác nhau và tìm thấy một ứng cử viên mới là QTL trên nhiễm sắc thể 16 (*qPS-DS16-1*) từ các mẫu alen trong vùng QTL. Trong số 41 gen được chú thích trong vùng QTL, sáu gen được tìm thấy có chứa SNP (nucleotide đơn đa hình)/các thay đổi indel trong trình tự mã hóa của bố mẹ so với bộ gen tham chiếu của đậu tương. Trong số sáu gen ứng cử viên tiềm năng, *Glyma.16g076600*, một trong những gen có chức năng đã biết, cho thấy mức độ biểu hiện rất khác biệt giữa các cặp bố mẹ chống chịu và nhạy cảm trong các giai đoạn sinh trưởng R3 đến R6. Hơn nữa, *Glyma.16g076600* là một chất tương đồng của AT4G19230 trong cây *Arabidopsis*, có chức năng liên quan đến dị hóa axit abscisic. Kết quả cung cấp thông tin hữu ích để hiểu cơ chế di truyền của hiện tượng tách quả và có thể được sử dụng để cải thiện hiệu quả của quá trình chọn lọc có marker hỗ trợ để phát triển các giống đậu tương chịu được sự tách quả.

Từ khóa: đậu tương; tách quả; QTL; gen ứng cử viên; axit abscisic

1. GIỚI THIỆU

Sự tách quả là một cơ chế cần thiết để sinh sản trong môi trường thích hợp ở nhiều loài hoang dã [1, 2, 3]. Một số thay đổi về hình thái và sinh lý đã được tìm thấy trong quá trình thuần hóa và đây được gọi là “hội chứng thuần hóa” [4, 5]. Trong số các hội chứng thuần hóa, tách quả là một trong những chiến lược quan trọng để tăng tỷ lệ sống sót của thực vật thông qua việc giảm cạnh tranh [4]. Các loại cây trồng bao gồm đậu tương (*Glycine max*) đã được phát triển để trở nên dễ chịu hơn với sự tách quả so với các loài sinh trưởng hoang dã của chúng thông qua quá trình chọn lọc tự nhiên từ các cây không bị tách quả [6].

Tách quả thường gặp ở các loài cây họ Đậu, họ Gramineae và họ Cải [2, 7]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu về hiện tượng tách quả đã được tiến hành trên các cây trồng đã được

thuần hóa, kết quả là đã xác định được nhiều gen ở lúa [8, 9], đậu tương [2, 10], đậu thông thường [11], Medicago [12] và đậu đũa [13, 14]. Ở đậu tương, vỏ bị vỡ ở giai đoạn chín có thể làm giảm năng suất nghiêm trọng, đặc biệt là trong điều kiện thời tiết khô hạn. Việc trồng các giống mẫn cảm với tách quả có thể dẫn đến thiệt hại về năng suất từ 50–100% [15]. Trong nhiều chương trình chọn giống, khả năng chống chịu với sự tách quả quả được coi là một đặc điểm cần thiết để giảm thiểu tổn thất năng suất trong điều kiện môi trường hiện tại, bao gồm cả sự nóng lên toàn cầu và điều kiện thời tiết khô hạn.

Sự tách quả ở đậu tương được coi là một tính trạng số lượng được kiểm soát bởi một số gen [16] và các nhà nghiên cứu đã báo cáo rằng tính trạng này được quy định bởi một locus tính trạng số lượng chính (QTL) và nhiều QTL phụ [17]. Ở đậu tương, một QTL chính liên quan đến sự tách quả lần đầu tiên được xác định trên nhiễm sắc thể 16 bằng cách sử dụng các marker đa hình giới hạn chiều dài các mảnh vỡ (RFLP) [18]. Funatsuki và cs [19] nhận thấy QTL này được khu vực hóa giữa các marker lặp lại trình tự đơn giản (SSR) Sat_093 và Sat_366 và đặt tên nó là *qPDH1* [20]. Một số nghiên cứu đã phát hiện locus *qPDH1* thông qua lập bản đồ liên kết sử dụng các quần thể có nguồn gốc di truyền khác nhau [16, 21, 22, 23, 24]. Lập bản đồ tốt [25, 26] dẫn đến việc nhân bản gen *Pdh1* (*Glyma.16g141400*), làm tăng độ xoắn của vỏ quả khô trong điều kiện độ ẩm thấp, và được phát hiện là có codon dừng sớm [2]. Cũng được xác định bằng cách sử dụng đậu tương hoang dã là gen NAC, được đặt tên là *SHAT1-5* (*Glyma.16g019400*), kích hoạt sinh tổng hợp thành thứ cấp và thúc đẩy sự dày lên của các tế bào nắp sợi [10]. Một số QTL thứ yếu cũng được phát hiện trên các nhiễm sắc thể số 2, 5, 10, 14 và 19 [16, 18]. Gần đây hơn, một số QTL mới đã được tìm thấy trên nhiễm sắc thể 1, 4, 6, 8, 9, 11, 17, 18 và 20 thông qua phân tích liên kết toàn bộ gen (GWAS) [27], trên nhiễm sắc thể 1, 5, 8, và 14 thông qua giải trình tự đoạn khuếch đại vị trí cụ thể (SLAF) [28] và trên nhiễm sắc thể 19 thông qua giải trình tự RNA [5]. Mặc dù giá trị cao của phương sai kiểu hình (PVE) được giải thích bởi QTL chính trên nhiễm sắc thể 16 (*qPDH1*), chiếm hơn 50% của toàn bộ phương sai kiểu hình [19,23], cơ chế của tính chịu tách quả hiện nay vẫn chưa hiểu đầy đủ. Do đó, thông tin bổ sung về QTL từ các nguồn gen đa dạng là cốt lõi để phát triển các giống đậu tương có tính chịu tách quả.

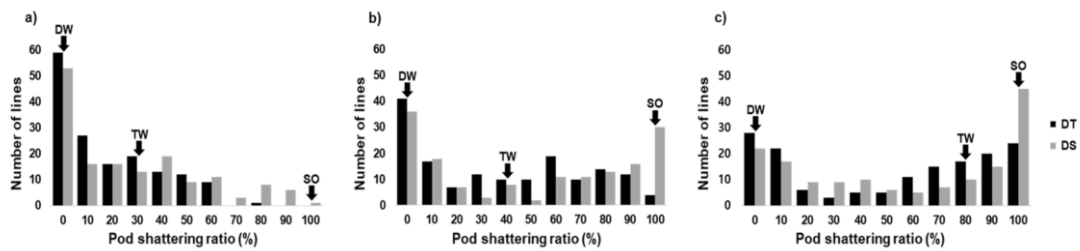
Daewonkong (DW) [29], được phát triển vào năm 1997, là một giống câ ưu tú với một số đặc điểm mong muốn, chẳng hạn như chống chịu cao với sự tách quả và chất lượng hạt để chế biến thực phẩm từ đậu tương, và chiếm hơn 80% tổng diện tích trồng đậu tương ở Hàn Quốc [30]. Mặc dù nó là một nguồn gen quan trọng cho tính chịu tách quả ở Hàn Quốc, thông tin di truyền về tính chịu tách quả của DW chưa được báo cáo trước đây. Trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi [30], chúng tôi đã khảo sát tính chịu tách quả bằng cách sử dụng hai quần thể dòng lai tái tổ hợp (RIL) có nguồn gốc từ DW và nhận thấy rằng các dòng có tính chống chịu và mẫn cảm với tách quả là khác biệt đáng kể. Từ kết quả, chúng tôi dự đoán rằng một QTL chính sẽ được tách biệt trong quần thể.

Mục tiêu của nghiên cứu này là (1) xây dựng bản đồ liên kết mật độ cao và khám phá các QTL cho sự tách quả bằng cách sử dụng hai quần thể RIL có nguồn gốc từ DW và (2) để dự đoán QTL/các gen ứng cử viên mới dựa trên các mẫu alen thu được trong quần thể. Để đạt được những mục tiêu này, chúng tôi đã đánh giá tỷ lệ tách quả trong quần thể RIL trong ba năm và định kiểu gen của quần thể bằng cách sử dụng mảng SNP 180 K.

2. KẾT QUẢ

2.1. Sự thay đổi trong tỷ lệ tách quả

Để đánh giá tính chịu tách quả của các quần thể được lập bản đồ, chúng tôi đã thực hiện thử nghiệm sấy khô trong tủ sấy đối với đậu tương được trồng trong khoảng thời gian ba năm (2016 đến 2018) và tính toán tỷ lệ tách quả sau khi sấy khô quả chín trong 24, 48 và 72 giờ [30]. Trong ba năm thử nghiệm, DW đã cho thấy khả năng chống chịu cao đối với tách quả mà không có quả bị tách trong ba thử nghiệm sấy khô trong lò. Mặt khác, tất cả các quả của Saeolkong (SO) đều bị vỡ vụn sau 24 giờ trong thử nghiệm sấy khô trong tủ sấy. Tawonkong (TW) cho thấy khả năng chống chịu trung bình lên đến 24 giờ với tỷ lệ tách quả 25%. Tuy nhiên, có đến 80% quả bị vỡ sau 72 giờ của thử nghiệm sấy khô (Bảng 1 và Hình 1).



Hình 1. Sự phân bố của hiện tượng tách quả trong hai quần thể (RIL) sau khi sấy khô quả; (a) trong 24 giờ, (b) trong 48 giờ, (c) trong 72 giờ (DW; Daewonkong, TW; Tawonkong, SO; Saeolkong) (Seo và cs, 2019).

Bảng 1. Tỷ lệ tách quả trung bình của bố mẹ và các dòng lai tái tổ hợp (RIL) trong hai quần thể được lập bản đồ trong ba năm.

Drying Time (Hour)	Year	Pod Shattering Ratio \pm SE (%) [†]					Broad-Sense Heritability	
		Parents			RILs		DT	DS
		DW	TW	SO	DT	DS		
24	2016	0	25	100	12.1 \pm 24.6	24.4 \pm 33.5		
	2017	0	0	100	9.9 \pm 34.8	23.3 \pm 33.8		
	2018	0	50	100	27.8 \pm 40.4	32.5 \pm 32.0		
	average	0	25	100	16.6 \pm 19.0c [‡]	26.7 \pm 26.2c	0.38	0.62
48	2016	0	35	100	27.8 \pm 34.7	47.7 \pm 42.9		
	2017	0	20	100	38.4 \pm 39.6	48.0 \pm 46.1		
	2018	0	50	100	44.8 \pm 36.4	50.5 \pm 38.6		
	average	0	35	100	37.0 \pm 31.9b	48.7 \pm 39.1b	0.78	0.84
72	2016	0	80	100	43.6 \pm 40.3	54.7 \pm 43.6		
	2017	0	100	100	53.5 \pm 43.2	51.1 \pm 46.8		
	2018	0	60	100	52.0 \pm 37.7	60.1 \pm 37.3		
	average	0	80	100	49.7 \pm 37.4a	55.3 \pm 39.0a	0.88	0.82

[†] Tỷ lệ tách quả trung bình tại các thời điểm làm khô khác nhau trong ba năm thí nghiệm (DW; Daewonkong, TW; Tawonkong, SO; Saeolkong, DT: RIL có nguồn gốc từ sự lai tạo giữa Daewonkong và Tawonkong, DS: RIL bắt nguồn từ sự lai tạo giữa Daewonkong và Saeolkong.

[‡] Các chữ cái khác nhau có nghĩa là trung bình của chúng khác nhau đáng kể trong trắc nghiệm đa biến của Duncan ($p < 0,05$).

Trong quần thể DT, lần lượt là 16,6%, 37,0% và 49,7% quả bị vỡ sau 24, 48 và 72 giờ, cho thấy xu hướng nhiều quả bị vỡ hơn khi kéo dài thời gian sấy. Một xu hướng tương tự cũng được tìm thấy trong quần thể DS với tỷ lệ tách quả lần lượt là 26,7%, 48,7% và 55,3% sau 24, 48 và 72 giờ (Bảng 1). H^2 trong quần thể DT dao động từ 0,38 đến 0,88 và

trong quần thể DS, từ 0,62 đến 0,84 (Bảng 1). Sự phân bố của sự tách quả trong các quần thể được lập bản đồ là tương tự nhau (Hình 1).

2.2. Xây dựng bản đồ liên kết

Trong số 169.028 marker SNP có kiểu gen và chất lượng cao, 24.407 marker (DW và TW) và 21.462 marker (DW và SO) được tìm thấy là đa hình giữa các dòng cùng bố mẹ. Sau khi xóa các marker thừa có giá trị bị thiếu >5% và biến dạng phân tích $p < 0,05$, tổng số 2.321 và 1.739 SNP đã được chọn và sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết tương ứng cho các quần thể DT và DS. SNP được phân bố trên tất cả 20 nhiễm sắc thể với khoảng cách trung bình 1,1 và 1,8cM giữa các SNP liền kề trong quần thể DT và DS (Bảng bổ sung S1 và S2).

2.3. Phân tích QTL

Qua nhiều năm thử nghiệm, một QTL chính đã được phát hiện trên nhiễm sắc thể 16 ở cả hai quần thể có tỷ lệ chênh lệch logarit cao (LOD) (lên đến 67,1 ở DT và 60,0 ở DS) và giá trị PVE (lên đến 82,8% ở DT và 80,1% ở DS). QTL chính được xác định trong nghiên cứu này được ký hiệu là *qPS-DT16-2* và bao gồm quỹ tích *qPDH1* (Bảng 2 và Bảng 3). Tương tự, *qPS-DT16-1* và *qPS-DS16-3* cũng được phát hiện trong quỹ tích *qPDH1*. Các QTL này được phát hiện ổn định riêng lẻ và trong nhiều năm. Điểm LOD cho các QTL của quần thể DT dao động 13,4–67,1 với PVE là 26,1–82,8% và của quần thể DS dao động lần lượt là 14,6–60,0 và 36,0–80,1% (Bảng 2 và Bảng 3). Cụ thể, *qPS-DT16-2* cho thấy giá trị LOD và PVE cao nhất trong năm 2017 trong 72 giờ sấy. Vùng QTL được xác định chứa năm gen ứng cử viên nằm trong locus *qPDH1* đã được báo cáo trước đây [21, 23, 26].

Bảng 2. QTL liên quan đáng kể với tính chống chịu tách quả trong quần thể RIL có nguồn gốc từ Daewonkong và Tawonkong.

Name of QTL	Chr. (LG) ¹	Year	Drying Time (Hour)	Position (cM)	Physical Interval ² (bp)	LOD ³	PVE ⁴ (%)	Add ⁵	No. Candidate Genes	References
<i>qPS-DT02</i>	2 (D1b)	2017	24	122	7,211,739–8,082,789	6.0	1.9	-5.9	87	Kang et al. 2009
<i>qPS-DT06</i>	6 (C2)	2016	48	103	5,498,397–6,170,213	3.6	6.1	-9.0	82	Novel
<i>qPS-DT11</i>	11 (B1)	2017	48	92	26,717,840–30,547,921	17.4	13.3	-20.0	189	Novel
<i>qPS-DT13</i>	13 (F)	2017	24	108	35,019,516–35,459,889	4.3	1.3	-5.0	54	Novel
<i>qPS-DT14</i>	14 (B2)	2017	24	11	48,063,838–48,101,634	33.4	16.4	-17.8	2	Novel
<i>qPS-DT16-1</i>	16 (J)	2017	24	63	29,532,807–29,809,243	7.4	2.3	-6.7	21	<i>qPDH1</i> (nearby)
		2018	72		29,532,807–29,809,243	31.0	67.8	-32.0		
<i>qPS-DT16-2</i>	16 (J)	2016	48	64	29,913,393–29,972,096	13.4	26.1	-19.0	5	<i>qPDH1</i> (Funatsuki et al. 2008)
		2016	72		29,913,393–29,972,096	23.9	48.0	-29.2		
		2017	48		29,913,393–29,972,096	30.1	29.6	-30.3		
		2017	72		29,913,393–29,972,096	67.1	82.8	-42.0		
		Combined ⁶	24		29,913,393–29,972,096	13.4	33.1	-11.2		
		Combined	48		29,913,393–29,972,096	35.7	60.8	-25.9		
	Combined	72		29,913,393–29,972,096	55.4	78.7	-34.6			
<i>qPS-DT20</i>	20	Combined	48	93	2,151,689–2,392,383	3.7	3.7	-6.3	17	Novel

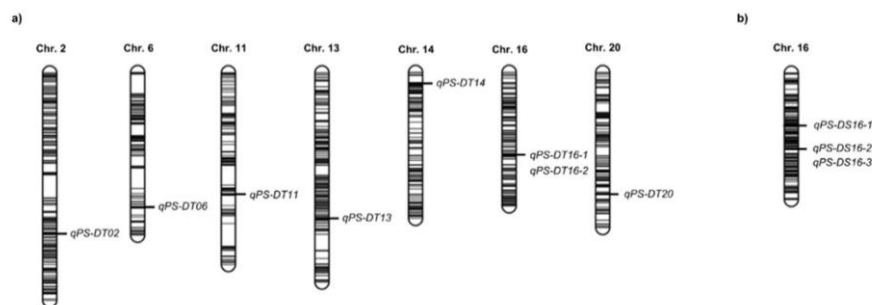
¹ Nhiễm sắc thể (Nhóm liên kết). ² Dựa trên vị trí vật lý của Williams82 phiên bản 2.1 (www.soybase.org). ³ Lôgarit của chênh lệch. ⁴ Phương sai kiểu hình giải thích bằng QTL. ⁵ Hiệu ứng phụ; giá trị âm cho biết rằng Daewonkong đã góp phần vào tính trạng. ⁶ Giá trị trung bình của 3 năm 2016, 2017 và 2018.

Bảng 3. QTL có liên quan đáng kể với tính chống chịu tách quả trong quần thể RIL có nguồn gốc từ Daewonkong và Saeolkong.

Name of QTL	Chr. (LG) ¹	Year	Drying Time (Hour)	Position (cM)	Physical Interval ² (bp)	LOD ³	PVE ⁴ (%)	Add ⁵	No. Candidate Genes	References
<i>qPS-DS16-1</i>	16 (J)	Combined ⁶	24	61	7,325,202–7,760,393	5.4	11.2	-7.1	41	Novel
<i>qPS-DS16-2</i>	16 (J)	2016	48	45	29,857,920–30,146,414	19.5	44.8	-28.7	20	<i>qPDH1</i> (Funatsuki et al. 2008)
		2016	72		29,857,920–30,146,414	18.0	42.4	-28.3		
		2017	24		29,857,920–30,146,414	14.6	36.0	-20.2		
		2017	48		29,857,920–30,146,414	56.0	61.2	-40.9		
		2017	72		29,857,920–30,146,414	60.0	63.0	-41.9		
		Combined	24		29,857,920–30,146,414	19.2	48.7	-14.8		
		Combined	48		29,857,920–30,146,414	40.9	70.3	-26.8		
<i>qPS-DS16-3</i>	16 (J)	2018	24	43	30,144,267–30,580,464	15.2	56.8	-24.4	25	<i>qPDH1</i> (nearby)
		2018	48		30,144,267–30,580,464	31.8	80.1	-37.0		
		2018	72		30,144,267–30,580,464	27.2	76.4	-34.3		

¹ Nhiễm sắc thể (Nhóm liên kết). ² Dựa trên vị trí vật lý của Williams82 phiên bản 2.1 (www.soybase.org). ³ Lôgarit của chênh lệch. ⁴ Phương sai kiểu hình giải thích bằng QTL. ⁵ Hiệu ứng phụ; giá trị âm cho biết rằng Daewonkong đã góp phần vào tính trạng. ⁶ Giá trị trung bình của 3 năm 2016, 2017 và 2018.

Một số QTL đặc trưng cho quần thể đối với hiện tượng tách quả cũng được phát hiện trên nhiễm sắc thể 2, 6, 11, 13, 14 và 20 trong quần thể DT và trên nhiễm sắc thể 16 trong quần thể DS (Hình 2). Có thể, do tác động lớn của QTL chính, các QTL này cho thấy giá trị LOD (3,6 đến 33,4) và PVE (1,3 đến 16,4%) tương đối thấp hơn so với các giá trị của QTL chính. *qPS-DT13* cho thấy giá trị PVE thấp nhất và *qPS-DT14* cho thấy giá trị PVE cao nhất. Trong số các QTL này, *qPS-DT11*, *qPS-DT14* và *qPS-DS16-1* cũng là các QTL có triển vọng với giá trị PVE tương đối cao (> 10%). Tất cả các QTL đều cho thấy tác dụng phụ âm (Bảng 2 và Bảng 3).

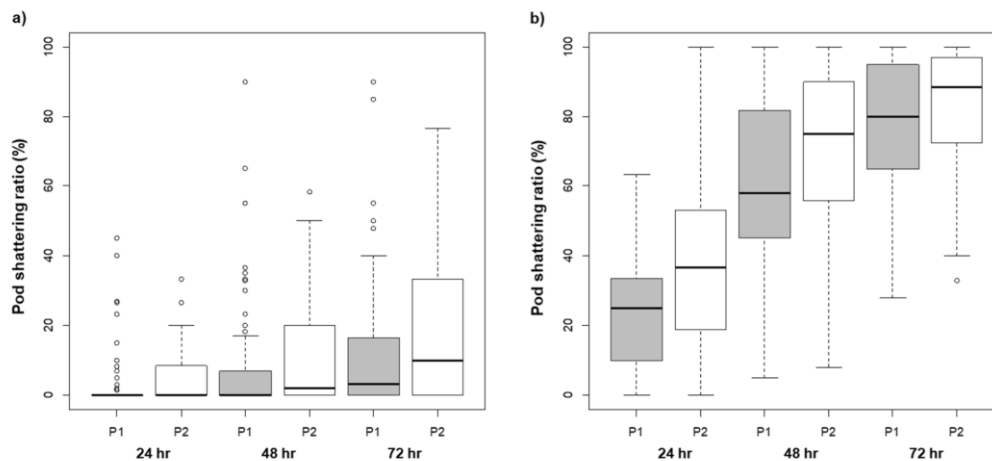


Hình 2. Các QTL liên quan đến chống chịu tách quả; (a) quần thể có nguồn gốc từ Daewonkong và Tawonkong, (b) quần thể có nguồn gốc từ Daewonkong và Saeolkong. Các thanh bên trong mỗi nhiễm sắc thể đại diện cho vị trí của các marker được sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết.

2.4. Sự biến đổi kiểu hình theo các kiểu alen

Sự kết hợp của RIL với alen P1 (DW) trong *qPS-DS16-2* (locus QTL chính) và *qPS-DS16-1* đồng thời cho thấy khả năng chống tách quả tốt hơn với tỷ lệ tách quả 2,5% so với sự kết hợp với alen P2 (SO) (6,2%, $p < 0,05$) tại 24 giờ sấy. Mặc dù có alen P2 (SO) trong *qPS-DS16-2*, các RIL có alen P1 (DW) trong *qPS-DS16-1* có khả năng chống chịu tốt hơn so với các RIL có alen P2 (SO) ở tất cả các giai đoạn sấy khô (Bảng 4). Cũng có sự khác biệt về tỷ lệ tách quả theo các kiểu hình alen trong vùng *qPS-DS16-1*; Các RIL trong đó alen P1 (DW) theo sau vùng *qPS-DS16-1* cho thấy mức độ chống chịu với sự

tách quả cao hơn so với khi alen P2 (SO) theo sau (Hình 3). Tuy nhiên, *qPS-DT11* và *qPS-DT14* cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về khả năng chịu tách quả bất kể alen P1 (DW) hoặc P2 (TW) trong vùng QTL chính (*qPS-DT16-2*) (Bảng 4). Xem xét tất cả các mẫu alen của QTL, vùng *qPS-DS16-1* đóng một vai trò quan trọng trong khả năng chống tách quả của quần thể RIL. Do đó, chúng tôi suy ra sự tồn tại của một gen ứng cử viên cho khả năng chịu tách quả trong vùng *qPS-DS16-1*.



Hình 3. Sự thay đổi tỷ lệ tách quả quả sau 24, 48 và 72 giờ sấy theo các kiểu alen trong locus *qPS-DS16-2* và *qPS-DS16-1* (locus QTL chính). ‘P1’ chỉ ra rằng các mẫu alen giống như Daewonkong (DW) và P2 chỉ ra rằng các mẫu alen giống như Saeolkong (SO); (a) theo sau alen P1 trong *qPS-DS16-2*, (b) theo sau alen P2 trong *qPS-DS16-2*.

Bảng 4. Sự khác biệt giữa dữ liệu kiểu hình theo các mẫu alen trong các QTL đã chọn.

Genotype ¹		<i>qPS-DS16-1</i>			<i>qPS-DT11</i>			<i>qPS-DT14</i>		
Major	Minor	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
P1	P1	2.5	6.5	10.9	2.6	6.5	10.7	3.5	8.1	12.7
	P2	6.2	12.5	18.6	4.3	10.7	15.6	3.8	9.0	13.6
t-value ²		-1.68 *	-1.50 ns	-1.61 ns	-1.15 ns	-1.45 ns	-1.44 ns	-0.15 ns	-0.29 ns	-0.24 ns
P2	P1	24.3	60.5	76.1	37.2	70.3	82.8	32.0	65.6	81.7
	P2	37.6	69.9	83.5	31.9	65.9	80.8	36.8	69.8	81.6
t-value		-3.81 **	-2.07 *	-2.00 *	1.43 ns	1.12 ns	0.73 ns	-1.32 ns	-1.09 ns	0.04 ns

¹ P1 chỉ ra rằng các mẫu alen giống như *Tawonkong* và P2 chỉ ra rằng các mẫu alen giống như *Saeolkong*. ² * và ** biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các kiểu hình bằng trắc nghiệm t-test của Student (tương ứng $p < 0,05$ và $p < 0,01$), ns biểu thị không có sự khác biệt đáng kể.

2.5. Xác định các gen ứng viên trong và gần QTL

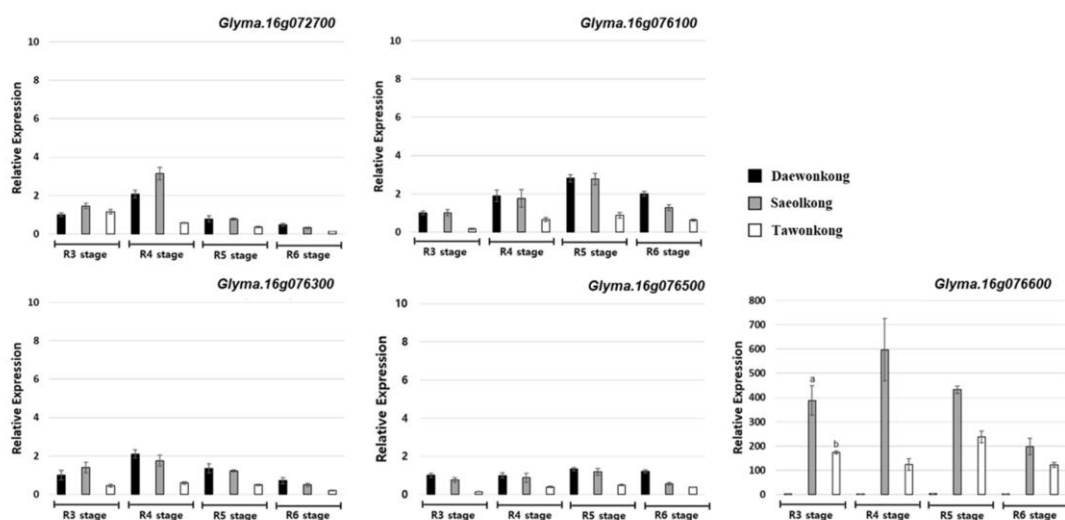
Trong nghiên cứu này, một số QTL đã được phát hiện trên nhiễm sắc thể 16. Trong và gần các vùng QTL, có năm gen ứng cử viên trong QTL chính (*qPS-DT16-2*) cho thấy giá trị cao nhất của PVE và 41 gen ứng cử viên trong QTL triển vọng (*qPS-DS16-1*) (Bảng 2 và Bảng 3). Trong số các gen nằm trong vùng QTL triển vọng, sáu gen có SNP hoặc chèn/xóa có thể gây ra các thay đổi chuỗi axit amin: *Glyma.16g072700*, *Glyma.16g073700*, *Glyma.16g076100*, *Glyma.16g076300*, *Glyma.16g076500* và *Glyma.16g076600* (Bảng 5).

Bảng 5. Thông tin SNP/Indel của các gen ứng viên được tìm thấy trong QTL *qPS-DS16-1*.

Gene Name	Position (bp)	Reference (Williams82)	DW	TW	SO	AA Change	Description
<i>Glyma.16g072700</i>	7,335,363	-	-	12 bp deletion	12 bp deletion	Deletion	Myb-like DNA-binding domain, DNA binding
<i>Glyma.16g073700</i>	7,446,096	A	A	T	T	Tyr/Asn	Unknown
<i>Glyma.16g076100</i>	7,665,996	C	T	C	C	Glu/Lys	Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity
<i>Glyma.16g076300</i>	7,725,602	A	C	A	A	Met/Leu	GMC oxidoreductase
<i>Glyma.16g076500</i>	7,760,100	T	C	T	T	Leu/Ser	Adaptin N terminal region
	7,760,393	A	C	A	A	Ile/Leu	
<i>Glyma.16g076600</i>	7,775,892	C	T	C	C	Glu/Lys	Cytochrome P450,
	7,775,945	T	A	T	T	Lys/Met	(+)-abscisic acid 8'-hydroxylase activity
	7,775,948	A	G	A	A	Ile/Thr	
	7,775,970	-	18 bp insertion	-	-	Insertion	
	7,776,045	C	T	C	C	Met/Ile	
	7,777,575	-	3 bp deletion	-	-	Asn/-	

DW: Daewonkong, TW: Tawonkong, SO: Saeolkong, AA: amino acid.

Ngoại trừ *Glyma.16g073700* (chức năng không xác định), sự biểu hiện của năm gen khác (Bảng bổ sung S3) được phân tích bằng qPCR trong các quả được thu hoạch từ giai đoạn phát triển R3 (quả đầu) đến R6 (hạt đầy đủ) [31, 32]. Trong số năm gen này, *Glyma.16g076600* cho thấy mức độ biểu hiện khác nhau đáng kể giữa bố mẹ chống chịu (DW) và bố mẹ mẫn cảm (TW và SO) (Hình 4). Có sáu hình trong *Glyma.16g076600*, bao gồm bốn SNP biến thể missense (là một phần trong sợi RNA thông tin có chứa codon bị thay đổi do đột biến để nó mã hóa cho một axit amin khác) và hai phần chèn/xóa. Đặc biệt, đoạn chèn 18bp ở vị trí 7.775.970 là đột biến dừng dẫn đến codon kết thúc sớm ở cuối trình tự trong exon 7.



Hình 4. Mức độ biểu hiện của năm gen ứng cử viên trong quả được thu hoạch ở các giai đoạn sinh trưởng từ R3 đến R6. Các chữ cái giống nhau biểu thị không có sự khác biệt đáng kể ở mức 0,05 của DMRT.

3. THẢO LUẬN

Tách quả ở giai đoạn trưởng thành (R8, trưởng thành hoàn toàn) là một chiến lược cần thiết để sinh sản ở các loài hoang dã, bao gồm cả ở *Glycine soja*. Tuy nhiên, nó có thể gây mất năng suất nghiêm trọng đối với các loài cây trồng được canh tác và là một trong những yếu tố hạn chế chính đối với việc thu hoạch bằng máy móc. Do đó, việc phát triển các giống chống chịu tách quả là một trong những mục tiêu cơ bản của nhiều chương trình chọn giống cây trồng. Tại Hàn Quốc, DW là giống đậu tương được trồng rộng rãi nhất nhờ tính chống chịu tách quả quả cao. Do đó, DW có thể là một nguồn gen có giá trị

để phát triển các giống chống chịu tách quả. Trong nghiên cứu này, DW cho thấy khả năng chống chịu cao đối với tách quả trong thử nghiệm sấy khô trong tủ sấy, không có quả bị vỡ cho đến khi sấy 72 giờ (Hình bổ sung S1), trong khi đối với cặp bố mẹ mẫn cảm, TW và SO, nhiều quả đã bị vỡ sau khi 24 giờ sấy (Bảng 1 và Hình 1).

Ở đậu tương, hiện tượng tách quả được coi là tính trạng số lượng có hệ số di truyền cao được kiểm soát bởi một gen chính và một số gen phụ [17]. Kể từ khi xác định được QTL chính đầu tiên trên nhiễm sắc thể 16 [18], hai gen trên nhiễm sắc thể 16 đã được đặc trưng, được đặt tên là *pdh1* (*Glyma.16g141400*) từ đậu tương trồng và SHAT1-5 (*Glyma.16g019400*) từ đậu tương hoang dại [2, 10]. Ở đậu tương trồng, *pdh1* là một gen chính đối với tính chịu tách quả và được chú thích là một protein trong bộ gen tham chiếu đậu tương (Wm82.a1.v2). Gần đây, dựa trên mô hình gen Wm82.a2.v1 đã được thay đổi, gen *pdh1* được xác định là *Glyma.16g141400* (chưa rõ chức năng). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khai thác sự khác biệt về kiểu hình giữa các cặp bố mẹ để xác định thành công QTL chính trên nhiễm sắc thể 16 nằm trong hoặc gần locus *qPDH1* trong cả hai quần thể (*qPS-DT16-1*, *qPS-DT16-2*, *qPS-DS16-2* và *qPS-DS16-3*) (Bảng 2 và Bảng 3). Tuy nhiên, vùng QTL bao gồm SHAT1-5, đã được xác định trong các nghiên cứu trước đây, không được phát hiện trong nghiên cứu hiện tại. Trong số các QTL chính, *qPS-DT16-2* trong quần thể DT cho thấy giá trị LOD và PVE cao nhất trong nghiên cứu này. Vùng QTL thể hiện giá trị PVE cao hơn (82,8%) và được lập bản đồ ở một khoảng hẹp hơn (59kb) so với các nghiên cứu trước đó và vùng này được phát hiện chỉ có năm gen ứng cử viên (Bảng 2 và Bảng 3). Các giá trị âm của hiệu ứng cộng cho thấy rằng sự biến đổi kiểu hình được giải thích bởi QTL là kết quả của DW bố mẹ chống chịu tách quả.

Gần đây hơn, một số gen ứng cử viên mới đã được xác định trên nhiễm sắc thể 9 (*Glyma.09g06290*) bằng cách sử dụng bản đồ liên kết toàn bộ gen [27], nhiễm sắc thể 1 (*Glyma.01g045800* và *Glyma.01g046000*), nhiễm sắc thể 5 (*Glyma.05g005600*, *Glyma.05g225900* và *Glyma.05g227400*), và nhiễm sắc thể 8 (*Glyma.08g271900* và *Glyma.08g274500*) bằng giải trình tự đoạn khuếch đại locus cụ thể [28], và nhiễm sắc thể 19 (*Glyma.19g231900*) bằng giải trình tự RNA [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tìm thấy một số QTL cho thấy giá trị PVE tương đối thấp trên nhiễm sắc thể 2, 6, 11, 13, 14, 16 và 20 (Hình 2). Trong số này, chỉ có *qPS-DT02* trên nhiễm sắc thể 2 được lập bản đồ tới một vùng được báo cáo trước đây, trong một nghiên cứu của Kang và cs (2009), trong khi những QTL khác được lập bản đồ đến các vị trí vật lý khác nhau trên cùng một nhiễm sắc thể [16, 27, 28] (Bảng 2 và Bảng 3). Có tổng cộng 472 gen ứng cử viên trong các QTL mới dựa trên vị trí vật lý của Williams82 (Wm82.a2.v1). Những gen đó có liên quan đến nhiều quá trình trao đổi chất và sinh học ở thực vật và góp phần vào quá trình sinh tổng hợp hoặc dị hóa một số hormone thực vật như auxin, axit gibberellic, và axit abscisic (ABA) (Bảng bổ sung S4).

Trong số các QTL được phát hiện, loại trừ locus *qPDH1*, chúng tôi chỉ chọn các QTL có triển vọng để tìm kiếm thêm các gen ứng viên có giá trị PVE >10% trên các nhiễm sắc thể 11, 14 và 16. Kết quả về kiểu alen của các QTL này cho thấy các mẫu alen trong vùng *qPS-DS16-1* có thể dẫn đến sự khác biệt đáng kể về tính chịu tách quả giữa các kiểu gen. Tổng cộng có 41 gen ứng viên được chú thích trong hoặc gần vùng *qPS-DS16-1* (72–78Mbp, dựa trên vị trí vật lý của bộ gen tham chiếu Wm82.a2.v1) (Bảng 3). Trong số 41 gen, có 6 gen có các thay đổi SNP/indel trong trình tự mã hóa của bố và mẹ. *Glyma.16g076600*, một trong sáu gen, cho thấy mức độ biểu hiện rất khác biệt giữa bố và mẹ trong các giai đoạn tăng trưởng R3 đến R6 (Hình 4). Gen này được biểu hiện nhiều ở

bố mẹ mẫn cảm (SO), một trong những cha mẹ của quần thể RIL mà QTL *qPS-DS16-1* được phát hiện. Mặt khác, có rất ít sự biểu hiện của gen này ở bố mẹ chống chịu (DW) và biểu hiện trung bình ở TW, cho thấy vai trò của *Glyma.16g076600* trong sự tách quả.

Glyma.16g076600 là một gen tương đồng của *AT4G19230* ở cây *Arabidopsis*, là một thành viên của họ gen *CYP707A* mã hóa một protein liên quan đến dị hóa ABA [33]. ABA là một loại hormone phản ứng với các áp lực từ môi trường và điều chỉnh lượng nước tiêu thụ ở thực vật. Trong điều kiện khô hạn, mức ABA nội sinh trong thực vật tăng lên, và enzyme *CYP707A* kiểm soát mức ABA nội sinh; sự biểu hiện quá mức của *CYP707A* dẫn đến giảm nồng độ ABA [34,35]. Sự điều hòa ABA gây ra sự biểu hiện của nhiều gen đóng vai trò quan trọng trong việc thích nghi với các căng thẳng phi sinh học và giảm sự tách quả [36].

Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện rõ rệt của *Glyma.16g076600* ở TW và SO có thể là một chỉ thị về mức độ sản xuất ABA trong quả có thể gây tách quả. Vai trò của các kích thích tố, bao gồm ABA, đã được báo cáo là điều chỉnh quá trình khử màu silique ở *Arabidopsis* và *Brassica* [36]. Do đó, có thể giả định rằng *Glyma.16g076600* điều chỉnh sự biểu hiện ABA trong quả và sự biểu hiện cao có thể liên quan đến tính mẫn cảm với tách quả. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu sâu hơn để xác nhận mối quan hệ giữa sự tách quả và mức ABA trong quả cũng như các bộ phận khác trong đậu tương.

4. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

4.1. Nguyên liệu thực vật

Hai quần thể RIL có nguồn gốc từ lai tạo giữa một giống chống chịu tách quả là Daewonkong (DW) làm mẹ và hai giống mẫn cảm với tách quả là Tawonkong (TW) [37] và Saeolkong (SO) [38], làm bố. Daewonkong, được phát triển vào năm 1997, là giống đậu tương phổ biến nhất ở Hàn Quốc do khả năng chống chịu tách quả rất tốt. Các quần thể RIL được phát triển thông qua phương pháp duy trì một hạt (SSD) từ thế hệ F2 đến thế hệ F_{5:6}, F_{6:7} và F_{7:8} trong mỗi năm thí nghiệm (2016, 2017 và 2018). Các quần thể bao gồm 154 dòng (DW × TW (DT)) và 153 dòng (DW × SO (DS)) được sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết mật độ cao và để phân tích các QTL liên quan đến tính chịu tách quả [30].

4.2. Đánh giá tính chống chịu tách quả

Việc đánh giá tính chống chịu tách quả trong ba năm được thực hiện như đã mô tả trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi [30]. Tóm lại, các quả trưởng thành từ tổng số 307 RIL và ba quả bố mẹ được trồng trên ruộng tại Miryang, Hàn Quốc được thu hoạch ở giai đoạn trưởng thành (giai đoạn R8) và được giữ ở nhiệt độ phòng trong một tuần [23]. Sau một tuần, tỷ lệ tách quả của mỗi RIL được xác định bằng tỷ lệ giữa số quả bị tách trên tổng số quả được tính trong 24, 48 và 72 giờ sấy trong tủ sấy ở 40°C [39] trong ba năm thí nghiệm (2016, 2017 và 2018).

4.3. Chiết xuất DNA bộ gen và xác định kiểu gen

Ba lá non của bố mẹ và các RIL F_{7:8} được thu hoạch hàng loạt ở giai đoạn V2 và được giữ trong tủ lạnh sâu ở -80°C. Lá được nghiền bằng máy nghiền hạt (TissueLyser II; Qiagen, Hilden, Đức). DNA bộ gen được chiết xuất bằng bộ kit thương mại (Exgene Plant SV Miniprep Kit; GeneAll, Seoul, Korea) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và 50 µL dung dịch đệm AE được sử dụng để rửa DNA [40]. 180K Axiom® SoyaSNP [41, 42, 43] được sử dụng để định kiểu gen của bố mẹ và 307 RIL của hai quần thể.

4.4. Xây dựng bản đồ liên kết và lập bản đồ QTL

Trước khi xây dựng bản đồ liên kết, các marker thừa có các mẫu phân tích giống hệt nhau không đóng góp thêm vào việc lập bản đồ di truyền đã bị loại bỏ bằng cách sử dụng chức năng Bin trong phần mềm QTL IciMapping V4.2. Các thông số để xây dựng bản đồ được đặt thành nhóm theo ngưỡng logarit 3.0 chênh lệch (LOD), sắp xếp theo nnTwoOpt và gộp sóng theo tổng các phân số tái tổ hợp liên kề. Xây dựng bản đồ được tiến hành bằng chức năng lập bản đồ của Kosambi và các QTL được xác định bao gồm khoảng bản đồ tổng hợp bao gồm (ICIM) bằng cách sử dụng QTL IciMapping V4.2 [44].

Tên của các QTL được chỉ định bằng cách kết hợp các chữ cái và số khác nhau như sau: q: QTL, PS: tách quả, DT:RIL bắt nguồn từ phép lai giữa Daewonkong và Tawonkong, và DS: RIL bắt nguồn từ phép lai giữa Daewonkong và Saeolkong. Các số theo sau là các chữ cái cho biết tên của quần thể RIL biểu thị nhiệm sắc thể chứa QTL. Ví dụ: các QTL có tên *qPS-DT16-2* và *qPS-DT11* tương ứng chỉ ra QTL thứ hai cho tách quả trên nhiễm sắc thể 16 và chỉ một QTL cho tách quả trên nhiễm sắc thể 11 trong quần thể RIL (DT) có nguồn gốc từ Daewonkong và Tawonkong.

4.5. Dự đoán về QTL và gen ứng cử mới

Các QTL có giá trị PVE cao (>10%), không bao gồm quỹ tích *qPDH1*, đã được chọn. Sau đó, các QTL có ý nghĩa thống kê đối với sự tách quả được xác định theo các mẫu alen của chúng dựa trên trình tự SNP trong các vùng QTL. Các gen ứng viên bên trong hoặc bên cạnh QTL ứng viên được xác định dựa trên SoyBase (www.soybase.org) và Phytozome (www.phytozome.net). Mô tả gen được lấy từ bộ gen tham chiếu đậu tương Williams_82 (Wm82.a2.v1).

4.6. Phân tích biểu hiện gen của các gen ứng viên

Đối với tổng số RNA chiết xuất, quả của DW, TW và SO được thu hoạch từ các cây lớn ở các giai đoạn sinh trưởng R3, R4, R5 và R6 tương ứng. Tổng số RNA của quả được phân lập bằng cách sử dụng RNeasy PowerPlant Kit (Qiagen, Hilden, Đức) và cDNA được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược (EcoDry cDNA Synthesis Premix, Takara Bio, Inc., Ohtsu, Japan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự biểu hiện gen được xác định bằng qPCR sử dụng hệ thống ABI 7300 (Hệ thống sinh học ứng dụng, Thành phố Foster, CA, Hoa Kỳ) với hỗn hợp tổng thể PCR xanh Power SYBR (Hệ thống sinh học ứng dụng, Woolston Warrington, Vương quốc Anh). Tất cả các thí nghiệm được thực hiện với ba lần lặp lại và kết quả được phân tích bằng phần mềm ExpressionSuite V1.3 (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Các đoạn môi cho các gen mục tiêu (Bảng bổ sung S3) được thiết kế bằng cách sử dụng Primer3.0 (<http://primer3.ut.ee/>). Gen *GmActin* (*Glyma.18g290800*) được sử dụng làm gen kiểm soát.

4.7. Phân tích thống kê

Thử nghiệm t-test của Student và thử nghiệm khoảng đa biến của Duncan (DMRT) được thực hiện bằng phần mềm R V3.6.3 (R Core Team, 2020) để so sánh các thay đổi kiểu hình của khả năng chống chịu tách quả và mức độ biểu hiện của các gen ứng viên. Hệ số di truyền theo nghĩa rộng (H^2) được tính theo công thức sau: $H^2 = \sigma_g^2 / \sigma_p^2$ [45].

5. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, một QTL chính, trên nhiễm sắc thể 16, bao gồm locus *qPDH1* và một số QTL mới trên nhiễm sắc thể 2, 6, 11, 13, 14, 16 và 20 được xác định từ bản đồ liên kết mật độ cao của hai quần thể RIL. Trong số các QTL mới này, chúng tôi đã xác

định *qPS-DS16-1* (*Glyma.16g076600*) có khả năng đóng một vai trò nào đó trong khả năng chống chịu tách quả dựa trên các kiểu biểu hiện của gen này. Chức năng của *Glyma.16g076600*, một thành viên của họ CYP707A, đã được báo cáo là có thể liên quan đến quá trình dị hóa ABA, một loại hormone được biết là có liên quan đến nhiều chức năng sinh lý, bao gồm cả tách quả. Do đó, kết quả của nghiên cứu này cung cấp thông tin hữu ích để hiểu cơ chế di truyền của hiện tượng tách quả và có thể được sử dụng để cải thiện hiệu quả của chọn lọc có marker hỗ trợ để phát triển các giống chống chịu tách quả ở đậu tương.

Xem các bảng bổ sung tại <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/9/1163/s1>

Tài liệu tham khảo

1. Fuller, D.Q. Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: Recent archaeobotanical insights from the Old World. *Ann. Bot.* **2007**, *100*, 903–924. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
2. Funatsuki, H.; Suzuki, M.; Hirose, A.; Inaba, H.; Yamada, T.; Hajika, M.; Komatsu, K.; Katayama, T.; Sayama, T.; Ishimoto, M. Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 17797–17802. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zhang, Q.; Tu, B.; Liu, C.; Liu, X. Pod anatomy, morphology and dehiscing forces in pod dehiscence of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Flora* **2018**, *248*, 48–53. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Di Vittori, V.; Gioia, T.; Rodriguez, M.; Bellucci, E.; Bitocchi, E.; Nanni, L.; Attene, G.; Rau, D.; Papa, R. Convergent evolution of the seed shattering trait. *Genes* **2019**, *10*, 68. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Kang, X.; Cai, J.; Chen, Y.; Yan, Y.; Yang, S.; He, R.; Wang, D.; Zhu, Y. Pod-shattering characteristics differences between two groups of soybeans are associated with specific changes in gene expression. *Funct. Integr. Genom.* **2020**, *20*, 201–210. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Bandillo, N.B.; Anderson, J.E.; Kantar, M.B.; Stupar, R.M.; Specht, J.E.; Graef, G.L.; Lorenz, A.J. Dissecting the genetic basis of local adaptation in soybean. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–12. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Tu, B.; Liu, C.; Wang, X.; Li, Y.; Zhang, Q.; Liu, X.; Herbert, S.J. Greater Anatomical Differences of Pod Ventral Suture in Shatter-Susceptible and Shatter-Resistant Soybean Cultivars. *Crop Sci.* **2019**, *59*, 2784–2793. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Konishi, S.; Izawa, T.; Lin, S.Y.; Ebana, K.; Fukuta, Y.; Sasaki, T.; Yano, M. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science* **2006**, *312*, 1392–1396. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Zhou, Y.; Lu, D.; Li, C.; Luo, J.; Zhu, B.-F.; Zhu, J.; Shangguan, Y.; Wang, Z.; Sang, T.; Zhou, B. Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor SHATTERING ABORTION1. *Plant Cell* **2012**, *24*, 1034–1048. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Dong, Y.; Yang, X.; Liu, J.; Wang, B.-H.; Liu, B.-L.; Wang, Y.-Z. Pod shattering resistance associated with domestication is mediated by a NAC gene in soybean. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–11. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Rau, D.; Murgia, M.L.; Rodriguez, M.; Bitocchi, E.; Bellucci, E.; Fois, D.; Albani, D.; Nanni, L.; Gioia, T.; Santo, D. Genomic dissection of pod shattering in common bean: Mutations at non-orthologous loci at the basis of convergent phenotypic evolution under domestication of leguminous species. *Plant J.* **2019**, *97*, 693–714. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fourquin, C.; del Cerro, C.; Victoria, F.C.; Vialette-Guiraud, A.; de Oliveira, A.C.; Ferrándiz, C. A change in SHATTERPROOF protein lies at the origin of a fruit morphological novelty and a new strategy for seed dispersal in *Medicago* genus. *Plant Physiol.* **2013**, *162*, 907–917. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

13. Suanum, W.; Somta, P.; Kongjaimun, A.; Yimram, T.; Kaga, A.; Tomooka, N.; Takahashi, Y.; Srinives, P. Co-localization of QTLs for pod Fiber content and pod shattering in F₂ and backcross populations between yardlong bean and wild cowpea. *Mol. Breed.* **2016**, *36*, 80. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. Lo, S.; Muñoz-Amatriaín, M.; Boukar, O.; Herniter, I.; Cisse, N.; Guo, Y.-N.; Roberts, P.A.; Xu, S.; Fatokun, C.; Close, T.J. Identification of QTL controlling domestication-related traits in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–9. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bhor, T.; Chimote, V.; Deshmukh, M. Inheritance of pod shattering in soybean (*Glycine max* L Merrill). *Electron. J. Plant Breed.* **2014**, *5*, 671–676. [[Google Scholar](#)]
16. Kang, S.-T.; Kwak, M.; Kim, H.-K.; Choung, M.-G.; Han, W.-Y.; Baek, I.-Y.; Kim, M.Y.; Van, K.; Lee, S.-H. Population-specific QTLs and their different epistatic interactions for pod dehiscence in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Euphytica* **2009**, *166*, 15. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Funatsuki, H.; Hajika, M.; Yamada, T.; Suzuki, M.; Hagihara, S.; Tanaka, Y.; Fujita, S.; Ishimoto, M.; Fujino, K. Mapping and use of QTLs controlling pod dehiscence in soybean. *Breed. Sci.* **2012**, *61*, 554–558. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Bailey, M.; Mian, M.; Carter, T., Jr.; Ashley, D.; Boerma, H. Pod dehiscence of soybean: Identification of quantitative trait loci. *J. Hered.* **1997**, *88*, 152–154. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Funatsuki, H.; Ishimoto, M.; Tsuji, H.; Kawaguchi, K.; Hajika, M.; Fujino, K. Simple sequence repeat markers linked to a major QTL controlling pod shattering in soybean. *Plant Breed.* **2006**, *125*, 195–197. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Funatsuki, H.; Hajika, M.; Hagihara, S.; Yamada, T.; Tanaka, Y.; Tsuji, H.; Ishimoto, M.; Fujino, K. Confirmation of the location and the effects of a major QTL controlling pod dehiscence, qPDH1, in soybean. *Breed. Sci.* **2008**, *58*, 63–69. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Suzuki, M.; Fujino, K.; Funatsuki, H. A major soybean QTL, qPDH1, controls pod dehiscence without marked morphological change. *Plant Prod. Sci.* **2009**, *12*, 217–223. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Yamada, T.; Funatsuki, H.; Hagihara, S.; Fujita, S.; Tanaka, Y.; Tsuji, H.; Ishimoto, M.; Fujino, K.; Hajika, M. A major QTL, qPDH1, is commonly involved in shattering resistance of soybean cultivars. *Breed. Sci.* **2009**, *59*, 435–440. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Lee, J.S.; Kim, K.R.; Ha, B.-K.; Kang, S. Identification of SNPs tightly linked to the QTL for pod shattering in soybean. *Mol. Breed.* **2017**, *37*, 54. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Miranda, C.; Culp, C.; Škrabišová, M.; Joshi, T.; Belzile, F.; Grant, D.M.; Bilyeu, K. Molecular tools for detecting Pdh1 can improve soybean breeding efficiency by reducing yield losses due to pod shatter. *Mol. Breed.* **2019**, *39*, 27. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Suzuki, M.; Fujino, K.; Nakamoto, Y.; Ishimoto, M.; Funatsuki, H. Fine mapping and development of DNA markers for the qPDH1 locus associated with pod dehiscence in soybean. *Mol. Breed.* **2010**, *25*, 407–418. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
26. Gao, M.; Zhu, H. Fine mapping of a major quantitative trait locus that regulates pod shattering in soybean. *Mol. Breed.* **2013**, *32*, 485–491. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
27. Hu, D.; Kan, G.; Hu, W.; Li, Y.; Hao, D.; Li, X.; Yang, H.; Yang, Z.; He, X.; Huang, F.; et al. Identification of Loci and Candidate Genes Responsible for Pod Dehiscence in Soybean via Genome-Wide Association Analysis across Multiple Environments. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 811. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Han, J.; Han, D.; Guo, Y.; Yan, H.; Wei, Z.; Tian, Y.; Qiu, L. QTL mapping pod dehiscence resistance in soybean (*Glycine max* L. Merr.) using specific-locus amplified fragment sequencing. *Theor. Appl. Genet.* **2019**, *132*, 2253–2272. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Kim, S.; Park, K.; Yun, H.; Lee, Y.; Lee, S.; Ryu, Y.; Hwang, C.; Kim, Y.; Kim, Y.; Seung, Y. A new soybean variety for soypaste with large seed and disease resistant “Daewonkong”. *RDA J. Crop Sci.* **1998**, *40*, 107–111. [[Google Scholar](#)]

30. Seo, J.; Kang, B.; Kim, H.; Kim, H.; Choi, M.; Oh, J.; Shin, S.; Baek, I.; Kwak, D. Variation in pod shattering in a RIL population and selection for pod shattering tolerance in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Korean J. Crop Sci.* **2019**, *64*, 414–421. [[Google Scholar](#)]
31. Fehr, W.; Caviness, C.; Burmood, D.; Pennington, J. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* L. Merrill 1. *Crop Sci.* **1971**, *11*, 929–931. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Xu, Y.; Wang, G.; Jin, J.; Liu, J.; Zhang, Q.; Liu, X. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. *Soil Biol. Biochem.* **2009**, *41*, 919–925. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Saito, S.; Hirai, N.; Matsumoto, C.; Ohigashi, H.; Ohta, D.; Sakata, K.; Mizutani, M. Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1439–1449. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mizutani, M.; Todoroki, Y. ABA 8'-hydroxylase and its chemical inhibitors. *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 385. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. Takeuchi, J.; Okamoto, M.; Mega, R.; Kanno, Y.; Ohnishi, T.; Seo, M.; Todoroki, Y. Abscinazole-E3M, a practical inhibitor of abscisic acid 8'-hydroxylase for improving drought tolerance. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Jaradat, M.R.; Ruegger, M.; Bowling, A.; Butler, H.; Cutler, A.J. A comprehensive transcriptome analysis of silique development and dehiscence in Arabidopsis and Brassica integrating genotypic, interspecies and developmental comparisons. *GM Crop. Food* **2014**, *5*, 302–320. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kim, S.; Park, K.; Lee, Y.; Yun, H.; Lee, S.; Ryu, Y.; Son, Y.; Kim, Y.; Kim, Y.; Seung, Y. A black seed coat soybean variety with small seed and lodging resistant “Tawankong”. *RDA J. Crop Sci.* **1998**, *40*, 102–106. [[Google Scholar](#)]
38. Baek, I.; Shin, D.; Kang, S.; Song, S.; Hur, S.; Kwack, Y.; Lim, M. A New Early Maturity, Good Seed Quality and High Yielding Soybean Variety “Saeolkong”. *Korean J. Breed. Sci.* **1998**, *30*, 397. [[Google Scholar](#)]
39. Kang, S.T.; Kim, H.K.; Baek, I.Y.; Chung, M.G.; Han, W.Y.; Shin, D.C.; Lee, S.-H. Genetic analysis of pod dehiscence in soybean. *Korean J. Crop Sci.* **2005**, *50*, 281–285. [[Google Scholar](#)]
40. Dhungana, S.K.; Kim, H.-S.; Kang, B.-K.; Seo, J.-H.; Kim, H.-T.; Shin, S.-O.; Park, C.-H.; Kwak, D.-Y. Evaluation of Flooding Tolerance of Soybean (*Glycine max* L. Merr.) in Greenhouse under Upland and Paddy Soil Conditions. *J. Crop Sci. Biotechnol.* **2019**, *22*, 283–290. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. 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. Development, validation and genetic analysis of a large soybean SNP genotyping array. *Plant J.* **2015**, *81*, 625–636. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jeong, N.; Kim, K.-S.; Jeong, S.; Kim, J.-Y.; Park, S.-K.; Lee, J.S.; Jeong, S.-C.; Kang, S.-T.; Ha, B.-K.; Kim, D.-Y. Korean soybean core collection: Genotypic and phenotypic diversity population structure and genome-wide association study. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0224074. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
43. Kim, K.H.; Kim, J.-Y.; Lim, W.-J.; Jeong, S.; Lee, H.-Y.; Cho, Y.; Moon, J.-K.; Kim, N. Genome-wide association and epistatic interactions of flowering time in soybean cultivar. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0228114. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. 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](#)]
45. 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](#)] [[PubMed](#)]