

大豆油分和蛋白性状的基因定位^{*}

张忠臣 战秀玲 陈庆山 滕卫丽 杨庆凯 李文滨

(东北农业大学大豆研究所, 哈尔滨 150030)

摘要 应用美国品种 Charleston(♀)和中国品种东农 594(♂)得到的 154 个 F₁₀ 代重组自交系群体, 构建了含有 163 个 SSR 标记、覆盖 1835.5cM、由 20 个连锁群组成的遗传连锁图谱。采用复合区间作图法, 对 2002 年群体的油分和蛋白数据进行了 QTL 分析, 共检测到了 6 个 QTL, 其中 oil-4 和 pro-2 三个位点位于同一连锁群 N 上。

关键词 大豆; 油分; 蛋白质; QTL; 基因定位

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)02-0081-05

大豆育种的多数目标性状是数量性状, 受多基因控制, 并且容易受环境变化的影响。传统的数量遗传学方法可以对其进行整体的遗传效应和环境效应的分析, 但无法检测控制这些性状的 QTL 的数目、单个 QTL 的遗传效应以及它们在染色体上的位置。

随着分子遗传学的发展和 RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等分子标记技术的完善, 尤其是高密度遗传连锁图谱的构建, 数量性状位点(QTL)的基因定位和确定其在染色体上的位置的研究变成了现实, 从而图位克隆控制这些数量性状的主效基因。最近在番茄中已经鉴定和克隆了控制果实大小和形状的 QTL 基因(Tanksley 等, 2000)。利用分子标记构建高密度大豆遗传连锁图谱, 结合现代分子操作技术, 用来研究大豆结构基因组, 追踪和标记有经济价值的主效基因, 分析这些数量性状的遗传规律, 进而发现和克隆这些主效基因。

关于大豆油分和蛋白性状的 QTL 定位研究, 已有过相应的报道^[2-9], 但由于这些研究中的群体大小和类型等方面的限制, 所以 QTL 定位的精度不够高。本文利用两个地理和遗传远缘的品种杂交得到的重组自交系群体构建了大豆遗传连锁图谱, 对油分等重要农艺性状进行了 QTL 分析和定位。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选自中国农业科学院作物品种资源研究所提供的 Charleston(♀)和东北农业大学大豆研究所提供的东农 594(♂)以及 154 个 F₁₀ 代重组自交系群体。

1.2 种子油分和蛋白含量

2002 年末, 用近红外谷物品质分析仪对东农 594 和 154 个 F₁₀ 代重组自交系群体进行了种子油分和蛋白含量的测定。

1.3 总 DNA 的提取方法

随机取 2 粒种子, 按照改良的 SDS 法提取亲本和群体的总 DNA。

1.4 琼脂糖凝胶电泳检测

取 10^μl DNA 稀释样, 在 0.8% (W/V) 琼脂糖凝胶中电泳 30min, 在紫外投射仪下观察和统计其丰度, 用于 PCR 扩增。

1.5 SSR 标记分析

1.5.1 引物来源:

一部分由中国农业科学院作物品种资源研究所提供, 一部分按照 soybase 网址上提供的大豆微卫星序列合成。

1.5.2 PCR 反应体系

模板 2.5^μl, 超纯水 12.0^μl, Buffer2^μl, 引物 1.5^μl, dNTP1.5^μl, Taq 酶 0.5^μl。

1.5.3 PCR 扩增条件:

* 收稿日期: 2003-11-24

项目来源: 国家 863 计划(2002AA207007, 2001AA241063, 2001AA211041)资助。

作者简介: 张忠臣(1978-), 男, 硕士研究生, 从事分子标记辅助育种。E-mail: zhongchenzhang@hotmail.com

反应在 95℃ 预变性 5min, 然后进入循环: 94℃ 变性 30sec; 47℃ 复性 30sec; 72℃ 延伸 30sec; 循环 20 次后在 72℃ 延伸 5min, 置于 4℃ 下保存。PCR 产物的每个 SSR 体系加上 8^{ul} 甲酰胺双色 Loading Buffer(在 PCR 板上), 置于 PCR 仪中变性 10min, 然后放入冰水混合物中冷却。在 6% 的聚丙烯酰胺标准测序胶上分离, 在 100W 恒功率下电泳约 2h, 然后使用快速银染法对凝胶进行染色, 统计带型并照相。

1.6 数据处理

1.6.1 遗传作图和 QTL 分析

本研究利用 Mapmaker/EXP3.0 和 Mapmaker/QTL1.1 作图软件, 构建分子标记连锁图谱, 然后进行区间作图和 QTL 分析^[10], LOD 值大于 2.5 作为 QTL 存在的域值, 利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传图距(cM)。

1.6.2 基因型记载

本研究将来源于亲本 Charleston(♀)带型记为 A, 来源于东农 594(♂)带型记为 B, 双亲杂合带型为 H, 缺失或模糊带型记为“—”。

2.1 连锁图谱的构建

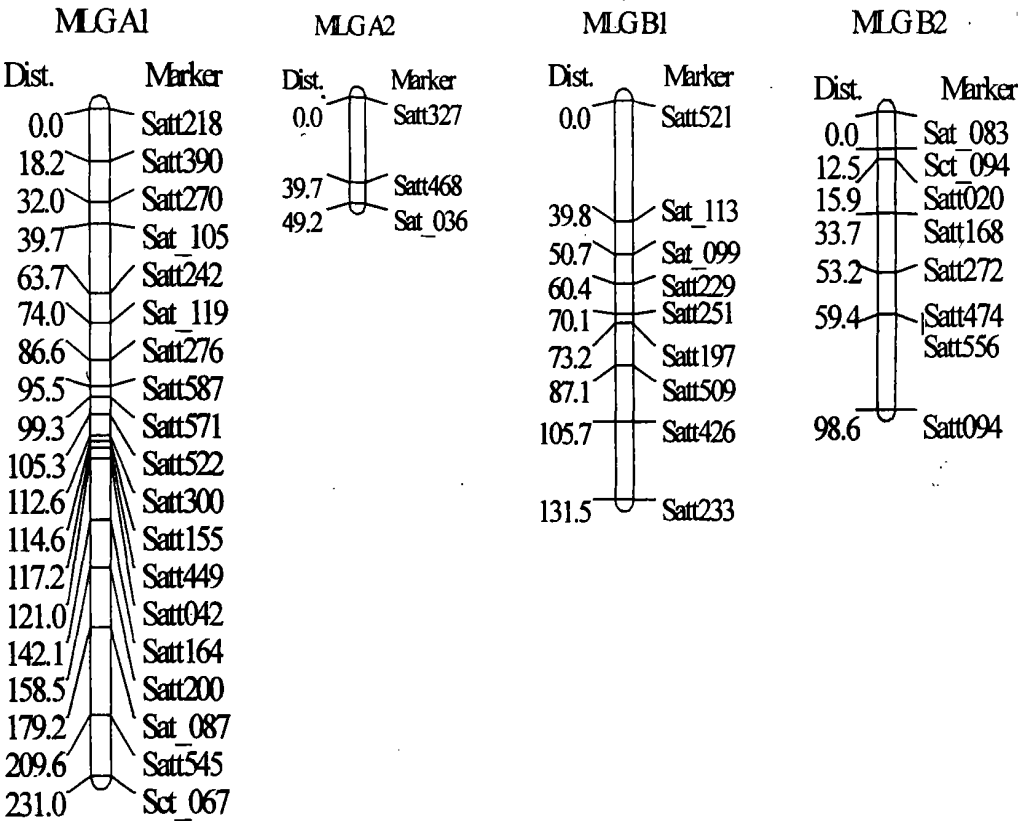
利用 Mapmaker/EXP3.0 作图软件, 进行了标记间连锁分析, 构建了一张用于 QTL 分析的框架图谱(图 1)。该图谱包括 163 个 SSR 标记, 分布在大豆的 20 个连锁群上, 总长度为 1913.5cM, 标记间平均距离为 11.89cM。

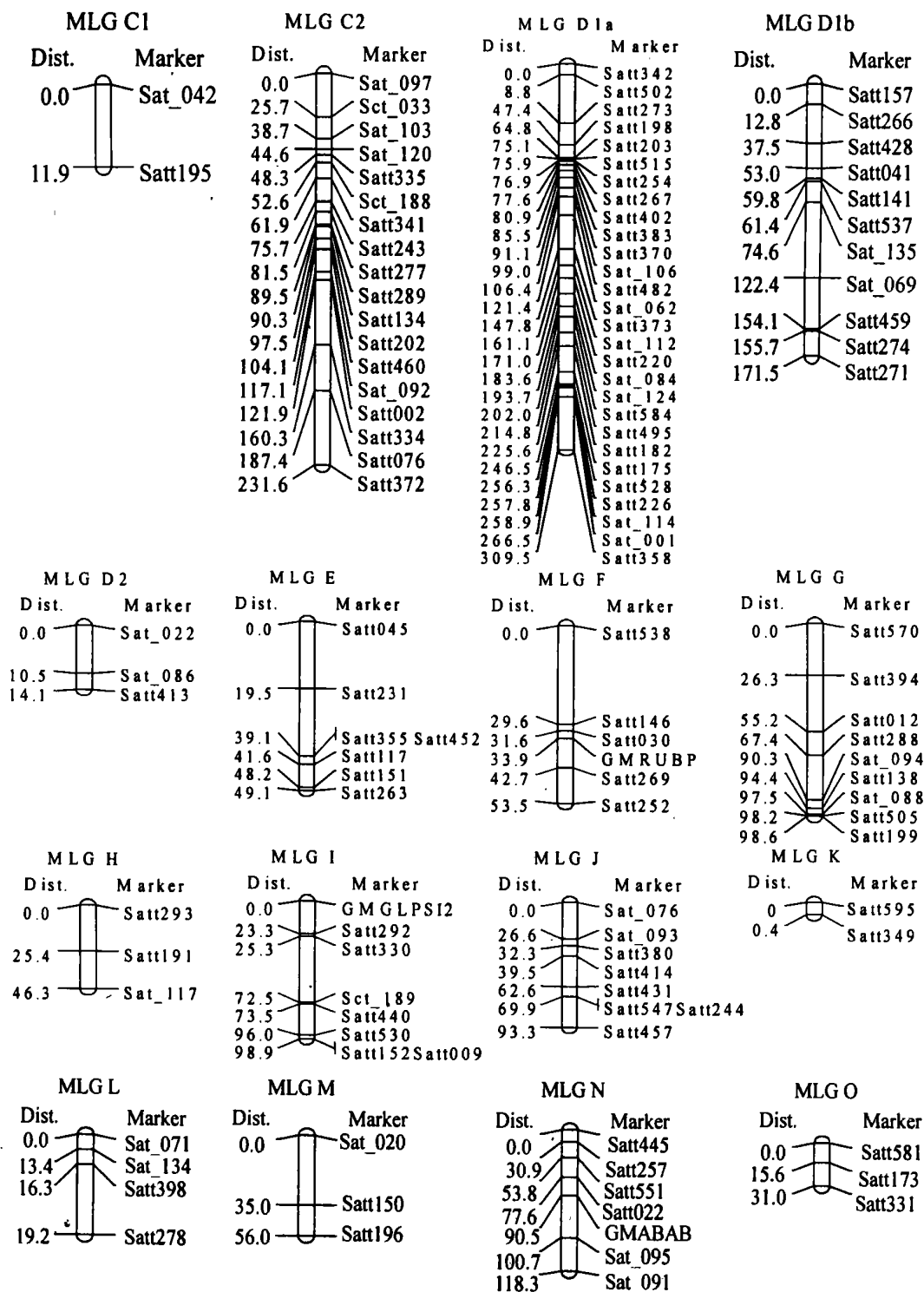
2.2 油分和蛋白性状在亲本间的差别和群体中的分离

大豆油分和蛋白性状在亲本间及群体中的分布如表 1 和图 2、图 3 所示。这两个性状在 RIL 群体中表现为连续分布, 表明是受多基因控制的数量性状。蛋白含量在双亲中的差异为 2.03%, 群体中为 9.87%; 油分含量在双亲间差异为 2.20%, 群体中为 5.53%, 说明群体中有超亲分离现象, 为今后选育高油和高蛋白品种提供遗传资源。

RIL 群体中油分含量的分布在双亲间表现为较好的正态分布, 而蛋白含量的分布整体上略偏向于低蛋白亲本东农 594, 但也有与高蛋白含量的亲本 Charleston 相近的株系, 这说明群体在一定程度上表现出偏向亲本东农 594 分离的趋势。

2 结果与分析





图中左侧数据为遗传距离，单位为厘摩尔根

The number displayed on the left is genetic distance, whose unit is cM.

图 1 大豆 Charleston 和东农 594 的 RIL 群体框架图谱

Fig. 1 A linkage map of soybean in RIL population from Charleston and NEAU594 cross
©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

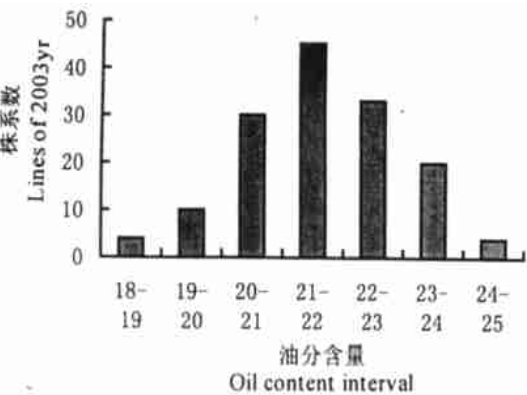


图2 油分含量分布

Fig. 2 Oil content distribution

表1 大豆油分和蛋白在亲本和群体间的变异

Table 1 Variation of seed oil and protein content between parents and RIL lines of soybean

基因型	蛋白含量(%)	油分含量(%)
Genotype	Protein content	Oil content
东农 594	40.35	21.83
Charleston	42.38 *	19.63 *
群体范围	34.63—44.50	18.80—24.33
群体平均值	39.74	21.43

注：* 数据引自赵剑峰《中美半矮秆大豆杂交后代高世代遗传多样性分析》(2001)^[11]。

2.3 油分和蛋白的 QTL 定位

表2 大豆油分和蛋白的 QTL 分析

Table 2 Analysis of oil and protein content of soybean

性状	位点	连锁群	标记	LOD 值	贡献率(%)	加性效应
Trait	QTL locus	Linkage group	Marker	LOD value	Variance explained	Additive effect
油分	oil-1	D2	Sat-022	2.5	8.87775	-0.3017991
	oil-2	F	Satt538-Satt146	2.5	16.35497	-0.3502379
	oil-3	F	Satt030-GMRUBP	2.5	11.24847	-0.2991729
	oil-4	N	GMABAB	2.5	14.50931	-0.3366524
蛋白	pro-1	E	Satt045-Satt231	2.5	19.92303	0.4819308
	pro-2	N	Sat-091	2.5	6.97226	0.3502594

3 讨论

在构建大豆遗传图谱时，为了获得较高的多态性，一般采用远缘杂交的办法。但是，过分远缘又会出现严重的偏分离等现象。因此，本文采用了性状差异较明显的两个地理远缘的美国品种 Charleston (♀)和中国品种东农 594 (♂)得到的 154 个 F₁₀ 代重组自交系群体，虽然亲本的多态性小，但群体和同种标记的数量之多提高了 QTL 定位的准确性，避免了种间杂交的缺点。

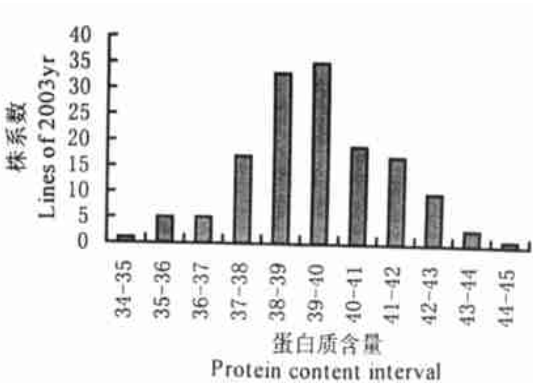


图3 蛋白含量分布

Fig. 3 Protein content distribution

通过复合区间作图法对油分和蛋白性状进行 QTL 分析，共检测到 6 个 QTL (表 2)。控制油分的 4 个 QTL 分别位于 D2、F 和 N 三个不同的连锁群上，均表现为负的加性效应，这可能受父本 Charleston 影响比较大。其中 3 个 QTL: oil-2、oil-3 和 oil-4 贡献率为 11.2%—16.4%，而 oil-1 的贡献率低于 10%。与蛋白含量相关的 2 个 QTL 分别位于 E 和 N 两个连锁群上，分别揭示了 19.9% 和 7.0% 的总变异，且都呈现正的加性效应，这一点与母本东农 594 的贡献有关。这也说明了蛋白含量与油分含量呈负相关，与前人的研究是一致的 (Johnson and Bernard, 1962)。

本文应用复合区间作图法，共检测到了 6 个 QTLs，其中 pro-2 与刘峰、Lee 等定位的与蛋白含量相关的 QTL 位于同一连锁群 N 上，但不在同一区间；pro-1 被定位在 E 连锁群上，与 Lee、Brumer 等定位的控制蛋白含量的 QTL 位于同一连锁群 E 上，但也不在同一区间；而 4 个 QTL 位点 oil-1、oil-2、oil-3 和 oil-4 分别定位到 D2、F、和 N 连锁群上，没有发现类似的报道，这说明了油分和蛋白含量的定位可能具有群体的特异性，同时也说明 QTL 定位不仅与环境因素有关，而且与群体性质、遗传背景和农艺性状的类型有着密切关系。

参考文献

1 Frary A, Nesbitt T C, Grandillo S et al. Cloning and transgenic expression of fw2.2: a quantitative traits locus key to the evolution of tomato fruit[J]. Science, 2000, 289: 85—87.

2 刘峰. 大豆的基因组作图和重要农艺性状基因定位[D]. 中国科学院博士学位研究生学位论文, 1999.

3 吴晓雷, 王永军, 贺超英, 等. 大豆重要农艺性状的 QTL 分析[J]. 遗传学报, 2001, 28(10): 947—955.

4 L. M. Mansur, K. G. Lark, H. Kross et al. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). Theor. Appl. Genet., 1993, 86: 907—913.

5 L. M. Mansur, J. H. Orf, K. Chase, et al. Genetic mapping of Agronomic traits using recombinant lines of soybean[J]. Crop Sci., 1996, 36: 1327—1336.

6 S. H. Lee, M. A. Bailey, M. A. R. Mian et al. RFLP loci associated with soybean seed protein and oil content across populations and locations[J]. Theor. Appl. Genet., 1996, 93: 649—657.

7 B. W. Diers, P. Keim, W. R. Fehr et al. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content[J]. Theor. Appl. Genet., 1992, 83: 608—612.

8 E. C. Brummer, G. L. Graef, J. Orf, J. R. Wilcox et al. Mapping QTL for seed protein and oil content in eight soybean populations[J]. Crop Sci., 1997, 37: 370—378.

9 G. Csanadi, J. Vollmann, G. Stift et al. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean[J]. Theor. Appl. Genet., 2001, 103: 912—919.

10 Lander E S, Bostein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps[J]. Genetics, 1989, 121: 185—189.

11 赵剑峰. 中美半矮秆大豆杂交后代高世代遗传多样性分析[D]. 东北农业大学硕士学位论文, 2001.

12 Johnson H W, Bernard R L. Soybean genetics and breeding[J]. Adv. Agron., 1962, 14: 149—221.

QTL MAPPING OF SEED OIL AND PROTEIN CONTENT OF SOYBEAN

Zhang Zhongchen Zhan Xiuling Chen Qingshan Teng Weili Yang Qingkai Li Wenbin

(Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract A recombinant inbred lines of soybean was developed from an intraspecies cross of Charleston and NEAU594. A genetic linkage map of soybean genome was constructed, which composed of 20 linkage groups, included 163 SSR markers, covered 1835.5cM. The composite interval mapping was used to identify quantitative loci (QTLs) associated with protein and oil content in the RIL population. The results indicated that 6 QTLs were detected for protein and oil content in 2002, among which oil-4 and pro-2 were located on LG N.

Key word Soybean; Oil; Protein; QTL; Gene mapping