

大豆维生素 E 遗传图谱构建及 QTL 分析

李海燕, 韩英鹏, 武小霞, 聂腾坤, 张大勇, 李文滨

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 在黑龙江省三地点对合丰 25 和 Bayfield 杂交后的 144 个重组自交系群体的维生素 E 中各个成分进行 QTL 分析。结果发现在哈尔滨共得到 8 个与维生素 E 含量相关的 QTL, 在呼兰共得到 9 个与维生素 E 含量相关的 QTL, 在绥化共得到 11 个与维生素 E 含量相关的 QTL。通过分子辅助育种法筛选出 11 个高维生素 E 含量的品系。

关键词: 大豆; 维生素 E; QTL 分析; 分子辅助育种

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0492

QTL Analysis of Soybean Vitamin E and Genetic Map Construction

LI Hai-yan, HAN Ying-peng, WU Xiao-xia, NIE Teng-kun, ZHANG Da-yong, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Quantitative trait loci of agronomic traits and components of vitamin E of 144 recombinant inbred lines which were crossed by Hefeng 25 and Bayfield were analyzed in three places of Heilongjiang province. The results showed that there were 8, 9 and 11 QTLs in connection with vitamin E contents in Harbin, Hulan and Suihua. Eleven optimal strains with high V_E content were screened by MAS.

Key words: Soybean; Vitamin E; QTL analysis; Marker assisted selection

维生素 E 是一种脂类维生素, 亲脂疏水。天然维生素 E 主要来源于植物。动物油中也存在生育酚, 但生育酚的含量普遍低于植物油。天然维生素 E 具有重要抗氧化功能, 可增强机体免疫力, 具有抗癌、预防心血管疾病和神经紊乱等功效^[1]。在植物体内, 维生素 E 还具有保护膜的完整性等作用^[2]。天然维生素 E 可用作婴幼儿食品的抗氧化剂、营养强化剂等。不仅会提高食品中的营养价值, 还能提高食品的新鲜度和加工产品的货架贮存期^[3]。可见, 维生素 E 对人类的健康至关重要, 但人体自身不能合成维生素 E, 需从植物中获取。利用分子标记辅助选择方法是目前除常规育种方法外进行大豆性状改良最有效的育种方法, 它可加速遗传改良进程, 极大地提高育种的效率。通过分子标记辅助选择方法培育高含量的维生素 E 的大豆新品种已成为当前的育种目标。

目前, 大豆的许多品质性状的 QTL 都已经定位到了大豆遗传图谱上。林延慧等^[4] 2010 年对蛋白质含量进行 QTL 分析。同年, 苗兴芬等^[5] 对大豆脂肪酸含量的 QTL 进行分析, 发现在多年多点同时检

测到的 QTL 共有 15 个。2011 年, 单大鹏等^[6] 对大豆蛋白质含量进行 QTL 定位。葛振宇等^[7] 对蛋白质含量和油分含量进行 QTL 定位以及相关性分析, 并在该群体中定位到 2 个与蛋白质含量有关的 QTL, 3 个与油分含量有关的 QTL。2012 年, 张晶莹^[8] 等人对不同环境条件下大豆异黄酮主要组分进行 QTL 定位研究, 为大豆异黄酮分子标记辅助育种提供理论依据。姚丹等^[9] 以高蛋白和高油品种为材料, 研究了大豆脂肪含量的遗传规律, 发现了 2 个主效 QTL 和 2 个微效 QTL。其中包括了 1 个在 2 年间稳定存在的主效 QTL。

2013 年 Feng 等^[10] 研究在高含量生育酚品系与低生育酚品系杂交后甜玉米中控制生育酚积累的 QTL, 利用 136 个多态性分子标记构建了遗传图谱。同年, Haddadi 等^[11] 对向日葵中 123 个 RIL 中生育酚含量进行了 QTL 定位。

本研究以合丰 25 × Bayfield 构建的重组自交系群体为材料, 在黑龙江省哈尔滨、呼兰和绥化 3 个地点对大豆维生素 E 各含量进行 QTL 定位, 以期高维生素 E 大豆分子育种奠定基础。

收稿日期: 2013-12-30

基金项目: 中国博士后项目 (20110491025); 国家重点基础研究发展计划“973 计划” (2012CB126311); 东北农业大学科学研究基金 (2012RCB32); 哈尔滨市科技创新人才研究项目 (2011RFQXN040)。

第一作者简介: 李海燕 (1978-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事大豆遗传育种及生物技术研究。E-mail: lhy2112002@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

以合丰 25 为母本,加拿大大豆品种 Bayfield 为父本,在哈尔滨、绥化和呼兰进行杂交后得到 F_{2:7} 衍生的 144 份 RIL 群体。

SSR 引物 800 对,参照 SoyBase 网址 (http://129.186.26.94/) 上的序列,由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 在田间各株系和亲本内随机选取等量的新鲜叶片,按照 SDS 方法提取亲本及后代群体 DNA。

1.2.2 PCR 扩增反应 反应体系包括:50 ng·μL⁻¹ 浓度的 DNA 3 μL,每条引物 3 μL,dNTP 0.3 μL,10 × Buffer 2.0 μL,Taq 聚合酶 0.2 μL,用 ddH₂O 补足至 20 μL。

PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,进入循环:94℃ 变性 30 s;47℃ 复性 30 s;72℃ 延伸 30 s;循环 35 次后在 72℃ 延伸 5 min,置于 4℃ 保存。

1.2.3 扩增产物检测 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳为取 10 μL PCR 样品,在 95℃ 变性 5 min,立即放冰上冷却。PCR 产物在 6% 的聚丙烯酰胺测序胶上,100 W 电泳,约 90 min 分离,银染,显影,记录数据。

1.3 数据统计分析

利用亲本间有差异的引物对群体进行检测。通过查询大豆公共遗传连锁图谱,确定存在差异的 SSR 标记。以最大图距 50 cM 作为划分连锁群和排列 markers 的基准距离。利用 WinQTLCart (V2.0) 软件进行 QTL 检测,以 LOD 大于 2.0 作为 QTL 存在阈值,母本带型记“A”,父本带型记“B”,数据缺失记“-”,杂合型及异常带型记“H”。

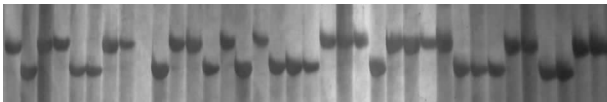
2 结果与分析

2.1 亲本 SSR 引物多态性筛选

以 800 对 SSR 引物对亲本合丰 25 与 Bayfield 进行检测,共有 157 对引物表现良好多态性,多态率为 19.63%。应用这些标记扩增 RIL 群体株系,带型清晰。

2.2 SSR-PCR 产物分析

将这 157 对多态性引物逐一在 F_{2:7} RIL 群体中进行扩增,产物经电泳后进行快速银染检测(图 1)。统计银染带型并记录。



1:父本;2:母本。
1: Male parent;2: Female parent.

图 1 Sat_246 在 F₇ 群体中扩增产物

Fig. 1 Sat_246 amplification in some plants of F₇ population

2.3 大豆 SSR 遗传图谱的构建与分析

SSR 引物在大豆连锁群分布见表 1。其中有 157 个 SSR 引物被分配到 2004 年 Song 定义的 20 条染色体上。这些 SSR 标记总长约为 6 800.8 cM,包括 136 个 SSR 座位,几乎覆盖整个染色体组,分子标记间距平均为 50.01 cM,每个连锁群上的标记数在 3~12 个,长度在 21.3~732.7 cM 范围。平均距离最大连锁群为 E,为 122.8 cM,最小连锁群为 H,为 7.10 cM。SSR 标记分布较均匀,在 C2、D1b、F 三个连锁群上标记分布较多,每个连锁群上都有 10 个以上 SSR 标记,这 3 个染色体共有 33 个 SSR 分子标记,占总标记数 21.02%。

表 1 SSR 标记在所建遗传图谱上的分布

Table 1 Distribution of SSR markers on the map

连锁群 Linkage group	长度 Length/cM	标记数 No. of markers	平均距离 Average distance/cM
A1	211.7	5	42.34
A2	455.0	9	50.56
B1	285.9	5	57.18
B2	70.2	3	23.40
C1	444.7	8	55.59
C2	500.2	10	50.02
D1a	253.2	9	28.13
D1b	707.8	12	58.98
D2	198.5	6	33.08
E	368.4	3	122.80
F	732.7	11	66.61
G	333.6	7	47.66
H	21.3	3	7.10
I	232.0	5	46.40
J	67.5	4	16.88
K	391.7	7	55.96
L	511.7	9	56.86
M	351.3	9	39.03
N	155.7	5	31.14
O	507.7	6	84.62
全长 Full length/cM	6800.8	136	50.01

2.4 大豆维生素 E 各组分的 QTL 分析

采用复合区间作图法对三地的 RIL 群体进行 α -、 γ -、 δ -生育酚和维生素 E 总含量进行 QTL 分析。在哈尔滨共发现 4 个 α -生育酚 QTL、2 个 γ -生育酚 QTL、1 个 δ -生育酚和 1 个维生素 E 总含量 QTL;在

呼兰共发现 4 个 α -生育酚 QTL、2 个 γ -生育酚 QTL、2 个 δ -生育酚和 1 个维生素 E 总含量 QTL;在绥化共发现 2 个 α -生育酚 QTL、4 个 γ -生育酚 QTL、1 个 δ -生育酚和 4 个维生素 E 总含量 QTL。具体信息详见表 2。

表 2 大豆种子 α -、 γ -、 δ -生育酚及 V_E 总含量相关的 QTL 定位

Table 2 QTL tagging of soybean seed α -、 γ -、 δ -tocopherol and total V_E content

地点 Site	性状 Trait	位点 QTL	连锁群 LG	标记区间 Marker interval	QTL 位置* Position* /cM	LOD	加性效应 Addictive effect	贡献率 R ² /%
哈尔滨 Harbin	α -	qha- α -1	D1b	satt542 ~ satt266	15.02	3.11	-14.52	41.78
		qha- α -2	D1b	satt266 ~ satt274	14.02	2.68	-14.68	41.87
		qha- α -3	K	satt617 ~ sat087	1.37	2.48	5.88	7.96
		qha- α -4	N	sat239 ~ satt022	6.08	2.04	-6.42	10.05
	γ -	qha- γ -1	G	sat327 ~ satt303	0.01	3.63	23.51	10.19
		qha- γ -2	K	satt617 ~ sat087	43.38	2.38	47.83	47.37
	δ -	qha- δ -1	A2	satt424 ~ sat097	0.14	2.17	0.65	8.34
	V_E	qve-ha-1	N	sat239 ~ satt022	0.10	2.44	-32.89	7.22
呼兰 Hulan	α -	qhu- α -1	C2	satt286 ~ satt643	0.01	6.26	-5.30	16.72
		qhu- α -2	L	sat199 ~ satt664	19.75	4.17	-6.67	28.58
		qhu- α -3	N	satt152 ~ sat239	13.09	3.17	-5.87	23.48
		qhu- α -4	N	sat239 ~ satt022	10.10	2.92	-4.83	15.80
	γ -	qhu- γ -1	C2	satt371 ~ sat062	0.02	2.52	-15.64	7.14
		qhu- γ -2	D1b	satt546 ~ satt041	2.02	2.23	15.24	6.94
	δ -	qhu- δ -1	D1a	sat110 ~ satt580	0.01	2.68	-10.35	7.62
		qhu- δ -2	D1b	satt546 ~ satt041	4.40	2.08	9.85	7.46
	V_E	qve-hu-1	N	sat239 ~ satt022	0.10	2.10	-37.06	13.87
绥化 Suihua	α -	qsu- α -1	A2	satt177 ~ satt133	8.01	2.69	-3.68	12.67
		qsu- α -2	M	satt150 ~ satt245	11.78	3.04	5.12	21.02
	γ -	qsu- γ -1	D2	sat362 ~ satt154	4.01	2.49	-16.45	9.40
		qsu- γ -2	L	satt561 ~ satt527	0.02	2.24	13.39	6.09
		qsu- γ -3	L	satt527 ~ satt076	4.02	2.27	15.05	7.93
		qsu- γ -4	M	satt567 ~ satt150	4.02	2.45	15.70	8.51
	δ -	qsu- δ -1	M	satt567 ~ satt150	5.79	2.17	11.22	8.10
		qve-su-1	A2	satt177 ~ satt133	4.00	3.11	-30.98	11.25
	V_E	qve-su-2	D1b	sat169 ~ satt579	0.10	2.53	25.02	7.08
		qve-su-3	D2	sat362 ~ satt154	0.10	2.66	-25.19	6.95
		qve-su-4	M	satt150 ~ satt245	10.00	2.09	30.1814	10.02

* 距标记区间中第一个标记的距离。

* Distance from the first marker listed in marker interval.

2.5 大豆维生素 E 分子标记辅助育种

这些标记定位在 N 连锁群上,将它们映射到公共图谱,通过元分析整合出一致性 QTL(图 2)。它们位于 N 连锁群 Sat239 ~ Satt022,将这两个标记对大豆基因组序列进行 blastn 分析。截取基因组序列进行 SSR 分析,并根据 SSR 在这段序列上的分布,选取其中 9 个能将这段序列平均分成 10 段的简单

重复序列,设计引物进行扩增。经过筛选后发现新开发的 16 个 SSR 标记中有 3 个在亲本间扩增具多态性,分别是 GmSSR01、GmSSR13 和 GmSSR14,这 3 个标记在群体上进行验证,多态性良好。从该图谱上可看出在 Sat239 ~ Satt022 区间,插入 3 个新标记,这 3 个标记把该区间分成 4 个区段,这对大豆高维生素 E 分子辅助育种是很有帮助的。

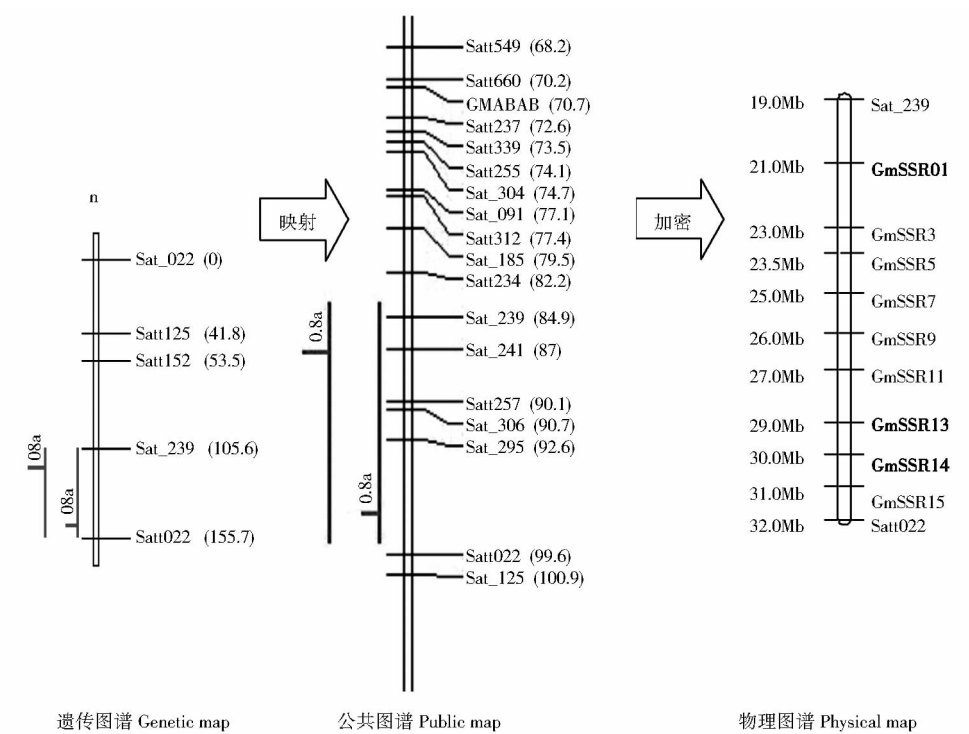


图 3 大豆维生素 E (Sat239 ~ Satt022) 精细定位

Fig. 3 Fine mapping of interval (Sat239-Satt022) related to V_E in soybean

比较三地的标记发现 Satt617、Sat239、Satt546、Satt177、Satt150、Sat362 这 6 个标记位点重复出现, 进行分子辅助选择, 与 F_7 代 RIL 群体农艺性状相结

合进行选择。由表 3 可知, 大豆高维生素 E 的优良品系有 11 个, 品系号为 4、29、37、52、54、114、144、122、135、104 和 120。

表 3 合丰 25 × Bayfield 高维生素 E 品系的选择

Table 3 Selection for high V_E lines in Hefeng 25 × Bayfield F_7 RIL population

品系 Line	δ -生育酚 $\delta\text{-}V_E/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	γ -生育酚 $\gamma\text{-}V_E/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	α -生育酚 $\alpha\text{-}V_E/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	V_E 总含量 Total content/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	百粒重 100-seed weight/g	蛋白含量 Protein content/%	油分含量 Oil content/%
4	154.80	264.41	61.74	480.95	16.95	41.7	21.2
29	142.09	250.74	45.90	438.73	17.48	42.3	20.7
37	84.63	227.32	54.36	366.31	22.70	45.2	20.7
52	103.83	276.25	57.71	437.80	17.50	42.4	21.3
54	94.15	279.58	77.53	451.26	20.09	41.2	21.4
144	149.19	224.42	50.60	424.21	13.76	37.0	20.2
114	206.21	250.29	33.31	489.81	16.16	39.2	20.3
122	83.20	340.61	61.28	485.09	20.69	40.8	21.2
135	97.87	283.84	74.31	456.02	15.74	42.9	20.7
104	96.31	309.93	71.82	478.05	16.94	40.6	21.4
120	98.50	228.94	97.62	425.07	21.52	39.5	21.5

3 结论与讨论

3.1 遗传图谱的分析

大豆种子 α -、 γ -、 δ -生育酚及维生素 E 总含量相关的 QTL 定位在 10 个连锁群上。用 800 对 SSR 引

物对父母本进行多态性筛选, 其中 157 对引物存在多态性, 但是只有 136 对引物定位到连锁图谱上。总体来看, 定位到图谱上的标记较少, 分子标记间距较大, 有待进一步加密。

3.2 维生素 E 含量 QTL 分析

在所定位到的 28 个与维生素 E 主要组分相关的 QTL 中,有 2 个标记在多环境下均被检测到。一个是在哈尔滨和呼兰两地点都有的 qha- α -4 和 qhu- α -4 都位于 N 连锁群上,标记在 Sat239 ~ Satt022 区间,qha- α -4 在图谱中的位置与标记 Sat239 的遗传距离为 6.08 cM,qhu- α -4 在图谱中的位置与标记 Sat239 的遗传距离为 10.1 cM。2007 年 Maria 得出的结论是 α -生育酚含量标记在 K 连锁群上的 Sat243 ~ Sat167 区间,这与本实验有明显的差别,可能的原因是所选亲本不同。

另一个相同标记是在哈尔滨和呼兰两地,发现的 qve-ha-1 和 qve-hu-1 均与维生素 E 含量相关,且都位于 N 连锁群上,标记区间也都是在 Sat239 ~ Satt022。二者在图谱中的位置与标记 Sat239 的遗传距离都为 0.1 cM。

因此,该标记可能是控制维生素 E 的主要 QTL,其作用在分子标记辅助育种中得到了证实。

3.3 分子辅助育种

通过分子标记和常规育种选择相结合的方法筛选出 11 个性状优良的品系,其中维生素 E 含量大于 $450 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的优良品系有 4、54、114、122、135 和 104。结合植株的农艺性状,筛选出综合性状最优品系为 122,它具有较高的维生素 E 含量,百粒重为 20.69 g,蛋白含量 40.8%,油分含量 21.2%。这为维生素 E 分子辅助育种提供了依据。

参考文献

- [1] Lee H J, Ju J, Paul S, et al. Mixed tocopherols prevent mammary tumorigenesis by inhibiting estrogen action and activating PPAR- γ [J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15: 4242-4249.
- [2] Li Z, Keasling J D, Niyogi K K. Overlapping photoprotective function of vitamin E and carotenoids in *Chlamydomonas* [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(1): 313-323.
- [3] 刘雅南,刘宁,刘涛,等. 维生素 E 酯类衍生物的合成研究及发

展现状[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(18): 383-390. (Liu Y N, Liu N, Liu T, et al. Study on the synthesis and current situation of vitamin E esters derivatives [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(18): 383-390.)

- [4] 林延慧,张丽娟,李伟,等. 大豆蛋白质含量的 QTL 定位[J]. *大豆科学*, 2010, 29(2): 207-209. (Lin Y H, Zhang L J, Li W, et al. QTLs mapping related to protein content of soybeans [J]. *Soybean Science*, 2010, 29(2): 207-209.)
- [5] 苗兴芬,朱命喜,徐文平,等. 大豆脂肪酸含量的 QTL 分析[J]. *作物学报*, 2010, 36(9): 1498-1505. (Miao X F, Zhu M X, Xu W P, et al. QTL analysis of fatty acids contents in soybean [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(9): 1498-1505.)
- [6] 单大鹏,刘春燕,蒋洪蔚,等. 两种方法定位 5 个地点大豆蛋白含量 QTL[J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(1): 9-14. (Shan D P, Liu C Y, Jiang H W, et al. QTL analysis of soybean protein content using two methods in 5 different environments [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2011, 33(1): 9-14.)
- [7] 葛振宇,刘晓冰,刘宝辉,等. 大豆种子蛋白质和油份性状的 QTL 定位[J]. *大豆科学*, 2011, 30(6): 901-905. (Ge Z Y, Liu X B, Liu B H, et al. QTL mapping of protein and oil content in soybean [J]. *Soybean Science*, 2011, 30(6): 901-905.)
- [8] 张晶莹,葛一楠,孙君明,等. 多环境条件下大豆异黄酮主要组分的 QTL 定位[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(19): 3909-3920. (Zhang J Y, Ge Y N, Sun J M. Identification of QTLs for major isoflavone components among multiple environments in soybean seeds [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(19): 3909-3920.)
- [9] 姚丹,王丕武,张君. 大豆脂肪含量遗传分析及 QTL 定位研究[J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(4): 438-443. (Yao D, Wang P W, Zhang J, et al. Inheritance analysis and mapping QTL on fat content trait in soybean [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2012, 33(4): 438-443.)
- [10] Feng F Q, Deng F, Zhou P, et al. QTL mapping for the tocopherols at milk stage of kernel development in sweet corn [J]. *Euphytica*, 2013, 193: 409-417.
- [11] Haddadi P, Ebrahimi A, Langlade N B, et al. Genetic dissection of tocopherol and phytosterol in recombinant inbred lines of sunflower through quantitative trait locus analysis and the candidate gene approach [J]. *Molecular Breeding*, 2012, 29: 717-729.