

# 大豆亚麻酸含量的 QTL 分析<sup>\*</sup>

杨 柳 张彬彬 韩英鹏 李文滨

(东北农业大学大豆研究所, 教育部大豆生物学重点实验室, 哈尔滨 150030)

**摘要** 由于亚麻酸的高度不饱和性, 导致大豆油的稳定性和耐贮性降低, 并严重影响豆奶的商品价值。因此降低大豆种子亚麻酸含量是当今大豆育种的一个重要目标。本研究利用正常亚麻酸含量的品种合丰 25 与亚麻酸含量仅为 3% 的突变品系 L-14 杂交所得的 F<sub>2</sub> 代和 F<sub>3</sub> 代群体, 对 500 多对 SSR 引物进行筛选, 共有 90 个 SSR 标记被分配到 1999 年 Cregan 定义的 20 条染色体中, QTL 分析表明有 3 个分子标记 Satt066、Satt424、Satt476 与大豆亚麻酸含量密切相关, 分别定位在连锁群 MLG B2、MLG A2、MLG C1 上, 且变异贡献率分别为 8.7%、4.99% 和 5.3%。并用这些分子标记对 F<sub>3</sub> 代家系进行了验证。

**关键词** 大豆; 亚麻酸含量; SSR 标记; QTL; 遗传贡献率

**中图分类号** S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)03-0270-05

大豆脂肪酸的组成, 特别是亚麻酸含量的高低, 决定着品种作为食用油的價值。由于亚麻酸(C 18:3)的高度不饱和性, 易使油质氧化变劣, 在贮存过程中豆油常常变成青绿色, 产生怪味, 造成豆油及其食品食味不佳, 营养价值下降, 甚至有毒性。因此, 提高大豆种子优异脂肪酸含量, 降低亚麻酸含量, 就成为生理学家、营养学家和育种学家密切关注的问题, 同时也成为世界主要大豆生产国大豆油脂品质生化育种的热点课题。

种子油份中亚麻酸的遗传受多基因控制(White 等, 1961; Martin, 1983; Graef, 1988), 并且受环境影响较大, 采用传统育种方法进展缓慢, 而寻找可靠的分子标记来选择低亚麻酸品系是有效的育种方法。在育种实践过程中利用分子标记对重要农艺性状进行辅助选择, 能够有效提高育种效率。DNA 标记已经成为针对遗传复杂性状、环境敏感性状以及测定昂贵的生化性状选择的一种有效的分子辅助育种手段。

目前, 关于大豆油份和蛋白质含量的分子标记研究报道较多(Brummer 等, 1997; Diers 等, 1992), 但有关亚麻酸遗传标记的研究非常少, 特别是利用杂交后代群体发掘与低亚麻酸含量相关的 QTL 报道甚少, 尤其在我国未见报道。

本研究分析了大豆杂交后代亚麻酸含量的遗传变异规律, 重点利用 SSR 分子标记技术, 研究与低亚麻酸含量相关的 QTLs, 目的是为利用分子辅助育种手段培育低亚麻酸大豆品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究选用高亚麻酸含量品种合丰 25(7.5%) 和低亚麻酸突变系 L-14(2.7%) 进行杂交, 利用自交所得 68 个 F<sub>2</sub> 代群体做 QTL 分析, 并用得到的与大豆亚麻酸含量显著相关分子标记对 217 株 F<sub>3</sub> 代家系材料进行验证。

F<sub>2</sub> 代群体材料于 2004 年冬季种植于东北农业大学香坊实验站温室内, 采用盆栽种植, 于 2005 年春季收获种子并测定脂肪酸含量。然后选择 F<sub>2</sub> 代高亚麻酸含量和低亚麻酸含量的种子于 2005 年种植于室外, 同年秋季收获。

### 1.2 大豆种子亚麻酸含量的测定

大豆种子脂肪酸含量采用气相色谱法脂肪酸甲酯化法测定, 因油料作物中的脂肪酸多以甘油酯的形式存在不宜采用气相色谱法测定, 但在氢氧化钾

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2006-04-04

作者简介: 杨柳(1981-), 女, 硕士, 研究方向大豆生物技术。

通讯作者: 李文滨, E-mail: wenbinli@yahoo.com

– 甲醇溶液中室温可迅速酯化为脂肪酸甲酯, 可通过测定脂肪酸甲酯间接测定脂肪酸含量。本实验采用日本岛津 GC-14C 型气相色谱仪分析。

气谱条件为: 进样口温度为 250℃; 检测器温度为 250℃; N<sub>2</sub> 流速为 1.4ml/min; 分馏比为 30:1; 柱温 150℃。程序升温为 150℃保持 1min, 10℃/min 的速率升至 200℃, 保持 20min。

色谱图结果计算按峰面积归一化法由气谱工作站 N3000 完成。

1.3 叶片总 DNA 提取

采用改进的 CTAB 法提取叶片总 DNA (Keim 等, 1988)。

1.4 SSR 反应

SSR 引物来源: 根据 Soybase 网址 (<http://129.186.26.94/>) 提供的 SSR 引物序列, 由上海博亚生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系: 反应总体积为 20μl, 反应液包括 2μl 模板 DNA (25ng/μl), 2μl 10×PCR 缓冲液, 1.5μl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2.0μl SSR 引物 (10ng/μl), 0.2μl dNTP (10mM), 0.2μl Taq 酶 (5units/ul), ddH<sub>2</sub>O 补至 20μl, 液体石蜡覆盖。

PCR 扩增条件: SSR 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 36 次后在 72℃延伸 5min, 降温至 4℃保存。

聚丙烯酰胺凝胶电泳: PCR 产物加入 8μl 甲酰胺双色 Loading Buffer, 置于 PCR 仪中 94℃变性 5min, 放入冰水混合物中冷却。用 6% 的聚丙烯酰胺标准测序胶分离, 凝胶成分包括 6% 的聚丙烯酰胺、8mol/l 尿素、0.04% 过硫酸铵、0.1% TEMED, 电泳缓冲液 1×TBE, 在 100W 恒功率下电泳约 2hr, 用快速银染法对凝胶进行染色, 统计带型并照相。

1.5 数据整理和连锁分析

根据 SSR 标记的分析结果, 将各株系位点的带型和亲本相应位点的带型进行比较, 与母本合丰 25 带型有相同位点的基因型记为 A, 与父本 L-14 带型有相同位点的基因型记为 B, 双亲杂合带型为 H, 由于各种原因造成的带型不清楚或数据缺失的位点的基因型记为“-”。利用 Mapmaker/EXP3.0b (Lander, E. S. 等, 1987) 软件进行连锁分析, 用 Mapchart2.1 作图软件构建分子标记连锁图谱。用 Kosambi 函数将重组率转换成遗传距离 (centimorgan, cM)。QTL 分析采用 WinQTLCart2.1 完成。

2 结果与分析

2.1 遗传分析

采用气相色谱法测定亲本和 F<sub>2</sub> 代自交群体的亚麻酸含量, 结果如表 1 所示。后代群体的亚麻酸含量多数介于双亲之间, 少数存在超亲现象。其中最大值达到 9.331%, 大于母本合丰 25 (7.48%), 表现正向超亲的占 14.71%, 而最小值达到 2.466%, 小于父本 L-14 (2.662%) 的表现负向超亲的共占 1.47%, 说明 F<sub>2</sub> 代群体具有丰富的遗传变异, 是 QTL 定位的理想群体。

图 1 为 F<sub>2</sub> 代群体亚麻酸含量的概率密度分布图, 其趋势线基本呈连续平滑曲线, 接近正态分布, 且在 SAS 系统中, 采用 PROC UNIVARIATE 过程的 NORMAL 命令验证其正态性, 其中偏度 (Skewness = 0.11) 接近 0, F<sub>2</sub> 代群体亚麻酸含量分布基本上是无偏的, 峰度 (Kurtosis = -1.17) 不为 0, 所以 F<sub>2</sub> 代群体亚麻酸含量趋于轻尾的正态分布。可以证明亚麻酸的遗传为多基因控制的数量性状遗传

表 1 父母本及 F<sub>2</sub> 代群体五种主要脂肪酸含量的差异

Table 1 The variation of the contents of five main fatty acids in the two parents and F<sub>2</sub> population

	棕榈酸 Palmitic (%)	油酸 Oleic (%)	亚油酸 Linoleic (%)	硬脂酸 Stearic (%)	亚麻酸 Linolenic (%)
合丰 25	11.225	20.705	55.696	4.893	7.480
L-14	10.396	19.845	62.998	4.098	2.662
F <sub>2</sub> 群体最大值	12.145	23.137	64.694	6.248	9.331
F <sub>2</sub> 群体最小值	9.231	14.602	51.606	4.352	2.466
F <sub>2</sub> 群体平均值	10.561	18.938	59.725	5.173	5.628

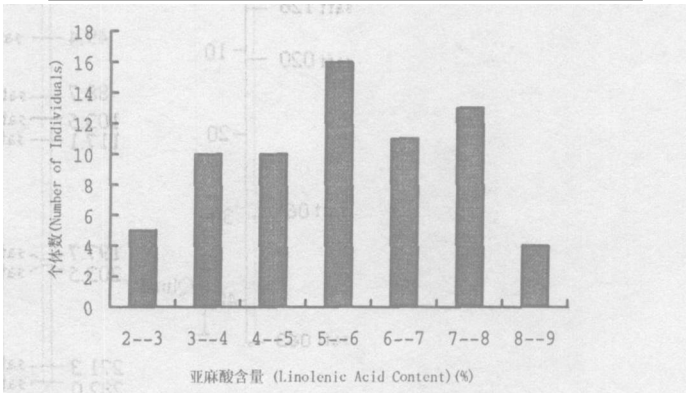


图 1 F<sub>2</sub> 代种子亚麻酸含量频率分布

Fig. 1 Frequency distribution of linolenic acid content of F<sub>2</sub> seeds ( Hefeng 25× L-14)

传。这与一些前人的研究结果相一致( WhiteH. B., 1961; Cherif 等, 1975; Hawkins 等, 1983)。

2.2 连锁分析

用 500 对 SSR 引物对父母本(L-14 和合丰 25)进行筛选, 其中 142 对引物存在多态性, 将这些

引物在 F<sub>2</sub> 代自交群体上扩增, 共有 91 个分子标记表现出良好的多态性。将 91 个标记用于连锁分析, 其中有 90 个 SSR 标记被分配到 1999 年 Cregan 定义的 20 条染色体中的 19 条上(见图 2)。19 个连锁群总长约为 2627cM, 分子标记间的平均距离为

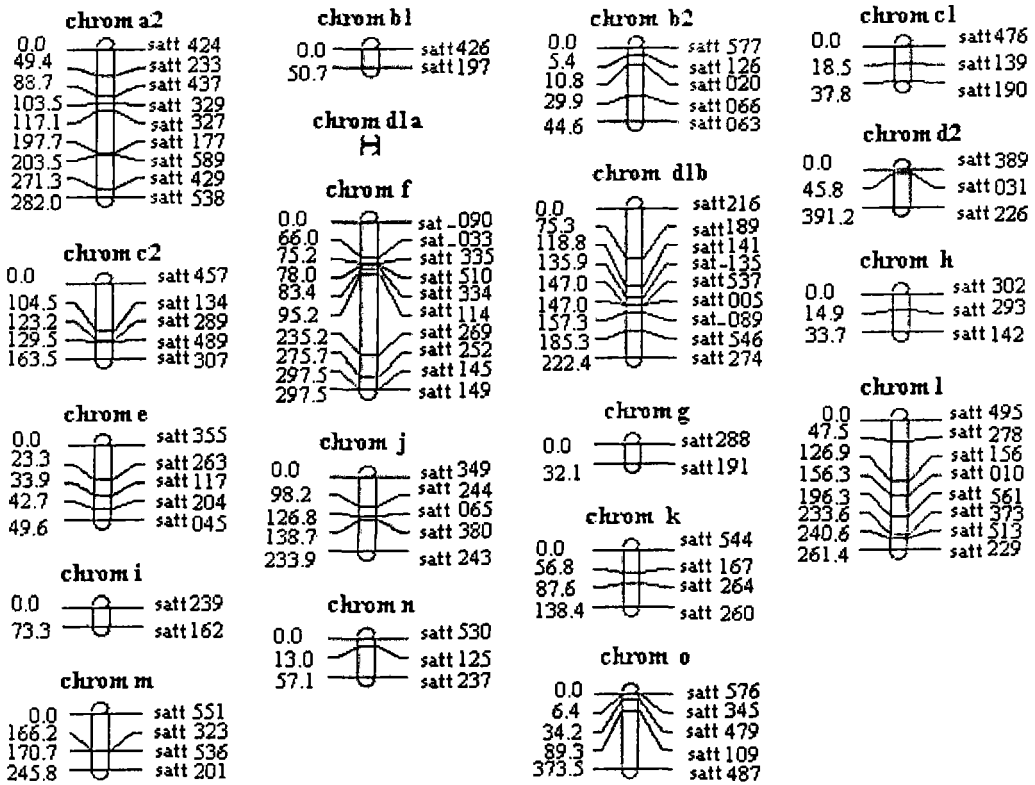


图 2 大豆遗传连锁图谱

Fig 2 Soybean genetic linkage map based on SSR markers using the F<sub>2</sub> population of Hefeng 25 X L 14  
注: 图中左侧数据为遗传距离, 单位为厘摩尔根

Note: The number displayed on the left side of the column is genetic distance (cM)

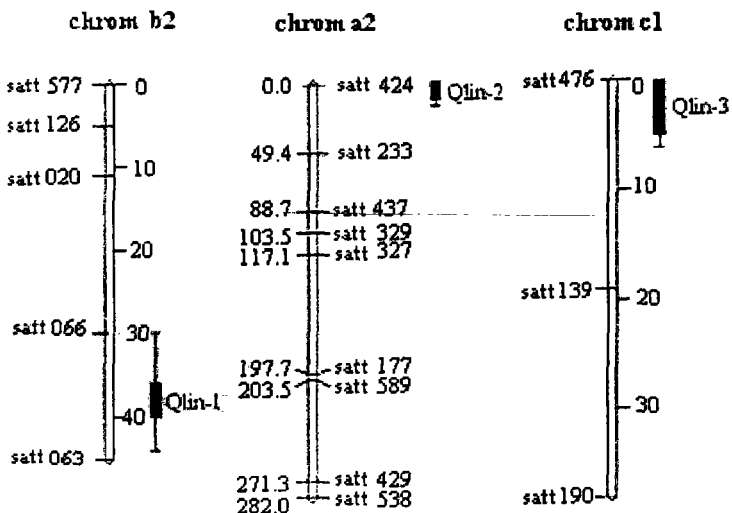


图 3 大豆低亚麻酸含量 QTL 定位

Fig 3 Mapping QTLs associated with low linolenic acid content of soybean

29.2 cM, 几乎覆盖整个染色体组。其中分子标记最多的一条染色体为 MLG F, 含有 10 个标记; 共有 16 个染色体组群只有 5 个以下的标记。其中分子标记主要集中在 MLG A2、MLG D1b+W、MLG F 和 MLG L 四个染色体组上, 共有 36 个分子标记, 占总数 40%, 可示为分子标记密集区。

2.3 大豆低亚麻酸含量 QTL 分析

当 LOD 值大于 2.0 时, 利用复合区间法检测 QTL, 经过 WinQTLCart 2.1 计算共鉴定出 3 个与大豆亚麻酸含量显著相关的 QTL (见图 3), 即: Q<sub>lin</sub> 1, Q<sub>lin</sub> 2 和 Q<sub>lin</sub> 3, 其对低亚麻酸含量的贡献率分别为 8.7%、4.99% 和 5.3%, LOD 值分别达到了 2.37、2.27、2.42。Q<sub>lin</sub> 1 定位在连锁群 MLG B2 上, 其与 SSR 标记 Satt066 的遗传距离是 6.1 cM; Q<sub>lin</sub> 2 定位在 MLG A2 上, 其与 SSR 标记 Satt424 的遗传距离是 0.01cM; Q<sub>lin</sub> 3 定位在连锁群 MLG C1 上, 其与 SSR 标记 Satt476 的遗传距离是 0.01cM (见表 2)。

表 2 与大豆底亚麻酸含量相关的 QTLs

Table 2 The QTLs associated with low linolenic acid content of soybean

连锁群 MLG	相关的分子标记 Associated molecular markers	LOD 值 LOD score	R <sup>2</sup> (%)
Q <sub>lin</sub> 1	B2 Satt066 – Satt063	2.37	8.7
Q <sub>lin</sub> 2	A2 Satt424 – Satt139	2.27	4.99
Q <sub>lin</sub> 3	C1 Satt476 – Satt589	2.42	5.3

注: R<sup>2</sup> 表示分子标记对亚麻酸含量的贡献率。

Note: R<sup>2</sup> is R square or the proportion of the phenotypic data explained by the marker locus.

2.4 F<sub>3</sub> 代 QTL 验证

本研究所检测出的三个分子标记 Satt066、Satt424、Satt476, 经 F<sub>3</sub> 代验证表明, 在高亚麻酸组的总准确率为 63.3%, 低亚麻酸组的总准确率为 70%, 具有一定选择准确性, 可以用于大豆低亚麻酸含量分子辅助选择育种 (见图 4)。

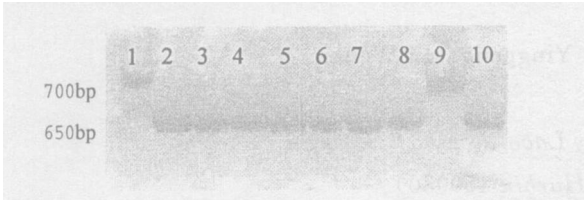


图 4 SSR 标记 Satt476 在 F<sub>3</sub> 代家系的验证结果

Fig 4 The SSR markers Satt476 tested in F<sub>3</sub> progeny

1: 母本 2: 父本 3~10: F<sub>3</sub> 家系内低亚麻酸含量材料

1: female 2: male 3~10: low linolenic content

materials in F<sub>3</sub> progeny

3 讨论

3.1 大豆亚麻酸含量后代遗传和连锁图分析

选择合适的双亲材料是创建理想做图群体的关键之一。本研究所用的组合是高亚麻酸含量品种合丰 25 (亚麻酸含量 7.48%) 和低亚麻酸含量突变系 L-14 (亚麻酸含量 2.66%) 进行杂交所衍生的 F<sub>2</sub> 代群体。F<sub>2</sub> 代群体单株的亚麻酸变异范围较大 (见表 1, 图 1), 亚麻酸含量变异范围为 2.466% ~ 9.331%。正态性验证结果表明, 该群体分布偏度 (Skewness = 0.11) 接近 0, 群体亚麻酸含量分布基本上是无偏的, 但峰度 (Kurtosis = -1.17) 不为 0, 所以 F<sub>2</sub> 代群体亚麻酸含量趋于轻尾的正态分布, 是适合品质性状作图群体。本实验证明亚麻酸的遗传为多基因控制的数量性状遗传, 这与前人的研究结果相一致 (White H. B., 1961; Cherif 等, 1975; Hawkins 等, 1983)。本研究所得到的 90 个 SSR 分子标记被分配到 1999 年 Cregan 定义的 20 条染色体的 19 条上, 总长约为 2627cM, 分子标记间的平均距离为 29.2 cM, 几乎覆盖整个染色体组。其中分子标记最多的一条染色体为 MLGF, 包括 10 个标记。共有 16 个染色体组群只含有 5 个以下的标记。本研究所得到的图谱分子标记间隙很大, 须采用不同分子标记形式进行图谱加密, 以构建高饱和的遗传图谱。另外, 由于初次尝试在冬季温室种植, 种子出苗率较低, 造成 F<sub>2</sub> 代群体相对较小, 可能对遗传图谱的精确性有一定影响。

3.2 亚麻酸含量的 QTL 分析

关于大豆油份和蛋白质含量的分子标记研究报道较多, 但有关亚麻酸含量遗传标记的研究非常少。利用后代杂交群体, 发掘与低亚麻酸含量相关的 QTL 报道甚少, 尤其在未见报道。而在其它作物上有相关报道。在大豆上, Brummer 等在 1995 年用 L1640 品系将控制低亚麻酸的 fan 基因定位在 B2 连锁群上。本研究在连锁群 MLG B2 中检测到一个 QTL, 相关的 Satt066 标记位点是否与 fan 基因有关尚有待进一步研究。关于低亚麻酸的 QTL 研究在油菜中报道较多。Rajcan 等在 1999 年利用 DH 群体得到与油菜亚麻酸和芥子酸相关的两个 RAPD 标记: RM350 and RM574, 共解释 39% 的遗传变异。D. J. Somers 等 1998 年利用高低亚麻酸品系杂交得到的双单倍体, 应用 RAPD 技术, 得到 6 个与亚麻酸含量相关的标记, 分布在三个连锁群上, 分别解释 32%、14% 和 5% 的遗传变异, QTL

分析表明,这三个位点共解释 51% 的遗传变异。Pirjo Tanhuanpää 和 Alan Schulman 在 2002 年利用 F<sub>2</sub> 代群体共得到 27 个与亚麻酸含量相关的 RAPD 标记,分布于三个连锁群,三个 QTL 共解释 73.5% 的遗传变异。并将 fad3 基因定位于一个 QTL 附近,控制 23.5% 的变异。而本研究得到的其它 2 个分子标记 Satt424 和 Satt476 与大豆亚麻酸含量显著相关,变异贡献率分别为 4.99% 和 5.3%。如前所述,本实验 F<sub>2</sub> 代群体相对较小,但从遗传分布图可见,大豆亚麻酸含量遗传基本符合正态分布,说明该群体遗传信息量具有一定代表性,但也不能排除小群体对 QTL 分析结果的影响。所以我们正在繁育该杂交组合的大群体,计划在遗传变异稳定后,进一步通过多年多点实验,发掘具有广泛辅助选择指导意义的 QTL。

### 3.3 检测出的分子标记对 F<sub>3</sub> 高世代选择的指导作用

本研究检测出的与低亚麻酸显著相关的分子标记在 F<sub>3</sub> 代的分析表明,这 3 个标记检测高亚麻酸含量材料的准确率为 63.3%,检测低亚麻酸含量材料的准确率为 70%。说明本研究所获得的 QTL 对于辅助选择低亚麻酸含量大豆材料具有一定指导意义,可以用于新品种选育,加快育种进程和提高育种效率。

## 参 考 文 献

- 1 王金陵,杨庆凯,吴宗璞.中国东北大豆[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1999:298-314
- 2 王金陵.大豆[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1982:1-2
- 3 鲁振明.大豆低亚麻酸种质的遗传与选育[J].大豆通报,1999,4:16
- 4 马淑英,梁歧.大豆籽粒发育过程中脂肪酸的组分分析[J].大豆科学,1999,18:124-128
- 5 朱军.数量性状遗传分析的新方法及其在育种中的应用[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(1):1-6
- 6 胡明祥.我国大豆品种脂肪酸组成的分析研究[J].吉林农业科学,1986,(1):12-17
- 7 陈霞.黑龙江省主栽大豆品种脂肪、脂肪酸组分的测定及其相关性的分析[J].大豆科学,1996,15(1):91-95
- 8 裴东红.降低大豆籽粒中亚麻酸含量的研究进展[J].大豆科学,1995,14(3):255-259
- 9 姚振纯.大豆脂肪酸组分与改良[J].大豆通报,1997,(1):14
- 10 刘丽君.大豆亚麻酸的生化合成和调控[J].大豆通报,1993,(3):16-17
- 11 S. M. Rahman, Y. Takagi. Inheritance of reduced linolenic acid content in soybean seed oil[J]. Theor Appl Genet, 1997: 299-302
- 12 I. Rajcan, K. J. Kasha, L. S. Kottl, et al. Detection of molecular markers associated with linolenic and erucic acid levels in spring rapeseed [M]. Kluwer Academic Publishers, 1999: 173-181
- 13 D. J. Somers, K. R. D. Friesen, G. Rakow. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in Brassica napus[J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 897-903
- 14 P. B. Cregan, T. Jarvik, A. L. Bush et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome[J]. Crop Sci, 1999, 39: 1464-1490
- 15 Zenglu Li, Richard F. Wilson et al. Molecular mapping genes conditioning reduced palmitic acid content in N87-2122-4 soybean [J]. Crop Sci., 2002, 42: 373-378
- 16 Brummer, E. C., A. D. Nickell, J. R. Wilcox, et al. Mapping the Fan locus controlling linolenic acid content in soybean[J]. Crop Sci. 1995, 34: 829-833
- 17 Keim, P., T. C. Olson, R. C. Shoemaker. A rapid protocol for isolating soybean DNA[J]. Soybean Genet. Newsl. 1988, 15: 150-152
- 18 Zhu H, Hayes P, Kleinhofs A, Kudrna D et al Does function follow form principal QTLs for fusarium head blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled haploid population of barley[J]. Theoretical and Applied Genetics. 1999. 99(7-8): 1221-1232

## QTL ANALYSIS OF LINOLENIC ACID CONTENT IN SOYBEAN

Yang Liu Zhang Binbin Han Yingpeng Li Wenbin

(Soybean Research Institute of NEAU, Key Laboratory of Soybean Biology,  
Ministry of Education, Harbin 150030)

**Abstract** Linolenic acid is the unstable component of soybean oil that is responsible for a shortened shelf life of the oil and commercial value of soybean milk. Therefore, the breeding objective to reduce linolenic acid levels in soybean oil is very important. In the present study, F<sub>2</sub> progeny segregating(下转第 278 页)

*Gus* 染色和 PCR 检测, 从 1200 粒转化当代种子中可以筛选到 2 株阳性植株, 表明 400ppm 卡那霉素能有效抑制东农 46 非转化体幼苗的生长, 用其对东农 46 大豆转基因后代进行筛选是完全可行的, 同时还可以大大提高花粉管通道法转化当代种子筛选工作效率。

## 参 考 文 献

1 周思君. 大豆抗虫基因转移及其转化系统优化研究[D]. 东北农业大学博士论文, 2000. 1.

- 2 雷勃钧. 外源 DNA 直接导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 1991, 10 (1): 58 - 63.
- 3 袁鹰, 刘德璞, 王玉民, 等. 卡那霉素对大豆生长的抑制及筛选试验研究[J]. 大豆科学, 2003, (4): 62 - 67.
- 4 黄培堂译《分子克隆实验指南》[M]. 北京: 科学出版社.
- 5 胡张华, 黄锐之, 刘智宏, 等. 利用花粉管导入法获得转反义 PEP 基因大豆植株[J]. 浙江农业学报, 1999, 11(2): 99 - 100.
- 6 雷勃钧, 尹光初, 王树林, 等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆引起的变异[J]. 中国油料, 1989, 3: 11 - 14.
- 7 徐香玲, 邹联沛, 刘伟华, 等. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究[J]. 大豆科学, 1999, 18(2): 101 - 108.

## THE STUDY ON THE SCREENING OF TRANSGENE SOYBEAN BY WAY OF POLLEN TUBE USING KANAMYCIN

Xu Pengfei<sup>1</sup> Zhang Shuzhen<sup>1</sup> Wu Junjiang<sup>2</sup> Han Yingpeng<sup>1</sup> Zhang Dayong<sup>1</sup>  
Li Wenbin<sup>1</sup> Yang Chuanping<sup>3</sup>

(1. *Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030;*

2. *Heilongjiang Acadeng of Agricultural Sciences, Harbin 150086;*

3. *North east Forestry University, Harbin 150040)*

**Abstract** Kanamycin was used to screen T<sub>0</sub> seeds of transgene Dongnong 46 by way of pollen tube. The results showed that 400ppm kanamycin could inhibit growth of non transgene plants, and positive plants could be gotten using *Gus* and PCR detection. It was proved that this method was economic and effective in screening the transgene plants.

**Key words** Soybean; Pollen tube way; Kanamycin

(上接第 274 页)

from a cross between Hefeng 25, a soybean cultivar with normal linolenic content, and L-14, a soybean mutant line with only 3% linolenic acid, were used to screen over 500 SSR markers. A total of 90 SSR markers were distributed in twenty linkage groups developed by Cregan et al. (1999). QTL analysis showed that three SSR markers Satt066, Satt424, Satt476 were relevant to low linolenic acid, which were distributed in three linkage groups: MLG B2, MLG A2, MLG C1, respectively. The three QTLs accounted for 8.7%, 4.99% and 5.3% of the phenotypic variation in linolenic acid level in this population, respectively. These markers have been tested on F<sub>3</sub> generation.

**Key words** Soybean; Linolenic acid content; SSR marker; QTL