

大豆亚麻酸相关基因的标记与验证

刘丽君,薛永国,赵贵兴,张 雷

(黑龙江省农业科学院大豆研究所,哈尔滨 150086)

摘要 大豆油脂组分决定着大豆品质和加工特性,其中亚麻酸含量关系到大豆油加工的成本和大豆油的品质特性。以哈 89016 和黑河 18 作为杂交亲本创造遗传群体,利用 BSA 方法,找到与亚麻酸含量相关的标记 Satt286,根据 Satt286 在大豆杂交后代群体中的池子个体带型和表型性状,计算得到控制亚麻酸位点的引物 Satt286 与控制低亚麻酸的基因连锁。分析结果表明,控制亚麻酸的位点和引物距离 9.5cM;t-测验分析 Satt286 引物标记分组的高、低亚麻酸个体的实际亚麻酸含量,得到的平均值分别为 3.91% 和 6.36%,二者差异达到极显著水平,说明 Satt286 引物作为筛选低亚麻酸品种的标记是有效的。在哈 89016 和黑河 18 后代(F_4)群体中挑选出亚麻酸含量最低个体 13 个和最高个体 9 个,这些个体的带型和表型性状对亚麻酸含量控制基因符合率为 82%,这表明引物 Satt286 与控制亚麻酸的基因是真实连锁的,可以作为群体后代的筛选标记。利用实时定量荧光 PCR 技术分析了大豆哈-89016 和黑河 18 品种亚麻酸相关基因 *Fad3c* 的基因表达量,结果表明,在发育的籽粒中,低亚麻酸品种哈-89016 的 *Fad3c* 的基因转录量明显低于黑河 18,证实了大豆亚麻酸 *Fad3c* 基因的表达式与品种亚麻酸含量的高低有关。

关键词 大豆;亚麻酸;分子标记

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)06-0847-06

MAPPING AND VERIFICATION OF GENES RELATED TO LINOLENIC ACID CONTENT IN SOY-BEAN

LIU Li-jun, XUE Yong-guo, ZHAO Gui-xing, ZHANG Lei

(*Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086*)

Abstract Oil composition is one of critical factors affecting the qualities and processing properties of soybean, and linolenic acid content is closely related to the processing cost and qualities of soybean oil. In the experiment, Ha 89016 and Heihe 18 were used as parents to develop F_2 generations, and bulked segregant analysis (BSA) method was adopted to detect SSR markers conferring linolenic acid content. Satt286 was found to closely link with genes controlling linolenic acid content, with a genetic distance of 9.5 cM. The average content of lower and higher linolenic acid individuals differentiated by Satt286 was 3.91% and 6.36%, respectively, and their difference reached 0.01 significant level. From the filial 4 generation of hybridization between H89016 and Heihe 18, 13 individuals with lower linolenic acid content and 9 with higher linolenic acid content were selected and the accuracy between molecular marker

收稿日期:2007-07-18

基金项目:国家 863 项目(2006AA1021F9);国家 973 项目(2002CB111300)

作者简介:刘丽君(1958-),女,研究员,从事大豆遗传育种及栽培学研究。E-mail:nkyssbd@126.com

and phenotypic value of each individual reached 82% ,which confirmed the primer Satt286 closely linked with genes controlling linolenic acid content and could be used to select individuals differed in linolenic acid content. The expression level of gene *Fad3c*, which was related to linolenic acid content, were analyzed by real-time quantitative PCR method between soybean Ha 89016 (lower linolenic acid content) and Heihe 18 (higher linolenic acid content) , and results showed the transcription rate of Ha-89016 was significantly lower than that of Heihe18, which further confirmed that the expression level of the *Fad3c* gene was related to the final linolenic acid content in different soybeans.

Key words Soybean; Linolenic acid; Molecular marker

大豆是我国重要的油料、粮食作物之一,也是重要的工业原料,大豆油脂组分是决定大豆油加工成本和品质的重要指标,关系到油脂的贮藏和风味。一般大豆品种的种子含油量约为 18% ~ 22% ,其中脂肪酸含量的组成分别是 11.73% 的棕榈酸(16: 0) 3.29% 的硬脂酸(18: 0) 21.81% 的油酸(18: 1) 54.16% 的亚油酸(18: 2) 以及 8.98% 的亚麻酸(18: 3)。它们有不同的熔点、氧化稳定性和化学功能。作为不同用途的大豆,对脂肪酸组分比例要求不同。大豆脂肪酸中的亚麻酸在分子结构上,由于具有三个不饱和双键,因而易于氧化使油质变劣。亚麻酸含量的高低是影响大豆油脂贮藏稳定性的重要原因,在贮藏过程中大豆油的颜色常常变成青绿色,导致大豆油食味不佳。其主要原因是由于油脂中亚麻酸含量高的缘故。因此,降低大豆脂肪酸组分中的亚麻酸含量一直是大豆品质育种的一个重要指标,也是大豆品质改良研究中的一个重要课题^[1]。国内外学者相继在大豆脂肪酸遗传、脂肪酸的组分形成关系上进行了研究找到了低亚麻酸的突变体,在大豆突变体中发现了一个与低亚麻酸密切相关的标记 FAD3A,研究表明 FAD3 在种子发育中高量表达,相应的亚麻酸含量就高。

分子标记辅助育种和传统育种相结合的育种方式正发展成为一种快速高效的育种手段^[2-4]。本文针对大豆亚麻酸的形成以及相关基因的标记研究,利用荧光定量 PCR 技术、SSR 引物和 BSA 方法,得到大豆亲本亚麻酸相关基因 *Fad3c* 表达的差异,以及后代与亚麻酸相连锁的分子标记,为分子标记辅助育种,加快育种进程,创制低亚麻酸品种(系)奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑河 18 和哈 89016 及其杂交得到 F₂ 代植株,共

272 株,其中亲本哈 89016 为辐射变异低亚麻酸材料,亚麻酸含量为 3.75% ,黑河 18 为普通大豆品种,亚麻酸含量为 6.14% 。

1.2 方法

1.2.1 亚麻酸的测定测定 F₂ 代的植株籽粒按株收获考种,采用仪器采用日本日立 163 型气相色谱仪测定亚麻酸含量,色谱图采用面积归一化法处理,平行样品测 3 次,平行样的准确度差别标准小于 1% 为有效数据,取平均值。

1.2.2 大豆亚麻酸相关基因的分子标记 DNA 的提取:采用氯仿/异戊醇法;池子混合和引物筛选:将检测的 F₂ 群体的亚麻酸含量按照从少到多排序,分别取亚麻酸含量最低和最高的极端值各 10 个 DNA 样本,等量混合组成高亚麻酸 DNA 池子(H)和低亚麻酸 DNA 混合池子(L),然后用引物在池子和亲本间进行 PCR 检测,筛选分别在亲本和池子间都存在多态性,而且亲本哈 89016 和 L 池子带型一致,亲本黑河 18 和 H 池子带型一致的阳性引物。引物的定位和连锁性分析:将阳性引物在小群体(即池子群体)中展开,统计分析;然后在 F₂ 代的大群体中展开,统计分析相关带型分布,以及和表型的对应关系,分析引物和基因的相关性。用极大似然法计算标记基因和目标基因间的重组率, $c = (N1 + N2)/N$, 其中 N 为个体总数, N1 为重组低亚麻酸个体数, N2 为高亚麻酸重组的个体数。

1.2.3 引物准确性验证 将按照连锁引物带型分成的两组植株亚麻酸实际含量进行 t 测验分析,进行差异显著性分析。将得到的与亚麻酸相关的阳性引物,在亚麻酸群体的后代(F₄代)中展开,即低亚麻酸含量 < 2% 的个体和高亚麻酸含量 ≥ 10% 个体中展开,统计带型和亚麻酸表型性状的符合情况。

1.2.4 大豆 FAD3C 基因的表达测定 RNA 的提取步骤。裂解:将约 0.1 g 叶片材料放入预冷的研钵中,加入液氮,迅速研磨成碎末,加入 1 mL 的 Trizol,室温放

置,待 Trizol 液溶解后,转入 1.5 mL 的离心管中,4℃ 下 12000 r min⁻¹离心 10 min,取上清液,转入另一支 1.5 mL 离心管;纯化:加入 200 (L 的氯仿,加盖,用力震荡 15 s,室温放置 3 min;分层:4℃10000 r min⁻¹离心 10 ~ 15 min,取上清液,转入另一支 1.5 mL 离心管;沉淀:加等体积的异丙醇,混匀,室温放置 20 ~ 30 min,4℃ 10000 r min⁻¹离心 10 min,去上清;75% 乙醇(用 DEPC 水配置)洗涤,DEPC 水溶解。

大豆 FAD3 基因的表达量检测采用实时定量荧光 PCR,进行相对定量分析,将含有相对定量的结果放置一个坐标图上,数据取 3 次重复的平均值。相对表达量 = -2△△CT = 2 - (△CT 处理 - △CT 对照) = 2 - [(CT 处理 - CT 内参) - (CT 对照 - CT 内参)]。仪器采用 STRATAGEN Mx3000T PCR 仪。

2 结果与分析

2.1 大豆群体脂肪酸组分分析

对黑河 18 和哈 89016 杂交得到的 F₂ 代植株,共 272 株,检测其脂肪酸组分,用 SPSS 统计分析 F₂ 代的脂肪酸组分中各成分都有大的变化幅度,其中亚麻酸含量变化最明显,方差为 4.13,最高值为 11.248,最低值为 0.468,存在超亲现象,变异系数达 0.377。而且它们基本都符合正态分布(图 1)。对大豆群体脂肪酸组分中各成分作相关性分析的结果表明,各组分与亚麻酸之间都成显著或极显著负相关(表 1)。

2.2 亲本间多态性分析

用 300 对 SSR 引物对哈 89016 和黑河 18 亲本进

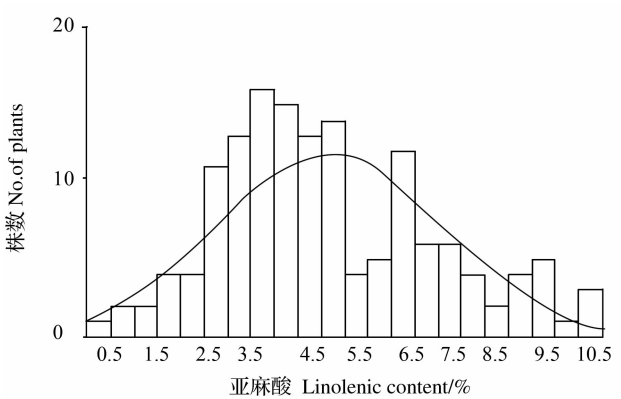


图 1 F₂群体亚麻酸含量分布

Fig.1 Distribution of linolenic content in F₂ population of soybean

表 1 大豆脂肪酸组分的相关性分析

Table 1 Correlation analysis of soybean fat components					
名称 Fat component	棕榈酸 Palm	硬脂酸 Stearic	油酸 Oleic	亚油酸 Linoleic	亚麻酸 Linolenic
棕榈酸 Palm	1				
硬脂酸 Stearic	-0.027	1			
油酸 Oleic	-0.257 **	0.416 **	1		
亚油酸 Linoleic	0.159 **	-0.596 **	-0.680 **	1	
亚麻 Linolenic	-0.192 **	-0.181 **	-0.404 **	-0.126 *	1

*, ** 分别表示在 5% 和 1% 水平上显著 * , ** indicate significant at 0.05 and 0.01 significant level, respectively

行扩增、检测,筛选它们之间存在的多态性引物(图 2)。结果筛选出 50 对差异引物,分布于 20 个连锁群中的 18 个连锁群(表 2)。



图 2 亲本间多态性引物筛选

Fig.2 Screening of polymorphic SSR primers between parents

2.3 大豆 F₂ 代群体亚麻酸的遗传标记和定位

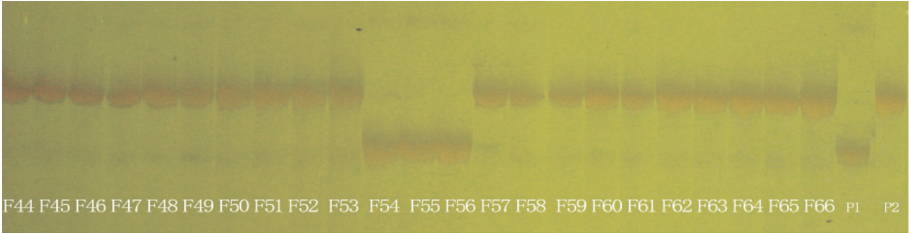
根据哈 89016 和黑河 18 杂交 F_{2,3} 籽粒亚麻酸含量,分别选取亚麻酸含量最低和最高的极端值各 10 个 DNA 样本,等量混合,组成高低亚麻酸池子。然后把在亲本中有多态性的引物在亲本和池子间 PCR 筛选。筛出阳性引物 Satt286。

筛出的阳性引物 Satt286 在池子群体中展开(图 3)。可见 Satt286 在池子个体中的带型和表型性状几乎完全一致,达 100%,只有低亚麻酸池子中的 194、269、272 个体带型稍微有些中间带型,初步判断 Satt286 与控制亚麻酸含量的基因连锁。

表 2 利用亲本筛出的多态性引物及其在连锁群上的分布
Table 2 The primers have polymorphism between parents and their groups

连锁群 Linkage group	A1	B2	B2	C1	C2	Q	M	W	D2
引物 Primer	Satt200	Satt197	Satt168	Satt164 Satt195	Satt277 Satt286 Satt307	Satt184 Satt502 Satt532	Satt175	Satt428	Satt301

连锁群 Linkage group	E	F	N	G	H	J	K	O	L
引物 Primer	Satt204 Satt573 Satt411	Sat_188 Satt146 Satt149 Satt269 Satt334 Satt586	Satt530 Satt009	Satt199 Satt288 Satt303 Satt309 Satt324 Satt472	Satt253 Satt302 Satt434 Satt052	Satt183 Satt405	Satt240	Satt358 Satt262 Satt345 Satt473 Satt479	Satt_112



P1:哈 89016,P2:黑河 18,F44 – F66;F_{2,3}代群体中的 44 – 66 个体
P1 :Ha 89016 ,P2 :Heihe 18 ,F44 – F66 :Progenies of F_{2,3}

图 3 引物 Satt286 在 F₂群体中的扩增部分电泳图

Fig.3 Electrophoresis results of primer Satt286 in F_{2,3}population

把 Satt286 在 F₂代群体中展开(图 3),统计分析带型和亚麻酸含量表型数据的符合程度,根据亚麻酸个体带型和表型的突变情况,计算它们的重组率(16 + 10)/272 =9.5,为 9.5 cM,判断控制亚麻酸位点和引物 Satt286 距离为 9.5 cM,Satt286 位于公共图谱的 C2 连锁群。

2.4 大豆亚麻酸标记引物的准确性验证

2.4.1 t-TEST 检测 根据引物 Satt286 带型,将 F_{2,4}群体分为三组,与哈 89016 带型一致的为一组,与黑河 18 带型一致的分为另外一组,中间带型为第三组。计

算前两组实际植株亚麻酸含量之间差异显著性,它们的亚麻酸含量平均值分别为 3.9132% 和 6.3561%。方差分析表明差异达极显著水平,即以 Satt286 PCR 检测大豆 F₂群体后代,与亲本哈 89016 带型一致的植株亚麻酸含量明显低于与亲本黑河 18 带型一致的植株亚麻酸含量。所以引物 Satt286 可以作为本群体中挑选低亚麻酸植株的标记。

2.4.2 标记在后代中的检测 引物 Satt286 在亚麻酸群体 F₃代中验证,低亚麻酸和高亚麻酸植株的 DNA 扩增鉴定结果,如图 4。其中低亚麻酸个体的



图 4 Satt286 在亚麻酸群体后代中的 PCR 验证结果

Fig.4 The amplification result of Satt286 in the F_{2,4} population

13 个植株带型和表型完全一致,而 9 个高亚麻酸个体中 5 个有一致带型,其余 4 个不一致。即引物带型一致的有 18 个,不一致的为 4 个,说明 Satt286 检测后代的准确率是 82%。不一致性说明引物和目的基因是连锁关系,不是基因本身一部分。含有双带带型同时表明亚麻酸后代还在分化。结果表明 Satt286 引物还是与引起亚麻酸含量降低的基因相连锁,可以作为分子辅助育种的一个标记。

2.5 亲本间大豆亚麻酸相关基因 *Fad3* 的差异表达

取亲本结荚鼓粒期发育中的籽粒,用 TRIZOL 法提取 RNA(图 5),用 Oligo(dT)作引物,反转录酶用 Superscript II,反转录得 cDNA。

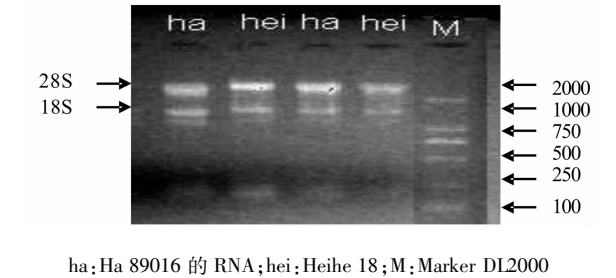


图 5 RNA 电泳图

Fig. 5 RNA eletrophesis

由 NCBI 中已有 *FAD3* 基因,用 Clustal 进行分析,找共有部分设计引物 4 对,扩增测序,发现 5'-GC-CACAGGACTCACCATCAG-3'-5'-TGTCGC-CAGAGTCGCTAA-3' 扩增得到一个与已有基因 *FAD3C* 基因高度同源的序列,达到 99%。

根据 GENBANK 中大豆 *FAD3c* 基因序列,用 PRIMER5.0 软件,设计全长引物 5'-AATGGT-TCAAGCACAGCC-3', 5'-CTTTAGTTGGACTGGGTC-3', 扩增得到 1200bp 大小的片段,回收连接 pGEM-T 克隆测序,得到 *FAD3C* 基因,含有完整 ORF 区,比对后一致性达到 99%。

查询设计 *FAD3C* 基因和内参 EF- α 因子的荧光定量 PCR 引物 5'-CCATTGCCACTTCATCTA-3', 5'-ATCGCTGAGACCGCTGT-3' 和 5'-CTGTAACAAGAT-GGATGCCACTAC-3', 5'-CAGTCAAGGTTTGTGGAC-CT-3'^[6], 得到相对定量的结果。哈 89016 发育籽粒中 *FAD3C* 基因的转录量明显低于黑河 18, 差异达到 5 倍(图 6)。表明 *FAD3C* 基因的表达量决定哈 89016 亚麻酸含量。

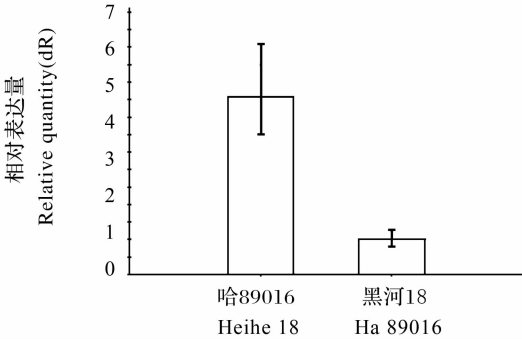


图 6 哈 89016 和黑河 18 荧光定量 PCR 结果

Fig. 6 The result of real-time PCR for soybean

3 讨论

大豆亚油酸和亚麻酸是油脂脂肪酸脱饱和酶作用下生成的,控制各自酶基因的 *FAD2* 和 *FAD3* 基因的表达量不同,导致亚麻酸含量的变化,用通用引物得到亲本哈 89016 种质中 *FAD3* 基因的同源片段,其 *FAD3* 的丰度较高,由 *FAD3* 基因的相对定量分析表明品种间差异显著,大豆结荚鼓粒期品种间 *FAD3* 的表达量差异最大;哈 89016 的 *FAD3* 表达量明显少于黑河 18;大豆中亚麻酸含量是由亚油酸在脂肪酸饱和酶作用下脱饱和得到的,因此由亚油酸脱饱和形成低亚麻酸的品种中 *FAD3* 活性比较低,可以说明 *FAD3* 基因是引发大豆亚麻酸含量降低的原因之一。

亚麻酸的标记和基因研究已经开展许多工作^[5-7]。对照 Song 等人整合的新的公共图谱, Satt286 属于 C2 连锁群,引物 Satt277 属于同一个连锁群。经 Soybase 网站查询,检索到已有的亚麻酸的 QTL 连锁标记为 A_023, SAC7-1。分析其周边连锁的引物和所在图谱,结合已有的几个图谱,根据基因距离不超过 15cM 为连锁引物,发现标记的 QTL 归为整合图谱的 E 连锁群,和 SSR 引物 Satt411、Satt213 连锁。杨柳等定位的亚麻酸 QTL 位于整合图谱的 A2、B2 连锁群^[8]。而本研究得到 Satt286 位于公共图谱的 C2 连锁群。说明大豆亚麻酸是一个多基因控制的性状,所以标记结果呈现多样性。

对 F₂ 群体依照 Satt286 带型分组,对它们的实际亚麻酸含量采取成组分析,平均值有较大差异, t 测验检测结果差异极显著,证明 Satt286 带型作为选择低亚麻酸标记,对于降低群体亚麻酸含量是有明显效果的。可以预测标记与群体选择方法相结合,进行群体

遗传改良,作为辅助选择标记,最终可以有效降低群体亚麻酸含量。而通常标记选择研究中,总是希望得到准确的标记,除了基于基因本身部分序列开发标记外^[9],实际中图谱法得到的标记与目的基因都有约 10 cM 的差异,甚至更大不可能作为准确选择的依据,尤其是单株选择依据。但是可以作为改良群体整体效应的标记,从而有效提高育种效率。

参 考 文 献

[1] 徐杰. 不同品质类型大豆品种脂肪酸形成规律的研究[D]. 东北农业大学硕士学位论文,2005.

[2] Cregan P B, Jarvik T. An integrated genetic linkage map of the soybean genome[J]. Crop Science, 1999, 35(5):1464 – 1490.

[3] 宛煜嵩, 王珍, 方宣钧, 等. 一张含有 227 个 SSR 分子标记的大豆遗传连锁图[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1):15 – 20.

[4] 陈庆山, 张忠臣, 刘春燕, 等. 应用 Charleston × 东农 594 重组自交系群体构建 SSR 大豆遗传图谱[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7):1312 – 1316.

(上接 846 页)

[19] Zheng Z W, Sumi K, Tanaka K, et al. The bean seed storage protein β -Phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar Type – II protein bodies of transgenic rice endosperm[J]. Plant Physiology, 1995, 109:777 – 786.

[20] Sindhu A S, Zheng Z W, Murai H. The pea seed storage protein legumin was synthesized, processed, and accumulated stably in transgenic rice endosperm[J]. Plant Science, 1997, 130(2):189 – 196.

[21] Katsube T, Kurisaka N, Ogawa M, et al. Accumulation of Soybean Glycinin and Its Assembly with the Glutelins in Rice[J]. Plant Physiology, 1999, 120:1063 – 1073.

[22] Higuchi W, Fukazawa C. A rice glutelin and a soybean glycinin have evolved from a common ancestral gene[J]. Gene, 1987, 55

[5] Pirjo Tanhuanpää, Alan Schulman. Mapping of genes affecting linolenic acid content in *Brassica rapa ssp. oleifera*. [J]. Molecular Breeding, 2002, 10:51 – 62.

[6] Schneider, KA, Brothers M E, Kelly J D. Marker assisted selection to improve drought resistance in common bean[J]. Crop Science, 1997, 37:51 – 60.

[7] Rahman S M, Kinoshita T, Anai, et al. Combining ability in loci for high oleic and low linolenic acids in Soybean[J]. Crop Science, 2001, 41:26 – 29.

[8] 杨柳, 张彬彬, 韩英鹏, 等. 大豆亚麻酸 QTL 的分析[J]. 大豆科学, 2006, 25(3):270 – 274.

[9] 薛庆中, 张能义, 熊兆飞. 应用分子标记辅助选择培育抗白叶枯病水稻恢复系[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(6):631 – 638.

[10] Song Q J, Shoemaker R C. A new integrated genetic linkage map of soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109:122 – 128.

[11] Shah S, Xin Z, Browse J. Overexpression of the FAD3 desaturase Gene in a mutant of arabidopsis[J]. Plant Physiology, 1997, 114:1533 – 1539.

(2 – 3):245 – 253.

[23] Yamagata H, Sugimoto T, Tanaka K, et al. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds[J]. Plant Physiology, 1982, 70:1094 – 1100.

[24] Zhao W M, Gatehouse J A, Boulter D. The purification and partial amino acid sequence of a polypeptide from the glutelin fraction of rice grains; homology to pea legumin. FEBS Letters, 1983, 162:96 – 102.

[25] Wen T N, Luthe D S. Biochemical characterization of rice glutelin[J]. Plant Physiology, 1985, 78:172 – 177.

[26] Okita T W, Hwang Y S, Hnilo J H, et al. Structure and expression of the rice glutelin multigene family[J]. Journal of biological chemistry, 1989, 264(21):12573 – 12581.