

大豆油分含量位点主要等位基因挖掘

吴 琼¹, 朱荣胜², 齐照明¹, 蒋洪蔚³, 杨春明⁴, 刘春燕³, 胡国华^{3,5}, 陈庆山^{1,5}

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 理学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090; 4. 吉林省农业科学院 水稻研究所, 吉林 长春 130117; 5. 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150050)

摘要:应用 241 份国内外大豆资源和 18 个 SSR 引物, 卡方检验及 t 检验鉴定出 3 个与大豆油分含量正向相关的重要位点, 分别为 Satt343, Sat_295 和 Satt598, 每一位点各含 1 个与油分相关的重要等位基因, 分别为 Satt343_3, Sat_295_6 和 Satt598_7, 这 3 个等位基因对油分含量呈正效应, 并在分别在引物 Satt343 和 Sat_295 附近发现已定位的与油分含量相关的基因。

关键词:大豆; 油分; 位点; 等位基因

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2012)04-0542-04

Mining Major Alleles of Oil Content Loci in Soybean[*Glycine max* (L.) Merr]

WU Qiong¹, ZHU Rong-sheng², QI Zhao-ming¹, JIANG Hong-wei³, YANG Chun-ming⁴, LIU Chun-yan³, HU Guo-hua^{3,5}, CHEN Qing-shan^{1,5}

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; 2. College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; 3. The Crop Research and Breeding Center of Land-Reclamation, Harbin 150090, Heilongjiang; 4. Rice Research Institute of Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130117, Jilin; 5. The National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150050, Heilongjiang, China)

Abstract: Increasing oil content in soybean is an important goal for soybean breeding. Using 18 SSR primers, polymorphisms were examined among 241 germplasms and three major loci of oil content were identified in soybean. These include Satt343, Sat_295, and Satt598. Three unique alleles (Satt343_3, Sat_295_6 and Satt598_7) of these loci had positive correlations with oil contents in soybean using Chi-square and T-test analysis. Two candidate genes relevant to oil content were found within the 3 cM region of Satt343 and Sat_295, respectively. These results may be significant for soybean breeding for high oil content.

Key words: Soybean; Oil content; Locus; Allele

油分含量是大豆的一个重要农艺性状, 如何有效地提高大豆的含油量一直是大豆育种家们比较关心的问题, 但大豆油分含量是由多基因控制的数量性状, 很难应用传统方法进行品种改良。自从 1988 年 Paterson 等^[1] 公布了应用分子标记定位的 QTL 之后, 许多与油分相关的 QTL 被定位出来, Mansur 等^[2] 应用 ‘Minsoy’ × ‘Noir’ 群体定位了 3 个与油分相关的 QTL。Csanadi 等^[3] 应用早熟品种杂交组合 ‘Maple Belle’ × ‘Proto’ 定位了 4 个与油分相关的 QTL。张忠臣等^[4] 通过 RIL 群体应用 CIM 定位了 6 个与蛋白和油分相关的 QTL。到 2011 年底至少已有 121 个 QTL 被定位^[5]。目前, 定位 QTL 的方法为 SM(单标记 QTL 分析)^[6], IM(区间作图法)^[7], CIM(复合区间作图法)^[8] 和 MIM(多区间作图法)^[9]。Qi 等^[5] 应用元分析的方法将已定位的 98 个 QTL 进行整合, 共得到 20 个“真实 QTL”及其相关标记。

QTL 附近存在与其相关的标记, 每个标记含有至少 2 个不同的等位基因, 近年来对某一基因的各个等位基因的研究越来越受到人们的重视。Wang 等^[10] 在对水稻粒长基因 *GS3* 进行研究时应用了 287 份水稻资源, 其中包括 213 份中国资源及杂交后代, 找到 *GS3* 基因的 4 个等位基因, 其中包括 SF28 位置的 1 个由 C 到 A 的点突变及 3 个标记位点, 应用统计方法鉴定出 SF28 是与长粒相关的等位基因, 2 个遗传标记 RGS1 和 RGS2 与短粒相关, 为水稻粒长育种提供了分子依据。Tian 等^[11] 应用 67 份水稻资源鉴定出与水稻适口性及烹饪性状相关的等位基因。而目前对大豆遗传标记各等位基因作用的研究还鲜有报道。卡方检验和 t 检验这 2 种检验方法已经被广泛应用。蒋洪蔚等^[12] 应用卡方分析在其构建的回交导入系中检测到 9 个供体片段的超导入位点, 并定位了 20 个与大豆耐低温相关的 QTL, 刘冠明等^[13] 应用 t 检验在水稻单片段

收稿日期: 2012-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(30871551); 现代农业产业体系(CARS-04-02A); 国家转基因专项(2011ZX08004-001)。

第一作者简介: 吴琼(1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆遗传分析及分子辅助育种。E-mail: diana. qq. wu@ gmail. com。

通讯作者: 陈庆山(1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: qshchen@ 126. com;

胡国华(1951-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为大豆遗传育种。E-mail: hugh757@ vip. 163. com。

代换系中共鉴定出 17 个性状的 57 个 QTL。该研究应用 241 份大豆品种对“真实 QTL”区间内的 18 个引物的各等位基因进行分析,应用统计学方法确定该 18 个位点内的与大豆油分含量相关的重要等位基因。旨在为大豆分子辅助选择育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采用国内外 241 份大豆资源,其中包括 126 份国内微核心种质,115 份国外引进品种,能够代表大多数遗传变异。241 份资源根据油分含量的高低分为 3 部分,96 份资源油分含量较高默认为高油资源,96 份资源油分含量较低默认为低油资源,油分含量中等的为普通资源,采用 96 份高油资源和 96 份低油资源两组数据进行分析。

1.2 方法

1.2.1 含油量测定 应用 FOSS Infratec™ 1241 谷物分析仪测定。

1.2.2 引物选取 根据 Qi 等^[5]的研究,在其对油分 QTL 元分析整合出的区间两侧选取引物,根据前人研究,这些区间内的引物可能与大豆油分含量相关,因此根据大豆公共图谱^[14],以定位的遗传区间内的引物作为本研究的引物(表 1)。

1.2.3 PCR 及电泳统计 采用 CTAB 法提取新鲜叶片 DNA^[15]。PCR 反应用 10 μL 反应体系,电泳应用 6% 聚丙烯酰胺凝胶,银染^[16]。电泳结果条带统计时,每个引物分别根据分子量大小依次记录为 1、2、3……依次类推,如 Satt317 分子量大小在第三

位的等位基因记为 Satt317_3。

表 1 所用引物及其所在连锁群
Table 1 SSR markers matched in soybean genetic map

引物 SSR marker	所在连锁群 Matched Gm	引物 SSR marker	所在连锁群 Matched Gm
Sat_009	Gm14	Satt343	Gm13
Sat_164	Gm18	Satt389	Gm17
Sat_174	Gm20	Satt454	Gm05
Sat_293	Gm09	Satt468	Gm01
Sat_295	Gm03	Satt556	Gm14
Sat_414	Gm01	Satt598	Gm15
Satt200	Gm05	Satt613	Gm19
Satt267	Gm01	Satt664	Gm19
Satt317	Gm12	Satt700	Gm20

1.3 统计分析

应用卡方检验和 *t* 检验 2 种检验方法,将各大豆资源的分子数据分别应用 Matlab R2009a 和 Minitab14.12 软件进行运算,选取阈值为 0.01 显著水平。

2 结果与分析

2.1 大豆资源含油量

如表 2 所示,241 份大豆资源中测得油分含量最高为 23.0316%,最低为 17.0761%,平均为 21.2783%。这些资源的油分含量值基本能够代表大豆的各个品种。高油资源油分均值为 21.9157%,低油资源油分均值为 20.5807%,二者差异显著。

表 2 参试大豆资源油分含量
Table 2 Oil content of tested soybean germplasm

资源 Germplasm	油分含量 Oil content/%	资源 Germplasm	油分含量 Oil content/%	资源 Germplasm	油分含量 Oil content/%	资源 Germplasm	油分含量 Oil content/%
吉林茶里花	17.0761	L69-6095	20.8586	铁荚子	21.5045	L62-364	21.8158
昌吉黄豆 1	17.4877	IL1	20.8775	L65-756	21.5079	公野 03-5570	21.8266
白城秣食豆	18.1643	L72D-4045	20.8881	L69-4318	21.5084	N49	21.8297
公野 04L-141	18.2259	L72-1198	20.8919	黑河 31	21.5228	蒙豆 9 号	21.8418
黄脐	18.497	L67-971	20.9004	L68-758	21.5331	北丰 9 号	21.8532
茶秣食豆	18.8098	N02	20.9206	石大豆 1 号	21.5424	N23	21.8544
Maple Ridge	18.8501	SS202	20.9405	L67-1250	21.5459	合丰 35	21.856
小黄豆	19.204	吉育 66 号	20.9583	吉育 57 号	21.5466	Wilkin	21.8629
天鹅蛋	19.3115	N38	20.969	九农 21	21.551	Kato	21.8674
绿滚豆	19.6047	嘟噜豆	20.9811	L67-166	21.5511	嫩丰 11 号	21.8732
牛毛黄	19.6643	Harosoy	20.9812	黑农 48 号	21.5549	金元 1 号	21.8962
N32	19.8997	N31	20.9853	T295H	21.5644	N57	21.9291

续表 2

资源 Germplasm	油分含量 Oil content/%	资源 Germplasm	油分含量 Oil content/%	资源 Germplasm	油分含量 Oil content/%	资源 Germplasm	油分含量 Oil content/%
Boige du lot et geronne	19.9082	L67-234	21.0131	合丰 37	21.5725	黑河 4 号	21.9328
Nattawa	19.9736	嫩丰 15	21.0177	L72-1241	21.5758	黑龙江 41	21.9492
SS201	20.0058	L64-2139	21.0507	Nowa	21.5824	合丰 39	21.9739
94-12-9	20.1956	L66-707	21.067	N22	21.5905	N54	21.9739
倪丁花眉豆	20.2199	东农 42	21.0717	紫花 4 号	21.6033	蒙豆 14	21.9829
吉林 30 号	20.2574	L65-60	21.0795	L69-4266	21.6036	荆山璞	21.9872
杜纳吉卡	20.2892	Hark	21.0884	黑农 2 号	21.6129	吉林 39	21.9904
L72-1138	20.3643	铁荚四粒黄	21.0887	绥 02-339	21.6137	Maple Amber	22.0457
N62	20.4131	铁 5621	21.0924	东农 01-1234	21.6203	合丰 29	22.0503
N59	20.4161	L67-226	21.097	绥 02-336	21.6297	蒙豆 12 号	22.0652
丰地黄	20.4516	L73-79	21.1024	艾卡 166	21.6329	绥农 15	22.0719
Proto	20.4519	紫花 2 号	21.1136	吉育 71	21.6345	垦鉴 23	22.0985
盘石豆	20.4549	猫眼豆	21.1238	L63-1397	21.6374	黑农 37	22.1088
L67-3090	20.4567	L62-801	21.1325	L72-1140	21.6396	N09	22.1142
L70-4112	20.4645	Vinton81	21.1332	9748-9750	21.6399	Nattosan	22.1172
L71-46	20.4712	N35	21.1358	黑河小黄豆	21.6468	黑河 27	22.1625
N66	20.4784	L67-1687	21.1501	牧丰 1 号	21.6535	黑河 18	22.1646
青仁黑豆	20.5143	L61-1069	21.1563	黑交 01-1778	21.6568	吉林 35	22.1663
L62-558	20.5251	薄地高	21.1635	锦豆 33	21.6602	绥农 14	22.1753
L67-3388	20.5574	L69-4428	21.1703	公野 03-7239	21.6642	Wea	22.2211
Hitatsa	20.5866	锦州 4-1	21.1717	L63-1097	21.6694	东农 163	22.2864
吉 94	20.607	N13	21.1766	N68	21.6766	Hodgson	22.2878
花绿黄豆	20.6149	L63-1612	21.1936	黑河 1 号	21.6893	Dawson	22.3531
N36	20.6185	N20	21.1947	L84-337	21.7024	Maple Arrow	22.3754
压迫车	20.6298	LS201	21.1964	绥农 10 号	21.7126	绥农 1 号	22.4341
94-15	20.6865	L65-34	21.2029	元宝金	21.7157	公野 04-L15	22.4445
赫尔松 2 号	20.6924	克北 1 号	21.2059	合丰 40	21.7239	CN210	22.474
牛毛黄	20.7038	L66-704	21.2082	合 02-1667	21.7369	东农 434	22.4836
大粒黑豆	20.7407	北丰 14	21.2252	Weber	21.7399	Maple Presto	22.5375
凤交 66-22	20.7427	通农 13	21.2279	吉林 20	21.7491	Hodgson78	22.5417
N21	20.7446	北见白	21.2363	L64-1061	21.7637	N29	22.7231
60 天还仓	20.7509	L61-5047	21.2379	四粒黄	21.7687	合 00-23	22.8266
L69-4265	20.8074	L90-4711	21.2398	L73-1543	21.7743	吉育 67 号	22.8409
庆安黑豆	20.8174	新大豆 1 号	21.2442	丰收 6 号	21.8014	抗线 2 号	22.8888
L83-4387	20.8185	L65-540	21.2533	北丰 11 号	21.8062	黑农 44 号	22.9723
L65-237	20.8487	Vinton	21.2614	黄宝珠	21.8136	L65-1274	23.0316

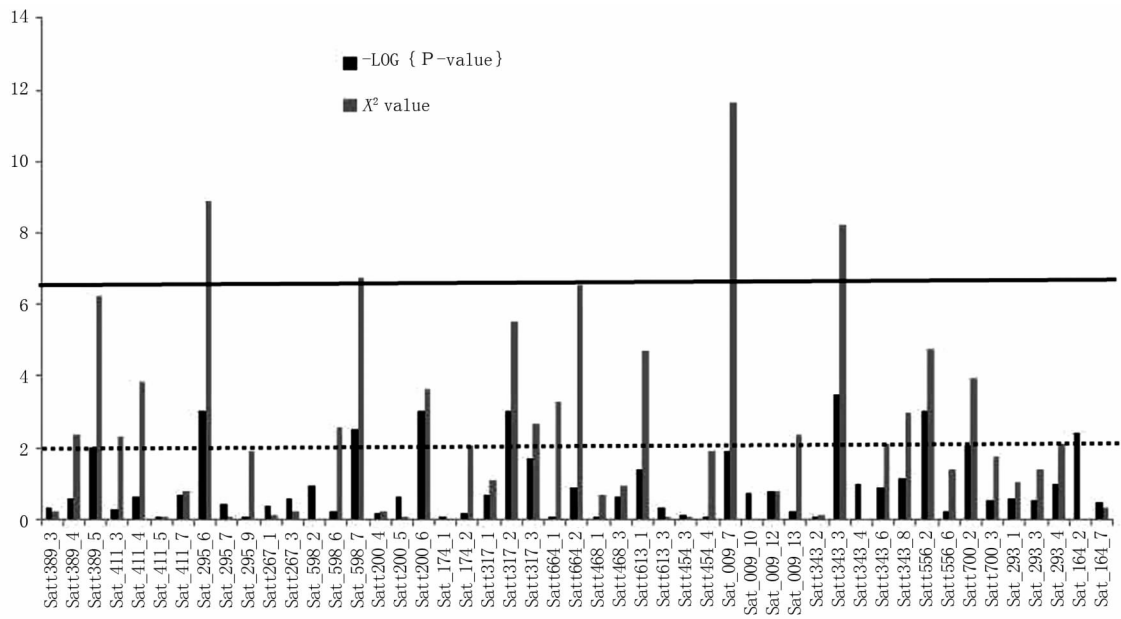
2.2 引物含有的等位基因数量及其检验结果

在 241 份资源中,经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析显示,不同引物位点含有等位基因数目不同,有些引物位点等位基因数目很少,最少的引物只有 3 个等位基因,如 Satt700;而有些引物的等位基因则很多,最多的引物含有 13 个等位基因,如 Sat_009。另

外,不同位点的不同等位基因在资源中出现的频数不同,根据统计需要,在 241 份资源中,同一位点等位基因出现频数低于 15 个的不具统计意义。因此,在 18 个引物中共有 80 个等位基因,舍去了其中频数低于 15 个的 31 个等位基因,对 49 个具有统计意义的等位基因进行进一步检验分析。

将 49 个等位基因经卡方检验发现,共有 4 个等位基因达到 0.01 显著水平(卡方值达到 6.635),为 Satt343_3, Sat_295_6, Sat_009_7 和 Satt598_7。经 t 检验共发现 9 个达到 0.01 显著水平的等位基因,分

别为 Satt343_3, Satt556_2, Satt317_2, Satt200_6, Sat_295_6, Satt598_7, Sat_164_2, Satt700_2 和 Satt389_5 (图 1)。2 种检验方法均检测到的等位基因有 3 个,分别为 Satt343_3, Sat_295_6 和 Satt598_7。



实线和虚线分别为卡方检验和 t 检验 0.01 显著水平阈值。

Full line and dotted line show 0.01 significant level of chi-square and t -test, respectively.

图 1 等位基因卡方检验及 t 检验结果

Fig. 1 Result of chi-square and t -test

3 结论与讨论

分别对于 3 个已定位的等位基因 Sat_295_6、Satt343_3 和 Satt598_7,将 241 份资源按油分含量分为两部分,一部分含有该等位基因,另一部分不含有该等位基因,含其中 1 个等位基因与不含该等位基因材料的油分含量均值差分别为 0.38%、0.40% 和 0.33%,且都为正值,表明含有这 3 个等位基因具有提高油分含量的作用。

同时,在大豆数据库(Soybase.org)内,分别在距离 Sat_295 和 Satt343 位点 3 cM 的区间内各有 8 个和 15 个基因,其中各有 1 个与油分含量相关的基因, FAD2-3 和 Glyma13g10600。FAD2-3 是油酸脂去饱和酶, Glyma13g10600 是脂肪酶-胆固醇相关的一种酯酶,参与脂肪代谢过程,这表明该引物可能与其附近的基因相连锁,找到这样与表型直接相关的位点具有重要意义。油分性状的表型与其调控的基因具有直接关系,在与基因连锁的重要位点附近挖掘油分含量相关基因,对深入了解基因的结构和功能具有重要意义。

本研究选取了 241 份大豆资源,应用卡方检验和 t 检验 2 种检验方法,共鉴定出 3 个与大豆油分

含量相关的重要位点,为大豆分子辅助选择育种提供了重要依据。

参考文献

- [1] Paterson A H, Lander E S, Hewitt J D, et al. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms [J]. *Nature*, 1988, 335: 721-726.
- [2] Mansur L M, Orf J H, Chase K, et al. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean [J]. *Crop Science*, 1996, 36: 1327-1336.
- [3] Csanadi G, Vollmann J, Stift G, et al. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 912-919.
- [4] 张忠臣, 战秀玲, 陈庆山, 等. 大豆油分和蛋白性状的基因定位 [J]. *大豆科学*, 2004, 23 (2): 81-85. (Zhang Z C, Zhan X L, Chen Q S, et al. QTL mapping of seed oil and protein content of soybean [J]. *Soybean science*, 2004, 23 (2): 81-85.)
- [5] Qi Z M, Wu Q, Han X, et al. Soybean oil content QTL mapping and integrating with meta-analysis method for mining genes [J]. *Euphytica*, 2011, 179: 499-514.
- [6] Kearsey M J, Hyne V. QTL analysis: a simple marker regression approach [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89: 698-702.

(下转第 551 页)

- ning similarity to the universal stress protein domain of bacteria [J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 1209-1219.
- [8] Wang W Q, Li L, Huang S, et al. A secondary suppression subtractive hybridization method for isolation and identification of some salt-induced genes in soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2012, 6: 46-55.
- [9] 李亮, 侯文胜. 抑制差减杂交技术在大豆研究中的应用[J]. *大豆科学*, 2010, 29(4): 702-706. (Li L, Hou W S. Application of suppression subtractive hybridization in soybean research[J]. *Soybean Science*, 2010, 29(4): 702-706.)
- [10] 常汝镇, 陈一舞, 邵桂花, 等. 盐对大豆农艺性状及籽粒品质的影响[J]. *大豆科学*, 1994, 13(2): 101-105. (Chang R Z, Chen Y W, Shao G H, et al. Effect of salt on agricultural characters and chemical quality of seed in soybeans[J]. *Soybean Science*, 1994, 13(2): 101-105.)
- [11] 郭蓓, 邱丽娟, 邵桂花, 等. 大豆耐盐基因的 PCR 标记[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(1): 10-16. (Guo B, Qiu L J, Shao G H, et al. Tagging salt tolerant gene using PCR markers in soybean[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33(1): 10-16)
- [12] Jian B, Liu B, Bi Y, et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR[J]. *BioMed Central: Molecular Biology*, 2008, 9: 59.
- [13] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [14] Hohnjec N, Kuster H, Albus U, et al. The broad bean nodulin VtENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily[J]. *Molecular and General Genetics*, 2000, 264: 241-250.
- [15] Chou M X, Wei X Y, Chen D S, et al. A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164: 764-772.
- [16] Maqbool A, Zahur M, Husnain T, et al. *GUSP1* and *GUSP2*, two drought-responsive genes in *Gossypium arboreum* have homology to universal stress proteins[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, 27: 109-114.
- [17] Sauter M, Rzewuski G, Marwedel T, et al. The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 2325-2331.
- [18] Nystrom T, Neidhardt F C. Effects of overproducing the universal stress protein UspA, in *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 927-930.
- [19] Zegzouti H, Jones B, Frasse P, et al. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display[J]. *Plant Journal*, 1999, 18: 589-600.
- [20] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 66-71.

(上接第 545 页)

- [7] Jansen R C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci [J]. *Genetics*, 1993, 135: 205-211.
- [8] Rodolphe F, Lefort M. A multi-marker model for detecting chromosomal segments displaying QTL activity[J]. *Genetics*, 1993, 134: 1277-1288.
- [9] Kao C H, Zeng Z B, Teasdale R D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci[J]. *Genetics*, 1999, 152: 1203-1216
- [10] Wang C G, Chen S, Yu S B. Functional markers developed from multiple loci in GS3 for fine marker-assisted selection of grain length in rice[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122: 905-913.
- [11] Tian X X, Qian Q, Liu Q Q, et al. Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities[J]. *PNAS*, 2009, 51: 21760 - 21765.
- [12] 蒋洪蔚, 李灿东, 刘春燕, 等. 大豆导入系群体芽期耐低温位点的基因型分析及 QTL 定位[J]. *作物学报*, 2009, 35(7): 1268-1273. (Jiang H W, Li C D, Liu C Y, et al. Genotype analysis and QTL mapping for tolerance to low temperature in germination by introgression lines in soybean[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(7): 1268-1273).
- [13] 刘冠明, 李文涛, 曾瑞珍, 等. 水稻单片段代换系代换片段的 QTL 鉴定[J]. *遗传学报*, 2004, 31(12): 1395-1400. (Liu G M, Li W T, Zeng R Z, et al. Identification of QTLs on substituted segments in single segment substitution lines of rice[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(12): 1395-1400).
- [14] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(1): 122-128.
- [15] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4321-4325.
- [16] Ji Y T, Qu C Q, Cao B Y. An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28: 1173-1175.