

# 黑龙江省主栽大豆品种脂肪含量分析及 SSR 分子标记辅助鉴定

孙梦阳,王艳,武林,韩英鹏,赵雪,滕卫丽,王桂玲,李文滨

(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/东北农业大学大豆研究所,黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:**以黑龙江省 92 个主栽大豆品种(系)为研究对象,分别对其在 2010 年和 2011 年的脂肪含量进行分析,发掘与脂肪含量紧密连锁的 SSR 标记,用以辅助鉴定黑龙江省主栽大豆品种的脂肪含量。结果表明:供试材料脂肪含量变异范围 2010 年为 17.10%~23.14%,2011 年为 17.70%~23.04%,两年平均为 17.40%~23.09%。结合 SSR 数据的品种系统进化树分析,可以将黑龙江省主栽大豆品种脂肪含量总体上分成大于 20% 和小于 20% 两类。此外,鉴别出 2 个与脂肪含量相关的 SSR 标记(Satt428-900、Satt502-150),标记指数与脂肪含量显著相关(相关系数分别为  $-0.41^*$  和  $0.41^*$ )。

**关键词:**黑龙江省;主栽大豆品种(系);脂肪含量;SSR 标记辅助鉴定;相关分析

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2013)02-0143-06

## Analysis of Oil Content Underlying Major Soybean Cultivars of Heilongjiang Province and SSR Molecular Marker-assisted Identification

SUN Meng-yang, WANG Yan, WU Lin, HAN Ying-peng, ZHAO Xue, TENG Wei-li, WANG Gui-ling, LI Wen-bin  
(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Biology and Genetics & Breeding for Soybean in Northeast China, Ministry of Agriculture/Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** A total of 92 major soybean cultivars (lines) of Heilongjiang province, which were analyzed for the oil content in year of 2010 and 2011 respectively, were chosen as the object to explore SSR markers associated with oil content in order to identify the oil content of the cultivars (lines). Analysis of variance underlying oil content showed that the range of variation of tested materials for oil content was 17.1%-23.14% in 2010 and 17.7%-23.04% in 2011, and the average was 17.4%-23.09%. The analysis of dendrogram of the cultivars combined with SSR data could roughly define the major cultivars of Heilongjiang province into two class with 20% as the border of oil content. Moreover, two SSR markers (Satt428-900, Satt502-150), of which the label index showed significantly correlation with oil content with  $-0.41^*$  and  $0.41^*$  as correlation coefficient respectively, were significantly correlated with oil content.

**Key words:** Heilongjiang province; Major soybean cultivars; Oil content; SSR marker molecular-assisted identification; Correlation analysis

黑龙江省是我国大豆生产的第一大省,大豆种植面积和产量均占全国的 1/3 左右<sup>[1]</sup>。黑龙江省大豆栽培历史悠久,经历了长期的自然演化和人工选择,形成了多种多样的大豆种质资源<sup>[2]</sup>。由于大豆是重要的经济作物和粮食作物,是人类摄取脂肪的主要来源。同时,大豆油也是我国人民主要植物油来源,它含有大量的不饱和脂肪酸,与动物油相比,其胆固醇含量低,长期食用可防止高血压、动脉硬化等心血管疾病。因此分析和评价现有黑龙江省主栽大豆品种脂肪含量,对于提高黑龙江省大豆产量,改良大豆品质具有重要的理论价值和现实意义。

目前已有很多报道采用不同材料分别得到了脂肪、脂肪酸组分含量 QTL 的初步定位结果,并找

到了一些主效 QTL 及与之连锁的分子标记<sup>[3-8]</sup>。但不同材料侧重的性状不同,不同遗传背景下的 QTL 定位结果不便整合,因此整个脂肪及各主要脂肪酸组分含量的 QTL 挖掘还有待进一步全面分析。

现以黑龙江省 92 个主栽大豆品种(系)为研究对象,对其在 2010 年和 2011 年的脂肪含量进行评价与分析,发掘与脂肪含量紧密连锁的 SSR 标记,用以辅助鉴定主栽大豆品种的脂肪含量。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供试材料为 92 个黑龙江省主栽大豆品种(系),详见表 1。

收稿日期:2012-09-10

基金项目:农业部大豆产业技术体系(CARS-04-PS04);国家“十二五”科技支撑计划(2011BAD35B06);国家重点基础研究发展计划“973 计划”(2012CB126311);国家自然科学基金(31201227);中国博士后项目(20110491024);黑龙江省博士后项目(LBH11220);黑龙江省骨干教师项目(1252G014)。

第一作者简介:孙梦阳(1987-),女,在读硕士,主要从事大豆生物化学与分子生物学研究。E-mail:wssmy@163.com。

通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

王桂玲(1964-),女,副教授,硕士生导师,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:wglhsd@126.com。

表1 供试材料名称

Table 1 Tested cultivars or lines

编号 Number	品种(系) Cultivar(line)	编号 Number	品种(系) Cultivar(line)	编号 Number	品种(系) Cultivar(line)
G1	北 98-22	G32	建 98-199	G63	黑农 44
G2	东农 163	G33	合丰 35	G64	建农 1 号
G3	垦丰 96-26	G34	黑农 45	G65	绥农 17
G4	钢 9178-2	G35	垦丰 9 号	G66	绥农 11
G5	农大 3816	G36	垦农 19	G67	垦鉴豆 21
G6	黑河 22	G37	合丰 25	G68	合丰 47
G7	垦鉴豆 29	G38	绥农 10	G69	合丰 41
G8	垦鉴豆 26	G39	垦鉴豆 7 号	G70	垦鉴豆 24
G9	北 98-151	G40	绥农 14	G71	垦鉴豆 4 号
G10	宝交 01-4046	G41	疆中 3293	G72	绥农 15
G11	黑河 95-750	G42	合丰 45	G73	黑河 1271
G12	东农 96-02	G43	垦鉴豆 19	G74	北 98-02
G13	垦鉴豆 18	G44	垦农 18	G75	黑鉴豆 26
G14	黑河 95-750	G45	大粒豆	G76	北 98-97
G15	北丰 16	G46	红丰 12	G77	黑河 27
G16	黑交 96-1525	G47	黑农 43	G78	黑河 31
G17	857-1	G48	黑农 35	G79	黑河 30
G18	合丰 40	G49	黑农 41	G80	黑河 19
G19	黑交 97-2481	G50	龙新 96-118	G81	垦鉴豆 27
G20	绥农 96-8319	G51	红丰 9 号	G82	合丰 42
G21	黑河 17	G52	阳 02-1	G83	哈北 46-1
G22	垦鉴豆 23	G53	合福 93154-2	G84	黑交 99-1582
G23	合丰 43	G54	垦鉴豆 25	G85	北丰 99-21
G24	疆丰 99-112	G55	农大 5918	G86	黑河 29
G25	黑河 18	G56	东农 46	G87	黑河 24
G26	垦鉴豆 1 号	G57	垦农 5 号	G88	北江 1 号
G27	99-5404	G58	红丰 11	G89	东农 44
G28	合丰 40	G59	宝丰 7 号	G90	九三大西江 1526
G29	建 98-139	G60	北 9464	G91	九三大西江 711
G30	建 97-825	G61	垦鉴 825	G92	九三大西江 151
G31	建 96-29	G62	合丰 39		

## 1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验于 2010 和 2011 年在东北农业大学香坊实验实习基地进行,随机排列,6 行区,行长 6 m,行距 0.70 m,株距 0.05 m,3 次重复,常规田间管理。成熟后每区随机取 3 株,测定脂肪含量。

1.2.2 大豆脂肪含量的测定 脂肪含量测定采用近红外品质分析仪和单粒近红外品质分析仪(Foss, 1241, Sweden)。

1.2.3 DNA 提取及丰度检测 分别取 1 g 新鲜叶

片研磨成粉,CTAB 法<sup>[9]</sup>提取基因组 DNA, RNA 消解。取 10  $\mu$ L DNA 稀释样,在 0.8% (W/V) 琼脂糖凝胶中电泳 30 min,在紫外投射仪下观察并统计其丰度。

1.2.4 SSR-PCR 检测 通过对 Song 等<sup>[10]</sup>构建的公共图谱进行分析,选择基本覆盖大豆全基因组的 341 对 SSR 引物进行多态性筛选。根据 SoyBase 网址(<http://129.186.26.94/>)提供的 SSR 引物序列,送由六合华大基因股份有限公司合成。

PCR 反应体系:反应总体积为 20  $\mu$ L,反应液包

括 2  $\mu\text{L}$  模板 DNA (25  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR 缓冲液, 1.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 2.0  $\mu\text{L}$  SSR 引物 (10  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  dNTP (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  Taq 酶 (5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ , 液体石蜡覆盖。RAPD 反应体系: 模板 2  $\mu\text{L}$  (20  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), buffer 2  $\mu\text{L}$ , 氯化镁 2  $\mu\text{L}$ , 引物 2  $\mu\text{L}$ , dNTP 0.3  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 0.2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 在 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s; 47 $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s; 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$  下保存。

聚丙烯酰胺凝胶电泳检测: PCR 产物, 加上 8  $\mu\text{L}$  甲酰胺双色缓冲液 (2.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溴酚兰, 2.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  二甲苯青, 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 95% 去离子甲酰胺), 置于 PTC-100<sup>TM</sup> peltiter thermal cycler 中变性 5 min, 迅速放入冰水混合物中冷却 5 min。PCR 产物在 POWERPAC3000 电泳仪中 100 W 恒功率, 以 6% 聚丙烯酰胺标准测序胶为介质, 以 1  $\times$  TBE 为缓冲液, 电泳分离, 快速银染后检测<sup>[11]</sup>。

### 1.3 数据分析

1.3.1 SSR 标记与脂肪含量的相关分析 SSR 标记与脂肪含量的相关分析采用 SAS8.2<sup>[12]</sup> 软件的 T 测验法进行分析。采用标记指数作为衡量二者相关关系的指标, 即较高的标记指数 (与高脂肪含量相关的标记出现的百分率同与低脂肪含量相关的标记出现的百分率之差) 代表着较高的脂肪含量。

1.3.2 SSR 标记的统计和处理方法 根据凝胶电泳图谱对各材料的等位变异逐一进行统计, 有带记为 1, 无带记为 0, 获得 0, 1 矩阵。分别计算以下参数:

① 35 个 SSR 位点的等位变异数 (NA) 和多态性信息含量 (PIC)

$$PIC_i = 1 - \sum P_i^2$$

$P_i$  为第  $i$  个等位变异出现的频率, PIC 反映了某个位点多态性水平和区分群体的能力<sup>[13]</sup>。

② 遗传相似系数: 根据 Robert<sup>[14]</sup> 和 Robert<sup>[15]</sup> 研究中的方法计算简单相似系数 (SMC)

$$SMC = a / (n - d)$$

$a$  为两个品种间共有的条带数,  $n$  是总条带数,  $d$  为两个品种都缺失的条带数。用 NTsys 2.10e 软件计算 SMC。

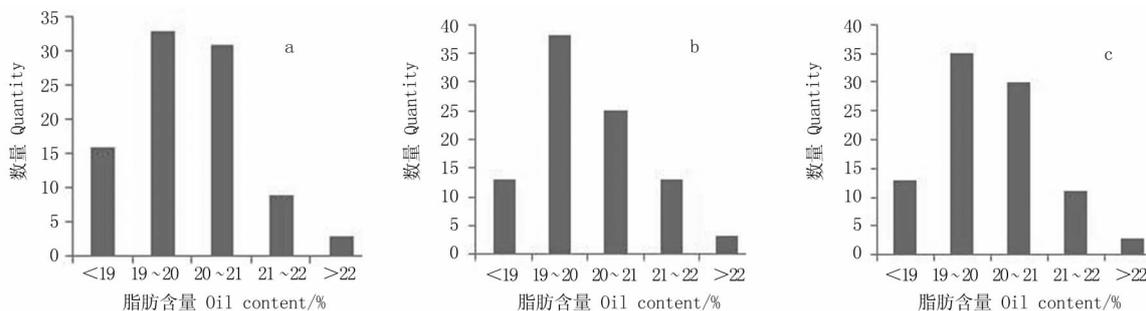
1.3.3 聚类分析 用 NTsys 2.10e 软件, 在 SMC 基础上, 利用非加权类平均法 (UPGMA) 对 0, 1 矩阵进行聚类分析, 建立树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆脂肪含量的统计与分析

如图 1 所示, 92 个主栽大豆品种 (系) 的脂肪含量主要集中在 19% ~ 21%, 占总数 70.6%, 脂肪含量在 19% 以下和在 22% 以上的较少, 分别占总数的 14.1% 和 3.26%。

由方差分析结果 (表 2) 可见, 2010 年供试材料脂肪含量变异范围为 17.10% ~ 23.14%, 2011 年供试材料脂肪含量变异范围为 17.70% ~ 23.04%, 两年脂肪含量平均变异范围为 17.40% ~ 23.09%, 表明黑龙江省主栽大豆品种脂肪的遗传变异较为丰富, 大部分品种的脂肪含量较高。



a 为 2010 年脂肪含量分布; b 为 2011 年脂肪含量分布; c 为两年平均脂肪含量分布

a, b, c indicate distribution of oil content in 2010, 2011 and its average, respectively

图 1 各品种脂肪含量分布情况

Fig. 1 Oil content of different soybean cultivars

表 2 大豆脂肪含量数据分析

Table 2 Analysis of soybean oil content (%)

年份 Year	平均值 $\pm$ 标准误 Mean $\pm$ SD	极差 Range	变化范围 Range	变异系数 Variation coefficient
2010	19.032 $\pm$ 1.330	6.040	17.10 ~ 23.14	6.6
2011	19.023 $\pm$ 1.289	5.340	17.70 ~ 23.04	6.4
平均 Average	19.041 $\pm$ 1.305	5.680	17.40 ~ 23.09	6.5

### 2.2 SSR 标记的筛选及分析

选择基本覆盖大豆的全基因组的 341 对 SSR 引物,进行引物多态性筛选。结果所有引物均扩增

出稳定的产物,有 53 对引物具有多态性(部分见图 2),多态性引物频率为 15.5%。

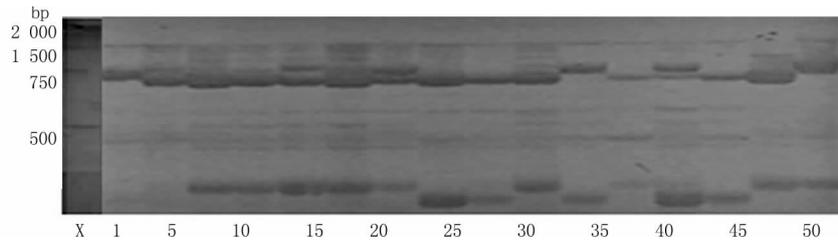


图 2 部分 SSR 标记多态性筛选

Fig. 2 Screening for part of polymorphic SSR markers

### 2.3 SSR 位点多样性及脂肪含量遗传分析

对 92 个主栽大豆品种(系)的分析发现,53 个 SSR 位点有 121 个等位基因,平均每个位点有 2.28 个等位变异。其中大部分等位变异数为 2 个,等位变异数为 3 个的有 Satt518、Satt314、Satt114、Satt545、Satt519、Satt336、Satt514、Satt547、Satt576、Satt388 和 Satt589,等位变异数为 4 个的有 Satt544 和 Satt244,

平均 PIC 的变化范围为 0.112 ~ 0.795(表 3)。

利用 Jaccard 运算法则得到 SSR 标记的遗传相似矩阵,再应用 Mantel 检验<sup>[16]</sup>来评估遗传相似矩阵的相关程度,得到脂肪含量相关系数范围是 0.395 ~ 0.561。用 UPGMA 来描述大豆品种(系)间的关系,并结合 SSR 数据的品种系统进化树(图 3),可以将供试品种(系)以脂肪含量 20% 为界大致分为两类。

表 3 每个位点所具有的等位基因数及多态性信息含量值

Table 3 Numbers of alleles and PIC value of each locus

位点 Locus	等位变异数 Alleles	多态性信息量 PIC	位点 Locus	等位变异数 Alleles	多态性信息量 PIC
Satt604	2	0.494	Satt066	2	0.390
Satt187	2	0.455	Satt358	2	0.399
Satt341	3	0.532	Satt244	4	0.646
Satt518	3	0.575	Satt239	2	0.399
Satt184	2	0.374	Satt226	2	0.452
Satt114	3	0.565	Satt380	2	0.135
Satt544	4	0.684	Satt126	2	0.724
Satt545	3	0.534	Satt082	2	0.403
Satt552	2	0.401	Satt076	2	0.384
Satt590	2	0.468	Satt514	3	0.795
Satt537	2	0.719	Satt482	2	0.292
Satt556	2	0.663	Satt307	2	0.548
Satt519	3	0.563	Satt420	2	0.112
Satt575	2	0.449	Satt437	2	0.729
Satt490	2	0.425	Satt389	2	0.212
Satt094	2	0.146	Satt561	2	0.356
Satt380	2	0.561	Satt296	2	0.130
Satt293	2	0.702	Satt543	2	0.455
Satt168	2	0.147	Satt177	2	0.592
Satt237	2	0.464	Satt547	3	0.543
Satt197	2	0.261	Satt452	2	0.532
Satt198	2	0.616	Satt576	3	0.673
Satt285	2	0.277	Satt211	2	0.573
Satt270	2	0.653	Satt201	2	0.454
Satt274	2	0.468	Satt388	3	0.520
Satt122	2	0.323	Satt589	3	0.487
Satt336	3	0.519			

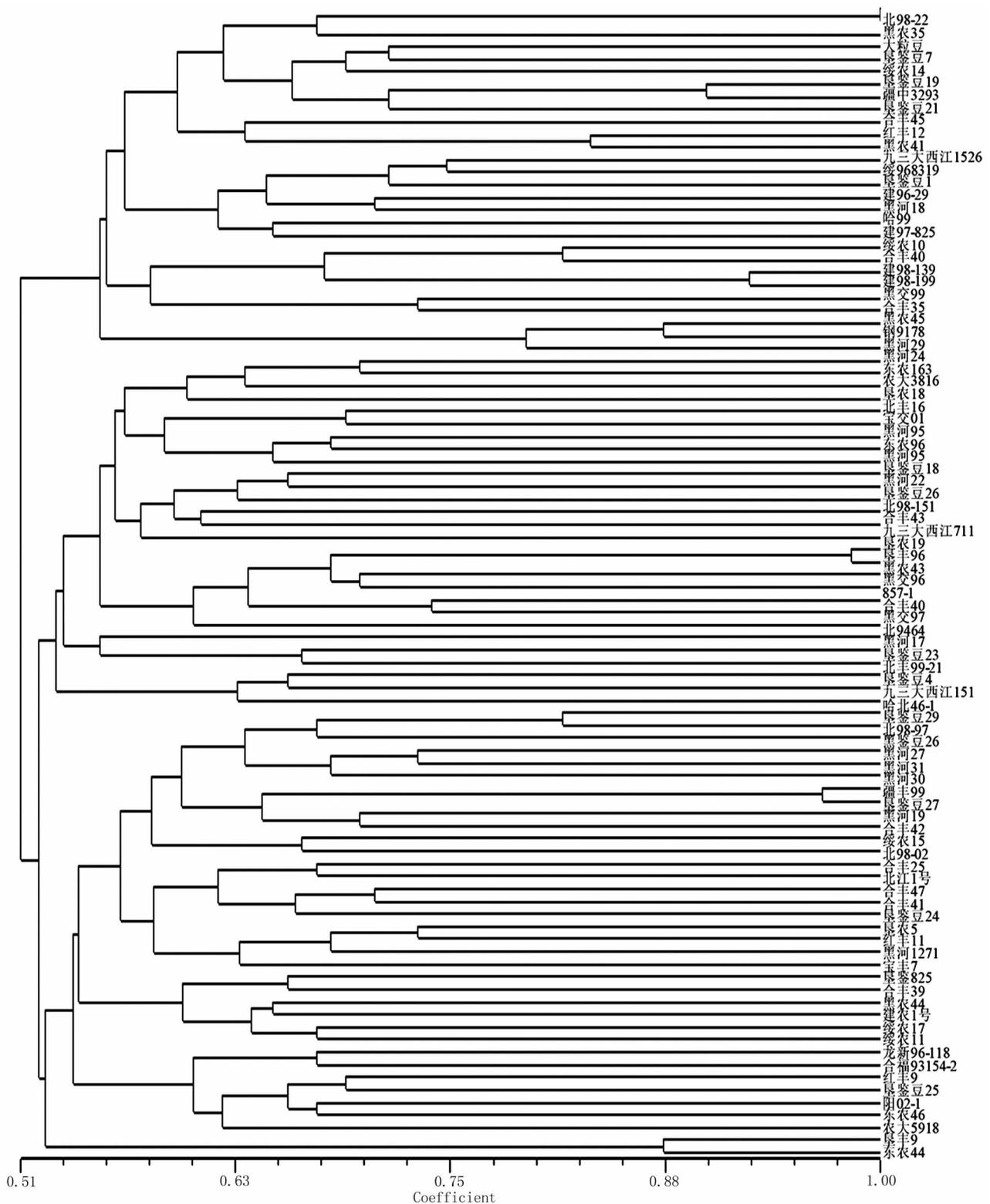


图3 结合 SSR 数据的系统树图

Fig.3 Dendrogram combined with SSR data

2.4 脂肪含量与分子标记的相关分析

T 检测表明 2 个 SSR 标记 (Satt428-900、Satt502-150) 的标记指数与脂肪含量呈显著相关, 相关系数分别为:  $-0.41^*$  和  $0.41^*$  (表 4), 说明鉴别出的这 2 个标记可以应用于黑龙江省主栽大豆品种 (系) 脂肪含量的辅助育种。

表 4 与脂肪含量紧密相关的标记

Table 4 Markers closely associated with oil content

标记 Marker	标记频率 Marker Frequency	Marker Frequency	相关系数 Correlation coefficient
Satt428-900	>20%	<20%	$-0.41^*$
Satt502-150	0.28	0.69	$0.41^*$
	0.86	0.45	

\*  $P < 0.05$ .

### 3 结论与讨论

目前全国油料作物种植面积持续下滑,产量徘徊不前,提高大豆产品质量已成为振兴大豆产业的基础条件<sup>[17]</sup>。黑龙江省是中国高油大豆优势产区,因此,研究大豆脂肪含量对于选育高油大豆品种、改善大豆品质具有重要意义。

本研究以黑龙江省 92 个主栽大豆品种(系)为研究对象,通过对其脂肪含量进行分析,结果表明,2010 年和 2011 年两年脂肪含量平均变异范围为 17.40%~23.09%。由此可见,黑龙江省主栽大豆品种(系)脂肪的遗传变异较为丰富,而且大部分品种的脂肪含量相对较高。研究亦发现黑龙江省主栽大豆品种(系)的脂肪含量多分布在 20% 左右。因此基于高油份含量的特点,黑龙江大豆主要适用于榨油、油脂食用、豆饼作饲料或肥料等方面。同时,分析结合 SSR 数据的 92 个主栽品种(系)的系统进化树,可以将供试品种(系)以脂肪含量 20% 为界分为两类。

此外,本研究鉴别出 2 个与脂肪含量紧密相关的 SSR 标记(Satt428-900、Satt502-150),其标记指数与脂肪含量均呈现显著相关(相关系数为  $-0.41^*$ 、 $0.41^*$ )。这 2 个标记应用于可以改进大豆脂肪含量的分子标记辅助育种。

### 参考文献

[1] 何海燕,沙伟,张艳馥. 黑龙江省大豆种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 大豆科学,2011,30(1):36-40. (He H Y, Sha W, Zhang Y F. ISSR analysis of the genetic diversity of soybean germplasm resources in Heilongjiang province[J]. Soybean Science,2011,30(1):36-40.)

[2] 郭文韬. 试论中国栽培大豆起源问题[J]. 自然科学史研究,1996,15(4):326-333. (Guo W T. On the origin of cultivated soybean problem[J]. Studies in the History of Natural Science,1996,15(4):326-333.)

[3] Diers B W, Shoemaker R C. Restriction fragment length polymorphism analysis of soybean fatty acid content[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology,1992,69:1242-1244.

[4] Li Z L, Wilson R F, Rayford W E, et al. Molecular mapping genes

conditioning reduced palmitic acid content in N872212224 soybean [J]. Crop Science,2002,42:373-378.

[5] Spencer M M, Pantalone V R, Meyer E J. Mapping the Fas locus controlling stearic acid content in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics,2003,106:615-619.

[6] Hyten D L, Pantalone V R, Sams C E, et al. Seed quality QTL in a prominent soybean population[J]. Theoretical and Applied Genetics,2004,109:552-561.

[7] 梁慧珍,王树峰,余永亮,等. 大豆异黄酮与脂肪、蛋白质含量基因定位分析[J]. 中国农业科学,2009,42(8):2652-2660. (Liang H Z, Wang S F, Yu Y L, et al. QTL mapping of isoflavone, oil and protein content in soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009,42(8):2652-2660.)

[8] 李侠,常玮,韩英鹏,等. 大豆种子脂肪酸含量的遗传分析[J]. 大豆科学,2009,28(3):404-408. (Li X, Chang W, Han Y P, et al. Genetic analysis on fatty acid composition contents in soybean seed[J]. Soybean Science,2009,28(3):404-408.)

[9] 杨少辉,张丽娟,段会军,等. 大豆种子 DNA 的提取方法[J]. 大豆科学,2003,22(2):151-153. (Yang S H, Zhang L J, Duan H J, et al. DNA extraction methods of soybean seeds[J]. Soybean Science,2003,22(2):151-153.)

[10] 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,2004,109:122-128.

[11] Triziano R N, Caetano-Anolles G. Laboratory exercises on DNA amplification Fingerprinting for evaluating the molecular diversity of horticultural species[J]. HortTechnology,1998,8:413-423.

[12] 李东风,张平,宫明. SAS 系统使用手册(5)[M]. 北京:北京出版社,1993. (Li D F, Zhang P, Gong M. SAS System user manual (5)[M]. Beijing:Beijing Press,1993.)

[13] Weir B S. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data[M]. Sunderland: Sinauer Associates,1990.

[14] Robert R S. Thurstone's analytical method for simple structure and a mass modification thereof[J]. Psychometrika,1958,3:237-257.

[15] Charles D M, Rudolf B L. Observations on the behavior of Brazilian halictid bees V. *Chloralictus* [J]. Insectes Sociaux, 1958, 4: 379-407.

[16] Mantel K, Schultze-Dewitz G, Willeitner H, et al. Buchbesprechungen[J]. Holz als Roh-und Werkstoff,1967,11:444.

[17] 韩冬伟,王守义,王淑荣,等. 黑龙江省齐齐哈尔市高油大豆脂肪积累动态的研究[J]. 黑龙江农业科学,2010(1):30-32. (Han D W, Wang S Y, Wang S R, et al. Dynamic research of high oil soybean fat accumulation in Qiqihar city, Heilongjiang province [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences,2010(1):30-32.)