

研究论文

Research Article

大豆异黄酮含量相关 SSR 分子标记的研究

傅旭军 朱申龙 朱丹华 袁凤杰 杨清华 郁晓敏 董德坤*

浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 杭州国家大豆改良分中心, 杭州, 310021

* 通讯作者, dongdekun@sohu.com

摘要 大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的一类次级代谢产物, 是一种重要的生物活性物质。本研究以异黄酮含量差异显著的‘中豆 27’(4 447 ug/g)和‘台湾 75’(2 062 ug/g)为亲本, 构建了包括 160 个家系 $F_{2.6}$ 高代重组自交系群体。采用高效液相色谱方法测定双亲及群体各单株的不同异黄酮组分的含量。异黄酮不同组别中, 大豆苷类含量最高, 黄豆黄素苷类含量最低。异黄酮不同存在形式中, 丙二酰基葡萄糖苷型含量最多, 苷元型含量最少。使用 197 对在双亲间表现出多态性的 SSR 引物对 RIL 群体进行扩增。而后使用 SAS 程序的 Proc GLM 命令进行异黄酮含量和标记间的方差分析, 在 $p < 0.01$ 显著水平上共检测到包括 21 个 SSR 标记的 41 个显著性互作。其中部分标记同时与多个不同的异黄酮成分相关, 4 个 SSR 标记与总异黄酮含量相关。本研究为高异黄酮含量育种的分子标记辅助选择奠定了基础。

关键词 大豆, 异黄酮, 高效液相色谱, 简单序列重复(SSR)

Studies on SSR Markers Associated with the Content of Soybean Isoflavones

Fu Xujun Zhu Shenlong Zhu Danhua Yuan Fengjie Yang Qinghua Yu Xiaomin Dong Dekun*

Hangzhou National Sub-center Soybean Improvement, Institute of Corp and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, 310021

* Corresponding author, dongdekun@sohu.com

DOI: 10.13271/j.mpb.014.000125

Abstract Soybean isoflavones are kinds of secondary metabolites generated in soybean growing stages, which have important biological activities. In this study, a segregating $F_{2.6}$ population with 160 RILs was developed by crossing ‘Zhongdou 27’ and ‘Taiwan 75’, with the total isoflavone contents of 4447 ug/g and 2062 ug/g, respectively. Isoflavones of both parents and the RIL populations were extracted and then measured by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. Among different groups, the daidzin group showed the highest isoflavones content, while the glycitin group showed the lowest. Among different structures, malonyl-glycosides had the highest isoflavones content, and aglycones had the lowest. After genotyping the RIL population with 197 simple sequence repeat (SSR) markers, an analysis of variance (ANOVA) was performed to detect the interaction between genetic markers and isoflavones contents. A total of 41 interactions between 9 kinds of isoflavone contents and 21 SSR markers were detected at $p < 0.01$ level. Some markers were associated with more than one kind of isoflavone contents simultaneously. Four markers were associated with the total isoflavone content. This research might be a reference for detecting soybean isoflavones and further applying to marker assisted selections (MAS) in high isoflavone content breeding program.

Keywords Soybean, Isoflavone, HPLC, Simple sequence repeat (SSR)

大豆异黄酮是存在于大豆等豆科植物中的黄酮类化合物, 属于植物次生代谢产物。大豆异黄酮以 3 种形式(苷元型、葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型或丙二酰基葡萄糖苷型)存在, 因而共包括 12 种大豆异黄酮(表 1)。

基金项目: 本研究由浙江省旱作粮油科技创新团队项目(2011R50026-18)和农业部转基因生物新品种培育重大专项(2012ZX-08009004)共同资助

表 1 大豆异黄酮化合物的结构类型
Table 1 Structural types of soybean isoflavones

结构类别	苷元型	葡萄糖苷型	乙酰基葡萄糖苷型	丙二酰基葡萄糖苷型
Structural categories	Aglycones	Glycosides	Acetyl-glycosides	Malonyl-glycosides
大豆苷类	大豆苷元	大豆苷	乙酰大豆苷	丙二酰大豆苷
Daidzin group	Daidzein (De)	Daidzin (D)	6"-O-acetyldaidzin (AD)	6"-O-malonyldaidzin (MD)
染料木苷类	染料木黄酮	染料木苷	乙酰染料木苷	丙二酰染料木苷
Genistin group	Genistein (Ge)	Genistin (G)	6"-O-acetylgenistin (AG)	6"-O-malonylgenistin (MG)
黄豆黄素苷类	黄豆黄素	黄豆黄素苷	乙酰黄豆黄素苷	丙二酰黄豆黄素苷
Glycitin group	Glycitein (GLE)	Glycitin (GL)	6"-O-acetylglycitin (AGL)	6"-O-malonylglycitin (MGL)

大豆异黄酮是一种天然植物弱雌激素，可以起到类雌激素作用，明显减轻由于更年期热潮而引起的不适应症状(Tham et al., 1998)。研究表明大豆异黄酮在抗癌(Zhang et al., 2008; Dagdemir et al., 2013; Tian et al., 2014)、抗骨质疏松(Om and Shim, 2007; Alekel et al., 2010)、预防心血管病(Sirtori and Lovati, 2001)、提高记忆力(Thorp et al., 2009; Bansal and Parle, 2010)、抗菌消炎(Naim et al., 1974)以及提高机体免疫力等方面具有重要的作用。大豆异黄酮在医药(Kronenberg and Fugh-Berman, 2002)、食品(吴伟等, 2008)、畜牧业(Yuan et al., 2012)等多个行业具有广阔的应用前景,是目前大豆研究的热点之一。

大豆异黄酮含量属于多基因控制的数量性状。不同大豆品种间的大豆异黄酮含量差异很大(孙君明等, 2002)。运用传统的育种方式很难对这类性状进行选择。结合现代分子生物学技术,对大豆异黄酮含量相关的 QTL 进行定位或对其主效基因进行分子标记,将会极大推动分子标记辅助育种在大豆品质育种上的应用。

本研究以黄酮含量差异显著的‘中豆 27’和‘台湾 75’为亲本构建大豆高世代重组自交系群体,使用高效液相色谱(HPLC)的方法测定群体 12 中异黄酮成分的含量;而后使用 SSR 分子标记对异黄酮含量进行关联分析;以期获得与大豆异黄酮含量紧密相关的分子标记,进而为大豆异黄酮含量相关的分子标记辅助选择奠定基础。

1 结果与分析

1.1 大豆异黄酮含量及其在 F_{2:6} 群体中的分布

本研究使用的 HPLC 检测方法可以清晰地将大豆 12 种异黄酮成分区分出来(图 1),检测方法稳定可靠。大豆异黄酮 12 种成分中 A-Genistin、M-Glycitein、Genistein 和 Daidzein 四种成分由于含量较低,

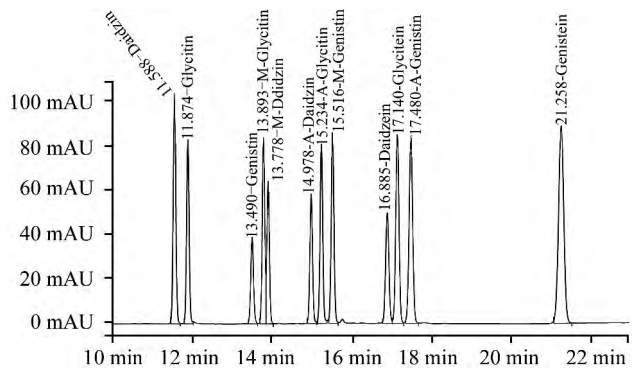


图 1 大豆 12 种异黄酮标样的 HPLC 图谱

Figure 1 Chromatogram of 12 soybean isoflavones

部分材料检测值为 0,因而未用于统计分析。其它 8 种(A-Daidzin, A-Glycitein, Daidzin, Genistin, Glycitein, Glycitin, M-Daidzin, M-Genistin)异黄酮成分含量和总异黄酮含量(Total)均呈现明显的单峰分布,表现为典型的数量性状特征(图 2)。正态检验结果表明, A-Glycitein、M-Daidzin 和总异黄酮含量同时符合正态分布(数据略)。

在 160 个 RIL 中,大豆总异黄酮含量单株最高达到 5 449.9 $\mu\text{g/g}$,最低值为 2 191.1 $\mu\text{g/g}$,平均 3 467.1 $\mu\text{g/g}$ 。8 种异黄酮成分中 M-Daidzin 含量最高,介于 770.0 $\mu\text{g/g}$ 和 2 330.4 $\mu\text{g/g}$ 之间,平均 1 334.0 $\mu\text{g/g}$; Glycitein 含量最低,介于 27.6 $\mu\text{g/g}$ 和 86.6 $\mu\text{g/g}$ 之间,平均仅为 53.5 $\mu\text{g/g}$ 。

大豆苷、染料木苷和黄豆黄素苷 3 类异黄酮中,大豆苷类含量最高,单株最高值达到 3 276.8 $\mu\text{g/g}$,最低为 1 108.3 $\mu\text{g/g}$;染料木苷类含量其次,最高为 2 086.1 $\mu\text{g/g}$,最低为 889.0 $\mu\text{g/g}$;黄豆黄素苷类含量最低,平均含量仅为 239.2 $\mu\text{g/g}$ 。

大豆异黄酮的四种不同存在形式中,丙二酰基葡萄糖苷型含量最高,平均为 2 426.5 $\mu\text{g/g}$,占总异黄酮含量的 70.26%;其次是葡萄糖苷型,含量为 755.6 $\mu\text{g/g}$,占总异黄酮含量的 21.88%;苷元型含量最低,平均 53.5 $\mu\text{g/g}$,仅占总异黄酮含量的 1.55%。

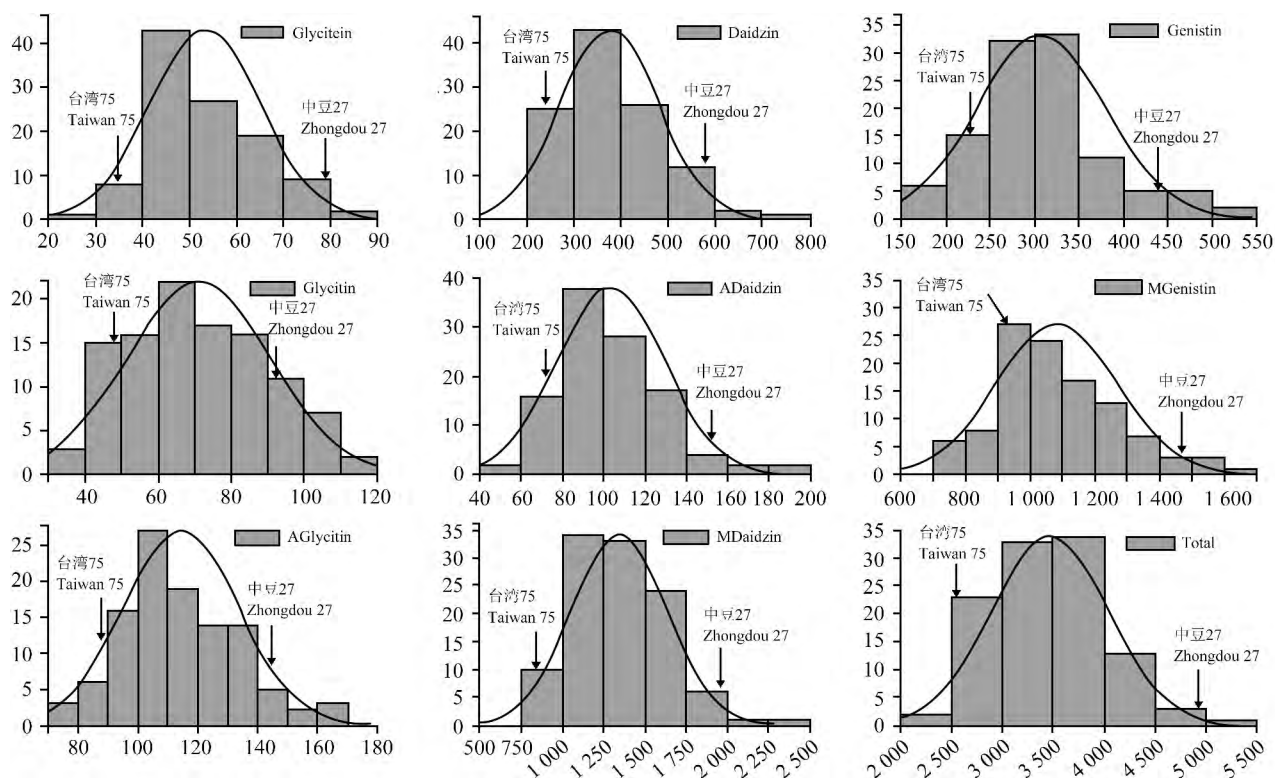


图2 大豆异黄酮含量在 F_{26} RIL 群体中的分布

注: 纵坐标为频数; 横坐标为异黄酮含量(单位 ug/g)

Figure 2 Distribution of soybean isoflavones content in the F_{26} RIL population

Note: Numbers in vertical coordinates mean frequency; Numbers in horizontal coordinates mean soybean isoflavone contents (ug/g)

1.2 不同异黄酮种类的相关分析

处理 A-Genistin、M-Glycitin、Genistein 和 Daidzein 含量低未用于分析外,其它 8 种异黄酮及总异黄酮含量间的相关分析表明: Glycitein 与 Glycitin、Daidzin、MDaidzin 不相关, A-Daidzin 与 A-Glycitin、M-Genistin 不相关, Glycitin 与 A-Daidzin 含量显著 ($p < 0.05$) 正相关,除此之外的所有其它性状之间均表现为极显著 ($p < 0.01$) 正相关(表 2)。

1.3 SSR 分析

从 Soybase 数据库选择的分布在不同染色体的 700 个 SSR 标记中有 197 个在双亲间表现出明显的多态性,且扩增条带清晰易辨,双亲间 SSR 标记多态性比例为 28.1%。在检测的 F_{26} 群体中,197 个 SSR 标记的带型均表现为“A”、“B”或者“.”(难于辨识或缺失),未发现杂合型带型出现。图 3 为 Satt289 和 Satt565 在部分 F_{26} 群体中的分离情况。

参照 Soybase 数据库及 Song 等(2010)的研究结果,双亲间表现多态性的 197 个 SSR 标记涵盖了大豆的 20 个连锁群。其中 D1b 连锁群标记最多,含 19 个 SSR 标记, E 连锁群最少,仅包括 4 个 SSR 标记(图 4)。

1.4 异黄酮含量关联 SSR 标记的分析

使用 SAS 的 Proc GLM 命令对 F_{26} 群体 8 种异黄酮组分(A-Daidzin, A-Glycitin, Daidzin, Genistin, Glycitein, Glycitin, M-Daidzin、M-Genistin)、总异黄酮含量与对应的 SSR 标记进行方差分析。结果 8 种异黄酮组分和总异黄酮含量性状在 $p < 0.01$ 水平共检测到 41 个 SSR 标记与异黄酮含量之间的显著性互作。与异黄酮含量互作的 SSR 标记共 21 个,分布于除 A2、D1b、F、H 和 L 连锁群以外的其余 15 个大豆连锁群,其中 B1、C2 连锁群上各有 3 个标记、J 连锁群上有 2 个标记分别与多种异黄酮成分相关(图 4)。与 A-Daidzin 含量互作的 SSR 标记最少,仅有 1 个 sat_174; 与 Glycitin 含量互作的标记最多,共有 11 个;与总异黄酮含量相关标记有 4 个(表 3)。

部分标记同时与多个性状相关,如 sat_366 与 A-Glycitin、Genistin、M-Genistin、Totals 相关,标记 sat_402 与 A-Glycitin、Genistin、Glycitein、M-Genistin 相关;标记 sat_259 与 A-Glycitin、Daidzin、Genistin、Glycitein、M-Daidzin、M-Genistin、Totals 相关等(图 4)。

值得注意的是,有些标记与同一类异黄酮的不同存在形式同时相关。如大豆苷类(Daidzin Group)

表 2 不同异黄酮成分之间的相关性

Table 2 Correlations between different components of soybean isoflavones

组分大豆异黄酮 Components of soybean isoflavones	黄豆黄素 Glycitein	黄豆黄 素苷 Glycitin	大豆苷 Daidzin	染料木苷 Genistin	乙酰黄豆 黄素苷 A-Glycitin	乙酰大豆苷 A-Daidzin	丙二酰大 豆苷 M-Daidzin	丙二酰染 料木苷 M-Genistin	总含量 Total
黄豆黄素 Glycitein	1.000	0.099	0.092	0.371	0.425	0.577	-0.016	0.383	0.247
黄豆黄素苷 Glycitin	0.303 9	1.000	0.343 2	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.866 7	<0.000 1	0.009 7
大豆苷 Daidzin	0.092	0.400	1.000	0.615	0.356	0.638	0.884	0.332	0.869
染料木苷 Genistin	0.343 2	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.000 4	<0.000 1
乙酰黄豆黄素苷 A-Glycitin	0.371	0.385	0.615	1.000	0.860	0.279	0.427	0.869	0.802
乙酰大豆苷 A-Daidzin	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.003 3	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
丙二酰大豆苷 M-Daidzin	0.425	0.381	0.356	0.860	1.000	0.184	0.353	0.981	0.738
丙二酰染料木苷 M-Genistin	<0.000 1	<0.000 1	0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.054 9	0.000 2	<0.000 1	<0.000 1
总含量 Total	0.577	0.209	0.638	0.279	0.184	1.000	0.611	0.102	0.565
	<0.000 1	0.028 9	<0.000 1	0.003 3	0.054 9	<0.000 1	<0.000 1	0.289 6	<0.000 1
	-0.016	0.418	0.884	0.427	0.353	0.611	1.000	0.300	0.868
	0.866 7	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.000 2	<0.000 1	<0.000 1	0.001 5	<0.000 1
	0.383	0.308	0.332	0.869	0.981	0.102	0.300	1.000	0.706
	<0.000 1	0.001 1	0.000 4	<0.000 1	<0.000 1	0.289 6	0.001 5	<0.000 1	<0.000 1
	0.247	0.491	0.869	0.802	0.738	0.565	0.868	0.706	1.000
	0.009 7	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

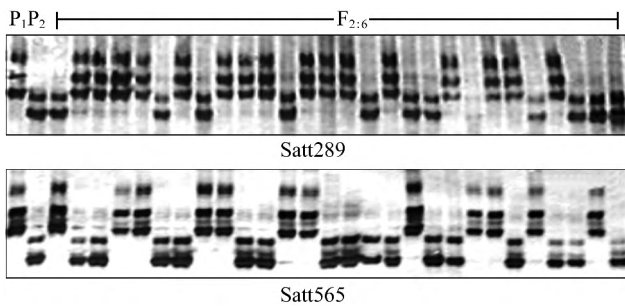


图 3 标记 satt289 和 satt565 在 F_{26} 群体中的分离
注: P₁: 中豆 27; P₂: 台湾 75
Figure 3 Segregation of SSR markers satt289 and satt565 in the F_{26} RIL population
Note: P₁: Zhongdou27; P₂: Taiwan75

中, 标记 sat_174 同时与 Daidzin 和 A-Daidzin 相关, sat_259 同时与 Daidzin 和 M-Daidzin 相关。染料木苷类(Genistin Group)中, sat_402、sat_259、sat_366 和 satt577 分别与 Genistin 和 M-Genistin 相关。黄豆黄素苷类(Glycitin Group)中的 sat_402 和 sat_259 也分别与 Glycitin 和 A-Glycitin 相关(表 3)。

2 讨论

大豆异黄酮由于具有特定的生理活性而在品种选育过程中备受人们关注。异黄酮各成分均表现为

典型的数量性状(图 2), 因而传统的育种方式在高异黄酮含量新品种选育过程中难度较大。由于 DNA 水平的分子标记具有遗传稳定、不受环境影响等优点, 如能找到控制异黄酮生物合成的关键基因、QTL 或者与异黄酮含量紧密连锁的分子标记, 则将会大大促进异黄酮含量相关的品质育种进程, 这也是科研工作者的努力方向之一。

本试验使用高效液相色谱方法(Yuan et al., 2009)测定了大豆重组自交系群体 12 种异黄酮的含量, 并对其进行分析。12 种异黄酮中, 苷元型含量最低, Daidzein 和 Genistein 在许多株系中均未检测到, Glycitein 含量也仅占总含量的 1.56%, 这与相关报道的游离型苷元含量仅占总异黄酮含量的 2-3%基本吻合(Kudou et al., 1991; 吴伟等, 2008)。

通过使用 197 对 SSR 引物对大豆重组自交系群体的异黄酮含量进行单标记的 QTL 定位, 共找与总异黄酮含量及 8 种不同异黄酮成分相关的 SSR 标记 21 个。在这 21 个 SSR 标记中, 同一标记与多个异黄酮成分相关的现象非常普遍(表 3), 尤其是同一标记同时与同一类异黄酮的不同存在形式相关这一现象非常值得注意。在前人的研究中也可以看到相似的同—标记/QTL/染色体区域对应不同异黄酮性状的研究结果(Gutierrez-Gonzalez et al., 2009; 2010; 2011;

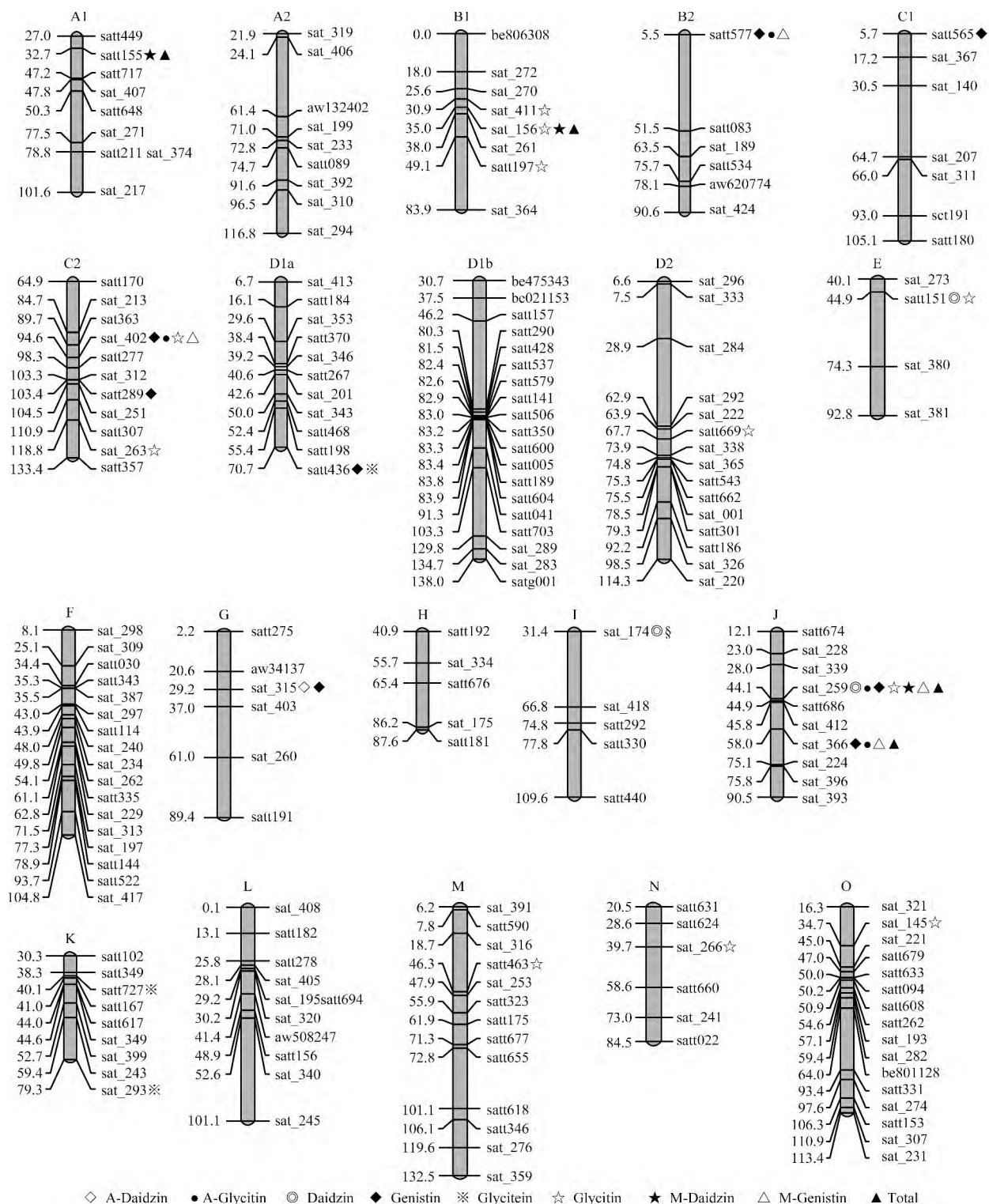


图 4 异黄酮相关标记在遗传连锁图谱上的分布

注: 所有标记均为在双亲间表现出多态性的 SSR 标记

Figure 4 Distribution of the SSR markers associated with isoflavone contents on the Linkage groups

Note: All the makers mapped on the linkage groups are polymorphism between parents

Li et al., 2014; Meksem et al., 2001; Meng et al., 2011; Zeng et al., 2009; Zhang et al., 2014)。一方面, 这种现象可能与不同异黄酮成分含量极显著正相关有关(表2),

另一方面, 同一类异黄酮的不同存在形式可以相互转化可能是造成这一结果的原因之一。

参照前人研究结果我们发现, 与 Glycitin 相关的

表 3 异黄酮含量相关 SSR 分子标记
Table 3 SSR markers associated with the contents of soybean isoflavones

异黄酮 Isoflavone	标记 SSR marker	p 值 p value	连锁群 Linkage group	位置(cM) Position (cM)	相关 QTL 及分子标记等 QTL and SSR makers		
					QTL 或标记(性状) QTL/Maker (Trait)	连锁群位置 Position	参考文献 Reference
大豆苷 Daidzin	sat_174	0.004 8	I	31.38			
	sat_259	0.001 3	J	44.05	qDAI16 (Daidzein)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
	satt151	0.006 8	E	44.93	qTOT16 (Total)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
乙酰大豆苷 A-Daidzin	sat_174	0.005 3	I	31.38			
丙二酰 大豆苷 M-Daidzin	satt155	0.005 8	A1	32.69	qGLY5_2 (Glycitein)	32.40~33.81	Gutierrez-Gonzal et al., 2011
					Satt155 (Genistein)	32.69	Primomo et al., 2005
	sat_156	0.005 3	B1	35.00	Satt251 (Glycitin)	38.80	Meksem et al., 2001
					Satt251 (Glycitin)	38.80	Kassem et al., 2004
	sat_259	0.003 6	J	44.05	qDAI16 (Daidzein)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
					qTOT16 (Total)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
染料木苷 Genistin	satt565	0.002 1	C1	5.74	qDAI4 (Daidzein)	10.45~20.97	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
	sat_402	0.000 9	C2	94.58	qDAI6 (Daidzein)	103.19~103.33	Gutierrez-Gonzal et al., 2011
					qGEN6 (Genistein)	98.15~100.91	Gutierrez-Gonzal et al., 2011
					qTOT6 (Total)	98.15~100.91	Gutierrez-Gonzal et al., 2011
	satt289	0.008 6	C2	103.42	Satt289 (Genistein)	103.42	Primomo et al., 2005
	sat_315	0.001 9	G	29.20			
	sat_259	<0.000 1	J	44.05	qGLY6-2 (Glycitein)	103.20	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
					qDAI16 (Daidzein)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
					qTOT16 (Total)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
	sat_366	0.007 6	J	57.95			
	satt577	0.001 7	B2	5.47			
	satt436	0.003 2	D1a	54.52	qDAI1 (Daidzein)	56.59	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
丙二酰 染料木苷 M-Genistin	sat_402	0.000 5	C2	94.58			
	sat_259	0.000 2	J	44.05	qDAI16 (Daidzein)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
					qTOT16 (Total)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
	sat_366	0.001 9	J	57.95			
	satt577	<0.000 1	B2	5.47			
黄豆黄素 Glycitein	satt727	0.001 3	K	40.10	Satt555/Satt178 (Daidzein)	35.75~37.82	Kassem et al., 2004
					Sat_116 (Glycitein)	44.45	Meksem et al., 2001
					Satt337 (Glycitein)	38.93	Meksem et al., 2001
	satt436	0.005 5	D1a	54.52			
	sat_293	0.000 1	K	79.33	Satt196 (Glycitein)	83.24	Primomo et al., 2005
黄豆黄素苷 Glycitin	sat_402	0.003 8	C2	94.58			
	sat_263	0.003 2	C2	118.77			
	sat_411	0.005 5	B1	30.87			
	sat_156	0.000 1	B1	35.00	Satt251 (Glycitin)	38.80	Meksem et al., 2001
					Satt251 (Glycitin)	38.80	Kassem et al., 2004
	sat_145	0.004 9	O	34.66			
	sat_259	0.008 2	J	44.05	qDAI16 (Daidzein)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
					qTOT16 (Total)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010

续表 3

Continuing table 3

异黄酮 Isoflavone	标记 SSR marker	<i>p</i> 值 <i>p</i> value	连锁群 Linkage group	位置(cM) Position (cM)	相关 QTL 及分子标记等 QTL and SSR makers		
					QTL 或标记(性状) QTL/Maker (Trait)	连锁群位置 Position	参考文献 Reference
	satt151	0.006 0	E	44.93			
	satt197	<0.000 1	B1	49.07	Satt197 (Glycitin)	49.07	Meksem et al., 2001
	sat_266	0.006 0	N	39.72	Satt197 (Glycitin)	49.07	Kassem et al., 2004
	satt463	0.000 9	M	46.27	Satt080 (Glycitin)	43.69	Kassem et al., 2004
	satt669	0.006 2	D2	67.70	Satt080 (Daidzein)	43.69	Meksem et al., 2001
乙酰黄豆	sat_402	0.001 3	C2	94.58	Satt245 (Daidzein, Genistein, Total)	49.03	Primomo et al., 2005
黄素苷	sat_259	0.000 3	J	44.05			
A-Glycitin					qDAI16 (Daidzein)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
	sat_366	0.002 1	J	57.95	qTOT16 (Total)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
	satt577	0.000 2	B2	5.47			
总含量	satt155	0.008 5	A1	32.69	qGLY5_2 (Glycitein)	32.40~33.81	Gutierrez-Gonzal et al., 2011
Total					Satt155 (Genistein)	32.69	Primomo et al., 2005
	sat_156	0.006 3	B1	35.00	Satt251 (Glycitin)	38.80	Meksem et al., 2001
	sat_259	<0.000 1	J	44.05	Satt251 (Glycitin)	38.80	Kassem et al., 2004
	sat_366	0.005 6	J	57.95	qDAI16 (Daidzein)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010
					qTOT16 (Total)	41.85	Gutierrez-Gonzal et al., 2010

satt197 标记与 Kassem 等(2004)报道相关标记完全一致;与 Genistin 含量相关的标记 satt289 与 Primomo 等(2005)报道的 Genistein 相关标记以及 Gutierrez-Gonzalez 等(2010)报道的控制 Glycitein 含量的 QTL 吻合;与 M-Daidzin 相关的 Satt155 与 Primomo 等(2005)报道的 Genistein 相关的标记一致。而部分其它标记,如 Glycitein 相关的 sat_293、Glycitin 相关的 sat_156、sat_266 和 satt463, M-Daidzin 和 Totals 相关的 sat_156 也在文献中找到了遗传距离在 5 cM 以内的对应 QTLs (表 3)。这些标记或者标记所在染色体区段在不同的研究中重复出现,可能存在较高的潜在应用价值。

本研究初步确定了与大豆异黄酮含量相关的多个分子标记。由于异黄酮含量除了受本身遗传因素影响外,还会受生长季节、温度、光照等诸多环境因素影响(孙君明和丁安林, 1998; 沈黎明等, 1999; 刘丽君等, 2002; 李卫东等, 2004; 梁慧珍, 2005), 因而对异黄酮含量相关的 QTL、分子标记的验证等还需要通过多年多点试验等进行综合研究。

3 材料与方法

3.1 分析群体构建

以异黄酮含量差异显著的‘中豆 27’(总异黄酮含量 4 447 $\mu\text{g/g}$)和‘台湾 75’(总异黄酮含量 2 062 $\mu\text{g/g}$)为亲本进行杂交,后代经杭州(春秋两季)和海南连续加代繁殖,构建了包括 160 个家系的 $F_{2.6}$ 高代重组自交系群体。

3.2 异黄酮提取与含量测定

参照 Yuan 等(2009)的方法提取和测定大豆异黄酮含量。取 0.5 g 大豆粉加入含 5 mL 按 3:1 (v/v)混合的甲醇:0.1 mmol/L 盐酸的离心管中,200 r/min 振荡提取 2 h。吸取 2 mL 提取混合物至 2 mL 离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min 离心 15 min。上清液使用 0.45 μm 的 PTFE 膜过滤用于异黄酮含量测定。

使用安捷伦 1100 系列 HPLC 系统进行异黄酮含量测定。色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 \times 150 mm, 5 μm 。流动相 A:0.1%的三氟乙酸水溶液(v/v), 流动相 B:0.1%三氟乙酸乙腈溶液(v/v), 流速

1 mL/min。流动相动态变化设定为(流动相 A%/ 流动相 B%) :起始(100/0) ,14 min(71/29) ,18 min(70/30) ,24 min(58/42) ,34 min(100/0)。进样量 5 μ L ,柱稳 37 $^{\circ}$ C ,检测波长 254 nm。所有异黄酮标样均购自 Sigma 公司。

3.3 DNA 提取与 SSR 分析

利用 CTAB 法微量提取大豆基因组 DNA ,并使用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测提取总 DNA 的质量。从 Soybase 数据库中(<http://www.soybase.org>)选择分布在不同染色体上的 700 对 SSR 引物进行多态性筛选 ,利用条带清晰且在双亲间表现为多态性的引物对重组自交系群体进行扩增。

PCR 反应体系 :基因组 DNA 约 100 ng ,上下游引物各 0.3 μ mol/L ,2 \times GoTaq Green mix (Promega) 5 μ L ,补充去离子水至总体积为 10 μ L。为兼顾不同 SSR 引物退火温度的差异 ,PCR 反应程序设定为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min ,94 $^{\circ}$ C 变性 20 s ,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s ,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s ,共 13 个循环 ,每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C ,然后是 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s ,47 $^{\circ}$ C 退火 20 s ,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s ,共 25 个循环 ,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min ,PCR 产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

SSR 标记对双亲及重组自交系群体的 PCR 扩增结果使用 6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离检测 ,并参照许绍斌等(2002)的方法进行银染和显色。简单来说 ,聚丙烯酰胺凝胶首先在 0.1%的硝酸银(w/v)溶液中振荡染色 10 min ,然后用自来水冲洗 30 s ,最后在含 0.5%甲醛(v/v)的 2%的氢氧化钠(w/v)溶液中振荡显色至条带清晰可辨。

3.4 条带统计

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳结果进行条带统计。条带类型表现为亲本 1 的记为“A” ,表现亲本 2 的记为“B” ,表现为双亲杂合型的记为“H” ,难于辨别的条带或缺失数据记为“.”。

3.5 数据分析

使用 SAS for windows v8.1 的 PROC UNIVARIATE NORMAL 命令检测各类异黄酮含量的在 RIL 群体的分布情况 ,并使用 OriginPro 7.5 作图。

使用 SAS for windows v8.1 的 PROC GLM 命令进行异黄酮含量相关标记的筛选 ,以 $p < 0.01$ 为阈值判断标记与异黄酮含量相关的显著性。使用 PROC CORR 命令分析不同异黄酮组分之间的相关性。

分子标记的遗传位置参考 Song 等(2010)研究结

果。与异黄酮含量相关 SSR 标记在连锁图谱上的分布使用 MapChart v2.1 软件进行绘制。

作者贡献

傅旭军、朱申龙和朱丹华是本研究的实验设计和实验研究的执行人 ;傅旭军和袁凤杰完成数据分析 ,论文初稿的写作 ;杨清华和郁晓敏参与实验设计 ,试验结果分析 ;董德坤是项目的构思者及负责人 ,指导实验设计 ,数据分析 ,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由浙江省旱作粮油科技创新团队项目(2011R50026-18)和农业部转基因生物新品种培育重大专项(2012ZX08009004)共同资助。

参考文献

- Alekel D.L., Van Loan M.D., Koehler K.J., Hanson L.N., Stewart J.W., Hanson K.B., Kurzer M.S., and Peterson C.T., 2010, The soy isoflavones for reducing bone loss (SIRBL) study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.*, 91: 218-230
- Bansal N., and Parle M., 2010, Soybean supplementation helps reverse age- and scopolamine-induced memory deficits in mice, *J. Med. Food*, 13(6): 1293-1300
- Dagdemiir A., Durif J., Ngollo M., Bignon Y.J., and Bernard-Gallon D., 2013, Histone lysine trimethylation or acetylation can be modulated by phytoestrogen, estrogen or anti-HDAC in breast cancer cell lines, *Epigenomics*, 5: 51-63
- Gutierrez-Gonzalez J.J., Vuong T.D., Zhong R., Yu O., Lee J.D., Shannon G., Ellersieck M., Nguyen H.T., and Sleper D.A., 2011, Major locus and other novel additive and epistatic loci involved in modulation of isoflavone concentration in soybean seeds, *Theor. Appl. Genet.*, 123(8): 1375-1385
- Gutierrez-Gonzalez, J.J., Wu X., Gillman J.D., Lee J.D., Zhong R., Yu O., Shannon G., Ellersieck M., Nguyen H.T., and Sleper D.A., 2010, Intricate environment-modulated genetic networks control isoflavone accumulation in soybean seeds, *BMC Plant Biology*, 10: 105
- Gutierrez-Gonzalez J.J., Wu X.L., Zhang J., Lee J.D., Ellersieck M., Shannon J.G., Yu O., Nguyen H.T., and Sleper D.A., 2009, Genetic control of soybean seed isoflavone content: importance of statistical model and epistasis in complex traits, *Theor. Appl. Genet.*, 119(6): 1069-1083
- Kassem M.A., Meksem K., Iqbal M.J., Njiti V.N., Banz W.J., Winters T.A., Wood A., and Lightfoot D.A., 2004, Definition of soybean genomic regions that control seed phytoe-

- strogen amounts, *J. Biomed. Biotech.*, 1: 52-60
- Kronenberg F., and Fugh-Berman A., 2002, Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials, *Ann. Intern. Med.*, 137: 805-813
- Kudou S., Fleury Y., and Welti D., 1991, Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), *J. Agric. Biol. Chem.*, 55(9): 2227-2233
- Li W.D., Liang H.Z., Lu W.G., Wang S.F., Yang Q.C., Yang C. Y., and Liu Y.F., 2004, Effects of eco-physiological factors on isoflavone contents in soybean seeds, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 37(10): 1458-1463 (李卫东, 梁慧珍, 卢为国, 王树峰, 杨青春, 杨彩云, 刘亚非, 2004, 大豆籽粒异黄酮含量与生态因子相关关系的研究, *中国农业科学*, 37(10): 1458-1463)
- Li B., Tian L., Zhang, J.Y., Huang L., Han F.X., Yan S., Wang L. Z., Zheng H.K., and Sun J.M., 2014, Construction of a high-density genetic map based on large-scale markers developed by specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq) and its application to QTL analysis for isoflavone content in *Glycine max*, *BMC Genomics*, 15: 1086
- Liang H.Z., Li W.D., Fang X.J., Cao Y.N., and Wang H., 2005, Genetic analysis of combining abilities and heterosis in contents of soybean isoflavone and its components among the soybean varieties [*Glycine max* (L.) Merr.], *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 38(10): 2147-2152 (梁慧珍, 李卫东, 方宣钧, 曹颖妮, 王辉, 2005, 大豆异黄酮及其组分含量的配合力和杂种优势, *中国农业科学*, 38(10): 2147-2152)
- Liu L.J., Gao M.J., Wu J.J., Yang Y.F., Li Y.Z., Liang X.L., and Pu G.F., 2002, Study on Genetic Change and Selection of Soybean Processing Qualities, *Heilongjiang Nongye Kexue (Heilongjiang Agricultural Sciences)*, (1): 13-14 (刘丽君, 高明杰, 吴俊江, 杨玉芳, 李玉征, 梁孝莉, 蒲国锋, 2002, 大豆加工品质的资源筛选和遗传改良的研究, *黑龙江农业科学*, (1): 13-14)
- Meksem K., Njiti V.N., Banz W.J., Iqbal M.J., Kasseem M.M., Hyten D.L., Yuang J., Winters T.A., and Lightfoot D.A., 2001, Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content, *J. Biomed. Biotech.*, 1: 38-44
- Meng F.L., Han Y.P., Meng W.L., Li Y.G., and Li W.B., 2011, QTL underlying the resistance to soybean aphid (*Aphis glycines* Matsumura) through isoflavone-mediated antibiosis in soybean cultivar 'Zhongdou 27', *Theor. Appl. Genet.*, 123: 1459-1465
- Naim M., Gestetner B., Zilkah S., Birk Y., and Bondi A., 1974, Soybean isoflavones characterization, determination, and antifungal activity, *Agr. Food Chem.*, 22(5): 806-810
- Om A.S., and Shim J.Y., 2007, Effect of daidzein, a soy isoflavone, on bone metabolism in Cd-treated ovariectomized rats, *Acta Biochimica Polonica*, 54(3): 641-646
- Primomo V.S., Poysa V., Ablett G.R., Jackson C.J., Gijzen M., and Rajcan I., 2005, Mapping QTL for individual and total isoflavone content in soybean seeds, *Crop Sci.*, 45: 2454-2464
- Shen L.M., Sun J.M., and Ding A.L., 1999, Contents and distribution of isoflavones in soybean under different light conditions, *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Oil Crop Sciences)*, 2(2): 36-40 (沈黎明, 孙君明, 丁安林, 1999, 不同光照条件下大豆体内异黄酮的含量与分布, *中国油料作物学报*, 2(2): 36-40)
- Sirtori C.R., and Lovati M.R., 2001, Soy proteins and cardiovascular disease, *Curr. Atheroscler Rep.*, 3(1): 47-53
- Song Q.J., Jia G.F., Zhu Y.L., Grant D., Nelson R.T., Hwang E. Y., Hyten D.L., and Cregan P.B., 2010, Abundance of SSR motifs and development of candidate polymorphic SSR markers (BARCSOYSSR_1.0) in soybean, *Crop Sci.*, 50(5): 1950-1960
- Sun J.M., and Ding A.L., 1998, Accumulation of isoflavone of soybean seeds during development, *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)*, 34(1): 10-13 (孙君明, 丁安林, 1998, 大豆种子发育过程中异黄酮的积累, *植物生理学通讯*, 34(1): 10-13)
- Sun J.M., Ding A.L., and Chang R.Z., 2002, Genetic analysis on isoflavone content in soybean seeds, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 35(1): 16-21 (孙君明, 丁安林, 常汝镇, 2002, 大豆籽粒中异黄酮含量的遗传初步分析, *中国农业科学*, 35(1): 16-21)
- Tham D.M., Cardner C.D., and Haskell W.L., 1998, Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence, *J. Clin. Endocr. Metab.*, 83(7): 2223-2235
- Thorp A.A., Sinn N., Buckley J.D., Coates A.M., and Howe P.R. C., 2009, Soya isoflavone supplementation enhances spatial working memory in men, *Br. J. Nutr.*, 102(9): 1348-1354
- Tian T., Li J.S., Li B., Wang Y.W., Li M.Y., Ma D.X., and Wang X.W., 2014, Genistein exhibits anti-cancer effects via down-regulating FoxM1 in H446 small-cell lung cancer cells, *Tumour Biol.*, 35: 4137-4145
- Wu W., Wang C.Y., and Wu C., 2008, The study survey of soybean isoflavone, *Nongchanpin Jiagong Xuekan (Academic Periodical of Farm Products Processing)*, (3): 33-39 (吴伟, 王储炎, 吴传华, 2008, 大豆异黄酮的研究概况, *农产品加工学刊*, (3): 33-39)
- Xu S.F., Tao Y.F., Yang S.Q., and Chu J.Y., 2002, A simple and rapid method used for silvers staining and gel preservation, *Yichuan (Hereditas (Beijing))*, 24(3): 335-336 (许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 褚嘉佑, 2002, 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法, *遗传*, 24(3): 335-336)
- Yuan F.J., Zhu D.H., Deng B., Fu X.J., Dong D.K., Zhu S.L.,

- Li B.Q., and Shu Q.Y., 2009, Effects of two low phytic acid mutations on seed quality and nutritional traits in soybean (*Glycine max* L. Merr), *J. Agric. Food Chem.*, 57(9): 3632-3638
- Yuan X.X., Zhang B., Li L.L., Xiao C.W., Fan J.X., Geng M.M., and Yin Y.L., 2012, Effects of soybean isoflavones on reproductive parameters in Chinese mini-pig boars, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 3(4): 31
- Zeng G.L., Li, D.M., Han Y.P., Teng W.L., Wang J., Qiu L.Q., Li W.B., 2009, Identification of QTL underlying isoflavone contents in soybean seeds among multiple environments, *Theor. Appl. Genet.*, 118(8): 1455-1463
- Zhang H.J., Li J.W., Liu Y.J., Jiang W.Z., Du X.L., Li L., Li X.W., Su L.T., Wang Q.Y., and Wang Y., 2014, Quantitative trait loci analysis of individual and total isoflavone contents in soybean seeds, *J. Genet.*, 93(2): 331-338
- Zhang L.L., Li L., Wu D.P., Fan J.H., Li X., Wu K.J., Wang X.Y., and He D.L., 2008, A novel anti-cancer effect of genistein: reversal of epithelial mesenchymal transition in prostate cancer cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, 29(9): 1060-1068



Bioscience Methods (BM)



Bioscience Methods (ISSN 1925-1920) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The journal publishes all the latest and outstanding research articles, letters and reviews in all areas of bioscience, the range of topics including (but are not limited to) technology review, technique know-how, lab tool, statistical software and known technology modification. Case studies on technologies for gene discovery and function validation as well as genetic transformation. The standard article processing charges (APC) collected by BioPublisher is 1 200 CAD per article. Authors from low-income countries and areas or having financial difficulties can apply the discount for APC upon submission, and if the authors are qualified to be waived they don't necessarily pay the APCs. We do not want

fees to prevent the publication of worthy work.

Email: edit@bm.biopublisher.ca

Web: <http://bm.biopublisher.ca>