

研究报告

Research Report

大豆百粒重相关分子标记的实用性分析与验证

任海红¹ 刘学义^{1*} 朱保葛² 林汉明³

1 山西省农业科学院经济作物研究所, 汾阳, 032200; 2 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京, 100101; 3 香港中文大学生命科学学院, 香港, 999077

* 通讯作者, lxy1959@126.com

摘要 本研究从全国各地收集到不同生态类型大粒材料 36 份, 小粒材料 12 份。运用已经定位的分子标记共 7 对, 经 PCR 扩增, 用 9% 丙烯酰胺凝胶电泳, 统计每个 SSR 位点, 最后采用 SPSS 软件作方差分析。结果显示, 选出 3 个与大粒相关的实用性标记, 分别为 GNE070、Satt126 和 Satt633。可以被一个或一个以上标记检出的大粒材料占 35 (大粒材料共 36 份), 检出率高达 97.2%。研究结果表明用 GNE070、Satt126 和 Satt633 联合检测, 可以应用于分子标记辅助育种大粒育种实践。

关键词 大豆, 百粒重, 分子标记, 实用性

Practical Analysis & Verification of Molecular Marker of Weight of 100-seed in Soybean

Ren Haihong¹ Liu Xueyi^{1*} Zhu Baoge² Lam Honming³

1 Industrial Crop Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Fenyang, 032200; 2 Institute Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101; 3 School of Life Sciences, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, 999077

* Corresponding author, lxy1959@126.com

DOI: 10.13271/j.mpb.012.000069

Abstract 48 soybean (36 large grain varieties and 12 small grain varieties) varieties are collected from many areas of China, including different ecological types. 7 pairs of location-known molecular markers are used for systematically practical confirmation and value evaluation. Amplified by PCR, ran electrophoresis with a 9% acrylamide gel, counted each SSR loci and finally analysed variance with SPSS software. The results are as follows: 3 practical molecular markers (GNE070, Satt126, Satt633) were selected in the large/small grain group. In short, 35 materials can be detected by one or more markers (the number of large-seed material is 36), and the coincident rate is as high as 97.2%. The experimental results show that the joint use of GNE070, Satt126 and Satt633 is feasible in molecular marker-assisted breeding (large-grain breeding) practice.

Keywords Soybean, 100-seed weight, Molecular marker, Practicability

大豆在农作物中既是粮食兼油料作物, 又是家畜和轻工业的重要原料作物。提高大豆产量是育种家追求的永恒课题, 而百粒重是控制大豆产量性状的主要数量性状。目前, 对大豆百粒重进行基因定位已有较多研究(Liu et al., 2011; Orf et al., 1999; Mian et al., 1996; Zhang et al., 2004), 然而利用分子标记辅助育成的品系或品种还相对较少, 绝大多数的研究仍停留在标记鉴定、定位、作图等基础环节(杨友

才等, 2005)。这些分子标记受其原始研究材料所限制, 与育种家使用材料有较大差距, 难以真正应用于育种实践, 即分子育种与传统育种衔接不够, 育种家不便利用, 导致分子标记研究尚不能大规模应用。通过分子标记辅助选择提高效率, 大规模培育优良品系或品种的期望仍未实现。

目前, 大豆分子标记验证方面, 孙鸿雁等(2008)以 72 份高油、高蛋白种质资源为材料, 对大豆油分

收稿日期 2013-02-20

接受日期 2013-05-30

网络出版日期 2013-08-05

URL: <http://5th.sophiapublisher.com/abstract-1437-mpbopa>

基金项目 本研究由国家大豆产业技术体系和山西省百人计划项目共同资助

蛋白质含量相关的 QTL 进行了实用性验证。杨喆等(2008)对 F₂ 分离群体进行大豆高油基因 SSR 分子标记,并得到一个通用性标记。而在百粒重方面未见报道。本研究从育种家亲本材料出发,利用国内外一些已发表的与百粒重相关的 QTL 定位和分子标记研究成果,通过检测以验证其 QTL 的稳定性及实用性,为分子标记辅助大豆育种、鉴定目标性状选择育种提供分子水平上的理论依据。

1 结果与分析

1.1 电泳结果分析

电泳后统计带型进行方差分析(孙鸿雁等,2008),只有 GNE070、Satt126 和 Satt633 标记表现出显著或极显著差异(表 1)。GNE070、Satt126 和 Satt633 在大(小)粒组材料中的扩增产物呈多态性,对各等位变异的材料数量、所代表的平均百粒重进行统计,并做方差分析(表 1)。

GNE070 是一个 EST-SSR 标记,获得 2 种等位变异扩增产物, DNA 片段长度分别为 300 bp 和 280 bp,具有极显著差异。GNE070 第 2 等位变异,即 DNA 片段长度为 280 bp,所代表的大豆品种(系)平均百粒重为 28.1 g,明显高于第 1 等位变异的 18.9g(表 1)。即在 DNA 片段长度为 280 bp 下存在着一个与大粒

相关的等位变异(图 1)。在第 2 等位变异中大粒材料共 31 份,占大粒材料(36 份)总数的 86.1%。

Satt126 扩增产物存在 2 种等位变异, DNA 片段长度分别为 170 bp 和 130 bp,具有极显著差异。Satt126 第 1 等位变异所代表的平均百粒重为 27.8 g,明显高于第 2 等位变异的 20.5 g(表 1)。即在 DNA 片段长度为 170 bp 下存在着一个与大粒相连锁的等位变异。在第 1 等位变异中大粒材料共 29 份,占大粒材料(36 份)总数的 80.6%(图 2)。

Satt633 获得 3 种等位变异扩增产物, DNA 片段长度分别为 170 bp、160 bp 和 140 bp,其中 1 和 2 呈极显著差异,1 和 3 之间具有显著差异。Satt633 第 1 等位变异所代表的平均百粒重为 27.5 g,明显高于第 2、第 3 等位变异的 21 g 和 23.1 g(表 1)。即在 DNA 片段长度为 170 bp 下存在着一个与大粒相连锁的等位变异(图 3)。在第 1 等位变异中大粒材料共 29 份,占大粒材料(36 份)总数的 80.6%。

1.2 分子标记检测结果与品种(系)关系分析

GNE070、Satt126 和 Satt633 在大(小)粒组材料中的扩增产物呈多态性,对大粒材料在 GNE070、Satt126 和 Satt633 中出现与大粒相关(或连锁)的带型进行统计(表 2)。

从表 2 可以看出 36 份大粒材料可以被 GNE-

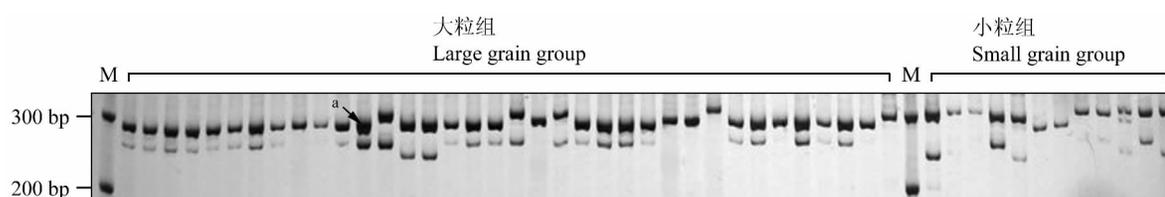


图 1 GNE070 在大 / 小粒组中的扩增

注: M: 100 bp DNA ladder marker; a: 第二等位变异

Figure 1 Amplification of GNE070 in the large/small grain group

Note: M: 100 bp DNA ladder marker; a: The second allelic variation

表 1 与百粒重相关的 SSR 位点中各等位变异所代表百粒重的数据分析

Table 1 Analysis of data for the weight of 100-seed among alleles of SSR loci with weight of 100-seed

引物 Primer	等位变异 Allele (No.)	DNA 片段(bp) DNA fragment (bp)	材料数量 Number	平均值(g) Mean (g)	方差分析 Analysis of variance		
					1-2	1-3	2-3
GNE070	1	300	15	18.9	t=-5.658		
	2	280	33	28.1	p=0.000**		
Satt126	1	170	17	20.5	t=-4.151		
	2	130	31	27.8	p=0.000**		
Satt633	1	170	29	27.5	t=2.712	t=2.261	t=-0.049
	2	160	12	21.0	p=0.010**	p=0.030*	p=0.961
	3	140	7	23.1			

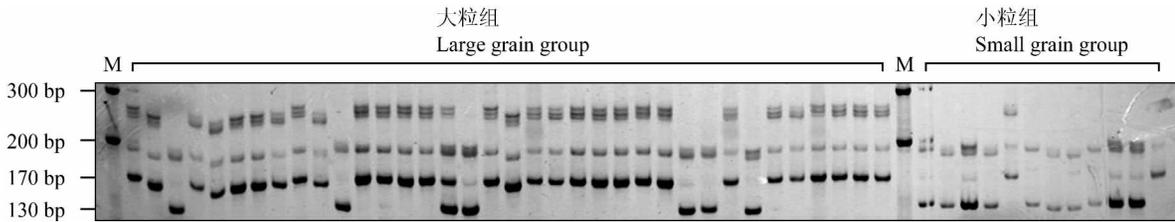


图 2 Satt126 在大 / 小粒组中的扩增

注: M: 100 bp DNA ladder marker

Figure 2 Amplification of Satt126 in the large/small grain group

Note: M: 100 bp DNA ladder marker

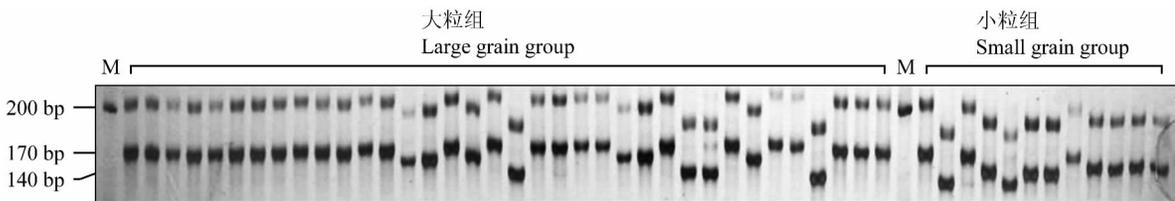


图 3 Satt633 在大 / 小粒组中的扩增

注: M: 100 bp DNA ladder marker

Figure 3 Amplification of Satt633 in the large/small grain group

Note: M: 100 bp DNA ladder marker

070、Satt126 和 Satt633 三个标记检出的材料占 20 份,如科丰 14、诱处 4 号、科丰 35 等育种骨干亲本材料。可被其中两个标记检出的材料占 11 份,被其中一个标记检出的材料占 4 份,只有一份材料徐豆 9313 未能被任何一个标记检出。由此可见,可以被一个或一个以上标记检出的大粒材料占 35 (大粒材料共 36 份) 检出率高达 97.2%。该结果表明用 GNE070、Satt126 和 Satt633 联合检测,应用于分子标记辅助育种大粒育种实践是可行的。

2 讨论

高产是育种专家们追求的主要目标,然而产量是个由多种性状作用并与环境互作形成的综合指标。在农业生产上,大豆的籽粒产量是用单位面积上株数、单株荚数、每荚粒数和百粒重来计算的,这些因子共同影响大豆的产量,并且这些因子互相影响、互相制约,其中任何一个因子发生变化,都会引起产量的变化。在这些产量因子中,百粒重是遗传力较高的性状。本研究选出 3 个与大粒有关的分子标记联合检出率高达 97.2%,但仍没有达到 100%,其原因在于百粒重是大豆的数量性状,是由微效多基因控制的,并受环境因素的影响。

目前,分子标记主要集中在标记鉴定、定位、作图等基础环节。大豆油分蛋白质方面有一些实用性研究,而在百粒重方面未见报到。本文选出 3 个与籽粒大小相关的实用性标记 GNE070、Satt126 和 Satt633,

这三个标记的联合检测,可以将分子标记与传统育种有效地结合,真正发挥分子标记在大粒育种中的作用。

3 材料与方法

3.1 实验材料

本研究从全国各地收集到大豆材料共 48 份(表 3),绝大部分为中国不同生态区域大豆育种研究的骨干亲本和特异材料,对我国目前大豆育种研究,特别是分子标记辅助育种有重要应用价值。所用引物共 7 对(GNE070, GNE230, Satt070, Satt126, Satt2-59, Satt409 和 Satt633),是汇总了目前国内外大豆分子标记研究的重要结果,从公共图谱或查文献获得,并结合本试验特点进行筛选。

3.2 实验方法

采用 CTAB 法提取大豆芽 DNA (王关林和方宏筠, 2005, 科学出版社, pp.744) 经 0.8% 的琼脂糖凝胶 (EB 染色) 上电泳检测 DNA 的质量,然后 SSR 扩增, 9% 丙烯酰胺胶电泳,最后统计每个 SSR 位点,以 1 和 0 记录等位基因的有无,缺失记为“.”,获得矩阵。将全部电泳结果的数据,采用 SPSS 软件作方差分析。

作者贡献

任海红是本研究的执行人,并完成数据分析,论文初稿的写作,朱保葛及林汉明是本研究的实验设计者,

表 2 大 / 小粒材料中 GNE070, Satt126 和 Satt633 标记出现情况统计

Table 2 Amplification statistics of GNE070, Satt126 and Satt633 in the large/small grain materials

材料编号 Code	GNE070	Satt126	Satt633	出现次数 Times	材料编号 Code	GNE070	Satt126	Satt633	出现次数 Times
1	+	+	+	3	25	+	+	-	2
2	+	+	+	3	26	+	+	+	3
3	+	-	+	2	27	+	-	-	1
4	+	+	+	3	28	-	-	-	0
5	+	+	+	3	29	+	+	+	3
6	+	+	+	3	30	+	-	-	1
7	+	+	+	3	31	+	+	+	3
8	+	+	+	3	32	+	+	+	3
9	+	+	+	3	33	+	+	-	2
10	+	+	+	3	34	+	+	+	3
11	+	-	+	2	35	+	+	+	3
12	+	+	+	3	36	-	+	+	2
13	-	+	+	2	37	-	-	+	1
14	+	+	-	2	38	-	-	-	0
15	+	+	-	2	39	-	-	+	1
16	+	-	+	2	40	-	-	-	0
17	+	-	-	1	41	-	+	-	1
18	+	+	+	3	42	+	-	-	1
19	-	+	-	1	43	+	-	-	1
20	+	+	+	3	44	-	-	+	1
21	-	+	+	2	45	-	-	-	0
22	+	+	+	3	46	-	-	-	0
23	+	+	+	3	47	-	-	-	0
24	+	+	-	2	48	-	+	-	1

表 3 大(小)粒组材料和性状

Table 3 Germplasm & trait of large/small grain group

序号 Code	材料名称 Material name	百粒重(g) 100-seed weight (g)	序号 Code	材料名称 Material name	百粒重(g) 100-seed weight (g)
1	8502	31.4	14	科绿 1 号	29.6
2	9602-1	31.6		Kelv1	
3	9702	26.8	15	科台 75	34.0
4	J23Y-39-6-3	31.8		Ketai75	
5	LT126	31.2	16	特大粒 1 号	36.7
6	T117-119	33.2		Tedali1	
7	科丰 14 号	27.0	17	延庆引	29.0
	Kefeng14			Yanqingyin	
8	科丰 14- 选 -2	28.2	18	诱处 4 号	27.5
	Kefeng14- 选 -2			Youchu4	
9	科丰 15 号	29.3	19	中作 975	25.2
	Kefeng15			Zhongzuo975	
10	科丰 17 号	28.2	20	9304	28.5
	Kefeng17		21	8803-8	32.0
11	科丰 34 号	32.2	22	9007Y-2-1-5	28.6
	Kefeng34		23	郑 58-13-20	28.0
12	科丰 35 号	28.8		Zheng58-13-20	
	Kefeng35		24	新六青	27.2
13	科丰 36 号	27.5		Xinlvqing	
	Kefeng36		25	阜 9363	30.2
				Fu9363	

续表 3

Continuing table 3

序号 Code	材料名称 Material name	百粒重(g) 100-seed weight (g)	序号 Code	材料名称 Material name.	百粒重(g) 100-seed weight (g)
26	京引科选 1 号 Jingyinkexuan1	28.6	37	97-126	16.2
27	京豆 2 号 Jingdou2	26.8	38	E-182	14.2
28	徐豆 9313 Xudou9313	25.0	39	PEKING	11.7
29	豫豆 16 Yudou16	25.8	40	汾豆 62 号 Fendou62	12.8
30	光黑大豆 Guangheidadou	28.4	41	高丰 1 号 Gaofeng1	14.4
31	滑 20 Hua20	27.5	42	灰布支 Huibuzhi	9.4
32	中作 91-6014 Zhongzuo91-6014	25.6	43	科丰 14- 选 -3 Kefeng14- 选 -3	15.2
33	中黄 4×中品 661-172 Zhonghuang4×Zhongpin661-172	25.7	44	科丰 1 号 Kefeng1	13.4
34	中黄 4×中品 661-252 Zhonghuang4×Zhongpin661-252	25.8	45	科丰 37 号 Kefeng37	18.3
35	中黄 4×中品 661-337 Zhonghuang4×Zhongpin661-337	27.9	46	鲁豆 4 号 Ludou4	16.6
36	中黄 4×中品 661-379 Zhonghuang4×Zhongpin661-379	25.4	47	潍科 928 Suike928	15.2
			48	中品 661 Zhongpin661	16.2

注: 大粒组中百粒重 ≥ 25 g; 小粒组中百粒重 ≤ 18.3 g

Note: 100-seed weight ≥ 25 g in large grain group; 100-seed weight ≤ 18.3 g in small grain group

并完成试验结果分析和论文初稿的修改,刘学义是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文修改和定稿。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家大豆产业技术体系和山西省“百人计划”项目资助。感谢中国科学院遗传与发育生物所朱保葛课题组同仁在本研究过程中给予的热情帮助。

参考文献

Liu W.X., Kim M.Y., Van K.J., Lee Y.H., Li H.L., Liu X.H., and Lee S.H., 2011, QTL identification of yield-related traits and their association with flowering and maturity in soybean, *J. Crop Sci. Biotech*, 14(1): 65-70

Mian M.A.R., Bailey M.A., Tamulonis J.P., Shipe E.R., Carter T.E.J., Parrott W.A., Ashley D.A., Hussey R.S., and Boerma H.R., 1996, Molecular markers associated with seed weight in two soybean populations, *Theor. Appl. Genet.*, 93(7): 1011-1016

Orf J.H., Chase K., Jarvik T., Mansur L.M., Cregan P.B., Adler F.R., and Lark K.G., 1999, Genetics of soybean agronomic traits: i. comparison of three related recombinant inbred

populations, *Crop Sci.*, 39(6): 1642-1651

Sun H.Y., Liu L.J., Zhang X.M., Yang Z., Gao M.J., Zhang L., and Wei L., 2008, Validate practicability of SSRs linked with QTL of oil and protein content in soybean, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(6): 1085-1090 (孙鸿雁, 刘丽君, 张小明, 杨喆, 高明杰, 张雷, 魏崑, 2008, 大豆油分蛋白质含量相关 QTL 的实用性验证, 分子植物育种, 6(6): 1085-1090)

Yang Y.C., Zhou Q.M., and Zhu L.S., 2005, On toacco varieties and resistance heredity to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*), *Hunan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences))*, 31(4): 381-383 (杨友才, 周清明, 朱列书, 2005, 烟草品种青枯病抗病性及抗性遗传研究, 湖南农业大学学报(自然科学版), 31(4): 381-383)

Yang Z., Liu L.J., Gao M.J., Pu G.F., and Zhang L., 2008, Molecular marker assistant selection for high oil QTL in soybean, *Dadou Kexue (Soybean Science)*, 27(6): 921-924 (杨喆, 刘丽君, 高明杰, 蒲国锋, 张雷, 2008, 大豆高油相关 QTL 分子标记辅助选择研究, 大豆科学, 27(6): 921-924)

Zhang W.K., Wang Y.J., Luo G.Z., Zhang J.S., He C.Y., Wu X.L., Gai J.Y., and Chen S.Y., 2004, QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers, *Theor. Appl. Genet.*, 108(6): 1131-1139