

褐色种皮大豆与其黄色种皮衍生亲本的表型及基因型比较

续 曲¹,郭 勇²,邱丽娟²

(¹首都师范大学附属中学,北京 100048;²农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081)

摘要:大豆种皮色在从野生大豆到栽培大豆的选择过程中逐渐由黑色变成黄色,是重要的形态标记,因此,大豆种皮色相关基因的研究无论是对进化理论研究还是育种实践都具有非常重要的意义。利用褐色种皮 J1265-2 大豆及其衍生亲本黄色种皮大豆 J1265-1 为材料,通过 SSR 引物扩增片段,检验遗传背景的异同,同时对控制种皮的候选基因 *GmF3'H* 进行扩增和测序分析。结果表明,褐色种皮和黄色种皮材料不仅用 161 对 SSR 分子标记检测没有发现差异,其褐色种皮候选基因 *GmF3'H* 的编码区及起始密码子上游 1465 bp 序列也是一致的。因此,证明褐色种皮 J1265-2 大豆与其衍生亲本黄色种皮大豆 J1265-1 为近等基因系,其控制褐色种皮的基因型与已报道的基因型不同。

关键词:大豆;种皮色;表型;基因型

Comparison of Phenotype and Genotype between Brown Seed Coat Line and Its Parental Line with Yellow Seed Coat in Soybean(*Glycine max*)

XU Qu¹, GUO Yong², QIU Li-juan²

(¹High School Attached to Capital Normal University, Beijing 100048; ²The National Key Facility for Gene Resources and Genetic Improvement/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Seed coat color, one of the most important morphological markers, is changed from black to yellow during the artificial selection of cultivated soybean from wild soybean. Therefore, discovering genes related to the seed coat color is very important not only for evolutionary study but also for breeding practice in soybean. In this study, J1265-1 (yellow seed coat) and its derived line J1265-2 with brown seed coat were used to check whether they had the same genetic background using 161 SSR markers. Meanwhile, The coding sequence and promoter region of a candidate gene (*GmF3'H*) which was related to seed coat color in soybean was also amplified and sequenced. SSR marker analysis revealed that two lines with different seed coat color had similar genetic background and they were near isogenic lines. There were no sequence difference between two lines in coding region and 1465 bp promoter region of *GmF3'H*, suggesting that gene controlling brown seed coat in J1265-2 was different from the known allele.

Key words: Soybean; seed coat color; phenotype; genotype

颜色是遗传研究中最早的评估特性之一,起源于孟德尔所进行的工作。20 世纪初,孟德尔的遗传定律被世人所公认,此后在大豆中进行的遗

传研究大多与颜色特征相关。同时,大豆种皮色作为形态标记,在育种后代的评估中有非常重要的作用^[1]。在玉米、金鱼草、矮牵牛、拟南芥等植

收稿日期:2012-04-10 修回日期:2012-06-19 网络出版日期:2013-02-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130219.1433.003.html>

基金项目:国家高科技研究发展计划(“863”计划)项目(2012AA101106);大豆空间环境诱变育种关键技术与示范(2008BAD97B04-8)

作者简介:续曲,首都师范大学附属中学。E-mail: xudino@gmail.com

通信作者:邱丽娟,研究员,博士生导师。E-mail: qiu_lijuan@263.net

物中都已经对种子或花的色素进行了广泛的研究,但是由于大豆中影响颜色的因素较多,而且大豆基因组复杂,在分子遗传水平上研究较少。导致种皮颜色差异的自然产物包括类黄酮和花青素,色素的沉着不仅与大豆种子外观及商业品质有关,也与抗氧化性的药用价值和营养价值有关。同时,大豆中很多的研究也表明种皮色素沉着对降低低温胁迫或减少病毒疾病有重要作用^[2-3]。此外,大豆种皮色是一种重要的进化性状,是在从野生大豆到栽培大豆人工选育的过程中逐渐从黑色演变出绿色、褐色、双色、黄色等,因此对大豆种皮颜色进行研究不仅具有重要的应用价值而且对于研究大豆的进化具有理论意义。

大豆种皮色的遗传研究始于 20 世纪初,迄今已发现 5 个位点(*I*、*T*、*W1*、*R*、*O*)与大豆种皮颜色有关^[4]。其中,3 个独立位点(*I*、*R*、*T*)主要控制色素的合成决定种皮的颜色^[5-7]。*R*、*T* 位点通过控制原花青素和花青素的种类而控制局部具体颜色^[8-9],包括黑色(*i*、*R*、*T*)、不完全黑(*i*、*R*、*t*)、褐(*i*、*r*、*T*)和浅褐(*i*、*r*、*t*)。黑色种皮(*i*、*R*、*T*)和不完全黑色种皮(*i*、*R*、*t*)中花青素和原花青素均有沉积^[10-11]。*O* 和 *W1* 位点只有在 *ir* 或者 *it* 都隐性纯合的背景下才能影响种皮的颜色^[4]。到目前为止,*T* 位点是研究最为清楚的位点,也是唯一已经被克隆了基因的位点,该位点通过控制原花青素和花青素的种类而控制局部具体颜色。目前的研究结果表明 *T* 位点对应的 *GmF3'H* 基因,编码类黄酮-3'-羟基化酶,催化三羟基黄烷酮生成二氢黄酮醇的过程,是黄烷酮、儿茶酸、原花青素和花青素代谢途径的关键酶^[8]。*GmF3'H* 单碱基的变化是导致近等基因系黄色和褐色种皮颜色差异的原因^[9]。

褐色种皮大豆 J1265-2 是从其亲本黄色种皮大豆 J1265-1 分离出来的。本研究将在这 2 个大豆品系的种皮色表型鉴定的基础上,利用分布在大豆全基因组的 161 个 SSR 标记进行基因型分析,结果表明二者具有相同的遗传背景;同时对控制种皮颜色的候选基因 *GmF3'H* 进行扩增和测序分析,发现候选基因的编码序列和启动子区序列也是相同的。本研究结果表明,J1265-2 中含有 1 个与已报道的基因型不同的基因控制褐色种皮遗传,为新基因的发掘提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用的 2 个品系,分别为 J1265-1、J1265-2。J1265-1 是黄色种皮品系,褐色种皮的 J1265-2 是从 J1265-1 分离出来的衍生品系。

1.2 表型性状鉴定

大豆种皮色鉴定依照《大豆种质资源描述规范和数据标准》^[12] 进行。

1.3 大豆总 DNA 的提取

每份材料选取 3 粒种子,提取 2 份大豆材料基因组 DNA,参照关荣霞等^[13] 的方法,并作了适当的修改。大豆种子磨豆粉,加 600 μ L 裂解液,在 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min;加入 600 μ L 氯仿振荡混匀,12000 r/min 离心 10 min;将上清液转入新的离心管中;加入 800 μ L 沉淀液,混匀 1~2 min,离心 10 min,去除上清;加入 100 μ L 浓度为 1.2 mol/L 的 NaCl 溶液和 300 μ L 冷乙醇,混匀放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 10 min 沉淀 DNA;离心 10 min 弃上清,70% 冷乙醇洗 1 次;加 100 μ L 超纯水溶解 DNA。提取的大豆总 DNA 用紫外分光光度计测定浓度。

1.4 SSR 标记分析

从大豆连锁群中选择 161 对 SSR 引物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系如下:10x buffer 2.0 μ L,引物 12.0 μ L,引物 2 2.0 μ L,dNTP 0.5 μ L,*Taq* 酶 0.5 μ L,DNA 2.0 μ L,ddH₂O 11.0 μ L。PCR 反应在 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司 PTC-200 型)上进行。SSR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性后,94 $^{\circ}$ C 30 s,47 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经高温变性后用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测 SSR 标记间是否存在差异。

1.5 候选基因的克隆及测序

根据候选基因的基因组序列,利用 Primer Premier 5 软件在每个外显子外侧设计特异性的上下游引物。以 J1265-1 和 J1265-2 的基因组 DNA 为模板,利用 KOD 高保真 DNA 聚合酶(日本 TOYOBO 公司),通过 PCR 扩增的方式扩增各片段。所用引物序列为:A-1 (5'-CACATAACTACATCATCTCAAAACCTA-3'), A-2 (5'-ATAAAGACTAAAAAACCACTTGACTAA-3'); B-1 (5'-ATGGATACTGAAGCAGTTTGTAGAA-3'), B-2 (5'-CACGGAAGTTAGGTAAGGATT-3'); C-1 (5'-GGATAAGATGAGTTAACCATCAACTT-3'), C-2 (5'-ACTAATCATTGAATCCCATCCATA-3')。扩增得到的基因组序

列片段经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳回收后进行测序,测序结果根据基因的编码序列拼接之后,用 BioEdit 软件进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 不同种皮颜色的表型观察

2 份材料除种皮颜色外其他性状基本相同。J1265-1 种子卵圆形,黄色种皮,褐脐;J1265-2 种子也为卵圆形,种皮为褐色并有开裂,褐脐,但不同年份种皮开裂程度不同(图 1)。



图 1 黄色种皮 J1265-1 (A) 和褐色种皮 J1265-2 (B) 的种子
Fig.1 Soybean seeds of J1265-1 (A) with yellow seed coat and J1265-2 (B) with brown seed coat

2.2 利用 SSR 标记比较褐色和黄色种皮材料的遗传背景

2 份材料提取的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳和分光光度计测定,表明质量较好。将 2 份材料的 DNA 稀释到 20 ng/ μ L 左右,选用分布在 20 个染色体的 161 个 SSR 标记(图 2)进行 PCR 扩增后聚丙烯酰胺凝胶电泳,2 份材料扩增产物的带型一致,可以初步判定这 2 种不同颜色的材料具有几乎相同的遗传背景。

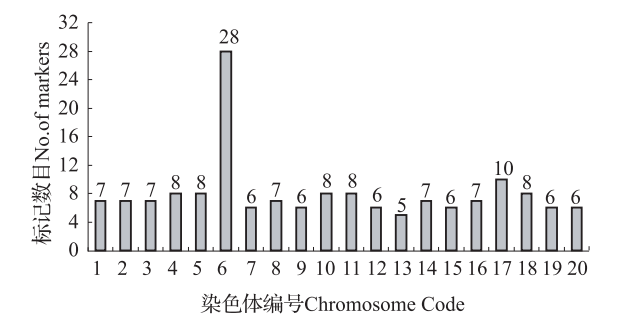
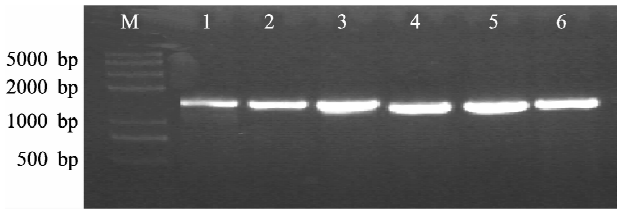


图 2 选用的 SSR 标记在各染色体上的分布
Fig.2 Distribution of SSR markers on different chromosome

2.3 种皮色候选基因 *GmF3'H* 基因组 DNA 序列的扩增和测定

已有研究表明大豆中编码 *T* 位点的基因 *GmF3'H* (*Glyma06g21920*) 与大豆的种皮颜色关系密切^[8-9]。*GmF3'H* 基因组 DNA 全长 6549 bp, 包含 3 个外显子、2 个内含子, 编码序列长 1542 bp, 编码 513 个氨基酸。利用 3 对特异性引物 (A-1/2、B-1/2、C-1/2) 对 *GmF3'H* 的基因组中外显子区域进行扩增, 在 2 种材料中都扩增到出目的条带(图 3), 回收测序后, 根据已完成全基因组测序的大豆品种 Williams 82 中该基因预测的编码序列 (<http://www.phytozome.net>) 对外显子序列进行拼接, 拼接后进行序列比对分析(图 4), 结果表明, J1256-2 和 J1256-1 中扩增到的 *GmF3'H* 基因组外显子序列无任何差异, 都和 Williams 82 中的序列一样, 在 973 位存在 1 个单碱基 A 的缺失。同时, 对该基因起始密码子上游 1465 bp 的启动子区域进行扩增并测序, 结果表明启动子区域也不存在差异。因此, 控制 J1256-2 褐色种皮的基因型与已报道的 *GmF3'H* 等位基因不同。



M: DNA 标准品; 1~2: 引物 A 扩增片段; 3~4: 引物 B 扩增片段; 5~6: 引物 C 扩增片段
M: Marker, 1-2: Fragment amplified by primer A, 3-4: Fragment amplified by primer B, 5-6: Fragment amplified by primer C

图 3 种皮色候选基因 *GmF3'H* 在 J1256-1 和 J1256-2 中的扩增

Fig.3 Amplification of *GmF3'H* in J1265-1 and J1265-2

3 讨论

SSR 标记广泛存在于大豆基因组中, 而且大部分标记都表现为共显性且具有丰富的多样性。SSR 标记用于大豆品种的纯度鉴定, 快速、准确; 并可根据等位变异判断为机械混杂或位点不完全纯合^[14]。在亲本基因型纯合的情况下, 1 对在亲本间有多态性的 SSR 引物即可对 F_1 的真伪进行准确判断; 一般情况下, 通过 3 对多态性引物也可以对 F_1 的真伪进

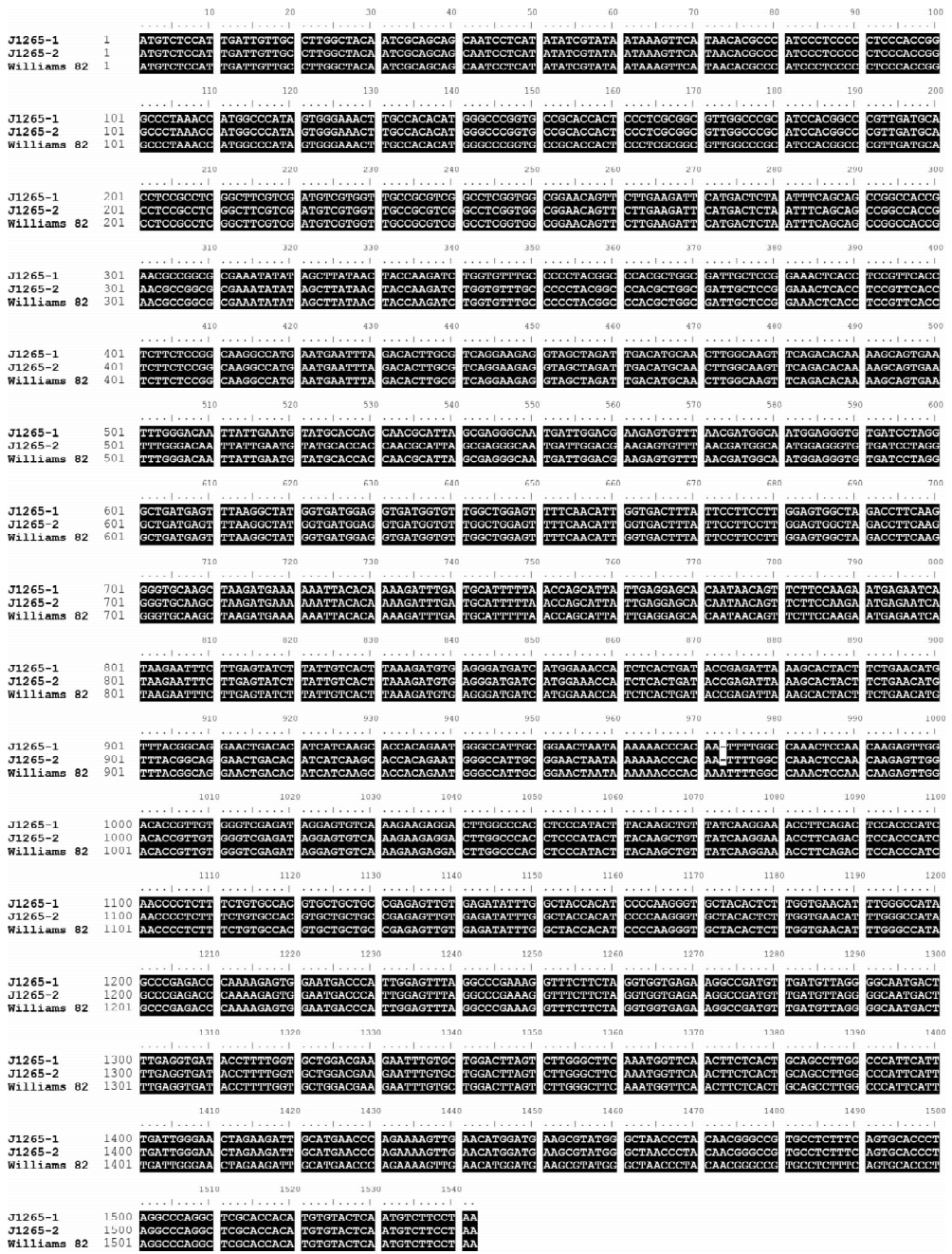


图 4 J1265-1 和 J1265-2 中 *GmF3'H* 编码序列对比分析

Fig.4 Sequence alignment of *GmF3'H* coding sequence in J1265-1 and J1265-2

行准确的分子鉴定^[15]。根据最新研究表明,大豆 SSR 的分布与基因分布密切相关^[16]。本研究利用 SSR 标记进行不同大豆材料遗传背景的研究工作,用 161 个 SSR 标记分析了 2 个不同种皮颜色的品系,没有检测到差异,表明这 2 个品系除了个别位点存在差异之外具有相似的遗传背景,推测 J1265-1 和 J1265-2 为近等基因系材料。利用近等基因系可较准确地筛选到与目标性状连锁的分子标记,鉴别目标性状基因的染色体片段,并对目标基因进行较

精密定位^[17],因此,本研究为大豆种皮颜色相关基因的发掘奠定了很好的材料基础。值得注意的是,本研究所用的褐色裂皮种子与已知的褐色种皮不同,其种皮上有裂纹,是从黄种皮大豆中分离出来的新类型。因此,研究褐色种皮大豆与其衍生亲本黄色种皮大豆的相互关系并与已知褐色种皮基因型进行比较将具有重要的理论价值。

栽培大豆是由野生大豆进化而来的。典型的野生大豆表现为种皮黑色、子粒小,而多数生产上用的

栽培大豆品种是黄色种皮。大豆的种皮颜色由多个位点控制,褐色(*i,r,T*)、浅褐色(*i,r,t*)种皮中只有原花青素合成^[8]。前人的研究表明大豆与其他作物一致,在种皮色中起作用的主要是与类黄酮生物合成或转运途径的酶密切相关。然而,种皮色的连续变化表明,控制颜色的相关基因,不仅与结构基因有关,也与其启动子有关,尤其是转录因子可能发挥作用,如孟德尔 1865 年发表的关于豌豆花色性状的关键基因,在 150 年后被克隆出来并证明该基因是一种控制花青素生物合成途径的转录因子^[18]。然而已知大豆种皮色的 5 个基因位点中,目前只有控制褐色的 *T* 位点的基因被克隆,该基因编码黄酮-3'-羟基化酶,*GmF3'H* 编码序列 1164 位 C 碱基的缺失是 *T* 和 *t* 基因型差异的原因^[8]。

本研究对 *GmF3'H* 基因外显子序列的扩增和比对分析表明,该基因的外显子序列在 2 种不同种皮色的衍生品系中不存在差异,但是与完整的 *GmF3'H* 编码序列相比,都在 973 位核苷酸单一碱基 A 缺失,从而改变其后的读码框,导致翻译提前终止,造成黄酮-3'-羟基化酶缺失。同时 *GmF3'H* 还能完全抑制色素在种脐周围的沉积,部分抑制种皮的开裂^[10]。但是,本研究褐色种皮品系 J1265-2 与其黄色种皮品系 J1265-1 相比,161 个 SSR 位点不存在差异,*GmF3'H* 基因的编码区和启动子区也不存在差异,而且种皮还存在裂纹。这种基因型和表现型的不同,说明这 2 个品系具有相似的遗传背景,控制 J1265-2 褐色种皮的基因型与已报道的 *GmF3'H* 基因型不同,但是否由新的等位基因或基因位点所控制,还有待进一步的试验验证。

参考文献

[1] Yang K, Jeong N, Moon J K, et al. Genetic analysis of genes controlling natural variation of seed coat and flower colors in soybean [J]. J Hered, 2010, 101 (6) : 757-768

[2] Takahashi R. Association of soybean genes *I* and *T* with low temperature induced deterioration [J]. Crop Sci, 1997, 37 (6) : 1755-1759

[3] Senda M, Masuta C, Ohnishi S, et al. Patterning of virus-infected *Glycine max* seed coat is associated with suppression of endogenous silencing of chalcone synthase genes [J]. Plant Cell, 2004, 16 (4) : 807-818

[4] Palmer R G, Pfeiffer T W, Buss G R, et al. Qualitative genetics [M]//Boerma H R, Specht J E. Soybeans: improvement, production, and uses. Madison (WI) : ASA, CSSA, and SSSA, 2004: 137-214

[5] Bernard R L, Weiss M G. Qualitative genetics [M]//Caldwell B E. Soybean: improvement, production and uses. Madison (WI) : American Society of Agronomy, 1973: 117-149

[6] Palmer R G, Kilen T C. Qualitative genetics and cytogenetics [M]//Wilcox J R. Soybeans: improvement, production and uses. Madison (WI) : American Society of Agronomy, 1987: 135-209

[7] Nicholas C D, Lindstrom J T, Vodkin L O. Variation of proline rich cell wall proteins in soybean lines with anthocyanin mutations [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21 : 145-156

[8] Zabala G, Vodkin L. Cloning of the pleiotropic *T* locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3' hydroxylase [J]. Genetics, 2003, 163 (1) : 295-309

[9] Toda K, Yang D, Yamanaka N, et al. A single-base deletion in soybean flavonoid 3-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color [J]. Plant Mol Biol, 2002, 50 : 187-196

[10] Buzzett R I, Buttery B R, MacTavish D C. Biochemical genetics of black pigmentation of soybean seed [J]. J Hered, 1987, 78 : 53-54

[11] Todd J J, Vodkin L O. Pigmented soybean (*Glycine max*) seed coats accumulate proanthocyanidins during development [J]. Plant Physiol, 1993, 102 : 663-670

[12] 邱丽娟, 常汝镇. 大豆种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006

[13] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟. 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取 [J]. 大豆科学, 2003, 22 (1) : 73-74

[14] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟. 利用 SSR 方法鉴定大豆品种纯度 [J]. 分子植物育种, 2003, 1 (3) : 357-360

[15] 田蕾, 关荣霞, 刘章雄, 等. 用 SSR 标记鉴定大豆杂交组合 *F*₁ 的方法研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (4) : 443-447

[16] Ott A, Trauttschold B, Sandhu D. Using microsatellites to understand the physical distribution of recombination on soybean chromosomes [J]. PLoS ONE, 2011, 6 (7) : e22306

[17] Tanksley H P. Mapping in plant breeding [J]. Biotechnology, 1999, 7 : 257-268

[18] 邱丽娟, 郭勇, 黎裕, 等. 中国作物新基因发掘: 现状、挑战与展望 [J]. 作物学报, 2011, 37 (1) : 1-17