

大豆低聚糖优异种质鉴定及 GWAS 分析

李岩哲¹, 熊雅文¹, 许亚男¹, 唐威¹, 张红梅², 张威², 刘晓庆², 王琮², 许文静³, 张群¹, 陈华涛^{1,2}

(¹南京农业大学生命科学学院, 南京 210095; ²江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014; ³南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 大豆中含有丰富的营养物质和活性物质, 其中低聚糖有许多对人体健康有益的功能, 大范围的鉴定评价并筛选大豆低聚糖特异种质具有重要的育种意义。本研究利用 HPLC 法, 对包含 264 份大豆材料的自然群体进行了不同环境下的低聚糖含量测定。海南三亚和江苏南京两个环境下大豆的总低聚糖含量范围分别为 6.18%~11.46% 和 4.19%~13.80%, 共筛选出不同环境下表现稳定的 16 份大豆低聚糖特异种质。结合大豆自然群体的低聚糖含量表型数据和基因型数据进行了全基因组关联分析, 在不同环境下分别鉴定到与低聚糖显著关联的 SNPs, 并挖掘目的性状候选基因。本研究为特用大豆品种选育提供了材料支撑, 为大豆发掘低聚糖候选基因和开发分子标记提供了较好的基础。

关键词: HPLC; 大豆低聚糖; GWAS; SNP

Identification and GWAS Analysis of Soybean Oligosaccharide Germplasm

LI Yan-zhe¹, XIONG Ya-wen¹, XU Ya-nan¹, TANG Wei¹, ZHANG Hong-mei², ZHANG Wei², LIU Xiao-qing², WANG Qiong², XU Wen-jing³, ZHANG Qun¹, CHEN Hua-tao^{1,2}

(¹College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; ³College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Soybean is rich in nutrients and active substances. Oligosaccharides are beneficial functional components for human health, and identification of soybean oligosaccharide specific germplasms is of great practical significance. In this study, the content of oligosaccharides was quantified by HPLC method in a population of 264 soybean genotypes that were cultivated at multiple environments. The total oligosaccharide content in Sanya city of Hainan province and Nanjing city of Jiangsu Province ranged from 6.18% - 11.46% and 4.19% - 13.80%, respectively. Sixteen oligosaccharide specific genotypes with stable performance at different environments were obtained. Genome-wide association scanning (GWAS) was carried out by combining phenotypic and genotypic data of oligosaccharide content in natural soybean populations. SNPs significantly associated with oligosaccharides content were identified and candidate genes were considered to be related with oligosaccharide/sucrose. Collectively, this study provided germplasm resources applicable for the selection and breeding of special soybean varieties, and also provided foundation for further exploring oligosaccharide candidate genes and developing their molecular markers in soybean.

Key Words: HPLC; soybean oligosaccharide; GWAS; SNP

收稿日期:

修回日期:

网络出版日期:

第一作者研究方向为功能性大豆分子育种技术, E-mail: 961838604@qq.com。

通讯作者: 陈华涛, 研究方向为大豆分子育种技术及种质创新研究, E-mail: cht@jaas.ac.cn。

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 在中国具有悠久的栽培历史, 是中国重要的经济和油料作物之一。大豆中不仅含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素和矿物质等营养物质, 还含有低聚糖、皂苷、磷脂、异黄酮等生物活性成分^[1]。大豆低聚糖 (SBOS, soybean oligosaccharides) 是大豆中可溶性糖的总称, 主要包括蔗糖 (二糖)、棉子糖 (三糖) 和水苏糖 (四糖) 等^[2]。大豆低聚糖在大豆中占比约为 7%~10%, 其中蔗糖含量最高约占 5%, 水苏糖约 4%, 棉子糖含量最少, 约为 1%。通常以大豆、大豆粕、大豆胚芽为原料生产^[3]。

低聚糖具有多种生物活性, 其中水苏糖和棉子糖具有甜度低、热值低等良好的理化特性, 同时能促进双歧杆菌的增殖, 促进菌群繁殖, 平衡肠内菌群, 可防止便秘和腹泻^[4~5]。低聚糖具有保护肝脏、降低血压、血脂、抗癌、延缓衰老、抑制病原菌的增长、增强免疫力等作用^[6]。1988 年日本大豆低聚糖产品正式上市, 主要有糖浆、粉末、颗粒剂等产品。我国对低聚糖研究起步较晚但发展较快, 自 1996 年保龄宝生物股份有限公司大量生产功能性低聚异麦芽糖产品以来, 中国功能性低聚糖市场取得了迅猛的发展^[7]。目前在含乳饮料中使用得比较广泛和成熟, 少量用于糖果和酒类等生产, 还有一部分作为保健品或保健品的配料使用^[8]。大豆低聚糖组成与含量在大豆种质资源中存在着显著差异, 高蔗糖低水苏糖大豆适合进行豆腐加工^[9], 低蔗糖高水苏糖大豆适于进行大豆低聚糖加工^[10, 11]。此外, 研究还发现低聚糖在植物生长发育、逆境胁迫反应等过程中发挥着重要作用, 低聚糖在成熟种子中积累, 与种子活力和耐旱性密切相关, 通过调控棉子糖合成酶提高植物抗旱能力^[4]。鉴于大豆低聚糖的重要应用价值, 大范围的鉴定、评价并筛选高低聚糖大豆优异种质受到研究者的广泛重视。

基于连锁不平衡 (LD, linkage disequilibrium) 的全基因组关联分析 (GWAS, genome-wide association study) 已广泛应用于各种作物不同性状的基因挖掘研究中。GWAS 利用自然群体中广泛的遗传多样性和全基因组高密度的单核苷酸多态性标记 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 筛选与表型变异显著相关联的 SNP 标记。GWAS 高通量发掘目标性状显著关联位点的优势已经成为研究基因组学的关键手段之一^[12]。GWAS 具有耗时短、成本低和遗传信息来源广泛等优点。全基因组关联分析在大豆的不同性状中广泛应用, 如油脂、蛋白质和百粒重等通过 GWAS 分析获得大量显著关联位点^[13, 14, 15]。本研究利用 HPLC 测定大豆籽粒中低聚糖组分含量, 结合 GWAS 鉴定与大豆低聚糖显著关联的 SNP 位点, 为大豆分子育种开发标记和发掘低聚糖关键候选基因打下基础。

项目基金: 江苏省重点研发计划 (现代农业) 重点项目 (BE2019376); 国家重点研发计划项目 (2018YFE0112200); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(20)2007)。

Foundation project: Jiangsu Province Key Research and Development Program (modern agriculture) key project (BE2019376); National Key Research and Development Program (2018YFE0112200); Agricultural science and technology Independent innovation Fund of Jiangsu Province (CX(20)2007) ¹

1 材料与方法

1.1 试验材料

264 份大豆种质资源，包含 52 份地方种和 212 份栽培种，由江苏省农业科学院经济作物研究所大豆课题组提供。2020 年种植于海南三亚试验基地（经度 109.685092，纬度 18.334734）；2021 年种植于江苏南京六合试验基地（经度 118.634071，纬度 32.47821）。田间材料播种采取随机区组设计，3 次重复。单次重复种植 3 垄，每垄播种 10 穴，每穴两株苗，垄长 1.5 m，垄间距 40 cm，穴距 15 cm。按照常规田间管理方法，收获后及时晒干、脱粒保存。

1.2 仪器与试剂

高效液相色谱仪；植物组织研磨仪；离心机；超声波清洗机、万分之一天平；水浴锅；烘箱及其他实验室常用设备。

蔗糖、水苏糖、棉子糖色谱级纯分析标准品（纯度 $\geq 99\%$ ），均购于阿拉丁公司；无水乙醇，乙腈（色谱纯）购于德国默克，水为超纯水，耗材：50 mL 离心管，1 mL 注射器，0.22 μm 滤膜。

1.3 色谱条件

色谱柱：日本岛津 shim-pack GIST-NH2（4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm ）流动相：乙腈/水=63/37（V/V）（超声脱气 30 min）；流速：1 mL/min；色谱柱温度 30 $^{\circ}\text{C}$ ；检测器温度 35 $^{\circ}\text{C}$ ；进样体积 10 μL ；检测器：（RID）示差折光检测器。

1.4 标准溶液的配制

1.4.1 标准液的配制

准确称取蔗糖 50 mg，棉子糖、水苏糖各 25 mg（精确至 0.1 mg），置于 25 mL 容量瓶中用 80 % 乙醇溶液溶解并定容，配制成蔗糖、棉子糖、水苏糖标准液，浓度分别为 2 mg/mL、1 mg/mL、1 mg/mL，放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.4.2 绘制标准曲线

移取适量标准液，用 80%乙醇进行梯度稀释，其中蔗糖浓度分别稀释为 2 g/mL、1 g/mL、0.5 g/mL、0.25 g/mL 4 个浓度梯度的标准工作液。棉子糖和水苏糖浓度分别稀释为均为 1 g/mL、0.5 g/mL、0.25 g/mL、0.125 g/mL 4 个浓度梯度的标准工作液。根据测定结果绘制标准曲线，并计算

相关系数。

1.5 低聚糖提取方法

将收获后的大豆晒干，参照《粮食、油料检验—水分测定法》^[16]中 105℃恒重法将大豆放入烘箱烘干至恒重，取少量大豆籽粒放入植物组织研磨仪中（40 Hz，2 min）研磨至粉末。精确称取 1.000 g 大豆粉（精确至 0.1 mg）于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 80%乙醇溶液并振荡均匀，置于 70℃水浴锅中水浴 1 h，10 min 震荡摇晃一次，取出放置于试验台上冷却至室温，3000 r/min 离心 5 min，用 1 mL 注射器吸取 1 mL 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤至 2 mL 进样瓶内，放置 4℃冰箱保存待测。

分别取 10 μL 梯度稀释后的标准品溶液置于进样瓶中，利用高效液相色谱仪获得低聚糖各组分的保留时间及色谱峰面积，并绘制出标准曲线。在相同色谱条件下，吸取等体积的大豆样品提取液，测定大豆样品中蔗糖、棉子糖、水苏糖含量。

1.6 相关性分析

通过 SPASS 26.0 软件分析大豆材料低聚糖组分含量相关性。

1.7 全基因组关联分析

基于本研究室前期研究获得的 264 份大豆自然群体的基因型数据（包含 2,597,425 个 SNPs）^[17]，本研究采用混合线性模型（MLM）进行全基因组关联分析^[18]。设定显著阈值为 $-\text{Log}_{10}(P) = 5.0$ 。当关联到的 SNP 阈值 ≥ 5.0 时，则该 SNP 被认为是显著关联位点。 R^2 代表该位点所解释的表型变异率。

1.4 候选基因分析

全基因组关联分析得到与大豆株高显著关联的 SNP 后，利用在线数据库 Phytozome 13 中大豆基因组信息（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Gmax_Wm82_a2_v1），找寻与大豆低聚糖性状显著关联 SNP 前后 120 Kb 区间内控制大豆低聚糖相关的基因，并与拟南芥基因组数据库里基因序列进行 Blastp 比对，确定候选基因。

2 结果分析

2.1 低聚糖组分线性回归方程

配制不同浓度梯度的蔗糖、棉子糖、水苏糖标准品溶液经高效液相色谱仪分析后，以浓度 X

(mg/mL) 对峰面积 Y 作图，用 Excel 进行回归拟合，得到标准曲线的回归方程（表 1）。

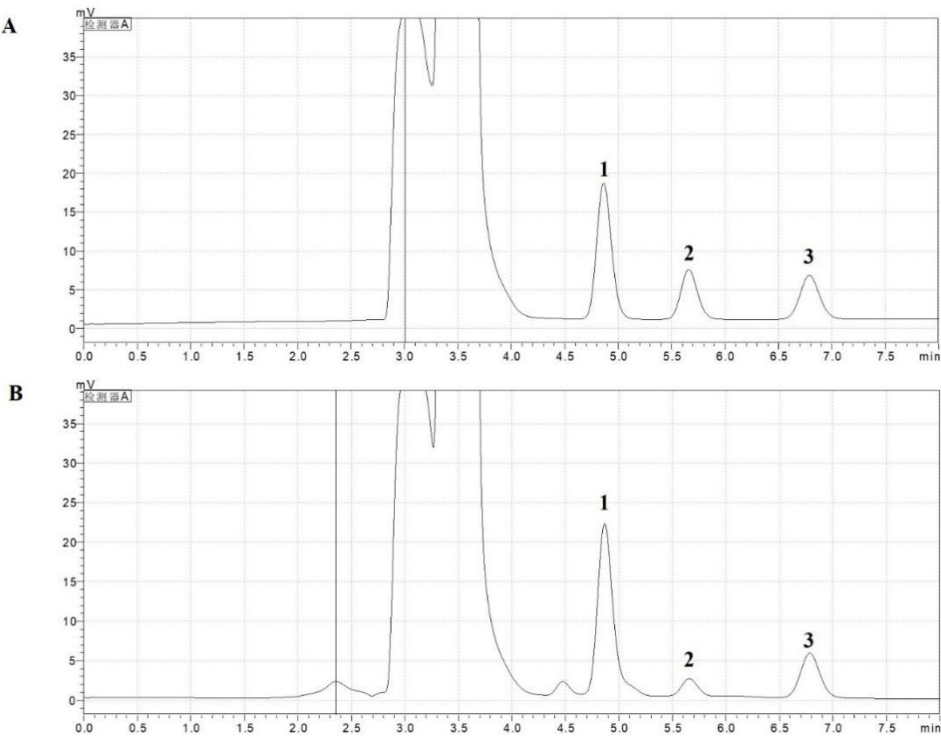
表 1 大豆低聚糖组分线性回归方程及相关系数

Table.1 Linear regression equation and coefficient of determination of oligosaccharide in soybean

低聚糖	回归方程	决定系数
Oligosaccharide	Linear regression equation	Coefficient of determination
蔗糖	$Y = 85359X + 466.55$	0.9999
棉子糖	$Y = 70980X + 373.25$	0.9998
水苏糖	$Y = 73522X + 361.93$	0.9998

2.2 HPLC 色谱分析

使用流动相乙腈/水体积比为 80:20、70:30、63:37 进行预试验，最终确定使用乙腈/水=63/37 (v/v) 流动相，柱温 30 ℃，检测器 35 ℃，流速 1 mL/min，蔗糖、棉子糖、水苏糖的平均保留时间分别为 4.866 min，5.663 min，6.791 min，可在 10 min 内使大豆低聚糖标准品和大豆籽粒样品中的蔗糖、棉子糖、水苏糖完整分开，并具有良好的峰型（图 1），显著缩短了使用 HPLC 检测大豆低聚糖的时间，提高了检测效率。



1: 蔗糖; 2: 棉子糖; 3: 水苏糖; A: 标准液, B: 大豆样品。

1: Sucrose; 2: Raffinose 3: Stachyose; Figure A shows the standard solution, Figure B shows the soybean sample.

图 1.大豆低聚糖组分标准液及大豆样品的 HPLC 图谱

Fig.1 The chromatogram of standard liquid and soybean samples of 3 components of soybean

2.3 精密度分析

按照 1.3 的色谱条件分别测定蔗糖、棉子糖、水苏糖的标准工作液，测定 4 次。统计分析每次的低聚糖各组分的保留时间和峰面积（表 2）。三种大豆低聚糖色谱保留时间的相对偏差分别为 0.038%、0.039%、0.042%，各低聚糖峰面积的相对偏差为 0.163%、2.12%、0.36%，该仪器具有良好的精度和重复性。

表 2 低聚糖各组分保留时间和峰面积

Table 2 Retention time and peak area of each sugar component (n=4)

大豆低聚糖 Soybean oligosaccharides	保留时间 Retention time			峰面积 Area of peak		
	保留时间 Retention time (min)	平均值 Average/min	相对标准偏差 (%) Relative standard deviation	峰面积 Area of peak	平均值 Average	相对标准偏差 (%) Relative standard deviation
蔗糖	4.864			170721		
	4.867	4.866	0.038	176824	172781	1.63
	4.868			172651		
	4.868			170965		
棉子糖	5.659			71060		
	5.664	5.663	0.039	72964	70903	2.12
	5.663			69654		
	5.663			69935		
水苏糖	6.788			73535		
	6.795	6.791	0.042	73963	73916	0.36
	6.791			74141		
	6.791			74026		

2.4 表型分析

利用 HPLC 测定 264 份大豆自然群体在两个环境下（2020，三亚；2021，南京）大豆低聚糖含量。结果显示来自海南三亚的大豆材料蔗糖、棉子糖、水苏糖和总低聚糖的平均含量分别为 4.97%、0.70%、2.60%和 8.27 %，其含量范围分别为 3.12%~7.92%、0.38%~1.18%、1.52%~3.48%和 6.18%~11.46%。低聚糖各组分的变异系数分别为 17.19%、21.06%、13.78%和 12.06%。来自江苏南京的大豆材料蔗糖、棉子糖、水苏糖和总低聚糖的平均含量分别为 3.68%、0.96%、2.59%和 7.22%，其含量范围分别为 2.06%~8.52%、0.51 %~2.25%、0.79%~5.19%和 4.19%~13.80%，变异系数分别为 22.97%、34.99%、37.83%和 22.92%（表 3）。

三种低聚糖组分中蔗糖占总低聚糖的比例最高，棉子糖占比最低；来自海南三亚的大豆材料蔗糖、水苏糖和总低聚糖含量水平略高于江苏南京种植的大豆材料，而棉子糖含量水平略低于江苏南京种植的大豆材料（图 2）。来自江苏南京的大豆材料低聚糖各组分的变异系数普遍高于海南三亚种植的大豆材料。两个环境下变异系数均反映出供试的大豆自然群体之间的低聚糖各组分变异丰富度较高，种质间存在较大差异，遗传类型比较丰富。这些结果表明本试验的大豆自然群体中的低聚糖含量较高，具有一定的选择潜力和利用价值。

表 3 三亚及南京地区大豆低聚糖含量描述统计

Table 3 Descriptive statistics of soybean oligosaccharide content in Sanya and Nanjing

地区	性状	最小	最大	均值	标准差	方差 Var	变异
Area	Trait	Min	Max	Mean	SD		系数
		(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)			CV (%)
三亚	蔗糖	30.12	79.16	49.65	8.54	72.87	17.19
	棉子糖	3.78	11.75	7.00	1.47	2.17	21.06
	水苏糖	15.19	34.75	26.04	3.58	12.88	13.78
	低聚糖	61.82	114.61	82.69	9.97	99.50	12.06
南京	蔗糖	20.63	85.21	36.75	8.44	71.27	22.97
	棉子糖	5.12	22.54	9.58	3.35	11.24	34.99
	水苏糖	7.89	51.90	25.88	9.79	95.82	37.83
	低聚糖	41.93	137.96	72.20	16.55	273.86	22.92

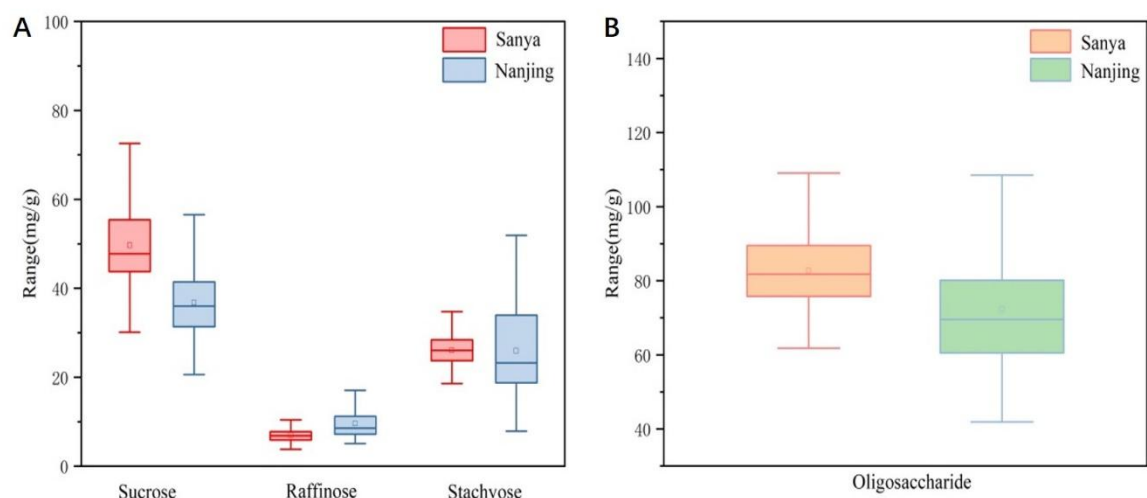


图 2 大豆低聚糖及组分的箱线图分析

Fig.2 Boxplot analysis of soybean oligosaccharides and components

2020 年鉴定到高低聚糖含量最高的 3 份种质，它们分别是潍科 8 号（11.46%）、泗阳 209（10.91%）、溧阳青豆 172（10.80%）；2021 年鉴定到高低聚糖含量最高的 3 份种质，它们分别是：石 1415（13.80%）、铜山天鹅蛋（12.20%）、齐黄 39（11.79%）。在 2020 和 2021 两年的材料中均筛选到，且在不同地区间具有稳定性的蔗糖、棉子糖、水苏糖、低聚糖含量水平较高种质资源各 3 份（表 4）。这些筛选的低聚糖及其成分含量特异的种质，丰富了我国的低聚糖含量优异种质资源。

表 4 在三亚和南京两年的检测中均筛选到低聚糖组分高的品种

Table 4 Varieties with high oligosaccharide components were identified in both Sanya and Nanjing

名称	三亚	南京
Name	Sanya	Nanjing
蔗糖	徐豆 4 号（6.72%）	徐豆 4 号（6.00%）
	泗阳 209（7.56%）	泗阳 209（5.65%）
	蒙豆 8206（4.47%）	蒙豆 8206（3.30%）
棉子糖	NX-F4-2（1.17%）	NX-F4-2（1.46%）
	NX-23-25（1.11%）	NX-23-25（1.99%）
	辽鲜豆 12 号（1.02%）	辽鲜豆 12 号（1.76%）
水苏糖	淮豆 6 号（3.47%）	淮豆 6 号（4.15%）

低聚糖	皖豆 33 (3.42%)	皖豆 33 (4.16%)
	徐 78107-6 (3.34%)	徐 78107-6 (4.76%)
	潍科 8 号 (11.46%)	潍科 8 号 (11.26%)
	泗阳 209 (10.91%)	泗阳 209 (10.22%)
	徐豆 4 号 (10.23%)	徐豆 4 号 (11.61%)

2.5 相关性分析

大豆材料低聚糖组分相关性分析表明：于三亚种植和南京六合种植的大豆蔗糖、棉子糖、水苏糖分别与总低聚糖含量间均存在显著正相关，蔗糖与棉子糖含量间均呈现极显著正相关性，推测棉子糖含量与蔗糖含量有关，两个环境的结果具有一致性（图 3）。蔗糖、棉子糖和水苏糖与总低聚糖的相关系数分别为 0.801**、0.566**和 0.775**，蔗糖和总低聚糖的相关系数最高为 0.801** 这与低聚糖中蔗糖所占比例高有关（表 5）。

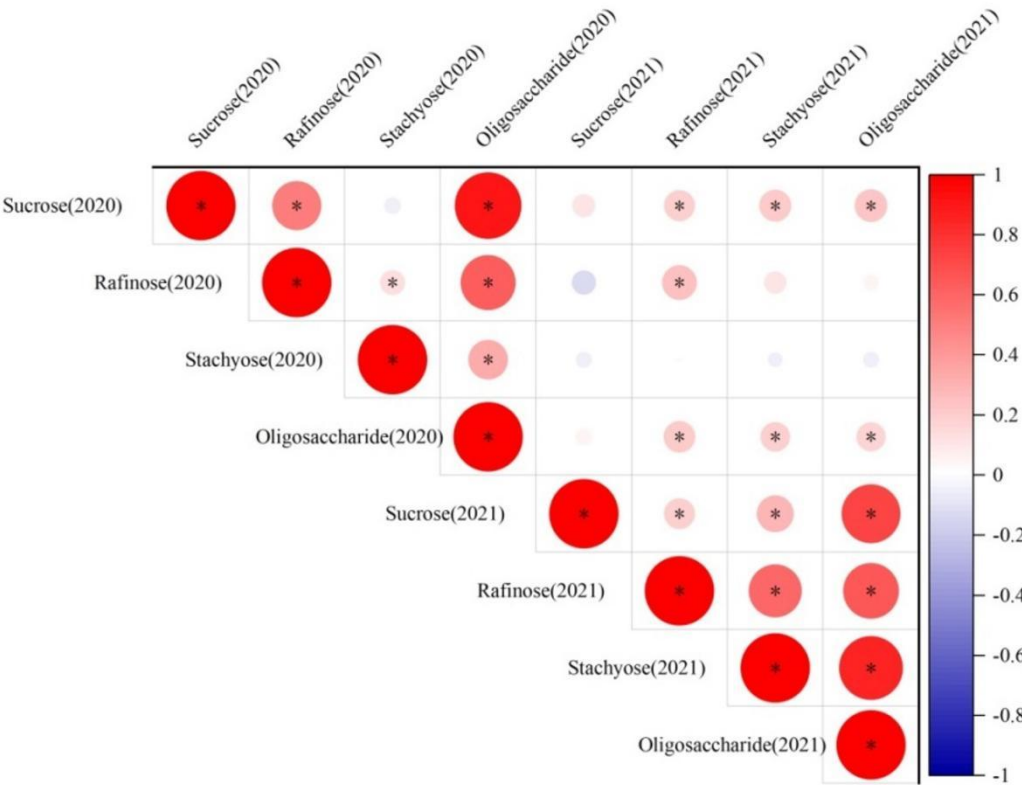


图 3 大豆低聚糖及组分含量相关性分析图。

Fig 3 Correlation analysis of soybean seed oligosaccharides and its components

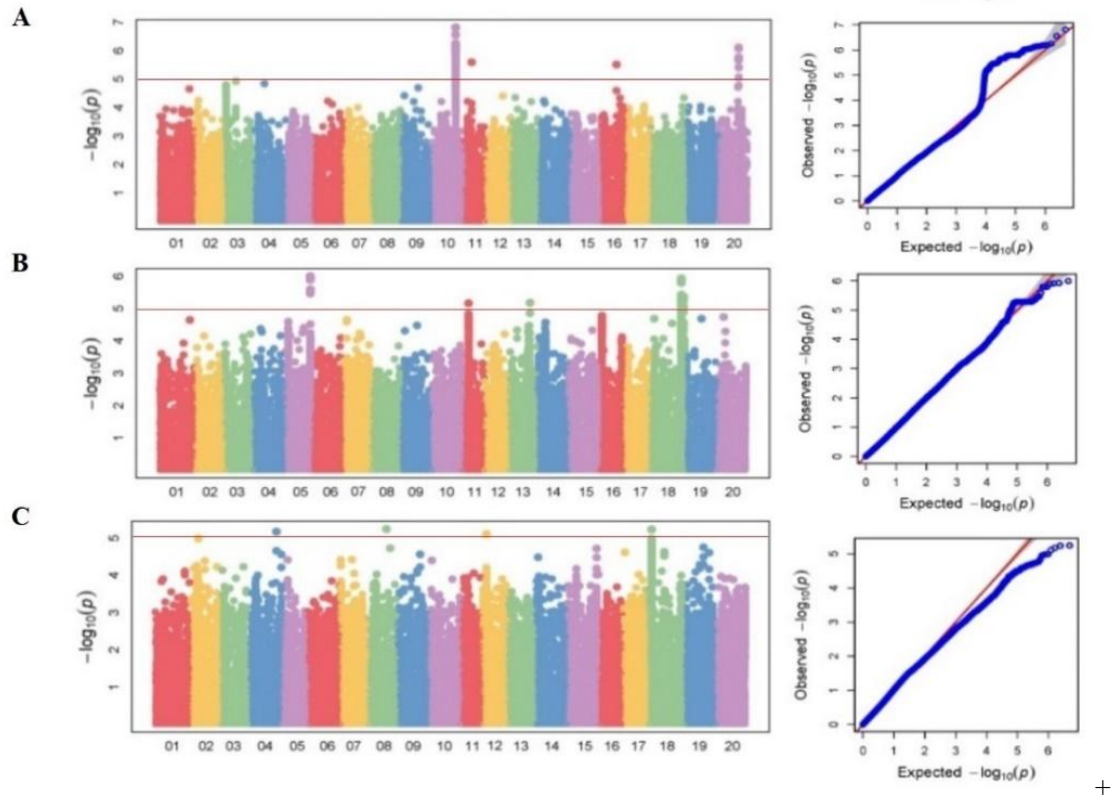
表 5 大豆低聚糖及组分含量相关性分析

Table 5. Correlation analysis of oligosaccharides and its components in soybean seeds

名称	蔗糖	棉子糖	水苏糖	大豆低聚糖
Name	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Oligosaccharides
蔗糖	1			
棉子糖	0.214**	1		
水苏糖	0.286**	0.458**	1	
大豆低聚糖	0.801**	0.566**	0.775**	1

2.6 大豆低聚糖含量 GWAS 分析及候选基因挖掘

利用 HPLC 法测定了三亚和南京两个环境下大豆自然群体的三种低聚糖（水苏糖、棉子糖和蔗糖）含量，结合基因型数据进行全基因组关联分析，曼哈顿图见图 4 和图 5。分别鉴定出 613 个和 258 个与低聚糖显著关联的 SNPs（表 6）。同时我们也对低聚糖总含量进行全基因组关联（图 6），不同环境下分别检测到 1 个和 32 个与大豆低聚糖显著相关的 SNPs（表 6）



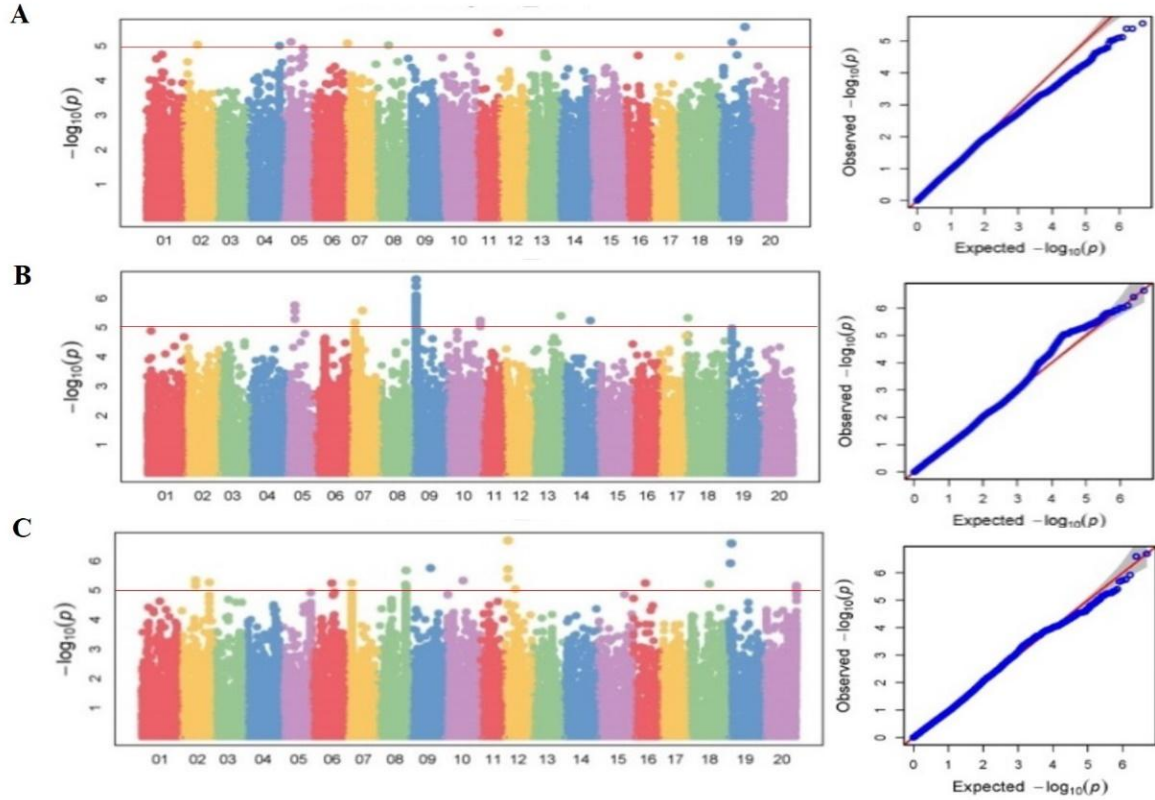
(A) (B) (C) 分别是水苏糖、棉子糖和蔗糖的 GWAS 结果

(A), (B) and (C), GWAS results of stachyose, raffinose and sucrose, respectively.

图 4 . 种植于海南三亚的大豆低聚糖各组分全基因组关联分析曼哈顿图及 Q-Q 图.

Fig 4. Genome-wide association analysis of soybean oligosaccharide components in Sanya, Hainan province, 2020

Manhattan plot and Q-Q plot.



(A) (B) (C) 分别是水苏糖、棉子糖和蔗糖的 GWAS 结果

(A), (B) and (C), GWAS results of stachyose, raffinose and sucrose, respectively.

图 5 . 种植于江苏南京的大豆低聚糖各组分全基因组关联分析曼哈顿图及 Q-Q 图.

Fig 5. Genome-wide association analysis of soybean oligosaccharide components in Nanjing, Jiangsu province, 2021

Manhattan plot and Q-Q plot.

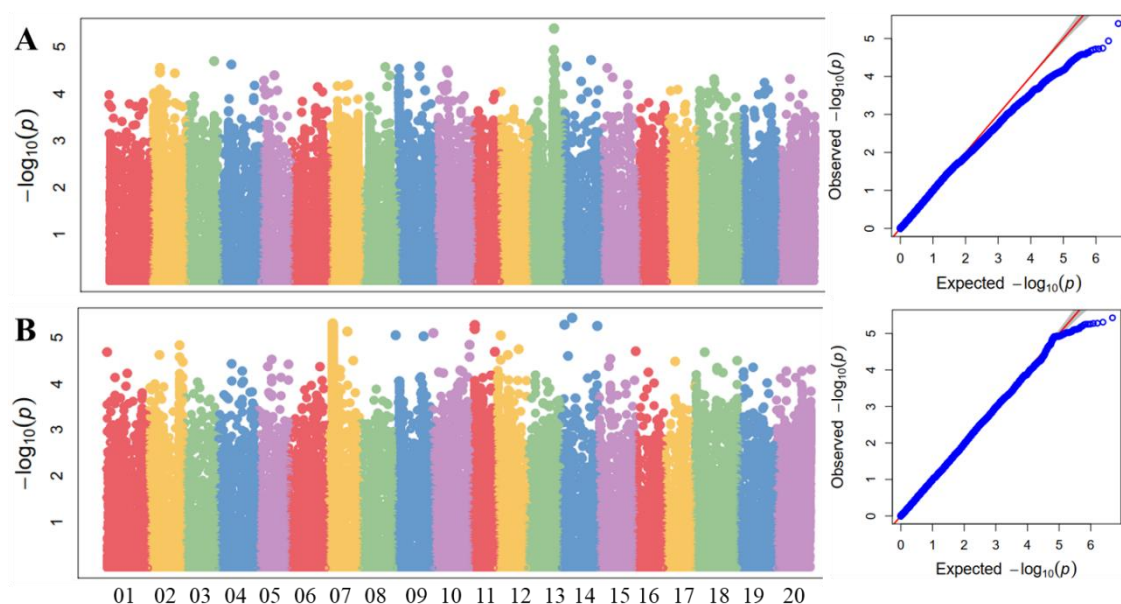


图 6. 种植于三亚 (A) 和南京 (B) 的大豆低聚糖含量全基因组关联分析曼哈顿图及 Q-Q 图.

Fig 5. Manhattan plot and Q-Q plot for GWAS of soybean oligosaccharide content in Sanya (A) and Nanjing (B), respectively.

GWAS 分析发现：利用种植于三亚的大豆材料，共关联到 613 个 SNP 位点，与棉子糖关联的 SNP 有 83 个，其中位于 5 号染色体上的 SNP 有 5 个，11 号染色体 1 个、13 号染色体 2 个、18 号染色体上的 SNP 有 75 个，单个 SNP 的表型变异解释率在 6.56%~8.10%之间；与水苏糖关联的 SNP 有 526 个，其中位于 10 号染色体上的 SNP 有 502 个，11 号、14 号、16 号染色体上 SNP 各有 1 个，20 号染色体上的 SNP 有 21 个，单个 SNP 位点的表型变异解释率在 8.74%~12.53%之间；与蔗糖关联的 SNP 有 4 个分别位于 4 号、8 号、12 号、18 号染色体上，单个 SNP 位点的表型变异解释率在 7.73%~7.98%之间。

利用种植于南京六合的大豆材料，共关联到 258 个 SNP，检测到与棉子糖关联的 SNP 有 224 个，其中位于 5 号染色体有 3 个、7 号染色体有 2 个、9 号染色体上的 SNP 最多，有 211 个，10 号染色体有 5 个。单个 SNP 位点的表型变异解释率为 7.47%~12.68%；与水苏糖关联的 SNP 有 9 个大多分布在 11 和 19 号染色体上，单个 SNP 位点的表型变异解释率为 6.45%~9.28%，与蔗糖关联的 SNP 有 25 个，分布在 2、8、12、20 号染色体上，单个 SNP 位点的表型变异解释率为 6.14%~12.13%。

对种植于三亚和南京的大豆材料的低聚糖含量进行 GWAS 分析，得到显著相关的 SNP 有 33 个，分别位于 7、9、10、11、12、13 和 14 号染色体上（图 6），单个 SNP 位点的表型变异解释率为 7.08%~8.37%。

比较 GWAS 分析结果发现，不同环境下不同类型低聚糖之间没有定位到相同的 SNP 位点，与低聚糖总含量也没有定位到相同或者相近的 SNP 位点；而在同一环境下，种植于南京大豆材料

的蔗糖和低聚糖总含量在 7 号和 12 号染色体上定位到相同的 SNP 位点，分别为 S07_7714433 和 S12_4957877，这有可能是因为蔗糖占比低聚糖含量大，相关性最高导致的。

表 6 自然群体中与大豆低聚糖关联的 SNP 位点数量

Table 6 Number of SNP associated with soybean oligosaccharides in natural populations

低聚糖组分	年份	地点	-log ₁₀ (P) ≥5
Oligosaccharide component	Year	Location	
蔗糖	2020	三亚	4
	2021	南京	25
棉子糖	2020	三亚	83
	2021	南京	224
水苏糖	2020	三亚	526
	2021	南京	9
低聚糖	2020	三亚	1
	2021	南京	32

表 7 低聚糖组分显著相关 SNPs 分布

Table 7 SNPs were significantly associated with each oligosaccharide

地点	低聚糖组分	染色体	SNP 数目	极显著 SNP	-log ₁₀ (P) 值极大值
Location	Oligosaccharide component	Chromosome	SNP number	Peak SNP	(-log ₁₀ (P)max)
三亚	棉子糖	5	5	S05_40347558	5.99
		18	75	S18_52012350	5.93
	水苏糖	10	502	S10_37983091	6.81
		20	21	S20_33869418	6.11
南京	棉子糖	9	211	S09_5224523	6.64
		10	5	S10_49321337	5.24
	水苏糖	11	2	S11_31904885	5.38
		19	2	S19_39525205	5.55
	蔗糖	7	5	S07_7714433	5.24
		8	5	S08_41780063	5.67
		12	4	S12_4957877	5.72
		13	1	S13_31939397	8.37
三亚	低聚糖总量	7	23	S07_7714433	7.59
		9	2	S09_17346	7.16
		10	1	S10_537832	7.24
		11	2	S11_4846904	7.53
		12	1	S12_4957877	7.15

因此我们分别在 S07_7714433 和 S12_4957877 位点的上下游 120 Kb 区间范围，内寻找调控大豆低聚糖/蔗糖含量的候选基因。依据在线数据库 phytozome 13 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 中大豆基因组注释信息可知，在这两个区间内区分别存在 25 个和 34 个候选基因。根据在拟南芥中同源基因比对应后发现 5 个基因可能为控制大豆低聚糖/蔗糖含量的候选基因（表 8）。其中，*Glyma.07G083200* 和 *Glyma.12G067000* 编码细胞色素 P450, *Glyma.07G083500* 编码 bHLH 转录因子, *Glyma.12G066000* 编码 MYB 转录因子, *Glyma.12G066800* 编码 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖（UAA）转运蛋白。

表 8 大豆低聚糖/蔗糖含量的候选基因
Table 8 Candidate genes for oligosaccharide/sucrose in soybean

基因 ID	同源基因	功能注释
Gene ID	Homologs	Functional annotation
<i>Glyma.07G083200</i>	<i>AT2G45510</i>	细胞色素 P450
<i>Glyma.07G083500</i>	<i>AT4G29100</i>	基本螺旋-环-螺旋蛋白家族 (bHLH)
<i>Glyma.12G066000</i>	<i>AT5G59780</i>	MYB 转录因子
<i>Glyma.12G066800</i>	<i>AT5G59740</i>	UDP-N-乙酰氨基葡萄糖 (UAA) 转运蛋白
<i>Glyma.12G067000</i>	<i>AT5G06900</i>	细胞色素 P450

3 讨论

大豆低聚糖具有许多对人类有益的生理功能，被广泛的应用于食品、化工和医药等领域，具有良好的发展前景。鉴定评价优异的低聚糖大豆种质，建立简便、准确、高效率的测定方法非常重要，大豆低聚糖的检测方法有液相色谱法（HPLC）^[19-21]、气相色谱（GC）^[22]、薄层色谱分析法^[23]和比色法^[24]等，以反向键和相色谱检测^[22]为原理的 HPLC 法可以直接对提取出的低聚糖进行检测，样品处理简单，样品损失少，运用的更加广泛。以往的研究中，使低聚糖完全分离的保留时间在 20~30 min 左右，分离速度较慢，不利于大批量样本的检测^[25,26,27]。本研究中使用岛津 shim-pack GIST-NH2 色谱柱，柱温 30℃，检测器温度 35℃，乙腈/水 63/37，10 min 内可将三种低聚糖完整分开，显著提高了检测效率，此方法方便、快捷、准确，可作为常规方法使用。

通过分析发现大豆低聚糖含量及各组分在不同大豆种质间之间存在明显差异，本研究所用大豆群体 2020 年和 2021 年的低聚糖含量范围分别为 6.18%~11.46%，4.19%~13.80%。李俊茹^[28]对两个大豆群体低聚

糖及组分分析,发现变异系数分别为 9.14%~25.56%和 6.30%~18.71%。本研究筛选到 16 份大豆低聚糖优异种质,为大豆低聚糖品种选育奠定材料基础。利用 GWAS 分析了不同环境下与大豆低聚糖含量显著相关位点,在 5、13、18 号染色体上定位到与棉子糖显著关联的 SNP 位点,在 11 号染色体上定位到与水苏糖显著关联的 SNP 位点,在 8、12、18 号染色体定位到与蔗糖显著关联的 SNP 位点。通过多年多点的不同环境试验,对不同环境条件下的低聚糖含量进行测定,这使关联分析得到的低聚糖 SNP 位点更加可靠。但在两个环境下未鉴定到共同显著关联位点,这可能是由于低聚糖是典型的数量性状,由多基因控制,易受环境条件影响。因此后续研究一方面可以扩大研究群体数量,另外继续检测不同环境下大豆低聚糖含量,以期获得更加可靠的与低聚糖含量显著关联位点,使低聚糖候选基因的发掘和遗传标记的开发更加精确。本研究获得的显著关联 SNP 位点为分子辅助育种奠定基础,在特用大豆的育种方面具有重要应用价值。

参考文献

- [1] 孙明明,王萍,李智媛,吕世翔,王冠,韩英鹏,李文滨.大豆活性成分研究进展[J].大豆科学,2018,37(6):975-983.
Sun M M,Wang P,Li Z Y,Lv S X,Wang G,Han Y P,Li W B. Research Progress of Soybean Active Ingredients[J]. Soybean Science, 2018,37(6):975-983
- [2] 宋志峰,金卫东,王丽,黄璜,王巍巍,张之鑫,蔡红梅,魏春雁.吉林省部分大豆品种(系)低聚糖含量分析[J].大豆科学,2009,28(3):516-519+523.
Song Z F,Jin W D,Wang L,Wang W W,Zhang Z X,Cai H M,Wei C Y.Determination of oligosaccharides in some soybean varieties (line) in Jilin province [J] Soybean Science, 2009,28(3):516-519+523.
- [3] 杨福明,冯丽丽,罗淑年,王立枫,史永革. 大豆中生物活性成分及其检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(3):858-865.
Yang F M,Feng L L,Lou S N,Wang L F,Shi Y N. Research progress of bioactive components in soybean and their detection technologies[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021,12(3):858-865.
- [4] Li T, Zhang Y M, Liu Y,Li X D,Hao G L,Han Q H, Dirk LMA,Downie AB,Ruan Y L,Wang JM. Raffinose synthase enhances drought tolerance through raffinose synthesis or galactinol hydrolysis in maize and Arabidopsis plants[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2020,295(23):8064-8077.
- [5] 张沛,杨桂芹,刘海英. 大豆低聚糖对家禽肠道微生态的影响及作用机制研究进展[J]. 饲料工业,2016,37(5):60-64.
Zhang P,Yang G Q,Liu H Y. Research progress of effects and mechanisms of soybean oligosaccharides on intestinal microecology in poultry[J] Feed Industry,2016,37(5):60-64.
- [6] 周晓莉,许喜林. 大豆低聚糖的生理功能及应用[C].“健康中国2030·健康食品的创新与发展”暨2019年广东省食品学会学术年会论文集.2019:25-28
Zou X L,Xu X L. The physiological function and application of soybean oligosaccharides[C]. Proceedings of the 2019 Guangdong Food Society Annual Conference 2019:25-28
- [7] 毕云枫,徐琳琳,姜珊,王玉华.低聚糖在功能性食品中的应用及研究进展[J].粮食与油脂,2017,30(1):5-8.
Bi Y F,Xu L L,Jiang S,Wang Y H. Application and research progress of oligosaccharides in functional food[J]. Cereals&Oils,2017,30(1):5-8
- [8] 刘红梅,刘聚胜.功能性低聚糖的研究及在食品中的应用现状[J].轻工科技,2012,28(4):15-16.
Liu H M,Liu J S. Research status of functional oligosaccharides and their application in food[J] Light Industry Science and Technology,2012,28(4):15-16
- [9] Redondo-Cuenca A, Villanueva-Suárez M J, Rodríguez-Sevilla M D, Mateos-Aparicio, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*)[J]. Food Chemistry, 2006,101(3):1216-1222.
- [10] 王璇琳,李素波,高红伟,田曙光,宫锋,章扬培.重组 α -半乳糖苷酶解大豆低聚糖研究[J].食品科学,2008,29(12):222-226.
Wang X L,Li S B,Gao H W,Tian S G,Gong F,Zhang Y P. Study on hydrolysis of soybean oligosaccharide by recombinant α -galactosidase[J].Food Science ,2008,29(12):222-226.
- [11] Chen W, Duizer L, Corredig M, Goff H D. Addition of soluble soybean polysaccharides to dairy products as a source of dietary fiber[J]. Journal of Food Science, 2010,75(6):C478-84.
- [12] 张雁明,邢国芳,刘美桃,刘晓东,韩渊怀. 全基因组关联分析:基因组学研究的机遇与挑战[J]. 生物技术通报, 2013(6):1-6.
Zhang Y M,Xing G F,Liu M T,Liu X D,Han Y B. Genome wide association study : opportunities and challenges in genomic research[J] Biotechnoligy Bulletin2013(6):1-6
- [13] Cao Y C, Li S G, Wang Z L, Chang F G, Kong J J, Gai J Y, Zhao T J. Identification of major quantitative trait loci for seed oil content in soybeans by combining linkage and genome-wide association mapping[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1222.
- [14] Zhang W, Xu W, Zhang H, Liu X, Cui X, Li S, Song L, Zhu Y, Chen X, Chen H (2021) Comparative selective signature analysis and high-resolution GWAS reveal a new candidate gene controlling seed weight in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2021, 134:1329-1341

- [15] Goettel W, Zhang H Y, Li Y, Qiao Z Z, Jiang H, Hou D Y, Song Q J, Pantalone V R, Song B H, Yu D Y, An Y Q C. POWR1 is a domestication gene pleiotropically regulating seed quality and yield in soybean[J]. Nature Communications, 2022, 13: 3051.
- [16] GB5497-85[J].
- [17] Zhang W, Xu W J, Zhang H M, Liu X Q, Cui C Y, Li S S, Zhu Y L, Chen X, Chen H T. Comparative selective signature analysis and high-resolution GWAS reveal a new candidate gene controlling seed weight in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2021, 134(5):1329-1341.
- [18] Zhang Z W, Ersoz E, Lai C Q, Todhunter, R J, Tiwari, H K, Gore, M A, Bradbury, P J, Yu, J M, Arnett, D K, Ordovas, J M, Buckler, E S. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies[J]. Nature Genetics, 2010, 42(4):355-360.
- [19] 刘晓丹, 岳海艳, 谭智峰. 大豆低聚糖仪器检测方法现状概述[J]. 食品科技, 2021(20):158-163.
- Liu X D, Yue H Y, Tan Z F. An overview of the current status of soybean oligosaccharide instrumental testing methods[J]. Food Science and Technology, 2021(20):158-163.
- [20] 王晓岩, 郝再彬, 邱丽娟. HPLC法快速检测大豆籽粒中大豆低聚糖的含量[J]. 食品科技, 2010, 35(07):287-290.
- Wang X Y, Hao Z B, Qiu L J. The method for rapid detection of soybean oligosaccharide content by HPLC[J]. Food Science and Technology, 2010, 35(07):287-290.
- [21] 王玉军, 纪伟东, 李永平, 韩俊杰, 叶红洋. 高效液相色谱法测定大豆低聚糖中的棉籽糖和水苏糖[J]. 现代食品科技, 2010, 26(07):750-752.
- Wang Y J, Ji W D, Li Y P, Han J J, Ye H Y. Determination of raffinose and stachyose in soybean oligosaccharides by HPLC[J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(7):750-752.
- [22] 薛连海. 气相色谱法测定大豆中低聚糖含量[J]. 分析化学, 2003(03):382.
- Xue H L. Determination of oligosaccharide in soybean by gas chromatography[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2003(3):382.
- [23] 陈凌霄, 钟如此, 赵静, 李邵平. 薄层色谱结合气相色谱-质谱法评价几种市售功能糖质量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 29-33.
- Chen L X, Zhong R C, Zhao J, Li S P. Quality evaluation of commercial functional saccharides by TLC and GC-MS[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2018, 38(1): 29-33.
- [24] 张述伟, 宗营杰, 方春燕, 黄赛华, 李静, 许建华, 王亦菲, 刘成洪. 蒽酮比色法快速测定大麦叶片中可溶性糖含量的优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(7): 196-200.
- Zhang S W, Zong Y J, Fang C Y, Huang S H, Li J, Xu J H, Wang Y F, Liu C H. Optimization of Anthrone Colorimetric Method for Rapid Determination of Soluble Sugar in Barley Leaves[J]. Food Research and Development, 2020, 41(7):196-200.
- [25] GBT 22491-2008 [S].
- [26] 王玉军, 纪伟东, 李永平. 大豆低聚糖粉中棉子糖和水苏糖的测定方法研究[J]. 大豆科技, 2010(4):23-25.
- Wang Y J, Ji W D, Li Y P. Study on the determination of raffinose and stachyose in soybean oligosaccharide powder[J]. Soybean Science, 2010(4):23-25.
- [27] 李怡然. 豆制品水溶性生物活性物质检测方法的优化及含量分析[D]. 内蒙古农业大学, 2014.
- Li Y R. Optimization method and analysis for water-soluble bioactive substances content in soybean products. [D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [28] 李俊茹. 大豆品种资源低聚糖与脂肪酸鉴定及特异种质筛选[D]. 河北农业大学, 2021.
- Li J R. Oligosaccharides and fatty acids identification and specific germplasm screening of soybean variety resources. [D]. Hebei Agricultural University, 2021.