

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, 王琼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。本研究利用高效液相色谱法(HPLC, high performance liquid chromatography), 测量了包含264份大豆材料的自然群体的蔗糖含量、棉子糖含量、水苏糖含量以及总低聚糖含量。结果表明3种低聚糖中蔗糖占总低聚糖的比例最高, 棉子糖占比最低, 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10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, 为发掘大豆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, including sucrose, raffinose, stachyose and total oligosaccharide, were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) method in a population of 264 soybean genotypes that were cultivated at two environments. It was shown that among the three oligosaccharides, sucrose accounts for the highest proportion of total oligosaccharides, and raffinose accounts for the lowest proportion. 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. Ten oligosaccharide specific genotypes with stable performance at different environments were obtained. Genome-wide association study (GWAS) was carried out by combining phenotypic and genotypic data of oligosaccharide content in natural soybean population. SNPs significantly associated with oligosaccharides content were identified and candidate genes were considered to be related with oligosaccharide/sucrose. Collectively, this study provided germplasm

收稿日期: 2022-10-28 修回日期: 2023-01-29 网络出版日期: 2023-02-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221028001>

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

通信作者: 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

基金项目: 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 projects: 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)

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; genome-wide association study; SNP

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大豆低聚糖^[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(SNP, single nucleotide polymorphism)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^[13-15]。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。

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^[16]。2020年种植于海南三亚试验基地(109.685092°E, 18.334734°N);2021年种植于江苏南京六合试验基地(118.634071°E, 32.47821°N)。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 色谱条件

色谱柱:日本岛津 shim-pack GIST-NH2(4.6 mm×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 °C;检测器温度35 °C;进样体积10 μL;检测器:(RID)示差折光检测器。

1.3 标准溶液的配制及标准曲线绘制

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 °C冰箱中保存备用。

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均分别稀释为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。

1.4 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》^[17]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。

1.5 相关性分析及全基因组关联分析

通过SPASS 26.0软件分析大豆材料低聚糖组分含量相关性。

利用本研究室前期研究获得的包含2,597,425个SNPs的264份大豆自然群体的基因型数据^[16],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。

1.6 候选基因分析

全基因组关联分析得到与大豆低聚糖显著关联的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 结果与分析

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,得到蔗糖的标准曲线回归方程为 $Y=85359X+466.55$ ($R^2=0.9999$),棉子糖的为 $Y=70980X+373.25$ ($R^2=0.9998$),水苏糖的为 $Y=73522X+361.93$ ($R^2=0.9998$),上述3个回归方程的相关系数均大于0.9998,相关系数 R^2 越大说明标准曲线的回归方程的准确性越高。

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。

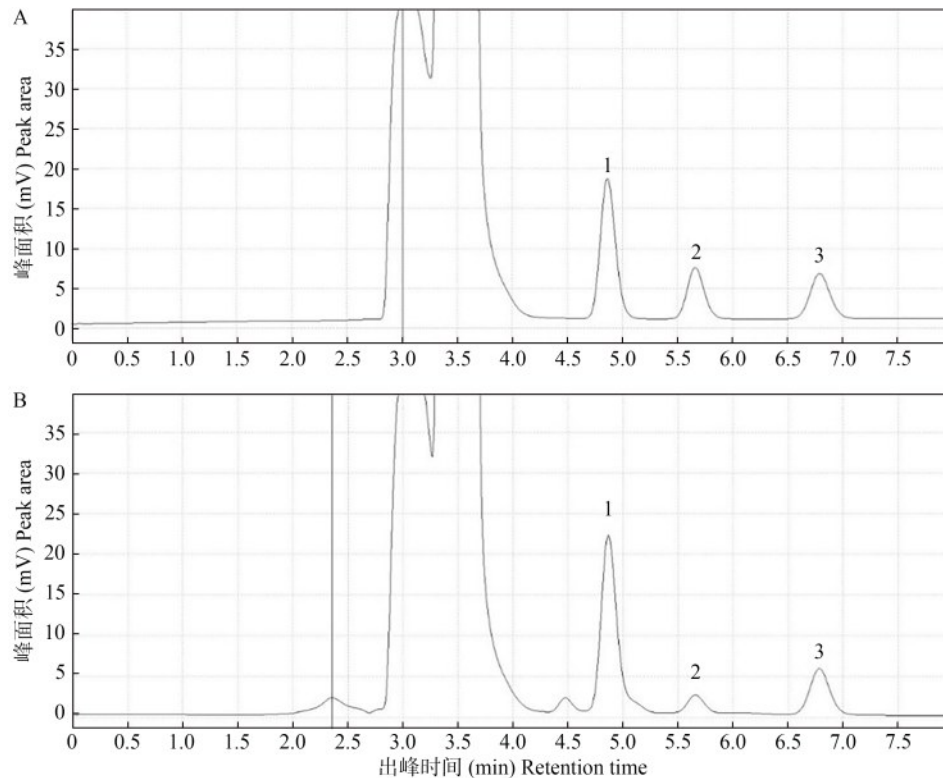
2.3 精密度分析

为确保低聚糖含量检测结果的准确性和重复性,本研究首先对仪器的精密度进行分析。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,结果表明3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1.63%、2.12%、0.36%,表明该仪器具有良好的精度和重复性。

2.4 表型分析

利用HPLC测定264份大豆材料在两个环境下(2020年三亚,2021年南京)低聚糖含量。结果显示海南三亚种植的大豆材料蔗糖、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3.01%~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%。江苏南京种植的大豆材料蔗糖、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1)。

3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;海南三亚种植的大豆材料蔗糖、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)。江苏南京种植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。两个环境下的变异系数均反映出供试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。这些结果表明本研究的大豆自然群体中一些材料的总低聚糖含量较高,具有一定的选择潜力和利用价值。



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

A: The standard solution; B: The soybean sample; 1: Sucrose; 2: Raffinose; 3: Stachyose

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

表 1 三亚及南京地区大豆低聚糖含量描述统计

Table 1 Descriptive statistics of soybean oligosaccharide content in Sanya and Nanjing

地点	性状	最小(%)	最大(%)	均值(%)	标准差	方差	变异系数(%)
Location	Traits	Min.	Max.	Mean	SD	Var	CV
三亚 Sanya	蔗糖	3.01	7.92	4.97	8.54	72.87	17.19
	棉子糖	0.38	1.18	0.70	1.47	2.17	21.06
	水苏糖	1.52	3.48	2.60	3.58	12.88	13.78
	总低聚糖	6.18	11.46	8.27	9.97	99.50	12.06
南京 Nanjing	蔗糖	2.06	8.52	3.68	8.44	71.27	22.97
	棉子糖	0.51	2.25	0.96	3.35	11.24	34.99
	水苏糖	0.79	5.19	2.59	9.79	95.82	37.83
	总低聚糖	4.19	13.80	7.22	16.55	273.86	22.92

鉴定到2020年三亚的总低聚糖含量较高的3份种质分别为潍科8号(11.46%)、泗阳209(10.91%)、溧阳青豆172(10.80%);2021年南京总低聚糖含量较高的3份种质分别为石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蔗糖、棉子糖、水苏糖、低聚糖含量较高种质资源各3份(表2)。筛选出来的的低聚糖含量较高的的大豆种质,丰富了我国的低聚糖含量优异种质资源。

2.5 相关性分析

相关性分析表明:三亚种植和南京种植的大豆蔗糖、棉子糖、水苏糖分别与总低聚糖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)。两个环境平均值的相关性分析结果显示,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,这与低聚糖中蔗糖所占比例高有关(表3)。

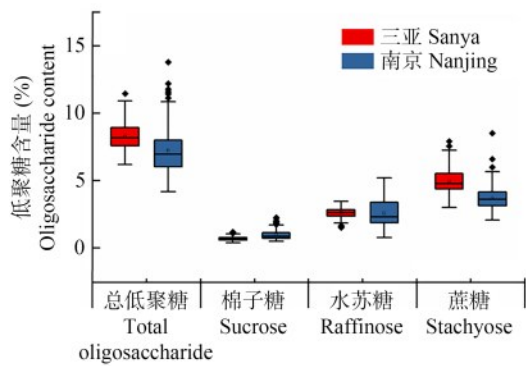


图2 大豆低聚糖及组分的箱线图分析

Fig.2 Boxplot analysis of soybean oligosaccharides and components

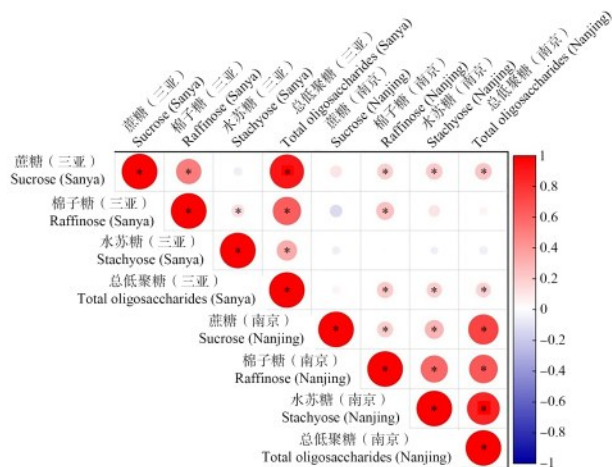
表2 高低聚糖组分大豆种质

Table 2 Varieties with high oligosaccharide components

性状 Traits	三亚 Sanya	南京 Nanjing
蔗糖 Sucrose	徐豆4号(6.72%) 泗阳209(7.56%) 蒙豆8206(4.47%)	徐豆4号(6.00%) 泗阳209(5.65%) 蒙豆8206(3.30%)
棉子糖 Raffinose	NX-F4-2(1.17%) NX-23-25(1.11%) 辽鲜豆12号(1.02%)	NX-F4-2(1.46%) NX-23-25(1.99%) 辽鲜豆12号(1.76%)
水苏糖 Stachyose	淮豆6号(3.47%) 皖豆33(3.42%)	淮豆6号(4.15%) 皖豆33(4.16%)
总低聚糖 Total oligosaccharides	徐78107-6(3.34%) 滩科8号(11.46%) 泗阳209(10.91%) 徐豆4号(10.23%)	徐78107-6(4.76%) 滩科8号(11.26%) 泗阳209(10.22%) 徐豆4号(11.61%)

括号内数字为低聚糖含量

Numbers in brackets represent the content of oligosaccharides



*表示在P<0.05水平上差异显著

*represents significant at P<0.05 level

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3 大豆低聚糖及组分含量相关性分析

Table 3 Correlation analysis of oligosaccharides and its components in soybean seeds

性状 Traits	蔗糖 Sucrose	棉子糖 Raffinose	水苏糖 Stachyose	总低聚糖 Total oligosaccharides
蔗糖 Sucrose	1			
棉子糖 Raffinose	0.214**	1		
水苏糖 Stachyose	0.286**	0.458**	1	
总低聚糖 Total oligosaccharides	0.801**	0.566**	0.775**	1

**代表在P<0.01水平下显著

**represents significant at P<0.01 level

2.6 大豆低聚糖含量GWAS分析及候选基因挖掘

利用HPLC法测定的三亚和南京两个环境下大豆自然群体的3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。分别鉴定出613个和258个与低聚糖显著关联的SNPs(表4)。同时也对总低聚糖进行全基因组关联分析,不同环境下分别检测到13个和63个与大豆低聚糖显著相关的SNPs(表4)。

表4 自然群体中与大豆低聚糖显著关联的SNP位点数量

Table 4 Number of SNP associated with soybean oligosaccharides in natural populations

性状 Traits	地点 Location	显著SNP数量 Number of significant SNPs
蔗糖 Sucrose	三亚	4
棉子糖 Raffinose	南京	25
水苏糖 Stachyose	三亚	83
总低聚糖 Total Oligosaccharides	南京	224
	三亚	526
	南京	9
	三亚	13
	南京	63

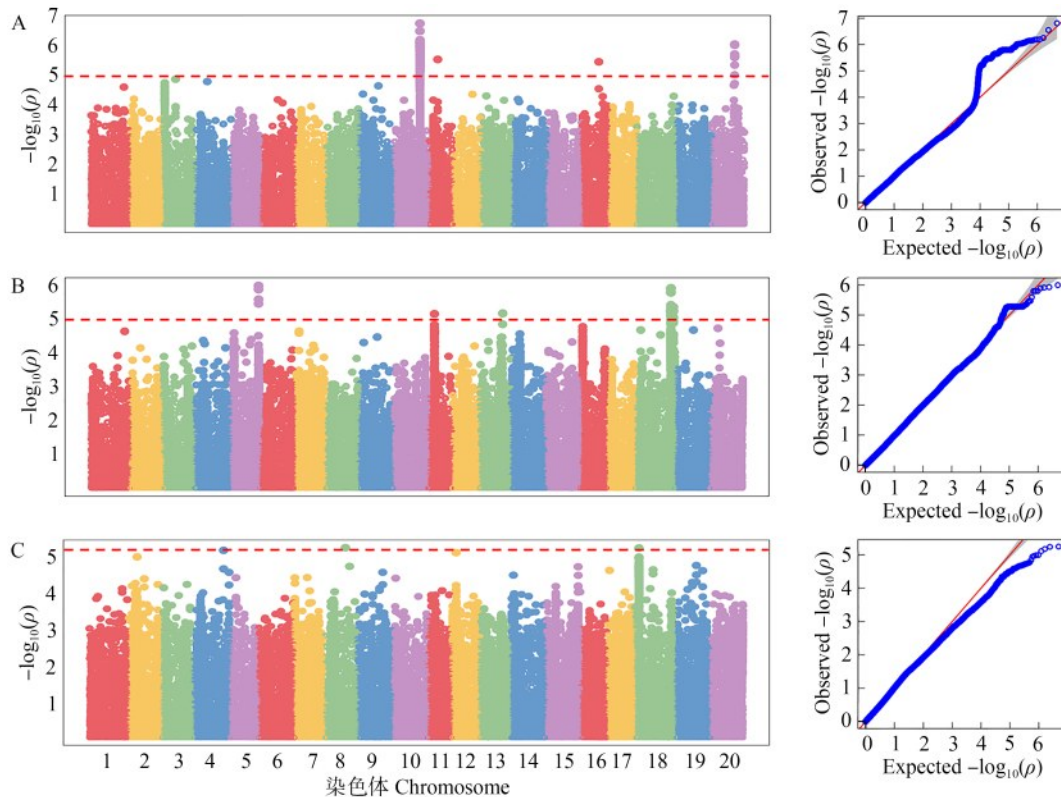
种植于三亚的大豆材料关联到的613个SNP位点(表4、表5),分布在4、5、8、10、11、12、13、14、16、18和20号染色体上(图4)。其中与棉子糖关联的SNP有83个,其中位于5号染色体上的SNP有5个,11号染色体1个、13号染色体2个、18号染色体上的SNP有75个,单个SNP的表型变异解释率在6.56%~8.10%之间;与水苏糖关联的SNP有526个,其中位于10号染色体上的SNP有502个,11号、14号、16号染色体上SNP各有1个,20号染

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。

表 5 与大豆低聚糖组分显著相关的 SNPs 分布

Table 5 SNPs were significantly associated with each oligosaccharide

地点 Location	性状 Traits	染色体 Chromosome	SNP 数目 SNP number	显著 SNP Peak SNP	$-\log_{10}(P)$	
三亚 Sanya	棉子糖	5	5	S05_40347558	5.99	
		11	1	S11_8532780	5.16	
		13	2	S13_33150168	5.17	
		18	75	S18_52012350	5.93	
	水苏糖	10	502	S10_37983091	6.81	
		11	1	S11_12265789	5.59	
		14	1	S14_18348932	5.11	
		16	1	S16_24780273	5.51	
		20	21	S20_33869418	6.11	
		蔗糖	4	1	S04_43438175	5.17
	8		1	S08_29598256	5.25	
	12		1	S12_6050657	5.11	
	18		1	S18_5345374	5.24	
	南京 Nanjing	总低聚糖	13	1	S13_31939397	8.37
棉子糖		5	3	S05_13437635	5.76	
		7	2	S07_18801464	5.58	
		9	211	S09_5224523	6.64	
水苏糖		10	5	S10_49321337	5.24	
		2	1	S02_19882534	5.04	
		4	1	S04_47298064	5.01	
		5	1	S05_11902447	5.12	
		7	1	S07_2261246	5.07	
		8	1	S08_18699463	5.02	
		11	2	S11_31904885	5.38	
		19	2	S19_39525205	5.55	
		蔗糖	2	4	S02_22004571	5.34
			6	1	S06_30280657	5.24
7			1	S07_7714433	5.24	
8			5	S08_41780063	5.67	
9			1	S09_29359665	5.75	
10			1	S10_26288825	5.33	
12	4		S12_4957877	5.72		
16	1		S16_17098645	5.24		
总低聚糖	18	1	S18_30295586	5.21		
	19	2	S19_4207170	6.59		
	20	4	S20_47616141	5.16		
	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		
14	3	S14_15182200	7.79			



A、B、C分别是水苏糖、棉子糖和蔗糖的GWAS结果；红色虚线代表显著阈值 $-\log_{10}(p) = 5$ ，下同

A, B, C were GWAS results of stachyose, raffinose and sucrose, respectively; The red dotted line represents the significant threshold $-\log_{10}(p) = 5$, the same as below

图4 种植于海南三亚的大豆低聚糖各组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

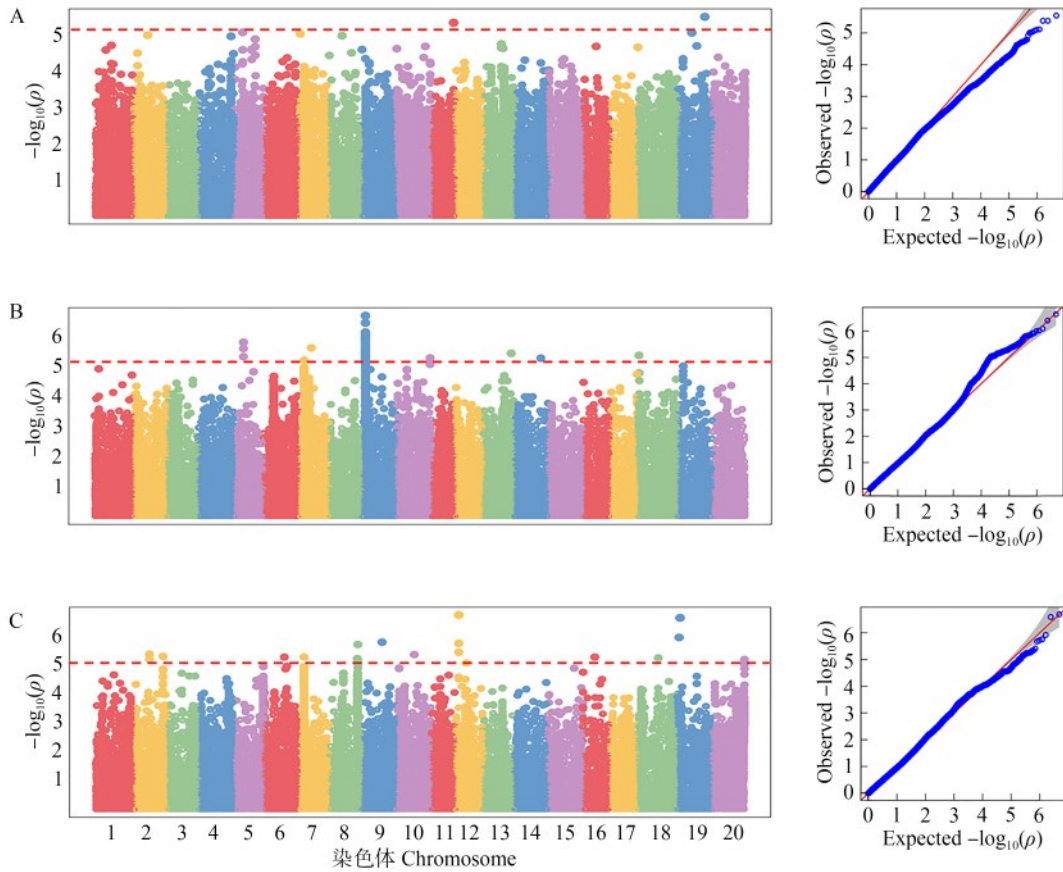
利用种植于南京六合的大豆材料，共关联到258个SNP(表4、表5)，分布在2、5、7、8、9、10、11、12、16、18、19和20号染色体上(图5)。检测到与棉子糖关联的SNP有224个，其中位于5号染色体有3个、7号染色体有2个、9号染色体上的SNP最多，有211个，10号染色体有5个，单个SNP位点的表型变异解释率为7.47%~12.68%；与水苏糖关联的SNP有9个，大多分布在11和19号染色体上，单个SNP位点的表型变异解释率为6.45%~9.28%，与蔗糖关联的SNP有25个，大多分布在2、8、12、19、20号染色体上，单个SNP位点的表型变异解释率为6.14%~12.13%。

对种植于三亚和南京的大豆材料的总低聚糖含量进行GWAS分析，得到显著相关的SNP有76个(表4、表5)，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，总低聚

糖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总低聚糖在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(表5)，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。

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总低聚糖/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6)。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。



A、B、C 分别是水苏糖、棉子糖和蔗糖的GWAS结果

A, B, 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

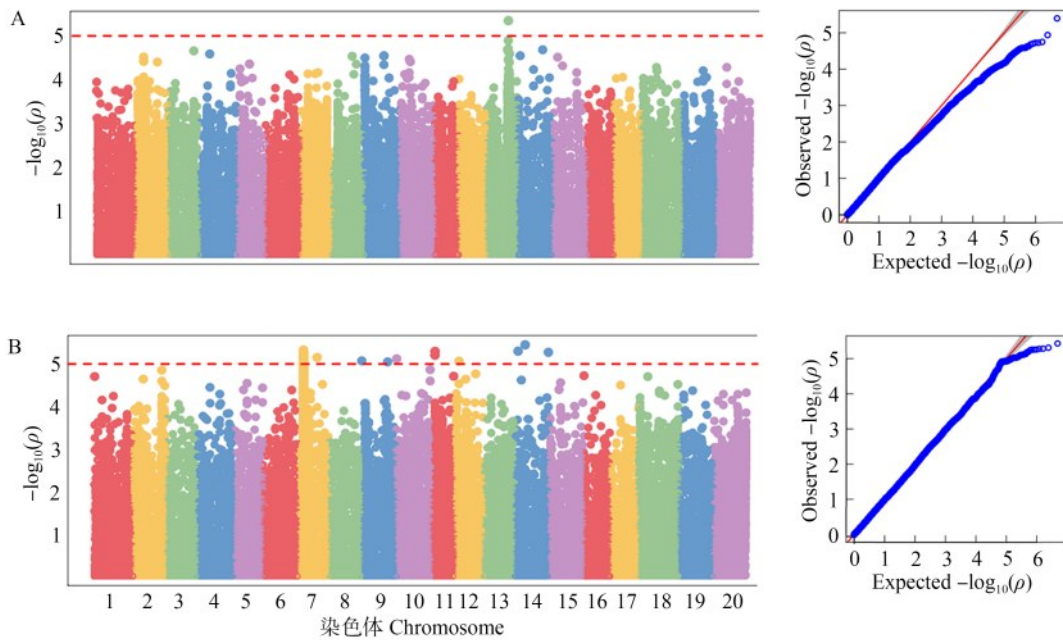


图6 种植于三亚(A)和南京(B)的大豆总低聚糖全基因组关联分析曼哈顿图及Q-Q图

Fig.6 Manhattan plot and Q-Q plot for GWAS of total oligosaccharide content in Sanya (A) and Nanjing (B)

表6 大豆低聚糖/蔗糖含量的候选基因

Table 6 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、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]。本研究使用岛津shim-pack GIST-NH2 色谱柱,柱温30℃,检测器温度35℃,乙腈/水=63/37(v/v),10 min内可将3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存在明显差异,本研究种植于海南三亚和江苏南京的大豆群体总低聚糖含量范围分别为6.18%~11.46%和4.19%~13.80%。李俊茹^[27]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%。本研究筛选得到10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检测不同环境下与大豆低聚糖显著相关位点,共检测到947个SNP与目标性状显著关联的位点。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.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. 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.大豆科学,2009,28(3):516-519,523
Song Z F, Jin W D, Wang L, Huang H, Wang W W, Zhang Z X, Cai H M, Wei C Y. Determination of oligosaccharides in some soybean varieties (line) in Jilin province. 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.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. 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 L M A, Downie A B, Ruan Y L, Wang J M. Raffinose synthase enhances drought tolerance through raffinose synthesis or galactinol hydrolysis in maize and Arabidopsis plants. 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.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. Feed Industry, 2016, 37(5): 60-64
- [6] 杨建远.大豆低聚糖的生理功能及在家禽生产中的应用.饲料研究,2010(12):21-23
Yang J Y. Physiological function of soybean oligosaccharide and its application in poultry production. Feed Research, 2010(12): 21-23
- [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.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. 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.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. 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*). *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 -半乳糖苷酶水解大豆低聚糖研究. *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. *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. *Journal of Food Science*, 2010, 75(6): 478-84
- [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. *生物技术通报*, 2013(6): 1-6
- Zhang Y M, Xing G F, Liu M T, Liu X D, Han Y H. Genome wide association study: Opportunities and challenges in genomic research. *Biotechnology Bulletin*, 2013(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. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1222
- [14] 梁腾月, 谷勇哲, 马英杰, 王辉, 杨光, 敖雪, 邱丽娟. 大豆耐低磷性全基因组关联分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1): 237-251
- Liang T Y, Gu Y Z, Ma Y J, Wang H, Yang G, Ao X, Qiu L J. Genome wide association study of low phosphorus tolerance in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(1): 237-251
- [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. *Nature Communications*, 2022, 13: 3051
- [16] 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(5): 1329-1341
- [17] 商业部粮食储运局. 粮食、油料检验水分测定法. GB/T 5497-1985. 1985-11-02
- Grain Storage and Transportation Bureau of the Ministry of Commerce. Inspection of grain and oilseeds Determination of moisture content. GB/T 5497-1985. 1985-11-02
- [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. *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. *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. *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. *食品科技*, 2010, 35(7): 287-290
- Wang X Y, Hao Z B, Qiu L J. The method for rapid detection of soybean oligosaccharide content by HPLC. *Food Science and Technology*, 2010, 35(7): 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. *现代食品科技*, 2010, 26(7): 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. *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. *分析化学*, 2003(3): 382
- Xue L H. Determination of oligosaccharide in soybean by gas chromatography. *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. *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. *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. 萘酚比色法快速测定大麦叶片中可溶性糖含量的优化. *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. *Food Research and Development*, 2020, 41(7): 196-200
- [25] 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. *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. *Soybean Science*, 2010(4): 23-25
- [26] 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. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014
- Li Y R. Optimization method and analysis for water-soluble bioactive substances content in soybean products. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014
- [27] 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. 保定: 河北农业大学, 2021
- Li J R. Oligosaccharides and fatty acids identification and specific germplasm screening of soybean variety resources. Baoding: Hebei Agricultural University, 2021