

Verbesserung von Qualitätseigenschaften der Sojabohne unter Einsatz molekularer Marker

J. VOLLMANN, G. CSANÁDI, G. STIFT, T. LELLEY und P. RUCKENBAUER

Einleitung

Die Sojabohne (*Glycine max* [L.] Merr.), die ca. 20 % Öl und 40 % Protein enthält (Tabelle 1), wird im weltweiten Anbau primär als Ölpflanze betrachtet (FEHR, 1989). In Europa allerdings, wo der Sojabohnenanbau gegenwärtig eine Fläche von etwa 1.25 Mio. ha umfaßt, steht der vor allem in der Fütterung genutzte hohe Proteingehalt im Mittelpunkt des Interesses. Da der Proteingehalt jedoch zumeist negativ mit dem Ertrag und hoch negativ mit dem Ölgehalt korreliert ist (WILCOX und CAVINS, 1995; BURTON, 1987), wurde er bislang nur bei der Züchtung von Sorten für spezielle Verwendungszwecke berücksichtigt (z.B. ORF et al., 1991). Erst im letzten Jahrzehnt wurde begonnen, vermehrt auf hohen Proteingehalt zu selektieren, nachdem sich gezeigt hatte, daß bei Sojabohnen aus dem Proteingehalt in den meisten Anbaujahren auf dem Weltmarkt eine höhere Wertschöpfung als aus dem Ölgehalt zu erzielen ist (LEFFEL, 1989). Neben dem Proteingehalt sind für einen Einsatz in der Fütterung auch weitere qualitative Kriterien von Bedeutung, etwa die Konzentration essentieller Aminosäuren oder der Gehalt an Trypsinhibitoren (Tabelle 1). Letztere erfordern zu deren Deaktivierung eine Hit-

zebehandlung der rohen Samen, weshalb versucht wird, diese Verdauungshemmstoffe züchterisch zu eliminieren (FEHR, 1989).

Eine Selektion auf Qualitätsmerkmale ist meist mit einem hohen analytischen Aufwand verbunden und erfordert oft größere Probenmengen, was den Einsatz molekularer Marker in diesem Bereich nahelegt. Bei Sojabohnen stehen erst mit den Mikrosatelliten (SSRs) ausreichend polymorphe Marker zur Verfügung, die für eine Kartierung von QTLs - also von einzelnen Loci, welche für quantitative Merkmale kodieren - geeignet sind (AKKAYA et al., 1995; CREGAN et al., 1999). Zuvor wurden QTLs für Öl- und Proteingehalt in interspezifischen Kreuzungen (DIERS et al., 1992), später auch in Kreuzungen zwischen adaptierten Sorten (LEE et al., 1996; MANSUR et al., 1996; BRUMMER et al., 1997) mit Hilfe von RFLPs identifiziert. RFLPs erwiesen sich jedoch bei Sojabohnen aufgrund des engen genetischen Hintergrunds (HYMOWITZ und BERNARD, 1991) vielfach als wenig polymorph und wegen der quasi-tetraploiden Genomstruktur als Marker, die meist gleichzeitig mehrere DNA-Fragmente (multiple Loci) detektieren, was Kartierungsarbeiten wesentlich erschwert; Mikrosatelli-

ten sind dagegen Single-Locus-Marker, die in Sojabohnen eine oft hohe Anzahl an Allelen je Locus aufweisen, wobei die einzelnen Allele meist symmetrischer verteilt sind als in RFLPs (CREGAN et al., 1999).

In den nachfolgend geschilderten Untersuchungen wurden Mikrosatelliten sowie Proteinmarker zur Darstellung der genetischen Diversität von Sojabohnen früher Reifegruppen, zur Kartierung von QTLs bzw. zur Selektion auf Qualitätsmerkmale in ausgewählten Kreuzungspopulationen eingesetzt.

Material und Methoden

Genotypen

Aufgrund von Vorexperimenten wurden insgesamt 18 Sojabohnen-Genotypen, die entweder einer frühen Reifegruppe (Reifegruppen 0-000) angehören oder besondere Qualitätsmerkmale aufweisen, für verschiedene Untersuchungen mit molekularen Markern ausgewählt.

Bestimmung der genetischen Diversität

Mit Hilfe von 12 Paaren Sojabohnenspezifischer Mikrosatelliten-Primer (AKKAYA et al., 1995) wurden die 18 ausgewählten Genotypen - wie bei DOLDI et al. (1997) beschrieben - untersucht und paarweise genetische Distanzen aufgrund von Mikrosatelliten-Polymorphismen ermittelt. Die genetische Diversität innerhalb des ausgewählten Sortimentes wurde in einem Dendrogramm mittels der UPGMA-Clusteranalyse dargestellt.

Molekulargenetische Untersuchung einer spaltenden Population und QTL-Mapping von Qualitätsmerkmalen

Die Sojabohnensorten *Ma.Belle* und *Proto* sowie 82 F₂-Pflanzen der Kreuzung

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der Sojabohne und ausgewählte wertbestimmende Qualitätskriterien

Stoffgruppe	Quantität ¹	Qualitätskriterien
Protein	~ 40 %	- Gehalt an essentiellen Aminosäuren (Lysin, Methionin etc.) - Gehalt und Aktivität von Protease-Inhibitoren (Kunitz-TI, Bowman-Birk-TI)
Öl	~ 20 %	- Fettsäuremuster (Gehalt an gesättigten FS, Linolensäuregehalt) - Lipoxygenaseaktivität
Andere (Kohlehydrate, Rohfaser u.a.)	< 40 %	- Oligosaccharide (Raffinose, Stachyose) - Isoflavone (Genistein u.a.) - Pigmente (Hilum, Samenschale)

¹Bezugsbasis: Trockenmasse

Autoren: Dr. Johann VOLLMANN, o.Univ.Prof. Dr. Peter RUCKENBAUER, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität für Bodenkultur (BOKU) Wien, Gregor-Mendel Str. 33, A-1180 WIEN; Dr. Gyula CSANÁDI, Gertraud STIFT und Prof. Dr. Tamás LELLEY, Abteilung Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, IFA Tulln, Konrad-Lorenz Str. 20, A-3430 TULLN



zungspopulation *Ma.Belle* x *Proto* wurden mit 561 sojaspezifischen Mikrosatelliten-Primerpaaren (AKKAYA et al., 1995; CREGAN et al., 1999) untersucht, wie bei CSANÁDI et al. (2000) beschrieben. Mit den für die spaltende Population polymorphen Mikrosatelliten wurde zunächst eine genetische Kopplungskarte mittels MAPMAKER/EXP 3.0 (LINCOLN et al. 1992a) erstellt. Danach wurden sowohl mittels einfacher Varianzanalyse (SAS INST., 1988) als auch mit Hilfe von Intervall-Mapping (MAPMAKER/QTL 1.1; LINCOLN et al., 1992b) Assoziationen zwischen Markern und QTLs für Qualitätsmerkmale wie Proteingehalt, Ölgehalt, Tausendkorngewicht sowie für andere agronomische Merkmale gesucht. Die phänotypischen Daten dazu wurden an F₂-abgeleiteten Linien in Feldversuchen unter fünf verschiedenen Umweltbedingungen ermittelt.

Verringerung des Gehaltes an Trypsininhibitoren

Eine konventionelle Linie wurde mit einer Sojabohnenlinie gekreuzt, die das Null-Allel des Kunitz-Trypsininhibitors aufweist und aus einer vorangegangenen Kreuzung mit der Sorte *Kunitz* (BERNARD et al., 1991) stammt. Kunitz-TI-freie Nachkommenschaften wurden in der F₂-Generation mit Hilfe einer Standard-Proteinelektrophorese (SDS-PAGE) und Comassie Brilliant Blue-Färbung aufgrund des Fehlens der Kunitz-Proteinbande bei 21 kD identifiziert. 123 F₂-abgeleitete Linien dieser Kreuzung wurden auf zwei Standorten zur Ermittlung von Qualitätsparametern geprüft.

Feldversuche und Qualitätsuntersuchungen

Die einzelnen Feldversuche wurden in den Jahren 1997 und 1998 auf den Standorten Raasdorf, Gr. Enzersdorf (Niederösterreich), Pama (Burgenland) und Wien (Garten der Univ.f.Bodenkultur) in 2,3 m langen Einzelreihen als generalisierte Gitteranlagen in 2 Wiederholungen angelegt und als Gitteranlagen bzw. mittels Nachbaranalyse (VOLLMANN et al., 2000) ausgewertet. Die Feststellung des Protein- bzw. Ölgehaltes der Untersuchungsproben erfolgte mit Hilfe der Nahinfrarot-Reflexionsspektroskopie (NIRS), wobei sämtliche Inhaltsstoffgehaltswerte in g kg⁻¹ bezogen auf

Trockenmasse angegeben wurden. Die Trypsininhibitoraktivität wurde nach der Methode von KAKADE et al. (1974) an entfettetem Sojamehl bestimmt und wird ausgedrückt in mg Trypsin, das von einem g Sojamehl inhibiert wird.

Ergebnisse und Diskussion

Die 18 ausgewählten Sojabohnensorten wurden aufgrund ihrer durch Mikrosatellitenmarker ermittelten genetischen Distanzen sehr deutlich in zwei Gruppen geteilt, wie aus dem in *Abbildung 1* wiedergegebenen Dendrogramm ersichtlich ist. Dabei enthält die größere obere Gruppe (von *Dom* bis *Sundance*) vor allem frühreifende, für einen Anbau in Mitteleuropa adaptierte Genotypen, während fast alle proteinreichen Genotypen sowie die Sorte *Kunitz*, welche das Null-Allel für den Kunitz-Trypsininhibitor trägt, in der unteren Gruppe (*Nattosan* bis *BARC-6*) zu finden sind. Innerhalb der Gruppen ist eine gute Übereinstimmung der Gliederung mit Pedigreeinformationen festzustellen: So enthalten z.B. die Sorten *Ma.Arrow* und *Ceresia* die Sorte *Harosoy* in ihrem Pedigree (DOLDI et al., 1997), *M6X111* und *M6X89* stammen aus derselben Kreuzung, die Sorte *Sundance* ist aus einer *Apache*-Kreuzung hervorgegangen und *Provar* scheint im Pedigree der Sorte *Proto* (ORF et al., 1991) auf. Darüber hinaus konnten auch Sorten mit unbekanntem Pedigree (*Pando*, *Dom*, *Ma.Belle*) genetisch eingeordnet werden,

was für die Auswahl von Kreuzungseltern von Bedeutung ist. Die untersuchten Sorten konnten mit den 12 Markern nicht nur eindeutig unterschieden werden, sondern es war auch ein z.B. im Vergleich zu RAPDs hoher Grad an Polymorphismen mit bis zu 6 Allelen pro Markerlocus feststellbar (DOLDI et al., 1997). Damit eignet sich dieser Markertyp nicht nur besonders zur Darstellung genetischer Diversitätsverhältnisse, sondern auch zur Identifikation von Sorten (RONGWEN et al., 1995). Beides ist von besonderer Bedeutung für die Anwendung an Sortimenten mit engem genetischen Hintergrund, was für Sojabohnengenotypen der frühesten Reifegruppen zutrifft, die sortengeschichtlich auf ganz wenige „Plant Introductions“ zurückgehen (HYMOWITZ und BERNARD, 1991).

In der Kreuzung *Ma.Belle* x *Proto* waren 149 der 561 verfügbaren sojaspezifischen Mikrosatelliten-Primerpaare polymorph, konnten also für die Erstellung einer genetischen Kopplungskarte mit Hilfe der F₂-Population verwendet werden. Die einzelnen Marker wichen jeweils nur unwesentlich vom für den kodominanten Erbgang erwarteten 1:2:1-Aufspaltungsverhältnis ab, und die amplifizierten Mikrosatelliten waren auf dem Gel nach Silberfärbung zumeist sehr deutlich zu erkennen, wie *Abbildung 2* zeigt. Die aufgrund dieser Daten erstellte Kopplungskarte umfaßt derzeit 135 gekoppelte Marker, 14 weitere Marker

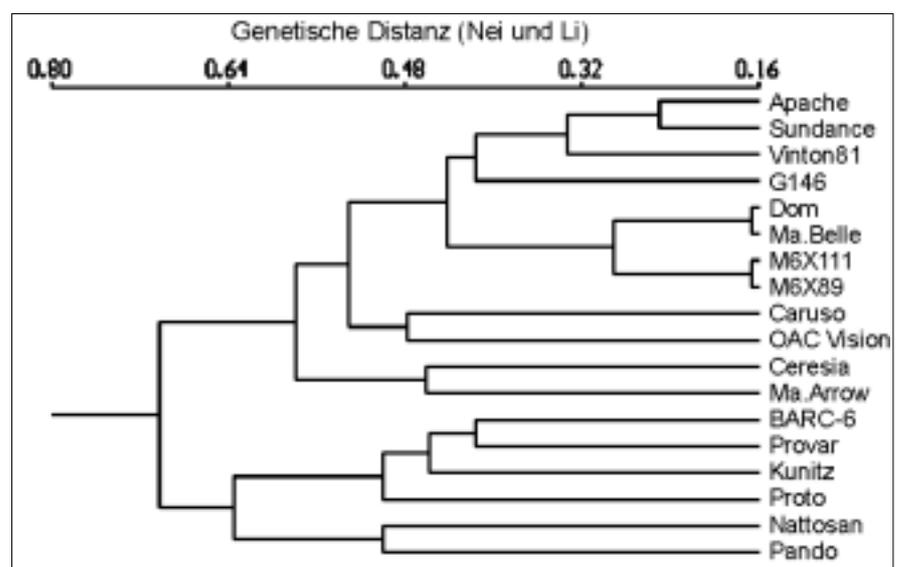


Abbildung 1: Dendrogramm von 18 Genotypen der Sojabohne aufgrund von Mikrosatelliten-basierten genetischen Distanzen (UPGMA-Clusteranalyse)



Abbildung 2: Beispiel eines Mikrosatelliten-Bandenmusters des Markers Satt42 in Elterngenotypen und einigen F₂-Pflanzen

Tabelle 2: Phänotypische Kennzahlen für verschiedene Merkmale von F₂-Nachkommenschaften der Kreuzung *Ma.Belle* x *Proto* (Mittelwerte über 5 Umwelten)

Merkmale	Ma. Belle	Proto	Populationsmittelwert	LSD (0.05)	h ² (%)
Reifezeit (Tage nach dem 31.7.)	42.9	53.2	50.8	4.7	65.7
Dauer der reprod. Phase (Tage)	79.8	82.7	86.0	5.2	50.4
Wuchshöhe (cm)	50.8	59.8	58.6	8.3	87.8
1000-Korn-Gewicht (g)	215	191	208	17	83.0
Proteingehalt (g kg ⁻¹)	402	423	417	15	58.4
Ölgehalt (g kg ⁻¹)	199	185	189	13	59.2

konnten noch keiner Kopplungsgruppe zugeordnet werden. Die Marker liegen in insgesamt 20 Kopplungsgruppen vor, was gut mit dem haploiden Chromosomensatz der Sojabohne von 1 n = 20 übereinstimmt. Die Kopplungskarte umfaßt eine Gesamtlänge von 600 cM (centi-Morgan), was eine durchschnittliche Markerdichte von 4.4 cM ergibt. Die kleinsten Kopplungsgruppen werden allerdings erst von zwei Markern gebildet, die größten dagegen stimmen gut mit der von CREGAN et al. (1999) vorgestellten Karte (USDA/Iowa State Univ. - map) überein.

Die Ergebnisse der für eine QTL-Analyse notwendigen Bestimmung der Phänotyp-Werte sind für Eltern und F₂-Nachkommenschaften der Kreuzung *Ma.Belle* x *Proto* in Tabelle 2 zusammengefaßt. Der Elter *Ma.Belle* weist im Vergleich zu *Proto* eine frühere Reifezeit, eine geringere Wuchshöhe, ein deutlich höheres TKG sowie einen geringeren Protein-, aber einen höheren Ölgehalt auf. Von den Qualitätsmerkmalen weisen Protein- und Ölgehalt eine mittlere operative Heritabilität auf, während sich für das TKG in dieser Kreuzungspopulation ein deutlich höherer Schätzwert für die Heritabilität (h² = 83 %) ergibt. Die mit QTLs gekoppelten Mikrosatellitenmarker und die jeweiligen Allelmitelwerte werden exemplarisch für die

Merkmale Proteingehalt und TKG in Tabelle 3 wiedergegeben. Für Proteingehalt und für TKG zeigt sich, daß sowohl *Ma.Belle* als auch *Proto* positive bzw. negative Alleleffekte zur Merkmalsausprägung beitragen können, wodurch etwa Transgressionen erklärbar sind. Die mit dem Proteingehalt assoziierten Marker stehen gleichzeitig auch mit dem Ölgehalt in Zusammenhang, wobei hoher Protein- mit niedrigem Ölgehalt bzw. niedriger Protein- mit hohem Ölgehalt gekoppelt ist. Auch das in Abbildung 3 für die Kopplungsgruppe 5 wiedergegebene Intervallmapping für

Tabelle 3: Mikrosatellitenmarker und mit diesen assoziierte Effekte auf die Merkmale Proteingehalt und TKG in F₂-Nachkommenschaften der Kreuzung *Ma.Belle* x *Proto* (kombinierte Varianzanalyse über 5 Umwelten)

Marker	Kopplungsgruppe	Sig.niveau (F-Test)	Allelmitelwerte		
			Ma. Belle	heterozygot	Proto
Proteingehalt (g kg ⁻¹)					
Satt77	6	0.0009	417.4	419.1	413.0
Sct28	5	0.0069	414.6	417.0	418.7
Satt567	n.gek. ¹	0.0020	417.0	418.4	413.1
Satt196	14	0.0009	416.9	418.8	413.7
TKG (g)					
Satt210	16	<0.0001	202.6	208.3	213.1
Satt219	18	<0.0001	214.0	207.5	196.2
Satt229	20	<0.0001	212.8	207.8	200.2
Satt313	15	<0.0001	203.7	212.9	211.7
Satt358	18	<0.0001	215.8	205.9	202.4
Satt562	13	<0.0001	218.0	208.9	200.4

¹ bisher nicht in einer Kopplungsgruppe

Protein- und Ölgehalt zeigt etwa im Bereich des Markers Sct28 Peaks für 2 vermutlich eng gekoppelte QTLs, wenngleich eine genauere Lokalisation mehr Marker in diesem Bereich erfordern würde. Diese Kopplung zwischen Protein- und Ölgehalt wurde auch in anderen QTL-Analysen mit RFLP-Markern gefunden (BRUMMER et al., 1997; LEE et al., 1996) und könnte eine Erklärung für die meist hoch negative Korrelation zwischen diesen beiden Merkmalen (BURTON, 1987) bei der Sojabohne sein. Wegen der höheren Heritabilität für das Merkmal TKG im Vergleich zum

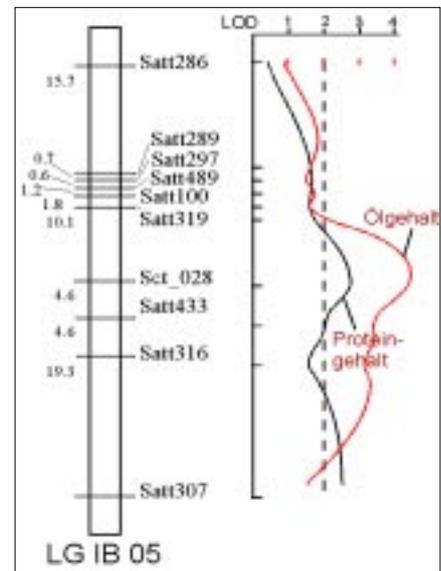


Abbildung 3: Beispiel für eine Mikrosatelliten-basierte Kopplungsgruppe (LG IB05) mit dazugehörigen LOD-Scores für die Merkmale Öl- und Proteingehalt

Proteingehalt (Tabelle 2) wurden für das TKG auch mehr Marker gefunden, die auf sehr hohem Signifikanzniveau mit diesem Merkmal assoziiert sind (Tabelle 3). Eine ähnlich große Anzahl von Markern bzw. vermutlichen QTLs für TKG wurde auch von MIAN et al. (1996) für zwei verschiedene Kreuzungspopulationen beschrieben. In *Abbildung 4* schließlich sind beispielhaft für den Marker Satt562 die Effekte der beiden Markerallele auf das TKG in Form von kumulativen Häufigkeitsverteilungen dargestellt. Homozygote Träger des Satt562-Allels von *Ma.Belle* weisen immer ein deutlich höheres TKG auf als solche von *Proto*, während die kumulative Häufigkeitsverteilung der heterozygoten F_2 -Nachkommenschaften genau dazwischen liegt, was auf eine in diesem Fall rein additive Vererbungsweise schließen läßt.

Die Häufigkeitsverteilung der Trypsin-inhibitoraktivität (*Abbildung 5*) in der Kreuzung zwischen einer Kunitz-Trypsin-inhibitor-freien (P1) und einer Ku-

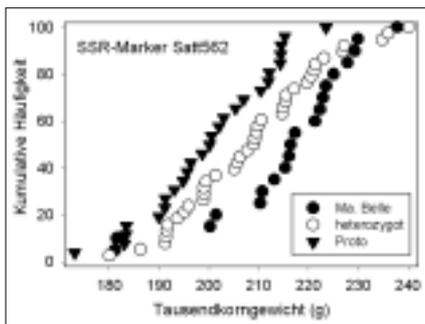


Abbildung 4: Kumulative Häufigkeitsverteilung der Tausendkorngewichte von F_2 -Nachkommenschaften der Kreuzung *Ma.Belle* x *Proto* gegliedert nach den Allelen des Markers Satt562

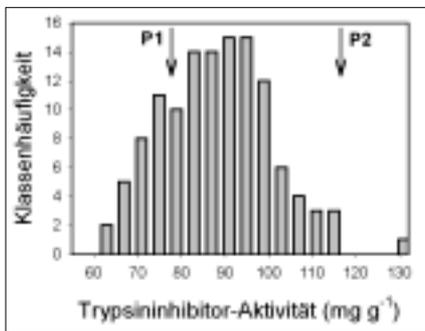


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der Trypsin-inhibitor-Aktivität in 123 $F_{2,3}$ -Linien der Kreuzung zwischen einer Kunitz-Trypsin-inhibitor-freien (P1) und einer Kunitz-TI-hältigen Linie (P2)

nitz-TI-hältigen Linie (P2) gibt das Bild eines quantitativen Merkmals mit einem zusätzlich spaltenden Majorgen (3:1-Aufspaltung des Kunitz-Faktors). Dabei liegen die homozygot rezessiven, Kunitz-TI-freien Linien, welche durch Protein-Elektrophorese leicht identifizierbar sind (ORF und HYMOWITZ, 1979; McNIVEN et al., 1992), um den Elter P1 und weisen eine Trypsin-inhibitoraktivität zwischen 63 und 96 mg g^{-1} auf. Die Trypsin-inhibitoraktivität ist also gegenüber konventionellen Sorten bzw. dem Elter P2 durch das Kunitz-Null-Allel um etwa 30-50 % reduziert.

Die chemische Bestimmung der gesamten Trypsin-inhibitoraktivität ist sehr zeitaufwendig (KAKADE et al., 1974), und der neben dem Kunitz-Inhibitor ebenfalls anwesende Bowman-Birk-Inhibitor, von dem es keine Null-Varianten gibt, ist genetisch kaum charakterisiert (NIELSEN, 1996). Ein QTL-Mapping wie in der Population *Ma.Belle* x *Proto* für TKG bzw. Proteingehalt demonstriert, könnte in diesem Fall nicht nur die genetischen Verhältnisse klarlegen, sondern auch einen rascheren Zuchtfortschritt bringen. Dies trifft sinngemäß auch für andere, zum Teil gesundheitsrelevante Inhaltsstoffe der Sojabohne wie etwa die Isoflavone zu (MESSINA, 1997), die bislang nicht berücksichtigt worden sind, aber durch den Einsatz molekularer Marker einer züchterischen Bearbeitung ebenfalls erschlossen werden könnten.

Zusammenfassung

Für die Verbesserung verschiedener Qualitätseigenschaften bei Sojabohnen früher Reifegruppen (MG 0-000) wurden Mikrosatelliten und Proteinmarker im Hinblick auf eine Unterstützung der Selektion eingesetzt. Im Genpool frühreifender Sojabohnen, der durch einen engen genetischen Hintergrund ausgezeichnet ist, konnten mit Sojabohnenspezifischen Mikrosatelliten die für ein Qualitätszuchtprogramm in Frage kommenden Eltern hinsichtlich ihrer genetischen Diversität charakterisiert werden, wobei auch Sorten mit unbekanntem Pedigree integriert werden konnten. In der Population *Ma.Belle* x *Proto* wurden Mikrosatellitenmarker gefunden, die mit QTLs für Proteingehalt, Ölgehalt oder TKG assoziiert sind.

Dabei scheinen QTLs für hohen Proteingehalt oft mit solchen für niedrigen Ölgehalt gekoppelt zu sein, was die negative Korrelation zwischen diesen beiden Merkmalen erklärt. In der Kreuzung zwischen einer Kunitz-Trypsin-inhibitor-freien und einer konventionellen Linie wurden mit Hilfe von Protein-Elektrophorese Kunitz-TI-freie Linien identifiziert, die eine reduzierte Trypsin-inhibitoraktivität aufweisen.

Summary

Microsatellites and protein markers were used in a breeding program focusing on the improvement of seed quality characters of early maturing soybeans (MG 0-000). Using soybean-specific microsatellite primers, the genetic diversity within a set of parental genotypes of narrow genetic base was characterized and genotypes with unknown pedigree were integrated. In the population *Ma.Belle* x *Proto*, microsatellites were identified which are associated with QTLs affecting seed protein content, oil content or seed size. QTLs coding for high protein content appear to be linked with QTLs coding for low oil content, which helps to explain the negative correlation between those two characters. In a population segregating for the null-allele of the Kunitz trypsin inhibitor, Kunitz-free segregants with reduced trypsin inhibitor activity were identified.

Danksagung

Die vorliegenden Ergebnisse wurden im Rahmen der vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF) geförderten Forschungsprojekte Nr. P10663-ÖBI und P10743-ÖBI erarbeitet.

Literatur

- AKKAYA, M. S., R. C. SHOEMAKER, J. E. SPECHT, A. A. BHAGWAT and P. B. CREGAN, 1995: Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci.* 35:1439-1445.
- BERNARD, R. L., T. HYMOWITZ and C. R. CREMEENS, 1991: Registration of 'Kunitz' soybean. *Crop Sci.* 31:232-233.
- BRUMMER, E. C., G. L. GRAEF, J. ORF, J. R. WILCOX and R. C. SHOEMAKER, 1997: Mapping QTL for seed protein and oil content in eight soybean populations. *Crop Sci.* 37:370-378.
- BURTON, J. W., 1987: Quantitative genetics: results relevant to soybean breeding. In: WILCOX, J. R. (ed.), *Soybeans: Improvement, Production,*

- and Uses (2nd edn.), Am. Soc. Agronomy, Madison, WI, USA, 211-247.
- CREGAN, P. B., T. JARVIK, A. L. BUSH, R. C. SHOEMAKER, K. G. LARK, A. L. KAHLER, N. KAYA, T. T. VAN TOAI, D. G. LOHNES, J. CHUNG and J. E. SPECHT, 1999: An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39:1464-1490.
- CSANÁDI G., J. VOLLMANN, G. STIFT, P.B. CREGAN and T. LELLEY, 2000: Identification of agronomically important QTLs in the genome of early maturing soybean genotypes using molecular genetic markers, in *Vorbereitung*.
- DIERS, B. W., P. KEIM, W. R. FEHR and R. C. SHOEMAKER, 1992: RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. *Theor. Appl. Genet.* 83:608-612.
- DOLDI, M.-L., J. VOLLMANN and T. LELLEY, 1997: Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. *Plant Breeding* 116:331-335.
- FEHR, W. R., 1989: Soybean. In: RÖBBELEN, G., R. K. DOWNEY and A. ASHRI (eds.), *Oil crops of the world, their breeding and utilization*, McGraw-Hill, New York, 283-300.
- HYMOWITZ, T. and R. L. BERNARD, 1991: Origin of the soybean and germplasm introduction and development in North America. In: SHANDS, H. L. and L. E. WIESNER (eds.), *Use of plant introductions in cultivar development, Part 1, Special Publication No. 17*, Crop Science Soc. of America, Madison, WI, USA, 147-164.
- KAKADE, M. L., J. J. RACKIS, J. E. MCGHEE and G. PUSKI, 1974: Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry* 51:376-382.
- LEE, S. H., M. A. BAILEY, M. A. R. MIAN, T. E. CARTER, Jr., E. R. SHIPE, D. A. ASHLEY, W. A. PARROTT, R. S. HUSSEY and H. R. BOERMA, 1996: RFLP loci associated with soybean seed protein and oil content across populations and locations. *Theor. Appl. Genet.* 93:649-657.
- LEFFEL, R. C., 1989: Breeding soybeans for the economic values of seed oil and protein. *J. Prod. Agric.* 2:338-343.
- LINCOLN, S., M. DALY and E. LANDER, 1992a: Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report, 3rd edn., Cambridge, MA, USA.
- LINCOLN, S., M. DALY and E. LANDER, 1992b: Mapping genes controlling quantitative traits with MAPMAKER/QTL 1.1. Whitehead Institute Technical Report, 2nd edn., Cambridge, MA, USA.
- MANSUR, L. M., J. H. ORF, K. CHASE, T. JARVIK, P. B. CREGAN and K. G. LARK, 1996: Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. *Crop Sci.* 36:1327-1336.
- McNIVEN, M. A., B. GRIMMELT, J. A. MacLEOD and H. VOLDENG, 1992: Biochemical characterization of a low trypsin inhibitor soybean. *J. Food Sci.* 57:1375-1377 + 1407.
- MESSINA, M. J., 1997: Soyfoods: Their role in disease prevention and treatment. In: LIU, K. (ed.), *Soybeans, chemistry, technology, and utilization*, Chapman & Hall, New York, 442-477.
- MIAN, M. A. R., M. A. BAILEY, J. P. TAMULONIS, E. R. SHIPE, T. E. CARTER Jr., W. A. PARROT, D. A. ASHLEY, R. S. HUSSEY and H. R. BOERMA, 1996: Molecular markers associated with seed weight in two soybean populations. *Theor. Appl. Genet.* 93:1011-1016.
- NIELSEN, N. C., 1996: Soybean seed composition. In: VERMA, D.P.S. and R.C. SHOEMAKER (eds.), *Soybean, Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*, CAB International, Wallingford, UK, 127-163.
- ORF, J. H. and T. HYMOWITZ, 1979: Genetics of the Kunitz trypsin inhibitor: An antinutritional factor in soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:722-726.
- ORF, J. H., J. W. LAMBERT and B. W. KENNEDY, 1991: Registration of Proto soybean. *Crop Sci.* 31:486.
- RONGWEN, J., M. S. AKKAYA, A. A. BHAGWAT, U. LAVI and P. B. CREGAN, 1995: The use of microsatellite DNA markers in soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90:43-48.
- SAS INSTITUTE, 1988: SAS/STAT User's Guide. Release 6.03 ed. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- VOLLMANN, J., J. WINKLER, C.N. FRITZ, H. GRAUSGRUBER and P. RUCKENBAUER, 2000: Spatial field variations in soybean performance trials affect agronomic characters and seed composition. *Europ. J. Agron.* 12:13-22.
- WILCOX, J. R. and J. F. CAVINS, 1995: Backcrossing high seed protein to a soybean cultivar. *Crop Sci.* 35:1036-1041.

