

文章编号:1003-8701(2009)06-0031-03

分子标记技术在大豆遗传育种中的应用

姚丹,闫伟,张扬,关淑艳,王丕武*

(吉林农业大学,长春 130118)

摘要:大豆是世界上重要的经济与粮食作物,大豆研究一直受到人们的广泛关注,但与玉米、水稻等作物相比,其研究进展十分缓慢。20世纪80年代末,DNA分子标记技术的出现,大大提高了遗传育种效率。本文从大豆遗传图谱的构建、遗传多样性研究、数量性状基因分析、分子标记辅助育种等四个方面概述了分子标记技术在大豆遗传育种中的应用情况。

关键词:大豆;分子标记;遗传育种;应用

中图分类号:S565.103.53

文献标识码:A

Applications of Molecular Marker in the Soybean Genetic Breeding

YAO Dan, YAN Wei, ZHANG Yang, GUAN Shu-yan, WANG Pi-wu*

(Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: As soybean is the most important economic and food crops in the world, soybean research has been paid more attention at all times, but soybean researches progressed slowly comparing with corn, rice and other crops. The emergence of DNA molecular marker technology in late 1980s greatly improved the efficiency of genetic breeding. Molecular markers applied in soybean genetics and breeding were summarized from the four aspects, i.e., soybean genetic map construction, genetic diversity studies, genetic analysis of quantitative traits, and molecular marker-assisted breeding.

Key words: Soybean; Molecular marker; Genetic breeding; Application

大豆是世界上重要的经济与粮食作物,也是食用油和植物蛋白的主要来源之一。因此,大豆的遗传研究一直受到广泛的重视。但由于大豆的遗传变异程度低,基因组较大并含有广泛的复制区和丰富的重复序列,染色体又很小,难于进行细胞遗传学观察等研究,导致大豆的遗传研究明显滞后于其它作物。

现代分子生物学技术的发展,使得建立在DNA水平上的揭示遗传多态性的遗传标记成为可能。1980年,人类遗传学家D.R.L. Botstein等首先提出了DNA限制性片段长度多态性(RFLP)

可以作为遗传标记的思想,开创了直接应用DNA多态性发展遗传标记的新阶段,也为遗传育种的研究开辟了一条新的途径。

1 DNA分子标记

DNA分子标记是继形态标记、细胞学标记和生化标记之后发展起来的一种新的遗传标记形式,前三种标记都是以基因表达的结果为基础,是对基因的间接反映;而DNA分子标记是以DNA多态性与性状间的紧密连锁关系为基础的遗传标记,是性状基因遗传变异的真实反映,能够稳定遗传,且遗传方式比较简单,可以在不同的发育阶段对不同组织DNA进行检测分析。DNA分子标记大多以电泳谱带的形式表现,依其所用的分子生物学技术,大致可分为三大类:第一大类是基于Southern杂交技术为核心的方法,主要指限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length

收稿日期:2009-03-31

基金项目:吉林省科技厅重大项目(20060202),校内青年活动基金“大豆蛋白和油分含量SSR标记及QTL定位分析”

作者简介:姚丹(1977-),女,讲师,博士,主要从事大豆、玉米遗传转化及QTL定位研究。

通讯作者:王丕武,男,教授,博士生导师,E-mail: peiwuw@yahoo.com.cn

polymorphism, RFLP)。第二大类是基于 PCR 技术为核心的 DNA 扩增方法, 基于 PCR 的分子标记又可分为二类, 一类是使用随机引物(Arbitrary primer), 这一类方法以随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 为代表, 它不需要预先知道任何基因组的 DNA 序列信息, 其引物是通用的, 无种属界限; 另一类是利用特定引物或成对引物扩增的标记, 主要有 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)、STS (Sequence Tagged Sites)、SSR (Simple Sequence Repeat)、ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 等。第三大类是 PCR 与酶切相结合的方法, 主要指扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)。

2 分子标记技术在大豆遗传研究中的应用

大豆是由古四倍演变而来的二倍体作物, 其基因组大小为 $129 \times 10^9 \sim 181 \times 10^9$ bp。由于大豆的基因组较大, 染色体又很小, 而且细胞在有丝分裂时染色体压缩, 使细胞不易观察, 因此, 大豆的细胞遗传学研究难度较大。DNA 分子标记出现后, 以其数量丰富、遗传稳定及操作简便等特点, 已经广泛地应用于大豆遗传连锁图谱的构建、遗传多样性研究、基因与 QTL 分析、品种鉴定、分子标记辅助育种等方面。

2.1 构建大豆遗传连锁图谱

相对于其他重要作物而言, 大豆的经典遗传图谱发展十分缓慢。例如, 迄今大豆上已鉴定的包括形态、色素和同工酶在内的常规标记约有 250 个, 但能分配到连锁图上的只有 68 个, 形成 20 个短小的连锁群, 并且大多数连锁群上只有 2~3 个标记。分子标记作图技术的发展, 使得大豆分子遗传图谱有了迅速的发展, 连锁图上的标记数从 1987 年的 57 个增至 1999 年的 1 423 个。遗传图谱在许多研究领域, 从植物改良中的标记辅助选择育种到分子遗传研究中的图位克隆(Map based clone)都发挥了重要作用。

1988 年, Apuya 等^[1]应用大豆两个栽培品种 Minsoy 和 Noir1 杂交得到的 F_2 群体构建了第一张大豆 RFLP 图谱, 共有 11 个 RFLP 标记分布在 4 个连锁群上。随后, Keim 等应用 G. max 和 G. Soja 进行种间杂交, 构建了第二张 RFLP 图谱, 该图谱包括 130 个 RFLP 标记组成的 26 个连锁群,

覆盖大豆基因组 1 200 cM。Shoemaker 和 Olson 同样使用 G.max×G.Soja 杂交的 F_2 群体, 发展了含有 25 个连锁群的遗传图谱, 包括 365 个 RFLP 标记, 11 个 RAPD 标记, 3 个经典性状标记和 4 个同功酶标记。目前, 较为完整的大豆遗传连锁图谱是 1999 年 Cregan 等运用 SSR 标记, 同时对三个作图群体, USDA10WA G.max×G.soja 的 F_2 群体, Univ. Of Utah Minsoy×Noir1 的重组自交系和 Univ.Of Nebraska Clark×Harosoy 的 F_2 群体, 进行作图。鉴于定位的连锁图仍有不少大于 20cM 的无 SSR 标记的区间, 有必要寻找新的 SSR 位点, 创建更为密集的分子标记图谱, 为将来建立大豆基因组核苷酸序列图谱提供信息。

我国大豆遗传图谱研究工作始于 1997 年, 张德水等^[3]用栽培大豆与半野生大豆间的杂种 F_2 群体, 以 RFLP 标记为主构建了中国第一套大豆分子连锁图。2000 年, 刘峰等应用栽培大豆长农 4 号和半野生大豆新民杂交得到的 F_8 代重组自交系, 构建了一张较高密度的遗传连锁图谱。2006 年, 巩鹏涛等对宛煜嵩等利用重组自交系群体 Jinf 构建的含有 227 个 SSR 标记的图谱的基础上进行整合, 整合后的大豆分子遗传图包含 315 个 SSR 标记和 40 个 AFLP 标记, 总图距为 1951.7 cM, 相邻标记间的平均图距为 5.48 cM。2007 年, 宋显军等利用沈农 6 号×OhioFG1 群体, 构建了包括 27 个连锁群和 170 个 SSR 标记的大豆遗传图谱。与国外遗传图谱相比, 国内构建的大豆遗传图谱存在着标记数偏少, 有些区段标记间距离偏大等问题。

2.2 遗传多样性的研究

自 20 世纪 70 年代限制性片段长度多态性 (RFLP) 诞生以来, 分子生物技术迅速发展, 使得遗传多样性可以直接从 DNA 分子水平进行检测。它是直接基于 DNA 序列上变化, 不受环境的影响, 可以客观准确地反映生物遗传多样性。广泛作为遗传多样性分析的分子标记主要有 RFLP, RAPD, AFLP 和 SSR。

大豆种质遗传多样性的分子标记分析可用于研究系统进化和亲缘关系。1996 年, 惠东威等^[5]用 8 个引物对大豆属中的 Glycin 亚属中的 10 个种和 Soja 亚属中的 3 个种共 21 份材料进行了基因组指纹图谱构建, 通过对其指纹图谱的量化分析对大豆属中的各个种进行了亲缘关系重建。1999 年, 许东河等选用全国各野生大豆和栽培大豆中

的有代表性材料,用等位酶、细胞器 DNA (包括 mtDNA 和 cpDNA)RFLP 标记和细胞核 DNA RAPD 标记对其进行了遗传多样性分析,结果表明,野生大豆综合遗传多样性水平高于栽培大豆,并且在其所用的分子标记位点,野生大豆与栽培大豆群体等位基因的分布频率差异明显,为研究大豆的起源和演化提供了依据。

2.3 数量性状基因分析

QTL(Quantitative Trait Loci)即数量性状基因座位,是控制数量性状的基因在基因组中的位置。QTL 定位(QTL Mapping)是检测分子标记和 QTL 间的连锁关系,估计 QTL 的效应,利用分子标记进行遗传连锁分析,检测出 QTL。借助与 QTL 连锁的分子标记,可以在育种中对有关的 QTL 的遗传动态进行跟踪,增强数量性状的可操作性,提高数量性状优良基因型选择的准确性和预见性。

随着大豆高密度连锁遗传图谱的构建,使许多大豆的重要农艺性状 QTL 得到了定位,其中包括形态特征、抗病特性、营养特征、籽粒性状等。在我国,中科院遗传所吴晓雷等 2001 年应用科丰 1 号×南农 1138-2 的 201 株重组自交系,通过分析大豆种子中的蛋白质和脂肪含量,检测到蛋白质含量的 QTL 位点 1 个,分别位于 B1、B2 和 W 连锁群上,在 B2 和 M 连锁群上检测到 2 个脂肪含量相关的 QTL,其中 M 连锁群上的 oc2 可能是主效基因。2002 年,宛煜嵩等利用晋豆 23×灰不支杂交获得的 F8 代 RIL 群体在 O 连锁群上检测到一个抗大豆抱囊线虫的 QTL,可解释 11.73% 的遗传变异。2005 年,王晓丹鉴定出了 2 个与蛋白质含量 QTLs 密切相关的 SSR 标记 Satt202 和 Satt551,并鉴定出 2 个与油分含量 QTL 紧密连锁的标记 Satt345 和 Satt472。2007 年,高文瑞等^[7]研究了大豆籽粒大小的遗传及 SSR 标记分析,得出了 6 个 SSR 标记在 J280082×海系 13 和巴马九月黄×海系 13 这 2 个群体中都表现出与籽粒大小相关,其中 satt302 和 satt070 在 2 个群体中对籽粒大小性状变异的解释率都较高(>8%)。

2.4 分子标记辅助育种

分子标记辅助选择 (MAS, Marker assisted selection)是指把分子标记技术应用于育种过程之中,通过分析目的基因紧密连锁的分子标记的基因型来进行育种,从而达到提高育种效率的目的。分子标记辅助育种选择是分子育种的(还包括利用基因工程育种)的一部分,其对提高作物性状

选择效率的潜力正在被广泛研究。

从 90 年代开始,我国开始利用已经鉴定出或引进的优异种质对大豆重要基因进行分子标记、评价大豆种质遗传多样性、辅助选择大豆优良种质的研究。Guo 等 1998 年利用 BSA 法鉴定出共显性、与耐盐/盐敏感等位基因紧密连锁的 RAPD 标记,并应用于大豆品种资源耐盐鉴定和育种后代鉴别真伪杂种、区分纯合与杂合个体的分子标记辅助选择。除大豆耐盐基因标记外,大豆其它重要基因的分子标记也取得了进展。1998 年,郑翠明等用“抗病×感病”组合 F₂ 代鉴定出一个与东北 SMV 的 3 号强毒株系抗性基因连锁的分子标记。中国农业科学院作物品种资源所利用美国引进的脂肪氧化酶缺失基因转育鲁豆 4 号的脂肪氧化酶近等基因系,确立了大豆 SSR 标记辅助背景选择时适宜标记的数目和选择方式,建立了选择策略,为大豆 Lox 缺失育种提供了理论依据和分子标记辅助选择方法。

3 展 望

分子标记技术为大豆遗传育种工作开辟了一条更宽广的道路,它为育种工作的每一步环节带来了很大的方便,使传统育种方法更趋成熟、合理和完善。但我们还应清楚的看到,分子育种的发展离不开常规育种,而且在今后相当长的一段时间内,常规育种方法在大豆品种选育中将起重要的主导作用。目前,分子标记技术在大豆遗传研究应用中还存在一些问题,例如分子标记技术成本较高,标记的基因数目和位点少,以及绝大多数的研究仍停留在标记鉴定、定位、作图等基础环节。当然,随着现代生物技术的进一步发展,简化分子标记技术复杂的操作程序,各方面技术基础工作的完善,减少资金耗费,在大豆的遗传育种工作中使用分子标记技术必将成为现实,同时大豆基因组测序计划的完成无疑将对大豆分子育种发展起到极大的促进作用。随着 DNA 分子标记技术的迅速发展和应用,以及一些新的分子标记的不断开发, MAS 将结合传统育种技术为大豆遗传育种带来一场深刻的革命。

参考文献:

- [1] APuya NR, Frazier, Keim P, Roth EJ, Lark KG. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max(L.) Merri*[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1988, 5: 889-901.
- [2] Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome (下转第 44 页)

[1] 联合国环境规划署. 全球环境展望 2000[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2000, 33-34.

[2] 张哲寰, 赵海卿, 李春霞, 等. 松嫩平原土地沙化现状与动态变化[J]. 地质与资源, 2008, 17(3): 202-207.

[3] 尹宪强. 污泥堆肥使用对土壤与作物的影响研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.

[4] 于建权, 肖映秋, 陈新, 等. 半干旱风沙区疏林式草牧场防护林的土壤改良效应[J]. 东北林业大学学报, 2001, 29(2): 55-58.

[5] 魏自民, 谷思玉, 赵越, 等. 有机物料对风沙土主要物理性

质的影响[J]. 吉林农业科学, 2003, 28(3): 16-18.

[6] 白雪峰, 王国晨, 刘洋, 等. 草炭改土对风沙土水分状况的影响[J]. 辽宁农业科学, 2004(4): 51-52.

[7] 邢兆凯, 张学丽, 杨树军. 施用草炭对风沙土改良效果的初步研究[J]. 辽宁农业科学, 1999(2): 39-42.

[8] 金凤鹤, 西崎泰, 山口达明, 等. 东北地区内陆苏打盐渍土旱作玉米实施泥炭改良的研究[J]. 生态学杂志, 1998, 17(1): 16-21.

[9] 左岩波, 周权, 刘坤, 等. 森林表土种植作物后化学性质变化研究初报[J]. 现代化农业, 2005, 8(313): 37-39.

(上接第 33 页)[J]. Crop Science, 1999, 39: 1464-1490.

[3] 张德水, 董伟, 惠东威, 等. 用栽培大豆与半野生大豆间的杂种 F₂ 群体构建基因组分子标记连锁框架图[J]. 科学通报, 1997, 42(12): 1326-1330.

[4] 宋显军. 基于 SSR 标记的大豆遗传图谱构建与重要农艺性状 QTL 定位[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007.

[5] 惠东威, 陈受宜, 庄炳昌. 利用 rRNA 基因 ITS-1 序列构建的大豆属(Glycine)12 个种的种系关系[J]. 中国科学: C 辑, ***

1997, 27(4): 327-333.

[6] 吴晓雷, 王永军, 贺超英, 等. 大豆重要农艺性状的 QTL 分析[J]. 遗传学报, 2001a, 28(10): 947-955.

[7] 高文瑞, 陈晨, 王红铃, 等. 大豆籽粒大小的遗传及 SSR 标记分析[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(2): 107-114.

[8] Guo Bei, Shao G H, Chang R Z. A RAPD marker linked to the salt tolerant gene in soybean [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1998, 25: 30-31.

(上接第 39 页)但同时具有降低磷利用率的特性, 对于磷敏感型亲本 Nippionbare 则相反。这种现象在 Ming 等和吴平等的研究中也都存在。此外, 在小麦的遗传研究中, 也发现磷利用率与磷吸收量和分蘖数呈负相关的现象。最理想的耐低磷基因型既具有高的磷吸收量的特性, 又具有高的磷利用率的特性。因此, 磷利用率在水稻耐低磷机制中的具体作用, 还有待进一步探讨。

(1): 4-8.

[2] 李华慧, 辜琼瑶, 严洪斌, 等. 水稻不同基因型全生育期耐低磷能力的鉴定、评价指标[J]. 西南农业学报, 2007, 20(5): 1036-1039.

[3] 台德卫, 张效忠, 苏泽胜, 等. 不同磷营养胁迫下水稻苗期性状基因型差异的研究[J]. 分子植物育种, 2005, 3(5): 704-710.

[4] 曹黎明, 潘晓华. 水稻不同耐低磷基因型的评价指标分析[J]. 上海农业学报, 2004, 16(4): 31-34.

[5] 杨建峰, 贺立源, 左雪冬, 等. 不同 PH 值低磷土壤上水稻磷营养特性研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(1): 62-68.

[6] 高方远, 陆贤军, 康海岐, 等. 水稻耐低磷种质的苗期筛选与鉴定[J]. 作物学报, 2006, 32(8): 1151-1155.

6 水稻耐低磷研究发展方向及展望

随着植物营养遗传学、分子生物学及相关学科的不断发展和水稻磷效率相关研究取得了一定的进展及初步成果, 而且随着水稻耐低磷材料的不断挖掘及研究工作的不断展开, 人们对水稻耐低磷种质的筛选、水稻磷效率相关性状的遗传及水稻适应磷匮乏的本质将会有更深入的认识。然而我们仍需要在以下几个方面进行较为深入的研究。①不断完善水稻磷高效基因型体系; ②磷酸盐转运蛋白与水稻低磷胁迫的关系研究; ③在水稻中开展一些与磷效率密切相关的性状研究; ④开展更多的有关水稻磷胁迫的 QTLs; ⑤建立一套较为规范的、可靠可行的水稻耐低磷鉴定评价标准; ⑥进一步明确水稻磷效率相关性状与产量及其构成因素间的关系。

[7] 李锋, 曲雪艳, 潘晓华, 等. 不同水稻品种对难溶性磷利用能力的初步研究[J]. 植物营养学报, 2003, 9(4): 420-424.

[8] 明凤路, 路群, 王伟, 等. 水稻磷酸盐转运蛋白基因的克隆、表达及功能分析[J]. 中国科学 C 辑, 2006, 36(5): 385-389.

[9] 郭强, 孙淑斌, 徐国华, 等. 水稻中的磷转运蛋白基因在异源表达系统中的功能分析[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(3): 227-233.

[10] Goff S A, Ricke D, Lan T H et al. A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica) [J]. Science, 2002, 296: 92-100.

[11] Paszkowski U, Kroken S, Rowx C, et al. Rice Phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbioses [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 13324-13329.

[12] Penghui Ai, Shubin Sun, Jianning Zhao, et al. Two rice phosphate transporters, OsPht1;2 and OsPht1;6, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation [J]. The Plant Journal, 2009, 57: 798-809.

参考文献:

[1] 鲁如坤. 土壤磷素水平和水体环境保护[J]. 磷肥与复肥, 2003, 18

[13] 吴平, 倪俊建. 应用 AFLP 与 RFLP 标记研究水稻磷吸收与利用率的数量性状位点[J]. 植物学报, 2000, 42(3): 229-233.

[14] Su J, Xiao yan, Li M, et al. Mapping QTLs for phosphorus-deficiency tolerance at wheat seedling stage. Plant and Soil, 2006, 281: 25-36.