

文章编号:1003-8701(2010)03-0015-03

用 SSR 标记进行野生大豆耐碱基因定位及 QTL 分析

李小威¹,董志敏²,赵洪锬^{2,3},张春宝³,董英山^{2*}

(1. 吉林农业大学农学院,长春 130118;2. 吉林省农业科学院生物技术研究中心,长春 130033;
3. 东北师范大学生命科学学院,长春 130024)

摘要:以抗碱野生大豆 Gs0001(♀)和碱敏感栽培大豆吉科豆 1 号(♂)的 F₂ 群体作为基因定位群体,通过 BSA 法(Bulked-segagant analysis,群分法),对大豆耐碱基因进行 SSR 分子标记定位。在分布于大豆 20 个连锁群的 488 对 SSR 引物中,筛选出 7 对与耐碱基因紧密连锁的标记,这 7 对标记位于 G 连锁群相近的区域。利用 Mapmaker/EXP3.0 分析,在最小似函数值 LOD=14.0 时,将耐碱基因定位于 Satt298 与 Satt269 之间,距离两个标记的遗传距离分别为 1.3 cm 和 6.9 cm。此耐碱基因的贡献率是 40.31%。

关键词:耐碱基因;BSA;栽培大豆;SSR;野生大豆

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

Genetic Mapping and QTL Analysis in Wild Soybean by SSR Markers

LI Xiao-wei¹, DONG Zhi-min², ZHAO Hong-kun^{2,3}, ZHANG Chun-bao³, DONG Ying-shan^{2*}

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130022; 2. Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033; 3. School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: Using F₂ of alkali-tolerant wild soybean Gs0001 (♀) and alkaline-sensitive cultivated soybean 'Jikidou 1' (♂) as gene targeting groups, SSR Molecular Markers of soybean alkali-resistant genes were carried out by the BSA (Bulked-segagant analysis) method. In 488 pairs of SSR primers distributed in 20 linkage groups, 7 pairs of markers closely linked with the alkali-resistant genes were screened out, which was near to G linkage group regions. Using Mapmaker/EXP3.0 analysis, the minimum function value LOD = 14.0, alkali-resistant gene was between Satt298 and Satt269. The genetic distances between the two markers were 1.3 cM and 6.9 cM, respectively. The alkali-resistant gene's contribution rate was 40.31%.

Keywords: Alkali tolerant gene; BSA; Cultivated soybean; SSR; Wild soybean

土壤盐碱化是影响世界农业生产最主要的非生物胁迫之一^[1-2],根据 FAO/UNESCO 世界土壤地图,碱化土地面积达到 4.34×10^8 hm²。随着土壤盐碱化的日益严重,对作为主要粮食作物的大豆进行抗盐碱性的研究显然十分必要。在我国吉

林省白城地区,土壤严重碱化,导致荒地增多,土地利用效率降低。因此开发利用碱化土地,增加土壤的产出率和利用率迫在眉睫。

野生大豆是栽培大豆的近缘祖先种,具有许多优良基因,与栽培大豆的亲缘关系较近,遗传物质容易交流,可用性好,因此,对野生大豆的研究受到越来越多的重视。从目前文献看,盐碱胁迫对作物的影响研究,多数以 NaCl 等中性盐胁迫为主,只有少数以 Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 等碱性盐为研究对象^[3-4]。本研究在借鉴作物耐盐相关研究的基础上,利用 NaHCO₃ 溶液对大豆进行胁迫,鉴定出耐敏单株,并利用 SSR 标记结合 BSA 法^[12](Bulked-

收稿日期:2010-04-01

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划前期)资助项目(2007CB116205,2004CB117203-3);农业部生物资源保护与利用项目资助

作者简介:李小威(1984-),女,在读硕士,主要从事植物资源与分子生物学研究。

通讯作者:董英山,男,研究员,E-mail:ysdong@cjaas.com

selegant analysis (群分法)对野生大豆和栽培大豆的杂交后代进行耐碱基因定位。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为野生大豆 Gs0001(♀)和栽培大豆吉科豆 1 号(♂)及其杂交后代的 96 个 F_2 群体和 F_2 的衍生群体 $F_{2.3}$ 。

1.2 方法

1.2.1 亲本及其子代耐碱性鉴定

2008 年 12 月,对亲本野生大豆 Gs0001 和吉科豆 1 号进行耐碱鉴定。亲本耐碱性鉴定在温室内进行。采用水培法。每份材料,每个浓度梯度鉴定 10 株。溶液设定 5 个浓度梯度。(100 mM,150 mM,200 mM,250 mM,300 mM) 待苗期 v3- v5,即第一对三出复叶长出至第三对三出复叶长出,然后将苗移入盛有 NaHCO_3 溶液的 250 mL 三角瓶中。处理后 3 d 根据植株叶片萎蔫程度,调查记载单株的耐碱性和碱敏感性,并在生长发育后期,进一步确定其植株耐碱表现型。结果表明,野生大豆 Gs0001 为抗碱品种,栽培大豆吉科豆 1 号为碱敏感品种。250 mM NaHCO_3 可作为大豆耐碱性鉴定浓度。

2009 年 3 月,在温室对 F_2 群体单株脱粒种植。每株收获至少 20 株 $F_{2.3}$,采用土培法,浇灌 250 mM NaHCO_3 溶液并对其进行耐碱鉴定,鉴定标准同上述亲本耐碱鉴定。目的是根据 $F_{2.3}$ 群体抗感碱的表型推出 F_2 群体基因型及抗感碱表型,从而确定 F_2 群体抗感碱单株,建立抗感碱 DNA 池。

1.2.2 F_2 群体基因组 DNA 的提取

提取方法采用高盐 CTAB 法,取 0.1 g 新鲜叶片(经洗涤去除杂物)。在液氮下研碎,装入 1.5 mL 离心管中,加入 750 μL Extraction Buffer,并置于冰上 10 min。4℃离心 10 min。去上清,然后用 750 μL Extraction Buffer 溶解沉淀两次并 4℃离心 10 min,去除上清,加入 750 μL (Extraction Buffer:High Salt CTAB Buffer:Sarkoyl=5:3.5:0.3)混合液 55℃水浴 90 min。加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),摇 10 min,然后 9 000 rpm 离心 20 min,转移上清于一个新的离心管中。加入 2/3 体积预冷的混合有 1/10 体积乙酸钠的异丙醇。4℃,9 000 rpm 离心 20 min。去上清并用 75%乙醇洗涤。去除乙醇,在空气下干燥,并用 200 μL TE 溶解,-20℃保存备用。

1.2.3 BSA(Bulked selegant analysis)法建池

在 F_2 群体中随机选取耐碱单株和碱敏感单株各 15 株,等量混匀 DNA,构建 F_2 耐碱池(T)和碱敏感池(S)。

1.2.4 引物筛选

引物筛选分两个阶段进行,首先在已经公布的大豆 20 个连锁群,每隔 3~5 cM 选择一个 SSR 引物,共选择 488 对引物。利用亲本多态性对 488 对引物进行初筛,其中有 256 对引物在亲本间表现出多态性。将有多态性的引物在抗感池 T、S 及父母本间扩增,有 7 对引物表现出差异条带,用最后筛出的这 7 对引物对 F_2 群体进行电泳检测。

1.2.5 PCR 扩增检测

PCR 反应在 PTC-225 热循环仪上进行。20 μL 反应体系包括 2.0 μL 10×Buffer,150 $\mu\text{mol/L}$ dNTP,0.15 $\mu\text{mol/L}$ SSR 引物,1.5 mmol/L MgCl_2 ,1U Tag DNA 聚合酶,50 ng 基因组 DNA 模板,ddH₂O 补齐。

PCR 反应程序为:95℃预变性 4 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min 后,于 4℃保存。

PCR 扩增产物加 8 μL 的上样缓冲液(98%甲酰胺,0.25%溴酚蓝,0.25%二甲苯腈 FF,10 mM EDTA),94℃变性 10 min 后立即置于冰水混合物中。在 6.0%变性聚丙烯酰胺凝胶(60 g Acrilamide,3.16 g Bis-acrilamide,420.24g Urea,50 ml 10×TBE,用 ddH₂O 定容至 1 L),恒功率 80 W 电泳。上槽液为 1/3×TBE(10×TBE 配方:108 g Tris,55 g Boric acide,40 mL 0.5 mol/L EDTA,pH8.0,用 ddH₂O 定容至 1 L),下槽液 1×TBE。电泳分离后进行银染。

2 结果与分析

2.1 遗传分析

$F_{2.3}$ 群体经耐碱鉴定的结果表明,96 份衍生群体的抗感性发生明显分离,耐碱株和碱敏感株的表现型之比近于 3:1,其中有 22 份衍生群体的 20 个单株表现为全抗碱,43 份衍生群体的 20 个单株抗感碱表现出 3:1 分离,有 31 份衍生群体的 20 个单株表现为全感碱。由此推出 F_2 群体的基因型,如果用 Aa 来代表一对等位基因,则 F_2 群体中有 22 份基因型为 AA,43 份基因型为 Aa,31 份基因型为 aa。由此表明,大豆耐碱可能受一对主效基因控制。

本研究筛选了分布于大豆 20 个连锁群的 488 对引物,最后将目的基因定位在 G 连锁群上,在其他连锁群上没有筛选到连锁的标记。连锁标

记在耐碱单株中检测出与耐碱亲本相同的一条扩增带,为纯合显性,或者检测出亲本的两条带,为杂合型,在敏感单株中检测出与敏感亲本相同的一条扩增带,为纯合隐性,进一步在分子水平上证明了在 F₂ 群体中大豆耐碱性受一对基因控制,耐碱性为显性基因控制,碱敏感性为隐性基因控制。

2.2 耐碱相关基因定位

用 488 对引物对耐碱亲本和碱敏感亲本进行 SSR 标记筛选,其中有 256 对在两个亲本中存在多态性。将有多态性的引物在抗感池 T、S 及父母本间扩增,有 7 对引物表现出差异条带,用最后筛选出的这 7 对引物对 F₂ 群体的 96 份材料进行电泳检测(图 1)。对照公共图谱发现这 7 个标记位于 G 连锁群相近区域。利用 Mapmaker/EXP3.0 分析,将扩增带中与耐碱亲本相同的记为 A,与碱敏感亲本相同的记为 B,同时出现两亲本扩增带的记为 H。在最小似函数值 LOD=14.0 时,计算目的基因与连锁标记的遗传距离,最后将耐碱基因定位于 Satt298 与 Satt269 之间,距离两个标记的遗传距离分别为 1.3cM 和 6.9cM(图 2)。此耐碱基因的贡献率是 40.31%。

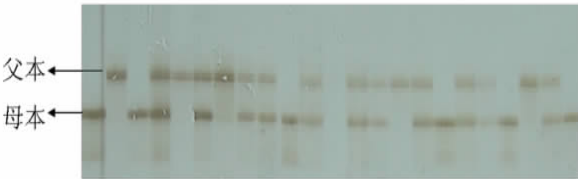


图 1 satt298 在“吉科豆 1 号×Gs0001”组合的部分 F₂ 群体中的 PCR 扩增结果

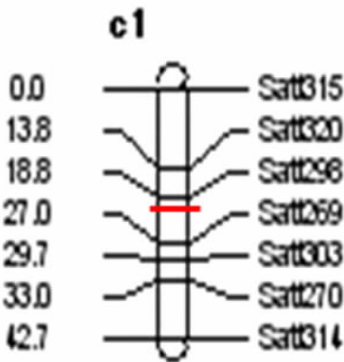


图 2 大豆 C1 染色体上与耐盐基因紧密连锁的 SSR 标记遗传连锁图

3 讨 论

碱性盐的危害机理与中性盐明显不同,它除了能引起钠离子胁迫和渗透胁迫之外,更主要的

是它能引起土壤 pH 值的明显升高,并且其破坏力大于前两种胁迫^[5-6]。NaHCO₃ 对植物的作用,在有机酸、离子、可溶性糖含量以及植物生长、质膜透性、光合酶活性等方面都不同于 NaCl^[7-8]。

BSA 法首次被 Michlmore 等^[9]利用并成功地筛选出莠苣中霜霉菌基因相连锁的标记。在实际建池时基因池的大小主要取决于目的区域内定位标记位点的密度。密度小,植株数可减少;密度大,植株数要增加。另外与所有材料间遗传背景差异的大小也有一定关系。差异大的应选 10 个以上的植株建池,差异小的应选较少的植株建池。这样就可以避免建池株数过多则多态性检出率较低;株数过少取样的随机误差增大,多态性位点就会不真实的弊端^[10]。

对于利用 SSR 标记定位基因的群体,选择亲本时,除了考虑目标性状明显差异外,应选择遗传背景差异较大的品种做亲本杂交,更利于基因定位^[11]。本试验亲本间性状差异明显,为大豆中典型的耐碱和碱敏感品种,且遗传背景差异较大,群体构建较好,因而得以成功的基因定位。

大豆 20 个连锁群上,目前已经开发了 1015 个 SSR 标记,选择 SSR 标记时每隔 3~5cM 选择一个 SSR 引物,足以代表这一区域的标记与目标性状的关系。在本试验已经筛选到的与耐碱基因最紧密连锁的两个基因 Satt298 与 Satt269 之间相隔 8.2cM,这一范围的标记都可以看出与耐碱性相连锁。SSR 标记以其共显性高,特异性高,带型清晰易统计等优点而被广泛用于大豆基因定位中。从本试验的结果来看,SSR 标记具有操作简便、稳定可靠、对 DNA 质量要求较低、重复性好等优点,因而 SSR 标记是一种实用可靠的基因定位技术。

参考文献 :

[1] Zhu J K. Plant salt tolerance [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(2) :66- 71 .
[2] Wei W, Bilsborrow P E, Hooley P, et al. Salinity induced differences in growth, ion distribution and partitioning in barley between the cultivar maythorpe and its derived mutant golden promise[J]. Plant and Soil, 2003, 250(2) :183- 191 .
[3] Abd El- Samad H M, Shaddad M A K. Comparative effect of sodium carbonate, sodium sulfate and sodium chloride on the growth and related metabolic activities of pea plants[J]. Journal of Plant Nutrition, 1996(19) :717- 728 .
[4] Bie Z L, Tadashi I, Yutaka S. Effects of sodium sulfate and sodium bicarbonate on the growth, gas exchange and mineral composition of lettuce[J]. Horticultural Science, 2004, 99 :215- 224 .
[5] 石德成,盛彦敏. 不同盐浓度的混合盐对羊草的胁迫反应[J]. 植物学报, 1998, 40(12) :1136- 1142 .

- [29] 卫龙宝, 卢光明. 农业专业合作组织实施农产品质量控制的运作机制探析——以浙江省部分农业专业合作组织为例[J]. 中国农村经济, 2004(7): 36-40.
- [30] 胡定寰, Fred Gale, Thomas Reardon. 试论“超市+农产品加工企业+农户”新模式[J]. 农业经济问题, 2006(1): 36-39.
- [31] 周洁红. 农户蔬菜质量安全控制行为及其影响因素分析——基于浙江省 396 户菜农的实证分析[J]. 中国农村经济, 2006(11): 26-34.
- [32] 单吉堃. 认证制度的建构与有机农业发展[J]. 学习与探索, 2004(4): 81-86.
- [33] 林学贵. 食品安全标签——日本有机农产品认证和标示制度及其意义[J]. 国际贸易, 2005(2): 41-44.
- [34] 严可仕. 台湾有机农产品的发展及启示[J]. 台湾农业探索, 2008(3): 2-4.
- [35] 向敏. 实施 HACCP 认证应对蔬菜产品出口绿色壁垒[J]. 中国蔬菜, 2003(3): 1-3.
- [36] 顾黄辉, 等. 农产品质量安全溯源机制建设的探索[J]. 农业环境与发展, 2007(4): 55-57.
- [37] 周应恒, 张蕾. 溯源系统在全球食品安全管理中的运用[J]. 农业质量标准, 2008(1): 39-43.
- [38] 修文彦, 任爱胜. 国外农产品质量安全追溯制度的发展与启示[J]. 农业经济问题, 2008(S1): 206-210.
- [39] 陈红华, 田志宏. 谈如何有效发挥零售商在我国农产品可追溯系统中的作用[J]. 经济师, 2008(7): 9-10.
- [40] 屈晓晖, 等. 蔬果农产品可追溯物流实现技术研究[J]. 中国物流与采购, 2008(12): 70-71.

(上接第 17 页)

- [6] 石德成, 赵可夫. NaCl、NaCO₃ 胁迫下星星草根际 K⁺、Na⁺、Ca²⁺ 的生理行为[J]. 应用与环境生物学报, 1997, 3(2): 112-118.
- [7] 石德成. 磷酸中和缓解 Na₂CO₃ 对星星草的胁迫作用[J]. 草业学报, 1995, 4(4): 34-38.
- [8] 石德成, 殷立娟. 盐(NaCl)与碱(Na₂CO₃)对星星草胁迫作用的差异[J]. 植物学报, 1993, 35(2): 144-149.
- [9] Bi C L, Shen Y Z, Huang Z J, et al. Molecular Biological Identification of Wheat Salt-Tolerant Lines[J]. Hereditas, 1999, 21(6): 32-36.
- [10] 王宏英, 张萃, 黄占景, 等. 用微卫星标记定位小麦耐盐突变体的耐盐相关基因[J]. 作物学报, 2004, 30(7): 697-699.
- [11] 张海燕. 大豆耐盐基因定位及耐盐相关基因分子标记的开发[D]. 硕士学位论文, 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2005.
- [12] Michelmore R W, Paran Z, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregation populations[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832.

(上接第 36 页)

- [8] Ryding S O, Forsberg C. Sediments as a nutrient source in shallow polluted lakes[A]. The Hague: Dr. Junk Publ., 1977.
- [9] 由文辉. 沉积物中磷负荷及其释放对水质的影响[J]. 上海环境科学, 1997, 16(12): 23-25.
- [10] 彭近新, 陈慧君. 水质富营养化与防治[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1988: 45-62.
- [11] 安琪, 李发荣. 滇池草海海底泥疏挖对水体水质及底泥影响分析研究[J]. 云南地理环境研究, 2002, 14(2): 65-69.
- [12] 刘恩峰, 沈吉, 朱育新, 等. 太湖沉积物重金属及营养盐污染研究[J]. 沉积学报, 2004, 22(3): 507-512.
- [13] David L C. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving water: review[J]. J Environ Qual, 1998(27): 261-266.
- [14] 彭近新, 陈慧君. 水质富营养化与防治[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1988: 45-62, 94-112.
- [15] 邓焕广, 陈振楼, 张兴正. 沉积物中磷的研究进展[J]. 广州环境科学, 2004, 19(1): 1-4.
- [16] Williams J D H, et al. Forms of phosphorus in surgical sediments of Lake Erie[J]. J Fish Res Board Can, 1976, 33: 413-429.
- [17] 刘敏, 侯立军, 许世远, 等. 长江河口潮滩表层沉积物对磷酸盐的吸附特征[J]. 地理学报, 2002, 57(4): 397-406.
- [18] 金相灿. 沉积物污染化学[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992.
- [19] 王小蓉, 华兆哲, 徐菱, 等. 环境条件变化对太湖沉积物磷释放的影响[J]. 环境化学, 1996, 15(1): 15-19.
- [20] Perkins R.G., Underwood G.J.C.. The potential for phosphorus release across the sediment-water interface in an entropic reservoir dosed with ferric soleplate [J]. Wat.Res.2001, 35(6): 1399-1406.
- [21] Andersen J.M. Influence of pH on release of phosphorus from lake sediment [J]. Arch.Hydrobiol, 1975, 76(4): 411-419.