

苜蓿耐盐基因分子标记的筛选

杨青川¹ 韩建国^{2,*} 孙彦² 康俊梅¹

(¹ 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094; ² 中国农业大学动物科学技术学院草地研究所, 北京 100094)

摘要: 以耐盐苜蓿 × 敏盐苜蓿组合的 F₂ 群体为试验材料, 利用改良 BSA 法筛选与苜蓿耐盐基因紧密连锁的分子标记。在对 26 组 520 条 RAPD 随机引物筛选中, 共有 66 条引物为 DNA 多态性引物, 选出一个与苜蓿耐盐基因相连锁的分子遗传标记。通过 F₂ 代群体的遗传分析, 观测到分子标记与耐盐性等位基因之间发生重组, 但重组值较小, 在 A₈ × D₂ 杂交组合中, 重组率为 2.27%; 在 A₅ × D₁ 杂交组合中, 重组率为 4.03%。这些结果表明, 这一显性标记与苜蓿的耐盐基因座位连锁程度较为紧密。用国外登记的耐盐苜蓿种质及相对敏盐种质单株对获得的耐盐标记进行验证, 85% 耐盐种质材料 AZ-90NDC-ST 的单株 DNA 都扩增出 1 个约 1 400 bp 的 DNA 片段; 75% 敏盐种质材料 AZ-88NDC 的单株 DNA 未能扩增出此片段。

关键词: 苜蓿; 耐盐性; 分子标记

中图分类号: S551

Selection of Molecular Marker to Salt Tolerance Gene in Alfalfa

YANG Qing-Chuan¹, HAN Jian-Guo^{2,*}, SUN Yan², KANG Jun-Mei¹

(¹ Institute of Animal Sciences, CAAS, Beijing 100094; ² Institute of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: More than 100 countries exist saline-alkali soil problem with different degree in the world. Alfalfa named "the king of forage" is a very important protein forage, breeding salt tolerant alfalfa cultivars is an economic and effective way for the development and utilization of saline-alkali soil. The objective of this study was to select the molecular markers linked closely to the salt-tolerant genes using the improved BSA (Bulk Segregant Analysis) in F₂ population between salt-tolerant and salt-sensitive alfalfa. The molecular marker was used to appraise the germplasm of alfalfa, and realized the assistant selection of parents and cross offsprings in the salt-tolerant breeding and the germplasm innovation of alfalfa. In pot culture, 66 primers that can mark the DNA polymorphism from 520 primers by applying RAPD marker were detected. Based on the identified results of salt tolerance of cross A₈ × D₂ and A₅ × D₁, the salt tolerant and salt susceptible bulks of F₂ population, and bulks of their parents were constructed. By using the improved BSA method, a special primer, which could amplify a 1 400 bp fragment in the salt tolerant sample was identified. According to the genetic analysis of the group F₂ from A₈ × D₂ and A₅ × D₁ hybridization, there was a small crossing over value between the salt tolerant alleles and its related molecular marker. However the recombination single was rare, only 4 recombination singles appear in F₂ offsprings of A₈ × D₂ group, the recombination ratio was 2.27%; only 5 recombination singles appear in F₂ offsprings of A₅ × D₁ group, the recombination ratio was 4.03%. These results indicated that the marker were linked closely to the salt-tolerant gene loci of alfalfa through analysis of two cross offsprings and their parents. The molecular markers of salt tolerant gene loci were used to identify external registered alfalfa germplasm resources. A 1 400 bp DNA fragment could be amplified in 85% individuals of AZ-90NDC-ST and 80% ones of Alfalfa which were salt tolerant germplasms, while not in 75% of AZ-88NDC which was a salt sensitive germplasm. Above results indicate that molecular marker provides valuable information for selecting salt tolerant parent in improving cultivars and identifying the salt tolerance of different alfalfa germplasm resources.

Key words: Alfalfa; Salt tolerance; Molecular marker

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2002AA241101)和农业部农业结构调整重大项目研究专项(2002-09-01B)。

作者简介: 杨青川(1966-), 男, 副研究员, 博士, 长期从事牧草的常规育种与生物技术育种研究。* 通讯作者: 韩建国。

Received(收稿日期): 2004-03-22, Accepted(接受日期): 2004-12-26.

近年来,随着分子标记技术的不断成熟,植物基因定位的方法和速度都取得了长足的进步,其中群分法(Bulk Segregant Analysis, BSA)由于其便利、快速和准确的特点而在植物基因定位中广泛应用。群分法的具体做法是,从一对表型极其差异的亲本所产生的任何一种分离群体中根据目标性状类型将其分成两组,将两组内一定数量的植株DNA等量混合形成两个DNA池。两个DNA池相当于一个近等基因池。所以利用分子标记技术检测出的两个池多态性的谱带,就可能与控制目标性状的基因连锁。当然用群分法所发现的与目的基因连锁的标记准确性是否可靠,也还需要在更大的分离群体中通过共分离分析予以验证。利用分子标记,迄今在玉米、水稻、番茄、大豆、小麦和棉花等各种作物上定位了许多重要农艺性状基因,其中包括作物的抗病性、抗虫性、耐逆性、光周期的敏感性,雄性不育和育性恢复^[1-4]。

分子标记不仅能对控制质量性状的基因进行定位,而且还可以对数量性状基因定位^[5]。过去数量性状的遗传分析一直停留在统计水平上,尽管统计方法日趋精细,数量性状依然是一个形式上的单位。而分子标记则可以将这些数量基因定位到某个染色体区段上。利用分子标记现已成功定位了水稻粒形、生育期、产量构成因素等数量性状基因^[6,7],此外还有控制番茄果实重、种子重、果实固形物含量、pH值等数量性状基因^[8]。随着研究的深入,分子标记将为研究数量性状之间的基因互作等基础研究提供依据。

本研究通过建立耐盐苜蓿与敏盐苜蓿相互杂交的F₂群体,应用BSA和分子生物学技术,对可能影响其耐盐性的基因类型进行分析,筛选出与苜蓿耐盐基因紧密连锁的分子标记。为紫花苜蓿的耐盐鉴定和分子标记辅助育种提供指导,以加速耐盐苜蓿的育种进程。对我国盐碱地紫花苜蓿大幅度增产具有重要的现实意义。

1 材料和方法

1.1 耐盐亲本材料与敏盐亲本材料

中首1号(中国农业科学院畜牧研究所培育的耐盐苜蓿品种)为原始材料,再经二次轮回选择,一次盐碱地混合选择,在盆栽条件下0.45% NaCl胁迫得到的耐盐苜蓿新材料,称为Sn。

首先从69个苜蓿品种中筛选出敏盐苜蓿品种

大西洋、渭南,而后盆栽育苗,在苗期进行浓度为0.3%的NaCl盐胁迫,把表现出明显敏盐症状(如叶片变黄、萎蔫等)的单株立即移出予以抢救,隔离种植,单独收种,二代选择得到。来源于大西洋苜蓿的敏盐材料,称为Sn₁,来源于渭南苜蓿的敏盐材料,称为Sn₂。

1.2 杂交后代分离群体

11个“耐盐×盐敏感”单株杂交组合:A₁×D₆、A₁₃×D₃、A₁₂×D₉、A₃×D₅、A₈×D₂、B₂₆×W₁、A₅×D₁、B₂₀×D₆、A₉×W₁、B₁₂×D₁、A₁×D₃,用于苜蓿的耐盐遗传研究。其中耐盐单株A来源于Tn,敏盐单株D来源于Sn₁、Sn₂。2001年配制杂交组合,2002年F₁自交,并在中国农业科学院畜牧研究所进行F₂代材料的苗期盆栽耐盐鉴定。

1.3 国外引进的耐盐与敏盐品种和种质

耐盐种质材料Alfanafa来自于澳大利亚;AZ-90NDC-ST来自于美国。

敏盐种质材料AZ-88NDC,来自于美国。

1.4 主要生化试剂

试验中所用26组520条随机引物购自OPEROR公司;dNTP、Taq DNA聚合酶(5 U/μL)、1 kb DNA Ladder、100 bp DNA Ladder(加拿大Biostar公司)等生物试剂分别购于北京鼎国、华绿渊等公司。

1.5 DNA提取

用CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide 十六烷基三甲基溴化铵)法,从供试材料的叶片提取DNA^[9]。

1.6 DNA池的构建

20株耐盐新材料的DNA稀释后,等量混合构成Tn DNA池;20株敏盐新材料的DNA稀释后,等量混合构成Sn₁ DNA池。

从F₂群体中选择最耐盐和最敏盐的单株各20株,将稀释的基因组DNA分别等量混合构成F₂耐盐池和盐敏感池。

1.7 PCR的扩增 扩增后电泳检测,拍照记录。

1.8 统计与分析

$$\text{交换值} = \frac{\text{重组型配子数}}{\text{总配子数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 亲本多态性引物的筛选

经过对520条引物的分析,鉴定出66条具有多

态性的引物,占 12.7%。这 66 条引物共扩增出 451 个位点,平均每个引物扩增 6.8 个位点,两个材料产生的多态性位点共 142 个,占总扩增位点的 31.5%。本实验所检测出 DNA 多态性是 Tn 耐盐材料 DNA 池与 Sn 敏感材料 DNA 池在遗传物质上的多样性。通过对 F₂ 代的进一步探测,为确定与苜蓿耐盐性状紧密连锁的分子遗传标记奠定了基础。

2.2 苜蓿耐盐性基因标记的筛选与获得

根据 BSA 法,选择 F₂ 代 DNA 耐盐池(20 个 F₂ 单株混合)、F₂ 代 DNA 敏感池(20 个 F₂ 单株混合)、耐盐亲本 DNA(A₈ 单株)、敏感亲本 DNA(D₂ 单株)、Tn 耐盐材料 DNA 池(20 个耐盐材料优株 DNA 混合样品)、Sn1 敏感材料 DNA 池(20 个敏感苜蓿单株 DNA 混合样品)。用已获得的 66 个多态性引物继续筛选 6 种 DNA 样品,经筛选在耐盐 F₂ 单株 DNA 混合样品、耐盐亲本 DNA 样品(A₈)及耐盐材料 Tn DNA 中均扩增出一条约 1 400 bp 的 PCR 特异片段(图 1)。而在敏感 F₂ 植株 DNA、敏感亲本池 Sn1 DNA 中则没有这一特异片段;推测这个扩增产物(1 400 bp)与苜蓿的耐盐基因相连锁。

2.3 苜蓿耐盐性基因分子标记的鉴定

2.3.1 用分离群体鉴定苜蓿耐盐性基因分子标记

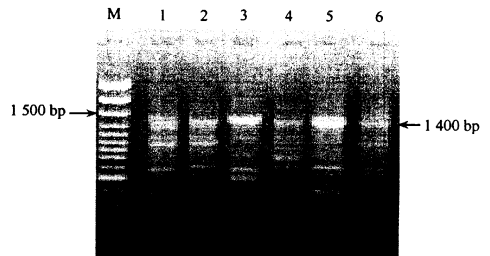


图 1 6 个样品中扩增的 PCR 产物
Fig.1 PCR amplified products in 6 samples

M:标准分子量;1:Tn 耐盐材料池;
2:Sn1 敏感材料池;3:A₈;4:D₂;
5:耐盐 F₂ 单株混合样品;6:敏感 F₂ 单株混合样品。
M:Standard Marker;1:Tn Salt tolerant material;
2:Sn1 Salt sensitive material;3:A₈;4:D₂;
5:Mixture of F₂ Salt tolerant singles;
6:Mixture of F₂ salt sensitive singles.

在 A₈ × D₂ 杂交组合的 176 个 F₂ 植株的盆栽耐盐鉴定中,133 株表现为耐盐型,43 株表现为盐敏感型。通过对耐盐型个体进行 RAPD 分析,有 131 个单株扩增出约 1 400 bp 的特异片段,两个单株未扩增出这一片段;43 株敏感型单株中 41 株未扩增出这一特异片段,有 2 个单株扩增出约 1 400 bp 的特异片段(图 2)。

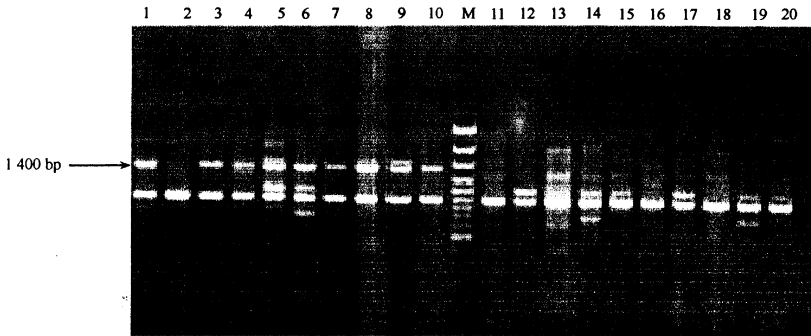


图 2 A₈ × D₂ 组合 F₂ 植株耐盐个体与敏感个体的 PCR 产物
Fig.2 PCR amplified products of salt tolerant and susceptible F₂ plants of A₈ × D₂

1:单株 A₈ DNA 池;2:单株 D₂ DNA 池;M:标准分子量;3~10:F₂ 耐盐个体;11~18:F₂ 敏感个体。
1:DNA of A₈ single;2:DNA of D₂;M:Standard marker;3~10:F₂ salt tolerant plants;11~18:F₂ salt sensitive plants.

在 A₈ × D₁ 组合的 162 个 F₂ 植株的盆栽耐盐鉴定中,118 株表现为耐盐型,44 株表现为敏感型。对 44 株盐敏感型进行 RAPD 分析,除 2 株扩增出 1 400 bp 的特异片段外,其余 42 株均未扩增出这一

特异片段。随机分析 80 株耐盐型的 PCR 扩增带型,其中有 3 株未扩增出这一特异片段,其余均表现为约 1 400 bp 的特异片段(图 3)。

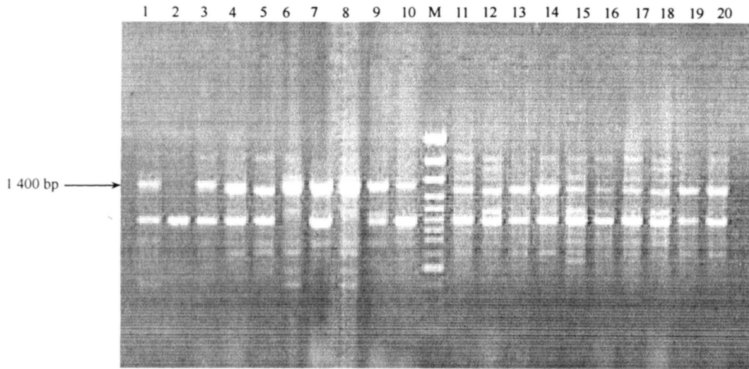


图3 $A_5 \times D_1$ 组合 F_2 植株耐盐个体与敏盐个体的 PCR 产物

Fig.3 PCR amplified products of salt tolerant and susceptible F_2 plants of $A_5 \times D_1$

1:耐盐亲本单株 A_5 DNA 池;2:敏盐亲本单株 D_1 DNA 池;M:标准分子量;3-10: F_2 代耐盐个体;11-20: F_2 代敏盐个体。
1:DNA of A_5 single;2:DNA of D_1 single;M:Standard marker;3-10: F_2 salt tolerant plants;11-20: F_2 salt sensitive plants.

2.3.2 苜蓿耐盐基因与标记间的遗传距离 通过对 $A_8 \times D_2$ 、 $A_5 \times D_1$ 两个单株杂交组合 F_2 代群体的遗传分析,都观测到分子标记与耐盐性等位基因之间发生重组,但重组值较小,表明在这两个群体中标记与耐盐性基因表现为共分离。在 $A_8 \times D_2$ 杂交组合中, F_2 代分离群体中出现了 4 个重组个体,重组率为 2.27%;在 $A_5 \times D_1$ 杂交组合中, F_2 代分离群体中出现了 5 个重组个体,重组率为 4.03%。这些结果表明,这一显性标记与苜蓿的耐盐基因座位连锁程度较为紧密。

2.3.3 用国外耐盐种质鉴定苜蓿耐盐性基因分子标记 澳大利亚登记注册的耐盐品种 Alfanafa 测

试的 20 个单株中,16 个单株扩增出约 1 400 bp 的特异片段,4 个单株未扩增出这一特异片段;美国注册登记的耐盐种质材料 AZ-90NDC-ST,随机参试的 20 个单株中,17 个单株扩增出约 1 400 bp 的特异片段,3 个单株未扩增出这一特异片段;美国注册登记的敏盐种质材料 AZ-88NDC,随机参试的 20 个单株中,5 个单株扩增出约 1 400 bp 的特异片段,15 个单株未扩增出这一特异片段(图 4)。这一结果表明,在耐盐苜蓿品种、种质中绝大多数单株具有 1 400 bp 的特异片段,在敏盐苜蓿种质材料中,大多数单株未能扩出该特异片段。

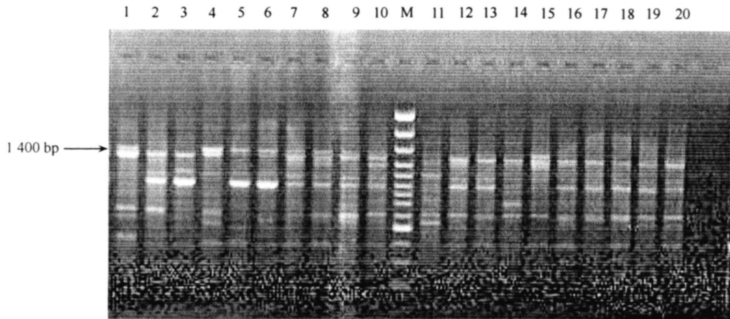


图4 国外耐盐苜蓿材料 AZ-90NDC-ST 与敏盐材料 AZ-88NDC 的 PCR 产物

Fig.4 PCR amplified products in single plant of salt tolerant AZ-90NDC-ST and susceptible AZ-88NDC

1-10:耐盐种质 AZ-90NDC-ST 的单株;M:标准分子量;11-20:敏盐种质材料 AZ-88NDC 的单株。
1-10:The plants of salt tolerant germplasm AZ-90NDC-ST;M:Standard Marker;11-20:The plants of salt sensitive germplasm AZ-88NDC.

3 讨论

3.1 植物耐盐性标记分析

资料表明植物的耐盐性是数量性状,受微效多基因控制,且受环境条件的影响。但我们的研究表明,和别的数量性状一样,耐盐性状也受少数主基因控制。Daravsi 等根据小麦某一性状在杂交后代分离群体中分离出极端表型的植株,形成成对 DNA 池,一个池含有更多的减效位点,而另一池含有更多的增效位点,通过对基因池多态型位点的检测,然后对组成这两个池的植株进行分子标记分析,对控制该数量性状位点临近区域分子标记进行了定位^[10]。

3.2 利用 BSA 法筛选苜蓿耐盐性基因标记

苜蓿基因组较大,Diwan 等发现四倍体苜蓿基因组中约有 19 000 个(AT)_n + (CT)_n + (CA)_n + (ATT)_n 简单重复序列^[11]。本研究在筛选耐盐基因标记时,在 BSA 的基础上,结合混合池进行分析,目的在于减少不同遗传背景的影响。用于筛选耐盐基因标记的共有 20 个耐盐新材料(Tn)单株构成的耐盐池,20 个敏感新材料(Sn1)单株构成的敏感池,其基因组 DNA 序列很大,一旦获得与耐盐性基因密切相关的标记,同时也鉴定了标记的可用性。

在不同种质中的个别个体上,该标记与其耐盐性不能共分离,这种现象可能是由两方面的原因引起的,一是大多数苜蓿品种(种质)是具有广泛遗传基础的综合品种,一个耐盐品种或耐盐种质材料中的单株不可能全部是耐盐纯合体或耐盐杂合体;二是苜蓿在耐盐鉴定中可能受环境条件的影响,使耐盐鉴定结果不准确。我们的研究结果证明,在耐盐苜蓿品种或种质材料中,全部单株或多数单株个体可以扩增出 1 400 bp 的特异片段;而在敏感品种或种

质材料中,没有或仅有少数个体扩增出该特异片段。

References

- [1] Dallas J F. Detection of DNA "fingerprints" of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite probe. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 6 831 - 6 835
- [2] McCouch S R, Kochert G, Yu Z. Molecular mapping of the rice nuclear genome. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 815 - 829
- [3] Young N D, Zamir D, Canal M. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. *Genetics*, 1988, 120: 579 - 585
- [4] Haley S D, Miklas P N, Stavelly J R. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 505 - 512
- [5] Shen F-F(沈法富), Liu F-Z(刘凤珍), Yu Y-J(于元杰). Molecular marker application in plant breeding. *Journal of Shan Dong Agricultural University*(山东农业大学学报), 1997, 22(1): 46 - 52 (in Chinese with English abstract)
- [6] Lin H-X. RFLP Mapping of QTLs for grain shape traits in *indica* rice. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 1995, 28(4): 1 - 7 (in Chinese with English abstract)
- [7] Xu Y-B(徐云碧), Shen Z-T(申宗坦), Chen Y(陈英). Molecular mapping for quantitative trait loci controlling yield. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 1995, 22(1): 46 - 52 (in Chinese with English abstract)
- [8] Osborn T C, Alexander D C, Fobes J F. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. *Theor Appl Genet*, 1987, 73: 350 - 356
- [9] Gu H-Y(顾红雅), Qu L-J(瞿礼嘉), Chen Z-L(陈章良). *Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual*(植物分子生物学——实验手册). Beijing: Higher Education Press, 1998. 4 - 11 (in Chinese)
- [10] Darvasi A, Winreb A, Minke V, Weller J I, Soller M. Detecting marker—QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics*, 1993, 134: 943 - 951
- [11] Diwan N, Bhagwat A A, Baughan G R. Simple sequence repeat (SSR) DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, 1997, 40: 887 - 895