

大豆耐盐基因的 PCR 标记

郭蓓¹, 邱丽娟¹, 邵桂花², 常汝镇¹,
刘立宏¹, 许占友¹, 李向华¹, 孙建英¹

(¹ 农业部作物品种资源与生物技术重点开放实验室, 中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081;

² 中国农业科学院作物育种与栽培研究所)

摘要: 以大豆耐盐品种和盐敏感品种及“耐盐品种×盐敏感品种”组合的 F₂ 群体为试验材料, 筛选和鉴定与大豆耐盐性基因紧密连锁的 PCR 标记, 旨在建立快速准确的大豆耐盐性鉴定方法。利用 BSA 法, 对耐(敏)盐品种池和一个组合 F₂ 的耐(敏)盐池进行了鉴定, 获得一个共显性标记。经 F₂ 分析, 在盐敏感个体中仅扩增出约 600bp 的特异片段; 在耐盐性个体中扩增出约 700bp 的特异片段或 2 个特异片段(700bp/600bp), 经过连锁值测定, 表明该标记与大豆耐盐基因位点紧密连锁。此外, 该标记在其它 2 个组合 F₂ 群体及 12 个耐盐品种和 13 个盐敏感品种中得到验证, 表明此标记可用于大豆耐盐种质鉴定及大豆耐盐遗传育种的分子标记辅助选择, 使大豆耐盐性室内鉴定成为可能。为此, 大豆耐盐性基因的分子标记及其获得方法和应用已申请了中华人民共和国发明专利。

关键词: 耐盐基因; 分子标记; 专利; 大豆

中图分类号: S565.103 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2000)01-0010-07

在耕地面积有限的情况下, 开发和利用荒地, 尤其是盐碱地是十分必要的。目前, 我国有盐碱地 660 万 ha。由于全球海平面逐年上升, 气温升高, 降雨量减少, 使干旱、半干旱区土壤次生盐渍化日趋严重。因此, 培育耐盐新品种是开发和利用盐渍地的有效方法。

我国科学家已对大豆各发育时期的耐盐性表现、盐对大豆农艺性状及籽粒品质的影响、耐盐生理生化^[1, 7, 10], 盐胁迫下大豆叶片 SOD 和脯氨酸的变化, 离子对膜毒害^[2, 3], 钙对膜的保护作用^[10]等进行了研究。邵桂花等^[6, 9]研究建立了大豆种质资源耐盐性的田间鉴定方法, 对中国 4000 余份、美国 260 份大豆资源进行了耐盐性鉴定, 筛选出一批耐盐品种; 利用筛选出的耐盐品种和盐敏感品种配制耐盐×盐敏感及其反交等组合进行耐盐性遗传分析, F₁ 代表耐盐, F₂ 代耐盐和盐敏感植株分离比率为 3: 1, F₂ 代耐盐株衍生的 F₃ 代品系中, 纯合耐盐株系和耐盐性分离株系的比率为 1: 2。用敏感品种为回交亲本, BC₁F₁ 代耐盐与敏感株分离比率为 1: 1, 表明大豆的耐盐性受一对基因控制, 耐盐为显性, 盐敏感为隐性^[8]。

由于大豆耐盐性受一对基因控制, 故可在育种早期世代对耐盐性进行鉴定选择。然而, 大豆耐盐性的田间鉴定要求在盐渍条件下进行, 而且鉴定结果易受到日照、气温、降水、风力等环境因素影响, 因此需要严格控制处理条件。近 10 年来, 发展较快的分子标记与表型鉴定相比, 具有不受环境条件和植物生长发育阶段影响, 鉴定准确, 多态性高, 标记位点多且分布在整个基因组等优点。目前常采用近等基因系法和分离群体组群分析法 (bulked segregate

收稿日期: 1999-05-04

基金项目: “九五”国家科技攻关项目“大豆种质资源指纹图谱绘制及重要农艺性状基因分子标记”专题中的研究内容
郭蓓现在中国农业科学院作物品种资源研究所攻读硕士学位, 工作单位为北京农学院农学系。邱丽娟为联系作者。

analysis, BSA 法^[20]) 筛选与目的基因连锁的分子标记。

本研究以上述大豆耐盐性遗传分析的分选群体为试验材料, 根据田间耐盐性鉴定结果, 旨在利用 BSA 法评价和筛选出与大豆耐盐性基因紧密连锁的分子标记, 以便为大豆耐盐种质鉴定和大豆耐盐育种分子标记辅助选择提供准确快速的鉴定方法。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

本试验选用 3 个“耐盐× 盐敏感”组合的 F₂ 群体和 25 个耐 (敏) 盐性品种作为试验材料。3 个组合包括“文丰 7 号× Union”, “锦豆 33× Hark”, “铁丰 8 号× 早熟 6 号”。在 25 个品种中, 12 个是耐盐品种, 包括晋豆 9 号、晋豆 6 号、晋豆 5 号、晋豆 1 号、锦豆 33、中豆 19、文丰 7 号、铁丰 8 号、丹豆 5 号、Lee、PI437654、Mansoy, 其余 13 个是盐敏感品种, 包括 85-140、中品 661、丹豆 1 号、铁丰 21、晋豆 13、汾豆 31、矮脚早、早熟 6 号、Nebsoy、Union、Jackson、BSR101 和 Hark。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆耐盐性田间鉴定 在山东省昌邑县种畜场进行耐盐性田间鉴定。试验地属于中度盐化强沙质盐碱土, 为海水倒灌区, 土壤含盐量是 0.4% ~ 0.7%。大豆于 1997 年 5 月 20 日播种, 3 个“耐盐× 盐敏感”组合的 F₂ 群体各种植 200 个单株, 生长至 V₃(2~3 片复叶展开) 时期时, 抽提地下咸水(其成分与海水组成相同)与地面淡水调配成浓度为 14.8 ds/m (含盐量 0.95%) 的咸水, 对大豆植株进行处理^[9]。处理后 3d 根据植株叶片上盐斑的有无, 调查记载单株的耐盐性和盐敏感性, 并在生长发育后期, 进一步确定其植株耐盐表现型。

1.2.2 DNA 池的建立 (1) 后代池: 从“文丰 7 号× Union” F₂ 群体中随机选择耐盐和盐敏感单株各 20 株, 分株提取基因组 DNA 并测定浓度, 然后将 20 株耐盐和 20 株盐敏感单株 DNA 分别等量混合构成 F₂ 耐盐池(1T)和盐敏感池(1S)。(2) 品种池: 分别提取 25 个品种的基因组 DNA 并测定浓度, 然后将 12 个耐盐品种和 13 个盐敏感品种 DNA 分别等量混合构成品种耐盐池(T_m)和品种盐敏感池(S_m)。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 扩增反应的总体积为 25μL, 反应液包括 1× PCR buffer [50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH9.0), 0.1% TritonX-100], 1.5mmol/L MgCl₂, 0.1mmol/L dNTP, 1U Taq 酶(上海生工生物公司), 15ng 的引物(Operon 公司)和 40ng 的模板 DNA。

扩增反应在 Hybaid 的 Thermal Cycling System 上进行, 程序为: 94℃ 3 min 预变性后, 94℃ 15s, 36℃ 30s, 72℃ 1 min, 经 50 个循环之后, 72℃ 延伸 7 min。扩增产物在含有溴化乙锭的 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察照相。

2 结果与分析

2.1 大豆耐盐性基因标记的筛选与获得

根据 BSA 法, 选用后代耐盐池(1T)、后代敏盐池(1S)、耐盐亲本(文丰 7 号)、敏盐亲本(Union) 4 个 DNA 样品, 此外, 为更好地消除遗传背景的影响, 还加入了 2 个 DNA 样品, 即耐盐品种池(T_m)和敏盐品种池(S_m), 用这 6 个样品进行引物的筛选。经筛选鉴定出一个特异引物(已申请国家发明专利, 专利申请号为 98111783. X)^[5], 该引物可在 6 个样品中扩增出 2 个特异 PCR 标记(图 1), 即在 3 个耐盐样品(1T、T_m 和文丰 7 号)中均扩增出 1 条约



M. 标准分子量 Marker; 1. 1T; 2. 1S; 3. 文丰 7 号 Wenfeng 7; 4. Union; 5. Tm; 6. Sm

图 1 6 个样品中扩增的 PCR 产物

Fig. 1 PCR amplified products in 6 samples

700bp 的特异片段; 在 3 个盐敏感样品 (1S、Sm 和 Union) 中均扩增出约 600bp 的 1 个特异片段, 推测这 2 个扩增产物(700bp 和 600bp) 分别与大豆的耐盐性和盐敏感等位基因有关。F₂ 耐盐池(1T) 同时扩增出约 700bp 和 600bp 2 个特异片段, 推测组成 1T 的耐盐个体包括纯合和杂合 2 种, 进一步分析组成 1T 的 20 个单株, 其中 7 个单株扩增出 700bp 1 个片段, 13 个单株扩增出 700bp/600bp 2 个片段。对“文丰 7 号× Union”组合的 F₁ 代进行 PCR 分析, 可同时扩增出 700bp 和 600bp 2 个特异片段, 表明这 2 个与大豆耐盐性和盐敏感等位基因有关的标记为共显性标记。

2.2 大豆耐盐性基因与分子标记的连锁关系

在“文丰 7 号× Union”组合的 200 个 F₂ 植株的田间耐盐性鉴定中, 152 株表现为耐盐型, 48 株表现为盐敏感型。通过对耐盐型个体的 PCR 分析确定, 有 39 个个体只扩增出 700bp 1 个特异片段, 为纯合型; 113 个个体扩增出 700bp/600bp 2 个特异片段, 为杂合型。而 48 株盐敏感型个体中, 都只扩增出 600bp 1 个特异片段, 为纯合型。通过对该群体的分析, 未发现重组个体, 表明此标记与大豆耐盐性基因间紧密连锁。

2.3 大豆耐盐性基因分子标记的鉴定

2.3.1 在其它 2 个分离群体中的鉴定

在“锦豆 33× Hark”组合的 200 个 F₂ 植株的田间耐盐性鉴定中, 156 株表现为耐盐型, 44 株表现为盐敏感型。对盐敏感型 44 株进行 PCR 分析, 43 株扩增出 600bp 1 个特异片段, 1 株扩增出 700bp/600bp 2 个特异片段, 为重组个体。对 87 株耐盐型个体进行 PCR 扩增, 其中有 1 株扩增出了 600bp 的特异片段, 为重组个体, 其余均表现为 700bp 1 个特异片段或 700bp/600bp 2 个特异片段。在“铁丰 8 号× 早熟 6 号”组合的 200 个 F₂ 植株的田间耐盐性鉴定中, 164 株表现为耐盐型, 36 株表现为盐敏感型。在 36 株盐敏感型个体中, 均只扩增出 600bp 1 个特异片段, 但此特异片段稍有上移, 这与其盐敏感亲本早熟 6 号表现一致。随机分析 78 株耐盐型的 PCR 扩增带型, 有 3 株扩增出了 600bp 的特异片段。

2.3.2 在大豆品种中的鉴定

对组成 T_m 样品的 12 个耐盐品种分别进行 PCR 分析, 均扩增出 700bp 的特异片段。对组成 S_m 样品的其他 13 个盐敏感品种进行 PCR 扩增时, 都可检测到 600bp 特异片段(图 2), 田间耐盐鉴定结果与分子标记鉴定结果完全一致。但丹豆 1 号和早熟 6 号(第三组合亲本之一)的特异片段稍有上移。

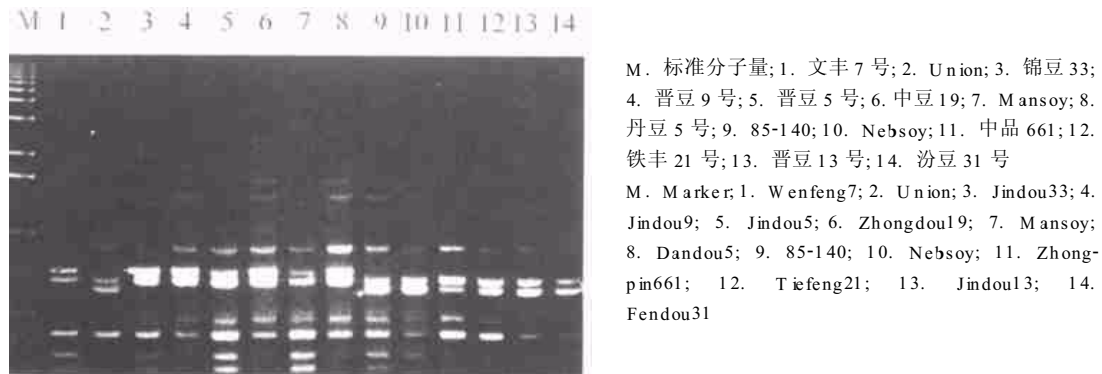


图 2 不同耐/敏盐品种的 PCR 产物

Fig. 2 PCR amplified products in tolerant/susceptible cultivars

3 讨论

3.1 大豆耐盐性基因与标记间的遗传距离

通过对“文丰 7 号× Union” F_2 分离群体的分析, 未观察到分子标记与耐盐性等位基因之间发生重组, 表明在该群体中标记与耐盐性基因表现为共分离。在“锦豆 33× Hark”的 F_2 分离群体中出现了 2 个重组个体, 重组率为 1.2%。在“铁丰 8 号× 早熟 6 号”的 F_2 分离群体中出现了 3 个重组个体, 重组率为 2.8% (见表)。这些结果表明, 这一共显性标记与大豆耐盐性基因座位紧密连锁。但在不同组合中耐盐性基因与其标记间的遗传距离存在差异, 究其原因一方面是在不同的遗传背景下, 标记与基因之间的遗传距离会发生一定的改变。另一方面, 由于测定是在不同群体中进行, 会产生随机抽样误差。另外, 大豆耐盐性的田间鉴定可能受到环境因素干扰, 因此也不能完全排除环境对鉴定结果的影响。

表 3 个组合 F_2 代群体中标记与耐盐性基因间的连锁距离¹⁾Table Linkage distances between marker and salt tolerant gene among three F_2 populations

组合 Crosses	表现型 Phenotype		分子标记 Molecular markers				重组率 Recombination frequency
	耐盐株数 T-plants	盐敏感株数 S-plants	耐 _{700或700/600} T _{700or700/600}	耐 ₆₀₀ T ₆₀₀	敏 _{700/600} S _{700/600}	敏 ₆₀₀ S ₆₀₀	
	文丰 7 号× Union	152	48	152	0	0	
Wenfeng7× Union							
锦豆 33× Hark	87	44	86	1	1	43	1.2%
Jindou33× Hark							
铁丰 8 号× 早熟 6 号	78	41	75	3	0	41	2.8%
Tiefeng8× Zaoshu6							

¹⁾ T: Tolerance, S: Susceptible

3.2 对大豆耐盐性机理的初步认识

据 Abel 等^[4]的研究结果, 大豆品种的耐盐性不同是由于植株地上部氯离子的积累和排泄存在差异, 其中耐盐品种 Lee 可排泄氯离子, 而盐敏感品种 Jackson 则积累氯离子。邵

桂花等^[8]通过对大豆耐盐性遗传分析所用的各组合亲本进行叶片和茎秆排氯或吸氯的测定,发现了与 Abel 相似的结果,即耐盐品种含氯量低,而盐敏感品种则含氯量高。特别值得提出的是,我们用本研究鉴定出的分子标记,对 Abel 等研究大豆品种耐盐性与氯排除之间关系时所选用的耐盐品种 Lee 和盐敏感品种 Jackson 也进行了分析,结果 Lee 和 Jackson 同样分别扩增出 700bp 的耐盐特异带和 600bp 的盐敏感特异带,这表明关于大豆耐盐性,尽管 Abel 等和邵桂花等用于评价大豆耐盐性的指标不同,但在耐盐机理方面可能是相同的。

3.3 大豆耐盐性的遗传规律

尽管在水稻^[4]、小麦^[8]、番茄^[15]、大麦^[19]等作物中发现耐盐性是受多基因控制的性状,但在水稻^[11]、小麦^[16]、玉米^[12]中也观察到耐盐性受单基因或不完全显性主基因控制。在大豆中 Abel 等^[13]研究发现大豆叶片和茎秆排氯或吸氯特性受一对单基因控制,其中排氯为显性基因(*Ncl*)控制,吸氯为隐性基因(*ncl*)控制。邵桂花等对大豆耐盐性进行遗传分析的结果表明,大豆的耐盐性是受一对基因控制,耐盐为显性,盐敏感为隐性。本研究发现的共显性标记首次在分子水平上证实了大豆的耐盐性是受一对基因控制的。用该标记分析水稻、小麦、大麦、绿豆、糜子的耐盐和盐敏感品种时,均未出现与大豆相似的耐盐和盐敏感特异带。这一现象说明,在基因组中的这一区域,大豆与其它五种作物的同源性较低,这可能也是大豆耐盐性机制有别于其他作物的原因。

3.4 大豆耐盐性基因的等位性

大豆基因组约为 1.3×10^9 bp 到 1.8×10^9 bp,基因组中有 40%~60%的重复序列。据估计,在多数的(65%~70%)单拷贝序列中,长度为 1.1~1.4kb 单拷贝序列间分散有 0.3~0.4kb 的重复序列因子。本研究在筛选耐盐性基因标记时,在 BSA 法的基础上,结合品种池(*Tm*, *Sm*)进行分析,目的在于减少不同遗传背景的影响。用于筛选耐盐性基因标记的共有 12 个耐盐性品种和 13 个盐敏感品种,其基因序列约为 $12 \times 1.3 \times 10^9 \sim 13 \times 1.8 \times 10^9$ bp,从中获得与 1 个耐盐性基因连锁标记的可能性极小,但若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。大豆耐盐性品种间杂交‘锦豆 33×铁丰 8 号’和‘锦豆 33×Mansoy’的 F_1 、 F_2 及 F_3 代均表现为耐盐^[8]。这表明上述鉴定的 3 个耐盐性品种锦豆 33、铁丰 8 号和 Mansoy 的耐盐性是由相同位点的等位基因控制遗传的。用本研究鉴定出的分子标记分析上述 3 个耐盐性品种时均观察到耐盐片段(700bp),这个片段也同样存在于包括文丰 7 号在内的其它耐盐品种中。通过大豆盐敏感品种间杂交“早熟 6 号×Hark”和“早熟 6 号×85-140”组合 F_1 、 F_2 及 F_3 代的耐盐性鉴定^[8],证明 3 个盐敏感品种间控制盐敏感的基因也具有等位性,且与上述 3 个耐盐性品种是相同位点。除早熟 6 号和丹豆 5 号中的特异 DNA 片段略大于 600bp 外,在 Hark、85-140 和其它盐敏感品种中都检测到特异 DNA 片段(600bp)。因此推断,本研究所用的大豆种质的控制耐盐性遗传的基因可能都是等位的。

在不同品种及分离群体中的极个别个体上,该标记的大小发生了轻微的变化(特异带上移的现象),这种现象揭示出在不同的遗传背景下,或是相同遗传背景在不同的环境条件下,标记片段的大小会在某种程度上发生改变。值得注意的是,即便在不同的品种或个体中该标记的大小有轻微变化,但这并没有妨碍标记对品种或个体耐盐及敏盐特性的鉴别能力,这表明已筛到的耐盐基因标记对于大豆耐盐种质鉴定和大豆耐盐育种后代的选择具有较高的应用价值。

参考文献:

- [1] 常汝镇, 等. 盐对大豆农艺性状及籽粒品质的影响 [J]. 大豆科学. 1994, 13(2): 101~ 105.
- [2] 陈一舞, 等. 盐胁迫对大豆幼苗子叶各细胞器超氧化物歧化酶(SOD)的影响 [J]. 作物学报. 1997, 23(1): 1~ 6.
- [3] 陈一舞, 等. 盐胁迫下大豆超氧化物歧化酶的变化 [J]. 作物学报. 1994, 20(3): 363~ 367.
- [4] 林鸿宣, 等. 应用分子标记检测水稻耐盐性的 QTL [J]. 中国水稻科学. 1998, 12(2): 72~ 78.
- [5] 邱丽娟, 等. 中华人民共和国专利局 (专利申请号 98111783. X) [P]. 1998 .
- [6] 邵桂花. 大豆种质资源耐盐性田间鉴定方法 [J]. 作物杂志. 1987, (3): 36~ 37.
- [7] 邵桂花, 等. 大豆萌发期耐盐生理初步研究 [J]. 作物杂志. 1994, (6): 25~ 27.
- [8] 邵桂花, 等. 大豆耐盐性遗传的研究 [J]. 作物学报. 1994, 20(6): 721~ 726.
- [9] 邵桂花, 等. 大豆种质资源耐盐性鉴定初报 [J]. 中国农业科学. 1986, (6): 30~ 34.
- [10] 谢承陶, 等. 盐渍土改良原理与作物抗性 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1993.
- [11] 张耕耘, 等. 九个水稻耐盐突变体的 RFLP 分析 [J]. 植物学报. 1994, 36(5): 345~ 350.
- [12] Abdel T F M, et al. Molecular markers for salt tolerance in some inbreds of maize (*Zea mays* L.) [J]. Arab Universities Journal of Agricultural Sciences. 1997, 5(2): 389~ 417.
- [13] Abel G H. Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybeans [J]. Crop Science. 1969, 9(6): 697~ 698.
- [14] Abel G H. Salt tolerance of soybean varieties during germination and later growth [J]. Crop Science. 1964, 4: 157~ 160.
- [15] Foolad M R, et al. Mapping QTLs conferring salt tolerance during germination in tomato by selective genotyping [J]. Molecular Breeding. 1997, 3(4): 269~ 277.
- [16] Gorham J, et al. Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K^+ / Na^+ discrimination in wheat [J]. Proceeding of the Second New Physiologist symposium. 1997, 137(1): 109~ 116.
- [17] Guo Pei, et al. A RAPD marker linked to the salt tolerant gene in soybean [J]. Soybean Genetics Newsletter. 1998, 25: 30~ 31.
- [18] King I P, et al. Characterization of *Thinopyrum bessarabicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and genomic in situ hybridization [J]. Theoretical and Applied Genetics. 1993, 86(8): 895~ 900.
- [19] Mano Y, et al. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance at germination and the seedling stage in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Euphytica. 1997, 94(3): 263~ 272.
- [20] Michelmore R W, et al. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, 88: 9828~ 9832.

Tagging Salt Tolerant Gene Using PCR Markers in Soybean

Guo Bei¹, Qiu Lijuan¹, Shao Guihua², Chang Ruzhen¹,

Liu Lihong¹, Xu Zhanyou¹, Li Xianghua¹, Sun Jianying¹

(¹Institute of Crop Germplasm Resources of CAAS, Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; ²Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS)

Abstract: The purpose of this study was to screen and identify PCR markers associated with salt tolerant gene in soybean so that salt identification can be conducted efficiently and accurately. Soybean cultivars with salt tolerance or susceptibility and three crosses of salt tolerant cultivar with susceptible cultivar were used as materials in this experiment. By using BSA method, two codominant PCR markers were identified through the tolerant (susceptible) salt cultivars bulks and the tolerant (susceptible) salt bulks of a F₂ population. There was a 600bp band in the susceptible individuals and a 700bp band or two 700bp/600bp bands in the tolerant individuals. The markers were closely linked with salt tolerant/susceptible alleles. Moreover the markers were tested in the other two "salt tolerant cultivar × susceptible cultivar" F₂ populations and confirmed by 12 salt tolerance cultivars and 13 salt susceptible cultivars with different genetic backgrounds. It indicated that the markers (700bp and 600bp) can be applied in salt tolerant identification of the soybean germplasm resources, and markers-assisted selection in salt tolerant breeding of soybean. The molecular markers, the obtained method and application of soybean salt tolerant gene were patented for invention in 1998.

Key words: Salt tolerant gene; Molecular marker; Patent; Soybean