

# 大豆油份分子标记<sup>\*</sup>

刘昭军, 李 铁, 刘 琦, 刘丽艳, 李希臣  
(黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

**摘要:**采用 BSA 法对垦农 18(高油, 23.21 %)与黑农小粒豆(低油, 19.0%)的杂交 F<sub>2:3</sub> 群体进行 RAPD 分析。用 200 个随机引物对构建的高油 DNA 池和低油 DNA 池进行扩增, 有 46 个引物产生了 RAPD 扩增产物, 共获得 315 个片断, 其中产生多态性片段的随机引物为 4 个同高油含量相关的特征性条带分别为 S<sub>56</sub> 900bp、S<sub>61</sub> 600bp、S<sub>107</sub> 600/450/370bp、S<sub>134</sub> 450/500bp。这些标记平均可以区分 F<sub>2:3</sub> 群体中 87.1% 的高油与低油单株, 重复性好, 可以用作高油含量的分子标记。

**关键词:**高油大豆; RAPD; 分子标记

中图分类号: S 565.1      文献标识码: A      文章编号: 1002-2767(2006)06-0006-03

## RAPD Marker Related with Oil Content of Soybean

LIU Zhao jun, LI Tie, LIU Qi, LIU Li yan, LI Xi chen

(Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract :** With Bulk Segregation Analysis , RAPD method was employed to analyze genome

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2006-08-24  
基金项目: 黑龙江省青年基金项目( QC04C34)  
第一作者简介: 刘昭军( 1974- ), 男, 黑龙江海林市人, 博士, 助研, 从事植物生物技术研究。 E-mail: liuzhaojun7@yahoo.com。

### 3 结论与讨论

从以上分析可以看出同一种质导入不同的热带种质选系与不同的测验种间的杂种优势有较大差异。热导选系组配的杂交种多数散粉期、抽丝期比相邻对照晚, 导入自交系熟期越早, 延后的时间相对越长。本试验仅从产量的对照优势看: 甸骨 11A 导入 Suwan1、556 选系与红玉米, 红玉米导入 Suwan1、EVT5 选系与甸骨 11A, 长 3 导入 Suwan1、墨黄 9 选系与海 014 杂种优势显著高于相邻对照, 可进一步研究利用。本试验所选定的测验种均是与未改良系杂交且有较强优势的自交系, 所组配的杂交种直接与未改良系的强优势组合比较, 目标明确, 适用性较强。由于材料局限, 对热导选系的杂种优势评价还有待于进一步研究。例如除本试验选定的测验种之外, 与其它类群自交系的杂种优势, 以及其组配的杂交种与当地生产用同熟期杂交种的比较等。

#### 参考文献:

[1] 潘兴明. 热带亚热带玉米种质的利用[ M]. 云南: 云南科技出

版社, 2003.

[ 2] 倪昔玉, 刘礼超, 雷本鸣. 山区玉米育种优良自交系苏 37 ( S37) 的选育研究[ J]. 四川农业大学学报, 1996, 14( 3): 366 370.  
[ 3] 王懿波, 王振华, 王永普. 等. 中国玉米主要种质杂交优势利用模式研究[ J]. 中国农业科学, 1997, 30( 4): 16 24.  
[ 4] 陈彦惠, 王利明, 戴景瑞. 中国温带玉米种质杂交与热带、亚热带种质杂优组合模式研究[ J]. 作物学报, 2000, 26( 5): 557 564.  
[ 5] 李新海, 李明顺, 袁力行, 等. 热带、亚热带玉米种质的研究与利用[ J]. 中国农业科学, 2000, 33( 增刊): 20 26.  
[ 6] 潘兴明, 谭静, 杨峻云, 等. 外来热带、亚热带玉米自交系与温带玉米自交系产量配合力分析及其遗传关系的研究[ J]. 中国农业科学, 2002, 35( 7): 743 749.  
[ 7] 陈泽辉, 高翔, 祝云芳, 等. Suwan 1 与我国四大玉米种质的配合力杂种优势分析[ J]. 玉米科学, 2005, 13( 1): 5 9.  
[ 8] 刘志新, 姜敏, 王金军, 等. 14 份 CIMMYT 玉米群体材料配合力分析及利用价值评价[ J]. 玉米科学, 2005, 13( 增刊): 14 17, 19.  
[ 9] 苏俊, 刘志增. 热带玉米种质在北方早熟春玉米改良中的利用[ J]. 玉米科学, 2005, 13( 4): 8 12.

DNA of  $F_{2:3}$  population obtained by crossing Kennong 18(oil content, 23.21 %) with Heinongxi aolidou(oil content, 19.0%). Two hundred random primers were used to amplify between the high and low oil content DNA pools, among which there were 315 amplified fragments by 46 primers that produced RAPD product and we found there were 4 random primers produced polymorphic bands. 4 markers related with oil content were  $S_{56}$  900bp、 $S_{67}$  600bp、 $S_{107}$  600/450/370bp、 $S_{134}$  450/500bp respectively. These markers could separate 87.1% high or low plants in  $F_{2:3}$  population. The results showed very stable and repeatable. The RAPD markers was useful to assist the selection for high oil content soybean plants in soybean hybrid breeding.

**Key words:** RAPD; molecular marker; oil content; soybean

大豆是重要的油料作物。为了满足人民营养水平提高的需要,国内外的育种家们十分重视大豆高脂肪含量的育种,因此选育优质、高油大豆成为大豆育种者的一个重要目标。在传统育种工作中,育种家从大量的杂交分离后代中通过性状观察,选择理想的重组基因型进行大豆高油育种,过程复杂、费时费力。并且脂肪含量等品质性状属于数量性状,易受环境影响,选择缺乏准确性。随着 RAPD、SSR 和 AFLP 等基于 PCR 的 DNA 分子标记技术的出现,为这一问题的解决开辟了新途径。使育种家将复杂性状表型选择育种变为复杂性状的分子标记辅助选择育种的设想正在成为现实。

本研究采用 BSA(Bulked Segregates Analysis)即分离群体分组分析法(Michelmore et al 1991)<sup>[1]</sup>,对高油×低油组合的  $F_2$  代分离群体进行分子标记研究,旨在寻找与高油份含量相关的 RAPD 分子标记,为高油新品种的选育提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验材料为高油大豆垦农 18 与低油大豆黑农小粒豆杂交的  $F_{2:3}$  群体。在三初复叶期采集大豆植株叶片,每株挂牌编号,叶片经液氮冷冻后存于超低温冰箱中备用;对单株子粒进行油份含量测定,卡方值检测所选单株的油份含量呈正态分布。将具有极端值( $23\% \pm 0.3\%$  与  $19\% \pm 0.3\%$ )的高油株和低油株进行分组,获得高油大豆(59 株)与低油大豆(63 株)两个群体。

RAPD 引物( $S_1$ ~ $S_{200}$  共 200 条)以及 PCR 反应试剂均为上海生工生物工程有限公司产品,其它药品为分析纯产品。

### 1.2 DNA 的提取

DNA 提取参照关荣霞等<sup>[2]</sup>的方法,DNA 用超纯水溶解,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 RAPD 分析

1.3.1 PCR 反应体系 反应总体积为  $25\mu\text{L}$ ,其中含 25ng 模板 DNA,  $10\times\text{Buffer}$   $2.5\mu\text{L}$ ,  $10^4\text{M}$  10 碱基随机引物  $1\mu\text{L}$ , dNTP( $10\text{mmol}$   $4\times\text{dNTP}$ )为  $0.5\mu\text{L}$ ,  $1.5\text{UTaq}$  DNA 聚合酶,灭菌的  $\text{ddH}_2\text{O}$  补至  $25\mu\text{L}$ 。

1.3.2 PCR 反应程序 PCR 反应在 PE 热循环仪(MJPTC2200 型)上进行,  $94^{\circ}\text{C}$  2 min,  $36^{\circ}\text{C}$  2 min,  $72^{\circ}\text{C}$  2 min, 5 个循环;  $94^{\circ}\text{C}$  30s,  $36^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。

1.3.3 PCR 产物的检测 扩增产物在含有溴化乙锭的 1.5% 的琼脂糖凝胶中进行电泳分离检测,电泳缓冲液为 TAE,上样量为  $6\mu\text{L}$ ,电泳时电压为  $4\text{V}/\text{cm}$ ,1.5 h 完成。凝胶在成相系统中观察并照相记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 高油、低油 DNA 样品池的建立及 RAPD 分析

本研究应用 SDS 法提取 DNA,纯化定量,电泳检测提取基因组 DNA 的质量完全符合标记所用(见图 1),对引物进行了大量筛选(见图 2)。将 59 个高油株分为一组(高油池),63 个低油株分为一组(低油池),将每个材料的 DNA 稀释到相同的浓度,再分别将 DNA 等量均匀混合形成相应的两个 DNA 样品池,进行 RAPD 分析。供试的 200 个随机引物有 46 个产生了 RAPD 扩增产物,共获得 315 个条带,其中产生 RAPD 多态性的随机引物有 4 个,结果如图 3~6 所示。

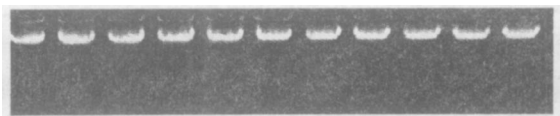


图 1 基因组 DNA 的检测

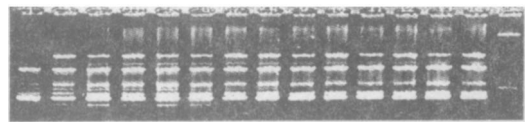


图 2 引物的筛选(模板为垦农 18)

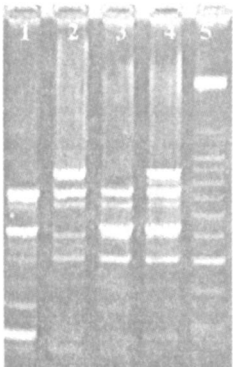


图 3 S<sub>56</sub> 扩增的图谱

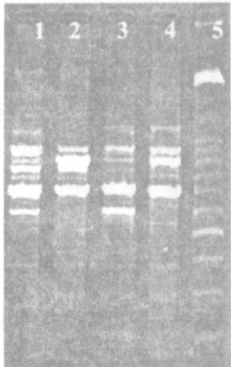


图 4 S<sub>61</sub> 扩增的图谱

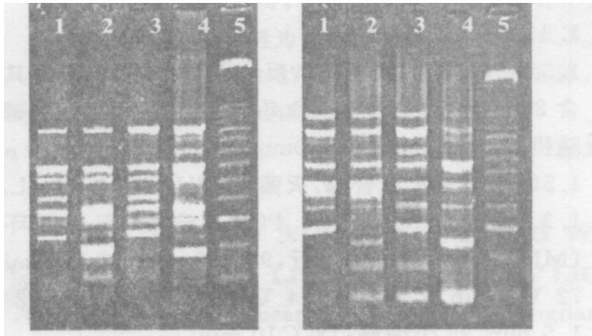


图 5 S<sub>107</sub> 扩增的图谱

图 6 S<sub>134</sub> 扩增的图谱

注: 图 3~6 中泳道 5、4、3、2、1 分别为 Marker、黑农小粒豆、垦农 18、低油池、高油池。

2.2 大豆高油份含量相关的特异 DNA 片段

在 46 个产生了 PCR 扩增产物的引物中, 只有 4 个引物产生了多态性条带, 高油池与低油池的差异带同亲本垦农 18 与黑农小粒豆的差异带一致。他们共扩增 7 条特征性条带, 其中在高油植株中存在而低油植株中未扩增出的条带为 3 条, 分别为 S<sub>56</sub>-900bp、S<sub>107</sub>-370bp、S<sub>134</sub>-450, 在高油植株中未扩增而低油植株中存在的条带为 4 条, 分别为 S<sub>61</sub>-600bp、S<sub>107</sub>-450bp、S<sub>107</sub>-600bp、S<sub>134</sub>-500bp, 引物 S<sub>107</sub> 与 S<sub>134</sub> 特征条带分别为 3 条和 2 条。

表 多态性引物对 F<sub>2:3</sub> 群体的扩增验证

引物名称	扩增片段大小(bp)	高油植株检出率(%)
S <sub>56</sub>	900	78.9
S <sub>61</sub>	350	87.5
S <sub>107</sub>	600、450、370	90.6
S <sub>134</sub>	450、500	91.6

将 4 个扩增有多态性条带的引物分别在 F<sub>2:3</sub> 群体中进行扩增验证, 结果它们对高油份含量大豆植株的检出符合率分别为 78.9%(S<sub>56</sub>)、87.5%(S<sub>61</sub>)、90.6%(S<sub>107</sub>)、91.6%(S<sub>134</sub>)(见表 1)。经过多次重复验证, 均获得相同的扩增结果, 这些多态性标记能够区分 F<sub>2:3</sub> 群体中绝大部分植株, 初步推测这 4 个多态性引物扩增特异性片段与大豆高油份含量密切

相关。  
3 讨论

BSA 法(分离组群分析法)或近等基因系法是进行 RAPD 分子标记常常采用的策略<sup>[3]</sup>。通过筛选大量的随机引物, 经 RAPD 分析可以找出与目的基因连锁的标记并进行分子定位。BSA 法在近等基因系尚不具备的情况下是首选的方法。根据目标性状的分离情况, 对 F<sub>2</sub> 群体构建两个相对的 DNA 池, 构建的 DNA 池只有目标基因是经过选择而其余的遗传成分是随机的, 因而在群体较大的情况下, 可以认为遗传背景基本相同, 所以所构建的 DNA 池可被认为是近等基因池。在两个组群之间不同, 而群体内各个 F<sub>2</sub> 个体间又完全相同的扩增产物就是与目标基因连锁的 RAPD 标记。大豆油份含量为数量性状, 因此在通过分子标记时, 都采用 QTL 方法。传统育种中, 大豆 F<sub>2</sub> 分离群体筛选大豆油份含量高的目标单株很困难, 本研究对配制杂交组合的亲本进行 RAPD 标记筛选, 利用已筛选的稳定的 RAPD 标记直接进行 F<sub>2</sub> 群体验证, 可以提高选择的效率。本研究获得了 4 个与大豆高油含量相关的 RAPD 标记, 在所建立的分离群体内对高油份含量的目标单株检出率平均达到 87.1%, 利用这几个标记对已经审定的高油以及低油份含量品种进行了验证, 符合率也很高。RAPD 标记方法简单、快速, 因此被广泛用于目的基因的分子标记, 该技术不足之处为稳定性和重复性较差, 另外, RAPD 标记大多是显性标记, 无法区分纯合型和杂合型基因型, 因此必须严格控制反应条件以提高稳定性。下一步通过对 RAPD 特异性片段进行测序, 将其转换成 SCAR 标记就可以稳定迅速地用其来标记辅助选育优良的高油大豆新品种<sup>[4]</sup>, 提高选择效率, 加速育种进程。

参考文献:

[1] Micheltore R W, Paran L, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by using segregating analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Science USA, 1991, 88: 9828-9832.

[2] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟, 等. 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取[J]. 大豆科学, 2003, 22(1): 73-74.

[3] 方宣钧, 吴为人, 唐继良. 作物 DNA 标记与辅助育种[M]. 北京, 科学出版社, 2001: 38.

[4] Hernandez P, Martin A, Dorado G. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker assisted selection wheat[J]. Molecular Breeding, 1999, (5): 245-253.