

宁丽华,何晓兰,张大勇. 大豆耐盐相关基因 *GmNclI* 功能标记的开发及验证[J].江苏农业学报,2017,33(6):1227-1234.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.005

大豆耐盐相关基因 *GmNclI* 功能标记的开发及验证

宁丽华, 何晓兰, 张大勇

(江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所/江苏省农业生物学重点实验室,江苏 南京 210014)

摘要: 土壤盐渍化严重影响大豆生产,因而鉴定大豆耐盐种质的分子标记对大豆耐盐新品种的培育具有重要意义。本研究分析了大豆耐盐相关基因 *GmNclI* 等位变异位点的限制性酶切位点,通过酶切 PCR 产物,琼脂糖凝胶电泳和酶切片段分析,开发建立了分子标记 *CAPS/Xba I*。利用该标记对 10 份不同耐盐大豆种质进行酶切分型鉴定,然后通过测序试验进行验证。结果表明,用所开发的共显性标记 *CAPS/Xba I* 对 10 份大豆种质进行耐盐性鉴定,鉴定结果与依据表型进行鉴定的结果一致。由此可见,*CAPS/Xba I* 可用于大豆品种的耐盐性鉴定。

关键词: 大豆; 耐盐性; *GmNclI*; 酶切扩增多态性序列(CAPS)标记

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1227-08

Development and validation of the function marker of soybean salt tolerance gene *GmNclI*

NING Li-hua, HE Xiao-lan, ZHANG Da-yong

(Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/ Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy, Nanjing 210014, China)

Abstract: Soil salinization will lead to serious reduction of yield and affect the quality of soybean. Therefore, identifying molecular markers linked to the function gene of salt tolerance will be helpful to soybean breeding. On the basis of the allelic variations of *GmNclI*, which was a salt tolerance gene, a pair of primers was designed, and the method of restriction analysis was used to develop function marker. Finally, a cleaved amplified polymorphic sequences(CAPS) marker named *CAPS/Xba I* was developed. Ten different salt tolerance characteristic soybean cultivars have been screened by this marker. The result of salt tolerance soybean identified by the codominant marker was consisted with the result of that identified according to phenotype. So, *CAPS/Xba I* could be used in the identification of soybean salt tolerance.

Key words: soybean; salt tolerance; *GmNclI*; cleaved amplified polymorphic sequences(CAPS) mark

收稿日期:2017-08-31

基金项目:国家自然科学基金项目(31701453);江苏省自然科学基金项目(BK20160584)

作者简介:宁丽华(1985-),女,山东泰安人,博士,助理研究员,主要从事农学研究。(Tel) 025-84391957;(E-mail) NLH_2015@126.com

通讯作者:张大勇,(E-mail) cotton.z@j126.com

土壤盐渍化和次生盐渍化是一个全球性的问题,严重影响农业生产并造成生态问题。由于环境恶化和不合理耕作等原因,盐渍化土壤面积不断增加。目前,全球约有 7.6% 的土壤发生盐渍化,而中国盐渍化土壤面积高达 $2.7 \times 10^8 \text{ hm}^2$, 约占耕地面积的 10.0%^[1-2]。大豆是重要的粮食作物和油料作物,在中国食品工业和农业生产中占重要地位。大

豆属于中度耐盐作物,其土壤盐度阈值为 5 dS/m,将盐浓度从 2 dS/m 提高到 7 dS/m,大豆产量降低 40.0%^[3]。不同大豆品种的耐盐特性显著不同,利用含有优异等位变异基因的种质资源^[4]来选育耐盐品种,对于促进盐渍土地的有效利用和实现大豆高产稳产具有重要的理论意义和实践价值。

传统耐盐大豆选育工作主要是通过盐渍条件下对大豆不同生育期的耐盐特征表型鉴定进行判断^[5],而表型鉴定结果易受环境及人为因素的影响,从而降低耐盐品种的选育效率。分子生物学的发展和分子标记技术的广泛应用,为大豆耐盐遗传育种提供了有效的辅助工具。为了更好地开展耐盐大豆育种工作,提高大豆耐盐育种效率,育种工作者开发了一批与大豆耐盐基因紧密连锁的分子标记。使用改进的随机多肽扩增 DNA(RAPD)方法在耐盐品种 Morgan 和文丰 7 中鉴定到 3 个特异的多态性位点^[6]。郭蓓等^[7]开发的共显性 RAPD 分子标记,可以鉴定耐盐大豆个体(700 bp)和盐敏感大豆个体(600 bp),该标记在锦豆 33×Hark 以及铁峰 8 号×早熟 6 号这 2 个 F₂ 群体中均得到了验证^[8]。田蕾^[9]将前期开发的 RAPD 标记转化为特定序列扩增 DNA(SCAR)标记,SCAR 标记的使用增强了 RAPD 标记的特异性并简化了 PCR 分析。但是大豆耐盐性状是一个复杂的数量性状,由多个基因甚至基因网络控制^[10-11],仅靠现有的耐盐分子标记来鉴定大豆种质的耐盐性是远远不够的,急需开发和补充新的可用于育种实践的有效分子标记。

单价阳离子/H⁺逆向转运蛋白在植物对盐胁迫的抵抗中发挥重要作用。大豆 *GmCAX1* 基因编码 1 种阳离子/H⁺逆向转运蛋白,该基因在拟南芥中过表达可显著提高拟南芥植株的耐盐性^[12]。大豆钾离子转运蛋白基因 *GmHKT1;4* 在烟草中过表达后,会在盐胁迫的耐受中发挥作用^[13]。在拟南芥中,若编码质膜上 Na⁺/H⁺转运蛋白的 *GmSOS1* 过表达,则可显著提高盐胁迫条件下种子的萌发率^[14]。*GmSALT3* 属于定位在内质网上的阳离子/H⁺转运蛋白,在控制 Na⁺向地上部的运输中发挥重要作用^[15]。*AtCHX21* 转运蛋白能够将 Na⁺从内皮层细胞运输到根系的中柱中,最终将 Na⁺加载到木质部^[16]。大豆 *GmNcl1* 蛋白与拟南芥 CHXs 转运蛋白家族成员亲缘关系较近。*GmNcl1* 基因受盐胁迫诱导而表达上调,为耐盐的相关基因^[17-18]。赫卫等^[17]

对不同耐盐性大豆品种的 *GmNcl1* 基因进行测序,发现耐盐品种和盐敏感品种之间存在特定的单倍型 GAGATATTC(耐)/TTT---CT(敏)序列。本研究拟根据已公布的 *GmNcl1* 基因(Glyma.03g171500)的全基因序列,寻找该基因在不同耐盐特性材料中特异的单核苷酸多态性(SNP),并将其转化为基于 PCR 技术检测的基因特异性分子标记,以期提高耐盐基因的筛选效率。

1 材料与方法

1.1 供试材料及耐盐性鉴定

本试验所用大豆材料如表 1 显示,试验在江苏省农业科学院的温室中进行,大豆的耐盐性采用本实验室前期建立的大豆苗期耐盐性鉴定方法^[17]进行鉴定。

表 1 大豆材料的名称及耐盐特性

Table 1 Name and salt tolerance characteristic of soybean used in this study

品种名称	耐盐特性	表型鉴定来源
铁峰 8 号	耐盐	Guan 等 ^[15]
Lee68	耐盐	罗庆云等 ^[19]
BB52	耐盐	於炳军 ^[20]
大悟六月爆	耐盐	本实验室鉴定
清远小青豆	耐盐	宁丽华等 ^[18]
Jackson	盐敏感	罗庆云等 ^[19]
Williams 82	盐敏感	田蕾 ^[9]
N23674	盐敏感	於炳军 ^[20]
邢阳灰黄豆	盐敏感	宁丽华等 ^[18]
南农 89-30	盐敏感	宁丽华等 ^[18]

1.2 引物设计

根据已公布的大豆基因组序列,利用 Primer 5.0 在线软件设计引物(表 2),用于基因启动子的扩增以及分子标记开发。

1.3 *GmNcl1* 基因启动子的克隆及序列分析

以 Lee68 和 Jackson 的 DNA 为模板,用高保真聚合酶扩增启动子序列。PCR 反应体系:2×Phanta Max buffer 25 μl, dNTP Mix(10 mmol/L) 1 μl,上游

引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 4 μl ,高保真聚合酶(1 U/ μl) 1 μl ,模板 DNA(20 ng/ μl) 4 μl ,ddH₂O 补足到 50 μl 。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。对 PCR 产物进行凝胶电泳检测,条带大小与目的片段大小一致,用 PCR 回收试剂盒回收纯化 PCR 产物,回收后的产物与 T 载体重组,将重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 中。对菌液 PCR 鉴定为阳性的样品进行测序验证。测序正确的启动子序列用植物顺式元件数据库 PLACE^[21] 和 Plant-CARE 数据库^[22] 进行在线预测,分析启动子可能存在的顺式作用元件。本研究中所涉及的引物合成和测序试验均由南京金斯瑞有限公司完成。

表 2 本研究所用引物

Table 2 The primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>Ncl</i> -Promoter	GGAGTCAATGAAACCGGATG
	GGTTGTTCTTGTGATGTTTGTAGTC
CAPS- <i>Xba</i> I	CTCACAACTCACAATTGCCA
	GAGGCTACGTGCGCCTCTA

1.4 酶切反应与电泳

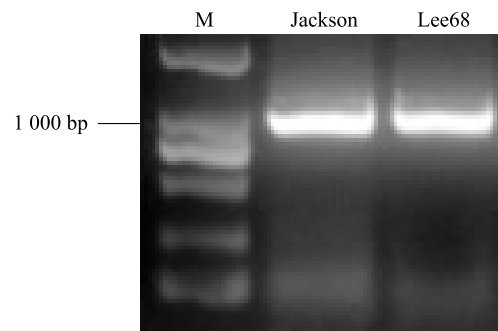
用限制性内切酶 *Xba* I 单酶切 PCR 扩增产物。酶切体系:10 \times FastDigest Green buffer 5 μl ,DNA 1 μg ,限制性内切酶 *Xba* I 1 μl ,ddH₂O 补足到 50 μl 。确保酶切体系中 *Xba* I 酶的用量充足。酶切条件为:37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 15 min,反应结束后,65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 20 min 终止酶切反应。对酶切产物进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 *GmNcl1* 启动子克隆及顺式作用元件分析

以盐敏感大豆材料 Jackson 和耐盐大豆材料 Lee68 的 DNA 为模板,以 *Ncl*-Promoter 为引物,克隆 *GmNcl1* 基因的启动子,长度为 1 320 bp(图 1),其测序比对结果如图 2 显示,不同耐盐特性大豆材料 *GmNcl1* 启动子的碱基序列存在差异。为了进一步分析这些碱基差异是否会引起不同材料中顺式作用

元件的差异,对这 2 种不同耐盐特性大豆材料 *GmNcl1* 基因的启动子区域序列进行在线分析。表 3 显示,*GmNcl1* 启动子区含有真核生物 RNA 聚合酶 II 识别位点 TATA-盒子和 CAAT-盒子,还发现 MYB 转录因子结合位点、TC-重复序列和热激应答元件(HSE)等与干旱、高温等胁迫响应相关的顺式作用元件,说明 *GmNcl1* 基因可能被盐胁迫相关的转录因子调控。该基因启动子区域含有与激素代谢相关的调控元件,例如参与脱落酸响应的 ABA 应答元件(ABRE),参与乙烯代谢的乙烯应答元件。另外,该基因存在一些光响应的顺式作用元件(G-盒子和盒子 I),还存在一些其他的调控元件,如调节胚乳发育的顺式作用元件(*Skn-1* 基序)。对 Lee68 和 Jackson 的 *GmNcl1* 启动子顺式作用元件进行比较,发现不同耐盐性大豆材料的该基因启动子区所包含顺式作用元件的类型和数目并没有差异。



M:DL 2 000 bp DNA marker。

图 1 启动子扩增产物电泳图

Fig.1 PCR amplified products of *GmNcl1* promoter

2.2 启动子等位变异分析

利用 DNAMAN 软件对启动子区域突变位点前后的限制性酶切位点进行分析,结果(表 4)显示,-403(G \rightarrow C)和-670(T \rightarrow G)处没有酶切位点,而在 2 种材料(Jackson 和 Lee68)的-897(T \rightarrow A)处均存在 *Tsp509* I 酶切位点,不适合开发标记。-385(C \rightarrow T)处形成特异的 *Xba* I 酶切位点,-393(---- \rightarrow ATAT)处可以形成特异的 *Ssp* I 酶切位点,-948(T \rightarrow G)处可以形成特异的 *Tail* 酶切位点,这 3 个点适合建立酶切扩增多态性序列(CAPS)标记。从经济学角度考虑,-385(C \rightarrow T)处形成的 *Xba* I 酶切位点更经济实惠,所以本研究重点对这个位点进行酶切分析。

Jackson	GGAGTCAATGAAACCGGATGGGTTTGCTTACAAAAAATAAAATTAAACCGGATGGATAATTAATTCTAATGCCACAGATC	80
Lee68	GGAGTCAATGAAACCGGATGGGTTTGCTTACAAAAAATAAAATTAAACCGGATGGATAATTAATTCTAATGCCACAGATC	80
Jackson	ATGACATTTGATACAAAATACTACTTTAACTCCTTTGATGCTTATAAAGTTTGGTGTTTGAGGTTTGATGAATCTTTTAA	160
Lee68	ATGACATTTGATACAAAATACTACTTTAACTCCTTTGATGCTTATAAAGTTTGGTGTTTGAGGTTTGATGAATCTTTTAA	160
Jackson	TTTATTCATGAAGATCGATCGAATTAACCTTAAGAAATTAATAAAAAATAACAAGAAATTTCTCATGGCTAATAAAAAAT	240
Lee68	TTTATTCATGAAGATCGATCGAATTAACCTTAAGAAATTAATAAAAAATAACAAGAAATTTCTCATGGCTAATAAAAAAT	240
Jackson	TAGCATAATCTTGTAGAAGCTACAATTTTAAATATAAAATTTTATTTTATATAAATAAATACTTACAGTAATTCATGAAA	320
Lee68	TAGCATAATCTTGTAGAAGCTACAATTTTAAATATAAAATTTTATTTTATATAAATAAATACTTACAGTAATTCATGAAA	320
Jackson	AATTGTAAAAAATAAATGCTCCACTGCTGAACGTGAAGCAATGCTTAGACTTATTATATTTATACACTATATATTATT	400
Lee68	AATTGTAAAAAATAAATGCTCCACTGCTGAACGTGAAGCAATGCTTAGACTTATTATATTTATACACTATATATTATT	400
Jackson	TTGGTAACCACTTCTAATAAGAAATTTTGAATTTATGTTGTAATCTAAGGTCCAAATTATTTTACAAATTTGTTTGAT	480
Lee68	TTGGTAACCACTTCTAATAAGAAATTTTGAATTTATGTTGTAATCTAAGGTCCAAATTATTTTACAAATTTGTTTGAT	480
Jackson	TTGATTATGAGATTAAATTTTGTAGACTTAGTCAAGTTATTCGTTTTTCTCCAGAAATATATTTTATACCTCCTTTTTTA	560
Lee68	TTGATTATGAGATTAAATTTTGTAGACTTAGTCAAGTTATTCGTTTTTCTCCAGAAATATATTTTATACCTCCTTTTTTA	560
Jackson	GACAGTAAAAATATATTATATTTTTTTTTTCAAGTTAAATACAAAAAACTTTTCTATGAGTATGGGTAATTAATGAGTCT	640
Lee68	GACAGTAAAAATATATTATATTTTTTTTTTCAAGTTAAATACAAAAAACTTTTCTATGAGTATGGGTAATTAATGAGTCT	640
Jackson	CTCAAACCTTTTAGTGTTTTAATAGTTAATAGTTAATTTTGGACATTTGAAATTATAATACGTATTATTTTTTCAAAAGAC	720
Lee68	CTCAAACCTTTTAGTGTTTTAATAGTTAATAGTTAATTTTGGACATTTGAAATTATAATACGTATTATTTTTTCAAAAGAC	720
Jackson	ATGAAGAGTGTTGCAGAGACAAATTAGTTTTGAATTAAATATGAAATATAATTTATTTAATTAACCTATTCTTGAACGT	800
Lee68	ATGAAGAGTGTTGCAGAGACAAATTAGTTTTGAATTAAATATGAAATATAATTTATTTAATTAACCTATTCTTGAACGT	800
Jackson	ATAAATATATCCATTTTGAATTCATTTGTTCAAGTCTTTTTTTTACATTCCAACCATTTACTACAATACCTTATATTGTAT	880
Lee68	ATAAATATATCCATTTTGAATTCATTTGTTCAAGTCTTTTTTTTACATTCCAACCATTTACTACAATACCTTATATTGTAT	880
Jackson	TTCACTCAAGAGCAACTCACAACCTACAATTGCCACAGTAATAT---CAGAAAATTCTCTAGAGTAAATTAAGAAGCTCA	960
Lee68	TTCACTCAAGAGCAACTCACAACCTACAATTGCCACAGTAATATATATCAGAAAATTCTCTAGAGTAAATTAAGAAGCTCA	960
Jackson	CATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAATCATCTGAAGAAAAGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTCACGCAACT	1 040
Lee68	CATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAATCATCTGAAGAAAAGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTCACGCAACT	1 040
Jackson	GATTATTCATCACTCAGATTTCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAATCATA	1 120
Lee68	GATTATTCATCACTCAGATTTCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAATCATA	1 120
Jackson	TATTAGGAGTTGAATTTGAAATTTGCGATTAGCGCCACGCAAAGGTAGCGTTAAAAAAGATGAGATAACAAAGAGAGGGA	1 200
Lee68	TATTAGGAGTTGAATTTGAAATTTGCGATTAGCGCCACGCAAAGGTAGCGTTAAAAAAGATGAGATAACAAAGAGAGGGA	1 200
Jackson	TAGAGGCGCACGTAGCCTCAGCAGCCGCGAATTTTAATTAACCCGTCAGCTATGTTTT	1 260
Lee68	TAGAGGCGCACGTAGCCTCAGCAGCCGCGAATTTTAATTAACCCGTCAGCTATGTTTT	1 260

图 2 不同耐盐性大豆 *GmNclI* 基因启动子的序列比对Fig.2 Alignment of *GmNclI* promoter sequence of two soybean cultivars

表 3 *GmNclI* 基因启动子区顺式作用元件的功能预测
Table 3 Function prediction of the *cis*-elements in the promoters of *GmNclI*

元件类型	名称	数目		基序序列(5'→3')	功能
		J	L		
胁迫相关	MYB 转录因子结合位点	1	1	CAACTG	参与干旱诱导
	热激应答元件	2	2	AAAAAATTTC/AGAAAATTCG	参与高温胁迫
	TC-重复序列	2	2	GTTTCTTAC/ATTTCTTCA	参与防御和胁迫响应
激素相关	TCA-元件	1	1	CCATCTTTT	参与水杨酸响应
	TGA-元件	1	1	AACGAC	生长素响应
	TGACG-基序	2	2	TGACG	MeJA 响应
	ABA 应答元件	1	1	TACGTG	脱落酸响应
	CGTCA-基序	2	2	CGTCA	MeJA 响应
	乙烯应答元件	2	2	ATTTCAAA	乙烯响应
	光响应				
光响应	AE-盒子	1	1	AGAAACAA	光响应
	AT1-基序	1	1	ATTAATTTTACA	光响应
	盒子 4	3	3	ATTAAT	光响应
	盒子 I	3	3	TTTCAA	光响应
	G-盒子	2	2	CACGTT/A	光响应
	G-盒子	2	2	CACGTT/TACGTG	光响应
	GA-基序	1	1	AAAGATGA	光响应
基本元件	CAAT-盒子	25	25	CAA(A)T(T)	增强子
	TATA-盒子	87	87	TACAAA/TTTTA/TATAA/ TAATA/TATAAATATAAA	转录起始位点
其他	GCN4_基序	2	2	CAAGCCA/TGAGTCA	参与胚胎发育
	Skn-1_基序	1	1	GTCAT	参与胚胎发育
	TATCCAT/C-基序	2	2	TATCCAT	参与蔗糖抑制响应

J;Jackson 的 *GmNclI* 启动子中所含顺式作用元件;L;Lee68 的 *GmNclI* 启动子中所含顺式作用元件。

表 4 *GmNclI* 基因启动子序列多态位点及酶切位点
Table 4 The polymorphic loci and enzyme loci of *GmNclI* promoter sequence

位置	限制性内切酶	酶切位点	多态性位点	
			Jackson	Lee68
-385	<i>Xba</i> I	5'-T↓CTAGA-3'	C	T
-393	<i>Ssp</i> I	5'-AAT↓ATT-3'	----	ATAT
-403	/	/	G	C
-670	/	/	T	G
-897	<i>Tsp509</i> I	5'-↓AATT-3'	T	A
-948	<i>Tail</i>	5'-A↓CGT-3'	T	G

/;该多态性位点不能形成酶切位点序列;----;碱基缺失。

2.3 -385 位点的 CAPS 标记开发

提取 Lee68 和 Jackson 的 DNA,用 *GmNclI* 基因的特异引物(CAPS-*Xba* I)进行 PCR 扩增,反应结束后,将所得 PCR 产物在 2.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳。采用限制性内切酶 *Xba* I 对 PCR 产物进行酶切,得到-385 位点的酶切分型结果。Lee68 对应的酶切产物仅有 1 条 324 bp 的 DNA 片段,而 Jackson 包含 280 bp 和 40 bp 的 2 个 DNA 片段。将这个具有多态性的酶切扩增序列命名为 CAPS/*Xba* I 标记。利用 CAPS/*Xba* I 标记对另外 8 个供试材料进行分子标记鉴定。结果(图 3)显示,耐盐大豆材料中酶切后条带为 324 bp,而盐敏感大豆材料的酶切后条带为 280 bp 和 40 bp 2 个条带。

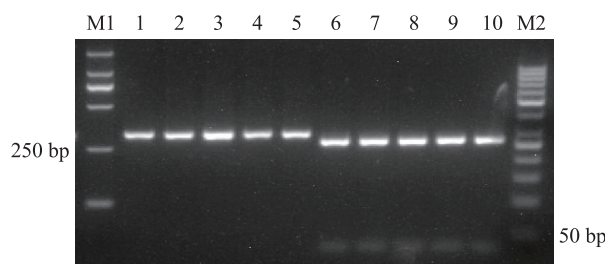
2.4 CAPS 标记验证

图 4 显示,酶切后仅有 324 bp 1 条片段的 PCR

产物的第 30~33 位核苷酸为 ATAT,并且第 45 位核苷酸为 T。酶切后有 280 bp 和 40 bp 2 条片段的 PCR 产物的第 45 位核苷酸为 C。

3 讨论

GmNcl1 基因和 *GmSALT3* 基因均位于 Do 等^[23]定位的一个主效耐盐 QTL 区段内,该 QTL 位于 *SSR03_1335* 与 *SSR_1359* 之间。生物信息学分析结果表明,这 2 个基因均编码 Na^+/H^+ 转运蛋白家族。Guan 等^[15]发现,*GmSALT3* 基因与大豆耐盐性相关,该基因主要在耐盐大豆品种铁峰 8 号的根系中表达,NaCl 处理后,该基因在耐盐大豆材料中大量表



M1:DL 2 000 bp DNA marker;M2: 50 bp DNA ladder;1:铁峰 8 号;2:Lee68;3:BB52;4:大悟六月爆;5:清远小青豆;6:Jackson;7:Williams 82;8:N23674;9:邢阳灰黄豆;10:南农 89-30。

图 3 *CAPS/Xba I* 对不同大豆耐盐特性鉴定结果

Fig.3 The result of *CAPS/Xba I* detection of soybean salt tolerance characteristic

BB52	CTCACAACCTCACAAATTGCCACACTAATATATATATCAGAAAATTCTT	TAGAGTAAAT	55
Jackson	CTCACAACCTCACAAATTGCCACAGTAA-----TATCAGAAAATTCTCT	TAGAGTAAAT	55
Williams 82	CTCACAACCTCACAAATTGCCACAGTAA-----TATCAGAAAATTCTCT	TAGAGTAAAT	55
N23674	CTCACAACCTCACAAATTGCCACACTAA-----TATCAGAAAATTCTCT	TAGAGTAAAT	55
南农89-30	CTCACAACCTCACAAATTGCCACACTAA-----TATCAGAAAATTCTCT	TAGAGTAAAT	55
邢阳灰黄豆	CTCACAACCTCACAAATTGCCACACTAA-----TATCAGAAAATTCTCT	TAGAGTAAAT	55
Lee68	CTCACAACCTCACAAATTGCCACACTAATATATATATCAGAAAATTCTT	TAGAGTAAAT	55
大悟六月爆	CTCACAACCTCACAAATTGCCACACTAATATATATATCAGAAAATTCTT	TAGAGTAAAT	55
清远小青豆	CTCACAACCTCACAAATTGCCACACTAATATATATATCAGAAAATTCTT	TAGAGTAAAT	55
铁峰8号	CTCACAACCTCACAAATTGCCACACTAATATATATATCAGAAAATTCTT	TAGAGTAAAT	55
BB52	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
Jackson	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
Williams 82	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
N23674	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
南农89-30	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
邢阳灰黄豆	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
Lee68	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
大悟六月爆	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
清远小青豆	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
铁峰8号	TAAGAAGCTCACATAAAGAAACAAAGTCTCATCGTCAAGCCAAATCATCTGAAGAAA		110
BB52	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
Jackson	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
Williams 82	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
N23674	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
南农89-30	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
邢阳灰黄豆	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
Lee68	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
大悟六月爆	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
清远小青豆	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
铁峰8号	AGCATTGAGGTAGTCGTTAGCTGTTTTACGCAACTGATTATTCATCACTCAGATT		165
BB52	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
Jackson	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
Williams 82	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
N23674	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
南农89-30	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
邢阳灰黄豆	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
Lee68	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
大悟六月爆	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
清远小青豆	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220
铁峰8号	TCAACCGACACTTTAATTTGATAAGAAGTTCATATATAAATTAAGAAACCCACAA		220

图 4 测序结果比对

Fig.4 Results of nucleotide sequence blast

达,在盐敏感大豆材料中不表达。*GmSALT3* 基因可能在 Na^+ 向地上部的运输中发挥作用,但是并不直接控制盐分向地上部的运输。赫卫等^[17]发现,盐胁迫下 *GmNcl1* 基因诱导表达上调,表明该基因也与大豆的耐盐性相关。盐胁迫处理 4 种不同耐盐特性的大豆后,*GmNcl1* 表达量均显著上调,而且盐敏感品种上调倍数高于耐盐品种^[18]。基因的表达受上游相关转录因子的调控,而转录因子对基因的调控是通过与启动子区的顺式作用元件共同作用完成的^[24]。因此,分析启动子区的顺式作用元件有助于了解基因的表达调控机制。本研究发现,具有不同耐盐特性的大豆 *GmNcl1* 基因启动子区域内顺式作用元件的类型和数目并无差别,说明不同材料 *GmNcl1* 基因表达模式的差异并不是由于启动子区域差异所造成的。

传统耐盐性鉴定必须严格控制处理条件,并经过反复的表型鉴定才能获得准确的耐盐种质,需要投入大量的人力物力,而且鉴定结果的准确性低。采用分子标记技术分析大豆耐盐特性,不易受外界环境和生长时期等因素的限制,能直接准确地鉴定出耐盐特性^[25]。大豆耐盐分子育种工作已经开展了一段时间,但是利用分子标记辅助选择育种的研究进展缓慢。这主要是因为标记与目的基因间的距离较远,在标记辅助育种过程中易发生分离,影响分子标记辅助选择的效率。在候选基因区段内进行序列多样性分析,开发基于候选基因的功能标记,可以对遗传多样性和遗传距离进行相对准确地估计,提高分子标记辅助选择和分子设计育种的效率。耐盐相关基因 *GmNcl1* 在不同耐盐特性的大豆材料中存在不同的单倍型 GAGATATTC(耐)/TTT----CT(敏)序列^[17]。

为了更加高效地筛选和鉴定耐盐大豆品种,本研究将 *GmNcl1* 基因的多态位点开发成 CAPS 标记。CAPS 标记是特异引物 PCR 扩增产物与限制性内切酶相结合而产生的一种 DNA 分子标记,是针对目标基因本身开发的标记,它揭示了特异 PCR 产物 DNA 序列上限制性酶切位点的变异信息。CAPS 标记技术具有多态性高,共显性,所需 DNA 量少,操作简便,结果稳定可靠等优点^[26]。本研究所开发的 CAPS/*Xba* I 分子标记能有效鉴定大豆的耐盐特性。值得注意的是,本研究只对有限的大豆材料进行鉴定,而耐盐性是一个复杂的数量性状,由多个基因甚

至基因网络控制,该基因或许并不能完全解释表型变异,所以下一步还需要选取更具代表性的材料对本研究中所开发的分子标记进行验证。

参考文献:

- [1] PRRIDA A K, DAS A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60(3): 324-349.
- [2] 王楠,赵士振,吕孟华,等. 大豆耐盐相关 QTLs 鉴定和功能基因研究进展[J]. *遗传*, 2016, 38(11): 992-1003.
- [3] PAPIERNIK S K, LINDSTROM M J, SCHUMACHER J A, et al. Variation in soil properties and crop yield across an eroded prairie landscape[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2005, 60(6): 388-395.
- [4] 邵桂花,常汝镇,陈一舞. 大豆耐盐性研究进展[J]. *大豆科学*, 1993(3): 244-248.
- [5] 张彦威,张礼凤,李伟,等. 大豆发芽期和苗期耐盐性的隶属函数分析[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(1): 21-25.
- [6] 郭宝生,翁跃进. 大豆耐盐机理及相关基因分子标记[J]. *植物学报*, 2004, 21(1): 113-120.
- [7] 郭蓓,邱丽娟,邵桂花,等. 大豆耐盐基因的 PCR 标记[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(1): 10-16.
- [8] 郭蓓,邱丽娟,邵桂花,等. 大豆耐盐性种质的分子标记辅助鉴定及其利用研究[J]. *大豆科学*, 2002, 21(1): 56-61.
- [9] 田蕾. 大豆耐盐基因定位及耐盐种质资源分子标记选择效率分析[D]. 北京:中国农业科学院, 2008.
- [10] HAMWIEH A, TUYEN D D, CONG H, et al. Identification and validation of a major QTL for salt tolerance in soybean[J]. *Euphytica*, 2011, 179(3): 451-459.
- [11] XU D, DO D T. Genetic studies on saline and sodic tolerances in soybean[J]. *Breeding Science*, 2012, 61(5): 559-565.
- [12] LI W Y, WONG F L, TSAI S N, et al. Tonoplast-located *Gm-CLC1* and *GmNHX1* from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells[J]. *Plant Cell & Environment*, 2006, 29(6): 1122-1137.
- [13] CHEN H, CHEN X, GU H, et al. *GmHKT1;4*, a novel soybean gene regulating Na^+/K^+ ratio in roots enhances salt tolerance in transgenic plants[J]. *Plant Growth Regulation*, 2014, 73(3): 299-308.
- [14] NIE W X, XU L, YU B J. A putative soybean *GmsSOS1* confers enhanced salt tolerance to transgenic *Arabidopsis sos1-1* mutant[J]. *Protoplasma*, 2015, 252(1): 127-134.
- [15] GUAN R, QU Y, GUO Y, et al. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in *GmSALT3*[J]. *The Plant Journal*, 2014, 80(6): 937-950.
- [16] HALL D, EVANS A R, NEWBURY H J, et al. Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(5): 1201-1210.
- [17] 赫卫,刘林,关荣霞,等. 大豆耐盐相关基因 *GmNcl1* 的序

- 列单倍型及表达分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(3): 411-421.
- [18] 宁丽华, 张大勇, 刘 佳, 等. 盐胁迫下苗期栽培大豆生理响应及 Na^+ 动态平衡关键基因的表达[J]. 中国农业科学, 2016, 49(24): 4714-4725.
- [19] 罗庆云, 於丙军, 刘友良. 大豆苗期耐盐性鉴定指标的检验[J]. 大豆科学, 2001, 20(3): 177-182.
- [20] 於丙军. 一年生盐生野大豆 BB52 苗期耐盐机理的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2001.
- [21] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1): 297-300.
- [22] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.
- [23] DO T D, CHEN H, HIEN V T T, et al. *Ncl* synchronously regulates Na^+ , K^+ , and Cl^- in soybean and greatly increases the grain yield in saline field conditions[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 19147.
- [24] 李濯雪, 陈信波. 植物诱导型启动子及相关顺式作用元件研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 8-15.
- [25] 方宣钧. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [26] 邢延豪, 周延清, 楚素霞, 等. CAPS 标记技术及其应用进展[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 74-76.

(责任编辑: 王 妮)