

大豆种子连续取样技术及基因型鉴定研究

袁继臣

曹县种子公司 山东 菏泽 274400

DOI:10.12238/etd.v3i4.5282

摘要:大豆在一年生草本植物中是最理想的优质植物蛋白,因在世界上需求量较大,可以称之为最重要的豆类植物,对人体生长发育和健康具有重要作用,其主要产于中国东北,现在在很多地区都会生产。基因分型是促进大豆量产的重要手段,它可以将大豆基因功能中的遗传和分子进行分析标记,进而辅助大豆育种。高效快捷的连续取样技术和基因型鉴定技术能有效降低大豆种子鉴定的时间成本,将种植成本有效控制合理范围内,显著提高大豆种子种植养效率。本次探究微型电钻同空气泵联合设计的连续取样设备对大豆种子可以实现无损连续提取,并能优化大豆DNA提取技术及鉴定技术。此方法同样适用于水稻等作物。

关键词:大豆种子;连续取样;基因型鉴定;取样技术

中图分类号: TQ91 **文献标识码:** A

Study on Continuous Sampling Technology and Genotype Identification of Soybean Seeds

Jichen Yuan

Caoxian Seed Company Shandong Heze 274400

Abstract: Soybean is the most ideal high-quality plant protein among annual herbs. It can be called the most important legume because of its large demand in the world. It plays an important role in human growth, development and health. It is mainly produced in northeast China and now it will be produced in many areas. Genotyping is an important means to promote soybean mass production. It can analyze and mark the genetics and molecules in soybean gene function, and then assist soybean breeding. Efficient and fast continuous sampling technology and genotype identification technology can effectively reduce the time cost of soybean seed identification, effectively control the planting cost within a reasonable range, and significantly improve the efficiency of soybean seed planting and breeding. The continuous sampling equipment jointly designed by micro electric drill and air pump can realize nondestructive continuous extraction of soybean seeds, and optimize soybean DNA extraction technology and identification technology. This method is also applicable to rice and other crops.

Keywords: Soybean seed; Continuous sampling; Genotype identification; Sampling technique

通过专家以及研究人员的多次试验,大豆基因组测序工作进展迅速,大豆基因学同样有了很大的进步与成就。通过先进的科学技术已经能实现大豆农艺性状核心基因的克隆,实现大豆核心位点的有效鉴定。这项技术不仅为大豆提供了优质基因序列,还确保了大豆育种材料、大豆自然群体中的有效鉴定和发掘,这对大豆分子育种具有里程碑一样的意义,对后期进行大豆分子育种奠定坚实的基础。季节是大豆种植需要考虑的重要制约因素,通常每年完成一季种植。实际上经研发可以在南繁加代中实现大豆繁殖2代的效果,但是经试验发现,2代繁殖效果不符合发掘大豆优良基因的需求。若想推进大豆种子育种工作的有效发展,必须完成大豆基因型鉴定方法的构建和完善。

现代农业中种子的基因型是由大样本评估鉴定的,包括农作物的种子基因纯度、农作物的分子育种、农作物种子基因序列等。随后,有专家研究出使用手术刀和剃须刀对种子样品进行收集的方法,但通过实践经验我们发现,上述两种方式都无法将样品收集效率提到最高。此后,有学者发明了

适合提取大体积种子样品的钻孔法,但还是无法进行连续提取,对整体的效率有所影响。此次研究利用微型电钻、空气泵、移液枪头等设备,建立了一种可以简便、快速、无损的进行大豆种子提取的技术。

1 提取对象

此次研究对象选取大豆基因系与其建立的F₂代遗传体和衍生群体^[1]。

2 提取设备

电钻(钻头最大直径10mm,芝加哥cp85288,美国)、稳定气压空气压缩机(奥突斯4x1500W-160L,杭州洪正机电设备有限公司)、离心机(LW250,浙江金华)、回旋式振荡器(TRS600,上海)、PCR仪(X960,上海力新仪器有限公司)、水浴锅(HH-501S,上海赫田科学仪器有限公司)、聚丙烯384透明白底深孔方形微孔板以及普通5ml移液器吸头。

3 试剂

CTAB溶液(十六烷基三甲基溴化铵、北京中科瑞泰生物科技有限公司),配比计量为1.5%十六烷基三甲基溴化铵、

1.4mol/L NaCl、100mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、20 mmol · L⁻¹ EDTA (4 mL 0.5 mol Stock · (100 mL) - 1)、1% PVP-40和CIA溶液（在氯仿中加入1/24异戊醇）^[2]。

4 技术流程

4.1 取样流程

首先将深孔方形微孔板上高层裹上锡纸，以免样品交叉污染，然后对其缓缓施加压力，直至原有的微型孔出现。之后将微型电钻固定在试验台上，左手和右手拿的分别是5ml移液枪头、种子，两只手需要灵活操作和配合，要注意种胚对准钻头，不要使种胚其他部分受到损坏。钻速为180-200转/min，直至钻头触碰到种子胚乳，将移液枪头粗端经左手移到钻头下，收集5.85-9.75mg的大豆胚乳组织至枪头管内^[3]。操作完成后，用移液枪头捅破锡箔纸，将收集的样品转移到深孔板内。使用胶带将收集完成的一排封层，以免接下来的取样过程交叉污染。重复上述步骤，直至全部取样完成，注意每次取样完成后对仪器的清洗。全部取样完成后，对其进行低速离心^[4]。

4.2 DNA 提取

揭开锡纸，每个孔内滴加85 μL CTAB溶液，并进行低速离心操作，保证植物样品、溶液存在于试管底部，并覆盖锡箔封板膜。将其放置于每分钟六十转的摇床中，进行60℃的水浴加热30min，完成后将其放入60℃可以进行水平震荡的恒温箱中，进行低速1.5h震荡。完成震荡后取出将其冷却至室温后，将75 μL CIA滴入，将其置于水床上，室温下摇2h，离心45min。

利用8/12连枪去50 μL上清液到384深孔板中，在其中滴入30 μL异丙酮；进行1h的离心，倒置离心数秒，随后加入10 μL 70%无水乙醇；倒置离心数秒，之后在室温环境下静置5-10min，具体时间按样品晾干程度记录；加入50 μL的含RNase的TE溶液，使DNA充分溶解^[5]。

5 具体应用

此次研究连续获取大豆种子的样品以及基因，涉及的设备简单、常见，操作较为便捷，同时不会阻碍植物的发育。提取的种子不需要进行粉碎，就可直接对其进行DNA提取与基因型的鉴定。与现在常用的钻孔法相比较，可以大大提高钻取率^[6]。

使用图位克隆分离法进行生育期基因E1分离时，要在很多以及不同的样品基数中选出遗传重组个体。如果在种子时期对大豆的基因型做检测，可以大大提高田间种植的效率。基于上述理论，用CTAB检测13497粒左右的种子样品，并获取了13416粒种子的基因型和10个遗传重组体。

6 种子钻孔法提取 DNA 的应用

选取的种子品种为荷豆12和Williams 82，种子钻孔法提取母本为荷豆12、父本为Williams 82的28粒杂交种子的DNA。MOL0051分子标记230bp的扩增片端，DNA为模板为Williams 82DNA，经观察扩增片段小于230 bp的是荷豆12，可发现荷豆12与Williams 82之间具有多态性^[7]。PCR检测结果显示，在

28粒杂交种子中，有26粒杂交种子与荷豆12产生相同2条带，与Williams 82同样产生相同的2条带，剩余2粒只与母体荷豆12产生相同的条带。据此可得知，28粒杂交种子中真正的杂交种有26粒，表明杂交不成功。

种植时有钻孔的种子，可以及时鉴定并发现种子是否存在假阳性，在F1和F2代群体中仅表现出荷豆12的表型；在F2代群体表现性状分离为真正的大杂交种子，这就表明提取DNA时采用种子钻孔技术，能高效鉴定杂交种子的真伪^[8]。

7 基因型分析

基因分型通过DNA序列生物学试验检查个体来实现的，检查是将目标DNA序列与另外个体DNA序列进行有效比较，最终确定个体的遗传是够能构成差异。基因分型能促进遗传图谱的构建、图位克隆、辅助育种、分子标记等工作的开展。如果是基因型没有事先做好鉴定，就会需要更多的种植材料，会在很大程度上增加工作内容和工作时间。使用在目标区域极其接近的2个分子标记筛选分离群体的种子，之后通过种植重发种子，将重组个体的表型进行重新鉴定，最后根据鉴定结果，精准提高基因定位的速度，人力、物力和财力方面都会得到提高，并且可以加快实验完成的速度。

基因型和种子活力有着很大的关系，种子活力是具备遗传功能的，这也就表明种子活力是可以在子代中进行表现。从常规的理论讲，如果大豆种子的籽粒越大，其发生裂变的几率也就越大，所以小粒种的活力更高。种子活力会受到很多因素的影响，比如种子发育条件、采收、运输、储存等多种因素。

8 注意事项

（1）在钻孔时要注意静电现象的发生，对组织取样和转移带来一定的影响。静电出现时，可以将更换钻头或者将静电转移到其他金属上。

（2）为了减少样品污染率，种皮组织不可以加入样本中；种子取样后，清洁时采用空气泵，利用气流完成对钻头、移液枪、手套的无接触清洁，以确保不会存在种子残留组织。

（3）提取DNA时利用不含蛋白酶提取液，例如使用CTAB等，因为需要提取的样品数量非常多，检测液中若存在蛋白酶，会对降低样品的转移效率，进而导致部分样品鉴定失败。可以通过少量提取DNA组织来避免这种情况。

（4）按顺序摆放钻取的种子，可以在基因鉴定时快速按需找到样品。

（5）针对不同大小尺寸的种子，要精准合理地选择合适的钻头直径、钻孔深度以及合理转速。通过具体目的分析，合理运用不同的DNA提取技术、基因鉴定技术。

结语

从当前研究来看，大豆功能因子和浓缩蛋白通过同一技术就可以实现提取生产并被实际应用。该项技术在大豆连续提取技术中占据前列，据相关专业研究人员介绍，该技术中的超声波可以击破种子细胞核膜，加入多种溶剂后进行萃取实现膜分离，所用的设备先进，在该领域中名列前茅^[9-10]。

目前已经有很多从大豆中提取基因组DNA的研究,其中多数还是通过对比采样对象和对比提取方法来比较的。大豆种子中物质成分丰富,例如脂类、酚类等,这些物质对进行高质量DNA提取造成一定的影响,传统意义上对于大豆种子的提取,步骤繁,需要消耗巨大的财力,对种子取样后,种子无法进行后续的生长发育。本次研究采用对种子钻孔,快速、简便地对大豆种子进行取样,并且不会干预种子的发育,并且可以达到分子标记的扩增要求,实验成功率高。

种子钻孔法在DNA提取中存在一定缺点,因为大豆种子富含蛋白质,这就导致碱裂解法不能有效清除种子内的杂质,与CTAB法相比,提取的种子DNA纯度略低^[11]。基于这种现象的存在,这种方法只能进行实验室常规PCR基因型的鉴定,适用范围具有限制性。高质量DNA实验要通过种子DNA纯化才能完成。大豆种子的组成比较特殊,种皮和胚分别来源于母本和父本母本结合,因种皮基因型与母本一致,所以在研究分离群体或选择群体中个体基因型时,必须用砂纸磨掉一块种皮后再钻孔取样,这样钻孔得到的胚能避免种皮母体DNA的污染。不同试验不同处理,若母体DNA不影响后期实验,可不用摩擦去除种皮。需要注意的是,样品材料不要选择很多,防止受碱裂解的影响,影响下一步的PCR扩增。

参考文献:

- [1] 夏正俊,李玉卓,朱金龙,等.快速、无损大豆种子连续取样技术及其DNA制备[J].植物学报,2021,56(1):56-61.
- [2] 王荣繁,杨存义.大豆种子耐储藏的生物学机制研究进展[J].中国油料作物学报,2020,42(5):911-919.
- [3] 安正中.大豆种子生产技术研究进展[J].现代农业,2020(6):30-31.
- [4] 杨少辉,张丽娟,段会军,等.大豆种子DNA的提取方法[J].大豆科学,2003,22(2):151-153.
- [5] LI CHANGCHUN, MA CHUNYAN, CUI YINGQI, et al. UAV Hyperspectral Remote Sensing Estimation of Soybean Yield Based on Physiological and Ecological Parameter and Meteorological Factor in China[J]. Journal of the Indian Society of Remote Sensing,2020,49(4):873-886.
- [6] A comparative study of human IgE binding to proteins of a genetically modified (GM) soybean and six non-GM soybeans grown in multiple locations.
- [7] MUHAMMAD IKRAM.大豆驯化与改良过程中种子大小与形态性状QTNs及其候选基因的研究[D].湖北:华中农业大学,2020.
- [8] 张井勇.大豆细胞质雄性不育"三系"异交率相关性状及其异交率鉴定方法的研究[D].黑龙江:东北农业大学,2018.
- [9] 曾旋睿.大豆品质改良相关基因GmAGL1, GmDof11和GmDof4的遗传转化研究[D].江苏:南京农业大学,2017.
- [10] 裴友财.大豆EMS诱变群体M2代主要品质性状遗传分析及脂肪酸脱氢酶FAD2相关SNP标记的开发[D].吉林:吉林农业大学,2018.
- [11] 张伟,闫晓艳,杨继余,等.不同基因型大豆产量对氮磷钾肥的响应鉴定研究[C]//第25届全国大豆科研生产研讨会论文集.2015:94-94.