



耐盐转基因大豆事件 FA8015 旁侧序列分离及定性 PCR 检测

马 阔^{1,2}, 仲晓芳², 牛 陆², 赵倩倩², 杨向东²

(1. 吉林师范大学 生命科学学院, 吉林 四平 136000; 2. 吉林省农业科学院 农业生物技术研究/吉林省农业生物技术重点实验室, 吉林 长春 130033)

摘 要:本研究前期利用转基因技术, 将菠菜 (*Atriplex hortensis*) 甜菜碱醛脱氢酶编码基因 *AhBADH* 导入栽培大豆 Williams 82 中, 获得耐盐性较强的转基因大豆事件 FA8015。为进一步加快该转基因事件生物安全评价, 本研究分离了 FA8015 外源 T-DNA 旁侧序列, 并依据其序列特征, 建立事件特异性检测方法。Southern 杂交结果表明, 转基因事件 FA8015 外源 T-DNA 为单拷贝插入。利用基因组重测序技术, 获得转基因大豆事件 FA8015 的基因组信息, 并与参考基因组 Williams 82 做比较, 初步确定转基因大豆事件 FA8015 外源 T-DNA 片段整合位点。然后根据整合位点, 设计融合大豆基因组和 T-DNA 序列的引物, 获得了 1 160 bp 的左边界旁侧序列, 包括 405 bp 的大豆基因组序列和 750 bp 的 T-DNA 序列; 右边界获得了 1 254 bp 的旁侧序列, 其中 601 bp 为 T-DNA 片段, 653 bp 为大豆基因组序列; 序列分析证明转基因事件 FA8015 的 T-DNA 整合位点为 Chr15 染色体的 25129882 位点, 整合方式为正向单拷贝插入, 与 Southern 杂交和重测序结果一致。依据 PCR 结果设计事件特异性引物, 建立了转基因大豆事件 FA8015 转化体特异性检测方法。该方法特异性强、灵敏度高, 可快速识别该转基因大豆事件的身份, 为该转化事件及其衍生品的安全性和监管提供技术支撑。

关键词:大豆; 耐盐; 转基因事件; 重测序; 旁侧序列; 定性 PCR 检测; 耐盐

Flanking Sequence Isolation of Salt-Tolerant Transgenic Event FA8015 of Soybean and Quantitative PCR Test

MA Kuo^{1,2}, ZHONG Xiao-fang², NIU Lu², ZHAO Qian-qian², YANG Xiang-dong²

(1. School of Life Science, Jilin Normal University, Siping 136000, China; 2. Agro-Biotechnology Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences / Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun 130033, China)

Abstract: In our previous study, we introduced the betaine-aldehyde dehydrogenase encoding gene *AhBADH* from *Atriplex hortensis* into the soybean cultivar Williams 82 to generate the salt-tolerant transgenic event FA8015. To advance safety assessment of the transgenic event, in this study, we further analyzed the flanking sequences of the foreign T-DNA insertion and established an event-specific detection method based on these flanking sequences. Southern blot analysis confirmed the single-copy insertion of the T-DNA in the genome of the transgenic event FA8015. Genome re-sequencing method was used to obtain the genomic sequences of transgenic event FA8015. The integration site of T-DNA in FA8015 was preliminary determined compared with Williams 82 genome information. Then the primers were designed according to the flanking sequences of integration site for PCR amplification. After sequencing these fragments, a 1 160 bp fragment was amplified from left border of T-DNA, including 405 bp fragment from soybean genome and 750 bp sequence from T-DNA, and a 1 254 bp product was obtained from right border with 601 bp T-DNA fragment and 653 bp soybean genome sequence. These results indicated that one copy of T-DNA in FA8015 was integrated into soybean genome at 2512882 on Chr15 in accord with Southern blot and genome re-sequencing. Event-specific primers were designed base on fragment sequencing and then event-specific PCR was constructed. This method could identify this transgenic event quickly and specifically. And it also provided support for the safety and supervision of the transgenic event FA8015 and its derivatives.

Keywords: Soybean; Salt tolerance; Transgenic event; Re-sequencing; Flanking sequence; Qualitative PCR detection

土壤盐碱化是影响我国农作物生产的重要因素之一。目前我国盐碱地分布总面积已达 9 914 万 hm^2 , 居世界第三位^[1]。研究表明, 植物的耐盐性是受多

基因控制的复合遗传性状, 渗透调节能力是植物耐盐性的重要特点之一^[2]。当植物受到外界盐胁迫时, 在细胞中会积累一定数量的可溶性有机物质,

收稿日期: 2018-07-18

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项 (2016ZX08004-004); 吉林省农业科学院创新工程项目 (c6215000220, c7208000307)。

第一作者简介: 马阔 (1993 -), 男, 硕士, 主要从事大豆生物技术育种研究。E-mail: 448586253@qq.com。

通讯作者: 杨向东 (1976 -), 男, 博士, 研究员, 主要从事大豆生物技术育种研究。E-mail: xdyang020918@126.com。

如脯氨酸、甜菜碱、醇类等,作为渗透调节剂进行渗透调节,以适应外界的低水势,其中的甜菜碱合成涉及到两类酶,即胆碱单氧化酶(choline monooxygenase, CMO)和甜菜碱醛脱氢酶(betaine-aldehyde dehydrogenase, BADH),其中 BADH 是该合成途径中的关键酶^[2-3]。1995 年,肖岗等^[4]从耐盐性较强的山菠菜(*Atriplex hortensis*)中克隆了 BADH 基因,到目前为止,已从多种植物中分离获得 BADH 基因,并已广泛应用于植物耐盐基因工程研究^[4-8]。转基因事件 FA8105 即为通过农杆菌介导方法将山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因(*AhBADH*)转入到大豆中获得的耐盐品系。连续 3 代耐盐性分析表明,转基因事件在 1.5% NaCl 处理条件下能够正常萌发和开花结实,具有较强的芽期和苗期耐盐性,该转基因事件现已经进入申请环境释放阶段(申请号:农基安办字 2016-F122)。

为了保障转基因产品标签制度的实施以及消费者知情权和选择权,国家出台了严格的转基因产品检测分析方法及其标准化规程来保障。外源基因的整合位点,不仅对该基因的转录、表达以及调控有重要影响,而且对该作物的遗传稳定性和安全性也具有重要意义。由于每一个转基因生物品系都具有特异的外源插入载体与植物基因组的连接区序列,基于 T-DNA 整合位点旁侧序列的分离而建立的品系特异性检测方法具有非常高的特异性和准确性。全基因组重测序是在已知某物种基因组序列的基础上,对该物种不同个体的整个基因组序列进行测序,差异性分析个体或群体^[9],进而得到全部的遗传信息,并精确、全面的分析每个碱基序列。基于以上原理,本研究利用重测序技术和 PCR 检测相结合的方法,测定出转基因大豆 FA8015 中 T-DNA 的拷贝数和 DNA 整合位点的旁侧序列,并建立该事件特异性 PCR 检测方法,为该转基因大豆育种及监管提供必需的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

植物表达载体以 pCambia3300 为骨架,目的基因 *AhBADH* 和筛选标记基因 *bar* 均由 *CaMV 35S* 启动子驱动。转基因事件 FA8015 由本课题组培育并保存^[10]。栽培大豆品种 Williams 82、沈农 9 号、吉育 47 和吉育 72 由吉林省农业科学院大豆研究所提供,粳稻品种吉粳 88 号由吉林省农业科学院水稻所提供,鲁棉研 15 号为市售转基因抗虫棉花。

1.2 DNA 提取

大豆及水稻和棉花种子播种于盆钵中,待单叶

完全张开取约 100 mg 叶片,经液氮研磨后采用高盐 CTAB 法提取总 DNA^[11]。利用 Nanodrop 紫外分光光度计(Thermo Scientific, USA)测定 DNA 浓度和纯度,1% 琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 完整性。转基因事件植株 FA8015 的根、茎、叶、花和种子 DNA 均采用此方法。

1.3 Southern 杂交检测

提取转基因事件 FA8015 叶片基因组 DNA,用 Roche 公司 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒进行 Southern 杂交检测。具体方法参考试剂盒说明书。根据插入序列内部的特异性酶切位点(含 *Sac* I 和 *Hind* III 位点),分别用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Hind* III 单酶切基因组总 DNA(50 μg)。酶切混合液用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后,在高盐(20 × SSC)条件下转移至带正电荷的 Hybond TM-N + 尼龙膜上。根据 *AhBADH* 基因序列设计引物,扩增探针(引物为 FA-F1: 5'-GGCATCTGTGACTTGTCTAGAATTCGG-3', FA-R1: 5'-TCAAGGAGACTTGTACCATCCCCATG-3')。探针长度为 937 bp,利用 DIG 随机引物标记法标记探针。杂交温度 42℃;洗膜条件为 2 × SSC[含 0.1% SDS(sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠)],室温下洗膜 2 次,每次 5 min;0.5 × SSC(含 0.1% SDS),66℃ 条件下洗膜 2 次,每次 15 min。然后于室温下用 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐)/NBT(nitroblue tetrazolium chloride, 氯化硝基四氮唑兰)进行显色,直至出现清晰条带。

1.4 基因组重测序

委托北京百迈客生物科技有限公司对转基因事件 FA8015 进行重测序分析。将检测合格的样品基因组 DNA 用超声波片段化,然后对片段化的 DNA 进行纯化、末端修复、3'端加 A、连接测序接头,再用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择,进行 PCR 扩增形成测序文库。质检合格的文库采用二代高通量测序 Xten 平台进行测序。对测序得到原始短序列进行质量评估(Q20 和 Q30),获得过滤短序列(Clean Reads)。然后将 Clean Reads 与参考基因组序列(Wm82. a2. v1 http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Gmax)进行比对。通过比对定位 Clean Reads 在参考基因组上的位置,统计样品的测序深度、基因组覆盖度等信息。

将转基因大豆 FA8015 重测序数据分别比对到参考基因组和外源 T-DNA 序列,根据比对结果找出下列两类末端匹配短序列:第一类为一端短序列比对上参考基因组序列,另一端短序列比对上 T-DNA

序列;第二类为两端中任何一端短序列一部分序列比对上参考基因组序列,另一部分比对上 T-DNA 序列。采用 bwa 软件比对参考基因组,选取能比对上外源 T-DNA 序列的全部短序列,进行局部组装。根据组装的基序使用 blastn 分别比对外源 T-DNA 序列和参考基因组结果,选取基序比对到染色体的区域,并对这些区域的比对结果进行 IGV 软件截图验证,获得外源插入片段整合位置信息。

1.5 旁侧序列 PCR 验证

根据 1.4 序列分析结果,初步获得转基因事件 FA8015 外源 T-DNA 整合位点及其左、右侧旁侧序列,设计 PCR 检测引物 FA8015LB-F/FA8015LB-R, FA8015RB-F/FA8015RB-R(表 1),使扩增产物包含部分大豆基因组序列和 T-DNA 片段。以 FA8015 基因组 DNA 为模板,利用上述引物分别进行 PCR 扩增。PCR 反应在 25 μ L 体系中进行:2 \times PCR Mix (AS111, TransGen Biotech, 北京),1 μ L 正向/反向引物(10 μ m \cdot L⁻¹),100 ng 基因组 DNA。反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 3 min,35 个循环,72℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上检测,然后委托生工生物工程(上海)有限公司测序(<http://www.sangon.com/>),测序所得序列与外源 T-DNA 和参考基因组序列比对,最终获得转基因大豆事件 FA8015 外源 T-DNA 片段左边界和右边界旁侧序列。

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

引物 Primer	序列 Sequence	目的片段长度 Target fragment length/bp
FA8015LB-F	5'-TTTGTCACTCCACCCATACCTGG-3'	1160
FA8015LB-R	5'-CACCATCGTCAACCACTACATCG-3'	
FA8015RB-F	5'-TTTACGGCGAGTCTCTGTTAGGTC-3'	1254
FA8015RB-R	5'-TCATACACACACCCTCATCACAC-3'	
FA8015LB-SF	5'-TAGATGGTCCCGTATGTCGTCC-3'	403
FA8015LB-SR	5'-TGCCCGTCACCGAGATTGA-3'	
FA8015RB-SF	5'-GCTGGCGTAATAGCGAAGAG-3'	339
FA8015RB-SR	5'-TGGAGACCAATGCGAAATGC-3'	

1.6 特异性 PCR 检测

根据 PCR 检测结果设计特异性引物,PCR 产物融合一部分大豆基因组序列和一部分 T-DNA 序列。分别提取转基因大豆植株 FA8015 的根、茎、叶、花

和种子 DNA,以 JY47、JY72、栽培大豆、水稻(非转基因水稻吉梗 88 号)、棉花(鲁棉研 15 号)的基因组 DNA 为对照,其中栽培大豆 DNA 为吉育 47、吉育 72 和沈农 9 号混合 DNA,以左右边界特异性引物进行 PCR 扩增 FA8015LB-SF/SR、FA8015RB-SF/SR(表 1)。PCR 反应体系同 1.5,反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环,72℃ 延伸 5 min。扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶检测。

2 结果与分析

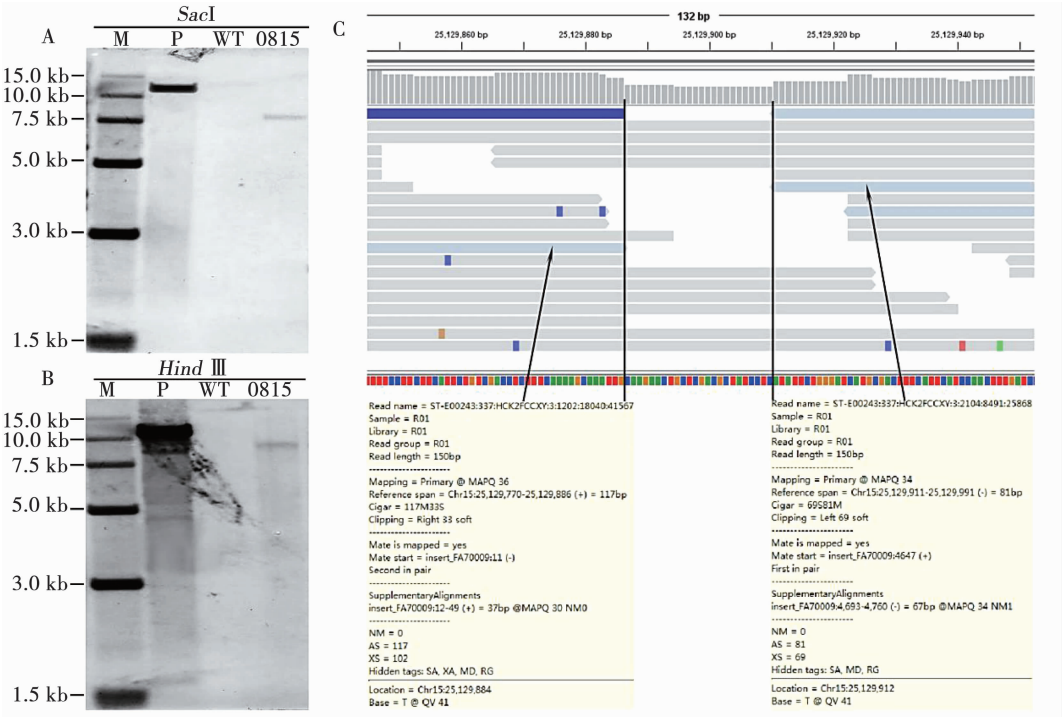
2.1 Southern 杂交检测及基因组 DNA 重测序

以 *AhBADH* 基因片段为探针检测 T₄ 代转基因大豆事件 FA8015 的拷贝数,Southern 杂交结果显示:转基因事件 FA8015 中,只检测到 1 个条带,野生型大豆则没有杂交条带出现,表明外源 T-DNA 以单拷贝形式整合到大豆基因组中(图 1A 和 B)。

将该转基因事件进行重测序,获得了 13.45 Gbp 的 Clean Data,Q30 达到 90.45%。样品与参考基因组平均比对率为 99.43%,平均覆盖深度为 12 \times ,基因组覆盖度为 99.23%(至少 1 个碱基覆盖)。将转基因大豆 FA8015 重测序数据分别与参考基因组 Williams 82 序列和外源 T-DNA 序列进行比对,选取能比对上外源 T-DNA 序列的全部短序列,进行局部组装。根据组装的基序使用 blastn 分别比对外源 T-DNA 序列和参考基因组结果,选取基序比对到染色体的区域,并对这些区域的进行 IGV 截图验证(图 1C),获得了外源 T-DNA 片段整合位置信息。分析结果表明,转基因大豆 FA8015 外源片段整合位点为 Chr15 号染色体 25129882 位点,整合方式为单拷贝正向插入。

2.2 左边界旁侧序列 PCR 验证

根据测序分析获得的转基因大豆 FA8015 左边界旁侧序列信息,设计特异性引物进行 PCR 扩增,扩增产物融合一段大豆基因组序列和 T-DNA 片段。结果显示:扩增产物只在转基因大豆 FA8015 中出现,而阳性质粒和野生型 Williams 82 中没有条带(图 2A)。将所得片段进行测序,经分析表明,FA8015 左边界旁侧序列共 1 160 bp,其中 1~405 bp 为大豆基因组序列(Chr15 号染色体 25129482-25129882 bp),406~1 160 bp 为 T-DNA 片段;由于 T-DNA 的插入,导致大豆基因序列发生了 28 bp (Chr15 号染色体 25129883-25129910) 缺失(图 2B)。

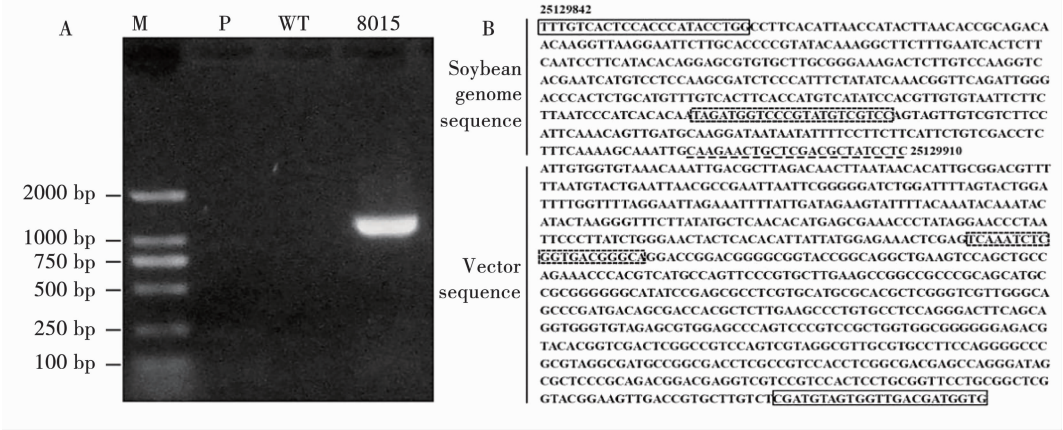


A 和 B 分别为将基因组 DNA 使用 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切后进行的 Southern 杂交检测。M; 15 kb DNA Marker; P; 阳性质粒; WT; 野生型 Williams 82; 8015; 转基因事件 FA8015。C 为 T-DNA 序列整合位点 IGV 的截图验证; 箭头: T-DNA 整合位点上游和下游大豆基因组序列信息; 竖线: T-DNA。

A and B; Southern blot analysis of transgenic event FA8015 with genomic DNA digested by *Sac* I and *Hind* III, respectively. M; 15 kb DNA Marker; P; Positive plasmid; WT; Wild-type Williams 82; 8015; Transgenic event FA8015; C; Arrows, Up- and down-stream of flanking sequences of T-DNA integration site; Long strings; T-DNA.

图 1 转基因事件 FA8015 Southern 杂交检测和 T-DNA 序列整合位点 IGV 截图验证

Fig. 1 Southern blot of transgenic event FA8015 and screenshot verification of inserted T-DNA by IGV



A; 左边界旁侧序列 PCR 扩增; M; 2 kb DNA Marker; P; 阳性质粒; WT; 野生型 Williams 82; 8015; 转基因大豆 FA8015。B; 左边界旁侧序列分析; 实线方框: 引物 FA8015LB-F/R 结合位点; 虚线方框: 引物 FA8015LB-SF/SR 结合位点; 下划线: 缺失的碱基。下同。

A; PCR amplification of left flanking sequence; M; 2 kb DNA Marker; P; Positive plasmid; WT; Wild-type Williams 82; 8015; Transgenic event FA8015. B; Sequence analysis of left flanking sequence; Solid line box; Primer binding sites of FA8015LB-F/R; Dotted box; Primer binding sites of FA8015LB-SF/SR; Dotted line; Deleted bases. The same below.

图 2 转基因事件 FA8015 左边界旁侧序列 PCR 验证

Fig. 2 PCR amplification of left flanking sequence of transgenic event FA8015

2.3 右边界旁侧序列 PCR 验证

根据 FA8015 右边界旁侧序列, 设计一对特异性引物, 扩增产物融合了大豆基因组序列和 T-DNA

片段, 该片段只在转基因大豆 FA8015 中存在, 而对对照材料中均没有扩增 (图 3A)。进一步的序列分析表明, FA8015 的 T-DNA 右边界旁侧序列共 1 254 bp,

其中 1 ~601 bp 为 T-DNA 片段序列,602 ~1 254 bp (Chr015 号染色体 25129911-25130561bp) 为大豆基

因组序列(图 3B)。由于 T-DNA 的整合,导致两个碱基的插入。

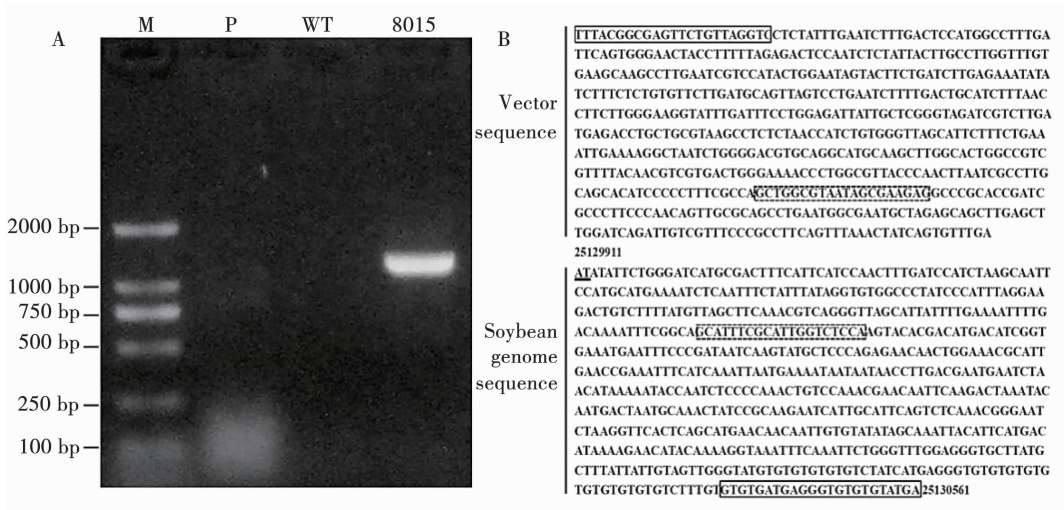


图 3 转基因事件 FA8015 右边界旁侧序列 PCR 验证

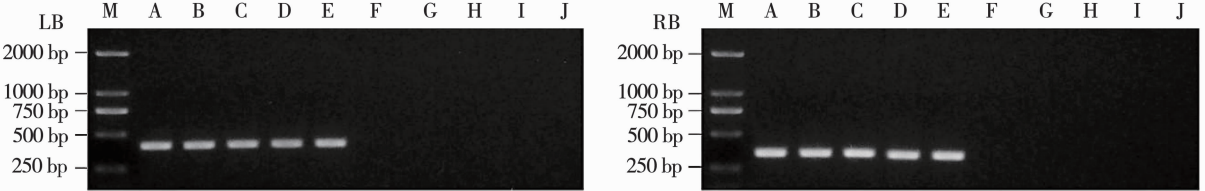
Fig 3 PCR amplification of right flanking sequence of transgenic event FA8015

以上序列分析结果表明,转基因事件 FA8015 的 T-DNA 整合位点为大豆基因组 Chr15 染色体的第 25129882 位点,而且为单拷贝正向插入,与重测序分析的结果一致。将整合位点的左右两侧的大豆基因组序列约 4 kb 与 NCBI 数据库进行比对,证明整合位点左边界序列为编码区,且该基因功能未经过验证;右侧边界序列为非编码区。T-DNA 整合位点为二者临界点。

2.4 特异性 PCR 检测

根据已经确定的 T-DNA 整合位点及旁侧序列

来设计转基因事件特异性 PCR 检测引物,其中左边界引物 FA8015LB-SF/SR 扩增产物为 403 bp (图 4A),右边界 FA8015RB-SF/SR 引物扩增产物为 339 bp (图 4B)。当模板为大豆品种吉育 47、吉育 72、沈农 9 号、栽培水稻吉梗 88 号和转基因棉花时,均没有扩增产物出现;以 FA8015 根、茎、叶、花和种子 DNA 为模板时,可扩增出清晰的条带,证明这两对引物均可以特异的识别转基因大豆事件 FA8015 (图 4)。



LB:左边界特异性引物 FA8015LB-SF/SR 检测;RB:右边界特异性引物 FA8015RB-SF/SR 检测;M:2 kb DNA Marker;A:根;B:茎;C:叶;D:花;E:种子;F:JY47;G:JY72;H:栽培大豆;I:水稻;J:棉花。
LB: Primer pair of FA8015LB-SF/SR for left border amplification; RB: Primer pair of FA8015RB-SF/SR for right border amplification; M: 2 kb DNA Marker; A: Root; B: Steam; C: Leaf; E: Seed; F: JY47; G: JY72; H: Cultivated soybean; I: Rice; J: Cotton.

图 4 事件特异性引物 PCR 检测

Fig. 4 PCR analysis by event-specific primer pairs

3 讨论

基因组重测序技术已经应用在多种作物的遗传分析上,如谷子^[12]、水稻^[13]、大豆^[14-15]、番茄^[16]等。将基因组重测序技术应用在转基因作物旁侧序列分析中鲜少报道,但与基因组步移和巢式 PCR 技术相比,引物设计上能够更直观更准确,可减少 PCR 扩增次数,准确率更高,但是测序和分析的周期相对较长。本研究在此基础上,对大豆耐盐转基

因事件 FA8015 进行了重测序,经过序列比对分析,初步定位了 T-DNA 的整合位点。然后根据此整合位点的序列信息设计引物,通过 PCR 扩增并测序分析,证实了该 T-DNA 整合位点为大豆基因组 Chr15 的第 25129882 位点,而且 T-DNA 整合位点为非编码区;T-DNA 在整合过程中发生了碱基和插入缺失,与转基因水稻中的研究相类似^[17]。依据旁侧序列建立的转化事件 FA8015 特异性 PCR 检测方法,可快速准确的鉴别出该转基因事件的身份。

测序技术从第一代的 Sanger 技术开始,发展到今天经过了几代的改进,无论是从读长、检测手段,还是精确度、通量等,都得到的飞跃式的发展,并且已经成功应用于基因组、转录组等方面的研究^[18]。随着检测成本的降低、测序时间的减少以及数据分析的简便,测序可变得更便捷、高效,应用空间更为广阔。本研究将该技术应用在转基因事件旁侧序列的分析上,不仅拓宽该技术的应用范围,而且以此为基础建立的特异性检测方法为转基因事件 FA8015 及其衍生物的安全评价和监管提供技术。

4 结 论

本研究采用重测序方法获得了大豆耐盐转基因事件 FA8015 外源 T-DNA 整合位点旁侧序列,结果表明,T-DNA 整合位点为大豆基因组 15 号染色体的 25129882,且为单拷贝正向插入。据此旁侧序列特征设计特异性引物,建立大豆转基因事件 FA8015 特异性检测方法。该方法可以准确识别不同转基因事件,从而为实现该转基因事件及其产品的有效监督管理提供依据。

参考文献

[1] 王遵亲,祝寿全,愈仁培,等. 中国盐渍土[M]. 北京:科学出版社,1993. (Wang Z Q, Zhu S Q, Yu R P. Chinese saline soil[M]. Beijing:Science Press, 1993.)

[2] Hanson A D, May A M, Grumet R, et al. Betaine synthesis in chenopods: Loccalization in chloroplasts[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, 82: 3678-3682.

[3] Yamada N, Takahashi H, Kitoy K, et al. Suppressed expression of choline monooxygenase in sugar beet on the accumulation of glycine betaine[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 96: 217-221.

[4] 肖岗,张耕耘,刘风华,等. 山菠菜甜菜碱脱氢酶基因研究[J]. 科学通报, 1995, 40: 741-745. (Xiao G, Zhang G Y, Liu F H, et al. Study on *BADH* gene of *Atriplex hortensis* L[J]. Chinese Science Bulletin, 1995, 40: 741-745.)

[5] Yang X H, Liang Z, Wen X G, et al. Genetic engineering of the biosynthesis of glycine betaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 66: 73-86.

[6] Nuccio M L, Russell B L, Nolte K D, et al. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase[J]. The Plant Journal, 1998,

16(4): 487-496.

[7] Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, et al. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum [J]. Plant Physiology, 1996 (110): 1301-1308.

[8] Weretlnyk E A, Hanson AD. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87: 2745-2749.

[9] Ley T J, Mardis E R, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukzemia genome [J]. Nature, 2008, 456(7218): 66-72.

[10] 尚丽霞,蔡勤安,于志晶,等. 甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)基因转化大豆的研究[J]. 东北农业科学, 2016, 41(2): 35-38. (Shang L X, Cai Q A, Yu Z J, et al. Transformation of soybean with betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) gene[J]. Journal of Northeast Agricultural Science, 2016, 41(2): 35-38.)

[11] Tel-zur N, Abbo S, Myslabodski D, et al. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (*Cactaceae*) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17: 249-254.

[12] Bai H, Cao Y H, Quan J Z, et al. Identifying the genome-wide sequence variations and developing new molecular markers for genetics research by re-sequencing a landrace cultivar of foxtail millet [J]. Plos One, 2013, 8(9): e73514.

[13] Hiroki T, Akira A, Kentaro Y, et al. QTL-seq: Rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations[J]. Plant Journal, 2013, 74(1): 174-183.

[14] Qi X, Li M W, Xie M, et al. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing[J]. Nature Communications, 2014, 5(5): 4340.

[15] Zhou Z, Jiang Y, Wang Z, et al. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(4): 408-414.

[16] Lin T, Zhu G, Zhang J, et al. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding[J]. Nature Genetics, 2014, 46(11): 1220-1226.

[17] 魏岁军,邓力华,肖国樱. 转基因水稻 EB7001S 事件特异性检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(2): 621-631. (Wei S J, Deng L H, Xiao G Y. Establishment of an event-specific method to detect transgenic rice (*Oryza sativa*) EB7001S [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(2): 621-631.)

[18] Goodwin S, McPherson J D, McCombie W R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies[J]. Nature Reviews and Genetics, 2016, 17: 333-351.