

利用 SSR 分子标记鉴定“梅桥”大豆种质纯度

盛新颖¹, 詹少华², 樊洪泓¹, 蔡永萍¹, 林毅¹

(1. 安徽农业大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230036; 2. 皖西学院 化学与生命科学系, 安徽 六安 237012)

摘要:“梅桥”大豆是安徽省淮北市地区农家菜用大豆品种, 长年的连续种植导致纯度比较混杂, 产量明显下降, 利用 SSR 分子标记技术对 92 单株“梅桥”大豆种质纯度进行鉴定, 以期为梅桥大豆的提纯复壮提供理论依据。结果表明: 采用改良的 CTAB 方法, 可以提取高质量的大豆基因组 DNA; 在优化 SSR-PCR 反应体系的基础上, 筛选出 8 对 SSR 引物, 平均每个引物得到条带数 10.6 个, 条带的多态性频率为 70.9%, 梅桥大豆的种质纯度为 38.04%。

关键词: SSR 标记; 大豆; DNA 提取; 种质纯度

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)02-0210-05

Purity Identification of “Meiqiao” Soybean (*Glycine max*) by SSR Markers

SHENG Xin-ying¹, ZHAN Shao-hua², FAN Hong-hong¹, CAI Yong-ping¹, LIN Yi¹

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 2. Chemistry and Biology Department, West Anhui University, Liu'an 237012, Anhui, China)

Abstract: “Meiqiao” is a vegetable soybean with good quality in Huaibei Anhui Province, as result of continuous cultivation, the purity and yield reduced seriously. In this article, 92 plants were selected to identify the purity using SSR molecular markers so that it could provide theoretical guide for purification and rejuvenation of “Meiqiao” Soybean. The results showed that the high quality soybean genomic DNA was extracted by improved CTAB method, under optimization of SSR-PCR reaction system, eight SSR primers were selected and 10.6 bands were obtained from each one, the rate of polymorphic bands was 70.9%, the purity of “Meiqiao” Soybean germplasm was 38.04%.

Key words: SSR Markers; Soybean; DNA extraction; Germplasm Purity

“梅桥”大豆是安徽省淮北地区菜用大豆名优品种, 蛋白质等营养物质含量丰富, 清脆香甜, 青绿色种皮, 在当地也称为“梅桥”大青豆, 属于夏秋大豆品种, 每年 10 月份上市, 畅销上海、浙江、江苏等省市, 是安徽淮北地区的主要经济作物品种之一, 但是该品种是传统种植的农家品种, 品种纯度不够理想, 影响了农户的经济效益, 严重制约了“梅桥”大豆产业化发展。

大豆品种的纯度鉴定方法主要有: 形态鉴定法、生理生化法、DNA 分子标记法, 其中分子标记的方法直接鉴定遗传物质本身, 具有快速、准确的优点。简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSR) 具有在基因组中分布广, 多态性好, 表现为复等位共显性的孟德尔式遗传方式, 同时由于 SSR 分子标记重复性好、SSR 序列的两侧具有保守序列便于设计引物, 试验成本相对较低, 因此 SSR 分子标记成为当前应用最广泛的分子标记之一^[1-2]。

目前, SSR 分子标记技术已广泛应用于玉米^[3-4]、水稻^[5]、棉花^[6]、甜瓜^[7]等尤其是其杂交种

纯度鉴定上。在大豆纯度鉴定上也有报导, 谢皓等^[8]建立了 SSR 分子标记技术鉴定大豆种子纯度一般方法。田蕾等^[9]用 3 对 SSR 引物对 148 个耐盐与盐敏感大豆品种正反交 F₁ 植株进行分子鉴定, 验证了该方法的可行性; Diwan^[10]选用 20 个 SSR 标记, 成功的区分了北美地区用形态性状及 RFLP 标记不能分辨的品种。关荣霞等^[11]研究表明, 用 3~5 对 SSR 引物, 即可鉴定品种纯度。但是利用 SSR 标记进行大豆农家品种纯度鉴定尚未见报导, 该文在优化 SSR 反应条件的基础上, 对“梅桥”大豆种质纯度进行鉴定, 为“梅桥”大豆的提纯复壮提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆种子由安徽省蚌埠市淮上区农业综合服务站提供, 2008 年种植于安徽农业大学实验基地, 大田种植, 常规管理, 随机选取 100 个单株, 取嫩叶, 保存于 -70℃ 冰箱备用。

收稿日期: 2009-11-05

基金项目: 安徽高校省级自然科学研究重点资助项目 (KJ2008A089)。

第一作者简介: 盛新颖 (1982), 女, 硕士, 研究方向为大豆分子育种。E-mail: lingjun19850420@126.com。

通讯作者: 林毅, 教授, 博士生导师。E-mail: linyiahau@126.com。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及其检测 大豆基因组 DNA 提取采用改良 CTAB 法。提取液组成: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.0, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA pH 8.0, $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 2% PVP (W/V), 2% CTAB (W/V), 临用前加 2% β -巯基乙醇, 提取参照詹少华^[12]的方法, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性和质量, 电泳时间为 35 min; 利用紫外分光光度计检测 DNA 纯度和浓度。

1.2.2 SSR-PCR 反应体系的优化及扩增程序 大豆 PCR 反应体系参考冯国军^[13]的方法, 在此基础上, 对 DNA 浓度和 dNTPs 的浓度进行进一步优化, 在 25 μL 的反应体系中, DNA 分别以 20、40、60、80 ng 4 个梯度进行设计; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 分别以 0.3、0.5、0.7 μL 3 个梯度设计。扩增程序参考谢皓等^[8]的方法, 再根据引物退火温度做一定的优化和改进, 具体程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 60 s, 复性 60 s, 72°C 延伸 90 s, 35 循环, 72°C 延伸 7 min, 复性温度依据不同引物而异。

1.2.3 聚丙烯酰胺电泳检测 6% 聚丙烯酰胺, 含有 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 电泳缓冲液 $0.5 \times \text{TBE}$, 500 V 电压, 在二甲苯青到达胶板约 2/3 处停止电泳。取 10 μL 扩增产物与 2 μL 的 $6 \times \text{Loading Buffer}$ 混匀上样, 银染按照 Snguineti 的方法^[14], 显色结果用凝胶成像系统拍摄。

1.2.4 SSR 引物的筛选 参考已报道文献中大豆 SSR 引物的筛选结果, 从 <http://soybase.org/resources/ssr.php> 下载 34 对大豆 SSR 引物序列, Satt002, Satt022, Satt082, Satt137, Satt173, Satt184, Satt220, Satt298, Satt373, Satt390, Satt424, Satt426, Satt437, Satt481, Satt573, Satt583, Satt586, Satt596, Satt629, Satt636, Satt637, Satt644, Satt656, Satt664, Satt683, Satt728, Sat_130, Sat_192, Sat_215, Sat_253, Sat_272, Sat_305, Sat_306, Sat_313, SSR 引物由上海生工公司合成, 筛选带型稳定、清晰且具有多态性的引物。

1.2.5 SSR 标记电泳检测结果的统计分析 选择 250 ~ 1 000 bp 的扩增条带^[1,10], 采用矩阵法^[15]统计电泳结果。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

图 1 为 5 个单株 DNA 的琼脂糖电泳检测结果,

DNA 条带清晰、完整, 没有出现 DNA 碎片和连片, 同时 DNA 谱带靠近点样孔处, 表明该方法提取的 DNA 分子量较大, DNA 完整性好; 点样孔处无残留, RNA 含量低。

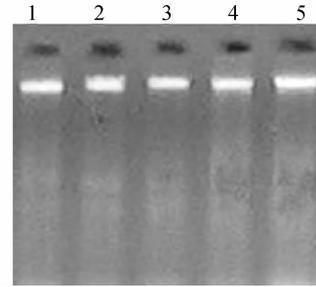


图 1 “梅桥”大豆 gDNA 的琼脂糖电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the “Meiqiao” soybean gDNA

图 2 为 DNA 提取液的紫外扫描光谱, 在 260 nm 处呈现出明显的吸收峰, 而在 230 nm 处呈现凹陷状态, 280 nm 处没有出现吸收峰, 表明 DNA 提取液中蛋白质、糖类杂质含量很少。DNA 提取液的 A_{260}/A_{280} 的值介于 1.745 ~ 1.983 之间, 平均值为 1.835, 基本不含蛋白质和多糖等杂质, RNA 含量也较少, 符合高纯度 DNA 的特征。

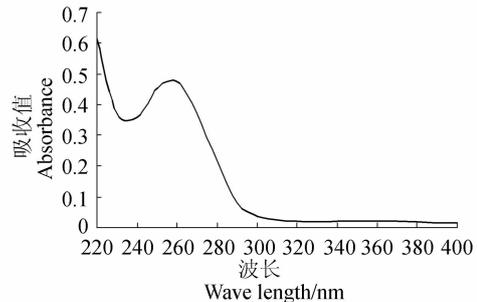
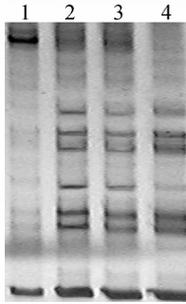


图 2 “梅桥”大豆 gDNA 的紫外光谱

Fig. 2 Ultraviolet spectrum of the “Meiqiao” soybean gDNA

2.2 SSR-PCR 反应体系优化的结果

由图 3 看出, 在其它反应参数一致的情况下, 试验设计的 4 个不同 DNA 模板浓度均能扩增出条带, 其中 25 μL 反应体系中 40 ng DNA 模板扩增条带最为清晰。如图 4 所示, 当 dNTPs 浓度为 $0.28 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 基本没有扩增产物, 当浓度为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 虽能扩增出条带, 但不够丰富、清晰, 当 dNTPs 浓度 $0.20 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时能扩增效果最佳, 条带丰富且稳定清晰。优化的 PCR 反应体系为: 40 ng DNA 模板, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 0.5 μL , $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA 聚合酶 0.2 μL , $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上、下游引物各 1.5 μL , 10 倍 PCR 缓冲液 2.5 μL , 加水补足至 25 μL 。

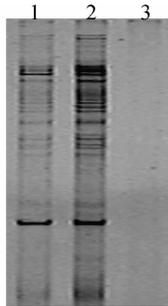


1~4 DNA 浓度分别为 20, 40, 60, 80 $\text{ng} \cdot 25 \mu\text{L}^{-1}$

1~4: 20, 40, 60, 80 $\text{ng} \cdot 25 \mu\text{L}^{-1}$ respectively

图3 不同 DNA 浓度的 SSR-PCR 扩增结果

Fig.3 SSR-PCR amplifying results by different concentration DNA



1~3 dNTPs 浓度分别为 0.12, 0.20, 0.28 $\text{mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ dNTPs concentration in 1~3 were 0.12, 0.20, 0.28 $\text{mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ respectively

图4 不同 dNTPs 浓度的 SSR-PCR 扩增结果

Fig.4 SSR-PCR amplifying results by different concentration dNTPs

2.3 引物筛选

用随机 DNA 模板对 34 对 SSR 引物进行筛选, 结果有 29 对引物能够扩增出条带, 占检测引物的 85.29%; 其中的 8 对引物 Satt137、Satt173、Satt220、Satt298、Satt390、Satt583、Satt596、Sat_272 的扩增产

物带型清晰稳定、多态性高、重复性好, 占检测引物的 23.53%, 利用此 8 对引物作为鉴定“梅桥”大豆种质纯度的核心引物。

2.4 “梅桥”大豆的种质纯度

利用筛选出的 8 对核心引物, 分别对“梅桥”大豆的 92 个单株的 DNA 模板进行 SSR-PCR 扩增, 这些扩增结果反映了不同单株的多态性, 表明“梅桥”大豆纯度较低。图 5 是引物 Satt173 在 1 到 23 单株 DNA 的扩增结果, 其中的 1、2、3、5、6、8、10、12、13、14、15、18、21 单株与其它 10 个单株之间存在不同程度的差异条带; 图 6 为引物 Satt583 在 24 到 46 单株 DNA 的扩增结果, 其中 1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、14、16、17 各单株的条带与其它植株存在差异; 图 7 是引物 Satt298 在 47 到 69 单株 DNA 的扩增结果, 各植株差异较大, 其中只有 1、4、6、15、16、17、18、19 单株的条带内无差异条带; 图 8 是引物 Satt596 在 70 到 92 单株 DNA 的扩增结果, 其中的 4、5、6、9、10、11、12、13、18、19、20、21 单株的条带与其它 11 个单株存在不同差异。

多态性条带的统计结果见表 1, 所选的 8 对引物的多态性均在 50% 以上, 其中 Satt390 和 Satt583 条带多态性较高, 达到 90.9%。Sat_272 条带数量相对较少, 而检测到的差异植株也随之减少; 相反, Satt596 条带较丰富, 其检测出的差异植株数量也随之增加。结果表明, 不同 SSR 引物对鉴定大豆的种质纯度及其多态性分析上有较大差异。综合 8 对引物的扩增结果, 完全无差异的植株共有 35 株, 梅桥大豆的种质纯度为 38.04%。

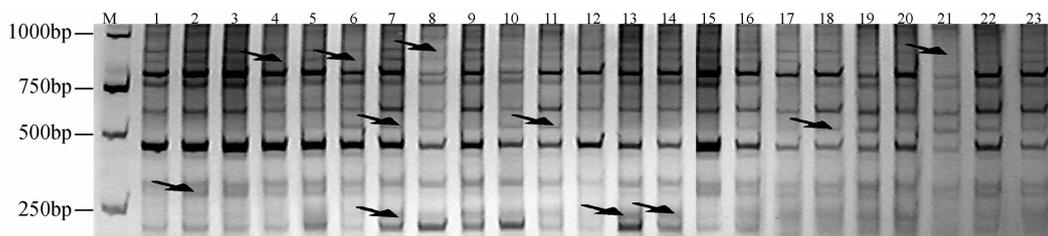


图5 植株 1 到 23 由引物 Satt173 的扩增结果(箭头所示为差异条带)

Fig.5 Amplifying result by SSR primer satt173 from No.1 to No.23 materials(arrows show different bands)

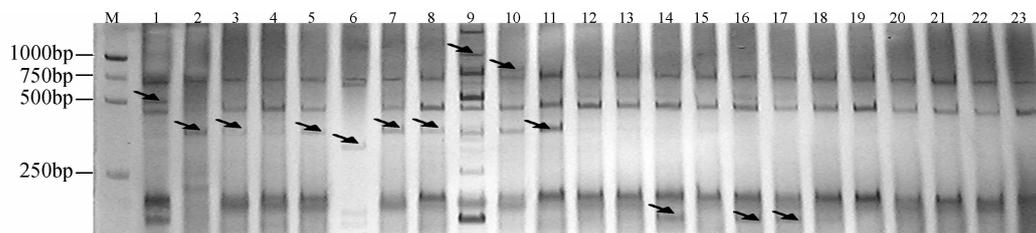


图6 植株 24 到 46 由引物 Satt583 的扩增结果(箭头所示为差异条带)

Fig.6 Amplifying result by SSR primer satt583 from No.24 to No.46 materials(arrows show different bands)

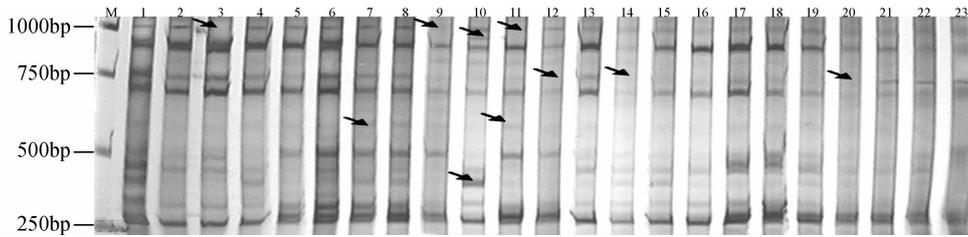


图 7 植株 47 到 69 由引物 Satt298 的扩增结果(箭头所示为差异条带)

Fig. 7 Amplifying result by SSR primer satt298 from No. 47 to No. 69 materials(arrows show different bands)

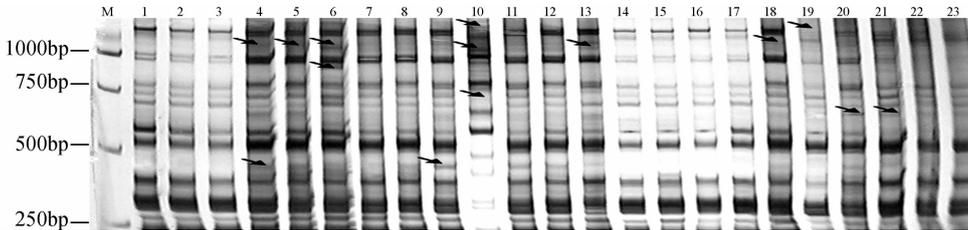


图 8 植株 70 到 92 由引物 Satt596 的扩增结果(箭头所示为差异条带)

Fig. 8 Amplifying result by SSR primer satt596 from No. 70 to No. 92 materials(arrows show different bands)

表 1 由 8 对 SSR 引物扩增得到的“梅桥”大豆多态性

Table 1 Polymorphism of bands which amplified by 8 pair SSR primers for “Meiqiao” soybean

序号 No.	名称 Name	条带数 No. of bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性频率 Frequency of the polymorphism/%	有差异条带的植株数 No. of plants with different bands	差异条带植株数所占的比例 Ratio of plants with different bands/%
1	Satt137	11	6	54.6	47	51.1
2	Satt173	8	4	50.0	51	55.4
3	Satt220	10	6	60.0	38	41.3
4	Satt298	10	7	70.0	52	56.5
5	Satt390	11	10	90.9	39	42.4
6	Satt583	11	10	90.9	46	50.0
7	Satt596	17	11	64.7	54	58.7
8	Sat_272	7	6	85.7	26	28.3
平均 Mean		10.6	7.5	70.9	44.1	48.0

3 讨论

大豆农家品种具有抗病能力强、栽培技术要求简单和适应当地气候等优点,其中产量高、品质好的优良品种深受农户欢迎,同时这些品种也是重要的育种材料,但是农家品种往往具有纯度不高的缺点,对其进行纯化复壮是大豆育种的一项重要和基础工作。分子标记可以辅助大豆的品种纯化,大豆分子标记既可以鉴定农家品种的纯度,又可以鉴定品种纯化复壮后的效果,分子标记的鉴定关系到育种计划的制定,结果表明,“梅桥”大豆的纯度只有

38.04%,这表明该品种经过纯化后具有较大的增产潜力,在纯化的策略方面宜采用纯系育种法,一般的田间去杂措施难以达到纯化品种的目的。

结果表明,不同的 SSR 引物对鉴定大豆的多态性存在较大差异,有些引物扩增的条带太少,如 Satt424、Satt426、Satt481、Satt573 等;有些引物虽然可以扩增出丰富的条带,但是没有多态性的差异,如 Satt586、Satt629。只有扩增的条带较多且多态性丰富的引物才可以应用于品种纯度的鉴定,筛选出的 8 对引物,可以作为鉴定“梅桥”大豆纯度的核心引物,同时也为其它大豆品种纯度鉴定中核心引物的筛选提供借鉴。

参考文献

- [1] 宋启建. 大豆 SSR 分子标记的创制及其应用[J]. 大豆科学, 1999, 18(3): 248-254. (Song Q J. A Review of development and apply ication of simple sequence repeats (SSR) in soybean [J]. Soybean Science, 1999, 18(3): 248-254.)
- [2] 詹少华, 盛新颖, 樊洪泓, 等. 大豆 EST 序列长度与 SSR 特性的关系[J]. 大豆科学, 2009, 28(2): 204-209. (Zhan S H, Sheng X Y, Fan H H, et al. Relationship between the length of soybean ESTs sequence and characters of EST-SSR[J]. Soybean Science, 2009, 28(2): 204-209.)
- [3] 王凤格, 赵久然, 王璐, 等. 适于玉米杂交种纯度鉴定的 SSR 核心引物的确定[J]. 农业生物技术学报, 2007, 5(6): 964-969. (Wang F G, Zhao J R, Wang L, et al. Determination of SSR core primers for maize hybrid purity identification [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 5(6): 964-969.)
- [4] 李艺, 铁双贵, 朱位红, 等. 鉴定玉米杂交种郑单 958 种子纯度的 SSR 标记筛选[J]. 玉米科学, 2008, 16(1): 40-43. (Li Y, Tie S G, Zhu W H, et al. Selection of SSR markers for Zhengdan 958 maize hybrid seed purity identification [J]. Journal of Maize Sciences, 2008, 16(1): 40-43.)
- [5] 刘之熙, 陈祖武, 朱克永, 等. 利用 SSR 分子标记快速鉴定杂交水稻种子纯度技术体系的优化[J]. 杂交水稻, 2008, 23(1): 60-63. (Liu Z X, Chen Z W, Zhu K Y, et al. Optimization of the rapid purity identification system of hybrid rice seeds by using SSR markers[J]. Hybrid Rice, 2008, 23(1): 60-63.)
- [6] 李驰, 卢新雄, 张志娥, 等. 利用 SRAP 和 SSR 分子标记检测分析 29 份棉花种质遗传完整性[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 21-25. (Li C, Lu X X, Zhang Z E, et al. Genetic integrity analysis of cotton (*Gossypium hirsutum* L inn.) accessions using SRAP and SSR markers [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2007, 8(1): 21-25.)
- [7] 李菊芬, 许玲, 马国斌. 应用 SSR 分子标记鉴定甜瓜杂交种纯度[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(3): 494-500. (Li J F, Xu L, Ma G B. Identification of melon hybrid purity by SSR markers[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2008, 16(3): 494-500.)
- [8] 谢皓, 陈学珍, 于同泉, 等. 一种大豆品种纯度鉴定方法与程序的建立[J]. 种子, 2007, 26(9): 104-107. (Xie H, Chen X Z, Yu T Q, et al. Development of the method and procedure of variety purity identification in soybean[J]. Seed, 2007, 26(9): 104-107.)
- [9] 田蕾, 关荣霞, 刘章雄, 等. 用 SSR 标记鉴定大豆杂交组合 F₁ 的方法研究[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 443-447. (Tian L, Guan R X, Liu Z X, et al. Verity identification of soybean hybrids using SSR markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9(4): 443-447.)
- [10] Diwan N, P R Cregan. Automated sizing of fluorescent - labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 723-733.
- [11] 关荣霞, 刘燕, 刘章雄, 等. 利用 SSR 方法鉴定大豆品种纯度[J]. 分子植物育种, 2003, 1(3): 357-360. (Guan R X, Liu Y, Liu Z X, et al. Purity identification of soybean varieties with SSR technique[J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(3): 357-360.)
- [12] 詹少华, 尹艺林. 大豆基因组 DNA 提取纯化方法研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(23): 9871-9872, 9928. (Zhan S H, Yin Y L. Study on extraction and purification methods of soybean genomic DNA[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2008, 36(23): 9871-9872, 9928.)
- [13] 冯国军, 徐启江, 李玉花, 等. 普通菜豆 SSR 反应条件的优化[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(1): 27-34. (Feng G J, Xu Q J, Li Y H, et al. Optimal condition for simple sequence repeat in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(1): 27-34.)
- [14] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. Trends Plant Science, 1996, 1(7): 215-222.
- [15] 秦君, 李英慧, 刘章雄, 等. 用 SSR 分子标记解析大豆品种绥农 14 与系谱亲本间的遗传关系[J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 3999-4007. (Qin J, Li Y H, Liu Z X, et al. Genetic relationship among parents of elite soybean (*Glycine max*) cultivars Suinong 14 pedigree revealed by SSR markers[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(12): 3999-4007.)

启 事

《大豆科学》编辑部现有少量 2006~2009 年过刊及精装合订本, 其中期刊每本 10.00 元, 邮费 5.00 元; 合订本每册 90.00 元, 邮费 10.00 元, 合计 100.00 元。数量有限, 欲购从速。

汇款地址: 哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部。

邮 编: 150086

电 话: 0451-86668735

E-mail: dadoukx@sina.com