

大豆抗旱种质资源遗传多样性的 SSR 分析

王振东¹, 陈超力¹, 于佰双², 李进荣², 王 惠¹

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:以 45 份具有不同程度抗旱性的大豆为材料, 利用 SSR 分子标记对这些材料进行分析, 选取 2 个产地、农艺性状差异显著的大豆品种静乐黑滚豆和辽 13, 对 SSR 引物进行筛选, 从中选择出多态性丰富, 带型较好的引物 11 对。用筛选出的引物对 45 份大豆种质进行 PCR 扩增。聚类结果表明:GD = 0.41 处可将 45 个大豆品种分成两大类, 大部分品种被归为第 1 类, 有 31 个品种, 占总品种数的 69%, 第 2 类包含 14 品种, 占总品种数的 31%。两个大类又各自细分成不同的亚类群, 聚类结果反映出品种间关系与地理起源、表型形态等具有一定的相关性。

关键词:大豆; 遗传多样性; SSR; 聚类分析

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)03-0370-04

SSR Analysis of Genetic Diversity of Soybean Germplasm in Drought Resistance

WANG Zhen-dong¹, CHEN Chao-li¹, YU Bai-shuang², LI Jin-rong², WANG Hui¹

(1. Department of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning; 2. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract:The genetic diversity of 45 soybean germplasms including different degrees of drought resistance were analyzed by SSR method. Eleven pair of primers with rich polymorphism and good model were selected from ‘Jingle black’ and ‘Liao 13’, of which the place of origin and the agronomic traits are farther apart. The 11 pair of primers were used to amplify the genome DNA of 45 materials. Clustering results showed that 45 soybean varieties could be divided into two major categories while GD = 0.41, most of the varieties were classified as first category, there are 31 accessions, accounting for 69% of the total; the second category consisted of 14 accessions, accounted for 31% of the total. Two major categories were subdivided into their different sub-group, The cluster results exhibited their relationship related with the geographic origin and appearance.

Key words:Soybean; Genetic diversity; SSR; Cluster analysis

大豆含有丰富的蛋白质、脂肪等营养元素, 是人类重要的营养来源, 推广优质高产品种是增加大豆产量的最直接方式, 而遗传多样性的下降所导致的亲本遗传基础狭窄现象, 是当前大豆育种难以取得突破性进展的重要原因。对大豆种质资源遗传多样性进行研究, 一方面, 有助于了解品种的遗传背景及品种间的亲缘关系, 为种质资源的利用与开发提供信息; 另一方面有助于对种质资源进行区划, 为不同地域生态环境间的相互引种或驯化提供指导。干旱使得很多高产品种遗传潜力难以发挥, 不仅影响了作物的产量, 而且限制了作物的广泛分布, 提高品种的抗旱能力已经成为现代大豆育种研究工作中急需解决的关键问题之一^[1]。以分子标记技术为基础的大豆种质资源遗传多样性研究, 在培育大豆高产优质新品种研究中发挥重要作用, 但有关利用分子标记技术对大豆抗旱种质资源进行遗传多样性分析的

研究鲜有报道^[2-3]。

该文利用 SSR 分子标记对 45 份不同程度抗旱性的大豆进行遗传多样性分析, 旨在为大豆资源的利用和保存提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

不同抗旱能力的 45 份大豆种质资源由沈阳农业大学植保学院及中国农科院作物所提供(表 1)。

1.2 基因组的提取与纯化

以大豆干种子为材料, 采用 SDS 法^[4-5]提取基因组 DNA。

1.3 DNA 浓度测定和质量检测

取 DNA 5 μL 于 0.8% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 并观察 DNA 是否有降解。

收稿日期: 2009-12-21

基金项目: 辽宁省博士启动基金资助项目(20071060)。

第一作者简介: 王振东(1956-), 男, 教授, 博士生导师, 现从事生物技术教学与研究。E-mail: zhendongwang1212@yahoo.com.cn。

通讯作者: 王惠, 副教授, 博士。E-mail: wanghuisynd@yahoo.com.cn。

用紫外分光光度计检测稀释1 000 倍的DNA 样浓度,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值确定 DNA 样品的纯度,记录在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值的比值和度。

表 1 试材料序号和名称
Table 1 Name and number of materiles

序号 No.	品种名 Name	抗旱性 Drought resistance	产地 Producing area	序号 No.	品种名 Name	抗旱性 Drought resistance	产地 Producing area
1	开育 10 Kaiyu 10	不抗	辽宁	24	铁丰 31 Tiefeng 31	不抗	辽宁
2	吉 883 Ji 883	不抗	吉林	25	黑农 48 Heinong 48	不抗	黑龙江
3	蒙 81104 Meng 81104	高抗	安徽	26	晋 31 Jin 31	低抗	山西
4	晋 21 Jin 21	不抗	陕西	27	辽 17 Liao 17	低抗	辽宁
5	合丰 40 Hefeng 40	不抗	黑龙江	28	苏科 3 Suke 3	不抗	辽宁
6	辽 13 Liao 13	不抗	辽宁	29	大白眉 Dabaimei	不抗	辽宁
7	赤不流黑豆 Chibuliuheidou	高抗	山西	30	密云黑豆 Miyunheidou	中抗	黑龙江
8	新辽 13 Xinliao 13	不抗	辽宁	31	小黑豆 Xiaohaidou	中抗	河北
9	开育 8217 Kaiyu 8217	不抗	辽宁	32	抗线 2 号 Kangxian No. 2	不抗	黑龙江
10	Fayette	不抗	美国	33	90-1105	不抗	黑龙江
11	6178	低抗	辽宁	34	比松 Bisong	不抗	美国
12	嫩丰 18 Nenfeng 18	低抗	黑龙江	35	老鼠皮 Laoshupi	中抗	陕西
13	灰皮支 Huipizhi	中抗	山西	36	牛毛黄 Niumaohuang	不抗	吉林
14	辽 10 Liao 10	不抗	辽宁	37	东山 69 Dongshan 69	不抗	山东
15	辽 15 Liao 15	不抗	辽宁	38	许庙黑豆 Xumiaoheidou	高抗	河北
16	嫩丰 15 Nenfeng 15	不抗	黑龙江	39	山东 40A-2-8 Shandong 40A-2-8	不抗	山东
17	辽 11 Liao 11	不抗	辽宁	40	花黑虎 Huaheihu	高抗	河北
18	汾豆 62 Fendou 62	低抗	山西	41	丹东 4 号 Dandong No. 4	不抗	辽宁
19	嫩丰 17 Nenfeng 17	低抗	黑龙江	42	静乐黑滚豆 Jingleheigundou	高抗	山西
20	沈农 8 Shennong 8	不抗	辽宁	43	铁角豆 Tiejiaodou	低抗	安徽
21	Custer	不抗	美国	44	大屯小黑豆 Datunxiaohaidou	高抗	河北
22	商丘滚龙珠 Shangqiugunlongzhu	不抗	河南	45	茶豆 Chadou	低抗	河北
23	开育 8157 Kaiyu 8157	不抗	辽宁				

1.4 PCR 扩增反应

1.4.1 扩增反应 在其它条件不变的情况下,比较各 PCR 反应参数对扩增结果的影响,以建立扩增结果稳定的 PCR 反应体系。最后确认反应体系为 20 μL,其中 10 × PCR Buffer 2. 0 μL (含 Mg²⁺), dNTPs(2.5 mmol · L⁻¹) 1.6μL, Taq DNA Polymerase (5 U · μL⁻¹) 0. 2 μL, 上下游 Primer 分别为 (10 μmol · L⁻¹) 0. 8 μL, DNA Template 2. 0 μL, ddH₂O 12. 6 μL;确定 55℃ 为退火温度。

1.4.2 PCR 反应程序 94℃ 预变性 5 min 1 个循环,94℃ 变性,55℃ 退火,72℃ 延伸各 30 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。4℃ 保存。

1.5 SSR 引物的筛选

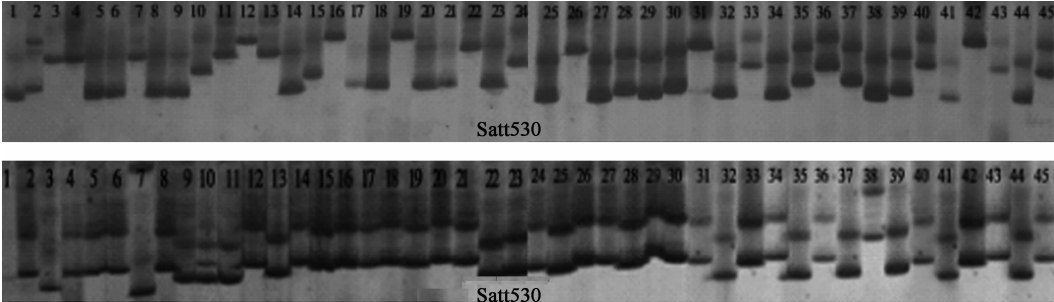
从供试材料中选取 2 个产地、农艺性状差异显著的大豆品种静乐黑滚豆和辽 13 对 SSR 引物进行筛选,从中选择出多态性丰富,带型较好的引物 11 对(表 2),用筛选出的引物对 45 份大豆种质资源进行 PCR 扩增。

表 2 选用的 SSR 引物
Table 2 SSR loci used in the study

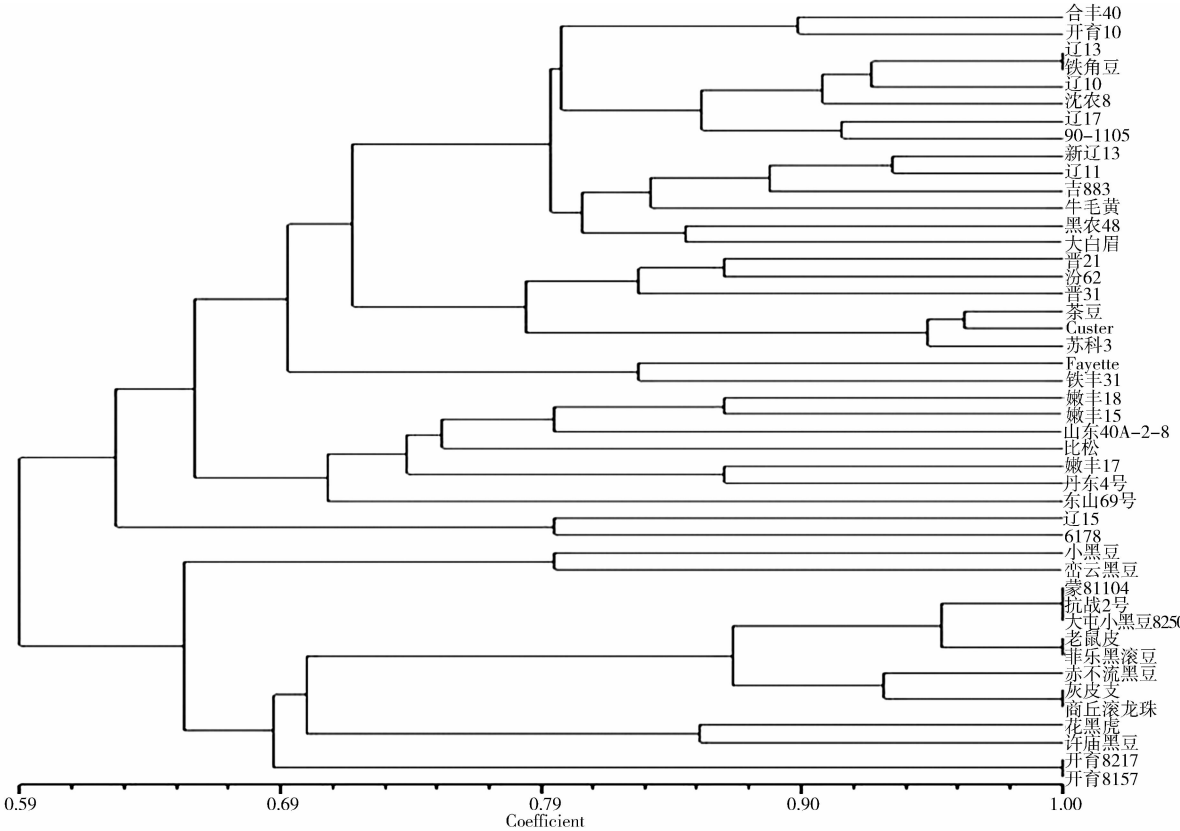
位点 Loci	重复序列 SSR motif	正向序列 Forward(5'→3')	反向序列 Reverse(3'→5')
Satt338	(ATT)16	GCGCCCAAGTATTATGAGATATTTGAT	GCGATAATTTTAAAACTGGACCA
Satt431	(ATT)21	GCGTGGCACCCCTTGATAAATAA	GCGGCAGAAAGTTTTTCTGTAACA
Satt334	(ATT)16	GCGTTAAGAATGCATTTATGTTTACTC	GCGAGTTTTTGTTGGATTGAGTTG
Satt286	(ATT)17	GCGGCGTTAATTTATGCCCGGAAA	GCGTTTGGTCTAGAATAGTTCTCA
Satt038	(ATT)17	GGGAATCTTTTTTCTTTCTATTTA AGTT	GGGCATTGA AATGGTTTTAGTCA
Satt226	(ATT)18	GCGAAACAACCTCACTTAAGCAATACAT	GCGTCTCCTACCTTTCTTATC
Satt147	(ATT)14	CCATCCCCTTCTCCAAATAGAT	CTTCCACACCCCTAGTTTAGTGACAA
Satt453	(ATT)13	GCGGAAAAAAAACAATAAACAAACA	TAGTGGGGAAGGGAAGTTACC
Satt130	(ATT)14	TAAACGAAATTTAGTTTAAAGACT	TGAATGGCTAAAAACGTGATT
Satt279	(ATT)28	GCGCAAAAGGACGCCCAACCAATAG	GCGGTGATCGGATGTTATAGTTTCAG
Satt530	(ATT)12	CATGCATATTGACTTCATTATT	CCAAGCGGCTGAAGAGGTTTTT

84# q r Ñ Î 0 f g
WÀ , • t ((8 ž £ ´ p '¾• Ã õ ° t ((8
¤ 8 j >9 a & ' h < x y ((8 « ¬ E C & « ¬ ù
8 “ À j ! ¬ - ® Ž n . , ¹ ° !³ - • ° é q Y
± Ý n — æ § &
84= # Ò Ó Ô Õ
™ § . K A q Q A (´) t > ¬ 6 , & f ! 1 , & D 1 , e 1 & # !
L ì 9 : † ² n p æ 6 , & q 5 1 , A ¢ ~ 1 2 , 5
: " ¤ 8 « ¬ t # e æ ! 1 & A ¢ ~ 1 2 & 5 ‡ " ¤
8 « ¬ ï t # e æ ! 1 , & A ¢ ~ , j & 5 « ¬ ï É Ê
„ w † ‡ t # e æ & 9 : ³ — R N f & j 6 , & W À
S ^ R M - • j . Y (* (: ^ F ! \$ L ì 9 : ³ — ^ ´ 8 >
w Û p µ d Ñ &

! #] ^ + M _
! 4 & # (° ((8 q r Ñ Î 0 Ã Ö ' M _
À õ ° B / t & & j ((8 ¤ 8 j >9 a & ' h <
x y « ¬ ! 0 ° & & j ¤ 8 à á ô Ö Ø Â n " Ñ & # !
o « ¬ ï \$! , Ø Â n f A ! (@ ¤ \$ > µ « ¬ ï t Ø Â
f A } Ø ^ 9 , ! @ ¤ \$ \$ O G O µ } ê ï Ö ! , &
0 À ((8 ñ n Ë Ï t 9 : † ² p æ ^ % 4 \$ \$ \$ \$ b & 4
% 8 8 8 8 é € † ² p æ ^ % 4 ' ' 9 &
! 4 ! # ((8 q r Ã Ö ' 0 x N M _
b Ñ ! â 0 ú ï ! ~ R N f % 4 > Þ â 0 Z >9 a
h < ' ! ` & Ê ! & á ' h < . k ^ ! & Ê ! Ö \$ &
, h < ! ~ " h < æ t " " d ! ~ R N f % 4 ! O



L & # ^ ((8 í î q r Ø Û 0 . / » N . - Ú Û L o
A (5 ? & # 6 * 4 " # (; F 1 2 / (4 5 * 8 & 4 ' . % # \$: / (* - 8 (' B ' B * + + 0 \$ & # * &



L ! # >9 ~ ! " Ü ¿ ((8 x N Ý Þ L
A (5 ? ! # F * 4 - & ' 5 8 % # " / >9 . " 9 7 * % ; , : ') % & 7 9 + + 0

处,第1类群可细分为6个亚类群;第2类包含14品种,占总品种数的31%,在 $GD=0.3$ 处,第2类群可细分为4个亚类群。其中第1类中第1亚类主要是东北地区的品种,其中大部分是辽宁的品种,都为不抗旱或低抗旱品种。第2亚类都为不抗旱品种,其中晋21、汾62、晋31的亲缘关系相对较近,它们都是山西品种。第3亚类都为不抗旱品种。第4亚类为中嫩丰18、嫩丰15、嫩丰17被分在一起,同源品种之间相近的亲缘关系在此得到了很好的体现。第5亚类只有1个品种。第6亚类2个品种都是不抗旱品种。第2类可分为4个亚类,第1亚类是2个中等抗旱品种。第2亚类全部为黑豆品种,并且大部分为高抗旱品种。第3亚类为河北地区的高抗旱黑豆品种。第4亚类有2个辽宁同源品种开育8217、开育8157,均为不抗旱品种。从SSR数据分析、聚类结果来看,选用的11对SSR特异引物能将抗旱性不同的45份大豆加以区分,使这些大豆品种依产地、抗旱性、表型形态等划分成不同的类群。

3 讨论

3.1 不同抗旱性大豆遗传相似系数及遗传距离

对不同地区不同抗旱程度的45份大豆之间的遗传相似系数及遗传距离进行分析,结果在 $GD=0.41$ 处将各品种明显划分成黄色种皮和黑色种皮为主的两大类群。第1类群中各品种的差异相对比较明显,品种间的遗传距离相对较大,也比较符合地域分布。第2类群中的遗传距离则相对较小,特别是第2亚类中的几个品种,虽然它们来自几个不同省份,但遗传距离却非常小,这表明相对于黄色种皮品种,选用的黑色种皮品种之间的遗传多样性和分化程度相对较低^[7-11]。第2亚类中有几组品种的遗传距离为0,这一方面体现了品种之间的分化程度较低,也表明试验中选用的引物对黑色种皮品种的特异性较差,如果想进一步弄清它们之间的遗传多样性关系,需要针对黑豆品种重新筛选特异性引物进行进一步试验。

3.2 SSR技术的优势及展望

SSR标记以其众多优点被广泛应用于大豆研究中,SSR标记的高多态性使得其对大豆遗传多样性研究具有相当优势:在图谱构建中,SSR标记结合其它标记将使得大豆图谱越来越密,越来越多的与目标性状紧密相关的基因和QTL被定位,为分子标记辅助选择育种和克隆抗病、抗虫等抗性基因提供了前提;在品种鉴定中,利用SSR的高多态性可建立不同品种的DNA指纹图谱,以用于品种鉴别和专利保护。近些年出现了1种新型分子标记表达序列标签,即ESTs(expressed sequence tags),通过ESTs发

展SSR标记为SSR引物的开发开辟了新的途径,同时节约了时间和费用。随着SSR标记技术的不断发展和完善及更多SSR位点的发现,SSR标记将在未来的大豆研究中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 张家榕,李贵全.大豆农艺性状与抗旱性研究[J].山西农业大学学报,2006,26(2):143-145. (Zhang J R, Li G Q. Soybean agronomic traits and drought resistance [J]. Journal of Shanxi Agricultural University, 2006, 26 (2): 143-145.)
- [2] 赵银月,保丽萍,耿智德,等.云南省大豆地方种质资源遗传多样性的初步分析[J].西南农业学报,2006,19(4):591-592. (Zhao Y Y, Bao L P, Geng Z D, et al. A preliminary analysis of genetic diversity of soybean germplasm resources in Yunnan Province [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2006, 19 (4): 591-592.)
- [3] 周蓉,王智贤,张小娟,等.湖北省大豆种质资源的遗传多样性分析[J].大豆科学,2006,25(3):212-217. (Zhou R, Wang Z X, Zhang X J, et al. The genetic diversity analysis of soybean germplasm in Hubei Province [J]. Soybean Science, 2006, 25 (3): 212-217.)
- [4] 张永明,孙彩云,梁承邳.一步法提取植物DNA用于大规模RAPD分析[J].遗传,2000,22(2):106. (Zhang Y M, Sun C Y, Liang C Y. One-step extraction of plant DNA for large-scale RAPD analysis [J]. Genetics, 2000, 22 (2): 106.)
- [5] 王振东,孙仓,王惠.不同方法从大豆不同材料中提取基因组DNA效果的比较[J].大豆科学,2008,27(1):15-19. (Wang Z D, Sun C, Wang H. Comparison of the extraction effect of the soybean genomic DNA from the different materials and different methods [J]. Soybean Science, 2008, 27(1): 15-19.)
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proceeding of National Academy of Science USA, 1979, 76: 5256-5273.
- [7] 张志永,陈受宜,盖钧镒,等.栽培大豆品种间RAPD标记的多态性分析及聚类分析[J].大豆科学,1998,17(1):1-9. (Zhang Z Y, Chen S Y, Gai J Y et al. RAPD markers between cultivated soybean varieties polymorphism analysis and cluster analysis [J]. Soybean Science, 1998, 17 (1): 1-9.)
- [8] 赵洪锬,王玉民,李启云,等.中国不同纬度野生大豆和栽培大豆SSR分析[J].大豆科学,2001,20(3):689-698. (Zhao H K, Wang Y M, Li Q Y, et al. China at different latitudes of wild soybean and cultivated soybean SSR analysis [J]. Soybean Science, 2001, 20 (3): 689-698.)
- [9] 王振东,贾利,孙仓,等.大豆抗旱种质资源遗传多样性的RAPD分析[J].大豆科学,2009,28(1):26-30. (Wang Z D, Ja L, Sun C, et al. RAPD analysis of genetic diversity of soybean germplasm in drought resistance [J]. Soybean Science, 2009, 28(1): 26-30.)
- [10] 周晓霞,庄炳昌,王玉民,等.利用RAPD与SSR技术进行野生大豆种群内分化的研究[J].中国生态农业学报,2002,10(4):6-9. (Zhou X F, Zhang B C, Wang Y M, et al. Study of the differentiation wild soybean population using RAPD and SSR techniques [J]. Chinese Eco-agriculture Sinica, 2002, 10 (4): 6-9.)
- [11] 朱申龙.应用AFLP方法研究中国大豆的遗传多样性[J].浙江农业学报,1998,10(6):302-309. (Zhu S L. Application of AFLP approach the study of Chinese soybean genetic diversity [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 1998, 10(6): 302-309.)