

# 大豆 SSR 分子标记的创制及其应用<sup>\*</sup>

宋启建

南京农业大学大豆研究所

## 摘 要

SSR 标记 (Simple Sequence Repeat) 具有均匀、随机、广泛地分布于大豆基因组,比 RFLP 及 RAPD 分子标记具多态性,呈孟德尔式遗传,共显性等特点。这一标记目前已广泛地应用于大豆分子遗传图谱构建,分子标记辅助选择,遗传多样性及遗传距离分析,品种鉴别等。随着新的 SSR 标记的面世,遗传图谱更为饱和,这一标记的应用将更具前景。本文介绍了制作 SSR 标记的过程,概述了 SSR 在大豆上的应用进展。

关键词 SSR 标记 遗传图谱

简单序列重复 (SSR) 也称为微卫星 (Microsatellite) 或串联重复 (STR) 的分子标记在大豆的遗传图谱构建,遗传多样性分析,亲缘关系鉴定, DNA 指纹图谱构建,品种鉴定, QTL 分析及分子辅助育种中具有公认的优越性及应用前景。这一分子标记的特殊性及重要性源于其以下特征:

- (1) 均匀、随机,广泛地分布于大豆基因组,平均间隔约 15Kb (Z. Wang et al. 1994)
- (2) SSR 序列的两侧顺序常较保守,在同种而不同遗传型间多相同
- (3) 多数 SSR 无功能作用,增加或减少几个重复序列的频率高,因而在品种间具广泛位点变异,比 RFLP 及 RAPD 分子标记具多态性 (Morgante et al., 1993, Rongwen, et al. 1995)
- (4) 呈孟德尔式遗传,共显性,因而对个体鉴定具特殊意义。
- (5) 仅需微量组织,即便 DNA 降解,其亦能有效地分析鉴定。
- (6) 虽然开始筛选重复序列和引物设计过程较慢,但只要引物确知,使用便极为简单,结果极为稳定。

基于上述特征,SSR 已成为在大豆上应用最广,最为重要的分子标记。

目前,大豆上已定名的 SSR 分子标记共有 900 多个,其中约 450 个已定位于大豆连锁群上。这些标记均由位于 Maryland 州的美国农业部大豆与苜蓿实验室 Cregan 博士发

<sup>\*</sup> 鸣谢: 本文作者非常感谢 Soybean and Alfalfa Research Laboratory, ARS- USDA 的 Perry Cregan 博士, F. Edward 等所提供的技术帮助和指导。

收稿日期 1999- 02- 05

Received on Feb. 5, 1999

展而定名的。本文作者有幸在该实验室与其共事,参与植物 SSR分子标记的创制全过程,对其创制及其所发展的标记应用稍有所了解,略加介绍,供参考。

## 1 SSR分子标记创制方法

SSR分子标记的创制包括以下过程:大豆基因组文库的构建;带有重复序列克隆的识别和筛选;测序;引物设计;检测

### 1.1 大豆基因组文库的构建

从 Willions 品种幼苗中提取 DNA,用 Qiagen Genomic DNA Purification Kit(Qiagen Inc.) 纯化,纯化后的 DNA 用多种限制性内切酶(SmaI, BsrBI, NlaIV, Cac8 I, NCI136II)酶切,酶切后的片段在 1% 琼脂凝胶电泳分离。切下大小为 400-750bp 的片段后,用 GeneClean II(Bio 101 Inc) kit 纯化。纯化的片段连接到 Bluescript(Stratagene)或 pGem 载体中,转化大肠杆菌,如 XL2-Blue 菌株,将转化后的大肠杆菌涂布于含青霉素(100mg/L), X-gal(40ug/L), IPTG(400mg/L)的 LB 选择培养基上,以便判断连接,转化效果及对克隆的选择。

### 1.2 含有 SSR 克隆的识别与筛选

#### 1.2.1 杂交膜的复制

经过 37°C,约 12 小时的培养后,将杂交膜覆盖在含克隆的培养基上复制,复制后的膜转移到仅含氯霉素(175mg/L)的 LB 培养基上,37°C 下培养 5-6 小时。随后将膜分别置于用 10% SDS,变性液(0.5M NaOH, 1.5M NaCl),中和液(1M Tris-HCl, 1.5M NaCl, pH7.5), 2X SSC 浸湿的 3MM 纸上各 5, 15, 5 和 5 分钟。待膜干后,在 80°C 的烘箱中真空干燥 90 分钟。

#### 1.2.2 探针的制备

大豆上,在具 2 个核苷酸重复序列的 SSR 中,出现频率最高,最易于设计引物的为 (CT)<sub>n</sub>,在具 3 个核苷酸重复序列的 SSR 中,则为 (ATT)<sub>n</sub>(Morgante, 1993)。因而目前对重复序列的筛选侧重于上述两种类型。制备时分别以 GGG(ATT)<sub>10</sub>, GG(CT)<sub>15</sub> 为模板,以 CCC(AAT)<sub>2</sub>, CC(CT)<sub>3</sub> 为引物,在含 Klenow 聚合酶,缓冲液,α-<sup>32</sup>PdATP, dTTP 或 dCTP 的混合液中反应约 30 分钟(37°C)。完毕,用 BioSpin 6 Chromatography column 过滤。

#### 1.2.3 膜的预杂交

将杂交膜在 6XSSC 溶液中洗 5 分钟,随后分别在含 0.05M Tris-HCl, 1.0M NaCl, 0.001M EDTA, 0.1% SDS 42°C 溶液中洗两次,每次 45 分钟,在含 0.1XSSC, 0.5% SDS 的 65°C 溶液中洗 30 分钟,在含 6XSSPE, 5X Denhardt's, 1% SDS 的 37°C 溶液中预杂交 30 分钟,将杂交膜,已变性的探针及约 10ml 的 1% SDS, 6XSSPE 加入预冷的杂交管中,在 37°C 下杂交 12-16 小时。

#### 1.2.4 洗膜

杂交后,杂交膜在含 1XSSC, 0.1% SDS 的溶液中洗约 40 分钟,对含 GG(CT)<sub>15</sub> 的探针,洗膜温度为 38°C,对含 GGG(AAT)<sub>10</sub> 的探针,洗膜温度为 46°C。洗毕,将膜包装,放入 X 胶片,置于 -70°C 约 2-3 小时。冲洗胶片后,便可以看到杂交信号。根据信号位置,就可以在相应的培养皿上找到带信号的相应克隆的大致位置。

### 1.2.5 克隆的再选择

即便将胶片信号与培养皿克隆对得很齐,但在选择时,很难准确无误地一次选择到与探针杂交的克隆,因而常在其附近选择 6-8 个克隆,用牙签将克隆分别挑到多孔盘的每孔中,每孔盛有 105ml LB 培养液(含 50mg/L 青霉素),在 37°C 条件下培养 12-16 小时。用带针印章将培养物盖至膜上(nitrocellulose membrane),在固体 LB 培养基培养 12-16 小时(37°C) 其后的预杂交,杂交,洗膜,信号显示等过程与上述步骤相同。只是在探针制备时,不用重新合成,而是将原有的探针在 95°C 下变性 15 分钟,迅速放入 -70°C 的乙醇及干冰混合液中,冰冻,然后用于杂交。

待光片冲洗后,根据信号强弱或有无,从 6-8 个克隆中再选择一个带强信号的克隆,将该克隆再涂布于含 100mg/L 青霉素的 LB 培养基上,培养 12-16 小时,从其中选择 6-8 个克隆培养,经盖印至杂交膜上,预杂交,杂交,洗膜,显示等,选择带强信号的对应克隆。经过三轮的筛选,此时带信号的对应克隆具单一插入片段且含所寻找的重复核苷酸顺序。

### 1.3 序列分析

筛选出的带 SSR 序列克隆在作序列分析之前可作两种处理:第一种处理:将单个克隆经 12 小时(37°C)液体 LB 摇动培养后,用 QIAwell Plasmid Kit(Qiagen Inc.)分离和提取带插入系列质粒,用作系列分析。第二种处理:选择单个克隆,加入 100ul 的 0.1% Tween 20,在 100°C 温度下煮 15 分钟,以其作模板,加入 T3, T7 或 SK, KS 引物作 PCR 扩增,PCR 产物用 QIAquick PCR purification Kit(Qiagen Inc.)纯化后用作系列分析。第一种处理方法结果很稳定,但成本较高,也多占用一些时间。第二种方法简便,但对某些 SSR 重复序列扩增效果不太理想。系列分析采用 ABI dRhodamine sequencing kit,先作 PCR 反应,经沉淀及变性后在自动测序仪上测序。

### 1.4 引物设计

目前多数使用 PRIMER 0.5 计算机软件(Whitehead Institute, Cambridge, MA02142)选择引物,大豆上选择时的主要参数为:引物长度一般为 18-30bp,产物的长度为 80-300bp,PCR 反应的退火温度为 47°C 左右。引物 3 端有 1-2 G/C 核苷酸,单个引物少于 3 个核苷酸的互补,两个引物之间少于连续 3 个核苷酸的配对,以防止 PCR 时引物形成 dimer 及发夹结构而影响扩增物的产量。

### 1.5 PCR 引物的检测

以构建基因文库 Williams 品种的 DNA 及提供测序并设计引物的带有插入顺序的质粒 DNA 作模板,在加入引物, dNTPS, DNA 聚合酶, Mg<sup>2+</sup>, 缓冲液,  $\alpha$ -<sup>32</sup>p dATP 后作 PCR 反应。反应产物在 6% 聚丙烯酰胺测序胶上分离,在 X 胶片上显示。剔除那些两个反应产物片段大小不一致,或非期望片段大小,或有多个片段的引物。对于那些扩增出单一片段且与期望片段大小相一致的引物,进一步在来源差异较大的大豆遗传型上检测是否具多态性。扩增出多态性片段的引物便可以定名,作为 SSR 标记供应用。

在大豆上,可定名应用的 SSR 标记仅占所测序列的 20-30%,占所设计引物的 40-50%。许多含有 SSR 的序列由于太靠近质粒,或由于 SSR 连续重复次数小于 7,或由于以前出现过的序列,因而被淘汰。设计的引物或由于不具多态性,或由于扩增出多个片段,

扩增片段与期望不一致等原因也被淘汰

在已设计的 900多个 SSR标记中,约 700个 SSR标记的引物选择设计在  $(ATT)_n$  两侧,约 200个 SSR标记的引物选择设计在  $(CT)_n$  两侧,约 30个 SSR标记的引物选择设计在  $(AT)_n$  及其它类型两侧。

## 2 SSR标记的应用

### 2.1 构建大豆分子遗传图谱

在过去的几年中,大豆上已有许多遗传图谱构建的报导 (Shoemaker and Olson, 1993, Lark etc, 1993, Shoemaker and Specht, 1995)。其中利用 RFLP标记是较常用的一种。但 RFLP标记的局限使大豆遗传图谱因所基于的群体变化而变化。首先, RFLP分子标记很少有多于 2个以上的等位基因。而且这两个等位基因的频率相差较大 (Keim et al., 1992)。所以任两个遗传型在同一 RFLP位点上具有多态性的频率非常低。尤其当两个遗传型都是育成品种时更是如此 (Apuya et al., 1988, Lark et al. 1993)。Shoemaker and Specht(1995)报导 365个在 *G. max* × *G. soja* 群体中呈多态性的分子标记中,仅有 118个在 Clark × Harosoy 群体中具多态性。这意味着在一个群体中具多态性的片段,在另一群体中却无分离。RFLP的第 2种局限性在于:多数 RFLP标记往往检测到多个 DNA片段,即与多个位点杂交。因为这类 RFLP标记,往往在一个群体中分离的片段,在另一群体中却不分离。对这类 RFLP标记除要标明探针,所用的限制性内切酶外,还要标明分离片段分子的大小。这种 RFLP多处出现的特点使得 RFLP所构建的连锁图往往含糊不清。SSR分子标记可克服上述 RFLP标记的不足。首先,单个位点具有多个等位基因,而每一遗传型中仅有一个等位基因的特点。在大豆上,SSR分子标记的多态性已经得到充分证实 (Akkaya et al., 1992),某些位点具有多达 26个等位基因。其次,在引物设计与选择时,仅保留那些在纯系中扩增出一个片段,淘汰那些扩增出多于一个片段的引物。

迄今为止,大豆上已公开了 900多个 SSR标记的引物序列,其中 443个 SSR标记已分别在下列 1个, 2个或 3个群体中定位: A81-35602 × *G. soja* (PI468816) F<sub>2</sub> 群体, Minsoy × Noir1 纯系, Clark × Harosoy F<sub>2</sub> 群体。定位的 SSR标记的顺序在不同群体中几乎一致。许多 SSR标记在 2个或 3个群体中均分离,因而通过这些 SSR标记将 3个群体各自原有 20以上的连锁群对应在一起,合并成为 20个连锁群,这 20个连锁群很有可能对应于大豆的 20对染色体。通过 SSR的桥梁作用,合并后的遗传图谱上,除有 443个 SSR标记外,共有 500个 RFLP, 98个 RAPD, 10个 AFLP, 12个同功酶及 22个形态性状标记 (Cregan et al., 1999)

目前,美国大豆界正广泛地合作,试图以 SSR图谱为基础定位 200多个农艺形态性状(包括抗性,色素,形态发育等)。鉴于定位的连锁图仍有不少大于 20cM 无 SSR标记的区间,如在 Minsoy × Noir 1 群体的连锁图上共有 36个这样的区间。美国农业部,美国大豆协会, Monsanto 种子公司资助 Dr. Cregan 利用 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) 文库及原有 SSR, RFLP 标记在这些区间发展新的 SSR标记。美国大豆协会, Monsanto 种子公司正在讨论在近 5年发展 1500- 2000个 SSR标记的计划,预期将建立更为密集的 SSR标记遗传图谱。

### 2.2 品种鉴别

植物品种专利保护条例的试行,目的在于保护育种者育成品种的利益不受侵害。品种受到专利保护的条件是:它必须有别于其它已育成品种的特征。过去特征多用花,茸毛颜色,叶形,生长习性,生育期长度等形态特征描述,但许多现代育成品种遗传背景相近,随着登记品种的增多,根据农艺性状区分品种已变得十分困难。SSR指纹图谱将为品种提供独特的特征。结合SSR多态性及其精确的片段大小,便可建立每一品种的标准图谱,以鉴别品种。Diwan (1997)选择包含北美95%的位点变异的32个大豆遗传型(Gizlice等),分析了20个大豆SSR标记,每一标记平均观察到10.1个等位基因。20个SSR标记成功地区分那些用形态性状不能分辨的及用17个RFLP未能分辨的品种。Rongwen (1995)等对97个大豆遗传型,利用7个SSR标记分析,每个位点发现11-26个等位基因,除2个具相似系谱的遗传型SSR图谱相同外,其它遗传型图谱均呈现特异性。Qijian Song等(1998)利用8个SSR标记对韩国59个大豆地方品种的分析显示:当结合2个位点鉴定时,27.4%的品种可以被区分开,结合3个位点鉴定时,52.8%的品种可以被区分开,结合8个位点鉴定时,93.2%的品种可以被区分开。

### 2.3 分子标记与辅助选择

SSR标记多应用于抗病(如抗南方根节线虫病, Jakkula等, 1998, 疫霉根腐病 Yu等 1998, 灰斑病 Wang等, 1998, 抗胞囊线虫病), 抗虫(如抗鳞翅目昆虫, Walker等 1998), 抗逆(如抗涝, Van Toai等, 1998, 抗酸性土壤中的铝毒危害, Kilgore等, 1998), 品质基因(如亚麻酸, 棕榈酸, Cregan, Kenworthy)的识别, 转移及育种选择中。已发现 Satt309与G群上抗SCN, Satt358, Satt445与抗南方根结线虫病, Satt064与抗涝等, Satt064与ms连锁。研究者还发现与疫霉根腐病, 灰斑病连锁标记, 并试图利用这样标记转移和累积相连锁基因(Walker等, 1998)。

### 2.4 遗传多样性及遗传距离

SSR标记信息用于估计育种亲本之间的距离, Cornelious等(1998)报导这种距离越远, 杂种后代产量愈有提高的趋势。Nelson等试图利用中国和日本育成不同熟期品种的遗传基因以丰富美国育种基因库, 他们从不同连锁群上选取SSR标记, 研究不同群体的遗传多样性及品种间的遗传距离, 以便利杂交育种亲本选择。Song等(1998)利用朝鲜地方品种资源研究SSR标记信息与农艺性状标记信息之间的关系, 建议多样性选择与保持时, 应注重结合分子与农艺性状双重信息。

可以预料, 随着遗传图谱上SSR及其它标记饱和度的提高, SSR标记在大豆基因及QTL分析, 辅助育种, 资源保护与利用, 品种系谱分析等领域的应用将具有更广泛的前景。

## 参 考 文 献

- [1] Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A., Cregan, P. B. 1992. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.
- [2] Apuya, N. R., B. L. Frazier, P. Keim, E. J. Roth, and K. G. Lark. 1988. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Theor. Appl. Genet.* 75: 889-

- [3] Cornelious, B. K., C. H. Sneller. 1998. Association of yield and genetic distance in soybean lines derived from crosses of northern by southern elite parents. 1998. Annual Meeting Abstract OF ASA, CSSA and SSSA p74
- [4] Cregan, P. B., Jarvik, A. L., Bush, R. C., Shoemaker, K. G., Lark, A. L., Kahler, T. T., VanToai, D. G., Lohnes, J., Chung, and J. E. Specht. 1999. An integrated genetic map of the soybean. Crop Science (in press)
- [5] Diwan, N., and P. R. Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. Theor. Appl. Genet.
- [6] Gizlice, Z., Carter Jr., T. E., Burton, J. W. 1994. Genetic base for North American public soybean cultivars released between 1947 and 1988. Crop Sci. 34: 1143-1151
- [7] Jakkula, L. R., M. A. R. Mian, J. P. Tamulonis, and H. R. Boerma. 1998. Marker assisted selection for southern root knot nematode resistance in soybean. Symposium of Molecular and Cellular Biology of the Soybean B-7
- [8] Kangfu Yu, P. Vaino, Terry A., and Dick B. 1998. Molecular mapping of quantitative trait loci (QTL) underlying tolerance of soybean to phytophthora root rot. Symposium of Molecular and Cellular Biology of the Soybean B-8
- [9] Keim, P., Shoemaker, R. C., Palmer, R. G. 1989. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. Theor. Appl. Genet. 77: 786-792
- [10] Keim, P., Beavis, W., Schupp, J., Freestone, R. 1992. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. Theor. Appl. Genet. 85: 205-212
- [11] Kilgore-norquest, L. L., C. H. Sneller, B. A. Hodges, and B. L. Okimoto. 1998. Heritability and marker assisted selection associated with aluminum tolerance in an F4-derived soybean population. 1998 Annual Meeting Abstract OF ASA, CSSA and SSSA. p74
- [12] Lark, K. G., Weisemann, J. M., Matthews, B. F., Palmer, R., Chase, K., Macalma, T. 1993. A genetic map of soybean (*Glycine max* L.) using an intraspecific cross of two cultivars "Minsoy" and "Noir 1". Theor. Appl. Genet. 86: 901-906
- [13] Morgante, M., Olivieri, A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal 3: 175-182
- [14] Nelson, R. L., P. B. Cregan, H. R. Boerma, T. E. Carter, C. V. Quigley, M. M. Welsh, J. Alvernaz, and R. Mian. 1998. DNA marker diversity among modern northern American, Chinese and Japanese soybean cultivars. 1998 Annual Meeting Abstract OF ASA, CSSA and SSSA. p164
- [15] Rongwen, J., Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A., Lavi, U., Cregan, P. B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor. Appl. Genet. 90: 43-48
- [16] Shoemaker, R. C., T. C. Olson. 1993. Molecular linkage map of soybean (*Glycine max* L. Merr.). p. 6 - p. 6: 138. In S. J. O'Brien (ed.) Genetic Maps: Locus maps of complex genomes. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- [17] Shoemaker, R. C., Specht, J. E. 1995. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. Crop Sci. 35: 436-446
- [18] Qijian Song, Kyo-Moon Shim, and Nam-Soo Kim. 1998. Genotype fingerprinting, differentiation and association between morphological traits and SSR information of soybean landraces. Plant Resource 1(2): 81-91
- [19] Qijian Song, Nam-soo Kim. 1998. SSR-FING: a BASIC computer program for DNA fingerprinting analysis with microsatellite SSR information. Korean Journal of Genetics 20(1): 29-34
- [20] VanToai, T. T., G. Boru, K. G. Lark, and S. K. St. Martin. 1998. Mapping of QTL for tolerance to soil waterlogging in soybean. Symposium of Molecular and Cellular Biology of the Soybean B-12

- [21] Walker, D. R., H. R. Boerma, J. N. All, and W. A. Parrott. 1998. Molecular breeding to pyramid insect resistance genes in soybean. 1998. Annual Meeting Abstract OF ASA, CSSA and SSSA. p77
- [22] Wang, T., M. A. R. Mian, J. Alvernaz, D. V. Phillips, and H. R. Boerma. 1998. Mapping Rss3 gene conferring resistance to frogeye leaf spot in soybean. Symposium of Molecular and Cellular Biology of the Soybean B- 10
- [23] Wang, Z., J. C. Weber, G. Zhong, S. D. Tanksley, 1994, Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88 1- 6

## A REVIEW OF DEVELOPMENT AND APPLICATION OF SIMPLE SEQUENCE REPEAT (SSE) IN SOYBEAN

Song Qijian

(*Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China*)

### Abstract

Simple sequence repeat (SSR) marker is highly polymorphic in soybean than other molecular markers such as RFLP, RAPD due to its high mutation rate and abundance with an even and random distribution in soybean genome. It is codominant and follows Mendelian inheritance. All these allow the widely application of the marker to genome mapping, marker assisted selection and DNA fingerprinting etc, in soybean. A protocol to develop SSR marker in soybean as well as examples of the application of SSR marker in soybean is reviewed.

**Key words** SSR marker; Genome mapping