

# 野生大豆芽期耐盐性状的关联分析

阚贵珍,张 威,李亚凯,喻德跃

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

**摘 要:**盐渍化是危害大豆生产的主要非生物胁迫因素之一。目前大豆耐盐性研究主要集中在栽培大豆的苗期耐盐性,而芽期耐盐性状的研究相对较少。野生大豆蕴含丰富的耐逆基因,是栽培大豆遗传改良的重要资源。为了研究野生大豆芽期耐盐性状的遗传机制,以 113 份野生大豆为试验材料,进行芽期耐盐性状的鉴定,结合群体的分子标记对包括 2 年平均值在内的 3 个环境下的 3 个耐盐指数进行全基因组关联分析,共检测到与野生大豆芽期耐盐相关的位点 26 个,6 个 SSR 标记 Satt521、Satt022、Satt239、Satt516、Satt251 和 Satt285 在 2 个或 3 个环境下均被检测到,4 个 SSR 标记 Satt516、Satt251、Satt285 和 GMES4990 与 2 个或 3 个耐盐指数显著相关。对这些 SSR 标记进行分析,挖掘了最优的等位基因及其载体材料。以上这些结果对于阐明野生大豆芽期耐盐性状的遗传机制,进一步发掘新的耐盐基因具有重要意义。同时也为栽培大豆遗传基础的拓宽、大豆耐盐分子标记辅助选择和分子设计育种等后续研究提供重要依据。

**关键词:**野生大豆;芽期;耐盐;关联分析

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.05.0737

## Association Mapping of Wild Soybean (*Glycine soja*) Seed Germination Under Salt Stress

KAN Gui-zhen, ZHANG Wei, LI Ya-kai, YU De-yue

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Salinity is one of major abiotic stress factors threatening soybean production. The previous studies mainly focused on salt tolerance at the soybean seedling stage. A few studies regarding salt tolerance during germination have been reported. Wild soybeans with richness of resistance genes are valuable resources for soybean genetic improvement. The objective of this study was to identify the genetic mechanisms of wild soybean seed germination under salt stress. One natural population consisting of 113 wild soybean accessions was used in this study. Three salt tolerance indices were measured. The molecular markers associated with salt tolerance were detected in 2013, 2014 and across two years by combining SSRs of genome-wide association analysis. 26 SSR-trait associations were identified using a mixed linear model and the TASSEL 2.1 software. Six SSRs, Satt521, Satt022, Satt239, Satt516, Satt251 and Satt285, were identified in two or three environments. Four SSRs, Satt516, Satt251, Satt285 and GMES4990, were co-associated with two or three salt tolerance indices. Furthermore, elite alleles and their carrier materials were identified by analyzing alleles at the above loci. These results could contribute to elucidate the genetic mechanisms of salt tolerance, explore new salt tolerant genes, and provide important foundation for broadening soybean's genetic base, molecular marker assisted selection and molecular design breeding in soybean salt tolerance breeding.

**Keywords:** Wild soybean; Germination; Salt tolerance; Genome-wide association mapping

土壤盐渍化和次生盐渍化是限制世界农业生产和影响生态环境的重要因素<sup>[1-3]</sup>。据估计,全世界 20% 的农业用地盐渍化<sup>[4]</sup>。土壤盐碱化和次生盐碱化日趋严重,尤其在干旱、半干旱及依赖灌溉的种植区,全球盐碱地每年以  $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$  hm<sup>2</sup> 的速度增长,预计到 2050 年,全世界将有超过 50% 的盐碱化耕地,严重威胁农业可持续发展<sup>[5]</sup>。大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 属中度耐盐植物,其盐害阈值为 5 dS·m<sup>-1</sup><sup>[6]</sup>。盐胁迫可阻碍大豆种子萌发

和植株生长,减少根瘤,抑制生物学产量的积累,导致产量下降和品质变化<sup>[2, 6-9]</sup>,同时盐胁迫可造成植株叶片褪绿、白化及坏死,甚至植株死亡<sup>[9]</sup>。虽然培育耐盐品种是解决盐碱地产量减少的最有效方法<sup>[10]</sup>,但是在实际育种中,由于还没有经济有效的筛选鉴定方法,而且田间盐分分布不均匀,这些都极大阻碍了耐盐育种的进展。大豆耐盐遗传机制的研究与分子标记技术的广泛应用为大豆耐盐遗传育种提供了有力的辅助工具<sup>[2]</sup>。

收稿日期:2017-06-20  
基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(KYZ201705)。  
第一作者简介:阚贵珍(1978-),女,博士,副教授,主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail:kanguizhen@njau.edu.cn。  
通讯作者:喻德跃(1965-),男,教授,博导,主要从事植物分子遗传与生物技术研究。E-mail:dyyu@njau.edu.cn。

目前,大豆分子耐盐育种已经取得长足的进展。多个主要耐盐(包括耐碱)QTL 被检测到,这些 QTL 主要定位在连锁群 D2<sup>[11-12]</sup>,G<sup>[13]</sup>和 N<sup>[1-2, 9, 14-15]</sup>,其中位于连锁群 N 上的 QTL 被不同的研究者检测到,这个区段包含的关键耐盐基因已经通过重测序<sup>[16]</sup>及图位克隆<sup>[15]</sup>被克隆出来。以上报道主要是针对大豆苗期耐盐的研究,对大豆芽期耐盐的遗传定位报道比较少,而在生产实际上首要问题是种子在盐碱地表层土壤中能否发芽出土,其次才是植株是否能存活结实,也就是说大豆萌发期的耐盐性是直接决定在盐碱地上种植时能否保证全苗,壮苗,提高产量的关键<sup>[17]</sup>,因此大豆芽期耐盐的研究尤为重要。

另外上述基于有限亲本材料所构建的分离群体的 QTL 定位只是有关染色体片段的初步定位<sup>[18]</sup>,对于寻找目标基因来说尚存在较大的不足。近年来,随着模式植物全基因组测序的完成,应用关联分析方法发掘植物数量性状基因已成为目前国际植物基因组学研究的热点之一<sup>[19]</sup>。大豆耐盐性状关联分析也有少量报道<sup>[20-22]</sup>。Zhang 等<sup>[20]</sup>利用 257 个大豆栽培材料和 135 个 SSR 标记进行上位性关联分析,85 个与环境互作的耐盐指数 QTL 被检测到,在这些 QTL 附近的耐盐相关基因也被发现。Kan 等<sup>[21]</sup>利用 191 个大豆地方种和 1 142 个 SNP 标记进行大豆芽期耐盐关联分析,鉴定到 8 个与芽期耐盐显著相关 SNP 标记和 13 个可能的 SNP 标记;利用 Blast 分析,获得了 9 个候选耐盐基因。基因表达量分析表明 5 个候选基因 *Glyma08g12400.1*、*Glyma08g09730.1*、*Glyma18g47140.1*、*Glyma09g00460.1* 和 *Glyma09g00490.3* 在芽期与耐盐响应。Kan 等<sup>[22]</sup>利用重组自交系群体和 196 份材料的自然群体进行大豆芽期耐盐性状的连锁和关联分析,11 个 QTLs 和 22 个 SSRs 被检测到,其中标记 Sat\_162 和 Kan 等<sup>[21]</sup>获得候选基因 *Glyma08g12400.1* 的距离为 792 811 bp。

一年生野生大豆 (*Glycine soja* Sieb and Zucc) 是栽培大豆的近缘野生种,适应性广泛。中国是大豆的起源中心,野生大豆资源丰富,占全世界野生大豆资源的 90% 以上。野生大豆抗盐性强也为许多研究所证实<sup>[11]</sup>,野生大豆蕴藏丰富的优良的耐逆基因,与栽培大豆杂交亲和<sup>[23]</sup>,分子标记分析表明野生大豆的遗传多样性高于栽培大豆,而且野生大豆的优异性状导入栽培大豆的研究已有报道<sup>[11]</sup>,日本国际农林水产业研究中心 (Japan International Re-

search Center for Agricultural Sciences, JIRCAS) 利用野生大豆材料 JWS156-1 进行了耐盐的定位研究<sup>[1, 11-12]</sup>,因此充分利用丰富的野生大豆资源,筛选优异耐盐种质,并进行大豆耐盐的分子遗传育种研究是完全有必要的。

本研究利用 113 份野生大豆进行芽期耐盐鉴定,结合群体分子标记进行全基因组关联分析,鉴定与野生大豆芽期耐盐性状显著相关的分子标记,阐明野生大豆芽期耐盐的遗传机制,为栽培大豆耐盐遗传基础的拓宽、大豆耐盐基因型种质鉴定以及大豆耐盐分子标记辅助育种提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 113 份野生大豆自然群体材料来自全国 24 个省份,材料均由国家大豆改良中心提供。该自然群体已成功用于产量相关性状的关联分析<sup>[24]</sup>。

田间试验于 2013 和 2014 年在南京农业大学江浦试验站 (N32. 12°, E118. 37°) 进行。采用完全随机区组设计,3 个区组,每个材料随机种植在 4 m<sup>2</sup> 的小区,每个小区 4 穴,每穴种植 20 粒种子,出苗 14 d 进行间苗,每穴 5 株。野生大豆生长期间扦插竹竿以利于直立生长。成熟时收获种子用于实验室芽期耐盐鉴定。

1.2 耐盐鉴定

芽期耐盐鉴定参考罗庆云<sup>[25]</sup>的方法,其中芽期耐盐鉴定中合适的 NaCl 盐溶液浓度为 150 mmol·L<sup>-1</sup><sup>[13, 21-22]</sup>。

芽期耐盐鉴定前,将种子在烘箱中烘干 3 d 以确保种子干燥度一致。每个材料要挑选表皮无破损、无皱缩、无病斑,颜色大小尽量均匀的种子,用手术用刀片划破种皮,置于含水或者 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液消毒的玻璃培养皿 (内径为 9 cm),充分接触,每皿 50 粒,处理前分别称量并记录每皿种子的干重。将装有处理液和种子的培养皿置于恒温培养箱中,黑暗条件下 (25 ± 1) °C 培养 24 h,将吸胀的种子称重并用相应的处理液清洗,再置于垫有消毒的两层定性滤纸的玻璃培养皿,再相应加入 5 mL 水或者 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液。每 24 h 统计种子发芽数目。种子发芽标准:以胚根长度超过或等于种子长度的 1/2,即认为种子发芽。培养 7 d。试验采取完全随机设计,每个材料设置处理组 (150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液) 和对照组 (水),每组 3 次重复。

芽期耐盐性鉴定指标包括,吸胀率  $IR\% = (W_2 - W_1)/W_1 \times 100$  ( $W_1$  代表未加溶液处理时的重量,  $W_2$  种子吸胀 24 h 后的重量)、发芽指数 ( $GI = \sum Gt/Dt$ ,  $Dt$  发芽试验的第  $N$  日,  $Gt$  发芽试验第  $N$  日的发芽数)、发芽率  $GR\% = (\text{发芽种子数}/\text{供试种子数}) \times 100$  及盐害指数  $ST = B/CK$  ( $B$  为  $150\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 盐溶液处理下的材料发芽率、吸胀率和发芽指数,  $CK$  为  $0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 水处理下的材料发芽率、吸胀率和发芽指数<sup>[3, 25-26]</sup>。

1.3 表型分析

利用 SAS 9.3 软件对 113 份自然群体的 3 个耐盐指数,相对吸胀率 (ST-IR),相对发芽指数 (ST-GI),相对发芽率 (ST-GR) 进行描述性统计分析。同时用 SAS 9.3 进行了方差分析以及相关分析。

1.4 分子标记

采用 CTAB 法提取野生大豆自然群体单株鲜嫩叶片的基因组 DNA<sup>[27]</sup>。参考 Song 等<sup>[28]</sup> 和 Hwang 等<sup>[29]</sup> 报道的遗传图谱,选取了覆盖 20 条染色体的 85 个 SSR 标记,对野生大豆自然群体进行基因组分型。PCR 所用引物序列来自 Song 等<sup>[28]</sup> 和 Hwang 等<sup>[29]</sup>,由英俊公司(上海)合成。PCR 扩增采用  $10\text{ }\mu\text{L}$  反应体系:  $10 \times \text{PCR Buffer } 1.5\text{ }\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+} (25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}) 0.8\text{ }\mu\text{L}$ ,  $\text{dNTP} (2.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}) 0.2\text{ }\mu\text{L}$ ,  $\text{Taq 酶} (0.5\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}) 0.1\text{ }\mu\text{L}$ ,引物  $3\text{ }\mu\text{L}$ ,模板 DNA ( $10\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $3\text{ }\mu\text{L}$ , $\text{ddH}_2\text{O } 1.4\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为:  $95^\circ\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ;  $94^\circ\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ ,  $52 \sim 56^\circ\text{C}$  退火  $30\text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $50\text{ s}$ , 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸  $7\text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$  保存。用 8% 非变性聚丙烯酰胺胶对扩增产物进行分离,银染检测。利用 Quantity One 软件,参照 DNA Ladder ( $50\text{ bp}$ ) 分析扩增产物条带的分子量大小,确定 SSR 标记等位变异数目及大小 (bp),用于后续分析。

1.5 关联分析

利用 STRUCTURE 2.2 软件进行群体结构  $Q$  和材料间亲缘关系  $K$  分析。前期研究中用 74 个覆盖全基因组的 SSR 标记对 113 份野生大豆进行群体结构分析,取  $\Delta K$  值最大时的  $K$  值为构成这 113 份野生大豆组成的总群体的亚群数,在此  $K$  值时 7 次重复运行结果中  $\text{Ln}(P)$  最大的那一次所对应的  $Q$  矩阵用于后续运算<sup>[24]</sup>。本研究为了避免群体结构和 Kinship 对关联分析结果的影响,利用 TASSEL

2.1 软件包中的混合线性模型  $\text{MLM}(Q + K)$  对盐害指数相关性状与 85 个 SSR 标记进行关联分析。以  $P < 0.01$  或者  $-\text{Log } P > 2$  为阈值决定标记与性状是否关联。

在关联分析的基础上,计算各位点及等位基因对性状的效应。具体计算公式如下:  $a_i = \sum X_{ij}/n_i - \sum N_k/n_k$ ,  $\text{AN} = a_i/\sum N_k/n_k \times 100\%$ ,  $a_i$  代表第  $i$  个等位变异的表型效应值,  $X_{ij}$  为携带第  $i$  个等位变异的第  $j$  个材料性状表型测定值,  $n_i$  为具有第  $i$  个等位变异的材料数。  $N_k$  为携带无效等位变异的第  $k$  个材料的表型测定值,  $n_k$  为具有无效等位变异的材料数。AN 为增效(减效)等位变异表型效应的增效(减效)比例<sup>[30]</sup>。根据这些效应估计值,确定最优的等位基因及其载体材料。

2 结果与分析

2.1 表型数据分析及相关分析

对 2013 和 2014 年 113 份野生大豆自然群体的室内发芽试验的相关性状(吸胀率、发芽率及发芽指数)以及相对盐害指数的平均值进行了描述性统计、方差分析以及相关分析。由表 1 可知,在  $150\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 盐溶液处理下,吸胀率、发芽指数及发芽率变化范围分别为  $80.11\% \sim 200.45\%$ 、 $0.17 \sim 25.03$ 、 $1.33\% \sim 92.00\%$ ,其平均值分别为  $134.28\%$ 、 $5.92$ 、 $32.46\%$ ;在  $0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液处理下,吸胀率、发芽指数及发芽率变化范围分别为  $71.52\% \sim 239.26\%$ 、 $2.12 \sim 34.21$ 、 $12.33\% \sim 102.67\%$ ,其平均值分别为  $150.43\%$ 、 $16.74$ 、 $69.43\%$ ,大于盐溶液处理下 3 个种子萌发性状的平均值。耐盐指数中相对吸胀率平均值为  $0.93$ ,变化范围为  $0.57 \sim 1.66$ ;相对发芽指数平均值为  $0.32$ ,变化范围为  $0.04 \sim 0.80$ ;相对发芽率平均值  $0.43$ ,变化范围为  $0.04 \sim 0.96$ ;并且 3 个耐盐指数表现为连续性的变异(图 1)。方差分析结果表明,吸胀率、发芽指数及发芽率 3 个种子萌发性状在盐溶液处理和对照之间存在极显著差异,而且在不同材料间以及不同年份间均存在极显著差异;3 个耐盐指数在不同材料间及年份间也均存在极显著差异。因此,野生大豆芽期耐盐相关性状属于多基因控制的数量性状,且容易受环境的影响。



$P < 0.001$ ), 与对照中的发芽率相关不显著;盐溶液处理中的吸胀率除与对照中的发芽指数呈极显著正相关外( $P < 0.01$ ), 与对照中的发芽率,盐溶液处理中的发芽指数和发芽率均相关不显著;对照和盐溶液处理中的发芽指数和发芽率两两极显著正相关( $P < 0.001$ )。

综上所述,虽然对照中的吸胀率与对照中的发

芽率相关不显著,而且盐溶液处理中的吸胀率与对照中的发芽率,盐溶液处理中的发芽指数和发芽率均相关不显著,但是相对吸胀率与相对发芽指数、相对发芽率呈显著、极显著负相关;另外相对发芽指数和相对发芽率呈极显著正相关,其相关系数也比较大。因此相对吸胀率、相对发芽指数和相对发芽率可以作为野生大豆芽期耐盐指标。

表 2 113 份野生大豆芽期 3 个耐盐性状的相关性分析

Table 2 Phenotypic correlations between three germination-related traits based on the means of the traits in 113 wild soybean accessions									
性状 Trait	处理 Treatment	IR		ST-IR S/C	GI		ST-GI S/C	GR	
		C	S		C	S		C	S
IR	S	0.644 ***							
ST-IR	S/C	-0.669 ***	-0.117						
GI	C	0.429 ***	0.283 **	-0.339 ***					
	S	0.340 ***	0.114	-0.342 ***	0.748 ***				
ST-GI	S/C	0.212 *	0.008	-0.227 *	0.416 ***	0.795 ***			
GR	C	0.146	0.066	-0.201 *	0.891 ***	0.591 ***	0.309 ***		
	S	0.270 **	-0.022	-0.358 ***	0.771 ***	0.939 ***	0.741 ***	0.682 ***	
ST-GR	S/C	0.268 **	-0.075	-0.335 ***	0.546 ***	0.833 ***	0.907 ***	0.400 ***	0.873 ***

\*、\*\*、\*\*\* 分别代表在  $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$  水平存在显著性差异。

\*, \*\* and \*\*\* means significant at  $P < 0.05, P < 0.01$  and  $P < 0.001$ .

2.2 与野生大豆芽期耐盐性状相关的 SSR 标记

利用关联分析共检测到与 3 个野生大豆芽期耐盐指数显著相关的 SSR 标记 26 个,包括 10 个与相对吸胀率显著相关的 SSR 标记,9 个与相对发芽指数显著相关的 SSR 标记以及 7 个与相对发芽率显著相关的 SSR 标记(表 3~5)。

与相对吸胀率显著相关的 SSR 标记有 10 个,

表 3 与相对吸胀率显著相关的 SSR 标记 ( -LogP > 2)

Table 3 SSR markers significantly associated with ST-IR ( -LogP > 2)					
年份 Year	标记 Marker	染色体 Chromosome	位置 Position	-LogP	前人研究 Previous studies
2013	Satt521	3	65.46	14.40	Chen 等 <sup>[13]</sup> ;Zhang 等 <sup>[20]</sup>
	Satt251	11	36.48	5.62	
2014	Satt521	3	65.46	55.31	Zhang 等 <sup>[20]</sup> Zhang 等 <sup>[20]</sup>
	Satt022	3	102.06	2.77	
	Satt285	16	25.51	2.82	
	Satt239	20	36.94	3.98	
两年联合 Two years combined	Satt521	3	65.46	34.75	Zhang 等 <sup>[20]</sup> Zhang 等 <sup>[20]</sup>
	Satt022	3	102.06	3.04	
	Satt038	18	1.84	2.96	
	Satt239	20	36.94	3.83	

与相对发芽指数显著相关的 SSR 标记有 9 个,主要位于 3、4、11、13、16 和 19 号染色体上, -LogP 为 2.24~11.30。2013 年检测到显著相关的 SSR 标记

主要位于 3、11、16、18 和 20 号染色体上, -LogP 为 2.77~55.31。2013 年检测到显著相关的 SSR 标记 2 个,2014 年检测到显著相关的 SSR 标记 4 个,2013 和 2014 两年联合检测到显著相关的 SSR 标记 4 个。其中 Satt521 在 2013、2014 以及两年联合均被检测到,Satt022 和 Satt239 在 2014 和两年联合均被检测到。

4 个,2014 年检测到显著相关的 SSR 标记 3 个,2013 和 2014 两年联合检测到显著相关的 SSR 标记 2 个。其中 Satt251 和 Satt516 在 2013 和两年联合均被检测到。

表 4 与相对发芽指数显著相关的 SSR 标记 ( -Log*P* > 2)  
Table 4 SSR markers significantly associated with ST-GI ( -Log*P* > 2)

年份 Year	标记 Marker	染色体 Chromosome	位置 Position	-Log <i>P</i>	前人研究 Previous studies
2013	Satt641	3	29. 28	2. 24	Chen 等 <sup>[13]</sup> ;Zhang 等 <sup>[20]</sup>
	Sat_330	7	140. 69	1. 97	
	Satt251	11	36. 48	9. 44	
	Satt516	13	44. 42	11. 30	
	Satt285	16	25. 51	3. 60	
2014	Satt578	4	65. 08	2. 85	Zhang 等 <sup>[20]</sup>
	Satt102	9	30. 28	2. 96	
	GMES4990	19	90. 06	4. 89	
两年联合	Satt251	11	36. 48	2. 31	Kan 等 <sup>[22]</sup> Chen 等 <sup>[13]</sup> ;Zhang 等 <sup>[20]</sup>
Two years combined	Satt516	13	44. 42	3. 81	

与相对发芽率显著相关的 SSR 标记有 7 个,主要位于 11、13、16 和 19 号染色体上, -Log*P* 为 2. 51 ~ 8. 16。2013 年检测到显著相关的 SSR 标记 3 个, 2014 年检测到显著相关的 SSR 标记 2 个,2013 和 2014 两年联合检测到显著相关的 SSR 标记 2 个。其中 Satt251 和 Satt516 在 2013 和两年联合均被检

测到;而且 Satt251 在 2013 年被检测到与相对吸胀率也显著相关。另外,Satt285 被检测到与 2013 年的相对发芽指数和相对发芽率以及 2014 年的相对吸胀率显著相关; GMES4990 被检测到与 2014 年的相对发芽指数和相对发芽率显著相关。

表 5 与相对发芽率显著相关的 SSR 标记 ( -Log*P* > 2)  
Table 5 SSR markers significantly associated with ST-GR ( -Log*P* > 2)

年份 Year	标记 Marker	染色体 Chromosome	位置 Position	-Log <i>P</i>	前人研究 Previous studies
2013	Satt251	11	36. 48	7. 31	Chen 等 <sup>[13]</sup> ;Zhang 等 <sup>[20]</sup>
	Satt516	13	44. 42	8. 16	
	Satt285	16	25. 51	3. 37	
2014	GMES4990	19	90. 06	2. 89	Zhang 等 <sup>[20]</sup> Kan 等 <sup>[22]</sup>
	GMES4376	19	91. 10	2. 51	
两年联合	Satt251	11	36. 48	2. 89	Kan 等 <sup>[22]</sup> Chen 等 <sup>[13]</sup> ;Zhang 等 <sup>[20]</sup>
Two years combined	Satt516	13	44. 42	3. 75	

由以上分析可以看出,6 个 SSR 标记 Satt521、Satt022、Satt239、Satt516、Satt251 和 Satt285 在 2 个或 3 个环境下均被检测到,4 个 SSR 标记 Satt516、Satt251、Satt285 和 GMES4990 与 2 个或 3 个耐盐指数显著相关。这些稳定检测到的 7 个 SSR 标记可以进行下一步优异等位基因的分析。

2.3 优异等位基因的挖掘

计算 7 个稳定检测的 SSR 标记的等位基因对耐盐性状的效应值。根据这些效应估计值,确定最优的等位基因及其载体材料(表 6)。

相对吸胀率在 2013 年增效和减效效应最大的等位基因分别是 Satt521-A204 和 Satt521-A172,效应值分别为 4. 63% 和 - 15. 44%,其载体材料分别是 NJAU\_W55 和 NJAU\_W73;相对吸胀率在 2014 年

增效和减效效应最大的等位基因分别是 Satt022-A207 和 Satt285-A263,效应值分别为 28. 63% 和 - 29. 32%,其载体材料分别是 NJAU\_W38 和 NJAU\_W85;相对吸胀率在 2013 和 2014 两年联合分析中,增效和减效效应最大的等位基因分别是 Satt022-A207 和 Satt521-A172,效应值分别为 20. 97% 和 - 8. 71%,其载体材料分别是 NJAU\_W38 和 NJAU\_W73。

相对发芽指数在 2013 年增效和减效效应最大的等位基因分别是 Satt516-A237 和 Satt251-A212,效应值分别为 92. 77% 和 - 76. 04%,其载体材料分别是 NJAU\_W31 和 NJAU\_W107;相对发芽指数在 2014 年增效和减效效应最大的等位基因分别是 GMES4990-A236 和 GMES4990-A254,效应值分别为

32.04% 和 - 33.20% , 其载体材料分别是 NJAU\_W101 和 NJAU\_W4; 相对发芽指数在 2013 和 2014 两年联合分析中, 增效和减效效应最大的等位基因分别是 Satt251-A198 和 Satt516-A289, 效应值分别为 83.48% 和 - 68.28% , 其载体材料分别是 NJAU\_W11 和 NJAU\_W72。

相对发芽率在 2013 年增效和减效效应最大的效应值分别为 148.69% 和 - 88.26% , 等位基因分别是 Satt516-A237 和 Satt285-A246, 其载体材料分别是 NJAU\_W31 和 NJAU\_W105; 相对发芽指数在 2014 年增效和减效效应最大的效应值分别为 42.00% 和 - 31.24% , 等位基因分别是 GMES4990-A236 和 GMES4990-A254, 其载体材料分别是 NJAU\_W101 和 NJAU\_W4; 相对发芽率在 2013 和 2014 两

年联合分析中, 增效和减效效应最大的效应值分别为 68.48% 和 - 48.21% , 等位基因分别是 Satt251-A288 和 Satt516-A289, 其载体材料分别是 NJAU\_W101 和 NJAU\_W72。

从以上分析可以看出, 等位基因 Satt521-A172 和 Satt022-A207 在不同环境下的相对吸胀率中检测为优异等位基因; 等位基因 Satt516-A237、GMES4990-A236、GMES4990-A254 以及 Satt516-A289 在相对发芽指数和相对发芽率中检测为优异等位基因; 另外, 野生大豆材料 NJAU\_W31 和 NJAU\_W101 同时携带了相对发芽指数和相对发芽率的增效等位基因, 野生大豆材料 NJAU\_W4 以及 NJAU\_W72 同时携带了相对发芽指数和相对发芽率的减效等位基因。

表 6 稳定检测到的 SSR 标记的优异等位基因效应及载体材料  
Table 6 Effects and typical accessions for elite alleles of stable SSR

性状 Trait	年份 Year	优异等位基因 Elite allele	AN /%	载体材料 Accession	性状 Trait	年份 Year	优异等位基因 Elite allele	AN /%	载体材料 Accession
ST-IR	2013	Satt521-A204	4.63	NJAU_W55	ST-GI	2013	Satt285-A263	42.41	NJAU_W112
		Satt521-A172	-15.44	NJAU_W73			Satt285-A246	-53.68	NJAU_105
	2014	Satt521-A147	11.17	NJAU_W38		2014	GMES4990-A236	32.04	NJAU_W101
		Satt521-A172	-1.85	NJAU_W73			GMES4990-A254	-33.20	NJAU_W4
	两年联合 Two years combined	Satt022-A207	28.63	NJAU_W38	两年联合 Two years combined		Satt251-A198	83.48	NJAU_W11
		Satt022-A291	-3.51	NJAU_W70			Satt251-A281	-33.61	NJAU_W51
		Satt239-A168	2.98	NJAU_W38			Satt516-A277	18	NJAU_W110
		Satt239-A216	-4.73	NJAU_W97			Satt516-A289	-68.28	NJAU_W72
		Satt285-A275	1.18	NJAU_W102	ST-GR	2013	Satt251-A181	67.98	NJAU_W2
		Satt285-A263	-29.32	NJAU_W85			Satt251-A212	-88.26	NJAU_W107
		Satt022-A207	20.97	NJAU_W38		2014	Satt516-A237	148.69	NJAU_W31
		Satt022-A224	-0.42	NJAU_W113			Satt516-A261	-34.7	NJAU_W85
		Satt239-A185	11.69	NJAU_W14			Satt285-A263	26.09	NJAU_W112
		Satt521-A147	5.58	NJAU_W38			Satt285-A246	-77.76	NJAU_105
		Satt521-A172	-8.71	NJAU_W73			GMES4990-A236	42.00	NJAU_W101
							GMES4990-A254	-31.24	NJAU_W4
ST-GI	2013	Satt251-A198	87.32	NJAU_W11	两年联合 Two years combined		Satt251-A288	68.48	NJAU_W101
		Satt251-A212	-76.04	NJAU_W107			Satt251-A281	-37.2	NJAU_W51
		Satt516-A237	92.77	NJAU_W31			Satt516-A277	24.93	NJAU_W110
		Satt516-A247	-42.2	NJAU_W99			Satt516-A289	-48.21	NJAU_W72

3 结论与讨论

种子萌发是植物生长的一个关键阶段, 种子萌发是从种子吸胀开始的<sup>[31]</sup>。吸胀是种子萌发过程

中对外界环境极为敏感的一个阶段<sup>[32]</sup>。种子在萌发过程中很快地响应植物的盐胁迫, 并且随着盐胁迫程度的增加, 种子的萌发受到显著抑制。盐胁迫造成的这种抑制是由于离子毒害和离子吸收不平

衡,进而造成水分吸收减少,种子内营养物质利用效率减弱<sup>[3, 31]</sup>。种子吸胀速率的降低可以减小盐胁迫带来的危害<sup>[33-34]</sup>。前人研究表明,大豆种子在吸胀阶段具有更强的耐盐性<sup>[6]</sup>。虽然本研究中盐溶液处理中的吸胀率除与对照中的发芽指数呈极显著正相关外,与对照中的发芽率,盐溶液处理中的发芽指数、发芽率、相对发芽指数以及相对发芽率均相关不显著,但是相对吸胀率除与盐溶液处理中的吸胀率相关不显著外,与对照中的3个发芽性状、盐溶液处理中的发芽指数和发芽率以及相对发芽指数、相对发芽率均呈显著、极显著负相关。因此相对吸胀率可以作为耐盐研究的指标之一,这在Wang等<sup>[3]</sup>的研究结果中已有报道。另外,由于相对发芽指数和相对发芽率具有极显著的相关性,所以相对发芽指数与相对发芽率显著关联的位点中重合位点比较多(Satt516、Satt251、Satt285和GMES4990),这与Kan等<sup>[21-22]</sup>报道的结果相符。由此,推测ST-GI与ST-GR的遗传机理可能是相同的。

野生大豆蕴含丰富的优异耐逆基因,是栽培大豆遗传改良的重要资源<sup>[23]</sup>。本研究利用野生大豆自然群体进行芽期耐盐研究,对包括两年平均值在内的3个环境下的3个耐盐指数进行关联分析,共检测到与野生大豆芽期耐盐相关的位点26个,Satt521在3个环境下均被检测,3个标记Satt022、Satt239和Satt516在两个环境下均被检测到,Satt251和Satt285在两个环境下被检测与3个耐盐指数显著相关,标记Satt516在2个环境下被检测与相对发芽指数和相对发芽率2个耐盐性状显著相关,标记GMES4990在1个环境下被检测与相对发芽指数和相对发芽率2个耐盐性状显著相关。对这些显著关联到的SSR标记进行分析,挖掘了最优的等位基因及其载体材料。以上这些结果为栽培大豆遗传基础的拓宽,大豆耐盐分子标记辅助选择和分子设计育种等后续研究提供重要依据。将本试验中关联分析定位到的位点,与大豆全基因组序列数据库Soy-Base (<http://www.soybase.org>)及国内外大豆耐盐研究结果进行比较<sup>[13, 20-22]</sup>,发现除标记Satt102、GMES4990和GMES4376以外,本研究检测的其它位点均和1个或多个大豆农艺性状相关联,其中本研究检测到的7个SSR标记与前人大豆耐盐研究鉴定到的标记一致或遗传区域基本一致(表3~5)。本研究结果中位于11号染色体上,与2013年3个耐盐指数、2年联合分析中相对发芽指数和相对发芽率显著相关的标记Satt251,与Zhang等<sup>[20]</sup>检测到的与主根长显著相关的标记Satt509、Chen等<sup>[13]</sup>检测到的与存活时间相关的QTL *qpsdB1.1*的

遗传区域基本一致;位于16号染色体上,与2013年的相对发芽指数和相对发芽率以及2014年的相对吸胀率显著相关的标记Satt285,与Zhang等<sup>[20]</sup>检测到的与主根长和苗的生物量显著相关的标记Satt228的遗传区域基本一致;位于3号染色体上与2013年和两年联合分析中的相对吸胀率显著相关的标记Satt022在Zhang等<sup>[20]</sup>的研究中与主根长、根的鲜重和根的干重显著相关;位于19号染色体上与2014年相对发芽指数和相对发芽率显著相关的标记GMES4990以及与2014年相对发芽率显著相关的标记GMES4376,与Kan等<sup>[22]</sup>检测到与相对吸胀率显著相关的标记Satt156以及与相对发芽指数和相对发芽率相关的标记Satt664的遗传区域基本一致;位于18号染色体上与两年联合分析中的相对吸胀率显著相关的标记Satt038,与Zhang等<sup>[20]</sup>检测到与主根长、下胚轴长以及苗的生物量显著相关的标记Satt309的遗传区域基本一致。

以上比较结果均验证了本研究检测的结果是真实可靠的。还有较多的位点是本研究检测到的新的位点,究其原因可能是耐盐性状是个多基因控制的复杂数量性状,大豆耐盐研究中不同大豆种质耐盐能力有明显差异,各生育阶段耐盐机制也不同,而且各生育阶段耐盐性之间没有明显的相关性<sup>[6, 9, 35]</sup>。目前关于大豆耐盐的研究主要集中在大豆的苗期,关于大豆芽期耐盐的遗传研究比较少。然而,在拟南芥、水稻、番茄等其它植物中已有很多研究尝试了解芽期耐盐的遗传机制<sup>[20]</sup>,其它植物的耐盐研究有助于我们对植物耐盐遗传机制的了解,也能大豆耐盐的研究提供参考。

参考文献

[1] Hamwieh A, Tuyen D D, Cong H, et al. Identification and validation of a major QTL for salt tolerance in soybean[J]. Euphytica, 2011, 179: 451-459.

[2] Hamwieh A, Xu D H. Conserved salt tolerance quantitative trait locus(QTL) in wild and cultivated soybeans[J]. Breeding Science, 2008, 58: 355-359.

[3] Wang Z F, Wang J F, Bao Y M, et al. Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress[J]. Euphytica, 2011, 178(3): 297-307.

[4] Flowers T J, Yeo A R. Breeding for salinity resistance in crop plants. Where next? [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1995, 22: 875-884.

[5] Ashraf M. Breeding for salinity tolerance in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1994, 13: 17-42.

[6] Phang T H, Shao G, Lam H M. Salt tolerance in soybean[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(10): 1196-1212.

[7] Wang D, Shannon M C. Emergence and seedling growth of soy-



bean cultivars and maturity groups under salinity groups under salinity[J]. Plant Soil, 1999, 214: 117-124.

[ 8 ] Essa T A. Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean [ *Glycine max* ( L. ) Merrill ] cultivars[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2002, 188: 86-93.

[ 9 ] Lee G J, Boerma H R, Villagarcia M R, et al. A major QTL conditioning salt tolerance in S-100 soybean and descendant cultivars [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109: 1610-1619.

[ 10 ] 张海燕, 关荣霞, 李英慧, 等. 大豆耐盐性种质资源 SSR 遗传多样性及标记辅助鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6 ( 3 ): 251-255. ( Zhang H Y, Guan R X, Li Y H, et al. Genetic diversity analysis and marker assisted identification of salt tolerant soybean by using SSR marker[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2005, 6(3): 251-255. )

[ 11 ] Tuyen D D, Lal S K, Xu D H. Identification of a major QTL allele from wild soybean ( *Glycine soja* Sieb. & Zucc. ) for increasing alkaline salt tolerance in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121: 229-236.

[ 12 ] Tuyen D D, Zhang H M, Xu D H. Validation and high-resolution mapping of a major quantitative trait locus for alkaline salt tolerance in soybean using residual heterozygous line[J]. Molecular Breeding, 2013, 31(1): 79-86.

[ 13 ] Chen H T, Cui S Y, Fu S X, et al. Identification of quantitative trait loci associated with salt tolerance during seedling growth in soybean ( *Glycine max* L. ) [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2008, 59: 1086-1091.

[ 14 ] Ha B K, Vuong T D, Velusamy V, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci conditioning salt tolerance in wild soybean ( *Glycine soja* ) PI 483463 [J]. Euphytica, 2013, 193 ( 1 ): 79-88.

[ 15 ] Guan R X, Qu Y, Guo Y, et al. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in *GmSALT3* [J]. Plant Journal, 2014, 80(6): 937-950.

[ 16 ] Qi X P, 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: 4340.

[ 17 ] 寇贺, 曹敏建, 那桂秋. 大豆种子萌发期耐盐性综合鉴定指标初探[J]. 杂粮作物, 2007, 27(5): 352-354. ( Kou H, Cao M J, Na G Q. Preliminary study on comprehensive evaluation of salt tolerance for soybean during seedling stage [J]. Rain Fed Crops, 2007, 27(5): 352-354. )

[ 18 ] Salvi S, Tuberosa R. To clone or not to clone plant QTLs: Present and future challenges [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10: 297-304.

[ 19 ] 杨小红, 严建兵, 郑艳萍, 等. 植物数量性状关联分析研究进展[J]. 作物学报, 2007, 33(4): 523-530. ( Yang X H, Yan J B, Zheng Y P, et al. Reviews of association analysis for quantitative traits in plants[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(4): 523-530. )

[ 20 ] Zhang W J, Niu Y, Bu S H, et al. Epistatic association mapping for alkaline and salinity tolerance traits in the soybean germination stage[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84750.

[ 21 ] Kan G Z, Zhang W, Yang W M, et al. Association mapping of soybean seed germination under salt stress[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290: 2147-2162.

[ 22 ] Kan G Z, Ning L H, Li Y K, et al. Identification of novel loci for salt stress at the seed germination stage in soybean [J]. Breeding Science, 2016, 66(4): 530-541.

[ 23 ] Andersson M S, de Vicente M C. Gene flow between crops and their wild relatives [M]. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2010: 465-481.

[ 24 ] Hu Z B, Zhang D, Zhang G Z, et al. Association mapping of yield-related traits and SSR markers in wild soybean ( *Glycine soja* Sieb. and Zucc. ) [J]. Breeding Science, 2014, 63 ( 5 ): 441-449.

[ 25 ] 罗庆云. 野生大豆和栽培大豆耐盐机理及遗传研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2003: 24-31. ( Luo Q Y. Study on mechanism and inheritance of salt tolerance in wild soybean ( *Glycine soja* ) and cultivated soybean ( *Glycine max* ) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003: 24-31. )

[ 26 ] Long N V, Dolstra O, Malosetti M, et al. Association mapping of salt tolerance in barley ( *Hordeum vulgare* L. ) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(9): 2335-2351.

[ 27 ] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12: 13-15.

[ 28 ] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109: 122-128.

[ 29 ] Hwang T Y, Sayama T, Takahashi M, et al. High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean[J]. DNA Research, 2009, 16: 213-225.

[ 30 ] 文自翔, 赵团结, 郑永战, 等. 中国栽培和野生大豆农艺及品质性状与 SSR 标记的关联分析 II. 优异等位变异的发掘[J]. 作物学报, 2008, 34, 1339-1349. ( Wen Z X, Zhao T J, Zheng Y Z, et al. Association analysis of agronomic and quality traits with SSR markers in *Glycine max* and *Glycine soja* in China: II. Exploration of elite alleles[J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34: 1339-1349. )

[ 31 ] Bewley J D. Seed germination and dormancy[J]. Plant Cell, 1997, 9(7): 1055-1066.

[ 32 ] Fredj M B, Zhani K, Hannachi C, et al. Effect of NaCl priming on seed germination of four coriander cultivars ( *Coriandrum sativum* ) [J]. EurAsian Journal of BioSciences, 2013, 7: 11-29.

[ 33 ] McCormac A C, Keefe P D. Cauliflower ( *Brassica oleracea* L. ) seed vigour: Imbibition effects[J]. Journal of Experimental Botany, 1990, 41: 893-899.

[ 34 ] Vertucci C W, Leopold A C. Water binding in legume seeds[J]. Plant Physiology, 1987, 85(1): 224-231.

[ 35 ] 邵桂花, 常汝镇, 陈一舞. 大豆耐盐性研究进展[J]. 大豆科学, 1993, 12(3): 244-248. ( Shao G H, Chang R Z, Chen Y W. Reviews of salt tolerance in soybean[J]. Soybean Science, 1993, 12(3): 244-248. )