

利用 SSR 标记分析山东省花生区试品种的遗传多样性特点

陈静¹, 胡晓辉¹, 苗华荣¹, 石运庆¹, 迟玉成¹, 崔凤高¹, 吴兰荣², 禹山林¹

(¹ 山东省花生研究所, 山东青岛 266100; ² 山东省青岛市种子站, 山东青岛 266100)

摘要: 利用 SSR 标记对山东省花生区试品种进行遗传多样性分析, 以参加国家北方区试的 17 份省外花生品种为对照。结果表明, 10 对 SSR 引物在 45 份花生品种共扩增出 57 条带, 其中 45 条呈现多态, 多态性比率为 78.95%。引物的多态性信息含量 (PIC) 变幅为 0.369~0.857, 平均值为 0.683。多样性指数比较表明, 山东省的基因多样性指数 $H(0.2476)$ 和 Shannon 指数 $I(0.3723)$ 均低于河南省 (0.2928, 0.4241) 和省外 (0.2929, 0.4268)。山东省内品种间的遗传相似系数介于 0.440~1.000 之间, 平均为 0.730, 省外品种间的遗传相似系数变化范围为 0.311~0.962, 平均为 0.638, 显著性测验表明山东省区试品种内的相似性极显著高于省外品种内的相似性。聚类分析表明山东省花生区试品种遗传基础较近, 绝大部分品种聚在第 II 类群; 河南省和河北省的部分品种与其他品种亲缘关系较远。与省外区试品种相比, 山东省花生区试品种遗传基础较近, 应不断引入省外亲缘关系较远的品种以拓宽其遗传基础。

关键词: 花生; SSR 标记; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S565.2 文献标识码: A

SSR-based Analysis of Genetic Diversity of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Varieties from the Region Tests of Shandong Province

Chen Jing¹, Hu Xiaohui¹, Miao Huarong¹, Shi Yunqing¹, Chi Yucheng¹,

Cui Fenggao¹, Wu Lanrong², Yu Shanlin¹

(¹Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100; ²Seed Station of Qingdao, Qingdao 266100)

Abstract: The purpose is to investigate the Genetic diversity of peanut varieties from the Region Tests of Shandong province. 45 peanut varieties were analyzed using SSR markers, including of 28 Shandong peanut varieties and 17 peanut varieties from other provinces. Total 57 bands were generated with 10 SSR primers, of which 45(78.95%) were polymorphic. The average polymorphism information content (PIC) was varied from 0.369–0.857, with an average of 0.683. The genetic diversity indices of Shandong peanut varieties (0.2476, 0.3723) were all lower than other provinces (0.2929, 0.4268) and Henan province (0.2928, 0.4241). The value of GS from Shandong peanut varieties ranged from 0.440 to 1.000, on an average of 0.730. The value of GS from other provinces varieties ranged from 0.311 to 0.962, on an average of 0.638. The significant test showed that the similarity of Shandong peanut varieties was higher than others provinces, and the difference was greatly significant at 0.01 level. The results of cluster analysis indicated that, the genetic basis of Shandong peanut varieties tends narrow, and most of varieties from Shandong were clustered into II group. The genetic basis of Shandong peanut varieties tends narrow. It is necessary to broaden its genetic basis by introducing diverse and distant varieties as parents in breeding program from other provinces.

Key words: peanut, SSR marker, genetic diversity, cluster analysis

基金项目: 山东省良种工程项目“高产优质出口专用花生新品种培育”(2007LZ004-02); 国家科技支撑计划课题“高产优质特用花生育种技术研究及新品种选育”(2006BAD01A04); 山东省科技成果转化资金项目“高产油用型大花生新品种花育 25 号种子繁育与示范”。

第一作者简介: 陈静, 女, 1976 年出生, 山东兖州人, 助研, 主要从事花生遗传育种研究。通信地址: 266100 山东省青岛市李沧区浮山路 126 号 山东省花生研究所。Tel: 0532-87631512, E-mail: mianbaohua2008@126.com。

通讯作者: 禹山林, 男, 1956 年出生, 山东莱州人, 研究员, 主要从事花生遗传育种研究。通信地址: 266100 山东省青岛市李沧区浮山路 126 号 山东省花生研究所。Tel: 0532-87626830, E-mail: yshanlin1956@163.com。

收稿日期: 2008-10-09, 修回日期: 2008-10-21。

山东省是中国花生生产大省,2001—2006年期间,年均种植面积 930 030 hm²,单产 3634.30 kg/hm²,总产 3 528 600t。面积和总产分别占全国的 18.64%和 24.82%,单产水平居全国首位^[1]。山东省也是中国花生育种工作起步较早、发展较快的省份之一,自建国以来培育出一批优良的花生品种,但由于长期对产量、抗性、品质等性状的连续定向选择,造成了育成品种遗传基础逐渐狭窄、遗传多样性下降^[2]。因此对代表当前花生育种动向和水平的区试品种进行遗传多样性分析,筛选遗传亲缘关系较远的品种应用于花生育种越来越重要。有关栽培种花生遗传多样性分析方法包括利用分子标记在基因组水平揭示遗传差异和利用亲缘关系指数分析遗传亲缘关系,涉及材料有栽培种花生种质资源和推广品种^[2-7]。唐荣华等利用 SSR 引物筛选出在珍珠豆型、多粒型花生品种中产生多态性的引物,并进行聚类分析,珍珠豆型花生品种间的遗传距离为 0.04~0.69,平均为 0.37,分为 4 个类群^[3];多粒型花生品种间遗传距离为 0.09~0.82,平均为 0.59,分为 5 个不同类群^[4]。韩柱强利用 SSR 标记分析栽培种花生的多态性,结果表明供试品种间的遗传相似系数值为 0.2~1.0,平均为 0.4788;聚类分析表明供试品种大多数

按亚种聚为两大类群(I、II),在两大类群下,大多数品种也基本上按类型分类^[5]。刘冠明等利用 6 对 SSR 引物对汕油和粤油系列的 15 个主要品种进行了遗传多样性分析,多态性信息含量为 0.124~0.622,品种间的相似系数为 0.167~0.833,聚类分析将这些品种划分为 4 大类^[6]。王丽丽等应用亲缘关系指数分析山东不同年代主栽花生品种的遗传多样性,认为近期育成的品种遗传多样性有所下降^[2]。以往的研究有对栽培种花生种质资源和推广品种进行多态性、多样性分析的报道。而利用 SSR 标记直接对区域试验品种进行多样性分析的研究尚无报道。笔者采用 SSR 标记对山东省花生区试品种进行遗传多样性分析,旨在分子水平了解山东省花生区试品种的遗传多样性水平,揭示目前山东省花生育种现状,以期为山东省花生育种策略的调整提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

材料为 2007 年参加山东省区域试验和国家北方区域试验的花生品种 45 份(表 1),其中 28 份来源于山东省不同育种单位,其余 17 份品种来自河南、河北、江苏、辽宁省,由病害鉴定单位和国家北方区试承担单

表 1 供试材料

代号	品种名称	参试组别	来源	代号	品种名称	参试组别	来源
1	P03-9	大花生组	山东省花生研究所	24	农大 119	小花生组	山东农业大学
2	P03-4	大花生组	山东省花生研究所	25	05A110	小花生组	山东农业大学
3	花选 11 号	大花生组	山东省花生研究所	26	莱农 26	小花生组	青岛农业大学
4	远育 16-9	大花生组	山东省花生研究所	27	民生一号	小花生组	山东省济宁市农业科学院
5	花选 10 号	大花生组	山东省花生研究所	28	鲁花 12 号	小花生组 ck	山东省烟台福山区农科所
6	P06-1	大花生组	山东省花生研究所	29	豫花 9633	大花生组	河南省农科院经作所
7	2005-X	大花生组	山东省花生研究所	30	豫花 9634	大花生组	河南省农科院经作所
8	P06-9	大花生组	山东省花生研究所	31	濮花 23 号	大花生组	河南省濮阳农科所
9	P03-3	大花生组	山东省花生研究所	32	郑农花 8 号	大花生组	河南省郑州农科所
10	远育 16-8	大花生组	山东省花生研究所	33	冀 9813	大花生组	河北省农科院粮油所
11	农大 138	大花生组	山东农业大学	34	徐州 9430	大花生组	江苏省徐州农科所
12	05A106	大花生组	山东农业大学	35	徐州 9519	大花生组	江苏省徐州农科所
13	潍 9819	大花生组	山东省潍坊农科院	36	濮花 22 号	小花生组	河南省濮阳农科所
14	潍 9816	大花生组	山东省潍坊农科院	37	濮花 24 号	小花生组	河南省濮阳农科所
15	临花 5 号	大花生组	临沂市农科院	38	开农 41	小花生组	河南省开封农科所
16	1013	大花生组	山东省即墨市永丰花生所	39	驻 20150	小花生组	河南省驻马店农科所
17	鲁花 11 号	大花生组 ck	山东省莱阳农学院	40	冀 9801	小花生组	河北省农科院粮油所
18	E12	小花生组	山东省花生研究所	41	冀 9606	小花生组	河北省农科院粮油所
19	R03-3	小花生组	山东省花生研究所	42	徐州 9318	小花生组	江苏省徐州农科所
20	系选 98-2	小花生组	山东省花生研究所	43	徐州 9505	小花生组	江苏省徐州农科所
21	E1	小花生组	山东省花生研究所	44	2008	小花生组	辽宁省风沙地改良利用研究所
22	R06-2	小花生组	山东省花生研究所	45	9658	小花生组	辽宁省风沙地改良利用研究所
23	花育 20 号	小花生组 ck	山东省花生研究所				

位山东省花生研究所提供。

1.2 SSR 分析

采用 CTAB 法提取 DNA^[8]。SSR 引物序列参照^[9]，由北京华大基因研究中心合成。采用 15 μ l PCR 反应体系：模板 1.5 μ l，Taq 酶 0.2 μ l，10 \times Taq Buffer 7.5 μ l，引物 0.6 μ l，ddH₂O 4.6 μ l。SSR 反应程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94 $^{\circ}$ C 变性 1 min，55 $^{\circ}$ C 退火 1 min，72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s，34 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min；4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物在 8% 非变性 PAGE 凝胶上分离，银染法显带。所有胶板均拍照存档。

1.3 数据统计

统计 SSR 电泳图谱上有差异且易于识别的多态性条带，在相同迁移率的位置上，有带记为“1”，无带记为“0”，组成 1 和 0 的原始矩阵。采用 NTSYS-pc 2.10e 软件进行聚类分析^[10]。对原始矩阵用 SimQual 程序求 Dice 相似系数，并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的 UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) 方法进行聚类分析，并通过 Treeplot 模块生成聚类图。根据供试品种的来源省份，利用 POPGENE Ver1.31 软件^[11]计算不同省份花生品种的多

态性位点 (NPL)、多态性位点百分数 (PPL)、Nei 基因多样性指数 (H) 和 SHANNON 指数 (I)。分子标记的多态性用计算每个引物的多态性信息指数 (Polymorphic information content, PIC), $PIC=1-\sum f_i^2$ 表示，其中 f_i 为 i 位点的基因频率。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性

利用 6 个形态差异较大的品种对 24 对 SSR 引物进行了筛选，确定其中的 10 对引物用于本研究。10 对引物在 28 份山东省品种中共扩增出 54 条带，其中 42 条呈现多态，每对引物平均产生多态性条带 4.2 个，引物的 PIC 值变幅为 0.360~0.857，平均值为 0.682；在 17 份省外品种中共扩增出 56 条带，其中 41 条呈现多态，每对引物平均产生多态性条带 4.1 个，引物的 PIC 值变幅为 0.375~0.835，平均值为 0.666；在 45 份品种中共扩增出 57 条带，其中 45 条呈现多态，每对引物平均产生多态性条带 4.5 个，引物的 PIC 值变幅为 0.369~0.857，平均值为 0.682 (表 2)。表明这些引物总体上具有较好的鉴别能力。

表 2 不同 SSR 引物的扩增结果

引物	多态性信息指数			多态性条带数		
	SM28*	SM17	SM45	SM28	SM17	SM45
PM32	0.785	0.765	0.774	5	5	5
PM36	0.744	0.786	0.785	6	4	6
PM50	0.826	0.835	0.832	8	6	8
PM73	0.799	0.698	0.753	5	5	5
PM170	0.857	0.750	0.857	4	7	7
PM297	0.499	0.500	0.500	2	2	2
PM348	0.667	0.667	0.667	3	3	3
PM375	0.360	0.375	0.370	2	2	2
PM377	0.749	0.746	0.749	4	4	4
PM384	0.537	0.541	0.540	3	3	3
合计 Total				42	41	45
平均 Mean	0.682	0.666	0.683	4.2	4.1	4.5

注：*SM28、SM17、SM45 分别为山东省品种、省外品种和全部品种。

2.2 山东省区试品种与省外区试品种遗传多样性比较

根据供试品种来源不同，比较其遗传多样性差异。从表 3 可知，多态性位点 NPL 变化范围为 19 (辽宁) 至 45 (全部)；多态性位点百分数 PPL 的变化幅度在 33.33%~78.95%；平均等位基因数 A 的变化从 1.333 (辽宁) 到 1.790 (全部)；有效等位基因数 A_e 的变化范围为 1.236 (辽宁)~1.525 (河南)；基因多样性指数 H 的变化从 0.138 (辽宁) 到 0.293 (省外、河南)；Shannon 指数的变化范围为 0.202 (辽宁)~0.427 (河南)。以上结果

表明，山东省的多态性位点 (NPL)、多态性位点百分数 (PPL) 和平均等位基因数略高，但有效等位基因数、基因多样性指数和 Shannon 指数均低于河南、省外和全部。依据遗传多样性高低顺序排列为：省外 > 河南 > 全部 > 山东 > 河北 > 江苏 > 辽宁。

2.3 聚类分析

利用 NTSYS2.10 分析软件，对扩增的 45 条多态带，计算品种间的遗传相似系数，并进行遗传聚类分析。45 份供试品种间的遗传相似系数介于 0.311~1.000

之间(表 4), 平均为 0.690; 山东省内品种间的遗传相似系数介于 0.440~1.000 之间, 平均为 0.730; 省外品种间的遗传相似系数变化范围为 0.311~0.962, 平均为

0.638。t 测验显示, 山东省品种内的相似性极显著高于省外品种内的相似性, 也极显著高于全部品种内的相似性(表 4)。表明省外品种具有较为丰富的遗传变异。

表 3 不同来源花生品种的多样性水平

来源	样本数	多态性位点数	多态性位点百分数	等位基因数	有效等位基因数	基因多样性指数	Shannon 指数
山东省	28	42	73.68%	1.737	1.420	0.248	0.372
河南省	8	40	70.18%	1.702	1.525	0.293	0.424
河北省	3	35	61.40%	1.614	1.456	0.253	0.368
江苏省	4	26	45.61%	1.456	1.365	0.199	0.286
辽宁省	2	19	33.33%	1.333	1.236	0.138	0.202
省外品种	17	41	71.93%	1.719	1.513	0.293	0.427
全部品种	45	45	78.95%	1.790	1.487	0.284	0.422

表 4 山东省内外花生区试品种遗传相似系数比较

材料	样本数	遗传相似系数变幅	SM28	SM17	SM45
山东省品种 (SM28)	28	0.440~1.00	0.730 ^a		
省外品种 (SM17)	17	0.311~0.962	7.368**	0.638 ^b	
全部品种 (SM45)	45	0.311~1.00	6.357**	4.395**	0.690 ^c

注:**表示在 0.01 水平上差异显著;a,b,c 分别为山东省品种、省外品种和全部品种的遗传相似系数平均值。

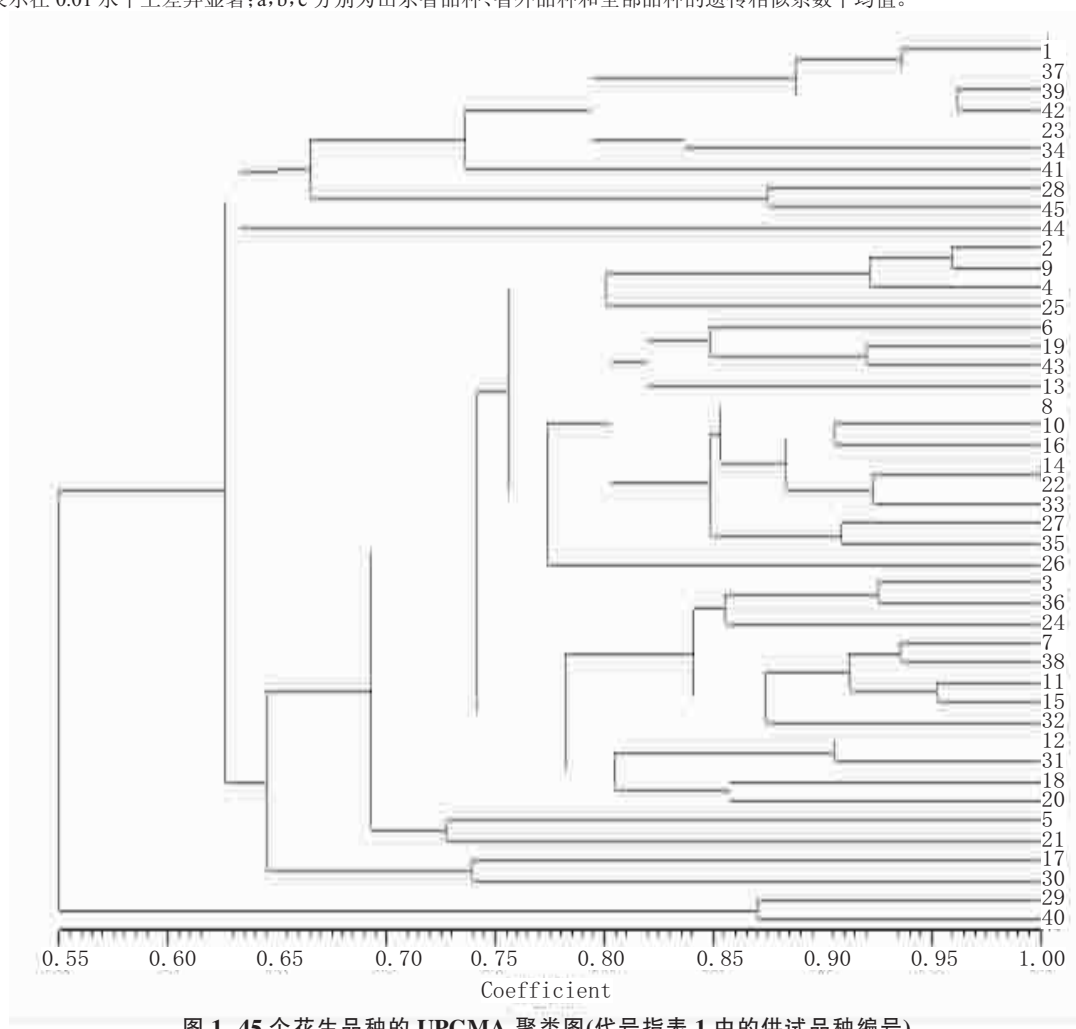


图 1 45 个花生品种的 UPGMA 聚类图(代号指表 1 中的供试品种编号)

聚类分析图显示(图 1), 在遗传相似系数 0.63 处, 可分为 3 个类群。第 I 类群包含 10 个品种, 分别是山

东省的 P03-9、花育 20 号、鲁花 12 号, 河南省的驻 20150、濮花 24 号, 江苏省的徐州 9318、徐州 9430, 河

北省的冀 9606 和辽宁省的 9658、2008。10 个品种中仅 P03-9 和徐州 9430 为大花生,其它均为小花生。该类群在遗传相似系数 0.72 处,又可分为 3 个组,辽宁省的 2008 单独成为第 3 组,辽宁省的 9656 和山东省的鲁花 12 号聚在一起成为第 2 组,其它 7 个品种聚在一起成为第 1 组。大部分品种聚在第 II 类群,包含 33 个品种,在遗传相似系数 0.72 处,该类群又可分为 3 个组,第 1 组包含 29 个品种,其中 21 个为山东省的品种,省外 8 个品种分布其中;山东省的花选 10 号和 E1 聚在一起成为第 2 组;山东省的鲁花 11 号和河南省的豫花 9634 聚在一起成为第 3 组。第 III 类群仅包含 2 个品种,分别是河北省的冀 9801 和河南省的豫花 9634。聚类结果表明,山东省提供的区试品种品种间的遗传基础较近,如除 P03-9 聚在第 I 类群,其它均聚在第 II 类群。而省外的部分品种与山东省的亲缘关系较远,如河北省的冀 9801 和河南省的豫花 9634,因而山东省花生育种中选用亲本时应注重引入省外亲缘关系较远的品种以拓宽其遗传基础。

3 讨论

笔者选用了 28 个山东省花生品种,其中鲁花 12 号、花育 20 号、鲁花 11 号为对照,其它 25 个为山东省 7 家育种单位提供的花生区试品种,具有很好的代表性。同时选用了国家北方区 4 个省份的 17 个区试品种,目的是在分子水平上了解山东省花生区试品种的遗传多样性水平,进而为合理利用花生种质和培育优良新品种提供参考。

与省外品种相比,山东省品种的基因多样性指数 H 和 Shannon 指数 I 均低于省外品种,应不断引入亲缘关系较远的品种以拓宽其遗传基础。不同省份比较,河南的基因多样性指数 H 和 Shannon 指数 I 最高,其次是山东、河北、江苏、辽宁。山东省材料来自多家不同的育种单位,非常具有代表性;河南省仅 8 份材料,来自 5 家不同的育种单位,基本可以代表河南当前的育种水平;而河北省的材料仅 3 份,且来自同一育种单位,其基因多样性指数略低于山东,推测其实际的多样性水平可能要高一些。另外遗传相似系数平均数的显著性 t 测验表明山东省品种内的相似性极显著高于省外品种内的相似性,也极显著高于全部品种内的相似性。所以山东省的花生品种有必要拓宽遗传基础,并且有拓展的空间,如果直接利用省外一些品种,如河南、河北的部分品种,就可能增加山东省花生品种的遗传变异。

需要指出的是,取样数与遗传多样性评价参数高低(等位基因变异、Shannon 指数、He)之间达到显著

和极显著相关^[2]。因此,对不同样本品种的遗传多样性进行比较时,其结果的差异可能是由于取样数的不同导致的。本研究中,省外品种少,但其参数却高,说明山东省与省外品种间的差异是客观存在的,不同省份品种间的遗传差异也是客观存在的。

开展遗传多样性分析评价目的是了解供试材料的遗传多样性水平,以期拓宽育成花生品种遗传基础提供理论指导。利用花生野生种拓宽育成花生品种遗传基础非常有前景,这是因为花生野生种具有栽培种所不具备的基因源,如蛋白质含量高、抗病虫和适应性强等。长期以来花生科技人员十分关注野生种的利用,获得了携带野生种遗传信息的种质,并提供了分子水平的证据^[13,14];获得了利用野生种培育的新品种,如通过审定(省级或国家)的品种远杂 9102、远杂 9307、梧油 7 号、桂花 22、桂花 26、花育 20 号(《中国花生品种系谱》待出版),但未见相关分子水平验证的报道;还获得一些品系提供参加省或国家区域试验,如远育 16-8、远育 16-9、E12 等。本研究中就包含 3 个与野生种有亲缘关系的品种远育 16-8、远育 16-9 和 E12,聚类分析显示均聚在第 II 类群,并未表现出其遗传基础与其他品种具有较大的差异。原因可能是本研究选用的标记个数较少,或是利用野生种培育花生新品种的过程中,由于人为定向选择或自然选择导致野生种基因的丢失。同样本研究结果也势必可以引起大家值得深思的一个问题,那就是利用花生野生种拓宽育成花生品种遗传基础非常有前景,人们也探讨了试图利用野生种的多种方法,如通过染色体加倍、果针离体培养等^[15-17],但利用过程中野生种对于育成品种的贡献率究竟有多大非常值得深入探讨,因为这关系到如何更加合理的利用野生种实现拓宽育成花生品种遗传基础的愿望。陈本银等认为利用野生花生对栽培种花生进行改良时,优先利用与栽培种花生遗传距离小的野生资源,有助于提高野生花生的利用效率,也可以其为桥梁来利用其他亲缘较远的优异野生种质^[18]。

参考文献

- [1] 全国农业统计提要.<http://www.agri.gov.cn/sjzl/nongyety.htm>.
- [2] 王丽丽,李尚霞,王月福.应用亲缘关系指数分析山东省不同年代主栽花生品种的遗传多样性.中国油料作物学报,2008,30(1):46-50.
- [3] 唐荣华,庄伟建,高国庆,等.珍珠豆型花生的简单序列重复(SSR)多态性.中国油料作物学报,2004,26(2):20-26.
- [4] 唐荣华,贺梁琼,高国庆,等.多粒型花生的 SSR 分子标记.花生学报,2004,33(2):11-16.
- [5] 韩柱强,高国庆,韦鹏霄,等.利用 SSR 标记分析栽培种花生的多态性及亲缘关系.作物学报,2004,30(11):1097-1101.

- [6] 刘冠明,郑奕雄,陈建萍,等.汕油系列和粤油系列花生品种遗传多样性的 SSR 标记分析.安徽农业科学,2006,34(11):2338-2339.
- [7] Subramanian V, Gurtu S, Nageswara Rao R C et al. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay.Genome,2000,43(4):656-660.
- [8] 陈静,胡晓辉,苗华荣,等.CTAB 法提取花生总 DNA 在 SSR 和 SRAP 中的扩增效果.花生学报,2008,37(1):29-32.
- [9] 唐荣华.花生属种质资源遗传多态性和分子分类研究.福建农林大学:博士论文:37-39.
- [10] Rohlf F J. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System,Version 2.10. Exeter Software, New York,2002
- [11] Francis C, Yeh and Rong-cai Yang. POPGENE version 1.31,1999.
- [12] 关媛,鄂文弟,王丽侠,等.以湖南和湖北大豆[Glycine max(L.) Merr.]为例分析影响遗传多样性评价的因素.作物学报,2007,33(3):461-468.
- [13] 吴兰荣,陈静,胡文广,等.利用花生野生种创新花生种质及其 RAPD 遗传鉴定.中国油料作物学报,2003,2:9-11.
- [14] He L Q,Tang R H,Gao G Q. Molecular evidence for gene introgression from wild species to cultivated varieties in peanut. Molecular Plant Breeding,2005,36:815-820.
- [15] 申馥玉,王在序,甘信民.花生种间三倍体杂种染色体加倍技术的研究.中国农业科学,1984,17(4):21-25.
- [16] F Y Shen, C T Wang and S F Duan. Aseptic culture of gynophores to obtain peanut intersectional hybrids.Euphytica,1995,81(3):245-249.
- [17] 申馥玉,朱学忠,王传堂,等.利用果针离体培养克服花生属种间杂交不亲和的研究.中国农业科学,1992,25(5):31-35.
- [18] 陈本银,姜慧芳,廖伯寿,等.利用 SSR 标记研究花生属种间亲缘关系.植物遗传资源学报,2007,8(2):140-144.

致谢: 山东省花生研究所段淑芬研究员对本研究提出宝贵修改意见,王传堂研究员、袁美博士提供 SSR 引物,河北农业大学周海基同学参加了部分试验和数据调查工作,特此致谢!