

利用中国秋大豆(*Glycine max*(L.) Merr)

筛选 SSR 核心位点的研究

谢 华¹, 常汝镇¹, 曹永生¹, 张明辉², 冯忠孚², 邱丽娟¹

(¹ 中国农业科学院作物品种资源研究所/农业部作物品种资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081;

² 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 选择中国秋大豆为试验材料, 对基因组 DNA 进行 SSR 标记筛选和鉴定。经过 200 个位点在琼脂糖胶上初筛和 96 个位点在变性聚丙烯酰胺胶上复筛, 选出 60 个位点, 这些位点具有以下特点: (1) 分布在大豆 20 个整合遗传连锁群, 相邻位点间平均遗传距离在 50 cM 左右。除连锁群 C₂、O 上分别有 5 个位点, G、K、M 上分别有 2 个位点外, 其余 15 个连锁群均分布有 3 个位点; (2) 与 96 个位点在 80 份秋大豆种质检测到种质间遗传关系达到极显著相关 ($r = 0.910^*$); (3) 在 80 份秋大豆初选核心种质中表现出较高多态性, 平均每个位点等位变异数为 9.3, 多态性信息含量 (PIC) 值为 0.773; (4) 在检测的秋大豆绝大多数种质基因组中, 均为单一拷贝的位点, 具有较高特异性; (5) 在相同的 PCR 扩增条件下, 同一位点不同等位变异间易于识别且扩增强度较为一致。这套 SSR 核心位点的确定为中国大豆核心种质的构建奠定了基础。

关键词: 大豆; SSR 位点; 遗传多样性; 指纹图谱; 核心种质

Selection of Core SSR Loci by Using Chinese Autumn Soybean

XIE Hua¹, CHANG Ru-zhen¹, CAO Yong-sheng¹, ZHANG Ming-hui², FENG Zhong-fu², QIU Li-juan¹

(¹ Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Crop Germplasm and Biotechnology, Ministry of Agricultural, Beijing 100081; ² College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: In this study Chinese autumn soybean were used as materials, and their genomic DNAs were analyzed with SSR markers. The objective was to obtain a set of representative SSR loci for analysis of genetic diversity and DNA fingerprinting in Chinese soybean germplasm. Therefore, it will be useful for enhancing management and utilization of Chinese soybean germplasm resources. Ninety-six loci from 200 loci were screened out by resolving alleles with agarose gels, and then detected alleles with silver stained polyarylamide gels. A set of 60 representative SSR loci was obtained which had following characteristics: (1) they distributed on 20 integrated linkage groups with an average of 50 cM genetic distances between two adjacent loci, including 5 loci on each of C₂ and O, 2 loci on each of G, K and M, and 3 loci on each of the other 15 linkage groups; (2) Defined the relationship among Chinese autumn soybeans were greatly significant correlation with that using 96 loci ($r = 0.910^*$); (3) They showed a higher level of polymorphism with an average of 8.8 alleles and 0.773 value of polymorphism informative content (PIC) per locus detected in the 80 autumn soybeans; (4) Each of them had single loci in majority of the 80 autumn soybeans and exhibited specificity; (5) Different alleles per locus were easy to discriminate and revealed approximately uniform amplified intensity under the same PCR conditions. This set of core SSR loci will play a very important role in establishment of Chinese soybean core collection.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr; SSR loci; Genetic diversity; Fingerprinting; Core collection

收稿日期: 2002-02-21

基金项目: 国家“973”项目大豆核心种质构建课题资助项目(G1988010203)

作者简介: 谢 华(1970-), 女, 山东莘县人, 博士, 研究方向为作物种质资源。邱丽娟为通讯作者, Tel: 010-62186650; Fax: 010-62186629; E-mail: qiu_ljuan@263.net

在作物种质鉴别和遗传多样性研究中,常用的传统方法是对作物表型性状差异进行评价。20 世纪 90 年代,分子标记技术的发展与广泛应用,使作物种质资源研究逐渐从表型深入到基因型水平。从基因组 DNA 水平上反映种质间的遗传差异,具有较高的个体特异性和对环境的稳定性。常用于种质鉴别及遗传多样性分析的有 RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 等分子标记。作为共显性分子标记,SSR 标记在种内品种间的多态性远高于 RFLP 标记。稳定性好于 RAPD 标记,技术本身又较 AFLP 标记简单,并以其位点特异性高,在基因组中具有广泛、丰富的分布等特点,现已被证实很适合像大豆这种严格自花授粉作物进行遗传多样性分析^[1-5]。目前,已开发出大豆 SSR 位点有 1 000 多个,公开报道已有 606 位点定位在大豆连锁群上^[6]。

在同一作物不同品种之间,并非所有 SSR 标记所要求的扩增条件都相同,扩增产物质量都好,扩增强度表现一致和多态性都高,基因组中拷贝数也并非都是单一的。为了提高分子标记在种质鉴别中的检测效率,发展一套具有较高质量与信息含量的分子标记鉴别体系,是十分重要的^[7]。

宋启建等^[8]从大豆 20 个连锁群上按一定的遗传距离,选取 48 个以 (ATT)_n 为单位的三核苷酸重复 SSR 位点,用 35 个北美大豆祖先品种测定位点的等位变异,选留 13 个片段长度信息互补且具最大区分效率位点,并检测其有效性,目前已被美国农业部推荐用于大豆品种专利保护的 DNA 指纹分析的标准位点。

大豆起源于我国,种质资源非常丰富^[9]。为了更有效地评价我国大豆种质的遗传变异,笔者通过 SSR 标记在中国秋大豆核心种质中扩增效果及多态性的分析,旨在确定一套有代表性的 SSR 核心位点,用于中国大豆种质资源遗传多样性和 DNA 指纹图谱的分析,以加强对种质资源的管理和保护,进而对指导大豆品种的遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 80 份秋大豆种质,约占全国秋大豆种质总数 11%,为秋大豆集中分布的浙江、江西、福建和湖南等 4 省 52 个收集点有代表性资源。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 为防止种质混杂所带来的影响,每份选脐色、种皮色、粒形等籽粒特征表现一致

的种子 20 粒,于温室点播,待苗长出 3 出复叶时,至少选取 8 株长势和表型特征较为一致的植株。取其新鲜的 3 出复叶提取基因组 DNA,提取方法参照 Keim 等^[10]的 CTAB 法,并稍作改动。

1.2.2 引物选择 根据已定位于大豆连锁群上 606 个 SSR 位点,从中选取 200 个均匀分布的位点,其中大多数位点较其分布区域内相邻 SSR 标记多态性信息含量要高^[6]。

1.2.3 PCR 反应与电泳检测 PCR 反应在 PCR 扩增仪 PE-9600 上进行。20 μ l 反应体系中含有 50~100 ng 基因组 DNA 模板,1 \times PCR 缓冲液、1.25 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol·L⁻¹ dNTP、0.2 μ mol·L⁻¹ SSR 引物和 1U Tag DNA 聚合酶。SSR 引物由上海生物工程公司合成,序列由 Perry Cregan 博士提供。SSR 反应程序包括:95℃ 预变性 4 min 后进行 35 个循环的 95℃ 变性 30s,47℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,在经 72℃ 延伸 10 min 后于 4℃ 保存。扩增产物用琼脂糖检测时,选用 3% Agrose (其中 1.5% 为 Bio-west Agrose,1.5% 为 Metaphor Agrose);用聚丙烯酰胺检测时,用测序胶(6% 聚丙烯酰胺,8 mol·L⁻¹ 脲素)电泳分离,分离过程中保持 100 W 恒定功率,待双色指示剂中二甲苯腈跑至电泳槽固定位置(距点样孔 2/3 处),停止电泳,银染后记录结果。每次检测 31 个样品,每板中间泳道设 Marker(PBR322/MspI)作对照样品,同一位点不同板之间谱带再经同一板统一检测校正。

1.2.4 数据分析 每个位点用 1 和 0 数字记录供试种质等位变异有和无;“1”代表有某一等位变异;“0”代表无,建立 0,1 矩阵。分别计算以下参数:

采用 Simpson 指数计算某一 SSR 位点 *i* 的多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC) 按 Narvel 等^[5]计算公式统计: $PIC_i = (n/n - 1) \{1 - \sum P_{ij}^2\}$, *n* 为资源份数, P_{ij} 为第 *i* 个位点第 *j* 个等位变异的频率;平均多态性信息含量: $PIC = \sum PIC_i / r$, *r* 为调查位点数。

根据 Nei 和 Li 的公式计算遗传相似系数: $GSC_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 N_{ij} 为种质 *i* 和种质 *j* 共有的等位变异数, N_i 为种质 *i* 具有的等位变异数, N_j 为种质 *j* 具有的等位变异数。遗传相似系数矩阵比较采用 Mantel Test。

用 Ntsys 2.10 软件包完成 GSC_{ij} 、Mantel Test。

2 结果与分析

2.1 不同 SSR 位点多态性分析

用随机选取 8 份秋大豆核心种质对 200 个位点进行同一反应体系及反应程序 PCR 扩增,在 3% 琼脂糖胶电泳检测的基础上,选出扩增效果稳定、扩增产物唯一、片段长度有差异的 96 个 SSR 位点。

用 96 个 SSR 位点对 80 份秋大豆种质基因组进行扩增,产物经 6% 丙烯酰胺胶分离,均检测出多态性(表 1),总共扩增出 845 个等位变异,每个位点等位变异数为 2~23 个,平均为 8.8 个。不同位点

表 1 80 份秋大豆种质 96 个 SSR 位点检测到的等位变异数和 PIC 值

Table 1 Number of alleles and PIC value of 96 SSR loci detected in 80 accessions of autumn soybean

| 位点 ¹⁾ Loci | 连锁群 Linkage group | 等位变异数 Number of alleles | PIC 值 PIC value | 位点 Loci | 连锁群 Linkage group | 等位变异数 Number of alleles | PIC 值 PIC value |
|--------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|------------|----------------------|----------------------------|--------------------|
| Satt236* | A ₁ | 8 | 0.671 | Satt309* | G | 9 | 0.817 |
| Satt276* | A ₁ | 16 | 0.901 | Satt352* | G | 8 | 0.818 |
| Satt300* | A ₁ | 15 | 0.872 | Average | | 8.5 | 0.818 |
| Average | | 13.0 | 0.815 | Satt434* | H | 6 | 0.693 |
| Satt429* | A ₂ | 6 | 0.785 | Satt279* | H | 9 | 0.867 |
| Satt390* | A ₂ | 4 | 0.696 | Satt253 | H | 6 | 0.730 |
| Satt187* | A ₂ | 6 | 0.816 | Satt314 | H | 4 | 0.300 |
| Average | | 5.3 | 0.766 | Satt142 | H | 7 | 0.742 |
| Satt415* | B ₁ | 9 | 0.846 | Satt442* | H | 8 | 0.824 |
| Satt509 | B ₁ | 3 | 0.233 | Average | | 6.7 | 0.693 |
| Satt453* | B ₁ | 6 | 0.791 | Satt571* | I | 5 | 0.141 |
| Satt197* | B ₁ | 16 | 0.912 | Satt451 | I | 3 | 0.366 |
| Average | | 8.5 | 0.696 | Satt148 | I | 10 | 0.490 |
| Satt168* | B ₂ | 6 | 0.721 | Satt239* | I | 9 | 0.840 |
| Satt556* | B ₂ | 6 | 0.565 | Sct-189* | I | 10 | 0.841 |
| Satt126 | B ₂ | 6 | 0.736 | Satt354 | I | 14 | 0.892 |
| Satt577* | B ₂ | 9 | 0.732 | Satt270 | I | 12 | 0.889 |
| Sat-063 | B ₂ | 9 | 0.776 | Average | | 9.0 | 0.637 |
| Average | | 7.2 | 0.706 | Satt431* | J | 13 | 0.889 |
| Satt578 | C ₁ | 7 | 0.650 | Satt244 | J | 21 | 0.938 |
| Satt194* | C ₁ | 7 | 0.743 | Satt596* | J | 18 | 0.889 |
| Satt565* | C ₁ | 7 | 0.509 | Sct-001* | J | 7 | 0.681 |
| Satt180* | C ¹ | 10 | 0.495 | Satt249 | J | 10 | 0.830 |
| Average | | 7.8 | 0.599 | Satt215 | J | 5 | 0.573 |
| Satt277* | C ₂ | 9 | 0.771 | Satt547 | J | 9 | 0.839 |
| Satt281* | C ₂ | 8 | 0.828 | Average | | 11.9 | 0.806 |
| Satt371* | C ₂ | 6 | 0.768 | Sat-044 | K | 12 | 0.840 |
| Sat-130* | C ₂ | 8 | 0.749 | Satt242* | K | 9 | 0.806 |
| Average | | 7.8 | 0.779 | Satt559 | K | 15 | 0.875 |
| Satt203* | D _{1a} + Q | 15 | 0.880 | Satt588* | K | 5 | 0.743 |
| Satt548 | D _{1a} + Q | 5 | 0.633 | Average | | 10.3 | 0.816 |
| Satt184* | D _{1a} + Q | 9 | 0.790 | Satt373* | L | 9 | 0.614 |
| Satt147 | D _{1a} + Q | 8 | 0.755 | Satt495 | L | 5 | 0.764 |
| Satt267* | D _{1a} + Q | 11 | 0.821 | Satt462* | L | 15 | 0.914 |
| Average | | 9.6 | 0.776 | Sat-099* | L | 11 | 0.844 |
| Satt216* | D _{1b} + W | 13 | 0.833 | Average | | 10.0 | 0.784 |
| Satt141 | D _{1b} + W | 14 | 0.877 | Satt590* | M | 8 | 0.718 |
| Satt005* | D _{1b} + W | 23 | 0.935 | Satt346* | M | 9 | 0.880 |
| Satt271 | D _{1b} + W | 3 | 0.518 | Satt245 | M | 9 | 0.717 |
| Sat-069 | D _{1b} + W | 11 | 0.866 | Satt308 | M | 7 | 0.773 |
| Satt579 | D _{1b} + W | 6 | 0.778 | Satt306 | M | 5 | 0.526 |
| Satt542* | D _{1b} + W | 8 | 0.819 | Average | | 7.6 | 0.723 |
| Satt600 | D _{1b} + W | 8 | 0.658 | Satt022* | N | 11 | 0.886 |
| Average | | 10.8 | 0.786 | Satt521 | N | 7 | 0.574 |
| Satt389 | D ₂ | 7 | 0.659 | Satt159 | N | 8 | 0.748 |
| Satt186 | D ₂ | 6 | 0.806 | Satt387* | N | 9 | 0.733 |
| Satt226* | D ₂ | 7 | 0.812 | Satt530* | N | 7 | 0.784 |
| Satt386* | D ₂ | 10 | 0.796 | Average | | 8.4 | 0.745 |
| Satt301 | D ₂ | 7 | 0.478 | Satt487* | O | 8 | 0.841 |
| Satt002* | D ₂ | 14 | 0.887 | Satt592* | O | 5 | 0.763 |
| Average | | 8.5 | 0.740 | Satt259* | O | 10 | 0.857 |
| Satt268* | E | 5 | 0.411 | Satt345* | O | 11 | 0.830 |
| Satt230* | E | 5 | 0.621 | Satt243* | O | 9 | 0.752 |
| Sat-112* | E | 9 | 0.802 | Sat-038 | O | 8 | 0.754 |
| Average | | 6.3 | 0.611 | Average | | 8.5 | 0.800 |
| Sct-188* | F | 2 | 0.484 | Total | | 845 | |
| Satt334* | F | 12 | 0.892 | Average | | 8.8 | 0.738 |
| Satt269 | F | 4 | 0.310 | | | | |
| Satt146* | F | 8 | 0.810 | | | | |
| Average | | 6.5 | 0.624 | | | | |

¹⁾ * "为入选的核心位点 " * "Selected core loci

等位变异数不等,其中 Sct-188 等位变异数最少,仅有 2 个;Satt 005 等位变异数最多,达到 23 个。有 80 个(83%以上)位点等位变异超过 5 个;其中具有 7、8、9 个等位变异的位点分别有 12、12、16 个(占 42%)。不同连锁群上 SSR 位点等位变异各异,变化范围为 5.3~13.0。 A_2 连锁群等位变异最低,平均为 5.3 个; A_1 连锁群等位变异最大,平均达 13.0 个。

为了进一步比较 SSR 位点多态性大小,计算了 96 个 SSR 位点在 80 份种质中的 PIC(表 1)。不同的 SSR 位点 PIC 变化也很大,Satt 571 的 PIC 最小,仅有 0.141;而 Satt 244 的 PIC 高达 0.938,大多数位点的 PIC 在 0.700~0.900 之间,平均每个位点的 PIC 为 0.738。不同连锁群 SSR 位点 PIC 不同, C_1 连锁群位点平均 PIC 最小,为 0.599;G 连锁群位点平均 PIC 最大,为 0.818。

2.2 SSR 位点对种质鉴别能力分析

利用计算机对 80 份种质进行随机抽样,统计鉴别不同份数的种质所需要的最少位点数。随机抽取 5 份种质,若随机选择位点 5 次重复结果显示,能将其完全区分开所需的最少位点数分别有 6、4、2、3、3 个,平均为 3.86 个;若定向选择位点,多态性信息含

量较高位点仅需要 1 个,多态性信息含量较低位点则需要 21 个。鉴别 10、20、30、40、50、60、70、80 份数不等的种质,在随机选择位点情况下,5 次重复结果平均所需最少位点数分别为 4.67、5.00、5.29、5.83、6.00、6.17、6.67、7.00 个。可见,随着鉴别种质数的增加,所需位点数逐渐增加。而在定向选择位点情况下,增加的种质数在一定范围内变化时,鉴别可以需要相同的最少位点数,超过一定范围,所需最少位点数增加。如对于多态性信息含量较高位点,鉴别 10~20 份种质,需要位点数为 1 个;种质数增加到 40~80 份,位点数增加到 4 个;对于多态性信息含量较低位点,鉴别 10~40 份种质,需要位点数为 27 个,50~80 份种质时,位点数增加到 39 个。鉴别相同份数种质,需要多态性信息含量较高的位点数明显低于多态性较低的位点数,如鉴别 50、60、70、80 份种质,多态性信息含量较高位点需要 4 个,较低位点则需要 39 个。可见,定向选择位点时,鉴别一定的种质数所需要的最少位点数,既要依种质份数,又要视选择位点的多态性信息含量的高低而定,鉴别相同份数种质,随机选择需要的位点数介于定向选择多态性信息含量较低和多态性信息含量较高位点数之间。

表 2 鉴别不同份数的种质所需要的最少位点数

Table 2 The minimum of SSR loci in identifying the different numbers of accessions

| 种质份数 Accessions | 随机选择位点 Random selection of loci | | | | | 平均 Mean | 定向选择位点 Directional selection of loci | |
|--------------------|------------------------------------|----|-----|----|---|------------|---|---------|
| | I | II | III | IV | V | | Max PIC | Min PIC |
| 80 | 7 | 5 | 7 | 7 | 9 | 7.00 | 4 | 39 |
| 70 | 7 | 5 | 7 | 8 | 6 | 6.67 | 4 | 39 |
| 60 | 8 | 5 | 7 | 6 | 5 | 6.17 | 4 | 39 |
| 50 | 7 | 5 | 7 | 6 | 5 | 6.00 | 4 | 39 |
| 40 | 7 | 5 | 7 | 6 | 4 | 5.83 | 4 | 27 |
| 30 | 7 | 4 | 5 | 5 | 6 | 5.29 | 2 | 27 |
| 20 | 5 | 6 | 5 | 4 | 5 | 5.00 | 1 | 27 |
| 10 | 7 | 3 | 5 | 4 | 6 | 4.67 | 1 | 27 |
| 5 | 6 | 4 | 2 | 3 | 3 | 3.86 | 1 | 21 |

群体内成对种质间遗传相似系数(GSC)可以在遗传上反映种质间相似程度,同时也可以揭示种质间遗传差异的大小,即两种质间 GSC 越小,则二者遗传差异越大。笔者通过 GSC 参数分析旨在确定与总等位变异数分析的种质间 GSC 达到显著或极显著相关所需要的等位变异数。根据等位变异多少、PIC 值大小分 4 种类型:位点等位变异从少到多(A)和从多到少(B)、位点 PIC 从小到大(C)和从大到小(D)对位点进行排序,选取等位变异数目。结果表明,在相同数目等位变异情况下,按位点等位变

异数从少到多(A)和 PIC 从小到大(C)排列位点,其分析 GSC 与总等位变异分析 GSC 间相关系数均高于另外两种类型(B和D);4 种类型相关系数均随着等位变异数的增加而增大。当用 200 个等位变异时,按等位变异从少到多(A)、PIC 从小到大(C)的组合,相关系数最先达到显著相关,400 个等位变异时,已达到极显著相关;而按等位变异数从多到少(B)、PIC 从大到小(D)的类型,在 500 个等位变异时,相关系数达到显著相关,600 个等位变异时,达到极显著相关。同样,PIC 值较大类型,所需等位变

异数也相应偏多。因而在相等等位变异情况下,对于等位变异较多或 PIC 值偏高的位点,相应地增加了所分析的位点数。可见,相关系数达到显著或极显著相关,需要分析一定的等位变异数或位点数。按所有位点平均等位变异为 8.8 来计算,分析 500

~ 600 个等位变异,需要位点数范围为 56.8 ~ 68.2。当分析位点数在 56.8 ~ 68.2 及等位变异数在 500 ~ 600 个时,与 96 个位点及 845 个等位变异所揭示种质间遗传差异大小接近或达到极显著相关(0.866* ~ 0.931**)。

表 3 不同位点组合等位变异数与所有位点总等位变异分析 80 份秋大豆种质 GSC 之间相关系数¹⁾

| 等位变异数 Alleles | 不同位点组合与总体的 GSC 相关系数 | | Correlation coefficient between different composition of loci and total loci | | |
|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------|----------------|
| | 最少等位变异数(A) Min numbers alleles | 最多等位变异数(B) Max numbers alleles | 最小 PIC 值(C) Min PIC value | 最大 PIC 值(D) Max PIC value | 平均值 Average |
| 100 | 0.623 | 0.450 | 0.564 | 0.445 | 0.521 |
| 200 | 0.780 | 0.549 | 0.741 | 0.552 | 0.655 |
| 300 | 0.865* | 0.659 | 0.842* | 0.664 | 0.757 |
| 400 | 0.908** | 0.747 | 0.905** | 0.762 | 0.831* |
| 500 | 0.944** | 0.817* | 0.943** | 0.841* | 0.886* |
| 600 | 0.969** | 0.889* | 0.966** | 0.898* | 0.931** |
| 700 | 0.984** | 0.924** | 0.984** | 0.942** | 0.958** |
| 800 | 0.996** | 0.962** | 0.996** | 0.968** | 0.980** |

¹⁾ * 和 ** 分别代表显著和极显著相关 * * and ** * represent significant and greatly significant correlation, respectively

2.3 有代表性 SSR 位点的确定

为了扩大基因组检测范围,鉴于目前大豆遗传连锁群总长度近 3 000 cM,遗传距离大约 50 cM 左右,选取一个 SSR 位点,故确定 60 个核心位点。这些位点在整合连锁群上相邻位点平均相距 50 cM 左右外,还考虑了其它 3 个因素:(1)为保证分析位点在基因组中具有较高的特异性,入选位点在绝大多数种质中为单一拷贝;(2)为了提高种质鉴别能力,尽量选取等位变异数较多和 PIC 较高的位点;(3)在相同 PCR 扩增条件下,其扩增产物强度较为一致,片段大小差异易于识别。

选出的 60 个 SSR 核心位点(表 1),遍及大豆 20 条连锁群,在连锁群上相邻位点间平均遗传距离在 50cM 左右。除连锁群 C₂、O 分别有 5 个位点,G、K、M 分别有 2 个位点,其余 15 个连锁群位点数均为 3 个。与 96 个位点检测种质间遗传差异达到极显著相关($r = 0.910^*$)。60 个位点在 80 份秋大豆种质中共检测到 561 个等位变异数,平均位点等位变异数为 9.3,多态性信息含量为 0.773。

3 讨论

3.1 秋大豆种质遗传变异代表性

大豆起源于我国,国家作物种质库中保存的大豆种质已高达 2.3 万余份。关于这些种质资源的生育日数、子粒基本特征(包括粒色、粒形、粒大小、脐

色等)植株性状(包括生育习性、结荚习性、茸毛色、花色、叶形、株高)脂肪和蛋白质含量及其抗性 etc 农艺性状在《中国大豆品种资源目录》(包括续编一、二)中有详细记载。在中国大豆种质资源各种生态类型群体中,秋大豆数量较少,分布范围比较集中,但表型变异类型非常丰富^[11];本研究所用的 80 份种质样本,约占全国秋大豆种质总数 11%,来自秋大豆集中分布的浙江、江西、福建和湖南等 4 省,遍及 52 个收集点,表型特征均有其地理差异的代表性。从大豆短日性这一原始性状推论,栽培大豆可能起源于中国南方^[12]。大豆生态类型是长期适应各地光温生态条件的结果,由于我国幅员辽阔,气候复杂多样,以及我国大豆种植制度的多样性,仅从光温生态方面很难得出有说服力的结论。盖钧镒等^[13]根据农艺性状、等位酶、细胞器 RFLP 标记对野生大豆和栽培大豆不同群体间遗传距离分析,也提出大豆起源于中国南方。田清震等^[14]的研究表明,长江流域及中南部野生大豆和栽培大豆农艺性状多样性丰富程度较高,支持南方起源说,并将起源地确定为我国中南部。谢华^[15]研究表明,南方秋大豆的 SSR 等位变异数是 5 个群体中最高的,且与其它群体之间遗传关系较远。在短日性这一原始性状上又强于其它各群体,且有些表型性状表现出一些原始性状特点,如浙江缙云撒豆、江西贵溪懒豆、湖南宜章禾根豆等百粒重仅在 6 g 左右。可见,

中国南方秋大豆可能是从当地野生大豆进化而成。因此,由南方秋大豆筛选出的 SSR 标记,不仅适用于栽培大豆的指纹图谱分析,对野生大豆的遗传多样性研究也是具有指导意义的。

3.2 SSR 位点的代表性

种质资源研究所需的分子标记数目并非越多越好,国际上也普遍赞同发展一套高信息含量分子标记,使其能在遗传研究中广泛和容易利用的观点^[7,16~19]。在各种类型的分子标记中,SSR 标记以其检测位点特异性、等位基因多样性、在基因组中分布的广泛性等特点,成为目前资源研究中最重要

的分子标记。Macaulay 等^[7]从大麦近 600 对 SSR 引物中,筛选出一套有代表性且信息含量较高的 48 对 SSR 引物,供不同实验室以及不同研究中试验结果直接比较利用。大豆 SSR 标记在其基因组中具有数量多、多态性丰富等特点,为了提高 SSR 标记在大豆种质鉴别中的检测效率,笔者以秋大豆核心种质为材料,筛选出一套多态性和代表性都较高的位点,用于中国大豆种质资源遗传多样性及 DNA 指纹图谱分析,将利于有效地对中国大豆种质资源进行深入评价与利用。

大豆 SSR 引物在设计过程中,虽然已淘汰了有多个扩增产物的引物^[20],但由于天然异交率的存在,或种质资源遗传背景的差异,一些种质中某些位点还是检测到同源位点的存在。为了提高检测位点特异性,在进行位点选择时,仅保留在绝大多数种质中具有单一拷贝的位点。

一般来说,大豆 SSR 标记随机分布于大豆基因组中,但也发现有 SSR 分布的不均衡区域^[6]。选取的 60 个 SSR 位点,在各连锁群上的间隔不尽一致,但相邻位点间平均遗传距离 50 cM 左右,基本覆盖了大豆基因组。

SSR 位点多态性高低既取决于它在群体内所揭示的等位变异数,即等位变异的丰富程度,又与其不同等位变异频率高低,即不同等位变异分布均匀程度密切相关。某一位点揭示的等位变异越多,不同等位变异在群体内分布又较为均匀,则该位点多态性越高。PIC 值是群体中位点等位变异丰富程度和均匀程度的综合反映。因此,常用来衡量位点多态性高低。本研究鉴定出 60 个 SSR 位点,在 80 份秋大豆种质检测到的平均 PIC (0.773) 明显高于 Cregan 等^[6]用地理来源差异大且分属不同熟期组大豆种质的研究结果(0.689)。Macaulay 等^[7]用 48 个

有代表性 SSR 位点在地理类型不同的 24 份大麦种质检测到平均 PIC (0.64) 也低于本研究结果。

Keim 等^[16]利用 RFLP 标记分析大豆品种间遗传距离标准误时,指出超过 90 个位点时,评价种质间遗传距离准确性较高。选取的 60 个 SSR 核心位点与 96 个位点在 80 份秋大豆种质检测到种质间遗传差异达到极显著相关 ($r = 0.910^*$),说明二者检测到遗传差异非常接近。谢华^[15]利用这套核心位点对中国不同生态类型大豆群体进行遗传多样性分析,表明中国大豆不同生态类型群体内种质间较密切的系谱关系和明显的地理分布特点,以及不同生态类型群体明显的遗传分化现象。王彪^[21]利用这套位点对中国大豆初选核心种质的随机样本 190 份材料进行分析时,也得到类似的分析结果。可见,这 60 个 SSR 位点适用于中国大豆种质资源遗传多样性分析,具有代表性。

References

- [1] Akkaya M S, Bhagwat A A, Cregan P B. Length polymorphism sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 1992, 132 : 131 - 139.
- [2] Rongwen J, Akkaya M S, Bhagwat A A, Lavi U, Cregan P B. The microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90 : 43 - 48.
- [3] Maughan P J, Saghai Maroof M A, Buss G R. Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean. *Genome*, 1995, 38 : 715 - 723.
- [4] Diwan N, Cregan P B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95 : 723 - 733.
- [5] Narvel J M, Fehr W R, Chu W C, Grant D, Shoemaker R C. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. *Crop Science*, 2000, 40 : 1452 - 1458.
- [6] Cregan P B, Jarvik T, Bush A L, Shoemaker R C, Lark K G, Kahler A L, Kaya N, Van Tosai T T, Lohnes D G, Chung J, Specht J E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science*, 1999, 39 : 1464 - 1490.
- [7] Macaulay M, Ramsay L, Powell W, Waugh R. A representative, highly informative genotyping set of barley SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102 : 801 - 809.
- [8] 宋启建, Quigley C V, Carter T E, Nelson R L, Boerma H R, Strachan J, Cregan P B. 用于大豆品种鉴定的一套标准三核苷酸重复系列位点的筛选. 第七届全国大豆学术讨论会论文集摘要集, 中国作物学会大豆专业委员会, 2001 : 47 - 48.
Song Q J, Quigley C V, Carter T E, Nelson R L, Boerma H R, Strachan J, Cregan P B. Selection of a set of standard 3-base pair (bp) repeats sequence markers for identification of soybean culti-

- vars. Proceeding of the Seventh National Soybean Research Conference of China ,Soybean Committee of the Crop Science Society of China ,2001 :47 - 48.(in Chinese)
- [9] 常汝镇 ,孙建英 ,邱丽娟. 中国大豆种质资源研究进展. 作物杂志 ,1998 ,3 :7 - 9.
- Chang R Z ,Sun J Y ,Qiu L J. Advances of study on soybean (*Glycine max* (L.) Merr) gemplasm resources in China. *Crops* ,1998 ,3 :7 - 9. (in Chinese)
- [10] Keim P ,Olson T C ,Shoemaker R C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genetics Newsletter* ,1988 ,15 :150 - 152.
- [11] 周新安 ,彭玉华 ,王国勋 ,常汝镇. 中国栽培大豆遗传多样性和起源中心初探. 中国农业科学 ,1998 ,31(3) :37 - 43.
- Zhou X A ,Peng Y H ,Wang G X ,Chang R Z. Preliminary studies on the centers of genetic diversity and origination of cultivated soybean in China. *Scientia Agricultura Sinica* ,1998 ,31(3) :37 - 43.(in Chinese)
- [12] 王金陵 ,武镛祥 ,吴礼和 ,孙善澄. 中国南北地区大豆光照生态类型的分析. 农业学报 ,1956 ,7(2) :169 - 180.
- Wang J L ,Wu Y X ,Wu L H ,Sun S C. Analysis of photoperiod ecotypes for north and south regions in China. *Journal of Agronomy* ,1956 ,7(2) :169 - 180. (in Chinese)
- [13] 盖钧镒 ,许东河 ,高 忠 ,岛本义也 ,阿部纯 ,福士泰史 ,北岛俊二. 中国栽培大豆和野生大豆不同生态类型群体间遗传演化关系地的研究. 作物学报 ,2002 ,28(5) :513 - 520.
- Gai J Y ,Xu D H ,Gao Z ,Shimamoto Y ,Abe J ,Fukushi H ,Kitajima S. Studies on the evolutionary relationship among ecotypes of *G. max* and *G. soja* in China. *Acta Agronomica Sinica* ,2002 ,28(5) :513 - 520.(in Chinese)
- [14] 田清震. 中国野生大豆与栽培大豆 AFLP 指纹分析及生态群体遗传关系研究. 南京农业大学博士学位论文 ,2000.
- Tian Q Z. AFLP fingerprint analysis and genetic relationship among eco-types of *G. max* and *G. soja* in China. Nanjing Agricultural University ,Ph. Dissertation ,2000.(in Chinese)
- [15] 谢 华. 中国大豆预选核心种质代表性样品遗传多样性研究. 中国农业科学院博士学位论文 ,2002.
- Xie H. Genetic diversity on representative samples from primary core collection of soybean (*G. max*) in China. Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Ph. Dissertation ,2002.(in Chinese)
- [16] Keim P ,Beavis W ,Schupp J ,Freestone R. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* ,1992 ,85 :205 - 212.
- [17] Thompson J A ,Nelson R L. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. *Crop Science* ,1998 ,38 :1 356 - 1 362.
- [18] Lorenzen L L ,Boutin S ,Young N ,Specht J E ,Shoemaker R C. Soybean pedigree analysis using map-based markers : I. Tracking RFLP markers in cultivars. *Crop Science* ,1995 ,35 :1 326 - 1 336.
- [19] Skourupska H T ,Shoemaker R C ,Warner A ,Shipe E R ,Bridges W C. Restriction fragment length polymorphism in soybean germplasm of the southern USA. *Crop Science* ,1993 ,33 :1 169 - 1 176.
- [20] 宋启建. 大豆 SSR 分子标记的创制及其应用. 大豆科学 ,1999 ,18(3) :248 - 254.
- Song Q J. A review of development and application of simple sequence repeat (SSR) in soybean. *Soybean Science* ,1999 ,18(3) :248 - 254.(in Chinese)
- [21] 王 彪. 中国栽培大豆遗传多样性 SSR 研究. 西北农业大学硕士学位论文 ,2002.
- Wang B. Analysis of genetic diversity of Chinese soybean cultivars using SSR markers. Northwest Agricultural University Master Dissertation ,2002.(in Chinese)

(责任编辑 卞海军)