

大豆地方品种遗传结构及其保存研究

王 俊^{1,2}, 王林林^{1,2}, 刘章雄², 关荣霞², 金龙国², 李英慧², 常汝镇², 罗淑萍¹, 邱丽娟²

(¹新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; ²中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

摘 要:我国具有丰富的地方品种,但在大豆育种中利用率较低,这与对地方品种的保存和鉴定研究较少有关。通过利用全基因组 SSR 标记扫描的方法对地方品种羊眼豆和毛豆进行纯度鉴定,旨在为地方品种的纯化及遗传完整性的保存提供科学依据。结果表明:羊眼豆在 502 个 SSR 标记位点的多态性为 44.8%,毛豆在 405 个 SSR 标记位点的多态性为 41.2%;检测 2 个地方品种纯度所需的最少标记数和种子粒数分别为 3 个标记和 4 粒种子;根据遗传一致性分别对 2 个地方品种进行聚类,在相似系数为 0.85 时,均被分为 3 个组。因此,这 2 个地方品种纯度较低,根据遗传一致性分组情况,对两个地方品种的一组进行提纯后作为一个品种保存,而另外 2 个组则可分别作为 2 个不同的地方品种保存其遗传完整性。

关键词:大豆;地方品种;SSR;纯度鉴定;遗传完整性;品种保存

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2008)03-0361-05

Genetic Structure and Conservation of Soybean Landraces

WANG Jun^{1,2}, WANG Lin-lin¹, LIU Zhang-xiong², GUAN Rong-xia², JIN Long-guo², LI Ying-hui², CHANG Ru-zhen², LUO Shu-ping¹, QIU Li-juan²

(¹Agronomy College of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang; ²The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI) / Key Laboratory of Germplasm & Biotechnology (MOA), Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: There are abundant soybean landraces in China, but few of them has been utilized in breeding program because of insufficient identification. In this study, two landraces of Yangyandou and Maodou were analyzed for their identity in order to provide instruction of purification and genetic integrity conservation of soybean landraces. The genome-wide SSR markers screening was used to analyze two landraces. Results showed (i) 44.8% of the 502 selected SSR markers showed polymorphism in Yangyandou and 167 of the 405 SSR markers showed polymorphism which accounted for 41.2% in Maodou; (ii) The minimum numbers of SSR markers and individual seed to determine the purity of two landraces were 3 and 4 respectively; (iii) Based on the cluster analysis, the two landraces could be segregated into 3 groups when the identity coefficient was at the level of 0.85. Results suggest that the purity of the two landrace are at low level. According to the genetic identity, one of the three groups could be utilized for one landrace and the others two groups could be separated as two different genetic integrity preservations for each of two landraces.

Key words: Soybean; Landrace; SSR; Purity determination; Genetic integrity; Variety preservation

我国已收集保存 23 000 余份栽培大豆资源, 6 000 余份野生大豆资源, 是全世界保存大豆种质数量最多的国家^[1], 其中地方品种占栽培大豆资源的 93%, 还有收集潜力^[2]。大豆地方品种是长期自然和人工选择的结果, 有其特殊的地域适应性, 在表型性状或遗传特性方面存在广泛的多样性, 是研究和

利用大豆优异性状的宝贵资源^[1]。地方品种的妥善保存对持续改良大豆品质和提高产量育种具有十分重要的意义。大豆地方品种的传统鉴定方法, 包括植株形态和种子特性、生理生化指标检测、病虫害抗性鉴定等方面, 但是这些表型性状鉴定易受到环境条件影响, 具有一定的不准确性^[3]。

收稿日期: 2008-04-12

基金项目: 科技部大豆共享数据平台课题资助项目(2005DKA21001); 农业部大豆繁种课题资助项目(NB06-070401-05, NB05-070401-22-06, B06-070401-18-11)。

作者简介: 王俊(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为大豆种质资源。E-mail: wjsoybean_2008@163.com。

通讯作者: 邱丽娟, 研究员, 博士生导师。Tel: 010-62135623; E-mail: qiu_lujuan@263.net。

遗传完整性,是指群体的遗传结构得到完全的保持,包括基因型频率分布及等位基因频率和原始群体一样保持不变^[4]。由于种质保存过程中的遗传流失、遗传脆弱性、遗传漂变等因素,品种的遗传结构极易发生改变,从而破坏了品种的遗传完整性^[4]。如何保持在繁种过程当中遗传多样性和完整性不致丢失,是大豆种质保存过程中面临的一项难题。

近年来,分子生物学的发展使基于 PCR 技术的 RAPD 标记^[5]、RFLP 技术^[6]和 SSR 标记^[7]成为种质鉴定和品种纯度检测的主要手段,同时越来越趋向于用最少的标记就便能达到快速检测品种纯度的目的。关荣霞等^[8]研究表明利用分布于不同连锁群的 11 对 SSR 引物对不同大豆品种纯度进行鉴定,达到了比较好的鉴定效果。

研究针对目前大豆地方品种资源鉴定及保存方面存在的问题,利用 SSR 标记技术从分子水平对大豆地方品种进行了纯度鉴定和遗传结构分析,为地方品种的纯化及遗传完整性和多样性的保存和合理利用提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用材料为由国家资源保存中期库中提供的 2 个地方品种羊眼豆和毛豆的种子。

1.2 试验方法

1.2.1 取样 全基因组 SSR 位点的筛选采用检测池的方法。羊眼豆种子 29 粒,分成 22 粒和 7 粒两个样本池;同样,毛豆种子 20 粒则以每 10 粒为一个池,每个池的种子混合磨取豆粉提取 DNA。在对检测到多态性的 SSR 位点则扩大种子数量并进行单粒检测。

1.2.2 DNA 的提取与 PCR 扩增 大豆豆粉 DNA 的提取采用 SDS 快速提取法^[9]。对所建 4 个池的 DNA 进行全基因组 SSR 标记扫描,所选引物分别分布在大豆 20 个连锁群。引物序列来自大豆数据库 (<http://bldg6.arsusda.gov/cregan/soymap.htm>),由赛百盛生物公司合成。PCR 扩增反应总体积为 20 μL ,反应液由 1 \times PCR 缓冲液、dNTPs 各 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1 U Taq 聚合酶,模板 DNA 20 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$,正反向引物各 150 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$,加 ddH₂O 补足至 20 μL 组成。PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,再进行 35 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 47 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,

72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染^[10],室温干燥,读取数据或照相。

1.3 数据统计

数据统计采用以下指标:

位点杂合率(Site Heterogeneity Rate, SHR) (%) = 杂合位点总数/检测位点总数 \times 100。

位点稀有等位变异率(Rare Allelic Variation Rate, RAVR) (%) = 稀有位点变异率个体数目/该位点总检测个体数 \times 100。

遗传相似系数(Genetic Similarity, GS)^[11] 遗传相似系数的分析采用 0~1 系统记录谱带位置,在相同迁移位置有带记为 1,无带记为 0。按 Nei and Li^[12]的方法计算材料间遗传相似系数(GS), $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$,其中, N_i 代表第 i 个单粒的扩增带纹数目, N_j 代表第 j 个单粒的扩增带纹数目, N_{ij} 代表第 i, j 个单粒间共有的带纹数目。根据 GS 值以不加权成对算术平均法 UPGMA 进行聚类,建立遗传相似系数聚类图。运算在 NTSYS2.1 统计软件包上完成。

遗传一致性分析的引物数折算的具体方法为:先根据分别检测并统计过的多态性位点数占位点筛选时有多态性位点总数的百分比计算出拟进行遗传相似性分析的无多态性标记数目,然后将其计入遗传相似性分析数据,均标以 1,表示该位点有带且无多态性。这样遗传多样性分析就可以代表整个基因组水平,而无取样偏差。折算可参照以下公式:(X:拟进行遗传相似性分析的无多态性标记数目;A:经个体检测过的有多态性标记数;B:标记筛选的有多态性标记总数;D:标记筛选的无多态性标记总数)。

2 结果与分析

2.1 品种纯度分析

利用分布在 20 个连锁群^[13]的 502 对 SSR 引物检测羊眼豆 2 个 DNA 池,225 个位点具有多态性,占 44.8%。随机选取 70 个多态性 SSR 位点检测组成两个池的 29 粒种子的 DNA,其稀有等位变异率为 27.1%。对毛豆 2 个 DNA 池用 405 个 SSR 位点分析,多态性位点为 167 个,占 41.2%。随机选择 57 个多态性 SSR 位点分析组成 2 个池的 20 粒种子 DNA,其平均稀有等位变异率为 29%。

在国家大豆新品种审定时,品种纯度的标准是位点杂合率 $< 15\%$ 。与此标准相比,地方品种羊眼

豆和毛豆的纯度,均比较低,需要对其进行纯化。

为了检测稀有等位变异率真实性,将羊眼豆和毛豆的检测个体数目分别从 29 粒和 20 粒扩大到 60 和 108 单粒,检测位点数分别为 17 和 8 个,两个地方品

种的平均稀有等位变异率分别增加到 33.8% 和 31.9%。可见,平均稀有等位变异率表现为随着检测群体数目的扩大而呈一定程度增加,且羊眼豆稀有等位变异率增幅(6.7%)高于毛豆(2.0%)。

表 1 检测标记数目对稀有等位变异率的影响

Table 1 Effect of the number of SSR markers tested on average individual seeds marker heterogeneity rate

统计位点数 No. of SSR markers involved	稀有等位变异率 Rare allelic variation rate of individual seeds/%					
	羊眼豆 Yangyandou			毛豆 Maodou		
	从小到大 From low to high	随机排列 Random	从大到小 From high to low	从小到大 From low to high	随机排列 Random	从大到小 From high to low
10	0.085	0.288	0.534	0.195	0.288	0.495
20	0.144	0.288	0.433	0.198	0.305	0.418
30	0.175	0.284	0.376	0.207	0.290	0.368
40	0.192	0.278	0.343	0.227	0.293	0.329
50	0.206	0.271	0.321	0.260	0.291	0.304
60	0.227	0.269	0.302	0.290*	0.290*	0.290*
70	0.271	0.271	0.271	-	-	-
平均 Average /%	0.271	0.271	0.271	0.290	0.290	0.290

* 为毛豆所用标记总数为 57 个时的平均稀有等位变异率。随机排列稀有等位变异率为 6 次随机排列得到结果的平均值。

* Denotes the average rare allelic variation rate of Maodou when the marker No. is 57. Random selected rare allelic variation rate is average amount calculated for 6 times.

2.2 检测位点数分析

为了明确位点稀有等位变异率是否受检测位点数的影响,将位点稀有等位变异率从小到大的顺序和从大到小的顺序分别排列分组(表 1),对其变化趋势进行计算机模拟。结果表明随机选择位点分组得到的平均稀有等位变异率结果均位于上述两种分组方法得出的平均值之间,且随机排列稀有等位变异率并未随所选引物数量的增多而有明显的变化,标准误分别为 0.00828 和 0.00622。说明随机选择的 SSR 标记能够代表该群体的稀有等位变异率状况,且整体平均稀有等位变异率相对恒定,所选引物数目的变化对其影响较小。同时还可以看出,当引物数增加到 50 以上时,平均稀有等位变异率趋于定值。从表 1 可以看出,羊眼豆稀有等位变异率变动范围为 8.5% ~ 53.4%,变幅为 0.449;毛豆则分别为 19.5% ~ 49.5% 和 0.30,两者的变异幅度均较高,且羊眼豆高于毛豆。

2.3 品种遗传结构分析

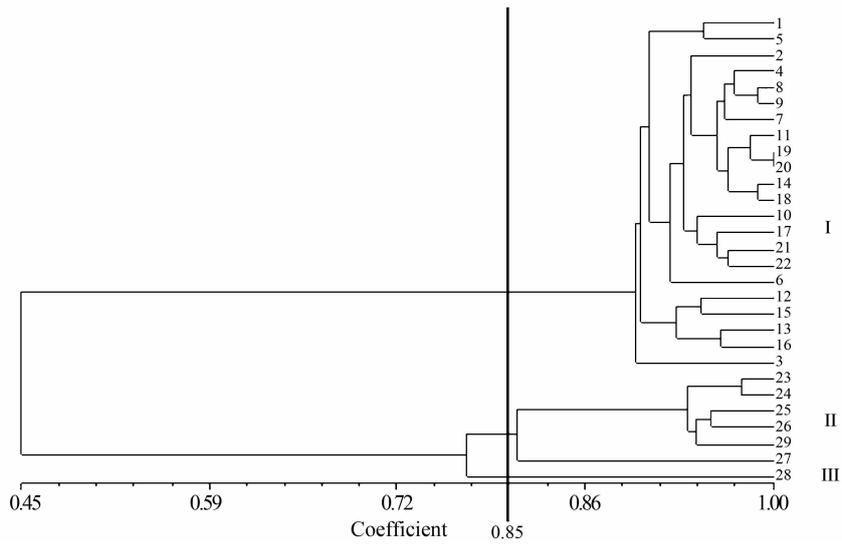
根据 SSR 数据用 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) 法进行聚类(图 1、图 2)。利用有多态性的标记对所选材料进行遗传一致性分析,发现羊眼豆在相似系数为 0.38 时可分为两类,如果将无多态性的标记按比例折算,然后进行遗传一致性分析,结果在相似系数为 0.60 时将

羊眼豆分为两类(图 1)。

毛豆未折算与折算后的遗传相似性分析,在相似系数为 0.29 和 0.55 时分为两类(图 2)。以上结果说明所选标记的代表性对聚类结果影响很大。从表 3 可以看出,随着相似系数增大,分组数也相应增加。当相似系数为 0.70 时,2 个品种都分成 2 组,而当相似系数为 0.80 和 0.85 时,2 个品种均被分为 3 组;当相似系数增加到 0.95 时,2 个品种分别被分为 14 组和 7 组,这说明如果要提高品种纯度,两地方品种又可分别被提纯为 14 个和 7 个品种(图 1、图 2)。

2.4 检测地方品种纯度所需最少位点数和种子粒数

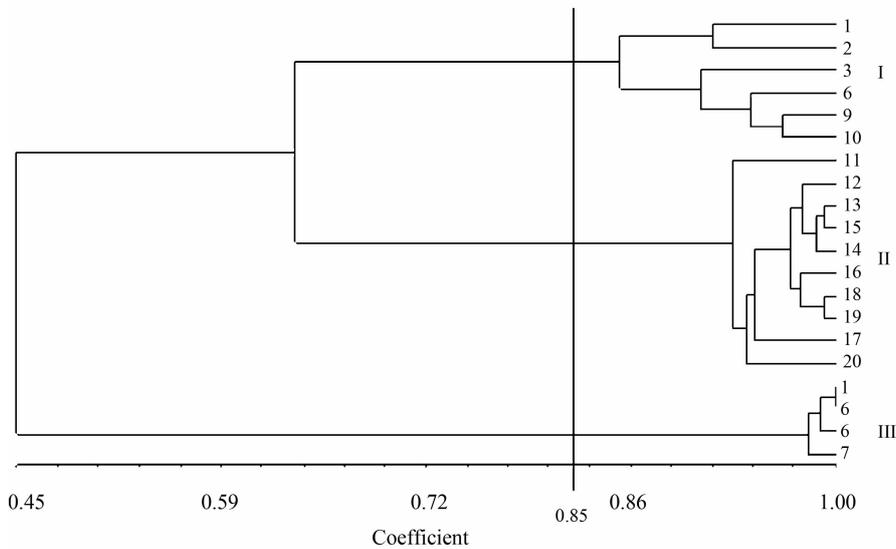
结果表明,随机选择的 SSR 标记能够代表该群体的平均位点杂合率状况,且平均稀有等位变异率相对恒定,选择引物数目的多少对其影响较小。因此,可以根据平均位点杂合率和稀有等位变异率计算检测品种纯度所需检测最少标记数和种子粒数。建议采用以下两个计算公式:最少位点数 = $\lceil (1/\text{品种最低纯度标准})/\text{位点杂合率} \rceil$; 最少种子单粒数 = $\lceil 1/\text{稀有等位变异率} \rceil$ ($\lceil \rceil$ 表示向上取整函数)。不同位点杂合率和稀有等位变异率下的最少检测种子粒数和最少检测位点数如表 2 所示。



1-29 表示 29 个不同单粒种子。1-29 represent different individual seeds.

图 1 29 粒羊眼豆种子 SSR 标记聚类树状图

Fig. 1 Dendrogram of 29 Yangyandou seeds by SSR markers



1-20 表示 20 个不同单粒种子。1-20 represent individual seeds.

图 2 20 粒毛豆种子 SSR 标记聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of 20 Maodou seeds by SSR markers

以羊眼豆和毛豆为例,其位点杂合率分别为 44.8% 和 41.2%, 2 个地方品种稀有等位变异率分别为 27.1% 和 29.0%, 如果能代表地方品种纯度水平, 则随机选取 3 个引物、对 4 粒种子进行检测就可明确地方品种纯度。若存在一粒种子在某一个随机选择的位点处存在杂合条带, 即说明该品种不纯。为提高准确率, 检测单粒种子数可以根据实际情况适当增加。

3 讨论

3.1 纯度检测所需最少位点数和最少单粒数公式的应用

根据研究结果, 如果已知品种位点杂合率和稀有等位变异率, 即可计算出纯度检测所需最少位点数和最少单粒数。然而在检测前, 通常位点杂合率和稀有等位变异率都是未知的, 这似乎限制了该公

表2 不同位点杂合率和稀有等位变异率条件下
检测品种纯度所需最少标记数和种子粒数

Table 2 The least No. of seeds and markers needed to determine
the purity of a variety under different SHR and RAVR

参 数 Parameter	位点杂合率或稀有等位变异率 SHR or RAVR/%									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
最少种子粒数 The least No. of seeds be tested	10	5	4	3	2	2	2	2	2	1
最少位点数 The least No. of markers be tested	12	6	4	3	3	2	2	2	2	2

式的应用。为此,在检测前可以假设位点杂合率和稀有等位变异率,计算得出的最少检测位点数和最少单粒数,在此条件下检测杂合标记或稀有等位变异位点,从而判断该品种是否符合设定标准。

3.2 地方品种提纯和遗传完整性保存

收集保存的地方品种纯度不高,在大豆、水稻^[14]、小麦^[15]等作物中都有不同程度的发生。盖钧镒^[4]提出,植物种质资源保存在繁种过程中要保持其遗传完整性及遗传多样性。从品种纯化的角度,应用遗传一致性分析的结果,供试品种在遗传相似性系数在0.85时均被分为三个组,结合大豆品种资源目录记载的表型性状,选择与表型性状最吻合的一组用于繁种纯化,其他二组的个体则可被分成二个新的品种,用于地方品种遗传完整性保存,以确保大豆品种的种子纯度。种子扩繁样本容量可参照章元明^[16]等给出的标准:播前样本容量为264~330粒。

参考文献

- [1] 邱丽娟,常汝镇,孙建英,等. 中国大豆品种资源的评价与利用前景[J]. 中国农业科技导报,2000(5):58-61. (Qiu L J, Chang R Zh, Sun J Y, et al. Perspects of evaluation and utilization of soybean germplasm China[J]. Review of China Agricultural Science and Technology,2000(5):58-61.)
- [2] 常汝镇,孙建英,邱丽娟,等. 中国大豆品种资源收集潜力的分析[J]. 作物品种资源,1993(1):1-3. (Chang R Z, Sun J Y, Qiu L J, et al. Collection potentiality of soybean germplasm resource[J]. China Seeds,1993(1):1-3.)
- [3] 陈芳芳,陈青,王惠英,等. 作物品种鉴定和纯度分析技术研究进展[J]. 福建农业科技,2007(2):13-16. (Chen F F, Chen Q, Wang H Y, et al. Progress on variation identification and purity analysis technology[J]. Fujian Agricultural Science and Technology,2007(2):13-16.)
- [4] 盖钧镒. 植物种质群体遗传结构改变的测度[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(1):1-8. (Gai J Y. Indicators related to genetic structure changes of plant germplasm population[J]. Journal of Plant Genetic Resources,2005,6(1):1-8.)
- [5] 张菊平,张兴志,张长远,等. 碧绿3号苦瓜种子纯度的RAPD检测研究[J]. 种子,2003,23(1):25-26. (Zhang J P, Zhang X Z, Zhang C Y, et al. Studies on Bilv No. 3 of Balsam Pear (*Momordica charantia* L.) seed purity tested by RAPD markers[J]. Seed,2003,23(1):25-26.)
- [6] 邓俭英,刘忠,康德贤,等. RFLP分子标记及其在蔬菜研究中的应用[J]. 分子植物育种,2005,3(2):245-248. (Deng J Y, Liu Z, Kang D X, et al. RFLP Molecular marker and its application to vegetable researches[J]. Molecular Plant Breeding,2005,3(2):245-248.)
- [7] 鲍根良,富田桂,小林麻子,等. 粳稻品种SSR多态性检出率的分析[J]. 中国农业科学,2005,38(12):2549-2554. (Bao G L, Katsura T, Asako K, et al. Analysis on SSR polymorphisms of japonica rice varieties[J]. Scientia Agricultura Sinica,2005,38(12):2549-2554.)
- [8] 关荣霞,刘燕,刘章雄,等. 利用SSR标记鉴定大豆品种纯度[J]. 分子植物育种,2003,1(3):357-360. (Guan R X, Liu Y, Liu Z X, et al. Purity identification of soybean varieties with SSR technique[J]. Molecular Plant Breeding,2003,1(3):357-360.)
- [9] 张伟,谢甫绶,宋显军,等. 适于SSR分析的大豆干种子中DNA快速提取[J]. 华北农学报,2007,22(2):133-135. (Zhang W, Xie F T, Song X J, et al. Rapid extraction of genome dna from soybean dry seed for SSR analysis[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2007,22(2):133-135.)
- [10] 傅占江,刘宝文,刘体全. DNA聚丙烯酰胺凝胶电泳三种银染方法比较[J]. 临床军医杂志,2002,30(4):71-73. (Fu Z J, Liu B W, Liu T Q, et al. Comparison of three DNA silver staining methods on polyacrylamide gels electrophoresis[J]. Journal of Clinical Medical Officer,2002,30(4):71-73.)
- [11] Halliburton R. Introduction to population genetics[M]. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ,2004.
- [12] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endo-nucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,1979,76:5269-5273.
- [13] Cregan P B, Jarvik T, Bush A, et al. An integrated genetic linkage map of the soybean[J]. Crop Science,1999,39:1464-1490.
- [14] 韩龙植,曹桂兰. 中国稻种资源收集、保存和更新现状[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(3):359-364. (Han L Z, Cao G L. Status of collection, conservation and propagation of rice germplasm in China[J]. Journal of Plant Genetic Resources,2005,6(3):359-364.)
- [15] 张玲丽,王辉,李立会,等. 中国小麦地方品种大青芒遗传多样性研究[J]. 中国农业科学,2007,40(8):1579-1586. (Zhang L L, Wang H, Li L H, et al. Genetic diversity analysis of common wheat landrace daqingmang in various growing areas[J]. Scientia Agricultura Sinica,2007,40(8):1579-1586.)
- [16] 章元明,盖钧镒. 大豆地方品种种质保持中适宜样本容量的研究[J]. 中国农业科学,1995,28(增刊):70-75. (Zhang Y M, Gai J Y. A study on suitable sample size in the conservation of landrace of soybeans[J]. Scientia Agricultura Sinica,1995,28(supplement):70-75.)