

冀鲁豫花生育成品种的遗传多样性分析

耿 健, 刘立峰, 崔顺立, 陈焕英, 魏新燕

(河北农业大学农学院/河北省作物种质资源重点实验室, 保定 071001)

摘要:以冀鲁豫三省不同地域的 41 个花生育成品种为材料, 利用 SSR 分子标记结合田间表型鉴定、聚类分析等方法对其遗传多样性进行了研究。结果表明, 21 对 SSR 引物对 41 个花生育成品种进行了扫描, 共检测到 52 个等位变异, 每个位点 2 ~ 4 个, 平均 2.5 个, Shannon 信息指数变幅为 0.21 ~ 1.40, 平均为 0.73。聚类分析显示在阈值为 5.54 可将供试品种分为 3 大类群 7 个亚类。不同品种 9 个农艺性状变异系数在 13.16% ~ 186.49% 之间, 基于农艺性状的聚类分析结果显示在阈值为 5.48 时可以将供试品种分为 6 大类群 11 个亚类, 各大类群间品种的农艺性状表现各具特点。

关键词:花生; 育成品种; SSR; 遗传多样性

Genetic Diversity of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Varieties Bred in Hebei, Shandong and Henan Provinces

GENG Jian, LIU Li-feng, CUI Shun-li, CHEN Huan-ying, WEI Xin-yan

(Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei Province/ College of

Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: In order to assess the genetic diversity, 41 peanut varieties bred in Hebei, Henan and Shandong provinces were used with methods of SSR markers, phenotypic identification and cluster analysis. Using 21 pairs of SSR primers, 41 peanut varieties were screened and 52 alleles were detected, with 2-4 alleles per locus and average of 2.5. Shannon information index of varieties ranged from 0.21 to 1.40 with an average was 0.73 for each pair of primers. Cluster analysis based on SSR markers showed that 3 groups and 7 subclasses were clustered while threshold was 5.54. The coefficient of variation for nine kinds of agronomic traits were at range of 13.16% - 186.49%. And the result of cluster analysis based on agronomic traits showed that these varieties were divided into 6 categories and 11 subclasses when threshold was 5.48. Varieties in each category have their own characters.

Key words: Peanut; Varieties; SSR; Genetic diversity

花生(*Arachis hypogaea* L.) 是世界上广泛种植的油料和蛋白质作物, 是我国重要油料作物和经济作物之一。华北平原的冀鲁豫三省是我国花生的集中种植区, 花生种植面积、总产分别占到全国的 48% 和 56%^[1]。近年来, 我国的花生育种工作取得了长足发展, 各地育成的花生新品种近百个^[2]。然而在花生育种工作中也存在一些突出的问题: 一是产量水平徘徊, 没有大幅度的提高; 二是育成的专用

型花生品种还较少; 三是新育成的品种适应性不够, 有的年份病虫害发生严重, 品种的遗传脆弱性凸现。因此加强花生品种资源遗传多样性研究, 对于拓宽品种的遗传基础, 促进花生的遗传改良和新品种选育具有十分重要的意义。

在花生的遗传多样性研究方面, 唐荣华等^[3]对 24 个多粒型花生作了 SSR 标记的多样性分析, 结果发现 16 个品种遗传距离为 0.09 ~ 0.82,

收稿日期: 2011-01-02 修回日期: 2011-12-08

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项基金; 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(10960120D); 河北省自然科学基金(C2009000591)

作者简介: 耿健, 硕士, 主要从事花生分子生物学研究。E-mail: xtreesgj@hotmail.com

通讯作者: 刘立峰, 博士, 教授, 主要从事花生基因组学与分子育种研究。E-mail: liulifeng@hebau.edu.cn

平均为 0.59。任小平等^[4]使用 AFLP 标记对 15 份龙生型花生品种作了遗传多样性考察,发现多态引物比例为 42.03%,比其他类型的花生都要高,因此推断龙生型花生在 DNA 水平上存在丰富的多样性。叶冰莹等^[5]使用 RAPD 技术对以南方育成品种为主的全国各地共 12 个花生品种进行了多样性分析,发现多态引物比例为 73.33%,遗传距离在 0.1128~0.3665 之间。王传堂等^[6]对以山东育成种为主的 10 个品种进行了分子标记分析,结果显示 SSR 与 STS 多样性引物更适于鉴别品种间的差异。姜慧芳等^[7]对我国抗青枯病花生种质的遗传多样性进行了系统研究。崔顺立等^[8]对 75 个河北省不同植物学类型花生地方品种的遗传多样性进行了分析。

本研究以在冀、鲁、豫广泛种植的 41 个育成品种为研究材料,利用 SSR 分子标记和田间表型鉴定,对其遗传多样性进行研究,以期冀、鲁、豫三省花生亲本选配提供参考,为花生遗传资源有效利用和花生新品种选育提供理论依据。

表 1 供试花生品种

Table 1 The peanut varieties

品种编号 Code	品种名称 Name	地理来源 Origin	品种编号 Code	品种名称 Name	地理来源 Origin	品种编号 Code	品种名称 Name	地理来源 Origin
1	冀 9742	河北	15	邢花 5 号	河北	29	鲁花 11	山东
2	冀 9814	河北	16	邢夏 1	河北	30	鲁花 14	山东
3	冀 9818	河北	17	邢夏 2	河北	31	鲁花 2000	山东
4	冀花 2 号	河北	18	花 8258	河北	32	鲁花 9 号	山东
5	冀花 4 号	河北	19	濮 9515	河南	33	维 9819	山东
6	冀花 5 号	河北	20	濮花 21	河南	34	花育 18	山东
7	冀花 6 号	河北	21	濮花 22	河南	35	花育 20 号	山东
8	冀花 8 号	河北	22	濮花 23	河南	36	花育 22 号	山东
9	冀油 4 号	河北	23	濮花 25 号	河南	37	花育 23 号	山东
10	唐 08-4211	河北	24	濮花 9519	河南	38	花 37	山东
11	唐 9806	河北	25	漂花 1 号	河南	39	平度 08	山东
12	唐花 10 号	河北	26	开农 58	河南	40	丰花 1 号	山东
13	邢花 1 号	河北	27	豫花 9633	河南	41	源花 8 号	山东
14	邢花 4 号	河北	28	远杂 9847	河南			

读带时,电泳图上清晰且可重复出现的带型为“1”,同一位置无带或不易分辨带型记为“0”,统计每个 SSR 位点的等位基因数,计算引物的多态性百分率(多态性谱带数/总谱带数×100%)和不同类

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用本实验室收集到的冀、鲁、豫三省育成的 41 个花生品种,品种名称及来源见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采集 0.1g 的叶片放入研钵中,加入液氮迅速研磨成粉末状后,采用高盐低 pH 值法提取花生叶片的 DNA^[9],之后溶于 40μl TE 缓冲液中,取部分稀释为 20ng/L 备用。

1.2.2 SSR 分析 试验所用 SSR 引物使用实验室保存的共 167 对引物序列,由上海生物工程公司合成。采用 15μl 体系进行 PCR 扩增,其中包括 40ng DNA、1×PCR Buffer、0.5U Taq 酶、4mM dNTP。扩增程序为:95℃ 预变性 5min,之后按 95℃ 30s、退火温度 1min、72℃ 1.5min 的程序运行 35 个循环,最后 72℃ 延伸反应 10min。扩增产物使用 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳检测,额定功率 80W,电泳时间 40min。使用 Sanguinetti 等^[10]速银染方法进行凝胶的染色显影。

型间的 Shannon 信息指数^[11]($I = -\sum P_i \times \ln P_i$,其中 P_i 为某引物组合第 i 对多态性带在供试材料中出现的概率)。利用 DPS Version7.05^[12] 软件计算供试材料两两之间的遗传距离,采用最长距离法对

欧氏距离进行聚类分析。

1.2.3 农艺性状调查 供试材料于 2009 年、2010 年在保定市农业科学研究所试验田种植。种植方式采用双行区,单粒播种,行长 1.5 m,行距 0.4 m。田间栽培管理与大田栽培基本一致。农艺性状调查中,按常规方法考察主茎高、总分枝数、单株生物重、三成果数(花生单株中 3 粒种子的荚果的数量)、单株结果数、秕果数、单株生产力、百果重、百仁重 9 个农艺性状,性状考察按全国统一标准记载^[13],每年每个品种考查 5 株。

表 2 供试材料的农艺性状表现及变异程度

Table 2 Performance and variance of agronomical characters

性状 Trait	最大值 Max	最小值 Min	平均值 Mean	标准差 <i>s</i>	方差 V	极差 R	变异系数(%) CV
株高(cm) Stem length	69.46	39.48	54.09	7.12	50.71	29.98	13.16
总分枝 Total of branch	8.40	4.80	6.18	0.85	0.71	3.60	13.67
单株生物重(g) Biomass/Plant	91.02	34.17	56.33	14.10	198.81	56.85	25.03
三成果数 No. of three pods	2.20	0.00	0.22	0.42	0.18	2.20	186.49
总果数 Total of pods	40.80	14.47	23.46	6.50	42.28	26.33	27.72
单株生产力(g) Pod mass/Plant	3.00	0.63	1.47	0.64	0.41	2.37	43.40
秕果数 Hollow pod number/Plant	63.68	18.94	33.01	10.38	107.66	44.74	31.43
百果重(g) 100-pod weight	239.74	123.26	188.92	29.65	879.40	116.48	15.70
百粒重(g) 100-seed weight	98.46	49.62	77.15	12.38	153.29	48.84	16.05

对供试品种的农艺性状表现进行聚类,得到树状聚类图(图 1)。从图 1 可以看到,在阈值为 5.48 时,可将考察的 41 个品种分为 6 大类群。其中第 I 大类群共有 8 个品种,山东品种 2 个,河北品种有 6 个。第 II 大类群共有 18 个品种,组成相对复杂,共分为 3 个亚类群,品种地域来源比较平均,其中河北的育成品种有 6 个,河南有 5 个,山东的品种数目为 5 个。第 III 大类群共有 6 个品种,冀、鲁、豫三省各 2 个。第 IV 大类群只有冀油 4 号 1 个品种。第 V 大类群有 3 个品种,分别是自河北育成冀 9742、冀花 2 号和山东的育成种鲁花 9 号。第 VI 大类群共有 5 个品种,河北、山东各 1 个品种,河南 3 个品种。

对各大类群的表型数据分析发现,各大类群在农艺性状表现上各有特点:第 I 大类群秕果数最少,

2 结果与分析

2.1 农艺性状分析

对 41 个供试材料的株高、分枝数、单株生物重、三成果数、总果数等 9 个性状分析结果见表 2。从各性状变异系数来说,变异程度大小依次为三成果数、秕果数、单株生产力、总果数、单株生物重、百粒重、百果重、总分枝、株高。总体来看各项变异系数多在 20% 以上,差异明显,表明冀、鲁、豫三省育成品种在表型性状上分化明显。

比总平均水平低 19.12%,子粒表现饱满。第 II 大类群与总体平均水平差距不大,属于中间类型,但是百粒重与百果重高于总平均水平 8% 以上。第 III 大类群的秕果数为最高,比总平均水平高 39.53%,说明该类品种子粒饱满度较差;三成果数稍高于平均水平。第 IV 大类群只有冀油 4 号 1 个品种,因为它的三成果数最多,为 2.2 个/株,比平均水平高 888.46%,而三成果数又是区分度最大的农艺性状,故而单独聚为一类。第 V 大类群的株高、总分枝数、生物重、总果数均为最高,分别比平均水平高出 14.56%、27.88%、38.06% 和 48.81%。第 VI 大类群的单株生产力比平均水平高 50.22%,是最高的一大类群,百果重与百粒重也超过总平均值的 22% 以上,具有较高的育种利用价值。

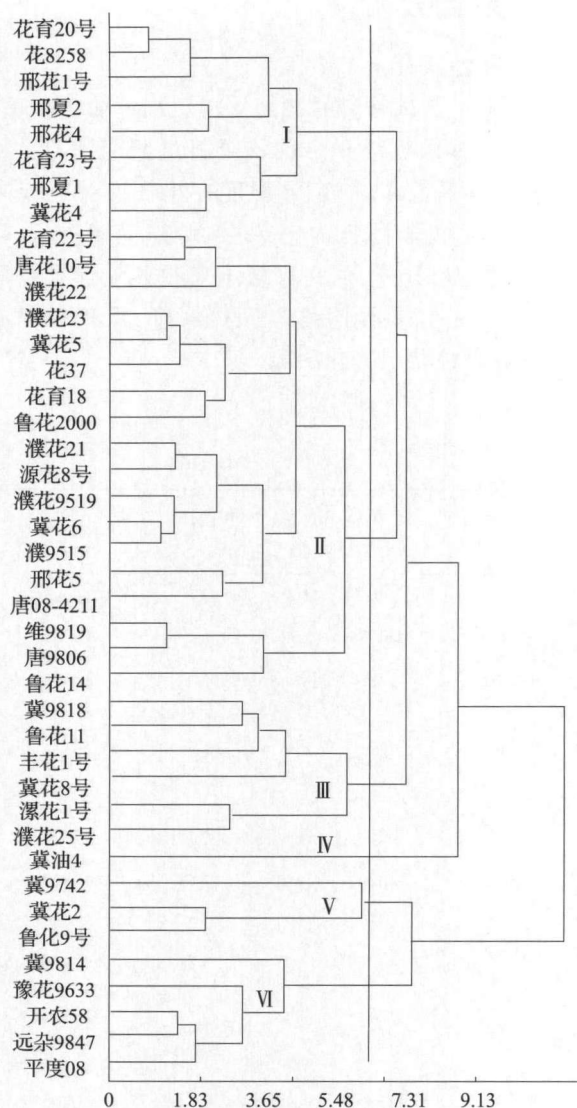


图1 农艺性状聚类图

Fig. 1 Dendrogram of cluster analysis based on agronomic trait

2.2 SSR 扩增结果

从本实验室所保存的 167 对引物中,筛选到多态性、重复性较好的 21 对引物对 41 个冀、鲁、豫花生育成品种进行了扫描,结果表明共检测到了 52 个等位变异(图 2、表 3),多态性位点百分率为 12.57%,每个位点的等位变异在 2~4 的范围内,平均 2.5 个。

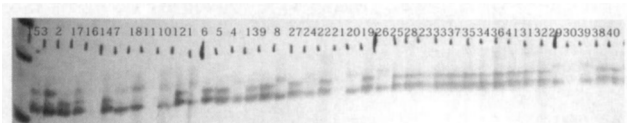


图2 PMc468 对 41 个材料的 SSR 扩增结果

Fig. 2 The pattern of 41 cultivars amplified by PMc468

2.3 基于 SSR 的多样性分析

根据每对 SSR 引物可检测的等位基因数和它们的分布频率,计算了 21 对 SSR 引物在不同品种间的 Shannon 信息指数。结果显示 Shannon 信息指数变幅在 0.21~1.40 之间,平均值为 0.73(表 3)。

按照供试品种的地理来源进行基于 SSR 的遗传多样性分析(表 4),发现冀、鲁、豫三省的育成品种各项数值均与总体水平差距不大,但各省份的 Shannon 信息指数均值均大于 0.7,表明三省的育成品种具有较高的遗传多样性。

2.4 基于 SSR 的聚类分析

利用 SSR 引物扩增的数据结果建立树状聚类图如图 3 所示。由图 3 可以看出 41 个供试品种在阈值为 5.54 时可分为 3 大类群,其中第 I 大类群包括 3 个亚类,山东供试材料最多,为 9 个,河北的供试材料为 4 个,河南供试材料为 4 个;第 II 大类群中河北供试材料最多,共有 10 个,山东供试材料有 2 个,河南供试材料 3 个;第 III 大类群共有 9 个品种,包括 4 个河北供试材料,3 个河南供试材料和 2 个山东育成品种。

通过聚类结果发现河北的育成品种同山东的品种亲缘关系较远:河北品种主要分布在第 II 大类群中,而山东的育成品种多在第 I 大类群中;河南的育成品种分布比较零散,表明河南的育成品种同其他两省的亲缘关系都比较近。

3 讨论

3.1 农艺性状聚类和分子标记聚类结果的差异

别墅等^[14]对中国三大主产棉区进行遗传多样性研究时,使用了 RAPD 分子标记与农艺性状调查两种方法,并认为分子标记与农艺性状之间获得的结果类似,相关性很高。夏友霖等^[15]首次运用 AFLP 技术和表型分析对川渝地区的主要花生种质资源和推广品种进行了分析,两种方法的聚类结果基本一致,都能将不同植物学类型的品种区分开。但在较为细小的类群划分上,两种方法仍有较大差异。刘立峰等^[16]在对河北省花生地方品种的农艺性状和品质性状的遗传分化研究中也得出了相似的结论。李之国等^[17]分别利用农艺性状和 AFLP 标记对菜用大豆遗传多样性进行分析的结果表明,二者的聚类结果并不一致,并推测是因为环境对表型影响的结果。

本研究对冀鲁豫三省育成品种农艺性状聚类和

表 3 SSR 引物扩增 41 个育成品种的等位基因数和 Shannon 信息指数

Table 3 Numbers of alleles and Shannon information index for each SSR marker

SSR 标记 SSR Markers	等位基因数 No. of alleles				Shannon 信息指数(I) Shannon information index			
	河北	河南	山东	总体	河北	河南	山东	总体
PM42	4	4	4	4	1. 31	1. 19	1. 20	1. 39
PM93	1	1	1	1	0. 30	0. 30	0. 37	0. 33
PM137	2	2	2	2	0. 54	0. 46	0. 50	0. 48
PMc468	3	3	3	3	0. 98	0. 95	0. 82	0. 90
PMc660	3	3	3	3	0. 60	0. 96	1. 05	0. 88
PM188	2	2	2	2	0. 50	0. 50	0. 56	0. 49
PM106	1	1	1	1	0. 10	0. 33	0. 25	0. 21
PM145	1	1	1	1	0. 37	0. 33	0. 31	0. 34
PM346	3	3	2	3	0. 71	0. 92	0. 63	0. 73
PM179	3	3	3	3	0. 92	1. 01	1. 00	1. 00
S112	2	2	2	2	0. 65	0. 67	0. 73	0. 71
PM36	4	4	4	4	1. 33	1. 32	1. 47	1. 40
PM50	2	2	2	2	0. 71	0. 47	0. 65	0. 63
PM375	2	2	2	2	0. 39	0. 61	0. 60	0. 50
PM3	3	3	2	3	1. 01	0. 87	0. 69	0. 96
PM377	2	2	2	2	0. 60	0. 61	0. 61	0. 59
PM343	3	3	3	3	1. 07	0. 97	0. 79	0. 95
PM305	2	2	2	2	0. 56	0. 56	0. 51	0. 54
PM325	3	3	3	3	0. 91	0. 96	1. 04	0. 98
PM296	2	3	3	3	0. 67	0. 80	0. 52	0. 60
PM15	3	3	3	3	0. 97	0. 80	0. 91	0. 91

表 4 不同省份育成品种的遗传多样性分析

Table 4 Genetic diversity of varieties bred in different provinces

地理来源 Origin	品种数量 No.	Shannon 信息指数(I) Shannon information index	等位基因数 No. of alleles
河北 Hebei	18	0. 71	51
河南 Henan	10	0. 74	52
山东 Shandong	13	0. 74	50
总体 Total	41	0. 73	52

分子标记聚类结果具有一定差异,分析原因,一是三省均属于华北平原,花生育种目标大致相同,育成品种大多为普通型或中间型,品种类型少。另外表型聚类受到考察性状多少的影响,理论上讲性状越多越真实可靠。二是基于分子标记的聚类结果受到分子标记的多少及其在染色体上的分布的影响。本研究从 167 对引物中,只筛选到多态性、重复性好的 21 对,可能是这些品种类型较少所致,也有可能是所用的分子标记较少或分子标记在染色体上的分布集中,代表性差所致,因此要在以后的研究中加强分

子标记的开发,农艺性状与基因型分析相结合来考察品种的遗传多样性更为科学合理。

3.2 遗传多样性的评价方法

遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分,广义的遗传多样性是指地球上所有生物携带的遗传信息的总和,而狭义的遗传多样性是指种内不同群体之间或同一群体内不同个体的遗传变异的总和。遗传多样性的表现是多层次的,可以表现在外部形态上、生理代谢上,也可以表现在染色体、DNA 分子水平上。在遗传多样性的评价方法上,利用 Shannon 信息指数和 Nei 遗传多样性指数已经在水稻^[18]、小麦^[19]、棉花^[20]等主要农作物上得到应用,在大豆^[21]、苜蓿^[22]等豆科作物上也有所报道,而在花生上报道较少。Jiang 等^[23]利用花生种质间的遗传距离来评价其遗传多样性。Tang 等^[24]引入了“区别指数”这一参数来评价不同 SSR 引物检测花生种质资源的效率,利用不同类型花生种质间的遗传距离评价了其遗传多样性。崔顺立等^[8]利用 Shannon 信息指数和 Nei 遗传多样性指数等参数,结合遗传距

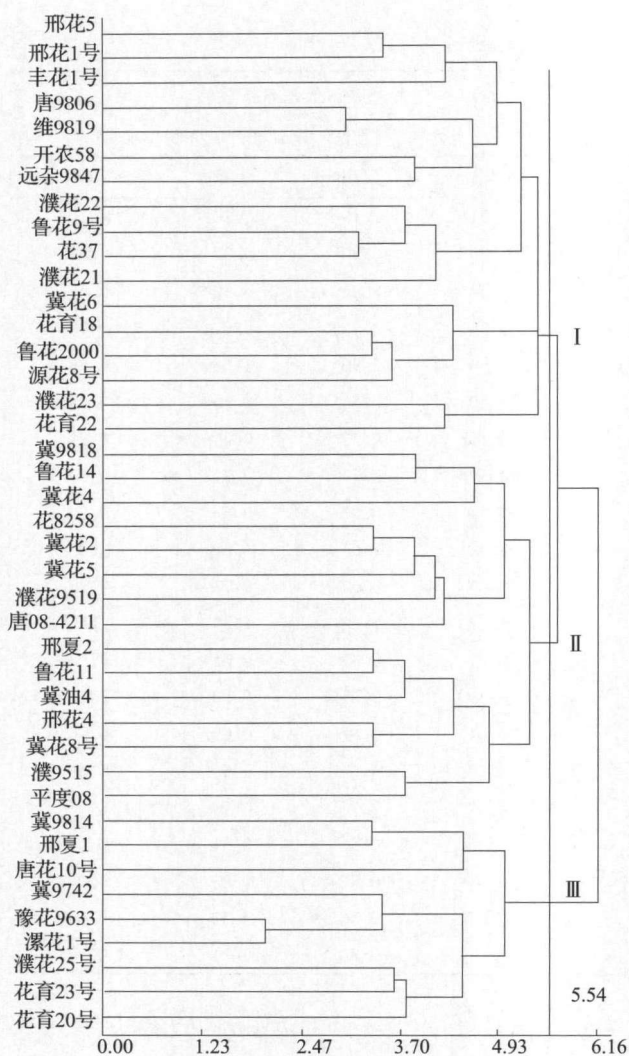


图3 基于 SSR 标记的聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram analysis based on SSR

离,对河北省花生地方品种基于 SSR 标记的遗传多样性进行了评价。本研究利用 21 对 SSR 引物对 41 个冀、鲁、豫三省的育成品种的遗传多样性分析结果表明,Shannon 信息指数的平均值在 0.70 以上,三省的育成品种的遗传多样性比较丰富。

参考文献

- [1] 孙大容. 花生育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [2] 禹山林. 中国花生品种及其系谱[M]. 上海: 上海科学出版社, 2008
- [3] 唐荣华, 贺梁琼, 高国庆, 等. 多粒型花生的 SSR 分子标记[J]. 花生学报, 2004, 33(2): 11-16
- [4] 任小平, 姜慧芳, 廖伯寿, 等. 龙生型花生的遗传多样性[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(4): 401-405
- [5] 叶冰莹, 陈由强, 朱锦懋, 等. 应用 RAPD 技术分析花生品种遗传变异[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(3): 15-18
- [6] 王传堂, 杨新道, 于翔, 等. DNA 分子标记技术在花生品种鉴定上的应用研究[J]. 华北农学报, 2006, 21: 110-113
- [7] 姜慧芳, 廖伯寿, 任小平, 等. 抗青枯病花生种质的遗传多样性[J]. 作物学报, 2006, 32(8): 1156-1165
- [8] 崔顺立, 刘立峰, 陈焕英, 等. 河北省花生地方品种基于 SSR 标记的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3346-3353
- [9] Guillemat P, Drouard L M. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive and reliable method[J]. J Plant Mol Bio Rep, 1992, 10(1): 60-65
- [10] Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914-921
- [11] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA Polymerase amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531-6534
- [12] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 308-310
- [13] 姜慧芳, 段乃雄. 花生种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006
- [14] 别墅, 孔繁玲, 周有耀, 等. 中国 3 大主产棉区棉花品种遗传多样性的 RAPD 及其与农艺性状关系的研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(6): 597-603
- [15] 夏友霖, 李加纳, 廖伯寿, 等. 川渝地区花生品种遗传多样性分析[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(3): 300-305
- [16] 刘立峰, 耿立格, 王静华, 等. 河北省花生地方品种农艺性状和品质性状的遗传分化[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(2): 190-194
- [17] 李之国, 李喜焕, 张彩英, 等. 基于农艺性状和 AFLP 位点的菜用大豆遗传多样性[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(4): 391-396
- [18] 郝伟, 张旭, 徐正进, 等. 东北三省水稻遗传多样性和亲缘关系的 SSR 分析[J]. 河南农业科学, 2008, 4(4): 18-24
- [19] 王淑英, 樊廷录, 李兴茂. 冬小麦抗旱种质资源遗传多样性研究[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(3): 402-409
- [20] Chen G, Du X M. Genetic diversity of source germplasm of upland cotton in China as determined by SSR Marker analysis[J]. Acta Genet Sinica, 2006, 33(8): 733-745
- [21] 王果, 胡正, 张保缺, 等. 山西省野生大豆资源遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(7): 2182-2190
- [22] 蒿若超, 张月学, 唐凤兰. 利用 RAPD 分子标记研究苜蓿种质资源遗传多样性[J]. 草业科学, 2007, 24(8): 69-73
- [23] Jiang H F, Liao B S, Ren X P, et al. Comparative assessment of genetic diversity of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes with various levels of resistance to bacterial wilt through SSR and AFLP analyses[J]. J Genet Genom, 2007, 34(6): 544-554
- [24] Tang R H, Gao G Q, He L Q, et al. Genetic diversity in cultivated groundnut based on SSR markers[J]. J Genet Genom, 2007, 34(5): 449-459