

不同 SSR 标记检测技术及其在花生栽培种遗传多样性分析中的应用

王燕龙^{1,2}, 单雷¹, 付春³, 徐平丽¹, 姜言生³, 柳展基¹, 曲志才², 唐桂英¹

(¹山东省农业科学院高新技术研究中心/山东省作物遗传改良与生态生理重点实验室, 济南 250100;

²曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165; ³山东省潍坊市农业科学院, 潍坊 261031)

摘要:以 85 份花生栽培种为材料, 分别应用银染法和荧光检测法检测 9 对 SSR 引物的扩增产物。比较结果显示, 荧光检测法具有灵敏度高、检测结果准确、效率高等优点。聚类分析表明, 银染法与荧光检测法分别能够区分 74 个、82 个花生品种, 并分别聚成 8 个、9 个类群; 荧光检测法的聚类结果虽然反映的品种间遗传多样性较低, 但与品种类型、产地及其亲缘关系相关程度更高, 表明荧光检测数据更精确、可靠。遗传多样性分析发现, 地方品种的遗传多样性指数最高, 其次为多粒型育成品种, 表明我国地方品种和多粒型育成品种蕴藏了丰富的优异性状, 有利于对其挖掘和利用。

关键词:花生; SSR; 银染法; 荧光检测法; 遗传多样性

Different SSR Detection Techniques and their Application in Genetic Diversity Analysis of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars

WANG Yan-long^{1,2}, SHAN Lei¹, FU Chun³, XU Ping-li¹,
JIANG Yan-sheng³, LIU Zhan-ji¹, QU Zhi-cai², TANG Gui-ying¹

(¹Hi-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Shandong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology, Jinan 250100; ²College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165; ³Weifang Academy of Agricultural Sciences, Weifang 261031)

Abstract: In the present study, we assessed 9 SSRs products of 85 peanut cultivars using silver-staining method and fluorescent detection assay. The results showed fluorescent detection assay was more sensitive, accurate, and efficient than silver-staining method. Cluster analysis indicated fluorescent detection assay was able to separate 82 peanut cultivars into 9 clusters, while silver-staining method separated 74 cultivars into 8 clusters. The clusters from fluorescent detection assay were more closely related to the types, origins, and pedigrees of the peanut cultivars. Genetic diversity analysis showed the peanut landraces had the highest genetic diversity index, followed by the Valencia type peanut cultivars, suggesting the landraces and Valencia type cultivars harboring a broad genetic variation.

Key words: peanut; SSR; silver-staining; fluorescence detection; genetic diversity

花生栽培种 (*Arachis hypogaea* L.) 属于花生区组 (*Arachis* section), 是高度自花授粉的异源四倍体豆科植物 ($2n = 4x = 40$)^[1]。我国花生分类系统依据植物学和农艺学性状将花生栽培种分

为 5 大类型: 普通型、龙生型、中间型、珍珠豆型和多粒型^[2]。虽然花生栽培种在生长习性、生育期及形态上存在很大差异, 但是应用 RFLP^[3-4]、RAPD^[5]、AFLP^[6] 等分子标记检测到的遗传多态

投稿日期: 2013-03-26 修回日期: 2013-06-13 网络出版日期: 2013-12-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131219.1112.004.html>

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (31201272); 山东省科技发展计划 (2012GNC1101)

第一作者研究方向为植物基因工程与农业生物技术。E-mail: wangyanlong0000@126.com

通信作者: 单雷, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: shlei1025@sina.com

性极低,而 SSR 可以检测到相对较高的多态性^[6]。

栽培花生由于长期的人工选育,品种的遗传背景变得较为复杂。利用亲缘关系较远、遗传差异大的材料作亲本进行杂交,可以有效地保存栽培花生遗传多样性,有利于优良品种的选育。目前国内外多个实验室已通过花生基因组和 EST 序列开发了大量 SSR 引物,常规 SSR 标记技术也已广泛应用于花生栽培种和野生资源的遗传多样性研究。M. C. Moretzsohn 等^[7]利用 12 对 SSR 标记分析了 60 份花生栽培品种和 36 份野生种材料,聚类分析显示所有 Virginia 型(HH)栽培种聚在 Group II,其余 45 个栽培种聚在 Group I 中;Group III 中所有 36 个野生种聚为一大类,而包含相同基因组的材料又分别聚在一个分支;遗传多样性分析显示,巴西花生种质具有较大的遗传多样性。任小平等^[8]采用 27 对花生 SSR 引物,对国际半干旱所(ICRISAT)的 168 份花生微核心种质材料(来自世界 5 大洲 42 个国家)进行了分析,结果显示 ICRISAT 花生微核心种质资源具有丰富的遗传多样性,不同来源的变种群间存在明显的遗传差异。R. Koppolu 等^[9]应用 32 个 SSR 标记分析 85 个野生花生及 11 个栽培种质(涵盖花生区组的 7 个区组),结果显示野生种 *A. duranensis* 和 *A. Ipaënsis* 与栽培种 *A. hypogaea* 亲缘关系最近,说明可以通过桥梁亲本把花生区组以外的野生种优良基因转移到花生栽培种中。耿健等^[10]应用 21 对 SSR 引物分析 41 个冀、鲁、豫 3 省的花生育成品种的遗传多样性,结果显示 3 省的育成品种遗传多样性均比较丰富。

目前检测 SSR PCR 产物的方法主要有 4 种,(1)琼脂糖凝胶电泳-EB 染色法^[11],分辨率低,常用于产物的初步检测;(2)放射性同位素标记-放射性自显影检测法^[12],灵敏度高,但操作步骤多、成本高并且存在辐射危害;(3)PAGE-银染法^[13],使用设备简单、分辨率较高,已经广泛使用;(4)荧光标记引物-毛细管电泳检测法^[14],分辨率高、检测效率高,但对设备要求高、成本也较高,近年来逐步被应用。基于全自动 DNA 分析仪的 SSR 荧光标记检测技术已经在小麦、棉花、玉米等多种具有复杂基因组作物的种质资源评价和遗传多样性分析等方面得到了广泛应用^[14-16]。而在花生中仅报道了几例应用 SSR 荧光标记技术进行遗传资源分析、杂种鉴定研究。R. K. Varshney 等^[17]应用 SSR 标记和荧光 SSR 标记构建了第 1 个栽培花生遗传连锁图谱。而国内目前

仅见李双铃等^[18]将荧光 SSR 技术应用于花生 F₁ 杂种鉴定的报道。为了促进 SSR 荧光标记技术在花生中的应用,进一步提高 SSR 检测的准确性,本研究首先比较了 SSR 标记银染法和荧光检测法 2 种检测方法,然后分别应用银染法和荧光检测法对我国栽培花生种质进行遗传多样性分析,为 SSR 检测技术的选择、遗传育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 85 份花生栽培种种质,由中国农科院油料作物研究所、山东省花生研究所、山东省农科院高新技术研究中心和潍坊农科院提供,产地涵盖全国 13 个省(表 1)。

1.1.2 试剂 所用植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)为天根生化科技(北京)有限公司产品,2 × *Taq* PCR MasterMix 购于北京百泰克生物技术有限公司(Bioteke);丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、TEMED 为上海生工生物工程技术有限公司产品;其他生化试剂均为国产分析纯。所用 11 对 SSR 普通引物和荧光标记引物(表 2)均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取每个花生品种幼嫩叶片 0.2 g,用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取并纯化 DNA。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,分光光度计检测 DNA 样本的浓度及质量;然后将 DNA 浓度稀释至 12.5 ng/μL,备用。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 体系共 15 μL:含 6 μL ddH₂O,7.5 μL 2 × *Taq* PCR MasterMix,正、反向引物(50 ng/μL)各 0.5 μL,0.5 μL DNA 模板(12.5 ng/μL)。反应程序为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,48 ~ 65 °C(参考表 2 中 T_m 值)30 s,72 °C 30 s 共 30 个循环;继续延伸 72 °C 5 min;4 °C 保存。SSR PCR 扩增产物经 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(电泳缓冲液 0.5 × TBE,电压 150 V,时间 2 h)、0.1% AgNO₃ 染色,然后对电泳结果进行拍照、读带分析。荧光引物多重 PCR 依据退火温度接近、片段大小不重合添加相同荧光标记,片段大小重合添加不同荧光标记的原则组合引物,反应体系加入的引物量根据扩增条带增减,扩增条件与上述 PCR 相同。荧光 SSR PCR 产物由济南鲁生生物科技有限公司应用 ABI3730XL 测序仪以片段检测法检测。

表1 供试花生品种

Table 1 The peanut varieties in this study

编号	品种	类型/缩写	系谱	产地/缩写	编号	品种	类型/缩写	系谱	产地/缩写
Code	Variety	Type/ Abbreviation	Pedigree	Origin/ Abbreviation	Code	Variety	Type/ Abbreviation	Pedigree	Origin/ Abbreviation
1	天府15号	中间型/I	育成品种	四川/SC	44	合油4号	珍珠豆型/S	育成品种	广西/GX
2	天府3号	中间型/I	育成品种	四川/SC	45	桂花17	珍珠豆型/S	育成品种	广西/GX
3	阜花11号	中间型/I	育成品种	辽宁/LN	46	桂花22	珍珠豆型/S	育成品种	广西/GX
4	鲁花8号	中间型/I	育成品种	山东/SD	47	桂花25	珍珠豆型/S	育成品种	广西/GX
5	花育16号	中间型/I	育成品种	山东/SD	48	桂花30	珍珠豆型/S	育成品种	广西/GX
6	丰花3号	中间型/I	育成品种	山东/SD	49	白沙1016	珍珠豆型/S	育成品种	广东/GD
7	潍花6号	中间型/I	育成品种	山东/SD	50	粤油79	珍珠豆型/S	育成品种	广东/GD
8	鲁花11号	中间型/I	育成品种	山东/SD	51	粤油551	珍珠豆型/S	育成品种	广东/GD
9	鲁花14号	中间型/I	育成品种	山东/SD	52	汕油523	珍珠豆型/S	育成品种	广东/GD
10	花育17号	中间型/I	育成品种	山东/SD	53	汕油71	珍珠豆型/S	育成品种	广东/GD
11	花育23号	中间型/I	育成品种	山东/SD	54	湛油75	珍珠豆型/S	育成品种	广东/GD
12	花育27号	中间型/I	育成品种	山东/SD	55	台山珍珠	珍珠豆型/S	地方品种	广东/GD
13	花37	中间型/I	育成品种	山东/SD	56	泉花10号	珍珠豆型/S	育成品种	福建/FJ
14	花育31号	中间型/I	育成品种	山东/SD	57	泉花327	珍珠豆型/S	育成品种	福建/FJ
15	潍花7号	中间型/I	育成品种	山东/SD	58	泉花646	珍珠豆型/S	育成品种	福建/FJ
16	花育19号	中间型/I	育成品种	山东/SD	59	天府5号	普通型/Vi	育成品种	四川/SC
17	花育21号	中间型/I	育成品种	山东/SD	60	天府7号	普通型/Vi	育成品种	四川/SC
18	花育22号	中间型/I	育成品种	山东/SD	61	丰花1号	普通型/Vi	育成品种	山东/SD
19	花育25号	中间型/I	育成品种	山东/SD	62	临花6号	普通型/Vi	育成品种	山东/SD
20	鲁花9号	中间型/I	育成品种	山东/SD	63	花育32	普通型/Vi	育成品种	山东/SD
21	徐花8号	中间型/I	育成品种	江苏/JS	64	鲁花15	普通型/Vi	育成品种	山东/SD
22	徐花9号	中间型/I	育成品种	江苏/JS	65	湘花8号	普通型/Vi	育成品种	湖南/HN
23	豫花7号	中间型/I	育成品种	河南/HN	66	豫花9号	普通型/Vi	育成品种	河南/HN
24	濮花1号	中间型/I	育成品种	河南/HN	67	冀花2号	普通型/Vi	育成品种	河北/HB
25	豫花15号	中间型/I	育成品种	河南/HN	68	冀花4号	普通型/Vi	育成品种	河北/HB
26	天府9号	中间型/I	育成品种	四川/SC	69	冀油4号	普通型/Vi	育成品种	河北/HB
27	宁海大京生	珍珠豆型/S	地方品种	浙江/ZJ	70	唐油4号	普通型/Vi	育成品种	河北/HB
28	台南13号	珍珠豆型/S	育成品种	中国台湾/TW	71	江田种	普通型/Vi	地方品种	福建/FJ
29	天府11号	珍珠豆型/S	育成品种	四川/SC	72	勾了种	普通型/Vi	地方品种	福建/FJ
30	天府13号	珍珠豆型/S	育成品种	四川/SC	73	洋豆	普通型/Vi	地方品种	福建/FJ
31	花育20号	珍珠豆型/S	育成品种	山东/SD	74	固花2号	普通型/Vi	育成品种	*
32	潍花9号	珍珠豆型/S	育成品种	山东/SD	75	沙岭大只豆	普通型/Vi	地方品种	*
33	芙蓉花生	珍珠豆型/S	地方品种	湖南/HN	76	临桂麻壳	龙生型/D	地方品种	广西/GX
34	湘花12号	珍珠豆型/S	育成品种	湖南/HN	77	飞龙乡	龙生型/D	地方品种	广西/GX
35	湘农小花生	珍珠豆型/S	地方品种	湖南/HN	78	向阳籽	龙生型/D	地方品种	*
36	湘花555	珍珠豆型/S	育成品种	湖南/HN	79	铁打坚	龙生型/D	地方品种	*
37	中花4号	珍珠豆型/S	育成品种	湖北/HB	80	四粒红	多粒型/V	地方品种	辽宁/LN
38	中花5号	珍珠豆型/S	育成品种	湖北/HB	81	法库四粒红	多粒型/V	地方品种	辽宁/LN
39	中花7号	珍珠豆型/S	育成品种	湖北/HB	82	台山三粒肉	多粒型/V	地方品种	广东/GD
40	中花8号	珍珠豆型/S	育成品种	湖北/HB	83	余山凤凰窝	多粒型/V	地方品种	*
41	豫花14	珍珠豆型/S	育成品种	河南/HN	84	印度多粒品种	多粒型/V	地方品种	*
42	远杂9102	珍珠豆型/S	育成品种	河南/HN	85	栖霞糠皮三粒红	多粒型/V	地方品种	*
43	郑花5号	珍珠豆型/S	育成品种	河南/HN					

* 表示未知 * means not available

表 2 本研究所用 SSR 引物

Table 2 SSR primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	退火温度(°C) T _m	荧光标记 Fluorescent label	引物序列来源 Source of primer sequences
GM9	F: CAGCAAAGAGTCGTCAGTCG	48	FAM	文献[19]
	R: GAAAGTTCACCTTGAGCAAATTCA		Non	文献[19]
GM74	F: GAAGGACCCCATCTATTCAAA	58	FAM	文献[19]
	R: TCCGATTTCCTCTCTCTCTCTC		Non	文献[19]
GM150	F: TAGAAGAAGGAGAGGGTGAGAA	58	FAM	文献[20]
	R: CTAAGATGGTGGTGGGAATTA		Non	文献[20]
GM269	F: TTGCTACTAAGCCGAAAATGAA	54	FAM	文献[20]
	R: CTGAAATTAACACATATGCACACA		Non	文献[20]
GM424	F: AATGCATGAGCTTCCATCAA	58	HEX	文献[20]
	R: AACCCCATCTTAAAACTTTACCAA		Non	文献[20]
GM488	F: ACTCCCGATGCACCTTCAAAT	65	FAM	文献[21]
	R: AACCTCTGTGCACCTGTCCCT		Non	文献[21]
GM518	F: AACTCGCTTGTACCGGCTAA	57	FAM	文献[21]
	R: AGGAATAATAACAATACCAACAGCA		Non	文献[21]
GM556	F: TGCTTCCATCAGCTTTTCCT	60	FAM	文献[21]
	R: AAATGAGGGCCTCCAAAGTT		Non	文献[21]
GM606	F: TAATAAAGGTGACGTGGCGA	62	FAM	文献[22]
	R: TTATCATGATTACCACGACCG		Non	文献[22]
GM613	F: GCGTGAAATGAGTGTGTGAG	60	HEX	文献[22]
	R: CATAGCCACCATAGACACCAAA		Non	文献[22]
GM623	F: CAGGATGAACAGGCACAGAAT	60	ROX	文献[22]
	R: ATGAACAATTGCGATTTGGAC		Non	文献[22]

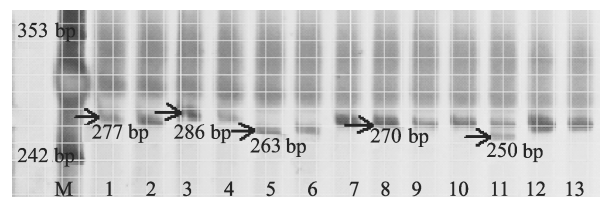
1.3 统计分析 常规银染法得到的凝胶图片应用 Hornil StylePix 图片编辑器标尺工具记录片段大小,在相同迁移位置,有带记作 1,无带记作 0;应用 GeneMapper ID v3.2 软件将荧光检测法得到的数据转化为峰图,有效峰的有无也以“1,0”形式进行统计。利用 NTSYS-pc 2.10e (Rohlf, 2006) 软件计算供试材料的遗传距离,采用类平均法 (UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic average) 对欧氏距离进行聚类分析。利用 POPGENE version 1.32^[20] 软件计算 Nei 基因多样性指数 H 和 Shannon 信息指数 $I^{[23]}$ 。

2 结果与分析

2.1 SSR 荧光检测法与银染法的比较

2.1.1 荧光检测法的高灵敏性 应用 GM9、GM74、GM150、GM269、GM424、GM488、GM518、GM556 及 GM606 共 9 对具多态性且特异性好的引物对 85 个花生栽培品种进行扩增,扩增产物通过常规非变性

PAGE-银染法进行电泳检测(图 1),共检测到 33 个等位变异,平均每对引物 3.56 个。引物添加荧光标记对相同材料进行扩增,通过毛细管电泳检测到 69 个等位变异,平均 7.78 个(表 3)。荧光技术在每个位点平均检测到的等位变异比银染法多 4 个,表明荧光检测法具有更高的灵敏性,更适于做遗传背景分析。



M: Marker, 1~13 为品种编号

M: Marker, 1-13: Number of variations

图 1 银染法检测引物 GM556 对 13 份栽培花生种质资源的扩增结果

Fig. 1 The amplification results of GM556 in 13 peanut cultivars by silver staining

表 3 2 种方法检测出的等位变异的对比

Table 3 Comparison of allelic variations obtained by the two detection methods

引物-标记 Primer-Marker	检测体系-泳道显色 Detection system-color	等位基因片段大小(bp) Allelic size											等位变异数量 Allelic number	
GM9	银染检测	212	221	227	231	241							5	
GM9-FAM	荧光检测-蓝	212	219	221	223	225	227	229	231	235	237	239	241	12
GM74	银染检测	270	277	284	294							4		
GM74-FAM	荧光检测-蓝	270	272	275	277	280	282	284	286	288	290	294	11	
GM150	银染检测	228	236	242							3			
GM150-FAM	荧光检测-蓝	228	230	236	238	241							5	
GM269	银染检测	223	227	231	243							4		
GM269-FAM	荧光检测-蓝	223	225	227	229	231	233	243					7	
GM424	银染检测	255	261	264							3			
GM424-HEX	荧光检测-绿	255	257	261	264							4		
GM488	银染检测	195	220	229	236	247							5	
GM488-FAM	荧光检测-蓝	195	220	224	226	229	232	236	240	245	247			10
GM518	银染检测	260	267	276							3			
GM518-FAM	荧光检测-蓝	260	265	267	270	274	276						6	
GM556	银染检测	250	263	270	277	286							5	
GM556-FAM	荧光检测-蓝	250	255	263	265	268	270	273	277	280	286			10
GM606	银染检测	282	295							2				
GM606-FAM	荧光检测-蓝	282	285	288	292	295							5	

2.1.2 荧光检测法的高准确性 由表 3 可以看出 2 种方法检测到的片段大小基本一致。荧光检测法各电泳样品中均具有分子量内标,通过 GeneMapper ID v3.2 软件可以准确读出片段大小,即使 1 bp 的大小差异也能准确区分。本研究中荧光检测法得到的等位基因差异最小为 2 bp,并且 2 bp 差异在 GM9-FAM 中有 8 个、GM74-FAM 8 个、GM150-FAM 1 个、GM269-FAM 5 个、GM424-HEX 1 个、GM488-FAM 2 个、GM518-FAM 2 个、GM556-FAM 2 个;银染法检测的最小差异为 3 bp,且仅检出 GM424 中等位变异 264 ~ 261 bp 之间 1 个(表 3)。银染法所得片段只能通过肉眼与分子量标准进行比较,不同胶块整合容易出现视觉误差,造成读带错误。因此,荧光检测法检测的准确性更高。

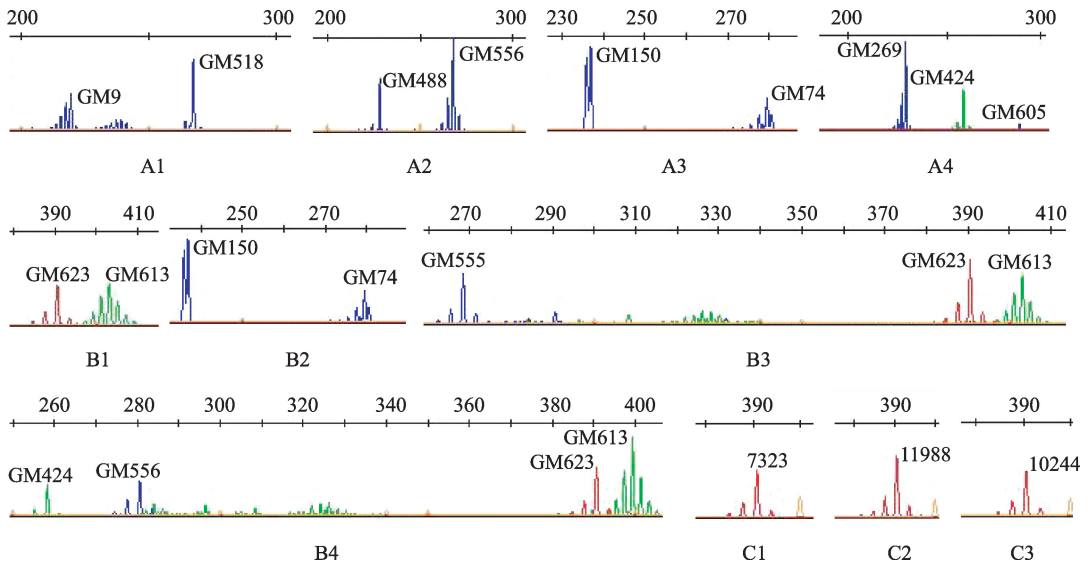
2.1.3 荧光检测法的高效性 对 85 个花生栽培品种分别用 2 种方法进行检测。银染法需要电泳 18 块板,每天完成 4 块板,需要 5 d 的时间才能完成。而荧光检测法在检测之前,根据银染法得到的目的片段大小,GM9 与 GM518、GM488 与 GM556、GM150 与 GM74、GM269 与 GM424 与 GM606 分别混合点样(图 2 A1 ~ A4),只需 4 块 96 孔板,1 d 就能完成全

部 85 个样品 69 个多态性位点的检测。荧光检测法的检测效率明显高于银染法。

2.2 进一步提高荧光检测法效率的探索

由于荧光检测法引物合成及检测仪器的成本比常规银染法高,因此需进一步提高其检测效率,降低试验成本,促进该方法的广泛应用。

2.2.1 高通量 PCR 尽管不同荧光标记的单一 PCR 反应产物混合上样测序可有效提高检测效率,但大量 PCR 反应的成本还是相对较高。为此,本研究按照扩增反应具有相同退火温度、所有 PCR 产物片段均能有效区分的原则,设计了几个多重 PCR 反应:(1)单一荧光标记的二重 PCR:GM74-FAM 与 GM150-FAM 作为二重 PCR 的引物组合,退火温度为 58 °C,扩增产物片段大小差异大于 50 bp(图 2 B2);(2)不同荧光标记的二重 PCR:GM613-HEX 与 GM623-ROX 作为引物组合,二者退火温度均为 60 °C,扩增产物片段大小差距小于 20 bp,但检测的产物分别显绿色与红色(图 2 B1);(3)不同荧光标记的三重 PCR:GM556-FAM、GM613-HEX、GM623-ROX 作为引物组合,PCR 反应的退火温度为 60 °C,产物分别显蓝色、绿色、红色(图 2 B3);(4)多种



A1 ~ A4: 不同荧光引物扩增产物混合点样检测 (A1: GM9 与 GM518 组合; A2: GM488 与 GM556 组合;

A3: GM150 与 GM74 组合; A4: GM269/GM424 与 GM606 组合); B1 ~ B4: 高通量 PCR 扩增产物的毛细管荧光检测

(B1: 不同荧光标记的二重 PCR; B2: 相同荧光标记的二重 PCR; B3: 不同荧光标记的三重 PCR;

B4: 不同荧光标记的四重 PCR); C1 ~ C3: 毛细管荧光检测不同反应条件下 SSR 扩增产物 (C1: 处理 1; C2: 处理 2; C3: 处理 3)

A1-A4: Detection of mixed fluorescent SSR products amplified by different primers (A1: The primer combination of GM9 and GM518,

A2: The primer combination of GM488 and GM556, A3: The primer combination of GM150 and GM74, A4: The primer combination of GM269,

GM424, and 606), B1-B4: Detection of the high-throughput SSR PCR products by fluorescence technique

(B1: Double PCR by different primers with different fluorescence marker, B2: Double PCR by different primers with same fluorescence marker,

B3: Triplex PCR by different primers with different fluorescence marker, B4: Quadruplex PCR by different primers with different fluorescence marker),

C1-C3: Detection of SSR products amplified using different condition by fluorescence technique (C1: Treatment 1, C2: Treatment 2, C3: Treatment 3)

图 2 应用 GeneMapper ID v3.2 软件分析部分 SSR 荧光检测数据

Fig. 2 Analysis of partial fluorescent SSR data derived from ABI3730XL sequencing by GeneMapper ID v3.2 software

荧光标记的四重 PCR: 引物组合为 GM424-HEX、GM556-FAM、GM613-HEX、GM623-ROX, 扩增产物分别显绿色、蓝色、绿色和红色, 绿色产物片段之间大小差异远大于 50 bp (图 2 B4)。以上反应检测结果表明, 所有多重 PCR 产物片段均能有效区分。因此, 通过荧光 SSR 技术结合高通量 PCR 能够有效区分各等位基因片段, 进一步提高检测效率。

2.2.2 大片段检测优化 本研究发现对于大片段 DNA, 2 种检测方法用相同 PCR 反应体系, 银染法谱带强度比小片段 DNA 高, 而荧光检测产物峰值明显降低, 扩增产物片段越大峰值越低 (图 2 A4), 这与易红梅等^[24]发现玉米扩增产物大于 350 bp 峰值明显降低的结果一致。本研究以花育 31 号 DNA 为模板、引物 GM623 的 PCR 反应终程序为 72 °C 5 min 时, 峰值为 7323 (图 2 C1); 将 PCR 程序终延伸改为 60 °C 45 min, 峰值变为 11988 (图 2 C2); PCR 终延伸维持 72 °C 5 min 不变, 但 PCR 产物检测浓度增加 1 倍时, 峰值变为 10244 (图 2 C3)。峰值低往往会造成读带错误忽略, 因此, 大于 300 bp

的片段可通过彻底延伸或加大检测浓度提高峰值, 确保检测的准确性和可靠性。

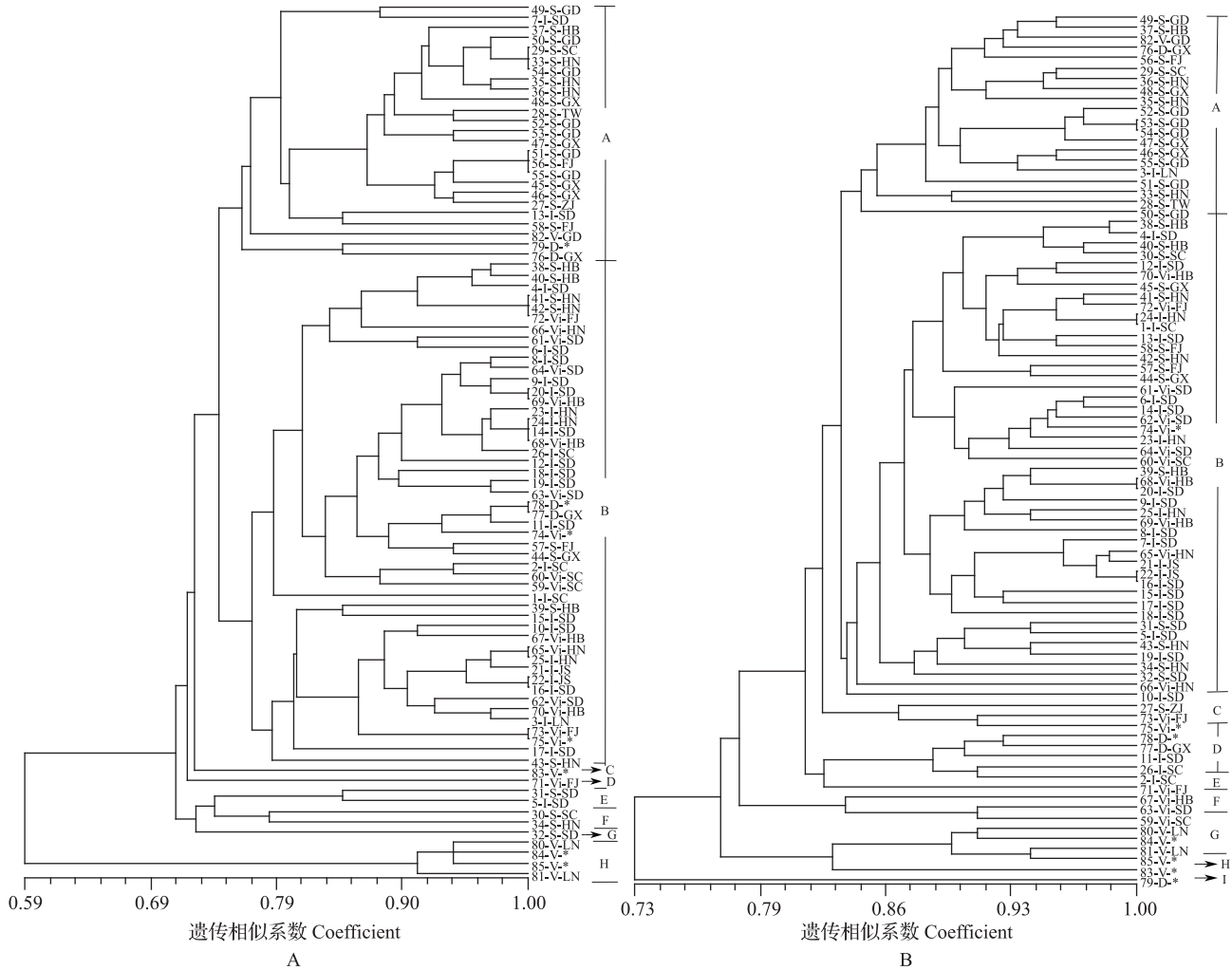
2.3 花生栽培种遗传多样性分析

2.3.1 银染法检测分析栽培花生的遗传多样性

银染法数据显示, 9 对引物能够将 85 个栽培品种中的 74 个完全区分开 (图 3 A), 品种间遗传相似系数为 0.59 ~ 1.00, 在遗传相似系数 0.74 处分为 A、B、C、D、E、F、G、H 8 个类群。类群 A 共 25 个品种, 分为 2 大分支: 其中一支由 22 个育成品种和 1 个地方品种 (台山三粒肉) 组成, 22 个育成品种聚在一起, 除了潍花 6 号、花 37 为中间型, 其余均为珍珠豆型; 多粒型品种台山三粒肉与 22 个育成品种间遗传距离最远, 并单独分在一个分支中。另一支 2 个龙生型地方品种铁打坚、临桂麻壳聚在一起。从产地分析, 该类群包含所有的 8 个广东产地的品种。类群 B 共 49 个品种, 其中 47% 的品种具伏花生血统, 龙生型地方品种向阳籽与飞龙乡、普通型地方品种洋豆与沙岭大只豆分别聚在一起。类群 C 仅 1 个多粒型地方品种余山凤凰窝。类群 D 仅 1 个普通型

地方品种江田种。类群 E 包含 2 个山东产地品种花育 16 号和花育 20 号。类群 F 包含 2 个珍珠豆型育成品种天府 13 号和湘花 12 号。类群 G 仅 1 个山东产地的珍珠豆型品种淮花 9 号。类群 H 包含 4 个多粒型地方品种四粒红、法库四粒红、印度多粒品种、栖霞糠皮三粒红。利用 POPGENE version 1.32 软件进行多样性分析,结果表明,不同类型花生栽培种的 Shannon 信息指数 I 为 0.1145 ~ 0.3736, Nei 基

因多样性指数 H 为 0.0765 ~ 0.2365(表 4)。5 大类型中多粒型的指数 I 和 H (0.3213、0.2160) 均最高、龙生型 (0.1145、0.0765) 最低,可能是龙生型样本数目过少(仅 4 个)所致,地方品种的指数 I 和 H (0.3736、0.2365) 高于育成品种 (0.3185、0.2026)。综上所述,我国栽培花生遗传背景总体上比较狭窄,相对而言多粒型与地方品种的遗传多样性较高。



A:银染法;B:荧光检测法,各品种以品种编号-类型-产地形式表示

A:Silver staining,B:Fluorescence, All varieties represented in the form of variety code-botanical type-origin

图 3 应用 NTSYS-pc 2.10e 软件得到的 85 个栽培花生品种的聚类图

Fig. 3 Cluster dendrogram of 85 peanut cultivars using NTSYS-pc 2.10e software

2.3.2 荧光检测法检测分析栽培花生的遗传多样性 荧光检测法数据显示,9 对引物能够将 82 个品种完全区分开(图 3 B),品种间遗传相似系数为 0.73 ~ 1.00。在遗传相似系数 0.85 处分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 9 个类群。类群 A 共 20 个品种,其中 17 个为育成品种,3 个为地方品种;育成品种中除阜花 11 号为中间型,其余均为珍珠豆型;并且 8

个广东产地的品种均在这一类群中。类群 B 共 46 个品种,全部为育成品种,其中 53% 的品种具伏花生血统。类群 C 包含 3 个地方品种宁海大京生、洋豆、沙岭大只豆。类群 D 中包含 3 个中间型品种及 2 个单独聚在一起龙生型地方品种向阳籽和飞龙乡。类群 E 仅 1 个地方品种江田种。类群 F 包含 3 个普通型育成品种冀花 2

号、花育 32、天府 5 号。类群 G 包含 4 个多粒型地方品种四粒红、法库四粒红、印度多粒品种、栖霞糠皮三粒红。类群 H 仅 1 个多粒型地方品种余山凤凰窝。类群 I 仅 1 个龙生型的地方品种铁打坚。反映不同类型花生栽培种多样性水平的指数 I 和 H 分别为 0.1508 ~ 0.2303 和 0.0902 ~ 0.1372 (表 4)。5 大类型中中间型的指数 I 和 H (0.1508、0.0902) 为最低,地方品种 (0.2302、0.1372) 比育成品种 (0.1914、0.1129) 高,多粒

型品种的 H 指数在 5 大类型中最高。从聚类图可以看出,多粒型、龙生型品种(铁打坚)与其他品种间的遗传距离较大,而遗传多样性指数显示,多粒型仅 H 指数最高,龙生型的 I 和 H 指数 (0.1563、0.1031) 均较低,这一结果可能是由于参试的龙生型品种仅 4 个、多粒型仅 6 个,即其材料数量过少所致。荧光检测法检测分析的结果同样表明,栽培花生总体而言遗传多样性较低,而其中多粒型与地方品种的遗传多样性相对较高。

表 4 不同类型栽培花生品种的遗传多样性分析

Table 4 Genetic diversity of peanut varieties from different botanical types

类型 Type	数目 No.	银染法 Silver staining		荧光检测法 Fluorescence		2 种方法 Both methods	
		I	H	I	H	I	H
中间型 Intermediate	25	0.2770	0.1751	0.1508	0.0902	0.1917	0.1176
珍珠豆型 Spanish	32	0.2951	0.1876	0.1797	0.1085	0.2171	0.1341
普通型 Virginia	18	0.2938	0.1882	0.1972	0.1194	0.2285	0.1416
龙生型 Dragon	4	0.1145	0.0765	0.1563	0.1031	0.1428	0.0945
多粒型 Valencia	6	0.3213	0.2160	0.1900	0.1217	0.2325	0.1522
育成品种系 Breeding line	67	0.3185	0.2026	0.1914	0.1129	0.2325	0.1419
地方品种 Landrace	17	0.3736	0.2365	0.2303	0.1372	0.2766	0.1693
合计 Total	85	0.3491	0.2183	0.2081	0.1207	0.2537	0.1523

I = Shannon 信息指数; H = Nei 遗传多样性指数 I = Shannon information index, H = Nei genetic diversity index

2.3.3 银染法与荧光检测法检测分析栽培花生遗传多样性的差异

2 种方法聚类结果基本趋势一致,均与花生的类型、产地、亲缘关系呈正相关,并体现了栽培花生遗传背景狭窄,而地方品种具有相对较高的遗传多样性。相比之下,荧光检测法更精确、可靠。荧光检测法检测出的一些等位变异,如 233GM269、229GM269、225GM269、292GM606、288GM606、GM285GM606 和 257GM424 等,在银染法中没有检测出来。因此,荧光检测法可有效地将 82 个品种区分开,而银染法仅能分辨 74 个品种;荧光检测法聚在一起的伏花生血统品种占 53%,明显大于银染法 (47%);并且地方品种聚类比较集中。但是,本研究中龙生型品种的聚类结果在 2 种检测方法中存在较大差异。进一步分析发现,采用银染法和荧光检测法,在 4 个龙生型品种(铁打坚、飞龙乡、向阳籽、临桂麻壳)中能够检测出的多态性标记数分别为 3、0、0、2 和 8、2、2、7,银染法检出的等位变异数过少、荧光检测法在不同品种中得到的等位变异数目差异较大。造成这一结果的原因,一是选用的引物少、且特异性强,造成一些等位变异被遗漏;二是分析龙生型品种数目过少,导致一些品种间

的差异在荧光检测法中被放大。

对 85 个供试品种聚类分析发现,荧光检测法得到品种间的遗传相似系数为 0.73 ~ 1.00,高于银染法 (0.59 ~ 1.00);对 Shannon 信息指数和 Nei 基因多样性指数分析发现,荧光检测法得到的数值均比银染法低。可见,荧光检测法反映的品种间的遗传多样性较低,这可能是由于荧光检测法检出的一些等位变异体现了品种间遗传背景的相似性,而银染法却无法检测出这些等位基因,即一些信息在银染法中被掩盖了。另外,荧光检测法得到的多粒型 Nei 基因多样性指数在 5 大类型中最高,而 Shannon 信息指数却比普通型低,这可能是指数 I 测度公式具有不确定性,计算需大样本要求所致^[25]。

3 结论与讨论

本研究对常规银染法和荧光检测法 2 种检测 SSR PCR 产物的方法进行了比较,与银染法相比,荧光检测法具有灵敏度高、准确性强、效率高等优点。荧光检测法由于借助自动测序仪,避免了制胶、电泳、染色、读带等一系列步骤人工操作的影响,技术的可操作性、重复性更强。此外,通过高通量 PCR、

高通量上样检测及大片段检测优化等方法可以提高检测效率,有效降低试验成本。但是,荧光检测法也有一定的局限性,如多位点扩增产物不同类型峰图的识别与取值较复杂^[26]。

栽培花生起源于南美洲,是由 2 个含有 A、B 不同染色体组的二倍体野生种杂交并加倍进化而来^[7]。随后,经过长期的自然进化和人工驯化产生了在形态、生长习性、生育期等方面具有明显差异的大量种质资源。然而,在我国,过去的三、四十年育种目标存在较大局限,主要集中在产量性状、含油量、蛋白质含量等有限几个方面,使得许多具有优异性状的种质材料特别是农家品种得不到应用;同时育成品种间相互杂交的几率明显增加,造成现有育成品种间遗传背景越来越狭窄。以往许多实验室的分子标记多态性研究也已证实了上述结果^[27-28]。鉴于 SSR 标记荧光检测法的高灵敏度和准确性,本研究选取 9 对多态性及特异性较好的引物,分别用银染法和荧光检测法扫描了 85 个栽培品种的 SSR 标记多态性,并利用所得数据分别进行遗传多样性分析。荧光检测法可有效鉴别其中的 82 个品种,而银染法只能区分 74 个;荧光检测法聚类结果与类型、产地、亲缘关系等的一致度更高,充分体现了荧光检测法在遗传多样性分析方面更精确、可靠。由于荧光检测法可检测到的等位变异数量更多、更精确,一些具有相似遗传背景的品种可以有效区分,因此,总体上反映的品种间的遗传多样性较银染法明显更低。本研究测试的 85 个材料中大部分为育成品种(67 个,占 79%),其中 30 个育成品种含伏花生血缘,9 个具狮头企背景,因此,荧光检测法获得的数据可能更真实地揭示了这些品种的遗传差异,以此为依据选择遗传关系较远的材料配制杂交组合,有利于优良性状的选育。此外,采用荧光检测法构建指纹身份证也会更可靠,可以有效保护品种所有人的合法知识产权,为花生育种提供科学准确的鉴定技术。

Shannon 信息指数近年来被许多研究者用于种质资源遗传多样性分析,但该指数测度的准确与否与分析样本的大小密切相关。本研究中无论银染法还是荧光检测法检测的 Shannon 信息指数均较低(0.1145 和 0.1563),而任小平等^[29]认为龙生型花生资源在植物学性状和品质性状以及分子水平上均具有丰富的遗传多样性,这可能是由于本研究中的龙生型参试样本量太少所致,因此这一结果可能不能全面反映这一类型材料的遗传多样性的真

实状况。洪伟等^[30]以及关媛等^[25]的研究也发现了类似问题,为此,洪伟等^[30]将 Shannon 指数改为

$$\lim_{L \rightarrow \infty} \frac{-\sum_{i=1}^{N(L)} P_i \ln P_i}{\ln L}, \text{关媛等}^{[25]} \text{将公式改为 } -\ln NEP_i \ln P_i$$

(N 为样本数),但目前还没有相关软件的建成。为了提高多样性分析的准确性与高效性,应依据改进的公式开发计算软件。

本研究发现栽培花生 5 大类型中多粒型花生品种的遗传多样性较高,这与 R. H. Tang 等^[31]检测出多粒型花生资源的遗传多样性最丰富一致。另外,本研究中地方品种的遗传多样性指数最高,并且与其他品种间遗传距离较大。崔顺立等^[32]、林茂等^[33]应用常规银染 SSR 标记技术分别对河北及贵州花生地方品种进行了遗传多样性分析,也得出了相同结论。因此,为拓宽栽培花生遗传背景,多粒型品种及地方品种作为育种亲本更为有利。本研究供试材料中多粒型品种和地方品种较少,反映的状况不全面,因此,为了改善国内花生育种,应收集更多的地方品种及多粒型品种进行遗传多样性分析,从而全面地反映出国内花生的遗传多样性,为花生遗传育种和杂交亲本选择提供依据。

与银染法相比,荧光检测法具有灵敏度高、准确性强、效率高等优点,通过此方法揭示的品种遗传多样性更加准确、可靠。为降低荧光检测法实验成本,可以通过高通量 PCR、高通量检测及大片段检测优化等方法提高检测效率。花生栽培种总体上遗传背景狭窄,而多粒型育成品种与地方品种遗传多样性指数相对较高,与其他品种间遗传距离较大,可以作为育种亲本拓宽栽培花生遗传背景。

参考文献

- [1] Singh A K, Smarrt J. The genome donors of the groundnut/peanut (*Arachis hypogaea* L.) revisited [J]. Genet Resour Crop Ev, 1998, 45(2): 113-118
- [2] 孙大容. 中国栽培花生的品种分类[M]. 北京: 农业出版社, 1984
- [3] Kochert G, Halward T, Branch W D, et al. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species [J]. Theor Appl Genet, 1991, 81(5): 565-570
- [4] Halward T, Stalker T, LaRue E, et al. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Plant Mol Biol, 1992, 18(2): 315-325
- [5] Gimenes M A, Hoshino A A, Barbosa A V G, et al. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) [J]. BMC Plant Biol, 2007, 7: 9
- [6] He G, Meng R, Newman M, et al. Microsatellite as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. BMC Plant Biol, 2003, 3(3): 1-6
- [7] Moretzsohn M C, Hopkins M S, Mitchell S E, et al. Genetic diver-

- sity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome [J]. BMC Plant Biol, 2004, 4 (11): 1-10
- [8] 任小平, 张晓杰, 廖伯寿, 等. ICRISAT 花生微核心种质资源 SSR 标记遗传多样性分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43 (14): 2848-2858
- [9] Koppolu R, Upadhyaya H D, Dwivedi S L, et al. Genetic relationships among seven sections of genus *Arachis* studied by using SSR markers [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10 (15): 1471-2229
- [10] 耿健, 刘立峰, 崔顺立, 等. 冀鲁豫花生育成品种的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13 (2): 201-206
- [11] Yu G, Bao Y, Shi C, et al. Genetic diversity and population differentiation of liaoning weedy rice detected by RAPD and SSR Markers [J]. Biochem Genet, 2005, 43: 261-270
- [12] Christensen M, Sunde L, Bolund L, et al. Comparison of three methods of microsatellites detection [J]. Scand J Clin Lab Invest, 1999, 59 (3): 167-178
- [13] Benbouza H, Jacquemin J M, Baudoin J P, et al. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels [J]. Biotechnol Agron Soc Environ, 2006, 10 (2): 77-81
- [14] Comertpay G, Baloch F S, Kilian B, et al. Diversity assessment of turkish maize landraces based on fluorescent labelled SSR markers [J]. Plant Mol Biol Rep, 2012, 30: 261-274
- [15] 郝晨阳, 王兰芬, 张学勇, 等. 我国育成小麦品种的遗传多样性演变 [J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2005, 35 (5): 408-415
- [16] Wang K, Guo W, Zhang T. Development of one set of chromosome-specific microsatellite-containing BACs and their physical mapping in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 2007, 115 (5): 675-682
- [17] Varshney R K, Bertoli D J, Moretzsohn M C, et al. The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2009, 118 (4): 729-739
- [18] 李双铃, 王辉, 任艳, 等. 利用荧光标记 SSR 技术鉴定花生 F₁ 代杂交种 [J]. 花生学报, 2009 (4): 35-38
- [19] Moretzsohn M C, Leoi L, Proite K, et al. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae) [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111 (6): 1060-1071
- [20] Ferguson M E, Burow M D, Schulze S R, et al. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. Hypogaea* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108 (6): 1064-1070
- [21] Qin H D, Feng S, Chen C, et al. An integrated genetic linkage map of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) constructed from two RIL populations [J]. Theor Appl Genet, 2012, 124 (4): 653-664
- [22] Budiman M A, Jones J I T, Citek R W, et al. Methylation-filtered and shotgun genomic sequences for diploid and tetraloid peanut taxa [EB/OL]. [2006-03-21]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [23] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76 (10): 5269-5273
- [24] 易红梅, 王凤格, 赵久然, 等. 玉米品种 SSR 标记毛细管电泳荧光检测法与变性 PAGE 银染检测法的比较研究 [J]. 华北农学报, 2006, 21 (5): 64-67
- [25] 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 [J]. 作物学报, 2007, 33 (3): 461-468
- [26] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 等. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析 [J]. 作物学报, 2005, 31 (2): 144-149
- [27] 殷冬梅, 王允, 尚明照, 等. 花生优异种质的分子标记与遗传多样性分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43 (11): 2220-2228
- [28] 康红梅, 李保云, 孙毅. 花生表型及 SSR 遗传多样性的研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13 (1): 66-71, 76
- [29] 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
- [30] 洪伟, 吴承祯. Shannon-Wiener 指数的改进 [J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7 (2): 120-124
- [31] 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
- [32] 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
- [33] 林茂, 李正强, 郑治洪, 等. 贵州省花生地方品种的遗传多样性 [J]. 作物学报, 2012, 38 (8): 1387-1396