

应用 SSR 标记分析中国北方名优绿豆的遗传多样性

任红晓¹, 程须珍², 徐东旭¹, 高运青¹, 尚启兵¹

(¹ 张家口市农业科学院, 河北张家口 075000; ² 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 利用 39 对 SSR 分子标记对 78 份中国北方名优绿豆品种进行遗传多样性分析, 共检测出 104 个等位变异, 平均为 2.74 个。不同引物所揭示的试验材料多态信息含量 (*PIC*) 变幅在 0.03 ~ 0.58 之间, 平均 0.26。分析 4 个地理来源的名优绿豆资源, 结果表明内蒙古的等位变异数和多态信息含量值最大, 是传统名优绿豆种质资源最丰富的地区, 河北张家口次之。聚类分析表明河北张家口和山西大同的种质为组群 I, 内蒙古和吉林白城的资源为组群 II。

关键词: 中国北方; 传统绿豆品种; 遗传多样性; SSR

Genetic Diversity of Traditional Mungbean Varieties in Northern China by SSR Markers

REN Hong-xiao¹, CHENG Xu-zhen², XU Dong-xu¹, GAO Yun-qing¹, SHANG Qi-bing¹

(¹ Zhangjiakou Academy of Agricultural Sciences, Zhangjiakou Hebei 075000;

² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: In this study, genetic diversity of 78 traditional mungbean varieties of North China were analyzed by 39 SSR molecular markers, total 104 allelic variations were detected with an average of 2.74. The polymorphic information content (*PIC*) of tested materials detected by different primers varied from 0.03 to 0.58 with an average of 0.26. The analysis of mungbean resources from 4 geographic origin indicated that Inner Mongolia was the most diversity region of traditional mungbean resources, with the highest allelic variation and *PIC* value, and the second was Zhangjiakou of Hebei province. Cluster analysis showed that germplasm from Zhangjiakou of Hebei province and Datong of Shanxi province were the first group, and those from Inner Mongolia and Baicheng of Jilin province were the second group.

Key words: north China; traditional mungbean varieties; genetic diversity; SSR

绿豆在我国已有两千余年的栽培历史, 是我国人民传统的豆类食物。绿豆子粒中含有多种维生素及钙、磷、铁等矿物质, 由于其营养丰富, 用途广泛, 李时珍称其为“菜中佳品”^[1-3]。DNA 分子标记在遗传多样性分析、分子标记辅助育种和遗传作图中具有重要作用。SSR (simple sequence repeat) 因其多态性高、共显性和技术简便的优点, 国内外学者利用 SSR 分子标记对不同来源的绿豆种质进行了遗传多样性分析^[4-8]。我国是绿豆主要出口国, 许多传统名特绿

豆品种, 如张家口鹦哥绿豆、白城鹦哥绿豆等在国际市场上久享盛誉, 目前仅见程须珍等^[9]利用 RAPD 标记对 16 个绿豆品系进行过遗传分析; 刘岩等^[10]利用 40 对 SSR 引物对 18 个不同地理来源 (共 272 份种质) 的绿豆群体进行遗传多样性分析, 而针对这些传统名特品种进行的多样性分析国内外则未见报道。本研究选用 SSR 分子标记对来自于河北张家口、山西大同、内蒙古和吉林白城等我国北方的名优绿豆品种的遗传多样性进行分析, 能有效地反映名优资源群体

收稿日期: 2014-03-25 修回日期: 2014-08-07 网络出版日期: 2015-02-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150206.1633.006.html>

基金项目: 国家食用豆产业技术体系建设专项资金资助项目 (CARS-09-Z3)

第一作者从事食用豆新品种选育与栽培技术研究。E-mail: renhongxiao456@126.com

间的亲缘关系和遗传多样性,为研究绿豆的起源和引种提供有效的理论参考,并为绿豆的优异种质资源保护和提高育种材料的利用效率奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

参试材料为我国目前北方主产区的名优地方品种,共 78 份,来自全国 4 个省(区),其中河北张家口 20 份,山西大同 22 份,内蒙古 17 份,吉林白城 19 份。张绿 1 号由张家口市农业科学院豆类所提供,其余 77 份由中国农业科学院作物科学研究所提供。

表 1 不同来源地的参试材料
Table 1 The accessions from each origin(north China)

| 序号 Code | 名称或编号 Name or Code | 原产地或来源 Origin | 序号 Code | 名称或编号 Name or Code | 原产地或来源 Origin |
|------------|-----------------------|------------------|------------|-----------------------|------------------|
| 1 | 张绿 1 号 | 河北张家口市 | 40 | C0381 | 山西大同灵丘县 |
| 2 | C0274 | 河北张家口市 | 41 | C0385 | 山西大同广灵县 |
| 3 | C0276 | 河北张家口市 | 42 | C0386 | 山西大同广灵县 |
| 4 | C0277 | 河北张家口市 | 43 | C5645 | 内蒙古 |
| 5 | C0279 | 河北张家口怀来县 | 44 | 突泉大明绿 | 内蒙古 |
| 6 | C0280 | 河北张家口怀来县 | 45 | 和林小明绿 | 内蒙古 |
| 7 | C0281 | 河北张家口怀来县 | 46 | C2039 | 内蒙古克什克腾旗 |
| 8 | C0282 | 河北张家口怀来县 | 47 | C2040 | 内蒙古克什克腾旗 |
| 9 | C0283 | 河北张家口宣化县 | 48 | C2051 | 内蒙古赤峰市 |
| 10 | C0284 | 河北张家口宣化县 | 49 | C2052 | 内蒙古赤峰市 |
| 11 | C0288 | 河北张家口涿鹿县 | 50 | C2053 | 内蒙古赤峰市 |
| 12 | C0292 | 河北张家口阳原县 | 51 | C0678 | 内蒙古翁牛特旗 |
| 13 | C0293 | 河北张家口阳原县 | 52 | C0679 | 内蒙古喀喇沁旗 |
| 14 | C0294 | 河北张家口阳原县 | 53 | C0681 | 内蒙古阿鲁旗 |
| 15 | C0297 | 河北张家口尚义县 | 54 | C0682 | 内蒙古赤峰市 |
| 16 | C0298 | 河北张家口尚义县 | 55 | C0683 | 内蒙古赤峰市 |
| 17 | C3709 | 河北张家口阳原县 | 56 | C0684 | 内蒙古赤峰市 |
| 18 | C3710 | 河北张家口阳原县 | 57 | C0685 | 内蒙古翁牛特旗 |
| 19 | C3711 | 河北张家口阳原县 | 58 | C0686 | 内蒙古宁城 |
| 20 | C3712 | 河北张家口万全县 | 59 | C0687 | 内蒙古宁城 |
| 21 | 大同绿豆 | 山西大同县峰峪乡兼场村 | 60 | MD-008 | 吉林白城 |
| 22 | 大同绿豆 | 山西大同县党留庄乡兼埔村 | 61 | LDS-001 | 吉林白城 |
| 23 | 大同绿豆 | 山西大同灵丘县柳科乡柳科村 | 62 | C5668 | 吉林白城 |
| 24 | 大同绿豆 | 山西大同县石家田乡小庄村 | 63 | C6396 | 吉林白城 |
| 25 | 大同绿豆 | 浑源县东坊城乡荆庄 | 64 | 白绿 11 号 | 吉林白城 |
| 26 | 大同绿豆 | 山西大同市南郊区高店 | 65 | C5635 | 吉林白城 |
| 27 | C0376 | 山西大同市 | 66 | C5787 | 吉林白城 |
| 28 | C0377 | 山西大同天镇县 | 67 | 白绿 10 号 | 吉林白城 |
| 29 | C0378 | 山西大同天镇县 | 68 | C5634 | 吉林白城 |
| 30 | C0379 | 山西大同天镇县 | 69 | 大鹦哥绿 985 | 吉林白城 |
| 31 | C0387 | 山西大同浑源县 | 70 | C0700 | 吉林白城大安县(市) |
| 32 | C1839 | 山西大同市 | 71 | C0701 | 吉林白城洮南市 |
| 33 | C1840 | 山西大同市 | 72 | C0702 | 吉林白城通榆县 |
| 34 | C1841 | 山西大同市 | 73 | C0703 | 吉林白城通榆县 |
| 35 | C1845 | 山西大同市 | 74 | C0704 | 吉林白城通榆县 |
| 36 | C1848 | 山西大同市 | 75 | C0706 | 吉林白城通榆县 |
| 37 | C1874 | 山西大同县 | 76 | C3923 | 吉林白城市 |
| 38 | C1875 | 山西大同县 | 77 | C3924 | 吉林白城通榆县 |
| 39 | C0380 | 山西大同灵丘县 | 78 | C3925 | 吉林白城洮南市 |

1.2 基因组 DNA 的提取

每份材料取 5 粒种子播种于营养钵内,出苗后 10 d 左右,从每份材料的 2~3 株绿豆幼苗上采集刚展开的新鲜嫩叶^[11]于 2.0 mL 标记的 EP 管中,立即置于冰上。在液氮中冷冻后研磨成细粉,CTAB 法提取基因组 DNA^[12-13]。将基因组 DNA 原液于 -20 ℃ 保存,PCR 扩增时取适量稀释为 25 ng/μL 备用。

1.3 PCR 扩增

39 对 SSR 引物由中国农业科学院作物科学研究所提供,PCR (polymerase chain reaccation) 扩增的整个反应体系为 10 μL,包含 25 ng/μL 绿豆基因组 DNA 1.5 μL,20 mmol/L MgCl₂ 1.0 μL,40 mmol/L dNTPs 0.2 μL,2.5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.12 μL,2 μmol/L 引物 0.75 μL,蒸馏水 6.43 μL。反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,循环 35 次;72 ℃ 延伸 5 min,整个 SSR 分析的 PCR 扩增反应在东胜 EDC-810PCR 热循环仪上进行。

1.4 扩增产物检测

8% 的聚丙烯酰胺非变性凝胶电泳分离扩增产

物,360~380 V 恒压下电泳,电泳时间一般在 1.5 h 左右。将凝胶用蒸馏水洗涤 2 次,用 10% AgNO₃ 溶液染色 10 min,蒸馏水洗涤 3 次后用 1.5% NaOH 加 1% 甲醛溶液显影,8 min 后蒸馏水洗涤 2 次后读带。

1.5 数据处理

根据各 SSR 位点 PCR 扩增片段(等位变异的迁移率)分别读取数据,按照数据分析软件的要求转换成对应格式。利用 PopGene32 和 Powermarker V3.25 软件计算各遗传参数^[14-15]。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

39 对 SSR 引物在 78 份名优绿豆资源中共检测出 104 个等位变异,等位变异范围为 2~5 个,平均为 2.74 个。其中引物 p2-436 等位变异数目最多,为 5 个。本研究中不同引物的多态信息含量(PIC)变幅在 0.03~0.58 之间,引物 p2-436 多态信息含量(PIC)最高,为 0.54,平均为 0.26(表 2)。

表 2 SSR 标记的等位变异数目和多态信息含量

Table 2 Number of alleles and polymorphism information content for SSR markers

| 序号 Code | 多态性引物编号 Code of polymorphic primers | 等位变异数目 No. of alleles | 多态信息含量 PIC | 序号 Code | 多态性引物编号 Code of polymorphic primers | 等位变异数目 No. of alleles | 多态信息含量 PIC |
|------------|---|--------------------------|---------------|------------|---|--------------------------|---------------|
| 1 | p1-397 | 4 | 0.45 | 21 | p3-223 | 3 | 0.29 |
| 2 | p1-1367 | 3 | 0.22 | 22 | p3-302 | 4 | 0.15 |
| 3 | p2-41 | 2 | 0.37 | 23 | p3-310 | 3 | 0.03 |
| 4 | p2-64 | 2 | 0.31 | 24 | p3-335 | 3 | 0.16 |
| 5 | p2-208 | 2 | 0.17 | 25 | p3-368 | 2 | 0.15 |
| 6 | p2-436 | 5 | 0.54 | 26 | p3-427 | 3 | 0.16 |
| 7 | p2-510 | 2 | 0.07 | 27 | p3-429 | 3 | 0.04 |
| 8 | p2-516 | 3 | 0.18 | 28 | p3-598 | 4 | 0.12 |
| 9 | p2-536 | 3 | 0.15 | 29 | p3-627 | 3 | 0.26 |
| 10 | p2-624 | 3 | 0.55 | 30 | p3-671 | 2 | 0.35 |
| 11 | p2-627 | 3 | 0.58 | 31 | p3-765 | 2 | 0.13 |
| 12 | p2-637 | 3 | 0.12 | 32 | p3-789 | 2 | 0.27 |
| 13 | p2-740 | 2 | 0.32 | 33 | p3-835 | 2 | 0.37 |
| 14 | p2-756 | 2 | 0.17 | 34 | x-34 | 2 | 0.35 |
| 15 | p2-999 | 2 | 0.15 | 35 | x-120 | 2 | 0.37 |
| 16 | p2-1042 | 4 | 0.17 | 36 | c-250 | 2 | 0.38 |
| 17 | p2-1063 | 3 | 0.19 | 37 | c-273 | 2 | 0.37 |
| 18 | p3-135 | 2 | 0.04 | 38 | h-5 | 4 | 0.45 |
| 19 | p3-136 | 3 | 0.22 | 39 | h-40 | 2 | 0.27 |
| 20 | p3-203 | 4 | 0.51 | 平均数 Mean | | 2.74 | 0.26 |

2.2 不同地区名优绿豆品种遗传多样性比较

由表 3 可以看出,4 个参试资源群体从总体上分析,有效等位基因变异数平均为 1.49,多态位点百分率平均为 82.05%。不同地理来源组群的平均等位变异数的变异范围在 1.87~2.51 之间,平均 2.09;有效等位变异数在 1.45~1.55 之间,平均为 1.49 个;多态信息含量(*PIC*)的变异范围为 0.20~0.26,平均 0.24。内蒙古的平均等位变异数最高,其

次为河北张家口的。内蒙古和河北张家口的多态信息含量最大,吉林白城的其次,山西大同的多态信息含量最小。多态位点百分率是反应遗传多样性的重要指标之一,4 个地区的多态位点百分率平均为 82.05%,内蒙古的最高为 100%,山西大同与吉林白城的最低为 69.23%。综合各群体间的参数可知内蒙古为名优绿豆资源最丰富的地区,河北张家口次之,山西大同与吉林白城的遗传多样性相对较低。

表 3 参试绿豆品种群体遗传多样性比较

Table 3 Genetic diversity of mungbean varieties from different origins

| 组群 | 平均等位变异数 | 有效等位变异数 | 多态位点 | 多态位点百分率(%) | 多态信息含量 |
|------------|------------------------|--------------------------|------------------|--------------------------------|------------|
| Population | No. of average alleles | No. of effective alleles | Polymorphic loci | Percentage of polymorphic loci | <i>PIC</i> |
| 河北张家口 | 2.10 | 1.55 | 35 | 89.74 | 0.26 |
| 山西大同 | 1.87 | 1.45 | 27 | 69.23 | 0.20 |
| 内蒙古 | 2.51 | 1.52 | 39 | 100.00 | 0.26 |
| 吉林白城 | 1.87 | 1.45 | 27 | 69.23 | 0.22 |
| 平均 Mean | 2.09 | 1.49 | 32 | 82.05 | 0.24 |

2.3 不同地区名优绿豆品种遗传距离、遗传一致度

遗传距离和遗传一致度是用来衡量群体间亲缘关系的重要参数,遗传一致度大,表明群体间的亲缘关系越近,反之就越远^[16-17]。由表 4 得知,4 个地区绿豆品种的遗传一致度变异范围在 0.93~0.97 之间。内蒙古和吉林白城的绿豆品种遗传一致度较高,遗传关系相对较近;河北张家口和内蒙古、吉林白城的遗传一致度较低,其亲缘关系相对较远。

表 4 群体间遗传距离及遗传一致性

Table 4 Genetic identity and gentic distance between populations

| 群体 | 河北张家口 | 山西大同 | 内蒙古 | 吉林白城 |
|-------------|-------------|--------|----------------|----------|
| Populations | Zhangjiakou | Datong | Inner Mongolia | Baicheng |
| 河北张家口 | | 0.96 | 0.93 | 0.93 |
| 山西大同 | 0.04 | | 0.96 | 0.95 |
| 内蒙古 | 0.07 | 0.04 | | 0.97 |
| 吉林白城 | 0.07 | 0.05 | 0.03 | |

右上角为遗传一致性,左下角为遗传距离
Nei's genetic identity (above diagonal) and gentic distance (below diagonal)

2.4 不同地区名优绿豆品种聚类分析

利用 UPGMA 法构建 4 个群体的聚类图(图 1),在遗传相似系数 1.88 处,参试绿豆品种群体可被分为 2 个组群,组群 I 包括河北张家口和山西大同地区的绿豆品种群;组群 II 包括内蒙古和吉林白城地区的绿豆品种群。

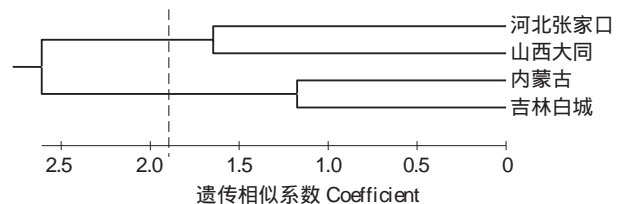


图 1 4 个地区绿豆群体的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of mungbean populations in 4 provincialism

3 讨论

本研究利用 39 对 SSR 分子标记对 78 份中国北方绿豆品种进行遗传多样性分析,共检测到 104 个等位基因,因此,可较好地揭示参试材料的遗传多样性。然而,本研究中的平均等位基因数(2.74 个)和 *PIC* 值(0.26)都不高。刘岩等^[10]利用 40 对绿豆 SSR 引物对 272 份绿豆种质分析得到平均等位基因数为 3.1 个,*PIC* 值为 0.3497,与之相比,结果稍低。分析其原因,可能与以下几个方面有关:(1)所用引物多态性水平较低,等位基因数介于 2~5 个;(2)参试种质的数量及来源有限,研究中参试品种均来自中国北方,增加样本数多态信息含量可能会增加;(3)由于长时间的自然驯化及地区间资源共享,造成遗传变异率较低。综合各群体间的参数得到内蒙古为名优绿豆资源最丰富的地区,河北张

家口次之,山西大同的遗传多样性相对较低。虽然山西大同的绿豆资源最多,但遗传多样性在 4 个地区中最低,从而从分子水平上证明材料份数多,遗传多样性并不是最大^[18]。

周连弟^[19]研究指出遗传距离能够反映群体间亲缘关系的远近。本研究中,4 个地区参试品种的遗传距离变异范围在 0.03~0.07 之间,其中内蒙古和河北张家口与吉林白城和河北张家口的绿豆品种遗传距离为 0.07,亲缘关系相对较远;吉林白城和内蒙古的遗传距离为 0.03,其亲缘关系较近。名优绿豆种质资源分布和地理区域也有一定的关系。聚类分析显示中国北方传统名优绿豆品种可分为两大组群,河北张家口和山西大同的为第 1 组群;内蒙古和吉林白城的为第 2 组群。从地理来源上看,组群 I 由华北地区品种构成;组群 II 由东北及内蒙古地区品种构成。在今后的育种工作中,应加强亲缘关系较远地区间的基因交流及新基因挖掘。

参考文献

- [1] 郑卓杰. 中国食用豆类学[M]. 北京:中国农业出版社,1997: 141-166
- [2] 王丽侠,程须珍,王素华,等. 应用 SSR 标记对小豆种质资源的遗传多样性分析[J]. 作物学报,2009,35(10):1858-1865
- [3] 赵庆勇,张亚东,朱镇,等. 30 个梗稻品种 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(2):218-223
- [4] Kumar S V, Tan S G, Quah S C, et al. Isolation and characterization of seven tetranucleotide microsatellite loci in mung-bean, *Vigna radiata* [J]. Mol Ecol Not, 2002, 2: 293-295
- [5] Kumar S V, Tan S G, Quah S C, et al. Isolation of microsatellite markers in mungbean, *Vigna radiata* [J]. Mol Ecol Not, 2002, 2: 96-98
- [6] Miyagi M, Humphry M, Ma Z Y, et al. Construction of bacterial artificial chromosome libraries and their application in developing PCR-based markers closely linked to a major locus conditioning bruchid resistance in mungbean [J]. Theor Appl Genet, 2004, 110: 151-156
- [7] Gwag J G, Chung J W, Chung H K, et al. Characterization of new microsatellite markers in mungbean (*Vigna radiata* L.) [J]. Mol Ecol Not, 2006, 6: 1132-1134
- [8] 刘长友,程须珍,王素华,等. 用于绿豆种质资源遗传多样性分析的 SSR 及 STS 引物的筛选[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 298-302
- [9] 程须珍,王素华,吴绍宇,等. 绿豆抗豆象基因 PCR 标记的构建与应用[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1534-1539
- [10] 刘岩,程须珍,王丽侠,等. 基于 SSR 标记的中国绿豆种质资源遗传多样性研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(20): 4197-4209
- [11] 王丽侠,王素华,程须珍. 绿豆种质资源、育种及遗传研究进展[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1519-1527
- [12] Doyle J J, Doyle J E. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15
- [13] 黄桂华. 短枝木麻黄种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2006
- [14] 沈志军,马瑞娟,俞明亮,等. 无锡水蜜桃品种群遗传多样性及与其他群体亲缘关系的 SSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(3): 367-372
- [15] 米日吉利·马木提,阿里甫·艾尔西,宁新民. 利用 SRAP 和 RGA 标记对新疆海岛棉品种的聚类分析[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(11): 2017-2024
- [16] 姜伟,何觉民,陆建农,等. 中国主要棉花栽培群体的遗传多样性分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(1): 127-133
- [17] 宫慧慧,谢华,马英才,等. 利用 SSR 分析小豆种质的遗传多样性分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(5): 872-880
- [18] Wang L X, Guan Y, Guan R X, et al. Establishment of Chinese soybean (*Glycine max*) core collections with agronomic traits and SSR markers [J]. Euphytica, 2006, 151: 215-223
- [19] 周连弟. 板栗种质资源遗传多样性研究[D]. 北京:中国农业大学, 2005