

大豆种质资源苗期耐盐鉴定及遗传多样性分析

林 峰,赵慧艳,史飞飞,高 鹏,刘晨煦,岳 阳,金 昕,张意德,
李永光,韩英鹏,赵 雪,滕卫丽

(东北农业大学农学院/大豆生物学教育部重点实验室/农业农村部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,哈尔滨 150030)

摘要: 盐碱地是边际土壤的主要类型之一,利用边际土地耕作是减缓耕地紧缺的有效途径。为筛选耐盐性较强的大豆种质资源,提高盐碱土地大豆产量,本研究对392份来自国内外不同地域的大豆种质资源,采用150 mmol/L NaCl进行苗期盐胁迫处理,采用单株分类记载法进行苗期耐盐性鉴定,并利用10个与耐盐基因连锁的SSR标记对高耐及耐盐等级大豆种质资源进行分子辅助鉴定及遗传多样性分析,应用相似性系数分析、聚类分析等方法对高耐及耐盐等级大豆种质资源进行综合评价。结果表明:筛选出58份高耐及耐盐大豆种质资源,包括赤豆1号、东农69等高耐大豆种质资源14份,黑农51、黑河35等耐盐大豆种质资源44份;58份耐盐大豆种质资源分子辅助鉴定表明,绥农1号、合丰50和东大2号携带耐盐等位变异最多,均为6个,标记平均鉴定效率为43.45%,平均准确率为68.46%,其中分子标记Satt201的鉴定效率和鉴定准确率最高,分别为60.34%和96.55%;聚类分析表明,58份大豆种质资源间的相似性系数在0.5385~0.9231之间,平均值为0.6974,相关系数为0.6240,说明58份大豆种质资源大部分遗传关系较近,遗传多样性较低,58份耐盐大豆种质资源并未按地域进行聚类,但一个类群或亚群中大部分种质资源来源地在地理位置上相同或较为接近,可从中筛选亲缘关系较远的大豆种质资源作为亲本,用于培育耐盐大豆新品种奠定遗传基础。

关键词: 大豆;苗期;盐胁迫;分子辅助鉴定;遗传多样性分析

Identification of Salt-tolerant Germplasm Resources in Soybean Seedlings and Genetic Diversity Analysis

LIN Feng, ZHAO Huiyan, SHI Feifei, GAO Peng, LIU Chenxu, YUE Yang, JIN Xin, ZHANG Yide,
LI Yongguang, HAN Yingpeng, ZHAO Xue, TENG Weili

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese of Ministry of Education/
Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding (Genetics) in Northeast China of the Ministry of
Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150030)

Abstract: Saline-alkali soil is one of the main types of marginal soils. Using the marginal land for agricultural cultivation is an effective way to alleviate the shortage of farming land. In order to screen soybean germplasm resources showing salt tolerance to improve soybean yield in saline soils, 392 samples from different geographic regions at home and abroad were treated with 150 mmol/L NaCl at the seedling stage. Each single plant was identified and genotyped using 10 SSR markers linked to salt tolerant genes, in order to perform molecular-assisted identification and genetic diversity analysis. Similarity coefficient analysis, cluster analysis and other methods were applied to comprehensively evaluate the soybean germplasm resources. Fifty-eight soybean germplasm resources were identified, including 14 showing high tolerance, such as Chidou 1 hao and Dongnong 69, and 44 showing salt-tolerant, such as Heinong 51 and Heihe 35. Although genotyping

收稿日期: 2023-11-28 网络出版日期: 2024-01-10

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231128003>

第一作者研究方向为大豆遗传育种, E-mail: 1520491419@qq.com

通信作者: 滕卫丽, 研究方向为大豆遗传育种与生物技术, E-mail: twlneau@163.com

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1201103-01-03); 财政部、农业农村部现代农业产业技术体系(CARS-04-PS04)

Foundation projects: National Key Research and Development Project Program (2021YFD1201103-01-03); Modern Agricultural Industrial Technology System, Ministry of Finance, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (CARS-04-PS04)

these 58 samples, Suinong 1 hao, Hefeng 50 and Dongda 2 hao carried the most salt tolerant allele variations, all of which were 6, and the average identification efficiency was 43.45% and the average accuracy was 68.46%, of which the molecular markers Satt201 had the highest identification efficiency of 60.34% and the highest accuracy of 96.55%. Cluster analysis showed that the similarity coefficients among the 58 soybean germplasm resources ranged from 0.5385 to 0.9231, with an average value of 0.6974 and a correlation coefficient of 0.6240, indicating that most of the 58 soybean germplasm resources were genetically close, and the genetic diversity was relatively low, and that the 58 soybean germplasm resources were not clustered geographically, but most of them were geographically identical or had the same place of origin in a taxon or subgroup. However, we didn't detect the correlation between genetic similarity and geographically collection sites. The distant germplasm resources can be selected as parents, to breed new salt-tolerant soybean varieties.

Key words: soybean; seedling; salt stress; molecular assisted identification; genetic diversity analysis

高产、优质、稳产、适应性强、现代化和机械化是 21 世纪农作物的基本要求^[1]。大豆是我国供求矛盾较为突出的粮油作物,也是世界各国常用的油料作物之一^[2],相较于其他作物,大豆属于中等耐盐作物,盐害会降低大豆产量,高盐环境甚至会导致大豆凋亡^[3]。目前,在中国西北地区、东北地区和滨海地区盐碱土地面积较大,严重影响我国北方地区大豆的产量与品质^[4],培育高产、稳产、优质的耐盐大豆品种是解决这一问题的关键。

简单重复序列标记(SSR, simple sequence repeats)又称微卫星序列标记(MS, microsatellite sequence),是一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术,具有多态性高、重复性好、稳定性好、可靠性高、简便快捷、实验成本较低等优点。田蕾^[5]利用 6 对 SSR 引物对 145 份大豆种质进行耐盐性分子标记辅助选择,共检测 16 个耐盐特有等位变异,26 个盐敏感特有等位变异。李雪华^[6]对 12 份大豆品种进行⁶⁰Co γ 射线诱变,筛选出耐盐性突变体进行 SSR 标记分析,得到 1 个与耐盐相关的标记 Satt193,并鉴定出 T30628、T30014 等 4 个高耐盐家系。Kan 等^[7]对 196 份大豆地方品种组成的自然群体进行检测,通过关联定位,发现 7 个 SSR 标记与 3 个耐盐指数相关联,并筛选出优异耐盐材料 S15 和 S134。遗传多样性研究是作物改良的基础,作物种质资源遗传多样性发掘对育种成败起决定性作用^[8]。向艳涛等^[9]利用 212 对 SSR 引物对 84 份来自中国和日本的毛豆种质进行聚类分析,结果表明毛豆种质资源遗传多样性丰富度较低,遗传背景单一。李琼等^[10]利用 42 对 SSR 引物对 50 份来自黄淮海地区大豆种质资源进行遗传多样性分析,通过非加权组平均法

(UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic means)进行聚类,结果表明黄淮海地区北部的大豆种质资源遗传多样性丰富度高于南部。Jeevan 等^[11]利用 35 对 SSR 引物对 29 份大豆种质材料进行遗传多样性分析,共检测到 34 个等位基因,SSR 引物多态信息含量(PIC, polymorphism information content)值在 0.0640~0.6890 之间。

虽有学者对大豆种质资源在苗期^[12]、芽期^[7]进行耐盐表型鉴定及分子辅助鉴定,筛选耐盐大豆种质资源,但对耐盐大豆种质资源进行 SSR 分子辅助鉴定与遗传多样性分析较少,对耐盐大豆种质资源间的遗传关系研究尚有不足。本研究对 392 份大豆种质资源进行苗期耐盐性鉴定,初步筛选耐盐种质资源,利用 10 个与耐盐基因连锁和 20 个在大豆基因组中均匀分布的 SSR 标记,对耐盐种质进行耐盐性分子辅助鉴定和遗传多样性分析,进一步筛选耐盐大豆种质资源,明确其相互间的遗传关系,以期筛选亲缘关系较远的耐盐大豆种质资源,为培育耐盐大豆品种提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

372 份国内大豆种质资源和 20 份国外大豆种质资源,共 392 份材料,由东北农业大学收集并保存。材料分布情况如下:黑龙江省 257 份,吉林省 42 份,辽宁省 16 份,内蒙古 22 份,北京 18 份,河北省 7 份,山东省 4 份,湖北省 2 份,天津、新疆、浙江省以及甘肃省各 1 份,国外 20 份。

1.2 试验方法

1.2.1 苗期耐盐性鉴定 参考刘谢香等^[13]和 Guan

等^[14]建立的大豆苗期耐盐鉴定方法,将 392 份大豆种质资源盆栽播种于东北农业大学抗旱棚内,每份大豆种质资源分为处理组与对照组,分别播种于 8 cm×8 cm×8 cm 育苗钵中,每钵播种 8 粒种子,每 20 钵置于 48 cm×35 cm×10 cm 的塑料盒内,播种完成后每个塑料盒中浇 5 L 蒸馏水。对生真叶完全展开时处理组进行 2 L 150 mmol/L NaCl 盐处理,对照组进行 2 L 蒸馏水处理,每 3 d 处理一次,共处理 3 次,最后一次处理 5 d 后根据单株分类记载法^[13]进行叶面枯萎程度调查(表 1),并计算盐害指数,依据盐害指数值判定不同大豆种质资源苗期耐盐等级(表 2)。于 V3 时期采摘高耐和耐盐等级大豆种质资源植株上部新鲜嫩叶,存入-80 ℃冰箱,留待提取 DNA 使用。

表 1 大豆苗期耐盐级别划分标准
Table 1 Classification criteria for salt tolerance grade in soybean seedlings

耐盐级别 Salt tolerance grade	表型特征 Phenotypic characterization
1	健康的绿叶,没有观察到损伤
2	轻度坏死,真叶轻微发黄
3	中度坏死,三出复叶发黄
4	严重坏死,超过 75% 叶面发黄
5	凋亡,植物完全枯萎

表 3 用于分子辅助鉴定与耐盐基因连锁的 SSR 标记

Table 3 SSR markers linked to salt-tolerant genes for molecular assisted characterization

标记名称 Marker name	正向序列(5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
Sat_091	CTTCTGGATAGTTGGGACTGATA	GGAACAGGTCGTGAAAAGTTAT
Satt339	TAATATGCTTTAAGTGGTGTGGTTATG	GTTAAGCAGTTCCTCTCATCACG
Sat_162	GCGTGGTTTTTCGCTGGATATA	GCGCATTTTCGTAACATATTTTTCAC
Satt239	GCGCAAAAAATGAATCACAAT	GCGAACACAATCAACATCCTTGAAC
Satt462	CGGTCACGAATACAAGATAAATAATGC	GCGTGCATGTCAGAAAAAATCTCTATAA
Satt281	AAGCTCCACATGCAGTTCAAAAAC	TGCATGGCACGAGAAAGAAGTA
Satt237	GCGTGATTTCAATCCTTTTTTC	GCGGTTGTCTGTTAGAACCT
Satt636	GTCATGACTCATGAGTCACGTAAT	GCTGCATATCCACTCTCATTGACT
Satt588	GAGCCAAAACCAAAGTGAAGAAC	CCAACTAATCCCAGGGACTTACTT
Satt201	GCGTTGATACTTTCCTAAGACAAT	GGGAGAGAAGGCAATCTAA

表 2 大豆苗期耐盐等级划分标准

Table 2 Classification criteria for salt tolerance in soybean seedlings

盐害指数(%) Salinity index	耐盐等级 Salt tolerance class
0.0~20.0	高耐
20.1~40.0	耐盐
40.1~60.0	中耐
60.1~80.0	敏感
80.1~100.0	高敏

盐害指数计算公式:

$$\text{盐害指数} = \frac{\sum(\text{耐盐级别} \times \text{该级别株数})}{\text{株数总和} \times 5(\text{最高耐盐级别})} \times 100$$

1.2.2 DNA 提取及 SSR 分子鉴定 将鉴定出的高耐和耐盐大豆种质资源叶片从-80 ℃冰箱取出,按照 CTAB 法^[15]提取 DNA。采用核酸蛋白分光光度计检测 DNA 浓度,稀释至 100 ng/μL,存入-20 ℃冰箱备用。

采用张海燕等^[16]和胡雯恬^[17]研究中与大豆耐盐基因连锁的 10 对 SSR 引物对耐盐大豆种质资源进行分子辅助鉴定(表 3),以铁丰 8 号和 Williams82 分别为耐盐和盐敏感对照(由东北农业大学保存)。根据弟文静^[18]的研究并结合 <https://soybase.org/> 网站选取平均分布在大豆 20 条染色体上的 20 对多态性较高的 SSR 引物用于遗传多样性分析,引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成(表 4)。

表4 用于遗传多样性分析的SSR标记
Table 4 SSR markers used for genetic diversity analysis

标记名称 Marker name	染色体 Chromosome	正向序列(5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
Satt184	1	GCGCTATGTAGATTATCCAAATTACGC	GCCACTTACTGTTACTCAT
Satt141	2	CGGTGGTGGTGTGCATAATAA	CCGTCATAAAAAAGTCCCTCAGAAT
Sat_379	3	GCGTTTGGCTCATCTTTCTTTTA	GCGGCCCTAAGCACAACTGAACCTAT
Satt396	4	GCGAAAAGGGATAAGTTTAAAAAT	GCGGGCCTGTAAAGGGATTCC
Satt211	5	GAAAAAGCCACATCCAA	CATGGGCATGCAGTAACA
Satt643	6	CGGGATAAATAGAAGTGGAACA	TTGGCAAATGTGAAATGTATA
Satt551	7	GAATATCACGCGAGAATTTTAC	TATATGCGAACCCCTCTTACAAT
AW132402	8	GCGCCTCCCTCCTCTCCTTTCTT	GCGTTTCCCACATATTCTATCAITTTGTT
Satt242	9	GCGTTGATCAGGTCGATTTTATTGT	GCGAGTGCCAACTAACTACTTTTATGA
Satt262	10	GCGCCCCATTAATGTAAACACA	GCGGAGTTCAACGCATTCACCTT
Satt453	11	GCGGAAAAAAAACAATAACAACA	TAGTGGGGAAGGGAAGTTACC
Satt279	12	GCGCAAAAGGACGCCACCAATAG	GCGGTGATCGGATGTTATAGTTTCAG
Satt072	13	GGAAAGAATCAGCAAAAT	CCCCCACATAAATAATAAA
Satt168	14	CGCTTGCCCAAAAATTAATAGTA	CCATTCTCCAACCTCAATCTTATAT
Satt685	15	ATCGTGGCATGTCTCACTAC	GAGGCGGAAGGAAATCTAAT
Satt674	16	GCGAATCCTCTAGCTTACCAAAGAA	GCGATTAGCCATCAAAACCTAT
Satt301	17	GCGAAACACTCCTAGTTGATTACAAA	GCGATATAATGCACAAAGAAATTAAAGA
Satt309	18	GCGCCTTCAAATTGGCGTCTT	GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT
Satt373	19	TCCGCGAGATAAATTCGTAAAAT	GGCCAGATACCCAAGTTGTACTTGT
Satt571	20	GGGTAGGGGTGGAATATAAG	GCGGGATCCGCGGATGGTCAAAG

采用20 μL PCR反应体系:Buffer(北京酷来搏科技有限公司)2 μL ,Taq酶和dNTP(北京酷来搏科技有限公司)各0.3 μL,上下游引物各1 μL,双蒸水13.4 μL,模板DNA 2 μL。反应程序:95 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共循环38次,72 ℃延伸10 min,4 ℃冰箱保存。PCR产物采用6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis)法检测,电压1500~1800 V,时长2 h。银染法染色,显影后拍照记录。

1.3 数据分析

对电泳图片进行条带读取,将每个等位变异作为一个位点,在该位点相同位置,有条带记为“1”,无条带记为“0”,录入Excel得到矩阵。运用Excel软件进行数据统计分析,计算与耐盐基因连锁的SSR引物的鉴定效率和准确率^[19],计算用于遗传多样性分析SSR引物的多态信息含量^[20]。将矩阵录入NTSYS 2.10e软件中,计算得到供试材

料的遗传相似性系数和距离矩阵。运用NTSYS 2.10e 和MEGA-X采用非加权组平均法和邻接法(NJ, neighbor joining)进行亲缘关系聚类分析,并绘制树状图,通过ITOL在线软件对聚类图进行美化。

计算公式如下:

$$\text{鉴定效率}(\%) = \frac{\text{耐盐位点数}}{\text{总位点数}} \times 100$$

$$\text{准确率}(\%) = \frac{\text{耐盐位点数} + \text{盐敏感位点数}}{\text{总位点数}} \times 100$$

其中耐盐位点数为58份高耐和耐盐等级大豆种质资源与耐盐对照(铁丰8号)对应的等位变异数;盐敏感位点数为58份高耐和耐盐等级大豆种质资源与盐敏感对照(Williams82)对应的等位变异数。

$$\text{多态信息含量(PIC)} = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

其中 P_{ij} 为标记i的第j个等位变异出现的频率。

2 结果与分析

2.1 大豆种质资源苗期耐盐性鉴定

392份大豆种质资源盐胁迫处理后的耐盐表型鉴定结果(图1)表明,中耐大豆种质资源数量最多,为132份,高耐大豆种质资源数量最少,为14份,不同耐盐等级大豆种质资源呈现正态分布(图2)。通过苗期耐盐表型鉴定,筛选出高耐和耐盐等级大

豆种质资源(以下统称耐盐大豆种质资源)共58份(表5),其中黑龙江26份,占比最大,为44.83%,其次为北京11份,占比18.97%。在58份耐盐大豆种质资源中,东北地区(黑龙江、吉林、辽宁)的种质资源数量最多,为36份,占比62.07%;黄淮海地区(北京、山东、河北)的种质资源13份,占比22.41%;其他地区(新疆、内蒙古)的种质资源7份,占比12.06%;国外种质资源2份,占比3.45%。



A: 高耐大豆种质资源中黄50; B: 耐盐大豆种质资源合丰50; C: 高敏大豆种质资源黑农66; 左侧为处理组, 右侧为对照组
A: High tolerant soybean germplasm resource Zhonghuang 50; B: Salt-tolerant soybean germplasm resource Hefeng 50; C: High sensitive soybean germplasm resource Heinong 66; The left side is the treatment and the right side is the control

图1 盐胁迫处理下高耐、耐盐与高敏大豆种质资源比较

Fig. 1 Comparison of high tolerant, salt-tolerant and high sensitive soybean germplasm resources under salt stress treatment

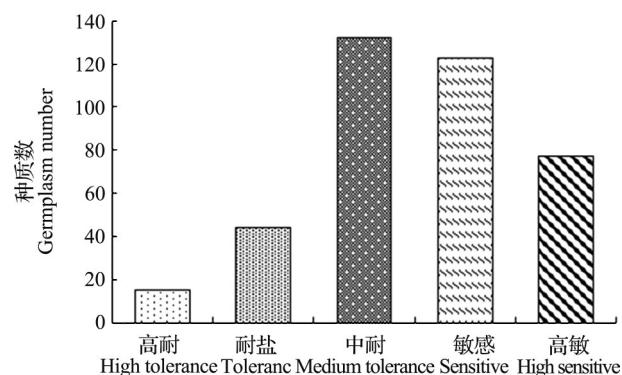


图2 392份大豆种质资源耐盐等级数量分布

Fig. 2 Distribution of salt tolerance class of soybean germplasm resources

2.2 58份耐盐大豆种质资源分子辅助鉴定分析

10个与耐盐基因连锁的SSR标记共检测到42个等位变异(表6), 鉴定效率在17.24%~60.34%之间, 鉴定准确率在46.55%~96.55%之间。其中检测到6个等位变异的SSR分子标记有1个, 为Satt462, 鉴定效率为32.76%, 鉴定准确率为72.41%; 检测到5个等位变异的SSR分子标记有2个, 分别为Satt281和Satt588, 鉴定效率分别为46.55%和48.28%, 鉴定准确率分别为65.52%和72.41%; 检测到4个等位变

异的SSR分子标记有5个, 分别为Sat_091、Satt339、Satt239、Satt237和Satt636, 鉴定效率在17.24%~44.83%, 鉴定准确率在46.55%~72.41%之间; 检测到3个等位变异的SSR分子标记有2个, 分别为Sat_162和Satt201, 鉴定效率分别为17.24%和60.34%, 鉴定准确率分别为79.31%和96.55%。10个SSR分子标记对58份耐盐大豆种质资源的平均鉴定效率为43.45%, 平均准确率达68.46%, 检测等位变异数最多的SSR标记为Satt462(图3), 检测到6个等位变异; 鉴定效率最高的SSR标记是Satt201, 鉴定效率为60.34%; 鉴定准确率最高的SSR标记也是Satt201(图4), 鉴定准确率为96.55%, 具有较高的耐盐育种利用价值。分子辅助鉴定结果表明, 58份大豆种质资源中, 中黄908、长农33、L-9和黑河54未检测到与耐盐及盐敏感对照对应的等位变异, 绥农1号、合丰50和东大2号携带耐盐等位变异最多, 均为6个; 合丰29、吉育303、农大23和赫尔松2号携带耐盐等位变异次之, 均为5个; 其余47份大豆种质资源携带耐盐等位变异1~4个不等, 说明本研究表型鉴定与分子辅助鉴定具有一致性, 为选育大豆耐盐新品种奠定基础。

表5 耐盐大豆种质资源

Table 5 Salt-tolerant soybean germplasm resources

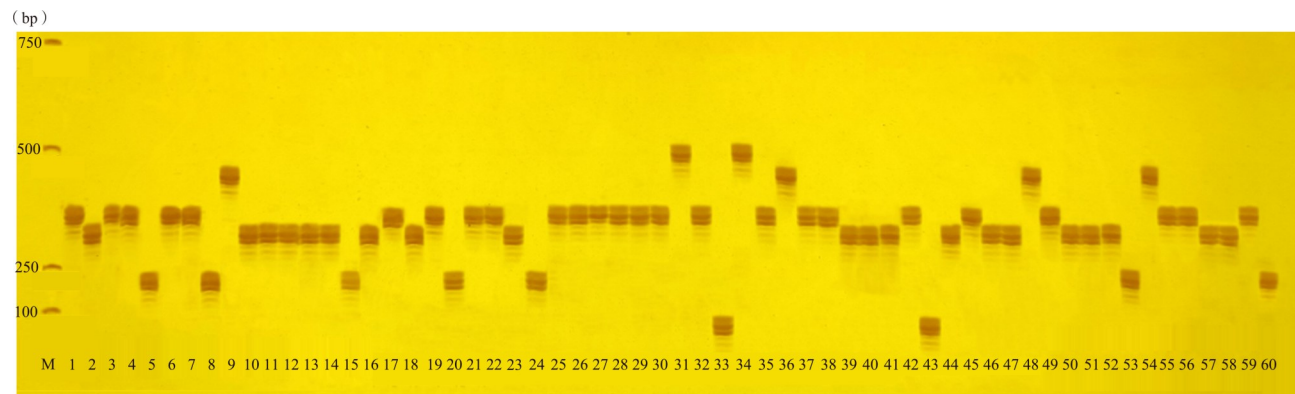
序号 No.	名称 Name	来源地 Origin	耐盐等级 Salt tolerance class	序号 No.	名称 Name	来源地 Origin	耐盐等级 Salt tolerance class
1	Williams82(对照)	国外	高敏	31	中品 03-5334	北京	耐盐
2	铁丰 8 号(对照)	辽宁	高耐	32	中黄 10 号	北京	耐盐
3	黑农 51	黑龙江	耐盐	33	小白脐	辽宁	耐盐
4	克北 1 号	黑龙江	耐盐	34	中作 00-683	北京	耐盐
5	绥农 1 号	黑龙江	耐盐	35	赫尔松 2 号	国外	高耐
6	合丰 29	黑龙江	耐盐	36	四粒黄	吉林	耐盐
7	中品 03-5179	北京	耐盐	37	抗线 3 号	黑龙江	耐盐
8	铁丰 31	黑龙江	耐盐	38	九农 21	吉林	耐盐
9	中黄 908	北京	耐盐	39	东农 46	黑龙江	耐盐
10	呼交 11-359	内蒙古	耐盐	40	嫩丰 15	黑龙江	耐盐
11	黑河 35	黑龙江	耐盐	41	垦丰 14	黑龙江	高耐
12	黑农 71	黑龙江	耐盐	42	昌吉黄豆	新疆	耐盐
13	黑农 48	黑龙江	耐盐	43	白城秣食豆	吉林	耐盐
14	合丰 50	黑龙江	耐盐	44	大粒黑豆	山东	耐盐
15	长农 38	吉林	耐盐	45	黑河 48	黑龙江	耐盐
16	长农 33	吉林	高耐	46	中作 GHJ14403	北京	耐盐
17	吉育 252	吉林	高耐	47	中黄 901	内蒙古	耐盐
18	赤豆 1 号	内蒙古	高耐	48	宝丰 8 号	黑龙江	耐盐
19	吉育 303	吉林	高耐	49	蒙豆 12	内蒙古	耐盐
20	农大 38	黑龙江	耐盐	50	呼交 11-322	内蒙古	耐盐
21	农大 23	黑龙江	耐盐	51	呼交 10-206	内蒙古	耐盐
22	龙豆 5 号	黑龙江	高耐	52	登科 1 号	内蒙古	耐盐
23	中黄 75	北京	高耐	53	黑河 54	黑龙江	耐盐
24	中黄 50	北京	高耐	54	黑河 51	黑龙江	高耐
25	中黄 48	天津	高耐	55	抗线 5 号	黑龙江	耐盐
26	中黄 44	北京	耐盐	56	丰收 12	黑龙江	耐盐
27	东农 69	黑龙江	高耐	57	吉林小粒 4 号	吉林	耐盐
28	东大 2 号	黑龙江	耐盐	58	垦农 18	黑龙江	耐盐
29	L-9	国外	耐盐	59	吉育 71	吉林	高耐
30	五星 4 号	河北	高耐	60	黑农 61	黑龙江	耐盐

表 6 耐盐基因连锁 SSR 标记的等位变异分布及鉴定准确率

Table 6 Allelic variation distribution and identification accuracy of salt-tolerant gene linked SSR markers

等位变异 Alleles	种质数 Germplasm number	鉴定效率(%) Identification of efficiency	准确率(%) Iccuracy rating	等位变异 Alleles	种质数 Germplasm number	鉴定效率(%) Identification of efficiency	准确率(%) Iccuracy rating
Sat_091-1	19	32.76	46.55	Satt281-1	27	46.55	65.52
Sat_091-2	8			Satt281-2	11		
Sat_091-3	15			Satt281-3	5		
Sat_091-4	16			Satt281-4	3		
Satt339-1	23	39.66	67.24	Satt281-5	13		
Satt339-2	16			Satt237-1	17	29.31	60.34
Satt339-3	19			Satt237-2	18		
Satt339-4	10			Satt237-3	8		
Sat_162-1	10	17.24	79.31	Satt237-4	15		
Sat_162-2	36			Satt636-1	10	17.24	48.28
Sat_162-3	12			Satt636-2	18		
Satt239-1	26	44.83	72.41	Satt636-3	7		
Satt239-2	16			Satt636-4	23		
Satt239-3	7			Satt588-1	28	48.28	72.41
Satt239-4	9			Satt588-2	14		
Satt462-1	35	32.76	72.41	Satt588-3	11		
Satt462-2	10			Satt588-4	4		
Satt462-3	2			Satt588-5	1		
Satt462-4	4			Satt201-1	35	60.34	96.55
Satt462-5	5			Satt201-2	21		
Satt462-6	2			Satt201-3	2		

-1 为耐盐等位变异;-2 为盐敏感等位变异;-3~-6 为其他等位变异
-1 is a salt-tolerant allele; -2 is a salt-sensitive allele; -3 to -6 are the other allelic variants



1: Williams82; 2: 铁丰 8 号; 3~60: 58 份高耐和耐盐大豆种质资源, 编号与表 5 同; 下同
1: Williams82; 2: Tiefeng 8; 3-60: 58 high tolerant and salt-tolerant soybean germplasm resources, number is the same as table 5; The same as below

图 3 Satt462 在 58 份耐盐大豆种质资源中的多态分布
Fig. 3 Polymorphic distribution of Satt462 in 58 soybean salt-tolerant germplasm resources

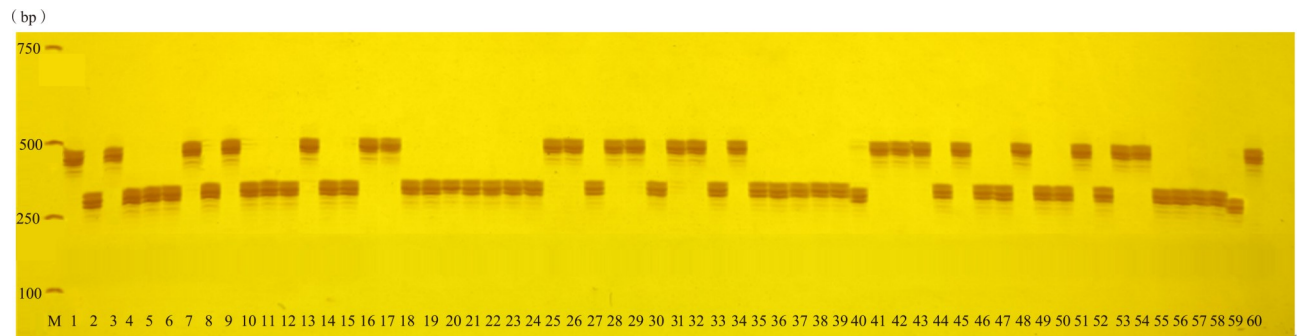


图4 Satt201在58份耐盐大豆种质资源中的多态分布

Fig. 4 Polymorphic distribution of Satt201 in 58 salt-tolerant soybean germplasm resources

2.3 耐盐大豆种质资源遗传多样性分析

2.3.1 SSR标记多态性信息含量分析 20个标记在58份大豆苗期耐盐种质资源中共获得83个等位变异,不同SSR标记的等位变异数不同,等位变异数范围在2~6之间,平均每个SSR标记有4.15个等

位变异(表7)。20个SSR标记的多态性信息含量幅在0.4867~0.8111之间,其中标记Satt301最高,为0.8111,标记Satt072最低,为0.4867,平均值为0.6442,表明对大豆种质资源耐盐分子辅助鉴定具有一定的参考价值。

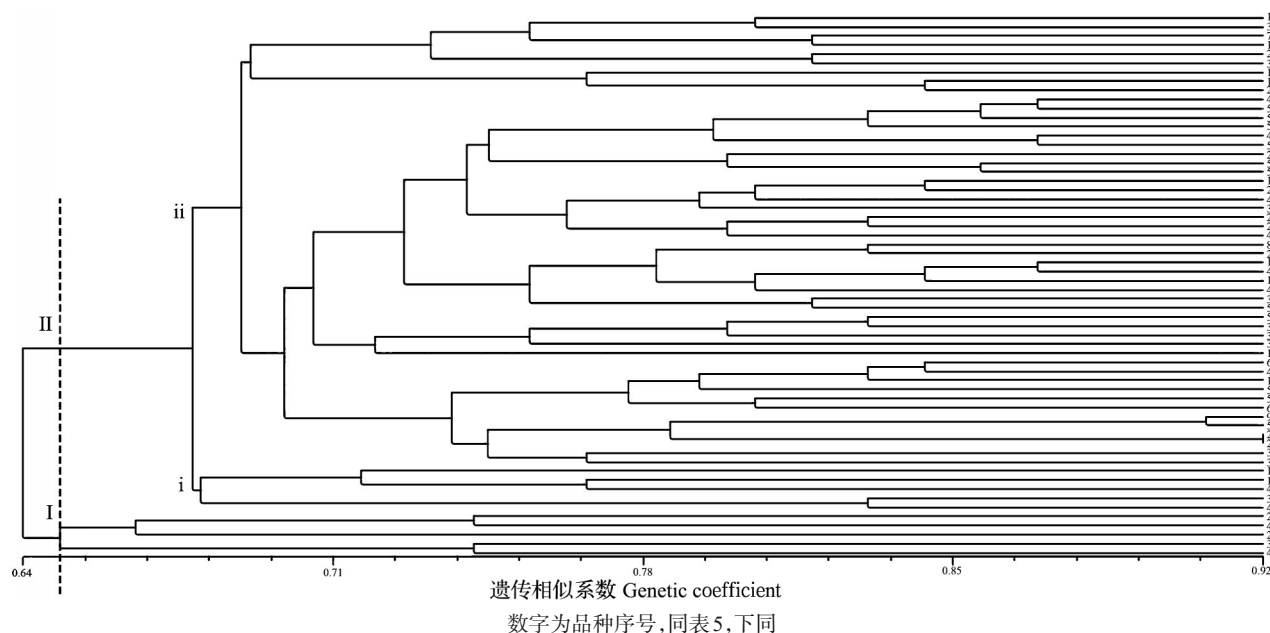
表7 用于遗传多样性分析的SSR标记等位基因变异数和多态性信息含量

Table 7 Allelic variation and polymorphic information content of SSR markers for genetic diversity analysis					
引物名称 Marker name	等位基因变异数 Allelic variation	多态性信息含量 Polymorphism information content	引物名称 Marker name	等位基因变异数 Allelic variation	多态性信息含量 Polymorphism information content
Satt211	2	0.5128	Satt072	3	0.4867
AW132402	4	0.6756	Satt309	3	0.5587
Satt453	6	0.7236	Satt279	4	0.6493
Satt168	4	0.6072	Satt571	4	0.6868
Satt396	3	0.5550	Satt674	4	0.6400
Satt643	4	0.6981	Satt242	5	0.5994
Satt184	5	0.7876	Satt373	4	0.6949
Satt141	6	0.7587	Satt551	5	0.6869
Satt301	6	0.8111	Sat_379	4	0.4975
Satt685	2	0.4978	Satt262	5	0.7556

2.3.2 58份耐盐大豆种质资源亲缘关系分析 遗传相似性系数可以反应不同大豆种质资源间的亲缘关系远近。利用NTSYS 2.10e软件对遗传相似性系数进行计算,结果表明58份耐盐大豆种质资源间的相似性系数在0.5385~0.9231,平均值为0.6974。其中遗传相似性系数最小的大豆种质资源有5对,分别为黑龙江的丰收12与北京的中黄10号、黑龙江的合丰50与山东的大粒黑豆、黑龙江的合丰50与国外的L-9、吉林的白城秣食豆与内蒙古的赤豆1号以及吉林的白城秣食豆与吉育303,遗传相似性系数均为0.5385,说明这5个组合种质资源间亲缘关系相对较远。遗传相似性系数在0.9000~0.9999之间数量最少,有2对。遗传相似性系数在0.6000~0.6999之间的组合有842对,占总数的46.01%,其次是在0.7000~0.7999之间,有772对,占总数的42.19%,说明58份大

豆种质资源大部分遗传关系较近,遗传多样性较低。

2.3.3 UPGMA法聚类分析 基于遗传相似性系数,利用UPGMA法对58份耐盐大豆种质资源进行聚类分析并绘制树状图(图5),在遗传相似性系数约0.6480处将58份耐盐大豆种质资源划分I和II两个类群。结合耐盐表型鉴定结果,第I类群包含东大2号、白城秣食豆等5份耐盐大豆种质资源,第II类群分为i和ii两个亚群,其中第i亚群包含垦丰14、赤豆1号共2份高耐大豆种质资源和长农38、大粒黑豆等3份耐盐大豆种质资源,第ii亚群含有的高耐大豆种质资源较多,包含赫尔松2号、龙豆5号等13份高耐大豆种质资源和黑河48、垦农18等36份耐盐大豆种质资源。在第I类群和第II类群中,58份耐盐大豆种质资源地域划分不明显,来自各省份的大豆种质资源在2个类群中均有分布。



The number represents the variety number which is the same as table 5, the same as below

图5 58份耐盐大豆种质资源的UPGMA亲缘关系聚类分析

Fig.5 UPGMA phylogenetic cluster analysis of 58 salt-tolerant soybean germplasm resources

2.3.4 NJ法聚类分析 基于遗传相似性系数计算大豆种质资源间的遗传距离,运用MEGA-X软件的N-J法对58份耐盐大豆种质资源进行聚类分析(图6),结果表明58份耐盐大豆种质资源被明确地分为3个类群。结合耐盐表型鉴定结果,第I类群包含吉育71、吉育252高耐大豆种质资源2份和黑衣61、宝丰8号等耐盐大豆种质资源3份,第II类群包

含农大23、呼交10-206等耐盐大豆种质资源8份,第III类群分为i和ii两个亚群,其中第i亚群包含东农69、中黄50等高耐大豆种质资源4份和九农21、东农46等耐盐大豆种质资源18份,第ii亚群包含赫尔松2号、吉育303等高耐大豆种质资源7份和黑衣48、中品03-5179等耐盐大豆种质资源14份。58份耐盐大豆种质资源中,来自黑龙江和吉林的大豆种质资源在3个类群中均有分布,来自其他省份的大豆种质资源多集中于第III类群。

3 讨论

大豆苗期耐盐鉴定结果可直接反应大豆全生育期耐盐水平^[21]。牛远等^[22]发现大豆苗期受到盐胁迫后,耐盐性普遍表现为地上部分株高增长受到抑制,地下部分根的干重和鲜重积累量降低。郭蓓等^[12]采用耐盐性田间鉴定方法对59份大豆种质资源进行盐胁迫处理,筛选出耐盐品种小白脐和大粒黑豆,与本研究筛选的耐盐品种一致。单株分类记载法^[13]是根据单株叶片枯萎程度计算盐害指数鉴定大豆苗期耐盐等级的方法。单株分类记载法通过人工观察叶面枯萎程度,存在一定人为误差,因此本研究结合与耐盐基因连锁的SSR标记,对初步鉴定出的高耐和耐盐等级大豆种质资源进行分子辅助鉴定,进一步明确大豆种质资源的耐盐性,筛选优异耐盐大豆种质资源,为提高大豆耐盐新品种育种效率奠定基础。

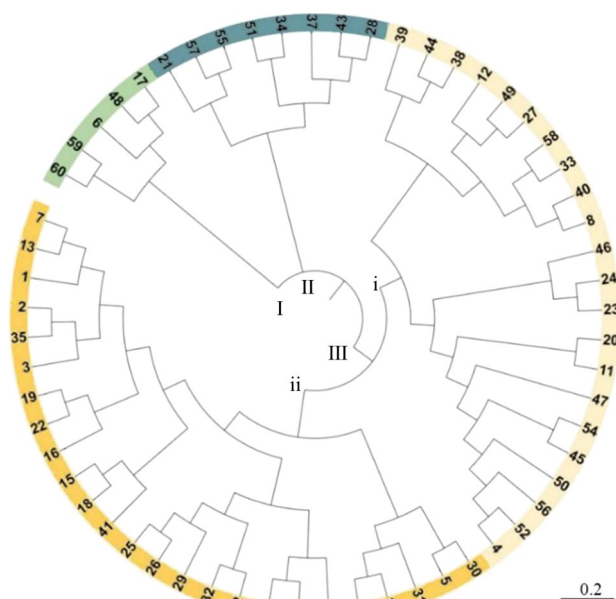


图6 58份耐盐大豆种质资源的N-J亲缘关系聚类分析

Fig.6 N-J relationship cluster analysis of 58 salt-tolerant soybean germplasm resources

张海燕等^[16]利用位于大豆不同连锁群的60个SSR标记对150份大豆品种进行分子辅助鉴定,检测到133个耐盐种质资源特有等位变异。Lee等^[23]对以S-100和Tokyo杂交衍生的F_{2.5}群体进行QTL定位,鉴定出1个主效耐盐QTL,位于大豆3号染色体上的Sat_091和Satt237之间。Kan等^[24]对184个F_{7.11}家系构成的重组自交系群体进行QTL定位,在大豆8号染色体定位1个QTL位点Sat_162。本研究选取张海燕等^[16]和胡雯恬^[17]筛选到的Sat_091、Satt339、Satt239、Satt201等10个与耐盐基因连锁的SSR分子标记,对表型鉴定为高耐和耐盐的58份大豆种质资源进行分子验证。结果表明,除大豆种质资源中黄908、长农33、L-9和黑河54外,绥农1号、合丰50和东大2号携带耐盐等位变异最多,均为6个;合丰29、吉育303、农大23和赫尔松2号携带耐盐等位变异其次,均为5个;其余47份大豆种质资源携带耐盐等位变异1~4个不等,说明本研究表型鉴定与分子辅助鉴定具有一致性。绥农1号、合丰50和东大2号在表型鉴定与分子辅助鉴定中均表现为耐盐,可作为耐盐亲本选育大豆耐盐新品种。中黄908、长农33等4份耐盐大豆种质资源未检测出耐盐等位变异,除与耐盐表型鉴定的准确性有关外,也可能是因为这些大豆种质资源的耐盐性是由不同的耐盐基因位点控制,此外也不排除分子标记与耐盐基因之间发生重组的可能性^[22]。10个与耐盐基因连锁的SSR标记,鉴定效率在17.24%~60.34%,准确率在46.55%~96.55%。其中SSR标记Satt201的鉴定效率和鉴定准确率均最高,分别为60.34%和96.55%,说明在培育耐盐大豆新品种过程中,利用这些标记进行分子辅助鉴定具有较高的实际应用价值。

随着分子辅助育种技术的发展,分子标记技术也广泛应用于遗传多样性研究^[25]。张春宝等^[26]利用SRAP标记对东北地区14份育成品种、5份国外品种和1份地方品种进行了遗传多样性分析,同样发现供试品种遗传背景狭窄,黑龙江、吉林两省大豆品种之间遗传相似性较高。虽然前人对大豆的遗传多样性有一定研究,但对耐盐大豆种质资源的遗传多样性研究却较少,本研究对58份耐盐大豆种质资源进行遗传多样性分析,遗传相似系数在0.5385~0.9231之间,且88.20%集中在区间0.6000~0.7999内。这一结果表明,本研究所选的耐盐资源之间的相似程度较高,可能是因为其中大多数种质资源来自同一地域,具有相同的亲本或祖先亲本,

所以遗传差异较小,因此可引进亲缘关系较远的外来品种或遗传多样性较高的野生大豆作为亲本进行杂交,为培育大豆耐盐新品种奠定丰富的遗传基础。

本研究使用UPGMA和NJ两种方法对58份耐盐大豆种质资源进行亲缘关系聚类分析,发现高耐盐等级大豆种质资源长农33、吉育303、龙豆5号、中黄48、五星4号和赫尔松2号在两种方法建立的亲缘关系聚类图中都聚集在同一类群,且58份大豆种质资源在两种方法建立的亲缘关系聚类图中地域划分不明显,但一个类群或亚群中大部分种质资源来源地在地理位置上相同或较为接近,说明UPGMA法与NJ法聚类结果具有一致性^[27]。两种聚类方法结果均表明58份耐盐大豆种质资源亲缘关系较近,在培育耐盐大豆品种时,可参考聚类分析图中的亲缘关系分布,筛选亲缘关系较远的大豆种质资源作为亲本。

参考文献

- [1] Qu S, Cai Q, Cui H M, Abraham L, Jiao Y L, Ma G L, Wang P W. Bioinformatics and functional analysis of high Oleic acid-related gene gmSAM22 in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 2022, 92(2): 501-519
- [2] 赵慧艳, 林春雨, 梁晓宇, 王洋. 黑龙江省大豆推广品种农艺品质性状优异等位变异发掘. *中国油料作物学报*, 2019, 41(5): 688-695
Zhao H Y, Lin C Y, Liang X Y, Wang Y. Mining of novel alleles of agronomic traits and quality traits in soybean commercial varieties in Heilongjiang province. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2019, 41(5): 688-695
- [3] Phang T H, Shao G, Lam H M. Salt tolerance in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(10): 1196-1212
- [4] 张翼夫, 李问盈, 胡红, 陈婉芝, 王宪良. 盐碱地改良研究现状及展望. *江苏农业科学*, 2017, 45(18): 7-10
Zhang Y F, Li W Y, Hu H, Chen W Z, Wang X L. Current status and prospects of saline and alkaline land improvement research. *Jiangsu Agricultural Science*, 2017, 45(18): 7-10
- [5] 田蕾. 大豆耐盐基因定位及耐盐种质资源分子标记选择效率分析. 北京: 中国农业科学院, 2008
Tian L. Localisation of salt tolerance genes in soybean and analysis of selection efficiency of molecular markers for salt tolerance germplasm resources. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008
- [6] 李雪华. 大豆突变体库的初步构建及突变类型的鉴定. 南京: 南京农业大学, 2003
Li X H. Preliminary construction of a soybean mutant library

- and identification of mutation types. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003
- [7] Kan G Z, Ning L H, Li Y K, Hu Z B, Zhang W, He X H, Yu D Y. Identification of novel loci for salt stress at the seed germination stage in soybean. *Breeding Science*, 2016, 66(4): 530-541
- [8] Sun B R, Fu C Y, Yang C Y, Ma Q B, Pan D J, Nian H. Genetic diversity of wild soybeans from some regions of southern China based on SSR and SRAP markers. *American Journal of Plant Sciences*, 2013, 4(2): 257-268
- [9] 向艳涛, 刘昌燕, 韩雪松, 李莉, 孙龙清, 陈宏伟, 沙爱华. 基于 SSR 标记的毛豆种质资源遗传多样性分析. *中国油料作物学报*, 2023, DOI: 10.19802/j.issn.1007-9084.2023040
- Xiang Y T, Liu C Y, Han X S, Li L, Sun L Q, Chen H W, Sha A H. Genetic diversity analysis of vegetable soybean germplasm resources based on SSR markers. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2023, DOI: 10.19802/j.issn.1007-9084.2023040
- [10] 李琼, 耿臻, 杨青春, 舒文涛, 李金花, 常世豪, 张东辉, 张保亮. 黄淮海 50 份大豆种质资源 SSR 遗传多样性分析. *种子*, 2021, 40(8): 39-44, 50
- Li Q, Geng Z, Yang Q Q, Shu W T, Li J H, Chang S H, Zhang D H, Zhang B L. Genetic diversity analysis of 50 soybean germplasms in Huanghuaihai based on SSR. *Seed*, 2021, 40(8): 39-44, 50
- [11] Jeevan K S P, Susmita C, Sripathy K V, Agarwal D K, Pal G, Singh A N, Kumar S, Rai A K, Gandara J S. Molecular characterization and genetic diversity studies of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars using SSR markers. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(3): 2129-2140
- [12] 郭蓓, 邱丽娟, 邵桂花, 许占友. 大豆耐盐性种质的分子标记辅助鉴定及其利用研究. *大豆科学*, 2002, 21(1): 56-61
- Guo B, Qiu L J, Shao G H, Xu Z Y. Molecular marker-assisted identification of salt-tolerant germplasm in soybean and its utilization. *Soybean Science*, 2002, 21(1): 56-61
- [13] 刘谢香, 常汝镇, 关荣霞, 邱丽娟. 大豆出苗期耐盐性鉴定方法建立及耐盐种质筛选. *作物学报*, 2020, 46(1): 1-8
- Liu X X, Chang R Z, Guan R X, Qiu L J. Establishment of screening method for salt tolerant soybean at emergence stage and screening of tolerant germplasm. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(1): 1-8
- [14] Guan R X, Qu Y, Guo Y, Yu L L, Liu Y, Jiang J H, Chen J G, Ren Y L, Liu G Y, Tian L, Jin L G, Liu Z X, Hong H L, Chang R Z, Gilliam M, Qiu L J. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in GmSALT3. *Plant J*, 2015, 80: 937-950
- [15] 武林琳. 两种转基因大豆基因组 DNA 提取方法的比较. *现代农村科技*, 2022(3): 60-62
- Wu L L. Comparison of two genomic DNA extraction methods for transgenic soybeans. *Modern Rural Science and Technology*, 2022(3): 60-62
- [16] 张海燕, 关荣霞, 李英慧, 王丽侠, 漆维江, 常汝镇, 刘章雄, 邱丽娟. 大豆耐盐性种质资源 SSR 遗传多样性及标记辅助鉴定. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(3): 251-255
- Zhang H Y, Guan R X, Li Y H, Wang L X, Luan W J, Chang R Z, Liu Z X, Qiu L J. Genetic diversity analysis and marker assisted identification of salt tolerant soybean by using SSR marker. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6(3): 251-255
- [17] 胡雯恬. 大豆幼苗性状耐盐胁迫能力优异等位变异的发掘. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2022
- Hu W T. Discovery of allelic variants for superior salinity stress tolerance in soybean seedling traits. Harbin: Heilongjiang University, 2022
- [18] 弟文静. 大豆芽期耐盐碱性评价及相关等位变异的发掘. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2021
- Di W J. Evaluation of salinity tolerance in soybean germination and discovery of related allelic variants. Harbin: Heilongjiang University, 2021
- [19] 滕卫丽, 李文滨, 韩英鹏, 邱丽娟, 常汝镇, 关荣霞. 大豆种质对 SMV 抗性鉴定的 SSR 辅助选择. *中国油料作物学报*, 2008, 30(2): 224-228
- Teng W L, Li W B, Han Y P, Qiu L J, Chang R Z, Guan R X. Identification of the SMV resistance assessment and assisted selection SSR markers in soybean. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2008, 30(2): 224-228
- [20] 白志元, 杨玉花, 武国平, 卫一超, 张瑞军. 68 个大豆品种(系)遗传多样性分析. *中国农业大学学报*, 2020, 25(3): 17-24
- Bai Z Y, Yang Y H, Wu G P, Wei Y C, Zhang R J. Genetic diversity analysis of 68 soybean varieties. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(3): 17-24
- [21] 罗庆云, 於丙军, 刘友良. 大豆苗期耐盐性鉴定指标的检验. *大豆科学*, 2001, 20(3): 177-182
- Luo Q Y, Yu B J, Liu Y L. Examination of indicators for the identification of salt tolerance in soybean seedlings. *Soybean Science*, 2001, 20(3): 177-182
- [22] 牛远, 杨修艳, 戴存凤, 王博文, 任高磊, 吴静磊, 王飞兵, 陈新红. 大豆芽期和苗期耐盐性评价指标筛选. *大豆科学*, 2018, 37(2): 215-223
- Niu Y, Yang X Y, Dai C F, Wang B W, Ren G L, Wu J L, Wang F B, Chen X H. Screening of indicators for evaluating salt tolerance in soybean at germination and seedling stages. *Soybean Science*, 2018, 37(2): 215-223
- [23] Lee G J, Boerma H R, Villagarcia M R, Li Z, Zhou X, Gibbs M O, Boerma H R. A major QTL conditioning salt tolerance in S100 soybean and descendent cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(8): 1610-1619
- [24] Kan G Z, Zhang W, Yang W M, Ma D Y, Zhang D, Hao D R, Hu Z B, Yu D Y. Association mapping of soybean seed germination under salt stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(6): 2147-2162
- [25] 李敏, 关博文, 杨学, 陈庆山, 张睿, 武小霞, 金慧, 吴玉娥. 大豆种质资源遗传多样性分析. *农业科技通讯*, 2021(11): 4-8

- Li M, Guan B W, Yang X, Chen Q S, Zhang R, Wu X X, Jin H, Wu Y E. Genetic diversity analysis of soybean germplasm resources. *Agricultural Science and Technology Newsletter*, 2021(11): 4-8
- [26] 张春宝, 邱红梅, 赵洪锬, 彭宝, 赵丽梅, 董英山. 东北地区大豆种质遗传多样性的 SRAP 标记分析. *大豆科学*, 2014, 33(1): 17-22
- Zhang C B, Qiu H M, Zhao H K, Peng B, Zhao L M, Dong Y S. SRAP marker analysis of genetic diversity of soybean germplasm in Northeast China. *Soybean Science*, 2014, 33(1): 17-22
- [27] 庄旻敏. 我国近岸海域铜藻金潮生物学溯源研究. 上海: 华东师范大学, 2022
- Zhuang M M. Molecular biology based traceability study of *Sargassum horneri* golden tides in the nearshore of China. Shanghai: East China Normal University, 2022