

基于 SSR 分子标记的普通菜豆种质遗传多样性分析

Genetic diversity analysis of common bean germplasms based on SSR molecular markers

夏春阳 杜吉到 韩毅强 孙浩月

XIA Chun-yang DU Ji-dao HAN Yi-qiang SUN Hao-yue

李 明 吴洪斌 张 琦 于晟龙

LI Ming WU Hong-bin ZHANG Qi YU Sheng-long

(黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江 大庆 163319)

(College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

摘要:建立 SSR-PCR 反应体系对 69 份菜豆种质资源进行遗传多样性分析,并利用 UPGMA 法进行聚类分析及类群划分。17 对 SSR 标记共检测获得等位变异位点 55 个,变幅 2~5 个,平均每对检测到标记 3.24 个;17 对引物的多态性位点数 17 个,多态性百分含量 100%。根据聚类分析结果:材料间遗传相似性系数(GS)变异范围 0.392~0.963,平均值为 0.659;在遗传相似系数 0.67 水平上 69 份菜豆种子材料分为 4 个类群,说明普通菜豆种质遗传多样性丰富。

关键词:普通菜豆;SSR 标记;遗传多样性

Abstract: The genetic diversity of 69 common bean germplasm resources was analyzed by SSR-PCR reaction system, and cluster analysis was carried out by UPGMA method. Seventeen pairs of SSR markers were detected and 55 allelic mutation loci were obtained, ranging from 2 to 5, with an average of 3.24 markers per pair. Seventeen pairs of primers had 17 polymorphic loci with 100% polymorphism. According to the cluster analysis results, the genetic similarity coefficient (GS) of the material ranged from 0.392 to 0.963, with an average of 0.659. 69 kinds of the beans seeds were divided into four groups at the genetic similarity coefficient of 0.67. This study inclined that the genetic diversity of kidney bean germplasm was rich.

Keywords: common bean; simple sequence repeat; genetic diversity

基金项目:黑龙江省农垦总局重点研发项目(编号:HKKY100208);黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(编号:YJSCX2019-Y07)

作者简介:夏春阳,女,硕士。

通信作者:杜吉到(1973—),男,黑龙江八一农垦大学教授,博士。
E-mail: djbynd@163.com

收稿日期:2019-05-10

普通菜豆又名芸豆、四季豆,属豆科蝶形花亚科菜豆族菜豆属菜豆种,是菜豆属重要的栽培种之一^[1]。中国普通菜豆的主产区主要分布在黑龙江、内蒙古、吉林、云南、贵州、山西、陕西等地。普通菜豆适应性强在世界范围内均有种植,是最受消费者欢迎的食用豆类作物之一^[2],成熟普通菜豆经过加工后可以制成豆沙或者糕点等,未达到成熟时期的可作为蔬菜食用。普通菜豆籽粒中蛋白质含量为 17%~23%,脂肪含量为 1.3%~2.6%,碳水化合物含量为 56%~61%^[3],还含有矿物质以及多种维生素,在欠发达国家和地区,菜豆可供人们直接食用,并且是人们膳食结构中重要的组成部分^[4-5]。

目前中国对菜豆种质资源研究包括对现有的资源进行系统的形态鉴定;对部分菜豆种质资源进行抗病虫、抗逆性试验鉴定,首先筛选出一部分优质种质资源,对菜豆特殊功能成分进行提取及分析^[6]。Lei 等^[7]对 233 份菜豆进行形态多样性鉴定,并筛选出 183 份优异种质。Blair 等^[8]和栾非时等^[9]分别对 323 份芸豆和 60 份芸豆基于形态性状进行聚类分析,分别划出 2 个类群与 3 个类群。遗传多样性是指在群体内个体间基因组成的差异,这是一个种群和一个物种中的遗传基础,一个种群的遗传多样性越丰富,种质资源对生存环境的适应力越强,更容易扩展分布的范围和开拓新环境^[10]。分子标记是 DNA 水平遗传变异的直接反映,新的 DNA 标记技术如简单重复序列(SSR)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)、表达序列标签(EST)扩增片段多态性(AFLP)、简单重复序列标记(ISSR)、单核苷酸多态性(SNP)等分子标记技术不断涌现应用,已成为现代作物育种领域的研究内容与技术手段。SSR 标记与 RAPD、RFLP 等分子标记相比,

SSR 具有共显性、丰富的多态性、高度的稳定性,简便的操作性等优点^[11]。为了更好地利用菜豆的种质资源,利用 SSR 分子标记对菜豆进行遗传多样性分析,得到相关数据从而判断其遗传关系,有助于菜豆优势基因的挖掘和种质材料的利用。目前 SSR 分子标记技术已被广泛应用于水稻^[12]、小麦^[13]、玉米^[14]等大田作物。张赤红等^[15]基于 SSR 标记技术对 377 份菜豆进行了遗传多样性评价并予以分类。试验拟利用分子标记技术对普通菜豆种质资源进行遗传多样性研究,探讨 DNA 水平上的遗传差异和遗传结构,分析普通菜豆种质资源的遗传多样性丰富程度,为保护菜豆种质资源保护和研究利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菜豆(见表 1):国家杂粮技术中心种质资源库。

1.2 普通菜豆基因组 DNA 提取和检测

普通菜豆种子在室温下种植,取生长至 3 周叶龄叶片采用 CTAB 法提取基因组 DNA,利用核酸蛋白定量检测仪和 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 的质量和浓度。浓度稀释至 100 ng/ μ L,−20℃ 备用。

1.3 引物设计和筛选

32 对试验引物参照文献^[15−16]设计,以参试材料基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,以条带清晰、多态性好、方便统计、稳定性好的 SSR 引物作为核心引物。

1.3.1 PCR 扩增

(1) PCR 反应体系:Taq 酶(1.25 U) 0.1 μ L,1.6 μ L dNTP (2.5 mmol/L),1 μ L 模板 DNA(100 ng/ μ L),1 μ L 上、下游引物(10 μ mol/L),2 μ L 10 $\times$ Taq Buffer,用超纯水将体积补齐至 20 μ L。

(2) PCR 扩增程序:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,依据各引物退火温度复性 30 s,延伸温度 72℃ 延伸 40 s,设置 30 个循环;最终 72℃ 延伸 7 min。

1.3.2 扩增产物检测 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术检测,电泳结束后对凝胶结果进行快速银染检测。

(1) 灌胶:用 8% 的变性聚丙烯酰胺灌胶,防止出现气泡,轻轻插入梳子,使其聚合 1.5 h 左右。

(2) 电泳:清除气泡及残胶,插入样品梳子,接通电源,170 W 恒功率电泳,预电泳 10 min。每一个加样孔点入 5 μ L 样品。电泳 2 h,电泳结束后小心分开两块玻璃板。

(3) 固定:50% 无水乙醇+2% 冰醋酸,轻轻晃动 3 min。

(4) 漂洗:蒸馏水快速漂洗 1 次,不超过 15 s。

(5) 显影:1.6% NaOH+0.4% 甲醛显影,轻轻晃动至条带出现(胶背景为蛋黄色)。

1.4 数据记录 and 统计分析

采用手动读带法,统计清晰稳定、有差异的条带,有带记为 1,无带记为 0。用 PopGene32v1.32 软件计算各 SSR 引物的等位基因数、多态性信息含量值(PIC)、Shannon's 多样性指数。用 NT-SYS 计算品种间的相似系数,按类平均法(UPGMA)进行聚类分析,绘制品种间的亲缘关系聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性引物的筛选

利用 69 份普通菜豆种质资源材料对 32 对 SSR 引物进行多态性筛选,最终获得 17 对条带清晰、多态性好、方便统计、稳定性好的 SSR 引物用于对 69 份普通菜豆种质资源进行遗传多样性分析。引物 BM170 的 PAGE 电泳效果图如图 1。

表 1 69 份供试材料
Table 1 69 common beans test materials

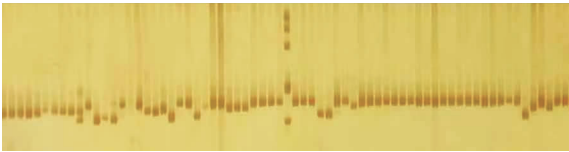
编号	名称	编号	名称	编号	名称	编号	名称
1	红腰饭豆	19	Y10Y14	37	15ZY-033	55	红皮芸豆
2	CX72-1	20	垦芸 3 号 Y30	38	英国红芸豆 Y80	56	紫花芸豆 Y63
3	绿黑豆 Y124	21	北国红	39	小黑芸豆 Y98	57	奶花芸豆
4	垦芸 3 号	22	肾豆	40	翻眼芸豆	58	紫园
5	秋豆角	23	黑豆 Y135	41	黑芸豆 Y94	59	GHR1302
6	垦鉴北国白	24	紫沙	42	加拿大白芸豆	60	农家品种 Y96
7	矮生油豆	25	黑禾花	43	GHR1302	61	有机红小豆
8	黑芸豆 Y120	26	花脸豆	44	麻雀蛋 F1767	62	小浅黄条纹芸豆
9	依安红芸豆	27	九三一窝蜂	45	红花脸	63	GKUS01
10	奶圆粒	28	红荏芸豆	46	红色岛屿	64	白菜豆
11	CX50	29	点滴褐	47	白豆 3354	65	紫沙
12	有机斑豆	30	内蒙古红花芸豆	48	白帽豆	66	垦农 30
13	脸谱	31	有机红小豆	49	旧花点 Y138	67	假红芸 1 号
14	白小豆	32	浅花芸豆	50	龙芸 10 号	68	小红芸豆
15	龙江小黑芸豆	33	龙芸 10 号	51	黑豆 Y135	69	龙 28
16	DQ01	34	吉引黑芸豆	52	蒙古圆		
17	山东枣花	35	双管 Y52	53	脚印		
18	白花芸豆	36	紫粉豆	54	神木鸡腰白		

2.2 普通菜豆种质间的遗传多样性分析

利用 PopGene32v1.32 软件对 69 份普通菜豆种质资源进行遗传多样性分析见表 2。经多态性分析结果显示: 17 对 SSR 标记共检测获得等位变异位点 55 个, 变幅 2~5 个, 平均每对检测到标记 3.24 个。其中标记 BM143、BM141 检测到的变异位点数最高为 5 个位点, 标记 BM183、DH2 检测到的变异位点数最少为 2 个位点, 其余标记皆检测到 3~4 个变异位点。17 对引物的多态性位点数 17 个, 多态性百分含量 100%; 17 对 SSR 标记有效等位基因数(ne)介于 1.417 与 3.805 之间, 平均 2.347; 观测等位基因数(na)介于 2 与 5 之间; Shannon(I)指数变异范围为 0.566~1.360, 平均 0.912; 基因流(Nm)介于 0.030 与 1.098 之间, 平均 0.255。表明普通菜豆种质资源间变异范围较大, 亲缘关系较远, 具有丰富的遗传多样性。

2.3 69 份普通菜豆种质资源的聚类分析

2.3.1 普通菜豆种质资源的 GS 聚类分析 GS 聚类结果



从左至右依次为 1~69 号材料

图 1 引物 BM170 对 69 份普通菜豆材料 DNA 扩增结果
Figure 1 DNA amplification results of 69 common kidney bean materials by primers BM170

显示(图 2) 69 份菜豆种质材料间存在着不同程度的遗传差异性。材料间遗传相似性系数(GS)变异范围为 0.392~0.963, 平均值为 0.659; 其中编号 5 的秋豆角和编号 60 的农家品种 Y96 间遗传相似性系数最大为 0.963, 说明两份材料间亲缘关系最近; 其次编号为 11 和 28 的材料 CX50、红荳芸豆及编号为 16 和 18 的材料 DQ01 和白花芸豆间关系相对较近, 遗传相似性系数为 0.960, 说

表 2 基于 SSR 标记的 69 份菜豆种质材料遗传多样性分析

Table 2 Genetic diversity indicators of 69 kidney bean germplasm materials based on SSR markers

Locus	引物序列	na	ne	I	Nm
BM156	F:CTTGTTCCACCTCCCATCATAGC R:TGCTTGATCTCAGCCAGAATC	4	2.558 4	1.068 8	0.604 1
BM170	F:AGCCAGGTGCAAGACCTTAG R:AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC	3	2.466 6	0.986 7	0.290 3
BM183	F:CTCAAATCTATTCACTGGTCAGC R:TCTTACAGCCTTGCAGACATC	2	1.895 1	0.665 2	0.030 7
BM154	F:TCTTGCGACCGAGCTTCTCC R:CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG	3	1.417 3	0.565 6	0.166 4
BM143	F:GGGAAATGAACAGAGGAAA R:ATGTTGGGAACCTTTAGTGTG	5	2.897 7	1.284 6	0.783 9
BM164	F:CCACCACAAGGAGAAGCAAC R:ACCATTTCAGGCCGATACTCC	2	1.931 4	0.675 3	0.100 7
BM181	F:ATGCTGCGAGTTAATGATCG R:TGAGGAGCAAACAGATGAGG	3	1.788 1	0.782 6	0.246 3
DH2	F:AAAAATCCACACCCTTTTGG R:TGCACTAAGGAGGAGTTCCA	2	1.991 7	0.691 1	0.049 3
BM213	F:AACCCTAAGCTTCACGCATTTG R:GAGAGATTGACGACGGTTT	2	1.778 5	0.629 5	1.098 1
DH1	F:CGAAGTGTTTGTGGGATGAG R:ATGCGCAATAAGGAGGTTGA	3	2.268 2	0.913 3	0.065 1
BM160	F:CGTGCTTGCGAATAGCTTTG R:CGCGGTTCTGATCGTGACTTC	4	3.805 4	1.360 7	0.442 5
* DH5	F:ACGTTTCCTCGTTTTTCAGC R:TCGAAACAGGGGAACCTTCTT	3	1.974 7	0.737 8	0.229 4
BM141	F:TGAGGAGGAACAATGGTGGC R:CTCACAACACACAACGCACC	5	3.471 5	1.331 0	0.394 1
GATS91	F:GAGTGCGGAAGCGAGTAGAG R:TCCGTGTTCTCTGTCTGTG	3	1.838 6	0.788 1	0.433 9
PUV18791	F:GGGAGGGTAGGGAAGCAGTG R:GCGAACCACGTTTCAATGA	4	3.231 4	1.252 9	0.695 9
BM53	F:AACTAACCTCATACGACATGAAA R:AATGCTTGCACTAGGGAGTT	3	2.642 1	1.030 6	0.150 6
BM139	F:TTAGCAATACCGCCATGAG R:ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	3	1.942 8	0.738 0	0.131 9
平均值		3.176 5	2.347 0	0.911 9	0.255 4

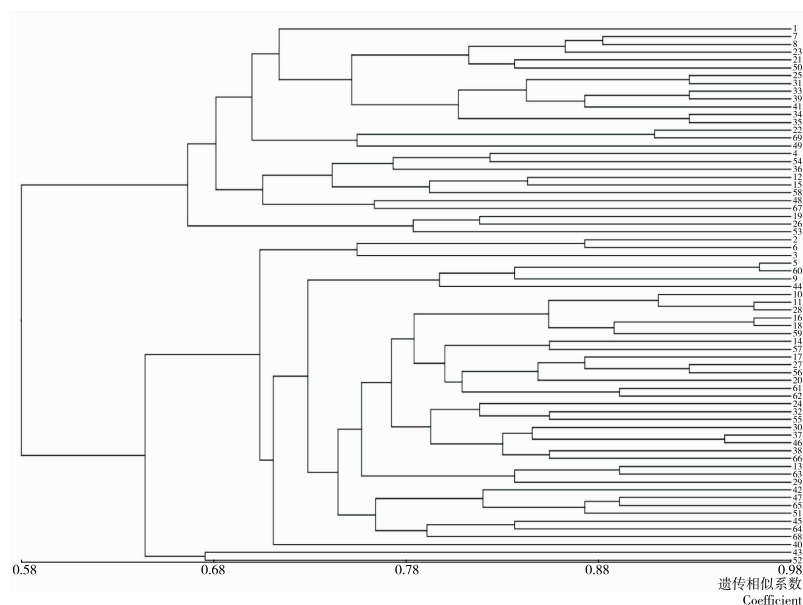


图2 根据 SSR 构建的 69 份普通菜豆种质的聚类分析

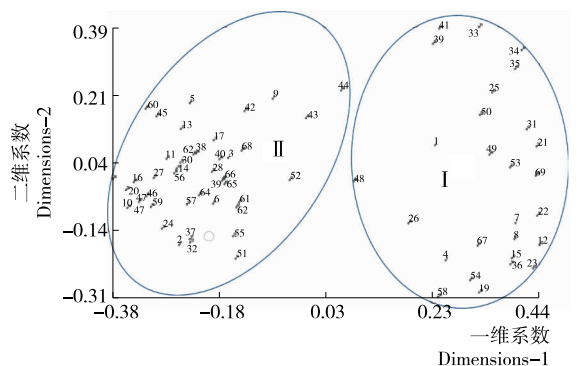
Figure 2 Cluster analysis of 69 common kidney bean germplasms constructed according to SSR

明以上材料在菜豆杂交育种中应尽量避免作为亲本选配组合。其中编号 4 的垦芸 3 号和编号 43 的 GHR1302 间遗传相似性系数最小为 0.392,说明这些材料间亲缘关系最远;其次编号 8 的黑芸豆 Y120 和编号 45 的红花脸间的遗传相似性系数为 0.393,两者亲缘关系也相对较远;以上这些亲缘关系较远的材料可用作亲本选配杂交组合材料。以 69 份菜豆核心种质材料间的遗传相似性系数按 UPGMA 法进行聚类分析(图 2)。SSR 标记能很好地区分 69 份菜豆种质材料,在遗传相似系数 0.60 水平上将 69 份菜豆种子材料分为两个组群:第一组群包含编号为 1、7、19 等 27 份菜豆;在遗传相似系数 0.67 水平上分为 I、II 两个亚组群:第 I 亚组群包括编号为 19、26、53 的 Y10Y14、花脸豆和脚印;第 II 亚组群包含编号为 1 的红腰饭豆等 24 份菜豆材料。第二组群包含编号为 2、3、6 等在内的 42 份材料;在遗传相似系数 0.67 水平上又分为 I、II 两亚组群:第 I 亚组群包括编号 43、52 的 GHR1302、蒙古圆两份材料;第 II 亚组群包含编号为 40、68、64 的翻眼芸豆、小红芸豆、白菜豆等 40 份菜豆材料,表明普通菜豆种质遗传多样性丰富。

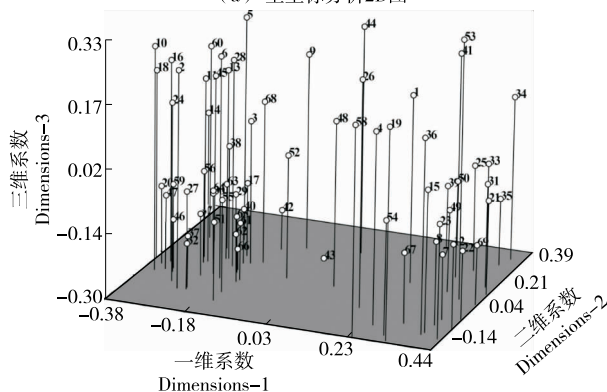
2.3.2 SSR 标记主坐标聚类分析 通过主坐标分析法对获取的 69 份材料 SSR 标记数据进行聚类分析,可将 69 份菜豆分为两大类,此分类同 GS 聚类中的聚类结果基本一致,见图 3。

3 结论

试验利用筛选 17 对 SSR 标记引物对 69 份普通菜豆种质资源进行遗传多样性分析,经多态性分析结果显示:17 对 SSR 的多态性位点数和平均等位变异位点分别为 17.00, 3.24 个,多态性百分含量 100%;有效等位基因数



(a) 主坐标分析2D图



(b) 主坐标分析3D图

图3 SSR 主坐标分析聚类图

Figure 3 SSR primary coordinate analysis clustering diagram

(ne)、观测等位基因数(na)和 Shannon(I)指数的平均值分别为 2.347, 0.912, 0.255,表明引物具有较高的多态性,可用于普通菜豆品种的区分;69 份菜豆种质材料间遗传

相似性系数(GS)变异范围为 0.392~0.963,平均值为 0.659,在遗传相似系数 0.60 水平上将 69 份菜豆种子材料分为两大组群,在遗传相似系数 0.67 处两个组群还共分为 4 个亚组群,表明普通菜豆种质遗传多样性丰富。后续将进行构建普通菜豆品种分子身份证,从而利用普通菜豆分子身份证构建和遗传多样性分析为优质亲本选配、品种鉴定和菜豆品质的监督与管理提供帮助。

参考文献

- [1] 雷蕾. 普通菜豆核心种质遗传结构及多样性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018: 1-3.
- [2] SINGH S P. Broadening the genetic base of common bean cultivars; A review[J]. Crop Sci, 2001, 41(6): 1 659-1 675.
- [3] 陈明丽, 王兰芬, 赵晓彦, 等. 普通菜豆基因组学及炭疽病遗传研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(6): 941-947.
- [4] DELGADO-SALINAS A, BIBLER R, LAVIN M. Phylogeny of the genus Phaseolus (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape[J]. Syst Bot, 2006, 31(4): 779-791.
- [5] BITOCCHI E, NANNI L, BELLUCCI E, et al. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(14): 788-796.
- [6] 陈祥友, 宋利平, 胡志辉. 菜豆种质盐溶蛋白遗传多态性分析[J]. 江汉大学学报: 自然科学版, 2011, 39(3): 86-92.
- [7] MEDRAOUI L, ATER M, BENLHABIB O, et al. Evaluation of genetic variability of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) in northwestern Morocco by ISSR and RAPD markers[J]. Comptes Rendus-Biologies, 2007, 330(11): 789-797.
- [8] BLAIR M W, PANAUD O, MCCOUCH S R. Inter simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 780-792.
- [9] 栾非时, 崔成焕, 王金陵. 菜豆种质资源形态标记的研究[J]. 东北农业大学学报, 2001, 32(2): 134-138.
- [10] GUPTA S K, BANSAL R, GOPALAKRISHNA T. Development and characterization of genic SSR markers for mungbean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek) [J]. Euphytica, 2014, 195(2): 245-258.
- [11] 姜俊辉, 杨涛, 王芳, 等. 国内外蚕豆核心种质 SSR 遗传多样性对比及微核心种质构建[J]. 作物学报, 2014, 40(7): 1 311-1 319.
- [12] 从夕汉, 施伏芝, 阮新民, 等. 东南亚 62 个籼型水稻亲本 SSR 遗传多样性分析[J]. 核农学报, 2016, 30(5): 859-868.
- [13] 李正玲, 胡琳, 王会伟, 等. 河南省同名小麦地方品种 SSR 遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报, 2016, 36(5): 560-570.
- [14] 易红梅, 王风格, 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.
- [15] 张赤红, 曹永生, 宗绪晓, 等. 普通菜豆种质资源形态多样性鉴定与分类研究[J]. 中国农业科学, 2005(1): 27-32.
- [16] 冯国军. 黑龙江优质菜豆种质资源研究及育种策略[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008: 38-40.
- (上接第 209 页)
- [5] FENG Yan-jun, ZHANG Min, MUJUNDAR A S, et al. Recent research process of fermented plant extract: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 65: 40-48.
- [6] KISHIDA T, MIZUSHIGE T, NAGAMOTO M, et al. Lowering effect of an isoflavone-rich fermented soybean extract on the serum cholesterol concentrations in female rats, with or without ovariectomy, but not in male rats[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(7): 1 547-1 556.
- [7] LIM K H, HAN J H, LEE J Y, et al. Assessment of anti-diabetogenic potential of fermented soybean extracts in streptozotocin-induced diabetic rat[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(11): 3 941-3 948.
- [8] 白浩, 文佳嘉, 费爽雯, 等. 酵素的功能与综合应用研究进展[J]. 食品工业, 2017(6): 270-272.
- [9] 费鹏, 杨同香, 赵胜娟, 等. 怀山药酵素粉的制备及抗氧化作用[J]. 食品与机械, 2018, 34(8): 209-212, 226.
- [10] 张旭普, 白俊岩, 刘腾云, 等. 糙米酵素混菌发酵工艺优化[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 180-185.
- [11] 秦松, 王君, 高志鹏, 等. 奇魅植物酵素对小鼠酒精性肝损伤保护作用的研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(10): 1 323-1 325.
- [12] ARUOMA O I, COLOGNATO R, FONTANA I, et al. Molecular effects of fermented papaya preparation on oxidative damage, MAP Kinase activation and modulation of the benzo[a] pyrene mediated genotoxicity [J]. Biofactors, 2010, 26(2): 147-159.
- [13] 战伟伟, 魏晓宇, 高本杰, 等. 蓝靛果椰子复合酵素发酵工艺优化[J]. 中国酿造, 2017(1): 191-195.
- [14] 江洁, 刘晓兰, 薛振磊, 等. 乳酸菌和酵母菌共生发酵茶饮料的研制[J]. 食品科学, 2001, 22(1): 44-46.
- [15] 于晓艳, 任清, 卢舒娴, 等. 微生物酵素主要功效酶活力的测定[J]. 食品科技, 2008, 33(7): 193-196.
- [16] 洪厚胜, 朱曼利, 李伟, 等. 葡萄果渣酵素的发酵工艺优化及其理化特性[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 71-80.
- [17] 李凡, 吕兵. 白首乌酵素发酵工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 185-190.
- [18] 张梦梅, 刘芳, 胡凯弟, 等. 酵素食品微生物指标与主要功效酶及有机酸分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 195-200.
- [19] 赵芳芳, 莫雅雯, 蒋增良, 等. 功能性微生物酵素产品的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 283-287.