

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.06.006

付阳云, 文晓鹏. 菜豆 EST-SSR 分子标记开发及部分种质分子身份证构建 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(6): 63-73.

菜豆 EST-SSR 分子标记开发及部分种质分子身份证构建

付阳云, 文晓鹏

贵州大学 农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025

摘要: 为开发菜豆高效新型分子标记, 从分子水平解析菜豆重要种质的遗传多样性及亲缘关系, 基于菜豆转录组数据, 设计 EST-SSR 引物, 建立 EST-SSR 标记系统. 利用 PCR 筛选出多态性引物, 结合毛细管电泳, 分析 81 份菜豆种质的亲缘关系, 并构建分子身份证. 通过 MISA 软件, 在菜豆转录组数据 85 276 条非冗余序列中, 共挖掘出 11 649 个 EST-SSR 位点. 菜豆转录组 SSR 标记主要重复单元为 1~3 个碱基, 其中单碱基为主要类型, 占总量的 56.7%; 其次是三碱基重复, 占总量的 21.1%. 从 128 对 EST-SSR 引物中筛选出 18 对多态性高、重复性好的引物进行 PCR 扩增. 供试种质的多态性信息量(PIC)为 0.50~0.95, 平均为 0.88; 遗传相似性系数为 0.15~0.65, 以 0.35 为阈值可将 81 份种质分为 3 大类, 其中贵州种质主要分布于第 I、III 类, 而省外品种仅分布在第 II 类. 利用核心引物 TDc9 和 TDc66 可以有效区分 81 份菜豆种质, 并构建其分子身份证. 研究开发的 EST-SSR 标记系统, 可用于菜豆种质的鉴定及亲缘关系分析.

关键词: 菜豆; 转录组; 分子标记开发; EST-SSR 标记;

分子身份证

中图分类号: S643.1

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2024)06-0063-11

Development of EST-SSR Marker System for *Phaseolus vulgaris* and Construction of Molecular ID for Some Important Germplasms

FU Yangyun, WEN Xiaopeng

Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University / The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guiyang 550025, China

Abstract: To develop an efficient marker system for *Phaseolus vulgaris* as well as to elucidate the phylogenetic relationships of important germplasms, in the present work, EST-SSR primers were designed based

收稿日期: 2024-02-08

基金项目: 贵州 2023 年省级财政种业发展项目(黔科合中引地[2023]009).

作者简介: 付阳云, 硕士研究生, 主要从事种质鉴定研究.

通信作者: 文晓鹏, 博士, 教授.

on the transcriptome data, subsequently, an EST-SSR marker system was established. Using PCR and capillary electrophoresis with selected polymorphic primers, the 81 *Phaseolus vulgaris* germplasms, most of which originated in Guizhou Province, were fingerprinted and genetically identified. With MISA software, a total of 11 649 EST-SSR loci were identified from 85 276 unigene sequences in the transcriptome data of *Phaseolus vulgaris*. The main repetitive units of SSR markers in the transcriptome of *Phaseolus vulgaris* are 1 to 3 bases, with single base repeats being the main type, accounting for 56.7% of the total, followed by triple base repeats, accounting for 21.1% of the total. Totally, 18 pairs of EST-SSR primers with higher polymorphism and better repeatability were selected from 128 primer pairs. The polymorphic information content (PIC) of the tested germplasms were ranged from 0.50 to 0.95, with an average value of 0.88. The genetic similarity coefficient (DICE) varied from 0.15 to 0.65. When DICE is 0.35, the 81 germplasms can be divided into three categories, among which, the germplasms from Guizhou were mainly distributed in class I and III, and the cultivars from the other provinces were only distributed in class II. The core primers TDc9 and TDc66 might efficiently differentiate the 81 *Phaseolus vulgaris* germplasms, thereby were employed to construct the molecular ID. Conclusively, the established EST-SSR marker system may be effective for identifying *Phaseolus vulgaris* germplasms and elucidating genetic diversity.

Key words: *Phaseolus vulgaris*; transcriptome; molecular marker development; EST-SSR marker; molecular ID

菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)属豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Papilionoideae)菜豆属(*Phaseolus*)植物,是菜豆属重要的栽培种之一,又称芸豆、四季豆^[1],由墨西哥、中美洲中心和南美洲中心驯化为栽培种^[2]. 中国有悠久的菜豆栽培历史,主要分布在黑龙江、内蒙古、吉林、云南、贵州、山西、陕西等地^[3]. 我国菜豆产业目前存在品种单一、退化严重,以及种质资源命名混乱等问题,如“同物不同名,同名不同物”等现象普遍存在^[4-5],因此,对菜豆种质的真实性进行区分整理,揭示其亲缘关系,对菜豆种质资源的保护与利用有重要意义.

简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR),又称微卫星 DNA,是指基因组中由 1~6 个核苷酸组成的基本单位多次重复而构成的 DNA 片段,因其多态性丰富、稳定性好和具共显性而备受关注. 根据来源不同,可分为基因组 SSR 和表达序列标签 SSR(EST-SSR),其中 EST-SSR 标记因开发简单、快捷和低成本而在很多作物上得到应用. 徐国辉等^[6]利用 10 对 EST-SSR 核心引物,对蓝莓优良品系的父本进行了鉴定,并构建了相应的 DNA 指纹图谱. 杨仕美等^[7]基于火龙果转录组测序数据,开发出 EST-SSR 标记并用于火龙果种质的亲缘关系分析. 李松等^[8]利用 20 对 SSR 核心引物,对云南玉溪玉米自交系进行遗传多样性分析,为云南玉米品种推广提供了理论依据. 在菜豆上,陈其福等^[9]采用 SSR 标记分析了 14 个食荚菜豆品种的亲缘关系,并建立了特异性指纹图谱. 杨义杰等^[10]应用 8 对 SSR 引物分析了 20 份芸豆品种的遗传多样性. Shabib 等^[11]利用 SSR 分子标记技术对 11 份菜豆品种作遗传多样性分析,为新品种选育提供了研究依据,但尚未见菜豆 EST-SSR 分子标记开发利用的报道.

菜豆是贵州主要夏季蔬菜之一,也有极为丰富的种质资源,但其亲缘关系和遗传背景不清晰,极大地影响了遗传育种和知识产权保护. 本文基于菜豆转录组数据,设计 EST-SSR 引物,建立 EST-SSR 标记系统;筛选出核心引物,分析了 50 种贵州种质和 31 个省外品种间的亲缘关系,并构建其分子身份证,旨在为菜豆育种亲本的选择、品种鉴定以及品种知识产权保护提供可靠的遗传学依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用菜豆种质共 81 份,其中 50 份采自贵州各地,由贵州大学蔬菜研究院提供,剩余 31 个品种为市面采购. 种质名称信息见表 1.

表 1 81 份菜豆种质信息

编号	代码	名称	来源	编号	代码	名称	来源
1	MD1	豆 3	贵州大学蔬菜研究院	42	MD42	渝研白花	贵州大学蔬菜研究院
2	MD2	豆 9	贵州大学蔬菜研究院	43	MD43	贵农青棒豆	贵州大学蔬菜研究院
3	MD3	豆 15	贵州大学蔬菜研究院	44	MD44	卓白 4 号	贵州大学蔬菜研究院
4	MD4	豆 18	贵州大学蔬菜研究院	45	MD45	紫龙架豆	贵州大学蔬菜研究院
5	MD5	豆 18(2)	贵州大学蔬菜研究院	46	MD46	红玉	贵州大学蔬菜研究院
6	MD6	豆 19	贵州大学蔬菜研究院	47	MD47	绿满架	贵州大学蔬菜研究院
7	MD7	豆 19(2)	贵州大学蔬菜研究院	48	MD48	红妃	贵州大学蔬菜研究院
8	MD8	豆 20	贵州大学蔬菜研究院	49	MD49	W1	贵州大学蔬菜研究院
9	MD9	豆 22	贵州大学蔬菜研究院	50	MD50	W2	贵州大学蔬菜研究院
10	MD10	豆 23	贵州大学蔬菜研究院	51	MD51	绿瀑布四季豆	山东省寿光市
11	MD11	豆 25	贵州大学蔬菜研究院	52	MD52	寿禾白不老九粒白	山东省寿光市
12	MD12	豆 28	贵州大学蔬菜研究院	53	MD53	卓嫩小金豆	山东省寿光市
13	MD13	豆 30	贵州大学蔬菜研究院	54	MD54	矮帝四季豆	山东省寿光市
14	MD14	豆 34	贵州大学蔬菜研究院	55	MD55	无架四季豆	山东省寿光市
15	MD15	豆 35	贵州大学蔬菜研究院	56	MD56	泰美一号	北京金润东田农业科技有限公司
16	MD16	豆 38	贵州大学蔬菜研究院	57	MD57	特级九粒白芸豆	山东省昌邑市
17	MD17	豆 41	贵州大学蔬菜研究院	58	MD58	红玉无筋架豆	山东省寿光市
18	MD18	豆 42	贵州大学蔬菜研究院	59	MD59	压塌架九粒白芸豆	山东省寿光市
19	MD19	豆 57	贵州大学蔬菜研究院	60	MD60	无筋地豆王	河北省定州市
20	MD20	豆 62	贵州大学蔬菜研究院	61	MD61	九粒白 1	河北省定州市
21	MD21	豆 63	贵州大学蔬菜研究院	62	MD62	压趴架春秋紫架豆	河北省定州市
22	MD22	豆 64	贵州大学蔬菜研究院	63	MD63	传统老来少芸豆	山东省兴海县
23	MD23	豆 72	贵州大学蔬菜研究院	64	MD64	盛丰六号	北京农林科学院
24	MD24	豆 75	贵州大学蔬菜研究院	65	MD65	盛丽四号	北京农林科学院
25	MD25	豆 76	贵州大学蔬菜研究院	66	MD66	架豆王	山东省兴海县
26	MD26	豆 80	贵州大学蔬菜研究院	67	MD67	大红袍架豆	北京农林科学院
27	MD27	豆 84	贵州大学蔬菜研究院	68	MD68	家家乐无筋豆	北京农林科学院
28	MD28	豆 85	贵州大学蔬菜研究院	69	MD69	京研白不老九粒白	北京农林科学院
29	MD29	豆 86	贵州大学蔬菜研究院	70	MD70	红花四季豆	青县兴运蔬菜良种繁育中心
30	MD30	豆 86(2)	贵州大学蔬菜研究院	71	MD71	脆嫩架豆	安徽省合肥市
31	MD31	豆 91	贵州大学蔬菜研究院	72	MD72	无筋绿架豆	青县兴运蔬菜良种繁育中心
32	MD32	豆 95	贵州大学蔬菜研究院	73	MD73	压塌架九粒白	宁夏省平罗县
33	MD33	豆 96(1)	贵州大学蔬菜研究院	74	MD74	绿龙架豆	甘肃省酒泉市
34	MD34	豆 96(2)	贵州大学蔬菜研究院	75	MD75	盛优一号	北京农林科学院
35	MD35	豆 100	贵州大学蔬菜研究院	76	MD76	九粒白 2	北京农林科学院
36	MD36	M21	贵州大学蔬菜研究院	77	MD77	超长四季豆	中国农业科学院蔬菜花卉研究所
37	MD37	俊星绿冠王	贵州大学蔬菜研究院	78	MD78	白圆龙	中国农业科学院蔬菜花卉研究所
38	MD38	渝研翠柳	贵州大学蔬菜研究院	79	MD79	量天尺	中国农业科学院蔬菜花卉研究所
39	MD39	超级白玉	贵州大学蔬菜研究院	80	MD80	万斤青	安徽省合肥市
40	MD40	翡翠架豆	贵州大学蔬菜研究院	81	MD81	红花白荚	安徽省合肥市
41	MD41	长白 1 号	贵州大学蔬菜研究院				

1.2 菜豆转录组测序及引物设计

将菜豆转录组测序样本送至生工生物工程(上海)股份有限公司,利用 Illumina HiSeq 平台进行分析测序,对上机测序得到的原始序列进行过滤,去掉含接头的短序列和低质量的短序列,得到高质量的测序数据.使用 MISA 软件对基因转录本进行 SSR 检测,根据搜索出的 SSR 位点及其侧翼序列,使用 Primer 3 完成 EST-SSR 引物设计.

1.3 PCR 扩增及产物检测

将获得的 81 份菜豆种子浸种 2~3 d 后,移栽至土壤培养 2~3 周,直至长出 2 片真叶,采摘包于锡纸,放置于-20 ℃冰箱内,用于后续 DNA 提取.采用北京天根生化科技有限公司的新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取所有样品 DNA,操作步骤按照试剂盒说明书进行. DNA 提取完成后采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,采用全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)检测其浓度与纯度,质量合格后将其存于-20 ℃冰箱中备用.

选取种子性状差异性较大的 8 个样品 DNA 为模板,利用 128 对引物分别进行扩增. PCR 扩增体系为 10 μ L: 模板基因组 DNA 1 μ L, 正、反向引物各 1 μ L, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 5 μ L(北京天根生化科技有限公司), ddH₂O 补充至 10 μ L. SSR-PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 最适退火温度 57~60 ℃ 反应 30 s, 72 ℃ 反应 1 min, 共 38 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min; 扩增产物放置于 4 ℃ 冰箱中冷藏保存.

PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,初步筛选出有多态性的引物. 将多态性较好、重复性高、稳定性好的引物对 81 份菜豆样品进行 PCR 扩增,最后使用毛细管电泳对扩增产物进行检测分析. 毛细管电泳由 Qsep100™ 全自动核酸蛋白分析仪完成.

1.4 数据处理

利用毛细管电泳方法采集条带,人工读条统计 100~500 bp 内的条带,记录明显条带,对多态性佳的引物重复扩增至少 3 次,其中绝大多数带型可重复,对不稳定谱带忽略不计. 有谱带的标记为“1”,没有谱带的标记为“0”,建立数据库. 利用 POPGEN 32 软件分析每对 EST-SSR 引物的等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数及 Shannon 信息指数;应用 PIC_CALC 软件计算 PIC 值;用 NTSYS pc 2.10e 软件计算相似系数,并按 UPMGA 方法构建亲缘关系树状图.

1.5 DNA 分子身份证构建

利用核心引物扩增的带型数据,赋值“0/1”形成菜豆种质的指纹代码,通过条形码和二维码生成器(<https://www.qr-batch.com/>)生成包含各供试种质基本信息的 DNA 分子身份证.

2 结果与分析

2.1 菜豆转录组 EST-SSR 位点分析及引物设计

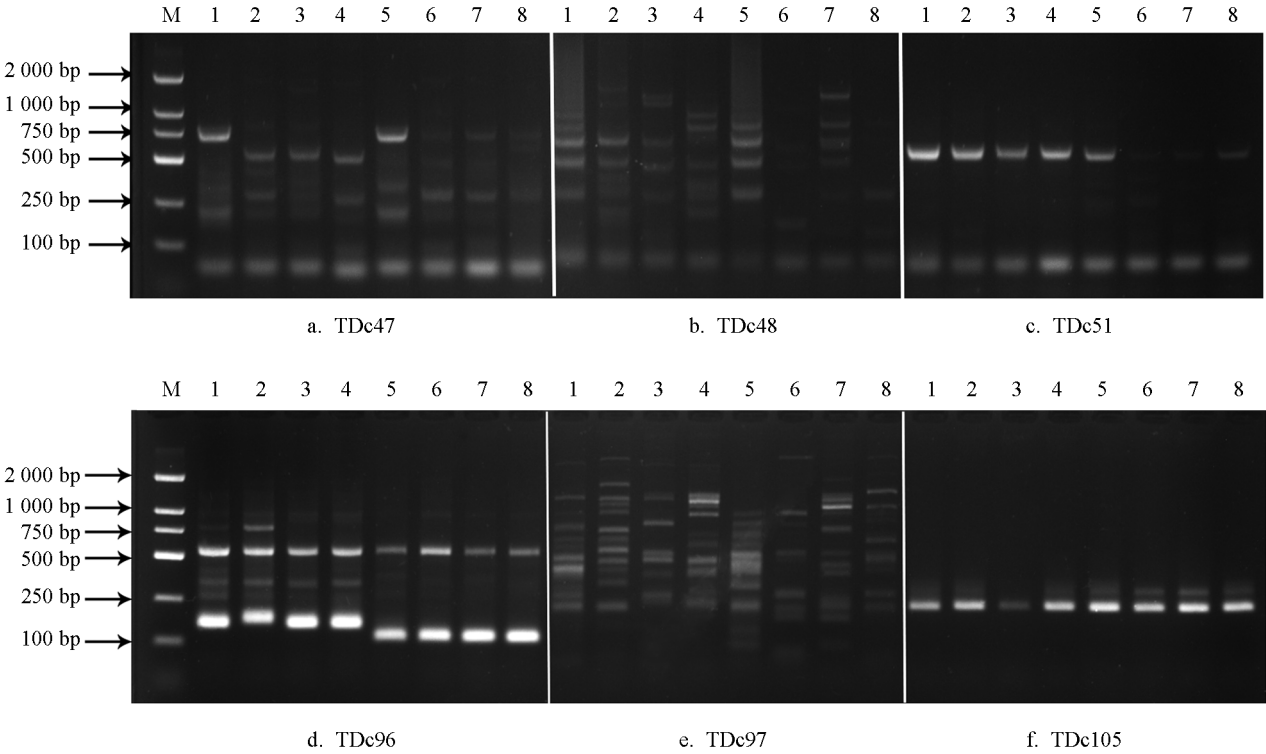
利用 MISA 软件对菜豆转录组测序数据 85 276 条非冗余序列进行分析,共挖掘出 11 649 个 EST-SSR 位点. SSR 标记的重复单元碱基数有单碱基重复、二碱基重复、三碱基重复、四碱基重复、五碱基重复、六碱基重复,还有复杂的重复碱基(略),对应的标记数目分别为 6 610, 2 389, 2 458, 132, 36, 24. 菜豆转录组 EST-SSR 标记主要重复单元为 1~3 个碱基,其中单碱基重复位点数最多,占总量的 56.7%;其次是三碱基重复,占总量的 21.1%. 使用 Primer 3 共设计 EST-SSR 引物 30 177 对,随机合成 128 对 EST-SSR 引物,分析 81 份菜豆种质的遗传多态性.

2.2 菜豆 EST-SSR 引物筛选

在 128 对 EST-SSR 引物中,122 对引物能扩增出条带,有效扩增比例为 95%. 经重复筛选,有 18 对引物能稳定扩增出多态性好、重复性高的条带(表 2),部分引物筛选结果见图 1.

表 2 筛选出的 18 对 EST-SSR 引物信息

序号	引物	引物序列	重复基序	退火温度/℃
1	TDc9	F-AAACGGAACCAACTCACCAG R-GAGGAGCCCTTAGTTTTGGC	(GA)8	60
2	TDc17	F-GAATGTTGAAAGAGAGAATTTTGGA R-CTTTCCCAAGCCATAGATGC	(AT)13	60
3	TDc39	F-TTGGAATGGAGCTATTGGCTT R-TGCAGGATTCATTCCTTAGATG	(TA)10	59
4	TDc40	F-GGCAATGGAGTTTAAAGGGT R-GGTTTCAAAGCTCACCAAGC	(T)10	60
5	TDc46	F-TGGTCGCTTTGAAAGGTAAA R-AGCAGGAGAAACGAATCGAG	(TAT)6	59
6	TDc47	F-TACCATTTAGCGCACCATCA R-AGCTTCAAACCTCGGGAAAGC	(A)15	60
7	TDc48	F-GGCAGAATCATCCAAAATGC R-TTGTTTTGTTAATCATTCTCACA	(AT)9	60
8	TDc53	F-AGGTTCCCCCTTCACAAAAG R-TTTTGGCTTCAAGGAGAGGA	(AT)7	60
9	TDc54	F-AATGAAGGGGCTCAACCTTT R-CAGGGGAGGAGATGTCAGAA	(TG)7	60
10	TDc64	F-CTCCCACTCTTCACGTGTGT R-TAGCAGCTCAAAACAACCGA	(AT)11	59
11	TDc66	F-AAGCAGCTGCAAGTGTTTCA R-ATAATGCAGGGAGTGGCATC	(AT)6	59
12	TDc69	F-TCGACGTATTACACAACCAACA R-CCTCTCTTCCATGAGTGCAA	(AAG)5	59
13	TDc86	F-GCATTCTTTTCCTCCAACCA R-ATTTCAGGGGAATCAAACC	(GAA)5	60
14	TDc96	F-CCTCATAGAAGTGCAAACCTCA R-CAACTGAACCCAAATCCAGG	(TAA)8	60
15	TDc97	F-TGCGATCATTTCAATCAATCA R-CCCATGACTTAAGCCAAACA	(A)12	60
16	TDc109	F-TCCAAACCGTCCTTGAAGTC R-AATTGCTCTCGGCATTCATC	(GCG)5	60
17	TDc112	F-TGGCCATCAAGATATTTCACA R-AACAGCAGCCCTCTCTTCAG	(AT)13	59
18	TDc120	F-GGAAGGTCTAGGCGAACTCA R-CCCAGCTGATTTTCCAGTCT	(AC)8	59



M 为 DL 2000 DNA Marker; 数字 1~8 代表 8 个不同种质。

图 1 基于琼脂糖凝胶电泳的部分 EST-SSR 引物筛选结果

2.3 菜豆 EST-SSR 引物多态性分析

利用 18 对多态性引物对 81 份菜豆样品进行 PCR 扩增，将扩增产物进行毛细管电泳，部分种质的电泳结果见图 2。通过 POPGEN 32 对统计的“0/1”数据进行分析，结果显示，18 对引物在 81 份样品中共检测出 492 个多态性位点；最小多态性位点数为 8 个，最大为 39 个，平均 27.3 个。等位基因数平均为 2.0 个，有效等位基因总数为 23.0 个，单对引物产生有效等位基因数为 1.1~1.4 个，平均为 1.3 个。Nei's 基因多样性指数为 0.07~0.25，平均为 0.18。Shannon 信息指数变化范围为 0.14~0.40，平均为 0.30。PIC 值为 0.50~0.95，平均为 0.88(表 3)。结果表明，筛选出的 18 对 EST-SSR 引物具有很好的多态性，81 份菜豆种质也具有丰富的遗传多样性。

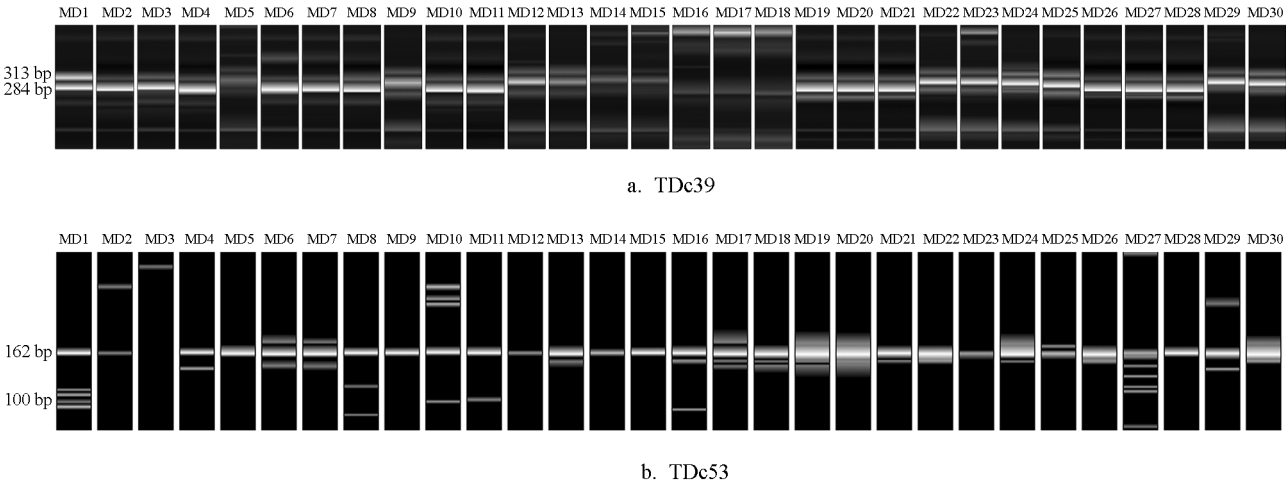


图 2 部分种质的电泳结果

表 3 基于 EST-SSR 标记的 81 份菜豆种质的遗传多样性分析

序号	EST-SSR 引物	多态性 位点数/个	等位 基因数/个	有效等位 基因数/个	Nei' s 基因 多样性指数	Shannon 信息指数	PIC 值
1	TDc9	33	2.0	1.4	0.22	0.36	0.93
2	TDc17	38	2.0	1.4	0.24	0.37	0.95
3	TDc39	31	2.0	1.4	0.24	0.37	0.93
4	TDc40	31	2.0	1.2	0.12	0.22	0.92
5	TDc46	21	2.0	1.1	0.07	0.15	0.89
6	TDc47	39	2.0	1.3	0.20	0.34	0.95
7	TDc48	12	2.0	1.1	0.07	0.14	0.79
8	TDc53	8	2.0	1.2	0.12	0.22	0.50
9	TDc54	29	2.0	1.2	0.16	0.27	0.92
10	TDc64	23	2.0	1.3	0.17	0.27	0.86
11	TDc66	36	2.0	1.4	0.25	0.40	0.94
12	TDc69	37	2.0	1.3	0.19	0.32	0.94
13	TDc86	28	2.0	1.1	0.10	0.20	0.83
14	TDc96	26	2.0	1.3	0.18	0.30	0.89
15	TDc97	37	2.0	1.3	0.22	0.37	0.95
16	TDc109	13	2.0	1.3	0.18	0.29	0.79
17	TDc112	32	2.0	1.3	0.22	0.36	0.94
18	TDc120	18	2.0	1.4	0.25	0.38	0.88
合计		492	36.0	23.0	3.20	5.33	15.80
平均		27.3	2.0	1.3	0.18	0.30	0.88

2.4 菜豆种质的亲缘关系分析

利用 NTSYSpc 2.01e 软件计算 81 份菜豆种质的遗传相似性系数. 聚类结果表明, 遗传相似性系数变化幅度为 0.15~0.65, 其中 MD4 和 MD8 亲缘关系较近, 相似系数为 0.65, 而 MD37 和 MD77 亲缘关系较远, 相似系数仅为 0.15. 在遗传相似系数为 0.35 时, 可将 81 份种质分为 3 大类(图 3): 第Ⅰ类包含 MD1, MD3, MD4 等 18 份种质, 第Ⅱ类中包含的种质数量最多, 共计 59 份种质, 在相似系数为 0.37 时, 又将其分为 3 个亚类, 其中第一亚类包含 MD24, MD25, MD30 等 36 份种质, 第二亚类包含 MD56, MD58, MD63 等 22 份种质, 而第三亚类仅有种质 MD57. 第Ⅲ类仅有 4 份来源于贵州的种质, 即 MD36, MD37, MD38 和 MD47. 省外种质(MD51~MD81)全部聚在第Ⅱ类群, 极有可能与来源地有关, 因为这 31 份品种均是来源于北方, 可能其遗传背景重合度较高; 而来自贵州的 50 份种质在 3 大类中均有聚类, 折射出贵州种质间的遗传差异大, 可以从中挖掘优异资源, 在遗传育种上有较大的潜在价值.

2.5 DNA 分子身份证的构建

利用 18 条 EST-SSR 引物对 81 份菜豆种质进行毛细管电泳, 获得每对引物扩增的带型数据, 这些“0/1”数据可作为菜豆种质指纹图谱或分子身份证构建的直接依据. PIC 值较高的引物为 TDc17

(0.95), TDc47(0.95), TDc66(0.94), TDc69(0.94) 及 TDc97(0.95)(表 3), 其中 TDc17, TDc66, TDc97 均能鉴别出 77 份种质, TDc66 的 Shannon 信息指数(0.40)最高, 故选取 TDc66 作为核心引物, 但仍有 4 份种质不能被识别, 分别为 MD42, MD49, MD57 和 MD63. TDc9, TDc47 和 TDc97 等 3 对引物可鉴定这 4 份种质. 这 3 对引物的多态性位点数分别为 33, 39, 37, 选取多态性位点数少且具备同等鉴别力的引物对 TDc9, 能避免构建分子身份证的繁琐性, 因此, 利用引物对 TDc9 和 TDc66 扩增的 EST-SSR 标记, 可构建全部供试种质的分子身份证, 分别生成包含基本信息的条形码和二维码(表 4).

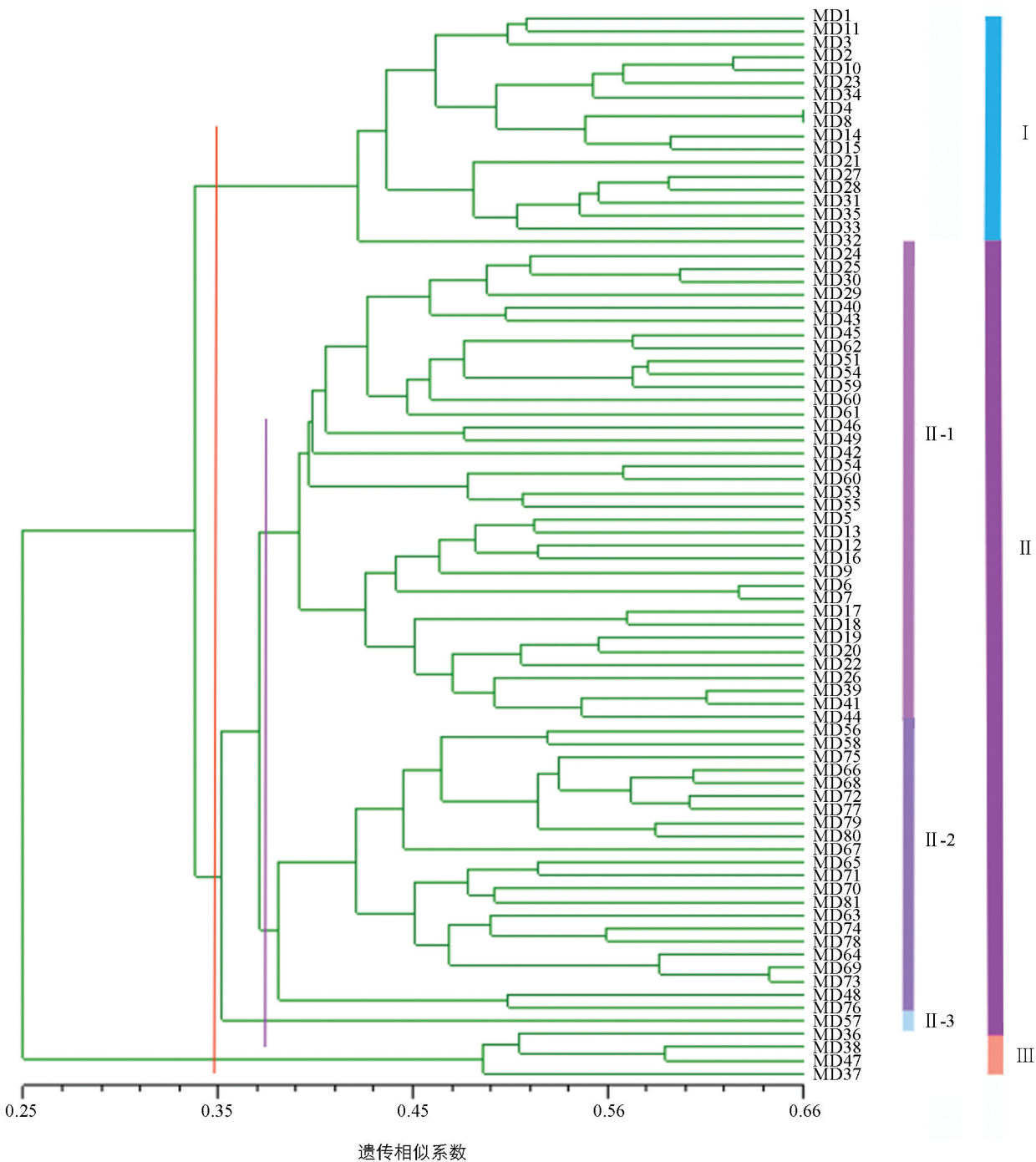


图 3 81 份菜豆种质聚类树

表 4 部分供试菜豆种质分子身份证

编号	代码	名称	品种条形码	二维码
1	MD1	豆3	 0000000010100000000010011000000000100000101001000100000010000000	
2	MD2	豆9	 010000001010010000110001100000001001000010101000100110001100000000	
3	MD3	豆15	 00000000010000000000100011001100000010001000101010101010101100000000	
4	MD4	豆18	 0000000010100000100001000110000000100100010001001110001000000000	
5	MD5	豆18(2)	 00000000101000000000110001100000000010000110100000000110001100000000	
6	MD6	豆19	 000000001000000000001000110000000000100000010100000101000000000000	
7	MD7	豆19(2)	 000000001010000100001000110001000100010101000000001100011000000000	
8	MD8	豆20	 000000001010000100001100000000100100001000100010010100001010000000	
9	MD9	豆22	 000000000100000100001100000000101000001010100001010000100000000000	
10	MD10	豆23	 00000000101001010000110001100000000010101000100010010001000000111	
11	MD11	豆25	 0000000010100000100000100111000000000010001000100010011100000100000000	
12	MD12	豆28	 0000000001000000000010001100000000001000100010001001001001000110000000	

3 讨论

3.1 菜豆的 EST-SSR 分子标记

相比于主观意识强, 且易受环境、气候等外界因素影响的传统形态学标记, 共显性强、标记数量充足、多态性高、能够高效快速鉴别种质特异性的分子标记备受关注。菜豆作为我国主要的粮食作物, 却

存在种植品种单一、品种退化严重以及种质资源命名混乱等问题,因此急需开发更为可靠且方便快捷的分子标记来促进菜豆育种.转录组数据是开发标记的理想资源^[12],相较于基因组测序,转录组测序成本低、耗时短.近年来许多果树^[13]、木本植物^[14]、药用植物^[15]以及食用菌^[16]等,均基于转录组测序开发出 EST-SSR 分子标记用于遗传多样性分析和品种种质鉴定及辅助育种.本研究基于菜豆转录组数据分析结果,开发合成了 128 对 EST-SSR 引物,并验证挖掘了 18 对重复性好、特异性强、多态性高的引物,用于分析菜豆的遗传多样性.

根据目前的相关研究报道,当 $PIC > 0.5$ 时,表明引物有较高多态性; $0.5 \geq PIC > 0.2$ 时,表明引物有中等多态性; $PIC \leq 0.2$,则表明引物多态性较低^[17].夏春阳等^[3]利用 SSR 分子标记分析了 69 份普通菜豆种质资源的遗传多样性, PIC 值平均为 0.659.另外,陈琼^[18]也利用 33 对 SSR 核心引物对 26 份菜豆 DUS 测试标准品种的遗传多样性进行了分析, PIC 值平均为 0.604.本研究中所筛选的 18 对引物的 PIC ($0.50 \sim 0.95$) ≥ 0.5 ,表明这 18 对引物具有较高多态性,因此,本文开发的 EST-SSR 标记系统能用于菜豆种质的鉴定及亲缘关系分析.

3.2 贵州菜豆种质亲缘关系

地理来源不仅是物种亲缘关系分析的重要指标,更是影响物种遗传分化的重要因素^[19].在长期的自交或近交下,不但会降低种群的遗传多样性,还会大大限制挖掘优良种质的可能性和培育新品种的创新性.本研究中所用种质主要分为贵州省内及省外两类样本,省外 31 份菜豆样本主要来源于山东、河北和甘肃等地.基于菜豆转录组分析结果,本研究成功完成 EST-SSR 分子标记的引物设计开发,筛选出 18 对多态性极佳的 EST-SSR 引物,利用这些多态性好的引物能将 81 份菜豆种质明确区分开,可分为 3 大类群.由聚类结果可以看出,省外品种主要集中在第 II 类群.这一趋势表明这些品种的亲缘关系较近,极有可能是具有相同或相似的遗传背景,导致遗传变异水平低.贵州省内收集的 50 份菜豆种质资源可被分为 3 大类群,且第 I、III 类群均为省内种质,仅有少量种质在第 II 类群的第三亚类中,表明这 50 份种质遗传变异水平高,且遗传背景丰富多样.这可能与我国西南优质菜豆种质资源交流逐年加强、少量新育成品种逐渐具备更丰富的遗传背景有关^[18],因此,在杂交育种时需尽量选取来源不同的资源进行组配,以拓宽遗传背景,从而提高我国菜豆种质资源的遗传多样性^[20].

3.3 菜豆种质的分子身份证

目前,有 3 种构建分子身份证的方式:1) 赋值“0/1”形成字符串;2) 编码等位基因;3) 编码基因型^[21].谢倩等^[22]利用 12 对 EST-SSR 引物对 59 份橄榄种质进行遗传多样性分析,并构建了分子身份证.刘伟等^[23]应用 SSR 荧光标记法构建山东地方桃种质资源分子身份证.陆育生等^[24]利用 SSR 标记分析了广东黄皮种质资源的遗传多样性水平及亲缘关系,并构建了分子身份证.本研究以“0/1”字符串生成条形码,作为构建分子身份证的直接依据;利用 TDc9 和 TDc66 作为鉴定全部供试种质的高效核心引物,以此构建 81 份菜豆种质的分子身份证.

本研究开发的 EST-SSR 标记可用于菜豆的系统发育、物种进化及亲缘关系等研究,为今后菜豆品种资源保存、利用、育种和提高育种效率等奠定理论基础,充分发挥它们在育种工作中的应用价值.

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.
- [2] 张赤红.普通菜豆种质资源遗传多样性与分类研究[D].北京:中国农业科学院,2004.
- [3] 夏春阳,杜吉到,韩毅强,等.基于 SSR 分子标记的普通菜豆种质遗传多样性分析[J].食品与机械,2019,35(10): 232-236.
- [4] 刘春良,王兰芬,武晶,等.普通菜豆生长习性相关基因定位[J].植物遗传资源学报,2017,18(4): 713-719.

[5] 夏春阳. 基于表型与 SSR 分子标记的普通菜豆种质资源鉴定 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2020.

[6] 徐国辉, 高雄梅, 赵丽娜, 等. 蓝莓优良杂交品系父本鉴定及 DNA 指纹图谱构建 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(5): 1580-1589.

[7] 杨仕美, 乔光, 毛永亚, 等. 基于火龙果转录组测序的 SSR 标记开发及种质亲缘关系分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(24): 8096-8110.

[8] 李松, 施德林, 董云武, 等. 基于 SSR 标记的云南 35 个玉米自交系遗传多样性分析 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(5): 732-738.

[9] 陈其福, 李艳美, 李佳荫, 等. 基于 SSR 标记的食荚菜豆指纹图谱构建 [J]. 北方园艺, 2019(9): 1-7.

[10] 杨义杰, 王颖, 张东杰, 等. 不同 SSR 标记检测技术在芸豆品种的遗传多样分析中的应用 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2017, 29(6): 1-5, 19.

[11] SHABIB J M, SHEHATA A, AL-RUMAIH M M. Assessment the Genetic Diversity of Common Bean *Phaseolus vulgaris* Collection by Microsatellite SSR Markers [J]. Academic Journals, 2013, 8 (40): 5032-5046.

[12] 李小白, 向林, 罗洁, 等. 转录组测序(RNA-seq)策略及其数据在分子标记开发上的应用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 720-726, 740.

[13] 秦玥, 朱高浦, 郭欢欢, 等. 扁桃 EST-SSR 分子标记开发及遗传多样性评价 [J]. 林业科技通讯, 2023(6): 20-25.

[14] 廖初琴. 赣南油茶 EST-SSR 分子标记的开发及遗传多样性分析 [D]. 广州: 广州大学, 2023.

[15] 李辉, 冯源恒, 唐生森, 等. 基于转录组测序的枫香 EST-SSR 引物开发及有效性评价 [J]. 广西植物, 2023, 43(2): 327-335.

[16] 马杰, 屈雯, 陈春艳, 等. 基于转录组序列的羊肚菌 EST-SSR 标记开发与遗传多样性分析 [J]. 江苏农业学报, 2020, 36(5): 1282-1290.

[17] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.

[18] 陈琼. 普通菜豆 SSR 分子标记鉴定体系的建立及应用 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.

[19] 骆晚侠, 张李, 杨凯, 等. 小豆 SSR 分子标记遗传连锁图谱构建 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(17): 3534-3544.

[20] 公丹, 王素华, 程须珍, 等. 普通豇豆应用核心种质的 SSR 指纹图谱构建及多样性分析 [J]. 作物杂志, 2020(4): 79-83.

[21] 马庆国, 宋晓波, 贺君星, 等. 基于 SSR 分子标记的核桃种质资源分子身份证构建 [J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(2): 1-9.

[22] 谢倩, 张诗艳, 江来, 等. 橄榄转录组 SSR 信息分析及分子标记开发与应用 [J]. 园艺学报, 2023, 50(11): 2350-2364.

[23] 刘伟, 李森, 李桂祥, 等. 应用 SSR 荧光标记法构建山东地方桃种质资源分子身份证 [J]. 山东农业科学, 2022, 54(2): 6-13.

[24] 陆育生, 彭程, 常晓晓, 等. 基于 SSR 标记的广东黄皮种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(12): 187-199.

责任编辑 周仁惠