

# 182 份东北地区受保护大豆品种 DNA 指纹库的构建及分析

赵艳杰 冯艳芳 黄思思 马莹雪 李媛媛 张蝶 邓超 韩瑞奎 唐浩

(农业农村部科技发展中心,北京 100176)

**摘要:**为评估东北地区受保护大豆品种遗传多样性,利用 40 对 SSR 引物结合荧光毛细管电泳技术,构建了 182 份东北地区已授予植物新品种权的大豆品种 DNA 指纹库。182 份大豆品种共扩增出 266 种基因型,每对引物的等位变异数为 4~20 种不等,平均每对引物产生 11.05 种基因型。聚类分析结果表明,182 份大豆品种之间的遗传相似系数的变化范围是 0.4887~1.0000,平均相似系数为 0.7785,遗传基础较窄。聚类结果显示,182 份大豆品种可聚合成 13 大类,黑农系列品种间、垦豆系列品种间聚合紧密,遗传基础相对较窄,合农系列品种间、吉育系列品种间、绥农系列品种间距离较远,遗传基础相对较宽。考察 3 个 DNA 指纹相同的品种合农 75、合丰 50 号、龙垦 335 的田间表型,发现合农 75 与合丰 50 号表型差异较小,合农 75 与龙垦 335 表型差异较大,因此 DNA 指纹图谱库可以为特异性(可区别性)判定时辅助筛选近似品种提供参考,但品种特异性(可区别性)的最终判定还需要依靠田间种植对比试验。

**关键词:**东北地区;大豆;品种保护;DNA 指纹库;遗传多样性

近年来,随着人们品种权意识的日益增强,且《种子法》中要求品种登记、审定、保护均需

要通过特异性(可区别性,Distinctness)、一致性(Uniformity)和稳定性(Stability)的测试(简称 DUS 测试),因此植物品种 DUS 测试工作任务量不断加大,加之我国培育、审定和保护大豆新品种速度的加

通信作者:唐浩

**2.4 仓位管理功能** 在开始包装时或在包装过程中,可通过选择仓位功能任意定义需要供料的仓位组合,做到不包装的机台对应的仓位不供料。

系统设备正常运行时会有动画实时显示各设备运行状态,分料小车只有运行到某个仓位或固定在某个仓位时才会显示,以明确分料小车目前在哪个仓位上,否则没有显示,如果小车不在运行中也不在某个仓位显示时,屏幕上方会出现复位按钮,此时须按下该按钮使小车复位(回到较近的仓位)。

**2.5 参数设置功能** 参数设置部分包括关闸等待时间、进料相关时间、故障相关时间及下料位管理等部分。

**2.6 故障信息查询功能** 通过按钮选项对历史信息进行查询,可查看各个故障发生的时间及事件信息。运行中出现故障时会弹出报警信息窗口或触发声光报警,严重时可能引起相关设备停止运行,可根

据事件信息确定故障来源。

## 3 结语

该系统采用人机交互界面(HMI)及 PLC 自动控制整个分料过程,可视化操作,人机界面友好,用户可根据使用需求选择运行模式,设定相应任务参数,系统即可按设定的运行模式,从进料开始自动完成物料的均衡分配供给,实现个性化供料。本系统高度自动化、智能化,能确保整个自动送料过程连续稳定、安全可靠,可在种子加工成套设备中广泛应用。

## 参考文献

- [1] 郁汉琪. 可编程控制器原理及应用. 北京:人民邮电出版社,2010
- [2] 赵兴森,文生平,徐永谦. 基于 PLC 的自动配料控制系统设计. 计算机测量与控制,2013,21(4): 962-964

(收稿日期:2019-09-06)

快,大豆骨干亲本的使用使得品种间的遗传多样性降低,单纯依据表型性状进行品种田间检验越来越困难,因此对 DUS 测试技术的要求越来越高<sup>[1]</sup>。以分子标记为基础的 DNA 指纹鉴定技术具有准确可靠、简单快速的优点,指纹图谱是鉴别品种的有力工具<sup>[2]</sup>,因此建立以分子标记为基础的 DNA 指纹图谱能够为特异性(可区别性)判定时辅助筛选近似品种和解决品种纠纷提供技术支持。

我国在大豆 DNA 指纹图谱构建方面取得了一定的成果,田清震<sup>[3]</sup>利用 AFLP 分子标记技术,建立了我国代表性野生大豆和栽培大豆种质的指纹图谱。赵洪锟等<sup>[4]</sup>利用 RAPD 分子标记技术,构建了 64 份吉林省大豆骨干亲本及主推品种的 DNA 指纹图谱。高明<sup>[5]</sup>利用 SSR 分子标记技术构建了 89 个吉林省推广大豆品种的 DNA 指纹图谱,并进行遗传多样性分析。徐海凤等<sup>[6]</sup>用 45 对 SSR 引物对 43 份大豆品种(系)进行遗传相似性分析,并构建指纹图谱。陈亮等<sup>[7]</sup>从 320 对 SSR 标记引物中筛选出由 7 个 SSR 标记构建了吉林省新育成大豆品种的 DNA 指纹图谱。徐冬雪等<sup>[8]</sup>以参加 2016 年河北省区域试验的 21 个大豆品系为材料,用 62 对 SSR 引物构建了指纹图谱。而针对东北地区申请保护大豆品种 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析还未见报道。

截止到 2018 年 11 月份,东北地区受保护的大豆品种数量占将近一半,本研究利用均匀分布于大豆染色体的 40 对 SSR 引物,对东北地区已获得植物新品种权的 182 份大豆品种进行遗传分析,同时构建其 DNA 指纹图谱库,为 DUS 测试中辅助筛选近似品种和解决品种纠纷奠定了基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 182 份来自东北地区申请植物新品种保护大豆授权品种(表 1)。

**1.2 DNA 提取** 从每个品种中取 50 粒种子,放在装有适量湿沙土的发芽盒内于人工气候培养箱发苗,每个样品随机取叶片 20 片以上,液氮研磨后,用改良的 CTAB 法提取种子 DNA<sup>[9]</sup>。

**1.3 SSR 标记检测及数据分析** 品种区分效果好、峰型易读的 40 对 SSR 引物由黑龙江省农业科学院作物育种研究所推荐(表 2),荧光引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。PCR 体系含 1×TaqMan® Gene Expression Master Mix、30ng DNA,加 ddH<sub>2</sub>O 补

足 20μL。95℃ 预变性 5min,94℃ 变性 45s,60℃ 退火 45s,72℃ 延伸 45s~1min 30s,共 32 个循环;72℃ 延伸 10~15min,16℃ 条件下保存。将 PCR 产物进行适当稀释后,取 1μL 稀释液加 8.5μL 去离子甲酰胺、0.5μL Liz-500 分子量内标,于 ABI 3730DNA 分析仪上进行毛细管电泳检测。利用北京市农林科学院玉米中心开发的 SSR 指纹分析器采集扩增产物的片段大小。采用 Powermarker V3.25 软件进行聚类分析,用 Figtree 模块生成聚类图。

## 2 结果与分析

**2.1 SSR 标记多态性分析** 分析 182 份大豆品种 40 对 SSR 引物标记多态性,共扩增出 266 种多态性基因型,每对引物的基因型表现从 4~20 种不等,平均每对引物扩增出 11.05 种基因型。

**2.2 遗传多样性分析** 利用 Powermarker V3.25 软件进行遗传相似性分析,结果表明,182 个大豆品种间遗传相似系数的变化范围是 0.4887(黑交 00-1152 与野褐 1 号)~1.0000(龙垦 335、合农 75 和合丰 50 号),平均为 0.7785。从聚类分析结果(图 1)来看,182 份大豆品种可聚合为 13 大类,龙垦 331 单独为一类;垦丰 16、垦豆 26 号、垦豆 38、垦豆 37、垦豆 28、垦豆 36、垦豆 39、垦豆 33 聚合在一起;黑农 70、黑农 64、黑农 68、黑农 66、黑农 69 聚合在一起,说明上述 8 个垦豆系列品种和 5 个黑农系列品种遗传基础较窄。除此之外,合农系列、吉育系列、绥农系列品种分布较远,说明遗传基础较远。

龙垦 335、合农 75 和合丰 50 号具有相同的 DNA 指纹,查询 DUS 测试数据库中 3 个品种的田间表型数据,合农 75 和合丰 50 号在“下胚轴:花青甙显色强度”等 5 个性状上有 1 个代码差异,表型相近,合农 75 和龙垦 335 在“茎:茸毛密度”等 14 个性状上有 1~3 个代码差异,表型差异较大(表 3)。

## 3 讨论

大豆是高度自交结实作物,遗传基础狭窄。邱丽娟<sup>[10]</sup>发现 18 个美国大豆品种提供了美国 85% 的育成品种的遗传物质。崔章林<sup>[11]</sup>分析了中国 651 个大豆品种的系谱,认为中国东北、黄淮海地区和南方 3 大产区衍生品种最多仅 38 个祖先亲本。本研究利用 40 对 SSR 引物对 182 份东北地区已授植物新品种保护权的品种进行分析,发现其平均相似

表 1 182 份来自东北地区申请植物新品种保护大豆授权品种

编号	样品名称	编号	样品名称	编号	样品名称	编号	样品名称
1	合农 72	47	东农 65	93	龙豆 4 号	139	吉恢 100 号
2	吉育 362	48	东农 63	94	龙黄 2 号	140	杂交豆 3 号
3	华疆 4 号	49	绥农 41	95	牡豆 8 号	141	杂交豆 2 号
4	吉育 612	50	绥中作 40	96	东生 7 号	142	东豆 50
5	合丰 52 号	51	金源 71	97	东生 6 号	143	东农 55
6	吉育 341	52	吉育 204	98	吉农 31	144	克山 1 号
7	吉育 611	53	吉育 303	99	吉农 28	145	黑农 64
8	龙垦 331	54	吉育 205	100	垦豆 31	146	黑农 61
9	龙垦 336	55	吉育 202	101	垦豆 33	147	广兴黑大豆 1 号
10	龙垦 338	56	吉育 406	102	黑农 69	148	绥农 30
11	哈交 L442-2	57	蒙豆 37 号	103	绥无腥豆 2 号	149	绥农 31
12	东农豆 353	58	嫩奥 5 号	104	绥农 32	150	吉育 95
13	合农 71	59	嫩奥 2 号	105	绥农 35	151	垦丰 23 号
14	东农豆 251	60	绥农 23	106	吉育 99	152	吉育 401
15	黑农 53	61	东农 56	107	龙豆 3 号	153	东豆 339
16	合农 91	62	穆选 1 号	108	吉育 201	154	嫩丰 19 号
17	黑农 50	63	嫩奥 4 号	109	吉育 105	155	丰收 26
18	合交 02-69	64	北豆 51	110	黑河 49 号	156	绥农 29
19	中科毛豆 1 号	65	北豆 42	111	垦豆 29	157	东农 30655
20	垦豆 42	66	北豆 40	112	垦豆 30	158	垦丰 22 号
21	垦豆 41	67	东农 59	113	垦豆 28	159	垦丰 20 号
22	东农豆 253	68	龙达 1 号	114	吉恢 83 号	160	北豆 14 号
23	黑交 01-1900	69	北豆 52	115	北豆 37	161	黑河 51
24	黑交 00-1152	70	东农 60	116	野黑 1 号	162	垦丰 18 号
25	长农 26	71	北豆 53	117	北豆 34	163	垦丰 17 号
26	龙垦 335	72	垦豆 39	118	东生 5 号	164	黑河 48 号
27	长农 27 号	73	垦丰 16	119	垦豆 26 号	165	安 02-686
28	东农豆 252	74	垦豆 37	120	垦豆 27 号	166	北豆 10 号
29	黑农 71	75	垦保小粒豆 1 号	121	黑农 68	167	黑农 52
30	黑农 70	76	垦保 1 号	122	黑农 66	168	北豆 28
31	龙黄 3 号	77	北豆 57	123	龙黄 1 号	169	安 D205-8
32	合农 65	78	垦保 2 号	124	黑农 67	170	垦丰 15
33	合农 66	79	黑科 56 号	125	北豆 6 号	171	垦丰 19 号
34	合农 67	80	垦豆 38	126	黑农 65	172	哈 99-5307
35	合农 68	81	绥农 39	127	黑农 60	173	合丰 50 号
36	合农 64	82	绥农 38	128	黑农 63	174	合丰 51 号
37	合农 97	83	绥农 37	129	黑农 59	175	垦丰 14 号
38	合农 76	84	绥农 36	130	辽豆 22 号	176	垦丰 13 号
39	合农 95	85	垦豆 36	131	北豆 23 号	177	黑农 46
40	合农 75	86	垦豆 34	132	合农 58 号	178	黑农 49
41	合农 92	87	垦豆 35	133	合丰 57 号	179	黑农 48
42	合农 94	88	龙豆 1 号	134	合丰 56 号	180	绥农 14-3
43	长密豆 30 号	89	先农 1 号	135	合农 61 号	181	合农 113
44	合农 70	90	东农 3399	136	合农 59 号	182	合农 77
45	合农 85	91	龙豆 5 号	137	嫩丰 18 号		
46	合农 69	92	吉大豆 3 号	138	野褐 1 号		

表 2 SSR 标记引物

编号	标记	连锁群	编号	标记	连锁群	编号	标记	连锁群
1	Satt300	A1	15	Satt588	K	29	Satt330	I
2	Satt429	A2	16	Satt567	M	30	Satt431	J
3	Satt197	B1	17	Satt022	N	31	Satt242	K
4	Satt556	B2	18	Satt487	O	32	Satt373	L
5	Satt100	C2	19	Satt236	A1	33	Satt551	M
6	Satt267	D1a	20	Satt453	B1	34	Sat_084	N
7	Satt005	D1b	21	Satt168	B2	35	Satt345	O
8	Satt514	D2	22	Satt180	C1	36	Satt308	M
9	Satt268	E	23	Satt281	C2	37	Satt271	D1b
10	Satt334	F	24	Satt458	D2	38	Satt408	D1a
11	Satt191	G	25	Satt384	E	39	Satt646	C1
12	Satt142	H	26	Satt193	F	40	Satt209	A2
13	Satt239	I	27	Satt288	G			
14	Satt380	J	28	Satt442	H			

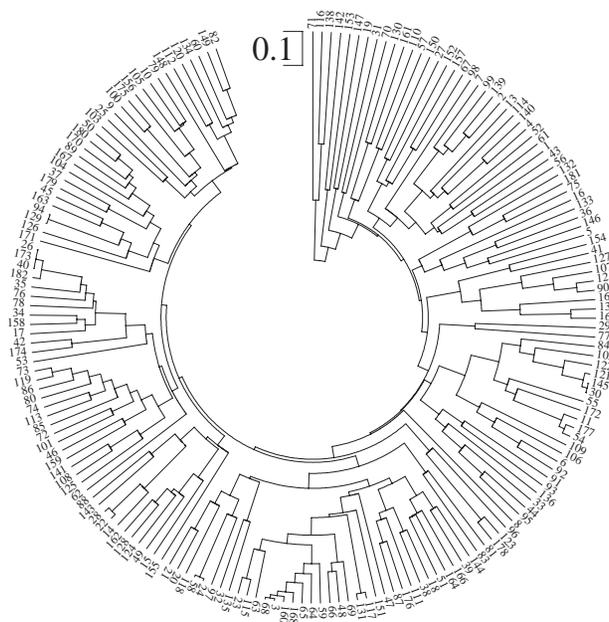


图 1 182 份东北地区申请保护大豆品种 UPGMA 聚类图

系数为 0.7785,遗传基础较窄,又由于育种采用大豆品种同质化严重,加大了 DUS 测试中特异性鉴定的难度。除此之外,8 个垦豆系列品种和 5 个黑农系列品种紧密聚合在一起,说明同一育种单位育成的新品种遗传多样性低,因此在大豆的新品种选育上可考虑拓宽遗传基础。

《种子法》中规定“农业、林业主管部门可以采用国家规定的快速检测方法对生产经营的种子品种进行检测,检测结果可以作为行政处罚依据”。由于基因与性状的关系并不都是简单的线性关系,

基因与基因、基因与基因产物、基因与环境之间存在着复杂的相互关系,分子检测结果与田间表型鉴定结果也无必然关联。本研究中,龙垦 335、合农 75 和合丰 50 号 DNA 指纹相同,合农 75 和合丰 50 号表型相近,说明了构建大豆 DNA 指纹数据库在特异性(可区别性)判定时辅助筛选近似品种具有一定的参考意义;合农 75 和龙垦 335 表型差距较大,说明品种特异性(可区别性)的最终判定不能仅仅依靠分子鉴定,还需要依靠田间种植对比试验。

表3 龙垦335、合农75和合丰50号的田间鉴定结果

性状	合农75		合丰50号		龙垦335	
	代码及描述	数据	代码及描述	数据	代码及描述	数据
1.* 下胚轴:花青甙显色	9.有	/	9.有	/	9.有	/
2.* 下胚轴:花青甙显色强度	7.强	/	7.强	/	6.中到强	/
3.* 茎:茸毛颜色	1.灰色	/	1.灰色	/	1.灰色	/
4.茎:茸毛密度	3.疏	/	4.疏到中	/	6.中到密	/
5.* 复叶:小叶形状	2.三角形	/	2.三角形	/	2.三角形	/
6.复叶:小叶数量	1.三小叶	/	1.三小叶	/	1.三小叶	/
7.* 叶片:绿色程度	5.中	/	5.中	/	5.中	/
8.* 开花期	4.早到中	35d	4.早到中	36d	4.早到中	41d
9.* 花:花冠颜色	2.紫色	/	2.紫色	/	2.紫色	/
10.仅适用于有分枝品种:植株:分枝数量	1.极少	0.5个	1.极少	0.6个	1.极少	1.4个
11.* 仅适用于有分枝品种:植株:分枝与主茎夹角	3.小	/	3.小	/	6.中到大	/
12.* 植株:高度	4.矮到中	73.5cm	5.中	79.9cm	4.矮到中	
13.* 植株:结荚习性	2.亚有限	/	2.亚有限	/	2.亚有限	/
14.* 植株:生长习性	1.直立	/	1.直立	/	1.直立	/
15.* 成熟期	3.早	111d	3.早	112d	6.中到晚	/
16.主茎:节数量	4.少到中	13.9个	4.少到中	14.35个	5.中	/
17.植株:底荚高度	2.极低到低	7.65cm	2.极低到低	6.15cm	3.低	/
18.植株:落叶性	3.落叶		3.落叶	/	3.落叶	/
19.植株:荚果数量	4.少到中	61.85个	4.少到中	52.95个	3.少	/
20.荚果:种子数量	4.多	3.5个	4.多	3.5个	3.中	/
21.荚果:弯曲程度	3.中	/	3.中	/	3.中	/
22.荚果:炸荚性	2.极轻到轻	/	1.无或极轻	/	1.无或极轻	/
23.荚果:颜色	5.深褐色	/	5.深褐色	/	3.浅褐色	/
24.* 百粒重	6.中到高	21.77g	5.中	20.97g	4.低到中	/
25.* 种子:形状	3.长椭圆形	/	2.椭圆形	/	2.椭圆形	/
26.种子:种皮颜色数量	1.单色	/	1.单色	/	1.单色	/
27.* 仅适用于单色种皮品种:种子:种皮颜色	2.中等黄色	/	2.中等黄色	/	1.浅黄色	/
28.仅适用于双色品种:种子:种皮色斑类型	/	/	/	/	/	/
29.种子:子叶颜色	1.黄色	/	1.黄色	/	1.黄色	/
30.* 种脐:颜色	2.中等黄色	/	2.中等黄色	/	2.中等黄色	/
31.种子:种皮开裂比率	2.极低到低	/	2.极低到低	/	1.无或极低	/

\*:必测性状

## 参考文献

- [1] 戴剑,洪德林. 试论 DNA 分子标记技术在植物新品种鉴定中的应用前景. 金陵科技学院学报,2008,24(4): 56-60
- [2] 梁明山,曾宇,周翔,侯留记,李霞. 遗传标记及其在作物品种鉴定中的应用. 植物学通报,2001,18(3): 257-265
- [3] 田清震. 中国野生大豆与栽培大豆 AFLP 指纹分析及生态群体遗传关系研究. 南京:南京农业大学,2000
- [4] 赵洪银,李启云,王玉民. 吉林省大豆骨干亲本及主推品种 DNA 指纹图谱的构建. 中国油料作物学报,2000,22(4): 12-14
- [5] 高明. 吉林省大豆推广品种 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性评价. 长春:吉林农业大学,2008
- [6] 徐海风,程保山,杨加银,沈业松. 黄淮海地区夏大豆品种(系)指纹图谱的构建及其遗传多样性分析. 西南农业学报,2014,27(5): 1814-1819
- [7] 陈亮,郑宇宏,范旭红,孟凡凡,孙星邈,张云峰. 吉林省新育成大豆品种 SSR 指纹图谱身份证的构建. 大豆科学,2016,35(6): 896-901
- [8] 徐冬雪,史晓蕾,闫龙,刘兵强,邸锐,陈强. 河北省区域试验大豆品系指纹图谱构建遗传相似性分析及纯度鉴定. 河北农业科学,2018,22(1): 62-66,70
- [9] 吴艳艳,代德艳,蔡春梅. 一种改良的大豆 DNA 提取方法. 大豆科学,2015,34(1): 112-115
- [10] 邱丽娟. 利用 RAPD 标记鉴定大豆种质. 作物学报,1997,23(4): 408-417
- [11] 崔章林. 中国大豆育成品种及其系谱分析. 1923-1995. 北京:农业出版社,1998

(收稿日期:2019-08-02)