作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2009, 35(5): 816−820 http://www.chinacrops.org/zwxb/
ISSN 0496-3490; CODEN TSHPA9 E-mail: xbzw@chinajournal.net.cn

**DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00816**

# 小豆 SSR 引物在绿豆基因组中的通用性分析

王丽侠 程须珍* 王素华 刘长友 梁 辉

中国农业科学院作物科学研究所资源中心, 北京 100081

摘 要: 分析了 187 对小豆 SSR 引物在绿豆基因组中的可转移性, 以期为绿豆分子遗传育种研究提供分析工具。结果表明, 约 75%的小豆 SSR 引物可在绿豆中有效扩增, 但不同小豆连锁群 SSR 引物的可转移率存在差异。多态性分析发现 80 对引物中有 28 对在 60 份绿豆种质中可以检测到多态性, 等位变异数从 2~7 不等, 平均为 2.9, PIC 指数从 0.02~0.69, 平均为 0.36。UPGMA 聚类及主坐标分析表明, 尽管同一省份的种质不能紧密聚在一起, 但大多在聚类图上成簇状分布, 说明相同来源的绿豆种质具有相似的遗传背景; 此外, 国外及我国边远地区的绿豆种质在遗传背景上与内部省份间存在明显差异。这些多态性 SSR 不仅可以有效用于绿豆分子遗传学研究, 还可以用于不同来源绿豆种质资源的辅助鉴别。

关键词: 小豆; 绿豆; SSR; 可转移性

# Transferability of SSR from Adzuki Bean to Mungbean

WANG Li-Xia, CHENG Xu-Zhen*, WANG Su-Hua, LIU Chang-You, and LIANG Hui

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** Simple sequence repeat (SSR) is a popular tool in genetic studies. Currently, only a few SSR markers are available in mungbean (*Vigna radiata* L.), whereas plenty of SSR markers have been developed in its close relative adzuki bean (*V. angularis* L.). In this study, 187 SSR primer pairs from adzuki bean were tested in mungbean. Approximately 75% of them generated repeatable and clear products in mungbean, indicating a high homology between genomes of the two species. Of the transferable SSR markers, 28 primer pairs generated polymorphic products in 60 mungbean genotypes with a total of 81 alleles. The average polymorphic information content (PIC) value is 0.36. Based on the SSR fingerprints, the 60 accessions can be divided into different groups in agreement with their geographical origins. The exotic accessions were notably separated from the domestic genotypes, indicating the importance of exotic accessions in broadening the Chinese mungbean gene pool. The polymorphic SSR markers identified in this study are effective in genetic study and germplasm resource screening in mungbean.

**Keywords:** Adzuki bean; Mungbean; SSR; Transferability

绿豆(*Vigna radiata*)为豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Papilionaceae)菜豆族(Phaseoleae)豇豆属(*Vigna*)的一个栽培豆种。绿豆除富含蛋白质、维生素、矿质元素等营养物质外, 还具清热解毒等药用价值[1]。随着人们生活水平、健康意识的提高和膳食结构的改变, 国内外对绿豆的需求量也逐渐增加。加强绿豆的遗传育种研究, 发掘新基因、创造新种质, 培育高产、优质、适应性广的绿豆品种尤显重要。然而绿豆遗传研究落后, 表型分析在新基因发掘、种质创新及育种研究中仍起主导地位, 导致这些工作的效率大大降低。因此, 开展绿豆 DNA 分子标记研究, 不仅可以提高上述研究工作的效率, 还可以促进绿豆现代基因组学等深层次研究。

SSR(simple sequence repeat)因其共显性、多态性高、易操作、耗费低等优点, 在多样性分析[2]、基因标记[3]、辅助育种[4]等方面的应用越来越广泛。然而, 目前公开发表的绿豆 SSR 标记数目非常有限[5-8], 且研究表明这些 SSR 引物的多态性较低, 进一步利用受到限制[9]。由于同属于豇豆属的小豆中已经开发了大量 SSR 引物[10], 而且有研究报道 SSR 标记在近缘和非近缘植物基因组间均有一定的通用性[9,11-12]。因此, 本文拟通过 187 对小豆 SSR 引物在绿豆基因

本研究由农业部行业专项(nyhyzx07-017, 3-32), 中央级科研院所社会公益研究专项(082060302-14), 国家自然科学基金项目(30871565)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 程须珍, E-mail: chengxz@caas.net.cn; Tel: 010-62189159

Received(收稿日期): 2008-08-08; Accepted(接受日期): 2008-12-15.

组中的扩增, 为绿豆遗传多样性分析、基因型鉴定、分子标记辅助育种等研究提供手段, 其次为两种作物比较基因组学研究提供一定信息。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

随机从国家种质库中选取 4 份绿豆种质用于 PCR 条件的优化与扩增分析, 4 份小豆种质作对照。从绿豆初选核心样本中随机选取 60 份评价 SSR 引物的多态性水平。这 60 份种质分别来自中国广西(10 份)、中国山西(15 份)、中国山东(11 份)、中国吉林(7 份)、中国新疆(3 份)、中国内蒙古(3 份)、泰国(7 份)、印度(2 份)和菲律宾(2 份)。

### 1.2　SSR 分析

每份参试种质取 3~4 粒种子, 室内发芽, 取刚展开的新鲜叶片提 DNA, 提取方法、PCR 条件优化及凝胶检测程序均参考刘长友等[9]的方法。采用小豆 187 对 SSR 引物, 分布于小豆的 11 个连锁群[10]。PCR 反应体积为 20 μL, 含 1×PCR 缓冲液, 2 mol $L^{-1}$ $MgCl_2$, 100 μmol $L^{-1}$ dNTP, 0.4 mmol $L^{-1}$ 引物, 20 ng DNA, 1 U *Taq* DNA 聚合酶。

### 1.3　数据统计与分析

将 SSR 等位变异按照电泳谱带的“有”、“无”转换为“1”、“0”数据, 利用 NTSYSpc-2.1 以非加权平均法(UPMGA)计算种质间 Nei-Li 遗传相似系数, 并进行聚类及主坐标分析[13], 以评价所获 SSR 数据对不同来源绿豆种质的鉴别能力。

## 2　结果与分析

### 2.1　SSR 引物的可转移性分析

通过不同退火温度试验, 共有 134 对引物可以在绿豆基因组中产生稳定的扩增产物, 占引物总数的 75%左右, 这些通用性引物分布在小豆不同连锁群上(表 1)。其中以第 7 连锁群(LG7)上 SSR 的可转移率最高(100%), 第 8 连锁群 LG8 上 SSR 的可转移率较低(57%)。

表 1　小豆不同连锁群 SSR 标记数目及其可转移性分析

**Table 1　Linkage distribution, number of detected and transferable SSRs**

| 连锁群<br>Linkage group | 总引物数<br>Number of SSRs | 可扩增引物数<br>Number of transferable SSRs |
|---|---|---|
| LG1 | 27 | 24 |
| LG2 | 19 | 14 |
| LG3 | 15 | 12 |
| LG4 | 24 | 21 |
| LG5 | 13 | 10 |
| LG6 | 11 | 7 |
| LG7 | 8 | 8 |
| LG8 | 23 | 13 |
| LG9 | 14 | 10 |
| LG10 | 13 | 8 |
| LG11 | 11 | 7 |

### 2.2　多态性分析

随机选取 80 对引物分析 60 份绿豆种质, 有 28 对引物可以检测到 2 个以上的等位变异, 多态性引物比率占 35%(表 2)。这些多态性引物的等位变异数变化范围 2~7 不等, 平均为 2.9 个, 其中检测到等位变异数最多的位点是第 1 连锁群的 X31; PIC 多样性指数的变化从 0.02 到 0.69, 平均 PIC 值是 0.36, 其中多态性指数最低和最高的分别是位于第 1 连锁群的 X11(0.02)和 X31(0.69)。

### 2.3　种质间的遗传距离分析

基于 UPGMA 聚类分析, 60 份绿豆种质可分为 2 大类(图 1), 第 I 类包括我国华北及其以北地区的种质, 虽然山西、山东、吉林、内蒙古等省份的绿豆种质不能完全分开, 但是同一省份的种质多成簇聚在一起。第 II 类包括国外以及我国广西、新疆的绿豆种质, 但是广西、新疆绿豆种质的遗传背景和国外种质也有较明显差异。上述结果与二维主坐标分析的结果基本一致(图 2), 说明这些 SSR 数据可以用于绿豆资源的鉴别。

不同群体间的遗传关系则更能反映出绿豆种质资源遗传背景与其地理分布的相关性(图 3)。群体间的平均遗传分化系数(Fst=0.40)也揭示了不同来源绿豆种质资源间较高的遗传背景上的差异。

表 2 在 60 份绿豆种质中检测到多态性的小豆 SSR 引物

**Table 2 LG distribution and primer sequence of the polymorphic SSRs detected in 60 mungbean accessions**

| SSR 引物<br>SSR primer | 连锁群<br>(LG) | 引物序列<br>Primer sequence(5′–3′) | SSR 引物<br>SSR primer | 连锁群<br>(LG) | 引物序列<br>Primer sequence (5′–3′) |
|---|---|---|---|---|---|
| X11 | 1 | CACACTCATTTATTCTCACC<br>CTTTACTCTCAACATTTCGC | X60 | 3 | GGAGGAGAAGTCTCGGACC<br>GAGCGTTTTGCACAGTGTTCAC |
| X12 | 1 | ACTGGATGAGGGTTTAGTGCG<br>CTGTCTTGTCTTGTGGGTTCGTTC | X62 | 3 | TGGGCTACCAACTTTTCCTC<br>TGAGCGACATCTTCAACACG |
| X20 | 1 | TCTCTTCCTCTATGGCTTGG<br>GCTCCTCTTTTTGCTGCATC | X65 | 3 | CAACATTTCAACCTTGGGACAG |
| X21 | 1 | AAACATACCCCTGGCAGTTCC<br>TTCTGACCTAAGAAAGAGCCTGG | X81 | 4 | TCTTGTCATTTAGCACTTAGCACG<br>TTGTTGTTTACTAAGAGCCCGTGT |
| X31 | 1 | CAGTTACGAGTCTTGAACTTCAGC<br>CAGCTCTGTACAAAGCTGTAACTG | X87 | 4 | GTCCTTGTTTTCCTCTCCATGG<br>CATCAGCTGTTCAACACCCTGTG |
| X33 | 1 | GGCTGAAGGTGATGACAGAAG<br>GGCACTGGTTTTCTAAGGTTGTTG | X88 | 4 | GCTCTGTCAGTTCCCACTAC<br>GGTCCTGAACCCAGATGAAC |
| X34 | 1 | CGGAAGAAGAACGCAGAGTG<br>GCATCAACAAGGACTTCTGC | X101 | 5 | GGCTCATTGTACCACTGGATAT<br>ATGCCTCCTTTCAGGTGATTGT |
| X39 | 1 | CGATGTCTCTTGCTTCAAGG<br>GTGAAGGACTAGCCAAGTTTG | X102 | 5 | AGCAAATTATTGGATGAAAG<br>TTATTTGGAATACGGATTGT |
| X40 | 1 | GATTGGGAATCTGCTGTTG<br>GTGATCCACACACAGTAC | X109 | 5 | GATTCCCTTCCTAGCTATGG<br>CTGCTGGACATGAAGATTCAG |
| X46 | 2 | AATTGCTCTCGAACCAGCTC<br>GGTGTACAAGTGTGTGCAAG | X113 | 6 | GAAGAAGAACCCTACCACAG<br>CACCAAAAACGTTCCCTCAG |
| X49 | 2 | GGCAGAATCGTACAAGTG<br>GTCAGATTCTCGCTTGCATG | X148 | 8 | CGCGTATTGGTGACTAGGTATG<br>CTTAGTGTTGGGTTGGTCGTAAGG |
| X54 | 2 | GAGGAAGTGTTGCAGCACC<br>GTAGACTCTGCAGAGGGATG | X152 | 8 | GTAGACACTGATCATCACC<br>GACCATCATCGATACGATTC |
| X55 | 2 | GCATATAAGAAAAGCTTATCC<br>CTCTTGGAGTGATTTGATC | X166 | 9 | GCTGACGTAGGTGACAACC<br>CGGCTTGTGCTTCATTGTCTG |
| X56 | 2 | GGTCCCAAAATCACCCAG<br>GGTTCATTTGGAGCACTGAG | X168 | 9 | GTCGTTTCCGGAAACTGTTC<br>GATCCGAACCTCTTTCTGC |

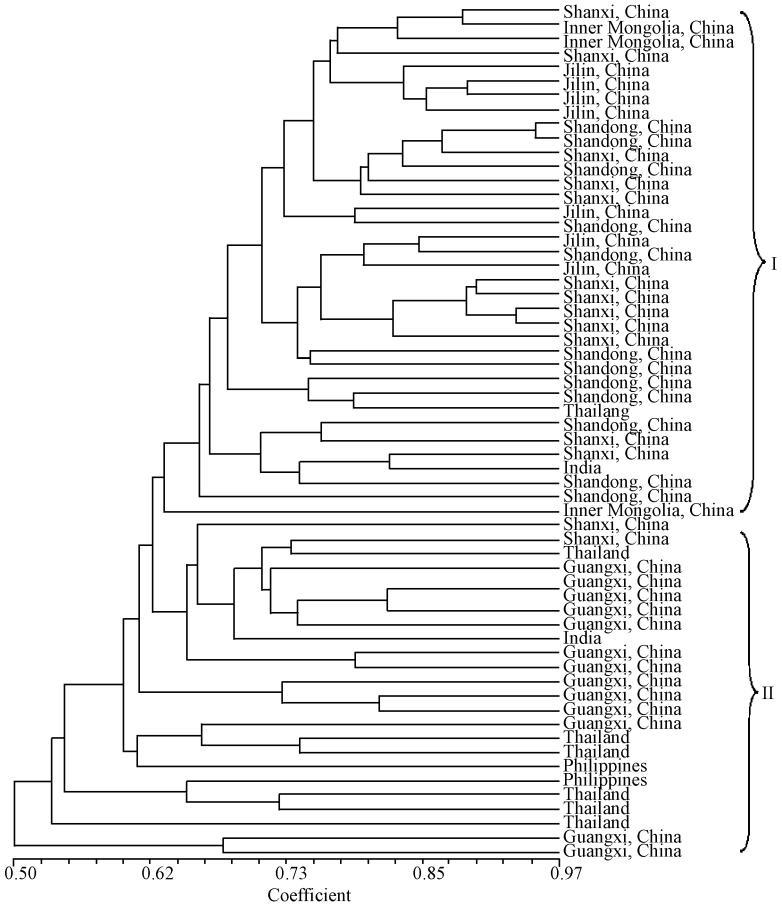


图 1 60 份绿豆种质的 UPGMA 聚类图

**Fig. 1 Dendrogram of 60 mungbean accessions based on UPGMA**

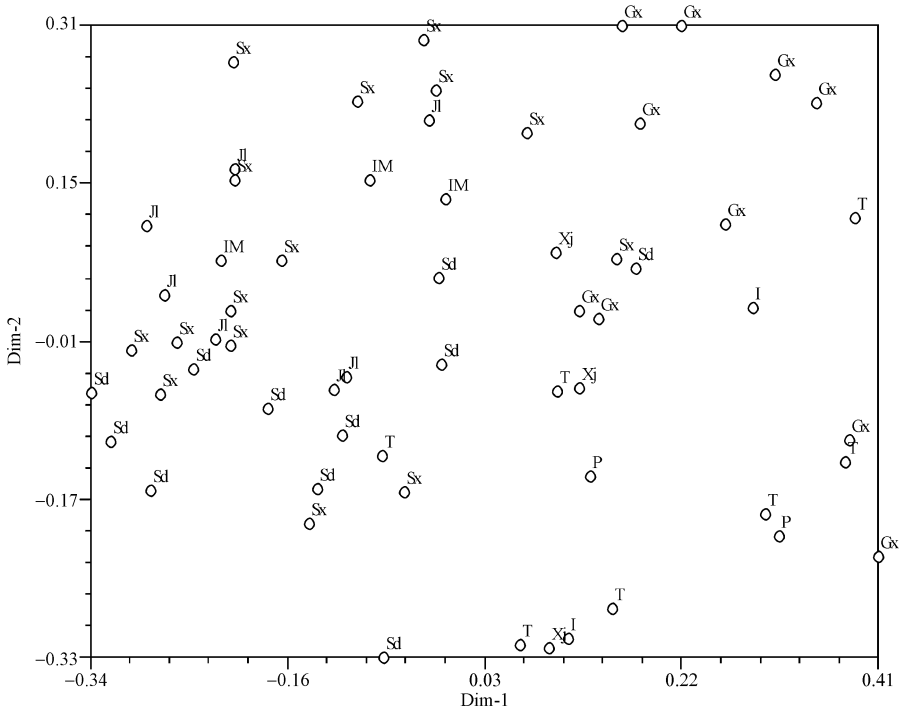


图 2　基于 SSR 数据对 60 个绿豆种质的两维主坐标分析

**Fig. 2　PCOA analysis for 60 mungbean accessions based on the SSR fingerprints**

Sx: Shanxi, China; Sd: Shandong, China; Jl: Jilin, China; Gx : Guangxi, China; T: Taiwan, China; Xj: Xinjiang, China; P: Philippines; IM: Inner Mongolia, China; I: India.

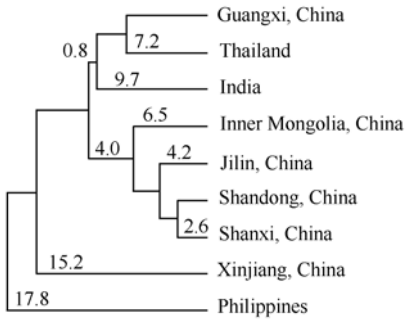


图 3　不同地理来源绿豆群体间遗传关系

**Fig. 3　Relationships among mungbean populations from different geographical regions**

## 3　讨论

种质资源的遗传多样性分析对新基因发掘、制定育种策略以及提高种质资源的收集、保存和利用效率均具重要意义。我国作为绿豆起源地，收集和保存了丰富的绿豆种质资源。然而由于绿豆遗传研究相对落后，可用的特异性 DNA 分子标记有限，遗传多样性评价、遗传关系分析、新基因发掘、种质创新等工作还主要依靠表型性状[14-18]和一些通用型 DNA 标记的分析[19-25]，极大降低了上述工作的效率，限制了我国绿豆种质资源的充分利用。本研究根据基因组进化的保守性，利用绿豆近缘种小豆的 SSR 标记开展绿豆的研究，发现在所分析的小豆 SSR 引物中，75%以上的标记在绿豆基因组可以有效扩增，说明在绿豆遗传研究比较落后的情况下，引用近缘种 SSR 标记进行绿豆遗传分析是便捷可行的方法。进一步分析发现 35%的引物可以检测到多态性，虽然平均等位变异数(2.9)和 PIC 值(0.36)比较低，这可能是所分析种质数量有限所致，增加样本大小，多态性信息含量可能会增加[26]。因此，本研究所获 SSR 标记的利用不仅对绿豆种质资源遗传多样性分析、基因发掘、鉴定、标记辅助选择育种等研究能起极大促进作用，对于绿豆、小豆的比较基因组学等研究也将提供有用的工具。

聚类分析中来源相同的绿豆种质间遗传背景比较相近，说明这些 SSR 标记对绿豆种质资源有一定的鉴别能力。本研究也表明我国华北中部如山西、山东、吉林等省份的绿豆种质遗传背景比较相近，省际间的资源难以完全分开；而我国广西及新疆的种质与其他地方的遗传背景差距比较大，几乎可以单独列为一类；可见我国边远省份绿豆种质资源的收集和利用有待加强。此外，国外材料与我国绿豆种质间存在较大的遗传差异，说明从国外引种对于

拓宽我国绿豆品种的遗传基础，丰富我国绿豆基因库具有重要意义。

## 4 结论

小豆 SSR 标记在绿豆基因组中具有可转移性。这些 SSR 标记对不同地理来源的绿豆种质具有一定的鉴别能力，可以用于遗传多样性评价、遗传关系分析及标记辅助选择育种等工作。

## References


[1] Zheng Z-J(郑卓杰), Wang S-M(王述民), Zong X-X(宗绪晓). Chinese Legumes (中国食用豆类学). Beijing: China Agriculture Press, 1997(in Chinese)

[2] Wang L X, Guan R X, Liu Z X, Chang R Z, Qiu L J. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Sci*, 2006, 46: 1032–1038

[3] Röder M S, Plaschke J, Konig S U, Borner A, Sorrells M E, Tanksley S D, Ganal M W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet*, 1995, 246: 327–333

[4] Sun L, Wang C, Su C, Liu Y, Zhai H, Wan J. Mapping and marker-assisted selection of a brown plant hopper resistance gene *bph2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genet Sin*, 2006, 33: 717–723

[5] Kumar S V, Tan S G, Quah S C, Yusoff K. Isolation and characterization of seven tetranucleotide microsatellite loci in mungbean, *Vigna radiata*. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2: 293–295

[6] Kumar S V, Tan S G, Quah S C, Yusoff K. Isolation of microsatellite markers in mungbean, *Vigna radiata*. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2: 96–98

[7] Miyagi M, Humphry M, Ma Z Y, Lambrides C J, Bateson M, Liu C J. 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. *Theor Appl Genet*, 2004, 110: 151–156

[8] Gwag J G, Chung J W, Chung H K, Lee J H, Ma K H, Dixit A, Park Y J, Cho E G, Kim T S, Lee S H. Characterization of new microsatellite markers in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Mol Ecol Notes*, 2006, 6: 1132–1134

[9] Liu C-Y(刘长友), Cheng X-Z(程须珍), Wang S-H(王素华), Wang L-X(王丽侠), Sun L(孙蕾), Mei L(梅丽), Xu N(徐宁). The screening of SSR and STS markers for genetic diversity analysis of mungbean. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2007, 8(3): 298–302(in Chinese with English abstract)

[10] Han O K, Kaga A, Isemura T, Wang X W, Tomooka N, Vaughan D A. A genetic linkage map for azuki bean (*Vigna angularis* Willd. Ohwi & Ohashi). *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1278–1287

[11] Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the *Genus* and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol*, 1998, 15: 1275–1287

[12] Sharma R K, Gupta P, Sharma V, Sood A, Mohapatra T, Ahuja P S. Evaluation of rice and sugarcane SSR markers for phylogenetic and genetic diversity analyses in bamboo. *Genome*, 2008, 51: 91–103

[13] Rohlf F J. NTSYS-pc2.1 numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: State University of New York, 1992

[14] Bisht I S, Mahajan R K, Patel D P. The use of characterisation data to establish the Indian mungbean core collection and assessment of genetic diversity. *Genet Res Crop Evol*, 1998, 45: 127–133

[15] Han F-X(韩粉霞), Li G-Y(李桂英). Correlation analysis between main agronomical traits of mungbean. *North China J Agric Sci* (华北农学报), 1998, 13(4): 66–69(in Chinese with English abstract)

[16] Bhattacharya A, Vijaylaxmi. Genetic diversity in mungbean: Phenological, physiological and yield forming traits. *Legume Res*, 2005, 28: 1–6

[17] Chattopadhyay K, Ali M N, Sarkar H K, Mandal N, Bhattacharyya S. Diversity analysis by RAPD and ISSR markers among the selected mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) genotypes. *Indian J Genet Plant Breed*, 2005, 65: 173–175

[18] Chen X(陈新), Yan J-Y(严继勇), Gao B(高兵), Zhang Z-M(张智民), Shrivies P. The evaluation on traits of $F_1$ plants between diverse parents. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), 2006, (5): 34–35(in Chinese)

[19] Cheng X-Z(程须珍), Yang C Y. Studies on relationships among species in mungbean groups using RAPD markers. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2001, 34(2): 216–218(in Chinese with English abstract)

[20] Afzal M A, Haque M M, Shanmugasundatam S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of selected mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) cultivars. *Asian J Plant Sci*, 2004, 3: 20–24

[21] Ma L-P(马丽萍), Cheng X-Z(程须珍), Zhang H(张辉). Study on AFLP marker related to bruchid resistance gene in wild mungbean germplasm TC1966. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 2005, 8(5): 629–633(in Chinese with English abstract)

[22] Cheng X Z, Wang S H, Wu S Y, Zhou J H, Wang S M, Yang C Y. Tagging and utilization bruchid resistance gene using PCR markers in mungbean. *Agric Sci China*, 2005, 4: 579–583

[23] Selvi R, Muthiah A R, Manivannan N, Raveendran T S, Manickam A, Samiyappan R. Tagging of RAPD marker for MYMV resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Asian J Plant Sci*, 2006, 5: 277–280

[24] Soehendi R, Chanprame S, Toojinda T, Srinives P. Inheritance and AFLP tagging of leaflet mutants in mungbean (*Vigna radiate* L. Wilczek). *Kasetsart J*, 2006, 40: 566–572

[25] Sun L(孙蕾), Cheng X-Z(程须珍), Wang S-H(王素华), Wang L-X(王丽侠), Liu C-Y(刘长友), Mei L(梅丽), Xu N(徐宁). Heredity analysis and gene mapping of bruchid resistance of a mungbean cultivar V2709. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 41(5): 1297–1307(in Chinese with English abstract)

[26] Wang L X, Guan Y, Guan R X, Li Y H, Ma Y S, Dong Z M, Liu X, Zhang H Y, Zhang Y Q, Liu Z X, Chang R Z, Xu H M, Li L H, Lin F Y, Luan W J, Yan Z, Ning X C, Zhu L, Cui Y H, Piao R H, Liu Y, Chen P Y, Qiu L J. Establishment of Chinese soybean (*Glycine max*) core collections with agronomic traits and SSR markers. *Euphytica*, 2006, 151: 215–223