

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00223

绿豆基因组 SSR 引物在豇豆属作物中的通用性

钟 敏 程须珍* 王丽侠 王素华 王小宝

中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘 要: 分子标记的种间通用性可降低其开发成本, 提高利用效率, 也有助于促进遗传研究较薄弱物种的分子遗传学研究。本文选取绿豆、小豆、豇豆及饭豆材料各 3 份, 分析 1 205 对新开发的绿豆基因组 SSR 引物在这些材料中的扩增效果, 结果显示绿豆基因组 SSR 引物在豇豆、小豆和饭豆中的通用性比率分别为 50.0%、73.3%和 81.6%; 多态性比率分别为 4.1%、1.7%和 1.5%; 在 4 个种间均通用的引物 469 对。这些通用性 SSR 引物将有助于这 4 种食用豆类在多样性评价、连锁图谱的构建、基因定位及比较基因组学等方面的研究。

关键词: 豇豆属; SSR; 通用性

Transferability of Mungbean Genomic-SSR Markers in Other *Vigna* Species

ZHONG Min, CHENG Xu-Zhen*, WANG Li-Xia, WANG Su-Hua, and WANG Xiao-Bao

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

Abstract: Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.), mungbean (*V. radiata* L. Wilczek), rice bean [*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi], and adzuki bean (*V. angularis* Willd. Ohwi and Ohashi) are major food legumes in China. At present, SSR markers for genetic analysis of these legumes are much limited. Transferability analysis of primers has the vital significance to reduce their development cost and improve their development efficiency. In this study, 1 205 SSR primers were tested for their transferability and polymorphism by PCR amplification with the genomic DNA of four *Vigna* species, cowpea, adzuki bean, mungbean and rice bean. The results indicated that the transferability rate of mungbean genomic-SSR in cowpea, adzuki bean and rice bean was 50.0%, 73.3%, and 81.6%, and the ratio of polymorphism SSR primers in these crops was 4.1%, 1.7%, and 1.5%, whereas 32.0% in mungbean. A total of 469 mungbean genomic-SSR primers were detected to be highly transferable among different species of *Vigna*. The transferability of mungbean genomic-SSR was higher in adzuki bean and rice bean than in cowpea. These transferable markers are useful for further genetic and breeding studies in these species.

Keywords: Genus *Vigna*; SSR; Transferability

绿豆(*Vigna radiata*)、小豆(*Vigna angularis*)、豇豆(*Vigna unguiculata*)和饭豆(*Vigna umbellata*)均属于豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Papilionaceae)菜豆族(Phaseoleae)豇豆属(*Vigna*)^[1], 是我国的主要栽培食用豆类, 其资源丰富、种类繁多, 在增加我国农产品出口、改善饮食以及调整种植结构等方面发挥了重要作用^[2]。然而, 由于一直被视为小作物, 它们的基础研究起步晚、起点低, 尤其是在分子遗传研究方面与水稻、玉米、大豆等大作物相比仍非常薄弱。

微卫星 DNA (microsatellite DNA, 又称 SSR)是

一类由几个(多为 1~6 个)碱基组成的串联重复序列, 基于微卫星序列的微卫星引物, 是一种基于 DNA 长度多态性的分子标记技术, 具有共显性、可重复性、多态性丰富等优点, 是构建遗传连锁图谱^[3]、基因定位^[4]、种质资源的多样性分析^[5]和分子标记辅助育种(MAS)^[6]等的理想工具。

近年来, 众多研究表明 SSR 引物在近缘植物乃至远缘植物基因组间有一定的通用性, 并基于这些通用性引物进行了比较基因组学方面的研究^[2,7]。Sharma 等^[8]分析发现 98 对水稻 SSR 引物和 20 对甘

本研究由北京市自然科学基金项目(6103025), 国家食用豆产业技术体系建设项目(nycytx-18), 食用豆行业科技专项(nyhyzx07-017)和农业部作物种质资源保护项目资助(NB10-2130135-25-09)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 程须珍, E-mail: chengxz@caas.net.cn, Tel: 010-62180535

第一作者联系方式: E-mail: zhongmin1987@126.com

Received(收稿日期): 2011-07-07; Accepted(接受日期): 2011-10-12; Published online(网络出版日期): 2011-12-01.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20111201.0922.015.html>

蔗 EST-SSR 引物在 23 份竹子中的通用性分别为 44.9% 和 75%; 王小国等^[9]分析发现小麦基因组 SSR 引物在大麦、燕麦、小黑麦和三芒草等早熟禾亚科植物的通用性分别为 73.2%、82.9%、87.8% 和 85.4%; 李楠等^[10]分析发现 940 对 SSR 引物在甜瓜、黄瓜和西瓜中的通用性均超过 24%。可见, 在近缘植物间进行 SSR 引物的通用性分析是有效可行的。目前公开发表的绿豆^[11-14]、小豆^[3]、豇豆^[15]和饭豆的 SSR 引物均有限, 且多态性水平较低^[2,16-17], 限制了豇豆属各栽培种的深入研究。新标记的开发与利用必将有力促进这些近缘作物的遗传育种研究。

磁珠富集法是探针杂交法的一种^[18], 用生物素标记重复序列特异探针与基因组酶切片段杂交, 利用生物素与链亲和素亲和性强的特性, 用包被链亲和素的磁珠进行磁力吸附完成重复序列目标片段的富集, 富集的片段经洗脱、测序后, 根据 SSR 两端的保守序列设计引物^[19], 以其快速、高效和经济等特点而在众多动植物 SSR 引物的开发中广泛应用^[20]。因而磁珠富集法可作为从绿豆基因组中分离 SSR 的一种简单而又高效的方法。

本文分析了 1 205 对磁珠富集法开发的绿豆 SSR 引物在小豆、豇豆和饭豆中的通用性, 将有效节约豇豆属 SSR 引物的开发成本, 为绿豆、小豆、豇豆和饭豆等豇豆属作物的种质资源保护、遗传多样性及比较基因组学研究提供一个强有力的、高效的检测手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从国家种质库选取绿豆、小豆、豇豆及饭豆材料各 3 份。绿豆材料分别为澳大利亚野生绿豆 ACC41、栽培种 Berken 和 ATF3640; 豇豆材料分别为俄罗斯引进种 1344、1345 和 1347; 小豆材料为分别 B0134、B0139 和 B0153; 饭豆材料分别为中国江西地方种 2010-3-16、2010-3-18 和中国云南地方种 2009-7-26。

1.2 SSR 引物来源

利用磁珠富集法开发的绿豆 SSR 引物 2 240 对, 包括单核苷酸单元重复序列引物(P1) 1 090 对, 二核苷酸单元重复序列引物(P2) 350 对, 三核苷酸单元重复序列引物(P3) 800 对。引物均由北京博迈德生物技术有限公司合成。

1.3 DNA 提取

分别取各材料的 5 粒种子种植于温室, 出苗后约

15 d 取其幼嫩叶片, 采用改良的 CTAB 法提取 DNA^[21]。

1.4 PCR 扩增

PCR 扩增反应总体积 10 μ L, 含 30 ng 基因组 DNA, 1 \times Taq buffer (20 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.8; 10 mmol L⁻¹ KCl; 10 mmol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂; 0.1% Triton X-100), 1 mmol L⁻¹ dNTPs, 上下游引物各 0.25 μ mol L⁻¹ 和 1 U Taq DNA polymerase。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51~55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。整个反应在东胜 EDC-810 PCR 扩增仪上进行。

1.5 扩增产物的检测

用 8% 的聚丙烯酰胺非变性凝胶电泳分离扩增产物, 在 200 V 恒压下电泳, 根据 SSR 分子量大小及差异带型的可辨程度调整电泳时间。将凝胶用蒸馏水洗涤 2 次后, 用 0.2% 的 AgNO₃ 溶液染色 10 min, 蒸馏水洗涤 2 次后用 1.5% NaOH 加 0.5% 甲醛溶液显影至条带清晰, 蒸馏水洗涤 2 次后读带。在每个物种一份或一份以上材料中能扩增出清晰条带, 即认为该引物在该物种中能够有效扩增。

2 结果与分析

2.1 绿豆基因组 SSR 引物的筛选

2 240 对绿豆基因组 SSR 引物中有 1 205 对在绿豆材料中能有效扩增(图 1), 有效扩增率为 53.8% (表 1)。其中 P1 有效扩增 633 对, 有效扩增率为 58.1%; P2 有效扩增 135 对, 有效扩增率为 38.6%; P3 有效扩增 437 对, 有效扩增率为 54.6%。表明在绿豆基因组 SSR 引物中, 不同核心单元重复类型的 SSR 引物的有效扩增率有明显差别, 单核苷酸重复类型和三核苷酸重复类型引物的扩增成功率高于二核苷酸重复类型的 SSR 引物。

2.2 绿豆基因组 SSR 引物的通用性分析

分析得到的 1 205 对成功扩增的绿豆基因组 SSR 引物在豇豆属其他作物中的通用性, 其中, P1 在豇豆中成功扩增 288 对(表 2), 小豆中成功扩增 442 对, 饭豆成功扩增 490 对, 在饭豆中的扩增成功率最高, 为 77.4%; P2 在豇豆中成功扩增 87 对, 小豆中成功扩增 109 对, 饭豆成功扩增 91 对, 在小豆扩增成功率最高, 为 80.7%; P3 在豇豆中成功扩增 228 对, 小豆中成功扩增 332 对, 饭豆成功扩增 402 对, 在饭豆中扩增成功率最高, 为 92.0%。

在豇豆属其他物种的通用性比率 P1 引物平均为 64.2%, P2 引物平均为 70.9%, P3 引物平均为 73.4%。

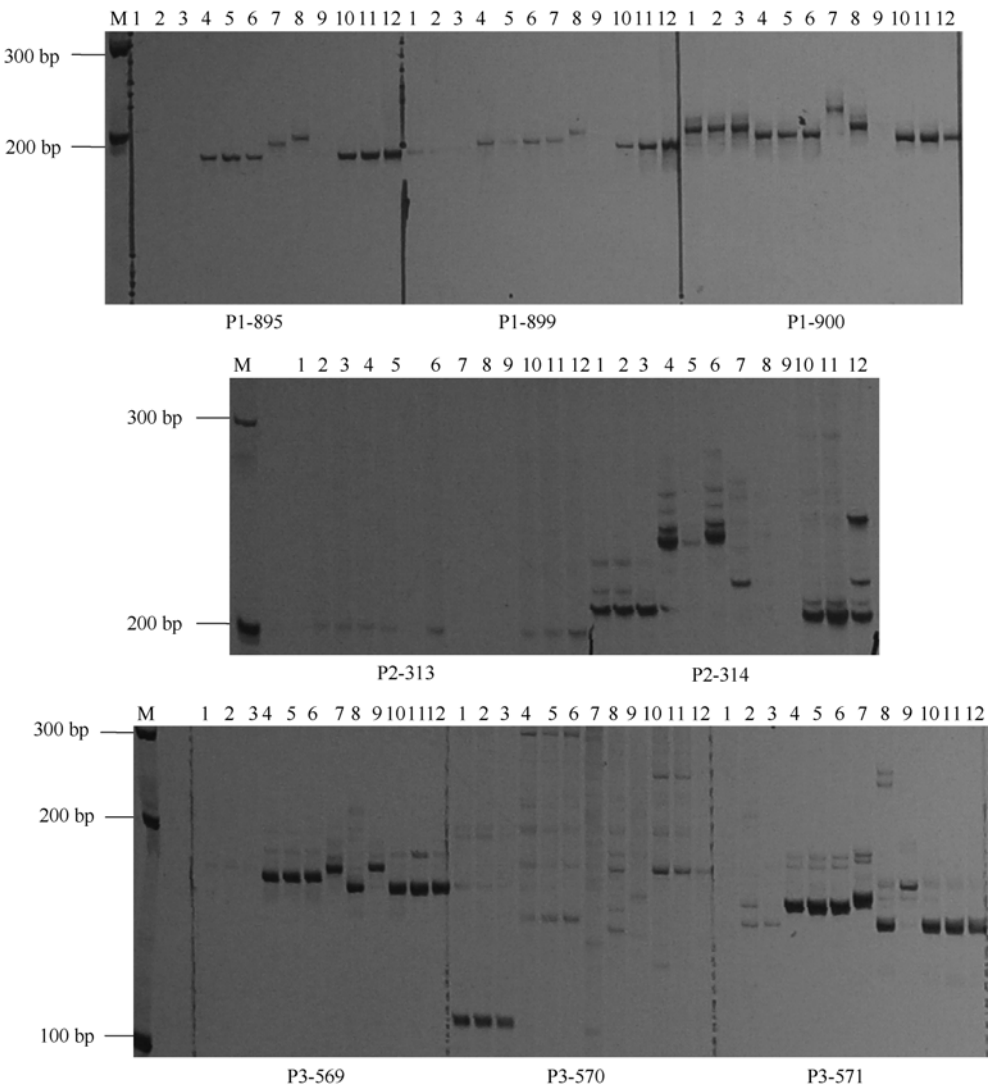


图 1 部分绿豆基因组 SSR 引物(P1、P2 和 P3)在豇豆属 4 个物种中的扩增图
Fig. 1 Amplification of some mungbean genomic-SSR markers with different repeats (P1, P2, and P3) in four *Vigna* species
1~3: 豇豆材料; 4~6: 小豆材料; 7~9: 绿豆材料; 10~12: 饭豆材料。
1-3: cowpea; 4-6: adzuki bean; 7-9: mungbean; 10-12: rice bean.

表 1 不同核心单元重复类型的绿豆基因组 SSR 引物在绿豆中的扩增
Table 1 Amplification of mungbean genomic-SSR markers with different nucleotide repeats in mungbean

SSR 类型 Core motif of SSR	引物数目 No. of primer pairs	扩增引物数 No. of amp- lication primers	有效扩 增率 Ratio (%)
Mono-nucleotide repeat (P1)	1090	633	58.1
Di-nucleotide repeat (P2)	350	135	38.6
Tri-nucleotide repeat (P3)	800	437	54.6
Total	2240	1205	53.8

表明不同核心单元重复类型的绿豆基因组 SSR 引物的通用性有差异, 三核苷酸重复类型 SSR 引物的通

用性比率高于二核苷酸重复类型和单核苷酸重复类型 SSR 引物。

绿豆基因组 SSR 引物在豇豆中共成功扩增 603 对, 在小豆中共成功扩增 883 对, 在饭豆中共成功扩增 983 对。比较这些 SSR 引物在豇豆(50.0%)、小豆(73.8%)和饭豆(81.6%)中的通用性比率, 发现绿豆基因组 SSR 引物在饭豆中的通用性比率最高, 小豆中次之, 豇豆中最低, 绿豆基因组 SSR 引物在小豆和饭豆的通用性比率相近且都远高于在豇豆中的通用性比率。

在分析的 1 205 对绿豆基因组 SSR 引物中, 共有 469 对引物在豇豆属其他 3 个种中具有通用性, 占

表 2 不同核心单元重复类型的绿豆基因组 SSR 引物在豇豆、小豆和饭豆中的通用性比率

Table 2 Transferability rate of mungbean genomic-SSR with different nucleotide repeats in cowpea, adzuki bean, and rice bean

SSR 类型 Core motif of SSR	引物数目 No. of primer pairs	通用引物数(比率) No. of transferable primers (ratio)		
		豇豆 Cowpea	小豆 Adzuki bean	饭豆 Rice bean
Mono-nucleotide repeat (P1)	633	288 (45.5%)	442 (69.8%)	490 (77.4%)
Di-nucleotide repeat (P2)	135	87 (64.4%)	109 (80.7%)	91 (67.4%)
Tri-nucleotide repeat (P3)	437	228 (52.2%)	332 (76.0%)	402 (92.0%)
Total	1 205	603 (50.0%)	883 (73.3%)	983 (81.6%)

38.9%。其中, P1 引物 229 对, 占 P1 引物总数的 36.2%; P2 引物 43 对, 占 P2 引物总数的 31.9%; P3 引物 197 对, 占 P3 引物总数的 45.1%。表明不同核心单元重复类型的 SSR 引物在豇豆属其他种中均可通用的概率有差异, P3 引物的概率高于 P1 引物和 P2 引物的概率, 这与不同类型绿豆基因组 SSR 引物在豇豆属其他物种中的通用性比率一致。

2.3 SSR 引物的多态性分析

绿豆基因组 SSR 引物在绿豆中共有 314 对表现出多态; 在豇豆中有 25 对表现出多态; 在小豆中有 15 对表现多态; 在饭豆中有 15 对表现出多态(表 3)。在绿豆中的多态性比率为 32.0%, 扩增到豇豆、小豆和饭豆中的多态性比率分别为 4.1%、1.7%和 1.5%。部分在豇豆属种间表现多态的 SSR 引物见表 4。

表 3 SSR 引物在豇豆属 4 个种内的多态性分析

Table 3 Polymorphism analysis of SSR primers amplification in four *Vigna* species

物种 Species	引物总数 No. of primers	多态性扩增 的引物数目 No. of polymorphic primers	比率 Ratio (%)
豇豆 Cowpea	603	25	4.1
小豆 Adzuki bean	883	15	1.7
绿豆 Mungbean	1205	386	32.0
饭豆 Rice bean	983	15	1.5

3 讨论

3.1 绿豆基因组 SSR 引物的通用性

来自绿豆基因组的 SSR 引物尚有 1 035 对没有成功扩增, 一方面由于用于筛选 SSR 引物的绿豆材料较少(3 份), 这些材料与用于开发绿豆基因组 SSR 标记的基因组 DNA 可能有一定的遗传距离; 另一方面根据基因组 SSR 位点设计 SSR 引物时不可避免会遇到 GC 含量过高, 形成二聚体或发卡结构等, 这些因素均会影响 PCR 使引物不能有效扩增; 再者 PCR

和电泳等技术环节也会对实验结果有一定的影响, 如同一引物在不同物种中的 PCR 体系和退火温度可能不一样。

在成功扩增的 1 205 对绿豆基因组 SSR 引物中, 仅在绿豆种内得到有效扩增而在供试的豇豆属其他种间不具有通用性的引物有 216 对(17.9%)。可能由于这些 SSR 位点为绿豆基因组特有, 只在绿豆中有扩增产物。这些品种特异引物有可能在绿豆野生种和近缘种的分类和鉴别中发挥作用。

SSR 引物的通用性在一定程度上依赖于近缘物种之间 SSR 侧翼序列的保守性和进化过程中 SSR 的稳定性。SSR 两端的侧翼序列在生物的基因组中特别是在具有高度近亲关系的种间具有不同程度的保守性, 许多研究都表明微卫星侧翼序列在属内种间和亲缘关系较近的属间是相当保守的, 并且亲缘关系越近, 通用性越高。Gaspero 等^[22]用葡萄的 11 对 SSR 引物对其 3 个栽培种、真葡萄亚属和原叶葡萄亚属内的 14 个种及其近缘属爬山虎属内的五叶地锦扩增, 10 对引物在被检测的葡萄属种中获得条带, 7 对引物在五叶地锦中扩增成功, 说明微卫星侧翼序列在葡萄属内高度保守。Rossetto 等^[23]将 3 个葡萄的 EST-SSR 引物用于葡萄科内 4 个属 8 个种的扩增, 发现微卫星位点的保守性可使它们在许多近缘种的遗传学研究中通用, 同时还指出少量位点侧翼序列的变异性可有效地区别近缘种, 并能用于检测近缘种间的进化关系。本研究中绿豆基因组 SSR 引物在豇豆中的通用性比率(50.0%)明显低于在小豆(73.3%)和饭豆(81.6%)中的通用性比率, 且在小豆和饭豆中的通用性比率差别较小, 可能是由于小豆、饭豆和绿豆同属于豇豆属 *Ceratotropis* 亚属(亚洲亚属), 而豇豆属于 *Vigna* 亚属, 小豆、饭豆同绿豆之间的亲缘关系较豇豆与绿豆的亲缘关系更近, 因而同源序列更多, 扩增成功率更高。根据这个结果可以推测在所分析的豇豆属 3 个物种中, 饭豆与绿豆的亲缘关系最近, 小豆次之, 而豇豆最远。

在豇豆属 4 个种间均可通用的 469 对引物中, 有

表 4 部分多态性 SSR 引物信息
Table 4 Description of the polymorphic primers

多态性引物编号 Code of primers	多态性材料 Polymorphic material	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temp. (°C)	目标片段大小 Fragment size (bp)
P1-24	Cowpea	(T) ₁₀	F: TGCAAAAAATTCACCAAAGCA R: GGCCTCCATCCATACTTGAA	55	268
P1-32	Cowpea	(A) ₁₀	F: TGATGTCCCCTCATGGGTAT R: TACGAAGCGAACAACATTGC	55	232
P1-38	Cowpea	(G) ₁₁	F: CGTGGTGAGAAGTCCACTGA R: AGTGTGTTTCGGATCCTTGG	55	248
P1-42	Cowpea	(A) ₁₀	F: GCCTTCTGCAACTTTTCCA R: TTTACCGGTGCACCTTTTTC	55	199
P1-44	Cowpea	(A) ₁₀	F: TGTGAAAAATACACGGCGAA R: GCGTAGGATCTTTTTGATCTGA	54	216
P1-49	Cowpea	(A) ₁₀	F: TCGAGGACAATTGTATTTGACA R: CGGTTTGCAGATTGTCTCT	54	209
P1-52	Rice bean	(A) ₁₀	F: CAGGCTAGTGATTGAGGACACA R: TCAAACCCCATCAACAGACA	55	141
P1-64	Cowpea, rice bean	(A) ₁₀	F: CGACAATGAGAGGGGTCTC R: TAGTTTTTGTGGCGTGCAG	55	159
P1-65	Rice bean	(A) ₁₀	F: TGGTCCCCTCTCCACTATG R: TGGGACTTTGTTGGCTCCTA	55	298
P1-70	Rice bean	(A) ₁₀	F: CATTAAGGAAGCAGGAAGCG R: TCAAGTAGCACCCATCCTCA	55	140
P1-79	Rice bean	(A) ₁₀	F: TGTGAGCTCTATTGTGGCCTT R: GCCTACTTCAGTCCCAAGTA	55	284
P1-80	Cowpea	(A) ₁₀	F: TGCTTTCTGGGTGATCTCAA R: TGACAACGCATTCAATTCCT	55	184
P1-93	Cowpea	(A) ₁₀	F: AGGCCAAAGAATTTGTGCTG R: TTGTTACTCCAACTCACATGG	54	104
P1-123	Cowpea, adzuki bean	(A) ₁₀	F: GGAAGCACGTTTTGTTCCCT R: GCGCACATATACACGCAGAG	55	209
P1-125	Adzuki bean	(A) ₁₀	F: CGAATCATTGGTTTAACTGAATAAC R: AGATCCATCGACCTGAGACG	54	79
P1-137	Cowpea, adzuki bean, rice bean	(A) ₁₀	F: GCACTTGAAGAAAAACCGA R: GTGCGTGATGATGTTTGCTT	54	217
P1-683	Rice bean	(A) ₁₄	F: CGAGGTGCATTTGAAGAAA R: ATTATTCTCGTTTGGTTGG	54	175
P1-691	Adzuki bean	(T) ₁₀	F: CTCAGTTTGTGACAGCCGAA R: TCAATTGGTGCTAGTCTGTCA	54	153
P1-984	Adzuki bean	(T) ₁₀	F: CCCGTAAAAATCGGGAAAAAT R: GGTGGTGAGACTTGGCTAGG	55	189
P1-1047	Rice bean	(A) ₁₁	F: GGAGACGAGACGTGTGACAA R: AACGATTCATTGTGCCATCA	55	182
P2-6	Cowpea, adzuki bean	(AC) ₆	F: AAAACACACGCACACACACC R: TGTTTGTGTTTATGTGGCGA	54	155
P2-12	Cowpea, adzuki bean	(GA) ₁₅	F: AAAAGCATCCAAACGGAACA R: CACCCTCGTGTTCCTATCTTCTC	55	147
P2-24	Cowpea, adzuki bean	(GA) ₁₅	F: AAACCATTAATGCAGTCAAGCA R: TCAAGTTGGGTAGTCGGATTC	54	129
P2-26	Cowpea, adzuki bean, rice bean	(AC) ₆	F: AAACGCAAAAACCCAAAC R: TGGGTGGGTGTGAGAGTGTA	55	102
P2-27	Cowpea, adzuki bean	(TC) ₁₄	F: AAACGCAGTCCCCTAACTT R: CGGTACGTAACGAACAAACAAA	55	129
P2-38	Cowpea, adzuki bean	(GT) ₁₀	F: AAATGACTTGGAGAGAGGGCT R: TTTGCACTAGAGAATAGTTCACAAA	54	113
P2-39	Cowpea, adzuki bean, rice bean	(AC) ₆	F: AAATGCCAAACCGAAATGAG R: GCGGCCAATCTTGAAGTTT	55	127
P2-41	Adzuki bean	(AC) ₆	F: AAATTAGGGGATCCGCATGT R: TGC GTGTGTGTTTGTGTTT	55	150
P2-44	Cowpea, adzuki bean	(GA) ₉	F: AAATTGGGTAAAGGCCAG R: TTTTCCTATCTCGCTCCCTC	55	131
P2-45	Cowpea	(GA) ₁₃	F: AACAAACCAAGTGGGTGGAG R: GCCATTATCAGGGACACGAG	55	139
P2-48	Cowpea, adzuki bean, rice bean	(AC) ₆	F: AACACACAAACCCACCC R: TGTGTTGTGTATGTATGAGTGTGTG	54	147
P2-55	Adzuki bean	(AG) ₁₃	F: AACGCCCCAAGTAAAAACAA R: TTTGTTTGGTGGTGTGTTCA	55	101

(续表 4)

多态性引物编号 Code of primers	多态性材料 Polymorphic material	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temp. (°C)	目标片段大小 Fragment size (bp)
P2-86	Adzuki bean	(AC) ₇	F: ACACACACATGCACCGAAAC R: TGTGTTGTGTTTGTATAATTACGTGTG	55	117
P3-125	Adzuki bean	(TGC) ₅	F: CGAGAGGCTGTTGTTGTTGA R: CTCACCTTCCGCTCCCT	55	109
P3-435	Rice bean	(TTG) ₅	F: GGGTTGGTTGTGGAAAACAT R: ACGCACCATAGCTTCTGCTT	55	141
P3-581	Rice bean	(TTC) ₁₀	F: CCTCCACACCCTCCCTTTAT R: GGTGGTGTTCATGCTGTGT	55	167
P3-687	Adzuki bean	(CAA) ₆	F: TAGCAACAGCAGGAAAAGCA R: TGTGTTGTGTTGTTGTTGTG	54	182
P3-697	Cowpea	(GAA) ₅	F: TTACCCGTTGGAGGAAACAG R: CTCCATCGTCCAGACAAACA	54	176
P3-724	Rice bean	(GAG) ₆	F: ATCATTGATCCCCCTCATCA R: CCATCGCAAAATCACAAGAA	55	183
P3-750	Rice bean	(TGC) ₅	F: GAAAGTCTGATCCAGCTCCG R: TATGGAGGGTCCGTCATCTC	55	190
P3-753	Cowpea	(GAA) ₅	F: GATCTGAAGGGTGATCGGAA R: CGTTGGATTGGAGGCAGTAT	55	184
P3-754	Rice bean	(GAT) ₆	F: GATGACGATGAGGATGAGGG R: CTGGACTGCAAGGTTGTCCT	55	184
P3-776	Rice bean	(TTG) ₆	F: GTTGCTGTTGTTGTTGCGTT R: CTCACCTACGCTCTGTGACG	54	195

220 对在这 4 个种中扩增出一致的带型, 表明豇豆属这 4 个物种在进化过程中 SSR 侧翼序列在属内高度保守, 并且进化非常稳定; 有 249 对引物扩增出的产物在种间表现差异, 片段的大小和数目差异较大, 表明这些 SSR 引物在绿豆的近缘种间具丰富的多态性。这个结果说明豇豆属的这 4 个种在进化过程中仍保留了大量同源序列, 这些序列在进化过程中部分发生了变异, 部分极为保守。

很多研究表明, 在植物中三核苷酸单元重复类型的 EST-SSR 引物的通用性最高^[24-26]。本研究中, 三核苷酸单元重复类型的基因组 SSR 引物通用性比率(73.4%)高于二核苷酸单元重复类型的基因组 SSR 引物通用性比率(70.9%)和单核苷酸单元重复类型的基因组 SSR 引物通用性比率(64.2%), 表明在绿豆中, 三核苷酸单元重复类型的基因组 SSR 引物通用性也最高。

目前, 豇豆属作物中可用的 SSR 标记还非常有限, 因而利用在近缘种中已开发的大量 SSR 标记进行本物种的遗传分析是非常便捷和经济的。赵丹等^[4]研究发现小豆、黑吉豆、菜豆和豇豆 SSR 引物在绿豆中有效扩增率分别为 65%、72%、42%和 30%; 王丽侠等^[27]在分析小豆 SSR 引物在绿豆基因组中的通用性时, 发现 75%的小豆 SSR 引物可在绿豆中有效扩增。本实验中绿豆基因组 SSR 引物在饭豆、小豆和豇豆中的通用性比率分别为 81.6%、73.3%和 50.0%, 与上述数据相比, 开发的绿豆基因组 SSR 引

物在豇豆属种间具有较高的通用性, 也说明在豇豆属近缘种间筛选通用性 SSR 引物是高效可行的。

3.2 绿豆基因组 SSR 引物的多态性

本研究得到的绿豆 SSR 引物多态性比率(32.0%)较赵丹等^[4]得到的绿豆 SSR 引物多态性比率(5.8%)以及刘长友等^[28]筛选到的绿豆 SSR 引物多态性比率(14.6%)都高出许多。表明所筛选的绿豆基因组 SSR 引物的多态性较好, 这可能与选取的 3 份绿豆材料的地理来源及材料差异性有关, 1 份为澳大利亚野生种, 2 份为栽培种, 差异较大。绿豆 SSR 引物在豇豆属其他作物中的多态性较低, 主要可能由于所用筛选材料的有限, 每个种内仅选取了 3 份材料, 且 3 份材料均为随机挑选的栽培种, 材料间的差异较小。若要进一步分析这些引物在豇豆属其他种中的多态性, 可一方面增加筛选材料的数量, 另一方面选择品种间性状差异较大的材料, 如国外和国内材料, 野生和栽培材料。

当前对豇豆、小豆、绿豆和饭豆等食用豆类作物基因组信息了解和研究较少, 整个豇豆属的研究还处于较落后的水平, 本研究获得的通用性引物将为继续深入开展豇豆属作物研究提供帮助, 尤其是在种质资源的收集、保存、多样性分析和评价鉴定以及高密度遗传连锁图谱的构建中具有重要意义。鉴于豆科比较基因组学的研究结果认为豆科植物中亲缘关系较近的物种间广泛存在染色体同线性^[29-30], 可以利用这些 SSR 标记在各种图谱上的锚定作用,

在不同物种的遗传图谱和连锁群间比较研究, 从而揭示不同基因组的结构特征及相互之间的关系。并可以进一步将这些通用性引物转移至其他豇豆属乃至豇豆属外的作物中, 促进不同作物之间的比较基因组学研究。

4 结论

筛选出 1 205 对可在绿豆种内或种间有效扩增的绿豆基因组 SSR 引物, 其在豇豆属饭豆、小豆和豇豆中的通用性比率分别为 81.6%、73.3%和 50.0%, 多态性比率分别为 1.5%、1.7%和 4.1%, 在绿豆中的多态性比率达 32.0%。这些 SSR 引物将有助于豇豆属作物的遗传变异分析、多样性分析、遗传图谱构建及比较基因组学等研究。

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: Chinese Agriculture Press, 1997. pp 3–6 (in Chinese)
- [2] Cheng X-Z(程须珍), Wang S-H(王素华). The Development and Technology Application in Chinese Mungbean Industry (中国绿豆产业发展及科技应用). Beijing: Chinese Science and Technology Agriculture Press, 2002. pp 3–8 (in Chinese)
- [3] Han O K, Kaga A, Isemura T, Wang X W, Tomooka N, Vaughan D A. A genetic linkage map for adzuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1278–1287
- [4] Zhao D(赵丹), Cheng X-Z(程须珍), Wang L-X(王丽侠), Wang S-H(王素华), Ma Y-L(马燕玲). Integration of mungbean (*Vigna radiata*) genetic linkage map. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(6): 932–939 (in Chinese with English abstract)
- [5] Wang L-X(王丽侠), Cheng X-Z(程须珍), Wang S-H(王素华), Liang H(梁辉), Zhao D(赵丹), Xu L(徐宁). Genetic diversity of adzuki bean germplasm resources revealed by SSR markers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(10): 1858–1865 (in Chinese with English abstract)
- [6] Fazio G, Chung S M, Staub J E. Comparative analysis of response to phenotypic and marker-assisted selection for multiple lateral branching in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 875–883
- [7] Lim G A, Jewell E G, Li X, Erwin T A, Love C, Batley J, Spanenberg G, Edwards D. A comparative map viewer integrating genetic maps for *Brassica* and *Brabidopsis*. *Plant Biol*, 2007, 7: 40–45
- [8] 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
- [9] Wang X-G(王小国), Liang H-Y(梁红艳), Zhang W(张薇). General use analysis in pooideae of SSR marking coming from the wheat gene set. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2007, 22(4): 155–157 (in Chinese with English abstract)
- [10] Li N(李楠), Zhang H-Y(张海英), Chen N-L(陈年来), Wang Y-J(王永健), Xu Y(许勇), Gong G-Y(宫国义), Guo S-G(郭绍贵). Comparison of versatility and polymorphism of SSRs in three cucurbitaceae. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2008, 23(4): 110–114 (in Chinese with English abstract)
- [11] 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
- [12] 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
- [13] 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
- [14] 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
- [15] Xu Y-H(徐雁鸿), Guan J-P(关建平), Zong X-X(宗绪晓). Genetic diversity analysis of cowpea germplasm resources by SSR. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(7): 1206–1209 (in Chinese with English abstract)
- [16] Xu N(徐宁), Cheng X-Z(程须珍), Wang S-H(王素华), Wang L-X(王丽侠), Zhao D(赵丹). Advances in research on germplasm resources of adzuki bean (*Vigna angularis*). *J Plant Genet Res* (植物遗传资源学报), 2008, 9(3): 392–396 (in Chinese with English abstract)
- [17] Gupta S K, Gopalakrishna T. Development of unigene-derived SSR markers in cowpea (*Vigna unguiculate*) and their transferability to other *Vigna* species. *Genome*, 2010, 53: 508–523
- [18] Kandpal R P, Kandpal G, Weissman S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 88–92
- [19] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*, 2002, 11: 1–16
- [20] Chen H-Q(陈怀琼), Sui C(隋春), Wei J-H(魏建和). Summary of strategies for developing SSR primer. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2009, 7(4): 845–851 (in Chinese with English abstract)
- [21] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11–15
- [22] Di Gaspero G, Peterlunger E, Testolin R, Edwards K J, Cipriani G. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 301–308
- [23] Rossetto M, McNally J, Henry R J. Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in Vitaceae. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 61–66

- [24] Wen M-F(文明富), Chen X(陈新), Wang H-Y(王海燕), Lu C(卢诚), Wang W-Q(王文泉). Transferability analysis of cassava EST-SSR and genomic-SSR markers in jatropha and rubber tree. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2011, 37(1): 74–78 (in Chinese with English abstract)
- [25] Chen H M, Li L Z, Wei X Y, Li S S, Lei T D, Hu H Z, Wang H G, Zhang X S. Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat. *Chin Sci Bull*, 2005, 50: 2328–2336
- [26] Li L Z, Wang J J, Guo Y, Jiang F S, Xu Y F, Wang Y Y, Pan H T, Han G Z, Li R J, Li S S. Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat. *Prog Nat Sci*, 2008, 18: 1485–1490
- [27] Wang L-X(王丽侠), Cheng X-Z(程须珍), Wang S-H(王素华), Liu C-Y(刘长友), Liang H(梁辉). Transferability of SSR from adzuki bean to mungbean. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(5): 816–820 (in Chinese with English abstract)
- [28] 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 Res* (植物遗传资源学报), 2007, 8(3): 298–302 (in Chinese with English abstract)
- [29] Humphry M E, Konduri V, Lambrides C J, Magner T, McIntyre C L, Aitken E A B, Liu C J. Development of a mungbean [*Vigna radiate* L.) Wilczek] RFLP linkage map and its comparison with lablab (*Lablab purpureus*) reveal a high level of colinearity between the two genomes. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 160–166
- [30] Boutin S R, Young N D, Olsen T C, Yu Z H, Shoemaker R C, Vallejos C E. Genome conservation among three legume genera detected with DNA markers. *Genome*, 1995, 38: 928–937