

大豆种质资源苗期耐盐鉴定及遗传多样性分析

林峰, 赵慧艳, 史飞飞, 高鹏, 刘晨煦, 岳阳, 金昕, 张意德, 李永光, 韩英鹏,

赵雪, 滕卫丽

(东北农业大学农学院/大豆生物学教育部重点实验室/农业农村部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要: 盐碱地是边际土壤的主要类型之一, 利用边际土地耕作是减缓耕地紧缺的有效途径。为筛选耐盐性较强的大豆种质资源, 提高盐碱土地大豆产量, 本研究对 392 份来自国内外不同地域的大豆种质资源, 采用 150 mmol L⁻¹ NaCl 进行苗期盐胁迫处理, 利用单株分类记载法进行苗期耐盐性鉴定, 计算盐害指数, 确定耐盐等级, 并利用聚丙烯酰胺凝胶电泳对高耐及耐盐等级大豆种质资源进行分子辅助鉴定及遗传多样性分析, 应用多态性信息含量分析、相似性系数分析、聚类分析等方法对高耐及耐盐等级大豆种质资源进行综合评价。结果表明: 筛选出 58 份高耐及耐盐大豆种质资源, 包括高耐大豆种质资源赤豆 1 号、东农 69 等 14 份, 耐盐大豆种质资源黑农 51、黑河 35 等 44 份; 利用 Sat_091、Satt339 等 10 个与耐盐基因连锁的 SSR 分子标记对 58 份大豆种质资源进行分子辅助鉴定, 平均鉴定效率为 43.45%, 平均准确率为 68.46%, 其中分子标记 Satt462 和 Satt201 鉴定效率最高, 为 60.34%, 分子标记 Satt201 准确率最高, 为 96.55%; 聚类分析表明, 58 份大豆种质资源间的相似性系数在 0.5385~0.9231 之间, 平均值为 0.6974, 相关系数为 0.6240, 说明 58 份大豆种质资源大部分遗传关系较近, 遗传多样性较低, 58 份耐盐大豆种质资源并非按地域进行聚类, 但一个类群或亚群中大部分种质资源来源地在地理位置上相同或较为接近, 可从中筛选亲缘关系较远的大豆种质资源作为亲本, 为耐盐育种的亲本选配提供依据, 也为培育耐盐大豆新品种奠定遗传基础。

关键词: 大豆; 苗期; 盐胁迫; 分子辅助鉴定; 遗传多样性分析

Identification of Salt-tolerant Germplasm Resources in Soybean Seedlings and Genetic Diversity Analysis

LIN Feng, ZHAO Huiyan, SHI Feifei, GAO Peng, LIU Chenxu, YUE Yang, JIN Xin, ZHANG Yide, LI Yongguang, HAN Yingpeng, ZHAO Xue, TENG Weili

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University/ Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese of Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150030)

Abstract: Saline soil is one of the main types of marginal soil, and the use of marginal land for farming is an effective way to slow down the shortage of arable land. In order to screen soybean germplasm resources with strong salt tolerance and improve soybean yield in saline soils. In this study, 392 soybean germplasm resources from different geographic regions at home and abroad were treated with 150 mmol L⁻¹ NaCl for seedling salt stress, seedling salt tolerance was identified using the single-plant classification and documentation method, the salt damage index was calculated, the salt tolerance grade was determined, and molecular-assisted identification and genetic diversity analysis were performed using polyacrylamide gel electrophoresis on soybean germplasm resources with high tolerance and tolerance salt grades. Polymorphism information content analysis, similarity coefficient analysis, cluster analysis and other methods were applied to comprehensively evaluate the soybean germplasm resources of high tolerance and tolerance salt grades. The results showed that 58 high tolerance and salt-tolerant soybean germplasm resources were screened, including 14 high tolerance soybean germplasm resources, such as Chi Dou 1, Ji Yu 303 and Dong Nong 69, and 44 salt-tolerant soybean germplasm resources, such as Hei Nong 51, Hu Jiao 11-359 and Hei He 35. The SSR molecular markers linked to salt

第一作者研究方向为大豆遗传育种, E-mail: 1520491419@qq.com

通信作者: 滕卫丽, 研究方向为大豆遗传育种与生物技术, E-mail: twlneau@163.com

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1201103-01-03); 财政部、农业农村部现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-04-PS04)

Foundation projects: National Key Research and Development Project Program (2021YFD1201103-01-03); Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Development Special Funds Program for the Construction of Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-04-PS04)

tolerance genes, such as Sat_091 and Satt339, were useful for the identification and genetic diversity analyses of 58 soybean germplasm resources screened. The average identification efficiency was 43.45% and the average accuracy was 68.46%, of which the molecular markers Satt462 and Satt201 had the highest identification efficiency of 60.34% and the molecular marker Satt201 had the highest accuracy of 96.55%. Cluster analysis showed that the similarity coefficients among the 58 soybean germplasm resources ranged from 0.5385 to 0.9231, with an average value of 0.6974 and a correlation coefficient of 0.6240, indicating that most of the 58 soybean germplasm resources were genetically close, and the genetic diversity was relatively low, and that the 58 soybean germplasm resources were not clustered geographically, but most of them were geographically identical or had the same place of origin in a taxon or subgroup. However, most of the germplasm resources in a taxon or subgroup were geographically the same or relatively close to each other. Soybean germplasm resources that were distantly related to each other can be selected as parents, which will provide a basis for the selection of parents for salt-tolerant breeding, and will also lay a genetic foundation for breeding new salt-tolerant soybean varieties.

Key words: soybean; seedling; salt stress; molecular assisted identification; genetic diversity analysis

高产、优质、稳产、适应性强、现代化和机械化是 21 世纪农作物的基本要求^[1]。大豆是我国供求矛盾较为突出的油粮作物，也是世界各国常用的油料作物之一，其油脂、蛋白含量较为突出^[2]。相较于其它作物，大豆属于中等耐盐作物，盐害会降低大豆产量，高盐环境甚至会导致大豆凋亡。目前，在中国西北地区、东北地区和滨海地区盐碱土地面积较大，严重影响我国北方地区大豆的产量与品质^[3]，培育高产、稳产、优质的耐盐大豆品种是解决这一问题的关键所在。

简单重复序列标记（SSR， Simple Sequence Repeats）又称微卫星序列标记（MS， Microsatellite Sequence），是一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术。由于它具有多态性高、重复性好、稳定性好、可靠性高、简便快捷、实验成本较低等优点，在分子育种中被广泛应用。田蕾^[4]利用 6 对 SSR 引物对 145 份大豆种质进行耐盐性分子标记辅助选择分析，共检测耐盐特有等位变异 16 个，盐敏感特有等位变异 26 个。李雪华^[5]对 12 份大豆品种进行 ⁶⁰Co γ 射线诱变，并对筛选出的耐盐性突变体进行 SSR 标记分析，筛选出一个相关标记 Satt193。Kan 等^[6]对 196 份大豆地方品种组成的自然群体进行检测，通过关联定位，共检测到 22 个简单序列重复序列（SSR）位点。遗传多样性研究是作物改良的基础，作物种质资源遗传多样性发掘对育种成败起决定性作用^[7]。向艳涛等^[8]利用 212 对 SSR 引物对 84 份来自中国和日本的毛豆种质进行聚类分析，结果表明，该毛豆种质资源遗传多样性丰富度较低，遗传背景单一。李琼等^[9]利用 42 对 SSR 引物对 50 份来自黄淮海地区大豆种质资源进行遗传多样性分析，通过非加权组平均法（UPGMA）聚类分析，结果表明，50 份黄淮海地区大豆种质资源遗传多样性丰富度北部高于南部。Jeevan 等^[10]利用 35 对 SSR 引物对 29 份大豆种质材料进行遗传多样性分析，共检测 34 个等位基因，SSR 引物多态信息含量（PIC）值在 0.0640~0.6890 之间。

虽有学者对大豆种质资源在苗期、芽期进行耐盐表型鉴定及分子辅助鉴定，以筛选耐盐大豆种质资源，但对耐盐大豆种质资源进行 SSR 分子辅助鉴定与遗传多样性分析少之又少，对耐盐大豆种质资源间的遗传关系研究尚有不足。本研究对 392 份大豆种质资源进行苗期耐盐性鉴定，初步筛选耐盐种质资源，利用 10 个与耐盐基因连锁和 20 个在大豆基因组中均匀分布的 SSR 标记，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行耐盐性分子辅助鉴定和遗传多样性分析，进一步筛选耐盐大豆种质资源，明确其相互间的遗传关系，以期从中选取亲缘关系较远的耐盐大豆种质资源，为培育耐盐大豆品种提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以 372 份国内大豆种质资源（图 1）和 20 份国外大豆种质资源为基础材料，由东北农业大学收集并保存。材料分布情况如下：黑龙江省 257 份，吉林省 42 份，辽宁省 16 份，内蒙古 22 份，北京 18 份，河北省 7 份，山东省 4 份，湖北省 2 份，天津、新疆、浙江省以及甘肃省各 1 份，国外 20 份。

1.2 方法

1.2.1 苗期耐盐性鉴定

参考刘谢香等^[11]和 Guan 等^[12]建立的大豆苗期耐盐鉴定方法，将 392 份大豆种质资源盆栽播种于东北农业大学抗旱棚内，每份大豆种质资源分为处理组与对照组播种于育苗钵中，对生真叶完全展开时对对照组进行 2 L 150 mmol L⁻¹ NaCl 盐处理，对处理组进行 2 L 蒸馏水处理，每 3 d 处理一次，共处理三次，最后一次处理 5 d 后根据单株分类记载法^[12]进行叶面枯萎程度调查（表 1），并计算盐害指数（表 2），依据盐害指数值判定不同大豆种质资源苗期耐盐等级（图 1）。于对照组采摘高耐和耐盐等级大豆种质资源新鲜嫩叶，存入-80 °C冰箱，留待提取 DNA 使用。

表 1 大豆苗期耐盐胁迫分级划分标准

Table 1 Classification criteria for salt stress tolerance grading in soybean seedlings

耐盐级别	表型特征
Salt tolerance grade	Phenotypic characterization
1	健康的绿叶，没有观察到损伤
2	轻度坏死，真叶轻微发黄
3	中度坏死，三出复叶发黄
4	严重坏死，超过 75%叶面发黄
5	凋亡，植物完全枯萎

盐害指数计算公式：

$$\text{盐害指数} = \frac{\sum(\text{耐盐级别} \times \text{该级别株数})}{\text{株数总和} \times 5(\text{最高耐盐级别})} \times 100$$

表 2 大豆苗期耐盐等级划分标准

Table 2 Criteria for classifying salt tolerance in soybean seedlings

盐害指数 (%)	耐盐等级
Salinity index	Salt tolerance class
0.0~20.0	高耐
20.1~40.0	耐盐
40.1~60.0	中耐
60.1~80.0	敏感
80.1~100.0	高敏



A: 高耐大豆种质资源中黄 50; B: 耐盐大豆种质资源合丰 50; C: 高敏大豆种质资源黑农 66; 左侧为处理组, 右侧为对照组。

A: high tolerant soybean germplasm resource Zhonghuang 50; B: salt tolerant soybean germplasm resource Hefeng50; C: high sensitive soybean germplasm resource Heinong 66; the left side is the treatment and the right side is the control.

图 1 盐胁迫处理下高耐、耐盐与高敏大豆种质资源的比较

Fig. 1 Comparison of high tolerance, salt tolerance and high sensitivity soybean germplasm resources under salt stress treatment

1.2.2 大豆 DNA 的提取

将鉴定出的高耐和耐盐大豆种质资源叶片从-80 °C冰箱取出, 按照 CTAB 法^[13]提取 DNA。采用核酸蛋白分光光度计检测 DNA 浓度, 稀释至 100 ng/μL, 存入-20 °C冰箱备用。

1.2.3 引物

采用张海燕等^[14]和胡雯恬^[15]研究中与大豆耐盐基因连锁的 10 对 SSR 引物对耐盐大豆种质资源进行分子辅助鉴定 (表 3)。根据弟文静^[16]的研究, 并结合 <https://soybase.org/>网站选取平均分布在大豆 20 条染色体上的 20 对多态性较高的 SSR 引物用于遗传多样性分析, 由北京睿博兴科生物技术有限公司合成 (表 4)。

表 3 用于分子辅助鉴定的与耐盐基因连锁的 SSR 标记

Table 3 SSR markers linked to salt tolerance genes for molecular assisted characterization

标记名称	标记序列 (5'-3')
Marker name	Marker sequence (5'-3')
Sat_091	Forward: CTTCTGGATAGTTGGGACTGATA Reverse: GGAACAGGTCGTGAAAAGTTAT
Satt339	Forward: TAATATGCTTTAAGTGGTGTGGTTATG Reverse: GTTAAGCAGTTCCTCTCATCACG
Sat_162	Forward: GCGTGGTTTTTCGCTGGATATA Reverse: GCGCATTTTCGTAACATATTTTTCAC
Satt239	Forward: GCGCCAAAAAATGAATCACAAT Reverse: GCGAACACAATCAACATCCTTGAAC
Satt462	Forward: GCGGTCACGAATACAAGATAAATAATGC Reverse: GCGTGCATGTCAGAAAAAATCTCTATAA
Satt281	Forward: AAGCTCCACATGCAGTTCAAAAC Reverse: TGCATGGCACGAGAAAGAAGTA
Satt237	Forward: GCGTGATTTC AATCCTTTTTTC Reverse: GCGGTTGTCCTGTTAGAACCT
Satt636	Forward: GTCATGACTCATGAGTCACGTAAT Reverse: GCTGCATATCCACTCTCATTGACT
Satt588	Forward: GAGCCAAAACCAAAGTGAAGAAC

Satt201

Reverse: CCAACTAATCCCAGGGACTTACTT
Forward: GCGTTGATACTTTCCTAAGACAAT
Reverse: GGGAGAGAAGGCAATCTAA

表 4 用于遗传多样性分析的 SSR 标记

Table 4 SSR markers used for genetic diversity analysis

标记名称	染色体	标记序列（5'-3'）
Marker name	Chromosome	Marker sequence（5'-3'）
Satt184	1	Forward: GCGCTATGTAGATTATCCAAATTACGC Reverse: GCCACTTACTGTTACTCAT
Satt141	2	Forward: CGGTGGTGGTGTGCATAATAA Reverse: CCGTCATAAAAAGTCCCTCAGAAT
Sat_379	3	Forward: GCGTTTTGGCTCATCTTTCTTTTA Reverse: GCGGCCCTAAGCACAACTGAACCTAT
Satt396	4	Forward: GCGAAAAGGGATAAGTTTAAAAAT Reverse: GCGGGCCTGTAAAGGGATTCC
Satt211	5	Forward: GAAAAAGCCCACATCCAA Reverse: CATGGGCATGCAGTAACA
Satt643	6	Forward: CGGGATAAATAGAAGTGGAACA Reverse: TTGGCAAATGTGAAATGTATA
Satt551	7	Forward: GAATATCACGCGAGAATTTTAC Reverse: TATATGCGAACCTCTTACAAT
AW132402	8	Forward: GCGCCTCCCTCCTCTCCTTTCTT Reverse: GCGTTTCCCACATATTCTATCATTTGTT
Satt242	9	Forward: GCGTTGATCAGGTCGATTTTATTGT Reverse: GCGAGTGCCAACTAACTACTTTTATGA
Satt262	10	Forward: GCGCCCCATTAATGTTAACACA Reverse: GCGGAGTTCAACGCATTACCTT
Satt453	11	Forward: GCGGAAAAAAAAACAATAACAACA Reverse: TAGTGGGGAAGGGAAGTTACC
Satt279	12	Forward: GCGCAAAAGGACGCCCACCAATAG Reverse: GCGGTGATCGGATGTTATAGTTTCAG
Satt072	13	Forward: GGAAAGAATCAGCAAAAT Reverse: CCCCCACATAAATAATAAA
Satt168	14	Forward: CGCTTGCCCCAAAAATTAATAGTA Reverse: CCATTCTCCAACCTCAATCTTATAT
Satt685	15	Forward: ATCGTGGCATGTCTCACTAC Reverse: GAGGCGGAAGGAAATCTAAT
Satt674	16	Forward: GCGAATCCTCTAGCTTACCAAAGAA Reverse: GCGATTAGCCATCAAAACCTAT
Satt301	17	Forward: GCGAAACACTCCTAGTTGATTACAAA Reverse: GCGATATAATGCACAAAGAAATTAAAGA
Satt309	18	Forward: GCGCCTTCAAAATTGGCGTCTT Reverse: GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT
Satt373	19	Forward: TCCGCGAGATAAATTCGTAAAAT Reverse: GGCCAGATACCCAAGTTGTACTTGT
Satt571	20	Forward: GGGTAGGGGTGGAATATAAG Reverse: GCGGGATCCGCGGATGGTCAAAG

1.2.4 PCR 扩增及电泳

采用 20 μL PCR 反应体系，Buffer 2 μL ， Taq 酶和 dNTP 各 0.3 μL，上下游引物各 1 μL，双蒸水 13.4

μL，模板 DNA 2 μL。反应程序：95 °C预变性 5 min，94 °C变性 30 s，55 °C退火 30 s，72 °C延伸 30 s，共循环 38 次，72 °C延伸 10 min，4 °C冰箱保存。PCR 产物采用 6% PA 胶聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测，电压 1500 V~1800 V 进行电泳，时长 2 h。银染法染色，显影后拍照记录。

1.2.5 数据分析

对电泳图片进行条带读取，将每个等位变异作为一个位点，在该位点相同位置，有条带记为“1”，无条带记为“0”，录入 Excel 得到矩阵。运用 Excel 软件进行数据统计分析，计算与耐盐基因连锁的 SSR 引物的鉴定效率和准确率，计算用于遗传多样性分析 SSR 引物的多态信息含量^[17]。将矩阵录入 NTSYS 2.10e 软件中，计算得到供试材料的遗传相似性系数和距离矩阵。运用 NTSYS 2.10e 和 MEGA-X 采用非加权组平均法（UPGMA）和邻接法（NJ）进行亲缘关系聚类分析，并绘制树状图，通过 ITOL 在线软件对聚类图进行美化。

$$\text{鉴定效率 (IE\%)} = \frac{\text{耐盐位点数}}{\text{总位点数}} \times 100$$

$$\text{准确率 (CR\%)} = \frac{\text{耐盐位点数} + \text{盐敏感位点数}}{\text{总位点数}} \times 100$$

$$\text{多态信息含量 (PIC)} = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

2 结果与分析

2.1 大豆种质资源苗期耐盐性鉴定

本试验对 392 份大豆种质资源盐胁迫处理后，获得耐盐表型鉴定结果，其中中耐大豆种质资源数量最多，为 132 份，高耐大豆种质资源数量最少，为 14 份，不同耐盐等级大豆种质资源呈现正态分布（图 2）。通过苗期耐盐表型鉴定，获得 58 份高耐和耐盐等级大豆种质资源，其中黑龙江育成种质资源 26 份，占比最大，为 44.83%；其次为北京育成种质资源 11 份，占比 18.97%。在 58 份大豆种质资源中，东北地区（黑龙江、吉林、辽宁）育成种质资源数量最多，为 36 份，占比 62.07%；黄淮海地区（北京、山东、河北）育成种质资源 13 份，占比 22.41%；其它地区（新疆、内蒙古）育成种质资源 7 份，占比 12.06%；国外育成种质资源 2 份，占比 3.45%。以 Williams82 和铁丰 8 号作为盐敏感与耐盐对照，编号分别为 1 和 2，通过表型鉴定筛选的 58 份大豆高耐和耐盐等级大豆种质资源（以下统称耐盐大豆种质资源）随机编号为 3~60（表 6），进行 SSR 标记分子辅助鉴定和遗传多样性分析。

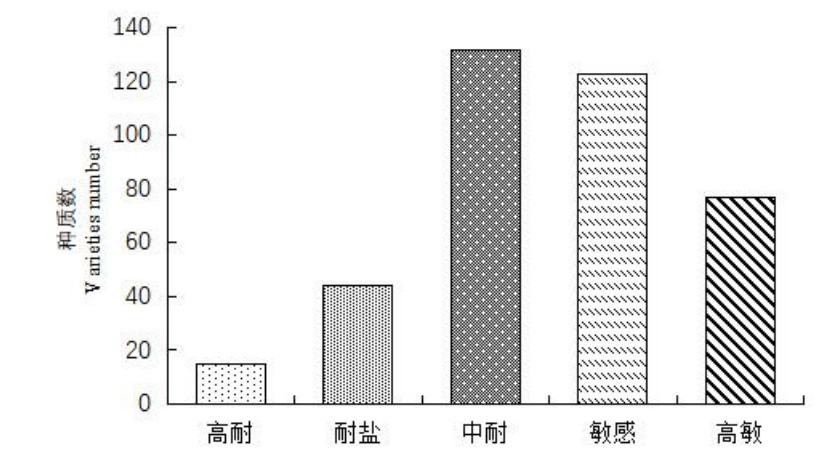


图2 392份大豆种质资源耐盐等级数量分布

Fig.2 Distribution of salinity tolerance levels of soybean germplasm resources

表 6 58 份耐盐大豆种质资源

Table 6 58 salt-tolerant soybean germplasm resources

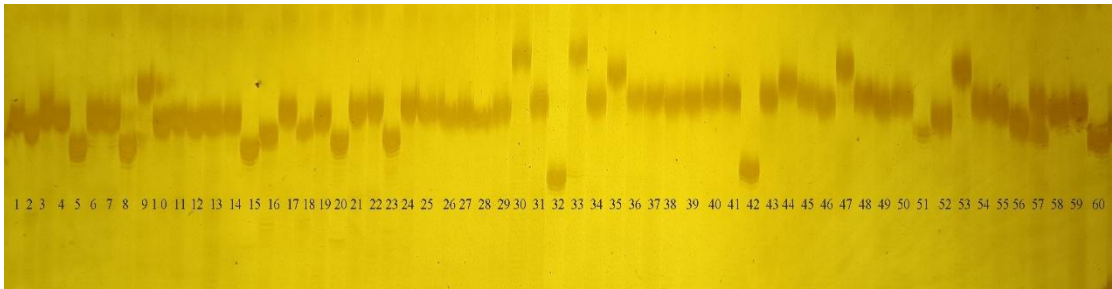
序号 No.	种质名称 Varieties name	来源地 Origin	耐盐等级 Salt tolerance class	序号 No.	种质名称 Varieties name	来源地 Origin	耐盐等级 Salt tolerance class
1	Williams82	国外	HS	31	中品 03-5334	北京	T
2	铁丰 8 号	辽宁	HT	32	中黄 10 号	北京	T
3	黑农 51	黑龙江	T	33	小白脐	辽宁	T
4	克北 1 号	黑龙江	T	34	中作 00-683	北京	T
5	绥农 1 号	黑龙江	T	35	赫尔松 2 号	国外	HT
6	合丰 29	黑龙江	T	36	四粒黄	吉林	T
7	中品 03-5179	北京	T	37	抗线 3 号	黑龙江	T
8	铁丰 31	黑龙江	T	38	九农 21	吉林	T
9	中黄 908	北京	T	39	东农 46	黑龙江	T
10	呼交 11-359	内蒙古	T	40	嫩丰 15	黑龙江	T
11	黑河 35	黑龙江	T	41	垦丰 14	黑龙江	HT
12	黑农 71	黑龙江	T	42	昌吉黄豆	新疆	T
13	黑农 48	黑龙江	T	43	白城秣食豆	吉林	T
14	合丰 50	黑龙江	T	44	大粒黑豆	山东	T
15	长农 38	吉林	T	45	黑河 48	黑龙江	T
16	长农 33	吉林	HT	46	中作 GHJ14403	北京	T
17	吉育 252	吉林	HT	47	中黄 901	内蒙古	T
18	赤豆 1 号	内蒙古	HT	48	宝丰 8 号	黑龙江	T
19	吉育 303	吉林	HT	49	蒙豆 12	内蒙古	T
20	农大 38	黑龙江	T	50	呼交 11-322	内蒙古	T
21	农大 23	黑龙江	T	51	呼交 10-206	内蒙古	T
22	龙豆 5 号	黑龙江	HT	52	登科 1 号	内蒙古	T
23	中黄 75	北京	HT	53	黑河 54	黑龙江	T
24	中黄 50	北京	HT	54	黑河 51	黑龙江	HT
25	中黄 48	天津	HT	55	抗线 5 号	黑龙江	T
26	中黄 44	北京	T	56	丰收 12	黑龙江	T

27	东农 69	黑龙江	HT	57	吉林小粒 4 号	吉林	T
28	东大 2 号	黑龙江	T	58	垦农 18	黑龙江	T
29	L-9	国外	T	59	吉育 71	吉林	HT
30	五星 4 号	河北	HT	60	黑农 61	黑龙江	T

HT: 高耐; T: 耐盐; MT: 中耐; S: 敏感; HS: 高敏
HT: High Tolerance; T: Tolerance; MT: Medium Tolerance; S: Sensitive; HS: High Sensitivity

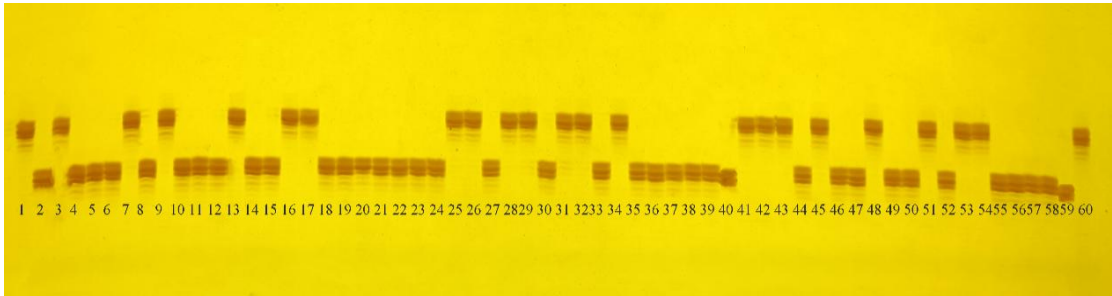
2.2 58 份大豆种质资源分子辅助鉴定分析

10 个与耐盐基因连锁的 SSR 标记共检测到 42 个等位变异（表 7），鉴定效率在 17.24%~60.34%之间，鉴定准确率在 46.55%~96.55%之间。其中检测到 6 个等位变异的 SSR 分子标记有 1 个，为 Satt462，鉴定效率为 60.34%，鉴定准确率为 77.59%；检测到 5 个等位变异的 SSR 分子标记有 2 个，分别为 Satt281 和 Satt588，鉴定效率为 46.55%和 48.28%，鉴定准确率为 65.52%和 72.41%；检测到 4 个等位变异的 SSR 分子标记有 5 个，分别为 Sat_091、Satt339、Satt239、Satt237 和 Satt588，鉴定效率在 17.24%~44.83%，鉴定准确率在 46.55%~72.41%之间；检测到 3 个等位变异的 SSR 分子标记有 2 个，分别为 Sat_162 和 Satt201，鉴定效率为 17.24%和 60.34%，鉴定准确率为 79.31%和 96.55%。10 个与耐盐基因连锁的 SSR 分子标记对 58 份耐盐大豆种质资源的平均鉴定效率为 43.45%，平均准确率达 68.46%，检测等位变异数最多的 SSR 标记为 Satt462（图 3），检测到 6 个等位变异；鉴定效率最高的 SSR 标记为 Satt462 和 Satt201，鉴定效率为 60.34%；鉴定准确率最高的 SSR 标记为 Satt201（图 4），鉴定准确率为 96.55%。以上结果对分子辅助鉴定大豆耐盐种质资源具有一定的利用价值。



1: Williams82; 2: 铁丰 8 号; 3-60: 58 份高耐和耐盐大豆种质资源
1: Williams82; 2: Tiefeng 8; 3-60: 58 high tolerance and tolerance salt soybean germplasm resources
图 3 Satt462 在 58 份大豆种质资源中的多态分布

Figure 3 Polymorphic distribution of Satt462 in 58 soybean germplasm resources



1: Williams82; 2: 铁丰 8 号; 3-60: 58 份高耐和耐盐大豆种质资源
1: Williams82; 2: Tiefeng 8; 3-60: 58 high tolerance and tolerance salt soybean germplasm resources
图 4 Satt201 在 58 份大豆种质资源中的多态分布

Figure 4 Polymorphic distribution of Satt201 in 58 soybean germplasm resources

表 7 耐盐基因连锁的 SSR 标记对大豆种质资源的等位变异分布及鉴定准确率

Table 7 Allelic variation distribution and identification accuracy of salt-tolerant gene linked SSR markers on soybean germplasm resources

等位变异 Alleles	种质数 No.	鉴定效率 (%) Identification of efficiency	准确率 (%) CR	等位变异 Alleles	种质数 No.	鉴定效率 (%) Identification of efficiency	准确率 (%) CR
Sat_091-1	19	32.76	46.55	Satt281-1	27	46.55	65.52
Sat_091-2	8			Satt281-2	11		
Sat_091-3	15			Satt281-3	5		
Sat_091-4	16			Satt281-4	3		
Satt339-1	23	39.66	67.24	Satt281-5	13		
Satt339-2	16			Satt237-1	17	29.31	60.34
Satt339-3	19			Satt237-2	18		
Satt339-4	10			Satt237-3	8		
Sat_162-1	10	17.24	79.31	Satt237-4	15		
Sat_162-2	36			Satt636-1	10	17.24	48.28
Sat_162-3	12			Satt636-2	18		
Satt239-1	26	44.83	72.41	Satt636-3	7		
Satt239-2	16			Satt636-4	23		
Satt239-3	7			Satt588-1	28	48.28	72.41
Satt239-4	9			Satt588-2	14		
Satt462-1	35	60.34	77.59	Satt588-3	11		
Satt462-2	10			Satt588-4	4		
Satt462-3	2			Satt588-5	1		
Satt462-4	4			Satt201-1	35	60.34	96.55
Satt462-5	5			Satt201-2	21		
Satt462-6	2			Satt201-3	2		

等位变异 1 为耐盐等位变异；等位变异 2 为盐敏感等位变异

Allelic variant 1 is a salt-tolerant allele; allelic variant 2 is a salt-sensitive allele

2.3 耐盐大豆种质资源遗传多样性分析

2.3.1 用于遗传多样性分析的 SSR 标记多态性信息含量分析

20 个标记在 58 份大豆苗期耐盐种质资源中共获得 83 个等位变异，不同 SSR 标记的等位变异数不同，经检测其范围在 2~6 之间，平均每个 SSR 标记有 4.15 个等位变异（表 8）。多态性信息含量是用来衡量多态性程度高低的参数，本研究选用的 20 个 SSR 标记中，多态性信息含量变幅在 0.4867~0.8111 之间，其中标记 Satt301 最高，为 0.8111，标记 Satt072 最低，为 0.4867，平均值为 0.6442。

表 8 用于遗传多样性分析的 SSR 标记等位基因变异数和多态性信息含量

Table 8 Allelic variation and polymorphic information content of SSR markers for genetic diversity analysis

引物名称 Marker name	等位基因变异数 Allelic variation	多态信息含量 PIC	引物名称 Marker name	等位基因变异数 Allelic variation	多态信息含量 PIC
Satt211	2	0.5128	Satt072	3	0.4867
AW132402	4	0.6756	Satt309	3	0.5587
Satt453	6	0.7236	Satt279	4	0.6493
Satt168	4	0.6072	Satt571	4	0.6868
Satt396	3	0.5550	Satt674	4	0.64

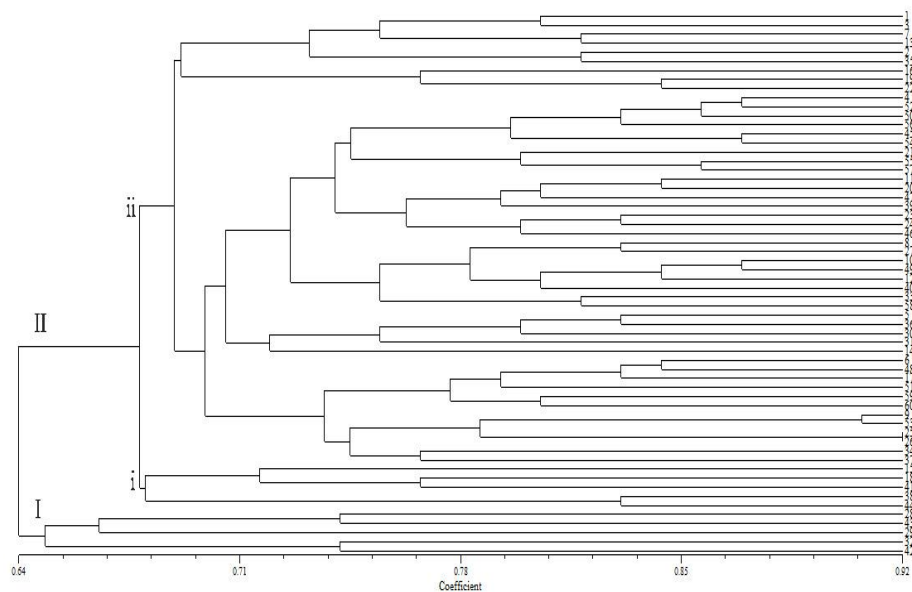
Satt643	4	0.6981	Satt242	5	0.5994
Satt184	5	0.7876	Satt373	4	0.6949
Satt141	6	0.7587	Satt551	5	0.6869
Satt301	6	0.8111	Sat_379	4	0.4975
Satt685	2	0.4978	Satt262	5	0.7556

2.3.2 58 份大豆种质资源亲缘关系分析

遗传相似性系数可以反应不同大豆种质资源间的亲缘关系远近。利用 NTSYS 2.10e 软件对遗传相似性系数进行计算，可知 58 份大豆种质资源间的相似性系数在 0.5385~0.9231 之间，平均值为 0.6974。其中遗传相似性系数最小的大豆种质资源有 5 对，分别为来自黑龙江的丰收 12 与来自北京的中黄 10 号、来自黑龙江的合丰 50 与来自山东的大粒黑豆、来自黑龙江的合丰 50 与来自国外的 L-9、来自吉林的白城秣食豆与来自内蒙古的赤豆 1 号以及来自吉林的白城秣食豆与吉育 303，遗传相似性系数为 0.5385，说明在所有组合中，以上组合种质资源间亲缘关系相对较远。在 58 份大豆种质资源中，遗传相似性系数在 0.9000~0.9999 之间数量最少，有 2 对。遗传相似性系数在 0.6000~0.6999 之间占大多数，有 842 对，占总数的 46.01%，其次是在 0.7000~0.7999 之间，有 772 对，占总数的 42.19%，说明 58 份大豆种质资源大部分遗传关系较近，遗传多样性较低。

2.3.3 UPGMA 法聚类分析

基于遗传相似性系数，利用 UPGMA 法对 58 份大豆种质资源进行聚类分析并绘制树状图（图 5），在遗传相似性系数约 0.6480 处将 58 份大豆种质资源划分两个类群。结合耐盐表型鉴定结果，第 I 类群中大豆种质资源耐盐等级全部为耐盐，高耐盐等级大豆种质资源全部集中在第 II 类群，其中第 ii 亚群含有高耐大豆种质资源较多。在第 I 类群和第 II 类群中，58 份耐盐大豆种质资源地域划分不明显，来自各省份的大豆种质资源在 2 个类群中均有分布。



1: Williams82; 2: 铁丰 8 号; 3-60: 58 份苗期耐盐大豆种质资源

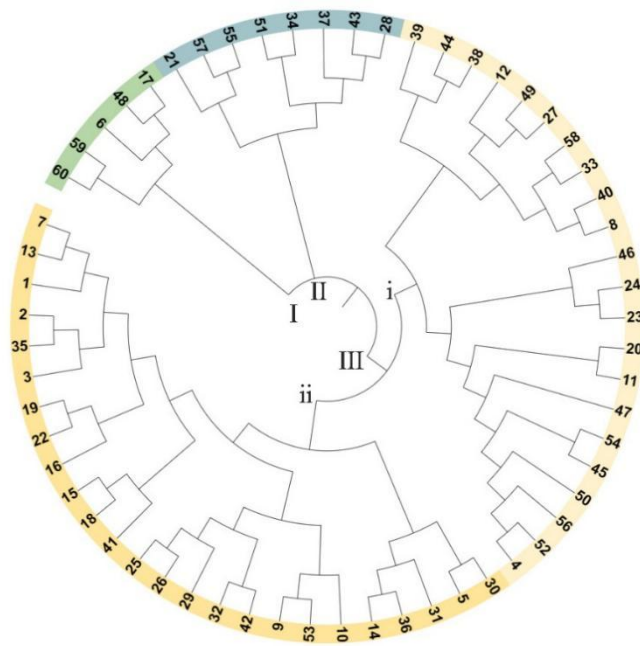
1: Williams82; 2: Tiefeng 8; 3-60: 58 high tolerance and salt tolerance soybean germplasm resources

图 5 58 份大豆种质资源的 UPGMA 亲缘关系聚类分析

Fig.5 UPGMA phylogenetic cluster analysis of 58 soybean germplasm resources

2.3.4 NJ 法聚类分析

基于遗传相似性系数计算大豆种质资源间的遗传距离，运用 MEGA-X 软件使用 N-J 法对 58 份大豆种质资源进行聚类分析，并绘制树状图（图 6），58 份大豆种质资源被明确地分为 3 个类群。结合耐盐表型鉴定结果，第 II 类群中大豆种质资源耐盐等级全部为耐盐，第 III 类群集中了多数高耐盐的大豆种质资源。58 份耐盐大豆种质资源中，来自黑龙江和吉林的大豆种质资源在 3 个类群中均有分布，来自其它省份的大豆种质资源多集中于第 III 类群。



1: Williams82; 2: 铁丰 8 号; 3-60: 58 份苗期耐盐大豆种质资源

1: Williams82; 2: Tiefeng 8; 3-60: 58 high tolerance and salt tolerance soybean germplasm resources

图 6 58 份大豆种质资源的 N-J 亲缘关系聚类分析

Fig.6 N-J relationship cluster analysis of 58 soybean germplasm resources

3 讨论

大豆苗期耐盐鉴定结果直接反应大豆全生育期耐盐水平^[18]。牛远等^[19]发现大豆苗期受到盐胁迫后，耐盐性普遍表现为地上部分株高增长受到抑制，地下部分根的干重和鲜重积累量降低。郭蓓等^[20]采用耐盐性田间鉴定方法对 59 份大豆种质资源进行盐胁迫处理，筛选出耐盐品种小白脐和大粒黑豆，与本试验筛选的耐盐品种一致。单株分类记载法^[1]是根据单株叶片枯萎程度计算盐害指数鉴定大豆苗期耐盐等级的方法。单株分类记载法通过人工观察叶面枯萎程度，存在一定人为误差，本研究结合与耐盐基因连锁的 SSR 标记，对初步鉴定出的高耐和耐盐等级大豆种质资源进行分子辅助鉴定，以明确不同 SSR 标记的鉴定效率和准确率。

张海燕等^[14]利用位于 Satt237 和 Sat_091 之间的 SSR 标记 Satt339 对 150 份大豆品种进行分子辅助鉴定,检测到 12 个等位变异。Lee 等^[21]通过对以 S-100 和 Tokyo 杂交衍生的 F_{2.5} 群体进行 QTL 定位,鉴定出一个主效耐盐 QTL,位于大豆 3 号染色体上的 Sat_091 和 Satt237 之间。Kan 等^[22]对 184 个 F_{7:11} 代家系构成的 RIL 群体进行 QTL 定位,在大豆 8 号染色体定位一个 QTL 位点 Sat_162。本研究选取张海燕等^[14]和胡雯恬^[15]筛选到的 Sat_091、Satt339、Satt239、Satt201 等 10 个与耐盐基因连锁的 SSR 分子标记,对表型鉴定为高耐和耐盐的 58 份大豆种质资源进行分子验证。结果表明,除大豆种质资源中黄 908、长农 33、L-9 和黑河 54 外,绥农 1 号、合丰 50 和东大 2 号携带耐盐等位变异最多,均为 6 个;合丰 29、吉育 303、农大 23 和赫尔松 2 号携带耐盐等位变异其次,均为 5 个;其余 47 份大豆种质资源携带耐盐等位变异 1~4 个不等,说明本研究表型鉴定与分子辅助鉴定具有一致性。大豆种质资源绥农 1 号、合丰 50 和东大 2 号在表型鉴定与分子辅助鉴定中均表现为耐盐,可作为耐盐亲本为选育大豆耐盐新品种奠定基础。中黄 908、长农 33 等 4 份耐盐大豆种质资源未检测出耐盐等位变异,除与耐盐表型鉴定的准确性有关外,也可能这些大豆种质资源的耐盐性是由不同的耐盐基因位点所控制,此外也不排除分子标记与耐盐基因之间发生重组的可能性^[23]。10 个与耐盐基因连锁的 SSR 标记,鉴定效率在 17.24%~60.34%之间,准确率在 46.55%~96.55%。其中 SSR 标记 Satt462 和 Satt201 的鉴定效率最高,为 60.34%,且 Satt201 的鉴定准确率最高,为 96.55%,说明在培育耐盐大豆新品种过程中,利用这些标记进行分子辅助鉴定具有较高的实际应用价值。

随着分子辅助育种技术的发展,分子标记技术也广泛应用于遗传多样性研究^[24]。张春宝等^[25]利用 SRAP 标记对东北地区 14 份育成品种、5 份国外品种和 1 份地方品种进行了遗传多样性分析,同样发现供试的品种遗传背景狭窄,黑龙江、吉林两省大豆品种之间遗传相似性较高。虽然前人对大豆的遗传多样性有一定研究,但对耐盐大豆种质资源的遗传多样性研究却少之又少,本研究对 58 份耐盐大豆种质资源进行遗传多样性分析,遗传相似系数在 0.5385~0.9231 之间,且 88.20%集中在区间 0.6000~0.7999 内。这一结果表明,本试验所选的耐盐资源之间的相似程度较高,可能其中大多数种质资源来自同一地域,具有相同的亲本或祖先亲本,在遗传上差异较小,因此可引进亲缘关系较远的外来品种或遗传多样性较高的野生大豆作为亲本进行杂交,为培育大豆耐盐新品种奠定丰富的遗传基础。

本研究使用 NTSYS2.10e 和 MEGA-X 软件通过 UPGMA 和 NJ 两种方法相结合,对 58 份耐盐大豆种质资源进行亲缘关系聚类分析,发现高耐盐等级大豆种质资源 16 (长农 33)、19 (吉育 303)、22 (龙豆 5 号)、25 (中黄 48)、30 (五星 4 号) 和 35 (赫尔松 2 号) 在两种方法建立的亲缘关系聚类图中都聚集在同一类群,且 58 份大豆种质资源在两种方法建立的亲缘关系聚类图中地域划分不明显,但同一地域的大豆种质资源多集中在同一类群,说明 UPGMA 法与 NJ 法聚类结果具有一致性^[26]。将两种方法相结合,其研究结果充分表明 58 份耐盐大豆种质资源亲缘关系较近,在培育耐盐大豆品种时,可参考聚类分析图中的亲缘关系分布,筛选亲缘关系较远的大豆种质资源作为亲本。

4 结论

通过苗期耐盐大豆种质资源表型鉴定,筛选出高耐大豆种质资源 15 份,耐盐大豆种质资源 43 份。结合 SSR 分子标记辅助鉴定技术,标记 Satt462 和 Satt201 鉴定效率最高,为 60.34%,标记 Satt201 准确率最

高, 为 96.55%。聚类分析表明, 58 份大豆种质资源间的相似性系数在 0.5385~0.9231 之间, 平均值为 0.6974, 相关系数为 0.6240, 说明 58 份大豆种质资源大部分遗传关系较近, 遗传多样性较低。58 份耐盐大豆种质资源并非按地域进行聚类, 但一个类群或亚群中大部分种质资源来源地在地理位置上相同或较为接近。

参考文献

- [1] Qu S, Cai Q, Cui H M, Abraham L, Jiao Y L, Ma G L, Wang P W. Bioinformatics and functional analysis of high Oleic acid-related gene gmSAM22 in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 2022, 92(2): 501-519.
- [2] 赵慧艳, 林春雨, 梁晓宇, 王洋. 黑龙江省大豆推广品种农艺品质性状优异等位变异发掘. *中国油料作物学报*, 2019, 41(5): 688-695.
- Zhao H Y, Lin C Y, Liang X Y, Wang Y. Mining of novel alleles of agronomic traits and quality traits in soybean commercial varieties in Heilongjiang Province. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2019, 41(5): 688-695.
- [3] 张翼夫, 李问盈, 胡红, 陈婉芝, 王宪良. 盐碱地改良研究现状及展望. *江苏农业科学*, 2017, 45(18): 7-10.
- Zhang Y F, Lin W Y, Hu H, Chen W Z, Wang X L. Current status and prospects of saline and alkaline land improvement research. *Jiangsu Agricultural Science*, 2017, 45(18): 7-10.
- [4] 田蕾. 大豆耐盐基因定位及耐盐种质资源分子标记选择效率分析. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- Tian L. Localisation of salt tolerance genes in soybean and analysis of selection efficiency of molecular markers for salt tolerance germplasm resources. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008.
- [5] 李雪华. 大豆突变体库的初步构建及突变类型的鉴定. 南京: 南京农业大学, 2003.
- Li X H. Preliminary construction of a soybean mutant library and identification of mutation types. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003.
- [6] Kan G Z, Ning L H, Li Y K, Hu Z B, Zhang W, He X H, Yu D Y. Identification of novel loci for salt stress at the seed germination stage in soybean. *Breeding Science*, 2016, 66(4): 530-541.
- [7] Sun B R, Fu C Y, Yang C Y, Ma Q B, Pan D J, Nian H. Genetic diversity of wild soybeans from some regions of southern China based on SSR and SRAP markers. *American Journal of Plant Sciences*, 2013, 4(2): 257-268.
- [8] 向艳涛, 刘昌燕, 韩雪松, 李莉, 孙龙清, 陈宏伟, 沙爱华. 基于 SSR 标记的毛豆种质资源遗传多样性分析. *中国油料作物学报*, 2023, 1(4): 1-11.
- Xiang Y T, Liu C Y, Han X S, Li L, Sun L Q, Chen H W, Sha A H. Genetic diversity analysis of vegetable soybean germplasm resources based on SSR markers. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2023, 1(4): 1-11.
- [9] 李琼, 耿臻, 杨青春, 舒文涛, 李金花, 常世豪, 张东辉, 张保亮. 黄淮海 50 份大豆种质资源 SSR 遗传多样性分析. *种子*, 2021, 40(8): 39-44+50.
- Li Q, Geng Z, Yang Q Q, Shu W T, Li J H, Chang S H, Zhang D H, Zhang B L. Genetic diversity analysis of 50 soybean germplasms in Huanghuaihai based on SSR. *Seed*, 2021, 40(8): 39-44+50.
- [10] Jeevan K S P, Susmita C, Sripathy K V, Agarwal D K, Pal G, Singh A N, Kumar S, Rai A K, Gandara J S. Molecular characterization and genetic diversity studies of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars using SSR markers. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(3): 2129-2140.
- [11] 刘谢香, 常汝镇, 关荣霞, 邱丽娟. 大豆出苗期耐盐性鉴定方法建立及耐盐种质筛选. *作物学报*, 2020, 46(1): 1-8.
- Liu X X, Chang R Z, Guan R X, Qiu L J. Establishment of screening method for salt tolerant soybean at emergence stage and screening of tolerant germplasm. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(1): 1-8.
- [12] Guan R X, Qu Y, Guo Y, Yu L L, Liu Y, Jiang J H, Chen J G, Ren Y L, Liu G Y, Tian L, Jin L G, Liu Z X, Hong H L, Chang R Z, Gilliam M, Qiu L J. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in GmSALT3. *Plant J*, 2015, 80: 937 - 950.
- [13] 武林琳. 两种转基因大豆基因组 DNA 提取方法的比较. *现代农村科技*, 2022, (3): 60-62.
- Wu L L. Comparison of two genomic DNA extraction methods for transgenic soybeans. *Modern Rural Science and Technology*, 2022, (3): 60-62.
- [14] 张海燕, 关荣霞, 李英慧, 王丽侠, 漆维江, 常汝镇, 刘章雄, 邱丽娟. 大豆耐盐性种质资源 SSR 遗传多样性及标记辅助鉴定. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(3): 251-255.
- Zhang H Y, Guan R X, Li Y H, Wang L X, Luan W J, Chang R Z, Liu Z X, Qiu L J. Genetic Diversity Analysis and Marker Assisted Identification of Salt Tolerant Soybean by Using SSR Marker. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6(3): 251-255.
- [15] 胡雯恬. 大豆幼苗性状耐盐胁迫能力优异等位变异的发掘. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2022.
- Hu W T. Discovery of allelic variants for superior salinity stress tolerance in soybean seedling traits. Harbin: Heilongjiang University, 2022.
- [16] 弟文静. 大豆芽期耐盐碱性评价及相关等位变异的发掘. 黑龙江大学, 2021.
- Di W J. Evaluation of salinity tolerance in soybean germination and discovery of related allelic variants, 2021.
- [17] 白志元, 杨玉花, 武国平, 卫一超, 张瑞军. 68 个大豆品种(系)遗传多样性分析. *中国农业大学学报*, 2020, 25(3): 17-24.
- Bai Z Y, Yang Y H, Wu G P, Wei Y C, Zhang R J. Genetic diversity analysis of 68 soybean varieties. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(3): 17-24.

- [18] 罗庆云, 於丙军, 刘友良. 大豆苗期耐盐性鉴定指标的检验. 大豆科学, 2001, 20(3): 177-182.
- Luo Q Y, Yu B J, Liu Y L. Examination of indicators for the identification of salt tolerance in soybean seedlings. Soybean Science, 2001, 20(3): 177-182.
- [19] 牛远, 杨修艳, 戴存凤, 王博文, 任高磊, 吴静磊, 王飞兵, 陈新红. 大豆芽期和苗期耐盐性评价指标筛选. 大豆科学, 2018, 37(2): 215-223.
- Niu Y, Yang X Y, Dai C F, Wang B W, Ren G L, Wu J L, Wang F B, Chen X H. Screening of indicators for evaluating salt tolerance in soybean at germination and seedling stages. Soybean Science, 2018, 37(2): 215-223.
- [20] 郭蓓, 邱丽娟, 邵桂花, 许占友. 大豆耐盐性种质的分子标记辅助鉴定及其利用研究. 大豆科学, 2002, 21(1): 56-61.
- Guo B, Qiu L J, Shao G H, Xu Z Y. Molecular marker-assisted identification of salt-tolerant germplasm in soybean and its utilization. Soybean Science, 2002, 21(1): 56-61.
- [21] Lee G J, Boerma H R, Villagarcia M R, Li Z, Zhou X, Gibbs M O, Boerma H R. A major QTL conditioning salt tolerance in S100 soybean and descendent cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(8): 1610-1619.
- [22] Kan G Z, Zhang W, Yang W M, Ma D Y, Zhang D, Hao D R, Hu Z B, Yu D Y. Association mapping of soybean seed germination under salt stress. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(6): 2147-2162.
- [23] 郭蓓, 邱丽娟, 邵桂花, 许占友. 大豆耐盐性种质的分子标记辅助鉴定及其利用研究. 大豆科学, 2002, 21(1): 56-61.
- Guo B, Qiu L J, Shao G H, Xu Z Y. marker-assisted identification of the salt tolerance in soybean. Soybean Science, 2002, 21(1): 56-61.
- [24] 李敏, 关博文, 杨学, 陈庆山, 张睿, 武小霞, 金慧, 吴玉娥. 大豆种质资源遗传多样性分析. 农业科技通讯, 2021, 599(11): 4-8.
- Li M, Guan B W, Yang X, Chen Q S, Zhang R, Wu X X, Jin H, Wu Y E. Genetic diversity analysis of soybean germplasm resources. Agricultural Science and Technology Newsletter, 2021, 599(11): 4-8.
- [25] 张春宝, 邱红梅, 赵洪锬, 彭宝, 赵丽梅, 董英山. 东北地区大豆种质遗传多样性的 SRAP 标记分析. 大豆科学, 2014, 33(1): 17-22.
- Zhang C B, Qiu H M, Zhao H K, Peng B, Zhao L M, Dong Y S. SRAP marker analysis of genetic diversity of soybean germplasm in Northeast China. Soybean Science, 2014, 33(1): 17-22.
- [26] 庄旻敏. 我国近岸海域铜藻金潮生物学溯源研究. 上海: 华东师范大学, 2022.
- Zhuang M M. Molecular biology based traceability study of *Sargassum horneri* golden tides in the nearshore of China. Shanghai: East China Normal University, 2022.