植物学通报 2002，19（1）：44～48
Chinese Bulletin of Botany

大豆 SSR 技术研究进展①

[1]王 彪 [2]邱丽娟②

[1]（西北农林科技大学 陕西杨陵 712100） [2]（中国农业科学院作物品种资源研究所 北京 100081）

摘要 微卫星 DNA 是重复单位少于 6 个核苷酸的简单重复序列。在大部分真核细胞的基因组中有着广泛分布，呈孟德尔式遗传。以此为基础发展起来的 SSR 标记是一种共显性分子标记，遗传多态性丰富。本文着重介绍近年来 SSR 技术应用在大豆遗传图谱构建、基因研究、品种鉴定和分子标记辅助育种等方面取得的进展，并初步预测该方法在大豆研究中的发展方向。

关键词 大豆，SSR 标记

Current Advance of Simple Sequence Repeats in Soybean

[1]WANG Biao [2]QIU Li-Juan②

[1]（*Northwest Science and Technology University of Agriculture & Forestry*，Yangling，Shannxi 712100

[2]（*Institute of Crop Germplasm Resources*，*CAAS*，Beijing 100081）

Abstract Microsatellite DNA can be defined as relatively short runs of tandemly repeated DNA with repeat lengths of 6 bp or less. It is widely distributed in most eukaryotic genomes，following Mendelian inheritance. The SSRs are multiallelic codominant genetic markers. This paper reviewed the progress of the marker applied to genome mapping，gene analysis，genotype identification and marker-assisted selection in soybean breeding in recent years，meanwhile，the author predicted the future development of this technology in soybean research.

Key words Soybean，SSR marker

建立在微卫星 DNA 核苷酸序列信息基础上的 SSR（simple sequence repeat）分子标记技术应用于大豆研究以来，发展极为迅速。微卫星 DNA 通常是由 1-6 核苷酸组成重复单位，重复几到几十次不等。这些简单序列重复绝大部分随机、均匀、广泛分布于大豆基因组中，平均间隔约 15 kb（Wang *et al*，1994），两端特异性序列在属内是保守的，呈孟德尔式遗传，多样性指数比 RFLP（restriction fragment length polymorphism）及 RAPD（random amplified polymorphic DNA）要高（Morgante and Olivieri，1993），是一种共显性遗传的 STS（sequence-tagged sites）标记。在大豆遗传图谱构建、遗传多样性研究、系谱与进化关系探索、基因与 QTL 分析、品种鉴定、分子标记辅育种等方面应用越来越广泛（宋启建，1999）。SSR 引物合成依赖其两端保守序列的信息。目前设计出来的大豆基因组 SSR 引物超过 900 种，而且数目还在增加，产品有专门公司出售，使用简便，结果稳定、准确。

① 国家‘973’计划资助项目（G1998010203）。
② 通讯联系人。Author for correspondence. 邱丽娟地址 北京白石桥中国农业科学院作物品种资源研究所大豆种质资源研究室 100081。
https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t21-006
作者简介：王彪，西北农林科技大学生命科学学院硕士生；邱丽娟，中国农业科学院作物品种资源所研究员，博士生导师，主要从事植物分子技术研究，主持国家‘973’大豆核心种质构建课题。
收稿日期：2001-01-03 接受日期：2001-04-10 责任编辑：姜联合

1　构建大豆分子遗传图谱

大豆分子遗传图谱的构建现在主要基于 SSR、RFLP、RAPD、AFLP（amplified fragment length polymorphism）四种分子标记技术与传统的形态学、细胞学和生化标记相结合的方法。RFLP 很早就应用到大豆遗传图谱研究中（Apuya *et al*，1989），但是从建立的品种指纹图谱来看，该技术单个探针信息量少，鉴别效率不高（Keim *et al*，1989）。RAPD 分析由于所采用引物 Tm 值较低，扩增结果易受外界条件影响，重复性、稳定性均有待提高（Mienie *et al*，1995；Zhang *et al*，1996）。AFLP 是 1993 年发明的，此方法受专利保护，分析试剂盒十分昂贵，结果也不够清晰（Vos *et al*，1995；田清震等，2000）。SSR 标记因单个位点具有多个等位基因，而且每一遗传型仅有一个等位基因，多态性丰富等特点（Akkay *et al*，1992），十分有利于遗传研究。Jin 等（1998）以大豆雄性不育突变系（msms）与“栽培种”Minsory（MsMs）杂交构建了 107 个体的 F2 群体，在亲本间筛选出多态性标记包括 102 个 RFLP 探针和 31 个 SSR 标记，这些标记均用于分析 F2 群体，将其雄性不育基因定位到美国依阿华大学所建的大豆分子遗传图谱 D1b 连锁群上。同年，Orf 等（1998a）在 Minsory × Archer 群体定位了 261 个 SSR 位点，在 Nior1 × Archer 群体的分子连锁图谱标志出 229 个 SSR 位点。到 2000 年 10 月止，较为完整的大豆遗传图谱是 Cregan 等（1999a）运用 SSR 标记，将 RFLP、RAPD、AFLP、同工酶及形态性状标记整合而成。在 G. max × G. soja F2 代、Minsory × Noir1 重组自交系和 Clark × Harosoy F2 代三个群体中，总共运用 606 个 SSR 标记位点，同一基因组中每个 SSR 只有一个位点，这 3 个群体中 SSR 位点排列顺序几乎是一致的。根据 SSR 标记在这些群体中分离情况，将原有 20 个以上连锁群进行相对应排列，结合大豆遗传物质的特点，整理成为 20 个连锁群，期望能与大豆 20 对染色体相对应。鉴于定位的连锁图仍有不少大于 20cM 无 SSR 标记的区间，有必要寻找新的 SSR 位点，创建更为密集的分子标记图谱，为将来建立大豆基因组核苷酸序列图谱提供信息。有消息称美国农业部、美国大豆协会、Monsanto 种子公司资助 Cregan 博士利用 BAC（bacterial artificial chromosomes）文库及原有 SSR、RFLP 标记在这些区间发展新的 SSR 标记计划，预期将会建立包括 1500 ~ 2000 个 SSR 位点遗传图谱（宋启建，1999）。若这一目标能够实现，大豆的分子遗传图谱将会更加准确和完善，对科研的指导意义也更大。

2　遗传多样性的研究

采用快捷、精确、可靠的方法对大豆种质资源进行遗传多样性分析，明确其间的遗传距离，对于大豆资源的充分利用、遗传学研究及育种实践均有重要价值。利用系谱分析、地理来源及有限的表型鉴定数据，难于将数以万计的大豆品种资源区别开来。随着分子标记研究的深入，用分子方法标记出等位基因，继而计算其遗传距离，已成为近年来研究的主流。用 SSR 分子标记技术对大豆进行品种间聚类分析，与运用其他分子标记方法如 RAPD、RFLP 取得的结果吻合很好。用 SSR 标记的方法对 96 种不同大豆基因型进行聚类分析，并将其结果与 RFLP 法相比较，表明 SSR 标记比 RFLP 标记多态性高，完全可以用来对大豆遗传特性进行分析（Rongwen *et al*，1995）。Maughan 等（1995）用 5 对 SSR 引物在 94 个品种检测到 79 个等位位点。也有人将野生大豆与栽培大豆用 SSR 方法分析，结果得出野生大豆遗传多样性和分化程度都较高的结论（Yong *et al*，1999）。许占友等（1999b）从中

http://www.cnki.net

国大豆品种资源中选择农艺性状相差显著的 90 份材料,用一份野生大豆品种作对照,用 12 对 SSR 引物对其进行分析,平均每个引物可扩增出 6 个等位位点。现在 SSR 分子标记技术日趋成熟,且简便易行,运用该技术可对我国已有大豆种质资源进行系统、全面遗传分析。

3 系谱、进化关系探讨

微卫星标记为共显性标记,具有丰富的等位基因,呈孟德尔式遗传,这是亲缘关系分析的基础。在 1997 年,有人运用 12 对 SSR 引物成功地对 18 种大豆基因型作了系谱分析(Doidi *et al*,1997)。中国农业科学院种质资源研究所用 SSR 方法佐证了山西是我国大豆发源地之一的结论(许占友等,1999b)。Brown-Guedira 等(2000)运用 satt002、satt006、satt080 三对引物,结合 RAPD 标记,研究北美大豆 18 个细胞质供体祖先和 87 个引进大豆品种之间的关系,发现有几种引进品种与北美祖先遗传型不同。SSR 分子标记虽然存在后代位点偏离问题,但根据 SSR 位点在大豆重组自交系 F8 代群体中偏离情况研究,对大豆微卫星在经过多次减数分裂后的稳定性分析后认为,其等位基因差异分析仍有可能用于确定不同起源大豆之间的相互关系(刘峰等,2000)。Peakall 等(1998)考察 31 个大豆 SSR 位点在野生同属植物和其他豆属植物中的同源性,发现高达 65% 的引物扩增出产物,这些扩增片段与栽培大豆相比较短,也出现断裂情况。然而,85% 扩增出的位点在 G. clandestina 中具有多态性,不同属间扩增片断的同源性却很低(3% ~ 13%)。根据这些特性,深入研究其位点特性,有助于阐明种的进化问题。

4 品种鉴定

根据色素、形态等指标来区分大豆的品种已不能够满足实际要求,因为很多育成品种在农艺性状上差异甚微,传统的方法不能将其区分开。SSR 分子标记方法是进行品种鉴定的一种高效方法。据报道,用 SSR 标记来分辨 66 个优良美国大豆品种,只用 13 个位点就可以做到过去按成熟期、形态等农艺性状对其划分(Song *et al*,1999c)。用 8 个位点对韩国 59 个大豆品种分析显示,93.2% 的品种可以被区分开(Song *et al*,1999)。然而,Keim 等(1989)用 17 个 RFLP 探针鉴定野生和栽培大豆品种,仍有 7 个材料具有相同等位位点而无法区分。而 Diwan 和 Cregan(1997)运用 20 个 SSR 位点成功地分开在形态和色素上以及 Keim 用 17 个 RFLP 都没能完全区别出来的栽培品种,显示该方法在品种鉴定方面的高度辨别能力。

5 数量性状基因分析

SSR 位点随机均匀分布在大豆基因组中,利用 QTLs 和 SSRs 位点存在连锁关系,对其基因进行分析。Orf 等(1999b)研究植株高度、倒伏、开花期、生殖期、成熟期、产量、种子重量、种子含油量、种子蛋白含量等数量性状与 400 多个 RFLP 和 SSR 标记之间的关系,分析了部分主效基因的影响。另外,用 SSR 标记大豆突然痒死症状(Abu-Thredeih *et al*,1996)、大豆抗虫数量性状基因(Terry *et al*,2000)等都是较成功的例子。大豆平短茸毛基因控制叶表面茸毛性状,一开始认为大豆中这种表型是由两对等位基因控制,由于文献关于该重

http://www.chinbullbotany.com

复基因显隐性报道不一致，Lee 等(1999)用 SSRs 和 RFLPs 技术相结合研究表明，这一表型性状由主效重复基因和少数修饰基因控制，纠正了前人的错误看法。

6　分子标记辅助育种

用分子标记指示重要农艺性状，为育种提供服务，是 SSR 技术运用最广泛的一个领域。抗南方根结线虫病，抗疫霉根腐病，抗灰斑病，抗鳞翅目昆虫，抗涝，抗酸性土壤，抗铅，亚麻酸，棕榈酸等基因的 SSR 标记均见报道(宋启建，1999)。D1b + W 连锁图上 satt600 和 K011 标记紫花表型基因 wp(Hegstad *et al*，2000)；LGJ 连锁图上 satt244 和 satt507 标记抗蛙眼叶病斑基因 rcs3(Mian *et al*，1999)；抗茎腐病基因(Kim and Diers，2000)、抗大豆花叶病毒病基因(Yu *et al*，1994；Zheng *et al*，2000)、抗逆、品质基因 SSR 标记亦取得进展。抗大豆孢囊线虫病的研究最为典型，已发现 satt309、sat-163、satt038、satt130 标记位于 MLG 连锁群上，与抗大豆孢囊线虫病基因有关，科学家们试图利用这些知识来培育抗大豆孢囊线虫病品种(Cregan *et al*，1999b；Meksem *et al*，1999；Mudge *et al*，1997)。雄性不育能给育种带来诸多方便，是育种工作者孜孜寻求的捷径。寻找雄性不育恢复基因的 SSR 标记的是人们努力解决的问题。许占友等(1999a)用 2 个不育系和 5 个恢复系的核基因组为模板，从 60 对 SSR 核心引物中筛选出多态性高的引物，来标记与恢复基因有关的 3 个等位位点，经 F2 分离群体分析，satt441 与恢复基因的遗传连锁距离为 9.2cM。总之，运用 SSR 技术标记有重要利用价值的大豆基因是当前研究热点，也是其发展方向之一。SSR 技术在大豆中应用的潜力巨大。简化其引物设计程序，寻找更多 SSR 位点，充分发挥该技术优点，探索新的应用领域，是未来研究的主要任务。同时也应注意到它的进步给开拓大豆新的分子标记，如 SNP(single nucleotide polymorphisms)奠定了坚实的基础。

参　考　文　献

田清震，盖钧镒，喻德跃，贾继增，2000. 大豆 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP) 研究. 大豆科学，**19**(3)：210 ~ 217

刘峰，东方阳，邹继军，陈受宜，庄炳昌，2000. 应用微卫星标记进行大豆种质多样性和遗传变异性分析. 遗传学报，**27**(7)：628 ~ 633

许占友，李磊，邱丽娟，常汝镇，汪茂斌，李智，郭蓓，1999a. 大豆“三系”的选育及恢复基因遗传定位. 中国农业科学，**32**(2)：32 ~ 38

许占友，邱丽娟，常汝镇，李向华，郑翠明，刘立宏，郭蓓，1999b. 利用 SSR 标记鉴定大豆种质. 中国农业科学，**32**(增刊)：40 ~ 48

宋启建，1999. 大豆 SSR 分子标记的创制及其应用. 大豆科学，**18**(3)：248 ~ 254

Abu-Thredeih J，Chang S J C，Doubler T W，Lightfoot D A，1996. Intergration of SDS、SCN race3 and SCN race14 resistance QTL with the soybean genome map. *Soybean Genetics Newsletter*，**23**：158 ~ 162

Akkaya M S，Bhagwat A A，Cregan P B，1992. Length polymorphism sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*，**132**：1131 ~ 1139

Apuya N R，Frazier B L，Keim P，Roth E J，Lark K G，1989. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean，*Glycine max* (L.). *Merrill Theor Appl Genet*，**75**：889 ~ 901

Brown-Guedira G L，Thompson J A，Nelson R L，Warburton M L，2000. Evalution of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Science*，**40**(3)：815 ~ 823

Choi-Ik Yong，Kang-Jung Hoon，Song-HiSup，Kim-NamSoo，1999. Genetic diversity measured by simple sequence repeat variations among the wild soybean (*Glycine soja*) collected along riverside of five major rivers in Korea. *Genes and Genetic Systems*，**74**(4)：169 ~ 177

Cregan P B，Jarvik T，Bush A L，Shoemaker R C，Lark K G，Kahler A L，Kaya N，VanToai T T，Lohnes D G，Chung J，Specht J E，1999a. An intergrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science*，**39**：1464 ~ 1490

Cregan P B，Mudge J，Tickus E W，1999b. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the rgh1 locus. *Theor Appl Genet*，**99**(5)：811 ~ 818

https://www.scientific.net/AMR.97-101.2512 (2010)

Diwan N, Cregan P B, 1997. Automated sizing of fluorescent -labeled simple sequence repeat (SSRs) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor Appl Genet*, **95**: 723 ~ 733

Doldi M L, Wollmann J, Lelley T, 1997. Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. *Plant-Breeding*, **16**(4): 331 ~ 335

Hegstad J M, Tarter J A, Vodkin L O, Nickell C D, 2000. Posting the wp flower color locus on the soybean genome map. *Crop Science*, **40**(2): 534 ~ 537

Jin W, Palmer R G, Morner H T, Shoemaker R C, 1998. Molecular mapping of a male-sterile gene soybean. *Crop Science*, **38**(6): 1681 ~ 1685

Keim P, Shoemaker R C, Palmer R G, 1989. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. *Theor Appl Genet*, **77**: 786 ~ 792

Kim H S, Diers B W, 2000. Inheritance of partial resistance to sclerotinia stem rot in soybean. *Crop Science*, **40**(1): 55 ~ 61

Lee J M, Bush A L, Specht J E, Shoemaker R C, 1999. Mapping of duplicated genes in soybean. *Genome*, **42**(5): 829 ~ 836

Maughan P J, Saghai Maroot M A, Buss G R, 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome*, **38**: 715 ~ 723

Meksem K, Douber T W, Chancharoenchai K, Vjiti V N, Chang S J C, RaoArelli A P, Cregan P B, Gray L E, Gidson P T, Lightfoot D A, 1999. Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani* SDS and SCN in near isogenic lines. *Theor Appl Genet*, **99**: 1131 ~ 1142

Mian H A R, Wang-TianYuan, Phillips D V, Alrerhaz J, Boerma H R, Wang T Y, 1999. Molecular mapping of the Rcs3 gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. *Crop Science*, **39**(6): 1687 ~ 1691

Mienie C M S, Smit M A, Preforius P J, 1995. Use of random amplified polymorphic DNA for identification of South African soybean cultivars. *Field Crops Res*, **43**: 43 ~ 49

Morgante M, Olivieri A M, 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, **3**: 175 ~ 182

Mudge J, Cegan P B, Kenworthy J P, Kenworthy W J, Orf J H, Yong N D, 1997. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. *Crop Science*, **37**(5): 1611 ~ 1615

Orf J H, Chase-Ki, Jarvik T, Mansur L M, Cregan P B, Adler F R, Lark K G, 1999b. Genetics of soybean agronomic traits: Ⅰ Comprision of three related recombinant inbred populations. *Crop Science*, **39**(6): 1642 ~ 1651

Orf J H, Mansur L M, Lark L G, 1998a. Recombinant inbred populations from the crosses Minsory -Archer and Noir1-Archer. *Soybean Genetics Newsletter*, **25**: 154

Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A, 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume gena, implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*, **15**(10): 1275 ~ 1287

QiJian Song, Kyo-Moon Shim, Nam-SooKim, 1998a. Genotype fingerprinting differentiation and association between morphological traits and SSR information of soybean landraces. *Plant Resources*, **1**(2): 81 ~ 91

QiJian Song, Nam-SooKim, 1998b. SSRFING: A basic computer program for DNA fingerprinting analysis with microsatellite SSR information. *Korean Journal of Genetics*, **20**(1): 29 ~ 34

Rongwen J, Akkaya M S, Bhagwat A A, Lavi U, Cregan P B, 1995. The use of microsatellites DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**(1): 43 ~ 48

Song Q J, Quingley C V, Nelson R L, Carter T E, Boerma H R, Strachan J L, Cregan P B, 1999. A selected set of trinucleotide simple sequence repeat markers for soybean cultivar identification. special issue: cultivar group classification. *Plant Varieties and Seeds*, **12**(3): 207 ~ 220

Terry L I, Chase k, Jarvik T, Orf J, Mansur L, Lark K G, 2000. Soybean quantitative trait loci for resistance to insects. *Crop Science*, **40**(2): 375 ~ 382

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Freijter S A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, **23**(21): 4407 ~ 4414

Wang Z, Weber J L, Zhong G, Tanksley S D, 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet*, **88**: 1 ~ 6

Yu-Yg, Maroof M A S, Buss G R, Maughan P J, Tolin S A, 1994. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology*, **84**(1): 60 ~ 64

Zhang J, Mc Donald M B, Sweeney P M, 1996. Soybean cultivar identification using RAPD. *Seed Sci & Technol*, **24**: 589 ~ 592

ZhengCui Ming, ChangRu zhen, QiuLi Juan, 2000. Progress on the study of the disease soybean mosaic virus. *Acta Phytothologica Sinica*, **33**(2): 97 ~ 105

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t21-006