

中国不同纬度野生大豆和栽培大豆 SSR 分析^{*}

赵洪锬 王玉民 李启云 张 明 庄炳昌^{**}

(吉林省农业科学院省农业生物技术重点开放实验室, 公主岭 136100)

摘要 采用 SSR 分子标记技术对我国不同纬度的野生大豆 (*G. soja*) 和栽培大豆 (*G. max*) 各 22 份进行了多样性分析, 通过对所合成的 40 对引物的筛选, 12 对引物扩增结果表现出良好的多态性。引物 BARC-sat39 在野生大豆和栽培大豆之间有特异谱带。表明这个 SSR 标记是与栽培大豆和野生大豆有关的一个等位基因位点。通过对实验结果量化后数据分析, 野生大豆和栽培大豆的平均遗传距离分别为 0.176 和 0.150, 表明野生大豆的多态性比栽培大豆较为丰富; 在遗传距离 0.300 处, 野生大豆和栽培大豆被明显分为二类, 与以往大豆属 *Soja* 亚属的形态学分类结果相一致, 为野生大豆和栽培大豆分为二个种提供了分子水平上的证据。

关键词 SSR; 野生大豆; 栽培大豆; 遗传多样性

中图分类号 S565.102 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2001)03-0172-05

野生大豆 (*G. soja*) 的近缘野生种, 在我国分布广泛, 现有资源 6000 余份, 占世界总数的 90% 以上, 其中蕴藏着品质好、抗性强、丰产性好等一大批优异基因型。近 20 多年来, 国内外从农艺学、生态学、品质化学、遗传育种、孢粉学等基础生物学方面对野生大豆进行了广泛的研究^[1], 这些研究为拓宽大豆育种的遗传基础提供了宝贵的基础资料, 同时也为大豆的起源、演化提供重要的参考。近年来随着分子生物学技术的发展, RAPD、RFLP、AFLP 及 SSR 等分子标记手段大量的应用于大豆遗传研究^[2-4]。Akkaya 等首次对大豆微卫星 DNA 进行了研究, 发现其与 RAPD、RFLP 等分子标记相比不仅大量存在并且具有高度的多态性^[12]。该技术目前已广泛应用于大豆遗传图谱构建、基因定位和 QTL 分析、品种鉴定和种质保存、家系分析及辅助育种等研究, 但其用于野生大豆和栽培大豆的比较研究还少有报道。

本研究根据已发表的序列选择性的合成了 40 对 SSR 引物^[15], 对我国 44 份来源于不同纬度不同进化类型的野生大豆和栽培大豆进行了遗传多样性分析, 一方面探讨了我国不同进化类型大豆的分类、

演化等问题, 另一方面可为分子标记辅助育种, 拓宽大豆遗传育种基础提供一定的分子证据。

1 材料与方法

1.1 材料

选择我国 24—50°N 不同纬度的野生大豆 (*G. soja*) 22 份, 同纬度栽培大豆 (*G. max*) 地方品种 22 份。供试材料均由吉林省农业科学院提供 (表 1)。

1.2 DNA 提取

新鲜叶片总 DNA 采用 Rogers 和 Bendis 报道的 CTAB (Cetyl thylammonium bromide) 方法^[16], 并参考忻骅等稍作改进的方法提取^[17]。

1.3 PCR 反应

反应体系总体积 25 μ l, 其中大豆基因组 DNA 60ng, 2 μ l 2.5mM dNTP, 0.1 μ m³ 一端和 5' 一端引物各 2 μ l, 2.5 μ l 10 \times buffer (100mM Tris-HCl pH=8, 3mM KCl, 20mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.1% Np-40), 1.5 单位 Taq DNA 聚合酶, 加 2 滴石蜡油防止蒸发。反应循环参数: 94℃ 5min,

* 收稿日期: 2000-06-28

** 联系人

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (基础上编号: 39730330, 39670448) 和“973”资助项目。

作者简介: 赵洪锬 (1974-), 女, 研究生, 现从事大豆分子生物学研究。

表 1 试材品种、来源、类型及所处地理位置

Table 1 Varieties origination and locations of all the materials in the experiment

试材编号 No	试材名称 Name	纬度 °N	经度 °E	原产地 Origination	类型 Type	试材编号 No.	试材名称 Name	纬度 °N	经度 °E	原产地 Origination	类型 Type
1	ZYD00088	50	127		W	23	ZYD02819	39	112		W
2	爱晖本地种	50	127	黑爱晖	C	24	黄豆	39	112	晋左玉	C
3	ZYD00069	49	128		W	25	ZYD02903	38	111		W
4	逊克八月忙	49	128	黑逊克	C	26	白圆大黑豆	38	111	晋临县	C
5	ZYD00152	48	126		W	27	ZYD03328	35	106		W
6	克山灰杆	48	126	黑克山	C	28	黄豆	35	106	甘清水	C
7	ZYD00471	46	129		W	29	ZYD03564	35	114		W
8	嘟噜豆	46	129	黑通河	C	30	郑州大粒黄	35	114	郑州	C
9	ZYD00235	47	127		W	31	ZYD03485	34	113		W
10	铁娃子	47	127	黑绥棱	C	32	宝羊眼豆	34	113	豫宝丰	C
11	ZYD00810	45	126		W	33	ZYD03510	33	114		W
12	四粒黄	45	126	吉榆树	C	34	泌阳牛毛黄	33	114	豫泌阳	C
13	ZYD00968	42	120		W	35	ZYD04361	30	109		W
14	小金黄	42	120	吉公主岭	C	36	恩施黄壳豆	30	109	鄂恩施	C
15	ZYD001618	43	124		W	37	ZYD04550	31	114		W
16	天鹅蛋	43	124	辽昌图	C	38	开山白	31	114	浙上虞	C
17	ZYD01915	42	123		W	39	ZYD04958	26	117		W
18	油葫芦	42	123	辽新民	C	40	泰宁青皮	26	117	闽泰宁	C
19	ZYD02540	41	119		W	41	ZYD05191	24	113		W
20	铁英	41	119	辽喀左	C	42	英德中青	24	113	粤英德	C
21	ZYD02726	40	116		W	43	ZYD05173	27	101		W
22	昌平青豆	40	116	北京	C	44	黄豆	27	101	滇宁蒗	C

注: W 表示野生大豆; C 表示栽培大豆, 以下图形编号同。

表 2 SSR 引物一览表

Table 2 SSR primers used in the experiment

位点 Locus	核心序列 Core motif	5' 引物 5' end primer(sense)	3' 引物 3' end primer(anti-sense)
1(SoyGPATR)	(CTT) ₄ CCCT(CTT) ₇	GGA AGA AAG TAT TGG TCT GT	AGG AGA GAG TGG AGA GAT TA
2(BARC—Sat22)	(AT) ₂₆	GCC TTT TCT GAC TGT TAA	CAG TGA CTA AAA CTT ACT AT
3(BARC—Sat39)	(AT) ₁₇	CAA GAA TAA TCT AAA GGT ACA AC	AGT TAA AAA ACC CAC ACA AC
4(BARC—Sat26)	(AG) ₁₄	CGA AAC GCA AAA TCT C	AAA ACG TAT CTG AAG TAG TGG
5(BARC—Sat15)	(TAA) ₂₁	TAT CCT AGA GAA GAA GAA CTA AAA AA	GTC GAT TAG GCT TGA AAT A
6(BARC—Sat19)	(AAT) ₁₄	CCA ACT TGA AAT TAC TAG AGA AA	CTT ACT AGC GTA TTA ACC CTT
7(BARC—Sat120)	(ATT) ₁₆	GAG AAA GAA ATG TGT TAG TGT AA	CTT TTC CTT CTT ATT CTT TGA
8(BARC—Sat122)	(TAA) ₂₂	TGT ATT TTA CCT TAC CTT TGA	AAC TGC CAC CAA TGA C
9(BARC—Sat130)	(TAA) ₁₈	AAA AAG TGT AAC CAA GCC	TCT TAA ATC TTA TGT TGA TGC
10(BARC—Sat131)	(ATT) ₁₂	TTC CAC TTT GTA TCA CTT TC	TGA CTG TAA AAG AAC AGA TAA A
11(BARC—Sat145)	(ATT) ₁₇	TGG TTT CTA CTT TCT ATA ATT ATT T	ATG CCT CTC CCT CCT
12(BARC—Sat177)	(ATT) ₁₃	GAT CTA AAG TCT GAT ATT TTT AAC TA	AAA AGG AGA AGG GAG TTG AT

一个循环; 94℃ 30s, 52℃ 30s, 68℃ 30s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。反应在 UNO II PCR 循环仪上进行。PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶 80v 电泳检测, 0.5μg/ml EB 稀释液浸泡 5min, 电泳结果通过 BIO-RAD 公司的 GelDoc1 000 紫外凝胶成像分析系像并记录。

1.4 统计分析

每个样品不同引物(引物组合)中扩增谱带按有无赋予不同的数值, 有带赋值为 1, 无带赋值为 0。采用 NTSYS-PC Version 软件中的 Qualitative 进行遗传距离计算, 得到相似性系数矩阵; SAHN Clustering 绘制品种亲缘关系系数状图。遗传相似性计算公式 $S_{XY} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 N_x 为在材料 x 中某一引物扩增的条带数, N_y 为在材料 y 中同一引物扩增出的条数, N_{xy} 为在 x 和 y 中扩增出片段长度相

同的条带数。材料间的遗传距离: $GD (genetic\ distance) = 1 - S_{xy}$ 。

2 结果与讨论

参考 Cregan 等^[13] 的研究结果, 共选择合成了 40 对 SSR 引物, 通过调整 PCR 反应条件进行筛选, 有 16 对引物的扩增产物表现出了比较好的多态性。我们选用其中 12 对引物(表 2)对我国 44 份代表性纬度的野生大豆和栽培大豆地方品种进行 PCR 扩增, 共获得 56 个多态性标记, 而且可将 44 份供试材料完全分开, 说明 SSR 标记技术能够提供较为丰富的遗传多样性信息, 这与前人的工作一致^[8-11], 因此可以广泛的应用于遗传多样性研究中。

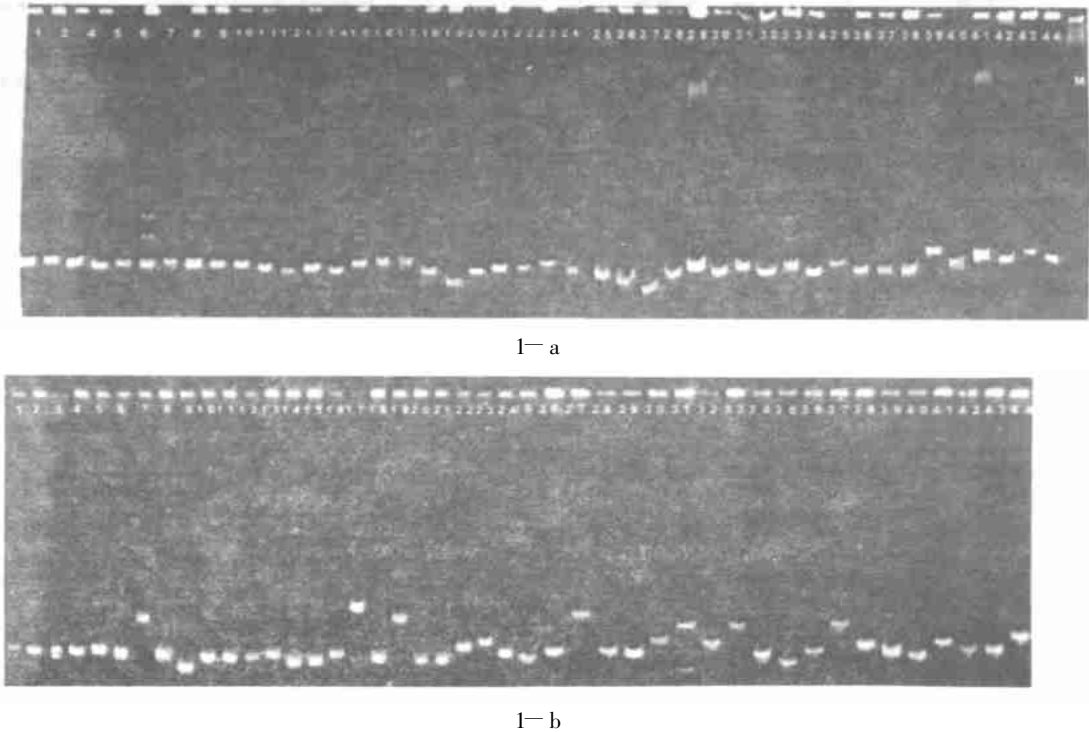


图 1 44 份野生大豆和栽培大豆的 SSR 图谱

Fig. 1 SSR fingerprint of 44 wild soybean and cultivated soybean

图 1-a 引物 SoyGPATR 10% 聚丙烯酰胺电泳检测结果。
图 1-b 引物 BARC-Satt45 10% 聚丙烯酰胺电泳检测结果
M: Size Marker(100bp); 1, 2 3……43, 44 材料编号, 同表 1。

关于野生大豆与栽培大豆的分类地位, 过去有两种不同的观点。一种认为野生大豆与栽培大豆杂交可育, 没有生殖隔离, 因而认为野生大豆与栽培大豆应属于同一个种。近年来, 一些分子生物学的研究结果也支持这一观点^[18-19]。另一种认为野生大豆与栽培大豆虽然杂交可育, 把两者划为 2 个种缺

乏遗传证据, 但由于野生大豆的形态特征和生理等性状与栽培大豆区别明显, 又是野生、没有栽培种植的, 因此宜作为一个独立的种。此种观点是大豆分类研究的主流。根据 SSR 指纹图谱量化后进行 UPGMA 所得亲缘关系树状图(图 2)可以看出: 除 ZYD00152、ZYD03564、ZYD05173 外, 野生大豆和栽

培大豆 2 个种被完全分为 2 个类群, 与以前大豆属 *Soja* 亚属的形态学分类结果基本一致, 说明野生大豆与栽培大豆不但在形态上差异明显, 在遗传基础上也存在明显的区别。本研究支持野生大豆与栽培大豆分为 2 个独立种的假说。在 SSR 聚类图中, ZYD00152、ZYD03564 及 ZYD05173 并没与其它野生大豆聚为一类, 而是与栽培大豆聚为一类, 我们推测这三个基因型可能属于一些过渡类型, 即半野生或半栽培大豆, 因此, 对这些特殊材料进一步的研究可能会为大豆的进化研究提供十分有益的信息。通过本研究可以看出, SSR 标记对于大豆种间分类是一种比较理想的手段。

采用 NTSYS-PC Version 软件中的 Qualitative 将 44 份野生大豆和栽培大豆经 12 对 SSR 引物扩增的数据进行聚类分析, 野生大豆和栽培大豆的平均遗传距离分别为 0.176 及 0.150, 表明野生大豆的多态性比栽培大豆更为丰富, 与 Maughan J, M A Saghai^[8] 等野生大豆的遗传多样性大于栽培大豆的结论相一致。从我们所得的聚类图来看, SSR 标记可以非常明显的将野生大豆与栽培大豆二个种区分开来, 但就每一种内以纬度差异为划分指标, 纬度相

近的材料虽能聚为一类, 但划分还相当模糊(图 2), 这有两种可能, 一是本研究选用的材料只是代表该纬度的一种, 而不是一个该纬度地区的基因池; 其二, 实验检测出多态性位点偏低, 因此对整个基因组覆盖率偏小, 不能提供足够的基因组信息。通过总体平均遗传距离比较, 栽培大豆: 40—50°N 分别为 0.124, 30—39°N 为 0.170, <30°N 为 0.187; 野生大豆: 40—50°N 分别为: 0.180, 30—39°N 为 0.229, <30°N 为 0.256。无论是野生或栽培大豆, 随地理纬度的增加其遗传距离都有递减的趋势, 表明北方大豆多样性相对低于南方。大豆为高度自交结实作物, Delanny 等^[20] 曾分析了美国和加拿大 1981 年前杂交育成的品种, 发现 10 份引入种质对美国北方大豆的遗传贡献率达 80% 以上, 7 份引入种质对南方大豆的贡献率也相似, 而且这些贡献率较大的种质大部分来自相同的地理区域。邱丽娟等^[21] 对我国 1992 年以前育成的 304 个杂交品种进行了分析发现这些品种可以追溯到 22 个祖先种。盖钧铭等^[22] 分析了我国 1923—1992 年育成的 504 个品种的系谱, 也得到了同样的结果。上述研究结果均表明, 遗传基础狭窄是国内外大豆育种普遍存在的问题。因

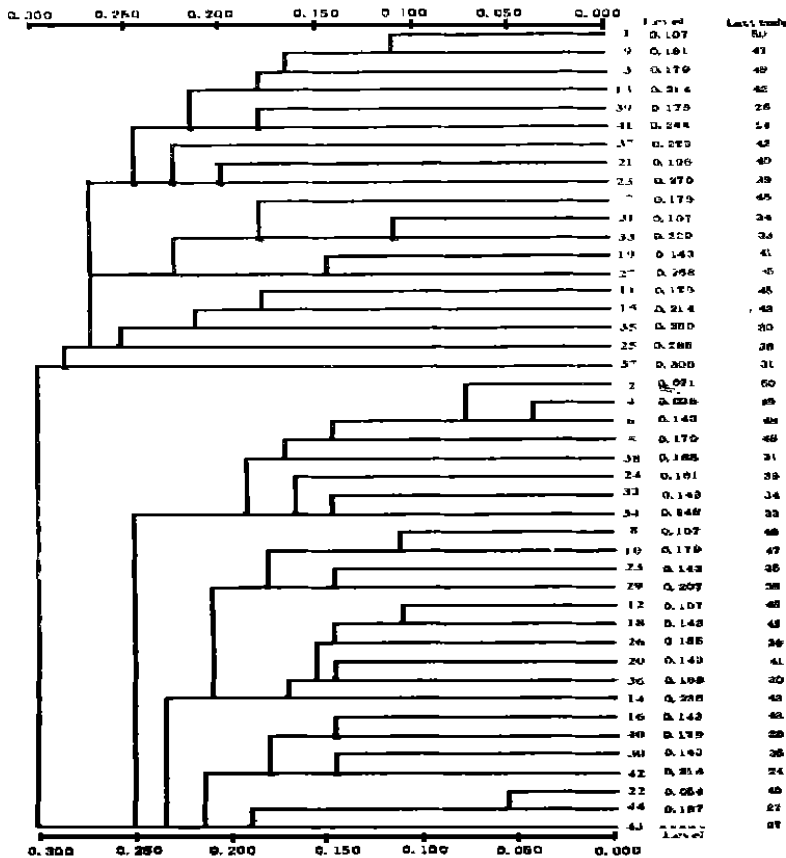


图 2 44 份野生大豆和栽培大豆的 SSR 聚类图

此,寻找与利用多态性丰富的种质资源对大豆育种及生产有着十分重要的意义。本实验结果,也为选取异地材料或野生大豆做亲本在改良栽培大豆中具有遗传潜力提供了分子生物学证据。

参 考 文 献

- 1 庄炳昌主编. 中国野生大豆生物学研究[M]. 科学出版社, 1999.
- 2 Hu J. and C. F. Quiros. Identification of btovcoli and cauliflower cultivars with RAPD Marker[J]. Plant Cell Report. 1991, 10: 505—511.
- 3 Martin G B. J. G. K. Williams. S. D. Tanksley. Rapid identification of marker linked to a *pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines[J]. Proc Natl Acad Sci. USA. 1991, 88: 2336—2340.
- 4 Mohan M., S. Nair, J. S. Bentur et al., RFLP and RAPD mapping of the rice Gm2 gene that confers resistance to biotype 1 of gallmidge (*Orseoliaoryzae*)[J]. Theor. Appl. Genet, 1994, 87: 782—785.
- 5 Hu Z. A. Yun R. Zhong M. et al., Detection of DNA diversity of wild soybean (*Glycine soja*) in natural populations by new procedure of RAPD and RFLP[J]. Soybean Genetics Newsletter. 1997, 24: 37—38.
- 6 P. Manjarrez Sandoval, Thomas E. Carter, Jr., D. M. Webb, et al. EFLP genetic similarity estimates and coefficient of parentage as genetic variance prediction for soybean yield[J]. Crop Science. 1997, 37(3): 698—703.
- 7 R. R. Prabhu, D. Webb, H. Jensen, S. et al., Genetic relatedness among soybean genotypes using AND amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and pedigree[J]. Crop Science. 1997, 37(5): 1590—1595.
- 8 Maughan P. J., Saghai M. Aroof M. A., Buss G. R. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean [J]. Genome. 1995, 38(4): 715—723.
- 9 庄炳昌, 惠东威, 王玉民, 等. 中国不同纬度进化类型大豆 RAPD 分析[J]. 科学通报, 1994, 39(23): 2218—2180.
- 10 邱丽娟, Randall L. Neison, Lila O. Vodkin. 利用 RAPD 标记鉴定大豆种质[J]. 作物学报, 1997, 23(4): 347—349.
- 11 刘峰, 陈受宜, 庄炳昌. 微卫星标记在大豆遗传作图中的应用[J]. 高技术通讯, 1999, 6: 8—11.
- 12 庄炳昌, 王玉民, 徐豹, 等. 大豆属 *Glycine* 亚属植物花粉形态研究[J]. 作物学报, 1996, 22(3): 279—282.
- 13 刘峰, 陈受宜. 大豆基因组中的微卫星标记[J]. 大豆科学, 1998, 17(3): 256—260.
- 14 赵洪锬, 王玉民, 庄炳昌, 等. 中国不同纬度野生及栽培大豆的 AFLP 分析[J]. 高技术通讯, 2000, 7: 32—35.
- 15 Akkaya M. S., Bhagwat A. A., Cregan P. B. Integration of simple sequence repeat DNA markers[J]. Crop Sci. 1995, 1439—1445.
- 16 Rogers O. S., Extraction of DNA from plant tissues[J]. Plant Molecular Biology Manual. 1998, 6: 1—10.
- 17 忻骅, 袁卫明, 顾其敏, 等. 抽提大豆各组织总 DNA 方法的比较研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(6): 719—720.
- 18 惠东威, 庄炳昌. 利用对大豆属植物系统学研究的初报[J]. 科学通报, 1994, 39(2): 175—178.
- 19 张二荃, 王鲁萍, 曹凯鸣. 细茎大豆(*G. gracilis*) deS 基因结构与分子进化结构[J]. 复旦学报, 1998, 37(2): 151—157.
- 20 Delamy X. Relative genetic contributions among ancestral lines to Northern American Soybean cultivars[J]. Crop Science. 1983, 24: 944—949.
- 21 邱丽娟, 常汝镇. 第五届世界大豆科学讨论会论文集[C]. 1994, 84.
- 22 盖钧镒, 崔章林. 中国大豆育成品种亲本分析[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17(3): 19—23.

SSR ANALYSIS OF WILD SOYBEAN (*G. soja*) AND CULTIVATED SOYBEAN FROM DIFFERENT LATITUDE IN CHINA

Zhao Hongkun Wang Yumin Li Qiyun Zhang Ming Zhuang Bingchang

(Jilin Province Key Lab. On Agro-Biotechnology, JAAS, Gongzhuling, 136100)

Abstract DNA genetic variation of 22 accessions of wild soybean and 22 accessions of cultivated soybean, which were from different latitude in China, was studied by SSR technique. Forty pairs of soybean SSR primers were synthesized according to published data, and 12 out of them had polymorphic alleles. Specific bands were amplified by primer 3 between wild soybean and cultivated soybean, which showed this SSR marker was one of the alleles among wild soybean and cultivated soybean. The data analysis showed that: The average genetic distance of wild soybean and cultivated soybean were 0.176 and 0.150 respectively which agreed on the thesis that wild soybean had more polymorphism than that of cultivated soybean. And also it provided a molecular proof that wild soybean and cultivated soybean belonged to two species from the dendrogram at the site of genetic distance 0.300, which conformed to phenotypic results.

Key words SSR; Wild soybean (*G. soja*); Cultivated soybean (*G. max*); Genetic diversity