

## 广西新收集野生大豆资源的遗传多样性分析

曾维英<sup>1,2</sup>, 梁江<sup>1</sup>, 陈渊<sup>1</sup>, 韦清源<sup>1</sup>, 汤复跃<sup>1</sup>, 钟开珍<sup>1</sup>, 陈文杰<sup>1</sup>

(1. 广西玉米研究所, 广西 南宁 530227; 2. 广西农业科学院 作物遗传改良生物技术重点实验室, 广西 南宁 530007)

**摘要:** 利用23对SSR引物对广西新收集的200份野生大豆资源进行遗传多样性分析。结果表明:23个SSR位点共扩增出137个多态性带,每个位点等位变异数目范围为3~11个,平均为5.96个;Simpson指数分布范围为0.503~0.834,平均为0.689;Shannon-weaver指数分布范围为0.407~1.444,平均为0.683;遗传相似系数分布范围为0.266~0.969,平均为0.720,广西新收集野生大豆材料表现出丰富的遗传多样性。聚类分析结果显示,200份材料分为三大类,各地区材料之间存在着明显的遗传差异,但有些同一地区内的材料也表现出了明显的遗传分化。

**关键词:** 广西;野生大豆;遗传多样性;SSR

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2011)03-0379-05

## Genetic Diversity Analysis of New Wild Soybean Collection in Guangxi

ZENG Wei-ying<sup>1,2</sup>, LIANG Jiang<sup>1</sup>, CHEN Yuan<sup>1</sup>, WEI Qing-yuan<sup>1</sup>, TANG Fu-yue<sup>1</sup>, ZHONG Kai-zhen<sup>1</sup>, CHEN Wen-jie<sup>1</sup>

(1. Guangxi Maize Research Institute, Nanning 530227; 2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China)

**Abstract:** Two hundred accessions of wild soybean, collected from Guangxi province were used as materials in this study. Twenty-three pairs SSR primers were used to analyze the genetic diversity of these materials. The result showed that one hundred and thirty-seven bands were amplified in twenty-three pairs SSR primers, with each locus has 5.96 bands. Genetic diversity index showed that distribution of Simpson index was 0.503 – 0.834, distribution of Shannon-weaver index was 0.407 – 1.444, and the dicesimilarity was 0.266 – 0.969, which suggested that wild soybean collected from Guangxi had abundant genetic diversity. Clustering analysis showed that, two hundred accessions of wild soybean were divided into 3 categories. The genetic distance was very close among the materials in one population and also the materials of different populations because of their similar habitat. However, there were genetics differentiations in a same population.

**Key words:** Guangxi; Wild soybean; Genetic diversity; SSR

野生大豆属国家二级保护植物,是不可多得的育种材料,在长期自然选择中形成了较为丰富的变异类型,携带着抗病虫、抗旱、耐冷、耐盐、耐瘠薄等有利基因,具有结荚多而密等特点,蕴藏着高蛋白、高适应性等潜势,是生物多样性重要组成部分,是拓宽栽培大豆种质资源的重要基因源。我国野生大豆分布非常广泛,拥有量占全世界的90%,但由于受城镇建设的高速发展、盲目开垦、农田精耕细作、生态环境日益恶化等诸多因素的影响,野生大豆的生存环境受到较大破坏,分布面积急剧减少或消失。我国虽已在全国范围内搜集过,抢救了一批

资源,但由于人力物力有限,所以要有选择的保存种质、适当的设立原位保护点。遗传多样性的研究可以为搜集考察及原位保护点的设立提供理论依据。近年来,SSR技术已成功应用于野生大豆的遗传多样性研究。李向华等<sup>[1]</sup>以65份东北地区新收集野生大豆资源以及与其来源相同的已经编目保存的资源为试验材料,利用60对SSR引物进行遗传分析,结果表明新收集材料在22个位点的遗传多样性指数都高于以前收集的资源,有62个等位变异是新收集材料所特有的,新收集材料与其它资源间的平均遗传相似系数为0.1918。说明新收集

收稿日期:2011-01-26

基金项目:广西区青年科学基金资助项目(桂科青099171);广西农业科学院基本业务费[200814(基)];现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目。

第一作者简介:曾维英(1981-),女,助理研究员,研究方向为大豆遗传育种与分子生物学。E-mail: zengweiyang\_1981@163.com。

的材料使得野生大豆的遗传多样性水平得到提高,对野生大豆进行补充考察和收集是有价值的。另外,研究者分别对河南<sup>[2]</sup>、山西<sup>[3]</sup>、北京<sup>[4]</sup>、冀东沿海地区<sup>[5]</sup>及黑龙江省的野生大豆采用 SSR 分子标记方法进行了遗传多样性分析,均表现出丰富的遗传多样性。但应用分子标记对广西野生大豆进行遗传多样性的研究鲜有报道,该研究拟利用 SSR 标记从分子水平上对 200 份新收集野生大豆资源的遗传多样性进行研究。通过对广西野生大豆资源的分子水平进行多样性分析,试图阐明广西野生大豆资源的遗传多样性情况,从而为广西野生大豆资源的保护和收集提供理论依据;还可以挖掘野生大豆优良基因,为大豆育种提供宝贵的基础材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

2008 年 9~10 月,对桂林、柳州和贺州三市的 10 个县(区)30 多个乡镇野生大豆分布情况、生长环境及种质资源进行考察、收集。根据野生大豆的叶形、茸毛色、荚色、荚形、花序长短等表型性状收集野生大豆资源 200 份。2009 年 3 月份种植野生大豆,长出三出复叶时取嫩叶片,贮存在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 取 2 g 左右新鲜叶片放入研钵中,加入 PVP 和液氮,用组织研磨棒研磨直至叶片成粉末状。叶片 DNA 提取方法参考周思君<sup>[6]</sup>的 SDS 法,在一些具体操作上略有改进。

1.2.2 引物选择 利用 10 份 1980~1981 年收集的 12 份新收集的广西野生大豆材料对谢华等<sup>[7]</sup>筛选的核心引物进行筛选,共筛选出 23 对扩增条带清晰、等位变异较为丰富、适用于广西野生大豆资源遗传多样性研究的 SSR 引物。SSR 引物序列来自美国农业部大豆基因组数据库(<http://129.186.26.94/SSR.html>),SSR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 PCR 反应与电泳检测 PCR 反应在 Bio-rad 公司的扩增仪上进行,反应体系为 15.0  $\mu\text{L}$ ,其中  $10\times$  PCR 反应缓冲液 1.36  $\mu\text{L}$ , 2.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

$\text{MgCl}_2$  0.8  $\mu\text{L}$ , 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs 0.24  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Taq DNA 聚合酶 0.1  $\mu\text{L}$ , 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SSR 引物 3.0  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 50~100 ng,最后加 ddH<sub>2</sub>O 至 15.0  $\mu\text{L}$ 。SSR 反应程序为  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 30 个循环;最后在  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min,  $10^{\circ}\text{C}$  保温。扩增产物在 8% 的聚丙烯酰胺非变性凝胶上电泳分离 2 h(恒定功率 40 W),银染检测。

1.2.4 SSR 数据分析 所有材料各 SSR 位点的不同等位变异在银染的聚丙烯酰胺凝胶上都表现为谱带的有和无,将“有”赋值为“1”,“无”赋值为“0”,建立材料 SSR 标记的 0、1 矩阵。然后计算各对 SSR 引物的 Shannon-weaver 遗传多样性指数和 Simpson 指数。Shannon-weaver 遗传多样性指数 ( $H'$ ) =  $-\sum p_j \ln p_j$ ; Simpson 指数 =  $1 - \sum p_j^2$ ;群体平均遗传多样性指数则为:  $H = \sum H_i/r$ ,其中  $p_j$  为  $i$  位点第  $j$  个等位变异的频率,  $r$  为调查位点数。

利用 NTSYS 2.10 软件计算材料间的 Nei's 标准遗传距离(D),以非加权类平均法(UPGMA)进行聚类分析,建立树状聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传多样性分析

引物检测分析结果(表 1)显示,23 对引物都表现为多态性。23 对 SSR 引物在 200 份野生大豆资源中共检测到 137 个等位基因变异,平均每个位点有 5.96 个等位变异数,等位变异数目范围为 3~11 个,其中以 satt226(位于 D2 连锁群)的等位变异数最少,为 3 个;以 satt577(位于 B2 连锁群)的等位变异数最多,为 11 个,说明 Satt577 变异丰富;等位变异数介于 6~11 个的引物有 12 对,5 个以下的有 11 对,不同位点等位变异数不等。

不同的 SSR 引物多态性信息量存在着一定的差异,SSR 位点的 Simpson 指数分布范围为 0.503~0.834,平均为 0.689,其中以 satt590(位于 M 连锁群)的 Simpson 指数最低(0.503),satt197(位于 B1 连锁群)的 Simpson 指数最高(0.834);Shannon-weaver 指数分布范围为 0.407~1.444,平均为 0.683,其中以 satt590(位于 M 连锁群)的 Shannon-

weaver 指数最低(0.407),satt197(位于 B1 连锁群)的 Shannon-weaver 指数最高(1.444)。

从表 1 可以看出 satt197 的 Simpson 指数与 Shannon-weaver 指数最高,其等位变异数为 10 个;而 satt590 的 Simpson 指数与 Shannon-weaver 指数最低,其等位变异数为 4 个。这 3 个评价遗传多样性

水平的指标具有很大程度的一致性,也就是说当某一引物的等位变异数较多时,其 Simpson 指数与 Shannon-weaver 指数也较高<sup>[8]</sup>。satt577 和 satt243 引物的等位变异数也较多,Simpson 指数和 Shannon-weaver 指数也较大。

表 1 23 对 SSR 引物遗传多样性指数

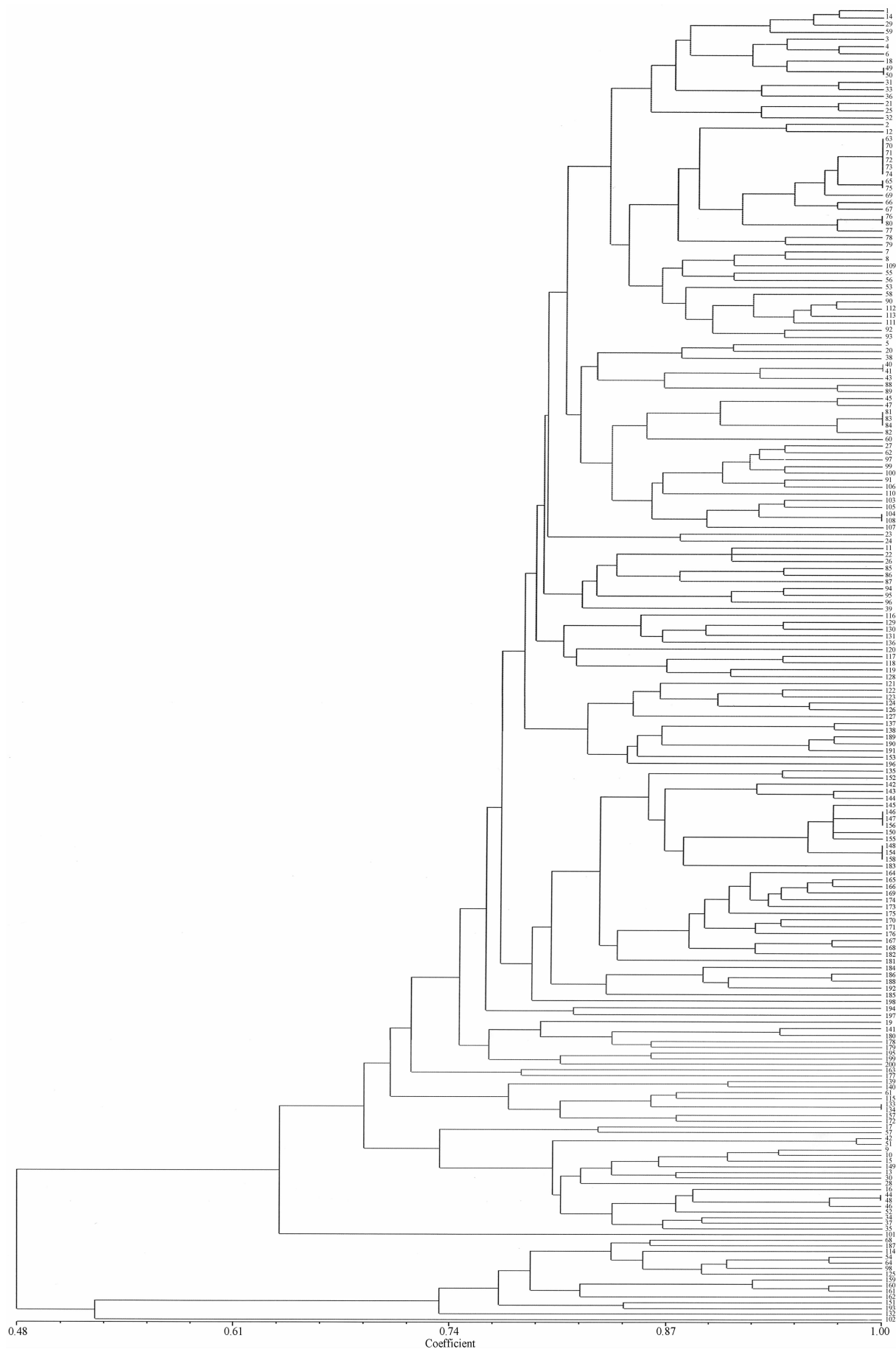
Table 1 Genetic diversity index of 23 loci SSR primers

SSR 引物 Primer	连锁群 Linkage group	等位基因 Alleles	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 H'	SSR 引物 Primer	连锁群 Linkage group	等位基因 Alleles	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 H'
Satt197	B1	10	0.834	1.444	Satt462	L	7	0.726	0.644
Satt453	B1	5	0.723	0.541	Sat_099	L	5	0.584	0.457
Satt556	B2	6	0.759	0.627	Satt022	N	5	0.719	0.621
Satt577	B2	11	0.774	0.747	Satt590	M	4	0.503	0.407
Satt180	C1	4	0.689	0.621	Satt243	O	9	0.823	0.826
Satt002	D2	6	0.742	0.690	Satt259	O	6	0.603	0.689
Satt226	D2	3	0.523	0.633	Satt345	O	7	0.658	0.572
Satt268	E	7	0.608	0.962	Satt184	D1a + Q	5	0.711	0.611
Sat_122	E	4	0.714	0.593	Satt203	D1a + Q	4	0.609	0.575
Satt146	F	4	0.543	0.622	Satt267	D1a + Q	6	0.731	0.754
Satt279	H	7	0.752	0.801	Satt216	D1b + W	5	0.744	0.561
Satt442	H	7	0.769	0.719	平均 Mean		5.96	0.689	0.683

2.2 品种间遗传相似性和聚类分析

利用 NTSYS 2.10 软件计算 200 份野生大豆材料间的遗传相似系,发现这些材料相互间的遗传相似系数的分布范围为 0.266~0.969,平均为 0.720;遗传距离介于 0.031~0.634 之间,平均遗传距离为 0.280。根据 23 对引物在 200 份野生大豆材料中扩增获得的 137 个等位变异,用 UPMGA 法构建 SSR 聚类图(图 1)。对 200 份野生大豆进行聚类分析结果表明,可以把这些材料分为 3 大类。第 1 大类主要为材料 102,材料 102 为半野生大豆、绿色种皮,收集于灌阳县县城边的荒地;第 2 大类包含 15 份野

生大豆,主要收集于灵川县、灌阳县、恭城县 3 县的 4 个乡镇;大部分野生大豆聚在第 3 大类中,包含 184 份材料,材料来自桂林市雁山区、兴安县、全州县、荔浦县、恭城县、平乐县等地的 26 个乡镇。绝大部分野生大豆在遗传相似系数 0.74~0.87 之间有效地区分开,其中第 3 大类在遗传相似性系数为 0.74 又聚为 6 亚类。同一地区的大部分材料被聚到一类中,即遗传距离很近,但其中也有部分材料聚到了其它类中,表明野生大豆材料地区内存在着明显的遗传分化,因此,聚类结果与野生大豆的地理来源、表型性状都具有一定相关性。



E ä, ää) OP ä ä ( F E

ö ää, ó

" !

&amp;

!

ää " ! #

### 3 结论与讨论

该研究利用 23 对 SSR 引物对 200 份广西新野生大豆资源进行遗传多样性分析,共扩增出 137 个等位变异,等位变异数目范围为 3~11 个,平均每对 SSR 引物扩增出 5.96 个;SSR 位点的 Simpson 指数分布范围为 0.503~0.834,平均为 0.689;Shannon-weaver 指数分布范围为 0.407~1.444,平均为 0.683;遗传相似系数分布范围为 0.266~0.969,平均相似系数为 0.720。根据 SSR 分子标记数据分析对 200 份野生大豆进行聚类,可以把这些材料分为 3 大类,同一地区的大部分材料被聚到一类中,即遗传距离很近,但其中也有部分材料聚到了其它类中,表明野生大豆材料地区内存在着明显的遗传分化,野生大豆的遗传多样性与地理来源、野生大豆的表型性状具有一定相关性。

海林等<sup>[9]</sup>利用 12 对 SSR 引物对 67 份半野生大豆种质进行了遗传多样性分析,共检测到 184 个等位基因变异,平均每个位点等位基因数目为 15.41 个。李向华等<sup>[1]</sup>以 65 份东北地区新收集野生大豆资源以及与其来源相同的已经编目保存的资源为材料,利用 60 对 SSR 引物进行遗传分析,结果表明新收集材料在 22 个位点的遗传多样性指数都高于以前收集的资源,有 62 个等位变异是新收集材料所特有,新收集材料与其它资源间的平均遗传相似系数为 0.1918。说明新收集的材料使得野生大豆的遗传多样性水平得到提高,对野生大豆进行补充考察和收集是有价值的。王果等<sup>[2]</sup>利用 33 对 SSR 引物分析河南省 268 份野生大豆材料,共检测到 443 个等位变异,每个 SSR 位点的等位变异范围为 6~22 个,平均为 13.4 个。SSR 引物 Simpson 指数的平均值为 0.7196;Shannon-weaver 指数的平均值为 1.7741。王果等<sup>[3]</sup>利用 30 对 SSR 引物分析了 49 份山西太原野生大豆材料,共检测到 208 个等位变异,每个 SSR 位点的等位变异范围为 4~11 个,平均为 7 个;引物的 Shannon-weaver 指数的分布范围为 0.7451~2.1081,平均为 1.5030;位点多态信息量(PIC)值的分布范围为 0.3813~0.8575,平均为 0.7007。严茂粉等<sup>[4]</sup>使用 40 对 SSR 引物分析了北京地区野生大豆天然种群的遗传结构与遗传多样性,10 个种群共检测到 526 个等位变异,平均每对引物等位基因数为 13.15 个,种群平均 Shannon 指数为 0.658。王丹等<sup>[5]</sup>利用 27 对 SSR 引物对冀东沿海地区的 370 及黑龙江省的 2 份野生大豆为材料进行遗传多样性分析,27 个 SSR 位点扩增出 209 个多态性带,平均每个位点等位基因数目为 7.74 个,SSR 位点 Simpson 指数为 0.3998~0.8358,Shannon-weaver 指数为 0.7567~1.9879,冀东沿海地区野生大豆材料表现出丰富的遗传多样性。对比上述研究结果,该研究的 200 份材料虽然表现出

了较高的遗传多样性,但遗传变异相对来说还偏小,导致这一结果可能有 3 个原因:一是材料收集的地理范围较狭窄,主要集中在广西桂林的东部;二是研究采用的 SSR 引物数目较少;三是采集的样本量还不够大,遗漏了一些遗传变异。因此,有必要继续对广西的野生大豆资源进行抢救性收集、鉴定和利用。

此外,satt197、satt577 和 satt243 引物在研究中不仅扩增出的等位变异数较多,而且 Simpson 指数和 Shannon-weaver 指数也较大,因此可以优先应用于广西大豆种质资源的鉴别和遗传多样性评价。

### 参考文献

- [1] 李向华,田子盟,李福山.新考察收集野生大豆与已保存野生大豆的遗传多样性比较[J].植物遗传资源学报,2003,4(4):345-349. (Li X H, Tian Z G, Li F S. Genetic analysis of newly collected wild soybean materials and conserved germplasm from the same place [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2003, 4(4): 345-349.)
- [2] 王果.河南省野生大豆资源遗传多样性分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2006:24-26. (Wang G. The genetic diversity of annual wild soybeans in Henan province [D]. Yangling: Northwest A & F university, 2006: 24-26.)
- [3] 王果,胡正,张保缺,等.山西省野生大豆资源遗传多样性分析[J].中国农业科学,2008,41(7):2182-2190. (Wang G, Hu Z, Zhang B Q, et al. Genetic diversity analysis of Shanxi's wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(7): 2182-2190.)
- [4] 严茂粉,李向华,王克晶.北京地区野生大豆种群 SSR 标记的遗传多样性评价[J].植物生态学报,2008,32(4):938-950. (Yan M F, Li X H, Wang K J. Evaluation of genetic diversity by SSR markers for natural populations of wild soybean (*Glycine soja*) growing in the region of Beijing [J]. China Journal of Plant Ecology, 2008, 32(4) 938-950.)
- [5] 王丹,乔亚科,韩粉霞,等.河北东部沿海地区野生大豆 SSR 多样性分析[J].大豆科学,2010,29(4):555-558. (Wang D, Qiao Y K, Han F X, et al. Genetic diversity of *Glycine soja* in eastern coastal area of Hebei province [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 555-558.)
- [6] 周思君.小样品大批量大豆模板 DNA 快速分离法[J].大豆科学,1999,18(4):318-321. (Zhou S J. Rapid isolation of soybean DNA for PCR with large numbers of small samples [J]. Soybean Science, 1999, 18(4): 318-321.)
- [7] 谢华,常汝镇,曹永生,等.利用中国秋大豆(*Glycine max* (L.) Merr)筛选 SSR 核心位点的研究[J].中国农业科学,2003,36(4):360-366. (Xie H, Chang R Z, Cao Y S, et al. Selection of core SSR loci by using Chinese autumn soybean [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(4): 360-366.)
- [8] 高慧.北方沿海滩涂野生大豆资源的收集与其遗传多样性的 SSR 分析[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2008:22. (Gao H. Genetic diversity of newly collected wild soybean in coastal land in north of China revealed by SSR markers [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008: 22.)
- [9] 海林,王克晶,杨凯.半野生大豆种质资源 SSR 位点遗传多样性分析[J].西北植物学报,2002,2(4):751-757. (Hai L, Wang K J, Yang K. Genetic diversity of semi-wild soybean using SSR markers [J]. Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica, 2002, 22(4): 751-757.)