

野生大豆遗传多样性研究 I

4个天然居群等位酶水平的分析*

裴颜龙 王 岚 葛 颂** 王连铮

(中国农业科学院作物育种栽培研究所)

摘 要

本文采用水平淀粉凝胶电泳技术对分布于北京、山东和大连4个野生大豆天然居群共计120个体进行了等位酶水平遗传多样性分析。7个酶系统13个等位酶位点的检测表明,该地区野生大豆天然居群遗传变异水平较高,多态位点比率 $P=69.20$, 等位基因平均数 $A=1.77$, 平均期望杂合度 $He=0.133$, 居群间有较明显的遗传分化, 基因分化系数 $G_{st}=0.391$, 即有39.1%的遗传变异存在于居群间。本文结果表明该地区遗传固定指数 F 偏小, 居群异交率较高。4个居群遗传多样性明显高于日本野生大豆研究结果, 而与韩国野生大豆遗传变异水平相近, 进一步证明我国为野生大豆遗传变异中心。

关键词 野生大豆; 等位酶; 居群; 遗传多样性

野生大豆 (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) 是栽培大豆近缘祖先种, 主要分布在中国、朝鲜半岛、日本和俄罗斯远东地区, 其中我国分布最为广泛, 南起北纬 24° 左右的广东、广西北部地区、北至 53° 左右黑龙江流域均有野生大豆天然居群分布^[3,5]。在广大的分布区内不仅居群数量大, 个体数目多, 而且随着环境因子的变化, 其居群特征也在形态、细胞、等位酶和 DNA 水平上发生相应的变异。由于该类群具有重要的经济意义, 国内外研究人员从不同学科作了大量工作。我国学者对野生大豆进行了广泛的调查, 并收集野生大豆材料 5200 余份, 分别开展了种子蛋白变异, 品质化学分析, 光周期反应和一些农艺性状评估和利用方面研究^[3,7,10]。在国际上, 美国的研究人员在积极开展野生资源收集和整理的同时, 以产于日本和韩国的野生大豆天然居群为材料, 进行了形态性状和等位酶变异相结合的综合研究^[13,16,20], 发现居群的遗传变异很丰富, 特别是韩国6个野生大豆天然居群等位酶分析结果显示该地区高水平的遗传变异, 进而推测韩国为野生大豆主要遗传变异中心之一^[20]。但关于我国野生大豆天然居群遗传多样性的研究, 国内仅见个别地点报道^[6,9]。

* 国家自然科学基金资助项目

** 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室

本文于1996年4月15日收到。This paper was received on April 15, 1996.

本文以野生大豆天然居群为研究对象,采用水平切片淀粉凝胶电泳技术,开展了居群间和居群内等位酶水平的遗传多样性研究,为全面揭示野生大豆天然居群形态、细胞、等位酶和 DNA 水平上的遗传多样性研究提供资料,为更有效的保存和利用野生大豆资源提供科学依据。

表 1 电泳检测所用酶系统、凝胶缓冲系统和位点数目

Table 1 Enzyme systems assayed, gel buffers and the number of loci scored

| 酶系统 Enzyme system | 缩写 Abbreviation | 酶分类编码 EC No. | 缓冲系统 Gel buffer | 位点数目 No. of loci |
|--|--------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| 天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase | AAT | EC 2. 6. 1. 1 | I I | 2 |
| 心肌黄酶 Diaphorase | DIA | EC 1. 6. 2. 2 | I | 2 |
| 异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase | IDH | EC 1. 1. 1. 42 | I | 1 |
| 磷酸葡萄糖脱氢酶 Phosphogluconate dehydrogenase | PGD | EC 1. 1. 1. 44 | I | 1 |
| 磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucosomerase | PGI | EC 5. 3. 1. 9 | I | 3 |
| 磷酸葡萄糖变位酶 Phosphoglucumutase | PGM | EC 1. 1. 1. 25 | I I | 2 |
| 磷酸丙糖异构酶 Triosephosphale isomerase | TPI | EC 5. 3. 1. 1 | I I | 2 |

材料和方法

一、居群采样

野外工作于 1995 年 9—10 月进行。4 个居群分别取自北京大学校园(13 株、简称北大居群);北京昌平中国农业科学院作物育种栽培研究所昌平基地(30 株,简称昌平居群);山东省禹城市中国农业科学院禹城试验基地(30 株、简称禹城居群)。辽宁省大连市(47 株,简称大连居群)。取样时严格按单株收集豆荚,保证个体间距大于 5m,及时脱粒并保存在 4℃冰箱中备用。

二、酶电泳实验

每株取 2 粒健康饱满的种子,砂纸擦破种皮,后放入装有蛭石的培养皿中萌发,取 5—7 天幼苗子叶约 30mg,加入 0. 1ml 的研磨缓冲液,在冰浴中研磨提取,提取液配方参考 Soltis 等^[7],稍加调整而成。即 0. 1M Tris-HCl(pH7. 5),0. 001M 乙二胺四乙酸四钠盐(EDTA)、0. 02%巯基乙醇、8%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、10%二甲亚砜(DMSO)。以 2mm×6mm 的纸条(Wicks)(新华 1 号滤纸)蘸吸研磨后的提取液,后放入培养皿存-75℃冰箱备用。

采用水平式淀粉胶电泳技术,所用水解淀粉为 Sigma 公司产品(S-4501),淀粉胶浓度为 12%。采用 2 种凝胶缓冲系统对 12 种酶系统进行了检测,所用凝胶缓冲液系统均根据 Soltis 等^[17]稍加调整而成:

I. 电极缓冲液:0.4M Tris-HCl pH 7.0;胶缓冲液:0.02M 组氨酸 pH7.0。

II. 电极缓冲液:0.4M Tris-HCl pH 7.0;胶缓冲液:0.005 组氨酸 pH7.0。

酶的组织化学染色法详见文献^[17,18]。其中 AAT 为液染,其它均为胶染^[17]。

三、等位酶分析及数据处理

酶谱的遗传分析参考前人的工作,结合谱带在居群中的分离式样和酶分子结构推断。酶谱记录和解释参照王中仁^[1,2]。通过电泳分析获得二倍体基因型频率进而计算以下遗传参数。

1. 多态位点百分率 P : $P = (\text{多态位点数} / \text{检测位点总数}) \times 100\%$

2. 每个位点等位基因平均数 A : $A = \text{各位点等位基因数的总和} / \text{检测位点总数}$

3. 杂合度观测值 H_o : $H_o = \text{杂合体个体数} / \text{样本大小}$

4. 杂合度期望值 H_e : $H_e = \sum h_e / n, h_e = 1 - \sum P_i^2$

P_i 为单个位点上第 i 个等位基因的频率, n 为检测位点的总数。

5. 基因分化系数 G_{st} : $G_{st} = D_{st} / H_t = (H_t - H_s) / H_t$

其中, H_t 和 H_s 分别为总群体和亚群体的基因多样性(平均期望杂合度 H_e), 计算同前 H_e 的计算。 D_{st} 为亚群体间基因多样性 $D_{st} = H_t - H_s$ 。

6. 遗传一致度 (I) 和遗传距离 (D)

$$I = \sum X_i Y_i / \sum x_i^2 \sum Y_i^2$$

其中, X_i = X 群体第 i 个等位基因频率, Y_i = Y 群体第 i 个等位基因频率。

$$D = -\ln I$$

7. 固定指数 (F): $F = 1 - H_o / H_e$

其中 H_o 和 H_e 计算同前

以上各遗传参数的详细计算方法和意义均参考文献^[11,12]。

结 果

本研究共测定 12 种酶系统,其中 10 种酶系统获得清晰和稳定的谱带,其中遗传判别可靠的酶系统有 7 种,共受 14 个基因位点编码,这些酶系统的种类,编码位点的数目,检测所用的凝胶缓冲系统详见表 1。本文以上述 7 种酶系统 13 个位点为遗传标记进行居群遗传学分析。

对 4 个居群的分析表明,在所确立的 13 个位点上有了 4 个位点(Dia-1、Pgi-3、TPi-1、TPi-2)为单态(只有 1 个等位基因),其余 9 个位点均为多态位点(有 2 个以上的等位基因),多态位点的比率为 69.20。表 2 为上述 9 个多态位点等位基因种类及其在 4 个居群和总居群的频率。由表 2 可见,9 个多态位点中 Idh-1 位点有 3 个等位基因,其余多态位点有 2 个等位基因。根据表 2 数据计算出居群变异水平的几个指标列于表 3。由表 3 可见,

不同居群多态位点数目变化比较明显,昌平和大连居群较高($P=53.8$),禹城居群和北大居群均较低($P=7.7$),总居群的 P 值和平均值分别为 69.2 和 38.57。各居群观测杂合度(H_o)以大连居群最高(0.48),北大居群最低(0.00)。各居群期望杂合度(H_e)以昌平居群最大(0.148),禹城居群最小(0.007)。

表 2 4 个野生大豆居群在 9 个多态位点上的基因频率

Table 2 Allele frequencies at nine polymorphic loci in the four populations of *Glycine soja*

| | | 居群 Population | | | | |
|-------------|---|---------------|-----------------|--------------|-------------|--------------|
| 位点 Locus | | 禹城 Yucheng | 昌平 Changping | 大连 Dalian | 北大 Beida | 总居群 Total |
| Aat-1 | a | 1.000 | 0.500 | 0.000 | 0.000 | 0.375 |
| | b | 0.000 | 0.500 | 1.000 | 1.000 | 0.625 |
| Aat-2 | a | 0.050 | 0.083 | 0.000 | 0.000 | 0.033 |
| | b | 0.950 | 0.917 | 1.000 | 1.000 | 0.967 |
| Dia-3 | a | 0.000 | 0.650 | 0.543 | 0.000 | 0.375 |
| | b | 1.000 | 0.350 | 0.457 | 1.000 | 0.625 |
| ldh-1 | a | 0.000 | 0.000 | 0.042 | 0.000 | 0.017 |
| | b | 1.000 | 1.000 | 0.926 | 1.000 | 0.970 |
| | c | 0.000 | 0.000 | 0.032 | 0.000 | 0.013 |
| Pgd-1 | a | 0.000 | 0.300 | 0.255 | 0.615 | 0.242 |
| | b | 1.000 | 0.700 | 0.745 | 0.385 | 0.758 |
| Pgi-1 | a | 1.000 | 0.967 | 0.979 | 1.000 | 0.984 |
| | b | 0.000 | 0.033 | 0.021 | 0.000 | 0.016 |
| Pgi-2 | a | 1.000 | 0.967 | 0.979 | 1.000 | 0.984 |
| | b | 0.000 | 0.033 | 0.021 | 0.000 | 0.016 |
| Pgm-1 | a | 0.000 | 0.133 | 0.032 | 0.000 | 0.046 |
| | b | 1.000 | 0.867 | 0.968 | 1.000 | 0.954 |
| Pgm-2 | a | 0.000 | 0.000 | 0.207 | 0.000 | 0.081 |
| | b | 1.000 | 1.000 | 0.793 | 1.000 | 0.919 |

表 3 野生大豆 4 个居群的遗传变异性指标

Table 3 Genetic variability in the four populations of *Glycine soja*

| 居群 Populations | A | P | Ho | He | F | t |
|----------------|-----|------|-------|-------|--------|-------|
| 禹城 Yucheng | 1.1 | 7.7 | 0.008 | 0.007 | -0.143 | 1.334 |
| 昌平 Changping | 1.5 | 53.8 | 0.036 | 0.148 | 0.757 | 0.138 |
| 大连 Dalian | 1.6 | 53.8 | 0.048 | 0.116 | 0.586 | 0.261 |
| 北大 Beida | 1.1 | 7.7 | 0.000 | 0.038 | 1.000 | 0.000 |
| 平均值 Mean | 1.4 | 38.6 | 0.031 | 0.091 | 0.659 | 0.206 |
| 总居群 Total | 1.7 | 69.2 | 0.028 | 0.133 | 0.789 | 0.118 |

* 根据全部 13 个位点的计算值. Calculated based on all 13 loci

基因多样性值见表 4, 居群间的基因分化系数 $G_{st}=0.391$, 即在总的遗传变异中有 39.1% 的变异存在于居群间。居群间遗传一致度 (I) 或称相似性系数和遗传距离 (D) 列于表 5。禹城居群和大连居群间遗传一致度最低 ($I=0.886$), 昌平居群和大连居群遗传一致度最高 ($I=0.973$)。

表 4 野生大豆 4 个居群基因多样性统计量*

Table 4 Analysis of gene diversity at eleven polymorphic loci among the four populations

| 位点 Locus | HT | HS | DST | GST |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| Aat-1 | 0.469 | 0.125 | 0.344 | 0.733 |
| Aat-2 | 0.064 | 0.062 | 0.002 | 0.039 |
| Dia-3 | 0.469 | 0.266 | 0.203 | 0.432 |
| Idh-1 | 0.059 | 0.056 | 0.003 | 0.043 |
| Pgd-1 | 0.367 | 0.282 | 0.085 | 0.231 |
| Pgi-1 | 0.031 | 0.031 | 0.000 | 0.015 |
| Pgi-2 | 0.031 | 0.031 | 0.000 | 0.015 |
| Pgm-1 | 0.088 | 0.081 | 0.007 | 0.076 |
| Pgm-2 | 0.149 | 0.125 | 0.024 | 0.163 |
| 平均值 Mean | 0.133 | 0.081 | 0.052 | 0.391 |

* H_t , H_s 和 D_{st} 的平均值为全部 13 个位点的平均值。Gst 平均值由 H_t , H_s 和 D_{st} 的平均值计算得到 [$G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$]。

Means of H_t , H_s and D_{st} are averages over all 13 loci. mean for G_{st} is computed from the mean values for H_t , H_s and D_{st} .

讨 论

Hamrick 和 Godt^[14]根据 165 个属, 449 个物种共 633 篇等位酶研究比较了不同植物的遗传多样性水平。从分类群上看, 裸子植物变异水平最高, 一年生, 短寿多年生和长寿多年生植物水平相近; 从繁育系统看, 以异交为主的物种变异水平最高, 自交和异交混合的次之, 自交植物最低。野生大豆作为一年生自交物种与相关类群比较, 明显高于自交类群的平均值 ($A=1.31$, $P=20.0$, $H_e=0.074$), 也高于一年生类群的平均值 ($A=1.48$, $P=30.0$, $H_e=0.105$), 而表现出高水平的遗传多样性。

Yu 等^[20]。Bult 等^[13]分别以产于韩国和日本的野生大豆天然居群开展了等位酶水平遗传多样性分析。发现产于日本 Mishima 市郊的居群遗传多样性较低 ($A=1.14$, $P=0.14$, $H_e=0.046$), 而韩国材料表现出高水平的遗传多样性 ($A=1.4$, $P=0.37$, $H_e=0.134$)。相比之下, 本研究结果 (见表 2) 明显高于日本材料, 在 P 和 H_e 值上分别为日本居群的 2.76 和 1.98 倍, 而与韩国居群相近, 其中 P 值略高于韩国材料。在居群分化指标上, 已表明 4 个居群间出现明显的分化, 但并没发现与地理分布有明显的相关。例如, 相距最近的北大居群与昌平居群遗传一致度较低, 而相距最远的北大居群和大连居群遗传一致度较高。此

结果可能与北大居群取样数目偏少有关。Yu 等^[20]、Bult 等^[13]、李军等^[6]、胡志昂等^[9]研究结果也表明居群间分化与地理分布无明显相关,这很可能与各自工作的取样地区偏小有关。同时也可能野生大豆种子散播受人类活动和动物取食影响,使得相距较远的居群具有相同的种源,综合前人工作发现本文 4 个居群与韩国的 6 个居群均表现出高水平遗传多样性而与日本材料不同,表明本地区和朝鲜半岛可能是野生大豆多样性中心之一,相信随着研究居群数目和酶系统数量的增加,会得出更科学具体的结论。

表 5 居群间遗传一致度(I)和遗传距离(D),右上角为遗传一致度(I)左下角为遗传距离

Table 5 Genetic similarity(I) and distance(D) between populations of *Glycine soja*, above diagonal; genetic identity(I); below diagonal; genetic distance

| 居群 Population | 禹城 Yucheng | 昌平 Changping | 大连 Dalian | 北大 Beida |
|------------------|---------------|-----------------|--------------|-------------|
| 禹城 Yucheng | * * * * | 0.939 | 0.886 | 0.892 |
| 昌平 Changping | 0.063 | * * * * | 0.973 | 0.936 |
| 大连 Dalian | 0.121 | 0.027 | * * * * | 0.963 |
| 北大 Beida | 0.114 | 0.066 | 0.038 | * * * * |

关于野生大豆等位酶水平表现出高水平遗传多样性,目前尚无合理的解释,主要的原因可能是缺少关于野生大豆物种特性方面的研究工作,如分布范围问题、繁育系统问题、种子散布机制等问题还不十分清楚,而这些特性都将直接影响遗传多样性水平;另一方面对分布在中国的野生大豆居群缺少相关研究,无法全面系统探讨遗传多样性时空变化。值得注意的是野生大豆繁育系统的变异,人们通常认为它是严格自交的物种,异交率 $<1\%$ ^[15],但是,King T. C. 认为异交率数值在 1—2% 水平。况且交配系统尚受光照、湿度、温度等多因子影响。居群间交配系统的样式及分化程度以及不断天然杂交和不断自然选择等因子,很可能是野生大豆表现高水平遗传多样性主要原因。本文采用 Wright^[19]提出的用固定指数(F)来近似估算异交率(t); $t=(1-F)/(1+F)$ 的方法,计算出值见表 3,表明野生大豆天然居群异交率居群间有较大的分化,总居群水平上异交率比以往的报道要高。初步分析认为有二种可能:一种情况是本地区野生大豆居群的繁育系统与其他地区出现分化;另一种情况是所选酶系统偏少而造成的统计上的一种偏差,不管怎样,繁育系统样式及居群间分化程度是一个有重要理论意义和应用前景研究课题,值得深入研究。

野生大豆是重要的作物品种资源,未来的育种能否取得持续的进展,很大程度上取决于资源的掌握和利用。目前的野生大豆资源的保存和利用情况不容乐观,一方面是缺少系统深入的居群水平的遗传多样性研究,对野生大豆遗传多样性时空变化不明确,更缺少特异种质资源分子水平遗传多样性研究,对不同遗传资源如何保存和如何利用等问题尚不十分清楚,对野生资源的利用重视不够,形成目前栽培大豆遗传基础狭窄,育种进展缓慢状况^[8]。另一方面,目前对野生大豆天然居群没有采取系统的保护措施,通常认为野生大豆居群数目多,个体数量大,不存在遗传多样性丧失的问题。事实恰好相反,野生大豆天然居群对环境因子变化十分敏感,尤其对水分变化。而目前水域的破坏又比较严重,因此遗传多样性丧失正在加剧^[4,9]。建议有关单位应支持系统开展遗传多样性的研究。为有效的就地保存、迁地保存和育种提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] 王中仁, 1994c, 等位酶分析的遗传学基础, 生物多样性, 2(3), 149~156
- [2] 王中仁, 1994d, 等位酶分析的遗传学基础, 生物多样性, 2(4), 213~219
- [3] 王连铮等, 1983, 黑龙江省野生大豆考察与研究, 植物研究, 3(3), 116~129
- [4] 付立国, 1992, 中国植物红皮书—稀有濒危植物第一册, 科学出版社
- [5] 全国野生大豆考察组, 1983, 中国野生大豆资源考察报告, 中国农业科学, 6, 69~75
- [6] 李军等, 1995, 同工酶水平野生大豆种群内分化的研究, 植物学报, 37(9), 669~676
- [7] 李福山, 1993, 中国野生大豆的资源分布及生态分化研究, 中国农业科学, 26(2), 47~58
- [8] 杨琪, 1993, 大豆遗传基础拓宽问题, 大豆科学, 12(1), 75~80
- [9] 胡志昂等, 1985, 北京地区野生大豆天然群体遗传结构, 植物学报, 27(6), 599~604
- [10] 徐豹等, 1985, 中国野生大豆种子蛋白的分析、T 和 S 各等位基因频率、地理分布与大豆起源问题, 大豆科学, 4(1), 7~13
- [11] 葛颂等, 1988, 用同工酶研究马尾松群体的遗传结构, 林业科学, 24(4), 399~409
- [12] 葛颂, 1989, 用同工酶定量分析林木群体变异和分化的方法, 西南林学院学报, 9(1), 84~91
- [13] Bult, C. J. et al. 1992. Electrophoretic and morphological variation within and among natural populations of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) Bot. Bull. Academia Sinica 33:111-122
- [14] Hamrick J. L. et al., 1990, Allozyme diversity in plant species. In: Brown A. H. D. et al. (eds.) Plant Population Genetics, Breeding, and Genetics Resources. Sunderland, Mass: Sinauer, 43-63
- [15] John, B. Carlson and Nels R. Lersten, 1987. Reproductive Morphology 95-134 in Wilcox J. R., (eds.) 1987, Soybean: Improvement, Production, and Uses Amer. Soc. Agron. USA
- [16] King Y. T. et al., 1990. Comparing differentiation of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) populations based on isozymes and quantitative traits, Bot. Bull. Academia Sinica 31:129-142
- [17] Soltis D. E. et al., 1983. Starch gel electrophoresis of ferns, a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. Amer Fern J. 73(1):9~29
- [18] Wendel, J. F. et al., 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D. E. and Soltis, P. S. (eds.) Isozymes in plant Biology, Washington DC, Dioscorides Press, 5~45
- [19] Wright S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating, Evolution 19:395~420
- [20] Yu H. R. et al., 1993. Genetic Variation in South Korea natural populations of wild soybean (*Glycine soja*), Euphytica 68:213~221

STUDIES ON GENETIC DIVERSITY OF *GLYCINE SOJA* - ISOZYME VARIATION IN FOUR POPULATIONS

Pei Yanlong Wang Lan Ge Song¹ Wang Lianzheng

(*Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS*)

(¹*Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, CAS*)

Abstracts

Genetic variation was estimated by starch gel electrophoretic resolution of 14 putative isozyme loci in four populations of the wild soybean from Beijing, Shandong and Liaoning provinces, China. The results indicated the presence of obvious high variation. 9 loci were polymorphic loci. The average number of alleles per locus, percent of polymorphic loci and expected heterozygosity in the total population were 1.77, 69.20% and 0.133, respectively. This amount of variation was higher than the average for 123 self-fertilized plant species and 473 plant species of all mating systems, the level of genetic variation was compatible to that of South Korea.

Key words *Glycine soja*; Isozyme; Population; Genetic diversity

讣 告

我国著名作物遗传育种学家、南京农业大学博士生导师,《大豆科学》编委会顾问马育华教授因病不幸于 1996 年 10 月 9 日在南京逝世,享年 84 岁。

马育华教授是我国作物遗传育种学科的奠基人之一,毕生从事植物育种原理和方法、应用数量遗传与试验统计、大豆遗传育种等领域的教学和科学研究工作,培养了大批优秀人才,取得了丰硕的成果,为我国农业教育、科研事业的发展做出了杰出的贡献。

《大豆科学》编辑部

一九九六年十月十日