

# 湖北省大豆种质资源的遗传多样性分析<sup>\*</sup>

周 蓉 张小娟 王贤智 沙爱华 周新安 涂赣英

(中国农业科学院油料作物研究所, 农业部油料作物遗传改良重点开放实验室, 武汉 430062)

**摘要** 利用 SSR 标记和 UPGMA 聚类分析, 对 64 份湖北省大豆种质资源进行遗传多样性分析。结果表明, 27 对 SSR 引物扩增出 166 条多态性带, SSR 的遗传多样性指数分布范围, Simpson 指数为 0.2406~0.9037, 平均值 0.6960; Shannon weaver 指数为 0.4800~2.4684, 平均值 1.4538。聚类分析将湖北省地方大豆品种分为 3 个类群, 包括鄂中南江汉平原大豆类群, 鄂西北大豆类群以及鄂东、鄂南和鄂西混合类群。江汉平原大豆地方品种表现出较高的遗传多样性水平。

**关键词** 大豆; 种质资源; SSR; 遗传多样性

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)03-0212-06

湖北省大豆栽培历史悠久, 是南方大豆产区之一。在湖北全省土地总面积中, 除大部分为山地(占 56%)外, 还分布有岗地、丘陵及平原等。由于地理和气候条件较为复杂, 大豆种植分布广, 用途多, 耕作制度多样化, 在长期自然选择和人工选择过程中形成了丰富的遗传类型和相应的特异种质。现已收集湖北省地方大豆品种 1200 多份, 分析表明, 湖北省的大多数县(或市)均有数量不等的地方农家品种, 因此研究湖北省大豆种质特异性和遗传多样性, 对于培育适应不同生产需求的品种将提供有益的种质类型和基因源。本研究利用 SSR 标记技术对湖北省大豆农家品种进行遗传多样性分析, 旨在了解不同地区夏大豆种质等位基因分布状况, 以期对种质资源的分类和有效利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料来自中国农科院油料所收集保存的湖北省夏大豆品种资源, 经 2004 年更新繁殖后, 从不同县(或市)来源的种质资源中随机抽取品种, 共计 64 份材料(表 1)。每份材料取 20~30 粒种子, 在光照生长箱中以清水培养成幼苗。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取及 PCR 反应** 基因组 DNA 的提取参照王珍等的 SDS 法<sup>[1]</sup>, 部分操作略有改动。取 1 周龄幼叶 200~300mg, 用液氮迅速研磨成粉末状, 置 1.5mL 离心管中并加入 650 $\mu$ L 于 65 $^{\circ}$ C 预热的 SDS 提取缓冲液, 充分混匀后放入 65 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 min。随后加入预冷 5 mol/L KAc 150 $\mu$ L, 冰浴 20 min 后以 13000r/min 离心 15 min。将上清液移入一新离心管, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 摇匀, 13000r/min 离心 8 min; 再将上清液移入另一新离心管, 加入 0.7 倍体积的异丙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaAc, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min 以上。13000r/min 离心 15 min 后, 移去上清液, 70%乙醇清洗沉淀, 室温保持 10 min 后 13000r/min 离心 5 min; 倒掉上清液后再次用乙醇清洗沉淀, 最后用 200 $\mu$ L TE 缓冲液溶解沉淀, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

实验选用 32 对 SSR 引物, 由北京三博志远生物公司合成, 引物序列来自 <http://129.186.26.94/SSR.html>。PCR 反应在 PTC-200 扩增仪上进行。总反应体积 20 $\mu$ L, 其中包括 10 $\times$  buffer 2.0 $\mu$ L, 10mmol/L dNTP 0.4 $\mu$ L, 20mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ L, 10mmol/L 引物 0.8 $\mu$ L, 2U/ $\mu$ L Taq 酶 0.5 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 13.8 $\mu$ L, 模板 DNA 1 $\mu$ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 47 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2005-11-05

基金项目: 国家“863”重大专项(2002AA207007); 农业部油料作物遗传改良重点开放实验室资助项目。

作者简介: 周蓉(1957-), 女, 研究员, 主要从事大豆种质资源研究

通讯作者: 周新安。

表 1 供试材料的编号、品种名称及来源  
Table 1 Germplasm s from different regions of Hubei province

序号 Number	统一编号 Code	品种名称 Landrace	来源 Origin	序号 Number	统一编号 Code	品种名称 Land race	来源 Origin
1	12048	大白黄豆	宜昌	33	12115	高秆青	南漳
2	12050	绿黄豆 1	新洲	34	12095	冬黄豆	宜都
3	12052	八月炸黄豆	大冶	35	12094	大青黄豆	当阳
4	12054	大青豆	汉川	36	12221	代米豆 1	长阳
5	12056	八月炸	应山	37	12143	黑黄豆	郧西
6	12029	牛毛黄 1	来凤	38	12141	绿色黄豆	郧县
7	12019	白迟黄豆 1	利川	39	12121	九月寒	宜城
8	12036	巫脸巴黄豆 1	鹤峰	40	12225	黑黄豆	老河口
9	5538	云梦花叶豆	云梦	41	12142	大粒绿	竹山
10	12067	青皮大豆	罗田	42	12184	黑皮黄豆	钟祥
11	12097	冬黄豆	枝江	43	12271	茶黄豆 2	公安
12	12098	青黄豆	秭归	44	12226	小黑豆	枣阳
13	12073	猴子毛 1	英山	45	12263	酱色黄豆 1	黄梅
14	12102	绿黄豆	五峰	46	20482	圆黄豆	兴山
15	12082	十月冬	阳新	47	20453	牛哨桩	神农架
16	12071	斑鸠黄豆	蕲春	48	20491	扇子白	房县
17	12065	八月爆	安陆	49	20521	陕西豆	竹溪
18	1208	绿皮冬黄豆	通山	50	11653	猴子毛 1	嘉鱼
19	5526	沔阳牛哨桩	仙桃	51	11661	八月炸 2	洪湖
20	12072	青皮黄豆	广济	52	11658	八月爆	赤壁
21	12066	细粒早黄豆	麻城	53	12062	被子棵黄豆 3	大悟
22	5514	襄阳八月炸	襄阳	54	5531	松滋茨衣子	松滋
23	12146	黑黄豆 1	建始	55	5548	孝感黄豆	孝感
24	12155	糙黄豆	巴东	56	5534	均县黄豆	郧县
25	12163	牛毛黄 2	宣恩	57	5550	荆州冬黄豆	荆州
26	12175	野黄豆	红安	58	5551	武昌秋黄豆	武昌
27	12182	猪肝豆	通城	59	5561	京山黄豆	京山
28	12183	八月爆	崇阳	60	5525	黄陂八月渣	黄陂
29	12124	大青豆	保康	61	5656	天门孝感豆	天门
30	12123	青豆	谷城	62	5900	荆门冬豆子	荆门
31	12133	青皮树子黄豆 1	随县	63	5855	江陵黄豆	江陵
32	12090	小青黄豆	远安	64	5680	监利重阳豆	监利

1.2.2 电泳分析检测 PCR 产物用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳,以 DYY-12 型电泳仪在 1×TBE 缓冲液中电泳 2h 左右,银染法检测。

1.2.3 数据分析 对每个 SSR 产物银染后,根据分子量 Marker DNA 片段的长度大约在 200~1200bp 之间的条带加以统计,有带记为“1”,无带记为“0”。遗传相似系数( *I* )按 Simple matching 公式

计算<sup>[2]</sup>,  $I = (n_{xy} + n_{00}) / (n_{xy} + n_x + n_y + n_{00})$ , 遗传距离  $D = (1 - I) / I$ 。 *n<sub>x</sub>* 代表成对比较的一个品种中标记到的所有带数, *n<sub>y</sub>* 代表另一个品种中标记的总带数, *n<sub>xy</sub>* 为两个品种共有的带数, *n<sub>00</sub>* 为两个品种均无带的位点数。利用 SPSS 系统聚类软件分析,非加权类平均法(UPGMA)构建聚类图。遗传多样性按 Simpson 指数  $H = 1 - \sum p_i^2$  和 Shan

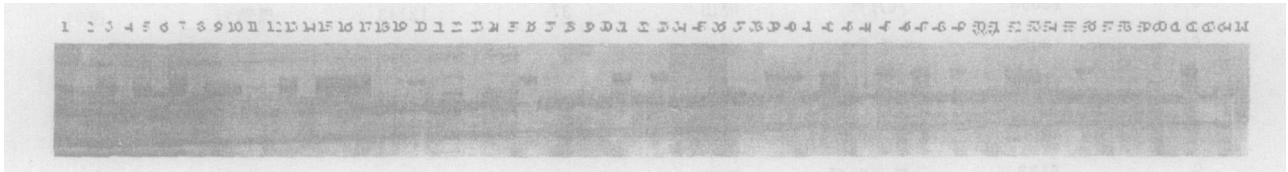
non weaver 指数  $H = -\sum p_i \ln p_i$  的公式计算<sup>[3]</sup>,  $p_i$  为某个 SSR 位点第  $i$  个等位基因的频率。

2 结果与分析

2.1 SSR 的多态性

研究选择 32 对 SSR 引物对 64 个大豆品种进行多样性分析,其中有 27 对引物能扩增出较清晰的谱

带,有 5 对引物(Satt236, Satt409, Satt281, Satt184 和 Satt453)未能扩增出清晰的谱带。在 27 对引物中,每对引物可扩增 DNA 片段的变异范围为 3 ~ 20,如 Satt578、Sat\_099 和 Sat\_038 获得 3 条带, Satt534 获得 20 条带;27 对引物共获得扩增 DNA 片段 171 条,其中共有带 5 条,多态性片段为 166 条,多态性片段比例达 97. 07%。SSR 的 Simpson 指数的分布范围为0. 2406 ~ 0. 9037,平均值为



1 ~ 64 为样品序号(其品种名称和编号同表 1); M 为 Marker  
1 ~ 64; The number of soybean landraces( the same name and code as table 1); M; Marker

图 1 引物 Satt300 对 64 份大豆种质资源的 SSR 电泳图谱

Fig 1 SSR profiles of 64 soybean landraces amplified by primer Satt300

表 2 27 对 SSR 引物的扩增多态性以及 Simpson 指数和 Shannon weaver 指数

Table 2 Numbers of polymorphic band amplified from 27 SSR primers and Simpson index and Shannon weaver index

引物	连锁群	扩增总带数	多态性带数	Simpson 指数	Shannon 指数
Primer	Linkage group	Total bands	Polymorphic bands	Simpson index	Shannon index
Satt300	A1	8	8	0. 7030	2. 0628
Satt390	A2	4	4	0. 6957	1. 2788
Satt429	A2	6	6	0. 7794	1. 6483
Satt197	B1	6	6	0. 7592	1. 5722
Satt126	B2	5	5	0. 6320	1. 1546
Satt534	B2	20	16	0. 8637	2. 2834
Satt578	C1	3	3	0. 2406	0. 4800
Sat_130	C2	6	6	0. 7139	1. 4113
Satt184	D1a+ Q	4	4	0. 7168	1. 3115
Satt141	D1a+ Q	6	5	0. 6934	1. 3734
Satt542	D1b+ W	5	5	0. 7598	1. 4885
Satt271	D1b+ W	11	11	0. 8593	2. 1058
Satt186	D2	6	6	0. 6692	1. 4118
Satt114	F	16	16	0. 9037	2. 4684
Satt434	H	4	4	0. 6302	1. 1456
Satt354	I	9	9	0. 8371	1. 9533
Satt431	J	5	5	0. 7763	1. 5541
Satt242	K	6	6	0. 7420	1. 5090
Satt588	K	5	5	0. 7242	1. 4232
Satt462	L	4	4	0. 7380	1. 3611
Sat_099	L	3	3	0. 6012	0. 9888
Satt373	L	6	6	0. 8099	1. 7266
Satt245	M	5	5	0. 5171	0. 9903
Satt308	M	5	5	0. 7094	1. 4069
Satt521	N	6	6	0. 5915	1. 0813
Satt022	N	4	4	0. 7495	1. 3852
Sat_038	O	3	3	0. 3764	0. 6766
Total		171	166		
Average		6. 33	6. 15	0. 6960	1. 4538

0. 6960; Shannon weaver 指数的分布范围为0. 4800 ~2. 4684, 平均值为 1. 4538( 表 1), 表明湖北省大豆

表 3 江汉平原类群与其他类群的遗传多样性比较

Table 3 Comparison of Simpson index of Jiangnan group with other group

引物 Primer	连锁群 Link age g roup	江汉平原类群 Jiangnan g roup		其他类群 Other group		总样本 Total sample	
		Simpson 指数	变异数	Simpson 指数	变异数	Simpson 指数	变异数
Satt300	A1	0. 7850	5	0. 8302	8	0. 7030	8
Satt390	A2	0. 6485	4	0. 6895	4	0. 6957	4
Satt429	A2	0. 6391	3	0. 7671	6	0. 7794	6
Satt197	B1	0. 4023	3	0. 7503	6	0. 7592	6
Satt126	B2	0. 7059	4	0. 6066	5	0. 6320	5
Satt534	B2	0. 8313	11	0. 8678	14	0. 8637	16
Satt578	C1	0. 1800	2	0. 2505	3	0. 2406	3
Sat_ 130	C2	0. 6272	4	0. 7119	6	0. 7139	6
Satt184	D1a+ Q	0. 6844	4	0. 7192	4	0. 7168	4
Satt141	D1a+ Q	0. 7146	5	0. 7559	5	0. 6934	5
Satt542	D1b+ W	0. 6735	5	0. 6752	5	0. 7598	5
Satt271	D1b+ W	0. 8713	9	0. 8520	11	0. 8593	11
Satt186	D2	0. 5207	3	0. 6772	6	0. 6692	6
Satt114	F	0. 8704	11	0. 8969	16	0. 9037	16
Satt434	H	0. 6944	4	0. 5928	4	0. 6302	4
Satt354	I	0. 7826	6	0. 8392	9	0. 8371	9
Satt431	J	0. 7467	5	0. 7658	5	0. 7763	5
Satt242	K	0. 7166	5	0. 7317	6	0. 7420	6
Satt588	K	0. 5444	3	0. 7412	5	0. 7242	5
Satt462	L	0. 7337	4	0. 7389	4	0. 7380	4
Sat_ 099	L	0. 6391	3	0. 5794	3	0. 6012	3
Satt373	L	0. 7692	5	0. 7788	6	0. 8099	6
Satt245	M	0. 1653	2	0. 5636	5	0. 5171	5
Satt308	M	0. 6982	4	0. 9188	5	0. 7094	5
Satt521	N	0. 5928	4	0. 5904	6	0. 5915	6
Satt022	N	0. 6850	4	0. 7380	4	0. 7495	4
Sat_ 038	O	0. 0000	1	0. 4174	3	0. 3764	3
M ean		0. 6268	4. 56	0. 7054	6. 07	0. 6960	6. 15

2. 2 遗传多样性

2. 2. 1 UPGMA 聚类分析 利用 SSR 数据对 64 个品种聚类, 结果见图 2, 在  $D = 0. 3947$  处将 64 个品种分为三大类群: 第 I 类 10 个品种, 第 II 类 10 个品种, 第 II 类 44 个品种。分析这些品种的来源地与分类的联系, 可以看出以 SSR 分子标记的分类结果与品种的地理来源有一定关系。第 I 类主要为鄂中南江汉平原地区的材料, 即除了 1 份材料外, 其他 9 份材料均来自江汉平原地区( 天门孝感豆、江陵黄豆、

监利重阳豆、京山黄豆、黄陂八月渣、松滋茨衣子、荆州冬黄豆、武昌秋黄豆、孝感黄豆); 第 II 类主要为鄂西北地区的材料, 包括来自老河口的黑黄豆和均县黄豆, 神农架的牛啃桩, 房县的扇子白, 竹溪的陕西豆, 兴山的圆黄豆等; 第 III 类包括鄂东、鄂南及鄂西等地区的材料。在  $D = 0. 3387$  处可将第 II 类划分为 3 个亚类, III- 1 亚类包括 13 份材料, 主要为鄂东和鄂东北地区的材料; III- 2 亚类有 3 份材料, 属鄂东南、鄂西北及鄂中南江汉平原混合类型; III- 3 亚

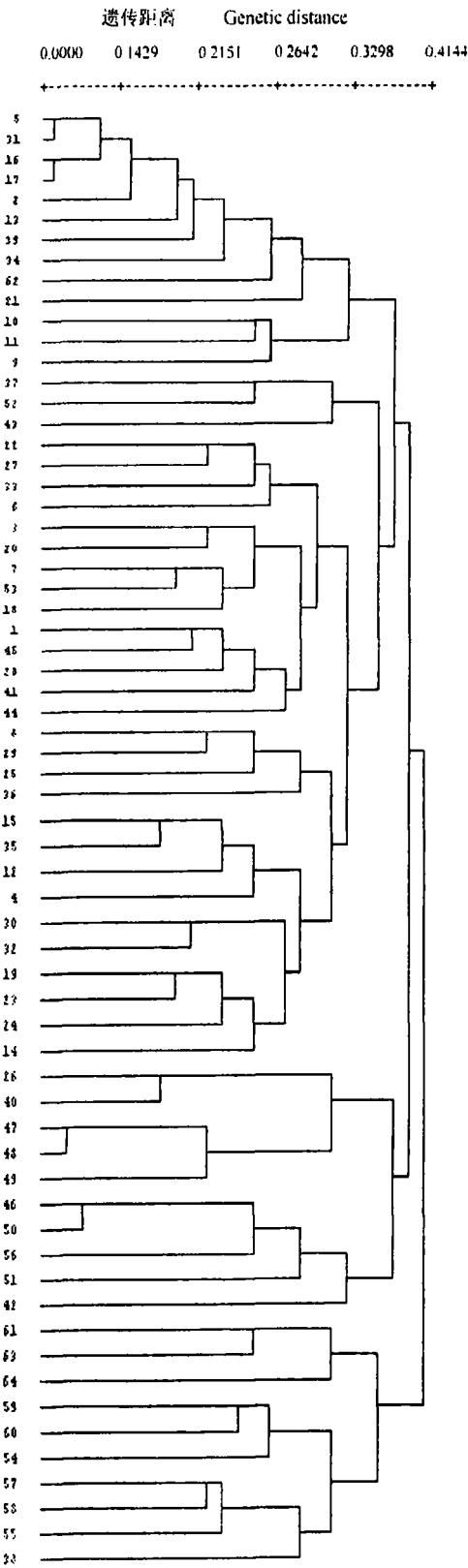


图2 64份湖北省大豆种质资源的SSR聚类图  
Fig. 2 Dendrogram of 64 soybean landraces  
from Hubei on SSR data

类有 28 分材料。III-3 亚类可进一步在  $D = 0.3263$  处划分为 2 个组, III-3-1 组有 14 份材料, 主要为来自鄂南部的材料, 包括鄂东南部的黄石市、咸宁市及黄冈市、孝感市的南部地区, 鄂西南部的恩施土家族苗族自治州等; III-3-2 组也有 14 份材料, 主要为来自鄂西的材料, 包括鄂西南部山区的恩施土家族苗族自治州、宜昌市的部分山区和鄂西北襄樊市的部分山区。

2.2.2 江汉平原大豆的遗传多样性 从本实验 UPGMA 聚类步骤来看, 在最后的合并项  $D = 0.4144$  处, 参试材料分为 2 大类, 即将鄂中南江汉平原地区的材料和其他地区的材料截然分开。江汉平原地区属多宜性地带, 亚热带气候, 自然环境良好, 土壤多为江河的冲积物组成。如此分类是否预示江汉平原地区的大豆品种与其他地方品种有较大的遗传差异呢? 初步研究表明, 分类为江汉平原类群的 10 份材料的遗传多样性(Simpson 指数)在  $0 \sim 0.8713$  范围内, 平均  $0.6268$ , 等位变异数  $1 \sim 11$ , 平均等位变异数  $4.56$ ; 而其他 54 份材料的 Simpson 指数在  $0.2505 \sim 0.9188$  范围内, 平均  $0.7054$ ; 等位变异数  $3 \sim 16$ , 平均等位变异数  $6.07$ (表 2), 从 Simpson 指数的分布范围反映江汉平原类群的大豆种质遗传变异较大。另一方面, 对聚类图分析表明, 一些来自江汉平原地区的大豆地方品种在其他类群、亚类及组间均有分布, 表明江汉平原大豆品种间的遗传差异较大, 遗传多样性水平较高。根据 Nei 的观点<sup>[3]</sup>, 总遗传多样性包括各种群内的遗传多样性和各种群间的遗传多样性, 是否可以将江汉平原地区材料作为一个类群, 进一步分析与其他各个类群的关系或群体间的分化, 有待于进一步研究。

3 讨论

湖北省属亚热带季风性湿润气候, 光照充足, 热量丰富, 无霜期长, 降水充沛, 雨热同季。但因全省南北纬度相差 4 度多, 东西经度相差约 8 度, 加上复杂多样的地貌类型, 使得不仅南北气候有别, 东西气候迥异, 而且兼有北亚热带、中亚热带以及南温带、中温带等多种气候类型, 致使各地植物资源表现出显著的地域差别。许多研究者利用农艺性状数据和分子标记数据聚类分析均表明地理因素对品种有很大影响<sup>[4~8]</sup>, 本实验也反映出参试材料处于相同或相邻的地理位置、类似的气候条件等与分类有一定的关系。如 III-1 亚类主要为鄂东地区的材料, 这一

地区多为山地, 但主要为中低山、丘陵以及山区向平原的过渡地段; III-3-2 主要为来自鄂西山区的材料, 受地势地貌影响, 不同的海拔高度有不同的气候特征: 高山春短冬长无夏; 高山冬季较长, 春夏秋平分; 丘陵河谷和低山则四季分明, 因而, 一些来自地形复杂和气候差异明显的地区的材料, 在聚类中表现与地理分布无关。

尽管实验没有针对农艺性状作聚类分析, 但是从观察实验材料的种皮颜色也反映出与系统聚类有一定的关系。第 I 类 10 份材料中有 8 份材料均为黄色种皮; 第 II 类 10 份材料中有 7 份材料为黄色种皮; III-1 亚类 13 份材料中有 11 份均为绿色种皮; III-3-2 组 14 份材料中有 11 份材料亦均为绿色种皮。但是也有不同的种皮颜色材料聚为一类, 如 III-3-1 组有 14 份材料, 其中黄色种皮为 4 份, 绿色种皮 6 份, 黑色种皮 3 份, 褐色种皮 1 份; 而混合类型 III-2 亚类仅有 3 份材料, 种皮颜色分别为绿色、黄色和褐色。本实验材料的种子表型特征和聚类表现的特点与其他研究者有关农艺性状聚类的结果相一致<sup>[4]</sup>, 表明种皮颜色也是大豆分类的重要因素之一, 因此有必要进一步开展农艺性状聚类研究, 为大豆种质深入评价提供和积累相关数据。

在本实验中将鄂中南江汉平原大豆的遗传多样性(Simpson 指数)与其他类群及总样本的遗传多样性进行比较, 发现不同的 SSR 引物以及不同连锁群的引物所揭示的遗传多样性(或平均值)结果是不一样的, 有的甚至相反, 其他作物也有类似情况<sup>[9]</sup>, 表

明 SSR 引物的选择对实验结果有很大影响。因此认为应当选择多个多态性信息量较高的 SSR 标记用于种质资源的亲缘关系研究, 才能得出比较准确的结论。

致谢: 本实验得到了陆光远博士的热情帮助, 长江大学的王道云、彭文舫同学以及孝感学院的肖腾和孟淑娇同学等参加了实验室工作, 一并表示衷心感谢!

## 参 考 文 献

- 1 王珍, 方宣钧. 植物 DNA 分离[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 281-288
- 2 王树成, 李增智. 分子数据的遗传多样性分析方法[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(1): 90-94
- 3 Nei M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- 4 崔艳华, 邱丽娟, 常汝镇, 等. 黄淮夏大豆遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 15-22
- 5 游明安, 盖钧镒. 长江下游大豆地方品种的聚类分析[J]. 中国油料, 1994, 16(4): 36-45
- 6 盖钧镒, 许东河, 高忠, 等. 中国栽培大豆和野生大豆不同生态类型群体间遗传演化关系的研究[J]. 作物学报, 2000, 26(5): 513-520
- 7 钱吉, 陈库, 郑师章, 等. 不同纬度野生大豆种群间的遗传变异[J]. 复旦学报(自然科学版), 1998, 37(2): 208-212
- 8 何余堂, 涂金星, 傅廷栋, 等. 中国白菜型油菜种质资源的遗传多样性研究[J]. 作物学报, 2002, 28(5): 697-703
- 9 冯宗云, 张义正, 张立立, 等. 应用微卫星标记研究西藏野生二棱大麦的遗传多样性及地理分化[J]. 高技术通讯, 2003, 10: 46-53

## GENETIC DIVERSITY OF SOYBEAN GERMPLASM FROM HUBEI PROVINCE IN CHINA BY SSE

Zhou Rong Zhang Xiaojuan Wang Xianzhi Sha Aihua Zhou Xinan Tu Ganying

(Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Ministry  
Key Laboratory of Oil Crops Genetic Improvement, Wuhan 430062)

**Abstract** There were more than one thousand local soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] germplasms in Hubei province. However, their diversity was not well characterized. The objective of this study was to quantify genetic diversity of sixty four soybean landraces from Hubei by SSR and cluster analysis with the UPGMA method. 166 polymorphic bands were amplified by twenty seven pairs SSR primers. Genetic diversity index showed that distribution of Simpson index was 0.2406~0.9037 and mean 0.6960, and distribution of Shannon weaver index was 0.4800~2.4684 and mean 1.4538. By using the dendrogram analysis, 64 landraces were separated into three major groups at the DNA level: Jiangnan alluvial plain group, northwest Hubei group and mixed group of the east, south and west of Hubei province. The diversity level of soybean landrace from Jiangnan alluvial plain was higher than that of other landraces.

**Key words** Soybean; Germplasm; SSR; Genetic diversity