

中国吉林省和韩国野生大豆的遗传多样性及遗传关系分析

朴向民¹, 张圣珍², 许建², 金弘植², 赵龙九², 刘宪虎¹

(¹延边大学农学院农学系, 吉林 龙井 133400; ²韩国忠北大学农业生命环境学院, 忠北 清州 361-763)

摘要:利用9对多样性较高的SSR引物分析了来自中国吉林省(36份)和韩国(40份)野生大豆材料的遗传多样性。结果表明:在全部76份材料中,共检测到172个等位基因,每对引物平均获得19.1个。其中,在韩国的野生大豆资源中,每对引物检测到等位基因数11~18个,平均13.7个。中国吉林省的野生大豆资源中,每对引物检测到等位基因数5~16个,平均12.3个。不论中国吉林省还是韩国的野生大豆都具有较高的多态性信息含量(PIC),分别为0.821和0.868,两者遗传多样性并没有明显差异。聚类分析结果表明可将中国吉林省与韩国的野生大豆分为两大类群。

关键词:野生大豆;遗传多样性;SSR标记;聚类分析

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)02-0181-05

Genetic Diversity of Annual Wild Soybean (*Glycine Soja*) between China Jilin Province and Korean

PIAO Xiang-min¹, JANG Seong-jin², HU Gung², KIM Hong-sig², CHO Yong-gu², LIU Xian-hu¹

(¹Department of Agronomy, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, Jilin, China; ²College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, 361-763, Korea)

Abstract: This study was carried out to investigate genetic diversity of China Jilin province (36) and Korean (40) wild soybean using nine simple sequence repeat (SSR) markers. A total of 172 alleles were observed in 76 accessions with an average of 19.1. For each, Korean wild soybean were ranged from 11 to 18 with average 13.7, and China Jilin province were ranged from 5 to 16 with average 12.3. Wild soybeans from China Jilin province and Korea all had high genetic diversity with PIC value of 0.821 and 0.868 respectively. There was no obvious difference of genetic diversity between them. Cluster analysis grouped China Jilin province and Korean wild soybean into two genetic clusters.

Key words: Wild soybean; Genetic diversity; SSR marker; Cluster analysis

一年生野生大豆(*Glycine soja*, 以下简称野生大豆)是栽培大豆(*G. max*)的祖先物种,局限分布在中国、朝鲜半岛、日本、俄罗斯远东等地区。野生大豆作为大豆的天然基因库,具有高蛋白、抗逆性强、繁殖系数大的优良特点,是我国乃至世界宝贵的植物遗传资源^[1]。作物的遗传多样性是作物改良的基础,遗传多样性研究是保护生物学的核心研究领域之一。近10年来,国内外对野生大豆的遗传多样性进行了广泛的研究,这些研究为拓宽大豆育种的遗传生物学技术的发展奠定了基础^[2]。

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR),也称微卫星DNA(microsatellite DNA)或短串联重复(short tandem repeat, STR),是一种以1~6个核苷

酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列。因其具有不易受环境影响,多态性高,能较好地反映出种质资源之间的遗传差异等优点而被广泛应用于野生大豆的遗传多样性研究中^[3-4]。利用9对多样性相对较高的SSR引物,分析了包含中国吉林省(36份)和韩国(40份)的总76份野生大豆材料的遗传多样性,为利用韩国的野生大豆资源作为新的基因源来拓宽我国大豆育成品种的遗传基础提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为76份野生大豆。中国吉林省36份

收稿日期:2008-12-01

作者简介:朴向民(1983-),女,在读硕士,研究方向为作物遗传育种。

通讯作者:刘宪虎,教授。E-mail:liuxh@ybu.edu.cn。

材料主要采自于延边地区;韩国 40 份材料采自全国 9 个道区。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 将野生大豆种子以 Cho 等^[5]的方法进行 DNA 提取,后将 DNA 的浓度调整为 $30 \sim 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

表 1 用于鉴定中国和韩国野生大豆多样性的 9 个 SSR 引物及其所在的连锁群,引物序列及退火温度

Table 1 SSR loci, sequence and annealing temperature of 9 primers used for investigate genetic diversity between Chinese and Korean wild soybeans

引物 Primer	连锁群 Linkage group	Forward primer	Reverse primer	退火温度 Annealing temperature
1. Satt185	E	GCGCATATGAATAGGTAAGTTGCACTAA	GCGTTTTCTACAATATTTCCAT	49℃
2. Satt187	A2	GCGTTTTAATTTATGATATAACCAA	GCGTTTTATCTCTTTTCCACAAC	48℃
3. Satt141	D1b	CGGTGGTGGTGTGCATAATAA	CCGTCATAAAAAAGTCCCTCAGAAT	47℃
4. Satt245	M	AACGGGACTAGGACATTTTATT	GCGCCTCCTGAATTTCAAAGAATGAAGA	46℃
5. Satt197	B1	CACCTGCTTTTTCCTCTCTCT	AAGATACCCCAACATTATTTGTAA	47℃
6. Satt157	D1b	GGGCTCACTCTCGATAGTAGGATAAAG	GGGATACCAAAAAGGAATAATTGCTT	49℃
7. Sat_022	N	GCGGCTTTTCTGACTGTAA	GCGCAGTGAAAACCTACTACTAT	47.5℃
8. Sat_036	D1a	GCGACTCCAAGTTTTTTTGT	GCGGGAGTTAGAGGAAGAGAACA	52℃
9. Sat_043	K	GCGGTCCGTCAATGAATATTAATAAATAA	GCGAAAGCGGCAGAGAGAGAAAAGT	48℃

1.3 SSR 分析

PCR 反应体系总体积为 $20 \mu\text{L}$,其中分别加入模板 DNA ($30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $2.0 \mu\text{L}$; $10 \times \text{buffer}$ (含 Mg^{2+}) $2.0 \mu\text{L}$; $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP $1.0 \mu\text{L}$; $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Primer (forward) $0.5 \mu\text{L}$, Primer (reverse) $0.5 \mu\text{L}$; Taq 酶 ($2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$; ddH₂O $13.5 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94°C 预变性 5 min , 1 个循环; 94°C 变性 40 s ; $47 \sim 52^\circ\text{C}$ 退火 40 s ; 72°C 延伸 60 s ; 36 个循环; 72°C 延伸 7 min , 1 个循环; 4°C 保存。扩增的 DNA 产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上,电泳 1 h 后,采用银染法进行 DNA 显带。

1.4 数据处理

SSR 扩增带形以 0, 1 和 9 统计,即在相同迁移率位置上,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失记为“9”,获得矩阵。将全部电泳结果的数据利用 NTSYSpc 2.02a 软件,计算得到品种间的遗传相似值 (genetic similarity, GS), 计算公式为: $\text{GS} = m / (m + n)$, 其中 m 为基因型间共有的带数目, n 为差异带数目。多态性信息量 (polymorphism information content, PIC), 其计算公式为: $H_i = 1 - \sum f_i^2$, 公式中 H_i 是某个位点的预期异质结合度,指从群体中随机选取的两个个体在某位点具有不同等位变异的可能性,多用来表示标记检测遗传多样性, f_i 表示某一位点的第 i 个等位变异在群体中出现的频率^[6]。利用 NTSYSpc 2.02a 软件进行聚类分析,在遗传相似系

1.2.2 引物选择 为了充分揭示位于不同连锁群上的 SSR 位点在供试材料中的遗传多样性,通过调整 PCR 反应条件由韩国生物技术公司合成的 100 对引物中筛选了 9 对谱带清晰且具有较好的多态性 SSR 引物(表 1)。

数矩阵的基础上,用 UPGMA (Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Averages) 方法构建 76 份材料的分子系统树。

2 结果与分析

2.1 SSR 多态性分布和遗传多样性检测

用 9 对 SSR 引物在供试的 76 份野生大豆上共检测到 172 个等位基因,每对引物检测出 $12 \sim 26$ 个等位基因,平均 19.1 个,检测等位基因数最多的引物为 Satt157,最少的引物为 Satt141(表 2)。中国吉林省野生大豆材料中检测到 111 个,每对引物检测出 5 (Satt141) ~ 16 个 (Satt157), 平均 12.3 个;其多态性位点的扩增片段大小为 $119 \sim 332 \text{ bp}$ 。韩国野生大豆检测到 124 个,每对引物检测出 11 (Satt187) ~ 18 (Sat-036) 个,平均 13.7 个;其多态性位点的扩增片段大小为 $105 \sim 332 \text{ bp}$ 。中国吉林省与韩国野生大豆的共有等位基因(在两者之间都被检测出的等位基因)总数为 63 个,平均 7.0 个。9 对 SSR 引物在中国吉林省野生大豆的多态性信息含量 (PIC) 范围为 $0.677 \sim 0.890$, 平均值为 0.821;在韩国野生大豆的 PIC 范围为 $0.785 \sim 0.941$, 平均值为 0.868(表 2)。由此可以看出,用 SSR 标记揭示野生大豆不同种的遗传多样性的效率是比较高的。从本数据来看,韩国野生大豆的多态性信息含量比中国吉林省略微高一点,但两者的遗传多样性并没有明显差异。

表2 中国吉林省与韩国野生大豆 SSR 分析所用的 9 个引物检测到的等位基因的数、分子量范围及 PIC
Table 2 Range of allele size ,Number of alleles and PIC value by 9 SSR markers of Chinese and Korean wild soybeans

引物 Primer	等位基因大小 Range of allele size(bp)			等位基因数 Number of allele				PIC 值 PIC value		
	CWS	KWS	Total	CWS	KWS	Total	Shared	CWS	KWS	Total
1. Satt185	270 – 182	263 – 189	270 – 182	16	17	24	9	0.875	0.870	0.903
2. Satt187	291 – 233	293 – 155	293 – 155	8	11	14	5	0.760	0.785	0.873
3. Satt245	328 – 158	219 – 171	328 – 158	14	13	18	9	0.888	0.861	0.904
4. Sat_043	332 – 250	315 – 251	332 – 250	16	11	21	6	0.890	0.842	0.914
5. Satt141	190 – 146	178 – 147	190 – 146	5	12	12	5	0.677	0.843	0.860
6. Satt197	214 – 136	201 – 126	214 – 126	11	12	19	4	0.752	0.797	0.868
7. Sat_022	227 – 190	221 – 189	227 – 189	11	13	16	8	0.880	0.888	0.912
8. Satt157	328 – 201	332 – 208	332 – 201	16	17	24	9	0.797	0.901	0.873
9. Sat_036	163 – 119	238 – 105	238 – 105	14	18	24	8	0.870	0.941	0.944
Total	–	–	–	111	124	172	63	–	–	–
Max.	332	332	–	16	18	24	–	0.890	0.941	0.944
Min.	119	105	–	5	11	12	–	0.677	0.785	0.860
Mean	–	–	–	12.3	13.7	19.1	7.0	0.821	0.868	0.894

KWS;Korean wild soybean CWS;Chinese wild soybean

2.2 等位基因的分布

比较 9 对 SSR 引物在中国吉林省与韩国野生大豆中所检测出的等位基因的分布图(图 2),可以看出引物 Satt245,Satt185,Sat_043 在中国吉林省野生大豆中检测到的等位基因范围包含了韩国野生大豆的等位基因范围。而在引物 Satt187,Satt141,Satt036 中,情况则正好相反,并且引物

Satt141 在中国吉林省野生大豆中检测到的 5 个等位基因类型全部包含在韩国野生大豆的等位基因类型中;从等位基因的整体分布来看,中国吉林省与韩国的野生大豆中检测到共有等位基因只占整体等位基因中较少的比率(约 40% 左右),大部分的等位基因类型为两者相互之间不曾检测出的等位基因(图 1)。

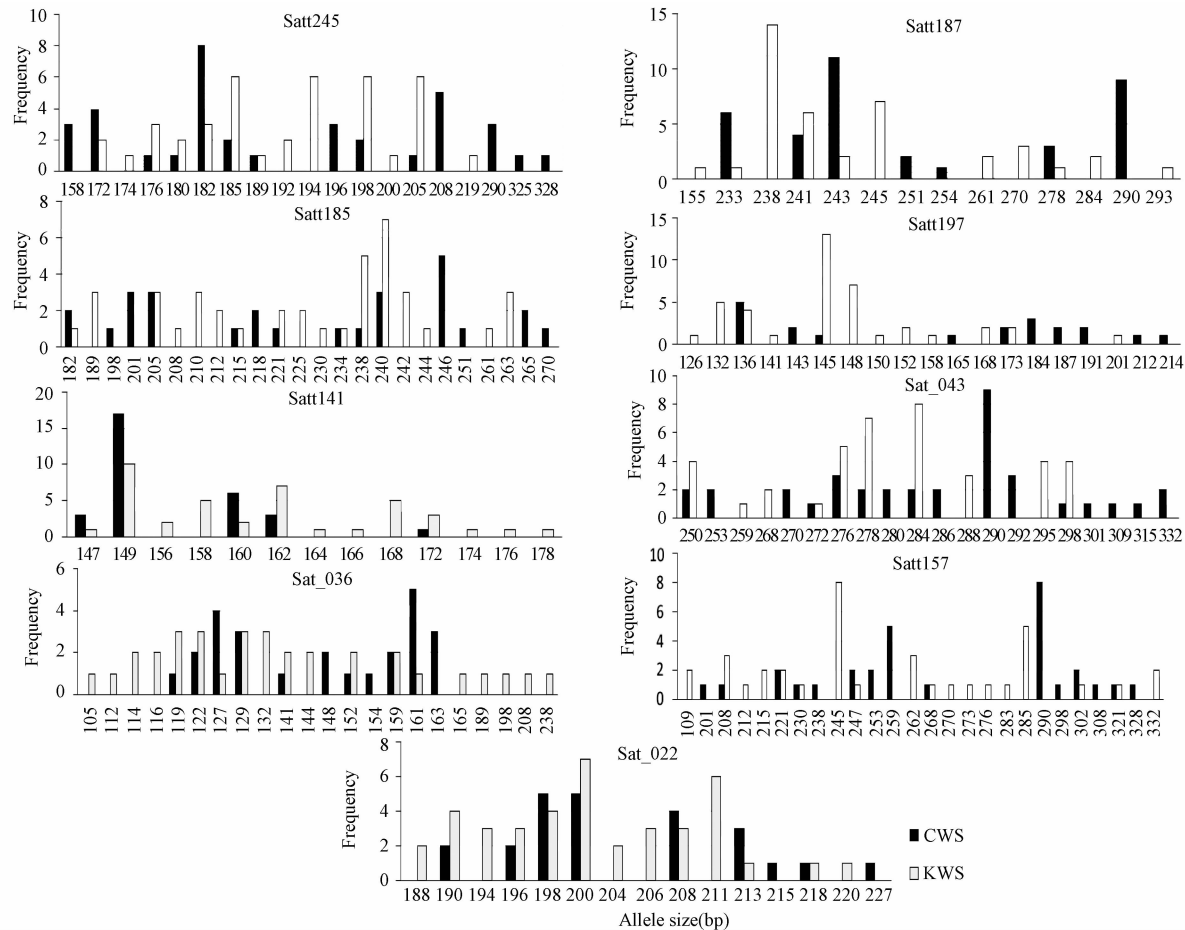


图1 9 个 SSR 引物在中国吉林省与韩国野生大豆中所检测出的等位基因频率
Fig.1 Allele frequency at 9 SSR markers in China Jilin province and korean wild soybean

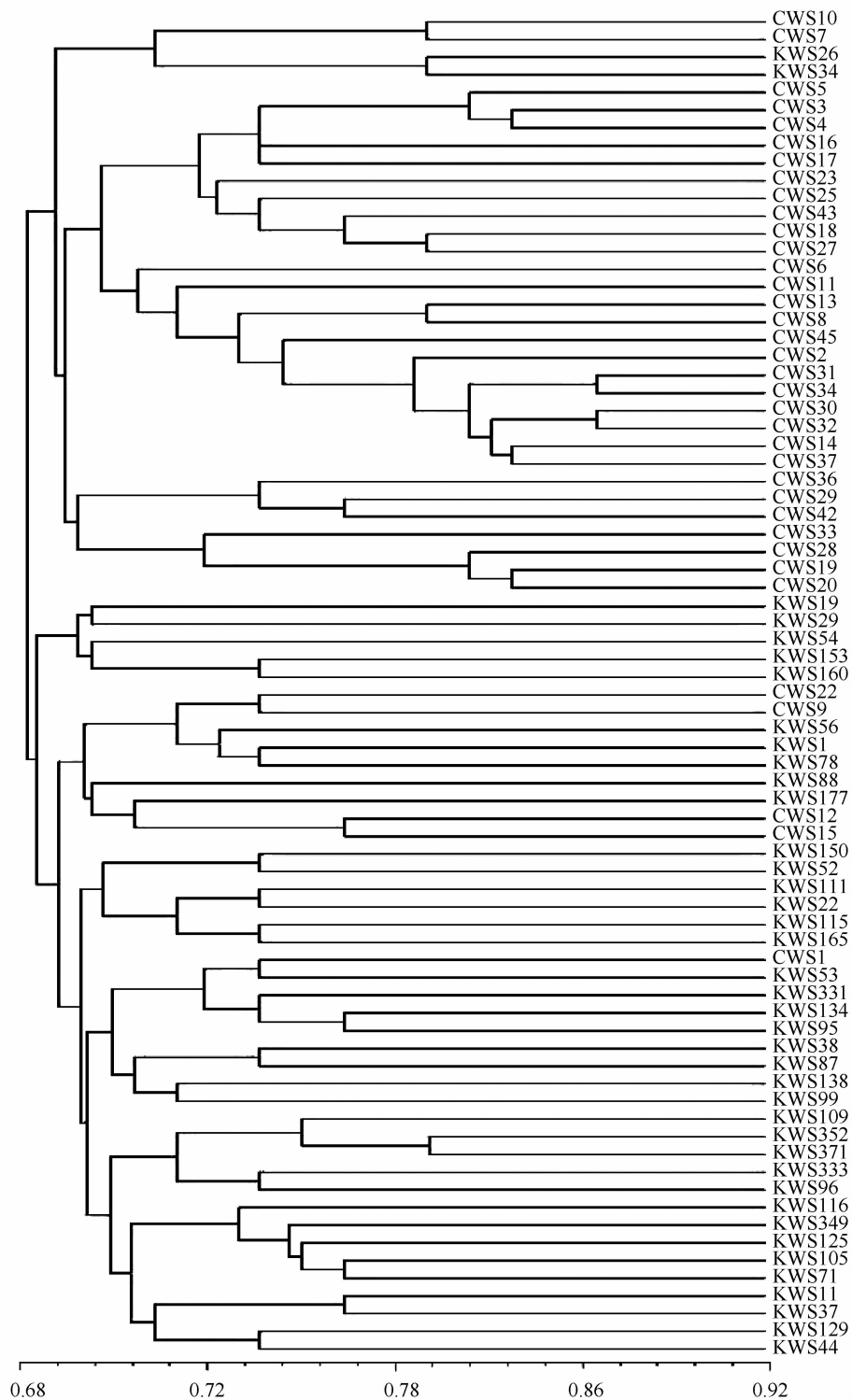


图2 利用UPGMA法分析中国与韩国野生大豆的遗传距离建立的树状图

Fig. 2 A UPGMA dendrogram based on genetic distance among Chinese and Korean wild soybeans

2.3 聚类分析

利用NTSYSpc 2.02a软件分析76份野生大豆材料中检测到的172个等位基因,计算76份样本之间的遗传相似系数,得到76份样本间的遗传相似系

数矩阵,然后按照UPGMA方法对76份材料进行聚类分析(图2)。由图可见,在遗传相似系数为0.68的水平上,中国吉林省36份与韩国的40份野生大豆材料基本上可以区分为两大类群:第一大类群包

括 31 份中国吉林省与 2 份韩国的野生大豆材料 KWS26(江原道)与 KWS34(京畿道);第二大类群包括 38 份韩国与 5 份中国的野生大豆材料: CWS22、CWS9、CWS12、CWS15、CWS1, 该五份材料均来自延边地区。说明中国吉林省与韩国的野生大豆在遗传基础上存在比较明显的区别。

3 讨论

在 76 份野生大豆的 9 个 SSR 位点中共检测到 172 个等位基因,平均每个位点 19.1 个, PIC 平均值 0.894, 这一结果高于目前的国内外相关研究报告^[7-10]。这与研究所选材料跨越中韩两国,且筛选了多态性较高的引物进行试验有关。韩国野生大豆中检测到的等位基因数与 PIC 平均值(124 个; 0.868)均略微高于中国吉林省的野生大豆材料(111 个; 0.821)。这可能由于中国的野生大豆采样比较集中,大部分都采自于吉林省延边地区,材料间的遗传关系比较接近,而韩国的材料采自于全国九个道区,比较分散,所以韩国野生大豆的遗传多样性较中国吉林省略为丰富。但两者之间的遗传多样性并无明显差异。这一结果与 Lee 等^[9]对中、日、韩三国的 274 份野生大豆材料的遗传多样性进行分析,并得到 PIC 平均值分别为 0.818、0.804 与 0.849 的研究结果相一致。

结果还显示,中国吉林省与韩国的野生大豆中检测到共有等位基因只占整体等位基因中较少的比重,大部分的等位基因类型为两者相互之间不曾检测出的等位基因,说明中国吉林省与韩国的野生大豆在遗传基础上存在比较明显的区别。76 份材料的聚类分析结果显示:中国吉林省与韩国的野生大豆材料可以区分为两大类群,说明两者之间的遗传关系相对较远。这一点与等位基因分布的分析结果相符合。但是在两大类群中,均有对方的个别样本出现,这可能由于中国延边地区与韩国的交流密切,通过各种人为因素造成的两地之间的基因流动。这与 Yoon 等^[10]的试验结果相似。

选用的 9 对 SSR 标记均表现出较高的多态性,显示了 SSR 标记的高效性,同时说明 SSR 标记是进行野生大豆材料遗传多样性分析的有效工具,因此

在种质的遗传多样性检测中核心引物的筛选也是一个重要的方面。结果表明:中国吉林省与韩国的野生大豆材料都具有较丰富的遗传多样性,并且两者在遗传基础上存在比较明显的区别,其结果为利用韩国的野生大豆资源作为新的基因源来拓宽我国大豆育成品种的遗传基础提供参考信息,为今后进一步的种质资源的扩增、改良和创新提供分子依据。

参考文献

- [1] 李福山,李向华. 野生大豆在自然界中光温反应的规律[J]. 作物学报,2003,29(5):670-675. (Li F S, Li X H. Response regularity of wild soybean to photoperiod and temperature in natural environment[J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(5):670-675.)
- [2] 张小明,刘丽君,唐晓飞,等. 中俄大豆种质遗传多样性分析[J]. 大豆科学,2008,27(1):15-20. (Zhang X M, Liu L J, Tang X F, et al. Genetic diversity of soybean germplasm in Russia and China[J]. Soybean Science, 2008, 27(1):15-20.)
- [3] 吴晓雷,贺超英,陈受宜,等. 用 SSR 分子标记研究大豆属种间亲缘进化关系[J]. 遗传学报,2001,28(4):359-366. (Wu X L, He C Y, Chen S Y, et al. Phylogenetic analysis of interspecies in genus glycine through SSR markers[J]. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(4):359-366.)
- [4] Hearne C, Ghosh S, Todd J. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits[J]. Trends in Genetics, 1993, 8:288-294.
- [5] Cho Y G, T Ishii, S M Temnykh, et al. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GeneBank sequences in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100:249-257.
- [6] Senior M S, Murphy J P, Goodman M M, et al. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationship in maize using an agarose gel system[J]. Crop Science, 1998, 38:1088-1098.
- [7] 丁艳来,赵团结,盖钧镒,等. 中国野生大豆的遗传多样性和生态特异性分析[J]. 生物多样性,2008,16(2):133-142. (Ding Y L, Zhao T J, Gai J Y, et al. Genetic diversity and ecological differentiation of Chinese annual wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Biodiversity Science, 2008, 16(2):133-142.)
- [8] Dong Y S, Zhuang B C, Zhao L M, et al. The genetic diversity of annual wild soybean grown in China[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103:98-103.
- [9] Lee J D, Yub J K, Yoon S S, et al. Genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) accessions from South Korea and other countries[J]. Crop Science, 2008, 48:606-616.
- [10] Yoon M S, Lee J R, Cho E G. SSR profiling and its variation in soybean germplasm[J]. Korean Journal of Crop Science, 2007, 52(1):81-88.