

## 黑龙江省大豆品种醇溶蛋白的遗传多样性分析

沙 伟,何海燕,张艳馥

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘 要:**采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(SDS-PAGE)对来自黑龙江省的 25 份大豆品种进行醇溶蛋白遗传多样性分析。结果供试材料共分离出 19 条谱带,多态性条带 12 条,多态性比率达 63.16%,其中  $\alpha$  区 3 条带, $\beta$  区 5 条带, $\gamma$  区 5 条带, $\varepsilon$  区 6 条带。材料间的 Nei-Li 遗传相似性系数(GS)范围为 0.4737~0.9474,平均值为 0.7105;遗传距离(GD)范围为 0.0541~0.7472,平均值为 0.3654,表明供试材料之间具有较为丰富的醇溶蛋白遗传多样性。聚类分析结果表明,在 GS 值为 0.79 处可聚为 4 类,主成分分析进一步验证了此结果。由此可见,醇溶蛋白标记技术能很好地用来区分不同的大豆品种,为大豆品种鉴定和种质资源利用奠定基础。

**关键词:**大豆;醇溶蛋白;遗传多样性;聚类分析;主成分分析

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)06-0934-04

## Gliadin Genetic Diversity in Soybean Varieties in Heilongjiang Province

SHA Wei, HE Hai-yan, ZHANG Yan-fu

(College of Life Science and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

**Abstract:** The SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to detect the gliadin genetic diversity of 25 soybean varieties in Heilongjiang province, and the results were as follows: 1) A total of 19 bands were detected in 25 cultivars, the polymorphic bands were 12, amount to 63.16%, among  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\varepsilon$  zones, there were 3, 5, 5 and 6 bands, respectively. The Nei's genetic similarity coefficient of the tested cultivars ranged from 0.4737 to 0.9474, and the average GS was 0.7105; the genetic distances of the tested cultivars ranged from 0.0541 to 0.7472, the average GD was 0.3654, these results suggested that there was a rich genetic polymorphism of gliadin among the cultivars. 2) According to the cluster analysis, the tested cultivars could be classified into 4 groups at the level GS 0.79, and principal component analysis verified the results further. Thus, gliadin clusters markers could efficiently classify the soybean varieties, and laid the foundation for soybean variety identification and the utilize of germplasm resources.

**Key words:** Soybean; Gliadin; Genetic diversity; Cluster analysis; Principal component analysis

黑龙江省大豆栽培历史悠久,在不同的生态条件影响下,大豆种质资源经历了长期的自然演化和人工选择,形成了多种多样的种质资源。科学地评价黑龙江省大豆种质资源的遗传多样性,不仅有利于大豆种质资源的合理保存、优异大豆种质资源的挖掘与创新,而且对于中国大豆种质资源的遗传多样性研究也具有重要的意义。

醇溶蛋白结构上的差异能真实地反映出基因表达上的差异<sup>[1]</sup>。醇溶蛋白在结构上为单亚基,具有高度的异质性和复杂性,在品种间存在明显差异,带纹及组合方式完全受基因控制,几乎不受外界环境的影响,通过标准电泳后所展现的谱带多少及差异,能充分反映出品种间的亲缘关系及遗传多样性,故被称为品种的生化指纹。近年来,国内外已将醇溶蛋白电泳分析广泛应用于植物遗传多样性分析<sup>[2-4]</sup>、种类的鉴别、种子纯度检验、杂种优势

预测、代换系和易位系以及体细胞无性系变异鉴定<sup>[5-8]</sup>等方面。

近年来,利用醇溶蛋白多样性在小麦品种研究中得到广泛的应用,而利用醇溶蛋白研究不同大豆品种的遗传多样性却未见报道。该文利用醇溶蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对黑龙江省 25 份大豆品种的遗传多样性进行研究,为大豆新品种选育提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

选取来自黑龙江省不同生态区的 25 份大豆品种为材料(表 1)。大豆种子在 70℃ 下烘干至衡重,用粉碎机粉碎,过 120 目筛,置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

收稿日期:2010-09-10

基金项目:黑龙江省教育厅科研资助项目(10551331)。

第一作者简介:沙伟(1963-),女,教授,博士生导师,主要从事植物学、植物遗传学方面的研究。E-mail:Shw1129@263.net。

表 1 供试样品材料  
Table 1 Experimental plant materials

| 序号<br>No. | 品种名称<br>Variety      | 序号<br>No. | 品种名称<br>Variety          |
|-----------|----------------------|-----------|--------------------------|
| 01        | 北疆 296 Beijiang 296  | 14        | 绥农 28 Suinong 28         |
| 02        | 北疆 641 Beijiang 641  | 15        | 华疆 3 号 huajiang 3        |
| 03        | 黑农 44 Heinong 44     | 16        | 垦丰 16 Kenfeng 16         |
| 04        | 黑农 48 Heinong 48     | 17        | 富兴 9 号 Fuxingj 9         |
| 05        | 合丰 50 Hefeng 50      | 18        | 富兴 4 号 Fuxing 4          |
| 06        | 合丰 55 Hefeng 55      | 19        | 抗线 8 号 Kangxian 8        |
| 07        | 垦鉴豆 4 号 Kenjiandou 4 | 20        | 抗线铁杆 I Kangxiantie-gan I |
| 08        | 垦农 18 Kennong 18     | 21        | 丰收 26 Fengshou 26        |
| 09        | 垦农 22 Kennong 22     | 22        | 丰豆 3 Fengdou 3           |
| 10        | 北豆 14 Beidou 14      | 23        | 甘优 120 Fanyou 120        |
| 11        | 嫩丰 16 Nenfeng 16     | 24        | 黑河 38 Heihe 38           |
| 12        | 绥农 14 Suinong 14     | 25        | 东农 51 Dongnong 51        |
| 13        | 绥农 27 Suinong 27     |           |                          |

1.2 试验方法

1.2.1 大豆醇溶蛋白提取 通过正交试验筛选出大豆醇溶蛋白提取的最佳条件。取大豆粉 0.1 g 置于 1.5 mL 离心管中,加少许抗坏血酸、PVP,800  $\mu$ L 60 % 乙二醇,漩涡振荡 10 min,20  $^{\circ}$ C 振荡浸提 8 h,4 $^{\circ}$ C,12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 20 min,取上清液即为醇溶蛋白(若浑浊则需重复离心),置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.2.2 大豆醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳 SDS-PAGE 电泳采用常规的 Laemmli<sup>[9]</sup> 碱性不连续系统,浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 10%。取 20  $\mu$ L 等体积充分混匀的上样缓冲液和样品提取液的混合液(100  $^{\circ}$ C 变性 5 min),注入点样孔。电泳过程采用稳压电泳:浓缩胶 80 V;分离胶 120 V,待指示染料下行到距胶板末端 1 cm 处,停止电泳,剥胶,三氯乙酸固定,用考马斯亮蓝 R-250 染色,甲醇-冰乙酸溶液脱色,扫描记录结果。

1.2.3 数据分析 参照 Woychick 等<sup>[10]</sup> 的方法,根据迁移率大小将电泳谱带分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\varepsilon$  4 个区,统计每个区所出现的条带数,每个样品的电泳条带按有无记录,电泳条带有时赋值为 1,否则赋值为 0,按 Nei 的方法<sup>[11]</sup> 计算品种间相似系数(GS)、遗传距离(GD),对各品种间的聚类分析则是利用 NT-SYS-PC 软件按基于 Nei-Li 遗传相似系数的不加权成对群算术平均法(UPGMA)进行,同时还进行了基于遗传相似系数的主成分分析,做出各种质材料的散点分布图。

2 结果与分析

2.1 醇溶蛋白谱带多样性分析

25 份材料的醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱如图 1 所示,从电泳图谱可以看出,25 份供试材料中,最多的 1 份材料分离出 19 条谱带,根据 SDS-PAGE 中相对迁移率大小不同,可将大豆醇溶蛋白分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  及  $\varepsilon$  4 个区,其中  $\alpha$  区 3 条带, $\beta$  区 5 条带, $\gamma$  区 5 条带, $\varepsilon$  区 6 条带,每份材料可以分离出 8 ~ 19 条迁移率不同的谱带,平均 14.28 条,其中具多态性的谱带平均为 7.28 条,多态性比率达 63.16%。表明供试材料具有丰富的醇溶蛋白遗传多样性。

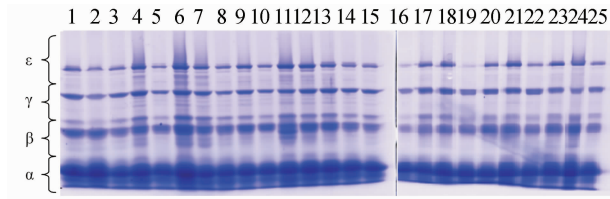


图 1 25 份大豆供试材料的醇溶蛋白  
(电泳图谱材料编号同表 1)

Fig.1 Gliadin patterns of 25 accessions of soybean after SDS-PAGE( The code is the same as Table 1.)

2.2 醇溶蛋白遗传相似性系数及遗传距离分析

利用 25 个供试品种的醇溶蛋白位点计算品种间的遗传相似性系数(GS),并据此计算相应的遗传距离(GD)。从所得矩阵可以看出:材料间的遗传相似性系数范围在 0.4737 ~ 0.9474 之间,变幅为 0.4737,平均值为 0.7105。遗传距离范围在 0.0541 ~ 0.7472,变幅为 0.6931,平均值为 0.3654。其中材料北疆 641 和绥农 27;垦丰 16 和绥农 28、华疆 3 号的相似性系数最小,其遗传距离最大,表明它们之间的亲缘关系最远。北疆 296、丰收 26 和甘优 120;合丰 55 和垦鉴豆 4 号、华疆 3 号;垦农 22 和绥农 14;绥农 27 和富兴 9 号、华疆 3 号;黑农 48 和华疆 3 号;富兴 9 号和富兴 4 号、丰收 26;抗线 8 号和丰豆 3、东农 51 的相似性系数最大,其遗传距离最小,表明这些品种之间材料亲缘关系最近。且 GS 的频率分布近似于正态分布(图 2)。以上结果表明,不同种质材料的醇溶蛋白基因在表达水平上存在着广泛的遗传变异,具有丰富的遗传多样性。

2.3 醇溶蛋白的聚类分析

根据 25 份材料的醇溶蛋白遗传相似性系数,利用 UPGMA 法对其进行聚类分析(图 3)。在 GS = 0.79 的水平,所有供试材料可分为 4 类:第 1 类

包括北疆 296、垦农 18、绥农 27、富兴 9 号、富兴 4 号、抗线铁杆 I、丰收 26、甘优 120、黑河 38;第 2 类包括黑农 44、黑农 48、合丰 55、垦鉴豆 4 号、垦农 22、嫩丰 16、绥农 14、华疆 3 号;第 3 类有合丰 50、北豆 14、绥农 28;第 4 类为北疆 641、垦丰 16、抗线 8 号、东农 51、丰豆 3。由此可见,利用大豆种子醇溶蛋白遗传多样性能较好的将黑龙江省的不同大豆品种进行分类。

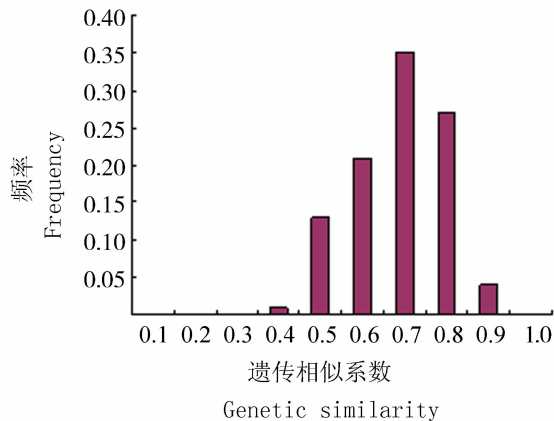


图 2 25 份大豆品种遗传相似性系数分布图

Fig. 2 Distribution of genetic similarities among 25 accessions of soybean estimated from total gliadin makers

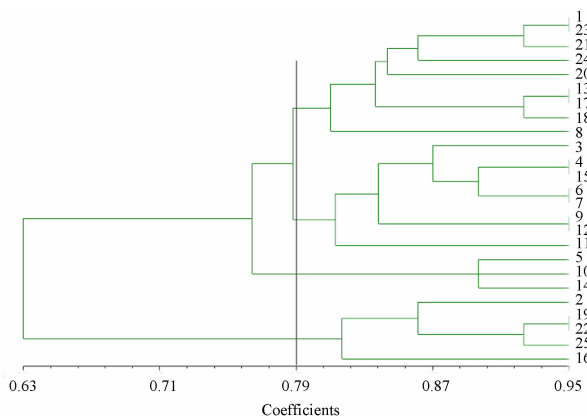


图 3 25 份大豆材料基于 Nei 氏相似系数的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for soybean based on Nei's genetic similarity coefficients

#### 2.4 醇溶蛋白的主成分分析

在 NTSYS-PC 软件上对不同大豆品种进行主成分分析。根据第一、第二主成分进行作图,所形成的不同大豆品种的位置分布如图 4 所示。将位置靠近的大豆品种划归在一起,结果表明主成分分析的结果与 UPGMA 聚类分析结果相一致,并能更直观地体现不同大豆品种之间的遗传多样性,是对聚类结果的直观解释和佐证。

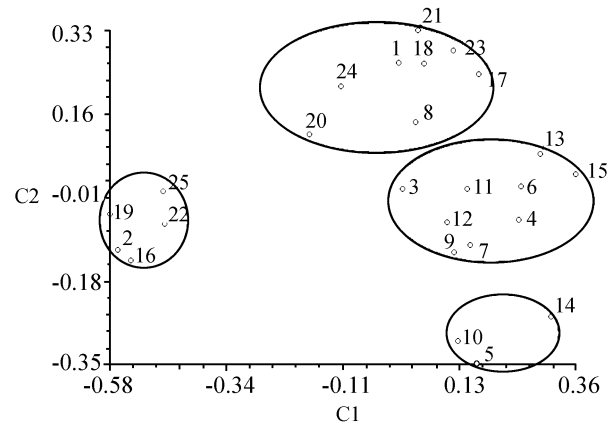


图 4 25 份大豆品种基于 Nei-Li 相似系数的主成分分析

Fig. 4 PCA analysis for soybean based on Nei's genetic similarity coefficients

### 3 讨论

醇溶蛋白的遗传多样性分析是分子生态学的一种研究方法。醇溶蛋白标记技术具有相对比较简单、不需太精密的仪器并且花费少等优点,只要植物具备丰富的醇溶蛋白多态性,醇溶蛋白标记就可成为评价植物遗传多样性和系统进化研究的优良可选技术体系之一<sup>[12-13]</sup>。近年来,利用醇溶蛋白标记技术对小麦族植物进行品种鉴定、系统进化、种质遗传变异等研究已有广泛报道<sup>[14-18]</sup>,但利用醇溶蛋白标记技术对大豆的研究却鲜有报道。

利用醇溶蛋白标记对黑龙江省 25 份大豆的遗传多样性进行研究,结果表明 SDS-PAGE 能较好的将醇溶蛋白谱带分离出来,相对于 A-PAGE 来说,SDS-PAGE 具有胶板韧性大,易剥胶的优点。由电泳结果可见,25 份材料中,最多的 1 份材料共分离出 19 条谱带,其中 12 条具有多态性,多态性比率为 63.16%。前人研究表明,对于植物物种水平的遗传多样性而言,多态性比率在 50% 左右被认为该物种的遗传多样性是丰富的<sup>[19-21]</sup>。由此可知供试大豆品种具有丰富的遗传多样性。材料间 GS 值变异范围为 0.4737 ~ 0.9474,在蛋白质水平上证明不同大豆品种之间的差异很大,遗传多样性丰富。聚类分析及主成分分析结果表明,利用醇溶蛋白遗传多样性能较好的揭示出黑龙江省 25 份供试大豆材料之间的亲缘关系,以此证明醇溶蛋白标记可以作为研究大豆品种遗传多样性的一种简单、有效的方法,能够为大豆新品种选育提供物质基础和理论依据。

## 参考文献

- [1] 钱迎倩,马克平.生物多样性研究的原理与方法[M].北京:中国科学技术出版社,1994:141-165. (Qian Y Q, Ma K P. The principle and method for Biodiversity research [M]. Beijing: Science and Technology Press, 1994:141-165. )
- [2] 马啸,陈仕勇,周永红,等.老芒麦种质的醇溶蛋白遗传多样性研究[J].草业学报,2009,18(3):59-66. (Ma X, Chen S Y, Zhou Y H, et al. Genetic diversity of Gliadin in worldwide germplasm collections of *Elymus sibiricus* [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2009,18(3):59-66. )
- [3] 张学勇,杨欣明,董玉琛.醇溶蛋白电泳在小麦种质资源遗传分析中的应用[J].中国农业科学,1995,28(4):25-32. (Zhang X Y, Yang X M, Dong Y S. Genetic analysis of wheat germplasm by acid polyacrylamide gel electrophoresis of gliadins [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1995,28(4):25-32. )
- [4] 李正玲,许为钢,张清珍,等.河南省地方小麦品种醇溶蛋白的遗传多样性分析[J].麦类作物学报,2008,28(4):582-587. (Li Z L, Xu W G, Zhang Q Z, et al. Genetic heterogeneity and diversity within and among Henan wheat landraces with the same name as revealed by gliadin composition [J]. Journal of Triticeae Crops, 2008,28(4):582-587. )
- [5] Draper S R. ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986 [J]. Seed Science and Technology, 1987,15:431-434.
- [6] Zillman R R, Bushuk W. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams II. Effects of environmental and experimental factors on the gliadin electrophore-grams [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1979,59:281-286.
- [7] 张学勇,杨欣明,董玉琛.醇溶蛋白电泳在小麦种质资源遗传分析中的应用[J].中国农业科学,1995,28(4):25-32. (Zhang X Y, Yang X M, Dong Y S. Genetic analysis of wheat germplasm by acid polyacrylamide gel electrophoresis of gliadins [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1995,28(4):25-32. )
- [8] 范莉英,李德颖,李敏.应用种子蛋白电泳图谱对高羊茅品种进行鉴别与聚类研究[J].草业学报,1996,5(4):5-10. (Fan L Y, Li D Y, Li M. Identification and cluster analysis of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. ) cultivars using SDS-PAGE diagram of seed protein [J]. Acta Prataculturae Sinica, 1996,5(4):5-10. )
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970,227:680-685.
- [10] Woyehick J H, Boundy J A, Dimler R J. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentric area [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1961,94(3):477-482.
- [11] Nei M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979,76:5269-5273.
- [12] Mellish A, Coulman B, Fernandez Y. Genetic relationships among selected crested wheatgrass cultivars and species determined on the basis of AFLP markers [J]. Crop Science, 2002,42:1662-1668.
- [13] 杨瑞武,魏秀华,周永红,等.赖草属植物醇溶蛋白的遗传多样性[J].云南植物研究,2004,26(1):103-110. (Yang R W, Wei X H, Zhou Y H, et al. Genetic polymorphism of gliadin in leymus [J]. Acta Botanica Yunnanica 2004,26(1):103-110. )
- [14] 马啸,周永红,余海清,等.野生垂穗披碱草种质的醇溶蛋白遗传多样性分析[J].遗传,2006,28(6):699-706. (Ma X, Zhou Y H, Yu H Q, et al. Genetic diversity of gliadin in wild germplasm of *Elymus nutans* Griseb [J]. Hereditas, 2006,28(6):699-706. )
- [15] 郎明林,卢少源,张荣之.中国北方冬麦区主栽品种醇溶蛋白组成的遗传演变分析[J].作物学报,2001,27(6):958-966. (Lang M L, Lu S Y, Zhang Y Z. Analysis of the genetic evolution of gliadin composition in the major wheat cultivars grown in north China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2001,27(6):958-966. )
- [16] 魏育明,郑有良,刘登才,等.四川小麦地方品种 Gli-1、Gli-2 和 Glu-1 位点的遗传多样性[J].植物学报,2000,42(5):496-501. (Wei Y M, Zheng Y L, Liu D C, et al. Genetic diversity of Gli-1, Gli-2 and Glu-1 alleles in Sichuan wheat landraces [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2000,42(5):496-501. )
- [17] 杨瑞武,魏秀华,周永红,等.赖草属植物醇溶蛋白的遗传多样性[J].云南植物研究,2004,26(1):103-110. (Yang R W, Wei X H, Zhou Y H, et al. Genetic polymorphism of gliadin in Leymus [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2004,26(1):103-110. )
- [18] 兰秀锦,郑有良,刘登才,等.山羊草属植物醇溶蛋白的遗传多样性分析[J].草业学报,2006,15(6):93-100. (Lan X J, Zheng Y L, Liu D C, et al. Gliadin polymorphism of *Aegilops* species [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2006,15(6):93-100. )
- [19] 马小军,汪小全,徐昭玺.人参不同栽培群体遗传关系的 RAPD 分析[J].植物学报,2000,42(6):587-590. (Ma X J, Wang X Q, Xu Z X. RAPD variation within and among populations of ginseng cultivars [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2000,42(6):587-590. )
- [20] 刘果厚,贾宝丽.浑善达克沙地榆遗传多样性的研究[J].干旱区资源与环境,2003,17(5):123-128. (Liu G H, Jia B Li. The study of genetic diversity of *Ulmus pumila* var. *Ulmus pumila* [J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2003,17(5):123-128. )
- [21] 孙坤,陈纹,马瑞君.子午岭中国沙棘亚居群的遗传多样性研究[J].兰州大学学报,2004,40(3):72-75. (Sun K, Chen W, Ma R J. A study on the genetic diversity of subpopulations of *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* at Ziwuling, Gansu [J]. Journal of Lanzhou University, 2004,40(3):72-75. )