

## 辽宁省野生大豆种质资源的 SSR 遗传多样性分析

李建东, 燕雪飞, 董思言, 魏苗, 王国骄, 孙备

(沈阳农业大学农学院, 辽宁沈阳 110161)

**摘要:**以30份2007年辽宁省的野生大豆种质资源为材料,利用40对SSR引物进行遗传多样性分析。结果表明:18对SSR引物扩增出129个等位变异,平均每个位点等位变异7.22个,Shannon-Weaver指数变化范围为1.1753~2.1234,平均为1.7285。中部平原半湿润区内的种质数、平均等位变异数和遗传多样性指数最高,其次为东部山地湿润区,西部丘陵半干旱区内分布种质数最少,其平均等位变异数和遗传多样性指数均最低。中部平原半湿润区和东部山地湿润区之间的遗传相似性最高(0.6496),遗传距离最近(0.4314),而西北部平原低丘半湿润区和西部丘陵半干旱区之间的遗传相似性最低(0.4326),遗传距离最远(0.8379)。聚类结果看到SSR分子标记的结果与品种的地理来源没有明显的相关性。

**关键词:**野生大豆;遗传多样性;SSR;聚类分析

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)01-0028-05

## Analysis of Genetic Diversity of *Glycine soja* Germplasm Resources in Liaoning Province

LI Jian-dong, YAN Xue-fei, DONG Si-yan, WEI Miao, WANG Guo-jiao, SUN Bei

(College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

**Abstract:** In order to evaluate the genetic diversity of the wild soybean (*Glycine soja*) in the different region of Liaoning Province, China, a total of 30 wild soybean accessions from 5 ecological regions (semi-humid zone of plain in the centre, semi-humid zone of low hill in the south, semi-humid zone of plain and low hills in the northwest, semi-arid zone of hill in the west, and humid zone of mountainous lands in the east, abbreviated as region I, II, III, IV and V, respectively) of Liaoning province in 2007 were genotyped using 40 pair of SSR primers. 129 alleles were detected by 18 pair of SSR markers, with an average of 7.2 alleles for each locus. Shannon-Weaver diversity indexes varied from 1.1753 to 2.1234 with averaged 1.7285. The region I had the most germplasmas, the alleles and the highest genetic diversity, followed by the region V and the region IV had the least and the lowest. The value of genetic similarity was highest (0.6496) while the value of genetic distance was the lowest (0.4314) between the region I and V. The value of genetic similarity was the lowest (0.4326) while the value of genetic distance was highest (0.8379) between the region III and IV. There was no relativity between the results by the SSR markers and geographic origin by cluster analysis.

**Key words:** *Glycine soja*; SSR; Genetic diversity; Genetic distance; Cluster analysis

野生大豆是栽培大豆的野生祖先种,为栽培大豆的遗传育种和种质改良提供了重要的基因资源,是大豆的天然基因库。野生大豆地理分布仅限于东亚中北部地区,包括中国、朝鲜半岛、日本、俄罗斯远东地区,主要分布于我国,除海南、青海和新疆外,其余各省区均有野生大豆分布。

野生大豆的遗传多样性研究从形态学、等位酶水平逐渐过渡到分子水平。目前分子水平常用的研

究方法有 RFLP, AFLP, SSR 等多种分子生物学标记法,其中 SSR 标记作为重复性稳定性高的共显性标记,近年来被广泛用于大豆的遗传作图。丁艳来等<sup>[1]</sup>以 196 份由国家大豆改良中心种质库提供的来自 24 个省区的野生大豆为研究对象,揭示了中国野生大豆遗传多样性以及不同分布区的地理生态特异性。关媛<sup>[2]</sup>等揭示了湖北大豆的遗传丰富度显著高于湖南大豆,但二省大豆遗传多样性指数之间没

收稿日期:2009-07-06

基金项目:辽宁省教育厅高等学校创新团队科研资助项目(2009i088)。

第一作者简介:李建东(1964-),男,教授,博士生导师。研究方向为农业生态,野生资源利用与保护。

有显著差异。海林等<sup>[3]</sup>利用 12 对 SSR 对半野生大豆种质进行了遗传多样性分析,发现省内的种质之间遗传差异较大,严茂粉等<sup>[4]</sup>利用野生大豆天然居群为材料揭示出北京地区野生大豆种群遗传分化表现出地理差异。辽宁省地势大体为北高南低,从陆地向海洋倾斜,山地丘陵分列于东西两侧,向中部平原倾斜。复杂多样的地形地貌及气候条件为野生大豆的生长提供了不同的生态环境。该文对辽宁省野生大豆 30 份材料的 SSR 遗传多样性分析,旨在明确辽宁省野生大豆资源的遗传多样性分布特点,揭示不同生态区的亲缘关系,同时为辽宁省野生大豆种质资源的利用与开发提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

供试的 30 份野生大豆材料由中国农业科学院作物品种资源所提供,来自辽宁省 30 个地区 2007 年的保存种质(表 1)。参试材料在农艺性状上具有多样性,如粒色(黑色、褐色、双色、黄色等)、百粒重、生育日数等。辽宁省生态区划采用模糊聚类分析的方法进行区划<sup>[5]</sup>。全省划分为 5 个野生大豆生态气候区:中部平原半湿润区(I 区)、南部低丘湿润半湿润区(II 区)、西北部平原低丘半湿润区(III 区)、西部丘陵半干旱区(IV 区)、东部山地湿润区(V 区)。30 份材料分属 I 区 10 份,II 区 6 份,III 区 5 份,IV 区 3 份,V 区 6 份,每区的材料视作一个群体。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子萌发和 DNA 的提取 从每份材料中取 2 粒野生大豆种子,划破种皮,将种子放于装有蛭石的塑料盆中,在培养箱内 28℃ 恒温萌发,用 CTAB 法<sup>[6]</sup>提取全基因组 DNA。

1.2.2 SSR 标记 在每条染色体上选取 2 对大豆 SSR 引物,由上海赛百盛基因技术公司合成,引物序列见 <http://www.soybean.org/resources/ssr.php>。从中筛选出扩增条带清晰、反应稳定的 18 对引物对供试辽宁省野生大豆 DNA 样品进行扩增。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 含 10  $\times$  Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ (含  $\text{Mg}^{2+}$ ), 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 0.4  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  正、反向 SSR 引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , Taq 聚合酶 (2.5U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 以及 1.5  $\mu\text{L}$  的 30  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  模板 DNA, ddH<sub>2</sub>O 为 12.9  $\mu\text{L}$ 。应用 MJ Research 公司 PTC200 96v 进行扩增,反应程序为:94℃ 下模板预变性 5 min

后,94℃ 下模板 DNA 变性 1 min,55℃ 下引物与模板靶位点结合 1 min,72℃ 下延伸 2 min,35 个循环,最后 72℃ 下延伸 7 min。扩增产物在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中恒压电泳,银染检测<sup>[7]</sup>。

表 1 供试材料的编号和来源

Talbe 1 Accession numer and origin of experiment materials

序号 No.	编号 Accession number	来源 Origin	序号 No.	编号 Accession number	来源 Origin
1	ZYD02225	本溪 Benxi	16	ZYD02560	凌海 Linghai
2	ZYD01620	昌图 Changtu	17	ZYD02379	康平 Kangping
3	ZYD02420	朝阳 Chaoyang	18	ZYD02246	宽甸 Kuandian
4	ZYD02011	大洼 Dawa	19	ZYD01914	辽中 Liaozhong
5	ZYD01962	灯塔 Dengta	20	ZYD02486	凌源 Lingyuan
6	ZYD02269	凤城 Fengcheng	21	ZYD02180	清原 Qingyuan
7	ZYD02684	抚顺 Fushun	22	ZYD02617	绥中 Suizhong
8	ZYD02413	阜新 Fuxin	23	ZYD01931	台安 Taian
9	ZYD02093	瓦房店 Wafangdian	24	ZYD01896	铁岭 Tieling
10	ZYD02045	盖州 Gaizhou	25	ZYD01922	新民 Xinmin
11	ZYD01942	海城 Haichen	26	ZYD02607	兴城 Xingcheng
12	ZYD02593	黑山 Heishan	27	ZYD02669	岫岩 Xiuyan
13	ZYD02211	桓仁 Hengren	28	ZYD02591	义县 Yixian
14	ZYD02530	建昌 Jianchang	29	ZYD02389	彰武 Zhangwu
15	ZYD02119	金州 Jinzhou	30	ZYD02145	庄河 Zhuanghe

### 1.3 SSR 数据分析

根据每个 SSR 标记的等位变异的有无分别以 0、1 记,统计等位变异数(NA)、Nei's 遗传距离<sup>[8]</sup>以及遗传多样性指数(以 Shannon-weaver 指数  $I$  表示,  $I = -\sum p_i \ln p_i$ ,  $p_i$  为某个 SSR 位点第  $i$  个等位基因的频率<sup>[9]</sup>),上述计算使用 Popgen1.32 软件。聚类分析根据供试材料的 Jaccard 遗传相似系数矩阵,按 NTSYSpc2.10e 软件的类平均法(UPGMA)进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 辽宁省野生大豆 SSR 位点多态变异

利用 40 对 SSR 引物对辽宁省 30 份野生大豆种质基因组进行扩增,其中有 18 对引物能扩增出较清晰的谱带(图 1、2),18 个 SSR 位点共检测出 129 个等位基因变异,每个位点的等位基因数目范围为 4~10 个,多态最少的有 4 条带(Satt431 和 Satt022),多态最高的为 10 条带(Satt534 和 Satt114),平均为 7.22 个(表 2)。每个引物在不同生态区中产生的带数差异较大,中部平原半湿润区检测出的位点数最多(95 个),平均为 5.28 个/位点,其余依次为东部山地湿润区(4.11 个/位点)、西北部平原低丘半湿润区(3.72 个/位点)、南部低丘湿润半湿润区(3.67 个/位点)、西部丘陵半干旱区(2.56 个/位点)。

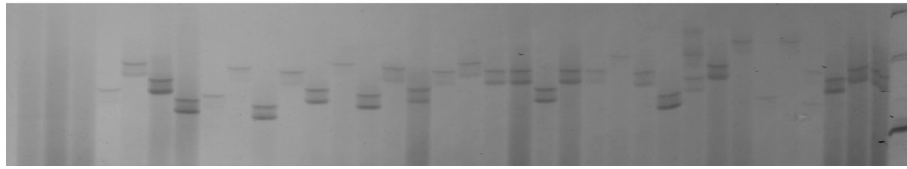


图1 引物 Satt177 扩增产物电泳检测结果

Fig.1 Electrophoretic result of PCR products by using primer Satt177

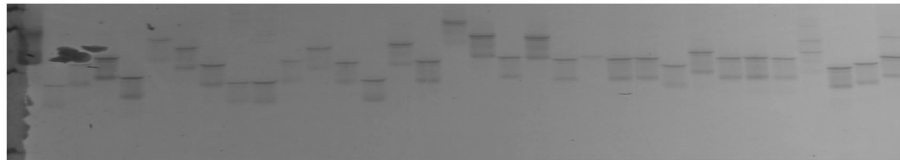


图2 引物 Satt005 扩增产物电泳检测结果

Fig.2 Electrophoretic result of PCR products by using primer Satt005

## 2.2 遗传多样性指数分析

不同 SSR 位点的遗传多样性指数有较大的差异(表 2), Shannon- weaver 指数最高为 2. 1234 (Satt190), 最低为 1. 1753 (Satt022), 平均为 1. 7285。不同生态区的群体中 Shannon- weaver 指数

的差异也较大, 最高为 1. 4997 (中部平原半湿润区), 其余依次为 1. 2893 (东部山地湿润区)、1. 1925 (西北部平原低丘半湿润区)、1. 1845 (南部低丘湿润半湿润区)、0. 8736 (西部丘陵半干旱区)。

表2 18个SSR标记所检测的辽宁省野生大豆不同生态区遗传多样性

Table 2 Genetic diversity detected by 18 SSR markers in the samples of *Glycine soja* from different ecological regions of Liaoning province

引物(连锁群) Primer(LG)	辽宁省 Liaoning		I区 Region I		II区 Region II		III区 Region III		IV区 Region IV		V区 Region V	
	NA	I	NA	I	NA	I	NA	I	NA	I	NA	I
	Satt276(A1)	7	1.6859	4	1.2130	1	0	4	1.3863	3	1.0986	2
Satt177(A2)	9	1.8731	6	1.6138	3	1.0114	3	0.8018	4	1.3297	6	1.7482
Satt534(B2)	10	1.9979	7	1.7540	4	1.3209	4	1.3863	2	0.6365	5	1.6094
Satt190(C1)	9	2.1234	6	1.7329	3	1.0549	3	1.0549	2	0.6931	4	1.3322
Satt281(C2)	7	1.8336	7	1.8867	5	1.5607	4	1.3322	2	0.6365	4	1.2425
Satt147(D1a+Q)	8	1.9421	7	1.8344	4	1.2425	4	1.3322	2	0.6931	6	1.7918
Satt005(D1b+w)	8	1.7178	5	1.3592	3	1.0114	4	1.3322	3	1.0986	4	1.2425
Satt168(D2)	7	1.8995	6	1.6675	5	1.5607	3	1.0549	2	0.6365	3	1.0114
Sat_112(E)	5	1.3374	4	1.2861	3	1.0397	2	0.5623	3	1.0114	4	1.2799
Satt114(F)	10	2.0129	6	1.7061	5	1.5454	8	2.0253	4	1.3863	7	1.8201
Satt288(G)	7	1.8908	4	1.2130	4	1.3863	3	1.0986	2	0.6931	5	1.6094
Satt434(H)	5	1.3127	4	1.1873	4	1.3297	2	0.6931	3	1.0114	3	1.0986
Satt571(I)	7	1.6694	6	1.5401	4	1.1988	6	1.7481	2	0.6365	4	1.3297
Satt431(J)	4	1.3444	3	1.0549	4	1.3297	4	1.2799	3	1.0986	3	1.0114
Satt544(K)	9	2.0282	7	1.8344	4	1.3297	4	1.3322	2	0.6365	4	1.3297
Satt462(L)	7	1.7131	5	1.5341	4	1.3322	3	1.0549	3	1.0986	5	1.5607
Satt590(M)	6	1.5555	5	1.5230	3	1.0549	3	0.9503	2	0.6931	2	0.6931
Satt022(N)	4	1.1753	3	1.0549	3	1.0114	3	1.0397	2	0.6365	3	0.8240
总计 Total	129		95		66		67		46		74	
平均值 Average	7.2	1.7285	5.28	1.4997	3.67	1.1845	3.72	1.1925	2.56	0.8736	4.11	1.2893

### 2.3 不同生态区间亲缘关系分析

不同生态区材料遗传相似性和遗传距离见表 3,各生态区间的遗传距离变化范围为 0.4314 ~ 0.8379,平均为 0.6224;各生态区间遗传相似性变化范围为 0.4326 ~ 0.6496,平均为 0.5409;其中,中部平原半湿润区和东部山地湿润区之间的遗传相似性最高,为 0.6496,遗传距离最近,为 0.4314;而西北部平原低丘半湿润区和西部丘陵半干旱区之间的遗传相似性最低,为 0.4326,遗传距离最远,为 0.8379。

表 3 不同生态区遗传相似性和遗传距离比较

Table 3 Comparison of genetic identity and genetic distance of germplasm in different ecological regions

生态区	I 区	II 区	III 区	IV 区	V 区
Region	Region I	Region II	Region III	Region IV	Region V
I	-----	0.5979	0.5951	0.5346	0.6496
II	0.5143	-----	0.5116	0.4328	0.5478
III	0.5191	0.6702	-----	0.4326	0.5267
IV	0.6263	0.8376	0.8379	-----	0.5803
V	0.4314	0.6019	0.6412	0.5442	-----

----- 以上为 Nei's 遗传相似性,----- 以下为 Nei' 遗传距离

Values above and below "-----" are Nei's genetic similarity and Nei's genetic distance, respectively.

### 2.4 聚类分析

根据遗传相似系数建立 30 份材料间的树状遗传关系图(图 3)。根据聚类图,可以把这些材料分为两大类。第 1 类包括 25 份,分别为材料 22、20、28、1、3、19、13、29、18、6、15、25、30、8、27、9、14、16、12、2、17、10、11、7 和 24,又可分为 3 个亚类:第 1 亚类包括 21 份,分别为材料 22、20、28、1、3、19、13、29、18、6、15、25、30、8、27、9、14、16、12、2、17;第 2 亚类包括 1 份,为材料 10,第 3 亚类包括 3 份,为材料 11、7 和 24;第 2 类有 5 份材料,分别为材料 4、23、5、26 和 21(图中地区编号与表 1 相同)。聚类结果看到 SSR 分子标记的结果与品种的地理来源并没有明显的相关性。

## 3 讨论

### 3.1 多态性分析

朴向民<sup>[10]</sup>在 76 份来自中国 and 韩国的野生大豆的 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;丁艳来对来自全国 24 个省区的

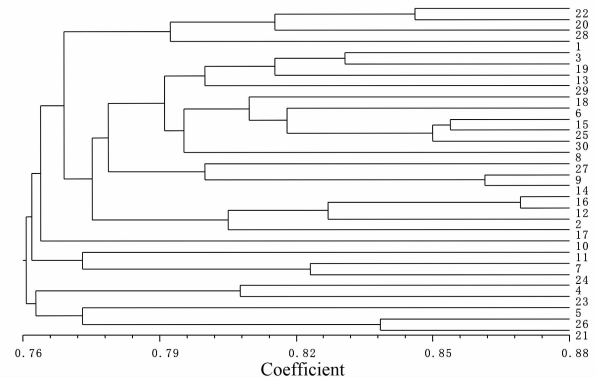


图 3 不同地区野生大豆聚类分析

Fig. 3 Dendrogram of 30 materials of wild soybean from different regions on genetic similarity

196 份野生大豆的研究等位基因平均为 16.1 个<sup>[1]</sup>;王果<sup>[11]</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 位点的等位变异平均为 7 个。该研究从 30 份野生大豆的 18 个 SSR 位点共检测 129 个等位基因,平均每个位点 7.2 个。等位变异有随着取样范围的缩小逐渐减少的趋势,然而 SSR 位点多态性主要与 3 个因素有关;因此平均等位基因的比较具有相对性,只有加上遗传多样性的分析才更完善。

### 3.2 种质数量与遗传多样性的关系

采用 2007 年收集的 30 份种质资源选择野生大豆 SSR 遗传多样性,其中,西部丘陵半干旱区收集到的种质数最少,遗传多样性最小,中部平原半湿润区内收集的种质数最多,遗传多样性最大。关荣霞等<sup>[12]</sup>的结果显示样本数与等位基因变异数有极显著正相关,该研究从区域尺度证明了遗传多样性与种质数量有关,为野生大豆种质收集提供建议:在野生大豆适宜区,其分布范围广,遗传多样性高,所以应收集尽量多的种质材料,而对于非适宜区,遗传多样性较低,在考虑经费,时间等条件下,可以适当减少种子的收集。

### 3.3 聚类分析

严茂粉在对北京地区野生大豆的 10 个种群的聚类分析中看到北京地区野生大豆种群遗传结构与地理分布有一定的相关性<sup>[4]</sup>。从聚类结果看到 SSR 分子标记的结果与品种的地理来源并没有明显的相关性,但参试材料所处的地理位置及其气候条件等与分类有一定的关系:如第 1 大类中,西部丘陵半干

旱区的材料均在第1亚类,这一地区地形以丘陵为主,气候干旱少雨;第2大类不含有西北部平原低丘半湿润区、西部丘陵半干旱区的材料,地形有山地和平原,夏季多雨。但是,也有地理分布较远的材料聚在一起,如兴城和清原聚在一起。因而应在多个水平,借助多种研究手段,对材料进行综合评价,才能更为准确地评价种质资源。

## 参考文献

- [1] 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.)
- [2] 关媛,鄂文弟,王丽侠,等. 以湖南和湖北大豆为例分析影响遗传多样性评价的因素[J]. 作物学报,2007,33(3):461-468. (Guan Y, E W D, Wang L X, et al. Analysis of factors influencing the genetic diversity evaluation using two soybean collections from Hunan and Hubei [J]. Acta Agronomica Sinica,2007,33(3):461-468.)
- [3] 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,2002,22(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.)
- [4] 严茂粉,李华,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, China [J]. Journal of Plant Ecology, 2008,32(4):938-950.)
- [5] 杨志岩,李晓鹏,刘毅,等. 辽宁省杨树栽培生态气候区及适生品种[J]. 辽宁林业科技,2005(4):1-3. (Yang Z Y, Li X P, Liu Y, et al. Planting eco-climate zones of poplar and suitable varieties in Liaoning province [J]. Liaoning Forestry Science and Technology,2005(4):1-3.)
- [6] McGregor C E, Lamber C A, Greyling M M, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Euphytica,2000,113(2):135-144.
- [7] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of a microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*O. sativa* L.) [J]. Molecular and General Genetics MGG,1996,252(5):597-607.
- [8] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1973,70(12):3321-3323.
- [9] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication [M]. Urbana: Illinois University Press,1963.
- [10] 朴向民,张圣珍,许建,等. 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[J]. 大豆科学,2009,28(2):181-185. (Piao X M, Zhang S Z, Xu J, et al. Genetic diversity of annual wild soybean (*Glycine Soja*) between China Jilin Province and Korean [J]. Soybean Science,2009,28(2):181-185.)
- [11] 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 [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(7):2182-2190.)
- [12] 关荣霞,刘秀敏,常汝镇,等. 辽宁省新宾县野生大豆遗传多样性分析[J]. 高技术通讯,2006,16:67-72. (Guan R X, Liu X M, Chang R Z, et al. Genetic diversity analysis of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) from in-situ conserved population in Xinbin County of Liaoning Province Chinese [J]. High Technology Letters,2006,16:67-72.)
- (上接第21页)
- [15] 杨秀红,吴宗璞,张国栋. 无限结荚习性与亚有限结荚习性大豆品种根系性状的比较研究[J]. 大豆科学,2001,20(3):231-234. (Yang X H, Wu Z P, Zhang G D. A comparative study on characteristics of root system between in determinate and sub-determinate soybean varieties [J]. Soybean Science,2001,20(3):231-234.)
- [16] 滕卫丽,韩英鹏,李文滨. 不同叶形大豆品种产量性状边际效应指数分析[J]. 大豆科学,2008,27(3):420-427. (Teng W L, Han Y P, Li W B. Marginal effect index on the yield characters of soybean cultivars with different leaf shape [J]. Soybean Science, 2008,27(3):420-427.)