

文章编号 :1003-8701(2010)02-0001-04

吉林省龙井保护区野生大豆居群遗传多样性的研究

孙晓环^{1,2}, 刘晓冬², 赵洪锟², 王玉民^{2*}, 刘宪虎^{1*}

(1. 延边大学农学院农学系, 吉林 龙井 133400; 2. 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130033)

摘要: 利用 28 对 SSR 引物对吉林省龙井保护区一个居群的 32 份野生大豆进行了遗传多样性分析, 共检测到 120 个等位变异, 平均等位变异数为 4.29 个。32 份野生大豆的遗传相似系数为 0.58~1.0, 平均相似系数为 0.63。聚类分析结果表明, 此居群野生大豆的生长趋势与地理位置有明显的相关性, 呈遗传斑块生长。28 对 SSR 引物得到的 Simpson 指数分布范围为 0.1191~0.6738, 平均值为 0.4544; Shannon-weaver 指数分布范围为 0.2771~1.4783, 平均值为 0.8865。通过遗传多样性指数表明: 吉林省龙井保护区此居群的野生大豆具有较高的遗传多样性。

关键词: 野生大豆; 居群; 遗传多样性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

Diversity of a Population of Wild Soybean (*G. soja*) Growing in Longjing Conserved Region of Jilin Province

SUN Xiao-huan^{1,2}, LIU Xiao-dong², Zhao Hong-kun², Wang Yu-min^{2*}, Liu Xian-hu^{1*}

(1. Department of Agronomy, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400; 2. Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033, China)

Abstract: 28 SSR markers were used to evaluate the genetic diversity of 32 wild soybean accessions collected from Longjing Conserved Region in Jilin Province. A total of 120 polymorphic bands were amplified with these SSR markers and the average alleles were 4.29 for each marker. The coefficient of genetic similarity among 32 wild soybean accessions ranged from 0.58 to 1.0, the average genetic similarities coefficient was 0.63. Clustering analysis showed that there was a relationship between growth tendency and geographic proximity, and the phenomenon of genetic plaque could be seen clearly. The distribution of Simpson index for 28 SSR loci was 0.1191~0.6738, the average Simpson index were 0.4544; Shannon-weaver index for 28 SSR loci was 0.2771~1.4783, the average Shannon-weaver index were 0.8865. These results showed that there existed a highly genetic diversity for wild soybean accessions from Longjing area in Jilin Province.

Keywords: Wild soybean (*G. soja*); Population; Genetic diversity

中国是世界上公认的大豆起源地, 而且是拥有野生大豆(*G. soja*)资源生物多样性最丰富, 分布

最广的国家。目前, 国家基因库收集保存的野生大豆资源达 8 500 余份。野生大豆种群生态学研究表明, 野生大豆小种群内存在非常丰富的遗传变异。过去, 我国野生大豆只注重资源的收集与考察, 对于种群内的遗传多样性研究不足, 导致了一些遗传变异收集的不全面。本文对吉林省龙井保护区野生大豆的一个居群进行了遗传多样性研究, 旨在为野生大豆保护策略的制定和大豆遗传基础的拓宽提供理论依据。

收稿日期: 2010-02-02

项目基金: 农业部农业生物资源保护与利用项目 / 农业部 CWRC 项目(编号: 00053198)

作者简介: 孙晓环(1983-), 女, 在读硕士, 从事野生大豆遗传多样性研究。

通讯作者: 王玉民, 研究员, E-mail: wangym@cjaas.com
刘宪虎, 教授, E-mail: liuxh@ybu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 取 样 方 法

吉林省龙井野生大豆保护区面积 60 hm²,属温带大陆性半湿润季风气候区,春季干燥多风,夏季湿热多雨。伴生植物有狗尾草、芦苇、野艾蒿、香蒿、拂子毛等。保护区包括一段山地、一段草场和一段平原,野生大豆数量也较多,分布相对均匀,山地上的树林因为遮盖比较严重,没有野生大豆分布,草场上野生大豆分布较均匀,但是因为不能完全禁止放牧,所以野生大豆数量不多;平原上部分地方有耕地,除了耕地外,野生大豆分布较均匀,数量很多。采样点选择在保护区的平原上,此野生大豆居群分布较均匀,数量较多,每个采样点收获 20~30 粒野生大豆种子。此居群约 6 175 m²,共设置 32 个采样点。采样点设计间隔为 18m,按野生大豆实际分布情况有改动,每个采样点都进行 GPS 定位确定其位置(图 3)。

1.2 实 验 方 法

1.2.1 DNA 提 取

选取单株幼苗的三出复叶叶片,采用高盐 CTAB 法提取总 DNA^[1]。

1.2.2 SSR 标 记

选择 28 对本实验室筛选的核心 SSR 引物,按照 Soybase 网址 <http://soybase.agron.iastate.edu/resources/ssr.php> 提供的大豆微卫星序列送交北京鼎国生物技术公司合成。

PCR 反应体系总体积为 20μL,其中分别加入模板 DNA (30ng·μL⁻¹)3.0μL;10×buffer (含 Mg²⁺) 2.0μL;2.5 mol·L⁻¹ dNTP 0.4μL;10 pmol·μL⁻¹ Primer (forward)1μL;Primer (reverse)1μL;Taq 酶 (2U·μL⁻¹)0.64μL;ddH₂O 11.96μL。PCR 反应程序:94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s;47~61℃退火 30 s;72℃延伸 50 s,运行 35 个循环;72℃延伸 5 min;最后于 4℃保存待测。PCR 反应在 T-gradient Thermal Cycler PCR 扩增仪 (Bio-metra)上进行。

1.2.3 电 泳 分 析 检 测

PCR 扩增产物采用 6%变性聚丙烯酰胺胶(8 mol/L 脲素)进行电泳分离,银染后检测其等位变异。电泳分离过程中保持 60 W 恒定功率,电泳时间为 2 h 左右,数码相机照相记录。

1.3 数 据 分 析 方 法

SSR 扩增谱带以 0,1 和 2 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“2”,获得矩阵。利用 NTSYS pc 2.02a 软件进行遗传相似系数计算,并绘制亲缘关系树状图。

遗传相似性计算: $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 。

其中, N_x 为在材料 X 中某一引物扩增的条带数, N_y 为在材料 Y 中同一引物扩增出的条带数, N_{xy} 为在 X 和 Y 中扩增出片段长度相同的条带数^[2]。

利用 POPGENE 3.0 软件计算 Simpson 遗传多样性指数和 Shannon-weaver 遗传多样性指数。

Simpson 遗传多样性指数(也称位点多态信息量, (PIC)): $PIC = 1 - \sum P_i^2$

P_i :第 i 个等位变异出现的频率;

Shannon-weaver 遗传多样性指数(也称基因型多样性, (H')): $H' = -\sum P_i \ln P_i$

P_i :第 i 个等位变异出现的频率^[3]。

2 结 果 与 分 析

2.1 SSR 位点多态变异和遗传多样性指数

利用 28 对 SSR 引物对 32 个野生大豆样本进行 SSR 分析,均能扩增出较清晰的谱带,共检测到 120 个等位基因变异,等位基因数范围为 2~7 个,每对引物平均等位基因变异数为 4.29 个。其中,2~4 个等位基因变异的有 15 对引物,5~7 个等位基因变异的有 13 对引物。Sat_112 和 Satt178 检测到的等位基因变异最少,都只有 2 个;Satt180 和 Satt590 检测到的等位基因变异最多,都有 7 个。可见,不同的 SSR 引物多态性具有很大的差异。

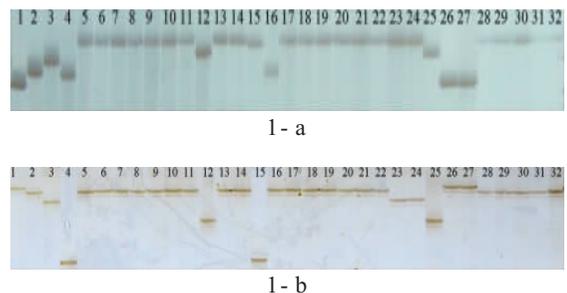


图 1 32 份野生大豆的 SSR 图谱

图 1-a 引物 Satt596 聚丙烯酰胺电泳检测结果

图 1-b 引物 Satt487 聚丙烯酰胺电泳检测结果

1, 2, 3, ……31, 32 依次是图 3 中 LJz01, LJz03, LJz04, LJz6, LJz11, LJz12, LJz13, LJz14, LJz15, LJz16, LJz17, LJz18, LJz19, LJz20, LJz21, LJz22, LJz23, LJz24, LJz25, LJz26, LJz27, LJz28, LJz29, LJz30, LJz31, LJz32, LJz33, LJz34, LJz35, LJz36, LJz37, LJz38

Simpson(PIC)指数和 Shannon-weaver(H')指数常用来衡量某一种群或地区的遗传多样性高低,我们用这两个指数评价各引物遗传多样性的状况及在居群中的分布。Simpson(PIC)指数分布

范围为 0.119 1~0.673 8, 平均值为 0.454 4。当 $PIC > 0.5$ 时, 该位点为高度多态性, 标记可以提供合理的信息; 当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时, 为中度多态性位点, 标记可以提供较合理的信息; 当 $PIC < 0.25$ 时, 为低度多态性位点, 标记提供信息的能力较差。由表 3 可以看出, 除引物 Satt175 和 Satt178 的 $PIC < 0.25$ 其他引物的 $PIC > 0.25$, 都能提供较合理的信息。28 对引物中的 10 对引物 $PIC > 0.5$, 在这些位点上属高度多态性, 其中引物 Satt180 的 PIC 值(0.673 8)最高。Shannon-weaver 指数最低值为 0.277 1 (Satt175), 最高值为 1.478 3 (Satt180), 平均值为 0.886 5。按 Shannon-weaver 遗传多样性指数把 28 对引物分为高、中、低 3 类: 指数值高的引物($H' > 0.7$) 有 23 对; 指数值中等的引物($0.3 < H' < 0.7$) 有 4 对; 指数值低的引物($H' < 0.3$) 只有一对 (Satt175), 可以看出 Simpson 指数和 Shannon-weaver 指数反映遗传多样性的趋势相同, 均可以表现出此居群的野生大豆的遗传多样性水平较高。

表 1 28 对 SSR 引物的 Simpson 指数和 Shannon-weaver 指数

引物	连锁群	等位基因数	Simpson 指数 (PIC)	Shannon-weaver 指数(H')
Satt022	N	5	0.546 9	0.997 9
Sat-112	E	2	0.263 7	0.433 4
Satt168	B2	5	0.560 5	1.111 1
Satt173	O	6	0.572 3	1.203 5
Satt175	M	3	0.119 1	0.277 1
Satt178	K	2	0.194 8	0.345 2
Satt180	C1	7	0.673 8	1.478 3
Sct-189	I	4	0.502 0	0.904 6
Satt213	E	4	0.416 0	0.832 9
Satt226	D2	4	0.525 4	0.932 1
Satt239	I	3	0.404 3	0.727 7
Satt268	E	3	0.406 2	0.735 6
Satt281	C2	3	0.361 3	0.656 2
Satt300	A1	5	0.568 4	1.152 3
Satt308	M	3	0.470 7	0.748 2
Satt309	G	5	0.568 4	1.143 8
Satt339	N	3	0.275 4	0.538 6
Satt408	D1a	5	0.457 0	0.935 8
Satt431	J	5	0.498 0	1.021 0
Satt442	H	5	0.492 2	0.986 2
Satt453	B1	4	0.484 4	0.918 0
Satt462	L	4	0.527 3	1.010 3
Satt487	O	5	0.462 9	0.979 1
Satt505	G	3	0.476 6	0.831 4
Satt553	E	6	0.609 4	1.217 0
Satt561	L	4	0.400 4	0.746 2
Satt590	M	7	0.466 8	1.065 8
Satt596	J	5	0.419 9	0.892 6
总数	17	120		
平均		4.29	0.454 4	0.886 5

2.2 聚类分析

利用 NTSYS pc 2.02a 软件分析 32 份野生大豆样本的 120 个等位基因变异, 计算 32 份样本之间的遗传相似系数, 得到 32 份样本间的遗传相

似数矩阵, 按照 UPGMA 方法对 32 份样本进行聚类分析(图 2)。从聚类分析树状图来看, 32 份样本可在遗传相似系数为 0.60 处划分为两大类群, 其地理位置在图 3 上体现为三角框和方形框两大类。从图 3 可以看出野生大豆居群遗传结构与地理分布有着一定的相关性, 呈斑块分布。从图 2 可以看出, LJZ11 和 LJZ23 亲缘关系非常近, 从地理位置看, 两份材料离的也不远, 很可能是一个母本的种子。因为野生大豆自花授粉特性, 子代的亲缘关系非常近, 28 对多态性较好的引物也没有把两份材料区分开。

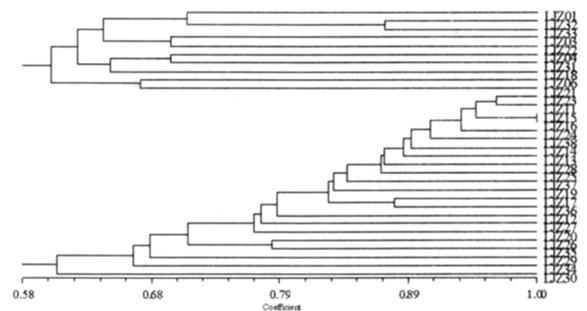


图 2 32 份野生大豆聚类分析树状图

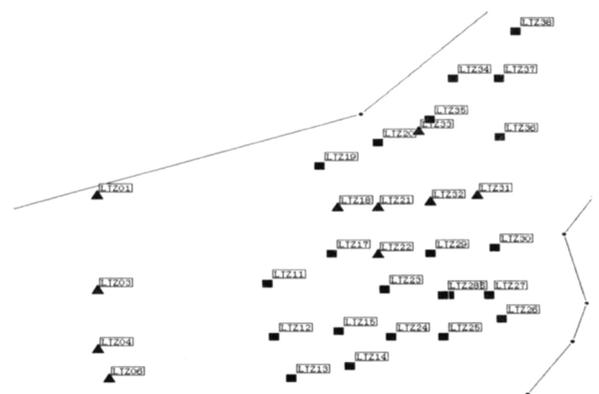


图 3 32 份野生大豆的采样点

3 讨论

鉴于朱维岳^[4]等的研究结论: 居群内进行采样, 样本之间距离应在 18 m 以上, 以保证采集到完全不同的基因型; 赵茹^[5]等的研究结论: 野生大豆居群遗传多样性估算与取样策略样本量达到 30~45 个时, 遗传多样性水平能达到总体变异的 90% 以上。所以, 龙井保护区居群野生大豆采样点选用 18 m 采样距离, 并且选择的 32 个样本基本能反映出遗传多样性水平。同时, 按 50 m 采样距离(共取 90 份材料)取样, 覆盖整个保护区, 研究其采样方法不同引起的遗传多样性差异(研究中, 尚未发表)。

28 对 SSR 引物对 32 份野生大豆材料进行 SSR 遗传多样性分析,共检测到 120 个等位基因变异,平均每对引物为 4.29 个,等位基因数范围为 2~7 个。高于关荣霞^[6]等在辽宁新宾县野生大豆 10 个自然居群遗传多样性研究中,53 对引物共检测到 123 个等位变异,平均每对引物为 2.3 个;低于朴向民^[7]等在中国吉林省的野生大豆和韩国比较中,9 对引物共检测到 172 个等位变异,平均每对引物为 19.1 个,等位基因数范围为 12~24 个。因此本文认为材料采集地不同,对等位变异的影响较明显。

从聚类分析图上可以看出,龙井保护区的野生大豆居群遗传结构与地理分布有着一定的相关性,由图 3 可见,三角框区域有部分遗传距离较远的方形框存在,呈遗传斑块生长。野生大豆是一年生自花传粉的草本植物,具有高度自交性,而其种子主要通过炸荚的方式进行传播,种子的传播距离比较近^[7]。野生大豆居群内的个体之间在远距离的基因流受到限制。理论和实验研究均表明:空间距离或基因流的限制,均会影响植物居群内不同个体之间的有性交配和种子散布,进而导致居群内的不同基因型呈集聚分布或簇状分布^[8-9]。

从聚类分析中得到遗传相似系数为 0.58~1.0,平均遗传相似系数为 0.63。遗传相似系数比较低,说明材料间遗传变异大,野生大豆居群内存在很高的遗传多样性。遗传多样性指数是反映种质材料遗传多样性的有效指标,遗传多样性指数高的地区说明种质类型较多,遗传差异较大,在品种改良中有较多可利用的遗传性状。Simpson 指数和 Shannon-weaver 指数值都比较高,并且趋势相同。Simpson 指数高,杂合度大,说明居群内基因型一致性差,遗传变异大,选择潜力大;Shannon-weaver 指数分为高、中、低三类,而指数值高的引物有 23 对,占所用引物总数的 82.1%。所以,可以表现出此居群的野生大豆的遗传多样性水平很高。李军等^[10]用同工酶,周晓馥^[11]等用 RAPD 技术,分别对野生大豆不同居群的遗传多

样性进行了研究,发现野生大豆居群内存在高度的遗传多样性,建议进一步保护野生大豆居群内的遗传多样性。

野生大豆居群内高度的遗传多样性,可能是由于龙井保护区居群是原生野生大豆居群和历史时间较长而形成的。同时,野生大豆遗传多样性研究也为丰富野生大豆有利基因资源提供理论依据。通过对吉林省龙井保护区野生大豆的考察,发现野生大豆的分布面积锐减,曾经大的群体,现在已经不多见了,野生大豆的分布及生存的空间越来越小,寻找一块分布均匀的居群非常困难。这种现象主要是因为保护不及时而造成的。从考察情况可以看出,对龙井保护区居群内野生大豆遗传资源的保护和研究十分必要。

参考文献:

- [1] 王传堂,黄 粤.改良 CTAB 法和高盐低 pH 值法提取花生 DNA 的效果[J].花生学报,2002,31(3):20-23.
- [2] 赵洪锬,王玉民,李启云,等.中国不同纬度野生大豆和栽培大豆 SSR 分析[J].大豆科学,2001,20(3):172-176.
- [3] 孙君灵,杜雄明,孙其信,等.棉花 γ 射线诱变后代的 SSR 标记遗传多样性[J].中国农业科学,2006,39(10):1967-1976.
- [4] 朱维岳,周桃英.基于遗传多样性和空间遗传结构的野生大豆居群采样策略[J].复旦学报(自然科学版),2006,45(3):222-228.
- [5] 赵 茹,程 舟,陆伟峰,等.基于分子标记的野生大豆居群遗传多样性估算与取样策略[J].科学通报,2006,51(9):1042-1048.
- [6] 关荣霞,刘秀敏,常汝镇,等.辽宁新宾县原位保护区野生大豆(*Glycine soja* Sieb. & Zucc.)遗传多样性分析[J].高技术通讯,2006,16(1):67-72.
- [7] 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.
- [8] Sokal R R, Waterberg D E.A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation -by-distance model [J]. Genetics, 1983, 105:219-237.
- [9] Furnier G R, Knowles P, Ciyde M A, et al.Effect of avian seed dispersal on the genetic structure of whitebark populations[J].Evolution, 1987, 41:607-612.
- [10] 李 军,郑师章,钱 吉,等.野生大豆种子雨的研究[J].应用生态学报,1997,8(4):372-376.
- [11] 周晓馥,庄炳昌,王玉民,等.利用 RAPD 与 SSR 技术进行野生大豆种群内分化的研究[J].中国生态农业学报,2002,10(4):6-9.