

利用 SSR 标记揭示我国夏大豆(*Glycine max* (L.) Merr) 种质遗传多样性

谢华 关荣霞 常汝镇 邱丽娟*

(中国农业科学院作物品种资源研究所, 农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081; 北京农业生物技术研究中心, 北京 100089. * 联系人, E-mail: qiu_lujuan@263.net)

摘要 利用 67 个 SSR 标记, 分析了来自我国栽培大豆初选核心种质中的 158 份夏大豆, 旨在阐明其遗传多样性特点, 为育种利用提供理论依据. 结果表明, 在所有供试夏大豆中共鉴定出等位变异 460 个, 平均每个位点有 6.9 个; 其中, 80 份黄淮夏和 78 份南方夏大豆的等位变异数分别为 414 个和 419 个, 平均每个位点均接近 6.2 个. 所有供试夏大豆平均每个位点多样性(D)为 0.735, 变化范围为 0.414~0.905, 其中黄淮夏大豆 D 值平均为 0.708, 变化范围为 0.387~0.886; 南方夏大豆 D 值平均为 0.687, 变化范围为 0.189~0.884. 黄淮夏大豆和南方夏大豆在特异等位变异数、等位变异频率、遗传相似性系数均存在差异, UPGMA 聚类分析也可将黄淮夏大豆和南方夏大豆基本分成 2 类. 这表明黄淮夏大豆和南方夏大豆可划为 2 个不同的基因池. 在夏大豆育种中, 两种夏大豆类型间可以通过种质资源相互利用来拓宽类型内育成品种的遗传基础.

关键词 我国夏大豆 SSR 标记 遗传多样性

大豆起源于我国, 有 5000 多年的栽培历史. 由于长期自然和人工选择, 积累了极为丰富的种质资源. 目前, 国家作物种质资源库中收集和保存的我国大豆种质高达 2.3 万多份. 然而, 这些种质资源在大豆育种上的利用非常有限. 盖钧镒等人^[1]报道, 我国在 1923~1995 年育成的 651 个大豆品种来自于 348 个祖先亲本, 其中, 38 个祖先亲本的核、质贡献分别达 54.18% 与 56.84%. 可见, 利用大豆种质资源拓育成品种遗传基础方面尚有相当大的潜力.

简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)标记具有在基因组中分布的丰富性、遗传上共显性和技术上的简单性等特点, 被广泛应用于植物遗传多样性分析、分子作图、基因定位和系谱分析等研究. 在大豆中, SSR 标记具有高水平的长度多态性. 据报道, AT 和 ATT 重复单元在大豆中单位点等位变异数可以达到 8 个^[2]. 而对野生大豆及来源于不同国家的栽培大豆进行分析, 单个 SSR 位点检测的等位变异数变化范围可高达 11~26 个^[3,4]. 目前, 在分子水平上, 利用 SSR 标记对大豆种质遗传多样性研究主要集中在北美改良及其引进祖先品种上^[5-7]. 此外, Abe 等人^[8]分析了来自 14 个亚洲国家大豆种质. 作为世界大豆初级基因库中的基础材料, 我国的大豆种质资源仅对形态和农艺性状进行了评价^[9-11], 尚未对其基因

组 DNA 水平遗传多样性进行深入而系统的研究. 因此, 不能满足育种工作者对拓宽品种遗传基础的需求.

根据播种期、生育日数以及光温反应特性, 我国栽培大豆可以划分为春、夏、秋 3 种主要生态类型, 其中夏大豆包括分布在黄淮流域的黄淮夏大豆和分布在长江流域及其以南广大地区的南方夏大豆两种类型^[12]. 本研究采用变性聚丙烯酰胺凝胶分离、银染染色检测方法, 以来自我国栽培大豆初选核心种质中的 158 份黄淮和南方夏大豆为材料, 分析 67 个 SSR 位点遗传变异, 旨在明确我国夏大豆种质遗传多样性, 提高我国大豆种质资源保存和利用的效率.

1 材料和方法

() 材料. 供试的 158 份我国黄淮和南方夏大豆种质选自我国栽培大豆(*Glycine max* (L.) Merr) 初选核心种质^[13], 来源于国家农作物种质资源库, 其中绝大多数为不同收集点的农家品种, 少数为改良品种. 在表 1 中, 左侧为黄淮夏大豆种质(序号为 H01~H80), 右侧为南方夏大豆种质(序号为 N01~N78).

() 基因组 DNA 准备. 为防止种质混杂带来的影响, 每份种质选取脐色、种皮色、粒形等籽粒特征表现一致的种子至少 20 粒, 于温室育苗. 取其新

表 1 供试我国夏大豆种质编号、名称及收集地

序号	国家统一编号	名称	收集地	序号	国家统一编号	名称	收集地
H01	ZDD01672	一粒传大黄豆	河北乐亭	N01	ZDD04444	南农 493-1	原南京农学院
H02	ZDD01680	7599	张家口坝下农业科学研究所	N02	ZDD04446	苏豆 1 号	江苏省农业科学院
H03	ZDD01758	平顶黄	河北任丘	N03	ZDD04451	金大 332	前金陵大学
H04	ZDD01830	平顶开白花	河北曲阳	N04	ZDD04474	溧水中子黄豆乙	江苏溧水
H05	ZDD02570	新黄豆	山东省农业科学院	N05	ZDD04538	岔路口 1 号	原华东农业科学研究所
H06	ZDD02572	齐黄 1 号	山东省农业科学院	N06	ZDD04617	江都晚秋豆	江苏江都
H07	ZDD02598	早黄 3 号	烟台农业科学研究所	N07	ZDD04888	南通黄油豆	江苏南通
H08	ZDD02604	跃进 4 号	菏泽农业科学研究所	N08	ZDD05385	六月爆	安徽太湖
H09	ZDD02611	文丰 7 号	济宁农业科学研究所	N09	ZDD05439	猴子毛	安徽桐城
H10	ZDD02643	兖黄 1 号	山东兖州	N10	ZDD05470	浦东大黄豆	上海
H11	ZDD02645	平顶黄	山东临朐	N11	ZDD05476	奉贤穗稻黄	上海奉贤
H12	ZDD02652	大粒黄	山东福山	N12	ZDD05567	安陆红黄豆	湖北安陆
H13	ZDD02680	平顶四	山东掖县	N13	ZDD05602	武昌冬黄豆	湖北武昌
H14	ZDD02697	一窝猴	山东平度	N14	ZDD05608	黄陂猴子毛	湖北黄陂
H15	ZDD02715	平顶黄	山东益都	N15	ZDD05644	天门大籽黄	湖北天门
H16	ZDD02718	谷里混	山东博山	N16	ZDD05755	蒲圻黄色豆	湖北蒲圻
H17	ZDD02730	六月鲜	山东平邑	N17	ZDD05813	恩施早白黄豆	湖北恩施
H18	ZDD02735	五叶子	山东莒南	N18	ZDD05818	武昌青皮豆	湖北武昌
H19	ZDD02748	天鹅蛋	山东蒙阴	N19	ZDD06076	贼勿要	浙江德清
H20	ZDD02763	平顶五	山东枣庄	N20	ZDD06088	白毛豆	浙江余杭
H21	ZDD02792	八月炸	山东莱芜	N21	ZDD06147	冬豆	浙江天台
H22	ZDD02810	吊死鬼豆子	山东济阳	N22	ZDD06153	毛豆	浙江三门
H23	ZDD02836	柳叶尖	山东临清	N23	ZDD06172	白皮	浙江兰溪
H24	ZDD02844	铁角皮	山东寿张	N24	ZDD06189	八月拔	浙江杭州
H25	ZDD02858	大滑皮	山东济宁	N25	ZDD06755	大颖黄	广西忻城
H26	ZDD02883	铁角黄	山东曹县	N26	ZDD11281	1138-2	原南京农学院
H27	ZDD03117	栾川八月炸白豆	河南栾川	N27	ZDD11799	七月早	湖北五峰
H28	ZDD03130	林县糙黄豆	河南林县	N28	ZDD11910	露水白	湖北郧县
H29	ZDD03138	民权牛毛黄	河南民权	N29	ZDD13224	迟黄豆-3	四川丰都
H30	ZDD03142	陈留牛毛黄	河南开封	N30	ZDD13276	和平冬豆	四川自贡
H31	ZDD03143	内黄牛毛黄	河南内黄	N31	ZDD13382	花腰豆	四川北川
H32	ZDD03145	武陟红毛狼	河南武陟	N32	ZDD13550	梅早豆	四川西昌
H33	ZDD03157	泌阳牛毛黄	河南泌阳	N33	ZDD13585	红岩猫儿灰	四川会东
H34	ZDD03207	永成大黄茧壳	河南永成	N34	ZDD13604	大青皮豆	四川简阳
H35	ZDD03276	鹿邑天鹅蛋	河南鹿邑	N35	ZDD13766	红豆	四川叙永
H36	ZDD03592	望山猴	陕西镇巴	N36	ZDD13822	花腰子	四川峨眉
H37	ZDD03595	扇子白	陕西略阳	N37	ZDD13854	田豆(1)	浙江嵊县
H38	ZDD03852	丰县西河糙	江苏丰县	N38	ZDD14279	七月豆	江西德兴
H39	ZDD03871	沛县大白角	江苏沛县	N39	ZDD14332	白花豆子	江西宁都
H40	ZDD03916	铜山天鹅蛋	江苏铜山	N40	ZDD14351	大青丝	江西上饶
H41	ZDD03947	邳县软条枝	江苏邳县	N41	ZDD14598	华容重阳豆甲	湖南华容
H42	ZDD03978	新沂平顶黄	江苏新沂	N42	ZDD14606	岳阳牛毛红	湖南岳阳
H43	ZDD04002	东海白花糙	江苏东海	N43	ZDD14626	安化迟黄豆(甲)	湖南安化
H44	ZDD04044	赣榆气水汪豆	江苏赣榆	N44	ZDD15676	白水豆	贵州罗甸
H45	ZDD04061	徐豆 1 号	徐州农业科学研究所	N45	ZDD15843	小黄皮豆-2	贵州施秉
H46	ZDD04086	滨海大白花甲	江苏滨海	N46	ZDD15918	咪咪豆-13	贵州沿河
H47	ZDD04197	灌云大四粒	江苏灌云	N47	ZDD16013	白水豆-2	贵州印江
H48	ZDD04263	58-161	江苏省农业科学院	N48	ZDD16122	黄豆子-4	贵州玉屏
H49	ZDD08024	科丰 6 号	中国科学院遗传与发育生物学研究所	N49	ZDD16446	小绿皮豆-2	贵州黎平
H50	ZDD08347	霸县大豆	河北霸县	N50	ZDD16487	早豆-3	贵州松桃
H51	ZDD09882	鲁豆 2 号	济宁农业科学研究所	N51	ZDD16875	黄壳黄豆	广东澄迈

表 1(续)

序号	国家统一编号	名称	收集地	序号	国家统一编号	名称	收集地
H52	ZDD09884	鲁豆 4 号	山东省农业科学院	N52	ZDD17025	鸡窝豆	广西永福
H53	ZDD09895	跃进 5 号	菏泽农业科学研究所	N53	ZDD17029	八月青	广西南丹
H54	ZDD10084	早丰 1 号	河南郑州	N54	ZDD17100	靖西黄豆 1	广西靖西
H55	ZDD10085	郑州 135	河南省农业科学院	N55	ZDD17103	长坪大黄豆	广西蒙山
H56	ZDD10095	郑 77249	河南省农业科学院	N56	ZDD17122	龙州黄豆	广西龙州
H57	ZDD10375	水白豆	陕西凤县	N57	ZDD17140	梅湾黄豆	广西宁明
H58	ZDD10411	八月炸	陕西蓝田	N58	ZDD17169	白土青豆	广西河池
H59	ZDD10491	回茬八月炸	陕西镇安	N59	ZDD17202	德保青	广西德保
H60	ZDD10571	泥巴豆	陕西岚皋	N60	ZDD17267	八月黑皮豆	广西贵县
H61	ZDD11344	涡阳大蚕壳	安徽涡阳	N61	ZDD17279	崇左褐豆	广西崇左
H62	ZDD11347	五河大豆	安徽五河	N62	ZDD17318	大角豆	云南镇雄
H63	ZDD11358	阜阳 335	阜阳农业科学研究所	N63	ZDD17331	小黄豆	云南会泽
H64	ZDD11408	灵璧小油豆	安徽灵璧	N64	ZDD17381	细黄豆	云南文山
H65	ZDD11412	宿县平顶五	安徽宿县	N65	ZDD17385	大白豆	云南红河
H66	ZDD11449	稻熟黄	安徽滁县	N66	ZDD17436	细白豆	云南曲靖
H67	ZDD11579	中豆 19(83-19)	中国农业科学院油料研究所	N67	ZDD17487	大青豆	云南巍山
H68	ZDD18399	中黄 1	中国农业科学院作物研究所	N68	ZDD17513	黑豆	云南墨江
H69	ZDD18589	前进 2 号	河北沧县	N69	ZDD17556	松子黄豆	云南昭通
H70	ZDD18646	石人沟早黄豆	河北丰宁	N70	ZDD19734	黑皮螺丝豆	江苏金湖
H71	ZDD18700	黄本 13	河北灵寿	N71	ZDD19911	宜兴晚黄豆	江苏宜兴
H72	ZDD18712	石庄大粒黄	河北安平	N72	ZDD20531	豌豆早	湖北竹溪
H73	ZDD19090	望城大八月鲜	山东莱西	N73	ZDD20756	矮脚黄	四川康定
H74	ZDD19099	落叶黄	山东即墨	N74	ZDD21250	早黄豆	浙江建德
H75	ZDD19159	崩节黄	山东海阳	N75	ZDD21536	训豆 - 1	福建周宁
H76	ZDD19377	鲁豆 6 号	潍坊农业科学研究所	N76	ZDD21587	八月黄 - 5	福建泰宁
H77	ZDD19406	豫豆 12	河南省农业科学院	N77	ZDD21711	青皮豆	福建顺昌
H78	ZDD19407	郑 133	河南省农业科学院	N78	ZDD22051	新桥黄豆	湖南大庸
H79	ZDD19500	扇子白	陕西宁陕				
H80	ZDD19714	楚秀	淮阴农业科学研究所				

鲜的三出复叶, 参照Keim等人^[44]的CTAB法提取基因组DNA.

() SSR位点选取. 本研究所用的 67 个SSR位点(表 2), 均已被定位在大豆遗传图谱上^[45], 覆盖大豆 20 条连锁群, 每条连锁群上分布 2~6 个, 平均为 3 个. SSR引物序列来自美国农业部大豆基因组数据库(<http://129.186.26.94/SSR.html>).

() PCR 扩增与电泳检测. 20 μL 扩增体系中含 50 ng 基因组 DNA, 1×PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0)和 50 mmol/L KCl), 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 0.2 μmol/L 引物和 1 U Taq 酶 (Promega). PCR 反应程序为: 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s, 47 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 35 个循环; 68 延伸 10 min. SSR 引物由上海生物工程公司合成.

采用 Bio-Rad 测序胶板装置, 在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶(8 mol/L 脲素)中电泳分离, 银染后检测其等位变异. 20 μL 扩增产物中加 10 μL 缓冲液(98%甲

酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.25% 溴酚蓝和 0.25% 二甲苯青 FF), 混合后于 95 变性 5min. 取 5 μL 混合液电泳. 为提高检测效率, 根据不同位点等位变异分子量范围, 在同一玻璃板上先后进行多次上样. 为保证样品不重合, 分子量较小位点先上样电泳, 分子量较大的位点则隔电泳一定时间后上样. 电泳分离过程中保持 100 W 恒定功率, 电泳时间为 2 h 左右. 不同检测板的不同等位变异, 再经同一检测板进行统一校正, 并设标准分子量 Marker 作对照.

() 数据分析. 用数字 1 和 0 分别表示供试种质某一等位变异有无. 有记为“1”, 无记为“0”, 建立 0 和 1 数据库. 按 Narvel 等人^[6]公式计算某一位点(i)多样性(maker diversity, 简称 D): $D_i = n(1 - \sum P_{ij}^2) / n - 1$, n 为资源份数, P_{ij} 为第 i 个位点第 j 个等位变异频率. 平均位点多样性: $D = \sum D_i / r$, r 为调查位点数. 采用 Jaccard(J)系数计算成对种质间遗传相似性, $J = N_{ij} / (N - N_{00})$, 其中 N_{ij} 为种质 i 和种质 j 共有的等位变异数, N 为所有供试种质等位变异数, N_{00} 为种质 i 和

表 2 黄淮大豆和南方夏大豆在 67 个 SSR 位点的等位变异数和多样性(D)

位点(连锁群)	等位变异数						位点多样性(D)		
	总	黄淮夏	南方夏	共有	黄淮夏特异	南方夏特异	总	黄淮夏	南方夏
Satt236(A1)	7	7	7	7	0	0	0.775	0.779	0.764
Satt300(A1)	6	4	6	4	0	2	0.414	0.451	0.368
Satt187(A2)	5	5	5	5	0	0	0.630	0.594	0.586
Satt390(A2)	6	5	5	4	1	1	0.703	0.679	0.707
Satt409(A2)	13	13	13	13	0	0	0.905	0.886	0.874
Satt429(A2)	6	6	6	6	0	0	0.766	0.790	0.684
Satt197(B1)	10	8	9	7	1	2	0.858	0.831	0.799
Satt415(B1)	4	3	4	3	0	1	0.654	0.653	0.631
Satt453(B1)	5	5	5	5	0	0	0.687	0.519	0.742
Satt168(B2)	6	5	6	5	0	1	0.763	0.648	0.692
Satt556(B2)	6	5	6	5	0	1	0.433	0.387	0.473
Satt577(B2)	8	8	7	7	1	0	0.805	0.747	0.752
Satt180(C1)	4	4	4	4	0	0	0.719	0.685	0.563
Satt194(C1)	5	4	5	4	0	1	0.737	0.737	0.684
Satt565(C1)	7	7	6	6	1	0	0.713	0.766	0.602
Sat_130(C2)	3	3	3	3	0	0	0.608	0.593	0.615
Satt277(C2)	12	11	12	11	0	1	0.870	0.831	0.846
Satt281(C2)	12	12	11	11	1	0	0.874	0.880	0.841
Satt286(C2)	6	5	6	5	0	1	0.780	0.736	0.738
Satt307(C2)	7	6	7	6	0	1	0.770	0.735	0.702
Satt371(C2)	5	5	4	4	1	0	0.684	0.601	0.686
Satt184(D1a+Q)	6	5	6	5	0	1	0.743	0.746	0.723
Satt203(D1a+Q)	6	6	5	5	1	0	0.741	0.726	0.643
Satt267(D1a+Q)	3	3	2	2	1	0	0.608	0.535	0.488
Satt005(D1b+W)	15	10	15	10	0	5	0.874	0.826	0.882
Satt216(D1b+W)	9	7	8	6	1	2	0.848	0.804	0.707
Satt542(D1b+W)	9	8	8	7	1	1	0.743	0.687	0.767
Satt002(D2)	9	8	8	7	1	1	0.834	0.754	0.838
Satt226(D2)	7	5	7	5	0	2	0.826	0.765	0.832
Satt386(D2)	4	4	4	4	0	0	0.521	0.468	0.560
Sat_112(E)	5	5	4	4	1	0	0.590	0.470	0.670
Satt230(E)	4	4	2	2	2	0	0.569	0.617	0.426
Satt268(E)	8	8	4	4	4	0	0.733	0.739	0.488
Satt146(F)	6	4	6	4	0	2	0.668	0.682	0.617
Satt334(F)	7	6	5	4	2	1	0.791	0.809	0.718
Satt586(F)	12	12	9	9	3	0	0.890	0.863	0.856
Sct_188(F)	3	2	3	2	0	1	0.509	0.500	0.511
Satt012(G)	13	10	13	10	0	3	0.890	0.840	0.884
Satt309(G)	5	5	3	3	2	0	0.534	0.494	0.493
Satt352(G)	8	8	8	8	0	0	0.853	0.864	0.800
Satt279(H)	8	7	8	7	0	1	0.809	0.827	0.708
Satt434(H)	5	4	4	3	1	1	0.640	0.487	0.679
Satt442(H)	7	6	7	6	0	1	0.763	0.747	0.758
Satt239(I)	6	6	6	6	0	0	0.771	0.734	0.724
Satt571(I)	6	6	3	3	3	0	0.646	0.778	0.189
Sct_189(I)	7	7	7	7	0	0	0.827	0.796	0.830
Satt414(J)	8	6	7	5	1	2	0.647	0.757	0.385
Satt431(J)	7	7	7	7	0	0	0.840	0.808	0.835
Satt596(J)	6	6	5	5	1	0	0.800	0.789	0.791
Sct_001(J)	6	6	4	4	2	0	0.729	0.715	0.615
Satt001(K)	8	7	7	6	1	1	0.756	0.786	0.673
Satt242(K)	7	6	7	6	0	1	0.811	0.775	0.802
Satt588(K)	7	6	7	6	0	1	0.777	0.715	0.823
Sat_099(L)	8	7	7	6	1	1	0.751	0.631	0.784
Satt373(L)	7	7	7	7	0	0	0.774	0.736	0.698
Satt462(L)	12	12	10	10	2	0	0.886	0.869	0.856
Satt346(M)	5	5	5	5	0	0	0.694	0.631	0.701
Satt590(M)	6	5	6	5	0	1	0.762	0.687	0.712
Satt022(N)	7	7	6	6	1	0	0.808	0.811	0.772
Satt339(N)	6	5	6	5	0	1	0.776	0.653	0.757
Satt387(N)	3	3	3	3	0	0	0.577	0.607	0.490
Satt530(N)	6	5	5	4	1	1	0.770	0.774	0.684
Satt243(O)	5	5	4	4	1	0	0.700	0.702	0.626
Satt259(O)	6	4	6	4	0	2	0.666	0.616	0.699
Satt345(O)	7	7	6	6	1	0	0.816	0.825	0.730
Satt487(O)	7	6	7	6	0	1	0.772	0.724	0.788
Satt592(O)	5	5	5	5	0	0	0.740	0.744	0.677
总	460	414	419	373	41	46			
平均	6.9	6.2	6.2				0.735	0.708	0.687

种质 j 均不具有的等位变异数。在遗传相似系数基础上, 利用非加权类平均法 UPGMA(unweight pair group method using arithmetic averages)对所有供试种质建立树状图。黄淮夏大豆和南方夏大豆等位变异频率的差异用卡方测验进行显著性检验。等位变异数采用计数法; D 和 χ^2 测验利用 Microsoft Excel 计算; J 和 UPGMA 利用 NTSYS-pc 软件包完成。

2 结果与分析

2.1 遗传变异

67 个 SSR 位点在 158 份参试夏大豆种质中共检测到 460 个等位变异(表 2), 平均每个位点等位变异数为 6.9 个, 变化范围为 3~15 个; 其中, 在 80 份黄淮夏大豆中检测出 414 个等位变异, 平均每个位点的等位变异数为 6.2 个, 变化范围为 2~13 个, 而 78 份南方夏大豆的等位变异总数、平均等位变异数及每个位点等位变异数变化范围分别为 419, 6.2 和 2~15 个。

参试夏大豆共有等位变异数为 373 个(表 2), 占总等位变异数的 81%。在黄淮夏大豆中 29 个位点检测出 41 个特异等位变异, 占总等位变异数的 9%; 在南方夏大豆中 33 个位点检测出 46 个特异等位变异, 占总

等位变异的 10%。黄淮和南方夏大豆分别有 328 个(占 79%)和 344 个(占 82%)等位变异频率低于或等于 0.25, 而等位变异频率高于或等于 0.75 分别仅有 1 个和 3 个。

参试夏大豆平均每个 SSR 位点多样性 D 为 0.735, 变化范围为 0.414~0.905(表 2)。其中, 黄淮夏大豆 D 值平均为 0.708, 变化范围为 0.387~0.886; 南方夏大豆 D 值平均为 0.687, 变化范围为 0.189~0.884。黄淮夏大豆在 37 个位点的 D 值高于南方夏大豆, 但有 30 个位点的 D 值低于南方夏大豆。

对黄淮夏大豆和南方夏大豆之间的位点等位变异频率进行卡方测验, 有 53 个(79.10%)位点在 0.05 水平上表现出显著性差异, 其中 49 个位点(73.13%)差异极显著(0.01 水平)(表 3)。

黄淮夏大豆成对种质间遗传相似性系数 J (结果未显示)变化范围为 0.101~0.672, 平均值为 0.284; 其中任一份种质与其他所有种质间 J 平均值变化范围为 0.225~0.337。南方夏大豆 J 值变化范围为 0.125~0.716, 平均值为 0.298; 其中任一份种质与其他所有种质间 J 平均值变化范围为 0.254~0.342。任一份黄淮与南方夏大豆成对种质间 J 平均值变化范围

表 3 黄淮和南方夏大豆种质之间的位点等位变异频率差异性卡方测验^{a)}

位点	卡方值	位点	卡方值	位点	卡方值
Satt236	5.707	Satt267	54.977**	Sct_189	9.840
Satt300	6.617	Satt005	27.848*	Satt414	37.742**
Satt187	19.745**	Satt216	83.434**	Satt431	16.983**
Satt390	16.130**	Satt542	13.946	Satt596	8.868
Satt409	29.632**	Satt002	30.814**	Sct_001	44.951**
Satt429	15.225**	Satt226	30.062**	Satt001	29.369**
Satt197	47.688**	Satt386	2.676	Satt242	29.168**
Satt415	9.112*	Sat_112	15.784**	Satt588	12.058
Satt453	26.396**	Satt230	24.794**	Sat_099	32.766**
Satt168	61.823**	Satt268	70.694**	Satt373	40.488**
Satt556	8.556	Satt146	33.939**	Satt462	27.484**
Satt577	52.606**	Satt334	33.493**	Satt346	13.448**
Satt180	27.880**	Satt586	35.061**	Satt590	35.078**
Satt194	16.543**	Sct_188	1.251	Satt022	9.451
Satt565	22.524**	Satt012	38.157**	Satt339	47.421**
Sat_130	0.700	Satt309	19.496**	Satt387	9.518**
Satt277	33.653**	Satt352	24.755**	Satt530	38.080**
Satt281	14.264	Satt279	31.075**	Satt243	31.798**
Satt286	32.377**	Satt434	30.969**	Satt259	11.901*
Satt307	30.763**	Satt442	12.400	Satt345	33.247**
Satt371	22.486**	Satt239	30.555**	Satt487	13.644*
Satt184	6.471	Satt571	82.559**	Satt592	15.765**
Satt203	29.971**				

a) **和***分别代表 5%和 1%水平差异显著

为 0.179~0.293, 任一份南方夏则与黄淮夏大豆成对种质 J 平均值变化范围为 0.174~0.272. 2 种夏大豆类型之间成对种质的 J 平均值为 0.236, 低于 2 种夏大豆类型内成对种质间 J 平均值.

2.2 遗传关系

根据遗传相似性系数 J 进行 UPGMA 聚类, 将参试夏大豆分为 3 大类群(图 1), 第 1 类群均为黄淮夏大豆种质. 第 2 类群比较特殊, 仅包括 2 份种质, 一份为黄淮夏大豆, 即河北张家口的 7599(H02); 另一份为南方夏大豆, 即云南墨江黑豆(N68). 第 3 类群除鲁西南的鲁豆 2 号(H51)和陕西镇安的回茬八月炸(H59)为黄淮夏大豆外, 其余均为南方夏大豆种质.

第 1 类群又可明显分为 5 个亚类群:

第 1 亚类群以河北中北部品种为主, 如乐亭一粒传大豆(H01)、任丘平顶黄(H03)、霸县大豆(H50), 但陕西的水白豆(H57)和八月炸(H58)也在此类群中, 这 2 个品种关系较近, 为什么会与河北早熟夏大豆关系密切还需研究鉴定.

山东平度一窝猴(H14)独自构成第 2 亚类群, 在遗传上表现出特殊性.

第 3 亚类群包括的材料比较多, 可分为 3 组. 第 1 组主要是山东的夏大豆. 该组又分为 2 个亚组, 第 1 亚组包括有齐黄 1 号血缘和莒选 23 血缘的选育品种, 如跃进 4 号(H08)和究黄 1 号(H10)的母本都是莒选 23, 而文丰 7 号(H09)则是莒选 23×齐黄 1 号(H06)的后代. 此外, 还有山东农家种(H14)和河北曲阳农家种(H04). 第 2 亚组以山东的农家种为主, 以益都平顶黄(H15)为代表, 但还包括 2 份河南农家种(H27 和 H28). 第 2 组也可分为 2 个亚组, 第 1 亚组包括 4 份山东品种(H16, H23, H24 和 H26); 河南牛毛黄类型, 以开封牛毛黄(H30)为代表, 包括民权牛毛黄(H29)、内黄牛毛黄(H31)和武陟红毛狼(H32); 徐州地区的农家种, 如丰县西河糙(H38)、邳县软条枝(H41)、沛县大白角(H39)、铜山天鹅蛋(H40)、新沂平顶黄(H42)和东海白花糙(H43)等都是徐州地区的大豆品种, 这些品种 20 世纪 60 年代还有不小的面积种植. 第 2 亚组包括郑州 135(H55)、早丰 1 号(H54)和郑 77249(H56), 这 3 个品种的血缘关系密切, 早丰 1 号为郑 135 的父本, 郑州 135 又为郑 77249 的母本; 还包括 2 份皖北品种(H61 和 H63)以及地处陕西秦岭南麓的兰皋泥巴豆(H60). 第 3 组以地理上相邻的鲁西南、皖北及豫东地区的品种为主, 包括平顶四(H13)、滨海大白花

(H46)、灌云大四粒(H47)、58-161(H48)、永成大黄茧壳(H34)、鹿邑天鹅蛋(H35), 其中永城、鹿邑地处豫东, 滨海和灌云为距离很近的 2 个县, 其中, 58-161 是从滨海大白花中系选育成.

第 4 亚类群可分为 2 组. 第 1 组以皖北和山东半岛地区品种为主, 包括皖北夏大豆五河大豆(H62), 适于皖北种植的中豆 19(H67)和豫豆 12(H77), 其中具有相同细胞质(沁阳水白豆)的豫豆 12(H77)和郑 133(H78)聚在一起; 山东半岛的海阳崩节黄(H75)、莱阳望城大八月鲜(H73)、即墨落叶黄(H74)、鲁豆 6 号(H76). 此外, 还包括河北中北部极早熟夏大豆品种黄本 13(H71)和石庄大粒黄(H72)、陕西北扇白(H79)和江苏淮阴的楚秀(H80). 第 2 组由河北中北部极早熟夏大豆品种中黄 1 号(H68)、丰宁的石人沟早黄豆(H70)和沧县的前进 2 号(H69)组成.

第 5 亚类群分为 2 组, 主要由黄淮地区南部的晚熟品种组成. 第 1 组包括陕西镇巴的望山猴(H36)、略阳的扇子白(H37)和河南沁阳的牛毛黄(H33); 第 2 组由苏北的赣榆气水汪豆(H44)和徐豆 1 号(H45)组成, 科丰 6 号(H49)也聚在本组, 这是因为该品种有 58-161 和徐豆 1 号的血缘之故.

从该类群聚类结果看, 种质间表现出较强的血缘关系和地域关系. 如前面提到的聚在一起河南早丰 1 号、郑州 135 和郑 77249 之间的血缘关系, 山东、徐州的品种分别聚在一起, 表现出明显的地域性.

第 2 类群可明显分为 4 个亚类群.

第 1 亚类群比较复杂. 先是 3 份浙江品种(N21, N23 和 N24)首先聚在一起, 2 份四川品种(N29 和 N30)聚在一起, 另有 2 份湖北品种(N27 和 N28)、1 份浙江品种(N22)、1 份广西品种(N25). 由奉贤穗稻黄中选出的 1138-2(N26)聚在此中, 与其亲本有较大的遗传变异. 该亚群还包括 2 份黄淮夏大豆品种, 即上面提到的陕西镇安的回茬八月炸(H59)和鲁西南鲁豆 2 号(H51), 遗传上有其特殊性.

第 2 亚类群中又分为 2 组. 第 1 组中亲缘较近的南农 493-1(N01)、苏豆 1 号(N02)和金大 322(N03)聚在一起, 其中, 苏豆 1 号的母本是南农 493-1. 另有同一地点的 2 个品种聚在一起, 关系更近些, 如 2 份安徽品种(N08 和 N09), 2 份上海品种(N10 和 N11). 4 个江苏品种(N04, N05, N06 和 N07)聚集一起. 四个湖北品种中也两两聚集, 安陆红黄豆(N12)和武昌冬黄豆(N13), 黄坡猴子黄(N14)和天门大籽黄(N15). 第 2 组

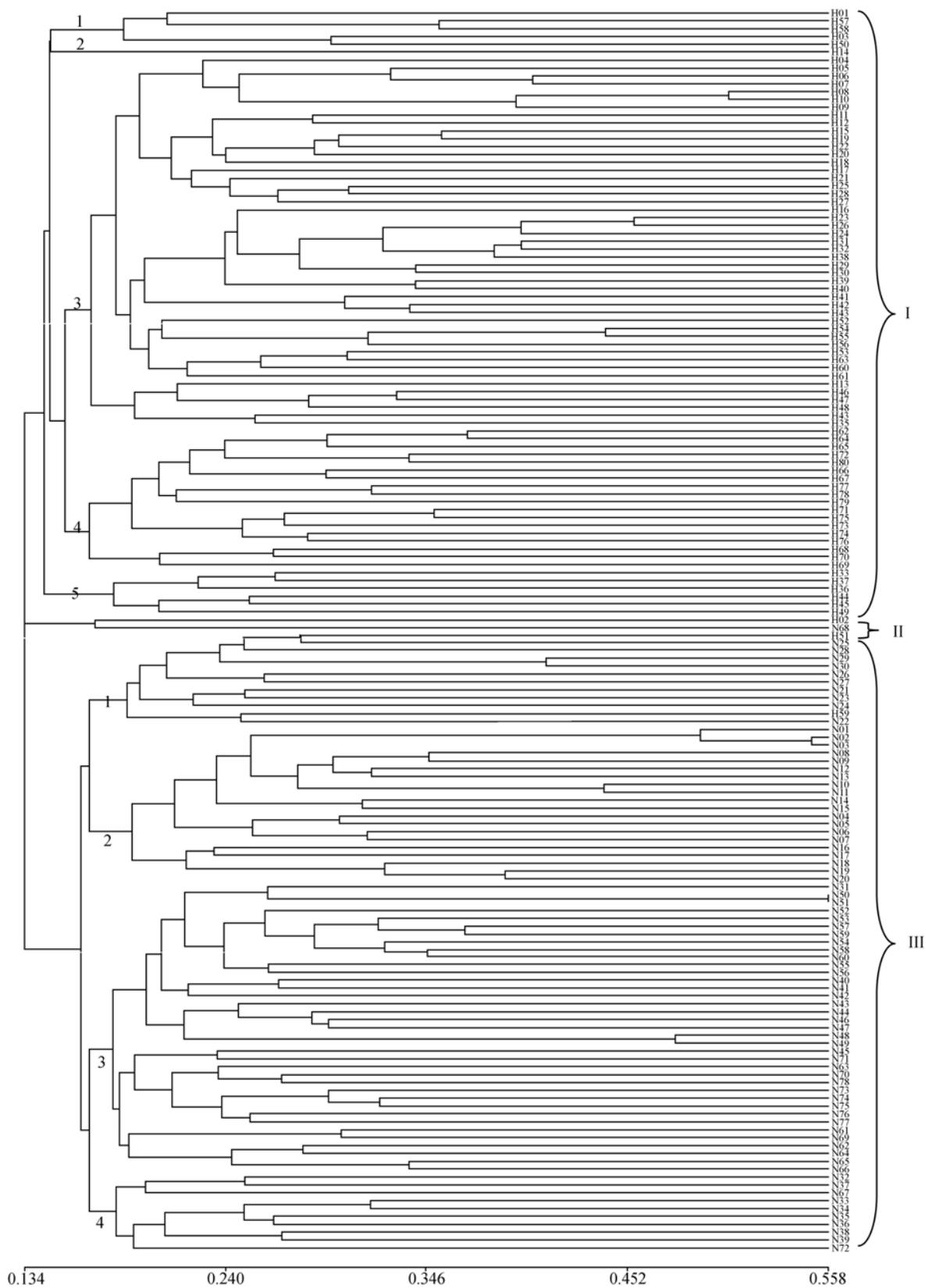


图1 我国夏大豆种质遗传相似性 UPGMA 聚类树状图

则由 3 份湖北(N16、N17 和 N18)和 2 份浙江品种(N19 和 N20)组成。

第 3 亚类群中分为 3 组。第 1 组分为 3 个亚组。第 1 亚组除 3 份分别来自四川(N31)、贵州(N55)、广东(N51)外,其余 9 份均来自广西。第 2 亚组中包括 2 份湖南品种(N41 和 N42)和 1 份江西品种(N40),第 3 亚组中除 1 份湖南品种(N43)外,其余 5 份均为来自贵州。第 2 组中除 1 份品种来自广西(N61)外,其余 5 份均为云南品种。第 3 组以福建品种(N75、N76 和 N77)为主,也有 2 份江苏品种(N70 和 N71),其余 4 份则分别来自贵州(N45)、四川(N73)、浙江(N74)和湖南(N78)4 省。

第 4 亚类群以四川品种(N32、N33、N34、N35 和 N36)居多,但也包含有江西(N38 和 N39)、浙江(N37)、云南(N67)和湖北(N72)的品种。

第 1 类群从总体上看,第 1 亚群和第 2 亚群的大多数品种来自江苏、浙江、湖北等长江中下游地区,第 3 亚群和第 4 亚群的大多数品种主要来自四川、贵州、云南和广西。可见,汪越胜¹⁾在重新区划大豆栽培区时,提出了云贵区有其一定道理。

3 讨论

3.1 我国夏大豆种质遗传多样性

本研究利用 SSR 标记分析了我国夏大豆种质遗传多样性。通过与北美祖先亲本和引进及优良种质比较,揭示出我国夏大豆种质中蕴含着更为丰富的遗传变异。本研究利用的 67 个位点中,Diwan 和 Gregan^[5]与 Narvel 等人^[6]分别检测了 4 个(Satt001, Satt005, Satt002 和 Satt012)和 17 个位点(Satt187, Satt390, Satt409, Satt168, Satt 577, Satt194, Satt307, Satt184, Satt005, Satt002, Satt146, Satt012, Satt309, Satt001, Satt242, Satt588 和 Satt022)。在上述 4 个位点中,Diwan 和 Gregan 在代表北美大豆遗传基础 95% 等位变异的 35 份祖先品种中,检测出 37 个等位变异,位点平均多样性为 0.805;而在我国 158 份黄淮与南方夏大豆中共检测到 45 个等位变异,位点平均多样性为 0.839,其中,黄淮和南方夏大豆等位变异数分别为 37 和 43 个,位点平均多样性分别为 0.802 和 0.820。在上述 17 个位点中,Narvel 等在 79 份北美引进与优良种质中,发现 110 个等位变异,位点平均多样性为 0.659;而在 158 份黄淮与夏大豆中共达到 133

个,位点平均多样性为 0.765,其中在黄淮和南方夏大豆中等位变异数分别达到 114 个和 126,位点平均多样性分别为 0.732 和 0.735。与 Abe 等^[8]研究结果相比,7 个相同 SSR 位点(Satt236, Satt197, Satt180, Satt203, Satt002, Satt431 和 Satt001)在来自 14 个亚洲国家 131 份种质中检测到等位变异数(80)虽高于我国 158 份黄淮和南方夏大豆(51),但由于其位点等位变异分布不均匀,其位点平均多样性(0.756)低于我国(0.789)。

本研究在黄淮和南方夏大豆中不仅发现各自的特异等位变异(表 2),而且大量位点等位变异频率在二者之间表现出显著差异(表 3);在遗传相似性方面,黄淮与南方夏大豆 2 种类型间种质遗传差异较各类型内种质差异更加明显(在黄淮与南方夏大豆成对种质间遗传相似系数 J 平均值为 0.236,在黄淮夏大豆成对种质间为 0.284,在南方夏大豆成对种质间为 0.298);遗传相似系数 UPGMA 聚类分析,明显地将黄淮和南方夏大豆分聚在不同类群中(图 1)。可见,我国黄淮和南方夏大豆虽同属于夏大豆生态类型,在光温反应特性、生育日数及其播种期有着相似特征,但其遗传基础上各自又具有其特殊性,基本上为不同种质池。这与 Abe 等人^[8]认为我国黄淮和南方大豆没有明显差异的结果相反。参试种质来源的广泛性和 SSR 标记在遗传连锁图上分布的均匀性,可能是本研究结果与前人研究结果不同的主要原因。

我国大豆种植面积大,耕作栽培制度复杂,不仅可以划分为春、夏和秋大豆,夏大豆可以进一步划分为黄淮和南方夏大豆,春大豆也可以分为北方、黄淮和南方春大豆。本研究对夏大豆分析结果,预示着光温反应、播种类型明显不同的春、夏和秋大豆之间,以及播种类型相似的北方、黄淮和南方春大豆种质可能也存在较大的遗传差异。

3.2 利用 SSR 标记进行大豆遗传多样性研究的启示

SSR 标记等位变异分析用于评价大豆种内品种之间的遗传关系已被证实^[6,8]。本研究利用 67 个 SSR 标记既反映我国夏大豆种质遗传多样性,也反映出众多大豆种质间遗传关系,如黄淮夏大豆中有血缘关系的河南早丰 1 号、郑州 135 和郑 77249 聚在一起,来源不同地域的种质如黄淮夏大豆中的山东种质、徐州的种质则分别聚在不同类群。另外,有些品种无论

1) 汪越胜. 我国大豆品种的熟期组、生态区域及光温反应遗传特性研究. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 1999

表型还是基因型都极其相似,如民权牛毛黄和陈留牛毛黄等。可对这些种质进行深入的对比分析,包括比较农艺性状的异同,也应包括等位酶和分子生物学的分析,这对正确鉴别品种有重要指导意义。与此相反,有些品种血缘关系很近,遗传相似系数却差别较大,分别聚在不同类群中,如郑州133与跃进4号同为莒选23×5905组合的后代,但没有聚在一起,郑133是该组合材料的F₄代从山东引入河南,是环境条件作用的结果还是选择方向不同导致的差异还有待进一步验证。联想到美国大豆品种是在我国大豆品种的基础上发展起来的,但RAPD标记分析表明,中美两国大豆品种遗传差异明显^[16,17],据推测,日本和韩国大豆最早也来源于我国,但RAPD分析结果发现,日本和韩国的大豆彼此更加相似,二者明显不同于我国大豆^[18]。此外,SSR标记分析也揭示日本和我国大豆为不同基因池^[8]。是否是在不同环境条件下按不同利用要求进行选择,导致了遗传上重大差异,还需从分子生物学方面进行深入研究。

3.3 利用 EST 序列, 发展大豆 EST-SSR 标记

目前在美国农业部大豆基因组数据库公开发表的SSR标记引物序列已经有1000多个。这些SSR标记大部分分布在非基因区。随着功能基因组学的快速发展,利用表达序列标签(EST)开发以PCR为基础的新型分子标记成为可能。EST-SSR标记(基于EST的SSR标记)识别为基因组中表达序列遗传变异,与功能基因紧密连锁,在遗传变异和遗传图谱的研究中更加实用。目前,有关EST-SSR标记已经在多种植物如葡萄^[19]、水稻^[20]、硬粒小麦^[21]、黑麦^[22]、大麦^[23]、小麦^[24]和扁桃^[25]中报道。在大豆中,已利用314,254个大豆EST序列,拼接获得56147个单基因,从中发现3383个SSR标记^[26]。这些SSR标记的发展以及多态性标记的发现和利用,尤其是在大豆种质研究中的利用,将会从功能基因的水平上更深入地揭示其遗传多样性并在标记辅助育种中发挥重要作用。

致谢 本工作作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号:G1998010203和2004CB117203)。

参 考 文 献

- 1 盖钧镒,赵团结,崔章林,等. 我国1923~1995年育成的651个大豆品种的遗传基础. 我国农业科学, 1998, 31(5): 35~43
- 2 Akkaya M S, Bhagwat A A, Cregan P B. Length polymorphism of simple sequence repeats DNA in soybean. Genetics, 1992, 132: 1131~1139
- 3 Maughan P J, Saghai Maroof M A, Buss G R. Microsatellite and

- amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean. Genome, 1995, 38: 715~723
- 4 Rongwen J, Akkaya M S, Bhagwat A A, et al. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor Appl Genet, 1995, 90: 43~48
- 5 Diwan N, Cregan P B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. Theor Appl Genet, 1997, 95: 723~733 [\[DOI\]](#)
- 6 Narvel J M, Fehr W R, Chu W C, et al. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. Crop Sci, 2000, 40: 1452~1458
- 7 Brown-Guedira G L, Thompson J A, Nelson R L, et al. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. Crop Sci, 2000, 40: 815~823
- 8 Abe J, Xu D H, Suzuki Y, et al. Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs. Theor Appl Genet, 2003, 106: 445~453
- 9 中国农业科学院油料作物研究所, 主编. 我国大豆品种资源目录. 北京: 农业出版社, 1982
- 10 中国农业科学院作物品种资源研究所, 主编. 我国大豆品种资源目录(续编一). 北京: 农业出版社, 1991
- 11 中国农业科学院作物品种资源研究所, 主编. 我国大豆品种资源目录(续编二). 北京: 农业出版社, 1996
- 12 周新安, 彭玉华, 王国勋, 等. 我国栽培大豆品种的分类检索研究. 作物品种资源, 1998, 1: 1~4
- 13 邱丽娟, 曹永生, 常汝镇, 等. 我国大豆(*Glycine max*)核心种质构建. 取样方法研究. 我国农业科学, 2003, 36(12): 1445~1449
- 14 Keim P, Olson T C, Shoemaker R C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. Soybean Genet Neswsl, 1988, 15: 150~152
- 15 Cregan P B, Jarvik T, Bush A L, et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. Crop Sci, 1999, 39: 1464~1490
- 16 邱丽娟, Nelson R L, Vodkin L O. 利用 RAPD 标记鉴定大豆种质. 作物学报, 1997, 23(4): 408~417
- 17 Li Z L, Qiu L J, Thompaon J A, et al. Molecular genetic analysis of the U.S. and Chinese soybean ancestral lines. Crop Sci, 2001, 41: 1330~1336
- 18 Li Z L, Nelson R L. Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by RAPDs. Crop Sci, 2001, 41: 1337~1347
- 19 Scott K D, Eggler P, Seaton G, et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor Appl Genet, 2000, 100: 723~726 [\[DOI\]](#)
- 20 Cho Y G, Ishil T, Temnykh S, et al. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L). Theor Appl Genet, 2000, 100: 713~722 [\[DOI\]](#)
- 21 Eujayl I, Sorrells M E, Baum M, et al. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. Theor Appl Genet, 2002, 104: 399~407 [\[DOI\]](#)
- 22 Hackauf B, Wehling P. Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. Plant Breeding, 2002, 121: 17~25 [\[DOI\]](#)
- 23 Thiel T, Michalek W, Varsheny K, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L). Theor Appl Genet, 2003, 106: 411~422
- 24 Gao L F, Jing R L, Huo N X, et al. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. Theor Appl Genet, 2004, 108: 1392~400 [\[DOI\]](#)
- 25 Xu Y, Ma R C, Xie H, et al. Development of SSR Markers for the Phylogenetic Analysis of Almond Trees from China and the Mediterranean Region. Genome, 2004, 47: 1091~1104 [\[DOI\]](#)
- 26 Tian A G, Wang J, Cui P, et al. Characterization of soybean genomic features by analysis of its expressed sequence tags. Theor Appl Genet, 2004, 108: 903~913 [\[DOI\]](#)

(2004-12-17 收稿, 2005-01-26 收修改稿)