

中国不同 SKTI 类型栽培大豆地方品种的遗传多样性

张志华,李向华,王克晶

(中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大工程/农业部北京大豆生物学重点实验室,北京 100081)

摘要:大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂(SKTI)广泛存在于栽培大豆和野生大豆中,具有多种变异类型,常作为一种遗传标记用来研究大豆的起源与传播。本研究对我国 10131 份大豆地方品种进行了 SKTI 多态性鉴定,使用 20 对细胞核 SSR (nuSSR) 标记和 5 对叶绿体 SSR(cpSSR) 标记对不同 SKTI 类型的 187 份地方品种进行了遗传多样性分析。结果显示,在细胞核水平上 *Tib* 类型材料遗传多样性低于 *Tia* 类型,但是在叶绿体基因组水平上 *Tib* 类型材料明显高于 *Tia* 类型,暗示 *Tib* 类型大豆在驯化过程中可能来源于较多的野生大豆个体祖先,而不是来源于单一祖先。聚类分析显示不同地区的 *Tib* 类型材料存在优先聚类的现象,说明 *Tib* 类型材料具有祖先亲缘性。来源于甘肃省的 *Tib* 类型大豆地方品种的叶绿体单倍型类型丰富,并以 II 型和 III 型为主,具有 II 型叶绿体单倍型的大豆地方品种很可能是其他地区的同类型大豆的主要来源;基于甘肃 *Tib* 类型大豆具有较高的遗传多样性,并与其他省区 *Tib* 类型材料亲缘关系密切等因素,推测甘肃地区是栽培大豆 *Tib* 类型的起源中心。

关键词:栽培大豆;地方品种;SKTI;遗传多样性

Genetic Diversity in Different SKTI Types of Chinese Soybean Landraces

ZHANG Zhi-hua, LI Xiang-hua, WANG Ke-jing

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement(NFCRI) / MOA Key Lab of Soybean Biology(Beijing), Beijing 100081)

Abstract: Soybean Kunitz trypsin inhibitor(SKTI) extensively exists in cultivated and wild soybeans with many kinds of variants, which is often used as a genetic marker to study the origin and dissemination of soybeans. In this study, 10131 Chinese soybean landrace accessions were identified for SKTI types and a set of representative sample of 187 soybean landraces was analyzed to assess the genetic diversity and relationships of different SKTI type accessions using 20 nuclear SSR markers and 5 chloroplast SSR markers. Results showed that at the nuclear DNA level, the genetic diversity of the *Tib* type accessions was lower than that of the *Tia* type, but the genetic diversity at the chloroplast DNA level was just opposite. The cluster analysis showed that the *Tib* accessions from different regions tended to cluster together preferentially, indicating a close relationship among those *Tib* accessions. The *Tib* type soybean landraces in Gansu province were rich in diversity of chloroplast haplotypes, and were principally comprised of type II and III. The soybean landraces with chloroplast haplotype II in Gansu might be the main source of the soybeans with the same type in other provinces. Based on that *Tib* type soybean landraces in Gansu province had a higher genetic diversity and a close relationship with those from other provinces, Gansu province might be a center of the origin for *Tib* type soybeans in China.

Key words: cultivated soybean; landrace; SKTI; genetic diversity

收稿日期:2012-12-26 修回日期:2013-01-09 网络出版日期:2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1735.011.html>

基金项目:作物种质资源保护项目;种质资源平台

作者简介:张志华,硕士,研究方向为大豆遗传多样性。E-mail: zzh sniper@126.com

通信作者:王克晶,研究员,长期从事野生大豆资源研究。E-mail: wangkejing@caas.cn

表 1(续)

地区 Geographic region	材料数 Size	SKTI 类型 SKTI type				Tib 频率% Tib Frequency	SSR 分析 SSR analysis					
		Tia	Tib	Tic	Tid		Tia	Tib	Tic	Tid	总计 Total	
东南 South-East	浙江 ZJ	268	268									
	福建 FJ	259	258	1		0.386	9	1			10	
	江西 JX	284	284									
	湖南 HuN	245	245									
西南 South-West	贵州 GZ	637	637									
	四川 SC	556	556									
	重庆 CQ	202	202									
	西藏 XZ	16	16									
华南 South	广东 GD	298	298									
	广西 GX	278	278									
	云南 YN	294	292	2		0.680	11	2			13	
	海南 HaiN	24	24									
总计 Total		10131	10087	41	2	1	0.400	143	41	2	1	187

HLJ: Heilongjiang, JL: Jilin, LN: Liaoning, NMG: Neimenggu, HeB: Hebei, BJ: Beijing, Shanx: Shanxi, SD: Shandong, JS: Jiangsu, AH: Anhui, SH: Shanghai, HuB: Hubei, HeN: Henan, Shaanx: Shaanxi, GS: Gansu, NX: Ningxia, XJ: Xinjiang, ZJ: Zhejiang, FJ: Fujian, JX: Jiangxi, HuN: Hunan, GZ: Guizhou, SC: Sichuan, CQ: Chongqing, XZ: Xizang, GD: Guangdong, GX: Guangxi, YN: Yunnan, HaiN: Hainan

1.2 方法

1.2.1 SKTI 提取及类型鉴定 每份大豆地方品种选取 1 粒种子,使用微型钻磨机钻取 0.05 g 大豆粉。提取方法参考 T. Hymowitz 等^[3]的方法;采用 Davis-PAGE 电泳进行 SKTI 类型鉴定(10% 分离胶,4% 浓缩胶),SKTI 标样为 Sigma 公司大豆胰蛋白酶抑制剂。

1.2.2 DNA 提取及 SSR 标记分析 材料在温室内存植,选取幼苗新长出的 3 出复叶,使用 CTAB 法^[21]提取 DNA。根据 P. B. Cregan 等^[22]构建的大豆遗传连锁图谱,每个连锁群选择 1 对引物,共计使用 20 对引物。根据 W. Powell 等^[18]和 D. H. Xu 等^[19]方法选取 3 对叶绿体 SSR 引物(SOYCP、gmcp2 和 gmcp4),并从本实验室设计的大豆叶绿体基因组 SSR 引物中筛选出 2 对引物(SOYCP3, forward-TCAATAATTCCTACTTCTAT, reverse-AAACGAAATGACCCCTCCC; SOYCP4, forward-TCCTTTCATCAGAGAATCTT, reverse-ACATTCAATTATGTCTTCGC),共计 5 对叶绿体 SSR 引物。PCR 扩增体系为 20 μ L,包含 100 ng 模板 DNA,上下游引物各 10 pmol,dNTPs 各 100 μ M,1U Taq 酶和 2 μ L 10 \times PCR buffer。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s(35 个循环),72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,最终 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,银染检测。

1.2.3 数据处理 根据分析目的,采取 2 种材料分组方法:首先,按照地理生态区域划分为 3 组,即东

北区(NE,包含黑龙江 25 份、吉林 30 份和辽宁 30 份共 85 份)、黄淮区(HH,包含甘肃 59 份、山东 10 份和江苏 2 份共 71 份)和南方区(S,包含江苏 8 份、福建 10 份和云南 13 份共 31 份);再根据 SKTI 类型,将材料划分为 Tia 组(143 份)、Tib 组(41 份)、Tic 组(2 份)和 Tid 组(1 份)。所采用的遗传多样性及群体结构分析方法如下:1)遗传多样性参数:应用 Popgen 1.32^[23]计算平均等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、香农指数(I)等。应用 Powermarker 3.25^[24]软件计算多态性信息量(PIC)、基因多样性(h)、主要基因频率($M.A.F$)、特有等位变异数(SPA)和特缺等位变异数(SDA)等。2)聚类分析:应用 Powermarker 3.25^[24]软件,采用 Nei(1983)遗传距离进行邻近法(NJ,neighbor-joining)聚类。3)群体结构分析:应用 Structure Version 2.2^[25]分析 187 份材料的遗传背景, K 值(K 代表群体数目)设为 1 到 50,将 MCMC(markov chain monte carlo)开始时的不作数迭代(length of burn-in period)和不作数迭代后的 MCMC 均设为 1 万次,重复运行 20 次。根据运行结果 $\ln P(D)$ 值的平均数,应用公式

$$\Delta K = m(|L(K+1) - 2L(K) + L(K-1)|) / s[L(K)],$$

计算 ΔK 值并判断出最佳分类群数^[26]。

2 结果与分析

2.1 SKTI 类型的分布

本研究在 10131 份大豆地方品种中共检测到

41 份 *Tib* 类型材料、2 份 *Tic* 类型材料和 1 份 *Tid* 类型材料,其余 10087 份均为 *Tia* 类型材料(表 1)。其中,*Tib* 类型材料仅在 8 个省检测到,*Tib* 频率从高到低依次为甘肃(21 份,7.320%)、黑龙江(5 份,1.044%)、吉林(7 份,0.906%)、云南(2 份,0.680%)、辽宁(3 份,0.441%)、福建(1 份,0.386%)、山东(1 份,0.344%)、江苏(1 份,0.173%);*Tic* 类型材料仅在辽宁省检测到 2 份,位于大连和丹东地区;*Tid* 类型位于甘肃省文县^[4]。

2.2 187 份样本材料 SSR 位点的遗传多样性

2.2.1 遗传多样性参数

20 个 SSR 位点共检测到 230 个等位基因变异,多数引物表现了较高的多态性,平均每个位点等位基因数为 11.5 个,变化范围为 3(SOYGPATR)~20(Satt281)个;每个位点香农指数(*I*)变异范围为 0.773(Satt267)~2.586(Satt373),平均值为 1.831;多态信息量(*PIC*)与香

农指数趋势相同,每个位点多态信息含量变异范围为 0.364(Satt267)~0.903(Satt373),平均值为 0.744;每个位点基因多样性变异范围为 0.392(Satt267)~0.909(Satt373),平均值为 0.770;多样性指数高的引物其主要基因频率较低,说明在多态性较高的 DNA 区段上基因频率分布比较均衡(表 2)。

5 个叶绿体 SSR 位点共检测到 14 个等位基因变异,平均每个位点等位基因数为 2.8 个,变化范围为 2(SOYCP3 和 SOYCP4)~4(SOYCP)个;香农指数(*I*)、基因多样性(*h*)和多态信息含量(*PIC*)趋势相同,每个位点香农指数变异范围为 0.194(SOYCP4)~0.614(gmcp2);每个位点多态信息含量变异范围为 0.088(SOYCP4)~0.320(gmcp2);每个位点基因多样性变异范围 0.092(SOYCP4)~0.387(gmcp2)(表 3)。

表 2 20 个细胞核 SSR 位点所在连锁群及在 187 份材料中的遗传多样性信息

Table 2 Linkage groups of 20 nuclear SSR markers and genetic diversity information for 187 soybean landraces

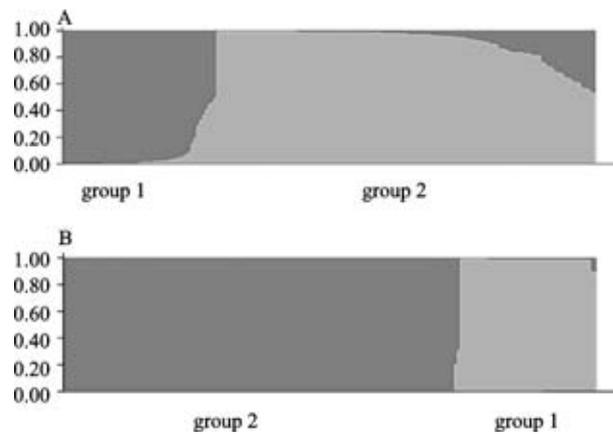
位点 Locus	连锁群 LG	等位 基因数 <i>N_a</i>	有效等位 基因数 <i>N_e</i>	期望 杂合度 <i>H_e</i>	主要基因频率 <i>M.A.F</i>	香农 指数 <i>I</i>	多态信息含量 <i>PIC</i>	基因 多样性 <i>h</i>
Satt236	A1	10	4.841	0.796	0.337	1.818	0.767	0.793
Satt429	A2	14	7.299	0.865	0.199	2.167	0.848	0.863
Satt197	B1	12	5.818	0.830	0.227	1.932	0.806	0.828
Satt168	B2	8	4.163	0.762	0.323	1.539	0.719	0.760
SOYGPATR	C1	3	2.522	0.605	0.536	1.009	0.535	0.604
Satt281	C2	20	10.103	0.903	0.196	2.554	0.893	0.901
Satt267	D1a	4	1.644	0.393	0.765	0.773	0.364	0.392
Satt216	D1b + W	17	6.672	0.852	0.187	2.120	0.832	0.850
Satt386	D2	5	2.461	0.595	0.568	1.088	0.537	0.594
Satt384	E	6	2.166	0.540	0.630	1.026	0.486	0.538
Satt586	F	11	6.395	0.846	0.247	2.027	0.825	0.844
Satt352	G	10	3.260	0.695	0.511	1.585	0.668	0.693
Satt434	H	10	5.679	0.826	0.339	1.998	0.807	0.824
Satt571	I	8	4.282	0.769	0.374	1.656	0.735	0.767
Satt431	J	17	8.913	0.890	0.193	2.377	0.878	0.888
Satt588	K	16	6.173	0.840	0.262	2.123	0.820	0.838
Satt373	L	18	10.997	0.912	0.161	2.586	0.903	0.909
Satt308	M	13	6.386	0.846	0.233	2.066	0.825	0.843
Satt022	N	11	4.972	0.801	0.269	1.803	0.770	0.799
Satt173	O	17	8.286	0.882	0.227	2.382	0.869	0.879
均值 Mean		11.5	5.652	0.772	0.339	1.831	0.744	0.770

表 3 187 份材料的 5 个 cpSSR 位点遗传多样性信息

Table 3 Genetic diversity information of 5 cpSSR markers for 187 soybean landraces

位点 Locus	等位基因数 <i>N_a</i>	有效等位基因数 <i>N_e</i>	主要基因频率 <i>M.A.F</i>	香农指数 <i>I</i>	多态信息含量 <i>PIC</i>	基因多样性 <i>h</i>
gmep2	3	1.631	0.743	0.614	0.320	0.387
gmep4	3	1.624	0.743	0.596	0.314	0.384
SOYCP	4	1.165	0.925	0.333	0.137	0.141
SOYCP3	2	1.617	0.743	0.570	0.309	0.382
SOYCP4	2	1.101	0.952	0.194	0.088	0.092
均值 Mean	2.8	1.423	0.821	0.461	0.234	0.277

2.2.2 遗传结构 使用 Structure 2.2 软件根据 20 对核 SSR 位点多态信息对 187 份材料进行 STRUCTURE 分析,在 $K=2$ 时 ΔK 有最大值,因此将 187 份材料划分为 2 个类群(图 1)。类群 I 包含 54 份材料,由甘肃(41 份)、吉林(6 份)、黑龙江(3 份)、云南(3 份)和江苏(1 份)材料组成;类群 II 包含 133 份材料,包含了黑龙江、吉林、辽宁、山东、江苏、福建、云南 7 个省的大部分材料,以及甘肃省的 18 份材料。其中类群 I 中黑龙江和吉林 2 个省的 9 份材料全部为 *Tib* 类型,占这 2 个省 *Tib* 类型材料总数的 75%,甘肃省的 41 份材料中有 16 份为 *Tib* 类型,占甘肃省 *Tib* 类型总数的 76%,说明黑龙江、吉林和甘肃省的大部分 *Tib* 类型材料在核 SSR 水平上亲缘关系密切。



A: 20 对 nuSSR 位点分析得出的 2 个类群;

B: 5 对叶绿体 SSR 位点分析得出的 2 个类群

A: 2 groups obtained by 20 nuSSR markers,

B: 2 groups obtained by 5 cpSSR markers

图 1 187 份材料 STRUCTURE 结果分析

Fig. 1 Structure analysis for the 187 landraces

根据 5 对叶绿体 SSR 位点信息进行的 STRUCTURE 分析,同样在 $K=2$ 时 ΔK 有最大值,因此也划分为 2 个类群,类群 I 包含 47 份材料,其中甘肃 30 份、吉林 6 份、云南 4 份、黑龙江 3 份、福建 2 份、山东 1 份和辽宁 1 份;类群 II 包含 140 份材料,包含江苏省全部材料,辽宁、山东、福建、黑龙江、吉林和云南省的大部分材料,以及甘肃 29 份材料。

比较细胞核和叶绿体 SSR 信息所得出的 STRUCTURE 分析结果,发现有 32 份材料划分到同一类群中,其中甘肃 22 份(8 份 *Tib* 类型,14 份 *Tia* 类型),吉林 6 份(全部为 *Tib* 类型),黑龙江 3 份(全部为 *Tib* 类型)和云南 1 份(*Tia* 类型)。说明这些材料不论是从细胞核 SSR 还是从叶绿体 SSR 水平上,亲缘关系都非常密切。

2.3 不同生态地区群体的遗传多样性

在 20 对核 SSR 位点上,黄淮地区(HH)等位基因数最高(9.050),南方地区(S)等位基因数最低(7.400);香农指数(*I*)、多态信息含量(*PIC*)和基因多样性(*h*)趋势相同,黄淮和南方地区高,东北地区低。特有等位变异是某群体具有而其他各群体都没有的等位变异;特缺等位变异是某群体没有而其他各群体都有的等位变异;特有、特缺等位变异表示了群体的特异性^[27];3 个不同生态类型群体的特有(特缺)等位变异数分别为东北 21(17)、黄淮 36(8)、南方 22(26)(表 4)。

在 5 对叶绿体 SSR 位点上,南方地区等位基因数略高(2.200),而黄淮地区有效等位基因数最高(1.608);基因多样性、香农指数和多态信息含量趋势相同,黄淮地区最高,其次为南方地区,东北地区最低(表 5),与核 SSR 得出的结论一致。

表 4 不同生态地区材料 20 对核 SSR 位点遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters of different eco-geographical groups based on 20 nuSSR markers

生态类型 Eco-geographical type	样本数 No.	等位	有效等位	等位变异数		主要 基因频率 <i>M.A.F</i>	香农 指数 <i>I</i>	多态信息 含量 <i>PIC</i>	基因 多样性 <i>h</i>
		基因数 <i>Na</i>	基因数 <i>Ne</i>	特有 <i>SPA</i>	特缺 <i>SDA</i>				
中国东北 NE	85	7.850	4.242	21	17	0.415	1.528	0.664	0.697
中国黄淮 HH	71	9.050	4.881	36	8	0.382	1.704	0.714	0.743
中国南方 S	31	7.400	4.603	22	26	0.377	1.632	0.707	0.739

表 5 不同生态地区材料 5 对 cpSSR 位点遗传多样性参数

Table 5 Genetic diversity parameters of different eco-geographical origin groups based on 5 cpSSR markers

生态类型 Eco-geographical type	样本数 No.	等位	有效等位	主要 基因频率 <i>M.A.F</i>	香农 指数 <i>I</i>	多态信息 含量 <i>PIC</i>	基因 多样性 <i>h</i>
		基因数 <i>Na</i>	基因数 <i>Ne</i>				
中国东北 NE	85	2.000	1.269	0.880	0.367	0.189	0.211
中国黄淮 HH	71	2.000	1.608	0.732	0.447	0.236	0.306
中国南方 S	31	2.200	1.320	0.864	0.396	0.200	0.227

2.4 不同 SKTI 类型群组之间的遗传多样性

由于 *Tic* 和 *Tid* 类型材料数目太少,因此仅分析 *Tia* 和 *Tib* 类型群体的遗传多样性。20 对核 SSR 位点上,整体水平上 *Tia* 类型的遗传多样性高于 *Tib* 类型,但是香农指数在 6 个位点 (*Satt267*、*Satt386*、*Satt384*、*Satt352*、*Satt571* 和 *Satt022*) 上、多态信息含量和基因多样性指数在 6 个位点 (*Satt267*、*Satt384*、*Satt352*、*Satt434*、*Satt571* 和 *Satt022*) 上, *Tib* 类型高于

Tia 类型(表 6)。*Satt386* 和 *Satt434* 位点上香农指数同多态信息含量、基因多样性指数的趋势相反,可能是由不同多样性参数本身统计学上的差异造成的。

在 5 对叶绿体 SSR 位点上, *Tib* 类型的遗传多样性明显高于 *Tia* 类型, *Tia* 类型香农指数 0.318, 而 *Tib* 类型为 0.679; *Tia* 类型多态信息含量 0.163, 而 *Tib* 类型为 0.359; *Tia* 类型基因多样性为 0.188, 而 *Tib* 类型为 0.452(表 7)。

表 6 *Tia* 和 *Tib* 类型群体的 20 对核 SSR 位点遗传多样性参数Table 6 Genetic diversity parameters of *Tia* and *Tib* type groups based on 20 nuSSR markers

位点 Locus	连锁群 LG	等位基因数 <i>Na</i>		有效等位基因数 <i>Ne</i>		香农指数 <i>I</i>		多态信息含量 <i>PIC</i>		基因多样性 <i>h</i>	
		<i>Tia</i>	<i>Tib</i>	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>
<i>Satt236</i>	A1	10	8	4.489	4.321	1.778	1.688	0.748	0.736	0.777	0.769
<i>Satt429</i>	A2	13	8	6.535	3.941	2.083	1.640	0.829	0.716	0.847	0.746
<i>Satt197</i>	B1	12	6	5.675	2.353	1.919	1.220	0.801	0.547	0.824	0.575
<i>Satt168</i>	B2	8	6	4.319	2.326	1.555	1.187	0.729	0.538	0.768	0.570
SOYGPATR	C1	3	3	2.520	2.395	1.010	0.963	0.536	0.505	0.603	0.583
<i>Satt281</i>	C2	21	11	9.269	7.747	2.511	2.187	0.883	0.858	0.892	0.871
<i>Satt267</i>	D1a	4	3	1.535	1.917	0.707	0.782	0.328	0.402	0.348	0.478
<i>Satt216</i>	D1b + W	15	9	6.699	3.974	2.108	1.680	0.833	0.717	0.851	0.748
<i>Satt386</i>	D2	4	5	2.414	2.371	1.042	1.061	0.527	0.510	0.586	0.578
<i>Satt384</i>	E	5	4	1.925	2.847	0.906	1.130	0.435	0.578	0.481	0.649
<i>Satt586</i>	F	11	6	6.006	4.233	2.005	1.572	0.814	0.728	0.833	0.764
<i>Satt352</i>	G	8	8	2.684	5.970	1.359	1.917	0.598	0.812	0.627	0.833
<i>Satt434</i>	H	10	8	4.907	5.982	1.928	1.903	0.778	0.812	0.796	0.833
<i>Satt571</i>	I	7	8	4.184	4.389	1.610	1.735	0.727	0.745	0.761	0.772
<i>Satt431</i>	J	17	8	8.824	4.817	2.397	1.771	0.877	0.765	0.887	0.792
<i>Satt588</i>	K	15	12	6.052	4.789	2.101	1.961	0.815	0.772	0.835	0.791
<i>Satt373</i>	L	19	10	10.935	5.817	2.595	1.984	0.902	0.808	0.909	0.828
<i>Satt308</i>	M	13	8	6.119	5.452	2.049	1.842	0.817	0.792	0.837	0.817
<i>Satt022</i>	N	10	9	4.556	4.631	1.726	1.782	0.748	0.755	0.780	0.784
<i>Satt173</i>	O	15	11	7.718	5.204	2.310	1.967	0.858	0.787	0.870	0.808
均值 Mean		11.00	7.55	5.368	4.274	1.785	1.599	0.729	0.694	0.756	0.729

Tia、*Tib* 类型样本数分别为 143、41,下同 The sample size of *Tia* and *Tib* type groups is 143 and 41 respectively, the same as below

表 7 *Tia* 和 *Tib* 类型群体的 5 对 cpSSR 位点遗传多样性参数

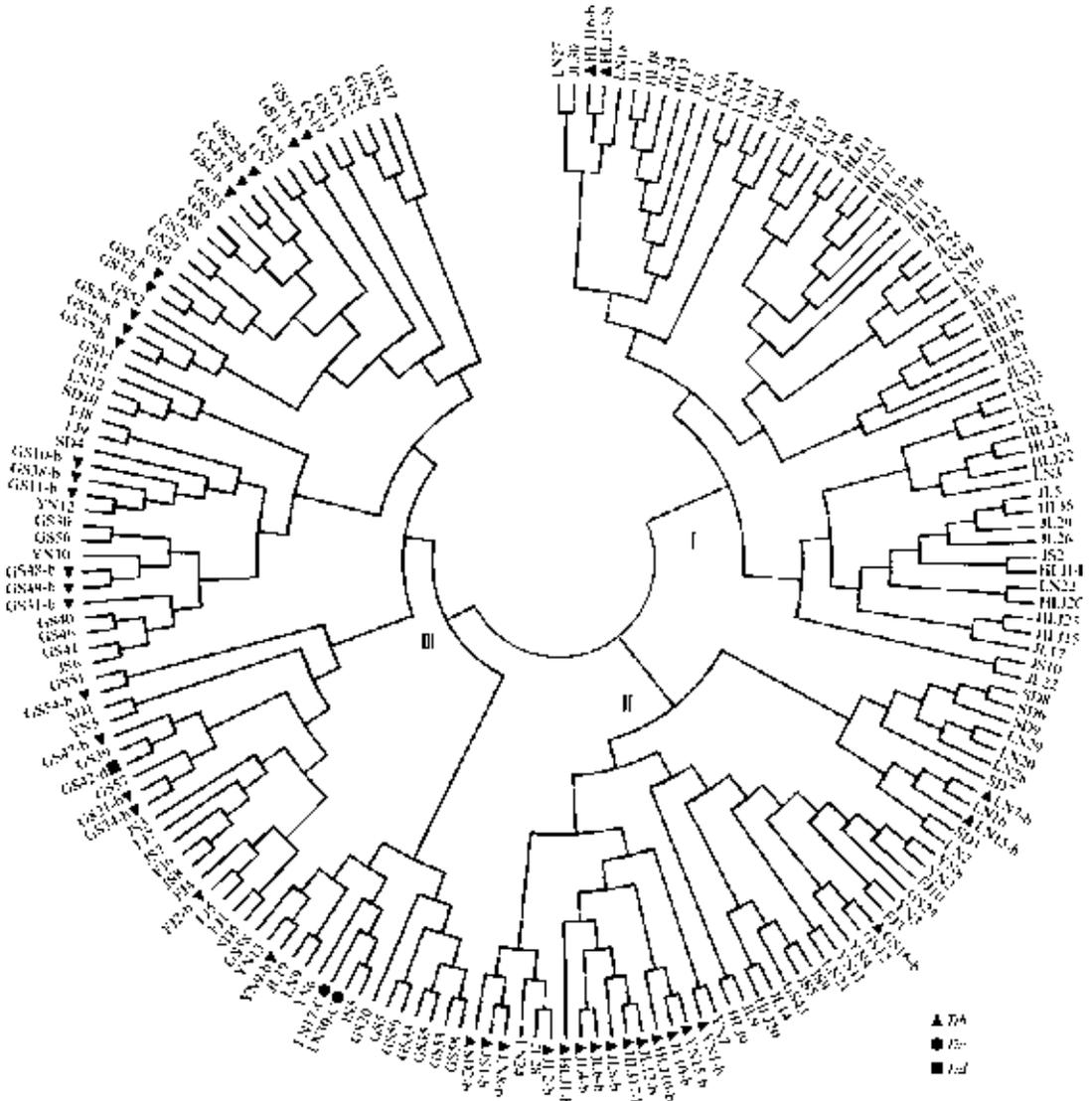
Table 7 Genetic diversity parameters of *Tia* and *Tib* groups based on 5 cpSSR markers

位点 Locus	等位基因数 N_a		有效等位基因数 N_e		香农指数 I		多态信息含量 PIC		基因多样性 h	
	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>	<i>Tia</i>	<i>Tib</i>
gmcp2	2	3	1.424	2.197	0.474	0.854	0.253	0.441	0.298	0.545
gmcp4	3	2	1.410	1.989	0.493	0.691	0.252	0.374	0.291	0.497
SOYCP	3	3	1.058	1.612	0.147	0.635	0.054	0.324	0.055	0.380
SOYCP3	2	2	1.424	1.989	0.474	0.691	0.253	0.374	0.298	0.497
SOYCP4	1	2	1.000	1.521	0.000	0.526	0.000	0.284	0.000	0.343
均值 Mean	2.2	2.4	1.263	1.862	0.318	0.679	0.163	0.359	0.188	0.452

2.5 *Tia* 和 *Tib* 类型材料亲缘关系分析

根据 20 对核 SSR 位点多态性信息使用 Nei (1983) 距离和 NJ 聚类法对 187 份材料进行聚类分析。结果如图 2 所示,可以分为 3 个亚群(表 8),其中第 I 亚群主要由黑龙江、吉林和辽宁 3 个省的 *Tia*

类型材料构成,此外黑龙江的 2 份 *Tib* 类型材料(HLJ13、16)与辽宁的 *Tia* 类型材料(LN18)聚到一起;第 II 亚群所含 *Tib* 类型比例最高,其中黑龙江的 3 份 *Tib* 类型材料(HLJ1、10、17)和吉林的 6 份 *Tib* 类型材料(JL4、6、8、10、12、15)聚类到一起,辽宁的



图中 *Tib*、*Tic* 和 *Tid* 类型分别用 ▲、● 和 ■ 图形作为前缀表示,无图形前缀的为 *Tia* 类型,下同
Tib, *Tic*, and *Tid* types were represented by ▲, ●, and ■ as prefix, those without prefix were *Tia* type, the same as below

图 2 根据 20 对 nuSSR 引物位点信息对 187 份材料进行邻近法聚类

Fig. 2 Neighbor-joining cluster of 187 landraces based on 20 nuSSR markers

表 8 根据 20 对 nuSSR 位点信息对 187 份材料采用邻近法聚类为 3 个类群的统计结果

Table 8 Grouping of 187 landraces by NJ clustering based on 20 nuSSR markers

聚类亚群	黑龙江	吉林	辽宁	山东	江苏	福建	云南	甘肃	总计
Clusters	HLJ	JL	LN	SD	JS	FJ	YN	GS	Total
I	18a,2b	19a	15a	0	3a	0	0	1a	56a,2b
II	2a,3b	3a,7b	7a,3b	5a,1b	2a,1b	2a	6a,1b	3a,1b	30a,17b
III	0	1a	3a,2c	4a	4a	7a,1b	5a,1b	33a,20b,1d	57a,22b,2c,1d

a、b、c、d 分别代表 *Tia*、*Tib*、*Tic* 和 *Tid* 类型,下同

a,b,c,and d represent *Tia*,*Tib*,*Tic*,and *Tid* types respectively,the same as below

1 份 *Tib* 类型材料 (LN8)、江苏 1 份 *Tib* 类型材料 (JS1) 和山东 1 份 *Tib* 类型材料 (SD2) 聚类到一起,而且上述 12 份 *Tib* 类型材料又与 2 份 *Tib* 材料 (JL2、YN1)、3 份 *Tia* 材料 (JL28、LN24 和 YN7) 聚类到一起;第 III 亚群主要由甘肃省的品种构成,甘肃省内的 *Tib* 类型材料分布虽然较为分散,但是也存在小范围的不同地区的 *Tib* 类型材料聚到一起的情

况。辽宁省的 *Tic* 类型材料以及甘肃省的 *Tid* 类型材料分别与其本省的 *Tia* 类型材料聚类到一起。

使用 5 对叶绿体 SSR 位点信息的聚类分析如图 3 所示,也划分 3 个亚群,其中第 I 亚群和第 II 亚群主要由 *Tib* 材料构成,第 III 亚群主要由 *Tia* 材料构成(表 9)。在第 I 亚群中 3 份黑龙江省的 *Tib* 材料 (HLJ1、10、17) 和 6 份吉林省的 *Tib* 材料 (JL4、6、8、

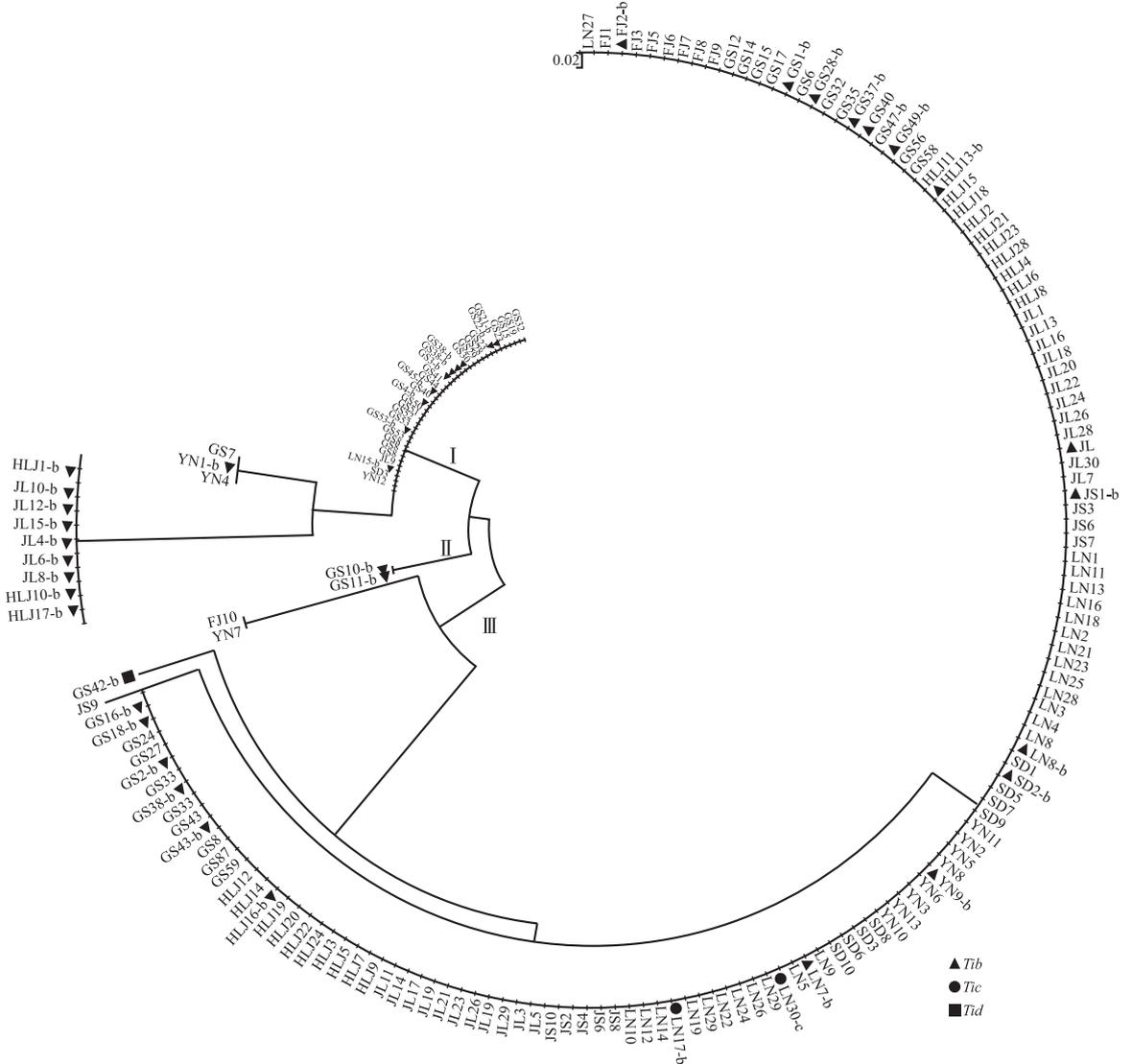


图 3 根据 5 对 cpSSR 引物位点信息对 187 份材料进行邻近法聚类

Fig. 3 Neighbor-joining cluster of the 187 accessions based on the 5 cpSSR markers

表 9 根据 5 对 cpSSR 引物位点信息对 187 份材料进行的邻近法聚类

Table 9 Grouping of 187 landraces by NJ clustering based on 5 cpSSR markers

聚类亚群 Clusters	黑龙江 HLJ	吉林 JL	辽宁 LN	山东 SD	江苏 JS	福建 FJ	云南 YN	甘肃 GS	总计 Total
I	3b	1a,6b	1b	1a	0	1a	2a,1b	19a,9b	24a,20b
II	0	0	0	0	0	0	0	2b	2b
III	20a,2b	22a,1b	25a,2b,2c	8a,1b	9a,1b	8a,1b	9a,1b	18a,10b,1d	119a,19b,2c,1d

10、12、15) 聚类到一起,而且与云南会泽的 1 份 *Tib* 材料(YN1) 距离非常近,与核 SSR 聚类结果相同;在核 SSR 聚类亚群 III 中分布较为分散的部分 *Tib* 类型材料(GS3、4、21、22、31、34、38、45、54) 在叶绿体 SSR 聚类分析中聚到一起;叶绿体 SSR 聚类第 II 亚群由 2 份甘肃华亭的 *Tib* 材料(GS10、11) 组成,这 2 份材料在核 SSR 聚类中也聚类在一起;此外,大部分 *Tia* 材料在 5 个叶绿体 SSR 水平上遗传关系密切;甘肃省的 *Tid* 类型材料在第 III 亚群中单独分化为一支,说明其与其他材料在叶绿体基因组水平具有不同的遗传背景;辽宁省的 2 份 *Tic* 类型材料在第 III 亚群中与其他 *Tia* 材料聚到一起。

2.6 叶绿体 SSR 单倍型分析

187 份材料共产生 8 种叶绿体单倍型(表 10),其中单倍型 II 在 8 个省均有分布,且数量最多;单倍型 III 在除黑龙江和江苏以外的地区都有分布,且以甘肃地区为主;单倍型 IV 和 V 为 *Tia* 类型特有,其中单倍型 IV 仅分布在江苏 1 份 *Tia* 类型中,单倍型 V 分布在福建和云南 2 份 *Tia* 类型中;单倍型 I 和 VII 为 *Tib* 类型特有,其中单倍型 I 仅分布在黑龙江和吉林的 9 份 *Tib* 类型中(HLJ1、10、17, JL4、6、8、10、12、15),单倍型 VII 分布在甘肃 2 份 *Tib* 类型中(GS10、11);单倍型 VI 分布在云南 1 份 *Tia* 和 *Tib* 类型以及甘肃 1 份 *Tia* 类型中;单倍型 VIII 为 *Tid* 类型特有。

3 讨论

3.1 不同 SKTI 类型的地理分布

王衍桐等^[28] 对 1858 份大豆地方品种进行了 SKTI 类型鉴定,检测到 10 份类型(频率为 0.54%),其中黑龙江 2 份(1.3%) 位于克山,辽宁 3 份(2.2%) 位于丹东,福建 1 份(1.25%) 位于晋江,西藏 4 份 *Tib* (12.9%);1 份 *Tic* 位于辽宁丹东。赵述文等^[29] 对东北三省 2277 份大豆进行了 SKTI 类型鉴定,共检测到 8 份类型(0.35%),其中黑龙江 6 份(0.83%)、吉林 2 份(0.25%),辽宁 744 份材料

中未检测到 *Tib*;2 份 *Tic* 类型位于黑龙江延寿地区和辽宁丹东地区。刘兴媛等^[30] 对中国 14067 份大豆进行 SKTI 电泳分析,共检测到 38 份 *Tib* 类型(0.27%),甘肃 25 份(10.00%)、山东 4 份(0.52%)、河南 1 份(0.19%)、江苏 4 份(0.31%)、安徽 2 份(0.30%)、福建 1 份(0.42%)、云南 1 份(0.33%)。

本试验在 773 份吉林省材料中检测到 7 份 *Tib*, 频率为 0.91%,高于赵述文等^[29] 2 份 *Tib* 类型大豆的调查结果,说明吉林地区 *Tib* 类型大豆也较多。本试验除在曾经报道检测到 *Tib* 类型的丹东地区检测到 1 份 *Tic* 类型大豆之外,还在大连地区(庄河) 新检测到 1 份 *Tic*。在 294 份云南省材料中检测到 2 份 *Tib* 类型,分别位于会泽和德钦地区,之前仅在云南检测到 1 份 *Tib* 类型大豆^[30]。

3.2 群体的遗传多样性

关于大豆的遗传多样性,不同学者采用不同群体和遗传标记进行了大量的研究。L. X. Wang 等^[16] 对 129 份中国大豆使用 60 对核 SSR 位点的遗传多样性进行分析,平均等位基因数 12.2,平均多态信息含量 0.78;张军等^[31] 对 378 份我国大豆育成品种使用 64 对核 SSR 位点进行分析,平均等位变异数 8.94,平均多态信息含量 0.752;宋喜娥等^[32] 对 248 份我国大豆微核心种质使用 100 对核 SSR 位点进行分析,平均等位变异数 14.60,平均多态信息含量 0.743。本研究对 187 份我国大豆地方品种使用 20 对核 SSR 位点进行了分析,得出平均等位基因数为 11.5,平均多态信息含量 0.744,尽管样本数和标记数有差异,本研究结果与前人研究结论基本一致,基本反映出了我国栽培大豆地方品种的遗传多样性。

关于我国不同地理生态区大豆的遗传多样性,张军等^[31] 和宋喜娥等^[32] 的结果都证明黄淮地区最高,其次是南方地区,东北地区最低。L. X. Wang 等^[16] 提出黄河流域是栽培大豆的遗传多样性中心。Y. H. Li 等^[33] 对 1863 份我国大豆地方品种采用 59

表 10 5 对叶绿体 SSR 引物位点单倍型及其在各省的分布

Table 10 Haplotypes of 5 cpSSRs and their distribution in different regions

单倍型 Haplotype	叶绿体 SSR (cpSSRs)										各省分布 (Distribution in different regions)				总计 Total			
	gmcp4	gmcp2	SOYCP4	SOYCP3	黑龙江 HLJ	吉林 JL	辽宁 LN	山东 SD	江苏 JS	福建 FJ	云南 YN	甘肃 GS	a	b	c	d		
I*	3	1	2	2	3b (12%)	6b (20%)	25a,2b,2c (97%)	8a,1b (90%)	8a,1b (90%)	7a,1b (80%)	8a,1b (69%)	18a,10b (47%)	115	9				
II	2	2	1	3	20a,2b (88%)	22a,1b (77%)								19	2			
III	3	1	1	3		1a (3%)	1b (3%)	1a (10%)		1a (10%)	1a (8%)	18a,9b (46%)	22	10				
IV	1	2	1	3				1a (10%)					1					
V	2	1	1	2					1a (10%)		1a (8%)		2					
VI	3	1	1	4							1a,1b (15%)		2	1				
VII*	3	3	1	3										2				
VIII	3	2	1	3													1	

* 代表 *Tib* 类型特有单倍型; 括号内百分数代表各省中不同叶绿体单倍型的比例* represents the specific haplotypes of *Tib* type accessions, the percentage in brackets represents the proportions of different haplotypes in each province

对细胞核 SSR 引物进行分析, 得出来自黄河流域 (即河北、河南、安徽、甘肃、陕西、山西等省) 的大豆地方品种遗传多样性最高, 提出栽培大豆起源于黄河流域。本研究使用 20 对细胞核 SSR 引物获得的结果也显示黄淮地区 (尤其是甘肃东南部地区) 栽培大豆地方品种遗传多样性较高, 其次为南方地区, 而东北地区最低, 且 5 对叶绿体 SSR 位点的结果也支持这一结论。

Tia 类型材料在细胞核 SSR 水平上高于 *Tib* 类型, 但是在叶绿体 SSR 水平上 *Tib* 类型却明显高于 *Tia* 类型, 尽管 *Tia* 类型材料样本数远大于 *Tib* 类型样本数。这说明 *Tib* 类型大豆在驯化过程中可能来源于较多的野生大豆个体祖先, 而不是来源于单一祖先。

3.3 大豆地方品种材料间的遗传关系

大豆地方品种是长期自然和人工选择的结果, 同一地区的大豆地方品种往往亲缘关系较近, 因此来源于相同地区的大豆地方品种在进行聚类分析时往往聚类到一起^[32,34-35]。本研究在对细胞核与叶绿体 SSR 信息的聚类分析中, 发现黑龙江 3 份 *Tib* 类型材料、吉林 6 份 *Tib* 类型材料, 以及辽宁、江苏和山东各 1 份 *Tib* 类型材料优先聚类到一起, 且与 2 份 *Tib* 材料 (JL2、YN1)、3 份 *Tia* 材料 (JL28、LN24 和 YN7) 聚类到一起, 而没有与其本省的大部分 *Tia* 类型材料优先聚类到一起, 说明黑龙江、吉林、辽宁、江苏、山东和云南的这 14 份 *Tib* 类型材料亲缘关系非常近。而且其中黑龙江的 3 份 *Tib* 类型材料和吉林的 6 份 *Tib* 类型材料在叶绿体 SSR 水平优先聚在一起, 说明这 9 份材料很可能具有相同的来源。此外, 黑龙江的 2 份 *Tib* (HLJ13、16) 与辽宁的 *Tia* 聚到一起, 其余的 *Tib* 类型材料 (辽宁 2 份、云南 1 份和福建 1 份) 分别与本省的 *Tia* 类型材料聚到一起, 未与其他 *Tib* 类型材料优先聚类到一起。

STRUCTURE 分析中, 有 54 份材料划分到细胞核 SSR 类群 I 中, 其叶绿体单倍型分布为 22 份 II 型 (甘肃 19 份、云南 2 份、江苏 1 份), 20 份 III 型 (甘肃 19 份、云南 1 份), 9 份 I 型 (黑龙江 3 份、吉林 6 份), 2 份 VII 型 (甘肃), 1 份 VI 型 (甘肃)。甘肃地区具有不同叶绿体单倍型的大豆地方品种 (尤其是 II 型和 III 型) 在细胞核水平上亲缘关系如此密切, 推测这些栽培大豆地方品种之间发生过较多的基因交流。

甘肃为我国大豆地方品种中 *Tib* 类型比例最高的地区, 本研究结果显示甘肃的 *Tib* 类型大豆地方

品种的叶绿体单倍型类型丰富,且与其他省的许多 *Tib* 类型材料亲缘关系密切,同时这一地区的 *Tia* 与 *Tib* 类型材料之间亲缘关系也较近,推测该地区是栽培大豆 *Tib* 类型的起源中心。此外,甘肃省大豆主要由 2 种叶绿体单倍型 II 型(18 份 *Tia* 和 10 份 *Tib*) 和 III 型(18 份 *Tia* 和 9 份 *Tib*) 组成,而 II 型单倍型也是其他地区栽培大豆的主要类型,推测甘肃具有 II 型叶绿体单倍型的大豆地方品种很可能是其他地区同类型大豆的主要来源。

在叶绿体单倍型分析中发现黑龙江、吉林 2 省的 9 份 *Tib* 类型材料具有特有的 I 型叶绿体单倍型,这种叶绿体单倍型是栽培大豆在驯化和传播过程中发生的变异,还是来源于 *Tib* 类型的野生大豆,有待研究证实。

参考文献

- [1] Kunitz M. Crystallization of trypsin inhibitor from soybean [J]. Science, 1945, 101: 668-669
- [2] Singh L, Wilson C M, Hadley H H. Genetic differences in soybean trypsin inhibitor separated by disc electrophoresis [J]. Crop Sci, 1969, 9: 489-491
- [3] Hymowitz T. Electrophoretic analysis of SBTI-A2 in the USDA soybean germplasm collection [J]. Crop Sci, 1973, 13: 420-421
- [4] Zhao S W, Wang H. A new electrophoretic variant of SBTI-A2 in soybean seed protein [J]. Soybean Genet Newsl, 1992, 19: 22-24
- [5] Orf J H, Hymowitz T. Inheritance of the absence of the Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans [J]. Crop Sci, 1979, 19: 107-109
- [6] Hymowitz T, Kaizuma N. Soybean seed protein electrophoresis profiles from 15 Asian countries or regions; hypotheses on paths of dissemination of soybeans from China [J]. Econ Bot, 1981, 35 (1): 10-23
- [7] 徐豹, 赵述文, 邹淑华, 等. 中国野生大豆 (*G. soja*) 种子蛋白的电泳分析 *Ti* 和 *Sp1* 各等位基因频率、地理分布与大豆起源问题 [J]. 大豆科学, 1985, 4(1): 7-13
- [8] Wang K J, Li X H, Takahata Y, et al. Allelic diversity and geographical pattern at soybean Kunitz trypsin inhibitor single locus in Chinese wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) [J]. Plant Breeding, 2010, 129(3): 264-270
- [9] 王克晶, 李向华. 我国北方野生大豆存在 *Tif* 类型的大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 [C]//第八届全国大豆学术讨论会论文集. 昆明: 中国作物学会大豆专业委员会, 2005: 167-168
- [10] Wang K J, Kaizuma N, Takahata Y, et al. Detection of two new variants of soybean Kunitz trypsin inhibitor through electrophoresis [J]. (Japan) Breed Sci, 1996, 46: 39-44
- [11] Wang K J, Takahata Y, Ito K, et al. Genetic characterization of a novel soybean Kunitz trypsin inhibitor [J]. Breed Sci, 2001, 51: 185-190
- [12] Wang K J, Yamashita T, Watanabe M, et al. Genetic characterization of a novel *Tib*-derived variant of soybean Kunitz trypsin inhibitor detected in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Genome, 2004, 47: 9-14
- [13] Wang K J, Takahata Y, Kono Y, et al. Entity evidence for differentiation between *Tia* and *Tib* types of soybean Kunitz trypsin inhibitor; detection of a novel transitional variant type between *Tia* and *Tib* in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) [J]. Theor Appl Genet, 2005, 112: 66-71
- [14] Wang K J, Takahata Y, Kaizuma N. Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Theor Appl Genet, 2008, 117: 565-573
- [15] Hymowitz T, Kaizuma N. Dissemination of soybeans (*Glycine max*); Seed protein electrophoresis profiles among Japanese cultivars [J]. Econ Bot, 1979, 33(3): 311-319
- [16] Wang L X, Guan R X, Liu Z X, et al. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers [J]. Crop Sci, 2006, 46(3): 1032
- [17] 刘亚男, 李向华, 王克晶. 国家基因库野生大豆微核心样本遗传变异性的 SSR 标记分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10 (2): 211-217
- [18] Powell W, Morgante M, Doyle J J. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus *soja* revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites [J]. Genetics, 1996, 144: 793-803
- [19] Xu D H, Abe J, Gai J Y, et al. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans; evidence for multiple origins of cultivated soybean [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105 (5): 645-653
- [20] 王栋, 卢新雄, 张志娥, 等. SSR 标记分析种子老化及繁殖世代对大豆种质遗传完整性的影响 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(2): 192-199
- [21] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 149-151
- [22] Cregan P B, Jarvik T, Bush A L, et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome [J]. Crop Sci, 1999, 39: 1464-1490
- [23] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. Popgene version 1. 31 quick user guide [M]. Canada: University of Alberta, and Centre for International Forestry Research, 1999
- [24] Liu K, Muse S V. PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data [J]. Bioinformatics, 2005, 21: 2128-2129
- [25] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. Genetics, 2000, 155: 945-959
- [26] Evanno G, Regnant S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study [J]. Mol Ecol, 2005, 14: 2611-2620
- [27] 张军, 赵团结, 盖钧镒. 中国东北大豆育成品种遗传多样性和群体遗传结构分析 [J]. 作物学报, 2008, 34(9): 1529-1536
- [28] 王衍桐, 李福山, 常汝镇. 从种子蛋白电泳分析看我国大豆品种 *Ti* 和 *Sp1* 位点等位基因的分布 [J]. 作物学报, 1986, 12 (1): 31-37
- [29] 赵述文, 邹淑华, 胡明祥, 等. 东北三省栽培大豆 (*G. max*) 种子蛋白中 *Ti* 和 *SP1* 位点等位基因频率及分布 [J]. 大豆科学, 1991, 10(1): 77-81
- [30] 刘兴媛, 林国庆, 李中平, 等. 中国大豆种子蛋白中 *SBTI* 等位基因频率及分布 [J]. 吉林农业科学, 1993(1): 6-9
- [31] 张军, 赵团结, 盖钧镒. 中国大豆育成品种群体遗传结构分化和亚群特异性分析 [J]. 中国农业科学, 2009, 42 (6): 1901-1910
- [32] 宋喜娥, 李慧英, 常汝镇, 等. 中国栽培大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 微核心种质的群体结构与遗传多样性 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(11): 2209-2219
- [33] Li Y H, Guan R X, Liu Z X, et al. Genetic structure and diversity of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) landraces in China [J]. Theor Appl Genet, 2008, 117: 857-871
- [34] Wen Z X, Zhao T J, Ding Y L, et al. Genetic diversity, geographic differentiation and evolutionary relationship among ecotypes of *Glycine max* and *G. soja* in China [J]. Chinese Sci Bull, 2009, 54 (23): 4393-4403
- [35] 张彩英, 李喜焕, 常文锁, 等. 应用 SSR 标记分析大豆种质资源的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (3): 308-314