

# 山东省 3 个野生大豆居群生育期基因遗传多样性分析

刘月<sup>1,2</sup>, 齐广勋<sup>3</sup>, 桑永生<sup>1,2</sup>, 王英男<sup>2</sup>, 李玉秋<sup>2</sup>, 王玉民<sup>2</sup>,  
刘晓冬<sup>2</sup>, 赵洪锐<sup>3</sup>, 袁翠平<sup>2</sup>, 董英山<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>吉林农业大学农学院, 长春 130118; <sup>2</sup>吉林省农业科学院大豆研究所, 长春 130124; <sup>3</sup>吉林省农业科学院作物资源研究所, 公主岭 136100)

**摘要:** 以来自山东省 3 个居群的 137 份野生大豆种质资源为试验材料, 利用等位基因特异性 DNA 标记进行生育期 *E1~E4* 基因型鉴定及遗传多样性分析。结果表明: 在山东省野生大豆生育期基因 *E1~E4* 中, *E1*、*E4* 位点上只检测出 1 个等位变异, 皆为显性基因型 *E1*、*E4*; *E2*、*E3* 位点上变异较为丰富, 分别以 *E2-in*、*E3-Ha* 为主; 共发现 5 种基因型组合, 其中 *E1E2-dlE3-HaE4* 基因型为优势组合。3 个居群遗传变异不尽相同, 临沂居群 *E2*、*E3* 位点以 *E2-in*、*E3-Mi* 为主, 共有 4 种基因型组合, 基因型组合以 *E1E2-inE3-MiE4* 为主。蓬莱和荣成居群, *E2*、*E3* 位点以 *E2-dl*、*E3-Ha* 为主, 共有 3 种基因型组合, 以 *E1E2-dlE3-HaE4* 为主。在遗传多样性方面, 山东荣成和蓬莱的亲缘关系较近, 与临沂亲缘关系较远。遗传多样性最高的为临沂居群, 其次是蓬莱居群, 荣成居群。本研究结果可为山东省野生大豆种质资源利用提供理论依据, 具有重要的应用价值。

**关键词:** 野生大豆; *E* 基因; 遗传多样性; 相关性

## Genetic Diversity Analysis of Wild Soybean Resources from Three Populations of Shandong Province by Using the Functional Markers Targeting the Growth Period-Related Genes

LIU Yue<sup>1,2</sup>, QI Guang-xun<sup>3</sup>, SANG Yong-sheng<sup>1,2</sup>, WANG Ying-nan<sup>2</sup>, LI Yu-qiu<sup>2</sup>, WANG Yu-min<sup>2</sup>,  
LIU Xiao-dong<sup>2</sup>, ZHAO Hong-kun<sup>3</sup>, YUAN Cui-ping<sup>2</sup>, DONG Ying-shan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

<sup>2</sup>Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124;

<sup>3</sup>Crop Germplasm Resources Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100)

**Abstract:** The genetic diversity analysis of 137 wild soybean accessions from three populations of Shandong province were analyzed by allele-special DNA markers. One dominant allele was detected at *E1* and *E4* loci, respectively, while the haplotypes *E2-in* and *E3-Ha* were found to be predominant at *E2* and *E3* loci, respectively. Out of five genotypic combinations, the genotype carrying *E1E2-dlE3-HaE4* was predominant. By further analyzing the diversity among the three populations, four genotypic combinations were detected in Linyi population. The genotypes carrying *E1E2-inE3-MiE4* were often detected, while *E2-in* and *E3-Mi* were major alleles at *E2* and *E3* loci, respectively. Three genotypic combinations were observed in both Penglai and Rongcheng populations, while *E1E2-dlE3-HaE4* was often detected. The alleles *E2-dl* and *E3-Ha* were superiority allele on *E2* and *E3* loci, respectively. A similarity on genetic diversity was found between Rongcheng and Penglai populations, while both were differing with Linyi population that represented a highest genetic diversity. Taken

收稿日期: 2019-09-09 修回日期: 2019-11-12 网络出版日期: 2019-12-18

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190909001>

第一作者研究方向为野生大豆种质资源研究, E-mail: yueliu0807@163.com

通信作者: 董英山, 研究方向为野生大豆种质资源研究, E-mail: ysdong@cjaas.com

基金项目: 吉林省农业科技创新工程 (CXGC2018JC003, CXGC2017ZY006); 吉林省农业科技创新工程人才基金项目 (C92070402)

**Foundation project:** Jilin Province Agricultural Science and Technology Innovation Project (CXGC2018JC003, CXGC2017ZY006); Jilin Province Agricultural Science and Technology Innovation Project Talent Fund Project (C92070402)

together, the results gained from this study might provide insights for the utilization of wild soybean germplasm resources in Shandong Province.

**Key words:** wild soybean; *E* gene; genetic diversity; correlation

一年生野生大豆 (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) 是栽培大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 的近缘祖先, 为典型的短日性植物, 不同地区生育期差别很大, 出苗至开花需 40~150 d, 出苗至成熟需 80~210 d, 一般比当地栽培大豆开花较晚<sup>[1-2]</sup>, 并且与栽培大豆不存在生殖隔离<sup>[3]</sup>。野生大豆分布范围很窄, 仅分布在中国、日本、朝鲜和俄罗斯远东的部分地区, 在中国除新疆、青海、海南 3 省区外, 其余各省均有分布, 如此广泛的地理分布和巨大的环境差异, 导致野生大豆群体能够适应不同生态类型条件, 变异类型丰富<sup>[4]</sup>。植物的光周期现象是长期在特定的环境条件下形成的一种对光照的生态适应性, 是决定野生大豆能够适应不同地区生态条件的关键因素<sup>[5]</sup>。

野生大豆与栽培大豆同是光周期敏感植物<sup>[6]</sup>, 其开花和成熟同样受生育期基因控制。目前国内学者对大豆生育期基因研究发现, 大豆的生育期是由多个主效基因同时调控, 目前已发现控制大豆开花和成熟的基因共有 12 个, 并且每个基因所起到的作用不同, 分别是 *E1~E11* 和 *J* 基因<sup>[7-18]</sup>。其中, 大豆生育期基因 *E1~E4* 是研究最广泛的。Tsubokura 等<sup>[19]</sup>研究表明 *E1~E4* 基因与大豆品种的生态适应性相关, 对大豆开花期变异贡献率达 62%~66%。其中 *E1* 基因主要等位变异类型有 *E1*、*e1-nl*、*e1-as*、*e1-fs*、*e1-b3a*<sup>[20-22]</sup>。*E2* 基因的主要等位变异类型有 *E2-in*、*E2-dl* 和 *e2-ns*<sup>[19, 23]</sup>。*E3* 基因主要的等位变异类型有 *E3-Ha*、*E3-Mi*、*e3-tr*、*e3-mo* 和 *e3-fs* 基因型<sup>[19, 22]</sup>。*E4* 基因主要的等位变异类型有 *E4*、*e4-SORE-1*、*e4-oto*、*e4-tsu*、*e4-kam* 和 *e4-kes*<sup>[24-25]</sup>。2006-2010 年王克晶等<sup>[26]</sup>研究发现来自于相同或相近的光周期条件下的同一居群野生大豆开花时间不尽相同, 居群内个体间往往会出现开花期幅度变化较大的情况, 这表明天然居群生育期基因存在异质性, 极小居群因为个体间亲缘关系较近或者是源自于同一家系而导致花期相同或相似。这种表型之间的差异往往是由于生育期基因型与环境共同导致的结果。野生大豆在遗传进化中由于长期的自然选择, 形成特定的生态结构, 导致野生大豆的生育期是较为稳定的遗传性状, 遗传力较高, 基

因型估算的平均广义遗传力高达 92.8%<sup>[5]</sup>。但是目前为止, 尚未有人对野生大豆生育期基因研究有关内容进行报道。董英山等<sup>[27]</sup>研究发现黄河中下游区域可能为野生大豆起源中心之一, 而山东省地处黄河下游, 野生大豆资源分布广, 34° 30' ~ 38° 15' N、114° 45' ~ 122° 45' E 范围内均有发现且综合变异系数高、遗传多样性丰富<sup>[28]</sup>。因此本研究对山东省荣成、临沂、蓬莱 3 个地区居群的野生大豆, 共 137 份野生大豆种质资源进行农艺性状调查并利用等位基因特异性 DNA 标记鉴定生育期 *E1~E4* 基因型, 以期了解山东省荣成、临沂、蓬莱 3 个地区的野生大豆生育期基因的遗传变异和地理分布, 并为山东省野生大豆的保护和利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验材料为吉林省农业科学院大豆研究所采自山东省荣成、临沂、蓬莱 3 个居群的 137 份材料, 其中荣成 32 份, 临沂 61 份, 蓬莱 44 份。在每个居群内采用随机采种的方法, 采种间隔距离 30 m。并且对每个取样点都进行 GPS 定位确定位置。试验材料于 2017-2018 年种植于吉林省农业科学院公主岭市作物资源平台。

### 1.2 调查与记录

按照《大豆种质资源描述规范和数据标准》观察并记录叶形、荚型、粒型、花色、荚色、粒色、种脐色、茎茸毛色共 8 个质量性状<sup>[29]</sup>。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 DNA 的提取与引物设计** 采用改良的 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法提取大豆嫩叶中的 DNA, 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 并用 Nano Drop 2000 超微量分光光度计测定 DNA 的浓度后并稀释成工作浓度为 50 ng/μL。利用前人<sup>[19-25]</sup>根据 *E1~E4* 基因序列和长度设计的等位基因特异性标记引物, 在采用合适的限制性内切酶对生育期基因型加以区分的方法, 鉴定待测样本生育期基因型。引物和酶切方法如表 1 (引物由吉林省库美有限公司合成)。

表1 标记和限制性酶的种类

Table 1 The information of PCR markers and restriction enzymes

| 基因<br>Gene | 变异类型<br>Variation type                  | 引物<br>Primer  | 引物序列 (5'-3')<br>Primer sequence (5'-3') | 标记方法<br>Marker type         | 限制性内切酶<br>Restriction enzyme | 参考文献<br>Reference |        |
|------------|---|---------------|---|-----------------------------|------------------------------|-------------------|--------|
| <i>E1</i>  | <i>e1-as/e1-nl</i>                      | E1-1          | F: TCAGATGAAAGGGAGCAGTGTCAAAAAGAAGT     | dCAPS                       | <i>Taq</i> I                 | [ 20 ]            |        |
|            |   |               | R: TCCGATCTCATCACCTTTCC                 |                             |                              |                   |        |
|            | <i>e1-b3a</i>                           | E1-1          | F: TCAGATGAAAGGGAGCAGTGTCAAAAAGAAGT     | dCAPS                       | <i>Bfu</i> I                 | [ 20-21 ]         |        |
|            |   |               | R: TCCGATCTCATCACCTTTCC                 |                             |                              |                   |        |
|            | <i>e1-fs/E1</i>                         | E1-2          | F: CACTCAAATTAAGCCCTTTCA                | CAPS                        | <i>Hinf</i> I                | [ 20, 22 ]        |        |
|            |   |               | R: TTCATCTCCTCTTCATTTTGTG               |                             |                              |                   |        |
| <i>E2</i>  | <i>E2-in/E2-dl</i>                      | E2-1          | F: TGTTGATATTACATGCACATGCAT             | InDel                       |                              | [ 19 ]            |        |
|            |   |               | R: GGCAGTTTCACCTTCTTAGC                 |                             |                              |                   |        |
|            | <i>e2-ns</i>                            | E2-2          | F: GAAGCCCATCAGAGGCATGTCTTATT           | dCAPS                       | <i>Dra</i> I                 | [ 19, 23 ]        |        |
|            |   |               | R: GAGGCAGAGCCAAAGCCTAT                 |                             |                              |                   |        |
| <i>E3</i>  | <i>E3-Ha ( e3-Mo )<br/>/E3-Mi/e3-tr</i> | E3-1          | F: TGGAGGGTATTGGATGATGC                 | FLP                         |                              | [ 19 ]            |        |
|            |   |               | R1: CTAAGTCCGCCTCTGGTTTCAG              |                             |                              |                   |        |
|            |   |               | R2: CGGTCAAGAGCCAACATGAG                |                             |                              |                   |        |
|            |   |               | R3: GTCCTATAACAATTCTTACGACG             |                             |                              |                   |        |
|            | <i>E3-Ha/e3-Mo</i>                      | E3-2          | F: TTGCATGAAGTTTTGGTTGC                 | CAPS                        | <i>Mse</i> I                 | [ 19 ]            |        |
|            |   |               | R: CAACTGAACTGAAGACCCACAA               |                             |                              |                   |        |
|            | <i>e3-fs</i>                            | E3-3          | F: GGGATAGTTCTGATGCTGTTCAA              | CAPS                        | <i>Ale</i> I                 | [ 22 ]            |        |
|            |   |               | R: CCTTGTATCGATAGCATATGTGCT             |                             |                              |                   |        |
| <i>E4</i>  | <i>e4-SORE-1</i>                        | E4-1          | F: AGACGTAGTGCTAGGGCTAT                 | FLP                         |                              | [ 24 ]            |        |
|            |   |               | R1: GCATCTCGCATACCAGATCA                |                             |                              |                   |        |
|            |   |               | R2: GCTCATCCCTTCGAATTCAG                |                             |                              |                   |        |
|            |   | <i>e4-kam</i> | E4-2                                    | F: CTTAATAAAGCCATGACTGGTTTG | CAPS                         | <i>Afl</i> II     | [ 25 ] |
|            |   |               |   | R: CTTGAGTTTCAATGAGGTTTCAAC |                              |                   |        |
|            | <i>e4-kes</i>                           | E4-2          | F: CTTAATAAAGCCATGACTGGTTTG             | CAPS                        | <i>Bsp</i> HI                | [ 25 ]            |        |
|            |   |               | R: CTTGAGTTTCAATGAGGTTTCAAC             |                             |                              |                   |        |
|            | <i>e4-oto</i>                           | E4-3          | F: CCCAGACACTCTTGTGTGAT                 | CAPS                        | <i>Sac</i> I                 | [ 25 ]            |        |
|            |   |               | R: CCATACTCTCGGTATCTTTC                 |                             |                              |                   |        |
|            | <i>e4-tsu</i>                           | E4-4          | F: CACCCTAGGAGTTGTGTTGTT                | dCAPS                       | <i>Eco</i> R V               | [ 25 ]            |        |
|            |   |               | R: GCGGTTCTGTACAATTGCCTGATA             |                             |                              |                   |        |

**1.3.2 生育期基因分型方法** *E1* 基因的基因分型: 用 E1-1 引物对基因组 DNA 进行扩增, 444 bp 处没有条带的为 *e1-nl* 基因型, 对其扩增出的 PCR 产物 (444 bp) 用 *Taq* I 和 *Bfu* I 限制性内切酶进行酶切反应。能被 *Taq* I 酶切成 2 个片段即 410 bp 和 34 bp 的材料为 *e1-as* 基因型; 能被 *Bfu* I 酶切成 2 个片段即 336 bp 和 108 bp 的材料为 *e1-b3a* 基因型。再用 E1-2 引物对基因组 DNA 进行扩增, 对其 PCR 产物 (218 bp) 利用 *Hinf* I 限制性内切酶进行酶切反应, 能被酶切成 3 个片段即 136 bp、46 bp 和 36 bp 的材料为 *e1-fs* 基因型, 其余材料均为 *E1* 基因型。

*E2* 基因的基因分型: 用 E2-1 引物对基因组 DNA 进行扩增, 扩增出 544 bp 的材料为 *E2-in* 基因型, 512 bp 为 *E2-dl* 基因型, 用 E2-2 引物对基因组

DNA 进行扩增, PCR 产物 (142 bp) 用 *Dra* I 限制性内切酶进行酶切, 142 bp 为 *E2* 基因型, 能被酶切成 2 个片段即 115 bp 和 27 bp 为 *e2-ns* 基因型。

*E3* 基因的基因分型: 用 E3-1 引物对基因组 DNA 进行扩增, 1339 bp 的材料为 *E3-Mi* 基因型, 275 bp 为 *e3-tr* 基因型, 558 bp 为 *E3-Ha/e3-mo/e3-fs* 基因型。用 E3-2 引物对 558 bp 的材料基因组 DNA 进行扩增, 对其 PCR 产物 (324 bp) 利用 *Mse* I 限制性内切酶进行酶切反应, 能被酶切成 2 个片段即 223 bp 和 101 bp 为 *e3-mo* 基因型。再用 E3-3 引物对基因组 DNA 进行扩增, 对其 PCR 产物 (758 bp) 利用 *Ale* I 限制性内切酶进行酶切反应, 能被酶切成 2 个片段即 552 bp 和 206 bp 片段的材料为 *E3-Ha* 基因型, 未被酶切开的材料为 *e3-fs* 基因型。

*E4* 基因的基因分型:用 *E4-1* 引物对材料基因组 DNA 进行扩增,837 bp 的材料为 *e4-SORE-1* 基因型,对扩增出 1229 bp 的材料再用 *E4-2* 引物进行扩增,PCR 产物(494 bp)利用 *Afl* II 酶切和 *Bsp* HI 限制性内切酶进行酶切反应,能被 *Afl* II 酶切成 2 个片段即 286 bp 和 208 bp 为 *e4-kam* 基因型,能被 *Bsp* HI 酶切成 2 个片段即 399 bp 和 95 bp 为 *e4-kes* 基因型,对未确定基因型的材料基因组 DNA 用 *E4-3* 引物进行扩增,PCR 产物(535 bp)利用 *Sac* I 限制性内切酶进行酶切反应,能被酶切成 2 个片段即 439 bp 和 96 bp 为 *e4-oto* 基因型,继续对未确定基因型的材料基因组 DNA 用 *E4-4* 引物进行扩增,PCR 产物(355 bp)利用 *EcoR* V 限制性内切酶进行酶切反应,能被酶切成 2 个片段即 332 bp 和 23 bp 为 *e4-tsu* 基因型,其余均为 *E4* 基因型。

**1.3.3 PCR 反应与限制性酶切反应体系** PCR 反应均采用 10  $\mu$ L 体系,包括 0.2  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L) 引物,0.1  $\mu$ L (5 U/ $\mu$ L) Taq DNA 聚合酶(采用全式金 Easy Taq<sup>®</sup> DNA polymerase),0.8  $\mu$ L (2.5 mmol/L) dNTP,50 ng 模板 DNA 和 1  $\mu$ L 的 10 $\times$  EasyTaq<sup>®</sup>buffer 并于 ddH<sub>2</sub>O 补足 10  $\mu$ L。

PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 15 s,50~56  $^{\circ}$ C 复性 20 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 20~50 s,进行 30 个循环,72  $^{\circ}$ C 后延伸 8 min。PCR 产物采用 1%~3% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

限制性酶切反应均采用 10  $\mu$ L 体系,包括 0.3~1  $\mu$ g 目的片段产物,0.1  $\mu$ L (10 U/ $\mu$ L) 限制性内切酶,1  $\mu$ L 的 10 $\times$  NEB buffer 并于 ddH<sub>2</sub>O 补足 10  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 反应 2~3 h(其中 Taq I 反应温度为 65  $^{\circ}$ C)。酶切产物利用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,用 US EverbrightInc 公司的 Super Page GelRed 核酸染料稀释液浸泡 30 min,UV 紫外凝胶成像分析并记录。

**1.3.4 数据统计分析** 利用 popgene 32 软件计算等位基因观察值 ( $N_a$ , Observed number of alleles)、等位基因有效值 ( $N_e$ , Effective number of alleles)、期望杂合度 ( $H_e$ , Expected heterozygosity)、Shannon 多样性指数 ( $I$ , Shannon's Information index)、Nei's 遗传距离 ( $GD$ , Genetic distance)、Nei's 遗传一致度 ( $GI$ , Genetic identity) 等遗传多样性指标。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生大豆农艺性状及生育期基因分型

调查的山东省临沂、蓬莱、荣成 3 个群体共 137

份野生大豆资源均为蔓生型生长、无限结荚习性,有泥膜,叶形为卵圆形,荚型为弯镰,粒型为扁圆,花色为紫色,荚熟色为黑色,粒色为黑色,种脐色为黑色,茎茸毛色为棕色。生育期基因分型结果详见 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190909001>,附表 1。

### 2.2 山东省野生大豆生育期基因的遗传多样性分析

本研究对山东省临沂、蓬莱、荣成 3 个居群的野生大豆的生育期 *E1*~*E4* 基因的遗传变异进行分析(图 1,表 2)。3 个群体中等位基因型频率分析结果表明(图 1A),这 3 个地区在 *E1* 和 *E4* 位点上,只检测出 *E1* 和 *E4* 基因型,未发现其他隐性等位变异。*E2* 位点上检测出 3 个等位变异,基因型频率为 *E2-in* (54.01%)>*E2-dl* (40.88%)>*e2-ns* (5.11%)。*E3* 位点上检测出 2 个显性等位变异,基因型频率为 *E3-Ha* (70.80%)>*E3-Mi* (29.20%)。根据不同等位基因型组合频率分析结果表明(图 1B),共有 5 种类型,其中 *E1E2-dlE3-HaE4* 基因型组合所占比例最大,为 36.50%,其次是 *E1E2-inE3-HaE4*、*E1E2-inE3-MiE4*,分别占 29.20%、24.80%,*E1e2-nsE3-HaE4* 和 *E1E2-dlE3-MiE4* 所占比例最小,为 5.10%、4.40%。

临沂居群中(图 1C),*E2* 和 *E3* 位点均检测出 2 个显性等位变异,而未发现其他隐性等位变异。*E2* 位点上 *E2-in* (73.77%) 远大于 *E2-dl* 的基因型频率 (26.23%),*E2-in* 为主要基因型;*E3* 位点上 *E3-Mi* (65.57%) 大于 *E3-Ha* 的基因型频率 (34.43%),*E3-Mi* 为主要基因型。临沂居群基因型组合共有 4 种类型(图 1D),其中 *E1E2-inE3-MiE4* 基因型组合所占比例最高,为 55.70%,其次是 *E1E2-inE3-HaE4*、*E1E2-dlE3-HaE4*,分别占 18.00%、16.40%,*E1E2-dlE3-MiE4* 基因型所占比例最少为 9.80%。

蓬莱居群中(图 1E),*E2* 位点检测出 2 个显性等位变异和 1 个隐性等位变异,而其他位点上只检测出 1 个基因型,即 *E1*、*E3-Ha*、*E4*。*E2* 位点上基因型频率为 *E2-dl* (45.45%)>*E2-in* (43.18%)>*e2-ns* (11.36%),*E2-dl* 为主要基因型。蓬莱居群基因型组合共有 3 种类型(图 1F),其中 *E1E2-dlE3-HaE4* 基因型组合所占比例最高,为 45.45%,其次是 *E1E2-inE3-HaE4* 为 43.18%,*E1e2-nsE3-HaE4* 基因型组合所占比例最少为 11.36%。

荣成与蓬莱居群在生育期 *E1*~*E4* 基因上的遗传变异相似(图 1G),仅 *E2* 位点的基因型频率不同,其频率为 *E2-dl* (62.50%)>*E2-in* (31.25%)>*e2-ns* (6.25%),*E2-dl* 为主要基因型。蓬莱居群基因型组合共有 3 种类型(图 1H),其中 *E1E2-dlE3-HaE4* 基

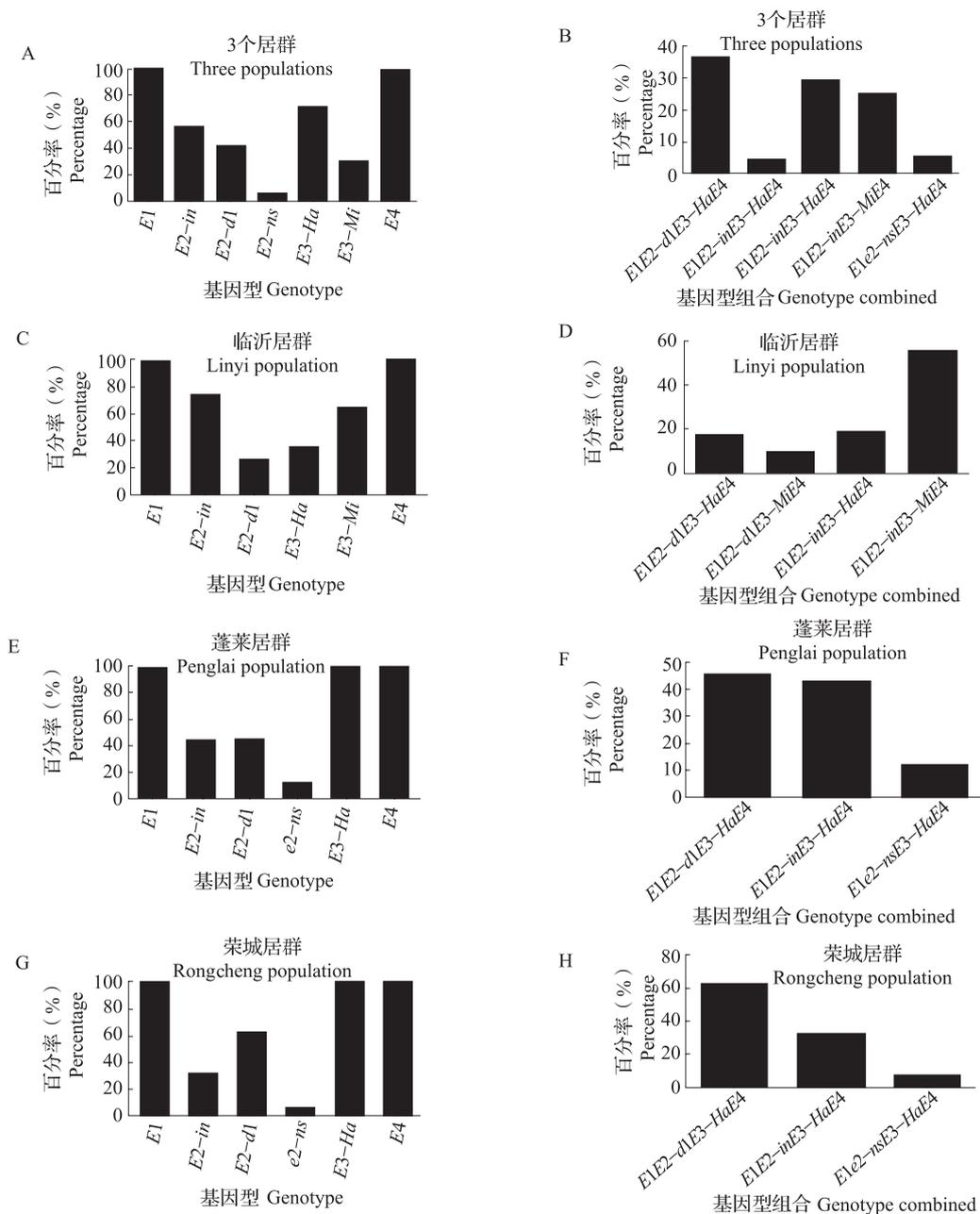


图1 不同群体中等位基因与基因型组合频率

Fig.1 Combination frequency of intermediate gene and genotype in different populations

因型组合所占比例最高,为62.50%,其次是 *E1E2-inE3-HaE4*,占31.30%,*E1e2-nsE3-HaE4* 基因型组合所占比例最低为6.20%。

期望杂合度和 Shannon 多样性指数是衡量遗传多样性水平的重要指标。基于 *E1~E4* 位点对这3个居群的野生大豆进行遗传多样性分析(表2),发现3个居群中 *E2* 基因多样性最高,*E3* 基因多样性次之,*E1* 和 *E4* 基因多样性最低。并且每个居群的基因多样性不尽相同,在临沂居群中 *E3* 基因多样性最高,*E2* 基因多样性次之,*E1* 和 *E4* 基因多样性

最低;在蓬莱居群中 *E2* 基因多样性最高,*E1*、*E3* 和 *E4* 基因多样性最低;在荣成居群中 *E2* 基因多样性最高,*E1*、*E3* 和 *E4* 基因多样性最低。从总体来看,3个居群中,临沂居群遗传多样性较高,而蓬莱和荣成居群遗传多样性较低。

遗传一致度和遗传距离是评价居群间相似程度的重要指标。在这3个群体中荣成和蓬莱居群的遗传距离最小且遗传一致度最大,而与临沂居群的遗传距离最大且遗传一致度最小(表3)。这说明荣成与蓬莱居群亲缘关系较近,与临沂居群亲缘关系较远。

表 2 野生大豆基因位点的遗传变异

Table 2 Genetic variation of gene loci in wild soybean

| 居群                | 位点        | 样本数         | 等位基因观察值                    | 等位基因有效值                     | 期望杂合度                   | Shannon 多样性指数               |
|-------------------|-----------|-------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Population        | Locus     | Sample size | Observed number of alleles | Effective number of alleles | Expected heterozygosity | Shannon's information index |
| 3 个居群             | <i>E1</i> | 137         | 1.0000                     | 1.0000                      | 0.0000                  | 0.0000                      |
| Three populations | <i>E2</i> | 137         | 3.0000                     | 2.1671                      | 0.5385                  | 0.8503                      |
|                   | <i>E3</i> | 137         | 2.0000                     | 1.7049                      | 0.4134                  | 0.6039                      |
|                   | <i>E4</i> | 137         | 1.0000                     | 1.0000                      | 0.0000                  | 0.0000                      |
|                   | 平均        | 137         | 1.7500                     | 1.4680                      | 0.2380                  | 0.3636                      |
|                   | 临沂        | <i>E1</i>   | 61                         | 1.0000                      | 1.0000                  | 0.0000                      |
| Linyi             | <i>E2</i> | 61          | 2.0000                     | 1.6313                      | 0.3870                  | 0.5754                      |
|                   | <i>E3</i> | 61          | 2.0000                     | 1.8231                      | 0.4515                  | 0.6438                      |
|                   | <i>E4</i> | 61          | 1.0000                     | 1.0000                      | 0.0000                  | 0.0000                      |
|                   | 平均        | 61          | 1.5000                     | 1.3636                      | 0.2096                  | 0.3048                      |
|                   | 蓬莱        | <i>E1</i>   | 44                         | 1.0000                      | 1.0000                  | 0.0000                      |
| Penglai           | <i>E2</i> | 44          | 3.0000                     | 2.4631                      | 0.5940                  | 0.9681                      |
|                   | <i>E3</i> | 44          | 1.0000                     | 1.0000                      | 0.0000                  | 0.0000                      |
|                   | <i>E4</i> | 44          | 1.0000                     | 1.0000                      | 0.0000                  | 0.0000                      |
|                   | 平均        | 44          | 1.5000                     | 1.3658                      | 0.1485                  | 0.2420                      |
|                   | 荣成        | <i>E1</i>   | 32                         | 1.0000                      | 1.0000                  | 0.0000                      |
| Rongcheng         | <i>E2</i> | 32          | 3.0000                     | 2.0317                      | 0.5078                  | 0.8305                      |
|                   | <i>E3</i> | 32          | 1.0000                     | 1.0000                      | 0.0000                  | 0.0000                      |
|                   | <i>E4</i> | 32          | 1.0000                     | 1.0000                      | 0.0000                  | 0.0000                      |
|                   | 平均        | 32          | 1.5000                     | 1.2579                      | 0.1270                  | 0.2076                      |

表 3 3 个野生大豆居群之间的遗传距离和遗传一致度

Table 3 Genetic Identity and genetic distance coefficient among three populations

| 居群           | 临沂     | 蓬莱      | 荣成        |
|--------------|--------|---------|-----------|
| Populations  | Linyi  | Penglai | Rongcheng |
| 临沂 Linyi     | ****   | 0.8496  | 0.8261    |
| 蓬莱 Penglai   | 0.1630 | ****    | 0.9956    |
| 荣成 Rongcheng | 0.1910 | 0.0044  | ****      |

对角线下方: Nei's 遗传距离; 对角线上方: Nei's 遗传一致度

Above diagonal: Nei's genetic distance, Below diagonal: Nei's genetic identity

### 3 讨论

生育期是影响大豆品质、产量和生态适应性的重要农艺性状, 决定大豆品种的适宜种植范围, 一直受到科研工作者的重视。伴随着分子生物学和遗传学的进一步发展, 生育期基因被逐渐定位和克隆, 前人对不同地方大豆品种主要的生育期基因 *E1*~*E4* 等位基因变异类型和生态适应性进行了深入研究, 发现不同等位基因型组合与大豆品种的生态类型密切相关<sup>[21, 30-31]</sup>。野

生大豆是栽培大豆的近缘祖先, 含有丰富的基因资源, 遗传变异多样性高, 但是尚未有人对野生大豆天然居群的生育期基因进行系统地研究, 本研究通过对山东省 3 个天然野生大豆群体生育期基因型研究发现, *E1* 和 *E4* 位点只有 1 种变异类型皆为显性基因型 *E1* 和 *E4*; *E2* 位点有 3 种变异类型为 *E2-in*、*E2-dl* 和 *e2-ns*, 以 *E2-in* 为主; *E3* 位点有 2 种变异类型为显性基因型 *E3-Ha* 和 *E3-Mi*, 以 *E3-Ha* 为主。基因位点遗传变异分析结果表明, 3 个群体中 *E2*、*E3* 比 *E1*、*E4* 位点遗传变异较为丰富, 并且只有 *E2* 位点检测出隐性基因且基因频率为 5.11%。而 Li 等<sup>[30]</sup>对山东省 15 份栽培大豆核心种质资源 *E1*~*E4* 基因型鉴定发现 *E2* 位点隐性基因频率为 80.00%, Zhai 等<sup>[32]</sup>对中国 180 份优良大豆品种 *E1*~*E4* 基因型鉴定发现 *E2* 位点隐性基因频率为 84.45%, 这表明本研究的 3 个野生大豆居群 *E2* 位点隐性基因频率低于栽培大豆。Watanabe 等<sup>[23]</sup>发现 *E2* 基因对大豆开花期的影响可能不受光周期调控, 不同环境条件下对开花期的影响相对稳定, 这可能是由于在驯化过程中, 开花期和成熟期因为人为选择而导致 *e2-ns* 基因型被栽培

大豆广泛应用。赵洪锬等<sup>[33]</sup>通过 AFLP 技术和 Lam 等<sup>[34]</sup>通过高通量测序技术均证实了野生大豆比栽培大豆的遗传多样性丰富,野生大豆中可能蕴含着尚未被发现而栽培大豆中没有的隐性基因,所以我们应该对这些种质资源进一步深入研究。也有可能是由于选取材料相对栽培大豆空间分布较窄、遗传关系较近造成的。

本研究发现共有 5 种基因型组合,以 *E1E2-d1E3-HaE4* 为优势基因型组合。这与前人<sup>[21,30-31]</sup>在研究栽培大豆和野生大豆的生育期 *E1~E4* 优势基因型的鉴定结果基本吻合。Li 等<sup>[30]</sup>对中国大豆核心种质资源进行生育期 *E1~E4* 基因型鉴定 *E1e2-nsE3E4* 和 *E1E2E3E4* 为优势组合。Zhai 等<sup>[32]</sup>对中国 180 个优良大豆品种进行生育期 *E1~E4* 基因型鉴定 *E1E3E4* 为优势组合。Jiang 等<sup>[31]</sup>对来自于中国和南美以及俄罗斯的 85 份大豆种质资源进行 *E1~E4* 基因型鉴定 *E1e2E3E4* 和 *E1E2E3E4* 为优势组合,其中 4 份野生大豆种质资源(23° N、39° N、46° N 和 50° N)基因型均为 *E1E2E3E4*。说明该优势基因组合不仅普遍存在于栽培大豆而且也可能广泛存在于野生大豆中。

山东省不同野生大豆居群的生育期遗传变异各不相同,临沂居群的 *E2*、*E3* 位点分别以 *E2-in*、*E3-Mi* 为主,基因型组合以 *E1E2-inE3-MiE4* 为主。而在蓬莱和荣成居群则与临沂居群不同,*E2*、*E3* 位点分别以 *E2-dl*、*E3-Ha* 为主,基因型组合以 *E1E2-d1E3-HaE4* 为主,蓬莱(37° 46' N, 120° 51' E)和荣成居群(37° 22' N, 122° 34' E)有可能是由于经纬度较近,所以导致其生育期基因型变异相似;临沂居群(35° 38' N, 117° 17' E)距离蓬莱、荣成经纬度较远,因此生育期基因变异类型差异较大。Jiang 等<sup>[31]</sup>研究不同纬度栽培大豆生育期基因型组合变异也发现不同基因型组合与纬度之间关系密切。这说明野生大豆生育期基因型很可能具有较强的地域性,与经纬度相关联。

野生大豆在自然条件下生长,很多丰富的功能基因并未因人为选择的影响而丢失,是栽培大豆育种的宝贵资源。但是由于对野生大豆资源保护与利用的重视程度不够,导致了有许多优异基因尚未发现,因此,我们应加大对野生大豆种质资源的收集和利用,对更多的野生大豆进行生育期基因研究,以期拓宽栽培大豆生育期基因遗传基础、创造新种质及选育大豆新品种打下良好的基础<sup>[35]</sup>。

## 参考文献

- [1] 徐豹. 中国野生大豆 (*G. soja*) 研究十年. 吉林农业科学, 1989 (1): 5-13  
Xu B. Ten-year study of wild soybean (*G. soja*) in China. Journal of Jilin Agricultural Science, 1989 (1): 5-13
- [2] 徐豹, 路琴华, 庄炳昌. 世界野生大豆的生态型及其地理分布的研究. 植物生态学与地植物学学报, 1989, 13 (2): 114-120  
Xu B, Lu Q H, Zhuang B C. Analysis of ecotypes and their geographical distribution of wild soybean (*G. soja*) in the world. Acta Phytocologica ET Geobotanica Sinica, 1989, 13 (2): 114-120
- [3] 李向华, 王克晶, 李福山, 严茂粉. 野生大豆 (*Glycine soja*) 研究现状与建议. 大豆科学, 2005, 24 (4): 305-309  
Li X H, Wang K J, Li F S, Yan M F. Research progress of wild soybean (*Glycine soja*) and suggestions for improving its effective utilization and protection. Soybean Science, 2005, 24 (4): 305-309
- [4] 王克晶, 李向华. 中国野生大豆 (*Glycine soja*) 遗传资源主要形态、遗传变异和结构. 植物遗传资源学报, 2012, 13 (6): 917-928  
Wang K J, Li X H. Morphological types, genetic variation and structure in Chinese wild soybean (*Glycine soja*) genetic resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13 (6): 917-928
- [5] 王克晶. 野生大豆地理群体的性状变异. 生物学通报, 1991 (11): 20-21  
Wang K J. Variation of characters in geographical population of wild soybean. Biological Bulletin, 1991 (11): 20-21
- [6] 李福山. 野生大豆光温反应规律的研究. 植物遗传资源学报, 2011, 12 (5): 139-143  
Li F S. Response regularity of wild soybean to photoperiod and temperature in natural environment. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12 (5): 139-143
- [7] Bernard R L. Two major genes for time of flowering and maturity in soybeans. Crop Science, 1971, 11 (2): 242-244
- [8] Abe J, Xu D, Miyano A, Komatsu K, Kanazawa A, Shimamoto Y. Photoperiod-insensitive Japanese soybean landraces differ at two maturity loci. Crop Science, 2003, 43 (4): 1300-1304
- [9] Buzzell R I. Inheritances of a soybean flowering response to fluorescent day length conditions. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 1971, 13 (4): 703-707
- [10] Buzzell R I, Voldeng H D. Inheritance of insensitivity to long day length. Soybean Genet News, 1980, 7: 26-29
- [11] Mcblain B A, Bernard R L. A new gene affecting the time of flowering and maturity in soybean. Journal of Heredity, 1987, 78 (3): 160-162
- [12] Bonato E R, Vello N A. *E6*, a dominant gene conditioning early flowering and maturity in soybeans. Genetics and Molecular Biology, 1999, 22 (2): 229-232
- [13] Cober E R, Voldeng H D. A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to *E1* and *T*. Crop Science, 2001, 41 (3): 698-701
- [14] Cober E R, Molnar S J, Charette M, Voldeng H D. A new locus for early maturity in soybean. Crop Science, 2010, 50 (2): 524-527
- [15] Kong F J, Nan H Y, Cao D, Li Y, Wu F F, Wang J L, Lu S J, Yuan X H, Cober E R, Abe J, Liu B H. A new dominant gene

- E9* conditions early flowering and maturity in soybean. *Crop Science*, 2014, 54(6): 2529-2535
- [ 16 ] Samanfar B, Molnar S J, Charette M, Schoenrock A, Dehne F, Golshani A, Belzile F, Cober E R. Mapping and identification of a potential candidate gene for a novel maturity locus, *E10*, in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2017, 130(2): 377-390
- [ 17 ] Wang F F, Nan H Y, Chen L Y, Fang C, Zhang H Y, Su T, Li S C, Cheng Q, Dong L D, Liu B H, Kong F J, Lu S J. A new dominant locus, *E11*, controls early flowering time and maturity in soybean. *Molecular Breeding*, 2019, 39(5): 70
- [ 18 ] Lu S J, Zhao X H, Hu Y L, Liu S L, Nan H Y, Li X M, Fang C, Cao D, Shi X Y, Kong L P, Su T, Zhang F G, Li S C, Wang Z, Yuan X H, Cober E R, Weller J L, Liu B H, Hou X L, Tian Z X, Kong F J. Natural variation at the soybean *J* locus improves adaptation to the tropics and enhances yield. *Nature Genetics*, 2017, 49(5): 773-779
- [ 19 ] Tsubokura Y, Watanabe S, Xia Z J, Kanamori H, Yamagata H, Kaga A, Katayose Y, Abe J, Ishimoto M, Harada K. Natural variation in the genes responsible for maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean. *Annals of Botany*, 2014, 113(3): 429-441
- [ 20 ] Xia Z J, Watanabe S, Yamada T, Tsubokura Y, Nakashima H, Zhai H, Anai T, Sato S, Yamazaki T, Lü S X, Wu H Y, Tabata S, Harada K. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(32): 2155-2164
- [ 21 ] Zhai H, Lü S X, Wu H Y, Zhang Y P, Zhang X Z, Yang J Y, Wang Y Y, Yang G, Qiu H M, Cui T T, Xia Z J. Diurnal expression pattern, allelic variation, and association analysis reveal functional features of the *E1* gene in control of photoperiodic flowering in soybean. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135909
- [ 22 ] Xu M, Xu Z H, Liu B H, Kong F J, Tsubokura Y, Watanabe S, Xia Z J, Harada K, Kanazawa A, Yamada T, Abe J. Genetic variation in four maturity genes affects photoperiod insensitivity and *PHYA*-regulated post-flowering responses of soybean. *Plant Biology*, 2013, 13(1): 91
- [ 23 ] Watanabe S, Xia Z, Hideshima R, Tsubokura Y, Sato S, Yamanaka N, Takahashi R, Anai T, Tabata S, Kitamura K, Harada K. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics*, 2011, 188(2): 395-407
- [ 24 ] Liu B H, Kanazawa A, Matsumura H, Takahashi R, Harada K, Abe J. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome *a* gene. *Genetics*, 2008, 180(2): 995-1007
- [ 25 ] Tsubokura Y, Matsumura H, Xu M, Liu B H, Nakashima H, Anai T, Kong F J, Yuan X H, Kanamori H, Katayose Y, Takahashi R, Harada K, Abe J. Genetic variation in soybean at the maturity locus *E4* is involved in adaptation to long days at high latitudes. *Agronomy*, 2013, 3(1): 117-134
- [ 26 ] 王克晶, 李向华. 国家基因库野生大豆 (*Glycine soja*) 资源最近十年考察与研究. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(4): 507-514
- Wang K J, Li X H. Exploration and studies of wild soybean germplasm resources in the China genebank during recent decade. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(4): 507-514
- [ 27 ] 董英山, 庄炳昌, 赵丽梅, 孙寰, 张明, 何孟元. 中国野生大豆遗传多样性中心. *作物学报*, 2000, 26(5): 521-527
- Dong Y S, Zhuang B C, Zhao L M, Sun H, Zhang M, He M Y. The genetic diversity centers of annual wild soybean in China. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(5): 521-527.
- [ 28 ] 王栋, 丁汉凤, 王效睦, 孔维国, 李润芳, 李湛, 谢坤, 李群, 戴双, 张晓冬. 山东省野生大豆种质资源保护利用现状分析. *农学学报*, 2016, 6(12): 28-34
- Wang D, Ding H F, Wang X M, Kong W G, Li R F, Li Z, Xie K, Li Q, Dai S, Zhang X D. Protection and utilization of wild soybean germplasm resources in Shandong province. *Journal of Agriculture*, 2016, 6(12): 28-34
- [ 29 ] 邱丽娟, 常汝镇, 刘章雄. 大豆种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2006: 69-79
- Qiu L J, Chang R Z, Liu Z X. Specification and data standard for description and data of soybean germplasm resources. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2006: 69-79
- [ 30 ] Li J C, Wang X B, Song W W, Huang X Y, Zhou J, Zeng H Y, Sun S, Jia H C, Li W B, Zhou X N, Li S Z, Chen P Y, Wu C X, Guo Y, Han T, Qiu L. Genetic variation of maturity groups and four *E* genes in the Chinese soybean mini core collection. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172106
- [ 31 ] Jiang B J, Nan H Y, Gao Y F, Tang L L, Yue Y L, Lu S J, Ma L M, Cao D, Sun S, Wang J L, Wu C X, Yuan X H, Hou W S, Kong F J, Han T F, Liu B H. Allelic combinations of soybean maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* result in diversity of maturity and adaptation to different latitudes. *PLoS One*, 2014, 9(8): e106042
- [ 32 ] Zhai H, Lü S X, Wang Y Q, Chen X, Ren H X, Yang J Y, Cheng W, Zong C M, Gu H P, Qiu H M, Wu H Y, Zhang X Z, Cui T T, Xia Z J. Allelic variations at four major maturity *E* genes and transcriptional abundance of the *E1* gene are associated with flowering time and maturity of soybean cultivars. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97636
- [ 33 ] 赵洪锬, 王玉民, 李启云, 张明, 庄炳昌. 中国不同纬度野生大豆和栽培大豆 SSR 分析. *大豆科学*, 2001, 20(3): 172-176
- Zhao H K, Wang Y M, Li Q Y, Zhang M, Zhuang B C. SSR analysis of wild soybean and cultivated soybean in different latitudes in China. *Soybean Science*, 2001, 20(3): 172-176
- [ 34 ] Lam H M, Xu X, Liu X, Chen W, Yang G, Wong F L, Li M W, He W, Qin N, Wang B, Li J, Shao G, Wang J, Sun S S, Zhang G. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nature Genetics*, 2010, 42(12): 1053-1059
- [ 35 ] 崔杰印, 武婷婷, 宋雯雯, 贾鸿昌, 吴纪安, 韩天富. 黑龙江中上游地区早熟野生大豆种质资源的抗旱性鉴定. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(6): 1073-1076
- Cui J Y, Wu T T, Song W W, Jia H C, Wu J A, Han T F. Drought tolerance evaluation of the early-maturing annual wild soybeans from the upper and middle reaches of Heilongjiang River. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(6): 1073-1076