DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00219

用于中国小豆种质资源遗传多样性分析 SSR 分子标记筛选及应用

徐 宁 程须珍* 王丽侠 王素华 刘长友 孙 蕾 梅 丽

中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘 要: 以 375 份小豆核心种质为试验材料, 利用从小豆及其近缘种 SSR 引物中筛选出的 13 对引物进行遗传多样性分析。检测结果显示, 小豆种质资源具有丰富的遗传多样性, 共检测到 133 个等位变异, 每对 SSR 引物检测到等位变异 4~19 个, 平均 10.23 个, 国内各省多态信息含量(PIC)平均为 0.561, 多态位点比例(PP)平均为 93.523%。聚类结果表明, 小豆资源遗传关系与生态分区有明显的联系, 且东北地区资源与中南部资源遗传关系较近。湖北、安徽、陕西 3 省资源的 PIC 较高, 且基本位于主坐标三维图的中心区域, 推断湖北、安徽和陕西是中国栽培小豆的起源地或多样性中心。该结果有助于更好地对小豆种质资源进行收集、保护和利用。

关键词: 小豆; SSR; 遗传多样性

Screening and Application of SSR Molecular Markers for Genetic Diversity Analysis of Chinese Adzuki Bean Germplasm Resources

XU Ning, CHENG Xu-Zhen*, WANG Li-Xia, WANG Su-Hua, LIU Chang-You, SUN Lei, and MEI Li

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Adzuki bean [*Vigna angularis* (Willd) Ohwi & Ohashi] is a major food legume in China, with special functions in people's life and agricultural production. In order to evaluate the genetic diversity of adzuki bean germplasm and provide information for gene mining and plant breeding, a total of 375 accessions of adzuki bean core collection were analyzed with 13 pairs of microsatellite (SSR) markers screened from SSR primers of adzuki bean and its relatives. A wide genetic variation was observed in all collections. Four to nineteen alleles per SSR primer pair were detected with an average of 10.23 alleles. The mean of polymorphism information content (PIC) and the percentage of polymorphic loci (PP) for the collections in China were 0.561 and 93.523%, respectively. The dendrogram by UPGMA cluster analysis among populations showed that there were correlations between the groups clustered and their putative geographic origins, and the collections from northeast had a closer genetic relationship with that from middle-south region of China. SSR data showed that PIC in Hubei, Shannxi, and Anhui provinces was the first three high, which almost located in the central part of the three dimensions of PCO (principal coordinate analysis). We concluded that Hubei, Shannxi, and Anhui provinces were the origin or diversity center of cultivated adzuki bean in China. The results could be available for collection, conservation, and utilization of adzuki bean germplasm resources.

Keywords: Adzuki bean (*Vigna angularis*); SSR; Genetic diversity

小豆[*Vigna angularis* (Willd) Ohwi & Ohashi]是我国主要食用豆类作物, 在农业生产和生活中具有独特的作用。中国是小豆的起源国, 资源拥有量居世界第一位^[1], 东北、华北、黄河中下游和长江中下游地区种植面积最大, 但长期以来小豆一直被看作是“小作物”, 基础性研究相对比较薄弱。近年来, 应用 DNA 分子标记评价小豆种质资源遗传多样性

的工作也已逐步开展, 但广泛使用的分子标记多为 RAPD^[2-6]和 AFLP^[7-12]。SSR 分子标记具有揭示遗传变异多、共显性、结果稳定、操作简单等优点, 已成为重要的研究工具。2004 年, Wang 等^[13]用微卫星富集法开发了 8 对小豆 SSR 引物, 用其分析了含 20 份材料的群体, 其中 3 份出现杂合带, 并指出在此群体中栽培种的基因已向野生种转移。此后一直没

本研究由作物种质资源保护项目(NB04-07), 国家科技基础条件平台建设项目(2004-06DKA), 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD02B08), 农业科研专项资金(nykyzx07-017)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 程须珍, E-mail: Chengxz@caas.net.cn; Tel: 010-62189159

第一作者联系方式: E-mail: xuning2008@163.com

Received(收稿日期): 2008-05-08; Accepted(接受日期): 2008-10-15.

有关于小豆 SSR 研究的报道。

传统基因组 SSR 引物的开发费时、费力、成本高,而近缘种引物也是 SSR 引物来源之一^[14],野生大豆成功借用栽培大豆的 SSR 引物^[15],普通菜豆的 SSR 引物用于豇豆属物种间遗传变异的研究^[16]。本研究对文献中查到的小豆及其近缘种绿豆、豇豆和普通菜豆 SSR 引物进行筛选,旨在填补国内 SSR 分子标记在小豆种质资源上应用的空白,并从分子水平上评价我国小豆资源的遗传多样性,为有效利用小豆种质资源及深入探讨栽培小豆在我国的传播提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

375 份小豆核心种质^[17],含国内 366 份,即黑龙江 15 份、吉林 20 份、辽宁 12 份、内蒙古 10 份、河北 31 份、北京 30 份、天津 6 份、山东 17 份、河南 19 份、江苏 10 份、山西 70 份、陕西 30 份、甘肃 4 份、宁夏 2 份、安徽 22 份、湖北 38 份、湖南 7 份、四川 4 份、贵州 7 份、云南 4 份、广东 2 份、广西 3 份、海南 1 份、台湾 2 份;国外 9 份,包括澳

大利亚 1 份、朝鲜 1 份、日本 7 份。均由国家作物种质库提供种子。

1.2 基因组 DNA 制备

将试验种子浸泡 10~12 h 后,播种于营养钵,置 20℃~25℃温室,出苗 10 d 后,从每份材料的 5 株幼苗上采收刚要展开的嫩叶 0.3 g 左右,在液氮中研磨成细粉;依照 Mimura 等^[5]的方法稍作修改后,提取基因组总 DNA,放入-20℃冰箱备用。

1.3 SSR 分析

供筛选 SSR 引物 106 对(表 1),由北京赛百盛基因技术公司合成。PCR 扩增体系 20 μL,含 10 ng μL⁻¹ DNA 模板 3 μL, 10×buffer 2 μL, 25 mmol L⁻¹ MgCl₂ 1.2 μL, 2.5 mmol L⁻¹ dNTPs 0.4 μL, 2 μmol L⁻¹ 正、反 SSR 引物各 0.75 μL, 2.5 U μL⁻¹ *Taq* DNA 聚合酶 0.24 μL, ddH₂O 11.66 μL。反应程序为 95℃模板预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 47℃~68℃温度梯度退火 45 s, 72℃延伸 45 s, 35 个循环,最后 72℃延伸 5 min。扩增产物经用 6%聚丙烯酰胺变性凝胶,在 60 W 恒功率下电泳,根据不同引物扩增产物的大小确定适当的电泳时间。银染法^[18-19]染色后读带,照相。

表 1 试验供筛选的 SSR 引物
Table 1 Primers of SSR used in study

引物种类 Primer	分类 Class	引物数目 No. of primers	引物来源 Source of primers
小豆 SSR Azuki bean SSR	豇豆属 <i>Vigna</i>	8	Wang 等 ^[13]
绿豆 SSR Mungbean SSR	豇豆属 <i>Vigna</i>	41	Gwag 等 ^[20] , Kumar 等 ^[21] , 澳大利亚刘春吉博士实验室及泰国 Peerasak 实验室
豇豆 SSR Cowpea SSR	豇豆属 <i>Vigna</i>	27	Li 等 ^[22]
普通菜豆 SSR Common bean SSR	菜豆属 <i>Phaseolus</i>	30	Zhang ^[23]

1.4 数据统计分析

在电泳图谱上,清晰的条带记为“1”,同一位置上无条带记为“0”。SSR 标记多态性指标以多态信息含量(polymorphism information content, PIC)表示:

$$PIC = 1 - \sum f_{ij}^2 \quad [24],$$

式中, f_{ij} 表示第 i 个位点上,第 j 个等位基因的频率。用 POPGENE Version 1.31 软件^[25]计算平均等位变异数目(NA)、有效等位变异数(NE)、实际观察杂合度(HO)、多态位点比例(PP)、香农指数(SI)、基因流(Nm)和遗传一致度(GI)。根据遗传一致度,利用 NTSYS Version 2.10^[26]软件中的 SHAN 程序和 UPGMA 方法进行聚类分析,利用 EIGEN 程序进行主坐标分析。

2 结果与分析

2.1 各种引物扩增情况

用 106 对 SSR 引物对 12 份表型性状差异较大的材料进行扩增能力和扩增多态性筛选,8 对小豆 SSR 引物中的 7 对能够获得扩增产物并且显示出多态性,有效扩增率和多态性比率均为 87.5%。在 41 对绿豆 SSR 引物中,能够获得扩增产物的引物有 35 对,具有多态性的引物有 4 对。在 27 对豇豆 SSR 引物中,能够获得扩增产物的有 20 对,具有多态性的引物有 1 对。在 30 对普通菜豆 SSR 引物中,能够获得扩增产物的引物有 19 对,具有多态性的引物有 1 对(表 2)。

表 2 各种引物扩增情况
Table 2 Amplification for different primer pairs

引物种类 Type of primers	引物数目 No. of primers	有扩增产物 Product		无扩增产物 No product	有效扩增率 Effective amplification (%)	多态性比率 Polymorphism (%)
		单态 Monomorphic	多态 Polymorphic			
小豆 SSR Azuki bean SSR	8	0	7	1	87.5	87.5
绿豆 SSR Mungbean SSR	41	31	4	6	85.4	9.8
豇豆 SSR Cowpea SSR	27	19	1	7	74.1	3.7
普通菜豆 SSR Common bean SSR	30	18	1	11	63.3	3.3

2.2 多态性引物分析

利用筛选得到的 SSR 引物(表 3)分析 375 份小豆资源, 共检测到 133 个等位变异, 每对 SSR 引物等位变异数为 4~19 个, 平均为 10.23 个。其中小豆引物 X3 的等位变异数最多, 为 19 个, 其次是 L52(18 个)、X6(17 个)、X2(16 个), 普通菜豆引物 C2 最少, 为 4 个。不同 SSR 引物所揭示的参试材料多态信息含量(PIC)

介于 0.147~0.913 之间, 平均为 0.678。PIC 高于 0.800 的位点数有 6 个, 占 46.2%, 小于 0.400 的有 2 个位点, 即 L62、J13, 这两个位点的等位变异数也较少。小豆、绿豆、豇豆、普通菜豆 4 种类型的 SSR 引物检测到的平均等位变异数目分别为 12.86、8.50、5.00、4.00, 所揭示参试材料的平均 PIC 分别为 0.773、0.662、0.147、0.603(表 4)。部分扩增产物的电泳扫描照片见图 1。

图 1 引物 X5 扩增结果

Fig. 1 PCR products amplified with primer X5

M: pBR322 DNA/*Msp* I 分子量标准; 1~67: 部分供试材料编号。

M: pBR322 DNA/*Msp* I markers; 1–67: No. of part adzuki bean collections used.

表 3 多态性引物
Table 3 Description of the polymorphic primers

多态性引物编号 Code of polymorphic primers	引物序列 Primer sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temp. (°C)	目标片段长 Fragment size (bp)
X1	F:GTGCAGCCACTACATGAATG; R:GAAGTTGACACTCATCCACC	62.3	110–123
X2	F:AGGCGAGGTTTCGTTTCAAG; R:GCCCATATTTTACGCCCAC	58	90–123
X3	F:CCCGATGAACGCTAATGCTG; R:CGCCAAAGGAAACGCAGAAC	58	123–217
X4	F:CATCTTCCTCACCTGCATTC; R:TTTGGTGAAAGATGACAGCCC	60	110–147
X5	F:TCAGCAATCACTCATGTGGG; R:TGGGACAAACCTCATGGTTG	56	123–201
X6	F:GATTGCTTTTAGCAGAGGGC; R:GAAGAAACCCATCTCGATCC	60	147–201
X8	F:AGGATTGTGGTTGGTGCATG; R:ACTATTTCCAACCTGCTGGG	65	123–180
L1	F:GCGAAGTGATCTTATCTGCT; R:GTCAAATCTGAACCATAAA	48	242–309
L52	F:GAGGCCAATCCATAACTTT; R:AGCACCACATCAGAGATTCC	58	123–190
L62	F:ACCTGCAAGTTGGCAAGA; R:TATGTGCACGCATGGAAG	56	100–123
L63	F:TCCCTTGTTGGGAGATCCT; R:CTTGCCACACTCCTTGC	56	242–309
J13	F:GTCCAAAGCAAATGAGTCAA; R:TGAATGACAATGAGGGTGC	60	190–238
C2	F:TGCACAACACATTAGTGAC; R:CCTACCAAGATTGATTATGGG	48	123–147

表 4 SSR 标记的等位变异数目和多态信息含量
Table 4 Number of alleles and polymorphism information content for SSR markers

多态性引物编号 Code of polymorphic primers	等位变异数目 No. of alleles	多态信息含量 Polymorphism information content
X1	9	0.725
X2	15	0.878
X3	19	0.830
X4	12	0.805
X5	11	0.842
X6	17	0.901
X8	7	0.433
L1	6	0.776
L52	18	0.913
L62	5	0.343
L63	5	0.615
J13	5	0.147
C2	4	0.603
平均数 Mean	10.23	0.678

2.3 不同省域小豆种质资源遗传多样性比较

以每一个资源量不低于 4 份的省份为一个群体, 依据 SSR 鉴定数据, 计算各群体小豆种质资源各项遗传多样性参数(表 5)。湖北、陕西、安徽、河北、

北京是小豆遗传多样性较丰富地区, 其中湖北无论是等位变异数(6.615)、多态信息含量(0.687), 还是香农指数(1.460)在调查省份中都最大, 是小豆种质资源最丰富的省份, 陕西次之, 安徽 PIC 居第 3 位, 这

表 5 13 对 SSR 引物在 20 个小豆群体中检测到的遗传多样性参数
Table 5 Estimates of genetic parameters for 20 populations of Adzuki bean based on 13 SSR primers

组群 Population	份数 Number	平均等位 变异数 NA	有效等位 变异数 NE	实际观察 杂合度 HO	多态信 息含量 PIC	多态位 点数 NP	多态位点 比例 PP(%)	香农指数 SI
中国黑龙江 Heilongjiang, China	15	4.154	2.665	0.015	0.511	13.0	100.000	0.984
中国吉林 Jilin, China	20	4.769	3.101	0.042	0.568	12.0	92.310	1.120
中国辽宁 Liaoning, China	12	4.385	3.278	0.062	0.570	12.0	92.310	1.120
中国内蒙古 Inner Mongolia, China	10	3.923	2.775	0.046	0.558	12.0	92.310	1.029
中国北京 Beijing, China	30	5.692	3.480	0.062	0.609	12.0	92.310	1.247
中国天津 Tianjin, China	6	3.000	2.383	0.067	0.493	10.0	76.920	0.812
中国河北 Hebei, China	31	6.308	3.728	0.052	0.601	13.0	100.000	1.283
中国山东 Shandong, China	17	4.923	3.157	0.023	0.550	13.0	100.000	1.106
中国河南 Henan, China	19	5.077	3.049	0.037	0.592	13.0	100.000	1.179
中国山西 Shanxi, China	70	6.154	2.911	0.047	0.560	13.0	100.000	1.157
中国甘肃 Gansu, China	4	2.462	2.051	0.039	0.460	11.0	84.620	0.698
中国陕西 Shaanxi, China	30	6.462	4.025	0.038	0.640	13.0	100.000	1.358
中国江苏 Jiangsu, China	10	4.154	2.780	0.055	0.560	12.0	92.310	1.061
中国安徽 Anhui, China	22	5.385	3.714	0.034	0.621	13.0	100.000	1.257
中国湖北 Hubei, China	38	6.615	4.310	0.077	0.687	13.0	100.000	1.460
中国湖南 Hunan, China	7	3.308	2.655	0.055	0.522	11.0	84.620	0.944
中国四川 Sichuan, China	4	2.385	2.022	0.019	0.436	10.0	76.920	0.649
中国贵州 Guizhou, China	7	3.615	2.933	0.033	0.567	12.0	92.310	1.039
中国云南 Yunnan, China	4	2.846	2.453	0.019	0.552	13.0	100.000	0.892
平均 Mean		4.506	3.025	0.043	0.561	12.2	93.523	1.073
日本 Japan	7	3.154	2.546	0.022	0.562	13.0	100.000	0.952

NA: the number of alleles per locus; NE: the effective number of alleles per locus; HO: average observed heterozygosity; PIC: Polymorphism information content; NP: the number of polymorphic loci; PP: proportion of polymorphic loci; SI: Shannon's index.

与形态数据分析结果相一致(数据未发表)。虽然山西小豆资源量大,但遗传多样性并不是最高,再一次从分子水平上证明了资源份数多,遗传多样性不一定最大的论断。有效等位变异数(NE)与等位变异的频率有关,与平均等位变异数(NA)相比,山西、北京、河南、吉林、黑龙江、江苏等省份的有效等位变异数较小,说明这些省份极端频率的等位变异相对较多。观察杂合度 H_O 反映杂合位点在基因组中所占的比例,国内 19 个省份实际观察杂合度平均为 0.043,变化范围为 0~0.077,说明尽管异交率很低,小豆在天然条件下的杂交也是存在的。多态位点比例是反映遗传多态的重要指标之一,国内 19 个省份多态位点比例平均为 93.523%,最高为 100%,最低为 76.920%,有 15 个省份多态位点比例大于 90%,表明中国各省小豆的遗传多态性普遍较高。日本小豆资源等位变异数(3.154)小于中国的平均值(4.506),

多态信息含量(0.562)与中国平均值(0.561)持平,香农指数(0.952)小于中国的平均值(1.073)。另外,广西的 3 份参试材料在每个位点都有自己独特的相同等位变异类型。

2.4 聚类分析

20 个群体间的遗传一致度和基因流如表 6,根据遗传一致度运行 NTSYS(2.10)软件进行聚类(图 2),可分为 6 个组。中国东北三省、中国内蒙古与日本资源聚为一组;陕西、湖北、江苏、湖南和四川资源聚为一组;北京、山西、河北和天津资源聚为一组;山东、河南、甘肃和安徽资源聚为一组,但没有将河南和甘肃资源区分开来;贵州和云南分别各为一组。可见,对群体的聚类结果与小豆生态分区有一定的关系。另外,还可以看出东北地区资源首先与中南部资源聚在一起,然后才与北方剩余各省资源聚到一起,表明东北地区小豆资源与中南部资源的遗传关系较近。

图 2 小豆种质资源 20 个群体的聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of 20 populations of Adzuki bean germplasm resources based on genetic identity

有限的基因流是促进居群发生基因分化的主要原因^[27],由表 6 可以看出各省间基因流的变化范围为 0.756(甘肃与云南间)~9.225(北京与河北间),其中西南地区及甘肃省与其他各省资源间的基因流都偏小,平均都在 2.0 以下,而陕西、湖北、北京、河北、安徽资源与其他各省资源间的基因流都较高,平均在 3.1 以上。各省间遗传一致度的变化范围为 0.4055(甘肃与云南间)~0.9356(北京与河北间)。还可以看出,主产区省份间基因流、遗传一致度普

遍较高,这可能与省份间相互引种有关。另外,中国陕西与日本资源间基因流、遗传一致度最高,东北与陕西资源间,华北、黄河中下游地区与安徽资源间基因流和遗传一致度都普遍较高。

2.5 主坐标分析

根据遗传一致度,作主坐标分析图(图 3)。从图中可以看出 20 个参试群体可以分成 4 个部分,中国黑龙江、中国吉林、中国辽宁、中国内蒙古和日本 5 个群体聚在一起,组成第 1 部分;北京、天津、河

表6 20个群体间的基因流(Nm)(上三角)和Nei's遗传一致度(GI)(下三角)

Table 6 Gene flow(Nm) (above diagonal) and Nei's genetic identity(GI) (below diagonal) among 20 populations

群体 Population	黑龙江 Heilong jiang, China	吉林 Jilin, China	辽宁 Liaoning, China	内蒙古 Inner Mongolia, China	北京 Beijing, China	天津 Tianjin, China	河北 Hebei, China	山东 Shandong, China	河南 Henan, China	山西 Shanxi, China	甘肃 Gansu, China	陕西 Shaanxi, China	江苏 Jiangsu, China	安徽 Anhui, China	湖北 Hubei, China	湖南 Hunan, China	四川 Sichuan, China	贵州 Guizhou, China	云南 Yunnan, China	日本 Japan
Heilongjiang, China		3.520	2.587	2.656	2.469	1.061	2.093	1.549	2.017	2.503	1.166	2.793	1.840	1.948	3.190	1.423	1.116	1.606	1.263	2.397
Jilin, China	0.859		3.068	2.954	2.809	1.527	2.371	1.976	2.847	2.898	1.588	3.737	2.172	3.209	3.869	2.009	1.323	2.003	1.177	2.594
Liaoning, China	0.799	0.813		3.123	3.878	1.730	3.748	2.052	2.221	2.377	1.412	3.079	2.246	2.815	3.837	1.918	1.492	1.925	1.420	2.280
Inner Mongolia, China	0.814	0.819	0.831		4.420	1.588	5.436	2.351	3.783	5.131	1.482	4.170	2.343	2.918	3.775	2.038	1.303	2.346	1.167	2.374
Beijing, China	0.772	0.780	0.839	0.873		4.600	9.225	3.547	5.766	7.007	1.816	4.638	2.684	4.888	4.313	1.876	1.358	2.205	1.455	2.428
Tianjin, China	0.678	0.683	0.740	0.728	0.920		3.271	2.069	2.513	2.785	1.219	2.309	1.390	2.553	1.921	1.144	0.933	1.065	0.916	1.357
Hebei, China	0.731	0.740	0.838	0.903	0.936	0.864		4.178	5.321	7.042	1.882	4.682	2.430	4.190	4.133	2.086	1.314	2.141	1.459	2.077
Shandong, China	0.664	0.715	0.717	0.773	0.831	0.790	0.864		5.430	3.924	1.597	5.307	2.036	3.663	3.306	1.951	1.094	1.728	1.441	1.630
Henan, China	0.728	0.793	0.722	0.857	0.893	0.825	0.885	0.904		7.906	2.087	5.890	2.455	4.890	3.776	1.948	1.232	2.162	1.405	1.928
Shanxi, China	0.770	0.791	0.729	0.884	0.914	0.837	0.917	0.855	0.931		1.672	5.846	2.149	3.730	3.237	1.864	1.157	2.090	1.350	2.211
Gansu, China	0.621	0.7120	0.677	0.717	0.744	0.711	0.759	0.731	0.797	0.743		1.660	1.161	1.736	1.687	0.909	0.788	1.173	0.756	1.018
Shaanxi, China	0.791	0.832	0.782	0.862	0.847	0.795	0.854	0.891	0.893	0.890	0.711		4.303	4.926	7.134	3.008	1.691	2.583	2.019	3.239
Jiangsu, China	0.721	0.741	0.753	0.780	0.770	0.685	0.751	0.735	0.768	0.715	0.626	0.867		2.961	4.582	1.714	1.775	2.200	1.342	2.179
Anhui, China	0.708	0.811	0.775	0.800	0.864	0.826	0.844	0.842	0.875	0.828	0.734	0.859	0.805		4.993	2.472	1.398	2.450	1.441	2.180
Hubei, China	0.811	0.826	0.816	0.831	0.818	0.720	0.817	0.797	0.804	0.774	0.684	0.889	0.867	0.849		2.798	1.774	3.104	2.075	2.763
Hunan, China	0.648	0.726	0.722	0.750	0.677	0.624	0.699	0.731	0.705	0.663	0.541	0.810	0.702	0.764	0.774		1.003	1.457	1.297	1.670
Sichuan, China	0.654	0.673	0.719	0.703	0.662	0.627	0.642	0.624	0.643	0.595	0.575	0.745	0.789	0.688	0.740	0.622		1.106	0.953	1.375
Guizhou, China	0.663	0.703	0.686	0.772	0.691	0.557	0.682	0.664	0.713	0.684	0.623	0.722	0.757	0.729	0.760	0.637	0.630		1.061	1.917
Yunnan, China	0.557	0.454	0.569	0.500	0.496	0.483	0.542	0.562	0.542	0.499	0.406	0.632	0.572	0.513	0.626	0.592	0.579	0.445		1.104
Japan	0.792	0.779	0.748	0.780	0.743	0.662	0.688	0.654	0.688	0.716	0.549	0.809	0.759	0.718	0.745	0.690	0.712	0.709	0.480	

北和山西 4 个群体组成第 2 部分; 第 3 部分包括安徽、河南、山东和甘肃 4 个群体; 第四部分包括陕西、湖北、湖南、江苏、四川、贵州和云南 6 个群体, 其中湖北、湖南、江苏、四川距离较近, 陕西、贵州、云南较分散。可见, 主坐标分析图与聚类图

的大体趋势是相一致的。另外, 可以看出湖北、陕西、安徽 3 省基本位居三维图的中心区域, 说明这 3 个省份与分成的 4 个部分遗传关系相对接近, 但湖北倾向于南方各省, 陕西倾向于东北地区, 安徽倾向于黄河中下游和华北地区。

图 3 20 个群体小豆种质资源主坐标分析三维图

Fig. 3 Three dimensions of PCO for Adzuki bean germplasm resources from 20 populations

3 讨论

SSR 标记的引物有 4 种来源^[28], 即相关文献、近缘种的引物、基因组文库和数据库。对于有研究基础的作物, 随着基因组研究的深入和 SSR 标记的广泛应用, 现有的 SSR 标记已不能满足高密度遗传图谱构建等研究的需要, 通常采用数据库搜寻法从 EST 序列中获得 SSR 标记, 如小麦^[29]。由于对小豆研究比较薄弱, 所以采用简单易行的前两种方法获得 SSR 引物, 这两种方法较适用于研究相对落后的小宗作物, 如绿豆^[30]。本研究从小豆及其近缘种绿豆、豇豆、普通菜豆 SSR 标记中共筛选出 13 对具有多态性 SSR 引物, 其中小豆引物 7 对、绿豆引物 4 对、豇豆引物 1 对、普通菜豆引物 1 对, 有效扩增率为小豆(87.5%) > 绿豆(85.4%) > 豇豆(74.1%) > 普通菜豆(63.3%), 其 SSR 引物检测到的平均等位变异数目分别为 12.86、8.50、5.00、4.00, 所揭示参试资源的多态信息含量 PIC 分别为 0.773、0.662、0.147、0.603。这从另一方面反映了 4 种作物亲缘关系的远近, 小豆、绿豆、豇豆同属于豇豆属(*Vigna*), 普通菜豆属于菜豆属(*Phaseolus*), 而小豆、绿豆又同属于亚洲豇豆亚属(*Ceratotropis*), 说明在筛选物种的 SSR

标记时, 亲缘关系越近, 有效扩增率越高, 筛选出具有多态性引物的机率也越大。

本研究中每对 SSR 引物检测到的等位变异数为 4~19 个, 平均为 10.23 个, 明显高于豇豆属其他作物。徐雁鸿等^[31]用 SSR 分子标记分析豇豆种质资源遗传多样性时每对 SSR 引物检测到 2~7 个等位位点, 平均为 3.69 个; 刘长友等^[30]在筛选用于绿豆种质资源遗传多样性分析的 SSR 及 STS 引物时每对引物从 192 份材料中检测到 2~11 个等位变异。说明小豆种质资源遗传变异丰富。王述民等^[2]利用 RAPD 标记评价小豆种质遗传多样性时, 得出的平均香农指数为 0.692, 明显低于本研究的结果 1.073(表 5), 说明 SSR 能检测到更丰富的遗传变异。

对 20 个群体聚类结果表明, 小豆资源遗传关系与生态分区有明显的联系, 即在自身进化传播过程中, 在某一生态环境下, 小豆经过长期人工选择和改良后, 在遗传结构上发生了能够区别于其他生态区资源的变异。没有将河南和甘肃资源区分开来的可能原因是甘肃参试资源少或所用标记数目有限。我国小豆的主产区分布在东北、华北、黄河中下游和长江中下游地区, 群体聚类结果与该主产区的分布大体一致。

湖北、陕西、安徽 3 省的多态信息含量(PIC)最高,且湖北(神农架地区有大量野生小豆存在)资源与陕西、安徽资源基因交流最频繁(表 6),笔者推断这 3 个省份是中国栽培小豆的起源地或多样性中心,与对形态性状分析的结果吻合(未发表),亦与王述民^[32]初步认为黄河中下游和华中地区是中国小豆起源地或多样性中心的研究结果相吻合,且本研究指出的起源地或多样性中心具体到了 3 个相邻省份。宗绪晓等^[8]认为中国与日本栽培小豆分别来源于不同的祖先,同时指出中国与日本栽培小豆间相互渗透,但没有揭示二者的关系之谜。本研究进一步证实了中国与日本栽培小豆间的确有联系,日本与东北地区资源聚为一组,说明中国栽培小豆很可能是从东北地区传入日本的。日本资源与中国陕西资源的基因流、遗传一致度都最高(表 6),东北地区与陕西资源的基因流、遗传一致度也普遍较高(表 6),王述民等^[7]利用 AFLP 标记鉴定小豆资源遗传多样性时将全部 9 份日本资源与 8 份中国陕西资源中的 6 份聚在一组,并指出日本小豆被归于该组群可能与该组群的其他种质在最初来源地上相近有关,由此推断由中国传入日本的栽培小豆的祖先很可能在中国陕西。群体聚类结果表明东北地区与中南部资源遗传关系较近,而两地区在地里位置上被华北和黄河中下游地区隔离,聚类图显示安徽与华北、黄河中下游地区的资源关系密切。综上所述,笔者推断中国栽培小豆从起源地向东北地区传播时陕西可能是一条重要途经,而向黄河中下游、华北地区传播时安徽可能是一条重要途经。西南地区,尤其是广西、云南的栽培小豆也可能另有起源地。同时由于引种等原因还发生着局部地区间基因的交流(表 6),这些还都需要更多 SSR 标记和其他方法的进一步验证。

本研究为我国小豆种质资源的考察收集提供了重要参考,建议加强对湖北、陕西、安徽、云南、广西等省份小豆古老品种、半野生种和野生种的考察,发现稀有、珍贵变异类型,从而在小豆品种改良和种质创新中合理利用。

4 结论

从小豆近缘种中能够筛选出有效用于小豆遗传多样性分析的 SSR 引物。中国小豆种质资源遗传多样性比较丰富,参试省份的聚类结果与中国小豆主产区的分布大体一致,东北地区与中南部地区小豆

资源遗传关系较近。初步推断出湖北、陕西、安徽是中国栽培小豆的起源地或多样性中心。应加强对上述地区小豆资源的考察、收集,用于品种改良和种质创新。

References

- [1] Zheng Z-J(郑卓杰), Wang S-M(王述民), Zong X-X(宗绪晓). China Food Legume Science(中国食用豆类学). Beijing: China Aquaculture Press, 1997. pp 173–195(in Chinese)
- [2] Wang S-M(王述民), Hu Y-K(胡英考), Hu J-P(胡家蓬). Study on genetic diversity of Adzuki bean (*Vigna angularis* Willd. Ohwi & Ohashi) germplasm based on RAPD markers. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2002, 3(1): 14–19(in Chinese with English abstract)
- [3] Jin W-L(金文林), Guo B(郭蓓), Wen Z-X(文自翔), Li N(李国), Pu S-J(濮绍京), Zhao B(赵波). Study on germplasm resources of wild Adzuki bean (*V. angularis* var. *nipponensis*) based on RAPD analysis. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2004, 19(2): 28–31(in Chinese with English abstract)
- [4] Jin W-L(金文林), Wen Z-X(文自翔), Pu S-J(濮绍京), Zhao B(赵波). Genetic diversity and evolution of Adzuki bean (*Vigna angularis*) germplasm resources based on RAPD markers. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2005, 38(2): 241–249(in Chinese with English abstract)
- [5] Mimura M, Yasuda K, Yamaguchi H. RAPD variation in wild, weedy and cultivated azuki beans in Asia. *Genet Resour Crop Evol*, 2000, 47: 603–610
- [6] Xu R Q, Tomooka N, Vaughan D A, Doi K. The *Vigna angularis* complex: Genetic variation and relationships revealed by RAPD analysis, and their implications for in situ conservation and domestication. *Genet Resour Crop Evol*, 2000, 47: 123–134
- [7] Wang S-M(王述民), Zhang C-H(张赤红). Genetic diversity of Adzuki bean (*Vigna angularis* Willd. Ohwi & Ohashi) germplasm revealed by AFLP markers. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2002, 3(3): 1–5(in Chinese with English abstract)
- [8] Zong X-X(宗绪晓), Vaughan D, Kaga A, Tomooka N, Wang X-W(王新望), Guan J-P(关建平), Wang S-M(王述民). Preliminary study on geographical distribution and evolutionary relationships between cultivated and wild Adzuki bean (*Vigna angularis* var. *angularis* and var. *nipponensis*) by AFLP analysis. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2003, 36(4): 367–374(in Chinese with English abstract)
- [9] Zong X-X(宗绪晓), Vaughan D, Kaga A, Tomooka N, Wang X-W(王新望), Guan J-P(关建平), Wang S-M(王述民). Genetic diversity in *Vigna angularis* revealed by AFLP analysis. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(4): 562–568(in Chinese with English abstract)
- [10] Su S-Q(粟生群), Rong T-Z(荣廷昭), She Y-H(余跃辉), Liu J(刘坚). Genetic diversity in cultivated azuki bean (*Vigna angularis* var. *angularis*) germplasm resources revealed by AFLP markers.

- J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 2005, 23(2): 156–162(in Chinese with English abstract)
- [11] Xu R Q, Tomooka N, Vaughan D A. AFLP markers for characterizing the Azuki bean complex. *Crop Sci*, 2000, 40: 808–815
- [12] Yoon M S, Lee J, Kim C Y, Baek H J. Genetic relationships among cultivated and wild *Vigna angularis* Willd. Ohwi et Ohashi and relatives from Korea based on AFLP markers. *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54: 875–883
- [13] Wang X W, Kaga A, Tomooka N, Vaughan D A. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in Adzuki bean (*Vigna angularis* Willd. Ohwi & Ohashi). *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 352–360
- [14] Li M-F(李明芳), Zheng X-Q(郑学勤). Research progress of methods of SSR primers development. *Hereditas* (遗传), 2004, 26(5): 769–776(in Chinese with English abstract)
- [15] Rod P, Simon G, Wes K, Michele M, Antoni R. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol*, 1998, 15: 1275–1287
- [16] Dikshit H K, Jhang T, Singh N K, Koundal K R, Bansal K C, Chandra N, Tickoo J L, Sharma T R. Genetic differentiation of *Vigna* species by RAPD, URP and SSR markers. *Biol Plant*, 2007, 51: 451–457
- [17] Xu N(徐宁), Cheng X-Z(程须珍), Wang S-H(王素华), Wang L-X(王丽侠), Zhao D(赵丹). Establishment of an Adzuki bean (*Vigna angularis*) core collection based on geographical distribution and phenotypic data in China. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(8): 1366–1373(in Chinese with English abstract)
- [18] Bassam B, Gaetano A J, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biol*, 1991, 196: 80–83
- [19] Van Toai T T, Peng J, Martin S. Optimization of silver staining AFLP technique for Soybean. *Soybean Genet Newsl*, 1996, 3: 206–209
- [20] Gwag J G, Chung J W, Chung H K, Lee J H, Ma K H, Dixit A, Park Y J, Cho E G, Kim T S, Lee S H. Characterization of new microsatellite markers in mungbean, *Vigna radiate* L. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6: 1–3
- [21] Kumar S V, Gtan S G, Quah S C, Yusoff K. Isolation and characterization of seven tetranucleotide microsatellite loci in mungbean, *Vigna radiate*. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2: 293–295
- [22] Li C D, Christian A F, Benjamin U, Singh B B, Scoles G J. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci*, 2001, 41: 189–197
- [23] Zhang X-Y(张晓燕). The gene pool tracing and genetic diversity assessment of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm resources from China. Ph.D Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007(in Chinese with English abstract)
- [24] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 3321–3323
- [25] Yeh F Y, Boyle R, Ye T, Mao Z. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31. Molecular Biology and Biotechnology Centre, Alberta: University of Alberta, 1997
- [26] Rohlf F. NTSYS-pc Numerical Taxonomy System, Exeter Publishing. NY: Setauket, 2002
- [27] Yu P(余萍), Li Z-C(李自超), Zhang H-L(张洪亮), Li D-Y(李道远), Wang M-X(王美兴), Sun J-L(孙俊立), Wang X-K(王象坤). Genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) by using SSR markers and phenotypic traits in Guangxi province. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2004, 31(9): 934–940(in Chinese with English abstract)
- [28] Zhou Y-Q(周延清). The Application of DNA Molecular Markers in Study on Plants (分子标记技术在植物研究中的应用). Beijing: Chemical Industry Press, 2005. pp 131–143 (in Chinese)
- [29] Chen J-F(陈军方), Ren Z-L(任正隆), Gao L-F(高丽锋), Jia J-Z(贾继增). Developing new SSR markers from EST of wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(2): 154–158(in Chinese with English abstract)
- [30] Liu C-Y(刘长友), Cheng X-Z(程须珍), Wang S-H(王素华), Wang L-X(王丽侠), Sun L(孙蕾), Mei L(梅丽), Xu N(徐宁). Screening of SSR and STS markers for genetic diversity analysis of mungbean germplasm. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源科学), 2007, 8(3): 298–302(in Chinese with English abstract)
- [31] Xu Y-H(徐雁鸿), Guan J-P(关建平), Zong X-X(宗绪晓). Genetic diversity analysis of cowpea germplasm resources by SSR. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(7): 1206–1209(in Chinese with English abstract)
- [32] Wang S-M(王述民). The Core Collection Establishment and Its Genetic Diversity Assessment and Classification of Adzuki Bean [*Vigna angularis* (Willd) Ohwi & Ohashi] Germplasm Resources. PhD Dissertation of China Agricultural University, 2001(in Chinese with English abstract)