

## \* 学术论文 \*

## 大豆属遗传多样性和进化关系\*

吴晓雷 贺超英 陈受宜\*\*

中国科学院遗传研究所植物生物技术实验室, 北京 100101

**摘要** 对大豆属中11个种的进化关系进行了研究. 结果表明, *Glycine* 亚属和 *Soja* 亚属的细胞质限制性酶切片长度多态性(RFLP)指纹图谱差异较大, 特别是 *Hind* III 的酶切指纹图谱, *Soja* 亚属的大多数材料的等位基因数比 *Glycine* 亚属的多. 利用30对简单重复序列(SSR)引物分析种间多样性表明, 不同位点在种间的等位基因数目不同, 为6~29, 平均每个位点15.9个, *Glycine* 亚属中种间的指纹图谱差异比 *Soja* 亚属中种间的大. 用10对扩增片段长度多态性(AFLP)引物组合检测的 AFLP 指纹图谱表明, AFLP 多态性为97.6%. 不同引物组合揭示多态的能力不同, *Glycine* 亚属特异带344条, *Soja* 亚属特异条带仅为61条. 对于不同种来说, 除了 *G. clandestina* 和 *G. soja* 外, 其他种都有种的特异带. 根据 RFLP, SSR 和 AFLP 分析的数据, 用 UPGMA 法构建了大豆属相关种的分子系统树, 并确立了半野生种 *G. gracilis* 的分类地位, 这对于栽培大豆种(*G. max*)的起源、进化和改良具有重要意义.

**关键词** 大豆属 亲缘关系 遗传多样性 进化

大豆属是豆科植物中最为重要的一个属, 大豆是重要的油料、饲料作物, 也是人类食用的植物蛋白的主要来源之一. 从植物分类上, 大豆属包括 *Glycine* 和 *Soja* 两个亚属. *Glycine* 亚属包括16个野生种, 而对于 *Soja* 亚属内的分类, 至今尚有不同观点. 一种认为应分为野生、半野生和栽培3个种<sup>[1]</sup>, 或者野生和栽培2个种<sup>[2]</sup>, 也有认为应归为1个种<sup>[3]</sup>. 大豆属种间的亲缘进化关系的阐明, 不仅有助于从理论上了解栽培大豆的进化和起源, 而且也有助于大豆基因组学的研究以及品种培育.

利用线粒体或叶绿体基因组的限制性酶切片长度多态性(RFLP)等分子标记, 研究植物物种的进化关系和起源, 已得到广泛地应用<sup>[4~6]</sup>. 大豆属的线粒体基因组的进化研究将 *Soja* 亚属的线粒体基因组类型分为4组<sup>[7,8]</sup>. 简单重复序列(SSR)标记由于具有简便、快速、稳定性高和等位基因多样性高等特点, 已经广泛地用于比较基因组研究<sup>[9]</sup>、遗传多样性分析<sup>[10~12]</sup>和系统学研究<sup>[9,13]</sup>. 已经证明, SSR 引物不仅在同一属内的不同种间能扩增重复序列, 而且在同一科不同属的物种间也能扩增出重复序列<sup>[9,12,13]</sup>. Peakall 等<sup>[14]</sup>通过比较31对引物在大豆野生种和其他豆科植物中 SSR 位点, 认为65%的大豆引物在 *Glycine* 属中都能扩增出 SSR, 尽

2000-11-24 收稿, 2001-01-12 收修改稿

\* 国家重点基础发展规划研究资助项目 (G1998010208)

\*\* 联系人, E-mail: sychen@genetics.ac.cn

管扩增出的序列较短. Powell 等<sup>[15]</sup>认为大豆 SSR 是复等位的. 扩增片段长度多态性(AFLP)标记是基于 PCR 反应的一种高效的选择性扩增限制性内切酶片段的标记系统, 由于每次反应可以检测多个位点, 在很多植物中, 已广泛地应用于遗传多样性和进化关系的研究<sup>[15-22]</sup>.

本文利用 4 个细胞器 DNA 探针, 30 对 SSR 引物和 10 对 AFLP 引物, 分别分析了大豆属 11 个种的 RFLP, SSR 和 AFLP 指纹图谱, 确立了遗传多样性及进化关系, 并对大豆近缘野生种的分类地位进行了探讨.

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

共分析了大豆属的 11 个种 37 份材料(表 1). 多年野生种由吉林省农业科学研究所大豆研究所提供, 近缘野生种 *G. soja* 和 *G. gracilis* 由中国农业科学院作物品种资源研究所提供.

表 1 植物材料

种	收集号	染色体数	来源	编号 <sup>a)</sup>	种	收集号	染色体数	来源	编号 <sup>a)</sup>
大豆亚属						Y0100	40	中国	20
<i>G. argyrea</i>	PW0004	40	澳大利亚	2	<i>G. gracilis</i>	Y0043	40	中国	21
<i>G. canescens</i>	PW0008	40	澳大利亚	3		Y0073	40	中国	22
	PW0006	?	澳大利亚	4		Y0074	40	中国	23
<i>G. clandestina</i>	PW0012	40	澳大利亚	5		Y0146	40	中国	24
<i>G. cyrtoloba</i>	PW0021	40	澳大利亚	6	<i>G. max</i>	科丰 1 号	40	中国	25
<i>G. falcata</i>	PD0030	40	澳大利亚	7		南农 1138-2	40	中国	26
<i>G. latifolia</i>	PW0031	40	澳大利亚	8		早熟 18 号	40	中国	27
<i>G. tabacina</i>	PD0005	40	澳大利亚	9		94-12	40	中国	28
	PD0021	80	澳大利亚	10		科丰 34	40	中国	29
	PD0042-3	?	中国	11		科丰 6 号	40	中国	30
<i>G. tomentella</i>	PW0049	38	澳大利亚	12		豫豆 2 号	40	中国	31
	PW0052	40	澳大利亚	13		鲁豆 4 号	40	中国	32
	PW0054	78	澳大利亚	14		五叶	40	中国	33
	PW0060	80	中国福建	15		新科 3 号	40	中国	34
	PW0063	?	澳大利亚	16		中野 1 号	40	中国	35
黄豆亚属						长农 4	40	中国	1
<i>G. soja</i>	Y0047	40	中国	17		东农 410	40	中国	36
	Y0049	40	中国	18		东农 40566	40	中国	37
	Y0069	40	中国	19					

a) 植物材料的编号

### 1.2 基因组 DNA 提取

对于每份种质材料, 从 5 株幼苗上摘取相同数量的叶片, 参照 Chen 等的<sup>[21]</sup>方法提取亲本及群体的总 DNA.

### 1.3 RFLP 分析

用揭示多态能力较强的 4 种限制性内切酶 *EcoR* I, *EcoR* V, *Hind* III, *Taq* I 酶切总基因组 DNA. Southern 转移和分子杂交等操作程序参照 Chen 等人<sup>[21]</sup>方法进行. 选择了 4 个来源于胞质的 DNA 作探针, 它们分别是 *atp6*, *L1*, *L6* 和 *L39*, 均由本实验室克隆. 其中 *atp6* 是全

长的线粒体 ATP 合成酶第 6 亚基编码基因<sup>[23]</sup>, L1、L6 和 L39 则来自大豆基因组文库. L6 是线粒体中编码 NADH 辅酶 Q 氧化还原酶第 5 亚单位基因的部分序列,该蛋白与 *Vicia faba* 的核苷酸序列有 93% 的同源性<sup>[24]</sup>. L39 是叶绿体中编码核糖体组蛋白大亚单位 14 (*rhl14*) 基因的一部分,与 *Phaseolus vulgaris* 中 *rhl14* 的核苷酸序列有 85% 的同源性<sup>[25]</sup>. L1 的序列尚未确定.

#### 1.4 SSR 分析

SSR 引物是按照 SoyBase 网址(<http://129.186.26.94>)上提供的大豆微卫星序列合成;PCR 参照 SoyBase 的条件进行.

#### 1.5 AFLP 分析

采用 GIBCOBRL 公司的 AFLP™ Analysis System I 试剂盒,内切酶为 *EcoR* I 和 *Mse* I. 随机选用 10 对引物组合.

#### 1.6 数据处理

假设每个 RFLP 探针或 SSR 和 AFLP 引物仅检测 1 个位点,每个多态性条带为 1 个等位基因,以 1 和 0 记录等位基因的有和无,获得矩阵,分别计算以下参数:平均每个位点的等位基因数  $A = \sum_{i=1}^n A_i/n$ , 其中  $A_i$  为第  $i$  个位点上的等位基因数,  $n$  为检测的位点总数;基因多样性的确定:根据公式  $PD = 1 - 1/n \sum P_i^2$ , 其中  $P_i$  是指第  $i$  个等位基因出现的频率,  $n$  是指等位基因的数目.

根据 Nei 和 Li<sup>[22]</sup>的公式计算相似系数( $S_{ij}$ )和遗传距离( $GD_{ij}$ ),  $S_{ij} = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ ,  $GD_{ij} = 1 - S_{ij}$ ,  $N_{ij}$ 是指材料  $i$  和  $j$  之间共同的等位基因. ( $N_i + N_j$ )是两个材料所有的等位基因数目. 用 MVSP(3.1 版)软件进行主成分分析和聚类分析,用 UPGMA(unweighted pair-group mean average)法构建大豆属 11 个种的分子系统树.

## 2 结果与分析

### 2.1 种间遗传多样性分析

**2.1.1 细胞质遗传的 RFLP 指纹图谱** 为了明确大豆相关种间细胞器遗传多样性和进化的关系,利用选择的 4 个探针 *atp6*, L1, L6 和 L39 对大豆基因组 DNA 进行 RFLP 分析. 结果表明它们在“科丰 1 号”和“南农 1138-2”两个亲本间 6 种限制性内切酶的酶切片段中,至少有 1 种酶的酶切片段呈现多态,并且在具 201 个株系的重组近交系中呈现细胞器遗传物质传递的独特特征即母系遗传. 利用上述的 4 个细胞器 RFLP 探针,与 *EcoR* I, *EcoR* V, *Hind* III 和 *Taq* I 4 种内切酶组合,从 11 个种 28 份材料中共检测了 15 个 RFLP 位点,118 个等位基因和 921 个 RFLP 条带. 从平均每个位点的等位基因数来看,不同种间每个位点产生的等位基因数差别较大(图 1),*Soja* 亚属的大多数材料的等位基因数比 *Glycine* 亚属的多,特别是 *Hind* III 的酶切条带数. 这可能是由于某个基因中 *Hind* III 酶切位点发生突变或者是基因拷贝数不同所致. 不同探针所揭示的多态性是不同的,*atp6* 探针和 4 种酶切组合产生 44 条 RFLP 带,将 28 个品系分为 18 种类型. L6 探针产生 31 条带,出现 20 种带型. L39 探针仅产生 13 条带,有 8 种带型. L1 探针产生 30 条带,有 18 种带型. 根据不同种的 RFLP 的带型矩阵,通过 MVSP 软件分析,获得 11 个种的相似性和遗传距离(表 2),遗传距离最小值为 0.077,最大值为 0.798,平均为 0.525.

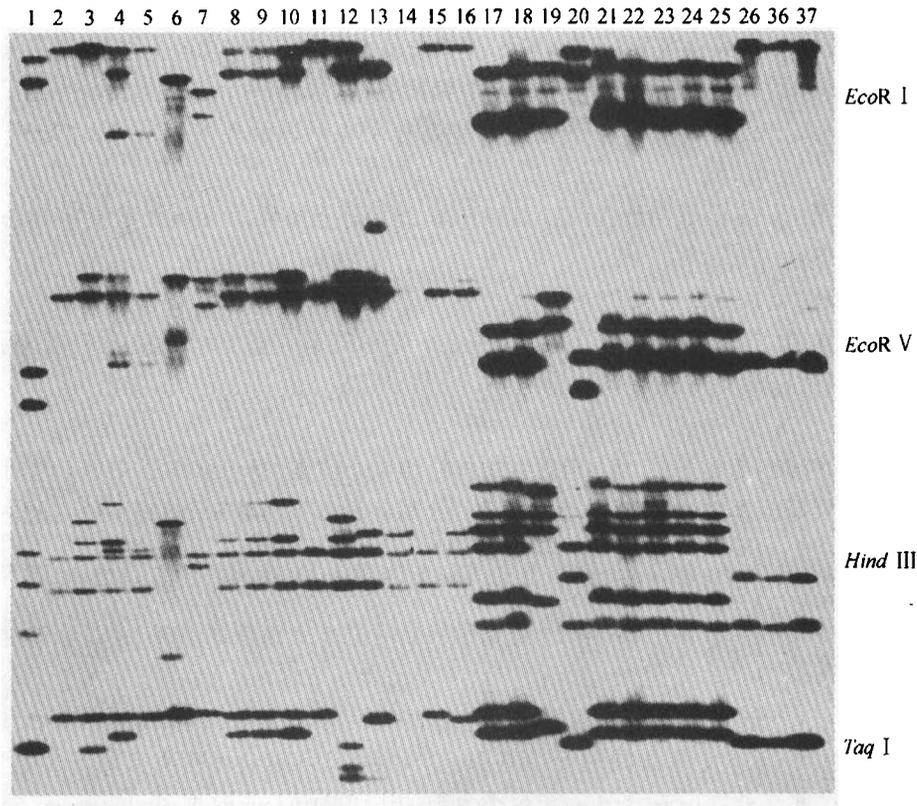


图 1 *atp6* 在大豆属 11 个种中的 RFLP 指纹图谱  
1~37 为植物材料的编号(同表 1)

表 2 根据 RFLP 分析的 11 个种间的相似性(下)和遗传距离(上)

种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	<i>G. arg</i>	<i>G. cla</i>	<i>G. cyr</i>	<i>G. fal</i>	<i>G. lat</i>	<i>G. can</i>	<i>G. tab</i>	<i>G. tom</i>	<i>G. soja</i>	<i>G. gra</i>	<i>G. max</i>
1	1.000	0.222	0.551	0.333	0.269	0.333	0.228	0.290	0.667	0.634	0.625
2	0.778	1.000	0.593	0.406	0.387	0.184	0.343	0.361	0.596	0.580	0.533
3	0.449	0.407	1.000	0.593	0.509	0.606	0.548	0.612	0.798	0.789	0.835
4	0.667	0.594	0.407	1.000	0.355	0.447	0.313	0.417	0.596	0.654	0.622
5	0.731	0.613	0.491	0.645	1.000	0.270	0.077	0.314	0.674	0.671	0.681
6	0.667	0.816	0.394	0.553	0.730	1.000	0.215	0.333	0.566	0.548	0.490
7	0.772	0.657	0.452	0.687	0.923	0.785	1.000	0.280	0.629	0.643	0.613
8	0.710	0.639	0.388	0.583	0.686	0.667	0.720	1.000	0.549	0.573	0.531
9	0.333	0.404	0.202	0.404	0.326	0.434	0.371	0.451	1.000	0.225	0.183
10	0.366	0.420	0.211	0.346	0.329	0.452	0.357	0.427	0.775	1.000	0.234
11	0.375	0.467	0.165	0.378	0.318	0.510	0.387	0.469	0.817	0.766	1.000

**2.1.1.2 SSR 指纹图谱** 为了充分展示位于不同染色体上的 SSR 位点在种间进化的表现,在不同的连锁群上选择了 30 对 SSR 引物,进行 PCR 扩增. 从实验结果来看(表 3),所有 SSR 位点

都是多态的,30 个位点共产生 477 个等位基因. 不同位点在种间的等位基因数目为 6~29,平均每个位点 15.9 个. 由此看出,用 SSR 标记揭示大豆不同种的遗传多样性效率是比较高的. 从 SSR 指纹图谱可以看出, *Glycine* 亚属中种间的指纹图谱差异比 *Soja* 亚属中种间的指纹图谱差异大(图 2). 这一结果与惠东威等<sup>[3]</sup>的结果是一致的.

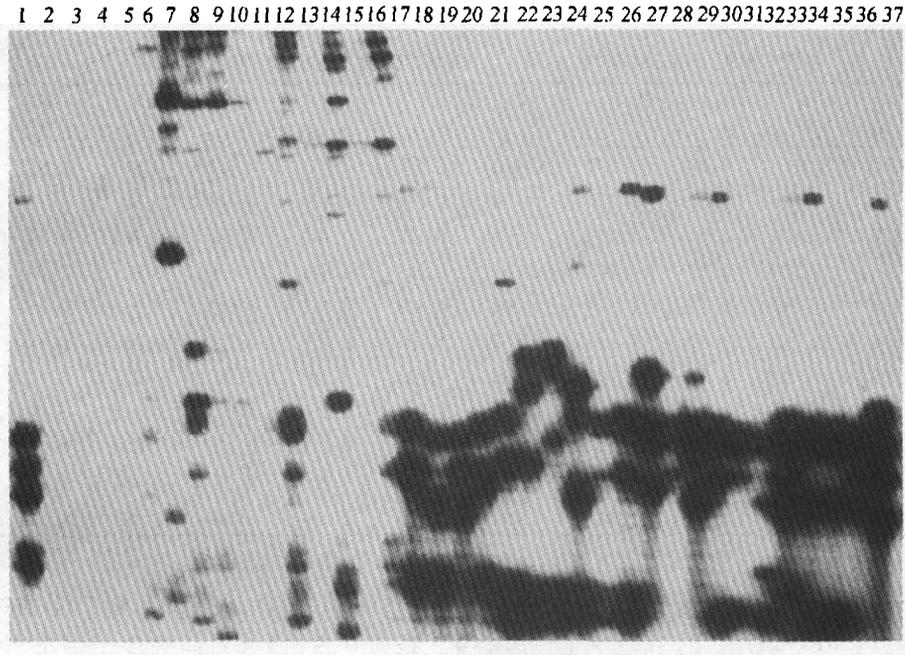


图 2 SSR 引物 Satt012 在大豆属 11 个种中的扩增带型  
1~37 为植物材料的编号(同表 1)

表 3 大豆(*G. max*)SSR 位点和基因多样性

位点	连锁群	等位基因数	基因多样性	位点	连锁群	等位基因数	基因多样性
ABAB	N	24	0.941	Satt049	I	10	0.810
HSP176	F	13	0.817	Satt095	D1b + W	15	0.895
GPATR	C1	12	0.856	Satt152	N	24	0.940
GMGLPS12	I	24	0.924	Satt159	N	18	0.910
LBC	O	6	0.712	Satt180	C1	17	0.900
GMRUBP	F	20	0.899	Satt182	L	11	0.878
Sat_009	B2	11	0.863	Satt431	J	20	0.938
Sat_022	D2	12	0.872	Satt045	E	10	0.874
Sat_033	N	9	0.845	Satt200	A1	17	0.916
Sat_036	D1a + Q	13	0.886	Satt302	H	10	0.782
Sat_039	F	20	0.909	Satt316	C2	10	0.855
Sat_043	K	20	0.917	Satt409	A2	22	0.922
Sct_026	B1	8	0.787	Satt436	D1a + Q	16	0.910
Satt002	D2	10	0.865	Satt463	M	25	0.924
Satt012	G	29	0.943	Satt408	D1a + Q	21	0.926

种间的遗传距离分析表明:总体上 *Glycine* 亚属内种间的遗传距离大于 *Soja* 亚属内种间的遗传距离,但也有一些例外(表 4). 其原因可能与栽培大豆或近缘野生种在进化过程中,由于受到人为选择压力的影响,使遗传距离减小. 另外, *Glycine* 亚属中的 *G. cyrtoloba* 与 *G. max* 遗传距离最近,而 *G. canescens* 与 *G. max* 遗传距离最远.

表 4 根据 SSR 分析的大豆属 11 个种间的遗传距离(上)和相似系数(下)

种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	<i>G. arg</i>	<i>G. da</i>	<i>G. cyr</i>	<i>G. fal</i>	<i>G. lat</i>	<i>G. can</i>	<i>G. tab</i>	<i>G. tom</i>	<i>G. soja</i>	<i>G. gra</i>	<i>G. max</i>
1	1.000	0.633	0.850	0.797	0.860	0.792	0.760	0.719	0.810	0.813	0.846
2	0.367	1.000	0.729	0.789	0.774	0.239	0.679	0.728	0.809	0.779	0.793
3	0.150	0.271	1.000	0.770	0.674	0.172	0.743	0.737	0.729	0.745	0.748
4	0.203	0.211	0.230	1.000	0.658	0.183	0.678	0.695	0.825	0.790	0.823
5	0.140	0.226	0.326	0.342	1.000	0.319	0.462	0.672	0.765	0.769	0.768
6	0.208	0.761	0.828	0.817	0.681	1.000	0.667	0.795	0.886	0.851	0.881
7	0.240	0.321	0.257	0.322	0.538	0.333	1.000	0.682	0.823	0.776	0.800
8	0.281	0.272	0.263	0.305	0.328	0.205	0.318	1.000	0.814	0.811	0.819
9	0.190	0.191	0.271	0.175	0.235	0.114	0.177	0.186	1.000	0.592	0.518
10	0.187	0.221	0.255	0.210	0.231	0.149	0.224	0.189	0.408	1.000	0.631
11	0.154	0.207	0.252	0.177	0.232	0.119	0.200	0.181	0.482	0.369	1.000

**2.1.3 AFLP 标记指纹图谱** 11 个种 37 份材料的 AFLP 指纹(图 3)分析结果为共扩增出 925 条长度为 40 ~ 400 bp 的 DNA 片段,其中 903 条带在 37 份材料间表现出多态,多态性为 97.6% (表 5). 不同引物组合揭示多态的能力不同,在 *Glycine* 和 *Soja* 亚属间,引物 EAAC/MCAT 的多态性为 20.6%,而 EACC/MCTC 的多态性为 70.3%. *Glycine* 亚属特异带 344 条, *Soja* 亚属仅为 61 条. 对于不同种来说,除了 *G. clandestina* 和 *G. soja* 外,其他种都有种的特异带. 根据 AFLP 的带型分析结果进行遗传距离和相似性分析(表 6)表明, *Soja* 亚属内种间遗传距离近,相似性程度较高,而 *Glycine* 亚属中各个种间的遗传距离较远.

表 5 不同引物组合在大豆属和亚属中的多态性

引物组合	总条带	呈多态条带数	多态性/%	<i>Glycine</i> 亚属特异带	<i>Soja</i> 亚属特异带	两亚属共享带	多态性/%
EAAC/MCAT	102	102	100	21	0	81	20.6
EACC/MCTG	107	105	98.1	55	4	48	55.1
EACC/MCAA	112	106	94.6	28	5	79	29.5
EACC/MCTA	125	125	100	53	16	56	55.2
EACC/MCTC	111	109	98.2	69	9	33	70.3
EAAG/MCTT	72	66	91.7	17	1	54	25.0
EAAG/MCTA	121	116	95.9	26	2	98	23.1
EAGC/MCTG	116	116	100	59	12	45	61.2
EACA/MCAC	59	58	98.3	16	12	31	47.5
合计	925	903	97.6	344	61	520	43.8

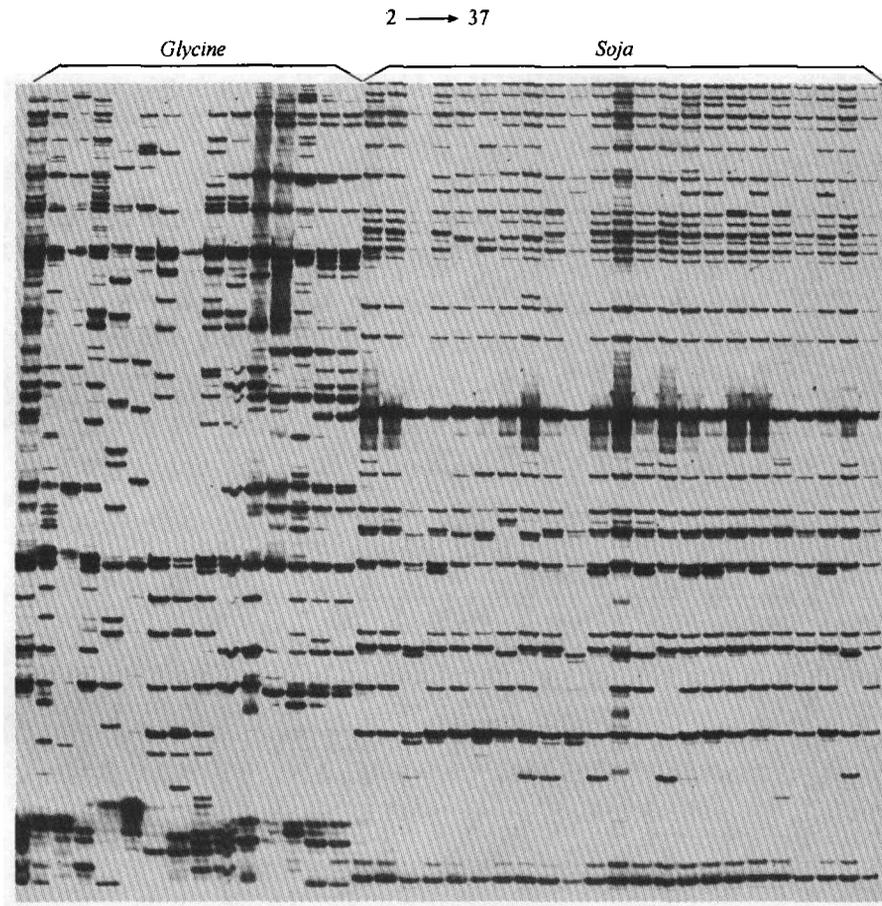


图 3 引物 E-AGC/M-CTG 在大豆属 11 个种中的 AFLP 带型  
2~37 为植物材料的编号(顺序同表 1)

表 6 根据 AFLP 分析的大豆属 11 个种间的遗传距离(上)和相似系数(下)

种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	<i>G. arg</i>	<i>G. cla</i>	<i>G. cyr</i>	<i>G. fal</i>	<i>G. lat</i>	<i>G. can</i>	<i>G. tab</i>	<i>G. tom</i>	<i>G. soja</i>	<i>G. gra</i>	<i>G. max</i>
1	1.000	0.386	0.560	0.542	0.483	0.508	0.305	0.323	0.517	0.504	0.489
2	0.614	1.000	0.611	0.596	0.565	0.530	0.404	0.471	0.598	0.601	0.588
3	0.440	0.389	1.000	0.545	0.548	0.574	0.537	0.535	0.579	0.582	0.550
4	0.458	0.404	0.455	1.000	0.525	0.603	0.466	0.510	0.551	0.541	0.535
5	0.517	0.435	0.452	0.475	1.000	0.586	0.329	0.461	0.553	0.562	0.523
6	0.492	0.470	0.426	0.397	0.414	1.000	0.455	0.428	0.516	0.534	0.507
7	0.695	0.596	0.463	0.534	0.671	0.545	1.000	0.289	0.472	0.467	0.411
8	0.677	0.529	0.465	0.490	0.539	0.572	0.711	1.000	0.437	0.430	0.385
9	0.483	0.402	0.421	0.449	0.447	0.484	0.528	0.563	1.000	0.110	0.133
10	0.496	0.399	0.418	0.459	0.438	0.466	0.533	0.570	0.890	1.000	0.165
11	0.511	0.412	0.450	0.465	0.477	0.493	0.589	0.615	0.867	0.835	1.000

根据 RFLP 分析数据计算的遗传距离与根据 SSR 分析数据计算的遗传距离的相关系数为 0.515, 与 AFLP 的相关系数为 0.583, SSR 与 AFLP 之间的相关系数为 0.644. 这说明 RFLP 标记反映的细胞质的进化关系与基因组的不同, 另外 SSR 标记与 AFLP 标记揭示的是基因组的不同部位.

## 2.2 聚类分析

通过 UPGMA 方法, 利用相似系数矩阵和 RFLP, SSR 和 AFLP 3 种分子标记对 37 个品种 (或品系) 进行聚类分析 (图 4) 表明, 来自 11 个种的不同品种 (或品系) 可被分为 3 个组: 第 1 组为 *Glycine* 亚属的 *G. canescens* 种的 PW06; 第 2 组由 *Soja* 亚属的 3 个种组成; 第 3 组由 *Glycine* 亚属中另外 7 个种组成. 在 *Soja* 亚属中, 又可分为 3 个亚组: 第 1 亚组由科丰 1 号和南农 1138-2 组成; 第 2 亚组为 *G. max* 种的其他试材; 第 3 亚组由 *G. soja* 和 *G. gracilis* 两个种组成. 第 3 组又可分为 5 个亚组: 第 1 亚组为 *G. cyrtoloba*; 第 2 亚组为 *G. tabacina* 和 *G. latifolia*; 第 3 亚组为 *G. falcata*; 第 4 亚组为 *G. tomentella* 和 *G. canescens* 种中 PW08; 第 5 亚组为 *G. clandestina*, *G. argyrea* 和 *G. tabacina* 种中的 PD42-3 组成.

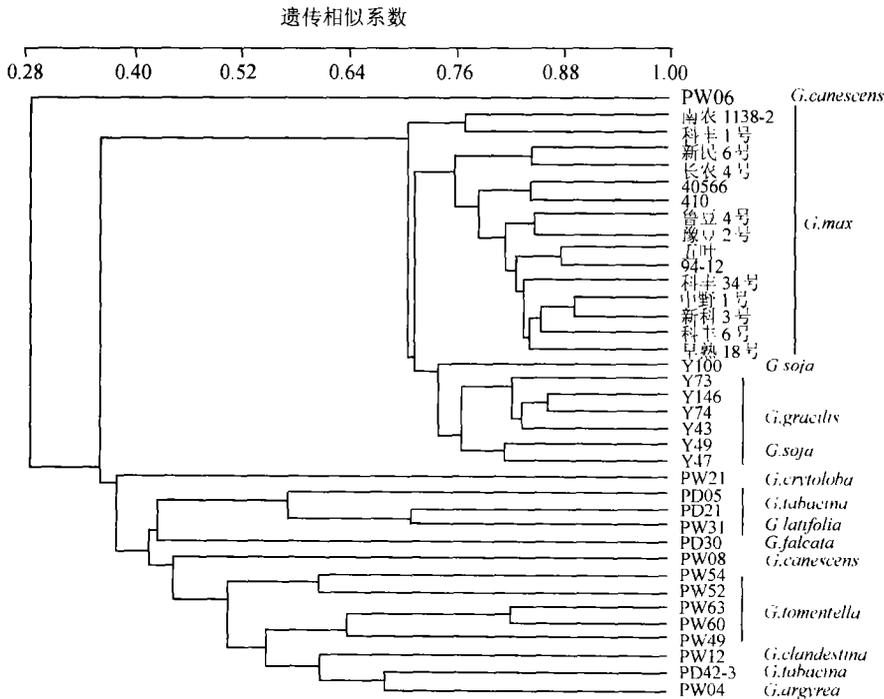


图 4 根据 RFLP, SSR 和 AFLP 分析的数据构建的大豆属 11 个种分子系统树

## 3 讨论

### 3.1 *G. gracilis* 种的分类地位

大豆属由 *Glycine* 和 *Soja* 两个亚属组成<sup>[2]</sup>. 由于 *Soja* 亚属内不存在种间杂交障碍, 所以关于 *Soja* 亚属内 *G. max*, *G. gracilis* 和 *G. soja* 3 个种的分类地位一直存在争议. 一般认为 *Soja*

亚属是由 *G. max* 和 *G. soja* 两个种组成, *G. gracilis* 并不是一个独立的种, 其中的半野生型属于 *G. soja*, 半栽培型属于 *G. max*<sup>[1]</sup>. 本实验室惠东威等<sup>[3,26]</sup>和庄炳昌等<sup>[27]</sup>根据 RAPD 和 ITS1 的分析结果, 认为 *Soja* 亚属内 3 个种应为一个种, 这与本文结果不同. 一般认为 RAPD 分析较适宜于种内分析而仅比较单一一位点 rRNA 基因的 IST1 序列又有相当的局限性, 因此所得到的结果难以反映全貌.

本文结果表明, *Soja* 亚属种间遗传距离相对于 *Glycine* 亚属内的种间遗传距离明显低, 但是在树型图中 *Soja* 亚属 3 个种的界限还是比较明显的, 因此看来这 3 个种是独立存在的. 当然, 在每个种内也存在着不同的进化类型, 如 *Soja* 亚属的 Y100, 虽然为蔓生型, 但从叶片形态特征和结荚特性等方面更接近于栽培大豆.

### 3.2 大豆属种间遗传多样性

揭示大豆种间遗传多样性是研究种间亲缘关系的基础, Kanazawa 等<sup>[7]</sup>根据栽培大豆和野生大豆线粒体 DNA 的 RFLP 将 *Soja* 亚属的细胞质分为 4 种类型. Kato 等<sup>[8]</sup>阐明 *Soja* 亚属中 *G. soja* 种的含有 *atp6* 的 mtDNA 片段在 3' 端下游和 5' 端上游都有结构变异, 这种变异是重组造成的. 这些结果说明大豆属种间的细胞质基因组遗传变异水平比较高. 本文结果表明, 大豆种间在线粒体和叶绿体基因组结构上都有不同程度的变异, 特别是 *Glycine* 亚属内种间的变异更大.

通过 SSR 标记技术检测的大豆属的基因组多态性很强, 这对研究栽培大豆的起源以及系统进化具有重要的意义, 特别是对大豆属种间比较基因组学的研究更有价值, 还为有效地发掘和利用野生大豆丰富的有利基因资源提供了理论依据. 本研究结果显示, 在 37 份材料中, 每个位点检测到的等位基因数为 6~29, 平均为 15.7 个等位基因, 这一结果与 Maughan 等<sup>[17]</sup>的结果是一致的. 所以大豆属种间 SSR 多态性明显高于 RFLP 标记以及线粒体 DNA 和叶绿体 DNA 的多态性. *Glycine* 亚属存在大量等位基因, *Soja* 亚属在基因多样性和等位基因数方面均较大程度的减少, *Soja* 亚属的等位基因数仅为 *Glycine* 亚属的 71.5%, 说明 *Soja* 亚属在进化过程中发生了基因丢失, 这可能是造成栽培大豆 (*G. max*) 遗传基础狭窄的主要原因之一, 所以从野生资源中发掘有利基因具有巨大潜力.

AFLP 标记对揭示大豆属种间多态性效率比较高, 平均每对引物可以扩增 93 条带, AFLP 每个引物所揭示的位点数比 RFLP 效率高几倍. 虽然利用 AFLP 研究大豆遗传多样性方面的报道很少, 但是 AFLP 作为 DNA 指纹标记已经广泛地应用在生物多样性或遗传多样性研究中, 如水稻<sup>[28]</sup>、橄榄<sup>[29]</sup>等. AFLP 的另一特点是几个引物产生的位点基本上可以覆盖整个基因组, 所以在研究整个基因组在种间的进化关系上具有独特优势. 通过利用 AFLP 技术, 我们获得的结果表明, 总体上 *Soja* 亚属种间遗传距离明显低于 *Glycine* 亚属的种间遗传距离, 证明了这两个亚属的分类界限是很明显的. 同样, *Glycine* 亚属的 AFLP 特异位点明显高于 *Soja* 亚属的特异性位点, 这充分说明了 *Glycine* 亚属具有丰富的遗传多样性.

大豆种间亲缘关系的建立是对形态学、细胞学、生物化学、分子生物和遗传学以及地理分布等数据的综合反映, 本文构建的大豆属 11 个种的进化关系, 仅是从 DNA 分子水平上揭示种间的亲缘关系.

**致谢** 感谢吉林省农业科学研究院大豆研究所庄炳昌先生和中国农业科学院作物所

种资源研究所王克晶先生提供的野生资源以及遗传所大豆育种课题组朱保葛先生提供的部分栽培大豆品种资源。

### 参 考 文 献

- 1 庄炳昌. 中国野生大豆生物学研究. 北京: 科学出版社, 1999
- 2 Hymowitz T, et al. Taxonomy and speciation. In: Soybeans Improvement, Production and Uses, 2nd ed. American Society of Agronomy Monograph 16, Madison, Wisconsin, 1987, 23
- 3 惠东威, 等. RAPD 重建的大豆属植物的亲缘关系. 遗传学报, 1996, 23(6): 460
- 4 Palacios C, et al. Study of the evolutionary relationships among Limonium species (*Plumbaginaceae*) using nuclear and cytoplasmic molecular markers. Mol Phylogenet Evol, 2000, 14(2): 232
- 5 Parfitt D E, et al. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(15): 7987
- 6 Abe T, et al. Phylogenetic relationships in the genus *Oryza* based on mitochondrial RFLPs. Genes Genet Syst, 1999, 74(1): 23
- 7 Kanazawa A, et al. Phylogenetic relationships of the mitochondrial genomes in the genus *Glycine* subgenus *Soja*. Genes Genet Syst, 1998, 73(4): 255
- 8 Kato S, et al. Evolutionary changes in the structures of the *cox2* and *atp6* loci in the mitochondrial genome of soybean involving recombination across small interspersed sequences. Curr Genet, 1998, 34(4): 303
- 9 Dayanandan S, et al. Conservation of microsatellites among tropical tree (*Leguminosae*). American Journal of Botany, 1997, 84(12): 1658
- 10 F-japonica, et al. Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species. Theor Appl Genet, 1999, 99(1~2): 11
- 11 Perera L, et al. Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut. Genome, 2000, 43(1): 15
- 12 Primmer C R, et al. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. Mol Biol Evol, 1998, (8): 997
- 13 Cuadrado A, et al. The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. Chromosoma, 1998, 107(8): 587
- 14 Peakall R, et al. 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(10): 1275
- 15 Powell W, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breeding, 1996, 2: 225
- 16 Hill M, et al. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca spp.* Theor Appl Genet, 1996, 93: 1202
- 17 Maughan P J, et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: Species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. Theor Appl Genet, 1996, 93: 392
- 18 Sharma S K, et al. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. Theor Appl Genet, 1996, 93: 751
- 19 Tohme J, et al. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. Crop Sci, 1996, 36: 1375
- 20 Pakniyat H, et al. AFLP variation in wild barley (*Hordeum vulgare* C. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. Genome, 1997, 40: 332
- 21 Chen S Y, et al. Molecular biological identification of a rice salt tolerant line. Acta Bot Sin, 1991, 33: 569
- 22 Nei M, et al. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Nat Acad Sci USA, 1979, 76: 5256
- 23 He C Y, et al. Isolation and characterization of a mitochondrial *atp6* gene from soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Acta Bot Sin, 2001, 43(1): 51
- 24 Scheepers DGJM, et al. Variant mitochondrial transcripts of a broad bean line are associated with two point mutations located upstream of *nad5* exon. Plant Sci, 1997, 129: 203
- 25 Carelse O, et al. The common bean chloroplast *trnH* (GUG) gene and its eukaryotic putative promoter elements. Nucleic Acids Res, 1992, 20 (20): 5481
- 26 惠东威, 等. 利用 rRNA 基因 ITS-1 序列构建大豆属 (*Glycine*) 几个种的种系关系. 中国科学, C 辑, 1997, 27(4): 327
- 27 庄炳昌, 等. 中国不同纬度不同进化类型大豆的 RAPD 分析. 科学通报, 1994, 39(23): 2178
- 28 Zhu J, et al. AFLP markers for the study of rice biodiversity. Theor Appl Genet, 1998, 96: 602
- 29 Angiolillo A, et al. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. Theor Appl Genet, 1999, 98: 411