

研究
简报

豇豆种质资源 SSR 标记遗传多样性分析

徐雁鸿 关建平 宗绪晓*

(中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081)

摘要: 从 46 对备选的豇豆 SSR 引物中鉴定筛选出扩增带单一、稳定清晰且多态性强的 13 对引物。用这 13 对引物, 对来自中国、非洲和亚洲其他国家的共 316 份栽培豇豆 [*Vigna unguiculata* (Linn) Walp.] 资源的 DNA 进行 SSR 扩增, 以研究其遗传多样性。结果共检测到 47 个等位位点, 平均每对引物扩增出 3.692 个等位位点, 有效等位基因平均 2.003 个; 5 对 SSR 引物 VM16、VM26、VM20、VM25 和 VM23, 对于检测豇豆遗传变异最为有效。UPGMA 聚类图显示, 13 对 SSR 引物即能将其中的 260 份参试资源区分开, 其中国内、外资源差异明显, 被划为 2 大类群; 国内资源类群又可分为与地理来源的气候生态区明显关联的 2 个北方组群、4 个南方组群和 2 个混合组群, 8 个组群间相对独立又相互渗透; 国内育种高代材料的遗传多样性狭窄。

关键词: 豇豆; SSR; 聚类分析; 遗传多样性

Genetic Diversity Analysis of Cowpea Germplasm Resources by SSR

XU Yan-Hong, GUAN Jian-Ping, and ZONG Xu-Xiao*

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China)

Abstract: Thirteen reproducible and informative SSR primer pairs were selected from the 46 candidates. A representative set of 316 cowpea genetic resources from China, Africa and other countries of Asia, were analyzed by SSR methodology using these informative primer pairs. A total of 47 alleles were detected with an average of 3.692 alleles per SSR primer pair, and on an average 2.003 alleles from each SSR primer pair were effective. According to integrated evaluation, five SSR primer pairs, VM16, VM26, VM20, VM25, and VM23, were most effective for genetic diversity studies of cowpea. The dendrogram by UPGMA cluster analysis showed that 260 accessions of the 316 were distinct and revealed enough genetic diversity for identification and classification of accessions within *Vigna unguiculata*. There was a clear difference between foreign and Chinese genetic resources. Within Chinese accessions, 8 distinct groups including two northern groups, four southern groups and two complex groups, were detected, indicating that the Chinese breeding lines have a narrow genetic background.

Keywords: Pigeonpea; SSR; Cluster analysis; Genetic diversity

豇豆 [*Vigna unguiculata* (Linn) Walp.] 起源于非洲, 中国是豇豆的次级起源中心之一^[1-2]。2005 年全世界豇豆栽培面积 10 457 000 hm², 总产 3 697 000 t, 仅次于菜豆、鹰嘴豆, 在全部 20 多种食用豆类作物中排第 3 位^[3]。豇豆是世界上主要的食用豆类作物, 也是我国六大食用豆类作物之一, 我国共收集保存豇豆种质资源 4 700 余份^[1-2], 但尚未进行深入系统的遗传多样性分析。全面了解栽培资源的遗传多样性, 是豇豆资源研究的重要目标, 研究结果不仅有助于豇豆资源保护, 更有助于杂交组合选配以提高豇豆育种效率。

国内外已有基于形态学特征^[4]、生理学特性^[5]、同工酶^[13-14]、种子储藏蛋白^[6]、叶绿体 DNA^[7] 多态性、DNA 限制性片段长度多态性 (RFLP)^[8] 等豇豆遗传多样性研究。之前国内曾主要采用形态学^[9]、同工酶^[10-11]、数值分类、RAPD^[12] 等方法进行豇豆栽培资源的聚类分析。何礼^[12] 对我国 76 份长豇豆品种进行 RAPD 分析表明, 我国长豇豆资源的遗传多样性很低。国外则应用 RAPD^[15]、AFLP^[16]、SSR^[17] 等技术对多年生和一年生豇豆、野生豇豆和栽培豇豆资源进行研究。其中, Li^[17] 等 2001 年利用 27 对 SSR 引物对 90 份豇豆品系的

基金项目: CGIAR Generation Challenge Program; 科技部植物种质资源共享平台建设项目 (2003DEA3N024-07)

作者简介: 徐雁鸿 (1975-), 女, 硕士研究生, 主要从事豇豆种质资源研究。

* 通讯作者 (Corresponding author): 宗绪晓 (1964-), 男, 研究员, 主要从事食用豆类资源研究与遗传改良工作。Tel: 010-62186651;

E-mail: zongxx@mail.caas.net.cn

Received (收稿日期): 2006-09-01; Accepted (接受日期): 2006-12-20.

遗传相似性进行研究,表明微卫星标记在豇豆中的多态性较高,能够区分豇豆品系和确定系谱范围。国内外从 DNA 水平对豇豆种质资源遗传多样性进行的研究主要集中在种、亚种分类上,迄今我国尚无针对豇豆栽培资源的 SSR 遗传多样性研究报道。

本研究拟在豇豆 SSR 引物鉴别、评价和筛选的基础上,利用 SSR 标记揭示豇豆栽培种质的遗传多样性,以分析其本身的遗传多样性分布特点及与地理来源间的关系,从而有助于国内外豇豆资源的收集、研究和育种工作。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

来自 12 个省区的 294 份国内豇豆栽培资源,其中北方 7 省区(北京、内蒙古、辽宁、吉林、黑龙江、山西和河南)的 117 份,南方 5 省区(江苏、湖北、湖南、安徽和广西)的 162 份,高代材料 15 份;以及来自非洲、菲律宾、土耳其和日本的 22 份国外豇豆栽培资源,共计 316 份。采用稍作修改后的 CTAB 法^[18]提取基因组 DNA,溶于 $0.1 \times TE$ 溶液。

1.2 SSR 引物与统计分析

46 对备选豇豆 SSR 引物来自国际热带作物研究所(IITA)已发表的序列^[17],由英骏生物技术有限公司(Invitrogen)合成。在 PCR 体系建立后,从中筛选出 13 对可以扩增出稳定清晰的多态性单一一带的引物。利用 NTSYSpc2.1 软件、PopGen 软件和 FSTAT 软件进行数据处理和聚类分析^[19]。

2 结果与分析

2.1 参试资源的遗传多样性分析

利用上述 13 对 SSR 引物,经 PCR 扩增与聚丙烯酰胺凝胶电泳,对 316 份参试资源进行分析。检测到 47 个等位位点,每对 SSR 引物 2~7 个等位位点,平均值 3.692 个,其中引物 VM16 的等位位点数最多,为 7 个,其次是 VM20、VM23,各为 5 个。有效等位基因平均 2.003 个,其中扩增出超过 2 个等位基因的引物有 6 个,按等位基因数由多到少的引物顺序为 VM16、VM26、VM25、VM20、VM23 和 VM19。不同 SSR 引物揭示的国内外参试资源遗传多样性指数介于 0.0913~1.6148,其中大于 1 的引物有 5 个,排列顺序为 VM16、VM26、VM20、VM25、VM23。不同 SSR 引物在不同组群的等位基因丰富度介于 1.000~4.175,其中引物 VM16 在国内外参试资源中的等位基因丰富度最高,其次为 VM26、VM20、VM23。因此引物 VM16、VM26、VM20 和 VM23 对于检测参试资源的遗传多样性最为有效。

316 份参试资源的遗传多样性指数为 0.732,其中国外资源为 0.798,国内资源为 0.705,国外资源略高于国内资源。13 对 SSR 引物在 316 份参试资源中检测到的平均等位基因数为 3.692 个,在国内资源和国外资源中检测到的平均等位

基因数分别为 2.923 和 4.308 个,由此可见国外资源的遗传多样性高于国内资源。以省份为单位,13 对 SSR 引物揭示的平均遗传多样性指数介于 0~0.7202,按大小顺序为广西(0.7202)、湖北(0.5998)、湖南(0.5322)、内蒙(0.5110)、江苏(0.4726)、河南(0.4342)、辽宁(0.4081)、北京(0.3359)、山西(0.3009)、吉林(0.1600)、黑龙江(0.0375)、安徽(0)。13 对 SSR 引物检测到的等位基因数依大小顺序为广西(3.615)、湖北(3.689)、河南(3.154)、江苏(2.462)、内蒙(2.231)、北京(2.231)、湖南(2.000)、辽宁(2.000)、山西(1.692)、吉林(1.308)、黑龙江(1.154)、安徽(1.000)。由此可见广西、湖北是我国豇豆资源遗传多样性较丰富的地区,安徽、吉林、黑龙江、山西等省是我国豇豆资源遗传多样性较低的地区,河南省豇豆资源的遗传丰富度较好,遗传均匀度一般。

2.2 参试资源的聚类分析

2.2.1 参试资源组群划分 316 份豇豆栽培资源间遗传相似性系数介于 0.67~1.00。以 0.67 为切割点,可分解成分别包含 20 份和 296 份参试资源的 2 大类群。前一类群以国外来源为主(12 份),命名为“国外组群”,其下的亚群中尚混有 8 份国内资源,没有明显的地理分布相关性。后一类群,除 10 份国外资源外,其余 286 份全部来自国内,故命名为“国内类群”。以遗传相似性系数 0.78 为切点,按从上到下的顺序“国内类群”可以分解成 8 个组群,仅 1 份广西资源、1 份湖北资源和 1 份非洲资源被排除在外。组群 1,除 1 份国外资源外,全部为南方资源,命名为“南方组群 I”;组群 2,南、北方(包括高代材料)资源几乎各占 1/2,命名为“混合组群 I”;组群 3,南、北方资源几乎各占 1/2,命名为“混合组群 II”;组群 4,南方资源几乎占 90%,命名为“南方组群 II”;组群 5,北方资源占 90%以上,命名为“北方组群 I”;组群 6,100%北方资源,命名为“北方组群 II”;组群 7,资源全部来自南方,命名为“南方组群 III”;组群 8,资源全部来自广西,命名为“南方组群 IV”。分类结果表明,组群间表现出较明显的地理分布趋向性。对参试资源进行主成分分析作图(图 1),结果与聚类作图相似。在坐标图上国外资源主要分布在中上部,我国北方资源主要位于右下部,我国南方资源主要位于左方,育种高代材料主要集中在中部。

2.2.2 参试资源组群间相互关系分析 利用 PopGen 软件对不同组群进行聚类分析(图 2),2 个混合组群的遗传距离最近,其次是混合组群 I、II 与南方组群 II。由图可见,南方组群与北方组群间的遗传距离大于混合组群与南方组群间的遗传距离,混合组群与南方组群间的遗传距离又大于 2 个混合组群间的遗传距离。

3 讨论

3.1 遗传多样性与聚类分析

本研究中每对引物从 316 份材料中仅扩增出等位基因 2~7 个,因此,SSR 引物在豇豆中的多态性虽然相对较高,但又远低于其他作物,可能是由于豇豆栽培种的遗传多样

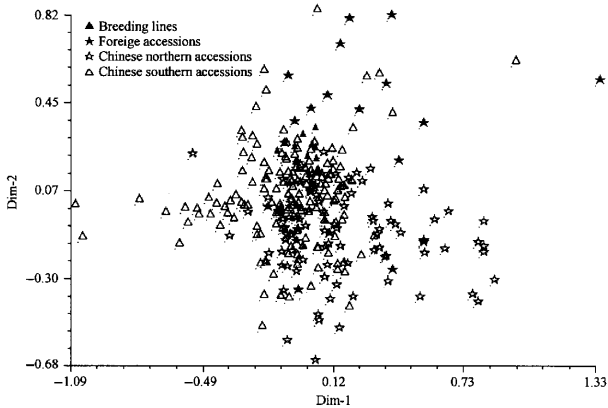


图1 二元主成分分析显示316份豇豆资源
Fig.1 Two-dimension principle correspondence analysis of the 316 cowpea genetic resources

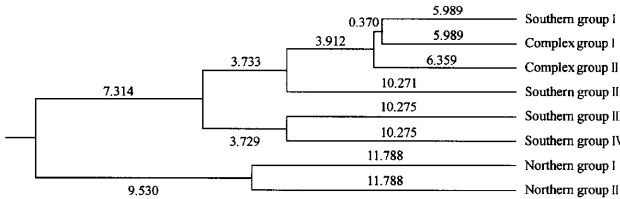


图2 PopGen 聚类图显示8个组群间的关系
Fig.2 A dendrogram of PopGen cluster showing relationships among the eight groups

性低。豇豆栽培种和野生种的遗传多样性已经采用同工酶标记、RFLP、AFLP、SSR 等方法进行广泛研究过。Vaillancourt^[14]对112份栽培豇豆和43份野生豇豆的26个同工酶位点的多样性进行了分析,表明栽培豇豆的遗传多样性水平远低于野生豇豆;Pasquet^[13,20]从等位酶角度研究了豇豆不同亚种间的遗传关系和栽培豇豆的遗传多样性变化,结果显示,典型自花授粉品种的遗传变异水平很低,品种间的遗传变异更小,与其他食用豆类作物比,栽培豇豆的等位酶变异水平呈下降趋势。Li等^[17]应用46对SSR标记对90份育种品系和1份野生品种的研究表明,豇豆的遗传多样性比其他作物低,尤其是比其他食用豆类作物低。Coulbaly等^[16]采用AFLP方法对117份材料(一年生栽培资源47份,一年生野生资源52份,多年生野生资源18份)的遗传关系、表型组成和遗传多样性进行分析,表明一年生野生资源比栽培资源具有更丰富的遗传变异,并支持豇豆只在非洲大陆的北部经历过1次驯化的观点。豇豆的1次驯化是指栽培豇豆是由同一祖先在某个特定的区域内驯化而来的,遗传基础比较狭窄,因此遗传多样性很低。

国内外许多研究报道采用形态学、同工酶、AFLP等方法对豇豆栽培资源进行聚类分析,但很少报道与地理来源有相

关性。Pasquet^[20]对271份来自5个栽培组群的豇豆进行等位酶多态性研究,结果揭示栽培组群内的遗传变异与品种的地理位置分布没有相关性。本研究的聚类分析表明,国内、外资源差异明显,被划为2大类别。国内资源SSR分类组群与地理来源关系比较密切。

3.2 亲缘关系

本研究表明,国内各省参试资源间的相对遗传距离变化范围为0.0467~0.9377,其中安徽与黑龙江间的遗传距离最大,内蒙和山西间的遗传距离最小。国内15份参试高代材料,有11份聚在混合组群II中,4份聚在南方组群II中,没有渗透到其他6个组群,表明其遗传多样性狭窄,豇豆亲本材料的遗传背景亟待拓宽。国外资源的遗传多样性指数略高于国内资源,其原因可能是:(1)22份国外资源中有16份来自非洲,而非非洲是公认的豇豆起源中心;(2)另外6份材料分别来自日本、菲律宾和土耳其,这3个国家在地理位置上相差较远。其中,国外资源组群与国内资源组群之间互有交叉,国内资源中地理位置相差较远的资源聚在一起可能的原因是:(1)所收集到的豇豆SSR引物数量有限,筛选后只有13对引物能够用于本试验,不足以将这些组群分开;(2)这些来自不同区域的材料本身就存在混杂和重复的情况。

References

- [1] Zheng Z-J(郑卓杰), Wang S-M(王述民), Zong X-X(宗绪晓). Food Legumes in China (中国食用豆类学). Beijing: China Agriculture Press, 1997. pp 306-317 (in Chinese)
- [2] Wang P-Z(王佩芝), Li X-X(李锡香), Wang S-M(王述民), Zong X-X(宗绪晓), Cheng X-Z(程须珍). Descriptors and Data Standard for Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] (豇豆种质资源描述规范和数据标准). Beijing: China Agriculture Press, 2005 (in Chinese)
- [3] FAO. Statistical Database, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome. <http://www.fao.org>, 2006
- [4] Ehlers J D, Hall A E. Genotypic classification of cowpea based on responses to heat and photoperiod. *Crop Sci*, 1996, 36(33): 673-679
- [5] Fery R L. The genetics of cowpea: A review of the world literature. In: Singh S R, Rachie K O eds. Cowpea Research, Production and Utilization. New York: John Wiley & Sons, 1985. pp 25-62
- [6] Fotofo M, Azanza J L, Pasquet R, Raymond J. Molecular heterogeneity of cowpea (*Vigna unguiculata*) seed storage proteins. *Plant Syst Evol*, 1994, 191 (1/2): 39-56
- [7] Vaillancourt R E, Weeden N F. Chloroplast DNA polymorphism suggests a Nigerian centre of domestication for the cowpea (*Vigna unguiculata*). *Am J Bot*, 1992, 79(10): 1194-1199
- [8] Fatokun C A, Danesh D, Young N D. Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. *Theor Appl Genet*, 1993, 86 (1): 97-104
- [9] Li S-X(李曙轩), Zeng M(曾勉). Classification of cowpea. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1954, 3(1): 61-70 (in Chinese)
- [10] Hu Z-H(胡志辉), Chen C-Y(陈祚友), Lei G(雷刚). Genetic diversity within yardlong bean based on isozyme analyses. *Northern Hort* (北方园艺), 2002(1): 46-47 (in Chinese)
- [11] Chen C-Y(陈祚友), Hu Z-H(胡志辉), Lei G(雷刚). Variety comparative test and their amylase isozyme analysis. *Changjiang Veg* (长江蔬菜), 1999, (1): 29-32 (in Chinese)
- [12] He L(何礼). Studies on the Genetic Diversity and Breeding Strategy of Chinese Cultivated Cowpea (我国栽培豇豆的遗传多样性研究及其育种策略的探讨). PhD Dissertation of Sichuan University, 2002 (in Chinese with English abstract)
- [13] Pasquet R S. Genetic relationships among subspecies of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on allozyme variation. *Theor Appl Genet*, 1999, 98 (6/7): 1104-1119
- [14] Vaillancourt R E, Weeden N F, Barnard J. Isozyme diversity in the cowpea species complex. *Crop Sci*, 1993, 33(3): 606-613
- [15] Mignouna H D, Ng N Q, Ikea J, Thottapilly G. Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA. *J Genet Breed*, 1998, 52(3): 151-159
- [16] Coulibaly S, Pasquet R S, Papa R, Gepts P. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theor Appl Genet*, 2002, 104(2/3): 358-366
- [17] Li C D. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci*, 2001, 41(1): 189-197
- [18] Ausubel F M, Kingston R E, Seidman J G, Struhl K, Brent R. Moore D D, Smith J A. eds. Ma X-J(马学军), Shu Y-L(舒跃龙) trans. Short Protocols in Molecular Biology (2nd edn) [精编分子生物学实验指南(第2版)]. Beijing: Science Press, 1998. pp 37-38 (in Chinese)
- [19] Nei M. Genetic distance between populations. *Am Nat*, 1972, 106 (4): 283-292
- [20] Pasquet R S. Genetic diversity of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on allozyme variation. *Theor Appl Genet*, 2000, 101 (1/2): 211-219