

# AFLP 初析小豆栽培和野生变种(*Vigna angularis* var. *angularis* and var. *nipponensis*) 间演化与地理分布关系

宗绪晓<sup>1</sup>, Duncan Vaughan<sup>2</sup>, Norihiko Tomooka<sup>2</sup>, Akito Kaga<sup>2</sup>,  
王新望<sup>2</sup>, 关建平<sup>1</sup>, 王述民<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 日本农业生物资源研究所, 日本茨城 305-8602)

**摘要:** 利用 12 对 AFLP 引物, 以饭豆标准品系 M00 作对照, 对来自中国、日本、韩国、尼泊尔、印度、不丹的 146 份小豆栽培种(*Vigna angularis* var. *angularis*) 和野生种(*Vigna angularis* var. *nipponensis*) 种质的基因组 DNA 进行扩增, 得到 313 条多态性带。据 AFLP 多态性数据绘制的聚类图, 可区分其中的 143 份种质, 表明小豆物种(*Vigna angularis*) 存在足够的遗传多样性, 可用于资源材料的准确鉴别与分类。鉴于此, 采用新开发的利用 AFLP 数据揭示核苷多样性的 Innan's 进化树分析方法, 进一步将 146 份小豆资源分成 7 个明显不同的地理演化群, 即中国栽培种、日本栽培种、日本综合群-韩国栽培种、中国台湾野生种、中国野生种、尼泊尔-不丹栽培种和喜马拉雅野生种演化群。就上述地理演化群的遗传多样性、地理分布以及野生种与栽培种之间可能的演化关系进行了分析, 初步认为栽培小豆至少应当有 4 个不同类型的野生祖先和 3 个不同的地理起源。

**关键词:** 小豆(*Vigna angularis*); AFLP; 遗传多样性; 地理分布; 起源演化

## Preliminary Study on Geographical Distribution and Evolutionary Relationships Between Cultivated and Wild Adzuki Bean (*Vigna angularis* var. *angularis* and var. *nipponensis*) by AFLP Analysis

ZONG Xu-xiao<sup>1</sup>, Duncan Vaughan<sup>2</sup>, Norihiko Tomooka<sup>2</sup>, Akito Kaga<sup>2</sup>,  
WANG Xin-wang<sup>2</sup>, GUAN Jian-ping<sup>1</sup>, WANG Shu-min<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

<sup>2</sup> National Institute of Agrobiological Sciences of Japan, Karannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602)

**Abstract:** A representative set of 146 adzuki (*Vigna angularis* var. *angularis* and var. *nipponensis*) germplasm from 6 Asian countries traditionally for adzuki bean production, together with an out group standard rice bean (*Vigna umbellata*), were analyzed by AFLP methodology using 12 informative primer pairs. 313 unambiguous polymorphic bands were created. According to the dendrogram by cluster analysis based on AFLP banding, 143 of the accessions were distinct and revealed enough genetic diversity for identification and classification of accessions within *Vigna angularis*. A neighbor joining tree was generated using newly developed Innan's nucleotide diversity estimate from the AFLP data; From analysis, 7 distinct evolutionary groups, named Chinese cultivated, Japanese cultivated, Japanese complex-Korean cultivated, China Taiwan wild, Chinese wild, Nepal-Bhutan cultivated and Himalayan wild, were detected. Nucleotide diversity with geographical distribution of each group is discussed, regarding the evolutionary relationships between wild and cultivated adzuki

收稿日期: 2000-05-13

基金项目: IPGRI 与 JIRCAS 联合资助的中、日、韩、朝国际合作项目“东亚小豆(*Vigna angularis*) 综合种群遗传多样性分析(1999~2002)”

作者简介: 宗绪晓(1964-), 男, 山东莱州人, 副研究员, 主要从事食用豆类资源、种质创新和利用研究。Tel: 010-62186651; E-mail: zongxx@

mail.caas.net.cn

beans. The preliminary results indicated that cultivated adzuki bean should be domesticated from at least 4 progenitors in at least 3 geographical origins.

**Key words :** Adzuki bean (*Vigna angularis*); AFLP; Genetic diversity; Geographical distribution; Evolutionary relationships

小豆 (*Vigna angularis*) 是少数几个起源于亚洲的食用豆类栽培种之一<sup>[1]</sup>, 是东亚历史悠久的传统作物<sup>[1,2]</sup>。最近发现不丹和尼泊尔历史上也有小豆种植<sup>[3]</sup>。普遍认为小豆起源于中国, 日、韩小豆源于中国, 其主要依据是中国小豆栽培资源形态多样性丰富, 以及在喜马拉雅山、云南、山东、湖北等地仍有小豆野生种和半野生种<sup>[2,4~7]</sup>。但是近年来发现, 野生小豆和半野生小豆, 从喜马拉雅山西侧的印度、尼泊尔、不丹, 直至中国和中国台湾岛、朝鲜半岛到日本群岛都有广泛分布<sup>[1,8]</sup>。栽培小豆有可能在上述区域内的多个地方驯化而成, 形成多个起源中心, 向中国惟一起源说提出了严峻挑战。

现已有利用 RAPD 和 AFLP 分子标记研究小豆遗传多样性的若干报道, 但因选材仅包括栽培资源<sup>[3,9]</sup> 或者虽包括野生资源却来源单一<sup>[10~12]</sup>, 未触及全球小豆起源演化问题。为此, 本研究广泛收集了印度喜马拉雅地区、尼泊尔、不丹、中国和中国台湾、韩国和日本的栽培、野生和半野生小豆代表性资源 146 份, 并引入种外对照, 采用小豆资源研究中较为先进有效的 AFLP 方法<sup>[9,10]</sup>, 试图在揭示其 DNA 遗传多样性的基础上, 进一步探索小豆资源地理分布与其野生、栽培变种之间的内在联系, 寻找小豆起源演化的真实答案。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

146 份小豆 (*Vigna angularis*) 资源及 1 份饭豆 (*Vigna umbellata*) 标准对照种 M00, 由中国农业科学院作物品种资源研究所和日本农业生物资源研究所提供。其中 84 份原产于中国 (79 份栽培资源、5 份野生资源), 36 份原产于日本 (24 份栽培资源、5 份半野生资源和 7 份野生资源), 9 份栽培资源原产于韩国, 12 份原产于尼泊尔 (9 份栽培资源、3 份野生资源), 3 份原产于不丹 (2 份栽培资源、1 份野生资源), 1 份野生资源原产于印度, 1 份野生资源原产于中国台湾, 饭豆 (*Vigna umbellata*) 标准对照种 M00 原产于日本。上述参试资源样品, 能够较好地代表世界小豆野生资源的自然分布、传统栽培区栽培资源分布, 以及小豆种内的遗传多样性。

### 1.2 DNA 提取

参试材料于 2001 年 10 月 8 日用营养钵育苗, 温室温度为 25~30℃, 在出苗后 14~25 d, 从每份材料的 5 株幼苗上采收刚要展开的嫩叶 0.2~0.3 g, 经液氮冻干, 研磨成细粉, 依照 Dellaporta 等<sup>[13]</sup> 创立的方法稍作修改后, 提取基因组总 DNA, 采用 1% 琼脂胶电泳, 溴化乙啶 (EtBr) 显影, 以已知浓度的  $\lambda$  DNA 作对照, 稀释标定为 50 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup>, 放 -20℃ 冰箱备用。

### 1.3 AFLP 分析

AFLP 指纹图谱分析方法源于 Key Gene<sup>[14]</sup>, 稍作修改。

基因组总 DNA 酶切连接: 吸取标定好的参试资源 DNA 样品每份 5  $\mu$ l (DNA 含量约为 0.25  $\mu$ g), 分别配制成 20  $\mu$ l 各含 2.5 U EcoRI、2.5 U MseI、10 mmol Tris HAcetate (pH 7.5)、10 mmol MgAcetate、50 mmol KAcetate、5 mmol DTT 和 50 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup> BSA 的反应液, 置 37℃ 恒温箱 3 h, 迅速加入 10  $\mu$ l 各含 5 pmol EcoRI 接头核苷酸链、5 pmol MseI 接头核苷酸链 (表 2)、1 U T4 DNA 连接酶、1 mmol ATP、10 mmol Tris-Acetate (pH 7.5)、10 mmol MgAcetate、50 mmol KAcetate、5 mmol DTT 和 50 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup> BSA 的反应液, 置 37℃ 恒温箱过夜。之后, 于 65℃ 水浴锅中 10 min 灭活酶反应, 用含 10 mmol Tris-HCl 与 0.1 mmol EDTA (pH 8.0) 的混合溶液稀释 5 倍, 放 -20℃ 冰箱贮藏备用。

选择性预扩增 PCR: 采用 1 对选择性预扩增引物 (表 1)。选择性预扩增 PCR 反应液每份 20  $\mu$ l, 各含 5  $\mu$ l 限制性酶切连接并稀释 5 倍后的 DNA 产物、0.6  $\mu$ l 浓度 50 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup> 的 E00 引物、0.6  $\mu$ l 浓度 50 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup> 的 M00 引物、1.6  $\mu$ l 浓度各为 2.5 mmol 的 dNTP 混合液、0.08  $\mu$ l 浓度 5 U· $\mu$ l<sup>-1</sup> 的 Taq DNA 聚合酶、以及 2  $\mu$ l 的 10× PCR 缓冲液。预扩增 PCR 反应在 GeneAmp PCR system 9700 PCR 仪上进行, 依次经历 30 s 94℃ 变性反应、1 min 56℃ 退火反应、1 min 72℃ 延长反应的共 25 次循环。PCR 预扩增产物, 用含 10 mmol Tris-HCl 与 0.1 mmol EDTA (pH 8.0) 的混合溶液稀释 20 倍, 放 -20℃ 冰箱贮藏备用。

表 1 DNA 接头和 AFLP 引物的核苷酸顺序

Table 1 The sequences of adapters and primers

DNA 接头和 AFLP 引物 Adapter and primers	核苷酸序列 Nucleotide sequences	用途 Application
EcoRI 接头 Adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'	接头连接 Adapter ligation
MseI 接头 Adapter	5'-GACGATGAGTCCTGA G-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'	接头连接 Adapter ligation
EcoRI 引物 Primer		
E00	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	预扩增 Pre-selective amplification
E32	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3'	扩增 Selective amplification
E33	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG-3'	
E38	5'-GACTGCGTACCAATTC ACT-3'	
E39	5'-GACTGCGTACCAATTC AGA-3'	
E44	5'-GACTGCGTACCAATTC ATC-3'	
E45	5'-GACTGCGTACCAATTC ATG-3'	
E47	5'-GACTGCGTACCAATTC CAA-3'	
E50	5'-GACTGCGTACCAATTC CAT-3'	
E59	5'-GACTGCGTACCAATTC CTA-3'	
E75	5'-GACTGCGTACCAATTC GTA-3'	
E83	5'-GACTGCGTACCAATTC TCA-3'	
E93	5'-GACTGCGTACCAATTC TTG-3'	
MseI 引物 Primer		
M00	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'	预扩增 Pre-selective amplification
M32	5'-GATGAGTCCTGAGTAA AAC-3'	扩增 Selective amplification
M33	5'-GATGAGTCCTGAGTAA AAG-3'	
M38	5'-GATGAGTCCTGAGTAA ACT-3'	
M39	5'-GATGAGTCCTGAGTAA AGA-3'	
M45	5'-GATGAGTCCTGAGTAA ATG-3'	
M47	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAA-3'	
M50	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAT-3'	
M75	5'-GATGAGTCCTGAGTAA GTA-3'	

表 2 小豆 7 个演化群及其粒色分布<sup>1)</sup>

Table 2 7 evolutionary groups of *Vigna angularis* and their distribution on seed colors

演化群名称 Evolutionary group	包含的参试资源 Accessions	粒色分布 Distribution of seed colors
中国栽培种 Chinese cultivated	C01 ,C02 ,C03 ,C04 ,C05 ,C06 ,C07 ,C08 ,C09 ,C10 ,C11 ,C12 ,C13 ,C14 , C15 ,C16 ,C17 ,C18 ,C19 ,C20 ,C21 ,C22 ,C23 ,C24 ,C25 ,C26 ,C28 ,C30 , C31 ,C32 ,C33 ,C34 ,C35 ,C36 ,C37 ,C38 ,C39 ,C40 ,C41 ,C42 ,C43 ,C44 , C45 ,C46 ,C47 ,C48 ,C50 ,C51 ,C52 ,C53 ,C54 ,C55 ,C56 ,C57 ,C58 ,C59 , C60 ,C61 ,C63 ,C64 ,C65 ,C66 ,C67 ,C68 ,C69 ,C74 ,C75 ,C76 ,C77 ,C78 , C79 ,C80 ,C81 ,C82 ,C83 ,C84 ,C85 ,C86 ,J01 ,J02	56 红 ,9 白 ,2 黄 ,2 绿 ,6 黑麻 ,5 红条纹 56 red , 9 white , 2 yellow , 2 green , 6 black-marble , 5 red- strip
日本栽培种 Japanese cultivated	C49 ,J10 * ,J13 ,J14 ,J33 ,J34 ,J35 ,J36 ,J38 ,J39 ,J40 ,J41 ,J42 ,J43 ,J44 ,J45	9 红 ,1 白 ,3 黑 ,3 黑麻 ,9 红 , 1 white , 3 black , 3 black-marble
日本综合群-韩国栽培种 Japanese complex-Korean cultivated	J03 * ,J04 # ,J05 * ,J06 # ,J07 * ,J08 # ,J09 * ,J11 # ,J15 ,J16 ,J18 ,J19 ,J20 , J21 ,J22 ,J25 * ,J30 * ,J31 # ,J32 ,K01 ,K02 ,K03 ,K04 ,K05 ,K06 ,K07 , K08 ,K09	13 红 ,2 白 ,1 绿 ,12 黑麻 13 red , 2 white , 1 green , 12 black-marble
中国台湾野生种 China Taiwan wild	T01 * , B03	1 黑麻 ,1 红/黑麻 1 black-marble , 1 red/black-marble
中国野生种 Chinese wild	C87 * , C88 * , C89 * , C90 * , C91 *	5 黑麻 5 black-marble
尼泊尔-不丹栽培种 Nepal-Bhutan cultivated	B02 ,N04 ,N05 ,N07 ,N08 ,N10 ,N11 ,N12 ,N13 ,N14	9 红 ,1 褐 9 red , 1 brown
喜马拉雅野生种 Hymalayan wild	B01 * , I01 * , N01 * , N02 * , N03 *	5 黑麻 5 black marble

<sup>1)</sup> \* C 代表原产中国的资源 ; B 代表原产不丹的资源 ; J 代表原产日本的资源 ; K 代表原产韩国的资源 ; N 代表原产尼泊尔的资源 ; I 代表原产印度的资源 ; T 代表原产中国台湾岛的资源 ; \* 代表野生资源 ; # 代表半野生资源

“ C ” refers to accessions from China ; “ B ” refers to accessions from Bhutan ; “ J ” refers to accessions from Japan ; “ K ” refers to accessions from Korea ; “ N ” refers to accessions from Nepal ; “ I ” refers to accessions from India ; “ T ” refers to accessions from Taiwan island of China ; “ \* ” refers to wild accession ; “ # ” refers weedy accession

选择性扩增 PCR:采用 12 对选择性扩增引物(表 1)。选择性扩增 PCR 反应液每份 20  $\mu\text{l}$ ,各含 5  $\mu\text{l}$  的 PCR 预扩增产物(已稀释 20 倍) 0.6  $\mu\text{l}$  浓度 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  的 EcoRI 引物、0.6  $\mu\text{l}$  浓度 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  的 MseI 引物、1.6  $\mu\text{l}$  浓度各为 2.5 mmol 的 dNTP 混合液、0.08  $\mu\text{l}$  浓度 5  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  的 Taq DNA 聚合酶、以及 2  $\mu\text{l}$  的 10 $\times$  PCR 缓冲液。DNA 选择性扩增仍在上述 PCR 仪上进行,依次经历 30 s 94 $^{\circ}\text{C}$  变性反应、30 s 65 $^{\circ}\text{C}$ (每循环降温 0.7 $^{\circ}\text{C}$ )退火反应、1 s 72 $^{\circ}\text{C}$  延长反应的共 13 次循环后,接着依次经历包括 30 s 94 $^{\circ}\text{C}$  变性反应、30 s 56 $^{\circ}\text{C}$  退火反应、1 s 72 $^{\circ}\text{C}$  延长反应在内的另外 23 次循环。最终反应产物,置 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱贮藏备用。

电泳:取 PCR 产物,以及浓度 5  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  梯度分别为 10 bp 和 50 bp 的两种标记 DNA(美国 Promega 公司生产)各 2  $\mu\text{l}$ 。各混以 2  $\mu\text{l}$  变性染色液(内含 98% 的甲酰胺、10 mmol 的 EDTA、0.1% 的溴酚蓝和 0.1% 的二甲苯蓝 FF)在 PCR 仪上 95 $^{\circ}\text{C}$  下变性 3~4 min,立刻冰镇,各取变性后冰镇着的 2  $\mu\text{l}$  上述混合液,点样在 6%(w/v)丙烯酰胺单体凝胶垂直电泳板上,缓冲液为 0.5 $\times$  TBE,在 3 000 V 电压、70 W 恒定功率下电泳 100 min。DNA 银染系统显影。

#### 1.4 数据处理方法

AFLP 显带的记录方法为:针对某一条带而言,“有”记作“1”;“无”记作“0”,只记载清晰易辨的扩增带,将所有 12 对选择性扩增引物产生的 DNA 扩增带数据输入到数据矩阵。样品间的遗传相似性计算,采用 Jaccard's 相似系数分析方法<sup>[15]</sup>进行,得到相似性系数矩阵。利用该相似性系数矩阵,以除权配对法(UPGMA)进行 SAHN 聚类分析<sup>[16]</sup>。

利用 AFLP 多态性数据计算 DNA 核苷酸多态性的分析,以小豆的严格自花授粉特性为前提,采用新近发明的 Innan's 方法<sup>[17]</sup>进行,进化树的计算与绘制,采用邻位相连法、利用 PHYLIP 计算程序<sup>[18]</sup>,经 1 000 次的通径分析得到。

## 2 结果与分析

### 2.1 小豆种质的 AFLP 多态性

采用 12 对 AFLP 选择性扩增引物,共扩增出 580 条清晰可辨的带(图 1),其中 313 条具有多态性,比例为 53.93%。从 Jaccard's 相似系数矩阵得到的聚类图(图 2),显示小豆种内资源间的最大遗传差异只有 15% 左右,但是,采用 12 对引物便可将 146 份资源中的 143 份正确识别。表明 AFLP 指纹

图谱数据在小豆资源材料识别和区分上表现出的高分辨率,足以用于小豆种内分类、演化及其与地理分布间关系的研究。

### 2.2 小豆种内的演化群

基于 AFLP 呈现的高分辨率,采用 Innan's 核苷酸多样性数据绘制出的进化树,清晰地显示出 7 个显著不同的与来源地密切相关的演化群(图 3)。7 个演化群相当严格地对应着各自的自然分布和传统栽培区,据此分别命名为中国栽培种、日本栽培种、日本综合群-韩国栽培种、中国台湾野生种、中国野生种、尼泊尔-不丹栽培种以及喜马拉雅野生种演化群(表 2)。饭豆标准对照“M00”被排除在外,与上述 7 个演化群之间存在很远的遗传距离,证实了 Innan's 分析的可靠性。该结果清楚地显示,小豆核苷酸多样性具有地理起源渐变群的显著特点。然而,从常用的、传统上认为最能代表小豆遗传多样性和进化程度高低的籽粒颜色进行分析,除野生和半野生资源均为黑麻外,找不到上述演化群与地理起源间的对应关系(表 2)。

中国栽培种演化群,涵盖所有 79 份中国参试栽培资源中的 78 份,以及 2 份日本栽培资源;日本栽培种演化群,包含 15 份日本栽培资源,1 份中国栽培资源和 1 份日本野生资源;日本综合群-韩国栽培种演化群,由 27 份日本栽培、野生和半野生参试资源以及所有 9 份韩国栽培资源组成;中国台湾野生种演化群,由 1 份台湾野生资源和 1 份不丹栽培资源组成;中国野生种演化群,涵盖了所有 5 份来自中国的野生资源;尼泊尔-不丹栽培种演化群,由 9 份尼泊尔栽培资源和 1 份不丹栽培资源组成;喜马拉雅野生种演化群,涵盖了所有来自喜马拉雅山西侧的 5 份野生资源材料,其中来自不丹 1 份、尼泊尔 3 份、印度 1 份(表 2)。

### 2.3 小豆种内演化群群内、群间的演化关系

中国栽培种、日本栽培种、日本综合群-韩国栽培种演化群间的遗传差异较小。中国栽培种与日本栽培种以及日本综合群-韩国栽培种演化群间的通径值很小,而且相互渗透;中国栽培种演化群中含有 2 份日本栽培资源,日本栽培种演化群中含有 1 份中国栽培资源和 1 份日本野生资源,日本综合群-韩国栽培种演化群中含有该地理范围内其它所有的栽培、半野生和野生参试资源,显示出上述 3 个演化群间的亲密血缘关系,其中的栽培种可能来自遗传相似的野生祖先。尽管如此,中国栽培种演化群中只有 2 份来自日本,来自中国的 79 份栽培资源中仅有

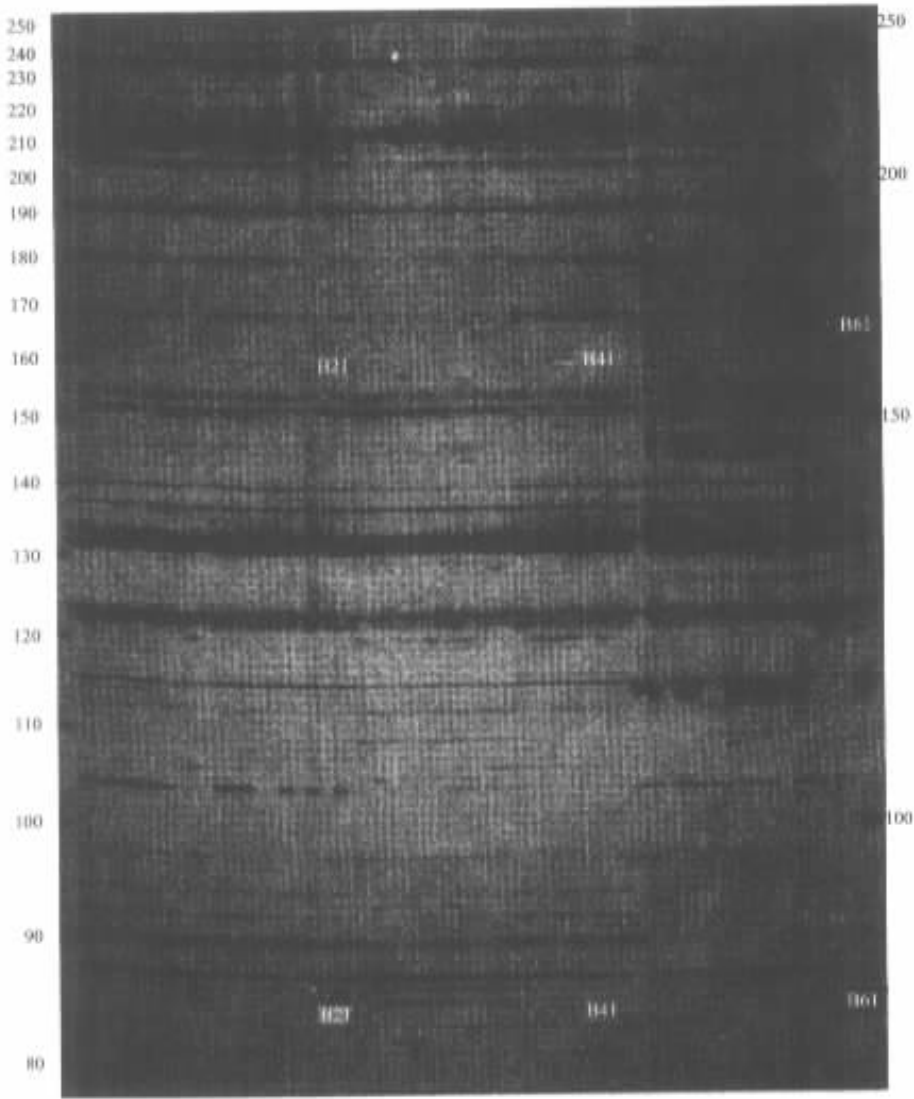


图 1 引物对 E75/M75 扩增的 AFLP 带型

Fig.1 AFLP banding patterns produced by primer pair E75/M75

1 份划在本演化群之外、其它 78 份全部划在本演化群内,说明中国栽培种起源的独立性,应与另 2 个亲缘密切演化群栽培种的起源明显不同;日本栽培种资源绝大部分被划分在 2 个不同的演化群中,日本野生资源中的 1 份(J10)划在日本栽培种演化群,其它所有 6 份日本野生和 5 份半野生资源均划在日本综合群-韩国栽培种演化群中,表明日本栽培种演化群的遗传结构与日本综合群-韩国栽培种演化群差异明显,其中的那份野生材料代表的应是该演化群的祖先遗传类型,划分在日本综合群-韩国栽培种演化群中的日本栽培资源,同所有韩国栽培资源和几

乎所有日本野生和半野生资源归为一类,显示该群中的日本资源与韩国栽培资源具有很近的亲缘关系,该演化群可能揭示了日本和韩国的栽培资源与该群内半野生和野生资源间具有直接的进化关系,或具有遗传类型相近的祖先。

从进化树显示的信息看,中国台湾野生种与中国野生种、日本综合群-韩国栽培种演化群间的遗传差异远比与喜马拉雅野生种演化群的遗传差异小,说明中国台湾与中国、日本野生资源间的亲缘关系较近,而喜马拉雅地区野生种与上述 3 个地方野生种的亲缘关系均较远。

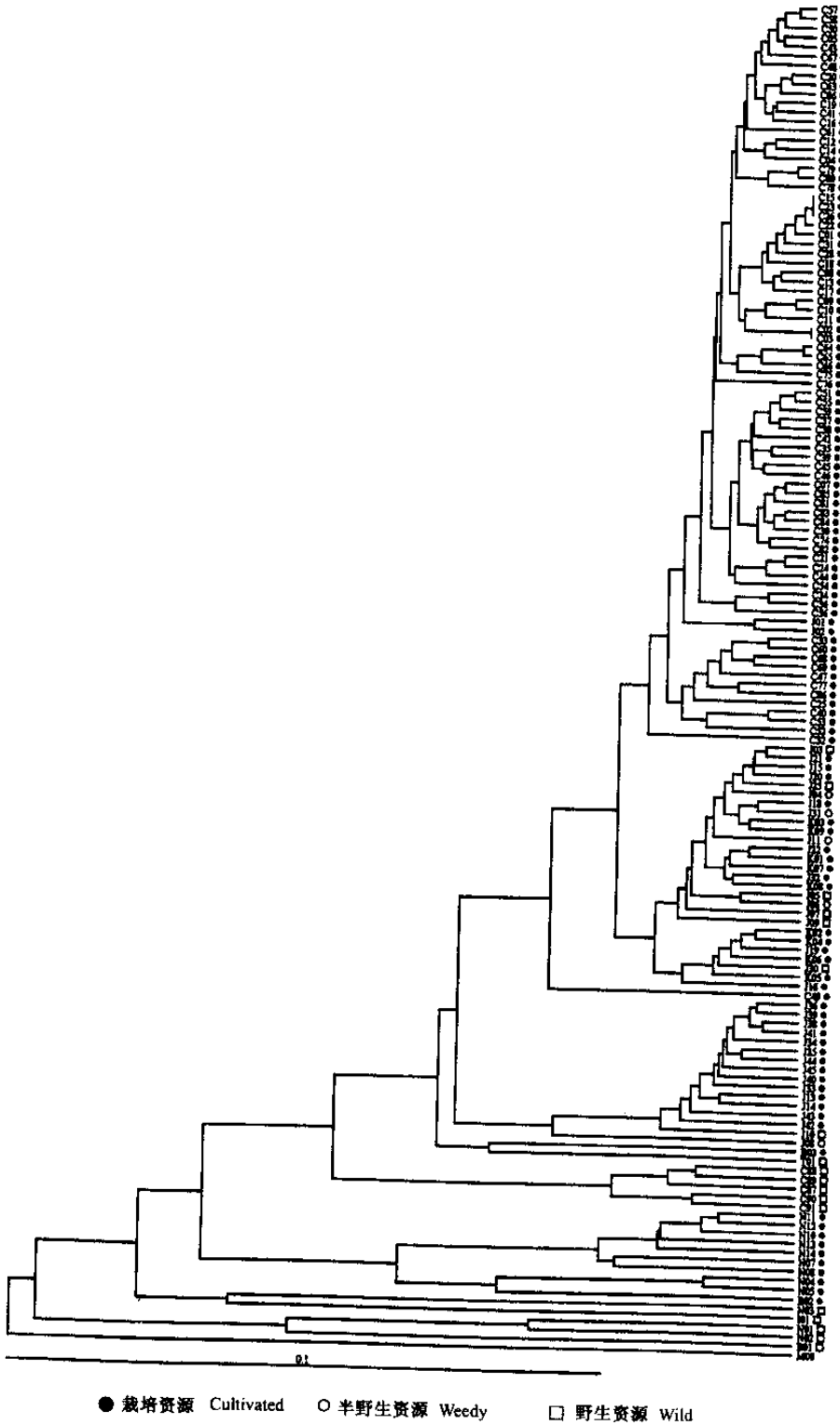


图 2 基于 AFLP 多态性数据转化成的 Jaccard's 相似系数矩阵得到的聚类图

Fig.2 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Jaccard's similarity matrix converted from AFLP polymorphism data

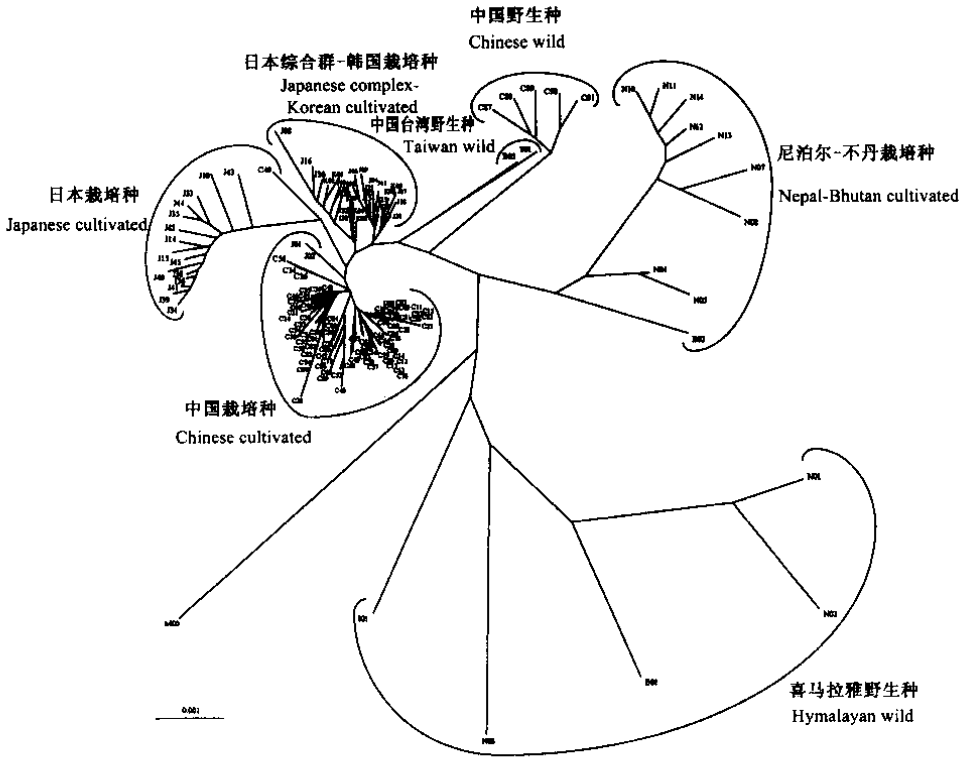


图 3 基于 Innan's 核苷酸多样性数据采用邻位相连法绘制的进化树(示 7 个地理演化群)

Fig.3 A neighbor-joining tree based on pairwise distance using Innan's unclotide diversity data( showing evolutionary groups )

尼泊尔-不丹栽培种演化群中的 10 份资源均为栽培种,但是所有 10 份资源间均存在较大的遗传差异,显示该演化群所代表的栽培资源中蕴藏着丰富的遗传多样性,与其它包含栽培资源的组群间存在明显差异,为今后小豆资源改良和育种亲本筛选提供了重要的基因库。喜马拉雅野生种演化群包含所有 5 份来自喜马拉雅山西侧的野生资源,群内遗传差异是所有 7 个演化群中最大的,表明该演化群所代表的野生资源中蕴藏显著的遗传多样性。尼泊尔-不丹栽培种和喜马拉雅野生种演化群均起源于喜马拉雅地带,虽然两演化群间的遗传差异显著,鉴于该地区与其它小豆分布区的严格地理隔离,预示其间应当有某种进化关系。

### 2.4 栽培小豆的起源演化中心

根据上述试验结果初步分析,栽培小豆的起源和演化应当是多中心的。中国栽培小豆应有同一个

野生祖先,且起源于中国;日本栽培小豆分为 2 个类型,应当有 2 个不同类型的野生祖先,且均起源于日本群岛,韩国的栽培资源与日本 2 个栽培类型中的 1 个相同,应当共有 1 个祖先;喜马拉雅山西侧的栽培类型,应当另有不同祖先,且起源于该地区。据此,栽培小豆至少应当有 4 个不同的野生祖先和 3 个不同的地理起源。

### 3 讨论

栽培小豆起源研究,过去主要建立在形态学分类、杂交是否可育和同工酶分析基础上,虽然明确定义了栽培小豆起源于野生小豆,但是对有否共同祖先以及起源地是否惟一,没有明确结论。本研究首次从 DNA 遗传多样性角度,初步肯定了栽培小豆起源演化的多中心特点,为今后的进一步探索奠定了基础。但是,尚无法确定中国小豆栽培种、尼泊尔

-不丹栽培种各起源于何种野生类型,也没有揭示中、日、韩栽培小豆之间的关系之谜。以上缺陷,显然是因为对于小豆自然分布区内野生、半野生小豆资源的收集远不充分所致。为彻底揭开上述谜团,需要更多收集中国和朝鲜半岛的野生和半野生资源,以及来自喜马拉雅地带的栽培、野生、半野生小豆资源,加入随后的相关研究中。

中国参试资源取材主要依据其地理分布密度,因而缺乏国内西南地区的小豆资源,致使南亚和东亚之间缺少过渡地带的小豆材料,是追索南亚和东亚小豆之间起源和进化关系的障碍,也是本项研究的缺憾,再一次佐证了研究取材的重要性。进一步的相关研究中,务必加入能够代表上述过渡地带的小豆资源,使得 DNA 遗传多样性数据更加全面系统。

致谢:本项研究是国际遗传资源研究所(IPGRI)国际合作项目“东亚小豆(*Vigna angularis*)综合种群遗传多样性分析”的一部分,中国、日本、韩国、朝鲜有关研究所参与了该项目。作者衷心感谢国际遗传资源研究所组织并赞助了该项目,同时感谢日本农业科学国际研究中心(JIRCAS)为该项研究第一作者提供了赴日 AFLP 研究赞助,并对日本 Tokachi Hokkaido 地区农业试验站为本项研究提供来自尼泊尔和不丹的小豆资源深表谢意。

## References

- [ 1 ] Tomooka N, Vaughan D A, Moss H, Maxted N. *The Asian Vigna. The Genus Vigna Subgenus Ceratotropis Genetic Resources*. Kluwa Academic Press, 2003.
- [ 2 ] 郑卓杰, 王述民, 宗绪晓. 中国食用豆类学. 北京:中国农业出版社, 1997.  
Zheng Z J, Wang S M, Zong X X. *Food legumes in China*. Beijing: China Agriculture Press, 1997. (in Chinese)
- [ 3 ] 王述民, 胡英考, 胡家蓬. 利用 RAPD 标记评价小豆种质遗传多样性. 植物遗传资源科学, 2002, 2(1): 14-19.  
Wang S M, Hu Y K, Hu J P. Study on genetic diversity of adzuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) germplasm based on RAPD markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2002, 2(1): 14-19. (in Chinese)
- [ 4 ] 董玉琛译. 主要栽培植物的世界起源中心. 北京:农业出版社, 1982.  
Dong Y C. *Evolutionary Centers of Major Cultivated Plants in the World*. Beijing: Agricultural Press, 1982. (in Chinese)
- [ 5 ] 丁振麟. 豆类作物. 北京:高等教育出版社, 1959.  
Ding Z L. *Legume Crops*. Beijing: Graduate Education Press, 1959. (in Chinese)
- [ 6 ] 胡家蓬. 小豆资源研究初报. 作物品种资源, 1984, 1: 21-25.  
Hu J P. Preliminary study on adzuki bean germplasm resources. *Crop Germplasm Resources*, 1984, 1: 21-25. (in Chinese)
- [ 7 ] 姜勇贵. 山东省小豆资源生态型研究. 作物品种资源, 1984, 4: 9-12.  
Jiang Y G. Study on ecological types of Shandong local adzuki germplasm. *Crop Germplasm Resources*, 1984, 4: 9-12. (in Chinese)
- [ 8 ] Tomooka N, Egawa Y, Kaga A. Biosystematics and genetic resources of the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. In: 7<sup>th</sup> MAFF International Workshop on Genetic Resources. *Wild legumes*, 2000: 37-62.
- [ 9 ] Yee E, Kidwell K K, Sills G R, Lumpkin T A. Diversity among selected *Vigna angularis* (azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Science*, 1999, 39: 268-275.
- [ 10 ] Xu R Q, Tomooka N, Vaughan D A. AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. *Crop Science*, 2000, 40: 808-815.
- [ 11 ] Mimura M, Yasuda K, Yamaguchi H. RAPD variation in wild, weedy and cultivated azuki beans in Asia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2000, 47: 603-610.
- [ 12 ] Yoon M S, Doi K, Kaga A, Tomooka N, Vaughan D A. Analysis of the genetic diversity in the *Vigna minima* complex and related species in East Asia. *Journal of Plant Research*, 2000, 113: 375-386.
- [ 13 ] Dellaporta S L, Wood, Hicks J B. A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Molecular Biology*, 1983, 1: 19-21.
- [ 14 ] Key Gene. *AFLP Protocol for Public Release*. Version 2.1, 1994: 3.
- [ 15 ] Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 1908 44: 223-270.
- [ 16 ] Rohlf J F. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.1. Users Guide. Setauket, New York: Exeter Software, 2000.
- [ 17 ] Innan H, Terauchi R, Kahl G, Tajima F. A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. *Genetics*, 1999, 151: 157-164.
- [ 18 ] Felsenstein J. Phylogenies from restriction sites, a maximum likelihood approach. *Evolution*, 1992, 46: 557-574.