

中国野生大豆遗传资源搜集基本策略与方法

王克晶 李向华

(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工程, 北京 100081)

摘要: 遗传资源搜集原则是通过种子采集追求样本具有最高程度的遗传多样性。为了合理而有效地搜集野生大豆资源, 近年来通过野生大豆居群考察和遗传多样性分析, 初步明确了野生大豆资源居群的遗传多样性分布动态: 遗传多样性地理的和生态的区域性、生态系统内居群的遗传相关性及各种生境下居群遗传多样性差异, 从理论上奠定了野生大豆资源合理有效搜集的依据。根据居群遗传多样性的分布规律, 初步建立了居群野生大豆资源的搜集策略和方法。

关键词: 遗传多样性; 考察搜集; 搜集策略; 野生大豆; *Glycine soja*

Fundamental Strategies and Methods for Collection of Wild Soybean Germplasm Resources in China

WANG Ke-Jing, LI Xiang-Hua

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

Abstract: The object of collecting for crop genetic resources is to obtain the highest degree of genetic diversity in the seed samples. In order to effectively collect wild soybean germplasm resource, we surveyed and analyzed genetic diversity in the natural populations of wild soybean in recent years, and understood the patterns of genetic diversity in wild soybean populations: including geographical and ecological regionalities of genetic diversity, genetic relationship among populations within ecosystems, and the degrees of genetic diversity in wild soybean populations under various habitats. These results have become a theoretical fundament in guiding collecting of wild soybean germplasm. According to the distribution of genetic diversity for wild soybean populations in various habitats, we preliminarily established fundament principia and methods for effectively collecting wild soybean germplasm resources.

Key words: Genetic diversity; Collecting; Sampling strategy; Wild soybean; *Glycine soja*

大豆(*Glycine max*)起源于中国,中国野生大豆(*G. soja*)是其直接的祖先。野生大豆是大豆遗传资源的重要组成部分,在大豆起源与进化的研究中具有重要的价值。野生大豆在我国的分布范围在23°57′~53°33′30″N, 96°46′~135°E,北至黑龙江省沿岸,东至乌苏里江沿岸,南至广东省中北部,西至西藏察隅。

野生大豆是一年生草本自花植物,种群内会有2%~3%的异交率^[1],具有比较强的环境适应性。在我国的生长环境包括公路边、河岸、湖岸、水塘、林

下及林间空地、农田边、沿海盐碱地、荒山、草原、草丛、山顶、山谷、山坡、干枯河道、湿地,几乎有草本植物生长的地方都能见到。野生大豆居群的分布面积变化极大,通常沿着适宜环境分布。在湿地、江河(口)岸边或开阔的地方分布几十亩甚至上千亩,而面积小的仅1m²。

野生大豆资源搜集原则是通过搜集种质最大程度地保护其遗传多样性。由于野生大豆种群分布面积差异很大,分布的环境复杂,资源搜集工作需要合理的采集策略和措施,搜集到的种子材料才能较

收稿日期:2011-11-10 修回日期:2012-01-25

基金项目:农业部农作物种质资源保护与利用专项;农业部农业野生植物保护项目

作者简介:王克晶,长期从事野生大豆资源工作。E-mail: wangkj@caas.net.cn

大程度地代表该物种在一定区域范围内的遗传多样性,同时也能够很好地保护采集地资源种群的基本生存数量和遗传结构不受到干扰和破坏。作为以种子方式繁殖和以自交生殖的野生大豆来说,野生大豆取样样本的遗传多样性是受搜集样本空间尺度大小影响的。如果是大空间的地理尺度取样,其遗传多样性表现为地理空间(区域)种群间的遗传多样性小于种群内的遗传多样性^[2-3];如果是一定空间范围内的小尺度天然居群取样,其遗传多样性表现为居群间遗传多样性大于居群内^[4-6]。

野生大豆资源搜集时单一居群内个体样本取样策略有若干研究者进行了研究^[7-9],他们指出取样 35~45 个体能基本包含该居群 100 个样本中绝大部分的遗传变异,取样时每个体间应该相隔 10m 以上,这样才能保证不对遗传变异完全相同的个体重复取样。对一个地理区域范围资源取样,府宇雷等^[4]提出在一个地区尽可能收集居群,在种群内适当采集单株;胡志昂和王洪新^[10]建议在十几到几十公里间隔设取样点,每点取 100 单株,每株取一个有效荚。由于野生大豆居群面积大小、所在的生态系统和居群形成的时间和历史背景都不相同,地理区域的和居群的遗传多样性水平和分布样式不尽相同,实际取样有复杂性。当欲对不同生态系统中的资源进行搜集时,不可能事先测定居群的遗传多样性后再取样。所以,

表 1 搜集居群的概况

Table 1 Information on natural populations of Chinese wild soybean analyzed in this study

| 居群 Pop. | 样本数 Sample size | 采集点 Collection site | 居群面积(m ²) Area size | 生境 Habitat |
|---------|-----------------|---------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 33 | 漠河-1 黑龙江 | 7000 | 荒地 Wasteland |
| 2 | 21 | 漠河-2 黑龙江 | 500 | 田边 水沟 Field edge, drain ditch |
| 3 | 30 | 塔河-1 黑龙江 | 1500 | 柳条林 Osier filed |
| 4 | 31 | 塔河-2 黑龙江 | | 柳条林护坡 Osier revetment-like |
| 5 | 30 | 平谷-1 北京 | 1000 | 公路边(稍旱) Roadside |
| 6 | 27 | 平谷-2 北京 | | 旱河堤 Drought revetment-dike |
| 7 | 33 | 十堰-1 湖北 | 4000 | 山谷、田边 Valley, field edge |
| 8 | 33 | 十堰-2 湖北 | 5000 | 山谷、田边 Valley, field edge |
| 9 | 33 | 襄樊-1 湖北 | 400 | 山顶、行人多 Mountain |
| 10 | 34 | 襄樊-2 湖北 | 1300 | 山顶、废弃农田 Wasteland |
| 11 | 34 | 开县-1 重庆 | 3000 | 山坡 Hillside |
| 12 | 35 | 关面 重庆 | 2000 | 山坡 Hillside |
| 13 | 26 | 连州-1 广东 | 1000 | 小河边 Rivulet |
| 14 | 10 | 连州-2 广东 | 500 | 山脚 Hill-foot |
| 15 | 30 | 明溪-1 福建 | 150 | 公路边 Roadside |
| 16 | 30 | 明溪-2 福建 | 100 | 公路边 Roadside |
| 17 | 30 | 上察隅 西藏 | 1000 | 山坡、田边 Hillside, field edge |
| 18 | 30 | 下察隅 西藏 | 300 | 山坡、田边 Hillside, field edge |
| 19 | 30 | 一汽院内 天津 | 80 | 水沟 Drain ditch |
| 20 | 41 | 蓟县-1 天津 | 300 | 水塘 Pond |

客观上需要对各种生态环境下分布面积大小不同的居群遗传多样性水平、居群间的基因流和相互遗传关系、居群内个体的亲缘关系有所认识,在理论上理解天然居群遗传多样性及居群相互遗传关系共性的、规律的东西,这是资源搜集必要的理论基础,对指导搜集具有重要意义。遗传资源搜集不是“即兴”采集行为而是以群体遗传学和保护遗传学的理论为基础进行。

为了制定一个合理的野生大豆资源搜集策略和方法,根据保护遗传学的基本原理,本文进行了各种生态系统的野生大豆居群、不同尺度地理种群样本的遗传多样性水平测定,初步研究和探讨了如何合理地搜集野生大豆资源的一些有关的理论基础,为合理有效搜集野生大豆资源提供参考。

1 基本理论数据调查、分析与研究方法

1.1 数据来源

本文以本课题研究数据为基础,结合多年考察,分析和阐述合理搜集野生大豆资源理论依据的居群遗传多样性动态和分布。

1.2 居群样本采集

使用在各地采集的 31 个居群(表 1)评价自然居群遗传多样性水平。居群取样随机采集单株,取样植株距离根据居群面积大小,在 2~20m。

续表

| 居群 Pop. | 样本数 Sample size | 采集点 Collection site | 居群面积(m ²) Area size | 生境 Habitat |
|---------|-----------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------|
| 21 | 40 | 蓟县-2, 天津 | 300 | 路边坡、林下 Road revetment-dike |
| 22 | 40 | 蓟县-3, 天津 | 600 | 水坑内周围 Pond |
| 23 | 30 | 延庆, 北京 | 3000 | 白河水库边 Reservoir |
| 24 | 28 | 怀柔, 北京 | 400 | 小河岸边 Stream |
| 25 | 30 | 密云, 北京 | 3000 | 白河岸边 Stream |
| 26 | 30 | 平谷-1, 北京 | 1000 | 公路边(稍旱) Roadside, drought |
| 27 | 30 | 顺义, 北京 | 1000 | 路边 Roadside |
| 28 | 30 | 石景山, 北京 | 2000 | 永定河岸 Riverside |
| 29 | 30 | 门头沟, 北京 | 500 | 山区路边 Roadside |
| 30 | 30 | 昌平, 北京 | 1000 | 路旁沟中 Roadside, ditch |
| 31 | 30 | 朝阳, 北京 | 1000 | 河岸 Stream |
| 32 | 30 | 丰台, 北京 | 2000 | 永定河边 Riverside |

4 号和 26 号居群为统一居群, 在两套样本中重复分析使用见表 2

1.3 基因库资源样本

对国家基因库野生大豆收集品 375 份样本和 96 份微核心样本调查了其遗传多样性和地理的分布^[11-12]。

1.4 SSR 标记

对取样研究样本提取 DNA 和进行 SSR 标记。1~22 号居群使用一套 20 对 SSR 引物, 23~31 号居群使用一套 20 对 SSR 引物。两套共同引物 16 对 (Satt168、Satt180、Satt216、Satt236、Satt267、Satt281、Satt352、Satt373、Saa386、Satt414、Satt429、Satt431、Satt434、Satt453、Satt571、Satt590)。1~22 号居群差异引物: Satt022、Sac_112、Satt586、Satt173, 23~32 号居群差异引物: Satt390、Satt334、Satt242、Satt530。

1.5 数据处理

使用 Popgen1.31、PowerMarker3.25、FSTAT2.9.3、STRUCTURE2.1 软件进行相应的遗传多样参数估计和有关的遗传关系分析(有关分析软件在相应网站下载)。遗传参数包括多态位点百分率(A_p)、等位基因数(N_a)、基因型(单元型, Hap)、香农指数(I)、实际观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、等位基因丰富度(R)、居群内变异(AMOVA 分析, $N_{var} \%$)。

2 调查结果与分析

2.1 野生大豆考察搜集空间尺度上的种群基本遗传特性

2.1.1 地理区域性 我国野生大豆地理分布上明显存在区域性。使用国家基因库 375 份样本进行了遗传多样性分析^[11], 并分析了 96 份微核心样本遗传多样性, 研究结果已经证明这种地理区域性的存在(图 1, 图 2)^[11-12]。

研究显示, 我国野生大豆遗传上分为长江以北

(北方、中部、华东北部) 和以南(东南、南方、西南) 两大地理区域(图 1)。研究还显示, (1) 地理距离较近的生态区之间的遗传距离比与之地理较远的区域间的遗传距离小。东北(NE) 与北方(N)、长江流域(CJV)、南方(S) 的遗传距离依次降低, 为 0.295、0.439、0.549。同样, 北方与长江流域、与南方之间遗传距离依次降低, 为 0.353 和 0.487; 南方(S) 与长江流域、与北方之间依次增加, 为 0.468 和 0.487。(2) 由北向南, 生态区之间遗传距离逐渐增大。(3) 南方生态区与其他生态区之间的遗传距离数值都比较高, 这可能与南方生态区的遗传多样性和遗传结构有关。基因库野生大豆种质东北生态区与北方生态区更为相近, 长江流域生态区和南方生态区各自较远(图 2)。

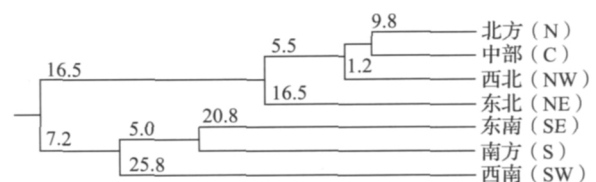


图 1 国家基因库核心样本资源基于 Nei's (1978) 遗传距离的 UPGMA 地理区域聚类

Fig. 1 A UPGMA dendrogram in a set of genebank core collection of wild soybean based on Nei's (1978) genetic distance between seven geographical ecotypes

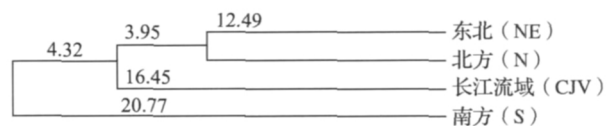


图 2 国家基因库微核心样本资源基于 Nei's (1972) 遗传距离的 UPGMA 地理区域聚类

Fig. 2 A UPGMA dendrogram in a set of genebank micro-corecollection of wild soybean based on Nei's (1972) genetic distance between 4 geographical regions

2.1.2 生态区域性 野生大豆对生态环境比较敏感。在一个地区往往会出现生态区域遗传差异。北京地区野生大豆基于 SSR 标记分析的遗传多样性发现^[5]，北京野生大豆遗传关系上分为北部燕山余脉生态区域(图 3, I 组)和西南部太行山余脉生态区域(图 3, II 组)。在一个地区或生态区内也往往有生态系统的联系。北京北部 1、2 和 3 号居群(图 3)是白河水系生态系统, 7、9 和 10 号居群属于永定河水系生态系统。

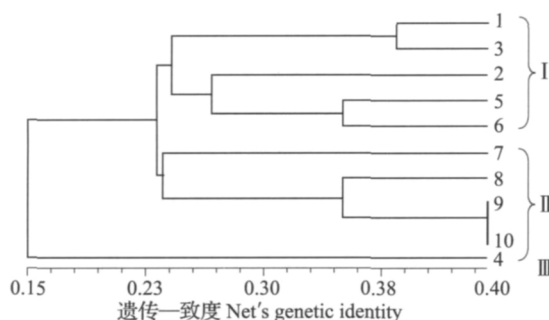


图 3 北京地区 10 个野生大豆天然种群的聚类分析

Fig. 3 Clustering of 10 Beijing natural populations of wild soybean based on Nei's (1972) genetic identity

2.1.3 居群遗传多样性差异 天然居群的生境条件千差万别,包括公路边、河岸、湖岸、水塘、林下及林间空地、农田边、沿海盐碱地、荒山、草原、草丛、山顶、山谷、山坡、干枯河道、湿地,几乎有草本植物生长的地方都能生长。各种生境下居群的遗传多样性有着基本的动态(表 2、表 3)。遗传多样性的高低由遗传参数或指数体现,遗传参数多种多样,主要有等位基因数、香农指数、辛普森指数(基因多样性指数 h 、多态性信息量指数 PIC)、等位基因丰富度等。一些分子的遗传多样性指数是描述一个基因位点情况,此时对一个居群而言,各位点总和的简单算数平均数即可作为居群整体的估算值。野生大豆居群估算的遗传多样性高低值只能在同一套研究样本中居群间比较,不可与其他资料做数字高低比较,只能比较趋势,因为各研究资料结果来源背景不尽相同,如所使用的遗传标记种类(RAPD、AFLP、SSR 等)、标记的数目、同样标记数目而引物不同、样本大小、相同样本数而取样尺度不同等。

调查中也看到,绝大部分面积较大、受干扰小、土质肥沃的自然居群通常有较高的遗传多样性,表现出相对多的等位基因数(N_a , 带数)、相对高的香农指数(I)和等位基因丰富度(R)等。如 1、2、4、7、8、9、13、14、15、21、23、25、27、29、30、31 号居群,这些居群分布在撂

荒地、受干扰少的存在历史长的山区、水系统(河岸、河床、湖岸、水塘)、大块原野。某些公路边或排水沟居群有时遗传多样性也较高(15 号居群、20 号居群)。19 号排水沟居群很可能与水流动携带外来迁移个体定居有关。总的倾向是通常在生态环境好而且是原始的居群具有高的遗传多样性,如果居群受到明显的环境胁迫,或者是奠基者居群都显示出低的遗传多样性。

从表 1 和表 2 中看到,同样的生态环境而遗传多样性不同。这里要考虑的原因有居群的大小、居群的形成历史时间和背景、居群是否受到外因干扰、环境的选择。一个居群经常是受到环境多种因素的复合影响。归结起来主要导致野生大豆居群遗传多样性波动或损失因素有:

(1) 奠基者效应:往往是新生或正在成长的居群。由少数传播种子繁衍而生,遗传多样性较低。常见于公路、大院、河滩、空地、草坪等人工工程。如表 2 中 19 号(厂区)和 24 号(河滩)居群。

(2) 环境选择效应:处于某种环境下的居群,如盐碱地、干旱或其他逆境等自然条件下的居群在长期的自然选择下适应生境条件而正常生长,但是形态上比较单一,遗传多样性较低。如表 2 中 5 号和 6 号居群(干旱环境)、西藏 17 号和 18 号居群。在高原环境下生长,西藏居群的遗传多样性都较低。但是 17 号居群有较多的等位基因组合型(单元型、基因型),暗示了这个居群发生了由个体间天然杂交而引起了高频率的基因重组。

(3) 干扰:当居群受到一些动物或放牧的危害,居群基因型(家系)数量和个体数量减少,遗传多样性降低。如表 2 中 12 号居群(放牧),在一个山坡上,遭受村民放牧,个体分布密度相对稀落,遗传多样性较低。

(4) 居群衰退:居群遭遇不良的生存条件变化而处于某种环境胁迫之下,或者遭遇群落其他资源竞争优势的物种而处于劣势情形下居群的生存力逐年下降,个体繁殖率降低,种子补充不足,居群面积萎缩,严重时消亡。这样的居群遗传多样性往往会发生很大丢失。在野外经常能够遇见这种衰败萎缩群体,搜集这样的居群也是一种资源抢救。

(5) 生境破坏或侵蚀:野生大豆居群突然遭遇自然灾害或人类生产活动而失去生存空间。这种灾难是频繁发生的。2010 年上海闵行区一小区住宅工地仅几株野生大豆。1998 年在河北省迁安市发现一个面积 0.2hm² 芦苇塘野生大豆居群,2007 年已经被开垦种植水田。

表2 野生大豆居群遗传多样性参数

Table 2 Diversity parameters in 18 natural populations of wild soybean in China

| 居群 Pop. code | 带数 <i>N_a</i> | 丰富度 <i>R</i> | 观察杂合 <i>H_o</i> | 期望杂合 <i>H_e</i> | 香农指数 <i>I</i> | 多态位点(%) <i>A_p</i> | 单元型 Hap | 居群变异(%) Var |
|-----------------|----------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------|---------------------------------|------------|----------------|
| 1 | 57 | 2.394 | 0.003 | 0.345 | 0.599 | 90 | 25 | 2.628 |
| 2 | 48 | 2.199 | 0 | 0.317 | 0.525 | 85 | 13 | 1.544 |
| 3 | 45 | 2.029 | 0.002 | 0.235 | 0.409 | 80 | 14 | 1.630 |
| 4 | 52 | 2.540 | 0.005 | 0.406 | 0.684 | 90 | 26 | 2.902 |
| 5 | 20 | 1.000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 6 | 21 | 1.030 | 0 | 0.004 | 0.008 | 5 | 2 | 0.0002 |
| 7 | 61 | 2.770 | 0 | 0.445 | 0.771 | 100 | 30 | 3.411 |
| 8 | 80 | 3.578 | 0.003 | 0.546 | 1.020 | 95 | 35 | 4.170 |
| 9 | 50 | 2.201 | 0.002 | 0.354 | 0.574 | 75 | 30 | 2.708 |
| 10 | 45 | 2.178 | 0 | 0.352 | 0.575 | 80 | 31 | 2.778 |
| 11 | 33 | 1.548 | 0.003 | 0.102 | 0.186 | 45 | 13 | 0.790 |
| 12 | 25 | 1.158 | 0 | 0.036 | 0.067 | 25 | 6 | 0.292 |
| 13 | 45 | 2.016 | 0.020 | 0.270 | 0.462 | 70 | 27 | 1.602 |
| 14 | 41 | 2.000 | 0.010 | 0.330 | 0.532 | 70 | 14 | 0.743 |
| 15 | 49 | 2.128 | 0.083 | 0.329 | 0.544 | 95 | 30 | 2.260 |
| 16 | 30 | 1.274 | 0 | 0.050 | 0.096 | 50 | 5 | 0.348 |
| 17 | 31 | 1.549 | 0.007 | 0.238 | 0.342 | 55 | 26 | 1.638 |
| 18 | 25 | 1.226 | 0 | 0.068 | 0.108 | 25 | 8 | 0.475 |
| 19 | 20 | 1.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | — |
| 20 | 48 | 2.329 | 0 | 0.216 | 0.391 | 85 | 12 | — |
| 21 | 52 | 2.590 | 0.008 | 0.329 | 0.572 | 95 | 9 | — |
| 22 | 35 | 1.732 | 0 | 0.104 | 0.186 | 75 | 31 | — |
| 23 | 54 | 2.696 | 0.007 | 0.388 | 0.650 | 80 | 38 | 4.577 |
| 24 | 22 | 1.100 | 0.002 | 0.021 | 0.033 | 10 | 3 | 0.222 |
| 25 | 83 | 4.142 | 0.030 | 0.586 | 1.095 | 100 | 77 | 6.797 |
| 26 | 20 | 1.000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 27 | 93 | 4.597 | 0.055 | 0.624 | 1.200 | 95 | 64 | 7.100 |
| 28 | 37 | 1.849 | 0 | 0.185 | 0.311 | 55 | 16 | 2.202 |
| 29 | 76 | 3.790 | 0.032 | 0.454 | 0.831 | 100 | 42 | 5.214 |
| 30 | 88 | 4.332 | 0.020 | 0.606 | 1.137 | 95 | 42 | 7.095 |
| 31 | 59 | 2.945 | 0.048 | 0.395 | 0.689 | 85 | 56 | 4.405 |
| 32 | 49 | 2.450 | 0.028 | 0.368 | 0.611 | 85 | 44 | 4.205 |

此表有3套分析样本:1~18号居群、19~22号居群、23~32号居群

2.1.4 居群内同质性 不同居群内个体的亲缘性程度也会有差异。有可能基因频率或其他遗传参数相似,但是含有少的基因型意味着居群的同质性个体比例高并且遗传交流少。遗传多样性低的居群、面积小的居群往往基因型也少,遗传同质性也高。表2中低于10个单元型的居群(21号居群例外)不外乎是环境选择效应(5号和6号干旱居群、18号高寒居群)、干扰(12号居群)、小居群(16号居群)和奠基者效应(24号居群)。

2.1.5 居群遗传分化 绝大多数野生大豆居群都存在数量各异的特有SSR带(表3)。不同生境下的

居群往往遗传上有显著差异,即使同生态区(同县地域11-12居群、同峡谷17-18居群)、同一座山(7-8居群、9-10居群)、同村(13-14居群)、同一条公路(15-16居群),甚至同一居群,相距30~40m异质环境的亚居群(3-4居群、5-6居群)也发生显著遗传差异,显示出居群对环境的遗传适应性是很敏感的,表现出不同的等位基因频率遗传结构。如果等位基因频率积累的差异显著,就造成了遗传上分化(表4遗传分化 F_{st} 值),等位基因频率的不同是居群遗传分化的原因(等位基因的种类和频率不同,频率变动在0~100%)。

两个居群存在遗传分化是因为居群等位基因频率积累的差异所导致。有时在具有相同或相近的遗传参数居群之间,评价居群是否有遗传分化就很难判断。如表 2 中的同一座山的 2 个居群(9 号和 10 号居群)基本上有完全类似的遗传参数,而一对同村居群(1 号和 2 号居群),也基本有类似的遗传参数。每组两个居群间是否有显著遗传差异很难回答。通过遗传分化参数 F_{st} 分析发现 9 -

10 居群发生遗传分化,而 1 - 2 居群没有显著分化。但是, F_{st} 指数显著性测验只表明两个居群是否有遗传分化或分化程度的大小,而不能说明为什么。引入一个等位基因频率积累差异指数 τ (Difference index of allele frequency accumulation)。这个指数解释为什么 9 - 10 居群分化而 1 - 2 居群没有分化(表 3)。1 - 2 居群在样本中 τ 值最小;而 9 - 10 居群的 τ 值非常高。

表 3 野生大豆成对邻近居群的遗传结构差异

Table 3 Differences in genetic structures between nine pairs of neighboring populations of Chinese wild soybean separated at various geographical distances

| 居群 Population- pair | 特异带数 Number of specific alleles | 特异带位点数 Number of loci involved for specific alleles | 同基因位点数 Number of loci with same single alleles | 异基因位点数 Number of loci with different alleles | 基因频率积累 差异指数 τ value | |
|---------------------------|---------------------------------------|--|---|---|--------------------------------|-------|
| 1-2 | 1 | 15 | 13 | 2 | 0 | 0.387 |
| | 2 | 6 | 3 | | | |
| 3-4 | 3 | 11 | 7 | 1 | 0 | 0.486 |
| | 4 | 3 | 3 | | | |
| 5-6 | 5 | 11 | 11 | 8 | 11 | 1.002 |
| | 6 | 12 | 12 | | | |
| 7-8 | 7 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0.895 |
| | 8 | 26 | 11 | | | |
| 9-10 | 9 | 17 | 12 | 3 | 2 | 0.958 |
| | 10 | 26 | 17 | | | |
| 11-12 | 11 | 14 | 5 | 8 | 2 | 0.770 |
| | 12 | 5 | 8 | | | |
| 13-14 | 13 | 12 | 6 | 5 | 0 | 0.884 |
| | 14 | 9 | 16 | | | |
| 15-16 | 15 | 21 | 4 | 1 | 1 | 0.639 |
| | 16 | 4 | 11 | | | |
| 17-18 | 17 | 14 | 11 | 5 | 6 | 1.067 |
| | 18 | 11 | 11 | | | |

等位基因频率积累差异指数 τ ($\tau = \frac{1}{L} \sum_i \sum_j |x_{ij} - y_{ij}|$), x_{ij} 和 y_{ij} 是居群 x 和 y 第 i 位点第 j 等位基因频率 L 是位点数

2.1.6 遗传分化或亲缘性的“河流效应” 野生大豆在水系生态系统中,在一定距离范围内居群间的遗传分化会比较小,或亲缘性较高,表现遗传距离很小^[1,13]。同样在相邻的地理区域种群间也发现这种现象,出现低的遗传距离^[2,11-12]。在分析北京的居群时发现,沿着同一河流的一定区段居群遗传距离比较小,遗传关系密切(图 2)。同时,下游区域居群遗传多样性高。如北京水系的 4 个岸边居群,北京白河上游 23 号居群遗传多样性参数低于下游 25 号居群(表 2);北京永定河上游 27 号居群遗传多样性参数低于下游 31 号居群(表 2)。北京这两个下游居群都是缓冲肥沃地带,在那里能很好接收到上游扩散种子。23 和 25 号居群相距约 123km 河道距

离 28 和 32 居群相距约 17.5km 的河道距离。23 和 25 居群距离太远可能不会成为有力的证据,但是 28 和 32 居群的距离可能会对下游居群产生一定影响,水系会对居群的形成和种子扩散起一定的媒介作用。

2.1.7 基因流 野生大豆居群间的基因流包含两个方面的作用,分别是花粉漂移(天然杂交)和种子传播(个体迁移),这两个方面会对邻近居群产生影响,种子扩散距离要比花粉漂移的距离长。分析了黑龙江塔河县 2 个异质环境亚居群(表 1 中 3 号和 4 号居群,柳条林和林地护坡),结果发现两个居群内和相距近 30m 范围内居群间发生个体天然杂交(图 4)^[14]。

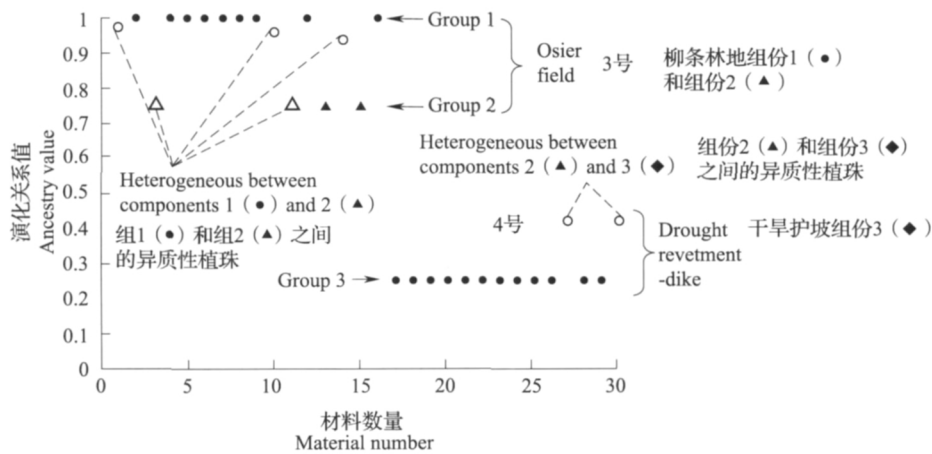


图4 野生大豆居群内和相距近 30m 的居群间发生个体天然杂交

Fig.4 There was natural crossing within and between natural populations of wild soybean. No. 3 and No. 4 populations spaced at approx. 30 m apart

野生大豆种子最远传播距离在日本野生大豆报告为 12.4km^[15],他们使用 20 对 SSR 引物鉴定出 12.4km 之远的居群出现相同基因型个体。Kuroda 等^[16]还鉴定出 100 ~ 400m 范围内的野生大豆居群会出现相同基因型个体。本研究在黑龙江省漠河县同一个村相距约 1.5km 的两个居群(表 1 中 1 号和 2 号居群)检测到各出现 4 株在 20 对 SSR 引物上等位基因完全相同的基因型个体。

李军等^[17]报告种子炸荚大部分在 3m 范围内, Oka^[18]测定野生大豆炸荚弹射种子距离最远有 5m, 2010 年本研究在北京观测到最远达 5.8m。炸荚距离与植株高度、种子和荚的大小、当日天气有密切关系。所以如果以 Oka 测定的最远 5m 计算, 1.5km 距离靠自身力量种子传播也需要 300 年。然而 1 号居群是荒废不到 10 年的荒地, 1 号和 2 号之间是平坦农田, 也没有水的流动传播, 因此 2 号到 1 号居群

种子传播是外部因素动力(如动物、鸟和人类农事作业等), 显示出外部因素对野生大豆种子传播是有深刻影响的。

评估了表 1 中前 18 个居群, 9 对不同地理距离的天然居群的基因流参数(表 4)。结果显示, 除了 1-2 号对居群(1-2)、干旱环境复合居群 5-6 号对(亚)居群(5-6)外, 基本上基因流的强弱与地理距离成正反向关系, 地理距离越大, 基因流变小。5-6 号(亚)居群严重干旱环境天然杂交很难成功, 公路边的个体也很难适应干河堤上的生境条件, 尽管是紧密生长在一起的居群, 出现了适应性差异隔离, 也没有什么基因流发生, 因此基因流很低, 与最远相距 50km 的 K-L 居群间的极低基因流的含义是不同的。这个结果说明, 在资源保护原位保护点的设置上需要考虑生态区和地理的距离, 同样对种子搜集具有指导意义。

表 4 不同地理距离成对居群间的遗传关系

Table 4 Genetic relationship between paired neighboring populations of Chinese wild soybean separated at various geographical distances

| 居群 Population-pair | 地理距离 Geographical distance | 遗传一致性 Genetic identity | 遗传距离 Genetic distance | 基因流 Gene flow | 同基因型 Identical genotype | 分化 Differentiation (Fst) | |
|-----------------------|-------------------------------|---|---|---|----------------------------|---|----------|
| K-L (No. 11-12) | 50 km | 0.598 | 0.515 | 0.091 | 0 | 0.732* | P < 0.05 |
| Q-R (No. 17-18) | 35 km | 0.575 | 0.553 | 0.212 | 0 | 0.541* | P < 0.05 |
| O-P (No. 15-16) | 20 km | 0.651 | 0.429 | 0.326 | 0 | 0.434* | P < 0.05 |
| J-I (No. 9-10) | 2.5 km | 0.651 | 0.430 | 0.781 | 0 | 0.243* | P < 0.05 |
| A-B (No. 1-2) | 1.5 km | 0.943 | 0.059 | 4.325 | 1 | 0.055 | P > 0.05 |
| M-N (No. 13-14) | 1.0 km | 0.822 | 0.196 | 1.253 | 0 | 0.166* | P < 0.05 |
| G-H (No. 7-8) | 0.8 km | 0.671 | 0.400 | 1.476 | 0 | 0.145* | P < 0.05 |
| E-F (No. 5-6) | 40 m | 0.499 | 0.695 | 0.002 | 0 | 0.993 * | P < 0.05 |
| C-D (No. 3-4) | 30 m | 0.896 | 0.110 | 2.109 | 3 | 0.106* | P < 0.05 |

方框数值表示特例

2.1.8 形态与遗传一致性 野生大豆形态上遗传多样性与分子上的遗传多样性基本具有一致的趋势。在形态类型丰富的某个地区或地理区域也往往有丰富的遗传多样性。丁艳来等^[19]报道中国南方野生大豆的形态和 SSR 遗传多样性最高,其次是黄淮海地区,东北最低。北京调查 10 个野生大豆天然居群结果显示,以百粒重、株高、地上干物重、单株产量、叶长、叶宽、生长速率 7 个形态和数量性状表型和 SSR 的香农指数有一致的变化趋势(图 5)。

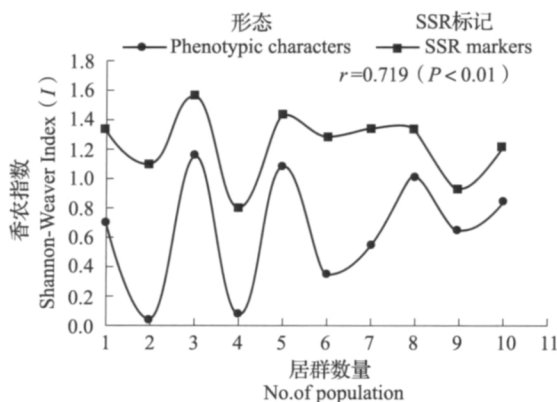


图 5 10 居群 SSR 香农指数与表型的香农指数的变化一致的趋势

Fig. 5 Distribution patterns of genetic and phenotypic Shannon-Weaver indexes across ten populations of wild soybean sampled in Beijing regions

2.2 资源搜集策略与方法

2.2.1 划定地理生态区域和生态系统 野生大豆在邻近地理区域生态区有一定的遗传亲缘性(图 1~图 3)和河流效应,在某个地区的资源搜集需要尽可能涵盖地理的和生态的区域,搜集的资源具有不同生态区域代表性,包含多的生理、生态和遗传的多样性。

2.2.2 搜集居群划分 野生大豆种群由于人为因素、气象事件、土壤差异、地理因素及其他自然因素导致种群片断化,形成大小不等分布形状各异的小居群。根据 2002 年以来全国搜集的 1971 个居群统计,野生大豆面积最小不足 1m²,最大有 10000m²,甚至更大。全国 80.9% 居群不足 100m²,100~500m² 占 12.3%,500~1000m² 占 2.6%,1000m² 以上占 4.2%。在这里搜集居群是指为便于搜集而实际搜集的空间范围个体群,与严格意义上的植物生态学的居群有区别。因为资源搜集的特殊性,搜集的个体群是近似于而不完全等同于植物生态学的居群范围。

在下列情况下,原则上可以划分为独立搜集居群,如居群之间有明显的空间隔离,如距离 100m 以上的不同生境、地形隔离。在自然条件下有些野生大豆居群的边界大小实际很难把握,有的沿着某个生态梯度分布,没有明显的边界。特别是河岸或水渠等环境,野生大豆沿着水道断断续续零星分布,没有清楚的居群边界,有时候野生大豆是零星簇状斑块连续分布,这种情况下就需要人为划分搜集居群。花粉可能漂移的距离大约 30m,那么零星簇状的间断的斑块状分布可以认为以一个花粉源(主要簇状斑块)为半径、潜在的遗传相关范围大约直径为 60m。Jin 等^[20]研究上海江湾机场遗址野生大豆居群取样策略发现,在 30m 距离范围内个体间遗传上呈显著正相关,超过 60m 开始出现遗传负相关性,其结果与本研究根据花粉漂移试验估计的潜在遗传相关小居群分布范围吻合。李军等^[17]观测母株弹射距离 2~5m,种子炸荚弹射距离最远 5m。假如在没有其他外在因素作用下,经历 30 年种子传播距离约 150m(2~5m×30≈60~150m),考虑到两端双向扩散,居群范围应在 300m。

根据以上的居群研究,结合资源搜集的实际操作特性,野生大豆沿着某个生态梯度断续零星分布时可以人为划定搜集居群。如果个体群间断间隔达到 60m 以上,可以划定为一个搜集居群(图 6a);如果个体植株断续零星分布有 150m,可以划定为一个搜集居群进行采种(图 6b);一个连续分布的大居群可以在适当地方断开划定一个直径大约 300m 范围的搜集居群(图 6c,d)。

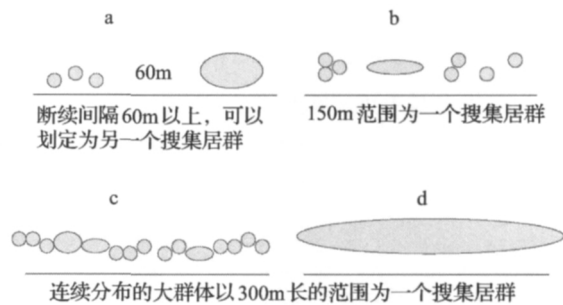


图 6 野生大豆搜集居群的人为划定

Fig. 6 Artificially-delimiting limits of wild soybean populations for collecting wild soybean resources

2.2.3 搜集居群的地理空间设置 在一个地区、一个生态区、一个生态系统,资源搜集需要在一定空间范围内设置取样点。胡志昂和王洪新^[10]建议在十几到几十公里间隔设取样点,每点取 100 单株,每株取一个有效荚。李军等^[17]建议在一个地区尽可能

取多的单株,每株收几个荚。府宇雷等^[4]提出在一个地区尽可能收集居群,在种群内适当采集单株。前者减少了取样居群数量,增加居群内的样本,后者强调多搜集居群。

根据 18 个居群(表 3)和 10 个北京天然居群的核 SSR 遗传多样性分析^[5]显示,野生大豆各居群往往都有自己的特异等位基因。因此,应该通过搜集多的居群实现遗传多样性保护。然而,资源搜集必须考虑搜集地区的空间范围、生态环境、各项成本和减少遗传背景类似样本,掌握一些基本原则。

(1) 距离原则: 在同一个生态条件或相似的生态区域,当野生大豆居群密度较大时,可以每 5 ~ 10km 间隔设置取样点。当居群密度较小时,可以 1 ~ 2km 间隔设置取样点。甚至在野生大豆极其稀少的生态环境下,可以缩短地理空间距离,甚至在 100m 到几百米距离设置间隔取样。对环境一致并且有遗传关联的种群(可能容易发生基因相互渗透)如同一水系等,资源收集时可适当增加距离。对取样点的距离设置应根据居群密度实际情况和搜集居群的划定原则确定。

(2) 生境原则: 即使在相同的地理空间范围或附近地段上有时也出现不同生境的居群,一般有明显的形态差异,可以作为不同种质搜集,有利于稀有基因的保护。

(3) 抢救性搜集: 濒危状态的居群应及时抢救搜集。

3.2.4 搜集居群内种子采集方法 野生大豆种子采集取样时要考虑整个居群的代表性,每份野生大豆资源是一个居群的混合取样样本,而不是一个单株样本(半野生型和特殊类型除外)。对于野生大豆居群内的植株取样策略,金燕和卢宝荣^[7]、赵茹等^[8]和朱维岳等^[9]研究指出,取样 35 ~ 45 个体能代表居群 90% 以上遗传多样性。居群内种子采集要遵循居群内个体分布的格局。野生大豆个体分布根据居群内的环境异质性主要有随机分布(Random distribution)、集聚分布(Aggregated distribution)、嵌式分布(Mosaic distribution)。在随机和集聚分布的居群根据居群大小把握取样间隔距离(通常 5 ~ 20m),采用随机取样方式,在嵌式分布居群中取样点随着植株簇的分布随机采集样本。资源采集可以混合采集种子,也可以单株采集种子。单株采集缺点是保种个体数量太大,如果是上百个搜集以上居群,保种数量之大和成本过高。无论是混合还是单株采集,原则上取样点要代表该搜集居群的范围,保证有一定距离间隔的

单株 30 ~ 50 株。但是,对于遗传多样性可能单一的新生居群、小居群、环境胁迫下的居群可以适当减少取样数,降低成本。

野生大豆天然居群内有时会偶尔发现大粒型个体植株,可以单株采集和编号;有时会发现白花、灰毛等稀有形态性状类型,可按形态性状采集和编号。天然居群的大小和植株密度差异很大,最小的居群面积可能仅 1m²,甚至几株。在采集小居群样本时,注意每个植株保留一定量种子,防止人为灭绝。

3 讨论

野生大豆可能在几百万年前开始与多年生野生大豆出现分化^[21]。中国的亚热带是世界被子植物的起源地^[22]。野生大豆很可能起源该地理范围。我国的福建及华南地区或许是野生大豆的起源地或是最靠近起源地。野生大豆物种从在中国南部的起源地向北部、西北及西南地区扩散和定居。野生大豆向各地迁移过程中在适宜的地方定居,形成适应当地生态环境的种群。

分布于我国各地的野生大豆居群是动态的,居群的面积、密度和遗传结构是处于变化之中,野生大豆居群从诞生到消亡所持续的时间是受气候变化、自然和地理的条件变化和人类活动影响而决定的。近几十年来,考察发现有些居群消失,同时也看到由直接和被动的种子迁移出现新生居群。但是就目前我国的整体而言,居群消失和新生居群诞生速度并不平衡,消失的速度大于新生的速度,我国的野生大豆资源面积在减少,主要是由于环境恶化和人为因素。另外,野生大豆种群由于环境的变化,片断化严重,居群的面积小型化。根据最近 10 年(2001 - 2010 年)资源搜集和考察资料统计,搜集的居群面积 80% 小于 100m²。

我国野生大豆居群的分布主要在河流和湖泊及湿地、水塘和湿润处、山坡、公路沿线、林间空地、草原生态系统、农田生态系统(田边、地头、田埂、引水渠、农用路、村落附近、农田防护林带、水库等农业设施等)。实际上往往河流和湖泊及湿地、水塘和湿润处、山坡、公路沿线都与农田生态系统密切联系。近 10 年国家基因库搜集的野生大豆资源中超过 70% 是直接或间接从农田生态系统中搜集获得的;超过 50% 搜集居群靠近农田 100m 范围以内,超过 70% 搜集居群靠近 500m 范围以内。在宁夏,野生大豆依赖于农田引黄灌溉系统生存。在东北、黄淮海、南方大豆生产区,野生大豆居群密切靠近农田。在湿润和半湿润地区,野生大豆有时会生长在半干旱和季节性干旱的生境中。在干旱地区,野生大豆

主要生长在湿润和半湿润的生境中。

大豆诞生在我国有 5000 年历史,其诞生也意味着必然同野生大豆共存和重叠分布。这个过程中栽培大豆的基因也渗透到野生大豆中,对野生大豆物种产生重大影响^[23],出现一些白花、灰毛、绿子叶、无泥膜或大粒的半野生型大豆(*G. gracilis*) 通常还有相对高的脂肪含量^[24]。而且,野生大豆中百粒重 2.5~3.0g 的大粒型遗传背景与半野生大豆更密切,与栽培大豆的基因渗透有密切关系^[24]。半野生型大豆、百粒重 2.5~3.0g 的大粒型野生大豆几乎没有单纯的居群,基本都是零星生长于某些野生大豆居群中,偶尔有大粒型占优势的居群。有些百粒重 2.5~3.0g 的大粒型野生大豆也会含有不同的有色种皮(黄、绿、棕、双色及中间色)。

野生大豆为适应野生环境和物种繁衍,自然选择的压力总是倾向于结实较多的种子和种子变小。但是,并不是种子越小越有利于生存和繁殖后代,自然选择压力和进化的动力维持着一定生态环境下野生大豆个体的种子数量和种子大小的动态平衡。在天然居群中的半野生大豆个体在遗传性状分离下和自然选择双重作用下处于不稳定状态,消失的速度远大于母居群的速度。野外的半野生型大豆总是处于不断地偶尔诞生和逐渐消亡的动态之中。因此,半野生型大豆需要及时搜集保存。有些百粒重 2.5g 以上接近 3.0g 的大粒型野生大豆具有典型野生大豆形态,这样的个体是否是自然进化形成的需要研究。到目前为止,很少能够见到百粒重 2.5g 以上接近 3.0g 的大粒型野生大豆出现在远离农业生态系统的孤立居群或地理区域中。

国家基因库野生大豆资源保有量在省区间及在省区内的地区之间严重不平衡。宏观角度来讲,在未来的野生大豆资源搜集过程中,需要重点搜集我国西部地区(特别是西南地区)及广东的野生大豆。注重逆境下的野生大豆居群搜集,一是有的居群已经发生了遗传变异,适应逆境环境;二是遭遇了逆境环境,正在灭绝。在野生大豆分布广泛的地区应注意考察和搜集远离农田生态系统和远离人类经常活动地方的野生大豆居群(注意有些是居民搬迁后遗留的无人区域),也许这些地方没有受到栽培大豆的影响。

参考文献

- [1] Kiang Y T, Chiang Y C, Kaizuma N. Genetic diversity in natural population of wild in Iwate Prefecture, Japan [J]. *J Hered*, 1992, 83: 325-329
- [2] Wang K J, Takahata Y. A preliminary comparative evaluation of

- genetic diversity between Chinese and Japanese wild soybean (*Glycine soja*) germplasm pool using SSR markers [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54: 157-165
- [3] Wen Z X, Ding Y L, Zhao T J, et al. Genetic diversity and peculiarity of annual wild soybean (*G. soja* Sieb. et Zucc.) from various eco-regions in China [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 371-381
- [4] 府宇雷, 钱吉, 马玉虹, 等. 不同尺度下野生大豆种群的遗传分化[J]. *生态学报* 2002, 22(2): 176-184
- [5] 严茂粉, 李向华, 王克晶. 北京地区野生大豆种群 SSR 标记的遗传多样性评价[J]. *植物生态学报* 2008, 32(4): 938-950
- [6] 徐立恒, 李向华. SSR 标记对野生大豆种群遗传结构的研究[J]. *大豆科学* 2011, 30: 41-45
- [7] 金燕, 卢宝荣. 遗传多样性的取样策略[J]. *生物多样性*, 2003, 11(2): 155-161
- [8] 赵茹, 程舟, 陆伟峰, 等. 基于分子标记的野生大豆居群遗传多样性估算与取样策略[J]. *科学通报* 2006, 51: 1042-1048
- [9] 朱维岳, 周桃英, 钟明, 等. 基于遗传多样性和空间遗传结构的野生大豆居群采样策略[J]. *复旦学报: 自然科学版*, 2006, 45(3): 321-327
- [10] 胡志昂, 王洪新. 北京地区野大豆天然群体遗传结构[J]. *植物学报*, 1985, 27: 599-604
- [11] Li X H, Wang K J, Jia J Z. Genetic diversity and differentiation of Chinese wild soybean germplasm (*G. soja* Sieb. & Zucc.) in geographical scale revealed by SSR markers [J]. *Plant Breed*, 2009, 128: 658-664
- [12] 刘亚男, 李向华, 王克晶. 国家基因库野生大豆微核心样本遗传变异性的 SSR 标记分析[J]. *植物遗传资源学报* 2009, 10(2): 211-217
- [13] Fujita R, Ohara M, Okazaki K, et al. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. *J Hered*, 1997, 88: 124-128
- [14] Wang K J, Li X H. Genetic diversity and geographical peculiarity of Tibetan wild soybean (*Glycine soja*) [J/OL]. *Genet Resour Crop Evol*, 2011, Online
- [15] Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, et al. Population genetic structure of Japanese wild soybean (*Glycine soja*) based on microsatellite variation [J]. *Mol Ecol*, 2006, 15: 959-974
- [16] Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, et al. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan [J]. *Crop Sci*, 2008, 48: 1071-1079
- [17] 李军, 郑师章, 钱吉任, 等. 野生大豆种子雨的研究[J]. *应用生态学报* 1997, 8(4): 372-376
- [18] Oka H I. Genetic control of regenerating success in semi-natural conditions observed among lines derived from a cultivated x wild soybean hybrid [J]. *J Appl Ecol*, 1983, 20: 937-949
- [19] 丁艳来, 赵团结, 盖钧镒. 中国野生大豆的遗传多样性和生态特异性分析[J]. *生物多样性* 2008, 16(2): 133-142
- [20] Jin Y, He T H, Lu B R. Fine scale genetic structure in a wild soybean (*Glycine soja*) population and the implication for conservation [J]. *New Phytol*, 2003, 159: 513-519
- [21] Singh R J, Nelson R L. The utilization of soybean wild relatives: how can it be effective? [C]. *World Soybean Research Conference VIII*, Beijing, 2009: 211-212
- [22] Wu C Y. Hengduan Mountains flora and her significance [J]. *J Jpn Bot*, 1988, 63: 297-311
- [23] Wang K J, Li X H, Liu Y. Fine-scale phylogenetic structure and major events in the history of the current wild soybean (*Glycine soja*) and taxonomic assignment of semi-wild type (*Glycine gracilis* Skvortz.) within the Chinese subgenus *Soja* [J]. *J Hered*, 2011, 103: 13-27
- [24] Wang K J, Li X H. Genetic differentiation and diversity of phenotypic characters in Chinese wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) revealed by nuclear SSR markers and the implication for intraspecific phylogenetic relationship of characters [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2011, 58: 209-223