

基于 SSR 标记的四川大豆与引进大豆资源遗传多样性和群体结构分析

钟文娟,袁 灿,周永航,龚一耘,戢沛城,杨泽湖,牟方生

(四川省农业科学院 经济作物育种栽培研究所,四川 成都 610300)

摘 要:利用均匀分布于 20 条染色体的 53 对 SSR 标记(每条染色体上 2~5 对),对 190 份大豆资源进行遗传差异检测,随后根据标记试验结果进行遗传多样性分析、聚类分析、PCA 分析和群体结构分析。53 对 SSR 标记共检测到 159 个等位变异,每个位点等位基因范围为 2~6 个,平均每个位点的等位基因为 3 个,有效等位基因数 Nei 为 $1.474\ 4 \pm 0.237\ 5$,多态性信息含量 PIC 为 $0.305\ 0 \pm 0.105\ 6$;Shannon-Weaver 指数值为 $0.476\ 2 \pm 0.124\ 9$ 。这些参数显示了 190 份大豆资源异质程度不是很高,遗传多样性丰富程度一般,总体遗传多样性处于中等水平。UPGMA 聚类分析结果显示 190 份大豆资源(群体 1:P1)被分为 3 个大类,且四川审定大豆品种与野生大豆资源、国外引进资源亲缘关系较远,随后将四川审定大豆品种 31 份、国外资源 13 份和野生大豆资源 8 份共 52 份材料(群体 2:P2)单独进行聚类分析,52 份材料也被分成 3 个大类。群体 1 和群体 2 分别在 $K=3$ 、 $K=2$ 时得到合理群体结构。群体 1 的 3 个亚群分别是:亚群 I 由地域来源丰富的 78 份材料组成,不包含野生大豆资源;亚群 II 59 份材料中含 7 份野生大豆资源;亚群 III 53 份材料只包括 1 份野生大豆资源 zy05292。群体 2 分成两个亚群:亚群 I 26 份材料中含 24 份四川审定大豆品种和 2 份国外资源;亚群 II 包含了 6 份审定大豆品种。供试的 190 份大豆资源蕴含了比较丰富的遗传变异,显示了较高水平的基因多样性。群体结构不能严格地按照地域、来源国家的划分而区分,这一现象显示了大豆资源存在着广泛的基因交流。从分析结果来看,四川大豆资源的种质创新可以充分地利用国外引进资源与直立型野生大豆资源,进而丰富四川大豆的基因多样性。

关键词:四川大豆;野生大豆;SSR 标记;遗传多样性;群体结构

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.05.0657

Genetic Diversity and Population Structure Analysis of Sichuan Territory Soybean (*Glycine max*) and Introduced Resources by SSR Markers

ZHONG Wen-juan, YUAN Can, ZHOU Yong-hang, GONG Yi-yun, JI Pei-cheng, YANG Ze-hu, MU Fang-sheng
(Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610300, China)

Abstract: In total, 53 SSR locus, covered the entire soybean genome with 2 to 5 SSR locus were chosen on each chromosome, were used to conduct the genomic scanning of a collection of 190 soybean germplasms. And then based on the markers experiment results to analyze genetic diversity, clustering, PCA and population structure. A total of 159 alleles were detected using 53 SSR markers while 3 alleles was detected on average per locus with the range 2-6, the average value of Nei 's gene diversity was 1.474 4 with the range of $1.474\ 4 \pm 0.237\ 5$, the polymorphism information content (PIC) was 0.305 with the range of $0.305\ 0 \pm 0.105\ 6$, Shannon's Information Index was 0.476 2 with the range of $0.476\ 2 \pm 0.124\ 9$. These parameters indicated that the heterogeneous degree was not high and the genetic diversity was in the medium level in 190 soybean germplasms. The result of UPGMA cluster analysis indicated that the 190 soybean germplasms (Named P1) were divided into three major clusters. The 52 samples (Named P2) including 30 Sichuan soybean accessions, 14 abroad soybean resources and 8 wild soybean samples were divided into three broad clusters. Sichuan soybean accessions had a far genetic relationship with wild soybean and abroad soybean resources. The optimal K was 3 and 2 respectively in the population structure analysis of P1 and P2. P1 included 3 sub-populations: sub-population I contained 78 samples from different territory, sub-population II 59 germplasms had 7 wild soybean germplasms, sub-population III 53 samples only included 1 wild soybean zy05292. P2 had been divided into 2 sub-populations: sub-population I contained 24 Sichuan soybean accessions and 2 abroad resources, sub-population I had 26 germplasms including 8 wild soybean, 11 abroad resources and 7 Sichuan soybean accessions. The selected 190 soybean germplasms were relatively highly diversified and variable in genetic analysis, revealing high genetic diversity. The result showed that the population structure of all resources was not strictly consistent with territory and original countries was credited to the wide genetic exchange in soybean. All the results indicated that we could make full use of abroad resources and upright wild soybean to innovate Sichuan soybean germplasm and to enrich Sichuan soybean genetic diversity.

Keywords: *Glycine max*; *Glycine soja*; SSR marker; Genetic diversity; Population structure

大豆(*Glycine max*)被誉为“植物蛋白之王”,是世界上重要的油料作物和植物蛋白来源。同时也是我国七大农作物之一,大豆突破性新品种选育有着重要意义。新品种适应环境能力更好,抗逆性更高,更符合大豆育种市场的需要。传统的育种方式对其改良的效果已经远远不能满足生产上的需要和市场需求。对于品种的改良,一方面依赖于丰富的遗传变异资源,另一方面则是对其农艺性状遗传基础的了解程度。大豆种质资源是大豆品种选育的物质基础,挖掘一些育种品种与野生资源的相关优异等位基因,并将它们结合在一起,将会极大地丰富大豆的遗传背景,成为大豆育种过程中的珍贵材料^[1]。四川省育成大豆品种、地方资源以及外来资源的遗传多样性研究,四川地方品种与野生大豆(*Glycine soja*)、引进资源的亲缘关系及遗传结构研究,对四川大豆新品种的选育、遗传背景的拓宽、优异材料的创制及其优异基因的发掘有重要的指导意义。

SSR 标记因其具有操作简单、多态性高、成本低、稳定性好等优点,现已广泛应用于大豆遗传多样性研究。Akkaya 等^[2]第一次将 SSR 标记用于大豆研究来探究其多样性,研究结果表明 SSR 标记存在于大豆中,多态性水平极高,大豆基因组中存在极高的(AT)_n和(ATT)_n。王丽霞等^[3-4]分别利用 SSR 标记对 129 份大豆育成品种和 1 383 份春大豆进行遗传多样性分析,研究结果发现中国大豆资源收集过程中 7 大生态区域类型的划分是主要的种质来源;不同区域的春大豆遗传多样性与地理距离有一定的关系,说明中国大豆资源的收集存在某种程度的地理分化。Iquira 等^[5]对加拿大 100 个本地品种和 200 个外来种质用 39 个 SSR 标记进行了遗传多样性分析,结果显示外来种质比本地材料具有更高的遗传多样性。秦君等^[6]在绥农 14 等 14 个骨干品种中获得 1 494 个等位变异,共 550 个 SSR 标记,每个 SSR 位点的平均等位变异是 2.716 4,平均 PIC 值为 0.445 0,筛选出 30 个多态性好的位点,它

们可作为评价大豆种质资源遗传多样性的重要位点,为以后种质资源研究 SSR 位点的选择提供依据。Sun 等^[7]通过 41 个 SSR 标记和 18 个 SRAP 对中国北方 8 个核心野生大豆种质和 141 个中国南方一年生野生大豆种质进行分析,共获得 421 个等位基因,各个位点平均等位变异数为 10.27, PIC 值为 0.825。Mimura 等^[8]用 17 对 SSR 标记检测 130 份来自日本、中国、美国菜用大豆种质的多态性,把其中的 99 份区分开,研究结果表明日本菜豆遗传基础狭窄,遗传多样性比其它国家菜豆低,为日本菜用大豆品种的选育提供了理论依据。目前四川大豆选育存在种质资源引进利用不足、本地适宜品种和引进资源间亲缘关系不清楚等问题,极大地限制了四川大豆育种亲本的选配、种质遗传背景的拓宽和优异材料的创制,截止目前,还未有人对近 20 年来(1997-2016 年)四川大豆育成品种的遗传多样性、亲缘关系等进行研究报道。本研究利用 SSR 标记对四川育成大豆品种、野生大豆及引进的相关资源进行遗传多样性和群体遗传结果及亲缘关系分析,旨在为四川大豆育种亲本选配、利用引进种质资源对四川大豆的遗传改良、发掘优异等位位点等研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料由 3 部分组成:一是四川省内适宜种植的大豆材料:四川审定大豆品种以及适宜长江流域种植的区试材料(由南充市农业科学院张明荣课题组、四川省农科院作物所康海歧课题组、四川农业大学武晓玲提供);二是野生大豆资源(由中国农业科学院作物所王克晶课题组提供);三是引进的国外大豆资源(中国种质资源库)。共有大豆资源 190 份(表 1)。所有材料于 2015 年 4 月和 6 月种植在四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所青白江基地内。

表 1 试验材料
Table 1 List of all the accessions used in this study

编号 No.	材料名称 Name	来源 Origin	备注 Remarks
1	Hobitt	美国 America	引进资源 Introduced
2	T258H	美国 America	引进资源 Introduced
3	鄂豆 4 号 Edou 4	湖北仙桃 Xiantao, Hubei	育成品种 Released
4	T233	美国 America	引进资源 Introduced
5	T220	美国 America	引进资源 Introduced
6	南豆 5 号 Nandou 5	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
7	南豆 7 号 Nandou 7	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released

续表 1

编号 No.	材料名称 Name	来源 Origin	备注 Remarks
8	南豆 8 号 Nandou 8	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
9	川豆 7 号 Chuandou 7	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
10	湘春 10 号 Xiangchun 10	湖南长沙 Changsha, Hunan	育成品种 Released
11	油春 02-1 Youchun 02-1	湖北武汉 Wuhan, Hubei	引进资源 Introduced
12	浙 D2110 ZheD2110	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
13	湘春 228 Xiangchun 228	湖南长沙 Changsha, Hunan	引进资源 Introduced
14	油春 05-4 Youchun 05-4	湖北武汉 Wuhan, Hubei	引进资源 Introduced
15	中黄 13 Zhonghuang 13	北京 Beijing	育成品种 Released
16	川豆 14 Chuandou 14	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
17	川豆 14-1 Chuandou 14-1	四川雅安 Ya'an, Sichuan	引进资源 Introduced
18	川豆 14-2 Chuandou 14-2	四川雅安 Ya'an, Sichuan	引进资源 Introduced
19	成豆 14 Chengdou 14	四川成都 Chengdu, Sichuan	育成品种 Released
20	成 0285 Cheng 0285	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
21	油 05-72 You 05-72	湖北武汉 Wuhan, Hubei	引进资源 Introduced
22	油春 06-8 Youchun 06-8	湖北武汉 Wuhan, Hubei	引进资源 Introduced
23	油春 06-1 Youchun 06-1	湖北武汉 Wuhan, Hubei	引进资源 Introduced
24	华春 3 号 Huachun 3	广东广州 Guangzhou, Guangdong	育成品种 Released
25	成 0285 Cheng 0285	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
26	南豆 23 Nandou 23	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
27	南豆 21 Nandou 21	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
28	浙春 3 号 Zhechun 3	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	育成品种 Released
29	华春 6 号 Huachun 6	广东广州 Guangzhou, Guangdong	育成品种 Released
30	川豆 3 号 Chuandou 3	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
31	富豆 3 号 Fudou 3	四川茂县 Maoxian, Sichuan	育成品种 Released
32	Williams 82	美国 America	引进资源 Introduced
33	浙 27001 Zhe 27001	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
34	油春 12-4 Youchun 12-4	湖北武汉 Wuhan, Hubei	引进资源 Introduced
35	圣贡 6140-8 Shenggong 6140-8	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
36	成 02-5-122-14 Cheng 02-5-122-14	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
37	成 04-10-211-9 Cheng 04-10-211-9	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
38	CD8585	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
39	CD8508	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
40	南 XC-1 NanXC-1	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
41	圣贡 592-7 Shenggong 592-7	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
42	南 9707-23-2 Nan 9707-23-2	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
43	2008-9	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
44	南 25-10-1 Nan 25-10-1	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
45	L67-592	美国 America	引进资源 Introduced
46	L70-4170	美国 America	引进资源 Introduced
47	浙 H702 Zhe H702	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
48	开鲜 Kaixian	吉林 Jilin	市场购买 Purchase in market
49	撒可丰 6 号 Sakefeng 6	吉林 Jilin	市场购买 Purchase in market
50	丰豆 5 号 Fengdou 5	黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang	市场购买 Purchase in market
51	宏豆 88 Hongdou 88	中国 China	市场购买 Purchase in market
52	特级辽鲜 1 号 Tejiliaoxian 1	辽宁 Liaoning	市场购买 Purchase in market
53	美绿 66 Melv 66	中国 China	市场购买 Purchase in market

续表 1

编号 No.	材料名称 Name	来源 Origin	备注 Remarks
54	辽豆 15 Liaodou 15	辽宁 Liaoning	市场购买 Purchase in market
55	台湾 292 Taiwan 292	台湾 Taiwan	市场购买 Purchase in market
56	超早王 Chaozaowang	中国 China	市场购买 Purchase in market
57	超鲜 1 号 Chaoxian 1	中国 China	市场购买 Purchase in market
58	早冠 Zaoguan	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
59	满天星 Mantianxing	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
60	果粒沉 Guolichen	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
61	Clark-L1	美国 America	引进资源 Introduced
62	Wing Jet	美国 America	引进资源 Introduced
63	Koream	美国 America	引进资源 Introduced
64	Soysota	美国 America	引进资源 Introduced
65	Agate	美国 America	引进资源 Introduced
66	T261	美国 America	引进资源 Introduced
67	日本三青菜豆 Ribensanqingcaidou	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
68	绿秋 88 Lvqiu 88	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
69	丰豆 99 Fengdou 99	黑龙江 Heilongjiang	市场购买 Purchase in market
70	台湾 8 号 Taiewan 8	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
71	翠扇大豆 Cuishandadou	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	育成品种 Released
72	西豆 3 号 Xidou 3	重庆 Chongqing	育成品种 Released
73	湘春豆 26 Xiangchundou 26	湖南长沙 Changsha, Hunan	育成品种 Released
74	天隆 1 号 Tianlong 1	四川自贡 Zigong, Sichuan	育成品种 Released
75	中黄 39 Zhonghuang 39	北京 Beijing	育成品种 Released
76	贡 901 Gong 901	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
77	南 610-1 Nan 610-1	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
78	南 303-6 Nan 303-6	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
79	圣贡 827-2 Shenggong 827-7	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
80	南 0313-4 Nan 0313-4	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
81	渝豆 2 号 Yudou 2	重庆 Chongqing	引进资源 Introduced
82	优选大粒王 Youxuandaliwang	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
83	绿兴毛豆 Lvxingmaodou	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
84	绿秀 Lvxiu	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
85	精选优系三 Jingxuanyouxisan	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
86	铁鲜 1 号 Tiexian 1	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
87	成豆 9 号 Chengdou 9	四川成都 Chengdu, Sichuan	育成品种 Released
88	成豆 10 号 Chengdou 10	四川成都 Chengdu, Sichuan	育成品种 Released
89	成豆 13 Chengdou 13	四川成都 Chengdu, Sichuan	育成品种 Released
90	成豆 15 Chengdou 15	四川成都 Chengdu, Sichuan	育成品种 Released
91	成豆 16 Chengdou 16	四川成都 Chengdu, Sichuan	育成品种 Released
92	川豆 6 号 Chuandou 6	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
93	川豆 8 号 Chuandou 8	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
94	川豆 10 号 Chuandou 10	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
95	川豆 5 号 Chuandou 5	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
96	川豆 9 号 Chuandou 9	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
97	川豆 11 Chuandou 11	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
98	川豆 12 Chuandou 12	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released
99	川豆 15 Chuandou 15	四川雅安 Ya'an, Sichuan	育成品种 Released

续表 1

编号 No.	材料名称 Name	来源 Origin	备注 Remarks
100	成 010581 Cheng 010581	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
101	眉山六月黄 Meishanliuyuehuang	四川眉山 Meishan, Sichuan	本土品种 Local
102	珙县二季豆 Gongxianerjidou	四川宜宾 Yibin, Sichuan	本土品种 Local
103	湘豆 22 Xiangdoui 22	湖南长沙 Changsha, Hunan	育成品种 Released
104	台 75 (绿皮) Tai75 (green)	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
105	中黄 37 Zhonghuang 37	北京 Beijing	育成品种 Released
106	金翠扇 Jincuishan	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	市场购买 Purchase in market
107	新荆豆 Xinjingdou	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	市场购买 Purchase in market
108	天门 1 号 Tianmen 1	湖北天门 Tianmen, Hubei	市场购买 Purchase in market
109	紫县小豆 Yingxianxiaodou	四川 Sichuan	本地品种 Local
110	养生豆 Yangshengdou	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
111	荆州 1 号 Jingzhou 1	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	引进资源 Introduced
112	荆州 2 号 Jingzhou 2	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	引进资源 Introduced
113	南豆 99 Nandou 99	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
114	南豆 3 号 Nandou 3	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
115	南豆 4 号 Nandou 4	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
116	南豆 9 号 Nandou 9	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
117	南豆 10 号 Nandou 10	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
118	南豆 11 Nandou 11	四川南充 Nanchong, Sichuan	育成品种 Released
119	中豆 8 号 Zhongdou 8	湖北武汉 Wuhan, Hubei	育成品种 Released
120	CD200254	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
121	镇口大粒 Zhenkoudali	广东 Guangdong	引进资源 Introduced
122	早熟一号 Zaoshu 1	山东济宁 Jining, Shandong	引进资源 Introduced
123	东 98-2 Dong 98-2	不详 Unknown	引进资源 Introduced
124	中油 30 Zhongyou 30	湖北武汉 Wuhan, Hubei	引进资源 Introduced
125	B57	不详 Unknown	引进资源 Introduced
126	贡 9612 Gong 9612	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
127	南 207-23 Nan 207-23	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
128	浙 1216 Zhe 1216	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
129	浙 57001 Zhe 57001	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
130	浙 HD302 ZheHD302	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
131	浙 H0301 ZheH0301	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
132	灰葵 2 号 Huijia 2	不详 Unknown	引进资源 Introduced
133	CD07283	四川成都 Chengdu, Sichuan	引进资源 Introduced
134	浙 H0428-25 ZheH0428-25	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
135	鄂豆 010 Edou 010	湖北 Hubei	引进资源 Introduced
136	油 07-76 You07-76	湖北武汉 Wuhan, Hubei	引进资源 Introduced
137	HD0032	不详 Unknown	引进资源 Introduced
138	临豆 9 号 Lindou 9	山东临沂 Linyi, Shandong	引进资源 Introduced
139	蒙 1007 Meng 1007	内蒙古 Inner Mongolia	引进资源 Introduced
140	赣 05-2 Gan 05-2	江西 Jiangxi	引进资源 Introduced
141	浙夏 001 Zhexia 001	浙江 Zhejiang	引进资源 Introduced
142	贡选 1 号 Gongxuan 1	四川自贡 Zigong, Sichuan	育成品种 Released
143	贡夏 5104-1 Gongxia 5104-1	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
144	圣贡夏 617-2 Shenggongxia 617-2	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
145	贡夏 369-374 Gongxia 369-374	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced

续表 1

编号 No.	材料名称 Name	来源 Origin	备注 Remarks
146	南 F625 NanF625	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
147	贡夏 5104-2 Gongxia5104-2	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
148	南 9806-1 Nan 9806-1	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
149	川农 5218 Chuannong 5218	四川雅安 Ya'an, Sichuan	引进资源 Introduced
150	川农 5221 Chuannong 5221	四川雅安 Ya'an, Sichuan	引进资源 Introduced
151	通 06-299 Tong 06-299	江苏 Jiangsu	引进资源 Introduced
152	南农 J3-2 NannongJ3-2	江苏 Jiangsu	引进资源 Introduced
153	贡秋豆 702 Gongqiudou 702	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
154	贡秋豆 5104-7 Gongqiudou 5104-7	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
155	南 F7256-3-1 NanF7256-3-1	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
156	蒙 1210 Meng 1210	内蒙古 Inner Mongolia	引进资源 Introduced
157	赣吉 12-16 Ganji 12-16	江西 Jiangxi	引进资源 Introduced
158	南农 99-6 Nannong 99-6	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	引进资源 Introduced
159	南 F622 NanF622	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
160	FG56-45	不详 Unknown	引进资源 Introduced
161	南豆 25 Nandou 25	四川南充 Nanchong, Sichuan	引进资源 Introduced
162	苏鉴 13 Sujian 13	江苏 Jiangsu	引进资源 Introduced
163	圣贡夏 776 Shenggongxia776	四川自贡 Zigong, Sichuan	引进资源 Introduced
164	A1	泰国 Thailand	引进资源 Introduced
165	九月黄 Jiuyuehuang	四川 Sichuan	当地品种 Local
166	九月黄褐毛 Jiuyuehuang(brown)	四川 Sichuan	当地品种 Local
167	九月黄灰毛 Jiuyuehuang(gray)	四川 Sichuan	当地品种 Local
168	早熟 5 号 Zaoshu 5	不详 Unknown	市场购买 Purchase in market
169	南豆五号 Nandou 5	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
170	鑫金豆 1 号 Xinjindou 1	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
171	金大豆 626 Jindadou 626	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
172	金扇南农 38 Jinshannannong 38	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
173	金豆 3 号 Jindou 3	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
174	中豆 43 Zhongdou 43	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
175	金大豆 188 Jindadou 188	湖北 Hubei	市场购买 Purchase in market
176	中黄 22 Zhonghuang 22	北京 Beijing	市场购买 Purchase in market
177	A8	泰国 America	引进资源 Introduced
178	Arksoy(F-55) A	美国 America	引进资源 Introduced
179	尼日利亚 1 号 Nigeria 1	尼日尼亚 Nigeria	引进资源 Introduced
180	AGS 270	不详 Unknown	引进资源 Introduced
181	荆豆 3 号 Jingdou 3	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	引进资源 Introduced
182	翠扇王 Cuishanwang	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	市场购买 Purchase in market
183	zy05865 Y13	中国 China	蔓生型野生大豆 Wild type
184	zy02798 Y18	中国 China	蔓生型野生大豆 Wild type
185	zy03263 Y19	中国 China	蔓生型野生大豆 Wild type
186	zy05292 Y20	中国 China	直立型野生大豆 Wild type
187	zy05296 Y21	中国 China	直立型野生大豆 Wild type
188	zy05302 Y22	中国 China	直立型野生大豆 Wild type
189	zy05303 Y23	中国 China	直立型野生大豆 Wild type
190	zy05304 Y24	中国 China	直立型野生大豆 Wild type

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 在苗期采集幼嫩叶片,用 CTAB 法^[9]提取基因组 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量,分光光度计测定浓度,存于 -20℃ 备用。

1.2.2 SSR 标记分析 试验所用的 SSR 标记来源于 <http://soybase.org/> 已经公布的引物标记,每条染色体上选择 2 ~ 5 对 SSR 标记,使标记均匀分布于大豆染色体组,剔除部分多态性极差引物后,共 53 对 SSR 分子标记用于检测大豆遗传多样性。SSR

标记引物(表 2)由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 扩增体系为 20.0 μL:DNA 模板 3.0 μL,上下游引物 20 μmol·L⁻¹各 1.0 μL,PCR Master Mix 10.0 μL,ddH₂O 5.0 μL。PCR 扩增反应程序:95℃ 预变性 2.0 min;94℃ 变性 40 s,56℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 30 s,32 个循环;72℃ 延伸 5 min。扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测,对扩增条带记录带型,同一大小位置有条带赋值“1”,无条带则赋值为“0”,用于后续分析。

表 2 SSR 标记引物
Table 2 SSR markers

编号 No.	标记 SSR	染色体 Chromosome	连锁群 LG	编号 No.	标记 SSR	染色体 Chromosome	连锁群 LG
1	Satt267	Gm01	D1a	28	Satt279	Gm12	H
2	Satt184	Gm01	D1a	29	Satt434	Gm12	H
3	Satt141	Gm02	D1b	30	Satt442	Gm12	H
4	Satt350	Gm02	D1b	31	satt146	Gm13	F
5	Satt022	Gm03	N	32	Satt569	Gm13	F
6	Satt339	Gm03	N	33	Satt586	Gm13	F
7	Satt565	Gm04	C1	34	Satt522	Gm13	F
8	Satt338	Gm04	C1	35	Satt554	Gm13	F
9	Satt717	Gm05	A1	36	Satt687	Gm14	B2
10	Satt572	Gm05	A1	37	Satt556	Gm14	B2
11	Satt236	Gm05	A1	38	Satt602	Gm15	E
12	Satt460	Gm06	C2	39	Satt268	Gm15	E
13	Satt307	Gm06	C2	40	Satt452	Gm15	E
14	Satt371	Gm06	C2	41	Satt369	Gm15	E
15	Satt286	Gm06	C2	42	Satt431	Gm16	J
16	Satt680	Gm07	M	43	Satt249	Gm16	J
17	Satt540	Gm07	M	44	Satt458	Gm17	D2
18	Satt308	Gm07	M	45	Satt135	Gm17	D2
19	Satt346	Gm07	M	46	Satt372	Gm17	D2
20	Satt429	Gm08	A2	47	Satt688	Gm18	G
21	AW132402	Gm08	A2	48	AF162283	Gm18	G
22	Satt588	Gm09	K	49	Satt373	Gm19	L
23	Satt242	Gm09	K	50	Satt523	Gm19	L
24	Satt243	Gm10	O	51	Satt462	Gm19	L
25	Satt487	Gm10	O	52	Satt571	Gm20	I
26	Satt453	Gm11	B1	53	Satt239	Gm20	I
27	Satt665	Gm11	B1				

1.3 数据分析

用 Excel 2003 进行数据统计;利用 PIC_CALC 0.6 ([http://hi. baidu. com/luansheng1229/item/306815126d58e3a4fed5a4](http://hi.baidu.com/luansheng1229/item/306815126d58e3a4fed5a4)) 计算位点多态性含量 (polymorphism information content, PIC) 的值。用 Excel 2003 进行数据统计;采用软件 Popgene 分析遗传多样性,分别计算 Shannon 指数、平均有效位点数;用软件 NTSYS 进行聚类分析,采用按非加权配对法 (UPGMA) 进行聚类分析,并计算 GS 值;利用基于混合模型的 Structure^[10] 软件分析大豆的群体结构,设定群体数 K 的估计值范围为 1~20,将 MC-MC (Markov Chain Monte Carlo) 开始时的不作数迭代 (Length of Burn-in Period) 设为 10 000 次,将不作数迭代后的 MCMC 设为 100 000 次,每个 K 值重复数为 8 次。分别采用 Evanno 等^[11] 描述的方法, Structure Harvester^[12] 计算 ΔK 值。结果由 Distruct

软件^[13]来展示;主成分分析使用 GenAiex 软件^[14]。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记扩增结果与遗传多样性

筛选出覆盖全基因组的 53 对 SSR 多态性标记 (每条染色体筛选出 2~5 对),在 190 份供试材料中扩增,共得到 159 条多态性条带,平均每个引物扩增 3.0 个条带,其中 Satt586 和 Satt373 扩增条带最多 (6 个)。平均有效等位基因为 1.4744 ± 0.2375 ,范围 $1.1374 \sim 1.9998$;平均多态性信息含量 PIC 为 0.3050 ± 0.1056 ;变异范围 $0.1208 \sim 0.4999$;Shannon-Weaver 指数平均值为 0.4762 ± 0.1249 ,范围 $0.2394 \sim 0.6931$ (表 3)。以上参数表明 190 份大豆资源异质程度不是非常高,遗传多样性丰富程度一般,总体遗传多样性处于中等水平。

表 3 190 份大豆资源遗传多样性分析
Table 3 Genetic diversity of 190 samples

多样性指数 Diversity index	极大值(位点) Max.	极小值(位点) Min.	平均数 Average
有效位点数 Effective number of alleles	1.998 (Satt717)	1.1374 (Satt458)	1.4744 ± 0.2375
Shannon 指数 Shannon's information index	0.6931 (Satt717)	0.0258 (Satt458)	0.4762 ± 0.1249
多态性信息量 Polymorphism information content	0.4999 (Satt71)	0.1208 (Satt458)	0.3050 ± 0.1056

2.2 种群聚类分析

利用 DPS 和 NTSYS 进行聚类分析,根据 UPGMA 法构建的遗传关系聚类图 (图 1,图 2)。图 1 是 190 份供试材料聚类 (群体 1) 分析图,群体 1 遗传相似系数 GS 的范围为 $0.54 \sim 1.0$ 。对应的最大遗传距离为 0.46,最小遗传距离为 0。聚类分析表明当 $GS=0.55$ 时将 190 份材料分为 3 个大类:第一类是 Arksoy (F-55) A (美国) 和尼日利亚 1 号 (尼日尼亚) 2 份材料;第二类是 zy05865、zy02798、zy03263 (3 个都是蔓生型野生大豆) 和 Soysota、Wing Jet (美国) 5 份材料;第三类为余下的 183 份材料,其中 5 份直立型野生大豆 zy05292、zy05296、zy05302、zy05303、zy05304 与栽培大豆聚在一类。聚类结果显示 53 对引物能很好地鉴别区分 190 份供试材料。通过聚类分析可以看出,从国外引进的大豆资源与国内的大豆资源遗传关系较远;蔓生型野生大豆与栽培大豆

的亲缘关系较远,各自聚成一类,而蔓生型野生大豆与美国 Soysota、Wing Jet 聚在一起;直立型野生大豆与栽培大豆亲缘关系近与中国栽培大豆聚为一类,与蔓生型野生大豆的亲缘关系远。

四川审定大豆品种 31 份、国外资源 13 份和野生大豆资源 8 份共 52 份材料 (群体 2) 的聚类分析图显示 (图 2),在 $GS=0.56$ 时将群体 2 分成 3 个大类:第一类是 Arksoy (F-55) A (美国) 和尼日利亚 1 号 (尼日尼亚) 2 份材料,这与群体 1 聚类结果一致;第二类是国外引进资源与野生大豆资源类共 19 份材料;第三类是四川审定大豆品种和 1 份国外材料 williams 82,31 份四川大豆审定品种聚成一类。

在两次聚类分析中,zy05865、zy02798、zy03263 (蔓生型野生大豆) 和 Soysota、Wing Jet (美国) 5 份材料都能聚在一起,并且与四川审定大豆品种遗传距离较远。

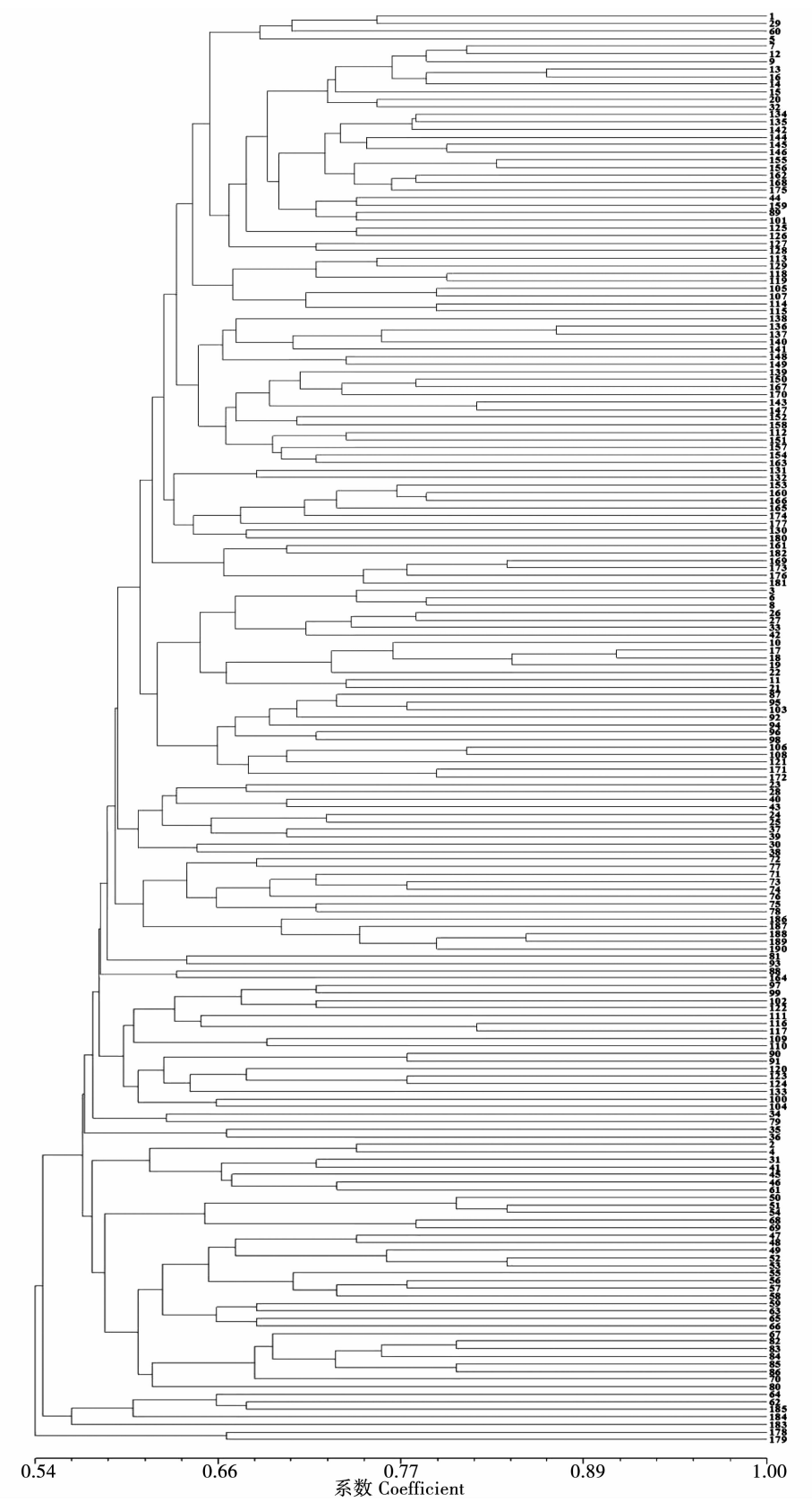


图 1 群体 1 SSR 标记聚类分析

Fig. 1 The dendrogram of P1 by SSR marker cluster analysis

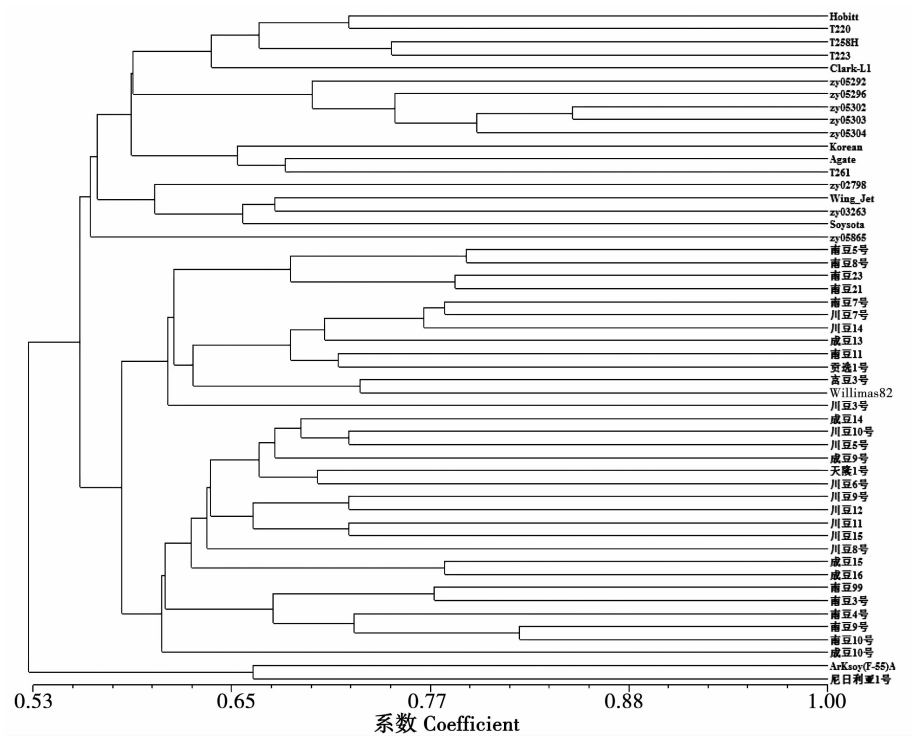


图2 群体2 SSR 标记聚类分析图
Fig. 2 The dendrogram of P2 by SSR marker cluster analysis

2.3 群体结构分析

利用 STRUCTURE Bayesian 模型分析群体结构, 群体 1 在 $K = 1$ 时得到最小 $\text{LnP}(K) = -10\,038.237\,5$, 在 $K = 20$ 时得到最大 $\text{LnP}(K) = -7\,472.85$ 。用 Evanno 等^[11] 的算法寻找最优 K 值, 在 $K = 3$ 时得到 ΔK 的最大值 109, 随后 ΔK 取值逐渐变小(图3)。根据分析结果, 在 $K = 3$ 时得到合理

群体结构(图4)。群体 1 由 3 类血缘组成, 共分成 3 个亚群: 亚群 I 由 78 份材料组成, 材料来源地丰富: 四川、湖北、湖南、广东、浙江、北京、江苏、江西等区域, 不包含野生大豆资源; 亚群 II 由 59 份材料构成, 包括 20 份鲜食大豆品种和 7 份野生大豆资源; 亚群 III 为 53 份来自各个地域的材料, 只包括 1 份野生大豆资源 zy05292。

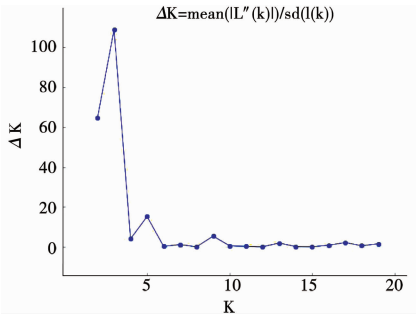


图3 群体1的 ΔK 值
Fig. 3 P1 ΔK values

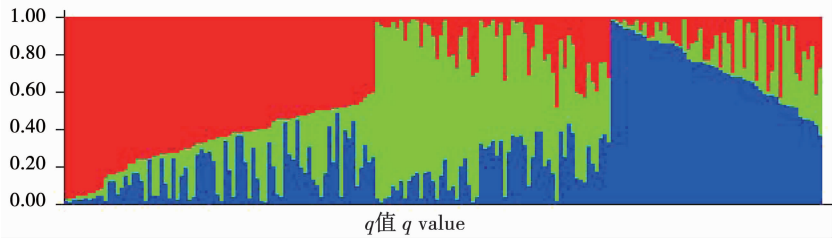


图4 群体1 群体结构图
Fig. 4 Population structure of P1

群体 2 在 $K = 2$ 时得到 ΔK 的最大值 156, 随后 ΔK 取值逐渐变小(图5)。群体 2 被平均分成两个亚群(图6), 各包含 26 份材料: 亚群 I 26 份材料中除了尼日尼亚 1 号和 Aksoy (F-55) A, 其余均为审

定大豆品种; 亚群 II 中包含了南豆 7 号、川豆 14、川豆 7 号、富豆 3 号、川豆 3 号、贡选 1 号和南豆 5 号 7 个审定大豆品种, 余下为国外引进资源和野生大豆材料。

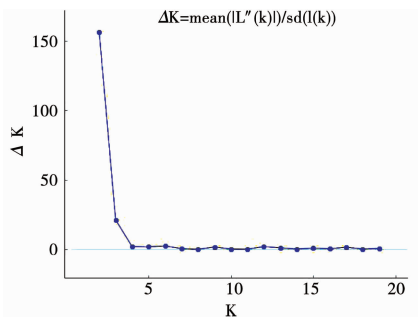


图5 群体2 ΔK 值
Fig. 5 P2 ΔK values

2.4 主成分分析

利用主成分分析对群体结构分析结果做进一步验证。第一、第二和第三主成分分别揭示总变异的 5.07%、4.43% 和 3.56%。可以看出,190 份材

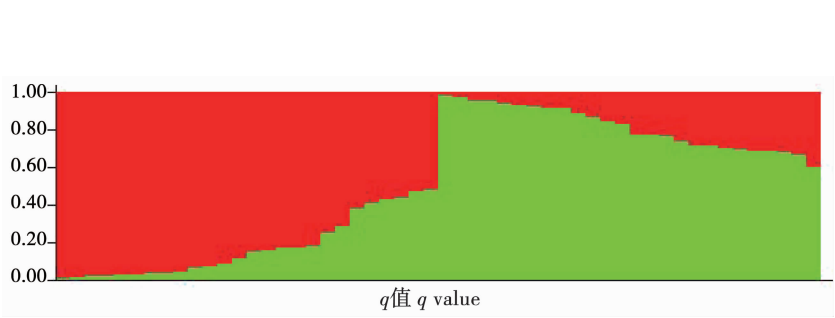


图6 群体2 群体结构图
Fig. 6 Population structure of P2

料根据四川省内和省外可以分成 3 个群体,四川省内的大豆资源虽与部分省外的资源混杂在一起,但部分省外材料单独成聚成类(图 7)。

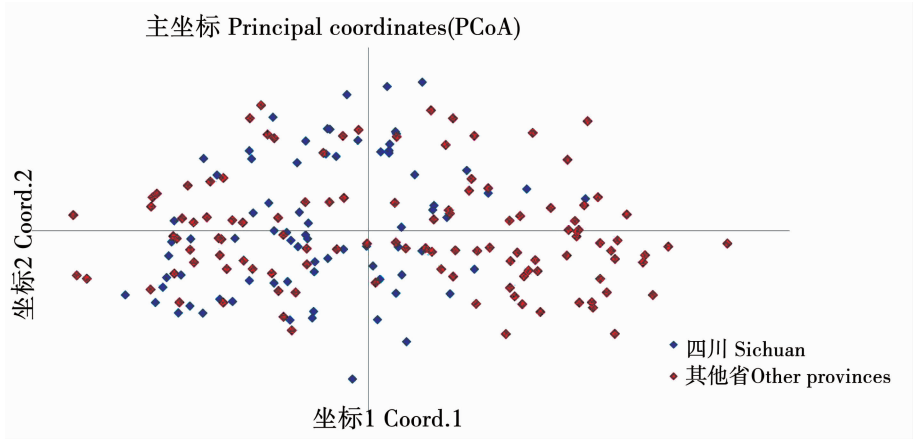


图7 主成分分析结果
Fig. 7 Principal components analysis

3 结论与讨论

本试验目的在于通过分析四川育成大豆品种与适宜四川种植的大豆资源的遗传多样性、遗传距离远近等进而在四川大豆育种工作中找到适合测配的亲本。选用覆盖大豆全基因组的 53 对 SSR 标记,对 190 份大豆资源进行遗传多样性分析。根据 Bostsein 等^[15]提出的衡量基因变异程度高低的 PIC 指标:0.25 < PIC < 0.5 时为中度多态位点,试验所有 53 对 SSR 引物均为中度多态位点。参试 190 份大豆资源遗传多样性丰富程度一般,总体遗传多样性处于中等水平。研究大豆育成品种的遗传多样性较多的使用 SSR 标记,因为它操作比较简便,具有很好的稳定性能,以及相对较高的多态性。遗传多样性和群体遗传结构研究是大豆新品种选育的基础^[16]。

聚类分析与群体结构分析:从群体 1 的聚类分析来看,聚类没有按照地域来区分,说明四川大豆育成的品种充分地利用了全国各地的种质资源,尤其与南方大豆种质资源有广泛的基因交流;而四川育成大豆品种的聚类分析中表明四川大豆种质资

源与引进的国外资源、野生大豆资源遗传距离较远。群体结构分析结果也印证了此结论。在群体 2 聚类分析结果中 31 份四川育成大豆品种聚成一类,并且“南豆系”和“川豆系”聚在一起,说明这两个系别的大豆品种亲本关系较近,遗传背景比较窄。并且“南豆系”“川豆系”和“成豆系”部分品种亲缘关系较近,与各系列在选育过程中种质资源互相引入有关。例如南豆 9 号的亲本是“矮脚早 × 川豆 4 号”;南豆 11 的亲本是“成豆 4 号 × 贡豆 6 号”。聚类分析显示“天隆 1 号”与“川豆 6 号”两个品种在供试材料中亲缘关系很近,从系谱选育分析发现这两个材料有着共同的亲本:天隆 1 号的母本中豆 32 中含有湘春豆 10 号的遗传基因,川豆 6 号的母本也来源于湘春豆 10 号,证明天隆 1 号与川豆 6 号种质中含有较多的湘春豆 10 号遗传成分。在群体结构分析结果中天隆 1 号与川豆 6 号同属一个亚群,证明了本试验聚类分析和群体结构分析结果与系谱选育的一致性。尼日尼亚 1 号和 Akrs soy (F-55) A (美国)这个两个资源在两次聚类分析中都聚在一起,并与其它资源遗传距离较远。野生大豆资源包括了蔓生型 (zy05865, zy02798, zy03263) 与直立型

(zy05292, zy05296, zy05302, zy05303, zy05304) 两类,其中蔓生型与栽培大豆遗传距离较远,直立型与栽培大豆遗传距离较近,但直立型野生大豆单独聚成一类。通过聚类分析发现国外资源与四川大豆亲缘关系较远,且部分资源在四川表现出抗性好、粗蛋白含量高等优点,可以作为四川大豆种质遗传背景扩充的途径之一。邱丽娟等^[17]肯定国外种质资源拓宽了中国大豆育成品种的遗传基础。从聚类分析结果来看,直立型野生大豆与栽培大豆亲缘关系较蔓生型相近,田间农艺性状观察结果也显示两者之间存在很多相似性。优先挖掘直立型野生大豆的优异基因,改良四川大豆种质的遗传背景。

群体1分为3个亚群,主成分分析与群体结构分析结果一致。群体结构分析结果显示四川大豆种质资源与其它省份收集的资源没有明显地域性,仅在其中一个亚群中四川省内种质资源少,其它省外资源所占比例大,UPGMA聚类、主成分分析结果与其一致。在四川大豆品种选育过程中,可以引入这部分亲缘关系较远的省外资源优异基因的进行遗传改良,丰富四川大豆种质的遗传背景。同时根据前人研究,供试材料的范围与数量,标记种类及标记密度决定了聚类分析反映亲缘关系远近,任何一个试验结果只能反映供试材料的相对关系,同时在进行遗传多样性和亲缘关系研究中,为了与育种更好地结合还应当考虑表现的多样性和相关性^[18],本研究资源多样性和育种利用价值还需进一步深入研究。

利用覆盖20条染色体的53对SSR标记(每条染色体上2~5对SSR标记),对190份大豆资源进行全基因组扫描,供试的190份大豆资源蕴含了比较丰富的遗传变异,显示了较高水平的基因多样性。群体结构不能严格地按照地域、来源、国家的划分而区分,这一现象显示了大豆资源间存在着广泛的基因交流。从分析结果来看,四川大豆资源的种质创新可以充分地利用国外资源与直立型野生大豆资源,进而丰富四川大豆的基因遗传多样性。

参考文献

[1] 刘小敏. 基于 SSR 标记的中国大豆育成品种的遗传多样性和遗传结构研究[D]. 南昌:南昌大学,2014:1-49. (Liu X M. Study on genetic diversity and genetic structure of Chinese soybean cultivars by SSR markers [D]. Nanchang: Nanchang University, 2014:1-49.)

[2] Akkaya M S. Length polymorphism of simple sequence repeats in soybean[J]. Genetics, 1992, 132: 1131-1139.

[3] Wang L X, Guan R X, Liu Z X, et al. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers [J]. Crop Science, 2006, 46: 1032-1038.

[4] Wang L X, Guan R X, Liu Z X, et al. Genetic diversity of Chinese spring soybean germplasms revealed by SSR markers [J]. Plant Breeding, 2008, 127: 56-61.

[5] Iquira E, Gagnon E, Belzile F. Comparison of genetic diversity between Canadian adapted genotypes and exotic germplasm of soybean [J]. Genome, 2010, 53(5): 337-345.

[6] 秦君, 张孟臣, 陈维元, 等. 基于分子和表型性状的大豆骨干品种遗传多样性分析 [J]. 华北农学报, 2013, 28 (1): 19-26. (Qin J, Zhang M C, Chen W Y, et al. Genetic diversity analysis of soybean backbone varieties based on molecular and phenotypic traits [J]. North China Agriculture Report, 2013, 28 (1): 19-26.)

[7] Bing R S, Hong Y F, Cun Y Y, et al. Genetic diversity of wild soybeans from some regions of Southern China based on SSR and SRAP markers [J]. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4 (2): 257-268.

[8] Mimura M, Coyne C J, Bambuck M W, et al. SSR diversity of vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54: 497-508.

[9] Doyle J. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12:13-15.

[10] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. Genetics, 2000, 155(2): 945-959.

[11] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study [J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.

[12] Earl D, Vonholdt B. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method [J]. Conservation Genetics Resources, 2012, 4 (2): 359-361.

[13] Rosenberg N A. Distruct: A program for the graphical display of population structure[J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(1): 137-138.

[14] Peakall R O D, Smouse P E. GenALEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 288-295.

[15] Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphism [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32:314-331.

[16] 张军, 赵团结, 盖钧镒. 中国东北大豆育成品种遗传多样性和群体遗传结构分析 [J]. 作物学报, 2008, 34 (9): 1529-1536. (Zhang J, Zhao T J, Gai J Y. Genetic diversity and genetic structure of soybean cultivar population released in Northeast China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(9): 1529-1536.)

[17] 邱丽娟, 常汝镇, 袁翠平, 等. 国外大豆种质资源的基因挖掘利用现状与展望 [J]. 中国遗传资源学报, 2006, 7 (1): 1-6. (Qiu L J, Chang R Z, Yuan C P, et al. Prospect and present statue of gene discovery and utilization for introduced soybean germplasm [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2006, 7 (1): 1-6.)

[18] 强海平, 余国辉, 刘海泉, 等. 基于 SSR 标记的中美紫花苜蓿品种遗传多样性研究 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(14): 2853-2862. (Qiang H P, Yu G H, Liu H Q, et al. Genetic diversity and population structure of Chinese and American Alfalfa (*Medicago Sativa*. L) germplasm assessed by SSR markers [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(14): 2853-2862.)