



# 黄淮海和南方大豆育成品种 TRAP 标记的遗传结构研究

刘嘉霖, 陈 琪, 谢慧敏, 罗火林, 杨柏云, 熊冬金

(南昌大学 生命科学院, 江西 南昌 330031)

**摘 要:**为采用新型分子标记技术有效评估与利用黄淮海和南方大豆种质资源,本研究通过目标区域扩增多态性 (TRAP) 功能标记对来自中国黄淮海和南方地域的 158 份大豆育成品种进行遗传结构及多样性分析。从随机组合的 84 组引物中筛选出 21 组多态性丰富的引物,共扩增出 436 条 DNA 条带,各引物条带数变幅为 18~26 个,平均 20.7 个。Nei's 基因多样性 (H) 变化范围为 0.172 5~0.473 6,香农信息指数 (I) 变化范围为 0.492 2~0.679 2,多态信息含量 (PIC) 变化范围为 0.144 6~0.360 7。基于 TRAP 分子标记的聚类分析表明大豆材料共分为 3 类,其中 I、II 两小类亚群主要为黄淮海地域品种,III 类大亚群黄淮海和南方地域品种分布均匀。Structure 遗传结构分析将大豆育成品种划分为 3 个不同血缘关系。大豆材料的 TRAP 标记聚类分析和遗传结构分析结果表示大豆品种的分布无明显的地域相关性。

**关键词:**大豆;黄淮海;南方;育成品种;TRAP 标记;遗传多样性

## Genetic Structure and Diversity of Soybean Cultivars Released from Huang-Huai-Hai and Southern China Based on TRAP Marker

LIU Jia-lin, CHEN Qi, XIE Hui-min, LUO Huo-lin, YANG Bo-yun, XIONG Dong-jin

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

**Abstract:** In order to evaluate and utilize the soybean germplasm resources in the Huang-Huai-Hai and southern region of China effectively with the new molecular marker technique, this research used target region amplification polymorphism (TRAP) to detect the genetic structure and diversity of 158 cultivated soybean from Huang-Huai-Hai and southern region of China. 21 groups of primers with rich polymorphism were selected from 84 groups of primers, which amplified 436 DNA bands totally. Each primer's bands ranging from 18 to 26, and the average was 20.7. The range of Nei's gene diversity (H) was 0.172 5–0.473 6, the Shannon information index (I) was 0.492 2–0.679 2, and the polymorphism information content (PIC) was 0.144 6–0.360 7. According to the cluster analysis based on TRAP molecular markers showed that soybean materials were divided into three categories, of which the two subgroups I and II were mainly Huang-Huai-Hai region soybean, subgroup III averaged soybean in Huang-Huai-Hai and southern region. Structure genetic structure analysis divided soybean into three different consanguinities. The results of the both analysis showed that there was no obvious regional correlation between the distribution of cultivated soybean.

**Keywords:** Soybean; Huang-Huai-Hai; Southern China; Cultivar; TRAP marker; Gene diversity

大豆是中国主要农作物之一,黄淮海和南方是中国重要的大豆产区,其大豆种质资源丰富,且两区种质交流频繁,选育出了大量优异的大豆育成品种<sup>[1]</sup>,研究黄淮海和南方大豆育成品种和祖先亲本间的遗传关系对大豆品种改良和亲本选配具有重要意义。分子标记是基于 DNA 多态性水平上的遗传标记之一,具有稳定、分布均匀、多态性高等特点,广泛应用于种质资源遗传结构与多样性研究<sup>[2-3]</sup>。SSR 标记重复性高且操作简便,张博等<sup>[4]</sup>用较少的 SSR 位点较好反映了大豆育成品种和祖先亲本间的遗传关系, Song 等<sup>[5]</sup>通过 SSR 标记在 91 株栽培大豆和 5 株野生大豆中发现了由 26 个等位基因组成的高水平变异位点, Wu 等<sup>[6]</sup>整合的大

豆连锁图中包含了 323 个已发现的 SSR 标记和 145 个新开发的 SSR 标记。在黄淮海和南方大豆育成品种遗传多样性方面,熊冬金等<sup>[1]</sup>利用 121 个 SSR 分子标记以中国 10 个大豆育成品种重要家族的 179 个品种为材料的遗传多样性分析表明群体具有丰富的遗传变异,黄淮海和南方地理位置较近,种质交流较多。王彩洁等<sup>[7]</sup>利用 125 个 SSR 标记对 89 个大面积种植的黄淮海和东北地区的育成品种进行遗传多样性研究,结果表明 2 个产区的材料基本可区分开,黄淮海地区品种进一步分成 3 亚类,与系谱分析的结果相同,并且区域品种同质化现象相当明显。金尚昆等<sup>[8]</sup>利用 60 个 SSR 标记对以黄淮海地区新近育成品种系为主的 284 份大豆材料的遗传

收稿日期:2019-10-28

基金项目:国家自然科学基金(31960407,31260332)。

第一作者简介:刘嘉霖(1994-),女,硕士,主要从事大豆种质资源研究。E-mail: 2275053036@qq.com。

通讯作者:熊冬金(1962-),男,博士,副教授,主要从事大豆种质资源研究。E-mail: jxxdj@163.com。

多样性研究表明 284 份大豆材料聚为 5 大类,与所分类群品系的地理来源相关。

与基因编码序列相关的功能分子标记也被应用于植物种质资源研究<sup>[9]</sup>,功能分子标记结合 PCR 及 EST 信息库设计的固定引物,相对于 SSR 分子标记能扩增出更大量的多态性片段<sup>[10]</sup>。在其它植物如小麦<sup>[11]</sup>、油菜<sup>[12-13]</sup>、鹰嘴豆<sup>[14]</sup>、向日葵<sup>[15-16]</sup>的遗传研究分析中都表现出较好的遗传多样性。在黄淮海和南方大豆育成品种遗传多样性方面也有研究,高晓玲等<sup>[17]</sup>和吴慧等<sup>[18]</sup>分别利用目标起始密码子(SCoT)标记和 EST-SSR 功能标记对黄淮海和南方大豆育成品种进行遗传多样性分析,聚类分析均可把黄淮海和南方大豆育成品种分开,随着时间的推移,大量的外来育种材料应用于大豆育种,遗传多样性呈递增趋势。本研究使用 TRAP 功能分子标记对黄淮海和南方大豆育成品种进行遗传结构

及遗传多样性分析,探讨不同功能标记对黄淮海大豆育成品种遗传多样性差异及 TRAP 标记跟踪性状优势的可行性,以期在功能分子标记水平为拓宽中国大豆育成品种遗传基础及筛选优异亲本提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

通过筛选中国 1923 – 2000 年育成的 1 300 个大豆育成品种中来自 A034、A084、A133、A231 家族的代表性大豆<sup>[1]</sup>,采集来自黄淮海和南方生态区共 13 个省份的 158 份大豆作为试验材料。其中 4 份为祖先亲本,分别为奉贤穗稻黄、猴子毛、邳县软条枝和上海六月白,154 份为选育品种(表 1)。158 份大豆试验材料均采自南京农业大学国家大豆改良中心江浦种植基地。

表 1 158 份大豆育成品种信息  
Table 1 The information of 158 cultivated soybeans

编号 No.	名称 Name	育成年份 Years	编号 No.	名称 Name	育成年份 Years	编号 No.	名称 Name	育成年份 Years
C001	阜豆 1 号	1977	C026	豫豆 16	1994	C063	苏豆 3 号	1995
C002	蒙庆 6 号	1974	C027	豫豆 19	1995	C064	苏协 4-1	1981
C003	皖豆 1 号	1983	C028	周 7327-118	1979	C066	徐豆 1 号	1974
C004	皖豆 3 号	1984	C029	文丰 7 号	1971	C067	徐豆 3 号	1978
C005	皖豆 6 号	1988	C030	濮海 10 号	2001	C068	徐豆 7 号	1986
C006	皖豆 9 号	1989	C031	商丘 1099	2002	C070	南农 88-31	1999
C007	皖豆 16	1996	C032	地神 22	2002	C071	南农 99-10	2002
C008	皖豆 21	2000	C038	中豆 8 号	1993	C072	淮豆 3 号	1996
C009	合豆 2 号	2003	C039	中豆 19	1987	C073	淮豆 6 号	2001
C010	合豆 3 号	2003	C040	中豆 20	1994	C074	通豆 3 号	2002
C011	科丰 35	1993	C041	苏协 1 号	1981	C083	荷 84-5	1989
C012	诱变 30	1983	C049	58-161	1964	C084	莒选 23	1963
C013	诱变 31	1983	C050	灌豆 1 号	1985	C085	鲁豆 1 号	1983
C014	诱处 4 号	1994	C051	淮豆 1 号	1983	C087	齐黄 22	1980
C015	早熟 6 号	1983	C052	淮豆 2 号	1986	C088	为民 1 号	1970
C016	早熟 18	1992	C053	南农 1138-2	1973	C089	跃进 5 号	1975
C017	中黄 4 号	1990	C054	南农 493-1	1962	C090	鲁豆 12	1996
C017	皖豆 10 号	1991	C055	南农 73-935	1990	C091	贡豆 2 号	1990
C018	中黄 6 号	1994	C056	南农 87c-38	1990	C092	贡豆 4 号	1992
C019	中黄 8 号	1995	C057	南农 86-4	1994	C093	贡豆 6 号	1993
C020	科丰 53	2001	C058	南农 88-48	1994	C095	淮豆 4 号	1997
C021	苏豆 1 号	1968	C059	南农菜豆 1 号	1989	C097	浙春 1 号	1987
C023	黔豆 4 号	1995	C060	宁镇 1 号	1984	C099	浙春 3 号	1994
C024	豫豆 3 号	1985	C061	苏 7209	1982	C102	中黄 24	2002
C025	豫豆 8 号	1988	C062	泗豆 11	1987	C103	奉贤穗稻黄	祖先亲本

续表 1

编号	名称	育成年份	编号	名称	育成年份	编号	名称	育成年份
No.	Name	Years	No.	Name	Years	No.	Name	Years
C104	猴子毛	祖先亲本	C166	沧豆 4 号	2000	C206	中豆 29	2000
C106	邳县软条枝	祖先亲本	C167	川豆 2 号	1993	C207	中豆 30	2001
C108	郑州 135	1975	C168	滨职豆 1 号	2003	C208	中豆 32	2002
C112	徐豆 8 号	1996	C173	中黄 3 号	1990	C209	湘春豆 10 号	1985
C113	徐豆 10 号	2001	C174	中黄 14	2001	C210	湘春豆 15	1995
C114	徐豆 11	2002	C175	中黄 25	2002	C211	湘春豆 16	1996
C115	徐豆 12	2003	C176	皖豆 13	1994	C212	湘春豆 19	2001
C116	齐黄 28	2003	C177	皖豆 19	1998	C213	湘春豆 20	2001
C118	贡豆 11	2001	C178	科新 3 号	1995	C214	湘春豆 22	2004
C122	南豆 5 号	2003	C180	黔豆 3 号	1996	C215	湘春豆 23	2004
C123	中黄 7 号	1993	C181	黔豆 5 号	1996	C216	苏豆 4 号	1999
C130	豫豆 24	1998	C182	地神 21	2002	C217	徐豆 9 号	1998
C131	豫豆 26	1999	C183	滑豆 20	2002	C218	赣豆 4 号	1996
C132	周豆 11	2003	C184	豫豆 12	1992	C219	成豆 9 号	2002
C133	周豆 12	2004	C187	豫豆 21	1996	C220	川豆 4 号	1996
C134	苏协 18-6	1981	C188	豫豆 22	1997	C221	川豆 5 号	1998
C135	苏协 19-15	1981	C189	豫豆 23	1997	C222	上海六月白	祖先亲本
C136	川豆 6 号	2002	C190	豫豆 25	1998	C223	贡豆 10 号	2002
C140	中黄 15	2001	C191	豫豆 28	2000	C224	贡豆 12	2003
C142	跃进 10 号	1999	C192	豫豆 29	2000	C225	贡豆 5 号	1993
C150	豫豆 2 号	1985	C196	郑 90007	2001	C226	贡豆 8 号	1997
C151	豫豆 5 号	1987	C197	郑 92116	2001	C227	贡豆 9 号	1998
C152	豫豆 7 号	1988	C199	郑交 107	2003	Ce22	诱变 4 号	1994
C157	豫豆 27	1999	C200	GS 郑交 9525	2005	Cfl2	中黄 30	2009
C158	河南早丰 1 号	1971	C202	鄂豆 5 号	1990	Cfl7	中黄 37	2006
C160	郑 86506	1991	C203	鄂豆 7 号	2001	CCg2	中黄 40	2007
C162	郑州 126	1975	C204	早春 1 号	1994	CD558	齐黄 29	2003
C165	川豆 8 号	2002	C205	中豆 24	1989			

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取及检测 选取 4 ~ 5 叶期的大豆叶片,采用改良的 CTAB 法<sup>[19]</sup> 提取 DNA。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,使用核酸定量仪 Qubit 2.0 测定浓度与纯度,根据检测结果将 DNA 稀释至 20 ng·μL<sup>-1</sup>, -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 TRAP 标记引物筛选 供试 TRAP 标记的 11 条固定引物和 13 条随机引物序列参考 Kwon 等<sup>[20]</sup> 和张吉清<sup>[21]</sup> 研究方法,序列信息如表 2 所示。

选取部分 TRAP 标记的固定引物和随机引物,组合成 84 组引物,筛选扩增产物多态性丰富的引物

对大豆样品进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 20 μL:模板 DNA 40 ng(10 ng·μL<sup>-1</sup>),固定引物与随机引物各 0.4 μL(0.1 μmol·L<sup>-1</sup>),*Taq* 酶 0.4 μL(0.1 U·μL<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub> 2.6 μL(1.5 μmol·L<sup>-1</sup>), dNTP 1.6 μL(10 mmol·L<sup>-1</sup>), ddH<sub>2</sub>O 补齐反应体系。PCR 程序为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 1 min, 35 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 扩增 1 min,5 个循环后;95 ℃ 1 min,50 ℃ 50 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 7 min延伸,PCR 产物放于 4 ℃ 保存。扩增后的 PCR 产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。电泳完毕后进行固定、洗涤、银染显影,观察结果并拍照。

表 2 引物参考序列及来源  
Table 2 The origins and reference series of primer

固定引物	序列	参考文献	随机引物	序列	参考文献
Fixed primer	Sequence	Reference	Random primer	Sequence	Reference
A1	TGTCTTTCAATTCGGTGC	[21]	B1	GGAACCAAACACATGAAGA	[24]
A2	CGTTTATTTCTCGCGTC	[21]	B2	TCATCTCAAACCATATACAC	[24]
A3	CCGAGTTGGTATGCTTGT	[22]	B3	TTCTTCTTCCTGGACACTT	[24]
A4	AATCTCAAGGACAAAAGG	[22]	B4	CTATCTCTCGGGACCAAAC	[24]
A5	CGAATCTCCACTAAACCC	[22]	B5	TTCTAGGTAATCCAACACA	[22]
A6	GCTTCAGAGCATTGAAGT	[22]	B6	GGAACCAAACACATGAAGA	[22]
A7	GAAAGACGAAGGAACAGG	[22]	B7	GCGAGGATGCTACTGGTT	[22]
A8	CAGAACTTGTGCTGCTG	[22]	B8	TTCTTCTTCCTGGACACAAA	[22]
B13G14	AATCTCAAGGACAAAAGG	[23]	B9	GA CTGCGTACGCACGCTGA	[25]
MIR156	GATCTCTTTGGCCTGTC	[20]	Sa4700	TTACCTTGGT CATACAACATT	[23]
MIR159	GATCTTGCTTCTTTGG	[20]	Sa12700	TTCTAGGTAATCCAACAACA	[23]
			Ga3800	TCATCTCAAACCATCTACAC	[23]
			Ga5800	GGAACCAAACACATGAAGA	[23]

1.3 数据分析

TRAP 标记将扩增的每 1 个条带视作 1 个位点,有条带记为 1,没有记为 0,使用 Excel 2013 进行统计分析。按照 158 份品种、黄淮海和南方 2 个地区亚群、5 个时期亚群(祖先亲本、1962 – 1970、1971 – 1990、1991 – 2000、2001 – 2009)分别进行遗传多样性分析、聚类分析和遗传结构分析。采用 Power Marker Version 3.25 和 NTSYS 2.02 软件分析所有大豆材料的遗传多样性;采用 UPGMA 法进行聚类分析<sup>[26]</sup>;采用 i-TOL 软件构建聚类无根树状图<sup>[27]</sup>;采用 STRUCTURE 软件进行遗传结构分析<sup>[28]</sup>。

2 结果与分析

2.1 TRAP 引物筛选

对 84 组温度梯度引物筛选结果后得到多态性较好的 21 对引物:B2A4、B2A7、B3A3、B3A4、B3A5、B3A8、B4A7、B6A3、B6A4、B6A6、B6A7、B7A7、B7A4、B8A4、B8A8、(Sa4700)(MIR159)、(Sa12700)(B14G14)、(Sa12700)(MIR159)、(Ga3800)(MIR159)、(Ga5800)(B14G14)、(Ga5800)(MIR159)。在 PCR 扩增后,用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增效果(图 1)。

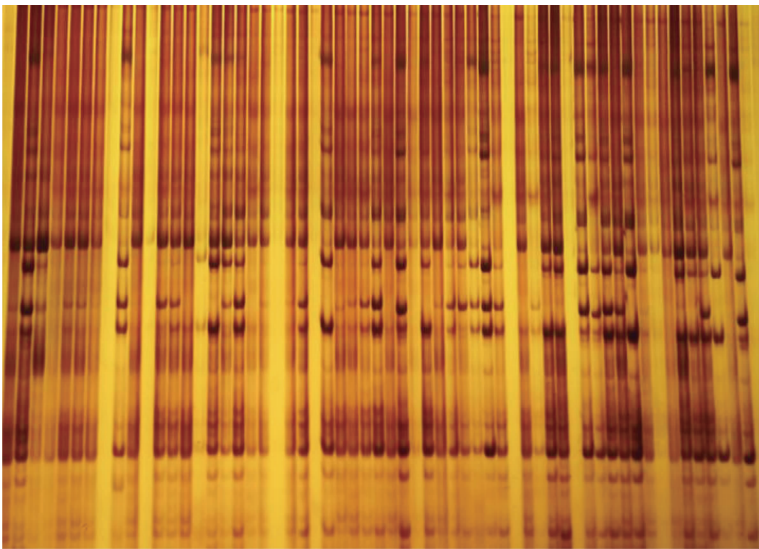


图 1 部分大豆育成品种 TRAP 引物标记扩增电泳图  
Fig. 1 Amplified electrophoresis of some soybeans labeled with TRAP primers

2.2 遗传多样性分析

2.2.1 品种遗传多样性 从随机组合的 84 组引物中筛选出 21 组 TRAP 标记引物,分析黄淮海和南方的 158 份大豆育成品种的多样性,分析结果如表 3 所示:共扩增出 436 条 DNA 条带,各引物条带数变幅为 18 ~ 26 个,平均 20.7 个。Nei's 基因多样性 ( $H$ ) 变化范围为 0.172 5 ~ 0.473 6,平均值为 0.303 1。香农信息指数 ( $I$ ) 变化范围为 0.492 2 ~

0.679 2,平均值为 0.628 8,多态信息含量 ( $PIC$ ) 变化范围 0.144 6 ~ 0.360 7,平均值为 0.247 9。基因频率变化范围为 0.044 3 ~ 0.512 9,平均值为 0.231 5。由 TRAP 标记的引物扩增结果可以看出该标记的扩增条带数较多,引物多态性较高。而 Nei's 基因多样性 ( $H$ ) 和多态信息含量 ( $PIC$ ) 指数为 0.2 ~ 0.3,说明大豆育成品种之间的遗传多样性较低。

表 3 TRAP 分子标记扩增多态性结果  
Table 3 The polymorphism result of TRAP marker

固定引物	随机引物	扩增条带数	基因频率	Nei's 基因多样性	香农信息指数	多态性信息指数
Fixed primer	Random primer	Fragment	Allele frequency	$H$	$I$	$PIC$
A4	B2	18	0.0443	0.3194	0.6457	0.3162
A7	B2	22	0.0506	0.1725	0.6281	0.1446
A3	B3	19	0.1203	0.2845	0.4922	0.2350
A4	B3	18	0.1835	0.2652	0.6456	0.2174
A5	B3	21	0.1899	0.1898	0.6025	0.1666
A8	B3	20	0.3734	0.3114	0.6055	0.2544
A7	B4	21	0.2658	0.2472	0.6496	0.2041
A3	B6	21	0.3291	0.2360	0.5935	0.1996
A4	B6	21	0.1076	0.3603	0.6090	0.2907
A6	B6	22	0.1835	0.2088	0.6581	0.1817
A7	B6	21	0.2911	0.2084	0.6182	0.1812
A4	B7	18	0.1772	0.3334	0.6182	0.2739
A7	B7	21	0.3734	0.3505	0.6736	0.2850
A4	B8	26	0.0886	0.3612	0.6727	0.2932
A8	B8	21	0.1646	0.2795	0.6407	0.2361
MIR159	Ga3800	22	0.2025	0.4736	0.6582	0.3607
B14G14	Ga5800	22	0.5127	0.2067	0.6113	0.1777
MIR159	Ga5800	21	0.3418	0.2742	0.5860	0.2342
MIR159	Sa4700	20	0.3987	0.2838	0.6792	0.2375
B14G14	Sa12700	22	0.2848	0.3307	0.6660	0.2737
MIR159	Sa12700	19	0.1772	0.3499	0.6512	0.2856
平均值 Mean		20.7	0.2315	0.3031	0.6288	0.2479

2.2.2 地域亚群间遗传多样性分析 基于 TRAP 数据的 158 份大豆品种地域亚群间分析结果表明:黄淮海大豆育成品种的 3 类遗传多样性指数  $H$ 、 $I$ 、 $PIC$  的平均值(0.303 5、0.468 9、0.248 6)均大于南方大豆育成品种(0.224 1、0.425 7、0.224 1)。比较

两个地区的 3 个遗传多样性指数的最大值和最小值,可以看出黄淮海大豆育成品种的最小值均小于南方品种,而最大值均大于南方品种,说明黄淮海地区品种的遗传多样性高于南方品种(表 4)。

表 4 TRAP 标记的大豆育成品种地域亚群间的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity based on TRAP marker between regional subgroup

产区 Growing area	Nei's 基因多样性			Shannon 信息指数			多态性信息指数		
	<i>H</i>			<i>I</i>			<i>PIC</i>		
	最小 Min.	最大 Max.	平均 Mean	最小 Min.	最大 Max.	平均 Mean	最小 Min.	最大 Max.	平均 Mean
黄淮海 Huang-Huai-Hai	0.0204	0.4999	0.3035	0.0574	0.6931	0.4689	0.0202	0.3750	0.2486
南方 Southern China	0.0322	0.4999	0.2241	0.0836	0.6930	0.4257	0.0317	0.3749	0.2241

2.2.3 时期亚群间的遗传多样性分析 按照大豆5个时间亚群的遗传多样性分析如表5所示,由于祖先亲本亚群和1962-1970亚群的品种数量分别为4和5个,数量较少,部分TRAP标记的遗传位点上无遗传特异性,这2类亚群的遗传多样性指数小于其它3个时期的遗传多样性指数。与祖先亲本相比,1962-1970和1971-1990两个亚群的3类遗传多样性指数*H*、*I*、*PIC*均随时间推移而递增。而在

1991-2000、2001-2009两个亚群的3类遗传多样性指数*H*、*I*、*PIC*的变幅基本相同,但平均值在降低。上述现象说明中国大豆育成品种亲本单调且遗传多样性水平低,整体来说1971-1990年由于杂交育种技术的发展及外国亲本的引入,杂交育种数增加,育成品种的遗传多样性水平最高,90年代之后遗传多样性水平的降低可能是品种间的遗传交流少造成的。

表 5 TRAP 标记的大豆育成品种分时期亚群间的遗传多样性

Table 5 Genetic diversity based on TRAP marker between period subgroup

群体 Population	Nei's 基因多样性			Shannon 信息指数			多态性信息指数		
	<i>H</i>			<i>I</i>			<i>PIC</i>		
	最小 Min.	最大 Max.	平均 Mean	最小 Min.	最大 Max.	平均 Mean	最小 Min.	最大 Max.	平均 Mean
1962-1970	0	0.480	0.2507	0	0.6830	0.4010	0	0.3648	0.2066
1971-1990	0.0408	0.5000	0.3344	0.1013	0.6931	0.5049	0.0400	0.3750	0.2696
1991-2000	0.0345	0.4998	0.2688	0.0883	0.6930	0.4240	0.0339	0.3749	0.2227
2001-2009	0.0444	0.5000	0.2701	0.1085	0.6931	0.3920	0.0434	0.3750	0.2163
祖先亲本 Ancestor	0	0.5000	0.2288	0	0.6931	0.3330	0	0.3750	0.1801

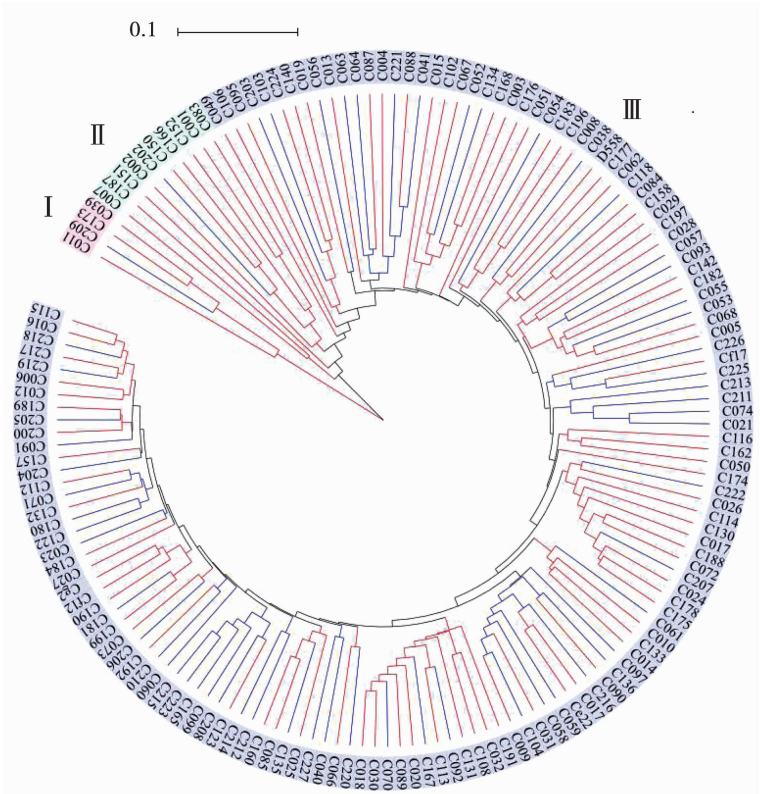
2.3 聚类分析

2.3.1 158份大豆品种遗传距离聚类分析 聚类分析结果表明:158份大豆品种的遗传相似性系数范围为0.2680~0.9220,平均遗传相似性系数为0.7040。相似性系数最高的品种为北京早熟18和江苏徐豆12,相似性系数最低的品种为北京科丰35和山东齐黄29。聚类无根树状图显示:13个省份亚群中的个体并未聚类在一起而是分散分布。所有样本并未按地区来源聚类,而是有混杂的情况(图2)。

基于158份大豆品种的Nei's遗传距离可分为3大类群。I类亚群共4个样本,II类亚群共10个样本,I、II两类亚群分别只有1个南方地区样本,其余为黄淮海地区样本,可视为I、II两小类亚群来自黄淮海地区。III类亚群为1大类群共144个大豆

样本,包括黄淮海地区85个样本和南方地区59个样本。III类亚群样本主要来自江苏、四川、山东等12个省,样本数较前两类群体多且混杂,一些样本数较少的省份亚群样本如江西、浙江、贵州、上海都聚类在III类群中,说明江西、贵州、上海各省亚群遗传距离相近(图2)。

2.3.2 时期亚群相似性系数聚类分析 对5个不同时期大豆育成品种亚群的相似分析结果表明:1991-2000与2001-2009亚群间相似性系数最高为0.993,祖先亲本与1962-1970亚群间的相似性系数最低为0.882(表6)。基于时期亚群间大豆品种的相似性系数的UPGMA聚类图表明:祖先亲本与育成品种亲缘关系最远,而年代相近的育成品种间亲缘关系最近,但尚不能说明大豆育成品种的基因遗传多样性与育种时间的关系(图3)。



图中红线表示来自黄淮海地区的大豆育成品种；蓝线表示来自南方地区的大豆育成品种。

The red line represents soybean varieties from Huang-Huai-Hai region；The blue line represents soybean varieties from southern China.

图 2 TRAP 标记的黄淮海和南方大豆育成品种树状图

Fig. 2 Dendrogram of soybean from Huang-Huai-Hai and southern China based on TRAP marker

表 6 分时期亚群间大豆育成品种的遗传距离和相似性系数分析  
Table 6 Nei’s genetic distance and identity of period subgroup

群体名称 Population	祖先亲本 Ancestor	1962 – 1970	1971 – 1990	1991 – 2000	2001 – 2009
祖先亲本 Ancestor		0. 882	0. 927	0. 936	0. 933
1962 – 1970	0. 126		0. 946	0. 941	0. 940
1971 – 1990	0. 076	0. 055		0. 985	0. 981
1991 – 2000	0. 066	0. 061	0. 016		0. 993
2001 – 2009	0. 069	0. 062	0. 019	0. 007	

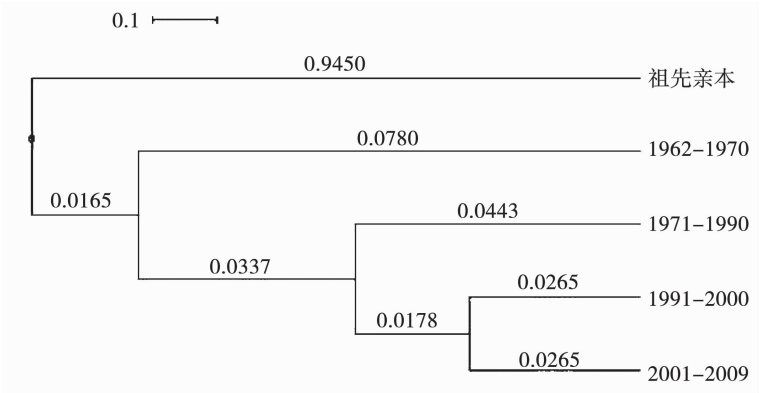


图 3 分时期亚群间大豆育成品种 TRAP 标记聚类图

Fig. 3 The cluster diagram of period subgroup based on TRAP marker



2.4 遗传结构分析

2.4.1 158 份大豆品种遗传结构分析 采用 STRUCTURE 软件对 158 份大豆育成品种的遗传结构分析结果如图 4 所示:当  $K=3$  时, $\Delta K$  数值最大,遗传差异最明显。大豆材料按血缘关系远近分为 3 类,每个类群中大豆材料按该群体遗传组分的  $Q$  值

大小顺序排列。 $Q \geq 0.6$ ,则表示这种材料的遗传结构单一,血缘较为纯合。而  $Q < 0.6$ ,则表示材料的遗传结构复杂,混合了不同群体的血缘关系。3 类亚群的大豆材料都有不同程度的遗传结构混杂的情况,且没有按地理来源聚类。

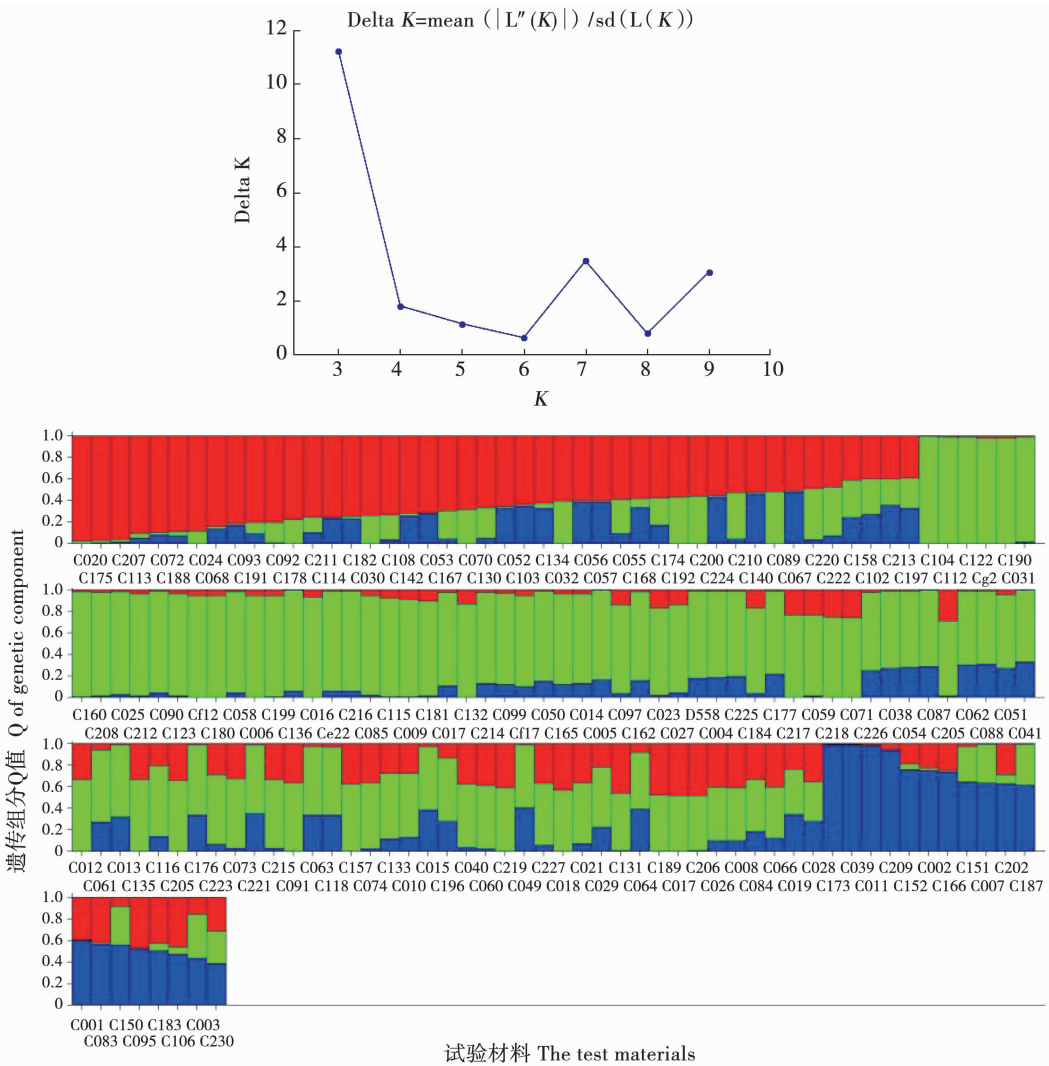


图 4 大豆育成品种 Structure 遗传结构分析  
Fig. 4 Genetic structure analyze of soybean

2.4.2 地域亚群遗传结构分布 从区域分析大豆品种的遗传结构,3 类聚群都由黄淮海地区和南方地区的品种组成,大豆材料并没有按照所有品种的地理来源聚类。比较两个产区的大豆品种遗传结构,黄淮海地区遗传分化明显大于南方地区,黄淮海地区的遗传多样性高于南方地区。

从省份来源分析大豆品种的遗传结构,I 类群有 44 个品种来自江苏、山东、河南等 8 个省,其中江苏和河南两省最多,共 12 个,科丰 53 的  $Q$  值最高,为 0.921 5。II 类群一共 95 个品种,数量最多,为来

自四川、湖北、湖南等 11 个省份的品种,一些品种数较少的南方省份如江西 1 个、浙江 2 个、贵州 3 个都聚于 II 类群,这类群中河南、江苏、北京 3 个省份品种数最多,分别为 16,22 和 12 个。II 类群中  $Q$  值最高的中黄 40 和徐豆 8 号分别来自北京和江苏。III 类群的 19 个品种分别来自河北、安徽、山东等 8 个省份,其中北京的中黄 3 号、科丰 35,湖北的中豆 19、湖南的湘春豆 10 号在 III 类群中  $Q$  值最高,分别为 0.993 4、0.992 1、0.986 5 和 0.973 4(表 7)。



表 7 不同省份大豆遗传结构分布

Table 7 Genetic structure distribution of provincial subgroups of soybean			
群体 Population	聚类亚群 Clustering subgroup		
	I	II	III
安徽 Anhui	0	10	4
北京 Beijing	6	12	2
贵州 Guizhou	0	3	0
河南 Henan	12	16	5
湖北 Hubei	1	7	3
湖南 Hunan	3	3	1
江苏 Jiangsu	12	22	2
江西 Jiangxi	0	1	0
山东 Shandong	3	8	1
上海 Shanghai	2	0	0
四川 Sichuan	5	11	0
浙江 Zhejiang	0	2	0
河北 Hebei	0	0	1
合计 Total	44	95	19

2.4.3 时期亚群遗传结构分布 从育种年代聚类分析大豆品种的遗传结构分析如表 8 所示:I 类群和 II 类群在 1991 – 2000 亚群品种数最多,分别为 15 和 37 个,占群体内比例的 34% 和 39%。III 类群品种在 1971 – 1990 亚群的杂交品种较多,共 11 个,占 III 类群的 57%。可以看出,1971 – 1990 和 1991 – 2000 两个亚群的大豆品种最多,大豆育种资源最丰富。这时期中国大量引进外国种质及各生态区品种,交流的频繁使杂交育成的大豆品种聚增,大豆育成品种遗传基础得到拓宽。各聚类亚群中祖先亲本数量少,在 1962 – 1970 年大豆品种个体数也很稀少。祖先亲本品种数目稀少在大豆资源开发中极为不利,在不断杂交育种过程中造成了大豆品种数目多,血缘遗传关系相近但遗传结构单一的情况。品种间血缘遗传关系越相近,大豆品种间杂交育种价值越小,无法培育新性状极具价值的大豆品种。1971 – 1990 和 1991 – 2000 年中国大力培育出许多优质种质资源,而在之后的 2001 – 2009 年所培育的大豆品种数下降,缺乏新型血缘关系较远的大豆品种,现阶段引进新大豆品种资源、进一步拓宽中国大豆育种资源尤为重要。

表 8 时期亚群遗传结构分布

Table 8 Genetic structure distribution of period subgroups of soybean			
群体 Population	聚类亚群 Clustering subgroup		
	I	II	III
祖先亲本 Ancestor	2	1	1
1962 – 1970	0	5	0
1971 – 1990	11	26	11
1991 – 2000	15	37	5
2000 – 2009	16	26	2
合计 Total	44	95	19

3 讨 论

TRAP 分子标记操作简便、稳定性好且引物多态性丰富,可大量运用于育种、种质评估、遗传多态性分析等研究。高晓玲等<sup>[17]</sup>对大豆品种的 SCoT 标记遗传多样性分析表示各对引物扩增条带变幅为 1 ~ 8 个,平均 4.8 个,Nei's 基因多样性(*H*)平均为 0.37(0.24 ~ 0.49),*PIC* 平均为 0.27。吴慧等<sup>[18]</sup>对大豆品种的 EST-SSR 标记检测到各对引物扩增条带变幅 3 ~ 25 个,平均 8.1 个,*PIC* 平均为 0.61(0.153 ~ 0.874)。TRAP 标记、SCoT 标记和 EST-SSR 标记 3 种标记比较表明 TRAP 标记的平均扩增条带数最多,引物多态性最高,其次为 EST-SSR 标记和 SCoT 标记,可能是由于 TRAP 标记是固定引物和随机引物的组合,筛选出的引物组合多态性丰富。而 EST-SSR 标记的 *PIC* 值明显高于其它两类分子标记,TRAP 标记和 SCoT 标记同为单引物分子标记,多态性结果大致相同。说明 TRAP 分子标记在辅助育种方面具有一定的可行性与应用优势。本研究利用 21 对 TRAP 功能分子标记分析 158 份中国黄淮海和南方地区大豆育成品种的遗传结构和多样性,共发现 436 个标记位点。各对引物扩增条带变幅为 18 ~ 26 个,平均 20.7 个。Nei's 基因多样性(*H*)平均为 0.303 1(0.172 5 ~ 0.473 6),*PIC* 平均为 0.247 9(0.716 0 ~ 0.988 3)。

本研究基于 TRAP 标记数据的 UPGMA 聚类与 Structure 遗传结构分析均将 158 份大豆聚为 3 类,与吴慧等<sup>[18]</sup>利用 EST-SSR 功能标记聚类分析结果相同。黄淮海大豆品种并未按区域聚集在一起,而是混杂聚为 3 类,说明大豆品种的遗传距离和地域分布无显著的相关性。如当 *K* = 3 时,亚群 II 混杂

着黄淮海大豆和南方大豆,不同区域的大豆品种聚在同一类群中可能与两个地区的遗传多样性高、分布地区广相关。黄淮海地区包括北京、河南、江苏等省,地域跨幅广,受环境因素影响遗传变异高,不会聚为1类群,而是均匀分散分布。中国大豆品种早期多在江苏、河南两省培育。通过杂交培育,辐射散状分布于其它各省,造成品种间血缘遗传关系相近。总体来说, $K=3$ 时,158份大豆育成品种的遗传结构有不同程度的混合,没有特定的聚类模式。从育种年代上分析大豆群体的遗传结构聚类结果,中国在1970-1990、1991-2000年期间不断大量杂交培育新大豆品种,导致这两时期段所培育的大豆品种在该3类亚群中所占遗传结构比例更高,现阶段大豆育种中注重引进新种质资源来拓宽大豆品种遗传基础。

4 结 论

本研究利用TRAP标记对中国黄淮海和南方地域的158份大豆育成品种及祖先亲本进行遗传结构及多样性分析,表明TRAP分子标记操作简便、稳定性好、多态性丰富,是大豆种质评估、遗传多态性分析等研究与辅助育种较理想的工具。基于TRAP标记数据的UPGMA聚类与Structure遗传结构分析均将158份大豆聚为3类,两种分析均表明黄淮海和南方地域大豆品种种质交流频繁,地域分布来源和基于TRAP标记的遗传距离无明显的相关性。

致谢: 特别感谢南京农业大学国家大豆改良中心盖钧镒院士、赵团结教授、王吴彬和刘方东博士提供试验材料。

参考文献

[1] 熊冬金,王吴彬,赵团结,等. 中国大豆育成品种10个重要家族的遗传相似性和特异性[J]. 作物学报, 2014, 40(6): 951-964. (Xiong D J, Wang W B, Zhao T J, et al. Genetic similarity and specificity of ten important soybean cultivar families released in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(6): 951-964. )

[2] Cho M J, Widholm J M, Vodkin L O. Cassettes for seed-specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1995, 13(3): 255-269.

[3] 方宣钧, 吴为人, 唐记良作物DNA标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001. (Fang X J, Wu W R, Tang J L. DNA marker-assisted selection of breeding [M]. Beijing: Science Press, 2001. )

[4] 张博, 邱丽娟, 常汝镇. 中国大豆部分获奖品种与其祖先亲

本间SSR标记的多态性比较和遗传关系分析[J]. 农业生物技术学报, 2003(4): 25-32. (Zhang B, Qiu L J, Chang R Z. Diversity comparison an genetic relationship analysis between awarded soybean cultivars and there ancestors in China[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003(4): 25-32. )

[5] Song Q J, Jia G F, Zhu Y, et al. Abundance of SSR motifs and development of candidate polymorphic SSR markers (BARC-SOYSSR\_1 0) in soybean [J]. Crop Science, 2010, 50: 1950-1960.

[6] Wu X, Vuong T D, Leroy J A, et al. Selection of a core set of RILs from Forrest x Williams 82 to develop a framework map in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(6): 1179-1187.

[7] 王彩洁, 孙石, 金素娟, 等. 中国大豆主产区不同年代大面积种植品种的遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2013, 39(11): 1917-1926. (Wang C J, Sun S, Jin S J, et al. Genetic diversity analysis of widely-planted soybean varieties from different decades and major production regions in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(11): 1917-1926. )

[8] 金尚昆, 朱玉萍, 缪依琳, 等. 黄淮海地区新育成大豆品系SSR标记多样性分析[J]. 大豆科学, 2018, 37(2): 173-178. (Jin S K, Zhu Y P, Miao Y L, et al. SSR marker diversity of newly developed soybean breeding lines from Huang-Huai-Hai Region[J]. Soybean Science, 2018, 37(2): 173-178. )

[9] 王泽立, 王鲁昕, 戴景瑞, 等. 运用近等基因系(NIL)、AFLP、RFLP和SCAR标记对玉米S组育性恢复基因(Rf3)的研究[J]. 遗传学报, 2001, 28(5): 465-470. (Wang Z L, Wang L X, Dai J R, et al. Molecular identification and mapping of a maize gene(Rf3) in S-type CMS using AFLP, RFLP and SCAR techniques[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2001, 28(5): 465-470. )

[10] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记——SRAP与TRAP及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(5): 777-781. (Liu L W, Gong Y Q, Huang H, et al. Novel molecular marker systems—SRAP and TRAP and their application[J]. Hereditas, 2004, 26(5): 777-781. )

[11] Zhou L, Liu T, Cheng Y K, et al. Molecular mapping of a stripe rust resistance gene in Chinese wheat landrace “Hejiangyizai” using SSR, RGAP, TRAP, and SRAP markers[J]. Crop Protection, 2017, 94: 178-184.

[12] 金梦阳, 刘列钊, 付福友, 等. 甘蓝型油菜SRAP、SSR、AFLP和TRAP标记遗传图谱构建[J]. 分子植物育种, 2006(4): 520-526. (Jing M Y, Liu L Z, Fu F Y, et al. Construction of genetic linkage map in Brassica napus based on SRAP, SSR, AFLP and TRAP [J]. Molecular Plant Breeding, 2006(4): 520-526. )

[13] 金梦阳, 李加纳, 付福友, 等. 甘蓝型油菜含油量及皮壳率的QTL分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(4): 677-684. (Jing M Y, Li J N, Fu F Y, et al. QTL analysis of oil and hull content in Brassica napus L [J]. Scientia Agricultural Sinica, 2007, 40(4): 677-684. )

[14] Kumar Y, Kwon S J, Coyne C J , et al. Target region amplification polymorphism ( TRAP ) for assessing genetic diversity and marker-trait associations in chickpea ( *Cicer arietinum* L. ) germplasm[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2014, 61(5): 965-977.

[15] Hu J, Seiler G J, Jan C C, et al. Assessing genetic variability among sixteen perennial *Helianthus* species using PCR based trap markers[C]. Fargo ND: Proceedings 25<sup>th</sup> Sunflower Search Workshop, 2003.

[16] Jan C C, Feng J, Seiler G J, et al. Amphiploids of perennial *Helianthus* species x cultivated Sunflower possess valuable genes for resistance to Sclerotinia Stem and Head Rot [ C ]. Fargo ND: Proceedings 25<sup>th</sup> Sunflower Research Workshop, 2006.

[17] 高晓玲, 吴慧, 陈琪, 等. 黄淮海和南方大豆育成品种的目标起始密码子(SCoT)遗传多样性分析[J]. 大豆科学, 2016, 35 ( 5 ): 717-722. ( Gao X L, Wu H, Chen Q, et al. Study on genetic diversity of Huang-Huai-Hai and Southern soybean cultivars by SCoT markers [ J ]. Soybean Science, 2016, 35 ( 5 ): 717-722. )

[18] 吴慧, 高晓玲 陈琪, 等. 基于 EST-SSR 标记的黄淮海和南方大豆育成品种遗传多样性研究[J]. 大豆科学, 2017, 36(3): 7-14. ( Wu H, Gao X L, Chen Q, et al. Genetic diversity of soybean cultivar released based on EST-SSR marker [ J ]. Soybean Science, 2017, 36(3): 7-14. )

[19] Mcgregor C E, Lambert C A, Greyling M M, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques ( RAPD, ISSR, AFLP and SSR ) in tetraploid potato ( *Solanum tuberosum* L. ) germplasm[J]. Euphytica, 2000, 113(2): 135-144.

[20] Kwon S, Hu J, Coyne C J. Genetic diversity and relationship among Faba bean( *Vicia Faba* L. ) germplasm entries as revealed by TRAP markers [ J ]. Plant Genetic Resources, 2010, 8 ( 3 ): 204-213.

[21] 张吉清. 大豆对疫病的抗性评价、抗病基因挖掘及候选基因分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013. ( The evaluation of the phytophthora resistance in soybean cultivars, mining and analysis of the Rps candidate gene [ D ]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013. )

[22] Miklas P N, Hu J, Grünwald N J, et al. Potential application of TRAP ( Targeted Region Amplified Polymorphism ) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean[J]. Crop Science, 2006, 46(2): 910-916.

[23] Hu J, Ochoa O E, Vick B A, et al. Application of the TRAP technique to lettuce( *Lactuca sativa* L. ) genotyping[J]. Euphytica, 2005, 144: 225-235.

[24] Hu J, Vick B A. Target region amplification polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21(3): 289-294.

[25] Wang Q, Zhang B, Lu Q, Conserved region amplification polymorphism ( CoRAP ), a novel marker technique for plant genotyping in *salvia miltiorrhiza*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 27(2): 139-143.

[26] Liu K, Muse SV. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. Bioinformatics, 2005, 21 ( 9 ): 2128-2129.

[27] Letunic I, Bork P; Interactive tree of life ( iTOL ) v3; An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees [ J ]. Nucleic Acids Research, 2016, 44( W1 ): W242-W245.

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