

# 利用 SSR 标记分析蚕豆品种 (品系) 与优异种质的遗传多样性

张红岩<sup>1</sup>☆ 郭兴莲<sup>2, 3</sup>☆ 杨涛<sup>1</sup> 刘荣<sup>1</sup> 黄宇宁<sup>1</sup> 季一山<sup>1</sup> 王栋<sup>1</sup>  
宗绪晓<sup>1</sup>\*

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 青海大学新农村发展研究院, 青海西宁 810016; <sup>3</sup> 青海省海东市互助县农业技术推广中心, 青海海东 810500)

**摘要:** 利用 99 对 SSR 荧光标记对 102 份国内蚕豆育成品种 (品系) 和优异种质资源进行遗传多样性分析。结果表明: 99 对 SSR 标记共检测出 937 个等位变异, 每对标记平均检测出 4~19 个等位变异, 平均为 9.46 个; 多态性信息量 (PIC) 变化范围为 0.38~0.88, 平均为 0.63; 有效等位变异 ( $N_e$ ) 变化范围为 1.79~9.22, 平均为 3.41; Shannon 信息指数变化范围为 0.79~2.44, 平均为 1.45。基于邻接法 (NJ) 的聚类分析将 102 份国内育成蚕豆品种 (品系) 及优异种质划分成春播和秋播两大生态类型; 优异蚕豆资源的遗传多样性最高, 其次为青海品种 (品系) 和云南品种, 江苏品种遗传多样性相对较低。群体遗传结构和主成分分析将供试蚕豆材料分为三大类, 第一大类主要以云南育成品种为主, 第二大类全部为青海育成品种 (品系), 第三大类主要为大部分优异种质资源以及全部江苏育成品种; 供试材料具有生态适应性狭窄和极强的地域生态特点。

**关键词:** SSR 标记; 蚕豆; 品种; 优异种质; 遗传多样性

蚕豆 (*Vicia faba* L.) 为豆科蝶形花亚科巢菜属的唯一栽培种, 为越年生 (秋播) 或一年生 (春播) 草本植物 (郑卓杰, 1997)。据 FAO 统计, 2005~2014 年全世界干蚕豆平均生产面积为 243.25 万  $\text{hm}^2$ , 总产量 429.80 万 t, 其中中国生产面积为 96.99 万  $\text{hm}^2$ , 总产量 164.877 万 t, 分别占世界的 35.76% 和 38.36% (FAO, 2017)。蚕豆在我国已有 2 000 余年的栽培历史, 是一种重要的粮食、蔬菜和饲料、绿肥兼用作物 (马钰, 2012), 是豆类蔬菜中重要的食用豆之一。

种质资源的多样性是育种工作的基础。早期, 人们主要采用形态学的方法对蚕豆的遗传多样性进行研究 (Robertson & El-Sherbeeney, 1991; Polignano et al., 1999), 该方法简便、经济, 但鉴定周期较长、易受环境影响 (王伟等, 2009)。随着分子生物技术的快速发展, RAPD (Link et al., 1995)、AFLP (Zeid et al., 2004)、ISSR (Fernandez et al., 2002; Terzopoulos & Bebeli, 2008) 等分子标记技术被应用于蚕豆种质资源的遗传多样性研究之中。Link 等 (1995) 利用 RAPD 标记对 3 个蚕豆自交系群体进行研究, 结果表明, 地中海种和欧洲小粒种被分为截然不同的 2 组, 欧洲大粒种介于两者之间。Zong 等 (2009) 利用 10 对 AFLP 引物对 204 份国内冬性蚕豆资源和 39 份国外冬性资源进行遗传多样性分析, 聚类分析和主成分分析结果表明, 中国蚕豆资源与国外蚕豆资源界限明显。王海飞等 (2011) 利用 11 对 ISSR 标记对国内外蚕豆资源的遗传多样性进行分析, 揭示了中国春播型蚕豆资源遗传多样性较为丰富, 美洲蚕豆种质资源遗传基础相对狭窄。Gong 等 (2011) 利用 11 对 EST-SSR 标

☆同等贡献作者

张红岩, 硕士研究生, 专业方向: 食用豆类种质资源, E-mail: 15701663965@163.com; 郭兴莲, 高级农艺师, 专业方向: 蚕豆育种与推广, E-mail: gx5870@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author): 宗绪晓, 博士, 研究员, 专业方向: 食用豆类种质资源, E-mail: zongxuxiao@caas.cn

收稿日期: 2017-08-22; 接受日期: 2017-10-31

基金项目: 国家食用豆产业技术体系项目 (CARS-09), 国家农作物种质资源共享服务平台项目 (NICGR2016-食用豆子平台), 欧盟、北美及大洋洲农业生物资源引进与农业技术需求和政策信息收集研究项目 (2016-X16)

记对 29 份国内外蚕豆品种进行遗传多样性分析,发现参试中国蚕豆品种遗传背景较为狭窄。目前,我国蚕豆种质资源的研究水平较为落后,其庞大的基因组严重限制了从分子水平研究蚕豆资源遗传多样性的步伐。

基于全自动遗传分析仪的 SSR 荧光标记具有省时、高通量、高准确度等特点,目前已应用于农作物的遗传多样性分析。雍洪军等(2009)基于该项技术对我国 7 个省的 90 份糯玉米进行遗传多样性分析,初步将供试玉米品种划分为 3 个类群。王瑞云等(2017)利用 15 对特异性 SSR 荧光标记扫描我国 11 个省的 132 份糜子资源,聚类分析可将参试糜子资源划分成 4 类。

蚕豆染色体组  $2n=12$ , 基因组片段大小约为 13 000 kb, 基因组庞大、基因组学研究滞后、开发的 SSR 标记十分有限。本试验利用中国农业科学院作物科学研究所冷季食用豆类课题组自主开发的 99 对 SSR 荧光标记引物,对 102 份国内育成蚕豆品种(品系)及优异种质资源的遗传多样性进行系统研究,旨在揭示中国代表性蚕豆品种(品系)和种质资源间的遗传多样性差异,为我国蚕豆育种产业的快速推进、科学合理选配亲本及挖掘和利用优异资源提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试蚕豆材料共计 102 份,其中青海育成品种(品系)27 个、云南育成品种 19 个、江苏育成品种 6 个、优异种质资源 50 份。优异种质资源主要是指综合农艺性状优良、具有抗病虫性及抗逆性等特殊性状的蚕豆资源。参试材料均取自国家种质资源中期库,由中国农业科学院作物科学研究所提供,2016 年 11 月种植于中国农业科学院作物科学研究所网室内。参试材料具体信息见表 1。

### 1.2 SSR 荧光标记

利用中国农业科学院作物科学研究所冷季食用豆类课题组构建的蚕豆 SSR 遗传连锁图谱,经 8% 非变性凝胶电泳多次筛选,获得在连锁群上均匀分布、多态性较高、PCR 扩增较稳定的 99 对 SSR 标记,标记的 5'端分别用 FAM(蓝色)、HEX(绿色)荧光染料标记。SSR 引物合成及 PCR 扩增产物荧

光检测均委托北京梓熙生物科技有限公司。 $2 \times Taq$  PCR Master Mix 购自北京康润诚业生物科技有限责任公司。DNA Marker 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

### 1.3 DNA 提取

每份参试材料选择生长良好的 4 个单株,取幼嫩叶片混合后,采用改良的 CTAB 法(Wang et al., 2015)提取 DNA,提取缓冲液中加入一定量的水溶性 PVP 和  $\beta$ -羟基乙醇(Gentile et al., 2017; Sokol et al., 2017),可以有效防止酚类物质的氧化作用。采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,采用 NanoDrop 2000 软件(Yang et al., 2015)检测 DNA 浓度,根据检测结果将其稀释到工作液浓度( $20 \sim 30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )后于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.4 SSR-PCR 扩增及产物荧光检测

采用  $10 \mu\text{L}$  的扩增反应体系,其中  $2 \times Taq$  PCR Master Mix  $5 \mu\text{L}$ ,  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的上、下游引物各  $1 \mu\text{L}$ , DNA ( $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 模板  $1.5 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $2.5 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 35 s,  $55 \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 40 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 共 32 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 5 min,  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  保温 7 min。

将 FAM(蓝色)和 HEX(绿色)荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 25 倍,分别取等体积的上述 2 种稀释液混合,吸取  $1 \mu\text{L}$  混合液、 $0.1 \mu\text{L}$  LIZ500 分子量内标和  $8.9 \mu\text{L}$  去离子甲酰胺分别加入到 DNA 分析仪专用深孔板孔中;然后在 PCR 仪上  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 min,取出后立即置于碎冰上,冷却 15 min 左右;瞬时离心 10 s,在 ABI3700 DNA 遗传分析仪上进行检测。

### 1.5 数据处理

采用 DNA Collection 和 Genemapper 软件进行原始数据收集和分析,建立相应数值数据库。采用 PopGenVersion 1.32 软件(孙源文等,2012)计算群体的等位变异数(observed number of alleles,  $N_a$ )、有效等位变异数(effective number of alleles,  $N_e$ )、Shannon 信息指数(I)。采用 PowerMarker 3.25 软件计算标记位点的多态性信息量(polymorphism information content, PIC),以邻接法(neighbor-joining)计算参试材料间 Nei's 遗传距离,进行聚类分析并用 FigTree 软件(Rambaut, 2009)做树状聚

表 1 参试蚕豆类型及来源地

编号	名称	类型	来源地	编号	名称	类型	来源地	编号	名称	类型	来源地
F1	F1	品系	青海	F35	云豆 1299	品种	云南	F69	蚕豆	优异种质	湖北
F2	F4	品系	青海	F36	云豆 1862	品种	云南	F70	二板豆	优异种质	湖南
F3	F5	品系	青海	F37	云豆 2037	品种	云南	F71	细米胡豆	优异种质	广西
F4	F6	品系	青海	F38	云豆 2401	品种	云南	F72	山宝白皮	优异种质	四川
F5	F7	品系	青海	F39	云豆 2457	品种	云南	F73	老胡豆	优异种质	贵州
F6	GF9	品系	青海	F40	云豆 2846	品种	云南	F74	焉牙	优异种质	云南
F7	GF13	品系	青海	F41	云豆 3032	品种	云南	F75	323	优异种质	陕西
F8	GF23	品系	青海	F42	云豆 3144	品种	云南	F76	蚕豆	优异种质	甘肃
F9	GF36	品系	青海	F43	云豆 4466	品种	云南	F77	房州早生 -1	优异种质	约旦
F10	GF45	品系	青海	F44	云豆 5932	品种	云南	F78	BL2	优异种质	加拿大
F11	GF47	品系	青海	F45	云豆 9224	品种	云南	F79	蚕豆	优异种质	德国
F12	TF39	品系	青海	F46	8137-1	品种	云南	F80	涡阳大青花	优异种质	宁夏
F13	TF40	品系	青海	F47	海门大青皮	品种	江苏	F81	大青豆	优异种质	日本
F14	TF42	品系	青海	F48	启豆 2 号	品种	江苏	F82	蚕豆	优异种质	法国
F15	VF2	品系	青海	F49	日本原种	品种	江苏	F83	蚕豆	优异种质	青海
F16	VF3	品系	青海	F50	通蚕鲜 6 号	品种	江苏	F84	二板子	优异种质	俄罗斯
F17	VF4	品系	青海	F51	通蚕鲜 7 号	品种	江苏	F85	大白胡豆	优异种质	安徽
F18	VF8	品系	青海	F52	通蚕鲜 8 号	品种	江苏	F86	大绿蚕豆	优异种质	山西
F19	VF11	品系	青海	F53	霞浦	优异种质	福建	F87	蚕豆	优异种质	上海
F20	青海 3	品种	青海	F54	Syr.L	优异种质	叙利亚	F88	仪征蚕豆	优异种质	浙江
F21	青海 9	品种	青海	F55	New Mammoth	优异种质	英国	F89	寿昌大粒佛豆	优异种质	安徽
F22	青海 10	品种	青海	F56	7071	优异种质	土耳其	F90	蚕豆	优异种质	江西
F23	青海 11	品种	青海	F57	7068	优异种质	黎巴嫩	F91	江阴小粒	优异种质	广西
F24	青海 12	品种	青海	F58	8034	优异种质	西班牙	F92	大板蚕豆	优异种质	四川
F25	青海 13	品种	青海	F59	943	优异种质	阿富汗	F93	青皮蚕豆	优异种质	河北
F26	青海 14	品种	青海	F60	888	优异种质	埃及	F94	蚕豆	优异种质	内蒙古
F27	青海 15	品种	青海	F61	369	优异种质	苏丹	F95	大粒蚕豆	优异种质	广西
F28	云豆 12 (68)	品种	云南	F62	蚕豆	优异种质	阿尔及利亚	F96	米胡豆	优异种质	贵州
F29	云豆 41	品种	云南	F63	本地种	优异种质	墨西哥	F97	绿皮豆	优异种质	云南
F30	云豆 459	品种	云南	F64	石港淮豆	优异种质	山西	F98	老胡豆	优异种质	陕西
F31	云豆 584	品种	云南	F65	绿豆豆	优异种质	内蒙古	F99	白胡豆	优异种质	重庆
F32	云豆 663	品种	云南	F66	蚕豆	优异种质	江苏	F100	蚕豆	优异种质	青海
F33	云豆 1051	品种	云南	F67	青裸蚕豆	优异种质	浙江	F101	K0729	优异种质	甘肃
F34	云豆 1225	品种	云南	F68	蚕豆	优异种质	江西	F102	蚕豆	优异种质	山东

类图。标记系数 (marker index, MI) 按 Senior 等 (1998) 的公式  $MI = \text{Allele} \times \text{PIC}$  计算, Allele 为该引物的等位基因数。采用 Structure 2.2 软件 (Evanno et al., 2005) 进行群体遗传结构分析, Burnin Period 和 after Burnin 各为 10 000,  $K$  值为 1~9, 每个  $K$  值各运行 15 次。利用 GenALEX 6 软件 (Peakall & Smouse, 2006) 计算材料间的遗传距离并进行主成分 (PCA) 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传多样性分析

102 份国内蚕豆育成品种 (品系) 及优异种质

在 99 个 SSR 位点 (表 2) 共检测出 937 个等位变异, 每对引物平均检测出 4~19 个等位变异, 平均为 9.46 个。99 个位点的多态性信息量 PIC 值变化范围为 0.38~0.88, 平均为 0.63; 标记系数 MI 变化范围为 1.74~15.40, 平均为 6.19; 有效等位变异变化范围为 1.79~9.22, 平均为 3.41; Shannon 信息指数变化范围为 0.79~2.44, 平均为 1.45。其中, 标记 SSR12192 的等位变异最多 (19 个), PIC 值为 0.78, MI 值为 14.77, 有效等位变异为 4.98, Shannon 信息指数为 2.01; SSR13513、SSR10910 与 EST2045 的等位变异均为 4 个, 它们的 PIC 值、MI 值、有效等位变异与 Shannon 信息指数也相应较低。

表 2 99 对 SSR 标记在 102 份蚕豆材料中的遗传多样性参数

标记名称	多态性信息量	标记系数	等位变异	有效等位变异	Shannon 指数	标记名称	多态性信息量	标记系数	等位变异	有效等位变异	Shannon 指数
CSSR5878	0.78	8.58	11	5.11	1.89	SSR12479	0.70	10.53	15	3.78	1.70
CSSR6201	0.70	9.15	13	3.61	1.78	SSR12524	0.42	4.15	10	1.79	0.99
EST1106	0.62	4.34	7	3.10	1.29	SSR12526	0.41	2.03	5	1.93	0.83
EST1117	0.63	5.01	8	2.89	1.45	SSR12536	0.57	5.15	9	2.51	1.33
EST1162	0.64	3.82	6	3.30	1.30	SSR12586	0.62	6.21	10	2.91	1.41
EST1217	0.67	3.35	5	3.60	1.35	SSR12670	0.66	11.29	17	3.20	1.74
EST1250	0.58	4.62	8	2.79	1.22	SSR12751	0.70	6.34	9	3.76	1.61
EST1368	0.86	15.40	18	7.63	2.29	SSR12842	0.68	5.46	8	3.63	1.51
EST1390	0.38	2.27	6	1.80	0.79	SSR12862	0.47	4.73	10	1.95	1.19
EST1496	0.43	2.99	7	2.02	0.91	SSR12868	0.46	4.17	9	2.03	1.07
EST1538	0.69	6.85	10	3.64	1.51	SSR13067	0.68	4.07	6	3.63	1.42
EST1539	0.61	8.52	14	2.72	1.54	SSR13106	0.71	5.68	8	4.04	1.53
EST1557	0.63	6.90	11	3.15	1.41	SSR13177	0.46	2.74	6	2.21	0.96
EST1584	0.58	5.23	9	2.81	1.27	SSR13179	0.79	13.44	17	5.38	1.98
EST1626	0.53	8.94	17	2.17	1.40	SSR13488	0.77	10.77	14	4.95	1.84
EST1652	0.62	4.34	7	3.06	1.31	SSR13510	0.71	6.42	9	4.03	1.62
EST1672	0.62	5.55	9	2.91	1.37	SSR13513	0.57	2.30	4	2.84	1.10
EST1741	0.73	8.01	11	4.27	1.63	SSR13598	0.57	5.74	10	2.77	1.28
EST1773	0.54	3.78	7	2.36	1.20	SSR13672	0.64	5.73	9	3.23	1.37
EST181	0.88	15.00	17	9.22	2.44	SSR13683	0.61	6.72	11	2.90	1.39
EST1879	0.66	5.30	8	3.52	1.40	SSR13701	0.72	5.74	8	4.09	1.60
EST1892	0.57	4.58	8	2.56	1.27	SSR13762	0.62	3.72	6	2.90	1.34
EST1905	0.61	8.55	14	2.74	1.51	SSR13771	0.72	6.51	9	4.02	1.67
EST1935	0.68	6.09	9	3.60	1.47	SSR14062	0.55	4.91	9	2.34	1.27
EST2045	0.43	1.74	4	2.16	0.87	SSR14069	0.47	4.22	9	2.01	1.07
EST554	0.74	7.41	10	4.37	1.72	SSR14219	0.71	7.78	11	3.96	1.63
EST587	0.57	5.74	10	2.65	1.34	SSR14252	0.77	13.90	18	4.69	2.09
EST676	0.78	6.25	8	5.17	1.80	SSR14283	0.73	10.93	15	3.97	1.89
EST710	0.58	3.50	6	2.82	1.25	SSR14320	0.72	12.21	17	3.83	1.89
EST896	0.74	11.11	15	4.36	1.87	SSR14456	0.53	3.15	6	2.51	1.07
EST945	0.55	6.57	12	2.29	1.40	SSR15140	0.62	6.23	10	2.84	1.47
SSR10882	0.51	2.57	5	2.26	1.08	SSR15363	0.44	2.62	6	1.87	0.96
SSR10910	0.47	1.89	4	2.23	0.95	SSR15741	0.78	7.06	9	5.27	1.82
SSR10911	0.59	3.52	6	2.87	1.22	SSR16491	0.62	4.37	7	3.08	1.33
SSR11448	0.61	3.64	6	3.08	1.19	SSR16772	0.70	5.56	8	3.81	1.52
SSR11611	0.43	3.01	7	1.87	0.95	SSR16800	0.66	5.96	9	3.39	1.45
SSR11752	0.45	3.58	8	1.91	1.02	SSR17457	0.71	4.25	6	4.01	1.49
SSR11771	0.55	2.74	5	2.61	1.11	SSR17478	0.72	8.64	12	4.08	1.69
SSR11885	0.54	4.90	9	2.32	1.30	SSR17507	0.70	6.29	9	3.80	1.59
SSR11908	0.69	4.83	7	3.74	1.51	SSR17611	0.77	6.16	8	5.01	1.71
SSR11979	0.57	3.44	6	2.80	1.15	SSR17715	0.78	7.76	10	5.06	1.81
SSR11989	0.73	8.06	11	4.25	1.71	SSR17719	0.76	7.59	10	4.68	1.77
SSR12080	0.67	5.38	8	3.55	1.44	SSR17991	0.65	4.58	7	3.19	1.46
SSR12192	0.78	14.77	19	4.98	2.01	SSR17997	0.58	5.82	10	2.59	1.34
SSR12193	0.69	6.22	9	3.57	1.62	SSR18109	0.61	3.64	6	2.98	1.29
SSR12232	0.84	10.03	12	6.80	2.09	SSR18236	0.78	7.84	10	5.18	1.91
SSR12321	0.66	3.29	5	3.43	1.33	SSR18417	0.52	4.64	9	2.32	1.11
SSR12332	0.65	5.16	8	3.20	1.44	SSR18541	0.64	8.99	14	3.04	1.59
SSR12396	0.61	5.50	9	2.86	1.39	SSR18766	0.58	5.18	9	2.51	1.35
SSR12450	0.75	11.24	15	4.54	1.85	平均	0.63	6.19	9.46	3.41	1.45



表明等位基因数、多态性信息量 PIC、MI 值、有效等位基因数与 Shannon 信息指数整体呈现出一致的变化趋势。

## 2.2 不同种质间的遗传关系

2.2.1 聚类分析 基于 NJ 聚类法, 102 份参试材料在遗传距离为 0.324 时被分成两大类 (图 1)。第一大类全部为青海蚕豆品种 (品系), 表现为春播生态类型。第二大类为云南、江苏育成品种和蚕豆优异种质资源, 整体表现为秋播生态类型。来源于青海的品种 (品系) 与其他供试材料界限较为明显, 可能由于育成品种的骨干亲本多以当地优异农家种为主, 或者在独特的地理环境下长期自然选择的结果。来源于青海的两份具有抗逆特性的蚕豆资源 F83 和 F100 与青海育成品种 (品系) 并没有聚类在一起, 可能是由于引种所致, 这两份资源是否为外来资源还需进一步验证。国内外蚕豆优异种质资源与云南和江苏蚕豆品种聚类在一起, 这为我国秋播型蚕豆育种研究、科学选配亲本及挖掘和利用优异资源提供了依据。

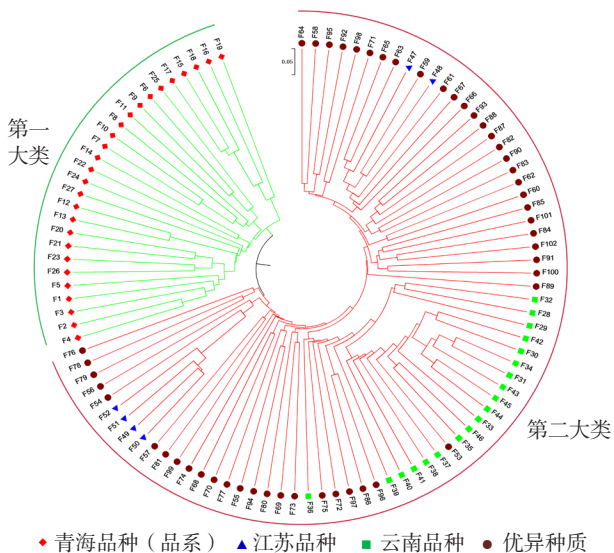


图 1 102 份蚕豆材料的 NJ 聚类图

由表 3 可以看出, 优异蚕豆种质资源和不同省份蚕豆品种的等位变异不同, 其中优异蚕豆资源组群最高, 其次为青海组群和云南组群, 江苏组群最低。有效等位变异最高为优异蚕豆资源, 其次为青海组群和云南组群, 江苏组群最低。Shannon 信息指数变化趋势与有效等位变异相同, 优异蚕豆资源 > 青海组群 > 云南组群 > 江苏组群。综合各组群

表 3 优异蚕豆种质与不同省份蚕豆品种 (品系) 间遗传多样性参数

组群	组群大小	等位变异	有效等位变异	Shannon 指数
云南	19	3.70	2.18	0.87
青海	27	5.79	3.26	1.32
江苏	6	2.56	1.97	0.72
优异种质	50	8.35	3.37	1.42

间的遗传多样性参数可知, 优异蚕豆资源遗传多样性较高, 其次为青海组群和云南组群, 江苏组群遗传多样性相对最低。

由表 4 可以看出, 优异种质资源与云南品种和青海品种 (品系) 之间的亲缘关系相对较近, 与江苏品种的亲缘关系相对较远, 各蚕豆组群之间的亲缘关系从某种程度上反映了优异种质资源在蚕豆主要产区的适应性。青海品种 (品系) 与江苏品种、云南品种亲缘关系相对较近, 云南品种与江苏品种之间亲缘关系相对较远。综合来看, 不同地理来源的蚕豆材料具有一定的地域生态性。

表 4 优异蚕豆种质与不同省份蚕豆品种 (品系) 组群的遗传相似系数 (右上) 与遗传距离 (左下)

组群	青海	云南	江苏	优异种质
青海	—	0.651 0	0.667 6	0.802 0
云南	0.429 3	—	0.611 6	0.819 6
江苏	0.404 1	0.491 6	—	0.739 5
优异种质	0.220 7	0.198 9	0.301 8	—

2.2.2 群体结构分析 采用 Structure 2.2 软件对 102 份参试材料进行群体结构分析, 因后验概率值  $[\ln P(D)]$  随亚群数的增大而增大, 故采用基于  $\Delta K$  的最大似然估计确定适宜亚群数。结果表明, 102 份参试材料在  $K=3$  时  $\Delta K$  出现峰值, 即参试材料从群体结构上可被分为 3 个亚群 (图 2)。进一步研究 Structure 软件分析得到的亚群和地理生态型间的关系发现, 亚群 I 主要包括青海全部品种 (品系) 和小部分优异种质资源; 亚群 II 主要包括云南大部分品种以及小部分优异种质资源; 亚群 III 主要包括江苏全部品种、大部分优异种质资源以及小部分云南品种。可见, 亚群分类结果与参试材料地理来源及生态类型存在一定程度的相关性。

2.2.3 主成分分析 主成分分析结果与 Structure 群体遗传结构分析结果基本一致。102 份蚕豆材料呈现出交叉分布的现象, 在一定程度上说明其遗传基

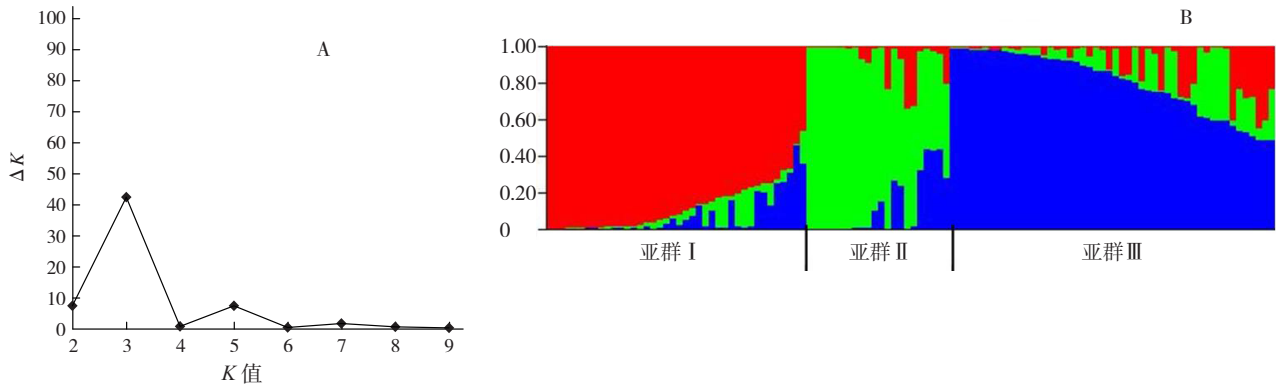


图2 102份蚕豆材料的群体遗传结构图

基础较为广泛(图3)。第一大类主要以云南育成品种为主,中间混杂个别优异种质资源;第二大类全部为青海育成品种(品系);第三大类主要为大部分优异种质资源以及全部江苏育成品种。

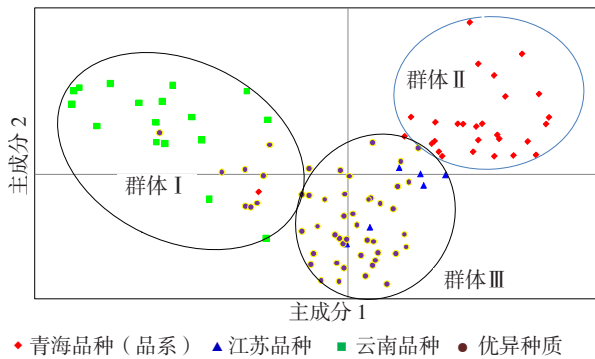


图3 102份参试蚕豆材料的PCA分析

### 3 结论与讨论

#### 3.1 SSR 荧光标记技术

SSR 荧光标记检测技术利用不同荧光基团染料(例如 HEX、ROX、TET、FAM、Texas、Red)标记引物,通过全自动 DNA 分析测序仪精确分析 PCR 扩增产物的片段大小。传统的银染法经济,但灵敏度较低、数据的有效整合性较差,同一胶板或不同胶板上样品谱带间相对位置难以有效识别,严重制约了数据的准确性。相对而言,SSR 荧光标记检测技术具有高通量、高灵敏度、高准确性、数据一致性高等优点,可实现不同板数样品间数据的有效整合。目前,该项技术已广泛应用于玉米(张全芳等,2017)、枸杞(尹跃等,2017)、水稻(王玲等,2015)、甘蓝型油菜(周梦妍等,2015)、高粱(王瑞等,2015)等作物。郝晨阳等(2005)利用

24 对 SSR 标记扩增小麦基因组,通过银染法检测到 235 个等位变异,每对引物平均检测到 3~20 个等位变异,平均为 9.8 个;基于 SSR 荧光标记技术检测到 312 个等位变异,每对引物平均检测到 4~24 个等位变异,平均为 13.0 个。通过分析两种 SSR 分型方法,相对于银染技术,荧光标记检测技术可以检测到更多的等位变异,检测效果更为理想,灵敏度更高,更适于当前作物遗传多样性和指纹图谱构建的分析与研究。

#### 3.2 蚕豆遗传多样性研究进展

早期人们主要通过蚕豆的主要农艺性状(生育期、种皮颜色、株高、籽粒大小、分枝数、有效荚数等)开展遗传多样性研究。康智明等(2015)对 6 份国内秋播型蚕豆品种和 6 份国外主栽品种进行农艺性状和品质的遗传多样性分析,结果表明品种的亲缘关系与地理来源关系不大。徐东旭等(2010)通过分析国内外不同地理来源的 637 份蚕豆种质资源的 18 个农艺性状,推断出参试资源由三大基因库组成,国内春、冬性蚕豆种质资源间以及国内外资源间具有较大的遗传变异。随着分子标记技术的日益成熟,不同类型的分子标记被应用到蚕豆基础性研究之中。本试验利用 99 对荧光 SSR 标记分析 102 份中国代表性蚕豆品种(品系)和优异种质,聚类分析显示春播型和秋播型蚕豆界限较为明显,这与前人研究结果一致。优异蚕豆资源的遗传多样性明显高于育成品种(品系),优异种质资源与云南品种和青海品种(品系)之间的亲缘关系相对较近,从某种程度说明优异种质整体上可以适应两地生态环境。在今后蚕豆育种过程中,建议育种家们扩大种质资源的筛选,充分挖掘和利用优异种质资源,提高育种效率。

### 3.3 种质资源创新是蚕豆育种的关键

优异的种质资源是培育优良作物品种的遗传物质基础,调查、收集和保存蚕豆种质资源显得尤为重要。蚕豆作为世界上第六大类食用豆类作物,我国拥有丰富的蚕豆种质资源,同时也是全球蚕豆栽培面积和总产量最高的国家。当前我国蚕豆育种主要目标以产量为主,部分骨干亲本的过度使用造成了蚕豆品种间的遗传基础狭窄。本试验通过对102份蚕豆品种(品系)和优异种质资源进行遗传多样性分析,云南、青海和江苏育成品种界限较为明显,表明蚕豆具有生态适应性狭窄和极强的地域生态特点,这一结论与庞雯等(2002)的研究结果一致。加强地方蚕豆品种整理与鉴定、引种、系统选育以及杂交育种是当前蚕豆育种的主要方式。尚启兵等(2003)通过引种和系统选育成功选育出蚕豆新品系 Divine,该品系具有单宁含量低、高蛋白、多抗性以及适应性广等特点,目前已经成为多个蚕豆新品种的育种亲本。吕梅媛等(2016)通过杂交育种方式成功选育出适应性广、产量较高、耐寒的蚕豆新品种云豆 690。充分挖掘和利用蚕豆优异种质资源,合理选配杂交组合是蚕豆获得高产稳产的主要途径。

#### 参考文献

郝晨阳,王兰芬,贾继增,董玉琛,张学勇. 2005. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析. 作物学报, 31(2): 144-149.

康智明,郑开斌,徐晓俞,李爱萍. 2015. 不同蚕豆品种农艺及品质性状的遗传多样性分析. 福建农业学报, 30(3): 249-252.

吕梅媛,王丽萍,杨峰,代程,于海天,何玉华. 2016. 广适、高蛋白优质蚕豆新品种“云豆 690”选育. 中国科技成果, 17(18): 17-19.

马钰. 2012. 蚕豆 SSR 标记的开发及遗传连锁图谱的构建〔硕士学位论文〕. 北京: 中国农业科学院.

庞雯,杨示英,宗绪晓,蔡庆生,韦广天. 2002. 广西原产和外引蚕豆种质资源鉴定评价. 植物遗传资源学报, 3(4): 39-43.

尚启兵,王志刚,李云霞,温启录,张耀辉,宗绪晓. 2003. 蚕豆新品系 Divine 的筛选和利用. 内蒙古农业科技, (4): 21-22.

孙源文,陈钰辉,刘富中,张映,连勇. 2012. 基于 SSR 分子标记的栽培种茄子遗传多样性分析. 中国蔬菜, (22): 17-23.

王海飞,关建平,孙雪莲,马钰,宗绪晓. 2011. 世界蚕豆种质资源遗传多样性和相似性的 ISSR 分析. 中国农业科学, 44(5): 1056-1062.

王玲,左示敏,张亚芳,陈宗祥,黄世文,潘学彪. 2015. 中国南方八省(自治区)水稻纹枯病菌群体遗传结构的 SSR 分析. 中国农业科学, 48(13): 2538-2548.

王瑞,张福耀,程庆军,田承华,凌亮. 2015. 利用 SSR 荧光标记构建 20 个高粱品种指纹图谱. 作物学报, 41(4): 658-665.

王瑞云,季煦,陆平,刘敏轩,许月,王纶,王海岗,乔治军. 2017. 利用荧光 SSR 分析中国糜子遗传多样性. 作物学报, 43(4): 530-548.

王伟,杨文鹏,张文龙. 2009. 贵州 48 个玉米杂交种及其亲本 SSR 指纹图谱的构建与分析. 贵州农业科学, 37(11): 1-8.

徐东旭,姜翠棉,宗绪晓. 2010. 蚕豆种质资源形态标记遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 11(4): 399-406.

尹跃,安巍,赵建华,李彦龙,樊云芳,曹有龙. 2017. 枸杞品种 SSR 荧光指纹图谱构建及遗传关系分析. 西北林学院学报, 32(1): 137-141.

雍洪军,张世煌,张德贵,李明顺,李新海,郝转芳,刘晓鑫,白丽,谢传晓. 2009. 利用 SSR 荧光标记分析 90 个糯玉米地方品种的遗传多样性. 玉米科学, 17(1): 6-12.

张全芳,梁水美,李燕,刘艳艳,范阳阳,郭庆法,鲁守平,步迅. 2017. 基于荧光 SSR 标记的玉米自交系遗传结构解析. 植物遗传资源学报, 18(1): 19-31.

郑卓杰. 1997. 中国食用豆类学. 北京: 中国农业出版社: 93-140.

周梦妍,吴金锋,许鲲,李锋,陈碧云,伍晓明. 2015. 甘蓝型油菜核心种质和新品系(系)的 SSR 等位变异分析. 分子植物育种, (6): 1248-1258.

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

FAO. 2017. FAO Statistical Database. <http://www.fao.org>.

Fernandez M, Figueiras A, Benito C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics, 104(5): 845-851.

Gentile F, Arcaro A, Pizzimenti S, Daga M, Cetrangolo G P, Dianzani C, Lepore A, Graf M, Ames P, Barrera G. 2017. DNA damage by lipid peroxidation productions: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. AIMS Genetics, 4(2): 103-137.

Gong Y M, Xu S C, Mao W H, Li Z Y, Hu Q Z, Zhang G W, Ding J. 2011. Genetic diversity analysis of faba bean (*Vicia faba* L.) based on EST-SSR markers. Agricultural Sciences in China, 10(6): 838-844.

Link W, Dixkens C, Singh M, Schwall M, Melchinger A E. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, 90(1): 27-32.

Peakall R, Smouse P E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.



- Molecular Ecology Notes, 6 (1): 288–295.
- Polignano G B, Alba E, Ugenti P, Scippa G. 1999. Geographical patterns of variation in Bari faba bean germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46 (2): 183–192.
- Rambaut A. 2009. FigTree. v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>.
- Robertson L D, El-Sherbeeny M. 1991. Distribution of discretely scored descriptors in a pure line faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm collection. *Euphytica*, 57 (1): 83–92.
- Senior M L, Murphy J P, Goodman M M, Stuber C W. 1998. Utility of SSR for de-termining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Science*, (38): 1088–1098.
- Sokol E, Nijenhuis M, Sjollem A, Jonkman M F, Pas H H, Giepmans B N G. 2017. Particle bombardment of ex vivo skin to deliver DNA and express proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1559: 107–118.
- Terzopoulos P J, Bebeli P J. 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, 108 (1): 39–44.
- Wang F, Yang T, Burlyaeva M, Li L, Jiang J, Fang L, Redden R, Zong X. 2015. Genetic diversity of grasspea and its relative species revealed by SSR markers. *PLoS One*, 10 (3): 34–38.
- Yang T, Fang L, Zhang X Y, Hu J G, Bao S Y, Hao J J, Li L, He Y H, Jiang J Y, Wang F, Tian S F, Zong X X. 2015. High-throughput development of SSR markers from pea (*Pisum sativum* L.) based on next generation sequencing of a purified Chinese commercial variety. *PLoS One*, 10: 103–107.
- Zeid M, Schön C C, Link W. 2004. Hybrid performance and AFLP-based genetic similarity in faba bean. *Euphytica*, 139 (3): 207–216.
- Zong X, Liu X, Guan J, Wang S, Liu Q, Paull J G, Redden R. 2009. Molecular variation among Chinese and global winter faba bean germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 118 (5): 971–978.

## Genetic Diversity of Faba Bean Varieties ( Lines ) and Elite Collections by SSR Markers

ZHANG Hong-yan<sup>1</sup>\*, GUO Xing-lian<sup>2, 3\*</sup>, YANG Tao<sup>1</sup>, LIU Rong<sup>1</sup>, HUANG Yu-ning<sup>1</sup>, JI Yi-shan<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>1</sup>, ZONG Xu-xiao<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China; <sup>3</sup>Agro-Tech Extension and Service Center of Huzhu County, Haidong City of Qinghai Province, Haidong 810500, Qinghai, China)

**Abstract:** In order to effectively excavate and utilize faba bean resources, the genetic diversity of 102 varieties ( lines ) and elite collections of faba bean in China were analyzed by SSR markers. The results indicated that 937 alleles were detected with 9.46 alleles per locus ranging from 4 to 19. The polymorphism information content ( PIC ) ranged from 0.38 to 0.88 with the mean value of 0.63. The effective number of alleles ranged from 1.79 to 9.22 with the mean value of 3.41. The Shannon index ranged from 0.79 to 2.44 with the mean value of 1.45. The 102 accessions were clustered into spring sowing ecological type and autumn sowing ecological type according to the genetic distances based on neighbor-joining method. The genetic diversity of faba bean varieties ( lines ) from different origins and elite collections showed that elite collections > Qinghai varieties ( lines ) > Yunnan varieties > Jiangsu varieties. The population genetic structure and principal component analysis showed that all the accessions were divided into 3 subgroups associated with characteristics of the narrow ecological adaptability and the strong regional ecology. Three subgroups were subgroup 1 including varieties from Yunnan and a small number of elite collections; subgroup 2 including all varieties ( lines ) from Qinghai; subgroup 3 including major elite collections and all bred varieties from Jiangsu. These results have provided important references for breeding new varieties and germplasm innovation of faba bean.

**Key words:** SSR marker; Faba bean (*Vicia faba* L.); Variety; Elite collections; Genetic diversity