

利用 ISSR 分子标记进行不同来源大豆品种的分类^{*}

谢甫绀¹ Yoshihito Takahata²

(1. 沈阳农业大学农学院, 沈阳 110161; 2. 日本岩手大学农学部)

摘要 采用 ISSR 分子标记技术对不同来源大豆品种(系)进行了分类研究, 对 UBC ISSR801—850 引物进行筛选, 发现有 11 个引物没有产物, 选出 39 个引物具有扩增产物, 一般每个引物可以扩增出 1—6 条带, 产物片段大小多在 831—3530b 之间。39 个引物共扩增出 121 条带, 其中多肽性带 47 条, 占 38.84%。每个引物平均可扩增出带数为 3.1 条; 其中多肽性带数为 1.21 条。ISSR 引物扩增的结果表明, ISSR 分子标记技术能很好地用来区分不同来源的大豆品种(系)。不同大豆品种(系)因其遗传背景不同, 经 ISSR 引物扩增出来的谱带数也不一样, 而且不同品种(系)还具有特异性的标记谱带。另外, 对沈农系列大豆品种(系)的生产力与本试验采用的日本大豆品种的比较分析可以看出, 沈农系列大豆品种(系)的生产力要高于日本大豆品种的生产力。

关键词 大豆; ISSR; 分子标记

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2005)03—0161—05

DNA 指纹图谱分析技术已广泛应用于各种生物的遗传研究等领域。DNA 指纹图谱分析的方法很多, 如 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等。近年来又发展出 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 标记技术, 该技术的特点是以 16—18 核苷酸的重复序列为引物, 直接在基因组 DNA 中进行 PCR 扩增, 用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 不需要预先知道基因组 DNA 的任何序列信息即可检测, 扩增谱带丰富, 多肽性高。ISSR 技术较好地满足了多肽水平高、操作简便易行、成本低等生物指纹图谱分析技术的要求, 因此逐渐被研究者广泛采用。

何予卿等(2001)利用 ISSR 分子标记研究了 37 份栽培稻和野生稻的亲缘关系, 结果表明 ISSR 技术可以很好地用来对不同进化程度的稻类进行亲缘关系分析。李进波等(2002)应用 ISSR 技术对 12 个水稻光温敏核不育系进行了 DNA 指纹分析, 结果表明用 13 个多肽性丰富的引物就能正确地区分供试的 12 个水稻光温敏核不育系。钱韦等(2000)的研究结果证明, ISSR 标记可以用来对中国疣粒野生稻的遗传多样性进行分析。王心宇等(2001)的研

究也证明, 利用 ISSR 标记技术能将亲缘关系很近的小麦品种或品系区分开来。刘万勃等(2002)采用 21 个 ISSR 引物对 37 份甜瓜种质进行了遗传多样性研究, 结果表明, ISSR 技术可以区分出野生甜瓜和栽培甜瓜, 是甜瓜种质多样性研究的一种很好方法。方宜钧等(2002)通过我国“应县小黑豆”对 SCN4 号生理小种抗性的 ISSR 分子标记研究, 证明 ISSR811 与抗 SCN 基因座位的遗传距离为 10.2cM, 并探讨了 ISSR811 用于大豆抗 SCN 育种进行分子辅助选择的可能性。

在国外, ISSR 技术也广泛应用于作物的遗传关系等分析, 如 Joshi 等(2000)用 ISSR 对水稻进行了遗传多样性和进化关系分析。Kantety 等(1995)采用 ISSR 技术探讨了马齿型和爆裂型玉米自交系的遗传多样性。Fang 等(1997)认为可以用 ISSR 标记区分亲缘关系很近的柑橘品种, Prevost 等(1999)仅用了 4 个 ISSR 引物就将 30 多个马铃薯品种区分开来了。总之, ISSR 分子标记技术可以广泛生物的遗传多样性、系统发育、基因标记、遗传图谱分析和生物进化等领域 (Pradeep Reddy 等, 2002)。

• 收稿日期: 2005—01—19

基金项目: 本研究得到国家留学基金委和日本文部省的支持。

作者简介: 谢甫绀(1966—), 男, 教授, 博士生导师, 博士, 主要从事大豆株型育种与产量生理研究。

本研究拟采用 ISSR 技术探讨不同来源大豆的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的材料共计 11 份,其中包括 7 份来自沈阳农业大学,品种为沈农 6 号,沈农 7 号、沈农 8 号,沈农 A31(圆叶),沈农 A31(尖叶),沈农 6059(圆叶),沈农 6059(尖叶);4 份来自日本秋田东北农试场,品种为农林 78 号(东北 70 号),农林 82 号(东北 4 号),农林 83 号(东北 69 号),农林 109 号(东北 112 号)。所有试材在 5 月 21 日播种于纸质钵中,每个品种播种 6 钵,6 月 14 日带土移栽到大田。栽种的行距为 1.0m,株距 0.3m。田间试验于 2004 年在岩手大学围场进行。

1.2 DNA 操作

当大豆生长到 6 片复叶前后(7 月 6 日),取成熟大豆叶片组织,用量为 100mg 左右,采用 QIA-GEN Dneasy Plant Mini Kit 法提取 DNA。

ISSR 引物来源于加拿大 British Columbia 大学,编号为 UBC ISSR801—900。本试验采用 UBC ISSR801—850 共计 50 个。PCR 反应体系为:20ng/ μ l 模板 DNA 7.5 μ l,15 μ M ISSR 引物 0.26 μ l,10 \times PCR Buffer 2.0 μ l,2.5mM dNTPmix 1.6 μ l,Taq DNA polymerase 0.1 μ l,加灭菌双蒸馏水

8.54 μ l,总反应体积为 20 μ l。整个 PCR 反应在 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP TP3000 扩增仪上完成。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 变性 3min;然后 45 次循环为 94 $^{\circ}$ C 1min,48 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min 后;72 $^{\circ}$ C 延伸 5min,之后于 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物在 1 \times TAE Buffer 中用 1% 琼脂凝胶电泳(Crosspower3500 电泳仪,200V,300mA,45min),EB 染色后于紫外灯下检测并记录照相。

1.3 数据处理与分析

扩增产物经电泳分离后,对每个样品的某个条带出现与否分别记录成“1”、“0”然后,利用 Infor-BIO 统计分析软件,计算出样品间的遗传系数,并画出聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 ISSR 引物扩增产物的表现

对 UBC ISSR801—850 引物进行筛选,发现 802,803,804,805,806,831,832,833,837,838,839 等 11 个引物没有产物,选出 39 个引物具有扩增产物,一般每个引物可以扩增出 1—6 条带,产物片段大小多在 831—3530b 之间(如图 1)。39 个引物共扩增出 121 条带,其中多肽性带 47 条,占 38.84%,每个引物平均可扩增出带数为 3.1 条,其中多肽性带数为 1.21 条(表 1)。

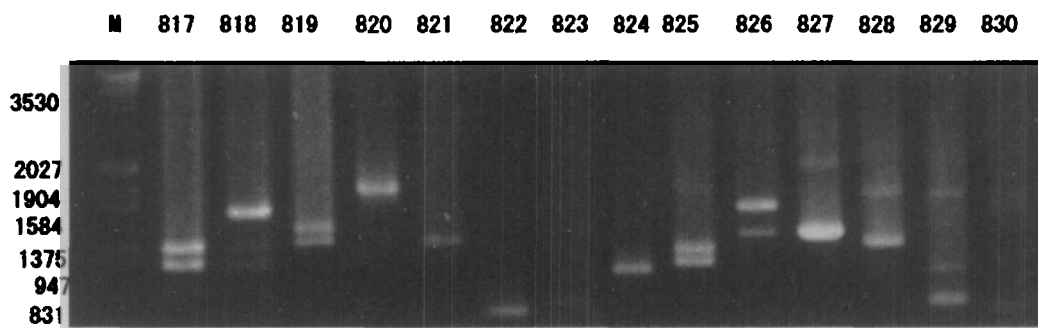


图 1 沈农 6 号大豆品种在不同 ISSR 引物下的扩增结果

Fig. 1 Amplification bands of different ISSR primers for soybean cultivar Shennong 6

2.2 不同品种之间的聚类分析

根据 ISSR 引物扩增的结果,利用 InforBIO 统计分析软件,计算出样品间的遗传系数,并画出聚类分析树状图(图 2)。

根据聚类分析图,若以遗传距离 0.075 为分界线,可以将所有参试品种归为 A、B、C、D 4 组,即:A

组为沈农 6059 的近等位基因系;B 组包括沈农 A31 的近等位基因系、沈农 7 号和沈农 8 号;C 组为沈农 6 号;D 组全是日本大豆品种。说明 ISSR 分子标记技术,可以用来区分不同来源地的大豆品种。沈农 6 号单属于一组,说明该品种具有一定的特异性。沈农 6 号是长花序短果枝特异株型品种,本研究从

分子水平上印证了该品种具有独特性。

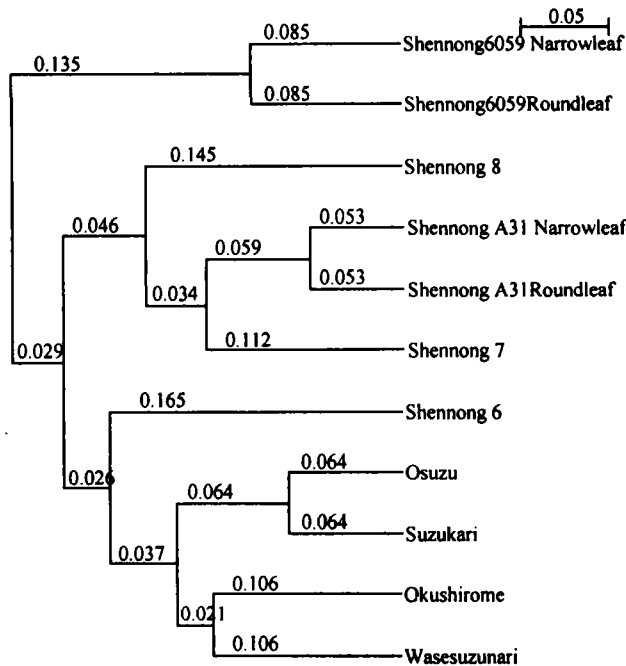


图 2 不同来源大豆品种聚类分析图

Fig. 2 The cluster tree for the soybean cultivars (UPGMA—simple matching)

表 1 50 个 ISSR 引物的序列及其扩增结果

Table 1 Sequences of 50 ISSR primers and their PCR amplified bands

引物编号 Primer	引物序列 Primer sequence	扩增总片 段数 Total bands	多肽性片 段数 Polymorphic bands	引物编号 Primer	引物序列 Primer sequence	扩增总片 段数 Total bands	多肽性片 段数 Polymorphic bands	引物编号 Primer	引物序列 Primer sequence	扩增总片 段数 Total bands	多肽性片 段数 Polymorphic bands
UBC801	(AT) ₈ T	2	1	UBC818	(CA) ₈ G	3	2	UBC835	(AG) ₈ YC	2	1
UBC802	(AT) ₈ G	0	0	UBC819	(GT) ₈ A	2	0	UBC836	(AG) ₈ YA	5	3
UBC803	(AT) ₈ C	0	0	UBC820	(GT) ₈ C	1	0	UBC837	(TA) ₈ RT	0	0
UBC804	(TA) ₈ A	0	0	UBC821	(GT) ₈ T	3	2	UBC838	(TA) ₈ RC	0	0
UBC805	(TA) ₈ C	0	0	UBC822	(TC) ₈ A	2	1	UBC839	(TA) ₈ RG	0	0
UBC806	(TA) ₈ G	0	0	UBC823	(TC) ₈ C	6	3	UBC840	(GA) ₈ YT	2	0
UBC807	(AG) ₈ T	3	1	UBC824	(TC) ₈ G	4	3	UBC841	(GA) ₈ YC	3	0
UBC808	(AG) ₈ C	4	1	UBC825	(AC) ₈ T	3	0	UBC842	(GA) ₈ YG	5	1
UBC809	(AG) ₈ G	2	0	UBC826	(AC) ₈ C	3	0	UBC843	(CT) ₈ RA	1	0
UBC810	(GA) ₈ T	4	1	UBC827	(AC) ₈ G	2	0	UBC844	(CT) ₈ RC	3	2
UBC811	(GA) ₈ C	4	1	UBC828	(TG) ₈ A	4	2	UBC845	(CT) ₈ RG	2	0
UBC812	(GA) ₈ A	6	2	UBC829	(TG) ₈ C	3	2	UBC846	(CA) ₈ RT	3	1
UBC813	(CT) ₈ T	4	1	UBC830	(TG) ₈ G	3	2	UBC847	(CA) ₈ RC	1	0
UBC814	(CT) ₈ A	3	2	UBC831	(AT) ₈ YA	0	0	UBC848	(CA) ₈ RG	4	1
UBC815	(CT) ₈ G	1	1	UBC832	(AT) ₈ YC	0	0	UBC849	(GT) ₈ YA	6	4
UBC816	(CA) ₈ T	3	3	UBC833	(AT) ₈ YG	0	0	UBC850	(GT) ₈ YC	3	0
UBC817	(CA) ₈ A	3	0	UBC834	(AG) ₈ YT	3	3	Total		121	47

注: * Y=(C,T) R=(A,G)

在大豆生长期间,对各品种的性状进行了调查, 结果如表 2 所示。从表 2 可以看出,沈农 6059 和沈

农 A31 两对近等位基因系,除了叶型指数不同外,一对近等位基因系之间其他生育性状几乎一致。根据 ISSR 引物进行的分子标记结果证实,同一对近等位基因系间如果使用适当的引物可以找到其差异性,比如,用 834、835、836 和 840 引物可以区分沈农 6059 近等位基因系(图 3)。另外,从表 2 还可以看出,沈农系列大豆的单株平均生产力为 $53.86 \pm 5.18\text{g}$,而生育日数相近(135 天左右)的日本大豆品种的单株平均生产力为 $45.19 \pm 4.48\text{g}$,沈农系列大豆品种的生产力要高于日本大豆品种的生产力,这可能与日本品种过多强调籽粒大小、蛋白质含量等品质性状有关,而沈农系列大豆多注重产量潜力的选择。

2.3 不同来源品种的特异性谱带

不同大豆品种(系)因其遗传背景不同,经 39 个 ISSR 引物扩增出来的谱带数也不一样,沈农 6059 (圆叶)最少,只有 85 条,平均每个引物扩增出 2.18

条,而农林 78 号最多,达 110 条,平均每个引物扩增出 2.82 条。另外,不同品种(系)还具有特异性的标记谱带。比如:沈农 6 号在 ISSR829 引物的 831b 处有特异带;沈农 7 号在 ISSR818 引物的 3530—2027b 和 1375b、ISSR 引物 835 的 947b 处有特异带;沈农 8 号在 811 引物的 947—831b、814 引物的 947b 有特异带。

对于同一对叶型不同的近等位基因系沈农 A31 来说,在 ISSR801 引物的 2027—1907b、813 引物的 947b、816 引物的 1375b、836 引物的 947b 和 849 引物的 947—831b 处有差异性谱带。

农林 82 号经辐射育成的农林 78 号在 801 引物的 2027—1904b、816 引物的 1584b、818 引物的 3530—2027b 和 1375b、821 引物的 1904b 和 1584—1375b、834 引物的 947b、846 引物的 1904b 中有多肽性谱带。

表 2 根据聚类分析图进行的品种分组情况及对应品种的性状

Table 2 The soybean cultivar groups and their agronomic characteristics

分组 Groups	品种 Cultivars	叶型指数 Leaf shape index	出苗—始花 Emergence— blooming (day)	始花—终花 Blooming duration (day)	始花—成熟 Blooming —maturity (day)	生育期 Maturity (day)	种皮颜色 Colour of seed coat	种脐颜色 Hilum colour	花色 Flower colour	单株产量 Grain weight/ plant(g)
A	沈农 6059 尖叶	3.41	56.3	18.7	80.7	137	黄	褐	白	46.04
	沈农 6059 圆叶	1.72	56.4	18.6	80.6	137	黄	褐	白	58.39
B	沈农 A31 尖叶	2.66	52.0	19.0	85.0	137	黄	白	白	55.95
	沈农 A31 圆叶	1.54	52.8	18.2	84.2	137	黄	白	白	49.82
	沈农 7 号	1.72	43.0	37.0	94.0	137	黄	褐	紫	60.14
C	沈农 8 号	1.34	50.2	20.6	86.8	137	黄	褐	紫	50.27
	沈农 6 号	1.47	52.2	16.8	82.8	135	黄	白	白	56.39
D	农林 109 号	1.55	50.0	19.0	85.0	135	黄	白	紫	50.36
	农林 83 号	1.86	50.0	18.5	85.0	135	黄	白	紫	42.47
	农林 82 号	2.02	50.0	19.0	85.0	135	黄	白	紫	42.73
	农林 78 号	1.98	37.3	21.8	66.8	104	黄	白	紫	19.48

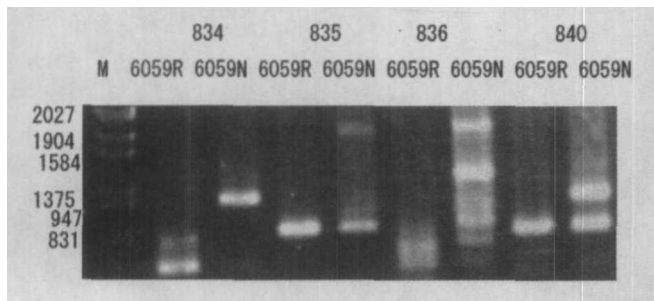


图 3 不同 ISSR 引物对沈农 6059 近等位基因系的区分

Fig. 3 The amplified bands of different ISSR primers for the pair of isogenic lines Shennong 6059

3 讨论与结论

对 UBC ISSR801—850 引物进行筛选,发现 11 个引物没有产物,选出 39 个引物具有扩增产物,一般每个引物可以扩增出 1—6 条带,产物片段大小多在 831—3530b 之间。39 个引物共扩增出 121 条带,其中多肽性带 47 条,占 38.84%。每个引物平均可扩增出带数为 3.1 条;其中多肽性带数为 1.21 条。

根据 ISSR 引物扩增的结果,利用 InforBIO 统

计分析软件进行聚类分析,若以遗传距离 0.075 为分界线,可以将所有参试品种归为 A、B、C、D 4 组,即:A、B、C 3 组均为沈农农业大学选育的大豆品种(系);D 组全是日本大豆品种。说明尽管多肽性带数的比例不是特别高,只占总扩增带数的 38.84%,但 ISSR 分子标记技术仍然能很好地区分出不同来源的大豆品种。另外,C 组只有沈农 6 号一个品种,说明该品种具有一定的特异性。沈农 6 号是长花序短果枝特异株型品种,本研究从分子水平上印证了该品种具有独特性。

对沈农系列大豆品种(系)的生产力与本试验采用的日本大豆品种的比较分析可以看出,沈农系列大豆品种(系)的生产力要高于日本大豆品种的生产力,这可能与日本品种过多强调品质性状有关,而沈农系列大豆多注重产量潜力的选择。

不同大豆品种(系)因其遗传背景不同,经 ISSR 引物扩增出来的谱带数也不一样。另外,不同品种(系)还具有特异性的标记谱带。比如:沈农 6 号在 ISSR829 引物的 831b 处有特异带。对于同一对叶型不同的近等位基因系沈农 A31 来说,在 ISSR801 引物的 2027—1907b、813 引物的 947b、816 引物的 1375b、836 引物的 947b 和 849 引物的 947—831b 处有差异性谱带。

参 考 文 献

- 1 钱韦,葛颂,洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报,2000,42(7):741—750.
- 2 王心宇,陈佩度,开增军,等. ISSR 标记在小麦指纹图谱分析中的应用研究初报[J]. 农业生物技术学报,2001,9(3):261—263.
- 3 何予卿,张宇,孙梅,等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系[J]. 农业生物技术学报,2001,9(2):123—127.
- 4 方宜钧,王敬强,寇煜嵩,等. 我国“应县小黑豆”对 SCN4 号生理小种抗性的 SSR 及 ISSR 分子标记研究[J]. 农业生物技术学报,2002,10(1):81—85.
- 5 刘万勃,宋明,刘富中,等. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质遗传多样性的研究[J]. 农业生物技术学报,2002,10(3):231—236.
- 6 李进波,牟同敏,方宜钧. 12 个水稻光温敏核不育系的 ISSR 标记鉴定及遗传分析[J]. 中国农学通报,2002,18(1):6—9.
- 7 Pradeep Reddy, M., N. Sarla, E. A. Siddiq. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. Euphytica, 2002, 128, 9—17.
- 8 Joshi, S. P., V. S. Gupta, R. K. Aggarwal, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter—simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100, 1311—1320.
- 9 Kantety, R. V., X. P. Zeng, J. L. Bennetzen et al. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter—simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. Molecular Breeding, 1995, (1), 365—373.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] CULTIVARS FROM DIFFERENT REGIONS THROUGH ISSR MARKERS

Xie Futi¹ Yoshihito Takahata²

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020—8550, Japan)

Abstract The phylogenetic analysis of soybean cultivars from different places were studied through ISSR Markers, the results showed that 39 primers of UBC ISSR 801—850 primers had amplified bands, every primer had 1 to 6 bands most of the bands were from 3530 to 831 b. The 39 primers produced 121 bands, among them 47 were polymorphic bands, the percentage of polymorphic bands (PPB) was 38.84%. Each primer could produce 3.1 bands among them 1.21 was polymorphic bands. According to the data of amplification, ISSR makers could efficiently classify the soybean cultivars from different places. Different cultivars had different numbers of amplified bands, and cultivar had specific bands. The cultivars from Shenyang China had a higher grain productivity than those from Akita, Japan.

Key words Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] ISSR; Molecular marker