

黑龙江省大豆种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

何海燕,沙伟,张艳馥

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:采用 ISSR 分子标记技术对黑龙江省 25 个大豆品种进行遗传多样性分析。结果表明:从 28 对随机引物中筛选出 9 对多态性明显、条带清晰、反应稳定的引物;9 对引物共扩增出 65 条带,其中 58 条为多态性条带,多态性比率为 89.23%;Shannon 多样性指数平均为 0.4604,每个位点的有效等位基因数为 1.5139;25 个品种间的遗传相似性系数变幅范围为 0.4462~0.8923,平均为 0.6692;UPGMA 聚类分析在 $GS = 0.698$ 处,将 25 份大豆材料分成 5 大类。

关键词:大豆;ISSR;遗传多样性

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)01-0037-04

Genetic Diversity Analysis of Soybean Germplasm in Heilongjiang Province by ISSR Markers

HE Hai-yan, SHA Wei, ZHANG Yan-fu

(College of Life Science and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: The genetic diversities of 25 soybean varieties were studied by ISSR markers, 9 polymorphic primers were selected from 28 ISSR primers, 65 bands were amplified with 9 primers, they contained 58 polymorphic bands and their polymorphism percentage was 89.23%; Shannon's index evaluation indicted that average Shannon's index was 0.4604 and the numbers of effective alleles were 1.5139; the genetic similarity coefficient among the 25 varieties ranged from 0.4462 to 0.8923, and the average GS was 0.6692; cluster analysis with UPGMA method showed that the cultivars tested in this study could be divided into five groups at the level GS 0.698.

Key words: Soybean; ISSR; Genetic diversity

大豆是重要的油料和粮食作物,是世界上食用油和植物蛋白的主要来源。中国是大豆的起源中心,品种资源丰富。目前中国国家作物种质资源库已经保存大豆种质资源 2 万余份,居世界各国大豆品种资源之首^[1]。黑龙江省是我国大豆生产的第一大省,大豆种植面积和产量均占全国的 1/3 左右。该省大豆栽培历史悠久,在不同的生态条件影响下,大豆种质资源经历了长期的自然演化和人工选择,形成了多种多样的种质资源,为省内外育种家和遗传研究者们所关注^[2-4]。分析该省大豆的遗传结构和遗传多样性,不仅有利于大豆种质资源的合理保存、优异大豆种质资源的挖掘与创新,而且对于东北地区大豆的生产和育种也具有重要的指导意义。

ISSR(Inter simple sequence repeat)分子标记是一种以微卫星序列为引物进行多位点 PCR 扩增的技术,该技术克服了 RFLP、SSR、RAPD、AFLP 等标

记技术的一些局限性,具有无需预知基因组背景信息、DNA 样品用量少、操作简单、重复性好、信息量大等优点^[5],被广泛应用于植物的遗传多样性分析^[6]、品种鉴定^[7]、遗传作图^[8]等研究。ISSR 分子标记在大豆中的应用也较多,周延清等^[9]利用 ISSR 分析河南大豆的遗传多样性;谢甫绶等^[10]利用 ISSR 分子标记进行不同来源大豆品种的分类。

研究采用正交试验法优化 ISSR-PCR 反应体系,对黑龙江省 25 份不同大豆品种进行遗传关系分析,旨在为该省大豆遗传多样性和亲缘关系研究提供分子水平的依据,为合理有效地利用种质资源、加快新品种选育提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选取来自黑龙江省不同生态区的 25 份大豆品种为材料(表 1)。种子经萌发长成幼苗,取其真叶,

收稿日期:2010-11-05

基金项目:黑龙江省教育厅科研资助项目(10551331)。

第一作者简介:何海燕(1985-),女,在读硕士,现从事植物遗传学方面研究。E-mail:hehaiyan122@163.com。

通讯作者:沙伟(1963-),女,教授,博士生导师,主要从事植物学和植物遗传学方面的研究。E-mail:Shw1129@263.net。

用清水冲洗干净,置于 -80°C 冰箱中保存备用。

表 1 供试样品材料

Table 1 Experimental plant materials

序号 No.	品种名称 Variety	序号 No.	品种名称 Variety
01	北疆 296 Beijiang296	14	绥农 28 Suinong28
02	北疆 641 Beijiang641	15	华疆 3 号 Huajiang 3 hao
03	黑农 44 Heinong44	16	垦丰 16 Kenfeng16
04	黑农 48Heinong48	17	富兴九号 Fuxingjiuhao
05	合丰 50Hefeng50	18	富兴四号 Fuxingsihao
06	合丰 55Hefeng55	19	抗线 8 号 Kangxian 8 hao
07	垦鉴豆 4 号 Kenjiandou 4 hao	20	抗线铁杆 I Kangxiantiegan I
08	垦农 18 Kennong18	21	丰收 26Fengshou 26
09	垦农 22 Kennong22	22	丰豆 3 Fengdou 3
10	北豆 14 Beidou14	23	甘优 120 Ganyou 120
11	嫩丰 16 Nenfeng16	24	黑河 38 Heihe 38
12	绥农 14 Suinong14	25	东农 51 Dongnong 51
13	绥农 27 Suinong27		

1.2 试验方法

1.2.1 大豆总 DNA 的提取和检测 用改进的 CTAB 法^[11]提取基因组总 DNA,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性,采用 Gene Spec I (日本产)核酸测定仪测定其浓度和纯度,并将其稀释为 $20\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的工作液,于 -80°C 冰箱中保存备用。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增反应 利用优化的 PCR 反应体系从 28 对随机引物中筛选出 9 对多态性明显、条带清晰、反应稳定的引物,对 25 个大豆品种的基因组总 DNA 进行扩增。反应总体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$, $1 \times \text{Buffer}$ (不含 Mg^{2+}) $2.5\text{ }\mu\text{L}$, Mg^{2+} 浓度为 $1.85\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度为 $1.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物浓度为 $1.2\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、

模板 DNA 量为 60 ng 、Taq 酶量为 0.7 U 。其它成分为无菌双蒸水。反应程序为: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 30 s , 52°C 退火 1 min , 72°C 延伸 2 min , 40 个循环; 72°C 延伸 10 min ; 4°C 保存。扩增产物在 2% (W/V) 的琼脂糖凝胶 (含 $\text{EB } 0.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、 $0.5 \times \text{TBE}$ 缓冲液中电泳分离 ($5\text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$), 用 2 000 bp DNA Ladder 作分子量标准,在紫外凝胶成像系统下拍照记录。

1.2.3 数据分析 ISSR 扩增产物以 0,1 统计建立数据库。在相同迁移位置,无带记为 0,有带记为 1。计算其扩增带总数和特异带总数,并将 0,1 矩阵图输入计算机,把图形数据转换成数值数据。利用 POPGENE32 软件计算 ISSR 扩增产物的 Shannon 多样性指数,多态位点数,多态位点比率和有效等位基因数。对各品种间的聚类分析则是利用 NTSYS-PC 软件按基于 Nei-Li 遗传相似系数的不加权成对群算术平均法 (UPGMA) 进行,构建出聚类图。

2 结果与分析

2.1 大豆 ISSR-PCR 扩增产物的多态性

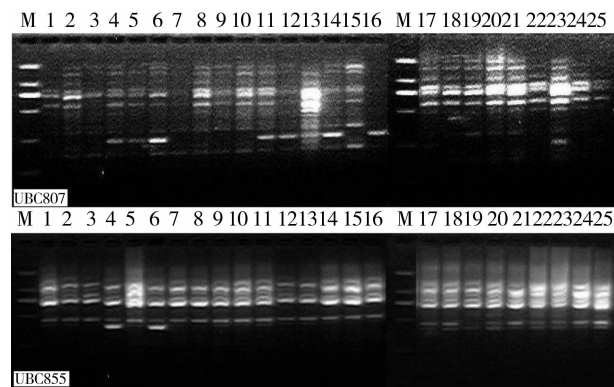
9 对引物对 25 个大豆品种共扩增出 65 条带,大小从 100 bp 到 2 000 bp (图 1),其中有 58 条为多态性条带,多态性比率为 89.23%。每个引物可扩增出 2~12 条多态性条带,平均产生多态性谱带 6.4 条。其中引物 UBC807、810、811、812、834 和 836 的多态性信息含量为 100%。Shannon 多样性指数评价样品遗传多样性结果表明:平均多样性指数 (I) 为 0.4604,每个位点的有效等位基因数 (Ne) 为 1.5139 (表 2)。以上结果表明大豆品种之间具有较高的多态性,遗传多样性较丰富,扩增结果见图 1。

表 2 ISSR 引物及其碱基序列和多态性分析

Table 2 ISSR primers and their sequences and polymorphism analysis

引物 Primer	碱基序列 Sequence	扩增条带 Band number	多态性条带 Polymorphic band number	条带大小 Band size /bp	多态性比率 Percentage of polymorphic band/%	shannon 多样性指数 I	有效等位 基因数 Ne
UBC807	(AG)8T	12	12	150-2000	100		
UBC808	(AG)8C	12	9	100-2000	75		
UBC810	(GA)8T	9	9	200-1500	100		
UBC811	(GA)8C	6	6	250-2000	100		
UBC812	(GA)8A	2	2	300-700	100		
UBC834	(AG)8YT	7	7	250-1000	100		
UBC835	(AG)8YC	5	4	250-1000	80		
UBC836	(AG)8YA	5	5	250-1000	100		
UBC855	(AC)8YT	7	4	300-1500	57.14		
总数 Total		65	58	100-2000	89.23	0.4604	1.5139

$$Y = (C, T).$$



M: DL2000 marker; 材料编号同表 1。

M: DL2000 marker; The code is the same as Table 1.

图 1 引物 UBC807 和 UBC855 对 25 个大豆品种基因组 DNA 的扩增结果

Fig. 1 ISSR fingerprinting of the 25 soybean cultivars with primers UBC807 and UBC855

2.2 大豆品种之间的遗传相似性与遗传差异性

根据 ISSR 扩增产物的电泳结果,利用 Nei's 的方法计算出 25 个大豆品种间的遗传相似性系数及遗传距离。结果表明,品种间的遗传相似性系数变幅范围为 0.4462 ~ 0.8923,遗传距离变幅范围为

0.1139 ~ 0.8071 cM,其中材料抗线 8 号和垦丰 16 之间的遗传相似性系数最小(0.4462),遗传距离最大(0.8071 cM);富兴四号和抗线铁杆 I、抗线 8 号之间的遗传相似性系数最大(0.8923),遗传距离最小(0.1139 cM)。由此说明黑龙江省大豆种质资源间的遗传基础相对较宽,存在较大的遗传变异性。

2.3 大豆品种间的 ISSR 聚类分析

利用 ISSR 数据对 25 个大豆品种进行聚类,结果如图 2 所示:在 $GS = 0.698$ 处可以将 25 份品种分成 5 大类。第 1 类有 4 个品种,为北疆 296、北疆 641、合丰 50 和绥农 28;第 2 类有 8 个品种,分别为黑农 44、垦鉴豆 4 号、垦农 18、垦农 22、北豆 14、丰豆 3、华疆 3 号和绥农 14;第 3 类有 11 个品种,分别为黑农 48、合丰 55、嫩丰 16、富兴九号、富兴四号、抗线 8 号、抗线铁杆 I、丰收 26、甘优 120、东农 51 和黑河 38;第 4 类仅有垦丰 16;第 5 类仅有绥农 27。从 ISSR 数据分析、聚类结果来看,选用的 9 对 ISSR 引物能很好地区分出黑龙江省 25 份大豆品种,为大豆品种鉴定和种质资源利用提供了物质基础和理论依据。

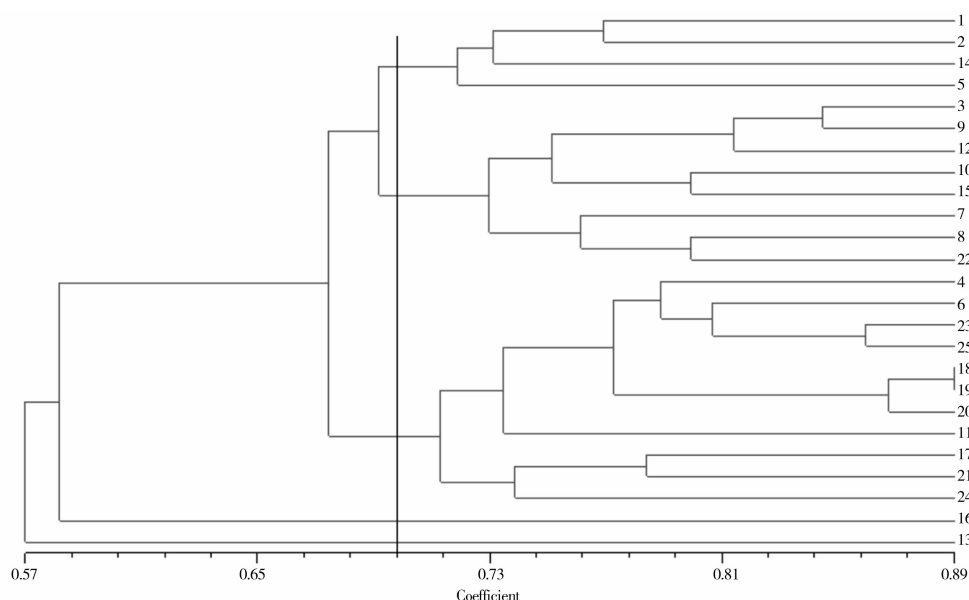


图 2 25 个大豆品种间的 ISSR 聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram for 25 soybean cultivars by ISSR markers

3 讨论

黑龙江省大豆栽培历史悠久,种质资源丰富。但为了防止大豆品种品质的退化,提高大豆抗性,在新近育成品种时应拓宽其遗传基础。因此,将农艺性状优良的品种进行杂交选育,有利于改良该省的大豆品质。利用聚类分析结果中不同组间的遗传相似性系数较小的大豆品种作为杂交亲本,有利于在育成品种中体现其杂种优势。

ISSR 通常为显性标记式遗传,具有很好的多态性、稳定性和可重复性,不受样品形态、基因表达与否及环境因子的限制。但 ISSR 谱带对于试验条件和程序的变化比较敏感,因此,保证 ISSR 扩增的稳定性是非常关键的。该研究通过正交试验的方法对反应体系进行了优化,并在对不同品种的基因组 DNA 进行扩增时,采用统一的体系和程序,以确保 ISSR 谱带的稳定性。从 28 对随机引物中筛选出的 9 对引物共扩增出 65 条带,其中多态性条带有 58 条,多态性比率为 89.23%;平均多样性指数为

0.4604,每个位点的有效等位基因数为 1.5139;25 个品种间的遗传相似性系数变幅范围为 0.4462 ~ 0.8923,说明黑龙江省大豆种质资源间的遗传基础相对较宽,存在较大的遗传变异性。

UPGMA 聚类分析可将 25 份大豆材料分成 5 大类,从分子水平上揭示了黑龙江省大豆种质资源间的亲缘关系,为大豆育种材料的筛选和后续深入研究提供了物质基础和理论依据。

参考文献

- [1] 邱丽娟,曹永生,常汝镇,等. 中国大豆 (*Glycine max*) 核心种质构建 I. 取样方法研究[J]. 中国农业科学,2003,36(12): 1442-1449. (Qiu L J, Cao Y S, Chang R Z, et al. Establishment of Chinese soybean (*G. max*) core collection I. Sampling strategy [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(12): 1442-1449.)
- [2] 卢翠华,何志鸿,宋英淑,等. 黑龙江省主要大豆品种同工酶酶谱分析[J]. 大豆科学,1990,9(2):145-148. (Lu C H, He Z H, Song S Y, et al. Isozyme type analysis of soybean planted in Heilongjiang province [J]. Soybean Science, 1990, 9(2): 145-148.)
- [3] 马淑梅,丁俊杰,郑天琪,等. 黑龙江省大豆疫霉根腐病生理小种鉴定结果[J]. 大豆科学,2005,24(4):260-262. (Ma S M, Ding J J, Zheng T Q, et al. The identification of physiological races of *Phytophthora Megasperma* [J]. Soybean Science, 2005, 24(4): 260-262.)
- [4] 秦君,李英慧,刘章雄,等. 黑龙江省大豆种质遗传结构及遗传多样性分析[J]. 作物学报,2009,35(2):228-238. (Qin J, Li Y H, Liu Z X, et al. Genetic structure and diversity of soybean germplasm in Heilongjiang, China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(2): 228-238.)
- [5] Godwin I D, Aitken A B, Smith W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. Electrophoresis, 1997, 18: 1524-1528.
- [6] 谢启鑫,缪南生,宋小民,等. 蝴蝶兰种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2010,30(7):1331-1336. (Xie Q X, Miu N S, Song X M, et al. Genetic Diversity Analysis of *Phalaenopsis* by ISSR markers [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(7): 1331-1336.)
- [7] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 780-792.
- [8] Cekic C, Battey N H, Wilkinson M J. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 540-546.
- [9] 周延清,李敏,贾敬芬,等. 河南大豆遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2006,26(9):1883-1887. (Zhou Y Q, Li M, Jia J F, et al. ISSR analysis of genetic diversity of soybean in Henan [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(9): 1883-1887.)
- [10] 谢甫锦, Yoshihito Takahata. 利用分子标记进行不同来源大豆品种的分类[J]. 大豆科学,2005,24(3):161-165. (Xie F D, Yoshihito Takahata. Phylogenetic analysis of soybean cultivars from different regions through ISSR markers [J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 161-165.)
- [11] 王晓丹,吕慧颖,张敬,等. 以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究[J]. 分子植物育种,2004,2(6):891-894. (Wang X D, Lu H Y, Zhang J, et al. Comparative study on methods of extracting DNA from soybean leaf for PCR [J]. Molecular Plant Breeding, 2004, 2(6): 891-894.)
- [10] 郭熙志,刘耀光,罗达. 以可转化人工染色体(TAC)载体为基础的百脉根基因文库的构建及筛选[J]. 植物生理与分子生物学报,2004,30(2):234-238. (Guo X Z, Liu Y G, Luo D. Construction and screening of a genomic dna library of *Lotus corniculatus* based on transformation competent artificial chromosomes [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(2): 234-238.)
- [11] Xu Y H, Zhu Y Y, Zhou H C, et al. Identification of a 98-kb DNA segment containing the rice *Eui* gene controlling uppermost internode elongation, and construction of a TAC transgene sublibrary[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 272: 149-155.
- [12] 姜大刚,付晓,柳忠玉,等. TAC 载体介导温敏不育水稻的遗传转化[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(3):52-55. (Jiang D G, Fu X, Liu Z Y, et al. The genetic transformation of thermo-sensitive male sterile rice mediated by TAC vector [J]. Journal of South China Agricultural University, 2005, 26(3): 52-55.)
- [13] 杨光宇,纪锋. 中国野生大豆资源的研究与利用综述[J]. 吉林农业科学,1999,24(1):12-17. (Yang G Y, Ji F. Summary about study and exploitation of *Glycine soja* in China [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 1999, 24(1): 12-17.)
- [14] Liu Y G, Whittier R F. Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agarose plugs and microbeads[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(11): 2168-2169.
- [15] 曹筑荣,王正华,曹孟良. 可转化人工染色体文库研究进展[J]. 长江大学学报(自科版)农学卷, 2006, 3(4):201-203. (Cao Z R, Wang Z H, Cao M L. Research about a transformation-competent artificial chromosome (TAC) library [J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2006, 3(4): 201-203.)
- [16] Zhang H B, Choi S D, Woo S S, et al. Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population [J]. Molecular Breeding, 1996, 2: 11-24.
- [17] Liu Y G, Nagaki K, Fujita M, et al. Development of an efficient maintenance and screening system for large insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector[J]. Plant J, 2000, 23(5):687-695.
- [18] 徐粤宇,周玉雷,赵茂林,等. 多枝赖草基因组 Mb 级 DNA 制备和酶切方法的优化[J]. 华北农学报,2007,22(6):24-29. (Xu Y Y, Zhou Y L, Zhao M L, et al. Optimized method of preparing and digesting Megabase-size DNA of *Leymus multicaulis* genomes [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007, 22(6): 24-29.)
- [19] 徐粤宇,周玉雷,宋琳琳,等. 多枝赖草基因组可转化人工染色体(TAC)文库的构建和鉴定[J]. 中国科学 C 辑:生命科学, 2008, 38(4):328-336. (Xu Y Y, Zhou Y L, Song L L, et al. Construction and identification of transformation-competent artificial chromosome library of *Leymus multicaulis* genomes [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, 38(4): 328-336.)

(上接第 36 页)