

福建湄洲岛烟豆 (*G. tabacina*) 遗传多样性分析

陈丽丽¹, 刘晓冬², 赵洪钺², 袁翠平², 王英男², 许明子¹, 王玉民²

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133000; 2. 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130033)

摘要:采用 20 个 ISSR 标记对来自福建湄洲岛的 40 份烟豆 (*G. tabacina*) 材料进行了遗传多样性分析以促进烟豆资源的保护开发和利用。结果表明:20 个 ISSR 引物对 40 份烟豆基因组 DNA 均可进行有效扩增,共扩增出 240 条谱带,其中多态性谱带 229 条,多态性比率为 95.4%;20 个 ISSR 引物的多态性信息含量为 0.03~0.37,平均为 0.27;40 份烟豆材料之间的 Dice 相似系数为 0.335 6~0.863 9,平均为 0.675 3,说明湄洲岛烟豆材料遗传变异较丰富;聚类分析将 40 份烟豆材料划分为 4 个类群,每个类群都包括来源于不同采集地点的材料,说明不同采集地点之间的材料存在基因交流。

关键词:ISSR 标记;烟豆;遗传多样性

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)03-0286-05

Genetic Diversity of *G. tabacina* from Meizhou Island of Fujian Province

CHEN Li-li¹, LIU Xiao-dong², ZHAO Hong-kun², YUAN Cui-ping², WANG Ying-nan², XU Ming-zi¹, WANG Yu-min²

(1. College of Agronomy, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: In this study, the genetic diversity of 40 accessions of *G. tabacina*, collected from Meizhou Island of Fujian province were analyzed using 20 ISSR markers to promote the protection, exploration and utilization of *G. tabacina*. A total of 240 bands were amplified, of which 229 bands, accounting for 95.4%, were polymorphic. The average polymorphism information content (PIC) of 20 ISSR primers was 0.27, ranging from 0.03 to 0.37. The Dice similarity coefficient of the tested accessions ranged from 0.335 6 to 0.863 9, and averaged 0.675 3. The tested *G. tabacina* were clustered into four groups by using the unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA), and each group contained one or more accessions from different collection sites. Results suggest there is rich of genetic diversity among the accessions of *G. tabacina*, and existing gene exchange among *G. tabacina* accessions from different collection sites.

Key words: ISSR marker; *G. tabacina*; Genetic diversity

多年生野生大豆是大豆遗传改良的第三基因库^[1],目前已发现 26 个种^[2]。烟豆 (*Glycine tabacina* Benth.) 是其中之一,产于中国福建(湄洲岛、东山岛)和广东,生长在海边岛屿的山坡或荒坡草地上,在澳大利亚、琉球群岛和南太平洋群岛至斐济亦有分布^[3]。烟豆具有抗病、耐旱和耐热等优势,在拓宽栽培大豆遗传基础方面具有潜在的应用价值^[4]。关于湄洲岛烟豆种群的研究,钱吉等^[5]应用 RAPD 标记技术对湄洲岛和平潭岛上的 4 个烟豆小群体进行了生态遗传学研究,发现在种群间地理距离较大时,遗传分化与地理距离有一定的相关性,在小范围内则无明显相关性。

ISSR 标记技术是由 Zietkiewicz 等^[6]于 1994 年提出的,是在 SSR (simple sequence repeat, 简单重复序列)基础上创建、基于 PCR 扩增的一种分子标记技术。即在 SSR 序列的 3'端或 5'端加上 1~4 个随

机核苷酸,在 PCR 反应中,锚定引物可以引起特定位点退火,导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间的 DNA 片段进行 PCR 扩增,所扩增的 inter SSR 区域的多个条带通过聚丙烯酰胺凝胶电泳或琼脂糖凝胶电泳得以分辨。ISSR 分子标记技术可以广泛用于生物的遗传多样性、系统发育、基因标记、遗传图谱构建和生物进化等研究领域^[7]。在大豆上,任小俊等^[8]应用 ISSR 标记对灰布支黑豆与晋豆 23 的 F₃ 群体进行研究,表明该群体内有较丰富的遗传变异。谢甫绶等^[9]采用 ISSR 标记对不同来源大豆品种(系)进行了研究,结果表明 ISSR 标记能很好地区分不同来源的大豆品种(系)。金燕等^[10]利用 ISSR 标记研究野大豆居群内遗传变异,并明确了野生大豆居群的取样策略。

本研究利用 ISSR 标记对湄洲岛 40 份烟豆材料进行遗传多样性分析,旨在明确湄洲岛不同采集地

收稿日期:2013-03-22

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201003021);农业部野生资源保护与利用项目;吉林省现代农作物种业发展专项资金项目。

第一作者简介:陈丽丽(1988-),女,硕士,主要从事大豆分子生物学研究。

通讯作者:许明子(1957-),女,教授,主要从事植物遗传育种研究。E-mail:xumz@ybu.edu.cn。

王玉民(1968-),男,研究员,主要从事野生大豆种质资源及其利用研究。E-mail:wangym@cjaas.com。

点烟豆材料在分子水平的遗传变异,为湄洲岛烟豆资源的保护、开发和利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

共 40 份烟豆材料(表 1),由吉林省农业科学院

农业生物技术研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 试验材料于 2012 年 10 月种植于温室,待幼苗生长至 2 片三出复叶时取 1 片三出复叶用于 DNA 提取。DNA 提取采用天根生化科技(北京)有限公司提供的快捷性植物基因组 DNA 提取系统进行。

表 1 40 份烟豆材料样品编号及采集地点

Table 1 Accessions and collection sites of 40 *G. tabacina*

编号 No. of accessions	采集地点 Collection site						
MZY001	莆田码头	MZY011	黄金海滩	MZY021	黄金海滩	MZY031	鹅尾山
MZY002	湄洲码头	MZY012	黄金海滩	MZY022	黄金海滩	MZY032	鹅尾山
MZY003	湄洲码头	MZY013	黄金海滩	MZY023	黄金海滩	MZY033	鹅尾山
MZY004	湄洲码头	MZY014	黄金海滩	MZY024	黄金海滩	MZY034	鹅尾山
MZY005	湄洲码头	MZY015	黄金海滩	MZY025	黄金海滩	MZY035	鹅尾山
MZY006	湄洲码头	MZY016	黄金海滩	MZY026	黄金海滩	MZY036	鹅尾山
MZY007	金海岸	MZY017	黄金海滩	MZY027	黄金海滩	MZY037	鹅尾山
MZY008	黄金海滩	MZY018	黄金海滩	MZY028	黄金海滩	MZY038	妈祖庙
MZY009	黄金海滩	MZY019	黄金海滩	MZY029	黄金海滩	MZY039	妈祖庙
MZY010	黄金海滩	MZY020	黄金海滩	MZY030	黄金海滩	MZY040	妈祖庙

1.2.2 ISSR 扩增 ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)2006 年公布的序列,由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。ISSR 反应体系为 25 μL ,其中, Premix 溶液(编号为 D335A,由宝生物工程(大连)有限公司提供) 12.5 μL , 40 ng DNA 2 μL , 10 pmol $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 引物 2 μL , 灭菌双蒸水 9.5 μL 。ISSR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 36 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.2.3 电泳检测 用 1 \times TAE 溶液配制 2.0% 琼脂糖,待胶溶解后,稍微冷却,再往胶中加入溴化乙锭(终浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),倒入制胶板上,冷却凝固后置于装有 1 \times TAE 溶液的电泳槽中。取 ISSR 扩增产物 5 μL 与 10 \times 上样缓冲液 2 μL 混匀后上样,稳压 130 V 电泳 2.5 h,采用 Bio-Rad DOC 2000 凝胶成像系统拍照记录电泳结果。

1.3 数据分析

ISSR 扩增结果稳定,电泳图谱中一个谱带均可看作一个位点,仅记录清晰稳定重复出现的条带。根据各条带的迁移率及其有无统计得到所有位点的二元数据,有带记为“1”,无带记为“0”。多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)参照 Anderson 的方法^[11]计算。采用 FreeTree 软件^[12]计算材料的 Nei 氏遗传相似系数矩阵,按类平均法(unweighted pair group method using arithmetic averages, UPGMA)进行聚类分析,采用 1 000 次重抽样对

聚类结果进行自举检验值(bootstrap)进行分析。利用 TreeView 1.6.6^[13]绘制 40 份材料的亲缘关系树状图。

2 结果与分析

2.1 20 个 ISSR 引物扩增结果

从 100 条 UBC 引物中选取 20 条引物(表 2)对 40 份烟豆基因组 DNA 进行扩增分析,它们均可扩增出清晰、稳定且重复性好的谱带(图 1)。20 条引物对 40 份烟豆基因组 DNA 进行有效扩增,扩增谱带在 3 条(UBC815)到 18 条(UBC864)之间,平均为 12.05 条;多态性谱带为 2~18 条,平均为 11.55 条;多态性比率为 66.7%~100%,平均为 94.10%;20 个 ISSR 引物共扩增 240 条谱带,其中多态性谱带 229 条,多态性比率高达 95.42%;20 个 ISSR 引物多态性信息含量为 0.03~0.37,平均为 0.27(表 2)。

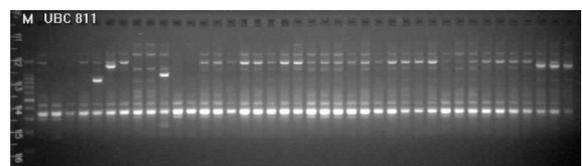


图 1 引物 UBC811 对 40 份烟豆基因组 DNA 扩增结果

Fig. 1 ISSR fingerprints of the 40 *G. tabacina* accessions generated by primer UBC811

表2 20个ISSR引物对扩增结果统计
Table 2 Summery of the amplification results of 20 ISSR primers

编号 No.	引物名称 Primer code	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增带数 No. of amplified bands	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比例 Percentage of polymorphic bands/%	多态性信息含量 PIC
1	UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	17	17	100.0	0.31
2	UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	11	10	90.9	0.26
3	UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	10	8	80.0	0.22
4	UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	11	10	90.9	0.26
5	UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	3	2	66.7	0.03
6	UBC816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	16	16	100.0	0.30
7	UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	16	15	93.8	0.29
8	UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	13	13	100.0	0.33
9	UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	6	6	100.0	0.31
10	UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	11	11	100.0	0.37
11	UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	9	7	77.8	0.22
12	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	13	13	100.0	0.19
13	UBC829	TGT GTG TGT GTG TGT GC	15	15	100.0	0.33
14	UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	14	13	92.9	0.18
15	UBC846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	9	8	88.9	0.18
16	UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	12	12	100.0	0.26
17	UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	13	13	100.0	0.33
18	UBC864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	18	18	100.0	0.37
19	UBC890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	9	9	100.0	0.31
20	UBC900	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	15	15	100.0	0.31
合计 Total			240	229	95.42	
平均 Average			12.05	11.55	94.10	0.27

R = (A, G), Y = (C, T), H = (A, C, T) (i. e. not G), V = (A, C, G) (i. e. not T)

2.2 40份烟豆材料的相似性系数

利用 FreeTree 软件计算得出的相似性系数矩阵表(略),40份烟豆材料间的相似性系数为0.335 6~0.863 9,总体平均相似性系数为0.675 3。M003与M021的相似性系数最低,为0.3356,表明这两份材

料差异最大,其中M003取自湄洲码头,M021取自黄金海滩。M034和M035相似性系数最高,数值为0.863 9,表明这两份材料差异最小,M034、M035均取自鹅尾山(表3)。

表3 不同采集地点材料之间的遗传相似系数

Table 3 Dice coefficient among *G. tabacina* accessions from different collection sites

采集地点 Collection site	平均相似性系数 Average similarity	相似性系数范围 Range of similarity	材料数 No. of accessions
莆田码头	-	-	1
湄洲码头	0.6738	0.5616 ~ 0.8505	5
金海岸	-	-	1
黄金海滩	0.7021	0.5446 ~ 0.8597	23
鹅尾山	0.7832	0.6906 ~ 0.8639	7
妈祖庙	0.7772	0.7525 ~ 0.8177	3
总计 Total	0.6753	0.3356 ~ 0.8639	40

2.3 40 份烟豆材料聚类分析

利用 FreeTree 软件计算出 40 份烟豆材料的 Dice 遗传相似系数矩阵,按类平均法进行聚类分析,并采用 1 000 次重抽样对聚类结果进行 bootstrap 分析,采用 Tree View 1.6.6 绘制 40 份材料的亲缘关系树状图(图 4)。结果表明,40 份烟豆材料可以分为 4 个类群。类群 I 包括 17 份材料,其中有 3 份材料来源于湄洲码头,1 份材料来源于金海岸,10 份材料来源于黄金海滩,3 份材料来源于妈祖庙;类群 II 包括 11 份材料,其中有 4 份材料(M027 ~ M030)来源于黄金海滩,7 份材料(M031 ~ M037)来源于鹅尾

山;类群 III 包括 9 份材料(M018 ~ M026),全部来源于黄金海滩;类群 IV 包括 3 份材料,其中 1 份材料(M001)来源于莆田码头,2 份材料(M002 和 M003)来源于湄洲码头。除类群 III 外,其他类群都包括来源于不同采集地点的材料,聚类结果与材料地理位置并不存在明显的相关关系,说明不同采集地点之间的材料存在基因交流。对聚类结果进行 bootstrap 分析表明,整个聚类结果的自举检验值为 5%~100%,其中类群 I、II、III、IV 的自举检验值分别为 5%~76%、10%~77%、25%~86% 和 98%~100%。

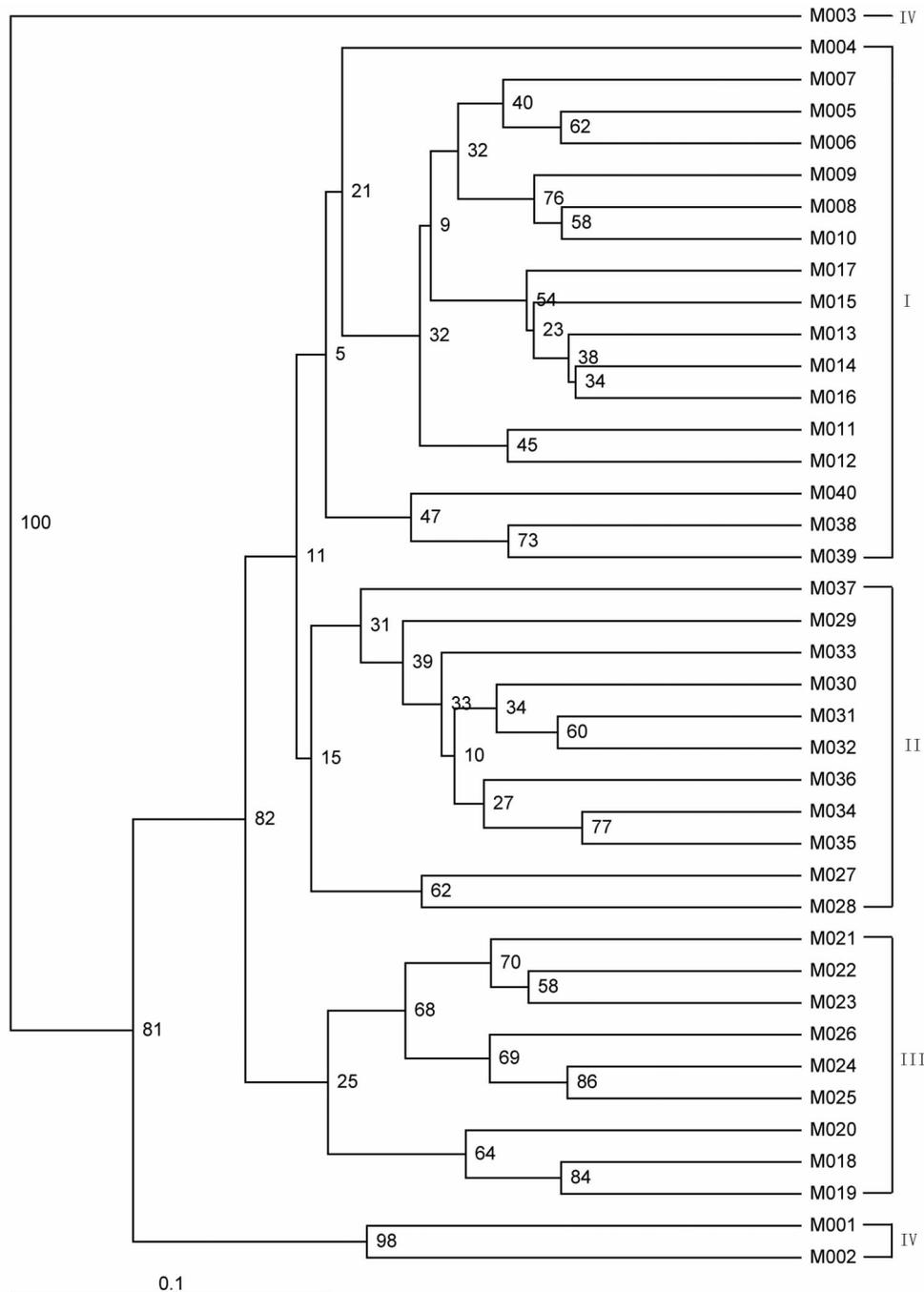


图 1 40 份烟豆材料基于 Dice 相似系数的 UPGMA 聚类图
 Fig. 1 UPGMA dendrogram of 40 *G. tabacina* accessions based on Dice coefficient

3 讨论

本研究采用 20 条 ISSR 引物对湄洲岛 40 份烟豆进行遗传多样性分析,共扩增 240 条谱带,其中多态性谱带 229 条,多态性比率高达 95.42%。说明 ISSR 标记可以有效地用于烟豆遗传多样性研究。钱吉等^[5]对湄洲岛和平潭岛上的烟豆 4 个小种群的 RAPD 研究结果多态性比例为 1.0,与本研究结果相近。40 份烟豆材料间的 Dice 相似性系数变幅为 0.335 6~0.863 9,说明湄洲岛烟豆种群具有较大的遗传变异。聚类分析结果显示并不是来自相同采集地点的材料总是聚在一起,说明不同采集地点之间的材料存在基因交流。这与王天菊等^[14]对花生进行 ISSR 分析结果显示样品聚类和地域没有明显的关系相一致;而与孙晓环等^[15]对龙井原位保护区野生大豆进行 SSR 分析结果显示原位保护区野生大豆和地理位置存在一定相关性不同。自举检验值(基于 1 000 重抽样)被用来估计聚类结果的可靠性。本研究聚类结果的自举检验值范围为 5%~100%,远低于 Chang 等^[16]的自举检验值(64%~100%),说明一些聚类节点可靠性较低。

大豆起源于中国,一年生野生大豆是栽培大豆的近缘野生种。到 2010 年底国家种质库已累计保存野生大豆资源收集品 8 518 份^[17]。近年来国家对野生大豆资源保护工作非常重视,先后在全国范围内建立了 30 多个野生大豆原位保护区。多年生野生大豆主要分布于大洋洲的澳大利亚和南太平洋的一些岛屿上,只有烟豆(*G. tabacina*)和多毛豆(*G. tomentella*)向北延伸到中国南部,分布在北纬 25°左右我国东南沿海地区及岛屿上。我国多年生野生大豆的考察搜集工作相对滞后,在国家种质资源库中只有很少几份,多年生野生大豆原位保护工作尚未开展,因此应加大多年生野生大豆资源考察和收集工作,在多年生野生大豆集中分布区域建立原位保护区;同时应加强多年生野生大豆基础研究工作,挖掘其中的优异基因,使其在大豆遗传改良中发挥作用。

参考文献

[1] Singh R J, Hymowitz T. Soybean genetic resources and crop improvement[J]. *Genome*, 1999, 42: 605-616.
 [2] Chung G H, Singh R J. Broadening the genetic base of soybean: a multidisciplinary approach[J]. *Critical Reviews in Plant Science*, 2008, 27: 295-341.
 [3] 侯宽昭. 广州植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1956. (Hou K Z. *Flora of Guangzhou*[M]. Beijing: Science Press, 1956.)
 [4] 韩峰, 凌以禄. 大豆多年生野生种收集、评价及利用研究进展[J]. *大豆科学*, 1992, 11(1): 64-69. (Han F, Ling Y L. Research

progress on collection, evaluation and utilization of wild perennial *Glycine* species[J]. *Soybean Science*, 1992, 11(1): 64-69.)
 [5] 钱吉, 马玉虹, 郑师章, 等. 烟豆小种群的 RAPD 研究[J]. *遗传*, 2003, 25(3): 314-316. (Qian J, Ma Y H, Zheng S Z, et al. RAPD study of populations of *Glycine tabacina*[J]. *Hereditas*, 2003, 25(3): 314-316.)
 [6] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
 [7] Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. *Euphytica*, 2002, 128(1): 9-17.
 [8] 任小俊, 马俊奎, 章彦, 等. 应用 ISSR 标记分析灰布支黑豆与晋豆 23 的 F₃ 群体的遗传多样性[J]. *分子植物育种*, 2008, 1(5): 629-632. (Ren X J, Ma J K, Zhang Y, et al. Genetic diversity of F₃ progeny derived from ZDD2315 × JinDou 23 revealed by ISSR marker[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2003, 1(5): 629-632.)
 [9] 谢甫缙, Takahata Y. 利用 ISSR 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 T, Takahata Y. Phylogenetic analysis of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars from different regions through ISSR markers[J]. *Soybean Science*, 2005, 24(3): 161-165.)
 [10] Jin Y, Zhang W J, Fu D X, et al. Sampling strategy within a wild soybean population based on its genetic variation detected by ISSR markers[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(8): 995-1002.
 [11] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps[J]. *Genome*, 1993, 36(1): 181-186.
 [12] Pavlicek A, Hrdá S, Flegr J. Free-tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*[J]. *Folia Biologica*, 1999, 45(3): 97-99.
 [13] Page R D M. TreeView version 1.6.6[M]. University of Glasgow, Glasgow, 2001.
 [14] 王天菊, 白德胜, 何龙飞, 等. 不同来源花生品种的 ISSR 分析及亲缘关系研究[J]. *花生学报*, 2011, 40(2): 7-12. (Wang T J, Bai D S, He L F, et al. Analysis on genetic relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) from different resource based on ISSR molecular markers[J]. *Journal of Peanut Science*, 2011, 40(2): 7-12.)
 [15] 孙晓环, 刘晓冬, 赵洪锬, 等. 吉林省龙井原位保护区野生大豆遗传多样性分析[J]. *大豆科学*, 2012, 31(3): 358-363. (Sun X H, Liu X D, Zhao H K, et al. Genetic diversity of wild soybean (*G. soja*) from Longjing in-situ conserved region of Jilin province[J]. *Soybean Science*, 2012, 31(3): 358-363.)
 [16] Chang Y K, Veilleux R E, Iqbal M J. Analysis of genetic variability among *Phalaenopsis* species and hybrids using amplified fragment length polymorphism[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2009, 134(1): 58-66.
 [17] 王克晶, 李向华. 国家基因库野生大豆 (*Glycine soja*) 资源最近十年考察与研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(4): 507-514. (Wang K J, Li X H. Exploration and studies of wild soybean germplasm resources in the China genebank during recent decade [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(4): 507-514.)