

利用 18S rRNA 基因部分序列研究大豆种质资源的进化关系

梁江¹, 陈渊¹, 汤复跃¹, 韦清源¹, 袁清华^{1,2}

(1. 广西玉米研究所, 广西南宁 530227; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点实验室, 广西南宁 530007)

摘要:利用模式植物拟南芥的 18S rRNA 基因序列设计的引物, 对 3 个野生大豆和 3 个栽培大豆的 18S rRNA 基因进行扩增, 利用其序列特征研究大豆的进化关系。结果 3 个野生大豆和 3 个栽培大豆均扩增得到 1 000 bp 左右的基因片段; 野生大豆之间的同源性均为 99%, 而栽培大豆之间的同源性较低, 相似性在 97% ~ 98% 之间; 通过 18S rRNA 基因序列研究不同豆科作物的进化关系, 发现大豆的系统发育树分枝处于靠近进化树树根的位置, 即大豆相对于其它豆科作物在系统发育上处于比较原始的位置。根据以上结果推测在进化过程中栽培大豆的遗传物质趋向多样性发展, 而遗传背景较单一可能是由于人为干预选择的过程所导致。利用 18S rRNA 基因的部分序列反映当代不同品种间的进化关系, 可为大豆种质资源的利用提供理论依据。

关键词:野生大豆; 栽培大豆; 拟南芥; 18S rRNA 基因

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)04-0586-04

Reveal the Evolutionary Relationship of Soybean Germplasm by Comparing 18S rRNA Gene Sequences

LIANG Jiang¹, CHEN Yuan¹, TANG Fu-yue¹, WEI Qing-yuan¹, YUAN Qing-hua^{1,2}

(1. Guangxi Maize Research Institute, Nanning 530227; 2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007, Guangxi, China)

Abstract: The evolution relationships between *Glycine soja* and *Glycine max* were studied by comparing the partial gene sequences of their 18S rRNA in this article. The results were as follows: 1 000 bp 18S rRNA genes of 3 wild soybeans and 3 cultivated ones were amplified using primers which were designed according to *Arabidopsis thaliana* 18S rRNA genes, the homology of 18S rRNA was 99% among the wild soybeans, while was from 97% ~ 98% among cultivated soybeans. By studying the evolutionary relationships of different legume crops with 18S rRNA sequence, we found that soybean was near the root of phylogenetic tree, which suggested that soybean was much more close to the phylogenetically primitive position compared to other legume crops. The results above suggested that soybean cultivars should become more diversified in the process of evolution, and the fact that soybean varieties had narrow genetic background may be due to human intervention in the process of selecting. In conclusion, 18S rRNA gene sequence could reflect the evolutionary relationships between different soybean varieties, which will provide theoretical basis for the utilization of soybean germplasm resources.

Key words: *Glycine soja*; *Glycine max*; *Arabidopsis thaliana*; 18S rRNA gene

随着人为干预的育种选择过程不断进行, 现代栽培作物的遗传基础越来越狭窄。栽培大豆由野生大豆进化而来, 它们具有相似的遗传背景, 然而在人为选择和自然选择的不断干预下, 内部的遗传物质会发生一些变化。这些变化表现在种属间以及品种间的差异, 并能通过遗传物质和表型性状体现出来^[1-2]。18S rRNA 基因是唯一具有信息分子和功能分子 2 种作用的编码核糖体 RNA 的基因, 为高重复序列, 约有 800 ~ 10 000 拷贝, 以连续排列方式存在于细胞核基因组内。由于协同进化 (Coevolution) 关系使该序列片断在核基因组不同拷贝间趋于相近, 甚至完全一致, 因此 18S rRNA 是研究种质资源之间进化关系的比较简便的手段之一。高等真核生物的 rRNA 基因 (rDNA) 具有多次重复,

rRNA 前体可降解为 18S、5.8S 和 28S 3 部分。庄炳昌等^[3]对大豆 rDNA ITS1 片段进行分离与克隆研究, 发现大豆与水稻的 rDNA 具有一定的同源性, 目前 18S rRNA 基因主要在中草药鉴定中应用^[4]。利用 18S rRNA 基因对现有的一些大豆育种材料进行了遗传背景分析, 研究其结构及序列, 从而为其在大豆育种上的利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生大豆 ye2、ye25、ye63 为广西当地的野生种。栽培大豆 C54、C55、C56 为广西玉米研究所大豆研究室选育的新品系。

收稿日期: 2010-03-09

基金项目: 国家大豆产业技术体系建设专项资助项目; 广西农业科学院科技发展基金资助项目 (2007005Z)。

第一作者简介: 梁江 (1969-) 男, 副研究员, 研究方向为大豆育种。E-mail: liangjiang0626@163.com。

通讯作者: 袁清华, 博士。E-mail: qinghua654321@126.com。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 用 TPS 抽提液提取(抽提液配方:100 mmol · L⁻¹ Tris-Cl, 10 mmol · L⁻¹ EDTA, 1 mol · L⁻¹ KCL)大豆基因组 DNA。取大豆幼叶 0.5 g 置于 2 mL 离心管中,加 800 μL 的 TPS 抽提液磨碎,将其放入 75℃ 的水浴锅中水浴 20 min, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 500 μL 于 1.5 mL 离心管中,加入等体积的冰酒精至 DNA 析出,12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,去上清,取沉淀,晾干,加灭菌双蒸水 150 μL 至溶解。

1.2.2 PCR 扩增 根据拟南芥 18S rRNA 基因的序列(Accession: X16077, GI: 16506)设计 1 对引物^[5]: ATR RNA SI, 5'-AGC CAT GCA TGT GTA AGT ATG AA-3'; ATR RNA ASI, 5'-GGC ATC GTT TAT GGT TGA GAC TA-3'。此对引物对拟南芥基因组的 PCR 扩增产物长度为 989 bp。

PCR 条件为:10 × EX Buffer 4μL, 2.5 mmol · L⁻¹ dNTP 4μL, 引物 ATRRNA SI (10μmol · L⁻¹), ATR RNA ASI (10 μmol · L⁻¹) 各 2 μL, 模板 DNA (20 ng · μL⁻¹) 2 μL, TaKaRa Ex-Taq 1 μL, 灭菌双蒸水补足体积为 50 μL。采用热启动 PCR, 94℃ 30 s, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min。35 个循环, 72℃ 10 min 补齐 PCR 产物片段。

1.2.3 测序 PCR 产物由北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。

1.2.4 序列分析方法 测序结果提交 NCBI 数据

库,找到该序列的同源序列。利用 GENEDOC 2.6.02 对 3 个野生大豆和 3 个栽培大豆材料的特征序列进行比较,分析这些材料的 18S rRNA 基因的序列同源性。运用 GENEDOC 2.6.02 及 treecon 软件对数据库中其它豆科作物的 18S rRNA 基因序列和大豆 18S rRNA 基因序列进行分析,研究大豆在豆科作物中的系统发育位置。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

利用所设计的引物对 3 个栽培大豆和 3 个野生大豆的 18S rRNA 基因进行 PCR 扩增(图 1)。

扩增片段大小为 1 000 bp 左右,而此对引物对拟南芥基因组的 PCR 扩增产物长度为 989 bp。表明已成功扩增出所需要的片段。

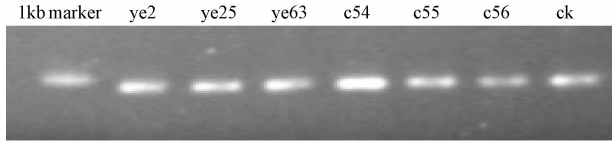


图 1 18S rRNA 基因 PCR 扩增结果
Fig.1 Results of the 18S rRNA gene PCR amplification

2.2 大豆种质资源的同源性分析

利用 GENEDOC 2.6.02 对 3 个野生大豆和 3 个栽培大豆材料的特征序列进行比较(图 2),结果显示在 18S rRNA 基因序列的 1 ~ 50 bp 和 890 ~ 1 000 bp 的位置上,这些种质资源的基因序列出现了较大的差异,尤其是栽培大豆 C56 与其它大豆在 18S rRNA 基因上具有极大差异。

表 1 不同大豆种质资源的部分 18S rRNA 基因序列同源性比较

Table 1 Sequence homology of 18S rRNA gene among soybean germplasm

	X02623.1	c54	c55	c56	ye2	ye25	ye63
X02623.1	100	99	99	97	99	99	99
c54			99	98	99	99	99
c55				98	99	99	98
c56					98	98	97
ye2						99	99
ye25							99
ye63							100

表 1 显示各野生大豆之间的 18S rRNA 基因序列同源性均为 99%,而栽培大豆的 18S rRNA 基因序列存在差异,其中 C56 与栽培大豆 X02623.1 及野生大豆 ye63 的同源性为 97%,和其它大豆种质资源的 18S rRNA 基因序列同源性为 98%;C55 与栽培大豆 C56 和野生大豆 ye63 的 18S rRNA 基因序列同源性为 98%,和其它大豆种质资源的同源性为 99%;C54 除与栽培大豆 C56 的同源性为 98% 外,与其它种质资源的 18S rRNA 基因序列同源性均为 99%。因此在进化过程中栽培大豆的遗传物质趋向多样性发展,而遗传背景较单一可能是由于人为干预选择的过程所导致。

2.3 大豆在豆科作物中的系统发育位置

利用 treecon 软件对 NCBI 数据库中其它豆科作物的 18S rRNA 基因序列和大豆 18S rRNA 基因序列进行分析(图 3),结果显示,除 C56 外,几个栽培大豆被紧密地聚集在一个系统发育分枝上(X02623.1 为前人已经对其 18S rRNA 研究过的大豆品种编号^[6]),野生大豆均在同一分枝上。这与形态分类结果一致,因此利用 18S rRNA 基因研究大豆的发育进化关系结果是可靠的。从进化关系来看,18S rRNA 基因序列被聚集在靠近进化树的树根位置(图 3),即大豆相对于其它豆科作物在系统发育上处于比较原始的位置。但由于该试验只是选用了 18S rRNA 基因部分序列进行研究,Bootstrap 值比较低,研究结果需要作进一步的验证。

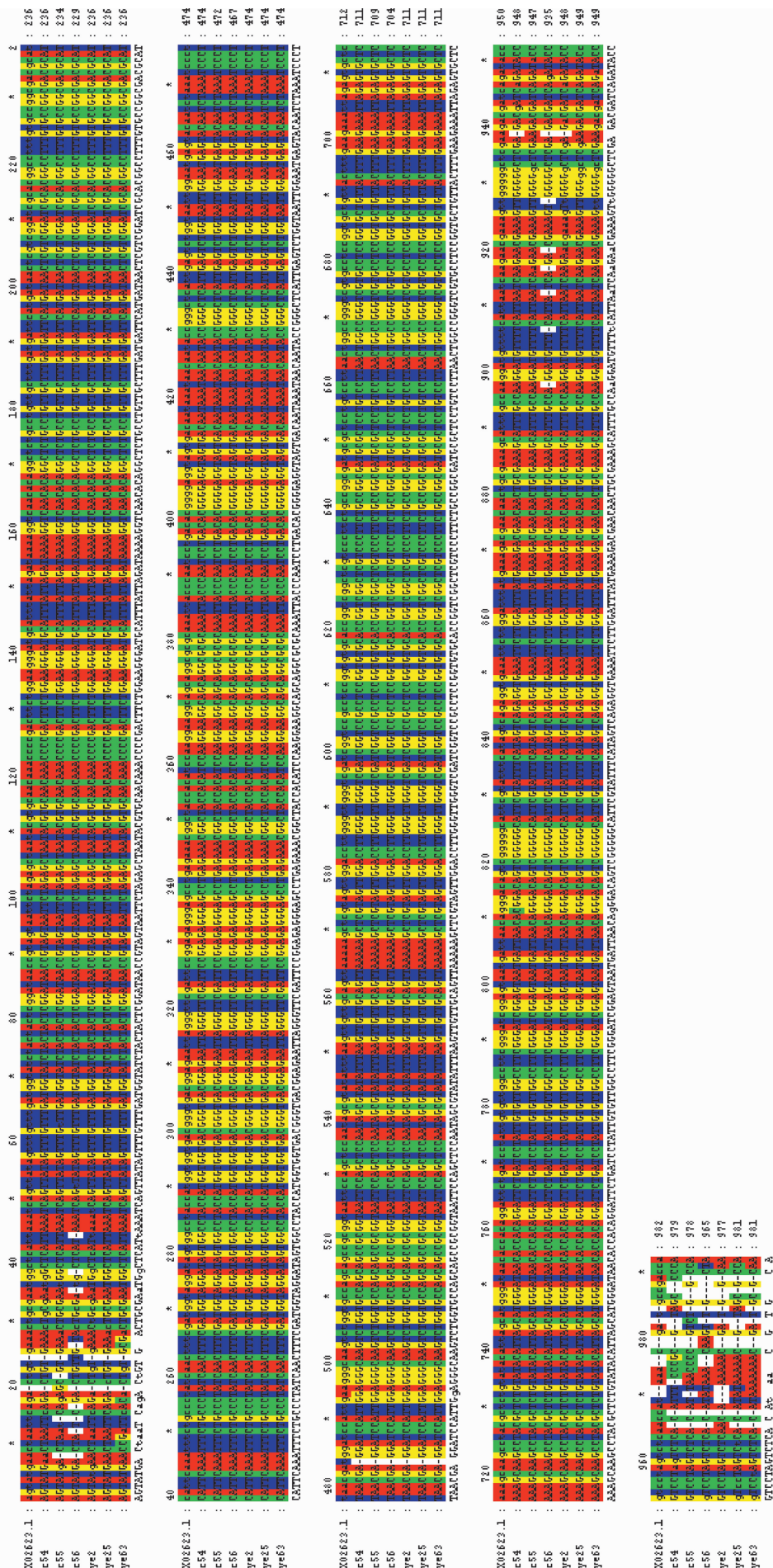


图2 大豆种质资源的18S rRNA基因部分序列(GeneDoc比对结果)
Fig.2 GeneDoc results of 18S rRNA gene sequence among soybean germplasm

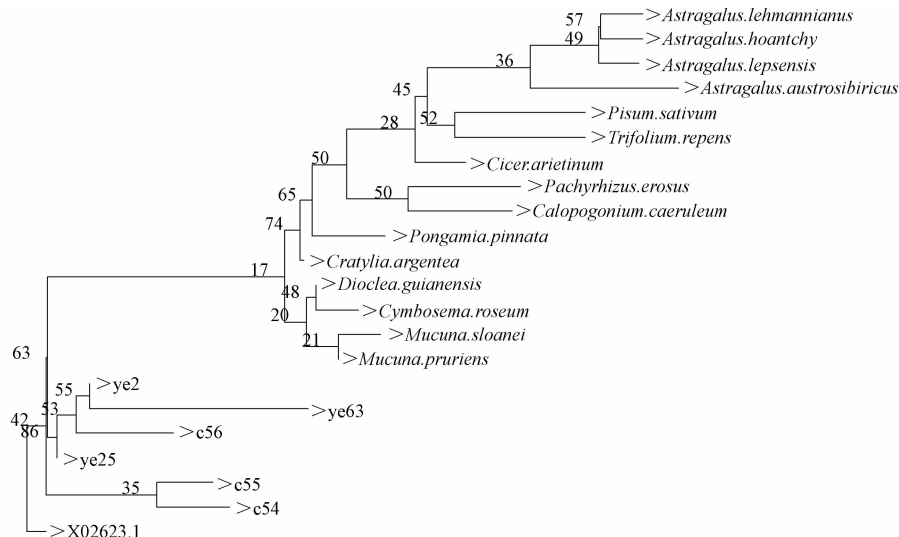


图 3 大豆在豆科作物中的系统发育位置

Fig. 3 Phylogenetic position of soybean in legume species

在分子进化系统研究中,18S rRNA 基因序列得到了广泛的应用。如:Kranz 和 Huss^[7] 用其探讨了蕨类植物的分子进化及其与种子植物的关系,Chaw 等^[8] 探讨了裸子植物的分子系统发育及种子植物的进化,李东霄等^[9] 对该基因进行克隆并对不同种类菟丝子进行了研究,吴耀生等^[5] 用该基因对拟南芥、人参属植物、三七的关系进行了研究。该研究所扩增的 18S rRNA 基因部分序列记录了大豆种质资源在进化过程中遗传物质的变化。结果显示野生大豆之间的同源性均为 99%,而栽培大豆之间的同源性较低。此结果表明在进化过程中栽培大豆的遗传物质趋向多样性发展,而遗传背景较单一可能是由于人为干预选择的过程所导致。

18S rRNA 序列中的差异位点可能作为人参属植物基因鉴定的特异位点。张英等^[10] 发现三七及其 9 种常见伪品的基因序列存在很大的差异,而不同产地的三七的核糖体基因序列特征完全一致。该研究表明,不同大豆种质资源在 18S rRNA 基因序列的 1~50 bp、890~1 000 bp 位置上,其基因序列出现了比较大的差异。这有可能是区别不同材料间差异性的特征序列,有待于进一步分析。

结果表明,18S rRNA 基因的部分序列反映了当代不同大豆品种间的进化关系,为以后的种质资源利用提供理论根据。利用已完成全基因组序列测定的模式植物拟南芥的分子生物学信息来研究植物基源的基因组序列,将有助于加快大豆种植资源的分子生物学研究进程。

参考文献

- [1] 张可炜,王仁卿. 不同进化类型大豆的遗传距离分析[J]. 山东大学学报(自然科学版),2000,35(2): 215-218. (Zhang K W, Wang R Q. Analysis of genetic distance on soybean of different evolutionary types[J]. Journal of Shandong University(Natural Science Edition),2000,35(2):215-218.)
- [2] 徐豹,路琴华. 不同进化类型大豆花荚形成和脱落的比较研究[J]. 大豆科学,1988,35(2): 103-112. (Xu B, Lu Q H. Comparative study on flowering and podding characteristics of wild, semi-wild, semi-cultivated and cultivated soybean[J]. Soybean Science,1988,35(2):103-112.)
- [3] 庄炳昌,徐豹,顾京,等. 大豆 rDNA ITS1 片段的分离与克隆研究简报[J]. 吉林农业科学,1992(1): 78-80. (Zhuang B C, Xu B, Guo J, et al. A brief report on isolation and cloning of rDNA-ITS1 in Soybean. [J]. Jilin Agricultural Sciences,1992(1): 78-80.)
- [4] 陈随清,王利丽. rRNA 基因(rDNA)序列分析在中药品种鉴定中的应用及研究进展[J]. 河南中医学院学报,2003,18(4): 86-88. (Chen X Q, Wang L L. Application and development of rRNA sequencing in origin identification of Chinese Materia Medica[J]. Henan Traditional Chinese Medicine, 2003, 18(4):86-88.)
- [5] 吴耀生, Steve Slocombe. 中药三七根核糖体 18S rRNA 基因的序列分析[J]. 中草药,2001,32(12): 1116-1119. (Wu Y S, Steve S. Sequencing of ribosomal 18S rRNA gene from *Panax pseudoginseng* var. *notoginseng*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2001,32(12): 1116-1119.)
- [6] Eckenrode V K, Arnold J, Meagher R B. Comparison of the nucleotide sequence of soybean 18S rRNA with the sequences of other small-subunit rRNAs [J]. Journal of Molecular Evolution, 1984,21(3): 259-269.
- [7] Kranz H D, Huss V A R. Molecular evolution of pteridophytes and their relationship to seed plants: evidence from complete 18S rRNA gene sequences [J]. Plant Systematics and Evolution, 1996, 202:1-11.
- [8] Chaw S M, Zharkikh A, Sung H M, et al. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences [J]. Molecular Biology and Evolution, 1997, 14(1):56-68.
- [9] 李东霄,陈亮. 南方菟丝子 18S rRNA 基因片段的克隆与序列分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006,45(增刊):60-62. (Li D X, Chen L. Cloning and sequence analysis of 18S ribosomal RNA gene fragment from *Cuscuta australis* R. Briamen[J]. Journal of Xiamen University(Natural Science Edition), 2006,45(Suppl):60-62.)
- [10] 张英,黄明辉,柏干荣,等. 三七的 18S rRNA, matK 基因序列和 HPLC 化学指纹图谱分析研究[J]. 药品评价, 2005,2(1): 23-30. (Zhang Y, Huang M H, Bu G R, et al. Study on molecular and chemical identification of *Panax notoginseng* by 18S rRNA gene and matK gene sequencing and by HPLC fingerprinting[J]. Drug Evaluation,2005,2(1):23-30.)