

野生大豆 ISSR 体系的优化及其在远缘杂交后代鉴定中的利用

陈丽丽¹, 王明玖¹, 何丽君², 王连生³

(1. 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 3. 绿源植物生物质开发利用研究所, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 以内蒙古野生大豆为材料, 运用 5 因素 5 水平正交试验设计对 ISSR-PCR 反应体系中 DNA 模板、Taq 酶、引物、dNTPs 和 Mg^{2+} 用量进行优化试验, 之后利用优化后的 ISSR-PCR 体系对内蒙古野生大豆及其与栽培大豆的杂交后代进行遗传关系研究。正交试验结果表明, 各因素对野生大豆 ISSR-PCR 反应影响大小依次为 Taq 酶 > Mg^{2+} > 引物 > 模板 DNA = dNTPs, 最佳反应体系为模板 DNA 50 ng、Taq 酶 0.5 U、引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μL 、 Mg^{2+} ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.0 μL 及 dNTPs ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) 3.0 μL , 2 μL 10 × PCR buffer、ddH₂O 补足至 20 μL 。以 10 个引物对供试材料进行扩增, 共得到条带 109 个, 多态性百分率为 60.23%, 其中引物 S23 可以将所有供试材料进行区分。基于 ISSR 标记的聚类分析将 13 个供试材料划分为 3 类, S001、S002、2、5、8-1 和 8-4 为第一类, 29、SF、NY、ZS、0004 和 PZ 为第二类, Y 为第三类。

关键词: 野生大豆; 正交设计; ISSR; 杂种鉴定

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)04-0459-08

Optimization for ISSR Reaction System of Wild Soybean and Its Utilization in Distant Hybrid Identification

CHEN Li-li¹, WANG Ming-jiu¹, HE Li-jun², WANG Lian-sheng³

(1. College of Ecology and Environmental Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; 2. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; 3. LyuYuan Plant Biomass Development and Utilization Institute, Tongliao 028000, China)

Abstract: Genomic DNA of *Glycine soja* was tested as the template, optimization experiments on some important parameters affecting ISSR-PCR amplification were conducted to establish an optimum system suitable for ISSR-PCR of hybrids of *Glycine soja* × *Glycine max*. Orthogonal design was used to optimize ISSR amplification system of the hybrids with five factors (including DNA template, Taq polymerase, primer, dNTP and Mg^{2+}) at five levels, respectively. Then using the best system to study the genetic relationship among the lines. According to the results of orthogonal test, the order of factors affecting the ISSR-PCR reaction of *Glycine soja* was: Taq polymerase > Mg^{2+} > primer > DNA template = dNTPs. A suitable ISSR-PCR reaction system was established, its total volume was 20 μL , containing 50 ng DNA template, 0.5 U Taq polymerase, 1.0 μL primer ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 3.0 μL dNTPs ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each), 2.0 μL Mg^{2+} ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and 2 μL 10 × PCR buffer. A total of 109 loci were amplified with 10 primers, the polymorphic loci percentage was 60.23%, the primer S23 could distinguish all the tested materials. All the tested materials were divided into three groups using cluster analysis. S001, S002, 2, 5, 8-1 and 8-4 were divided into the first group, 29, SF, NY, ZS, 0004 and PZ were divided into the second group, Y was the third group.

Key words: *Glycine soja*; Orthogonal design; ISSR; Hybrid identification

ISSR (inter simple sequence repeat) 标记是由加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等^[1]于 1994 年提出的建立在 SSR (simple sequence repeat) 基础之上, 操作方法类似于 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 标记的一种分子标记技术。与 RAPD 相比, ISSR 具有较好的稳定性; 与 SSR 相比, ISSR 引物设计更简单; 加之操作便捷、扩增位点多态性较高及

呈孟德尔式遗传等特点, 被广泛应用于种质资源鉴定、遗传作图及遗传多样性等方面的研究^[2-3]。

ISSR 技术应用于大豆属植物的研究已有很多, 金燕等^[4]利用 ISSR 技术探讨野生大豆居群内的遗传变异, 任小俊等^[5]、周延清等^[6]、何海燕等^[7]分别利用该技术对分布于某一地区的大豆品种资源进行遗传多样性研究, 谢甫锦等^[8-9]利用该技术对大

收稿日期: 2013-03-20

基金项目: 内蒙古应用技术研究与开发项目 (20091402); 内蒙古自然科学基金 (2010MS0511)。

第一作者简介: 陈丽丽 (1985-), 女, 在读博士, 主要从事草地资源管理与利用研究工作。E-mail: chenlili0809@163.com。

通讯作者: 王明玖 (1961-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事草地资源管理和草地生态学研究。E-mail: wangmj_0540@163.com。

何丽君 (1963-), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事豆科植物种质资源与创新研究。E-mail: helijun111@sina.com。

豆品种进行分类,王玉民等^[10]利用 ISSR 技术对大豆属 23 个品种(包括多年生野生大豆、一年生野生大豆和栽培大豆)进行亲缘关系远近的研究等。本试验拟对内蒙古野生大豆及其与栽培大豆杂交所产生后代株系进行 ISSR 研究,旨在从基因组 DNA 分子水平分析野生大豆与后代株系间及不同株系间的遗传差异性和相似性,为杂交后代选育利用及种质资源评价提供依据。

ISSR 是基于 PCR 的一种分子标记技术,其扩增结果易受模板 DNA、Taq 酶、 Mg^{2+} 、引物及 dNTP 等因子浓度和退火温度的影响,因此,在运用该技

术进行材料间遗传关系研究之前,应先建立一个合适的 ISSR-PCR 反应体系,以期获得可靠的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为内蒙古通辽市科左后旗草甸野生大豆及其与栽培大豆(通辽当地栽培品种大白眉)杂交后代中表型性状基本不再分离的株系 12 个及父本野生大豆(表 1)。所有供试材料均种植于内蒙古通辽市科左后旗查金台牧场试验地材料圃,于 2011 年秋收集供试材料种子用于 ISSR 标记试验。

表 1 供试材料及相关基本特征

Table 1 Test materials and their basic characteristics

株系 Line	生长习性 Growth habit	结荚习性 Pod bearing habit	种子粒形 Seed shape	种皮颜色 Seed coat color	株系 Line	生长习性 Growth habit	结荚习性 Pod bearing habit	种子粒形 Seed shape	种皮颜色 Seed coat color
0004	直立	有限	圆形	黄色	2	半直立	亚有限	椭圆形	黄色
SF	直立	有限	圆形	黄色	5	半蔓生	无限	长椭圆形	黄色
NY	直立	有限	圆形	黄色	8-1	直立	亚有限	圆形	浅绿色
PZ	直立	有限	圆形	黄色	8-4	直立	亚有限	圆形	浅绿色
ZS	直立	有限	圆形	黄色	29	半蔓生	无限	椭圆形	双色
S001	直立	亚有限	扁椭圆形	深绿色	Y	蔓生	无限	椭圆形	黑色
S002	半蔓生	无限	长椭圆形	黑色					

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取及纯度检测 将供试材料种子分别播种于苗盘,待幼苗长至 6~8 cm,各供试材料随机选取 10 株剪取新鲜幼叶进行混样,利用植物基因组 DNA 试剂盒(天根公司产品)提取 DNA。提取完成后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行纯度检测。

1.2.2 PCR 体系的正交设计 采用 5 因素 5 水平 $L_{25}(5^6)$ 正交试验设计,对 Taq 酶、 Mg^{2+} 、引物、dNTPs 和 DNA 模板 5 因子的用量进行优化。反应体系中,模板 DNA 用量分别为 10, 20, 30, 50 和 60 ng, Taq 酶用量分别为 0.250, 0.375, 0.500, 0.625 和 0.750 U,引物(浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)用量分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 μL , dNTPs(浓度 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each)和 Mg^{2+} (浓度 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)用量分别为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 和 3.0 μL 。正交设计共 25 种反应体系(表 2),各反应体系总体积为 20 μL ,除以上 5 个因素外,另加入 2 μL 10 × PCR

buffer,最后用 ddH₂O 补足 20 μL 。试验所用 Taq 及 dNTPs 等试剂为 Thermo 公司产品。

PCR 反应在 ABI 基因扩增仪上进行。PCR 热反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,循环 40 次;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。

1.2.3 确定引物退火温度 以野生大豆 DNA 样品为模板,引物的 T_m 值为基准,设置 $(T_m + 3)^\circ\text{C}$ 、 $(T_m + 6)^\circ\text{C}$ 、 $(T_m + 9)^\circ\text{C}$ 、 T_m 值温度、 $(T_m - 3)^\circ\text{C}$ 、 $(T_m - 6)^\circ\text{C}$ 、 $(T_m - 9)^\circ\text{C}$ 共 7 个温度梯度,进行 ISSR 扩增,根据扩增结果选择出条较丰富且清晰的温度作为引物的最适退火温度。

1.2.4 引物筛选 从所有供试材料中选择植株及种子特征存在明显差别的野生大豆及杂交后代株系 0004 和 S001 的 DNA 样品作模板,对 Sangon 公司合成的 50 个引物进行初步筛选,选出具有差异性条带的引物进一步用于所有供试材料 ISSR 扩增。

表 2 25 个处理中各因素及其水平组合

Table 2 Factors and levels in 25 treatments

编号 Number	DNA template /ng	Taq polymerase /U	Primer /μL	dNTPs /μL	Mg ²⁺ /μL
1	10	0.250	0.5	1.0	1.0
2	10	0.375	1.0	1.5	1.5
3	10	0.500	1.5	2.0	2.0
4	10	0.625	2.0	2.5	2.5
5	10	0.750	2.5	3.0	3.0
6	20	0.250	1.0	2.0	2.5
7	20	0.375	1.5	2.5	3.0
8	20	0.500	2.0	3.0	1.0
9	20	0.625	2.5	1.0	1.5
10	20	0.750	0.5	1.5	2.0
11	30	0.250	1.5	3.0	1.5
12	30	0.375	2.0	1.0	2.0
13	30	0.500	2.5	1.5	2.5
14	30	0.625	0.5	2.0	3.0
15	30	0.750	1.0	2.5	1.0
16	50	0.250	2.0	1.5	3.0
17	50	0.375	2.5	2.0	1.0
18	50	0.500	0.5	2.5	1.5
19	50	0.625	1.0	3.0	2.0
20	50	0.750	1.5	1.0	2.5
21	60	0.250	2.5	2.5	2.0
22	60	0.375	0.5	3.0	2.5
23	60	0.500	1.0	1.0	3.0
24	60	0.625	1.5	1.5	1.0
25	60	0.750	2.0	2.0	1.5

1.2.5 扩增条带的统计 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,同一引物的扩增产物在电泳中迁移率相同的条带为同源性条带,将属于同一位点的清晰可见的强带和反复出现的弱带记为“1”,否则记为“0”,形成二元统计数据。根据供试材料 ISSR 图谱的位点差异,统计多态性位点百分率并利用 NTSYS 软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度

用植物基因组试剂盒提取的所有供试材料的 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,条带清晰,说明所提取的 DNA 完整性好、无降解现象(图 1)。利用 Thermo Scientific NanoDrop 2000 分光光度计测定所有样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 变幅为 1.8 ~ 2.0,说明 DNA 纯度较高,符合 ISSR 标记试验的要求。

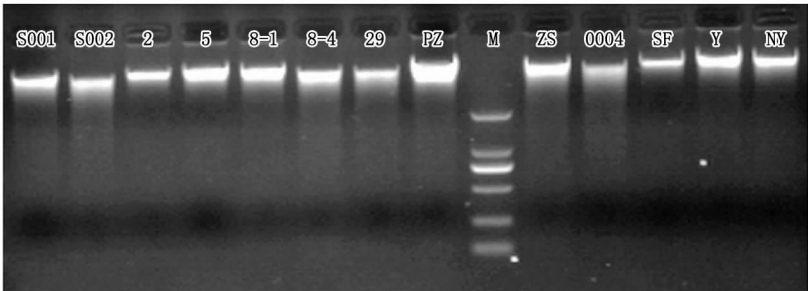


图 1 野生大豆及其与栽培大豆杂交后代株系基因组 DNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis detection of genomic DNA of *Glycine soja* and part of the lines from the cross of *Glycine soja* × *Glycine max*

2.2 ISSR 反应体系确定

2.2.1 各因素对野生大豆 ISS-PCR 反应的影响

根据扩增图谱可识别条带数为每个处理赋值,对正交试验结果进行极差分析和方差分析^[11]。根据极差分析结果(表 3)可以得出各因素对野生大豆 ISSR-PCR 反应的影响大小顺序为:Taq 酶 > Mg²⁺ >

引物 > 模板 DNA = dNTPs。为了判断各因素对野生大豆 ISSR-PCR 反应的影响是否显著,对试验结果进行了方差分析(表 4),结果表明各因素对野生大豆 ISSR-PCR 反应的影响从大到小顺序与极差分析相同,并且得出只有 Taq 酶用量对反应的影响显著,其他 4 个因素均不显著。

表 3 正交试验数据分析
Table 3 Data analysis of orthogonal test

编号 Number	DNA template /ng	Taq polymerase /U	Primer /μL	dNTP /μL	Mg ²⁺ /μL	扩增片段 Amplified bands
1	1	1	1	1	1	4
2	1	2	2	2	2	5
3	1	3	3	3	3	6
4	1	4	4	4	4	8
5	1	5	5	5	5	7
6	2	1	2	3	4	5
7	2	2	3	4	5	6
8	2	3	4	5	1	6
9	2	4	5	1	2	6
10	2	5	1	2	3	5
11	3	1	3	5	2	4
12	3	2	4	1	3	4
13	3	3	5	2	4	8
14	3	4	1	3	5	5
15	3	5	2	4	1	6
16	4	1	4	2	5	4
17	4	2	5	3	1	4
18	4	3	1	4	2	5
19	4	4	2	5	3	7
20	4	5	3	1	4	7
21	5	1	5	4	3	4
22	5	2	1	5	4	5
23	5	3	2	1	5	6
24	5	4	3	2	1	6
25	5	5	4	3	2	6
扩增片段数总和 Sum of the amplified bands						
K1	30	21	24	27	26	
K2	28	24	29	28	26	
K3	27	31	29	26	26	
K4	27	32	28	29	33	
K5	27	31	29	29	28	
R	3	11	5	3	7	

表 4 正交试验结果方差分析
Table 4 Variance analysis of orthogonal test results

方差来源 Variance sources	离差平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F value	F _{0.05}
DNA template	167.990	4	41.98	0.53	6.39
Taq	2439.51	4	609.88	7.72 *	
Primer	464.20	4	116.05	1.47	
dNTPs	167.90	4	41.98	0.53	
Mg ²⁺	908.64	4	227.16	2.88	
误差 Error	316.05	4	79.01		
总计 Total	4464.20	24			

2.2.2 各因素的不同水平对野生大豆 ISSR-PCR 反应的影响 根据极差分析和方差分析所得各因素对野大豆 ISSR-PCR 反应影响的大小顺序,逐步对各因素进行用量的确定。Taq 酶用量对体系扩增结果影响达到显著水平,随用量的增加,扩增条带更完整且清晰,但用量过大会出现条带缺失或模糊,如体系 11、12、16、17 和 21 泳道上半部分条带存在缺失,最终确定 Taq 酶最适用量 0.5 U。其他因素虽在扩增条带数上对反应的影响未达到显著水平,但可参考扩增条带的亮度和背景清晰度来筛选最佳体系。较低的 Mg²⁺ 浓度可降低非特异性扩增,体系 1、2、3、4、5 的 Mg²⁺ 用量递增,当用量为 2.0 μL 或 2.5 μL 时,扩增条带最清晰,背景较干净。体系中引物的用量是保证扩增结果稳定性的关键因素,

用量过少会导致扩增条带模糊,甚至缺失,如体系 1、10、14、18 和 22,而用量过多又会导致非特异性扩增,亮度较低,不易辨读,如体系 4、5、13 及 20 等,最终确定引物用量为 1.0 μL;模板 DNA^[12] 和 dNTPs 用量对扩增结果影响最小,可结合其他 3 个因素,选择符合试验要求的最小量。根据本试验扩增结果,体系 19 中各因素用量符合正交试验分析结果,且所扩增出来的条带较完整、清晰明亮、无非特异性扩增且没有拖尾现象,确定为最适反应体系(图 2)。即在总体积 20 μL 体系中包含 2 μL 10 × PCR buffer、模板 DNA 50 ng、Taq 酶 0.5 U、引物 (10 μmol·L⁻¹) 1.0 μL、Mg²⁺ (25 mmol·L⁻¹) 2.0 μL 及 dNTPs (25 mmol·L⁻¹) 3.0 μL。

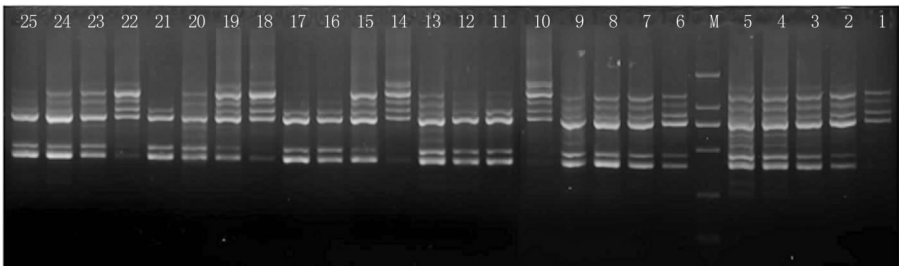


图 2 ISSR-PCR 正交试验设计 25 个体系扩增结果

Fig. 2 Amplified results of 25 systems about ISSR-PCR orthoronal design

2.3 引物退火温度的确定

引物的退火温度是影响 ISSR 扩增谱带样式的重要因素。退火温度一般可由引物的 T_m 值进行推断,在 T_m 值上下 10℃ 进行浮动。本试验以引物 S6 (T_m 值 55℃) 为例,当退火温度小于 58℃ 时,扩增条带出现不同程度的缺失;58℃ 和 61℃ 时条带多态性最高,且 58℃ 主带清晰、稳定;64℃ 时又出现条带缺失且主带模糊不清,不易辨识(图 3)。因此,引物 S6 的最适退火温度确定为 58℃。在进行其他引物 ISSR 扩增时选择高于 T_m 值 3℃ 作为退火温度。

2.4 遗传多样性分析

2.4.1 多态性位点 通过对 Sangon 公司合成的 50

个引物进行筛选,筛选出扩增产物 DNA 条带比较清晰、多态性条带数目比较多的 10 个引物对所有供试材料进行 ISSR-PCR 扩增(图 4)。共检测出总位点 109 个,平均每个引物可扩增出 6.9 条带,多态性位点共 69 个,多态位点百分率 60.23%,说明供试材料间存在较大的遗传变异。其中引物 S23 扩增出的多态性位点百分率达到 100%,可以区分 13 个供试材料。另外,引物 S30、S36、S41、S29、和 S43 扩增出的条带多态位点百分率也都达到了 50% 以上,可对部分株系进行区分(表 5)。

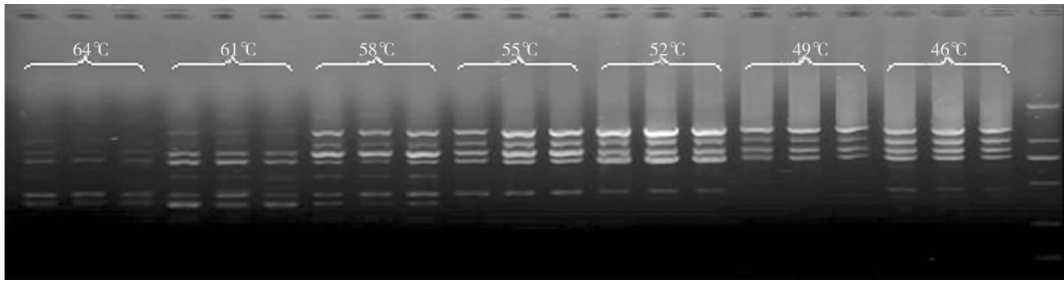


图 3 ISSR-PCR 退火温度的选择
Fig. 3 Selection of annealing temperature of ISSR-PCR

表 5 筛选出的引物序列及其扩增结果

Table 5 Primer sequence and amplification results

引物 Primer	序列(5'-3') Sequences	总条带数 Total loci	多态位点数 Polymorphism loci	多态位点百分率 Polymorphism percentage/%
S30	AGAGAGAGAGAGAGGA	15	11	73.33
S40	GAGAGAGAGAGAGACA	8	2	25.00
S36	ACACACACACACACGC	17	12	70.59
S39	GAGAGAGAGAGAGACG	11	5	45.45
S41	CTCTCTCTCTCTCTA	7	6	85.71
S9	GAGAGAGAGAGAGAT	13	4	30.80
S23	ACCACCACCACCACCACC	14	14	100.00
S29	AGAGAGAGAGAGAGGG	10	6	60.00
S35	ACACACACACACACAG	5	2	40.00
S43	CTCTCTCTCTCTCTTTC	7	5	71.43
总计 Total		109	69	—
平均数 Mean		10.9	6.9	60.23

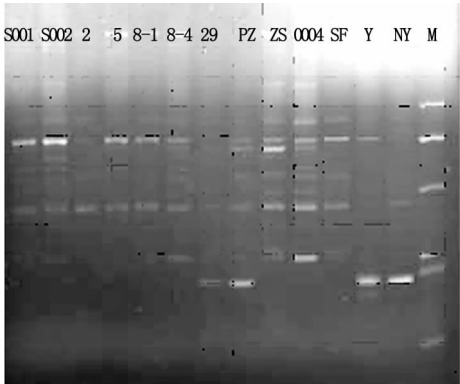


图 4 引物 23 对野生大豆及其与栽培大豆
杂交后代株系的 ISSR 扩增结果
Fig.4 PCR amplification result of *Glycine soja* and
the lines from *Glycine soja* × *Glycine max*
using primer 23

2.4.2 聚类分析 利用 NTSYS 软件对所有材料进行基于 ISSR 标记的遗传相似系数聚类分析。结果表明,株系 2 和 S002 的遗传相似度最高,达到了

86.24%,野生大豆与每个株系之间的相似系数几乎都小于该株系与其他株系之间的相似系数,说明株系之间的遗传相似度较高,从侧面证实杂交后代除继承了亲本野生大豆的遗传物质以外,还继承了栽培大豆亲本的遗传基因。在平均相似系数为 0.759 处,将 13 个材料分为三大类:S001、S002、2、5、8-1 和 8-4 为第一类,29、SF、NY、ZS、0004 和 PZ 为第二类,Y 为第三类(图 5)。聚类分析结果突出了 13 份供试材料之间的相似性和差异性,第一类较第二类更接近于野生大豆。结合各株系植株及种子特征,第一类几乎全部属于过渡型株系,其植株的表型性状介于野生大豆和栽培大豆之间且偏向野大豆,茎的生长习性多为半直立或蔓生,结荚习性多为亚有限或无限,种子大小及形状也各不相同;第二类除 29 以外,其他株系无论是株型还是籽粒特征都与传统栽培大豆相似,通过进一步选育有望从中筛选出优良的栽培大豆新品系。

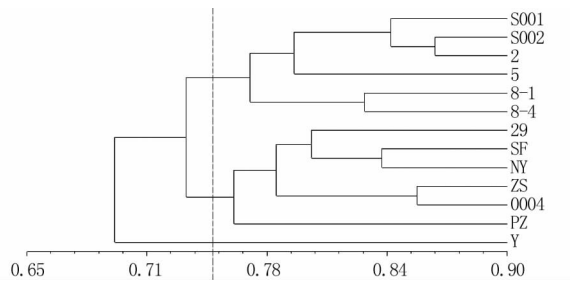


图5 野大豆及其与栽培大豆杂交后代株系聚类结果

Fig.5 Cluster analysis based on genetic similarity coefficient of *Glycine soja* and the lines from *Glycine soja* × *Glycine max*

3 讨论

3.1 ISSR-PCR 反应体系的优化

ISSR 技术虽然是结合了 RAPD 和 SSR 的优点,稳定性高、操作便捷,但必须综合考虑各个影响因素间的相互作用,建立最优的反应体系并确定最佳反应条件。多数学者采用正交试验法对 PCR 反应体系进行优化,代文娟等^[13]利用 5 因素 4 水平正交试验法对狭叶坡垒的 ISSR-PCR 反应体系进行了优化;王彦华等^[3]、张蕾等^[14]、赵春梅等^[15]分别利用 4 因素 3 水平正交试验法对不结球白菜、两面针、甜瓜建立起 ISSR-PCR 体系。也有学者利用单因素试验法和单因素试验法与正交试验相结合的方式对体系优化,如王岚等^[16]利用单因素试验法建立起了适用于川芎的 ISSR-PCR 体系,思彬彬等^[17-18]利用单因子梯度试验和 5 因素 4 水平正交试验相结合的方式建立并优化了桑叶和藤三七的 ISSR-PCR 反应体系。本试验对反应体系中的模板 DNA、Taq 酶、引物、dNTPs 和 Mg^{2+} 5 个因素在参考了前人研究中各因素用量的基础上,利用正交试验方法对各因素进行了 5 个浓度水平设计,在 25 个体系中选出扩增条带清晰、多态性较高、背景干净的体系 19 作为 ISSR 扩增的反应体系。除了以上 5 因素以外,退火温度也是 ISSR-PCR 技术的关键,另外还有其他因素如循环次数、变性及复性反应时间对扩增结果也有一定的影响。

3.2 ISSR 技术在遗传关系上的应用

植物杂种优势的产生在一定程度上取决于亲本间的遗传差异,遗传差异大,说明其亲缘关系较远,杂交后代的杂种优势较大。从 DNA 分子水平上,明确亲本及其杂种间的遗传差异大小,对选配亲本杂交组合及其杂种优势利用评价有重要的理论指导价值^[19-20]。吴学尉等^[21]对百合后代进行 ISSR 鉴定,能够较好地反应出 40 个来源于 4 个不

同亲本的杂交后代的亲缘关系。侯渝嘉等^[22]利用 19 个 ISSR 引物在多个茶树亲本及其杂种中进行遗传关系的分析和鉴定,认为 ISSR 技术在杂种定向选择和“亲缘跟踪”中应用,可为杂交育种提供理论基础。黄帆等^[23]利用 16 个 ISSR 引物对高加索三叶草、白三叶草及其杂种 F_1 代进行了遗传关系研究,从分子水平鉴定了杂种 F_1 代的真实性,并确定了其与亲本之间的遗传差异。本试验利用 ISSR 技术对野生大豆与栽培大豆杂交后代间及后代与野生大豆之间的亲缘关系作了初步鉴定,力求明确各后代株系间的遗传相似性。利用筛选出的 10 个引物对供试材料进行 ISSR 扩增,得到的多态性位点可以为后代鉴定及新品系杂交组配提供理论依据。

4 结论

正交试验结果表明,各因素对野生大豆 ISSR-PCR 反应的影响大小顺序为: Taq 酶 > Mg^{2+} > 引物 > 模板 DNA = dNTPs。确定最佳反应体系为模板 DNA 50 ng、Taq 酶 0.5 U、引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μL 、 Mg^{2+} ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.0 μL 及 dNTPs ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 3.0 μL , 2 μL 10 × PCR buffer、ddH₂O 补足至 20 μL 。各引物的退火温度为其相应的 T_m 值加 3℃。

对 13 份供试材料进行 ISSR 扩增,共获得条带 109 个,多态性位点 69 个,其中引物 S23 可以将所有供试材料进行区分。根据遗传相似系数,将 13 个供试材料划分为 3 类,且聚类分析结果与供试材料表型性状存在一定的联系。

参考文献

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [2] 宾晓芸,唐绍清,周俊亚,等. 金花茶遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *武汉植物学研究*, 2005, 23 (1): 20-26. (Bin X Y, Tang S Q, Zhou J Y, et al. ISSR analysis on genetic diversity of *Camellia nitidissima* Chi (Theaceae) in China [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2005, 23 (1): 20-26.)
- [3] 王彦华,侯喜林,徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究 [J]. *西北植物学报*, 2004, 24 (5): 899-902. (Wang Y H, Hou X L, Xu M Y. Study on optimization for ISSR reaction system in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* using orthogonal design [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, 24 (5): 899-902.)
- [4] 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.

- [5] 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,2003,1(5/6):629-632. (Ren X J, Ma J K, Zhang Y, et al. Genetic diversity of F₃ progeny derived from ZDD2315 × Jinbean 23 revealed by ISSR marker[J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(5/6): 629-632.)
- [6] 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.)
- [7] 何海燕,沙伟,张艳馥. 黑龙江省大豆种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 大豆科学,2011,30(1):37-40. (He H Y, Sha W, Zhang Y F. Genetic diversity analysis of soybean germplasm in Heilongjiang province by ISSR markers[J]. Soybean Science, 2011, 30(1):37-40.)
- [8] 谢甫锦, 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):5-9. (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):5-9.)
- [9] Xie F T, Takahata Y, Ohno Y. Phylogenetic analysis of vegetable-type (Edamame) and grain-type soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars through ISSR markers[J]. Soybean Science, 2008, 27(5):732-739.
- [10] 王玉民,姜昱,康岭生,等. 利用 ISSR 技术探讨大豆属植物的亲缘关系[J]. 吉林农业科学,2007,32(6):30-32,38. (Wang Y M, Jiang Y, Kang L S, et al. Phylogenetic analysis of soybean genus through ISSR markers[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2007, 32(6):30-32,38.)
- [11] 周凌瑜,吴晨炜,唐东芹,等. 利用正交设计优化小苍兰 ISSR-PCR 反应体系[J]. 植物研究,2008,28(4):402-407. (Zhou L Y, Wu C W, Tang D Q, et al. Optimization for ISSR-PCR system of *Freesia refracta* Klatt through orthogonal design[J]. Bulletin of Botanical Research, 2008, 28(4):402-407.)
- [12] 谢运海,夏德安,姜静,等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种,2005,3(3):445-450. (Xie Y H, Xia D A, Jiang J, et al. Optimization for ISSR-PCR system of *Fraxinus mandshurica* Rupr. using orthogonal design[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(3):445-450.)
- [13] 代文娟,唐文秀,邓涛,等. 正交设计优化狭叶坡垒 ISSR-PCR 反应体系[J]. 中国农学通报,2011,27(18):143-147. (Dai W J, Tang W X, Deng T, et al. Optimization for ISSR reaction system of *Hopea chinensis* by orthogonal design[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(18):143-147.)
- [14] 张蕾,严萍,韩正洲,等. 两面针 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 广州中医药大学学报,2012,29(1):70-74. (Zhang L, Yan P, Han Z Z, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system for *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 29(1):70-74.)
- [15] 赵春梅,金荣荣,刘英,等. 甜瓜 ISSR-PCR 反应体系的正交优化研究[J]. 中国农学通报,2012,28(4):146-150. (Zhao C M, Jin R R, Liu Y, et al. Optimization for ISSR-PCR system of *Cucumis melo* L. using orthogonal design[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(4):146-150.)
- [16] Wang L, Tang L. Optimization of ISSR-PCR reaction conditions for genomic DNA of *Ligusticum chuansiong* hort[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(2):307-309,323.
- [17] 思彬彬,刘明丽. 桑叶 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 安徽农业科学,2012,40(3):1329-1331. (Si B B, Liu M L. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system of *Morus alba* L. [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(3):1329-1331.)
- [18] 思彬彬,石巧层. 藤三七 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):643-645. (Si B B, Shi Q C. Establishment and optimization of *Boussingaultia* ISSR-PCR reaction system[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(2):643-645.)
- [19] 王子迎,王源超,张正光,等. 中国和美国大豆疫霉群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. 生物多样性,2007,15(3):215-223. (Wang Z Y, Wang Y C, Zhang Z G, et al. Genetic relationships among Chinese and American isolates of *Phytophthora sojae* by ISSR markers[J]. Biodiversity Science, 2007, 15(3):215-223.)
- [20] 李鸿雁,李志勇,王小丽,等. 内蒙古扁蓿豆遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2011,31(1):52-56. (Li H Y, Li Z Y, Wang X L, et al. Genetic diversity studies of *Medicago ruthenica* Inner Mongolia by ISSR[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31(1):52-56.)
- [21] 吴学尉,崔光芬,吴丽芳,等. 百合杂交后代 ISSR 鉴定[J]. 园艺学报,2009,36(5):749-754. (Wu X W, Cui G F, Wu L F, et al. Identification of ISSR in lily hybrids[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(5):749-754.)
- [22] 侯渝嘉,何桥,梁国鲁. 茶树杂交后代的 ISSR 分析[J]. 西南农业学报(自然科学版),2006,28(2):267-270. (Hou Y J, He Q, Liang G L. ISSR analysis of the hybrid descendants of tea camellias[J]. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science), 2006, 28(2):267-270.)
- [23] 黄帆,王明玖,何丽君,等. 高加索三叶草、白三叶及其杂种 F₁ 代的 ISSR 分析[J]. 中国草地学报,2012,34(6):107-112. (Huang F, Wang M J, He L J, et al. ISSR analysis of *Trifolium ambiguum* Bieb., *T. repens* L. and their hybrid F₁ [J]. Chinese Journal of Grassland, 2012, 34(6):107-112.)