DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2007.06.005

文章编号:1003-8701(2007)06-0030-03

利用ISSR技术探讨大豆属植物的亲缘关系

王玉民,姜 昱,康岭生,赵桂兰*

(吉林省农业科学院生物技术研究中心,长春 130033)

摘 要:对大豆属 *Glycine* 亚属19份多年生野生大豆、*Soja* 亚属2份野生大豆和2份栽培大豆进行了ISSR分析。结果表明:1.在 *Soja* 亚属中野生大豆和栽培大豆的指纹图谱很相近,相似性系数高达0.961,但在野生大豆和栽培大豆之间存在特异谱带。2.*Glycine* 亚属二倍体材料中,染色体组型为A类的 *G.argyrea*、*G.canescens* 和 *G.clandestina* 很好地聚为一类;*G.curvata* 和 *G.cyrtoloba* 的染色体组型同为C类,其指纹图谱的相似程度也较高;B类染色体组型 *G.latifolia* 和 *G.tabacina*(2n=40)的亲缘关系亦较近,同为B类染色体组型的 *G.microphylla* 却与染色体组型为C组的 *G.curvata* 和 *G.cyrtoloba* 的指纹图谱比较接近。3、*Glycine* 亚属多倍体材料中在 *G.tomentella* 和 *G.tabacina* 种内的多倍体材料的亲缘关系较近,尽管其地理来源不同;染色体组型为DD的 *G.tomentella*(2n=40)和染色体组型为EE的 *G.tomentella*(2n=38)与其它多倍体种的亲缘关系较远。4. *Soja* 亚属和 *Glycine* 亚属的相似性系数很低,亲缘关系较远,很早就发生了分化。

关键词:大豆属;多年生野生大豆;ISSR

中图分类号:Q75 **文献标识码**:A

大豆属植物属于豆科大豆亚族,据1999年最新结果[1],大豆属现在由17个种组成,包括 *Glycine* 和 *Soja* 两个亚属,主要是一年生和多年生种。大豆属种间亲缘关系的研究不仅是研究大豆起源、进化和分类的重要手段,对大豆基因组学的研究和遗传育种也有着重要意义。

ISSR(Inter-simple sequence repeats)是采用一个简单重复序列为引物,通过聚合酶链式反应来扩增两个相邻的方向相反的微卫星之间的区域[2]。它结合了RAPD和SSR两项技术的优点,简单易操作、费用低、多态性高、稳定性好。该技术可以用于任何含有大量简单重复序列的物种,而且不需要知道基因组的序列。用作ISSR分析的引物可以是基于任何SSR重复序列,可以是二碱基、三碱基、四碱基或是五碱基等。ISSR的引物设计比SSR简单,不需知道DNA序列即可用引物进行扩增,目前ISSR分析已广泛用于遗传多样性评价、品种鉴定等领域。周延清等(2006)[3]利用ISSR分析河南大豆的遗传多样性;谢甫绨等(2003)[4]利用ISSR分子标记进行不同来源大豆品种的分类;金燕(2003)[5]利用ISSR标记研究野生大豆居群内遗传变异。但是,还没有用于大豆属植物亲缘关系方面研究的报道。

本文采用ISSR标记技术,对大豆属植物23份材料进行了遗传关系分析,旨在探讨大豆属植物的亲缘关系和分类地位。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用试材均来自吉林省农业科学院生物技术研究中心,包括多年生野生大豆10个种19份材料,一年生野生大豆2份,栽培大豆2份(表1)。

1.2 DNA提取

DNA提取采用试剂盒进行。取叶片0.5 g液氮研磨,加入300μL 5M异硫氰酸胍溶液,裂解5

收稿日期:2007-05-14

作者简介:王玉民(1968-),男,研究员,主要从事大豆分子生物学研究。

通讯作者:赵桂兰

min;加入800μL 6M $KClO_4$,混匀,15 000 rpm离心5 min;取上清加50μL玻璃乳,混匀后室温放置20 min;≥15 000 rpm离心5 min,弃上清;加入400μL 6M$KClO_4$,混匀,15 000 rpm离心5分钟,弃上清;加入500μL 70%乙醇洗二次,吸干上清,室温晾干约10 min;加200μL TE,混匀,40~50℃ 1~5 min。≥15 000 rpm离心30~60 s,取上清,即为DNA。

表1　实验用的植物材料

编号	材料名称	种名	2n	染色体组型	产地	编号	材料名称	种名	2n	染色体组型	产地
1	PW0005	G. *argyrea*	40	A2A2	澳大利亚	13	PW0047	G. *tomentella*	38	EE	澳大利亚
2	PW0006	G. *canescens*	40	AA	澳大利亚	14	PW0049	G. *tomentella*	40	DD	澳大利亚
3	PW0012	G. *clandestina*	40	A1A1	澳大利亚	15	PW0055	G. *tomentella*	78	DDEE	澳大利亚
4	PW0018	G. *curvata*	40	C1C1	澳大利亚	16	PW0054	G. *tomentella*	78	DDEE	澳大利亚
5	PW0026	G. *cyrtoloba*	40	CC	澳大利亚	17	PW0080	G. *tomentella*	80	--	澳大利亚
6	PW0021	G. *falcata*	40	FF	澳大利亚	18	PW0066	G. *tomentella*	80	--	中国
7	PW0031	G. *latifolia*	40	B1B1	澳大利亚	19	PW0064	G. *tomentella*	80	--	中国台湾
8	PW0041	G. *microphylla*	40	BB	澳大利亚	20	ZYD5191	G. *soja*	40	GG	中国
9	PW0043	G. *tabacina*	40	B2B2	澳大利亚	21	英德中青	G. *max*	40	GG	中国
10	PW0045	G. *tabacina*	80	--	澳大利亚	22	ZYD4550	G. *soja*	40	GG	中国
11	PW0091	G. *tabacina*	80	--	中国	23	开山白	G. *max*	40	GG	中国
12	PW0100	G. *tabacina*	80	--	中国台湾						

1.3　ISSR分析

参照加拿大哥伦比亚大学UBC公司2006年公布的ISSR引物序列,由鼎国公司合成。PCR反应体系为25μL:其中包括10 mmol/L Tris-HCl (PH=8.3),1.8 mmol/L $MgCl_2$,5 mmol/L KCl,4种dNTP各200μmol/L,引物240 nmol/L,1U Taq DNA聚合酶,30 ng DNA。PCR反应程序为:94℃预变性4 min,然后94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环,72℃ 10 min,4℃保存。2.0%琼脂糖凝胶电泳,胶中加入适量溴化乙锭,采用Bio-Rad DOC1000凝胶成像系统记录电泳结果。

1.4　数据处理

ISSR扩增结果稳定,电泳图谱中一个谱带均可看作一个位点。根据各条带的迁移率及其有无统计得所有位点的二元数据。有带记为"1",无带记为"0"。用NTSYSpc ver1.70计算供试材料的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,绘制亲缘关系树状图。

2　结果与分析

2.1　引物筛选

我们共合成了30条ISSR引物,首先用4份材料DNA为模板,对引物进行筛选,选出了10条扩增条带清晰、重复性好的引物对所有材料进行分析(表2)。

表2　ISSR引物序列及其扩增的谱带数目

引物	序列 5′ →3′	谱带数
UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	6
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	10
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	7
UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	8
UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	7
UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	9
UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	6
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	8
UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	8
UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	8

2.2　指纹图谱分析

利用筛选出的10个引物建立了23份材料的指纹图谱(图1)。从这些材料的指纹图谱中可以看出,在*soja*亚属中野生大豆和栽培大豆的指纹图谱非常相似。引物UBC823扩增的结果中发现有一条带为野生大豆所特有,引物UBC822的扩增结果中发现2条带为栽培大豆所特有,它们可能为区分野生大豆和栽培大豆的特异谱带。*G. argyrea*和*G. canescens*的指纹图谱很接近,而且与*G. clandestina*的图谱比较接近;*G. curvata*和*G. cyrtoloba*的指纹图谱比较接近,并与*G. microphylla*的指纹图谱有许多共同的谱带;*G. tomentella*种内的多倍体种(2n=78,80)的指纹图谱比较相似,*G. tabacina*种内的多倍体种的指纹图谱也比较相似,而*G. tomentella*(2n=38,40)、*G. tabacina*(2n=40)与其相对应的多倍体种的指纹图谱差异较大。

2.3　亲缘关系分析

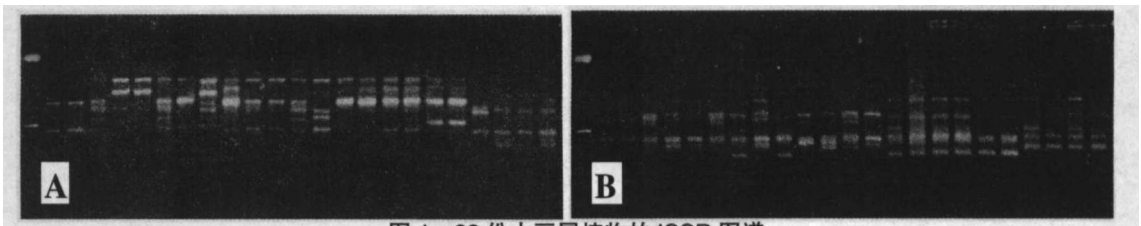

图1 23份大豆属植物的ISSR图谱

A、B分别为引物UBC822、UBC823的扩增结果，从左到右：第一泳道为Marker，第二泳道开始为材料，顺序与材料编号相同。

从图2可以看出，野生大豆和栽培大豆之间的相似程度很高，高达0.961，这说明野生大豆和栽培大豆基因组相似程度很高，亲缘关系较近。*G. argyrea* 和 *G. canescens* 的相似性系数为0.935，它们与 *G. clandestina* 的相似性系数为0.838；*G. curvata* 和 *G. cyrtoloba* 的相似性系数为0.909，与 *G. microphylla* 的相似性系数为0.864；*G. tomentella* 种内的多倍体种(2n=78,80)的相似性系数也较高，为0.846，*G.tabacina* 种内的多倍体种的相似性系数为0.857，而 *G. tomentella*(2n=38,40)、*G. tabacina*(2n=40)与其相对应的多倍体种的相似性系数均较低。

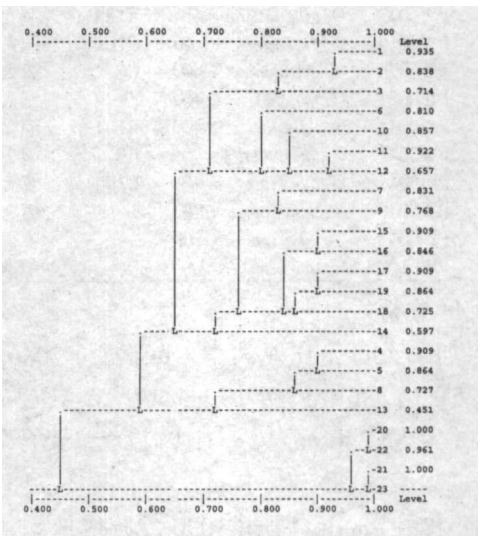

图2 大豆属植物23份材料亲缘关系树状图

3 讨 论

惠东威(1994)[6]采用随机扩增多态性DNA(RAPD)对大豆属植物系统学进行了研究，发现不论染色体组型和原产地如何 *G.tomentella* 种内和 *G.tabacina* 种内材料的亲缘关系较近。同时还发现 *G.tabacina* 与 *G.mirophylla* 和 *G.latifolia* 的指纹图谱有很多共同带，说明其亲缘关系较近。惠东威(1996)[7]又利用RAPD技术重建大豆属的亲缘关系，发现 *G.tomentella* 种内存在3种不同的进化类型，其分化距离已大于某些种种间的分化距离，它们可能是被形态遮蔽的3个种。顾京等(1994)[8]、惠东威(1997)[9]对大豆属12个种的第一转录间隔区(ITS Ⅰ)进行了序列分析。重建的树状图表明以往分类的种内(如 *G.tomentella*, *G.canescens* 和 *G.tabacina*)存在歧化现象，它们可能是被形态分析所掩盖的种。

本研究结果表明多年生野生大豆和一年生大豆的相似性系数很低，为0.451。说明多年生野生大豆和一年生大豆很早就发生了分化。这与前人利用其它方法研究的结果相符合。在 *Glycine* 亚属中，很多种内的歧化现象也比较普遍。在 *G.tomentella* 种内，由于染色体数目和染色体组型的不同，其分化的早晚也有明显的差异。在 *G.tabacina* 种内也是如此。综合惠东威等以前的研究结果，用不同方法对多年生野生大豆的系统发生或亲缘关系进行研究，到目前为止还不能得出一致的结论。Soja亚属的分化较晚，鉴于栽培大豆和野生大豆杂交可育，不存在生殖隔离，应该属于植物学上的同一个种。但野生大豆和栽培大豆之间在分子水平上还存在一定的遗传分化，我们发现引物UBC823扩增的结果中发现有一条带为野生大豆所特有，引物UBC822的扩增结果中发现2条带为栽培大豆所特有。这与赵洪锟等[10,11]对野生大豆和栽培大豆所进行的SSR及AFLP分析的结果相一致。而与惠东威等[6]利用RAPD对大豆属植物进行研究的结果有所不同。

参考文献：

[1] 庄炳昌．中国野生大豆生物学研究[M]．北京：科学出版社，1999．

[2] Zietkiewicz E, et al. Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification[J].Genomics,1994, 20: 176-183．

[3] 周延清，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．

(下转第38页)

都不耐贮存,难以进入商品市场。因此,微生物肥料的发展必然要在剂型上有革新,而剂型的革新又要求菌种更新换代。这样才能提高菌种的抗逆性和生物肥料的保质期。

③根据不同土壤和不同作物研制不同的配方。针对吉林省各个地区不同的气候条件、土壤类型和不同作物研制不同的生物有机肥料,使其具有较强的针对性和专一性,这样效果可能会更好。如针对我省东部地区的白浆土、棕壤等主要土类和气候特点,应主要接种抗病性强的优势菌种。西部地区气候较干旱,应选择抗逆性强的芽孢杆菌。而且西部地区土壤瘠薄,土著大豆根瘤菌类型较简单,以快生为主,固氮活性低,那么就可在大豆上选育接种慢生型固氮活性高的大豆根瘤菌。但大豆根瘤菌与寄主之间具有很强的专一性,因此,菌种的筛选要比豆种的选育超前或同步,达到菌种和豆种的最佳组合。中部地区土壤肥沃,气候条件较好,土著菌种类复杂,又很活跃,可选育营养、抗病和促生的优势菌群,发挥菌株间的协同作用,有效促进作物生长。如中部地区玉米茎腐病较严重,那么就可选育抗生菌、木霉等有效菌群,防止玉米茎腐病的发生,并增加作物产量和改善品质。

总之,以科学理论为指导进行生物有机肥的研制与开发,以增产增效和无公害为目标,在有效微生物菌种的选育和联合菌群的应用、工业发酵工艺和产品质量方面有所突破,使生物有机肥料取得令人信服的效果,必将为农业可持续发展作出应有的贡献。从发展趋势看,生物有机肥的产业化必将给吉林省经济带来巨大的影响力,也是把吉林省建设成为生态示范省的一个重要条件。

参考文献:

[1] 胡 可,王利宾,窦志忠. 生物有机无机复混肥肥效评价及其对土壤微生物的影响[J]. 山西农业大学学报,2006(3):276-278.
[2] 王艾平,邓接楼. 生物有机肥对水稻产量和品质影响的研究[J]. 作物杂志,2006(5):28-30.
[3] 沈中泉,等. 有机肥改善农产品品质的作用及机理[J]. 植物营养与肥料学报,1995(2):54-59.
[4] 严力蛟. 生物有机肥在农业上的应用[J]. 世界农业,1995(7):17-18.
[5] 杨玉爱. 我国有机肥料研究及展望[J]. 土壤学报,1996,33(4):414-422.

Status of Bio-organic Fertilizer Industry in Jilin Province and Its Development Trend

WU Hai-yan[1], LIU Chun-guang[1], LV Peng-fei[2], FAN Zuo-wei[1], XU Feng-shuang3, SUN Shu-rong1

(1. *Research Center of Agricultural Environment and Resources, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun* 130124; 2. *Jilin Difu Fertilizer Co., Ltd., Gongzhuling* 136100; 3. *Gongzhuling City Seed Company, Gongzhuling* 136100, China)

Abstract: The current situation, problems and trends of future development trend of bio-organic fertilizer industry in Jilin province was discussed in the paper. It was pointed out that the study of strains of multipurpose bacteria and the role of the joint mechanism should be strengthened. A theoretical basis for industrial production was provided.

Key words: Bio-organic fertilizer; Industrialization; Strains; Mechanism

(上接第 32 页)

[4] 谢甫绨,等. 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.
[5] 金 燕,等. 利用 ISSR 标记研究野大豆居群内遗传变异及其取样策略(英文)[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(8):995-1002.
[6] 惠东威,等. 利用 RAPD 对大豆属植物系统学研究的初报[J]. 科学通报,1994,39(2):175-178.
[7] 惠东威,等. RAPD 重建的大豆属植物的亲缘关系[J]. 遗传学报,1996,23(6):460-468.
[8] Gu J, et al. Studies on rDNA ITSl Regions of Soybean and its Wild Relatives[J]. Acta Botanica Sinica. 1994, 36: 759-764.
[9] Hui D, et al. Phylogeny of 12 species of genus Glycine Willd. reconstructed with internal transcribed region in nuclear ribosomal DNA[J]. Science in China (Series C). 1997, 40(2): 138-144.
[10]赵洪锟,等. 中国不同纬度野生大豆和栽培大豆 SSR 分析[J]. 大豆科学,2001,20(3):172-176.
[11]赵洪锟,等. 中国不同纬度野生及栽培大豆的 AFLP 分析[J]. 高技术通讯,2000,7:32-35.