

文章编号:1003-8701(2014)02-0028-05

菜豆种质资源的 ISSR 分析及特异性标记的筛选

杨 晶,张金鹏,张晓旭,毛伟东,张广臣*

(吉林农业大学园艺学院,长春 130118)

摘 要:采用 ISSR 分子标记技术对吉林省各科研院所近年审定和主栽的 36 份菜豆种质的遗传多样性进行研究。从 100 个引物中筛选出可扩增出清晰稳定条带、重复性好的 20 个引物对 36 个菜豆品种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。采用 NTSYSpc2.10 软件计算遗传相似系数,利用 UPGMA 方法进行聚类分析。结果表明:20 个引物共扩增出 87 条带,其中多态性谱带 76 条,多态性比率为 87.36%,多态性较高。36 个品种间遗传相似系数在 0.65~0.89 之间。利用 UPGMA 法可将供试菜豆分为 4 大类,聚类结果显示,菜豆种质资源间的亲缘关系与来源地的相关性较为紧密,20 号菜豆与其他品种的遗传距离相对较远。引物 840 为 20 号品种的特异性标记,在 1 100 bp 处多出一条谱带;引物 861 为 27 号品种的特异性标记,在 1 000 bp 处有一条谱带缺失;引物 846 为 31 号品种的特异性标记,在 1 050 bp 处有一条谱带缺失。3 个引物针对 20、27、31 号品种的特异性标记可将 3 个品种快速从所有供试的 36 个菜豆品种中鉴别出来。

关键词:菜豆;ISSR;亲缘关系;遗传多样性

中图分类号:S643.1

文献标识码:A

Analysis of Common Bean Germplasms Using ISSR and Screening of Specific Markers

YANG Jing, ZHANG Jing-peng, ZHANG Xiao-xu, MAO Wei-dong, ZHANG Guang-chen*

(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: ISSR marker was used to identify the genetic diversity and relationship of 36 common bean cultivars collected from the scientific research institutes in Jilin Province. 20 primers were screened out from the 100 ISSR primers. The genetic similarity coefficients were calculated with NTSYSpc2.10 and the cluster analysis was conducted by UPGMA. The results showed that 87 DNA fragments were amplified by PCR, among which 76 ones were polymorphic and the polymorphism frequency was 87.36%. The results showed that there was relatively high genetic diversity among the accessions. The values of genetic similarity coefficients among the accessions were between 0.65 and 0.89. The 36 common bean accessions were divided into four groups by UPGMA, the cluster analysis conducted with UPGMA showed that the clustering results were closely correlated with the source of common bean and the genetic distance between cultivar No.20 and other cultivars was relatively remote. The specific makers of cultivar No.20 based on primer 840 amplified an extra band in 1100bp, the specific makers of cultivar No.27 based on primer 861 amplified an absent band in 1000bp, and the specific makers of cultivar No.30 based on primer 846 amplified an absent band in 1050bp. 3 specific makers could quickly identify cultivar no.20, No.27 and No.31 from all the 36 common bean varieties.

Keywords: Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.); ISSR; Genetic relationship; Genetic polymorphism

收稿日期:2013-10-21

基金项目:吉林省科技厅重大攻关项目(10ZDGG008)

作者简介:杨 晶(1987-),女,在读硕士,主要从事菜豆遗传育种及生物技术研究。

通讯作者:张广臣,男,教授,硕士生导师,E-mail: gczh2005@126.com

菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)是重要的粮食作物和蔬菜作物,在世界范围内广泛栽培,而我国食荚菜豆的产量居世界首位^[1]。2006 年,菜豆在我国的播种面积达 59.52 万 hm²,总产量达 1 444.6 万 t,平均每 1 hm² 产量达 24 300 kg^[2]。菜豆已成为我国重要的出口农产品,在种植业结构调整、旱地农业发展以及出口创汇中具有重要作用^[3]。我国菜豆的种质资源遗传基础相对狭窄,筛选优质种质需选择遗传差异大、亲缘关系较远的亲本杂交,因此对其亲缘关系及遗传多态性深入研究对育种工作意义重大。

ISSR(Inter-Simple Sequence Repeats)是一种简单重复序列区间扩增多态性分子标记技术^[4],它结合了 SSR 和 RAPD 分子标记的优点,具有重复性好、稳定性较高和多态性高等特点^[5],已应用

于豆科作物如长豇豆^[6]、花生^[7]、苜蓿^[8]、蚕豆等^[9],以及蔬菜作物如薹菜^[10]、菜心^[11]、苦瓜^[12-13]、茄子^[14]等的亲缘关系及遗传多态性的研究,但应用于菜豆的研究较少。本试验利用 ISSR 分子标记技术对 36 份菜豆种质的遗传多样性进行了研究,以期对其种源鉴定及亲缘关系分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为吉林省各科研院所近年审定和个别吉林省主栽的菜豆品种 36 个(表 1),于 2013 年 1 月种植于吉林农业大学园艺学院人工气候箱内。待真叶展开后,从每份材料选取 5 株,取新鲜叶尖混合后于液氮中速冻,保存于 -80℃冰箱。

表 1 供试菜豆的编号、品种、来源

编号	品种	来源	编号	品种	来源
1	紫花地豆	吉林市农业科学院园艺所	19	紫将军	吉林市农业科学院园艺所
2	园丰 905	吉林市农业科学院园艺所	20	紫花皮	吉林市农业科学院园艺所
3	园丰 907	吉林市农业科学院园艺所	21	紫喙油豆	吉林省蔬菜花卉科学研究院
4	九架 10	吉林市农业科学院园艺所	22	黄玉油豆	吉林省蔬菜花卉科学研究院
5	九架 11	吉林市农业科学院园艺所	23	绿帘油豆	吉林省蔬菜花卉科学研究院
6	九架 12	吉林市农业科学院园艺所	24	吉丰油豆	吉林省蔬菜花卉科学研究院
7	九架 13	吉林市农业科学院园艺所	25	长农菜豆 1 号	长春市农业科学院园艺所
8	九架 14	吉林市农业科学院园艺所	26	长农菜豆 2 号	长春市农业科学院园艺所
9	九架 15	吉林市农业科学院园艺所	27	吉农油豆 1 号	吉林农业大学园艺学院
10	九架 16	吉林市农业科学院园艺所	28	弯脊	吉林农业大学园艺学院
11	挂满架	吉林市农业科学院园艺所	29	江源架豆	吉林农业大学园艺学院
12	五常大油豆	吉林市农业科学院园艺所	30	脊豆	吉林农业大学园艺学院
13	将军大油豆	吉林市农业科学院园艺所	31	黄金勾	吉林农业大学园艺学院
14	宽大马掌	吉林市农业科学院园艺所	32	将军一点红	吉林农业大学园艺学院
15	五常油豆	吉林市农业科学院园艺所	33	九月青	吉林农业大学园艺学院
16	江东宽	吉林市农业科学院园艺所	34	家雀蛋	吉林农业大学园艺学院
17	白云丰	吉林市农业科学院园艺所	35	吉菜豆 1 号	吉林省农科院经济植物研究所
18	油豆	吉林市农业科学院园艺所	36	吉菜豆 2 号	吉林省农科院经济植物研究所

1.2 DNA 提取和 ISSR 扩增

采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 36 份菜豆的总 DNA。ISSR-PCR 反应程序在参考文献^[15]反应体系基础上稍加改进,即反应总体积为 25 μL,其中 dNTP 浓度为 0.15 mmol·L⁻¹,引物浓度为 0.5 μmol·L⁻¹,模板 DNA45ng,Taq 酶为 1.5U,Mg²⁺ 浓度 2 mmol·L⁻¹,10 × Buffer2.5 μL,其他成分为无菌双蒸水。

试验所用 ISSR 引物序列参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的序列设计,由上海生工生物技术公司合成。选取 2 个形态差异大的菜豆品种的

DNA 样品,即紫花地豆和九架 15,用 100 个引物分别对其扩增,筛选出多态性好,稳定性高且清晰,扩增条带不少于 3 条的引物。使用梯度 PCR 仪优化所选引物的退火温度^[16],以给定引物 T_m 值为中心温度,温度梯度范围为 12℃,从自动形成的 8 个梯度中选出各引物最适退火温度。

ISSR-PCR 的产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像仪拍照记录。

1.3 扩增条带的统计与数据分析

ISSR 为显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,电泳图谱中的

每 1 个条带均被视为 1 个分子标记(marker) ,并代表一个引物的结合位点^[17]。本试验以 DNA2000 Marker 对比 ,选择清晰、可重复的谱带记录 ,同一引

物的同一位点有带记作“1” ,无带记做“0” ,用 Excel 软件构建原始的 0-1 矩阵。利用 NTSYSpc 2.10 软件计算遗传相似系数并进行聚类分析。

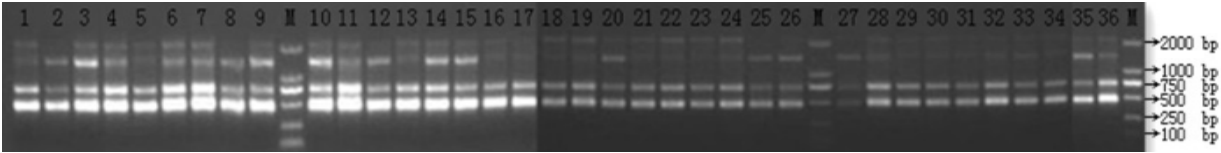


图 1 引物 823 对 36 个品种的扩增结果
M. DL2000 DNA Marker; 图 3, 4, 5 同。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增结果分析

利用 2 个表型差异较大的材料对 100 个 ISSR 引物进行了筛选 ,筛选出 20 条条带清晰 ,重复性好 ,多态性高的引物(表 2) ,通过退火温度梯度试验 ,明确了这些引物的最适退火温度 ,由表 2 可见引物的最适退火温度较其 T_m 值上下浮动 6℃

以内。利用这 20 个引物对 36 个菜豆品种进行 ISSR-PCR 扩增 ,总计获得 87 个位点 ,其中多态性位点 76 个 ,多态性百分比为 87.36% ;其中多态性信息含量最少的为引物 823 ,多态性信息含量为 50% ,多态性信息含量最多的为引物 812、引物 818 等 11 个引物 ,多态性信息含量为 100%。20 个引物扩增的条带数在 2 条至 6 条之间 ,平均为 3.8 条(表 2)。

表 2 引物退火温度及扩增结果

引物	序列(5'-3')	退火温度	T _m	扩增总带数	多态性带数	多态性(%)
812	(GA) ₈ A	57.9	52.18	4	4	100
818	(CA) ₈ G	51.8	54.59	4	4	100
823	(TC) ₈ C	51.8	54.59	4	2	50
824	(TC) ₈ G	48.9	54.59	3	3	100
834	(AG) ₈ YT	50.8	53.88	5	5	100
835	(AG) ₈ YC	53.8	56.16	4	3	75
840	(GA) ₈ YT	56.9	53.88	6	6	100
842	(GA) ₈ YG	58.8	56.16	3	3	100
846	(CA) ₈ RT	47.9	53.88	4	3	75
856	(AC) ₈ YA	56.9	53.88	6	5	83.33
857	(AC) ₈ YG	56.4	56.16	5	4	80
860	(TG) ₈ RA	53.4	53.88	5	4	80
861	(ACC) ₅	64.5	61.86	4	2	50
867	(GGC) ₅	71.0	75.52	4	3	75
880	(GGAGA) ₃	56.9	53.57	5	5	100
881	(GGGGT) ₃	61.3	61.77	6	6	100
888	BDB(CA) ₇	58.9	53.80	3	2	66.67
895	AGAGTTGGTGGTACGTCTTGAT	56.4	55.75	4	4	100
899	CATGGTGTTGGTCATTGTTCCA	63.4	58.12	4	4	100
900	ACTTCCACAGGTTAACACA	63.4	58.01	4	4	100
总数				87	76	87.36

2.2 聚类结果分析

36 个菜豆品种之间遗传相似系数最小为 0.65 ,最大的可达 0.89。聚类分析结果表明 ,在遗传相似系数为 0.68 处 ,将 36 个菜豆品种分为 4 大类。从图 2 可以看出 ,第一类群 :吉林市农业科

学院园艺所提供的 1~17 号品种 ,此类群的遗传相似系数在 0.72~0.87 之间 ,其中遗传相似系数最大的是品种 11 和品种 13 为 0.87 ;第二类群 :吉林省蔬菜花卉科学研究院提供的 21~24 号品种与吉林市农业科学院园艺所提供的 18、19 号品

种，此类群的遗传相似系数在 0.77~0.84 之间，虽然品种 18,19 来源地相同，但在相似系数为 0.79 处才可聚为一类，第三类群：长春市农业科学院园艺所提供的 25、26 号品种及吉林农业大学园艺学院提供的 27~34 号品种，此类群的遗传相似系数在

0.70~0.89 之间，第四类群：吉林省农业科学院经济植物研究所提供的 35、36 号品种及吉林市农业科学院园艺所提供的 20 号品种聚为一类，此类群的遗传相似系数在 0.71~0.81 之间，在遗传相似系数为 0.71 处，20 号品种单独聚为一类。

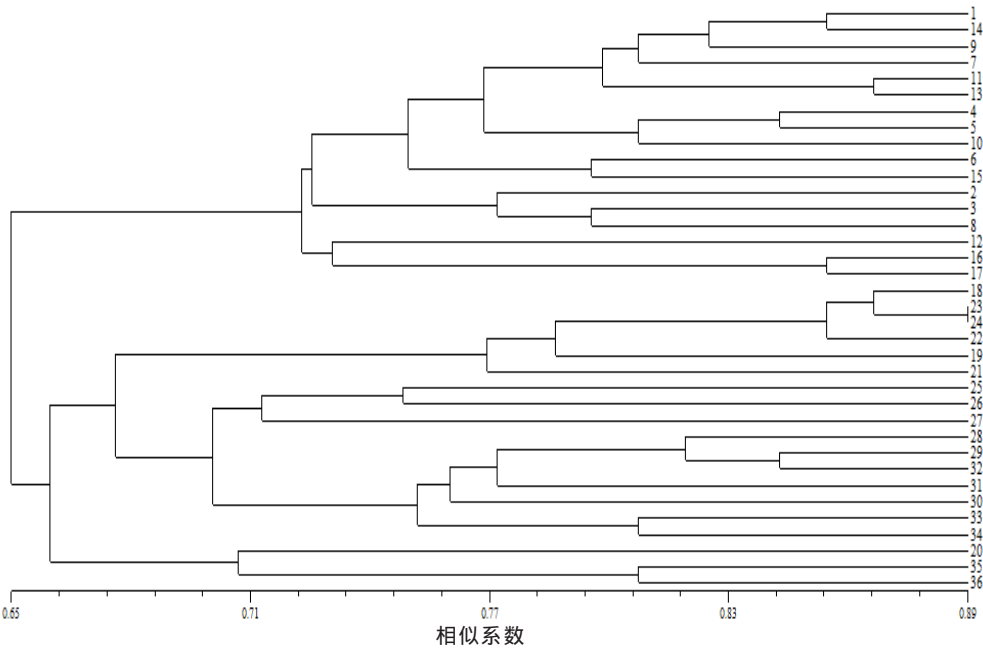


图 2 基于 ISSR 标记构建的 36 份菜豆品种的聚类树状图

2.3 菜豆品种的 ISSR 特异性标记

在所有扩增的 ISSR 条带中，部分条带为不同品种所特有，可作为 ISSR 分子标记的特征性条带，根据这些特征性条带可以将相应的品种从 36 个品种中快速辨别出来，其余材料可通过各引物扩增的差异带区分^[18]。本试验得到了以下 3 个特

异性分子标记。

2.3.1 ‘紫花皮’(编号 20)的特异性标记

图 3 为引物 840 对 36 个菜豆品种的 IS-SR-PCR 扩增，如箭头所示，与其他 35 份种质相比，20 号菜豆在 1100bp 处多出一条谱带。可以确定此为‘紫花皮’基于引物 840 的特异性标记。

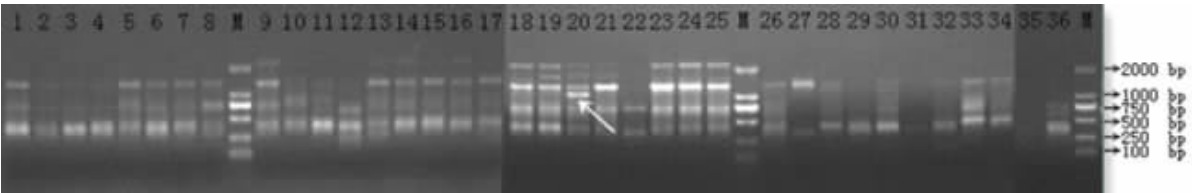


图 3 ‘紫花皮’的特异性标记

2.3.2 ‘吉农油豆 1 号’(编号 27)的特异性标记

图 4 为引物 861 对 36 个菜豆品种的扩增结果，如箭头所示，与其他 35 份种质相比，27 号菜

豆在 1 000 bp 处有一条谱带缺失。可以确定此为‘吉农油豆 1 号’基于引物 861 的特异性标记。

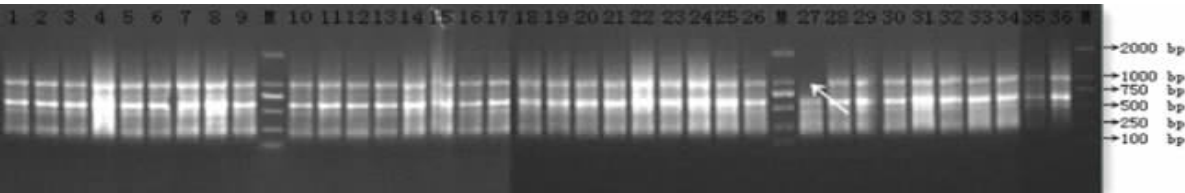


图 4 ‘吉农油豆 1 号’的特异性标记

2.3.3 ‘黄金勾’(编号 31)的特异性标记

图 5 为引物 846 对供试菜豆品种的扩增结果,如箭头所示,与其他 35 份种质相比,31 号菜

豆在 1050 bp 处有一条谱带缺失。可以确定此为‘黄金勾’基于引物 846 的特异性标记。

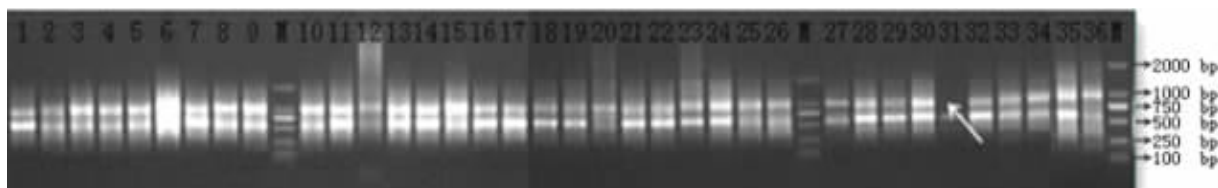


图 5 ‘黄金勾’的特异性标记

3 讨 论

3.1 菜豆的种质资源分析

对菜豆的 ISSR 标记结果分析可知,36 个菜豆品种扩增条带的多态性比率为 87.36%,但 36 个菜豆品种间的相似性系数变幅较小,可能与菜豆为闭花自花授粉作物有关^[20],可能还与吉林省的相对单一的气候条件有关,有必要进一步拓宽选种地范围,更为全面地评价菜豆的遗传多态性。

从聚类结果分析可以看出,同一来源地的菜豆大多聚为一类,这与李恩香等^[19]的研究结果一致,可能与材料所处的地理位置相似及育种目标相近有关。而 20 号菜豆品种在相似系数为 0.71 处单独聚为一类,说明与其他菜豆品种的遗传距离相对较远。1 号菜豆为矮生品种,其在相似系数为 0.86 处才可单独聚为一类(此处有问题,在 0.86 处,很多品种都是单独一类),可能因为此品种与同源地其他品种间亲缘关系较近。

3.2 菜豆品种的特异性标记

分子标记技术可以揭示不同品种之间的亲缘关系远近,可为杂交育种中亲本的选配提供极有价值的信息。由于受取材、时间、环境、人为等因素的影响,传统的形态特征很难鉴定品种及其来源^[21],分子标记技术是通过大量引物的筛选,使一些种显示出特异性条带,以作为鉴定、区别品种的依据之一^[22]。本试验采用 ISSR 分子标记技术,扩增出了 20、27 以及 31 号品种的特异性条带,可将这 3 个品种快速地从此所有供试的 36 个菜豆品种中鉴别出来。

对菜豆品种亲缘关系的研究,还应结合其形态特征、生理生化特性及其他分子标记技术等综合分析,可得到更全面的认识。

参考文献:

[1] 冯国军. 黑龙江优质菜豆种质资源研究与育种策略[D]. 东北林业大学, 2008.

[2] 农业部. 2006 年全国各地蔬菜播种面积和产量 [J]. 中国蔬菜, 2006(1): 66.

[3] 党根友. 芸豆栽培品种经济性状及种子贮藏蛋白特性研究 [D]. 西北农林科技大学, 2008.

[4] 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.

[5] 尹光晶, 宋廷宇, 吴春燕, 等. 豇豆 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. 北方园艺, 2012(12): 142-143.

[6] Tantasawat P, Trongchuen J, Prajongjai T, et al. Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 124(2): 204-216.

[7] 陈兆贵, 李建辉. 花生 ISSR 分子标记技术初步研究 [J]. 种子, 2011, 30(8): 55-58.

[8] 李红, 李波, 赵洪波, 等. 苜蓿种质资源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 草地学报, 2012, 20(1): 96-101.

[9] Terzopoulos P J, Bebeli P J. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers [J]. Field Crops Research, 2008, 108(1): 39-44.

[10] 宋廷宇, 吴春燕, 侯喜林, 等. 藿菜种质资源的 RAPD 和 ISSR 分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40 (6): 161-167.

[11] 陈兆贵, 王愈. 菜心 ISSR 分子标记技术初步研究 [J]. 种子, 2010, 29(3): 29-32.

[12] 陈禅友, 兰红, 李亚木, 等. 苦瓜种质资源 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 长江蔬菜, 2012(12): 19-22.

[13] Behera T K, Singh A K, Staub J E. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter melon (*Momordica charantia* L.) using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 115 (3): 209-217.

[14] Isshiki S, Iwata N, Khan M R. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 117(3): 186-190.

[15] 杨晶, 张广臣. 菜豆 ISSR-PCR 体系的优化与验证 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(4): 611-616.

[16] 魏鑫, 魏永祥, 王颖, 等. 平欧杂种榛 ISSR 反应体系的优化与验证 [J]. 北方园艺, 2010(4): 125-128.

可溶性糖和维生素 C 是衡量枣果营养品质的 2 个重要指标,其含量高低决定枣果营养价值和口感,进而影响枣果的商品价值。在一定氮素施用水平固定的基础上,增施磷肥和钾肥能显著提高红枣产量,同时也有利于红枣果实品质的提高。由表 3 可以看出,不同氮磷钾施肥配比对骏枣果实内在品质产生了一定影响。适量施用磷肥 (F13) 能显著提高红枣果实中可溶性糖含量,增幅为 4.0%,与不施磷处理(F12)相比差异显著。这可能是适量施磷促进红枣果实糖分的运输和积累。在肥料三要素中,钾素对果实品质的改善最为有利,有“品质元素”之称^[7],从表 3 可知,增施钾肥能提高红枣果实中 Vc 含量,F14、F15 与不施钾处理 (F13)有显著差异。

在滴灌条件下施用氮、磷、钾肥对提高红枣果实产量与改善品质有较大作用。在滴灌水量确定的条件下,氮、磷是影响产量的主要因素,钾是影响品质的主要因素。本研究仅设计氮、磷、钾施肥

配比在红枣生产上进行初步研究,综合分析表明,处理 3 效果为佳。

参考文献:

- [1] 党维勤,郑妍,晓锋,等. 谈黄土丘陵沟壑区红枣产业的发展[J]. 中国水土保持,2007(5):52-54.
- [2] 高新一,马元忠. 枣树高产栽培新技术[M]. 北京:金盾出版社,2003.
- [3] 刘国宏,谢香文,王则玉. 不同施肥水平对成龄红枣生长及产量的影响[J]. 新疆农业科学,2012,49(11):2081-2087.
- [4] 柴仲平,王雪梅,孙霞,等. 不同氮磷钾配比滴灌对灰枣产量与品质的影响[J]. 果树学报,2011,28(2):229-233.
- [5] 陈波浪,盛建东,李建贵,等. 氮、磷、钾肥对红枣产量和品质的影响[J]. 北方园艺,2011(3):1-3.
- [6] 付明胜,刘立斌,刘红梅. 陕北山旱地枣园平衡施肥技术的研究[J]. 土壤肥料,2002(3):3-6.
- [7] 高小军. 黄土丘陵区枣树平衡施肥技术[J]. 山西农业科学,2009,37(12):86.
- [8] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,2000:25-114.
- [10] 党维勤,郑妍,晓锋,等. 谈黄土丘陵沟壑区红枣产业的发展[J]. 中国水土保持,2007(5):52-54.
- [11] 高新一,马元忠. 枣树高产栽培新技术[M]. 北京:金盾出版社,2003.
- [12] 刘国宏,谢香文,王则玉. 不同施肥水平对成龄红枣生长及产量的影响[J]. 新疆农业科学,2012,49(11):2081-2087.
- [13] 柴仲平,王雪梅,孙霞,等. 不同氮磷钾配比滴灌对灰枣产量与品质的影响[J]. 果树学报,2011,28(2):229-233.
- [14] 陈波浪,盛建东,李建贵,等. 氮、磷、钾肥对红枣产量和品质的影响[J]. 北方园艺,2011(3):1-3.
- [15] 付明胜,刘立斌,刘红梅. 陕北山旱地枣园平衡施肥技术的研究[J]. 土壤肥料,2002(3):3-6.
- [16] 高小军. 黄土丘陵区枣树平衡施肥技术[J]. 山西农业科学,2009,37(12):86.
- [17] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [18] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,2000:25-114.
- [19] 于小玉,喻方圆,刘建兵,等. ISSR 在油茶品种鉴别和遗传多样性分析中的应用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2013,37(1):61-66.
- [20] 施维属,王江波,李开拓,等. 24 份甜橙种质资源的 ISSR 分析[J]. 热带作物学报,2010,31(6):902-907.
- [21] 李恩香,黄玉琴,蒋满英,等. 江西省龙牙百合种质资源遗传多样性研究[J]. 园艺学报,2010,37(5):811-816.
- [22] 缪恒彬,陈发棣,赵宏波. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2007,34(5):1243-1248.
- [23] 吴兴恩,范眸天,龚洵,等. 22 份柑橘资源的 ISSR 分析[J]. 云南农业大学学报,2006,21(1):36-41.
- [24] 罗文彬,蔡南通,邱永祥,等. 甘薯种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(10):110-114.