

绿豆种质资源的 ISSR 遗传多样性分析

赵雪英¹, 王宏民², 李 赫³, 张耀文¹

(¹山西省农业科学院作物科学研究所, 太原 030031; ²山西农业大学经济管理学院, 太谷 030801; ³山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要: 采用 10 个 ISSR 分子标记对地理来源不同的 33 份绿豆种质资源进行了遗传多样性分析。结果表明, 10 个引物在 33 份绿豆种质间共扩增出 118 个条带, 其中多态性条带 115 条, 多态性位点比例为 98.18%; 供试绿豆种质间的遗传相似系数在 0.50~0.98 之间, 平均 0.68。当遗传相似性系数为 0.682 时, 供试种质分为 4 个 ISSR 类群 (ISSR Groups, IGs), 第 I 类群包括产地为黑龙江、吉林共 9 份和河北的 1 份绿豆种质资源, 第 II 类群包括河南、山西和陕西的所有和河北的 4 份绿豆种质资源, 第 III 类群为来自泰国的 5 份绿豆抗虫资源, 第 IV 类群包括山东和内蒙古各 2 份绿豆资源; ISSR 类群划分与绿豆的地理来源存在一定相关性。

关键词: 绿豆; ISSR; 种质资源; 遗传多样性

Genetic Diversity of *Vigna radiate* Germplasm Resources by ISSR

ZHAO Xue-ying¹, WANG Hong-min², LI He³, ZHANG Yao-wen¹

(¹ Institute of Crop Science, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031;

² College of Economic and Management, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801;

³ College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstract: The genetic diversity of 33 mungbean (*Vigna radiate*) from different sources were examined using 10 ISSR-PCR. The results showed that 118 fragments were amplified with 98.18% of polymorphic ratio. The genetic similarity of all accession ranged from 0.50 to 0.98, with the average of 0.68. All accession were clustered into 4 groups (IGs) at 0.682 genetic similarity. All species from Heilongjiang and Liaoning and one variety from Hebei were grouped into IG-I. All materials from Henan, Shanxi and Shaanxi and 4 materials from Hebei were grouped into IG-II. Accessions from Thailand were grouped into IG-III. IG-IV included all materials from Shandong and Inner Mongolia. ISSR group deviation had a partial correlation with geographic origins of accession.

Key words: *Vigna radiate*; ISSR; germplasm resources; genetic diversity

绿豆 (*Vigna radiate*) 属豇豆属 (*Vigna*)、亚洲豇豆亚属 (*Ceratotropis*), 是我国种植和食用历史悠久的主要豆种。目前, 我国已收集到国内外绿豆种质资源约 6000 余份。然而, 分析我国近年育成的绿豆品种不难发现, 少数优良品种亲本被集中频繁利用, 这使我国绿豆育成品种遗传基础狭窄, 生产存在潜在的危险性。因此, 开展绿豆种质资源遗传多样

性的分析, 将我国绿豆的资源优势转化为育种优势, 无疑会对我国绿豆新品种的育成提供帮助。分子标记技术可以从本质上追寻和探讨种质资源的多样性和品种之间的相似性问题^[1]。近年来, 国内外有关绿豆及其近缘食用豆类种质资源遗传多样性的分析研究已有报道。S. V. Kumar 等^[2-3]筛选出 13 对绿豆 SSR 引物、J. G. Gwag 等^[4]筛选出 7 对绿豆 SSR

收稿日期: 2015-01-12 修回日期: 2015-04-09 网络出版日期: 2015-10-29

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151029.0952.010.html>

基金项目: 国家现代农业产业技术食用豆体系 (GARS-09-G11)

第一作者研究方向为食用豆类育种、栽培技术研究。E-mail: 809417053@qq.com

通信作者: 张耀文, 主要从事食用豆类育种、栽培技术研究。E-mail: zyw8118571@126.com

引物用于绿豆种质资源的遗传多样性分析;程须珍等^[5]利用 RAPD 标记对 16 个绿豆品系进行了遗传分析;刘长友等^[6]筛选出 6 对多态性 SSR 引物、2 对多态性 STS 引物,刘岩等^[7]利用 40 对 SSR 引物对 18 个地理来源不同的绿豆群体进行了遗传多样性分析;任红晓等^[8]利用 39 对 SSR 分子标记对中国北方 78 份绿豆品种的遗传多样性进行了分析,但由于 SSR 引物开发困难且成本较高,因此寻找更加便捷的分子标记技术将更有利于绿豆种质的遗传差异和亲缘关系分析。

ISSR 标记技术具有多态性丰富、稳定性强、成本低廉及操作简单等优点,现已广泛用于植物群体遗传多样性分析和种质鉴定等研究^[9-10],如乐云辰等^[11]利用 ISSR 分子标记技术对上海地区适应性良好的 11 个薄荷品种的遗传关系进行了分析,从分子水平阐明了其遗传多样性和相似性;关录

凡等^[12]利用 ISSR 分子标记对 8 个欧李品种的遗传变异进行了研究,赵孟良等^[13]利用 ISSR 分子标记分析了 43 份菊芋的遗传多样性。为进一步利用好我国的绿豆种质资源,本研究自加拿大英属哥伦比亚大学(University of British Columbia)公布的 ISSR 引物序列中随机选出 46 条引物^[14],对 33 份绿豆种质资源进行遗传多样性分析,以期绿豆种质资源评价体系的建立提供理论依据,同时也为我国绿豆种质资源遗传多样性的分析提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绿豆供试材料包括我国东北地区 9 份、河北 6 份、山西 2 份、陕西 4 份、河南 3 份、山东 2 份、内蒙古 2 份及泰国抗虫品种 5 份,共 33 份(表 1)。

表 1 供试绿豆材料

Table 1 List of *Vigna radiata* L. genetic stocks

编号 Code	品种(系) Varieties or strains	来源地 Origin or source	编号 Code	品种(系) Varieties or strains	来源地 Origin or source
1	嫩绿 1 号	中国黑龙江	18	横山绿豆	中国陕西
2	泰来绿豆	中国黑龙江	19	神木绿豆	中国陕西
3	白绿 6 号	中国吉林	20	府谷绿豆	中国陕西
4	白绿 8 号	中国吉林	21	A513-5-30	中国陕西
5	白绿 9 号	中国吉林	22	安绿 07-2	中国河南
6	白绿 11 号	中国吉林	23	安绿 9910	中国河南
7	白绿 522	中国吉林	24	安绿 02-1	中国河南
8	白绿 985	中国吉林	25	潍绿 9002-341	中国山东
9	大鹦哥绿 935	中国吉林	26	潍绿 8901-32	中国山东
10	保绿 956-6	中国河北	27	赤峰绿豆	中国内蒙古
11	I-159	中国河北	28	兴绿	中国内蒙古
12	冀绿 7 号	中国河北	29	B18	泰国
13	冀绿 8 号	中国河北	30	B20	泰国
14	冀绿 9 号	中国河北	31	B23	泰国
15	阳原绿豆	中国山西	32	B24	泰国
16	大同绿豆	中国山西	33	B27	泰国
17	串福-1	中国山西			

1.2 植物总 DNA 的提取

从每份绿豆材料中取 10 粒置于水中,浸泡 12h 后恒温培养箱中进行催芽,采用改良的 CTAB 法提取绿豆芽 DNA,然后于 4℃ 冰箱中保存、备用。

1.3 PCR 扩增及电泳检测

PCR 扩增反应体系 (20 μ L) 如下: Template DNA (50 ng/ μ L) 2 μ L, 10 \times Taq Buffer (with $MgCl_2$) 2 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 1.6 μ L, ISSR Primer (10 μ mol/L) 1 μ L, ddH₂O 13.2 μ L, Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.2 μ L。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 52 ~ 55℃ (不同引物退火温度不同) 复性 50 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 再延伸 10 min, 扩增结束后, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 110V/300A 电泳 0.5 ~ 1 h, 最后用 Bio-Rad 凝胶成像仪 Gel Doc XR 拍照, 保存并记录数据。引物自加拿大英属哥伦比亚大学 (University of British Columbia) 公布的 ISSR 引物序列中随机选出 46 条^[14], 由上海生物工程技术公司合成。以不同地理来源 9 份绿豆种质 DNA 为模板, 经 PCR 扩增后, 选取条带清晰、稳定、重复性好、多态性丰富的 10 个引物, 用于所有供试绿豆种质资源的 ISSR-PCR 扩增。

1.4 数据分析

同一条引物所扩增的产物电泳迁移位置相同的

被认为是同一位点, 用数字 1 和 0 分别表示供试绿豆材料某一位点有无产物, 有带的记作 1, 无带的记作 0, 形成 0、1 矩阵。用 NTSYS-pc2.1 软件计算供试绿豆种质两两间的遗传相似系数, 利用 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 引物对 33 份绿豆的扩增结果

从 46 个 ISSR 引物中筛出 10 个多态性好、条带清晰、重复性好的引物, 用于 33 份绿豆种质资源的 ISSR-PCR 分析。结果如表 2、图 1、图 2 所示, 由表 2 可见, 不同引物在供试绿豆样本间扩增条带为 7 ~ 19 条, 平均每个引物扩增 11.8 条, 扩增产物大小介于 150 ~ 1500 bp 之间。其中引物 UBC888 扩增条带数最多, 为 19 条, 引物 UBC841 扩增条带数最少, 仅 7 条。10 个引物共扩增出 118 条带, 其中多态性条带为 115, 多态性位点比率为 98.18%。除引物 UBC840 和 UBC888 外, 其余引物的多态性比例均为 100%。图 1 和图 2 为引物 UBC808 和引物 UBC835 扩增图谱。

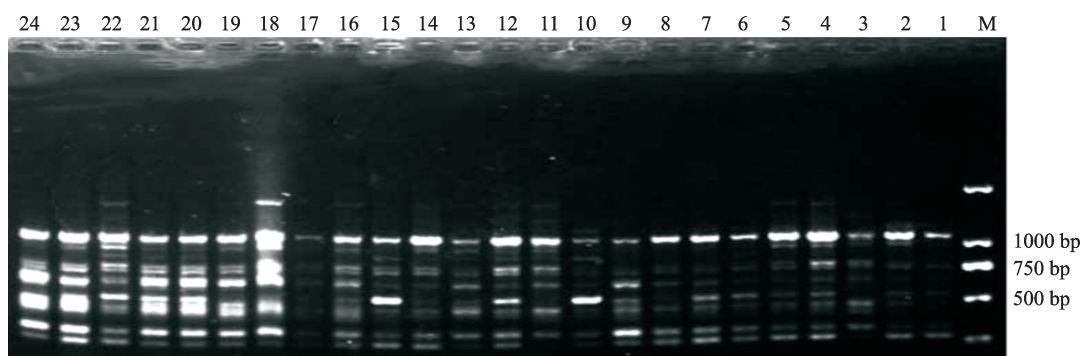
表 2 ISSR 引物扩增结果及多态性

Table 2 Amplification result and polymorphism of 10 ISSR primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence 5' → 3'	退火温度 (℃) Annealing temperature	扩增条带数 No. of bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性百分率 (%) Percentage. of polymorphic bands
UBC808	(AG) ₈ C	52	13	13	100.00
UBC810	(GA) ₈ T	52	11	11	100.00
UBC817	(CA) ₈ A	52	13	13	100.00
UBC834	(AG) ₈ YT	55	12	12	100.00
UBC835	(AG) ₈ YC	55	12	12	100.00
UBC840	(GA) ₈ YT	55	13	12	92.31
UBC841	(GA) ₈ YC	55	7	7	100.00
UBC849	(GT) ₈ YA	55	9	9	100.00
UBC864	(ATG) ₆	52	9	9	100.00
UBC888	BDB(CA) ₇	55	19	17	89.47
平均 Average			11.80	11.50	98.18

B 代表 C, G, T; D 代表 A, G, T; Y 代表 C, T

B: C, G, T; D: A, G, T; Y: C, T



1 ~ 24: 样品编号; M: DL2000 DNA marker, 下同
1 - 24: No. of samples, M: DL2000 DNA marker, the same as below

图 1 引物 UBC808 扩增图

Fig. 1 Amplification products of primer UBC808

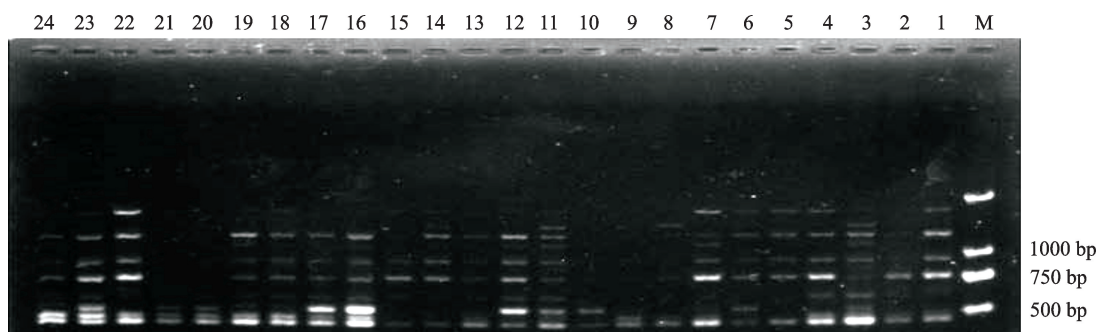


图 2 引物 UBC835 扩增图

Fig. 2 Amplification products of primer UBC835

2.2 33 份绿豆的遗传多样性分析

将 33 个供试绿豆种质按地理来源分为 9 个群体, 即黑龙江群体、吉林群体、河北群体、山西群体、

陕西群体、河南群体、山东群体、内蒙古群体以及来自国外的泰国群体, 各群体内及群体间的平均遗传相似系数见表 3。由表 3 可以看出, 不同地理来源

表 3 基于 ISSR 引物计算的 33 份绿豆样品的遗传距离

Table 3 Genetic distances of 33 *Vigna radiata* materials by ISSR

	黑龙江 Heilongjiang	吉林 Jilin	河北 Hebei	山西 Shanxi	陕西 Shaanxi	河南 Henan	山东 Shandong	内蒙古 Inner Mongolia	泰国 Thailand
黑龙江	0.835								
吉林	0.751	0.954							
河北	0.707	0.716	0.737						
山西	0.682	0.670	0.684	0.772					
陕西	0.688	0.692	0.745	0.730	0.794				
河南	0.654	0.659	0.723	0.719	0.783	0.747			
山东	0.602	0.600	0.573	0.588	0.593	0.591	0.769		
内蒙古	0.672	0.653	0.617	0.642	0.609	0.608	0.783	0.796	
泰国	0.613	0.645	0.650	0.654	0.668	0.653	0.616	0.604	0.830

群体内各绿豆种质间的平均遗传相似系数吉林最大,为 0.954;河北最小,为 0.737,依次为吉林 > 黑龙江 > 泰国 > 内蒙古 > 陕西 > 山西 > 山东 > 河南 > 河北,表明相同地理来源各种质间遗传分化程度明显不同,其中河北材料分化最大。

从表 3 还可以看出,不同地理来源绿豆群体间的平均遗传相似系数介于 0.573 ~ 0.783 之间,其中山东与内蒙古群体间的平均遗传相似系数最大(0.783),同源性最高;河北与山东群体间的平均遗传相似系数最小(0.573),亲缘关系最远,表明不同地理来源的群体间具有较明显的遗传分化。

2.3 33 份绿豆样品的聚类分析

根据 ISSR-PCR 扩增结果计算的遗传相似系数,构建 UPGMA 聚类图(图 3),对 33 份不同地理

来源的绿豆样品进行聚类分析。结果表明,供试 33 个绿豆样品间的遗传相似系数分布在 0.50 ~ 0.98 之间,平均为 0.68。当遗传相似性系数为 0.682 时,供试 33 个绿豆种质分为 4 个 ISSR 类群(IGs, ISSR Groups)。第 I 类群包括 10 份种质,分别为来自黑龙江和吉林的全部 9 份资源和河北的 1 份资源保绿 956-6;第 II 类群包括 14 份种质,分别为来自河南、山西和陕西的全部资源和河北的 4 份资源;第 III 类群包括 5 份种质,均为来自泰国的抗虫资源;第 IV 类群包括 4 份资源,分别来自山东的 2 份和内蒙古的 2 份。其中陕西府谷和 A513-5-30 两个品种之间的遗传相似系数最大为 0.98,显示它们具有较近的遗传距离;河北的保绿 956-6 和山东潍坊 8901-32 之间的遗传相似系数最小为 0.50,它们彼此存在较大的遗传差异。

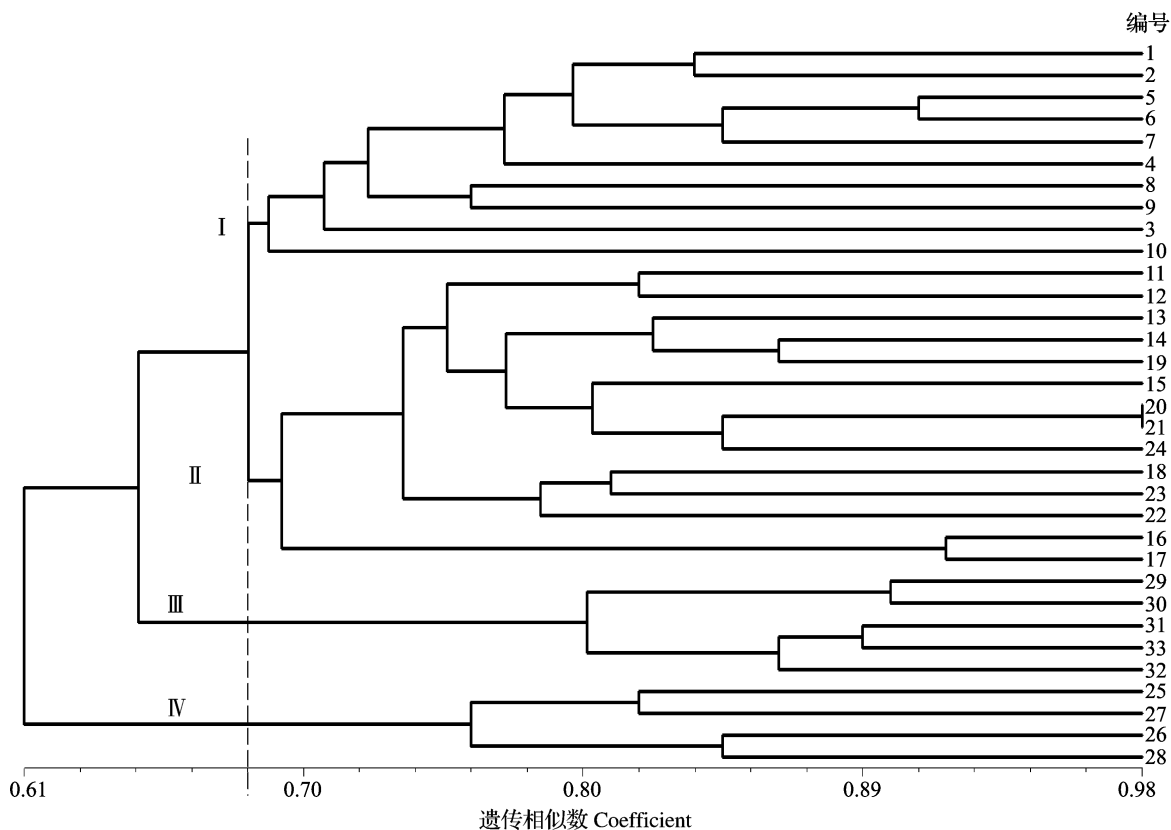


图 3 33 份绿豆的 ISSR-UPGMA 聚类图

Fig. 3 Dendrogram of the 33 *Vigna radiate* cultivars by the unweighted pair group method with Arithmetic Mean (UPGMA) using the ISSR cluster

2.4 33 份绿豆种质资源的主成分分析

利用 NTSYSpc2.1 对 33 个绿豆种质资源进行主成分分析,绘制三维主成分分析图(图 4)。第 1

主成分的贡献率为 14.02%,第 2 主成分的贡献率为 13.20%。该图将 33 个绿豆资源分为 2 个部分,第 1 个部分是 28 个供试的非抗虫品种,第 2 个部分

是供试的 5 个抗虫品种。该结果与 UPGMA 聚类分析的结果基本一致。

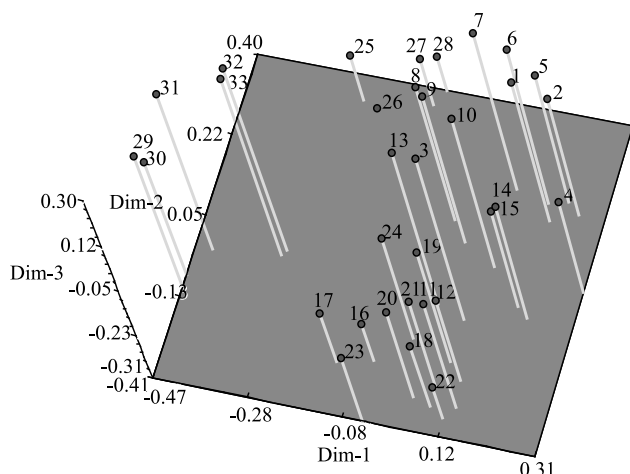


图 4 33 个绿豆种质资源的三维 PCA 分析图

Fig. 4 Three-dimension principal correspondence analysis of 33 *Vigna radiata*

3 结论与讨论

ISSR 标记具有可检测基因组多位点差异的特性,是分析作物种质资源遗传多样性的一种有效手段。本试验利用筛选出的 10 条 ISSR 引物对 33 份绿豆进行了遗传多样性分析,共检测到 118 个位点,多态性位点比例达 98.18%,说明供试绿豆基因组 DNA 遗传差异明显,多态性高,该分子标记技术是一种有效且可靠的用于绿豆种质资源间遗传多样性分析的技术和手段,可较好地揭示参试种质的遗传多样性。这与倪穗等^[15]利用 ISSR 技术分析 20 个茶花品种遗传关系的 ISSR 分析的研究结论基本一致。

供试 33 个绿豆种质的聚类分析结果表明,第 I 类群除 1 个河北品种外,其余均为东北地区的品种,第 II 类群全部为中西部地区的品种,第 III 类群为泰

国品种,第 IV 类群除 2 个山东品种外,均为北部内蒙古品种,可见 ISSR 类群的划分与绿豆的地理来源有一定的相关性。

参考文献

- [1] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 24(5): 613-616
- [2] Kumar S V, Tan G, Quah S C, et al. Isolation of microsatellite markers in mungbean, *Vigna radiata* [J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2: 96-98
- [3] Kumar S V, Tan G, Quah S C, et al. Isolation and characterization of seven tetranucleotide microsatellite loci in mungbean, *Vigna radiata* [J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2: 293-295
- [4] Gwag J G, Chung J W, Chung H K, et al. Characterization of new microsatellite markers in mungbean, *Vigna radiata* (L.) [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6: 1132-1134
- [5] 程须珍, 王素华, 吴绍宇, 等. 绿豆抗虫基因 PCR 标记的构建与应用[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1534-1539
- [6] 刘长友, 程须珍, 王素华, 等. 用于绿豆种质资源遗传多样性分析的 SSR 及 STS 引物的筛选[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 298-302
- [7] 刘岩, 程须珍, 王丽侠, 等. 基于 SSR 标记的中国绿豆种质资源遗传多样性研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(20): 4197-4209
- [8] 任红晓, 程须珍, 徐东旭, 等. 应用 SSR 标记分析中国北方名优绿豆的遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(2): 395-399
- [9] Kumar S V, Tan S G, Quah S C, et al. Isolation and characterization of seven tetranucleotide microsatellite loci in mungbean, *Vigna radiata* [J]. Molec Ecol Notes, 2002, 2: 293-295
- [10] Kumar S V, Tan S G, Quah S C, et al. Isolation of microsatellite markers in mungbean, *Vigna radiata* [J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2: 96-98
- [11] 乐云辰, 吴亚妮, 张艳玲, 等. 不同薄荷品种遗传关系的 ISSR 分析. 上海交通大学学报: 农业科学版 [J]. 2008, 26(1): 29-32
- [12] 关录凡, 王鑫, 王秋玉. 利用 ISSR 分子标记检测欧李不同品种间的差异[J]. 森林工程, 2009, 25(3): 17-22
- [13] 赵孟良, 孙雪梅, 王丽慧, 等. 43 份菊芋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, 2015, 43(9): 1-8
- [14] 周延青. DNA 分子标记在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 143-161
- [15] 倪穗, 李纪元, 王强. 利用 ISSR 技术分析 20 个茶花品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 林业科学研究, 2009, 22(5): 622-629