

栽培大豆品种间 RAPD 标记的多态性 分析及聚类分析^{*}

张志永^{①②} 陈受宜 盖钧镒 胡蕴珠 智海剑

(中国科学院遗传所^①, 北京 100101) (南京农业大学^②, 南京 210095)

摘 要

应用从 6000 多份大豆种质资源中筛选出的 21 个抗大豆花叶病毒病的品种或品系及 7 个感病的品种或品系, 选用 20 个随机引物, 对总 DNA 进行了随机扩增。有 18 个引物扩增得到了稳定的 RAPD 图谱, OPH-06 和 OPH-10 未能扩增到 RAPD 产物。扩增出的片段分子量在 0.6-4.6Kb 之间。随机引物扩增出的条带数在 5-17 条之间, 共扩增出 165 个条带, 品种间相同的条带有 104 个, 多态性条带有 61 个, 多态性条带占 37%。这 20 个引物可分为①无扩增产物的引物; ②扩增产物无多态性的引物; ③扩增产物多态性低于 15% 的引物; ④扩增产物多态性在 15%-30% 之间的引物; ⑤扩增产物多态性在 30%-50% 之间的引物; ⑥扩增产物多态性超过 50% 的引物。依据遗传距离进行聚类分析的结果表明, 这些材料可以明确地聚成 5 组。各组内姊妹系衍生出的品种或品系首先聚在了一起, 其次有一定血缘关系的聚在了亚组里。另外, 各组内或亚组内的品种或品系在地理分布上具有一定相关性。

关键词 栽培大豆; RAPD 多态性; 聚类分析

引 言

针对作物的病虫害防治, 一般认为利用品种抗性是最为经济有效的。拓宽品种的遗传基础, 在品种中积聚抗性基因将有助于形成持久抗性。而达到此目的首先应明确某类特异种质资源各种材料之间的关系。传统的技术和方法多数是从系谱分析、地理来源及形态学观察等方面入手, 不能进行精确的基因鉴定。

采用快捷而可靠的方法对种质资源材料进行分析, 明确其间的遗传学关系, 对于资源

* 收稿日期: 1997-06-25

This paper was received on June 25, 1997.

利用,遗传学研究及育种实践均有重要意义。近年来分子标记的提出及应用大大促动了这方面的工作。很多研究者应用多种分子标记对不同物种进行了系统进化,系谱分析和遗传变异性分析。

K. G. Lark 等 (1992, 1993), L. Terry 等 (1995),应用 RAPD对大豆进行了系统进化及亲缘关系方面的研究,证实了 RAPD方法在这方面应用的可行性。A. Rao- Arelli 等 (1994)对 29份抗大豆孢囊线虫的资源材料及两份感病品种,应用 RFLP分析的结果,分析了不同抗源间的遗传关系及遗传变异性。H. T. Skorupska 等 (1993)对 108份熟期组范围从 III - IX 的美国品种,应用 RFLP分析的结果,对熟期组内及组间的遗传变异性进行了分析。

盖钧镒和胡蕴珠等 (1989, 1995)对我国约六千份大豆资源进行了大豆花叶病毒病 (SMV)抗性的鉴定,结果表明黄淮、长江下游等地区资源的抗性优于其他地区。但整体上抗源很少,尤其是广谱抗源更为罕见。本文旨在对他们已鉴定出的抗源材料及一些感病品种,应用 RAPD技术,进行遗传变异性分析。以期大豆抗花叶病毒病育种工作中的亲本选配提供参考信息,为制作分子标记连锁图谱及抗性基因的分子标记研究做些基础性工作。同时验证 RAPD方法用于品种间遗传变异性分析的适用性。

材料和方法

1 采用的品种或品系: 共有 28个品种或品系,其中 21个经专化抗性鉴定表现抗一个以上的病毒株系,其余 7个为感病品种或品系,如苏协 18- 6 苏协 1号、南农 1138- 2 南农 73935 南农 8723 中豆 24和淮豆 2号。

2 DNA提取: 将上述 28份材料于 1995年 3月 14日播种在中国科学院遗传所实验温室内,待其第三个三出复叶长出后,采摘叶片,液氮处理后置 - 70℃下保存待用。参照“分子克隆”介绍的方法提取 DNA。

3 RAPD反应: 20个 10- mer随机引物购自 Operon公司,所用引物的编号为 OPH- 01- OPH- 20,其碱基序列参见 Operon 10- mer kits' product information。所用随机引物的 G+ C含量为 60- 70%。扩增反应在 25 μ l 体积中进行,其中模板 DNA 2 μ l (5ng / μ l),随机引物 2 μ l (50 μ mol/L), 2.5mM dNTPs 2 μ l, 10xbuffer 2.5 μ l, Taq DNA聚合酶 1u, 超纯水 16.5 μ l,上面覆盖 20- 30 μ l液体石蜡。热循环条件为: 94℃变性 1分钟, 35℃退火 2分钟, 72℃延伸 2分钟, 5个循环。接着 94℃ 0.5分钟, 35℃ 1分钟, 72℃ 1.5分钟, 40个循环,然后 72℃延伸 10分钟。扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶, K TAE缓冲液中电泳,经 EB染色,在紫外灯下观察结果并照相。

结果与分析

1 材料来源上述 28个品种来自美、韩及中国南北方,地理分布范围较广泛。我国的品种以山东、江苏的为主。如下表所示:

表 1 品种或品系的来源、产地、代码及泳道序号

| Table 1 The breeding methods, origins, codes and lane numbers of varieties or lines | | | | | | | | | |
|---|----|------------|--------|------|----------|----|---------------|--------|------|
| 泳道 序号 | 代码 | 品种名称 | 产地 | 来源 | 泳道 序号 | 代码 | 品种名称 | 产地 | 来源 |
| 28 | aa | Davis | 美国 | 引入 | 14 | oo | NJR44- 1 | 中国江苏 | 杂交选育 |
| 27 | bb | 南农 1138- 2 | 中国江苏 | 系选 | 13 | pp | 苏协 1号 | 中国江苏 | 杂交选育 |
| 26 | cc | 诱变 30 | 中国北京 | 杂交诱变 | 12 | qq | 苏协 18- 6 | 中国江苏 | 杂交选育 |
| 25 | dd | 科丰 1号 | 中国北京 | 系选 | 11 | rr | NJR25- 8 | 中国江苏 | 杂交选育 |
| 24 | ee | PI96983 | 美国(韩国) | 引入 | 10 | ss | NJR32- 8 | 中国江苏 | 杂交选育 |
| 23 | ff | 溧水中子黄豆乙 | 中国江苏 | 地方品种 | 9 | tt | 丰收黄 | 中国山东 | 地方品种 |
| 22 | gg | 南农 8723 | 中国江苏 | 杂交选育 | 8 | uu | 兗黄 1号 | 中国山东 | 杂交选育 |
| 21 | hh | 中豆 24 | 中国湖北 | 杂交选育 | 7 | vv | 7206- 9- 1- 1 | 中国山东 | 杂交选育 |
| 20 | ii | Kwanggyo | 韩国 | 引入 | 6 | ww | 历城小粒青 | 中国山东 | 地方品种 |
| 19 | jj | 淮豆 2号 | 中国江苏 | 杂交选育 | 5 | xx | 诱变 16 | 中国北京 | 杂交诱变 |
| 18 | kk | 邳县茶豆 | 中国江苏 | 地方品种 | 4 | yy | PI486355 | 美国(韩国) | 引入 |
| 17 | ll | 丰县红管豆 | 中国江苏 | 地方品种 | 3 | zz | 齐黄 1号 | 中国山东 | 系选 |
| 16 | mm | 美- 2 | 美国 | 引入 | 2 | θθ | 南农 73935 | 中国江苏 | 杂交选育 |
| 15 | nn | Buffalo | 美国 | 引入 | 1 | δδ | 山东 7222 | 中国山东 | 杂交选育 |

2 RAPD图谱分析

选用的 20个随机引物,有 18个引物扩增得到了稳定的 RAPD图谱, OPH- 06和 OPH- 10未能扩增到 RAPD产物。此结果与惠东威等(1994)采用这套引物对大豆属内不同种的扩增结果一致,扩增出的片段分子量在 0. 6- 4. 6Kb之间。扩增结果分析如下表:

表 2 20个引物对 28个品种(品系) DNA扩增的 RAPD图谱分析

| Table 2 The analysis of RAPD patterns with 20 random primers | | | | | | | | | |
|--|-------------|---------------|------------|---------------|---------|-------------|---------------|------------|---------------|
| 引物 | 扩增出的 条带数 | 品种间相同 的条带数 | 多态性 条带数 | 多态性条带 所占比例 | 引物 | 扩增出的 条带数 | 品种间相同 的条带数 | 多态性 条带数 | 多态性条带 所占比例 |
| OPH- 01 | 12 | 9 | 3 | 25% | OPH- 11 | 17 | 4 | 13 | 76% |
| OPH- 02 | 17 | 6 | 11 | 63% | OPH- 12 | 12 | 5 | 7 | 58% |
| OPH- 03 | 6 | 6 | / | / | OPH- 13 | 8 | 7 | 1 | 13% |
| OPH- 04 | 9 | 7 | 2 | 22% | OPH- 14 | 7 | 5 | 2 | 29% |
| OPH- 05 | 8 | 5 | 3 | 38% | OPH- 15 | 8 | 7 | 1 | 13% |
| OPH- 06 | / | / | / | / | OPH- 16 | 8 | 5 | 3 | 38% |
| OPH- 07 | 11 | 3 | 8 | 73% | OPH- 17 | 7 | 6 | 1 | 14% |
| OPH- 08 | 5 | 4 | 1 | 20% | OPH- 18 | 7 | 6 | 1 | 14% |
| OPH- 09 | 10 | 8 | 2 | 20% | OPH- 19 | 8 | 6 | 2 | 25% |
| OPH- 10 | / | / | / | / | OPH- 20 | 5 | 5 | / | / |

随机引物扩增出的条带数在 5- 17条之间 ,共扩增出 165个标记 .品种间相同的标记有 104个 ,多态性标记有 61个 ,多态性标记占 37%。这 20个引物可分为①无扩增产物的引物: OPH- 06, OPH- 10;②扩增产物无多态性的引物: OPH- 03, OPH- 20,如图 1所示;③扩增产物多态性低于 13%的引物: OPH- 13, OPH- 15, OPH- 17, OPH- 18;④扩增产物多态性在 13% - 30% 之间的引物: OPH- 01, OPH- 04, OPH- 08, OPH- 09, OPH- 14, OPH- 19,如图 2所示;⑤扩增产物多态性在 30% - 50% 间的引物: OPH- 05, OPH- 16;⑥扩增产物多态性超过 50% 的引物: OPH- 02, OPH- 07, OPH- 11, OPH- 12,如图 3所示

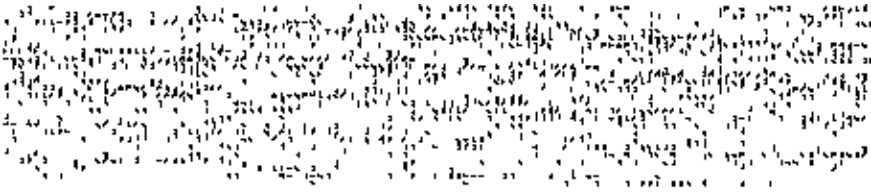


图 1 用引物 OPH- 03扩增的 RAPD图谱

Fig. 1 The RAPD pattern with primer OPH- 03

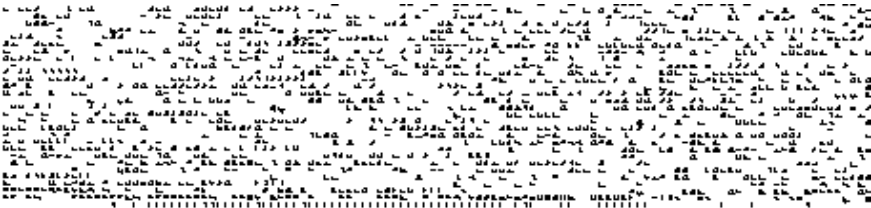


图 2 用引物 OPH- 13扩增的 RAPD图谱

Fig. 2 The RAPD pattern with primer OPH- 13



图 3 用引物 OPH- 07扩谱的 RAPD图谱

Fig. 3 The RAPD pattern with primer OPH- 07

3 利用 RAPD标记提供的遗传距离信息进行聚类分析

3.1 品种 (品系)间的遗传距离

参照 Nei M和 W. H. Li(1979)提出的相似性公式计算材料间在分子水平上的遗传距离。设 N_x 为在材料 x 中某一引物扩增出的条带数 , N_y 为在材料 y 中同一引物扩增出的

条带数, N_{xy} 为在 x 和 y 中扩增出片段长度相同的条带数。则这两个材料之间的遗传相似性可以表示为 $S_{xy}= 2N_{xy}/(N_x+ N_y)$,两个材料间的遗传距离则为 $GD= 1- S_{xy}$,利用上式对 28个材料进行了相互间遗传距离的计算。RAPD结果转换为原始数据的方法为: 每一个扩增出的条带记为 1,而某些品种 (品系)在相应的片段长度处未扩增出条带,则在相应的位置记录为 0。遗传距离的全矩阵列于表 3。

3.2 聚类分析

依据遗传距离矩阵,应用最短距离聚类法,最长距离聚类法,类平均法,重心法,中间距离法分别进行了聚类分析,所用聚类分析程序包 Cluster II由南京农业大学大豆所编制并提供。不同聚类方法所得的结果相似,趋势相同。反映出了品种或品系间的亲缘关系,地理分布等方面的关系。这里仅对应用较普及的类平均法聚类结果予以分析。

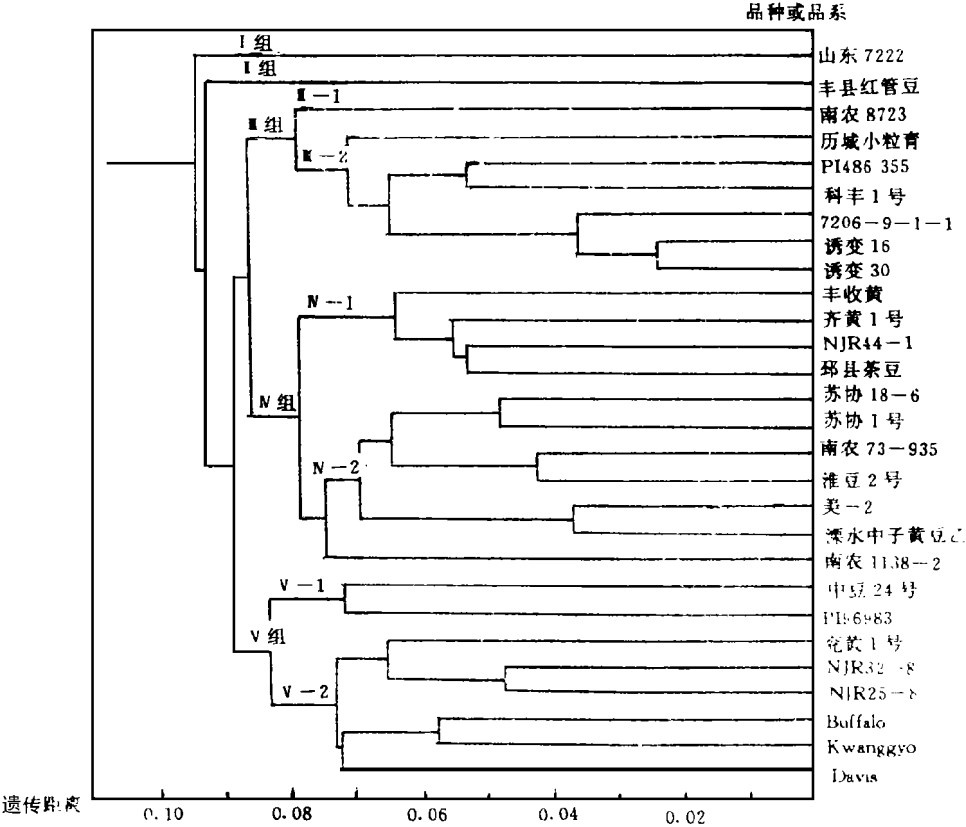


图 4 类平均法聚类图

Fig. 4 The results of cluster analysis

从聚类图可以看出,在遗传距离为 0.085处,可以明确地聚成 5组,除山东 7222和丰县红管豆与所有材料的遗传距离均较大,单独成组外,其余的可以聚成 3组,在遗传距离为 0.075处,这 3个组又可以分别再分为 2个亚组 (如图 4所示):

I 组: 山东 7222; II 组: 丰县红管豆; III - 1: 南农 8723; III - 2: 历城小粒青; PI486355, 科丰 1号, 7206- 9- 1- 1, 诱变 16, 诱变 30; IV - 1: 丰收黄, 齐黄 1号, NJR44- 1, 邳县茶

豆;IV - 2 苏协 18- 6, 苏协 1 号, 南农 73935, 淮豆 2 号, 美 - 2, 溧水中子黄豆乙, 南农 1138- 2; V - 1 中豆 24, PI96983; V - 2 充黄 1 号, NJR32- 8, NJR25- 8, Buffalo, Kwanggyo, Davis

各组内姊妹系衍生出的品种或品系首先聚在了一起,如Ⅲ组的诱变 16和诱变 30,Ⅳ组中的苏协 1号和苏协 18- 6,V 组中的 NJR25- 8和 NJR32- 8;其次有一定血缘关系的聚在了亚组里,如Ⅳ- 2中的苏协 18- 6,苏协 1号,南农 73935和南农 1138- 2均具有奉贤穗稻黄的血缘;V - 2中的 NJR25- 8 NJR32- 8有 Kwanggyo 的血缘,且抗性表现与 Kwanggyo 相同。另外,各组内或亚组内的品种或品系在地理分布上具有一定相关性。如Ⅲ组中的科丰 1号,诱变 16和诱变 30均来自北京,历城小粒青,7206- 9- 1- 1均来自山东;Ⅳ- 1中的丰收黄和齐黄 1号来自山东, NJR44- 1具有山东 7426的血缘,山东 7426是丰收黄的后代,邳县茶豆源自山东附近;Ⅳ- 2中的 7个品种除了美 2外均来自江苏;V - 2中的 Buffalo, Davis 均来自美国。针对抗性表现,对 SMV 扩谱最广泛的 3个品种:山东 7222,科丰 1号,溧水中子黄豆乙分别归属于不同的组,表明它们的遗传基础不同,可能携带有不同的抗性基因。而 7个感病品种却有 5个聚在了Ⅳ- 2中,这可能与亲缘关系及地理上的分布有关。

讨 论

RAPD 技术方法简单,耗费少,效率高,已应用于生物学研究的各个领域。如:染色体组图谱分析 (William 等, 1990); 基因定位 (Paran 等, 1991; Martin 等 1991; Upoff 等, 1992); 染色体标定 (Quiros 等, 1991), 品种鉴定 (Hu 等 1991), 遗传变异性分析及系统进化研究 (K. G. Lark 等, 1992, 1993; I. Terry 等, 1995; T. Millan 等, 1996)。一般而言,理想的标记应具备以下几个特点:①高度的多态性;②容易使用;③数目丰富;④确切可靠。对于 RAPD,前三点是其引起人们注意并予以广泛应用的突出属性。至于可靠性, RAPD 确实很敏感,反应体系及条件稍有变化,便会对其结果产生影响。所以应保持 DNA 模板浓度,引物浓度, Mg^{2+} 浓度,热循环反应条件相同, Taq DNA 聚合酶批次一致。就本实验而言,试验均进行 2- 3 次重复,重复性很好,结果是可靠的。

就某类特异种质资源,在栽培品种(或品系)间,应用 RAPD 进行遗传变异性分析,这方面的报道很罕见。本研究聚类分析结果与亲缘关系,地理分布的吻合性,证实了 RAPD 用于种内品种间遗传变异性分析的可行性。

利用聚类分析不同组间的,遗传距离较大的广谱抗源做为杂交亲本,利于拓宽遗传基础,在育成品种中积聚抗性基因,形成持久抗性。而利用不同组间的遗传距离较大同时抗性表现差异又大的材料做为杂交亲本,配制杂交组合,形成的分离群体中,分子标记多态性表现的水平将较高,利于构建分子标记框架图谱,定位抗性基因。

参 考 文 献

[1] 陈洪, 朱立煌, 徐吉臣, 陈美玲, 1995, RAPD 标记构建水稻分子连锁图, 植物学报, 37(9): 677- 684

[2] 陆朝福, 朱立煌, 1995, 植物育种中的分子标记辅助选择, 生物工程进展, Vol. 15, No. 4: 11- 17

- [3] 盖钧镒, 胡蕴珠等, 1989, 大豆资源对 SMV 株系抗性的鉴定, 大豆科学, Vol. 8, No. 4 322- 329
- [4] 胡蕴珠等, 1995, 大豆花叶病毒广谱抗源的鉴定与选育, 东北大豆种质资源拓宽与改良, 王金陵等主编, 黑龙江科学技术出版社, 174- 180
- [5] J 萨姆布鲁克等著, 1992, 分子克隆实验指南 (第二版), 科学出版社
- [6] A. P. Rao- Arelli et al., 1994, DN A fingerprinting of soybean accessions with resistance to soybean cyst nematode, Soybean Genetics Newsletter, 21 212- 218
- [7] Caetano- Anoles, G., B. J. Bassam, and P. M. Gresshoff. 1991, DNA amplification Fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technol 9 553- 557
- [8] Hu, J., and C. F. Quiros. 1991, Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports. 10 505- 511
- [9] Lark, K. G., J. Evans, F. Basha, R. Bogden, R. Copeland, R. Ellison, D. Horne K. Lee, K. McDonald, J. Piersonald, J. Pierson, W. Schuster, P. Wilhelm and Y. Yu. 1992, Molecular Phylogeny as a tool for soybean breeding. Soybean Genetics Newsletter, 19 174- 181
- [10] Lark, K. G, J. Evans, P. Wilhelm, S. Aktinson, M. Christensen, B. Crockett, B. Dunford, C. Jones, S. Mendenhall, T. Messick, C. Prout, P. E. Solomon, M. Stevens, I. Terry, C. Walker, C. L. Wong R. Ellison. 1993, Molecular Phylogeny as a tool for soybean breeding II, Soybean Genetics Newsletter 20 197- 201
- [11] Martin, G. B., J. G. K. Williams, and S. D. Tanksley. 1991, Rapid identification of markers linked to a Pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near- isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 2336- 2340
- [12] Michelmore, R. W., I. Paran, and R. V. Kesseli. 1991, Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. PNAS. 88 828- 832
- [13] Terry, I., K. G. Lark, L. Allphin, M. Stevens, A. J. Angilau, M. Gay, L. Harrison, B. Huff, P. Magasich, G. Miller, G. Nishimoto, C. Rhead, Q. Sahratian and J. Whitehead, J. A. Whitehead. 1994, Molecular Phylogeny as a tool for soybean breeding III, Soybean Genetics Newsletter. 21 245- 256
- [14] Terry, I. et al., 1995, Molecular phylogeny as a tool for soybean breeding IV, Soybean Genetics Newsletter, Vol. 22 251- 259
- [15] Welsh, J. and M. McClelland. 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18 7213- 7218
- [16] Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990, DN A polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 6531- 6535

POLYMORPHISMS AND CLUSTER ANALYSIS OF CULTIVATED SOYBEANS WITH RAPD

Zhang Zhiyong Chen Shouyi

(*Institute of Genetics, Academia Sinica, 100101*)

Gai Junyi Hu Yunzhu Zhi Haijian

(*Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, 210095*)

Abstract

In present study, twenty- one soybean accessions with host resistance to different SMV strains and 7 susceptible cultivars or lines were analysed for their genetic diversity using RAPD. Twenty 10- mer random primers were used to amplify the total DNA from 28 soybean accessions. The results showed that reproducible amplified products could be got with 18 primers. The length of amplification products are between 0.6- 4.6kb. Totally 165 RAPD bands were identified, of which, 104 bands were common in all the accessions and 61 bands were polymorphic between any two accessions. The polymorphic bands accounted for 37% of the total amplified bands. These primers could be divided into six groups. 1) no amplification products; 2) no polymorphisms between amplification products; 3) polymorphic bands accounted for less than 15% of the total bands; 4) polymorphisms between 15% - 30%; 5) polymorphisms between 30% - 50%; 6) polymorphisms above 50%. Based on the genetic distance matrix, cluster analysis were conducted. The results showed that these soybean accessions could be divided into five groups. Cultivars and lines clustered together in any group or subgroup were consistent with their pedigree and geographical distribution.

Key words Cultivated soybeans; RAPD; Polymorphisms; Cluster analysis