

东北地区不同大豆品种间的 RAPD 分析^{*}

郑蔚虹^{1,3} 田成亮³ 吴俊江² 刘丽君^{2**} 孙剑秋³

(1. 温州大学生命与环境科学学院, 温州 325027; 2. 黑龙江省农业科学院大豆研究所, 哈尔滨 150086; 3. 齐齐哈尔大学生命科学与工程学院生物系, 齐齐哈尔 161006)

摘要 实验采用 RAPD 技术对我国东北地区不同生态区的野生大豆和栽培的大豆品种材料进行了种间遗传关系分析。9 个引物共扩增出 141 个片段, 其中同源片段 6 个, 特异性片段 21 个, 多态性片段 114 个, 显示出东北地区栽培的大豆品种间具有良好的多态性。通过 NTSYS 软件对 RAPD 结果进行 UPGMA 聚类分析, 得到了各品种间的亲缘关系树状图。所有类型的品种在大约 0.45–0.80 的距离水平被聚在一起, 并于近 0.57 处分成 5 簇。其中野大豆 01–336 居群与栽培种黑农 40 单独成簇, 与其它品种间的亲缘关系最远, 其它野生居群及栽培品种交叉排列, 分成 8 簇。同一簇内野大豆居群间的遗传关系较近, 与栽培大豆品种间遗传距离较远; 不同簇间的野生大豆居群亲缘关系较远, 隔离性强于簇内野生大豆与栽培种。黑农 40 与其它栽培品种亲缘关系较远; 农家品种小金黄 11905 与白眉 103 亲缘关系很近, 与栽培品种合丰 34、抗线 3、绥农 8 亲缘关系相对近; 农家品种黄宝珠与元宝金和宝丰 7 亲缘关系相对较近。

关键词 大豆; 亲缘关系; RAPD

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000–9841(2005)02–0130–05

大豆是重要的经济作物, 中国作为大豆发源地有着丰富的种质资源, 野大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆的近缘种, 在已发现的野大豆居群中, 我国拥有的类型占世界总数的 90% 以上。目前, 随着科学技术的发展, 人们生活水平的提高, 对大豆的品质要求也越来越高, 提高大豆蛋白质含量和油份含量, 培育优质、高产及多抗的大豆品种已十分迫切, 传统的育种方法主要是依靠植物的形态进行选择, 不但耗费大量的人力和物力, 而且需要很长时间。近年来兴起的分子标记技术, 特别是 RAPD 技术, 与其它分子标记技术比较具有技术简单、快捷、反应灵敏等优点, 应用十分广泛。植物的遗传多样性是作物改良的基础, RAPD 标记已经被证明在多态性分析和品种鉴别中具有重要价值, 被用于分析从亚属到品种水平的遗传关系, 这为大豆种质多样性及遗传育种开辟了新途径^[1–10]。因而, 在国内开展对大豆分子水平上的研究, 特别是野生与栽培品种种间关系及遗传多样性的研究, 对大豆核心种质的构建, 保护和

开发大豆种质、改良栽培大豆品质、进行遗传育种具有重要应用价值和理论意义。

本文采用 RAPD 技术, 从分子水平上对我国东北地区不同进化类型的野大豆居群及栽培的大豆品种进行了种间关系的研究。为大豆生态遗传学提供若干种间、种内遗传距离参数, 进而指导大豆遗传育种工作。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用 28 份大豆材料由黑龙江省农业科学院大豆研究所提供(表 1)。

RAPD 引物为上海博亚生物技术有限公司产品, 共 4 组(A、B、C、D)80 个引物。为确保实验条件的稳定性, 主要试剂: Tag DNA 聚合酶, dNTPs, Rnase, 10× Buffer 也选用此公司产品。其它药品为国家分析纯产品。

* 收稿日期: 2004–05–14

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863) 编号 2002AA207007; 黑龙江省教育厅科学技术研究项目, 编号 10541258

作者简介: 郑蔚虹(1961–), 女, 副教授, 研究方向植物生理与分子生物学。E-mail: zhengweihong1@sina.com

** 通讯作者: E-mail: nkyssbd@mail.hl.cn

表 1 供试材料序号和名称
Table 1 Name and number of materiles

序号 Number	名称 Name	序号 Number	名称 Name	序号 Number	名称 Name
A	绥农 14	K	黑农 40	T	栽培
B	铁丰 3	L	01-64 (野生)	U	吉林 5
C	01-336(野生)	M	01-509(野生)	V	合丰 34
D	绥农 10-7	N	01-581(野生)	W	绥农 8
E	抗线 3	O	01-118(野生)	X	小黄金 11905
F	01-425(野生)	P	黑农 41	Y	黄宝珠
G	01-14 (野生)	Q	合丰 25	Z	白眉 103
H	吉林 3	R	抗线 2	#	元宝金
I	合丰 35	S	01-410(野生)	&	宝丰 7
J	黑农 37				

1.2 基因组 DNA 的提取与纯化

CTAB 法, 主要参见 Rogers 等^[16], 略有改进。

1.3 PCR 扩增反应

1.3.1 扩增反应 反应总体积为 25 μl, 其中含 20 ng 基因组 DNA 模板, 10×PCR Buffer [(w/Mg): 20 mM MgSO₄, 100mM KCl, 80 mM (NH₄)₂SO₄, 100mM Tris-HCl, pH = 9.0, 0.5% NP-40] 2.5 μl, 10mmol 4×dNTPs 0.5μl, 10^μM 10 碱基随机引物 1 μl, Tag DNA 聚合酶 1.5 U, 灭菌的 ddH₂O 补充到 25μl。

1.3.2 PCR 反应程序 预变性 94℃3min, 变性 94℃30s, 退火 37℃1min, 延伸 72℃2min, 40 个循环, 终反应 72℃10min。反应在(日本·株氏会社)杭州大和热磁电子有限公司生产的 Life Express 基因扩增仪上进行。

1.3.3 PCR 反应产物的检测 用 1.8% 琼脂糖凝胶进行电泳分离检测, 电泳缓冲液采用 0.5×TBE, 点样 6 μl, 电泳电压 80 v, 3-3.5 h 完成。电泳结果在溴化乙锭(EB)池中染色 20 min, 取出放入凝胶成像系统中照相记录结果。

1.3.4 数据统计分析 通过随凝胶成像系统机器配带的 Lab-works 软件分析确定扩增 DNA 条带, 记录每一条带的分子量, 转入 Excel 中, 依据在相同实验条件下, 迁移相同的条带视为同缘位点, 人工对不同种大豆个体所扩增出的 DNA 条带量化为 0 或 1(条带存在为 1, 不存在为 0), 得到原始数据。将此数据应用 NTSYS-pe V2.02a 软件进行矩阵分析, 然后按照 UPGMA 法构建聚类图。

2 结果

2.1 基因组 DNA 多态性

本实验首先以黑农 37、01-336(野生)为模板, 对博亚公司的 4 个系列共 80 个引物进行了初步筛选, 得到 40 个扩增谱带效果较好的引物; 再以合丰 25 为模板进行复筛(见图 1), 择优选出 9 个引物(引物序号、碱基序列及扩增出现片段数目见表 2)应用于 28 份(8 个野生居群和 20 个栽培种)大豆材料的 RAPD 扩增实验。这 9 个引物共产生 141 个片段, 大小从 100bp-2500bp 不等, 多数集中在 350bp-1500bp 之间, 单个引物扩增的多态性片段最多可达 24 条(见表 2), 最少的仅 1 条(如图 2; 也有无的如图 3), 平均每个引物可产生 15-16 个片段。在这 141

表 2 选用的引物序列

Table 2 Sequences of selective primers		
引物序号	碱基顺序	特征数
Number of primer	Sequence of base	Number
A-01	CAGGCCCTTC	11
A-02	TGCCGAGCTG	6
A-07	GAAACGGGTG	18
B-04	GGA CTGGAGT	18
B-05	TGCGCCCTTC	15
C-02	GTGAGGCGTC	24
C-13	AAGCCTCGTC	19
C-16	CACACTCCAG	18
D-13	GGGGTGACGA	12

个片段中, 6 条 (4.26%) 是所有样品共有; 21 条 (14.89%) 是种特异性的; 其余 114 条 (80.85%) 是多态性条带 (一个带至少为两个样品共有, 但不是所有样品共有)。对上述 141 个多态片段聚类分析的

结果表明, 这些片段几乎可将供试材料全部区分开 (图 4), 进一步分析表明: 有的扩增片段在我们所分析的所有栽培大豆中都存在, 而在所有野生大豆中都表现为缺失 (图 2)。

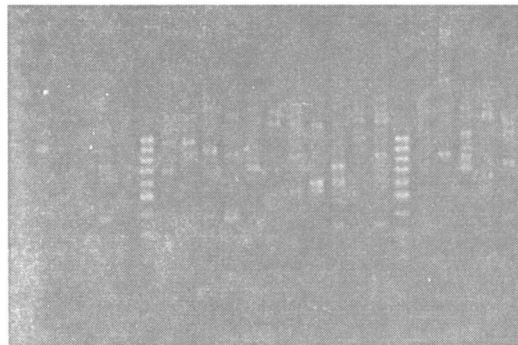
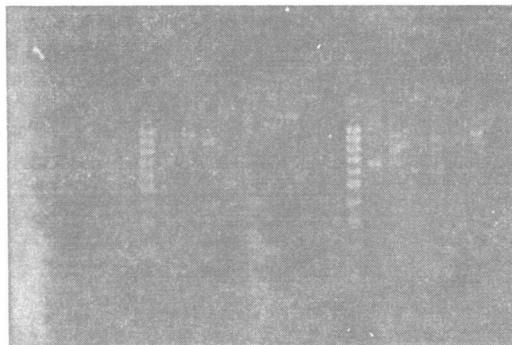


图 1 引物复筛 (模板为合丰 25)

Fig. 1 Multiple filtration of primers (the templet is Hefeng 25)

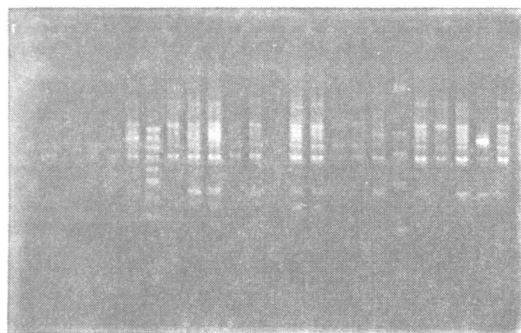


图 2 用引物 A07 扩增得到的基因组 DNA 指纹谱图

Fig. 2 Fingerprint map of genome DNA in A07 primer

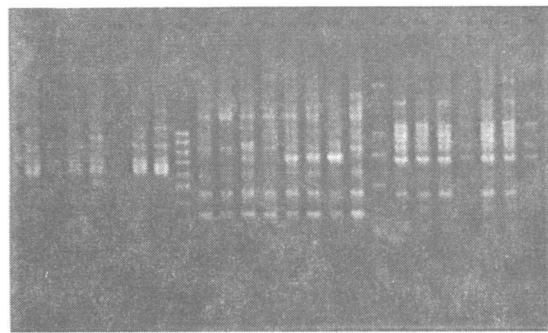


图 3 用引物 B04、C02、C13 扩增得到的基因组 DNA 指纹谱图

Fig. 3 Fingerprint map of genome DNA in B04, C02 and C13 primer

2.2 RAPD 扩增多态性的聚类分析

对参试的 28 份材料 (8 个野大豆居群和 20 个栽培品种) 利用优选出的 9 个随机引物进行 RAPD 扩增, RAPD 结果应用 NTSYS - pc 2.02a 软件分析, 计算了 Ochiai 系数, 并用 UPGMA 法进行聚类分析, 得出亲缘关系树状图 (如图 4)。图显示出所有类型的品种在大约 0.45 - 0.80 的距离水平被聚在一起, 并于近 0.57 处分成 5 簇。其中 C (野生居群 01 - 336) 与 K (栽培种黑农 40) 单独成簇, 与其它品种间的亲缘关系最远, 其它野生及栽培种交叉排列, 可再分成 8 簇。

可将供试的 28 份大豆材料全部分开, 个别引物可同时看出多个品种间的差异; 大部分引物显示出具有能够区别野生大豆和栽培大豆的特异性片段。同一簇内野大豆居群间的遗传关系较近, 与栽培的

大豆品种间遗传距离较远; 不同簇间的野大豆居群亲缘关系较远。黑农 40 与其它栽培品种亲缘关系较远; 农家品种小金黄与白眉亲缘关系很近, 与栽培品种合丰 34、抗线 3、绥农 8 亲缘关系相对近; 农家品种黄宝珠与元宝金和宝丰 7 亲缘关系相对较近。

长期以来, 育种单位通过互相引种, 田间调查、统计、分析, 把综合农艺性状优良的品种作为杂交亲本, 利用某些资源表型差异较大, 不同试材遗传背景不同、遗传距离不同来育种。这种育种方式周期长, 见效不明显, 且易在选择大豆杂交亲本时出现表里不一的现象。而 RAPD 这种分子标记与农艺性状相连锁, 应用于大豆育种, 提供了一个提高品种改良效率的有力工具。通过各个品种 RAPD 特异性谱带分析, 可快速、准确地进行大豆的种质鉴定, 从而选择出遗传距离大, 综合性状良好的核心种质材料

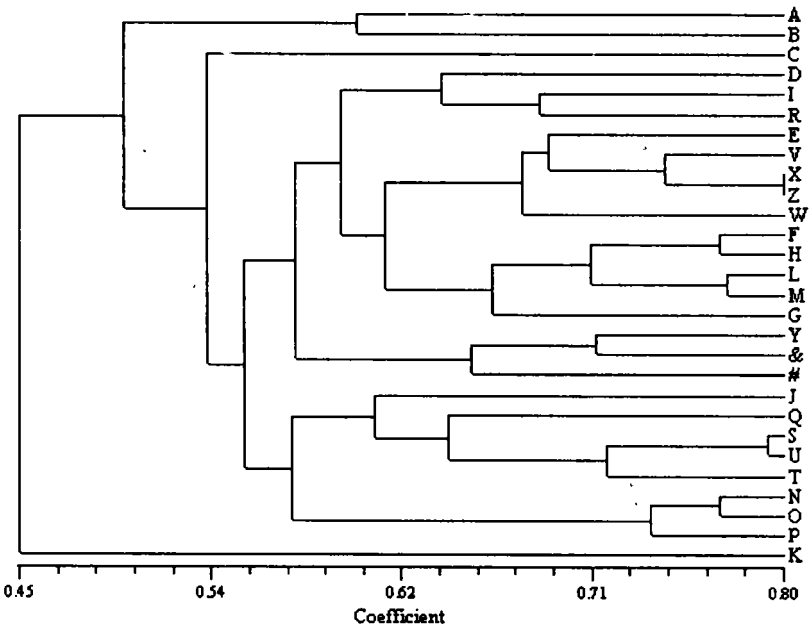


图 4 东北地区 28 份大豆(8 个野生居群和 20 个栽培种) 的 UPGMA 聚类分析树状图
(图中试材编号及名称见表 1 和表 2)

Fig. 4 Phylogenetic map of 28 cultivars in northeast area (8 populations of *Glycine soja* and 20 varieties of *G. max*)
Number and name were showed in Table 1 and 2.

作为亲本。例如,在上述 RAPD 结果分析中,野生种和栽培种之间明显表现出相似系数小、遗传距离大的现象。这些结果可为遗传育种工作提供可靠理论依据。因此,我们可选择某些野生品种作为亲本,较大的改变栽培大豆的遗传组成,通过对杂交早期世代进行劣株淘汰,缩短育种年限,提高育种质量。

参 考 文 献

1 崔章林, 盖钧镒. 世界大豆研究进展与动向[J]. 大豆科学, 1995 14(2): 167 - 173
2 惠东威. 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
3 庄炳昌. 中国不同纬度不同进化类型大豆的 RAPD 分析[J]. 科学通报, 1994, 39 (23): 2178 - 2180
4 邱丽娟. 利用 RAPD 标记鉴定大豆种质[J]. 作物学报, 1996, 23 (4): 408 - 417.
5 张志永, 盖钧镒. RAPD 在大豆种质资源及遗传连锁中的应用[J] 大豆科学, 1997. 16(1): 60 - 63
6 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K. J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acid Research, 1990, 18: 6531 - 6535
7 Mailer R J. Discrimination among cultivars of rapeseed (*B. brassica*

napus L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers[J]. Theor Appl Genet, 1990, 87: 697 - 704
8 Huff D R. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.) [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 927 - 934
9 Mienie C M S. Use of random amplified polymorphic DNA for identification of South African soybean cultivars[J]. Field Crops Research, 1995, 43: 43 - 49.
10 Vaughan D A. Population genetic diversity of wild soybean on the Kantoplain, Japan.[J] Soy Genet Newsl., 1995, 22: 145 - 146
11 Chen L F O. Polymorphic distinction of soybean by molecular markers[J]. Soy Genet Newsl., 1994, 21: 70 - 75.
12 Terry L. Molecular phylogeny as a tool for soybean breeding IV [J]. Soy Genet Newsl., 1995, 22: 251 - 259.
13 Skorupska H T. Resistance to soybean cyst nematode and molecular polymorphism in various sources of Peking soybean[J]. Euphytica, 1994, 75: 63 - 70.
14 Vantoai T T. RAPD markers of flooding tolerant Chinese soybean germplasm[J]. Soy Genet Newsl., 1993, 20: 153 - 159.
15 Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues [M]. Plant Mol Biol Manual, 1988, A6: 1 - 10.
16 Lark K G, J. Evans, F. Basha. Molecular Phylogenysis a tool for soy bean breeding [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1992, 19: 174 - 181.

STUDIES ON GENETIC RELATIONSHIPS AMONG NORTHEAST SOYBEAN CULTIVARS OF CHINA BY RAPD

Zheng Weihong^{1,3} Tian Chengliang³ Wu Junjiang² Liu Liyun^{2* * *} Sun Jianqiu³

(1. *School of Life and Environmental Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325027;*

2. *Soybean, Institute Heilongjiang Academy of Agricultural Science Harbin 150086;*

3. *College of Life Science and Technology, Qiqihar University, Qiqihar 161006*)

Abstract The genetic relationships among 8 populations of *Glycine soja* and 20 varieties of *G. max* from northeast of China were analyzed by RAPD method. 141 bands were amplified totally with 9 primers, in which 6 bands were homologous, 21 bands were unique and 114 bands were polymorphic respectively. The results showed that there were high polymorphic between *G. soja* and *G. max* in Northeast of China. Phylogenetic tree of cultivars was obtained through UPGMA cluster analysis. All cultivars were clustered at 0.45 to 0.80 distance level, 5 clusters were branched at 0.57. Wild species(*G. soja* 01 – 336) and cultivar (*G. max* Heinong 40) were clustered solely from other cultivars, and the rest were crossed and divided to 8 clusters again. In the same cluster, the relationships of the wild species were closed and insulated significantly with cultivars. In the different clusters, the relationships of the wild species were far and the segregation was stronger than *G. soja* and *G. max* that of the same cluster.

Key words Soybean; Cultivars; Genetic relationships; RAPD

(上接第 129 页)

root activity were not affected obviously by the decreasing of potassium concentration; but for the variety Tie 95068 – 5 sensitive to potassium, just the reverse was true. Under the condition of low potassium concentration, the expressions of root characteristics in Tiefeng 31 were beneficial to forming high yield. So Tiefeng 31 can be used as parent in breeding program for varieties tolerant to low potassium level or directly planted as available variety in the soil with low potassium concentration.

Key words Soybean tolerant to low potassium level; Root; Morphological characteristic; Physiological characteristic