

# 一个与大豆黄色种皮相关的 RAPD 标记<sup>\*</sup>

王 惠<sup>1</sup> 段玉玺<sup>1\*</sup> 陈立杰<sup>1</sup> 邱丽娟<sup>2</sup> 常汝镇<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学 植物线虫学研究室, 沈阳 110161; 2. 中国农科院作物所  
农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

**摘要** 利用 BSA 法对 11 个黑色种皮的大豆品种和 12 个黄色种皮的大豆材料的基因组 DNA 进行了 RAPD 分析, 供试的 100 个随机引物有 66 个产生了 RAPD 扩增产物, 其中产生 RAPD 多态性的随机引物有 15 个。在所产生的扩增产物中, 获得了一个与大豆种皮色相关的特异 DNA 片段 S79500。同时, 采用该标记对辽豆 10 号×PI437654 杂交后代种皮颜色有分化的群体和黄、青、黑、褐色种皮的大豆进行检测, 经验证这个 RAPD 标记具有较高的重复性和稳定性, 可用于辅助选育优良的黄色种皮的大豆新品种。

**关键词** RAPD; 分子标记; 大种皮颜色

中图分类号 S 565. 1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)01-0017-04

我国有丰富的大豆种质资源, 但对这些优异种质的认识只停留在表型上, 而对基因型了解很少。因此开发具有我国特色的重要性状基因的分子标记并进行辅助选择研究, 将对提高我国大豆育种水平起到促进作用。

本研究采用 BSA(Bulked Segregates Analysis)即分离群体分组分析法(Michelmore et al, 1991)<sup>[1]</sup>, 对不同种皮颜色的大豆品种进行研究, 旨在寻找与种皮颜色连锁的 RAPD 标记, 为新品种的选育提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

供试大豆材料为沈阳农业大学植物保护学院线虫学研究室保存的大豆和黑龙江省盐碱地作物育种所提供的大豆, 其中 1-11 代表黑色种皮大豆, 12-23 代表黄色种皮大豆, 24-31 代表辽豆 10 号×PI437654 杂交后代种皮颜色有分化的群体, 32-38 分别为黄、青、黑、褐色种皮的大豆。(表 1)

### 1.2 DNA 的提取

参照关荣霞等(2003)<sup>[2]</sup>的方法, 加以改进。将种子去除种皮(尤其是黑色种皮会影响结果的准确度)在研钵中研磨。取 0.2g 置于 2ml 离心管中, 加入预热的 SDS 提取缓冲液 800 $\mu$ l, 65℃水浴 40min。离心, 将上清小心转移到新的 Eppendorf 管中, 加等体积的酚/氯仿(1:1), 充分混匀, 静置 10min。离心后取上清, 加等体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提。离心取上清, 加 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA, 再次离心后, 弃去上清, 用 70%的乙醇洗涤 2 次, 风干, 加 200 $\mu$ l 超纯水溶解 DNA, 于 -20℃保存备用。

### 1.3 RAPD 扩增

扩增反应体系为 20 $\mu$ l。其中模板 DNA 100ng, 1U TaqDNA 聚合酶, 1×PCR buffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M dNTP, 随机引物 20ng/反应, 最后加超纯水补足 20 $\mu$ l, 于 PTC-200 型 PCR 仪中进行扩增。随机引物编号为 S1-S100。以上反应试剂均购自上海生工生物工程公司。PCR 反应程序为第 1 循环 94℃预变性 5min, 第 2 循环至 35 循环程序为 94℃变性 1min, 36℃退火 1min, 72℃延伸 1min, 最后一个循环在 72℃中保温延伸 5min。扩增产物在 1.2%

\* 收稿日期: 2004-09-15

基金项目: 国家自然科学基金课题(39770494)资助

作者简介: 王惠(1972-), 女, 博士研究生, 主要从事抗大豆胞囊线虫基因的抗性机制和分子标记研究。E-mail: wanghuisy nd@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 段玉玺\*(1964-), 教授, 博士生导师 Tel: 024-88454528 Fax: 024-88492630 E-mail: duanyx@syou.edu.cn

的琼脂糖凝胶上电泳, 电压为 4V/cm, 电泳结束后在 EB 中染色 30min, 在凝胶成像仪中检测分析。

表 1 供试大豆品种名称及全国总编号

Table 1 Names and national codes of soybean cultivars tested

序号 Number	品种名称 Varieties	全国总编号 National code	种皮颜色 Coat colour	序号 Number	品种名称 Varieties	全国总编号 National code	种皮颜色 Coat colour
1	Peking	WDD00467	黑	20	东农 163		黄
2	PI437654	WDD00643	黑	21	辽豆 10 号		黄
3	哈尔滨小黑豆	ZDD7170	黑	22	开育 10	ZDD18083	黄
4	灰皮支黑豆	ZDD2315	黑	23	Lee	WDD00741	黄
5	PI90763		黑	24	辽豆 10 号×PI437654 F <sub>5</sub>		黄
6	山阴大黑豆	ZDD2308	黑	25	辽豆 10 号×PI437654 F <sub>5</sub>		青
7	连毛会黑豆	ZDD1417	黑	26	辽豆 10 号×PI437654 F <sub>5</sub>		褐
8	应县小黑豆	ZDD2226	黑	27	辽豆 10 号×PI437654 F <sub>5</sub>		暗黄
9	小粒黑豆	ZDD1412	黑	28	辽豆 10 号×PI437654 F <sub>5</sub>		暗黄
10	PI88788	WDD00995	黑	29	辽豆 10 号×PI437654 F <sub>5</sub>		暗绿
11	小黑豆	ZDD8515	黑	30	辽豆 10 号×PI437654 F <sub>5</sub>		淡绿
12	Fayette	WDD00570	黄	31	辽豆 10 号×PI437654 F <sub>5</sub>		暗黄
13	辽豆 13		黄	32	辽豆 10 号		黄
14	Custer	WDD00595	黄	33	红荏豆		褐
15	Franklin	WDD00602	黄	34	丹豆 4 号		青
16	抗线虫 4 号		黄	35	东大一号		黄
17	Pickett	WDD01643	黄	36	合 00-783		黄
18	东农 434		黄	37	赤不流黑豆	ZDD2258	黑
19	农大 5129		黄	38	顺义黑豆	ZDD1522	黑

2 结果

2.1 黄、黑种皮 DNA 样品池的建立及 RAPD 分析

本研究应用 SDS 法提取 DNA, 纯化定量, 将每个材料的 DNA 稀释到相同的浓度, 再分别将 DNA 等量均匀混合形成相应的两个 DNA 样品池, 将 11 个黑色材料分为一组(黑池), 12 个黄色材料分为一组(黄池), 进行 RAPD 分析。供试的 100 个随机引物有 66 个产生了 RAPD 扩增产物, 其中产生 RAPD 多态性的随机引物有 15 个, 结果如图 1 所示。

2.2 大豆种皮颜色相关的特异 DNA 片段

应用 15 个能产生多态性的 RAPD 随机引物, 对 11 个黑色种皮材料和 12 个黄色种皮材料进行 RAPD 扩增, 其中引物 S79 产生了 1 个特异的 DNA 片段, 其片段大小为 500bp, 记为 S79500, 结果如图 2 所示。经过多次重复验证, 均获得相同的扩增结果, 重复性达到 100%, 该标记在所有的黄色种皮材料中出现, 而所有的黑色种皮材料中均无这个片段产生, 初步推测这个特异性片段与黄色大豆种皮颜色密切相关。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 M

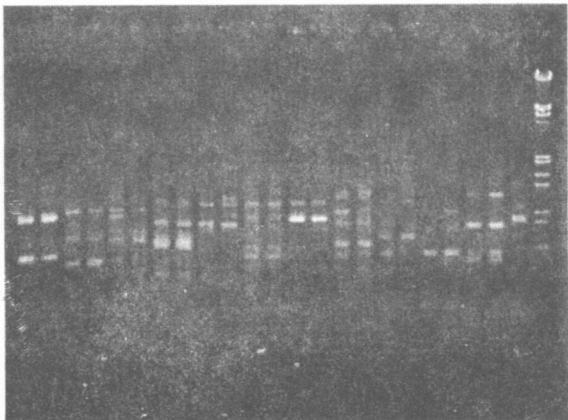


图 1 不同颜色种皮大豆 DNA 的随机引物扩增的 RAPD 产物电泳图谱  
奇数泳道为黄色种皮池, 偶数泳道为黑色种皮池

Fig. 1 The pattern of RAPD products by different primers for yellow and black coat soybean  
Odd numbers were yellow coat soybean, even numbers were black coat soybean

1, 2: Primer S2; 3, 4: Primer S3; 5, 6: Primer S4; 7, 8: Primer S5; 9, 10: Primer S7; 11, 12: Primer S66; 13, 14: Primer S67; 15, 16: Primer S68; 17, 18: Primer S79; 19, 20: Primer S71; 21, 22: Primer S85; 23: Primer S86

M: λDNA /EcoRI + Hind III

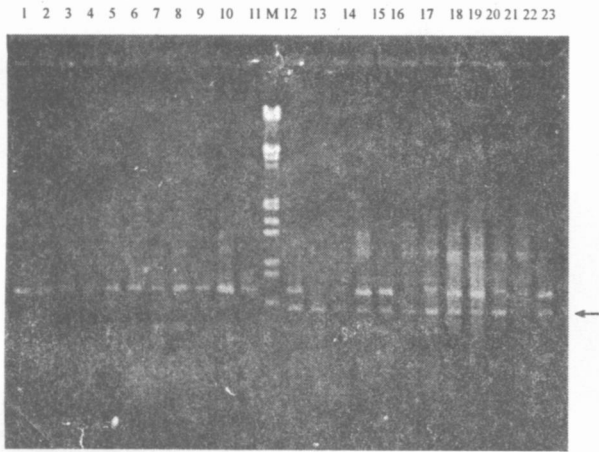


图 2 与大豆种皮颜色相关的 S79 引物扩增产物的电泳图谱

1-11 为黑色种皮品种, 12-23 为黄色种皮品种  
编号代表的不同品种名称与表 1 中的一致.

M:  $\lambda$ DNA/EcoRI + Hind III

箭头所示为 RAPD 标记 S79500

Fig. 2 The pattern of amplification products by Primer S79

1-11: black coat soybean varieties; 12-23: yellow coat soybean varieties see the Table 1.

The arrowhead indicated the S79500 band.

### 2.3 与种皮颜色相关的 RAPD 标记对不同颜色大豆品种的检测

应用辽豆 10 号  $\times$  PI437654 杂交后代种皮颜色有分化的群体和黄、青、黑、褐色种皮颜色不同的大

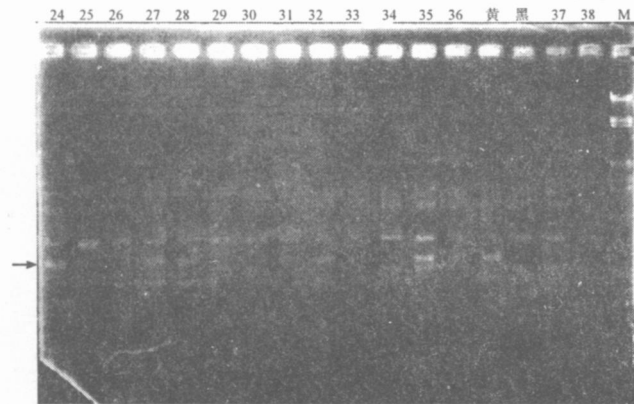


图 3 与大豆种皮颜色相关的 S79 引物的 RAPD 产物电泳图谱  
24-31 为辽豆 10 号  $\times$  PI437654 杂交后代种皮颜色有分化的群体; 32-38 分别为黄、青、黑、褐色种皮的大豆; 编号代表的不同品种名称与表 1 中的一致. 箭头所示为 RAPD 标记 S79500

Fig. 3 The pattern of amplification products by Primer S79  
24-31: The posterities of Liaodou 10  $\times$  PI437654; 32-38 indicated the yellow, green, black and brown coat soybeans. The number indicated different varieties see Table 1. M:  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III The arrowhead indicated the S79500 band.

豆品种对该标记进行检测。如图 3 所示, 黄色种皮

的大豆品种 24、27、28、31、32、35、36 均产生特异的 DNA 片段, 而青色种皮大豆(25、29、30、34)、褐色种皮(26、33)和黑色种皮大豆(37、38)则不产生该标记, 验证了该特异性片段与黄色大豆种皮颜色紧密连锁。

### 3 讨论

寻找与目标性状紧密连锁的 RAPD 分子标记, 通常采用 BSA 法或近等基因系法。利用这两种方法可在短时间内筛选大量的随机引物, 通过 RAPD 分析可以找出与目的基因连锁的 RAPD 标记并进行分子定位。在近等基因系尚不具备的情况下, BSA 法是广大研究者首选的方法之一。该法是将  $F_2$  群体根据其目标性状的分离情况构建 DNA 池, 构建的 DNA 池只有目标基因是经过选择而其余的遗传成分分是随机的, 因而在群体较大的情况下, 遗传背景可认为是相同或相似的, 所以由具体相同目标性状构建的 DNA 池可被认为是近等基因池。因此在两个群体之间完全不同, 而每个群体之内的各个  $F_2$  个体间又完全相同的那个 RAPD 扩增产物就是与目的基因连锁的 RAPD 标记。然而, 在  $F_2$  分离群体筛选所需要的目标单株很困难, 因此, 对欲配制杂交组合的亲本进行 RAPD 标记筛选, 利用已筛选的稳定的 RAPD 标记直接进行  $F_2$  群体验证, 可以提高选择的效率。

本研究以种皮颜色不同的大豆品种为材料进行 RAPD 扩增, 获得了与黄色种皮连锁的分子标记 S79500, 可用于不同种皮颜色杂交组合后代的筛选。Matson(1965)<sup>[3]</sup> 报道了 Peking 中的第 4 个基因 Rhg4 与控制黑色种皮基因 i 连锁。在大豆育种过程中黑色和深色种皮颜色都是大豆中的不良性状, 希望得到黄色种皮的优良大豆品种。通过此 RAPD 标记可以辅助选育优良的黄色种皮的大豆新品种, 提高选择效率, 加速育种进程。RAPD 技术具有简单、快速等特点<sup>[4]</sup>, 因此被广泛用于基因的分子标记, 但是这一技术也有不足之处, 一是稳定性和重复性都较低, 另外, RAPD 标记大多是显性标记, 无法区分纯合型和杂合型基因型, 因此必须严格控制反应条件以提高稳定性。为了提高 RAPD 标记的特异性和稳定性, 将其转化为 SCAR 标记<sup>[5]</sup>, 可取得较好的效果, 有关这方面的工作还有待于作进一步的研究。

参 考 文 献

1 Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease – resistance genes by using segregating analysis; A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[ J ]. Proc Natl Acad Science USA, 1991, 88: 9828 – 9832.

2 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟, 等. 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取[ J ]. 大豆科学, 2003, 22( 1): 73 – 74.

3 Matson. A. L. Evidence of a fourth gene for resistance to soybean cyst nematode[ J ]. Crop Science, 1965, 5: 477.

4 Williams J G K, Kubelic A R. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful genetic marker[ J ]. Nucleic Acids Res, 1990, 18( 22): 6531 – 6535.

5 Hernandez P, Martin A, Dorado G. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products; a practical tool for the introgression and marker – assisted selection wheat [ J ]. Molecular Breeding, 1999, 5: 245 – 253.

A RAPD MARKER RELATED WITH YELLOW SEED COAT OF SOYBEAN

Wang Hui<sup>1</sup> Duan Yuxi<sup>1 \*</sup> Chen Lijie<sup>1</sup> Qiu Lijuan<sup>2</sup> Chang Ruzhen<sup>2</sup>

( 1. Nematology Lab, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Key Lab of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Crops, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081)

**Abstract** BSA method was employed to analyze genome DNA of 11 black coat seed soybean and 12 yellow coat seed soybean by RAPD method. The bands were produced for 66 primers among 100 primers. There were polymorphism bands for 15 primers. In all products amplified, a special DNA fragment, S79500 was closely related with the yellow coat of soybeans. The primer S79500 became a RAPD marker for the yellow coat of soybean. In another hand, the S79500 also was used to test the filial generation with yellow, green, black and brown coat from Liaodou 10× PI437654. The results showed that the S79500 was very stable and repeatable. The RAPD marker S79500 was useful to assistant the selection for soybean hybrid breeding.

**Key words** RAPD; Molecular marker; Seed coat color