

王健胜,侯桂玲,谢永凤. 国内外苜蓿品种遗传多样性 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):35-38.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.009

国内外苜蓿品种遗传多样性 RAPD 分析

王健胜¹, 侯桂玲¹, 谢永凤²

(1. 平顶山学院,河南平顶山 467000; 2. 中国农业科学院草原研究所,内蒙古呼和浩特 010010)

摘要:采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记对 19 份国内外苜蓿种质的遗传多样性进行分析。结果显示,7 对 RAPD 引物在供试苜蓿材料中共获得有效扩增位点 51 个,其中多态性位点 50 个,多态性位点百分率为 98.04%。引物的有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数和多态性信息含量平均分别为 1.48 个、0.29、0.44 和 0.33。供试苜蓿材料间的遗传相似系数介于 0.039~0.922 之间,平均为 0.494。聚类分析和主成分分析均表明,供试苜蓿种质可被划分为两大类,其中第一类群包括的苜蓿种质数最多,达到 16 个,占有供试苜蓿种质数的 84.21%。研究结果将为供试苜蓿种质有效利用提供一定科学依据。

关键词:苜蓿;遗传多样性;RAPD 分析

中图分类号: S551+.703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0035-03

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是多年生同源四倍体($2n=4x=32$)和异花授粉植物,也是世界上最重要的豆科牧草之一,被誉为“牧草之王”^[1]。紫花苜蓿在我国的栽培历史较长,其栽培面积也是牧草中最大的。近年来,随着人们对苜蓿产业发展的逐步重视,我国不断加强了对国外苜蓿引种和种质资源交流,这为我国苜蓿相关研究提供了较为丰富的种质资源。但是,引种和品种资源交流频率的增加造成了现有苜蓿品种在名称和来源上的混乱,品种及种质的产权问题、种子质量问题也越来越严重,而且至今未能建立起有效的鉴别方

法和标准,这也在一定程度上限制了优良种质资源的进一步开发利用。因此,开展苜蓿种质资源研究显得尤其重要。

分子标记技术作为重要研究手段在植物种质资源研究中得到了极为广泛的应用,但与其他主要农作物相比,利用分子标记开展苜蓿种质资源的研究仍较少。由于苜蓿分子标记研究起步较晚,导致苜蓿专有分子标记开发数量较少,因此现有苜蓿研究中利用的分子标记主要以随机标记为主。目前,包括扩增片段长度多态性(AFLP)^[2]、微卫星(SSR)^[3-4]、微卫星间隔(ISSR)^[5-6]等多种类型分子标记都较好地应用于苜蓿种质资源研究中。随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记是一种较早开发的分子标记技术,由于它具有易扩增、多态性高、操作简便、无种属限制等优点而被广泛应用于苜蓿遗传多样性研究中^[7-9]。因此,本研究采用 RAPD 分子标记技术对国内外的 19 份苜蓿栽培种质进行了遗传多样性分析,在初步掌握不同苜蓿种质间亲缘关系的同时,发现具有优良变异的

收稿日期:2016-03-15

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:KJT142102110171);河南省平顶山市科技计划(编号:2014086)。

作者简介:王健胜(1978—),男,陕西礼泉人,博士,讲师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:wjsheng1998@163.com。

参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志(第 66 卷)[M]. 北京:科学出版社,1997:547-592.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:474.
- [3] 关杰敏,张桂芳,林吉,等. 凉粉草基因组 DNA 提取与分析[J]. 安徽农业科学,2010,38(20):10575-10577.
- [4] 李晓晖. 不同凉粉草种质资源的生理特性及种质评价[D]. 南宁:广西大学,2012.
- [5] 李晓晖,黎颖菁,黄荣韶,等. 凉粉草遗传多样性的 SCoT 和 ISSR 分析[J]. 西南农业学报,2012,25(5):1834-1840.
- [6] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One, 2010, 5(1):e8613.
- [7] 罗焜,陈士林,陈科力,等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究[J]. 中国科学(生命科学),2010,4(4):342-358.
- [8] 朱英杰,陈士林,姚辉,等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定

- 研究[J]. 药学报,2010,3(3):376-382.
- [9] Gao T, Yao H, Song J Y, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(1):116-121.
- [10] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, et al. Applying plant DNA barcodes for rosacea species identification[J]. Cladistics, 2011, 27:165.
- [11] Yao H, Song J Y, Liu C, et al. Use of ITS2 region as the Universal DNA barcode for plants and animals[J]. PLoS One, 2010, 5(10):e13102.
- [12] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, et al. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae[J]. Planta Medica, 2010, 76:1784.
- [13] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:277.
- [14] 黄玉吉,黄颖桢,陈菁瑛,等. 3 个仙草品系核糖体 DNA-ITS 序列分析[J]. 现代中药研究与实践,2012(3):22-25.
- [15] 师玉华,马定乾,张景景,等. 凉茶药材凉粉草与混伪品的 ITS2 条形码鉴定[J]. 中国药理学杂志,2015(15):1282-1285.

苜蓿种质,为我国苜蓿种质的科学鉴定、保护和高效利用提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料基本信息见表 1。

表 1 供试材料基本信息

编号	名称/系列编号	供试单位
1	42IQ	百绿国际草业(北京)有限公司
2	5S43	百绿国际草业(北京)有限公司
3	赛迪 7	百绿国际草业(北京)有限公司
4	游客	百绿国际草业(北京)有限公司
5	00385	中国农业科学院草原研究所
6	00399	中国农业科学院草原研究所
7	00038	中国农业科学院草原研究所
8	05234	中国农业科学院草原研究所
9	三得利	百绿国际草业(北京)有限公司
10	08452	中国农业科学院草原研究所
11	08432	中国农业科学院草原研究所
12	08443	中国农业科学院草原研究所
13	08464	中国农业科学院草原研究所
14	08451	中国农业科学院草原研究所
15	08440	中国农业科学院草原研究所
16	08462	中国农业科学院草原研究所
17	08446	中国农业科学院草原研究所
18	08428	中国农业科学院草原研究所
19	08426	中国农业科学院草原研究所

1.2 DNA 提取

每份材料随机选取 10~15 个单株幼嫩叶片等量混合,采用改良的十二烷基硫酸钠(SDS)法^[10]混合提取基因组总 DNA,经紫外分光光度计测定浓度后,稀释至适合浓度用于苜蓿基因组 PCR 扩增检测。

1.3 RAPD 标记检测

PCR 扩增反应在 Eppendorf PCR 扩增仪上完成。PCR 反应总体积为 20 μL,包括 1.5 μL 基因组 DNA(40 ng),1.5 μL 引物(20 mmol/L),2.0 μL10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺),2.0 μL 底物 dNTPs(2.5 mmol/L),1.0 μL Taq 酶(2 U/μL)和 12 μL ddH₂O。本研究用的 RAPD 引物相关信息见表 2。

RAPD-PCR 扩增程序:3 个循环(94℃ 1 min,37℃ 1 min,72℃ 2 min);37 个循环(94℃ 30 s,37℃ 40 s,72℃ 2 min);最后 72℃ 5 min。扩增产物用浓度为 1.8% 的琼脂

表 2 本研究所用 RAPD 引物序列及退火温度

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)
OPA2	TGCCGAGCTG	37
OPA3	AGTCAGCCAC	37
OPA4	AATCGGGCTG	35
OPC5	GATGACCGCC	35
OPC8	TGGACCGGTG	37
OPA13	CAGCACCCAC	37
OPC20	ACTTCGCCAC	37

糖凝胶进行电泳检测,并在紫外凝胶成像系统上保存分析,同时为了保证试验的准确性,每个 RAPD 反应都需要重复 3 次以上。

1.4 数据统计及分析

以 0、1、9 统计 SCOT 扩增带型,在相同迁移率位置上,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失记为“9”,并建立分子数据矩阵。利用 NTSYS-pc2.10 软件通过非加权平均法(UPMGA)计算苜蓿种质间的遗传相似系数,并在此基础上作聚类分析及主要成分分析。采用 POPGEN32 软件估算 SCOT 标记的主要遗传多样性参数,包括引物扩增总条带数(TNB)、多态性条带数(NPB)、多态性条带百分率(PPB)、有效等位基因数(*N_e*)、Nei's 基因多样性指数(*H*)、Shannon's 信息指数(*I*)和多态性信息含量(PIC)。

2 结果与分析

2.1 苜蓿种质 RAPD 多态性分析

利用筛选出的多态性表现较好的 7 个 RAPD 引物对苜蓿种质群体进行了检测分析。由表 3 可见,不同 RAPD 引物对苜蓿基因组的扩增存在较大差异,单个 RAPD 引物扩增条带数分布在 3~12 个,平均为 7.29 个,多态性条带数分布在 2~12 个,平均为 5.14 个。在所利用的 RAPD 引物中,除 OPA13 外,其余引物的多态性条带百分率均为 100.00%,所有引物多态性条带百分率平均达到了 95.24%。不同标记间的遗传参数差异也较大。有效等位基因数分布在 1.32~1.67 个,平均为 1.48 个;Nei's 基因多样性指数的分布范围是 0.23~0.38,平均为 0.29;所有引物的 Shannon's 信息指数都较高,其分布范围在 0.38~0.55,平均为 0.44。多态性信息含量是衡量分子标记有效性的重要指标之一,从表 3 不难看出,不同 RAPD 标记的多态性信息含量差异较大,其分布范围在 0.23~0.41,平均为 0.33。

表 3 苜蓿 RAPD 标记遗传多样性参数

引物	扩增总条带数 (个)	多态性条带数 (个)	多态性条带百分率 (%)	有效等位基因数 (个)	Nei's 基因多样性 指数	Shannon's 信息 指数	多态性信息含量
OPA2	6	6	100.00	1.67	0.38	0.55	0.41
OPA3	5	5	100.00	1.51	0.33	0.50	0.29
OPA4	12	12	100.00	1.35	0.24	0.39	0.34
OPC5	7	7	100.00	1.37	0.26	0.42	0.38
OPC8	10	10	100.00	1.32	0.23	0.38	0.35
OPA13	3	2	66.67	1.64	0.33	0.46	0.23
OPC20	8	8	100.00	1.48	0.27	0.42	0.28
平均	7.29	7.14	95.24	1.48	0.29	0.44	0.33

2.2 不同苜蓿种质亲缘关系分析

由表 4 可见,不同苜蓿种质间遗传相似系数差异较大。苜蓿种质 3 与 15 间的遗传相似系数最小,只有 0.039,表明这 2 个苜蓿种质间的亲缘关系最远;种质 6 与 7 间的遗传相似系数最大,达到了 0.922,表明与其他苜蓿种质相比,这 2

个苜蓿种质间具有较近的亲缘关系。同时可以看出,所有苜蓿种质平均遗传相似系数较低,只有 0.494,表明供试苜蓿种质整体遗传差异水平较高,在未来苜蓿遗传育种相关研究中具有较好的利用前景。

表 4 不同苜蓿种质间的遗传相似系数

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2	0.608																	
3	0.627	0.549																
4	0.490	0.451	0.588															
5	0.608	0.510	0.588	0.608														
6	0.588	0.569	0.647	0.745	0.784													
7	0.627	0.529	0.686	0.745	0.745	0.922												
8	0.608	0.510	0.627	0.588	0.549	0.647	0.647											
9	0.608	0.647	0.588	0.510	0.529	0.569	0.608	0.588										
10	0.686	0.686	0.588	0.667	0.569	0.647	0.686	0.510	0.725									
11	0.608	0.569	0.549	0.569	0.725	0.667	0.627	0.706	0.549	0.510								
12	0.373	0.490	0.314	0.431	0.353	0.353	0.392	0.392	0.647	0.549	0.431							
13	0.471	0.588	0.451	0.529	0.471	0.549	0.549	0.451	0.745	0.745	0.412	0.647						
14	0.608	0.451	0.471	0.647	0.529	0.588	0.588	0.549	0.588	0.667	0.529	0.412	0.647					
15	0.078	0.176	0.039	0.098	0.098	0.078	0.078	0.078	0.216	0.216	0.098	0.490	0.294	0.059				
16	0.510	0.647	0.529	0.569	0.549	0.627	0.667	0.490	0.706	0.784	0.529	0.549	0.725	0.647	0.196			
17	0.157	0.196	0.078	0.137	0.176	0.118	0.118	0.098	0.255	0.255	0.118	0.490	0.294	0.098	0.882	0.235		
18	0.647	0.529	0.706	0.647	0.647	0.745	0.784	0.588	0.627	0.627	0.647	0.412	0.569	0.647	0.098	0.725	0.137	
19	0.608	0.667	0.588	0.471	0.569	0.529	0.608	0.529	0.686	0.725	0.549	0.510	0.627	0.549	0.196	0.784	0.255	0.667

注:编号同表 1。

2.3 不同苜蓿种质聚类分析

基于 RAPD 标记检测获得的遗传相似系数对 19 份苜蓿种质进行了聚类分析,由图 1 可知,19 份苜蓿种质在遗传系数 0.420 处可被划分为 2 个大类,第 1 类群包括的苜蓿种质数最多,达到了 16 个,占供试苜蓿种质总数的 84.21%,其中国内苜蓿种质 11 个,国外苜蓿种质 5 个;第 2 类群包含的苜

蓿种质数只有 3 个,均来自国内,系数分别是 0.844 0、0.844 3 和 0.844 6。根据第 1 类群中苜蓿种质亲缘关系的远近,该类群在遗传相似系数 0.573 处又可划分为 2 个亚群,第 1 亚群共包括 8 个苜蓿种质,其中有 3 个国外种质,5 个国内种质,第 2 亚群也由 8 个苜蓿种质构成,除赛迪 7 和游客外,其余均为国内苜蓿种质。

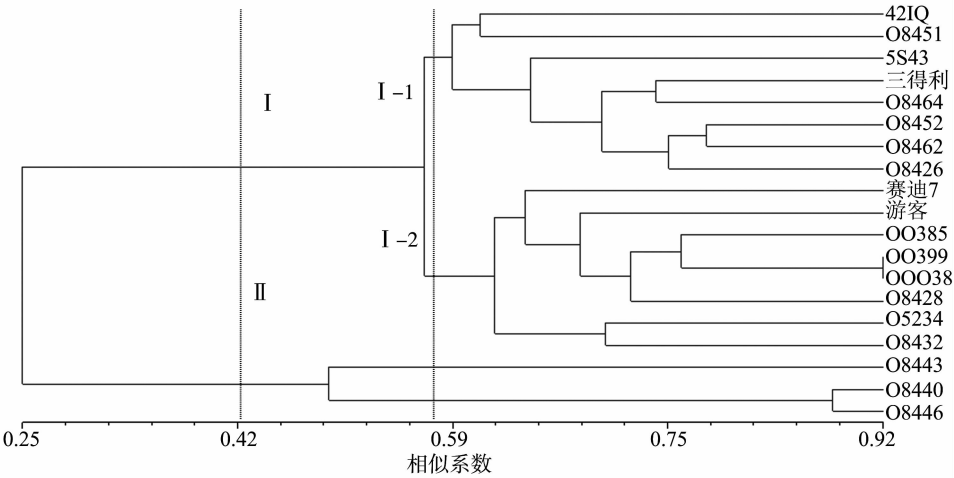


图1 苜蓿种质基于 RAPD 标记的聚类分析结果

2.4 苜蓿种质主成分分析

以 RAPD 标记检测数据为基础,对 19 份苜蓿种质进行了主成分分析,具体分析结果见图 2。在主成分分析中,前 3 个主成分能解释的总遗传变异较高,达 50.99%。从图 2 可以看出,主成分分析获得了与聚类分析完全一致的结果,聚类分析中被聚为同一类群的苜蓿种质在主成分分析中也被划分为

一类,由此可见,主成分分析结果也在一定程度上准确反映了不同苜蓿种质间的亲缘关系。

3 讨论

苜蓿种质资源研究一直备受重视^[11-12],利用不同类型的分子标记,许多学者对不同苜蓿种质资源开展了较多的研究,

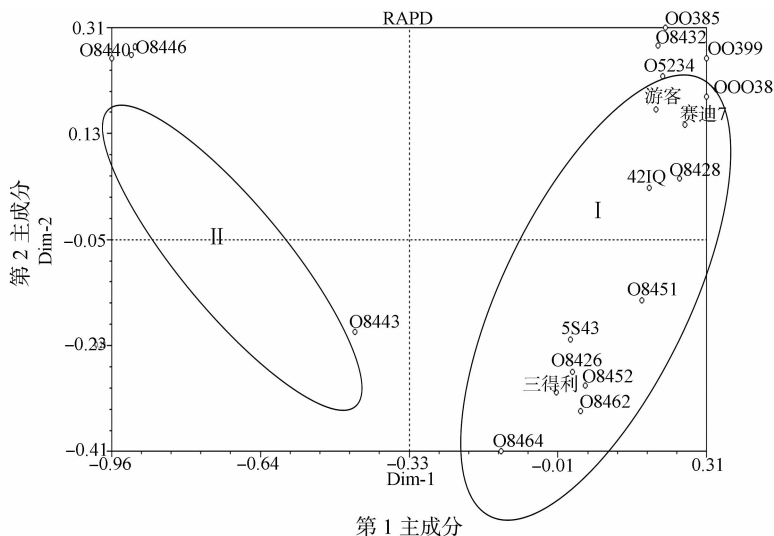


图2 苜蓿种质基于 RAPD 的主成分分析结果

其中 RAPD 标记是应用最早且应用频率较高的分子标记之一。为了获得苜蓿基因组理想的扩增效果,袁庆华等针对 RAPD 反应条件进行了专门的优化筛选探索^[13-15],这些研究结果也进一步促进了 RAPD 在苜蓿研究中的有效应用。本研究利用多态性表现良好的 RAPD 标记对 19 份国内外苜蓿种质进行了分析,7 个 RAPD 标记共获得 51 个有效扩增位点,其中多态性位点 50 个,多态性位点百分率达到 98.04%。杨晓莉等利用 10 个 RAPD 引物在 11 个苜蓿栽培品种中扩增获得了 81.1% 的多态性位点百分率^[16],蒿若超等用 35 个 RAPD 引物对 53 份苜蓿进行分析,获得的多态性位点百分率为 94.12%^[17],王赫等在利用 RAPD 引物进行苜蓿种质多样性分析中仅获得了 74.5% 的多态性位点百分率^[18]。通过比较不难看出,不同研究中 RAPD 标记对苜蓿基因组的扩增效果差异较大,而本研究获得的多态性位点百分率相对最高,究其原因,除了不同研究中利用的 RAPD 标记序列不同外,苜蓿种质的差异也是重要影响因素之一。

分子标记应用中多样性参数分析不仅有利于我们掌握分子标记对苜蓿基因组检测的有效性,同时也能在一定程度上反映所研究苜蓿种质遗传多样性状况。在以往的利用 RAPD 标记进行苜蓿种质遗传多样性研究中,有关 RAPD 标记多样性参数分析的报道甚少。本研究对所利用的 RAPD 标记的 4 种主要多样性参数作了分析,结果发现,RAPD 标记的主要多样性参数表现均较好,其中有效等位基因数平均为 1.48 个,Nei's 基因多样性指数平均为 0.29,Shannon's 信息指数平均为 0.44,多态性信息含量平均为 0.33。

以 RAPD 标记检测结果为基础,本研究对供试苜蓿种质的遗传多样性及亲缘关系作了分析。结果发现,供试苜蓿种质的遗传多样性较丰富,其平均遗传相似系数只有 0.494,在聚类分析中,19 份苜蓿种质可被划分为 2 个大类,该聚类分析结果已经清楚地反映了不同苜蓿种质间亲缘关系的状况。在未来苜蓿种质资源利用中,我们应当以此为基础,选择亲缘关系远、农艺性状表现良好且互补的苜蓿种质作为育种亲本配制杂交组合,只有这样,才能有效提高苜蓿优良新品种培育的效率和水平。

参考文献:

- [1] 耿华珠. 中国苜蓿[M]. 北京:中国农业出版社,1995.
- [2] 马向丽,毕玉芬,张凤仙. 紫花苜蓿杂交后代遗传变异的 AFLP 分析[J]. 草原与草坪,2010,30(2):50-55.
- [3] 陈立强,师尚礼. 42 份紫花苜蓿种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 草业科学,2015,32(3):372-381.
- [4] 张 栋,魏臻武,武自念,等. 淮阴苜蓿 SSR 指纹图谱的构建[J]. 草业科学,2012,29(6):924-930.
- [5] 张颖娟,王斯琴花. 不同苜蓿种质材料的 ISSR 分析及遗传多样性研究[J]. 中国草地学报,2014,36(3):35-39.
- [6] 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.
- [7] 李拥军,苏加楷. 苜蓿地方品种遗传多样性的研究——RAPD 标记[J]. 草地学报,1998,6(2):105-114.
- [8] 魏臻武. 苜蓿基因组 DNA 的 RAPD 指纹图谱[J]. 甘肃农业大学学报,2003,38(2):154-157.
- [9] 杨青川,孙 杰,韩国栋. 耐盐苜蓿与敏盐苜蓿 RAPD 多态性研究[J]. 草地学报,2001,9(2):83-86.
- [10] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep: Version II[J]. Plant Molecular Biology Reporter,1983,1(4):19-21.
- [11] 邵初阳,何晓兰,徐照龙,等. 甜高粱种质资源多样性及主要农艺参数聚类分析[J]. 江苏农业学报,2015,31(5):984-994.
- [12] 倪先林,赵甘霖,刘天朋,等. SSR 分子标记在糯高粱种质资源遗传多样性分析中的应用[J]. 江苏农业学报,2015,31(1):16-22.
- [13] 袁庆华,桂 枝,张文淑. 苜蓿基因组 DNA 提取和 RAPD 反应条件优选[J]. 草地学报,2001,9(2):99-105.
- [14] 孙 杰,杨青川,韩国栋. 紫花苜蓿 RAPD 反应条件优化[J]. 草地学报,2002,10(1):18-23.
- [15] 张 涛,杨青川,毛培胜. RAPD 分子标记鉴定紫花苜蓿品种的反应体系优化[J]. 草地学报,2006,14(4):333-337.
- [16] 杨晓莉,陈 丽,班 霆,等. 甘肃省苜蓿种质资源遗传多样性 RAPD 分析[J]. 草地学报,2008,16(2):129-134.
- [17] 蒿若超,张月学,唐凤兰. 利用 RAPD 分子标记研究苜蓿种质资源遗传多样性[J]. 草业科学,2007,24(8):69-73.
- [18] 王 赫,刘 利,周道玮. 苜蓿属种质资源遗传多样性 RAPD 分析[J]. 草地学报,2007,15(5):437-441.