

# 烟豆小种群的 RAPD 研究

钱吉, 马玉虹, 郑师章, 毛裕民

(复旦大学生命科学学院遗传研究所, 上海 200433)

**摘要:**本研究应用 RAPD 技术对湄洲岛和平潭岛上 4 个烟豆小种群进行的生态遗传学研究, 结果显示, 总的多态位点比率为 1.0, 4 个种群中最小为 0.41, 最大为 0.82, 表现出高度的多态性。利用相似系数及遗传距离进行的聚类分析结果表明, 在种群间地理距离较大时, 遗传分化与地理距离有一定的相关性, 在小范围内则无明显相关性。

**关键词:** 多年生野生大豆; 生态遗传学; RAPD

中图分类号: Q145

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)03-0314-03

## RAPD Study of Populations of *Glycine tabacina*

QIAN Ji, MA Yu-Hong, ZHENG Shi-Zhang, MAO Yu-Min

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** The ecological genetic research on *Glycine tabacina* populations was based on RAPD technique, which revealed 100% polymorphisms, with minimum value of 0.41 in population MM, and maximum value of 0.82 in population PT. Cluster analysis showed that the populations' genetic variation was correlation to the environment gradient when the geographic distance among populations was big. In small geographic range, however, no correlation exists between genetic structure and ecological factors because of random genetic drift.

**Key words:** wild perennial soybean; ecological genetics; RAPD

多年生野生大豆属于大豆属(*Glycine*)*Glycine* 亚属, 主要分布于大洋州的澳大利亚和南太平洋的一些岛屿上, 只有 *Glycine tabacina* (烟豆) 和 *Glycine tomentella* (多毛豆) 向北延伸到中国南部, 分布在北纬 25° 左右我国东南沿海地区及岛屿上。多年生野生大豆具有抗病、耐旱和耐热等优势, 可以成为我国大豆高产、优质、多抗育种的有价值的基因源, 在扩大栽培大豆种质资源方面具有潜在的应用价值<sup>[1]</sup>。对多年生野生大豆进行生态遗传学研究, 不仅有利于对其进行开发利用, 还可以为大豆的变异、进化以至起源等基础生物学问题的研究提供重要资料<sup>[2-3]</sup>。

本研究以烟豆 *Glycine tabacina* 4 个小种群为研究对象, 采用 RAPD 技术, 进行种群间和种群内

DNA 水平的遗传多样性研究, 提供多年生野生大豆种群生态遗传学的若干参数, 对保护和利用野生大豆的遗传资源提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究采用烟豆的新鲜叶片, 采集地点见表 1, 每个小种群样方面积为 5m×20m, 样品数为 20 个/种群。

### 1.2 方法

总 DNA 提取采用北京鼎国生物公司提供的“植物基因组 DNA 快速提取试剂盒”抽提, RAPD 反应的总体系为 25 $\mu$ L, 其中 dNTP 0.2mmol/L、Mg<sup>2+</sup> 3mmol/L、引物 (1 $\mu$ L 2.6mmol/L)、*Taq* 酶 0.5U、

收稿日期: 2002-09-02; 修回日期: 2002-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39800019)

作者简介: 钱吉 (1969-), 男 (汉), 籍贯苏州, 硕士, 讲师, 专业: 生态遗传学。Tel: 021-65643573 E-mail: jiqian@fudan.edu.cn

表 1 研究材料及其来源

Table 1 Materials and their resource

烟豆种群	来源	气候特征	纬度
MM	湄洲岛妈祖庙	典型亚热带	北纬 25°27'
MR	湄洲岛日纹石景	带海洋性	东经 119°
MY	湄洲岛烟墩山	季风气候	
PT	平潭岛	典型亚热带海洋性季风气候	北纬 25°43' 东经 119°23'

10×缓冲液 2.5μL、DNA 5ng,其余以无菌双蒸水补足。RAPD 反应程序为 95℃ 1min,35℃ 1min,72℃ 2min 共 5 个循环;然后 94℃ 1min,35℃ 1min,72℃ 1.5min 共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 5min。RAPD 产物于 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离(含 0.5μg/mL EB),结果用凝胶成像系统(FR-2000 UV/White Analysis)观察并记录。

统计所得电泳图谱中 RAPD 条带,条带的有无分别记作 1 和 0,然后应用 POPGENE32 进行处理计算多态位点比率,并计算遗传一致性  $I$  和遗传距离  $D$ <sup>[4]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 扩增

本研究中共应用了 20 个随机引物对烟豆的 4 个小种群(种群 PT:采自平潭岛;种群 MM:采自湄洲岛妈祖庙;种群 MY:采自湄洲岛烟墩山;种群 MR:采自湄洲岛日纹石景)进行了 RAPD 分析。经过条件优化,有 16 个引物扩增出效果良好的图谱。

### 2.2 数据处理

对扩增所得的结果,应用 POPGENE32 进行分析:

本实验共用 16 个引物扩增出 289 条条带,平均每个引物 18 条,根据 0.99 的多态位点标准,其中多态性条带 274 条,多态位点比率为 100%,popPT 多态比率最大为 0.82,popMM 多态比率最小为 0.41,按多态比率排序依次为:popPT>popMY>popMR>popMM(表 2)。

该矩阵对角线上方为遗传距离  $D$ ,下方为相似系数  $S$ (根据 Nei 1978 年无偏估计的遗传距离及相似系数)由表 3 可见,不同种群间的遗传距离从 0.7953 到 0.9407 不等;平均遗传距离为 0.8789。其中种群 MY 和种群 MR 距离最近,种群 PT 与其他 3 个种群距离较远。聚类分析结果也表明了这一点。

表 2 各引物检测四个烟豆小种群多态位点的数量(斜杠后是多态位点比率)

Table 2 No. and percentage of polymorphic sites in populations of *G. tabacina* with different primers

引物	popPT	popMM	popMY	popMR	总计
S101	4/0.80	2/0.4	4/0.8	1/0.2	5/1.0
S102	3/1.00	* * * *	* * * *	1/0.333	3/1.0
S103	8/0.80	5/0.5	6/0.6	5/0.5	10/1.0
S104	8/1.00	1/0.125	* * * *	3/0.375	8/1.0
S105	7/0.58	1/0.083	* * * *	8/0.667	12/1.0
S106	6/0.67	4/0.444	6/0.667	6/0.667	9/1.0
S107	0/0.00	* * * *	4/0.8	1/0.2	5/1.0
S108	4/1.00	3/0.75	2/0.5	1/0.25	4/1.0
S109	3/1.00	0/0.00	* * * *	* * * *	3/1.0
S111	* * * *	2/0.5	2/0.5	3/0.75	4/1.0
S112	* * * *	2/0.4	4/0.8	2/0.4	5/1.0
S113	6/0.75	* * * *	8/1.00	* * * *	8/1.0
S117	* * * *	6/0.857	5/0.714	4/0.571	7/1.0
S118	4/0.67	* * * *	4/0.667	2/0.333	6/1.0
S119	2/0.33	0/0.00	6/1.00	4/0.667	6/1.0
S120	1/0.17	* * * *	5/0.833	2/0.333	6/1.0
总计	56/0.82	26/0.41	57/0.76	43/0.51	101/1.00

表 3 四个烟豆小种群之间的遗传距离

Table 3 The genetic distance among populations of *G. tabacina*

	popPT	popMM	popMY	popMR
popPT	* * * *	0.8179	0.8870	0.7953
popMM	0.2010	* * * *	0.9236	0.9090
popMY	0.1180	0.0794	* * * *	0.9407
popMR	0.2290	0.0954	0.0611	* * * *

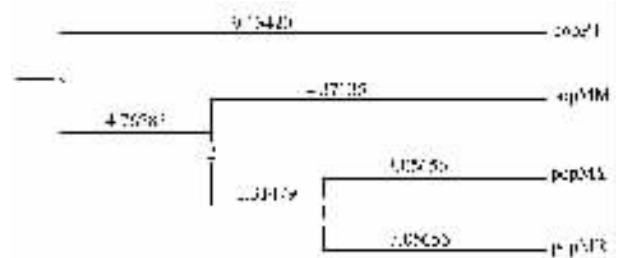


图 1 根据 Nei1978 无偏估计的遗传距离并通过 UPGMA 建立的聚类图

Fig. 1 Dendrogram generated based on the genetic distance using UPGMA methods

(pop1:PT;pop2:MM;pop3:MY;pop4:MR)

图 1 为根据 Nei 氏遗传一致性  $I$  和遗传距离  $D$  而构建的聚类图,如果逐渐减少引物数量,则建立的聚类图结果也都相同(图略),同样表明了种群 MY 和 MR 距离最近,种群 PT 和其他 3 个种群距离最远。

### 3 讨 论

从 RAPD 分析得到的数据结果来看,不同种群烟豆检测到的总的多态位点比率为 100%。若我们根据“最常见的等位基因频率小于或等于 0.99 的位点”的遗传多态定义,则烟豆的 4 个小种群均存在较高的遗传变异。本实验室印春悦等对嵎洲岛和平潭岛的 4 个烟豆小种群进行了等位酶的研究,得到的多态位点比率为 0.5623<sup>[5]</sup>;李军等在对金华地区野生大豆种群同工酶的研究中得到的多态位点比率为 0.4118<sup>[6]</sup>,Chiang Y. C. 在对分布在韩国、日本的 72 个野大豆种群的同工酶研究得到的平均多态性为 0.674<sup>[7]</sup>,均远远小于本文的 100% 的比率。而府宇雷等<sup>[8~9]</sup>对于金华地区一年生野生大豆 RAPD 分析,检测到了 99.5% 的多态比率,与本研究结果相符。造成上述结果是因为同工酶研究属蛋白质水平,仍是基因的表型,不是所有氨基酸替换都会引起净电荷的变化,或某一碱基的替换并不能改变蛋白质分子的迁移率,因此凝胶电泳不能检测出这类分子变异,而且由于只涉及蛋白质,意味着对整个基因组的结构基因进行分析,而对于大量染色体组中具调节或其他功能的基因没有研究,并且研究位点是否是染色体组中所有结构基因的随机样本或代表性取样也是个问题,种种原因导致了大量的遗传变异无法用工酶方法检测到。由于 RAPD 技术是基于 DNA 分子水平,使得在基因水平上研究种群遗传变异覆盖了更多信息,不仅包括编码区,还包括非编码区(Kongkiangam 等人对此也作过专门的比较)<sup>[10]</sup>。本文研究的结果显示,在 DNA 水平上烟豆的多态位点百分数较高,远大于一般的植物和多年生草本植物,表现出了高水平的遗传多样性<sup>[11]</sup>;另外烟豆小种群也具有相当高的遗传变异性,在野生大豆种质资源的利用和保护上有一定的价值。

本文根据相似系数和遗传距离,对 4 个小种群进行了聚类分析。聚类结果显示种群 MY 和种群 MR 先聚类,而平潭岛的种群 PT 和其他 3 个小种群间的距离最远。从地理距离来看,种群 PT 位于平潭岛,而其余 3 个小种群位于嵎洲岛,表明在种群间地理距离较大的情况下,遗传分化的分布格局与环境因素具一定相关性,即地理距离越远,遗传距离越大;地理距离越近,遗传距离越小。在较小范围内,由于光照等生态因子没有太大的变化,自然选择的压力趋于一

致,遗传距离与地理之间,并没有显著的相关性,可能是遗传漂变在遗传分布格局中起了主要作用。这一结论与胡志昂、李军等人的研究相符<sup>[6,12]</sup>。

野生大豆是重要的农作物品种资源。和一年生种 *G. soja* 一样,多年生野生种也具有高水平的遗传多样性,对扩大栽培大豆种质资源有相当的应用价值。应用 RAPD 进行的生态遗传学研究结果也将有助于探讨大豆的起源和进化<sup>[13~14]</sup>,进一步发挥我国丰富的野生大豆资源优势,为拓宽大豆育种的种质基础提供理论和实验依据。

### 参 考 文 献 (References):

- [1] 韩 锋,凌以禄. 大豆属多年生野生种收集、评价及利用研究进展[J]. 大豆科学, 1992, 11(1): 64~69.
- [2] 徐 豹,徐 航,庄炳昌,等. 中国野生大豆(*G. soja*)籽粒性状的遗传多样性及其地理分布[J]. 作物学报, 1995, 21(6): 733~739.
- [3] 庄炳昌主编. 中国一年生野生大豆生物学研究[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [4] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583~590.
- [5] Yin Chunyue, Qian Ji, Fu Cuizhang, et al. Genetic diversity in nature populations of *Glycine tabacina* in Fujian, China[J]. *Journal of genetics and molecular biology*, 2002, 13(1): 6~12.
- [6] 李 军,陶 芸,郑师章,等. 同工酶水平上野生大豆种群内分化的研究[J]. 植物学报, 1995, 37(9): 699~676.
- [7] Kiang Y T, Chiang Y C, Kaizuma N. Genetic Diversity in Natural-populations of Wild Soybean in Iwate Prefecture [J]. *Japan, Journal of Heredity*, 1992, 83(5): 325~329.
- [8] 府宇雷,钱 吉,陈 燃,等. 金华地区野生大豆小种群的分子生态学[J]. 复旦学报, 1999, 38(5): 584~586.
- [9] 府宇雷,钱 吉,马玉虹,等. 不同尺度下野生大豆种群的遗传分化[J]. 生态学报, 2002, 22(2): 176~184.
- [10] Kongkiangam P, Water way M J, Fortin M G, et al. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.); Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers[J]. *Euphytica*, 1995, 84: 237~246.
- [11] Hamrick J L. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A. H. D. (eds.) *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetics Resources*[M]. Sunderland, Mass: Sinauer, 1990, 43~63.
- [12] 王洪新,胡至昂,钟 敏,等. 盐渍条件下一年生野生大豆群体的遗传分化和生理适应: 同工酶和随机扩增多态 DNA 研究[J]. 植物学报, 1997, 39(1): 34~42.
- [13] 惠东威,庄炳昌,陈受宜,等. RAPD 重建的大豆属植物的亲缘关系[J]. 遗传学报, 1996, 23(6): 460~468.
- [14] 程须珍,杨又迪. RAPD 分析在绿豆亲缘关系研究中的应用[J]. 遗传, 1998, 20(增刊): 27~29.