

应用 RAPD 分析川西北高原青稞的遗传背景

洪棋斌¹, 侯磊¹, 罗小英¹, 李德谋¹, 肖月华¹, 裴炎¹, 杨开俊², 甲错²

(¹西南农业大学生物技术研究中心, 重庆 400716; ²四川省甘孜州农业科学研究所, 康定 626000)

摘要: 利用 RAPD 分子标记, 探讨了四川西北部青稞 42 个农家品种及 2 个育成品种的遗传背景。筛选出了 17 个 10 碱基随机引物, 共扩增出 79 条稳定的多态性谱带, 据之建立 1,0 型数据, 计算各品种间的 NL 相似系数, 再转化为相应的遗传距离矩阵, 采用离差平方和方法进行聚类分析, 获得聚类图; 取距离值 $T=0.6$, 可将 44 个品种分为 4 个大类。分析了各大类内品种地理来源、主要品种特性等, 发现大部分品种在各类内表现出一定规律性分布。通过不同多态性位点数的遗传距离的标准差和变异系数变化趋势的分析, 表明所得到的位点数已能可靠地对研究群体的遗传关系进行估计。

关键词: 大麦; RAPD; 分子标记; 遗传背景

中图分类号: S512.3; Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0578-1752(2001)02-0133-06

Using RAPD for Evaluating Genetic Background Among Naked Barley Varieties in Sichuan Northwestern Region

HONG Qi-bin¹, HOU Lei¹, LUO Xiao-ying¹, LI De-mou¹,
XIAO Yue-hua¹, PEI Yan¹, YANG Kai-jun², JIA Cuo²

(¹Biotechnology Research Center, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716;

²Sichuan Ganzi Agricultural Research Institute, Kangding 626000)

Abstract: The Qinghai-Tibet Plateau zone is rich of naked barley germplasms with superior characteristics in resistance to adverse conditions such as drought, radiation and diseases. The genetic relationships of 42 naked barley landraces and 2 bred varieties from northwest Sichuan Province, part of the Qinghai-Tibet Plateau zone, were evaluated with RAPD markers. Of 52 Operon arbitrary decamer primers tested, 17 distinguished a total of 79 polymorphisms. Genetic distance based on the Neil and Li's coefficients were calculated and used in cluster analysis with Ward's method. The results showed that the 44 varieties could be classified into four groups. The SDs (standard deviations) and CVs (coefficients of variation) of genetic distances at different number of polymorphisms were analyzed. Both of them showed an obvious downward trend along with increasing number of polymorphisms and became small and steady over 75 polymorphisms. Therefore, the number of polymorphic sites used in this paper were sufficient for the purpose of genetic evaluation in these naked barley populations.

Key words: Barley; RAPD; Molecular marker; Genetic background

我国是大麦的起源地之一, 种质资源极为丰富, 尤其是裸粒类型占有特别突出的地位。裸大麦资源主要起源和分布地区为青藏高原区, 包括西藏、青海和四川的西北部, 这里的裸大麦资源占全国裸大麦

资源的 77%^[1]。这些裸大麦资源适应青藏高原区复杂多变的地形和气候变化, 表现出抗寒、耐旱、抗盐碱、耐瘠薄以及多粒大粒、成熟早等优良性状^[2,3]。对于如此丰富优良的裸大麦种质资源, 国外限于资源

收稿日期: 1999-09-02

基金项目: 四川省应用基础研究项目

作者简介: 洪棋斌(1968-), 男, 四川德阳人, 助理研究员, 硕士, 现在中国农业科学院柑桔研究所从事柑桔品种资源和分子生物学研究。裴炎为通讯联系人, Tel: 023-68251883; Fax: 023-68864993; E-mail: peiyan@swau.edu.cn

材料、国内则由于研究手段和技术设备等多方面限制,未能得到深入的研究与利用。近年来,RFLP、RAPD、SSR、AFLP等分子标记技术的发展,为从分子水平深入研究大麦种质资源的遗传背景、评价种质资源等提供了新的方法和手段。RAPD最早是由Williams等^[4]提出的,具有操作快捷、简便的特点。本研究利用RAPD技术,对四川西北部的44个青稞品种遗传背景进行了探讨。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

从四川省甘孜州农业科学研究所提供的青稞品种中,选取了44个具有大粒、多粒、矮秆、早熟等优良农艺性状以及具有地域代表性的品种(表1)。表1

中品种编号首位数字“1”表示为冬性品种,“2”为多粒品种(每穗粒数多于50粒),“3”为大粒品种(千粒重 $\geq 40\text{g}$),“4”为育成品种,“5”为不同地域来源的品种,其中S209和S211既是大粒品种,又是多粒品种。表1中S102、S203、S206、S209、S210、S401、S402、S501、S519和S520为六棱品种,其余为四棱品种;S102、S103、S202、S203、S204、S207、S302、S303、S504、S515和S516为浅色品种,其余为深色品种;S102、S103、S203、S401、S402、S506、S509、S511、S512、S523和S524为早熟品种,S204、S207、S209、S210、S302、S306、S513、S519、S520和S525为晚熟品种,其余为中熟品种;S102、S203、S401、S402、S501和S515为矮秆品种,其余为中高秆品种。品种的大致地理分布见图1。

表1 青稞品种及其来源

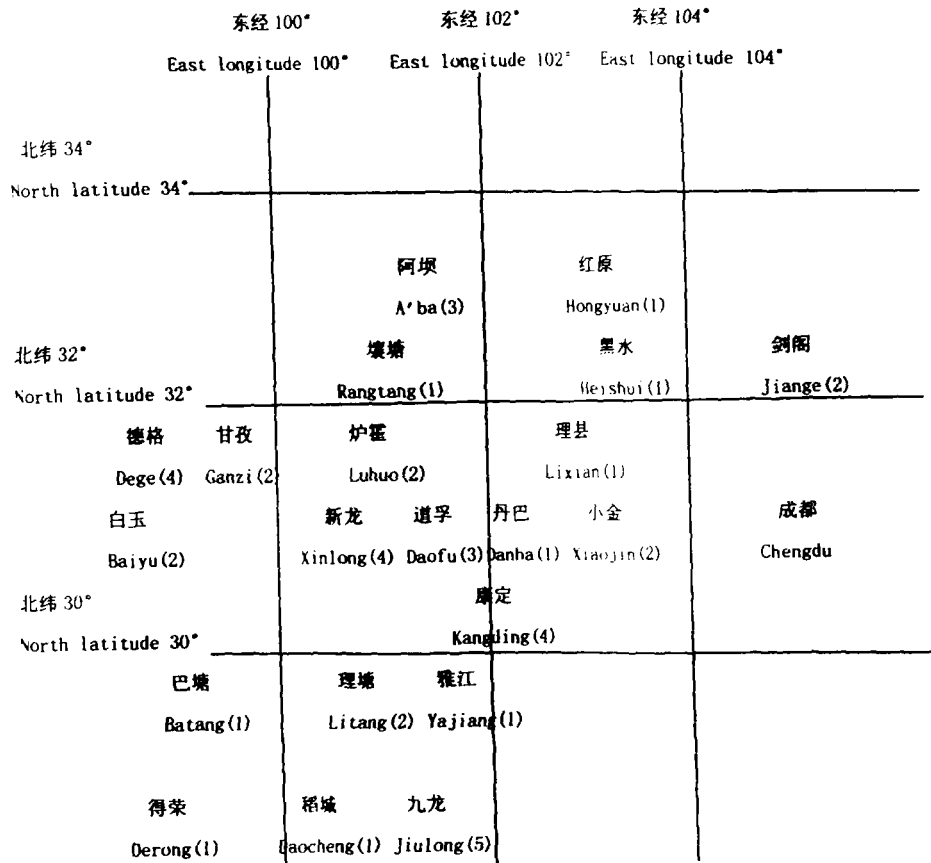
Table 1 Naked barley varieties and their source

品种名称 Name	编号 Code	来源 Source	品种名称 Name	编号 Code	来源 Source
九龙冬青稞 Jiulongdongqingke	S102	九龙 Jiulong	混早矮 77 Hunzao'ai77	S401	阿坝 A'ba
理县青稞麦 Lixianqingkemai	S103	理县 Lixian	红原黑青稞 Hongyuanheiyingke	S402	红原 Hongyuan
道孚快青稞 1号 Daofukuaiqingke 1	S201	道孚 Daofu	长芒六棱白青稞 Changmangliulengbaiqingke	S501	理塘 Litang
岗拖青稞 2号 Gangtuoqingke 2	S202	德格 Dege	葛色青稞 Geseqingke	S502	理塘 Litang
小青稞 2号 Xiaoqingke 2	S203	剑阁 Jiange	干加 Ganjia	S504	白玉 Baiyu
小金日隆 1号 Xiaojinrilong 1	S204	小金 Xiaojin	康巴青稞 Kangbaqingke	S505	白玉 Baiyu
聂嘎青稞 Niegaqingke	S206	丹巴 Danba	两季青稞 Liangjiqingke	S506	得荣 Derong
小金六棱春 Xiaojinliulengchun	S207	小金 Xiaojin	甘孜青稞 Ganzhiqingke	S509	甘孜 Ganzi
呷日索多 Jiarisuoduo	S208	稻城 Daocheng	红青稞 Hongqingke	S511	炉霍 Luhuo
迫折马 Paizhema	S209	新龙 Xinlong	黑水春青稞 Heishuichunqingke	S512	黑水 Heishui
黑六棱 Heiliuleng	S210	康定 Kangding	壤塘黑颈白六棱 Rangtangheijingbailiuleng	S513	壤塘 Rangtang
红原甲根黑青稞 Hongyuanjiagenheiyingke	S211	康定 Kangding	小青稞 1号 Xiaoqingke 1	S515	剑阁 Jiange
三岩龙本地早 Sanyanlongbendizao	S301	九龙 Jiulong	青青稞 Qingqingke	S516	炉霍 Luhuo
九龙白四棱 Jiulongbaisileng	S302	九龙 Jiulong	长芒红四棱 Changmanghongsileng	S517	德格 Dege
榆林本地青稞 Yulingbendiqingke	S303	康定 Kangding	青青稞 Qingqingke	S518	德格 Dege
春青稞 1号 Chunqingke 1	S304	九龙 Jiulong	色尔古 Se'ergu	S519	阿坝 A'ba
绿青稞 Lüqingke	S305	新龙 Xinlong	萨德本地青稞 Sadebendiqingke	S520	康定 Kangding
大盖黑青稞 Dagaiheiyingke	S306	新龙 Xinlong	俄母 1号 E'mu 1	S521	道孚 Daofu
岗拖青稞 1号 Gangtuoqingke 1	S307	德格 Dege	娘日青稞 1号 Niangeriqingke 1	S522	新龙 Xinlong
春青稞 2号 Chunqingke 2	S308	九龙 Jiulong	漳腊灰青稞 Zhanglahuiqingke	S523	阿坝 A'ba
道孚快青稞 2号 Daofukuaiqingke 2	S309	道孚 Daofu	白马尾青稞 Baimaweiqingke	S524	甘孜 Ganzi
白青稞 Baiqingke	S310	雅江 Yajiang	早地青稞 Handiqingke	S525	巴塘 Batang

1.2 DNA 的提取

青稞种子在营养钵中播种,出苗后取嫩叶约 2g,采用修改的 CTAB 法^[5]提取基因组 DNA。提取的 DNA 样品 2 μ l 稀释成 100 μ l,在 DU530 DNA/

Protein Analyzer (BECKMAN)上定量,同时用 DNA MARKER 作对照,在加有溴乙锭的 1%琼脂糖凝胶上电泳后比较定量。



括号中数字为来源于该地域的品种数

Number in each bracket represents no. of variety from the region

图 1 青稞品种的大致地理分布

Fig. 1 The approximate distribution of naked barley varieties

1.3 RAPD 反应及产物检测

PCR 反应在 GeneAmp 2400 型扩增仪(Perkin Elmer 公司)上进行,参照 Williams 等^[4]的反应体系,略作修改,采用 25 μ l 反应体积,含模板 DNA 50 ng 左右、OPERON 公司随机引物 240 nmol/L、每种 dNTP 100 μ mol/L、1 单位 Taq DNA 聚合酶(Promega 公司)、10 mmol/L Tris-HCl (pH8.8)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl₂、1% Triton X-100、以石蜡油覆盖。反应循环为:94 C 变性 4min,继以 94 C 变性 1min、37 C 退火 1min、72 C 延伸 1.5min,共 40 个循环,最后 72 C 延伸 10min。扩增产物在含溴乙锭的 1.4%琼脂糖凝胶上以 5V/cm 的电压电泳后,紫外灯下观察照相,根据底片记录多态性条带。

1.4 统计分析

根据 RAPD 扩增产物相同电泳迁移位置带的有无,建立 1,0 型数据。首先计算各品种间的 Neil 氏相似系数(NL)^[6,7],再根据遗传距离与相似度的相互关系转化为相应的遗传距离(GD)矩阵,采用离差平方和法进行聚类分析。同时,取 5~79 个位点数分别计算遗传距离的标准差(SD)和变异系数(CV),分析其变化趋势。计算公式分别为:

$$NL = 2SP / (2SP + 1 - S)$$

其中 S 为共有的 0 和 1 型带的数目的比值,P 为共有的 1 型带的数目的比值。

$$GD = -\ln(NL)$$

$$SD = \sqrt{[\sum GD(i,j) - AvgGD]^2 / (N-1)}$$

$$\text{Avg} = \delta \text{GD}(i, j) / (N - 1)$$

$$\text{CV} = \text{SD} / \text{GD}(i, j) / N$$

其中 AvgGD 为平均遗传距离, i, j 表示第 i 和第 j 个品种, N 为计算的遗传距离的个数。

2 结果与讨论

2.1 RAPD 重复性及其多态性

RAPD 具有操作快捷、简便、灵敏度高等优点,但在扩增重复性和资料统计等方面也存在一些不足^[6,8]。为了克服其不足,不同的研究者进行了多方面的探索,因为退火温度影响最大,对其探讨也最多。在大麦研究中, Tinker 等^[9]将变性温度置为 92℃,采用了 35℃的退火温度,获得了较好的重复性;而 Kleinhofs 等^[10]则采用 94℃ 30s、92℃ 30s 连续两步变性,将退火温度提高到了 36℃,获得了一定的重复性。本文则主要从两个方面努力,在青稞上获得了较为满意的结果:(1)参照 Williams 等^[4]的反应体系及条件,在提高扩增的稳定性、兼顾灵敏性的基础上,将退火温度提高至 37℃,并主要针对模板用量进行了选择。DNA 模板在 20~240ng 以内,均能正常扩增出相同的带。在大量扩增时,我们使用了 50ng 左右的模板量。以本文方法中介绍的标准反应条件,引物筛选与大量扩增中相同的 6 个样品的扩增结果一致;A11 号和 F14 号两个引物前后两次

全部样品扩增,结果也完全一致,因而可确认在一致的本反应体系下, RAPD 表现稳定,重复性好,可据之进行青稞的亲缘关系研究;(2)以本实验室对小麦 RAPD 的研究为基础,选择扩增带数在 7~10 条的随机引物,以性状和地域差异较大的 6 个样品进行初步扩增,对至少表现一个多态性且产物较为丰富、带型清晰的引物进行全部扩增。适宜的扩增带数和丰富的扩增产物在琼脂糖凝胶电泳后有利于形成清晰可辨的带型,更方便计数,有利于减少原始数据统计的误差。在获得原始数据后,再将其转化为 NL 系数,计算遗传距离,用于遗传关系研究,因为 NL 系数具有最直接的生物学意义,而且在 RAPD 存在假阳性或假阴性时,比其它相似系数表现更小的偏差^[6,7],这样进一步减少了资料统计方面的不足。

采用前述实验程序和方法,本研究总共筛选了 52 个随机引物,对 17 个表现多态性的引物进行了全部样品的扩增,琼脂糖凝胶电泳检测,得到了 79 个多态性位点。各引物检测到的多态性位点数差异较大,从 1~8 都有。表现多态性的随机引物及其序列组成见表 2。本研究所建立的青稞 RAPD 反应体系,和筛选的随机引物为进一步开展大麦的相关研究,如种质资源的评价、重要抗性 or 优质性状的快速分子标记筛选和分离等,提供了可供参考的方法和部分基础性资料。

表 2 表现多态性的随机引物及其序列组成

Table 2 Random primers and their sequences

名称 Name	序列 Sequence	多态性位点数 No. of polymorphisms	名称 Name	序列 Sequence	多态性位点数 No. of polymorphisms
A2	TGCCGAGCTG	3	A8	GTGACGTAGG	1
A11	CAATCGCCGT	8	A15	TCCGAACCC	1
A17	GACCGCTTGT	4	A19	CAAACGTCGG	5
B2	TGATCCCTGG	6	B7	GGTGACGCAG	5
B14	TGGGCTCTGG	6	B18	CCACAGCAGT	3
C1	TTCGAGCCAG	6	C15	GACGGATCAG	6
E7	AGATGCAGCC	4	E16	GGTGACTGTG	8
F14	TGCTGCAGGT	6	G16	AGCGTCCTCC	3
Q5	ACGCGTCTTG	4			

2.2 44 个青稞品种(系)的聚类分析

据上述 RAPD 分析所得 1,0 型数据,计算各品种间的遗传距离,并采用离差平方和法进行聚类分析,获得聚类图(图 2)。从图 2 可见,各类群间的遗传距离值有两个较大跳跃,其一在 0.6 左右,其二在 0.8 左右。取距离值 0.6,可将 44 个品种从 S103~S307 分为 I、II、III 和 N4 个大类;而取距离值 0.8,则分为 3 个大类,前述 4 个大类中的 II 和 III 两类合并为一新类,其它两类不变。分析两种分类各类内品

种地理来源和主要生物学性状和农艺性状,发现两者均表现出一定规律性分布,但第一种分类更细致一些,与四川西北野生六棱大麦分布的 4 个地区,即甘孜、道孚、德格和稻城^[11]表现一定的一致性,而且 I 和 III 两类中籽粒色泽分布表现明显差异,归为不同大类似乎更合理,因而我们倾向于此种分类。

I 类:4 个品种,均来源于阿坝及偏东相邻区域,可以地域命名为阿坝类群。此类中 S401 和 S402 是供试材料中唯一的两个育成品种,具有相近的来源,性

状均表现为六棱、早熟、矮秆、子粒色泽深;其它两个品种均为四棱,籽粒色泽浅。因为穗密度与棱型较一

致,六棱一般为中、密穗型,因而穗型也有同样分布;从成熟期看,早熟品种比例较高,占了 3 个。

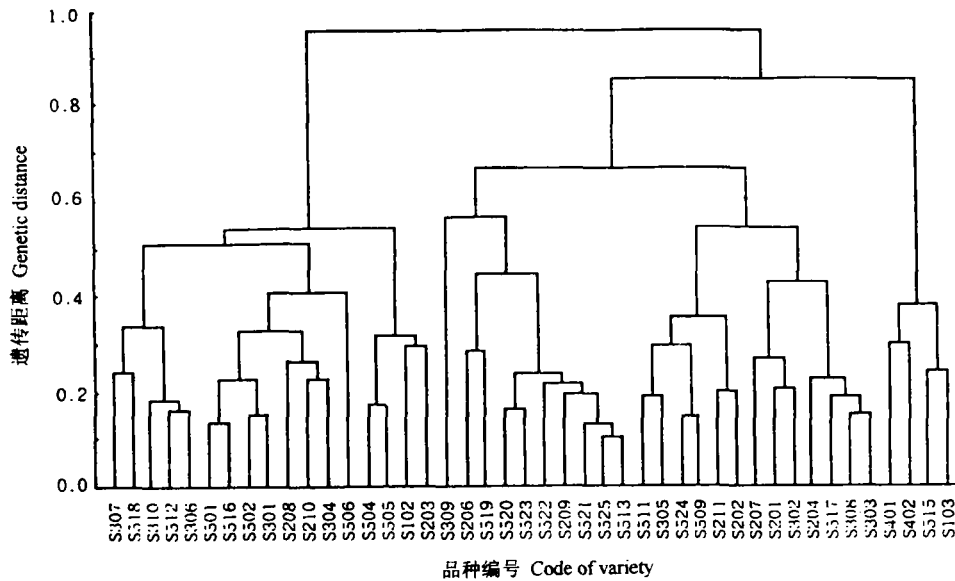


图 2 44 个青稞品种的高差平方和法聚类分析结果

Fig. 2 The genetic similarity tree obtained by cluster analysis with Ward's method for 44 naked barley varieties

I 类:13 个品种,来源于德格-甘孜地区及相邻区域的品种有 7 个,可以地域命名为德格-甘孜类群。此类中大粒品种和多粒品种分布较为集中,分别占全部大粒品种的 5/12 和多粒品种的 5/10;早熟品种和晚熟品种,各有 3 个;浅色品种较丰富,占全部浅色品种的 5/11。

II 类:10 个品种,来源于道孚-新龙地区及相邻区域的品种有 6 个;可以地域命名为道孚-新龙类群。此类中六棱品种和晚熟品种分布较为集中,分别有 4 个和 5 个。全部为深色品种。

III 类:17 个品种,有 9 个品种来源于稻城-九龙地区及相邻区域,命名为稻城-九龙类群。此类中有 4 个六棱品种,大粒品种也较多,占全部的 5/12。

总之,在各类中品种地理来源、主要品种特性等均表现一定的聚集趋势。如 10 个六棱品种分别归于 I 类、II 类和 III 类中,除 III 中两个较分散外,其余均较紧密聚集。这与 Tinker 等^[9]的结果有一些相似性。又如具有多粒大粒等优良农艺性状的品种,主要分布在 II 类和 III 类中,而早熟矮秆品种则主要分布在 I 类和 II 类中。这种品种地理来源、主要品种特性等的聚集分布特性,对青稞的资源收集和育种亲本的选择和搭配都有一定的参考价值。但是由于川西北高原复杂特殊的地理地貌特点^[12],民族与宗教分

布、商业与文化交流等不同特点,使部分地理距离相近的品种,可能彼此遗传距离较远,而一些地理虽然较远的品种却可能因为遗传交流,聚类在一起。

2.3 RAPD 在青稞遗传背景研究中多态性位点数目确定

RAPD 已广泛用于生物间遗传关系的研究,但为了获得可靠的研究结果,各研究者因研究对象及其数量的不同,却采用了不同的引物数量和多态性位点数。如同样是玉米自交系的研究,刘新芝等^[13]对 15 个品系使用了 6 个引物,29 个多态性位点,而 Pejic 等^[14]对 33 个自交系则应用了 25 个引物,90 个多态性位点进行分析,二者均获得了与已知谱系一致的结果;在大麦中,Tinker 等^[14]采用 19 个引物,31 个多态性位点对 27 个自交系进行了聚类分析,获得了与已知谱系追溯基本一致的结果。

为判断我们所选用的引物数量和多态性位点数是否合适,我们从获得的位点数中分别抽取 5 至 79 个,计算相应遗传距离的标准差和变异系数,作图分析变化趋势(图 3)。从图 3 中可见,遗传距离标准差和变异系数在 56 个位点数以前,均有较大变化,在此以后标准差变化已非常平缓,而变异系数在 56~75 之间仍有一定变化,在 75 以后才变得非常平缓。因而我们认为,在所探讨的群体大小(44 个),采用

RAPD 研究青稞的遗传关系,当多态性位点数达到或超过 75 以后,获得的结果估计应该已经较为可靠。此结论与周泽扬等^[15]以及 Pejic 等^[14]的研究结果较为一致。周泽扬等通过在蚕桑上的研究,认为 RAPD 位点数达到或超过 70 时,即可获得比较可靠的信息;Pejic 等在玉米自交系上的研究中认为,当 RAPD 的引物在 40~50 个、多态性谱带在 70 以上时,已能较可靠的估计遗传相似性。

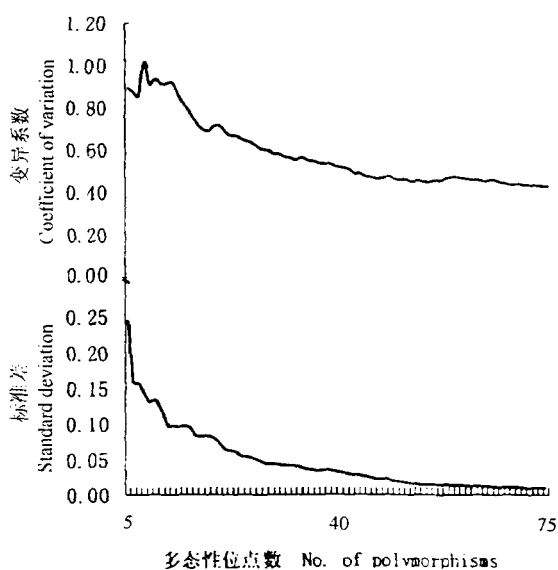


图 3 不同多态性位点数遗传距离的标准差和变异系数变化趋势

Fig. 3 The SDs (standard deviations) and CVs (coefficients of variation) of genetic distances on different number of polymorphisms

虽然多态性位点越多,所得到的结果从理论上来说越可靠,但需要付出的人力物力也越多,而且当多态性位点增加到一定程度,增加的位点对准确性的贡献已有限,因而我们认为应该根据研究对象和群体大小,在保证研究结果真实可靠的基础上,选择合理的分析位点数进行遗传关系的研究和评价。

References:

[1] Cao Y S, Zhang X Z. Atlas of Major Crop Germplasm Resources Distribution in China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 93. (in Chinese)
曹永生, 张贤珍. 中国主要农作物种质资源地理分布图集 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 93.
[2] Xu T W. On origin and systematic development of cultivated barley in China [A]. Barley committee of Chinese Crop Science society, Eds. Barley Science in China [C]. Beijing: China Agriculture Science and Technology Press. 1986: 34-43.

(in Chinese)

徐延文. 论中国栽培大麦的起源和系统发育 [A]. 中国作物学会大麦专业委员会. 中国大麦文集 [C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1986: 34-43.

- [3] Lu W, Ma D Q, Shun L J, et al. A study on identification of agronomic character and multiplication of barley germplasm resources [A]. Barley committee of Chinese Crop Science society and Institute of upland crops of Jiangxi Academy Agriculture Science, Eds. Barley Science in China [C]. Nanchang, Jiangxi Science and Technology Press. 1993: 1-6. (in Chinese)
陆 炜, 马得泉, 孙立军, 等. 大麦种质资源繁殖和农艺性状鉴定研究 [A]. 中国作物学会大麦专业委员会. 江西省旱作研究所. 中国大麦文集 [C]. 南昌: 江西科技出版社, 1993: 1-6.
[4] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers [J]. Nucl. Acids Res. 1990, 18: 6531-6535.
[5] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem. Bull. 1987, 19: 11-15.
[6] Lamboy W F. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts [A]. PCR Methods and Applications [M]. 1994: 31-37.
[7] Neil M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76: 5269-5273.
[8] Karp A, Edwards K, Bruford M, et al. Newer molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges [J]. Nature Biotechnol. 1997, 15: 625-628.
[9] Tinker N A, Fortin M G, Mather D E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley [J]. Theor. Appl. Genet. 1993, 85: 976-984.
[10] Kleinhofs A, Kilian A, Saghai Maroof M A, et al. A molecular, isozyme and morphological map of barley (*Hordeum vulgare*) genome [J]. Theor. Appl. Genet. 1993, 86: 705-712.
[11] Ma D Q. Study on classification and distribution of wild six-rowed barley in China [J]. Barley Science, 1997, 2: 7-10. (in Chinese)
马得泉. 中国野生六棱大麦分类和分布的研究 [J]. 大麦科学, 1997, 2: 7-10.
[12] Liu S Z, Shen Z X. Study on the plot of agricultural physiognomy on county level and cropland distribution rules in Sichuan Province, China. Chengdu, Chengdu Atlas Press, 1990: 83-91. (in Chinese)
刘淑珍, 沈镇兴. 四川省县级农业地貌区划及耕地分布规律研究 [M]. 成都: 成都地图出版社, 1990: 83-91.
[13] Liu X Z, Peng Z B, Fu J H, et al. Heterotic grouping of 15 maize inbreds with RAPD markers [J]. Scientia Agricultura Sinica. 1997, 30(3): 44-51. (in Chinese)
刘新芝, 彭泽斌, 傅骏骅, 等. RAPD 在玉米类群划分研究中的应用 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(3): 44-51.
[14] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs [J]. Theor. Appl. Genet. 1998, 97: 1248-1255.
[15] Zhou Z Y, Xia Q Y, Lu C, et al. The correlation between the number of RAPD-loci and the reliability of the information on genetic variation in molecular phylogenetic studies [J]. Hereditas (Beijing). 1998, 20(5): 12-15. (in Chinese)
周泽扬, 夏庆有, 鲁 成, 等. 分子系统学研究中分子位点数与遗传差异信息可靠性的关系 [J]. 遗传, 1998, 20(5): 12-15.