

利用 RAPD 与 SSR 技术进行野生大豆种群内分化的研究*

周晓馥 庄炳昌 王玉民 赵洪琨

(吉林省农业科学院农业生物技术重点开放实验室 公主岭 136100)

摘要 利用 RAPD 和 SSR 技术对 25°N 野生大豆种群 16 个样本进行分子标记,从 150 多个 RAPD 引物中筛选出具有多态性的引物 20 个,共扩增出 146 个标记位点,其中具有多态性的有 60 个,占总位点的 40.8%,平均遗传距离为 0.1536,杂合度为 0.3248。从 60 对 SSR 引物中筛选出 14 对具有多态性的引物,平均遗传距离为 0.2209,杂合度为 0.6961。聚类分析可将 25°N 野生大豆 16 个样本分成 5 类,表明种群内存在大量的遗传变异。为研究野生大豆种群内及种群间的遗传多态性探索了有效方法,并提出野生大豆核心种质资源的保存及取样对策。

关键词 RAPD SSR 种群分化 野生大豆 分子标记

Population differentiation of wild soybean based on the RAPD and SSR analysis. ZHOU Xiao-Fu, ZHUANG Bing-Chang, WANG Yu-Min, ZHAO Hong-Kun (Key Open Lab. On Agro-Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Science, GongzhuLing 136100), *CJEA*, 2002, 10(4): 6~9

Abstract Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) analyses were applied to 16 samples of wild soybeans (*Glycine soja* sieb and Zucc) originated from the region of 25°N. Twenty primers screened with 150 ones yielded 146 RAPD bands which had 60 polymorphic products and 40.8% of total bands, the average heterozygosity (H_e) was 0.3248 and the average genetic distance among the 16 samples was 0.1536. Fourteen pairs of soybean SSR primers screened had polymorphism, the average heterozygosity was 0.6961 and the average genetic distance was 0.2209. Cluster analysis showed there are five small classes divided from the 16 samples and there are some evidence showing genetic variations in the population. The genetic resource is also put forward.

Key words RAPD, SSR, Population differentiation, *Glycine soja*, Molecular markers

野生大豆 (*Glycine soja*) 是栽培大豆的野生近缘种,开展野生大豆的研究,特别是野生大豆种群内遗传分化多样性的研究,对保护和开发野生大豆资源具有重要意义。以往的野生大豆小种群内遗传分化研究是在同工酶和等位酶水平上进行的,证明了野生大豆小种群内存在着大量的遗传分化。庄炳昌^[3]对不同纬度不同进化类型大豆的 RAPD 分析也表明 *Glycine* 亚属内种间存在明显差异,且指出 25°N 在大豆资源研究中具有重要意义。为此,对 25°N 野生大豆种群进行了 RAPD 和 SSR 研究分析,探讨了种群内遗传结构及种群内遗传分化程度,为野生大豆分子生态学提供若干参数及理论基础,并提出大豆核心种质资源采集对策。

1 试验材料与方法

供试材料选择我国 25°N 野生大豆种群,该种群共包括 16 份材料,由吉林省农业科学院提供,引物购自 Operon 公司。DNA 提取按照 Roggers 和 Bendish(1988)报道的 CTAB(Cetyl thylammonium bromide)方法,并参考忻骅等(1997)的方法,稍作改进,提取新鲜叶片的总 DNA。RAPD 反应体系总体积 25 μ L,其中模板 DNA 50ng, 200 μ mol dNTP,引物 200nmol, 2.5 μ L 10 \times buffer (100mmol Tris-HCL pH = 8, 3mmol KCl, 200mmol MgCl₂, 0.001% geltatin, 0.1% Np-40), 1.5 单位 TaqDNA 聚合酶,加 2 滴石蜡油防止蒸发。反应循环参数为 94℃ 变性 5min 后:94℃ 30s, 52℃ 30s, 68℃ 30s, 45 个循环;最后 72℃ 延伸 10min,反应在 UNO || PCR 循环仪上进行,PCR 产物采用 1.4% 琼脂糖电泳检测,电泳结果在透式紫外灯上照相记录,RAPD 引物序列见表 1。SSR 反应体系总体积 25 μ L,其中模板 DNA 60ng, 200 μ mol dNTP,引物 200nmol, 2.5 μ L 10 \times buffer (100mmol Tris-HCL pH = 8, 3mmol KCl, 200mmol MgCl₂, 0.001% geltatin, 0.1% Np-40), 1.5 单位 TaqDNA 聚合酶,加 2 滴石蜡油防止蒸发,反应循环参数为 94℃ 5min 1 个循环:94℃ 30s,

* 国家自然科学基金项目(39730330, 39670448)和国家基础研究(973)发展规划项目(G1998010200)资助

收稿日期:2001-06-30 改回日期:2001-07-30

52℃ 30s,68℃ 30s, 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10min,反应在 UNO || PCR 循环仪上进行,PCR 产物采用 10% 聚丙烯酰胺 150V 电泳检测,电泳结果在透式紫外灯上照相记录,SSR 引物序列见表 2。数据处理是对不同的个体所扩增 DNA 条带量化为 1 或 0(有条带为 1,无条带为 0),在相同实验条件下迁移相同的条带视为同源位点。统计结果用软件 NTSYS-PC Version 1.70 Qualitative 进行矩阵分析,然后进行 SHAN Clustering 亲缘关系分析,并给出亲缘关系树状图。

表 1 RAPD 引物序列

Tab.1 RAPD primer sequences

引物号 No. of primers	引物序列 Primer sequences	引物号 No. of primers	引物序列 Primer sequences
OPB1	5' G T T T C G C T C C 3'	OPO13	5' G T C A G A G T C C 3'
OPF16	5' G G A G T A C T G G 3'	OPO19	5' G G T G C A C G T T 3'
OPG18	5' G G C T C A T G T G 3'	OPO8	5' C C T C C A G T G T 3'
OPG2	5' G G C A C T G A G G 3'	OPP2	5' T C G G C A C G C A 3'
OPG7	5' G A A C C T G C G G 3'	OPP3	5' C T G A T A C G C 3'
OPG8	5' T C A C G T C C A C 3'	OPP7	5' G T C C A T G C C A 3'
OPH20	5' G G G A G A C A T C 3'	OPP8	5' A C A T C G C C A 3'
OPH5	5' A G T C G T C C C C 3'	OPF14	5' T G C T G C A G G T 3'
OPH7	5' C T G C A T C G T G 3'	OPF4	5' G G T G A T C A G G 3'
OPH17	5' C C C A G C T G T G 3'	OPH12	5' A C G C G C A T G T 3'

表 2 SSR 引物序列

Tab.2 SSR primer sequences

引物号 No. of primers	引物序列 Primer sequences	引物号 No. of primers	引物序列 Primer sequences
161/162	5'TTT TTG TTT AAC TTA CTG TAC TFT3' 5'GCT AGT CTT CTA CAA CCT TCT A3'	209/210	5'CCA ACT TGA AAT TAC TAG AGA AA3' 5'CTT ACT AGC GTA TTA ACC CTT3'
163/164	5'GGA AGA AAG TAT TGG TCT GT3' 5'AGG AGA GAG TGG AGA GAT TA3'	225/226	5'TGG TTT CTA CT TCT ATA ATT ATT T3' 5'ATG CCT CTC CCT CCT3'
179/180	5'AAA GGA GTA GGA TGT AAG AGA3' 5'CAA ACC ACC AGT GAC C3'	227/228	5'AAA ATA ACT AAA ATG TCT TCT CA3' 5'TTG GTC AGA TTA TTA TAA GAT TG3'
181/182	5'GCC TTT TCT GAC TGT TAA3' 5'CAG TGA CTA AAA CTT ACT AT3'	235/326	5'GAT CTA AAG TCT GAT ATT TTT AAC TA3' 5'AAA AGG AGA AGG AAT GC3'
195/196	5'AAA AAA TAT TTA TAG GTT ACA TGT G3' 5'TTA CCA CTA AGA ATT AGG TCT AA3'	173/174	5'GAT ACG ACC AAA AAT TGT T3' 5'AAC TGA GAA GAT ACT ACC C3'
197/198	5'CGA AAC GCA AAA TCT C3' 5'AAA ACG TAT CTG AAG TAG TGG3'	215/216	5'GAG AAA GAA ATG TGT TAG TGT AA3' 5'CTT TCC CTT CTT ATT CTT TGA3'
199/200	5'TCG CCG GTA CAA AAG3' 5'CGA ATG AAC AAA CAA ACA3'	217/218	5'TGT AT TTA CCT TAC CTT TGA3' 5'ACC TGC CAC CAA TGA C3'

2 结果与分析

RAPD 多态性分析,从 150 个随机引物中筛选出 20 个有效引物(即在 25°N 野生大豆种群 16 个样本的基因组 DNA 中都扩增出 DNA 片段的引物),该 20 个有效引物共获得 146 个标记位点,其中 60 个表现出多态性,占总位点的 40.8%,平均每个引物扩增的 DNA 带数为 7.3 条,不同引物得到各自不同的 25°N 野生大豆种群 16 个样本的基因组 DNA 指纹图谱,其中用引物 OPG7 扩增得到的 DNA 指纹图谱见图 1。



图 1 用引物 OPG7 扩增得到的基因组 DNA 指纹图谱
Fig.1 Genomic DNA fingerprints amplified with the primer OPG7

SSR 多态性分析,从 60 对引物中筛选出对 16 个样本扩增产物具有明显多态性的引物 14 对(引物序列见表 2),扩增产物的多态性可通过 4% 琼脂糖凝胶电泳或 10% 聚丙烯酰胺 150V 电泳检测,研究发现采用聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨率明显优于琼脂糖电泳,因而本实验采用后者,用引物 163/164 扩增得到的 DNA 指纹图谱见图 2。UPGA 聚类分析,本实验对 14 对 SSR 引物在 25°N 野生大豆种群 16 个样本扩增的产物进行 UPGA 聚类分析的基础上,建立了 16 个样本 25°N 野生大豆遗传关系树状图(见图 3),同时对 20 个随机引物在 16 个样本扩增的 146 条 DNA 带进行 UPGA 聚类分析结果与图 3 基本相符。图 3 表明,16

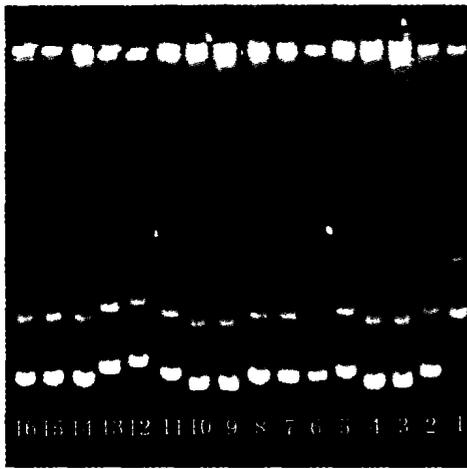


图 2 用引物 163/164 扩增得到的基因组 DNA 指纹图谱
Fig.2 Genomic DNA fingerprints amplified with the primers 163/164

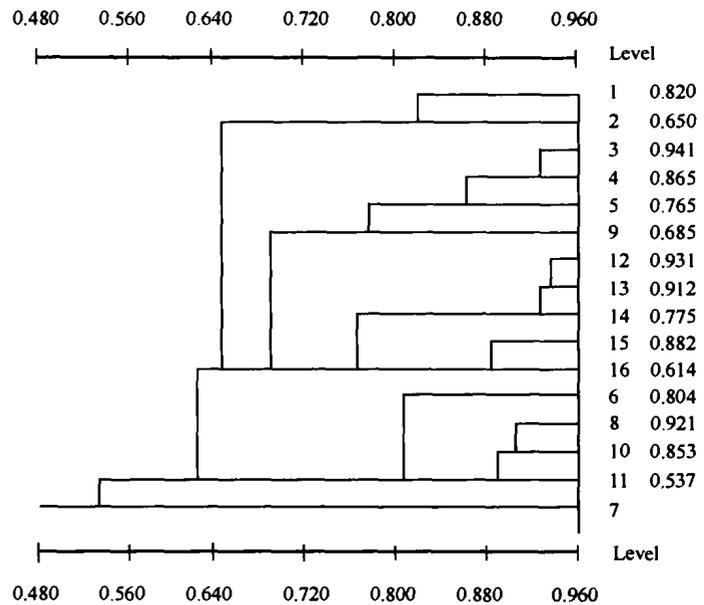


图 3 25°N 野生大豆 16 个样本的 SSR 聚类分析树状图
Fig.3 Dendrogram of 16 sampled from 25°N wild soybean based on SSR markers

个样本可划分为 5 个类群, I 类包括 1, 2 号样本, II 类包括 3, 4, 5 和 9 号样本, III 类包括 12, 13, 14, 15 和 16 号样本, IV 类包括 6, 8, 10

和 11 号样本, V 类包括 7 号样本, 这 5 个类群之间遗传距离分别为 0.350, 0.315, 0.386, 0.463。25°N 野生大豆小种群内遗传多态位点比例 (RAPD) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 号样本分别为 22.5%, 34.12%, 3.0%, 31.67%, 31.69%, 43.33%, 38.33%, 44.12%, 39.17%, 32.5%, 30.83%, 28.33%, 34.12%, 33.33%, 40.0%, 35.00%。假设每条谱带代表 1 个基因座位, 多态座位比例 = 多态座位数 / 所测座位总数。这一结果符合 Ayala F. J. [5] 的判断 (即对大部分有机体而言 1 个群体多态位点的比率介于 20% ~ 50% 间, 表明 25°N 野生大豆小种群内存在着大量的遗传分化, 25°N 野生大豆遗传多态位点比例在 0.225 ~ 0.4333 之间。25°N 野生大豆小种群群体杂合度 (Population heterozygosity, H_e):

$$H_e = 1 - \sum X_i^2 \quad (1)$$

其中 X_i 为第 i 等位基因或基因频率。从基因频率可计算出 25°N 16 个样本的平均杂合度 SSR H_e 为 0.6961, RAPD H_e 为 0.3248。由于野生大豆是自花授粉植物, 实际测量的 H_e 值应大大低于期望值, 从群体杂合度看, 同样可以得出 25°N 野生大豆小种群内存在着大量的遗传多样性这一结论。遗传距离和遗传一致性 (genetic identity, I):

$$I = \sum X_i Y_i / (\sum X_i^2 Y_i^2) / 1/2 \quad (2)$$

表 3 25°N 种群内 4 类间遗传距离与遗传相似性 (SSR)

Tab.3 The genetic distances and genetic identity between the 4 classes of 25°N Glycine soja (SSR)

类间 Types	相似性 (SSR) Genetic identity	RAPD	遗传距离 (SSR) Genetic distance	RAPD
I	0.650	0.8347	0.350	0.1653
II	0.685	0.8490	0.315	0.1510
III	0.614	0.8662	0.386	0.1338
IV	0.537	0.8841	0.463	0.1157

式中, X_i 、 Y_i 为群体 X、Y 的第 i 等位基因或基因型频率。遗传距离 (Genetic distance, D) $D = \ln I$, 聚类分析将 16 个样本分成 5 类。25°N 种群内 4 类间遗传距离与遗传相似性见表 3。

3 小结与讨论

本实验采用 RAPD 和 SSR 技术分别对样本进行标记, 2 类标记的结果大致相同, 但也存在一些差异。RAPD 技术操作简单, 灵敏度高, 但目前应用过程中最主要问题是 RAPD 扩增的带型不稳定。本研究发现扩增产物中弱带较多, 导致条带识别中的误差增大, 并可能引起实验重复性不好的后果。条带数目是决定 RAPD 分析性的最主要因素 [8], 故本实验对 RAPD 扩增的弱带不做统计。SSR 技术具有高共显性、多态性等特点, 是 1 种很有价值的分子标记, 它的 PCR 产物除主带以外, 上下还有一些阴影带, 这是由于扩增微卫星 DNA 时 TaqDNA 聚合酶滑动造成的, 但这些带一般均 > 300 ~ 400 个碱基, 不影响 SSR 分析 [11] 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳提高分辨率, SSR 技术分辨率高, 误差小, 分析结果更为可靠, 本实验采用 RAPD 与 SSR 相结合技术, 这为今后应用于野生大豆种群间的研究奠定了基础。关于小种群的遗传分化问题, 国内外应用

同工酶、等位酶技术对多种植物进行大量种间、种内变异的研究^[1,2],表明了各样本的生化遗传结构与环境之间不存在显著的相关性。本研究采用 RAPD 技术对 25°N 野生大豆种群内样本进行分子标记,进一步探讨了野生大豆种群内高度遗传多态性。根据“复等位基因以 0.01 以上频率共存”的遗传多态定义看,则种群多态位点的比例为 0.3350,这一结果符合 Ayala F. J.^[5]的判断,即对大部分有机体而言 1 个群体多态位点比率为 20%~50% 间,此结果略低于 Chiang Y. C.^[6]的分析结果,造成这一差异的原因可能是本研究系小范围内种群,但从中仍可看到 25°N 野生大豆小种群内存在的大量遗传分化。25°N 野生大豆种群的平均遗传距离为 0.221,平均相似系数为 0.779,这说明在 DNA 水平上供试样本的多态性并不丰富,这符合自交群体的特点^[7],与野生大豆在自然条件下只有 0.1% 左右的异花授粉率一致,说明野生大豆在自然条件下是自交,同时也证明本研究数据的可信性。种群是进化的基本单位^[5],种群内高度遗传分化为生态型的形成提供了丰富的物质基础。核心种质是以最小的资源数量,最大程度的代表整个资源的多样性,因此对资源多样性的正确评价是核心种质构建的基础。以表型的变异评价资源的多样性虽简单易行,但有些性状尤其是产量性状易受环境的影响;同工酶位点数较少,基因表达也有时空性。RAPD 和 SSR 标记克服了形态和同工酶标记的缺点,可计算不同基因在不同群体中出现的频率以估计不同群体乃至整个物种的基因多样性,且可了解不同群体及整个物种在所检测的位点上总的等位基因数及基因型数,本研究利用此技术进行研究结果表明,野生大豆小种群内存在高度的遗传变异,确定野生大豆种群的群体遗传结构及其变异程度,可制定合理的取样保存方案,同时为大豆基因组的遗传作图和基因定位、基因克隆等奠定了理论基础。

参 考 文 献

- 1 胡志昂,王洪新. 北京地区野生大豆天然群体遗传结构. 植物学报, 1985, 27(6):599~604
- 2 李 军等. 同工酶水平上野生大豆种群内分化的研究. 植物学报, 1995, 37(9):669~676
- 3 庄炳昌,惠东威等. 中国不同纬度进化类型大豆的 RAPD 分析. 科学通报, 1994, 39(23):2178~2180
- 4 庄炳昌主编. 中国野生大豆生物学研究. 北京:科学出版社,1999. 88~89
- 5 Ayala F. J. 现代遗传学. 长沙:湖南科学技术出版社, 1987. 704~890
- 6 Chiang Y. C. Genetic and quantitative variation in wild soybean populations. Dissertation Abstracts International, 1985, 47:490
- 7 Ratnaparkhe M. B., *et al.* Genetic fingerprinting of pigeonpea and its wild relatives using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91:893~898
- 8 Skroch P., *et al.* Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91:1086~1091