

羽扇豆种间遗传差异 AFLP 分析

海 林, 肖世和, 闫长生, 张秀英

(中国农业科学院作物育种栽培研究所, 北京 100081)

摘要: 利用 AFLP 对羽扇豆 (*Lupinus L.*) 3 个种 (*L. angustifolius L.*, *L. albus L.*, *L. pilosus Murr.*) 的 18 个品种指纹图谱进行了分析, 4 个引物组合共产生 462 条带, 多态性带为 442, 平均每个引物组合产生 110.5 多态性带, 多态性百分率为 95.7%。总体平均遗传多样性指数为 0.781。种间遗传差异大于品种间的遗传差异, 4 个引物组合种间和品种间的平均鉴定效率分别为 100% 和 84.7%。按 UPGMA 方法进行聚类分析, 所有的供试材料明显地分为 3 个组, 每一个组由同一个种的品种构成。

关键词: 羽扇豆; 遗传差异; AFLP

Analysis of Genetic Difference Between Species in Lupins by AFLP

HAI Lin, XIAO Shi he, YAN Chang sheng, ZHANG Xiur ying

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The genetic difference between species in lupins (*Lupinus L.*) including *L. angustifolius L.*, *L. albus L.*, *L. pilosus Murr.* was analyzed using AFLP. 462 bands were developed from 4 primer combinations based on 18 lupins varieties, and among them 442 (95.7%) were polymorphic with an average of 110.5 for per AFLP primer combination. The average genetic diversity index was 0.781 in this study. The genetic difference between species was higher than that of between varieties, the identification percentage of four AFLP primer combinations was 100% and 84.7% between species and between varieties, respectively. The results of cluster analysis indicated that 3 species were distinctly distinguished on the dendrogram using UPGMA method.

Key words: Lupins (*Lupinus L.*); Genetic difference; AFLP

羽扇豆 (*Lupinus L.*) 是一个种类繁多, 分布极广的植物属。其野生种分布在南北美洲, 地中海地区和北非, 后来被引入南非和澳大利亚。在 20 世纪有几个种已完全被驯化变成了重要的栽培作物, 还有一些种正在被驯化。新驯化的羽扇豆可作为新的豆科作物, 生长于不同的土壤和环境。从澳大利亚引进羽扇豆 3 个种的品种, 正在我国试种。随着国际间资源交流和相互引种日益增多, 品种的鉴定、种子质量标准化、品种知识产权以及育种家权益的保护, 逐渐受到人们的重视。因此, 开展对种质资源遗传差异的分析研究, 具有十分重要的现实意义。扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 具有多态性丰富、不受环境影

响、灵敏度高、快速高效、物种间通用等特点, 已广泛用于作物遗传多样性、指纹图谱和品种鉴定^[4,6,7,9,13]、基因定位^[8,11,12]、遗传作图^[5,10]等方面的研究。本文利用 AFLP 对羽扇豆种间的遗传差异分析, 目的是为羽扇豆种质资源的鉴定和分类提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

由澳大利亚西澳大学 B. Buirchell 博士提供, 供试材料除多毛羽扇豆 (*L. pilosus Murr.*) 为野生型外, 窄叶羽扇豆 (*L. angustifolius L.*) 和白羽扇豆 (*L. albus L.*) 均为栽培型 (表 1)。

收稿日期: 2001-11-07

基金项目: 948-971012 和 973-G1998010205 项目资助

作者简介: 海 林 (1964-), 男, 内蒙古通辽人, 副研究员, 主要从事作物分子标记、分子作图研究。Tel: 010-68918574; Fax: 010-68975212; E-mail: hailin001@yahoo.com。肖世和为本文通讯作者。Tel: 010-68918574; E-mail: xiaosh@mail.caas.net.cn

表 1 供试的羽扇豆

Table 1 Lupins (*Lupinus* L.) used in the study

序号 No	种名 Species	品种 Varieties	叶形 Leaf form	种子形状 Seed form	种皮颜色 Seed color
1	<i>L. angustifolius</i> L.	Tanjil	窄,长 Narrow, long	小,圆 Small, round	白,褐斑 White, brown spot
2		Kalya	窄,长 Narrow, long	小,圆 Small, round	白,褐斑 White, brown spot
3		Merrit	窄,长 Narrow, long	小,圆 Small, round	白,褐斑 White, brown spot
4		Quilnock	窄,长 Narrow, long	小,圆 Small, round	白,褐斑 White, brown spot
5		Belara	窄,长 Narrow, long	小,圆 Small, round	白,褐斑 White, brown spot
6		Danja	窄,长 Narrow, long	小,圆 Small, round	白,褐斑 White, brown spot
7		Yorrel	窄,长 Narrow, long	小,圆 Small, round	白,褐斑 White, brown spot
8		Tallerack	窄,长 Narrow, long	小,圆 Small, round	白,褐斑 White, brown spot
9	<i>L. albus</i> L.	FP21	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
10		Lolita	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
11		WTDI 80	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
12		Minori	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
13		Ida	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
14		Vladimir	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
15		Start	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
16		Amiga	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
17		Kiev Mutant	圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	白 White
18	<i>L. pilosus</i> Murr.		圆 Round	大,扁圆 Big, oblate	紫 Purple

1.2 方法

1.2.1 叶片 DNA 的提取 采用 Sharp (1988) 提出的,后经 Devos (1992) 改进的酚-氯仿方法。

1.2.2 AFLP 分析 采用 Vos (1995) 的方法,略有改动^[21]。

1.2.3 遗传多样性指数(genetic diversity index)

用公式 $1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ 计算,其中 P_i 为第 i 个等位基因的频率, n 为等位基因数目^[14]。

1.2.4 鉴别效率(identification percentage) 用引物组合可以区别的材料占供试材料的百分数表示。

1.2.5 聚类分析 根据 PCR 扩增的结果,有带则计为 1,无带则计为 0,利用简单匹配系数(simple matching coefficient) 估计基因频率,依据 $GS = m / (m + n)$ 计算遗传相似系数,其中 m 为基因型间共有带的数目, n 为差异带的数目。采用 NTSYS-PC 1.8 进行数据分析,按 UPGMA 法进行聚类。

2 结果与分析

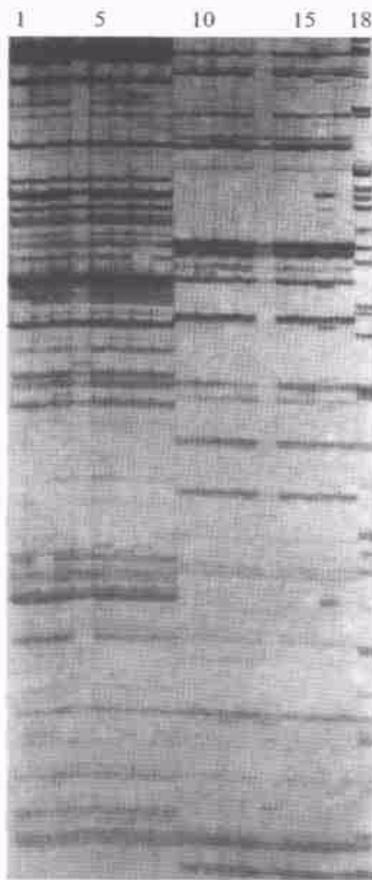
2.1 AFLP 多态性检测和遗传差异比较分析

表 2 AFLP 多态性检测和遗传差异分析

Table 2 AFLP polymorphism and analysis of genetic difference

序号 No	引物组合 Primer combination	总带数 Total bands				多态性带数 Polymorphic bands			遗传多样性指数 Genetic diversity index		
		<i>L. angustifolius</i> L.	<i>L. albus</i> L.	<i>L. pilosus</i> Murr.	合计 Total	<i>L. angustifolius</i> L.	<i>L. albus</i> L.	合计 Total	<i>L. angustifolius</i> L.	<i>L. albus</i> L.	合计 Total
1	M AAT/ E GAG	40	47	45	97	4	19	92	0.785	0.781	0.786
2	M ATC/ E AAT	61	63	47	130	21	22	125	0.606	0.614	0.764
3	M ATC/ E AAT	69	59	51	124	32	18	119	0.570	0.720	0.749
4	M AGA/ E GAA	57	39	43	111	20	20	106	0.655	0.783	0.824
合计 Total		227	208	186	462	77	79	442	2.616	2.898	3.123
平均 Average		56.8	52	46.5	115.5	19.3	19.8	110.5	0.654	0.725	0.781

本试验采用经筛选的 Mse I 和 EcoR I 的 4 组引物,对 18 份供试材料(表 1)进行了 AFLP 分析,其结果见表 2 和图 1。4 对引物组合共扩增出 462 条带,多态性带为 442 条,多态性百分率为 95.7%,平均每个引物扩增出 110.5 多态性条带。其中在窄叶羽扇豆的 8 个品种和白羽扇豆的 9 个品种中分别扩增出 227 和 208 条带,多态性条带分别为 77 和 79,多态性百分率分别为 33.9% 和 38.0%。在多毛羽扇豆的 1 个品种中,共扩增出 186 条带。为了更为充分地揭示所有供试材料的遗传差异,分别估算了总的平均遗传多样性指数,对窄叶羽扇豆和白羽扇豆的平均遗传多样性指数分别进行了估算(表 2),其值为 0.781、0.654 和 0.725。结果表明,不同基因型间存在着较为丰富的遗传多样性,其中种间的遗传多样性明显大于种内品种间的遗传多样性。窄叶羽扇豆和白羽扇豆之间也存在着一定的遗传差异。说明羽扇豆的种间进化比较明显,而种内品种间遗传基础较为相似。



1~18 的品种名同表 1

No 1~18 varieties are the same as Table 1

图 1 引物组合 M AGA/ E GAA 的 AFLP 指纹图谱

Fig.1 AFLP fingerprint of lupins amplified with M AGA/ E GAA

2.2 AFLP 指纹图谱的特征和不同引物组合的检测效率

根据 PCR 结果分析发现,种间带型差异十分明显,4 组引物在窄叶羽扇豆、白羽扇豆和多毛羽扇豆分别扩增出数目不等的特异带型,平均为 17.5、17.3 和 20.8 个(表 3)。这些特异带型具有种的特异性,对于特定的引物组合位点是稳定的,因此,可以根据这些带型将某个种和其它另外两个种区分

开。4 个引物组合对种的鉴别效率均为 100%,说明 4 个引物组合的任何一个组合都完全可以将 3 个供试羽扇豆种区分开。

4 组引物在 18 个供试品种中检测到数目不等的品种特异带型(表 4),引物组合 M AAT / E GAG、M ATC / E AAT、M ATC / E AAT、M AGA / E GAA 分别在 3、6、3、7 个品种中检测到 24、46、33、36 个带型(包括缺少某一带型),可以根据这些品种的特异带型来鉴别品种,4 组引物品种间的鉴别效率平均为 84.7%。除了 M AAT / E GAG 引物组合的鉴别效率为 66.7%,可以将 18 个品种的 12 个区分开,其余引物组合的鉴别效率均在 88% 以上,其中 M ATC / E AAT 引物组合的鉴别效率最高为 94.4%,可以将 18 个品种中的 17 个区分开。利用这 4 组引物可以将 18 个品种完全区分开。这 4 组引物在窄叶羽扇豆和白羽扇豆品种间的平均鉴别效率分别为 87.5% 和 80.6%。其中 M ATC / E AAT、M AGA / E GAA 组引物在窄叶羽扇豆内的鉴别效率均为 100%,同样的引物组合在白羽扇豆内的鉴别效率为 88.9% 和 77.8%。结果说明,不同的引物组合的鉴别效率在不同的种间和品种间存在着差异。本试验还通过用 4 组引物的任一、两两引物组合鉴别 18 个品种来分析鉴别羽扇豆品种所需最少引物组合,除 M AAT / E GAG 和 M ATC / E AAT 引物组合只能区分 18 个品种的 17 个外,其它任一、两两引物组合都可将 18 个品种完全区分开。因此可以将这些引物组合作为参考来选择鉴别羽扇豆品种的引物组合。

2.3 聚类分析

根据 AFLP 数据,按 UPGMA 方法对所有的供试材料进行了聚类分析,18 份材料按种的划分很明确地聚为 3 组(图 2)。第一组由窄叶羽扇豆的 8 个品种组成,第二组由白羽扇豆的 9 个品种组成,第三组是多毛羽扇豆的 1 个品种。第二组和第三组的亲缘关系较近,而和第一组亲缘关系较远。第一

表 3 种的特异带型数目和引物组合的种间鉴别效率

Table 3 Specific bands and identification percentage of primer combination for species

序号 No	引物组合 Primer combination	种特异带数 Special bands			鉴别效率 Identification percentage (%)
		<i>L. angustifolius</i> L.	<i>L. albus</i> L.	<i>L. pilosus</i> Murr.	
1	M AAT/ E GAG	17	19	18	100
2	M ATC/ E AAT	18	18	22	100
3	M AAA/ E GAG	12	21	21	100
4	M AGA/ E GAA	23	11	22	100
平均	Average	17.5	17.3	20.8	100

表 4 品种的特异带型和引物组合的品种间鉴别效率

Table 4 Specific bands and identification percentage of primer combination for varieties

序号 No	引物组合 Primer combination	品种数目 Varieties	具有某特异带数 Specific bands (present)	缺少某特异带数 Specific bands (absent)	鉴别效率 Identification percentage(%)		
					<i>L. angustifolius</i> L.	<i>L. albus</i> L.	总体 Total
1	M AAT/ E GAG	3	20	4	62.5	66.7	66.7
2	M ATC/ E AAT	6	32	14	87.5	88.9	88.9
3	M AAA/ E GAG	3	26	7	100	88.9	94.4
4	M AGA/ E GAA	7	32	4	100	77.8	88.9
平均	Average	4.8	27.5	7.3	87.5	80.5	84.7

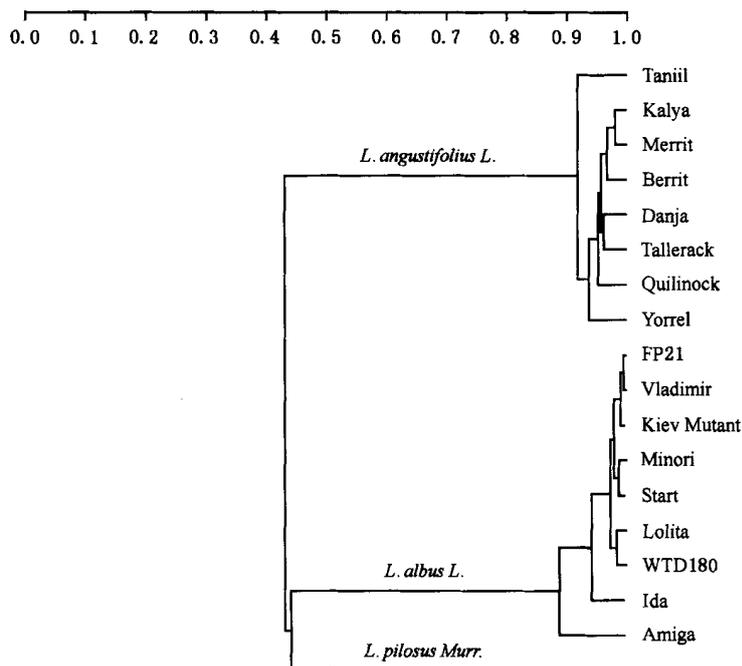


图 2 羽扇豆的 AFLP 聚类图

Fig.2 Dendrogram of lupins based on AFLP

组窄叶羽扇豆的 8 个品种形态上表现为叶片窄长,种子粒小、圆形,第二组白羽扇豆的 9 个品种和第三组多毛羽扇豆的 1 个品种除种子颜色外,叶形和种子形状十分相似,表现为叶片大而圆,种子粒大、扁圆形。结果表明,利用 AFLP 对羽扇豆品种分类的结果和形态学上的分类结果是一致的。

3 讨论

长期以来品种的鉴定是通过形态学标记诸如叶形、种皮颜色等形态性状以及生化标记进行的。当前,随着现代育成品种的日益增多,种质间的遗传基础越来越狭窄,因此,进行种质的遗传差异分析十分有益于品种的鉴定和分类。单纯靠形态性状和有限的生化位点来鉴定已远远不能满足这种现状。由于 DNA 分子标记直接反映 DNA 水平的差异,因此成

为一种鉴定品种的较为理想的方法而得到广泛的应用^[1,2,14,15]。

由于 AFLP 所检测的多态性是酶切位点的变化或酶切片段间 DNA 序列的插入与缺失,因此具有比其它 DNA 标记更为丰富的多态性,甚至可以检测到品种间 1 个碱基对之间的差异,很容易将基因型相近的品种区分开。Keim 用 17 个 RFLP 探针鉴定 58 个野生和栽培大豆种质,有 7 个材料具有相同的 RFLP 模式而无法分开^[15]。田清震在相似的研究中,用 17 对引物组合对 92 份野生和栽培大豆种质的 AFLP 指纹图谱进行分析,有 4 组引物的鉴别效率在 90% 以上,其中 M GGA/ E CGA 的鉴别效率为 100%^[2]。从以上两个研究结果比较分析证明,应用 AFLP 进行种质检测的效率是非常高的,因此非常适合品种的指纹分析^[3,16]。

本研究用 4 组引物对羽扇豆的 18 个品种进行了 AFLP 指纹图谱进行分析,4 个引物组合的种间平均鉴定效率为 100%,品种间的平均鉴定效率为 84.7%,其中除 M-AAT / E-GAG 和 M-ATC / E-AAT 的引物组合外,其它任何两组引物组合在一起都可以将 18 个品种分开。在白羽扇豆、窄叶羽扇豆和多毛羽扇豆检测到数目不等的种间和品种间特异带型,深入研究这些特异带型尤其是种间特异带型对羽扇豆的起源进化研究会提供有益的信息。

References

- [1] Chan Y H, Jia J H, Li C Y, Jin D M, Weng M L, Wang B. Rice seed identification by computerized AFLP-DNA fingerprinting analysis. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2000, 8 (3): 222 - 224. (in Chinese)
陈一华, 贾建航, 李传友, 金德敏, 翁曼丽, 王斌. 通过 AFLP-DNA 指纹的计算机分析进行水稻种子鉴定. 农业生物技术学报, 2000, 8(3): 222 - 224.
- [2] Tian Q Z, Gai J Y, Yu D Y, Jia J Z. A study on amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean. *Soybean Science*, 2000, 19(3): 210 - 217. (in Chinese)
田清震, 盖均镒, 喻德跃, 贾继增. 大豆 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP)研究. 大豆科学, 2000, 19(3): 210 - 217.
- [3] Jia J Z. Molecular germplasm diagnostics and molecular marker assisted breeding. *Scientia agricultural sinica*, 1996, 29(4): 1 - 10. (in Chinese)
贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1 - 10.
- [4] Wang T, Zhu J, Li G C, Zhou A Q, Zhang W. AFLP analysis of genetic relationships in apple rootstocks. *Scientia Agricultura Sinica*. 2001, 34(3): 256 - 259. (in Chinese)
王涛, 祝军, 李光晨, 周爱琴, 张文. 苹果砧木亲缘关系 AFLP 分析. 中国农业科学, 2001, 34(3): 256 - 259.
- [5] Wan C L, Tan Y D, Zhu Y F, He Y Y, Lu C, Zhou Z Y, Xiang Z H. Construction of molecular map of the silkworm (*Bombyx mori*. L.) using AFLP marker. *Scientia Agricultural Sinica*, 2001, 34(3): 338 - 341. (in Chinese)
万春玲, 谭远德, 朱玉芳, 贺原, 鲁成, 周择扬, 向仲怀. 利用 AFLP 标记构建家蚕分子遗传连锁图谱. 中国农业科学, 2001, 34(3): 338 - 341.
- [6] Bohn M, Utz H F, A E Melchinger. Genetics similarities among winter wheat cultivars determined on the basis on RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci*. 1999, 39: 228 - 237.
- [7] Caicedo A L, Gaitan E, Duque M C, Chica O T, Debouck D G, Tohme J. AFLP fingerprinting of *phaeolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Sci*. 1999, 39: 1497 - 1507.
- [8] Dong N V, Subudhi P K, Luong P N, Quang V D, Qug T D, Zheng H G, Wang B, Nguyen H T. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theor. Appl. Genet*. 2000, 100: 727 - 734.
- [9] Donini P, Elias M L, Bougourd S M, Koebner RMD. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome*, 1997, 40: 521 - 526.
- [10] Eujayl I, Baum M, Powell W, Weiskine, Plehu E. A genetic linkage map of lentil (*Lens* sp.) based on RAPD and AFLP marker using recombinant inbred lines. *Theor. Appl. Genet*. 1998, 97: 83 - 89.
- [11] Hartl L, Mohler V, Zeller F J, Hsan S L K, Schweizer G. Identification of AFLP markers closely linked to the powdery mildew resistance genes *pmlcand* and *pm4a* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 1999, 42: 322 - 329.
- [12] Lee J M, Bush A L, Specht J E, Shoemaker R C. Mapping of duplicate genes in soybean. *Genome*, 1999, 42: 829 - 836.
- [13] Maughan P J, Saghai Maroof M A, Buss G R, Huestis G M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet*. 1996, 93: 392 - 401.
- [14] Rongwen J, Akkaya M S, Bhagwat A A, Lavi U, Gegam P B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet*. 1995, 90: 43 - 48.
- [15] Keim P, Shoemaker R C, Palmer R G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. *Theor. Appl. Genet*. 1989, 77: 786 - 792.
- [16] Keim P, Schupp J M, Travis S E, Clayton K, Zhu T, Shi L, Ferreira A, Webb D M. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. 1997, *Crop Sci*. 37: 537 - 543.