

42个苜蓿品种间亲缘关系的RAPD分析

孙 卉¹, 朴政玉², 曲柏宏², 孙祎龙^{3*}

(1. 吉林工程职业学院, 吉林 四平 136001; 2. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002; 3. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘 要:应用RAPD标记,对42个不同苜蓿品种的亲缘关系进行研究。采用CTAB改良法可快速提取到较高质量苜蓿基因组总DNA用于RAPD扩增,并从RAPD反应中筛选出19个10碱基随机引物,总共扩增出220条带,其中138条呈多态性,占62.7%,82条为单态性带,占37.3%;利用MEGA2.1软件计算42个苜蓿品种遗传距离,进行UPGMA聚类分析,遗传距离在0.174~0.5000之间,说明供试苜蓿品种间遗传距离较大,亲缘关系较远。遗传距离为0.435时,42个苜蓿品种可分为五类,不同苜蓿品种间的亲缘关系有较大的差异,表明RAPD标记可作为苜蓿品种亲缘关系判定的依据。这为苜蓿品种遗传改良、杂交亲本选配提供可靠的科学依据。

关键词:苜蓿; RAPD; 亲缘关系; 遗传距离

中图分类号: S64

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)05-0030-06

Analysis of Genetic Relationship of 42 Alfalfa Varieties by RAPD

SUN Hui¹, PIAO Zhengyu², QU Baihong², SUN Yilong^{3*}

(1. Jilin Engineering Vocational College, Siping 136001; 2. Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002; 3. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: The genetic relationships of 42 alfalfa varieties were studied using RAPD analysis. The results showed that it is helpful to improve the genomic DNA quality used for RAPD amplification by using modified CTAB method. 19 random primers composed of 10 bases were selected from the RAPD markers, and there were 138 polymorphism fragments in the 220 amplified fragment found, accounting for 62.7%, 82 monomorphism fragments, accounting for 37.3%. MEGA2.1 software was used for calculating genetic distance of 42 alfalfa varieties. There were a distant relationship among them because the range of genetic distance was 0.174-0.5000. 42 alfalfa varieties can be divided into 5 groups when genetic distance was 0.435. RAPD markers can be used as the basis for classification of alfalfa genetic relationship, because the genetic relationship of different alfalfa varieties have bigger difference. The study was done to provide reliable scientific basis for improvement and hybrid parents selection of alfalfa variety.

Key words: Alfalfa; RAPD; Genetic relationship; Genetic distance

苜蓿以其粗蛋白含量高、营养价值高、适口性好,被誉为“牧草之王”。现在世界上许多国家推广应用的苜蓿品种,基本都是在收集大量苜蓿种质资源和评价研究基础上选育而成。但地域位置的不同,所能适应的苜蓿品种也各有差异,市场对适应性广、抗性强、高产、优质的苜蓿品种需求就显得十分迫切。我国随着农业种植结构的调整和奶产业的快速发展,势必带动牧草产业的高速

发展,而在草产业的发展中苜蓿草的种植首当其冲,因此,培育出既高产优质,又适应性强的苜蓿新品种,已是摆在苜蓿研究工作者面前的严峻课题。RAPD分子标记技术目前已在国内外很多物种的分类及遗传多样性分析中被广为应用^[1-6],为适应苜蓿新品种选育的需要,首先应对育种材料进行鉴定和评价,通过DNA分子标记RAPD指纹图谱鉴定苜蓿品种间的亲缘关系,才能为科学选种、杂交育种和品种适宜区域推广提供科学依据。出于此目的,对吉林省农业科学院畜牧分院牧草试验基地(公主岭)保存的42个苜蓿品种资源进行基因总组DNA的提取,运用RAPD技术对指纹图谱鉴定,探讨品种之间的亲缘关系,为更

收稿日期: 2017-07-06

基金项目: 吉林省自然科学基金(20150101111JC)

作者简介: 孙 卉(1987-),女,助教,硕士,主要从事生物化学与分子生物学的教学与研究。

通讯作者: 孙祎龙,男,研究员,硕士, E-mail: sunyilong@126.com

加科学地利用保护苜蓿品种资源和尽快培育出优质适应性强的苜蓿新品种提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验以采自吉林省农业科学院畜牧分院牧草

试验基地的42个苜蓿品种(见表1)资源为供试材料。为使所采样品尽量接近一致,用时2 h将42个品种 的样品采集完毕。在资源圃将采集的样品装入带有冰块的泡沫盒中带回实验室,放入事先预冷至-86℃超低温冰箱中保存待用。

表1 供试的苜蓿品种

编号	品种	产地	编号	品种	产地	编号	品种	产地
1	WL-525	美国	15	WL-323ML	美国	29	得龙苜蓿	加拿大
2	CW-321	美国	16	CW-200	美国	30	金钥匙	加拿大
3	WL-323 接种	美国	17	Ladak+	美国	31	龙牧 803	黑龙江
4	诺瓦苜蓿	美国	18	Magnum-Wet	美国	32	肇东苜蓿	黑龙江
5	CW-272	美国	19	Magnum-V	美国	33	龙牧 801	黑龙江
6	WL-232HQ	美国	20	CW-306	美国	34	公农 1 号	吉林
7	WL-252HQ	美国	21	WL-324	美国	35	公农 2 号	吉林
8	朝阳苜蓿	美国	22	农宝	美国	36	草原 2 号	内蒙古
9	菲尔兹	美国	23	CW-301	美国	37	草原 1 号	内蒙古
10	CW-340	美国	24	多叶苜蓿	美国	38	敖汉苜蓿	内蒙古
11	金字塔	美国	25	霍普兰德	美国	39	甘农 1 号	甘肃
12	大叶苜蓿	美国	26	苜蓿王	美国	40	宁苜 1 号	宁夏
13	辛普劳	美国	27	兼用型	加拿大	41	阿尔冈金	美国
14	Magna-601	美国	28	胜利者	加拿大	42	紫花苜蓿	不详

1.2 方 法

1.2.1 基因组总 DNA 提取

本试验采用CTAB改良法^[7]提取到苜蓿基因组DNA。其具体步骤如下:①在预冷的50 mL离心管中加入3 g的样品粉末;②再加20 mL经65℃下预热30 min的提取缓冲液,加200 μL β-巯基乙醇(BME)和1 g的PVP,在恒水温度始终控制在65℃的浴锅中温浴30 min;③取出加入10 mL氯仿,来回振动混匀后放入8 000 r/min离心机中,在18℃条件下运行10 min,去掉上下清液;④再次轻轻转动离心管温浴30 min,同时加入65℃预热的提取缓冲液15 mL;⑤重复③的操作,10 min后取上清;⑥再加入0.6×冰冻异丙醇,摇混均匀后静止沉淀DNA;⑦将沉淀好的DNA取出,用70%酒精反复冲洗,再将DNA移至无菌的1.5 mL离心管中自然风干;⑧在自然风干的DNA中加入适量TE使其充分溶解后,再加4 μL Rnase (10 mg/mL),置于37℃的水浴锅中过夜,其后放置于预冷成-20℃冰箱中保存待用。

1.2.2 DNA 电泳检测

从42个苜蓿DNA样品中随机选取22个DNA样品,以0.5×TBE做电泳缓冲液,每个样品提取

10 μL,在含0.5 μg/mL溴化乙锭(EtBr,EB)的0.7%琼脂糖凝胶上恒压(60 V)电泳1 h后停止电泳。再用凝胶成像系统GDS-8000照相,检测22个样品DNA的完整性。

1.2.3 DNA 浓度测定及定量稀释

提取150 μL DNA用TE缓冲液[Tris-HCl 10 mmol/L(pH 8.0),EDTA 1 mmol/L(pH 8.0)]稀释至3 000 μL,再用紫外可见分光光度计HitachiU-3010进行测定供试DNA样品的OD₂₆₀和OD₂₈₀。核酸纯度的检测是以OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值来表示,比值在1.5~2.0之间是符合要求的,并计算DNA原液浓度C。计算公式C(μg/mL)=OD₂₆₀×50×稀释倍数。用TE缓冲液将供试DNA样品稀释成10~100 ng/μL待用。

1.2.4 RAPD 分析

RAPD反应体系优化:根据DB80240-33型PCR仪样品槽的大小确定PCR反应总体积为25 μL,其中含模板DNA 90 ng/μL,10碱基引物10 pmol,dNTP 1.5 mmol/L,MgCl₂ 1.5 mmol/L,Taq DNA聚合酶1U,10×缓冲液[包含500 mmol/L KCl,100 mmol/L Tris-Hcl (pH9.0),1.0% Triton X-100]2.5 mmol/L,不足体积部分用重蒸馏水补齐至25 μL。

在 DB80240-33 型 PCR 仪上进行 PCR 反应,其扩增反应程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,40℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min,共 40 个循环;72℃最终延伸 5 min。

将加样缓冲液(0.25%溴酚蓝,0.25%二甲苯氰蓝,40%蔗糖)2 μ l与 PCR 扩增产物 10 μ L混匀振荡后,点入含有 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的 1.4%(西班牙产)琼脂糖凝胶中,在恒压 100 V 下电泳 2~3 h,取出凝胶,用凝胶成像系统 GDS-8000 照相,进行 42 个供试苜蓿品种 RAPD 分析。

1.2.5 数据处理分析

(1) 获得数据

电泳图谱中带的有无代表扩增片段的有无,同时体现了 DNA 指纹分析的结果。在电泳图谱中体现出的每一个分子标记(Maker)均为一个 RAPD 谱带(DNA 片段)并代表一个引物结合位点,同时也可看作是一个遗传位点。根据其有无统计获得所有位点及分子标记的迁移率的二元数据。强带和弱带均赋值为“1”,有带(显性)计为“1”,无带(阴性)计为“0”。

(2) 统计多态性

多态性(%)=(特征谱带数/总谱带数) \times 100%

(3) 距离系数的计算

$p\text{-distance}=1-S_{sm}=(b+c)/(a+b+c+d)$

S_{sm} 为简单匹配系数, $S_{sm}=(a+d)/(a+b+c+d)$ 。其中 a 代表两个品种的共有带数,b 和 c 分别代表两个品种的多态带数,d 代表两个品种均没有的带。 $p\text{-distance}$ 表示的是多态带数占总带数的比值^[8]。

(4) 数据分析

在 Excel 表格中输入统计所得二元数据,并将数据转化为 MEGA 格式,用 MEGA2.1 计算 $p\text{-distance}$;采用非加权配对算术平均法(UPGMA)建立系统发育树状图^[9]。

2 结果与分析

2.1 苜蓿 DNA 的质量及产率的提取

采用 CTAB 改良法,从苜蓿叶片中提取基因组总 DNA,再用 0.7% 的琼脂糖凝胶观测其质量。结果表明,DNA 无明显降解,并带型清晰(见图 1),用紫外可见分光光度计 HitachiU-3010 测定 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.5~2.0 之间,说明 DNA 的纯度和量都能够满足 RAPD 扩增条件。

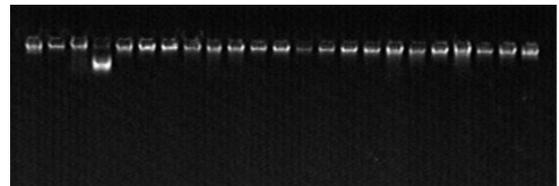


图 1 部分供试苜蓿基因组 DNA 电泳检测的结果

2.2 引物的筛选

检测结果表明,龙牧 801 和 Magnum-Wet 两个品种的 DNA 质量和纯度都比较理想,利用这两个品种的 DNA 对 70 个 10 碱基引物(见表 2)进行扩增筛选,筛选引物结果见图 2,共筛选出带型清晰又能产生较高多态性的引物 19 个(见表 3)。

应用这 19 个引物对 42 个苜蓿样品扩增共产生清晰可见的谱带 220 条,其中共有带数 82 条,多态性带数 138 条,多态性比率为 50.0%~85.7%,平

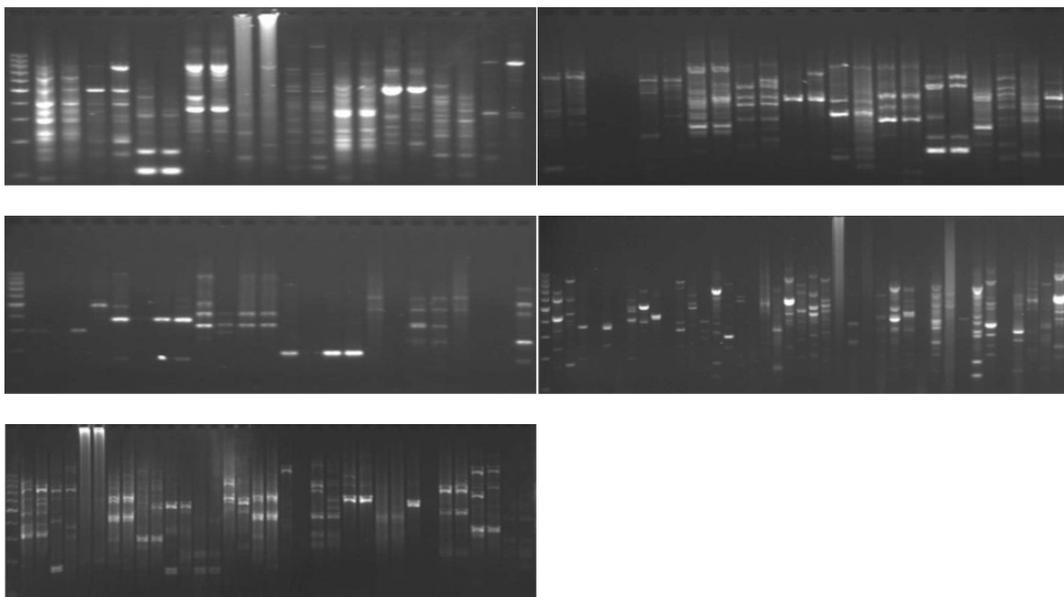


图 2 利用‘龙牧 801’和‘Magnum-Wet’DNA 对 70 个随机引物扩增的 RAPD 带样式

表2 苜蓿品种 RAPD 分析引物筛选的引物代码及序列

编号	引物代号	碱基序列	编号	引物代号	碱基序列	编号	引物代号	碱基序列
1	OPA-02	TGCCGAGCTG	25	OPF-14	TGCTGCAGGT	49	OPV-18	TGGTGGCGTT
2	OPA-03	AGTCAGCCAC	26	OPG-09	CTGACGTCAC	50	OPW-03	GTCCGGAGTG
3	OPA-04	AATCGGGCTG	27	OPG-14	GGATGAGACC	51	OPY-19	TGAGGGTCCC
4	OPA-05	AGGGGTCTTG	28	OPG-15	ACTGGGACTC	52	RA-01	AGCGCCATTG
5	OPA-08	GTGACGTAGG	29	OPG-16	AGCGTCCTCC	53	RA-02	CAGCACCCAC
6	OPA-09	GGTAACGCC	30	OPG-17	ACGACCGACA	54	S2	CCTTGACGCA
7	OPA-10	GTGACGTAGG	31	OPG-18	GGCTCATGTG	55	S4	AAGACCCCTC
8	OPA-12	TCGGCGATAG	32	OPG-19	GTCAGGGCAA	56	S5	AGATGCAGCC
9	OPA-18	AGGTGACCGT	33	OPH-07	CTGCATCGTG	57	S17	AGCGCCATTG
10	OPA-19	CAAACGTCCG	34	OPH-09	TGTAGCTGGG	58	S18	CCACAGCAGT
11	OPA-20	GTTGCGATCC	35	OPH-13	GACGCCACAC	59	S29	GGTAACGCC
12	OPB-01	GTTTCGCTCC	36	OPH-17	CACTCTCCTC	60	S43	GTCGCCGTCA
13	OPB-05	TGCGCCCTTC	37	OPH-18	GAATCGGCCA	61	P1	TCGGCGATAG
14	OPB-06	TGCTCTGCCC	38	OPI-05	TGTTCCACGG	62	P2	CAAACGTCCG
15	OPB-10	CTGCTGGGAC	39	OPI-07	CAGCGACAAG	63	P3	AGGGGTCTTG
16	OPB-11	GTAGACCCGT	40	OPI-16	TCTCCGCCCT	64	P4	GTGACGTAGG
17	OPB-12	CCTTGACGCA	41	OPI-18	TGCCCAGCCT	65	P5	AATCGGGCTG
18	OPB-17	AGGGAACGAG	42	OPM-09	GTCTTGCGGA	66	P6	GGTAACGCC
19	OPB-18	CCACAGCAGT	43	OPP-20	GACCCTAGTC	67	P7	CAGGCCCTTC
20	OPB-20	GGACCCTTAC	44	OPQ-14	GGACGCTTCA	68	P8	CAGCACCCAC
21	OPC-01	TTCGAGCCAG	45	OPQ-18	AGGCTGGGTG	69	P9	ACTCAGCCAC
22	OPD-16	AGGGCGTAAG	46	OPV-10	GGACCTGCTG	70	P10	TGCCGAGCTG
23	OPD-18	GAGAGCCAAC	47	OPV-12	ACCCCCACT			
24	OPD-19	CTGGGGACTT	48	OPV-16	ACACCCACA			

表3 19个引物对42个苜蓿品种扩增带数统计

引物代码	引物碱基序列	扩增带数	共有带数	多态性带数	多态性(%)
OPA-02	TGCCGAGCTG	11	4	7	63.6
OPA-08	GTGACGTAGG	10	3	7	70.0
OPA-20	GTTGCGATCC	9	3	6	66.7
OPB-10	CTGCTGGGAC	8	4	4	50.0
OPB-11	GTAGACCCGT	9	3	6	66.7
OPB-17	AGGGAACGAG	12	4	8	66.7
OPB-18	CCACAGCAGT	12	3	9	75.0
OPG-17	ACGACCGACA	12	6	6	50.0
OPG-18	GGCTCATGTG	12	5	7	58.3
OPH-07	CTGCATCGTG	14	2	12	85.7
OPH-09	TGTAGCTGGG	11	2	9	81.8
OPI-05	TGTTCCACGG	14	5	9	64.3
OPI-07	CAGCGACAAG	13	6	7	53.8
OPI-16	TCTCCGCCCT	11	4	7	63.6
OPQ-14	GGACGCTTCA	12	6	6	50.0
OPQ-18	AGGCTGGGTG	14	6	8	57.1
OPW-03	GTCCGGAGTG	10	5	5	50.0
OPY-19	TGAGGGTCCC	13	6	7	53.8
RA-01	AGCGCCATTG	13	5	8	61.5
总计		220	82	138	62.7

均62.7%。平均每个引物产生7.3条多态性带,利用这些多态性带作为分析42个苜蓿样品间亲缘关系的依据(表3)^[10]。

2.3 42个苜蓿品种的遗传距离与UPGMA聚类分析

用19个引物扩增获得138条多态性带构建二元数据矩阵,有带计为1,无带计为0,输入Excel表格,再用MEGA2.1软件计算各品种类型间的遗传距离(p-distance),构建距离矩阵,用UPGMA法建立42个供试苜蓿品种的遗传关系树状图(见图3)。从图3看出,在42个苜蓿供试样品中与其它品种亲缘关系较远的是排在最外围的两个品种辛普劳和Magna-601。品种间遗传距离最大为0.500的两个品种是菲尔兹和Magnum-Wet,说明这两个品种亲缘关系较远。品种间遗传距离最小为0.174的两个品种是WL-324和CW-306,说明两者的亲缘关系较近。

42个苜蓿品种的遗传距离在0.174~0.500之间,在遗传距离为0.435时,将42个苜蓿品种划分

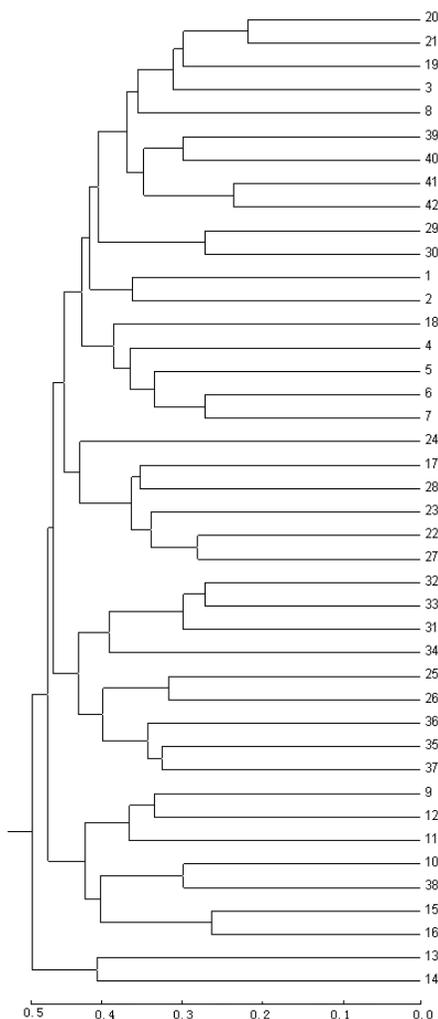


图3 42个苜蓿品种UPGMA聚类图

成五类。第一类由Magna-601和辛普劳组成,为美国品种;第二类包括大叶苜蓿、金字塔、敖汉苜蓿、菲尔兹、CW-200、CW-340、WL-323ML,主要是美国品种;第三类由草原1号、草原2号、苜蓿王、龙牧801、龙牧803、肇东苜蓿、霍普兰德、公农1号、公农2号组成,主要是内蒙古、黑龙江、吉林品种;第四类包括多叶苜蓿、胜利者、CW301、兼用型、Ladak+、农宝,主要是加拿大和美国品种;第五类由金钥匙、得龙苜蓿、CW-321、WL-525、WL-252HQ、WL-232HQ、CW272、Magnum-Wet、阿尔冈金、紫花苜蓿、诺瓦苜蓿、MagnumV、CW-306、WL-323接种、WL324、宁苜1号、甘农1号、朝阳苜蓿组成,主要是美国、宁夏和甘肃品种。

3 结论

3.1 试验采用CTAB改良法,从42个苜蓿品种中提取到具有较高质量的基因组总DNA,证明CTAB改良法可以充分适用在RAPD反应中,提取到的苜蓿基因组总DNA纯度高且降解程度低,并且对后续试验无明显影响;通过PCR技术从70个引物中筛选出电泳条带带型清晰且能产生较高多态性的19个10碱基随机引物。

3.2 利用前述步骤筛选出19个随机引物对42个苜蓿品种进行RAPD扩增,建立品种指纹图谱并计算遗传距离。苜蓿品种间遗传距离的大小,可直接表明亲缘关系的远近,遗传距离越大,亲缘关系越远;遗传距离越小,亲缘关系越近^[11-12]。品种菲尔兹和Magnum-Wet间的遗传距离最大,表明这两个品种间亲缘关系较远;WL-324和CW-306两者间遗传距离最小,表明这两者的亲缘关系较近。

3.3 根据苜蓿品种间的遗传距离进行聚类分析,将42个苜蓿供试品种划分成五类,与品种的来源基本一致,说明品种间的亲缘关系与地理地位有着一定的相关性,表明RAPD技术可作为苜蓿品种亲缘关系鉴定的依据^[13]。

参考文献:

- [1] Ozgun Kalkışım, Melih Okcu, Zuhul Okcu, et al. Relationships Among some Pears Genotypes(*Pyrus communis* L.) Based on ISSR and RAPD Analysis[J]. Erwerbs-Obstbau, 2016(4):259-264.
- [2] Serap Sunar, Nalan Yildirim, Guleray Agar, et al. Genetic diversity and relationships detected by ISSR and RAPD analysis among *Aethionema* species growing in Eastern Anatolia (Turkey) [J]. Comptes rendus - Biologies, 2016(3-4):147-151.

