

22 个紫花苜蓿品种遗传关系的 RAPD 分析

呼天明¹, 韩 博^{1,2}, 胡晓宁^{1,2}, 宋江湖¹, 郑红梅¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省农业分子生物重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】为不同品种苜蓿亲缘关系的判断和最大限度地利用杂种优势提供理论依据。【方法】采用 RAPD(Random amplified polymorphic DNA)标记方法,利用 NTSYS 软件,对 22 个紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)品种的遗传距离进行聚类,并对其亲缘关系进行分析。【结果】供试苜蓿品种之间的遗传基础较广,22 个随机引物共检出 289 条扩增片段,其中多态性条带占 88.93%;平均每个引物扩增的 DNA 条带数为 4~18 条,其中多态性谱带为 2~17 条;品种间遗传距离的变异为 0.135 6~0.361 1,平均遗传距离为 0.209 5,其中变异最大的是 WL252HQ 和“阿尔冈金”,最小的是“德福”和“赛特”,22 个紫花苜蓿品种中以“德福”和“赛特”间的亲缘关系最近。【结论】“阿尔冈金”与“三得利”之间及二者与其他品种之间亲缘关系较远,二者之间杂交或分别与其他品种之间杂交,可能会产生较大的杂种优势;引自加拿大的“放牧者”与其他 21 个苜蓿品种的遗传距离较远,其与这 21 种苜蓿品种杂交,亦可能会产生较大的杂种优势。

【关键词】 紫花苜蓿; RAPD; 遗传距离; 聚类分析; 杂种优势

【中图分类号】 S542⁺.903

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)04-0058-07

RAPD analysis of genetic relationship of 22 alfalfa varieties

HU Tian-ming¹, Han Bo^{1,2}, HU Xiao-ning^{1,2}, SONG Jiang-hu¹, ZHENG Hong-mei¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Research Center of Molecular Organism of Agriculture in Shaanxi Province, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to judge genetic relationship of different varieties of alfalfa, making the most of heterosis and gaining good hybrid offspring. 【Method】With RAPD markers, NTSYS software was used for cluster analysis of 22 alfalfa varieties genetic distance and kinship analysis between them. 【Result】The 22 alfalfa varieties of genomic DNA were amplified with 22 random primers, and there were 257 polymorphism fragments in the 289 amplified fragment found, accounting for 88.93%. The range of DNA bands amplified of each primer was 4 to 18, an average of 13.1, polymorphism bands 2 to 17, an average of 11.7. The variation range of genetic distance of 22 alfalfa varieties was 0.135 6—0.361 1, and the average value was 0.209 5. Evidently, a larger genetic variation happened between varieties, and the largest was “WL252HQ” and “Algonquin”, the Smallest “Derby” and “Sitel”. 【Conclusion】“Algonquin” and “Sandity” and the other 21 varieties show more distant relationship, the crossing between them and the other 21 varieties crossing can gain higher heterosis. “Haygrazer” crossing with the other 21 varieties can also gain higher heterosis.

Key words: alfalfa; RAPD; genetic distance; cluster analysis; higher heterosis

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)作为一种优质 蛋白质饲料,广泛种植于世界各地,并在我国畜牧业

* [收稿日期] 2008-06-16

[基金项目] 科技部国际科技合作项目(2006DFA33630);陕西省科技攻关项目(2006K03-G4)

[作者简介] 呼天明(1958—),男,内蒙古鄂尔多斯人,教授,博士生导师,主要从事牧草繁育及草畜一体化研究。

E-mail: hutianming@126.com

发展及西部生态系统恢复与重建中扮演着重要角色。苜蓿种质资源的开发利用及新品种培育,对我国苜蓿产业的发展极为重要^[1]。目前,有关利用 RAPD 技术对苜蓿种质资源遗传多样性的研究报道尚比较少。Echt 等^[2]对二倍体苜蓿的回交群体进行了 RAPD 分析,认为象苜蓿这类对其遗传信息了解非常少或某些遗传信息很难获得的种,利用 RAPD 标记较快掌握部分遗传信息,对其育种和种质资源鉴定具有重要意义。Yu 等^[3]利用 RAPD 技术,对几个苜蓿品种的亲缘关系和品种的杂合性进行了分析,认为 RAPD 标记可为杂合群体间亲缘关系的分析提供大量有用信息。我国学者在苜蓿遗传

资源研究方面做了许多工作^[4-5],但这些研究主要集中在引种、栽培、区划及少量品种的选育等方面。本试验对 22 个紫花苜蓿品种的遗传关系进行 RAPD 分析,以期为陕西省今后进一步引进和利用优质紫花苜蓿种质资源、丰富种质资源信息库、培育杂交新品种提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 供试的 22 个紫花苜蓿品种,包括 19 个从国外引进的高产优质紫花苜蓿品种和 3 个国内育成品种,其休眠级及来源见表 1。

表 1 供试 22 个紫花苜蓿品种的名称和来源

Table 1 Name and source of 22 alfalfa varieties

编号 Code	品种 Variety	休眠级 Fall	原产地 Source	编号 Code	品种 Variety	休眠级 Fall	原产地 Source
1	维多利亚 Victoria	6	美国 American	12	WL324		美国 American
2	全能 Total	3	美国 American	13	WH323ML	4	美国 American
3	皇后 Queen	4	美国 American	14	WL323HQ	3	美国 American
4	牧歌 AmeriGraze	4	美国 American	15	WL232HQ	2	美国 American
5	阿尔冈金 Algonquin	3	美国 American	16	金皇后 God Empress	3	美国 American
6	三得利 Sandity	5	荷兰 Holland	17	爱非尼特 Affinity	4	美国 American
7	中苜一号 Zhongmu 1		中国 Chinese	18	德福 Derfy	5	荷兰 Holland
8	赛特 Sitel	5	荷兰 Holland	19	德宝 Derby	5	荷兰 Holland
9	苜蓿王 Alfalfa King	4	美国 American	20	固原紫花 Guyuanzihua		中国 Chinese
10	关中苜蓿 Guanzhongmuxu		中国 Chinese	21	苜蓿 54Alfalfa 54	4	荷兰 Holland
11	WL252HQ		美国 American	22	放牧者 Haygrazer	4	加拿大 Canada

1.1.2 试剂材料 试验中所用的 *Taq* 酶、缓冲液、dNTP、随机引物等,均购自西安沃尔森生物技术有限公司。通过对 91 条 RAPD 引物进行筛选^[6-7],共筛选出有带的引物 70 个,其中 22 个引物序列(表 2)能扩增出具有多态性的条带,可用于亲缘关系及遗传距离多样性分析。

表 2 可用于紫花苜蓿亲缘关系分析的 22 条随机引物的序号与序列

Table 2 22 random primers and their sequences used in the RAPD analysis of alfalfa

引物序号 Primer No.	序列 5'→3' Sequence 5'→3'	引物序号 Primer No.	序列 5'→3' Sequence 5'→3'
S17	AGGGGTCTTG	S45	ACGGCGTATG
S18	TCTGTGCTGG	S47	GGACGGCGTT
S20	GTAGACCCGT	S51	CATCGCCGCA
S22	TGCGTGCCTG	S56	GTGAATGCGG
S23	ACCCGGTCAC	S58	GGAAGACGG
S24	GAGCGCCTTG	S63	CCTTGCGCCT
S25	GGGTAACGTG	S69	TTAGCGCCCC
S28	GAAACGGGTG	S70	AGGACTGCTC
S30	GGGGTGACGA	S71	GTGGGTGCCA
S33	CCACGGGAAG	S73	GGAACCCACA
S44	GGGACGATGG	S84	CCGCGTCTTG

1.2 试验方法

1.2.1 植物基因组 DNA 的提取 本试验采用 CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide 十六烷基三甲基溴化铵)法^[8],从供试材料的叶片提取 DNA,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性。

1.2.2 RAPD 标记反应体系及程序的筛选与优化 试验借鉴文献[9-11]等对 RAPD 反应体系及程序的筛选结果,筛选出比较适合本试验材料 DNA 检测的体系和程序,再对所选体系及程序加以优化,确定适宜于紫花苜蓿品种鉴定的 RAPD 分子标记反应体系及程序^[12-14]。最终确定的 PCR 总反应体系为 20 μL,其中 DNA(100 ng/μL)0.5 μL,引物(100 μmol/L)0.5 μL, *Taq* Buffer 2.5 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L)2 μL,dNTP(10 mmol/L)0.5 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL)0.3 μL,用无菌 ddH₂O 补足 20 μL。反应在 PTC-240 型 PCR 仪上进行,反应程序为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 1 min,37 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,39 个循环后,再于 72 ℃延伸 7 min。

1.2.3 扩增产物的检测 按照上述体系加样后于

BIO-RAD PCR 仪中进行扩增,用 15 g/L 琼脂糖凝胶对扩增结果进行检测,于 BIO-RAD 凝胶成像系统中进行电泳谱带检测并照相。

1.3 数据处理

对 RAPD 电泳凝胶图进行人工读带,同一引物扩增产物在电泳中迁移率一致的条带被认为具有同源性,将图形资料转换为数据资料。按扩增带的有无记数,当某一扩增带出现时,赋值为“1”;不存在时,赋值为“0”。用 NTSYS 软件对所有品种或材料进行聚类分析和遗传相似度分析。根据遗传相似度

计算出遗传距离(遗传距离 = 1 - 遗传相似度)^[7,9,15-16]。

2 结果与分析

2.1 DNA 的检测

所提取 22 份材料 DNA 的质量浓度最高为 4 759.8 ng/ μ L,最低为 690.0 ng/ μ L,平均为 2 000 ng/ μ L 以上。图 1 为稀释到 50 ng/ μ L 的 DNA 琼脂糖检验结果。从图 1 可以看出,提取的 DNA 纯度均较高,且基本上未发生降解。

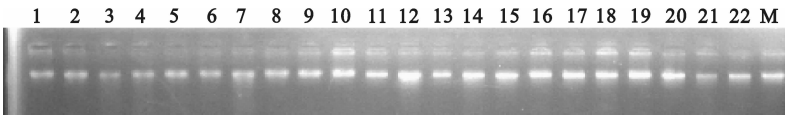


图 1 22 种紫花苜蓿的 DNA 检测结果
1~22. 参试的 22 种紫花苜蓿品种;M. DL2000 Marker
Fig. 1 DNA consequence of 22 alfalfa varieties
1—22. 22 alfalfa varieties of table1;M. DL2000 Marker

2.2 RAPD 扩增结果的分析

从 91 个随机引物中筛选出 22 个多态性好的引物,用以扩增供试材料,结果共扩增出 289 条条带,其中具有多态性的条带有 257 条,无多态性的条带有

32 条,多态性条带比率(PPB)为 88.93%,表明供试苜蓿品种之间的遗传基础较广。由扩增结果可知,22 个引物扩增的 DNA 条带分别有 4~18 条,其中引物 S30 和 S47 的扩增电泳图谱如图 2 和图 3 所示。

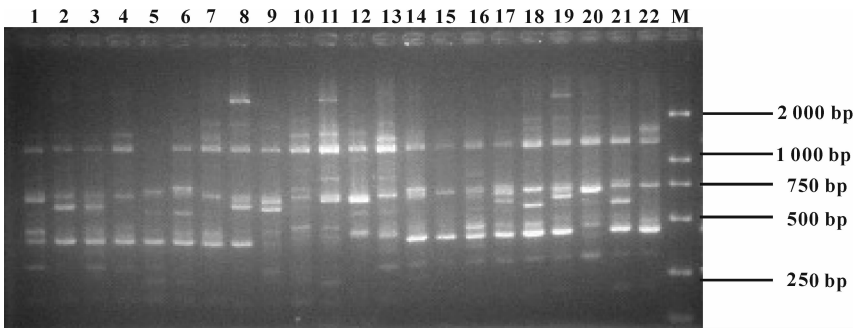


图 2 引物 S30 扩增产物的电泳图谱
1~22. 参试的 22 个紫花苜蓿品种;M. DL2000 Marker
Fig. 2 Partial results of electrophoresis of PCR products at RAPD S30
1—22. 22 alfalfa varieties of table 1;M. DL2000 Marker

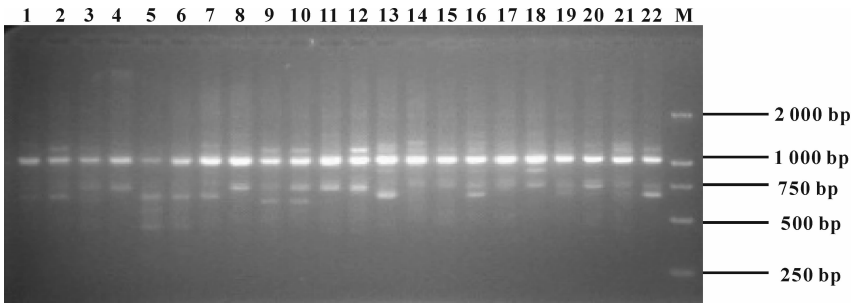


图 3 引物 S47 扩增产物的电泳图谱
1~22. 参试的 22 个紫花苜蓿品种;M. DL2000 Marker
Fig. 3 Partial results of electrophoresis of PCR products at RAPD S47
1—22. 22 alfalfa varieties of table 1;M. DL2000 Marker

多态性位点比率(P)是指具有多态性的位点数占检测到的位点数的比例^[14],是衡量一个种群内遗传变异水平高低的重要指标。可用于紫花苜蓿亲缘

关系分析的 22 条随机引物的扩增及分析结果如表 3 所示。

表 3 22 条随机引物对紫花苜蓿的扩增结果
Table 3 Amplified results of 22 random primers

引物号 Primer No.	多态性条带 Polymorphic strap	总带数 Total band number	多态位点比率 Percent of polymorphic loci	引物号 Primer No.	多态性条带 Polymorphic strap	总带数 Total band number	多态位点比率 Percent of polymorphic loci
S17	16	17	94.12	S45	15	16	93.75
S18	15	16	93.75	S47	9	10	90.00
S20	7	9	77.78	S51	15	18	83.33
S22	14	18	77.78	S56	16	18	88.89
S23	7	10	70.00	S58	10	12	83.33
S24	11	13	84.62	S63	7	8	87.50
S25	12	14	85.71	S69	9	9	100.00
S28	15	16	93.75	S70	12	12	100.00
S30	12	13	92.31	S71	12	12	100.00
S33	9	11	81.82	S73	15	15	100.00
S44	2	4	50.00	S84	17	18	94.44

2.3 22 个紫花苜蓿品种间的遗传距离及聚类分析

2.3.1 遗传距离 由表 4 可知,22 个紫花苜蓿品种间遗传距离的变幅为 0.135 6~0.361 1,平均遗传距离为 0.209 5;“德宝”与“赛特”之间遗传距离最小,为 0.135 6,其次是“爱非尼特”与“金皇后”,二者间的遗传距离为 0.173 6;“WL252HQ”与“阿尔冈金”之间的遗传距离最大,为 0.361 1。

2.3.2 聚类分析 由图 4 可以看出,22 个紫花苜蓿品种在遗传距离为 0.35 时,可以分为 3 大类:引自美国的“阿尔冈金”和引自荷兰的“三得利”聚为第 1 类;“维多利亚”、“全能”、“皇后”、“金黄后”、“爱非尼特”聚为第 2 类,这 5 个品种均引自美国;其余为第 3 类。第 3 类又可分为 4 个亚类,第 4 亚类中引自加拿大的“放牧者”与其他 3 个亚类的遗传距离较远。

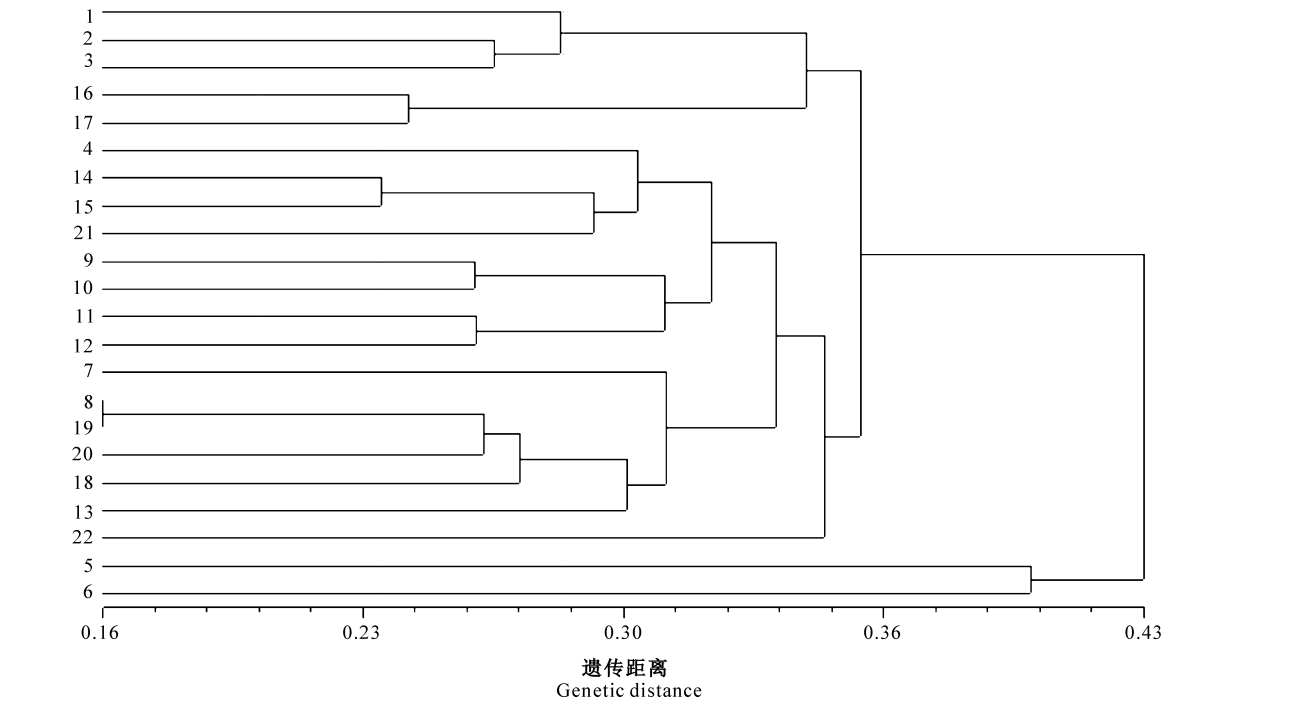


图 4 22 个紫花苜蓿品种的聚类分析
1~22. 参试的 22 个紫花苜蓿品种;M. DL2000 Marker
Fig. 4 Cluster analysis of dendrogram among 22 *Medicago* L. materials
1~22. 22 alfalfa varieties in table 1; M. DL2000 Marker

3 讨 论

本研究采用 RAPD 分子标记和聚类分析方法,对 22 份紫花苜蓿品种的遗传多样性进行了分析。所选材料中,国内品种包括中苜一号、关中苜蓿和固原紫花苜蓿,中苜一号和固原紫花苜蓿属于同一亚类,二者之间亲缘关系相对较近,与另一亚类关中苜蓿间的亲缘关系较远,说明中国地方品种之间发生了较大的遗传变异。19 个国外品种中,“赛特”和“德宝”间的遗传距离最小,是因为二者均引自荷兰,遗传变异较小;同样,WL323HQ 与 WL232HQ、“金黄后”与“爱非尼特”也均各自引自同一国家,所以其遗传距离较小,遗传变异也较小。孙其信^[17]在研究小麦遗传多样性时也得到了相似的结论,即来自不同地区的品种(品系),大部分按地理来源分为一类。“阿尔冈金”与“三得利”聚为 1 类,但二者与其他品种之间亲缘关系均较远,说明其发生了较大的遗传变异,因此二者杂交或与其他品种之间杂交可能会产生较大的杂种优势。“放牧者”与其他品种间的遗传距离也较远,这可能与其引自加拿大有关。因此,“放牧者”与其他品种之间杂交,也可能会产生较大的杂种优势。

一般来说,RAPD 标记对 DNA 质量的要求并不十分严格,无须用 RNase 进行 RNA 的处理。DNA 提取过程中,氯仿有强烈的脂溶性,可去除脂类杂质,V(氯仿):V(异戊醇)=24:1 的主要作用是抽提蛋白质,充分抽提且除去蛋白质是 DNA 提取中最重要的步骤,也是提高 DNA 质量的关键^[3]。Mg²⁺对 PCR 扩增的特异性和产量有显著影响,在一般的 PCR 反应中,各种 dNTP 浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 时,Mg²⁺浓度以 1.5~2.0 mmol/L 为宜。Taq 聚合酶浓度过高可引起非特异性扩增,浓度过低则使合成产物量减少;而 DNA 模板质量浓度以 30~100 ng/ μL 为宜^[18]。

本研究采用 RAPD 标记,揭示基因组中随机基因位点的多态性,由于反应体系很小,所以对试验精确程度的要求很高,对各成分浓度要求十分严格。试验操作中,在各模板浓度一致的前提下,各反应成分的混合成为关键。在初步接触 RAPD 技术时,需反复摸索反应条件和确定反应体系,但随着对该项技术的熟练掌握和对试验条件的严格控制,RAPD 技术能够获得较好的重复结果。

4 结 论

1)22 个随机引物共检出 289 条扩增片段,多态

性条带占 88.93%,表明供试苜蓿品种之间的遗传基础较广;每个引物扩增的 DNA 条带分别为 4~18 条,其中多态性谱带为 2~17 条;22 个品种间的遗传距离为 0.135 6~0.361 1,平均遗传距离为 0.209 5,其中变异最大的是 WL252HQ 和“阿尔冈金”,最小的是“德宝”与“赛特”;“阿尔冈金”和“三得利”及其与其他品种间的亲缘关系相对较远。因此,二者之间杂交或二者与其他品种杂交,可能会产生较大的杂种优势。另外,来自加拿大的“放牧者”与其他 21 个品种的遗传距离也较大,因此推测其与其他 21 个品种杂交,亦会产生较大的杂种优势。

2)本研究发现,22 个来自不同国家或地区的不同紫花苜蓿品种间的遗传多样性比较明显,遗传基础较广,具有丰富的遗传基础和广泛的适应潜力及开发价值。我国 3 个品种之间的遗传距离为 0.260 4,大于 22 个紫花苜蓿品种的平均遗传距离,说明国内品种间发生了较大的遗传变异,与聚类分析结果相一致。本研究结果表明,参试的 22 个国内外紫花苜蓿品种的遗传基础较广,具有发现有利基因的极大潜能。

【参考文献】

- [1] 王根旺.中国苜蓿种质资源及育种前景分析[J].甘肃农业,2005(2):31-34.
Wang G W. Analysis of the germplasm resources and breeding plan of Chinese alfalfa [J]. Gansu Agricultural,2005(2):31-34. (in Chinese)
- [2] Echt C S, Erdahl L A, McCoy T J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa [J]. Genome,1992,35:84-87.
- [3] Yu K F, Pauls K P. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous population of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples [J]. Theor Appl Genet, 1993,86:788-794.
- [4] 卢欣石.中国苜蓿遗传多样性及其基因生态类型研究[D].兰州:甘肃农业大学,1997.
Lu X S. Study on the genetic diversity and gene ecological types of alfalfa in China [D]. Lanzhou:Gansu Agricultural University,1997. (in Chinese)
- [5] 李拥军,苏加楷.苜蓿地方品种遗传多样性的研究——RAPD 标记[J].草地学报,1998,6(2):105-114.
Li Y J, Su J K. Study on relationships of the alfalfa local varieties in China—RAPD markers [J]. Acta Pratacultural Sinica, 1998,6(2):105-114. (in Chinese)
- [6] 郭江波,赵来喜.中国苜蓿育成品种遗传多样性及亲缘关系研究[J].中国草地,2004,26(1):9-13.
Guo J B, Zhao L X. Genetic diversity and relationship on registered bred alfalfa varieties in China [J]. Grassland of China,

2004,26(1):9-13. (in Chinese)

[7] 蒿若超,张月学,唐凤兰. 利用 RAPD 分子标记研究苜蓿种质资源的遗传多样性 [J]. 草业科学,2007,24(8):69-73.
Hao R C,Zhang Y X,Tang F L. Study on the genetic diversity of *Medicago sativa* using RAPD [J]. Pratacultural Science, 2007,24(8):69-73. (in Chinese)

[8] 印莉萍,祁小廷. 细胞分子生物学 [M]. 北京:科学出版社,2005:35-36.
Yin L P,Qi X T. Cell Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press,2005:35-36. (in Chinese)

[9] 汪恩华,刘杰,刘公社,等. 形态与分子标记用于羊草种质鉴定与遗传评估的研究 [J]. 草业学报,2002,11(4):68-75.
Wang E H,Liu J,Liu G S,et al. Germplasm identification and genetic evaluation on *Leymus chinensis* with morphology and molecular marker [J]. Acta Pratacultural Sinica,2002,11(4): 68-75. (in Chinese)

[10] 李拥军. 中国苜蓿地方品种亲缘关系的研究 [J]. 草业学报, 1999,8(3):46-53.
Li Y J. Study on relationships of the alfalfa local varieties in China [J]. Acta Pratacultural Sinica,1999,8(3):46-53. (in Chinese)

[11] 毕玉芬,车伟光,李季蓉. 利用 RAPD 技术研究弱秋眠性紫花苜蓿的遗传多样性 [J]. 作物学报,2005,31(5):647-652.
Bi Y F,Che W G,Li J R. Genetic diversity analysis of Weak-fall dormancy alfalfa [J]. Acta Agronomica Sinica,2005,31 (5):647-652. (in Chinese)

[12] 朴政玉,曲柏宏,孙伟龙. 苜蓿基因组总 DNA 提取及 RAPD 反应条件的优化 [J]. 湖北农业科学,2006,45(4):403-405.
Piao Z Y,Qu B H, Sun Y L. Optimization of alfalfa genomic DNA extraction method and RAPD reaction conditions [J]. Hubei Agricultural Sciences,2006,45(4):403-405. (in Chinese)

[13] 张涛,杨青川,毛培胜. RAPD 分子标记鉴定紫花苜蓿品种的反应体系优化 [J]. 草地学报,2006,14(4):333-337.
Zhang T,Yang Q C,Mao P S. Optimizing of reaction system of RAPD molecular marker for verification of alfalfa cultivars [J]. Acta Pratacultural Sinica,2006,14(4):333-337. (in Chinese)

[14] 汪小全,邹喻苹,张大明,等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题 [J]. 植物学报,1996,38(12):954-962.
Wang X Q,Zhou Y P,Zhang D M,et al. Study on the genetic diversity and phylogenic biology using RAPD [J]. Journal of Integrative Plant Biology,1996,38(12):954-962. (in Chinese)

[15] 胡宝忠,刘娣,胡国富. 中国紫花苜蓿地方品种随机扩增多态 DNA 的研究 [J]. 植物生态学报,2000,24(6):697-701.
Hu B Z,Liu D,Hu G F. Random amplified polymorphic DNA study of local breeds in Chinese alfalfa [J]. Acta Phytoecologica Sinica,2000,24(6):697-701. (in Chinese)

[16] 王玲,郑金贵,赖钟雄. 辣椒遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2003,32(2):213-216.
Wang L,Zheng J G,Lai Z X. RAPD analysis of genetic diversity in *Capsicum annuum* L. [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition,2003, 32(2):213-216. (in Chinese)

[17] 孙其信. 利用 RAPD 标记研究小麦品种间的遗传差异 [J]. 农业生物学报,1996,4(2):103-110.
Sun Q X. Study on the genetic discrepancy of wheat's using RAPD [J]. Journal of agricultural and Biology,1996,4(2): 103-110. (in Chinese)

[18] Zhao R,Cheng Z. Estimating genetic diversity and sampling strategy for a wild soybean (*Glycine soja*) population based on different molecular markers [J]. Chinese Science Bulletin, 2006,51(10):1219-1227.