

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2014)02-0065-05

遗传育种

黑龙江省马铃薯主栽品种遗传多样性的RAPD分析

赵光磊¹, 张雅奎¹, 吴凌娟¹, 徐学谱¹, 刁琢¹,
李功义¹, 梁杰¹, 董传民¹, 温福军¹, 吕文河^{2*}

(1.黑龙江省大兴安岭地区农林科学院, 黑龙江 加格达奇 165000; 2.东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 应用RAPD标记技术对黑龙江省34份马铃薯主栽品种的遗传多样性进行分析, 明确这些主栽品种的亲缘关系, 旨在为本区域马铃薯优良品种的选育提供理论依据。结果显示, 34条随机引物共扩增出条带185条, 其中多态性条带135条, 占总条带数的73%; 34份供试品种可聚为3大类7亚类, 遗传距离在0.112~0.551之间, 平均为0.364。结果表明, 黑龙江省马铃薯主栽品种的遗传相似性较高, 遗传基础比较狭窄。

关键词: 马铃薯; RAPD分析; 遗传多样性; 黑龙江省

RAPD Analysis of Genetic Diversity for Leading Potato Varieties in Heilongjiang Province

ZHAO Guanglei¹, ZHANG Yakui¹, WU Lingjuan¹, XU Xuepu¹, DIAO Zhuo¹,
LI Gongyi¹, LIANG Jie¹, DONG Chuanmin¹, WEN Fujun¹, LU Wenhe^{2*}

(1. Daxinganling Academy of Agriculture and Forestry, Jiagedaqi, Heilongjiang 165000, China;
2. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: The random amplified polymorphic DNA procedure (RAPD) was used to assess the genetic diversity for 34 leading potato varieties in Heilongjiang Province, which were to understand the genetic relationship of these leading potato varieties, and provide the theoretical basis for the breeding of potato varieties. The result showed that there were 135 polymorphic bands amplified with 34 primers, and the polymorphic rate was 73%; these 34 potato varieties were divided into three classes and seven subclasses, and the genetic distance among 34 potato varieties was ranged from 0.112 to 0.551, with an average of 0.364. These results suggest that the genetic similarity is high and the genetic base is narrow among leading potato varieties in Heilongjiang Province.

Key Words: potato; RAPD analysis; genetic diversity; Heilongjiang Province

马铃薯是世界上继水稻、小麦、玉米之后的第四大粮食作物, 是重要的粮菜兼用和工业原料作物。黑龙江省具有独特的地理位置和气候条件, 非常适宜马铃薯生长, 是中国重要的马铃薯新品种选育基地及种薯和商品薯生产基地。种质

材料的遗传背景研究是新品种选育的基础, 利用分子标记手段对种质资源进行准确、科学的鉴定和评价, 可以为育种工作提供可靠的依据。

DNA分子标记技术(如SSR, RAPD, ISSR和SPAR等)是进行种质资源的遗传多样性分析的重要手段^[1-4],

收稿日期: 2014-03-05

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(Zhsyz-1); 农业部公益性行业科研专项(3-6-1-6)。

作者简介: 赵光磊(1984-), 男, 硕士, 主要从事马铃薯遗传育种研究。

*通信作者(Corresponding author): 吕文河, 教授, 博士生导师, 主要从事马铃薯遗传育种研究, E-mail: luwenhe@yahoo.com。

其中RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)作为一种快速、简便和通用性好的分子标记技术, 一经问世, 便得到了广泛应用, 目前, 已成为生物遗传多样性研究的重要技术之一, 尤其在马铃薯遗传多样性研究方面有很多报道, 如杨先泉等^[5]、刘福翠等^[6]和邸宏等^[7]分别研究了四川省、云南省和中国部分马铃薯品种的遗传多样性。然而, 现有报道中多是对引进或育成多年的马铃薯品种进行分析, 随着近年来新育成品种在黑龙江省的推广和种植, 有必要针对黑龙江省马铃薯现有主栽品种的遗传多样性进行分析。为此, 本研究应用RAPD分子标记技术对黑龙江省34份马铃薯主栽品种的遗传多样性进行了分析, 旨在进一步了解这些品种的遗传特性, 以期为本省马铃薯种质资源

的利用和杂交育种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为34份黑龙江省马铃薯的主栽品种(表1), 由黑龙江省大兴安岭地区农林科学院提供。Taq DNA聚合酶和dNTP为BioTeke公司产品; RAPD引物由上海生工生物技术公司合成; 其他试剂均为进口分装或国产分析纯化。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

取各供试材料的幼嫩叶片, 用植物基因组试剂盒(购自百泰克生物技术有限公司)提取DNA, 用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA纯度化。

表1 34份供试马铃薯品种
Table 1 Thirty-four potato varieties used in this study

编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety
1	底西芮	10	克新12号	19	花园525	28	克新19号
2	诺兰	11	兴佳2号	20	东农309	29	费乌瑞它
3	麻皮布尔斑克	12	春薯1号	21	兴安红	30	克新18号
4	夏波蒂	13	克新22号	22	克新4号	31	中大1号
5	大西洋	14	东农308	23	东农307	32	讷引1号
6	东农306	15	早大白	24	克新13号	33	讷引2号
7	东农305	16	尤金	25	克新23号	34	讷引3号
8	213	17	讷引4号	26	东农303		
9	超白	18	中薯5号	27	讷引5号		

1.2.2 RAPD反应

PCR反应体系为25 μL, 其中含有1×buffer, 0.12 mmol/L dNTPs, 0.8 μmol/L 随机引物, 1.5 mmol/L Mg²⁺, 1 U Taq DNA酶, 40 ng模板DNA。

PCR反应程序为94℃预变性4 min, 94℃变性30 s, 37℃复性40 s, 72℃延伸1 min, 40个循环; 72℃延伸10 min, 4℃保存。PCR反应产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, EB染色观察后, 在紫外灯下照相记录。

1.2.3 数据分析

将电泳图谱上有带的记为1, 无带和模糊条带的记为0。根据RAPD数据使用NTSYS-pc2.10软件, 采用Nei和Li^[8]的方法计算遗传距离, 并用非加权组对平均聚类法(UPGMA)进行聚类。

2 结果与分析

2.1 RAPD标记的多态性分析

以34份马铃薯品种的基因组DNA为模板, 利用RAPD反应体系进行引物的筛选, 从80条引物中筛选出稳定性好、条带清晰、多态性丰富的引物34条, 用于品种间的比较分析。利用34个多态性引物共扩增出DNA带185条, 其中多态性条带135条, 占总条带的73%(表2)。其中扩增多态性条带最多的引物为S376和S265, 多态性条带为8条(图1)。

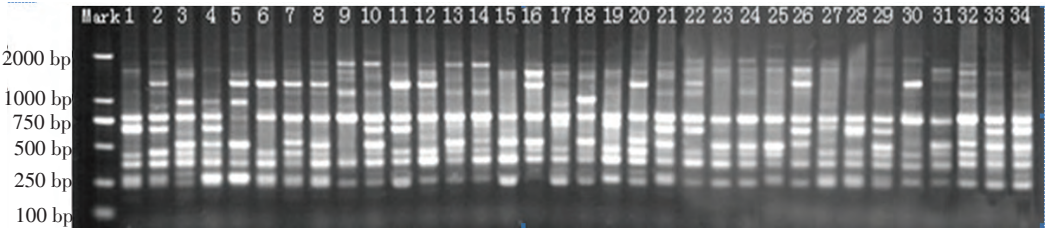
2.2 34份马铃薯品种的遗传距离

根据扩增的多态性条带, 利用NTSYS软件计算供试材料间的遗传距离, 结果表明, 34份马铃薯品种之间的遗传距离在0.112~0.551之间, 平均

表 2 不同随机引物扩增出 34 份马铃薯品种的条带数

Table 2 Numbers of DNA fragments amplified with different primers in 34 potato varieties

引物 Primer	碱基序列(5'→3') Sequence	扩增带数/多态性条带数 No. of amplified band/No. of polymorphic band	多态性比率(%) Percentage of polymorphic fragment
S28	GTGACGTAGG	04/03	75.0
S30	GTGATCGCAG	05/03	60.0
S32	TCGGCGATAG	07/07	100.0
S45	TGAGCGGACA	03/02	66.7
S51	AGCGCCATTG	05/03	60.0
S55	CATCCGTGCT	04/02	50.0
S60	ACCCGGTCAC	05/03	60.0
S66	GAACGGACTC	08/06	75.0
S70	TGTCTGGGTG	05/04	80.0
S82	GGCACTGAGG	04/02	50.0
S85	CTGAGACGGA	06/04	66.7
S89	CTGACGTCAC	04/02	50.0
S102	TCGGACGTGA	07/05	71.4
S103	AGACGTCCAC	04/03	75.0
S105	AGTCGTCCCC	07/06	85.7
S106	ACGCATCGCA	06/04	66.7
S111	CTTCCGCAGT	07/06	85.7
S112	ACGCGCATGT	05/04	80.0
S114	ACCAGGTTGG	07/06	85.7
S118	GAATCGGCCA	03/02	66.7
S126	GGGAATTCGG	04/03	75.0
S127	CCGATATCCC	04/03	75.0
S262	ACCCCGCCAA	06/04	66.7
S264	CAGAAGCGGA	03/02	66.7
S265	GGCGGATAAG	09/08	88.9
S304	CCGCTACCGA	06/03	50.0
S343	TCTCCGCTTG	05/05	100.0
S345	CTCCATGGGG	06/04	66.7
S346	TCGTTCGCA	06/03	50.0
S364	CCGCCCAAAC	04/02	50.0
S367	AGCGAGCAAG	03/02	66.7
S368	GAACACTGGG	06/05	83.3
S376	GAGCGTCGAA	10/08	80.0
S380	GTGTCGCGAG	07/06	85.7
合计 Total		185/135	73.0



Mark 为 DL 2000 DNA Marker; 1~34 泳道分别为编号 1~34 所代表的马铃薯材料。

Mark used was DL 2000 DNA Marker; 1~34 lanes represent 1~34 potato varieties.

图 1 引物 S376 扩增的 RAPD 图谱

Figure 1 Profile of amplified RAPD using primer S376

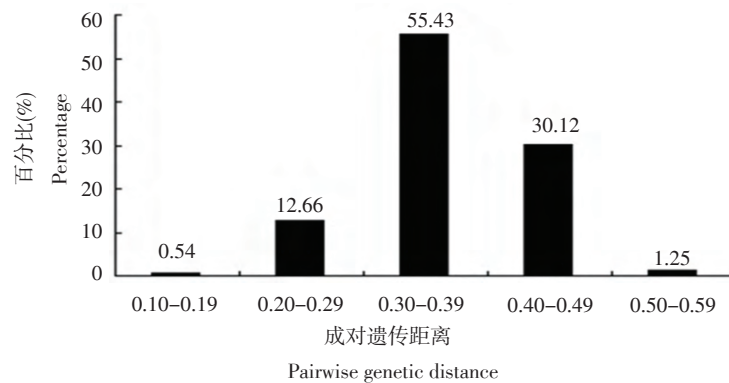


图2 34份马铃薯品种间的成对遗传距离分布图

Figure 2 Frequency distribution of pairwise genetic distance of 34 potato varieties

为0.364。其中成对遗传距离小于0.4的品种对有385个, 占总数的68.63%, 而成对遗传距离大于0.5的品种对仅为1.25%(图2)。上述结果说明, 黑龙江省马铃薯栽培品种的遗传距离狭窄, 遗传相似性较高, 遗传多样性程度较低。

2.3 34份马铃薯品种的聚类分析

应用UPGMA方法和NTSYS软件对RAPD结果

建立聚类树状图(图3)。从图3可知, 试供的34个品种可划分为3大类, I类包括7个品种, II类包括25个品种, III类仅包括2个品种。

I类可分为3个亚类: I-1亚类包括2个品种, 即‘底西芮’和‘夏波蒂’。I-2亚类有4个品种, 包括‘麻皮布尔斑克’、‘大西洋’、‘东农305’和‘东农306’。I-3亚类仅有1个品种, 即‘东农309’。

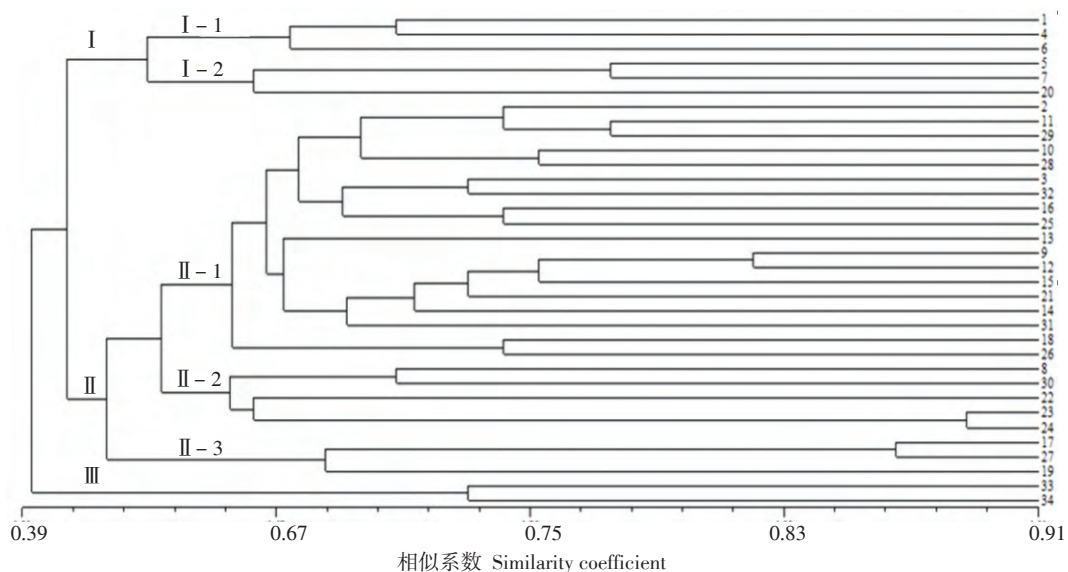


图3 34份马铃薯品种的聚类分析

Figure 3 Dendrogram of 34 potato varieties by using UPGMA analysis

II类在相似系数为0.65处, 又分为3个亚类: II-1亚类有19个品种, 其中又可分为4个亚亚类, II-1-1包括‘诺兰’、‘兴佳2号’、‘费乌瑞它’、‘克新22号’、‘讷引4号’和‘讷引5号’; II-1-2包括‘中薯5号’和‘东农303’; II-1-3包括‘超白’、‘春薯1号’、‘早大白’、‘兴安红’、‘东农308’和

‘中大1号’; II-1-4包括‘克新12号’、‘克新19号’、‘讷引1号’、‘尤金’和‘克新23号’。II-2亚类有3个品种, 即‘花园525’、‘东农307’和‘克新13号’。II-3亚类有3个品种, 即‘213’、‘克新18号’和‘克新4号’。

III类仅包括2个品种‘讷引2号’和‘讷引3号’。

从聚类结果可以看出, 国外育成品种或具有国外品种血缘的品种多聚在相同类群, 如‘底西芮’、‘夏波蒂’、‘麻皮布尔斑克’、‘大西洋’、‘东农 305’、‘东农 306’和‘东农 309’均聚在 I 类。‘诺兰’、‘兴佳 2 号’和‘费乌瑞它’也聚在 II-1-1 中。

3 讨 论

研究结果表明, 在 80 个随机引物中筛选出的 34 个引物能在 34 份马铃薯品种间扩增出较好的多态性片段, 共扩增出条带 185 条, 其中多态性条带 135 条, 占总条带数的 73%。分子聚类分析表明, 34 份马铃薯品种可聚为 3 大类 7 亚类。遗传距离分析表明, 黑龙江省 34 份马铃薯主栽品种之间的遗传距离在 0.112~0.551 之间, 平均为 0.364, 成对遗传距离小于 0.4 的品种对占总数的 68.63%。结果表明: 黑龙江省马铃薯栽培品种的遗传相似性较高, 遗传基础比较狭窄, 遗传多样性总体水平较低。

有报道认为, RAPD 技术由于受反应条件的影响很大, 假阳性率高, 重复性较差, 影响结果的准确性^[9], 但笔者认为, 只要严格地控制试验条件, 规范地进行试验操作, 增加试验重复次数, 是可以克服上述缺点的。前人的研究也证明, RAPD 技术用于资源评价是有效可靠的, 如 Williams 等^[10]利用 RAPD 标记对蚕豆的 66 个后代材料进行遗传分析, 其结果符合孟德尔遗传规律。国内外一些学者如 Demeke 等^[11]、Del Rioa 等^[12]、李凤云等^[13]和李先平等^[14]的研究进一步证明了 RAPD 标记可有效地用于马铃薯遗传多样性的研究。本研究结果发现, 亲缘关系较近的品种很早就聚在了一起, 如‘超白’和‘春薯 1 号’、‘大西洋’和‘东农 305’, 根据对它们的系谱进行调查后发现与此结果吻合, 由此也说明 RAPD 标记结果是可靠的。

研究表明, 黑龙江省马铃薯栽培品种的遗传相似性较高, 遗传基础比较狭窄, 这一结果与邸宏等^[15]以及段艳凤等^[16]的研究结论一致。这是由于黑龙江省近年来审定推广的马铃薯主栽品种主要来源于国外引进以及利用少数国外品种选育而成, 造成了黑龙江省栽培的马铃薯品种整体上亲缘关系较近。因此在今后的育种工作中应当加强引种和资

源创新力度, 创造丰富的变异材料, 扩大种质资源的遗传背景, 促进马铃薯产业的持续发展。

[参 考 文 献]

- [1] 宗绪晓, 关建平, 王述民, 等. 中国豌豆地方品种 SSR 标记遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2008, 34(8): 1330-1338.
- [2] 景建洲, 张勇, 李东亮, 等. 利用 RAPD 分子标记分析玉米种质遗传多样性 [J]. 中国农业通报, 2006, 12(12): 405-408.
- [3] 陈兆贵, 邓汉超, 赵淑平. 47 份水稻品种资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 498-502.
- [4] 杨平, 刘仙俊, 刘新春, 等. 利用 SRAP 标记研究四川高原青稞育成品种的遗传多样性 [J]. 遗传, 2008, 30(1): 115-122.
- [5] 杨先泉, 张佳, 刘坚, 等. 应用 RAPD 分析四川马铃薯地方品种与部分栽培品种间遗传关系 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 40-44.
- [6] 刘福翠, 谭学林, 郭华春. 云南省马铃薯品种资源的 RAPD 分析 [J]. 西南农业学报, 2004, 17(2): 200-204.
- [7] 邸宏, 陈伊里, 卢翠华. 中国马铃薯部分品种资源遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(7): 1-4.
- [8] Nei 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.
- [9] 赵姝华, 张波. RAPD 标记技术的实用性及稳定性探讨 [J]. 国外农学-杂粮作物, 1999, 19(4): 13-15.
- [10] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplification by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [11] Demeke T, Kawchuk L M, Lynch D R. Identification of potato cultivars and clonal variants by random amplified polymorphic DNA analysis [J]. Am Potato J, 1993, 70: 561-570.
- [12] Del Rioa A H, Bamberg J B, Huamanc Z, et al. Association of ecogeographical variables and RAPD marker variation in wild potato populations of the USA [J]. Crop Sci, 2001, 41: 870-878.
- [13] 李凤云, 盛万民, 刘昭军, 等. 马铃薯品种遗传多样性的 RAPD 和 AFLP 标记分析 [J]. 中国马铃薯, 2007, 21(5): 266-271.
- [14] 李先平, 何云昆, 孙茂林, 等. 马铃薯 RAPD 分析方法优化初探 [J]. 西南农业学报, 2000, 13(1): 59-64.
- [15] 邸宏, 陈伊里, 金黎平, 等. RAPD 和 AFLP 标记分析中国马铃薯主要品种的遗传多样性 [J]. 作物学报, 2006, 32(6): 899-904.
- [16] 段艳凤, 刘杰, 卞春松, 等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1451-1457.