

应用 RAPD 和 ISSR 标记对 24 份花生栽培种材料进行遗传多样性分析

闫苗苗¹, 魏光成^{1*}, 谭秀华¹, 王传堂²

(1. 滨州医学院, 山东 烟台 264003; 2. 山东省花生研究所, 山东 青岛 266100)

摘要: 利用 RAPD 引物和 ISSR 引物分析我国 24 份花生栽培种材料的遗传多样性。结果表明: 所选的 RAPD 引物和 ISSR 引物中分别有 13 条引物和 10 条引物扩增出了清晰并可重复的条带, 共扩增出 123 条带和 87 条带, 平均每条引物扩增出 9.5 条带和 8.7 条带, 其中多态性带分别占条带总数的 47.15% 和 57.47%, 平均每条引物扩增出 4.7 条和 5.7 条多态性带。在此基础上, 根据 Nei-Li 系数采用 UPGMA 法进行了聚类分析, 可将 24 份花生材料分成 4 类: 四粒红、汕油 523、冀花 2 号、花育 16 和粤油 7 号等 5 个品种聚为一类; 花育 20、中花 8 号聚为一类; 黑花生单独为一类; 其余的花生聚为一类。RAPD 和 ISSR 标记能够揭示花生栽培种的遗传多样性, 在种质鉴定和遗传作图等方面具有一定应用潜力。

关键词: 花生; RAPD; ISSR; 聚类分析; 遗传多样性

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)05-0584-04

Genetic diversity in 24 peanut cultivars as revealed by RAPD/ISSR profiling

YAN Miao-Miao¹, WEI Guang-Cheng^{1*}, TAN Xiu-Hua¹, WANG Chuan-Tang²

(1. Binzhou Medical College, Yantai 264003, China; 2. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China)

Abstract: Genetic diversity in 24 accessions of cultivated peanut materials from China was evaluated based on RAPD/ISSR profiling. Of the RAPD primers and ISSR primers tested, 13 and 10 primers produced a total of 123 and 87 repeatable, clear and readable bands, among which 47.15% and 57.47% were polymorphic, respectively. On average, a primer resulted in 9.5 and 8.7 bands, of which 4.7 and 5.7 were polymorphic. A dendrogram was constructed using UPGMA algorithm based on Nei and Li's similarity coefficient, which divided the 24 peanut materials into 4 groups. Silihong, Sanyou 523, Jihua 2, Huayu 16 and Yueyou 7 were in one group. Huyu 20 and Zhonghua 8 clustered together. Heihuasheng formed a separated group, and the rest peanut materials tested fell in a group. RAPD and ISSR are useful for the genetic diversity studies of the cultivated peanut, and have potential in characterization of peanut germplasm and gene mapping.

Key words: peanut; RAPD; ISSR; cluster analysis; genetic diversity

作为世界上主要的经济作物,花生栽培种是重要的食用植物油和优质蛋白质来源(张梅等,2009)。遗传标记技术是花生种质鉴定、遗传多样性分析及标记辅助育种不可或缺的重要手段。然而,花生

栽培种遗传基础狭窄,细胞学标记、生化标记极为缺乏,包括 SSR、AFLP、SRAP 等多种标记虽已有报道,仍难以满足精细作图的需要。

在众多标记方法中,RAPD 标记与 ISSR 标记

收稿日期: 2010-08-26 修回日期: 2011-03-07

基金项目: 山东省自然科学基金(Y2008D11)[Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province(Y2008D11)]

作者简介: 闫苗苗(1981-),女,山东蓬莱市人,硕士研究生,讲师,(E-mail)yanmm81@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: weiguangcheng2004@126.com)

由于不需要预知基因组序列信息、操作简单,在多种植物上得到了应用,并取得了理想效果。但花生上的 RAPD 相关报道较少,利用 ISSR 标记对我国花生进行研究未见报道。本研究旨在探讨 RAPD 和 ISSR 在花生栽培种上的应用效果,并在此基础上明确我国 24 份花生栽培种材料的遗传多样性水平。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的 24 个花生品种(表 1)均购自山东农科院花生研究所。挑选种粒饱满的 20 粒花生种子,自来水浸泡,25 °C 恒温培养箱中培养 2~3 d,待其发芽后移栽入花盆中。待其长出 7~8 片叶时便可取叶提取总 DNA。所选用的 RAPD 引物为从 A,C,K(Operon Technologies)套引物中挑选出的 10 碱基引物;选用的 ISSR 引物为不列颠哥伦比亚大学(UBC)生物技术实验室设计的引物,这些引物大部分是 16 或 17 个碱基,均由上海生工合成(表 2)。

表 1 实验所用花生品种

Table 1 Peanut cultivars used in the study

编号 Code	品种 Cultivars	编号 Code	品种 Cultivars
1	白沙 1016	13	D3049 普通型
2	汕油 523	14	中花 8 号
3	粤油 7 号	15	红花生
4	兴义多粒种	16	中花 5 号
5	豫花 15	17	四粒红
6	花育 19	18	鲁育 11
7	花育 20	19	黑花生
8	花育 23	20	花育 21
9	冀花 2 号	21	花育 22
10	SPR-A015 多粒型	22	恭城大扯子
11	SPR1-A011 多粒型	23	D2006 普通型
12	花育 17	24	花育 16

1.2 方法

1.2.1 供试花生基因组 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法提取花生基因组 DNA(梁雪莲等,2007;胡维新,2003)。

1.2.2 RAPD 引物筛选及其检测 以花育 16 和中花 8 号这两个材料的模板 DNA 对 60 条 RAPD 引物进行筛选,共筛选出条带清晰、多态性理想的引物 13 个(表 2)。RAPD 反应体系的最佳条件是利用 $L_{16}(5^4)$ 正交表来探索得到的:每 20 μL 体系中含有 $10\times\text{Buffer}$ 2.0 μL , $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$ 2.0 μL , $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ dNTP}$ 0.5 μL , $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物

1.0 μL , $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 0.8 μL , $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶 0.4 μL ,去离子水 13.3 μL ;热循环程序为:起始解链 94 °C 3 min,然后 94 °C 30 s, 37 °C 45 s 和 72 °C 1 min,40 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。扩展产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,然后用 EB 染色,凝胶成像系统中观察并拍照。

表 2 PCR 扩增结果

Table 2 PCR amplification results

引物编号及序列 Primer code and sequence	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性条带比率 Percentage of polymorphic bands(%)
S29 GGGTAACGCC	8	4	50.0
S31 CAATCGCCGT	7	3	42.9
S37 GACCGCTTGT	10	5	50.0
S39 CAAACGTCGG	11	5	45.5
S40 GTTGCGATCC	7	3	42.9
S63 GGGGGTCTTT	6	3	50.0
S69 CTCACCGTCC	10	5	50.0
S75 GACGGATCAG	12	6	50.0
S369 CCCTACCGAC	13	6	46.2
S370 GTGCAACGTG	11	5	45.5
S374 CCCGCTACAC	12	7	58.3
S375 CTCCTGCCAA	7	2	28.6
S376 GAGCGTCGAA	9	4	44.4
UBC845(CT)8RG	9	9	100.0
UBC848(CA)8RG	13	11	85.0
UBC855(AC)8YT	8	7	88.0
UBC856(AC)8YA	5	1	20.0
UBC857(AC)8YG	9	6	67.0
UBC859(TG)8RC	9	4	44.0
UBC840(GA)8YT	9	5	56.0
UBC825(AC)8T	8	2	25.0
UBC835(AG)8YT0	9	3	33.0
UBC818(CA)8G	8	2	25.0

1.2.3 ISSR 引物筛选及其检测 以花育 16 和中花 8 号这两个材料的模板 DNA 对 50 条 ISSR 引物进行筛选,共筛选出条带清晰、多态性理想的引物 13 个(表 2)。ISSR(李文表等,2006)反应体系经过优化和筛选后其最佳的条件是:25 μL 扩增反应体系中含有 $10\times\text{Buffer}$ 2.5 μL , $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$ 2.2 μL , $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ dNTP}$ 0.9 μL , $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物 1.2 μL , $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA 1.5 μL , $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶 0.3 μL ,去离子水 16.4 μL 。热循环程序为:起始解链 94 °C 7 min,然后 94 °C 30 s, 52 °C 45 s 和 72 °C 2 min,40 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。扩展产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,然后用 EB 染色,凝胶成像系统中观察并拍照。



图1 花生的DNA电泳图

Fig.1 Electrophoresis of DNA extracted from peanut

1.2.4 统计分析方法 用Bio1D软件估计每条片段的分子大小。当有条带出现时记作1,没有条带出现时记作0。应用NTSYS 2.0可以计算这个物种的遗传相似度。 $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, N_{ij} 表示基因型间共有条带的数目,运用MVSP(Multi-variate

statistical package)统计软件,根据Nei-Li系数,进行UPGMA法聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DNA提取结果

花生基因组DNA琼脂糖凝胶上电泳结果显示,电泳条带为清晰、整齐均匀的一条带,背景清晰(图1)。用Eppendorf BioPhotometer测得, OD_{260} / OD_{280} 的值在1.8左右,说明纯度较好。

2.2 RAPD和ISSR图谱分析

所选的17条RAPD引物和13条ISSR引物中,分别有13条和10条引物各扩增出清晰并可重复的123条带和87条带,平均每条引物扩增出9.5条带和8.7条带,其中多态性带58条和50条,占条带总数的47.15%和57.47%,平均每条引物扩增出4.7条和5.7条多态性带(图2~3)。这些可重复的清晰明亮的条带就是所要研究的产物(表2)。

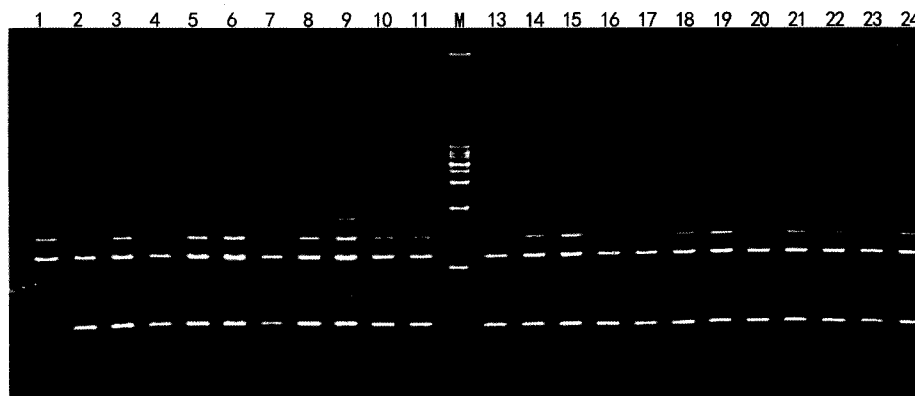


图2 24份种质DNA的RAPD图谱(引物S39)

Fig.2 RAPD-PCR amplification of DNA from 24 peanut germplasms using primer S39

M. 引物; 1-24. 24个花生品种泳道。下同。

M. Marker; 1-24. Lanes of 24 cultivars. The same below.

2.3 基于RAPD和ISSR指纹图谱的遗传和聚类分析

依据Nei-Li系数将供试的24个品种的花生聚为4类,其中黑花生单独成一类,它与其它三类的遗传相似性系数仅有0.40。花育20和中花8号聚为一类,其GS值为0.75,四粒红、汕油523、冀花2号、花育16和粤油7号五个品种聚为一类,其中四粒红与其它四个品种的GS值只有0.65,这五个品种聚为一类且GS值较低,说明来自不同地理区域的品种其相似性较小。其它16个品种聚为一类。

供试材料的Nei-Li系数分析结果表明,相似系数GS变异较大,在0.27(13号和17号)到0.92(花育17和白沙1016)之间,平均GS值为0.65。24份

样品中,黑花生和其他23份样品的相似性系数最小,说明黑花生和其他品种花生的亲缘关系最远。其它三类的GS值在0.65(四粒红和其它4个品种)到0.92(花育17和白沙1016)之间,GS值变异也较大,这说明所研究的这23份花生栽培种材料中存在较丰富的遗传多样性。这一结论与张建成等,(2005)利用SRAP技术所得的结论基本一致。

3 讨论

3.1 基因组总DNA提取

DNA的提取是植物分子生物学研究的重要技

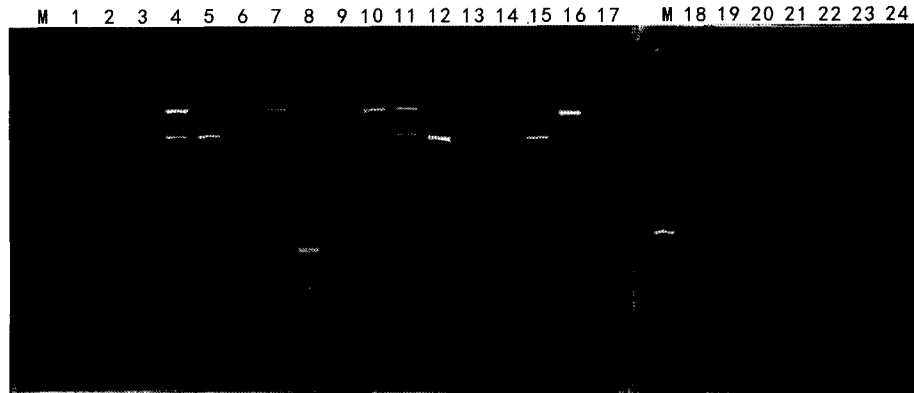


图 3 24 份种质 DNA 的 ISSR 图谱(引物 S39)

Fig. 3 ISSR-PCR amplification of DNA from 24 peanut germplasms using primer S39

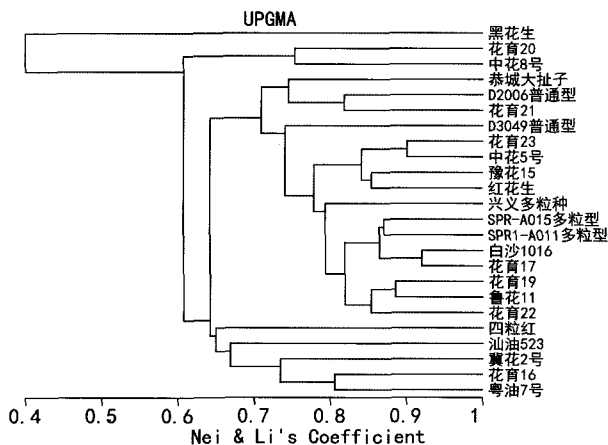


图 4 24 份花生种质遗传关系树状图

Fig. 4 UPGMA cluster analysis for 24 peanut germplasms

术环节之一,高质量的 DNA 是分子实验重复性和可靠性的保证。本实验在胡维新(胡维新,2003)CTAB 法的基础上稍做修改,提取的 DNA 质量较高, OD_{260}/OD_{280} 大于 1.8, OD_{260}/OD_{230} 大于 2.0,适合于 PCR 等分子生物学研究。在实验中遇到的主要问题是部分品种 DNA 在提取时褐化或蛋白质含量较高。植物含有较多的酚类物质容易褐化,为防止褐化解决的办法是加入适量的聚维酮(PVP),PVP 与多酚结合形成复合物,从而可有效避免多酚类化合物介导的 DNA 降解;研磨全过程应尽量在冰浴环境中,并加快研磨速度。个别品种蛋白质含量较高,可用氯仿:异戊醇(24:1)再抽提一次,效果较理想。本实验室用的提取缓冲液中的 CTAB 是一种阳离子去污剂,它能与核酸形成复合物,这些复合物在低盐溶液中会因溶解度的降低而沉淀,而在高盐溶液中可解离,从而使 DNA 和多糖分开,再

用乙醇沉淀 DNA 而除去 CTAB,不妨碍所提取 DNA 的质量。

3.2 RAPD 和 ISSR 分析在花生上的应用效果

RAPD 和 ISSR 技术作为一种操作简单的分子标记技术在植物种质资源研究中已得到了广泛应用(何华勤等,2004;Qian 等,2001;王利群等,2009;周延清等,2004;Galvfin 等,2003;He 等,2006;Bhat 等,1999;Raina 等,2001),但在花生上的相关报道较少。本研究证实,RAPD 和 ISSR 标记能够揭示花生栽培种的遗传多样性,在种质鉴定和遗传作图等方面具有一定应用潜力。

参考文献:

- 胡维新. 2003. 分子生物学常用实验操作[M]. 长沙:湖南科学技术出版社:19-20
- Bhat KV, Babrekar P, Lakhanpaul S. 1999. Study of genetic diversity in Indian and exotic sesame (*Sesamum indicum*) germplasm using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers[J]. *Euphytica*, **10**:21-33
- He HQ(何华勤), Jia XL(贾小丽), Liang Y(梁义), et al. 2004. RAPD 和 ISSR 标记对水稻化感种质资源遗传多态性的分析[J]. *遗传学报*, **31**(9):888-894
- He XQ, Liu QC, Ishiki K, et al. 2006. Genetic diversity and genetic relationships among Chinese sweetpotato landraces revealed by RAPD and AFLP markers[J]. *Breed Sci*, **56**:201-207
- Galvfin MZ, Bornet B, Balatti PA, et al. 2003. Inter simple sequence repeat ISSR markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean *Phaseolus vulgaris*[J]. *Euphytica*, **132**:297-301
- Li WB(李文表), Zhou XY(周先叶), Li Y(李勇), et al. 2006. Discussion on the ISSR reaction condition of *Trachycarpus fortunei* (棕榈 ISSR 反应条件的筛选与优化)[J]. *Guihaia* (广西植物), **26**(2):204-208
- Liang XL(梁雪莲), Zheng YX(郑奕雄), Cheng XL(陈晓玲), et al. 2007. Comparison of different methods of DNA extraction of peanut leave(花生 DNA 提取方法比较)[J]. *Biotechnology*(生
- (下转第 583 页 Continue on page 583)

稀,仅节上略密。叶片揉碎后有恶臭味,纸质,心形至卵状心形,长 2.8~4.5 cm,宽 2~3.5 cm,通常以生于茎中部的叶较大,先端急尖至短渐尖,基部心形,边缘具圆齿,上面被稀疏糙伏毛,下面被稀疏柔毛,叶脉隆起,背面紫色,具下凹腺点;叶柄长 0.5~3.5 cm,以茎中部者较长,向顶端渐短,两侧边缘具稀疏长柔毛。花通常成对着生于茎上部 2~3(~7) 节叶腋,苞片披针形至钻形,边缘具齿;花梗长 2~6 mm,被柔毛,近基部或中部具 1 对苞片,苞片钻形,具细齿。花萼在花时筒状,口部微张,长 12~14 mm,具 15 脉,外面被微柔毛,二唇形,上唇 3 裂略高,下唇 2 裂,裂片卵状三角形,顶端渐尖,具缘毛。花冠淡红色至紫红色,长约 3.8 cm,冠筒管状,中部以上逐渐扩大,脉上具长柔毛,余被稀疏短柔毛;檐部二唇形,上唇直立,2 浅裂,下唇增大,前伸,中裂片舌状,具有紫红色斑块,顶端 2 浅裂,侧裂片较小,长圆形,长为中裂片长的 1/3,上唇及下唇内侧均无毛;雄蕊 4,不伸出花冠,1 对着生于上唇近喉部,略短,另 1 对着生于侧裂片下部花冠管中部,略长;花丝微扁,无毛;花药 2 室,无毛,淡紫红色,成熟后贯通成 1 室;子房 4 裂,被毛;花柱细长,仅柱头伸出花冠;柱头 2 裂,淡紫红色;花盘杯状,裂片不明显,前方呈指状膨大。小坚果长椭圆形,黑色,具纵肋,长约 3 mm。花期 3~6 月,果期 6~7 月。

产于浙江桐庐县、泰顺县、龙泉市和福建将乐县、光泽县,生于海拔 500~1 400 m 较阴湿的竹林和阔叶林下。2009-05-15,李根有、张芬耀等,桐庐,500 m;2009-07-23,李根有、马丹丹等 L0968,凤阳山,1 400 m;李根有、陈征海等,泰顺乌岩岭,1 000 m(ZJFC);夏国华、李根有等 20110617,松阳箬寮,680 m。

致谢 感谢福建新日鲜集团有限公司陈新艳同志提供高野山龙头草在福建的分布资料。

参考文献:

- 吴征镒,李锡文. 1977. 中国植物志[M]. 北京:科技技术出版社,65(2):334-344
- Chen T(陈涛). 1990. A new variety of *Meehania*(Labiatae) from Anhui(安徽唇形科 *Meehania* 属一新变种)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),12(3):254
- Funamoto T, Tanabe T, Nakamura T. 2000. A karyomorphological comparison of two species of Japanese *Meehania*, Lamiaceae (Labiatae)[J]. *Society Chromosome Res*, 4:107-109
- Li XW, Hedge IC. 1994. *Meehania* Britton[M]//Wu, ZY, Raven Peter H(eds). *Flora of China*(17). Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden; 122-124
- Murata G, Yamazaki T. 1993. *Meehania* Britton[M]//Iwatsuki K, Yamazaki T, Boufford DE(eds). *Tokyo Kodansha; Flora of Japan* IIIa; 289-290
- Wu Cheng-yih, Li Hsi-wen, et al. 1977. *Labiatae*[M]. *Fl Reipubl Popularis Sin*, 65(2):334-344
- (上接第 587 页 Continue from page 587)
- 物技术),17(1):41-44
- Qian W, Ge S, Hong DY. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1(2):440-449
- Raina S, Rani V, Kojima T, et al. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in Peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species[J]. *Genome*, 44:763-772
- Wang LQ(王利群), Dai XZ(戴雄泽), Li XF(李雪峰), et al. 2009. Genetic diversity of velvetleaf germplasm by RAPD and ISSR markers(利用 RAPD 和 ISSR 标记分析青麻种质遗传多样性)[J]. *J Plant Genetic Res*(植物遗传资源学报), 10(1): 126-131
- Zhang JC(张建成), Wang CT(王传堂), Jiao K(焦坤), et al. 2005. Study on the seed test using sequence-related amplification polymorphisms (SRAP) in cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) (SRAP 标记技术在花生种子纯度鉴定中的应用)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 21(12):35-39
- Zhang M(张梅), Liu W(刘炜), Bi YP(毕玉平), et al. 2009. Isolation and identification of PNDREB1: a new DREB transcription factor from peanut (*Arachis hypogaea*) (花生中 DREB 类转录因子 PNDREB1 的克隆及鉴定)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), 35(11):1 973-1 980
- Zhou YQ(周延清), Jing JZ(景建洲), Li ZY(李振勇), et al. 2004. Assessment of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* germplasm detected by RAPDs and ISSRs(利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性)[J]. *Hereditas*(遗传), 26(6):922-928