

文章编号: 1001-411X(2000)04-0004-03

RAPD 标记在日本兵库县 20 个酒米品种类群划分中的应用

李余良¹, 吉田晋弥²

(1 广东省农科院作物研究所, 广东 广州 510640; 2 日本国兵库县立中央农业技术中心)

摘要:应用 RAPD 分子标记对日本兵库县 20 个酒米品种类群进行了研究. 筛选出对不同基因型酒米品种 DNA 扩增具有较好多态性的引物 11 个, 它们分别是 A₀₂、A₀₆、B₁₈、C₁₅、D₀₃、D₀₈、G₀₆、M₁₁、Q₁₆、S₁₃和 T₀₆, 根据这些随机引物对不同品种总 DNA 具有特异性的扩增谱带, 建立不同品种的 RAPD 多态性标准模式图, 可以快速鉴别品种和进行纯度分析; 依据扩增谱带建立 0、1 型数据, 计算 20 个酒米品种间的遗传距离, 以此进行聚类, 结果表明, 20 个酒米品种可被划分为 4 大类群, 划分结果与品种系谱较为一致, 证明 RAPD 分子标记技术对酒米品种类群划分是可行的.

关键词: RAPD 分子标记; 酒米; 类群划分

中图分类号: S513.02

文献标识码: A

兵库县在日本以生产优良酒米久负盛名, 自 1995 年以来全县酒米种植面积和产量就占日本国三成以上. 酒米品种山田锦以其特有的心白被视为优良品种经久不衰, 兵库梦锦、兵库北锦也是生产上利用的优良品种. 但近年来生产上栽培的品种繁多, 在田间容易发生机械、人为混杂, 为了探明各品种间的亲缘关系, 有必要对兵库县生产上利用的品种进行鉴定. 常规技术从形态特征、同工酶差异上进行鉴定, 可供选择的标记性状少, 且受环境影响较大, 鉴定的可靠性较低. 近年发展起来的 RAPD 分子标记技术, 以其操作简便, 所需 DNA 试样少、快捷、经济、多态性丰富而在育种上得到广泛应用. 大坪研一等^[1]利用 RAPD 技术对日本国内精米品种进行了判别. 本研究运用 RAPD 标记在分子水平上对该县 20 个酒米品种进行鉴定, 以期对酒米选育种、生产和酿酒工业提供品种识别依据.

1 材料和方法

1.1 材料

本研究采用的材料是兵库县生产上栽培利用的 20 个酒米品种, 分别是兵系 54 号、福光、越光、绢光、云床衣、日本晴、味丸、山彦、中生新千本、金南风、日野光、五百万石、高根锦、兵库北锦、兵库梦锦、山田锦、初杵、山福糯、白妙糯和播州糯, 于 1998 年 4 月种植于兵库县立中央农业技术中心试验站.

1.2 DNA 的提取

出穗前, 剪取各酒米品种叶片 5.0 g 作为提取

DNA 的材料, 按岛本功、佐佐木卓治^[2]的 DNA 提取方法进行.

1.3 PCR 扩增

上述精制的 DNA 10 倍稀释液在美国 Perkin Elmer PCR 仪上扩增, 随机引物为美国 Operon 公司生产的长度为 10 个核苷酸序列, 编号从 A₀₁~T₂₀计 220 个引物; Taq 酶为日本宝酒造公司产品. PCR 反应体系(20 μL)组成: Tris·Cl(pH 8.0)10 mmol/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, 4×dNTPs 分别为 0.2 mmol/L, 引物 1 mol/L, 1 个单位的 Taq 酶, 模板 DNA 20 ng. PCR 扩增程序为: 95℃预变性 2 min; 95℃热变性 1 min; 40℃复性 1 min; 72℃延伸 1.5 min, 45 个循环, 然后 72℃延长 10 min, 4℃保存.

1.4 电泳

上述 PCR 扩增产物用 w 为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 电压为 100 V, 电泳 2 h, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察照相.

1.5 计算方法

根据电泳结果确认多态性谱带的有无, 进行比较, 将上述 RAPD 分析谱带分别用 0、1 记录, 建立 11 个引物 20 个酒米品种 RAPD 分析谱带数据, 按 Nei 等^[3]的方法计算 20 个品种的相似度(I), 根据遗传距离(D)和相似度(I)的相互关系, 即 $D = 1 - I$, 按 Sokal 等^[3]的平均距离法(UPGMA), 应用 EXCEL97 逐步降维进行聚类. Nei 等的相似度法: $I = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 式中 N_{xy} 为 2 个品种共同的多态性谱带数; N_x 及 N_y 为 2 个品种各自的多态性谱带总数.

收稿日期: 1999-10-19

作者简介: 李余良(1969-), 男, 助理研究员, 硕士.

基金项目: 日本兵库县农业尖端技术项目

1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

2 结果与分析

2.1 引物扩增结果

本研究从 220 个引物中筛选出对供试品种 DNA 扩增具有较好多态性的引物 11 个, 它们是 A₀₂、A₀₈、B₁₈、C₁₅、D₀₃、D₀₈、G₀₅、M₁₁、Q₁₆、S₁₃ 和 T₀₆, 占所用引物的 5%, 从图 1 可以看出 B₁₈ 扩增可得到 4 条谱带, G₀₅ 扩增得到 2 条谱带, 各品种的 DNA 多态性谱带清晰, 并且稳定性好. 用这一系列随机引物对各供试品种 DNA 扩增建立相应品种的 RAPD 标准图谱, 对照该图谱, 就可以快速鉴别品种.

根据品种多态性谱带的有无, 进行比较, 分别以 0、1 记录, 得到 11 个引物 20 个酒米品种的 RAPD 分析谱带数据. 山田锦、兵库北锦、兵库梦锦等享有很高声誉的品种具有区别于其他品种的自身特异性 RAPD 多态性谱带, 分别有 10、5、8 个不同条带, 据此能够帮助我们在分子水平上准确识别这些优良品种. 4 和 5 及 9 和 10 两组品种的多态性谱带数量和位置相同, 说明使用现有的引物不能区分开来, 需筛选能产生特异性 RAPD 多态性谱带的引物供进一步分析, 除此之外, 参试的其他品种间的 RAPD 多态性谱带数量和位置互不相同.

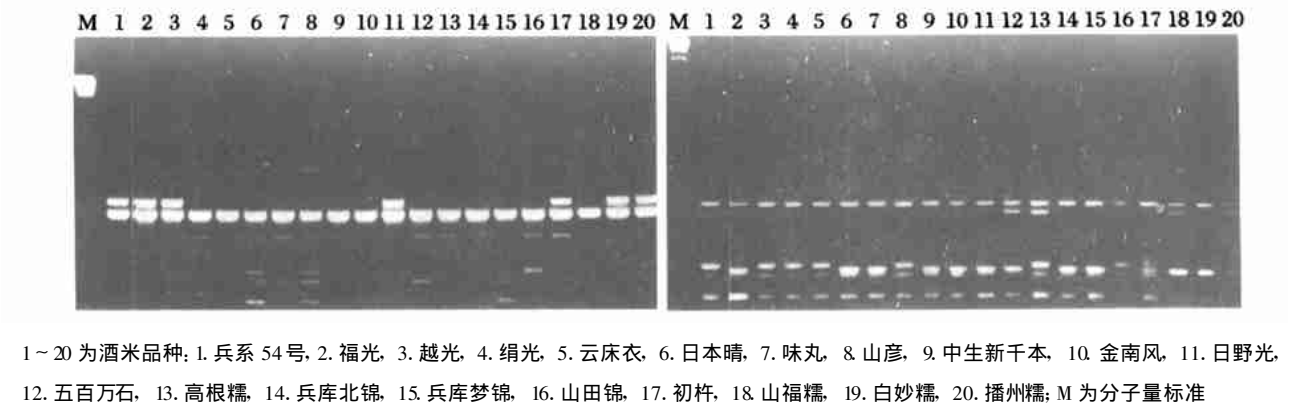


图 1 随机引物 B₁₈和 G₀₅的 RAPD 扩增谱带
Fig. 1 The RAPD patterns were obtained from 20 nices respectively amplified with primers B₁₈ and G₀₅

2.2 聚类分析

根据 1.5 的计算方法得到 20 个品种间的遗传距离, 其遗传距离在 0~0.733 之间, 可见供试品种间的亲缘程度差异很大, 有必要按类群进行亲缘关系分析.

根据遗传距离与相似度之间的相互关系, 进行聚类分析, 将 20 个酒米品种划分为 4 个大的类群, 从图 2 看出, I 类中包含中生新千本、金南风、味丸、白妙糯、播州糯、初杵等, 这些品种亲缘关系较近; II 类中包含具有很高评价的优良酒米品种山田锦, 以及兵库梦锦、兵库北锦和有名的粳稻品种日本晴, 此外还有山彦, 说明优良品种山田锦、兵库梦锦、兵库北锦亲缘程度较相似. III类中福光、越光、绢光、云床衣、日野光、山福糯及兵系 54 号等分在一起; IV类只有五百万石和高根锦 2 个品种. 进一步计算了 4 个类群间的 RAPD 标记遗传距离, 表 1 显示 I 类和 II 类亲缘关系最近, 遗传距离为 0.213; 其次是 III类同 I 类和 II 类, 其遗传距离为 0.234; IV类与上述 3 类亲缘关系最远, 其遗传距离为 0.254.

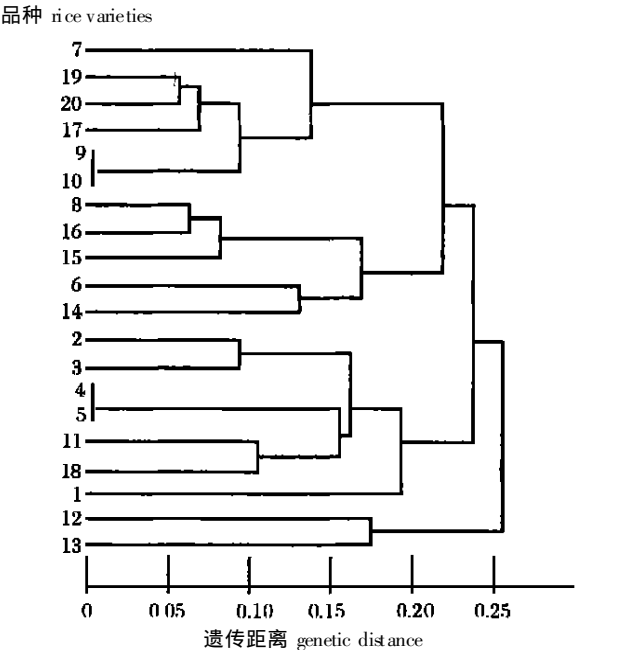


图 2 20 个酒米品种的 RAPD 分析聚类图
Fig. 2 RAPD marker clusters analysis of 20 nices

表 1 4 类酒米品种间 RAPD 标记遗传距离
Tab. 1 Genetic distance driven from RAPD maker
among 4 rice groups

类别 group	I	II	III
II	0. 213		
III	0. 234	0. 234	
IV	0. 254	0. 254	0. 254

3 结论与讨论

3.1 RAPD 标记技术在酒米品种类群划分上的可行性

RAPD 标记技术是利用一系列随机引物对整个基因组 DNA 进行多态性分析,检测区域几乎可以覆盖整个基因组,它不仅能检测单拷贝序列,而且能检测基因组中的重复序列.引物选择得当,完全能够检测不同品种间的微小差异.本研究应用 RAPD 标记技术成功地将日本兵库县 20 个酒米品种划分为 4 个大的类群,划分结果与已知的品种系谱较为一致,证明 RAPD 分子标记技术对酒米品种类群的划分是可行的.

3.2 RAPD 标记技术在酒米品种和纯度鉴定上也是可行的

许多研究者证明^[1,4,5],RAPD 分子标记技术以其操作简便、快速、多态性丰富、成本相对较低、所需 DNA 试样少、受环境影响小等特点在作物品种和纯度鉴定上得以广泛应用.本研究中只需要 20 ng

DNA,根据若干随机引物对不同品种总 DNA 具有特异性的扩增谱带,建立不同品种的 RAPD 多态性标准模式图谱,以此图谱作对照,就可以快速鉴别品种和进行纯度分析,对酒米选育种、生产和酿酒工业提供品种识别依据.其中享有很高评价的优良酒米品种山田锦、兵库梦锦以及兵库北锦等具有区别于其他品种的自身特异性 RAPD 谱带,从而为这些优良品种的鉴定提供了准确、可靠的分子鉴别手段.

3.3 随机引物筛选的重要性

本研究从 220 个随机引物中筛选出对不同基因型酒米品种 DNA 扩增具有较好多态性的引物 11 个,产生的谱带清晰,重复性好.但 I 类中的中生新千本和金南风,III类中的绢光和云床衣这两组品种应用现有的引物扩增不能区分,有必要筛选出对这类品种 DNA 具有特异性扩增谱带的引物供进一步分析.

参考文献:

[1] 大坪研一,藤井刚. RAPD 技术对国内精米品种的判别[J]. 日本食品科学工学会志, 1997, 44(5): 386—390
[2] 岛本功,佐佐木卓治. 新版植物的 PCR 实验手册[M]. 东京: 秀润社, 1997. 6 34—37, 67—68, 159—163
[3] 根井正利. 分子进化遗传学[M]. 东京: 培风馆, 1995. 92—93, 251—256
[4] DAVID J M. Classifying Japonica rice cultivars with RAPD makers[J]. Crop Science, 1995 35: 889—894
[5] SHUICHI F. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions [J]. Jpn J Genet, 1992, 67: 243—252

The Application of RAPD Technology to Heredity Grouping
of 20 Rice Varieties of Hyogo of Japan

LI Yu-liang¹, Yoshida Sinya²

(1 Crops Institute of Guangdong Provincial Agricultural Science Academy, Guangzhou 510640, China;
2 Biotechnology Institute of Hyogo Prefecture Agricultural Technology Center, Japan)

Abstract: Heredity groups were classified by cluster analysis with RAPD technology based on 20 rice varieties of hyogo prefecture of Japan. 11 primers, A02, A08, B18, C15, D03, D08, G05, M11, Q16, S13 and T06, selected from 220 candidate primers act as polymorphic DNA (RAPD) makers for 20 rice. The maps of RAPD standard polymorphic DNA in different varieties can be established by their specific characteristic bands. Thus, the cultivars and their purity could be identified and analysed quickly. In addition, Genetic distance among 20 rice varieties was calculated and clustered with RAPD makers. The results showed that 20 rice varieties could be classified into four groups. The four groups classified by cluster analysis with RAPD technology is consistent with the expected grouping based on available pedigree. The current study indicated that it was practical to group rice with RAPD technology.

Key words: RAPD maker; rice varieties; group and cluster classified

【责任编辑 周志红】