

# RAPD 标记在大豆品种鉴定中的应用初探

赵洪锬 李启云 王玉民 庄炳昌

(吉林省农业生物技术重点开放实验室, 公主岭 136100)

**提 要** 以十六烷基溴化铵(CTAB)选择性沉淀 DNA 的方法, 提取大豆种子、新鲜叶片或冷冻干燥叶片的总 DNA, 所得 DNA 纯度好, 降解少, 分子量大, 完全可以用于 RAPD 分析。本文就 RAPD 标记手段在大豆品种鉴定中的应用作一简报, 仅 OPA-04 就能将供试的 17 份大豆品种区分开, 表明 RAPD 用于种子纯度鉴定及品种鉴定是可行的。

**关键词** RAPD; 大豆; 品种鉴定

大豆是世界上主要粮食作物之一, 但由于大豆多为高度自交结实, 遗传背景狭窄, 难以农艺性状和同工酶分析等手段做完全的品种鉴定分析, 特别是对于生产上的大豆品种之间尤为困难。本文以 17 份吉林省大豆骨干亲本及主推品种做了 RAPD 分析, 结果说明 RAPD 标记用于大豆品种鉴定是可行的。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

试验材料由吉林省农科院大豆所、吉林省各地区农科院及辽宁省、黑龙江省等兄弟院所提供(见表 1)。

表 1 供试材料编号及品种

编号	品 种	编号	品 种
1	通农 11	10	辽豆 3
2	绥农 10	11	辽豆 9
3	绥农 14	12	辽豆 10
4	绥农 15	13	辽豆 11
5	合丰 23	14	铁丰 18
6	合丰 25	15	铁丰 23
7	合丰 35	16	铁荚 4 粒黄
8	黑农 40	17	鲁豆 4
9	东农 42		

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 DNA 提取

按照 Rogers 和 Bendich (1988)<sup>[1]</sup> 报道的 CTAB (Cetyltriethylammonium bromide) 方法, 并参考忻骅等 (1997)<sup>[2]</sup> 的方法, 稍作改进, 提取大豆半粒种子的总 DNA。

#### 1.2.2 RAPD 反应

反应体系总体积为 25  $\mu$ L, 其中模板 DNA 100 ng, 200  $\mu$ mol/L dNTP, 引物 200 nmol/L (O-pron 公司生产), 2.5  $\mu$ L (10 $\times$ buffer, 100 mmol/

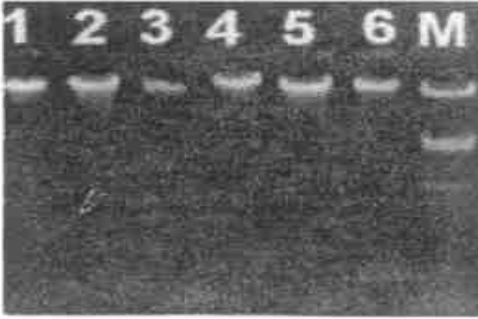
L Tris-HCl pH=8.3, 500 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 0.1% Np-40), 1 单位 Taq DNA 聚合酶, 加 2 滴石蜡油防止蒸发。反应循环参数为 94 $^{\circ}$ C 4 min, 一个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 37 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 5 个循环; 然后 94 $^{\circ}$ C 0.5min, 37 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C, 延伸 10 min。反应在 PE 480 PCR 循环仪上进行。

#### 1.2.3 电泳检测

反应产物加 2  $\mu$ L 上样缓冲液,用 1.5%的琼脂糖凝胶(内含 0.5  $\mu$ g/mL 溴化乙锭)电泳分离,用 BIO-RAD 公司的 GelDoc 1 000 紫外凝胶成像分析系统照相并记录。

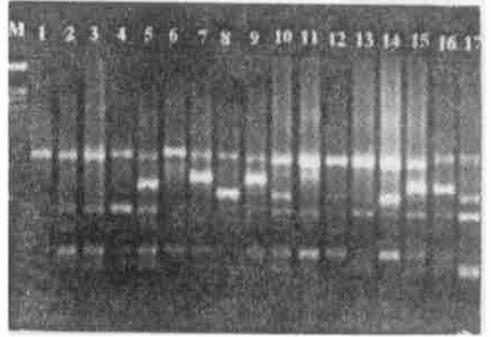
## 2 结 果

提取 DNA 质量好,很少被降解,基本上为大分子 DNA(20~30 kb)(图 1),完全可以用于 RAPD 分析,并可用于进一步的酶切、克隆等实验。



M 为 Marker(Lamder DNA/Ecor I+Hind III),  
1,2,3,4,5,6 分别代表绥农 14、东农 42、辽  
豆 3、辽豆 9、辽豆 11、铁丰 18

图 1 CTAB 法提取 DNA 结果



材料编号同表 1

图 2 OPA-04 RAPD 扩增结果

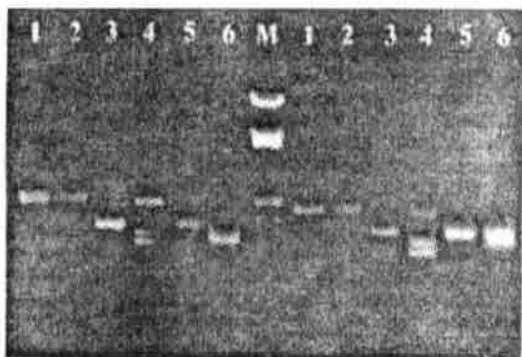
通过对 40 个引物(OPA01-20, OPB01-20)进行重复筛选,在 17 个材料上获得了基因 DNA 指纹图谱,而且表现出丰富的多态性,其中 OPA-04 表现出良好的多态性(图 2)。以每个可分辨的 PCR 扩增产物谱带分别代表 1 个性状,以 1 和 0 记录谱带的有和无进行统计,可将供试的 17 份大豆品种区分开(表 2)。

表 2 RAPD 扩增产物统计结果

实验编号	品 种	谱 带 编 号										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	通农 11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
2	绥农 10	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
3	绥农 14	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
4	绥农 15	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
5	合丰 23	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
6	合丰 25	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
7	合丰 35	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
8	黑农 40	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	东农 42	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
10	辽豆 3	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
11	辽豆 9	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
12	辽豆 10	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
13	辽豆 11	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
14	铁丰 18	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
15	铁丰 23	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
16	铁荚 4 粒黄	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
17	鲁豆 4	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1

为了验证 RAPD 标记的实际可操作性,又选择 6 份相同材料,运用两种型号(PE480,

UNO II)的PCR扩增仪进行对照试验,RAPD扩增产物的主要谱带完全一致(图3),表明该方法及反应系统比较稳定可靠,可以作为大豆品种鉴定手段在生产中应用。



注:Marker 右方为PE480扩增结果,左边为UNO II扩增结果。1,2,3,4,5,6分别代表吉林29、吉林30、吉林31、吉林35、吉林36、吉林38

图3 相同材料不同型号PCR仪RAPD扩增结果

### 3 讨论

过去,在生产实践中主要以农艺性状作为标记性状进行杂种后代、品种以及品种纯度的鉴定,但是可以用做标记的农艺性状较少。七八十年代,同工酶等生化技术手段被应用于作物品种鉴定中,使作物品种鉴定又向前迈进了一步。由于检测的同工酶种类有限,因此该技术的应用也具有一定的局限性。随着分子生物学的发展,Williams等<sup>[3]</sup>(1990)发展了随机扩增多态性DNA技术(RAPD),仅仅几年的时间就被广泛应用于品种鉴定、分类、进化、基因定位等研究领域。LF

Quiros等(1991)利用RAPD标记成功区别了12个Broccoli和14个向日葵品种,Mc Donald,MB等(1994)<sup>[4]</sup>利用几种材料种子DNA并进行RAPD扩增,表明RAPD可以用于品种鉴定,并可解决与品种专利有关的问题。

在我们的研究中,通过对DNA提取技术的改进,并对影响RAPD反应的各种因素进行了反复试验,形成了一套比较理想的反应程序,获得了较理想的实验结果,为大豆品种及杂种后代的鉴定等研究提供了一种新的技术。在此基础之上,我们将构建一套完整的吉林省大豆骨干亲本及主推品种DNA指纹图谱,为吉林省大豆骨干亲本及主推品种的纯度、品种鉴定提供分子水平上的证据。

### 参 考 文 献

- 1 Rogers O S, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual, 1998, A6: 1~10
- 2 忻 骅等. 抽提大豆各组织总DNA方法的比较研究. 生物化学杂志, 1997, 13(6): 719~721
- 3 Williams J G K, Kubelik A R et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are used as genetic markers. Nucleic Acid Research, 1990, 18(22): 6531
- 4 Mc Donald M B et al. DNA extraction of from dry seeds for RAPD analysis in variety identification studies. Seed Science and Technology, 1994, 22: 171~176

## Use of RAPD for Identification of Soybean Cultivars

ZHAO Hongkun LI Qiyun WANG Yumin ZHUANG Bingchang

(Jilin Provincial Agrobio-technology Key Open Lab., Gongzhuling 136100)

**Abstract** Random amplified polymorphic DNA(RAPD) was investigated as a means for identification of soybean cultivars. Extraction of total DNA by CTAB from soybean half-seed and fresh leaves is pure, with little degradation and large M. W. All of the seventeen soybean materials could be distinguished with only OPA-04, indicating that RAPD can be used for identification of seed purity and varieties.

**Key words** RAPD, Soybean, Identification of varieties

(责任编辑:任 禾)