

## 中国啤酒大麦品种 RAPD 标记的遗传多样性分析

张大乐, 石永春, 李锁平\*

(河南大学生命科学学院, 开封 475001)

**摘要:** 采用 RAPD 技术对中国 38 个啤酒大麦品种的遗传资源进行了聚类分析。结果表明: 从筛选出的 28 个有多态性的随机引物中, 共扩增出 153 条谱带, 其中 91 条谱带具有多态性, 占 59.4%。每个引物可扩增出 1~8 条多态性谱带, 平均 3.3 条。聚类分析表明, 在遗传距离 GD 值 0.27 水平上 38 个啤酒大麦品种可聚成两大类, 下分 5 个亚类。品种间遗传距离 GD 变幅为 0.009 52~0.378 46。RAPD 标记揭示出这 38 个啤酒大麦品种遗传变异较小, 遗传基础比较狭窄。

**关键词:** 啤酒大麦; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q75; S512.3<sup>+1</sup>

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)04-0305-05

## Genetic Variation Analysis by RAPD of Beer Barley in China

ZHANG Da-Le, SHI Yong-Chun, LI Suo-Ping\*

(College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475001, China)

**Abstract:** The genetic relationships among 38 genotypes of beer barley from China were investigated by RAPD. The results showed that 28 arbitrary primers produced 153 distinctive bands in total and 91 of them were found to be polymorphic, which accounted for 59.4%. Each primer could amplify 1 to 8 polymorphic bands with an average of 3.3 bands. Cluster analysis showed that 38 beer barley could be classified into 2 groups at the level of GD 0.27, which were respectively classified into 5 subgroups again. The GD varied from 0.009 52 to 0.378 46. Most beer barley had showed certain regular distribution in every subgroup. The results indicated that the genetic basis of them was rather narrow.

**Key words:** Beer barley; RAPD; Genetic diversity; Cluster analysis

大麦是世界上仅次于小麦、水稻和玉米的主要谷类作物, 主要用作啤酒酿造原料、牲畜饲料和人类的粮食, 在全世界广为种植。近年来, 随着我国啤酒工业的迅猛发展, 我国已成为啤酒大麦的主要进口国<sup>[1]</sup>。通过现代育种技术和常规育种技术相结合的途径, 选育出品质达到或超过进口啤麦的啤酒大麦新品种已是当务之急。然而, 目前我国推广的多数大麦品种的遗传基础比较单一, 造成育成品种在抗生物、环境胁迫或品质上没有新的突破<sup>[2]</sup>。因而, 广泛征集和引进国内外啤酒大麦品种资源并对其遗传背

景作出评价是培育优质、丰产、多抗、广适性啤酒大麦新品种的基础。

随着 RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等 DNA 分子标记技术的发展, 从分子水平上深入研究大麦种质资源的遗传背景及进化途径已有些报道<sup>[3-5]</sup>。但针对我国啤酒大麦品种利用分子标记分析其遗传多样性尚未见报道。本研究对来自江苏、浙江、湖北、福建、河南等省以及西北地区已审定并推广的啤酒大麦品种, 利用 RAPD 技术分析其遗传背景的差异, 以期合理利用其中的优异种质资源进行亲本选配

收稿日期: 2005-02-02, 修回日期: 2005-05-08。

基金项目: 河南省杰出青年科学基金项目(02120000900)资助。

作者简介: 张大乐(1979-), 男, 在读硕士, 研究方向为植物遗传学。李锁平(1962-), 男, 教授, 从事植物分子细胞遗传学研究。

\* 通讯作者(E-mail: lisp369@163.com)。

培育新品种提供分子水平上的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试啤酒大麦材料 38 份,均为栽培二棱大麦 (*Hordeum distichon* Linn.) 品种,由河南省驻马店农科所翟德昌研究员和中国农业科学院作物品种资源研究所张京研究员提供(表 1)。

表 1 供试材料的编号、名称

Table 1 The number and names of the beer barley

编号 No.	品种名称 Name of variety	编号 No.	品种名称 Name of variety	编号 No.	品种名称 Name of variety
A1	早熟 3 号	A14	浙 86-166	A27	浙皮 1 号
A2	矮早 3 号	A15	甘啤 3 号	A28	浙皮 2 号
A3	甸-84	A16	单 95168	A29	莆大麦 4 号
A4	单 2	A17	豫大麦 1 号	A30	莆大麦 5 号
A5	Suyin12	A18	豫大麦 2 号	A31	莆大麦 8 号
A6	沪 14	A19	舟麦 2 号	A32	鄂啤 1 号
A7	沪 16	A20	花 30	A33	鄂啤 2 号
A8	沪 10	A21	苏农 22	A34	鄂品 B-34
A9	盐引 1 号	A22	苏农 0030	A35	福引 1 号
A10	哈林顿	A23	苏农 7630	A36	扬引 3 号
A11	苏 B9607	A24	单 6	A37	莆 808047
A12	苏 B001	A25	浙农大 2 号	A38	秀麦 3 号
A13	浙 88-23	A26	浙农大 3 号		

### 1.2 方法

**大麦总 DNA 的提取** 每份材料播种 5~10 粒种子,培养黄化苗随机选择新鲜嫩叶片混合均匀,称取 10 g,参照文献[6]中的 CTAB 方法提取 DNA。

**RAPD 及其产物检测** 根据有关报道<sup>[7-9]</sup>,共选择了 33 个随机引物(购自上海生工公司)(表 2),每个引物重复试验 2 次,PCR 反应体积为 25  $\mu$ L/管,反应体系中含有 20 ng 左右的模板 DNA,每种 dNTPs 150  $\mu$ mol/L,2.0 mmol/L  $MgCl_2$ ,1 $\times$ Buffer [10 mmol/L Tris-HCl(pH=8.8,25 $^{\circ}$ C),50 mmol/L KCl,0.08% Nonidet P40],1.25U Taq 酶(以上 PCR 试剂均购自大连宝生物有限公司),0.5  $\mu$ mol/L 随机引物。PCR 反应在 PTC-100 型热梯度循环仪(购自美国 MJ Research 公司)上进行。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后进行反应循环:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,37 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共循环 40 次;最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 12.5  $\mu$ L 扩增产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上以 5 V/cm 的电压电泳,紫外透视仪上拍照。

**数据处理** 只记录重复的带,将任一扩增带看作一个性状,按带的有无建立 1,0 型二元数据矩阵。参照 Nei 和 Li 的方法计算供试材料间的遗传相似

系数和遗传距离<sup>[10]</sup>。遗传相似系数  $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ ,其中  $N_{ij}$  是指材料  $i$  和  $j$  共有的片段数目, $N_i + N_j$  指在两个材料中出现的片段数目之和。遗传距离  $GD = 1 - GS$ 。按照 UPGMA (unweight pair group method using arithmetic averages) 不加权重对群算术平均数方法进行系统聚类分析。用 DPS v3.11 专业版分析软件聚类并作图<sup>[11]</sup>。

表 2 产生多态性带的随机引物

Table 2 The primers which produced polymorphic bands

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'-3')	多态性谱带数 Number of polymorphic bands	总谱带数 Total bands
S5	TGCGCCCTTC	2	5
S7	GGTGACGCAG	2	5
S11	GTAGACCCGT	4	7
S16	TTTGCCCGGA	5	7
S24	AATCGGGCTG	5	8
S28	GTGACGTAGG	2	4
S31	CAATCGCCGT	8	11
S33	CAGCACCCAC	2	5
S37	GACCGCTTGT	2	3
S39	CAAACGTCGG	1	3
S62	GTGAGGCGTC	2	4
S69	CTCACCGTCC	3	4
S72	TGTCATCCCC	3	7
S75	GACGGATCAG	4	5
S86	GTGCTAACC	4	6
S147	AGATGCAGCC	5	8
S156	GGTGACTGTG	1	2
S216	GGTGAACGCT	3	5
S241	ACGGACGTCA	3	5
S249	CCACATCGGT	3	5
S257	ACCTGGGGAG	4	5
S282	CATCGCCGCA	4	9
S284	GGCTGCAATG	3	4
S486	GAGCGCCTTG	3	6
S1036	AAGCACGAG	2	4
S1056	TCTGGACCGA	2	3
S1423	CACTGGCCCA	5	7
S1429	AGAGCGTACC	4	6
Total		91	153

## 2 结果和分析

### 2.1 RAPD 产物的多态性

RAPD 分析结果表明,这 33 个随机引物均能产生扩增带,其中 28 个随机引物的扩增带具有多态性并且稳定,它们的大小为 300~2000 bp(图 1)。28 个引物产生稳定的多态性扩增产物(表 2)。从表 2 可以看出,28 个随机引物共产生 153 条谱带,其中 91 条有多态性,占 59.4%,每个引物可扩增出 1~8 条多态性谱带,平均每个引物产生 3.3 条。产生多态性的随机引物其所有扩增产物都用于分析,并将每条扩增带看作一个性状,这相当于比较了 38 份供试

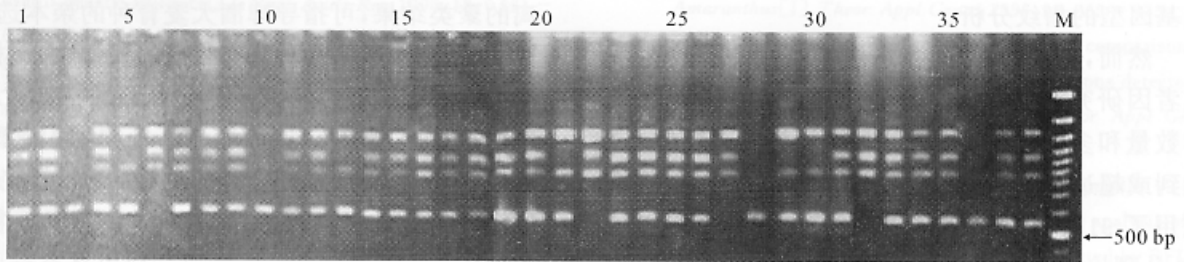


图1 引物 S284 对 38 个啤酒大麦品种的扩增结果

Fig. 1 Profile produced in 38 beer barley by the primer S284 (M:Marker GeneRuler™ 100 bp DNA)

啤酒大麦的 153 个性状,其中 91 个性状是多态的。

## 2.2 聚类分析

根据 RAPD 分析所得的 1,0 型数据进行聚类并作图。由图 2 可看出,在遗传距离 GD 值 0.27 水平上,供试的 38 份啤酒大麦品种聚成了两大类,又下分出 5 个亚类。

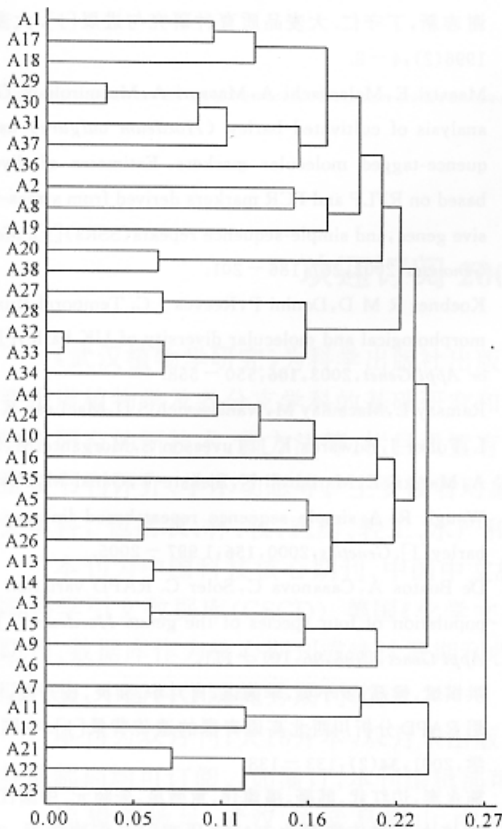


图2 38 个啤酒大麦的聚类图

Fig. 2 Dendrogram generated by cluster analysis for 38 beer barley varieties

第 I 亚类由苏农 22、苏农 0030 和苏农 7630 组成。第 II 亚类由沪麦 16、苏 B9607 和苏 B001 组成。第 I、II 亚类合在一起组成了第 I 大类。第 III 亚类包括甸-84、甘啤 2 号、盐引 1 号和沪麦 14。第 IV 亚类包含了 2 个小类:浙 88-23、浙 86-166、Suyin12、浙农大 2 号和浙农大 3 号组成一个小类;单 2、单 95168、哈

林顿和福引 1 号组成另一个小类。其余的为第 V 亚类,下分 3 个小类:早熟 3 号、矮早 3 号、豫大麦 1 号、豫大麦 2 号、莆大麦 4 号、莆大麦 5 号、莆大麦 8 号、莆 808047 和扬引 3 号、沪麦 10 号、沪麦 14 号组成一个小类;鄂啤 1 号、鄂啤 2 号、鄂品 B-34 和浙皮 1 号、浙皮 2 号组成另一个小类;花 30 和秀麦 3 号组成一个小类。第 III、IV、V 亚类合在一起组成了第 II 大类。

根据 Nei-Li 系数计算出的供试材料遗传距离可以看出,供试的啤酒大麦材料的遗传距离分布范围在 0.00952~0.37864 之间,其中鄂啤 1 号和鄂啤 2 号的遗传距离最小,为 0.00952,鄂品 B-34 和苏 B001 的遗传距离最大,为 0.37864,这符合鄂品 B-34 是半冬性二棱皮大麦,而苏 B001 是春性二棱皮大麦的事实。综上所述,RAPD 能较好揭示品种间的亲缘关系。

## 3 讨论

### 3.1 RAPD 标记在啤酒大麦研究中的应用

自从 Williams 等提出 RAPD 技术<sup>[12]</sup>以来,随着 RAPD 技术的深入应用,已被认为是研究系统进化、分类学等问题的有效工具<sup>[13,14]</sup>。施永泰等用 30 个多态性随机引物在 67 个栽培大麦品种中扩增出 130 个多态性位点,占 58.3%,平均每个引物产生 4.19 个多态位点<sup>[8]</sup>。Fernandez 等用 10 个 RAPD 引物对 16 份栽培大麦进行分析,共扩增出 79 条多态性谱带,占 63.0%,平均每个引物产生 7.9 条谱带<sup>[15]</sup>。本研究中用 28 个多态性随机引物在 38 个啤酒大麦品种中扩增出 91 条多态性谱带,占 59.4%,平均每个引物产生 3.3 条谱带。Chan 等<sup>[16]</sup>和 Rusel 等<sup>[17]</sup>通过与同工酶、RFLP 等其他标记技术比较,均认为 RAPD 适合用来研究谱系关系。并且本研究用这些引物区分开了亲缘关系极其密切的、已推广的啤酒大麦品种。我们认为 RAPD 标记可较好地揭示啤酒大麦品种间的遗传差异,可用于啤酒大

麦基因型的指纹分析。

然而,有关 RAPD 多态性位点数的有效性,研究者因研究对象及其数量的差异,选用了不同的引物数量和多态性位点数<sup>[18,19]</sup>,均认为多态性位点数达到或超过 70 个时,可得到较为可靠的结果。本研究用了 91 个多态性位点来分析 38 个啤酒大麦品种,从理论上说多态性位点数越多,所得到得结果越可靠。因此,本实验结果较为真实地反映了所用供试啤酒大麦材料的遗传关系。

### 3.2 啤酒大麦品种的遗传多样性以及在育种中的利用

我国推广的啤酒大麦品种,尤其是二棱啤酒大麦,绝大多数是通过品种间杂交成的,虽然育成品种具有较好的综合农艺性状,但由于长期的定向遗传改良,大多数品种间具有极高的遗传相似性,其遗传背景比较狭窄。从本实验供试材料的聚类图可以看出,第Ⅰ亚类中的沪麦 16、苏 B9607 和苏 B001,都是以苏引麦 2 号为亲本,经多代选育而成。第Ⅱ亚类中的甘啤 2 号是以匈-84-62 为父本、S-3 为母本杂交,经多代选育而来的,因而首先和匈-84 聚在了一起。第Ⅳ亚类中的浙 88-23 是由 81-85×浙农大 4 号经多代选育而成。尤其是第Ⅴ亚类中对早熟 3 号的利用更为普遍,豫大麦 1 号、莆大麦 4 号、矮早 3 号等都是直接以早熟 3 号为亲本选育而来的。虽然单 2、单 95168、花 30 都是利用细胞工程育种技术,通过花药培养诱导产生加倍单倍体植株,经多代选择育成的,但是这些育成品种所用的花药仍然来自自己推广的啤酒大麦品种,因而与已推广大麦品种的亲缘关系仍然相近。如春性二棱皮大麦花 30 是以 82146 为母本和秀麦 1 号为父本杂交,通过 F<sub>2</sub> 代花药培养诱导产生加倍植株经多代选择育成的。因而花 30 与秀麦 3 号首先聚在了一起。另外,从本实验供试材料的遗传距离可看出,最远的遗传距离为 0.37846,最近的仅为 0.00952,表明其亲缘关系较为密切,也证实了上面的观点。这与施永泰等用 RAPD 分析我国江、浙地区栽培大麦所得的育成品种有极高的遗传相似性的结论是一致的<sup>[8]</sup>。因此,应用特异性或不同类型的优良品种作为亲本,拓宽啤酒大麦的遗传基础已是当务之急。

我国大麦品种资源十分丰富,在杂交育种中,亲本选配应选用遗传差异较大的品种。然而,目前我国已推广的啤酒大麦品种的亲缘关系较为密切,因而在杂交育种中应选用亲缘关系远的材料以丰富其遗传背景。本研究所揭示的我国啤酒大麦品种遗传距

离的聚类结果,可指导啤酒大麦育种的亲本选配。研究表明,相关家系品种具有很高的相似性,不相关的家系品种则具有广泛差异<sup>[20]</sup>。由于我国啤酒大麦品种的遗传距离较小,因而应广泛征集和引进国内外种质资源,以当地丰产性好的家系品种为中心亲本,以引入的外来材料为辅,精心挑选一些具有特异适应性的地方品种,同时重视开发利用具有特用价值的野生资源,适当搭配,应用细胞工程、分子标记辅助选择和早代微量快速鉴定筛选等高效遗传改良技术,并将其与常规育种技术有机结合,以选育出更多更好的啤酒大麦新品种,促进我国啤酒工业的快速发展。

### 参考文献:

- [1] 杨建明,沈秋泉,汪军妹,朱靖环.我国大麦生产、需求与育种对策[J].大麦科学,2003(1):1-6.
- [2] 谢志新,丁守仁.大麦品质育种研究与进展[J].大麦科学,1996(2):4-8.
- [3] Maestri E, Malcevski A, Massari A, Marmioli N. Genomic analysis of cultivated barley (*Hordeum vulgare*) using sequence-tagged molecular markers. Estimates of divergence based on RFLP and PCR markers derived from stress-responsive genes, and simple-sequence repeats (SSRs)[J]. *Mol Genet Genomics*, 2002, **267**:186-201.
- [4] Koebner R M D, Donini P, Reeves J C. Temporal flux in the morphological and molecular diversity of UK barley[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, **106**:550-558.
- [5] Ramsay L, Macaulay M, Ivanisovich S D, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards K J, Tuveesson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmioli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W, Waugh R. A simple sequence repeat-based linkage map of barley[J]. *Genetics*, 2000, **156**:1997-2005.
- [6] De Bustos A, Casanova C, Soler C. RAPD variation in wild population of four species of the genus *Hordeum*[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **96**:101-111.
- [7] 洪祺斌,侯磊,罗小英,李德谋,肖月华,裴炎,杨开俊,甲错.应用 RAPD 分析川西北高原青稞的遗传背景[J].中国农业科学,2001, **34**(2):133-138.
- [8] 施永泰,边红武,韩凝,潘建伟,童微星,朱睦元.中国江浙地区栽培大麦遗传资源的 RAPD 研究[J].作物学报,2004, **30**(3):258-265.
- [9] 陈新平,闫玲,丁毅.中国近缘野生大麦的 RAPD 分析与进化途径探讨[J].植物学报,2000, **42**(2):179-183.
- [10] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**:5269-5273.
- [11] 唐启义,冯明光.实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002.
- [12] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are

- useful genetic markers[J]. *Nucl Acids Res*, 1990, **18**: 6 531 - 6 535.
- [13] Souframanien J, Gopalakrishna T. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **109**: 1 687 - 1 693.
- [14] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulate* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, **102**: 440 - 449.
- [15] Fernandez M E, Figueiras A M, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, **104**: 845 - 851.
- [16] Chan K F, Sun M. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus* [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 865 - 873.
- [17] Russel J R, Fuller J D, Macaulay M. Direct comparisons of level of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 714 - 722.
- [18] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplik V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 1 248 - 1 255.
- [19] 周泽扬, 夏庆友, 鲁成, 冯丽春, 向仲怀. 分子系统学研究中分子位点数与遗传差异信息可靠性的关系[J]. *遗传*, 1998, **20** (5): 12 - 15.
- [20] Manninen O, Nissila E, Jaccard P. Genetic diversity among Finnish six-rowed cultivars based on pedigree information and DNA markers [J]. *Hereditas Landskrona*, 1997, **126**(1): 87 - 93.

## 欢迎订阅 2006 年《武汉植物学研究》

《武汉植物学研究》为科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊(学报级)。主要报道植物学及各分支学科的基础研究和应用研究方面具创新性、有重要意义的最新研究成果,植物学研究的新技术、新方法等。栏目设置有:研究论文、技术与方法、综合评述、研究简报、学术讨论、重要书刊评介、学术动态等。主要读者对象为:从事植物学研究的科技人员、大专院校师生,以及相关学科,包括农、林、牧、医药、轻工、水产和环保等方面的工作者。

本刊为中国科技核心期刊、中国中文核心期刊,被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国科学引文数据库(CSCD)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等十多种国内外检索期刊、数据库作为核心期刊或统计源期刊收录。本刊曾荣获湖北省优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖、中国科学院优秀期刊奖。

本刊为双月刊,大16开本,双月末出版。国内定价15.00元,全年90.00元。邮发代号38-103,全国各地邮局均可订阅。如漏订,本刊编辑部可办理邮购。

编辑部地址:武汉市武昌磨山中科院武汉植物园内(或武汉市74006信箱);邮政编码:430074;电话:027-87510755;E-mail:editor@rose.whiob.ac.cn