

11 个猕猴桃品种间的遗传多样性分析

邹游¹ 丁建² 申瑛³ 赵建¹ 杨志荣¹ 吴成^{1*}

(¹四川大学生命科学学院 成都 610064; ²四川省自然资源研究所猕猴桃研究开发中心 成都 610015)

(³四川申能科技有限责任公司 成都 610036)

摘要 利用随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)技术对采自四川省猕猴桃科研基地的 11 个猕猴桃品种进行了遗传多样性分析. 通过引物筛选, 从 15 个 RAPD 引物中扩增出 135 条带, 其中 100 条为多态带, 占 74.07%. UPGMA 聚类分析结果揭示了各品种间的亲缘关系. RAPD 标记说明猕猴桃品种间遗传距离与地理分布有一定关系, 地理位置较近的材料能聚在一起. 分子标记可用于猕猴桃种质资源的分类、鉴定及良种选育. 图 2 表 2 参 15

关键词 猕猴桃; RAPD; 遗传多样性

CLC Q949.758.203

Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA in 11 *Actinidia* Varieties

ZOU You¹, DING Jian², SHEN Ying³, ZHAO Jian¹, YANG Zhirong¹ & WU Cheng^{1*}

(¹College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(²Centre of Kiwifruit Research and Development, Sichuan Natural Resources Research Institution, Chengdu 610015, China)

(³Sichuan Shen Neng Technology Co. Ltd., Chengdu 610036, China)

Abstract Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was applied to detect genetic diversity of the samples of 11 *Actinidia* varieties collected from the Centre of Kiwifruit Research and Development, Sichuan Natural Resources Research Institution. 15 RAPD primers produced 135 bands, of which 100 bands were polymorphic. The polymorphic bands accounted for 74.07% of the total bands. UPGMA (Un-weighted Pair Group Mathematics Average) clustering analysis displayed the genetic relation among the varieties. The RAPD markers indicated that the genetic distance of *Actinidia* varieties was related with their distribution, and some of them distributing closely could get together. Molecular markers could be used for classifying and identifying the germplasms of *Actinidia*, as well as for breeding of fine varieties. Fig 2, Tab 2, Ref 15

Keywords *Actinidia*; RAPD; genetic diversity

CLC Q949.758.203

猕猴桃为多年藤本植物,种类繁多,全世界共有 66 个种,约 118 个种下分类单位(变种、变型),其栽培品种也比较多,主要是中华猕猴桃和美味猕猴桃^[1]. 我国是猕猴桃的原产地,有着丰富的猕猴桃遗传资源. 由于雌雄异株,且染色体小、数目多,在倍性水平上呈多倍化,这在很大程度上影响了对猕猴桃遗传学研究的深入^[2~4]. 目前,对猕猴桃基因组的信息了解甚少,许多重要经济性状的遗传方式仍不清楚. 猕猴桃资源的遗传背景复杂,亲缘关系不清,传统分类方法不能提供种类和品种间的遗传信息^[5,6]. 因此,利用有效的分子标记技术对其遗传特异性及系统进化关系进行深入研究十分必要.

RAPD (random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 标记是 Williams J 和 Welsh J 在 1990 年研究出来的一种新型遗传标记法,因具有诸多优点如不需预先知道目的 DNA 序列,随机引物易得,标记数量多,方法简便迅速,这一技术已在植物的性别鉴定、染色体的起源分析、品种资源鉴定、细胞器遗传规律以及遗传多样性等研究中得到广泛的应用^[7]. RAPD 标记在猕猴桃中运用较少,作者采用该分子标记方法旨在建立适合于猕猴桃的 RAPD-PCR 反应体系,对有较多争议

的中华猕猴桃品种亲缘关系进行鉴别分析.

1 材料与方法

1.1 材料

猕猴桃红阳♀、红阳♂、红阳-1、红阳-2、79-1、79-3、武植三号、武植五号、武植六号、川猕一号、川猕二号等 11 个品种的幼叶叶片均采自四川省猕猴桃基地. 用干燥剂将叶片干燥后置于 -20℃ 冰箱备用.

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 用 SDS 法提取猕猴桃基因组 DNA. 具体操作如下: 取 0.5 g 嫩叶,加液氮迅速研磨成粉末,转入 1.5 mL 离心管中(每个样品做 3 管重复),加入 600 μL 65℃ 预热的 DNA 提取液[SDS 提取液: 100 × 1 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 20 × mmol/L EDTA (pH 8.0), 100 × mmol/L NaCl, 2% SDS, 3% 可溶性 PVP, 0.1% 偏重亚硫酸钠],充分混匀. 65℃ 水浴 60 min,加入 150 μL 的 5 mol/L KAc,小心混匀,冰浴 15 min 左右,8 000 r/min 离心 15 min. 将上清转入到另一洁净的离心管中,加入 600 μL 氯仿/异戊醇(24 : 1)洗涤,8 000 r/min 离心 15 min. 将上清转入到另一洁净的离心管中,加入 2/3 体积异丙醇,上下颠倒几次至白色絮状物产生,冰浴 10

收稿日期: 2006-06-22 接受日期: 2006-11-10

* 通讯作者 Corresponding Author (E-mail: sckw@163.com)

min, 10 000 r/min 离心 4 min. 弃上清, 加入 70 % 乙醇洗 2 ~ 3 次, 再用无水乙醇洗 1 次. 待 DNA 完全干燥后加入 100 μ L TE, 4 $^{\circ}$ C 条件下溶解, 充分溶解后加入 1 μ L RNA 酶 A (AMRESCO 分装) (10×10^{-3} g/mL), 37 $^{\circ}$ C 条件下放置 30 min. DNA 浓度用分光光度计检测, 稀释为 100×10^{-9} g/ μ L, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存^[8~10].

1.2.2 RAPD 反应体系的优化 PCR 反应在 PCT-200 PCR 仪器上进行. 设计反应体系为: 总反应体积 25 μ L, 其中模板 DNA 稀释 1、5、10、20、50 倍, 引物浓度为 1.5 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶浓度为 1、1.5、2、5 U, dNTP 浓度 0.1、0.25、0.5、0.75 mmol/L, MgCl₂ 浓度为 1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L, Buffer 浓度为 25 mmol/L. 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 30 ~ 50 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min. 40 个循环后, 在 72 $^{\circ}$ C 保持 8 min. 在此基础上对相关参数进行优化筛选^[11].

1.2.3 RAPD 产物观察 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 电压为 4 V/cm, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE. 然后用浓度 0.5×10^{-6} g/mL 溴化乙锭染色 30 min. 在紫外灯下观察电泳结果、照相.

1.2.4 引物的筛选 分别用“红阳 η ”、“红阳 δ ”、“川猕一号”、“川猕二号”为模板. 用优化后的反应体系对赛百盛公司的 5 套引物共 100 个进行筛选. 经过 3 次重复, 选用扩增重复性好, 带清晰且较多的引物.

1.2.5 RAPD 数据分析 图谱中的每一条带 (DNA 片段) 均为一个分子标记, 并代表 1 个引物结合点. 根据各分子标记的有无及其迁移率统计得到所有位点的二元数据, 无带 (隐性) 计为 0, 有带 (显性) 计为 1 (强带和弱带的赋值均为 1). 对

于多态位点, 仅在重复实验中能稳定出现的差异带用于数据分析.

不同品种间的随机扩增多态 DNA 片断相似性计算根据 Nei 等^[12] 的公式:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

其中 F 为共享度, N_{xy} 为种 x 和种 y 所共有的片断数, N_x 和 N_y 分别为种 x 和种 y 所拥有的片断数. 任意两种间的遗传距离 (P) 根据两种的共享 RAPD 片断相似性来计算, 即 $P = 1 - F$. 根据遗传距离, 用 UPGMA 法对各个种之间的亲缘关系进行聚类分析.

2 结果与分析

2.1 RAPD 反应体系的确定

经重复实验, 最终确定 PCR 反应体系为: 总反应体积 25 μ L, 其中模板 DNA 浓度为 1.5 ng/ μ L, 引物浓度为 1.5 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶浓度为 1.5 U, dNTP 浓度 0.25 mmol/L, MgCl₂ 浓度为 2.0 mmol/L, Buffer 浓度为 25 mmol/L. 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 38 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min. 42 个循环后, 在 72 $^{\circ}$ C 保持 10 min.

2.2 随机引物的筛选及 DNA 扩增结果

利用 4 份材料进行预备试验, 从 100 个 RAPD 引物中选取 15 个条带清晰、反应稳定性好的引物进行 RAPD 正式试验. 实验结果显示, 15 个随机引物对 11 个猕猴桃品种共扩增出 137 条带, 其中 104 条为多态带, 多态性为 74.29%, 每个引物扩增出 6 ~ 18 条带, 平均杂合度为 0.2921 (表 1). 从图 1 可以看出引物 J13 扩增的 DNA 条带.

表 1 各引物组合扩增位点和多态性位点数、多态性位点比例及杂合度
Table 1 Number of amplified loci and polymorphic loci, percentage of polymorphic loci, and heterozygosity of 15 primers

引物 Primers	序列 Sequence (5' ~ 3')	扩增位点数 Number of amplified loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性位点比例 (%) Percentage of polymorphic loci	杂合度 Heterozygosity
A1	CAGGCCCTTC	8	6	75.00	0.3191
A7	GAAACGGGTG	9	6	75.00	0.3191
A17	GACCGCTTGT	18	11	65.38	0.1826
C4	CCGCATCTAC	7	6	85.71	0.3699
C6	GAACGGACTC	8	5	62.50	0.2973
D15	CATCCGTGCT	16	12	80.00	0.2920
J13	CCACACTACC	11	9	81.82	0.3637
J14	CACCCGATG	8	5	62.50	0.2896
J18	TGGTCGCAGA	7	3	42.86	0.1905
J20	AAGCGGCCTC	10	9	90.00	0.3939
S3	CAGAGGTCCC	6	3	50.00	0.1719
S4	CACCCCCTTG	8	6	75.00	0.2898
S5	TTTGGGGCCT	6	6	100.00	0.3642
S15	CAGTTCACGG	6	6	100.00	0.4473
S19	GAGTCAGCAG	7	7	100.00	0.4765
扩增位点总数 Total		135	100		
平均数 Average		9	6	74.29	0.2921

2.3 各品种间的遗传距离

根据 15 条单个引物在 11 个猕猴桃品种出现的 RAPD 扩增条带, 计算出不同个体间的扩增片段遗传距离 (P) (表 2). 从表 2 可以看出, 各猕猴桃品种间的遗传距离在 0.205 4 ~ 0.597 8 之间. 武植六号与 79-3 之间遗传距离最小 (0.205 4),

其次红阳-1 与红阳-2 (0.227 3), 武植三号与川猕二号之间遗传距离最大 (0.597 8).

2.4 各品种的亲缘关系聚类分析

根据品种间的遗传距离, 用 UPGMA 法对 11 个猕猴桃品种间的亲缘关系进行聚类分析获得聚类图 (图 2). 从图 2 可以

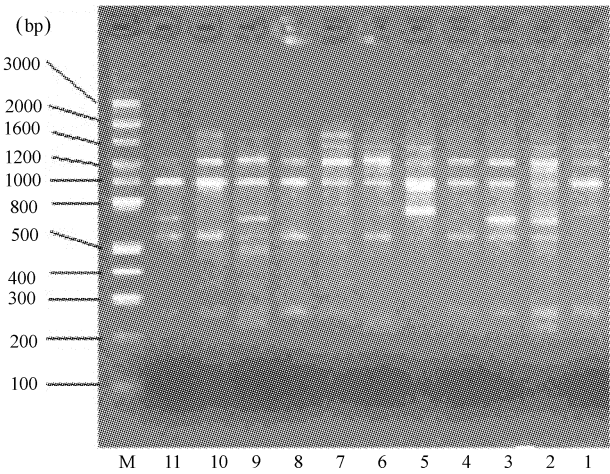


图1 引物 J13 扩增的 DNA 条带

Fig.1 Amplified DNA bands of primer J13

1: 红阳♀; 2: 红阳♂; 3: 红阳-1; 4: 红阳-2; 5: 79-1; 6: 79-3; 7: 武植三号; 8: 武植五号; 9: 武植六号; 10: 川猕一号; 11: 川猕二号. M: 分子量标记. 下同
1, Hong Yang ♀; 2, Hong Yang ♂; 3, Hong Yang-1; 4, Hong Yang-2; 5, 79-1; 6, 79-3; 7, Wu Zhi 3; 8, Wu Zhi 5; 9, Wu Zhi 6; 10, Chuan Mi 1; 11, Chuan Mi 2. M, Marker. The same below

表2 11个猕猴桃品种的 RAPD 片段遗传距离
Table 2 Genetic distance among 11 *Actinidia* varieties

品种 Variety	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.0000										
2	0.3978	0.0000									
3	0.2644	0.3743	0.0000								
4	0.2644	0.3743	0.2273	0.0000							
5	0.4191	0.4199	0.4873	0.4873	0.0000						
6	0.4590	0.3069	0.3773	0.3983	0.2973	0.0000					
7	0.4643	0.4618	0.4199	0.4199	0.4385	0.4169	0.0000				
8	0.3773	0.4308	0.5108	0.5108	0.2595	0.2782	0.4385	0.0000			
9	0.3167	0.3021	0.4418	0.4199	0.3365	0.2054	0.4169	0.2973	0.0000		
10	0.4530	0.5745	0.5978	0.5472	0.4669	0.4465	0.5978	0.4530	0.4878	0.0000	
11	0.5064	0.5365	0.4090	0.4530	0.4990	0.5623	0.4757	0.4530	0.5090	0.3199	0.0000

看出, 79-3 与武植六号首先聚在一起, 79-1 与武植五号、红阳-1 与红阳-2 也分别聚在一起. 所有猕猴桃品种可以聚为两大类, 川猕一号和川猕二号聚为一类, 而其它 9 个品种可以聚为一大类.

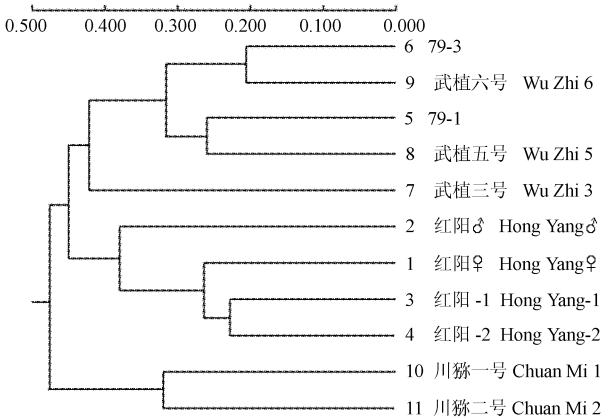


图2 根据遗传距离构建的 11 个猕猴桃品种的聚类图

Fig. 2 Phylogenetic relationship of 11 *Actinidia* varieties constructed according to genetic distance

3 讨论

RAPD 分析周期短, 可使研究者快速高效地获取研究材料 DNA 多态性位点资料; 但是它对反应体系及条件比较敏感^[13], 故在试验中保持实验条件的一致性以提高反应稳定性. 在预扩增中对影响 PCR 的各相关参数通过进行梯度对比, 对条件进行优化, 确定了最优反应条件和反应体系. 在本试验中, RAPD 分析稳定性较好, 试验均进行 2 次重复, 重复性好, 试验结果可靠.

在这 11 个猕猴桃品种中, 川猕一号、川猕二号为美味猕猴桃 (*A. deliciosa*), 其余 9 个品种均属中华猕猴桃 (*A. chinensis*). 79-1、79-3、武植三号、武植五号、武植六号为已培育为具有稳定遗传学特性的猕猴桃品种, 其亲本原产地均来自江西省, 在聚类图中, 他们亲缘关系较近. 猕猴桃属于雌雄异株, 异花授粉植物, 天然杂交可能性较大, 故其遗传距离大小与其地理分布远近呈正相关^[14]. 红阳-1、红阳-2 为红阳♀与红阳♂的子代, 故这两种品种遗传距离最小.

弄清物种的遗传多样性对资源开发和保护以及遗传育种都具有重要意义. 传统生物学分类是以幼苗、成年植株、花器、果实及种子等的植物学特征以及物候期、开花结果习性等生物

学特性为分类依据^[15], 但其形态学特征易受到环境因子的影响变得不易区分. 采用 RAPD 分子标记, 以 PCR 扩增条带的有无为原始依据进行聚类分析, 排除了传统形态分类学上形态特征不易区分的干扰, 从 DNA 水平上揭示猕猴桃遗传多样性, 探讨基因在各种群的动态分布. 该方法可结合生态因子筛选出适合分布区内不同区域生长的猕猴桃优良类型, 为猕猴桃的遗传育种提供理论依据, 为合理利用和保护猕猴桃资源奠定基础.

References

- 1 黄宏文. 猕猴桃研究进展 (II). 北京: 科学出版社, 2003
- 2 He ZC (何子灿), Zhong Y (钟扬), Liu HT (刘洪涛), Tang XH (唐先华), Ye L (叶力), Huang DS (黄德世), Xu LM (徐立铭). Quantitative taxonomic analyses of *Actinidia* (*Actinidiaceae*) in China based on micromorphological characters of foliar trichomes. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 2000, **38** (2): 102 ~ 105
- 3 Huang HW, Li JQ, Lang P, Wang S. Systematic relationships in *Actinidia* as revealed by cluster analysis of digitized morphological descriptors. *Acta Horticult*, 1999, **498**: 71 ~ 78
- 4 Messina R, Testolin R, Morgante M. Isozymes for cultivar identification in kiwifruit. *Hort Sci*, 1991, **26** (7): 899 ~ 902

- 5 熊治廷. 猕猴桃种间杂种三倍体形态学和减数分裂观察. 植物研究, 1990, **10** (1): 99 ~ 103
- 6 Huang HW, Fenny D, Wang HZ, Jiang ZW, Huang RH, Wang SM. Isozyme inheritance and variation in *Actinidia*. *Heredity*, 1997, **78**: 328 ~ 336
- 7 Mulcahy DL, Cresti M, Sansavini S, Douglas GC, Linskens HF, Mulcahy GB, Vingani R, Pancaldi M. The use of random amplified polymorphic DNA to fingerprint apple genotypes. *Sci Horticult*, 1993, **54** (2): 89 ~ 96
- 8 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002. 742 ~ 749
- 9 Luo ZY (罗志勇), Zhou G (周钢), Chen XH (陈湘晖), Lu QH (陆秋恒), Hu WX (胡维新). Isolation of high-quality genomic DNA from plants. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), 2001, **26** (2): 178 ~ 180
- 10 Chen GX (陈桂信), Pan DM (潘东明), Lü LX (吕柳新), Wang FH (王凤华), Lai ZX (赖钟雄). Advances in the techniques for extraction of nuclear DNA and isolation and cloning of target genes in fruit trees. *J Fujian Agri & For Univ Nat Sci Ed* (福建农林大学学报自然科学版), 2002, **31** (1): 44 ~ 50
- 11 Williams JCK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acides Res*, 1990, **18**: 6531 ~ 6535
- 12 Harada M, Yenbutra S, Yosida TH. Cytogenetical Study of *Rhinolophus Bats* (Chiroptera, Mammalia) from Thailand. *Proc Japan Acad*, 1985 (61): 455 ~ 458
- 13 Jie YC (揭雨成), Zhou QW (周青文), Chen PD (陈佩度). Genetic relation analysis of ramie culturars with RAPD mark. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2002, **28** (2): 254 ~ 259
- 14 Chen WQ (陈万秋), Li SG (李思光), Luo YP (罗玉萍). Application of molecular markers on *Actinidia*. *Jiangxi Sci* (江西科学), 2001, **19** (3): 162 ~ 165
- 15 李瑞高, 梁木源, 李洁维, 毛世忠. 猕猴桃属植物生物学特征特性观察. 广西植物, 1996, **16** (3): 265 ~ 272