

秦岭山区野生猕猴桃资源遗传多样性分析

魏艳霞^{1,3}, 王 飞¹, 吕俊辉², 姚春潮¹, 刘利花¹, 胡英建²

(1 西北农林科技大学 园艺学院 农业部西北园艺植物种质资源及遗传改良重点开放实验室/陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2 西安市猕猴桃研究所, 陕西 周至 710400; 3 平顶山市林业技术推广站, 河南 平顶山 467000)

【摘 要】 【目的】利用有效的分子标记技术,对秦岭山区野生猕猴桃的遗传多样性及系统进化关系进行研究,为猕猴桃新种质的挖掘和品种遗传改良奠定基础。【方法】利用随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)技术,对采自秦岭山区的野生猕猴桃 24 个优良单株和中华猕猴桃等 6 个种或变种及其品种的 22 份资源进行了遗传多样性和亲缘关系分析。【结果】通过引物筛选,用 16 个 RAPD 引物对 46 份猕猴桃资源扩增出 235 条带,其中 227 条为多态性条带,多态性位点比例为 96.29%;各猕猴桃资源间的遗传距离为 0.139 53~0.807 34;UPGMA 聚类分析结果显示,‘野生 99-13’与‘武植 2 号’、‘魁蜜’、‘金阳 1 号’、‘武植 6 号’、‘中华 8’和‘广西红肉’等中华系列猕猴桃(*A. chinensis* Planch.)聚在一起,其余 23 份野生猕猴桃与‘哑特’、‘秦美’、‘徐冠’、‘徐香’等猕猴桃品种遗传距离较近。【结论】24 份秦岭野生猕猴桃资源中,‘野生 99-13’属中华系列猕猴桃,其余 23 份均属于美味猕猴桃(*A. deliciosa* var. *deliciosa*)。

【关键词】 秦岭山区;野生猕猴桃;RAPD;遗传多样性

【中图分类号】 S663.402.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)07-0129-06

Genetic diversity analysis of wild kiwifruit from Qinling Mountain

WEI Yan-xia^{1,3}, WANG Fei¹, LV Jun-hui², YAO Chun-chao¹, LIU Li-hua¹, HU Ying-jian²

(1 Key Laboratory of Horticultural Plant Germplasm Resources and Genetic Improvement in Northwest China of Ministry of Agriculture /Key Laboratory for Molecular Biology of Agriculture of Shaanxi Province, College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Xi'an Institute of Kiwifruit, Zhouzhi, Shaanxi 710400, China; 3 Forestry Industry Technique Extending Station of Pingding shan City, Pingdingshan, Henan 467000, China)

Abstract: 【Objective】 The research studied genetic diversity and system evolution relations through the Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of wild kiwifruit germplasm resources from Qinling Mountain. These results provide a basis for the research of kiwifruit germplasm resources and the genetic improvement to varieties. 【Method】 RAPD technology was employed to analyze the genetic diversity of the samples, including 24 wild kiwifruits collected from Qinling Mountain and other 22 varieties. 【Result】 16 RAPD primers produced 235 bands, of which 227 bands were polymorphic. The polymorphic bands accounted for 96.29% of the total bands. The genetic distance of 46 kiwifruit gemplasms was from 0.139 53 to 0.807 34. UPGMA (Un-weighted pair group mathematics average) clustering analysis displayed genetic relation among the these materials as follows: the ‘Wild 99-13’ and ‘Wuzhi No. 2’, ‘Kui-mi’, ‘Jinyang No. 1’, et al, which belong to *A. chinensis*, had the colsest genetic relationship. The other 23 wild kiwifruits were classified into the *A. deliciosa* var. *deliciosa* because of nearer genetic distance with ‘Yate’, ‘Qinmei’, ‘Xuguan’ and ‘Xuxiang’. 【Conclusion】 In the 24 wild kiwifruits collected from Qinling

* [收稿日期] 2008-11-04

[基金项目] 陕西省农业攻关项目(2006K01-G28-01)

[作者简介] 魏艳霞(1982—),女,河南鲁山人,硕士,主要从事果树育种与生物技术研究。E-mail: weiyanyxia2005@163.com

[通信作者] 王 飞(1954—),女,河南孟津人,教授,博士生导师,主要从事果树及花卉生理与生物技术育种研究。

E-mail: xnwangfei521@126.com

Mountain, only ‘Wild 99-13’ belonged to *A. chinensis*, the other 23 wild kiwifruits were classified into the *A. deliciosa* var. *deliciosa*.

Key words: Qinling Mountain; wild kiwifruit; RAPD; genetic diversity

猕猴桃属于猕猴桃科(Actinidiaceae Hutch)猕猴桃属(*Actinidia* Lindl.),全世界共有 66 个种,约 118 个种以下分类单位(变种、变型),其栽培品种也比较多,主要有中华猕猴桃和美味猕猴桃^[1]。猕猴桃的自然分布非常广泛,从北纬 50°到赤道附近,纵跨北极和热带植物区^[2]。由于猕猴桃雌雄异株,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的深入研究^[3-5]。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。秦岭山区有着丰富的野生猕猴桃资源,其遗传背景复杂,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^[6-7]。因此,本研究旨在建立野生猕猴桃的 RAPD

分析体系,利用有效的分子标记技术对猕猴桃的遗传多样性及系统进化关系进行研究,以期对猕猴桃新种质的挖掘和品种遗传改良奠定基础,为制定有效的育种措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 供试猕猴桃资源取自西安市猕猴桃研究所种质资源圃和西北农林科技大学猕猴桃试验站种质资源圃(详见表 1),其中 1~24 号为野生猕猴桃资源。2006-04 和 2007-04,从生长旺盛的 46 份猕猴桃资源 1 年生新梢上取幼嫩的叶片,液氮速冻后于-70 ℃超低温冰箱中保存、备用。

表 1 供试猕猴桃种质资源

Table 1 Germplasm resources of kiwifruit used in this test

编号 Number	材 料 Material	编号 Number	材 料 Material
1	野生 99-1 Wild 99-1	24	野生 99-24 Wild 99-24
2	野生 99-2 Wild 99-2	25	米良 1 号 Miliang No. 1
3	野生 99-3 Wild 99-3	26	海沃德 Hayward
4	野生 99-4 Wild 99-4	27	秦美 Qinmei
5	野生 99-5 Wild 99-5	28	哑特 Yate
6	野生 99-6 Wild 99-6	29	西猕 52 号 Ximi No. 52
7	野生 99-7 Wild 99-7	30	红阳 Red Sun
8	野生 99-8 Wild 99-8	31	红阳 ♂ Red Sun ♂
9	野生 99-9 Wild 99-9	32	西选 2 号 Xixuan No. 2
10	野生 99-10 Wild 99-10	33	西选 2 号 ♂ Xixuan No. 2 ♂
11	野生 99-11 Wild 99-11	34	毛花猕猴桃 ♂ <i>A. eriantha</i> var. <i>eriantha</i> ♂
12	野生 99-12 Wild 99-12	35	葛枣猕猴桃 <i>A. polygama</i> (Sieb. et Zucc)Maxim
13	野生 99-13 Wild 99-13	36	中越猕猴桃 <i>A. indochinensis</i> Merr
14	野生 99-14 Wild 99-14	37	软枣猕猴桃 <i>A. arguta</i> (Sieb. et Zucc)Planch. et Miq
15	野生 99-15 Wild 99-15	38	徐冠 Xuguan
16	野生 99-16 Wild 99-16	39	海沃德芽变 Hayward sport
17	野生 99-17 Wild 99-17	40	魁蜜 Kuimi
18	野生 99-18 Wild 99-18	41	武植 2 号 Wuzhi No. 2
19	野生 99-19 Wild 99-19	42	武植 6 号 Wuzhi No. 6
20	野生 99-20 Wild 99-20	43	徐香 Xuxiang
21	野生 99-21 Wild 99-21	44	广西红肉 Guangxi red flash
22	野生 99-22 Wild 99-22	45	金阳 1 号 Jinyang No. 1
23	野生 99-23 Wild 99-23	46	中华 ♂ <i>Actinidia chinensis</i> ♂

1.1.2 试 剂 基础生化试剂购自西安沃尔森生物技术公司,Taq 酶等购自大连宝生物技术公司,随机引物购自上海生物工程公司。

1.2 方 法

1.2.1 猕猴桃基因组 DNA 的提取与检测 猕猴桃基因组 DNA 的提取方法在改良 CTAB 法^[8-10]的

基础上加以改进,具体改进有:①将 EDTA 的浓度从 50 mmol/L 提高到 80 mmol/L;②将样品加入 CTAB 提取液,65 ℃温浴处理后再加入等体积的氯仿-异戊醇充分混匀;③加入 RNA 酶 A 去除 RNA 后,重复 1 次氯仿-异戊醇抽提过程,然后再加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 5.2)和 2 倍总体积预

冷的无水乙醇,于-20℃下重新沉淀2h,挑出DNA,洗涤、干燥后溶于100μL TE中。

提取的猕猴桃DNA样品用含EB(0.5μg/mL)的15g/L琼脂糖凝胶进行电泳检测,并用UV-1700型紫外分光光度计检测。

1.2.2 猕猴桃 RAPD 反应体系的建立 从退火温度、PCR 循环次数、Mg²⁺ 浓度、DNA 聚合酶的种类和浓度、DNA 模板用量等方面优化猕猴桃 RAPD 反应体系。

PCR 反应在德国 Eppendorf 公司生产的 Mastercycler Gradient 型 PCR 仪上进行,退火温度梯度范围为(37±6)℃,仪器自动生成12个温度梯度。PCR 循环次数为34,36,38和40。

1.2.3 PCR 扩增产物的检测 用含EB(0.5μg/mL)的15g/L琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,DNA 分子量标记为广东东盛公司生产的DL2000,在凝胶成像系统(Gene Genius Bio Imaging System)上观察电泳结果并拍照保存。

1.2.4 引物的筛选 以野生猕猴桃‘野生99-3’、‘野生99-4’及‘葛枣猕猴桃’、‘软枣猕猴桃’4份资源的基因组DNA为模板,优化RAPD反应体系。用优化后的反应体系对100个引物进行筛选。经过2次重复,选用扩增重复性好、条带清晰且较多的引物进行RAPD扩增。

1.2.5 RAPD 数据分析 图谱中的每1条带

(DNA 片段)均为1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,将仅在重复试验中能稳定出现的差异带用于数据分析。数据分析采用DPS version 3.01处理系统。采用Jaccard 聚类距离中的类平均法(UPGMA)进行聚类^[11],自动生成各品种及变种的遗传聚类图和相异系数表。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃 RAPD 反应体系的确定

以野生猕猴桃‘野生99-3’、‘野生99-4’及‘葛枣猕猴桃’、‘软枣猕猴桃’的基因组DNA为模板,用S52、S269、S1126和S11634个随机引物,从退火温度、PCR 循环次数、Mg²⁺ 浓度、DNA 聚合酶的种类和浓度、DNA 模板用量等方面,对初步建立的猕猴桃 RAPD 反应体系进行优化,结果见图1。

经重复试验,最终确定PCR反应体系为:PCR 反应体积25μL,内含1×PCR 缓冲液,2.3mmol/L MgCl₂,0.16mmol/L dNTP,0.4μmol/L 引物,1.0U Taq DNA 聚合酶,50ng DNA,另外加盖矿物油25μL。RAPD 扩增程序为:94℃预变性5min;94℃变性30s,38℃退火30s,72℃延伸90s,共40个循环;72℃充分延伸10min,最后4℃保存。

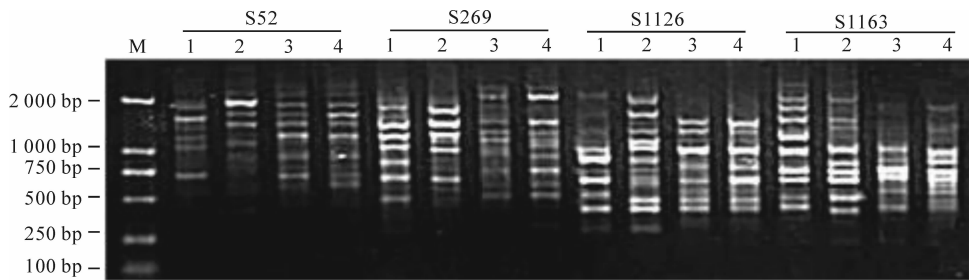


图 1 优化后的猕猴桃 RAPD 扩增图谱

M. DL2000; 1—4. 分别为‘野生99-3’、‘野生99-4’、‘葛枣猕猴桃’、‘软枣猕猴桃’

Fig. 1 Optimized RAPD graph of kiwifruit

M. DL2000; 1—4. ‘Wild 99-3’, ‘Wild 99-4’, ‘A. polygama’ and ‘A. arguta’

2.2 随机引物的筛选

利用‘野生99-1’、‘野生99-10’作为模板,从100个RAPD引物中筛选出30条适合野生猕猴桃RAPD分析的随机引物,对其进行RAPD扩增,从中选取16个条带清晰、反应稳定性好的RAPD引物进行分析,结果见表2。表2显示,16个随机引物对46份猕猴桃资源扩增出235条带,其中227条为

多态性条带,多态性位点比例为96.29%,每个引物扩增出9~17条带。

2.3 猕猴桃资源的 RAPD 扩增结果

由图2和图3可知,引物S1163对46份猕猴桃资源共扩增出14个多态性位点,且该引物对野生猕猴桃‘野生99-1’~‘野生99-24’扩增的DNA条带的多态性极丰富,适合于野生猕猴桃RAPD分析。

图 3 显示,S1163 对美味猕猴桃及中华猕猴桃种及其变种扩增的 DNA 条带的多态性也极为丰富。

表 2 各引物扩增位点数和多态性位点数及多态性位点比例

Table 2 Number of amplified loci and polymorphic loci as well as percentage of polymorphic loci			
引物 Primer	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
S1158	17	17	100.00
S1107	11	10	90.91
S1171	10	9	90.00
S1126	16	14	87.50
S1170	9	9	100.00
S1163	14	14	100.00
S269	15	15	100.00
S1216	16	16	100.00
S421	11	10	90.91
S1114	16	16	100.00
S1203	16	16	100.00
S1167	17	17	100.00
S1208	16	15	93.75
S76	16	15	93.75
S311	16	15	93.75
S1136	17	17	100.00
扩增位点总数 Total	235	227	
扩增位点平均数 Average	14.69	14.19	96.29

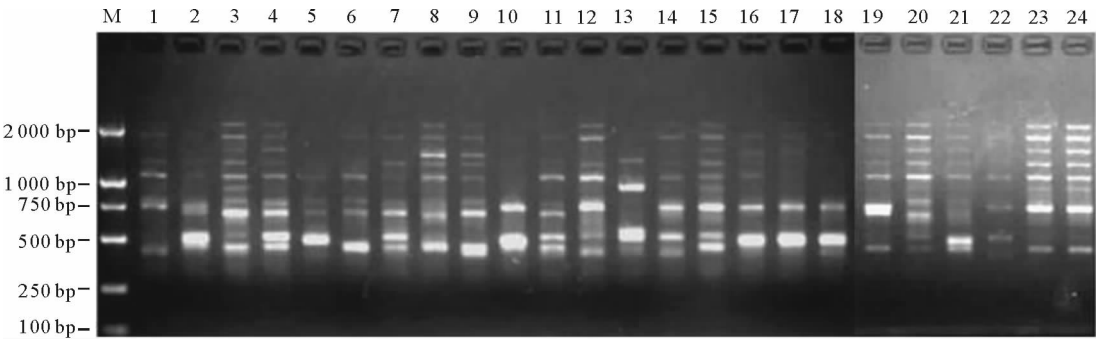


图 2 引物 S1163 对 24 份野生猕猴桃资源扩增的 DNA 条带

M. DL2000;泳道 1~24. 分别为野生猕猴桃‘野生 99-1’~‘野生 99-24’

Fig. 2 DNA bands amplified from 24 wild wikifruits by primer S1163

M. DL2000; Lane 1—24. Wild kiwifruit from ‘Wild 99-1’ to ‘Wild 99-24’

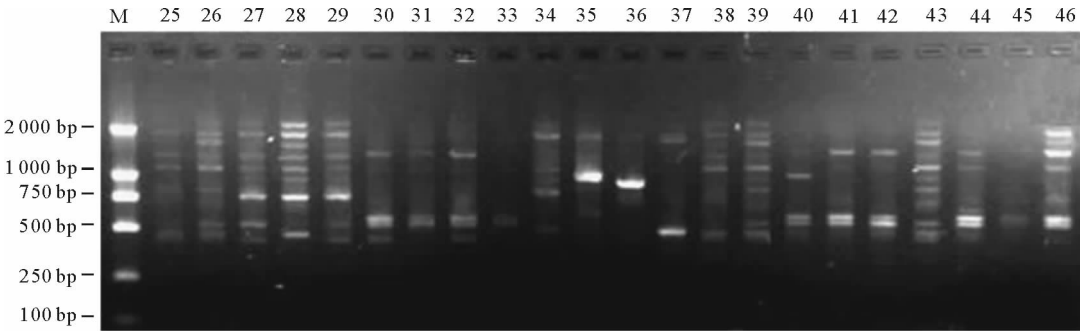


图 3 引物 S1163 对 16 份美味猕猴桃和 6 份中华猕猴桃资源扩增的 DNA 条带

M. DL2000;泳道 25~46. 分别为表 1 编号 25~46 中的猕猴桃种或变种及其品种

Fig. 3 DNA bands amplified from 16 *A. deliciosa* var. *deliciosa* and 6 *A. chinensis* Planch. by primer S1163

M. DL2000; Lanes 25—46. Species or variants and cutivars selected in table 1

2.4 猕猴桃资源间的遗传距离

利用 DPS 数据处理系统,根据 16 条引物分别在 46 份猕猴桃资源中出现的 RAPD 扩增条带,计算出不同个体间的扩增片段遗传距离(Jaccard 相异系数)。结果表明,各猕猴桃资源间的遗传距离为 0.139 53~0.807 34,其中‘野生 99-16’与‘野生 99-17’之间遗传距离最小(0.139 53),其次是‘秦美’与‘西猕 52 号’(0.262 14),‘野生 99-5’与‘软枣猕猴桃’之间遗传距离最大(0.807 34),由此说明这 46 份猕猴桃资源具有丰富的遗传多样性,为今后的遗传育种应用提供了依据。

2.5 猕猴桃资源的亲缘关系聚类分析

根据各个猕猴桃资源间的遗传距离,用 UPG-MA 法对秦岭山区 24 份野生猕猴桃资源及其他 22 份猕猴桃资源间的亲缘关系进行聚类分析,结果见

图 4。从图 4 可见,‘野生 99-16’与‘野生 99-17’首先聚在一起,‘野生 99-23’、‘野生 99-24’聚在一起。所有猕猴桃资源在遗传距离为 0.60 处分为 7 大类:‘红阳’、‘西选 2 号’、‘红阳 ♂’、‘西选 2 号 ♂’聚在一类,‘野生 99-13’与‘武植 2 号’、‘魁蜜’、‘金阳 1 号’、‘武植 6 号’、‘中华 ♂’和‘广西红肉’等中华猕猴桃聚在一类,‘中越猕猴桃’、‘毛花猕猴桃’、‘葛枣猕猴桃’、‘软枣猕猴桃’各为一类,其余 31 份资源聚为一类。‘野生 99-23’、‘野生 99-24’、‘哑特’、‘海沃德’、‘秦美’、‘西猕 52 号’、‘米良 1 号’聚在一起,说明他们的亲缘关系很近。秦岭山区 23 份野生猕猴桃与秦美、海沃德等美味猕猴桃聚为一大类,说明除‘野生 99-13’外的这 23 份野生猕猴桃属于美味猕猴桃。‘野生 99-13’与‘魁蜜’、‘金阳’等中华猕猴桃聚为一大类,说明其属于中华猕猴桃系列。

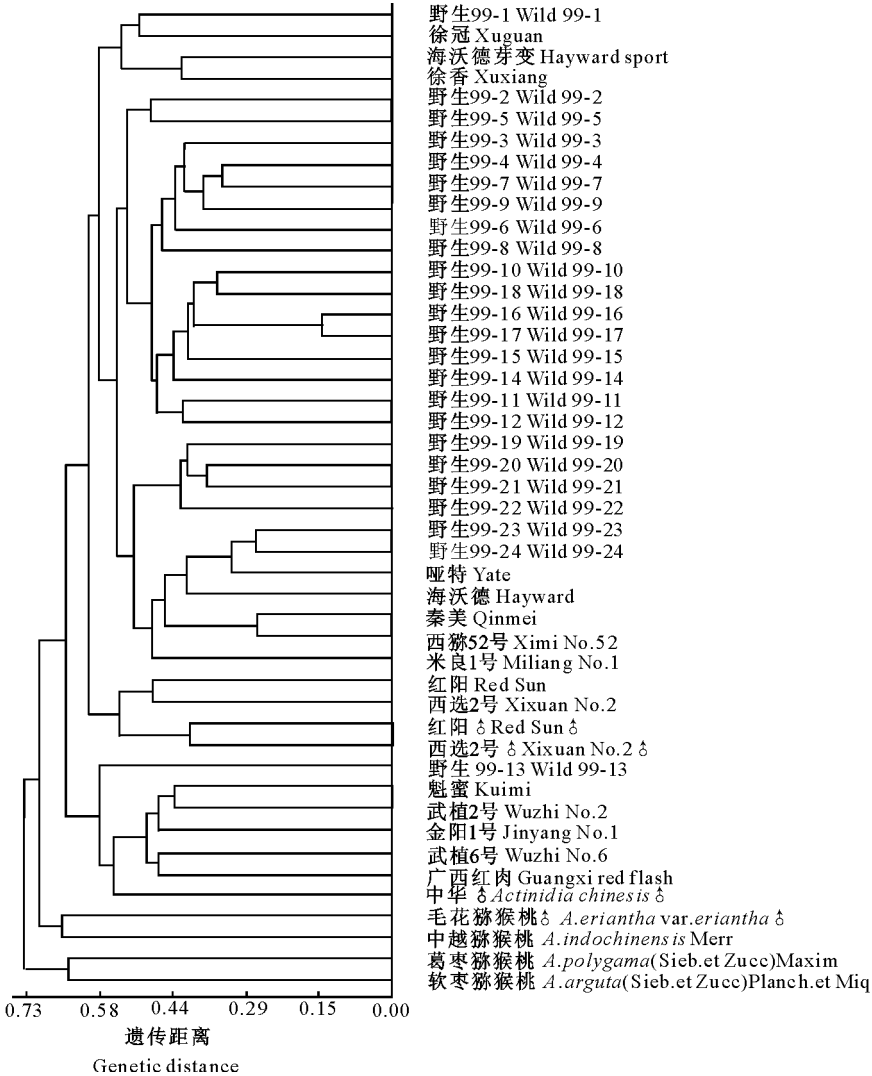


图 4 根据遗传距离构建的秦岭野生猕猴桃聚类图

Fig. 4 Phylogenetic relationship of wild kiwifruits in Qinling Mountain constructed according to genetic distance

3 讨 论

3.1 猕猴桃 RAPD 反应体系的建立与优化

RAPD 分析具有快速简便的特点,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^[12],故本研究为了尽量保持试验条件的一致性,在反应液上加盖 25 μL 矿物油以提高反应的稳定性。本试验在 RAPD 反应体系的建立和优化中选取 4 份猕猴桃资源,其中秦岭山区野生猕猴桃资源 2 份;在优化体系时选用了 4 条随机引物,以使体系更有代表性和说服力。

3.2 秦岭野生猕猴桃亲缘关系的分析

中华猕猴桃和美味猕猴桃是主要的栽培种,其形态学特征很相似,常认为美味猕猴桃是中华猕猴桃的变种。新西兰学者应用 DNA 分析指纹技术进行猕猴桃种间亲缘关系分析,认为中华猕猴桃和美味猕猴桃亲缘关系很近^[13]。随后,Kokudo 等^[14]、栗琪等^[15]分别用 RAPD 技术和 SSR 技术证实了这一点。Cipriani 等^[16]用 80 条随机引物对中华猕猴桃、狗枣猕猴桃和 13 个美味猕猴桃栽培品种进行检测,筛选品种特异性和基因特异性标记,每条引物得到的条带数为 4~11 条,所有品种均能被鉴别。

本研究中,在 46 份猕猴桃资源中,除‘野生 99-13’外的其余 23 份秦岭野生猕猴桃资源聚为一大类,与美味猕猴桃‘哑特’、‘海沃德’等的遗传距离更接近,这与其生物学特性一致。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^[17]。‘野生 99-23’、‘野生 99-24’与美味猕猴桃‘哑特’的遗传距离最近,这是由于‘哑特’原产于秦岭山区周至县境内。从聚类图上可以看到,‘西选 2 号’、‘红阳’与美味猕猴桃更接近,但图谱上它们的遗传距离与中华猕猴桃更接近,这可能是因为中华猕猴桃和美味猕猴桃这 2 个物种为遗传近缘种,有高度的遗传相似性,在猕猴桃属植物的种系亲缘关系处理中通常合并为中华/美味猕猴桃物种复合体^[18]。无论从琼脂糖凝胶电泳图还是从遗传距离聚类图上都可以看出,‘野生 99-13’猕猴桃与‘武植 2 号’等中华猕猴桃遗传距离较近,而与美味猕猴桃遗传距离较远。

4 结 论

经重复试验,最终确定 PCR 反应体系为:PCR 反应体积 25 μL ,内含 $1\times\text{PCR}$ 缓冲液,2.3 mmol/L MgCl_2 ,0.16 mmol/L dNTP,0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物,1.0

U Taq DNA 聚合酶,50 ng DNA,另外加盖矿物油 25 μL 。RAPD 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,38 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,共 40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

通过对秦岭山区 24 份野生猕猴桃的 RAPD 分析得出:秦岭山区野生猕猴桃资源间遗传距离系数较大,其遗传多样性极其丰富。‘野生 99-13’与‘魁蜜’、‘金阳’等中华猕猴桃聚为一大类,其为中华猕猴桃系列;其余 23 份野生猕猴桃与‘哑特’、‘秦美’、‘徐冠’、‘徐香’等品种遗传距离较近,归为一大类,属于美味猕猴桃。

[参考文献]

- [1] 黄宏文,龚俊杰,王圣梅,等.猕猴桃属(*Actinidia*)植物的遗传多样性[J].生物多样性,2000,8(1):1-12.
Huang H W, Gong J J, Wang S M, et al. Genetic diversity in the genus *Actinidia* [J]. Chinese Biodiversity, 2000, 8(1): 1-12. (in Chinese)
- [2] 梁畴芬.论猕猴桃属植物的分布[J].广西植物,1983,3(4):229-248.
Liang C F. Study on distribution of genus *Actinidia* [J]. Guihaia, 1983, 3(4): 229-248. (in Chinese)
- [3] 何子灿,钟 扬,刘洪涛,等.中国猕猴桃属植物叶表皮毛微形态特征及数量分类分析[J].植物分类学报,2000,38(2):121-136.
He Z C, Zhong Y, Liu H T, et al. Quantitative taxonomic analyses of *Actinidia* (Actinidiaceae) in China based on micromorphological characters of foliar trichomes [J]. Acta Phytotaxon Sin, 2000, 38(2): 121-136. (in Chinese)
- [4] Huang H W, Li J Q, Lang P, et al. Systematic relationships in *Actinidia* as revealed by cluster analysis of digitized morphological descriptors [J]. Acta Hort, 1999, 498: 71-78.
- [5] Messina R, Testolin R, Morgante M. Isozymes for cultivar identification in kiwifruit [J]. Hort Sci, 1991, 26(7): 899-902.
- [6] 熊治廷.猕猴桃种间杂种三倍体形态学和减数分裂观察[J].植物研究,1990,10(1):99-103.
Xiong Z T. Observations on the morphology and meiosis of interspecies hybrid triploid in *Actinidia* [J]. Bulletin of Botanical Research, 1990, 10(1): 99-103. (in Chinese)
- [7] Huang H W, Dane F, Wang Z Z, et al. Isozyme inheritance and variation in *Actinidia* [J]. Heredity, 1997, 78: 328-336.
- [8] 姚春潮,王跃进,刘旭峰,等.猕猴桃雄性基因 RAPD 标记 S1032-850 的获得及其应用[J].农业生物技术学报,2005,13(5):557-561.
Yao C C, Wang Y J, Liu X F, et al. Obtainment and application of RAPD Marker S1032-850 linked to male gene in *Actinidia* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2005, 13(5): 557-561. (in Chinese)