

广东猕猴桃种质资源 RAPD 聚类分析

陈晓玲, 谢振文, 梁 红

(仲恺农业技术学院 生物技术研究所, 广东 广州 510225)

摘 要: 为了探讨广东省和平县猕猴桃栽培品种和野生种之间的亲缘关系和类群聚合, 试验采用优化后的猕猴桃 RAPD 分子标记方法, 对源自广东省和平县的 21 个猕猴桃品种(引进和野生)进行分子多态性比较和聚类分析。结果表明: 猕猴桃种间的相似性系数为 65%~90%, 依据不同的相似性系数水平把 21 个种及品种分为不同的类群, 所聚类群与传统的形态学分类有一定的差异; 猕猴桃野生种与栽培品种之间有一定的差异, 但中华猕猴桃和美味猕猴桃 2 个种内的各栽培品种在聚类上互有交叉。黄毛猕猴桃品种与毛花猕猴桃、京梨猕猴桃、阔叶猕猴桃等野生种之间差异小, 亲缘关系较接近, 推测可能起源于同一个祖先种。广东和平县猕猴桃属植物类型丰富, 具有较高的遗传多样性。

关键词: 猕猴桃; 聚类分析; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: S 663.402.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0134-05

猕猴桃属 (*Actinidia* Lindl.) 隶属于猕猴桃科 (Actinidiaceae), 为多年生藤本植物, 雌雄异株, 是一种重要的水果资源。全世界现有猕猴桃属 66 个种, 其中 62 种原产中国^[1,2]。广东省有猕猴桃属植物分布的县(市)达 42 个, 其中粤北山区种类最多, 资源最丰富^[3,4]。和平县地处粤东北山区, 其西北面与江西定南县接壤, 是我国美味猕猴桃、中华猕猴桃的自然分布区之一, 也是广东省唯一的猕猴桃产区^[5]。该县 20 个乡镇都有野生猕猴桃分布, 共有 5 个野生品种: 灰毛猕猴桃、黄毛猕猴桃、毛花猕猴桃、多花猕猴桃、京梨猕猴桃; 猕猴桃的种植已遍布全县各个乡镇^[5,6]。

黄宏文等研究表明猕猴桃属植物从形态性状、营养成分、性别到染色体倍性变异都有很高的多样性, 存在着丰富的遗传多样性^[7]。Huang、陈万秋等通过同工酶研究表明猕猴桃在栽培品种和物种水平都存在高度的多样性^[7-8]。猕猴桃属植物的遗传多样性研究虽然取得了很大的进展, 然而在分子水平研究资料还不多, 特别是对县域范围内的猕猴桃属植物进行种内和种间遗传多样性研究还未见报道。现拟在对广东省猕猴桃产区和平县猕猴桃资源进行形态学观察和同工酶分析的基础上进一步从分子水平上研究其猕猴桃的分类、区域分

布和系统进化, 以期能为猕猴桃资源的开发利用, 发展区域猕猴桃产业提供一些科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

采用的试验材料取自广东省和平县水果研究所品种园, 嫁接于仲恺农业技术学院实验场内。取刚展开的幼叶为提取 DNA 的材料, 即取即用。

1.2 试剂

Taq 酶 (5 U/ μ L)、dNTP (浓度为 10 μ mol/L)、琼脂糖、EB、Tris、PVP 等购于上海生工公司, RNA 酶和 DNA marker 购于北京鼎国生物技术公司。试验共使用了 50 个随机引物, 长度为 10 bp, 均由上海生工公司合成。

1.3 主要设备

2400 型 PCR 扩增仪 (Pekin Elmer 公司), 紫外分光光度计 (Pharmacia 公司), 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司), 电泳装置 (北京六一仪器厂)。

1.4 DNA 提取

基因组 DNA 提取参照陈万秋等^[9]方法, 略加修改称为改良 SDS 法。取幼叶 1 g 加液氮研磨成粉, 再加入 2 mL SDS 提取液 (1.25% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 研磨混匀后置于 65℃水中水浴 30 min。离心 (10 800 rpm) 4 min, 取上清液加入等体积苯酚-氯仿-异戊醇 (12 : 12 : 1), 上下颠倒几次后再次离心 6 min; 取上清液加等体积氯仿, 混匀后离心 (10 800 rpm) 6 min; 取上清液加 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 混匀后再加等体积异丙醇, 上下颠倒几次, 离心 (10 800 rpm) 3 min。沉淀用 75%冷乙醇浸洗沉淀 30~60 s, 离心 (8 000 rpm) 3 min 后

第一作者简介: 陈晓玲 (1972-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事植物的遗传育种及教学管理工作。E-mail: cxling2003@126.com。

通讯作者: 梁红。E-mail: lhoffice@yahoo.com.cn。

基金项目: 广东省人大议案资助项目 (2005B20901005)。

收稿日期: 2008-05-17

去乙醇液,再用无水乙醇洗涤1次,真空干燥,为DNA粗制品。

DNA粗制品加入0.5 mL TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解后,加入15 μ L RNA酶,置于37 $^{\circ}$ C水中水浴30 min,颠倒几次,重复上述用苯酚-氯仿-异戊醇、氯仿、NaAc和异丙醇等萃取和离心等步骤进行纯化。干燥后,DNA样品贮存于-20 $^{\circ}$ C下备用。

作为对照,试验还采用陈大明方法^[10](用SDS提取液)和李思光的方法^[11](用CTAB提取液)进行DNA提取。所提取的DNA样品用Pharmacia公司产的紫外分光光度计进行DNA质量分析和浓度测定,同时用0.8%

琼脂糖凝胶进行电泳检查。

1.5 RAPD 反应

反应体系:模板DNA量100 ng, MgCl₂浓度2 mmol/L, dNTP浓度200 μ mol/L,引物浓度10 μ mol/L, Taq酶2 U(单位), 10 \times buffer 2.5 μ L,加ddH₂O使反应总体积为25 μ L。反应条件:起始94 $^{\circ}$ C 5 min,循环(40循环)94 $^{\circ}$ C(10 s) \rightarrow 36 $^{\circ}$ C(1 min) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C(1.5 min),最后延伸72 $^{\circ}$ C 10 min。RAPD扩增产物用1.4%琼脂糖凝胶电泳分离,上样15 μ L,将EB直接加入凝胶中(最终浓度为0.5 μ g/mL)。电泳完成后在凝胶成像仪上成像,并用GelcompareII(2004 version 5)软件进行聚类分析。

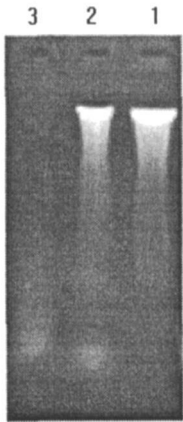


图1 不同方法提取毛花猕猴桃基因组DNA电泳结果

1.改良SDS法; 2.陈大明SDS法; 3. CTAB法

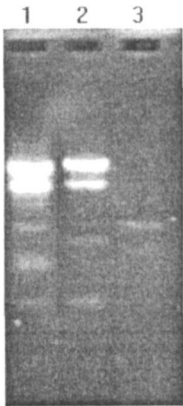


图2 用S₁₈引物扩增不同方法提取的毛花DNA样品的结果

1.改良SDS法; 2.陈大明SDS法; 3. CTAB法

2 结果与分析

2.1 猕猴桃基因组DNA提取方法比较

比较3种不同的DNA提取方法的提取效果(见图1),可见用改良SDS法和陈大明SDS法提取的猕猴桃基因组DNA通过凝胶电泳可以看到1条明显的亮带,这条带应是DNA带,下面较模糊的是小片段DNA,最前沿的应为RNA带;从CTAB法提取的DNA样品看到的DNA带模糊不清,而RNA带较明显,说明提取过程中DNA损失严重。用改良SDS法所提取DNA样品的谱带清晰,DNA长度约为2 kb。将这3种DNA样品用于RAPD反应的结果(见图2)表明,改良SDS法所提取的毛花猕猴桃基因组DNA带型清晰稳定,且条带最多,证明改良SDS法提取的DNA可满足RAPD扩增反应的要求。

在表1中,改良SDS法提取样品DNA A₂₆₀/A₂₈₀值为1.769,接近1.80,表明DNA较纯,此时DNA样品中

的蛋白质、酚类物质、色素及RNA等杂质含量极少,能较好地满足PCR反应的要求。其他两种方法提取的DNA的R值较低,纯度有所下降。故扩增效果不如改良SDS法。

表1 3种方法提取毛花猕猴桃DNA的比较(稀释40倍)

方法	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	C值(C value)	R(A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
改良SDS法	0.172	0.097	0.149	4.6	1.769
陈大明SDS法	0.131	0.086	0.154	5.2	1.529
CTAB法	0.070	0.047	0.151	7.7	1.490

2.2 RAPD反应体系的优化与多态性分析

试验从参照陈云鹏^[12]、陈万秋^[9]、陈延惠^[13]等研究的RAPD反应条件入手,逐步摸索出合适的RAPD反应条件。首先,通过模板DNA的梯度试验,确定其最佳的加样量为100~150 ng,高于500 ng基本扩不出带。Mg²⁺的浓度也是一个非常重要的因素,试验中采用

2 mmol/L,单独加入,试验结果比较稳定。合适的 dNTP 浓度在 50~400 μ mol/L 之间,但在 200 μ mol/L 时扩增效果最好。Taq 酶用量低于 1 U/25 μ L 时扩增效果较差,而用 2 U/25 μ L 时,效果明显,谱带稳定。

试验共使用了 50 个引物对 21 个猕猴桃品种(种)进行 RAPD 扩增。在这 50 个引物当中有 10 个引物的扩增失败,有 18 个引物的扩增具有多态性,占引物总数的 36%。在这 18 个引物中,又筛选条带清晰、稳定的 10 个引物(表 2)用于 RAPD 扩增和多态性分析。引物的筛选按照下面的步骤进行:首先是等量混合所有品种 DNA 样品;接着用各个不同的引物分别进行相同条件的 RAPD 扩增反应;然后选取带型清晰,条带较多的引物,再对所有猕猴桃品种的 DNA 逐一进行 RAPD 扩增,最后再确定最佳的引物,其扩增产物的数据用于多态性分析。

各个引物的 RAPD 扩增产物的位点数(电泳分离的 DNA 片段数)在 4~10 之间,10 个引物的总位点数为 70(表 2)。S₅₂ 扩增的位点数最多,为 10 个,引物 S₂₄₇ 扩增的位点数最少,为 4 个。所用 10 条多态性引物均获得了较好的扩增结果,共扩增出了 753 条带,其中多态性带为

300 条,约占扩增总带数的 40%,说明这 21 个猕猴桃种及野生种之间具有丰富的遗传多样性。扩增片段总数最多的引物是 S₁₈ 为 96 条带,绝大多数扩增产物的大小在 0.50~2 kb 之间。条带清晰、带型稳定,多态性好。在 10 条引物的扩增产物中可找到 5 条共有带,其分子量约为 750 bp(见图 3~6)。共有带表示每个品种都有的谱带,说明同一个属内种(品种)间有相同之处,亲缘关系相接近。

表 2 10 条引物的序列及扩增总 DNA 带数和位点数

引物	序列	G+C 含量/%	总 DNA 带数目	总位点数
S ₁	GTTTCGCTCC	60	67	7
S ₅	TGCGCCCTTC	70	78	7
S ₁₇	AGGGAAGAG	60	84	9
S ₁₈	CCACAGCACT	60	96	7
S ₂₁	CACCGTATCC	70	66	6
S ₅₂	CACCGTATCC	60	95	10
S ₆₄	CCGCATCTAC	60	60	6
S ₇₆	CACACTCCAG	60	73	6
S ₈₀	ACTTCGCCAC	60	83	8
S ₂₄₇	CCTGCTCATC	60	51	4
总数(total)			753	70

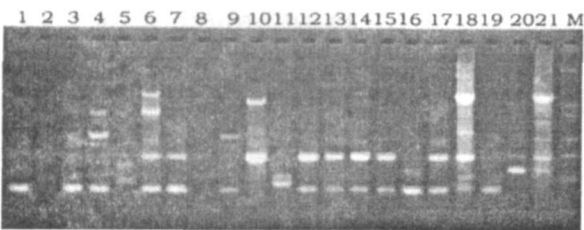


图 3 引物 S₁ 对 21 个猕猴桃品种(种)的扩增结果

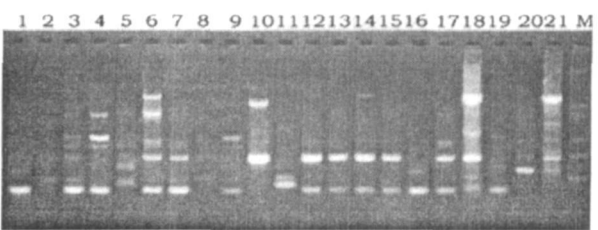


图 4 引物 S₅ 对 21 个猕猴桃品种(种)的扩增结果

1. 黄毛;2. 和平 1 号;3. 金早;4. 香绿;5. 三峡 1 号;6. 邦增 1 号;7. 金魁;8. 磨山 4 号;9. 华美 2 号;10. 两广;11. 桂林;12. 桂海 4 号;13. 通山 5 号;14. 革叶;15. 红阳;16. 多花;17. 大籽;18. 软枣;19. 京梨;20. 毛花;21. 阔叶;M. DNA 标记(从下至上:500 bp、750 bp、1 000 bp、1 600 bp、2 000 bp、19 325 bp)

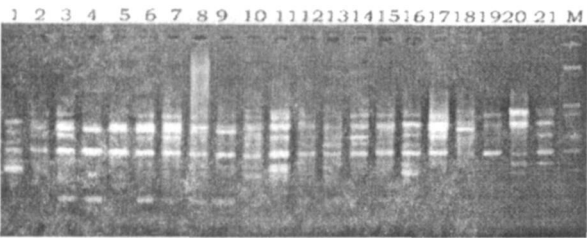


图 5 引物 S₁₈ 对 21 个猕猴桃品种(种)的扩增结果

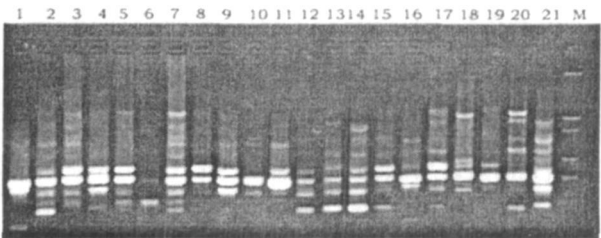


图 6 引物 S₇₆ 对 21 个猕猴桃品种(种)的扩增结果

2.3 RAPD 扩增产物聚类分析

根据 RAPD 扩增产物的分布以 0(代表该位点不显带)、1(代表该位点显带)收集统计数据建立数据库,得到

多态性分布表。显示了 10 条引物在 70 个位点的扩增带,位点 S₁-1,表示了引物 S₁ 的第一个多态性位点。1 表示强带和可重复出现的弱带,0 表示无带或不能重

复出现的弱带。

根据多态性分布数据, 用 Gelcompar II 软件分析了 21 个品种中任意 2 个种(品种)之间的相似性系数, 得到相似性系数矩阵, 再进行了聚类分析并构建了品种的树状图(见图 7)。由树状图可知, 栽培品种‘金魁’与‘金早’相似性系数最大, 超过 90%, 因而其亲缘关系最为接近; 野生猕猴桃‘黄毛’与各个品种或其他种的相似性系数都低于 65%, 亲缘关系远, 应单独聚为一类。总的来说, 野生种与栽培品种之间的相似性系数较低, 亲缘关系较远。

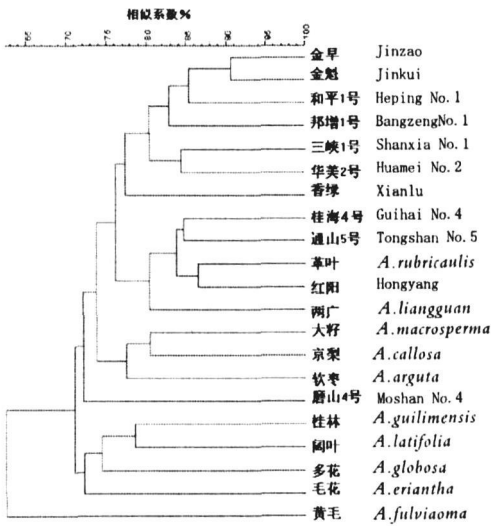


图 7 应用 GelcomparII 软件进行聚类分析所构建的种(品种)之间的树状图

通过聚类分析, 依据不同的相似性系数水平可把供试的 21 个种及品种分为不同的类群。当相似性系数为 72% 时, 分为 3 类: 即黄毛猕猴桃单聚为一类, 毛花、多花、阔叶和桂林猕猴桃聚为一类, 其余聚为另一类。当相似性系数为 76% 时, 可聚为 8 个类群: 即黄毛猕猴桃、毛花猕猴桃、多花猕猴桃及中华猕猴桃的‘磨山 4 号’各聚为一类; 桂林猕猴桃和阔叶猕猴桃聚为一类; 软枣猕猴桃、大籽猕猴桃和京梨猕猴桃聚为一类; 两广猕猴桃、中华猕猴桃的‘红阳’、‘革叶’猕猴桃、中华猕猴桃的‘通山 5 号’和‘桂海 4 号’聚为一类; 中华猕猴桃的‘金早’、美味猕猴桃的‘金魁’、‘和平 1 号’、‘邦增 1 号’、‘三峡 1 号’、‘华美 2 号’和‘香绿’聚为另一类。由图 7 中可知, 分属中华猕猴桃和美味猕猴桃的各个栽培品种之间的相似性系数均在 82% 以上, 表明它们的亲缘关系非常接近, 且 2 个种内品种间互有交叉。野生猕猴桃种与栽培猕猴桃品种之间的相似性系数较低, 其遗传差异较大。黄毛猕猴桃、毛花猕猴桃、多花猕猴桃以及中华猕猴桃

中的‘磨山 4 号’与其它 17 个种(品种)之间差异较大, 亲缘关系较远。最后, 黄毛猕猴桃与其他种(品种)的相性系数最低, 应单独聚为一类。

3 讨论

3.1 猕猴桃基因组 DNA 的 RAPD 扩增条件的优化

试验所采用的 DNA 提取方法是在陈万秋方法(提取液中加入 SDS)的基础上加以改进, 称为改良 SDS 法, 该方法提取的猕猴桃基因组 DNA 质量完全可以满足 PCR 要求。试验的扩增程序是以陈万秋等 RAPD 扩增程序为基础上进行参数的优化。在反应体系方面主要是 Taq 酶和模板 DNA 的增加(Taq 酶量是 2 U/25 μ L, DNA 量增加到 100 ng/ μ L), 以增加反应初期反应物的相对浓度。扩增程序是: 首先, 预变性 94 $^{\circ}$ C(5 min), 然后是 94 $^{\circ}$ C(10 s) \rightarrow 36 $^{\circ}$ C(1 min) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C(1.5 min), 共计 40 个循环, 最后延伸为 72 $^{\circ}$ C(10 min)。由于随机引物只有 10 bp, 且有可能与模板 DNA 的相应位置的序列并不一定严格互补, 降低复性温度和延长退火时间是十分必要的。经上述反应条件优化后扩增的 DNA 带清晰、稳定, 并表现出较高的多态性。因此, 可以将该 RAPD 分析的试验条件优化作为猕猴桃研究中与 PCR 扩增相关的其他试验程序的借鉴。

3.2 中华猕猴桃和美味猕猴桃种群有交叉, 亲缘关系近

生物多样性是生物进化的结果也是生物适应环境能力的表现。依据不同的相似性系数水平可把 21 个种分为不同的类群: 当相似系数为 72% 时, 21 个种分为 3 大类, 当相似性系数为 76% 时, 可聚为 8 个类群。聚类出类群与形态分类大体上相类似, 但也有一定的差异: 在亲缘关系上最接近的两个品种是‘金早’和‘金魁’, 相似性系数超过 90%, 但在形态分类上前者属于中华猕猴桃而后者属于美味猕猴桃, 说明这 2 个种内品种间互有交叉。这与郑轶琦等^[14]研究的中华猕猴桃和美味猕猴桃种群拥有高比例的等位基因, 两者有极近的亲缘关系相吻合。

3.3 分子标记聚类与地理分布之间的关系

高等植物之间的种类变异、cpDNA 变异和地理分布有密切关系。董晓莉等^[15]采用 UPMA 法对猕猴桃聚类的结果也与传统的形态分类存在一定的差异, 但反映了猕猴桃的地理分布。栽培品种‘金早’和‘金魁’来源于武汉植物所, 自然分布区在湖北省, 具有明显的区域性, 该研究结果与它们地理区域角度的分类相一致。桂林猕猴桃和阔叶猕猴桃都属于猕猴桃科星毛组, 原产地均在广西, 从形态学角度看, 两者有诸多相似之处。李健仔等^[16]通过叶绿体基因 PCR-RFLP 分析也显示桂林猕猴桃和阔叶猕猴桃在所分析的 28 个猕猴桃种群中,

它们片段共享度最大。试验中桂林猕猴桃和阔叶猕猴桃的 RAPD 酶谱分析也得到一致的结论。因此, 桂林猕猴桃和阔叶猕猴桃可归于同一种之下的 2 个亚种。毛花猕猴桃、京梨猕猴桃、黄毛猕猴桃、多花猕猴桃是广东和平的野生种, 在形态学上认为毛花猕猴桃、黄毛猕猴桃接近于美味猕猴桃, 多花猕猴桃和京梨猕猴桃则接近于中华猕猴桃^[9]。在试验中, 黄毛猕猴桃和其他栽培品种相似性系数较小, 可单聚为一类。但该品种与毛花猕猴桃、京梨猕猴桃、阔叶猕猴桃等野生种之间差异小, 亲缘关系较接近。这也说明了栽培品种与野生种之间遗传差异大, 亲缘关系远。因此, 推测黄毛猕猴桃、多花猕猴桃、毛花猕猴桃、阔叶猕猴桃可能起源于同一个祖先种。

4 结论

广东省和平县是我国猕猴桃栽培南界, 其栽培品种和野生资源十分丰富。试验采用优化后的猕猴桃 RAPD 分子标记方法, 对源自广东省和平县的 21 个猕猴桃品种(引进和野生)进行分子多态性比较和聚类分析。聚类分析表明, 猕猴桃种(品种)间的相似性系数为 65%~90%, 依据不同的相似性系数水平把 21 个种及品种可分为不同的类群, 聚类出类群与传统的形态分类存在一定的差异; 发现猕猴桃野生种与栽培品种之间有较大的差异, 但中华猕猴桃和美味猕猴桃 2 个种内的各个栽培品种在聚类上互有交叉, 亲缘关系较近。研究 RAPD 分析结果表明: 广东和平县猕猴桃属植物类型丰富, 具有较高的遗传多样性。

参考文献

- [1] 梁晴芬. 猕猴桃属植物的分布[J]. 广西植物, 1983(4): 229-248.
- [2] 黄宏文, 龚俊杰, 王圣梅, 等. 猕猴桃(*Actinidia*)属植物的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000 8(1): 1-12.
- [3] 邢福武, 陈芳, 李泽贤, 等. 广东省猕猴桃属植物资源调查研究[J]. 广东农业科学, 1990(1): 8-22.
- [4] 张爱玉, 逮万兵. 广东省猕猴桃生产现状、问题及对策[J]. 广东农业科学, 1997(4): 25-26.
- [5] 梁红. 和平县猕猴桃产业化发展研究[J]. 农业与技术, 2002, 22(6): 45-48.
- [6] 杨曼倩, 黄艳芳, 黎洁池, 等. 和平县野生猕猴桃资源调查[J]. 农业与技术, 2003 23(3): 80-84.
- [7] Huang H W, Dan F, Wang Z et al. Isozyme inheritance and variation in *Actinidia* [J]. Heredit, 1997, 78: 328-336.
- [8] 陈万秋, 叶新太, 李思光, 等. 猕猴桃酯酶同工酶和过氧化物酶同工酶分析及遗传多样性研究[J]. 南昌大学学报, 2001, 25(9): 269-272.
- [9] 陈万秋, 李思光, 罗玉萍, 等. 猕猴桃模板 DNA 的提取及 RAPD-PCR 最佳反应体系的建立[J]. 生物技术通报, 2003(3): 40-43.
- [10] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997 23(6): 621-624.
- [11] 李思光, 罗玉萍, 陈万秋, 等. 猕猴桃基因组 DNA 的提取及其 RAPD 扩增研究[J]. 南昌大学学报(理科版), 2004, 25(3): 265-268.
- [12] 陈云鹏, 曹家树, 缪颖, 等. 芸薹类蔬菜基因组 DNA 遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(2): 131-136.
- [13] 陈延惠, 李洪涛, 朱道圩, 等. RAPD 分子标记在猕猴桃种质资源鉴定上的应用[J]. 河南农业大学学报, 2003, 37(4): 360-364.
- [14] 郑琦, 李作洲, 黄宏文. 猕猴桃品种 SSR 分析的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2003 21(5): 444-448.
- [15] 董晓莉, 汤洁茹, 丁建, 等. 彩色猕猴桃与红色猕猴桃的遗传差异分析[J]. 果树学报, 2006, 23(5): 676-680.
- [16] 李健仔, 李思光, 罗玉萍, 等. 猕猴桃属植物叶绿体基因 PCR-RFLP 分析[J]. 植物研究, 2003 23(3): 328-333.

Clustering Analysis of *Actinidia* Germplasm in Guangdong Province by RAPD

CHEN Xiao-ling, XIE Zhen-wen, LIANG Hong

(Biology Institute of Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

Abstract: The genetic relationship and clustering analysis between cultivated varieties and wild *Actinidia* were discussed in this paper. The 21 varieties and species of cultivated and wild *Actinidia* in Heping County of Guangdong Province were used as materials for studying their amplification comparison and cluster analysis by the suitable parameters of RAPD. The results showed that the similarity coefficient of varieties or species was 65%~90%, based on these the 21 of varieties and species could be classified as different groups. It was showed significant differences between the wild species and cultivated varieties. But *A. chinensis* and *A. deliciosa* had some cross area in several cultivated varieties by cluster analysis. The difference of genetic relationship among the wild species of *A. fulvicaoma*, *A. latifolia*, *A. globosa* and *A. eriantha* was not obvious but nearly. It could be inferred that they might originated from the same ancestor species. *Actinidia* plants in Heping county of Guangdong Province displayed highly genetic diversity and the classification is very abundant.

Key words: *Actinidia*; Clustering analysis; Genetic diversity; RAPD