

黑莓亲缘关系的 AFLP 分析

张玉平, 姜 明, 鲁绍伟, 潘青华, 李少宁

(北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

摘 要:以引进的 11 个黑莓栽培品种和 13 株黑莓实生苗为试材, 采用 AFLP 分子标记技术, 从 *EcoRI*/*MseI* 引物组合中筛选出 10 对多态性好、扩增条带清晰的引物对其进行遗传多样性和亲缘关系的研究。结果表明: 黑莓样品共扩增出 657 条带, 多态性条带 488 条, 多态性比率为 74.3%。基于品种间遗传相似性系数的 UPGMA 聚类分析, 在遗传相似性系数 0.52 水平上可将黑莓分为 2 组, 与形态学分类基本一致。表明 AFLP 技术可有效应用于黑莓品种遗传关系的研究, 为品种鉴定、合理引种以及遗传育种提供可靠依据。

关键词:黑莓; 亲缘关系; AFLP

中图分类号:S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)21-0116-04

黑莓 (*Rubus* spp.) 属蔷薇科 (Rosaceae) 悬钩子属 (*Rubus*) 植物, 分属于实心莓亚属 (*Eubatus*), 又称黑莓亚

第一作者简介:张玉平(1972-), 女, 硕士, 副研究员, 现主要从事树莓遗传育种等研究工作。

责任作者:潘青华(1972-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事果树遗传育种等研究工作。

基金项目:北京市农林科学院青年基金资助项目(QNJ201002); 农业部公益性行业科研专项资助项目(201103037); 北京市财政资源资助项目(KJCX201101009)。

收稿日期:2013-06-19

属^[1-2], 该亚属共有 400 多种, 占悬钩子全部种类近 60%。根据园艺特征, 悬钩子属分为 2 个主要种群, 即黑莓种群和树莓种群, 黑莓种群果实成熟时不与花托分离, 而树莓果实成熟时与花托分离。黑莓果实个大, 酸甜适口, 除鲜食外还大部分制成速冻果实、果汁、果酒和果酱等食品以及黑莓色素、种籽油、天然维生素 E 等深加工产品。黑莓原产于北美东部和欧洲中部, 栽培历史约 150~200 a。国外已培育出了数百个品种^[3-5]。我国自 20 世纪 90 年代末开始引进, 但是许多品种的表现不如原产地, 而且生产中同物异名和同名异物现象较多, 致

[20] Rea P A. Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103:507-508.

[21] Ramos J, Clemente M R, Naya L, et al. Phytochelatin synthases of the

model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants[J]. Plant Physiology, 2007, 143:1110-1118.

Analysis of Phytochelatin Synthase Genes' Characteristics in Different Plants

JIANG Qian-qian, CAO Hui

(Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Universities of Shandong, Weifang University, Weifang, Shandong 261061)

Abstract: Phytochelatin synthase (PCS) is the key enzyme which catalyzes glutathione (GSH) polymerization to generate phytochelatin (PCs) in plants, and plays an important role in the mitigation of heavy metal stress. The nucleic acid and amino acid sequences, physical and chemical properties, protein structure, phylogenetic trees and functional domains of PCS genes from *Malus domestica*, *Malus hupehensis*, as well as *Pyrus betulifolia*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Nicotiana tabacum*, and *Lotus japonicus* which had been registered in GenBank were analyzed and investigated using bioinformatics online methods and software, such as ProtParam, TMHMM, SignalP, Phyre2, Pfam, Clustal X and MEGA. The results showed that the length of PCS proteins was between 465~506 amino acids, and the isoelectric point was between 5.67~7.77. The PCS proteins were mainly localized in the nucleus. The plant PCS proteins were unstable protein except *Ceratophyllum demersum*. The secondary structure of PCS proteins were mainly composed of α -helix, extended strand and random coil, and their spatial structure had a high degree of similarity. All the PCS proteins belonged to phytochelatin synthases protein families, which containing a phytochelatin functional domain, and three predicted active sites. This study would provide the basis for further investigating the structural characteristics and functions of this enzyme.

Key words: phytochelatin synthase (PCS); physical and chemical properties; phylogeny; sequence and structure analysis

使品种混乱,严重缺乏具有自主知识产权的适应我国气候特点的优良新品种。当前,随着人们对营养保健水果需求的增加,国内黑莓产业已进入快速发展期,生产上需要大量适应性强、抗性强的优良品种。因此,了解这些引进黑莓品种的遗传背景对资源的利用和创新有着重要的意义。

应用 ISSR、SRAP、SSR 及 RAPD^[6-9] 等分子生物学方法,可准确的对悬钩子属植物进行遗传多样性研究、亲缘关系分析、品种鉴定和遗传图谱构建。与其它分子标记相比,AFLP 技术不需预先了解所需扩增的 DNA

序列,适合对遗传背景了解不多的种类进行分类分析,而且多态性高,稳定性好,信息量大,重复性高。该研究利用 AFLP 技术从分子水平探讨引进的 11 个黑莓品种及 13 个实生苗的亲缘关系,以期黑莓品种的鉴别、资源的创新利用以及合理引种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 11 个引进黑莓品种和 13 株黑莓实生苗,详细信息见表 1。

表 1

材料信息

Table 1

Information of plant materials

编号 Numbers	品种 Varieties	系谱 Ancestry	审定年份 Released year	染色体数 Chromosome number	植株类型 Type of plant	刺的类型 Type of thorn
1	“三冠王”‘Triple Crown’	Carbondale 47×Arkansas 545	1996		半直立	无
2	“那好”‘Navaho’	ARK583(Thornfree×Brazos)×ARK631(ARK550×Cherokee)	1988	28	半直立	无
3	“瓦尔多”‘Waldo’	ORUS 1122[Marion×OSC878(Jenner-1×Eldorado)]× ORUS 1367(ORUS1083×NC37-35-M2)	1989	42	蔓生	无
4	“赫尔”‘Hull’	SIUS 47×Thornfree	1981	28	半直立	无
5	“卡瓦”‘Kiowa’	ARK791×ARK1058	1996		直立	有
6	“迷你”‘Siskiyou’	ORUS 2027 (Olallie×ORUS 1367)×ORUS 1826 (ORUS 1122×Boysen)	1999		蔓生	有
7	“塞尔文”‘Silvan’	ORUS742(Pacific×Boysen)×Marin		42	蔓生	有
8	“萨尼”‘Shawnee’	Cherokee×AR 586(Thornfree×Brazos)	1985	28	直立	有
9	“宝森”‘Boysen’	Clonal selection of Boysen(<i>R. ursinus</i> , in part)		49	蔓生	有
10	“欧莱里”‘Olallie’	Black Logan×Young		42	蔓生	有
11	“阿甜”‘Arapoho’	ARK631(ARK550×Cherokee)×ARK883(ARK593×ARK650)	1993	28	直立	无
12~24	黑莓实生苗					

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 对 24 份供试材料分别提取基因组 DNA,每个样本取 200 mg 嫩叶放入离心管中,液氮研磨,DNA 提取采用改良的 CTAB 法^[10]。使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量,并用紫外分光光度计测定 DNA 浓度,调节 DNA 浓度在 50 ng/μL 左右,−20℃保存待用。

1.2.2 AFLP 分析 AFLP 操作参照 Vos 等^[11] 方法,具体过程如下:酶切和连接:内切酶选用 *EcoRI* 和 *MseI*,酶切和接头连接采用一步法,37℃反应过夜,然后 70℃水浴 15 min 使酶失活。将连接产物稀释 20 倍保存备用。预扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,共 24 个循环;72℃ 10 min。预扩增产物用 1.5% 琼脂糖电泳检测。选择性扩增程序:94℃ 2 min;94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 1 min,共 12 个循环,每个循环递减 0.7℃;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,共 24 个循环;72℃ 10 min。选择性扩增产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染法显示条带。选取多态性好的 AFLP 引物 10 对,具体引物组合见表 2。

1.3 数据分析

根据 AFLP 扩增产物电泳图谱扩增的结果,视每条多态性条带为 1 个等位基因,相同的迁移位置中有带记

为“1”,无带记为“0”,构成二元数据矩阵,并统计引物位点,利用 NTSYS-pc 2.1 软件计算样品之间的遗传距离和相似系数,用 UPGMA 法聚类分析,构建系统树^[12]。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增产物的多态性分析

从合成的 64 对 *EcoRI*/*MseI* 引物组合中筛选出 10 对扩增多态性好、带型清晰的 AFLP 引物,对供试的 24 份黑莓基因组 DNA 进行扩增,结果见表 2 和图 1。由表 2 可知,10 对引物共得到 657 条有效扩增条带,检测到

表 2 AFLP 扩增产物多态性分析

Table 2 Polymorphic analysis of amplified bands by AFLP

<i>EcoRI</i> 引物 Primer <i>EcoRI</i>	<i>MseI</i> 引物 Primer <i>MseI</i>	扩增条带数 Numbers of amplified bands/条	多态性带数 Numbers of polymorphic bands/条	多态性比率 Percentage of polymorphic loci/%
CAC	AAG	68	44	64.7
CAA	AAA	70	59	84.3
CAT	AAT	58	42	72.4
CCA	ACA	62	55	88.7
CAT	ACA	75	60	80.0
CCA	AAT	84	66	78.6
CCC	ACC	58	46	79.3
CGT	AGC	55	36	65.5
CTC	AAG	63	30	47.6
CGT	AAG	64	50	78.1
平均 Mean		65.7	48.8	74.3

488 条多态性位点,平均多态性比率 74.3%。每对引物扩增出的带数为 55~84 条,多态性比率 47.6%~88.7%,平均每对引物扩增带数 65.7 条,平均多态性带数 48.8 条。其中,引物 CCA/ACA 共扩增出 62 条带,55 条为多态性条带,多态性比率 88.7%,是所有引物中多态性最高的,多态性最低的是 CTC/AAG,共扩增出 63 条带,多态性条带 30 条,多态性比率 47.6%。该结果表明,黑莓不同材料之间具有较高的遗传多样性水平。

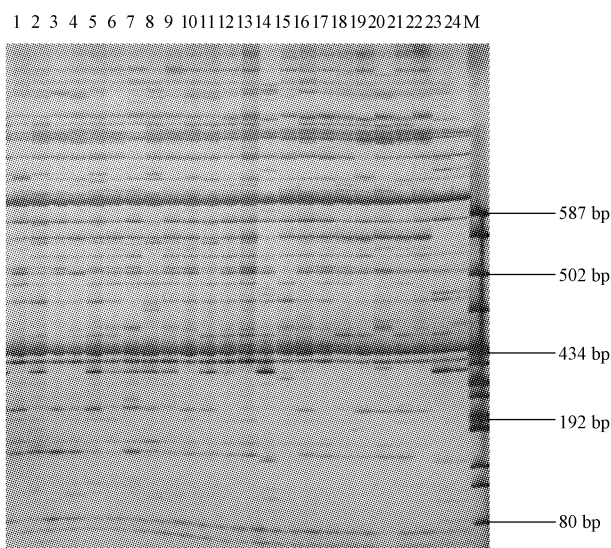


图 1 引物 CAT/AAT 的扩增结果

注:M;DNA Ladder pBR322;1~24 名称见表 1。下同。

Fig. 1 Amplification results of primer pairs CAT/AAT in blackberries

Note:M;DNA Ladder pBR322;No. 1~24 accessions showed in Table 1. Same the below.

2.2 亲缘关系分析

根据 AFLP 扩增结果,利用 24 份供试样品间的遗传相似系数进行 UPGMA 聚类分析,由图 2 可知,当遗传相似系数为 0.52 时,可将 24 份黑莓分成 2 组,第 1 组:引进品种“三冠王”、“萨尼”、“那好”、“阿甜”以及 23 号实生苗。第 2 组:包括引进品种“瓦尔多”、“迷你”、“塞尔文”、“欧莱里”、“赫尔”、“卡瓦”和“宝森”以及 12~22 号、24 号实生苗。

24 个黑莓相互之间相似系数一般在 0.52~0.82 之间,表明在分子水平上,黑莓各材料间的遗传多样性较为丰富,“迷你”(6 号)和“塞尔文”(7 号)、实生苗 20 号和 21 号相似系数较高,达 0.80 以上,表明其亲缘关系较近,“阿甜”(11 号)与其它品种相似系数在 0.53 左右。从图 2 可以看出,1 组黑莓品种间相似系数较 2 组低,表明遗传多样性也更为丰富。2 组黑莓引进品种间相似系数明显低于各实生苗间相似系数,表明实生苗之间的遗传多样性不太丰富,这与实生苗来自引进品种的种子实生后代是一致的。

从图 2 还可以看出,1 组中“三冠王”、“萨尼”、“那好”、“阿甜”和 23 号实生苗植株类型为直立或半直立,除“萨尼”有刺外,其它品种均无刺。追溯其系谱来源,发现“萨尼”、“那好”、“阿甜”均具有 Cherokee 的血统。实生苗(23 号)与“三冠王”(1 号)聚在一起,这与植株形态观察的结果比较一致;而 2 组中引进品种除“赫尔”(4 号)和“卡瓦”(5 号)2 个品种植株为半直立无刺和直立有大刺外,其它引进品种均为蔓生类型,且均有刺。大部分实生苗聚在 2 组中,这与其来源于“瓦尔多”、“赫尔”、“卡瓦”的种子实生后代比较一致。

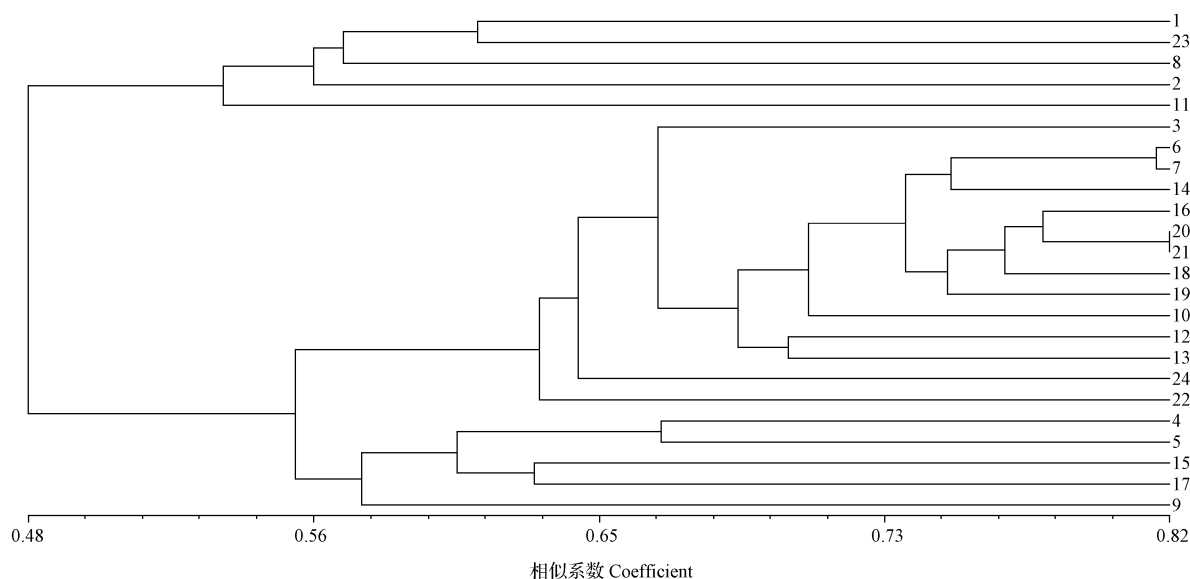


图 2 供试样品 AFLP 分析遗传相似系数聚类图

Fig. 2 Genetic similarity cluster based on AFLP analysis in raspberries and blackberries

3 讨论

该试验利用筛选出的 10 对 AFLP 引物组合对黑莓的 24 个基因组 DNA 进行扩增,得到了 657 条带,多态性条带 488 条,多态性比率 74.3%,平均每对引物获得多态性条带为 48.8 条,根据扩增条带的多态性可有效地将 24 份供试材料分开。

该研究将 11 个黑莓引进品种和 13 个实生苗分为 2 组,从引进品种看,遗传多样性较为丰富,1 组中品种植株类型为直立或半直立,而 2 组中品种除“赫尔”和“卡瓦”为半直立或直立类型外,其余均为蔓生类型。从 13 个实生苗聚类看,除 23 号聚在 1 组,其余均为 2 组,且遗传多样性不太丰富,这是该试验所用实生苗的遗传基础比较狭窄所致。Jia 等^[13]用 RAPD 标记技术对 13 个黑莓(*Blackberry*)、树莓(*Raspberry*)品种和 5 个野生树莓种类(*Rubus* spp.)的 26 个居群的遗传多样性进行了分析,用 15 个寡聚核苷酸随机引物共扩增出条带 131 条,其中多态性条带 118 条,占扩增条带总数的 90%,表明树莓属植物种间和品种间存在丰富的遗传多样性,通过聚类分析可将供试的 26 个居群分为 4 组,其中实生苗的 6 个不同居群单独聚类,其遗传差异不大。Agar 等^[14]用 3 对引物对 10 个黑莓基因型进行了 AFLP 分析,共扩增 223 条清晰的条带,其中多态性条带 115 条,多态百分率为 53%,表明遗传多样性的信息将有助于育种中对遗传材料的开发以及其它更深入的研究。

综上,根据 AFLP 技术得到的聚类结果与传统形态学具有较高的一致性,表明 AFLP 技术可以用于黑莓品种的遗传关系研究,为我国黑莓品种鉴定、亲本选配、遗传图谱构建等方面的深入研究提供准确有效的理论依据。

(致谢:感谢中国林业科学院张清华研究员提供的部分材料。)

参考文献

- [1] 张清华,董凤祥. 树莓发展现状与前景[J]. 林业实用技术,2007(11): 9-11.
- [2] 俞德浚,陆玲娣,谷粹芝. 中国植物志[M]. 37 卷. 北京:科学出版社,1985.
- [3] 贺善安,顾姻,孙醉君,等. 黑莓引种的理论导向[J]. 植物资源与环境,1998,7(1):1-9.
- [4] 王小蓉,汤浩茹,邓群仙. 中国树莓属植物多样性及品种选育研究进展[J]. 园艺学报,2006,33(1):190-196.
- [5] 王小蓉. 悬钩子属植物遗传多样性及其特异资源的筛选[D]. 雅安:四川农业大学,2008.
- [6] 和志娇. 滇西北部分悬钩子属植物亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 西北农业学报,2011,20(11):164-169.
- [7] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103:455-461.
- [8] Graham J, Smith K, Mackenzie K. The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 740-749.
- [9] 曲柏宏,金香兰. 梨属种质资源的 RAPD 分析[J]. 园艺学报,2001,28(5):460-462.
- [10] 张玉平,金万梅,许奕华,等. 适于 SSR 分析的树莓基因组 DNA 的快速提取[J]. 北方园艺,2009(10):68-70.
- [11] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA finger printing[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21):407-4414.
- [12] Rohlf F J. NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. Version 2.1. New York: State University of New York, 2000.
- [13] Jia J B, Li W L, Wu W L. RAPD analysis of *Rubus* spp[J]. Journal of Plant Resources an Environment, 2008, 17(3):18-22.
- [14] Agar G J, Halasz S, Ercisli. Genetic relationships among wild and cultivated blackberries (*Rubus caucasicus* L.) based on amplified fragment length polymorphism markers[J]. Plant Biosystems, 2011, 145(2):347-352.

Genetic Relationship Analysis of Blackberries by AFLP

ZHANG Yu-ping, JIANG Ming, LU Shao-wei, PAN Qing-hua, LI Shao-ning

(Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093)

Abstract: Taking 11 blackberry cultivars introduced abroad and 13 excellent seedlings of blackberry as materials, a total of 10 primer pairs selected from *EcoRI*/*MseI* primer combinations were used to analysis the genetic diversity and genetic relationship of them by AFLP. The results indicated that it produced 657 AFLP-bands, 488 of which were polymorphic bands, the polymorphic rate was 74.3%. The cluster analysis based on UPGMA showed that the 24 genotypes were classified into 2 groups at the level of $SM=0.52$, this result was coincidence with the morphological classification. It concluded that AFLP was an effective way to study of genetic diversity among blackberries accessions and will be helpful in identifying varieties, introduction reasonably and breeding purposes as well as further research.

Key words: blackberry; genetic relationship; AFLP