

‘黄金冠’桃及其品系亲缘关系的 RAPD 分析

冯海霞, 孟庆杰, 郭尚敬, 王光全

(聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059)

摘要: 利用 RAPD 技术对黄桃新品种‘黄金冠’及其它 6 个品系的亲缘关系进行了研究。从 80 个随机引物中筛选出 15 个重复性好、条带清晰的多态性引物对桃品系进行了 RAPD 扩增, 共扩增出 84 条谱带, 其中 38 条表现多态性, 多态性比率为 45.2%。利用 NTSYS 软件和 UPG-MA 聚类法对扩增结果进行了品种间相似系数的计算及聚类分析。结果表明: 相似系数为 0.78~0.86, 黄桃 19 和其它桃品系亲缘关系最远, ‘黄金冠’和锦黄 2 号的亲缘关系最近。

关键词: 黄金冠; 品系; 亲缘关系; RAPD

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)01-0020-03

桃起源于中国的西部地区, 在我国的绝大部分地区和世界多个国家均有分布, 种质资源十分丰富。在桃树悠久历史的栽培过程中, 经过长期的自然选择和人工驯化栽培形成了众多的品种和类型。为了更好地发掘和利用这些种质资源, 探明桃属植物种质资源的亲缘关系, 很多学者用形态学、细胞学、酶学、孢粉学等方法对桃种质进行了分类研究^[1-3]。应用传统方法研究取得了一些很有价值的成果, 但是还存在很多问题尚待解决。比如在有些研究中存在较多分歧, 尤其在桃(*Prunus persica* L.)种内品种群的划分上, 至今仍未能统一, 有必要进一步研究。‘黄金冠’是孟庆杰等^[3]发现的黄桃新品种, 它具有果肉黄色、果皮及果核处无红色素等独特优点。并且认为‘黄金冠’和锦绣在生物学形状方面相似, 但是利用分子标记手段的研究还未见报道。

近十几年来, 由 Welsh 和 Wiliam 等^[4-5]利用 PCR 技术发展起来的 RAPD 技术, 具有技术简单、检测速度快、只需少量 DNA 样品、不依赖于种属特异性和基因组结构、一套引物可用于不同生物基因组分析和成本较低等优点, 在国内外的桃、樱桃、苹果、杏、葡萄等^[6-12]多种果树中得到广泛应用。

为了进一步研究‘黄金冠’和其它桃品种的亲缘关

系, 揭示‘黄金冠’的起源, 该试验对包括‘黄金冠’在内的 7 个黄桃品系进行了 RAPD-PCR 分析, 并构建了遗传树状图对桃不同品种间的亲缘关系进行了研究, 为一些特殊种质资源的开发利用及保存提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 7 份黄桃品系, 在 2009 年 4 月初采集材料嫩叶, 采集地点是聊城大学科技园, 样品贮于-80℃的超低温冰箱中备用。样品名称依次为锦黄 2 号、锦黄 3 号、锦黄 4 号、黄桃 19、黄金冠、锦绣和早凤王。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及纯度测定 取各品种嫩叶, 采用 CTAB 法^[13]提取基因组总 DNA, 在提取缓冲液中加入 3% 的 PVP 和 2% 的 β-巯基乙醇, 去除多年生果树中的多糖和酚类物质。采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度, 测定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 下的吸光值确定其纯度, 于-20℃冰柜中保存备用。

1.2.2 PCR 反应体系的建立 该试验通过在不同温度、时间和离子浓度的 PCR 扩增, 摸索建立了一套专门适合桃品种 RAPD-PCR 扩增的程序。PCR 的反应体系如下, 20 μL 总体积中含不少于 50 ng DNA 模板, 引物 (10 mM) 1.6 μL, dNTP (10 mM) 0.5 μL, 10× Taq buffer (含 MgCl₂) 2 μL, Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 13.4 μL。扩增程序为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 45 s, 34℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 40 个循环, 最后 72℃延伸 5 min。并且试验用 dNTP、10× Taq buffer、Taq DNA 聚合酶均购自 TIANGEN 公司, 试验用品的统一性确保了扩增的稳定性。

1.2.3 引物筛选及 PCR 产物鉴定 参照北京赛百盛 SBS 公司的引物序列, 选取 A、B、C、D 4 个系列的 80 个引物对少数桃品种的 DNA 样品进行扩增, 从中筛选出

第一作者简介: 冯海霞 (1983-), 女, 山东阳谷人, 硕士, 研究方向为资源植物与演化植物学。E-mail: fenghaixia@163.com。

通讯作者: 王光全 (1957-), 男, 山东平邑人, 教授, 硕士生导师, 现主要从事果树学及植物学的教学和科研工作。E-mail: wgq@lzu.edu.cn。

基金项目: 山东省科技攻关资助项目 (2009BG10009031); 山东省教育厅资助项目 (J07YF17); 聊城大学重点科研基金资助项目 (X20060610)。

收稿日期: 2009-08-10

扩增性强、重复性好、多态性高的 15 个引物(表 1), 用于全部桃品种 DNA 样品的扩增。PCR 扩增反应结束后, 在 1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2.4 数据统计与分析 电泳图谱中的每 1 条带均代表了引物与模板 DNA 互补的一对结合位点, 可记为 1 个分子标记, 并估计扩增产物的分子量大小。将含有谱带的记为 1, 无带的记为 0, 形成 0、1 矩阵图以文本形式输入计算机。采用 NTSYS-pc 2. 10e 软件分析不同桃品种的 RAPD 扩增数据, 得到品种间的相似系数矩阵。根据 UPGMA 方法构建聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 RAPD-PCR 扩增结果分析相关性

表 1 列出了不同引物的碱基序列及其对不同桃品种扩增反应的结果。从 80 个随机引物中选出 15 个引物对 7 个桃品种的 DNA 样本进行 PCR 扩增。结果表明, 扩增的产物谱带从 3~10 条不等, 共产生 84 条扩增产物带, 其中 38 条具有多态性, 比例为 45.2%, 体现了该组植物丰富的遗传多样性。扩增产物的大小从 250~3 000 bp 不等, 说明该组植物具有丰富的多态性。引物 A9、

B12、C4 和 C17 对 7 个桃品种 DNA 的 PCR 扩增结果见图 1。

表 1 15 个随机引物对 7 个桃品系的扩增结果

Table 1 Amplification of the 15 arbitrary primers in the 7 peach varieties				
引物 Primers	序列 5'-3' Sequence	扩增总带数 Amplified total band/ 个	多态性条带数 Poly morphism band/ 个	多态位点比率 Poly morphism loci ratio/ %
A1	CAGGCCCTTC	7	4	57.1
A2	TGCCGAGCTG	5	1	20.0
A4	AATCGGCTG	5	4	80.0
A9	GGGTAAGCC	7	1	14.2
A14	TCTGTGCTGG	6	1	16.7
A18	AGGTGACCGT	4	3	75.0
B1	GTTTCGCTCC	10	5	50.0
B5	TGCCGCCCTTC	6	2	33.3
B12	CCTTGACGCA	8	2	25.0
C4	CCGCATCTAC	4	3	75.0
C12	TGTCATCCCC	6	4	66.7
C14	TGCGTGCTTG	4	1	25.0
C17	TTCCCCCCAG	4	2	50.0
C19	GTTGCCAGCC	6	4	66.7
D2	GGACCCAACC	3	2	66.7
总计 Total	15	84	38	45.2

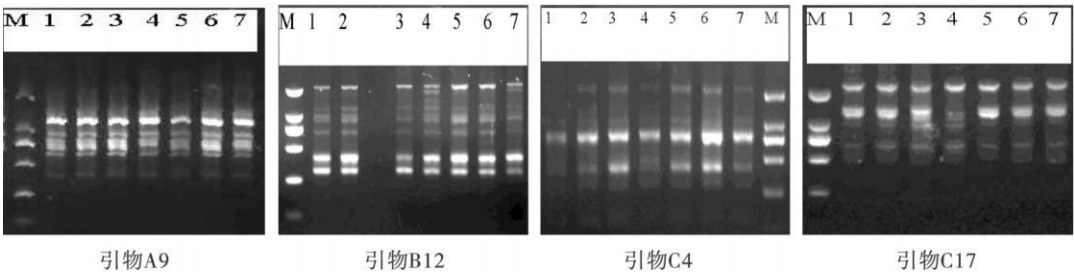


图 1 引物 A9、B12、C4 和 C17 对 7 个桃品种的 RAPD 扩增图谱

注: 数字 1~7 依次为锦黄 2 号、锦黄 3 号、锦黄 4 号、黄桃 19、黄金冠、锦绣和早凤王; M: 为 Marker DL 2000。

Fig. 1 Amplification patterns of primers A9, B12, C4 and C17 in the 7 peach cultivars by RAPD

Note: The numbers 1~7 in figure 1 represent jinhuang 2, jinhuang 3, jinhuang 4, huangtao 19, huangjuncun, jinxiu and zaofengwang; M: Marker DL2000.

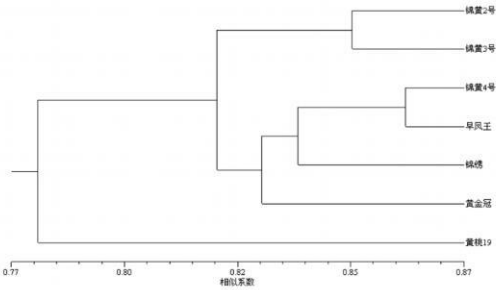


图 2 7 个黄桃品系的 RAPD 分析聚类树状图

Fig.2 Dendrogram of 7 peach varieties based on RAPD analysis

2.2 聚类分析

如图 2 所示, 采用 UPGMA 法构建遗传聚类树状

图, 相似系数范围在 0.78~0.86 之间。在相似系数 0.78 处, 黄桃 19 首先分离出来, 说明黄桃 19 和其余 6 个品系的桃的亲缘关系最远。其余 6 种可归为 2 类, I 聚类组中包括锦黄 2 号和黄金冠, 在 II 聚类组中含有锦黄 3 号、锦黄 4 号、早凤王和锦绣。说明新品种黄金冠和锦黄 2 号的关系最近, 其次是锦黄 3 号、锦黄 4 号、早凤王和锦绣, 和黄桃 19 的关系最远。

3 讨论

由于桃的栽培历史悠久, 桃的种质资源十分丰富, 国内外已有不少学者利用 RAPD 分子标记技术对桃的遗传多样性进行了分析, 在材料的分析和引物的选取上有一定差别。Warburton 等^[6] 和 Badenes 等^[14] 分别对美国和西班牙的桃品种进行了遗传多样性分析。杨新国等^[15] 采用 20 个引物分析了包括黄肉桃在内的 48 个桃

品种类型的亲缘演化关系, 将其分为 5 类: 甘肃桃、山桃、部分古老的北方蜜桃、硬肉桃为代表的北方品种, 以美国油桃为代表的油桃品种和以南方水蜜桃为代表的南方品种。对桃种质的演化及分类地位进行了尝试性的探讨。程中等^[16]用筛选的 22 个引物对桃属的 182 个桃变种进行了分析, 结果发现以水蜜桃、寿星桃、垂枝桃作为类群划分较明晰, 其它品种的分类划分则较困难, 说明原产中国的桃种质资源的遗传多样性极为丰富。

关于黄桃的研究 程中等^[17]采用 22 个引物对 37 个黄肉桃品系的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增, 通过扩增的 180 个位点的谱带的聚类, 建立了黄肉桃的分子检索表, 并提出了重点保存的黄肉桃种质, 其中锦绣也纳入了保存种质之列。孙萍等^[17]也是用 22 个引物对 44 个桃属植物品种进行了亲缘关系的分析, 黄肉桃类型中只包括锦绣。Zhongping C^[8]采用 22 个引物, 对 10 个类群的 180 个品种进行了的遗传多样性及其遗传结构的分析, 通过对所得的数据统计分析得出, 在类群的遗传多样性上表现为: 黄肉桃类>蜜桃类>蟠桃类>红叶桃类>硬肉桃类>碧桃类>水蜜桃类>油桃类>寿星桃类>垂枝桃类, 充分说明了黄桃类的遗传多样性及其丰富性。

该研究选取 7 个极具代表性的黄桃品系进行了 RAPD 分析。孟庆杰等^[3]从生物学形状上研究认为, ‘黄金冠’是从锦绣自然杂交得到的实生种。该试验利用分子生物学方法得出的结论是, ‘黄金冠’首先和锦黄 2 号聚为一类, 而后再和锦绣等聚在一起。这说明栽培种锦黄 2 号可能与 ‘黄金冠’的关系更近一些, 但鉴于其取样的数量和代表性, 其分类地位还有待于进一步分析。

参考文献

- [1] 汪祖华, 陆振翔, 陆秀华. 桃品种演化及分类研究—同工酶分析[J]. 园艺学报, 1990, 17(4): 241-247.
- [2] 汪祖华, 周建涛. 桃种质的亲缘演化关系—花粉形态分析[J]. 园艺

学报 1990 17(3): 161-168.

- [3] 孟庆杰, 黄勇, 王光全. 等. 罐藏. 鲜食兼用黄桃新品种 ‘黄金冠’[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 525.
- [4] Welsh J, McClelland M. Fingerprint genomic using PCR with arbitrary primers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 7213-7218.
- [5] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 6531-6535.
- [6] Warburton M L, Bliss F A. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients [J]. American Society for Horticultural Science, 1996, 121(6): 1012-1019.
- [7] 程中平, 陈志伟, 胡春根. 等. 黄肉桃种质资源的 RAPD 分析[J]. 遗传, 2003, 26(1): 49-56.
- [8] CHEN Z P. Genetic characterization of different demes in *Prunus persica* revealed by RAPD markers [J]. Scientia Horticulturae 2007; 242-247.
- [9] 蔡宇良, 李珊, 曹东伟. 等. 利用 DNA 扩增片段序列对樱桃种质资源的遗传分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 249-254.
- [10] Kolter B, Lehmann A, Mcdermott J M, et al. Identification of apple cultivars using RAPD markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 85: 901-904.
- [11] Shiran B, Amirbakhsh N, Kiani S, et al. Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers [J]. Scientia Horticulturae 2007, 111(3): 280-292.
- [12] 吴红, 常永义, 郝燕. 等. 利用 RAPD 标记研究部分葡萄品种的亲缘关系[J]. 果树学报 2008 25(6): 932-936.
- [13] 范国强, 李锋, 赵振利. 等. 悬铃木叶片 DNA 提取方法研究[J]. 河南农业大学学报, 2004, 38(1): 68-72.
- [14] Badenes M L, Martínez-Calvo J, Llácer G. Analysis of peach germplasm from Spain [J]. Acta Horticulturae 1998, 465: 243-250.
- [15] 杨新国, 张开春, 秦岭. 等. 桃种质亲缘演化关系的 RAPD 分析[J]. 果树学报, 2001, 18(5): 276-279.
- [16] 程中平, 陈志伟, 胡春根. 等. 桃遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 武汉植物学研究, 2002 20(2): 89-99.
- [17] 孙萍, 李唯, 姜寒玉. 等. 利用 RAPD 技术对桃属植物亲缘关系的分析[J]. 甘肃农业大学报 2005 40(5): 586-590.

RAPD Analysis of The Relative Relationship between ‘Huangjinguan’ and Other Varieties

FENG Hai-xia, MENG Qing-jie, GUO Shang-jing, WANG Guang-quan

(College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract: The relative relationship between Huangjinguan and other varieties were studied using RAPD technique. Fifteen primers out of 80 arbitrary primers generated a total of 84 bands of which 38 bands were polymorphic, and the polymorphic rate was 45.2 %. NTSYS software and UPGMA were used to calculate genetic similarity coefficient and cluster analysis. The results indicated that similarity coefficient was between 0.77 ~ 0.88. The relationship between ‘Huangjinguan’ and Qinhuang 2 was the nearest, while Huangtao 19 was far from the other.

Key words: Huangjinguan; variety; relative relationship; RAPD