

辽宁地区五种野生软枣猕猴桃 RAPD 遗传多样性分析

刘延吉¹, 耿书¹, 田晓艳²

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 辽宁石油化工大学 环境与生物工程学院, 辽宁 抚顺 113001)

摘要:以 CTAB 法提取的 5 种野生软枣猕猴桃基因组 DNA 为模板, 应用 RAPD 方法随机扩增多态性 DNA, 分析其亲缘关系。结果表明: 5 种软枣猕猴桃均表现出各自不同的多态性 RAPD 标记, 5 条单个引物分别扩增出一般为 4~6 条 RAPD 条带, 其分子量约在 250~2 000 bp 之间。依据这些多态性标记计算其种间遗传相似性, 建立了亲缘关系树形图。

关键词:软枣猕猴桃; RAPD; 亲缘关系

中图分类号:S 665. 303 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0130-03

野生软枣猕猴桃 (*Actinidia arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.) 为猕猴桃科浆果类果树, 俗称软枣子或园枣子, 是猕猴桃属中在中国地域分布最广泛的野生果树之一。野生软枣猕猴桃果实中丰富的次生代谢产物, 具有抗氧化性、抗病毒、抗疲劳、抗肿瘤和免疫调节等作用。对猕猴桃属植物种群内进行遗传结构变异的研究^[1-3]近些年成为热点。朱道圩等^[4]成功地将绿色荧光蛋白 (GFP) 基因导入了软枣猕猴桃原生质体, 并获得了瞬间表达。路文鹏等^[5]对东北原生种猕猴桃的软枣、狗枣及葛枣猕猴桃种质进行了 RAPD 研究并建立了指纹图谱。黄岳^[6]报道了长白山区野生软枣猕猴桃种 RAPD 分析。而辽宁地区的软枣猕猴桃在 RAPD 方面的研究鲜有报道。现以从辽宁收集的野生软枣猕猴桃叶片为材料, 研究软枣猕猴桃基因组 DNA 的最佳提取方法及确立软枣猕猴桃 RAPD 反应体系, 为鉴别辽宁地区及东北地区软枣猕猴桃品种差异提供简单而又准确的分子标记方法, 为进一步大规模研究软枣猕猴桃遗传多样性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

软枣猕猴桃叶片采自于辽宁本溪、抚顺、大连、鞍山、辽阳不同地区, 分别标记为 hw、hs、km、le1 和 hf, 其中 km 为雄性植株, 其余为雌性植株。从旺盛生长的 1 a 生新梢上取幼嫩的叶片, 用冰盒带回实验室, 液氮速冻后于 -20℃ 超低温冰箱中保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

DNA 的提取采用 CTAB 法, 参照 Sambrook^[7]略有改良。具体方法如下: 取约 200 mg 叶片, 在 -20℃ 预冷的研钵中迅速研磨成粉末状, 转入标记好的 1.5 mL Eppendorf 管中; 加入预热的裂解缓冲液 [2% CTAB, 1.42 mol/L NaCl, 80 mmol/L EDTA (pH 8.0), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2% 巯基乙醇] 500 μ L, 混匀。65℃ 水浴 30 min, 每隔 5 min 取出轻轻混匀; 加 500 μ L 氯仿/异戊醇 (24:1, V:V) 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min; 吸 350 μ L 上清液到 1 个新 Eppendorf 管中, 加 350 μ L 氯仿/异戊醇 (24:1, V:V) 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min; 吸取 200 μ L 上清液到一个新 Eppendorf 管中, 加入 200 μ L 预冷的无水乙醇, 轻轻混匀, -20℃ 静置 30 min; 12 000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 加入 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次; 吹风晾干至透明状, 溶于 50 μ L 1×TBE 中, -20℃ 保存。

1.3 PCR 及其产物检测

反应体系为 25 μ L, 其中 10×PCR Buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, 以重蒸馏水补充至 25 μ L。94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 38℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 的 EB) 进行电泳分离检测, 电泳缓冲液采用 0.5×TBE, 点样 8 μ L, 电泳电压 120 V, 电泳 40 min 左右, 在 UVP 公司的 GDS 8000 凝胶成像系统上观察并拍照记录。

1.4 数据统计分析

电泳图谱中的每条 RAPD 谱带可看作 1 个遗传位点, 根据每个分子标记的迁移率及其有无进行统计, 有带记为“1”, 无带记为“0”。用 POPGENE^[8] 软件计算各样品间的 Nei's 遗传距离^[9], 并应用 UPGMA 法构建聚

第一作者简介: 刘延吉 (1959-), 男, 辽宁大连人, 博士, 副教授, 研究方向为次生物质。E-mail: yanjiliu@yahoo.com.cn。

通讯作者: 田晓艳 (1971-), 女, 辽宁沈阳人, 硕士, 讲师, 研究方向为分子生物学。E-mail: maggietian2002@163.com。

基金项目: 抚顺市科技局“十一五”资助项目 (20091207)。

收稿日期: 2010-06-21

类分析图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 条带扩增结果

采用 35 个引物,对 5 种软枣猕猴桃基因组 DNA 进

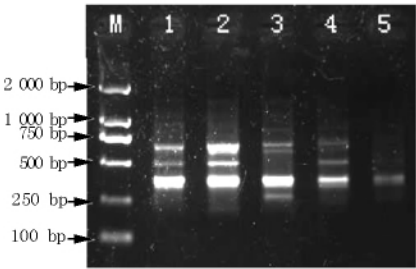


图 1 引物 S5 扩增的电泳结果

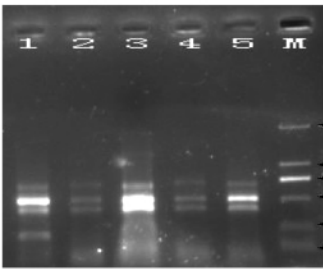


图 2 引物 S6 扩增的电泳结果

注:M:Marker;1:hw;2:hs;3:km;4:le1;5:hf,下同。

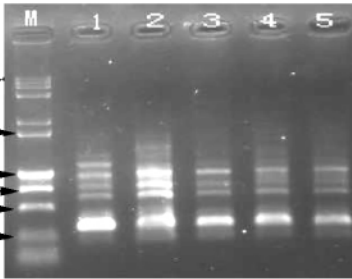


图 3 引物 S14 扩增的电泳结果

采用引物 S5 对雄性植株(km)、雌性植株(hw、hs、le1、hf)基因组 DNA 扩增出性别之间差异性的核苷酸片段(图 1)。雄性植株 km 的 DNA 扩增产物有 1 条大小约 255 bp 的特异性条带和 1 条大小约 700 bp 的特异性条带,而雌性植株(hw、hs、le1、hf)缺失这 2 条特异性条带;与雌性植株 hw、hs、le1 相比,雄株 km 明显缺失 1 条大小约 500 bp 的条带,但雌性植株 hf 也缺失这条带。因此,采用引物 S5 进行的 RAPD 标记,产生大小约 255 bp 和 700 bp 的 2 条特异性条带即为与软枣猕猴桃性别相关的基因标记,大小约 500 bp 的条带为参考条带,应用于辽宁地区软枣猕猴桃品种的性别鉴定。

hw 与其它 4 个品种(hs、km、le1、hf)相比,在引物 S6 扩增图上多 1 条大小约 250 bp 特异性条带(图 2);在引物 S14 扩增图上多 1 条大小约 1 200 bp 特异性条带(图 3)。这 2 条特异性条带说明 hw 在 DNA 水平上发生了一定范围的变异。S6 和 S14 引物可以快速将 hw 品种同其它 4 个品种鉴别开来。

2.2 种间的亲缘关系

根据 5 条单个引物在 5 个种出现的 RAPD 扩增条带,计算出不同个体间的扩增片段相似性(F)和遗传距离(P)(表 1)。

表 1 种间的 RAPD 片段相似性和遗传距离

	hw	hs	km	le1	Hf
hw	***	0.7778	0.6547	0.7274	0.7638
hs	0.2513	***	0.8001	0.8729	0.7638
km	0.4236	0.2230	***	0.7857	0.7143
le1	0.3183	0.1360	0.2412	***	0.8571
hf	0.2695	0.2695	0.3365	0.1542	***

注:对角线上为相似性,对角线下为遗传距离。

5 种个体进行扩增得到的遗传距离在 0.1360~0.4236 之间,平均遗传距离为 0.2623,相似性在 0.6547~0.8729 之间,这与乔金铎^[11]研究的软枣各品系间相似系

行了 RAPD—PCR 扩增检测,3 次重复^[10]。结果有 5 条引物能扩增出稳定的差异条带。条带数一般为 4~6 个,DNA 分子量大小介于 250~2 000 bp 之间。

数在 0.65~0.85 之间较为一致。遗传距离最小的是 hs 和 le1,仅为 0.1360;遗传距离最大的是 km 和 hw,为 0.4236。品种间遗传距离的差异可能受到地理距离、环境因子的影响所致。

2.3 种间亲缘关系聚类

根据种间的遗传距离,用 UPGMA 法对 5 个种间的近缘关系进行聚类分析获得树状图(图 4)。

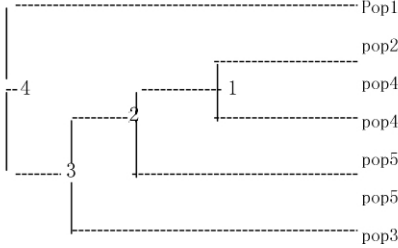


图 4 根据遗传距离构建的 5 种软枣猕猴桃的树形图

注:pop1:hw;pop2:hs;pop3:km;pop4:le1;pop5:hf。

从图 4 看出,5 种软枣猕猴桃可分成二类,hs 个体聚类成第 1 类,另 4 个个体聚成第 2 类。第 2 类中,雄性 km 与雌性的 hs、hf 有很大差异,这与表型观察一致。

3 结论

遗传多样性从理论上说是生物适应环境与进化的基础,就一个物种而言,种内遗传多样性愈丰富,该物种对环境变化的适应能力愈大、其进化的潜力也就愈大,也就愈有利于保持物种和整个生态系统的多样性^[12]。软枣猕猴桃作为辽宁及东北地区颇具开发潜力的经济作物,对其遗传多样性及其变化情况的研究是评估软枣资源质量、建立软枣人工繁殖和科学管理规范的重要基础工作。该试验的研究结果为辽宁地区软枣猕猴桃 RAPD 遗传分子标记的建立及软枣猕猴桃的遗传多样性提供了量化分析的有力手段。

参考文献

- [1] 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),2001,25(3):264-268.
- [2] 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.
- [3] Shirkot P,Sharma D R,Mohapatra T,et al. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var *deliciosa* by RAPD markers[J]. Scientia Horticulturae,2002,94(12):33.
- [4] 朱道圩,米银法,陈延惠,等. GFP 基因在软枣猕猴桃愈伤组织原生质体中瞬间表达的初步研究[J]. 河南农业大学学报,2003,37(2):145-148.
- [5] 路文鹏,李昌禹,曲炳章,等. 东北原生种猕猴桃种质 RAPD 研究[J]. 特产研究,2006,28(2):24-27.
- [6] 黄岳,朴一龙,王琳. 长白山野生软枣猕猴桃种质 RAPD 分析[J]. 延边大学农学学报,2009,31(2):119-123.
- [7] Sambrook J,David W. Bussel, I MolecularCloning: A LaboratoryManual [M]. Cold Sping Harbor Laboratory Press,2001:898-915.
- [8] Nei M. Genetic distance between Populations [J]. Am Natl,1972,106:283-292.
- [9] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE. Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis Release 1.31 [M]. Edmonton: University of Alberta,1999.
- [10] Pan Y B, Burner D M, Ehrlich K C, et al. Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR [J]. Biotechniques,1997,22(6):1071-1074,1076.
- [11] 乔金铎. 利用 RAPD 技术对吉林省重要果树资源的研究鉴定[D]. 北京:中国农业科学院研究生院,2007.
- [12] 施立明. 遗传多样性及其保存[J]. 生物科学信息,1990,2(1):158-164.

The Analysis of Genetic Diversity on Random Amplified Polymorphic DNA of Five *Actinidia arguta* Species in Liaoning Province

LIU Yan-ji¹, GENG Shu¹, TIAN Xiao-yan²

(1. Biotechnology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Environmental Technology and Biotechnology College, Liaoning University of Petroleum and Chemical Technology, Fushun, Liaoning 113001)

Abstract: The article assayed five *Actinidia arguta* species phylogenetic relationship through random amplified polymorphic DNA (RAPD) that taking them from five *Actinidia arguta* species genome with CTAB method. The results showed that every species had its own characteristic RAPD pattern and 5 single primers amplified 4~6 stripes of RAPD respectively, whose molecular weights range from 250~2 000 bp. According to the RAPD pattern, genetic similarity was calculated and a tree diagram of phylogenetic relationship was constructed.

Key words: *Actinidia arguta*; RAPD; phylogenetic relationship

国内目前唯一农化行业综合信息十日讯

Nong Hua Shi Chang

农 化 市 场 十 日 讯

专业、丰富、快捷、实用

《农化市场十日讯》是覆盖全国农化市场的专业性信息旬刊。

主要报导农药、肥料、农用化工原料、中间体、助剂、包装及机械等农化市场生产、流通、科技、服务等信息。

主要栏目:农化热线、要闻聚焦、市场纵览、营销企划、企业之窗、科技与产品、成果与专利、植保土肥、海外农化、会讯追踪、特约刊登、供求信息。

2011 年杂志及广告版面正在热订中……

通讯地址:江苏省南通市人民西路 366 号

邮编:226005

咨询订阅电话:0513-83556825、13809081381

传真:0513-83554785 QQ:394529587

E-mail:shirixun@126.com 网址:www.nh10.cn