

文章编号: 1000-5471(2008)01-0111-05

ISSR 标记技术在猕猴桃遗传研究中的运用^①

邹游, 黄敏, 侯若彤, 吴成, 杨志荣

四川大学生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065

摘要: 利用 ISSR 技术对采自四川省猕猴桃科研基地的 14 个猕猴桃品种进行了遗传多样性分析。通过引物筛选, 从 6 个 ISSR 引物中扩增出 103 条带, 其中 84 条为多态带, 占 82.41%。UPGMA 聚类分析结果揭示了各品种间的亲缘关系。ISSR 标记说明猕猴桃品种间遗传距离与地理分布有一定关系, 地理位置较近的材料能聚在一起。分子标记可用于猕猴桃种质资源的分类、鉴定及良种选育。

关键词: 猕猴桃; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: Q81

文献标识码: A

猕猴桃为多年藤本植物, 种类繁多, 全世界共有 66 个种, 约 118 个种下分类单位(变种、变型), 其栽培品种也比较多, 主要是中华猕猴桃和美味猕猴桃^[1]。我国是猕猴桃的原产地, 有着丰富的猕猴桃遗传资源。由于雌雄异株, 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研究的深入^[2-4]。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。猕猴桃资源的遗传背景复杂, 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^[5,6]。因此, 利用有效的分子标记技术, 对其遗传特异性及系统进化关系进行深入研究十分必要。

ISSR 是由 Zietkiewicz 等^[7]于 1994 年创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记, 目前已广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学研究中, 在玉米、小麦和水稻等作物的研究中也获得了广泛的应用。然而迄今为止, 在猕猴桃方面的研究还鲜有报道。故本文利用 ISSR 分子标记, 探讨了这种分子标记对于猕猴桃种质资源的遗传多样性, 旨在为猕猴桃遗传资源的鉴定及优良品质资源的发掘提供初步依据。

1 材料与方法

1.1 材料

猕猴桃红阳♀、红阳♂、红阳-1、红阳-2、79-1、79-3、武植三号、武植五号、武植六号、川猕一号、川猕二号、海沃德、秦美、红美等 14 个品种的幼叶叶片均采自四川省猕猴桃基地。用干燥剂将叶片干燥后置于-70℃冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

用 SDS 法提取猕猴桃基因组 DNA。具体操作如下: 取 0.5 g 嫩叶加液氮迅速研磨成粉末转入 1.5 mL 离心管中(每个样品做 3 管重复), 加入 600 μ L 65℃预热的 DNA 提取液(SDS 提取液: 100 \times 1 mmol/L Tris-HCl(pH 8.5), 20 \times mmol/L EDTA(pH 8.0), 100 \times mmol/L NaCl, 2% SDS, 3%可溶性 PVP, 0.1%偏重亚硫酸钠), 充分混匀。65℃水浴 60 min, 加入 150 μ L 的 5 mol/L KAc, 小心混匀, 冰浴 15

① 收稿日期: 2007-04-24

作者简介: 邹游(1982-), 男, 四川成都人, 硕士研究生, 主要从事现代遗传学与生物工程方向的研究。

通讯作者: 杨志荣, 教授, 博士生导师。

min 左右, 8 000 r/min 离心 15 min. 将上清转入到另一洁净的离心管中, 加入 600 μL 氯仿/异戊醇(24 : 1 V/V)洗涤, 8000 r/min 离心 15 min. 将上清转入到另一洁净的离心管中, 加入 2/3 体积异丙醇, 上下颠倒几次至白色絮状物产生, 冰浴 10 min, 10 000 r/min 离心 4 min. 弃上清, 加入 70%乙醇洗 2~3 次, 再用无水乙醇洗一次. 待 DNA 完全干燥后加入 100 μL TE, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下溶解, 充分溶解后加入 1 μL RNA 酶 A (AMRESCO 分装)(10×10^{-3} g/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 30 min. DNA 浓度用分光光度计检测, 稀释为 100×10^{-9} g/ μL -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存^[8-10].

1.2.2 ISSR 反应体系的优化

PCR 反应在 PCT-200 PCR 仪器上进行. 设计反应体系为: 总反应体积 20 μL , 其中模板 DNA 稀释 1, 5, 10, 20, 50 倍, 引物浓度为 1.5 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶浓度为 1, 1.5, 2, 5 U, dNTP 浓度 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mmol/L, MgCl_2 浓度为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L, $10 \times \text{Buffer}$ (Mg^{2+} free)为 2.0 μL . 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 7 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 30~50 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min. 45 个循环后, 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 7 min. 在此基础上对相关参数进行优化筛选^[11].

1.2.3 ISSR 产物观察

扩增产物用 6%的非变性聚丙烯酰胺(聚丙烯酰胺与双叉聚丙烯酰胺比例为 39 : 1)电泳分离, 然后用浓度 0.5×10^{-6} g/mL 溴化乙锭染色 30 min. 在紫外灯下观察电泳结果、照相.

1.2.4 引物的筛选

分别用“红阳♀”、“红阳♂”、“川猕一号”、“川猕二号”为模板. 用优化后的反应体系对购自加拿大 British Columbia 大学 100 条 ISSR 引物进行筛选. 经过 3 次重复, 选用扩增重复性好, 带清晰且较多的引物. 每个引物均设置不含模板 DNA 作空白对照.

1.2.5 ISSR 数据分析

图谱中的每一条带(DNA 片段)均为一个分子标记, 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, 仅在重复实验中能稳定出现的差异带用于数据分析.

不同品种间的随机扩增多态 DNA 片断相似性计算根据 Nei 等^[12]的公式:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

其中 F 为共享度, N_{xy} 为种 x 和种 y 所共有的片断数, N_x 和 N_y 分别为种 x 和种 y 所拥有的片断数. 任意两种间的遗传距离(P)根据两种的共享 ISSR 片断相似性来计算, 即 $P = 1 - F$. 根据遗传距离, 用 UPGMA 法对各个种之间的亲缘关系进行聚类分析.

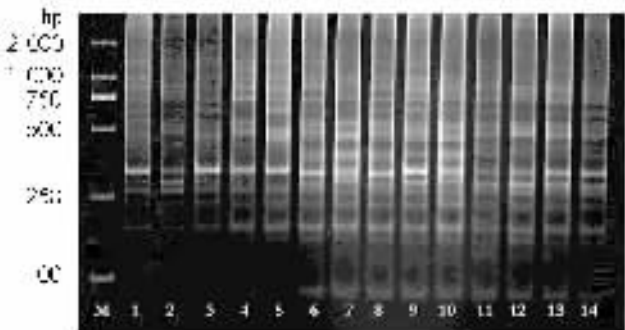
2 结果与分析

2.1 ISSR 反应体系的确定

经重复实验, 最终确定 PCR 反应体系为: 总反应体积 20 μL , 其中模板 DNA 浓度为 1.5 ng/ μL , 引物浓度为 1.5 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶浓度为 0.05 U/ μL , dNTP 浓度为 0.25 mmol/L, MgCl_2 浓度为 2.0 mmol/L, $10 \times \text{Buffer}$ (Mg^{2+} free)为 2.0 μL . 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 7 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 42 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min. 45 个循环后, 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 7 min.

2.2 随机引物的筛选及 DNA 扩增结果

利用 4 份材料进行预备试验, 从 100 个 ISSR 引物中选取 6 个条带清晰、反应稳定性好的引物进行 ISSR 正式试验. 实验结果显示, 6 个 ISSR 引物对 14 个猕猴桃品种分共扩增出 103 条带, 其中 84 条为多态带, 多态性为 82.41%, 每个引物扩增出 14~21 条带, 平均杂合度为 0.3141(表 1). 从图 1 可以看出引物 818 扩增的 DNA 条带.



1. 红阳♀; 2. 红阳♂; 3. 红阳-1; 4. 红阳-2; 5. 79-1; 6. 79-3; 7. 武植三号; 8. 武植五号; 9. 武植六号; 10. 川猕一号; 11. 川猕二号; 12. 海沃德; 13. 秦美; 14. 红美; M. 分子量标记.

图 1 引物 818 扩增的 DNA 条带

表 1 各引物组合扩增位点和多态位点个数、多态性位点比例及杂合度

引物	序列(5'~3')	扩增位点数	多态性位点数	多态性位点比例/%	杂合度
817	CACACACACACACACAA	19	17	89.47	0.342 1
818	CACACACACACACACAG	18	15	83.33	0.363 8
835	AGAGAGAGAGAGAGGCC	21	14	66.67	0.279 8
842	GAGAGAGAGAGAGACG	16	13	81.25	0.351 4
847	CACACACACACACAAC	14	12	85.71	0.327 3
849	GTGTGTGTGTGTGTCA	15	13	86.67	0.351 9
扩增位点总数		103	84		
平均数		17	14	82.41	0.314 1

2.3 各品种间的遗传距离

根据 6 条单个引物在 14 个猕猴桃品种出现的 ISSR 扩增条带, 计算出不同个体间的扩增片段遗传距离 (P) (表 2)。从表 2 可以看出, 各猕猴桃品种间的遗传距离在 0.187 2~0.621 5 之间, 红阳-1 与红阳-2 之间遗传距离最小(0.187 2), 其次是 79-1 与 79-3(0.215 5), 红阳-1 与海沃德之间遗传距离最大(0.621 5)。

2.4 各品种的亲缘关系聚类分析

根据品种间的遗传距离, 用 UPGMA 法对 14 个猕猴桃品种间的亲缘关系进行聚类分析获得聚类图 (图 2)。从图 2 可以看出, 红阳-1 与红阳-2 首先聚在一起, 79-3 与 79-1、武植五号与武植六号也分别聚在一起。所有猕猴桃品种可以聚为三大类, 红美单独一类, 川猕一号、川猕二号、海沃德与秦美聚为一类, 而其它 9 个品种可以聚为一类。

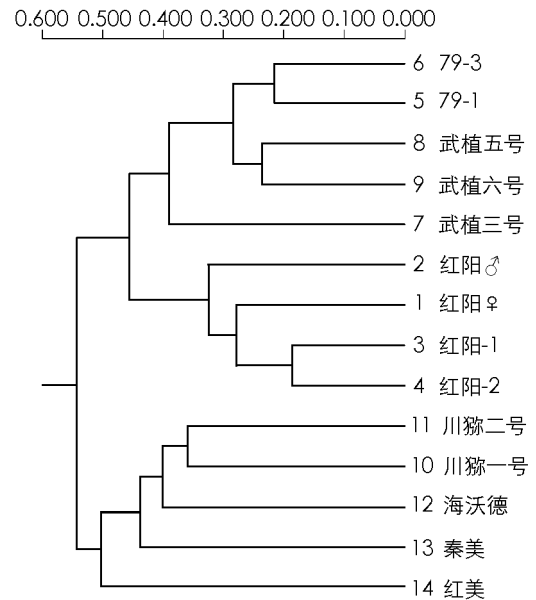


图 2 根据遗传距离构建的 14 个猕猴桃品种的聚类图

表 2 14 个猕猴桃品种的 ISSR 片段遗传距离

品种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.000 0													
2	0.316 9	0.000 0												
3	0.279 5	0.324 0	0.000 0											
4	0.279 5	0.324 0	0.187 2	0.000 0										
5	0.436 3	0.442 9	0.432 9	0.437 6	0.000 0									
6	0.443 2	0.398 3	0.455 8	0.455 8	0.215 5	0.000 0								
7	0.450 1	0.451 8	0.457 1	0.449 3	0.391 7	0.391 7	0.000 0							
8	0.442 1	0.448 5	0.447 9	0.447 9	0.283 3	0.283 7	0.380 4	0.000 0						
9	0.446 2	0.447 4	0.450 2	0.448 1	0.283 3	0.291 9	0.380 4	0.236 1	0.000 0					
10	0.523 2	0.517 2	0.523 3	0.509 8	0.53 0	0.523 4	0.531 7	0.524 7	0.518 8	0.000 0				
11	0.501 8	0.508 7	0.513 2	0.494 3	0.532 5	0.517 8	0.523 2	0.514 7	0.536 8	0.359 1	0.000 0			
12	0.524 7	0.523 1	0.621 5	0.587 8	0.534 3	0.580 4	0.538 9	0.565 2	0.573 4	0.400 8	0.400 8	0.000 0		
13	0.531 2	0.501 9	0.513 2	0.512 7	0.547 9	0.523 0	0.515 5	0.492 3	0.501 7	0.437 8	0.435 1	0.429 4	0.000 0	
14	0.572 1	0.563 4	0.571 1	0.572 6	0.545 6	0.537 8	0.549 1	0.521 2	0.529 5	0.491 3	0.503 2	0.497 3	0.501 1	0.000 0

3 讨论

ISSR 是以加锚 SSR 寡聚核苷酸为引物, 对位于反向排列的 SSR 之间的 DNA 序列进化 PCR 扩增, 而不是扩增 SSR 本身^[13]。ISSR 引物中包含有一定长度的重复序列, 与它结合的目标序列在 DNA 复制的过

程中存在滑动和不均等交换现象,使得它们在不同品种或个体间的重复次数存在较大差异更易于导致引物结合位点和两结合位点间的片段长度产生差异^[14]. ISSR 本身不需知道 DNA 序列即可进行 PCR 扩增,在引物设计上比 SSR 简单. ISSR 由于引物序列较长,退火温度较高,因此试验的重复性较好,稳定性较高.与 FRLP、RAPD、SSR 相比,ISSR 可揭示更多的多态性,现已在遗传多样性、起源进化、系统发育等方面得到广泛应用.

本试验进行 ISSR 标记时,在进行大量样品实验前先进行了 ISSR 反应条件的优化,在最适反应条件下,为避免其它随机因素的影响,对反应条件进行了精确的控制,并确保使用同一批次的 Taq 酶和同一台 PCR 仪,选取部分样品进行了重复实验.结果表明,在 ISSR 最适反应条件下,ISSR 实验有较好的重复性和稳定性.最终利用 ISSR 标记有效地检测出了猕猴桃的遗传多样性,即猕猴桃遗传多样性较高.对检测猕猴桃的遗传多态性来说,ISSR 标记是一种非常有效的工具.

在这 14 个猕猴桃品种当中,红美属于彩色猕猴桃种,单独一类与预期相符;川猕一号、川猕二号、海沃德和秦美属美味猕猴桃(*A. deliciosa*),其余 9 个品种均属中华猕猴桃(*A. chinensis*). 79-1、79-3、武植三号、武植五号、武植六号为已培育具有稳定遗传学特性的猕猴桃品种,其亲本原产地均来自江西省,在聚类图中,他们亲缘关系较近.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^[15]. 红阳-1、红阳-2 为红阳♀与红阳♂的子代,故这两种品种遗传距离最小.彩色猕猴桃为美味猕猴桃的红心变种,数量稀少,十分珍贵,是中国特有的种质资源,具有重要的育种价值.

弄清物种的遗传多样性对资源开发和保护以及遗传育种都有重要意义.传统生物学分类是以幼苗、成年植株、花器、果实及种子等的植物学特征和物候期、开花结果习性等生物学特性为分类依据^[16].但其形态学特征易受到环境因子的影响变得不易区分.采用 ISSR 分子标记以 PCR 扩增条带的有无为原始依据进行聚类分析,排除了传统形态分类学上形态特征不易区分的干扰,从 DNA 水平上揭示猕猴桃遗传多样性,探讨基因在各种群的动态分布.该方法可结合生态因子筛选出适合分布区内不同区域生长的猕猴桃优良类型,为猕猴桃的遗传育种提供理论依据,为合理利用和保护猕猴桃资源奠定基础.

参考文献:

- [1] 朱道圩. 猕猴桃遗传育种研究现状与展望 [J]. 河南农业大学学报, 1995, 29(4):328-336.
- [2] 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):102-105.
- [3] 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 Horticulturae, 1999, 498:71-78.
- [4] Messina R, Testolin R, Morgante M. Isozymes for cultivar identification in kiwifruit [J]. Hort Science, 1991, 26(7):899-902.
- [5] 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.
- [6] Huang H W, Fenny D, Wang H Z, et, al. Isozyme inheritance and variation in Actinidia [J]. Heredity, 1997, 78:328-336.
- [7] Bechker S. The constant elasticity of variance model and its implications for option pricing [J]. The Journal of Finance, 1980, 35(3):61-73.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 第 2 版. 北京:科学出版社, 2002:742-749.
- [9] 罗志勇, 周钢, 陈湘晖, 等. 高质量植物基因组 DNA 的分离 [J]. 湖南医科大学学报, 2001, 26(2):178-180.
- [10] 陈挂信, 潘东明, 吕柳新, 等. 果树核 DNA 提取、目的基因分离与克隆技术研究进展 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(1):44-50.
- [11] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et, al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acides Res, 1990, 18:6531-6535.
- [12] Harada M, Yenbutra S, Yosida TH. Cytogenetical Study of Rhinolophus Bats (Chiroptera, Mammalia) from Thailand [J]. Proc

Japan Acad, 1985 (61): 455 - 458.

- [13] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. 遗传, 2002, 24(5): 613 - 616.
- [14] 余 艳, 陈海山, 葛学辉. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15 - 19.
- [15] 陈万秋, 李思光, 罗玉萍. 分子标记在猕猴桃属植物中的研究进展 [J]. 江西科学, 2001, 19(3): 162 - 165.
- [16] 李瑞高, 梁木源, 李洁维, 等. 猕猴桃属植物生物学特征特性观察 [J]. 广西植物, 1996, 16(3): 265 - 272.

Analysis on Inter-Simple Sequence Repeats in 14 *Actinidia* Varieties

ZOU You, HUANG Min, HOU Ruo-tong,
WU Cheng, YANG Zhi-rong

Key Laboratory of Bio-resource and Ecological Environment of the Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065 China

Abstract: Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) was applied to detect genetic diversity of the samples of 14 *Actinidia* varieties collected from the Centre of Kiwifruit Research and Development, Sichuan Natural Resources Research Institution. 6 ISSR primers produced 103 bands, of which 84 bands were polymorphic. The polymorphic bands accounted for 82.41% of the total bands. UPGMA (Un-weighted Pair Group Mathematics Average) clustering analysis displayed the genetic relation among the varieties. The ISSR markers indicated that the genetic distance of *Actinidia* varieties was related with their distribution, and some of them distributing closely could get together. Molecular markers could be used for classifying and identifying the germplasms of *Actinidia*, as well as for breeding of fine varieties.

Key words: *Actinidia*; ISSR; genetic diversity

责任编辑 胡 杨