

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!。"本#利用 ISSR 分子标记, \$%了这种分子标记对于猕猴桃种质资源的遗传多样性, &在为猕猴桃遗传资源的鉴定及'良品资源的()提供* +, - .

1 材料与方法

1.1 材料

猕猴桃. / ♀、. / ♂、. / -1、. / -2、79-1、79-3、O 植 1 2、O 植 3 2、O 植 4 2、川猕-2、川猕 5 2、6 7 8、9 美、. 美等 14 个品种的: ; ; < = 采自四川省猕猴桃基地。用 > ? @ A ; < > ? B 置于 -70 °C D E 用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

用 SDS 法提 F 猕猴桃基因组 DNA. G 体 H 作 I 下: F 0.5 g J ; K L M N O 研 P 成 Q R S 入 1.5 mL 离 T U 中 (V 个样品 W 3 U 重复), K 入 600 μL 65 °C X Y 的 DNA 提 F L (SDS 提 F L: 100×1 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 20×mmol/L EDTA (pH 8.0), 100×mmol/L NaCl, 2% SDS, 3% 可 Z 性 PVP, 0.1% [重] ^ _), ' 分 a b. 65 °C 水 c 60 min, K 入 150 μL 的 5 mol/L KAc, 小 T a b, C c 15

① defg: 2007-04-24

作 h 简 i: j k (1982-), l, 四川成都 m, n o 研究生, 主要从 p q r 遗传学与生物 s 程方 t 的研究。通 u 作 h: v w x, 教 y, z o 生 { | .

min } ~ , 8 000 r/min 离 T 15 min. A 上清 S 入 一 的离 T U 中, K 入 600 μL / 异 (24 : 1 V/V) , 8000 r/min 离 T 15 min. A 上清 S 入 一 的离 T U 中, K 入 2/3 体 异 , 上下 色 状物产生, Cc 10 min, 10 000 r/min 离 T 4 min. 上清, K 入 70% 2~3 , 用 水 一 . DNA 全 > ? BK 入 100 μL TE, 4 °C 条 下 Z 解, ' 分 Z 解 BK 入 1 μL RNA A (AMRESCO 分)(10×10⁻³ g/mL), 37 °C 条 下 置 30 min. DNA 度用分 度 , 为 100 ×10⁻⁹ g/μL -20 °C CD 中 [8-10].

1.2.2 ISSR 反应体系的优化

PCR 应在 PCT-200 PCR 上进行. 应体系为: 应体 20 μL, 其中 DNA 1.5,10,20,50 倍, 引物 度为 1.5 μmol/L, Taq DNA 聚 度为 1,1.5,2,5 U, dNTP 度 0.1,0.25, 0.5,0.75 mmol/L, MgCl₂ 度为 1.0,1.5,2.0,2.5 mmol/L, 10×Buffer (Mg²⁺ free) 为 2.0 μL. 应程 序为: 94 °C X 变性 7 min, 94 °C 变性 30 s, 30~50 °C 复性 45 s, 72 °C 2 min. 45 个 环 B, 在 72 °C 7 min. 在此基 上对 关 数进行' 化筛选[11].

1.2.3 ISSR 产物观察

扩增产物用 6% 的 变性聚 (聚 与 聚 比 为 39 : 1) 分离, 然 B 用 度 0.5×10⁻⁶ g/mL 化 染色 30 min. 在 下 结果、 .

1.2.4 引物的筛选

分 用“ . / ♀ ”、“ . / ♂ ”、“川猕-2”、“川猕52”为 . 用' 化 B 的 应体系对 自 K 大 British Columbia 大学 100 条 ISSR 引物进行筛选. 经过 3 重复, 选用扩增重复性 , 带清 且较多的引 物. V 个引物 = 置不 DNA 作 对 .

1.2.5 ISSR 数据分析

图 中的 V 一条带 (DNA <) = 为一个分子标记, r 1 个引物结 点. - 各分子标记的有 及其 统得 有位点的 5 数 - , 带 (性) 为 0, 有带 (性) 为 1 (带和 带的 = 为 1). 对于多态位点, 在重复实验中能 定出 q 的 异带用于数 - 分析.

不 品种间的 扩增多态 DNA < 性 - Nei 等[12] 的 式:

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

其中 F 为共 度, N_{xy} 为种 x 和种 y 共有的 < 数, N_x 和 N_y 分 为种 x 和种 y 有的 < 数.

种间的遗传距离 (P) - 种的共 ISSR < 性 , P = 1 - F. - 遗传距离, 用 UPGMA 法对各个种 间的亲缘关系进行聚类分析.

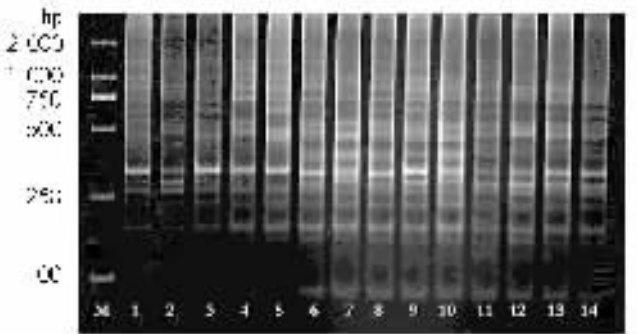
2 结果与分析

2.1 ISSR 反应体系的确定

经重复实验, 定 PCR 应体系为: 应体 20 μL, 其中 DNA 度为 1.5 ng/μL, 引物 度为 1.5 μmol/L, Taq DNA 聚 度为 0.05 U/μL, dNTP 度为 0.25 mmol/L, MgCl₂ 度为 2.0 mmol/L, 10×Buffer (Mg²⁺ free) 为 2.0 μL. 应程 序为: 94 °C X 变性 7 min, 94 °C 变性 30 s, 42 °C 复性 45 s, 72 °C 2 min. 45 个 环 B, 在 72 °C 7 min.

2.2 随机引物的筛选及 DNA 扩增结果

利用 4 材料进行 X E 验, 从 100 个 ISSR 引 物中选 F 6 个条带清 、 应 定性 的引物进行 ISSR 式 验. 实验结果 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%, V 个引物扩增出 14~21 条 带, 平 = 杂 度为 0.3141(1). 从图 1 可 出引 物 818 扩增的 DNA 条带.



1. . / ♀ ; 2. . / ♂ ; 3. . / -1 ; 4. . / -2 ; 5. 79-1 ; 6. 79-3 ; 7. 0植 1 2 ; 8. 0植 3 2 ; 9. 0植 4 2 ; 10. 川猕-2 ; 11. 川猕 5 2 ; 12. 6 7 8 ; 13. 9 美 ; 14. . 美 ; M. 分子 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、多态性位点比例及杂合度

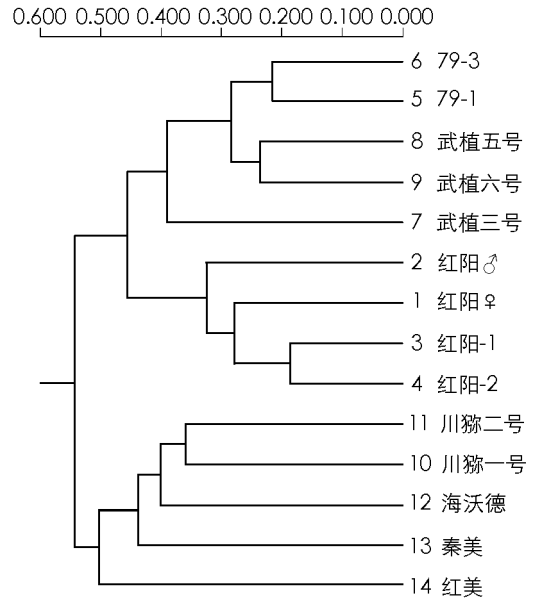
引物	序列(5'~3')	扩增位点数	多态性位点数	多态性位点比 /%	杂 度
817	CACACACACACACACAA	19	17	89.47	0.342 1
818	CACACACACACACACAG	18	15	83.33	0.363 8
835	AGAGAGAGAGAGAGGCC	21	14	66.67	0.279 8
842	GAGAGAGAGAGAGACG	16	13	81.25	0.351 4
847	CACACACACACACAAC	14	12	85.71	0.327 3
849	GTGTGTGTGTGTGTGTC	15	13	86.67	0.351 9
扩增位点 数		103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

2.3 各品种间的遗传距离

- 6 条单个引物在 14 个猕猴桃品种出 q 的 ISSR 扩增条带, 出 不 个体间的扩增 < 遗传距离 (P) (2). 从 2 可 出, 各猕猴桃品种间的遗传距离在 0.187 2~0.621 5 间. . / -1 与 . / - 2 间遗传距离 小(0.187 2), 其 是 79-1 与 79-3(0.215 5), . / -1 与 6 7 8 间遗传距离 大 (0.621 5).

2.4 各品种的亲缘关系聚类分析

- 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 出, . / -1 与 . / -2 聚 在一起, 79-3 与 79-1、O 植 3 2 与 O 植 4 2 也分 聚在一起. 有猕猴桃品种可 聚为 1 大类, . 美单 一类, 川猕-2、川猕 5 2、6 7 8 与 9 美聚为一 类, 而其 9 个品种可 聚为一类.



E 2 J B K L M N O P 1 14 Q R S T U V 1 W X E

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 K SSR 聚 ^ 为引物, 对位于 t 列的 SSR 间的 DNA 序列进化 PCR 扩增, 而不是扩增 SSR 本身^[13]. ISSR 引物中包 有一定长度的重复序列, 与 结 的目标序列在 DNA 复制的过

Z存 %& 均 ' (现) , * 它+ 同HI , G j FO 次存 | # 差 - . 导/V& e合z 1 两e合z 1j F 片段# %差 [14]. ISSR ! O1道DNA 即 JK PCR [\ , V&设计 SSR . ISSR V& | # , 234 | 5, 试3FO Q| 好, 稳yQ| 5.) FRLP、RAPD、SSR相 , ISSR gh- OFO* Q, 现 MNO PQ、 (J 、n 发. 到 8.

试3JK ISSR op 6, JK # 量PH23 先JKL ISSR 反 ^ 件F 优 , 最7反 ^ 件 , a89' 它随机 : F , ; 反 ^ 件JKL; 确F < \$, 并确保* 8同x = 次F Taq 酶 同x > PCR 仪, X取/RPHJKLO 23. ef 表r , ISSR 最7反 ^ 件 , ISSR 23w| 好FO Q 稳yQ. 最终78 ISSR op w E 检测] L?@AFMNO PQ, 即?@AMNO PQ| 5. ; 检测? @AFMNO* Q来q, ISSR op xI 非?w F 工具.

14G?@AHI @Z, 红 A B ?@AI , 独xd) 预期相C; " ? x 号、" ? 二号、海沃德 秦 A ?@A(A. *deliciosa*), ' D9GHI 均AZ ?@A(A. *chinensis*). 79-1、79-3、武三号、武 五号、武 六号a . 具w稳yMNS\$ QF?@AHI , ' k E 均来=EF > , cd Z, G+kl mn| } . ?@AA , H授粉 &, I ' Q| #, 故' MNS t #) ' EuRvJ} 正相m[15]. 红阳-1、红阳-2 a 红阳♀) 红阳♂F 代, 故 两I HI MNS t 最 . B ?@Aa ?@AF 红心 I , 量稀 , RKL, Z wFI ' (, 具wO F . IM值.

N &I FMNO PQ; ' (O发 保P以 MN. I 6wO 意Q. N %&\$Rd 以幼R、5 、H器、f 2 I F &\$ S &T期、OHe f UQ %&\$ QaRd 依据[16]. V' W * \$ S. X到+, F . R. < 8 ISSR R op以 PCR [\ ^ _ Fw无a Y 依据J KcdRS, 排ZLN W* Rd\$ W* S . RF干[, Y DNA gh?@AMNO PQ, 探讨D i I \ F &* Rv.] e合%* WX] 7合Rv ^ 同 _%# F?@A 优 d , a?@AFMN. I u' 依据, a合u78 保P?@A' (ayD 础.

参考文献:

[1] b道c. ?@AMN. IC 现) de [J]. fghi # \$\$, 1995, 29(4):328-336.

[2] j k, l m, nop, . Z ?@AA &叶表qrsW* S 量RdRS [J]. &Rd\$, 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] tuv. ?@AI j I 三 W* \$ w Rx 观察[J]. &C , 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] ymz, { | . &D 工 [M]. } 2 ~ . :B\$) ~ , 2002:742-749.

[9] 志 , , , . 5 量 &D DNA FRt [J]. g B# \$\$, 2001, 26 (2):178-180.

[10] , r, , . f 核DNA 取、FD Rt) 9: C J d [J]. hz # \$\$ (= B \$ ~), 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