

# 悬钩子属植物的 RAPD 分析

贾静波<sup>1</sup>, 李维林<sup>1,①</sup>, 吴文龙<sup>1</sup>, 阎连飞<sup>1</sup>, 郭巧生<sup>2</sup>

[1. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095]

**摘要:** 用 RAPD 标记技术对 13 个黑莓 (blackberry)、树莓 (raspberry) 品种和 5 个野生悬钩子种类 (*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%, 表明悬钩子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 A 组有粗叶悬钩子 (*R. alceaefolius* Poir.)、山莓 (*R. corchorifolius* L.)、插田泡 (*R. coreanus* Miq.)、掌叶覆盆子 (*R. chingii* Hu)、『威廉姆特』、『托拉咪』、『泰勒』、『金克维』、『布里斯托』、『宝森』7 号、『布莱兹』及其实生苗、『基奥瓦』、『萨尼』、『黑布特』等 15 个居群; B 组包括『宝森』1 号~『宝森』6 号和『马林』、『乔克多』等 8 个居群; C 组包括『赫尔』和『切斯特』的 2 个居群; D 组仅有蓬蘽 (*R. hirsutus* Thunb.) 1 种。这一聚类结果与传统形态学分类结果基本吻合。

**关键词:** 悬钩子属; 黑莓; 树莓; RAPD; 聚类分析

中图分类号: S663.2; Q347 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)03-0018-05

**RAPD analysis of *Rubus* spp.** JIA Jing-bo<sup>1</sup>, LI Wei-lin<sup>1,①</sup>, WU Wen-long<sup>1</sup>, LÜ Lian-fei<sup>1</sup>, GUO Qiao-sheng<sup>2</sup> (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Traditional Chinese Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(3): 18-22

**Abstract:** The genetic diversity of twenty-six populations including thirteen cultivars of blackberry and raspberry and five wild species of *Rubus* L. were analyzed by RAPD technique. The results show that 131 bands are amplified by fifteen oligonucleotide random primers, and there are 118 polymorphic bands that account for 90% of the total amplified bands, which indicated that there are abundant genetic diversity among species and cultivars of *Rubus*. The twenty-six populations can be divided into four groups according to the cluster analysis result of RAPD bands. Group A includes *R. alceaefolius* Poir., *R. corchorifolius* L., *R. coreanus* Miq., *R. chingii* Hu, 『Willamette』, 『Tulameen』, 『Taylor』, 『Kivigold』, 『Bristol』, No. 7 of 『Boysen』, 『Brazos』, 『Brazos』 seedlings, 『Kiowa』, 『Shawnee』 and 『Blackbutte』; group B includes Nos. 1-6 of 『Boysen』, 『Marion』 and 『Choctaw』; group C includes 『Hull』 and 『Chester』; group D only includes *R. hirsutus* Thunb. It is suggested that this cluster result is basic coincidence with the morphological taxonomic results of *Rubus* L.

**Key words:** *Rubus* L.; blackberry; raspberry; RAPD; cluster analysis

中国有悬钩子属 (*Rubus* L.) 植物 204 种 100 变种, 其中包括 138 个特有种, 大多数为野生种类。秦巴山区分布有悬钩子属植物 38 种 12 变种, 包括特有种 6 种 3 变种<sup>[1]</sup>。由于广泛的杂交、多倍化和无融合生殖, 使得悬钩子属植物的种间和种内分化复杂多样、类型错综混乱, 给悬钩子属的系统分类带来极大困难。悬钩子属被植物分类学家公认为分类上的难点属, 有关该属植物的分子系统学和进化遗传学的报道非常有限。对黑莓、树莓品种及其优良野

生种质间遗传关系的研究有助于了解其遗传背景和亲缘关系, 可为悬钩子属植物的系统分类研究和育种过程中亲本的选择提供参考依据。

收稿日期: 2007-12-27

基金项目: 江苏省高技术研究项目 (BG2007311); 国家科学技术部农业科技成果转化资金项目 (2007GB2C100118); 江苏省星火计划项目 (X2007001)

作者简介: 贾静波 (1981-), 女, 山西应县人, 硕士, 主要研究方向为园艺学。

① 通讯作者 E-mail: lwlcnb@ mail. cnbg. net

作者采用 RAPD 分子标记技术对引进的黑莓 (blackberry)、树莓 (raspberry) 品种和部分代表性野生悬钩子种类进行了遗传多样性分析,以期在分子水平上对其遗传背景和亲缘关系进行探讨,为进一步的育种工作提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验材料包括8个黑莓品种、5个树莓品种、1个黑莓和树莓的杂交品种和5个野生悬钩子种类,共26个居群。其中,树莓品种为:‘威廉姆特’(‘Willamette’)、‘托拉咪’(‘Tulameen’)、‘泰勒’(‘Taylor’)、‘金克维’(‘Kivigold’)和‘布里斯托’(‘Bristol’);黑莓品种为:‘赫尔’(‘Hull’)、‘切斯特’(‘Chester’)、‘布莱兹’(‘Brazos’)及其实生苗居群、‘基奥瓦’(‘Kiowa’)、‘马林’(‘Marion’)、‘乔克多’(‘Choctaw’)、‘黑布特’(‘Blackbutte’)和‘萨尼’(‘Shawnee’);黑莓与树莓的杂交品种为‘宝森’(‘Boysen’),有7个居群,即‘宝森’1号至‘宝森’7号(其中2个居群为变异类型,5个为不同的实生苗居群);野生种类为蓬蘽 (*Rubus hirsutus* Thunb.)、粗叶悬钩子 (*R. alceaefolius* Poir.)、山莓 (*R. corchorifolius* L.)、掌叶覆盆子 (*R. chingii* Hu) 及插天泡 (*R. coreanus* Miq.)。供试的黑莓和树莓品种均引种于美国,供试的野生种类采自中国的江苏省和福建省。所有种源均种植于江苏省·中国科学院植物研究所悬钩子种质圃以及黑莓和树莓品种资源圃内。

所用仪器有 Biometra T1 Thermocycler 型 PCR 仪、Sigma 3K18 型高速冷冻离心机、DYY-III 33A 型水平电泳槽、Amersham Pharmacia Biotech EPS 30 型电泳仪、Amersham Pharmacia Biotech 凝胶成像系统、紫外分光光度计和核酸蛋白测定仪。

实验用琼脂糖、*Taq* DNA 聚合酶、RNase A、寡聚核苷酸随机引物及 *d*NTP 等试剂均购自南京生兴生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取与检测 分别取供试居群的幼嫩新叶 1 g,洗净晾干,在液氮中研磨粉碎,参照 CTAB 区室法<sup>[2]</sup>提取基因组 DNA,用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测所提取的基因组 DNA

纯度<sup>[3]</sup>。

1.2.2 引物的筛选 选取30个长度为10 bp的寡聚核苷酸随机引物,对部分黑莓、树莓品种和悬钩子种类的基因组 DNA 进行预扩增,从中筛选出15条条带清晰、多态性高、重复性好且稳定性强的随机引物,用于进一步的 RAPD 标记分析。

1.2.3 RAPD-PCR 经过预实验,选择条带清晰、多态性丰富的 DNA 样品,用引物 H-1 进行 RAPD-PCR 扩增,设置不同的  $Mg^{2+}$  和 *d*NTP 浓度及退火温度 (35 °C ~ 39 °C),摸索扩增反应的最佳条件,最终确定悬钩子属植物的 RAPD-PCR 最佳反应体系为:总体积 20  $\mu$ L,其中包括 2.0  $\mu$ L 10 × Buffer、1.6  $\mu$ L 1 mol · L<sup>-1</sup>  $MgCl_2$ 、0.1  $\mu$ L 5 U · mL<sup>-1</sup> *Taq* DNA 聚合酶、1.2  $\mu$ L 2.5 mmol · mL<sup>-1</sup> *d*NTP、4.0  $\mu$ L 5  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> 引物和 20 ng 模板 DNA,双蒸水补齐至 20  $\mu$ L。

扩增程序为:95 °C 预变性 5 min;然后于 94 °C 变性 1 min、35 °C ~ 39 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 2 min,共 36 个循环;最后于 72 °C 延伸 7 min,扩增产物于 4 °C 保存。

采用上述扩增体系及扩增程序对供试样品的基因组 DNA 进行扩增,扩增反应结束后,用质量体积分数 1.2% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 1 × EB) 进行电泳以分离扩增产物。电泳结束后,用自动凝胶成像系统观察并拍照记录。

### 1.3 数据记录与统计分析

统计凝胶上的扩增条带,按照清晰易辨、重复、稳定的原则读带,有条带的记为“1”,同一位置没有条带则记为“0”,以此形成 RAPD 表型数据矩阵。统计每个引物扩增出的条带总数和其中的多态性条带数,并计算多态性条带百分率。用 NYSYS 分析软件中的 SM 方法计算任意 2 个居群间的遗传相似系数 (*SI*),并根据公式  $DS = 1 - SI$  计算遗传距离 (*DS*)。根据各居群间的遗传距离,采用 UPGMA 聚类分析方法建立不同居群间的遗传关系树状图。

## 2 结果和分析

### 2.1 RAPD 扩增产物的多态性分析

采用 15 个寡聚核苷酸随机引物对供试的悬钩子属植物 26 个居群的基因组 DNA 进行 RAPD-PCR 扩增反应,扩增结果见表 1,其中引物 H-3 对

表1 用于悬钩子属植物 RAPD 扩增的引物序列及多态性分析<sup>1)</sup>  
Table 1 The primer sequences used in RAPD analysis of *Rubus* spp. and polymorphism analysis<sup>1)</sup>

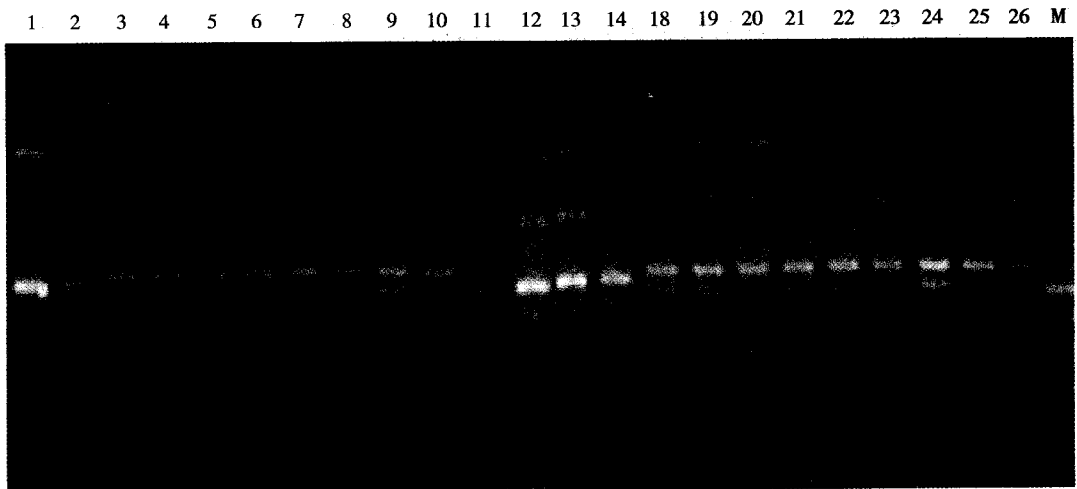
引物 Primer	5'→3'序列 5'→3' sequence	N	Np	PPB/%
H-1	GCCATGACCT	10	8	80.0
H-2	TGGCGCTCAA	11	10	90.9
H-3	CCAGCAGCTT	12	11	93.8
H-4	GACTGCACAC	10	9	91.7
H-5	ACGCAGGCAC	8	8	100.0
H-6	AGCCGGAAC	7	6	85.7
H-7	AGCAGGTGGA	6	4	66.7
H-8	ACGATGAGCC	7	6	85.7
H-9	GGCGGTACT	9	8	88.9
H-10	GTGACAGGCT	9	9	100.0
H-11	AAGAGAGGG	9	8	88.9
H-12	AGCTGCAGG	8	8	100.0
H-13	AGCTGAGCC	8	8	100.0
H-14	ACCACCCACC	10	9	90.0
H-15	TGGTGGACCA	7	6	85.7
合计 Total		131	118	
平均 Mean		8.7	7.9	89.87

<sup>1)</sup> N: 扩增条带数 Number of amplified band; Np: 多态性条带数 Number of polymorphic band; PPB: 多态性条带百分率 Percentage of polymorphic band.

26个居群基因组DNA的扩增图谱见图1。由表1可以看出,用15个寡聚核苷酸随机引物在26个居群的基因组DNA样品中共扩增出DNA条带131条,扩增得到的DNA片段长度为250~3500bp,其中多态性条带118条,占扩增条带总数的90%;各引物扩增出的DNA条带数为6~12条,平均每个引物扩增的条带数为8.7条,每个引物扩增的多态性条带平均数为7.9条。实验结果表明,供试的悬钩子属植物26个居群间具有较丰富的遗传多样性。

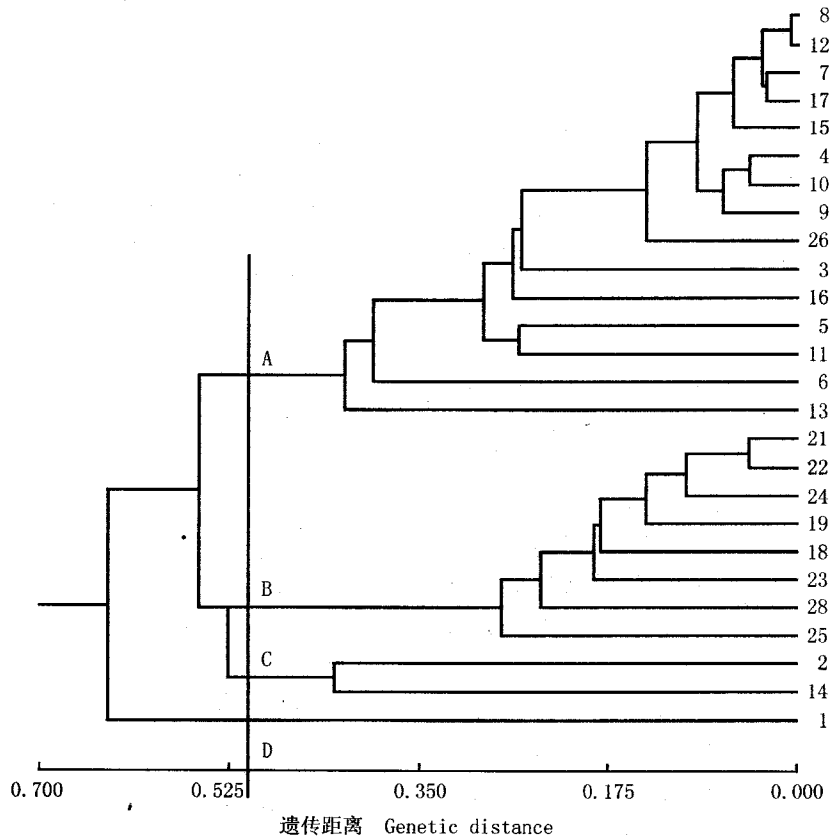
## 2.2 基于RAPD扩增结果的聚类分析

以RAPD扩增结果为基础,根据供试的悬钩子属植物26个居群间的遗传距离进行UPGMA聚类分析,获得的UPGMA树系图见图2。在聚类图上取 $\lambda = 0.510$ ,可将26个居群划分为4组。A组包括野生种类粗叶悬钩子、山莓、插田泡和掌叶覆盆子,树莓品种‘威廉姆特’、‘托拉咪’、‘泰勒’、‘金克维’和‘布里斯托’,黑莓品种‘基奥瓦’、‘萨尼’、‘黑布特’和‘布莱兹’及其实生苗,黑莓与树莓的杂交品种‘宝森’7号。B组包括黑莓与树莓的杂交品种‘宝森’1号至‘宝森’6号,黑莓品种‘马林’和‘乔克多’。C组包括黑莓品种‘赫尔’和‘切斯特’。D组仅有野生种类蓬蘽1种。



M: DNA分子量标准 DNA ladder marker; 1. 蓬蘽 *Rubus hirsutus* Thunb.; 2. ‘赫尔’ ‘Hull’; 3. 粗叶悬钩子 *R. alceaefolius* Poir.; 4. ‘布莱兹’ ‘Brazos’; 5. ‘基奥瓦’ ‘Kiowa’; 6. ‘威廉姆特’ ‘Willamette’; 7. 山莓 *R. corchorifolius* L.; 8. ‘布里斯托’ ‘Bristol’; 9. ‘托拉咪’ ‘Tulameen’; 10. ‘泰勒’ ‘Taylor’; 11. ‘金克维’ ‘Kivigold’; 12. ‘宝森’7号 No. 7 of ‘Boysen’; 13. ‘布莱兹’实生苗 ‘Brazos’ seedling; 14. ‘切斯特’ ‘Chester’; 18. ‘宝森’1号 No. 1 of ‘Boysen’; 19. ‘宝森’2号 No. 2 of ‘Boysen’; 20. ‘宝森’3号 No. 3 of ‘Boysen’; 21. ‘宝森’4号 No. 4 of ‘Boysen’; 22. ‘宝森’5号 No. 5 of ‘Boysen’; 23. ‘宝森’6号 No. 6 of ‘Boysen’; 24. ‘马林’ ‘Marion’; 25. ‘乔克多’ ‘Choctaw’; 26. ‘黑布特’ ‘Blackbutte’.

图1 引物H-3对悬钩子属植物的RAPD-PCR扩增图谱  
Fig. 1 The RAPD-PCR pattern of *Rubus* spp. amplified by primer H-3



1. 蓬蘽 *R. hirsutus* Thunb.; 2. ‘赫尔’ ‘Hull’; 3. 粗叶悬钩子 *Rubus alceaefolius* Poir.; 4. ‘布莱兹’ ‘Brazos’; 5. ‘基奥瓦’ ‘Kiowa’; 6. ‘威廉姆特’ ‘Willamette’; 7. 山莓 *R. corchorifolius* L.; 8. ‘布里斯托’ ‘Bristol’; 9. ‘托拉咪’ ‘Tulameen’; 10. ‘泰勒’ ‘Taylor’; 11. ‘金克维’ ‘Kivigold’; 12. ‘宝森’7号 No. 7 of ‘Boysen’; 13. ‘布莱兹’实生苗 ‘Brazos’ seedling; 14. ‘切斯特’ ‘Chester’; 15. 插田泡 *R. coreanus* Miq.; 16. ‘萨尼’ ‘Shawnee’; 17. 掌叶覆盆子 *R. chingii* Hu; 18. ‘宝森’1号 No. 1 of ‘Boysen’; 19. ‘宝森’2号 No. 2 of ‘Boysen’; 20. ‘宝森’3号 No. 3 of ‘Boysen’; 21. ‘宝森’4号 No. 4 of ‘Boysen’; 22. ‘宝森’5号 No. 5 of ‘Boysen’; 23. ‘宝森’6号 No. 6 of ‘Boysen’; 24. ‘马林’ ‘Marion’; 25. ‘乔克多’ ‘Choctaw’; 26. ‘黑布特’ ‘Blackbutte’.

图2 基于 RAPD 分析的悬钩子属植物的 UPGMA 树系图  
Fig. 2 The UPGMA dendrogram of *Rubus* spp. based on RAPD analysis

### 3 结论和讨论

从群体遗传和进化的角度看,物种间的差异实际上是基因频率的差异。由于地理隔离的原因,悬钩子属植物在长期的遗传变异和自然选择过程中基因频率必然发生变化,某些基因位点可能消失<sup>[4]</sup>。在多位点检测的基础上通过计算遗传距离并利用聚类分析进行种的识别,具有较高的可靠性<sup>[4]</sup>。遗传距离作为衡量双亲遗传差异大小的参数之一,必然和杂种优势存在一定的联系,因而,RAPD 分子标记技术已被广泛用于品种鉴定、分类及亲本选育等方面<sup>[5-12]</sup>。

在上述实验中,用 15 个寡聚核苷酸随机引物对悬钩子属栽培品种和野生种类的 26 个居群的基因组 DNA 进行扩增,得到了 131 条 DNA 条带,其中多态性条带有 118 条,多态性条带百分率达到 90%,根据条带的差异可以较好地将供试的 26 个居群区分开来。由此可知,悬钩子属植物有丰富的遗传多态性,利用 RAPD 分子标记技术可以检测悬钩子属植物的遗传变异,从而进行种类和品种的鉴别。

悬钩子属植物通常被分为两大类,即树莓类和黑莓类,而分布在中国的悬钩子属种类全部为树莓类<sup>[13]</sup>。根据实验获得的 UPGMA 树系图,在  $\lambda = 0.510$  处可将 26 个居群分为 4 组,其中供试的 5 个树莓品种全部归入 A 组,并与粗叶悬钩子、山莓、插

田泡和掌叶覆盆子等野生种类聚在一起,而且野生种类山莓和掌叶覆盆子都属于球果亚组(Subject. *Corchorifolii*),插田泡虽然属于柔毛叶亚组(Subject. *Pungentes*),但与山莓和掌叶覆盆子亲缘关系较近。因而,利用 RAPD 标记技术得到的这一结果与传统分类结果基本一致。另外,A 组中还包括‘基奥瓦’、‘萨尼’、‘黑布特’和‘布莱兹’等 4 个黑莓品种,揭示这些黑莓品种可能具有树莓的遗传背景。

品种‘宝森’是黑莓和树莓的杂交品种,其 6 个不同居群聚在 B 组中且遗传距离较近,说明居群间的遗传差异不大,这和‘宝森’的遗传背景完全吻合。‘赫尔’和‘切斯特’均为黑莓品种,虽然在树系图上它们单独被聚为 C 组,但这两个品种的遗传距离较远,说明黑莓品种‘赫尔’和‘切斯特’的遗传关系相对较远。D 组只含有野生种类蓬蘽,说明蓬蘽具有独特的遗传背景,这与传统的植物分类结果稍有出入,其原因有待进一步研究。

总体来看,根据 RAPD 分子标记结果得到的聚类结果与传统形态学分类结果基本吻合,说明 RAPD 分子标记可用于悬钩子属植物的系统分类学研究,至少可以为解决该属的种间分类问题提供一些有价值的遗传学信息。

#### 参考文献:

[1] 孙醉君, 顾 姻, 蔡剑华. 黑莓引种十年的回顾与展望[J]. 江苏林业科技, 1998, 25(9): 46-48, 54.

- [2] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5(2): 69-76.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993: 7-14.
- [4] 陈大霞, 李隆云, 钱 敏, 等. 黄连药材 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化[J]. *中草药*, 2006, 37(8): 1233-1237.
- [5] 李发根, 甘四明, 李 梅, 等. 利用 RAPD 标记进行桉树杂交亲本遗传变异的研究[J]. *广东林业科技*, 2005, 21(3): 1-5.
- [6] 郭平仲, 张金栋, 甘为牛, 等. 距离分析方法与杂种优势[J]. *遗传学报*, 1989, 16(2): 97-104.
- [7] 李周蛟, 王章荣. 用 RAPD 标记进行鹅掌楸杂种识别和亲本选配[J]. *林业科学*, 2000, 38(5): 169-174.
- [8] Arunachalam V. Genetic distance in plant breeding[J]. *Indian J Genet*, 1981, 41: 226-236.
- [9] Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F<sub>1</sub> grain yield, heterosis and RFLPs[J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 833-840.
- [10] 向增旭, 郭巧生. 不同金银花种源间遗传关系的 RAPD 分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2007, 16(2): 57-59.
- [11] Zhang Q F, Gao Y J, Yang S H, et al. A diallel analysis of heterosis in elite hybrid rice based on RFLPs and microsatellite [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 89: 185-192.
- [12] 朱 艳, 秦民坚, 杭悦宇, 等. 不同种源太子参的 RAPD 分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2007, 16(3): 19-22.
- [13] 俞德凌. 中国植物志 第三十七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 33-41.

## 《中国种业》2009 年征订启事

《中国种业》是由中华人民共和国农业部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊,系全国中文核心期刊和全国优秀农业期刊。

刊物目标定位:以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围:大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植和种子机械等,信息量大,技术实用。读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门的工作人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

本刊为月刊,大 16 开本,每期定价 5.80 元,全年定价 69.60 元。国内统一连续出版物号:CN 11-4413/S,国际标准连续出版物号:ISSN 1671-895X。全国各地邮局(所)均可订阅,邮发代号:82-132;也可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加 3 元。

地址:北京市中关村南大街 12 号中国农业科学院(邮编 100081);电话:010-62180279(编辑部),010-62186657(广告发行部);传真:010-62180279;E-mail: chinaseedqks@sina.com, chinaseedqks@163.com。

欢迎订阅、投稿和刊登广告。