

基于 ISSR 标记的猕猴桃品种 遗传多样性分析及指纹图谱构建

张安世^{1,①}, 韩臣鹏², 齐秀娟³, 张中海¹

(1. 焦作师范高等专科学校理工学院, 河南 焦作 454000; 2. 郑州绿博园管理中心, 河南 郑州 451470;
3. 中国农业科学院郑州果树研究所, 河南 郑州 450009)

摘要: 采用 ISSR 标记对中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.)、美味猕猴桃 [*A. chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.]、软枣猕猴桃 [*A. arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.] 和毛花猕猴桃 (*A. eriantha* Benth.) 的 32 个样本进行了遗传多样性分析, 并以 ISSR 标记为基础构建了 DNA 指纹图谱。结果表明: 筛选的 10 个多态性高且条带清晰的引物共扩增出 200 个条带 (位点), 其中, 多态性位点 195 个, 多态性位点百分率 (PPL) 达 97.50%; 各引物的多态性信息含量 (PIC) 以及供试样本的观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 多样性指数 (I) 的总均值分别为 0.908 0、1.980 0、1.356 9、0.225 5 和 0.361 3, 4 个猕猴桃种间的遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.414 6, 基因流 (N_m) 为 0.705 9, 且 32 个样本间的 N_a 、 N_e 、 H 和 I 值差异极显著 ($P < 0.001$)。供试 32 个样本间的遗传相似系数 (GS) 为 0.565 0~0.965 0, 平均值为 0.716 4; 基于 GS 值进行 UPGMA 聚类分析, 在 GS 值为 0.76 处将 32 个样本分为 4 组, 基本对应供试的 4 个猕猴桃种类, 其中, 第 I 组的大多数样本属于美味猕猴桃品种, 第 II 组的样本均属于中华猕猴桃品种, 第 III 组的样本属于毛花猕猴桃品种, 第 IV 组的样本均属于软枣猕猴桃品种。分子方差分析结果表明: 4 个猕猴桃的种间变异占总变异的 40.84%, 种内变异占总变异的 59.16%。研究结果表明: 供试的猕猴桃品种间遗传分化程度较高, 基因交流频率较低, 且总遗传变异的近 60% 存在于种内, 说明供试的猕猴桃品种具有较丰富的遗传多样性。另外, 根据 10 个 ISSR 引物的扩增结果, 筛选出引物 UBC818、UBC824、UBC854 和 UBC895 扩增的 15 个多态性位点构建的 DNA 指纹图谱可用于供试 32 个猕猴桃样本的鉴定。

关键词: 猕猴桃; ISSR 标记; 遗传多样性; 聚类分析; DNA 指纹图谱

中图分类号: S663.4; Q946-33 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2017)03-0019-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.03.03

Genetic diversity analysis and fingerprinting construction of cultivars of *Actinidia* spp. based on ISSR marker ZHANG Anshi^{1,①}, HAN Chenpeng², QI Xiujuan³, ZHANG Zhonghai¹ (1. School of Science, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454000, China; 2. Zhengzhou Green Museum Administrative Center, Zhengzhou 450000, China; 3. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2017, 26(3): 19-26

Abstract: Genetic diversity of 32 samples of *Actinidia chinensis* Planch., *A. chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev., *A. arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq. and *A. eriantha* Benth. were analyzed by using ISSR marker, and DNA fingerprinting was constructed based on ISSR marker. The results show that 200 bands (loci) are amplified by 10 primers screened with high polymorphic and clear band, in which, there are 195 polymorphic loci with percentage of polymorphic loci (PPL) of 97.50%. The overall averages of polymorphism information content (PIC) of each primer, observed number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Nei's gene diversity index (H) and Shannon's diversity index (I) of samples tested are 0.908 0, 1.980 0, 1.356 9, 0.225 5 and 0.361 3, respectively. The genetic

收稿日期: 2016-12-22

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程专项 (CAAS-ASTIP-2015-ZFRI)

作者简介: 张安世 (1965—), 男, 河南博爱人, 硕士, 教授, 主要从事植物分子生物学方面的研究。

①通信作者 E-mail: aszhang1212@163.com

differentiation coefficient (G_{st}) and gene flow (N_m) of four species in *Actinidia* Lindl. are 0.414 6 and 0.705 9, respectively. The differences in N_a , N_e , H and I values among 32 samples are extremely significant ($P < 0.001$). The genetic similarity coefficient (GS) among 32 samples tested is 0.565 0–0.965 0 with average of 0.716 4. UPGMA cluster analysis is carried out according to GS value, and 32 samples are divided into four groups at GS value of 0.76, which correspond to the four species in *Actinidia* tested. Among them, most of samples in group I belong to cultivars of *A. chinensis* var. *deliciosa*, samples in group II belong to cultivars of *A. chinensis*, sample in group III belongs to cultivar of *A. eriantha*, and samples in group IV belong to cultivars of *A. arguta*. The results of molecular variance analysis show that interspecies variation of four species in *Actinidia* accounts for 40.84% of the total variation, while intraspecies variation accounts for 59.16% of the total variation. It is suggested that cultivars of *Actinidia* spp. tested have high degree of genetic differentiation and low gene exchange frequency, and nearly 60% of the total genetic variation is existed in species, indicating that there is abundant genetic diversity in cultivars of *Actinidia* spp. tested. In addition, 15 polymorphic loci amplified by primers UBC818, UBC824, UBC854 and UBC895 are screened based on amplification result of ten ISSR primers, and DNA fingerprinting is constructed, which can be used to identify 32 samples of *Actinidia* spp. tested.

Key words: *Actinidia* spp.; ISSR marker; genetic diversity; cluster analysis; DNA fingerprinting

猕猴桃属 (*Actinidia* Lindl.) 植物为多年生藤本, 雌雄异株; 现有 54 种 21 变种^[1], 绝大部分为中国特有种类, 故亦称为中国半特有属^[2]。该属部分种类的果实为知名水果, 在中国的种植面积和市场需求不断扩大, 其中, 中华猕猴桃 (*A. chinensis* Planch.) 和美味猕猴桃 [*A. chinensis* var. *deliciosa* (*A. Chev.*) *A. Chev.*] 种植最为广泛, 软枣猕猴桃 [*A. arguta* (*Sieb. et Zucc.*) *Planch. ex Miq.*] 在部分地区也已开始商业栽培。在猕猴桃种植业发展过程中, 人们已经根据不同的需求培育出大量的栽培品种, 特别是近年来随着猕猴桃产业的快速发展, 异地间的品种交换日趋频繁, 导致猕猴桃品种混杂^[3], 存在“同名异物”或“同物异名”的现象, 不利于猕猴桃品种的推广应用和鉴定, 因此, 有必要对不同猕猴桃品种的遗传特性进行深入研究。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记技术^[4]具有引物通用性强、利用率高、操作简便和重复性强等优点, 在植物的遗传多样性、系统进化、DNA 指纹图谱及核心种质构建等方面已得到广泛的应用^[5-9], 目前, ISSR 标记已成功应用于猕猴桃种质资源研究^[10-11]。为明晰国产猕猴桃品种的起源, 探寻准确区分猕猴桃品种遗传特性的方法, 作者借鉴前人的研究成果, 以国产 32 个猕猴桃样本 (包括 5 个品种的雄株) 为研究对象, 利用 ISSR 标记进行遗传多样性和亲缘关系分析, 并在此基础上构建 DNA 指纹图谱, 以为猕猴桃种质资源的保护利用和新品种选育等提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料均来源于中国农业科学院郑州果树研究所猕猴桃选种圃 (地理坐标为东经 113°42'36"、北纬 34°42'36"), 共 4 种 32 个样本 (包括 27 个品种的雌株和 5 个品种的雄株), 分别为美味猕猴桃品种 ‘徐香’ (‘Xuxiang’)、‘金魁’ (‘Jinkui’)、‘金魁’雄株、‘皖翠’ (‘Wancui’)、‘金硕’ (‘Jinshuo’)、‘中猕 2 号’ (‘Zhongmi 2’)、‘海艳’ (‘Haiyan’)、‘米良 1 号’ (‘Miliang 1’)、‘海沃德’ (‘Hayward’) 和 ‘布鲁诺’ (‘Bruno’); 中华猕猴桃品种 ‘翠玉’ (‘Cuiyu’)、‘红阳’ (‘Hongyang’)、‘黄阳’ (‘Huangyang’)、‘黄阳’雄株、‘晚红’ (‘Wanhong’)、‘楚红’ (‘Chuhong’)、‘早金’ (‘Hort16A’)、‘金艳’ (‘Jinyan’)、‘琼浆’ (‘Qiongjiang’)、‘豫皇 1 号’ (‘Yuhuang 1’) 和 ‘湘吉红’ (‘Xiangjihong’); 软枣猕猴桃品种 ‘红宝石星’ (‘Ruby star’)、‘红宝石星’雄株、‘软红’ (‘Ruanhong’)、‘红贝’ (‘Hongbei’)、‘红贝’雄株、‘华红 1 号’ (‘Huahong 1’)、‘华红 2 号’ (‘Huahong 2’)、‘魁绿’ (‘Kuiliu’) 和 ‘桓优 1 号’ (‘Huanyou 1’); 毛花猕猴桃 (*A. eriantha* Benth.) 品种 ‘华特’ (‘Huate’) 和 ‘华特’雄株。所有供试植株龄均为 7 a, 每个样本随机选取 3 株, 每株采集 2 枚健康的幼叶, 置于 -80 °C 超低温冰箱中保存、备用。

主要仪器: Biofuge Primo R 型冷冻离心机 (美国

Thermo Fisher Scientific 公司)、PTC-200 型 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)、NanoDrop 1000 紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 和 G:BOX-HR 凝胶成像系统 (美国 Syngene 公司)。主要试剂 2×Taq MasterMix (含 Taq DNA 聚合酶、2×Taq PCR buffer、3 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 和 400 μmol · L⁻¹ dNTP Mix) 和 DL2000 DNA Marker 均购自北京康为世纪生物科技有限公司; ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公布的序列, 由金唯智生物科技 (北京) 有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 每个样本取 3 枚幼叶, 混合, 采用改良 CTAB 法^[12] 提取基因组 DNA, 并用质量体积分数 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 1000 紫外分光光度计检测其质量和浓度。用 TE 缓冲液将 DNA 稀释至 20 ng · μL⁻¹, 于 -20 °C 保存、备用。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增 选用 40 个 ISSR 引物进行扩增反应。反应体系总体积 10.0 μL, 包含 0.4 μL DNA、1.0 μL 引物、5.0 μL 2×Taq MasterMix 和 3.6 μL RNase-Free water。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min、退火 1 min (退火温度依引物而定)、72 °C 延伸 1.5 min, 循环 40 次; 最后于 72 °C 延伸 10 min。扩增产物于 4 °C 保存, 并用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离。

1.3 数据统计及分析

对上述 40 个 ISSR 引物的扩增条带进行比较, 从

中筛选出 10 个多态性高且条带清晰的引物, 并对各引物的扩增条带进行统计分析, 有条带记为“1”、无条带记为“0”, 并据此构建“1”和“0”矩阵。利用 POPGENE 1.32 软件进行 32 个猕猴桃样本的遗传多样性参数分析, 计算多态性位点百分率 (PPL)、观测等位基因数 (*N_a*)、有效等位基因数 (*N_e*)、Nei's 基因多样性指数 (*H*)、Shannon's 多样性指数 (*I*)、基因流 (*N_m*) 和遗传分化系数 (*G_{st}*) 以及遗传相似系数 (*GS*) 和遗传距离 (*GD*), 并利用 SPSS 17.0 软件对 *N_a*、*N_e*、*H* 和 *I* 值进行非参数 Kruskal Wallis Test 独立样本检验。采用 GenALEX 6.5 软件进行分子方差分析 (AMOVA)。参照黄秀等^[13] 的方法计算各引物的多态性信息含量 (*PIC*), 采用 NTSYS-pc 2.0 软件构建 UPGMA 聚类图; 同时, 参照张林等^[14] 的方法构建 32 个猕猴桃样本的 DNA 指纹图谱, 并采用 G:BOX-HR 凝胶成像系统中的 Genetool 软件计算各条带的片段长度。

2 结果和分析

2.1 ISSR 扩增结果及遗传多样性分析

采用 10 个多态性高且条带清晰的引物对 32 个猕猴桃样本进行 ISSR 分析, 扩增结果见表 1。由表 1 可以看出: 10 个引物共扩增出 200 个条带 (位点), 其中, 多态性位点有 195 个, 多态性位点百分率 (PPL) 为 97.50%, 表明这些引物具有较高的多态性。10 个

表 1 基于 10 个 ISSR 引物对 27 个猕猴桃品种 32 个样本的遗传多样性分析¹⁾

Table 1 Analysis on genetic diversity of 32 samples of 27 cultivars of *Actinidia* spp. based on ten ISSR primers¹⁾

引物编号 Primer code	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	t/°C	N	N _p	PPL/%	PIC	N _a	N _e	H	I
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	52.4	21	21	100.00	0.914 0	2.000 0	1.359 2	0.230 4	0.374 0
UBC818	CACACACACACACAG	52.4	21	21	100.00	0.914 5	2.000 0	1.391 2	0.234 4	0.368 7
UBC820	GTGTGTGTGTGTGTC	52.4	14	13	92.86	0.886 7	2.000 0	1.431 6	0.260 5	0.405 7
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG	52.4	20	20	100.00	0.919 3	2.000 0	1.369 1	0.239 6	0.384 1
UBC835(1)	AGAGAGAGAGAGAGCC	53.8	20	19	95.00	0.919 7	1.950 0	1.389 6	0.248 6	0.393 0
UBC835(2)	AGAGAGAGAGAGAGTC	56.1	27	27	100.00	0.926 9	2.000 0	1.350 4	0.216 4	0.346 9
UBC840	GAGAGAGAGAGAGATT	51.6	15	14	93.33	0.897 0	1.933 3	1.490 2	0.289 1	0.440 1
UBC841	GAGAGAGAGAGAGACC	53.8	22	21	95.45	0.920 1	1.954 5	1.384 5	0.239 4	0.377 8
UBC854	TCTCTCTCTCTCTCAG	53.8	20	20	100.00	0.912 5	2.000 0	1.305 3	0.205 1	0.336 4
UBC895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	56.4	20	19	95.00	0.869 2	1.950 0	1.151 6	0.118 7	0.221 8
总计 Total			200	195						
总均值 Overall average			20.0	19.5	97.50	0.908 0	1.980 0	1.356 9	0.225 5	0.361 3

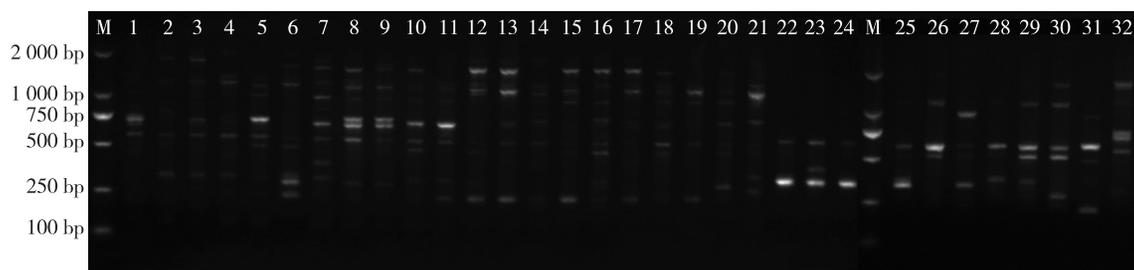
¹⁾ t: 退火温度 Annealing temperature; N: 位点总数 Total number of loci; N_p: 多态性位点数 Number of polymorphic loci; PPL: 多态性位点百分率 Percentage of polymorphic loci; PIC: 多态性信息含量 Polymorphism information content; N_a: 观测等位基因数 Observed number of alleles; N_e: 有效等位基因数 Effective number of alleles; H: Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index; I: Shannon's 多样性指数 Shannon's diversity index.

引物中,引物 UBC835 (2) 扩增的位点总数最多(27个),引物 UBC820 扩增的位点总数最少(14个),平均每个引物扩增的位点总数为20个。引物 UBC854 的扩增图谱见图1。该引物共扩增出20个条带,扩增出的DNA片段长度为220~2163 bp,且均为多态性条带,PPL值为100.00%;类似的引物还有 UBC815、UBC818、UBC824 和 UBC835 (2),其扩增的位点也均为多态性位点。

由表1还可以看出:基于10个引物的ISSR扩增结果分析了32个猕猴桃样本的遗传多样性参数,其中,多态性信息含量(PIC)均值为0.8692~0.9269,总均值为0.9080;观测等位基因数(N_a)均值为1.9333~2.0000,总均值为1.9800;有效等位基因数(N_e)均值为1.1516~1.4902,总均值为1.3569;Nei's 基因多样性指数(H)均值为0.1187~0.2891,

总均值为0.2255;Shannon's 多样性指数(I)均值为0.2218~0.4401,总均值为0.3613。4个猕猴桃种间的遗传分化系数(G_{st})为0.4146,表明总遗传变异的41.46%存在于种间,58.54%存在于种内。基因流(N_m)为0.7059,表明4个猕猴桃种间的遗传分化程度较高,基因交流频率较低。

分子方差分析结果表明(表2):4个猕猴桃的种间变异占总变异的40.84%,种内变异占总变异的59.16%,与 G_{st} 值的分析结果对应,说明4个猕猴桃种间存在较为丰富的遗传多样性。对 N_a 、 N_e 、 H 和 I 值的检验结果显示:供试的32个猕猴桃样本间的遗传多样性水平存在极显著差异($X^2 = 35.753$, $P < 0.001$),表明基于这10个ISSR引物的扩增结果计算的各项遗传多样性参数均能切实反映猕猴桃品种间的遗传多样性水平。



M: DNA marker; 1-3,5-11: 美味猕猴桃品种 Cultivars of *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.; 4,12-21: 中华猕猴桃品种 Cultivars of *A. chinensis* Planch.; 22-30: 软枣猕猴桃品种 Cultivars of *A. arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.; 31,32: 毛花猕猴桃品种 Cultivars of *A. eriantha* Benth. 1: '徐香' 'Xuxiang'; 2: '金魁' 'Jinkui'; 3: '金魁' (雄株) 'Jinkui' (male plant); 4: '翠玉' 'Cuiyu'; 5: '皖翠' 'Wancui'; 6: '金硕' 'Jinshuo'; 7: '中猕2号' 'Zhongmi 2'; 8: '海艳' 'Haiyan'; 9: '米良1号' 'Miliang 1'; 10: '海沃德' 'Hayward'; 11: '布鲁诺' 'Bruno'; 12: '红阳' 'Hongyang'; 13: '黄阳' 'Huangyang'; 14: '黄阳' (雄株) 'Huangyang' (male plant); 15: '晚红' 'Wanhong'; 16: '楚红' 'Chuhong'; 17: '早金' 'Hort16A'; 18: '金艳' 'Jinyan'; 19: '琼浆' 'Qiongjiang'; 20: '豫皇1号' 'Yuhuang 1'; 21: '湘吉红' 'Xiangjihong'; 22: '红宝石星' 'Ruby star'; 23: '红宝石星' (雄株) 'Ruby star' (male plant); 24: '软红' 'Ruanhong'; 25: '红贝' 'Hongbei'; 26: '红贝' (雄株) 'Hongbei' (male plant); 27: '华红1号' 'Huahong 1'; 28: '华红2号' 'Huahong 2'; 29: '魁绿' 'Kuiliu'; 30: '桓优1号' 'Huanyou 1'; 31: '华特' (雄株) 'Huate' (male plant); 32: '华特' 'Huate'.

图1 引物 UBC854 对27个猕猴桃品种32个样本的ISSR扩增图谱
Fig. 1 ISSR amplification pattern of 32 samples of 27 cultivars of *Actinidia* spp. by primer UBC854

表2 基于ISSR标记的4个猕猴桃种类的分子方差分析结果

Table 2 Result on molecular variance analysis on four species in *Actinidia* Lindl. based on ISSR marker

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of square	均方 Mean square	方差 Variance	方差比例/% Percentage of variance
种间 Interspecies	3	349.669	116.556	13.056	40.84
种内 Intraspecies	28	529.487	18.910	18.910	59.16

2.2 UPGMA 聚类分析

对32个猕猴桃样本间的遗传相似系数(GS)进行计算,结果表明:32个样本间的GS值为0.5650~0.9650,平均值为0.7164,变幅为0.4000,说明供

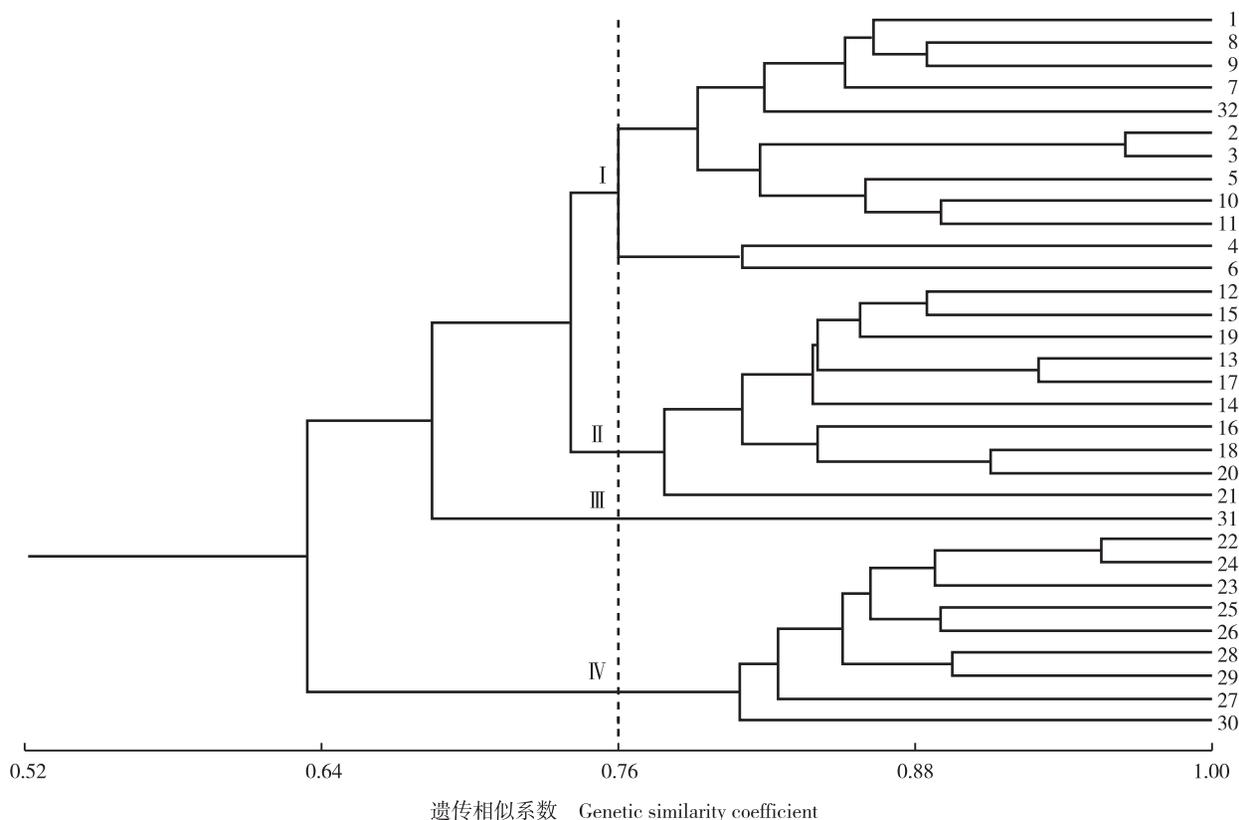
试的32个样本间遗传差异较大。其中,品种'金魁'与其雄株的GS值最大(0.9650),亲缘关系最近;而品种'米良1号'与'桓优1号'、'湘吉红'与'桓优1号'、'桓优1号'与'华特'雄株间的GS值均最小,

仅为 0.565 0, 亲缘关系最远。

基于上述 GS 值对 32 个猕猴桃样本进行 UPGMA 聚类分析, 结果见图 2。由图 2 可以看出: 在 GS 值为 0.76 处, 可将 32 个猕猴桃样本分为 4 组。第 I 组包括 12 个样本, 分别为品种‘徐香’、‘海艳’、‘米良 1 号’、‘中猕 2 号’、‘华特’、‘金魁’、‘金魁’雄株、‘皖翠’、‘海沃德’、‘布鲁诺’、‘翠玉’和‘金硕’; 第 II 组包括 10 个样本, 分别为品种‘红阳’、‘晚红’、‘琼浆’、‘黄阳’、‘早金’、‘黄阳’雄株、‘楚红’、‘金艳’、‘豫皇 1 号’和‘湘吉红’; 第 III 组仅包括‘华特’雄株 1 个样本; 第 IV 组包括 9 个样本, 分别为品种‘红宝石星’、‘红宝石星’雄株、‘软红’、‘红贝’、‘红贝’雄株、‘华红 2 号’、‘魁绿’、‘华红 1 号’和‘桓优

1 号’。其中, 第 I 组的样本除‘华特’和‘翠玉’外均属于美味猕猴桃品种; 第 II 组的样本均属于中华猕猴桃品种; 第 III 组的样本属于毛花猕猴桃品种; 第 IV 组的样本均属于软枣猕猴桃品种, 该聚类结果基本符合传统分类结果。

对供试的 32 个猕猴桃样本按照种类进行归类, 并计算 4 个猕猴桃种间的 GS 值和遗传距离 (GD), 结果见表 3。由表 3 可以看出: 4 个猕猴桃种间的 GS 值为 0.780 7~0.926 7, 其中, 中华猕猴桃与美味猕猴桃的 GS 值为 0.926 7, 亲缘关系最近, 与美味猕猴桃是中华猕猴桃的一个变种的分类地位一致; 毛花猕猴桃与中华猕猴桃、美味猕猴桃和软枣猕猴桃的 GS 值分别为 0.895 1、0.895 4 和 0.780 7, 相对于软枣猕猴桃,



1-3, 5-11: 美味猕猴桃品种 Cultivars of *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.; 4, 12-21: 中华猕猴桃品种 Cultivars of *A. chinensis* Planch.; 22-30: 软枣猕猴桃品种 Cultivars of *A. arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.; 31, 32: 毛花猕猴桃品种 Cultivars of *A. eriantha* Benth. 1: ‘徐香’ ‘Xuxiang’; 2: ‘金魁’ ‘Jinkui’; 3: ‘金魁’ (雄株) ‘Jinkui’ (male plant); 4: ‘翠玉’ ‘Cuiyu’; 5: ‘皖翠’ ‘Wancui’; 6: ‘金硕’ ‘Jinshuo’; 7: ‘中猕 2 号’ ‘Zhongmi 2’; 8: ‘海艳’ ‘Haiyan’; 9: ‘米良 1 号’ ‘Miliang 1’; 10: ‘海沃德’ ‘Hayward’; 11: ‘布鲁诺’ ‘Bruno’; 12: ‘红阳’ ‘Hongyang’; 13: ‘黄阳’ ‘Huangyang’; 14: ‘黄阳’ (雄株) ‘Huangyang’ (male plant); 15: ‘晚红’ ‘Wanhong’; 16: ‘楚红’ ‘Chuhong’; 17: ‘早金’ ‘Hort16A’; 18: ‘金艳’ ‘Jinyan’; 19: ‘琼浆’ ‘Qiongjiang’; 20: ‘豫皇 1 号’ ‘Yuhuang 1’; 21: ‘湘吉红’ ‘Xiangjihong’; 22: ‘红宝石星’ ‘Ruby star’; 23: ‘红宝石星’ (雄株) ‘Ruby star’ (male plant); 24: ‘软红’ ‘Ruanhong’; 25: ‘红贝’ ‘Hongbei’; 26: ‘红贝’ (雄株) ‘Hongbei’ (male plant); 27: ‘华红 1 号’ ‘Huahong 1’; 28: ‘华红 2 号’ ‘Huahong 2’; 29: ‘魁绿’ ‘Kuili’; 30: ‘桓优 1 号’ ‘Huanyou 1’; 31: ‘华特’ (雄株) ‘Huate’ (male plant); 32: ‘华特’ ‘Huate’.

图 2 基于 ISSR 标记分析结果的 27 个猕猴桃品种 32 个样本的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of 32 samples of 27 cultivars of *Actinidia* spp. based on analysis result of ISSR marker

表 3 基于 ISSR 标记分析结果的 4 个猕猴桃种间的遗传相似系数和遗传距离¹⁾

Table 3 Genetic similarity coefficient and genetic distance among four species in *Actinidia* Lindl. based on analysis result of ISSR marker¹⁾

种类 ²⁾ Species ²⁾	各种间的遗传相似系数和遗传距离 Genetic similarity coefficient and genetic distance among different species			
	ACD	AC	AA	AE
ACD	—	0.926 7	0.821 4	0.895 1
AC	0.076 1	—	0.810 9	0.895 4
AA	0.196 8	0.209 6	—	0.780 7
AE	0.110 8	0.110 5	0.247 5	—

¹⁾ 遗传相似系数和遗传距离分别位于横线上、下方 Genetic similarity coefficient and genetic distance are located above and under the line, respectively.

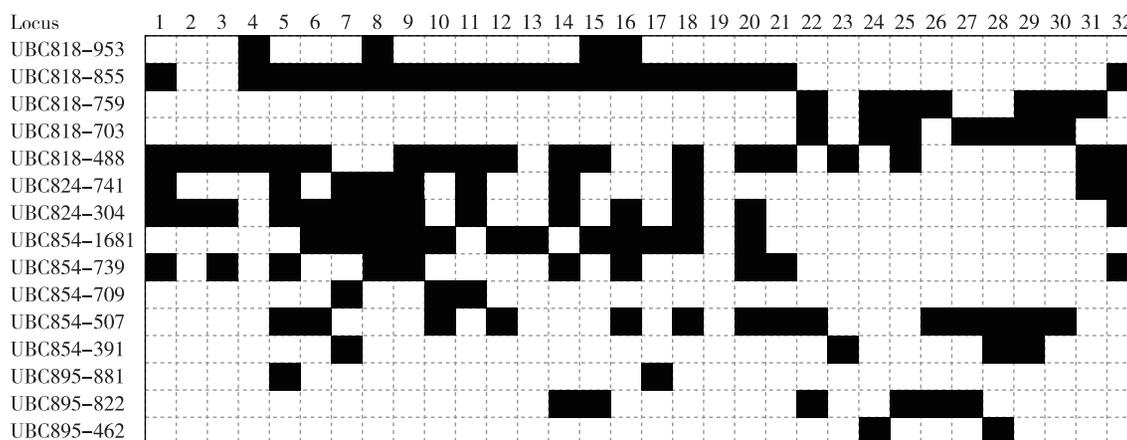
²⁾ ACD: 美味猕猴桃 *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.; AC: 中华猕猴桃 *A. chinensis* Planch.; AA: 软枣猕猴桃 *A. arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.; AE: 毛花猕猴桃 *A. eriantha* Benth.

毛花猕猴桃与中华猕猴桃和美味猕猴桃的亲缘关系更近,与上述聚类结果基本一致。

2.3 DNA 指纹图谱构建

对前述 10 个 ISSR 引物的扩增结果进行分析和筛选,选取引物 UBC818、UBC824、UBC854 和 UBC895 的扩增位点中具有不同特异性的 15 个多态性位点,构建了 32 个猕猴桃样本的 DNA 指纹图谱,结果见图 3。

由图 3 可见:在引物 UBC818 扩增的 5 个多态性位点中,‘红贝’、‘红贝’雄株和‘华特’雄株 3 个样本的位点具有特异性;在引物 UBC824 扩增的 2 个多态性位点中,仅‘华特’雄株的位点具有特异性;在引物 UBC854 扩增的 5 个多态性位点中,‘中猕 2 号’、‘海沃德’、‘布鲁诺’和‘红宝石星’雄株 4 个样本的位点



1-3,5-11: 美味猕猴桃品种 Cultivars of *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.; 4,12-21: 中华猕猴桃品种 Cultivars of *A. chinensis* Planch.; 22-30: 软枣猕猴桃品种 Cultivars of *A. arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.; 31,32: 毛花猕猴桃品种 Cultivars of *A. eriantha* Benth. 1: ‘徐香’ ‘Xuxiang’; 2: ‘金魁’ ‘Jinkui’; 3: ‘金魁’ (雄株) ‘Jinkui’ (male plant); 4: ‘翠玉’ ‘Cuiyu’; 5: ‘皖翠’ ‘Wancui’; 6: ‘金硕’ ‘Jinshuo’; 7: ‘中猕 2 号’ ‘Zhongmi 2’; 8: ‘海艳’ ‘Haiyan’; 9: ‘米良 1 号’ ‘Miliang 1’; 10: ‘海沃德’ ‘Hayward’; 11: ‘布鲁诺’ ‘Bruno’; 12: ‘红阳’ ‘Hongyang’; 13: ‘黄阳’ ‘Huangyang’; 14: ‘黄阳’ (雄株) ‘Huangyang’ (male plant); 15: ‘晚红’ ‘Wanhong’; 16: ‘楚红’ ‘Chuhong’; 17: ‘早金’ ‘Hort16A’; 18: ‘金艳’ ‘Jinyan’; 19: ‘琼浆’ ‘Qiongjiang’; 20: ‘豫皇 1 号’ ‘Yuhuang 1’; 21: ‘湘吉红’ ‘Xiangjihong’; 22: ‘红宝石星’ ‘Ruby star’; 23: ‘红宝石星’ (雄株) ‘Ruby star’ (male plant); 24: ‘软红’ ‘Ruanhong’; 25: ‘红贝’ ‘Hongbei’; 26: ‘红贝’ (雄株) ‘Hongbei’ (male plant); 27: ‘华红 1 号’ ‘Huahong 1’; 28: ‘华红 2 号’ ‘Huahong 2’; 29: ‘魁绿’ ‘Kuili’; 30: ‘桓优 1 号’ ‘Huanyou 1’; 31: ‘华特’ (雄株) ‘Huate’ (male plant); 32: ‘华特’ ‘Huate’.

图 3 基于 4 个 ISSR 引物 (UBC818、UBC824、UBC854 和 UBC895) 扩增结果的 27 个猕猴桃品种 32 个样本的 DNA 指纹图谱
Fig. 3 DNA fingerprinting of 32 samples of 27 cultivars of *Actinidia* spp. based on amplification result by four ISSR primers (UBC818, UBC824, UBC854 and UBC895)

具有特异性;而在引物 UBC895 扩增的 3 个多态性位点中,32 个样本的位点均不具有特异性。对 4 个引物扩增的 15 个多态性位点进行综合分析,供试的 32 个样本均具有特异的位点图谱,因此,根据引物 UBC818、UBC824、UBC854 和 UBC895 扩增的 15 个多态性位点构建的 DNA 指纹图谱可用于供试 32 个猕猴桃样本的鉴定。

3 讨论和结论

ISSR 标记具有良好的稳定性和较高的多态性,已经成为研究植物遗传多样性的主流技术之一,应用范围较广^[15]。本研究中,利用 ISSR 标记分析了 32 个猕猴桃样本的遗传多样性,结果显示:筛选出的 10

个引物共扩增出200个条带(位点),其中,多态性位点有195个,多态性位点百分率(PPL)达97.50%,高于邹游等^[10]和刘娟等^[11]对猕猴桃的同类研究结果,也高于采用其他分子标记对猕猴桃的相关研究结果^[16-18],这种现象与不同研究者采用的ISSR引物以及供试样本的品种甚至植株生长状况等方面的差异有关。

多态性信息含量(PIC)也是衡量引物多态性信息含量水平(高: $PIC > 0.50$; 适中: $0.25 < PIC < 0.50$; 低: $PIC < 0.25$)的重要指标^[19]。本研究结果显示:10个ISSR引物的PIC总均值为0.9080,说明本研究筛选的引物具有很高的多态性,可以有效地用于猕猴桃的遗传多样性分析。同样,在本研究中,观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H)和Shannon's 多样性指数(I)的总均值分别为1.9800、1.3569、0.2255和0.3613,均处于较高水平;而32个猕猴桃样本间的遗传相似系数(GS)为0.5650~0.9650,变幅达0.4000,说明供试的32个猕猴桃样本间存在较丰富的遗传多样性。而4个主要遗传多样性参数 N_a 、 N_e 、 H 和 I 值的独立样本检验结果则表明:供试32个猕猴桃样本间的遗传多样性水平存在显著差异,表明供试的猕猴桃品种间具有较为丰富的遗传变异。此外,4个猕猴桃种间的基因流(N_m)为0.7059,表明种间的基因交流频率较低;4个猕猴桃种间的遗传分化系数(G_w)为0.4146,表明供试猕猴桃种内的遗传变异(占总遗传变异的58.54%)高于种间,与分子方差分析结果基本一致。

从GS值以及聚类分析结果看,基于ISSR标记结果获得的GS值以及聚类分析结果基本可以将供试的32个猕猴桃样本按照亲本来源进行归类,而中华猕猴桃、美味猕猴桃、软枣猕猴桃和毛花猕猴桃4个种间的GS值也显示其亲缘关系符合传统分类,说明ISSR标记可用于猕猴桃品种的遗传关系研究。但基于ISSR标记的聚类结果与供试猕猴桃品种亲本的传统分类归属也略有差异,例如,‘翠玉’为中华猕猴桃品种,但却与美味猕猴桃的品种聚在同一组中,出现这种结果的原因可能与中华猕猴桃和美味猕猴桃的亲缘关系的复杂性有关。美味猕猴桃曾作为中华猕猴桃的硬毛品种,两者具有较高的遗传相似性^[20-21],有学者建议将两者归并为一个种^[17],而且在《Flora of China》^[22]中已对此进行了分类处理,将美味猕猴桃处理为中华猕猴桃的一个变种,说明二者的亲缘关系

很近。另外,毛花猕猴桃品种‘华特’与其雄株并未聚在一起,‘华特’与美味猕猴桃的品种聚在同一组,而其雄株单独成组,品种‘华特’与其雄株均为野生选种,不属于一个姊妹系,两者未能聚在一起可能与此有关,也可能与ISSR标记本身的局限性有关,需要结合形态学以及其他分子标记技术进行深入研究。另外,从品种的育种亲本来源看,供试的美味猕猴桃品种中,品种‘中猕2号’的母本为品种‘米良1号’^[23],因此,二者聚在一起;品种‘皖翠’是品种‘海沃德’的自然芽变品种^[24],而品种‘布鲁诺’与‘海沃德’均源自1904年新西兰从湖北宜昌引进的同一批种子^[25],这3个品种也聚在一起,体现出部分供试样本来源地域一致性的特征。由聚类分析结果还可见:美味猕猴桃品种‘金魁’与其雄株、软枣猕猴桃品种‘红贝’与其雄株均首先聚在一起,而软枣猕猴桃品种‘红宝石星’与其雄株也表现出很近的亲缘关系,与龚俊杰^[26]的研究结果类似。

依据形态学特征的品种鉴定很难区分表型极为相似的品种。DNA分子标记具有不受环境因子和时空条件影响且高效、快捷等优点,可直接反映品种间的遗传差异,已成为品种鉴定的有效方法之一。ISSR标记在植物品种鉴定和DNA指纹图谱构建方面都有成功应用,如:郑宇等^[27]利用6个ISSR标记产生的8个多态性位点绘制了ISSR指纹图谱,可准确区分比利时杜鹃(*Rhododendron hybridum* Hort.)的11个栽培品种(系);索志立等^[28]利用4个ISSR引物构建了紫斑牡丹[*Paeonia rockii* (S. G. Haw et Lauener) T. Hong et J. J. Li]与牡丹(*P. suffruticosa* Andrews)种间杂交后代及其亲本的DNA指纹图谱,从而在DNA分子水平上推测了紫斑牡丹的品种起源,且与早期的形态学观测结果相印证;张林等^[14]利用2个ISSR引物构建了DNA指纹图谱,能够准确鉴定62个朱顶红[*Hippeastrum rutilum* (Ker-Gawl.) Herb.]品种。本研究选用4个ISSR引物的15个多态性位点构建了32个猕猴桃样本的DNA指纹图谱,每个样本均具有各自特异的组合位点,可作为猕猴桃品种间分类和鉴定的依据。

综上所述,供试的32个猕猴桃样本间均具有较丰富的遗传多样性,其遗传关系基本符合传统分类结果,部分品种还体现出一定的来源地域一致性的特征;而利用4个ISSR引物扩增的15个多态性位点构建的DNA指纹图谱可准确区分供试的猕猴桃样本。

参考文献:

- [1] 黄宏文. 猕猴桃属——分类·资源·驯化·栽培[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 4-10.
- [2] 董晓莉, 汤浩茹, 甘玲, 等. DNA分子标记在猕猴桃上的应用[J]. 果树学报, 2005, 22(6): 682-686.
- [3] 叶凯欣, 罗森材, 梁雪莲, 等. 猕猴桃 SSR 分析[J]. 生物技术, 2009, 19(3): 39-42.
- [4] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [5] 赵孟良, 韩睿, 李莉. 24个菊芋品种(系)遗传多样性的 ISSR 标记分析[J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22(4): 44-49.
- [6] 李乃伟, 贺善安, 束晓春, 等. 基于 ISSR 标记的南方红豆杉野生种群和迁地保护种群的遗传多样性和遗传结构分析[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(1): 25-30.
- [7] 李宗艳, 秦艳玲, 蒙进芳, 等. 西南牡丹品种起源的 ISSR 研究[J]. 中国农业科学, 2015, 48(5): 931-940.
- [8] 李国田, 张美勇, 相昆, 等. 基于 ISSR 标记的 16 个核桃品种遗传多样性分析及分子身份构建[J]. 核农学报, 2015, 29(10): 1884-1892.
- [9] 李谋强, 师桂英, 叶树辉, 等. 基于 ISSR 分子标记数据的兰州百合核心种质构建方法研究[J]. 中国沙漠, 2015, 35(6): 1573-1578.
- [10] 邹游, 黄敏, 侯若彤, 等. ISSR 标记技术在猕猴桃遗传研究中的运用[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2008, 33(1): 111-115.
- [11] 刘娟, 廖明安, 谢玥, 等. 猕猴桃属 16 个雄性材料遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(3): 618-623.
- [12] 张安世, 邢智峰, 刘永英, 等. 苔藓植物 DNA 不同提取方法的比较分析[J]. 河南科学, 2009, 27(5): 559-562.
- [13] 黄秀, 曾捷, 聂刚, 等. 牛鞭草品种 EST-SSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2014, 22(2): 165-171.
- [14] 张林, 徐迎春, 成海钟, 等. 基于 ISSR 标记的 62 个朱顶红品种的遗传关系分析及指纹图谱构建[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(4): 48-54.
- [15] 廖丽, 王晓丽, 刘建秀, 等. 地毯草种质资源 ISSR 标记遗传多样性分析[J]. 草业科学, 2016, 33(4): 608-614.
- [16] 徐小彪, 廖娇, 黄春辉, 等. 基于 EST-SSR 标记分析猕猴桃种质遗传关系[J]. 果树学报, 2012, 29(2): 212-216.
- [17] 贾兵, 朱立武, 余兴, 等. 猕猴桃种质资源 RAPD 分析[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(3): 381-384.
- [18] 秦小波, 高继海. 利用 AFLP 分析西南特色猕猴桃的遗传多样性[J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21(4): 315-322.
- [19] 徐玉仙, 张微微, 莫海波, 等. 基于 EST-SSR 标记的莲属种质资源遗传多样性分析[J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(5): 595-604.
- [20] 黄宏文, 龚俊杰, 王圣梅, 等. 猕猴桃 (*Actinidia*) 属植物的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000, 8(1): 1-12.
- [21] 谢鸣, 蒋桂华, 柳国华, 等. 中华猕猴桃与美味猕猴桃生物学特性及生产性能比较[J]. 果树科学, 1995, 12(3): 161-164.
- [22] WU Z Y, RAVEN P H, HONG D Y. Flora of China: Vol. 12 [M]. Beijing: Science Press, 2005: 349-350.
- [23] 齐秀娟, 林苗苗, 徐善坤, 等. 美味猕猴桃新品种‘中猕2号’[J]. 园艺学报, 2015, 42(S2): 2835-2836.
- [24] 朱立武, 丁士林, 王谋才, 等. 美味猕猴桃新品种‘皖翠’[J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 86.
- [25] 姚家龙. 新西兰的猕猴桃育种[J]. 国外农学(果树), 1989(1): 29-31.
- [26] 龚俊杰. 猕猴桃属植物 AFLP 分析及其系统发育关系的研究[D]. 武汉: 华中农业大学园艺林学学院, 2003: 37-43.
- [27] 郑宇, 何天友, 陈凌艳, 等. 比利时杜鹃栽培品种的 ISSR 分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(3): 271-275.
- [28] 索志立, 张会金, 张治明, 等. 紫斑牡丹与牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据[J]. 云南植物研究, 2005, 27(1): 42-48.

(责任编辑: 郭严冬)