

猕猴桃野生居群的 SSR 分析初报

栗 琪, 李作洲, 黄宏文*
(中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘 要: 采用 SSR 分子标记技术对我国猕猴桃的 2 个商业栽培物种——中华猕猴桃和美味猕猴桃的 9 个天然居群(共 221 个样)的遗传多样性进行了初步分析。通过对 14 对猕猴桃引物的筛选, 8 对重现性好的引物扩增结果表现出良好的多态性。在 8 个多态性位点上共获得 222 个等位基因。居群等位基因平均数 $A = 17.3$, 多态位点百分率 $P = 100$, 多态信息指数 PIC 为 $0.87 \sim 0.96$, 显示出我国的猕猴桃野生居群具有极高的遗传多样性。中华猕猴桃和美味猕猴桃野生居群拥有高比例的共同等位基因, 反映出二者的亲缘关系极近。
关键词: 中华猕猴桃; 美味猕猴桃; SSR; 遗传结构; 多态信息指数
中图分类号: Q347; S663.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-470X(2004) 02-0175-04

Preliminary Study on SSR Analysis in Natural Populations of *Actinidia*

LI Qi, LI Zuo-Zhou, HUANG Hong-Wen*
(Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: Genetic diversity was preliminarily investigated for nine natural populations of two commercially important species of *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* using SSR genetic markers. Fourteen SSR loci were initially screened, and the result showed that high polymorphism existed in eight of the fourteen SSR primers, which were good reproducible primers. A total of 222 alleles were revealed from 8 polymorphism loci. A high level of genetic diversity was detected in *A. chinensis* and *A. deliciosa*, with mean number of alleles per locus $A = 17.3$ (range: $12.13 - 20.75$), percentage of polymorphic loci $P = 100$, and polymorphism information content (PIC) values range from 0.87 to 0.96 with an average of 0.936. Moreover, a large number of common alleles were found both in *A. chinensis* and *A. deliciosa*, suggesting a very close relationship of these two taxa. This study provided molecular evidence for explaining the genetic structure of natural populations of *Actinidia* and for further uses in making conservation strategy. In addition, it supplemented population reference for evaluate the system and evolutionary relationship between *A. chinensis* and *A. deliciosa*.
Key words: *Actinidia chinensis*; *Actinidia deliciosa*; SSR; Genetic structure; Polymorphism information content (PIC)

猕猴桃隶属于猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia*), 该属现有 66 种、约 118 个种下分类单位(变种、变型)^[1], 自然分布非常广泛, 其中绝大多数物种分布于中国。猕猴桃是 20 世纪果树史上驯化栽培最成功的果树之一。我国是猕猴桃的原产地, 有着得天独厚的丰富猕猴桃遗传资源, 并于 20 世纪

收稿日期: 2003-06-12, 修回日期: 2003-07-24。
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070082); 中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX2-SW-104); 中国科学院武汉植物园创新工程所长基金(05035117)。
作者简介: 栗琪(1978-), 女, 硕士研究生, 从事分子生物学与植物保育遗传研究(E-mail: liqi1910@sina.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hongwen@public.wh.hb.cn)。
(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

70年代开始进行资源的系统研究和利用。中华猕猴桃(*A. chinensis*)和美味猕猴桃(*A. deliciosa*)是目前用于经济栽培的主要资源^[1]。但一直以来,我国乃至世界上的主要栽培品种比较单一,狭小的遗传基础势必带来整个产业的脆弱性^[2],因此,培育新的栽培品种具有重要意义。此外,由于猕猴桃属中普遍存在自发的种间杂交和种内多倍化现象,因此不同学者对该属植物种的界定及亲缘关系存在不同的看法^[3-5]。长期以来,围绕中华猕猴桃和美味猕猴桃分类地位、亲缘关系的争论十分激烈^[6-8],品种资源的混杂现象也十分突出,十分不利于品种改良和新品种的选育。随着猕猴桃产业的发展,依托有效可靠的分子标记技术对中华猕猴桃和美味猕猴桃遗传特性及系统进化关系进行深入研究是有效地利用这些重要资源的基础,对我国猕猴桃种质资源的保育利用有着十分重要的意义。

在日益发展的众多分子标记技术中,微卫星(microsatellite) DNA,即简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)以其广泛分布于基因组、共显性、重现性好、多态性丰富等特点,广泛应用到植物分子生态、系统发育与进化、种质资源鉴定和评价等领域^[9-11]。SSR分子标记技术被认为是居群遗传结构分析强有力的工具,能为基因流和亲缘关系的精确测定提供重要参数^[9]。目前, RAPD及同工酶标记仅涉及猕猴桃物种及部分品种,且存在各自的缺陷^[5,12]。猕猴桃SSR位点的大量分离为研究猕猴桃野生居群的遗传特性提供了基础^[13,14]。在目前尚未见分子标记用于我国野生猕猴桃居群研究的情况下,笔者运用SSR标记对我国猕猴桃的两个主要商业栽培种——中华猕猴桃和美味猕猴桃的自然居群进行初步研究,拟探讨它们的遗传多样性及亲缘关系,为我国猕猴桃遗传资源的保护及可持续利用提供重要的遗传学证据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料采集于2002年4~5月,在猕猴桃原产地赣鄂边界的幕阜山地区(湖北通山和江西武宁)采集了4个中华猕猴桃的野生居群,在鄂西的宜昌、利川及重庆的丰都采集了5个美味猕猴桃自然居群。按照随机取样原则,每个居群取样数约为20~30株,其中仅江西武宁的居群取样数较少。取样试材为猕猴桃幼嫩叶片。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 选取猕猴桃幼叶或少量保存的干燥叶片按Weising等^[14]改进的植物总DNA提取法进行,并用紫外分光光度计与1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的浓度和质量。

1.2.2 PCR扩增及产物检测 按Huang等^[13]报道的微卫星位点,选取其中多态性好的14对引物(由上海博亚生物技术公司合成)进行筛选预实验,挑选出8对稳定性好的SSR引物用于正式实验,PCR程序按Huang等^[13]报道的反应条件及步骤进行。扩增产物采用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶(6% acrylamide/bisacrylamide 19:1, 7 mol/L urea in TBE, pH 8.3)电泳分离和银染检测。在PCR产物中加入等体积的loading buffer(98%甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯腈),在95℃下变性3 min。在Sequie-Gen GT System(BIORAD)电泳仪上进行预电泳和正式电泳。参照Echt等^[15]报道的方法稍加改进进行银染染色,凝胶在室温下自然干燥。

1.2.3 数据判读与分析 参照标准Ladder(pBR322 DNA/*Msp* I)判读每个位点的等位基因片段大小,使用Microsat ver. 1.5e(<http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat>)初步计算出各等位基因在不同居群中的频率分布、每位点等位基因平均数(A)、多态位点比率(P)、居群间分化系数(G_{st})等。采用多态信息指数^[16,17] PIC ($PIC = 1 - \sum f_{ij}^2$, f_{ij} 为*i*位点第*j*个等位基因的观察频率)估测中华猕猴桃和美味猕猴桃居群的遗传多样性。

2 结果与讨论

通过对14对猕猴桃SSR引物的筛选预实验,获得了多态性好、扩增带型清晰、稳定性好的8对引物^[13](UDK 96-001, UDK 96-015, UDK 96-016, UDK 96-034, UDK 96-040, UDK 97-409, UDK 97-413, UDK 96-414),对4个中华猕猴桃居群、5个美味猕猴桃居群共计221个样本进行了扩增,共测得222个等位基因和少量哑等位基因。等位基因最多的位点为UDK 96-001(40个),最少的为UDK 96-015(18个)。各位点均显示出很高的遗传多态性(见图1、图2),各个居群均显示出丰富的微卫星多态性。

实验结果表明,我国的猕猴桃野生居群具有比其他物种和品种更丰富的遗传多样性。中华猕猴桃居群和美味猕猴桃居群的遗传多态性指数分别高达

0.926 和 0.935, 美味猕猴桃居群略高于中华猕猴桃居群, 但尚未见显著差异。中华猕猴桃居群和美味猕猴桃居群检测到的特有等位基因数分别为 14 和 29, 共有等位基因数为 179, 有力地支持了两分类群有着极近的亲缘关系的观点^[12]。本实验中, 供试的中华猕猴桃经 SSR 分析发现几乎都为四倍体样本, 因此研究中缺乏二倍体中华猕猴桃样本, 在今后的研究中将进行更全面的居群取样以获得二倍体中华猕猴桃样本, 深入探讨二倍体、四倍体中华猕猴桃及美味猕猴桃三者的关系, 为确定四倍体中华猕猴桃和美味猕猴桃的起源问题提供确凿证据。



图 1 部分美味猕猴桃样本在 UDK97-409 位点上扩增的 SSR 谱带(其中 M 为 pBR³²²DNA/*Msp* I Ladder-Marker, 1~20 依次为宜昌雾渡河居群的 1~20 号样本)
Fig. 1 SSR patterns of some *A. deliciosa* in UDK97-409 locus (M is pBR³²²DNA/*Msp* I Ladder, 1-20 are the sample of population in Wuduhe of Yichang)



图 2 部分中华猕猴桃样本在 UDK96-015 位点上扩增的 SSR 谱带(其中 M 为 Marker, 1~12 依次为通山县九宫山居群的第 1~12 号样本)
Fig. 2 SSR patterns of some *A. chinensis* in UDK96-015 locus (M is pBR³²²DNA/*Msp* I Ladder, 1-12 are the sample of population in Jiugongshan of Tongshan County, Hubei)

中华猕猴桃居群间平均分化系数(G_{st})为 0.029, 美味猕猴桃居群间平均分化系数(G_{st})为 0.031, 中华/美味复合居群间平均分化系数(G_{st})为 0.006, 说明仅极少数遗传变异存在于居群间, 绝大

部分存在于居群内部。由此可见, 中华猕猴桃和美味猕猴桃的种间差异并不显著, 这与两分类群有着极近的亲缘关系相吻合^[3,4,12]。

比较供试的 9 个居群的位点平均等位基因数、遗传多态性指数及多态位点百分率可看出猕猴桃野生居群的 SSR 遗传多样性甚为丰富。居群位点平均等位基因数(A)为 12.13~20.75, PIC 值为 0.87~0.96, 多态位点百分率(P)为 100, 均高于同工酶和 RAPD 在猕猴桃物种及品种上的检测值^[7,12]。而猕猴桃微卫星的种间高多态性、复等位性及杂合性显示出其在猕猴桃系统发育研究中具有巨大的潜力, 可成为一种有效工具, 用来研究种与种亲缘关系、进化并为其分类提供分子水平上的依据。本研究显示的猕猴桃野生居群的丰富 SSR 遗传多样性为今后的猕猴桃产业大发展, 优良品种的选育, 珍稀濒危猕猴桃资源的保护, 野生资源的可持续利用, 提供了坚实的科学依据和明确的方向。

在本研究中, 有数个位点出现哑等位基因, 哑等位基因如果不被识别出来, 则会导致估测的群体中纯合子过多。在今后的实验中, 应进一步完善扩增条件, 重新调整引物的设计, 以便成功地扩增出所有的等位基因, 获取准确的数据信息。同时, 还应该增加采样的野生居群数, 广布于猕猴桃自然分布的各个区域, 探寻其群体遗传与生态格局的协同关系。此外, 除核微卫星标记外, 单亲遗传微卫星标记可以提供更多关于群体历史的信息, 线粒体、叶绿体 SSR 标记有其自身的优点^[1,18], 对单亲和双亲遗传的微卫星进行综合分析可以对群体结构和基因流等群体遗传学参数提供更详尽的资料, 深层次的探索猕猴桃种质资源的遗传多样性及系统进化等诸多问题。

参考文献:

[1] 黄宏文, 龚俊杰, 王圣梅, 何子灿, 张忠慧, 李建强. 猕猴桃属(*Actinidia*)植物的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000, 8(1): 1-12.
[2] 黄宏文. 面向 21 世纪的猕猴桃产业[A]. 见:黄宏文(主编), 猕猴桃研究进展[M]. 北京:科学出版社, 2000.1-3.
[3] 何子灿, 钟扬, 刘洪涛, 唐先华, 叶力, 黄德世, 徐立铭. 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.
[4] Huang H W, Li J Q, Lang P, Wang S M. Systematic relationships in *Actinidia* as revealed by cluster analysis of digitized morphological descriptors [J].

- Acta Horticulturae*, 1999, **498**: 71–78.
- [5] Messina R, Testolin R, Morgante M. Isozymes for cultivar identification in kiwifruit [J]. *HortScience*, 1991, **26** (7): 899–902.
- [6] 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.
- [7] Huang H W, Fenny D, Wang Z R, Jiang Z W, Huang R H, Wang S M. Isozyme inheritance and variation in *Actinidia* [J]. *Heredity*, 1997, **78**: 328–336.
- [8] Atkinson R G, Cipriani G, Whittaker D J, Gardner R C. The allopolyploid origin of kiwifruit, *Actinidia deliciosa* (Actinidiaceae) [J]. *Plant Syst Evol*, 1997, **205** (1–2): 111–124.
- [9] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 68–107.
- [10] Cipriani G, Marrazzo M T, Marconi R, Cimato A, Testolin R. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars[J]. *Theor Appl Genet*, 2002, **104**: 223–228.
- [11] Chase M, Moller C, Kesseli R, Bawa K S. Distance gene flow in tropical trees[J]. *Nature*, 1996, **383** (6599): 398–399.
- [12] Huang H W, Li Z Z, Li J Q, Kubisiak T L, Layne D R. Phylogenetic relationships in *Actinidia* as revealed by RAPD analysis [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 2002, **127** (5): 759–766.
- [13] Huang W G, Cipriani G, Morgante M, Testolin R. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterization, and homology in related species [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **97** (8): 1269–1278.
- [14] Weising K, Fung R W M, Keeling D J, Atkinson R G, Gardner R C. Characterization of microsatellites from *Actinidia chinensis* [J]. *Mol Breed*, 1996, **2**: 117–131.
- [15] Echt C S, May-Marquardt P, Hsieh M, Zahorchak R. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine[J]. *Genome*, 1996, **39**: 1102–1108.
- [16] Smith J F, Pham T V. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae) [J]. *Amer J Bot*, 1996, **83** (6): 717–726.
- [17] Weir B S. Genetic data analysis II [M]. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, 1996.
- [18] Testolin R, Cipriani G. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia* [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 897–903.