

油桃品种的 RAPD 分析

程中平^{1,2} 陈志伟² 胡春根³ 邓秀新³

(1 中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

(2 武汉市林业果树研究所, 武汉 430075)

(3 华中农业大学国家作物改良重点实验室, 武汉 430070)

摘要 为了用分子生物学方法对油桃品种进行分析, 本研究利用 RAPD 技术, 采用从 200 个 10 碱基随机引物筛选的 22 个引物对 19 个油桃品种的基因组 DNA 进行扩增, 通过扩增 180 个位点谱带的聚类, 分析供试油桃的系统发育, 将供试油桃品种分为 3 类; 并运用特殊谱带, 建立了油桃的品种分子识别表, 提出了重点保存的油桃种质有曙光、瑞光 2 号、五月火、艾米拉、红李光、阿姆肯。

关键词 油桃; RAPD; 系统发育; 品种分子识别表; 重点种质保存

中图分类号 S662.1

Analysis of Nectarine Cultivars Revealed by RAPD

Cheng Zhongping^{1,2} Chen Zhiwei² Hu Chungen³ Deng Xiuxin³

(1 Wuhan Institute of Botany, CAS, Wuhan 430074, China)

(2 Wuhan Forestry and Fruit Research Institute, Wuhan 430075, China)

(3 State Key Laboratory for Genetic Improvement of Crops,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract To analyze nectarine cultivars from angle of molecular biology, genomic DNAs of 19 accessions of nectarine peach (*Amgdalus persica* var. *necturina*) were amplified by RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) with 22 primers selected from 200 arbitrary 10 decamer primers. Analyzing phylogenetic relationship through cluster of the bands of 180 amplified loci. The experimented accessions could be divided among three groups. Molecular checking index and conservation of key germplasm which included 6 cultivars named Shuguang, Ruiguang No. 2, Mayfire, Amila, Hongliguang, Amken were put forward according to special bands.

Key words nectarine peach; RAPD; phylogenetic relationship; molecular checking index; conservation of key germplasm

油桃是桃中一个重要类群, 通常划作毛桃种下的一个变种。油桃最典型的外部特征是果皮光滑无毛, 果实一般较小, 低温需求量较低, 适合于设施栽培。在其种质资源的收集和植物学性状、农业生物学特性以及其育种利用等方面有广泛的研究^[1-3]。近年来分子生物学的发展, 特别是 RAPD 技术的发明^[4,5], 以 DNA 用量小、耗时少、提供信息量多等优点, 为更深入研究其内在规律提供了实用方法。本研究采用 RAPD 技术对收集 19 个油桃品种进行 DNA 扩增, 通过对扩增的 DNA 谱带进行分析, 为油桃品种识别、系统发育及资源保存提供分子生物学依据。

收稿日期: 2001-11-02

武汉市晨光计划资助项目 (985003074); 华中农业大学国家作物改良重点实验室资助项目; 中国科学院方向资助项目 (KSCX2-SW-104)。

* 程中平, 副研究员, 研究方向为果树栽培育种及其遗传多样性。湖北省武汉市

1 材料与方法

1.1 材料

19个油桃品种来源见表1。

表1 油桃(*Amygdalus persica* var. *necturina*) 19个品种的来源、多态带数及特殊位点

来源及 编号	品 种		多态 带数	特 殊 位 点									该样独 占位点	2样共 占一位点	
				S17 ⁻ 800bp	S2134 ⁻ 900bp	S68 ⁻ 1400bp	S319 ⁻ 950bp	S17 ⁻ 650bp	S51 ⁻ 700bp	S60 ⁻ 900bp	S167 ⁻ 850bp	S68 ⁻ 1350bp			S459 ⁻ 1000bp
武汉市林果所															
Q01	NJN72	NJN72	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
郑州果树所															
Q02	艾米拉	A m i l a	110	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Q03	瑞光3号	Ruiguang No. 3	114	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Q04	红日	Redsun	110	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Q05	瑞光2号	Ruiguang No. 2	115	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
Q06	卡拉	Kala	110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q07	华光	Huagang	113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q08	曙光	Shuguang	116	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	3
Q09	红李光	Hongliuguang	110	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Q10	丽格兰特	Legrand	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q11	五月火	Mayfire	117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Q12	早红2号	Earlyred No. 2	114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q13	兴津	Okitsu	115	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Q14	保油2号	Baoyou No. 2	113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
北京市林果所															
Q15	A m k i n g	Royal Point	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q16	Royal point	A m k i n g	113	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Q17	幻想	Fantasy	101	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Q18	昌黎油桃	Changliyoutao	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q19	秀峰	Shuho	105	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取采集的各桃种质幼嫩叶1~2片,剪掉叶脉,放入灭菌的研钵中,加入少量石英砂和700 μL 提取液[含100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0), 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇, 3% SDS]。研磨后,将研磨液倒入灭菌的1.5 mL 离心管中,然后在65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温30 min,取出平衡后离心2 min (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下同)。将上清液转入另一灭菌的离心管中,加入等体积苯酚-氯仿(1:1)混合液,上下颠倒数次,离心5 min。上清液再转入另一干净离心管,加入等体积氯仿,上下颠倒数次,离心同前。上清液转入另一干净离心管,然后加入5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠1滴和等体积的异丙醇,缓慢摇匀,静置片刻,离心2 min,弃去液体,沉淀的DNA用75%酒精加满试管,洗盐1 h,然后再换用半管无水酒精去水,经干燥后,加入100 μL TE液溶解,加入5 μL RNAse (5 $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min,重复上述离心过程。最后溶于100 μL TE溶液中,在紫外分光光度计测定DNA浓度。将原液稀释为10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的工作液,保存在4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用。

1.2.2 PCR 扩增及电泳检测 应用筛选的22个引物(表2),进行PCR扩增。扩增条件采用经优化的反应体系,PCR反应的总体积25 μL ,其中含10 \times PCR缓冲液2.5 μL , MgCl_2 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μL , dNTP (2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.5 μL , Tag 酶 (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.24 μL , 引物

($16.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $2.0 \mu\text{L}$, 模板 DNA ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $5.0 \mu\text{L}$ 。引物购自上海生工生物工程公司, PCR 缓冲液、Tag 酶、 MgCl_2 、dNTP 均购自 Shanghai promega 公司。反应液混均后, 在其上加一薄层矿物油。PCR 扩增仪为 DNA Thermal Cycler 480 (the Perkin-Elmer Corporation, USA)。反应程序为: 93°C 2 min , 36°C 1 min , 72°C 2 min 1 次循环; 93°C 1 min , 36°C 1 min , 72°C 2 min , 42 次循环; 93°C 1 min , 36°C 1 min , 72°C 10 min 1 次循环。扩增完毕, 在 1.4% 琼脂糖凝胶上 (μ , 加含 EB $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 电泳分离, 以华美产 Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III 和 MBI 产 Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus 作 Marker。在紫外透射仪上观察, 照相。

表 2 RAPD 分析中所用的 22 个引物

引物编号	引物碱基顺序	引物编号	引物碱基顺序	引物编号	引物碱基顺序
S ₁₇	AGGGAACGA G	S ₁₂₅	CCGAA TTCC	S ₃₆₀	AA GCGGCCTC
S ₁₈	CCA CA GCA GT	S ₁₆₇	CA GCGA CA A G	S ₄₄₁	GGCA CGTAA G
S ₂₁	CA GGCCCTTC	S ₃₁₉	TGGCA A GGCA	S ₄₄₄	AA GTCCGCTC
S ₂₄	AA TCGGGCTG	S ₃₄₁	CCC GGCA TAA	S ₄₅₂	CA GTGCTGTG
S ₂₉	GGGTAACGCC	S ₆₅	GA TGACCGCC	S ₄₅₉	GGTGCACGTT
S ₄₃	GTCGCCGTCA	S ₆₈	TGGA CCGGTG	S ₄₆₄	GTGTCTCA GG
S ₅₁	A GCGCCA TTG	S ₁₁₈	GAA TCGGCCA	S ₂₁₃₄	AA CA CA CGA G
S ₆₀	ACCCGGTCA C				

1.2.3 数据记录与统计 用 Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus 和 Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III 作分子量标记 (寿星桃、红叶桃、垂枝桃、碧桃、硬肉桃、蜜桃、水蜜桃、蟠桃、油桃、黄肉桃等类群各取 1~2 个品种参与 Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus 电泳, 对每一引物扩出桃中各类群这些代表品种比较准确确定主要带的分子量, 对其他用 Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III 作标记电泳的样品可参照 100 bp Ladder 分子量标记的主要带及 Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III 分子量标记带来综合确定分子量范围)。将 PCR 扩增中出现的清晰的带记为 1, 不出现的记为 0, 录入计算机 Excel 表格中, 以 NTSYS-pc 1.8 数据软件进行分析, 相似系数采用 Dice 系数, 最后用 UPGMA 方法聚类。

2 结果与分析

2.1 油桃的带型识别

本试验中 19 个油桃品种, 经不同引物对其 DNA 扩增, 得到各品种 RAPD 带型。引物 S₆₀ 扩增出的带中 (图 1-1), 曙光在 S₆₀-550 bp 处较其他油桃少 1 条带, 华光、曙光和兴津在 S₆₀-900 bp、S₆₀-1200 bp 较其他油桃品种多此带, 这些品种还和艾米拉在 S₆₀-1800 bp 处, 较其他油桃品种多 1 条带; 经引物 S₆₅ 扩增出的带 (图 1-2), 卡拉、早红 2 号、保油 2 号在 S₆₅-950 处少 1 条带, 瑞光 2 号、曙光、早红 2 号、兴津在 S₆₅-1100 bp 处多 1 条带; 经 S₄₅₉ 扩增出的带中 (图 1-3), 瑞光 3 号、华光、曙光、五月火、早红 2 号在 S₄₅₉-930 bp 处多 1 条带; 经 S₁₆₇ 引物扩增出的带中 (图 1-4), 红日、曙光在 S₁₆₇-850 bp 处多 1 条带。综合各引物扩增带, 得油桃 19 个品种的分型识别表现后。

2.2 油桃的聚类分析

将聚类图 (图 2) 以 0.9 处作一接合线, 可分为 3 类, 第 1 类为秀峰, 第 2 类为 Royal Point 和幻想, 其余品种均在第 3 类。秀峰虽为兴津油桃实生得来, 但未聚在兴津一组, 说明其更多接

- | | |
|---|------------|
| 1. 有 S ₁₇ -800 bp 带 | 曙光 |
| 1. 无 S ₁₇ -800 bp 带 | |
| 2. 有 S ₂₁₃₄ -900 bp 带 | 红李光 |
| 2. 无 S ₂₁₃₄ -900 bp 带 | |
| 3. 有 S ₆₈ -1400 bp 带 | 阿姆肯 |
| 3. 无 S ₆₈ -1400 bp 带 | |
| 4. 有 S ₃₁₉ -950 bp | 艾米拉 |
| 4. 无 S ₃₁₉ -950 bp | |
| 5. 有 S ₁₇ -650 bp 带 | 秀峰 |
| 5. 无 S ₁₇ -650 bp 带 | |
| 6. 有 S ₆₀ -900 bp 带 | 兴津 |
| 6. 无 S ₆₀ -900 bp 带 | |
| 7. 有 S ₄₅₉ -1000 bp 带 | 五月火 |
| 7. 无 S ₄₅₉ -1000 bp 带 | |
| 8. 有 S ₁₆₇ -850 bp 带 | 红日 |
| 8. 无 S ₁₆₇ -850 bp 带 | |
| 9. 有 S ₄₅₉ -930 bp 带 | 瑞光 3 号 |
| 9. 无 S ₄₅₉ -930 bp 带 | 瑞光 2 号 |
| 10. 有 S ₆₀ -850 bp 带 | 华光 |
| 10. 无 S ₆₀ -850 bp 带 | |
| 11. 有 S ₁₁₈ -680 bp 带 | NJN 72 |
| 11. 无 S ₁₁₈ -680 bp 带 | |
| 12. 有 S ₂₄ -1150 bp 带 | |
| 13. 有 S ₁₁₈ -1100 bp 带 | 昌黎油桃 |
| 13. 无 S ₁₁₈ -1100 bp 带 | 幻想 |
| 12. 无 S ₂₄ -1150 bp 带 | |
| 14. 有 S ₆₈ -1350 bp 带 | Rayo point |
| 14. 无 S ₆₈ -1350 bp 带 | |
| 15. 有 S ₆₅ -1100 bp 带 | 早红 2 号 |
| 15. 无 S ₆₅ -1100 bp 带 | |
| 16. 有 S ₁₆₇ -500 bp 带 | 保油 2 号 |
| 16. 无 S ₁₆₇ -500 bp 带 | |
| 17. 有 S ₃₆₀ -550 bp 带 | 丽格兰特 |
| 17. 无 S ₃₆₀ -550 bp 带 | 卡拉 |

纳了另一未知亲本的基因。曙光为丽格兰特和瑞光 2 号的杂交后代, 华光为瑞光 3 号和阿姆肯的杂交后代, 从前面的几个扩增图分析来看, 曙光和华光除表现具瑞光 2 号、瑞光 3 号的 RAPD 亲本带, 另外他们还表现具兴津油桃、早红 2 号的扩增带, 而未表现丽格兰特和阿姆肯 2 亲本的特征带, 可见, 亲本遗传给子代的基因的机率不等, 也说明秀峰可与兴津的带型不同。第 2 类中的 Rayal Point 和幻想同为美国的油桃品种聚在一组, 是否有相同的遗传背景, 由于资料有限, 无法作进一步分析。第 3 类中已知的曙光与丽格兰特和瑞光 2 号有亲缘关系; 华光与瑞光 3 号和阿姆肯有亲缘关系, 瑞光 2 号和瑞光 3 号是京玉和 NJN 76 的杂交后代, 相似系数在所有供试油桃中最大。

2.3 多态带数和特殊位点及重点保存种质

曙光的多态带虽名列第二, 但具有独占位点 1 个, 在 2 品种共占一位点数为 3 个, 且包含了五月火的 S₄₅₉-1 000 bp 位点、红日的 S₁₆₇-850 bp 位点、兴津的 S₆₀-900 bp 位点, 因此它应是重点保存的种质(表 1)。瑞光 2 号多态带数名列第 3, 在 2 品种共占一位点数为 2 个, 包含了幻想的 S₆₈-1 350 bp 位点, 瑞光 3 号的 S₅₁-700 bp 位点; 五月火的多态带数最多。因此, 瑞光 2

号、五月火和具独占位点的艾米拉、红李光、阿姆肯, 也应纳入种质保存之列。

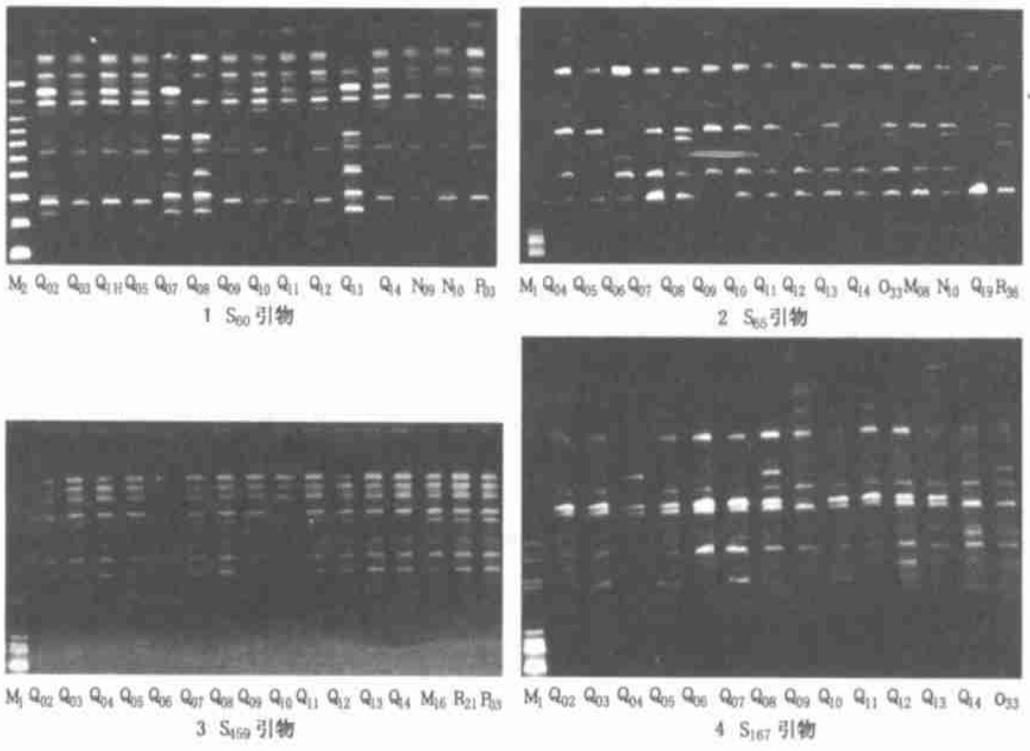


图 1 油桃 19 个品种的 RAPD 扩增带型

M₁ 为 DNA 分子量标记 Lambda DNA /EcoR I + Hind III; M 为硬肉桃; N 为蜜桃; O 为水蜜桃; P 为蟠桃; Q 为油桃品种, 编号见表 1; R 为黄肉桃

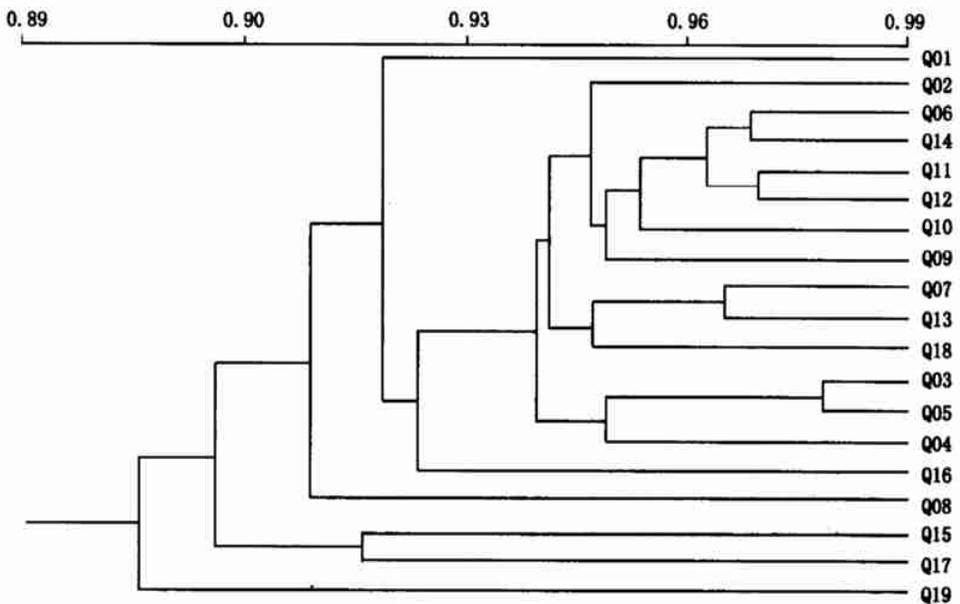


图 2 油桃 19 个品种的聚类分析

3 讨论

关于RAPD扩增产物的稳定性,汪小全等^[6]进行了不同浓度的模板DNA和干鲜叶的模板DNA比较,证明RAPD产物具有很好的重复性;Weeden等^[7]对扩增反应系统中成分的范围进行了比较试验,其结果认为模板、引物及镁离子在一定范围内的变化都不会引起RAPD扩增产物的变化。笔者也进行了同一品种不同时间同一程序提取的DNA的扩增试验,其结果是同一品种即使不同时间或不在同一批次扩增,采用同一反应体系,得到的DNA扩增带是一样的,本试验结果已在发表的论文中报道^[8]。笔者还采用同一引物对集团分离法(BSA)得到的桃粘离核的连锁标记进行了验证,虽然和他的反应体系不一样,但同样得到了粘离核在1 058 bp分离带。可见在进行扩增时,如果控制在同一反应体系条件下,得到的结果是稳定的。笔者在对已知遗传背景的桃属与近缘属间的杂种及桃属中的种进行聚类分析,得到的聚类位置与其遗传背景资料极为相符^[9]。由此说明RAPD技术对系统发育的位置确定也是可信的。本试验通过聚类分析得到的结果与遗传背景也是相吻合的。

通过从200个随机引物中筛选的22个10碱基随机引物对供试的油桃品种的基因组DNA的扩增,得到了多态带,依据这些带可以构建油桃的分子检索表,为将来进行对此品种的认识,直接采用鉴别的引物和区别带的位置提供了捷径,为同物异名、同名异物识别,杜绝生产中假冒伪劣品种造成危害,加强知识产权的保护,提供了理论依据。重点保存的油桃种质的提出,为油桃种质的保存和利用,具有其指导意义。

本研究承蒙中国农业科学院郑州果树所朱更瑞先生、江苏省园艺所郭洪先生、北京市林果所姜全先生及其他同仁提供试材和资料,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 中国农业科学院果树所主编 果树种质资源目录(第一集). 北京:农业出版社 1993
- 2 中国农业科学院果树所主编 果树种质资源目录(第二集). 北京:农业出版社 1998
- 3 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213~ 7218
- 4 Willimas Jonh G K, Anne R Kubelik, Kenneth J Livak, J Antoni Rafalski, Scott V Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531~ 6536
- 5 王力荣,朱更瑞,左覃元,方伟超. 短低温桃和油桃育种进展. *果树科学*, 2000, 17(1): 57~ 62
- 6 汪小全,邹喻苹,张大明,等. RAPD应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. *植物学报*, 1996, 38(12): 954~ 962
- 7 Weeden N F, Timmeman G M, Hemmat M, et al. Inheritance and reliability of RAPD markers. *Joint Plant Breeding Symposia Series*, November 1992. Minneapolis, Minnesota. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*, 1992, (1): 12~ 16
- 8 程中平,陈志伟,胡春根,等. 亲缘关系相近的桃品种的RAPD分析. *湖北农业科学*, 2001, (3): 41~ 43
- 9 程中平,陈志伟,胡春根,邓秀新,罗正荣. 利用分子标记对桃属植物种的识别及其亲缘关系分析. *华中农业大学学报*, 2001, 20(3): 199~ 204
- 10 程中平,陈志伟,胡春根,等. 利用RAPD技术对新疆桃分类地位的探讨. *园艺学报*, 2001, 28(3): 211~ 217