

利用AFLP分析西南特色猕猴桃的遗传多样性

秦小波^{1,2,3*}, 高继海^{3,4}

(1. 四川省自然资源科学研究院, 成都 610015; 2. 四川省生物资源保护与可持续利用实验室, 成都 610015; 3. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 4. 成都中医药大学药学院, 成都 610075)

摘要: 为分析西南地区特色猕猴桃(*Actinidia Lindl.*)的遗传多样性, 建立并优化了猕猴桃 DNA 多态性分析的 AFLP 体系, AFLP 标记体系为 300 ng 基因组 DNA 用 *EcoR* I/*Mse* I (15 U/5 U) 于 37°C 下酶切 2 h, 加接头后的混合物稀释 5 倍用于预扩增, 预扩增产物再稀释 10 倍后进行选择性扩增。结果表明, 筛选的 22 对引物进行扩增反应, 共得到 979 条条带, 其中多态性条带为 649 条。采用优化的 AFLP 体系, 对西南地区的 10 种猕猴桃 50 个样本进行了遗传多样性分析, 包括普通品种中华猕猴桃、美味猕猴桃, 及特色品种硬毛猕猴桃、毛被猕猴桃、革叶猕猴桃、四萼猕猴桃、狗枣猕猴桃、葛枣猕猴桃、京梨猕猴桃和紫果猕猴桃, 结果表明种内和种间的聚类关系明显; 斑果组(*sect. Maculatae*)和净果组(*sect. Leiocarpae*)的种间有聚类交叉, 并呈现地理区域性分布。

关键词: 猕猴桃; AFLP; 遗传多态性; 西南地区; 地理区域性

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.04.004

Studies on Genetic Diversity for Specialty Kiwifruits from Southwestern Regions of China Using AFLP System

QIN Xiao-bo^{1,2,3*}, GAO Ji-hai^{3,4}

(1. *Sichuan Academy of Natural Resource Sciences*, Chengdu 610015, China; 2. *Sichuan Provincial Laboratory for Natural Resources Protection and Sustainable Utilization*, Chengdu 610015, China; 3. *College of Life Science, Sichuan University*, Chengdu 610064, China; 4. *Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*, Chengdu 610075, China)

Abstract: In order to understand the genetic diversity of kiwifruits in southwest of China, AFLP system for kiwifruits was optimized. The optimum AFLP system was constructed as following: 300 ng DNA was digested with *EcoR* I/*Mse* I (15 U/5 U) at 37°C for 2 h, diluted by 5-fold after ligating with adaptors for the pre-amplification, and then the production of pre-amplification diluted 10-fold was used for selective amplification. The results showed that 979 electrophoretic bands were identified totally, of which 649 bands were polymorphic by using 22 pairs of primers. The genetic diversity of ten kiwifruit species, including *Actinidia chinensis*, *A. deliciosa*, *A. chinensis* var. *hispida*, *A. venosa* fo. *pudescens*, *A. rubricaulis* var. *coriacea*, *A. tetramera*, *A. kolomikta*, *A. ploygama*, *A. callosa* var. *henryi* and *A. arguta* var. *purpurea*, from southwestern China, were analysis by using the optimum AFLP system. The results indicated that there were obvious clustering relationship among intraspecific and interspecific, and cross cluster existed in species between *sect. Maculatae* and *sect. Leiocarpae*, related to geographic regional distribution.

Key words: Kiwifruit; AFLP; Genetic diversity; Southwestern China; Geographic region

收稿日期: 2012-11-26 接受日期: 2013-03-26

基金项目: 四川省应用基础研究项目(2012JY0107); 四川省科技条件平台项目资助。

作者简介: 秦小波, 博士, 主要从事植物资源与植物功能成分研究。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: qxb_2003@163.com

猕猴桃属(*Actinidia* Lindl.)隶属于猕猴桃科(Actinidiaceae)多年生藤本植物,是一种重要的水果资源。全世界现有猕猴桃属植物 66 种,其中 62 种原产于中国^[1-3],并在我国广泛分布。然而我国的猕猴桃分布类群比较复杂,种间的品质也参差不齐,差异性很大,因此猕猴桃种间亲缘关系的鉴定工作尤为重要^[4-5]。

扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)是一项新的 DNA 指纹技术,它结合了 Random Amplified Polymorphic DNA (RFLP)和 Polymerase Chain Reaction (PCR)技术的特点,具有 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性,不受环境季节条件的限制,具有反应灵敏、快速高效、指纹多态性丰富、重复性好等优点^[6]。目前, AFLP 技术在柑橘(*Citrus* sp.)^[7-8]、葡萄(*Vitis vinifera*)^[9-10]、苹果(*Malus pumila*)^[11-12]等果树的研究上均有应用,对猕猴桃的 AFLP 分析也有报道,如徐小彪^[13]对猕猴桃属植物的遗传多样性及种质超低温保存进行了研究。我国的西南地区,特别是四川地区是我国猕猴桃的重要产区,有多种优良品种种植,然而有关该地区猕猴桃类群分布与遗传多态性的研究还未见报道。

本研究在优化以往 AFLP 操作的基础上,构建了一套针对西南地区猕猴桃遗传进化关系研究的流程,并以 10 种特色猕猴桃为材料进行了验证,获得了比以往更丰富的多态性位点条带,为四川地区猕猴桃遗传多态性的保存以及猕猴桃优良品种的筛选奠定了基础。

表 1 西南地区特色猕猴桃材料

Table 1 Specialty *Actinidia* samples from southwest China

序号 No.	编号 Code	来源地 Origin	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Altitude (m)
中华猕猴桃 <i>Actinidia chinensis</i>					
1	ACC-1	峨眉山 Mount. Emei	29.58	103.31	2335
2	ACC-2	绵阳 Mianyang	31.82	104.55	1529
3	ACC-3	雅安 Ya'an	29.98	102.87	1701
4	ACC-4	德阳什邡 Shifang, Deyang	31.12	104.17	1439
5	ACC-5	重庆武隆 Wulong, Chongqing	29.21	107.66	1713
6	ACC-6	贵阳息烽 Xifeng, Guiyang	27.15	106.71	1762
7	ACC-7	广元青川 Qingchuan, Guangyuan	32.44	105.73	1433
8	ACC-8	凉山会理 Huili, Liangshan	26.59	102.24	1354
美味猕猴桃 <i>Actinidia deliciosa</i> var. <i>deliciosa</i>					
9	ADD-1	峨眉山 Mount. Emei	29.58	103.27	1506
10	ADD-2	重庆巫山 Wushan, Chongqing	31.04	109.98	1799
11	ADD-3	峨眉山 Mount. Emei	29.57	103.28	1621

1 材料和方法

1.1 材料

野生的猕猴桃叶片采自四川、云南和贵州省,共 10 种猕猴桃 50 个种质材料(表 1):中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch)、美味猕猴桃(*A. deliciosa* var. *deliciosa*)、硬毛猕猴桃(*A. chinensis* Planch. var. *hispida*)、毛被猕猴桃(*A. venosa* Rehd. fo. *pudescens* Li)、革叶猕猴桃(*A. rubricaulis* Dunn var. *coriacea*)、四萼猕猴桃(*A. tetramera* Maxim.)、狗枣猕猴桃[*A. kolomikta* (Maxim. et Rupr.) Maxim.]、葛枣猕猴桃[*A. polygama* (Sieb. et Zucc.) Maxim.]、京梨猕猴桃(*A. callosa* Lindl. var. *henryi* Maxim.)和紫果猕猴桃[*A. arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch.]。猕猴桃嫩叶采摘后立即液氮冻存、备用。

1.2 基因组DNA的提取

按照天根公司 DNasecure Plant Kit (DP320)试剂盒说明书的方法提取猕猴桃叶片基因组总 DNA。使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的质量与浓度,用分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。

1.3 双酶切程序优化

AFLP 技术对模板浓度不敏感,一定范围内能得到理想的结果^[14],为保障试验效果,同时节约材料, DNA 模板用量以 300 ng 为宜。

选用 *EcoR* I/*Mse* I 两种限制性内切酶(Biolabs)

续表(Continued)

序号 No.	编号 Code	来源地 Origin	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Altitude (m)
12	ADD-4	六盘水水城 Shuicheng, Liupanshui	26.39	105.06	1844
13	ADD-5	铜仁江口 Jiangkou, Tongren	27.76	108.33	1275
14	ADD-6	绵阳北川 Beichuan, Mianyang	31.59	104.35	1558
15	ADD-7	铜仁江口 Jiangkou, Tongren	27.73	108.30	1581
16	ADD-8	云南昭通 Zhaotong, Yunnan	27.23	103.75	1907
硬毛猕猴桃 <i>Actinidia chinensis</i> var. <i>hispida</i>					
17	ACP-1	重庆奉节 Fengjie, Chongqing	30.98	109.47	1834
18	ACP-2	巴中通江 Tongjiang, Bazhong	31.71	107.16	1648
19	ACP-3	重庆城口 Chengkou, Chongqing	31.93	108.98	1816
20	ACP-4	峨眉山 Mount. Emei	29.57	103.32	1944
21	ACP-5	绵阳北川 Beichuan, Mianyang	31.81	104.44	1482
22	ACP-6	重庆武隆 Wulong, Chongqing	29.24	107.86	1699
23	ACP-7	攀枝花盐边 Yanbian, Panzhihua	26.73	101.55	1816
革叶猕猴桃 <i>Actinidia rubricaulis</i> var. <i>coriacea</i>					
24	ARD-1	雅安石棉 Shimian, Ya'an	29.25	102.31	1233
25	ARD-2	贵阳息烽 Xifeng, Guiyang	27.14	106.73	1788
26	ARD-3	云南曲靖 Qujing, Yunnan	25.98	104.23	1138
毛被猕猴桃 <i>Actinidia venosa</i> fo. <i>pudescens</i>					
27	AVR-1	重庆城口 Chengkou, Chongqing	31.87	109.96	1822
28	AVR-2	云南雷山 Leishan, Yunnan	26.31	108.07	1601
29	AVR-3	铜仁江口 Jiangkou, Tongren	27.71	108.32	1233
30	AVR-4	峨眉山 Mount. Emei	29.59	103.25	1744
四萼猕猴桃 <i>Actinidia tetramera</i>					
31	AT-1	峨眉山 Mount. Emei	29.63	103.24	1611
32	AT-2	重庆巫山 Wushan, Chongqing	31.06	109.98	1831
狗枣猕猴桃 <i>Actinidia kolomikta</i>					
33	AK-1	乐山峨边 Ebian, Leshan	29.29	103.05	1725
34	AK-2	攀枝花盐边 Yanbian, Panzhihua	26.78	101.52	1837
35	AK-3	凉山会理 Huili, Liangshan	26.56	102.29	1748
36	AK-4	雅安汉源 Hanyuan, Ya'an	29.33	102.73	1600
37	AK-5	丽江永胜 Yongshen, Lijiang	26.66	100.80	1652
38	AK-6	云南丽江 Lijiang, Yunnan	27.15	100.98	1874
葛枣猕猴桃 <i>Actinidia polygama</i>					
39	AP-1	都江堰 Dujiangyan	30.95	103.59	1681
40	AP-2	重庆武胜 Wusheng, Chongqing	30.36	106.34	1834
京梨猕猴桃 <i>Actinidia callosa</i> var. <i>henryi</i>					
41	AC-1	铜仁江口 Jiangkou, Tongren	27.84	108.77	2300
42	AC-2	遵义桐梓 Tongzi, Zunyi	28.25	106.82	2571
43	AC-3	重庆武隆 Wulong, Chongqing	29.27	107.83	1994
44	AC-4	峨眉山 Mount. Emei	29.62	103.24	1765
45	AC-5	遵义务川 Wuchuan, Zunyi	28.55	107.86	2398
紫果猕猴桃 <i>Actinidia arguta</i>					
46	AA-1	昭通镇雄 Zhenxiong, Zhaotong	27.53	107.76	2361
47	AA-2	贵州罗甸 Luodian, Guizhou	25.61	106.64	2219
48	AA-3	曲靖会泽 Huize, Qujing	25.97	103.31	1936
49	AA-4	云南丽江 Lijiang, Yunnan	27.10	100.91	1828
50	AA-5	峨眉山 Mount. Emei	29.6	103.23	1781

在 37℃ 下分别水浴 2 h、4 h、8 h 和 12 h, 酶切体系为: DNA 300 ng、*EcoR* I 15 U、*Mse* I 5 U、100 × BSA 0.2 μL、2.0 μL 10 × NEB buffer 4, 加水至 20 μL。酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以猕猴桃基因组能够完全消化并且在琼脂糖凝胶上分布均匀为最佳效果。酶切后的混合液经 65℃ 水浴 10 min 后用 *T*₄ DNA Ligase (TaKaRa) 于 16℃ 连接接头过夜, 连接体系为: 酶切液 20.0 μL、*Mse* I 接头(50 pm μL⁻¹) 0.5 μL、*EcoR* I 接头(33 pm μL⁻¹) 0.2 μL、*T*₄ DNA ligase (350 U μL⁻¹) 1.2 μL、*T*₄ ligase buffer 2.5 μL, 加水至 25.0 μL。接头核苷酸为 Invitrogen 公司合成, 序列见表 2。

表 2 使用的接头序列与预扩增引物

Table 2 Ligation sequences and pre-amplification primers

引物 Primer	序列 Sequence
接头 Adaptor	
<i>Mse</i> I	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
<i>EcoR</i> I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
预扩增引物 Pre-primer	
Pre- <i>Mse</i> I	5'-GATGAGTCCTGAGTAAN-3'
Pre- <i>EcoR</i> I	5'-GACTGCGTACCAATTCN-3'

1.4 预扩增程序优化

连接产物分别稀释 5、10、20 和 30 倍后做预扩增 PCR。预扩增反应体系包含: 稀释后的连接产物 1 μL、预扩增引物各 1 μL、dNTP (2.5 mmol L⁻¹) 2.0 μL、10 × PCR buffer 2.5 μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.3 μL, 加水至 25 μL。PCR 反应程序为: 94℃ 2 min; 然后 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。预扩增引物序列见表 1。取 5 μL 预扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶检测, 以出现分布均匀且亮度合适的条带为佳。

1.5 选择性扩增引物优化

从 256 个引物对组合中筛选最佳的引物对。PCR 扩增体系与预扩增反应体系相同, PCR 反应程序为: 94℃ 2 min; 然后 94℃ 30 s, 65℃ 30 s (每个循环退火温度降低 0.7℃), 72℃ 80 s, 共 12 个循环; 接着 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 23 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。用变性聚丙烯酰胺

凝胶法对选择性扩增样品进行分析, 采用银染法显色^[15]。以分辨率清晰并大于 50 bp 的条带为可用条带进行统计。

本研究选择 10 种猕猴桃共 50 个种质材料, 使用等量混合 DNA 样品与硬毛猕猴桃 DNA 的 AFLP 结果进行比对, 筛选出总条带数不小于 40 条, 并且差异带条数不小于 20 条的引物对为最佳引物组合, 所有优化试验进行 3 次重复。

1.6 西南地区特色猕猴桃的遗传关系分析

西南地区 10 种特色猕猴桃共 50 个种质材料, 使用优化的双酶切、预扩增和选择性扩增体系进行 AFLP 标记; 根据变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图, 按条带的有(记为 1)和无(记为 0)进行数据统计, 在 Excel 表格中建立谱带数据矩阵; 使用 Jaccard 方法计算各材料间的遗传相似系数(GS), 并利用 NTSYS-PC 软件分析样品间的遗传关系^[9]。

2 结果和分析

2.1 猕猴桃基因组 DNA 提取

提取高质量的猕猴桃 DNA 是进行 AFLP 标记成功的前提, AFLP 标记对 DNA 分子的完整性和纯度有严格要求。使用天根公司试剂盒提取 10 种猕猴桃的基因组 DNA。从图 1 可见, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 所得的 DNA 完整, 没有杂带; 分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 的吸光值, A_{260}/A_{280} 约为 1.85 ~ 1.93, 表明这些 DNA 样品的纯度较好, 可用于后续试验。

2.2 酶切时间的优化

酶切时间的长短影响模板 DNA 能否剪切充分。使用 300 ng 猕猴桃 DNA 和 *EcoR* I/*Mse* I (15 U/5 U) 双酶切体系, 在 37℃ 下水浴 2 ~ 12 h, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 猕猴桃基因组 DNA 酶切 2 h 以上均可得到弥散的抹带状酶切产物, 产物主要集中在 500 ~ 1500 bp, 说明酶切充分、正常, 能满足后续试验要求(图 2)。因此, 采用 *EcoR* I/*Mse* I (15 U/5 U) 于 37℃ 水浴 2 h 作为猕猴桃双酶切试验的最适时间。

2.3 预扩增稀释倍数的优化

将酶切产物与接头连接后分别稀释 5、10、20

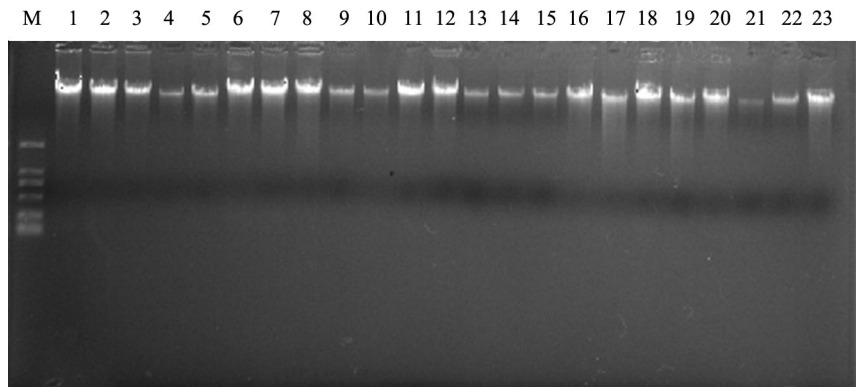


图1 猕猴桃的DNA检测。M:AL 2000 DNA marker; 1~23:猕猴桃DNA样品。

Fig. 1 Detection of kiwifruit DNA. M: AL 2000 DNA marker; 1 - 23: DNA samples of kiwifruit.

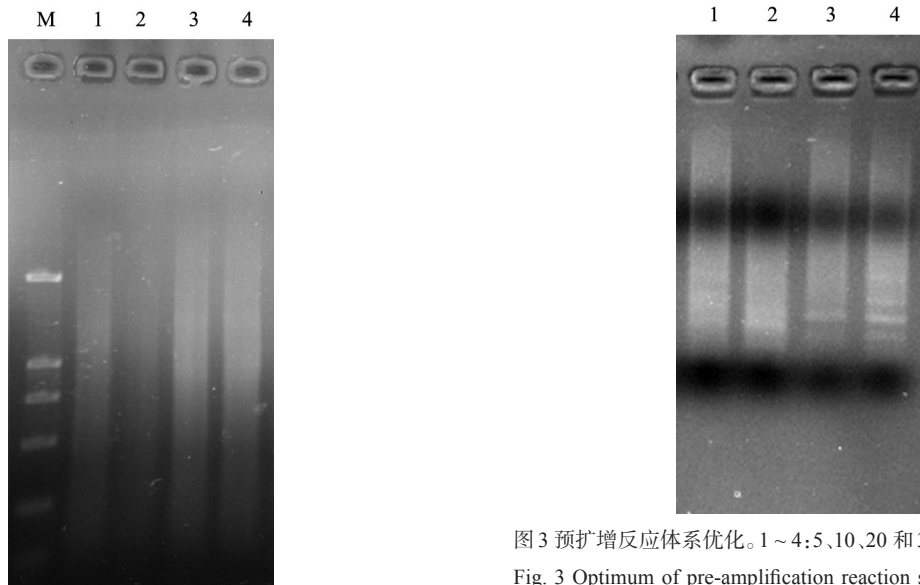


图2 DNA酶切时间的优化。M:2000 DNA marker; 1~4:300 ng DNA分别酶切2、4、8和12 h。

Fig. 2 Optimum of DNA digestion time. M: 2000 DNA marker; 1 - 4: 300 ng DNA digested for 2, 4, 8 and 12 hours, respectively.

和30倍进行PCR预扩增优化试验。如图3所示,各稀释倍数的模板都获得了比较稳定的涂抹状条带,但5倍稀释下得到的猕猴桃PCR预扩增条带分布最均匀、不同大小片段处的浓度也最均衡。虽然AFLP对DNA的浓度要求不严格,但低于 $10 \sim 12 \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$ 时得到的AFLP指纹样式往往不可靠^[22],因此确定PCR预扩增的最适模板浓度为5倍稀释的连接产物。

2.4 选择性扩增引物的优化

以往在猕猴桃的AFLP多态性分析时没有对全部选择性扩增引物组合(256对)进行优化,只做

图3 预扩增反应体系优化。1~4:5、10、20和30倍稀释的连接产物。
Fig. 3 Optimum of pre-amplification reaction system. 1 - 4: Ligation mixture diluted 5, 10, 20 and 30 folds, respectively.

了部分(64对)引物筛选,并最终只有4~8对引物用于正式实验^[16-17]。为避免引物组合和条带统计数目的不足而引起的多态性结果的不稳定和误差,本研究使用西南地区猕猴桃的256对选择性扩增引物组合(16×16)进行了优化试验,最终筛选出22对选择性扩增引物组合适宜西南地区猕猴桃AFLP多态性分析(表3)。这22对引物组合对西南地区10种猕猴桃50个种质材料共扩增出979条条带,其中硬毛猕猴桃的多态性条带数为649条,平均多态性条带比率为66.3%。部分电泳图谱见图4。

2.5 西南地区特色猕猴桃的遗传关系

为验证本研究筛选出的猕猴桃AFLP优化体系,并分析西南地区特色猕猴桃的遗传关系,构建了10种具有地域代表性的50个猕猴桃种质材料

表 3 挑选出的 AFLP 选择性引物

Table 3 AFLP selected primers

选择性引物 Selected primer	总条带数 Total bands*	多态性条带数 Polymorphic bands**	%
P1 (EACG/MCTG)	39	28	71.8
P2 (EACG/MCCC)	41	30	73.2
P3 (EACG/MCGT)	42	33	78.6
P4 (EACG/MCGG)	40	29	72.5
P5 (EACG/MCCT)	41	30	73.2
P6 (EAAC/MCAC)	54	37	68.5
P7 (EAAC/MCCA)	43	29	67.4
P8 (EAAC/MCCG)	44	22	50.0
P9 (EAAC/MCTT)	48	25	52.1
P10 (EAAC/MCCC)	46	27	58.7
P11 (EAAC/MCAA)	45	34	75.6
P12 (EAAC/MCCC)	44	36	81.8
P13 (EAAC/MCGT)	46	21	45.7
P14 (EAAC/MCGC)	47	32	68.1
P15 (EATT/MCTG)	48	37	77.1
P16 (EAGG/MCCC)	41	31	75.6
P17 (EAGG/MCCC)	46	31	67.4
P18 (EAGG/MCCG)	47	38	80.9
P19 (EAAA/MCAC)	40	20	50.0
P20 (EAAA/MCGT)	40	21	52.5
P21 (EATG/MCTG)	49	28	57.1
P22 (EATG/MCCG)	48	30	62.5
总数 Total	979	649	66.3
平均 Mean	44.5	29.5	66.3

*: 猕猴桃混合 DNA; **: 硬毛猕猴桃 DNA。

*: Mixed DNA of all samples; **: DNA of *Actinidia chinensis* var. *hispidula*.

的遗传结构树。从图 5 可见, 50 个猕猴桃种质材料按照种类聚类的趋势十分明显, 说明本实验优化的 AFLP 系统能够准确区分西南地区的各种特色猕猴桃。50 个猕猴桃种质材料的遗传相似性系数变化范围为 0.56 ~ 1.0, 其中多个种类存在相似度达 100% 的种质(如 ADD3 与 ADD7、ADD8, ACC2 与 ADD4-8 等), 而 AT 种质猕猴桃与 ADD 系列的遗传相似性最低。在相似系数 0.56 的水平上, 西南地区猕猴桃按照组系关系分为 3 个大类, 即星毛组 (sect. *Stellatae*) 猕猴桃(中华猕猴桃、美味猕猴桃和硬毛猕猴桃)聚为一大类, 斑果组(sect. *Maculatae*) (毛被猕猴桃、京梨猕猴桃和葛叶猕猴桃)和净果组 (sect. *Leiocarpae*) (紫果猕猴桃、四萼猕猴桃、紫果猕猴桃和葛枣猕猴桃)的聚类关系有交叉, 表现在狗枣猕猴桃的 AK-1 与毛被猕猴桃的 AVR-4 聚类

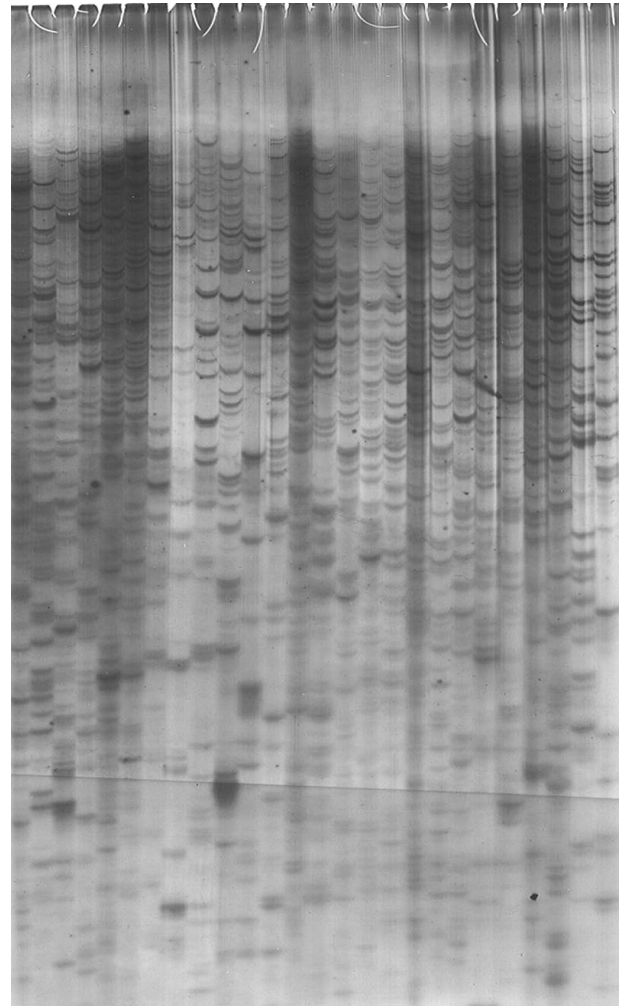


图 4 猕猴桃 AFLP 选择性扩增产物的聚丙烯凝胶电泳图

Fig. 4 Polypropylene gel electrophoresis of AFLP selective amplification for kiwifruits

关系接近, 而净果组的四萼猕猴桃(AT-1 和 AT-2)与西南地区其他种的遗传距离最远, 这与张田^[5]和黄宏文^[18]等的研究结果相同。同属净果组的紫果猕猴桃(AA-4)与狗枣猕猴桃(AK)也存在一定的亲缘关系, 其遗传相似性系数为 0.88, 说明两个品系间存在较近的亲缘关系。

3 讨论

AFLP 标记的操作步骤繁多, 需经总 DNA 提取、酶切连接、预扩增、选择性扩增、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染等步骤, 任何的不当操作都会直接影响实验的结果。其中, DNA 用量、酶切时间、连接产物稀释倍数与选择性扩增引物的筛选是影响试验结果的重要因素, 且以后三者最为重要^[19-20]。

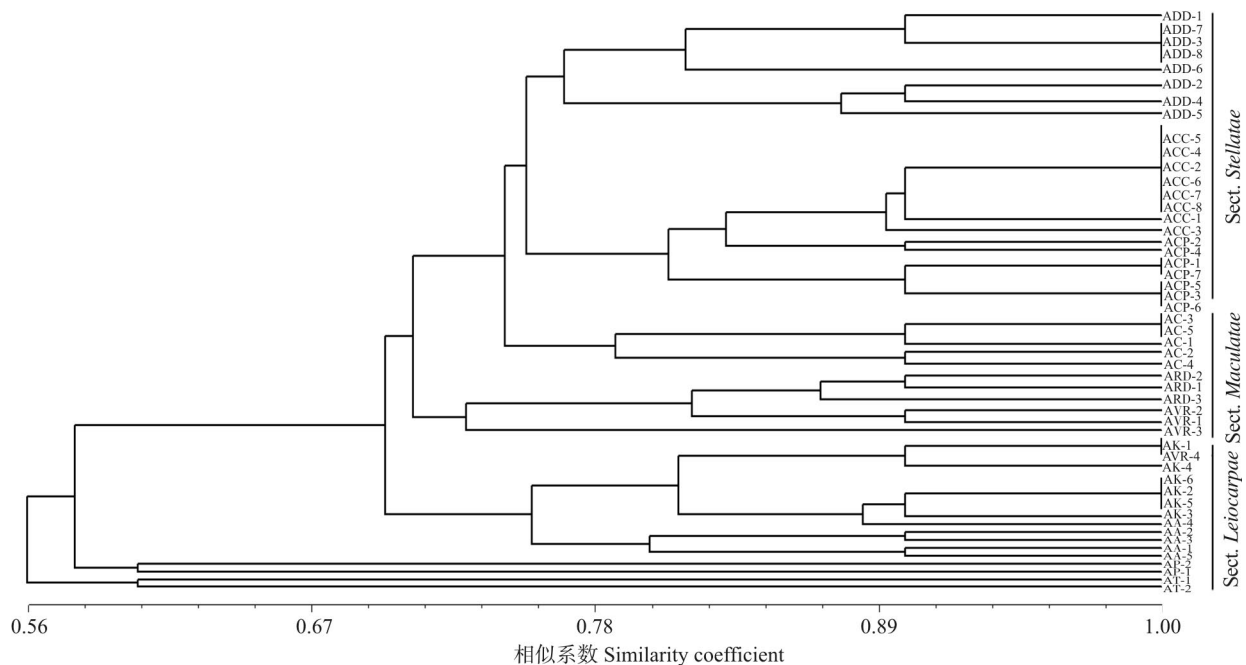


图5 西南地区特色猕猴桃品系基于 AFLP 的 UPGMA 聚类图

Fig. 5 UPGMA map among *Actinidia* species based on AFLP

本文使用西南地区的特色猕猴桃 10 种 50 个种质材料,针对 AFLP 试验中 3 个关键因子进行了优化,最终确定了西南地区猕猴桃 AFLP 多态性研究的体系为: 300 ng 基因组 DNA,用 *EcoR* I/*Mse* I (15 U/5 U)于 37℃下双酶切 2 h,酶切产物加接头后稀释 5 倍进行预扩增,预扩增产物稀释 10 倍后再使用 22 对引物进行选择扩扩增。

AFLP 标记的对象是双酶切处理的基因组 DNA,获得的指纹图谱多态性十分丰富,从分析手段上则是统计电泳条带的数量,因此 AFLP 从操作步骤以及结果分析方面都带有显著的生物统计学特点^[21-22]。虽然以往已有许多关于猕猴桃 AFLP 多态性分析的研究报道,都没有进行全部选择性扩扩增引物对(256 对)的优化,而只进行了部分(64 对)引物筛选,最后只有 8 对引物用于正式实验,少量引物组合和条带数目很容易导致多态性统计分析的不稳定性和偏差^[16-17]。本研究从 256 对引物中筛选出 22 对最适组合,利用这些选择性扩扩增引物对西南地区特色猕猴桃进行 AFLP 分析,每对引物扩扩增出的条带数都在 40 条以上,且多态性条带不少于 20 条。这 22 对引物对西南地区 10 种猕猴桃 50 个种质材料共扩扩增出 979 条带,远远多于以往的研究报道。使用本研究中获得的 22 条引物,保障了猕猴桃 AFLP 多态性分析统计结果的稳定性,弥

补了以往的不足。

我国西南地区是猕猴桃的密集生长区域,星毛组、斑果组、净果组和糙毛组(*sect. Strigosae*)猕猴桃都有分布,但野生糙毛组猕猴桃不易寻找。对西南地区 10 种猕猴桃 50 个种质材料的聚类分析结果表明,猕猴桃 2 种普通种类和 8 种特色种类基本按照种分别聚在一起,10 种猕猴桃间又按组系关系各自聚类。这与徐小彪^[13]的研究结果相似,说明西南地区猕猴桃的遗传多样性差异较大。从图 5 还可看出,四川地区的中华猕猴桃和硬毛猕猴桃在遗传关系上成为 1 个独立小类群,表明这两个种的遗传关系相近,可能是近年来四川地区大量引种猕猴桃造成的。斑果组与净果组种间存在的遗传结构交叉现象,暗示了西南地区猕猴桃分布的区域性特点,如狗枣猕猴桃的 AK-1 与毛被猕猴桃的 AVR-4 聚类关系接近,两个样本分别分布于四川凉山的盐源县和四川攀枝花的盐边县,地理位置十分接近,而紫果猕猴桃的 AA-4 与狗枣猕猴桃的 AK-2、AK-3、AK-5 和 AK-6 也存在较近的地理距离,因此也有聚类关系的交叉现象。

参考文献

- [1] Xu X B, Zhang Q M. Researches and utilizations of germplasm resource of kiwifruit in China [J]. *Chin Bull Bot*, 2003, 20(6):

- 648–655.
- 徐小彪, 张秋明. 中国猕猴桃种质资源的研究与利用 [J]. 植物学通报, 2003, 20(6): 648–655.
- [2] Fine A J. Hypersensitivity reaction to kiwi fruit (Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*) [J]. J Allergy Clin Immunol, 1981, 68(3): 235–237.
- [3] Gall H, Kalveram K J, Forck G, et al. Kiwi fruit allergy: A new birch pollen-associated food allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 1994, 94(1): 70–76.
- [4] Liu Y L, Li Z Z, Zhang P F, et al. Spatial genetic structure in natural populations of two closely related *Actinidia* species (*Actinidiaceae*) as revealed by SSR analysis [J]. Biodiv Sci, 2006, 14(5): 421–434.
- 刘亚令, 李作洲, 张鹏飞, 等. 猕猴桃自然居群SSR遗传变异的空间自相关分析 [J]. 生物多样性, 2006, 14(5): 421–434.
- [5] Zhang T, Li Z Z, Liu Y L, et al. Genetic diversity, gene introgression and homoplasmy in sympatric populations of the genus *Actinidia* as revealed by chloroplast microsatellite markers [J]. Biodiv Sci, 2007, 15(1): 1–22.
- 张田, 李作洲, 刘亚令, 等. 猕猴桃属植物的cpSSR遗传多样性及其同域分布物种的杂交渐渗与同塑 [J]. 生物多样性, 2007, 15(1): 1–22.
- [6] Hu J H, Pan L, Liu H G, et al. Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using AFLP and SSR markers [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(4): 3637–3647.
- [7] Oliveira C A, Bastianel M, Cristofani-Yaly M, et al. Development of genetic maps of the *Citrus* varieties ‘Murcott’ tangor and ‘Pera’ sweet orange by using fluorescent AFLP markers [J]. J Appl Genet, 2007, 48(3): 219–231.
- [8] Fu C H, Chen F Y, Deng X X. Genetic diversity of *Citrus succosa* Hort. ex Tanaka from seven Provinces as revealed by AFLP analysis [J]. Yi Chuan, 2006, 28(3): 268–272.
- [9] Ergul A, Kazan K, Aras S, et al. AFLP analysis of genetic variation within the two economically important Anatolian grapevine (*Vitis vinifera* L.) varietal groups [J]. Genome, 2006, 49(5): 467–475.
- [10] Fanizza G, Chaabane R, Lamaj F, et al. AFLP analysis of genetic relationships among aromatic grapevines (*Vitis vinifera*) [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(6): 1043–1047.
- [11] Paris R, Dondini L, Zannini G, et al. dHPLC efficiency for semi-automated cDNA-AFLP analyses and fragment collection in the apple scab-resistance gene model [J]. Planta, 2012, 235(5): 1065–1080.
- [12] Xu M L, Huaracha E, Korban S S. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple [J]. Genome, 2001, 44(1): 63–70.
- [13] Xu X B. Studies on genetic diversity and germplasm cryopreservation of genus *Actinidia* [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2004: 42–82.
- 徐小彪. 猕猴桃属植物的遗传多样性及种质超低温保存研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004: 42–82.
- [14] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acids Res, 1995, 23(21): 4407–4414.
- [15] Skrede I, Carlsen T, Stensrud Ø, et al. Genome wide AFLP markers support cryptic species in *Coniophora* (Boletales) [J]. Fung Biol, 2012, 116(7): 778–784.
- [16] Lu H, Yi G J, Xu X B, et al. Construction of the AFLP analysis system for *Actinidia* genome [J]. Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin, 2005, 25(8): 1528–1535.
- 陆华, 易干军, 徐小彪, 等. 猕猴桃AFLP分析体系的建立 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(8): 1528–1535.
- [17] Chen H, Yi G J, Xu X B, et al. Identification of the Kiwifruit germplasms in Jiangxi Province by AFLP and its classification significance [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2007, 23(2): 122–129.
- [18] Huang H W, Gong J J, Wang S M, et al. Genetic diversity in the genus *Actinidia* [J]. Biodiv Sci, 2000, 8(1): 1–12.
- 黄宏文, 龚俊杰, 王圣梅, 等. 猕猴桃属(*Actinidia*)植物的遗传多样性 [J]. 生物多样性, 2000, 8(1): 1–12.
- [19] Rodrigues M A, Santos C A, Santana J R. Mapping of AFLP loci linked to tolerance to cowpea golden mosaic virus [J]. Genet Mol Res, 2012, 11(4): 3789–3797.
- [20] Shukla A K, Shasany A K, Khanuja S P. cDNA-AFLP-based numerical comparison of leaf and root organ cDNAs in *Catharanthus roseus* [J]. OMICS, 2012, 16(7/8): 397–401.
- [21] Gupta S, Bharalee R, Bhorali P, et al. Molecular analysis of drought tolerance in tea by cDNA-AFLP based transcript profiling [J]. Mol Biotechnol, 2013, 53(3): 237–248.
- [22] Anderson A. DNA fingerprinting: New technique on trial [J]. Nature, 1989, 339(6224): 408.