



柿 SCoT-PCR 体系优化及品种遗传多样性分析

夏乐哈, 杨婷婷, 杨 勇*, 夏宏义, 张永芳, 王仁梓

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要: 选用国家柿种质资源圃中 24 个牛心柿和 22 个野柿为实验材料, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计, 建立了最优 SCoT-PCR 反应体系 (20 μ L 反应体系中, 含 Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* 聚合酶 1.0 U, 引物 0.5 μ mol/L, DNA 模板 80 ng), 并对不同引物的退火温度进行了优化, 以探讨 SCoT 标记在柿亲缘关系鉴定和品种分类方面的应用。结果显示: (1) 10 条 SCoT 引物对 46 份材料共扩增出 176 个位点, 其中多态性位点 170 个, 多态率达 96.6%; 46 份材料的遗传相似系数在 0.619~0.852 之间。(2) UPGMA 聚类分析显示, SCoT 标记能将 46 份材料完全区分开, 其中: 红花雄野毛柿、红花雌野毛柿单独被聚为一组, 独立于牛心柿和野柿之外, 与形态特征观察结果一致; 璧山牛心柿与野柿聚为一组, 在形态特征上璧山牛心柿也更趋于野柿, 且璧山牛心柿为四倍体, 与其他牛心柿 (六倍体) 不同, 璧山牛心柿应属于野生柿。研究表明, SCoT 标记是研究柿种质资源遗传多样性的有效手段; 46 份材料存在着较高的遗传多样性, 在一定程度上反映了品种的地理分布情况, 也说明地理因素对柿的亲缘关系有很大影响。

关键词: SCoT 标记; 柿; 体系优化; 遗传多样性

中图分类号: Q789

文献标志码: A

System Optimization of SCoT-PCR and Analysis on Genetic Diversity of Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.)

XIA Lehan, YANG Tingting, YANG Yong*, XIA Hongyi, ZHANG Yongfang, WANG Renzi

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this experiment, a $L_{16}(4^5)$ orthogonal design was used for the optimal SCoT-PCR reaction system with 24 Niuxinshi and 22 Wild persimmon accessions from National Field Genebank for Persimmon. The optimal PCR reaction mixture of SCoT-PCR system was 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.2 mmol/L dNTPs, 1.0 U *Taq* polymerase, 0.5 μ mol/L primer and 80 ng template DNA in 20 μ L mixtures. Furthermore, the annealing temperature of each primer was optimized, to explore relative identification and variety classification of persimmon with SCoT markers. The results showed that: (1) A total of 176 loci were detected with 10 SCoT primers in 46 accessions, 170 of which were polymorphic with a polymorphism of 96.6%. The genetic similarity ranged from 0.619 to 0.852. (2) The cluster analysis results showed that the 46 materials could be completely separated by using SCoT markers, Yemaoshi with staminate red flower and pistillate red flower were gathered for a group, they have far relationships with Niuxinshi group and Wild persimmon group, which is consistent with the morphologic observation. Bishan Niushishi was clustered on Wild persimmon group, which was based on its morphological characteristics showed the same as wild types. Bishan Niushishi is tetraploid, different from others which are hexaploid. Bishan Niuxinshi should belong to the

收稿日期: 2013-11-27; 修改稿收到日期: 2014-01-13

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201203047); 农业部农作物种质资源保护项目 (NB2012-2130135-21)

作者简介: 夏乐哈 (1986—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事柿种质资源与分子生物学研究。E-mail: xialehan@163.com

* 通信作者: 杨 勇, 硕士, 副教授, 主要从事柿种质资源研究。E-mail: yang.yong521@163.com

Wild persimmon. The research indicated that SCoT markers can be effectively used to evaluate the genetic diversity of persimmon germplasm. 46 persimmon accessions have high genetic diversity, reflecting the geographical distribution of species to a certain extent, and also show geographical factors have a significant impact on the genetic relationship for persimmon.

Key words: SCoT marker; *Diospyros kaki* Thunb.; system optimization; genetic diversity

起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)分子标记是 Collard 等^[1]在水稻上提出的基于 SRAP(单引物扩增反应)的新的目的基因分子标记方法。其依据植物基因中的 ATG 翻译起始位点侧翼序列的保守性,设计单引物并对基因组进行扩增。SCoT 标记结合 ISSR 标记和 RAPD 标记的优点,操作简单,成本低廉,多态性丰富,重复性好,引物设计简单且通用性良好,能有效地产生与性状联系的标记,不仅可以作为 ISSR 和 RAPD 的有效补充,而且是一种能跟踪性状的新的分子标记,有利于分子辅助育种^[2-5]。该分子标记技术已被成功应用于水稻^[1]、花生^[6]、甘蔗^[7]等常见农作物,而且在园艺植物遗传多样性研究中的应用也较为广泛,如龙眼^[5]、芒果^[8]、柑橘^[9]、石斛兰^[10]等。

柿(*Diospyros kaki* Thunb.)原产中国,有3 000多年的栽培历史^[11],柿属植物在世界上有近400多种,原产中国的有57种6变种1变型^[12]。中国是柿树栽培面积最多、产量最高的国家,其次是日本、韩国。从柿种质资源的收集保存数量上来看,中国目前处于世界领先地位,丰富的资源为柿属植物的遗传改良和新品种培育提供了丰富的材料。然而,由于柿树童期长、遗传上高度杂合、自交不亲和及多倍体现象普遍存在,再加上地区间的相互引种,导致同物异名、同名异物和品种混乱的现象普遍存在,品种间的亲缘关系不明确,给品种区分和育种工作带来诸多困难,使得柿种质的遗传改良进展缓慢,不利于优良品种的推广。加之,地方偏远,未进行资源调查的地方品种,给种质资源调查、收集以及遗传育种工作带来困难^[13]。对于中国柿种质资源的鉴定及亲缘关系的研究,还有大量的工作要做。全国各地种植柿的省份比较多,有一类都被称为“牛心柿”,它是柿的一个品种,果实外形似牛心,故以形状命名。根据130项制表^[14]进行形态学上的观测鉴定,发现一些“牛心柿”形态特征相似,似同一品种,而其他“牛心柿”形态特征差异较大,不是同一品种。为区别不同品种,引进后在名称前加上地方名。野柿在柿原产地是一种自然杂交后的实生后代,多数没有经过嫁接,可能是柿和柿的自然杂交后代,也可能是柿的变

种。野柿的果实虽然小,但是实生苗和其它柿品种亲和性好,具有较高的亲和力,尤其是可作为日本富有系甜柿的砧木来利用。SCoT 分子标记在柿属植物中已有报道^[15],但是取材范围小,且目前尚无对牛心柿和野柿的研究。本研究以24个牛心柿、22个野柿为试材,利用 SCoT 分子标记技术检测柿的遗传多态性,为柿和其他物种的研究提供新型分子标记技术,为开展相关研究提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 试验材料和试剂

试验用栽培品种24个牛心柿、22个野柿,均采自国家柿种质资源圃(表1)。2013年4月采摘幼嫩叶片,低温保存带回实验室,提取DNA。

试验中选用40条引物,其中1~36号参照 Collard 等^[1]公布的引物合成,37~40号参照熊发前等^[6]设计的引物合成(表2),所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。DL2000 marker, dNTPs, Taq 聚合酶, 10×Buffer 等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 采用改良 CTAB 法提取 DNA,参照井赵斌等^[16]提取 DNA 的方法并稍作改动。RNaseA 纯化 DNA 后,用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测其质量及完整性,稀释至40 ng/ μ L,然后在-20℃冰箱中保存备用。

1.2.2 SCoT-PCR 扩增程序及产物检测 PCR 扩增反应参照熊发前等^[17]并稍作改进,在 Eppendorf PCR 扩增仪上进行,扩增程序为94℃预变性3 min;94℃变性1 min,复性退火(50±5)℃1 min,72℃复性2 min,36个循环;最后72℃延伸5 min。扩增反应结束后,加入3 μ L 上样缓冲液(6×Loading buffer),取6 μ L 扩增产物在1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,电极缓冲液为1×TAE,EB染色后,利用凝胶成像系统采集图像。

1.2.3 SCoT-PCR 体系的正交优化设计 选取苍山牛心柿为模板,以 SCoT1 为扩增引物,将 Mg^{2+} 、Taq 聚合酶、dNTPs、引物、DNA 模板等5种影响因

素设置 4 个不同水平^[18](表 3),采用 L₁₆(4⁵)正交试验设计对柿 SCoT-PCR 反应体系进行优化。然后

表 1 供试材料和类型

Table 1 Test materials and types

编号 Code	试材 Genotype	种名 Species	染色体倍性 Ploidy level	原产地 Origin
1	苍山牛心柿 Cangshan Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	山东苍山 Cangshan,Shandong
2	孝义牛心柿 Xiaoyi Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	湖北孝义 Xiaoyi,Hubei
3	襄阳牛心柿 Xiangyang Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	湖北襄阳 Xiangyang,Hubei
4	新昌牛心柿 Xinchang Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	浙江新昌 Xinchang,Zhejiang
5	新安牛心柿 Xinan Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	河南新安 Xi'nan,He'nan
6	宿县牛心柿 Suxian Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	安徽宿县 Suxian,Anhui
7	恭城牛心柿 Gongcheng Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	广西恭城 Gongcheng,Guangxi
8	阳朔牛心柿 Yangshuo Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	广西阳朔 Yangshuo,Guangxi
9	舟曲牛心柿 Zhouqu Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	甘肃舟曲 Zhouqu,Gansu
10	鄖阳牛心柿 Yunyang Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	湖北鄖阳 Yunyang,Hubei
11	杭州牛心柿 Hangzhou Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	浙江杭州 Hangzhou,Zhejiang
12	河北农大牛心柿 Hebeinongda Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	河北保定 Baoding,Hebei
13	洛阳牛心柿 Luoyang Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	河南洛阳 Luoyang,He'nan
14	大丰牛心柿 Dafeng Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	江苏大丰 Dafeng,Jiangsu
15	正阳牛心柿 Zhengyang Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	河南正阳 Zhengyang,He'nan
16	临潼牛心柿 Lintong Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	陕西临潼 Lintong,Shaanxi
17	巴东牛心柿 Badong Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	湖北巴东 Badong,Hubei
18	澄江牛心柿 Chengjiang Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	云南澄江 Chengjiang,Yunnan
19	曹县牛心柿 Caoxian Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	山东曹县 Caoxian,Shandong
20	株洲牛心柿 Zhuzhou Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	湖南株洲 Zhuzhou,Hu'nan
21	临猗牛心柿 Linyi Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	山西临猗 Linyi,Shanxi
22	合阳牛心柿 Heyang Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	陕西合阳 Heyang,Shaanxi
23	齐镇牛心柿 Qizhen Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=6x=90	陕西眉县 Meixian,Shaanxi
24	璧山牛心柿 Bishan Niuxinshi	<i>D. kaki</i> Thunb.	2n=4x=60	重庆璧山 Bishan,Chongqing
25	凤山野生柿 Fengshan wide persimmon	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	广西凤山 Fengshan,Guangxi
26	楼后北野柿 Louhoubei wide persimmon	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	陕西眉县 Meixian,Shaanxi
27	野柿-01 Wide persimmon 01	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	浙江杭州 Hangzhou,Zhejiang
28	野柿-02 Wide persimmon 02	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	浙江杭州 Hangzhou,Zhejiang
29	野柿-03 Wide persimmon 03	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	浙江杭州 Hangzhou,Zhejiang
30	丽水野柿-01 Lishui wide persimmon01	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	云南丽水 Lishui,Yunnan
31	丽水野柿-02 Lishui wide persimmon02	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	云南丽水 Lishui,Yunnan
32	上虞野柿 Shangyu wide persimmon	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	浙江上虞 Shangyu,Zhejiang
33	伏山野柿-01 Fushan wide persimmon 01	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南伏山 Fushan,He'nan
34	伏山野柿-02 Fushan wide persimmon 02	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南伏山 Fushan,He'nan
35	伏山野柿-03 Fushan wide persimmon 03	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南伏山 Fushan,He'nan
36	伏山野柿-04 Fushan wide persimmon 04	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南伏山 Fushan,He'nan
37	伏山野柿-05 Fushan wide persimmon 05	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南伏山 Fushan,He'nan
38	伏山野柿-06 Fushan wide persimmon 06	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南伏山 Fushan,He'nan
39	伏山野柿-07 Fushan wide persimmon 07	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南伏山 Fushan,He'nan
40	百战坪野柿-01 Baizhanping wide persimmon 01	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南百战坪 Baizhanping,He'nan
41	百战坪野柿-02 Baizhanping wide persimmon 02	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南百战坪 Baizhanping,He'nan
42	百战坪野柿-03 Baizhanping wide persimmon 03	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南百战坪 Baizhanping,He'nan
43	百战坪野柿-04 Baizhanping wide persimmon 04	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南百战坪 Baizhanping,He'nan
44	百战坪野柿-05 Baizhanping wide persimmon 05	<i>D. kaki</i> var. <i>sylvestris</i> Mak.	2n=6x=90	河南百战坪 Baizhanping,He'nan
45	红花雄野毛柿 Yemaoshi with Staminate red flower	<i>D. spp.</i>	unknown	四川德阳 Deyang,Sichuan
46	红花雌野毛柿 Yemaoshi with Pistillate red flower	<i>D. spp.</i>	unknown	四川德阳 Deyang,Sichuan

表 2 检测用的 SCoT 引物序列

Table 2 The primer sequences used in SCoT analysis

编号 Code	引物 Primer	序列(5'→3')Sequence	编号 Code	引物 Primer	序列(5'→3')Sequence
1	SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA	21	SCoT21	ACGACATGGCGACCCACA
2	SCoT2	CAACAATGGCTACCACCC	22	SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC
3	SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG	23	SCoT23	CACCATGGCTACCACCAG
4	SCoT4	CAACAATGGCTACCACCT	24	SCoT24	CACCATGGCTACCACCAT
5	SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA	25	SCoT25	ACCATGGCTACCACCGGG
6	SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC	26	SCoT26	ACCATGGCTACCACCGTC
7	SCoT7	CAACAATGGCTACCACGG	27	SCoT27	ACCATGGCTACCACCGTG
8	SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT	28	SCoT28	CCATGGCTACCACCGCCA
9	SCoT9	CAACAATGGCTACCAGCA	29	SCoT29	CCATGGCTACCACCGGCC
10	SCoT10	CAACAATGGCTACCAGCC	30	SCoT30	CCATGGCTACCACCGGCG
11	SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA	31	SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT
12	SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	32	SCoT32	CCATGGCTACCACCGCAC
13	SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG	33	SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG
14	SCoT14	ACGACATGGCGACCACGC	34	SCoT34	ACCATGGCTACCACCGCA
15	SCoT15	ACGACATGGCGACCGCGA	35	SCoT35	CATGGCTACCACCGGCCC
16	SCoT16	ACCATGGCTACCACCGAC	36	SCoT36	GCAACAATGGCTACCACC
17	SCoT17	ACCATGGCTACCACCGAG	37	SCoT38	AAGCAATGGCTACCACCG
18	SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC	38	SCoT39	ACGACATGGCGACCAGCG
19	SCoT19	ACCATGGCTACCACCGGC	39	SCoT40	ACGACATGGCGACCACGT
20	SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG	40	SCoT41	ACGACATGGCGACCGCGG

表 3 柿 SCoT-PCR 反应体系 L₁₆(4⁵) 正交设计

Table 3 L₁₆(4⁵) orthogonal design of persimmon SCoT-PCR

水平 Level	模板 DNA 用量 Template DNA dosage/ng	Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration /(mmol/L)	dNTPs 浓度 dNTPs concentration /(mmol/L)	引物浓度 Primer concentration /(μmol/L)	Taq 聚合酶用量 Taq polymerase dosage/U
1	20	1.5	0.2	0.2	0.5
2	20	2.0	0.3	0.3	1.0
3	20	2.5	0.4	0.4	1.5
4	20	3.0	0.5	0.5	2.0
5	30	1.5	0.3	0.4	2.0
6	30	2.0	0.2	0.5	1.5
7	30	2.5	0.5	0.2	1.0
8	30	3.0	0.4	0.3	0.5
9	40	1.5	0.4	0.5	1.0
10	40	2.0	0.5	0.4	0.5
11	40	2.5	0.2	0.3	2.0
12	40	3.0	0.3	0.2	1.5
13	50	1.5	0.5	0.3	1.5
14	50	2.0	0.4	0.2	2.0
15	50	2.5	0.3	0.5	0.5
16	50	3.0	0.2	0.5	1.0

将条带的灵敏性、特异性及清晰度进行比较,从而进行下一步的分析。

1.2.4 引物筛选和退火温度的确定 根据正交试验结果,选择最佳反应体系进行引物筛选和退火温度的确定试验。

1.2.5 数据统计与处理 对扩增清晰且易于辨认的条带采用“0-1”系统记录其位置,在相同迁移位置有带的记为“1”,无带记为“0”,建立 SCoT 标记的 0、1 矩阵。利用 NTSYS-pc2.1 软件进行遗传相似系数计算,并用 UPGMA 程序构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 SCoT-PCR 最优体系建立

2.1.1 正交试验设计 由正交试验结果(图 1)可以看出,不同的处理组合,由于 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 聚合酶、引物和模板 DNA 用量搭配组合的不同,扩增结果存在着明显的差异。其中,处理 7,13 扩增结果不清晰,处理 15,16 条带比较清晰,条带幅度大。但因图片所显示的条带不是很亮,所以适当增加 DNA 的体积,比照处理 15 和 16 的搭配组合,调整后 20 μ L SCoT-PCR 优化体系为:40 ng/ μ L 模板 DNA 2.0 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 2.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μ L, 10 μ mol/L 引物 1.0 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 聚合酶 0.2 μ L。

2.1.2 引物筛选及最适退火温度 根据正交试验结果所确定的柿属植物 SCoT-PCR 最佳反应体系,以苍山牛心柿和野柿-01 的基因组 DNA 为模板,对本试验选定的 40 条引物进行筛选。通过反复试验,从 40 条引物中筛选出条带清晰、种间差异明显、多态性好的 10 个引物用于柿种质资源的遗传多样性分析(表 4)。

对每一筛选出的引物进行最适退火温度的确定。根据(50 $\pm$ 5) $^{\circ}$ C 的温度^[19]设定范围,PCR 仪自动生成 12 个温度梯度,分别为 45.1 $^{\circ}$ C、45.3 $^{\circ}$ C、45.9 $^{\circ}$ C、46.8 $^{\circ}$ C、47.9 $^{\circ}$ C、49.1 $^{\circ}$ C、50.4 $^{\circ}$ C、51.7 $^{\circ}$ C、52.8 $^{\circ}$ C、53.8 $^{\circ}$ C、54.5 $^{\circ}$ C 和 54.8 $^{\circ}$ C。根据电泳检测结果,选择扩增条带数量多、条带清晰的作为最适退火温度,扩增效果相同的情况下选择温度高的作为最适退火温度,以确保 PCR 产物的特异性。各

引物最适退火温度如表 4 所示。

2.2 SCoT 标记的遗传多态性分析

2.2.1 SCoT 标记的多态性 本研究从 40 条引物中筛选出扩增条带清晰、多态性强的引物 10 条。利用这 10 条引物对 46 份柿种质资源进行扩增,共扩增出 DNA 位点 176 个,其中 170 个位点具有多态性,占总位点的 96.6%,说明供试样品的遗传多样性比较丰富。引物 4、17、25、27、33、39 的多态性比率比较高,均为 100.0%;引物 25 扩增的条带最多(23 条),引物 27 扩增的条带最少(12 条);与其他引物相比,引物 20 的多态性最小,总条带为 18,多态性条带为 16,多态性比率为 88.9%。每条引物可扩增出 12~23 条带,平均 17.6 条。产物条带介于 300~3 000 bp 之间,以 500~2 000 bp 居多(图 2)。

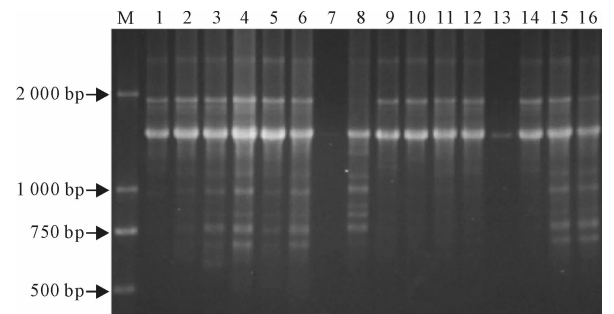


图 1 苍山牛心柿 SCoT-PCR 反应体系正交试验优化结果

M. DL2000 marker; 从左到右依次为
正交表 $L_{16}(4^5)$ 的 1~16 个处理
Fig. 1 The results of Cangshan Niuxinshi SCoT-PCR system optimized with orthogonal design
M. DL2000 marker; 1~16 corresponding to treatments of $L_{16}(4^5)$

表 4 柿 SCoT 引物筛选、最适退火温度及多态性分析

Table 4 Selected SCoT primers, annealing temperatures and polymorphic analysis in persimmon

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	退火温度 Annealing temperatures/ $^{\circ}$ C	总条带数 No. of total bands	多态性条数 No. of polymorphic bands	多态性百分率 Percentage of polymorphic bands/%
SCoT4	CAACAATGGCTACACCT	45.0	18	18	100.0
SCoT17	ACCATGGCTACCACGAG	51.5	18	18	100.0
SCoT20	ACCATGGCTACCACGCG	54.0	18	16	88.9
SCoT23	CACCATGGCTACCACCAG	52.5	20	18	90.0
SCoT25	ACCATGGCTACCACGGG	52.0	23	23	100.0
SCoT26	ACCATGGCTACCACGTC	47.0	17	16	94.1
SCoT27	ACCATGGCTACCACGTG	45.0	12	12	100.0
SCoT33	CCATGGCTACCACGCG	49.5	13	13	100.0
SCoT34	ACCATGGCTACCACGCA	51.5	19	18	94.7
SCoT39	ACGACATGGCGACCAGCG	54.0	18	18	100.0
合计 Total			176	170	96.6
平均 Mean			17.6	17	96.6

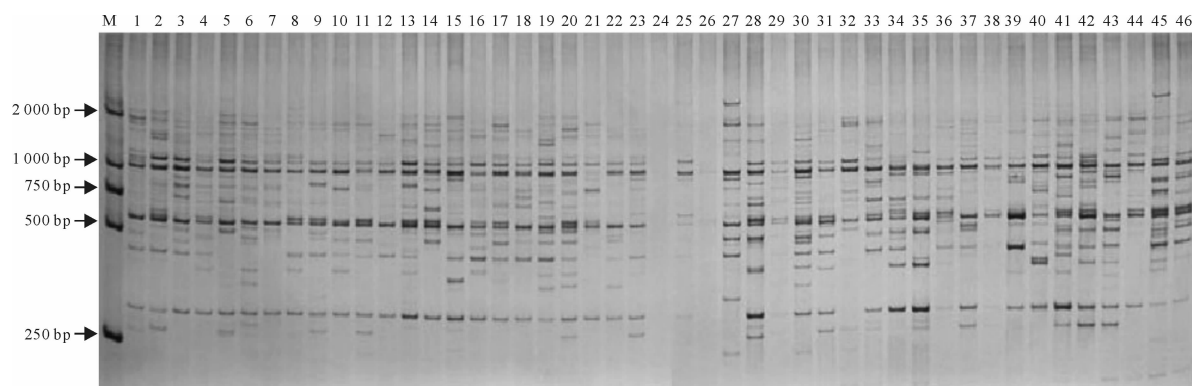


图2 引物 SCoT25 对 46 份柿种质的 SCoT-PCR 扩增

M, DL2000; 1~46. 材料名见表 1; 下图同

Fig. 2 SCoT-PCR amplification of 46 persimmon germplasms by using primer SCoT25

M, DL2000; 1~46. The serial numbers of material saw Table 1; The same as below

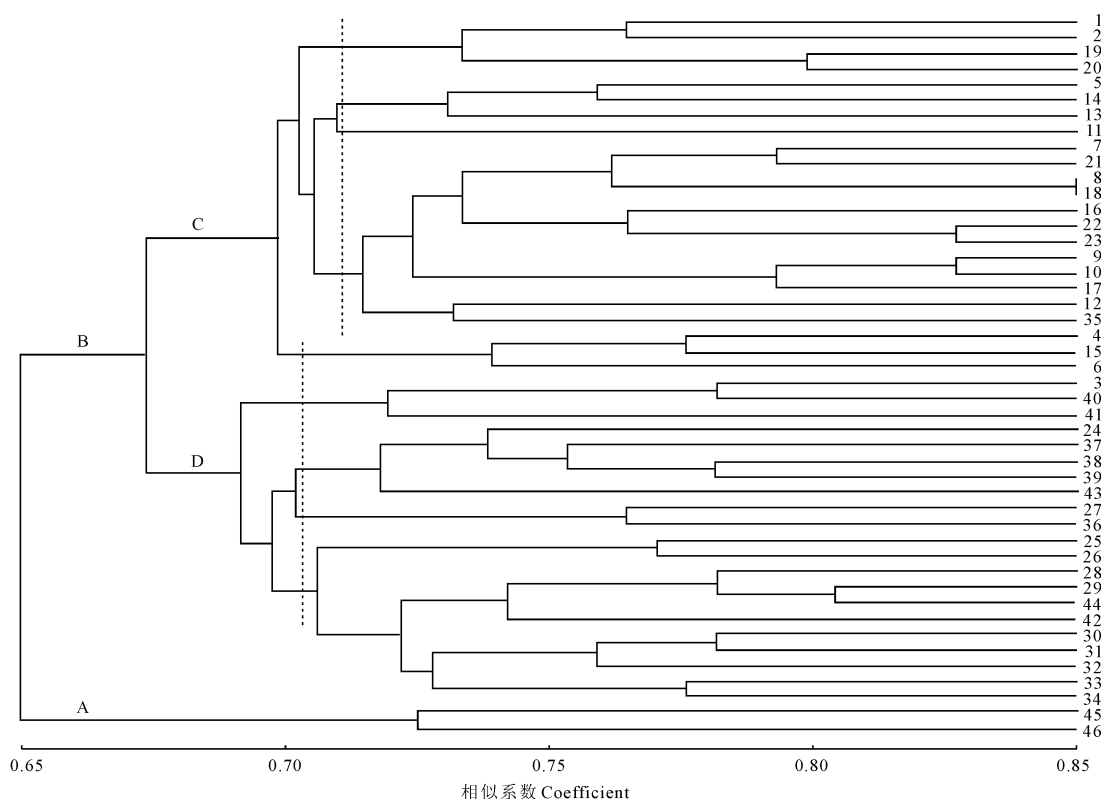


图3 46 份材料 SCoT 数据聚类图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis based on SCoT data of 46 cultivars

2.2.2 聚类分析 利用 Ntsys-pc2.1 软件计算出 10 条引物扩增结果在不同种质之间的相似系数, 46 份试材的相似系数值分布在 0.619~0.852 之间。其中, 来自广西的阳朔牛心柿与云南的澄江牛心柿, 相似系数最大, 数值为 0.852; 其次为舟曲牛心柿和鄯阳牛心柿、合阳牛心柿和齐镇牛心柿, 相似系数均为 0.830, 这可能是由于相互引种造成柿品种资源混乱, 出现了“同物异名”^[9]。从形态上看, 阳朔牛心

柿与澄江牛心柿非常相似, 舟曲牛心柿和鄯阳牛心柿、合阳牛心柿和齐镇牛心柿也几乎相同, 说明用 SCoT 标记可以鉴别同物异名品种。来自四川的红花雄野毛柿、红花雌野毛柿和其他 44 份材料的相似系数最小, 为 0.619, 说明这两者和其他种质资源的遗传差异很大^[7]。

用 UPGMA 构建 46 个柿品种的分子系统树 (图 3)。从聚类图可以看出, 柿品种之间的亲缘关

系比较复杂。在相似系数 0.680 的水平,可以将 46 个品种分成 A 和 B 两大组,其中 A 组只有红花雄野毛柿和红花雌野毛柿 2 个品种,B 组又可以分为 C (牛心柿组)、D (野柿组) 2 个组。在相似系数为 0.708 的水平,可以将牛心柿组分为 4 个亚组,其中第一亚组包括苍山牛心柿、孝义牛心柿、曹县牛心柿、株洲牛心柿,第二亚组包括新安牛心柿、杭州牛心柿、洛阳牛心柿、大丰牛心柿,第三亚组包括恭城牛心柿、阳朔牛心柿、舟曲牛心柿、鄯阳牛心柿、河北农大牛心柿、临潼牛心柿、巴东牛心柿、澄江牛心柿、临猗牛心柿、合阳牛心柿、齐镇牛心柿、伏山野柿-03,第四亚组包括新昌牛心柿、宿县牛心柿、正阳牛心柿;在相似系数为 0.701 的水平,可以将野柿组分为 3 个亚组,第一个亚组包括襄阳牛心柿、百战坪野柿-01、百战坪野柿-02,第二亚组包括璧山牛心柿、野柿-01、伏山野柿-04、伏山野柿-05、伏山野柿-06、伏山野柿-07、百战坪野柿-04,第三亚组包括凤山野生柿、楼后北野柿、野柿-02、野柿-03、丽水野柿-01、丽水野柿-02、上虞野柿、伏山野柿-01、伏山野柿-02、百战坪野柿-03、百战坪野柿-05。

3 讨 论

分子标记在柿及其他果树遗传育种、品种鉴定、亲缘关系分析等方面都有重要作用^[20-21]。其中 RAPD、SSR、ISSR 和 AFLP 是应用最为广泛的几种分子标记技术,但是它们都是传统意义上的随机 DNA 分子标记,得到的位点一般与目标性状基因距离较远,不能很好地与目标性状连锁,这使得分子标记在应用上与其目标有一定的偏差,因而限制了它们的应用^[2]。SCoT 分子标记作为一种基于 PCR 技术的新型分子标记具有操作简单、引物具有通用性、成本低廉、多态性高、可获得丰富的遗传信息等诸多优点,能更好地反映物种的遗传多样性和亲缘关系^[17]。SCoT 分子标记技术已经被成功应用于多种材料^[18-22],并且能很有效地将材料中的不同品种通过聚类分析区分开^[5-8]。侯小改等^[23]运用牡丹 17 个品种验证了 SCoT-PCR 体系良好的稳定性和可靠性,并从 36 个 SCoT 引物中筛选出扩增条带清晰多态性丰富的 24 个引物。陈香玲等^[24]从 86 条引物中筛选出 18 条重复性好,条带清晰的引物对 36 份菠萝种质资源进行 PCR 扩增,多态性比率为 64.99%,并且通过 UPGMA 聚类分析,SCoT 标记能将 36 份菠萝种质完全区分开。邓立宝等^[10]采用形态观察和 SCoT 分子标记研究相结合的方法对广

西西北部高原地区的 31 份柿种质资源进行研究,多态性带比例为 95.65%,并且聚类分析结果显示与表型分析的结果基本一致。本研究采用 SCoT 技术从分子水平上论证了柿品种中存在的同物异名、同名异物现象,并验证植物分子水平分类是形态分类的一个重要补充。在柿品种鉴别方面,SCoT 技术所揭示的多态性是真实可靠的,弥补了柿传统分类方法的不足,为柿种质资源的收集、保存、分类以及有效利用提供理论基础。

大多数关于 SCoT 分子标记的研究中,PCR 扩增时所有引物均采用单一退火温度^[4,6,9,23]。本研究对筛选出的引物逐一进行了退火温度的优化,发现不同的引物有不同的最适退火温度,范围从 45.0℃ 到 55.0℃,不同于 Collard 等^[1]采用的统一温度 50℃。研究认为,在进行不同材料的 SCoT 分析时,可以对所用引物的退火温度进行进一步筛选以提高扩增产物的特异性。

本试验选取遗传差异较大的 2 份柿基因组 DNA 为模板用于引物的筛选,从 40 条引物中筛选出 10 条适于柿属植物的多态性引物,在 46 份材料中都表现出较高的多态性,这说明柿属植物在系统进化方面有较高的相关性。利用这些引物能从部分材料中扩增出一些特异性条带,这些特异性条带是否与特定性状相关,还需要进一步实验证明。46 份材料中 10 条引物共扩增出 170 个多态性位点,平均每个引物有 17 个多态性位点,多态性比率高达 96.6%,这说明来源于中国不同省份的 24 个牛心柿和 22 个野柿存在着比较高的遗传多样性,适应环境的能力较强^[22]。同时,这也说明了 SCoT 分子标记在一定程度上反映了品种的地理分布情况,说明地理因素对柿的亲缘关系研究有很大影响。从聚类图可以看出,在相似系数 0.680 的水平,红花雄野毛柿和红花雌野毛柿与其他品种分开,形态观察可以看出他们的嫩叶呈深红褐色,花呈红色,其中红花雌野毛柿的花器官各部位都有毛,明显区别于其他柿种质资源,或可作为一个新种。璧山牛心柿和其他牛心柿存在较大的差异,在形态上可以看出璧山牛心柿各器官都有茸毛,尤其是子房上密被白色茸毛,接近于原始的野生性状,只是因为果实大小和当地的牛心柿相近,才被称为“牛心柿”,本质上属于野生,被聚在野柿一组是合理的。另外,璧山牛心柿是四倍体,也不同于其他牛心柿的六倍体,这也是对璧山牛心柿的首次分子学研究。本研究表明,丽水野柿、百战坪野柿和伏山野柿聚在同一亚组,这与井赵斌

等的研究结果^[16]一致;野柿和百战坪野柿没有聚在同一个亚组,这与耿攀等的研究结果^[25]一致,原因有待进一步阐明。在相似系数分析中,46 份柿基因型的遗传系数在 0.619~0.852 之间,说明 SCoT 标

记能够用于柿种质资源的遗传多样性分析。本研究为进一步利用 SCoT-PCR 标记技术进行柿种质亲缘关系研究、系统进化分析和遗传多样性评价奠定了基础。

参考文献:

- [1] COLLARD B C Y, MACKILL D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, **27**(1): 86—93.
- [2] LU C R(陆才瑞), YU SH X(喻树迅), YU J W(于霁雯), *et al.* Development and appraisalment of functional molecular marker: intron sequence amplified polymorphism (ISAP)[J]. *Hereditas(遗传)*, 2008, **30**(9): 1 207—1 216(in Chinese).
- [3] ANDERSEN J R, LÜBBERSTEDT T. Functional markers in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, **8**(11): 554—560.
- [4] CHEN H(陈 虎), HE X H(何新华), LUO C(罗 聪), *et al.* The Optimization of SCoT-PCR System of Longan (*Dimocarpus longan*) [J]. *Genomics and Applied Biology(基因组学与应用生物学)*, 2009, **28**(5): 970—974(in Chinese).
- [5] CHEN H(陈 虎), HE X H(何新华), LUO C(罗 聪), *et al.* Analysis on the genetic diversity of 24 Longan (*Dimocarpus longan*) accessions by SCoT markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica(园艺学报)*, 2010, **37**(10): 1 651—1 654(in Chinese).
- [6] XIONG F Q(熊发前), JIANG J(蒋 菁), ZHONG R CH(钟瑞春), *et al.* Application of SCoT molecular marker in genus *Arachis*[J]. *Acta Agronomica Sinica(作物学报)*, 2010, **36**(12): 2 055—2 061(in Chinese).
- [7] SU Y CH(苏亚春), LING H(凌 辉), WANG H B(王恒波), *et al.* Optimization of SCoT-PCR reaction system, and screening and utilization of polymorphic primers in sugarcane[J]. *Chinese Journal Applied and Environmental Biology(应用与环境生物学报)*, 2012, **18**(5): 810—818(in Chinese).
- [8] LUO C, HE X H, CHEN H, *et al.* Analysis of diversity and relationship among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, **38**(6): 1 176—1 184.
- [9] HAN G H(韩国辉), XIANG S Q(向素琼), WANG W X(汪卫星), *et al.* Establishment and application of SCoT molecular marker system for *Citrus*[J]. *Acta Horticulturae Sinica(园艺学报)*, 2011, **38**(7): 1 243—1 250(in Chinese).
- [10] BHATTACHARYYA P, KUMARIA S, KUMAR S, *et al.* Start codon targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species[J]. *Gene*, 2013, **529**(1): 21—26.
- [11] 河北农业大学, 曲泽洲. 果树栽培学各论[M]. 北京: 农业出版社, 1987: 274—294.
- [12] 李树刚. 柿[M]//吴征镒. 中国植物志(第 60 卷第 1 分册). 北京: 科学出版社, 1987: 84—154.
- [13] 王仁梓. 柿. [M]//中国农业科学院郑州果树研究所. 中国果树栽培学. 北京: 农业出版社, 1987: 619—636.
- [14] 杨 勇, 王仁梓, 等. 柿种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 41—61.
- [15] DENG L B(邓立宝), HE X H(何新华), LI T W(李天文), *et al.* Investigation and analysis on the genetic diversity of persimmon germplasms in Plateau of Northwest Guangxi[J]. *Acta Horticulturae Sinica(园艺学报)*, 2012, **39**(2): 215—224(in Chinese).
- [16] JING ZH B, RUAN X F, WANG R Z, *et al.* Genetic diversity and relationships between and within persimmon (*Diospyros* L.) wild species and cultivated varieties by SRAP markers[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2013, **299**(8): 1 485—1 492.
- [17] XIONG F Q(熊发前), TANG R H(唐荣华), CHEN ZH L(陈忠良), *et al.* SCoT: A novel gene targeted marker technique based on the translation start codon[J]. *Molecular Plant Breeding(分子植物育种)*, 2009, **7**(3): 635—638(in Chinese).
- [18] ZHANG J Y(张君玉), GUO D L(郭大龙), GONG Y(龚 莹), *et al.* Optimization of start codon targeted polymorphism PCR(SCoT-PCR) system in *Vitis vinifera*[J]. *Journal of Fruit Science(果树学报)*, 2011, **28**(2): 209—214(in Chinese).
- [19] QIN G X(秦国新), HE Q(何 桥), LIANG G L(梁国鲁), *et al.* Establishment and optimization of SCoT-PCR system in *Fragaria*[J]. *Journal of Fruit Science(果树学报)*, 2012, **29**(3): 393—397(in Chinese).
- [20] WANG W SH(王万双), LUO ZH R(罗正荣), CAI L H(蔡礼鸿). Advances in the identification and taxonomy of persimmon (*Diospyros kaki* L. f.) cultivars[J]. *Acta Horticulturae Sinica(园艺学报)*, 1998, **25**(1): 44—50(in Chinese).
- [21] GUO D L, ZHANG H Q, LUO ZH R. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis[J]. *Plant Science*, 2006, **170**(3): 528—533.
- [22] GUO L Y(郭丽英), GUO Y J(郭雁君), JI Q H(吉前华), *et al.* SCoT analysis of *Citrus reticulata* blanco cv. Bian Gan germplasm resources[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences(西南农业学报)*, 2013, **26**(2): 428—431(in Chinese).
- [23] HOU X G(侯小改), WANG J(王 娟), JIA T(贾 甜), *et al.* Orthogonal optimization of SCoT-PCR system and primer screening of tree peony[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica(华北农学报)*, 2011, **26**(5): 92—96(in Chinese).
- [24] CHEN X L(陈香玲), SU W Q(苏伟强), LIU Y Q(刘业强), *et al.* Analysis on genetic diversity of 36 pineapple collections by SCoT markers[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences(西南农业学报)*, 2012, **25**(2): 625—629(in Chinese).
- [25] GENG P(耿 攀), RUAN X F(阮小凤), YANG Y(杨 勇), *et al.* Analysis of genetic diversity of *Diospyros* spp. germplasm resources by using SSR markers[J]. *Journal of Northwest A&F University(Nat. Sci. Edi.)(西北农林科技大学学报·自然科学版)*, 2010, **38**(12): 190—196(in Chinese).