

韦荣昌,马小军,闫志刚,等. 罗汉果三倍体雌株与二倍体雄株遗传背景的 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):241-243,293.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.078

罗汉果三倍体雌株与二倍体雄株遗传背景的 RAPD 分析

韦荣昌^{1,2}, 马小军², 闫志刚¹, 白隆华¹, 潘丽梅¹, 韦树根¹, 施力军¹

(1. 广西药用植物园,广西南宁 530023; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193)

摘要:为了给无籽罗汉果优良品种的选育提供分子生物学依据,利用 RAPD 标记对 28 份罗汉果三倍体雌株与二倍体雄株进行遗传背景分析。结果表明,罗汉果三倍体雌株和二倍体雄株的遗传背景存在一定的丰富性,但大多遗传相似性系数较大,遗传距离较近。总的来说,罗汉果三倍体雌株和二倍体雄株遗传背景的复杂性较低,应该尽快采取相应措施,进行种质创新,丰富无籽罗汉果亲本的遗传背景。

关键词:罗汉果;二倍体;三倍体;遗传背景;RAPD

中图分类号: S567.903 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0241-03

罗汉果 [*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey] 是雌雄异株的葫芦科 (Cucurbitaceae) 罗汉果属多年生藤本植物^[1],为我国南方特有的珍贵药用植物和甜料植物,主产于广西壮族自治区永福、临桂、龙胜、兴安和融安等地^[2]。罗汉果果实含多种甜苷,其中甜苷 V 为世界上最强的非糖甜味物质之一,为蔗糖甜度的 300~400 倍,是一种综合性状极佳的天然甜味剂,广泛应用于食品、药品和保健品中,适合所有人群长期食用,是肥胖者、糖尿病人和高血压患者的理想糖替代品^[3-4]。多倍体罗汉果可大幅提高根、茎、叶、果实等部位的生物量和产量,其中三倍体罗汉果还具有无籽的特性,大大提高了整果利用率和甜苷提取收得率,对整个罗汉果产业具有里程碑的意义^[5]。罗汉果三倍体雌株经二倍体雄株授粉后所结的果实即为无籽罗汉果。本研究利用 RAPD 分子标记技术^[6-9]探讨罗汉果三倍体雌株和二倍体雄株的遗传背景,为无籽罗汉果优良品种的选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料采自广西桂林兴安县漠川乡的罗汉果种植基地,总共采集到 28 份材料:二倍体雄株 7 份,三倍体雌株 21 份,利用二倍体(或四倍体)父本花粉对四倍体(或二倍体)母本柱头进行人工授粉杂交获得(表 1)。每份材料选取生长状况良好的罗汉果单株 3~5 株,采集约 10 张健康成熟的叶片并混合成该份材料的样品,用硅胶干燥保存,带回实验室中待用。

1.2 RAPD 分析

采用改良 CTAB(2×)法^[10]提取罗汉果叶片的总 DNA。PCR-RAPD 反应体系^[11]:25 μL PCR 扩增反应体系中含 10×buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 脱氧核糖核苷酸

表 1 试验材料来源、倍性和性状

编号	材料	倍性	性状
M201	Dongguagua	2x	♂
M202	Qingpiguo(♀ Bolin 3 × ♂ Keyan1 C)	2x	♂
M203	Male 1	2x	♂
M204	Hongmaoguo	2x	♂
M205	Dongguagua 2	2x	♂
M206	Changtanguo	2x	♂
M207	Hongmaoguo 2(♀ Hongmaoguo × ♂ Dongguagua)	2x	♂
F301	♀ Bolin 3 (4n) × ♂ M205 (2n)	3x	♀
F302	♀ Bolin 3 (4n) × ♂ M206 (2n)	3x	♀
F303	♀ Bolin 3 (4n) × ♂ M204 (2n)	3x	♀
F304	♀ Bolin 3 (4n) × ♂ M202 (2n)	3x	♀
F305	♀ Keyan1 C (4n) × ♂ M205 (2n)	3x	♀
F306	♀ Keyan1 C (4n) × ♂ M206 (2n)	3x	♀
F307	♀ Keyan1 C (4n) × ♂ Dongguagua (2n)	3x	♀
F308	♀ Keyan1 C (4n) × ♂ M202 (2n)	3x	♀
F309	♀ Keyan1 C (4n) × ♂ M204 (2n)	3x	♀
F310	♀ Nongjia (4n) × ♂ M205 (2n)	3x	♀
F311	♀ Nongjia (4n) × ♂ M206 (2n)	3x	♀
F312	♀ Nongjia (4n) × ♂ M201 (2n)	3x	♀
F313	♀ Nongjia (4n) × ♂ M202 (2n)	3x	♀
F314	♀ Nongyuan B6 (4n) × ♂ M205 (2n)	3x	♀
F315	♀ Nongyuan B6 (4n) × ♂ M204 (2n)	3x	♀
F316	♀ Yongqing 1 (4n) × ♂ M205 (2n)	3x	♀
F317	♀ Yongqing 1 (4n) × ♂ M206 (2n)	3x	♀
F318	♀ Yongqing 1 (2n) × ♂ Dongguagua (4n)	3x	♀
F319	♀ Yongqing 1 (2n) × ♂ Changtanguo (4n)	3x	♀
F320	♀ Keyan1 C (2n) × ♂ Dongguagua (4n)	3x	♀
F321	♀ Keyan1 C (2n) × ♂ Changtanguo (4n)	3x	♀

(dNTP) 0.2 mmol/L (上海生工生物工程技术有限公司), RAPD 引物 0.5 μmol/L (上海生工生物工程技术有限公司), *Taq* DNA 聚合酶 (MBI Fermentas 公司) 1.0 U, 模板 DNA 约 30~50 ng, 超纯水补至 25 μL。在 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 伯乐公司, Model: PTC-200) 上进行以下扩增反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 40 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

收稿日期: 2014-04-15

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2011BAI01B03); 国家自然科学基金 (编号: 81373914); 广西自然科学基金 (编号: 2013GXNSFDA019021、2013GXNSFBA019170)

作者简介: 韦荣昌 (1983—), 男, 广西梧州人, 博士, 助理研究员, 主要从事生药学研究。E-mail: wrc830612@163.com。

引物筛选:从材料中随机选出 6 份样品(包含 2x、4x)进行引物筛选,从 200 条 RAPD 引物中筛选出 20 条扩增反应稳定、条带清晰、具有多态性的引物,并用于所有材料的扩增。20 个 RAPD 引物名称、序列见表 2。

琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物:将扩增产物置于 1.5 % 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶上所加电压不超过 5 V/cm,用 Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker (MBI Fermentas 公司)作为标准分子量对照,经溴化乙锭(EB)染色 20 ~ 30 min,在凝胶成像系统上观察拍照、记录。

RAPD 为显性标记,同一引物的扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,相同迁移位置上有扩增条带记录为 1,无扩增条带记录为 0,构建 0 - 1 原始矩阵。仅清晰、稳定、可分辨的并且长度在 400 ~ 2 000 bp 范围内的 ISSR 扩增条带才被记录。用 AFLP - SURV version 1.0^[12] 计算材料间遗传距离 *D*,按 $D = -\ln I$ 计算 Nei & Li 遗传相似性系数;用 NTSYS - pc version 2.02^[13] 软件的 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) 方法进行聚类分析;用 GenAIEx version 6.3^[14] 进行主坐标分析。

2 结果与分析

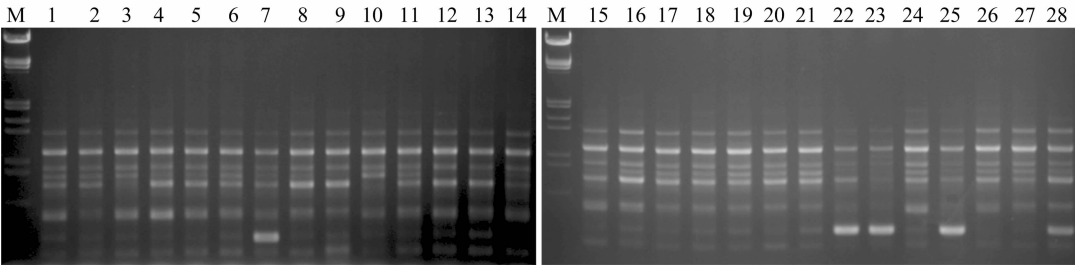
2.1 多态性分析

用 20 个 RAPD 引物对 28 份材料的总 DNA 进行 PCR 扩增,重复 2 次,2 次扩增产物重复性好且稳定,扩增得到的总条带数及多态性条带数见表 2。20 个引物扩增条带数的范围为 6 ~ 17 条,共同带在 1 ~ 8 条内,多态性条带数范围为 3 ~ 13 条,多态性百分比为 25.00% ~ 88.89%,且由总计的结果可知,扩增总条带数为 239 条(平均每个引物 11.95 条),其中

表 2 20 个 RAPD 引物名称、序列及其对 28 份材料的扩增条带统计

引物	引物序列 5'→3'	扩增总条带数	多态性条带数	多态性百分比 (%)
S24	AATCGGGCTG	10	6	60.00
S29	GGGTAACGCC	11	6	54.55
S38	AGGTGACCGT	11	7	63.64
S50	GGTCTACACC	13	6	46.15
S53	GGGGTGACGA	14	6	42.86
S64	CCGCATCTAC	13	5	38.46
S66	GAACGGACTC	11	7	63.64
S68	TGGACCGGTG	8	5	62.50
S69	CTCACCGTCC	14	8	57.14
S74	TGCGTGCTTG	10	5	50.00
S154	TGCGGCTGAG	9	6	66.67
S156	GGTGACTGTG	13	10	76.92
S164	CCGCCTAGTC	15	8	53.33
S170	ACAACGCCAG	6	3	50.00
S344	CCGAACACGG	13	10	76.92
S350	AAGCCCGAGG	17	13	76.47
S356	CTGCTTAGGG	9	8	88.89
S361	CATTCCGAGCC	15	13	86.67
S362	GTCTCCGCAA	15	13	86.67
S411	GTCCACTGTG	12	3	25.00
总计		239	148	61.32

多态性总条带数为 148 条,多态性条带百分比 (PPB) 为 61.32%。引物 S350 得到的条带数最多,为 17 条;引物 S170 得到的条带最少,为 6 条。其中,引物 S411 的扩增图谱见图 1。此外,在不同罗汉果品种间存在的多态性条带可作为鉴定品种的特征带。



M为Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III marker;1至28分别为M201、M202、M203、M204、M205、M206、M207、F301、F302、F303、F304、F305、F306、F307、F308、F309、F310、F311、F312、F313、F314、F315、F316、F317、F318、F319、F320、F321

图1 引物 S411 对 28 份材料的 ISSR 扩增图谱

2.2 遗传相似性系数及遗传距离

28 份材料间的相似性系数变化范围为 0.691 0 ~ 0.920 6,其中 F302 与 M202 间的相似性系数最低(0.691 0),遗传距离最高(0.369 6);而 F305 与 F306 间的相似性系数最高(0.920 6),遗传距离最小(0.082 7)。

2.3 聚类分析

从图 2 可看出,F305 和 F306 直接聚为一类,具有很高的相似性系数,两者距离最近;F321 独成一支,与其余材料相距较远;基本上相似性系数较高的材料排列并聚为一类。

在截距水平为 0.87 时,28 份材料被分为七大类:第一大类,包括 F301、F302;第二大类,包括 F303、F314、F304、F305、F306、F307、F308、F309、F310、F311;第三大类,包括 F315、F316、F317、F318、F319、M205、M207、M206;第四大类,包括

F312、F313;第五大类,包括 F320、M203、M204、M201;第六大类,包括 M202;第七大类,包括 F321。

2.4 双变量主坐标分析

主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 是基于 Nei & Li 遗传距离及相应的相似性系数进行的。因此,主坐标分析图中各个个体(品种)间的位置关系反映了它们在遗传上的相似性。由于每份试验材料都是通过选取生长状况良好的罗汉果单株 3 ~ 5 株,共采集约 10 张健康成熟叶片混合而成的,因此这 28 份材料的主坐标分析可看作“双变量主坐标分析”(double principal coordinate analysis, DPCoA:一种将物种与物种之间差异考虑到群体间相互关系的测度之中的排序方法)^[15-16]。通过 RAPD 标记对 28 份材料进行 DPCoA 排序发现,前3个主坐标的方差贡献率分别为 26.81%、21.86%

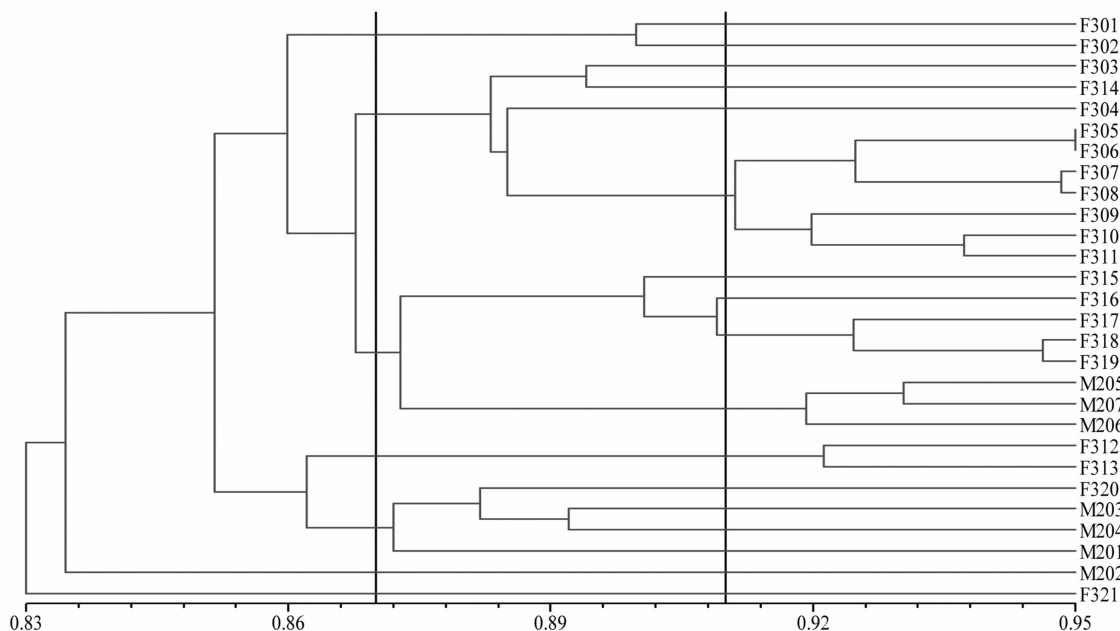


图2 供试 28 份材料的 UPGMA 聚类图示

和 17.60%，相对应的累积贡献率分别为 26.81%、48.67% 和 66.27%。一般认为，如果前 3 个主要特征向量的方差占总方差的 40% 以上，则排序效果是满意的^[17]，本试验结果 28 份材料的前 3 个主要特征向量的方差累积贡献率高达 66.27%，说明降维效果较好。因此，保留 DPCoA 的前二轴对 28 份材料进行排序分析，应用 GenAlEx version 6.3 获取坐标轴特征值及样品特征向量，并据此划分出 28 份不同材料在 DPCoA 前二轴空间中的排序图见图 3。

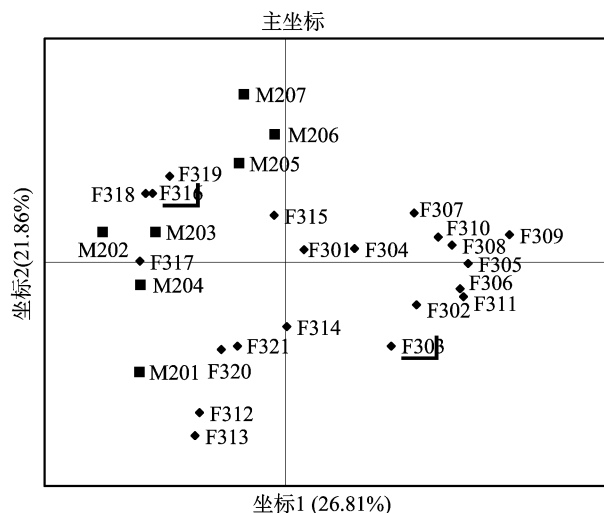


图3 28 份材料的第一、第二主坐标二维散点图示

由 Proj 划分而得的 28 份材料在 PCoA 排序图中空间分布十分明显，除 F316 和 F318 有部分交叉重叠外，其余样品间均无交叉重叠现象。PCoA 排序图把 28 份材料分为三大类。第一大类位于 A 区间，其中三倍体雌株 4 份 (F312、F313、F320、F321)，二倍体雄株 2 份 (M201、M204)。第二大类位于 B 和第 D 区间，其中只包括三倍体雌株 12 份 (F301、F302、F303、F304、F305、F306、F307、F308、F309、F310、F311、F314)。第三大类

位于 C 区间，其中只包括三倍体雄株 3 份 (F316、F318、F319)、二倍体雄株 5 份 (M202、M203、M205、M206、M207)。

比较图 2 和图 3 可知，对 28 份材料所进行的亲缘关系聚类分析和双变量主坐标分析的结果基本上是一致的，雌株和雄株间的距离相对较近聚在一起，而双变量主坐标分析能从多个方向、多个层面更直观和准确地反映材料间的遗传关系。

3 结论与讨论

3.1 罗汉果三倍体雌株与二倍体雄株的 RAPD 相关遗传

根据 RAPD 分析结果可知，有的材料之间虽然是不同的种质，但遗传相似性系数较高，说明它们的亲缘关系近；如 F315 因为由 Nongyuan B6 与 M204 株系杂交而成，所以与 M204 关系较近，其相似性系数高达 0.816 3。此外，在三倍体雌株中，如果其亲本相同或相似性系数较高，由于子代继承了亲本一定的遗传物质，因而子代间的相似性系数也会较高，如 F318 和 F319，由于其母本都是 Yongqing 1，因此其相似性系数高达 0.912 3；而因为 F305 和 F310 也都为同一父本 M205，所以其相似性系数也高达 0.858 0。

3.2 罗汉果三倍体雌株与二倍体雄株的合理组配

F302 与 M202 间的相似性系数仅为 0.6910，还有 M201 与 F302、F309 及 F312 与 M207 间的相似性系数都仅为 0.716 1，遗传距离较大；而且 M202 与母本间的相似性系数均在 0.6~0.7 之间。因此，初步推测罗汉果三倍体雌株与二倍体雄株中最适合作雌雄组配的是 F302 与 M202，其次是 F302 与 M204、F309 与 M204、F312 与 M207。

值得指出的是，虽然罗汉果三倍体雌株和二倍体雄株的遗传背景存在一定的复杂性，但大多遗传相似性系数较大，遗传距离较近，应该尽快采取相应措施，进行种质创新，丰富三倍体雌株和二倍体雄株的遗传背景，为无籽罗汉果优良品种的选育奠定坚实基础。

(下转第 293 页)

表 7 交城和墨玉骏枣甜味氨基酸含量

骏枣来源	甜味氨基酸含量(%)				
	甘氨酸	丙氨酸	丝氨酸	脯氨酸	合计
交城	0.13	0.13	0.10	1.53	1.89
墨玉	0.14	0.14	0.12	1.84	2.23

高,为 2.23%,高于交城骏枣。

3 结论与讨论

本研究结果显示,交城骏枣的氨基酸比值系数较高,说明与墨玉骏枣相比,交城骏枣中人体必需氨基酸组成与人体必需氨基酸搭配含量模式更接近,更加适合作为以蛋白摄取为目的枣果加以开发利用;但是,墨玉骏枣药用氨基酸、鲜味氨基酸、甜味氨基酸含量高于交城骏枣。药用氨基酸具有缓解疲劳、治糖尿病、健脑益智、抑制哮喘、促进纤维增殖与胶原合成等作用^[8-11];鲜味和甜味氨基酸则具有增味、增进口感等作用^[2]。由此可知,与交城骏枣相比,墨玉骏枣更具保健性,且具有较好的风味和口感,更加适合作为以保健为目的枣果深化开发利用。2 种骏枣支链氨基酸和芳香族氨基酸含量接近。孟祥勋等的研究结果则显示,随着纬度的升高,大豆氨基酸含量呈降低的变化趋势^[12]。本研究中交城骏枣采集地点的纬度为北纬 37.55°,高于墨玉骏枣采集地点纬度(北纬 37.27°)。这就有可能造成墨玉骏枣药用氨基酸、鲜味氨基酸、甜味氨基酸含量高于交城骏枣,但关于此推测的科学性还需进一步研究,关于交城骏枣和墨玉骏枣人体必需氨基酸组成模式存在的差异还须综合气温、日照时长、土壤条件等多方面因素进行深入研究分析。

本研究结果还显示,与墨玉骏枣相比,交城骏枣中人体必需氨基酸组成模式相对较好;与交城骏枣相比,墨玉骏枣药用氨基酸、鲜味氨基酸、甜味氨基酸含量相对较高;交城和墨玉

骏枣中支链和芳香族氨基酸含量相接近。说明种植于山西交城县和新疆和田墨玉县的骏枣氨基酸组成不同,各具特点,宜差异化加工利用。

参考文献:

- [1] 郭裕新,单公华. 中国枣[M]. 上海:上海科学技术出版社,2011.
- [2] 陈宗礼,贺晓龙,张向前,等. 陕北红枣的氨基酸分析[J]. 中国农学通报,2012,28(34):296-303.
- [3] 赵 堂. 不同产地红枣中氨基酸含量的测定[J]. 湖北农业科学,2013,52(16):3963-3965.
- [4] 张艳红,陈兆慧,王德萍,等. 红枣中氨基酸和矿质元素含量的测定[J]. 食品科学,2008,29(1):263-266.
- [5] 许重远,陈振德,陈志良,等. 金毛狗脊氨基酸的含量测定[J]. 药学实践杂志,2000,18(5):299-300.
- [6] 宁贞贞,李镁娟. 支链氨基酸在运动营养供给中的生物学功能及其应用[J]. 甘肃联合大学学报:自然科学版,2009,23(3):117-119.
- [7] 王 彬,蔡永强,郑 伟. 火龙果果实氨基酸含量及组分分析[J]. 中国农学通报,2009,25(8):210-214.
- [8] 潘学军,张文娥,刘 伟,等. 贵州核桃种仁脂肪酸和氨基酸含量分析[J]. 西南农业学报,2010,23(2):497-501.
- [9] 蒋与刚,徐琪寿. 条件性必需氨基酸在创伤愈合中的作用及其机制研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2002,24(3):59-62.
- [10] Khatri S B. Arginine metabolism and airflow obstruction in asthma [R]. Vienna:11th International Congress on Amino Acids,Peptides and Proteins:Amino Acids,2009:73.
- [11] Hurson M,Regan M C,Kirk D,et al. Metabolic effects of arginine in a healthy elderly population[J]. JPEN,1995,19:227-232.
- [12] 孟祥勋,胡明祥,张 明. 生态环境对大豆籽粒氨基酸组成的影响[J]. 吉林农业科学,1988(1):13-19,34.
- [10] Doyle J J,Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull,1987,19:11-15.
- [11] 秦新民,黄夕洋,蒋水元. 罗汉果性别相关的 RAPD 标记[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2007,25(3):109-112.
- [12] Vekemans X,Beauwens T,Lemaire M,et al. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size[J]. Molecular Ecology,2002,11(1):139-151.
- [13] Rohlf F J. NTSYSpc:numerical taxonomy and multivariate analysis system;version 2.02[M]. New York:Exeter Publications,1998.
- [14] Peakall R,Smouse P E. GENALEX 6:genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. Molecular Ecology Notes,2006,6(1):288-295.
- [15] Pavoine S,Dufour A B,Chessel D. From dissimilarities among species to dissimilarities among communities:a double principal coordinate analysis[J]. Journal of Theoretical Biology,2004,228(4):523-537.
- [16] 熊 雄,贺 强,崔保山. 黄河三角洲湿地草本植被的双变量主坐标排序[J]. 生态学杂志,2008,27(9):1631-1638.
- [17] Gauch H G. 群落生态学中的多元分析[M]. 北京:科学出版社,1982.
- [1] 路安民,张志耘. 中国罗汉果属植物[J]. 广西植物,1984,4(1):27-33.
- [2] 周良才,张碧玉,覃 良,等. 罗汉果品种资源调查研究和利用意见[J]. 广西植物,1981,1(3):29-33.
- [3] 李典鹏,张厚瑞. 广西特产植物罗汉果的研究与应用[J]. 广西植物,2000,20(3):270-276.
- [4] 农毅清,蒋 林. 罗汉果甜苷的提取与药理作用研究概况[J]. 广西中医药,2008,31(1):6-8.
- [5] 李 锋,蒋向军,蒋水元,等. 无籽(少籽)罗汉果培育成功(简报)[J]. 广西植物,2008,28(6):727.
- [6] Welsh J,Mcclelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research,1990,18(24):7213-7218.
- [7] 唐学芳,蒋舜媛,孙 辉,等. 川产羌活种质遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中草药,2008,39(9):1387-1392.
- [8] 李 勇,应益昕,赵东岳,等. 人参及西洋参栽培土壤微生物种群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中草药,2010,41(11):1871-1875.
- [9] 李隆云,陈大厦,钟国跃,等. 我国仙茅属植物遗传关系的 RAPD 分析[J]. 中草药,2011,42(5):980-984.

(上接第 243 页)

参考文献: