

中韩野生软枣猕猴桃种质资源遗传多样性分析

赵成日

(延边大学农学院, 吉林延吉 133002)

摘要:【目的】利用 RAPD 分子标记技术研究国内长白山地区和韩国由来野生软枣猕猴桃种质资源的遗传多样性。**【方法】**以长白山地区和韩国由来的 28 个野生软枣猕猴桃的叶片为材料, 利用 RAPD 分子标记技术进行了遗传多样性分析, 并明确了它们之间的亲缘关系。**【结果】**利用 131 个随机引物进行 PCR, 从中筛选出了多态性高、重复性好且扩增条带清晰的 24 个引物。24 个引物在 28 个野生软枣猕猴桃中共扩增出 191 条带, 其中多态性条带为 186 条, 占 97.4%。平均每个引物产生 7.75 个多态性条带。应用 NTSYSpc 2.10e 软件进行遗传一致度和遗传距离分析后用 UPGMA 方法进行聚类分析。28 个野生软枣猕猴桃种质资源之间的遗传距离为 0.020~0.934。遗传距离 0.58 时可将 28 个野生种划分成 2 大类。在遗传距离最小的 0.02 处, 有蛟河 2 号和 3 号 2 个野生种, 其 RAPD 分子标记相似性为 98%。**【结论】**来自不同地理区域的野生软枣猕猴桃之间存在较高的遗传多样性, 而在同一地理区域内遗传多样性较低。韩国野生软枣猕猴桃之间的遗传多样性较低, 且与二道白河、汪清、左家等地的野生软枣猕猴桃亲缘关系较近。即具有同一地理区域聚类趋势, 且不同地理区域间存在较高的遗传多样性。

关键词:软枣猕猴桃; 遗传多样性; RAPD; 长白山地区; 韩国

中图分类号: S663.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)09-1043-09

The genetic diversity of wild *Actinidia arguta* germplasm resources from China and South Korea

ZHAO Chengri

(Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, Jilin, China)

Abstract:【Objective】*Actinidia arguta* is more and more famous for its nutritional value and medical value. China, especially the Changbai mountain area, is the main distribution area of *A. arguta*. Most of the wild *A. arguta* are dioecious plants, the genealogy was not well established during the course of cultivation, management and breeding. The origin and pedigree of some new varieties (strains) was unclear. Distant hybridization has become an important way of germplasm innovation. Understanding the genetic background of Chinese and foreign wild *A. Arguta* is important for the improvement of the species via hybridization. RAPD markers were employed to study the genetic diversity of the germplasm resources of wild *A. arguta* from China and South Korea.【Methods】The leaf DNA of 28 wild *A. arguta* from Changbai Mountain region (24) and South Korea (4) was extracted by the plant genome DNA extraction kit of Solarbio company. Genomic RAPD-PCR was amplified using the following amplification systems and procedures: The system included 2 μL, 10 × PCR buffer, 2 U *Taq* DNA enzyme, 0.25 mmol·L⁻¹ dNTP, 2.0 mmol·L⁻¹ Mg²⁺, 0.3 μmol·L⁻¹ primer, 40 ng DNA template, and ddH₂O supplementation to 20 μL. The PCR reaction was carried out on the BIO-RAD T100™ Thermal Cycler PCR instrument. The running amplification reaction program was as follows: an initial denaturation 94 °C for 5 min, denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 36 °C for 1 min, extension at 72 °C for 2 min, reaction of 40 cycles, last extension at 72 °C for 5 min. The same template was repeated twice. RAPD-PCR amplification products were analyzed by 0.8% agarose gel (0.5×TAE buffer) electrophoresis.【Results】

收稿日期: 2018-04-24 接受日期: 2018-06-06

基金项目: 国家自然科学基金(31660319)

作者简介: 赵成日, 男, 讲师, 博士, 主要从事植物分子育种工作。Tel: 0433-2438212, E-mail: zhaochengri@ybu.edu.cn

The 24 primers had high genetic polymorphisms. A total of 191 bands were amplified, of which 186 were polymorphic bands, accounting for 97.4%. Average 7.75 polymorphic bands were produced by each primer. Genetic identity and genetic distance were calculated by NTSYSpc 2.10e software and cluster analysis was analyzed by UPGMA. The result showed that the genetic distances among the 28 wild species of *A. arguta* germplasm resources were 0.020~0.934. When the genetic distance was 0.58, the 28 wild species could be divided into two groups. The first group included Antu coloring type, Antu No. 1~6 from Antu County and Jiaohe No. 1~5 from Jiaohe. The second group include: Erdaobaihe No. 1~4 from Erdaobaihe; Wangqing No. 1~3 from Wangqing County and Wangqing Forestry Bureau; Zuojia No. 1~3 from the Zuojia special production Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS); Liaoning Huanren and Helong Qingshan; South Korea No. 1~4 from Chungbuk, Jeonnam and Gyeongnam in South Korea. The similarity of RAPD markers of Jiaohe 2 and 3, the two wild species reached 98% when the genetic distance was 0.0202. Almost all the wild species from the same area belonged to the same category within a very small genetic distance. For example, Antu No. 1~6 were within the 0.184 genetic distance; Jiaohe No. 1~5 were within 0.18 genetic distance; Wangqing No. 1~3 and Erdaobaihe No. 1 and No. 4 were within 0.315 genetic distance; Zuojia No. 1~3 was within 0.25 genetic distance; South Korea No. 1~4 were within 0.23 genetic distance; Erdaobaihe No. 2 and No. 3 were within 0.41 genetic distance. **【Conclusion】**There was a high genetic diversity among wild *A. arguta* collected from different geographic regions, but genetic diversity among those collected from the same geographical area was low. The genetic diversity of the wild *A. arguta* from South Korea was relatively low and was closely related to the wild *A. arguta* from Erdaobaihe, Wang Qing and Zuo Jia. The species collected from the same geographical area had the same clustering trend.

Key words: *Actinidia arguta*; Genetic diversity; RAPD; Changbai mountion; South Korea

软枣猕猴桃 [*Actinidia arguta* (Sieb. & Zucc.) Planch. ex Miq.] 俗称软枣子或园枣子, 也有猕猴桃梨、腾梨、藤瓜等别名^[1~2], 是猕猴桃科(Actinidiaceae)、猕猴桃属(*Actinidia*)的大型落叶多年生藤本植物, 是9种光果猕猴桃种类之一^[3~4]。因其果实富含各种氨基酸和矿物质, 根、茎、叶及果实又有药用价值和抗衰老的功能, 近年来备受各国研究人员的关注^[2, 5~8]。软枣猕猴桃又是一种优美的庭院观赏树木, 它的美观奇特远超其他花果树木, 可用于造园配景, 可谓一绝^[9~11]。

软枣猕猴桃喜生在海拔1 300 m以下, 土壤微酸性, 土壤透气性良好的阴坡的针阔混交林和杂木林内, 有时生于阳坡水分充足之处, 或山沟溪流旁。多攀缘在阔叶树上, 枝蔓多集中分布于树冠上部^[12]。

我国是软枣猕猴桃的起源和分布中心, 分布于云南、广西、贵州、湖南、江西、福建、浙江、四川、重庆、湖北、安徽、甘肃、陕西、河南、山西、山东、河北、北京、天津、辽宁、吉林、黑龙江。另外, 我国台湾、韩国、日本大部分地区和俄罗斯远东地区也有分布^[13~14]。

在我国东北三省的资源最为丰富, 其中长白山地区是主要分布区^[6~7]。在韩国野生软枣猕猴桃主要分布在忠清北道、全罗南道、庆尚南道。软枣猕猴桃人工栽培面积15 hm²左右, 主要分布于江原道、全罗南道、忠清南道、全罗北道, 占地面积分别为5~6 hm²、4~6 hm²、3 hm²、1 hm²^[15]。

软枣猕猴桃是雌雄异株植物^[7, 13], 在常年的栽培管理和育种过程中没能很好地建立系谱, 培育出的新品种(品系)混乱、系谱不清现象屡屡发生。了解国内外野生软枣猕猴桃之间的亲缘关系, 通过远缘杂交的手段培育、改良现有野生种的品质已成为种质资源创新的一个重要途径。

迄今, 针对野生软枣猕猴桃种质资源亲缘关系分析和遗传多样性方面的研究还不够全面^[1, 16~17], 比较国内外种质资源遗传多样性方面仍有待深入。因此, 利用分子标记手段, 从植物基因组水平上鉴定国内外野生软枣猕猴桃种质资源之间的亲缘关系及评价遗传多样性势在必行。笔者用RAPD分子标记技术研究国内长白山地区和韩国由来野生软枣猕猴桃

种质资源的遗传多样性,以期为野生软枣猕猴桃资源保存、有效利用和新品种选育提供分子依据。

1 材料和方法

1.1 材料

软枣猕猴桃野生种主要来自长白山地区及韩国(表1)。采集所有野生种的健壮枝条的新鲜幼叶,清洗后于-80℃的冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、检测及定量稀释 采用 Solarbio 公司的植物 DNA 提取试剂盒提取软枣猕猴桃总 DNA (<http://www.solarbio.com/data/pdf/D1500.pdf>)。对提取到的 28 个野生种的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳(0.8%, 0.5×TAE)和分光光度计(Nano EX型)2 种方式检测。检测达到标准后用 1×TE 缓冲液($\text{pH}=8.0$)稀释成 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 冷冻(或冷藏)保存, 备用。

1.2.2 RAPD 的分析 使用的基本反应条件是参考魏艳霞等^[18]的方法, 并进行了优化, 提高了试验的重复性。即 PCR 反应总体积 20 μL 中, 模板 DNA 40 ng、引物 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 MgCl_2 浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTP 浓度为 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 2.0 U, 其余用去离子水补充。PCR 反应在 BIO-RAD T100TM Thermal Cycler PCR 扩增仪上进行。其扩增的程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 40 个循环; 72℃ 最终延伸 5 min。

在 JY-SPCT 型电泳槽上用 0.5×TAE 缓冲液配制 0.8% 琼脂糖凝胶。电泳结束后进行溴化乙锭染色并照相。

1.2.3 随机引物的筛选 经过多次的预备试验, 对 131 个随机引物进行筛选(131 个引物为: OPA-01~20; OPC-01~20; OPD-01~20; OPE-01~20; OPF-01~20; OPG-01~20; OPH-01~11)。最后选择 24 个在野生种间表现多态性高、重复性好的引物。

1.2.4 数据分析 所有 RAPD 反应试验 2 次重复, 不能重复出现的条带不作统计分析。根据所照相片的图谱记录条带。对每个条带, 有带的记为“1”, 无带的记为“0”, 整理成“0/1”矩阵, 只记录清晰易辨的扩增条带。为了减少人为误差, 由 2 人分别进行记录后核对。根据“0/1”原始矩阵, 使用 NTSYSpc (Version 2.10e) 软件中的“Genetic distance”功能, 采用 Nei72 方法^[19], 计算出样品间的遗传一致度(genet-

ic identity) 和遗传距离 (genetic distance), 之后用“Clustering”中的“SAHN”功能按照 UPGMA 方法进行聚类分析, 最后利用“Graphics”中的“Tree plot”功能得到聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 植物基因总 DNA 提取

提取的 28 个野生种 DNA 电泳结果如图 1 所示, DNA 条带大小约为 23 kb, 条带清晰, 没有拖尾现象, 说明 DNA 完好无降解。经分光光度计检测, 其浓度及纯度都达到后续研究的要求。

2.2 野生软枣猕猴桃 RAPD 分析

利用从 131 个随机引物中筛选的 24 个引物对 28 个野生种进行 RAPD 扩增。筛选的依据主要是多态性程度和扩增的清晰度。这 24 个引物在供试材料中共扩增出 191 个重复性高的清晰条带, 其中 186 条为多态性带, 多态性百分数(总扩增条带数中多态性条带数所占百分比)为 97.4%, 平均每个引物扩增出 7.75 个多态性条带, 且扩增片段大小集中在 300~3 000 bp(表 2)。这些多态性带可用于样品间亲缘关系分析。部分引物扩增结果见图 2。

2.3 野生软枣猕猴桃的遗传一致度、遗传距离和聚类分析

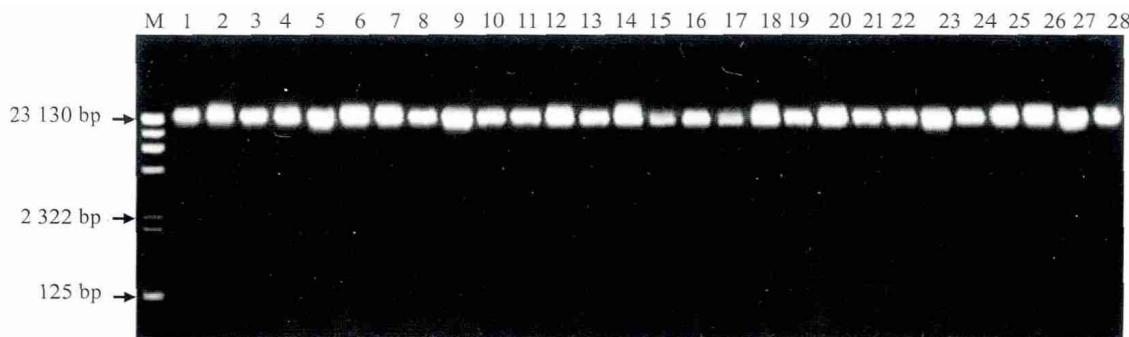
根据 RAPD 扩增结果, 利用 NTSYSpc (Version 2.10e) 软件进行数据处理, 计算出中韩野生软枣猕猴桃之间的遗传一致度和遗传距离。分析结果表明, 28 个野生种的遗传一致度为 0.502 5~0.979 7, 平均为 0.698 6。遗传距离的变化范围为 0.020 2~0.934 2, 平均为 0.444 6。其中, 24 个长白山地区野生种的遗传一致度为 0.502 5~0.979 7, 平均为 0.700 9。遗传距离为 0.020 2~0.934 2, 平均为 0.443 5。4 个韩国由来野生种的遗传一致度为 0.807 1~0.873 1, 平均为 0.846 9。遗传距离为 0.167 8~0.252 9, 平均为 0.200 6。

根据上述的遗传距离, 用 UPGMA 法构建了 28 个野生软枣猕猴桃聚类图(图 3)。从图 3 中可以看出, 遗传距离 0.58 时可将分析的 28 个野生种划分成 2 大类。第一大类包括: 来自安图县亮兵镇新安村的安图着色型、安图 1~6 号和来自蛟河市漂河镇青背村的蛟河 1~5 号。第二大类包括: 来自二道白河兴隆林场的二道白河 1~4 号; 来自汪清林业局大兴

表1 野生软枣猕猴桃的编号及取样点

Table 1 The number and location of wild *Actinidia arguta* germplasm resources

编号 No.	样品名称 Sample name	取样点 Sampling location	国家/省份(行政区划) Country/province (administrative divisions)
1	安图着色型 Antu coloring type	安图县亮兵镇新安村 Xin'an village of Liang Bing town, Antu county	中国/吉林 China/Jilin
2	安图1号 Antu No.1	安图县亮兵镇新安村 Xin'an village of Liang Bing town, Antu county	中国/吉林 China/Jilin
3	安图2号 Antu No.2	安图县亮兵镇新安村 Xin'an village of Liang Bing town, Antu county	中国/吉林 China/Jilin
4	安图3号 Antu No.3	安图县亮兵镇新安村 Xin'an village of Liang Bing town, Antu county	中国/吉林 China/Jilin
5	安图4号 Antu No.4	安图县亮兵镇新安村 Xin'an village of Liang Bing town, Antu county	中国/吉林 China/Jilin
6	安图5号 Antu No.5	安图县亮兵镇新安村 Xin'an village of Liang Bing town, Antu county	中国/吉林 China/Jilin
7	安图6号 Antu No.6	安图县亮兵镇新安村 Xin'an village of Liang Bing town, Antu county	中国/吉林 China/Jilin
8	蛟河1号 Jiaohe No.1	蛟河市漂河镇青背村 Qingbei village of Piaohe town in Jiaohe city	中国/吉林 China/Jilin
9	蛟河2号 Jiaohe No.2	蛟河市漂河镇青背村 Qingbei village of Piaohe town in Jiaohe city	中国/吉林 China/Jilin
10	蛟河3号 Jiaohe No.3	蛟河市漂河镇青背村 Qingbei village of Piaohe town in Jiaohe city	中国/吉林 China/Jilin
11	蛟河4号 Jiaohe No.4	蛟河市漂河镇青背村 Qingbei village of Piaohe town in Jiaohe city	中国/吉林 China/Jilin
12	蛟河5号 Jiaohe No.5	蛟河市漂河镇青背村 Qingbei village of Piaohe town in Jiaohe city	中国/吉林 China/Jilin
13	二道白河1号 Erdaobaihe No.1	二道白河兴隆林场 Xinglong forest farm in Erdaobaihe	中国/吉林 China/Jilin
14	二道白河2号 Erdaobaihe No.2	二道白河兴隆林场 Xinglong forest farm in Erdaobaihe	中国/吉林 China/Jilin
15	二道白河3号 Erdaobaihe No.3	二道白河兴隆林场 Xinglong forest farm in Erdaobaihe	中国/吉林 China/Jilin
16	二道白河4号 Erdaobaihe No.4	二道白河兴隆林场 Xinglong forest farm in Erdaobaihe	中国/吉林 China/Jilin
17	汪清1号 Wangqing No.1	汪清林业局大兴林场 Daxing forest farm in Wangqing Forestry Bureau	中国/吉林 China/Jilin
18	汪清2号 Wangqing No.2	汪清林业局大兴林场 Daxing forest farm in Wangqing Forestry Bureau	中国/吉林 China/Jilin
19	汪清3号 Wangqing No.3	汪清县牡丹川林场 Mudanchuan forest farm in Wangqing county	中国/吉林 China/Jilin
20	左家1号 Zuojia No.1	中国农科院左家特产研究所 Zuojia special production Institute of CAAS	中国/吉林 China/Jilin
21	左家2号 Zuojia No.2	中国农科院左家特产研究所 Zuojia special production Institute of CAAS	中国/吉林 China/Jilin
22	左家3号 Zuojia No.3	中国农科院左家特产研究所 Zuojia special production Institute of CAAS	中国/吉林 China/Jilin
23	辽宁桓仁 Liaoning Huanren	辽宁省桓仁县林业局 Forestry Bureau of Huanren county of Liaoning province	中国/辽宁 China/Liaoning
24	和龙青山 Helong Qingshan	和龙市青山林场 Qingshan forest farm of Helong city	中国/吉林 China/Jilin
25	韩国1号 South Korea No.1	韩国忠清北道 Chungbuk in South Korea	韩国/忠清北道 South Korea/Chungbuk
26	韩国2号 South Korea No.2	韩国全罗南道 Jeonnam in South Korea	韩国/全罗南道 South Korea/Jeonnam
27	韩国3号 South Korea No.3	韩国全罗南道 Jeonnam in South Korea	韩国/全罗南道 South Korea/Jeonnam
28	韩国4号 South Korea No.4	韩国庆尚南道 Gyeongnam in South Korea	韩国/庆尚南道 South Korea/Gyeongnam



M. λ -Hind III digest DNA marker; 1~28. 数字编号与表 1 一致。
M. λ -Hind III digest DNA marker; 1~28. The number is the same as Table 1.

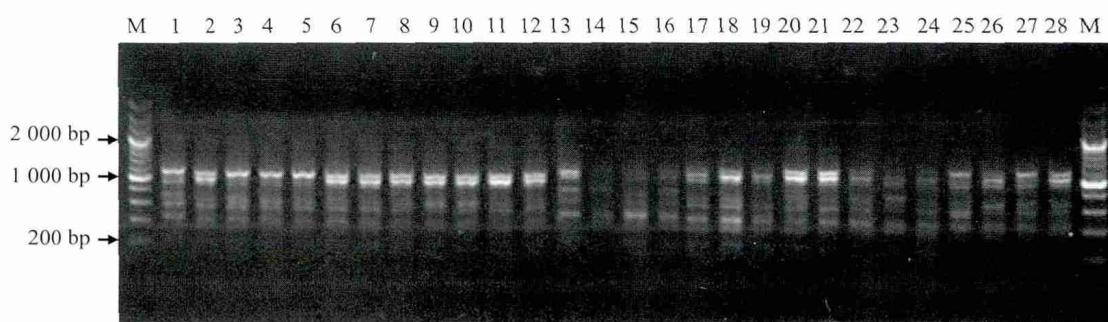
图 1 基因组 DNA 琼脂糖电泳检测

Fig. 1 Detection of extracted genomic DNA by agarose gel electrophoresis

表 2 各引物扩增条带和多态性条带

Table 2 Bands of primers amplified and polymorphic

序号 No.	引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	扩增条带数 No. of amplified bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性百分数 Percentage of polymorphic bands/%
1	OPA-04	AATCGGGCTG	7	6	85.7
2	OPC-15	GACGGATCATG	9	8	88.9
3	OPC-17	TTCCCCCCAG	8	8	100.0
4	OPD-01	ACCGCGAAGG	11	11	100.0
5	OPD-15	CATCCGTGCT	9	9	100.0
6	OPD-16	AGGGCGTAAG	11	11	100.0
7	OPD-18	GAGAGCCAAC	4	4	100.0
8	OPD-20	ACCCGGTCAC	10	10	100.0
9	OPE-04	GTGACATGCC	4	4	100.0
10	OPE-09	CTTCACCCGA	11	11	100.0
11	OPE-20	AACGGTGACC	7	6	85.7
12	OPF-02	GAGGATCCCT	8	8	100.0
13	OPF-13	GGCTGCAGAA	10	10	100.0
14	OPF-17	AACCCGGGAA	12	12	100.0
15	OPG-02	GGCACTGAGG	9	9	100.0
16	OPG-06	GTGCCTAAC	4	4	100.0
17	OPG-09	CTGACGTAC	7	7	100.0
18	OPG-10	AGGGCCGTCT	7	7	100.0
19	OPG-15	ACTGGGACTC	9	9	100.0
20	OPG-18	GGCTCATGTG	3	3	100.0
21	OPH-01	GGTCGGAGAA	8	7	87.5
22	OPH-07	CTGCATCGTG	8	7	87.5
23	OPH-09	TGTAGCTGGG	6	6	100.0
24	OPH-11	CTTCCCGCAGT	9	9	100.0
合计 Total		191	186	97.4	



M. DL2000 marker; 1~28. 数字编号与表 1 一致。
M. DL2000 marker; 1~28. The number is the same as Table 1.

图 2 引物 OPG-15 对 28 个供试样品的 RAPD 电泳扩增

Fig. 2 Amplification of 28 *A. arguta* samples using OPG-15 Primer

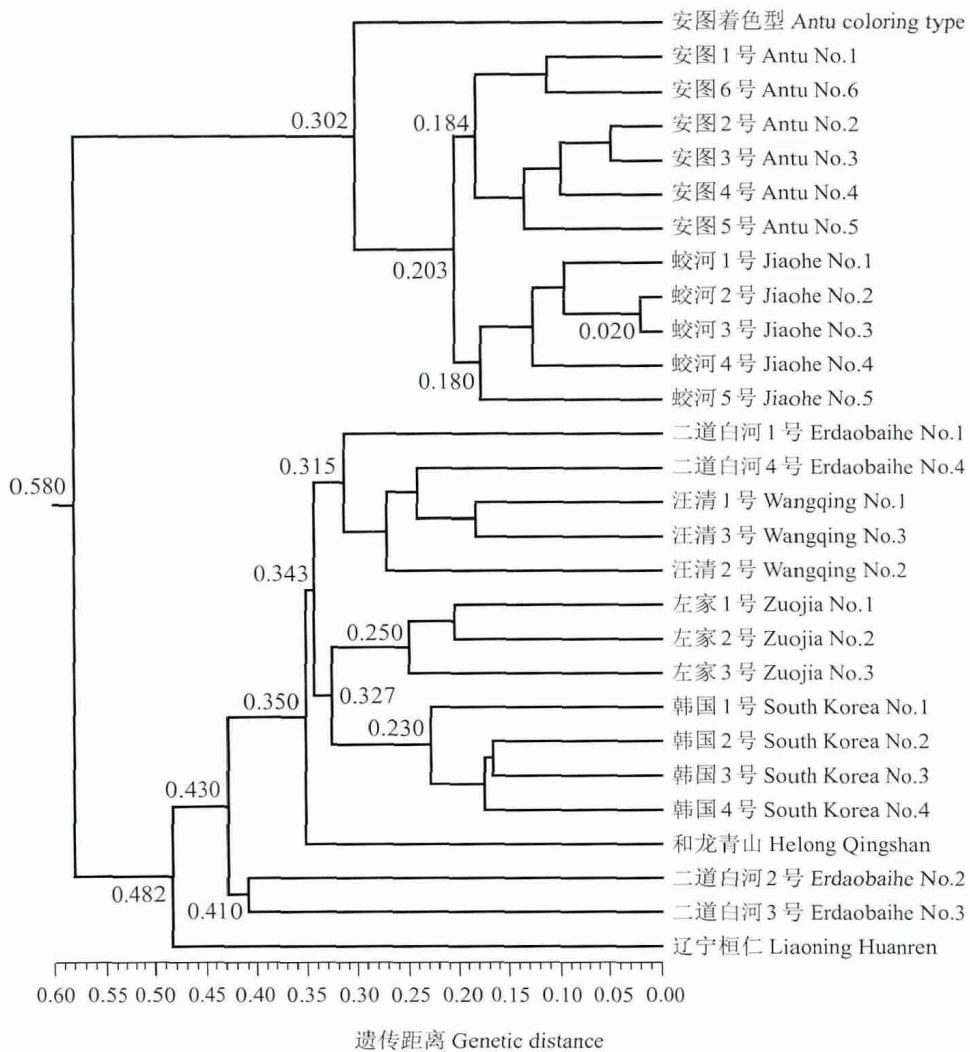


图 3 28 个野生软枣猕猴桃聚类分析

Fig. 3 The cluster analysis of the 28 *A. arguta* germplasm resources

林场和牡丹川林场的汪清1~3号;来自中国农业科学院特产研究所(左家)的左家1~3号;来自韩国忠清北道、全罗南道和庆尚南道的韩国1~4号;来自和龙市青山林场的和龙青山;来自辽宁省桓仁县林业局选育的辽宁桓仁。在遗传距离最小的0.02处,有蛟河2号和3号2个野生种,其RAPD分子标记相似性为98%(表3)。本研究结果中非常有趣的现象是来自同一区域的野生种几乎都在很小的遗传距离范围内归到了同一类。如,安图1~6号在0.184遗传距离内;蛟河1~5号在0.180遗传距离内;汪清1~3号与二道白河1、4号在0.315遗传距离内;左家1~3号在0.25遗传距离内;韩国1~4号在0.23遗传距离内;二道白河2~3号在0.41遗传距离内。这一现象表明来自不同地理区域的野生软枣猕猴桃之间存在较高的遗传多样性,而在同一地理区域内遗传多样性较

低。韩国的野生软枣猕猴桃之间的遗传多样性较低,且与二道白河、汪清、左家等地的野生软枣猕猴桃亲缘关系较近。

3 讨 论

3.1 野生软枣猕猴桃种质资源的遗传多样性

从理论上讲,遗传多样性是生物适应环境与进化的基础,就一个物种而言,种内遗传多样性愈丰富,该物种对环境变化的适应能力愈大,其进化的潜力也就愈大,也就愈有利于保持物种和整个生态系统的多样性。

在遗传多样性的参数中,分子标记的一致度和遗传距离能够反映遗传多样性程度。本研究中,利用24个引物扩增出191个重复性高的清晰条带,其中186条为多态性带,占97.4%,本研究中分析的28

表3 28个野生软枣猕猴桃的遗传一致度和遗传距离

Table 3 The genetic identity and genetic distance of the 28 wild *A. arguta* germplasm resources

注：矩阵上三角为遗传一致害，矩阵下三角为遗传差异。 $1 \sim 28$ 为野生软枣猕猴桃编号（详见表1）。

Note: The upper triangular matrix is genetic identity, the lower triangular matrix is genetic distance. 1 to 28 are the numbers of wild *A. arguta* germanasm resources (See details in Table 1).

个野生种的遗传一致度为0.502~0.9797,平均为0.6986;遗传距离为0.0202~0.9342,平均为0.4446。其中,24个长白山地区野生种的遗传一致度为0.5025~0.9797,平均为0.7009。遗传距离为0.0202~0.9342,平均为0.4435。说明长白山地区的24个野生种之间具有丰富的遗传多样性。4个韩国由来的野生种遗传一致度为0.8071~0.8731,平均为0.8469;遗传距离为0.1678~0.2529,平均为0.2006。说明韩国由来的4个野生种之间亲缘关系较近。聚类分析结果表明,28个野生软枣猕猴桃种质资源可在0.02~0.58的遗传距离范围内进行聚类。大部分来自相同或相近地理区域的野生种间遗传距离小,亲缘关系相近;但是也有部分供试材料间表现出遗传距离较大,亲缘关系较远,如二道白河1号、4号与二道白河2号、3号之间的遗传距离。本研究中所分析的28个野生种表现出同一地理区域聚类趋势,且不同地理区域间存在较高的遗传多样性。来自韩国3个不同行政区划的野生软枣猕猴桃之间的遗传多样性较低,且与二道白河、汪清、左家等地的野生软枣猕猴桃亲缘关系较近。

2009年,黄岳等^[17]对图们、汪清、安图、磐石、舒兰、蛟河、吉林左家等8个县市30个取样点由来的30个野生软枣猕猴桃进行了RAPD分析。利用14个随机引物共获得104条带,其中多态性条带为88条,占84.6%。聚类分析结果表明,30个野生种可在0.03~0.25的遗传距离之间聚类,且表现出同一地理区域的野生种分布于不同的聚类群中。这个结果虽然与本研究结果有些出入,但取样点的野生种资源的真实性,直接影响聚类分析结果。

2010年,刘延吉等^[18]对辽宁本溪、抚顺、大连、鞍山、辽阳的5个野生软枣猕猴桃进行了RAPD分析。结果表明,其遗传距离为0.1360~0.4236,平均遗传距离为0.2623。这些结果远远小于本研究中分析的28个野生种之间的遗传距离范围。表明本研究中分析的28个野生种内包含着遗传变异较大的、遗传多样性丰富的种质资源。对此遗传距离的大小范围贡献最大的有辽宁桓仁与蛟河2号、3号野生种。

3.2 野生软枣猕猴桃种质资源的利用与保护

物种的遗传变异是由一个物种的进化潜力和抵御不良环境的能力两方面决定的^[20~21]。高的遗传多样性是维持物种长期生存的基础,一个只有纯合子

构成的物种是很难长期维持稳定的,因为它很难适应不断变化的环境压力。多态性百分数是衡量一个种群遗传变异水平的重要指标。一个种群内多态性百分数高说明这个物种适应环境的能力较强,反之,则适应环境的能力弱,在长期的进化过程中就有被淘汰的可能性。

通过本研究了解到长白山地区和韩国野生软枣猕猴桃种质资源都有一个共性,即同一地理区域的聚类趋势,且不同地理区域间存在较高的遗传多样性。表明野生软枣猕猴桃种质资源遗传多样性丰富,其物种适应环境的能力较强。因此,广泛调查、收集、保护、保存不同地理区域的野生软枣猕猴桃种质资源在远缘杂交育种、新品种的培育工作中显得尤为重要。

4 结 论

对长白山地区和韩国由来的28个野生软枣猕猴桃种质资源进行了RAPD分析。利用筛选的24个引物共扩增出191条带,其中多态性条带为186条,占97.4%,平均每个引物产生7.75个多态性条带。28个野生种质资源间的遗传距离为0.0202~0.9342。聚类分析结果表明,同一地理区域具有聚类趋势,且不同地理区域间存在较高的遗传多样性。

参考文献 References:

- [1] 刘延吉,耿书,田晓艳.辽宁地区五种野生软枣猕猴桃 RAPD 遗传多样性分析[J].北方园艺,2010(18):130-132.
LIU Yanji, GENG Shu, TIAN Xiaoyan. The analysis of genetic diversity on random amplified polymorphic DNA of Five *Actinidia arguta* species in Liaoning province[J]. Northern Horticulture, 2010(18): 130-132.
- [2] 王佳卉.软枣猕猴桃 EST-SSR 分子标记的开发及遗传多样性分析[D].长春:吉林农业大学,2014.
WANG Jiahui. Development of EST-derived SSR markers in *Actinidia arguta* and genetic diversity analysis[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.
- [3] 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.
HUANG Hongwen, GONG Junjie, WANG Shengmei, HE Zican, ZHANG Zhonghui, LI Jianqiang. Genetic diversity in the genus *Actinidia*[J]. Chinese Biodiversity, 2000, 8(1): 1-12.
- [4] 李旭,曹万万,姜丹,孙贺,朴一龙.长白山野生软枣猕猴桃资源分布与果实和叶片性状多样性[J].北方园艺,2015(15):22-27.

- LI Xu, CAO Wanwan, JIANG Dan, SUN He, PIAO Yilong. Resource distribution and character diversity of fruit and leaf of wild *Actinidia arguta* from Changbai Mountain area[J]. Northern Horticulture, 2015(15): 22-27.
- [5] 张甲生,李平亚,石毅,宋秀环,卢士香,刘景英,李深宁,王陆黎,田莉玉.软枣猕猴桃中29种无机元素含量的测定[J].白求恩医科大学学报,1993(4):354-356.
- ZHANG Jiasheng, LI Pingya, SHI Yi, SONG Xiuhuan, LU Shixiang, LIU Jingying, LI Luanning, WANG Luli, TIAN Liyu. Determination of contents of inorganic elements in different parts of *Actinidia arguta* (Sieb. et zucc.) Planch[J]. Journal of Norman Bethune University of Medical Science, 1993(4): 354-356.
- [6] 孙宁宁.长白山野生软枣猕猴桃的成分分析及保鲜研究[D].长春:吉林农业大学,2007.
- SUN Ningning. Component analyzes and refreshing study on *Actinidia arguta* in Changbaishan[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2007.
- [7] 黄祥童,刘军,金哲军,隋亚臣.软枣猕猴桃光雾扦插育苗试验[J].北华大学学报(自然科学版),2010,11(2):177-182.
- HUANG Xiangtong, LIU Jun, JIN Zhejun, SUI Yachen. Test on sunlight and spray cuttage seedling of *Actinidia arguta*[J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2010, 11(2): 177-182.
- [8] 李红莉.东北地区野生猕猴桃生物学特性的分析与研究[J].中国林副特产,2013(2):13-15.
- LI Hongli. Study and analysis on biological characteristics of wild kiwifruit in northeast China region[J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2013(2): 13-15.
- [9] 戴晓峰.长春公园园林植物多样性调查和应用研究[D].长春:吉林农业大学,2016.
- HUANG Xiaofeng. Study on the diversity investigation and application of ornamental plants in Chengchun Park[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.
- [10] 赵芮.软枣猕猴桃离体快繁技术的研究[D].长春:吉林农业大学,2016.
- ZHAO Rui. Study on rapid propagation technique *in vitro* of *Actinidia arguta*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.
- [11] 黄圆博,姜丹,李旭,刘香苏,朴一龙.软枣猕猴桃苗木繁育技术研究[J].延边大学农学学报,2017,39(1):29-34.
- HUANG Yuanbo, JIANG Dan, LI Xu, LIU Xiangsu, PIAO Yilong. A study on the propagation of nursery stock technique of *Actinidia arguta* fruit[J]. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 2017, 39(1): 29-34.
- [12] 廖慧萍.3个软枣猕猴桃单系开花特性和果实品质调查比较及栽培技术[D].成都:四川农业大学,2012.
- LIAO Huiping. Comparison of the blossoms and fruits characteristic of three *Actinidia Arguta* strains and its planting technique[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2012.
- [13] 朴一龙,赵兰花.软枣猕猴桃研究进展[J].北方园艺,2008(3):76-78.
- PIAO Yilong, ZHAO Lanhu. Research progress of *Actinidia arguta*[J]. Northern Horticulture, 2008(3): 76-78.
- [14] 黄宏文.猕猴桃属:分类、资源、驯化、栽培[M].北京:科学出版社,2013:50-52.
- HUANG Hongwen. *Actinidia*: taxonomy, germplasm, domestication, cultivation[M]. Beijing: Science Press, 2013: 50-52.
- [15] 朴一龙,赵兰花.韩国软枣猕猴桃开发利用概况[J].中国果树,2012(4):75-76.
- PIAO Yilong, ZHAO Lanhu. Development and utilization of South Korean *A. argute*[J]. China Fruits, 2012(4): 75-76.
- [16] 路文鹏,李昌禹,曲炳章,李晓红,宋润刚,赵淑兰,王军.东北原生种猕猴桃种质 RAPD 研究[J].特产研究,2006,28(2):24-27.
- LU Wenpeng, LI Changyu, QU Bingzhang, LI Xiaohong, SONG Rungang, ZHAO Shulan, WANG Jun. A study of RAPD on germplasm of northeastern *Actinidia chinensis* in China[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2006, 28(2): 24-27.
- [17] 黄岳,朴一龙,王琳.长白山区野生软枣猕猴桃种质 RAPD 分析[J].延边大学农学学报,2009,31(2):119-123.
- HUANG Yue, PIAO Yilong, WANG Lin. Analysis of wild *A. arguta* resources in Changbai Mountain area by RAPD[J]. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 2009, 31 (2): 119-123.
- [18] 魏艳霞,豁泽春,王飞,张华敏,李金月.野生猕猴桃 DNA 的提取及 RAPD 分析体系的建立[J].西北农业学报,2008,17(2):169-173.
- WEI Yanxia, HOU Zechun, WANG Fei, ZHANG Huamin, LI Jinjie. Extraction of DNA and establishment of RAPD system in wild kiwifruit[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2008, 17(2): 169-173.
- [19] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [20] GRANT V. The evolutionary process: a critical study of evolutionary theory[M]. New York: Columbia University Press, 1991.
- [21] MILLAR C I, LIBBY W J. Strategies for conserving clinal, eco-typic and disjunct population diversity in widespread species [M]//Genetics and conservation of rare plants. New York: Oxford University Press, 1991: 149-170.