

文章编号: 1674-7054(2012)04-0293-05

基于叶绿体基因的香蕉遗传多样性研究

彭铁成^{1,2,3}, 徐芳³, 罗静瑶^{2,3}, 陈云云^{2,3}, 汤华^{1,2,3}

(1. 海南大学 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 热带生物资源可持续利用国家重点实验室培育基地, 海南 海口 570228; 3. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘要: 以7种不同来源的香蕉为材料, 选择2个叶绿体基因组的非编码区序列(即 *rpl16* 内含子序列和 *psaA-ycf3* 基因间隔序列), 进行PCR扩增、克隆转化及测序, 采用邻接法(NJ)构建系统进化树, 并测算了相对遗传距离。结果表明, 巴西蕉与另外6个抗枯萎病香蕉品种间存在一定的遗传差异, 但遗传差异程度不大。

关键词: 香蕉; 枯萎病; 叶绿体基因组; 遗传多样性

中图分类号: S 668.1; S 436.421.1+3

文献标志码: A

香蕉(*Musa* spp.)为芭蕉科(Musaceae)芭蕉属(*Musa*)植物,起源于东南亚和西太平洋地区,后被引入世界各地。香蕉是世界上最大宗的热带水果,被联合国粮农组织确定为世界第四大粮食作物,主要栽培品种有香牙蕉(AAA)、粉蕉(ABB)、大蕉(ABB)、龙牙蕉(ABB)、贡蕉(AA)等^[1]。我国是香蕉的原产地之一,种质资源丰富,目前国内香蕉的主栽品种,大多是引进巴西、威廉斯系列的品种,品种趋同性高,遗传多样性低。近年来,大规模爆发的香蕉枯萎病给香蕉生产造成了很大的经济损失^[2],引起了国家农业部及各级政府的高度重视。该病害一旦发生,化学防治和农业防治措施都达不到理想的效果。陈厚彬等^[3]进行了香蕉抗枯萎病种质的筛选,鉴定了多个抗病材料和感病材料。香蕉不同种质间抗性差异的存在,为香蕉抗枯萎病的遗传改良提供了可能,从长远看,选育抗病品种是防治香蕉枯萎病最经济、最有效的措施^[4]。从分子水平加强种质资源遗传多样性研究,将为香蕉抗枯萎病新品种的培育和性状改良奠定基础。在遗传多样性研究方面,常用的技术手段有形态学标记、生化标记和分子标记。在分子标记方面,可以采用基于细胞核基因组的RAPD, AFLP, SSR, ISSR等标记,也可以采用基于细胞质基因组的叶绿体DNA多态性^[5]研究。栽培品种的香蕉多为三倍体,通过无性繁殖扩大群体,许多香蕉枯萎病抗性品种是通过在田间选择突变体而获得的。细胞质基因组(线粒体和叶绿体基因组),可为鉴定抗病新品种的亲缘关系提供有利帮助。在生物进化过程中,内含子及基因间隔区在遗传过程中不受外界选择压力的影响,从而积累有较多的突变。笔者选择2个叶绿体基因组的非编码区序列(即 *rpl16* 内含子序列^[6]和 *psaA-ycf3* 基因间隔序列^[7]),设计PCR引物,对7个具有不同程度枯萎病抗性的香蕉品种,进行遗传多样性比较研究,旨在为香蕉抗枯萎病的遗传改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 采用巴西蕉、粤抗1号、粤抗3号、抗枯1号、抗枯5号、农科1号、粉杂等7个品种作为实验材料。其中,粤抗1号、粤抗3号、抗枯1号、抗枯5号、农科1号和粉杂为具有不同程度枯萎病抗性的品种,巴西蕉为当前国内主栽品种,但易感尖孢镰刀菌古巴专化型4号小种引起的枯萎病。

1.2 香蕉总DNA的提取 采用改良的CTAB法提取香蕉叶片总DNA。具体步骤为:取新鲜香蕉叶片5.0 g,加液氮迅速研磨成粉,快速转入50 mL离心管中,加入10 mL预热至65℃的CTAB提取缓冲液

收稿日期: 2012-10-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30860149);教育部科学技术研究重点项目(210172);热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室开放课题(2010hckled-01)

作者简介: 彭铁成(1984-),男,河南南阳人,海南大学农学院2009级作物遗传育种专业硕士研究生。

通信作者: 汤华(1974-),男,湖北恩施人,海南大学农学院副教授,博士。E-mail: thtiger@163.com

($w = 1.7\%$ 的 CTAB, $1.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl, $17.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA, $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl pH8.0, $\varphi = 2\%$ 的 β -巯基乙醇), 快速混匀, 65°C 水浴 30 ~ 60 min, 每隔 5 min 充分摇动 1 次。水浴结束后冷却至室温, 加入等体积的氯仿-异戊醇混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 24:1$), 轻柔摇动试管 10 min, 使有机相由无色转变为深绿色, 室温下 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 将上清转移到新的离心管中, 加入 $10 \mu\text{L} \rho = 10 \text{ g} \cdot \text{L}$ 的 RNaseA, 混匀, 37°C 水浴 2 h, 用等体积的氯仿-异戊醇混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 24:1$) 抽提 1 次, 室温下 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液转入新的离心管, 加 $2/3$ 体积的异丙醇, 沉淀 DNA, 钩出絮状 DNA, 浸于 $\varphi = 75\%$ 的乙醇漂洗 2 次, 晾干 10 min, 在沉淀仍有些潮湿的时候, 加入适量的 TE-8.0 溶解 DNA, 然后用 $w = 1.0\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 紫外分光光度计测定 DNA 浓度, -20°C 冰箱保存备用。

1.3 叶绿体基因序列的 PCR 扩增与检测 香蕉叶绿体基因组属于细胞质基因组, 对细胞质基因组进行分析, 可以反映古老的系谱关系。本研究选取了叶绿体基因组中的 *rpl16* 内含子(Cp1) 和 *pasA-ycf3* 基因间隔(Cp2) 作为扩增区段, 设计引物, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。Cp1 的引物序列: Cp1-F($5' - \text{GCTATGCTTAGTGTGTGACT} - 3'$); Cp1-R($5' - \text{CATTCTTCCTCTATGTTGTTT} - 3'$)。Cp2 的引物序列为: Cp1-F($5' - \text{AAATCGTGAGCATCAGCATG} - 3'$); Cp1-R($5' - \text{CCGAGGAGAACAGGCCATTC} - 3'$)。

PCR 反应体系为 $25 \mu\text{L}$, 含有 100 ng 的模板 DNA, $1.0 \mu\text{L}$ 的 PCR 引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $0.5 \mu\text{L}$ 的 dNTP($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $1.5 \mu\text{L}$ 的 Mg^{2+} ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $2.5 \mu\text{L}$ 的 $10 \times \text{PCR Buffer}$, $0.3 \mu\text{L}$ 的 *Taq* DNA 聚合酶($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)。PCR 反应程序为: 95°C 5 min; 95°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 2 min, 35 个循环; 72°C 8 min; 4°C 保存。PCR 产物的电泳检测: 用 $1 \times \text{TAE}$ 缓冲液配制 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶, 上样量 $10 \mu\text{L}$, 电压为 120 V , 电泳时间 45 min, 电泳结束后, 在 Gel-2000 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司) 上观察记录电泳结果。

1.4 PCR 产物的连接转化和测序 采用上海生工生物工程有限公司试剂盒(编号 BS435), 将 PCR 扩增产物连接到 T 载体。连接体系为 $10 \mu\text{L}$ ($1 \mu\text{L}$ 的 $10 \times \text{Ligation Buffer}$, $1 \mu\text{L} w = 50\%$ 的 PEG4000, $0.5 \mu\text{L}$ pUCM-T vector, $3.5 \mu\text{L}$ PCR 产物, $1 \mu\text{L}$ T4 DNA Ligase, $3 \mu\text{L}$ ddH₂O)。将经 23°C 水浴 1 h 的 $10 \mu\text{L}$ 连接反应液转移到 $100 \mu\text{L}$ DH5 α 感受态细胞中, 混匀后冰浴 30 min, 42°C 水浴 90 s, 快速冰浴 5 min, 加入 $500 \mu\text{L}$ 37°C 预热的 LB 液体培养基, 混匀后置于摇床($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 37°C) 培养 45 min, 然后取 $100 \mu\text{L}$ 转化液涂布到含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素(Amp) 的 LB 固体平板上, 37°C 培养 12 ~ 14 h。挑选白色单克隆菌落, 利用菌落 PCR 反应, 筛选确认阳性克隆。将阳性克隆菌接种于含有 1 mL LB 液体培养基(含 Amp $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 EP 管(1.5 mL) 中, 摇床($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 37°C) 培养 10 h, 然后将菌液送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.5 叶绿体基因序列的生物信息学分析 利用 ContigExpress 软件对测序的结果进行序列拼接, 拼接的序列利用 NCBI 网站中的 BLASTn 程序进行同源性检索, 检索结果采用 ClustalW 和 BioEdit 软件进行排序和分析。比对好的序列用 MEGA4.0 软件和 ClustalX 1.81 软件进行系统发育分析, 构建 NJ(Neighbor-joining tree) 邻接树, 并测算相对遗传距离。构建 NJ 树时, 设置空位作为缺失处理(gaps = missing), 采用自展法(bootstrap) 进行检测, 使用 Kimura2-parameter 法, 共循环 1 000 次重复, 获得各供试材料间的 NJ 邻接树。运用 DnasP 软件计算核苷酸多样性。

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取与检测 电泳检测结果表明, 条带清晰完整, 无明显拖尾, 也没有 RNA 带。说明 DNA 提取质量较好(图 1), 可进行后续实验。

2.2 PCR 扩增产物的电泳检测 利用叶绿体基因组 *rpl16* 基因的引物, 对 7 个香蕉品种的 *rpl16* 基因内含子序列进行 PCR 扩增, 能得到唯一的大小约 $1\,100 \text{ bp}$ 的清晰扩增条带(图 2)。利用叶绿体基因组 *pasA-ycf3* 基因间隔区的引物, 对 7 个香蕉品种的 *pasA-ycf3* 基因间隔区序列进行 PCR 扩

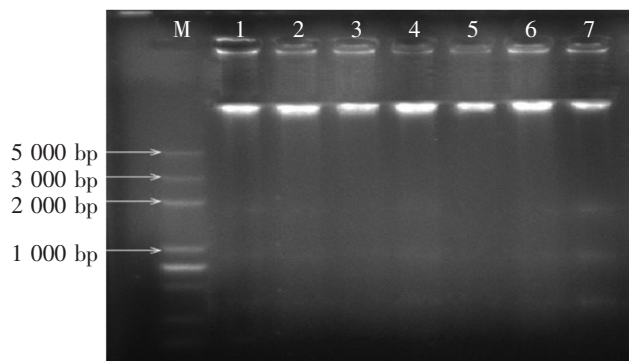


图 1 不同香蕉品种的总 DNA 电泳图
M 为 Marker; 1 ~ 7 分别为巴西蕉、粤抗 1 号、粤抗 3 号、抗枯 1 号、抗枯 5 号、农科 1 号、粉杂

增,能得到唯一的大小约 900 bp 的清晰扩增条带(图 3)。

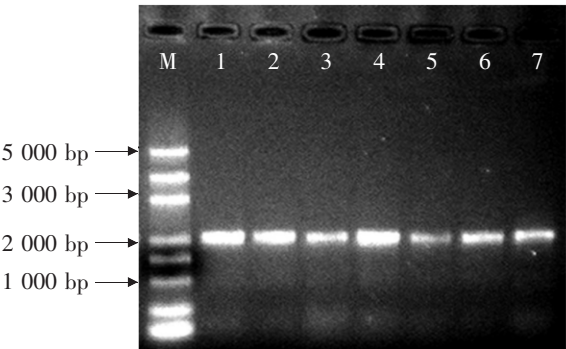


图 2 *rpl16* 基因内含子的 PCR 扩增产物

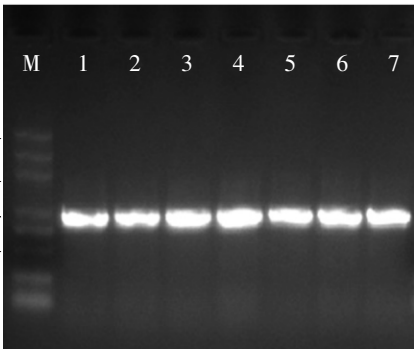


图 3 *pasA-ycf3* 间隔区的 PCR 扩增产物

M 为 Marker; 1~7 分别代表巴西蕉、粤抗 1 号、粤抗 3 号、抗枯 1 号、抗枯 5 号、农科 1 号、粉杂

2.3 叶绿体 *rpl16* 基因序列分析 扩增的 *rpl16* 基因序列约为 1 100 bp,测序分析后,通过 BLASTn 检索,与 Genbank 中的 *Musa acuminata* AAA Group voucher TM71 (QSG) ribosomal protein 16 (*rpl16*) gene, partial cds; chloroplast(AY855884. 1) 具有 99% 的一致性,说明扩增结果正确。对 7 个香蕉品种叶绿体 *rpl16* 的扩增 DNA 序列进行比较,选择富含多态性位点的 *rpl16* 内含子区段(总共 1 181 bp) 进行分析,其中,G + C 含量平均为 31. 9%,核酸多样性为 0. 009 13。全部分析了 1 038 个位点(不包括没有多态性的缺失/丢失位点),得到 27 个单变异位点,3 个简约信息位点。

遗传距离是研究群体遗传多样性的基础,可用来描述群体的遗传结构和品种间的差异,是反映所研究群体系统进化最基本的指标。本研究根据 *rpl16* 基因内含子序列信息,计算了各供试材料间的遗传距离(见表 1)。从表 1 可以看出,7 个香蕉品种之间的相对遗传距离为 0. 001 9~0. 018 5,其中,农科 1 号与粉杂之间的遗传差异最大,其相对遗传距离为 0. 018 5;其次为粉杂和抗枯 1 号,两者之间的相对遗传距离为 0. 015 6;巴西蕉、粤抗 1 号和粤抗 3 号之间的遗传差异最小,三者之间的相对遗传距离为 0. 001 9。总体来说,各供试香蕉材料之间都存在一定的遗传差异,但遗传差异不大。

表 1 不同香蕉品种叶绿体 *rpl16* 扩增序列的相对遗传距离

品种名称	1 - 巴西蕉	2 - 粤抗 1 号	3 - 粤抗 3 号	4 - 抗枯 1 号	5 - 抗枯 5 号	6 - 农科 1 号
2 - 粤抗 1 号	0. 001 9					
3 - 粤抗 3 号	0. 003 9	0. 001 9				
4 - 抗枯 1 号	0. 010 7	0. 008 7	0. 008 7			
5 - 抗枯 5 号	0. 005 8	0. 003 9	0. 003 9	0. 008 7		
6 - 农科 1 号	0. 013 6	0. 011 7	0. 011 7	0. 013 6	0. 011 7	
7 - 粉杂	0. 010 7	0. 008 7	0. 008 7	0. 015 6	0. 010 7	0. 018 5

采用 NJ 法构建邻接树(见图 4),从图 4 可以看出,7 个香蕉品种可以分成两大类,第 1 大类包括抗枯 1 号和农科 1 号;第 2 大类包括巴西蕉,粤抗 1 号、粤抗 3 号、抗枯 5 号和粉杂。第 2 大类又可分为两类,抗枯 5 号单独分出,巴西、粤抗 1 号、粤抗 3 号和粉杂归为一类。由此可知,粤抗 1 号和巴西之间的亲缘关系较近,粤抗 3 号和粉杂之间的亲缘关系较近。同时也说明,这 7 个香蕉品种之间存在着一定的遗传差异性。

2.4 叶绿体 *pasA-ycf3* 间隔区序列分析 扩增的 *pasA-ycf3* 基因间隔区序列长度约为 940 bp,测序后通过 BLASTn 检索,与 Genbank 中的 *Musa acuminata* AAA Group voucher TM71 (QSG) photosystem I P700 apoprotein A1 (*psaA*) gene, partial cds; *psaA-ycf3* intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I assembly protein (*ycf3*) gene, partial cds; chloroplast(AY870120. 1) 具有 100% 的一致性。对 7 个香蕉品种叶绿体 *pasA-ycf3* 的扩增 DNA 序列进行比较,选择富含多态性位点的 *pasA-ycf3* 间隔区段(总共 675 bp) 进行分析,其中,G + C 含量平均为 32. 1%,核酸多样性为 0. 003 65。总共分析了 627 个位点(不包括没有多态性的缺失/丢失位点),得到 8 个为单碱基置换或突变。由此说明,这 7 个香蕉材料叶绿体 *pasA-ycf3* 间隔区序列没有明显的区分特性序列,区分度不强。由表 2 可以看出,抗枯 5 号与粉杂之间的遗传差异最大,

两者之间的相对遗传距离为 0.012 9; 而巴西蕉、粤抗 1 号、粤抗 3 号、农科 1 号和抗枯 1 号这 5 个材料之间没有明显的遗传差异。

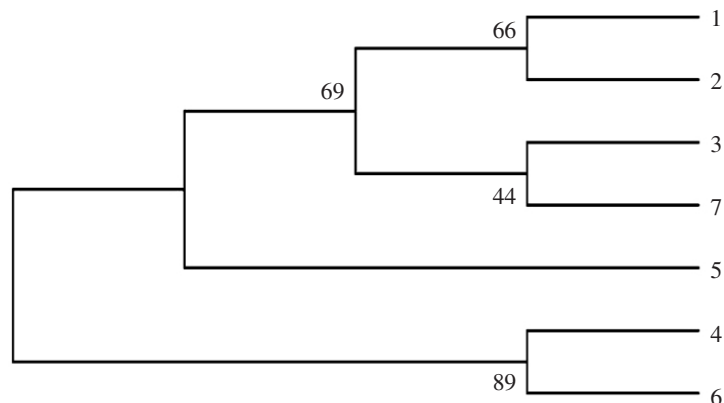


图 4 不同香蕉品种叶绿体 *rpl16* 扩增序列邻接树

1~7 分别代表巴西蕉、粤抗 1 号、粤抗 3 号、抗枯 1 号、抗枯 5 号、农科 1 号和粉杂

表 2 不同香蕉品种叶绿体 *pasA-ycf3* 间隔区扩增序列的相对遗传距离

品种名称	1 - 巴西蕉	2 - 粤抗 1 号	3 - 粤抗 3 号	4 - 抗枯 1 号	5 - 抗枯 5 号	6 - 农科 1 号
2 - 粤抗 1 号	0.0000					
3 - 粤抗 3 号	0.0000	0.0000				
4 - 抗枯 1 号	0.0000	0.0000	0.0000			
5 - 抗枯 5 号	0.0048	0.0048	0.0048	0.0048		
6 - 农科 1 号	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0048	
7 - 粉杂	0.0080	0.0080	0.0080	0.0080	0.0129	0.0080

叶绿体 *pasA-ycf3* 间隔区扩增序列邻接树分析, 如图 5 所示, 形成 2 个分支, 粉杂形成 1 个早出分支, 巴西蕉和其余 5 个抗枯萎病供试材料形成 1 个晚出分支, 内部靴带支持率较低, 表现出来的遗传距离差异不明显, 不能更好地区分这 7 个香蕉品种。

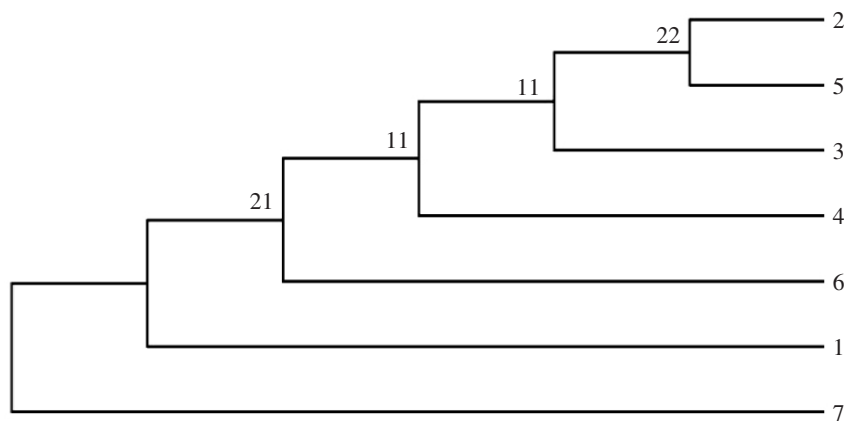


图 5 不同香蕉品种叶绿体 *pasA-ycf3* 间隔区扩增序列邻接树

注: 1~7 分别代表巴西蕉、粤抗 1 号、粤抗 3 号、抗枯 1 号、抗枯 5 号、农科 1 号和粉杂

3 讨 论

枯萎病对香蕉生产造成了极大的破坏, 要解决这一世界性的难题, 出路是培育抗枯萎病的香蕉品种。遗传多样性是物种自身生存和未来进化的资源, 不仅能给种群带来适应性方面的优势, 同样有利于人工育种, 基因的多样性对于提高物种或种群内其他成员的生产力具有潜在价值。本研究利用叶绿体基因内含子和间隔区序列的差异性, 设计 PCR 引物, 进行序列扩增、测序及聚类分析, 对不同基因型的 7 个香蕉

品种进行了分类,同时分析其遗传多样性。通过对巴西蕉及6个抗枯萎病香蕉品种遗传多样性的分析,发现这6个抗枯萎病材料与巴西蕉之间存在着一定的遗传差异,但遗传差异不是很大,说明当前的香蕉种质存在遗传多样性狭窄的问题。本研究采用2个不同的叶绿体基因组序列进行分析,其结果也有一定的差异,说明在遗传多样性研究中,采用更多的基因序列进行分析和综合比较,才能获得更加可靠的结果。

参考文献:

- [1] KAEMMER D, AFZA R, WEISING K, et al. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.) [J]. Biotechnology (N Y), 1992, 10 (9): 1030–1035.
- [2] DEASCENSAO A R, DUBERY I A. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race Four [J]. Phytopathology, 2000, 90 (10): 1173–1180.
- [3] 陈厚彬, 冯奇瑞, 徐春香, 等. 抗枯萎病香蕉种质筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2006(1): 9–12.
- [4] 严定平, 柳晓磊, 汤华. 香蕉枯萎病及其抗病育种研究进展 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2008, 26(3): 290–295.
- [5] SWANGPOL S, VOLKAERT H, SOTTO R C, et al. Utility of selected non-coding chloroplast DNA sequences for lineage assessment of *Musa* interspecific hybrids [J]. J Biochem Mol Biol, 2007, 40 (4): 577–587.
- [6] ZHANG W. Phylogeny of the grass family (Poaceae) from *rpl16* intron sequence data [J]. Mol Phylogenet Evol, 2000, 15 (1): 135–146.
- [7] SUMMER H, PFANNSCHMIDT T, LINK G. Transcripts and sequence elements suggest differential promoter usage within the *ycf3-psaAB* gene cluster on mustard (*Sinapis alba* L.) chloroplast DNA [J]. Curr Genet, 2000, 37 (1): 45–52.

Genetic Diversity of Banana Varieties Based on Genes from Chloroplast

PENG Tie-cheng^{1,2,3}, XU Fang³, LUO Jing-yao^{2,3}, CHEN Yun-yun^{2,3}, TANG Hua^{1,2,3}

(1. Key Laboratory for Conservation and Utilization of Tropical Crops Germplasm Resources, Ministry of Education, Haikou 570228, China; 2. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bio-resources-State Key Laboratory Breeding Base, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Banana is the most important tropical fruit. In recent years the outbreaks of banana *Fusarium* wilt have great negative impact on banana production. The study of genetic diversity of banana will provide support to genetic improvement of banana for resistance to *Fusarium* wilt. Seven banana varieties were used as sequencing materials, and 2 non-coding chloroplast DNA sequences (Intron sequence of *rpl16* gene and intergenic sequence of *psaA-ycf3* genes) in these varieties were amplified by PCR, cloned by TA, sequenced and analysed by bioinformatics to study the genetic diversity of banana. Neighbor joining method was used to establish phylogenetic tree and relative genetic distance measured. Results showed that Baxi banana had different degrees of genetic diversity as against the other 6 wilt-resistant banana varieties but the difference was not significant.

Key words: banana; *Fusarium* wilt disease; chloroplast genome; genetic diversity