

红阳猕猴桃全红芽变系的 RAPD 分析

宁允叶¹ 熊庆娥^{2*} 曾伟光¹ 曾光荣³

(¹ 四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014; ² 四川农业大学农学院, 雅安 625014; ³ 四川省广元市农业局, 广元 628000)

摘 要: 以 10 bp 的随机引物, 通过 PCR 技术对猕猴桃全红芽变系 86-3 及对照品种红阳的基因组 DNA 进行扩增, 以探讨芽变系遗传物质的变化。以 86-3 母株与红阳为材料对 300 条单引物进行了筛选, 得到在两个样品间的扩增有多态性片段 10 条引物 (S107、S84、S157、S27、S188、AY17、AY5、R11、AV9、AM11)。10 条引物共扩增出 148 个片段, 多态性片段为 20 个, 占 13.5%。两样品间相似系数为 0.7619, 遗传距离为 0.1429, 表明 86-3 果肉颜色的变化与遗传物质的改变密切相关。用 4 种引物 S107、S84、S157、AY17 分别对芽变系单株及对照进行 RAPD 扩增, 不同树龄、不同砧木的芽变单株与对照间的特异性片段同引物筛选中所得结果一致, 可用所得引物对全红芽变系嫁接株的果肉颜色进行早期预测。

关键词: 猕猴桃; 红果肉; 芽变; RAPD; 早期鉴定

中图分类号: S 663.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0511-03

猕猴桃为多年生木质藤本果树, 属猕猴桃科 (*Actinidiaceae* Hutch) 猕猴桃属 (*Actinidia* Lindl.)。红果肉猕猴桃为一稀有种质, 现已在新西兰及我国湖南、河南、四川等地培育或发现^[1,2], 但至今未见果肉全红的优质猕猴桃品种 (系) 的报道。

‘红阳’是 1986 年从中华猕猴桃实生群中筛选培育而成的一个变种, 果肉翡翠绿色, 沿果心向外呈放射状血红色条纹^[3]。1997 年在广元市苍溪县 ‘红阳’ 的无性繁殖后代中发现一个果肉全红且色泽比 ‘红阳’ 深的优良嫁接单株 (代号 86-3)。连续几年观察发现, 该植株生长健壮, 枝粗较软, 萌芽率高, 成枝力较弱; 其嫁接后代定植第 2 年结果, 结果枝主要发生在母枝上 2~10 节, 长 20 cm 左右, 可着果 1~4 个; 果实圆柱形, 果毛柔软, 单果 30 g 左右, 果肉全面着深红色 (见插图 3 图版, c); 其变异性状稳定。作者对其进行 RAPD 分析, 旨在探明其遗传物质的变化, 为猕猴桃果实着色方面的研究提供可借鉴的特异性 RAPD 片段。

1 材料与方 法

芽变材料: A. 86-3 母株; B. 4 年生嫁接单株 (砧木 ‘川猕一号’); C. 2 年生嫁接单株 (砧木 ‘川猕一号’); D. 2 年生嫁接单株 (砧木 ‘野生猕猴桃’)。所用单株均为田间随机取样。对照品种 ‘红阳’。所用材料均由广元市农业局提供。于 2002 年 4 月下旬采回幼叶, 液氮冷冻后移至 -80℃ 保存备用。

基因组 DNA 提取按文献 [4]。参照李思光等^[4]及 Cipriani 等^[5]的反应体系, 设计不同梯度的模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTP 浓度及 Taq 酶的量, 对反应条件进行优化。Taq 酶、10×Buffer (含 Mg²⁺)、dNTP (赛百盛公司), 10 bp 引物 (S 系列由基康公司合成, 其余购自赛百盛)。PCR 扩增程序参照文献 [6]。在 MJ Research 公司生产的 PTC-100™ PCR 仪中进行扩增, 产物以 DNA/EcoR + Hind (华美公司) 作 Marker 进行琼脂糖凝胶电泳。以 86-3 与对照为材料对 300 条单引物进行筛选, 具有多态性引物重复扩增 2~3 次。

收稿日期: 2002-12-02; 修回日期: 2003-04-30

*通讯作者。本试验在四川农业大学玉米所分子生物学实验室完成。

2 结果与分析

2.1 反应体系的优化及引物的筛选

在本试验所使用的 PCR 仪型号及扩增程序下, 根据扩增结果的清晰度和重复性确定优化的反应体系: 20 μL 总体积中, 模板 10 ng, 10 \times buffer (内含 Mg^{2+}) 2 μL , dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL , Taq 酶 1 U, 引物 (33 ng/ μL) 1 μL , 余者以双蒸馏水补足。

所用的 120 条 S 序列及 180 条赛百盛 10 bp 随机引物中, 除少数几个外, 都有清晰的扩增产物, 一般为 3~11 个片段, 介于 300~3 530 bp 之间。绝大多数引物在 86-3 与对照间扩增产物完全相同, 有 10 条引物在两者间扩增出 1~3 条清晰、稳定的多态性片段 (表 1)。

表 1 产生多态性随机引物的序列及扩增情况

Table 1 The sequences of the primers which produced polymorphic fragments and their amplification

引 物 Primer	碱基序列 Nucleotide sequence (5' 3')	扩增片段总数 Total fragments amplified	多态性片段数 Polymorphic fragments	引 物 Primer	碱基序列 Nucleotide sequence (5' 3')	扩增片段总数 Total fragments amplified	多态性片段数 Polymorphic fragments
S107	CTGCATCGTG	18	2	S84	AGCGTGICTG	19	1
S157	CTACTGCCGT	13	1	S27	GAAACGGGTG	17	3
S188	TTCAGGGTGG	15	3	AY17	GGTGATTCGG	9	1
AY5	TCGCTCGGTT	7	1	R11	GTAGCCGICT	20	2
AV9	GAGGTCCTAC	13	3	AM11	AGATCCCGCG	17	3

与对照相比, 86-3 母株的扩增片段出现质 (片段的有无及片段数) 或量 (强弱) 的变化: 其中 86-3 的扩增产物有 S84-500、S157-890、S27-1000、S27-700、S27-680、S188-931、S188-742、S188-580、AY17-564、R11-420、R11-350 片段, 而没有 S107-931、S107-698、AY5-460 片段; 引物 AV9、AM11 在 86-3 中没有 AV9-440、AM11-900 片段, 但有 AV9-564、AV9-350、AM11-1049、AM11-810 片段。此外, 86-3 中引物 S107、S84、AY17 的扩增产物分别在约 500 bp、941 bp、540 bp 的位置上表现片段密度增强, AY5 在约 370 bp、700 bp 处明显表现出片段密度减弱 (插页 3 图版, a)。无论质的差异还是量的差异都反映出 86-3 母株与对照在 DNA 水平上的差异。

2.2 86-3 母株与红阳遗传相似性分析

扩增结果若相对迁移距离相同则为单态性片段, 否则为多态性片段。所筛选出的 10 条引物在 86-3 与对照间共扩增出 148 个片段, 其中多态性片段为 20 个, 占 13.5%。将引物的扩增结果按片段有为“1”, 无为“0”录入 Excel 表格, 应用 NTSYSpc2.1 软件计算得到 86-3 与红阳间的遗传相似系数为 0.7619, 遗传距离为 0.1429。

2.3 特异性片段预测猕猴桃全红芽变嫁接单株的果肉颜色

用 S107、S84、S157、AY17 对不同树龄、不同砧木的芽变嫁接单株与红阳进行 RAPD 扩增, 结果见插页 3 图版, b。本试验中 86-3 母株 A 与 4 年生嫁接单株 B 果肉全红, 但来自不同生长地; 2 年生嫁接单株 C、D 果肉性状未知且砧木不同, 但所有接穗均采自同一芽变母株, 属于同一无性系。从图版, b 中可以看出, A、B、C、D 与红阳 (对照) 间的多态性片段与图版, a 中相应引物的扩增结果一致, 说明芽变所发生的遗传物质变化可以通过无性繁殖稳定存在, 不受生长环境、树龄及砧木影响。同一无性系不同个体间的谱带完全一致, 为采用 RAPD 鉴定芽变及预测芽变嫁接苗果肉颜色的可靠性、可重复性提供了试验依据。2 年生单株 C、D 的扩增谱带与 A、B 谱带完全一致, 因而在果实成熟前即可初步确定 C、D 为全红类型 (2002 年 9 月对所测 2 年生嫁接单株成熟果实进行调查验证, 结果果肉全面着红色, 与 RAPD 分析预测的结果一致)。

3 讨论

采用 RAPD 分析果树芽变材料, 优化反应体系极为重要, 本试验中采用优化后的反应体系扩增出

的图谱清晰、可重复性强。作者从 300 条 RAPD 引物中筛选出 10 条多态性引物，多次重复扩增结果显示 86-3 与对照间的多态性片段稳定存在，证实芽变果肉颜色的变化与遗传物质的改变密切相关，为全红猕猴桃新品种的审定提供了可信的证据。一般芽变与母株间遗传差异小，RAPD 检测难度较大^[7]，但本试验中 86-3 与对照品种间多态性片段多达 20 条，表明遗传物质发生较大变异。猕猴桃果肉的红色成分主要是花青素糖苷，而影响其合成代谢的基因分为结构基因和调节基因：结构基因编码合成代谢相关酶类，调节基因调控结构基因的表达及强度^[8]。本研究中得到多态性片段可能与果肉颜色形成的结构基因有关，或者与这些基因的表达调控有关。但它们是否全部与果肉颜色形成相关以及对相关片段的研究有待深入进行。

用 RAPD 来衡量品种（系）的遗传背景不受时间、生长发育时期及环境因子的影响。对于特定物种来说，RAPD 扩增体系一旦建立，该技术就变得简单、快速、高效。用筛选出的引物预测芽变嫁接单株果肉颜色，其特异性片段稳定出现。本试验所得特异性 RAPD 片段可用于全红芽变嫁接苗木纯度的早期鉴定。

本研究所用的芽变系与红阳间遗传背景基本一致，而果实颜色差异很大，因而是探索果实着色分子机制较理想的材料，也为猕猴桃育种工作提供重要的种质资源。

参考文献：

- 1 Seal A G. New red and green fleshed *Actinidia*. NZ Kiwifruit, 1988, (2): 9
- 2 朱道圩. 猕猴桃遗传育种研究现状与展望. 河南农业大学学报, 1995, 29 (4): 328 ~ 336
- 3 吴伯乐, 李兴德. 红肉优质耐贮猕猴桃——红阳. 中国果树, 1993, (4): 15
- 4 李思光, 罗玉萍, 陈万秋, 等. 猕猴桃基因组 DNA 的提取及其 RAPD 扩增研究. 南昌大学学报 (理科版), 2001, 25 (3): 264 ~ 268
- 5 Cipriani G, Bella R, Testolin R, et al. Screening RAPD primers for molecular taxonomy and cultivar fingerprinting in the genus *Actinidia*. Euphytica, 1996, 90 (2), 169 ~ 174
- 6 金勇丰, 张耀洲, 陈大明, 等. 桃早熟芽变品种‘大观一号’的 RAPD 分析及其特异片段的克隆. 果树科学, 1998, 15 (2): 103 ~ 106
- 7 Nybom H. DNA fingerprinting in sports of Red Delicious apples. HortScience, 1990, 25 (12): 1641 ~ 1642
- 8 包满珠. 植物花青素基因的克隆及应用——文献综述. 园艺学报, 1997, 24 (3): 279 ~ 284

Studies on Red Flesh Sport from ‘Red Sun’ Kiwifruit Using RAPD Marker

Ning Yunye¹, Xiong Qing 'e², Zeng Weiguang¹, and Zeng Guangrong³

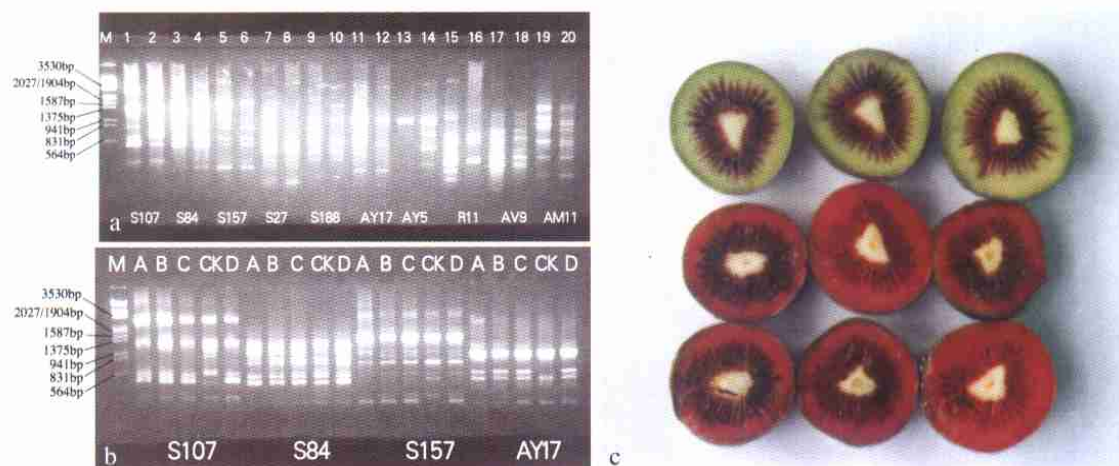
(¹ Forestry and Horticultural College, Sichuan Agricultural University, Ya 'an 625014, China; ² Agricultural College, Sichuan Agricultural University, Ya 'an 625014, China; ³ Guangyuan Agricultural Bureau, Guangyuan 628000, China)

Abstract : Genomic DNAs from ‘Red Sun’ kiwifruit and its sport red-fleshed kiwifruit were amplified by RAPD with 300 10-bp random primers to study the genetic substance change of the sport. Among the primers most amplification products were monomorphic, only ten of which could generate polymorphic segments. 20 out of the 148 amplified fragments were distinctive including the loss of a normal segment, appearance of a new segment and intensity changes. The Nei's association coefficient and genetic distance between them were 0.7619 and 0.1429 respectively. The differences of amplified DNA segments showed that the red-fleshed sport was related to changes of some genetic substances. The polymorphic segments could be used to forecast the flesh color of grafted seedlings from the sport scion.

Key words : Kiwifruit ; Red flesh ; Sport ; RAPD ; Forecast

宁允叶等：红阳猕猴桃全红芽变系的RAPD分析

Ning Yunye, et al: Studies on Red Flesh Sport from 'Red Sun' kiwifruit Using RAPD Marker



图版说明：a. 筛选出的10个随机引物的扩增指纹图（奇数为86-3母株，偶数为对照，M：DNA marker，λDNA/EcoR I+Hind III）；b. 引物S107、S84、S157、AY17对芽变系及‘红阳’的扩增图谱 [A. 86-3；B. 4年生嫁接单株（砧木‘川猕一号’）；C. 2年生嫁接单株（砧木‘川猕一号’）；D. 2年生嫁接单株（砧木野生猕猴桃）；CK为对照‘红阳’]；c. ‘红阳’（上排）和86-3（中、下排）横切面。
Explanation of plates: a. The profile amplified by the 10 primers which produced polymorphic fragments (The odd number is 86-3, the even is control); b. The amplification profile of the sport line and ‘Red Sun’ kiwifruit using primer S107, S84, S157, AY17 [A. 86-3, B. 4 years old grafted plant (rootstock being ‘Chuanmi 1’), C. 2 years old grafted plant (rootstock being ‘Chuanmi 1’), D. 2 years old grafted plant (rootstock being wild kiwifruit) CK. ‘Red Sun’ kiwifruit]; c. Fruit cross sections of ‘Red Sun’ kiwifruit (top row) and 86-3 (middle and lower row).

易图永等：几个抗疫病性不同的辣椒材料抗病基因同源序列的分离与比较

Yi Tuyong, et al: Amplified Resistance *Phytophthora* Blight Gene Analogs from *Capsicum annuum* Genomic DNA

Cf9pro	LSLSRNLHGPIKSSSGSTNLFMRLQILDLSNNGFSGNLPE	40
C36proTNKLHGPIRTLGSMTYLELQMLDLSSNAFTGNVPT	36
C39proRNKLHGPIQPSEDETIFPELRIIDLSYNEFSGNFPV	36
C41proTNKLHGPIRTLGSMTYLELQMLDLSSNAFTGNVPT	36
C51proRNKLHGPISDSRTDNLFAQIRVIDLSFNGFSGDLPV	36
C82proTNKLHGPISDSRTDNLFAQIRVIDLSNNGFSGDLPV	36
Cf2pro	•RLTSNKLHGPIRSSRAEIMFPDLRIIDLSRNAFSQDLEPT	39
C22proRNKLHGPIKYSRTNNSFAQIRVIDLSNNGFSGKLPV	36
Cf9pro	RILGNLQTMKKIIDENTRFPEYISDQYEIYYVYLTITITKG	80
C36pro	SMFQHLKAVRKIDPSKKAPSNEENGYYQNSIAVVTKAYSK	76
C39pro	SLFQHMKAARTIEQ•••TRKDPYFGDSYFQDFVTVAATKG	73
C41pro	SMFQHLKAVRKIDPSKKAPSNEENGYYQNSIAVVTKAYSK	76
C51pro	SLLEIFQAMKIIDENSRTKRYIADYYNGSNANLIVTTTKG	76
C82pro	SLFENFQAMKIISENSGTREYIADYYSVYYTNTLIVTTTKG	76
Cf2pro	SLFEHLKGMRTVDKTMEEPSYESYDDSVVVV•••••TKG	74
C22pro	SLFEIFQAMKII•••SGTREYIADYSGNYA•NTLIVITKG	72

图版说明：引物C扩增抗病基因同源序列与抗病基因Cf2、Cf9氨基酸序列的比较

Explanation of plate: Amino acid sequences comparison among amplified sequences by primer C and Cf2, Cf9