

利用 RAPD 分析鉴别荔枝的焦核突变体

刘成明^{1,2} 梅曼彤²

(¹ 华南农业大学园艺系, 广州 510642; ² 华南农业大学遗传工程研究室, 广州 510642)

摘要: 采用随机扩增多态性 DNA 方法, 对荔枝品种三月红、怀枝和它们的 9 个自然焦核突变体进行了多态性分析。经 500 个随机引物的筛选, 发现仅 1 个引物 OHL-12 能在品种与突变体间扩增出多态性片段, 其中 2 个焦核怀枝的特异片段大小为 1 645 bp, 4 个焦核三月红的特异片段大小为 722 bp, 初步认为这两条特异片段可能与荔枝的焦核基因相关。

关键词: 荔枝; 焦核突变体; RAPD

中图分类号: S 667.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 01-0057-03

1 目的、材料与方法

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 的“焦核”是指授粉受精过程正常, 但合子胚在随后的发育过程中败育或完全退化, 致使果实中的种子萎缩干瘪或呈空腔的现象。焦核的果实因种子变小, 果肉增厚, 糖度提高, 综合品质可大大提高。近年来, 我们和有关单位通过大量的选种工作, 获得了一些宝贵的焦核突变体, 希望通过 RAPD 分析, 从 DNA 水平上揭示荔枝的大核品种与焦核突变体之间的差异及表现形式, 探讨焦核突变的遗传机理, 为荔枝的选育种工作提供依据。

幼叶材料直接取自各焦核突变体母株及就近的原品种单株, 突变体与对照各 9 株。9 个突变体的名称、代号及焦核率 (%) 为: 花县焦核怀枝 HH (95.0), 中山焦核怀枝 ZH (90.0), 焦核三月红 90-1 (67.74), 90-4 (72.73), 90-7 (63.30), 90-8 (70.0), 90-9 (81.10), 90-12 (77.42), 90-18 (96.67)。其中, 焦核怀枝的焦核率为我们测定所得, 焦核三月红的焦核率为 1990 年 5 月“广东省中山市三月红荔枝优良单株评选”省级鉴定会现场测定的数据。据我们近几年的跟踪观测, 各单株的焦核率表现比较稳定。

基因组 DNA 提取基本按 SDS 方法, 但在防褐变、DNA 回收及纯化等方面作了改进。RAPD 扩增引物为 Operon Technologies (CA, USA) 公司的 10 碱基 RAPD 随机引物, 共计 500 个 (KIT A - KIT Y)。25 μ L 的反应体积中含: 反应缓冲液 (10 \times) 2.5 μ L, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTP 0.1 mmol/L (上海生工公司), Taq 酶 1.0 U (华美生物公司), 随机引物 0.2 μ mol/L, 模板 DNA 3 μ L (约含 DNA 15 ng)。反应在 PE-9600 热循环仪上进行, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入扩增循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 38 $^{\circ}$ C 复性 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 40 个循环。循环结束后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 600 s。反应产物经琼脂糖凝胶电泳和 EB 溶液染色后于 Bio-Rad 凝胶成像系统扫描成像, 用 Quantity One 4.1.0 软件进行 RAPD 谱带的检测分析。

2 结果分析与讨论

2.1 扩增引物的筛选

以三月红、怀枝原品种中两个单株的 DNA 为模板, 用 500 个引物进行全面的扩增筛选, 发现其中有 406 个能扩出 RAPD 产物, 片段大小为 280~5820 bp (OPH16-280 和 OPU02-5820)。再从这 406 个引物中挑选出较好的 105 个重复扩增, 选出最佳的 38 个用于焦核突变体的分析。

收稿日期: 2001-07-04; 修回日期: 2001-09-10

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (950398); 广东省科技计划项目 (2KM03001N)

2.2 品种与突变体间及对照株之间的单态性

38 个引物中, 37 个表现为完全的单态性, 即品种与突变体之间没有任何差别。据统计, 这 37 个引物对怀枝扩增出 321 条 RAPD 带 (平均每个引物扩增 8.68 条), 对三月红扩增出 370 条 (平均每个引物扩增 10.0 条), 如此大量的位点中竟然没有一个位点的差异, 说明品种与其突变体间的遗传背景高度一致。另一方面, 38 个引物对不同对照单株扩增的带型也完全相同, 表明这些对照株没有发生变异, 能够代表原品种的遗传型。

2.3 品种与突变体之间的多态性

38 个引物中, 只有 1 个引物 (OPL-12) 在原品种与突变体之间产生了明亮清晰的多态性带, 并且多次扩增的结果相同。如图 1 所示, 怀枝的两个焦核突变体都比原品种多 1 条相同的带 L12-1645; 三月红的 8 个焦核突变体中有 4 个 (90-1, 90-4, 90-7, 90-18) 比原品种多 1 条相同的带 L12-722, 另外的 3 个突变体 (90-8, 90-9, 90-12) 则与原品种无差异。需强调指出的是, 本研究中的焦核突变体是在不同的地区选育所得, 树龄都达几十年, 它们之间既不属无性繁殖姊妹系, 也不是无性繁殖的子女代。考虑到 2 个多态性位点都只与引物 OPL-12 有关, 可以推测 2 个品种都是因为在很相似的序列上发生突变而导致焦核, 至于不同突变体与原品种之间的共性差异, 则可能都是来自于这一段特定的 DNA 序列, 当然, 这种推测有待更深入的研究检验。



图 1 用引物 OPL-12 对供试材料扩增的 RAPD 谱带

Fig. 1 RAPD patterns of cultivars and their mutants with OPL-12

1, 3: 怀枝 Huazhi; 2: 花县焦核怀枝 HH; 4: 中山焦核怀枝 ZH; 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17: 三月红 Sanyuehong; 6: 90-1; 8: 90-4; 10: 90-7; 12: 90-8; 14: 90-9; 16: 90-12; 18: 90-18; M: DNA/ *EcoR* + *Hind*

荔枝“焦核”性状的表现比较复杂, 目前认为它不是简单的质量性状, 但尚缺乏资料积累^[1]。从品种上看, 有些品种的焦核率比较稳定, 而另一些品种则不甚稳定。例如, 典型的焦核品种糯米糍、绿荷包焦核率既高且稳定, 典型的大核品种怀枝、三月红焦核率很低也很稳定, 但一些半焦核性的品种如妃子笑、桂味则波动较大, 易受环境、气候甚至授粉方式 (同品种授粉或异品种授粉) 的影响。因此, 将焦核性状归为多基因控制性状是合乎情理的。王跃进等的研究认为, 葡萄的无核性 (来自无核白葡萄, 属于假单性结实) 由多基因控制, 而且这些基因有主效和微效之分^[2]。本研究中, 在 6 个突变体上发现 DNA 序列的改变 (2 个 RAPD 位点), 但还有 3 个突变体上没有找到 DNA 的差异, 是否暗示还存在着其它的控制基因。另外, 由于这 6 个突变体的焦核率都很高, 而且远远高于原品种 (据我们测定, 怀枝的焦核率约为 5%, 三月红的焦核率 < 10%), 因此推测它们的两个变异位点很可能分别与其内控制焦核的主效基因有关。看来虽然葡萄与荔枝分属不同的科, 但在无核 (小核) 的分子机制上也可能存在相似之处。

焦核突变体与原品种的遗传背景非常一致, 按本研究结果计算, 怀枝—焦核怀枝间的相似系数为 99.85% [(328 × 2) / (328 + 329)], 三月红—焦核三月红间的相似系数为 99.87% [(375 × 2) /

(375 + 376)], 远高于作物上的“近等基因系”, 印证了“芽变与原品种在基因型上只有微小的不同”^[1]的论断, 与现实的情况相当吻合。从形态和习性看, 突变体与原品种间除焦核率外几乎没有任何差别, 很难区分。正因如此, 苗木市场上已发生了许多以假冒真的情况, 加剧了品种的混乱甚至引发纠纷。过去因缺乏切实可靠的判别标准, 很难正确处理这类纠纷。本研究从分子水平上找到了判别的标准, 不但能为苗木纠纷提供证据, 而且可作为品种的登记、保护及推广利用的依据。

参考文献:

- 1 沈德绪主编. 果树育种学. 第二版. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 85, 293 ~ 294, 345 ~ 354
- 2 王跃进, Lamikanra Lu, 卢江, 等. 葡萄无核基因的 RAPD 遗传标记. 西北农业大学学报, 1996, 24 (5): 1 ~ 10

Identification of Stenospermocarpy Mutants of Litchi by RAPD Analysis

Liu Chengming^{1,2} and Mei Mantong²

(¹ Department of Horticulture South China Agricultural University, Guangzhou 510642; ² Genetic Engineering Laboratory, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract : For understanding the mechanism of stenospemocarpy mutation in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.), RAPD analysis was conducted in this study. Huaizhi and Sanyuehong, two cultivars grown in South China, and nine spontaneous mutants from them were used as materials. After screening 500 10-mer random primers for polymorphism among these two cultivars and their mutants, only one prime, OPL-12, was able to generate different electrophoresis pattern between Huaizhi and its two seed-abortive mutants, as well as Sanyuehong and its four seed-abortive mutants. The size of amplified fragments specifically for seed-abortive Huaizhi mutants was 1 645 bp, and which for seed-abortive Sanyuehong was 722 bp. The two specific amplified bands had been considered as markers of seed-abortion genes in litchi.

Key words : Litchi ; Seed-abortive mutant ; RAPD

新书推荐

《柑橘学》 何天富 主编

中华农业科教基金资助图书。全书分为 17 章。分别介绍了柑橘的发展史略、柑橘遗传资源、中国柑橘生态区划、柑橘的生物学、柑橘的代谢生理、柑橘的矿物质营养、柑橘育种、柑橘生物技术、柑橘育苗、果园建立、柑橘园的土壤管理、柑橘对不良环境的适应性及防护技术、柑橘病虫害、柑橘的采后处理及贮藏加工等重要内容。可作为高校师生和研究工作者的参考教材和资料, 供从事于柑橘生产者阅读参考。

定价: 207.00 元 (含邮费)



《苹果学》 束怀瑞等 主编

中华农业科教基金资助图书。全书分为 15 章。分别介绍了苹果栽培历史及生产概况、苹果属植物资源、苹果品种、苹果遗传、苹果育种、苹果生态、生理、苹果苗木繁育、苹果病虫害等重要内容。可作为高校师生和研究工作者的参考教材和资料, 供从事于苹果生产者阅读参考。

定价: 176.00 元 (含邮费)

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。

