

李 旭,吴松权,姜明亮,等. 软枣猕猴桃性别相关的 SRAP 分子标记[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):69-71.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.018

# 软枣猕猴桃性别相关的 SRAP 分子标记

李 旭, 吴松权, 姜明亮, 朴一龙

(延边大学农学院,吉林延吉 133000)

**摘要:**以软枣猕猴桃成龄雌株、雄株叶片为试验材料,利用 SRAP 分子标记手段及 SPSS 软件对统计数据进行分析,结果表明,从初筛的 80 对引物中筛选出 15 对可稳定扩增出多态性条带的引物组合,19 个雌、雄植株共得到 77 个条带,多态性条带为 72 个,多态率达到 93.50%;雌株多态性比率为 68.8%,雄株多态性比率为 87.0%;me2-em1、me6-em6、me7-em5、me7-em7 这 4 对引物的扩增结果表现出雌雄株间的多态性比率具有明显差异;供试的 19 个植株经聚类分析分成 2 组,2 组中均有 70% 以上表现出相同的性别。基于性别相关的 SRAP 可以有效分辨出软枣猕猴桃雌株、雄株。

**关键词:**软枣猕猴桃;雌雄异株;性别鉴定;SRAP;分子标记

**中图分类号:** Q943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0069-03

软枣猕猴桃[*Actinidia arguta* (Seib. et Zucc.) Planch. ex Miq.] 是猕猴桃科猕猴桃属中水平和垂直分布最广泛的多年生落叶藤本果树之一<sup>[1]</sup>,我国南北各地、朝鲜、日本、俄罗斯均有分布,以我国东三省资源最为丰富,其中,小兴安岭和长白山山区较为多见,是珍贵的抗寒果树资源。软枣猕猴桃果实富含维生素 C、酚类物质、类胡萝卜素及多种矿质元素,具有一定的药用价值。目前,软枣猕猴桃作为第 3 代猕猴桃,受到世界各国的广泛关注,其产业开发正蓬勃发展。但是,软枣猕猴桃为雌雄异株植物,以雌株产果实,雌株的经济价值明显高于雄株,而软枣猕猴桃实生苗需要 5~7 年才能结果,童期漫长,且实生繁殖后代出现雌雄比约为 1:4 的性别分离<sup>[2]</sup>,不利于生产需要。雌雄异株和幼苗期雌雄无法辨别给软枣猕猴桃种质资源的改良和育种带来巨大困难,因此,软枣猕猴桃的性别鉴定在生产和遗传育种方面有着重要的意义。

分子标记技术具有简单快捷等优点,逐渐成为植物辅助育种的重要手段。DNA 分子标记技术被应用于植物的性别鉴定,提高了植物性别鉴定的准确性和实用性。Michelmores 等提出的群体分离分析法(BSA)是一种有效的定位基因方法<sup>[3]</sup>,并据此得到了一些雌雄异株的植物性别连锁 DNA 标

记;Mulcahy 等在 *Silene latifolia* 中用 60 条随机引物筛选到 4 条与性别连锁的 RAPD 标记<sup>[4]</sup>;Hormaza 等通过 700 条引物的筛选,在 *Pistacia vera* 中找到 1 条单独性别连锁的 RAPD 标记<sup>[5]</sup>。相关序列扩增多态性(SRAP)是 Li 等发展的新型分子标记<sup>[6]</sup>,该标记通过独特的引物设计对可读框(open reading frames, ORFs)进行特异性扩增,具有简便、稳定、产率高、标记分布均匀、多态性强、目的片段便于克隆等特点,已被广泛应用于图谱构建、比较基因组学、基因克隆和亲缘关系等研究<sup>[7-10]</sup>,而在性别决定方面仅应用于少数几种植物中<sup>[11-14]</sup>。利用 SRAP 分子标记技术对软枣猕猴桃性别的相关特异片段研究未见报道。

本研究利用 SRAP 分子标记技术对软枣猕猴桃的雌、雄基因组 DNA 差异进行研究,以期对软枣猕猴桃幼苗期性别鉴定、软枣猕猴桃性别相关基因的克隆提供科学依据。同时,SRAP 体系的建立为利用 SRAP 分子标记技术对软枣猕猴桃进行相关研究提供了一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料于 2014 年 8 月取自延边大学野生浆果资源圃(枫林),选取生长势一致、无病虫害的 6 年生野生软枣猕猴桃雌株、雄株,分别取其成熟叶片,用冰盒保存,迅速带回实验室,液氮速冻。雄株取 10 个样品,记为 X1~X10;雌株取 9 个样品,记为 C1~C9。所用 SRAP 引物(表 1),均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

植物生理学通讯,2009,45(9):890.

[10] 李 彬. NAA 对椴树组织培养繁殖效应的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2000,35(2):210-212,231.

[11] 李洪忠,彭世勇,于 艳,等. 花毛茛叶片组织培养的初步探索[J]. 辽宁农业职业技术学院学报,2004,6(3):4-5.

[12] 巩振辉,申书兴. 植物组织培养[M]. 北京:化学工业出版社,2007.

收稿日期:2015-06-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160068)。

作者简介:李 旭(1989—),男,黑龙江兰西人,硕士研究生,从事果树栽培生理研究。E-mail: ybu09yllixu@163.com。

通信作者:朴一龙,博士,副教授,从事果树栽培和果实采后生理研究。E-mail: piaoly@ybu.edu.cn。

[6] 苏有志,周香梅. 大通地区金莲花栽培技术及开发利用[J]. 北方园艺,2008(2):247-248.

[7] 杨玉芳,王 玄,赵红霞,等. 金莲花组织培养和快繁体系建立的研究[J]. 中国农学通报,2011,27(8):136-139.

[8] 王莲辉,姜运力,余金勇,等. 长瓣兜兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2009,45(9):887.

[9] 杨春梅,赵培飞,汪国鲜,等. 本泌桜的组织培养和快速繁殖[J].

表 1 软枣猕猴桃雌、雄株 SRAP 引物序列

SRAP 引物	引物序列	SRAP 引物	引物序列
me1 - em1	5' - TGAGTCCAAACCGGATAG - 3'	me7 - em5	5' - TGAGTCCAAACCGGTAA - 3'
	5' - GACTGCGTACGAATTAAT - 3'		5' - GACTGCGTACGAATTAAC - 3'
me1 - em4	5' - TGAGTCCAAACCGGATAG - 3'	me7 - em6	5' - TGAGTCCAAACCGGTAA - 3'
	5' - GACTGCGTACGAATTTGA - 3'		5' - GACTGCGTACGAATTGCA - 3'
me2 - em1	5' - TGAGTCCAAACCGGAGC - 3'	me7 - em7	5' - TGAGTCCAAACCGGTAA - 3'
	5' - GACTGCGTACGAATTAAT - 3'		5' - GACTGCGTACGAATTATG - 3'
me3 - em1	5' - TGAGTCCAAACCGGATG - 3'	me9 - em7	5' - TGAGTCCAAACCGGATG - 3'
	5' - GACTGCGTACGAATTAAT - 3'		5' - GACTGCGTACGAATTATG - 3'
me3 - em8	5' - TGAGTCCAAACCGGATG - 3'	me10 - em3	5' - TGAGTCCAAACCGGATG - 3'
	5' - GACTGCGTACGAATTAGC - 3'		5' - GACTGCGTACGAATTGAC - 3'
me4 - em8	5' - TGAGTCCAAACCGGACC - 3'	me10 - em4	5' - TGAGTCCAAACCGGATG - 3'
	5' - GACTGCGTACGAATTAGC - 3'		5' - GACTGCGTACGAATTTGA - 3'
me6 - em3	5' - TGAGTCCAAACCGGGCT - 3'	me10 - em9	5' - TGAGTCCAAACCGGATG - 3'
	5' - GACTGCGTACGAATTGAC - 3'		5' - GACTGCGTACGAATTGAC - 3'
me6 - em6	5' - TGAGTCCAAACCGGGCT - 3'		
	5' - GACTGCGTACGAATTGCA - 3'		

1.2 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取软枣猕猴桃各株基因组 DNA, 用紫外分光光度计分别测定 DNA 在波长为 260、280 nm 处的 D 值, 检测其纯度及浓度; 用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的大小和完整性; 稀释成浓度为 50 ng/μL 的工作液, 分装, 超低温冰箱保存, 备用。

1.2 软枣猕猴桃的 SRAP 扩增

SRAP 扩增条件在参照邓传良等反应体系<sup>[14]</sup>的基础上进行优化, 确定软枣猕猴桃的 SRAP - PCR 反应体系 (20 μL) 为: 400 ng 基因组 DNA, 2 μmol/L 的正向、反向引物 1.0 μL, 10 × buffer 2.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP Mixture 0.4 μL, 1.25 U/μL Taq 酶 0.3 μL。PCR 扩增反应程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 37 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 90 s, 15 个循环; 94 ℃ 变性 1 min, 52 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min, 4 ℃ 保存。将上下游引物进行自由组合, 从 80 对引物组合的扩增图谱中筛选出带型清晰、雌雄基因组具有明显差异、重复性好且多态性高的引物组合。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果, 用 500 万像素数码相机拍照。

1.3 数据处理及分析

将清晰可辨的 DNA 条带进行统计, 弱带中稳定的条带予以保留, 不稳定的条带忽略不计, 计算雌、雄性别特异的条带数, 样品间同一迁移位置上的电泳条带记为 1, 无则记为 0。利用 SPSS 19.0 软件进行欧氏距离平方法聚类分析, 按照 Ward' method 离差平方建立聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 软枣猕猴桃基因组的 SRAP 扩增

以构建的软枣猕猴桃雌、雄基因组 DNA 为模板, 从初筛的 80 对引物中筛选出 15 对可以稳定扩增出多态性条带的引物组合。由图 1、表 2 可见, 多态性位点的分子量主要分布在 300 ~ 1 000 bp 之间, 19 个雌、雄植株共得到 77 个条带, 多态性条带为 72 个, 多态率达到 93.50%; 每对引物平均扩增出 5.13 个条带, 多态性条带数为 4.80 个; 雌株多态性比率为 68.8%, 雄株多态性比率为 87.0%; me2 - em1、me6 - em6、me7 - em5、me7 - em7 这 4 对引物的扩增结果表

现出雌雄株间的多态性比率差异明显; 没有出现与性别相关的特异条带, 但软枣猕猴桃雌、雄株基因组具有较为明显的差异性。



M—DNA marker, 分子量从上到下依次为 2 000、1 000、750、500、200、100 bp

图 1 软枣猕猴桃 SRAP 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

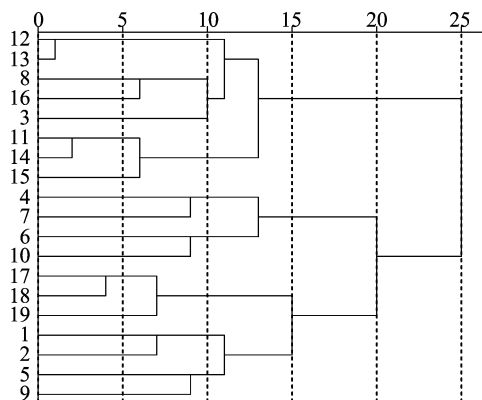
表 2 软枣猕猴桃雌株、雄株 SRAP 扩增条带数统计

引物名称	雌株多态带数	雄株多态带数	总的条带数	雌株多态性比率 (%)	雄株多态性比率 (%)
me1 - em1	3	4	5	60.0	80.0
me1 - em4	2	4	5	40.0	80.0
me2 - em1	3	5	5	60.0	100.0
me3 - em1	3	5	6	50.0	83.3
me3 - em8	5	6	7	71.4	85.7
me4 - em8	5	6	7	71.4	85.7
me6 - em3	5	4	5	100.0	80.0
me6 - em6	3	5	5	60.0	100.0
me7 - em5	1	3	3	33.3	100.0
me7 - em6	3	2	4	75.0	50.0
me7 - em7	2	5	5	40.0	100.0
me9 - em7	4	5	5	80.0	100.0
me10 - em3	4	4	5	80.0	80.0
me10 - em4	7	6	7	100.0	85.7
me10 - em9	3	3	3	100.0	100.0
总计	53	67	77	68.8	87.0

2.2 软枣猕猴桃雌株、雄株聚类分析

由图 2 可见, 供试的 19 个植株共分成 2 大组, 组 I 包括 8 个植株, 其中含有 2 个雄株, 编号为 3、8, 雌株占比为 71.43%, 组 II 包括 11 个植株, 其中含有 3 个雌株, 编号为 17 ~ 19, 雄株占比为 72.73%, 2 组中均有 70% 以上表现出相同的性别。猕猴桃为功能性雌雄异株植物, 自 20 世纪 70 年代发现能结果的雄株以来, 经研究发现, 猕猴桃在性别表达上

几乎呈现连续变异,至少有 6 种不同的性别表现型<sup>[1]</sup>,软枣猕猴桃性别变异可能是造成约 30% 分辨不清的原因。基于性别相关的 SRAP 可以有效分辨软枣猕猴桃的雌株、雄株。



编号 1~2、4~7、17~19 为雌株; 编号 3、8~16 为雄株

图2 软枣猕猴桃雌雄株聚类树状图

### 3 结论与讨论

SRAP 分子标记技术是对开放阅读框进行的特异扩增,利用该技术对基因组扩增所获取的特异片段直接代表了基因的表达状况,有利于对基因的表达及功能研究<sup>[15-18]</sup>。吴文珊等将 SRAP 分子标记应用于薜荔 (*Ficus pumila* Linn.) 早期性别鉴定,得到 1 条雌性多态性片段<sup>[19]</sup>。郑翠芳等利用 SRAP 分子标记技术建立了爱玉子 (*Ficus awkeotsang* Makino.) 性别相关的 DNA 指纹数据库,并获得爱玉子的 2 个雄性特异片段<sup>[11]</sup>。Zhou 等利用 SRAP 分子标记技术获得野牛草 (*Buchloe dactyloides*) 的 1 个雌性特异片段<sup>[13]</sup>。邓传良等利用 SRAP 分子标记技术获得菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 和葎草 [*Humulus scandens* (Lour.) Merr.] 性别相关的特异条带<sup>[12,14]</sup>。

本研究从 80 对 SRAP 引物中筛选出 15 对多态性较强的引物,利用琼脂糖凝胶电泳分离条带,从 19 个供试材料中共得到 77 个条带,多态性条带为 72 个,多态率达到 93.50%;每对引物平均扩增出的条带数为 5.13 个,多态性条带数为 4.80 个;雌株多态性比率为 68.80%,雄株多态性比率为 87.00%;me2-em1、me6-em6、me7-em5、me7-em7 这 4 对引物的扩增结果表现出雌株、雄株间的多态性比率差异明显。软枣猕猴桃性染色体的发育机制与菠菜类似<sup>[20]</sup>,但并没有出现如菠菜那样的特异条带<sup>[14]</sup>,这说明软枣猕猴桃雌株、雄株的基因组具有较为明显的差异性。软枣猕猴桃雌株、雄株聚类分析将供试的 19 个植株分成 2 大组,组 I 雌株占比为 71.43%,组 II 雄株占比为 72.73%,2 组中均有 70% 以上表现出相同的性别。目前,在葡萄上已经证实,性别决定基因可能与易受环境影响的一些基因发生互作<sup>[21]</sup>。因此,本研究软枣猕猴桃存在 30% 性别分辨不清的原因很可能是由软枣猕猴桃性别变异造成的,基于性别相关的 SRAP 可以有效分辨软枣猕猴桃雌株、雄株,虽不能达到 100% 的分辨,但这完全可以符合现阶段软枣猕猴桃性别鉴定工作的需要。

### 参考文献:

[1] 黄宏文. 猕猴桃属分类、资源、驯化、栽培[M]. 北京:科学出版

社,2013.

- [2] Khukhunaishvili R G, Dzhokhadze D I. Electrophoretic study of the proteins from *Actinidia* leaves and sex identification[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2006, 42(1): 117-120.
- [3] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [4] Mulcahy D L, Weeden N F, Kesseli R, et al. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm[J]. Sexual Plant Reproduction, 1992, 5(1): 86-88.
- [5] Hormaza J I, Dollo L, Polito V S. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89(1): 9-13.
- [6] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(2/3): 455-461.
- [7] 陈晖, 陈美霞, 陶爱芬, 等. 长果种黄麻 SRAP 标记遗传连锁图谱的构建及 3 个质量性状基因定位[J]. 中国农业科学, 2011, 44(12): 2422-2430.
- [8] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(1): 168-180.
- [9] 刘雅辉. 23 个小麦抗叶锈病近等基因系的 SRAP 多态性分析及 Lr19 的 SRAP 标记[D]. 保定:河北农业大学, 2007.
- [10] 李梅, 侯喜林, 郝日明. 基于 SRAP 分子标记的桂花品种亲缘关系研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(11): 1667-1675.
- [11] 郑翠芳, 朱晓东, 方丽娜, 等. 爱玉子性别与品系的 SRAP 分析[J]. 热带作物学报, 2009, 30(12): 1740-1745.
- [12] 邓传良, 任映雪, 张卫丽, 等. 葎草性别相关 SRAP 分子标记的鉴定[J]. 植物研究, 2014, 34(6): 798-802.
- [13] Zhou Y J, Wang X G, Zhang X Q. Development and application of a SRAP marker for the identification of sex in *Buchloe dactyloides*[J]. Euphytica, 2011, 181(2): 261-266.
- [14] 邓传良, 曹莹, 任映雪, 等. 菠菜性别相关 SRAP 分子标记的筛选及分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 516-521.
- [15] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1118-1126.
- [16] 刘雅辉, 王秀萍, 鲁雪林, 等. 棉花耐盐相关序列扩增多态性 (SRAP) 分子标记筛选[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 484-488.
- [17] 刘雅辉, 王秀萍, 鲁雪林, 等. 26 份棉花耐盐相关种质资源遗传多样性 SRAP 分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(1): 219-221.
- [18] 荆赞荣, 裴徐梨, 唐征, 等. 青花菜早中熟种质资源遗传多样性 SRAP 标记分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 41-43.
- [19] 吴文珊, 朱晓东, 陈友铃. 与薜荔性别相关的 SRAP 分子标记[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(5): 688-691.
- [20] Janick J. Inheritance of sex in tetraploid spinach[J]. Am Soc Hort Sci, 1955, 66: 361-363.
- [21] Moore J N. Cytokinin-induced sex conversion in male clones of *Vitis* species[J]. Am Soc Sci, 1970, 95: 387-393.