

猕猴桃性别鉴定研究进展

康宗利¹, 王 宁¹, 杨玉红¹, 张春红², 刘长江²

(1. 沈阳农业大学 生物科学与技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:从形态、生理生化、同工酶、DNA 分子标记等多方面综述了国内外在猕猴桃性别鉴定的研究进展。形态学、同工酶的猕猴桃性别鉴定方法相对简便但限制因素多, 导致结果有时不理想; DNA 分子标记较其它方法具有很多优点, 其发展和应用给猕猴桃性别研究提供了一条有效的途径。现就同工酶、DNA 分子标记在猕猴桃性别鉴定方面的应用进行了详细阐述, 同时指出了它们在猕猴桃性别研究中存在的不足。

关键词:猕猴桃; 性别鉴定; 同工酶; DNA 分子标记

中图分类号:S 663.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)20-0184-04

猕猴桃属 (*Actinidia* Lindl.) 属猕猴桃科 (Actinidiaceae), 其种类繁多, 现发现 66 种和 118 个变种及变型, 中国有 62 种, 并且是此属植物的主要优势资源国和原产地, 野生种群资源丰富^[1]。猕猴桃具有极高的营养价值和药用价值, 被称为“水果之王”, 其维生素 C 含量很高, 目前市场需求量正日益增大。根据联合国粮农组织统计, 截至 2005 年世界猕猴桃总产量为 125 万 t, 中国所占份额约 18%, 并不断攀升^[2]。猕猴桃科 (Actinidiaceae) 为显花雌雄异株植物, 雌株的花从结构上看虽然是具有雌雄两性器官的完全花, 但雄蕊败育不产生有活力的花粉; 而雄株的花则是雌蕊败育不形成胚珠^[3]。

猕猴桃早期性别鉴定的研究在实践中有重要的意义: 首先经济植物中雌雄异株现象十分普遍, 不同性别的植株往往具有不同的经济价值。猕猴桃以产果实为主, 雌株经济价值明显要高于雄株, 在栽培中合理选择雌雄个体有助于提高经济效益; 其次猕猴桃从种子播种到开花, 再到多产的成熟期需要 3~5 a, 童期漫长, 雌雄异株和幼苗期雌雄无法辨别, 给猕猴桃的改良和育种带来巨大的困难。因此猕猴桃性别鉴定的研究在生产和遗传育种方面都有重要的意义。如果在树苗成熟以前就判定其性别, 早期排除不需要的雄性植株, 就可以减少生产上的消耗, 在栽培中有效地控制雌雄比例, 就可以提高结果率和种质育种计划的效率, 节省大量的时间、人力和财力。但自 20 世纪 70 年代发现能结果的雄株以来^[4], 科学家们经过研究发现, 猕猴桃在性别表达上几乎呈现连续的变异, 至少有 6 种不同的性

别表现型: 完全两性植株、雌株、不完全雌株、可结果雄株、雄株和中性株^[5], 这就大大增加了雌雄鉴别的难度。但雌雄个体总会在生理生化、蛋白质与核酸等方面体现出不同程度的差异, 随着分子生物学的发展, 目前以雌雄株外部形态、生理代谢产物、所含化学物质、同工酶、特异蛋白质、氨基酸含量及核苷酸的差异为依据, 出现越来越多的植物性别鉴定方法, 这些方法在植物的性别鉴定研究中发挥了一定的作用^[6]。现着重从形态、生理生化、同工酶、DNA 分子标记方面介绍猕猴桃性别鉴定的研究进展。

1 猕猴桃性别的形态鉴定方法

植株雌雄形态差异包括植物体外部差异、内部细胞和组织器官差异, 它们主要受到二方面因素的影响, 一方面是植物基因本身差异因素, 另一方面取决于环境因素。所以形态差异在一定程度上能够反映植株不同性别基因水平的差异, 因此可以为部分种类猕猴桃的性别鉴定提供依据。例如, 王立军等针对软枣猕猴桃、狗枣猕猴桃生殖器官结构的形态学解剖研究, 得出虽然雌花与雄花在形态上非常相似, 但是雌花中的雄蕊退化, 而雄花中雌蕊退化^[7-8]; 赵淑兰等针对软枣猕猴桃花器官的形态分化进程的研究中观察到, 雄蕊原基分化期切片镜检可明显看出花萼原基两侧有短小的两轮突起, 而雌蕊原基分化期看到其内侧分化出许多小突起^[9]; 王学东等对狗枣猕猴桃花芽分化观察时也发现了雌雄蕊原基开始分化后二者的形态差异^[10]。形态差异鉴定雌雄异株植物方法有一定的优点: 简单、易学、可操作性强。但是, 大多数雌雄异株的植物在发育成熟之前, 雌雄植株形态差异不明显, 即使在成熟的猕猴桃雌雄植株上鉴别也会受到环境及发育阶段的影响, 此鉴定方法可以作为猕猴桃性别鉴定体系的一部分使用。

2 猕猴桃性别的生理生化鉴定方法

雌雄植株间生理生化的差异是指植株在生理指

第一作者简介: 康宗利(1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物生理与分子生物学。

基金项目: 农业部公益性行业科研专项资助项目(200903013)。

收稿日期: 2011-06-29

标、新陈代谢、生化特性、特异蛋白质等方面所体现出的差异,以此为依据的鉴定方法大多是对雌雄株个体间生理生化指标和活性进行比较,得到雌雄株的鉴别信息。

众所周知,同种生物不同性别一定会产生不同的蛋白质或者蛋白质质量存在差异。在猕猴桃性别特异蛋白研究方面,有报道显示同种猕猴桃不同性别中特异蛋白质存在差异,例如 Khukhunaishvili 等使用 SDS-PAGE 分析中华猕猴桃和狗枣猕猴桃叶的蛋白组成,发现了猕猴桃性别相关的特定蛋白^[11];石进校等对美味猕猴桃“米良 1 号”及配套雄株“帮增 1 号”不同发育时期、不同器官的过氧化物酶活性的检测表明,相对应的生长时期和相同的器官雌株过氧化物酶活性大于雄株过氧化物酶活性^[12]。这些性别特异蛋白质方面研究的成果都为猕猴桃性别鉴定提供了有力的依据。

3 同工酶在猕猴桃性别鉴定中的应用

同工酶标记是 20 世纪 60 年代出现的分子标记,其本质是具有同一底物专一性的不同分子形式,同工酶有组织、发育及物种的特异性,反映了编码这些酶的等位基因间的差异,由于同工酶是分子水平的指标,是基因差异在表达水平的体现,在一定程度上可以反映出雌雄株间的本质差异,是植物性别鉴定的有效途径之一,在猕猴桃性别鉴定中起了重要作用。例如, Hirsch 等较早发现中华猕猴桃花芽过氧化物酶同工酶谱带的雄性特有带^[13];晁无疾等在猕猴桃叶片中过氧化物酶同工酶酶谱上观察到了雄性植株特有的“性酶带”^[14];王姝清等对猕猴桃雌雄植株叶片中过氧化物酶同工酶的电泳分析测定表明,雌雄植株间同工酶酶谱存在明显差异^[15];但是,李存珍等运用同工酶分析法对中华猕猴桃性别进行早期鉴定,可惜未达到目的,结果无规律可循^[16];丁士林等用美味猕猴桃幼叶为材料未发现其过氧化物同工酶谱带的差异,也未发现性别酶带^[17];陈晓玲等采用聚丙烯酰胺梯度垂直平板电泳技术,分析了猕猴桃 6 个品种雌雄株的过氧化物酶及酯酶同工酶,结果表明,同一个品种的雌雄株之间的过氧化物酶及酯酶同工酶有一定的差异,但雌雄株之间的酶谱分析没有发现特征带^[18]。从以上试验例子可以发现运用同工酶方法鉴别猕猴桃植株性别有时成功,有时结果不明显,简单分析可能与猕猴桃的品种、植株生长发育时期和同工酶组织特异性等因素有关。与以形态差异进行性别鉴定的方法相比,同工酶水平的差异在猕猴桃性别鉴定结果的可信性上有明显提高,但其方法集中应用在雌雄株成熟个体上,缺乏对不同发育阶段和植株所处环境影响的研究,从而说明单独运用此法鉴别猕猴桃植株性别尤其是猕猴桃性别早期鉴定结果的可靠性上需进一步完善。

4 DNA 分子标记在猕猴桃性别鉴定中的应用

运用形态差异和生理生化差异的方法不能十分可靠地辨别猕猴桃性别,这就需要有其它的试验思路和

手段,随着生物学科和相关试验仪器的发展,核酸差异自然走进研究者的视线里并成为猕猴桃性别鉴定又一突破点,而体现核酸差异的方法就是 DNA 分子标记技术。DNA 分子标记(DNA molecular markers)是指可遗传并可检测的 DNA 序列,以个体间遗传物质核苷酸序列变异为基础,是 DNA 水平遗传变异的直接反应^[19],其广泛应用于雌雄异株植物的性别鉴定和植物遗传多样性研究中。目前常用于猕猴桃性别鉴定研究的 DNA 分子标记有 RAPD、SCAR、AFLP,这些方法建立在 PCR 的基础上,结合群体分离分析方法(Bulked Segregant Analysis,BSA),对雌雄异株植物进行早期性别鉴定。BAS 是由 Michelmore 等提出的定位基因的方法^[20],其原理是将分离群体根据目标性状分为 2 组,构建 2 个在目标基因区段存在差异的基因混合池,提取基因池中 DNA 作为模板进行 RAPD 分析,池间具多态性差异的标记必定与目的基因连锁。

DNA 分子标记与其它方法相比有很多优点:一是不受组织特异性及环境的影响,也就是说它以 DNA 形式出现在植物体的各个组织和各发育时期,不受季节、环境的限制,同时多态性高,利用大量引物、探针可完成覆盖基因组的分析;二是对采样的要求不高;三是在理论上,适用于各种性别决定机制形成的雌雄异株植物;四是可以从海量信息中筛选所需信息,而不是只根据几个信息位点进行判断,数量遍及整个基因组;五是测定结果容易标准化;六是鉴定结果准确性高,许多标记为共显性,能够鉴别出纯合的基因型与杂合的基因型,提供完整的遗传信息^[21-22]。鉴于以上优点,DNA 分子标记技术被应用于猕猴桃性别鉴定中,可以为猕猴桃性别鉴定提供更可靠准确的信息。

4.1 RAPD 标记

随机扩增的多态性 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA)简称 RAPD,是在 1990 年由 Williams 和 Welsh 以 DNA 聚合酶链式反应为基础提出的,该技术是应用 8~10 bp 任意寡聚脱氧核苷酸单链的片段为引物或称随机引物,在未知序列的基因组 DNA 上进行随机的 PCR 扩增所获得长度不同的 DNA 片段,然后用凝胶电泳分离扩增片段,经溴化乙锭染色,显示扩增片段^[23]。RAPD 标记可以分析雌雄株间差异序列,并提供丰富的多态位点,广泛应用于雌雄异株植物的性别鉴定中。例如,Harvey 等对人工育种的猕猴桃杂交后代应用 RAPD 标记的方法进行性别标记物的筛选,结合 BSA 的方法,Harvey 等^[24]从 500 个随机引物中筛选出 2 个特异性标记物:雄性特有的 800 bp 和雌性特有的 850 bp 的扩增条带。RAPD 标记存在少许不足:早期性别鉴定时不可避免也要经历繁琐的引物筛选过程、对试验条件较敏感、试验结果的重复性低,但尽管如此 RAPD 分子标记技术在快速进行猕猴桃性别早期鉴定上发挥着重要作用。

4.2 SCAR 标记

特征序列扩增区域(Sequence Characterized

Amplified Regions)简称 SCAR,是从 RAPD 技术发展而来的,通过对目标的 RAPD 片段的克隆与末端测序序列分析后设计出 1 对互补到原来 RAPD 两端碱基的引物,用这对引物与原来的模板 DNA 进行 PCR 扩增时,特征序列扩增区域被特异性扩增。由于 SCAR 标记方便、快捷、可靠,结果稳定重现性高,对反应条件不敏感,可以提供较 RAPD 更多的信息位点。因此,将 RAPD 转化成 SCAR 标记进行植物早期的性别鉴定可以获得更加稳定可靠的鉴定结果。例如, Gill G P 等^[25]在 Harvey 等^[24]研究的基础上,用 500 个随机引物在同代雌雄的 2 个 DNA 池中筛选出了 SmX 和 SmY 2 个 RAPD 标记,它们为中华猕猴桃性别连锁的 RAPD 标记。随后在形成 RAPD 标记物的引物后添加 12~13 个寡核苷酸,合成了 SCAR 引物;SmXf,SmXr,SmYf,SmYr,其中 SmY 可用于猕猴桃个体的早期性别鉴定。与 RAPD 标记相比,SCAR 标记鉴定结果的稳定性得到了显著提高,但 SCAR 标记需对 RAPD 标记进行克隆测序,较 RAPD 标记操作更复杂、花费更高。

4.3 AFLP 标记

扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism)简称 AFLP,该技术是由荷兰 Keygene 公司 Zabeau 等 1992 年发展的新检测方法,将基因组 DNA 用可产生黏性末端的限制性内切酶消化产生大小不同的酶切片段后,在限制性片段两端连接上人工接头作为扩增的模板,扩增后检测其多态性的一种 DNA 分子标记^[26],其具多态性丰富,DNA 用量少、检测效率高、可靠性好、重复性高等优点,是一种十分理想的分子标记,近年来在猕猴桃性别基因研究中得到越来越多的应用。例如,柯辉鹏等^[27]以猕猴桃(*Actinidia* spp.)幼叶为材料提取基因组 DNA,用选取的 4 对引物进行 6 对雌、雄 DNA 样品的扩增片段长度多态性(AFLP)扩增结果表明,同一品种雌雄样品之间的 AFLP 电泳图谱表现出一定的差异,同时 AFLP 多态性初步检测出猕猴桃不同性别在 DNA 水平上的差异;张潞生等^[28]制备了 AFLP 鉴别猕猴桃性别可用的 DNA 模板。AFLP 技术进行性别鉴定研究,可以得到与 SCAR 标记相当的准确性,同样,AFLP 标记步骤繁杂、工作量庞大,资金需求高。

5 小结

猕猴桃性别研究具有重要的生物学意义和经济价值。形态鉴定方法有助于了解猕猴桃性别分化时期雌雄花器官形成时解剖形态学差异,生理生化、同工酶鉴定方法有助于了解猕猴桃雌雄株生长时期生理生化指标的差异及变化规律,这 2 种方法都为猕猴桃性别鉴定研究及其进展提供了事实依据。然而,猕猴桃性别分化本质上是遗传物质核酸之间差异所引起的,所以在猕猴桃 DNA 分子水平上研究就成为其早期性别鉴定的重要一环,DNA 分子标记技术正是性别早期鉴定

主要的手段,此手段较其它方法提高了鉴定结果的准确性和可靠性。目前,与猕猴桃性别相关的 DNA 分子标记研究有一定进展,可是 DNA 分子标记技术存在操作繁琐、费用高等不足,这制约了相关研究工作的开展。尽管 DNA 分子标记技术有些不足之处,但应用它对猕猴桃进行早期性别鉴定显示了光明的前景,为持续利用猕猴桃属植物资源提供了科学依据。随着生物科学技术手段的提高和科研人员的辛勤努力,猕猴桃早期性别鉴定难题在实际生产应用领域会取得突破性进展。

参考文献

- [1] 黄宏文,龚俊杰,王圣梅,等. 猕猴桃属(*Actinidia*)植物的遗传多样性[J]. 生物多样性,2000,8(1):11-12.
- [2] 徐小彪,辜青青,李卫华. 世界猕猴桃产销进展[J]. 现代园艺,2007(4):23-24.
- [3] 陈万秋,李思光,罗玉萍. 分子标记技术在猕猴桃属植物中的研究进展[J]. 江西科学,2001,19(3):162-165.
- [4] Ferguson A R. Kiwifruit; a botanical review [J]. Hort Rev,1984,22:61-64.
- [5] Mcneilage M A. Progress in breeding hermaphrodite kiwifruit cultivars and understanding the genetics of sex determination [J]. Acta Hort,1997,444:73-78.
- [6] 尹立辉,詹亚光,李彩华,等. 植物雌雄株性别鉴定研究方法的评价[J]. 植物研究,2003,23(1):123-128.
- [7] 王立军. 软枣猕猴桃的解剖学研究[J]. 吉林农业大学学报,1990,12(4):34-38.
- [8] 王立军,张友民,贾伟平,等. 狗枣猕猴桃的解剖学研究[J]. 吉林农业大学学报,1994,16(9):55-58.
- [9] 赵淑兰,王玉兰,孙宪忠,等. 软枣猕猴桃花芽形态分化时期观察[J]. 中国果树,1996(2):25-26.
- [10] 王学东,苍晶,吴秀菊. 狗枣猕猴桃花芽分化的观察[J]. 东北农业大学学报,2001,32(3):285-289.
- [11] Khukhunaishvili R G, Dzokhadze D I. Electrophoretic study of the proteins from actinidia leaves and sex identification [J]. Applied Biochemistry and Microbiology,2006,42(1):107-110.
- [12] 石进校,刘应迪,李菁,等. 美味猕猴桃米良 1 号的过氧化物酶活性[J]. 吉首大学学报,2001,22(2):36-37.
- [13] Hirsch A M, Bligny D, Tripathi B K. Biochemical properties of tissue cultures from different organs of *Actinidia chinensis* [J]. Acta Hort,1977,78:75-82.
- [14] 晁无疾. 猕猴桃雌雄株间同工酶差异研究[J]. 中国果树,1987(2):42-45.
- [15] 王妹清,赵英琪,刘建朝,等. 猕猴桃雌雄植株过氧化物酶同工酶的研究[J]. 经济林研究,1989,7(2):30-33.
- [16] 李存珍,华鸿莺,徐敏珍. 同工酶鉴定中华猕猴桃性别的负结果报告[J]. 植物生理学通讯,1986(2):12-13.
- [17] 丁士林,朱秀珍,洪泽. 猕猴桃过氧化物同工酶研究[J]. 安徽农业大学学报,1997,24(4):395-397.
- [18] 陈晓玲,梁红,朱东华. 猕猴桃不同性别过氧化物酶及酯酶同工酶分析[J]. 农业与技术,2004,24(1):40-43.
- [19] 刘明,王继华,王同昌. DNA 分子标记技术[J]. 东北林业大学学报,2003,31(6):65-67.
- [20] Michelmores R W, Paran I, Kesseli R V, et al. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregating populations [J]. Proc Nat Acad Sci, USA,1991,88:9828-9832.
- [21] 董莉娜,苏雪,孙坤,等. DNA 分子标记在雌雄异株植物性别鉴定中的应用[J]. 广西植物,2006,26(1):63-68.
- [22] 曹越. 植物遗传研究与分子标记技术[J]. 青海农业科技,2004

(2):21-24.

[23] 张献龙,唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京:科学出版社,2004:411-412.

[24] Harvey C F, Gill G F, Fraser L G, et al. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*[J]. Sex Plant Report, 1997, 10: 149-154.

[25] Gill G P, Harvey C F, Gardner R C, et al. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*[J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 439-445.

[26] 肖尊安. 植物生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:235-236.

[27] 柯辉鹏,李小丹,周玲艳,等. 不同猕猴桃品种雌雄植株的 AFLP 分析[J]. 仲恺农业技术学院学报,2007,20(3):7-12.

[28] 张路生,李传友,贾建航,等. 猕猴桃雌雄性别的 AFLP 鉴别中 DNA 模板的制备[J]. 果树科学,1999,16(3):171-175.

Research Progress on the Sex Identification of *Actinidia*

KANG Zong-li¹, WANG Ning¹, YANG Yu-hong¹, ZHANG Chun-hong², LIU Chang-jiang²

(1. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Studies on sex identification of *Actinidia* of domestic and foreign were summarized and classified into many approaches about morphological and physiological methods; isoenzyme methods; DNA molecular markers methods. Morphological and isoenzyme methods were comparatively handier, but more limiting factors sometimes lead to unsatisfactory results of *Actinidia* gender research. DNA molecular markers have many advantages compared with the others methods, so the development and application of DNA molecular markers were efficient techniques in *Actinidia* gender research. This paper summarized the progress in research of *Actinidia* gender identification using isoenzyme and DNA molecular markers methods. And the current shortcomings of the ways were also discussed.

Key words: *Actinidia*; sex identification; isoenzyme; DNA molecular markers

立足黑龙江 辐射全中国 聚焦大农业 促进快发展

2012 年《黑龙江农业科学》征订启事

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊。是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊。现已被中国科学引文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库等多家权威数据库收录。

本刊内容丰富,栏目新颖,信息全面,可读性强。月刊,每月 10 日出版,国内外公开发行。国内邮发代号 14-61,每期定价 5.00 元,全年 60.00 元;国外发行代号 M8321,每期定价 8.00 美元,全年 96.00 美元。

热忱欢迎广大农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广人员、管理干部和广大农民群众踊跃订阅。全国各地邮局均可订阅,漏订者可汇款至本刊编辑部补订。汇款写明订购份数、收件人姓名、详细邮寄地址及邮编。

2010 年合订本已出版,还有少量 2007~2009 年合订本珍藏版。2007 年合订本每册定价 80.00 元,2008~2009 年合订本每册定价 90.00 元,2010 年合订本 150.00 元,邮费各 10.00 元,售完为止。

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号 《黑龙江农业科学》编辑部 邮编:150086

电话:0451-86668373 信箱:nykx13579@sina.com 网址:www.haasep.cn