

金秋梨和新高梨的分子遗传学对比分析

吕金海¹, 伍贤进¹, 周书伟²

(1. 怀化学院 生物工程系, 湖南 怀化 418008; 2. 湖南农业大学 生命科学学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 金秋梨和新高梨的形态性状、生物学性状以及酯酶同工酶、过氧化物酶同工酶、细胞色素氧化酶同工酶酶谱均产生了变化。利用异源 DNA 探针—小麦 rDNA 克隆 pTA71, 与四种核酸内切酶 Pst I、BamH I、EcoR I 及 Bgl II 酶切消化的金秋梨和新高梨叶片总 DNA 杂交, 结果表明, pTA71-Pst I 和 pTA71-BamH I 二种探针—酶组合可在金秋梨和新高梨中检测到 RFLP 差异。

关键词: RFLP; 同工酶; 金秋梨; 新高梨

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)03-0297-03

Molecular genetic comparison analysis of Jinqiu Pear and Xingao Pear

LV Jin-hai¹, WU Xian-jin¹, ZHOU Shu-wei²

(1. Department of Bioengineering, Huaihua University, Huaihua 418008, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The results of esterase, peroxidase and cytochrome oxidase isozyme showed that there were distinct differences between Jinqiu Pear and Xingao Pear in morphological and biological traits. The total genomic DNA digested with four restriction enzymes (Pst I, BamH I, EcoR I and Bgl II) was hybridized with a heterologous probe-pTA71 clone of wheat rDNA. Results showed that pTA71-Pst I, pTA71-BamH I revealed some RFLP differences between Jinqiu Pear and Xingao Pear.

Key words: RFLP; isozyme; Jinqiu Pear; Xingao Pear

金秋梨是日本梨新高(天の川×今村秋)的芽变株系, 属砂梨系统, 果实的经济性状优良。该品种曾获“全国星火科技精品金奖”(1994, 成都)和“星火科技实施 10 周年暨八五农业科技攻关成果博览会优秀项目金奖”(1996, 北京)。现已推广至湘、黔、川、桂等 8 省(区)。为这些地区的农业结构调整和农业产业化作出了较大贡献(黄渊基, 1996; 吕金海等 2002)。同工酶作为一种有效手段可以从分子水平鉴别许多从外部形态上难以区别的遗传变异, 试图通过酶谱分析, 研究金秋梨和新高梨的酯酶同工酶、过氧化物酶同工酶、细胞色素氧化酶同工酶的差异。RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, DNA 限制性酶切片段长度多态性)是一种比

同工酶更为基本的、在 DNA 水平上的多型性现象。近年来, RFLP 作为遗传标记, 已广泛应用于生物各研究领域(Beckmann 等, 1986), 不少果树上也开展了 RFLP 的研究(萧顺元等, 1995; Crowhurst 等, 1990; Furnier 等, 1990; Balfourier, 等, 2000; 李林林等, 2002; 李健仔等, 2003; 黄宏文等, 2000)。本文试图从 RFLP 分析入手, 研究金秋梨和新高梨之间的分子差异, 为分析金秋梨和新高梨突变的分子机制提供基础资料。

1 材料和方法

金秋梨和新高梨均采自湖南省怀化职业技术学

收稿日期: 2005-01-10 修回日期: 2005-08-20

基金项目: 湖南省教育厅资助项目(03C308)[Supported by Educational Committee of Hunan(03C308)]

作者简介: 吕金海(1968-), 男, 湖南永顺人, 副教授, 主要从事植物生理学与分子生物学教学与研究工作。

院教学园艺场。酯酶同工酶的分析:按徐玲玲等(2002)的方法进行。过氧化物酶同工酶分析:按张和禹等(2002)的方法进行。细胞色素氧化酶的同工酶分析:按邵耀椿等(2003)的方法进行。叶片总DNA的提取:采用改良的SDS法提取DNA(萧顺元等,1995):取2g叶片,在液氮下磨碎转入50mL离心管中,加15mL DNA提取缓冲液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH8.0; 50 mmol L⁻¹ EDTA, pH8.0; 500 mol L⁻¹ NaCl; 0.5% β-巯基乙醇),搅匀,加入2mL 10% SDS,摇匀后在65℃水浴中保温15min,加入5mL 3 mol·L⁻¹ KAc,摇匀,置于冰浴中20min,在12 000 r·min⁻¹下离心20min,上清液加入15mL 预冷(-20℃)的异丙醇,缓慢摇匀后,在-20℃下静置在6 500 r·min⁻¹下离心10min,去上清液,加750 μL Tris-EDTA 缓冲液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH8.0; 10 mmol·L⁻¹ EDTA, pH8.0)溶解DNA粗提物。用苯酚-氯仿纯化DNA。RNase处理后,将DNA贮于-20℃下备用。

分子杂交(Sambrook等,1989):以4种内切酶(PstI、BamHI、EcoRI、BglII, Promega公司产)酶切消化总DNA(5μg DNA,加15~20酶单位),以0.8%琼脂糖(Sigma公司产)凝胶电泳分离DNA片段,通过Southern Blot将DNA转移至硝酸纤维素滤膜上,以缺刻转移法(Nik translation Kit, Promega公司产)标记探针(小麦 rDNA 克隆 pTA71)(Gerlach等,1979)。将转移上DNA的滤膜和预杂交液(6×SSC, 5×Denhardt's reagent, 0.5% SDS 100μg·ml⁻¹变性的 ssDNA)在65℃下预杂交10~12h,加入标记好,已变性的探针,在65℃下继续杂交24h,倾掉杂交液,在室温下,用2×SSC, 0.5% SDS漂洗两次,每次5min,再用0.5×SSC, 0.1% SDS在65℃下漂洗15~30min,按常规方法进行放射自显影。

2 结果与分析

2.1 形态学和生物学变化

2.1.1 金秋梨和新高梨的品种对比分析 金秋梨在树体、果实等性状上和新高梨有很多相似之处,主要表现是:树冠直立,有两种树叶,一是长椭圆形的大叶,另一种是小圆叶。但果实形质上,二者存在差异,金秋梨果实平均大、果基平整、果皮薄、果心小、味道甜、石细胞少,小、成熟期9月1~15日、耐贮藏度长;而新高梨果实平均小、果基突丘、果皮厚、果心

大、味道微酸、石细胞多,大、成熟期8月20~30日、耐贮藏度短。

2.1.2 金秋梨和新高梨的正反交测验 日本梨是一个杂合的群体,其遗传基本论点有两点值得考虑。一是日本梨大多数品种自花不实;二是偏父性不亲和原理。金秋梨和新高梨的正反交测验结果见表1。新高梨×金秋梨的结实率为67%,而金秋梨×新高梨的结实率为36%,都不符合日本梨自花不实原理。再经反复测试,金秋梨×金秋梨的结实率为0,而新高梨×新高梨的结实率为11%,原因就在于新高梨本身具有一定的自花结实率,所以,新高的杂交组合亦表现出较高的结实率。同时也可以看出,有一定自花结实率的新高梨,其变异植株金秋梨的自花结实率为0。新高梨的父本是今村秋,今村秋×新高梨的结实率为0,今村秋×金秋梨的结实率为1.1%,表现结实率很低,符合偏父性不亲和原理。由上述测验不难看出,金秋梨和新高梨相交,不符合日本梨大多数品种自花不实原理,但却非常吻合偏父性不亲和原理。

表1 金秋梨和新高梨正反交测验
Table 1 Reciprocal cross examination of
Jinjiu Pear and Xingao Pear

品种 Cultivar	金秋梨 Jinjiu Pear ♀	新高梨 Xingao Pear ♀
金秋梨 Jinjiu Pear ♂	0	36%
新高梨 Xingao Pear ♂	67%	11%
今村秋 Jincunjiu Pear ♂	1.1%	0

2.2 金秋梨和新高梨同工酶谱分析

取金秋梨和新高梨的叶片进行酯酶同工酶、过氧化物酶同工酶、细胞色素氧化酶的同工酶电泳分析,结果见表2。金秋梨和新高梨酯酶同工酶的几种主要酶带迁移率是一致的;金秋梨和新高梨过氧化物酶同工酶共出现3条酶带,第1、2条基本一致,第3条出现变异,金秋梨的酶带迁移率略低;金秋梨和新高梨细胞色素氧化酶的同工酶出现的酶带不同,金秋梨为2条,新高梨为3条,金秋梨缺失第2条酶带。

2.3 金秋梨和新高梨的 RFLP 差异

采用小麦 rDNA pTA71 克隆为异源探针,与金秋梨和新高梨叶片总DNA的4种内切酶消化片段杂交,结果如表3和图1。结果表明, pTA71-EcoRI、pTA71-BglII 二种酶—探针组合未能检测到RFLP差异, pTA71-PstI、pTA71-BamHI 两种酶—探针组合能检测到RFLP差异。其中在 pTA71-PstI 组合上,凝胶前端有很强的杂交信号,分别可

以区分出 1 条和 2 条杂交带。在 pTA71-BamH I 组合上,新高梨有 2 条杂交带;金秋梨前端有一条弱杂交带,后端有一条难消化带。在 pTA71-EcoR I

组合上,两种材料前端可以看出 2 条杂交带,后端有一条难消化的带。在 pTA71-Bgl II 组合上,区分不出杂交带和难消化带。上述杂交结果说明金秋梨和

表 2 金秋梨和新高梨同工酶谱分析
Table 2 Isozyme analysis of Jinqiu Pear and Xingao Pear

品种 Cultivar	同工酶带迁移率 Enzyme band mobility		
	酯酶 Esterase isozyme	过氧化物酶 Peroxidase isozyme	细胞色素氧化酶 Cytochromeoxidase isozyme
金秋梨 Jinqiu Pear	一致 consistent	0.32,0.35,0.41	0.33,0.44
新高梨 Xingao Pear	一致 consistent	0.33,0.35,0.46	0.32,0.35,0.43

表 3 金秋梨和新高梨的 RFLP 差异
Table 3 RFLP difference of Jinqiu Pear and Xingao Pear

	金秋梨带数 Band quantity of Jinqiu Pear	新高梨带数 Band quantity of Xingao Pear	差异带数 Band quantity of difference
pTA71-PstI	2	1	1
pTA71-BamHI	2	1	1
pTA71-EcoRI	2	2	0
pTA71-BglII	分不清 non-clear	分不清 non-clear	0

新高梨在 rDNA 上存在 RFLP 变异。

3 讨论

(1)金秋梨和新高梨相比,发生了形态学特征和生物学特性的改变,通过继代栽培、高接鉴定和区试鉴定表明这些变异性状是稳定的(黄渊基,1996),属于遗传变异。金秋梨和新高梨相交,不符合日本梨大多数品种自花不实原理,但却非常吻合偏父性不亲和原理,这种在遗传性状方面的似而不是的现象,应该可以说是其变异之所在。

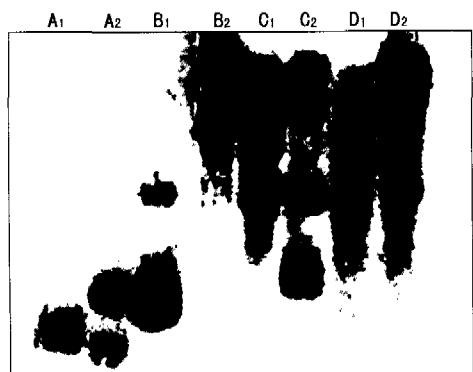


图 1 金秋梨和新高梨的 RFLP 差异
Fig.1 RFLP differences of Jinqiu Pear and Xingao Pear
1. 新高梨 Jinqiu Pear; 2. 金秋梨 Xingao Pear; A. pTA71-Pst I ;
B. pTA71-BamH I ; C. pTA71-EcoR I ; D. pTA71-Bgl II .

(2)本文对金秋梨和新高梨进行酯酶同工酶、过

氧化物酶同工酶、细胞色素氧化酶的同工酶分析表明,新高梨与其变异品种金秋梨的同工酶谱带数和显色深浅相近,但不完全一样,尤其是细胞色素氧化酶的同工酶,金秋梨比新高梨少了一条谱带,说明二者的血缘相近,但不是同一品种。

(3)DNA 的提取参照萧顺元(萧顺元等,1995)介绍的改良 SDS 法,提取的 DNA 适于进行 RFLP 分析,在 DNA 杂交试验中,采用小麦 rDNApTA71 克隆为探针,检测金秋梨和新高梨的 rDNA 变异,植物的 rDNA 是前后相联的一段重复序列,它包括 rRNA 结构基因编码区和基因间隔区(Intergenic Spacer,JGS),在植物体内 rDNA 的拷贝数达 $10^4 \cdot$ 基因组⁻¹(Ingle 等,1972),小麦的 pTA71 克隆包含 25S 和 18S 核糖体 RNA 基因及两者的间隔区,分子量约为 8.8 kb,以它为探针与金秋梨和新高梨总 DNA 的 4 种酶切消化片段杂交,在两种探针一酶组合上检测到 RFLP 差异,说明金秋梨和新高梨间存在 rDNA 变异。由杂交结果还可推测,在金秋梨和新高梨 RNA 基因中,存在有 EcoR I、Pst I、BamH I 和 Bgl II 四种内切酶切点。

参考文献:

Balfourier F, Imbert C, Charmet G. 2000. Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe[J]. *Theor Apple Genet*, **101**:131-138.
Beckmann JS, Soller M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species[J]. *Euphytica*, **35**:11-124.
Crowhurst RN, Rlints R, Atkinson G, et al. 1990. Restriction fragment length polymorphisms in the genus *Actinidia*[J]. *Plant Syst Evol*, **172**:193-203.
Furnier GR, Cummings MP, Clegg MT. 1990. Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation[J]. *J Hered*, **81**:183-188.
Gerlach WL, Bedbrook JR. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA gene from wheat and barley[J]. *Nucleic*
(下转第 241 页 Continue on page 241)

- Res Environ* (植物资源与环境), 4(2):7-12.
- Ma JS, Sun H, Cao W. 1999. The notes on the collectors and authors as well as location names related to the Dawn Redwood, *Metasequoia glyptostroboides*, after it's been discovered almost sixty years from central China (1941-2000) [J]. *Journal of Botany*, 9(2):143-147.
- Madsen K. 1999. *Metasequoia* after fifty years [J]. *Arnoldia* (Boston), 58/59.
- Mulligan BO. 1980. Notes on some rare conifers in the University of Washington Arboretum, Seattle [M]. Yearbook, International Dendrology Society, UK, 1979, London, UK, 34-40.
- Murray KW. 2001. *Metasequoia glyptostroboides* plant named 'Golden Dawn' [J]. *United States Plant*, 24, 11, 848.
- Nelson EC. 1998. *Metasequoia glyptostroboides*, the dawn redwood, Some Irish glosses on its discovery and introduction into cultivation [J]. *Curtis's Botanical Magazine*, 15(1):77-80.
- Pokorny J. 1970/1971. Vegetative propagation of *Metasequoia glyptostroboides* [J]. *Sbornik Vedeckeho Lesnickeho Ustavu Vysoke Skoly Zemedelske V Praze*, (13/14):35-46. [Czech]
- Polman JE, Michon SG L, Militz H, et al. 1999. The wood of *Metasequoia glyptostroboides* (Hu et Cheng) of Dutch origin [J]. *Holz Als Roh-und Werkstoff*, 57(3):215-221.
- Tokar F. 1986. Phenological observations on selected foreign conifers in the Mlynany Arboretum [J]. *Vedecke Prace Vyskumneho Ustavu Ovocnych a Okrasnych Drevin v Bojniciach*, (6):133-144. [Slovakian]
- Vazhov VI, Yaroslavtsev GD, Kuznetsov SI. 1988. Reaction of exotic conifers to the harsh winter of 1984/85 in the Ukraine [J]. *Byulleten' Glavnogo Botanicheskogo Sada*, (149):12-17. [Russian]
- Wang ZK (王忠魁). 1981. Chinese redwood endemic treasure tree species of China discovery and worldwide cultivation (中国固有珍宝树种——水杉发现始末及全球性引种) [J]. *Tunghai Univ Bull* (东海学报), (22):15-32.
- Wang XQ (王希群), Ma LY (马履一), Guo BX (郭保香). 2004a. History and research progress on the silviculture of *Metasequoia glyptostroboides* in China (中国水杉造林历史和造林技术研究进展) [J]. *J Northwest For Univ* (西北林学院学报), 19(2):82-88.
- Wang XQ (王希群), Ma LY (马履一), Guo BX (郭保香), et al. 2004b. The conservation of *Metasequoia glyptostroboides* and its current problems in China (水杉保护历程与存在的问题) [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), 12(3):377-385.
- Wang XQ (王希群), Ma LY (马履一), Tian H (田华), et al. 2005. Introduction on *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng in China (中国水杉引种研究) [J]. *Guihaia* (广西植物), 25(1):40-47.
- WCMC. 1994. Draft List of Temperate Trees [M]. IUCN, Gland, Switzerland.
- Williams CJ, Lepage BA, Vann DR, et al. 2003. T. Structure, allometry, and biomass of plantation *Metasequoia glyptostroboides* in Japan [J]. *Forest Ecology & Management*, 180(1/3):287-301.
- Yaroslavtsev GD. 1988. Cultivation of sequoias in the south of the USSR [J]. *Sbornik Nauchnykh Trudov-Gosudarstvennyi Nikitskii Botanicheskii Sad*. (106):55-63. [Russian]

(上接第 299 页 Continue from page 299)

- Acid Research*, 17:1 869-1 885.
- Huang YJ (黄渊基). 1996. New varieties of pear——Jinqiu Pear (梨树新品种——金秋梨) [J]. *J Fruit Sci* (果树科学), 13(1):62-64.
- Huang HW (黄宏文), Gong JJ (龚俊杰), Wang SM (王圣梅). 2000. Genetic diversity in the genus *Actinidia* (猕猴桃属植物的遗传多样性) [J]. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), 8(1):1-12.
- Ingle J, Sinclair. 1972. Ribosomal RNA genes and plant development [J]. *Nature*, 235:30-3.
- Lu JH (吕金海), Wu XJ (伍贤进). 2002. The activity of two enzymes in young fruit and young leaf of Jinqiu Pear and Xingao Pear (金秋梨和新高梨二种酶活性比较研究) [J]. *Chin Agri Sci Bull* (中国农学通报), 180:26-28.
- Li LL (李林林), Huang HW (黄宏文). 2002. PCR-RFLP analysis on mitochondrial DNA of *Actinidia* (猕猴桃属植物线粒体 DNA 片段 PCR-RFLP 研究初报) [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 20(2):153-156.
- Li JZ (李健仔), Li SG (李思光), Luo YP (罗玉萍), et al. 2003. DNA extracted from dried leaf of *Actinidia* and PCR-RFLP reaction to chloroplast DNA (猕猴桃干叶片 DNA 的提取及叶绿体基因 PCR-RFLP 反应) [J]. *Biotechnology* (生物技术), 6:10-11.
- Shao YC (邵耀椿), Yang XF (杨晓锋), Ding HD (丁海东), et al. 2003. Study on cytochrome oxidase isoenzymes by introducing laser radiated DNA into tomato (激光辐照 DNA 导入番茄细胞色素氧化酶的研究) [J]. *Applied Laser* (应用激光), 23(4):223-226.
- Sambrook J, Fritsh EF, Manitis T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual [M]. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Xiao SY (萧顺元), Zhang WC (章文才). 1995. Study on the application of RFLP markers in assessing *Citrus genecdiversity* (RFLP 在柑桔遗传多样性研究上的应用) [J]. *J Fruit Sci* (果树科学), 12(1):1-4.
- Xu LL (徐玲玲), Fang L (方亮), Liao L (廖亮), et al. 2002. Nature mutant train-RAPD analysis of esterase isozyme of *Dayalongcha* (猕猴桃属植物的遗传多样性) [J]. *J Tea Sci* (茶叶科学), 22(1):87-89.
- Zang HY (张和禹), Wu JX (吴家喜), Zhao ZL (赵正龙), et al. 2002. Peroxidase isozyme and RAPD analyses of ion implantation into mulberry (桑树注入 N+ 离子后过氧化物同工酶及 RAPD 分析) [J]. *Acta Sericologia Sin* (蚕业科学), 28(1):14-18.