

文章编号:1003-8701(2005)01-0057-04

分子标记技术在落叶果树上的应用

高玉江,侯佳贤,郑亚杰,崔 龙,姚环宇

(吉林省农科院果树所,吉林 公主岭 136100)

摘 要:分子标记技术已广泛应用于果树品种的鉴定、亲子关系的认定、芽变的鉴定、种质遗传基础评价与分类、重要农艺性状的连锁标记和果树杂交苗的早期预选等领域。综述了近年来国内外分子标记技术在落叶果树上的应用进展,并根据我国的实际情况,提出了今后发展应注意的事项。

关键词:分子标记;果树;品种鉴定;分类

中图分类号:S66

文献标识码:A

果树是多年生作物,它占地面积大,实生苗又存在童期,所以果树育种是一项耗费人力、物力、财力的工作;加之绝大多数果树为杂合体,杂交后代中广泛分离,经济性状普遍下降,出现理想品种的概率极低,果树遗传育种研究工作很难开展。但是,随着分子生物学技术的不断进步,分子标记技术的不断完善,为果树分类、品种鉴定、杂交实生苗早期预选提供了一条崭新的途径。为及时了解国内外的研究动态,有必要对当前分子标记技术在果树上的应用进行总结。

1 在落叶果树上应用的分子标记种类

分子标记是以生物的大分子,尤其是生物体的遗传物质——核酸的多态性为基础的遗传标记。目前用于果树上的 DNA 分子标记有 10 多种:限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单重复序列(SSR)、测定序列标签位点(STS)、序列特异性扩增区域(SCAR)、表达序列标签(EST)、简单序列长度多态性(SSLP)、数量可变串联重复(VNTR)、SPAR(Single Primer Amplification Reaction)和 SSR-anchored PCR 等,以 RAPD 应用的最为广泛。

2 分子标记技术在落叶果树上的应用

迄今为止,分子标记技术的研究涉及苹果、梨、桃、李、杏、樱桃、枣、葡萄、柿、板栗、核桃、山核桃、草莓、醋栗、黑穗醋栗、蔓越桔、悬钩子和无花果等 18 种落叶果树。主要应用领域有以下几个方面。

2.1 品种鉴定和种质资源研究

2.1.1 品种鉴定

果树为多年生植物,品种鉴定具有重要意义。品种鉴定通常是根据花、果、叶、茎的形态上或物候上的差异来进行,这些表型上的变化易受环境条件的影响,而在 DNA 水平上进行鉴定,就可以避免这些问题。

祝军等^[1]以 OPJ03 为引物,构建了 28 个苹果品种的 RAPD 指纹图谱,区分了其中的 15 个,区分率达 53.6%;周爱琴等以筛选出的 OPQ15 为引物,绘制了 19 个苹果砧木基因型的 DNA 指纹图谱,区分了其中的 17 个,区分率为 95%;C. M. Oliveira 利用 RAPD 进行了梨品种鉴定的探讨;U. Galderisi 利用 RAPD 分析鉴定无花果品种;U. Galderisi 利用 RAPD 对板栗进行分类和鉴定;M. Dolores Loureiro 利用 RAPD 进行葡萄品种鉴定;Patrick J. Wood 利用 RAPD 鉴定山核桃品种及其亲缘关系;吴树敬等对 20 个杏品种进行了 RAPD 分析,建立了红丰及新世纪等优新品种的 DNA 指纹图谱。

收稿日期:2004-08-22

作者简介:高玉江(1965-),男,河北省乐亭人,吉林省农科院果树所研究员,硕士,主要从事果树栽培技术、病虫害防治技术研究。

祝军等^[2]绘制了 25 个苹果品种的 AFLP 指纹图谱,确定了各供试品种的差异带,区分了供试的 25 个苹果品种;并建立了苹果矮化砧木 AFLP 分析技术体系,区分了供试的 5 个矮化砧木基因型。

Warren F. Lamboy^[3]利用 SSR 制订葡萄种质的 DNA 指纹图谱;M. A. Faria 利用 SSR 鉴定酿酒葡萄品种;Laura L. Benson 利用 SSR 鉴定湖北海棠品系;Claudio Cantini 利用 SSR 制作樱桃的 DNA 指纹图谱。

Jean-Guy Parent^[4]用 SCAR 标记鉴定了蔓越桔品种;P. G. Lanham^[5]利用 3 种方法制作了 12 种醋栗的指纹图谱,AFLP 可以区分每一基因型,ISSR 不能区分 3 种,RAPD 不能区分 2 种;乔玉山等^[6]建立了李种质资源 ISSR 反应体系和 18 个品种的指纹图谱。

2.1.2 亲子关系的确定

现在果树生产上应用的许多品种,最初从实生而来,父母本不清。DNA 分子标记在鉴定亲子关系上有独到的优势。Kiyoshi Banno^[7]利用同工酶和 RAPD 对鞍月梨进行亲子鉴定,证明它是新水和丰水的杂种实生;R. Heinkel, W. Hartmann 利用 RAPD 调查 4 个李子品种的起源。

2.1.3 果树芽变的鉴定

果树品种的另一大来源是芽变。张开春等^[8]通过组培育成一樱桃早熟芽变,定名为早丹,经 RAPD 技术鉴定,发现它的 DNA 指纹图谱与原品种 Xesphye 不同,多扩增出一条 OPU03-950DNA 谱带,说明该株系发生了 DNA 的变异;张今今等利用 RAPD 技术,对元帅系和富士系等苹果品种进行了 DNA 多态性分析,获得了元帅系普通型品种红星区别于其他短枝型芽变品种的多态性片段 OPK20-520;K. D. Scott 利用 AFLP 标记鉴定无核葡萄早熟芽变。

2.1.4 果树分类和种质遗传基础研究

分子标记可以为种质资源的研究提供了几乎无限的多态性证据,成为检测遗传多样性的最有效工具,已被用于很多方面的研究。

Nnadozie C. Oraguzie^[9]利用 RAPD 分析苹果属种质资源的遗传多样性及相互关系(分类);曲柏宏等对梨属 40 个品种和类型进行了 RAPD 扩增,将起源于欧洲的西洋梨和起源于中国的 3 个种明显区分开;C. M. Oliveira 等利用 RAPD 也对梨属进行了分子水平分类。

杨新国等^[10]利用 RAPD 技术,对 48 个桃品种类型的遗传变异进行了研究,把 48 个供试材料共分为 5 类,南方桃、北方桃、油桃各聚为一类;沈向等对 43 个杏品种进行了 RAPD 扩增,发现品种间表现出较强的地理分布集中性;Takehiko Shimada 利用 RAPD 分析樱桃的遗传多样性。

张立平等^[11]对葡萄属 33 个种及品种材料进行了 RAPD 分析,把供试 33 个材料可分为 9 类和 1 个特殊型;Nami Goto-Yamamoto 利用 AFLP 对葡萄进行表型性的聚类分析,得到的树状分类图和根据形态和地理位置的分类结果相吻合。

吴燕民等^[12]用 RAPD 技术对核桃属内 9 个种及近缘属的 2 个种进行了基因组 DNA 多态性分析,结果表明,铁核桃为核桃属中一个独立种;核桃属内组间和种间亲缘关系与经典分类学的结果完全一致;Mei Li 等利用 RAPD 对板栗进行分类;彭建营等利用 RAPD 技术对枣 64 个品种及类型的遗传变异进行了研究,把供试的 64 个品种及类型分为 8 类;罗正荣等采用 RAPD 技术对原产中国、日本和韩国的部分柿品种间的亲缘关系进行了初步的探讨。结果表明,富有和次郎、平核无和仓光、磨盘柿和杵头柿间可能具有较近的亲缘关系。

P. G. Lanham^[13]利用 RAPD 和 ISSR 展示黑穗醋栗次生基因库的基因多态性,在次生基因库中找到新的遗传变异,可用于育种;Lanham^[15]利用 3 种方法分析了 12 种醋栗的遗传多样性,发现欧洲栽培的醋栗遗传基础较窄。

2.2 一些重要农艺性状的研究及分子标记的筛选

2.2.1 自交不亲和基因的标记

大多数果树存在自交不亲和现象,筛选出自交亲和的品种,可以省去配置授粉品种的麻烦,确保高产稳产,在果树生产上具有重大意义。利用分子标记鉴定果树自交不亲和基因的报道也很多。Shogo Matsumoto 等^[14]利用 RFLP 分析了 50 多个苹果品种和砧木的自交不亲和等位基因;Hisayo Yamane 利用 RFLP 测定 10 余个甜樱桃品种的 S-基因型,并根据 S-基因型对樱桃进行了分类;M. L.

Badenes 利用 RAPD 技术对日本杏自交不亲和性进行分子标记。

2.2.2 抗病基因的标记

王跃进、王西平等^[15]运用 RAPD 技术,进行了葡萄抗黑痘病基因连锁的分子标记的研究,获得了与抗病基因相连锁的 RAPD 标记:OPV02-600 和 OPJ13-300;罗素兰等应用 BSA、RAPD 和 SCAR 方法研究了葡萄抗霜霉病基因的分子标记,发现了 RAPD 标记 OPO06-1500 与葡萄抗霜霉病主效基因 Rpv-1 紧密连锁,两者遗传距离为 1.7 cM,并将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记 SCO06-1500。

Kiyoshi Banno 证实了和日本梨黑斑病感病基因连锁的 RAPD 标记,250 种引物中 CMNB41/2350 和感病基因连锁。Minou Hemmat 利用 RAPD 标记苹果黑星病抗病基因 Vf;K. M. Haymes 利用 SCAR 标记了草莓抗红茎根腐病的 RPF1 基因,它可以用于育种中的选择。

张开春等^[16]研究建立了危害仁果类果树的苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)、苹果茎沟病毒(ASGV)和苹果茎痘病毒(ASPV)的 RT-PCR 检测体系;陈建军等比较了 DAS-ELISA、RT-PCR 和 IC-RT-PCR 3 种方法检测葡萄卷叶病毒Ⅲ。

2.2.3 果实性状的标记

杨英军等^[17]采用 RAPD 指纹分析技术,获得了控制桃果实性状有毛/无毛、白肉/黄肉这两个基因的 RAPD 分子连锁标记,其中多态性扩增 DNA 片段 OPP20-2200 与果实有毛/无毛基因的连锁遗传距离为 5.0 cM,多态性扩增 DNA 片段 OPU03-850 与果实白肉/黄肉基因的连锁距离为 9.6 cM。彭建营等筛选出 S154820 是与枣有核性状相关的分子标记;Shinya Kanzaki 研究了与日本柿自然脱涩性状连锁的分子标记,利用 AFLP 只能鉴定出一半非自然脱涩品种,而 RFLP 则能全部鉴定出;杨英军等获得了与葡萄无核基因相连锁的 SCAR 标记,并进行了测序。

2.2.4 矮化性状的标记

张开春等^[18]以平邑甜茶和扎矮 76 的杂交后代实生苗为试材,获得两个与苹果属显性矮化主基因 Dw 基因连锁的 RAPD 标记,分别是 F04-800 和 F03-1150,且与 Dw 基因的连锁距离分别是 14.0 cM 和 25.5 cM;王彩虹等以短枝富士和舞美的 F₁ 分离群体为试材,筛选到一个与苹果柱形基因 Co 基因连锁较为紧密的 AFLP 标记,用 PCR 的方法对其进行再扩增,实现了此标记片段的克隆和转化。

2.3 构建分子标记遗传图谱及分子标记协助育种早期选择

基因组图谱是基因或其他遗传标记在染色体上的排列顺序及其间距,基因组图谱的基础形式是遗传连锁图谱。由于果树多为异交植物,一般采用双假测交构建遗传连锁图。目前,至少构建了苹果、桃、梨、葡萄、李、越桔、甜樱桃和核桃等树种的初级分子连锁遗传图,最有影响的是美国和欧洲实施的苹果和核果类果树的基因组研究计划。

分子标记的一个主要目的是用于杂交苗的早期预选,提高育种效率。J. I. Hormaza^[19]利用 RAPD 和胚培养进行樱桃早期预先选择,减少育种成本,加速育种进程,可以判断出混合花粉授粉后得到的胚的父本;M. A. Dalbo 利用 RAPD 分子标记协助选择葡萄抗霜霉病品系。

2.4 标记的遗传性

乔飞^[20]利用 RAPD 标记评价桃种间杂交一代群体的分离方式,RAPD 标记在 F₁ 呈 3 种分离方式:孟德尔分离、偏离孟德尔分离规律、异常分离,其频率为 80%、14%、6%。刘孟军等以富士苹果和山定子及两者的种间杂交 F₁ 为试材,对 RAPD 标记的分离方式进行了研究,不分离标记、按 1:1 或 3:1 比例正常分离的标记、偏离孟德尔分离比例的标记和异常分离标记分别占 45.5%、45.0%、8.0%和 1.5%;双亲共有标记中 74.7% 不发生分离,单亲特有标记中 57.1%~79.6% 发生正常分离;富士特有标记中不分离标记占 33.3%,而山定子特有标记中不分离标记只占 4.3%,表明富士基因组中纯合基因位点的比例要高于山定子。

3 存在问题及今后工作建议

分子标记在果树上的应用研究报道很多,一些学者已经担心它有被滥用的可能^[21]。我国目前此类研究存在的突出问题是研究力量分散,很难对某一树种进行系统深入的研究,研究手段一般采用

RAPD, 研究结果往往是理论成果, 不能在生产实践中应用。建议有关部门通过大型的基因组计划进行研究力量的整合, 并注重研究的实用性。

参考文献:

- [1] 祝 军, 周爱琴, 等. 苹果 RAPD 分析体系的建立[J]. 果树科学, 2000, 17(4): 239-243.
- [2] 祝 军, 等. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 102-106.
- [3] Warren F. Lamboy and Christopher G. Alpha. Using simple sequence repeats for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1998, 123(2): 182-188.
- [4] Jean-Guy Parent and Daniele Page. Identification of raspberry cultivars by Sequence Characterized Amplified Region DNA analysis. Hortscience, 1998, 33(1): 140-142.
- [5] Lanham P G and Brennan R M. Genetic characterization of gooseberry germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 1999, 74(3): 361-366.
- [6] 乔玉山, 等. 李种质资源 ISSR 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 270-274.
- [7] Kiyoshi Banno, et al. Isozymes and RAPD markers to identify the parenthood of Japanese pear 'Kuratsuki'[J]. Japan. Soc. Hort. Sci. 2000, 69(2): 208-213.
- [8] 张开春, 等. 櫻桃小茎尖培养后的早熟变异与 RAPD 鉴定[J]. 果树科学, 2000, 17(3): 225-227.
- [9] Nnadozie C. Oraguzie, et al. Genetic diversity and relationships in Malus sp. Germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA[J]. Amer. Soc. Hort. Sci., 2001, 126(3): 318-328.
- [10] 杨新国, 等. 桃种质亲缘演化关系的 RAPD 分析[J]. 果树学报, 2001, 18(5): 276-279.
- [11] 张立平, 等. 葡萄属 RAPD 分类研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 191-193.
- [12] 吴燕民, 等. 运用 RAPD 对核桃属种间亲缘关系的研究[J]. 园艺学报, 2000, 27(1): 17-22.
- [13] P. G. Lanham. Genetic diversity within a secondary gene pool for Ribes nigrum L. revealed by RAPD and ISSR markers. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2000, 75(4): 371-375.
- [14] Kentaro Kitahara, et al. Complete sequences of the S-genes, Sd- and Sh-RNase cDNA in apple. Hortscience, 2000, 35(4): 712-715.
- [15] 王跃进, 等. 中国野生葡萄抗黑痘病基因的 RAPD 标记[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 321-325.
- [16] 张开春, 等. 采用 RT-PCR 技术检测苹果病毒[J]. 果树学报, 2001, 18(6): 370-371.
- [17] 杨英军, 等. 桃果实有毛/无毛、白肉/黄肉性状的 RAPD 分子标记[J]. 华北农学报, 2000, 15(3): 6-9.
- [18] 张开春, 等. 苹果属显性矮化主基因 Dw 的 RAPD 分子标记[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(2): 183-185.
- [19] J. I. Hormaza. Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. Scientia Horticulturae. 1999, 79: 121-126.
- [20] 乔 飞, 等. 利用 RAPD 标记评价桃种间杂交一代群体的分离方式[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 310-312.
- [21] H. Iketani. Classification of fruit trees - What is the problem? What is important?[J]. Japan. Soc. Hort. Sci. 1998, 67(6): 1193-1196.

A Review on the Utilization of Molecular Markers in Fruit Tree Researches

Gao Yujiang, Zheng Yajie, Hou Jiaxian and Yao Huanyu

(Pomology Institute, Academy of Agricultural Science of Jilin Province, 136100)

Abstract: Molecular markers and their utilization in fruit tree researches and breeding are briefly reviewed, and some new potential applications are suggested. Such markers have been employed in cultivar and hybrid identification, estimation of genetic similarities, taxonomy, disease diagnostics, genome mapping, marker assisted selection and population genetics studies of fruit trees.

Key words: molecular marker; fruit tree; cultivar identification; taxonomy

(上接第 33 页)20~25 日, 分蘖盛期施 25%氮肥;7 月 10~15 日, 幼穗分化初期施穗肥 25%氮肥、33%钾肥;多施农家肥, 改善土壤理化性状, 减少化肥的使用量, 有利于提高稻米品质。

4.5 节水增温, 适当晒田

浅水插秧, 深水活棵, 浅水分蘖, 适时晒田, 晒田后及时灌水, 后期间歇灌溉。

适合于吉林省吉林、通化、长春、四平和松原等地区种植通 35 的中熟、中晚熟稻作区种植。