

悬钩子属植物分子标记技术和基因组研究进展

杨燕林¹, 唐开学², 和加卫¹, 朱映安¹, 和志娇¹, 杨正松¹

(¹云南省农业科学院丽江高山经济植物研究所, 丽江 674100; ²云南省农业科学院, 昆明 650231)

摘要:中国有着丰富的悬钩子属植物资源。近几年来,随着国内外分子生物学研究方法的不断提高和完善,国外对悬钩子属的植物深入研究取得了较好的效果。而国内利用分子生物学手段研究该属植物的报道还较少或欠深入。综合有关文献,笔者综述了国内外悬钩子属植物 DNA 分子标记技术应用情况和主要的研究领域,遗传图谱构建及基因定位的最新研究进展,并对其研究前景进行了讨论。认为既要看到各种分子标记方法在悬钩子属植物生物学许多领域得到了广泛的应用,并取得很好的效果,也要充分估计这些分子标记方法在使用过程中具有局限性。文章指出,根据不同的研究目的以及研究对象,采取不同的分子标记方法是研究取得成功的关键。同时,选择适当的分子生物学手段对悬钩子属植物进行广泛和深入研究,对该属植物不论是在生产上的应用,还是生物多样性的保护方面都有不可估量的作用。

关键词:悬钩子;基因组;分子标记

中图分类号:Q7 **文献标识码:**A

Progress in the Molecular Technology and Gene of *Rubus* L.

Yang Yanlin¹, Tang Kaixue², He Jiawei¹, Zhu Ying an¹, He Zhijiao¹, Yang Zhengsong¹

(¹Institute of Alpine Economic Plant, Yunnan Academy of Agriculture Sciences, Lijiang 674100,

²Yunnan Academy of Agriculture Sciences Kunming, Yunnan 650231)

Abstract: China has rich resources of *Rubus* L. In recent years, a deep research of *Rubus* L. abroad has reached good result due to the development and improvement of research methods in the field of molecular biology; while in our country there are only very few or shallow reports on the research of *Rubus* L. using molecular biological methods. By referring to relative materials, this paper summarized the application of molecular markers of *Rubus* L., its main research field and the newest research progress in construction of genetic maps as well as gene identification of *Rubus* L. Besides, the applying future of its research was also discussed. It pointed out that the molecular methodologies were applied widely in many fields of biology of *Rubus* L. and good result has been reached, but most of the methodologies were still used with limitations. Therefore, for the success of the research it was the key to choose different and suitable methodologies according to research aims; and selecting appropriate means of molecular biology in its extensive and deep research is going to play an inestimable role in the production application and the protection of biodiversity of *Rubus* L.

Key words: *Rubus* L., gene group, molecular markers

蔷薇科(Rosaceae)树莓属(*Rubus* L.),又名悬钩子属,落叶稀常绿灌木、半灌木或多年生匍匐草本植物^[1]。树莓种类繁多,形态多异,主要产地在北半球温带,少数分布到热带和南半球,据陆玲娣 1983 年统计已知的

树莓属植物有 750 余种^[2]。树莓具有丰富的营养和独特的保健功能,具有很高的营养价值和药用价值^[3-5],是一类重要的小浆果类果树。欧美许多国家都利用不同的分子标记对悬钩子类果树(树莓和黑莓)品种间的

基金项目:云南省自然科学基金重点项目(2003C0015Z)及云南省国际合作项目(2001GH11)云南省应用基础研究面上项目(2006C0093M)。

第一作者简介:杨燕林,女,1981 年出生,云南大理人,植物保护学学士,初职,主要从事悬钩子属植物资源研究工作。通信地址:674100 云南省农业科学院丽江高山经济植物研究所。Tel: (0888)3113771, Email: douding986@sina.com。

通讯作者:唐开学, Tel: (0871)5120870, Email: kxtang@pubilc.km.yn.cn。

收稿日期:2008-05-26, 修回日期:2008-06-13。

亲缘关系估测、品种的快速鉴定、优良基因的定位和筛选以及遗传连锁图的构建等方面进行了深入研究,这些深入研究为树莓育种奠定了良好的基础。而国内对该属植物的遗传多样性分析及系统演化研究等反面的研究相对较少或欠深入。中国悬钩子属植物资源丰富,分布广泛,作者通过收集国内外大量文献资料,综述了悬钩子属植物的 DNA 分子标记技术应用情况和主要的研究领域,遗传图谱构建及基因定位的最新研究进展,为中国悬钩子属植物的深入研究提供参考依据,促进中国树莓产业的发展。

1 悬钩子属植物分子标记技术的应用与发展

1.1 RAPD (Random amplified polymorphic DNA, 即随机扩增多态性 DNA) 标记

随机扩增多态性 DNA 是由美国科学家 Williams^[6]和 Welsh^[7]在 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应) 基础上几乎同时发展起来的。

RAPD 标记可以在对受试物种缺乏任何分子生物学的背景下,直接对基因组进行多态性分析;操作简便,适合大量样本的快速分析。RAPD 具有几乎是无限的信息量,快速,高效,自动化的特点,1993 年 Parent 首次报道 RAPD 技术用于树莓栽培品种的鉴定^[8]后开始被广泛用于研究悬钩子属植物,Parent 发现同一品种采集于不同地点、生长的不同时期或是不同繁殖方法得来的材料,都会得到相同的特异性条带;树莓栽培品种的识别以及估计它们间的亲缘关系^[9,10], Fernandez, M. P. 等用 10 个随机引物和 7 个微卫星点鉴定了在亲缘关系比较近以及在现代育种中频繁用到的比较难区分的 36 个树莓栽培品种,两中标记都能区分亲缘关系较近品种以及准确估计他们之间的遗传多样性,能为育种工作者的品种权提供有力的证据;悬钩子属种间和种类间的亲缘关系^[11,12], Korbin, M. 等用 11 个 RAPD 随机引物和 16 对 ISSR 引物估计 36 个栽培品种间的亲缘关系以此来确定它们的育种的稳定性,从两个分子标记得到亲缘关系图谱虽然个别地方不同但都非常相似,在这些分析中 RAPD 都能准确估计品种间的亲缘关系,有些不同的品种只是品种名不同而基因型非常相似,RAPD 技术在树莓品种的鉴定中能更准确的估计品种间的亲缘关系。亲子鉴定及种质来源分析^[13-17],悬钩子属植物存在无融合生殖现象所以种的鉴定非常难,特别是在鉴定杂交后代是有性生殖还是无性生殖,单靠外部形态难以区分,而加上 RAPD 技术辅助就更能准确的估计出种质来源的情况;野生树莓的基因型分布以及遗传多样性分析与遗传分化^[18,19]Graham, J. 等发现覆盆子在苏格兰的分布

上遗传多样性随着地理空间间隔距离增加多样性也随之增大;悬钩子的系统分类^[20-22],李维林等用了 17 个随机引物在悬钩子属的 5 个种的 15 个个体中检测到 187 多态性带,觉得 RAPD 技术可用于检测悬钩子属植物遗传多样性,分类鉴定及悬钩子属的系统分化;单性莓组种群遗传多样性与遗传分化^[23],Korpelainen H 等发现兴安悬钩子虽然形态上存在很大的区别,但是遗传多样性非常低。

虽然 RAPD 广泛应用于悬钩子并取得很好的效果,但是不适用于属下的种间关系及属间关系分析,而且稳定性和可重复性不如 AFLP、SSR^[24]。

1.2 AFLP (Amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性) 标记

扩增片段长度多态性是 Zabeau 和 Vos 等^[25]提出的,就是将基因组 DNA 经限制性内切酶(通常 1 个含 6 碱基识别位点,如 EcoR I 或 Pst I 或 Sac I,另一个含 4 碱基识别位点,如 Mse I 或 Sse I)双酶切形成不同分子量的随机限制片段,再将特定的接头连接在这些片段的末端,形成一个带接头的特异片段,用接头引物进行 PCR 扩增,扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后就可鉴定限制性片段长度的多态性。AFLP 标记既有 RFLP 的可靠性,也有 RAPD 的灵敏性。该标记系统通过少量的引物扩增产生了数量丰富的带型标记,并且分辨率高,是一种十分理想和有效的遗传标记。

AFLP 主要应用于亲子鉴定及种质来源分析,AFLP 方法首次被 Johannes 应用于欧洲树莓亲子鉴定及种质来源分析^[25],他们最后得到的结果认为多倍体的悬钩子种只不过是遗传差异非常低的假融合现象,但在自然条件下也是存在有性杂交的从而保证了悬钩子属植物的遗传多样性;而随后被应用于研究生物入侵种粗叶悬钩子的遗传多样性^[26],发现本土树种的遗传多样性高于入侵种的遗传多样性,从而有助于认识入侵种的来源问题;北悬钩子的遗传多样性^[27],Hannele 等研究的北悬钩子的 6 个居群发现遗传多样性很高表明有性繁殖在这几个居群中起着很大的作用,最近培育的新品种通过 AFLP 也能明确的把他们区分开。AFLP 最近则被用于构建树莓的基因组的遗传连锁图,并与 SSRs 等标记被认为是构建“饱和”图谱的有力工具^[28]。

AFLP 在应用中的缺点是其标记呈孟德尔式遗传,非互显性,而且需要的价钱相对 RAPD 较高,对技术人员的要求也较高。

1.3 SSR (Simple sequence repeat, 简单序列重复)

SSR 也称微卫星 (Microsatellite),指的是在真核基

因组中以少数几个核苷酸(多数为2~4个)为单位多次重复的DNA序列。SSR技术就是对真核基因组中以1至5个碱基为基础的重复序列进行PCR扩增,经电泳分离,观察其变化的情况。由于在重复序列的两端往往是趋于保守的DNA序列,因此可以利用和两侧区段互补的短序列引物经PCR扩增反应、聚丙烯酰胺电泳或放射自显影,得到因简单重复序列数不同而引起的扩增片段的多态性。

由于SSR在真核基因组中很丰富,且它具有丰富的多态性和信息量、共显性遗传和PCR扩增结果重复性好等优点^[29],许多研究者都致力于开发出适合研究悬钩子属植物的微卫星标记且取得了一定的成绩,Amsellem等人从生物入侵种粗叶悬钩子中开发出的8个微卫星标记^[30],随后就应用于其遗传多样性的研究^[29],Graham等首次提出了适合用于研究野生树莓基因流与根腐病抗病基因的SSR分子标记^[31],随后用PstI为探针在基因组文库中选出10个微卫星标记,为研究悬钩子属植物红树莓栽培种和野生种之间的基因流子标记研究提供了一个新的研究手段,并对其在不同悬钩子属植物中的应用进行了论证^[32],用SSR和AFLP和EST-SSR标记一起构建了树莓的第一个基因组的遗传连锁图后^[28]最近又开发出了60个微卫星标记用于研究构建红树莓遗传连锁图和45个微卫星标记用于构建黑树莓遗传连锁图谱^[33],构建控制树莓茎秆柔毛有无的H基因的基因图谱^[34]。

SSR应用中的主要缺点是由于SSR两侧引物具有物种特异性,在具体实验中引物设计费时耗力^[32]。

1.4 ISSR (inter-simple sequence repeat 简单重复间序列)

ISSR分子标记是在SSR标记基础上发展起来的一种新技术,其基本原理是在SSR的5'或3'端加锚14个嘌呤或嘧啶碱基,然后以此为引物,对两侧具有反向排列SSR的一段基因组DNA序列进行扩增。重复序列和锚定碱基是随机选择的,扩增产物经聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离后,每个引物可以产生比RAPD方法更多的扩增片段,因此,ISSR标记是一种快速、可靠、可以提供有关基因组丰富信息的DNA指纹技术^[35]。

ISSR标记用于悬钩子植物的研究报道还比较少,Korbin, M. 等用11个RAPD随机引物和16对issr引物估计36个栽培品种间的亲缘关系以此来确定它们的育种的稳定性,从两个分子标记得到的亲缘关系图谱虽然个别地方不同但都非常相似,在这些分析中ISSR与RAPD都能准确估计品种间的亲缘关系^[11];HONG

Y.-P 等用于研究红树莓和黑树莓的遗传多样性取得很好的效果,认为将来可以用于生物遗传多样性保护和育种方面等的研究^[36]。

虽然大多数的研究表明,ISSR分子标记具有许多优点,但是也有一些研究表明,ISSR在对一些物种进行遗传多样性评估时,结果可能低于别的分子标记手段,原因可能是SSR基因在一个种群中分布状态不均匀,或是SSR基因不同的进化方式所导致^[37]。

1.5 DNA 序列分析

最充分揭示DNA多态性的方法是DNA序列分析,用得最多的是用“通用”引物扩增mtDNA、ctDNA或核DNA片段,随后直接测序。现阶段,悬钩子植物的DNA序列分析研究主要集中在核DNA片段测序分析方面。

核DNA片段测序分析可以获得大量的可靠数据。Alice等人利用对ITS序列测序得到的大量分子数据首次阐明悬钩子属的系统进化关系^[38],并认为ITS序列是研究悬钩子属植物种内或种间的系统发生和进化的强有力工具。后来又不断补充新材料获得更多的分子数据来完善悬钩子属的系统进化^[39],同时还利用ITS序列来证明悬钩子属植物不同居群间的杂交和基因流^[40]。利用ITS序列分析壳针孢属的系统发生关系时发现来自不同树莓品种的树莓壳针孢属于同一株系^[41]。这些研究虽然取得了很好的效果,可在后来Clifford W. 等利用ndhF基因序列来分析空心莓亚属的两个种的分类问题时认为ITS存在缺点,不及ndhF的效果好^[42]。说明DNA测序在悬钩子属上的应用还存在争议,得继续对大量悬钩子属植物进行深入研究找到合适的标记序列来解决种群学和系统学问题。

2 遗传图谱研究现状

Graham et al 等^[28]率先用AFLP、SSR和EST-SSR三种分子标记构建了来自欧洲多刺、棕色茎秆、果小、抗病性强的红莓品种Glen Moy与来自北美无刺、绿色茎秆、果大、风味好但抗并性差的红莓品种Latham的杂交后代群体的789cM长的遗传连锁图,最近又在现有的基因图谱上增加了20个微卫星标记构建了控制树莓茎秆柔毛有无的H基因的连锁群3、5和6谱^[34]。悬钩子属植物遗传图谱的构建相对同科其它属植物起步较晚,现在还属于初步阶段,还不能有效的应用到生产上。

3 悬钩子属基因研究

对悬钩子属植物基因研究主要集中在与悬钩子属植物抗病、成熟期和果实大小、颜色和气味相关基因和基因片段等几方面。

研究认为树莓植株茎秆柔毛有无与树莓抗病性有关,如果茎秆密被柔毛的话则抗茎腐病、灰霉病和炭疽病;但是容易感染茎斑病、黄锈病和白粉病。而控制树莓茎秆柔毛有无的基因是 H 基因,虽然 H 基因是如何影响植株抗病性和感病性还不知道,现已被深入研究还构建了其基因图谱^[34]。在很多植物中,已证实苯丙氨酸氨裂解酶 (PAL) 在果成熟有重要的功能。Amrita Kumar 等研究了编码苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)的两个基因 *RiPAL1* 和 *RiPAL2* 在树莓中的结构、表达和进化^[43],随后又研究了编码聚酮化合物的基因家族 PKS 的十个基因 (*Ripks1-10*) 在果实成熟过程中的表达形式^[44]。随着对悬钩子属植物基因组的深入研究很多都应用到生产上,利用基因枪等方法将 H 基因转化到树莓植株中,得到的转基因植物在抗病性和果实大小等方面都表现比较好。

4 问题与展望

中国是树莓属植物的重要分布中心之一,已发布的有 202 种、92 个变种^[45],其中特有种 138 种^[2],面对这样丰富多样的物种资源国内对其各方面的研究多数限于传统的研究方法。国内采用分子生物学对种和类型的遗传多样性研究相对较少或欠深入,除用 RAPD 方法研究悬钩子属系统分类与遗传多样性外未见用其它分子标记对树莓进行遗传多样性和其它方面的研究。这不但影响了对中国丰富的悬钩子属植物的利用及其产业化发展,还影响了对这个学科的了解及其生物多样性的保护。

随着当今世界分子技术的飞快发展,加快和促使了人们对各个领域的深入研究,分子标记手段的普及和不断改进以及新的分子标记和优秀的科研人员不断涌现,还有国外对悬钩子属植物的深入广泛研究为中国加强对悬钩子属植物研究奠定了良好的基础,对中国的悬钩子属植物的深入研究将会实现。从悬钩子属植物核 DNA 和叶绿体 DNA 中分离出的微卫星标记将在亲子鉴定、种群结构、物种形成、遗传资源保护和遗传连锁图的构建中起越来越大的作用;大规模基因组学研究将会为悬钩子属 DNA 不同区域和类型的多态提供新的证据;不断增加的 DNA 序列将会进一步促进物种的系统发生与遗传进化研究;构建悬钩子属植物遗传图谱逐渐趋于饱和并用其研究数量性状将为悬钩子属植物提供新的研究平台;利用不同的分子生物学手段研究悬钩子属有效的种群大小、基因流在种群中的分布状况将在保护物种方面起到重要作用。

虽然各种分子标记方法在悬钩子属植物生物学许多领域得到了广泛的应用,并取得很好的效果,也要充分估计这些分子标记方法在使用过程中具有局限性。根据不同的研究目的以及研究对象,采取不同的分子标记方法是研究取得成功的关键。分子标记以及它们在悬钩子属植物研究与培育新品种中的应用总结表 1,利用适当的分子生物学手段对中国悬钩子属植物进行广泛和深入研究,掌握越来越多的该属植物大量的分子生物学信息,对该属植物不论是在生产上的应用,还是生物多样性的保护方面都有不可估量的作用。

表 1 分子标记以及它们在悬钩子属植物研究与培育新品种中的应用总结

分子标记	用途
RAPD, SCAR 标记	品种鉴定、亲缘关系、居群结构、系统分类、遗传多样性
AFLP 标记	遗传多样性、品种鉴定、图谱构建
SSR 标记	遗传多样性、图谱构建
ISSR 标记	遗传多样性、亲缘关系
DNA 序列分析	亲缘关系、系统分类
特殊基因引物的 PCR	病害的诊断

参考文献

- [1] 俞德浚,中国科学院中国植物志编委会.中国植物志(第 37 卷)[M].北京:科学出版社,1985:10-218.
- [2] 陆玲娣.我国悬钩子属植物的研究[J].植物分类学报,1983,21(1):13-25.
- [3] 唐开学,李学林,钱绍仙,等.云南野生果树资源及其分布特点[J].西南农业学报,2003,16(1):108-112.
- [4] 杨静全,和秀云,和加卫,等.云南树莓资源的开发与利用[J].云南农业科技,2004,(6):46-46.
- [5] 杨静全,和加卫,和秀云,等.云南食用小浆果的发展前景[J].云南农业科技,2003,增刊:103-107.
- [6] Williams J.G, Kubelik A. R, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic marks [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22):6531-6535.
- [7] Welsh J, Mc Clelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary priers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18:7213-7218.
- [8] Parent, J-G, Fortin, M.G and Page. D. Identification of raspberry cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1993, 73:1115-1122.

- [9] Fernandez, M. P. Hernaiz, S. Ibanez, J. Genetic characterization of raspberry cultivars using molecular markers.[C]// International Society for Horticultural Science. ISHS Acta Horticulturae 585:9th International Rubus and Ribes Symposium,NOV 30-DEC 07, 2005, Pucon, CHILE. Chile:ISHS,2008:125-132.
- [10] Graham J, McNicol R J. Identification of red raspberry cultivars and an assessment of their relatedness using fingerprints produced by random primers [J].The Journal of Horticultural Science, 1994, 69(1): 123-130.
- [11] Korbin, M.Kuras, A.Straczynska, K.Orzel, A.Danek, J. Biotechnological directions in Polish breeding of Rubus.[C]// International Society for Horticultural Science. ISHS Acta Horticulturae 585:9th International Rubus and Ribes Symposium,NOV 30-DEC 07, 2005, Pucon, CHILE. Chile:ISHS, 2008: 133-139.
- [12] Graham J, McNicol R J. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between Rubus species [J]. Theor Appl Genet. 1995, 90(7-8): 1128-1132.
- [13] Chen H. J. , Mubarack, M. Naess, S. K, Srover. E. and Swariz H. Technique development rewards production of an in vitro graft chimera in Rubus[J]. Fruit Varieties Journal, 1996, 50(2):105-113.
- [14] Julie Graham1, Lucia Iasi & Steve Millam1.Genotype-specific regeneration from a number of Rubus cultivars [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 48(3):167-173.
- [15] Werlemrk,G, Nybom.,H. Pollen donor impact on progenies of pseudogamous blackberries[J]. Euphytica, 2003, 133(1):71-80.
- [16] Laurent amselien, Jean-Louis Noyer, and Martine Hossaert-Mckey. Evidence for a switch in the reproductive biology of Rubus alceifolius(Rosaceae) towards apomictic, between its native range and its area of introduction [J]. American Journal of Botany, 2001, 88(12): 2243-2251.
- [17] Rebecca A. Randell, Dianella G. Howarth & Clifford W. Morden.Genetic analysis of natural hybrids between endemic and alien *Rubus* (Rosaceae) species in Hawai'i [J]. Conservation Genetics, 2004(5): 217-230.
- [18] Weber C A. Genetic diversity in black raspberry detected by RAPD markers [J]. HortScience, 2003, 38(2):269-272.
- [19] Graham J, Squire GR, Marshall B, Harrison RE. Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry (*Rubus idaeus*) detected using RAPD markers[J]. Molecular Ecology, 1997 ,6(11):1001-1008.
- [20] Li Wen-lin, Gu Yin, He shan-An, and Zhang Zhi-Dong. Applicability of RAPD to Systematics and Genetic Diversity of *Rubus* L [J]. Acta Horticulturae, 2002, 585:51-56. (in Chinese)
- [21] Kraft, T., and H. Nybom. DNA fingerprinting and biometry can solve some taxonomic problems in apomictic blackberries [J]. Watsonia, 1995, 20:329-343.
- [22] Dallas D,Trople P,Moore P.Taxonomic Relationships in Rubus based on RAPD analysis. [C]// International Society for Horticultural Science. ISHS Acta Horticulturae 505:VII International Symposium on Rubus and Ribes, January 9-15, 1998, University of Melbourne, Melbourne, Australia. Melbourne:ISHS, 1999:373-378.
- [23] H.Korpelainen, K. Antonius-Klemola&G.Werlemark. Clonal structure of *Rubus hamaemorus* populations: comparison of different molecular methods[J]. Plant Ecology, 1999, 143(1):123-128.
- [24] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification:A general method for DNA fingerprinting[P]. European Patent Application: 924026297, 1992.
- [25] Johannes Kollmann, Thmas Steomger, AND Barbara A. Roy. Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae)species based on AFLP and allozyme analysis [J]. American Journal of Botany, 2000, 87(11):1592-1598.
- [26] Amsellem, L.,J.L. Noyer, T. Lebourgeois, and M. Hossaert-mckey. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using AFLP markers[J]. Molecular Ecology, 2000, 9:433-455.
- [27] Lindqvist K H, Koponen H, Valkonen J P T. Genetic diversity of arctic bramble (*Rubus arcticus* L. subsp. *arcticus*)as measured by amplified fragment length polymorphism [J]. Canadian Journal of Botany, 2003, 81(8):805-813.
- [28] Graham J, Smith K, MacKenzie K, Jorgenson L, Hackett CA, Powell W The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, enomic-SSR and EST-SSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(4):740-749.
- [29] 高志红,章镇,韩振海.SSR 技术及其在果树上的应用[J].果树学报, 2002,19(5):281-285.
- [30] Amsellem L, C. Dutech and N Billotte. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Rubus alceifolius* Poir (Rosaceae), an invasive weed in La Reunion island [J].Mol Ecol Notes, 2001, 1(1-2):33-35.
- [31] Graham J, Smith K.DNA markers for use in raspberry breeding. [C]// International Society for Horticultural Science. ISHS Acta Horticulturae 585: VIII International Rubus and Ribes Symposium,June, 2002, Dundee, Scotland, United Kingdom. Dundee:ISHS, 2002: 51-56.
- [32] Graham J, Smith K, Woodhead M, Russell J.Development and use of SSR markers in *Rubus* species [J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2 (3): 250-252.
- [33] Graham J, K. Smith, M. Woodhead, Russel J. Development and use of simple sequence repeat (SSR) markers in *Rubus* species [J]. Molecular Ecology Notes, 2005, 2(3):250-252.
- [34] Graham J, K. Smith I.Tierney K.MacKenzie C.A.Hackett Mapping gene Hcontrolling cane pubescence in raspberry and its asociation with resistance to cane botrytis and spur blight, rust and cane spot[J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(5):818-831.
- [35] 王建波.ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J].遗传, 2002,2(5):613-616.
- [36] Hong Y P, Kin M J, Hong K N. Genetic diversity in natural populations of two geographic isolates of Korean black raspberry[J].Journal

- of Horticultural Science and Biotechnology, 2003, 78(3):350-354.
- [37] 段昌群.生态科学进展(第一卷)[M].北京:高等教育出版社,2004: 153-159.
- [38] Alice, L. A., Campbell CS. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences [J]. American Journal of Botany, 1999, 86(1):1:81-97.
- [39] Alice, L.A. Evolutionary relationships in *Rubus* (Rosaceae) based on molecular data. [C]// International Society for Horticultural Science. ISHS Acta Horticulturae 585: VIII International Rubus and Ribes Symposium, June, 2002, Dundee, Scotland, United Kingdom. Dundee: ISHS, 2002:79-83.
- [40] Alice, L.A., Eriksson, T., Erikson B. and Campell, C.S. Hybridization and gene flow between distantly related species of *Rubus* (Rosaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences[J]. Syst.Bot, 2001, 26(4):769-778.
- [41] Gerard J. M. Verkley, Mieke Starink-Willems, Arien van Iperen, and Edwin C.A. Abeln Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA[J]. Mycological Society of America, 2004, 96(3):558-571.
- [42] Clifford W., Morden., Donald E., Gardner, and Dana A. Weniger. Phylogeny and Biogeography of pacific *Rubus* Subgenus *Idaeobatus* (Rosaceae) Species: Investigating the Origin of the Endemic Hawaiian Raspberry *R. macraei* [J]. Pacific Science, 2003, 57(2):181-197.
- [43] Amrita Kumar and Brian E. Ellis. The Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family in Raspberry. Structure, Expression, and Evolution[J]. Plant Physiology, September, 2001, 127(1):230-239.
- [44] Amrita Kumar and Brian E. Ellis. A family of polyketide synthase genes expressed in ripening *Rubus* fruits[J]. Phytochemistry, 2003, 62(3):513-526.
- [45] Li Wei-Lin, Wu wen-Long and Zhang Zhi-Dong. The utilization value and potential of Chinese bramble (*Rubus* L.). Acta Horticulturae, 2002, 585:133-138.(in Chinese).