

RAPD 技术在园艺植物种质资源和遗传育种中的应用

熊燕 张万民 (新疆塔里木大学植物科技学院, 新疆阿拉尔 843300)

摘要 综述了近年来 RAPD 技术在园艺植物种质资源研究、系谱分析、基因标记、分子遗传图谱构建等方面研究的应用。

关键词 RAPD 技术; 园艺植物; 种质资源; 遗传育种

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2007)13 - 03822 - 02

Application of RAPD Technique in Germplasm Resources and Genetic Breeding of Horticultural Plants

XIONG Yan et al (Institute of Plant Science and Technology, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract The paper summarized the recent progress of the application of RAPD technique in various aspects of horticultural plants including germplasm resources research, pedigree analysis, genetic markers, construction of molecular genetic map.

Key words RAPD technique; Horticultural plants; Germplasm resources; Genetics and breeding

分子标记是以生物体遗传物质——核酸的多态性为基础的遗传标记。近 10 多年来, 分子标记技术得以迅速发展和应用, 极大地加深了人们对生物遗传规律的认识。目前广泛应用的分子标记有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、STS、SCAR 等, 其中 RAPD 技术以其突出的特点, 受到生物学家重视, 在生物学多个领域得到广泛运用。

1 RAPD 技术原理和特点

随机扩增多态性 DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD), 是 1990 年由美国杜邦公司的 Williams 等和加州生物研究所的 Walsh 等同时推出的一种分子标记。其基本原理是根据 DNA 聚合酶反应技术 (PCR) 用人工合成的具有 9~10 个寡聚核苷酸的随机引物, 对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离, 经放射自显影或 EB 染色检测扩增产物, 这些扩增产物多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。RAPD 的生物学基础是在引物结合序列上发生单个碱基点突变、缺失、重复、易位、插入, 从而改变了扩增片段的大小或无法扩增, 形成 DNA 多态性片段。与其他分子标记技术相比, RAPD 具有以下特点: PCR 效率高、样品用量少、灵敏度高和检测容易; 引物无种属界限, 具有通用性, 且无需预知物种 DNA 序列; 无需制备克隆、标记探针, 及进行 Southern 印迹、分子杂交等工作; 操作简便迅速, 实验成本低, 无放射性污染; RAPD 标记是显性标记, 不能区别生物纯合个体和杂合个体。

2 RAPD 技术在园艺植物种质资源和遗传育种中的应用

2.1 种质资源的遗传多样性及其分类研究 遗传多样性是生命系统的基本特性, 它源于核酸的性质和突变的存在, 以及相关的交换和修饰机制。RAPD 是检测种质资源遗传多样性的有效工具, 可用于种质资源研究时取样量的大小、取样点的选择; 保护种质资源遗传完整性的最小繁殖群体和最小保种量的确定; 核心种质筛选等方面。

Patrick 等用 RAPD 方法对美洲山核桃的遗传多样性及其 44 个品种的遗传关系进行了分析^[1]。彭建营等利用 RAPD 技术对 64 个枣品种及类型的遗传变异进行了研究, 并对扩增结果进行聚类分析, 把供试的 64 个品种及类型分为 8 类, 对基本品种的确定及种下品种群的划分做了尝试^[2]。沈

向等对 43 个杏品种进行 RAPD 扩增, 根据相似系数进行 UPGMA 聚类, 结果发现, 品种间表现出较强的地理分布集中性, 也有广泛的遗传信息交流^[3]。张立平对葡萄属 RAPD 聚类分析结果表明, 美洲葡萄类群可聚为一类, 起源于我国的东亚类群分属于 8 个类型, 圆叶葡萄单独聚为一类^[4]。此外, 在苹果无融合生殖资源、甜茶、龙眼、杨梅、南瓜、栽培大豆上都进行了类似的种质资源多样性及分类研究。

2.2 系谱分析 利用 RAPD 技术可以了解物种 DNA 之间的同源程度, 从而确定它们的亲缘关系和进化地位。温州蜜柑虽在日本栽培较早, 但起源于我国。RAPD 分析为此提供了又一证据。Omura 等发现, 温州蜜柑的 RAPD 带型接近中国宽皮柑桔, 而与日本原产的立花桔 (*Citrus tachibana*) 差异较大, 说明温州蜜柑与宽皮柑桔关系更近^[5]。Harada 等用 RFLP 和 RAPD 技术确认 Tugarn 的亲本为红玉, 三倍体的乔纳金和陆奥的亲本为二倍体, 经系谱分析认为是母本金冠在减数分裂过程中为其后代提供了二倍体配子^[6]。柠檬起源是一个存在争议的问题, Deng 等采用 RAPD 分析, 结果认为柠檬可能源于枸橼^[7]。另外, 对南瓜属、兰花、黄瓜等进行了类似亲缘关系研究。

2.3 种质资源鉴定研究 对种质资源分类鉴定常以形态学特征、细胞学特征、同工酶等来区别, 但这些方法都有局限性, 尤其是某些关系较近的材料不能被准确区分。RAPD 分析可在 DNA 水平上提供大量的遗传信息, 应用于分类鉴定具有明显优势。

罗正荣等的研究表明, 在柿品种鉴定中, RAPD 技术比同工酶更为有效, 仅用 1 个引物就能区分供试的 15 个品种, 甚至可能鉴别芽变品种^[8]。Calderisi 等利用 RAPD 技术区分了 6 个不同的可食无花果品种, 并准确鉴别出既可制干, 也可制汁的独特品种 'Bianco del Glento'^[9]。

王跃进采用 RAPD 技术在幼苗期鉴定出圆叶葡萄和真葡萄亚属杂交的杂种^[10]。Stan 等以 RAPD 方法鉴别了来自草莓分生组织的体细胞无性系变异体^[11]。栾雨时利用 RAPD 技术快速鉴定番茄杂种纯度^[12]。RAPD 技术还鉴别了葡萄的性别, 香蕉、桃及玫瑰花等的芽变类型, 加拿大白杨和菊花的突变类型。

2.4 目标性状基因的分子标记 基因标记就是筛选与目的基因连锁的遗传标记, 它是基因定位克隆和分子辅助选择育种的前提。通过 RAPD 分析找出与靶基因连锁的 RAPD 标记

作者简介 熊燕 (1970 -), 女, 四川巴中人, 硕士, 讲师, 从事果树种质资源及其遗传育种研究工作。

收稿日期 2007-01-31

的方法目前运用的主要有2种:近等基因系法(Near Isogenic Lines, 简称NIL)和集群分离分析法^[13](Bulked Segregant Analysis, 简称BSA)。近等基因系的获得,对果树而言,需较长时间,故多用在1年生作物上。

Wang等采用BSA法对与葡萄无核基因性状连锁的RAPD标记进行了研究,从100个引物中筛选出UBC 269可以扩增出UBC 269₅₀₀片段与无核性状连锁,并在杂种、亲本及无核基因供给者群体中得到了验证,且对所获得的葡萄无核基因RAPD标记的序列进行了分析^[14-15]。Sriem等利用Early Mscat × Hane Seedless的F₁后代对与葡萄无核性状相关的平均种子鲜重、每果种子总鲜重、种子发育状况、种衣发育状况、胚乳发育状况及胚发育状况等进行了RAPD分析,建立了它们与RAPD标记的多元线性回归模型,为早期筛选葡萄无核后代提供了分子依据^[16]。

苹果黑星病是欧美各国苹果生产中的主要病害。多花海棠(*Malus floribunda*) 821因含有苹果抗黑星病的基因(Vf),被广泛运用于苹果的抗黑星病育种中。Tartarini应用BSA法筛选出了5个与Vf基因连锁的RAPD标记,其中的2个与Vf基因连锁极为紧密,间距仅为0.9 cm。对不同来源的抗性单株检测结果也证实了这一点^[17]。Yang等把与Vf基因紧密连锁的RAPD标记OPD20/600进行克隆并测序,然后合成特异序列引物,成功地对苹果品种及优系进行抗病性鉴定^[18]。Mirkussert用BSA法找到了苹果抗白粉病基因相连锁的RAPD标记^[19]。

Badenes等寻找到了与杏子雄性不育性及自交亲和性相连锁的RAPD标记^[20]。郜刚等利用BSA法结合已构建的分子标记连锁图谱,获得了马铃薯青枯病抗性的3个RAPD标记^[21]。另外,许多学者还利用RAPD技术标记了大豆的耐盐基因、西瓜野生种质耐冷性基因及抗枯萎病基因等控制作物农艺性状的基因。

2.5 构建分子遗传图谱 在果树育种上,早期选择具有重要意义。分子标记辅助选择(Marker Assisted Selection, MAS)可大大提高选择的准确性和提高育种效率。在这一过程中,利用连锁图谱寻找与目的基因(性状)紧密连锁的分子标记是辅助选择的关键。

近年来,RAPD以其多种优越性已广泛应用于动植物遗传图谱的构建,利用RAPD构建遗传连锁图谱通常需要有回交、测交或F₂分离群体,这对多年生果树而言并非易事。Hennat等在传统的果树杂交育种理论上提出“双假测交构想”(double pseudotestcross format),即利用多年生果树遗传上高度杂合F₁代即发生分离的特点,以F₁分离后代为作图群体,使多年生果树遗传作图的难题迎刃而解^[22]。

Lodhi等利用“双假测交战略”方法,研究葡萄种间杂交组合Cayuga × Aureore的60个后代,构建其遗传连锁图谱。该图谱共有RAPD标记439个,标记间平均遗传距离约6.1 cM。Cayuga图谱全长1 196 cM,214个座位分属于20个连锁群。该遗传图谱的绘制有可能使葡萄数量性状分析和利用图谱进行基因克隆(map based gene cloning)取得重大进展,可对未来的分子标记辅助育种产生巨大的推动作用^[23]。

Drlewanger以模式植物桃的F₂分离群体为试材,从524

个引物中筛选出38个具有多态性引物,构建了8个连锁群^[24]。他于1998年用甜桃(Fejalon jalousin(r))和酸桃(Fantasia)杂交所得的F₂群体分析了控制桃果实酸甜度的数量性状位点(QTL),用同工酶、RFLP、RAPD和AFLP构建了包括12个连锁群的遗传图谱,其中控制果实pH值、果酸、可溶性糖含量等都有至少1个QTL被检测,并发现它们大多都在第二连锁群上^[25]。近年来,在苹果、李、杏、葡萄、核桃、香蕉、樱桃、西瓜及其他园艺植物上也利用RAPD标记进行了分子遗传图谱构建。

3 结语

分子标记及其连锁遗传图无论在理论上或实践中都十分有价值。但也存在一些问题:关于园艺植物经济性状的标记报道较少,而对控制园艺植物重要农艺性状的数量性状基因研究更少;遗传连锁图上标记间的距离大;采用的标记多为RAPD标记,然而RAPD标记本身并不稳定。鉴于此,应注重寻找与重要农艺性状连锁更为紧密的分子标记,注重数量性状的研究,加强QTL作图;提高分离群体的可靠性,选用多种分子标记进行研究,增加图谱的饱和度;开辟果树基因定位及功能鉴定新途径;将传统育种方法与分子标记相结合,加速培育果树新品种。随着分子生物学的发展,分子标记在果树品种改良、品种鉴定、品种保护、资源创新及辅助选择育种等方面的应用具有广阔的发展前景,将大大缩短育种周期、加速育种进程。

参考文献

- [1] PATRICK J C, BRUCE W. Identification and genetic relatedness among pecan cultivars detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. *HortScience*, 2000, 35(3): 404.
- [2] 彭建营, 束怀瑞, 孙仲序, 等. 中国枣种质资源的RAPD分析 [J]. *园艺学报*, 2000, 27(3): 171-176.
- [3] 沈向, 郭卫东, 吴燕民, 等. 杏43个品种资源的RAPD分类 [J]. *园艺学报*, 2000, 27(1): 55-56.
- [4] 张立平, 林伯年, 沈德绪, 等. 葡萄属RAPD分类研究 [J]. *园艺学报*, 1998, 25(2): 191-193.
- [5] OMURA M, HIDAKA T, NESUMI H, et al. PCR markers for citrus identification and mapping techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees [M]. Japan: FTRS, 1993, 66-73.
- [6] HARADA T, MAISUKAWA K. DNA RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus* [J]. *Euphytica*, 1993, 65(2): 87-91.
- [7] DENG Z N, GENIILE A, NCCLOSI E, et al. Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers [J]. *J Hort Sci*, 1995, 70: 117-125.
- [8] 罗正荣, 米森敬三, 杉浦明. 应用RAPD技术进行柿种类和品种鉴定 [J]. *日本园艺学会杂志*, 1995, 64: 535-541.
- [9] GALDERISI V, CIPOLLAR M, BERNARDO G, et al. Identification of the edible fig 'Banco del Glerto' by random amplified polymorphic DNA analysis [J]. *HortScience*, 1999, 34(7): 1263-1265.
- [10] 王跃进, LAMKANRA O, SCHELL L, 等. 用RAPD分析鉴定葡萄属远缘杂种 [J]. *西北农业大学学报*, 1997, 25(3): 16-20.
- [11] HOKANSON S C, KELMING G, ELIZABETH L O, et al. Effectiveness of RAPD markers at distinguishing somaclonal variants of strawberry derived from meristem tip culture [J]. *Hort Science*, 2000, 35(3): 394.
- [12] 栾雨时. 利用RAPD技术快速鉴定番茄杂种纯度 [J]. *园艺学报*, 1998, 25(3): 247-251.
- [13] MICHELMORE R W, PARANI, KCSSEH 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 population [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88: 9828-9832.
- [14] WANG Y J, LAMKANRO O, LUJ, et al. Identification of genetic marker linked to seedless genes in grape using RAPD [J]. *西北农业大学学报*, 1996, 24(5): 1-10.
- [15] WANG Y J, LAMKANROO. Analysis of sequencing the RAPD marker linked to seedless genes in grapes [J]. *西北农业大学学报*, 1997, 25(4): 1-5.

(上接第3823 页)

- [16] STREEMJ M, BENHAYYI MG, SHEGELROY P. Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape[J] . J Amer Soc Hort Sci , 1996 ,121(5) :758- 763 .
- [17] TARTARINI S. RAPD markers linked to the Vf gene for scab resistance in apple[J] . Theor Appl Genet , 1996 , 92(7) :803 - 810 .
- [18] YANG H, KORBANS S. Screening apples for CPD20/ 600 using sequence specific primers [J] .Theor Appl Genet , 1996 , 92(2) :263 - 266 .
- [19] MARKUSSENT. Identification of PCR- based markers linked to the powdery - mildew- resistance gene H - 1 from *Malus robusta* in cultivated apple[J] . Hort Breeding , 1995 , 114 :530 - 534 .
- [20] BADENES L M, HURTADO MA, SANZ F, et al . Searching for molecular

markers linked to male sterility and self - compatibility in apricot [J] . Hort Breeding , 2000 ,119:157 - 160 .

- [21] 郜刚, 屈冬玉, 连勇. 马铃薯青枯病抗性的分子标记[J] . 园艺学报, 2000 , 27 (1) : 37- 41 .
- [22] HEMMAT M, WEEDEN NF, MANGANARIS A G, et al . Molecular marker linkage map for apple [J] . The Journal of Heredity , 1994 , 85(1) :4 - 11 .
- [23] LODH MA, DALY MJ, YE G N, et al . A molecular marker based linkage map of *Vitis*[J] . Genome , 1995 , 38 :786 - 794 .
- [24] DIRLEWANGER E, BODO C. Molecular genetic mapping of peach[J] . Euphytica , 1994 ,77(1/ 2) :101 - 103 .
- [25] DIRLEWANGER W. Detection of QTLs controlling peach fruit acidity and sweetness[J] . Acta Horticulture ,1998 ,465 :89 - 98 .