

# 我国果树种质资源鉴定技术的研究进展

赵敏 (河南石油勘探局五一社区, 河南南阳 473132)

**摘要** 对应用于果树种质资源鉴定的各种方法进行了系统的论述, 介绍了传统的形态学、孢粉学、细胞学、蛋白质凝胶电泳方法以及目前5种重要的DNA指纹图谱方法, 即RFLP、RAPD、小卫星DNA(VNTR)、微卫星DNA(SSR)和AFLP的特点以及在果树种质资源鉴定方面的应用。

**关键词** 果树; 种质资源鉴定技术; 蛋白质凝胶电泳; DNA指纹图谱

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05414-03

## Research Progress in the Identification Technology of Fruit Tree Germplasm

ZHAO Min (Oil Exploration Bureau of Wuyi Community in Henan, Nanyang, Henan 473132)

**Abstract** Various methods applied in identification of fruit tree germplasm were discussed in the paper. Applications and restrictions of the traditional morphological, palynological, cytological and protein gel electrophoresis methods were summarized. Moreover characteristics and applications of the newly developed DNA fingerprinting methods in this field such as RFLP, RAPD, VNTR, SSR and AFLP were also reviewed.

**Key words** Fruit tree; Germplasm identification technique; Protein gel electrophoresis; DNA fingerprinting

果树种质资源不仅包括栽培品种, 也包括半栽培品种和野生果树的种、变种和变型, 是遗传上高度杂合性的多年生木本植物, 而且在生产上重要的果树品种一般都以嫁接、扦插、压条等方式进行无性繁殖, 果树种质鉴定尤其是优良类型和品种的鉴定已成为果树育种的基础和发展生产的前提。随着经济的发展, 许多果树新品种不断地被选择和创造出来。

### 1 传统的果树种质鉴定方法

**1.1 形态学方法** 形态学性状便于观察和获取, 性状变化复杂多样, 具有最长的研究历史。目前大多数果树种质鉴定依据所研究树种最鲜明的形态特征进行区分、分类和命名。但是形态性状尤其是营养器官易受环境修饰而发生变化, 而且品种水平上的形态差别很少, 有时无法进行品种鉴定。由于标记数量的限制, 形态学标记已明显跟不上对越来越多的自然选育和人工培育的果树品种进行鉴定的要求。

**1.2 孢粉学方法** 花粉的形态特征受植物基因型控制而不受外界条件影响, 是探讨植物起源、演化及亲缘关系的重要特征之一。许多学者已应用孢粉学方法对梨属<sup>[1]</sup>、枣<sup>[2]</sup>、猕猴桃<sup>[3]</sup>等果树树种进行了较为详细的研究。国外一些学者<sup>[4]</sup>提出建立“花粉指纹档案”, 对于品种识别、原始材料管理无疑是有用的。在应用孢粉学方法进行果树种质鉴定分类时要注意制样方法的影响<sup>[5]</sup>, 并且即使同一品种内花粉粒之间也存在个体差异。所以如果仅以个别花粉性状的差异作为分类鉴定依据有时并不可靠, 必须结合其他指标进行综合考察。

**1.3 细胞学方法** 细胞学方法是从20世纪30年代兴起的一种利用染色体数目、核型、分带带型、减数分裂的行为分析等进行植物分类的方法。该方法也被应用到果树资源鉴定中<sup>[6]</sup>。由于多倍体在果树育种和应用中的重要性, 对染色体进行观察可直观地发现和鉴定果树种质资源中的多倍体, 从而迅速地应用到果树遗传育种和生产中。许多学者就是在他们的染色体研究中发现了多倍体<sup>[7-8]</sup>。染色体研究的实验条件相对简单, 结果快, 尤其是结合分带技术可揭示出

大量染色体结构的变异, 但由于染色体制片技术和分辨率的限制, 核型分析应用于品种鉴定还有一定的难度, 对于大多数具有小染色体和结构差异较小的果树植物来说, 染色体核型分析还不足以达到进行品种鉴定的目的。但随着植物染色体制片技术的日益成熟和各种分带技术、染色体原位杂交技术等的发展和运用, 细胞学方法在将来可能会成为果树品种资源鉴定的一个有效手段。

### 2 蛋白质凝胶电泳和果树种质鉴定

**2.1 常用的凝胶电泳方法** 根据分析方法的不同常用的凝胶电泳方法可分为两种主要类型: 蛋白组分的直接比较。该分析中, 某两个品种间的差异标准即为某一位置上某一条或一组蛋白质条带的“有”或“无”。蛋白质带型发生频率的间接比较, 即通常所说的同工酶或等位酶分析, 是在若干个或一个位点上统计某一酶带的出现频率。一般说来第1种方法对于由近交系、F<sub>1</sub>代杂种和无性系组成的品种群更加适合, 而第2种方法可用于异花授粉的种质资源。

**2.1.1 蛋白质分析。**最广泛地用于种质鉴别的蛋白即种子蛋白, 其组分的差异可反映出基因型的不同, 因而可用作品种的“生化指纹”。种子蛋白分析在大多数作物的品种鉴定和品质评价方面得到了广泛应用<sup>[6,9]</sup>。在一些重要作物上, 国际种子检验学(ISTA)已颁布了应用PAGE方法鉴定品种的标准程序, 许多国家已建立了种子蛋白指纹图谱数据库<sup>[10]</sup>。在果树上, 朱立武<sup>[11]</sup>用叶片和种子蛋白质为材料对柑橘进行了研究, 肯定了叶片蛋白质电泳带型在种间的差异和种子蛋白质电泳带型在种以下分类单元间的差异。

**2.1.2 酶分析。**酶电泳技术直到20世纪70年代才开始应用于植物研究, 但其重要性已受到广泛关注, 并成为目前果树品种鉴定、雌雄株鉴别、研究系统与演化的重要手段。果树同工酶研究几乎涉及到所有种类的树种, 目前经常测定的酶系统估计也有30种之多。应用同工酶进行果树资源研究有如下优点: 避免趋同进化和性状功能相关等问题; 谱带简单明确, 较少主观性; 受环境影响较少; 不存在加权问题; 共显性, 可区分杂合和纯合; 实验设备简单, 材料来源丰富, 成本较低, 分析时间快且结果便于比较。

自从Esen最早在果树分类上应用同工酶技术以来, 同

作者简介 赵敏(1980-), 女, 湖北随州人, 助理农艺师, 从事园林绿化工作。

收稿日期 2007-03-18

工酶分析在越来越多的果树树种中得到了广泛的应用<sup>[12]</sup>，国内学者也利用多种酶系统在枣<sup>[13]</sup>、杏<sup>[14]</sup>等树种中开展了研究，取得了较好的结果。但国内有些学者大多是利用过氧化物酶同工酶(POD)进行研究，这时应考虑到以POD为代表的同工酶遗传背景较为复杂，对于最终获得的谱带应做认真仔细的分析。因为同工酶的谱带型式会因构成该酶多态数目、编码基因位点数目及分析个体基因组成而有很大变化，因此凝胶上的酶谱这种电泳表型既有它的遗传背景，也会受生理和人为等因素的影响，并不能直接反映DNA水平的情况。所以，进行特定的遗传分析是酶电泳技术不可缺少的步骤<sup>[15]</sup>。

**2.2 其他凝胶电泳方法** 还有其他一些凝胶电泳方法，如SDS-PAGE方法，等电聚焦电泳(IEF)，双向电泳等，比传统的蛋白质和同工酶电泳方法有更高的分辨率和重复性，在许多作物上已有大量应用<sup>[9]</sup>。但这些方法较复杂，还有的成本较高，因而在果树上应用较少。

### 3 DNA 指纹图谱分析方法

“DNA 指纹图谱”一词可泛指一切具有某一种质特异性的谱带，借助指纹图谱，可区分不同的种质资源。指纹图谱是鉴别品种、品系的有力工具。20世纪80年代中后期，DNA分析技术开始大量应用于植物学研究，一些以前用蛋白质电泳和酶电泳等无法解决的问题也迎刃而解。与形态性状、细胞学性状、孢粉学性状以及蛋白质多态性状相比，DNA指纹图谱具有无与伦比的优越性：它们对表型无影响，而且基因组DNA的变异极其丰富，在发育的不同阶段，不同组织的DNA都可用于分析，也使得对果树这样生长周期长的植物进行早期鉴定成为可能。近年来随着分子生物学的迅猛发展，许多DNA分析技术相继涌现并迅速用于植物研究中。

**3.1 RFLP 分析** RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)限制性内切酶酶切片段长度多态性，是近年来发展起来的以生物基因组DNA序列变异为基础，研究不同基因组差异的一项新技术。RFLP不受显隐性关系、环境条件和发育阶段的影响；在数量上不受限制，检测方便；具有稳定遗传和特异性；而且用于检测RFLP的克隆探针可随意选择，可以是核糖体DNA，叶绿体DNA或总DNA，这样就可产生大量的多态性，为研究植物类群特别是属间、种间甚至品种间的亲缘关系、系统发育与演化提供有力的依据。

应用RFLP技术作为遗传工具始于1974年，从80年代起开始应用于植物，之后其他作物中的RFLP研究相继开展，目前主要用于各种植物遗传连锁图谱的绘制和目的基因的标记<sup>[16]</sup>，它在品种鉴定上的应用也已广泛开展起来。RFLP由于技术复杂，所需DNA量大，对所研究对象需要有一定的遗传背景知识，国内在应用RFLP技术进行果树种质资源的研究局限于少数类群如柑橘<sup>[17]</sup>、葡萄属植物<sup>[18]</sup>中。

**3.2 RAPD 分析** RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)随机扩增DNA多态性是J. William和J. Walsh两个研究小组在1990年发展起来的一种新型遗传标记，它是以人工合成的随机引物对基因组DNA进行扩增而产生能显示多态性的DNA指纹图谱。RAPD是一种基于序列的多态性，由于可在无任何分子生物学研究基础的情况下对某一物种进行指纹

图谱的构建、遗传多样性的研究；相对于RFLP来说较经济简便，DNA用量少(ng级)；避免了使用放射性同位素，因而近年来在果树品种资源鉴定方面得到了广泛的应用。

但从文献和笔者的经验来看，RAPD在目前主要存在两个问题：重复性和稳定性较差<sup>[19]</sup>；有许多因素均会影响RAPD的扩增结果，在对果树品种进行RAPD分析之前，要反复进行RAPD反应条件优化实验，以得到令人信服和可靠的结果。RAPD过于灵敏，且一般为显性标记，有时会使遗传分析变得复杂化<sup>[20]</sup>。因为有的RAPD标记不依照预期的遗传样式，在作图和遗传多样性研究中运用RAPD标记时应非常谨慎。

**3.3 小卫星DNA(VNTR)** 1980~1984年，人类遗传学家相继在人体基因组中发现了一些串联重复序列，这些序列由长度为11~60bp的核心序列串联重复而成，后来称之为小卫星DNA。由于重复单位的数目不同和重复拷贝数的等位性不同，使其表现出高度多态性。不同生物、同一生物的不同品种，甚至同一品种的不同个体，其所含小卫星各异，杂交产生的图谱各不相同，谱带遵循孟德尔遗传方式遗传并具有体细胞稳定性。这些特点使之成为目前较先进的遗传标记系统而广泛应用于许多作物的品种鉴定和遗传多样性研究中<sup>[21]</sup>。这一方法国内在果树上还未见有报道。

**3.4 SSR(微卫星)技术** SSR(Length Polymorphism of Simple Sequence Repeat)是一类由几个核苷酸(一般为15个)为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列。植物体内的二核苷酸重复(AT)<sub>n</sub>远比哺乳动物丰富，植物基因组中平均每隔2kb就有一个三核苷酸或四核苷酸重复，且每种类型的SSR在不同的物种中出现的频率不同。SSR多态性的信息量非常丰富，具有所有RFLP的遗传学优点，又比RAPD重复性能好、可信度高，因而是目前遗传标记中的热点。但由于SSR必须针对每个染色体座位的微卫星，发现其两端的单拷贝序列以设计引物，因而给SSR标记的利用带来了一定困难，然而一旦开发出某种生物的SSR标记，就又显现出该标记的利用价值。SSR目前已广泛应用于许多农作物中<sup>[22]</sup>。

**3.5 AFLP 技术** AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)技术是1993年由荷兰生物技术公司KE YGENE的Zabeau和Vos等人发明的，已申请了专利<sup>[23]</sup>。AFLP实际上是RFLP和PCR相结合的一种方法。与RAPD一样，AFLP可用于没有任何分子生物学研究基础的物种，其引物在不同物种间是通用的，被称为一种“半随机”的扩增。一个0.5mg的DNA样品，可做4000个AFLP反应，获得8万个标记，650万条带纹。可见AFLP的多态性非常高。利用放射性标记或银染方法在变性的聚丙烯酰胺凝胶上通常可检测到50~100个扩增产物，而且重复性强，因而非常适合于品种指纹图谱的绘制、遗传连锁图的构建及遗传多样性研究等。多数作物上的研究结果都表明其产生的多态性远远超过了RFLP、RAPD等，目前被认为是DNA指纹图谱技术中多态性最为丰富的一项技术。实际上，AFLP最适的应用范围，就是利用AFLP技术鉴定品种指纹，检测品种的质量和纯度。目前国内在果树上的应用刚刚兴起。祝军<sup>[24]</sup>、宋婉<sup>[25]</sup>分别应用AFLP银染法、荧光法在苹果、枣上做了有益的尝试。

#### 4 讨论

从以上分析中可以看出,指纹图谱分析无疑为果树种质鉴定提供了一种强有力的技术,它的出现为快速、准确地鉴定果树种质资源提供了可靠的手段。除此之外,它们在遗传研究和果树生产中有非常广泛的实际应用,在果树育种中,可作为重要性状遗传标记的来源,为开展用分子标记进行抗性选择育种工作奠定了一定基础;用于野生、栽培果树种以下变种、品种、类型的分类研究。品种的分类问题一直未能得到明确的解决,用于基因组作图,可进行果树种质资源亲缘关系和谱系分析,在收集果树野生、半野生资源中可进行遗传多样性的分析,从而为科学地进行果树种质资源的基因库保护、异地保存提供重要依据,为确定保存种质资源的量的大小、点的选择,最小繁殖群体的确定及核心果树种质的筛选奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 杨槐俊. 孢粉学在部分梨属植物分类研究中的应用[J]. 果树科学, 1985(3): 29.
- [2] 李树林, 曲泽洲, 王永惠. 枣品种资源的花粉学研究[J]. 河北农业大学学报, 1987, 10(3): 1-9.
- [3] 康宁, 王圣梅. 猕猴桃属9种植物的花粉形态研究[J]. 武汉植物学研究, 1993, 11(2): 11-14.
- [4] FOGLE H W. Identification of clones within four tree fruit species by pollen exine patterns[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1977, 102(5): 552-560.
- [5] 陈学森, 郭延奎. 扫描电镜不同制样方法对集中落叶果树花粉形态的影响[J]. 果树科学, 1992, 9(4): 198-202.
- [6] 胡志昂, 王洪新. 蛋白质多样性和品种鉴定[J]. 植物学报, 1991, 33(7): 556-564.
- [7] 俞宏, 董绍珍, 齐荣陵. 苹果属植物染色体观察研究[J]. 果树科学, 1985(1): 20-22.
- [8] 姚家龙, 崔致学. 猕猴桃属植物染色体数目研究[J]. 果树科学, 1988, 5(1): 24-25.
- [9] COOKE R J. Gel electrophoresis for the identification of plant varieties[J]. Journal of Chromatography, 1995, 698: 281-299.
- [10] DRAPER S R. ISIA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986[J]. Seed Sci & Technol, 1987, 15: 431-434.
- [11] 朱立武. 柑橘叶片与种子蛋白质电泳带型分析[J]. 安徽农学院学报, 1988(1): 51-55.
- [12] 成锁占, 杨文衡. 果树资源的同工酶研究进展[J]. 河北农业大学学报, 1988, 11(2): 140-145.
- [13] 曲泽洲, 王永惠. 同工酶在枣品种分类研究中的应用[J]. 河北农业大学学报, 1990, 13(4): 1-7.
- [14] 吕英民, 吕增仁, 高锁柱. 杏品种儿茶酚氧化酶同工酶分析[J]. 果树科学, 1996, 13(2): 105-106.
- [15] 葛颂. 酶电泳资料和系统与进化植物学研究综述[J]. 武汉植物学研究, 1994, 12(1): 71-84.
- [16] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1-10.
- [17] 肖顺元, 张文才. RFLP在柑橘遗传多样性研究上的应用[J]. 果树科学, 1995, 12(1): 1-4.
- [18] 张立平, 林伯年. 葡萄属植物核糖体基因的RFLP分析[J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 385-387.
- [19] JONES C J, EDWARDS K J, CASTAGLIONE S, et al. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories [J]. Molecular Breeding, 1997, 3(5): 381-390.
- [20] HILLAY M, KENNY S T. Anomalies of direct pairwise comparison of RAPD fragments for genetic analysis[J]. Botanical Magazine, 1995, 19(5): 694, 696-698.
- [21] NYBOM H. DNA fingerprinting: A useful tool in fruit breeding[J]. Euphytica, 1994, 77(1-2): 59-64.
- [22] PLASHKE J, GANAL M W, RODER M S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 1001-1007.
- [23] VOS P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [24] 祝军. 苹果、桃基因型DNA水平鉴定和苹果CO基因分子标记的研究[D]. 北京: 北京农业大学, 1998.
- [25] 宋婉, 续九如. AFLP技术在中国枣优良品种鉴定中的应用[M]// 彭士琪, 温陟良. 干果研究进展. 北京: 中国林业出版社, 1999: 242-248.