

DNA 遗传标记技术及其在果树研究上应用

丁晓东

(东北农业大学园艺系·哈尔滨)

一、前言

果树绝大多数种类都为无性繁殖的,因为,其无性系后代在遗传上是保持一致的,从而保证了品种的纯度。然而在实际工作中,由于人为和客观因素的影响,果树品种往往发生混杂和退化现象,给生产造成损失。因此快速有效的苗木鉴别技术是摆在果树工作者面前的一项研究课题。为了克服常规的形态学鉴别技术的局限性以前曾使用同工酶和蛋白电泳技术进行苗木鉴别。种苗蛋白和同工酶作为基因的产物,其结构的多样性在一定程度上能反映生物 DNA 组成上的差异和生物体的遗传多样性,但由于其为基因表达后的产物,仅为 DNA 全部多态性的一部分,而且其特异性易受环境条件和发育阶段的影响,因此对遗传变异的检测远不及 DNA 分析快速、准确、可靠。

DNA 遗传标记较其它遗传标记具有明显的优点。首先,可供探测的 DNA 标记的数量可能是无限的,这是同工酶技术所无法比拟的;其二, DNA 标记不像其它遗传标记那样随组织或发育阶段而异,从植物体任何部位提取的 DNA 均可用于分析,尤其是从幼苗或种子提取 DNA 可进行种苗品质的早期鉴定;第三, DNA 标记不受环境影响,其变异只源于等位基因 DNA 序列的差异。这种稳定性便于揭示品种间的遗传差异而排除了环境差异所造成的表型变异。

二、用于物种鉴别的 DNA 遗传标记技术

(一) RFLP 分析: 限制性内切酶酶切片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, 简称 RFLP), 是指用限制性内切酶处理不同生物个体的 DNA 所产生的大分子片段的大小差异。其原理是植物由于长期进化的结果会在种、属间甚至品种间同源 DNA 序列上的限制性内切酶识别位点上出现差异,或者是由于突变、重组等原因所引起的限制性内切酶识别位点上的核苷酸发生替换、插入或缺失等变化所致。这样,植物 DNA 经适当的限制性内切酶切割形成不同长度的片段,由于电泳迁移率不同,便会在凝胶上形成连续的谱带模型。不同植物个体来源的 DNA 可形

成不同的谱带模型,它们通过与克隆的 DNA 探针进行 Southern 杂交和放射自显影后,就能得到 DNA 的限制片段多态性。这种特定的限制性片段与 DNA 探针的组合便可以做为遗传标记。由于 RFLP 起源于基因组 DNA 的变异,不受显隐性关系,环境条件和发育阶段的影响,具有稳定遗传和专一性的特点;它在数量上不受限制,可随机选取足够数量能代表整个基因组的 RFLP 标记,而且每个标记变异大,检测方便;用于探测 RFLP 的克隆探针可随机选择,可以是核糖体 DNA,也可以是总 DNA。这样就可以产生和获得能够反映种属遗传差异的大量多态性,为研究植物类群特别是属间、种间甚至品种间的亲缘关系、系统发育关系及演化提供有力的证据。因此这种遗传标记技术是进行种及品种鉴别的有效手段。

(二) DNA 指纹技术: DNA 指纹技术 (DNA fingerprinting) 是一种在单一实验中可检测出大量 DNA 位点差异性的分子生物学技术。由核心序列串联重复构成的人体小卫星 DNA 探针,可以同时与众多的基因组的酶切 DNA 片段杂交,得到具有个体特异性的 DNA 图谱。不同物种的生物、同种生物的不同品种,甚至同一品种的不同个体之间,它们所含的小卫星 DNA 都有所差异,杂交产生的 DNA 图谱亦各不相同,就像人的指纹一样,所以把这种具有个体特征和种属特征的 DNA 图谱称之为 DNA 指纹图谱。这种利用人体小卫星 DNA 作为探针,探测不同生物的小卫星 DNA,产生相应的 DNA 指纹图谱的杂交方法称为 DNA 指纹法。DNA 指纹图谱具有高度的特异性,且遵循孟德尔遗传方式遗传。这些特点使 DNA 指纹图谱成为目前最为先进的遗传标记系统。

(三) RAPD 分析: 随机扩增的多态 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA 简称为 RAPD) 是 J. Williams 和 J. Welsh 两个研究小组于 1990 年同时指出的一种运用随机引物扩增,寻找多态性 DNA 片段的遗传标记技术。它是建立在 PCR 技术基础上,以随机的寡聚脱氧核苷酸作为 PCR 反应引物,对基因组

DNA进行扩增而显示多态性的DNA图谱。由于RAPD引物没有特异性,合成一套引物可用于不同生物基因组的分析,其操作简便易行,不需要克隆制备、同位素标记及Southern印迹等预备性工作,且具有分析速度快,所需DNA样品量少等优点,其在植物系统学研究中得到广泛应用,是检测种下变异的一种方便、有效的分子标记技术。尤其可以在对物种没有任何分子生物学研究基础的情况下,对物种进行基因组DNA指纹图谱的构建。

虽然RAPD标记技术在植物系统学研究中得到了广泛应用,但目前的研究多数停留在实验室阶段,将这一技术用于大规模种苗的鉴别迄今未见正式报道,要将这一技术直接用于生产实践中还存在一些问题尚待解决。一是RAPD扩增反应的条件要求苛刻,只有在极严格控制条件下,特异性条带才能重复再现。这种严格的反应条件在生产实践的应用上尚难达到;二是由于扩增反应产物的异源双链经再次扩增导致一些模糊不清的且不稳定的条带出现,这些条带只能通过大量的重复性试验加以排除,这在生产单位的实际操作中也很难做到;三是RAPD扩增产物为显性标记,只能检测一对等位基因的存在,无法鉴别纯合子与杂合子的差异,只能通过单倍体的RAPD分析才能加以克服。这在生产上同样是难以做到的。而果树生产上尤其是鉴别品种间等位基因的不同形式的差异时,RAPD标记无法区分。

三、DNA遗传标记的应用前景

DNA遗传标记技术除了可有效地用于种苗早期鉴定外,在果树生产和研究的诸多方面均可应用。

(一)估测栽培群体的遗传变异:从野生群体中选择培育出的栽培品种往往丢失了许多基因,群体的基因频率和基因型频率均发生了变化。这种种内变异使用同工酶技术鉴别和分析难于获得有明显差别的标记。而DNA标记的高分辨率能帮助研究者发现多基因系统中微效基因的变化,从而揭示选择后的群体与野生群体间的遗传差异,检测选择育种工作的有效性程度。

(二)种质资源的鉴别:果树生产上广泛存在的种质资源鉴别是DNA遗传标记最重要的应用领域。种质资源的鉴别最简单的是无性系间的鉴别,这种类似人类法医的工作是种质资源鉴别的主要方面。此外,估测不同种源群体的基因频率的变化也是种质资源评估的一个重要方面。在实际应用中,鉴别不同来源的种苗,对于适地适树、良种化栽培具有重要意义。

(三)开展果树分子育种研究:对果树种苗开展DNA分子遗传标记技术的研究,将为建立经济性状的连锁标记,克隆有价值的目的基因,开展果树分子育种工作奠定了基础。这些在其它经济植物的研究中已有成功的例子。例如Martin等通过比较蕃茄等位基因系的RAPD标记,分离了同抗Pseudomonas的基因紧密

抗寒苹果新品种宁酥引种简介

曲柏宏 朴一龙 朴红权 王兴国

延边地处位于吉林省东南部的长白山脚下,引种宁酥苹果的图们江沿岸地区,小气候条件好,海拔9~260m,年平均温度4.9~5.6℃,元月平均气温-13℃,极端最低气温-27.3~-32.7℃,有效积温2565~2742℃。1991年春我们从沈阳农业大学园艺系引进抗寒大苹果宁酥低接苗200株(砧木为山丁子),定植于我校果树实验场果园,株行距 2×4 m经4年观察表明,冬季不加任何防寒措施,植株没有冻害发生,生长结果正常。特别是1993年11月份骤然降温,辽宁苹果产区的国光、元帅等严重受冻,我地区的苹果的花芽冻害率平均达30%以上,而我校的宁酥却安然无恙。该品种已作为延边图们江沿岸地区的试栽推广品种,现已达50公顷。现简报几年来对宁酥苹果的引种结果。

1.果实经济性状。宁酥苹果果实圆筒形,平均纵径6.3cm,横径7.4cm,果形指数0.83。果面光滑,果皮底色黄绿,着红色条纹,色泽艳丽。平均单果重151.2g,最大果重192.4g。果心较小,平均纵径1.90cm,横径2.2cm。果皮薄,果肉黄白色,肉质酥脆,多汁,甜酸味浓,有香气,品质上等。采后一个月果实含糖量为9.67%,果肉硬度为9.48kg/cm²,贮至翌年1月末含糖量为11.06%,硬度为8.96kg/cm²。

2.生长结果习性。该品种幼树生长势强,萌芽力与成枝力均强。树冠较紧凑,呈圆锥形。4年生树高2.5cm,干周17.5cm,冠径2.20 \times 2.30cm,新梢平均生长量81.5cm。幼树定植后第3年结果,以腋花芽结果为主,短果枝结果较少,座果率极高,丰产性强。4年生平均株产15.1kg,最高株产25.5kg。

3.物候期。在本地区5月上旬萌芽,5月中下旬开花,8月下旬果实着色,10月初果实成熟,霜后落叶。

4.栽培技术要点。幼树定植时要选壮苗,挖大坑,施足底肥,灌透水,覆膜。管理上注意及时疏果,以增大果个,提高品质。为防止抽条,定植后1~2年以培土、包草防寒为宜。我们认为该品种可以在延边地区小气候条件好的图们江沿岸低接栽培,而在其他较寒冷地区以高接栽培为宜。(延边农学院果林系邮编:133400)

连锁的DNA片段,Klein-Lankhot等采用RAPD方法进行了蕃茄遗传标记,Paran等用分子标记技术定位了莴苣霜霉病病毒抗性基因。此外,利用分子标记技术对主要果树树种及其近缘种进行系统学研究,探明主要经济树种的起源及演化将为常规的杂交育种工作提供基础资料。(邮编:150030)