

桃分子标记研究进展

李靖¹, 尚霄丽¹, 张建鹏², 莫红³, 王政¹

(1. 河南农业大学林学院园艺学院, 郑州 450002; 2. 河南心连心化工有限公司, 新乡 453731; 3. 河南广播电视大学, 郑州 450008)

中图分类号: S662.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2005)06-0007-03

桃属于蔷薇科 (*Rosaceae*) 桃属 (*Prunus*), 起源于我国最古老的果树之一, 栽培历史悠久, 分布十分广泛, 是我国重要的果树种类。它的染色体数目少 ($2n=16$), 基因组小, 含有 0.30 ± 0.02 Pg DNA, 大约有 3.0×10^8 bp, 只有拟南芥基因组的两倍, 是最适合进行遗传学研究的多年生果树种类, 也是目前研究较为深入和广泛的果树种类。分子标记是继形态标记、细胞标记和生化标记之后发展起来的一种较理想的遗传标记形式。分子标记与前三种标记形式相比, 具有以下优点: 它不受环境、季节的限制, 直接以 DNA 的形式表现; 检测位点多、多态性和准确性高。许多分子标记技术体系已相继建立, 例如: 限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 (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)、微卫星 DNA (MS)、数量可变串联重复 (VNTR) 等, 已广泛应用于制作遗传连锁图谱、基因标记定位和克隆、种质鉴定、分子标记辅助选择、遗传多样性分析等多种研究领域。

1 分子标记技术在桃种质资源研究上的应用

目前, 许多果树生产发达的国家都非常重视种质资源的收集、保存和利用工作。随着现代分子生物学发展, 分子标记为种质资源的亲缘演化、分类、种质保存等研究工作提供了有力的依据, 使其能更有效的保护、利用果树种质资源。

1.1 桃属种的系统发育和分类

桃属分为 6 个种, 即普通桃、新疆桃、甘肃桃、光核桃、山毛桃、陕甘山桃, 其中蟠桃、油桃、寿星桃是普通桃的变种。随着分子标记在种质资源研究中的大量应用, 对桃种质资源的分类有了新的认识。杨英军对普通桃、新疆桃、山桃、甘肃桃及部分品种、变种进行多态性分析, 新疆桃被归入普通桃中, 推测它起源于普通桃^[1]。程中平等^[2]也发现新疆桃是普通桃的一个变种, 并且确定了桃种间亲缘演化关系。郭金英等^[3]对 110 份桃种质进行聚类分析, 也把新疆桃归为普通桃。俞明亮等采用 SSR 技术对桃的 6 个种和扁桃进行了鉴定, 发现普通桃与新疆桃的亲缘关系最近, 陕甘山桃与甘肃桃也有较近的亲缘关系, 在相似系数小于 0.589 时, 普通桃、新疆桃、陕甘山桃、甘肃桃 4 个种被聚为一类, 与这 4 个种相近的为光核桃, 其次为山桃, 最远的为扁桃^[4]。

1.2 品种鉴定及分子检索表

桃的栽培历史悠久, 品种繁多, 同物异名、同名异物现象较为普遍, 采用形态学和生化指标来鉴定品种有很大局限性, 而分子标记可从遗传本质上很准确的鉴定品种。Lu 等用 6 个引物 40 个 RAPD 标记做出的 18 个根砧的聚类团与常规系谱遗传分析取得了一致结果。Ouarda 等鉴定了 29 个毛、油桃品种, 除了 Redheaven 和紧凑型 Redheaven 未分开外, 其他品系一一分开。程中平等通过对 14 个蜜桃品种、37 个黄肉桃品种、13 个蟠桃品种、10 个寿星桃品种、19 个油桃品种的基因组 DNA 扩增出的 180 个位点进行聚类, 并运用特殊谱带, 建立了各个桃种的分子检索表, 提出了优先保存的种质。

1.3 种质资源的遗传多样性

桃多采用无性繁殖, 有很高的遗传多样性, 分子标记推进了种质资源的遗传多样性研究。Marilyn 等在树状图的 12 个聚群中, 90 个美国品种、自交系和欧洲、拉美的品种、自交系形成了 3 个聚群, 来自印、巴、俄、中的 13 个品种属于其他 9 个聚群, 因此美国品种的种质变异十分有限, 而亚洲桃的种质资源十分丰富。程中平等对砧木类、寿星桃类、碧桃类、垂枝桃类、红叶桃类、硬肉桃类、蜜桃类、水蜜桃类、蟠桃类、油桃类和黄肉桃类进行分析发现, 寿星桃、垂枝桃、红叶桃和碧桃为较原始类, 而硬肉桃、蜜桃、水蜜桃、蟠桃、油桃和黄肉桃为较进化类。在遗传多样性方面, 砧木类最高; 红叶桃、蜜桃、蟠桃和黄肉桃次之; 寿星桃、碧桃、垂枝桃、硬肉桃和水蜜桃较低。

2 质量性状基因定位

质量性状基因常由单个或少数基因控制, 应先找到与目的基因紧密连锁的分子标记, 然后利用相关软件进行作图, 分子标记与目标性状基因连锁的紧密程度越高, 结果就越准确, 其利用价值也越大。

农作物和蔬菜作物在寻找与目的性状相连锁的分子标记时, 通常用经过多次回交筛选得到的近等基因系 (near isogenic lines NIL) 为研究材料, 株系间的差异只在于某一目的性状, 因此利用这种材料很容易找到与目的性状紧密连锁的分子标记。因多年生果树要建立这样的群体材料几乎不可能, Michelmores 等建立的“混合分离分析”法 (bulk segregant analysis BSA) 很好地解决了这一困难, 这一方法的理论基础是: 两亲本分别含目标性状的显隐性基因型, 将后代分成两组, 一类含有目标性状, 另一类不含目标性状, 对两组的 DNA 进行多态性比较, 就极可能找到与目标性状紧密连锁的分子

标记。Chaparro 利用这种方法,发现枝下垂性状(We)与白花性状(w)连锁,连锁距离 33 cM;重瓣花(DI)与圆柱形(Br)连锁,连锁距离 10 cM;黄肉性状(Y)与苹果酸脱氢酶位点(Mdh1)连锁,连锁距离 26 cM;柳叶形(Wa)与一个新的矮化基因(DW₃)紧密连锁,遗传距离 0.4 cM;并且发现‘White Glory’拥有一个雄性不育位点(Ps₂),Ps₂与以前报道的Ps基因是非等位的,Ps₂与枝下垂、白花基因连锁,连锁距离分别为 15.5 cM 和 25.3 cM。Warburton 研究了果肉质、花粉育性和树体高矮和 3 个同工酶位点与 RAPD 标记间的连锁关系,并将黄肉基因(Y)和 3 个同工酶位点定位到桃的 RFLP 连锁图上。Salesses 等筛选到与抗根癌线虫连锁的 6 个标记,并且有两个标记位于基因两侧,遗传距离为 2.9 cM。

近年来,我国也进行了桃有毛/无毛、白肉/黄肉等基因的分标记定位研究。杨英军等^[5]以桃品种京玉和美味的正反交后代 69 株为试验材料,获得控制桃果实性状有毛/无毛、白肉/黄肉的 RAPD 分子连锁标记。由于 RAPD 技术稳定性低,也不能满足育种工作的需求,所以有必要将其转化为准确、稳定的 SCAR 标记。高慧敏等^[6]成功的完成了白肉基因(Y)和离核基因(F)的 RAPD 标记向 SCAR 标记的转化。

3 连锁图谱的构建

果树属于多年生植物,由于世代周期长及其基因型的高度杂合性,因而选育一个新品种比其它作物所费时间长,要求后代群体多,所花费资金也相对较高。分子遗传作图不仅在理论上而且在育种实践上有十分重要的意义和使用价值。通过构建与目的基因紧密连锁的分子标记的遗传图谱,为育种者指明了到达目标的最佳路径。果树植物分子遗传图谱不仅为育种者提供了一份基本资料,还可利用分子标记开展早期选择,可大大提高育种效率,加速育种进程,缩短育种周期,节省财力和物力。此外,人们利用已构建的果树植物遗传图谱,以与目标性状紧密连锁的标记为起点通过染色体步移(chromosome walking)技术,分离并克隆了目标基因^[7]。

桃作为遗传基础较简单的树种,它的连锁图谱研究工作进行的较为深入和广泛,特别是在美国和欧洲国家开展了大量的构建图谱工作,现列举已报道的桃遗传连锁图构建情况。

Sosinski B 等以 New Jersey × KV77119 的 F₁ 代及其后代为材料构建的,柱型(Pi/Br)、矮生(Dw)及紧凑型(Ct)等性状上发生了分离,利用 F₁ 中 4 株自交产生 71 株 F₂ 代,该群体在冠型及果肉颜色(Y)、花大小(Sh)、花瓣数(DI)和颜色(W)这些性状上发生了分离。该图谱覆盖了 540 cM,标记间平均距离 7 cM。

Rajapakse 等以‘Baily’和‘Suncrest’的 F₂ 代作为作图群体,分析了 145 个标记,包括 51 个 RFLP 标记、12 个 RAPD 标记和 82 个 AFLP 标记,果肉色和粘核在该群体发生了分离。该图谱覆盖 926 cM,标记间平均距离 6 cM。此外,对影响果实品质的 5 个数量性状(大小、重量、果汁 pH、含糖量、可溶性固形物)进行了 QTL 定位。

第三张连锁图是针对根结线虫的抗性进行作图。该图谱选用砧木材料‘Lovell’×‘Nemared’的后代进行作图。用 21

个引物组合共扩增出 169 个 AFLP 标记,其中 157 个标记构建了 15 个连锁群,覆盖近 1 300 cM,找到了与抗根结线虫的两个基因(Mi, Mij)紧密连锁的两个 AFLP 标记,分别相距 3.4 和 6.0 cM。

研究者们对这三张连锁图用共有标记进行了整合,创建了 8 个连锁群,包括 209 个标记,72 个 RFLP 标记、112 个 AFLP 标记、1 个 SSR 标记、18 个 RAPD 标记和 6 个形态学标记,覆盖 450 cM,标记间平均距离 2 cM。

Chaparro JX 等,对 9 个桃种内杂交的 F₂ 后代群体进行了研究,分析了两个同工酶位点(Cat1 和 Mdh1)和 14 个形态学位点,包括重瓣花(DI)、柱形(Br/Pi)、红叶(Gr)、白花(W)、果实表皮茸毛(G)、黄肉(Y)等,以及 83 个 RAPD 标记之间的连锁关系。在其中的 NC174RL× Pillar F₂ 后代群体中,所有的 RAPD 标记、Mdh1 和 4 个形态学位点,分为 12 个独立的连锁群。

4 数量性状的定位(QTLs)

作物中大多数重要的农艺性状、经济性状和农业生物学性状如产量、生育期、抗逆性及萌芽期等都是数量性状。与质量性状不同,数量性状受多基因控制,控制数量性状的基因称为多基因或微效基因,它们在染色体上的位置称为数量性状基因座(QTL)。遗传基础复杂,表现型与基因之间没有明确的对应关系。由于数量性状的广泛存在,受到植物学家、果树育种学家的普遍重视。

Dirlwanger 等利用桃品种 Summergrand 与 *P. davidiana* 杂交后代 77 株群体为材料构建连锁图,发现在亲本 *P. davidiana* 上有 1 个主效应的 QTL 和 5 个次效应的 QTLs 共同控制抗白粉病的基因,它们位于不同的连锁群上;而在亲本 Summergrand 上发现只有 3 个起次要作用的 QTLs 证明抗白粉病不是一个单基因控制的性状,而是由至少一个主基因与几个次要基因共同控制的。Qnarta 等^[8]建立的遗传图谱,包括 10 个 RFLP 标记、26 个 RAPD 标记,8 个连锁群,总长 257 cm(厘米),标记间平均相距 7.6 cm(厘米);并且将叶腺形、粘核基因分别定位在第 7 条和第 4 条连锁群上,同时还对抗白粉病、树形、开花及成熟期等性状进行 QTLs 分析,在第 7 条连锁群上发现一个抗白粉病的主基因,它与形态特征叶腺形紧密连锁。Vruel 等^[9]对控制抗桃卷叶病的 QTL 进行了作图,包括 9 个连锁群,发现抗桃卷叶病的 QTLs 分布在 6 个连锁群上,其中两个稳定表型效应的 QTLs 被分别定位在第 2 和第 3 条连锁群上。Sosinski 等确定了影响可溶性固形物、pH、耐冷、成熟与果实大小的 12 个 QTLs,其中 7 个 QTLs 定位到复合连锁图上。

桃果实的甜酸是影响其风味品质和经济价值的重要因素,它是杂交育种选择中一个重要的衡量标准。在以往的研究中,对果实甜酸性状的遗传研究一直非常有限。

吴俊等^[10]通过对果实非酸/酸性性状连锁的分析,其中与非酸/酸基因隐性位点紧密连锁的两个标记,分别来自引物组合 E-TA/M-CTC、E-AT/M-CTA,连锁距离分别为 1.47 cM、2.99 cM;引物组合 E-ACT/M-CAT 扩增的多态性片

段与非酸/酸基因显性位点连锁, 连锁距离为 16.2 cM。Dirlewanger 等确定了果实 pH 值、糖(蔗糖、山梨醇糖、果糖)、有机酸(苹果酸、柠檬酸、奎尼酸)的 QTLs, 所有果实成分的 QTLs 在第 5 条和第 6 条连锁群上均有分布。果实 pH 值的 3 个 QTLs 分别位于第 5、6 和 8 条连锁群上, 且第 5 连锁群上的 QTL 对 pH 值的影响要低于第 6 条(1995 年)和第 8 条(1996 年)连锁群上的 QTLs。苹果酸 3 个 QTL 分别位于第 1、5、6 连锁群上, 它们均表现出对该性状有较大的影响; 而奎尼酸在不同的年份 QTL 位于不同的连锁群上。吴本宏等^[1]也对桃的糖酸品质性状进行了基因定位, 糖酸性状的 QTL 数目、单个 QTL 的加性效应及贡献率因年份不同而有所差异, 但有些 QTLs 在两年中稳定表达; 染色体 7 上存在影响蔗糖、葡萄糖、果糖、山梨糖醇、柠檬酸和奎宁酸的 QTLs, 除了染色体 7 上影响葡萄糖和果糖的正效 QTLs 外, 染色体 1 上还存在着影响果糖的贡献率高达 46.1% 的负效 QTL; 染色体 3 和 5 上均存在影响苹果酸和柠檬酸含量的 QTLs, 染色体 3 上几乎分布了所有酸组分(苹果酸、柠檬酸、奎尼酸)的正效 QTLs。

5 存在问题及展望

桃起源于我国, 有丰富的种质资源和育种经验, 但在基础研究方面和国外有很大的差距, 这在很大程度上制约了资源的利用和保存, 也制约了品种选育工作的速度。欧洲、美国和日本都相继启动了桃基因组研究计划, 国外先后发表了十多张桃遗传连锁图, 而国内尚未公开发表一张桃遗传连锁图, 研究进展远远落后于先进国家研究水平。

分子标记辅助的 QTL 定位是新兴研究领域, 进展非常快, 每年发表的有关 QTL 定位研究的文献逐渐增多。虽然目前 QTL 定位主要只是初级定位, 还很少能做到精细定位, 但已可以把控制一个复杂性状的多个 QTL 分解开来, 并且确定

各 QTL。随着作物 QTL 定位研究的深入, 特别是更为饱和的遗传图谱的构建以及更为有效的统计分析方法的提出, 可以预期 QTL 定位研究将可在 QTL 精细定位、分子标记辅助 QTL 选择以及 QTL 克隆分离等方面分阶段实现目标。

参考文献:

- [1] 杨英军, 张开春, 林珂. 常见桃属植物 RAPD 多态性及亲缘关系分析[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(2): 187~190.
- [2] 程中平, 陈志伟, 胡春根, 等. 利用分子标记对桃属植物的识别及其亲缘关系分析[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(3): 199.
- [3] 郭金英. 桃种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2002.
- [4] 俞明亮, 马瑞娟, 许建兰, 等. 桃种间亲缘关系的 SSR 鉴定[J]. 果树学报, 2004, 21(2): 106~112.
- [5] 杨英军, 张开春, 李荣旗, 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.
- [6] 高慧敏. 桃(*Prunus persica* (L.) Batsch) 白肉基因(Y)和离核基因(F)的 SCAR 标记转化[D]. 保定: 河北农业大学, 2002.
- [7] Patocchi A, Gianfranceschi L, Gessler C. Towards the map-based cloning of Vf. fine and physical mapping of the Vf region[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99(6): 1012~1017.
- [8] Quarta R, Dettori M T, Sartori A, et al. Genetic linkage map and QTL analysis in peach[J]. Acta Hort, 2000, 521: 233~241.
- [9] Viruel M A, Madir D, Dirlewanger E, et al. Mapping quantitative trait loci controlling peach leaf curl resistance[J]. Acta Hort, 1998, 465: 79~87.
- [10] 吴俊. 桃(*Prunus persica* (L.) Batsch) 果实非酸/酸性状分子标记的筛选及遗传图谱的构建[D]. 泰安: 山东农业大学, 2003.
- [11] 吴本宏. 桃糖酸品质的影响因素及糖酸分子标记的初步定位[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.

注: 本文作者还有王珂¹

有些农户购买的农药尚未用完, 在冬季需妥善保存好农药, 避免农药挥发失效和人畜中毒事故的发生, 保存农药须注意以下问题。

1 保存好农药的标签及使用说明书, 对已破损的瓶袋等包装要及时更换, 可湿性粉剂农药要注意密封, 以防吸湿后结块失效, 对标签已落或模糊不清的农药, 必须重新用纸写明品名、用法、用量、有效期限、使用范围, 贴于瓶上或袋子上以备正确使用。

2 要注意保持温度, 大多数粉剂农药在高温情况下质量容易受影响, 温度越高农药越容易融化分解挥发, 甚至燃烧爆炸, 一些乳剂农药在遇到高温后容易破坏其乳化性能, 降低药效, 而有些瓶装液体农药当遇到低温后容易结冰, 形成块状, 或使瓶子冻裂, 在保管这类农药时应保持室内温度在 1℃以上。另外, 辛硫磷农药怕光照, 长期见光曝

晒, 会引起农药分解变质和失效, 在保管时要避免高温和日晒。

3 仔细阅读使用说明书, 把已失效的农药采取深埋处理, 切不可乱丢乱放。敌敌畏、乐果、辛硫磷等一些农药易挥发失效, 造成空气污染, 保管时一定要把瓶盖拧紧, 实行密封。

4 农药不能与粮油、豆类、种子以及蔬菜同室存放; 乳油剂和烟熏剂农药不能和火柴、机油、鞭炮等易燃易爆物品放在一起, 更不能存入在人、畜禽附近, 特别要防止小孩接触以免发生事故。

5 粉剂农药和植物调节剂, 很容易吸潮结块, 所以, 保管存放农药的场所应当保持干燥, 严防漏雨飘雪。还要留有窗户, 以便通风换气, 保持相应湿度在 75% 以下。

(吉林省长岭县巨宝山镇农业站, 131533)

保存农药五注意

钟 华