

# 果树分子遗传图谱研究进展

高 佳, 汤浩茹, 董晓莉, 罗 娅

(四川农业大学 林学院园艺学院 四川 雅安 625014)

**摘 要:** 概述了果树分子遗传图谱构建的理论基础、一般程序和方法, 针对作图群体类型、群体大小的确定、分子标记技术的选择和偏分离标记位点的处理等问题进行了讨论。介绍了质量和数量性状基因位点定位、基因组比较作图、标记辅助选择育种和基因定位克隆技术在果树分子遗传图谱上的应用及其所构建的分子遗传图谱, 指出了今后果树分子遗传图谱研究的重点。

**关键词:** 分子遗传图谱; 基因定位; 比较作图; MAS; 基因克隆

**中图分类号:** Q 946.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)10-0044-07

果树是一类重要的经济作物, 在世界农业生产中占据着十分重要的地位。随着社会经济的发展和人们生活水平的提高, 果树生产对品种的要求越来越高。由于大多数果树为多年生木本植物, 其童期长, 遗传背景复杂等, 致使果树优良种质的鉴定和品种的遗传改良较为困难。近年来, 随着多种遗传标记技术的研究和发展, 构建与重要农艺性状紧密连锁的遗传图谱 (genetic map), 为果树优良种质的鉴定、筛选和克隆以及优良新品种的培育提供了新的技术手段。遗传图谱又称为遗传连锁图谱 (genetic linkage map), 是指通过遗传重组所得到的基因在染色体上的线性排列图<sup>[1]</sup>。绘制遗传图谱的方法虽然很多, 但是在 DNA 多态性技术未开发前, 由于可利用的遗传标记较少, 因而绘制的遗传图谱很少。随着 DNA 多态性技术的开发, 可利用的遗传标记迅速扩增。以 DNA 多态性标记所构建的遗传图谱称为分子遗传图谱。根据查阅国内外大量文献, 结合自身工作实际, 对果树分子遗传图谱构建的理论基础、一般程序和方法以及所取得的成果作以概述, 以期为该领域的研究提供参考。

## 1 果树分子遗传图谱的构建

### 1.1 构建果树分子遗传图谱的理论基础

多数植物分子遗传图谱的构建是以连锁遗传中染色体的交换与重组为基础, 通过连续多次两点或三点测

验等方法计算出交换值, 确定位于同一染色体基因的相对位置和距离, 绘成连锁遗传图。果树为多年生木本和藤本植物, 其个体寿命长, 且多数为异交植物, 基因组高度杂合, 因而很难通过杂交获得纯系, 难以进行大批量的测交试验, 使得遗传图谱的构建一度陷入困境中。针对这种情况, Weeden 等<sup>[2]</sup> 提出“双假测交” (double-pseudotest cross) 理论, 将两个杂合体双亲均看作回交一代 (BC<sub>1</sub>) 群体, 并视对方为测交隐性亲本。因为两亲本杂交得到的 F<sub>1</sub> 代群体遗传位点已经产生分离重组, 一些分别包括了双亲特有遗传标记的位点, 对亲本而言为纯合型, 在 F<sub>1</sub> 代群体中呈 1:1 分离, 相当于“测交”, 可用于构建两亲本的分子连锁图; 另一些仅发生在双亲共有标记上的位点, 对亲本而言为杂合型, 在 F<sub>1</sub> 代群体中呈 3:1 分离, 可用于构建两亲本共同的分子连锁图, 并可用于判断双亲间的同源连锁群。通过“双假测交”法, Hemmat 等<sup>[3]</sup> 和 Yamamoto 等<sup>[4]</sup> 已构建了多种果树的分子遗传图谱。不仅如此, 目前多数木本植物所构建的分子遗传图谱也都采用“双假测交”法<sup>[5]</sup>。

### 1.2 构建果树分子遗传连锁图谱的一般程序和方法

遗传图谱的构建一般要经过作图群体的创建、筛选分离标记和遗传标记连锁分析等三个步骤。在遗传图谱构建中, 作图群体类型及大小、遗传标记的选择和分离标记的处理等是影响图谱质量的重要因素。

**1.2.1 杂交亲本的选择** 杂交亲本的选择将直接影响到构建分子遗传图谱的难易和所构建图谱的适用范围<sup>[6]</sup>。根据不同的研究目的和不同的物种, 选取的杂交亲本不同。考虑亲本间多态性差异与可育性的同时, 应尽量选取亲缘关系相对较远、遗传差异性大和分子标记多态性强的材料作为杂交亲本。同时, 也可选用几个不同的组合分别进行遗传作图, 以达到相互弥补的目的<sup>[7]</sup>。就目前已构建的图谱来看, 如果以筛选优良性状为目的开展基因定位和克隆, 多采用表型、性状或抗逆

**第一作者简介:** 高佳 (1983-), 女, 果树学硕士, 研究方向: 果树种质资源遗传育种。

**通讯作者:** 汤浩茹。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (30671454); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-04-0905); 高等学校全国百篇优秀博士学位论文作者专项基金资助项目 (200253); 四川省重点实验室专项 (2006ZD004)。

**收稿日期:** 2007-06-25

性上具有显著差异的品种进行杂交,如 Hurtado 等<sup>[8]</sup>利用抗洋李痘疱病毒 (PPV) 性状差异明显的两个栽培品种 ‘Goldrich’ 和 ‘Valerciano’ 构建了杏的分子遗传图谱,并进行了基因定位;如果以研究进化关系和比较种间遗传差异为目的,主要用于比较作图,则可采用不同种间或属间具有代表性的果树种类进行构图,如 Lambert 等<sup>[9]</sup>采用李属中几个不同的种进行了比较作图,并讨论了它们之间的亲缘关系。

**1.2.2 作图群体类型的特点及选取** 目前常用于构建果树分子遗传图谱的作图群体有  $F_1$  群体、 $F_2$  群体和回交 ( $BC_1$ ) 群体等。 $F_1$  群体适合于杂合度较高的树种,建群时间短,且能够同时对双亲作图,具有永久性。 $F_2$  群体适合于杂合度低的树种,建群时间长,要求两亲本在多位点上差异较大。 $BC_1$  群体与  $F_2$  群体相似,与之不同的是它具有永久性,但可检测的位点数较少,数据统计分析及作图相对较简单。对于不同的果树种类,根据其生物学特性不同,选取的作图群体不同。目前所构建的图谱中,对于同一物种不同学者采用的作图群体不同,在选择群体类型时一些研究者并没有考虑群体类型是否适合。由此,万怡震等<sup>[10]</sup>提出,苹果和梨等基因组高度杂合、自花不结实的树种,选取  $F_1$  群体作为作图群体能保证图谱准确性;但像桃和葡萄等自花结实率高的树种,其杂交  $F_1$  代目标性状分离可能偏离 1:1,最好采用  $BC_1$  或  $F_2$  代群体进行构图。

**1.2.3 群体大小的确定** Zamir<sup>[11]</sup>早在 1986 年就指出,衡量图谱质量的标准并不仅以标记数目为准,因为一定的作图群体大小只能建成一定饱和度的图谱。同时,作图群体样本容量大小决定了从随机分离结果中可辨别的最大图距和两个标记间检测到重组的最小图距。因此,作图群体大小的选取对于构建高饱和的遗传图谱十分重要。目前,用于果树分子遗传图谱构建的作图群体数目多在 50 ~ 100 株之间,而构建框架图群体个数不应小于 150 单株<sup>[12]</sup>,当需要检测到的重组分数 (recombination fraction) 达到 0.3, LOD 值为 3.0 时,需要的个体数在 300 个以上<sup>[13]</sup>。在实际构图中发现,由于作图群体较小,致使一些标记的图位相同,不能分辨相距很近的标记 ( $< 1.3$  cM) 之间的距离<sup>[14]</sup>。因此,为增加图谱的饱和度和准确性,应尽量构建较大的作图群体。但一味增大作图群体数目,势必会增加试验工作量和作图成本,对于植株高大的果树而言难度较大,这也是目前果树遗传图谱构建所要解决的问题之一。

**1.2.4 分子标记的选用** 分子标记的发展日新月异,种类繁多。目前在果树分子遗传图谱构建中应用较多的有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、ISSR、SCAR 和 CAPS 等<sup>[10,15]</sup>。相比较而言,应用较为简便的有 RAPD 和 ISSR,而构图效果较好的有 RFLP、AFLP 和 SSR。

AFLP 标记既能检测酶切位点不同形成的多态性,又能检测随机选择碱基形成的多态性,分辨率高,扩增位点多,检出率高<sup>[16]</sup>。但 AFLP 标记同 RAPD 标记一样,为显性标记,不能区分基因组的纯合型和杂合型。SSR 标记与 RFLP 标记同样具有较高的多态性和准确性,为共显性,但需要设计特异性引物,限制了它们的广泛应用。此外,不少学者研究发现,果树不同种或近缘种可以共享某些 SSR 引物。Hemmat 等<sup>[17]</sup>和 Dyk 等<sup>[18]</sup>就成功利用已构建的苹果 SSR 引物对梨品种进行作图。Yamamoto 等<sup>[4]</sup>还将苹果、梨、桃和樱桃不同品种中构建的 SSR 引物共同用于构建梨遗传图谱,并以此为基础探讨了蔷薇科植物之间的关系。总体说来,直接来自于基因表达序列、在不同遗传背景下可进行信息传输、可检测复等位以及简单和高效的共显性标记才是最理想的分子标记<sup>[19]</sup>。在实际作图中,不少学者选用了多种标记技术并结合传统的形态学和同工酶标记进行联合作图,大大增加了图谱的饱和度和真实性。另外,尹冬明等<sup>[20]</sup>提出,为解决林木由于其杂交组合特异性的遗传信息在实际育种程序应用中的局限性,应利用与性状表达有关的基因本身发展的分子标记。同时,他们还指出,EST 标记可作为遗传图谱标记及在不同群体中获得 QTL 信息比较的桥梁,并在林木中已得到了应用。有关这方面在果树上的应用还未见报道。事实上采用一些简单的随机标记进行初步分析,然后将随机标记与 QTL 间的连锁转化为 SSR 或 EST 标记等与相应 QTL 间的连锁分析也是一种较为有效的方法,在梨<sup>[21]</sup>和葡萄<sup>[22]</sup>上等也得到了应用。

**1.2.5 偏离标记位点的处理** 根据各自试验情况选取合适的分子标记技术后,通常是对亲本和群体材料进行单株 DNA 分子标记的多态性分析,统计分子标记位点的分离比例,然后通过  $\chi^2$  检验标记的分离与偏离孟德尔分离比例的符合程度。

在众多植物分子遗传图谱构建中,分子标记位点的分离都出现了三种情况:孟德尔分离、偏孟德尔分离和异常分离。呈孟德尔分离的标记是利用的主要类型,而呈偏孟德尔分离和异常分离的标记,不同学者持不同观点。根据目前的研究普遍认为,造成偏孟德尔分离的主要原因有:染色体在杂交过程中存在结构重排、缺失、插入和突变<sup>[23]</sup>;单个亲本细胞质基因组的细微影响<sup>[24]</sup>;杂种中有配子选择或隐性纯合致死等位基因的存在<sup>[25]</sup>;非等位位点的共带现象 (Co-migrating bands),尤其对 RAPD 和 AFLP 等高产标记系统更是如此<sup>[26]</sup>;研究群体偏小,使统计结果偏离真实值<sup>[27]</sup>;或与研究材料有关,如中间杂种比种内杂种的偏分离比例大等<sup>[28]</sup>。异常分离中非双亲扩增带来源于不同长度的等位核苷酸序列之间形成的异源双链体<sup>[29]</sup>或配子形成过程中染色体不等

价交换产生的新序列<sup>[30]</sup>。

对于偏分离标记位点的处理, Tulsieramd 等<sup>[31]</sup>、Rajapakse 等<sup>[32]</sup>、孙文英等<sup>[6]</sup>和房经贵等<sup>[33]</sup>均未将偏分离位点标记添加到分子遗传图谱中。但 Brummer 等<sup>[33]</sup>、Kiss 等<sup>[34]</sup>和 Davis 等<sup>[35]</sup>则将能够确定的偏分离位点标记用于所构建的分子遗传图谱中。另外, Heun 和 Helentgaris 还提出, 判读位点时可把 RAPD 标记分为“质量多态性”(Unambiguous polymorphism)和“数量多态性”(Quantitative polymorphism), 前者指直观的谱带有/无的多态性, 后者指谱带强度的多态性, 即把相同长度的片段按强度不同而分别统计<sup>[34]</sup>。但在实际操作中, 谱带强弱的判断有很大的主观性, 难于把握, 应用较少。

1.2.6 标记间的连锁分析和遗传距离的确定 目前构建植物遗传连锁图谱的方法除了传统的两点测验和三点测验外, 还有两点自交法<sup>[36]</sup>和三点自交法<sup>[37]</sup>。这些方法都是通过分析分离群体内双亲间有多态性遗传标记的连锁交换情况和趋于协同分离的程度, 运用 MAPMAKER/EXP3.0、JoinMap2.0、CRI-MAP、MAPQTL3.0 等<sup>[15]</sup>软件将标记位点间的交换值转换成遗传图距单位——厘摩(centi-Morgan, cM)。然后考虑多个标记基因位点的共分离, 对标记进行排列, 形成线性连锁图谱<sup>[38]</sup>。

## 2 果树分子遗传图谱的应用

遗传图谱主要有四个生物学功能: 基因定位、比较基因组作图、标记辅助选择育种和基因定位克隆。

### 2.1 基因定位

控制植物性状的基因表现为质量性状遗传和数量性状遗传特点。目前应用连锁图谱进行质量性状基因定位的方法主要有近等位基因系法(Near Isogenic Line, NIL)和混合群体分离分析法(Bulked Segregant Analysis, BSA)。而数量性状基因位点(quantitative trait loci, QTL)分析方法主要包括区间作图法(interval mapping)、多元回归法(multiple regression)、精细作图法(fine mapping)、标记回归法(marker regression)和完整连锁作图法(integrated linkage map graphic method)等<sup>[15]</sup>。由于果树很多重要农艺性状并不表现为明显的质量或数量性状遗传特点, 在实际研究中常采用多种方法进行混合分析。

Yamamoto 等<sup>[39]</sup>采用共同的 SSR 引物将自交不亲和 S 基因定位在日本梨、欧洲梨和苹果的第 17 连锁群上。Yamamoto 等<sup>[40]</sup>还利用桃品种‘Juseitou’基于连锁分析和 DNA 标记技术发现新的抗根癌线虫(*Meloidogyne spp.*)基因, 并成功得到 4 个与其抗性基因紧密连锁的 STS 标记, 其中 STS-834b 标记与 *M. javanica* 抗性基因呈共分离。Yamamoto 等<sup>[41]</sup>根据桃品种‘Akame’和‘Juseitou’构建的遗传图谱分析了桃的 13 种形态特征,

其中 3 个与着色相关的性状(果核周围果肉颜色、花色和果皮颜色)呈单基因遗传, 花色和核周围果肉颜色位于第 4 连锁群, 重组率为 0.13; 4 个数量性状(开花时间、成熟时间、落果时间和果实重量)分别包含了 6、3、3 和 4 个位点, 其中的 12 个位于第 3 和第 6 连锁群上, 但第 2、4、8 和 9 连锁群上未发现 QTLs; 另外还获得了几个与果肉粘度和两种抗根癌线虫(*M. incognita* 和 *M. javanica*)相连锁的 DNA 标记, 可作为性状选择的工具。Terakami 等<sup>[21]</sup>利用日本梨‘Kinchaku’鉴定出抗梨黑星病(*Venturia nashicola*)基因, 命名为 Vnk, 定位于第 1 连锁群中部, 并发现有 6 个标记(1 个 SSR Hio2c07 和 5 个 STSs)与 Vnk 相连锁, 在连锁群上相距 2.4~12.4 cM; 他们还从连锁群中通过 BAC 克隆分离出一个 SSR CH-Vf2 标记, 它包含了抗苹果黑星病(*Venturia inaequalis*)基因 Vf, 并被定位在‘Kinchaku’图谱的第 1 连锁群底部, 与 Vnk 基因位于同源连锁群的不同区段。Direlwange 等<sup>[42]</sup>对桃 4 个农艺性状(普通桃/油桃、平/圆果形、酸/甜果和花粉不育)进行了定位。Hurtado 等<sup>[8]</sup>将 PPV 基因定位于第 2 连锁群上, 并检测到它由两个共显性位点控制。Vilanova 等<sup>[43]</sup>利用 AFLP 和 SSR 标记将抗 PPV 基因定位在杏 G1 连锁群上, 自交不亲和位点被定位在 G6 连锁群上。Wang 等<sup>[44]</sup>利用 BSA 原理及 RFLP 标记对酸樱桃 6 个数量性状(花期、果实成熟期、雌蕊败育率、花粉萌芽率、果实重量和果实可溶性固形物含量)基因进行了定位, 所构建图谱由 17 个连锁群组成, 长 272.9 cM, 标记间平均距离 4.8 cM, 找到了 11 个与 6 个性状有关的 QTL(LOD>2.4)。Ballester 等<sup>[45]</sup>将扁桃自交不亲和 S 基因定位在第 6 连锁群底部, 距离标记位点 Pgl 15.2 cM。罗素兰等<sup>[22]</sup>采用 60 株 F<sub>1</sub> 代及其自交或互交得到的 3 个 F<sub>2</sub> 代作为试材, 应用 BSA、RAPD 和 SCAR 技术研究了葡萄抗霜霉病基因的分子标记, 发现了 RAPD 标记 OP006-1500 与葡萄抗霜霉病主效基因(RPv-1)紧密连锁, 遗传距离为 1.7 cM, 并将该片段克隆、测序, 设计特异性引物, 转化成了通用的 SCAR 标记 SCC06-1500。La 等<sup>[46]</sup>将橄榄 stearoyl-ACP desaturase 基因定位在第 4 条连锁群上。Cekic 等<sup>[47]</sup>采用成对的 ISSR 引物组合对欧洲草莓季节性开花位点进行了定位, 并认为组合引物比单个引物更能检测草莓的位点多态性。

### 2.2 基因组比较作图

比较基因组学(comparative genomics)主要是利用相同的 DNA 分子标记在不同物种基因组中的分布特点来揭示染色体或其片断上的基因及其排列顺序的相同或相似性, 并由此对相关物种的基因组结构和起源进行分析<sup>[48]</sup>。比较基因组作图可了解各种植物中更多的和可供利用的遗传标记, 有助于种间分子、遗传和杂交育种的信息转译<sup>[49]</sup>, 这对于像果树这种遗传研究较为滞后

的植物尤为重要。Yamamoto 等<sup>[39]</sup> 利用一些从苹果中得到的 SSR 引物对日本梨和欧洲梨品种所有的连锁群进行了标记, 可见梨和苹果基因组之间具有较高的同源性, 而且它们的自交不亲和 S 位点都位于第 17 条连锁群上。Testolin 等<sup>[30]</sup> 以桃基因组克隆做探针用于欧洲酸樱桃 RFLPs 的产生, 发现桃第 3 连锁群上紧密连锁的两个 RFLP 标记 B4A9HE 和 B7A5Z 在欧洲酸樱桃上也紧密连锁。Arus 等<sup>[51]</sup> 和 Lambert 等<sup>[9]</sup> 采用桃、樱桃、扁桃和李的 F<sub>2</sub> 群体及其种内群体的几种组合进行比较作图发现, 这些物种基因组之间相似性很高, 其中杏、桃和扁桃的分子遗传图谱染色体片段具有较高的同源性, 证明其亲缘关系较近。

2.3 标记辅助选择育种

标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)是利用饱和的基因组图谱来确定与任一目的基因紧密连锁的分子标记, 根据遗传图谱间接选择目的基因。与传统技术相比, MAS 可大大降低连锁累赘、加速目的基因的转移与利用和提高回交育种的效率。

现今, MAS 在植物育种中主要应用于杂交亲本的选择、杂种实生苗的早期鉴定、染色体片段去向的追踪、遗传转化种的目的基因检测、雌雄异株果树幼苗的性别鉴定和多种抗病性状的同时筛选等方面<sup>[52]</sup>。Tartarini 等<sup>[53]</sup> 在温室和田间对接种的苹果抗斑点病植株进行比较, 发现 5% 的植株在温室中表现为抗性而田间为易感型, 且经 MAS 鉴定, 纯合型植株比杂合型植株抗性高。Kanzaki 等<sup>[54]</sup> 利用 BSA 法通过对 128 个引物组合筛选获得了一个与控制柿甜涩性状连锁的 EACC/MCTA-400 标记, 该标记在完全甜柿中缺失而存在于不完全甜柿中, 可用于早期选择。Cheng 等<sup>[51]</sup> 用与 Thd-1 基因连锁的 RAPD 标记对苹果实生苗进行了果色预测。Damasco 等<sup>[56]</sup> 用 SCAR 标记对微繁矮生香蕉 Caverdish 进行了早期检测。

2.4 基因的定位克隆

基于遗传图谱的基因克隆称为定位克隆 (positional cloning), 也叫图位克隆法 (map-based cloning), 它是根据饱和基因组图谱, 找到一个与目的基因紧密连锁的分子标记, 并以为之探针筛选大片段基因组文库, 通过染色体步移 (chromosome walking) 或染色体登陆进行基因克隆和分离的方法。图位克隆的基础是高密度的遗传图谱和高解析的 QTL 定位。这种方法可以在未知基因产物的条件下分离控制生物质量和数量性状基因。目前有关这方面在果树上的成功报道较少, 主要是由于所构建的多数图谱密度较低, 定位的 QTL 也难以进行图位克隆。王彩虹等<sup>[57]</sup> 首先用 BSA 法筛选到一个控制苹果矮化密植柱型性状 Co 基因的 AFLP 标记, 通过分析发现, 该标记在苹果基因组中为单拷贝, 与 Co 基因位点的

重组率为 (3.3 ± 2.3) %。然后将一个与 Co 基因连锁较为紧密的 AFLP 标记进行再扩增, 实现了此标记的克隆和转化。Ma 等<sup>[58]</sup> 绘制了一张高密度的番木瓜分子遗传图谱, 得到了番木瓜环斑病毒外科蛋白标记 (papaya ringspot cirrus coat protein marker) 和控制外形性别 (morphological sex type) 及果肉颜色的标记位点, 并指出可进行性别基因的定位克隆。

已构建的果树分子遗传图谱表

果树种类	作图群体	群体大小	标记类型	连锁群	标记数量	图谱长度/ cM	参考文献
苹果	F <sub>1</sub>		AFLP, RAPD, SSR, SCAR		840	1 140 1 450	[59]
	F <sub>1</sub>		同工酶, RFLP, RAPD	24 21	253 156	950	[3]
	F <sub>1</sub>	155	RFLP, RAPD, 同工酶, SSR	17 19			[60]
梨	F <sub>1</sub>	81	RAPD	18 22	120 78	768 508	[61]
	F <sub>1</sub>	94	AFLP	9 3	28 9	188.6 96.5	[6]
	F <sub>1</sub>		AFLP, SSR, 同工酶	18 17	226 148	949 926	[4]
桃	F <sub>1</sub>		AFLP, SSR, 同工酶, 形态学	19 20	256 180	1 020 995	[39]
	F <sub>2</sub>		RAPD, 同工酶, 形态学	15			[62]
	F <sub>1</sub>		农艺学, 同工酶, RFLP, RAPD	11	249	712	[42]
	F <sub>2</sub>	270	RAPD, 形态学	8			[63]
	F <sub>2</sub>	71	RFLP, RAPD, 形态学	8	47	332	[32]
	F <sub>2</sub>		SSR, STS, AFLP, RAPD, ISSR, 形态学	8	178	571	[64]
	F <sub>2</sub>		SSR, 形态学	9	92	1 020	[41]
	F <sub>2</sub>	133	RAPD, AFLP, SSR, RFLP, 形态学	10	83	960	[65]
酸樱桃	F <sub>1</sub>		RFLP	19 16	126 95	461.6 279.2	[66]
	小孢子母细胞愈伤组织	56	同工酶, RAPD	10	89	503.3	[67]
杏	F <sub>1</sub>	81	AFLP, RAPD, RFLP, SSR	8	132	511	[8]
	F <sub>2</sub>	76	AFLP, SSR, 农艺学	7 11	80 211	467.2 602	[43]
柑橘	F <sub>2</sub>		SSR				[68]
	BC <sub>1</sub>	60	RAPD, RFLP, 同工酶	9	160	1 192	[69]
	F <sub>2</sub>	60	同工酶, 蛋白质, RFLP	10	46	1 700	[70]
	BC <sub>1</sub>		同工酶, RFLP	11 8	52 32	553 314	[71]
葡萄	F <sub>1</sub>	60	RAPD, 形态学	11	89	1 033	[72]
	F <sub>2</sub>	58	RAPD, CAPS, AFLP, SSR	20 20	153 179	1 199 1 470	[73]
番木瓜			RAPD	11	96	999.3	[74]
	F <sub>2</sub>	54	AFLP	12	1 501	3 294.2	[58]
橄榄	F <sub>1</sub>	95	RAPD, AFLP, RFLP, SSR	22 27	249 236	2 766 2 445	[46]
欧洲葡萄	BC <sub>1</sub>	168	ISSR				[47]
	F <sub>2</sub>	80	RAPD, 同工酶	7	80	445	[35]
香蕉	F <sub>2</sub>	92	同工酶, RFLP, RAPD	15	90		[75]
扁桃	F <sub>1</sub>	54	RAPD, SSR, RFLP, 同工酶	8 8	126 99	415 416	[76]
	芒果	F <sub>1</sub>	AFLP	15	81	354.1	[77]
猕猴桃	F <sub>1</sub>		SSR, AFLP		160 115	1 758.5 1 104.1	[50]
	栗	BC <sub>2</sub>	形态学, 同工酶, RFLP, RAPD	12	179	660.9	[78]

### 3 果树分子遗传图谱研究成果

果树遗传图谱构建工作始于 20 世纪 90 年代初, 迄今为止, 国内外已先后构建了苹果、桃、梨、葡萄、柑橘、李、杏、樱桃、草莓、芒果、猕猴桃、番木瓜、扁桃、香蕉、橄榄等十多种果树的分子遗传图谱。已构建的果树分子遗传图谱的作图群体类型与大小、标记类型与数量及图谱长度等列于表中。

### 4 小结

综上所述, 构建分子遗传图谱是基因定位克隆的基础, 也是遗传育种工作的前提。果树分子遗传图谱的构建以及在图谱基础上进行质量、数量性状定位, 基因组比较作图, 标记辅助选择育种和基因定位克隆等方面的研究已经取得了一些成绩。但总体来讲, 这些方面的研究与农作物相比差距较远。主要表现为以下几个方面:

#### 4.1 克服构建果树遗传图谱的局限性, 有计划的构建遗传图谱

目前所构建的果树遗传图谱质量参差不齐, 且普遍不高, 而且不同树种及品种之间存在不平衡性。众所周知, 高密度的遗传图谱是实现其生物学功能的基础。遗传图谱的应用价值也主要取决于图谱的密度和遗传标记的类型。如果构建图谱是为了进行主基因定位, 其平均间距要求在 10~20 cM; 如果为了 QTL 连锁, 其平均间距要求在 10 cM 以内。但目前所构建的果树分子遗传图谱很多都不能达到这个标准, 且所用标记中通用标记所占比例很小, 不利于图谱整合工作的开展。已构建的果树分子遗传图谱主要集中在核果类、仁果类果树以及柑橘和葡萄等商业产量较大的果树品种上, 而对一些商业产量较小的树种和具有重要育种价值的品种、砧木和原生种群相对很少, 甚至没有。因此, 应该有计划地构建作图群体, 筛选或研发在种内不同群体间有很好兼容性的遗传标记, 加大对果树分子遗传图谱的构建力度。另外也可先重点研究基因组较小, 遗传操作容易的材料, 克隆出与材料有关的基因, 并且借助比较基因组学研究再将其广泛延伸到其他重要的经济树种中<sup>[19]</sup>。在构图的同时应尽量结合传统理论技术, 采用多种标记技术联合作图, 在加大图谱密度和提高 QTL 定位精度的同时, 也便于不同种群间比较, 使图谱趋于高饱和化、实用化和通用化。而对于一些有争议的问题如标记的类型及其偏分离等, 多参考相关树种的处理并结合果树自身特性, 以真实性为前提。

#### 4.2 开展基因组作图, 扩大图谱应用范围

多数果树遗传图谱应用有限, 质量和数量性状的定位局限于少数几个基因; 基因组比较作图只停留在核果类果树上; 标记辅助选择育种和基因定位研究很少。而构建遗传图谱只是最基础的步骤, 开展功能基因研究才是重点。为了使构建的遗传图谱能够顺利投入下一步

研究中, 应在构图前拟好计划, 不能盲目构图。构图的同时可结合一些特征性状进行定位, 进一步研究连锁群与染色体之间的对应关系。尽量选择永久性群体进行构图, 在品种选择上也应考虑具有广泛性和代表性, 便于不同研究者之间的重复比较。

#### 4.3 进一步研发符合果树自身特点的理论技术

目前作图的统计分析方法和软件多数是从农作物上照搬过来的, 并不一定都适合于果树这样的异交物种。采用的多数标记技术本身也存在一些局限性。为此, 还应重视理论技术研究, 开发一些符合果树自身特点的理论技术。

#### 4.4 果树分子遗传图谱的构建有待于进一步深化研究

从表中可以看出, 由于群体类型、大小和标记技术选择的不同, 同种果树不同品种分子遗传图谱间得到的标记数量、图谱长度和连锁群数目不同。可见, 群体类型和大小及标记技术的选择对于作图效果的影响很大。另外, 从理论上讲, 连锁群数目应与树种染色体数目相同, 呈一一对应关系, 但目前所构建的多数图谱连锁群数目与树种染色体数目并不相同, 且差异很大。由此可见, 按照现有的理论技术水平所构建的果树分子遗传图谱很大程度上只是对果树基因组的一种粗略研究, 更精确深入的研究有待于进一步的发展。

尽管果树分子遗传图谱的构建和后续研究已经开展了十多年, 但在我国尚属初级阶段。我国是世界上拥有果树资源最丰富的国家之一, 以构建分子遗传图谱为基础, 对于果树珍贵种质资源的开发和利用尤为重要。因此, 应借鉴国外先进经验, 进一步扩大果树分子遗传图谱的构建及在构图基础上开展深入研究, 推动我国果树遗传研究的进一步发展。

### 参考文献

- [1] 刘树兵, 王洪刚, 孔令让, 等. 高等植物的遗传作图[J]. 山东农业大学学报, 1999, 30(1): 73-78.
- [2] Weeden N F, Hemmat M, Lawon D W, et al. Development and application of marker linkage map in woody fruit crops[J]. Eduphutica, 1994, 77: 71-75.
- [3] Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, et al. Molecular marker linkage map for apple[J]. Journal of Heredity, 1994, 85(1): 4-11.
- [4] Yamamoto T, Kinura T, Shoda M, et al. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(1): 9-18.
- [5] 尹佟明, 黄敏仁, 朱立煌. 利用显性分子标记和 F<sub>1</sub> 群体进行林木遗传连锁图谱的构建[J]. 生物工程进展, 1996, 16(4): 12-16.
- [6] 孙文英, 张玉星. 利用 AFLP 标记构建早美酥×八月红分子遗传图谱[D]. 河北农业大学硕士学位论文, 2005.
- [7] 尹佟明, 沈永宝, 郑阿宝. 林木遗传图谱构建研究概述[J]. 江苏林业科技, 2000, 27(6): 38-43.
- [8] Hurtado M A, Romero C, Vilanova S, et al. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) and mapping of PPV (sharka) resistance[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105(2/3): 182-191.

- [9] Lambert P, Hagen L S, Anus P, et al. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) compared with the almond Texas peach Earlygold reference map for prunus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(6): 1120-1130.
- [10] 万怡震, 王跃进, 张今今, 等. 多年生果树植物分子遗传图谱[J]. 园艺学报, 2002, 29(增刊): 629-634.
- [11] Zamir D, Tadmor Y. Unequal segregation of molecular genes in plants[J]. Bot Gaz, 1986, 147: 355-358.
- [12] 徐云璧, 朱立煌. 分子数量遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994, 81-85.
- [13] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [14] 尹佟明, 黄敏仁, 王明麻. 利用 RAPD 标记构建响叶杨和银白杨分子标记连锁图谱[J]. 植物学报, 1999, 41(9): 956-961.
- [15] 阮成江, 何祯祥, 钦佩. 中国植物遗传连锁图谱构建研究进展[J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1526-1536.
- [16] 孙秀峰, 陈振德, 李德全. 利用大白菜抗感干烧心病群体构建 AFLP 遗传连锁图[J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 65-70.
- [17] Hemmat M, Weeden N F, Brown S K. Mapping and evaluation of *Malus domestica* microsatellites in apple and pear[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2003, 128(4): 515-520.
- [18] Dyk M M van, Koning G, Simayi Z, et al. Development of microsatellite markers for marker-assisted breeding in pear (*Pyrus spp.*)[J]. Acta Horticulturae, 2005, 671: 307-313.
- [19] 张博, 杜生明, 黄敏仁. 林木遗传图谱研究现状及发展趋势[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 14-18.
- [20] 尹佟明, 李冬, 陈颖, 等. 马尾松表达序列标签多态性初步分析[J]. 林业科学, 2004, 40(6): 176-180.
- [21] Terakami S, Shoda M, Adachi Y, et al. Genetic mapping of the pear scab resistance gene Vnk of Japanese pear cultivar Kinchaku[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113(4): 743.
- [22] 罗素兰, 贺普超, 田鹏, 等. 与葡萄抗霜霉病基因紧密连锁的分子遗传标记[J]. 遗传学报, 2001, 28(1): 76-82.
- [23] 刘孟军, Shin Y U, Yea B W, Y B. RAPD 标记在苹果属种间杂交一代的分离方式[J]. 园艺学报, 1998, 25(3): 214-219.
- [24] Heun M, Helentjanis T. Inheritance of RAPDs in  $F_1$  hybrids of corn[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 85(6): 961-968.
- [25] Lanham P G. Estimation of heterozygosity in *Ribes nigrum* L. using RAPD markers[J]. Genetica, 1996, 98(1): 193-197.
- [26] Virk P S, Ford-Lloyd B V, Newbury H J. Mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and investigation of segregation distortion[J]. Heredity, 1998, 81(3): 613-620.
- [27] 乔飞, 王力荣, 范崇辉, 等. 利用 RAPD 标记评价桃树种间杂交一代群体的分离方式[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 310-312.
- [28] Byrne M, Murrell J C, Allen B. An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(6/7): 869-875.
- [29] Ayliffe M A, Lawrence G J, Ellis J G, et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause no parental RAPD bands[J]. Nucleic Acid Research, 1994, 22(9): 1632-1636.
- [30] 房贵贵, 章镇, 马正强, 等. AFLP 标记在两个芒果品种间杂交  $F_1$  代的多态性及分离方式[J]. 中国农业科学, 2000, 33(3): 19-24.
- [31] Tulsieram L K, Glaubitz J C, Kiss G, et al. Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes[J]. Biotechnology, 1992, 10: 686-690.
- [32] Rajapakse S, Belthoff L E, He G, et al. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90(3/4): 503-510.
- [33] Brummer E C, Bouton J H, Kochert G. Development of an RFLP map in diploid alfalfa[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 86: 329-332.
- [34] Kiss G B, Csanadi G, Kalman K, et al. Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers[J]. Mol Gen Genet, 1993, 238: 129-137.
- [35] Davis T M, Yu H. A linkage map of the diploid strawberry, *Fragaria vesca*[J]. Journal of Heredity, 1997, 88: 215-221.
- [36] 莫惠栋. 最大似然法及其应用[J]. 遗传, 1984, 6(5): 42-48.
- [37] 谭远德. 构建分子标记连锁图谱的一种新方法: 三点自交法[J]. 遗传学报, 2001, 28(1): 83-94.
- [38] 马三梅, 王永飞, 王得元. 农作物分子遗传图谱的研究进展[J]. 干旱地区农业研究, 2004, 22(4): 102-108.
- [39] Yamamoto T, Kimura T, Saito T, et al. Genetic linkage maps of Japanese and European pear aligned to the apple consensus map[J]. Acta Horticulturae, 2004, 663(1): 51-56.
- [40] Yamamoto T, Hayashi T. New root-knot nematode resistance genes and their STS markers in peach[J]. Scientia Horticulturae, 2002, 96(1/4): 81-90.
- [41] Yamamoto T, Shimada T, Imai T, et al. Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach[J]. Breeding Science, 2001, 51(4): 271-278.
- [42] Durelanger E, Pronier V, Parvery C, et al. Genetic linkage map of peach (*Prunus Persia* (L.) Batsch) using morphological and molecular markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97(5/6): 888-895.
- [43] Vilanova S, Romero C, Abbott A G, et al. An apricot (*Prunus armeniaca* L.)  $F_2$  progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(2): 239-247.
- [44] Wang D, Karle R, Iezzoni A F. QTL analysis of flower and traits in sour cherry[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100(3/4): 535-544.
- [45] Ballester J, Boskovic R, Battle L, et al. Location of the self-incompatibility gene on the almond linkage map[J]. Plant Breeding, 1998, 117(1): 69-72.
- [46] La Rosa R, Angiolillo A, Guerero C, et al. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(7): 1273-1282.
- [47] Cekic C, Battey N H, Wilkinson M J. The potential of ISSR-PCR primer pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(4): 540-546.
- [48] 沈利爽, 朱立煌. 植物的比较基因组研究和大遗传系统[J]. 生物工程进展, 1995, 15(2): 23-28.
- [49] Devos K M, Gale M D. Genome relationships: the grass model in current research[J]. The Plant Cell, 2000, 12: 637-646.
- [50] Testolin R, Huang W G. A kiwifruit (*Actinidia Spp.*) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(1): 30-36.
- [51] Anus P, Messeguer R, Viruel M, et al. The European prunus mapping project, progress in the almond linkage map[J]. Euphytica, 1994, 77(1/2): 97-100.
- [52] 王倩, 王斌. DNA 分子标记在果树遗传学研究上的应用[J]. 遗传

2000, 22(5): 339-344.

[53] Tartarini S, Sansavini S, Vinatzer B, et al. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the Vf scab resistance gene[J]. Acta Horticulturae International Society for Horticultural Science (ISHS), 2000, 538(2): 549-552.

[54] Kanzaki S, Yonemori K, Sugiura A. Identification of molecular markers linkage to the trait of natural astringency loss of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) fruit[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, 126(1): 51-55.

[55] Cheng F. Molecular markers for fruit color in apple (*Malus domestica*) [J]. HortScience, 1994, 29: 529 (Abstract).

[56] Damasco O B, Adjubs S W, Gidwin I D, et al. Use of a SCAR-based marker for the early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas[J]. Acta Horticulturae, 1998, 461: 157-164.

[57] 王彩虹, 王倩, 戴洪义, 等. 与苹果柱型基因(Co)紧密连锁的分子标记的筛选[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 187-190.

[58] Ma H, Moore P H, Liu Z Y, et al. High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya [J]. Genetics, 2004, 166: 419-436.

[59] Liebhard R, Koller B, Gianfranceschi L, et al. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(8): 1497-1508.

[60] Weeden N F, Brown S K, Hemmat, et al. Apple mapping Progress and Goals[C]. San Diego, C A; Plant Genome II 1995, 31.

[61] Iketani H, Abe K, Yamamoto T. Mapping of disease-related genes in Japanese pear using a molecular linkage map with RAPD markers[J]. Breeding Science, 2001, 51(3): 179-184.

[62] Chaparro J X, Wemer D J, O'Malley D, et al. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 87(7): 805-815.

[63] Dirdewanger E, Bodo C. Molecular genetic mapping of peach[J]. Euphytica, 1994, 77(1/2): 101-103.

[64] Yamamoto T, Yamaguchi M, Hayashi T. An integrated genetic linkage map of peach by SSR, STS, AFLP and RAPD[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2005, 74(3): 204-213.

[65] Shimada T, Yamamoto T, Hayama H, et al. A genetic linkage map constructed by using an intraspecific cross between peach cultivars in Japan [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2000, 69(5):

536-542.

[66] Wang D, Karle R, Brettin T S, et al. Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97: 1217-1224.

[67] Stockinger E J, Mulnix C A, Long C M, et al. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population[J]. Journal of Heredity, 1996, 87: 214-218.

[68] Kijas J M H, Thomas M R, Fowler J C S, et al. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of citrus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94(5): 701-706.

[69] Cai Q, Guy C L, Moore G A. Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89(5): 606-614.

[70] Jarrell D C, Roose M L, Traugh S N, et al. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84(1/2): 49-56.

[71] Durham R E, Liou P C, Gmitter F G, et al. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in citrus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84(1/2): 39-48.

[72] 罗素兰, 贺普超, 周鹏, 等. 利用 RAPD 标记和中间杂交组合构建葡萄的分子标记连锁图谱[J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 68-70.

[73] Dalbo M A, Ye G N, Weeden N F, et al. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map[J]. Genome, 2000, 43(2): 333-340.

[74] Sondur S N, Manshardt R M, Stiles J I. A genetic linkage map of papaya based of randomly amplified polymorphic DNA markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93(4): 547-553.

[75] Faure S, Noyer J L, Horry J P, et al. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 87(4): 517-526.

[76] Joobeur T, Periam N, Vicente M C, et al. Development of a second generation linkage map of almond using RAPD and SSR markers[J]. Genome, 2000, 43(4): 649-655.

[77] 房经贵, 刘大钧, 马正强. 利用双杂合位点标记资料构建芒果遗传图谱[J]. 分子植物育种, 2003, 1(3): 313-319.

[78] Kubisiak, Thomas J, Frederick, et al. Mapping resistance chryphonectria parasitica in catana[C]. San Diego, C A; Plant Genome IV, 1996.

## Research Progress of Molecular Genetic Map in Fruit Trees

GAO Jia, TANG Hao-nu, DONG Xiao-li, LUO Ya

(College of Forestry and Horticulture Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

**Abstract:** The theoretical basis, general procedures and methods of molecular genetic mapping in fruit trees were reviewed in this article. A great number of literatures on the application of the qualitative genes and quantitative trait loci, the comparative genomics, marker-assisted selection and the gene cloning on molecular genetic mapping in fruit trees were quoted. The situation of those maps was summarized in detail. Some suggestions for further study on the genetic molecular mapping were also put forward.

**Key words:** Molecular genetic map; Qualitative genes; Quantitative trait loci; Comparative genomics; Marker-assisted selection; Gene cloning