

RAPD 技术在我国观赏植物中的应用

管晓庆, 王奎玲, 刘庆华, 刘庆超, 孙玉林

(莱阳农学院环境艺术学院, 山东青岛 266109)

摘要: RAPD 标记技术由于其自身的优点在我国被广泛应用于观赏植物分子生物学方面的研究。主要包括观赏植物的系统发育和进化研究、亲缘关系鉴定、品种分类鉴定和观赏植物种质资源遗传多样性分析、目标性状基因的分子标记及遗传图谱的快速构建等研究。

关键词: RAPD 标记; 观赏植物; 亲缘关系; 品种分类

中图分类号: Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)04-0075-03

随机扩增多态性 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA 简称 RAPD)分子标记,是 Williams 和 Welsh 两小组 1990 年在 PCR 基础上发展起来的^[1]。它利用一系列不同的人工随机碱基顺序寡核苷酸为引物,对所研究物种的基因组 DNA 进行扩增而显示多态性的 DNA 指纹。RAPD 标记检测灵敏、方便,多态性强,近年来在我国被广泛应用于观赏植物分子生物学的研究。它可用于观赏植物的系统发育和进化研究、亲缘关系鉴定、品种分类鉴定、观赏植物种质资源遗传多样性分析、目标性状基因的分子标记、及遗传图谱的快速构建等研究。

1 系统发育、演化及分类上的应用

RAPD 标记能够从遗传本质上揭示物种间的遗传多样性,被广泛用于植物系统与分类学研究。传统植物系统分类的理论基础都是建立在分类群的性状分析基础上,这些来自形态学、解剖学、孢粉学、细胞学、植物化学等的性状都是表现型,而从分子遗传学角度来看,表现型的差异归根结底是来自基因型的差异,即在 DNA 序列上的差异,RAPD 标记所提供的基因序列间的比较为植物分类提供了最直接的证据。

谭晓风等利用筛选出的 16 种引物将 5 种油茶组植物分为 3 大类,20 种金花茶组植物分为 4 大类^[2]。贺晶利用 RAPD 技术对山茶属红山茶组 29 种植物进行了分子分类鉴别,将红山茶组植物分为四大类,分别归入张宏达分类系统中的光果红山茶亚组,毛蕊系,滇山茶系,其中短管红山茶自成一类^[3]。

2 亲缘关系鉴定的应用

在观赏植物亲缘关系研究中,RAPD 技术是应用最多的分子系统学方法之一。通过统计多态性条带,分析遗传相似系数和遗传距离并进行聚类分析,以确定亲缘关系的远近。目前 RAPD 技术在观赏植物的属间、种间及种内亲缘关系研究中得到了广泛应用,其中种内包括了栽培品种之间、野生种与栽培品种间以及杂种后代与父母本间的亲缘关系。通过 RAPD 技术确立亲缘关系的远近可帮助选配育种亲本及鉴定品种,推断品种起源。

2.1 属间亲缘关系鉴定的应用

王艇等对红豆杉科红豆杉属、白豆杉属、穗花杉属和榧树属 4 属 6 种植物进行了 RAPD 分析,试验结果采用 UPGMA 法进行聚类分析,表明红豆杉科中,南方红豆杉与红豆杉之间的遗传距离最小为 0.121,云南穗花杉、穗花杉与南方红豆杉间的平均遗传距离为 0.315,云南榧树与红豆杉科其它植物的亲缘关系较远^[4]。运用 RAPD 对桃、李、杏、梅、樱等植物系统发育的研究表明:李、杏在梅的系统发育过程中处于基本等同的地位,梅与杏、李关系较近,与桃、樱的亲缘关系则相隔较远^[5,6,7],可划分为桃属、李属、杏属和樱属。

2.2 种间亲缘关系鉴定的应用

RAPD 技术可用于探讨物种数目不多的小属的种间关系,包括几个近缘种的复合体属下物种数目不多的组,以及与栽培品种密切相关的野生种。陈向明等对蔷薇属的玫瑰、月季、蔷薇进行 RAPD 分析,表明玫瑰与月季的亲缘关系较近,两者与蔷薇的亲缘关系较远^[8]。

2.3 种内亲缘关系鉴定的应用

观赏植物栽培品种间的 RAPD 亲缘关系鉴定占据大部分,主要为品种的分类提供分子水平的理论依据。对中国水仙和欧洲红口水仙共 6 个品种进行 RAPD 分析结果表明中国水仙 3 个品种亲缘关系十分密切,红口水仙 3 个品种亲缘关系较近,中国水仙与红口水仙 3 个品种见得关系较远^[9]。对河南 17 个桂花品种^[10]和部分中国兰花^[11]的 RAPD 分析都表明种内不同品种间的亲

第一作者简介:管晓庆(1981-),女,莱阳农学院园林植物与观赏园艺专业硕士研究生,主要从事园林植物遗传育种与分类方面的研究,E-mail:guiyunwuxiang2004@163.com。

通讯作者:王奎玲(1963-),女,博士,副教授,现任莱阳农学院环境艺术学院园林教研室主任。

收稿日期:2006-11-20

缘关系较近,不同种间亲缘关系较远。

2.4 栽培品种与野生种间的亲缘关系鉴定的应用

探讨栽培品种与野生种的亲缘关系,主要用于研究观赏植物的起源问题。戴思兰等对7个中国菊花野生种和几个菊花栽培种的RAPD研究表明,野菊、毛华菊和菊花脑与菊花的遗传距离最小,亲缘关系最近,紫花野菊与菊花的距离远于其它几种。并结合以往研究结果,提出栽培菊花主要起源于野菊、毛华菊和菊花脑。孟丽等利用RAPD技术对芍药属牡丹组的11个野生牡丹类群和12个栽培牡丹品种间的亲缘关系进行了研究。革质花盘亚组各野生种与栽培品种间的亲缘关系都比较近,将两者聚为一类^[12]。5个野生种与栽培牡丹间亲缘关系从近到远依次为:杨山牡丹、四川牡丹、卵叶牡丹、紫斑牡丹和矮牡丹。张春英等也用RAPD解决了关于‘白山山碧’桃的起源问题。

2.5 杂种后代与父母本间的亲缘关系鉴定的应用

利用RAPD对部分观赏植物的杂交种后代与父母本之间的亲缘关系鉴定,可为杂交育种的亲本选配提供理论依据。陈新露等对丁香品种的亲缘关系进行RAPD分析,通过品种间相似系数比较,确认品种Rochester是从品种Flora选育而来,品种Maiden's Blush是由朝鲜丁香和欧洲丁香品种杂交而来。李辛雷等通过对菊属野生种、栽培菊花及种间杂种进行RAPD分析研究,结合杂交结实性与幼胚拯救成苗率表明:父母本亲缘关系近的遗传距离较小,杂交亲和性好,结实率较高,幼胚拯救易成功;反之杂交亲和性差,难以结实,幼胚拯救成苗率低。对圆叶牵牛4个亲本及各杂交组合F₂单株的RAPD扩增,其中3个杂交组合F₂基因组的DNA均有不少片段来自双亲中的共有片段,部分来自母本,另一部分则来自父本,还有极少的一部分是双亲均不具备的特异性片段^[13]。

3 品种分类和种质资源遗传多样性方面的应用

RAPD分子标记与分类的其它方法相比有许多不可取代的优点,是目前在观赏植物分类中应用最多的分子标记之一。观赏植物的分类由于生产和应用上的需要往往要鉴定到品种,这与植物学意义上只需到种、变种和变型的分类不同。观赏植物只要性状有变异、且变异能保留即被列为新品种,因此许多观赏植物在长期的人工栽培和自然选择条件下形成了大量的品种,要将它们进行系统的分类研究,单纯依靠形态是不够的^[14],运用RAPD分子标记可以解决这一难题,为观赏植物的起源、品种鉴定、专利保护提供科学依据。

目前已有众多的观赏植物利用RAPD技术进行了品种的分类和鉴定。如丁香、兰花^[9]、蝴蝶兰^[15]、仙客来^[16]、唐菖蒲^[16]、水仙^[11]、牡丹、香石竹^[17]、月季^[18]、玫瑰^[19]、红檉木^[20]、梅花^[21]、百合^[22,23]、菊花^[24]、美人蕉^[25]、桂花^[26]、银杏^[27,28]、竹类^[29]等的部分品种都运用

了RAPD技术进行有效鉴别。将形态分类和RAPD技术相结合,能更有效地进行品种分类,研究结果表明大部分观赏植物的RAPD鉴定和分类研究结果与传统分类学结果基本一致,也有少数因其复杂的遗传多样性而与不完全一致。

利用RAPD技术对观赏植物的种质资源进行遗传多样性分析有利于我们对观赏植物种质资源的科学认识,加强对特殊种质资源的保护意识,并为种质资源保存、开发利用策略的制定提供科学的理论依据。程中平利用RAPD技术对碧桃和红叶桃分别进行种质资源分析,运用特殊谱带,建立了分类检索表,并以此提出应重点保存的种质。利用RAPD分子标记技术对湖北保康野生紫薇的遗传多样性进行分析,结果表明保康野生紫薇具有较丰富的遗传多样性,其平均有效等位基因数为1.7257,平均基因多样性为0.4089,平均shannon信息指数为0.5952^[30]。

4 RAPD指纹图谱和目标性状基因标记应用

分子标记绘制成的DNA指纹图谱已成为鉴别品种、品系的有力工具。指纹图谱技术对良种质量的监测,名、优、特种质的保护及育成品种的知识产权和育种家们的权益等均有重要意义。国外利用RAPD标记绘制DNA指纹图谱相对较早,国内则相对较少,且开展晚。苏晓华等利用RAPD方法,在美洲黑杨×青杨3代谱系中分析分子标记,构建出第1张美洲黑杨×青杨分子连锁图谱。该图谱为杨树抗病、虫和其它性状基因定位提供了框架结构,为实现杨树分子遗传育种迈进了最重要的一步。张俊卫等对42个形态特征相似的官粉型梅花品种的基因组DNA进行随机引物PCR扩增。7个随机引物或其组合可以把42个品种区分开,产生的40个RAPD标记,可用于构建区分品种的指纹图谱^[25]。

RAPD技术可作为一种辅助育种手段,用于杂交育种中真假杂种的鉴定,杂种优势预测,品种选育早期鉴定,优良性状鉴定和目标性状基因标记等。目前在观赏植物中主要有利用RAPD研究目标性状基因标记的报道:许艳等利用RAPD分析技术,对开淡黄色花和橙色花的金盏菊进行了扩增反应^[31]。在9个随机引物中,有3个引物扩增的条带在两种不同花色金盏菊中有差异,该结果将为分析控制淡黄色和橙色花色有关的基因提供新的思路。高志红等应用RAPD分子标记技术和SCAR分子标记技术研究了梅单瓣花与复瓣花相关的分子标记,寻找单、复瓣相关基因及为梅杂交育种提供早期选择标记^[32]。结果表明从34个随机引物中筛选到一个多态性引物OPP01,扩增出只有单瓣花类型具有的分子量为1899的DNA特异片段,即OPP01-DS-1899;根据该序列设计大小分别为25bp和24bp的一对引物SSD-1和SSD-2将RAPD标记转为SCAR标记,寻找花瓣调控基因,该标记大小为1079bp。

5 其它方面的应用

RAPD 技术在观赏植物中除上述几个方面应用较多外,在其他方面也有一些相关研究。对经秋水仙素处理的不同倍性的金鱼草和东方百合的 RAPD 图谱研究,表明秋水仙素在诱导染色体加倍过程中,引起了分子遗传结构上一定程度的改变^[33,34]。对⁶⁰Co- γ 射线处理的菊花变异株和对照进行 RAPD 研究,结果表明,经过不同辐射剂量处理获得的变异菊花在 DNA 水平上存在多态性差异^[35]。对亚洲百合‘pollyanna’及辐射种球诱导出的 20 个表现型雄性不育突变体进行的 RAPD 分析,找出了其 9 个基因型突变体^[36]。用 RAPD 技术对矮牵牛组培的白化苗与正常苗间叶绿体 DNA 进行研究,发现 3 个引物能在源于同一植物体的组培白化苗与正常苗的叶绿体 DNA 之间扩增出差异常片段,说明矮牵牛的白化的确可能是由于叶绿体 DNA 水平上的碱基变化所引起的^[37]。

6 展望

分子标记技术在植物中最先应用于农作物、果树、蔬菜等农业方面,分子时代到来后,才开始应用到大量的观赏植物中,其中我国的观赏植物中目前运用较多的是 RAPD 技术。虽然 RAPD 标记技术存在稳定性和重复性差的缺点,但只要严格控制实验条件就会取得良好的效果;尽管 RAPD 标记是显性标记,但可以通过将其化为其他标记来克服。且 RAPD 标记费用低,操作简便,尤其适宜于我国一般科研单位对众多的观赏植物展开分子生物学方面的研究。随着分子生物学的迅猛发展,分子标记技术手段也在不断更新,但 RAPD 标记仍有着重要的应用价值,并结合其他新技术,共同解决诸多方面的问题。

参考文献:

- [1] William J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers[J]. Nuc Acid. Res., 1990, 18, 6531-6535.
- [2] 谭晓风, 漆龙霖. 山茶属植物油茶组与金花茶组的分子分类[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4), 31-34.
- [3] 贺晶. 山茶属红山茶组植物 RAPD 分类研究[D]. 中南林学院硕士学位论文, 2001, 5.
- [4] 王彪, 苏应娟, 黄超, 等. 红豆杉科植物 RAPD 分析及其系统学意义[J]. 西北植物学报, 2000, 20(2), 243-249.
- [5] 张俊卫, 包清珠, 陈龙清. 梅、桃、李、杏、樱的 RAPD 分析[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2), 13-16.
- [6] 程中平. 利用分子标记对桃、李、杏、梅、樱类植物系统发育的分析[J]. 中国南方果树, 2003, 32(3), 45-50.
- [7] 刘育林, 陈俊愉. 梅花亲缘关系 RAPD 研究初报[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(2), 81-85.
- [8] 陈向明, 郑国生, 孟丽. 玫瑰、月季、蔷薇等蔷薇属植物 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(1), 78-80.
- [9] 陈林娇, 田惠桥, 武剑. 中国水仙与欧洲水仙品种 RAPD 指纹研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(2), 177-180.
- [10] 尚富德, 伊艳杰, 张彤. 河南 17 个桂花品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2004, 31(5), 685-687.
- [11] 梁红建, 刘敏. 中国部分兰花品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 1996, 23(4), 365-370.
- [12] 孟丽, 郑国生. 部分野生与栽培牡丹种质资源亲缘关系的 RAPD 研究[J]. 林业科学, 2004, 40(5), 110-115.
- [13] 张汉尧, 王文泉, 刘小珍, 等. 牵牛花杂交 F₂ 代的 RAPD 多态性分析[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(3), 276-278.
- [14] 张俊卫, 包清珠. 分子标记在观赏植物分类中的应用[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2), 86-89.
- [15] 明凤, 董玉光, 姜玉霞, 等. 蝴蝶兰不同花色品种遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 上海农业学报, 2003, 19(2), 44-47.
- [16] 车代弟, 龚东芳, 秦智伟. RAPD 分子标记在球根花卉上的应用研究[J]. 东北农业大学学报, 2003, 34(2), 133-136.
- [17] 苏友波, 林春, 毛静. 香石竹品种的 RAPD 标记[J]. 园艺学报, 2004, 31(1), 109-111.
- [18] 王国良, 上田善弘, 巫水钦. 切花月季芽变品种的分子标记与鉴别研究[J]. 江苏林业科技, 2001, 28(1), 1-9.
- [19] 武蕾. 平阴玫瑰栽培品种种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[D]. 山东农业大学硕士学位论文, 2005, 6.
- [20] 李晨东, 唐前瑞. 不同来源红榿木材料的 RAPD 分析及分类学探讨[J]. 园艺学报, 2002, 29(3), 358-362.
- [21] 张俊卫, 梁玉荣, 包清珠. 利用 RAPD 标记鉴定和区分梅花 42 个宫粉型品种[J]. 2004, 31(4), 487-490.
- [22] 赵庆芳, 马世荣, 曾小英, 等. 百合栽培品种资源的 RAPD 分析[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2005, 41(2), 30-33.
- [23] 左志锐, 穆鼎, 高俊平, 等. 百合遗传多样性及亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2005, 32(3), 468-472.
- [24] 秦贺兰, 游捷, 高俊平. 菊花 18 个品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(5), 488-490.
- [25] 黄国涛. 美人蕉属(Canna)植物引种与品种分类研究[D]. 南京林业大学研究生博士学位论文, 2005, 6.
- [26] 赵小兰, 姚崇怀. 桂花部分品种的 RAPD 分析[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(5), 484-487.
- [27] 谭晓风, 冯晓黎, 胡芳名, 等. 银杏 16 个主要栽培品种的分子鉴别[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4), 37-41.
- [28] 谭晓风, 胡芳名, 张启发. 银杏主要栽培品种的分子鉴别[J]. 中南林学院学报, 1998, 18(3), 3-10.
- [29] 余学军, 张立钦, 方伟, 等. 绿竹不同类型 RAPD 分子标记的研究[J]. 西南林学院学报, 2005, 25(4), 98-101.
- [30] 杨彦伶, 张亚东, 张新叶, 等. 保康野生紫薇的遗传多样性研究[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(6), 667-670.
- [31] 许艳, 李建粤. 不同花色金盏菊的 RAPD 分析[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2001, 32(2), 72-76.
- [32] 高志红, 韩振海. 梅单瓣复瓣花的相关分子标记[J]. 园艺学报, 2003, 30(5), 612-614.
- [33] 吴福川, 胡秀. 不同倍性金鱼草基因组 DNA 随机扩增多态性研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(4), 482-485.
- [34] 郑恩乡, 吴福川. 东方百合四倍体及 2n 雌配子杂种后代 RAPD 分析[J]. 西南农业大学学报, 2005, 27(4), 515-517.
- [35] 洪亚辉, 朱兆海. 运用 RAPD 分析菊花辐射变异后代的差异[J]. 湖南农业大学学报, 2003, 29(6), 462-467.
- [36] 贾月慧, 张克中, 赵祥云. 辐射亚洲百合‘pollyanna’雄性不育突变体的 RAPD 分析[J]. 核农学报, 2005, 19(1), 29-32.
- [37] 张汉尧, 刘小珍, 杨宇明. 矮牵牛组培白化苗与正常苗叶绿体 DNA 多态性研究[J]. 湖北农业科学, 2005, 02, 15-16.