

分子标记技术在兰花遗传育种中的应用

蹇 黎

(贵州毕节学院环境与生命科学系, 551700)

摘 要:分子标记技术在兰花遗传图谱构建、遗传多样性和物种亲缘关系、分子标记辅助选择、品种(系)指纹图谱构建及杂种纯度鉴定等研究领域可广泛应用。综述了随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、扩增片段长度多态性标记(AFLP)、限制性片段长度多态性(RFLP)、单核苷酸多态性标记(SNP)等分子标记的基本原理、主要特点以及在兰花育种研究应用中的情况和展望。

关键词:兰花;分子标记;遗传育种;应用

中图分类号:S 682.31;S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)04-0083-03

分子标记是在形态标记、细胞标记和生化标记之后发展起来较为理想的一种新的遗传标记形式,具有标记数量多,不影响目标性状的表达,不易受环境影响,结果稳定可靠,重复性好等优点,成为评价育种资源最有力的工具之一。目前,基于 PCR 的 DNA 标记,已广泛应用于遗传图谱的建立、基因标记、基因组作图、基因克隆、亲缘关系和遗传多样性鉴定、品种(系)指纹图谱构建、

杂种纯度鉴定、目标性状的连锁和分子标记辅助选择等研究中^[1~4]。

兰花(Orchid)一般是指兰科植物(Orchidaceae),是被子植物中最大科之一。我国有丰富的野生兰花资源和丰富的国兰栽培品种资源,其中具有观赏性的兰花如蝴蝶兰、石斛兰、大花蕙兰、卡特兰、文心兰、兜兰、万代兰等花型奇特,色彩丰富,具有很高的经济价值。但由于兰科植物变异很大,中间类型多,种的界限不清楚,且目前主要的育种方法仍是传统的驯化育种,这将导致国兰品种改良进展缓慢,不能满足和达到日益增长的市场需求^[5,6]。近些年来,随着分子生物技术的迅速发展,使兰

作者简介:蹇黎(1978-),女,硕士研究生,研究方向为分子生物学与育种,E-mail:zggyjl@163.com。

收稿日期:2006-12-04

学报,1990,12(3):26-30.

[11] 贾洪斌. 吉林大学自然科学学报,1994,(3):122.

[12] 朱明智. 野生笃斯越橘的营养和经济价值评述[J]. 生物学杂志,1990,(5):18-22.

[13] 高原君. 中国野生植物开发与加工利用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995:331.

[14] 凌关庭. 天然食品添加剂手册[M]. 化学工业出版社,2000.

[15] 任玉林,李华,邓贵德,等. 天然食用色素—花色苷[J]. 食品科学,1995,16(7):22-27.

[16] 周国立. 食用天然色素及其提取应用[M]. 济南:山东科学技术出版社,1991:206.

[17] Ballington, J. R., Ballinger, W. E., Maness, E. P., and Luby, J. J. Anthocyanin aglycone and aglycone sugar content in the fruits of five species of *Vaccinium* section *Myrtillus*[J]. Can. J. Plant Sci, 1987, 68: 241.

[18] Cao, G. Verdon, C. P., Wu, A. H. B., Wang, H. and prior, R. L. Automated oxygen radical absorbing capacity assay using the LOBAS FARA Clinical chem 41,1738-1744 Biosynthesis and stability of monacylated anthocyanins[J]. Food Technol, 1995, 51: 69-71.

[19] Dougall, D. K., Baker, D. C., Galin, E. and Redus, M. Biosynthesis and stability of monacylated anthocyanins[J]. Food Technol, 1997, 51: 69-71.

[20] Gao, L. and Mazza, G. 1994. Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries[J]. J. Food sci, 59: 1057-1059.

[21] Gao, L. and Mazza, G. characterization of acetylated anthocyanins in low-bush blueberries[J]. J. Liq. chromatog, 1995, 18: 245-259.

[22] Genstat 5 committee. Genstat 5 reference manual, Release 3. Clarendon press. Oxford. UK. 1993.

[23] Kalt, W. Dufour, D. Health functionality of blueberries. Hort-technology, 1997, 7: 216-221.

[24] Kalt, W. McDonald, J. E., Rucker, R. D. and Lu, X. Anthocyanin content and profile within and among blueberry species [J]. Can. J. Plant Sci, 1999, 79: 617-623.

[25] Tadashi JCHIYANAGT, etc. Comparison of Anthocyanin Distribution in Different Blueberry sources by Capillary Zone Electrophoreses[J]. Biol. Pharm Bull, 2000, 23(4): 492-497.

[26] 唐传核. 花色苷的生理功能[M]. 中国食品用化学品, 1999.

[27] 蔺定远,李炳. 用光谱法评价花色苷的稳定性[J]. 食品与发酵工业, 1992, (5): 83-85.

[28] 王领,张子德,刘彩莉,等. 红葡萄制汁加工中色素的浸出及理化特性[J]. 食品科学, 1997, 18(2): 32-34.

[29] 孟凡丽. 越橘果实花色苷的提取分离、定量和结构鉴定研究[D]. 硕士学位论文.

[30] 王喜军. 越橘茎叶化学成分提取、分离及结构鉴定[J]. 中草药, 2002, 33(7): 595-596.

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

花育种中的间接选择成为可能,大大提高遗传分析的准确性和选育种的有效性。因此可利用分子生物学手段为开发兰花新品种、改善品质和增强抗性来取得较大的突破。文章综述了随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、扩增片段长度多态性标记(AFLP)、限制性片段长度多态性(RFLP)、单核苷酸多态性标记(SNP)等分子标记的基本原理、主要特点以及在兰花育种研究应用中的情况和展望^[1~4]。

1 分子标记的主要类型及特点

1.1 RFLP 标记(Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP 是最早发展的分子标记技术。其原理是利用放射性核素或非放射性物质标记探针,与转移于支持膜上的经过限制性酶切的基因组总 DNA 杂交,通过显示限制性酶切片段的大小,检测不同遗传位点等位变异的多态性。RFLP 具有在基因组 DNA 中位点固定,数量大,几乎分布于全基因组,可检测位点的复等位性,共显性等优点,但缺点是该方法 DNA 用量大,耗费成本高,操作繁琐,技术复杂,费时费力,且检测中需要的放射性同位素对人体有害。目前,RFLP 标记主要应用于遗传连锁图的绘制和目的基因定位以及品种鉴定等方面。

1.2 RAPD 标记(Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD 的原理是以基因组 DNA 为模板,以一个随机的寡核苷酸序列(通常为 10 个碱基对)作引物,通过 PCR 扩增反应,产生不连续 DNA 片段产物,用以检测 DNA 序列的多态性。它具有快速简便,无放射性污染,成本较低,分辨率高,灵敏度强等优点,RAPD 的缺点主要有引物筛选工作量大,试验可重复性差和多态性不足等。该技术目前在遗传学各个领域广为应用,尤其在种质资源鉴定及作物品种纯度和真实性鉴定方面受到广泛的重视。

1.3 AFLP 标记(Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP 技术基本原理是通过对基因组 DNA 酶切片段的选择性扩增来检测 DNA 酶切片段长度的多态性,选择性扩增是通过在引物的 3' 末端加上选择性核苷酸而实现的,通过改变选择性核苷酸的数目,就可预先决定所要扩增的片段数目。它具有多态性强、试验结果稳定、重复性好、典型的孟德尔遗传方式等优点,但受知识产权保护而限制了它在商业及生产上的应用;同时,试验对 DNA 纯度和内切酶的质量要求较高,操作程序长、步骤多,并要求很高的实验技能和精密的仪器设备。目前该技术已用于遗传作图、基因定位、DNA 指纹鉴定、遗传多样性分析等许多研究领域。

1.4 ISSR 标记(Inter-simple Sequence Repeats)

ISSR 标记根据植物广泛存在 SSR 的特点,利用在

植物基因组中常出现的 SSR 本身设计引物,无需预先克隆和测序。SSR 在真核生物中的分布是非常普遍的,并且进化变异速度非常快,因而锚定引物的 ISSR-PCR 可以检测基因组许多位点的差异。ISSR 通常为显性标记,具有很好的稳定性和多态性。近年来,已被应用于品种鉴定、遗传关系及遗传多样性分析、基因定位、植物基因组作图等。

1.5 SNP 标记(Single Nucleotide Polymorphism)

SNP 是指在染色体基因组水平上单个核苷酸的变异引起的 DNA 序列多态性,而其中最少数一种等位基因在群体中的频率不小于 1%。它包括单碱基的转换,颠换、插入及缺失等形式。SNP 标记在大多数基因组中存在较高的频率、数量丰富,可进行自动化检测,并在短时间内检测出大量的样品。但其鉴定则要通过芯片技术实现。

2 分子标记在兰花遗传育种中应用情况及展望

由于分子标记与传统应用的常规遗传标记相比具有诸多优点,部分标记在兰花遗传育种中已得到广泛应用。现将分子标记在兰花育种中的应用情况概述如下。

2.1 遗传多样性研究

遗传多样性是生命系统的基本特征,是物种适应自然和发生进化的遗传基础。研究遗传多样性可以减少育种工作中亲本选育的盲目性,提高育种效率。而在同一物种的各个品种间存在大量独特指纹标记。根据种质资源 DNA 指纹的多态性和各个目标性状的互补性,可以总体评价育种材料的变异丰富度并在其后代中选育出综合性状最佳的单株。

在分子标记中,RAPD 技术是评价和比较种内、种间遗传变异的常用方法。李钧敏等用 RAPD 分子标记技术对 30 个西兰花栽培新品种进行分析,结果显示 22 个引物在 30 个品种中共扩增出 229 条谱带,其中多态性条带有 109 条,多态位点百分率为 47.60%,表明品种间丰富的遗传多样性^[7]。文李利用 RAPD 技术分析兰属 5 个种 2 个变种共 13 个品种间的亲缘关系。从 55 种 10 个碱基随机引物中筛选出 4 种引物,扩增出 93 条多态性带,多态率为 100%^[8]。在栽培品种的鉴定上,梁红健等使用 10 种 20 个碱基引物对 19 个中国兰花品种的基因组 DNA 进行扩增,共产生 83 条扩增带,其中 80 条为多态性带。每个兰花品种都有其各自的扩增带,这种特异的条带可作为品种分子标记为其遗传多样性鉴定提供依据。

2.2 亲缘关系研究

利用分子标记可以确定亲本之间的亲缘关系,从而确定亲本间遗传距离,进而划分杂交优势群,提高杂种优势潜力。文李用 RAPD 技术分析了兰属(*Cymbidium*) 5 个种 2 个变种共 13 个品种间的亲缘关系,从 55 个随机引物中筛选出 4 种引物,扩增出 93 条多态性带,多态率为 100%,聚类分析表明,剑兰、墨兰和春兰的亲缘

关系较近,而春剑、寒兰、独占春和兔耳兰与剑兰的亲缘关系较远^[8]。明凤等利用筛选到的 25 个特异引物对蝴蝶兰不同花色品种作 RAPD 分析,将 12 个品种分为两个家族:第一家族中包含基色为白色的花色品种,花蕊颜色略有不同;第二家族为具有条纹的花色品种;确定品种间遗传距离最大为 0.7832,最小为 0.1034^[9]。这为近缘杂交获得不同类型的新品种提供了理论依据。

2.3 品种鉴定和杂种纯度鉴定

长期以来,各种兰花由于不同地域的相互引种栽培,出现了许多同物异名和同名异物的现象,品种名和品种分类十分混乱,而且用传统手段进行杂种纯度鉴定很费时,而且易受环境条件的影响。因此,对现有花卉品种准确的鉴定和分析十分重要,分子标记技术为品种鉴定提供了新手段并克服许多弊端。梁红健等用 RAPD 技术对 19 个中国兰花品种的基因组 DNA 进行扩增,共产生 83 条扩增带,其中 80 条为多态性带。每个兰花品种都有其特有的扩增带可与其它品种区别开来^[10]。Obara—Okeyo 等利用 RAPD 技术对 36 个大花蕙兰栽培种进行了品种鉴定和遗传分析,利用 OPA—1 引物,可将已混淆的品种明确地区别出来^[11]。分子标记不仅简单、迅速、可靠,而且 DNA 用量少,不影响被检测植株的后期生长。

2.4 遗传图谱的构建

遗传图谱构建是对基因组进行系统研究的基础,也是在分子水平上进行育种的依据。兰花遗传图谱的构建工作已经开展,谢伟等利用随机扩增多态 DNA 技术(RAPD)对兰属的 3 个品种春兰、春剑、蕙兰进行了分析与研究,建立了它们之间的 DNA 指纹图谱,找到了参试样品的特征谱带,并探讨它们之间的亲缘关系^[12]。谭文澄等采用分子技术对兰属 23 个样株和石斛兰属 1 个样株进行分析,获得了清晰易读的由 6—15 条带组成有特异性的遗传指纹图谱^[13]。随着分子标记的发展,也可以在兰花中产生 AFLP、AFLP、SSR 等分子标记的遗传图谱。

2.5 分子标记辅助选择育种

选择是作物育种的重要环节。以往都根据植株性状的表型进行选择,这种选择对于质量性状或便于观察的性状是有效的,但对数量性状或不容易观测、易受环境影响、表现不稳定的性状来说,依靠性状的表型进行选择就比较困难。作为辅助育种的分子标记可以通过连锁标记对这些性状进行早期间接选择,可以实现有利基因的定向转移而减少连锁累赘;可以实现目的基因的累加和大大缩短育种周期。利用分子标记进行辅助选择需要一定的前提,即首先要有足够的数量性状和质量性状位点;其次位点与标记有相当紧密的连锁程度;第三需完善的分子标记辅助选择的理论和技术。目前,在康乃馨、亚洲杂交百合等花卉中,兰花是利用分子标记

辅助育种相对比较多的一种^[14]。这说明在兰花中利用分子标记辅助选择育种具有一定的可行性。

3 结语

目前国兰品种改良进展缓慢,主要的育种方法仍是传统的驯化育种^[15,16],仍不能满足市场的需求。但随着分子标记技术的发展,在兰花中已展现了广阔的前景,如利用分子标记技术,能够准确鉴定种质资源中的优异农艺性状基因的多样性,发掘大量未被利用的优良农艺性状的基因,拓宽育种的物质基础;有助于在育种过程中对特定基因型的选择,缩短育种周期,提高育种效率;鉴定遗传多样性,确定杂交育种的亲本选配;揭示物种亲缘关系,有效进行种质资源创新,为兰花育种提供早期的辅助选择指标、以改良株形、花型、花色、花香和提高抗逆性等多种优良性状的利用,来丰富兰花遗传基础,从而更好地为兰花育种提供积极的指导意义。

参考文献:

- [1] Olson M, Hood L, Cantor C, et al. A common language for physical mapping of the human genome [J]. Science, 1989, 245: 1434-1435.
- [2] Mohler V, Jahoor A. Allele-specific amplification of polymorphic sites for the detection of powery mildew Resistance loci in wheat [J]. 1996, 93: 1078-1082.
- [3] Zhou Y F, Qi H X. Studies on increasing resistance of 9311 to bacterial blight by molecular marker assisted selection [J]. Plant Molecular Breeding, 2003, 1(3): 343-349.
- [4] Hai L, Xiao S H, Yan C S. Analysis of genetic difference between species in lupines by AFLP [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35(8): 911-915.
- [5] 王卜琼, 李枝林, 余朝秀. 兰花育种研究进展 [J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 551-556.
- [6] 张莉, 张明, 高宏秀. 兰花组织培养研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(11): 2134-2135, 2147.
- [7] 李钧敏, 金则新, 柯喜丹. 西兰花品种的随机扩增多态 DNA 分析 [J]. 江苏农业科学, 2006, 4: 66-70.
- [8] 李季, 叶庆升, 王小菁, 等. 利用 RAND 技术分析兰属品种间的亲缘关系 [J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7: 29-32.
- [9] 明凤. 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.
- [10] 梁红健. 中国部分兰花品种 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 1996, 23(4): 365-370.
- [11] Obara—Okeyo P, et al. Genetic diversity and identification of Cymbidium cultivars as measured by amplified polymorphic(RAPD) markers [J]. Euphytica, 1998, 99: 95-101.
- [12] 谢伟, 乐超银, 郭政宏. 兰属基因组 DNA 多态性 RAPD 分析 [J]. 湖北农业科学, 2006, 45(1): 24-26.
- [13] 谭文澄, 方盛国, 谢海, 等. 兰属植物 DNA 指纹图的研究 [J]. 四川师范大学学报, 1999, 23(4): 407-411.
- [14] Goovel G et al. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 117-122.
- [15] 王利民, 王四清, 杨玉峰. 兰花的种质资源和育种 [J]. 安阳工学院学报, 2005, 2(14): 4-10.
- [16] 曾碧玉, 朱根发, 刘海啸. 兰花选育研究进展 [J]. 园艺园林学科, 2005, 21(12): 272-276.