

中国板栗与美洲栗杂种抗性遗传标记——莽草酸脱氢酶(SKD)的遗传分析

李作洲, 黄宏文*

(中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘 要: 采用超薄平板聚丙烯酰胺等电聚焦技术和单株家系、杂交家系分析方法对中国板栗(*Castanea mollissima*)和美洲栗(*C. dentata*)莽草酸途径的关键性酶——莽草酸脱氢酶(SKD)的遗传变异进行了研究。对单株家系、种内杂交家系和种间回交 BC₁ 群体的研究表明: 栗属莽草酸脱氢酶共有 4 个活性区域, 活性基因座具有物种特异性, 并符合孟德尔式遗传, 美洲栗的 *Skd-1* 与 *Skd-2* 为独立分离基因座, 但中国板栗的 *Skd-3* 与 *Skd-4* 则为紧密连锁基因座。通过对中国板栗和美洲栗杂种 F₂ 代群体分离的杂种酶谱表型分析, 表明中国板栗 *Skd-3*、*Skd-4* 连锁群可能在基因组中存在重复, 并推断美洲栗的 *Skd-1* 和 *Skd-2* 可能分别由重复连锁群独自变异演替而成。莽草酸脱氢酶重复基因座的存在并表达出酶活性, 可能使中国板栗的莽草酸途径更有效率, 增强中国板栗在受到栗疫病菌等微生物攻击时的反应应答, 从而提高其抗性。研究认为莽草酸脱氢酶有作为抗性辅助选择遗传标记的潜力, 在回交育种拯救美洲栗计划中具有潜在的应用价值。

关键词: 栗属; 遗传标记; 种间杂种; 莽草酸途径; 莽草酸脱氢酶(SKD)

中图分类号: Q943; S664.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)06-0486-09

Genetic Analysis of Shikimate Dehydrogenase Allozymes, a Genetic Marker Resisting to Chustnut-blight, in Hybrid of *Castanea mollissima* × *C. dentata*

LI Zuo-Zhou, HUANG Hong-Wen*

(Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: In plants, the shikimate pathway is an important metabolism pathway in response to wounding and fungal attack. The genetic analysis of enzymes in the pathway can provide the basic information about their applicability as a genetic marker. In this study, variability and inheritance of shikimate dehydrogenase (SKD; EC 1.1.1.25) allozyme, one of the key enzymes in shikimate pathway, was investigated in *Castanea mollissima* and *C. dentata* using isoelectric focusing in thin-layer polyacrylamide slab gels. The single-tree progeny method and intra- and interspecific controlled cross families were used for the analyses. The results showed SKD had four activity zones and exhibited species specific banding patterns in *Castanea*. Two alleles were detected at each four locus and inherited in Mendelian fashion. Locus *Skd-1* and *Skd-2* unique to *C. dentata* seemed to be segregated independently, while a highly significant linkage was observed between two loci *Skd-3* and *Skd-4* unique to *C. mollissima*. However, the phenotypic analysis of SKD allozyme banding patterns in F₂ populations of *C. mollissima* × *C. dentata* revealed that the linkage group between *Skd-3* and *Skd-4* maybe have been replicated in *C. mollissima*. It is speculated that *Skd-1* and *Skd-2* in *C. dentata* possibly come from repetition linkage groups during a speciation process.

收稿日期: 2004-04-01, 修回日期: 2004-06-07。

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-104); 国家自然科学基金(39570057); 美洲栗基金会资助项目。

作者简介: 李作洲(1967—), 男, 在职博士研究生, 副研究员, 主要从事植物保育遗传研究(E-mail: lizz@rose. whioh. ac. cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: hongwen@public. wh. hb. cn)。

Because of expression of the double SKD loci activity, the shikimate pathway in *C. mollissima* is considered more efficient and consequently, responses of *C. mollissima* to *Cryphonectria parasitica* invasion and other microbial attack may be elevated. So the resistance of *C. mollissima* to chestnut blight is considered increase. This study suggested that SKD allozyme could be a potential genetic marker for aided selection on blight-resistance and have potential application in the backcross-breeding program of *C. dentata*.

Key words: *Castanea*; Genetic marker; Interspecific hybrid; Shikimate pathway; SKD

栗属(*Castanea*)为壳斗科(Fagaceae)中的重要植物类群,共有7个种,均为二倍体($2n=2x=24$),广泛分布于北半球温带的广阔地域,为重要的经济用材林树种和食用坚果树种^[1]。其中,美洲栗(*C. dentata*)和美洲榛果栗(*C. pumila*)仅分布于北美,欧洲栗(*C. sativa*)分布于欧洲大陆、非洲北部和西亚,其它4种分布于东亚,即中国大陆的板栗(*C. mollissima*)、茅栗(*C. seguinii*)和锥栗(*C. henryi*)及分布于日本、朝鲜半岛的日本栗(*C. crenata*)。栗属物种间除了地域分布差异外,也存在栗疫病抗性的差异,东亚物种的抗性显著地高于欧美物种,其中美洲栗抗性最差,而中国板栗对栗疫病的抗性最强^[2-5]。提高美洲栗对栗疫病的抗性一直是植物学家和植物病理学家的重要研究方向之一^[6,7]。

美洲栗曾广泛地分布于美国东部阿巴拉齐亚(Appalachia)山脉,北起缅因州(Maine)南至佐治亚州(Georgia),西达密歇根州(Michigan)、印第安纳州(Indiana)和田纳西州(Tennessee)以及加拿大的安大略省南部^[1,8],为美国东部天然落叶阔叶林的优势高大乔木树种,其材质优良,为优质速生用材树种。同时,其坚果具有较高的食用价值,为阿巴拉齐亚山脉的野生动物提供了稳定丰富的食物来源^[1]。自从20世纪初栗疫病从日本传入北美^[9,10],并于1904年在纽约动物园发现第一例栗疫病起,到1950年的近50年内,栗疫病迅速蔓延至整个北美,使美洲栗从高大的乔木变为仅依靠根蘖苗为生的残存灌木状,濒于灭绝^[7,11]。而特产于中国的中国板栗却与栗疫病菌长期共存,显示出对栗疫病菌有高度抗性^[4,5]。遗传多样性研究表明,栗属物种对栗疫病菌的敏感性在于其遗传基础薄弱的程度^[12-14]。

近百年来,为了挽救濒危的美洲栗,世界各国的病理学家和育种学家进行了不懈的努力,但收效甚微^[7,15,16]。20世纪早期,美国农业部曾经致力于通过抗病中国板栗与美洲栗杂交来挽救和恢复美洲栗种群,虽然获得了具有栗疫病抗性的杂种,但却丧失了美洲栗高大通直的特性,而被迫于20世纪60年代放弃^[7,17,18]。欧洲利用含dsRNA的弱毒力菌株来

防治欧洲栗(*C. sativa*)的栗疫病取得成效^[19,20],但因菌株营养亲和型的问题,未能成功地应用于美洲栗栗疫病的防治^[16]。20世纪80年代初,Burnham总结并反思了美洲栗育种计划,提出回交育种可以用于拯救美洲栗^[21,22]。在Burnham等^[7]的提议下,美洲栗基金会又开始执行美洲栗与中国板栗杂交的回交育种计划^[23]。与品种培育不同,美洲栗的挽救是为了恢复整个物种,它涉及到广泛分布于美国5个不同气候带20个州的大量居群遗传组成^[13]。虽然通过其自然居群遗传多样性的研究,可以采取科学合理的取样策略来达到事半功倍^[13],但对于一个多年生乔木树种来说,其大量的回交群体培育选择任务依然繁重。如果在回交后代群体幼苗期采用恰当的遗传标记辅助选择,将大大提高选择效率。

等位酶遗传标记和各种DNA分子标记已广泛地应用于农作物和果树的辅助选择育种^[24-26]。在美洲栗回交育种方面也开展了辅助选择的分子标记研究^[27],Kubisiak等^[28]通过美洲栗与中国板栗的种间杂交F₂代群体构建了栗属物种的连锁遗传图,并认为有3个区域与栗疫病抗性有关,但大多数为显性的RAPD标记。Huang等^[12,13,29]及其他学者^[14,30,31]采用等位酶遗传标记在栗属植物中开展了大量的遗传变异研究。这些研究对美洲栗的回交育种计划有着较大的指导意义和促进作用,但与回交育种辅助选择的要求还有较大差距。Huang等^[29]的研究表明莽草酸脱氢酶(SKD; EC 1.1.1.25)在中国板栗和美洲栗上的表现存在明显的差异。

SKD是微生物和植物莽草酸途径(shikimate pathway)的几个关键性的酶之一^[32-34]。当植物在受到食草动物、昆虫伤害或微生物攻击以及氮素饥饿等环境压力时,莽草酸途径的酶将产生应答^[32,35]。研究SKD在美洲栗与中国板栗杂种中表达以及其在杂种子代或回交子代中的分离,有助于推进特异辅助选择遗传标记在栗属育种中的应用。虽然许多研究者对栗属物种的SKD遗传变异进行了研究^[12-14,29,31],但将其作为栗疫病抗性遗传标记来研究尚未见报道,Huang等^[29]通过单株家系和种间杂

交分离较深入地研究了中国板栗和美洲栗 SKD 等 11 种等位酶的遗传变异,通过检测认为其基因座等位基因符合孟德尔式分离模式,但其共分离酶谱表型和抗性选择标记方面未作进一步的研究分析。

本研究在 Huang 等^[29]研究的基础上进一步研究 SKD 在美洲栗和中国板栗杂种中酶谱表现及其在 F₂ 代或回交子代种的共分离,其目的在于:①分析其 SKD 标记作为美洲栗回交育种栗疫病抗性标记的适用性;②筛选用于回交育种有效辅助选择的酶谱表型,为其作为辅助选择遗传标记用于美洲栗的回交育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所用材料与 Huang 等^[29]所用材料一致(表 1),包括中国板栗品种、美洲栗株系和种内、种间杂种家系后代。其中,种内水平共 200 多株植株,包括来源于中国国家板栗种质资源圃的 25 个广泛栽培的中国板栗品种,来源于美国弗吉尼亚州(Virginia)美洲栗基金会研究农场的 20 个美洲栗株系,以及来源于 6 个中国板栗品种控制杂交的后代。因栗属物种高度自交不亲和且可用后代数目大,单株后代研究法^[36]用于检测等位酶遗传,其自由授粉的种子随机地取于一株母树。对于种间研究,美洲栗×中国板栗的 F₂ 代和回交 BC₁ 代家系来源于美国弗吉尼亚州美洲栗基金会研究农场,F₂ 代家系来源于一个美洲栗×中国板栗的 F₁ 代同胞的杂交,回交 BC₁ 代家系来源于对美洲栗的回交^[37]。另外,本研究材料还涉及少许茅栗样本、美洲榛果栗株系、日本栗品种和欧洲栗种子。

1.2 电泳与酶谱染色

成熟种子的子叶用于种内杂交水平的酶电泳分析,而休眠冬芽用于 F₂ 代和 BC₁ 代家系的酶电泳分析。酶的提取、电泳及染色参照 Huang 等^[29]的方法:在冰浴条件下,取 50 mg 左右的种子或冬芽组织,加入预冷的 3 号提取缓冲液^[38]研磨成匀浆(每毫克组织加 5~10 μL 提取缓冲液,并加入少许石英砂助磨),并在 5 000×g 下离心 5 min 后(5415C Eppendorf;Brinkmann Instruments, Westbury, N. Y.),采用 1 mm²的 Whatman 3 号滤纸纤维芯浸提上清液作为等位酶等电聚焦电泳样本;超薄平板微型聚丙烯酰胺等电聚焦电泳方法^[39]用于酶电泳,电极缓冲液为 Serva 两性电解质(pH:4~9);酶染色液配方在 Wendel 和 Weeden^[38]的基础上对用量作了减半

表 1 不同栗属物种样本 SKD 酶的基因座与基因型
Table 1 Loci and genotype of shikimate dehydrogenase (SKD) in *Castanea* species cultivars and selections

物种 Species	品种或株系 Cultivars or selections	基因座和基因型 Locus and genotype			
		Skd-1	Skd-2	Skd-3	Skd-4
<i>C. mollissima</i>	焦扎 Jiaozha	—	—	ab	aa
	羊毛栗 Yangmaoli	—	—	ab	aa
	枣庄 Zaozhuang	—	—	aa	aa
	六月暴 Liuyuebao	—	—	aa	aa
	尖顶油栗 Jiandingyouli	—	—	ab	aa
	九家种 Jiujiazhong	—	—	aa	aa
	油栗 Youli	—	—	ab	ab
	中迟栗 Zhongchili	—	—	ab	aa
	金丰 Jinfeng	—	—	bb	aa
	燕红 Yanhong	—	—	aa	aa
	红光 Hongguang	—	—	aa	aa
	短刺板红 Duancibanhong	—	—	ab	aa
	长刺板红 Changcibanhong	—	—	aa	aa
	中果红栗 Zhongguohongli	—	—	aa	aa
	Homestead	—	—	ab	ab
	Leader	—	—	aa	aa
	Cropper	—	—	bb	bb
	AU-17	—	—	ab	ab
	AU-60	—	—	ab	ab
<i>C. dentata</i>	WS male sterile	bb	aa	—	—
	WS E1	aa	aa	—	—
	Hesper	ab	aa	—	—
	Shinebone	aa	aa	—	—
<i>C. crenata</i>	Tanawa	—	—	ab	aa
	Ibuki	—	—	aa	aa
	Toyotawa-wase	—	—	aa	aa
	Ginyose	—	—	ab	aa
	Yinhong	—	—	ab	ab
	Toshan 60	—	—	ab	aa
	Toshan 9	—	—	aa	aa
<i>C. sativa</i>	Weich	aa	aa	—	—
	Klepper	aa	aa	—	—
<i>C. seguinii</i>	H91-13	—	—	ab	aa
	H91-6	—	—	ab	aa
	H91-9	—	—	ab	aa
	H91-3	—	—	ab	aa
	H91-8	—	—	ab	ab
	H91-4	—	—	aa	aa
	H91-2	—	—	aa	aa
	H91-5	—	—	ab	aa
	H91-7	—	—	ab	ab
	H91-10	—	—	aa	aa
<i>C. pumila</i>	H91-79	—	—	aa	aa
	Am4065	ab	aa	—	—
	Am2348	aa	aa	—	—
	Am2342	ab	aa	—	—
<i>C. pumila</i>	Am3532	aa	ab	—	—

修改: 25 mL 50 mmol Tris-HCl (pH8.5), 2.5 mg (500 μ L) NADP, 25 mg Shikimic acid, 5 mg (500 μ L) NBT or MTT, 1 mg (200 μ L) PMS。在 37℃下温浴直至蓝带出现。用水漂洗(若使用了 NBT, 需要在水中存放一段时间)或固定。所用试剂均来自美国 Sigma 公司。

1.3 基因座位确定与数据分析

按 Huang 等^[29]的方法, 根据表型带谱与控制杂交分离比例来确定基因座位和等位基因, 在多个基因座中最靠近阳极的基因座标记为基因座 1, 然后依次用阿拉伯数字 2, 3, …标注, 等位基因依次从阳极向阴极用字母 a, b…表示, 若有哑等位基因, 则用字母 n 表示。 χ^2 检验用于检测分离基因座与预期单个基因座孟德尔分离比例的符合度, 在两项分离时, χ^2 检验采用 Yates 修正法^[40]。连锁遗传分析采用 LINKAGE-1 软件^[41]的最大似然法。

2 结果与分析

2.1 栗属 SKD 酶谱的物种特异性

本研究的 SKD 电泳酶谱结果与 Huang 等^[29]的研究结果一致, SKD 共有 4 个活性区域, 并且在栗属欧美物种与东亚物种间表现物种特异性。靠近阳极的 2 个活性区域基因座 *Skd-1* 和 *Skd-2* 为美洲栗、美洲榛果栗和欧洲栗等欧美栗属物种特有, 而随后活性区域基因座 *Skd-3* 和 *Skd-4* 则为东亚栗属物种所特有(表 1)。在美洲栗中, *Skd-1* 和 *Skd-2* 活性区域均表现为由 a、b 两个等位基因控制的单带或双带酶谱表型(图 1), 这与 Huang 等^[13]在美洲栗野生居群遗传多样性研究中检测到的 SKD 遗传变异结果相一致。在中国板栗中, *Skd-3* 活性区域上部几乎与美洲栗的 *Skd-2* 活性区域的下部重叠, 两活性区域均表现出各自由 a、b 2 个等位基因控制的单带

或双带酶谱(图 1), 也与郎萍和黄宏文^[31]所检测的中国板栗野生居群的 SKD 遗传变异相一致。另外, 有一美洲栗样本酶谱表型略为特殊, 在 *Skd-3* 活性区域表达出 1 条酶带。

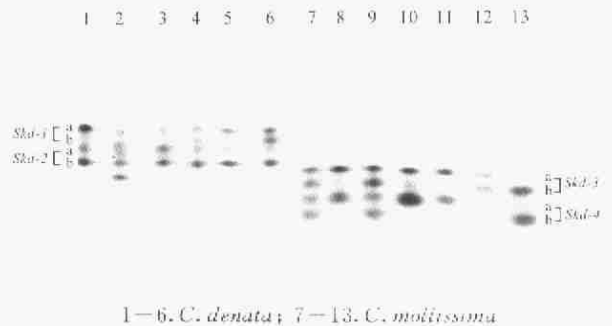


图 1 中国板栗和美洲栗莽草酸脱氢酶(SKD)电泳酶谱
Fig. 1 Band patterns of shikimate dehydrogenase (SKD) isozyme in *C. mollissima* and *C. denata*

2.2 中国板栗、美洲栗单株家系及种内控制杂交分析

种内控制杂交家系和单株后代分离研究及连锁遗传分析结果同样与 Huang 等^[29]的研究结果一致, 美洲栗的 *Skd-1* 基因座和 *Skd-2* 基因座可能为 2 个独自分离的基因座, 但由于美洲栗为濒危物种, 难以获得足够的纯美洲栗控制杂交家系后代进行等位基因分离检测, 该工作有待今后进一步研究。单株后代分析和种内控制杂交分析结果大多数表明中国板栗的 *Skd-3* 和 *Skd-4* 两基因座各自符合孟德尔式遗传(表 2), 但株系 Homestead 在 *Skd-4* 上显著偏离预期子代关系, 其作为母本的杂交组合子代也显著地偏离预期比率(表 3), 可能暗示该株系含有与配子选择性关联的基因^[42], 且 SKD 基因座可能与之连锁而形成连锁不平衡, 同时也可以看出 *Skd-3* 与 *Skd-4* 连锁。用于连锁遗传分析的 4 个家系均显著偏离自由组合独立分离比率, 表明两基因座为紧密连锁基因座。

表 2 中国板栗单株后代 SKD 酶基因座的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of shikimate dehydrogenase isozyme loci using single-tree progeny in <i>Castanea mollissima</i>							
基因座 Locus	母树及其基因型 Maternal tree		子代基因型 Progeny genotype				χ^2
	Name	Genotype	Total	aa	ab	bb	
<i>Skd-3</i>	Cropper	bb	20	0	17	3	2.04 ^{NS}
	Learder	aa	17	9	8	0	
	Homestead	ab	24	1	16	7	
	AU-60	ab	24	6	11	7	
<i>Skd-4</i>	AU-17	ab	24	6	14	4	0.38 ^{NS}
	Cropper	bb	20	0	17	3	5.04 [*]
	Learder	aa	17	9	8	0	
	Homestead	ab	24	3	18	3	
	AU-60	ab	24	8	8	8	
	AU-17	ab	24	8	11	5	0.04 ^{NS}

注: N 表示子代基因型个体总数; NS, * 分别表示不显著、0.05 水平上的显著性。
Notes: N is signed total number of progeny genotype; NS, * Non-significant or significant at $P=0.05$, respectively.

表 3 中国板栗种内杂交后代 SKD 酶基因座的分离与 χ^2 检验
Table 3 Segregation and chi-square test of shikimate dehydrogenase isozyme loci in intraspecific progenies of *Castanea mollissima*

基因座 Locus	杂交组合 Crosses	亲本基因型 Parental genotypes	子代基因型 Progeny genotype				预期分离比率 Expected ratio	χ^2
			Total	aa	ab	bb		
Skd-3	Homestead×Cropper	ab×bb	20	—	17	3	1:1	8.450**
	Cropper×AU-60	bb×ab	19	—	9	10	1:1	0.000 ^{NS}
	Leader×AU-60	aa×ab	24	15	9	—	1:1	1.042 ^{NS}
	Cropper×Leader	bb×aa	19	—	19	—		
	Homestead×AU-60	ab×ab	36	3	18	—	1:2:1	8.000*
Skd-4	Homestead×Cropper	ab×bb	20	—	9	15	1:1	0.050 ^{NS}
	Cropper×AU-60	bb×ab	19	—	8	11	1:1	0.211 ^{NS}
	Leader×AU-60	aa×ab	24	11	13	—	1:1	0.042 ^{NS}
	Cropper×Leader	bb×aa	19	—	19	—		
	Homestead×AU-60	ab×ab	36	12	6	18	1:2:1	18.000**

注: NS, *, ** 分别表示不显著, 0.05 水平或 0.01 水平上的显著性。
Notes: NS, *, ** Nonsignificant or significant at $P=0.05$ or 0.01 , respectively.

2.3 中国板栗×美洲栗F₂群体及回交BC₁群体分析

中国板栗与美洲栗的杂种F₁代拥有2个亲本物种的谱带,表现出4个活性区域杂交酶谱表型,且F₂代酶谱表型较复杂,除了亲本物种酶谱表型外,共分离出7种杂种酶谱表型(图2)。F₂代群体分离按美洲栗表型(*Skd*-1,-2)、杂种表型(*Skd*-1,-2,-3,-4)和中国板栗表型(*Skd*-3,-4) 3个酶谱表型等级检测,结果表明 F₂ 代群体分离显著偏离 1:2:1 的预期比例而偏向于中国板栗表型(表 4),与 Huang 等^[29]和 Kubisiak 等^[28]研究结果一致。但在所检测的 5 个

BC₁ 回交家系中,子代群体按美洲栗和杂种两级正常分离且符合 1:1 的预期分离比率(表 4),表明 SKD 表型酶谱总体上是按孟德尔式遗传的。然而仔细分析 F₂ 代群体杂种酶谱的具体表型,表明栗属物种 SKD 遗传具有复杂性(图 2):杂种表型 *h*₁ 含美洲栗 *Skd*-2^a、*Skd*-2^b 酶带与中国板栗的 *Skd*-3^a、*Skd*-4^a 酶带,而杂种表型 *h*₂ 含美洲栗 *Skd*-2^a、*Skd*-2^b 酶带与中国板栗的 *Skd*-3^a、*Skd*-3^b、*Skd*-4^a、*Skd*-4^b 酶带,均缺失美洲栗 *Skd*-1 基因座,暗示中国板栗的 *Skd*-3,-4 基因座可能与美洲栗 *Skd*-1 基因座互为

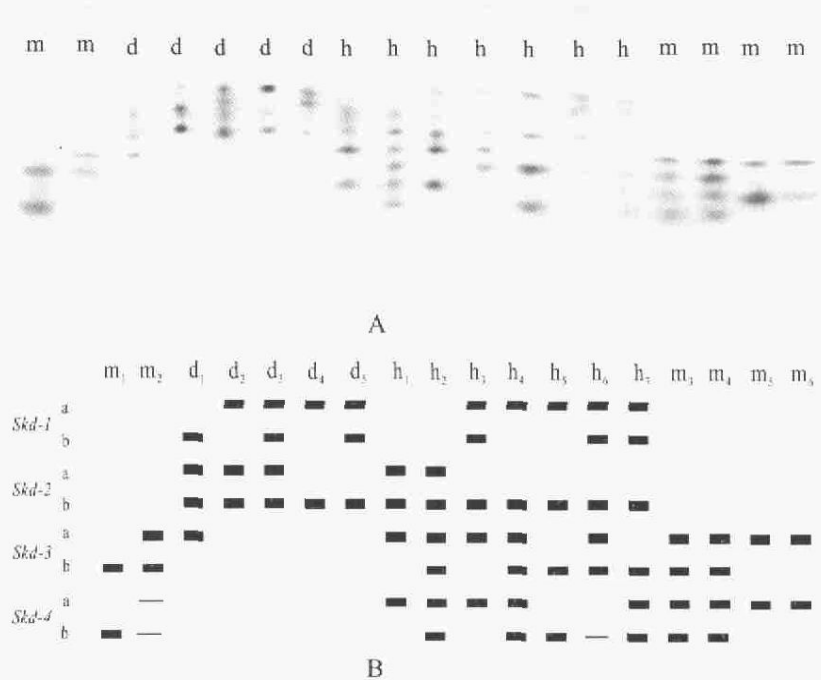


图 2 中国板栗×美洲栗杂种 F₂ 代群体分离莽草酸脱氢酶(SKD)电泳酶谱(A)和酶谱表型示意图(B)
Fig. 2 Band patterns (A) and the phenotypes (B) of shikimate dehydrogenase (SKD) isozyme in F₂ segregated population of *Castanea mollissima*×*C. dentata*

相对同源且在杂种中相互配对分离。但杂种表型 h_3 含美洲栗 $Skd-1^a$ 、 $Skd-1^b$ 、 $Skd-2^b$ 酶带与中国板栗的 $Skd-3^a$ 、 $Skd-4^a$ 酶带,好像又表明中国板栗的 $Skd-3$ 、 -4 基因座可能与美洲栗 $Skd-2$ 基因座互为相对同源且在杂种中相互配对分离,刚好与表型 h_1 、 h_2 的暗示相反,而形成矛盾。虽然以上任一假设都能解释含美洲栗 $Skd-1^a$ 、 $Skd-2^b$ 酶带与中国板栗的 $Skd-3^b$ 、 $Skd-4^b$ 酶带的杂种表型 h_5 ,但两者都不能单一解释 h_4 、 h_6 、 h_7 这 3 种杂种酶谱表型。杂种表型 h_4 含美洲栗 $Skd-1^a$ 、 $Skd-2^b$ 酶带与中国板栗的

$Skd-3^a$ 、 $Skd-3^b$ 、 $Skd-4^a$ 、 $Skd-4^b$ 酶带,表明中国板栗的 $Skd-3$ 、 -4 基因座既同美洲栗 $Skd-1$ 基因座配对分离又与 $Skd-2$ 基因座配对分离。杂种表型 h_6 含美洲栗 $Skd-1^a$ 、 $Skd-1^b$ 、 $Skd-2^b$ 酶带与中国板栗的 $Skd-3^a$ 、 $Skd-3^b$ 酶带和 $Skd-4^b$ 微弱酶带,以及杂种表型 h_7 含美洲栗 $Skd-1^a$ 、 $Skd-1^b$ 、 $Skd-2^b$ 酶带与中国板栗的 $Skd-3^b$ 、 $Skd-4^a$ 、 $Skd-4^b$ 酶带,表明中国板栗 $Skd-3$ 、 -4 基因座同时与美洲栗两独立分离基因座配对分离,而且 $Skd-3$ 、 -4 与 $Skd-1$ 间可能存在交换重组。

表 4 中国板栗×美洲栗 F_2 代群体和 BC_1 群体莽草酸脱氢酶的基因座分离与 χ^2 检验
Table 4 Segregation and chi-square test of shikimate dehydrogenase isozyme loci
in F_2 population of *Castanea mollissima*×*C. dentata* and BC_1 populations

杂交组合 Crosses	F ₂ 或 BC ₁ 群体基因座分离 Loci segregation in F ₂ or BC ₁				预期分离比率 Expected ratio	χ ²
	Total	aa	ab	bb		
F ₁ ×F ₁						
R4T52×R4T31	63	9	27	27	1 : 2 : 1	11.57**
BC ₁						
RF3×R4T31	18	9	9		1 : 1	0.00 ^{NS}
QA1×R4T52	25	11	14		1 : 1	0.16 ^{NS}
RF6×R4T31	9	5	4		1 : 1	0.00 ^{NS}
MCH×Nanking	27	13	14		1 : 1	0.00 ^{NS}
Mu×Nanking	23 ^a	9	11		1 : 1	0.00 ^{NS}

注: z 表示其中 3 株有疑问。NS, ** 分别表示不显著、0.01 水平上的显著性。
Notes: z, Three lines are suspected. NS, ** Non-significant or significant at $P=0.01$, respectively.

3 讨论

3.1 中国板栗 $Skd1-3$ 、 -4 基因座连锁群重复与栗属物种 SKD 基因座特异性分化

单株家系和种内控制杂交家系分析表明栗属存在 SKD 基因座物种特异性,在种内各基因座的遗传变异符合孟德尔单基因座等位基因分离模式,与 Huang 等^[29]的研究结果相一致。然而, F_2 代群体分离杂种酶谱表型(图 2)分析结果表明,中国板栗 SKD 的遗传变异可能并不是由单一 $Skd-3$ 、 -4 连锁群所决定的。到目前为止的研究报道表明 SKD 是一个标准的单体酶,且在二倍体植物中通常报道为 1 或 2 个基因座^[43-45],多基因座的报道较少^[46],在大多数植物种中其等位基因酶谱表型为单带表型^[26,27],在部分植物中也发现了 SKD 的单体双带或多带的酶谱表型,每个等位基因附加其“异构体(conformer)”或者“鬼带(ghost)”形成共分离的谱带表型^[48-50]。但就栗属物种 SKD 酶谱表型及其控制杂交分离酶谱表型看,SKD 在栗属物种中为明显的纯合子单带酶谱表型或杂合子双带酶谱表型^[29]。杂种 F_2 代分离的复杂表型可能暗示中国板栗的

$Skd-3$ 、 $Skd-4$ 存在重复基因座,原基因座与复制基因座可能分别位于不同的染色体上而且独立分离,但在其编码产物上两者可能一致,在其他植物上也曾发现过 SKD 的重复基因座^[33,48]。在中国板栗的自然居群中也曾发现过磷酸葡萄糖变位酶(PGM)的重复基因座现象^[51]。栗属物种起源于中国,且中国板栗可能为美洲栗和欧洲栗的原生种^[1,12,52],若中国板栗的 $Skd-3$ 、 -4 存在独立分离的重复基因座,则欧美栗种的特异基因座 $Skd-1$ 和 $Skd-2$ 基因座可能分别由 $Skd-3$ 或 $Skd-4$ 在重复基因座中各自突变并长期积累而成,且与之连锁的另一基因座可能失去活性而成为死基因或假基因,美洲栗极个别样本特异的酶谱表型(图 1),有可能是因突变或其它原因使死基因恢复活性表达的结果。可能也正是由于 SKD 基因座的重复,且在不同物种中长期变异而使其所在区域发生结构或功能的变异形成了物种特异性,从而难以将其构建于栗属物种的 12 个连锁遗传图谱中^[29]。种间杂交 F_2 代群体分离偏向中国板栗可能也与 SKD 重复基因座有关。当然,杂种 F_2 代酶谱表型的另一个可能的解释是美洲栗的 $Skd-1$ 、 $Skd-2$ 和中国板栗的 $Skd-3$ 、 -4 连锁群分别位于 3

对独立分离的不同染色体上,相互间缺乏同源性。但笔者认为重复基因座的存在更符合栗属物种进化演变规律。

3.2 栗属物种 SKD 特异性标记作为抗性遗传标记的分析

莽草酸途径在微生物和植物的芳香类化合物前体的合成中扮演着重要角色^[53],在植物中,莽草酸途径与植物应对环境刺激相关联^[32,34]。当植物在受到动物或微生物攻击时,该途径的酶类显著应答,植物莽草酸途径被认为与植物抵抗微生物或不良环境关联^[32,35,53]。一些研究表明,植物莽草酸途径酶类在根部表达水平高于茎叶,认为可能是由于植物的根所应对的微生物攻击和其它压力要高于茎叶的原因^[54,55],这也可能是栗疫病只危害美洲栗的茎干而不伤害其根部的原因之一^[1,56,57]。莽草酸途径应答差异也可能与栗属物种对栗疫病的抗性差异相关联,莽草酸脱氢酶(SKD)是植物或微生物莽草酸途径的几个重要关键性酶之一^[32-34]。美洲栗和中国板栗间 SKD 遗传的差异有可能影响它们对栗疫病抗性的差异,中国板栗 SKD 两连锁基因座的重复可能使中国板栗的 SKD 表达量高于美洲栗,从而使中国板栗的莽草酸途径有着更高的效率,使其具有较高的栗疫病抗性。SKD 作为连锁遗传标记的研究已常见于其它植物物种^[26,46,48],被认为可以作为农作物和果树育种的一种有用辅助筛选遗传标记^[24-26]。我们的研究认为,栗属物种的特异性 SKD 酶谱标记有作为栗疫病抗性筛选的遗传标记之一的潜力,若进一步进行 SKD 酶谱表型与栗疫病抗性关联性检测的研究,栗属 SKD 标记将有可能成为美洲栗回交育种的辅助选择标记。SKD 标记的共显性可能使其比显性标记在美洲栗回交育种中更具筛选效率。

微生物或植物莽草酸途径所涉及的酶类,除了 SKD 外还有多种,最为关键的酶类约有 7 种^[32]。Kubisiak 等^[28]发现在栗属物种中共有 7 个与栗疫病抗性应答关联的遗传区域,并在连锁遗传图谱中定位了 3 个区域,这些区域是否于莽草酸途径酶类相关联则有待于深入研究。进一步研究栗属物种莽草酸途径各种关键酶的遗传变异以及栗属物种栗疫病抗性与莽草酸途径酶类表达水平的关系,将对美洲栗回交育种有着重要意义。

参考文献:

- [1] Rutter P A, Milleer G, Payne J A. Chestnuts[A]. In: Moore J N, Ballington J R eds. Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. Wageningen[M]. The Netherlands: The International Society for Horticultural Science, 1990. 761 - 788.
- [2] Anagnostakis S L. Measuring resistance of chestnut trees to chestnut blight[J]. *Can J Forest Res*, 1992, **22**: 568 - 571.
- [3] Clapper R B. Relative blight resistance of some chestnut species and hybrids[J]. *J Forest*, 1952, **50**: 453 - 455.
- [4] Graves A H. Relative blight resistance in species and hybrids of *Castanea* [J]. *Phytopathology*, 1950, **40**: 1125 - 1131.
- [5] Huang H, Carey W A, Dane F, Norton J D. Evaluation of Chinese chestnut cultivars for resistance to *Cryphonectria parasitica* [J]. *Plant Dis*, 1996, **80**: 45 - 47.
- [6] Berry F H. Chestnut Breeding in the United States Department of Agriculture[A]. In: MacDonald W L, Cech F C, Luchok J, Smith C eds. Proceedings of the American Chestnut Symposium [C]. Morgantown, West Virginia: West Virginia University Press, 1978. 39 - 40.
- [7] Burnham C R, Rutter P A, French D W. Breeding blight-resistant chestnuts[J]. *Plant Breed Rev*, 1986, **4**: 347 - 397.
- [8] Stilwell K L, Wilbur H M, Werth C R, Taylor D R. Heterozygote advantage in the American chestnut, *Castanea dentata* (Fagaceae) [J]. *Am J Bot*, 2003, **90**: 207 - 213.
- [9] Anagnostakis S L. Chestnuts and the introduction of chestnut blight[J]. *Ann Repor North Nut Grow Assoc*, 1992, **83**: 39 - 42.
- [10] Milgroom M G, Wang K, Zhou Y, Lipari S E, Kaneke S. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* [J]. *Mycologia*, 1996, **88**(2): 179 - 190.
- [11] Anagnostakis S L. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen[J]. *Mycologia*, 1987, **79**: 23 - 37.
- [12] Huang H, Dane F, Norton J D. Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea* spp.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, **88**: 981 - 985.
- [13] Huang H, Dane F K, Kubisiak T L. Allozyme and RAPD analysis of the geographic variation and genetic diversity in natural population of the American chestnut *Castanea dentata* (Fagaceae) [J]. *Am J Bot*, 1998, **85**: 1013 - 1021.
- [14] Villani F, Pigliucci M, Benedettelli S, Cherubini M.

- Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations[J]. *Heredity*, 1991, **86**:131-136.
- [15] Burnham C R. The restoration of the American chestnut[J]. *Am Sci*, 1988, **76**:478-486.
- [16] Anagnostakis S L, Chen B, Geletka L M, Nuss D L. Hypovirus transmission to ascospore progeny by field-released transgenic hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* [J]. *Phytopathology*, 1998, **88**:598-604.
- [17] Anagnostakis S L. Biological control of chestnut blight[J]. *Science*, 1982, **215**:466-471.
- [18] Thor E. Breeding of American chestnut[A]. In: MacDonald W L, Cech F C, Luchok G, Smith C eds. Proceedings of the American Chestnut Symposium[C]. Morgantown, West Virginia; West Virginia University Press, 1978. 7-10.
- [19] Bissegger M, Rigling D, Heiniger U. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence [J]. *Phytopathology*, 1997, **87**:50-59.
- [20] Heiniger U, Ring D. Biological control of chestnut blight in Europe [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1994, **32**:581-599.
- [21] Burnham C R. Blight-resistance American chestnut; there's hope[J]. *Plant Dis*, 1981, **65**:459-460.
- [22] Burnham C R. Breeding for chestnut blight resistance [J]. *Nutshell*, 1982, **35**:8-9.
- [23] Hebard F. Notes from meadowview[J]. *J Am Chestnut Found*, 1996, **10**:8-12.
- [24] Shenoy V V, Seshu D V, Sachan J K S. Shikimate dehydrogenase-1² allozyme as a marker for high seed-protein content in rice [J]. *Crop Sci*, 1990, **30**:937-940.
- [25] Tahir M, Muehlbauer F J, Spaeth S C. Association of isozyme markers with quantitative trait loci in random single-seed-descent-derived lines of lentil (*Lens culinaris* Medik.) [J]. *Euphytica*, 1994, **75**:111-119.
- [26] Williamson S C, Yu H, Davis T M. Shikimate dehydrogenase allozymes; Inheritance and close linkage to fruit color in the diploid strawberry [J]. *J of Heredity*, 1995, **86**:74-76.
- [27] Bernatzky R, Mulcahy D L. Marker-aided selection in a backcross breeding program for resistance to chestnut blight in the American chestnut [J]. *Can J Forest Res*, 1992, **22**:1031-1035.
- [28] Kubisiak T L, Hebard F V, Nelson C D, Zhang J, Bernatzky R, Huang H, Anagnostakis S L, Doudrick R L. Molecular mapping of resistance to blight in an interspecific cross in the genus *Castanea* [J]. *Phytopathology*, 1997, **87**:751-759.
- [29] Huang H, Dane F, Norton J D. Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotypes [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1994, **119**:840-849.
- [30] Dane F, Huang H. Short note; Variability and inheritance of Diaphorases in American and Chinese *Castanea* species [J]. *Silvae Genet*, 2002, **51**:128-130.
- [31] 郎萍, 黄宏文. 栗属中国特有种居群的遗传多样性及地域差异 [J]. 植物学报, 1999, **41**(6):651-657.
- [32] Weaver L M, Herrmann K M. Dynamics of the shikimate pathway in plants [J]. *Trend Plant Sci*, 1997, **2**(9):346-351.
- [33] Magoma G N, Wachira F N, Imbuga M O, Agong S G. Biochemical differentiation in *Camellia sinensis* and its wild relatives as revealed by isozyme and catechin patterns [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, **31**:995-1010.
- [34] Diaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification [J]. *Plant Sci*, 2001, **161**:179-188.
- [35] Schnarrenberger C, Flechner A, Martin W. Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose pathway in chloroplast and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves [J]. *Plant Physiol*, 1995, **108**:609-614.
- [36] Gillet E. Genetic analysis using single tree progenies [A]. In: Fineschi S, Malvoti M E, Cannata F, Hattermer H H eds. Biochemical Markers in Population Genetics of Forest Tree [M]. The Hague, The Netherlands; SPB Academic Publishing bv, 1991. 41-48.
- [37] Hebard F. Inheritance of juvenile morphological traits in Crosses of Chinese and American chestnut [A]. In: Double M L, MacDonald W L eds. Proceedings of the International Chestnut Conference [C]. Morgantown, West Virginia; West Virginia University Press, 1992. 110-117.
- [38] Wendel J F, Weeden N F. Visualization and interpretation of plant isozymes [A]. In: Soltis D E, Soltis P S eds. Isozymes in Plant Biology [M]. Portland, Ore; Dioscorides Press, 1989. 5-45.

- [39] 黄宏文. 超薄平板微型聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦电泳方法——介绍一种高效、快速的生物同工酶分析方法[J]. 武汉植物学研究, 2000, **18**(3): 224—228.
- [40] Yates F. Contingency tables involving small numbers and the χ^2 [J]. *J Roy Stat Soc Supp*, 1934, **1**: 217—235.
- [41] Suiter K A, Wendel J F, Case J S. LINKAGE-1: A PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage[J]. *J Hered*, 1983, **74**: 203—204.
- [42] Perfegtti F, Pascual L. Segregation distortion of isozyme loci in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, **93** (3): 440—446.
- [43] Weeden N F, Gottlieb L D. The genetics of chloroplast enzymes[J]. *J Hered*, 1980, **71**: 392—396.
- [44] Weeden N F, Robinson R W. Allozyme segregation ratio in the interspecific cross *Cucurbito maxiam* $\times$ *C. ecuadorensis* suggest that hybrid breakdown is not caused by minor alterations in chromosome structure [J]. *Genetics*, 1986, **114**: 593—609.
- [45] Carre S, Tasei J N, LeGuen J, Mesquida J, Morin G. The genetic control of seven isozymeic loci in *Vicia faba* L.; Identification of lines and estimates of out-crossing rates between plants pollinated by bumble bees[J]. *Ann Appl Biol*, 1993, **122**: 555—568.
- [46] Nomura K, Yoneda K, Inoue H, Tateishi A, Kanehira T, Isobe K. Identification and linkage analysis of isozyme loci in open-pollinated varieties of radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *Sci Hortic-Amsterdam*, 1999, **82**: 1—8.
- [47] Weeden N F, Wendel J F. Genetics of plant isozymes [A]. In: Soltis D E, Soltis P S eds. *Isozymes in Plant Biology* [M]. Portland, Ore: Dioscorides Press, 1989. 46—72.
- [48] Williams W M, Mason K M, Williamson M L. Genetic analysis of shikimate dehydrogenase allozymes in *Trifolium repens* L [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **96**: 859—868.
- [49] Garvin D F, Roose M L, Waines J G. Isozyme genetics and linkage in Tepary bean, *Phaseolus acutifolius* A. Gray [J]. *J Hered*, 1989, **80**: 373—376.
- [50] Fromm M, Hattemer H H. Inheritance of allozymes and hybridization in two European *Tilia* species [J]. *Heredity*, 2003, **91**: 337—344.
- [51] 郎萍. 栗属中国特有种等位酶遗传多样性与遗传结构的比较[D]. 武汉: 中国科学院武汉植物研究所, 1998.
- [52] Dane F, Lang P, Huang H, Fu Y. Intercontinental genetic divergence of *Castanea* species in eastern Asia and eastern North America [J]. *Heredity*, 2003, **91**: 314—321.
- [53] Herrmann K M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism [J]. *Plant Physiol*, 1995, **107**: 7—12.
- [54] Phillips D A, Dakora F D, Sande E, Joseph C M, Zon J. Synthesis, release and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbionts [J]. *Plant Soil*, 1994, **161**: 69—80.
- [55] Volpin H, Phillips D A, Okon Y, Kapulnik Y. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots [J]. *Plant Physiol*, 1995, **108**: 1449—1454.
- [56] Huang H, Dane F, Norton J D. Evaluation of the genetic diversity of the American chestnut [J]. *HortScience*, 1996, **31**: 750.
- [57] Griffin G J. Blight control and restoration of the American chestnut [J]. *J Forest*, 2000, **98**: 22—27.