

文章编号: 1000-8551(2005)03-322-05

DNA 分子标记技术及其在小麦育种及遗传研究中的应用

李娜 焦湔 秦广雍

(郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要:本文介绍了几种常用的 DNA 分子标记, 如 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、STS、SNP 等, 并简要综述了分子标记技术在小麦遗传育种研究中的应用现状, 包括基因标记与定位、遗传图谱构建、外源染色体鉴定与标记、种质资源鉴定和辅助育种等。

关键词:分子标记; 小麦; 遗传育种

DNA MOLECULAR MARKER TECHNIQUES AND THEIR APPLICATION IN WHEAT BREEDING AND GENETIC STUDY

LI Na JIAO Zhen QIN Guang-yong

(Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450052)

Abstract: Molecular marker techniques, such as RFLP, RAPD, AFLP, SSR, STS and SNP are introduced, and the following aspects of their application in wheat breeding are discussed: gene tagging and location, genetic mapping, identification and marker of alien chromosomes, identification of germplasm resources and assisted breeding.

Key words: molecular marker; wheat; genetic breeding

遗传标记 (genetic markers) 是用来区分不同个体或群体, 并能够稳定遗传的物质或性状。在遗传育种研究中, 遗传标记指的是与目标性状紧密连锁, 同该性状共分离的可遗传的标识。最早出现的遗传标记是形态标记 (morphological markers), 而后在显微镜技术的支持下诞生了细胞学标记 (cytological markers) 20 世纪 60 年代随着电泳技术的发展又出现了生化标记 (biochemical markers)。这 3 种标记都是基因表达的结果, 是对基因的间接反映, 易受环境条件和发育阶段的影响, 标记位点数较少, 多态性较差。

20 世纪 80 年代以来, 以 DNA 多态性为基础的分子标记技术蓬勃发展起来。DNA 分子标记 (DNA molecular markers) 是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 是 DNA 水平遗传多态性的直接反映。与上述 3 种标记相比, DNA 分子标记具有如下特点: (1) 直接以 DNA 形式表现, 因而可以对各发育时期的个体、组织、器官甚至细胞作检测, 不受环境影响, 也不存在表达与否的问题; (2) 数量极多, 遍布整个基因组; (3) 多态性很高, 无须专门创造特殊的遗传材料; (4) 表现为“中性”, 即不影响目标性状的表达, 与不良性状也无必然连锁; (5) 多数分子标记表现为共显性, 能够鉴别出纯合与杂合基因型, 提供完整的遗传信息; (6) 操作相对简便。

小麦是世界上最主要的粮食作物。运用生物技术加快小麦育种进程、提高小麦产量、改善小麦品质已是育种学家和生物技术工作者共同面临的重大使命。由于小麦拥有庞大的基因组, 使得分子标记技术在小麦中的应用落后于大麦、玉米、水稻等作物。但近年来, 随着分子标记技术及检测系统的发展与完善, 分子标记技术在小麦中的应用已有了很大进展。本文将介绍一些常用的分子标记, 并就其在小麦遗传育种研究中的应用现状作一简要概述。

收稿日期: 2004-09-02

作者简介: 李娜 (1981 -), 女, 河南开封人, 硕士研究生。焦湔为通讯作者, Email: jiaozhen@zzu.edu.cn

1 几种常用的分子标记技术

自 1980 年 Botstein 等首次提出 DNA 限制性片段长度多态性(RFLP)以来,近 20 种各种 DNA 分子标记技术相继建立起来,下面简要介绍几种常用的分子标记技术。

1.1 限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

RFLP 技术是由于不同基因型中内切酶位点的碱基插入、缺失、重组或突变,使得基因组 DNA 经限制性内切酶酶切后产生长度不同的 DNA 片段,凝胶电泳后通过 Southern 印迹杂交,将这些 DNA 片段转移到硝酸纤维膜或尼龙膜上并与特异探针杂交,最后经放射自显影显示多态性。RFLP 是第 1 代 DNA 分子标记,来源于自然变异,具有共显性特点,且无表型效应。该技术成熟,结果可靠,应用较广,但对 DNA 质量要求高,需要量大,操作烦琐,需用放射性,成本较高,所以其应用受到了一定限制。

1.2 随机扩增多态性(Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD)

DNA RAPD 技术是建立于 PCR 基础之上,使用一系列 10bp 左右的单链随机引物,对基因组进行 PCR 扩增,并通过凝胶电泳检测多态性。RAPD 技术继承了 PCR 效率高、灵敏度高、易于检测等优点;其引物较短且随机排列,使 RAPD 技术可以在对物种没有任何分子生物学研究的背景下进行 DNA 多态性分析;所需 DNA 用量少,质量要求低。

RAPD 技术在实际应用中的不足之处,首先是显性遗传,不能识别杂合位点,使得遗传分析相对复杂,其次是稳定性不佳而导致重复性差,可能是所用引物较短、复性温度低、特异性差而导致 RAPD 的检测对反应条件敏感所致。许多研究表明^[1~2],复性温度、变性时间、变性与复性之间及复性与延伸之间的间隔、模板的浓度及质量、 Mg^{2+} 的浓度、引物的浓度及序列、dNTP 的浓度、聚合酶的浓度、种类及提供者、热循环仪的种类等都会影响到扩增结果。目前多从以下几方面考虑来提高反应的稳定性:(1)规范操作,反应体系的组分力求一致,尽可能使 RAPD 反应标准化;(2)提高扩增片段的分辨率;(3)将 RAPD 标记转化为 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions),即序列特异扩增区域,标记后再进行常规的 PCR 分析,可以显著提高反应的稳定性。由于近年来该技术得到了不少改进,因而被广泛应用于基因定位、遗传图谱构建和遗传多样性分析等方面的研究。

1.3 扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

AFLP 是 1993 年由 Zabeau 发现,并由 Vos 发展起来的一项专利技术^[3]。其原理是基于 PCR 技术扩增基因组 DNA 限制性片段。基因组 DNA 先用限制性内切酶切割(一般用两种限制性内切酶,一种是六碱基识别位点的低频剪切酶,如 EcoR;一种是四碱基识别位点的高频剪切酶,如 Mse),形成大小不等的 DNA 限制性片段,在其两端接上双链人工接头,作为 DNA 模板,利用两个选择性引物进行 PCR 扩增,最后用 PAGE 电泳检测多态性。可见, AFLP 实质上是 RFLP 和 RAPD 相结合的产物,既具有 RFLP 的稳定性,又有 RAPD 的灵敏性。多态性极其丰富, DNA 用量少,检测效率高,可靠性好,重复性高,是一种十分理想的分子标记。但不足之处是费用比较昂贵,且对 DNA 的纯度和内切酶的质量要求很高。该技术目前已广泛应用于遗传图谱构建、轮回选择育种及遗传多样性分析等领域,有着广阔的应用前景。

随着 AFLP 技术的不断进步和完善,各种基于 AFLP 的经济快速、操作简便的方法应运而生。例如,在 AFLP 技术的基础上又发展了一种新的分子标记——TE-AFLP^[4] (three endonuclease amplified fragment length polymorphism)即三限制性酶切扩增片段长度多态性,这种方法与传统的双酶切 AFLP 技术相比分辨率更高,而且可以减少带谱的数目,具有可靠、快速、方便的特点,应用前景广阔。

1.4 简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)

SSR 或称为微卫星 DNA (Microsatellite DNA),它以 1~6 个碱基为基本单元的串联重复序列。其分布遍及大多数真核生物的基因组中,且重复单位数具有高频率的变异^[5]。利用微卫星 DNA 两侧的特异性序列作为引物,以 gDNA 为模板,经 PCR 扩增后检测其 DNA 多态性。SSR 作为遗传标记的优点是:SSR 位点在整个基因组中分布广泛、均匀且数量充足,因而多态性极其丰富;SSR 标记呈孟德尔共显性遗传,可以区分纯合与杂合基因型;仅需要少量 DNA,且质量要求不高。因而此标记已广泛应用于目标基因标

记、绘制连锁图及种质资源鉴定等方面,是比较理想的分子标记。但对所有研究物种的一系列 SSR 位点进行克隆和序列分析,则是非常费时、费力且代价昂贵的工作。

1.5 序列标志位点(Sequence-tagged sites, STS)

STS 由 Olson 提出,最早发现于人类基因组中^[6]。它是根据单拷贝的 DNA 片段两端的序列设计一对特异引物,扩增基因组 DNA 产生一段长度为几百 bp 的特异序列,通过分析其多态性界定基因组的特异位点,不同的 STS 间不会出现重叠现象。该标记分析结果稳定可靠,可以作为比较遗传图谱和物理图谱的共同位标。

1.6 单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

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,包括单碱基的转换、颠换、插入及缺失等形式^[7]。SNP 标记通常具有双等位基因多态性,其突变率相当低,是一种稳定的突变。而且 SNP 标记密度高,富有代表性且易实现分析自动化。检测 SNP 的方法有 DNA 芯片技术、阵列杂交分析、同源杂交法及直接测序法等。其中以 DNA 芯片技术方法最佳,已得到大规模的发展与应用。SNP 被称为继 RFLP、SSR 之后的第 3 代分子标记。随着 DNA 芯片技术的发展,SNP 有望成为最重要、最有效的分子标记技术。

2 分子标记技术在小麦遗传育种中的应用

2.1 标记和定位目的基因

小麦育种工作的目的是实现品种改良,品种改良的实质就是对目的基因进行选择并实现优良基因集成的过程。因而,将目的基因进行标记进而将其快速定位,提高其选择效率,是加快小麦育种进程的关键。

小麦的农艺性状分为质量性状和数量性状。标记质量性状基因的方法目前主要有两个,即群体分离分析方法(Bulked Segregant Analysis,BSA)和近等基因系法(Near Isogenic Lines,NIL)。这两种方法都是选择两个在目标性状上存在差异的群体,所以得到的揭示多态性的分子标记就极可能与目标基因紧密连锁,然后通过进一步检测和连锁分析,则可以确定它与目标基因是否连锁及连锁的紧密程度。其中 BSA 要比 NIL 法简单快速,是一种对基因快速标记定位的有效方法。Hu 等^[8]利用 BSA 法对抗病品种郑州 871124 进行 RAPD 分析,从 1300 个随机引物中筛选到与小麦抗白粉病基因 Pm1 共分离的 2 个 RAPD 标记,UBC320₄₂₀和 UBC638₅₅₀。Qi 等^[9]对 Pm21 进行 RAPD 分析,用 BSA 法找到了与 Pm21 连锁的标记 OPH17₁₉₀₀。刘艳华等^[10]利用 BSA 法对山农 9021 中的 14 + 15 亚基基因进行 RAPD 分析,筛选出稳定的与 14 + 15 优质亚基基因连锁的标记 OPH07₁₂₇₅。魏艳玲等^[11]利用 SSR 技术定位了来自斯卑尔脱小麦新的抗条锈病基因 YrSp,位于 3A 染色体上。

小麦的许多重要农艺性状和经济性状一般都是由多基因控制的数量性状,对数量性状进行遗传研究的一个有效方法就是确定数量性状座位(Quantitative Trait Loci,QTL)。利用分子标记进行遗传连锁分析,可将 QTL 定位,并借助与 QTL 连锁的分子标记,在育种中对有关的 QTL 遗传动态进行跟踪,进而提高对数量性状优良基因型选择的准确性和预见性。目前,已报道的小麦 QTL 已多达数百个,广泛分布于小麦的多条染色体上。但与其他作物相比,小麦 QTL 的研究起步较晚,目前仅仅处于初级阶段,还没有哪个数量性状的全部 QTL 被精确定位出来,所以对小麦 QTL 的研究还需要进一步深入。

2.2 构建遗传图谱

遗传图谱的构建是对基因组系统研究的重要内容和基础,也是小麦育种和分子克隆等应用研究的理论依据。自 1980 年 Bostein 首次提出利用 RFLP 标记构建遗传图谱的设想以来,以分子标记构建遗传图谱得到了迅猛发展,目前各主要作物的 RFLP 图谱都已基本构建完成。由于小麦种间多态性较差,所以小麦遗传图谱的构建相对发展较慢。目前小麦的 RFLP 图谱主要有两套,一套为英国剑桥实验室绘制,该图谱标记已有 500 多个,平均每条染色体上有 25 个;另一套为美国康耐尔大学与法国等合作绘制,标记数 850 多个,已较为饱和。

由于 RFLP 图谱在育种实践中使用不便,因此,有必要使用一些相对经济方便的分子标记来构建图谱,或将已有的 RFLP 标记转化为其他分子标记。1998 年 Roder 等^[12]建立了第一张微卫星遗传图谱。与 RFLP 标记相比,大多数小麦 SSR 标记都是基因组专化性的,只在小麦 A、B 或 D 基因组含有一个 SSR 的特定位点扩增。由于利用方便和信息量高,SSR 已逐步替代 RFLP 进行小麦的遗传作图,迄今有近千个 SSR 标记已作图。Korzun 等^[13]将来自于六倍体小麦的 79 个双核苷酸微卫星位点整合到一个硬粒小麦 (*Triticum turgidum* L.) 的遗传连锁图上。

2.3 鉴定标记外源染色体片段

分子标记技术在鉴定外源染色体片段方面有着广泛的应用。它不仅可以鉴别外源染色体片段,还可以对其携带的外源基因进行标记和定位。LIU 等^[14]利用 GISH、RAPD 和 SDS-PAGE、A-PAGE 等方法,对普通小麦 K 型细胞质雄性不育保持系 T911289 的染色体组成进行了鉴定与分析,结果表明 T911289 缺少 1BS 染色体臂或 1BS 末端片段,其外源遗传物质来源于黑麦的 1RS。翁跃进等^[15]用 29 个小麦 RFLP 探针与 6 种限制性酶切的 M 染色体组 DNA 杂交,得到 55 个 M 染色体组的 RFLP 标记,其中 15 个与小麦染色体组 A、B、D 相同,40 个为 M 染色体组的特殊标记。Peil 等^[16]用 SSR 标记鉴定了二体小麦-*Aegilops markgrafii* 附加系,并找到了可以区分其染色体 A、B、C、D、F、G 的特异 SSR 标记。

2.4 种质资源鉴定

传统的种质资源鉴定方法是建立在表型与杂交基础之上的,不同程度上均带有一定的人为性,而且耗时耗力,效率与准确度均不高。分子标记的引入应用为这一研究工作提供了一个强有力的工具,极大地提高了种质资源鉴定的成效与准确性。Vaccino 等^[17]采用 RFLP 技术,利用两个特异性的麦谷蛋白和麦醇溶蛋白基因探针 K9 和 K32,将 54 个意大利小麦栽培种区分开。Prasad 等^[18]用 12 个 SSR 引物区分了 48 个小麦品种。John 等^[19]对英国过去 60 年普遍种植的 55 个小麦品种进行了 AFLP 分析,研究结果认为 AFLP 非常适合于鉴定小麦品种的真实性及纯度。

2.5 分子标记辅助育种

目前,小麦的许多重要性状都已获得了分子标记,包括与抗病、抗逆有关的质量性状和与产量、品质有关的数量性状。在小麦育种过程中,利用这些与目标基因紧密连锁的分子标记进行辅助选择,可以大大提高选择效率,缩短育种年限,有着很大的优越性。Talbert 等^[20]用与抗小麦条纹花叶病 *Wsm 1* 连锁的 RAPD 标记克隆测序后,合成了专化 RAPD 引物。该引物使 *Wsm 1* 的抗性在实验室中进行大批量的早代选择,进而加速了 *Wsm 1* 导入生产品种的进程。还有研究报道,利用 SSR 标记进行小麦抗大麦黄矮病毒的标记辅助选择。此外,还有利用 SSR 进行小麦抗俄罗斯蚜虫辅助育种的研究报道。

3 结语

从上述分子标记技术在小麦遗传育种中的应用来看,DNA 分子标记技术已成为小麦分子遗传及辅助育种研究中的重要工具。目前小麦分子遗传育种虽然进展很快,但总的来说还处在摸索期。分子标记技术尚不完全成熟和完善,在小麦中标记的多态性频率偏低,小麦遗传图谱的饱和度也不够高。而且已报道的小麦分子标记多为 RFLP 和 RAPD 标记,不便于育种实践,应将其转化为 SSR、SCAR、STS 等便于应用的标记。所以分子标记技术还不能作为一种独立的方法加以应用,还须与常规育种技术相结合才能发挥作用。随着分子生物学技术的不断发展应用,DNA 分子标记技术将在发掘与利用新的小麦种质资源、提高小麦产量、改善小麦品质等研究中发挥越来越重要的作用,势必将遗传育种和遗传改良推向一个新的层次和高度,开创小麦育种的新局面。

参考文献:

- [1] 孙广宇,张荣,彭友良. 随机扩增多态性 DNA 的重复性和可靠性问题. 植物保护, 2003, 29(4): 44 ~ 46
- [2] Tommerup I C, Barton J E, Brien P A O. Reliability of RAPD fingerprinting of there basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. Mycol Res, 1995, 99(2): 179 ~ 186

- [3] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent application number: 92402629. 7, 1993. Publication number EP 0534858
- [4] Vander Wurff A W G, Chan Y L, Van Straal N M, et al. TE-AHLP: combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. Nucl Acids Res, 2000, 28(24): 5005 ~ 5009
- [5] 朱振东, 贾继增. 小麦 SSR 标记的发展及应用. 遗传, 2003, 25(3): 355 ~ 360
- [6] Olson M, Hood L, Cantor C, et al. A common language for physical mapping of the human genome. Sci, 1989, 245: 1434 ~ 1435
- [7] 杨昭庆, 洪坤学. 单核苷酸多态性的研究进展. 国外遗传学分册, 2000, 23(1): 4 ~ 8
- [8] Hu X Y, Ohm H W, Dweikat I. Identification of RAPD markers linked to the gene Pm1 for resistance to powdery mildew in wheat. Theor Appl Genet, 1997, 94: 832 ~ 840
- [9] Qi L L, Cao M S, Chen P D, et al. Identification, mapping, and application of polymorphic DNA associated with resistance gene Pm21 of wheat. Genome, 1996, 39: 191 ~ 197
- [10] 刘艳华, 王洪刚, 刘树兵, 等. 小麦 14 + 15 谷蛋白亚基基因的 RAPD 分析. 西北植物学报, 2003, 23(6): 1001 ~ 1005
- [11] 魏艳玲, 倪中福, 解超杰, 等. 来自斯卑尔脱小麦新的抗条锈病基因 YrSp 的分子标记定位. 农业生物技术学报, 2003, 11(1): 30 ~ 33
- [12] Roder M S, Korzun V, Wendehake K, et al. A microsatellite map of wheat. Genetics, 1998, 149: 2007 ~ 2023
- [13] Korzun V, Roder M, Wendehake K, et al. Integration of dinucleotide microsatellites from hexaploid bread wheat into a genetic linkage map of durum wheat. Theor Appl Genet, 1999, 98: 1202 ~ 1207
- [14] LIU Bao-Shen, LI Da-Yong, ZHANG Xue-Yong. Primary identification of alien chromatin in T911289, a maintainer of wheat male sterile line with cytoplasm of *aegilops kotschy*. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(6): 724 ~ 730
- [15] 翁跃进, 贾继增, 董玉琛, 等. 小麦 M 染色体组的 RFLP 标记. 农业生物技术学报, 1997, 5(3): 103 ~ 111
- [16] Peil A, Korzun V, Schubert V, et al. The application of wheat microsatellites to identify disomic *Triticum aestivum*-*Aegilops markgrafii* addition lines. Theor Appl Genet, 1998, 96: 138 ~ 146
- [17] Vaccino P, Accerbi M, Corbellini M. Cultivar identification in *T. aestivum* using highly polymorphic RFLP probes. Theor Appl Genet, 1993, 86: 833 ~ 836
- [18] Prasad M, Varshney R K, Roy J K, et al. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theor Appl Genet, 2000, 100: 584 ~ 592
- [19] John R L, Paolo D, Robert M D, et al. DNA profiling and plant variety registration. The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. Euphytica, 1998, 102: 335 ~ 342
- [20] Talbert L E, Bruckner P L, Smith L Y, et al. Development of PCR markers linked to resistance to wheat streak mosaic virus in wheat. Theor Appl Genet, 1996, 93(3): 463 ~ 467

(上接第 273 页)

- [10] 魏虹. 地膜覆盖对半干旱区春小麦光合作用及产量的影响. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2000, 25(5): 621 ~ 625
- [11] 盛良学. 玉米地膜覆盖栽培的农田生态效应及增产机理. 云南农业科技, 1995(6): 38 ~ 39
- [12] 陈永祥, 刘孝义, 刘明国. 地膜覆盖栽培的土壤结构与空气状况研究. 沈阳农业大学学报, 1995, 26(2): 146 ~ 151
- [13] R L 米歇尔著. 作物生长和栽培. 顾慰连, 戴俊英, 叶金译. 北京: 农业出版社, 1981, 97 ~ 98.
- [14] 李富宽, 姜慧新. 秸秆覆盖的作用与机理. 当代畜牧, 2003(6): 38 ~ 40
- [15] Stone P J, Sertensen I B, Jamieson P D. Effect of soil temperature on phenology, Canopy development, biomass and yield of maize in a cool-temperate climate. Field Crops Research, 1999, 63: 169 ~ 178
- [16] Birch C J, Rickert K G, hammer G L. Modelling leaf production and crop development in maize (*Zea Mays* L.) after tassel initiation under diverse conditions of temperature and photoperiod. Field Crops Research, 1998, 58: 81 ~ 95
- [17] Birch C J, Kiniry J. Phyllochron responds to acclimation to temperature and irradiance in maize. Field Crops Research, 1998, 59: 187 ~ 200
- [18] 郑维, 方必国. 沟播是地膜棉花最佳播种方式. 新疆气象, 1997, 20(5): 25 ~ 26
- [19] 朱自玺, 方文松, 赵国强. 麦秸和残茬覆盖对夏玉米农田小气候的影响. 干旱地区农业研究, 2000, 18(2): 19 ~ 24