

# DNA 分子标记在作物种质资源中的应用进展

郭树春<sup>1</sup>, 安玉麟<sup>2</sup>, 李素萍<sup>2</sup>, 孙瑞芬<sup>2</sup>, 张艳芳<sup>1</sup>, 张启辰<sup>3</sup>, 闫素丽<sup>1</sup>

(1. 内蒙古农业大学 农学院 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古农牧业科学院 内蒙古 呼和浩特 010031;

3. 内蒙古生态环境监测站 内蒙古 呼和浩特 010010)

**摘要:** 近 20 年来, 随着分子生物技术的迅速发展, 已发展了多种分子标记, 并已得到广泛的应用, 文章综述了较为主要的一些分子标记及其在作物种质资源研究领域中的应用。

**关键词:** DNA 分子标记; 分类; 作物种质资源; 应用

**中图分类号:** S188 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2007) 专辑-0091-07

## The Advancements of DNA Molecular Markers' s Application in Crop Germplasm Resource

GUO Shu-chun<sup>1</sup>, AN Yu-lin<sup>2</sup>, LI Shu-ping<sup>2</sup>, SUN Rui-fen<sup>2</sup>,

ZHANG Qi-chen<sup>3</sup>, AN Xiao-ke<sup>3</sup>, YAN Su-li<sup>1</sup>

(1. Institute of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010019, China;

2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China;

3. Grassland research Insititude CAAS, Huhhot 010010, China)

**Abstract:** Recently with the rapid improvement of molecular biology, many DNA molecular markers have been developed and received more and more applications in the world. This paper introduces the DNA molecular markers' development and their application in crop germplasm resources.

**Key words:** Molecular marker; Classification; Crop germplasm resources; Application

我国地域辽阔、物种多样, 主要作物栽培品种和野生资源极其丰富, 为了充分开拓利用我国丰富多样的优异种质资源, 就必须把不同的个体加以区别。目前, 最可靠的方法是 DNA 分子标记<sup>[1]</sup>。DNA 分子标记是以生物大分子的多态性为基础的遗传标记, 其直接反映 DNA 水平上的个体差异, 它的应用是生物技术发展中最为显著的变化之一。它的产生突破了遗传学研究的颈瓶, 克服了传统的形态标记、细胞学标记和生化标记易受外界因素、生物个体发育阶段及器官组织差异的影响的缺陷, 具有不可比拟的优势, 因而具有广泛的应用前景。

## 1 DNA 分子标记的分类

### 1.1 第一代分子标记

#### 1.1.1 RFLP 分子标记 限制性片段长度多态性

(Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) 是最早应用的第一代分子标记技术<sup>[2]</sup>, 其可检测 DNA 序列上的微小变化, 甚至 1 个核苷酸的变化, 也能检测出来。

RFLP 是 Botstein B 等于 1980 年创建的, 它是根据物种的基因组 DNA 在限制性内切酶作用下, 产生相当多的大小不等的 DNA 片段, 利用放射性同位素或某些非放射物质标记探针与转移于支持膜上的基因组总 DNA (经限制性内切酶消化) 杂交, 通过显示限制性酶切片段的大小来检测不同遗传位点等位变异(多态性)的一种技术<sup>[3]</sup>。

RFLP 的特点是: 1) RFLP 标记的等位基因呈共显性遗传, 在分离群体中能区别各种可能的基因型, 同时 RFLP 是基因型的直接反映, 它们是相互独立的, 其表现不受基因互作的影响; 2) RFLP 利

收稿日期: 2007-12-12

基金项目: 国家农业部“948”项目(2004-T13)

作者简介: 郭树春(1981-), 男, 内蒙古乌兰察布人, 内蒙古农业大学硕士研究生, 研究方向作物遗传育种。

通讯作者: 安玉麟(1954-), 男, 内蒙古土默特右旗人, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为农作物育种。

用的是 DNA 普遍而大量存在的自然变异;3) 覆盖整个基因组,只要利用一个组合、一个试验群体就可进行研究分析,并构建详细的 RFLP 图谱;4) 不存在多效性或上位作用,因而有助于分析标记基因对性状的效应;5) 不受环境和发育的影响;6) 一般无表型效应<sup>[4]</sup>。但 RFLP 技术的缺陷主要是费时费钱,而且克隆可表现基因组 DNA 多态性探针较为困难。

1.1.2 RAPD 分子标记 为了克服 RFLP 技术上的缺点,美国杜邦公司的科学家 Williams 和加利福尼亚生物研究所 Welsh 等人于 1990 年建立了随机扩增多态性 (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 技术<sup>[5]</sup>。

RAPD 是建立在 PCR 的基础上,它以一系列人工合成的不同的随机排列顺序的寡聚核苷酸单链(通常为十聚体)为引物(Primer)对所研究的基因组总 DNA 进行 PCR 酶促体外扩增,扩增产物通过聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳分离,经 EB 染色(或银染、放射自显影)来检验扩增产物 DNA 片段的多态性其多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性<sup>[6]</sup>。

RAPD 的特点是:1) RAPD 操作简单、快捷、方便,它可以直接对生物基因组 DNA 多态性进行分析;引物的设计是随机的,因而,无须预先知道特异位点序列的信息,从而就避免了转移、分子杂交、探针合成等繁琐的步骤<sup>[7]</sup>;2) DNA 用量少,灵敏度高<sup>[8]</sup>;3) RAPD 的引物通用性强,所用的引物是人工设计合成的,一套引物可用于不同生物的基因组多态性分析;4) RAPD 操作安全不需同位素示踪,并且所用试剂毒性小,对人体一般不构成危害。

但 RAPD 有它难以克服的缺点,第一, RAPD 标记是显性标记,不能区别纯合体和杂合体,从而使它提供的遗传信息不够完整;第二, RAPD 标记在某些作物中,扩增的稳定性差;第三, RAPD 反应易受外界条件的影响,重复性不太令人满意;第四,易产生假带及非亲本带<sup>[9]</sup>。

1.1.3 AFLP 分子标记 扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLP) 是 1992 年由荷兰 Keygene 公司科学家 Zabeau 和 Vos 发明的一种 DNA 分子标记新技术<sup>[4]</sup>。

AFLP 技术是将基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后,形成分子量大小不等的随机限制性片段,用特定的接头(adapter)连接在这些 DNA 片段的两端,形成一个带接头的特异片段,通过接头序列和 PCR 引物 3' 末端的识别,特异性片段经变性、退火

和延伸周期性循环而扩增,最终通过聚丙烯酰胺电泳分子筛作用,将这些特异的限制性片段分离开来。AFLP 融合了 RFLP 和 RAPD 两种技术的优点,既具有 RFLP 的可靠性,又具有 RAPD 的灵敏性。它的出现是分子标记技术又一重大突破,被认为是目前一种较为理想、有效的分子标记。

AFLP 具有的优点是:1) AFLP DNA 需要量少,检测效率高;2) AFLP 可靠性好,重复性高;3) AFLP 多态性高、具稳定的遗传性;4) AFLP 易操作且样品适应性广;5) AFLP 聚类敏感、定位专一<sup>[10]</sup>。

但 AFLP 已申请专利,使用起来较为昂贵,并且 AFLP 分析需要同位素或非同位素标记引物,必须具有放射性同位素操作过程中的特殊防护措施以及配套的仪器设备,对 DNA 纯度和内切酶的质量要求较高<sup>[10]</sup>。

1.1.4 SCAR 分子标记 序列特异扩增区域 (Sequence Characterized Amplified Region, SCAR) 标记是在 RAPD 技术的基础上发展起来的,目的是为了提高 RAPD 分析的稳定性,其是在对基因组 DNA 作 RAPD 分析后,对目标 RAPD 片段进行克隆并对其末端测序,根据片段两端序列设计特定引物,然后对基因组 DNA 片段进行 PCR 特异扩增,这样就把与原 RAPD 片段相对应的单位点鉴别出来了<sup>[11]</sup>。

其特点是 SCAR 标记为共显遗传,具有高度重现性,可应用于基因定位和遗传作图。

1.1.5 CAPS 标记 酶切扩增多态性 (Cleaved Amplified Polymorphism Sequences, CAPS) 技术又称 PCR-RFLP 法,此法是将 PCR 技术与 RFLP 技术结合起来,利用已知位点 DNA 序列资源设计一套特异性的 PCR 引物(19~27bp),然后用这些寡核苷酸引物对 DNA 的某一基因或片段进行 PCR 扩增,对扩增产物进行 RFLP 分析,以显示扩增产物 DNA 片段的多态性<sup>[12]</sup>。

CAPS 标记显示的是特异基因或片段的限制性长度变异的信息,其精确性较高,并且省却了 RFLP 中的转膜这一步骤。

1.1.6 SSCP 标记 DNA 单链构象多态性 (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) 是指特长的单链 DNA 因核苷酸序列的差异而产生构象变异,在非变性聚丙烯酰胺中表现为电泳迁移率的差异。其方法为:利用 PCR 技术定点扩增基因组 DNA 中某一目的的片段,将扩增产物进行变性处理,双链 DNA 分开成单链,再用非变性聚丙烯酰胺凝胶

电泳分离,根据条带位置变化来判断目的片段中是否存在突变。通过多个样品间的对比,观察条带间位置的变化,从而显示出不同生物个体的 DNA 差异,达到指纹分析的目的<sup>[16]</sup>。

其特点为:快速、简便,但该技术可能漏查一些突变。

1.1.7 SRAP 标记 相关序列多态性 (Sequence-Related Amplified Polymorphism SRAP)是近年来发展起来的一种新型分子标记。

其原理是:利用独特的引物设计对 ORFs( Open Reading Frames, 开放式阅读框)进行扩增,正向引物长 17 bp, 5' 端的前 10 bp 是一段非特异性的填充序列,紧接着是 CCGG, 它们一起组成核心序列, 然后是靠着 3'端的 3 个选择性碱基, 对外显子进行扩增。反向引物长 18 bp, 即由 5'的 11 个无特异性的填充序列和紧接着的 AATT 组成的核心序列, 及 3'的 3 个选择性碱基, 对内含子和启动子区域进行特异扩增; 因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性扩增产物<sup>[17]</sup>。

其具有简便、稳定、中等产率、高共显性、易于测序等优点。

1.1.8 IRAP 标记 研究发现, 反转录转座子是通过 RNA 中间体反转录进行转座的一类可移动遗传因子, 在植物中广泛存在, 拷贝数多, 且散布于各染色体, 非常有利于分子标记的开展, 其主要特征是具有编码转座所必需成分的保守区域, 两端具有长的末端重复序列: (Long Terminal Repeats, LTR)。于是 1999 年由 Kalendar 等开发的 IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) 就是检测反转录转座子插入位点多态性的一种分子标记, 其原理是: 根据反转录转座子的 LTR 包含的保守序列设计出引物, 在 PCR 过程中与 LTR 反转录转座子的相应区域退火, 扩增出相邻的同一家族的反转录转座子成员间的片段<sup>[18]</sup>。

## 1.2 第二代分子标记

1982 年 Hamada 指出微卫星在人及其他真核生物的基因组中广泛存在<sup>[19]</sup>, 且微卫星寡核苷酸的重复次数在同一物种的不同基因型间差异很大, 因而第二代分子标记也随之产生了。

1.2.1 SSR 标记 SSR 标记的基本原理是, 通过在重复序列两端的特定短序列设计引物, 并进行 PCR 扩增反应; 琼脂糖凝胶电泳(或聚丙烯酰胺凝胶电泳)和放射自显影(或银染), 就可以检测到在简单重复序列重复单位数不同的 DNA 区域的多态性<sup>[20]</sup>。

SSR 技术的特点是: 1) SSR 呈共显性遗传; 2) SSR 在数量方面没有生物学上的限制; 3) 其标记带型简单, 记录的条带一致、客观、明确; 4) 采用 PCR 技术进行检测只需少量 DNA 样品, 且质量要求不高, 即使是部分降解的样品也可进行分析; 5) 每个位点均有许多等位形式; 6) 它还具有多态性高、实验程序简单等优点。

但 SSR 获得微卫星 DNA 标记一般需要建立、筛选基因组文库, 克隆测序, 引物设计等一系列实验, 人力、物力消耗巨大, 而且 SSR 标记中所使用的引物不同, 实验结果差异较大。因此, 尽管它在以上各领域内都得到了广泛应用, 但普及的程度却不大<sup>[21, 22]</sup>。

1.2.2 ISSR 标记 ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats 简单序列重复区间) 标记是一种基于微卫星序列发展起来的十分有效的分子标记。ISSR 利用人工合成的 16~18 个核苷酸重复序列作为引物, 在引物的 3'端或 5'端加上 2~4 个随机选择但通常是简并的核苷酸, 对传统意义上 SSR 之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增, 而不是扩增 SSR 本身。与 SSR 相比较, SSR 是共显性标记, 多态性丰富, 并且, SSR 标记必须依赖测序设计引物, 耗时费力, 在一定程度上阻碍了其广泛应用。而 ISSR 不需要预先获知序列信息, 而是用半随机引物进行扩增, 可获得丰富的多态性, 能比 RFLP/RAPD 提供更多的遗传信息<sup>[23]</sup>。

其特点是: 增出来的片段分子量大、多态性高, 具有稳定、简单、方便的优点。

1.2.3 RAMP 标记 RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) 是 Wu 等 1994 年提出的一种分子标记技术, 其原理是利用 5'端锚定 SSR 引物和一条 RAPD 引物搭配而成的引物组合, 对基因组的微卫星 DNA 进行随机扩增。

该技术具有操作简单, 不需要通过克隆、测序来设计特殊双引物, 适合遗传背景尚不清楚的物种等优点<sup>[24]</sup>。

1.2.4 REMAP 标记 反转录转座子微卫星扩增多态性 (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism REMAP) 是在大麦中提出的一种基于反转录转座子的 PCR 标记技术<sup>[25]</sup>。

其原理是根据反转录转座子的 LTR 保守序列和微卫星序列设计引物, 然后进行 PCR, 扩增出反转录转座子与邻近的微卫星间的片段, 从而检测出反转录转座子插入位点上 LTRs 与简单重复序列之间的多态性。REMAP 使用的一个引物是外向的

LTRs 引物,能与反转录转座子的 LTRs 中的序列相配对;另一引物与 RAMP 相似,也是锚定的微卫星序列引物,基于二或三核苷酸重复的 $(GA)_n$ 、 $(GT)_n$ 、 $(CA)_n$ 、 $(CAC)_n$ 、 $(GTG)_n$ 、 $(CAC)_n$  等,且多数是在 3' 端用一个选择性碱基锚定。REMAP 反应中所用的微卫星序列引物最小重复次数一般为 7。反转录转座子表达(启动子和加工信号)和整合位点趋于高度保守,PCR 扩增引物可从这些保守的 LTRs 区域产生,并且在 LTRs 末端或其附近退火<sup>[5]</sup>。

1.2.5 RMAPD 标记 随机微卫星扩增多态 DNA (Random Microsatellite Amplify Polymorphic DNA RMAPD) 是 2005 年蓝贤勇等在 RAPD 和微卫星 (SSR) 的基础上发展起来的一种检测 DNA 多态性的新方法。它利用随机引物和微卫星的上游或下游引物一起作为该扩增的引物,在 Taq DNA 聚合酶、MgCl<sub>2</sub> 和模板 DNA 等共同作用下进行 PCR 扩增的一种分子标记新方法。它是 RAPD 的一种广义的延伸,但又不完全等同与 RAPD 标记<sup>[12]</sup>。因此确定 RAMPD 是一种新的分子标记方法。该方法也具有 DNA 标记的特点,在群体遗传结构和亲缘管分析以及标记辅助选择等遗传育种领域具有广阔的应用前景。

### 1.3 第三代分子标记 SNP

单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 标记被称为第三代 DNA 分子标记。这种分子标记是分散于基因组中的单个碱基的差异,这种差异包括单个碱基的缺失和插入,但更常见的是单个核苷酸的替换<sup>[9,10]</sup>。

其优点是:(1)SNP 在种群中是二等位基因性的,在任何种群中其等位基因频率都可估计出来;(2)SNP 位点丰富,几乎遍布于整个基因组;(3)部分位于基因内部的 SNP 可能会直接影响蛋白质的结构或基因表达水平,因此它们本身可能就是疾病遗传机制的候选改变位点;(4)遗传稳定性高;(5)易于进行自动化分析<sup>[11]</sup>。

目前,有新型的分子标记还在不断的涌现,并且这些分子标记的应用越来越广泛,特别在作物种质资源中的应用更加活跃。

## 2 分子遗传标记在作物种质资源研究中的应用

### 2.1 作物品种分类及遗传多样性的研究

利用 DNA 分子标记可以对品种间亲缘关系、

作物种质遗传多样性的分析进行分析。

张照远等<sup>[20]</sup>利用 CAPS 技术对 54 个细叶桉的 EST (Expressed sequence tags, 表达序列标签) 序列在尾叶桉和细叶桉遗传图谱上的定位进行了研究。吴明根等<sup>[21]</sup>用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术,对东北地区杂草稻生态型以及普通水稻共 15 个样品进行了亲缘关系的分析。钟昌松等<sup>[30]</sup>利用 SSR 标记研究了 20 份特用玉米自交系的亲缘关系,表明甜玉米和糯玉米亲缘关系最近,个别爆裂玉米与糯玉米亲缘关系较近,大部分爆裂玉米与前两者的亲缘关系很远。何新华等<sup>[31]</sup>用 ISSR 技术鉴定 7 个吕宋芒品种(系)和柳州吕宋芒,表明 ISSR-PCR 技术对芒果品种(系)的鉴定非常有效,能区分亲缘关系很近的品种(系)。肖炳光等<sup>[34]</sup>利用基于反转录转座子 (IRAP) 的分子标记技术分析了 59 份烤烟品种间遗传差异。陈夕军等<sup>[35]</sup>在对江苏省水稻稻瘟病菌致病性及遗传多样性研究中,用 RFLP 将日本清泽系列鉴别品种分为 67 个小种。田志宏等<sup>[36]</sup>采用 RAPD 分子标记技术对从国外引进的 15 个高羊茅品种的遗传多样性进行了研究,将所有品种分为 3 类。何桥等<sup>[22]</sup>对我国 12 份莲雾资源和 2 个莲雾近缘种进行了 ISSR 分析,利用 UPGMA 聚类分析表明:蒲桃、马六甲蒲桃与莲雾分属于 3 个不同的组;12 个莲雾品种和品系又分成 4 个亚组。赵欢等<sup>[24]</sup>采用 RAMP 对原产于 42 个国家的 84 份红花材料进行遗传多样性分析,结果表明,被测材料间 RAMP 标记多态性较高。崔海丽等<sup>[37]</sup>利用 24 对 SSR 引物比较了来自中国 6 个省市的 29 个黑稻品种的遗传多样性,结果表明黑稻中存在丰富的遗传多样性。王林海等<sup>[38]</sup>利用 79 对 SSR 引物对河南省审定的 46 个小麦品种进行了分析,把这些品种分为 6 大类和 8 个亚类。程远辉等<sup>[27]</sup>采用新型分子标记 SRAP 对重庆地区何首乌资源进行遗传多样性研究,将 16 份材料分为 2 大类和 1 个特异类。王省芬等<sup>[44]</sup>利用 SSR 和 AFLP 两种分子标记技术,分析了 52 份转基因抗虫棉品种(系)的遗传多样性。

### 2.2 作物遗传图谱构建

随着以 RELP 为代表的分子标记的出现,遗传作图在许多作物及林木中得到了迅速发展<sup>[40]</sup>,为分子标记辅助选择和基因克隆奠定了基石。

陈丽静<sup>[4]</sup>利用优良栽培番茄品系 99165-30 与高抗晚疫病不同生理小种的野生多毛番茄 LA1777 远缘杂交,并构建了番茄永久饱和的分子遗传图

谱,并利用荧光 AFLP 技术,构建了番茄遗传连锁图谱框架图。黄福平等<sup>[10]</sup>用 ISSR 引物、RAPD 引物,对福鼎大白茶及其回交 1 代进行 ISSR 和 RAPD 检测,结果符合 3:1 和 1:3 分离比例的标记 36 个,占标记总数的 20.7%。金梦阳等<sup>[11]</sup>以黄籽 GH06 为母本、黑籽 P174 为父本杂交得到的第 6 代重组自交系 188 个株系为作图群体,通过 SRAP、SSR、AFLP 和 TRAP 四种分子标记对该群体进行遗传连锁分析,构建了一张包含 20 个连锁群、300 个标记位点的甘蓝型油菜分子遗传图谱。张照远等<sup>[12]</sup>利用 CAPS 技术对 54 个细叶桉 EST 序列在尾叶桉和细叶桉遗传图谱上的定位研究表明:7 个 EST 序列在作图群体中呈等位片段多态性,共有 4 个 EST-CAPS 标记整合到尾叶桉 RAPD 连锁图谱,分散于不同的连锁群。杜晓云等<sup>[13]</sup>对 7 种柿属植物分析中获得较理想的扩增结果,每个基因型都有其独特的指纹图谱,可作为区分不同基因型的依据。李双铃等<sup>[14]</sup>利用 Mse I 和 EcoR I 酶切和 9 对引物组合对 10 个山东花生主栽品种进行了 AFLP 分析。易骏等<sup>[15]</sup>从 13 个不同品莲子种的样品中扩增出 98 个条带,其中多态性条带 33 个,多态性条带百分率为 33.7%。文雁成等<sup>[38]</sup>利用 SRAP 和 SSR 标记构建了甘蓝型油菜品种指纹图谱,并对两种标记方法进行了比较,结果表明:SRAP 指纹中具有特异图谱的比例(82.5%和 50.7%)高于 SSR 指纹图谱的结果(60.0%和 44.4%)。

### 2.3 作物辅助选择育种中的应用

随着现代分子生物学的发展,现代生物技术为作物育种提供了强有力的工具,分子标记辅助选择技术就是其中重要的一项技术手段,不仅弥补了作物育种中传统的选择技术准确率低的缺点,而且加快了育种进程,为广大的育种专家所采用。

**2.3.1 杂种优势分析与预测** 根据各品种指纹图谱的差异程度可判断品种间亲缘关系的远近,测量品种间遗传距离,进行系谱分析,并在指导杂交组合配制、杂种优势预测等方面具有重要作用。袁力行<sup>[16]</sup>等用 RFLP、SSR、AFLP RAPD 分子标记进行了玉米杂种优势预测。逯腊虎<sup>[17]</sup>等为分析小麦杂种优势群,采用微卫星(SSR)分子标记对中国北方冬麦区普通小麦、穗分枝小麦(轮回选择后代)、西藏半野生小麦和斯卑尔脱小麦 Hubel 早熟诱变系共 45 份材料的遗传多样性进行了分析。结果表明,普通小麦群体普通小麦群体与穗分枝小麦、轮回选择后代、西藏半野生小麦和 Hubel 诱变系间存在着较大的

遗传差异。西藏半野生在用于小麦杂种优势利用时须先进行遗传改良。

**2.3.2 优良基因标记、定位、克隆、利用** 由于分子标记的应用,加快了抗性育种进程,并且具有抗虫、抗病、抗除草剂的等抗性好的品种不断问世。滕卫丽等<sup>[18]</sup>运用简单序列重复技术(SSR 技术),采用改良的分离群体组群分析法(BSA 法),对大豆品系中选 95-5117(R)×HB1(S)的 F5 代重组自交系群体接种 SMV 3 号株系鉴定抗性,并进行抗病基因的分子定位。丁国华等<sup>[19]</sup>用 318 条 RAPD 引物扩增黄瓜感病亲本 L18-10-2 和抗病亲本 129,成功地将 RAPD 标记转化成稳定的 SCAR 标记,即 SSBSP18-494。黄炳超等<sup>[20]</sup>用 AFLP 方法对从中国广东省 7 个地点采集的 4 个生物型的 DAN 指纹进行分析,创造了一批抗稻瘰蚊的新种质。葛荣朝等<sup>[21]</sup>对附加系 Line 15 进行耐盐性验证,并了解其外源多枝赖草染色体的遗传背景,对小麦-多枝赖草二体异附加系 Line 15 进行了生理、细胞和分子水平的系统检测,较全面地揭示了 Line 15 耐盐性的具体来源。

在育种中去雄一直困扰着许多科研工作者,分子标记的出现使得标记克隆雄不育基因成为可能。黄和艳等<sup>[22]</sup>以甘蓝显性雄性不育系 DGMS79-399-3 与优良品系 02-12 回交自交系为材料,利用远红外荧光标记 AFLP 技术及 Li-cor 基因测序仪对回交自交系不同基因型 (MsMs、MsmS 和 msms) 材料进行 AFLP 连锁标记快速筛选,从 512 对引物组合中筛选出 17 个差异标记,通过分析选择了其中 3 个单株为理想的雄性不育株,可用于进一步回交。高风云等<sup>[23]</sup>应用 252 条 10-mer 随机引物对遗传背景相似的可育株和不育株亚麻进行了 RAPD 分子标记,结果发现,在 252 条随机引物中有 2 条引物 (即 S62 和 S135) 可分别得到 1 个与显性核不育的雄性基因有关的 RAPD 分子标记为 S62-500 和 S135-350。

### 2.4 进行基因的标记定位和克隆利用

遗传标记最主要的应用还有克隆基因。目前有相当一批作物的重要农艺性状的质量数量性状基因被标记定位并克隆。熊立仲<sup>[24]</sup>等在研究微卫星 DNA 在水稻分子标记连锁图上的分布中,共定位了 28 个微卫星 DNA,其中 6 个为华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室根据数据库中的序列而设计的。研究发现:12 对引物的扩增带为单拷贝,其中 6 在亲本间有多态性;8 对引物的扩增产物为多拷贝,另外 2 对引物无明显扩增产物。通过连锁分析和作图,这 6 个新的微卫星被分别定位在第

2,6 和 7 号染色体上。

## 2.5 体细胞杂种的鉴定

遗传标记还有一重要的应用就是体细胞杂种的鉴定。李稳香<sup>[7]</sup>等用 SSR 指纹图谱标记对 10 个杂交水稻组合的子一代种子纯度进行鉴定,并进行人为掺杂与田间种植验证。马志强<sup>[8]</sup>等从 30 对 SSR 引物中筛选确定了能够清楚、稳定、准确的鉴别亲本 20 亲本和杂交种的一对引物 phi029 对杂交种亲本 20 进行纯度鉴定,结果与田间鉴定相差甚微。

## 3 展望

随着分子标记技术的不断发展和成熟,利用分子遗传标记技术进行作物种质资源的基因型鉴定,是开发利用现有我国丰富的野生种质优异基因的关键。在一些表型性状很差的野生资源和农家种中却隐藏着优良性状基因,只有利用现代分子标记技术,才能大量的野生种质资源进行鉴定,从而开发利用其中尚未利用的新的优异基因。并且其准确、可靠、高效率等优越性已充分显示出来,并展现出巨大的应用潜力<sup>[9]</sup>。随着这项技术的不断发展和完善,它将会推动作物遗传研究进入一个新的阶段。

### 参考文献:

- [1] 王金英,江川.分子遗传标记类型及其在作物种质资源研究上的应用[J].福建稻麦科技,2002,20(30):34-36.
- [2] 马克世,胡炳义.分子标记的发展及应用[J].周口师范学院学报,2006,23(2):81-84.
- [3] 贾继增.分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J].中国农业科学,1995,29(4):1-9.
- [4] 程各久,凌杏元.利用 RFLP 进行数量基因定位及效应分析的原理与方法[J].生物数学学报,1994,9(5):200-206.
- [5] 刘必谦,戴继勋. RAPD 标记在遗传育种中的应用[J].海洋通报,1997,16(5):85-89.
- [6] 石太湖,张华,冯立军. PCR、RAPD 技术在植物研究中的应用[J].国外农学-杂粮作物,1995,(5),16-18.
- [7] 谢军.分子标记技术在植物遗传育种中的应用[J].吉林农业科学,1998,(3):20-27.
- [8] 袁力利,傅骏弊,刘新芝,等.利用分子标记预测玉米杂种优势的研究[J].中国农业科学,2000,33(6):6-12.
- [9] 肖炳光,杨本超.利用 IRAP 标记分析烤烟品种间遗传差异[J].西北植物学报,2006,26(6):1119-1124.
- [10] 王青山,李葱葱,王晶,等. AFLP 分子标记技术及应用研究进展[J].吉林农业科学,2005,30(6):29-33.
- [11] 吴学谦,李海波,魏海龙,等. SCAR 分子标记在香菇菌株鉴定上的应用研究[J].植物学报,2005,24(2):259-266.
- [12] 徐安毕,王文泉.几种分子标记方法相结合建立的新型分子标记方法[J].生物学报,2007,42(1):26-30.
- [13] 曾莉娟.SSR 技术及其应用[J].热带农业科学,2001,(3):56-59.
- [14] 付杰,张明方,王涛.芥菜类作物的遗传多样[J].细胞生物学杂志,2004,26:344-348.
- [15] 田志宏,邱永福,严寒,等.用 RAPD 标记分析高羊茅的遗传多样性[J].草业学报,2007,9(1):60-65.
- [16] 丁建松,曹毅,童建. PCR-SSCP 研究进展[J].辐射防护通讯,2004,5(6):29-33.
- [17] 李巧燕,林瑞庆,朱兴全. SRAP 分子标记及其应用概述[J].热带医学杂志,2006,6(4):647-649.
- [18] 杜晓云,罗正荣.部分柿属植物 IRAP 反应体系的建立和指纹图谱构建[J].农业生物技术学报,2006,14(6):931-936.
- [19] 张桂莲,陈立云,张顺堂,等. SSR 标记及在水稻遗传育种中的应用[J].作物研究,2004,(5):325-328.
- [20] 曾莉娟.SSR 技术及其应用[J].热带农业科学,2001,(3):56-59.
- [21] 李造哲,扈廷茂.分子标记及其在植物育种中的应用[J].内蒙古农业大学学报,2000,21(3):102-105.
- [22] 贾继增.分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J].中国农业科学,1995,29(4):1-9.
- [23] 何桥,梁国鲁,谢江辉,等. Genetic Diversity Analysis of Wax Apple Germplasm by ISSR Markers [J]. 园艺学报,2006,37(4):173-175.
- [24] 赵欢,吴卫,郑有良,等.应用 RAMP 分子标记研究红花资源遗传多样性[J].植物遗传资源学报,2007,8(1):64-71.
- [25] 田清震,贾继增. AFLP 在小麦种质资源研究中的应用[J].麦类作物学报,2002,22(1):95-99.
- [26] 王林海,田志强,董中东,等.SSR 标记技术在小麦品种遗传多样性上的应用[J].河南农业大学学报,2007,1(1):9-15.
- [27] 程远辉,周昌华,马爱芬,等.重庆何首乌遗传多样性的 SRAP 研究[J].中国中药杂志,2007,32(8),661-663.
- [28] 张照远,甘四明,李发根,等. EST-CAPS 标记在尾叶桉和细叶桉遗传图谱构建中的应用 [J]. 林业科学研究,2007,14(2):84-88.
- [29] 吴明根,袁晓丹,柳参奎,等.利用 RAPD 分子标记分析东北地区杂草稻的亲缘关系 [J]. 安徽农业科学,2007,25(1):57-59.
- [30] 钟昌松,徐利远,余桂蓉,等.20 份特用玉米自交系亲缘关系的 SSR 标记研究[J].玉米科学,2006,12(4):49-52.
- [31] 何新华,李杨瑞,郭永泽. Identification of closely related mango cultivars by ISSR[J].广西植物,2007,5(1):48-51.
- [32] 黄福平,梁月荣,陆建良,等.应用 RAPD 和 ISSR 分子标记构建茶树回交 1 代部分遗传图谱 [J]. 茶叶科学,2006,2(3):16-21.
- [33] 金梦阳,刘列钊,付福友,等.甘蓝型油菜 SRAP、SSR、AFLP 和 TRAP 标记遗传图谱构建 [J]. 分子植物育种,

- 2006,13(4),78-84.
- [34] 熊立仲,土石平.微卫 DNA 和 AFLP 标记在水稻分子标记连锁图上的分析[J].植物学报,1998, 40( 7):605-614.
- [35] 赵中秋,郑海雷,张春光.分子标记的发展及其在植物研究中的应用[J].生命科学研究,2000, 4(2):68-72.
- [36] 李双铃,任艳,陶海腾,等.Establishment of AFLP Fingerprinting of Peanut Cultivars in Shandong Province [J].Journal of Peanut Science,2006,6(1):20-23.
- [37] 李稳香,詹庆才.杂交水稻种子纯度 SSR 指纹图谱标记鉴定技术研究[J].中国种业,2006,16(3):21-23.
- [38] 文雁成,王汉中,沈金雄,等.Comparison of cultivar fingerprints constructed with SRAP and SSR markers in Brassica napus [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2006,3:3-9.
- [39] 崔海丽,夏春镛,赵则胜.黑稻资源遗传多样性的 SSR 分析[J].中国农学通报,2007,15(1):73-77.
- [40] 赵中秋,郑海雷,张春光.分子标记的发展及其在植物研究中的应用[J].生命科学研究,2000, (2):68-72.
- [41] 逯腊虎,李振兴,倪中福,等.小麦杂种优势群研究 VI. 普通小麦与穗分枝小麦、轮回选择后代材料、西藏半野生小麦和斯卑尔脱小麦早熟诱变系的 SSR 分子标记遗传差异研究[J].麦类作物学报, 2007, 2: 26-31.
- [42] 滕卫丽,李文滨,邱丽娟,等.大豆 SMV3 号株系抗病基因的 SSR 标记[J].大豆科学, 2006, (3):44-49.
- [43] 丁国华,秦智伟,周秀艳,等.黄瓜霜霉病抗病基因(dn)的 RAPD 及 SCAR 分子标记[A].朱德蔚.中国园艺学会第十一届会员代表大会暨学术讨论会论文集[C].北京:中国科学技术出版社,2005.323-330.
- [44] 王省芬,马峙英,潘玉欣,等.转基因抗虫棉 SSR 和 AFLP 遗传变异研究[J].植物遗传资源学报 2006, 02: 27-32.
- [45] Huang Bingchao,Zhang Yang, Xie Zhenwen. Molecular Assisted Breeding for Resistant Varieties against Asian Rice Gall Midge in South China [J]. Molecular Plant Breeding .2007,(4):65-72.
- [46] 葛荣朝,张敬原,赵宝存,等.一个耐盐小麦-多枝棘草二体异附加系外源染色体的鉴定 [J]. 中国农业科学, 2006,39,(1) :201-206.
- [47] Jiang zhao-xue,Wang shi-quan, Deng qi-ming.Genetic analysis and molecular tagging on a novel excessive tillering mutant in rice [J].Acta genetica sinica,2006,(4): 58-63.
- [48] 黄和艳,张延国,邓波,等.利用 AFLP 标记辅助甘蓝显性雄性不育高代回交系选择[J].园艺学报,2006 ,33(3): 82-86.
- [49] 马志强,陈洁,郑根昌,等.分子标记方法鉴定玉米杂交种单 20 纯度的研究 [J]. 内蒙古民族大学学报, 2007, 03:59-62.
- [50] 杨恩.云南省主要推广核桃品种的分子标记鉴别及遗传分析[D].重庆:西南林学院,2006.
- [51] 高风云,张辉,斯钦巴特尔.亚麻显性雄性核不育基因的 RAPD 标记[J].华北农学报,2007, 22(1):133-135.
- [52] 王明霞,柳李旺,龚义勤,等.RAMP 与 REMAP 分子标记技术及其应用[J].分子植物育种 2006:4(6)859-865.
- [53] 杨晖.基于反转录转座子的 REMAP 和 IRAP 指纹图谱技术[J].安徽农业科学,2005,33(4):708-709.
- [54] 肖炳光,杨本超.利用 IRAP 标记分析烤烟品种间遗传差异[J].西北植物学报,2006,26(6):1119-1124.
- [55] 赵君,苏翻身,于长虹,等.几种常见的分子标记技术的比较[J].内蒙古农业科技,1999,(3):32-33.
- [56] 赵君,于长虹,云生园.RFLP 分子标记技术及其在植物育种中的应用[J].内蒙古农业科技,1999,(增刊):49-51.
- [57] 高风云,张辉,斯钦巴特尔.亚麻分子标记研究进展[J].内蒙古农业科技,2006,(2):30-31,33.
- [58] 肖海峻,孟利前,李玉冰.ISSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用[J].内蒙古农业科技,2006,(4):31-33,42.
- [59] 崔国惠,吴晓华,李元清.植物染色体工程在小麦品种改良上的研究进展[J].内蒙古农业科技,1998,(5):34-37.
- [60] 高银.植物抗逆机制与基因工程研究进展[J].内蒙古农业科技,2007,(5):75-78.
- [61] 刘耀权,周文厚.基因工程与植物保护[J].内蒙古农业科技,1997,(4):29-30.
- [62] 李恋.生物技术在植物育种上的新应用[J].内蒙古农业科技,2006,(3):52-54,56.
- [63] 马立晖,胡秀臣.转基因技术在大豆抗病虫害育种上的应用[J].内蒙古农业科技.2004,(专刊):76-77.
- [64] 李勇,田自华.旱稻根系与抗旱性研究进展[J].内蒙古农业科技,2006,(3):9-10,17.
- [65] 成慧娟,马尚耀,王立新,等.赤峰市高粱育种研究 56 年回顾及展望[J].内蒙古农业科技,2007,(3):72-73.
- [66] 成慧娟,马尚耀,王立新,等.赤峰市高粱育种研究 56 年回顾及展望[J].内蒙古农业科技,2007,(3):72-73.
- [67] 白海.印度旁遮普农业大学作物育种现状[J].内蒙古农业科技,1996,(2):24-25,32.
- [68] 崔国惠,于美玲,吴晓华,等.生物技术在小麦育种中的应用现状与前景[J].内蒙古农业科技,1996,(5):21-24.
- [69] 冯勇,赵瑞霞,苏二虎,等.优质高效青贮玉米品种选择与方法的探讨[J].内蒙古农业科技.2002,(专刊):32-35.