

水稻品种选育中常用的分子标记概述

薛文君¹, 宋丽¹, 王爱东¹, 高方远²

(1. 周口职业技术学院, 河南 周口 466000; 2. 四川省农业科学院, 成都 610066)

摘要: 分子标记辅助育种技术具有周期短、不受环境影响的优势, 因而在作物育种上得以广泛应用。本文就分子标记的种类及其特点做一简单的对比并概述了其在育种上的具体应用。

关键词: 分子标记; 育种; 多态性

中图分类号: S511.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)02-0022-05

A Review of Molecular Markers Used in Rice Breeding

XUE Wenjun¹, SONG Li¹, WANG Aidong¹, GAO Fangyuan²

(1. Zhoukou Vocational and Technical College, Zhoukou 466000; 2. Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: Compared with the traditional breeding technology, molecular marker assisted breeding technology has a short cycle and is not affected by environment, so it is widely used in crop breeding. In this paper, types and characteristics of molecular markers and their characteristics were compared and their specific application in breeding summarized briefly.

Key words: Molecular markers; Breeding; Polymorphism

分子标记辅助育种技术(Molecular marker assisted breeding technology)是指在小麦、水稻、玉米、油菜、大豆等重要作物的品种选育中,借助现代分子生物技术手段和经典遗传学的育种方法,结合生物体的表型性状和基因型进行筛选,从而选育出具备优良性状的新品种的辅助育种技术手段。是利用与目标性状紧密连锁的DNA分子标记对目标性状进行间接选择,是从作物DNA(脱氧核糖核酸)分子水平上进行间接选育的,这种选育方法有效克服了隐性基因的影响,与传统的育种方法相比较具有准确、高效等优点,可以加速育种进程而缩短选育世代。

1 遗传标记的发展历程

在应用传统的育种方法对作物的遗传分析中,往往是选取典型性状作为遗传标记的。随着遗传学的发展,遗传标记先后经历过四个发展阶段。这四个发展阶段分别是最初的形态学标记阶

段、细胞学标记阶段、蛋白质标记阶段和DNA分子标记阶段,遗传标记的每一个发展阶段都有着鲜明的特征,形态学标记是以明确显示遗传多态性的等位基因表型识别为特征的,细胞学标记通常是以染色体的结构和数目为特征,蛋白质标记以物种蛋白质结构的特异性为特征,分子标记以DNA、DNA聚合酶链式反应PCR为特征的。

20世纪80年代初, Bostein首次提出了DNA限制片段长度多态的概念,随后Mullis于1985年提出了DNA聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)。以DNA聚合酶链式反应为基础,研究者们开发出了一系列的分子标记诸如随机扩增多态性DNA即RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)、简单重复顺序即微卫星DNA标记SSR(Simple Sequence Repeat)、mRNA指纹分析即AFLP(based mRNA fingerprinting)等。这些标记的开发推动了分子标记技术在作物育种上的大规模应用^[1]。

DNA分子标记是以DNA形式出现,表现在DNA核苷酸水平上的差异以及单个核苷酸的不同,因而检测起来具有方便、数量丰富、变异位点多且不受环境的影响^[2],对目标性状无影响等显著优点。

收稿日期: 2016-10-29

基金项目: 四川省青年科技基金项目(06ZQ026-033); 四川省科技攻关计划(05NG1918)

作者简介: 薛文君(1971-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事分子生物学及作物分子育种研究。

迄今为止,经过研究者的不断努力,已开发出几十种 DNA 分子标记。根据各类分子标记的不同特点,可将分子标记分为3大类。第一大类是基于 DNA-DNA 的 Southern 杂交技术为基础的分子标记,在这类标记中广泛使用的一种是限制片段长度多态 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 标记;第二类是基于 DNA 聚合酶链式反应 PCR 为基础的分子标记,这类标记中广泛使用的有 RAPD、SSR、AFLP、CAPS、ISSR、STS 等;第三类是其他类型的分子标记如单核苷酸多态性 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) 等标记。

2 作物育种上常用的几种分子标记及特点

2.1 限制性片段长度多态

应用最为广泛的分子标记是限制性片段长度多态 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism),也是发现最早的一种以 Southern DNA-DNA 杂交技术为核心的第一代分子标记。Grodzicker 于 1974 年创立了限制性片段长度多态的概念, Bostein 等^[1]于 20 世纪 80 年代初提出了利用 RFLP 标记构建遗传连锁图的设想, 1988 年 Paterson 等首次成功将 RFLP 标记应用在番茄育种上。RFLP 标记的原理是利用特定的限制性内切酶 (restriction enzyme, RE) 识别、切割不同生物个体的基因组 DNA, 经过特定的程序处理获得反映特异性的 RFLP 图谱。其操作过程包括生物个体总 DNA 的提取和纯化、选择特异性的内切酶并构建反应体系等, DNA 在反应体系中被酶切成不同长度的片段、然后经过电泳检测。酶切的基因组较小时, 通常选用溴化乙锭 (EB) 进行染色并统计谱带的带型。而对于较大的基因组进行酶切时必须借助分子杂交手段 (Southern blotting) 来实现, 它的主要步骤是把特定的 DNA 谱带转移到硝酸纤维膜或尼龙膜上, 用制备好的目标 DNA 探针 (含有放射性标记的已知碱基序列 DNA 分子片段), 采用 Southern blotting 杂交法, 使探针 DNA 与硝酸纤维膜或尼龙膜上的 DNA 酶切片段进行充分的分子杂交, 经放射自显影后统计 DNA 的多态性并进行结果分析。

2.2 随机扩增多态性 DNA

随机扩增多态性 DNA (Randomly Amplified Polymorphism DNA, RAPD) 是由 Williams 和 Welsh 等在 1990 年以 DNA 聚合酶链式反应为基础开发的一种新型分子标记技术。这种标记主要是利用

8~10 bp 的随机排列的寡聚脱氧核糖单链引物, 对基因组 DNA 进行非定点 PCR 扩增以获得不同长度的多态性 DNA 片段, RAPD 所使用的引物各不相同, 每一种特定的引物在基因组 DNA 序列都有特定的结合位点, 当基因组 DNA 在这些特定区域发生碱基突变、片段插入或缺失时, 可导致这些特异性位点的分布发生变化, 引起扩增的 DNA 数量和长度的差异, 从而表现出多态性。

2.3 简单序列重复

简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 又称微卫星 DNA (Microsatellite, MS), 是 Moore 和 Sollotterer 在 1991 年同时提出来的。真核生物基因组中普遍存在着由 1~5 个碱基对组成的长达几十个核苷酸的重复序列, 分布在整个基因组的的不同位置上。微卫星 (microsatellite) DNA, 与其他分子标记相比, 结果更准确可靠; 同一类微卫星 DNA 可分布于整个基因组的的不同位置上, 其多态性主要源于碱基对重复次数或重复程度的不同。

根据 SSR 核心序列碱基数目的差异, 可将 SSR 分为单碱基重复型、2 碱基重复型、3 碱基重复型及 4 碱基重复型等。在植物基因组中不同的 SSR 的丰度 (即频率) 也有差异, 植物基因组中最丰富的 SSR 是 (AT)_n; 在同一类型的 SSR 内, 核心序列碱基种类不同的 SSR, 其频率也有很大差别^[4]。

利用微卫星标记的前提条件是必须知道扩增 DNA 片段两侧序列, 通常情况下研究者并不清楚 SSR 两侧序列, 这就限制了 SSR 技术在分析中的应用; 1994 年蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等发明的锚定简单重复序列 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 则可以克服这个障碍^[5], ISSR 的依据是在植物 DNA 中广泛存在 SSR 的特点, 利用 SSR 本身设计引物, 不需要预先对 DNA 进行测序和克隆。即使 DNA 发生降解, 仅需很微量的 SSR 分子, 也能进行鉴定分析^[6]。康奈尔大学的 McCouch 教授等通过检索数据库得到六千多个包含微卫星的 SSR 序列, 并从这些序列中成功开发了两千多个微卫星标记, 现在水稻中微卫星标记数已达到三千多个, 且这些已全部在网上公布, 研究者们都可以免费通过网上检索、下载使用^[7-9]。

2.4 扩增片段长度多态性

扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), 被称为最有力的分子标记^[10]已被广泛应用于基因定位、连锁图的绘制和基因追踪。是在 1992 年由荷兰人 Zebau 和

Vos等开发的介于RAPD和RFLP之间的一种检验DNA多态性的标记技术,AFLP有着其他分子标记无法比拟的优越性,因而被广泛地应用^[11-12]。

AFLP标记技术的原理是在一定条件下酶切生物体基因组DNA并选择特定长度的DNA片段进行扩增。进行AFLP分析时,也可以对基因组DNA进行双酶切,双酶切所产生的片段长度一般较小,可优先被扩增,可以只采用单酶切。在酶切时通常使用双链人工“接头”(adapter),与“接头”相邻的碱基序列可作为引物的结合位点。AFLP标记所用的引物通常是由核心碱基(Core sequence, CORE)序列、内切酶识别序列(Enzyme specific sequence, ENZ)、选择碱基序列(Selection extension, ENT)组成的;只有那些能与碱基配对的限制性酶切片段才被扩增,扩增片段可进行电泳检测^[13-14]。

1994年由zietkiewicz等创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记技术即:简单序列重复区间扩增多态性分子标记(Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR),是一种新型的分子标记。

2.5 酶切的扩增多态性

酶切的扩增多态性序列(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS)首先对DNA进行PCR扩增,针对待定位点设计引物,然后用内切酶对扩增产物进行酶切、电泳、EB染色分析;CAPS技术也可称为PCR-RFLP。在CAPS技术的基础上又发展出dCAPS(derived CAPS)技术,这种技术是检测单核苷酸多态性的一种良好的方法^[15]。

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)又被称为第三代多态性标记,是指相同位点上的不同等位基因之间在核苷酸水平的微小差异或只有小的插入、突变或缺失等。获得SNP的方法一是可以通过表达序列标签(EST)的分析来完成SNP的搜寻,第二种方法是通过DNA测序来获得SNP或者通过查询、搜索SNP数据库得到,SNP标记可区分不同个体遗传物质的差异。人类基因组有25万~40万个cSNP^[16],大约1000bp中会出现一次SNP。因此SNP可以作为一种特异性的标记,结合并借助于DNA芯片技术,随着科技的发展如果能将所有SNP信息记入DNA芯片,就可制造基因组扫描仪,用来扫描每个个体并分析它们在基因组成上的差异。

表1 分子标记的特点

标记特性	RFLP	RAPD	SSR	ISSR	AFLP	Indel	SNP
基因组分布	低拷贝编码序列	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组
DNA质量要求	高	低	中高	低	高	高	高
DNA需求	5~10 μ g	1~100ng	50~120ng	25~50ng	1~100ng	50ng	\geq 50ng
遗传特性	共显性	共显性	共显性	共显性	共显性	共显性	共显性
多态性	中高	较高	高	较高	较高	低	高
基因座位数	1~3	1~10	1~5	1~10	20~200	2	2
技术难度	高	低	低	低	中等	低	高
可靠性	高	低/中等	高	高	高	高	高
引物/探针类型	基因组DNA/DNA 特异低拷贝探针	9~10bp 随机引物	14~16bp 特异引物	16~18bp 特异引物	16~20bp 特异引物	22~25bp 特异引物	AS-PCR 引物
同位素使用	常用	不用	可不用	不用	常用	不用	不用
时间因素	多	少	少	少	中等	少	多
实验成本	高	较低	中等	较低	较高	中等	高

3 生物分子连锁图谱绘制

对目标性状进行分析和对目标基因进行克隆的一种有效手段就是DNA分子连锁图谱的绘制。传统的遗传图谱是根据基因表达性状绘制的且标

记也很少,现在通过DNA分子标记能够很容易地对目的基因进行跟踪和定位。通常对构建的作图群体进行分子筛选,与目标基因紧密连锁的分子标记可以通过PCR来选择,然后对作图群体的DNA带型进行分析作图,可以很准确地将目标基

因定位在2个相邻的分子标记之间,为对该基因的进一步克隆奠定基础。

3.1 利用分子标记构建作物遗传图谱

构建作物的遗传图谱通常需要一定的过程。主要步骤包括亲本系的选择、建立一个适合作图的子代 F_2 作图群体、对子代 F_2 群体中不同植株的基因型进行统计分析并确定各分子标记间的相对位置。研究者们应用这种作图方法,已经构建了包含数十种动植物的RAPD遗传图谱^[17]。

在水稻研究中,1988年McCouch等在爪哇稻和籼稻品种IR36杂交所得的 F_2 群体的53个植株DNA中,检测等位RFLP的分离而建立起世界上第一张RFLP分子标记图谱^[18]。该图谱共包含135个分子标记,图谱总长为1224.6厘摩;1994年,康乃尔大学的Causse等又构建了一个含有726个分子标记的RFLP遗传图谱^[19];同期的研究还有1995年陈洪等利用RAPD标记构建了含有52个RAPD标记的水稻分子标记图谱^[20],1998年日本的Harushima构建了包含2275个标记的水稻分子图谱,随后研究者们不断完善将标记从2275个标记增加到3267个^[21];这些遗传图谱的绘制,为水稻育种工作者利用这些标记对水稻等作物进行遗传多样性分析提供了极大的便利。

3.2 利用分子标记进行基因定位和对作物种质进行检测

利用这些已经开发的分子标记可以对作物重要性状的基因进行标记定位。例如在水稻中,通过分子标记定位的基因大多是抗病性基因。据粗略统计,利用分子标记定位的水稻抗稻瘟病主效抗性基因至少已有51个^[17]以及为数众多的抗稻瘟病QTL位点。张彦等应用SSR分子标记将水稻抗白叶枯病基因 $Xa-25$ 定位在第4染色体上长臂末端的RM6748和RM1153两个标记之间^[22]。

利用绘制的分子图谱还可以分析作物植株间的亲缘关系和对作物种子纯度进行鉴定以及对作物进行遗传多样性分析;有研究利用DNA指纹图谱对水稻品种及其纯度进行快速、准确的鉴定,而且用这种方法对作物种质鉴定操作简便、鉴定成本低廉、不受植株生长环境和发育阶段的影响。2002年赵勇等利用SSR分子标记鉴定水稻种质资源,有效地将水稻种质资源分为2个大类^[23];郝晓芬等用SSR标记分析了采自几个稻区的96份水稻品种,将其分为5个大类^[24]。由此可见用分子标记来对作物种质资源进行鉴定是可行的。

3.3 分子标记在水稻育种上的主要应用

研究者们在水稻育种实践中,利用分子标记辅助育种技术还能够对作物品种进行改良和对优势或抗病目标基因进行预测。育种工作者往往借助分子标记技术有效地将作物的优良性状基因导入到另一作物内,也可以追踪目标基因在植物体内的表达,还可以将多个优良性状的基因聚合在一个作物品种内。2003年LIU等通过分子标记将抗性基因导入珍汕97中,获得了较好的效果^[25]。

分子标记辅助选择的原理是如果已经找到与目标基因连锁的标记基因,在杂交后代群体里只要通过分子标记找到标记基因的个体,该个体就是一个符合育种需要的目标个体。把它选育出来进行繁衍成系,就可培育出一个新的抗病品种,从而大大缩短了育种时间。

4 展 望

到目前为止,分子标记技术已经在作物育种上大规模地应用,并取得了巨大的经济和社会效益。相信在不久的将来,随着基因工程技术的发展和作物育种研究的深入,分子标记辅助育种技术的应用范围将能够不断地突破。

参考文献:

- [1] 黎 裕,王建康,邱丽娟.中国作物分子育种现状与发展前景[J].作物学报,2010,36(9):63-67.
- [2] 杜 娟.DNA分子标记在水稻遗传育种中的应用[J].云南大学学报,2004(26):238-242.
- [3] Bostein D. Construction of a genetic linkage map in manusing restriction fragment leng thpolymorphism[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314-331.
- [4] 席章营,张桂权.SSR标记及其在作物遗传育种中的应用[J].河南农业大学学报,2002,36(3):293-297.
- [5] Wang Z. Survey of plant short tandem repeats[J]. Theor Appl Genet, 1994, 88: 1-6.
- [6] 孙 琦.SSR标记在玉米遗传育种中的应用[J].玉米科学,2006,14(1):37-39.
- [7] 菊玉栋,李金泉.水稻微卫星标记的发展与应用[J].安徽农业科学,2005,33(1):1921-1923.
- [8] 张增翠,侯喜林.SSR分子标记开发策略及评价[J].遗传,2004,26(5):763-768.
- [9] 李明芳,郑学勤.开发SSR引物方法之研究动态[J].遗传,2004,26(5):769-776.
- [10] 王青山,李葱葱,王 晶.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] Vos P. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J].Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [12] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification, a general method for DNA fingerprinting European patent Application(Publication No.0534858A1)[P]. Paris: European Patent Of-

- face, 1993.
- [13] 李爱丽, 马峙英. AFLP分子标记与作物改良[J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(1): 89-94.
- [14] 白晶, 张月学, 杨冬鹤, 等. 几种重要的分子标记原理及RAPD应用[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2004, 20(5): 89-91.
- [15] 张佳福. 单核苷酸多态性在植物研究中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(3): 304-308.
- [16] 刘堰, 欧阳克清, 赵虎成, 等. 随机扩增多态性DNA技术在生命科学中的应用[J]. 重庆大学学报, 2001, 24(4): 114-117.
- [17] 李落叶, 井金学. 稻瘟病抗性基因的分子定位及克隆[J]. 中国农学通报, 2006, 22(1): 49-53.
- [18] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecole mapping of rice chromosomes[J]. Theor Appl Genet, 1998, 76(6): 815-829.
- [19] Causse M A, Fulton T M, Cho Y G, et al. Saturated molecular map of the rice genome based on interspecific backcross population[J]. Genetics, 1994, 138(4): 1251-1274.
- [20] 陈洪, 朱立煌, 徐吉臣. RAPD标记构建水稻分子连锁图[J]. 植物学报, 1995, 37(9): 677-684.
- [21] Harushima Y, Yano M, Shomura A, et al. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population[J]. Genetics, 1998, 148(1): 479-494.
- [22] 张彦, 郭士伟, 何冰, 等. 利用SSR标记建立杂交水稻分子指纹图谱数据库[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(2): 181-183.
- [23] 赵勇, 杨凯, Akbar, 等. 利用水稻功能基因SSR标记鉴定水稻种质资源[J]. 中国农业科学, 2002, 35(4): 349-353.
- [24] 郝晓芬, 王志民, 王根全. SSR方法标记分子光敏雄性不育基因[J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 112-116.
- [25] LIU S P, LI X, WANG C Y. Improvement of Resistance to Rice Blast in Zhenshan97 by MolecularMarker-aided Selection[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(11): 1346-1350.

(责任编辑: 范杰英)