

综 述

遗传标记技术研究进展及在农作物 遗传育种中的应用^{*}

苏 萍

(黑龙江省农科院谷物品质研究中心)

遗传学通常将易于识别的等位基因称为遗传标记,并用来研究基因遗传和变异的规律。目前,遗传标记主要有形态标记(Morphological markers)、生化标记(Biochemical markers)及分子标记(Molecular markers)等三种类型,被广泛应用于生物分类学、育种学、遗传学和物种进化等研究领域。

1 形态标记

早在1910年,摩尔根等人利用果蝇作材料,发现决定眼色基因(R)与决定性别的基因(X)连锁遗传的现象,尔后又陆续发现了40多个肉眼可辨的果蝇突变型。A. H. Sturtevant(1913)对果蝇5个基因进行连锁分析,将其定位在X染色体上,确立了遗传学的染色体理论和遗传作图的基本原理,这些原理是细胞遗传、微生物遗传和分子遗传学建立和发展的基础。这些早期用于作图的遗传标记都是以等位基因的表现型为识别依据,属于形态标记。但是,生物特别是高等生物中可供应用的形态标记数量很少,使用这些标记只能建立稀疏且分布极不均匀的遗传图谱,其数目非常有限,检测时几乎离不开生物活体。虽然形态标记一直是生物学的主要遗传标记,但是随着生物学的发展,形态性状作为遗传标记已远远不能满足生物分类和进化研究的需要,必须由新的遗传标记取而代之。

2 生化标记

生化标记主要包括同工酶及贮藏蛋白(Hart et al., 1980; Zeller, 1973)。其原理是通过贮藏蛋白和同工酶的电泳分析可以以基因产物认识基因的存在及表达,由生化表现型反映基因型。目前,生化标记较广泛地应用于研究作物起源与进化、评估群体遗传结构、品种纯度鉴定和抗性生理研究等方面。仅小麦已有187个生化位点定位在小麦染色体上,其中已对编码小麦HMW、LMW麦谷蛋白质亚基及 α 、 β 、 γ 、 ω 麦醇溶蛋白的基因进行定位,用于小麦的遗传、育种、品种鉴定及品质评价等研究领域中。生化标记虽然使遗传标记的范围大为拓宽,但由于方法和技术的局限,能经常使用的生化标记的数目有限,无法建立较详细的遗传图谱。

3 分子标记

分子生物学的发展使遗传标记发生了变革,出现了一些能产生高度多态性并可真正代表物种本身遗传特征的遗传标记,即分子标记。分子标记技术的产生开创了直接应用DNA水平上遗传标记的新阶段。分子标记目前主要包括原位杂交、RFLP、RAPD、AFLP、SSR等技术,其中RAPD、AFLP、SSR等技术是以八十年代后期产生的聚合酶链式反应(Polymerase Chain

^{*} 收稿日期 1998-11-18

Reaction, PCR)为基础的新型分子标记

3.1 原位杂交标记 原位杂交 (In-situ Hybridization)技术最早由 Gall和 Paradue(1969)及 John等(1969)独立发展起来的。Heslop-Harrison等(1988)和 Le等(1989)于八十年代在植物上用地戈辛标记的总基因组 DNA作探针进行原位杂交取得成功。Schwarzacher等(1992)用外源基因组总 DNA作探针进行荧光原位杂交取得成功。Reader等(1994)对原位杂交技术进行了改进,建立了荧光素直接标记快速原位杂交方法。目前,原位杂交技术已广泛应用于动植物细胞的遗传研究,并逐渐形成一门新的交叉学科-分子细胞遗传学(Heslop-Harrison, 1991)

3.2 RFLP标记 RFLP(Restriction Fragment length Polymorphism),即限制性片断长度多态性,是80年代中期发展起来的一种分子标记。1980年 Bostein提出利用 RFLP作为标记构建遗传图谱。1987年 Donis-keller等构建了第一张人类 RFLP图谱,此后便开展起分子水平上 DNA多态性的应用研究,如基因遗传图谱的构建,基因的定位等,由此来研究生物的起源、进化和分类。目前,玉米、水稻、小麦及马铃薯等20多种重要农作物的 RFLP图谱相继构成。并且,一些主要作物的 RFLP图谱发展很快,在水稻分子图谱上,已定位了1500个以上的分子标记。在玉米连锁图上已定位的 RFLP标记超过1168个。同时 RFLP技术广泛用于农作物产量、抗性等重要数量性状基因的定位和克隆。

RFLP标记原理是采用限制性内切酶消化基因组 DNA,产生相当多的大小不等的 DNA片断,用放射性同位素标记的 DNA作探针,把与被标记 DNA相关片断检测出来,从而构建出多态性图谱。RFLP标记在遗传上是共显性的。RFLP技术的缺陷主要是克隆可表现基因组 DNA多态性的探针较为困难,但随着可标记多态性探针的增多, RFLP技术将在分子生物学研究中得以更广泛的应用。

3.3 RAPD标记 随机扩增多态性 DNA(Random Amplified Polymorphism DNA,简称 RAPD)是继 RFLP标记后由 Williams等人(1990)采用长度为9~10碱基的随机核苷酸序列为引物,扩增基因组 DNA而形成的又一种新型的遗传标记。它与 RFLP一样,以检出多态性为目的。RAPD分析大大减少多态性分析的工作,使用的 DNA极少,合成一套引物后可用于不同生物基因组分析。但 RAPD检测受反应条件影响较大,重复性差,不具单拷贝和共显性特征。因此,在构建分子连锁图谱时,一般需将 RAPD标记转变为 RFLP等其它共显性分子标记。

RAPD标记广泛地应用于遗传作图和基因的快速定位。A. M. Torres等(1993)以53个随机引物分析两个蚕豆 F_2 群体构建了一张饱含43个 RAPD标记的蚕豆遗传图谱。钟少斌等(1993)利用 RAPD标记发现了2个与小麦白粉病抗性基因 $Pm4a$ 连锁的,大小分别为1.95kb和1.15kb的 DNA片断。总之,许多 RAPD标记填补了原 RFLP连锁图的空白区域,某些 RAPD使图谱向端粒延伸,对构建高密度、趋向饱和的图谱是极有价值的。

3.4 AFLP标记 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism),即扩增片断长度多态性,是近年来发展起来的高效基因组多态性检测技术。在 AFLP分析中显示多态性 DNA片断不是由限制性内切酶酶切基因组的 DNA产生的,而是通过 PCR扩增基因组 DNA模板产生的。但鉴于一般的 PCR反应要求,在进行 AFLP分析前,必须根据基因组中被扩增的 DNA片断两端的序列设计合成相应的引物。AFLP与 RAPD一样,是一种高容量的分子标记技术,并兼有 RFLP和 RAPD两种方法的优点。目前,在国际水稻基因组实验室已建立应用 AFLP技术发展水稻分子标记图谱的技术。

3.5 SSR标记 在高等植物基因组中,除单一序列外,还存在许多重复序列,这种重复序列一般在 50% 以上。重复序列按其在染色体上分布方式,可分为散布重复序列和串联重复序列。散布重复序列的拷贝数很多,在重复单位之间彼此常有序列的变化,难以用做分子标记。串联重复序列按重复单位大小,又可分为卫星序列 (Satellite)、小卫星序列 (Minisatellite)和微卫星序列 (Microsatellite)三种。其中卫星序列的重复单位很大,一般分布在染色体的异染色体区,难于采用 RFLP或 PCR分析方法揭示其多态性。对于小卫星序列,主要存在于染色体近端粒处,可用 VNTR(Variable Number of Tandem Repeat Locus)揭示其多态性。对于微卫星序列,又称为简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR),其重复单位序列差异和数目变化,可形成非常丰富的多态性。SSR是一类由几个核苷酸 (一般为 1~ 6个)为重复单位组成长达几十个核苷酸的串联重复序列 (重复次数一般为 10~ 50次)。由于每个微卫星 DNA序列两端是相对保守的单拷贝序列,因此可根据两端序列设计一对特异引物,扩增每个位点的微卫星 DNA序列,再经聚丙烯酰胺凝胶电泳,比较扩增产物的长短差异,可揭示不同基因型个体之间在微卫星 DNA位点的多态性。SSR标记在遗传上一般是共显性分子标记。由于微卫星 DNA的多态性非常丰富,目前已成为人类遗传连锁图谱研究的热点,已构建了一张由 26个 SSR标记组成的人类第 20连锁群遗传图谱。

总之,分子标记技术是一类十分理想的遗传标记,在作物遗传育种中具有广泛的应用前景。具体如下:①对作物抗病、抗虫特性等重要农艺性状基因进行辅助选择,分子标记和遗传连锁图谱的应用,为跟踪、定位和克隆作物的抗病基因开辟了新的途径 (Tanksley et al, 1989)。颜清上等 (1996)利用 RAPD标记技术对大豆抗孢囊线虫 4号小种进行了辅助选择。Hartl等 (1993, 1994)利用 RFLP标记将小麦抗白粉病基因 Pm1 Pm11和 Pm18定位在染色体上;②进行数量性状基因定位,基因作用方式和效应评估。农作物的许多主要经济性状是由多个数量性状基因 (Quantitative trait loci,简称 QTL)控制而且易受环境影响的数量性状,应用分子标记技术而确定 QTL其染色体位置,分析估算每个 QTL的基因效应及互作效应等遗传参数,林鸿宣等 (1996)应用 RFLP标记对控制水稻株高及其构成因素的数量性状基因 (QTL)进行定位研究,共定位了 32个 QTLs,并估算了每个 QTL的贡献率和基因效应值大小;③在回交育种中克服连锁累赘,加速轮回亲本基因型同质化进程,在回交导入目标基因时,一个难于解决的问题是有利基因 (目标基因)与不利基因连锁。因此,回交不仅转移了目标基因,而且也转移了与之连锁的其它基因,这一现象称为连锁累赘 (Linkage drag),它常使改良后的新品种与原来育种目标不一致,用分子标记进行选择可显著减轻连锁累赘程度。Young和 Tanksley (1989, 1993)讨论了利用目标基因两侧的标记 (双标记)进行选择回交,可以极快地消除非轮回亲本不良性状的染色体片段;④在遗传资源评价中揭示遗传多样性。由于分子标记技术可用于构建基因组指纹图谱 (Finger prints),因而可用于品种内遗传多样性的评价。

综上所述,综合应用多种分子标记技术,建立各种农作物高密度分子标记图谱,使分子标记技术广泛地应用于作物的遗传育种之中。

(参考文献 24篇略)