

遗传标记的发展和分子标记的检测技术

王永飞¹, 马三梅¹, 刘翠平², 王 鸣³

(1 烟台师范学院 生物系, 山东 烟台 264025; 2 甘肃省华池县科委, 甘肃 华池 745600; 3 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 概述了遗传标记的发展, 比较了各种遗传标记的特点, 并重点介绍了近年来发展起来的分子标记及其检测技术。

[关键词] 遗传标记; 分子标记; 检测技术

[中图分类号] Q 781

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)06-130-07

遗传标记(Genetic markers)是指与目标性状紧密连锁, 同该性状共同分离且易于识别的可遗传的等位基因变异^[1-3]。遗传标记在遗传学的建立和发展过程中起着举足轻重的作用, 同时也是作物遗传育种的重要工具。随着遗传学的发展, 遗传标记的种类和数量也在不断增加, 已经历了形态学、细胞学、生化及分子标记等几个主要发展阶段。本研究对遗传标记的发展和分子标记检测技术的研究现状进行综述, 以为遗传学和育种学的研究提供参考。

1 遗传标记的发展及其类型

19 世纪 60 年代, Mendel 以豌豆为材料, 详细研究了豌豆的 7 对相对性状的遗传规律。由于这些性状都具有典型的外部形态, 很容易识别, 从而构成了最早的遗传标记, 即形态学标记, 由此奠定了近代遗传学的基础。1900 年以后, Morgan 等将 Mendel 所称的“遗传因子”(Inherited factor)的行为与细胞核内染色体的行为相联系进行研究, 导致了细胞遗传学的诞生, 从而使细胞学标记得到应用。随着生物学各个分支学科的发展, 遗传标记从可见形态的表现型扩展到生理、生化、细胞、发育和免疫等多个方面, 但所有这些标记都是以生物学的性状形式进行判别。1941 年 Beal 和 Tatum 通过研究红色面包酶的生化突变型, 提出了“一个基因一个酶”的假说, 创立了生化遗传学, 这也是第一个将生化标记用于遗传多样性分析的实例。生化标记主要有同工酶和贮藏蛋白标记, 生化标记的大量应用则是在 50 年代末 60 年代初。同工酶标记的兴起, 使遗传标记的识别

突破了活体形式, 但仍然没有突破表达基因的范围。1953 年, Watson 和 Crick 提出了 DNA 分子结构的双螺旋模型, 宣布了分子遗传学时代的到来。1974 年, Grudzicker 等首次提出 DNA 限制性片段长度多态性可以作为遗传标记, 开创了直接应用 DNA 多态性作为遗传标记的新阶段^[4]。1985 年 Mullis 等^[5]发明了聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR), 使直接扩增 DNA 的多态性成为可能, 随着 PCR 的迅速发展, 又产生了各种新型的分子标记, 如 RAPDs 和 SSRs 标记等, 从而使遗传标记进入了一个日新月异的发展阶段。

目前遗传标记主要有 4 种类型, 即形态标记(Morphological markers)、细胞标记(Cytological markers)、生化标记(Biochemical markers)和分子标记(Molecular markers)。

1.1 形态标记

形态标记是与目标性状紧密连锁, 表型上可识别的等位基因突变体。自然界的生物存在着许多非常明显的形态标记, 如果形、果色、花形、花色、种子的形态及色泽等等, 这些一直是人类选育新品种的重要标记, 也是孟德尔遗传学的重要基础。利用形态标记, 从表型上观察就可选择到与之连锁的目标个体。例如番茄的幼苗黄化与抗 TMV 紧密连锁, 用黄化苗作标记, 可在苗期选择到抗 TMV 的植株^[6]。目前人们已建立了许多作物例如番茄、水稻、棉花的形态标记遗传图谱^[7,8], 并在育种实践上得以应用。但由于形态标记数量少、多态性差、易受环境条件的影响, 因而远远不能满足遗传育种的需要。

[收稿日期] 2000-11-29

[基金项目] 高等学校博士点专项基金项目(960701); 烟台师范学院博士科研启动基金项目(200028)

[作者简介] 王永飞(1972), 男, 山西壶关人, 副教授, 博士, 主要从事植物遗传育种和分子生物学的教学和研究。

1.2 细胞标记

细胞遗传学的研究发现, 染色体数目的变化如缺体、单体、三体及结构的变化如缺失、易位、倒位、重复等, 常常引起某些表型性状的变化。因此染色体的变化可作为一种遗传标记, 用于测定基因所在的染色体及位置, 或通过染色体代换等遗传操作进行基因定位。例如在番茄上利用各种三体, 在烟草上利用单体, 已成功地将许多质量性状基因定位于染色体上, 并建立了相应的连锁群^[9]。细胞标记虽可克服形态标记的某些不足, 但这类标记材料的产生需要大量的人力和时间, 并且有些物种对染色体数目和结构变异反应敏感, 或适应此种变异的能力较差, 难以获得标记材料, 从而限制了细胞标记在遗传育种上的应用。

1.3 生化标记——同工酶标记

1952年Neilands首次结晶出两种类型的乳酸脱氢酶, 并证实它们为同工酶, 即它们是来源相同, 催化反应的性质相同而分子结构有差异的酶蛋白分子。与其他蛋白质一样, 同工酶是基因表达的产物, 由于不同的同工酶所带的电荷不同, 可通过电泳分离, 并经与底物反应或染色, 检测它们的存在与否和分子质量的大小, 因而可作为遗传标记。现在已有几十种同工酶系统例如酯酶同工酶、过氧化物同工酶等。同工酶标记已被广泛用于建立遗传图谱、种群分析等研究中^[10, 11]。同工酶作为遗传标记具有以下特点: 首先它比较稳定, 不受环境因素的影响; 其次, 它在种子和幼苗期就可以鉴定, 且所需试材少; 再次, 同工酶为共显性, 即来自双亲的一对等位基因可以在杂交后代中同时检测出来, 而不象显隐性性状那样, 杂交后代隐性性状被显性性状所掩盖。目前已对30多种植物进行了40多种同工酶分析, 许多重要农作物都已有了比较完整的同工酶图谱^[12]。但是, 在植物的群体研究中, 仅有10~20种同工酶表现出位点的多态性, 因而同工酶标记也具有其局限性, 不能成为更加理想的遗传标记。

1.4 分子标记

随着分子生物学的发展, 遗传标记的概念发展为在核酸分子水平上具有相对差异的等位区域(也称等位基因)。因它们广泛地存在于高等生物DNA的编码区和非编码区, 故称之为DNA分子标记。DNA分子标记是基于研究DNA分子由于缺失、插入、易位、倒位、重排或由于存在长短与排列不一的重复序列等机制而产生的多态性。前3种标记(形态、细胞和生化标记)都是以基因表达的结果为基

础, 是对基因的间接反映, 而分子标记则是DNA水平上遗传变异的直接反映。70年代初, 分子标记开始在植物遗传育种研究中得到应用, 随后尤其是近10年来, 在人类基因组计划(Human genome project, HGP)的推动下, 分子标记的研究和应用得到了迅速的发展。

与其他3种遗传标记相比, 分子标记具有以下优越性: 直接以DNA的形式表现, 在植物体的各个组织、各发育时期均可检测到, 不受季节、环境限制, 不存在表达与否的问题; 数量极多, 遍及整个基因组; 多态性高, 自然界存在着许多等位变异, 不需专门创造特殊的遗传材料; 表现为“中性”, 即不影响目标性状的表达, 与不良性状无必然的连锁;

有许多分子标记表现为共显性(Codominance), 能够鉴别出纯合基因型与杂合基因型, 提供完整的遗传信息^[13, 14]。因而现已形成了许多分子标记系统。

2 分子标记的检测技术

DNA分子标记检测技术大致可分为三类: 第一类是以电泳技术和分子杂交技术为核心的分子标记技术, 其代表性技术有RFLPs; 第二类是以电泳技术和PCR技术为核心的分子标记技术, 其代表性技术有RAPDs和AFLPs等; 第三类是以DNA序列为核心的分子标记技术, 其代表性技术为表达序列标记。

2.1 以电泳技术和分子杂交技术为核心的分子标记

该标记技术是利用限制性内切酶消化不同生物体的DNA分子, 电泳后用特异探针进行分子杂交, 通过放射性自显影或非放射性同位素显色技术来揭示DNA的多态性。其中最具有代表性的是发现最早和迄今应用最广泛的限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphisms, RFLPs)标记。

2.1.1 RFLPs标记 RFLPs标记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, 利用限制性内切酶消化基因组DNA时, 会产生大小不同的DNA片段, 电泳后通过Southern印迹法, 将这些大小不同的DNA片段转移到硝酸纤维素膜或尼龙膜上, 然后同特异的探针进行杂交, 最后通过放射性自显影或其他显色技术显示杂交结果, 从而揭示出DNA的多态性^[15, 16]。

用于RFLPs的探针多为单拷贝或低拷贝的DNA序列。RFLPs是一种共显性标记, 在分离群体

中纯合体可以与杂合体分开,因而提供标记座位完全的遗传信息。RFLPs 分析所需的DNA 量较大,但是膜做好以后可反复杂交多次。另外,RFLPs 非常稳定,多种农作物的RFLPs 分子遗传图谱已经建成,因而利用RFLPs 图谱对未知基因进行定位比较方便。不过,RFLPs 检测步骤较多,周期长,特别是只检测少数几个探针时成本较高。并且探针的制备、保存和发放也很不方便。另一问题是检测中要使用放射性同位素。尽管已有几种非放射性同位素标记方法问世,例如美国RBL 公司的Biotin 系统,德国Boehringer Mannheim 公司的Dig 系统和英国Amersham 公司的ECL 系统等,但它们的高价格、低成功率和繁多的试验检测步骤等缺点依然影响着其推广应用。

2.1.2 DNA 指纹标记 DNA 指纹(DNA fingerprinting) 标记是以重复序列为探针进行分子杂交,由于不同基因型中的重复次数不同而产生多态性的分子标记。目前常用的DNA 指纹标记主要有微卫星和小卫星DNA 标记。

(1) 微卫星DNA 标记。微卫星(Microsatellite) DNA 是指以少数几个核苷酸(多数为2~4个)为单位多次串联重复的DNA 序列,人们也称之为简单序列重复(Simple sequence repeats, SSRs)、短串联重复(Short tandem repeats, STRs)或简单序列长度多态性(Simple sequence length polymorphisms, SSLPs)。Hamada^[17]于1982年在人心肌肌动蛋白(Ha-25)的内含子中发现1个重复25次的(dT-dG)序列,同时指出这一序列在人及其他真核生物的基因组中广泛存在,并与Z型DNA 的形成有关。由于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,于是这一技术很快便发展为一种分子标记,并首先在人类和小鼠中构建了以微卫星为主的分子连锁图谱^[18,19]。目前已在多种植物例如拟南芥、大麦、大豆等中发展了微卫星标记并用于遗传作图和种质鉴定等^[20]。

(2) 小卫星DNA 标记。小卫星(Minisatellite) DNA 作为分子标记最早由Teffery 等和Nakamura 等提出,后者也称之为数目可变串联重复序列(Variable number of tandem repeats, VNTRs)。小卫星DNA 是由1个11~60个核苷酸的基本序列单位重复排列而成,其重复数从10到10000不等,分散或成簇分布。多态性的产生是由于重复单位之间的不平衡交换,从而产生不同的等位基因^[21,22]。

与RFLPs 标记相比,微卫星和小卫星DNA 在

基因组中非常丰富,多态性比RFLPs 显著增加。但是探针缺乏,研究者不得不自己合成探针或利用人类基因组研究中获得的DNA 片段与作物DNA 杂交。并且由于小卫星和微卫星DNA 不是单拷贝DNA,难以跟踪分离群体(如F₂或回交群体)中个体基因组同源区域的分离。此外还有研究^[23]表明,小卫星DNA 分布较为集中,因而限制了它的应用。

2.2 以电泳技术和PCR 技术为核心的分子标记

PCR 技术问世不久,便以简便、快速和高效等特点迅速成为分子生物学的有力工具,尤其是在DNA 分子标记技术的发展上更是发挥了人们始料不及的巨大作用。根据所用引物的特点,这类分子标记可概括为3种类型。

2.2.1 单引物PCR 标记 该类标记技术是以一个寡核苷酸序列为引物,对基因组DNA 进行PCR 扩增来鉴别多态性DNA 的过程。主要包括RAPDs、SPARs 和SSR 锚定PCR 等标记。

(1) RAPDs 标记。随机扩增多态性(Random amplified polymorphic DNA, RAPDs) 标记是Williams 等^[24]于1990年建立的以一个通常为10碱基的寡核苷酸序列为引物,对基因组DNA 随机扩增,从而得到多态性图谱作为遗传标记的方法。其特点是不依赖于生物种属特异性和基因组的结构,合成了一套可用于不同生物基因组分析的引物;它基于PCR 技术,分析程序较简单,所需DNA 的量极少;RAPDs 是一类显性的遗传标记,已被广泛用于基因的快速定位和遗传作图。但RAPDs 受反应条件影响较大,因而检测的重复性较差。

为了提高某一理想RAPDs 标记的稳定性,可首先将其克隆并对其末端测序后,在原来RAPDs 所用的10bp 引物上增加合成上述末端序列的14bp 的核苷酸,以此为引物对基因组DNA 再行扩增分析,此即SCARs (Sequenced characterized amplified regions, SCARs) 标记^[25]。这样不仅使得SCARs 的稳定性比RAPDs 增强了许多,而且检测DNA 间的差异可直接通过有无扩增产物来显示。

与RAPDs 类似的还有AP-PCR (Arbitrary primed PCR, AP-PCR)^[26]和DAF (DNA amplification fingerprinting)^[27], AP-PCR 使用的引物较长(10~50bp),但PCR 反应前2个循环的反应条件不严格,最终的反应结果与RAPDs 类似;而DAF所使用的引物长度比RAPDs 短,甚至可短至5bp,因此它所提供的谱带信息比RAPDs 大得多。在这3种类似的标记中,RAPDs 使用最为广泛。

(2) SPARs 标记。单引物扩增反应 (Single primer amplification reaction, SPARs) 标记由 Gupta 等^[28]提出, 其技术流程同 RAPDs。该系统所用的引物为微卫星序列或简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSRs), 扩增产物为各简单重复序列之间的 DNA 片段。在二碱基、三碱基、四碱基和五碱基的简单重复顺序中, 以四碱基的简单重复顺序最为有效。这些标记大多数散布于 DNA 序列中, 它们多为显性表现, 但也有些为共显性表现。

(3) SSR——锚定 PCR 标记。简单序列重复锚定 PCR 标记技术由 Zietkiewicz 等^[29]建立的。其技术要点是引物设计时, 在引物的 3 端或 5 端锚定上简单序列重复, 尤其是 (CA)_n, 另一端再设计 2~4 个碱基, 用这种引物扩增出的产物为简单重复序列之间的 DNA 序列。该标记多为显性表现。

2.2.2.3 端具有选择性的双引物 PCR 标记 该类标记最典型的技术为扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLPs) 标记, 该标记系统由 Zabeau 和 Ros 发明, 并已获欧洲专利局的发明专利^[30]。AFLPs 是基于 PCR 反应的一种选择性扩增限制性片段的方法, 其原理为基因组 DNA 用限制性内切酶消化, 然后连上一个接头 (Adaptor), 利用两个选择性引物进行 PCR 扩增, 该引物含有接头和酶切位点序列, 并且其 3 端加上了 2~3 个随机核苷酸, 即: 引物= 接头序列+ 酶切位点序列+ 2~3 个随机核苷酸。这种技术将 RAPDs 的随机性与专一性扩增巧妙结合, 又通过选用不同的内切酶以达到选择的目的, 故又称之为选择性限制片段扩增标记 (Selective restriction fragment amplification, SRFA)。显然用这种选择性引物扩增的限制性片段的数量受到引物在 3 端延伸的核苷酸序列的限制, 由此可以调节 AFLPs 产物的条带的特异性和数量。不难看出, AFLPs 兼具 RFLPs 和 RAPDs 两种方法的特点, AFLPs 的接头和引物适用于不同的生物类型, 而且 AFLPs 能提供比 RFLPs 和 RAPDs 更多的基因组的多态性信息。在遗传上 AFLPs 标记为显性或共显性^[31]。

2.2.3 基于特异双引物的 PCR 标记 真核生物基因组中的小卫星和微卫星 DNA 具有丰富的多态性, 依据这些 DNA 序列设计双引物进行 PCR 扩增会产生新的遗传标记。这包括短串联重复 (Short tandem repeats, STRs)^[32]和简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSRs)^[33]。

序列标志位点 (Sequence tagged sites,

STSs)^[34]标记是根据单拷贝的 DNA 片段两端的序列设计一对特异引物扩增基因组 DNA, 产生的一段长度为几百 bp 的特异序列。该特异序列在基因组中往往只出现一次, 从而能够界定基因组的特异位点。在人类基因组作图中已用其作为将遗传图谱和物理图谱整合的共同位标, 这在基因组作图上具有非常重要的作用。

切割的扩增产物多态性序列 (Cleaved amplified polymorphic sequence, CAPSs) 标记是指 PCR 产物经限制性内切酶消化后所表现出的 DNA 片段长度的变异, 该标记由 Konieczny 和 Ausubel^[35]提出。特异引物序列来自基因数据库、基因组或 cDNA 克隆以及已克隆的 RAPDs 条带等。该标记表现为共显性遗传。

2.3 以 DNA 测序技术为核心的分子标记

随着人类基因组研究计划的深入和 DNA 自动测序技术的不断改进, 以 DNA 序列为核心的分子标记也孕育而生, 其中最具代表性的是表达序列标记 (Expressed sequence tags, ESTs) 标记。

ESTs 标记主要是在 cDNA 文库中随机挑选克隆, 并进行单向测序 (Single pass sequencing) 而产生的 250~400 bp 的核苷酸序列片段。Adams 等^[36]最早用 ESTs 对表达序列进行了详细的研究, 他们从人脑 cDNA 文库中随机挑取 600 个克隆, 测序合成 ESTs, 从而发现了一系列在脑部表达的新基因。与一般的遗传标记相比, 它的优越性在于直接和一个表达基因相关, 且易于转变成 STSs。同时大量的 ESTs 可累积建立一个新的数据库, 为表达基因的鉴别等研究提供大量信息。由于 ESTs 来源于 cDNA 克隆, 因此它部分反映了基因组的结构及不同组织中基因的表达模式。通常 ESTs 还可在 GenBank 及 PIR (Protein information resource, PIR) 等数据库中进行比较分析, 以获得其可能的功能、表达模式等信息。目前该标记已在植物上得到应用, 在玉米和油菜中分别建立了 130 个和 237 个 ESTs, 尤其是在拟南芥中, 已有近 7 000 个 ESTs, 其中 5 000 个 ESTs 可编列成拟南芥表达基因目录^[37], 这些研究为表达基因的物理定位、构建基因转录图谱及高密度遗传连锁图谱奠定了基础。

当然这 3 类分子标记的区分不是绝对的, 有些分子标记技术是介于第一和第二类之间, 比如微卫星 DNA 既可作为探针进行分子杂交以测定 DNA 多态性的 DNA 指纹技术, 也可以作为引物进行 PCR 扩增以测定 DNA 多态性的 SSR 技术。有些分

子标记技术是介于第二、第三类之间,例如 SCARs 是对特异 RAPDs 条带进行克隆并测序,并以测出序列的末端 14 bp 加上原来 RAPDs 所用的 10 bp 的随机引物合成出 24 bp 的寡聚核苷酸为引物,然后用此引物进行 PCR 扩增,以测定基因组 DNA 的多态性。该技术可能将 RAPDs 的显性标记转变为共显性标记,从而提高遗传作图效率。

此外,根据 DNA 的变性和复性特征,还有单链构型多态性(Single strand conformation polymorphisms, SSCP)和变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gelelectrophoresis, DGGE)分子标记。DNA 双螺旋结构经过变性解链为单链 DNA,在变性条件撤消后,单链 DNA 发生复性形成不同的二级结构。不同的结构对 DNA 在凝胶中迁移速率影响很大。SSCPs 就是根据这种原理设计的。在许多情况下,SSCPs 甚至可检测到单个碱基的差异,多

态性水平很高。SSCPs 操作非常方便,但是有的变异不易检测到,而且只能检测小片段 DNA (2 kb 以下),尤其是 200 bp 以下效果最好^[38, 39]。

DGGE 也适用于小 DNA 片段的检测。它利用一个梯度变性胶来分离 DNA 片段。开始电泳时, DNA 在胶中的迁移率仅与分子大小有关,而一旦到达某一梯度, DNA 发生变性,两条单链分开形成分叉,大大降低了迁移速度。由于不同 DNA 片段变性条件不同,从而在凝胶上形成不同的泳带。用一个温度梯度作为变性条件代替 DGGE 中的变性剂梯度,同样可以达到相似的效果。这种方法称为温度梯度凝胶电泳(Temperature gradient gelelectrophoresis, TGGE)^[40]。

现将 3 类代表性分子标记技术及其他 DNA 标记技术总结后列于表 1。

表 1 几种代表性分子标记技术的比较

Table 1 Comparison among some representative assay technique of molecular markers

项目	第 I 类(Type I)			第 II 类(Type II)		第 III 类(Type III)	其他(Others)	
	RFLPs	Microsatellite	M in isatellite	RAPDs/AP-PCR	AFLPs	ESTs	SSCPs	DGGE/TGGE
创立者及年代 Founder and time	Grodzicker 等, 1974 Grodzicker et al, 1974	Hamada 等, 1982 Hamada et al, 1982	Jeffery 等, 1985 Jeffery et al, 1985	William 等, 1990/Wels 和 McClelland, 1990 William et al, 1990/Wels and McClelland, 1990	Zabeau 和 Vos, 1993 Zabeau and Vos, 1993	Adam s 等, 1991 Adam s et al, 1991	Beier 等, 1992 Beier et al, 1992	Myers 等, 1987 Myers et al, 1987
核心技术 Core technique	分子杂交技术和电泳技术 Molecular hybridization and electrophoresis	分子杂交技术和电泳技术 Molecular hybridization and electrophoresis	分子杂交技术和电泳技术 Molecular hybridization and electrophoresis	PCR 技术和电泳技术 PCR and electrophoresis	PCR 技术和电泳技术 PCR and electrophoresis	DNA 测序技术 DNA sequencing technique	电泳技术 Electrophoresis	电泳技术 Electrophoresis
多态性水平 Level of polymorphism	低 Low	高 High	高 High	中等 Middle	高 High	高 High	高 High	高 High
技术难度 Degree of technique difficulty	较高 Higher	较高 Higher	较高 Higher	低 Low	很高 Highest	很高 Highest	低 Low	低 Low
可靠性 Reliability	较高 Higher	较高 Higher	较高 Higher	较低 Lower	较高 Higher	高 Highest	较高 Higher	较高 Higher
遗传特征 Genetical property	共显性 Codom inance	显性 Dom inance	共显性 Codom inance	显性 Dom inance	显性/共显性 Dom inance/codom inance	共显性 Codom inance	显性 Dom inance	显性 Dom inance
费用 Expenses	中等 Middle	高 High	中等 Middle	低 Low	高 High	高 High	低 Low	低 Low
DNA 用量 Required amount of DNA	5~ 10 μg	50 ng	5~ 10 μg	< 50 ng	< 50 ng	< 50 ng	5~ 10 μg	5~ 10 μg
DNA 质量要求 Quality requirement of DNA	高 High	低 Low	高 High	低 Low	低 Low	高 High	低 Low	低 Low
检测基因组部位 Position of genome assayed	单/低拷贝区 Mono-copy/low-copy region	重复序列区 Repeated sequence region	重复序列区 Repeated sequence region	整个基因组 All the genome	整个基因组 All the genome	功能基因区 Function gene region	整个基因组 All the genome	整个基因组 All the genome
多态性类型 Type of polymorphism	碱基突变, 插入, 缺失, 易位, 倒位 Base mutation, insertion, deletion, translocation and inversion	重复序列的长度与次数的差异 The difference in length and frequency of repeated sequence	重复序列的长度与次数的差异 The difference in length and frequency of repeated sequence	碱基突变, 插入, 缺失, 倒位 Base mutation, insertion, deletion, translocation and inversion	碱基突变, 插入, 缺失, 倒位 Base mutation, insertion, deletion, translocation and inversion	碱基突变, 插入, 缺失, 倒位 Base mutation, insertion, deletion, translocation and inversion	碱基突变, 插入, 缺失, 倒位 Base mutation, insertion, deletion, translocation and inversion	碱基突变, 插入, 缺失, 倒位 Base mutation, insertion, deletion, translocation and inversion

从表1中可以看出, 这些分子标记技术各有其优缺点, 因此采用哪类分子标记应依据实验目的、实验材料、实验条件等决定。而且上述众多分子标记技术中每一种都不是十分完美的, 仍需进一步探索出

可靠性高、重复性好而又简便易行的分子标记技术。相信随着分子生物学的发展和生物技术的不断完善, 越来越多的分子标记技术将被开发, 为人类揭开生物之谜提供更有利的工具。

[参考文献]

- [1] 刘勋甲, 郑用琏, 尹 艳. 遗传标记的发展及分子标记在农作物遗传育种中的运用[J]. 湖北农业科学, 1998, (1): 33- 35.
- [2] 张开春, 尹淑萍, 杨英军, 等. 分子标记在果树上的应用[J]. 果树科学, 1999, 16(3): 210- 210
- [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, 1996, 29(4): 1- 10
- [4] 傅荣昭, 邵鹏柱, 高文远, 等. DNA 分子标记及其在药用植物研究上的应用前景[J]. 生物工程进展, 1998, 18(4): 14- 18
- [5] Mullis K B, Falona F. A specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction[J]. Methods Enzymol, 1987, 155: 335- 338
- [6] 西南农业大学. 蔬菜育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1980. 262- 263
- [7] 蔡 旭. 植物遗传育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1988. 286- 300
- [8] 余诞年. 番茄基因的分子标记与遗传作图[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 361- 366
- [9] 李竞雄, 宋天明. 植物细胞遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 214- 257.
- [10] Staub J E, Serquen F C, Gupta M. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding[J]. Hort Science, 1996, 31(5): 729- 741.
- [11] 沈法富, 刘凤珍, 于元杰. 分子标记在植物育种中的应用[J]. 山东农业大学学报, 28(1): 83- 91.
- [12] 白建荣, 郭秀容, 后变英. 分子标记的类型、特点及在育种中的应用[J]. 山西农业科学, 1999, 27(4): 33- 38
- [13] 周弈华, 陈正华. 分子标记在植物学中的应用及前景[J]. 武汉植物学研究, 1999, 17(1): 75- 86
- [14] 钱惠荣, 郑康乐. DNA 标记和分子育种[J]. 生物工程进展, 1998, 18(3): 12- 18
- [15] Lander E S, Botsten D. M appling mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps[J]. Genetics, 1989, 121: 185 - 199.
- [16] N ienhuis J, Helentjaris T. RFLP analysis of loci associated with insect resistance in tomato[J]. Crop Science, 1987, 27: 797- 803
- [17] Hamada H. A novel repeated element with ZDNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes[J]. Proc Natl Acad Sci U SA, 1982, 79: 6465- 6469.
- [18] Dietrich W F. A comprehensive genetic map of the mouse genome[J]. Nature, 1996, 380: 149- 152
- [19] Dib C. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites[J]. Nature, 1996, 380: 152- 154
- [20] 何 平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 42- 47.
- [21] 吴敏生, 王守才. 指纹图谱技术在品种鉴定和纯度分析上的应用[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(1): 51- 55.
- [22] 危文亮, 赵应忠. 分子标记在作物育种的应用[J]. 生物技术通报, 2000, (2): 12- 16
- [23] 刘 榜, 张庆德, 李 奎, 等. 微卫星DNA 作为遗传标记的优点及前景[J]. 湖北农业科学, 1997, 2: 49- 51.
- [24] William J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531- 6535.
- [25] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy resistance genes in lettuce using near-isogenic lines[J]. Genome, 1993, 34: 1021- 1027.
- [26] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 7213- 7218
- [27] Caetano A. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers[J]. Biotechnology, 1991, 9: 553- 557.
- [28] Gupta M, Chyi Y S. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89: 998- 1006
- [29] Ziethewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176- 183
- [30] 吴敏生, 戴景瑞. AFLP——一种新的分子标记技术[J]. 植物学通报, 1998, 15(4): 68- 74
- [31] 翁跃进. AFLP——一种DNA 分子标记新技术[J]. 遗传, 1996, 18(6): 29- 31.
- [32] Fregeau D, Adata A. DNA typing with short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification[J]. Biotechniques, 1993, 15: 100- 119
- [33] Sharon D. DNA fingerprints in plant using simple-sequence repeat and microsatellite probes[J]. Hort Science, 1995, 30(1): 109- 112
- [34] Olson M, Hood L, Cantor C. A common language for physical mapping of the human genome[J]. Science, 1989, 245: 1434- 1435
- [35] Konieczny A, Ausubel F M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype specific PCR based markers[J].

- Plant J, 1993, 4: 403- 411.
- [36] Adam s M D, Kelley J M, Gocayne J D, et al Complementary DNA sequencing: expressed sequence tag and human genome project[J]. Science, 1991, 252: 1651- 1656
- [37] Cooke R, Raynal M, Laudie M, et al Further progress towards a catalogue of all *arabidopsis* gene: analysis of a set of 5000 non redundant ESTs[J]. Plant J, 1996, 9(1): 101- 124
- [38] 张德水, 陈受宜. DNA 分子标记、基因组作图及其在植物遗传育种上的应用[J]. 生物技术通报, 1998, (5): 15- 22
- [39] 王倩, 王斌. DNA 分子标记在果树遗传学研究上的应用[J]. 遗传, 2000, 22(5): 339- 341.
- [40] 赵淑清, 武维华. DNA 分子标记和基因定位[J]. 生物技术通报, 2000, (6): 1- 4

Development of genetic markers and assay technique of molecular markers

WANG Yong-fei¹, MA San-mei¹, LIU Cui-ping², WANG Ming³

(1 Department of Biology, Yantai Normal University, Yantai, Shandong 264025, China; 2 Huachi Council of Science and Technology, Huachi, Gansu 75600, China; 3 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Genetic markers are essential tools of evaluating and selecting interesting genes and have been extensively applied in genetics and breeding studies. Genetic markers generally include morphological markers, cytological markers, biological markers and molecular markers. In this paper, the development and characters of genetic markers were described, the molecular markers and their assay techniques developed in recent years were especially introduced.

Key words: genetic markers; molecular markers; assay techniques

· 简 讯 ·

小麦新品种小偃 22 获 2000 年度陕西省科技进步一等奖

小偃 22 由西北农林科技大学(原西北植物研究所)李璋研究员选育而成。小偃 22 以小偃 6 号 × 775-1 的杂种 F₁ 代作母本, 小偃 107 作父本, 经复合杂交、系统选育而成。1998 年 8 月破格通过了陕西省农作物品种审定委员会审定, 并通过了国家黄淮麦区区域试验和生产试验。2000 年度获陕西省科技进步一等奖。

该品种属弱冬性, 幼苗半匍匐, 分蘖力中等, 长势健壮。叶色深绿, 叶片上挺, 株型紧凑, 株高 80 cm 左右, 茎秆粗硬, 抗倒性强。穗层整齐, 小穗排列紧密, 多花多粒, 结实性好。短芒、白壳、白粒, 千粒重 45 g 左右, 角质, 品质优良。中早熟, 落黄好。高抗条锈病, 轻感白粉病, 中感赤霉病, 中抗叶枯病。高产栽培条件下产量达到 7 500 kg/hm² 以上, 最高产量达 10 500 kg/hm²。适宜于陕西关中新老灌区水肥条件较好的地块及塬区旱肥地种植, 也适宜黄淮麦区同类生态条件的地区种植。

小偃 22 具有高产、稳产、优质、抗倒、抗病、抗旱、耐寒、适应性广等优点, 是制做馒头和面条的优质小麦。1998~ 2000 年累计种植 89.3 万 hm², 增产小麦 49.3 万 t, 新增产值 5.4 亿元。

小偃 22 于 1998 年获陕西省首届农作物新品种后补助项目, 1998 年至今一直被省农发办列为陕西省重大农业技术推广项目, 陕西省种子管理站决定从 2001 年起以小偃 22 作为陕西省区试对照品种。另外, 1998 年以来, 中央电视台(焦点访谈栏目)、陕西电视台、陕西广播电台、陕西日报、陕西农民报、科技日报、科学时报等媒体多次对小偃 22 的选育及生产示范进行了报道。

(屈李纯 供稿)