

89-95

第25卷 第5期
1997年10月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 25 No. 5
Oct. 1997

麦类作物分子标记研究新进展

赵惠青 许喜堂 杨新成

(陕西省农业科学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 根据1995~1997年最新版CABI(国际英联邦农业文摘数据库)资料,就以下几个方面着重讨论麦类作物分子标记的最新进展及存在的问题:①遗传连锁图的绘制;②比较基因组的研究;③性状的分子标记与辅助育种技术;④目前小麦分子标记亟待解决的问题及建议。

关键词 分子标记, 麦类作物, 研究进展

中图分类号 Q75, Q78 512

自 Botstein 等^[1]首次描述限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism 简称 RFLP)作为一种分子标记后,随着分子生物技术的发展,产生了多种基于 DNA 多态性的遗传标记。如依赖于 PCR 反应原理^[2],而发展形成的随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)、扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism,简称 AFLP),由 RFLP 发展而来的简单重复序列(Simple sequence repeat,简称 SSR)以及原位杂交(In situ hybridization)等技术。通过对 1995~1997 年最新 CABI 光盘数据库中麦类作物分子标记文献分析,作者发现,1995~1997 年这方面的研究工作主要集中在:①填补小麦 RFLP 连锁图上较大的间隙,使其更加“饱和”;②采用易为育种家们接受的经济、实用的分子标记(如 RAPD、SSR 等)来构建新的连锁图;③对小麦数量性状,尤其对品质、抗病性等方面研究的较多;④偏重于比较基因组和分子标记育种方面的研究。

1 遗传连锁图的绘制

遗传图谱既是遗传研究的重要内容,又是作物资源、育种及分子克隆等许多应用研究的理论依据和基础。在分子标记出现之前,大多数作物还没有一个较为完整的遗传连锁图。进入 80 年代以来,分子标记技术的迅速发展大大促进了遗传连锁图谱的构建。Nelson 等^[3]研究认为,分子标记连锁图的绘制将对整体的经典式遗传作图及该作物进化过程中染色体重建的记录等提供一个研究框架。目前各主要作物 RFLP 遗传连锁图谱的构建已基本完成,在完成的几套小麦 RFLP 连锁图谱中,最具代表性的为美国康奈尔大学与法国等国家合作绘制,其标记数多达 850 个,已较为“饱和”^[4]。目前该研究主要集中在以下两个方面:第一,继续填补已有连锁图上的较大间隙,使其更加“饱和”和精确,如 Marino 等^[5]绘制的小麦第 6 部分同源群染色体 RFLP 连锁图,已将 76 个位点标记在相应的染色体上,其中 6A 29 个、6B 24 个、6D 23 个,这些位点在 6A、6B、6D 染色体上分别分布在

收稿日期 1997-05-14

作者简介 赵惠青,女,1964 年生,助理研究员

178、132、206 cM 长度的图谱上;第二,采用更易为育种家们接受的经济、实用的分子标记来构建新的连锁图或利用 STS(Sequence tagged site)—PCR 方法将 RFLP 连锁图中的标记转换成 PCR 标记。主要进展表现在:①以一个随机的寡核苷酸序列(通常为 10 个碱基对)作引物,通过 PCR 扩增反应产生不连续的 DNA 产物,用以检测 DNA 序列多态性的 RAPD 技术。由于其简单易行,周期短,实验设备简单而倍受研究者的欢迎,已用来进行 RAPD 连锁图的绘制。Wang 等^[6]对中国春双端体及一套小麦——硬粒小麦代换系进行 RAPD 研究中获得 11 个特异产物,分别标记在硬粒小麦 A、B 染色体组和中国春 D 染色体组的 10 条染色体上。Hernandez 等^[7]对两个智利大麦品种及一套小麦——大麦附加系经 RAPD 分析后,获得了 190 个小麦专化带,185 个智利大麦特异带,108 个非专化带,在对附加系的分析中将 16 个带定位在相应的大麦染色体上,从而建立了大麦染色体的 RAPD 标记系统;②AFLP 的基本原理是选择性扩增基因组 DNA 的酶切片段,由于不同材料的 DNA 酶切片段存在差异,因而便产生了扩增产物的多态性,实际上 AFLP 是 RFLP 与 PCR 相结合的一种产物,由此获得的标记可直接补充到 RFLP 连锁图上。Becker 等^[8]利用春大麦品种 Proctor×Nudinka F₁ 创建的双单倍体群体(113 株)确定了 116 个 AFLP 标记,补充到大麦 RFLP 遗传图谱上,其中 1H 18 个,2H 21 个,3H 18 个,4H 21 个,5H 8 个,6H 6 个,7H 24 个,不仅填补了大麦 RFLP 遗传连锁图,而且增加了大麦遗传图谱的长度;③在动植物的基因组中均存在许多由 1~4 个碱基对组成的简单重复序列(SSR),如(GA)_n, (AC)_n, (GAA)_n 等,其遍布所有染色体及染色体的各个区段,已用来进行连锁图绘制及目标性状基因的标记研究,如大麦 DNA 每 330Kb 含一个(GA)_n,每 620Kb 含一个(CA)_n 重复序列。Liu^[9]用 45 个 SSR 标记 7 条大麦染色体,通过分析得到了 40 个位点,分别定位在大麦的 RFLP 遗传连锁图上。以上三方面的研究为麦类作物遗传连锁图的构建提供了比 RFLP 更为经济实用的方法。

2 比较基因组的研究

遗传连锁图揭示的一个重大的遗传现象就是禾本科植物基因组的保守性。近年来,小麦、水稻、玉米等禾本科植物比较遗传作图(Comparative genetic mapping)的研究取得了较大的进展。现已证明,整个禾本科作物均存在相当强的遗传保守性,并且已发现了不同作物染色体间的部分同源关系^[4,10,11]。不同作物间部分同源关系的研究不仅在整個禾本科植物起源进化研究上具有重要意义,而且在准确进行分子标记后,对实施重要基因克隆、分子标记辅助育种等方面也有重要的作用。

Kurata 等^[12]研究表明,小麦的 1、2、3、4、5、6、7 个染色体部分同源群分别与水稻的第 5、第 4、第 7、第 10、第 3、第 9、第 2 以及第 6 和第 8 具部分同源关系。Niwa 等^[13]对大麦的叶绿体 DNA(ct DNA)进行了分离和克隆,确定了其长度为 137 Kb,含有两个重复倒位片段约 23.7~21.1 Kb,其与小麦、黑麦的叶绿体基因组具有高度的保守性。用相应的水稻 Ct DNA 进行片段杂交,检测出了大麦的 13 个 RNA 位点和 33 个叶绿体蛋白位点,其基因变异位点和水稻、玉米叶绿体基因组十分相似。

Snape 等^[14]对 QTL 比较分析认为,由多倍体物种或重复染色体组物种所得到的同源标记或线性图可以用到另一种基因组如小麦-玉米上,其次,在具部分同源关系的种群

间,从某一种所得到的基因,可以揭示另一种未明确检测的基因,如研究小麦的籽粒品质,对非生物胁迫的适应性和反应性,特别是低温对其影响等,在小麦和大麦上均有相同的表现。

Devos 等^[15]用比较基因组法研究多倍体中基因组之间的关系,发现3个小麦基因组间具有共线性关系。在对易位系的研究过程中,用小麦基因组探针发现在黑麦中也具有相似的线性关系。经对水稻、玉米、小麦基因组进行比较,尽管这些植物在进化过程中已隔离了大约500万年,但其基因顺序却保持着高度的相似性(保守性)。因此基因组间的共线性关系可用作多种用途的遗传研究。

Deynze^[16]对燕麦六倍体和二倍体燕麦进行了RFLP连锁图绘制,并同小麦、水稻、玉米进行了比较,发现燕麦的A、D基因组的保守性最强,G组次之。这种具严格保守性的长度,从整条染色体 $101 \text{ cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到最小仅含两个位点的 $2.5 \text{ cmol} \cdot \text{L}^{-1}$,同时发现某些区段的基因顺序在4个物种中完全相同,决定种子贮藏蛋白和抗叶锈的基因在小麦和燕麦间具有同样的保守性。控制燕麦春化和光周期反应的3个基因位点与小麦、水稻、玉米具有部分同源关系,同时根据部分同源片段确定了燕麦6条染色体的着丝点位置。

Erpelding 等^[17]对作物近缘种间分子遗传图谱的互相转用进行了研究,以小麦和大麦为研究对象,用定位在大麦和小麦染色体上的97个目标序列位点来确定引物互相转用的可能性以及RFLP与STS定位间的对应程度。STS产物同时定位在小麦和大麦染色体组上的占75%,用RFLP预测STS位点在小麦上的准确度为69%,在大麦上为56%。Southern杂交表明,绝大多数引物能扩增出同源序列而得到RFLP克隆,尽管额外序列也得到扩增,但却不能与RFLP克隆杂交,非目标序列在种间转用过程中也经常得到扩增。总之,大麦和小麦之间STS互相转用是可行的,且可用RFLP预测STS位置。同时指出,种间转用的前提是需将各种的STS标记图谱重组而产生一个新的引物,即可进行研究。

种群及种间染色体片段或基因渐渗是植物普遍存在的现象。因此,人为或自然地产生了大量的种属间染色体易位。但如何简单有效的鉴别这些易位是长期以来科学家们致力于解决的难题。Blake^[18]利用115个引物,扩增出大麦特异STS标记135个,用此来检测小麦背景中小麦—大麦易位染色体,得到了满意的效果,为问题的解决开辟了一条新途径。Saghai^[19]用229个分子标记和110个多态性位点构建了大麦和水稻的比较基因组图谱,发现某些染色体或臂间具有相同的基因含量和序列,并观察到了17个保留区段分别分布于水稻 $287 \text{ cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (24%),玉米 $321 \text{ cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (31%)的范围内。结果还表明大麦绝大多数的单拷贝序列(72%)在水稻中也为单拷贝,且大麦大的基因组是由于进化进程中不平衡的过分杂交和重复序列DNA的扩增引起的,而不是由单拷贝序列的简单重复所致。通过比较基因组方法进行保留区段的鉴定对作物种间基因的渐渗及染色体进化等具有特殊的意义。

Yu 等^[20]用32个禾本科第一部分同源染色体群的DNA探针对二倍体燕麦的A组、六倍体燕麦、大麦的1H及玉米3、6、8染色体进行了共线性分析及定位,发现其中绝大多数DNA标记与抗性及醇溶蛋白位点有关,这些基因位点包括二倍体燕麦的抗冠锈病基因、抗丛生病基因,六倍体燕麦的抗冠锈病、大麦的抗白粉病基因,小麦的抗条纹花叶病基

因,玉米的抗矮生花叶病基因,由以上得到了高度相关的种间基因在 RFLP 标记及部分同源片段染色体间的线性连锁图。Kilian 等^[21]将 9 个位于水稻第 6 染色体末端 $2.7 \text{ cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 区域的探针定位于大麦 1H 染色体末端 $6.5 \text{ cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 区域,其中 8 个探针在两种作物间保持共线性。可见应用水稻克隆,可以饱和大麦基因组区段的图谱,并找到了与大麦抗秆锈基因 Rpg1 近着丝点标记紧密连锁的水稻探针,相距 $0.3 \text{ cmol} \cdot \text{L}^{-1}$,为借助水稻基因组克隆大麦抗病基因奠定了基础。

3 性状的分子标记及辅助育种技术

麦类作物作为主要的农作物,倍受分子生物学家的高度重视,旨在比经典遗传学更深层次上揭示麦类作物遗传机制。分子遗传连锁图的绘制,其另一目的是寻求能突破传统的遗传研究及育种的方法和途径——即获得性状的分子标记,并以此用作辅助标记育种技术从而最终用于作物遗传改良和育种实践。目前麦类作物上的许多重要性状已获得分子标记^[22~25],这些性状主要包括:①与抗病、抗逆有关的质量性状,如抗白粉基因 Pm_1 、 Pm_2 、 Pm_{12} 、 Pm_{21} ,抗叶锈基因 Lr34,从黑麦导入普通小麦的抗条锈基因,抗囊线虫病基因 Cre2,抗小麦条纹花叶病毒基因 wmsv、wmsl,抗眼斑病基因,抗麦秆蝇基因 H_6 、 H_8 、 H_{10} 、 H_{16} ,抗盐耐旱基因,耐铝性基因等;②与产量性状、成熟期、品质等有关的质量性状,如野生二粒小麦的高蛋白质含量基因及与高产有关的基因、小麦籽粒硬度基因等。就质量性状而言,一般有显隐性之分,因而在分离世代无法通过表型来识别目标基因的纯合与否,许多性状虽然由少数主基因控制,但仍受遗传背景、微效基因及环境因素的影响,表现出某些数量性状的特点。此外某些病害的发病条件很难创造,某些病虫害为检疫对象不允许引进,多种病害同时接种鉴定,有可能产生拮抗作用,所有这些都给依靠表型选择造成困难,但利用与质量性状基因紧密连锁的分子标记进行选择可使问题得以解决。就数量性状而言,一般由多基因控制,易受环境条件影响,因此选择效果不佳,分子标记技术的发展,可将复杂的数量性状进行分解,像研究质量性状基因一样对控制数量性状的多个基因分别进行研究,如小麦籽粒硬度直接影响小麦的烘烤品质和加工品质,而籽粒硬度是由多基因控制的,其一个主效基因位于 5DS,4 个单效基因分别位于 2A、2D、5B、6D,另外 3 个微效基因分别位于 5A、6D、7A,对于这样一个多基因控制的复杂性状 Sourdiller 等^[26]在线性模型中仅用 3 个 RFLP 标记就可解释大约 75% 的遗传变异,因而使复杂问题的研究难度大大简化。

分子标记已开始用于小麦育种,其优越性开始在实践中表现。例如,Deal 等^[25]发现普通小麦抗盐基因位于染色体 4D 长臂上,利用该抗盐基因的分子标记,他们将其转移到硬粒小麦的 4B 上,大大提高了硬粒小麦的抗盐性。Luo^[27]对位于中国春 4DL 端部的耐铝基因 Alt_2 用 xpsr-914 和 xpsr 10051 进行了标记,确定 Alt_2 位于 xpsr 39 的末端,而与 xksu C_2 相邻,同时与 knal(K^+/Na^+ 选择吸收基因和耐盐基因)相邻,以此为标记,在硬粒小麦的 4D 代换系的后代中选择出了两个 4BS·4DL 易位系,将中国春耐铝、耐盐基因导入了硬粒小麦,提高了硬粒小麦的抗铝和抗盐性。同理,Riede 等^[28]在巴西也用耐铝基因标记进行种质筛选和标记育种。

由蚜虫为害引起的小麦条纹花叶病 Wsmv 在北美是一种主要病害。在育种过程中由

于不具备有用的抗源,同时田间选择需要大量的劳力,因而致使生产上没有抗病品种,从外源植物导入抗性基因有望使问题得以解决。Tablert 等^[29]对中间偃麦草——普通小麦的易位系上的 Wsm1 抗性基因进行了 RAPD 标记,并对与 Wsm1 连锁的 RAPD 标记经克隆测序后,合成了专化的 RAPD 引物,该引物可使 Wsmv 的抗性在实验室进行大批量选择,进而加速 Wsm1 导入生产品种的进程。

Friebe^[30]在将中间偃麦草的抗小麦条纹花叶病 Wsmv 基因转入小麦的过程中,首先对 3 个抗病品系的染色体行为进行了 C-带分析,确认为中间偃麦草的一个端体附加系 $2n=42'+2t'$,进一步利用 RFLP 技术对该端体的同源群及抗性基因进行分析和标记。结果表明,其抗性基因与已定名的来源于中间偃麦草的抗性基因 Wsm1 不同,为一新的基因,该发现将对小麦的抗条纹花叶病育种具有重要的价值。

4 目前小麦分子标记亟待解决的问题及建议

1) 目前小麦 RFLP 连锁图基本饱和,也基本满足育种工作者的需要,但却很难用于小麦育种实践。因此,应该采用更易为育种家们接受的经济、实用的分子标记(如 SSR、RAPD 等)来构建新的连锁图,或者利用 STS-PCR 的方法,将小麦 RFLP 连锁图中的 RFLP 标记转换成 RAPD 标记。

2) 通过探索抗病标记研究,小麦育种已进入到辅助标记选择阶段,但许多研究都是将目标基因的标记与育种分开进行。目前应使两者结合起来同时进行。并应利用分子标记向小麦栽培品种中引入新的等位变异,以丰富小麦的遗传基础。

3) 禾谷类作物不同种之间基因及排列顺序的相似性,扩大了基因组研究的探针来源,有利于构建小麦饱和遗传图谱。目前在有些作物中已经用分子标记定位了农艺性状基因,根据共线性可以预测这些相似性状在尚未定位的麦类作物中的座位。由此可见,以禾本科植物基因组的关系进行更深入的研究是近期研究的方向。

4) 在小麦中,标记的多态性频率仍然较低,因此应该研究提高标记的多态性、稳定性、降低标记成本,并随时注意发现新的标记。

5) 小麦遗传标记自动化方面虽取得了较大进展,但多数仪器设备价格昂贵。因此,有些还需不断改进,从而降低标记成本。

6) 小麦分子标记育种虽是一种非常有希望的育种新技术,但目前尚不成熟和完善,因此还不能作为一种育种方法单独应用。只有将小麦分子标记技术与常规育种经验相结合,才能在小麦育种实践中发挥重要作用。

7) 充分利用国外已有的连锁图、探针等,结合我国小麦育种的实际情况,把研究重点放在对小麦产量影响较大,而又可能通过分子标记方法得以解决的一些问题。

参考文献

- 1 刘春吉,王明理. RFLP 分析过程中应注意的几个问题. 遗传, 1994, 16(6): 37~40
- 2 Mullis K B. Specific enzymatic amplification of DNA in Vitro the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol, 1986, 51: 263~273
- 3 Nelson J C, Sorrells M E, Deynze A E et al. Molecular mapping of wheat major genes and rearrangements in ho-

- moecologous groups 4,5 and 7. *Genetics*, 1995, 14(2): 721~731
- 4 贾继增. 分子标记种质资源和分子标记育种. *中国农业科学*, 1996, 29(4): 1~10
 - 5 Marino C L, Nelson J C, Lu Y H et al. Molecular genetic maps of the group 6 Chromosomes of hexaploid Wheat. *Genome*, 1996, 39(2): 359~366
 - 6 Wang R R C. *Production and Identification of Chromosome Specific RAPD Markers for Langdon Durum Wheat Disomic Substitution Lines*. *Crop Science*, 1995, 35: 886~888.
 - 7 Hernandez P, Rubio M J, Martin A. Development of RAPD marker in tritordeum and addition lines of Hordeum Chilense in Triticum aestivum. *Plant Breeding*, 1996, 115(1): 52~56
 - 8 Becker J, Kuiper M, Salamini F et al. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics*, 1995, 249(1): 65~73
 - 9 Liu Z W, Biyashev R M, Saghai-Marooif-MA. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(5~6): 869~876
 - 10 Chen X M, Line R F, Leung H et al. Virulence and polymorphic DNA relationships of puccinia striiformis sp. hordei to other rusts. *phytopathology*, 1995, 85(11): 1335~1342
 - 11 Ismal D. International plant genome conference II. January, 1995
 - 12 Kurata N. *Bio/Technology*, 1994, 12: 276~278
 - 13 Niwa T, Kanno A, Tsutsumi N et al. Detailed mapping of the chloroplast genome of barley (Hordeum Vulgare). *Genes and Genetic systems*, 1996, 71(3): 175~180
 - 14 Snape J W, Laurie D A, Quarrie S A. Comparative QTL analysis and its application to cereal breeding. *Induced mutations and molecular techniques for crop improvement proceedings*, 1995(6): 39~49
 - 15 Devos K M, Moore G, Gale M D. Conservation of marker synteny during evolution. *Eucarpia Genetic Manipulation in Plant Breeding Section Meeting*, *Euphytica*, 1995, 85(1~3): 367~372
 - 16 Deynze-AE-Van, Nelson J C, O'Donoghue L S et al. Comparative mapping in grasses, Oat relationships. *Molecular and General Genetics*, 1995, 249(3): 349~356
 - 17 Erpelding J E, Blake N K, Blake T K et al. Transfer of sequence tagged site PCR markers between wheat and barley. *Genome*, 1996, 39(4): 802~810
 - 18 Blake T K, Kadyrzhanova D, Shepherd K W et al. STS-PCR markers appropriate for wheat relationship. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(5~6): 826~832
 - 19 Saghai-Marooif-MA, Yang G P et al. Analysis of the barley and rice genomes by comparative RFLP linkage mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92(5): 541~551
 - 20 Yu G X, Bush A L, Wise R P. Comparative mapping of homoeologous group 1 regions and genes for resistance to obligate biotrophs in Avena, Hordeum and Zea mays. *Genome*, 1996, 39(1): 155~164
 - 21 Kilian A. Rice-barley synteny and its application to Saturation mapping of the barley Rpg 1 region. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 2729~2733
 - 22 Jia J, Devos K M, Chao S et al. RFLP map of the homoeologous group-6 chromosomes of wheat and their application in the tagging of Pm12, a powdery mildew resistance gene transferred from Aegilops speltoides to Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92(5): 559~565
 - 23 Schachermeyr G M. Abstract of Plant Genome II. San Diego, USA. 1995: 202
 - 24 Nelson J C. Abstract of plant Genome II. San Diego, USA. 1995: 172
 - 25 Deal K K. Abstract of Plant Genome II. San Diego, USA. 1995: 202
 - 26 Sourdille P, Perretant M R, Charret O et al. Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(4): 580~586
 - 27 Luo M C, Dyorak J. Molecular mapping of an aluminium tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring Wheat. *Euphytica*, 1996, 91(1): 31~35
 - 28 Riede C R, Anderson J A. Linkage of RFLP markers to an aluminium tolerance gene in wheat. *Crop Science*.

1996,36(4):905~909

- 29 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. Theoretical and Applied Genetics, 1996,93(3):463~467
- 30 Friebe B, Gill K S, Tuleen N A et al. Transfer of wheat streak mosaic virus resistance from Agropyron intermedium into wheat. Crop Science, 1996,36(4):857~861

Recent Progress in Molecular Markers to Tritical Crops

Zhao Huiqing Xu Xitang Yang Xincheng

(Shaanxi Academy of Agricultural Sciences, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract On the basis of CABI data (1995~1997), the authors of this paper discussed recent progress and problems related to molecular marker application to tritical crops in the following four aspects: ① genetic chain mapping; ② researches on comparative genetic groups; ③ traits of molecular markers and supplementary breeding techniques; and ④ present problems and perspectives of molecular markers to tritical crops.

Key words molecular marker, tritical crop, research progress

《中国蔬菜》1998年征订启事

《中国蔬菜》是中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的蔬菜科技期刊。主要报道蔬菜研究成果及进展情况;交流各地蔬菜生产经验;传播蔬菜科研、生产技术知识;介绍优良品种及国内外蔬菜科研动态等。读者对象是蔬菜科技人员、院校师生、广大的蔬菜生产者及经营者等。

本刊为双月刊,16开本,64页,每期定价3.5元,全年21元,各地邮局均可办理订阅,邮发代号82-131。