

文章编号: 1005-0906(2005)03-0014-03

# DNA 分子标记与玉米种质研究

张仁和,薛吉全,毛建昌,李凤艳,马国胜

(西北农林科技大学农学院,陕西 杨凌 712100)

**摘要:** DNA 分子标记是继形态标记、细胞标记和生化标记之后发展起来的一类重要的遗传标记,已在生命科学领域中广泛应用。介绍几种 DNA 分子标记的原理,综述了 DNA 分子标记在玉米种质遗传多样性鉴定、绘制指纹图谱、杂种优势类群划分和杂种优势预测等方面的应用,并探讨了在玉米种质研究中存在的问题和应用前景。

**关键词:** 玉米;分子标记;种质资源

**中图分类号:** S513.024

**文献标识码:** A

## Study on Genetic Markers and Germplasm Resources in Maize

ZHANG Ren-he, XUE Ji-quan, MAO Jian-chang, LI Feng-yan, MA Guo-sheng

(College of Agronomy Northwest Science and Technology University of  
Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Compared with morphological markers, cytological markers and biochemical markers, molecular markers have a series of advantages. Therefore they have been extensively application in life science. The principles of several DNA Molecular markers and their application on assessment of germplasm genetic diversity, fingerprinting construction, classification of heterotic groups and heterosis prediction for maize were reviewed. The present problems and prospective of molecular markers application in germplasm resource were evaluated.

**Key words:** Maize; DNA Molecular markers; Germplasm resource

种质资源是玉米育种的遗传物质基础,育种成效的大小取决于拥有优异种质的数量。因此,对玉米种质遗传多样性深入认识是合理利用种质的前提。多年来,玉米种群间的人工杂交构成复合群体,形成了一些新的变异类型种质,很难用传统的形态学或细胞学的方法进行鉴定评价;同工酶标记也曾被用于玉米种质遗传关系研究,由于标记位点数量有限,表现出一定的局限性。与它们相比,DNA 分子标记具有直接以 DNA 表现、标记数量多、遗传稳定、多态性高、不受环境影响等优点,是最为理想的遗传标记,无疑给玉米种质研究利用提供了新的技术途径。本文系统报道了近年来利用分子标记技术进行玉米种质研究取得的一些进展,以供玉米育种者参考。

## 1 DNA 分子标记的类型与原理

DNA 分子标记是以 DNA 序列的多态性为基础的遗传标记,它可以反映生物个体和群体基因组的差异,而这种差异通过将基因组限制性内切酶酶切、PCR 扩增、分子杂交等技术,在凝胶电泳上检测出来。随着分子生物学技术的迅速发展,相继出现了几十种 DNA 分子标记。目前,在玉米种质资源研究中应用较多的是 AFLP、SSR、RFLP、RAPD 等分子标记,依据其原理可以分为二类。

### 1.1 以 Southern 杂交为基础的分子标记

限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)开创了直接应用 DNA 多态性发展遗传标记的新阶段。RFLP 标记是指一个物种或品种的 DNA 片段长度多态性,反映了 DNA 序列中核苷酸排列顺序的差异。RFLP 标记的多态性来源于基因组限制性内切酶酶切位点的突变及相邻位点间 DNA 结构重排(包括缺失、重复、易位和插入),用限制性内切酶酶切不同品种的 DNA,通过琼脂糖凝胶电泳分离大小不同 DNA 片段,转移凝胶中

收稿日期: 2004-10-08; 修回日期: 2004-11-15

基金项目: 农业部“引进国际先进农业科学技术”项目(2003-Q02-3-5)

作者简介: 张仁和(1975-),男,在读硕士,从事玉米种质创新和育种工作。

薛吉全为本文通讯作者。Tel:029-87082934

E-mail: duwl@ylagri.gov.cn

的 DNA 到尼龙膜或硝酸纤维素膜上,用放射性同位素(通常用  $P^{32}$ )或非放射性标记(如地高辛等)的探针进行 Southern 杂交,经放射性自显影显示结果,从而揭示出不同遗传位点多态性。

## 1.2 以 PCR 技术为基础的分子标记

### 1.2.1 RAPD 技术

随机扩增多态性 DNA(Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD)是在 PCR 基础上发展起来的分子标记,通常以 10 碱基,碱基顺序随机排列的寡核苷酸序列为引物,对基因组 DNA 随机扩增鉴别多态性 DNA 的过程。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分离,经 EB 染色后,即可对此基因组 DNA 进行多态性分析。

### 1.2.2 SSR 技术

在高等生物基因组中普遍存在着 1~6 个碱基组成的简单重复序列 SSR(Simple Sequence Repeats),通常又称微卫星。因其重复次数不同而造成每个座位的多态性。微卫星位点两侧序列有一段是相当保守的单拷贝序列。因此,可以根据两侧序列设计一对特异引物,经 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物,经 EB 染色后放射自显影,可以精确的检测出待定位点微卫星 DNA 长度多态性。

### 1.2.3 AFLP 技术

扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)是 1993 年荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 发明的一种分子标记技术,已申请专利。AFLP 技术原理是基于 RFLP 技术和 PCR 技术的结合:植物基因组 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。然后将特定的双链接头连接到 DNA 片段的末端,随后以接头序列和相邻的限制性位点序列,作为引物结合位点,进行 PCR 扩增,最后通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增的 DNA 片段,从而显示出扩增片段长度多态性。

## 2 DNA 分子标记在玉米种质资源研究中的应用

### 2.1 绘制指纹图谱

对品种遗传本质 DUS(特异性、一致性、稳定性)的客观描述是品种鉴定和保护前提。DNA 分子标记建立品种的指纹图谱已用于品种鉴定。指纹图谱是鉴定品种、自交系的有力工具。它具有高度的个体特异性、迅速、准确等优点。在检测良种质量(真伪、纯度)、利用优良自交系和保护知识产权等方面均有重

要意义。

著名美国先锋公司首先引用了 AFLP 技术用于玉米自交系、杂交种的鉴定工作,建立品种档案,保护品种专利。法国 Faye 用 1 个 AFLP 引物在 2 个玉米基因型中发现了 30 条以上多态性带谱,十分适合于玉米基因鉴定。吴敏生等利用 AFLP 标记技术研究 17 个玉米自交系进行分类,研究发现用任何一对引物可以将 17 个自交系区分开来。Smith 等用 38 个探针酶组合对 78 个玉米杂交种检测到 288 个 RFLP 标记,运用这些标记将同工酶技术难以区分的杂交种区分开来。李启云等用 RAPD 技术经过 40 个引物的重复筛选,构建了吉林省玉米骨干系及主推品种的 DNA 指纹图谱,其中仅用 4 个引物可以完全区分所有供试材料。李晓辉等从 220 对引物中筛选出多态性丰富的 58 对引物,以 21 份玉米自交系和组配的 13 个杂交种为材料,进行 SSR 标记分析,利用两个或三个引物组合构建 SSR 图谱,可以将 13 个杂交种区分。赵久然等用 SSR 技术构建中国玉米品种 DNA 指纹库,将是国家品种质量鉴定的重要依据。

### 2.2 玉米种质遗传多样性研究

遗传多样性一般是种内遗传差异水平,它反映一个物种适应环境的能力及其被改造和利用的潜力。遗传多样性是生命系统的基本特征,高遗传多样性是维持物种长期生存的基础。以往对玉米遗传多样性的描述常用性状的平均数、方差和变异系数等遗传参数作遗传潜势分析;DNA 分子标记则能够从本质上揭示其变异规律,并用群体中某一位点等位基因数、多态性位点百分率、每个位点的平均等位基因数、多态性信息量(PIC)、多态性检测效率( $A_i$ )和群体的遗传多样性比率( $G_{st}$ )等指标评价玉米种质遗传多样性,现已成为分析遗传多样性的有效工具。

Smith 等用 230 对 RFLP 探针对 37 个玉米自交系等位变异进行检测,结果发现自交系等位变异数目与产量的决定系数( $r^2$ )高达 0.87,说明根据自交系等位变异预测杂交种的产量是非常有效的。吴敏生等利用 AFLP 标记技术研究 17 个玉米自交系遗传多样性;李新海等利用 43 对 SSR 引物在 21 份玉米自交系中共检测到 127 个等位基因变异,平均每对引物检测到等位基因为 2.95 个,多态性信息量(PIC)平均 0.511。他们研究都表明 AFLP、SSR 可用于自交系的遗传变异分析。袁力行等利用 AFLP、SSR、RFLP、RAPD 标记比较分析 15 个玉米骨干系的遗传多样性,结果 4 种标记都可以用于遗传多样性研究,其中 SSR 标记最高多态性信息量(PIC)十分适合

玉米种质遗传多样性分析。

### 2.3 玉米杂种优势群划分

杂种优势育种是玉米育种研究的主流。其理论基础是杂种优势群和杂种优势模式,合理准确地划分自交系杂种优势群,建立相应的杂种优势模式,是提高育种效率的重要基础研究。我国学者通过系谱法或地理来源分析初步划分了我国自交系类群,随着近年来多元复合种质的应用,以及育种过程中发生的种质交流与渗透,我国玉米种质基础日趋复杂。对当前玉米种质进行系统研究已迫在眉睫。原有根据系谱来源划分杂优群的方法已经不适应划分新类群和新杂优模式的需要。

利用 DNA 分子标记划分杂种优势群行之有效,结果与系谱法相一致,并可以将系谱不清的种质划分到相应的杂种优势群。刘新芝等利用 RAPD 标记将我国目前 15 个玉米骨干系划分为 6 个杂种优势群,结果与系谱法一致。Smith 等报道了利用 131 对 SSR 引物对 58 个自交系杂种优势群的划分,并同 RFLP 标记和系谱法比较,结果基本相同。李新海等将 SSR 用于自交系变异和优势群的划分,聚类分析结果表明,供试自交系可以分为两个类群:黄早四自成一类,其余 20 个自交系又可分为 5 个亚群。生产上利用高产组合的亲本均属于不同类群,而在类群(亚群)内未发现高产组合。袁力行等利用 SSR、RFLP 标记对 29 个玉米自交系杂优群的划分,将供试材料分为塘四平头、旅大红骨、LSC、BSSS 和 PA 5 个类群,划分结果与系谱基本一致,并把系谱不清的种质划到相应的杂种优势群。其中 PN 群种质的确认,进一步拓宽了我国玉米种质,丰富了玉米杂种优势利用模式,为育种实践提供了有价值的信息。

### 2.4 预测玉米杂种优势的研究

杂种优势利用可以明显的提高玉米产量和改善品质。杂种优势预测方法很多,分子标记形成以后,很快就应用到作物杂种优势预测上。Lee 等,Smith 等研究发现,RFLP 遗传距离与  $F_1$  杂种优势表现存在高度的相关性,可用于杂种优势预测。而 Melchinger 等和 Boppenmaier 等研究结果却不同,RFLP 难以预测玉米杂种优势。袁力行等利用 AFLP、SSR、RFLP、RAPD 标记对 15 个自交系进行遗传多样性分析的基础上也研究这种相关性,结果呈显著正相关,但相关程度还不足以预测杂种优势。吴敏生等进行 RAPD 分子标记与杂交种产量预测的研究,结果表明,利用 RAPD 标记预测杂种优势作用有限,应进一步研究与杂种优势有关的 QTL,从而预测高产组合。

众多研究表明,可能与所获得的分子标记与产量性状的基因位点相关性不高有关。Boppenmaier 等分别从理论和计算机模型的分析得出,要获得较高的相关性,必须增加与杂种优势有关的 QTL 连锁的标记位点的绝对数目。因此,在进行 DNA 分子标记预测杂种优势过程中,检测与杂种优势表达有关的所有座位,然后用这些座位来预测杂种优势,可能是一条有希望的途径。

## 3 存在的问题与展望

DNA 分子标记在玉米种质遗传多样性评价、鉴定品种绘制指纹图谱、杂种优势群划分和杂种优势的预测等方面具有重要的应用价值,取得了可喜的进展,展示了十分诱人的前景。从操纵表型真正进入到操作基因型的阶段,在某种意义上实现了遗传研究质的飞跃,找到了研究玉米种质资源的新途径。但实际上仍存在问题:①RFLP 分析成本高,且有放射性环境问题;RAPD 标记具有自身重复性差的缺点。②大多数已标记的基因是控制玉米质量性状的基因,而许多重要农艺性状是由多基因控制的数量性状,QTL 定位和作图力度不够。③与育种目标性状紧密连锁的分子标记,标记的多态性频率较低。

鉴此,玉米种质 DNA 分子标记应注意以下几个方面:利用 DNA 分子标记挖掘、鉴定与玉米高产、优质、抗逆性有关的新基因;积极寻找与目标农艺性状基因紧密连锁的经济高效的分子标记,并随时注意新型的 DNA 分子标记;同时 DNA 分子标记与形态标记、细胞标记和生化标记等技术有机结合,以获得对玉米种质的完整评价;简化分子标记技术,降低成本,实现检测过程的自动化,加速玉米种质研究进程。相信随着分子生物学的飞速发展和 DNA 分子标记技术的日臻完善,DNA 分子标记必将为玉米种质进一步深入研究利用搭建技术平台。

#### 参考文献:

- [1] 刘纪麟. 玉米育种学(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社,2002. 414-417.
- [2] 吴景锋. 我国主要玉米杂交种种质基础评述[J]. 中国农业科学, 1983,(2):1-8.
- [3] 王懿波,王振华,王永普,等. 中国玉米主要种质杂种优势利用模式研究[J]. 中国农业科学,1997,30(4):16-4.
- [4] 李新海,傅骏华,张世煌,等. 利用 SSR 标记进行研究玉米自交系遗传变异[J]. 中国农业科学,2000,33(2):1-9.
- [5] 刘新芝,彭泽斌,傅骏华,等. RAPD 在玉米类群划分的应用[J]. 中国农业科学,1997,30(3):44-51.
- [6] 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.

(上接第 16 页)

- [7] 袁力行,傅骏华,Warburton,等. 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性比较研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(8):725-733.
- [8] 袁力行,傅骏华,Warburton,等. 利用 RFLP 和 SSR 标记划分玉米自交杂种优势群的研究[J]. 作物学报, 2001, 27(5):86-91.
- [9] 赵久然,王凤格,郭景伦,等. 中国玉米品种指纹库建立系列的研究[J]. 玉米科学, 2003, 11(2):3-5.
- [10] 吴敏生,王守才,戴景瑞,等. AFLP 标记在玉米优良自交系优势群划分中的应用[J]. 作物学报, 2000, 26(1):1-13.
- [11] 吴敏生,王守才,戴景瑞,等. RAPD 分子标记在杂种优势群预测的研究[J]. 遗传学报, 1999, 26(5):578-584.
- [12] 李晓辉,李新海,李文华,等. SSR 标记技术在玉米杂交种纯度检测中应用[J]. 作物学报, 2003, 29(1):63-68.
- [13] 李启云,王玉民,庄炳昌,等. 吉林省玉米自交系及主推品种指纹构建[J]. 玉米科学, 1999, 7(1):9-13.
- [14] 李向拓,毛建昌,吴权明. 分子标记在玉米育种中的应用[J]. 玉米科学, 2004, 12(1):26-29.
- [15] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18: 7213-7218.
- [16] Welsh J, McClelland B J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18: 6531-6535.
- [17] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23: 4407-4414.
- [18] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, European Patent Application No.0534858, AL.
- [19] Lee M, Godshalk E B, Lamkey K R, et al. Association of AFLP among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. *Crop Sci.*, 1989, 29: 1067-1071.
- [20] Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, et al. Similarities among a group of elite inbreds as measured by pedigree, F<sub>1</sub> grain yield, grain yield heterosis and RFLP. *Theor Appl Genet.*, 1990, 80: 833-840.
- [21] Smith J S C, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize: Comparison with data from RFLPs and pedigree[J]. *Theor. Appl Genet.*, 1997, 95: 163-173.
- [22] Melchinger A E, Lee M, Lamkey K R, et al. Genetic diversity for RFLP: Relation to estimated genetic in maize inbred[J]. *Crop Science*, 1990, 30: 1033-1040.
- [23] Melchinger A E. Use of RFLP markers for an analysis of genetic relationships among breeding materials and prediction of hybrid performance. *Crop Science*, 1993, 33: 621-628.
- [24] Boppenmaier J, Melchinger A E, Seitz G, et al. Genetic diversity for RFLP in European maize inbred III. performance of crosses within versus between heterotic groups for grain traits. *Plant Breeding*, 1993, 111: 217-226.