

遗传标记

在植物研究中的应用

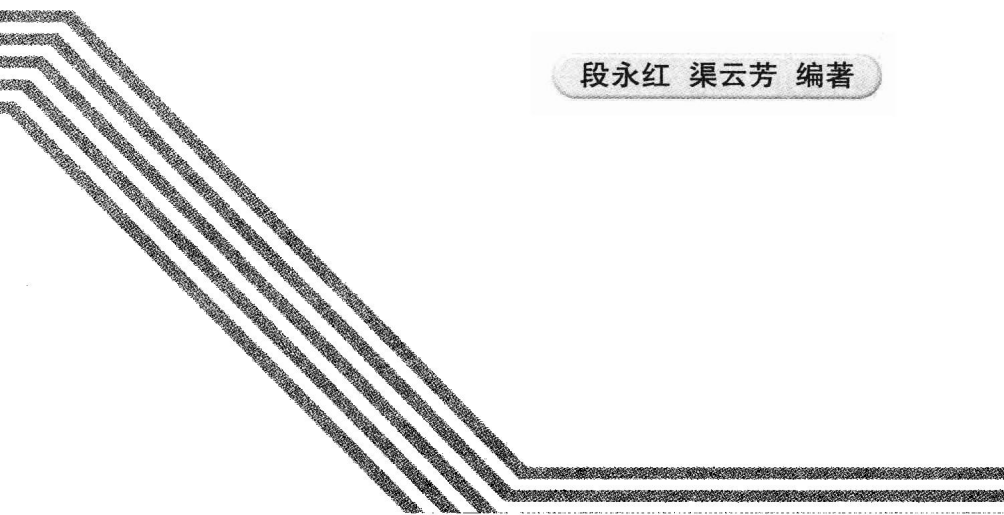
段永红 渠云芳 编著

中国农业科学技术出版社

遗传标记

在植物研究中的应用

段永红 渠云芳 编著



图书在版编目 (CIP) 数据

遗传标记在植物研究中的应用 / 段永红, 渠云芳编著.
北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.5
ISBN 978-7-5116-0198-8

I. ①遗… II. ①段…②渠… III. ①遗传标记-应用-植物育种: 遗传育种 IV. ①S33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 096713 号

责任编辑 贺可香 赵 赞

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109709 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)
(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82109709

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 850 mm × 1 168 mm 1/32

印 张 9.625

字 数 250 千字

版 次 2010 年 5 月第 1 版 2010 年 5 月第 1 次印刷

定 价 30.00 元

—————版权所有·翻印必究—————

目 录

绪论	(1)
一、遗传标记概述	(1)
二、遗传标记的发展	(2)
第一部分 形态学标记	(4)
一、形态学标记概述	(4)
二、形态学标记在植物研究中的应用	(5)
三、应用实例	(7)
参考文献	(16)
第二部分 细胞学标记	(19)
一、核型与核型分析	(20)
二、带型分析	(58)
三、原位杂交技术	(71)
参考文献	(79)
第三部分 生化标记	(87)
一、生化标记的种类	(87)
二、生化标记在育种中的应用	(88)
三、常见的生化标记的试验流程	(94)
四、应用实例	(103)
参考文献	(113)
第四部分 分子标记	(117)
第一章 分子标记概述	(117)
一、分子标记技术的特点	(118)
二、分子标记技术的种类	(118)

三、分子标记技术的优点	(120)
第二章 基因 (gene)	(122)
一、孟德尔和他的豌豆实验	(123)
二、摩尔根和他的黑腹果蝇	(126)
三、沃森、克里克 DNA 双螺旋结构模型	(127)
四、基因故事	(130)
第三章 DNA	(133)
一、新鲜样品的采集与保存	(134)
二、植物 DNA 分离提取时的关键问题	(135)
三、常用的提取 DNA 的方法	(137)
四、DNA 提取过程中注意事项	(142)
第四章 植物 DNA 的分析和检测	(142)
一、电泳技术	(142)
二、植物 DNA 的检测	(154)
三、植物 DNA 浓度测定	(160)
四、琼脂糖凝胶电泳 (AG) 和聚丙烯 酰胺凝胶电泳 (PAGE) 的区别 (表 4-4) ...	(161)
第五章 随机扩增多态性 DNA 标记技术 RAPD	(162)
一、RAPD 标记技术原理	(162)
二、RAPD 标记技术的应用	(163)
三、RAPD 标记技术的操作流程	(173)
四、RAPD 标记技术的特点	(174)
五、RAPD 标记技术中的影响因素	(175)
六、RAPD 标记技术实际操作中出现的问题 及解决方案	(179)
七、由 RAPD 标记技术转化的分子标记	(180)
八、RAPD 标记技术的应用实例	(191)

第六章 简单重复序列标记技术 SSR	(205)
一、SSR 标记技术的原理	(205)
二、SSR 标记技术的应用	(206)
三、SSR 标记技术的操作流程	(219)
四、SSR 标记技术的特点	(221)
五、SSR 标记技术中的影响因素	(221)
六、由 SSR 标记技术转化的分子标记	(222)
七、SSR 标记技术的应用实例	(233)
第七章 扩增片段长度多态性标记技术 AFLP	(242)
一、AFLP 标记技术的原理	(242)
二、AFLP 标记技术的应用	(243)
三、AFLP 标记技术的操作流程	(249)
四、AFLP 标记技术的特点	(252)
五、AFLP 标记技术实际操作中出现的问题 及解决方案	(253)
六、由 AFLP 标记技术转化的分子标记	(254)
七、MSAP 标记应用实例	(265)
参考文献	(275)

绪 论

一、遗传标记概述

遗传标记是指可以明确反映遗传多态性的生物特征。在经典遗传学 and 现代遗传学中，它的含义又有差异。在经典遗传学中，遗传多态性是指等位基因的变异。在现代遗传学中，遗传多态性是指基因组中任何座位上的相对差异。遗传标记不仅能够明确地反应出遗传多样性的生物特征，而且还更有利于帮助人们研究生物的遗传变异规律。遗传变异是生物的最基本特征之一，它对生物的存在和发展起着决定性的作用，正因为如此，不同研究者致力于揭开遗传变异的奥秘，并希望能够主动地改造自然。

在植物遗传学研究中遗传标记主要应用于连锁分析、基因定位、遗传作图及基因转移等。以植物研究中植物育种为例，植物育种的主要任务就是在人们预定目标的指引下，依赖于一定的种质资源，采用相应的育种程序和方法，诱发、创造和重组遗传变异，进而选育出适应当地自然条件，符合社会、生产需要，在遗传组成上相对稳定一致的优良品种供生产上应用。根据植物育种的任务，植物育种成效的大小主要取决于以下三个方面：一是亲本的选用问题，选用的亲本，必须是要求亲本中包含有能符合育种目标需要的基因资源，并且对这种基因资源的利用要很方便；二是采用的育种方法和程序要合理先进，通过使用这些方法，可以将优良基因重新组合在一起；三是要求所使用的鉴定技术准确、可靠。采用的鉴定方法应该不仅能挑选出植物的优良性状，而且还能鉴定出它在一定的自然、生产条件下的适应性和生产能

力。任何育种方法都要先引起变异，再鉴定选择变异，变异是育种的基础，选择是育种中不可缺少的环节，是创造新品种和良种繁育的重要手段。植物遗传育种工作的本质在于将目标基因转到人类需要的特定植物体。在植物育种中通常用和育种目标性状紧密连锁的遗传标记对目标性状进行追踪选择。在现代分子育种研究中，遗传标记的应用已经成为了进行基因定位和辅助选择育种的主要手段。随着遗传标记技术的发展，遗传标记在植物遗传育种工作中得到了有效的应用，尤其是在连锁分析、基因定位、遗传作图及基因转移、杂种真实性的鉴定等方面。

二、遗传标记的发展

遗传标记的发展经历了漫长的时间，每一种新型遗传标记的出现都推动了遗传学的发展，在植物研究中所起的作用也是不可估量的，发展到现在，遗传标记主要包括以下四种：即形态标记、细胞学标记、生化标记、分子标记。每一种标记的出现都有自己特定的背景，19世纪60年代，奥地利学者孟德尔利用豌豆杂交的试验，提出了“遗传因子”假说，首创了把形态标记作为遗传标记的先例；1900年以后，摩尔根等把孟德尔“遗传因子”的行为和细胞核内染色体的行为相联系进行了研究，促进了细胞遗传学的诞生，从而使得细胞学标记得到了应用；1941年，Beald 和 Tetum 通过研究红色面包酶的生化突变型，对一系列营养缺陷型进行了遗传分析，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应用于遗传多样性研究的实例；1953年，Wastan 和 Crick 提出了 DNA 分子的双螺旋结构，宣布了分子遗传学时代的到来。1974年，Grodizcker 等首次提出了 DNA 限制性片段长度多态性可以作为遗传标记，开创了直接利用 DNA 多态性作为遗传标记的新阶段，1985年，Mullis 等发明了聚合酶链式反应（PCR），使直接扩增

DNA 的多态性成为可能，随着 PCR 的迅速发展，又产生了多种新型的分子标记技术。可见，人类对基因从现象到本质的认识过程中，也是遗传标记从形态学标记到分子标记逐步发展、形成的过程，随着遗传学和新兴的分子生物学的发展，遗传标记已从形态学标记、细胞学标记、生化标记发展为今天人们普遍应用的分子标记，随着科学技术的不断进步，新型的分子标记还将不断涌现。

第一部分 形态学标记

一、形态学标记概述

形态学标记主要指的是植物的一些外部形态特征，比如像矮秆、白化、变态叶、雄性不育等，具体来说，形态学标记就是一种特定的肉眼可以看见的外部特征，可以用它来标记某一染色体区段，并且通过这个标记还能对一些没有定位的基因（或突变性状）进行连锁分析。从广义上来说，形态学标记还应包括其他的一些标记，如色素、生理特征、生殖特征以及与抗病虫有关的性状等。形态学标记有优点也有缺点，其优点是简单、直观、快速。其缺点是：①这类标记的表现很容易受到环境和其他修饰基因的影响（如上位基因）。比如说，黄瓜的有序性状与生长环境和修饰基因有关，随着生长环境和修饰基因的改变，它的有序性状也会有所不同。因此，性状的描述只有在系统的系谱和环境的记载时才有意义，因此会有很多的因素限制它们作为遗传标记在育种上的应用；②有许多重要的农艺性状大多是由多基因控制的数量性状，比如说像株高、穗长、抽穗期等，它们是由多个基因位点控制的，表现出来的并不是简单的性状差异，而是一个范围，因而适合农业生产要求的形态标记非常少。所以，利用形态学标记检测出来的基因位点是十分有限的，而且这些位点都是可变的（多态的），无法知道基因组中不变位点的比例，也就无法客观地度量遗传变异的大小。

二、形态学标记在植物研究中的应用

形态学标记作为遗传标记的基础，它在植物研究中的应用的例子有很多，张庆勤等在对燕麦与节节麦、黑小麦杂交的研究中，根据杂种后代小穗着生的部位、芒的生长位置，从形态上验证了在杂种 F_1 植株中存在有燕麦的特征性状。李振声等通过利用 4E 染色体的蓝色胚乳标记性状，对普通小麦与长穗偃麦草的杂交后代进行了研究，在此研究中，他们根据胚乳蓝色特征选育出了一个含 4E 染色体的异代换系，并将其用于培育蓝单体系。张晗等通过把 SSR 分子标记检测技术与芽鞘色、叶鞘色形态观察相结合的方法，研究了老化对玉米种质遗传完整性的影响，经过研究发现，在进行种质遗传完整性研究时，利用一个或几个特殊的农艺性状与分子标记技术相结合，可以快速、有效、简便地判断出种子老化后遗传完整性的变化情况。田崎通过对来自不同地方的 120 个小豆品种进行的调查发现，根据分枝性、主茎的坚实度及柔软度、主茎基部粗度、最长分枝的长度 4 项指标，可以把小豆株型按照其指数分成 A、B、C、D 这 4 个基本类型。卢新雄等对不同繁殖世代的水稻种质农艺性状进行了研究，结果表明，库存种质的田间出苗率比较低，与高繁殖世代的种质材料相比，低繁殖世代种质材料的始穗期和齐穗期提前了 1~3d；库存种质的每穗粒数比一直在生产上种植的种质少。任刚通过对黄瓜属种间杂交新种的形态学研究表明，杂交新种自交一代各个单株除了在节间长和侧枝数上有差异之外，其他方面均没有差异。王述民等通过对国内外 224 份小豆种质资源形态学标记进行的研究表明，我国小豆种质资源具有丰富的多态性，平均多样性指数达到了 1.035，高于国外种质材料 (0.827) 20.1%，根据形态性状可以把 224 份小豆种质聚类并划分为三大组群，其第一及第二组群与胡家蓬的第一、第四类组群相同，它们的差别在于后者把前者的第三类群又区分为两

个组群,我国小豆种质分布呈现出了从东北到西南的地理分布。邓洪平等以九叶青花椒为研究材料,对其进行了形态学标记和分子标记鉴定,研究结果表明,九叶青花椒已具有相对独立且稳定的形态特征,形成了不同于花椒及竹叶花椒的分类群,将其定义为变种是科学可行的。金文林选择了和小豆有关的7个有关气候因子进行了数值分析,初步将我国划分为8个小豆生态气候区,进而对各区适宜的小豆类型进行讨论。金文林等还曾对栽培种小豆与野生小豆一系列重要性状的差异进行研究,发现不同的品种、不同的类型之间在一些重要的性状上有着显著的差异,他们还对这些性状进行了相关分析,并对来源于中国、日本、韩国的栽培、野生、半野生小豆在进化上的关系进行了探讨。刘三才等对中国作物种质资源信息系统的小麦资料进行了研究,结果发现我国小麦选育品种和地方品种在4个穗部性状、5种病害性状、6个农艺和品质性状方面都存在较广泛的遗传多样性。在以形态学标记研究植物遗传多样性的同时,不同研究者也致力于研究植物明显的性状与植物品质或特性的相关性。以棉花为例,张金发等认为具有无蜜腺与鸡脚叶、窄卷苞叶等性状的棉株,对棉红铃虫有抗性。Kame等也通过研究发现,多毛性状可以抵抗红蜘蛛与棉蚜虫。据Callblkob等观察,在各种杂种中,凡是花冠呈淡黄色的,抗黄萎病较强,淡黄色花冠也是杂种铃重、纤维长度、强度的指示标志。Kohel把鸡脚叶、花瓣有红心、光籽、棕色纤维、红色植株、植株密生茸毛、黄色花粉及黄色花瓣8个显性基因转移到遗传标准系中,培育出了显性多标记基因系586与T588,可用于连锁分析,大大丰富了棉花连锁群的内容,从而可以进一步进行基因定位。此外,杨国枝以花生为研究材料,经过研究,认为花生茎基部节位茸毛密度易发生变化,中上部节位茸毛密度较稳定,且与抗旱有关,抗旱性差的品种未发现有密度大的茸毛,中上部节位茸毛长度与抗旱性无明显关系。

三、应用实例

实例一 具有代表性的三种锦鸡儿的形态学观察

我国现已查明的锦鸡儿属植物大约有 67 种, 在我们山西约有 20 种。由于生长环境条件的差异, 又加上常年的自然选择, 它们形成了自己特有的典型形态特征。从中挑选具有代表性的三种锦鸡儿进行形态学观察。

1. 试验材料

豆科锦鸡儿属 (*Caragana* Fabr) 中的三种具有代表性的柠条, 分别为:

小叶锦鸡儿 (*Caragana microphylla* Lam.) 是草原旱生灌木, 在吉林省、辽宁省、河北省、山东省、山西省和陕西省等都有分布。分布区海拔 200 ~ 1 500 m, 年平均温度一般为 1 ~ 6.5℃, 年平均降雨量 300 ~ 400 mm, 干燥度 1 ~ 2, 大于 10℃ 的年积温一般在 2 000 ~ 3 200℃。采种于山西省五寨县。

中间锦鸡儿 (*C. intermedia* Kuang et H. C. Fu) 在形态上与小叶锦鸡儿、柠条锦鸡儿相似。为沙生旱生灌木, 在草原及荒漠草原带的沙地上可成为建群植物, 组成沙地灌丛。也常散生于沙质荒漠草原群落中, 组成灌丛草原群落。采种于山西省神池县。

树锦鸡儿 [*C. arborescens* (Amm) Lam.] 分布于辽宁省、吉林省、陕西省、山西省、新疆维吾尔自治区和内蒙古自治区等, 1952 年由我国引入美国进行人工栽培。在内蒙古自治区和山西省一般栽种于黄土丘陵沟谷土质较好的地方。在锦鸡儿属中属于比较不耐干旱瘠薄的种。为园林绿化的好树种。采种于山西省大同市。

2. 试验方法

对小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和树锦鸡儿进行形态学观察, 观察它们的营养器官, 包括枝条、叶形、托叶、叶轴等; 生殖器官, 包括花

梗、花萼、花冠、果实的种类、子房的形态等。对其主要植物学性状和生物学特性分别进行观察并测量。分析其差异，寻求可能的原因。

3. 结果分析

(1) 小叶锦鸡儿的形态学特征



图 1-1 小叶锦鸡儿植株照片

灌木，高 1~2m，枝展开，初生枝条密被绒毛，后逐渐稀少。当年生枝具棱，淡黄褐色后变成黄绿色，老枝黄绿色，无毛。皮孔灰褐色，近圆形，细小，不甚明显。托叶在长枝宿存并硬化成硬刺，赤褐色或棕褐色，长 3~10mm。叶轴长 1~6.5cm，初密被灰色伏贴柔毛，后无毛，顶端尖头，长 1mm，不硬化成针刺，脱落。小叶 4~10 对，羽状排列，倒卵形或近椭圆形，长 3~10mm，宽 1~8mm，全绿，先端圆形，急尖，或近截形或微凹缺，具小细针尖状，基部渐狭或宽楔形。

幼时两面密被白色平伏毛，后仅具极稀疏柔毛。花多为单生，个别两个簇生，花梗长 1~2cm，密被柔毛，中部或上中部有关节。花萼钟状，长 8~12mm，宽 5~8mm，密生白色柔毛，基部偏斜，萼齿三角形，长约 3mm，边缘密被白色短柔毛。花冠长约 25mm，黄色。旗瓣近圆形，爪长 6mm 左右。翼瓣长 1.5cm，爪长约为瓣的 1 半，耳不明显，基本成截形。子房无柄、无毛，或生疏短柔毛，荚果条形，略扁，具急尖头，长 4~5cm，宽 5~7mm，无毛。分布于山西省、陕西省、内蒙古自治区、山东省等地区的小叶锦鸡儿一般为 4 月中旬发芽。5 月上旬展叶，5 月中旬开花，6 月上、中旬坐果，7 月中、下旬种子成熟。小叶锦鸡儿是极阳性树种，耐寒耐旱，耐高温，是“三北”（东北、华北、西北）地区营造薪炭林、饲料林、防护林的最为理想的树种之一（图 1-1）。

(2) 中间锦鸡儿的形态学特征

较矮的灌木，高 30 ~ 100cm，立地条件好的也有达 2m 者。树皮金黄色、黄绿色或黄白色，多年生老枝灰褐色，幼枝被丝质柔毛，枝常伸长、直立或弯曲。托叶在长枝上宿存，并硬化成针刺，长 4 ~ 7mm，叶轴密被白色丝质柔毛，脱落，羽状复叶长 5 ~ 50mm，小叶 3 ~ 9 对，椭圆形或倒卵状椭圆形，长 3 ~ 8mm，宽 2 ~ 3mm，先端圆或急尖，稀截形、具细尖刺，基部宽楔形，两面密被丝质短柔毛。花梗密被丝质短柔毛，长 8 ~ 12mm，常在中部以上具关节，稀少在中部或中部以下具关节。萼筒钟形，长 7 ~ 12mm，宽 5 ~ 6mm，被短柔毛。萼齿宽三角形，长约 2mm。花冠黄色，长约 25mm，旗瓣圆卵形或菱形，长 20 ~ 25mm。翼瓣长约为瓣片的 1/2，耳短，齿状。龙骨瓣矩圆形，具长爪，耳极短，因而瓣片基部呈截形，子房扁，披针形，无毛或疏生短柔毛。荚果披针形，较厚，单质，腹缝线凸起。果长 2 ~ 2.5cm，宽 4 ~ 6mm。为沙生旱生灌木，在草原带及荒漠草原带的沙地上可成为建群植物，组成沙地灌丛。也常散生于沙质荒漠草原群落中，组成灌木草原群落。常分布于陕西省、山西省、宁夏回族自治区及内蒙古自治区等（图 1-2）。



图 1-2 中间锦鸡儿植株照片

(3) 树锦鸡儿的形态学特征

高 2 ~ 5m，最高达 6 ~ 7m。树皮平滑有光泽，灰绿色，枝条软弱



图 1-3 树锦鸡儿
植株照片

细瘦。托叶三角状披针形,脱落。长枝上的托叶有时宿存并硬化成粗壮的针刺,长约 10mm。叶轴细瘦,上面有沟,长 4~9cm,脱落。小叶 4~7 对,羽状排列,卵形、宽椭圆形至长椭圆形,长 8~35mm,宽 5~13mm。花 1 朵或偶有 2 朵生于一花梗上,长 25~27mm。花梗单生或簇生,长 2~6cm,近上部有关节,苞片小。花萼圆筒状,长约 10mm,宽 7mm,无毛,基部偏斜,萼齿短而宽。花冠黄色,长为花萼的 3 倍。旗瓣 17~19mm,长宽近相等,具短爪。翼瓣较旗瓣稍长,长椭圆形。龙骨瓣较旗瓣稍短,钝头,爪较旗瓣稍短,子房近无毛。花期 5 月,果期 7~8 月。在陕西省、山西省、吉林省、辽宁省、内蒙古自治区等都有分布(图 1-3)。

实例二 不同棉花材料的形态学观察

1. 试验材料

亚洲棉 (A_2)

比克氏棉 (G_1)

亚洲棉 $\times$ 比克氏棉双二倍体 ($A_2A_2G_1G_1$)

陆地棉 ($[AADD]_1$)

海岛棉 ($[AADD]_2$)

($[A_2 \times G_1]$) $\times$ $[AD]_1$ 杂种 F_1

($[A_2 \times G_1]$) $\times$ $[AD]_2$ 杂种 F_1

2. 试验方法

(1) 植株和花器的形态学观察

在相应的生育期取同龄器官和组织,分别调查植株主茎、叶片等形态特征,以及蕾、花器官性状。

(2) 植株腺体的观察

取同龄样品，在解剖镜下统计 0.1cm^2 长方形孔内的腺体个数，再折算成 1cm^2 的腺体个数。

(3) 植株茸毛的观察

样品取正常生长的幼茎和已定型的嫩叶，苞叶、萼片取自花蕾初放期的花。观察时，在叶背紧靠主脉蜜腺上方，切取 0.1cm^2 的切块（避开主脉），幼茎取 1cm 长的切块，各取三份重复材料，用 4% 戊二醛固定液固定，单位面积表皮毛数为三次样品中 1mm^2 数据的平均值。

3. 结果与分析

(1) 亚洲棉 × 比克氏棉双二倍体的形态特征分析

从表 1-1 可以看出，亚比棉双二倍体在所调查的 23 个主要性状中，有 17.4% 的性状趋向于亚洲棉，如叶片的大小、花药的颜色、托叶的类型等，有 26.1% 的性状趋向于比克氏棉，如主茎上的茸毛等，39.1% 的性状表现为中间性状如主茎上腺体的密度，4.3% 的性状表现为双亲的互补型，如萼片的上缘性状，13.0% 的性状表现为超亲性状，如花瓣的颜色。

(2) (亚比棉 × 陆地棉) 杂种 F_1 的形态特征分析

从表 1-1 可知，三种杂种（亚比棉 × 陆地棉）杂种一代植株的主要特点：杂种 F_1 整体株型结构上近似陆地棉，但果枝细，果节长，营养枝较多，植株上有油腺。叶片类形多，有卵圆叶、二裂叶、三裂叶及五裂叶，但植株上部五裂叶居多。叶片有浅裂叶，也有深裂叶，缺刻深 $1/3 \sim 1/2$ ，裂片基部有收缩或不收缩，折叠或不折叠等多种类型。叶片茸毛多而长，叶片呈灰绿色（图 1-4）。苞叶三片而长，多数基部分离，也有的三片基部联合，苞叶顶端齿较长，基部外展，棉铃外露，与亚洲棉 × 比克氏棉杂种相近（图 1-5）。花为粉红色，且都是开放花，花瓣基部有红心（图 1-6）。据初步对杂种 23 个性状的观察统计，其中