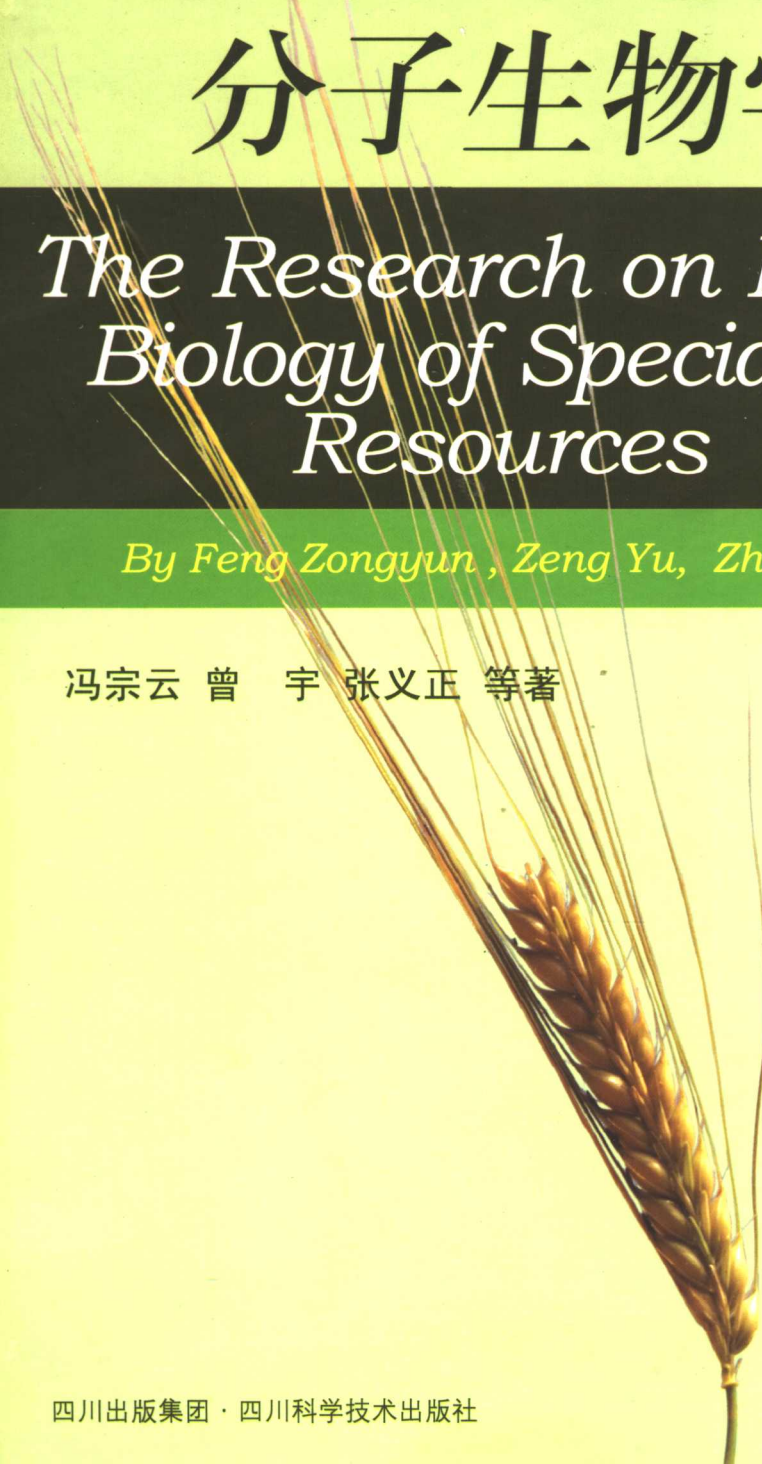
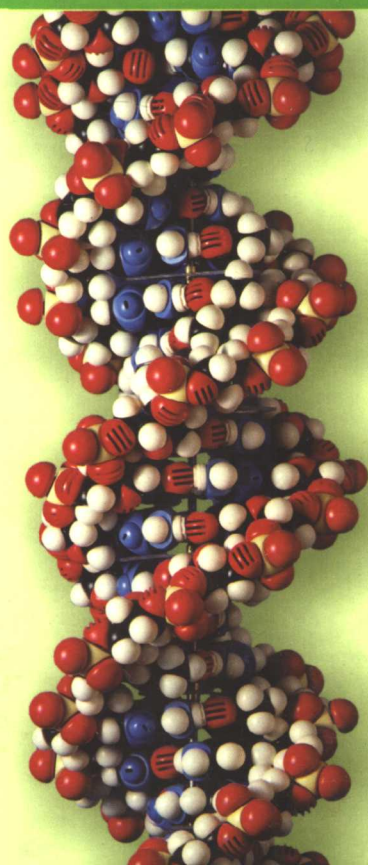


大麦特异遗传资源 分子生物学研究

*The Research on Molecular
Biology of Special Genetic
Resources in Barley*

By Feng Zongyun , Zeng Yu, Zhang Yizheng , et al.

冯宗云 曾 宇 张义正 等著



大麦特异遗传资源 分子生物学研究

The Research on Molecular
Biology of Special Genetic
Resources in Barley

冯宗云
曾 宇 等著
张义正

四川出版集团·四川科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

大麦特异遗传资源分子生物学研究/冯宗云等著.
成都:四川科学技术出版社,2006.1
ISBN 7-5364-5841-X/S·900

I.大... II.冯... III.大麦-分子遗传学-研究
IV.S512.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 111172 号

大麦特异遗传资源分子生物学研究

著 者 冯宗云 曾 宇 张义正 等
责任编辑 张 蓉
封面设计 韩建勇
责任校对 冯宗云 等
责任出版 邓一羽
出版发行 四川出版集团·四川科学技术出版社
成都市三洞桥路 12 号 邮政编码 610031
成品尺寸 244mm × 168mm
印 张 14 字数 250 千 插页 2
印 刷 成都成飞大雁企业公司印刷厂
版 次 2006 年 1 月成都第一版
印 次 2006 年 1 月成都第一次印刷
印 数 1-1000 册
定 价 43.00 元
ISBN 7-5364-5841-X/S·900

■ 版权所有·翻印必究 ■

■ 本书如有缺页、破损、装订错误,请寄回印刷厂调换
■ 如需购本书,请与本社邮购组联系。
地址/成都市三洞桥路 12 号 电话/(028)87734081
邮政编码/610031

前言

Preface

The Research on Molecular Biology of Special Genetic Resources in Barley

大麦是世界上最古老的作物之一,主要用作饲料、食粮、啤酒工业原料以及医药工业原料和保健食品,也是遗传学研究广泛应用的模式植物之一。在我国,大麦栽培历史悠久,遗传资源十分丰富,其变种和变异类型之多为世界之最,特异遗传资源也不少,是育种者育成优质、高产、多抗性和适应性强的大麦品种的基础。大麦遗传资源研究能够在育种、科研和生产应用中产生很大的经济效益和社会效益,是大麦研究工作的重要内容。

Watson 和 Crick 于 1953 年提出的 DNA 分子双螺旋结构模式理论,是遗传学发展到分子遗传学阶段的重要标志,开创了利用分子生物学手段研究大麦遗传资源的新领域,使遗传资源研究从传统的形态学、细胞学、生理生化水平发展到了分子水平。在国外,大麦分子生物学研究工作开展时间较早,研究也深入,涉及范围更广泛。在国内,大麦分子生物学研究起步较晚。近年来,随着分子生物学的理论和技术的发展,大麦遗传资源分子生物学研究受到高度关注,大麦起源、遗传多样性与进化、基因定位与克隆等领域都取得了较大的进展。显然,开展大麦遗传资源分子生物学研究可以从分子水平上深入地认识其遗传规律,更准确地评价和探讨遗传资源的重要问题,有效地保护和利用遗传资源。

本书分为综述与设想和起源、遗传多样性与进化及基因定位与克隆三个部分。书中汇集了著者近年来在国内外学术刊物或会议论文集上已发表或待发表的部分论文。期望本书能对我国大麦分子生物学研

究起到一定的推动作用,促进我国大麦科研与生产的发展。本书可供大麦专业研究人员及高等院校有关专业师生参考。

本书中的有关研究内容得到了国家科技部、教育部、国家自然科学基金、中国科学院“百人计划”基金、四川省科技厅、四川省教育厅等的资助。四川农业大学徐廷文教授为本书提出了许多宝贵意见,并审阅了书稿。有关老师和同事及大麦界同行也为本书的出版给予了大力支持、帮助和鼓励。在本书出版之际,谨向他们表示衷心的感谢。

由于我们学识有限,加之编写时间仓促,书中难免存在不妥、疏漏、甚至错误之处,恳请专家、读者不吝赐教和批评指正。

作 者

2005 年 10 月

目 录

第一部分 综述与设想 1

- 1 DNA 分子标记与作物数量性状改良 2
- 2 大麦密直穗型矮秆遗传资源及其育种应用 12
- 3 中国大麦核质互作型雄性不育研究与进展 17
- 4 大麦基因组中的微卫星标记及其应用 26
- 5 分子标记在大麦遗传育种中的应用 44

第二部分 起源、遗传多样性与进化 57

- 6 The Ancient Carbonized Barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum*)
Kernel Discovered in the Middle of Yalu Tsanypo River Basin
in Tibet 58
- 7 从来牟的释义谈中国栽培大麦起源问题 65
- 8 RAPD Markers in Diversity Detection and Variety Identification of
Tibetan Hulless Barley 85
- 9 应用微卫星标记研究西藏野生二棱大麦的遗传多样性及地理
分化 85
- 10 西藏野生大麦醇溶蛋白的遗传多样性 101
- 11 Further Molecular Evidence for the *Hordeum vulgare* ssp.
spontaneum in Tibet as Ultimate Progenitor of Chinese
Cultivated Barley 116
- 12 Genetic Diversity Analysis of Tibetan Wild Barley Using SSR
Markers 130

- 13 Genetic Diversity and Geographical Differentiation of Cultivated Six-rowed Naked Barley Landraces from the Qinghai-Tibet Plateau of China Detected by SSR Analysis 149

第三部分 基因定位与克隆 168

- 14 Inheritance and Chromosome Location for Multi-branching Trait of fl51-A Natural Mutant of the Qingke Barley (*H. vulgare* var. *nudum* HK.) Landrace Named Xueerdong from Sichuan Province, China 169
- 15 Chromosomal Location of Gene for Earbranching of Barley Natural Mutant “fl51” Using SSR Markers 175
- 16 青稞中 β - 葡聚糖的水法提取及性质分析 184
- 17 青稞 β - 1,3 - 葡聚糖酶 II 基因启动子的克隆分析及表达载体的构建 191
- 18 Cloning and Expression of A New Tibetan Hulless Barley (*Hordeum vulgare*) β - 1,3 - glucanase Gene 203

Contents

Chapter 1	Review and Imagination	1
1	Progress in Crop Quantitative Trait Improvement Using DNA Molecular Markers	2
2	The Application for Dwarf Genetic Resources of Erectoides Type in Barley Breeding	12
3	Review of Studies on Barley Nucleocytoplasmic Interaction Type Male Sterility in China	17
4	Microsatellite Markers and Application in the Barley Genome	26
5	The Applications of Molecular Markers in Genetics and Breeding of Barley	44
Chapter 2	Origin, Genetic Diversity and Evolution	57
6	The Ancient Carbonized Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L. var. <i>nudum</i>) Kernel Discovered in the Middle of Yalu Tsanypo River Basin in Tibet	58
7	Origin of Cultivated Barley in China with Reference to the Explanations of the Chinese Words Lai Mu	65
8	RAPD Markers in Diversity Detection and Variety Identification of Tibetan Hulless Barley	85
9	Genetic Diversity and Geographical Differentiation of <i>Hordeum</i>	

<i>vulgare</i> ssp. <i>spontaneum</i> in Tibet Using Microsatellite Markers	85
10 Genetic Diversity of Hordein in Three Groups of Wild Barley from Tibet	101
11 Further Molecular Evidence for the <i>Hordeum vulgare</i> ssp. <i>spontaneum</i> in Tibet as Ultimate Progenitor of Chinese Cultivated Barley	116
12 Genetic Diversity Analysis of Tibetan Wild Barley Using SSR Markers	130
13 Genetic Diversity and Geographical Differentiation of Cultivated Six-rowed Naked Barley Landraces from the Qinghai-Tibet Plateau of China Detected by SSR Analysis	149
Chapter 3 Gene Localization and Cloning	168
14 Inheritance and Chromosome Location for Multi – branching Trait of fl51 – A Natural Mutant of the Qingke Barley (<i>H. vulgare</i> var. <i>nudum</i>) Landrace Named Xueerdong from Sichuan Province, China	169
15 Chromosomal Location of Gene for Earbranching of Barley Natural Mutant “fl51” Using SSR Markers	175
16 Studies on “Water Method” Isolation and Characterization of Tibetan Hulless Barley β – glucan	184
17 Cloning and Analysis of the Promoter of Tibetan Hulless Barley β – 1,3 – glucanase Gene II and Construction of Expression Vector	191
18 Cloning and Expression of A New Tibetan Hulless Barley (<i>Hordeum vulgare</i> β – 1,3 – glucanase Gene	203

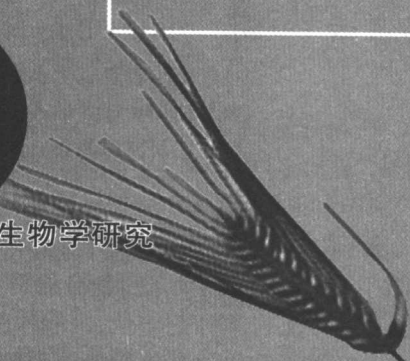
THE RESEARCH ON MOLECULAR BIOLOGY OF
SPECIAL GENETIC RESOURCES IN BARLEY



大麦特异

遗传资源

分子生物学研究



综述与设想

第一部分

Chapter 1 Review and Imagination

1 DNA 分子标记与作物数量性状改良*

冯宗云^① 苟琳^② 何萍^③ 张静^① 况素芬^①

① 四川农业大学农学院, 雅安 625014

② 四川农业大学基础部, 雅安 625014

③ 四川凉山彝族自治州农业局, 西昌 615000

摘 要:本文综述有关 DNA 分子标记的种类,如 RFLP、RAPD、AFLP、小卫星 DNA 和微卫星 DNA 标记及它们各自的特点,作物数量性状基因(QTL)定位的基础统计模型和方法有单标记定位、区间作图、复合区间作图等 20 余种。还对作物数量性状辅助选择及作物杂种优势预测等方面的进展进行了综述。

关键词:作物 DNA 分子标记;数量性状;基因定位;标记辅助选择;杂种优势

作物育种学家的不懈努力在于创造和培育高产、优质、多抗的作物新品种。主要应用形态学、细胞学及生理生化标记作为遗传标记的传统育种技术对培育作物新品种很有用,但也费时、费力。Botstein 等(1980)首先提出的可以作为遗传标记的 DNA 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,简称 RFLP)标记,以及 20 世纪 80 年代后期发展的各种新型 DNA 分子标记,使改良作物数量性状进入了一个崭新的阶段。

1.1 DNA 分子标记的种类及特点

1.1.1 RFLP 标记

RFLP 标记是利用放射性同位素或某些非放射性物质标记随机的

* 本文原载《西南农业学报》,11 卷《育种与栽培》专辑:1998.67~72。

基因组克隆和 cDNA 克隆的单拷贝或少数拷贝序列或中度重复序列的探针与转移于支持膜上的、经限制性内切酶消化的基因组总 DNA 杂交,通过显示限制性酶切片段的大小来检测不同遗传位点等位性变异(多态性)的一种技术。

与传统的遗传标记比较,RFLP 标记对构建遗传图最突出的优点是:无表型效应,RFLP 标记的检测不受环境条件和发育阶段的影响;非等位基因之间不存在上位效应,因而互不干扰;RFLP 标记源于基因组 DNA 的自身变异,几乎不受数量上的限制;RFLP 标记在等位基因之间一般表现为共显性,因此在配制组合时不受杂交方式的影响等。

1.1.2 RAPD 标记

RAPD 标记即随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA) 标记。RAPD 是由 William 等(1990)在 PCR (DNA 多聚酶链反应)技术基础上采用随机核苷酸序列为引物(9 或 10 个核苷酸长)扩增基因组 DNA 的随机片段获得的一种新的分子标记。

Waugh 和 Powell(1992)指出^[17],与 RFLP 标记相比,RAPD 有如下三个特点:合成一套引物,可用于不同生物基因组的分析,而不像 RFLP 探针有种族特异性;大大减少了多态性分析的预备性工作,如制备克隆、同位素标记、Southern 印迹、分子杂交等;如显性标记即每个标记提供的信息量少,RAPD 检测受反应条件影响大,重复性和稳定性差等。

1.1.3 AFLP 标记

AFLP 标记即扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism)标记。这是由 Zabeau 等提出的利用 PCR 检测 DNA 多态性的一项技术,其原理是选择性扩增基因组 DNA 酶切片段。它具有多态性强、稳定性好和重复性高的特点,特别适用于进行种质资源(品种)的指纹图谱绘制。

1.1.4 小卫星(minisatellite)和微卫星(microsatellite)DNA 标记

小卫星 DNA 是 1980 ~ 1984 年发现在人体基因组中存在一些高度

变异的特点,其 DNA 序列由一个 11 ~ 60bp 基本序列单位重复排列而成,每个位点都有多个等位基因,它们所含基本序列单位的数目不同,因而表现出长度上的差异。这些高度变异的序列叫小卫星。微卫星 DNA 是一类由几个(多为 1 ~ 5 个)重复单位组成,其长度一般小于 100bp,它的重复单位数目有很高的变异性,因而显示出高度的长度多态性,可探测到高度变异特点,叫微卫星。

小卫星和微卫星 DNA 标记具有以下特点:多位点性,即一个探针可同时检测基因组中数 10 个位点的变异性;高度变异性,一般选用任何一种识别四个碱基的内切酶,就能表现出高度变异性;遗传方式简单,遵循孟德尔遗传方式。

小卫星和微卫星探针都是高度变异的重复序列,所检测的多态性信息含量较高。但由于不是单拷贝 DNA,难于跟踪分离群体(如 F_2 或回交群体)中个体基因组同源区域的分离。

此外,还有 ALP(amplified length polymorphism)等标记技术。

1.2 DNA 分子标记与作物数量性状基因 (quantitative trait locus,简称 QTL)定位

作物的许多重要的经济性状属受微效多基因控制的数量性状。传统的数量遗传学研究方法对于鉴别单个数量基因及与之有关的染色体片段和确定 QTL 在染色体上的位置等显得无能为力。20 世纪 80 年代以前,数量遗传学家曾用经典的形态学和细胞学标记法研究与标记相连锁的个别数量性状,试图定位 QTL^[13,15]。随后,Stuber 等(1980)和 Tanksley 等(1982)利用同工酶标记分别对玉米和番茄进行 QTL 遗传作图。但由于这些标记数量太少及其技术上的局限性,极大地限制了众多的数量性状基因位点的深入研究。DNA 分子标记的建立和发展,使作物 QTL 作图及其定位方法进展很快。现已在番茄、玉米、水稻等 20 多种作物上绘出了 100 多个数量性状的 QTL 图谱,如番茄的果重、可溶性固形物含量、pH 值等,玉米的株高、穗位高、成熟期、产量及蛋白

质含量等,水稻稻瘟病抗性、产量及其构成因素、再生能力等。

1.2.1 作物 QTL 定位方法

利用 DNA 分子标记正确进行 QTL 定位及其效应的估计,有赖于 QTL 作图的统计模型和方法。自 20 世纪 80 年代初以来,相继提出了 20 余种作图统计方法。

1.2.1.1 单标记定位法

该法是利用线性回归原理,通过比较各标记基因型间数量性状的观测值的差异定位 QTL,并估计其效应的方法。利用此法定位了番茄回交群体控制 4 个数量性状的至少 21 个 QTL,以及用 1 700 个单株构成的 F_2 群体定位了番茄 18 个数量性状的 85 个 QTL^[18]。Edwards 等(1987)定位了玉米 82 个数量性状的 QTL,发现性状不同,其 QTL 数目也不同。该法不足之处在于:不能估计 QTL 的确切位置;不能确定标记是和 1 个还是多个 QTL 的连锁关系;QTL 效应估计值偏低,检测 QTL 需要较多的个体,其效率较低。

1.2.1.2 区间作图法

该法是 Landel & Botstein(1989)^[9]针对单标记定位法的不足提出的。它利用染色体上 1 个 QTL 两侧的各 1 对标记,建立个体数量性状测量值对双侧标记基因型指示变量的线性回归关系,以分离检验统计量中重组率和 QTL 效应。Peterson 等(1988)^[12]利用此法将控制番茄果实重量的 6 个 QTL 定位于 3、4、6、7 号染色体上,控制番茄果实 pH 值的 5 个 QTL 定位在第 3、5、7、8 和 10 染色体上。控制玉米株高的 16 个 QTL^[11]、控制水稻抗稻瘟病性的 14 个 QTL^[16]及影响再生能力的 6 个 QTL 等^[2]也被定位。但该法只适合于 1 条染色体上只有 1 个 QTL 的情形,否则该染色体上其他 QTL 将影响 QTL 位置和效应的估计;1 次只应用 2 个标记进行检测,未能利用染色体上其他标记的信息。

1.2.1.3 复合区间作图法

该法是 Zeng(1994)^[10]提出的,旨在提高 QTL 作图的可靠性和准

确性而发展的一种作图方法。它是利用多元回归特性构建的不受区间以外的其他 QTL 影响的检验统计量,以此统计量进行区间检验,从而区分同一染色体上的多个连锁 QTL 的效应。该法能减少剩余方差,提高 QTL 的发现率,并可降低测验统计量的显著水平。

单标记定位法虽难以精确标定 QTL 位置,但其发现能力仍可能是最高的,三种方法的同一性仍是主要的,方法间变异大多小于方法内变异^[1]。在构建 QTL 图谱时,应同时使用几种方法,并优先标定共同发现的 QTL,并可合并估计 QTL 的效应。

1.2.2 作物 QTL 的特性

作物 QTL 的数目并不多,一般为 4~5 个到 7~8 个,最多的 QTL 是在两极端蛋白质含量的玉米品系的杂交后代群体中发现的,控制蛋白质含量的 QTL 数目高达 22 个。

在多数数量性状中均检测到 1 个或 2 个数量主基因,它们能单独说明表型总变异的 10%~50%,而其他 QTL 的效应则较小。这未能证明数量性状遗传的微效多基因等效应假定。

有些 QTL 只有加性效应,但多数 QTL 加性效应和显性效应同时存在,而显性效应相对较小。大多数 QTL 不存在超显性,仅在优良自交系组配的高产玉米杂交种中发现产量性状的 QTL 普遍存在超显性。

各个 QTL 效应具有相对独立性。同一性或不同性状的 QTL 间存在一般不显著的高级互作和大都不显著的一级互作中只有少数,如前面述及的玉米蛋白质含量的 QTL 间存在互作。

普遍存在 QTL 与环境的互作。同一材料在不同环境下检测出的同一性状的 QTL 不尽相同,但主效应 QTL 表现相对稳定。

具有相关性的 QTL 的位置往往很接近,如水稻粒长的增效 QTL 与粒宽的减效 QTL 有一些位于同一标记区间。

存在对立效应的 QTL,即在大值亲本中含有减效的 QTL,而小值亲本中含有增效的 QTL。对立效应的 QTL 被认为是数量性状超亲分离的遗传基础。

存在共同起源的 QTL,如水稻基因大都在玉米上双倍存在。这对于预测一些重要的 QTL 在不同种中的位置以及分析物种进化进程是很有意义的。但有些物种则例外,如番茄与胡椒等。

随着 DNA 分子标记的发展,DNA 分子标记图谱的精度和密度的提高,QTL 作图统计方法的日臻完善以及检测群体的扩大,将会尽快构建出作物的众多 QTL 的完整的高密度分子连锁图谱。

1.3 DNA 分子标记辅助选择作物数量性状

DNA 分子标记辅助选择是根据与目标性状基因连锁的标记座位上的等位基因而定的。DNA 分子标记可用于任何性状的选择。对于育种中表型不难检测的性状不必要标记辅助;对于用常规方法费时费力又难以检测而对育种又十分重要的性状,利用分子标记进行辅助选择将有现实意义。对由 QTL 控制的数量性状进行分子标记辅助选择将有利于突破常规育种的局限,培育出高产、优质、多抗的新品种。最近,在玉米自交系培育过程中,应用 DNA 分子标记选择转移了与产量性状有关的 QTL,育成了两个高产杂交玉米,每公顷平均增产 3 750kg;应用连锁的 DNA 分子标记选择育成了由 QTL 控制的抗条锈病的大麦,增产 15%;国际水稻所通过标记辅助选择已经获得分别聚合了 3 个抗稻瘟病基因和 3 个抗白叶枯病基因的株系。墨西哥玉米小麦改良中心也已开展了用分子标记筛选具有某种特性的个体或群体。为了确保标记辅助选择的准确性,比较理想的是在两侧找到与目标基因紧密连锁的标记。

但是,DNA 分子标记辅助选择仍难以被广泛应用于作物数量性状改良,最主要的限制因素有三点:一是多数作物尚缺乏高密度的分子遗传图谱及可供利用的与目的基因紧密连锁(小于 5cM)的分子标记;其次是多数作物有重要经济价值的数量性状的 QTL 还不能十分准确地划分和定位;第三是标记辅助选择尚需要很高的成本。随着分子生物学技术的日新月异及分子数量遗传学的进一步发展,QTL 划分和定位

准确性及 QTL 作图效率将会进一步提高,各种作物的高密度 QTL 分子图谱的构建将会日趋完善,易于为作物育种学家接受的简单规范低成本分子标记操作体系也将逐渐建立,深信 DNA 分子标记辅助选择最终将成为广泛直接应用于常规育种中快速改良作物数量性状的有效方法。

1.4 DNA 分子标记与作物杂种优势预测

杂交种育种家们总是把兴趣放在配制杂交组合或对成千上万的杂交组合进行试验之前预知其优劣,寻求有益于杂种生产的预测杂种优势的可靠性方法一直成为作物育种家梦寐以求的目标。直至 20 世纪 70 年代 DNA 分子标记的出现,作物育种家企图利用 DNA 分子标记差异性计算的遗传距离预测杂种优势。

但这方面的研究结果不尽一致。多数研究结果表明,分子标记遗传距离与杂种产量或杂种优势间的相关较小,难以预测杂种优势^[6,7,8]。Melchinger 等(1990)认为^[11],造成二者相关较小的原因有三:一是标记位点未能更好地覆盖整个基因组;二是大多数标记座位的等位基因可能与杂种优势相关不密切;三是存在上位性。试图通过增加 DNA 分子标记在所研究作物基因组中的覆盖面以及增加探针数目来提高与杂种优势表达有关的座位的杂合性和杂种优势的相关性,结果也不尽如人意^[20,21]。从理论上推出根据未加选择的 RFLP 标记估计的遗传距离预测杂种表现毫无用处,增加标记数目并不能提高其相关性,应寻找与所研究性状紧密连锁的那些位点^[5]。应用以标记为基础的方法成功预测杂种优势,基因组必须被均匀分布的标记所充分饱和,或者必须存在高度的连锁非平衡^[3]。应用分布于整个玉米基因组的 257 个探针/酶组合得出,应用 DNA 分子标记计算的遗传距离与 F_1 产量、 F_1 杂种优势^[14] 以及遗传距离与特殊配合力间^[10] 达到显著或极显著水平甚至高度的相关。这显示了 DNA 分子标记差异性应用于作物杂种优势预测的可能性。如果影响经济性状的大多数 QTL 被标记,理