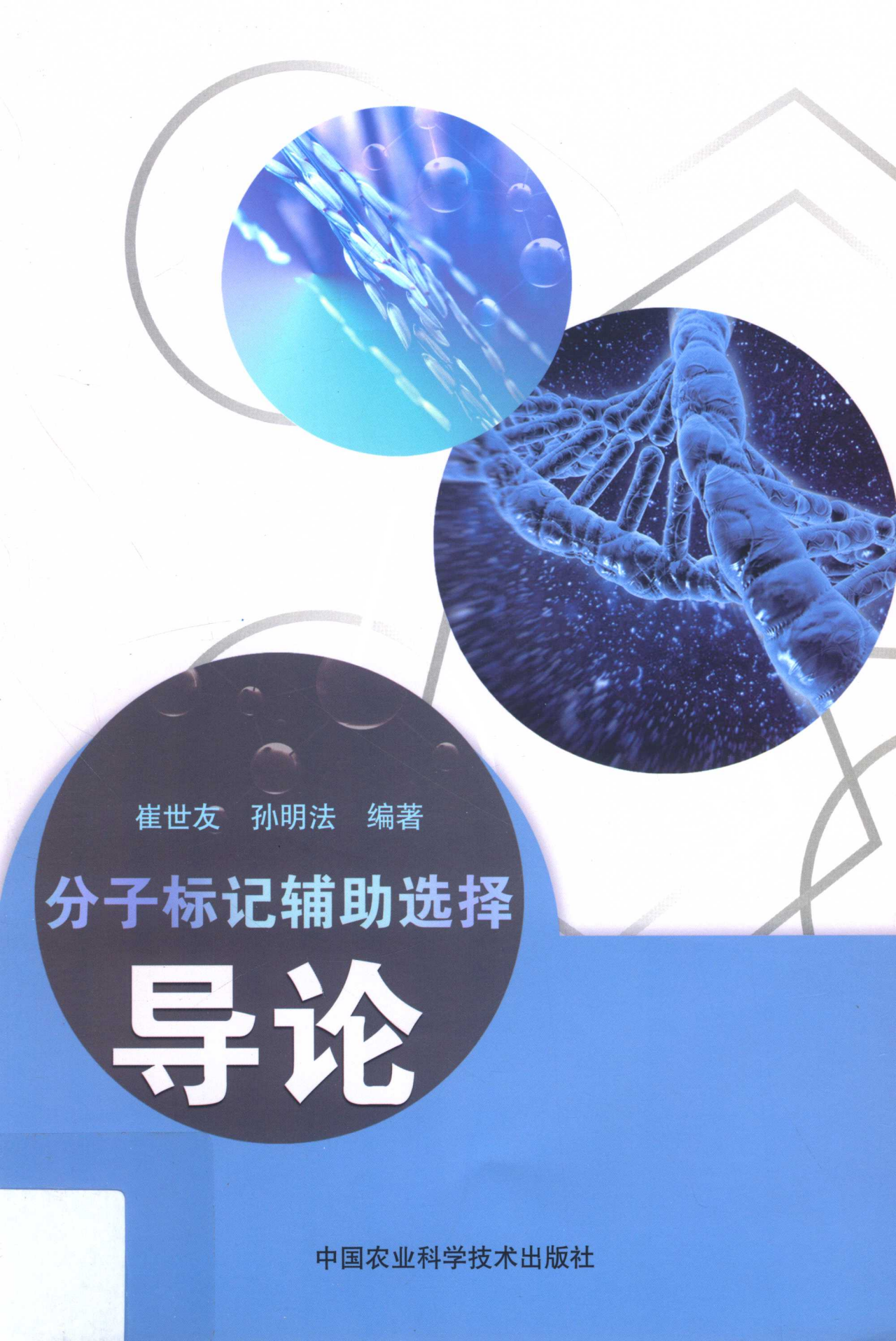
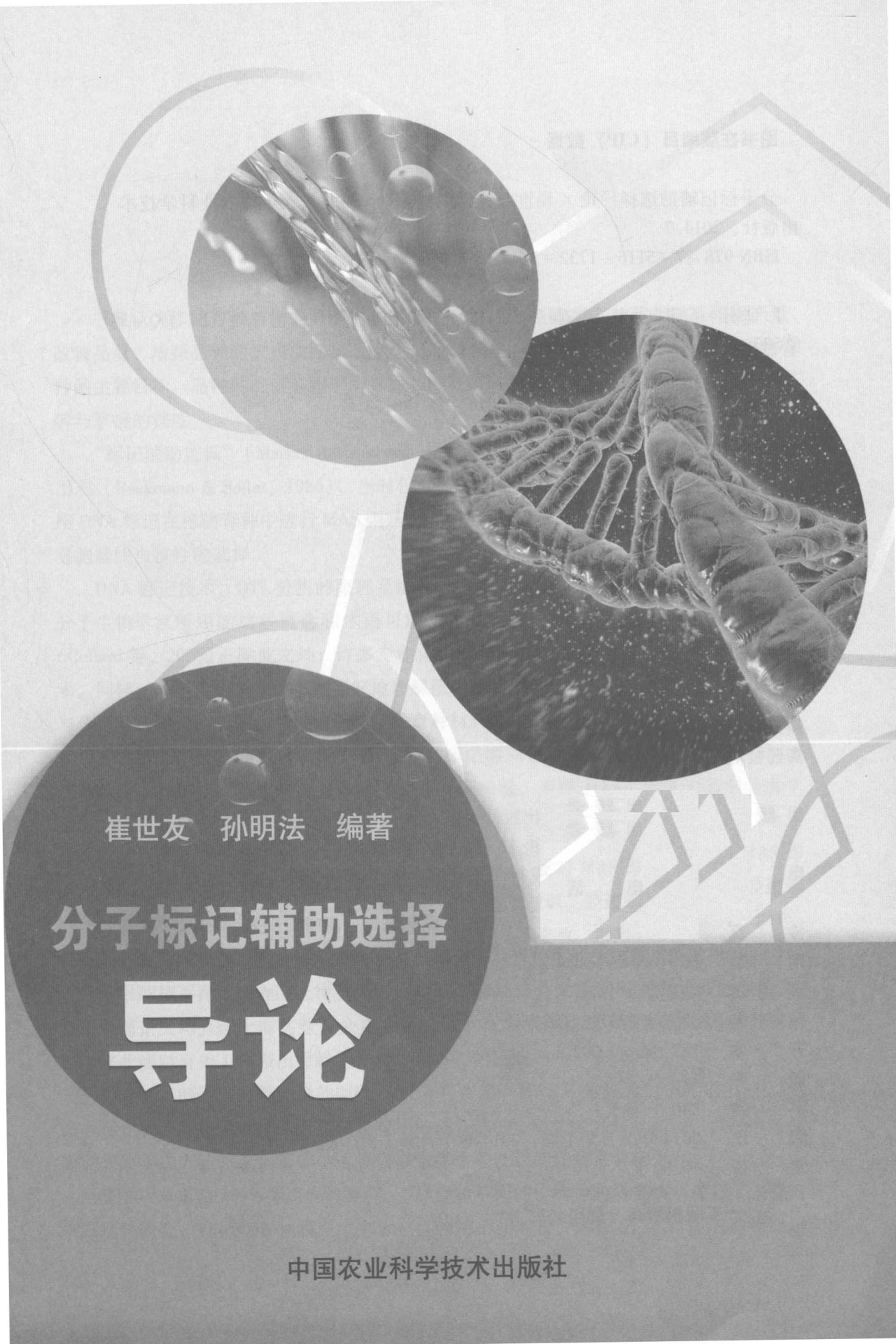




崔世友 孙明法 编著

分子标记辅助选择
导论

中国农业科学技术出版社



崔世友 孙明法 编著

分子标记辅助选择
导论

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

分子标记辅助选择导论 / 崔世友, 孙明法编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2014. 7

ISBN 978 - 7 - 5116 - 1732 - 3

I. ①分… II. ①崔…②孙… III. ①分子标记 - 应用 - 作物育种 IV. ①Q - 33
②S33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 138173 号

责任编辑 贺可香

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) 82109704 (发行部) (010) 82106638 (编辑室)

(010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82106650

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 787 mm × 1 092 mm 1/16

印 张 11

字 数 280 千字

版 次 2014 年 7 月第 1 版 2014 年 7 月第 1 次印刷

定 价 39.00 元

前言

一般认为作物育种工作主要还是基于田间观察，以经验为主。不断提高作物产量、改善品质、增强品种的抗病虫性和适应性（耐逆性）、提高水肥利用效率是现代作物育种的主要目标。品种的改良有赖于所掌握种质资源的数量和对其农艺性状遗传基础的了解与掌握的程度。

“标记辅助选择”（Marker Assisted Selection, MAS）一词在 20 多年前首次在文献中出现（Beckmann & Soller, 1986），当时仅涉及分子标记的利用潜力。而第一次真正利用 DNA 标记在植物育种中进行 MAS 则是 10 年后，即 Concobido 等（1996）所进行的大豆胞囊线虫抗性的选择。

DNA 标记技术、QTL 分析的原理及统计方法在过去的 20 年中得到了快速的发展，分子生物学家所用的这些概念和术语可能不为植物育种家以及其他植物科学家理解（Collard 等，2005）。除此之外，许多专业化的设备是基于分子基因分型所用的尖端技术。同样，分子生物学家也不能很好地理解植物育种中的基本概念。这限制了常规育种与分子育种整合的水平，并最终影响新的育种材料的培育。

大多数从事作物品种改良的科研人员对标记辅助选择（MAS）表现出漠不关心，作者认为其一可能由于他们认为作物育种主要是经验，无需 MAS；而更多的则是由于文献中的一些术语对于他们就像是“天书”，晦涩难懂。作者从事作物育种工作二十余年，在南京农业大学攻读博士学位期间（2003.9 ~ 2006.6）从育种者的角度对 MAS 作了较多的思考，试图撰写一本让普通育种家看得懂的书介绍 MAS 方面的知识。经过近两年的努力于 2009 年底完成初稿，但总感觉不满意，又经过 3 年多的不断修改、润色，仍旧怀着忐忑不安的心情奉献给各位读者，希望能给育种家的工作带来新的思路。

本书的撰写在很大程度上得益于一些期刊，特别是外文期刊所发表的综述性论文，由于每篇论文均有数十篇甚至百余篇参考文献，在大多数情况下仅列出综述论文的出处，在此谨对有关工作做出贡献的作者表示衷心的感谢。

尽管标记的开发需要大量的时间、资金和资源，MAS 比常规育种有潜在优势。然而，标记并非对每个性状的选择总是有用的或有效的。对于许多性状而言，已经有了高效的表型筛选方法，在大群体中通过表型选择这些性状的花费常常较少。

正如 Young 在 1999 所认为的那样，“尽管对不同的作物种的众多性状进行了大量的 QTL 定位研究，在植物育种程序中实际上仅利用了相对较少的标记”。目前这种状况仍

未得到太多的改变。尽管如此，MAS 在作物育种中仍有广阔的应用前景，理解 DNA 标记研制和 MAS 的基本概念和技术，包括分子生物学家使用的一些术语，植物育种家和研究者就能围绕一个共同目标——提高全球食物生产效率而协同工作。

作者于南通家中

2013 年 10 月 5 日

目 录

第一章 遗传标记	(1)
第一节 遗传标记的概念	(1)
第二节 基于 DNA 杂交的 DNA 标记	(3)
第三节 基于 PCR 的 DNA 标记	(6)
第四节 基于限制性酶切和 PCR 的 DNA 标记	(13)
第五节 基于单核苷酸多态性的 DNA 标记	(16)
第二章 连锁图谱的构建	(20)
第一节 图谱构建的理论基础	(21)
第二节 作图群体	(29)
第三节 标记的多态性鉴定与数据处理	(31)
第四节 标记的连锁分析	(33)
第三章 质量性状的分子标记	(36)
第一节 近等基因系分析法	(36)
第二节 分离体分组混合分析法	(41)
第四章 数量性状的分子标记	(49)
第一节 为何要寻找 QTL?	(49)
第二节 数量性状位点的初级定位	(51)
第三节 数量性状基因的精细定位	(60)
第五章 关联作图	(71)
第一节 连锁不平衡	(71)
第二节 连锁作图和连锁不平衡作图比较	(76)
第三节 关联分析的步骤、策略和基本方法	(78)
第四节 嵌套关联作图: QTL 定位的新发展	(91)
第五节 关联分析的应用	(100)
第六章 分子标记辅助选择	(103)
第一节 标记辅助选择概述	(103)
第二节 标记辅助选择中标记的开发	(106)
第三节 标记辅助选择在作物育种中的应用	(110)
第四节 MAS 用于改良质量性状	(119)
第五节 MAS 改良数量性状	(121)

第六节 影响分子标记辅助选择的因素 (126)

第七章 作物育种目标性状的标记辅助选择 (130)

第一节 产量 MAS (130)

第二节 抗病虫性 MAS (132)

第三节 耐逆性 MAS (137)

第四节 品质性状 MAS (141)

第八章 标记辅助选择展望 (145)

第一节 标记辅助选择影响低的原因 (145)

第二节 功能性分子标记的开发与应用 (150)

第三节 从高代回交 QTL 分析到分子设计育种 (159)

主要参考文献 (165)

第一章 遗传标记

第一节 遗传标记的概念

遗传标记 (genetic marker) 描述单个生物或物种间的遗传差异, 一般而言它们不是目标基因本身, 而仅起一种“标记”的作用。位于基因附近的遗传标记 (即紧密连锁) 可称为基因的标签, 这样的标记自身并不影响所研究性状的表型, 因为它们仅位于控制性状的基因附近或与该基因连锁, 所有的遗传标记均占据染色体内特定的基因组位置 (就像基因一样), 称为位点 (locus, loci)。

遗传标记主要有 3 类: ①形态标记 (morphological marker), 也称为经典的或可见的标记, 自身就是表型性状或特征; ②生化标记 (biochemical marker), 包括同工酶的等位变异; ③DNA 标记 (DNA marker), 有时也称为分子标记, 揭示了 DNA 中的变异位点 (Jones *et al*, 1997; Winter & Kahl, 1995)。

形态标记常常是可见的表型性状, 如花色、粒形、生长习性或色素。水稻中已有多达 300 多个形态标记, 在番茄中已发现的形态标记也有 300 多种。

同工酶标记是酶中存在的差异, 可通过电泳以及特殊的染色而检测。形态标记和生化标记主要的不足是数量上的限制, 受环境因素或植物发育阶段的影响 (Winter & Kahl, 1995)。尽管如此, 形态和生化标记对植物育种家还是非常有用 (Eagles *et al*, 2001; Weeden *et al*, 1994)。

DNA 标记由于其丰富性而得到广泛的使用, 它们来自不同类型的 DNA 突变, 如置换突变 (点突变)、重排 (插入或缺失) 或串联重复 DNA 在复制中的错误所引起 (Paterson, 1996)。这些标记是中性的, 因为它们常常位于 DNA 的非编码区内。与形态和生化标记不同的是 DNA 标记在数量上是无限的, 不受环境因素以及植物发育阶段的影响 (Winter & Kahl, 1995)。除了利用 DNA 标记构建遗传图谱外, 这类标记在植物育种中还有许多应用, 如检测种质或品种内的遗传多样性水平 (Baird *et al*, 1997; Henry, 1997; Jahufer *et al*, 2003; Weising *et al*, 1995; Winter & Kahl, 1995)。

DNA 标记根据其检测方法不同可大致分为 3 类: ①基于杂交的标记; ②基于聚合酶链式反应 (即 PCR) 的标记; ③基于 DNA 序列的标记 (Gupta *et al*, 1999; Jones *et al*, 1997; Joshi *et al*, 1999; Winter & Kahl, 1995)。本质上讲 DNA 标记可以通过电泳以及化学试剂 (溴乙非啶或银染) 染色, 或利用放射线或比色探针的检测揭示遗传差异。DNA 标记如能揭示相同或不同物种个体间的差异则更为有用, 这些标记称为多态性标记 (polymorphic marker), 而不能区别基因型间差异的称为单型标

记 (monomorphic marker) (图 1-1)。多态性标记又可根据其能否区别纯合和杂合而分为共显性或显性标记 (图 1-2)，共显性标记显示其片段大小的差异，而显性标记则为是否存在。严格地讲一个 DNA 标记的不同形式 (如胶上不同大小的带) 称为标记等位基因。共显性标记可有许多不同的等位基因，而显性标记仅有 2 个等位基因。常用标记的优、缺点见表 1-1。

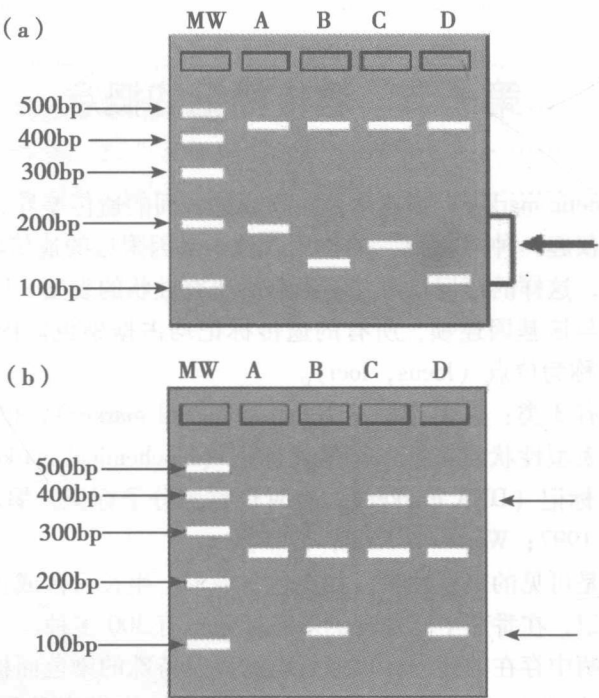


图 1-1 基因型 A、B、C 和 D 间假想的 DNA 标记
图示 (Collard *et al*, 2005)

箭头所指为多态性标记，不能区别基因型的称为单型标记。(a) SSR 标记示例，多态性标记揭示了 4 个基因型标记等位基因的大小差异，代表一个单一的遗传位点；(b) RAPD 技术所产生标记示例，注意这些标记或者出现或者不出现，这些标记的大小常常也按核苷碱基对表示，其大小根据一种分子量 DNA 梯度估计，对其中两种多态性标记而言，仅有 2 种不同的等位基因

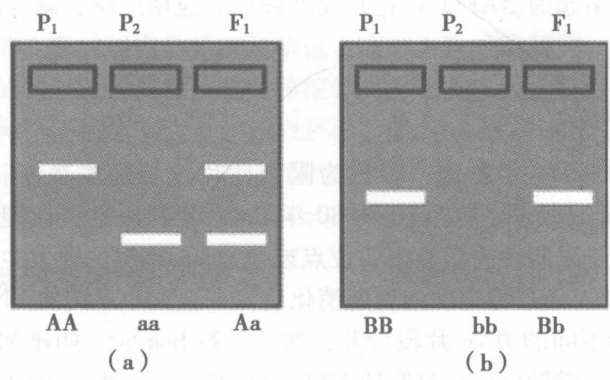


图 1-2 共显性标记 (a) 和显性标记 (b) 的比较 (Collard *et al*, 2005)

共显性标记可明确地区别纯合体和杂合体，而显性标记则不能

表 1-1 QTL 分析中常用 DNA 标记的优、缺点

分子标记	共显性或显性	优点	缺点	参考文献
限制性片段长度多态性 (RFLP)	共显性	稳健而可靠，可在群体间转换	耗时、费力、昂贵，需大量 DNA，多态性有限（尤其在亲缘近的家系中）	Beckmann & Soller, 1986 Kochert, 1994 Tanksley <i>et al</i> , 1989
随机扩增多态性 DNA (RAPD)	显性	快而简单，不贵，单个引物可能产生多个位点，只需少量 DNA	可重复问题，一般不可转换	Penner, 1996 Welsh & McClelland, 1990 Williams 等, 1990
简单序列重复 (SSR) 或微卫星	共显性	技术简单，稳健而可靠，群体间可转换	研制引物需要大量的时间和人力，常需聚丙烯酰胺电泳	McCouch <i>et al</i> , 1997 Powell <i>et al</i> , 1996 Taramino & Tingey, 1996
扩增片段长度多态性 (AFLP)	显性	多位点，产生高水平多态性	需要大量 DNA，技术复杂	Vos <i>et al</i> , 1995

第二节 基于 DNA 杂交的 DNA 标记

基于 DNA 杂交的 DNA 标记主要包括 RFLP 标记和 VNTR 标记。这类标记是利用限制性内切酶酶解不同生物体的 DNA 分子后，用同位素或非同位素标记的随机基因组克隆、cDNA 克隆、微卫星或小卫星序列等作为探针进行 DNA 间杂交，通过放射自显影或非同位素显色技术来揭示 DNA 的多态性。VNTR 多态性是由重复序列数目的差异性产生的，而 RFLP 多态性主要是由于 DNA 序列中单碱基的替换、DNA 片段的插入、缺

失、易位和倒位等引起的。RFLP 标记是发现最早、应用广泛、具有代表性的 DNA 标记技术。

一、RFLP 标记

Grozdzicker 等人 1974 年首创一种称为限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism, RFLP）的标记，1980 年 Botstein 利用这种标记构建遗传图谱。该标记的多态性是由于限制性内切酶酶切位点或位点间 DNA 区段发生突变引起的。其基本原理是基因组 DNA 经过特定的内切酶消化后，产生大小不同的 DNA 片段，通过凝胶电泳的方法将大小不同的 DNA 片段分开，然后进行 Southern 印迹和同位素标记的特定序列的探针杂交后，借助放射自显影技术显示出 DNA 分子水平上的差异。

图 1-3 为形成 RFLP 的原理示意图。如果某一个限制性位点发生了突变，这个限

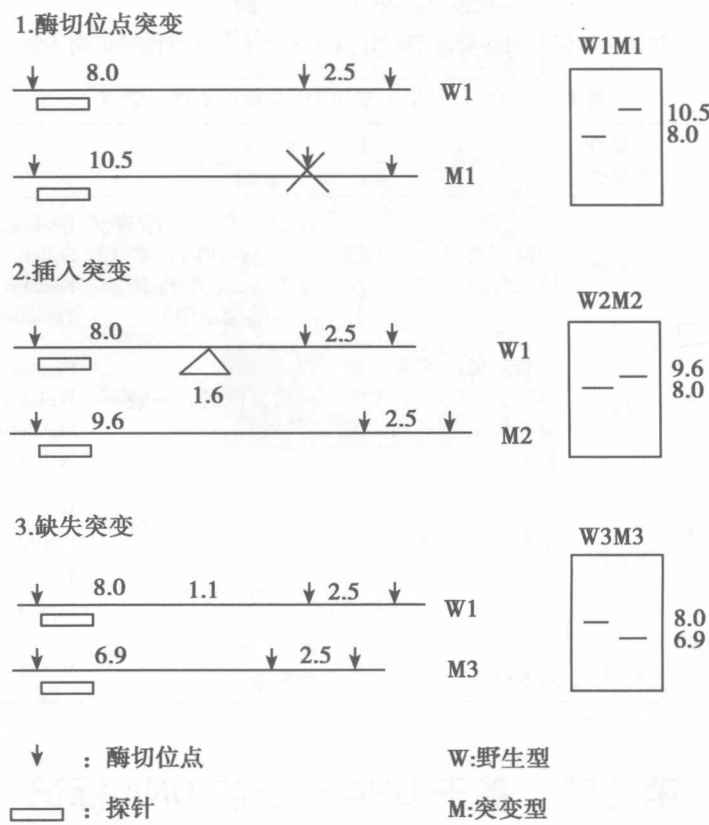


图 1-3 RFLP 标记多态性的分子基础（依方宣钧等，2001）

制性内切酶将不能识别这个位点，不再进行酶切反应，产生片段的大小将由其邻近的限制性酶切位点决定。由于植物基因组很大，某种限制性内切酶的酶切位点很多，经酶解后会产生大量长度不一的限制性片段，这些片段经电泳分离形成的电泳谱带是连续分布的，很难辨别出某一限制性片段大小的变化，利用单拷贝的基因组 DNA 克隆或 cDNA

克隆作为探针，通过 Southern 杂交技术才能检测到。一些作物如玉米、水稻、番茄等已有覆盖整个基因组的克隆，很容易从有关单位、商家索取或购买到。但大多数作物还没有覆盖整个基因组的克隆，仍需要研制特异探针。由于具有大量的酶和探针组合可供选配，因此，任何一种作物都具有大量的 RFLP 标记数量。RFLP 标记具有共显性、信息完整、重复性和稳定性好等优点。不过 RFLP 技术的实验过程较为复杂，需要对探针进行同位素标记，即使应用非放射性的 Southern 杂交技术，也是个耗时费力的过程。

二、VNTR 标记技术

1987 年，Nakamura 发现生物基因组内有一种短的重复次数不同的核心序列。许多生物体的 DNA 存在包含大量的串联重复序列的高变异区。通常将以 15 ~ 75 个核苷酸为基本单元的串联重复序列称为小卫星 (minisatellites)，以 2 ~ 6 个核苷酸为基本单元的简单串联重复序列称为微卫星 (microsatellites) 或简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR)。小卫星和微卫星也常常称作重复数可变串联重复 (variable number of tandem repeats, VNTR) 标记。VNTR 标记产生的多态性是由同一座位上的串联单元数量的不同而产生的。图 1-4 为 VNTR 变异的原理示意图。利用 VNTR 标记可进行分子定位和作图的研究工作。

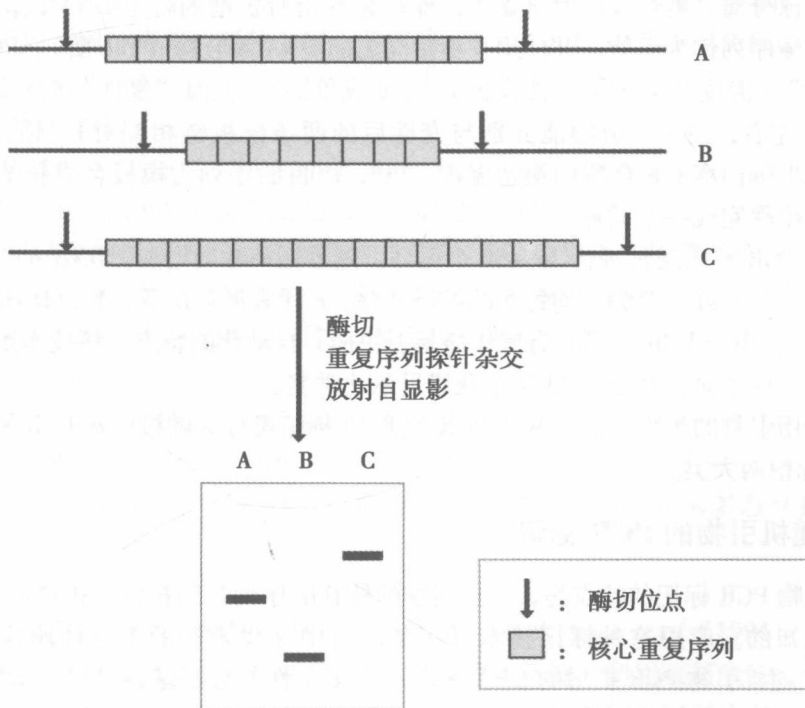


图 1-4 VNTR 变异的原理示意图 (方宣钧等, 2001)

A、B、C 分别表示不同基因型

为了使 VNTR 成为有用的 DNA 标记，需发展一种能够快速鉴定 VNTR 座位的技术。

理想的途径之一是 PCR 扩增, 所得 PCR 产物通过电泳即可比较其长度变异。但是, 小卫星序列往往太长, PCR 扩增无法获得满意的结果, 仍需利用 DNA Southern 杂交和标记探针来检测。微卫星序列常常较短, PCR 扩增即可获得满意的检测效果。由此有时将微卫星标记归类于基于 PCR 技术的 DNA 标记, 而 VNTR 标记则主要是指小卫星标记。利用小卫星中的重复单元作为杂交探针是获得 VNTR 信息最快捷的途径, 目前, 人类小卫星序列和噬菌体 M13 蛋白 III 基因序列已成为研究小卫星的常用探针。这些探针与植物基因组有较高的同源性, 因此, 可以用于植物基因组的小卫星研究。利用 DNA Southern 杂交技术可以产生许多多态性条带。这些丰富的 DNA 带谱用于 DNA 指纹研究是非常有用的, 但由于带谱复杂, 现有技术分析起来比较困难, 不太适合作图研究。

第三节 基于 PCR 的 DNA 标记

PCR (polymerase chain reaction) 技术是由美国 Cetus 公司的 Mullis 等人在 1985 年建立的一种利用酶促反应对特定 DNA 片段进行体外扩增的技术, 该技术只需非常少量 (通常在纳克级范围内) 的 DNA 样品, 在短时间内以样品 DNA 为模板合成上亿个拷贝。经过电泳分离、染色或放射自显影, 即可显示出所扩增的特定 DNA 区段。PCR 技术以短核苷酸序列作为引物, 并使用一种耐高温的 DNA 聚合酶 (Taq 酶)。PCR 过程由高温“变性” (温度升至 94℃, 使模板 DNA 变成单链)、低温“复性” (反应体系的温度降至 55℃左右, 使一对引物能分别与变性后的两条模板链相配对)、适温“延伸” (温度升高到 Taq DNA 聚合酶的最适温度 72℃, 以目的序列为模板合成新的 DNA 链) 这样的 3 个步骤完成一个循环。

典型的 PCR 技术通常进行 25 ~ 50 个循环, 随着循环数的增加, DNA 扩增产物呈指数增加: $Y = (1 + X)^n$ (X 为平均每次的扩增速率, n 代表循环次数, Y 为 DNA 片段扩增后的拷贝数), 由于 PCR 技术具有操作简易、快捷、自动化的特点, 该技术给生物学和医学带来了一场革命, 并于 1993 年荣获诺贝尔化学奖。

根据所用引物的类型不同, 基于 PCR 的 DNA 标记可分为随机引物 PCR 标记和特异引物 PCR 标记两大类。

一、随机引物的 PCR 标记

随机引物 PCR 标记的特点是, 所用引物的核苷酸序列是随机的, 扩增的 DNA 区段也是事先未知的。应用这种标记技术可在基因组中寻找未知的多态性座位作为新的 DNA 标记。随机引物 PCR 扩增的 DNA 区段产生多态性的分子基础是模板 DNA 扩增区段上引物结合位点的碱基序列发生了突变。因此, 不同来源的基因组在该区段 (座位) 上将表现为扩增产物有无的差异或扩增片段大小的差异 (图 1-5)。前者较为常见, 因此随机引物 PCR 标记通常是显性的, 但有时也会表现为共显性, 即扩增片段大小的差异。

目前, 常用的随机引物 PCR 标记主要有 RAPD、AP-PCR、DAF、ISSR 等。

(一) RAPD 标记

随机扩增多态性 DNA 即 RAPD 标记是由 Williams (1990) 和 Welsh (1990) 各自独立提出的一种以 PCR 为基础的 DNA 多态性检测技术。所用的引物长度通常为 9~10 个碱基, 大约只有常规的 PCR 引物长度的一半。使用这么短的 PCR 引物是为了提高揭示 DNA 多态性的能力。由于引物较短, 所以在 PCR 中必须使用较低的退火 (DNA 复性) 温度, 以保证引物能与模板 DNA 结合。RAPD 引物已经商品化, 可以向有关供应商直接购买, 无需自己合成。商品化的 RAPD 引物基本能覆盖整个基因组, 检测的多态性远远高于 RFLP。

RAPD 标记的优点是, 对 DNA 需要量极少, 对 DNA 质量要求不高, 操作简单易行, 不需要接触放射性物质, 一套引物可用于不同生物的基因组分析, 可检测整个基因组。在 RAPD 标记分析中, 通常每次 PCR 反应只使用一种引物。在这种情况下, 只有两端同时具有某种 PCR 引物结合位点的 DNA 区段才能被扩增出来。如果将 2 种引物组合使用, 则还可扩增出两端分别具有其中一种引物的结合位点的 DNA 区段, 产生新的带型, 找到更多的 DNA 分子标记。在实验材料多态性程度较低时, 可考虑不同引物组合使用的方法。RAPD 标记的不足之处主要是该标记一般表现为显性遗传, 不能区分纯合显性和杂合基因型, 因而提供的信息量不完整。另外, 由于使用了较短的引物, RAPD 标记的 PCR 易受实验条件的影响, 重复性较差。不过, 只要扩增到的 RAPD 片段不是重复序列, 则可将其从凝胶上回收并克隆, 转化为 RFLP 和 SCAR 标记, 以进一步验证 RAPD 分析的结果。

(二) DAF 标记

DNA 扩增指纹印迹 (DNA amplification fingerprinting, DAF) 标记与 RAPD 相似, 但它所使用的引物比 RAPD 标记的更短, 一般为 7~8bp, 甚至可以短到 5bp。因而与模板 DNA 随机结合的位点更多, 扩增得到的 DNA 条带也更多, 检测多态性的能力更强。在多态性程度比较低的作物如小麦上, DAF 技术是一种很有用的寻找 DNA 分子标记的手段。但由于 DAF 使用了更短的引物, 因而其 PCR 稳定性比 RAPD 更低。

(三) AP-PCR 标记

随机引物 PCR (arbitrarily primed PCR, AP-PCR) 标记 1990 年由 Welsh & McClelland 提出, 原理上也与 RAPD 相似, 但所使用的引物较长, 通常为 18~24 个碱基。因此, 其 PCR 反应条件与常规一样, 稳定性要比 RAPD 好, 但揭示多态性的能力要比 RAPD 低。

(四) ISSR 标记

简单序列重复区间 (ISSR) DNA 标记技术由 Zietkiewicz *et al* (1994) 提出, 该技术检测的是两个 SSR 之间的一段短 DNA 序列上的多态性。利用真核生物基因组中广泛存在的 SSR 序列, 设计出各种能与 SSR 序列结合的 PCR 引物, 对两个相距较近、方向相反的 SSR 序列之间的 DNA 区段进行扩增。一般在引物的 5' 或 3' 端接上 2~4 个嘌呤或嘧啶碱基, 以对具有相同重复形式的许多 SSR 座位进行筛选, 使得最终扩增出的 ISSR 片段不致太多。ISSR 技术所用的 PCR 引物长度在 20 个核苷酸左右, 因此, 可以采用与常规 PCR 相同的反应条件, 稳定性比 RAPD 好。ISSR 标记呈孟德尔式遗传, 具显性或

共显性特点。

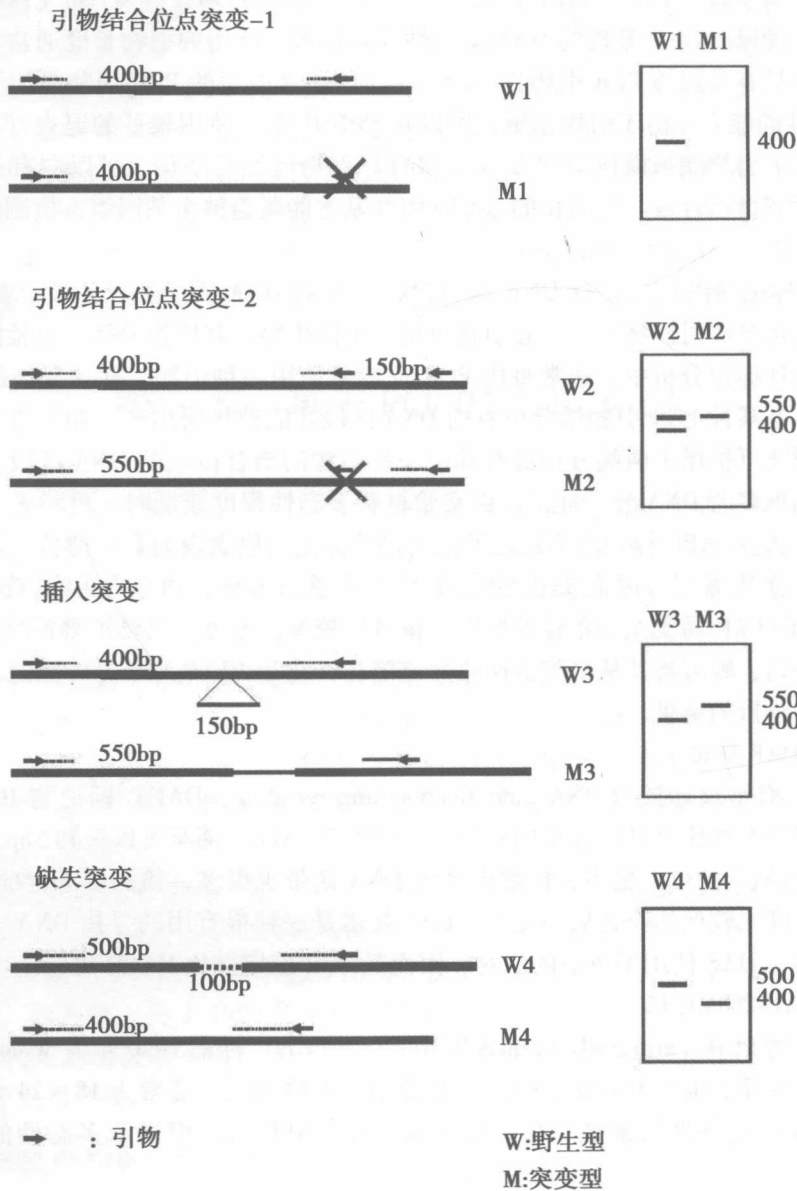


图 1-5 随机引物 PCR 产物多态性的分子基础 (方宣钧等, 2001)

类型 1 为显性标记, 是最常见的多态性, 类型 2、3、4 为共显性标记, 但较少见

在动植物基因组中存在大量的双核苷酸重复序列, 因此, 大多数 ISSR 标记所用 PCR 引物是基于双核苷酸重复序列的。近年来, ISSR 标记技术已应用于植物遗传分析的各个方面, 如品种鉴定、遗传关系及遗传多样性分析、基因定位、植物基因组作图研究等。Kojima *et al* (1998) 的研究表明, $(AC)_n$ 双核苷酸重复序列非常适合小麦的染

染色体作图，并成功地定位了一系列 ISSR 标记。Tsumura *et al* (1996) 研究发现，基于 $(AG)_n$ 和 $(CT)_n$ 序列的 ISSR 标记在柏树和松树中是最有用的。

二、特异引物的 PCR 标记

特异引物 PCR 标记所用的引物是针对已知序列的 DNA 区段而设计的，具有特定核苷酸序列，引物长度通常为 18 ~ 24 核苷酸，故可在常规 PCR 的复性温度下进行扩增，对基因组 DNA 的特定序列区域进行多态性分析。根据引物序列的来源，主要可分为 SSR 标记、SCAR 标记、STS 标记及 RGA 标记等。

(一) SSR 标记

简单序列重复 (SSR) 或微卫星标记的基本重复单元是由几个核苷酸组成的，重复次数一般为 10 ~ 50。同一类微卫星 DNA 可分布在基因组的不同位置上。由于基本单元重复次数的不同，而形成 SSR 座位的多态性 (图 1-6)。每个 SSR 座位两侧一般是相对保守的单拷贝序列，因此，可根据两侧序列设计一对特异引物来扩增 SSR 序列。经聚丙烯酰胺凝胶电泳，比较扩增带的迁移距离，就可知不同个体在某个 SSR 座位上的多态性。

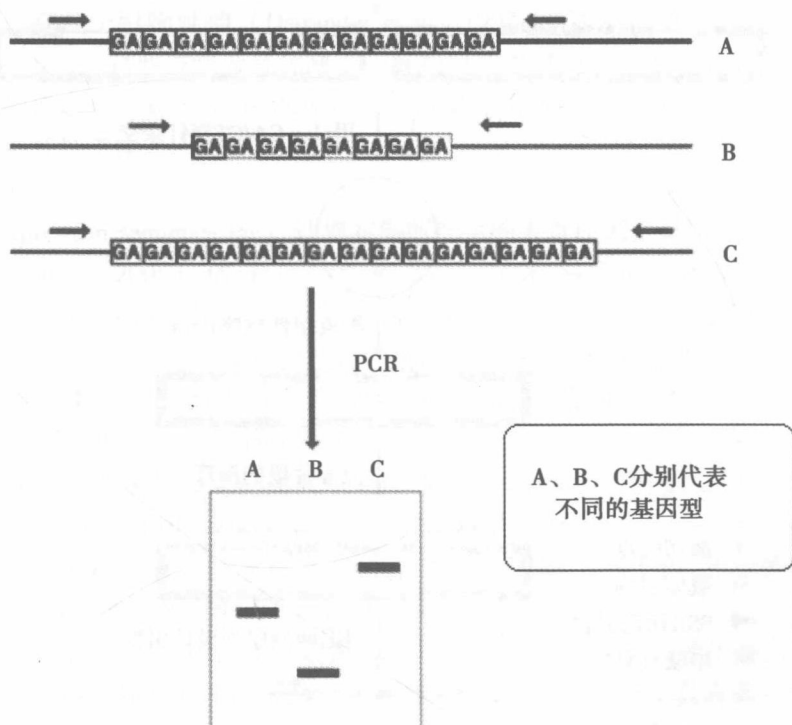


图 1-6 SSR 多态性分析示意图 (方宣钧等, 2001)

SSR 标记因其重现性好、操作简便、可检测位点多、共显性且均匀覆盖整个基因组等优点而成为育种家和遗传学家研究的有效工具，并已逐渐取代 RFLP 标记。由序列信息开发 SSR 主要从 BAC 末端、基因间序列等非编码序列及从 EST 等编码序列中开发，

前者称为基因组 SSR, 具有更高的多态性而在区分关系相近的基因型时更加有效; 后者称为 EST-SSRs, 来自转录本的特性赋予其更高的价值: 通过同源性检索可以推断其功能; 可用于对自然群体和种质收集品的功能多样性分析; 高水平的可转移性使之在比较定位和进化研究中可作为锚定标记。

1. SSR 标记的开发策略

检测 SSR 标记的关键在于一对特异 PCR 引物的设计, 为此, 必须事先了解 SSR 座位两侧的核苷酸序列, 寻找其中的特异保守区。图 1-7 是开发 SSR 引物序列的示意图。其过程是, 首先建立 DNA 文库, 筛选鉴定微卫星 DNA 克隆, 然后测定这些克隆的侧翼序列。也可通过 Genbank、EMBL 和 DDBJ 等 DNA 序列数据库搜索 SSR 序列, 由此省去了构建基因文库、杂交、测序等繁琐的工作。但后者获得的 SSR 信息量往往不如基因组文库的多。最后, 根据 SSR 两侧序列在同一物种内高度保守的特性设计引物。可见, 开发新的 SSR 引物是一项费时耗财的工作。近年来有些学者相继提出一系列高效的 SSR 标记开发策略。

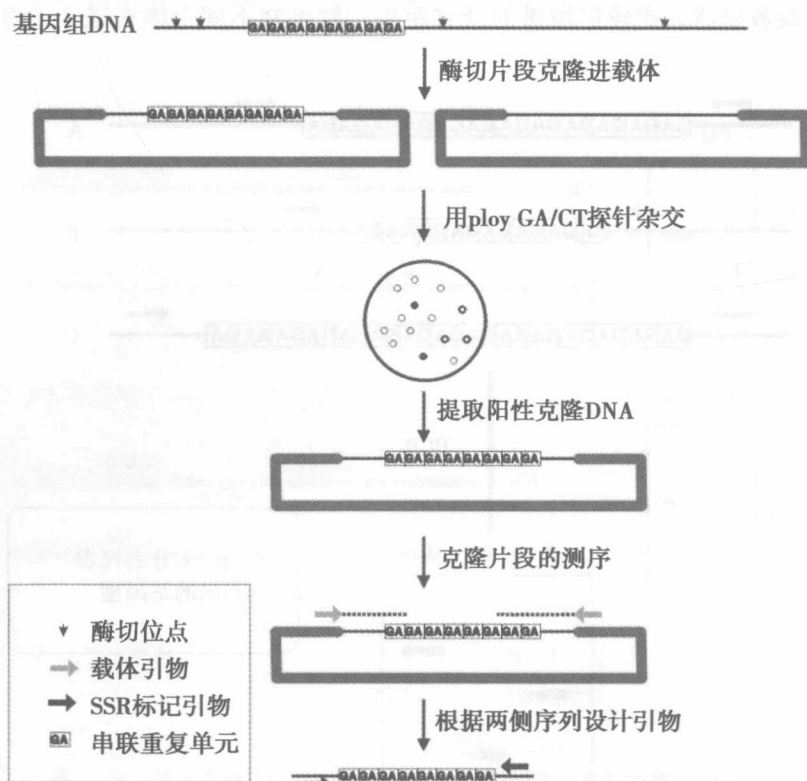


图 1-7 SSR 座位及引物序列开发示意图 (方宣钧等, 2001)

2. 基于 RAPD 富集 SSR

为避免基因组文库构建和筛选阳性克隆, Cifarelli *et al* (1995) 提出利用 SSR 与随机扩增产物杂交的开发策略, 并在糖用甜菜、橄榄、向日葵上成功分离出 SSR。其主要程序是: 先进行 RAPD 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分离扩增条带。再将 RAPD 扩增产物转到