

遗传多样性的分子检测*

邱芳 伏健民 金德敏 王斌

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 生物多样性的保护和可持续利用是维持全球经济稳定和发展的重要因素,也是保持我们赖以生存环境的重要内容。为了实现这一目的,必须尽快建立一套对生物多样性认识和检测的有效方法,逐步认清全球生物多样性的基本状况。本文论述了生物多样性特别是物种间和物种内多样性的几种主要检测方法,着重介绍分子标记的最新进展及比较基因组学的兴起在生物多样性研究中的广泛应用。

关键词 生物多样性,分子标记,比较基因组学

The molecular detection of genetic diversity/QIU Fang, FU Jian-Min, JIN De-Min, WANG Bin

Abstract The conservation and sustainable use of biodiversity is important not only to global economic stability and development, but also to the conservation of ecological environment. Therefore, it is necessary to establish an effective method for the detection of the biodiversity as soon as possible to get a clear knowledge about the status of global biodiversity. In this paper, several major analytical methods for biodiversity detection, especially for inter- and intra- species biodiversity were discussed, with emphasis on the latest advances in molecular markers and comparative genomics and their wide applications in biodiversity research.

Key words biodiversity, molecular markers, comparative genomics

Author's address Institute of Genetics, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101

1 引言

根据联合国《生物多样性公约》,生物多样性的定义是指所有来源的活的生物体中的变异性,包括陆地、海洋和其它水生生态系统及其所构成的生态综合体;它包括物种内多样性、物种间多样性、生态系统的多样性三个层次。

几十年来现代科技和以工业为主导的生产力的不断发展,一方面使人类社会的物质文明和精神文明达到新的高度,另一方面也使生态环境明显恶化,自然资源和能源过度消耗,生物多样性日益丧失。因此,如何对生物多样性加以认识、保护和可持续利用,已成为全球瞩目的问题。目前,各国政府及科学家已达成共识,大力支持开展生物多样性的起源、组成、功能和维持等基础性研究工作。

对生物多样性的检测和认识,是对生物多样性科学进行全面系统理论研究的基础和前提。随着生物科学各项重大技术的进步,生物多样性的检测手段日益成熟和多样化,可从不同角度和层次来揭示物种的变异性。其中,遗传标记的发展过程主要分为4种类型:(1)形态标记;(2)细胞标记;(3)生化标记;(4)分子标记。前3种标记都是基因表达型的标记,可利用的多态位点较少,易受环境影响,不能满足物种资源鉴定的需要。直到1980年美国 Botstein 提出DNA限制性酶切片断长度多态性(RFLP)可以作为遗传标记,开创了直接应用DNA多态性发展遗传标记的新阶段。80年代DNA多聚酶链式反应(PCR)技术的出现,又推动产生了许多新型的分子标记如RAPD标记,SSR标记等。1992年由 Zebeau 和 Vos 发展起来的扩增片段长

度多态性(AFLP)技术被认为是迄今为止最有效的分子标记,既有RFLP的可靠性,又有RAPD的方便性。分子标记的飞速发展促进了真核生物遗传图谱的构建,目前人类和各主要作物的RFLP遗传图谱已基本完成,可以提供基因组各基因间相互作用的全面信息,观察到群体内和群体间由于位点间互作引起的变异分化,在基础理论、遗传育种和物种进化等方面显示出重要应用价值。本文将阐述遗传多样性的主要检测方法,着重讨论分子标记及其在生物多样性研究方面的广泛应用。

2 遗传标记简介

2.1 形态标记

形态标记是指生物特定的肉眼可见的外部特征特性,如植物的株高、叶形、果实颜色等。从广义上讲形态标记也包括与色素、生殖生理特性、抗病抗虫性等有关的标记。由于简单直观,容易观察记载,长期以来,对物种的分类及资源鉴定都是以形态标记为主要的或初步的指标。由自然突变或物化诱变均可获得具有特定形态特征的材料,但所需时间长,并且可能同时诱变产生不利的重要性状。其缺点是数量较少,遗传表达有时不太稳定,易受环境条件及基因显隐性的影响。

2.2 细胞学标记

显微镜技术的改进,不仅使人类认识到微观世界的生物多样性,并且建立了染色体核型和带型分析技术来鉴别宏观物种的分类及核型演化。核型是指把动植物、真菌等的某一个体或某一分类群的体细胞内整套染色体显微摄影后再放大照片,按照染色体相对长度、臂指数、着丝粒指数、染色体臂数等4个参数将所有染色体作系统排列,可代表一个物种的染色体特征。染色体分带技术是将某物种染色体制片用不同物化手段处理,再用不同染料染色,在荧光激发下染色体臂会显示出不同的带数,如G带(Giemsa banding),C带(Constitutive heterochromatin banding),N带(Nucleolar organizer region banding)等,可明确鉴别许多物种核型中的任一条染色体,包括小麦黑麦在内的主要作物都有一套标准的染色体分带模式图^[1,2]。此外,染色体结构变异如缺失、易位,非整倍体如缺体、单体、三体等都各有其特定的细胞学特征,也可作为一种细胞标记。显然,细胞学标记的数目也很有限。

2.3 生化标记

60年代初出现了同工酶标记。可从蛋白质水平来反映生物的遗传变异。同工酶是指具有同一底物专一性的不同分子形式的酶,具有组织、发育及物种的特异性。其基本原理是根据电荷性质差异,通过蛋白质电泳或色谱技术和专门的染色反应显示出同工酶的不同形式,从而鉴别不同基因型。由于其经济方便,易于操作,受到广泛应用。特别在品种质量和纯度鉴定以及动植物群体遗传结构研究中进行同工酶电泳分析已成为常规操作^[3],但实验结果随动植物不同发育时期、器官及环境而变化,可以利用的遗传位点数量比较小,对电泳分析的样品要求较高。

2.4 分子标记

DNA的多态性是生物多样性的本质内容。为了深入掌握生物多样性的遗传学基础,最理想的办法就是直接观察测定DNA的变异。分子标记即是指以DNA多态性为基础的遗传标记。它具有以下优点:直接以DNA的形式出现,没有上位性效应,不受环境和其他因素的影响;多态性几乎遍及整个基因组;表现为中性标记;不影响目标性状的表达,与不良性状无必然连锁;有许多分子标记为共显性;部分分子标记可分析微量DNA和古化石样品。

3 常用分子标记的基本原理及其应用

依据多态性的检测手段,分子标记可分为三大类:a. 基于传统的 Southern 杂交技术的分子标记如 RFLP;b. 基于 PCR 反应的分子标记如 RAPD,DAF 等;c. PCR-RFLP 技术的结合即 AFLP 技术。依据在基因组中出现的频率,又可将分子标记分为低拷贝序列和重复序列,重复序列包括串联重复和散布重复。

3.1 基于 Southern 杂交技术的分子标记

3.1.1 限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) RFLP 是最早发展的分子标记,至今仍被广泛应用。其基本原理是利用限制性内切酶酶切不同个体基因组 DNA 后,与同位素或非同位素标记的探针杂交,从而显示与探针含同源顺序的酶切片段在长度上的差异。RFLP 的探针来源主要是随机的基因组(gDNA)克隆和 cDNA 克隆,其中 cDNA 探针的保守性比较强,许多同科物种的 cDNA 探针都可以作为通用探针,对研究物种起源和演化十分有利,缺点是多态性频率较低。gDNA 克隆用作 RFLP 探针一般为单拷贝,多态性较高。RFLP 标记呈孟德尔遗传,不受环境影响,是一种共显性标记,可区分纯合基因型和杂合基因型;非等位的 RFLP 标记之间不存在上位效应;结果稳定可靠,重复性好。这些优点使 RFLP 标记特别适用于构建连锁图,在分析群体内和群体间的遗传变异度、群体间基因流的评价以及谱系和亲缘关系时也是强有力的工具。如 1995 年 Shoemaker 等以大豆为材料,构建了包含有 490 个 RFLP 标记为主的 20 个连锁群的遗传图谱^[4],为大豆的基因组结构与功能研究打下基础。然而 RFLP 需要的 DNA 量较大,检测方法较为繁琐,周期长,多态检出效率低,只能检测内切酶识别位点上的变异,能提供的信息有限。

3.1.2 染色体原位杂交(Chromosome *in situ* hybridization) 染色体原位杂交是细胞学方法和分子杂交技术相结合的产物,是指利用特异性核酸片段作探针,直接同染色体的 DNA 片段杂交,在染色体上显示特异的 DNA 或 RNA。最初是采用同位素标记探针,杂交后通过放射自显影显示出杂交信号。最近几年主要发展以非放射性大分子如生物素、地高辛等标记特异性核酸片段,杂交信号经酶联显色或荧光显示的杂交技术,特别是荧光原位杂交技术(Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH)。原位杂交的优点是准确直观,在用整个基因组 DNA 或基因组特异重复序列作探针时,可以明显区分不同物种的染色体组成,在鉴定远缘杂种染色体构型和结构变异,物种起源演化方面有重要作用^[5]。如唐顺学等创制出抗叶、茎、条纹锈病、抗白粉病、抗根腐病 5 种病害的 4 属杂交种小麦新种质材料 Yi 4155,他们通过基因组原位杂交技术证明 Yi 4155 为小麦、燕麦、黑麦、中间偃麦草 4 属染色体易位的易位系,并鉴定了带有抗病性位点的异源导入片段在 Yi 4155 染色体上的分布及来源^[5]。但原位杂交技术非常复杂,对操作者要求较高。

3.2 基于 PCR(Polymerase Chain Reaction)的分子标记

PCR 反应技术的问世,推动了分子标记进一步发展,与 RFLP 相比,它所需要的 DNA 量较少,可检测 ng 水平;不需要同位素,安全性好;较便宜,快速易行,易于自动化。目前应用较多的有 RAPD、DAF 等标记。

3.2.1 随机扩增片段长度多态性(Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 标记 RAPD 技术由 Williams 和 Welsh 首先提出^[6,7],是利用一个随机序列的寡核苷酸作引物,通常为 10 个核苷酸,以生物的基因组 DNA 作模板进行 PCR 扩增反应,经琼脂糖凝胶电泳来检测 DNA 序列的多态性。与常规 PCR 反应相比,RAPD 有以下特点:1)RAPD 引物是 1 个 10bp 的

随机引物,常规 PCR 需用 2 个 20bp 左右的特定设计引物 2) RAPD 反应退火温度较低,一般在 36℃ 左右,一方面保证引物与模板的稳定配对,同时允许适当的错误配对,提高多态检出率。RAPD 标记检测灵敏、方便,多态性强,可以检测出 RFLP 标记不能检测的重复顺序区,可填补 RFLP 图谱的空缺,适用于种质资源鉴定和分类、目标性状基因的分子标记、遗传图谱的快速构建等研究。王斌等通过对温敏核不育水稻 F₂ 群体进行 RAPD 和 BSA 分析,筛选 400 个引物后找到了 1 个与温敏核不育基因连锁的单拷贝分子标记,其连锁距离为 6.7 cM^[8]。但是 RAPD 标记为显性标记,不能有效鉴别杂合子;易受反应条件的影响,稳定性较差。解决的办法之一是以测序扩增区段(Sequence characterized amplified region, SCAR)^[9] 标记取代 RAPD,即对特异 RAPD 条带进行克隆并测序,以测出序列的一端 10~20 bp 加以 RAPD 引物的 10 bp 合成出寡聚核苷酸引物,以此引物进行基因组常规 PCR 扩增分析。

3.2.2 DNA 扩增指纹分析(DNA Amplification Fingerprinting, DAF) DAF 技术是利用非常短的随机引物扩增不同个体的 DNA,然后采用高分辨力的聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染显色检测 DNA 的多态性。DAF 使用引物为 7~8bp,比 RAPD 反应更短,因而扩增产物也更多。最近 DAF 技术得到进一步改进:1) 内切酶消化模板 DNA 2) 使用微发夹引物,从而成倍增加可以检测的 DNA 多态性^[10,11]。Catano-Anolles 在 EMS 诱变的超结瘤大豆近等基因系分析中利用内切酶消化模板 DNA,仅用 19 个 8 碱基引物就获得了 42 个多态性标记,其中有 21 个与突变型表现为共分离^[11]。DAF 提供信息远远高于 RAPD 分析,但技术较为复杂。

任意引物 PCR(Arbitrary Primed DNA, AP-PCR)在 PCR 反应中使用的引物长度与常规 PCR 相当,但退火温度较低,允许大量错配,引动具有随机性质的扩增。由 RAPD、DAF、AP-PCR 一起组成的多态性分析方法统称任意扩增多带谱(Multiple Arbitrary Amplicon Profiling, MAAP),其中应用最广的还是 RAPD 标记。

3.2.3 序标位(Sequence Tagged Site, STS) STS 最早由 Olson M 提出,它是由一般长度为 200~500 bp 的序列所界定的位点,在基因组中只出现一次。任何单拷贝的多态性标记都可作为基因组的界标转变为 STS 标记。获得 STS 的方法是将单拷贝的克隆 DNA 从两端测序,设计一对专门扩增引物(大约 20 bp)特异性扩增这一段序列。最富多态性的 STS 标记可能是扩增带有微卫星重复序列的 DNA 区域所得到的 STS 标记^[12]。STS 标记的突出优点是共显性遗传方式,很容易在不同组合的遗传图谱间进行标记转移。在人类基因组作图中已获得了 21 000 个 STS,它们是将遗传图谱和物理图谱整合的有力中介^[13]。

3.3 扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

AFLP 是 Zabeau 等发明的一项技术^[14]。其基本原理是将 DNA 用可产生粘性末端的限制性内切酶消化产生大小不同的酶切片段,与含有共同粘末端的人工接头连接,作为进一步扩增的模板。实验中,根据需要通过选择在末端上分别增加了 1~3 个选择性核苷酸的不同引物,这样使得引物能选择性识别具有特异配对顺序的内切酶片段,然后把扩增的酶切片段在高分辨率的顺序分析胶上电泳,产生扩增片段长度不同的多态性带型。AFLP 标记实际是 RFLP 和 PCR 相结合的一种产物,所需 DNA 量少,不需 Southern 杂交,实验结果稳定可靠,重复性强,呈典型的孟德尔遗传,每个 AFLP 反应可以检测的位点多达 50~100 个,多态性很强,非常适合遗传多样性分析、种质鉴定、基因定位、快速构建遗传图谱等研究。如在 RFLP 多态性很差的大麦中进行 AFLP 分析,只用 16 个引物就定位了 118 个位点^[15]。美国的 Blair 利用 AFLP 技术研究 54 份水稻品种的系统发育和分类,并用同工酶研究得出的结果进行比较,认为二者不仅结论一致,并且 AFLP 对研究水稻品种的遗传变异和构建基因组图谱十分理想。AFLP 技术

的缺点是需要用同位素检测,费用昂贵,对操作人员素质及 DNA 质量要求较高。

3.4 重复顺序标记

在真核生物基因组中,除了基因的编码序列和调控序列,还有许多未知功能的重复序列。按其 在染色体上的分布方式,可分为串联重复(tandem)和散布重复(dispersed)或兼有二者的特性。

3.4.1 串联重复顺序 串联重复顺序的主要特征是 2 个以上的重复序列首尾相连构成特定的染色体区段,根据重复单位大小和次数可分为以下几类:

1)卫星序列(Satellite) 卫星 DNA 重复单位很大,一般为几百至几千 bp,通常分布在染色体异染色质区,具有高度物种特异性,可用于染色体和染色体片段的鉴定。

2)小卫星 DNA(Minisatellite) 小卫星 DNA 的重复单位在几个至几十 bp,总长度由几百至几千 bp 组成,在基因组中有上千个位点,主要分布在常染色质区的近端粒(Telomere)处,由于不同个体串联区的长度和丰度可变,因而可利用重复单位的同源序列作为探针进行多态性分析和染色体定位^[16],为遗传多样性分析提供一个高度个体变异性的 DNA 指纹图谱。这种多态性又被称为可变串联重复(Variable Number of Tandem Repeat Locus, VNTR)。Nakamura 等根据已分离的一些 VNTR 标记的共同保守顺序(GNNGTGGG)合成了 9 个不同的 18 碱基寡核苷酸,以 9 个合成序列作为探针筛到的 102 个人类的 cosmid 克隆有 33% 显示了复等位的 VNTR 多态性;不但为分离更多的 VNTR 标记提供了有效的方法,而且说明(GNNGTGGG)顺序在人类基因组复等位系统的发生过程中发挥了重要作用^[16]。VNTR 具有高度的个体特异性,简单而稳定的孟德尔遗传;但是 VNTR 指纹多是显性标记,无法区分杂合子纯合子。带有高信息量的多态性虽然使个体识别准确性提高,但给群体遗传分析带来困难,无法辨别个体间相同的带型是否来自同一遗传位点。

3)微卫星 DNA(Microsatellite) 微卫星 DNA 又称为简单重复顺序(Simple Sequence Repeats, SSR),是由几个核苷酸(2~5 个)为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列如(GA)_n(AC)_n(GAA)_n等,在染色体上呈随机分布,由于重复次数不同及重复程度的不完全而造成了每个座位的多态性^[17]。可以利用某个微卫星 DNA 两端的保守序列设计一对特异引物,扩增这个位点的微卫星序列,经聚丙烯酰胺凝胶电泳即可显示不同基因型个体在这个 SSR 位点的多态性。这种由保守序列确定的 SSR 可以检测出复等位的差异,常表现为共显性。除了用 PCR 扩增检测 SSR 多态性,还能以 SSR 作探针检测动植物基因组所含的重复序列^[18,19]。如 Echt 等以东方白松和火炬松为材料,直接以 SSR 作探针调查了松属基因组微卫星 DNA 的数量、频率,发现基因组中含量最丰富的核心序列是(AC)_n、(AG)_n、(AAT)_n、(ATC)_n,其 SSR 的最小估计密度为每百万碱基对有 16 个位点^[18]。SSR 被广泛用于资源鉴定、连锁图绘制及目标性状基因的分子标记等研究。SSR 分析技术的缺点是必须针对每个染色体座位的 SSR,测定并找到其两端的单拷贝序列设计引物,无疑这需要投入大量的人力、物力。

3.4.2 散布重复顺序 散布重复顺序为中度重复顺序,零散分布于低拷贝序列或其他重复序列之间,其分散程度与其所在物种基因组大小有关。其拷贝数很多,通常与转座子有密切关系,有相当比例为反转录转座子。反转录转座子的转座不伴随原有插入转座子的消失,因此在基因组扩大方面起重要作用。由于在不同的物种间组织特异性和同源性差别较大,分布广,可用于种的进化研究^[20]。在人类基因组中有一个 Alu 重复顺序的家族,重复单位约 300 bp 左右,分布广泛,几乎每个已知蛋白编码区的 intron 中都有 Alu 因子,目前已设计专门的 PCR 来揭示 Alu 多态性,即利用 Alu 中保守序列作为引物扩增重复单位间的 DNA 区域的 PCR 技术。

Nelson 等利用 Alu-PCR 从含有人类 X 染色体的人-鼠体细胞杂种 DNA 中直接扩增出人的 Alu 重复顺序,并将来源于人类 X 染色体的 YAC 克隆利用此技术作精确定位和排序^[21]。

在玉米和果蝇中被证实有转座子介导的染色体重组重排^[22,23],果蝇的各种转座子 DNA 在染色体上分布很广, β -异染色质和中心粒均有它的同源序列,这可能意味着散布重复顺序参与了物种基因组的自然演化历程且具有相似的起源和进化途径^[24]。

分子标记技术目前已出现几十种,而且可以断定,随着分子生物学的发展,新的分子标记还会不断涌现。以下列出一些目前常用的分子标记技术。

1)以传统的 Southern 杂交为基础的分子标记技术

RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)限制性内切酶酶切片段长度多态性标记

SSCP-RFLP(Single Strand Conformation Polymorphism-RFLP)单链构象多态性 RFLP

DGGE-RFLP(Denaturing gradient gel electrophoresis-RFLP)变性梯度凝胶电泳-RFLP

2)以 PCR 为基础的分子标记技术

RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)随机扩增多态性 DNA

STS(Sequence Tagged Site)测序的标记位点

SCAR(Sequence Characterized Amplified Region)测序的扩增区段

RP-PCR(Random Primer-PCR)随机引物 PCR

AP-PCR(Arbitrary Primer-PCR)随机引物 PCR

OP-PCR(Oligo Primer-PCR)寡核苷酸引物 PCR

SSCP-PCR(Single Strand Conformation Polymorphism-PCR)单链构象多态性 PCR

SODA(Small Oligo DNA Analysis)小寡核苷酸 DNA 分析

DAF(DNA Amplification Fingerprinting)DNA 扩增产物指纹分析

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)扩增的限制性内切酶片段长度多态性

3)以重复顺序为基础的标记

Satellite :卫星 DNA(重复单位为几百~几千碱基对)

Microsatellite :微卫星 DNA(重复单位为 2~5 碱基对)

Minisatellite :小卫星 DNA(重复单位为大于 5 个碱基对)

SSR(Simple Sequence Repeat)简单重复顺序即微卫星 DNA 标记

SRS(Short Repeat Sequence)短重复顺序

TRS(Tandem Repeat Sequence)串珠式重复顺序

4)以 mRNA 为基础的分子标记技术

DD(Differential Display)差异显示

RT-PCR(Revert Transcription PCR)逆转录 PCR

DDRT-PCR(Differential Display Reverse Transcription PCR)差异显示逆转录 PCR

RDA(Representative Difference Analysis)特征性差异分析

4 基因图谱和比较基因组学

DNA 标记技术的不断发展使许多物种的分子图谱日渐饱和,在遗传研究方面取得重大进展。小麦的 RFLP 连锁图揭示了小麦在进化过程中发生的易位情况。如染色体 7B 短臂上的一个片段和 5A 长臂上的片段易位到染色体 4A 上;4A 长臂的片段易位到 5A 5A 长臂末端的一个片段易位到 7B 短臂。这种易位发生在早期的四倍体小麦中,并且在后来形成的六倍体

小麦中依然存在^[25]。

目前,比较基因组作图已成为分子生物学的研究热点之一。比较基因组研究是利用近缘物种间同源的分子标记(包括 cDNA 克隆和 gDNA 克隆)在相关物种间进行遗传作图和物理作图,比较这些标记在不同物种基因组的分布情况,揭示染色体片段上同线性和共线性的存在,从而对不同物种的基因结构及进化历程进行精细分析。通过比较作图,不仅可以从分子水平上明确不同基因组间的系统进化关系,更重要的是有可能把一个科所有起源相对近缘的物种作为一个单一的遗传系统进行研究,为发育生物学和杂交育种提供更全面的指导^[26]。

比较基因组研究开始于人与鼠、牛比较作图的连锁同源性分析^[27]。对禾本科作物的比较基因组研究表明,禾本科作物的染色体之间许多片段存在广泛的同线性,共线性则趋于被倒位和其它转座等染色体重排事件所打乱^[28]。玉米基因组为水稻基因组的 9 倍,比较作图发现同线性片段分别为玉米和水稻基因组的 62% 和 70%。在水稻中 70% 的单拷贝的标记,在玉米中均检测到 2 个拷贝,如 R4 上的标记同时定位在 M2 和 M10 上,证实了玉米的异源二倍体起源假设,并说明了现代玉米在进化过程中发生了大量重组和重排事件^[29]。

禾本科基因组之间的保守性还反应在一些具体的基因位点,甚至 QTL 位点上^[30],揭示相关物种在复杂性状的遗传基础上也可能具有统一性。这样,在进行染色体物理图谱绘制时,可以挑选基因组较大相关物种进行,而在进行基因克隆时,可以选择基因组较小相关物种进行,然后再利用比较基因组作图来定位大遗传系统的其它物种。可见,比较基因组在研究生物的分类和进化、种质遗传多样性方面具有独到的优势。

5 结语

生物多样性研究的深入发展不仅可以反映现存物种的相对遗传关系,而且可以解释物种形成与灭绝的机制,有利于揭示保持生态系统功能稳定性和弹性的规律,确保制定各种政策和对策的科学性,使经济、社会同自然资源、生态环境协调发展,对最终实现可持续发展的战略目标具有重大意义。令人欣慰的是,生物多样性问题的重要性日益为人们所认识。1991 年,国际科联发起制定了国际生物多样性合作研究计划“DIVERSITAS”,它是唯一的全球合作计划;1995 年推出的“DIVERSITAS 计划新方案”,进一步完善了主要研究领域及交叉研究领域内容;1996 年推出的“DIVERSITAS”实施计划,强调了人文因素对生物多样性的影响,并且提出由于生物多样性研究的边界任务、理论体系、研究方法已比较完善,已发展成为一门独立的科学。无疑这些情况将有力促进国际间合作,对生物多样性科学的研究产生巨大的推动作用。

本文主要对直接检测 DNA 多态性的方法——分子标记及其应用作了扼要介绍,指出不同检测方法具有不同的特点。在研究生物的遗传多样性时,可从物种特异性、生长发育时期特异性以及已有的研究基础出发,将几种检测方法综合使用,扬长避短,发展成为快速有效的综合方法。值得一提的是,随着 DNA 测序技术向低成本化、高效自动化发展,将来有可能得到各个不同物种的 DNA 一级序列,可提供更有效的直接信息。

参 考 文 献

- 1 Gill B S, Friebe B, Endo T R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome band and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 1991, **34**: 830 ~ 839
- 2 Friebe B, Jiang J, Tuleen N et al. Standard karyotype of *Triticum umbellulatum* and the characterization of derived chromosome addition and translocation lines in common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 1995, **90**: 150 ~ 156
- 3 Brown A H D, Weir B S. Measuring genetic variation in plant population. In: Tanksley S D, Orton T J (eds.). *Isozyme in plant genetics and breeding* (part A). Amsterdam: Elsevier, 1983, 219 ~ 239

- 4 Shoemaker R C , Specht J E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. *Crop Science* , 1995 , **35** :436 ~ 446
- 5 Tang S X , Zhuang J J , Wen Y X et al. Identification of introgressed segments conferring disease resistance in a tetrageneric hybrid of *Triticum* , *Secale* , *Thinopyrum* and *Avena*. *Genome* , 1997 , **40** :99 ~ 103
- 6 Williams J G K , Kubelik A R , Livak J et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* , 1990 , **18** :6531 ~ 6535
- 7 Welsh J , MmClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* , 1990 , **18** :7213 ~ 7218
- 8 Wang B , Wang Z J , Wu W et al. Tagging and mapping the thermo-sensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* , 1995 , **91** :1111 ~ 1114
- 9 Paran I , Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 1993 , **85** :985 ~ 993
- 10 Caetano-Anolles G , Bassam B J , Gresshoff P M. Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicon profiling of endonuclease-digested DNA : identification of markers tightly linked to the supernodulation locus in soybean. *Mol. Gen. Genet.* , 1993 , **241** :57 ~ 64
- 11 Caetano-Anolles G , Gresshoff P M. DNA amplification fingerprinting using arbitrary mini-hairpin oligonucleotide primers. *Biotechnology* , 1994 , **12** :619 ~ 623
- 12 Weber J L , May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* , 1989 , **44** :388 ~ 396
- 13 Schuler G D et al. A gene map of the human genome. *Science* , 1996 , **274** :540 ~ 567
- 14 Zabeau M , Vos P. Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application* No. 0534 858 A1 , 1993
- 15 Becker J , Vos P , Kuiper M et al. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* 1995 , **249** :65 ~ 73
- 16 Nakamura Y , Carlson M , Krapcho K et al. New approach for isolation of VNTR markers. *Am. J. Hum. Genet.* 1988 , **43** :854 ~ 859
- 17 Weber J L , May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 1989 , **44** :388 ~ 396
- 18 Echt C S , May-Marquardt P. Survey of microsatellite DNA in pine. *Genome* , 1997 , **40** :9 ~ 17
- 19 Vosman B , Arens P. Molecular characterization of GATA/GACA microsatellite repeats in tomato. *Genome* , 1997 , **40** :25 ~ 33
- 20 Huttley G A , MacRae A F , Clegg M T. Molecular evolution of the Ac/Ds transposable-element family in pearl millet and other grasses. *Genetics* , 1995 , **139** :1441 ~ 1449
- 21 Nelson D L , Ledbetter S A , Corbo L et al. Alu polymerase chain reaction : a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1989 , **86** :6686 ~ 6690
- 22 Walker E L , Robbins T P , Bureau T E et al. Transposon-mediated chromosomal rearrangement and gene duplication in the formation of the maize R-r complex. *EMBO J.* , 1995 , **14** :2350 ~ 2363
- 23 Lankenau D H. Genetics of genetics in *Drosophila* : P elements serving the study of homologous recombination , gene conversion and targetting. *Chromosoma* , 1995 , **103** :659 ~ 668
- 24 Carmena M , Gonzalez C. Transposable elements map in a conserved pattern of distribution extending from beta-heterochromatin to centromeres in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* , 1995 , **103** :676 ~ 684
- 25 Liu C J , Atkinson M D , Chinoy C N et al. Nonhomoeologous translocations between group 4 , 5 and 7 chromosomes within wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* , 1992 , **83** :305 ~ 312
- 26 Helentjaris T. Implication for conserved genomic structure among plant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1993 , **90** :8308 ~ 8309
- 27 O'Brien S J , Graves J A M. Report of the committee on comparative gene mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* , 1990 , **55** :406 ~ 433
- 28 Yu G X , Bush A L , Wise R P. Comparative mapping homoeologous group 1 regions and genes for resistance to obligate biotrophs in *Avena* , *Hordeum* , and *Zea* mays. *Genome* , 1996 , **39** :155 ~ 164
- 29 Ahn S , Tanksley S D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1993 , **90** :7980 ~ 7984
- 30 Paterson A H , Lin Y R , Li Z K et al. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. *Science* , 1995 , **269** :1714 ~ 1718