遗传 HEREDITAS (Beijing) 19(2): 40～44 1997

· 综　述 ·

标记辅助选择在水稻改良中的应用前景①

郑康乐　　黄　宁

(中国水稻研究所, 杭州 310006)　　(国际水稻研究所, 马尼拉 1099)

Outlook on the Application of Marker-assisted Selection in Rice Improvement

Zheng Kangle　　Huang Ning

(China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)　　(International Rice Research Institute, Manila 1099)

水稻是重要的粮食作物。在常规育种中,运用生物技术加速水稻改良和提高改良水平是育种家和生物技术工作者的共同任务。

水稻是自花授粉的二倍体（$n=12$）作物，它的基因组在迄今研究的禾谷类作物中最小，单倍体基因组的 DNA 含量为 0.45pg，仅为分子生物学研究模式植物拟南芥的 3 倍，分别为小麦的四十分之一和大麦的十二分之一。水稻基因组的研究较受重视并取得了重大进展,已经构建了相当饱和的水稻分子连锁图谱，美国康乃尔大学的图谱含有 726 个标记，这些标记类型丰富[1]；日本构建了含有 1 383 个标记的高密度遗传图谱，其中 883 个克隆源于表达基因，标记间平均间隔为 300kb[2]；我国也利用双单倍体分离群体构建了连锁图谱[3]。应用与抗病基因紧密连锁的分子标记，已分离出水稻抗白叶枯病的基因 *Xa*-21[4]，这是禾谷类作物中第一个根据图谱成功分离的基因。

标记辅助选择是基因组研究在常规育种的直接应用，它的建立包括目的基因的定位和精密定位，以及将与目的基因紧密连锁的分子标记转换成以 PCR 为基础的标记。本文将就水稻标记辅助选择的研究进展作一概述，并讨论应用中的一些实际问题。

1 水稻重要性状的基因定位

基因定位就是确定基因在染色体上的位置及与之相连锁的标记。由分子标记定位的控制水稻重要性状的主基因已超过 30 个[5],以抗病虫害的基因最多（表 1），特别是抗稻瘟病和白叶枯病的基因，这有利于将抗同一疾病的不同基因聚合到同一品种中，以增加该品种对这一疾病的抗谱，获得持续抗性。除此之外，已经定位的主基因还包括恢复基因[6]、广亲和性基因[7~9]和光敏雄性不育基因[10]。这些基因控制的性状在我国当前的育种工作中很重要，而考种费时费力，它们受环境的影响也很大，利用标记进行辅助选择将有现实意义。水稻的很多经济性状，均由 QTL 控制，应用分子标记已经定位了对稻瘟病的抗性[11]和产量构成因素的 QTL[12]，对这些性状进行标记辅助选择将有利于育种家们突破常规育种的局限，培育出高产、优质、多抗的新品种。

---

①本文缩略语: RFLP: 限制性片段长度多态性, PCR: 聚合酶链式反应, QTL: 数量性状座位, RAPD: 随机扩增多态性 DNA, STS: 序标位, ALP: 扩增子长度多态性, PBR: PCR 扩增片段的 RFLP。

最初用分子标记对水稻性状定位，分子标记和目的基因间的距离不一定就很近，而且所用的分子标记多数为RFLP，有必要找到与目的性状基因紧密连锁的标记，即进行较精密的定位，并将RFLP尽可能转换成以PCR为基础的标记。

2 目的性状的精密定位

标记辅助选择是根据与目的性状基因连锁的标记座位上的等位基因而定的，选择的可靠程度取决于目的性状座位与标记座位的重组频率，因此希望这二个座位间的遗传距离越小越好。同时，倘能在目的基因二侧均找到紧密连锁的标记，则将进一步提高选择的可靠性。

水稻对稻瘟病有很多抗性主基因，其中有3个(*Pi-1*、*Pi-z*^{5} 和 *Pi-ta*)首先用RFLP分别定位在第11、6和12染色体上[13]，*Pi-1* 与RZ536连锁，遗传距离为14.0cM，*Pi-z*^{5} 与RG64紧密连锁，相距仅2.8cM，*Pi-t* 虽与RG869和RZ397紧密连锁，但遗传距离分别为15.4和18.1cM。*Pi-1* 和 *Pi-ta* 与标记的遗传距离较远，而 *Pi-z*^{5} 只在一侧有连锁标记。为了进行精密定位，用感病轮回亲本CO39和3个分别具有 *Pi-1*、*Pi-z*^{5} 和 *Pi-ta* 的近等基因系配组建立 F_2 和 F_3 构成的作图群体，它们分别由160、120和80个株系构成，从每一个已定位的染色体区域至少用9个RFLP标记，用多达30种酶检测亲本的多态性，结果在每一抗病基因二侧均找到了紧密连锁的标记（表1）。

表1　分子标记定位的水稻抗病、抗虫害基因

基　因	性　状　与　供　体		染色体	连锁的标记及距离(cM)		参考文献
Bph-10(t)	抗褐飞虱	*O. australiensis*	12	RG457	3.68	[21]
Gm-2	抗瘿蚊	Phalguna	4	RG329	1.3	[22]
				RG476	3.4	
Gm	抗瘿蚊	Duokang 1	4	Mb-1400	5~10	[23, 25]
Gih	抗叶蝉	ARC 11554	4	RZ262	2.1	[24, 26]
Pi-1	抗稻瘟病	LAC 23	11	Npb181	3.5	[25, 27]
				RZ536	7.9	
Pi-z^5	抗稻瘟病	5173	6	RG64	2.1	[25, 27]
				RG612	7.2	
Pi-ta	抗稻瘟病	Tetep	12	RZ397	3.3	[25, 27]
				RG241	5.2	
Pi-5(t)	抗稻瘟病	Moroberekan	4	RG498	5~10	[11]
Pi-7(t)	抗稻瘟病	Moroberekan	11	RG103	5~10	[11]
Pi-11(t)	抗稻瘟病	窄叶青8号	8	BP127A	14.9	[26, 28]
Pi-12(t)	抗稻瘟病	红脚占	12	RG869	5.1	[14]
RTSV	抗东格鲁球状病毒	ARC 11554	4	RZ262	4.5	[24, 26]
Xa-1	抗白叶枯病	Kogyoku	4	Npb235	3.3	[27]
				Npb197	7.2	
Xa-2	抗白叶枯病	Tetep	4	Npb235	3.4	[27]
				Npb197	9.4	
Xa-3	抗白叶枯病	Chugoku	11	Npb181	2.3	[27]
				Npb78	3.5	
Xa-4	抗白叶枯病	IR20	11	Npb181	1.7	[27]
				Npb78	1.7	
Xa-5	抗白叶枯病	IR1545-339	5	RG556	0~1	[28]
Xa-13	抗白叶枯病	*Long. grain*	8	RZ28	5.1	[29]
Xa-21	抗白叶枯病	*O. longistaminata*	11	RG103	0.1~1cM	[30]

目的性状的精密定位可以用上述扩大作图群体采用更多的探针和内切酶来实现，也可以应用随机引物扩增分别由分离群体中目的性状座位相对等位基因纯合个体组建的近等基因DNA池找到与目的性状座位紧密连锁的RAPD片段。例如，红脚占是我国抗稻瘟病育种中广泛应用的抗源，应用RFLP标记，将它的一个抗病基因定

位于第12连锁群，与RG869和RZ397连锁，但这二个标记在抗病基因的同侧，尽管应用了21个酶，仍未能检测到另一侧标记在构图群体双亲间有多态性，在F_2群体中分别将10株纯合感病植株和10株纯合抗病植株的DNA等量混合，用它们作模板经10碱基对随机引物扩增，找到了与抗病基因紧密连锁的RAPD片段，在由143单株组成的F_2群体中，没有发现该RAPD标记与抗病基因之间的重组[14]。

标记辅助选择中必须应用与目的性状基因紧密连锁的标记，还因为目的性状基因与标记间的重组率在不同群体中是不同的。构图群体往往不是育种群体，因此，标记辅助选择希望使用在育种群体中与目的基因的重组率仍旧是较低的标记。对3个不同F_2群体在第11染色体上10个区间的重组频率进行比较，结果表明，紧密连锁的座位之间的重组频率在不同群体间的差异并不大[15]。用二个具有共同父本的F_2群体分别构建RFLP图谱，群体均含171个单株，比较二个图谱中78个公共标记间的遗传距离，发现二张图谱中相应区间的遗传距离间高度相关[12]，说明紧密连锁的座位在不同群体中的遗传距离变化较小。为了确保标记辅助选择的准确性，比较理想的是在二侧找到与目的基因相连锁的标记，与基因的遗传距离小于5cM。

3 建立以PCR为基础的标记

迄今基因定位的标记，多数为RFLP，这是因为RFLP在多数作物中建立最早，它与众多的限制性内切酶配合，具有较高的多态性检测能力并相当可靠。大多数作物的分子遗传图谱均以RFLP标记为主，因此，一旦建立目的性状与RFLP的连锁，便可以直接将目的性状基因定位在染色体上。但RFLP的检测需要的DNA量较多，检测过程复杂，需要使用同位素或其他复杂昂贵的生化试剂，花费大，还有一定技术要求，难以在育种实践中推广应用。PCR仅需要极少量的DNA作模板，检测灵敏、快速、简单、准确，容易为育种家们接受应用。所以在标记辅助选择中，需要将RFLP转换成以PCR为基础的标记。通常采用的办法是将与目的性状基因连锁的RFLP标记的二端测序，合成一对专一性引物，以这一对引物通过PCR扩增出也与该目的性状连锁的序列，这样一些能用PCR检测的基因组序列称为序标位(STS)。水稻中已建立了一些STS作为界标[16]，现已有一些与目的性状连锁的RFLP转换成STS（表2）。有一些RAPD片段与目的性状连锁，将该片段的二端测序，合成引物，也能建立与目的性状座位连锁的STS标记（表2）。经STS引物扩增所得片段的长度在不同品种间可能不同，即存在扩增子长度多态性(ALP)，这种多态性很可能和原来的RFLP一样，与目的性状连锁，但由于一般的聚合酶扩增片段的长度限于0.5—2kb左右，而RFLP检测到的片段可以很大，ALP和RFLP中多态性的机制不一定相同，ALP就不如RFLP丰富，因此，需要用4个碱基对为识别位点的内切酶酶切扩增产物，产生PCR扩增产物的RFLP(PBR)，从而提高STS的多态性检测能力。用14套STS引物检测35个伊朗水稻种质、3个典型籼稻和2个典型粳稻品种，成对品种间ALP的频率为13%，用9种内切酶酶解，成对品种间BPR的频率为28%[17]。

尽管如此，由于目前与目的性状连锁的STS标记还不多，BPR的频率还是不及RFLP高，所以标记辅助选择还只能将二者结合使用。

4 标记辅助选择实例

在抗病育种中，经常碰到的问题是新育成品种在种植几年以后抗性丧失，将多个不同的抗性基因聚合在一个品种中被认为是建立持续抗性的重要途径之一。但不同抗病基因对测试小种的表现有时是相同的，用常规的方法难以确定不同抗性基因的存在，标记辅助选择在将作用相似的不同基因聚合到同一品种的过程中大有用武之地。已经知道抗白叶枯病基因*Xa-21*和pTA248连锁并且已建立了相应的STS引物(表2)，将带有*Xa-21*的IR24近等基因系IRBB21与不含该基因但含抗虫基因的另一个IR24的近等基因系杂交，对以该STS检测得到的34株纯合抗性的F_2植株，以白叶枯病常规接种方法检测F_3株系以确定F_2植株的基因型，结果表明：31株为纯合

抗病，仅 3 株为杂合抗病，准确率为 91.2%，而已知 pTA248 与 *Xa-21* 的距离为 1.2cM，9 %的误差反映选择群体和定位群体之间的重组频率的变化[18]。在一个以抗稻瘟病基因 $Pi\text{-}z^5$ 二侧的连锁标记的辅助选择中，纯合抗病 F_2 植株的选择准确率达 100%[19]，说明用目的性状基因二侧标记辅助选择可以达到很高的准确率。通过标记辅助选择，在国际水稻研究所、已经获得分别聚合 3 个抗稻瘟病基因和 3 个抗白叶枯病基因的株系。

表 2　与水稻抗病性连锁的 STS

标　记	基　因	染色体	STS 引　物 5′——3′	扩增子长度 (bp)1)	ALP／产生 PBR 的酶	参 考 文 献
RG64	$Pi\text{-}Z^5$	6	CTGCAGTGCAATGTACGGCCAGG CTGCAGTGCAATGTACGGCCAGG	1155	*Hae*Ⅲ	〔19〕
pTA248	*Xa*–21	11	AGACGCGGAAGGGTGGTTCCCGGA AGCGCGGTGTAATCGAAAGATGAAA	1000 700	ALP	〔31〕
RG556	*Xa*–5	5	TAGCTGCTGCCGTGCTGTGC AATATTTCAGTGTGCATCTC	1500	DraI	Bennett; Huang 未发表资料
P265.560	*Pi*–12(*t*)	12	CAGCTGTTCAGTCGTTTG CAGCTGTTCATACAAGAAAT	560	ALP	Lu 等 未发表资料

1）扩增子长度因基因型而异．此处所示为常见的长度。

5 提高标记辅助选择的实用性

对任何性状的基因均可找到与之相连锁的分子标记，因而分子标记可用于任何性状的选择。从上面的实例中可以看到，标记辅助选择能够达到较高的准确性。但单凭这一点、这一方法还难以被广泛应用，为了让广大育种家都能应用这一方法，还有一系列的问题需要解决。

首先，在育种中有相当一部分性状的表型不难检测，不必要标记辅助，即使有些性状需要标记辅助，但真正要育成一个品种，还必须有丰富经验的育种家的判断及多年多点的试种，所以标记只能是辅助，标记辅助选择离不开常规育种，或者说，这二者应该是互补的。根据育种家的意见，除了抗病虫基因的聚合，标记辅助选择首先可以考虑常规方法费时费工（如广亲和性和恢复性）和难以检测而对育种又十分重要的性状（如根部性状）。

其次，目前基因定位工作的进度还不够快，育种家选定准备用标记辅助选择的基因有些尚未定位或连锁并不紧密、育种家拿来就能用的以 PCR 为基础的标记还不多，即使有，也不一定在育种群体的双亲间表现多态。解决这一问题的办法之一是在育种群体内定位目的基因，将定位与标记辅助选择同步进行。在国际水稻研究所，最近发展的新株型水稻，已显示出较高的增产潜力，正在将多种抗病虫性转入新株型中、基因定位和辅助选择将同时进行。

再一个需要解决的问题是降低成本，建立简单规范的操作体系。由于育种群体一般比较大，而且选择必须在水稻生长早期确定。现已建立了一些快速简便的方法，如 DNA 提取，只要用幼叶 1—2 厘米长的叶尖，不须要液氮就能提取[20]，加上用 PCR 检测，一般一个群体能在一星期内完成检测。建立数据库，检测现有与重要性状连锁的标记在育种骨干亲本中的表现，利用基因图谱实验室较好的实验条件，可以为育种家提供直接可用的资料。总之，只要生物技术工作者与育种家围绕育种目标真正结合起来，标记辅助选择将在解决我国人民下个世纪的吃饭问题中发挥作用。

参 考 文 献

1　Causs M A, *et al*. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecfic backcross population. Genetics, 1994, 138: 1251～1274

2 Kurata N, *et al.* A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequenences. Nature Genetics, 1994, 8: 365～372

3 徐吉臣等. 用双单倍体群体构建水稻的分子连锁图. 遗传学报, 1994, 21(3): 205～214

4 Song W, *et al.* A receptor kinase-like protein encoded by the disease vesistance gene, Xa-21. Science, 1995, 270: 1804～1806

5 Zheng K, *et al.* PCR-based marker-assisted selection in rice breeding Discussion Paper Series No. 12 International Rice Research Institute, 1995a, pp. 1～24

6 Zhang G, *et al.* Molecular analysis of introgressed chromosome segments in a set of near-isogenic lines of rice for fertility-restoring genes. Rice Genet. Newslett, 1994a, 11: 147～149

7 郑康乐等. 应用RELP标记研究水稻的广亲和基因. 中国水稻科学, 1992, 6(4): 145～150

8 刘鹰明等. 水稻广亲和基因在RELP图谱上的初步定位. 华中农业大学学报, 1992, 11(13): 213～219

9 Yanagihara S, *et al.* Molecuular analysis of the inheritance of the S-5 locus conferring wide compatibility in indica / japonica hybrids of rice (*O. sativa* L.). Theor. Appl. Genet., 1995, 90: 182～188

10 Zhang Q, *et al.* An RFLP-based genetic analysis of photoperiod sensitive male sterility in rice. Rice Genet. Newslett, 1993, 10: 94～97

11 Wang G, *et al.* RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a duurably resistant rice cuultivar. Genetics, 1994, 136: 1421～1434

12 Lin H, *et al.* RFLP mapping of QTLs for yield and related characters in rice (Oryza sativa L.). Theor. Appl. Genet., 1995, 92: 920～927

13 Yu Z, *et al.* Tagging genes for blast resistance in rice via-lidage to RFLP markers. Theor. Appl. Genet., 1991, 81: 471～476

14 郑康乐等. 应用DNA标记定位水稻的抗瘟病基因. 植物病理学报, 1995, 25(4): 307～313

15 Abenes M L P, *et al.* Orientation and integration of the classical and molecular genetic maps of chromosome 11 in rice. Euphytica, 1994, 76: 81～87

16 Lnoue T, *et al.* Sequence-tagged sites (STSs) as stamderd lanelinarkers in the rice genome. Theor. Appl. Genet., 1994, 89: 728～734

17 Ghareyazie B, *et al.* Abuundance of PCR-based RFLP for maker-aided delection in rice. Rice Genet. Newslett, 1994, 11: 140～142

18 Abenes M L P, *et al.* Selection of bacterial leaf blight resistance plants in the F_2generation via their linkage to molecular markers. Rice Genet. Newsletter, 1993, 10: 120～123

19 Hittalmanni S, *et al.* Development of RCR-based markers to identify, rice blast resistance gene, *Pi-2(t)* in a segregating population. Theor . Appl. Genet., 1995, 91: 9～14

20 Zheng K, *et al.* Rapid DNA isolation for marker-assisted selection in rice breeding. Rice Genet. Newslett, 1995, 12: 255～258

21 Ishii T, *et al.* Molecular taggging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice, *O. sativa* . Genome, 1993, 37: 217～221

22 Mohan M, *et al.* RFLP and RAPD mapping of the rice Gm^2gene that confers resistance to biotype 1 of gall midge (*Orseolia oryza*). Theor. Appl. Genet., 1994, 87: 782～788

23 Katiyar S K, *et al.* Identification of RAPD markers linked to the gene controlling gall midge resistance against all biotypes in China. Rice Genet. Newslett, 1994, 11: 128～131

24 Sebastian L S, *et al.* Molecular mapping of resistance to rice tuungro spherical virus and green leafhopper in rice, phytopathology, 1996, (in press)

25 Mew T V, *et al.* Fine mapping of major genes for blast resistance in rice. Rice Genet. Newslett, 1994, 11: 126～128

26 朱立煌等. 用分子标记定位一个未知的抗稻瘟病基因. 中国科学, 1994, 24: 1048～1052

27 Yoshimara S, *et al.* RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near-isogenic lines of rice bacterial blight vesistance genes, Xa-1, Xa-3 和 Xa-4. Jpn. J. Genet., 1992, 67: 29～37

28 McCouch S R, *et al.* Molecular tagging of a recessive gene Xa-5 for resistance to bacterial blight of rice. Rice Genet. Newslett, 1991, 8: 143～145

29 Zhang G, *et al.* Molecular mapping of bacterial blight resistance gene on chromesome 8 in rice. Rice Genet. Newslett, 1994b, 11: 142～144

30 Ronald P, *et al.* Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight resistance locus, Xa-21. Mol. Gen. Genet., 1992, 236: 113～120

31 Chunwongse J, *et al.* Pregermination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. Theor. Appli. Genet., 1993, 86: 694～698

1996-05-09 收稿, 1996-08-06 修回.