

高等植物功能性分子标记的开发与利用

杨景华¹, 王士伟¹, 刘训言¹, 杨加付², 张明方¹

(¹浙江大学园艺系/园艺植物遗传资源与功能改良实验室/园艺植物生长发育与生物技术农业部重点开放实验室, 杭州 310029; ²温州大学生命与环境科学学院, 温州, 325027)

摘要: 在比较遗传分析中常用的随机 DNA 分子标记及目的基因标记的基础上, 综述高等植物中最新定义的功能性分子标记类型, 即功能性分子标记, 它包括间接类型及直接类型的功能性分子标记。功能性分子标记是建立在关联分析或近等基因系中等位基因的功能性基序中单核苷酸多态性位点基础上的一类新型显性分子标记, 它不依赖于分子遗传作图; 利用该标记可大大提高分子标记辅助选择的效率。

关键词: 功能性分子标记; 随机 DNA 标记; 目的基因标记; 等位基因; 单核苷酸多态性; 高等植物

Development and Application of Functional Markers in Higher Plants

YANG Jing-hua¹, WANG Shi-wei¹, LIU Xun-yan¹, YANG Jiafu², ZHANG Ming-fang¹

(¹Laboratory of Genetic Resources & Functional Improvement for Horticultural Plants, Department of Horticulture, Zhejiang University/Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Hangzhou 310029; ²College of Life and Environment Science, Wenzhou University, Wenzhou, 325027)

Abstract: The authors have reviewed one new kind of molecular marker in higher plants, functional markers (FMs), based on comparisons with random DNA markers (RDMs) and gene targeted markers (GTMs) that are usually applied in genetic analysis. FMs include direct functional marker (DFM) and indirect functional marker (IFM). FMs are derived from polymorphic sites within gene motifs causally involved in phenotypic trait variation, which exhibit dominant genetic characters. FMs are independent of molecular genetic mapping and may enhance the efficiency of marker-assisted selection in crops breeding.

Key words: Functional marker; Random DNA marker; Gene targeted marker; Allele gene; Single nucleotide polymorphisms; Higher plants

遗传标记通过遗传作图最初用于确定基因在染色体上的顺序, 1913 年 Sturtevant 首次在果蝇中采用了 6 个形态学性状完成了第一张遗传图谱^[1], 随后, Sax 等在大豆的研究中利用遗传标记提出质量/数量性状(种子颜色和种子大小)位点的遗传连锁^[2], 如今, 遗传标记被广泛应用于高等植物的基础生物学、育种、基因分离、分子辅助基因渐渗及品种保护等方面的研究^[3]。遗传标记的类型也从最初的形态学标记发展到现在的 DNA 分子标记。尽管形态学标记比较直观, 然而其受环境的影响较大, 数量有限, 并且有些性状

需到植物发育后期才能完成标记, 再加上基因多效性引起的形态标记之间互作影响等不利因素, 使得形态学标记的应用受到了很大限制。DNA 分子标记是以个体间核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 直接在 DNA 水平上检测生物个体之间的差异, 是生物个体在 DNA 水平上遗传变异的直接反映。自 20 世纪 70 年代 Grodzicker 创立限制性酶切片段多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记技术以来^[4], 众多基于 Southern 杂交或 PCR 扩增技术的 DNA 分子标记陆续建立起来并应用于高等植物遗传分析

收稿日期: 2007-11-09; 接受日期: 2008-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助(NSFC30771478)

作者简介: 杨景华(1978-), 男, 山东无棣人, 讲师, 博士, 研究方向为蔬菜种质创新与分子育种。E-mail: yangjinghua@zju.edu.cn。通讯作者张明方(1966-), 男, 浙江湖州人, 教授, 博士, 研究方向为蔬菜种质创新与分子育种。E-mail: mfzhang@zju.edu.cn

中,如 RAPD (random amplified polymorphism DNA)^[5]、SSR (simple sequence repeat)^[6]、AFLP (amplified fragment length polymorphism)^[7]、SNP (single nucleotide polymorphism)^[8]等,另外还有在上述标记基础上开发出来 AP-PCR、ISSR、STS、CAPS、SCAR 等分子标记^[9,10]。此类 DNA 分子标记所检测的多态性在基因组的位置大多为随机分布,因此可以通称为随机 DNA 分子标记 (random DNA markers, RDMs)。RDMs 的发展大大提高了人们对基因组多样性、遗传作图等的研究效率^[11],然而,由于遗传重组引起的 RDMs 与目的等位基因位点之间的遗传连锁问题限制了 RDMs 作为诊断性分子标记的应用^[12]。随着结构及功能基因组学的飞速发展,基于目的基因开发形成的目的基因标记 (gene targeted markers, GTMs) 及功能性分子标记 (functional markers, FMs) 成为一类新型分子标记类型。

1 功能性分子标记的概念

随机 DNA 分子标记基于基因组中随机多态性位点开发而成,目的基因标记基于基因与基因之间的多态性开发而成,而功能性分子标记基于功能基因基序 (motif) 中功能性单核苷酸多态性 (SNP) 位点开发而成。RDMs 与 GTMs 的开发可以不依赖于表型,而基于功能基因基序中单核苷酸多态性位点开发而来的

FMs 则需要与表型直接相关。先前有关来源于功能基因的分子标记在植物育种^[13-15]、生物多样性^[16]及人类遗传^[17,18]研究中已经开始应用,例如,“功能标记”、“目的基因标记”及“诊断标记”等名词出现^[14-16],但是都没有明确提出“功能性分子标记”这个概念。Andersen 和 Lübberstedt 在 2003 年最早定义了功能性分子标记的概念,即与表型相关的功能基因基序中功能性单核苷酸多态性位点开发而成的新型分子标记,功能性分子标记又可以分为直接类型功能性分子标记 (direct functional maker, DFM) 和间接类型功能性分子标记 (indirect functional marker, IFM)^[19]。表 1 中比较了不同类型分子标记的 DNA 来源、多态性位点的功能、功能序列的分析方法、标记开发的费用及标记的有效性等特点,表 1 中可以看出功能性分子标记由于其完全关联功能性基序,在应用上比 RDMs 和 GTMs 更具有优越性^[19]。相对于 RDMs 和 GTMs, FMs 可以不用首先对世代群体作图而直接利用,因此也避免了由于重组引起的遗传信息的丢失,可以更好地表现自然群体或者育种群体的遗传变异。总的来说, FMs 具有以下几个特点: (1) 更有效地固定群体中的等位基因; (2) 有助于控制平衡选择; (3) 有助于筛选自然群体及育种群体中的等位基因; (4) 在育种中有助于组合影响相同或不同性状的等位 FM; (5) 有助于构建连锁的 FM 单倍型。

表 1 不同类型分子标记的标比较

Table 1 Comparison of marker type

标记类型 Marker type	DNA 序列来源 Origin of DNA sequence	多态性位点功能 Function of polymorphic site	分析方法 Method for functional sequence motif characterization	标记开发费用 Marker development costs	标记的有效性 Quality of marker
RDM	未知 Unknown	未知 Unknown	-	低 Low	低 Low
GTM	基因 Gene	未知 Unknown	-	低 Low	中 Low
IFM	基因 Gene	功能基序 Motif	关联分析 Association study	中 Middle	高 Middle
DFM	基因 Gene	功能基序 Motif	近等基因 Isogenic gene	高 High	高 High

RDM: 随机 DNA 分子标记; GTM: 目的基因分子标记; IFM: 间接类型功能性分子标记; DFM: 直接类型功能性分子标记 (参考 Andersen^[19])。下同
RDM: Random DNA marker; GTM: Gene targeted marker; IFM: Indirect functional maker; DFM: Direct functional maker. The same as below

2 功能性分子标记的开发

功能性分子标记的开发首先需要鉴定出群体中与表型相关的功能基因的功能性基序的序列,具有明确基因功能的基因分离是功能性分子标记开发的前提。尽管目前在基因数据库 (GenBank+EBI+DDJB) 登录的基因序列已经有相当大的数量,但是已明确具体基因功能的基因仍然不多,在模式植物拟南芥中(约 25 000

个基因),仅有 10% 的基因明确了具体的功能,在其它物种中,具有明确具体功能的基因相对更少。然而,基于同源序列功能推测的方法,在其它物种中推定的功能基因约为 30%~50%。采用这种同源推测方法及植物基因组的线性关系,已成功鉴定出了大量农艺性状相关的基因^[20-23]。另外,通过利用 RNA 干扰^[24]、T-DNA 和转座子基因标签^[25,26]及基因表达 QTL 作图^[27]等方法也鉴定出了许多功能基因。总之,随着分子遗

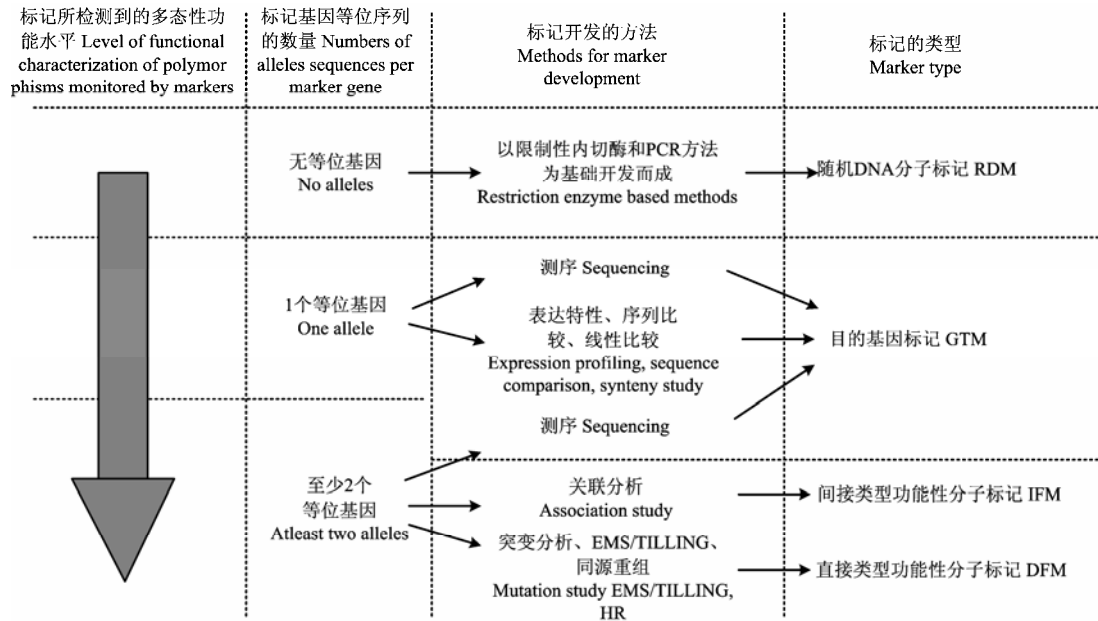
传学、分子生物学与功能基因组学等的发展，越来越多的功能基因被分离及验证。

2.1 间接类型功能性分子标记

多态性的等位序列是功能性分子标记开发的必要条件，然而，迄今为止，大规模基因组序列或表达序列标签主要集中在一个物种中的一个基因型或少数几个基因型中^[28,29]，因此，仅有少数基因可以比较其等位基因的序列多态性^[30,31]。由两个个体同一位点上平均序列分歧决定的核苷酸多样性在物种及种间存在相当大的变异^[32-37]，其中，自花授粉物种的变异远低于异花授粉物种^[38,39]。关联分析方法(association studies)依赖于以基因组中等位基因单倍型的非随机性为基础的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)，关联分析方法可以用来鉴定表型相关的基因和基因内部的功能基序^[30,31]。采用关联分析，除了要鉴定出大量等位序列以外，植物群体表型特点的获得同样非常重要。

准确区分基因内多态性对表型变异的效果要求基因组具有低的 LD 水平，在模式植物拟南芥中，存在 LD 的位点一般在几十 kb 以内，即超过几十 kb 的两位点，由于重组原先的 LD 就会消失^[40]，而在玉米中只有距离小于 1 kb 的位点才有可能存在 LD^[30,41]。因此，在类似玉米低水平 LD 值的物种中，关联分析方法在分离基序中具有非常大的潜力，例如分离与表型相关的核苷酸片断或者插入缺失序列，同时关联分析也可以获得此类基序的等位影响。然而，关联分析在区分单倍型结构中一些表型中性位点的成因时存在局限性^[30]，另外，物种的遗传背景也会影响到关联分析的结果，同时，统计学的方法已经用来控制未知群体的结构^[42]，关联分析方法只提供了序列基序间接或者统计上的证据，因此，这种开发策略得到的功能性分子标记被称为间接类型功能性分子标记(图)^[19]。

2.2 直接类型功能性分子标记



EMS: Ethylmethane sulfonate; HR: Homologous recombination; TILLING: Targeting-induced local lesions in genomes

图 不同类型分子标记描述

Fig. Definition of marker types based on the level of functional characterization

直接类型功能性分子标记可以通过直接比较近等基因系中功能基序的差异。近等基因型可以通过采用 TILLING (targeting-induced local lesions in genomes) 技术筛选大规模群体获得，另外还可以通过同源重组得到 (homologous recombination)。TILLING 技术最早用来筛选模式植物拟南芥经 EMS (ethyl

methanesulfonate) 诱导的突变体，通常为 C/G 到 T/A 的转换，因此，很多靶基因经常会发生无义等位突变^[43]。采用此方法，在豆科植物 (*Lotus japonicus*) 中，每 3 000 株植株中可以检测到一个对于 SYMRK 基因结构域特异性突变。因此，结合表型和 TILLING 的方法可以直接检测到自然或者诱导的突变多态性位点，由于

EMS 可以诱导大量的突变, 目前, 结合 TILLING 方法在作物中的应用非常广泛。此外, 通过遗传转化将等位点转化至近等基因系中可以直接验证基序中多态性位点突变后的功能。但是由于高等植物遗传转化过程中, T-DNA 在基因组中大多为随机插入整合, 位点效应及多点插入等原因可能会影响到覆盖等位基因间的数量表型效应, 这些问题可以通过基因位点目的性同源重组来解决^[44]。总之, EMS 诱变结合 TILLING 的方法是目前最有效的检测等位基因功能基序单核苷酸多态性位点的方法, 这种开发策略得到的功能性分子标记被称为直接类型功能性分子标记 (图)^[19]。

表 2 可用于功能性分子标记开发的候选基因

Table 2 Candidate genes for functional marker development

物种 Species	基因 Genes	性状 Traits	参考文献 References
玉米 Maize	<i>Dwarf8</i>	开花时间 Flowering time	30
	<i>tb1</i>	株高 Plant height	45
谷类植物 Cereals	<i>Dwarf8 orthologs</i>	株高 Plant height	46~48
水稻 Rice	<i>GBSS</i>	品质 Food quality	49
	<i>AOX</i>	低温胁迫 Cold stress	50
	<i>xa-5</i>	稻瘟病 Bacterial blight	51
	<i>Cre3</i>	抗线虫 Nematode resistance	52
小麦 Wheat	<i>Lr10</i>	抗锈病 Leaf rust resistance	53
	<i>Wx</i>	淀粉合成 Granule-bound starch synthase	54
	<i>Pina</i>	谷粒质地 Grain texture	55
	<i>PPO</i>	多酚含量 Polyphenol oxidase activity	56
	<i>Rht</i>	株高 Plant height	46, 57
	<i>Vrn</i>	春化作用 Vernalisation	58, 59, 60
	<i>VFR2</i>	春化作用 Vernalisation	61
油菜 Oilseed	<i>VFR2</i>	春化作用 Vernalisation	61
番茄 Tomato	<i>fw2.2</i>	果实大小 Fruit size	62
西瓜 Watermelon	<i>LCYB</i>	茄红素 Lycopene	63
几种作物 Several plants	<i>NBS-LRR</i>	抗病 Resistant disease	64
几种作物 Several plants	<i>ERF</i> 转录因子 <i>ERF</i> transfer factor	胁迫响应 Stress response	65

图, 不同的杂交群体需要重新进行 RDMs 标记, 而 FM 的应用可以不用事先构建作图群体和遗传图谱而直接应用, 这在构建分离群体亲本材料的选择、系谱选择及近交选择等育种工作中非常方便; 同时, 在杂交育种及复合育种中 FM 可以将功能等位基因整合到一起, 从而防止群体选择和循环选择中有益基因位点的遗传漂移; 此外, FM 还可以通过在不同变种中选择等位基因与表型相关的功能性位点的存在和缺失情况来评价和区分种质。在水稻中, 抗稻瘟病基因 *xa-5* 为隐性遗传, 因此在表型选择抗稻瘟病时速度就非常慢, 常规的分子标记辅助选择存在标记与 *xa-5* 基因不直接连锁和重组后分离的问题, Iyer-Pascuzzi 和 McCouch 通过将 *xa-5* 等位基因中功能性 SNP 位点转

3 功能性分子标记的应用

随着越来越多的功能基因及其等位基因的分离和注解, 功能性分子标记已成为继 RDMs 和 GTMs 之后的又一新型分子标记, 可以大大提高标记的效率。由于 FM 完全与功能基因的功能性基序相关, 因此, 它比 RDMs 和 GTMs 更具有优越性, 表 2 中列出了一些已报道的可能用于开发功能性分子标记的功能基因, 目前这些基因主要集中在一些大田作物中, 如玉米、小麦及水稻等。

在植物育种中, 采用 RDMs 标记时进行 QTL 作

化成 CAPS 标记, 从而开发成功能性分子标记, 可以快速直接筛选带有 *xa-5* 功能性位点的材料和变种, 并且具有 100 % 的可靠性, 大大提高水稻抗稻瘟病育种进程^[51]。尽管目前全球的气候呈现变暖的趋势, 但是在很多情况下, 植物的生长发育仍旧会遇到低温胁迫的影响, 造成生长发育受阻或者减产。高等植物线粒体中存在一条特殊的呼吸途径, 即线粒体交替氧化酶途径, 线粒体交替氧化酶基因在很多情况下被认为与低温胁迫相关, 近年来, 众多研究发现在植物受到环境胁迫时, 线粒体交替氧化酶基因及交替氧化酶的活性明显提高^[50,66-68]。Abe 等研究发现 *OsAOX1a* 基因在不同水稻变种中有一个 SNP 使得该位点编码的氨基酸从赖氨酸(Lys)变成天冬氨酸(Asn), 结果 *OsAOX1a*

基因所编码的蛋白质也从 32 kD 变成 34 kD, 该位点突变与水稻低温胁迫能力相关 (Lys 位点耐低温胁迫, Asn 位点不耐低温胁迫)^[50], 因此, 认为 AOX 基因可能可以用于低温胁迫的功能性分子标记的开发^[68,69]。另外, Bang 等最近在西瓜瓤色的研究中发现, LCYB 基因单核苷酸多态性位点, 在黄瓤西瓜中为 T 位点, 红瓤西瓜中为 G 位点, 其杂合 F1 中 T/G 都存在, 并将这个位点转化成 CAPS 标记, 可以明显区分不同瓤色的西瓜变种^[63]。

FMs 在遗传作图中表现十分优越, 采用 RDMs (或 GTMs) 标记进行遗传作图时, 需依赖于标记与目标基因座的连锁、标记与目标基因座的遗传距离、预期跟踪的基因数目及连锁世代群体的数量, 因此, 表型的确定至少需要进行 1 次标记选择来确定目的基因的存在。然而, 这可以通过 FMs 在回交过程的前期选择来解决。此外, 由于重组的相对缺乏, 许多大的染色体片段在不同世代间传递, 导致许多目的基因与一些不理想的基因一直保持连锁, 尤其是一些性状不太理想 (具有 1 个或少数几个好的性状) 材料作为回交的供体时^[70]。而 FMs 直接来源于功能基因的功能基序, 因此是与目标基因座完全连锁的, 采用 FMs 的前期选择比采用 RDMs 的前期选择具有更高的选择效率。采用 RDMs 标记出的等位基因的数量可能与该基因真正等位基因的数量不一致, 例如, 采用 AFLP 标记进行生物多样性研究中, 一般将相同标记的基因型归为同一类群基因型, 然而, 通常与 AFLP 标记连锁的染色体区域中等位组分存在很大的分歧, 因此, 此类 AFLP 标记就不能精确反映等位基因的真实数量, 而 FMs 可以精确地反映出等位基因真实的多样性^[16]。

4 讨论

尽管已有许多功能基因可以用来开发功能性分子标记 (表 2), 同时网络数据库中也提供了拟南芥 (<http://walnut.usc.edu/>) 和其它物种 (<http://www.grasp-euv.dk>) 的许多等位基因的序列, 但是, 即使在模式植物拟南芥中也只有 10% 的基因被明确注释了功能, 在其它作物中可能低于 5%, 目前被注释了功能的基因也大多是生物学意义的功能, 远远不能满足农艺性状意义的功能。因此, FMs 的开发需要更多具有农艺性状意义的功能基因的分离和验证, 另外, 是否所有生态和农艺性状相关的基因都能检测到有用的等位基因对于 FMs 的开发至关重要, 此外, 即使目的基因的功能被注释和验证, 合适试验材料的选择和通过表型

特点来区分表型遗传效果等因素对于 FMs 的开发同样重要。

间接类型功能性分子标记基于大量表型的关联分子基础上开发而成, 直接类型功能性分子标记基于近等基因系功能基因功能基序的序列测定, 开发的费用相对较高。为了提高直接类型功能性分子标记开发的效率并降低开发费用, 应该首先通过关联分析筛选候选功能基序, 然后再进行近等基因系等位基因功能基序的直接比对。Gao 等通过在引物设计过程中错配引物 3' 端的碱基, 然后通过优化 PCR 反应条件可以检测到单碱基突变位点, 为功能性分子标记的开发提供简便易行的思路^[71]。无论关联分析还是近等基因系标记都需要近交系, 在一些自交不亲和与近交系近交程度较低的物种中, 需要比较异质群体中的功能性等位基因, 结果所能检测范围内的遗传变异会造成功能性分子标记开发相对比较复杂。对于自花授粉、自交亲和的物种, FMs 的开发比严格异花授粉物种容易的多, 但是自花授粉物种的染色体通常表现为单倍型结构, 因此, 在进行关联分析和近等基因比较之前, 首先要获得高度重组自交系。分子标记辅助选择 (marker-assisted selection, MAS) 在育种过程中已表现出较高的效率, 尤其是对一些低遗传力的性状^[72], 然而对多数非主效基因来说, MAS 选择效率大大降低^[73]。对于数量性状, FMs 的开发同样也需要考虑到最合适的基因数目, 通常采用几个关键基因 (key genes) 更方便进行性状控制。总之, FMs 作为一类新型的分子标记, 在将来的植物育种、生物多样性及遗传作图等方面的研究中将会发挥更大的作用。

References

- [1] Sturtevant A H. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, 1913, 14: 43-59.
- [2] Sax K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 1923, 8: 552-560.
- [3] Henry R J. *Plant Genotyping*. CABI Publishing, 2001.
- [4] Grodzicker T, Anderson C, Sharp P A, Sambrook J. Conditional lethal mutants of adenovirus 2-simian virus 40 hybrids. I. Host range mutants of Ad2+ND1. *The Journal of Virology*, 1974, 13(6): 1237-1244.
- [5] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 1990, 18: 6531-6535.

- [6] Cardle I, Ramsay L, Milbourne D, Macaulay M, Marshall D, Waugh R. Computation and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 2000, 156: 847-854.
- [7] Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPDs, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 225-238.
- [8] Wang D G, Fan J B, Siao C J, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J. Large-scale identification mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998: 280: 1077-1082.
- [9] Gupta P K, Varshney R K, Prasad M. Molecular markers: principles and methodology. In: Jain S M. *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, 2002: 9-54.
- [10] Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop M N. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5 (25): 2540-2568.
- [11] Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 2000, 15: 199-203.
- [12] Rafalski J A, Tingey S V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 1993, 9: 275-280.
- [13] Eujayl I, Sorrells M E, Baum M, Wolters P, Powell W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 399-407.
- [14] Hackauf B, Wehling P. Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. *Plant Breeding*, 2002, 121: 17-25.
- [15] Thiel T, Michalek W, Varshney R K, Graner A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106: 411-422.
- [16] van Tienderen P H, de Haan A A, van der Linden C G, Vosman B. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. *Trends in Ecology and Evolution*, 2002, 17: 577-582.
- [17] Mukherjee B, Zhao H, Parashar B, Sood B M, Mahadevia P S, Klinger H P, Vikram B, Achary P M R. Microsatellite dinucleotide (T-G) repeat: a candidate DNA marker for breast metastasis. *Cancer Detection and Prevention Journal*, 2003, 27: 19-23.
- [18] De Young M P, Scheurle D, Damania H, Zylberberg C, Narayanan R. Down's syndrome-associated single minded gene as a novel tumor marker. *Anticancer Research*, 2002, 22: 3149-3157.
- [19] Andersen J R, Lübberstedt T. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(11): 554-560.
- [20] Barnes S. Comparing *Arabidopsis* to other flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5: 128-134.
- [21] Ware D H, Jaiswal P, Ni J, Yap I V, Pan X K, Clark K Y, Teytelman L, Schmidt S C, Zhao W, Chang K, Cartinhour S, Stein L D, McCouch S R. Gramene, a tool for grass genomics. *Plant Physiology*, 2002, 130: 1606-1613.
- [22] Collins N C, Webb C A, Seah S, Ellis J G, Hulbert S H, Pryor A. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1998, 11: 968-978.
- [23] Quint M, Mihaljevic R, Dussle C M, Xu M L, Melchinger A E, Lübberstedt T. Development of RGA-CAPS markers and genetic mapping of candidate genes for sugarcane mosaic virus resistance in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 355-363.
- [24] Denli A M, Hannon G J. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends in Biochemistry Science*, 2003, 28: 196-201.
- [25] Walden R. T-DNA tagging in a genomics era. *Critical Reviews in Plant Science*, 2002, 21: 143-165.
- [26] May B P, Martienssen R A. Transposon mutagenesis in the study of plant development. *Critical Reviews Plant Science*, 2003, 22: 1-35.
- [27] Jansen R C, Nap J P. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics*, 2001, 17: 388-391.
- [28] The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, 408: 796-815.
- [29] Yu J, Hu S, Wang J, Wong G K, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, 296: 79-92.
- [30] Thornsberry J M, Goodman M M, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler E S. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, 2001, 28: 286-289.
- [31] Osterberg M K, Shavorskaya O, Lascoux M. Naturally occurring indel variation in the *Brassica nigra* *COL1* gene is associated with variation

- in flowering time. *Genetics*, 2002, 161: 299-306.
- [32] Small R L, Ryburn J A, Wendel J F. Low levels of nucleotide diversity at homoeologous *Adh* loci in allotetraploid cotton (*Gossypium* L.). *Molecular Biology Evolution*, 1999, 16: 491-501.
- [33] Filatov D A, Charlesworth D. DNA polymorphism, haplotype structure and balancing selection in the *Leavenworthia PgiC* locus. *Genetics*, 1999, 153: 1423-1434
- [34] Shepard K A, Purugganan M D. Molecular population genetics of the *Arabidopsis* CLAVATA2 region. The genomic scale of variation and selection in a selfing species. *Genetics*, 2003, 163: 1083-1095.
- [35] Tenaillon M, Sawkins M C, Long A D, Anderson L K, Gaut R L, Doebley J F, Gaut B S. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Proceedings of the National Academic Science of the USA*, 2001, 98: 9161-9166
- [36] Hagenblad J, Nordborg M. Sequence variation and haplotype structure surrounding the flowering time locus *FRI* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2002, 161: 289-298.
- [37] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, Van Tossell C P, Matukumalli L K, Grimm D R, Hyatt S M, Fickus E W, Yong N D, Cregan P B. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*, 2003, 163: 1123-1134.
- [38] Pollak E. On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing. *Genetics*, 1987, 117: 353-360.
- [39] Baudry E, Kerdelhue C, Innan H, Stephan W. Species and recombination effects on DNA variability in the tomato genus. *Genetics*, 2001, 158: 1725-1735.
- [40] Nordborg M, Borevitz J O, Bergelson J, Berry C C, Chory J, Hagenblad J, Kreitman M, Maloof J N, Noyes Tina, Oefner P J, Stahl E A, Weigel D. The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 2002, 30: 190-193.
- [41] Remington D L, Thomsberry J M, Matsuoka Y, Wilson L M, Whitt S R, Doebley J, Kresovich S, Goodman M M, Buckler E S. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 2001, 98: 11479-11484.
- [42] Pritchard J K, Stephens M, Rosenberg N A, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 2000, 67: 170-181.
- [43] McCallum C M, Comai L, Greene E A, Henikoff S. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology*, 2000, 123: 439-442.
- [44] Hanin M, Paszkowski J. Plant genome modification by homologous recombination. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6: 157-162.
- [45] Doebley J, Stec A, Gustus C. Teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics*, 1995, 141: 333-346.
- [46] Peng J, Richards D E, Hartley N M, Murphy G P, Devos K M, Flintham J E, Beales J, Fish L J, Worland A J, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape J W, Gale M D, Harberd N P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 1999, 400: 256-261.
- [47] Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell*, 2001, 13: 999-1010.
- [48] Chandler P M, Marion-Poll A, Ellis M, Gubler F. Mutants at the *Slender1* locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiology*, 2002, 129: 181-190.
- [49] Ayres N M, McClung A M, Larkin P D, Bligh H F J, Jones C A, Park W D. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94: 773-781.
- [50] Abea F, Saitob K, Miurac K, Toriyama K. A single nucleotide polymorphism in the alternative oxidase gene among rice varieties differing in low temperature tolerance. *FEBS Letters*, 2002, 527: 181-185.
- [51] Iyer-Pascuzzi A S, McCouch S R. Functional markers for xa5-mediated resistance in rice (*Oryza sativa*, L.). *Molecular Breeding*, 2007, 19: 291-296.
- [52] Lagudah E S, Moullet O, Appels R. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat. *Genome*, 1997, 40: 659-665.
- [53] Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublait A, Keller B. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proceedings of the National Academic Science of the USA*, 2003, 100: 15253-15258.
- [54] Murai J, Taira T, Ohta D. Isolation and characterization of the three Waxy genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene*, 1999, 234: 71-79.
- [55] Gautier M F, Aleman M E, Guirao A, Marion D, Joudrier P. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Molecular Biology*, 1994, 25: 43-57.
- [56] Sun D J, He Z H, Xia X C, Zhang L P, Morris C, Appels R, Ma W,

- Wang H. A novel STS marker for polyphenol oxidase activities in bread wheat. *Molecular Breeding*, 2005, 16: 209-218.
- [57] Ellis M H, Spielmeier W, Gale K R, Rebetzke G J, Richards R A. Perfect markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 1038-1042.
- [58] Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academic Science of the USA*, 2003, 100: 6263-6268.
- [59] Yan L, Helguera M, Kato K, Fukuyama S, Sherman J, Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploidy wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 1677-1686.
- [60] Fu D, Szűcs P, Yan L, Helguera M, Skinner J S, Zitzewitz J V, Hayes P M, Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics Genomics*, 2005, 273: 54-65.
- [61] Kole C, Quijada P, Michaels S D, Amasino R M, Osborn T C. Evidence for homology of flowering-time genes *VFR2* from *Brassica rapa* and *FLC* from *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 425-430.
- [62] Nesbitt T C, Tanksley S D. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*. Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*, 2002, 162: 365-379.
- [63] Bang H, Kim S, Leskovar D, King S. Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene b-cyclase (*LCYB*) gene. *Molecular Breeding*, 2007, 20: 63-72.
- [64] Madsen L H, Collins N C, Rakwalska M, Backes G, Sandal N, Krusell L, Jensen J, Waterman E H, Jahoor A, Ayliffe M, Pryor A J, Langridge P, Schulze-Lefert P, Stougaard J. Barley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. *Molecular Genetics Genomics*, 2003, 269: 150-161.
- [65] Singh K B, Foley R C, Oate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5: 430-436.
- [66] Moore A L, Albury M S, Crichton P G, Affourtit C. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in Plant Science*, 2003, 7: 478-481.
- [67] Fiorani F, Umbach A L, Siedow J N. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. *Plant Physiology*, 2005, 139: 1795-1805.
- [68] Arnholdt-Schmitt B, Costa J H, Melo D F. AOX-a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends in Plant Science*, 2006, 11(6): 282-287.
- [69] Arnholdt-Schmitt B. Functional markers and a 'systemic strategy': convergency between plant breeding, plant nutrition and molecular biology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43: 817-820.
- [70] Stam P, Zeven A C. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica*, 1981, 30: 227-238
- [71] Gao Z S, Van de Weg W E, Schaart J G, Van der Meer I M, Kodde L, Laimer M, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen L J W J. Linkage map positions and allelic diversity of two *Mal d 3* (non-specific lipid transfer protein) genes in the cultivated apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110: 479-491.
- [72] Lande R, Thompson R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 1990, 124: 743-756
- [73] Bernardo R. What if we knew all the genes for a quantitative trait in hybrid crops? *Crop Science*, 2001, 41: 1-4.