

DNA 分子标记在甘薯遗传育种中的应用

宋吉轩, 张敏 陈超 (贵州省生物技术研究, 贵州贵阳550006)

摘要 论述了分子标记在甘薯的起源、进化与分类, 图谱构建、遗传多样性分析、品种鉴定、基因定位和辅助育种等方面的应用情况, 并对甘薯的分子育种提出了展望。

关键词 DNA 分子标记; 甘薯; 遗传育种

中图分类号 S531 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)30-13055-02

Application of DNA Molecular Markers in Genetics and Breeding of Sweet Potato

SONG Ji-xuan et al (Biological Technology Institute of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract The application of molecular marks in origin of sweet potato, anagenesis, classification, construction of atlas, analysis of genetic diversity, identification of species, gene mapping and assisted breeding and so on were summarized in this paper, and the prospect of molecular breeding of sweet potato was put up with at one time.

Key words DNA molecular markers; Sweet potato; Genetics and breeding

甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 属于旋花科植物, 起源于中南美洲热带地区, 是我国四大粮食作物之一, 年种植面积达 660 万 hm^2 , 占世界甘薯种植面积的 65.4%, 年产量约 1.5 亿 t, 占世界甘薯总产的 85.9%^[1]。甘薯既是粮食, 又是加工饲料和淀粉的原料, 其茎尖、嫩叶、叶柄还可作为蔬菜鲜食, 兼有粮食作物和经济作物的特点, 且具有产量高、稳产性好、用途广等优点, 对保障我国粮食与能源安全起到了重要作用。

在作物遗传育种中, 利用经典的遗传标记进行作物品种改良已取得一定的进展, 如, 形态标记、细胞学标记和同工酶标记, 然而这些标记数量有限, 很难对它们的基因组进行更详细的研究, 对于复合基因控制的数量性状研究也受到一定的限制。随着分子生物学的发展, 产生了多种基于 DNA 多态性的分子标记技术。由于 DNA 分子标记技术具有不受季节、环境限制, 多态性高等优点, 可利用其进行甘薯的起源、进化和分类分析、种质鉴定、基因定位和遗传图谱构建, 并最终应用到生产实践中。目前, 甘薯育种研究主要是以 PCR 为基础的 RAPD、AFLP 和 ISSR 等分子标记, 多用于以下几方面的研究。

1 甘薯的起源、进化和分类

考古学、语言学、历史学以及植物学研究结果表明, 甘薯起源于美洲, 并在该地区驯化出许多栽培品种, 最近从分子水平上对其进行了进一步的证实。Zhang D P 等^[2]的 RAPD 和 AFLP 分析表明, 南美洲甘薯的遗传多样性高于巴布亚新几内亚的, 美洲中部的甘薯栽培种遗传多样性最高, 表明美洲是甘薯最初多样性和起源中心。Simon 等用 71 个 RAPD 标记分析了世界 6 个地区具代表性的 74 个甘薯品种之间的亲缘关系, 其结果支持甘薯起源于美洲并传到世界各地的假说, 并发现由于非洲和亚洲地区复杂的生态环境和杂交关系, 正在该地形成新的基因池^[3]。贺学勤等利用 RAPD、ISSR 和 AFLP 分子标记对 48 份中国甘薯地方品种进行多态性分析, 支持中国是甘薯的次生多态性中心, 并指出广东是中国

最早的甘薯引入地^[4]。

Shih 等用 8 对 SSR 引物分析 22 个来自中国大陆、中国台湾和日本及由杂交育种、多交育种衍生的甘薯品种。分析表明, 多交衍生品种具有高水平的遗传多样性, 有助于将来获得优良甘薯材料, 大多数地方种与中国大陆和日本材料间的亲缘关系较远, 很可能起源于爪哇和婆罗门地区^[5]。种间杂交实验和染色体组分析技术的结果表明, *I. trifida* 可能是甘薯的祖先种。根据不同分子标记得到的聚类图, 表明 *I. trifida* 与栽培种甘薯有很近的亲缘关系, 而且两者的 - 淀粉酶基因片段中外显子核苷酸序列相似性达 98.8%^[6]。

甘薯组植物包括甘薯及其近缘野生种, 根据自交亲和性、杂交亲和性、形态学和细胞遗传学可以划分为两个群, 即与甘薯杂交亲和的 A 群和不亲和的 B 群。Raja Pakse 等根据不同甘薯组植物上扩增 p- 淀粉酶基因片段中内含子和外显子核苷酸序列变异程度, 从分子水平对甘薯组植物进行了分类, 获得了与前人一致的结果^[6]。根据甘薯的种内交配亲和性, 又可将甘薯划为若干个不孕群, 包括 A L、NP 共两个不孕群和一个亲和群, 每个不孕群受到一对等位基因的控制, 并将该类基因称为 S 基因, 因此, 设计与该类基因紧密连锁的分子标记, 或许可作为一种甘薯不孕群测定的方法^[7]。

2 构建分子标记连锁图

分子标记图谱的构建是通过选择亲本来建立起一系列群体大小适宜的资源家系, 采用多态性好的分子标记检测其在家系中的基因型, 通过对家系中分子标记的连锁定位分析, 构建出遗传连锁图谱, 确定连锁群。

连锁遗传图谱既是遗传研究的重要内容, 又是植物遗传资源收集、保存、育种、定位和克隆目的基因等许多应用研究的理论依据和基础。国际马铃薯中心于 2003 年构建了第 1 张甘薯遗传连锁图, 作图群体是抗感 SPVD 的非洲地方品种 'Tanazania × Bkilaniya' 的 F1 代, 两个亲本分别产生 90 和 80 个连锁群, 共定位了 1 100 个 AFLP 标记, 标记位点间平均图距为 5.9 cM, 缺点是该图谱是显性标记构建的^[8]。Rubens N. Tonita 等利用 AFLP 标记和 AMF (AFLP based mRNA fingerprinting) 标记构建控制甘薯属植物自交不亲和性基因——S 基因的连锁图。实验找到了与 S 基因连锁的 8 个分子标记, 其中 AAM8 标记与 S 基因紧密连锁, 并将 S 基因定位在位于所得

基金项目 贵州省农业科学研究所资助项目。

作者简介 宋吉轩 (1978-), 男, 贵州铜仁人, 在读硕士, 助理研究员, 从事薯类育种、高产栽培技术的研究。

收稿日期 2008-09-01

连锁图上 1.25 cm 的范围内。这些连锁的标记对于从 BAC 载体中筛选和克隆 S 基因,进而研究与甘薯自交不亲和性相关的母方和父方决定子具有很大意义^[9]。吴洁等于 2005 年利用甘薯高淀粉品种绵粉一号与甘薯低淀粉品种红旗四号杂交 F₁ 代分离群体,根据淀粉含量,选择 F₁ 代分离群体中高、低淀粉含量极端类型材料各 23 个构成选择性基因型子群体,构建了包括 21 个 SRAP 标记和 9 个连锁群(母本 4 个连锁群,父本 5 个连锁群)的甘薯 SRAP 连锁图^[10]。

3 遗传多样性分析

种质亲缘关系和种质资源多样性评价是作物育种研究的重要内容,它决定了种质在今后育种实践中的有效利用。阎文昭等在国内首次报道了甘薯品种群体 RAPD 多态性。通过该方法可进行品种聚类分组,在形态特征调查基础上,通过整理应用分子标记分析目前主要推广杂交种的亲本及将来有利用价值的优良亲本的亲缘关系,从而为现阶段甘薯育种实践中减少杂交组合数目、有效利用杂交优势群、提高品种质量和育种效率提供依据。

Zhang DP 等通过 RAPD 标记对南美及巴布亚新几内亚各 18 份甘薯栽培在的遗传变异及遗传多样性进行了分析,结果表明,甘薯在这两个地区间差异显著,说明甘薯栽培在不同的环境中,经过几百年的隔离进化和选择产生了较大的变异。随后在 2004 年对不同地理区域来源的甘薯品种遗传多样性进行了 RAPD 分析,结果表明,甘薯从美洲传入非洲和亚洲后,经过有性杂交和地区环境的长期适应,形成了新的基因池^[2]。

随着分子标记技术的不断开发,新的分子标记不断应用到甘薯遗传多样性分析中。贺学勤等用 RAPD、ISSR 和 AFLP 标记对系谱关系明确的 7 个甘薯品种进行了亲缘关系分析。24 个 RAPD 引物、14 个 ISSR 引物和 9 对 AFLP 引物分别扩增出 173、174 和 168 条多态性带。3 种分子标记在检测甘薯品种间遗传差异上相关程度高,其中 RAPD 与 ISSR 之间的相关系数最大,为 0.932 8。用 ISSR 标记估计的品种间遗传距离为 0.128 6 ~ 1.093 2,平均 0.488 3,大于其余 2 个标记的估计值。3 种分子标记皆可揭示甘薯品种的亲缘关系,其中 ISSR 标记产生的聚类图与系谱图最吻合,认为 ISSR 标记更适于分析甘薯品种的亲缘关系^[11]。

4 品种鉴定

分子标记能对整个基因组 DNA 碱基序列的变化进行分析,通过电泳谱带产生 DNA 指纹。同一物种的各个品种间存在大量的多态性标记,某一品种具有区别于其他品种的独特标记,即一些特异性 DNA 片段的组合称为该品种的“指纹”,各品种独特的指纹片段构成该物种的 DNA 指纹库。DNA 指纹不仅可以用于品种鉴定,也可以为杂交种真伪鉴定提供可靠的证据。同时可通过检测品种是否具有该品种特有的标记指纹片段对 F₁ 代杂交种纯度进行鉴定,对种子质量进行监测。

Arthur Q V 应用 RAPD 标记对甘薯品种“Jewel”在美国 8 个州种植的无性系进行了分析,发现 8 个无性系中 5 个的多态性谱带在 7.1% ~ 35.7%,表明 RAPD 标记可以检测出无性系中的变异^[12]。之后对不同甘薯品种无性繁殖过程中不同

来源的芽产生的变异进行了 RAPD 分析,结果表明,用分生组织进行无性繁殖比用不同芽进行无性繁殖更能保持基因型的一致。王晶姍等用 PEG 融合方法融合甘薯(*I. batatas*)品种元气和第二群近缘野生种 *I. triloba* 的原生质体,并将融合原生质体进行培养,得到了再生植株。提取再生植株 DNA 进行 RAPD 分析,结果证实再生植株中确有 4 株为两亲本体细胞杂交种,与形态学观察、染色体数分析结果相一致^[13]。

5 基因定位与辅助育种

分子标记辅助选择就是利用目标基因与分子标记之间的紧密连锁关系,对目标性状进行间接选择。如果目标基因与某个分子标记紧密连锁,那么通过对分子标记基因型的检测,就能获知目标基因的基因型。

在我国,对甘薯危害较为严重的茎线虫病,是由腐烂茎线虫引起的,主要危害甘薯的块根,造成畸形或腐烂,也危害地上部造成局部畸形。由于轮作防病的局限性和药剂使用的污染性,抗病品种的选育显得尤为重要。传统的鉴定方法易受自然条件和人为管理因素的影响,且周期长,对于不结块根的野生种不适用,分子标记辅助不受上述因素干扰,可以简便、快速和准确的对抗茎线虫病品种鉴定。Ukoskit 等应用 BSA 法,通过甘薯抗根结线虫与不抗的亲本杂交产生的 F₁ 代的 71 个个体,建立抗/感池,在 760 个 RAPD 随机引物中获得 9 个在抗/感池中有多态性的引物,其中引物 OH_{SISDD} 的片段在抗池有,而在感池无,根结线虫抗性基因的重组率为 0.242 1 ± 0.05 7^[14]。郭金平等采用甜菜抗线虫病基因序列 H1PTDI 设计引物,通过 PCR 扩增,获得 1 对特异性引物可用于甘薯抗线虫病品种的筛选^[15]。袁照年等应用 RAPD 技术筛选了 320 个随机引物,找到 1 个引物 SI20-500 在抗感池间扩增出了多态性谱带,可以作为抗型薯瘟基因的连锁标记^[16]。潘大仁等提取具有线虫病抗性的金山 25 甘薯的全部 DNA,并以甜菜抗线虫病基因(H1pro)序列设计 PCR 引物,以金山 25 的 DNA 为模板,经扩增后得到一条特异性片段。序列分析表明,它与甜菜的 H1pro 基因具有一定同源性,因此,可以利用 H1pro 基因分离出完整的甘薯抗线虫病基因,进而以该基因设计抗线虫病分子标记,筛选抗线虫病品种,也可以通过转基因技术培育出具有高抗性的转基因甘薯^[17]。

6 展望

分子标记技术的发展对植物、微生物进行遗传操作和改良提供了可能性,显示出了广阔的应用前景。DNA 分子标记以其独特的优越性决定了它具有更高的可靠性和高效性,更容易从分子水平上去研究物种的亲缘关系、种质资源保存、构建图谱及辅助育种等。但目前还存在着一些问题,如实验费用偏高、步骤较繁琐、实验过程要接触危险药品等。相信随着技术的不断完善,分子标记技术将会更加安全、快捷,它将与基因组学和育种、检测程序更加紧密地结合,成为挖掘及培育甘薯新种质,新资源的重要工具。

参考文献

- [1] 贺学勤,刘庆昌.分子标记在甘薯育种中的应用[J].内蒙古农业大学学报,2004,25(4):125-127.
- [2] ZHANG DP, CHISTAN M, HUAJIANZ, et al. RAPD variation in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from South America and Papua New Guinea[J]. Genet Resour Crop Evol, 1998, 45: 271-277.

41%~60%的猪场有15家,占19.76%;抗体阳性率为61%~80%的猪场有4家,占5.26%;抗体阳性率为81%~100%的猪场有16家,占21.05%。按照抗体阳性率大于75%为猪群免疫合格,则有20家达到免疫合格标准,占所监测猪场26.32%。由此表明,鄂西北地区各猪场间的蓝耳免疫效果差异大,呈现群体免疫不合格多(73.77%)、合格少(26.23%)等特点,做好抗体免疫监测意义十分重大。

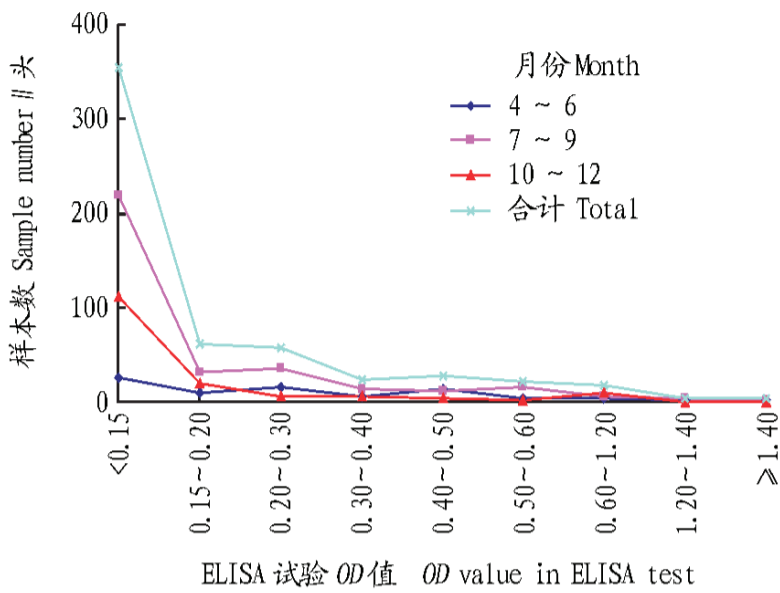


图1 鄂西北地区规模化猪场2007年4~12月份蓝耳病毒抗体ELISA值分布

Fig.1 Distribution of ELISA of large scale pig farm in Hubei Province northwestern region from April to December in 2007

表1 鄂西北地区2007年猪蓝耳病毒抗体不同阳性率区间猪场分布

Table 1 Hg farm dstrbution of different positive rate intervals in Hubei Province northwestern region in 2007

月份 Month	检测猪场 总数 Testing pig farm number	不同阳性率(%) 区间分布猪场数 家 Hg farm number with different positive rate intervals					
		0	1~20	21~40	41~60	61~80	81~100
4~6	12	1	1	1	2	1	6
7~9	42	16	3	5	9	3	6
10~12	22	12	0	2	4	0	4
合计 Ttd	76	29	4	8	15	4	16

(上接第13056页)

- [3] SIMON TEMPLAR G CHAKI, MARIA BEREMMI, ZHANG D P, et al. Genetic diversity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) in relationship to geographic sources as assessed with RAPD markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2003, 50: 429-437.
- [4] 贺学勤, 刘庆昌, 王玉萍, 等. 中国甘薯地方品种的遗传多样性分析[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(2): 250-257.
- [5] SHHY H, YUTT, HIAO FL. Application of simple sequence repeats in determining the genetic relationships of cultivars used in sweet potato ploy cross breeding in Taiwan[J]. *Siencia Horticulurae*, 2002, 93: 215-224.
- [6] RAJAPAKSE S, NILMALGODA S D, MOLNAR M, et al. Phylogenetic relationships of the sweet potato in ipomoea series Batatas (*Xanthoiviaceae*) based on nuclear 8-amyase gene sequences[J]. *Mil Phylogenet Evid*, 2004, 30(3): 623-632.
- [7] 陈凌云, 刁英, 杨新笋, 等. DNA分子标记技术在甘薯遗传育种研究中的应用[J]. *安徽农学通报*, 2006, 12(9): 40-43.
- [8] KRIEGER A, CERVANTES J C, BURG K, et al. A genetic linkage map of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) based on AFLP markers [J]. *Mil Breed*, 2003, 11: 169-185.
- [9] RUBENS NT, KAZUYO F, SYUKOT, et al. Genetic mapping of AFLP/AMF-derived DNA markers in the vicinity of the self-incompatibility locus in ipomoea

3 结论与讨论

(1) 在受检的572份血清中,阳性数217份,总体阳性率37.94%。其中,抗体弱阳性样本143份,占25.00%,抗体强阳性样本74份,占12.94%。在受检的76家猪场中,群体免疫合格率在75%以上的有20家,占26.32%。由此可见,鄂西北地区蓝耳抗体免疫状况不容乐观,应引起养殖管理部门的高度重视,加强蓝耳病的积极预防。

(2) 据调查,2007年4~9月鄂西北地区许多猪场暴发高致病性蓝耳病,猪场全群暴发、猝不及防,给养猪业带来沉重的打击。抗体监测结果表明,群体免疫不合格猪场的发病率很高,在70%以上。因此,疫苗的适时接种和抗体的监测意义显得尤为重要。

(3) 国内许多文献资料报道,蓝耳与猪瘟、圆环、附红体等传染病可混合感染^[1-3]。这些疾病的混合感染在鄂西北许多发病猪场屡屡存在。根据鄂西北地区疫病的流行情况,加强相关疫病的防控,构建完整的生物安全体系刻不容缓。

(4) 对于高致病性蓝耳病的预防,建议采用灭活疫苗进行。方法:母猪在产前1个月用高致病性猪蓝耳病灭活油佐剂疫苗4 ml/头免疫;种公猪每隔6个月用高致病性猪蓝耳病灭活油佐剂疫苗免疫(4 ml/头);23~25日龄的仔猪用高致病性猪蓝耳病灭活油佐剂疫苗免疫(2 ml/头),4周后加强免疫1次效果更好^[4]。

(5) 加强养殖场的饲养管理,适当使用抗生素防止继发感染,并在饲料或饮水中添加电解多维、黄芪多糖、大黄苏打类药,减少猪只的应激。在疾病暴发时期尽量减少人员出入,对需要出入养殖场人员进行严格消毒。

参考文献

- [1] 薛永平, 薛国华, 王大维. 猪圆环病毒和蓝耳病混合感染的诊治[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2004(5): 83.
- [2] 杨宗照, 张书霞, 谷根林. 浙江省某规模场猪蓝耳病和猪瘟合并感染的诊断[J]. *中国预防兽医学报*, 2002(3): 72-73.
- [3] 曹亚丹, 温夫娟, 张建农. 猪附红细胞体病与蓝耳病混合感染的诊断与防治[J]. *畜禽业*, 2004(4): 27-28.
- [4] 邱立新, 郑杰. 高致病性猪蓝耳病的临床诊断与防治[J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(1): 114-115.
- [5] *trifida* [J]. *Sex Part Report*, 2004, 16: 265-272.
- [10] 吴洁, 谭文芳, 何俊蓉, 等. 甘薯SRAP连锁图谱构建淀粉含量QTL检测[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(6): 841-845.
- [11] 贺学勤, 刘庆昌, 瞿红, 等. 用RAPD, ISSR和AFLP分析系谱关系明确的甘薯品种的亲缘关系[J]. *作物学报*, 2005, 31(10): 1300-1304.
- [12] ARILLUR Q V, LABONIE D R. Genetic variation among sweet potato propagated through root and storage root yield in "Jewel", sweet potato clones [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1995, 120(5): 734-74.
- [13] 王晶珊, 孙世孟, 王维华, 等. 甘薯同一不亲和群内品种间体细胞杂交[J]. *植物学通报*, 2004, 21(3): 306-311.
- [14] UKOSKIT K, THOMPSON G, WATSON C E, et al. Identifying a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker linked to a gene for root knot nematode resistance in sweet potato [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1997, 122(6): 818-821.
- [15] 郭金平, 潘大仁. 甘薯线虫病品种抗性的PCR检测[J]. *作物学报*, 2002, 28(2): 167-169.
- [16] 袁照年, 陈选阳, 张招娟, 等. 甘薯抗I型薯瘟病的RAPD标记筛选[J]. *江西农业大学学报*, 2005(5): 861-863, 938.
- [17] 潘大仁, 陈观水, 周以飞, 等. 甘薯抗线虫病相关基因片段克隆及序列分析初步研究[J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2006, 35(1): 56-59.