

# RAPD 分析技术在小麦分子育种中的应用

李静雯, 欧巧明, 张正英<sup>\*</sup> (甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃兰州 730070)

**摘要** 针对 RAPD 分析技术在小麦分子育种研究中所出现的具体问题, 对其在小麦遗传变异分析、目的基因的标记与定位、外源染色体的检测、品种鉴定、遗传图谱的构建、近缘种属间的遗传关系与遗传多样性研究等方面的最新进展和应用进行了综述, 为小麦分子标记辅助选择育种等相关研究提供有益的借鉴。

**关键词** RAPD; 小麦; 分子育种; 分子标记

**中图分类号** S512 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)23-09873-02

## Applications of RAPD in Wheat Molecular Breeding

LI Jing-wen et al (Biotechnology Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070)

**Abstract** According to the concrete problems in the application of RAPD technique in wheat molecular breeding, the latest development and application in several aspects were reviewed, such as wheat genetic variation analysis, the marking and orientation of interest gene, detection of extrinsic chromosome, identification of breed, construction of genetic map, genetic relationship and genetic diversity of related species, which offered useful references for correlative research on wheat molecular marker assisted selection.

**Key words** RAPD; Wheat; Molecule breeding; Molecular marker

小麦基因组较大, 染色体之间存在部分同源性, 容易产生非特异性扩增, 在一定程度上限制了 RAPD 分析技术在小麦分子育种中的应用。但目前, RAPD 技术通过对反应条件和检测手段的不断改进, 重复性和多态性已大大提高, 成本开始下降。现已在作物分子标记辅助育种, 尤其是小麦的遗传变异分析、目的基因的标记与定位、外源染色体的检测、品种鉴定、遗传图谱的构建、小麦近缘种属间的遗传关系等分子标记育种方面得到了广泛应用, 取得很大进展, 定位了许多有价值的目标性状基因, 为鉴定和筛选目的基因提供了一种新方法。

笔者针对 RAPD 分析技术在小麦分子育种研究中所出现的具体问题, 对其在小麦分子标记辅助选择育种方面的最新进展和应用进行了综述, 以为小麦分子育种及相关研究提供有益的借鉴。

### 1 外源染色体片断及易位系的检测

RAPD 分析技术的出现, 为从分子水平上探讨外源 DNA 导入和引起变异的遗传机制提供了可能。由于 RAPD 技术是以 DNA 序列的多态性为基础, 虽然目前 RAPD 反应所扩增产出的特异片段多为重复序列, 因而难于转化为 RFLP 探针<sup>[1]</sup>。但不同染色体和染色体组之间的差异很大部分也是由这些重复序列引起的, 因此用 RAPD 技术不仅可以追踪远缘杂交中的外源基因, 鉴定和标记外源染色体片段、易位系和所携带的抗性基因, 还可研究近缘种属间的遗传关系, 这只需考查同一种随机引物扩增 DNA 片段的多态性变化, 就可以鉴别出不同材料间核酸分子水平上的差异。

外源 DNA 导入受体植物后可以产生大量的性状变异, 且多数变异性状是供体和受体都没有的。通过 RAPD 检测发现变异体上往往出现与供体相同的“特异带”, 供体和受体都没有而变异体特有的“变异带”, 以及受体有而变异体没有的“缺失带”3 种多态性 DNA 带, 以此来说明外源 DNA 的导

入是否引起了受体基因组 DNA 分子结构的变化。

裴新梧等将高粱 DNA 导入小麦后进行 RAPD 检测发现, 导入后代的基因组出现多态性, 并具有供体特异性带<sup>[2]</sup>。王黎明将外源 DNA 导入高粱后, 用 RAPD 技术检测发现在 RAPD 扩增产物中出现多态性<sup>[3]</sup>。郑红军等用 RAPD 技术检测了将外源 DNA 转入普通小麦的后代矮秆变异体, 有 5 个引物检测出了 DNA 的多态性<sup>[4]</sup>。雷勃钧等用 RAPD 技术对供体、受体和转化后代的总 DNA 提取物进行了检测, 证明在转化后代的 DNA 分子内存在着受体没有而供体有的 DNA 序列<sup>[5]</sup>。伍玲等以小麦、玉米等为外源 DNA 供体转导紫稻后, 经过 RAPD 检测发现, 有 6 个引物扩增出了有差异的多态性 DNA 片段<sup>[6]</sup>。上述研究均已证明 RAPD 技术应用于外源 DNA 导入后代的变异系检测是切实可行的。

鲍晓明等用 40 个引物对普通小麦、天兰冰草及小冰草易位系进行 RAPD 分析, 确证了小冰草中含有冰草染色体片段<sup>[7]</sup>。毛龙等用 RAPD 技术在小麦-黑麦易位系中扩增出黑麦特异片段 OPE1221500<sup>[8]</sup>。Iqbal 等用 RAPD 技术, 在 2 组近等基因系 (Chaisholom 和 Arkan) 上检测到了黑麦 1RS 染色体上的特异片段 OPR19-1350<sup>[9]</sup>。Francis 等用集团分离法 (BSA) 从 413 个引物中找到 1 个能特异扩增黑麦片段的引物 OPH20, 并将其之转换为 STS 标记, 确认该片段是一个未知的散布重复序列<sup>[10]</sup>。另外, 陈建莉等<sup>[11]</sup>、孙其信<sup>[12]</sup>、King 等<sup>[13]</sup>均已用 RAPD 技术得到的特异标记, 对相关基因进行了定位。

### 2 目的基因的标记与定位

由于 RAPD 技术可以运用的引物很多, 可对整个基因组进行分析, 寻找 2 组 DNA 样品间的多态性差异, 从而得到与此差异区域相连锁的遗传标记。因此可以用 RAPD 技术定位在某一特定 DNA 区域内的特定目标基因。

利用 RAPD 技术进行小麦相关目标基因的定位, 根据样品来源可分为 2 种方法, 一是近等位基因系的基因定位; 二是利用对目标基因有分离的 F<sub>2</sub> 群体进行基因定位。

**2.1 近等位基因系的基因定位** 近等位基因系 (NIL) 除了目标基因所在区域同轮回亲本不同外, 其余性状大部分都同

**基金项目** 甘肃省科技攻关项目“小麦生物技术育种及种质创新研究” (GS035-A41-001-03)。

**作者简介** 李静雯 (1979-), 女, 甘肃榆中人, 硕士, 研究实习员, 从事基因工程在作物育种中的应用研究。<sup>\*</sup>通讯作者。

**收稿日期** 2008-06-02

轮回亲本相同,因此可以利用 RAPD 技术定位目标基因。

李松涛等利用 RAPD 技术对小麦抗白粉病基因 *Pm4a* 的近等基因系进行了分析,筛选出 3 个有多态性的引物,并推测其中 2 个标记与该抗性基因连锁,从而证明了用 RAPD 技术进行基因定位是完全可行的<sup>[14]</sup>。Procunier 等用近等基因系结合 DGGE 找到了分别与抗锈基因 *Lr29* 和 *Lr25* 紧密连锁的 2 个标记<sup>[15]</sup>。Schachermayr 等<sup>[16-17]</sup>利用近等基因系找到 1 个与抗叶锈病基因 *Lr24* 完全连锁的 RAPD 标记(OPJ-09)。Dweikat 等用近等基因系结合 DGGE 技术和双引物法找到 1 个与抗麦秆蝇基因 *H9* 连锁的 RAPD 标记<sup>[18]</sup>。Demeke 等利用近等基因系找到 1 个与抗腥黑穗病基因 *Bt-10* 紧密连锁和 1 个与对应感病等位基因松散连锁的 RAPD 标记<sup>[19]</sup>。

**2.2 目标基因有分离的 F<sub>2</sub> 群体的基因定位** Michelmor 等提出应用混合分离个体分析法(BSA)可进行目标基因有分离的 F<sub>2</sub> 群体的基因定位。Qi 等用 RAPD 分析技术对小麦抗白粉病易位系的 F<sub>2</sub> 分离群体进行检测,并用筛选出的多态性引物 OPH17 在所有抗病个体中扩增出 1 条长约 1 900 bp 的抗白粉病基因 *Pm-1* 连锁的特异片段,而所有感病个体中无此带<sup>[20]</sup>。Hartl 等利用 BSA 法找到 1 个与小麦抗白粉病基因 *Pm18* 连锁的标记<sup>[21]</sup>。在国内,宋书娟等首次运用 RAPD 标记对子群体的分化进行了研究<sup>[22]</sup>。朱其洪等<sup>[23]</sup>、王京兆等<sup>[24]</sup>分别用 RAPD 技术获得 1 个与 BYDV 抗性基因连锁的分子标记和与光敏核不育基因 PGMS 连锁的分子标记。

### 3 小麦近缘属种间的遗传关系研究

不同小麦品种间虽然同源成分很高,但即使是亲缘关系很近的物种,染色体组总是存在一定的差异,因而 RAPD 分析技术可以直接从 DNA 分子水平进行研究,在对物种缺乏分子生物学研究的条件下,对不同小麦品种的核 DNA 进行 RAPD 扩增的多态检测,再根据电泳图谱进行统计分析,揭示了它们品种间和品种内的亲缘关系。

Joshi 等对 15 个小麦品种的核 DNA 进行了 RAPD 扩增,得到了 109 条特异片段,其中 7 条具多态性,结合其他方法,建立了品种遗传关系树状图,并用 RAPD 技术检查了野生小麦和栽培四倍体小麦的关系<sup>[25-26]</sup>。Wei 等用 RAPD 分析技术对小麦簇内代表 8 个不同居群的 22 个物种进行分析,结果获得了 29 个对属特异和 11 个对物种特异的片段,揭示了它们之间的亲缘关系<sup>[27]</sup>。Dhaliwal 等通过 RAPD 技术揭示了品种间和品种内的亲缘关系,将野生一粒小麦的 2 个材料分在不同组中,这与前人的报道相似<sup>[28]</sup>。He 等在源于一粒杂交种的重组自交群体中,用双引物法检验出了多态性,并且特异片段在群体中的分离情况符合孟德尔比例<sup>[29]</sup>。

### 4 品种(系)鉴定及纯度检测

任何亲缘关系很近的物种,其 DNA 指纹都具有不同程度的个体特异性,因此 RAPD 技术可以用于品种鉴定、纯度检测以及区分真假杂交种。

RAPD 标记一般为共显性标记。在理论上,杂种 F<sub>1</sub> 与亲本之一的带型有可能完全一致,若单引物无法区别杂种和亲本时,可分析 2~3 个引物,以区别真假杂种和混杂类型。

鲍晓明等<sup>[7]</sup>、李丽等<sup>[30]</sup>已分别用 RAPD 技术进行了 2 个小冰麦易位系和杂交种纯度鉴定,结果显示大部分的

RAPD 标记可以在不同的 PCR 仪上和不同来源的 *Taq* 酶的条件下得到,从而证明 RAPD 分子标记技术对鉴定小麦间亲缘关系极近的杂交种纯度是真实可靠的。目前,用 RAPD 技术进行小麦品种纯度和杂种纯度检验的相关报道还比较少,相信不久也会得到广泛的应用。

### 5 构建遗传图谱

RAPD 标记用于遗传作图(Genetic Map)是从 1991 年开始的。理论上,RAPD 标记是无限的,而且在端粒、重复序列及 RFLP 标记区都可找到 RAPD 位点,可以做出很密集的遗传图谱来。但因为所得标记多来源于基因组的重复 DNA 序列,这就限制了将该标记转化为 RFLP 探针的可能,从而无法用来构建小麦的连锁遗传图<sup>[1]</sup>。目前,因为染色体分辨技术、RAPD 及 DNA 分析技术的发展,大量的 RAPD 标记被筛选出来,大大促进了遗传连锁图构建的发展,可以进行部分遗传作图。

### 6 总结

RAPD 分析技术经历了近 10 年的发展,已在小麦等农作物分子育种方面取得了一系列可喜的成绩,其可靠性得到了广泛的认可。现在 RAPD 技术克服了以往的许多缺点,重复性和多态性都有提高。相信随着分子生物学的发展以及模板 DNA 获得的更加简便、快速,反应条件的优化和检测手段的改进,加之用 RAPD 方法大规模自动化分析样品成为可能,将大大加快分子标记辅助选择育种和其他有关应用研究的步伐,对小麦等作物的分子遗传标记领域产生重大影响。

### 参考文献

- [1] DEVOS K M, GALE M D. The use of random amplified polymorphism DNA markers in wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 84: 567-572.
- [2] 裴新梧, 崔凯荣, 孔英珍. 导入高粱 DNA 选育丰产、抗逆小麦新品系及其 RAPD 分子验证[J]. *兰州大学学报*, 1996, 35(2): 131-135.
- [3] 王黎明. 外源 DNA 导入高粱及其后代的 RAPD 分子验证[J]. *中国农学通报*, 2002, 18(3): 19-21.
- [4] 郑红军, 于元杰, 尹承俯. 外源 DNA 导入小麦的 RAPD 验证及遗传分析[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(4): 758-765.
- [5] 雷勃钧, 李希臣, 卢翠华, 等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 分子验证[J]. *中国科学(B辑)*, 1994, 24(6): 596-601.
- [6] 伍玲, 李平, 刘熔山. 外源导入水稻的变异材料随机扩增多态性分析[J]. *西南农业学报*, 1998, 11(4): 28-32.
- [7] 鲍晓明, 黄百梁, 李松涛, 等. 用 RAPD 技术鉴定两个小冰麦易位系[J]. *遗传学报*, 1993, 20(1): 81-87.
- [8] 毛龙, 胡含, 朱立煌, 等. 应用 RAPD 分析一个抗条锈病的小麦-黑麦易位系[J]. *科学通报*, 1994, 39(22): 2087-2090.
- [9] IQBAL M J. Identification of the 1RS ryechromosome segment in wheat by RAPD analysis [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91: 1048-1053.
- [10] FRANCIS H A. Conversion of a RAPD generated PCR product, containing a novel dispersed repetitive element into a fast and robust assay for the presence of ryechromatin in wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90: 636-642.
- [11] 陈建莉, 薛秀庄. 用 Landon 二体代换系建立小麦染色体 RAPD 标记[J]. *遗传学报*, 1996, 23(1): 32-39.
- [12] 孙其信. 节节麦 D 染色体组特异 RAPD 标记[J]. *中国农业大学学报*, 1996, 1(1): 34-36.
- [13] KING I P. Characterization of *Thinopyrum bessarabicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and genomic in situ hybridization [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 86: 895-900.
- [14] 李松涛, 张忠延, 王斌, 等. 用新的分子标记方法(RAPD)分析小麦抗白粉病基因 *Pm4a* 的近等基因系[J]. *遗传学报*, 1995, 22(2): 103-108.

表 3 螺丝壳鹅掌楸种群静态生命表  
Table 3 The stable life style of *Liriodendron chinense* population luosike

大小级 Size class	区间长度 m Interval length	各区间存活数 $X_x$ Survival number of each interval	各区间存活 数标准化 $L_x$ Survival number standardization of each interval	存活百分 数//% Survival percentage	各区间死亡率 标准化 Mortality standardization of each interval	死亡率 Mortality	$\ln X_x$	$\ln L_x$	区间致死力 Interval mortality
$S_1 \& S_2$	$H: 0 \sim 1.20$	86	10 000	45.74	2 674	0.26	4.45	9.21	0.31
$S_3$	$D: 0.01 \sim 0.20$	63	7 326	33.51	3 140	0.43	4.14	8.90	0.56
$S_4$	$D: 0.21 \sim 0.45$	36	4 186	19.15	3 953	0.94	3.58	8.34	2.89
$S_5$	$D: 0.46 \sim 0.80$	2	233	1.07	117	0.50	0.69	5.45	0.69
$S_6$	$D > 0.80$	1	116	0.53	116	1.00	0	4.75	

状极其危险,如不加以重视和保护,可能会导致该种群消亡。

威胁该种群的主要原因有 3 方面:在结实中具胚率极低,植被破坏使幼苗正常生长发育所依赖的环境丧失和人为过度的砍伐。因此,要保护好该种群,主要解决后 2 个致危因素。首先,要加强宣传教育,让当地居民认识保护植被的重要性;其次,严禁人为砍伐树木,破坏植被;第三,在调查中发现,多数繁殖株是当地的坟山树或者是居民的自留山树和风景树,有不能砍伐且不能剃枝的传统习俗,而被保存了下来。可利用这一习俗,对该种群加以保护。但要想提高该种群的更新能力和种群增长力,最关键还是从综合保护的角度,保护这一物种生存的植被环境和严禁人为砍伐。

笔者从都匀市林业局得到消息,每年政府将拿出一部分资金,对螺丝壳鹅掌楸分布区内的所有鹅掌楸进行清点登

记,责任到户进行保护,严禁砍伐,开始启动这一地区重要植物资源(以鹅掌楸为主)的综合保护工程,打算与附近四方潭景区连接成片,建立自然保护区,这将会对该种群的保护和发展带来希望。

#### 参考文献

(上接第 9874 页)

- [1] 郭治友. 都匀市螺丝壳水源林保护区现存珍稀濒危植物鹅掌楸天然分布[J]. 黔南民族师范学院学报, 2003, 23(3): 34-36.
- [2] 黔南布依族苗族自治州史志编纂委员会. 黔南布依族苗族自治州志·地理志[M]. 贵阳: 贵州民族出版社, 1986: 35-193.
- [3] 李先琨. 濒危植物元宝山冷杉与南方红豆杉种群生态学研究[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 87-96.
- [4] 赵学农, 刘伦辉, 高圣义, 等. 版纳青梅种群结构动态与分布格局[J]. 植物学报, 1993, 35(7): 552-560.
- [5] 李性苑, 李旭光, 李东平. 贵州雷公山秃杉种群生态学研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 27(3): 334-338.
- [6] 宋书娟, 李雅轩, 郭平仲, 等. 小麦异交群体长期选择早代的 RAPD 多态性分析[J]. 首都师范大学学报, 1999, 20(3): 53-61.
- [7] 朱其洪, 贾旭, 王京兆, 等. 用 RAPD 方法获得与小麦 BYDV 抗性基因连锁的分子标记[J]. 科学通报, 1995, 40(19): 1709-1801.
- [8] 王京兆, 王斌, 徐琼芳, 等. 用 RAPD 方法分析水稻光敏不育基因[J]. 遗传学报, 1995, 22(1): 53-58.
- [9] JOSHI C P. Application of the RAPD for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats [J]. Genome, 1993, 36(3): 602-609.
- [10] JOSHI C P. RAPD analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats [J]. Plant Science (Limerick), 1993, 93(1/2): 95-103.
- [11] WEI J Z, WANG R C. Genome and species specific markers and genome relationships of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analyses [J]. Genome, 1995, 38: 1230-1236.
- [12] DHALIWAL H S. Genetic diversity in diploid and hexaploid wheats as revealed by RAPD markers [J]. Crop Improvement, 1993, 20(1): 17-20.
- [13] HE S, MACKENIC S. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84: 573-578.
- [14] 李丽, 郑晓鹰, KLCKE E. 利用 RAPD 分子标记对番茄杂交种纯度的鉴定研究[J]. 广西植物, 2003, 23(2): 149-154.
- [15] PROCUNIER J D. PCR based RAPD-DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *25* in wheat [J]. Journal of Genetics & Breeding, 1995, 49: 87-91.
- [16] SCHACHERMAYR G, MESSMER M M, FEUILLET C, et al. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum* derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90: 982-990.
- [17] SCHACHERMAYR G, SIEDLER H, GALE M D, et al. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf resistance gene of wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88: 110-115.
- [18] DWEIKAT I. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 85: 497-505.
- [19] DEMEKE T, LAROCHE A, GAUDET D A, et al. A DNA marker for the *Bt210* common bunt resistance gene in wheat [J]. Genome, 1996, 39: 51-55.
- [20] QI L L. Identification, mapping, and application of polymorphic DNA associated with resistance gene *Pm21* of wheat [J]. Genome, 1996, 39: 191-197.
- [21] HARTL L, WEISS H, STEPHAN U, et al. Molecular identification of powdery mildew resistance gene in common wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90: 601-606.