文章编号:1000-2367(2016)03-0140-06 DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2016.03.025

分子标记技术在作物育种中的应用与展望

李元龙, 王中华

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

摘 要:回顾分子标记的发展,介绍了一些有代表性的分子标记在生态学,聚类分析,品种差异性分析以及分子育种中等多方面的应用,并总结了它们的优缺点.随着深度测序技术的发展和多种序列信息库的完善,预测了未来分子标记的发展方向——功能性分子标记(Functional molecular marker),这种新型的分子标记技术利用了基因中的一些功能元件或者重要的单碱基多态性(SNP)位点,提高了在应用中的分辨率和灵敏度.

关键词:分子标记;单碱基多态性(SNP);功能标记;作物育种

中图分类号:S565 **文献标志码**:A

自从第一代分子标记——RFLP 分子标记问世以来,越来越多的分子标记被开发出来,如 RFLP, RAPD, AFLP, SSR 等,这些分子标记应用于种质资源的评估、系统发育、进化分析以及 QTL 定位中.然而,早期大多数分子标记都是位于基因的非编码区和非调控区,为中性标记.而在实际的育种工作中,往往需要针对作物的某一经济性状展开,如大豆的蛋白含量,油料含量,粒重等[1-3].这就需要开发出更加有效、准确的与基因功能相关联的分子标记.随着作物基因组、转录组、蛋白组信息越来越详细以及多种作物基因功能研究的深入,更高灵敏度和特异性的功能性分子标记(Functional Marker)被开发出来,这将是未来分子标记的发展方向.

1 RFLP 与 T-RFLP 技术

限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,RFLP)标记是最早开发的 DNA 标记技术[4],借助限制性内切酶切割基因组,获得具有多态性的 DNA 片段,利用 Southern 印迹转移到硝酸纤维膜上,用放射性 DNA 探针来显示膜上 DNA 片段的多态性图谱.最终表现出不同个体间序列信息的差异. RFLP 属于共显性标记,在构建遗传图谱时,具有不受非等位基因间上位作用的影响的优点,但由于 RFLP 的步骤烦琐、周期长,渐渐不适用于现代分子育种研究.不过,现在仍可应用于比较基因组学的研究. Keim P 等使用 17 个 RFLP 分子标记针对大豆属中的两大亚属,栽培大豆亚属(*Glycine max* (Linnaeus) Merril)和野生大豆亚属(*Glycine soja Sieb.* et Zucc)进行了基因组差异性分析,结果发现在栽培大豆亚属内的品种之间的基因组差异是最小的[5].而在野生大豆亚属中各品种间基因组有明显的差异,Menancio DI 等用 RFLP 方法分析了 7 个野生大豆种之间的亲缘关系和变化,研究发现野生大豆种(*Glycine tabacina* Benth.)和另一野生大豆种(*Glycine clandestine* Wendl.)之间基因组差异最明显,从进化来源上分析,这种差异性是从野生大豆亚属(*Glycine soja* Sieb. et Zucc)开始慢慢分离的,并最终形成了两个不同的种[6].可见 RFLP 分子标记技术在揭示遗传层面上的物种演化和起源方面有着重要的意义.

在 RFLP 技术的基础上,末端限制性片段长度多样性(Terminal restriction fragment length polymorph-

收稿日期:2015-12-25;**修回日期**:2016-03-20.

基金项目:陕西省重点科技创新团队计划项目(2014KCT-2S)

第 1 作者简介:李元龙(1992-),男,河南新乡人,西北农林科技大学硕士研究生,研究方向为作物遗传育种,E-mail:845686931@qq.com.

通信作者:王中华(1969-),西北农林科技大学博士生导师,教授,研究方向为作物遗传育种,E-mail:zhonghuawang@nwsuaf.edu.cn.

ism，T-RFLP）技术于上世纪末被发明. 在 RFLP 引物的 5’末端加入荧光标记后进行 PCR，再酶切，将这些酶切片段用自动测序仪分析，筛选出 5’末端被荧光标记的片段，即末端限制性片段（Terminal restriction fragments，T-RFs），不同长度的 T-RFs 就显示出不同的样本多态性，相比于 RFLP 技术，由于其 5’端的荧光标记，所以筛选出的结果可信度更高，降低了假阳性造成的误差.

2　RAPD 与 SCAR 技术

随机扩增多态性 DNA（Random Amplified Polymorphic DNA，RAPD）技术是第一个利用 PCR 技术的显性分子标记技术[7]. 以作物基因组序列为模版，设计长度为 10 bp 左右的随机引物进行 PCR 扩增，在不同的基因组中会扩增出多条长度不同的片段. 其最明显的优点是，操作简单，并且可以在未知基因组序列信息的情况下使用，省去了 DNA 探针的制备，减少了实验步骤. 是一种粗略进行作物基因组多态性扫描与差异分离的方法. 然而，在多倍体物种中，使用 RAPD 技术无法保证结果的重复性、稳定性，会在后期的结果统计中增加许多不必要的麻烦. 为了弥补 RAPD 技术的不足，人们又陆续开发了序列扩增区域标记（sequence characterized amplified regions，SCAR）、相关序列扩增多态性标记（Sequence-related amplified polymorphism，SRAP）、随即扩增微卫星多态性标记（Random amplified microsatellite polymorphism，RAMP）等标记[8]. 而其中以 SCAR 分子标记技术最为优异，其结合了 RAPD 和 SSR 标记的优点，使 PCR 扩增产物更特异，并且其稳定性和重复性都得以保证.

3　AFLP 标记技术

继 RAPD 分子标记之后，出现了一种与 RFLP 标记相似的分子标记——扩增片段长度多态性标记（amplified fragment length polymorphism，AFLP）[9]. 两者的相同点是都要用限制性内切酶对基因组 DNA 或 cDNA 进行切割，得到许多酶切片段，不同点是，AFLP 技术会对得到的限制性片段进行扩增，扩增方法是将双链接头连接到限制性 DNA 片段的末端，接头序列和相邻的限制性酶切位点作为引物结合位点，然后在高分辨率下的变性的 PAGE 电泳下，酶切片段长度多态性就被展现出来，这是一种共显性标记. AFLP 的 PCR 产物丰富多样，低产量与高产量的 PCR 产物可以差 5000 倍以上，在不同品种之间存在丰富的多态性，可用于鉴定品种之间纯度. 在研究基因组与表型关联性中具有很高的可信度. AFLP 分析常用的是 *EcoR* I/*Mse* I 双酶切组合. Toru Takeuchi 等人在对菜豆的抗矮黄病毒基因的定位研究中使用的就是该酶切组合[10]. 韩清等利用 cDNA-AFLP 技术对比研究了辣椒核雄性不育两用系的不育植株品系和可育植株品系两者的基因表达差异，从 1024 对 AFLP 引物中筛选出 111 对引物，共扩增出 205 条差异性条带，在经过回收条带，BLAST 比对后，对应筛选出 48 个基因，其中 32 个基因在不育株系中差异表达，16 个基因在可育株系中差异表达[11]. Du H 等利用 256 对 AFLP 引物分析了番茄抗叶斑病品种 PI 114490 和不抗叶斑病品种 OH 88119 中的基因表达差异，从扩增条带结果中可以看到 79 个差异性条带，对应了 71 个基因，其中共有 7 个基因在抗叶斑病品种 PI 114490 和不抗叶斑病品种 OH 88119 中存在表达差异[12].

4　SSR 与 RAMP 分子标记技术

简单序列重复（simple sequence repeats，SSR）是基因组中的单一重复序列，拷贝数的差异导致了序列长度的不同，它的产生和 DNA 复制、修复，以及 DNA 聚合酶滑动导致的错配有关或是在减数分裂中姐妹染色单体的不均等交换有关[13]. SSR 作为一种共显性标记，大量分布于多种作物的基因组中，如拟南芥、小麦、水稻、大豆等. 由于其密度足够大，覆盖整个基因组，广泛用于基因定位和聚类分析的研究中. Yoko Yamashita 等人使用 SSR 分子标记在大豆品种“wilis”中定位了抗矮化病毒的基因（Rsdv1）. 最终把 Rsdv1 基因定位在了 44 kb 的区间内，其中共 6 个候选基因[14]. 杨凯敏等用 59 个 SSR 分子标记对 90 份大豆品种进行了基因组扫描，依照带型统计结果，利用 Popgene32 软件计算品种间遗传距离，遗传距离（GD）跨度为 0.0307～1.4529，在 GD=0.805 处，将 90 份大豆材料分为 3 大类群[15]. 聚类分析研究可以确定品种之间遗传背景的差异，也可以确定与表型显著相关联的分子标记，对进一步寻找 QTL 位点，开展分子育种工作有重要意义.

Wang YH 等用 10 个 SSR 分子标记对 5 个野生大豆品种,共 195 份材料进行多态性分析,发现具有多态性的比率为 97.78%,可以看出这 5 个野生大豆品种有丰富的遗传多样性,SSR 标记位点的 Shannon 指数(H') 的分布范围为 0.3595~0.6506,平均值 0.5386,Nei's 变异系数为 0.1533,基因流动频率为 1.3805,作者对这些数据分析得出,在这 5 个野生大豆中既存在大量的遗传变异又有大量的基因交换[16].

然而,SSR 分子标记在亲缘关系相近的品种中应用时,产物的多态性会很低.为了解决这一问题,人们设计出 RAMP(random amplified microsatellite polymorphisms)分子标记技术,其中一条引物以微卫星 DNA 核心序列作为引物,并在引物的 5' 端或 3'端加上几个锚定碱基,另一条引物为 10 bp 左右的随机引物.这时,引物的组合就有 2 种类型(1)一条引物的 3'端加上锚定碱基,另一条引物使用 RAPD 引物;(2)一条引物的 5'端加上锚定碱基,另一条引物使用 RAPD 引物.利用 RAMP 方法既增加了扩增结果在相近品种之间的多态性,又能体现出微卫星 DNA 核心重复序列在基因组数量上的优势[17].

5 SNP 位点的应用

得益于 SNP 数据库,酶切扩增多态性序列(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences,Caps)标记技术被大量开发出来.最早应用于拟南芥的基因定位中[18].如今,多个作物的全基因组序列被测序完成,Caps 技术应用也更加广泛,既可用于品种之间的多态性分析,又可以用于遗传作图和基因定位.操作流程大概是先设计特异性引物扩增出含有 SNP 位点的特异性片段,再用限制性内切酶切割目的片段,从而鉴别出不同品种序列信息的差异.以大豆品种 william82 和菏豆 12 中某一段序列为例.

William82 序列 5'CGTTCCCATCATAAATAAGCTGCATAATAGCAACCATCAT 3';

菏豆 12 序列 5' CGTTCCCATCATAAATAAGCAGCATAATAGCAACCATCAT 3'.

限制性内切酶 Alu I 可以识别"AGCT"并切割序列,在 william82 和菏豆 12 中,由于一个碱基的差异,形成一个 SNP 位点,结果 Alu I 可以将 William82 的序列切成两条带,却切不开菏豆 12 的序列,从而显示出品种间差异.然而 SNP 正好位于酶切识别位点上的情况并不是很多,因此,许多 SNP 位点并不能被用于设计分子标记,这就局限了 Caps 引物的开发与应用.因此衍生酶切扩增多态性序列(derivant Cleaved Amplified Polymorphic Sequences,Dcaps)标记就应运而生,这种分子标记是在扩增引物中引入错配碱基,一般引入错配碱基的数量不超过两个,否则会降低引物结合稳定性,影响扩增的准确性和效率.Dcaps 标记是由错配碱基和 SNP 位点共同组成一个酶切识别位点,这样一来,Caps 和 Dcaps 几乎可以利用所有的 SNP 位点,这两种分子标记,都是共显性标记,利用了品种之间 SNP 的差异和限制性内切酶切割位点不同,从而多态性区分的.Ryoji Takahashi 利用 Caps 分析方法,在比较大豆紫花和蓝紫花的基因差异的研究中发现,大豆蓝紫色花的表型与一个 MYB 家族中编码转录因子的基因——GmMYB-G20-1 有关,此基因在大豆紫花品种与大豆蓝紫花品种两类之间,存在单碱基的差异[19].某些基因中 SNP 的差异会影响表型变化,如大豆高镉品种与低镉品种中镉含量有明显的高低差异.是由于 GmHMA1a——与金属离子运输相关的基因中存在一个碱基 G 到 A 的差异,表现为谷氨酸到甘氨酸的变化造成的[20].为了筛选这种可以影响植物性状的 SNP 位点,许多分子育种学家使用定向诱导基因组局部突变技术(Targeting Induced Local Lesions IN Genomes,Tilling),这种手段最早由美国的 Fred Hutchinson 癌症研究中心 Steven Henikoff 领导的研究小组发展起来,是一种反向遗传学研究方法,可以揭示不同物种中等位基因之间的差异.在美国的拟南芥 Tilling 项目中,一年时间内就获得了 100 个基因上的 1 000 多个突变位点[21].如今,高通量测序技术已经相当成熟,比对不同品种的 EST 序列测序,也会发现许多 SNP 和 InDel 位点.以大豆为例,对比不同大豆品种的 EST 序列,就会发现 3899 个 SNP 位点[22].这些 SNP 位点都是与基因功能相关,这对于更深入的研究基因功能,蛋白作用或是应用与作物分子育种的研究都有重要意义.

6 DArT 技术

在大数据的今天,高通量技术才能满足人们对基因序列的探索,因此,多样性序列芯片技术(Diversity arrays technology, DArT)于 2001 年被 Jaccoud 等开发出来[23],这种技术具有高通量,低成本,自动化,可重

复等优点，通过基因芯片杂交的技术，来区分不同序列信息多态性的方法. 每一个多态性位点即是一个 DArT 标记. 这种方法大致可以分为 3 步，基因组代表 DNA 芯片的制备，探针的制备，杂交结果观察.

(1)基因组代表 DNA 芯片的制备

首先要将待测基因组 DNA 经不同切割频率的限制性内切酶酶切，如切割频率高的内切酶 Tap I，Bsn I，Ban II 和切割频率低的内切酶 Pst I. 在酶切后，样本基因组 DNA 的复杂性就会降低，会得到初始样本的 0.1%～10%的"基因组代表 DNA"，将这些 DNA 加上特异性接头后扩增，如 Pst I 的接头. 将会得到"基因组代表 DNA"多个拷贝，再按照构建文库的方法，转入克隆载体，筛选阳性子，扩增纯化后点入芯片中得到基因组代表 DNA 芯片. 代表基因组 DNA 的多态性会直接影响到后续基因型评价时获得的多态性位点的数量，所以在酶切时要注意适度的降低初始样品的 DNA 复杂性. 这些步骤与 AFLP 技术很相似，Wenzl 等就采用了这种技术在大麦中构建了基因组代表性文库，从中筛选出多态性片段的比例为 15%～20%[24]. 不同物种的基因组特点和限制性内切酶的选择都会影响获得的多态性片段的比例，Wittenberg 等当使用 *Pst* I，*EcoR* I，*Taq* I 3 种限制性内切酶对拟南芥样本 DNA 进行酶切时，实验结果相比于 Pst I/Taq I 两种酶切法要更好[25].

(2)探针的制备

总体来说，探针的制备要与制备芯片上的代表 DNA 使用相同限制性内切酶处理，连接相应的内切酶的接头，进行 PCR 扩增，最后加上荧光标记，才能作为 DNA 探针使用.

(3)杂交结果观察

当探针与基因芯片杂交时，由于不同样本"代表基因组 DNA"的差异，探针在芯片上同一点结合反馈的荧光值是不同的，每一种差异结果就是一个 DArT 标记. DarT 技术在分子标记辅助育种的研究中从 QTL 位点附近筛选分子标记是非常有效的一种方法. Niedziela A 等利用 DArT 技术从小黑麦 7R 和 3R 染色体上的耐铝性的 QTL 位点中共筛选出 24 个多态性 DarT 标记[26]. 这些标记的开发对以后小黑麦耐铝性相关基因的精细定位研究非常有帮助. 自从 Wenzl 在大麦中构建了第一张 DArT 遗传连锁图谱以来，DArt 标记被运用到木薯，小麦，高粱等多种多倍体作物中的染色体高密度遗传图谱的构建中. Mantovani 等利用 162 个 SSR 标记和 497 个 DArT 标记构建了硬粒小麦的遗传连锁图谱[27]. Hearnden 等用 442 个 DArT 标记和 536 个 SSR 标记构建了大麦的高密度遗传图谱，图谱距离为 1100.1 cM，标记间平均距离为 1.0 cM[28]. 另外由于 DArT 技术可以借助芯片进行大量的片段分析，所以其优势也就不言而喻了. Sanchez-Sevilla，J F 等从 62 个草莓品种中共可以得到 7680 条片段来作为代表基因组 DNA 芯片，其中可用 DArT 标记为 603 个[29].

7　SCoT 与 PAAP 技术

目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism，SCoT)标记是随着功能基因组学的发展而出现的一类分子标记，基于单引物扩增反应(single primer amplification reaction，SPAR)，根据基因中 ATG 翻译起始位点侧翼保守性区域来设计的[30]. 它同样可以像 RAPD 一样，应用于未知的基因组中分析品种之间的基因差异，但其扩增的产物比 RAPD 更特异，每个引物平均 5～10 条扩增产物[31]. Deng L 等使用了 SCoT 标记对柿(*Diospyros kaki* Thunb)，野柿(*D. kaki var. sylvestris* Mak.)，君迁子(*D. lotus* Linn.)，油柿(*D. oleifera* Cheng.)中共 95 份材料进行了基因多样性分析，共分为 3 个组，它们的相似系数为 0.608，在 4 个品种中，野柿的多样性程度最高. 它又可以分为两个亚组，之间的相似系数为 0.19[32]. 陈大霞使用 SCoT 标记对中国境内 66 份川续断(*Dipsacus asperoides* C. Y. cheng. et T. M. Ai)材料进行多态性检测，20 条引物共得到 181 条扩增带，其中有 109 条呈多态性. 并且不同引物扩增的多态性比率有较大差异，变幅为 25.00%～81.82%，这说明川续断野生种质资源具有较高的遗传多态性[33]. 因为 SCoT 标记多展示的是与基因相关联的多态性，可作为传统标记的互补手段，目前已经广泛应用于水稻和花生的多样性分析与重要性状标记等研究中.

与 SCoT 技术类似的还有一种技术——启动子锚定扩增多态性(promoter anchored amplified polymorphism，PAAP)，是将启动子区域作为引物的锚定结合位点，一条引物结合在已知启动子核心保守序列区，

另一条为随机引物.这两种技术的相同点是,可以反映功能基因区域的多态性.而不同点有二,其一,引物设计不同.SCoT 技术使用的是单引物,而 PAAP 技术使用的是双引物.其二,使用条件和目的不同.SCoT 技术可以在未知序列信息的物种中使用,多用于研究基因多样性.而 PAAP 技术则要已知启动子的核心保守序列,针对不同的启动子保守序列设计不同的引物,但是,启动子区域序列信息大都是预测而来的,可以利用拟南芥中已知的转录因子如 MYB 家族、ERF 家族、KNOX 家族等的蛋白结构,来预测启动子的简并性序列或者根据测序信息数据库比对得到.如今已知的一些典型的启动子核心区域都有对应的引物序列,如 G box 对应引物"GCC-ACSTGTC",GC box 对应引物"NNNGGG-CGGN",CAAT box 对应引物"YRRCCA-AT-WSR"等.由于启动子侧翼序列的变异会直接影响该基因的表达,并或间接地影响到某些表型中去,所以 PAAP 技术对于研究作物 QTL 位点功能具有非常重要的意义.

8 总结与展望

在过去的几十年中,可以把分子标记大致分为以下几类:

1) 最初的分子标记在基因组中的位置大都是随机的,在应用中并无序列针对性,如 RFLP、AFLP、RAPD.后来发展的 SSR 标记虽然利用了微卫星 DNA 序列的特点,但是却多存在与基因组的内含子或非编码区中.人们为了更有针对性的使用分子标记,就必须把分子标记的特异性提高,扩大分子标记的覆盖范围.

2) 随着多种序列信息库的建立,设计出的分子标记也更加精细,然而,为了能深入研究等位基因间的功能,就需要筛选出大量的多态性位点.TILLING 技术的发明在一步步的弥补这个空缺,它是一种揭示等位基因之间的多态性的方法[34].随后的分子标记选择育种(MAS)完善了表型与基因功能的联系,此种方法对于作物性状主效 QTL 位点非常有效,但却不能捕捉到一些微效 QTL[35].为了解决这一问题,全基因组选择(genomic selection,GS)于 2001 年被首次提出.利用覆盖整个基因组的标记来进行分子标记选择育种[36].

3)可以预测出将来越来越多的是从功能基因中开发分子标记或是开发与功能基因紧密连锁的分子标记.利用这类分子标记应用到基因定位的研究中,可以减少回交次数和计算重组率的误差,使遗传作图也更精细[37].然而,如果多个 QTL 位点相隔很近,在定位 QTL 时,就会造成遗传距离的偏差,这时就需要一种更高分辨率的方法——全基因组关联分析(Genome Wide Association Studies,GWAS),这种分析方法可以将 QTL 识别位点缩小到 1 Mbp 的距离,Vaughn 等使用这种方法研究了大豆种子多个性状的基因位点[38].

分子标记的发展离不开大数据库的完善和数据分析,然而,要想使用 GWAS 分析方法,在多种作物中寻找到极个别有效的 SNP 位点还是有一定难度的,如今一种新型的寻找 SNP 位点的技术——竞争性等位基因特异性 PCR(Kompetitive Allele Specific PCR,KASP)使寻找 SNP 位点,对复杂基因组分析的工作变得更廉价和准确.此技术在小麦中应用广泛[39].基于功能性 SNP 位点,开发与基因功能相关的分子标记才是分子标记未来的发展方向[40].

参 考 文 献

[1] Nichols D, Glover K. Fine mapping of a seed protein QTL on soybean linkage group I and its correlated effects on agronomic traits[J]. Crop Sci,2006,46:834-839.

[2] Eskandari M, Cober E R, Rajcan I. Genetic control of soybean seed oil: I. QTL and genes associated with seed oil concentration in RIL populations derived from crossing moderately high-oil parents[J]. Theor Appl Genet,2013,126:483-495.

[3] Pathan Safiullah M, Tri Vuong, Clark Kerry. Genetic Mapping and Confirmation of Quantitative Trait Loci for Seed Protein and Oil Contents and Seed Weight in Soybean[J]. Crop Sci,2013,53(3):765-774.

[4] Bernatsky R, Tanksley S. Towards a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences[J]. Genetics, 1986,112(4): 887-898.

[5] Keim P, Shoemaker R C, Palmer R G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean[J]. Theor Appl Genet,1989,77(6):786-92.

[6] Menancio D I, Hepburn A G, Hymowitz T. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of wild perennial relatives of soybean [J]. Theor Appl Genet,1990,79(2):235-40.

[7] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids research,1990,18(22):6531-6535.

[8] Babu K N, Rajesh M K, Samsudeen K, et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques[J]. Methods Mol Biol,2014,1115:191-209.

[9] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res,1995,23(21):4407-4414.

[10] Yamashita Y, Takeuchi T, Okuyama M, et al. Development and validation of DNA markers linked to Sdvy-1, a common bean gene conferring resistance to the yellowing strain of Soybean dwarf virus[J]. Breed Sci,2014,64(4):404-408.

[11] 韩　清,冯　森,刘　辰,等. 利用 cDNA-AFLP 技术研究辣椒核雄性不育两用系的基因差异表达[J]. 农业生物技术学报,2012,20(10):1117～1125

[12] Du H, Li W, Wang Y, et al. Identification of genes differentially expressed between resistant and susceptible tomato lines during time-course interactions with Xanthomonas perforans race T3[J]. PLoS One,2014. 9(3):93476.

[13] Luo W Y, Hu J, Li X F. The evolution and application of microsatellites[J]. Yi Chuan,2003,25(5):615-619.

[14] Yamashita Y, Takeuchi T, Ohnishi S, et al. Fine mapping of the major Soybean dwarf virus resistance gene Rsdv1 of the soybean cultivar 'Wilis'[J]. Breed Sci,2013,63(4):417-422.

[15] 杨凯敏,李贵全,郭数进,等. 大豆自然群体 SSR 标记遗传多样性及其与农艺性状的关联分析[J]. 核农学报,2014,28(9):1576-1584

[16] Wang Y H, Zhang X J, Fan S J. Genetic diversity of wild soybean populations in Dongying, China, by simple sequence repeat analysis [J]. Genet Mol Res,2015,14(3):11613-11623.

[17] Min W K, Han J H, Kang W H, et al. Reverse random amplified microsatellite polymorphism reveals enhanced polymorphisms in the 3′ end of simple sequence repeats in the pepper genome[J]. Mol Cells,2008,26(3):250-257.

[18] Konieczny A, Ausubel F M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers[J]. plant journal,1993,4(2):403-410.

[19] Takahashi R, Yamagishi N, Yoshikawa N. A MYB transcription factor controls flower color in soybean[J]. J Hered,2013,104(1):149-153.

[20] Benitez E R, Hajika M, Takahashi R. Single-base substitution in P1B-ATPase gene is associated with a major QTL for seed cadmium concentration in soybean[J] J Hered,2012,103(2):278-286.

[21] Till B J, Colbert T, Codomo C, et al. High-throughput TILLING for Arabidopsis[J]. Methods Mol Biol,2006,323:127-135.

[22] Shu Y, Li Y, Zhu Z, Bai X, et al. SNPs discovery and CAPS marker conversion in soybean[J]. Mol Biol Rep,2011,38(3):1841-1846.

[23] Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. [J]. Nucleic Acids Res,2001,29(4):25.

[24] Wenzl P, Carling J, Kudrna D, et al. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101(26):9915-9920.

[25] Wittenberg A H, van der Lee T, Cayla C, et al. Validation of the high-throughput marker technology DArT using the model plant Arabidopsis thaliana[J]. Mol Genet Genomics,2005,274(1):30-39.

[26] Niedziela A, Mankowski D, Bednarek P T. Diversity Arrays Technology-based PCR markers for marker assisted selection of aluminum tolerance in triticale (Wittmack)[J]. Molecular Breeding,2015,35(11):209.

[27] Mantovani P, Maccaferri M, Sanguineti M C, et al. An integrated DArT-SSR linkage map of durum wheat[J]. Molecular Breeding, 2007,22(4):629-648

[28] Hearnden P R, Eckermann P J, McMichael G L, et al, A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross[J]. Theor Appl Genet,2007,115(3):383-391.

[29] Sanchez-Sevilla J F, Horvath A, Botella M A, et al, Diversity Arrays Technology (DArT) Marker Platforms for Diversity Analysis and Linkage Mapping in a Complex Crop, the Octoploid Cultivated Strawberry (Fragaria x ananassa)[J]. PLoS One,2015,10(12):0144960.

[30] Hawkins J D. A survey on intron and exon lengths[J]. Nucleic Acids Res,1988,16(21):9893-908.

[31] Bertrand C, Mackill D J. Start codon targeted(SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Mol Biol Rep,2009,27(1):86-93.

[32] Deng L, Liang Q, He X, et al. Investigation and Analysis of Genetic Diversity of Diospyros Germplasms Using SCoT Molecular Markers in Guangxi[J]. PLoS One,2015,10(8):e0136510.

[33] 陈大霞,张　雪,崔广林,等. 川续断野生种质资源遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(10):1898-1903

[34] Mejlhede N, Kyjovska Z, Backes G, et al. EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes mlo and Mla in barley[J]. Plant Breed,2006,125(5):461-467.

[35] Desta Z A, Ortiz R. Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement[J]. Trends Plant Sci,2014,19(9):592-601.

(下转第 183 页)

Construction of Chinese Sports Fields and Facilities Development Trends Under the Background of Sports Power

SONG Zhongliang, CHEN Gengliang, HE Xinjia

(Department of P. E, Wuhan Institute Technology, Wuhan 430205, China;
2. Deriodical Press, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Abstract: Sports power construction is the new goal of our country sports. The construction of sports fields and facilities affect the sports power construction directly, but it is also the vital component of sports power construction. By means of literature review, mathematical statistics, comparison analysis, the paper researches the census data of the two General Survey of sports fields and facilities in China. The results show that the quantity of our country sports fields and facilities number, site area, site and quality as well as the sports area per capita and so on have been greatly improved in the past ten years. But there are some problems in the urban and rural per capita and regional distribution, structure of sports fields, average amount of field and utilization ratio, and finally propose some constructive suggestion for the development of construction of Chinese sports fields and facilities under the background of sports power construction.

Keywords: sports power; sports fields and facilities; census data; comparison analysis

(上接第 145 页)

[36] Meuwissen T H, Hayes B J, Goddard M E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps[J]. Genetics, 2001, 157(4): 1819-1829.

[37] Pazhamala L, Saxena R K, Singh V K, et al. Genomics-assisted breeding for boosting crop improvement in pigeonpea (Cajanus cajan) [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 50-55.

[38] Vaughn J N, Nelson R L, Song Q, et al. The genetic architecture of seed composition in soybean is refined by genome-wide association scans across multiple populations[J]. G3 (Bethesda), 2014, 4(11): 2283-2294.

[39] Neelam K, Brown-Guedira G, Huang L. Development and validation of a breeder-friendly KASPar marker for wheat leaf rust resistance locus Lr21[J]. Journal Citation Reports, 2013(31): 233-237.

[40] Andersen J R, Lubberstedt T. Functional markers in plants[J]. Trends Plant Sci, 2003, 8(11): 554-560.

Application and Perspective of Molecular Marker Technology in Crop Breeding

LI Yuanlong, WANG Zhonghua

(Agricultural College, North West Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: This paper reviews the development of molecular markers and introduces some typical molecular markers applying for ecology, cluster analysis, species diversity analysis, molecular breeding of crops and so on, as well as, summarizes their advantages and disadvantages. With the development of deep sequencing technology and the improvement of sequence information database, functional molecular markers will be the future development direction of molecular marker research. The new type of molecular marker takes advantage of some functional components or important single-base polymorphism (SNP) sites in gene to improve the sensitivity and resolution in the application.

Keywords: molecular marker; single-base polymorphism; functional marker; crop breeding