

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00913

# 扩增共有序列遗传标记(ACGM)及其在植物中的应用价值

何俊平<sup>1,2</sup>, 阮松林<sup>2</sup>, 祝水金<sup>1</sup>, 马华升<sup>2</sup>

1. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029;
2. 杭州市农业科学研究院生物技术研究所, 杭州 310024

**摘要:** 扩增共有序列遗传标记(Amplified consensus genetic markers, ACGM)是建立在亲缘关系较近的物种间同源基因中编码序列(外显子)存在高度保守性,而非编码区(内含子)存在潜在多态性基础之上的一种基于 PCR 的新型 DNA 分子标记技术。随着比较基因组学和生物信息学的迅猛发展,ACGM 技术已成为物种间同源基因比较、系统发生关系分析和感兴趣基因定位的有效工具。文章就 ACGM 技术尤其是它在芸薹属和禾本科物种中的应用研究做详细介绍。同时,对 ACGM 技术可能的应用前景进行了展望。

**关键词:** ACGM; 基因组进化; 基因定位

## Amplified consensus genetic markers and its application in plants

HE Jun-Ping<sup>1,2</sup>, RUAN Song-Lin<sup>2</sup>, ZHU Shui-Jin<sup>1</sup>, MA Hua-Sheng<sup>2</sup>

1. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. Institute of Biotechnology, Hangzhou Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310024, China

**Abstract:** Amplified consensus genetic markers (ACGM) is a novel PCR-based DNA molecular marker technique, which is based on the conservation of coding sequences and the potential polymorphism within non-coding sequences in homologous genes among closely related species. Along with the rapid development of comparative genomics and bioinformatics, the ACGM technique has already become a powerful tool for comparing homologous genes, analyzing phylogenetic relationships among species, and mapping of genes of interest. Here, an introduction to ACGM technique, especially its application in *Brassica* genera and Gramineae, was presented in detail. The prospects of ACGM were also discussed.

**Keywords:** amplified consensus genetic markers (ACGM); genome evolution; gene mapping

分子标记是应用现代分子生物学原理揭示生物遗传多态性的新兴分子技术,是遗传标记分子水平的拓展,也是现代遗传学研究的有力工具。自 1980 年首次提出分子标记的概念以来<sup>[1]</sup>,分子标记已广泛应用于遗传图谱构建、基因定位、基因克隆、基

因组比较、遗传多样性分析及辅助选择育种等很多方面的研究<sup>[2~5]</sup>。随着人类基因组计划的完成和大量模式生物基因组序列的大规模分析及生物信息学的快速发展,越来越多的基因组序列信息已被获得,但如何运用已有模式生物序列信息来研究相关物种,

收稿日期: 2008-12-26; 修回日期: 2009-03-30

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(编号: 20080441230)

作者简介: 何俊平(1979-), 女, 博士, 研究方向: 植物功能基因组学。Tel: 0571-87311794; E-mail: peace0120@yahoo.com.cn

通讯作者: 祝水金(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物生物技术与基因工程。Tel: 0571-81703758; E-mail: zshjzhu@zju.edu.cn

马华升(1962-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 植物生物技术。Tel: 0571-87313241; E-mail: hzhmsma@163.com

则一直是生命科学领域研究者关注的热点。基于此, Brunel 等<sup>[6]</sup>于 1999 年依据模式植物拟南芥 (*Arabidopsis*) 与芸薹属 (*Brassica*) 物种间编码序列的保守性首次提出了能够探知拟南芥和芸薹属间共有遗传信息的一种新型分子标记——扩增共有序列遗传标记 (Amplified consensus genetic markers, ACGM)。该分子标记的提出为具有相同系统发生起源物种间的比较研究提供了快速便捷的途径, 也为运用模式生物信息更好地理解相关物种提供了崭新机会。本文就 ACGM 技术尤其是它在植物中的应用价值作一较全面的概述, 并对该技术可能的应用前景作一展望。

## 1 ACGM 及其特点

ACGM 是建立在亲缘关系较近的物种间同源基因中编码序列(外显子)存在高度保守性, 而非编码区(内含子)存在潜在多态性基础之上的一种基于 PCR 技术的分子标记。它以一种植物已知功能基因的保守编码序列为依据设计简并引物, 而在另一种亲缘关系较近、需探知基因功能的植物总 DNA 中进行同源序列扩增, 并通过分析扩增产物来进一步确定功能相同基因(直向同源基因)的存在与否、拷贝分布、拷贝数多少以及序列间同源性等。它最大的优点是探知新的功能基因而无需克隆 (Extraction without cloning), 可以在很大程度上节省构建文库和人工诱变突变体的时间, 具有简便、快捷的特点。

## 2 ACGM 的发展及研究概况

随着比较基因组学的兴起及模式植物拟南芥研究工程中生理学和遗传学知识的不断丰富, 1999 年, Brunel 等<sup>[6]</sup>率先提出了能够探知拟南芥和芸薹属间共有遗传信息的 ACGM 分子标记技术, 并将之应用于油菜 (*Brassica napus* L.) 及其亲本种与拟南芥间同源基因的比较研究, 以探索芸薹属与拟南芥的同源、进化关系。之后, 相关研究者也相继运用该技术对芸薹属间、禾本科间物种的同源、进化关系进行了分析。然而, 随着拟南芥和水稻等模式植物基因组测序工作的相继完成, 及其大量新基因和功能未知基因功能注释的逐步完善, 近年来, ACGM 还被作为特异的分子标记应用于植物感兴趣基因的精细

遗传图谱构建及 QTL 定位等方面的研究。而有关 ACGM 技术在动物基因组上的研究应用, 笔者还尚未见报道。

## 3 ACGM 在植物研究中的应用

### 3.1 ACGM 在芸薹属植物中的应用

芸薹属植物是模式植物拟南芥亲缘关系最近的物种代表<sup>[7]</sup>, 同属于十字花科的拟南芥作为模式植物的深入研究, 尤其是拟南芥整个基因组测序的完成, 使芸薹属基因组和拟南芥基因组之间的比较研究非常令人关注。芸薹属和拟南芥基因组间的大量比较研究表明, 二者基因组间存在着广泛的同线性 (Synteny)、共线性 (Collinearity) 及微观共线性 (Micro-synteny), 在进化过程中编码序列间呈现出高度保守性。Cavell 等<sup>[8]</sup>研究表明芸薹属和拟南芥编码序列间的保守性可达 87%, Brunel 等<sup>[6]</sup>通过比较分析 18 种蛋白质序列发现拟南芥和油菜同源序列间的保守性高达 88%, 而拟南芥和芸薹属中推定直向同源基因 (Putative orthologous genes) 外显子间的同源性通常有 80%~90%<sup>[9]</sup>。这些同线性或共线性及保守性的阐明为在芸薹属植物研究过程中充分利用拟南芥基因组的生物学信息奠定了基础。

#### 3.1.1 ACGM 在芸薹属植物基因组进化方面的研究

为研究拟南芥和芸薹属物种间及芸薹属物种自身间的亲缘进化关系, Brunel 等<sup>[6]</sup>采用 ACGM 技术参考 AG、*LFY3*、*AP3*、*FAD7*、*FAD3* 和 *ADH* 等 6 个来源于生态型拟南芥已知功能位点的序列, 依据编码序列设计了 6 对简并引物, 分别在生态型拟南芥、4 个不同的冬性和春性油菜品种及油菜两个亲本种 [甘蓝 (*Brassica oleracea* L.)、白菜 (*Brassica rapa* L.)] 等 7 种不同基因型材料的总 DNA 中进行 PCR 扩增。结果表明, 所有引物在拟南芥中均能扩增出一条清晰条带, 在 4 种不同的油菜品种中均可扩增出 2~4 条清晰条带, 在油菜亲本种中则可扩增出 1~2 条清晰条带<sup>[6]</sup>。

令人感兴趣的是, 凡在甘蓝和白菜中扩增出 2 条带的引物在油菜中一般则可以扩增出 4 条带, 而在甘蓝和白菜中扩增出 1 条带的引物在油菜中则可以扩增出 2 条带, 该结果强烈地暗示了甘蓝型油菜

是由甘蓝与白菜异交后继续加倍而形成的一个物种,这与目前经典遗传学研究的结果非常吻合,说明ACGM可以用来推断具有亲缘关系物种间的系统发生起源。经过进一步研究,作者发现相同引物在不同的油菜品种间还表现出片段长度上的多态性,序列分析表明这些多态性多是由于品种间同源基因内含子长度上的差异所引起。对不同引物PCR产物的测序结果还证实油菜及其亲本中扩增出的序列与拟南芥的原始序列具有高度相似性,也证明了它们具有相同的系统发生起源,属同一个分类学家族。由此可见,ACGM技术可为拟南芥和芸薹属之间信息的穿梭利用提供快速便捷的途径,为探讨油菜的起源与进化创造有利条件。

参照Brunel等<sup>[6]</sup>提出的ACGM简并引物设计方法,Fourmann等<sup>[10]</sup>再次利用ACGM技术对相同类型材料的拟南芥、油菜及其亲本种进行了PCR扩增后的序列比较分析。他们共采用了32对ACGM引物,其中包含有Brunel等<sup>[6]</sup>设计的6对ACGM引物。32对ACGM引物的扩增结果表明:大部分引物在拟南芥上只能扩增出一条序列,而在油菜中则可扩增出1~7条序列,而且对于大多数ACGM引物而言,它们在油菜中扩增出的同源序列数目恰恰是它们在其亲本种甘蓝与白菜中扩增出的同源序列数目的总和。同源序列比对的结果显示,芸薹属物种和拟南芥在编码序列上存在着高度的保守性,而它们在内含子间却无显著的匹配性。但是,研究者认为油菜与其亲本种之一的同源序列在内含子上存在相似性的可能性是存在的。在基于内含子相似性的基础上,研究者对由32对ACGM引物扩增出的102条油菜序列、50条甘蓝序列及54条白菜序列进行了测序比较分析,发现在油菜中有23条序列的内含子与其亲本种甘蓝的内含子具有明显的相似性,有20条序列的内含子与其亲本种白菜的内含子具有显著的相似性。作者认为,在某种程度上,这些相似性的内含子序列的存在,使推测油菜遗传图谱上各连锁群的起源成为了可能,这也是具有高度保守性的外显子序列很难做到的。非变性聚丙烯酰胺凝胶检测、PCR产物直接测序对同源序列在4种不同油菜品种中多态性情况及其产生原因的分析显示,多态性的产生是由于不同品种间内含子和外显子中碱基替代、插入及缺失数目的不同而造成,进一步研究发现,在

内含子上发生改变的碱基数量是发生在外显子上的4倍还要多,据此推断,油菜品种间多态性产生的原因在于基因中内含子区域的差异,这对追寻甘蓝型油菜中某些序列的起源提供了极大的便利。上述结果充分表明,ACGM可以作为研究基因组进化的一个重要工具,而且在某种程度上还可以用来开发适合于遗传作图和遗传多样性分析的SNP标记,为研究进化过程中物种间基因组结构和DNA序列上的变异增加了新的手段。

李柱刚等<sup>[11]</sup>利用拟南芥脂肪酸合成途径中脂肪酸链延长酶基因*FAEI*序列保守区段设计ACGM简并引物,对芸薹属植物的3个基本种和3个复合种进行序列扩增分析,通过克隆、测序每个栽培种的PCR产物,分析比较了芸薹属作物脂肪酸链延长酶基因*FAEI*在不同栽培种中的拷贝数和序列变异情况。结果表明,拟南芥和芸薹属作物基因组中具有不同拷贝数(1~3)的*FAEI*基因,且所测定部分的基因序列之间具有高度同源性。由此推断,通过对亲缘关系密切的植物重要代谢途径中的关键基因进行分析和功能标记,可以探讨近缘物种之间的亲缘关系及分子进化情况。说明利用拟南芥基因组已知序列扩增共有基因,是对芸薹属作物相关基因进行标记的有效方法。此外,由于这种标记与基因功能相联系,对认识芸薹属植物表型变异的分子基础及分子进化也具有重要参考意义。

### 3.1.2 ACGM在芸薹属植物基因图谱定位方面的研究

对感兴趣的基因进行定位并最终克隆是目前许多研究者进行基因功能验证及利用所采取的一贯策略。然而对某个基因的克隆并不能一蹴而就,其中目标基因的精细定位往往是克隆策略中最艰苦、最耗时的限速步骤。但如果能够充分利用现有的各种生物学信息,则可以为目标基因的精细定位锦上添花。Lei等<sup>[12]</sup>在对油菜隐性核不育基因*BnMs2*精细定位的过程中,利用*BnMs2*基因位点两侧分子标记序列与拟南芥序列同源比对得到的共线的拟南芥基因组序列信息,开发出一个与*BnMs2*位点紧密连锁的共显性ACGM,显著缩小了*BnMs2*基因所在的染色体区间,为进一步克隆该基因提供了可资利用的信息。姚雪琴<sup>[13]</sup>在油菜隐性核不育基因*BnMs1*、*BnMs2*



精细遗传定位<sup>[12,14]</sup>的基础上,依据目标基因区域与拟南芥基因组的共线性关系设计了25对ACGM引物,开发出了2个与*BnMs2*基因紧密连锁的ACGM,继而与*BnMs2*基因共分离的ACGM为探针筛选油菜BAC文库,获得了*BnMs2*基因的候选克隆,实现了*BnMs2*基因的物理定位,加快了*BnMs2*基因进一步精细定位和克隆的步伐,同时也为与*BnMs2*基因具有相同功能的*BnMs1*基因的进一步精细定位克隆提供了生物信息学参考;He等<sup>[15]</sup>在对油菜隐性核不育基因*BnMs3*精细定位的过程中,依据*BnMs3*基因标记与拟南芥的共线性关系设计ACGM引物,开发出了一个与*BnMs3*基因仅有0.03 cM的ACGM标记,加速了*BnMs3*基因定位克隆的进程;说明ACGM不仅在辅助基因定位和克隆上具有一定的优越性,也可为进一步分离核不育基因提供重要的生物学信息。Schmidt等<sup>[16]</sup>参照芸薹属与拟南芥基因组的共线性信息设计ACGM引物,对芸薹属家族比较结构基因组学进行了较为详尽的研究,说明ACGM标记亦可为利用基因组较小的模式生物信息研究相关的复杂基因组物种提供便利。除此之外,Rocherieux等<sup>[17]</sup>还将Brunel等<sup>[6]</sup>和Fourmann等<sup>[10]</sup>依据拟南芥基因组序列开发的ACGM引物中的22个应用于甘蓝抗根瘤病品种的QTLs作图分析;Li等<sup>[18]</sup>在对油菜杂种优势的分子基础进行研究时,基于杂种油菜及其亲本的不同表达基因构建了油菜的分子功能图谱,该图谱中也包含了大量的ACGM标记。由此可见,ACGM不仅能够应用于植物质量性状座位的图谱定位分析,还可以应用于数量性状的图谱定位分析。

### 3.2 ACGM在禾本科植物中的应用

禾本科是一个十分重要的大科,水稻(*Oryza sativa* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea mays* L.)和高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]等主要粮食作物多为禾本科植物。开发禾本科间通用型的ACGM,对禾本科间比较基因组学的研究、同源基因的克隆、感兴趣基因的定位和分子标记辅助育种等无疑均具有重要的理论和实践意义。目前,水稻籼、粳两个亚种基因组序列草图和粳稻全基因组精细图谱的完成<sup>[19-21]</sup>,使得人们可以直接利用分子生物信息学手段比较两亚种间DNA序列水平上的多态性,这为开发更多的水稻分子标记提供了极大便利

<sup>[22, 23]</sup>,同时也为开发禾本科间通用的ACGM创造了机会。

Wang等<sup>[24]</sup>利用已公布的水稻亚种(籼稻 93-11和*Nipponbare*)基因组序列,借助生物信息学方法,开发了5 800多个候选的水稻内含子长度多态性标记,并通过实验从中开发出了173个在水稻中普遍适用的内含子长度多态性标记。该项研究表明,水稻亚种间存在着丰富的内含子长度多态性。可以预见,那些在水稻籼、粳亚种间存在的内含子长度多态性很有可能在其他禾本科物种中也存在着内含子长度多态性,因此,也有可能将它们开发成禾本科间通用型的ACGM。

依据上述思路,卢泳全等<sup>[25]</sup>参考水稻籼、粳两亚种间内含子长度多态性,开发了38对ACGM引物。这些引物在玉米、粟(*Setaria*)、大麦(*Hordeum*)、小麦(*Triticum*)、竹子(*Phyllostachys*)、稗(*Echinochloa*)和大米草(*Spartina*)等6个属的12种不同材料中的PCR扩增结果表明,几乎所有引物都可以在至少一种供试材料中扩增出特异条带,而1/3以上的引物则可以在全部供试材料中扩增出特异条带。在每一种供试材料中,平均大约有2/3的引物可以成功扩增出目标条带。作者通过进一步的统计分析发现,这些引物在各属内不同种、亚种间或品种(系)之间的多态性比例在24.1%~90.3%之间,平均为44.6%。以上结果表明利用水稻基因组序列信息开发禾本科间通用型的ACGM切实可行。那么,这些ACGM引物在除水稻外的其他禾本科材料中扩增出的条带是否为与水稻基因组序列同源的目标基因呢?为此,作者还将上述ACGM引物在其他禾本科材料中扩增出的条带测序并与水稻基因序列进行比对分析,结果显示引物在这些材料中扩增出的条带两侧外显子序列比较保守,内含子序列则表现出较大变异,但引物在非水稻材料中扩增出的主带片段与预期相符,是与水稻基因组序列同源的目标基因。由此推断,基于水稻基因组序列开发的以PCR扩增为基础的通用型ACGM可为禾本科物种间的比较基因组学研究提供便利,也开辟了物种间直向同源基因比较研究的一条新捷径。

为进一步研究ACGM的通用性和适用性,卢泳全等<sup>[26]</sup>继以上研究之后,又利用类似的方法开发出另外2对ACGM引物,与上述38对ACGM引物一起

在小麦属的 12 种不同材料中进行扩增, 以验证水稻基因组数据在小麦属中的通用性。40 对 ACGM 引物在 12 种不同材料中的扩增结果表明, 其中 32 对引物可以在至少一种小麦属材料中获得扩增产物, 占引物总数的 80%; 在能够获得特异产物的 32 对引物中, 有 28 对引物可以在供试的小麦材料中获得多态性条带, 占总引物对数的 70%。以上结果足以表明, 基于水稻基因组数据开发的 ACGM 在小麦属中具有很好的通用性, 可用于小麦属的遗传进化研究及遗传多样性分析, 同时对禾本科不同物种间的遗传分类研究也具有一定的借鉴作用。据此, Lu 等<sup>[27]</sup>继续采用上述 38 对 ACGM 引物对禾本科 5 个属(或亚科)的 10 份植物材料进行了遗传进化关系的初步分析。根据遗传距离, 利用 PHILIP 软件, 得到了 10 个供试材料的聚类图, 明确了供试材料间的遗传进化关系。随后, 董德臻等<sup>[28]</sup>进一步研究了水稻基因组数据在竹种中的通用性。研究者们利用上述方法继续开发出 1 对 ACGM 引物, 与上述 38 对引物一起在竹亚科 5 个属的 13 个种中进行 PCR 扩增。发现 39 对 ACGM 引物中的 34 对可以在至少一个竹种中获得特异产物。利用 PHILIP 软件, 同样得到了 13 个供试竹种材料的聚类图。上述结果表明, 利用基于禾本科模式植物水稻基因组数据的 ACGM 可为禾本科物种间的分类研究提供便利, 即使在遗传多样性很高的竹子物种中也同样适用, 为进一步进行竹子物种的分子生物研究奠定了基础。

### 3.3 ACGM 技术在其他植物中的应用

由于作为模式植物的十字花科物种拟南芥的深入研究, ACGM 技术除广泛应用于与其亲缘关系较近的芸薹属物种外, 在十字花科萝卜属中也得到了一定程度的应用。Giancola 等<sup>[29]</sup>运用 ACGM 技术首先获得拟南芥基因组上与萝卜 (*Raphanus*) 育性恢复基因 *Rfo* 位点的共线性区域, 进而利用特异的 ACGM 将 *Rfo* 位点限定在拟南芥的一个 BAC 克隆上, 与此同时在所用的分离群体中还获得一个与 *Rfo* 位点共分离的 ACGM, 实现了 *Rfo* 位点的精细定位, 为进而分离克隆 *Rfo* 基因提供了便利。在此基础上, Desloire 等<sup>[30]</sup>在推定的内含子两侧的外显子上设计引物, 进一步开发出了 17 个分布于 *Rfo* 位点两侧的 ACGM, 其中包含 13 个与目标基因连锁更为紧密的多态性标记,

大大缩小了目标基因所在的染色体区间。在这些 ACGM 的辅助下, *Rfo* 基因最终被成功分离克隆<sup>[30]</sup>。

研究表明, 不同物种间通用型分子标记开发的生物学基础是不同物种间 DNA 序列的同源性, 这也是 ACGM 技术的关键所在。事实上, ACGM 技术主要强调的是利用基因编码序列保守区域设计(简并)引物, 即充分利用基因外显子上的信息来寻找近源物种间基因进化过程中的差异, 这种方法在某种程度上为一些研究者提供了参考。Brauner 等<sup>[31]</sup>在对豆类作物进行比较作图时, 依据豌豆 (*Pisum sativum* L.) 中 37 个已知基因外显子的高度保守区域设计引物来扩增小扁豆 (*Lens culinaris* M.) 中的直向同源序列, 发现其中 2/3 的引物可以在小扁豆中成功扩增, 证实依据保守区域设计的引物在豆类作物的比较作图中具有一定的通用性。Etienne 等<sup>[32]</sup>在对影响桃子 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 果实品质的糖分及有机酸含量的候选基因和 QTL 分析时同样参考了 ACGM 方法, 作者依据 18 个编码可溶性糖和有机酸关键蛋白的 cDNA 序列设计特异引物进行相应基因的定位分析, 结合比较作图的结果检测到位于同一连锁群相同位置的一个候选基因和一个 QTL, 为之后利用分子标记进行桃类果实品质的辅助选择奠定了基础。Sorefan 等<sup>[33]</sup>在对拟南芥、豌豆中调控茎杆分枝基因 *MAX4* 和 *RMS1* 的比较研究过程中, 参考 Brunel 等<sup>[6]</sup>提出的 ACGM 引物设计思路, 依据拟南芥 *MAX4* 基因保守区域合成简并引物, 分析比较扩增产物发现 *MAX4* 和 *RMS1* 基因的氨基酸相似度可达 68%, 初步证明二者中调控茎杆分枝的基因为类过氧化物酶直向同源基因 (Orthologous dioxygenase-like genes)。

此外, Prioul-Gervais 等<sup>[34]</sup>在豌豆 RGA (Resistance gene analogs) 和 DR (Defense-related) 基因的定位研究中, 对扩增的 RGA 和 DR 候选基因条带中的感兴趣条带, 则采用了 Brunel 等<sup>[6]</sup>提出的 ACGM 引物 PCR 扩增参数重新扩增并测序。

卢泳全等<sup>[25]</sup>还将在水稻中开发的 ACGM 引物在拟南芥和棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) 的基因组 DNA 中进行扩增, 发现大约 20% 的引物至少能够在一种物种中得到特异的 PCR 产物, 表明扩增得到的特异片段也是来自与水稻同源的目标基因序列。此项结果说明, 利用禾本科模式植物基因组信息开发的 ACGM 可以应用于禾本科之外的物种乃至双子叶

植物,也说明ACGM技术是相同物种甚至不同物种间序列信息穿梭的一条便捷途径。

#### 4 ACGM 技术在植物基因定位和基因组比较上的应用前景

目前,运用图位克隆策略克隆感兴趣基因的研究日益增多,但图位克隆中目标基因的精细定位工作仍是每个研究者必须面对的一个难题,虽然以PCR为基础的分子标记的使用使分析较大群体成为可能,但是,精细定位目的基因仍然是图位克隆策略中最艰苦和最耗时的限速步骤。利用侧翼分子标记分析和混合样品作图是大多研究者经常采用的提高精细定位效率一种方法<sup>[35]</sup>,然而,利用ACGM技术则可以更有效地开发与目标位点连锁更紧密的分子标记,而且ACGM技术还有助于识别所研究物种中与拟南芥等模式生物基因同源的直向同源物,这些同源物很有可能是感兴趣基因的候选基因,这为利用候选基因策略克隆感兴趣的基因提供了重要的生物学信息。尤其当将感兴趣的基因定位在一个与模式生物共线或同线的小区间后,ACGM技术的应用将会为研究者提供更有价值的可供参考和利用的信息。

依据模式植物已知功能基因序列设计的引物在其近缘物种扩增出的序列只是直向同源基因的一部分,这可能会引起有关研究者的争议,但是由于这段序列存在着与感兴趣农艺性状的候选基因共分离的极大可能性,所以它可以作为一个基因标签用来识别相关的直向同源基因;另一方面,研究者还可以通过Tail-PCR的方法来补全所感兴趣的序列做进一步的分析<sup>[6]</sup>。同时,通过对扩增出的直向同源物进行测序,不但能够开发不同物种间特异的遗传标记,而且可以加速理解由于染色体重排或等位基因的变异引起的植物基因组的进化,便于积累珍贵的物种间进化信息。

Brunel等<sup>[6]</sup>和Fourmann等<sup>[10]</sup>的研究表明ACGM的多态性位点多位于内含子区域,这是由于内含子区域为非编码序列,在进化过程中受到的选择压力较小,更容易积累变异所致。真核生物基因组中散布着大量的内含子<sup>[36, 37]</sup>,大量存在的内含子序列为利用其潜在多态性开发真核生物中的分子标记提供了便利。但必须指出的是,因ACGM技术要求将引物

设计在内含子两侧的外显子上,因此一般情况下只有序列较短的内含子才适合于开发ACGM标记,研究表明,ACGM可以扩增出400~2 300 bp大小的片段<sup>[6]</sup>。随着有关物种cDNA/EST序列数量上的增加及其功能的不断确定,原则上,所有长度适当的内含子两侧的外显子上都有可能设计出比较保守的引物,而开发出通用性较好的ACGM标记。另有研究表明,内含子的长度虽然容易发生变异,但它在基因中的位置却是相当保守的<sup>[38, 39]</sup>。因此,通过同源基因的比较,可以开发出不同物种间通用的ACGM。依据内含子位置的保守性,通过将任一植物的EST与模式植物(水稻和拟南芥)基因组进行比较,已发展出了开发该植物潜在内含子多态性(Potential intron polymorphism)标记的方法,并在59种植物中开发出了57 000多个潜在内含子多态性标记<sup>[40]</sup>。说明,ACGM技术可以将有用的质量性状与数量性状位点的信息或资源快速便捷的从研究比较透彻的模式生物中转移到研究比较浅显的物种中<sup>[9, 10]</sup>,促进有关物种的生物学研究进展。

大量研究表明,以cDNA为探针的RFLP标记可以较好地在不同物种间互用,因此被大量应用于物种间的比较作图研究。然而,RFLP技术比较复杂和烦琐、费用较高、不便于广泛应用。目前使用广泛且基于PCR技术的SSR分子标记,由于其引物序列大多存在于基因组中的无用序列中,SSR标记也只在一些近缘物种间具有通用性。而基于PCR的ACGM技术却可以克服以上不利条件,在物种间的比较作图研究中具有重要的潜在利用价值。通过比较不同物种中直向同源基因在染色体上的位置可以确定染色体进化过程中的保守区域及发生重排的区域,对ACGM技术而言,这种方法在亲缘关系较远的物种同样适用。

可见,ACGM技术具有潜在的应用价值和广泛的应用前景。

## 5 展望

虽然目前对ACGM技术的应用研究主要集中在芸薹属物种与禾本科间,但是随着以比较作图为主要手段的比较基因组学研究的蓬勃发展,及物种间染色体的共线性或同线性的大量发现,ACGM技术将广泛应用于更多物种的研究,必将为物种间进



化、变异、遗传多样性和重要物种感兴趣基因的克隆提供重要的参考信息。

### 参考文献(References):

- [1] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331.
- [2] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531–6535. [\[DOI\]](#)
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407–4414. [\[DOI\]](#)
- [4] Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M, Hetzel DJ. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 1991, 10(3): 654–660. [\[DOI\]](#)
- [5] Li G, Quiros CF. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2–3): 455–461. [\[DOI\]](#)
- [6] Brunel D, Froger N, Pelletier G. Development of amplified consensus genetic markers (ACGM) in *Brassica napus* from *Arabidopsis thaliana* sequences of known biological function. *Genome*, 1999, 42(3): 387–402. [\[DOI\]](#)
- [7] Snowdon RJ, Friedt W. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*, 2004, 123(1): 1–8. [\[DOI\]](#)
- [8] Cavell AC, Lydiate DJ, Parkin IA, Dean C, Trick M. Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome. *Genome*, 1998, 41(1): 62–69. [\[DOI\]](#)
- [9] Schmidt R. Plant genome evolution: lessons from comparative genomics at the DNA level. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(1–2): 21–37. [\[DOI\]](#)
- [10] Fourmann M, Barret P, Froger N, Baron C, Charlot F, De-lourme R, Brunel D. From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus*: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(8): 1196–1206. [\[DOI\]](#)
- [11] 李柱刚, 崔崇士, 曹鸣庆, 马荣才. 芸薹属作物脂肪酸链延长酶基因(*FAEI*)拷贝数和序列变异分析. *农业生物技术学报*, 2006, 14(6): 926–930.
- [12] Lei SL, Yao XQ, Yi B, Chen W, Ma CZ, Tu JX, Fu TD. Towards map-based cloning: fine-mapping of a recessive genic male-sterile gene (*BnMs2*) in *Brassica napus* L. and syntenic region identification based on the *Arabidopsis thaliana* genome sequences. *Theor Appl Genet*, 2007, 115(5): 643–651. [\[DOI\]](#)
- [13] 姚雪琴. 芸薹属 A、C 基因组及拟南芥 *BnMs* 候选基因区共线性比较[学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [14] Yi B, Chen YN, Lei SL, Tu JX, Fu TD. Fine mapping of the recessive genic male-sterile gene (*Bnms1*) in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet*, 2006, 113(4): 643–650. [\[DOI\]](#)
- [15] He JP, Ke LP, Hong DF, Xie YZ, Wang GC, Liu PW, Yang GS. Fine mapping of a recessive genic male sterility gene (*Bnms3*) in rapeseed (*Brassica napus*) with AFLP- and *Arabidopsis*-derived PCR markers. *Theor Appl Genet*, 2008, 117 (1): 11–18. [\[DOI\]](#)
- [16] Schmidt R, Acarkan A, Boivin K. Comparative structural genomics in the *Brassicaceae* family. *Plant Physiol Biol*, 2001, 39(3–4): 253–262. [\[DOI\]](#)
- [17] Rocherix J, Glory P, Giboulot A, Boury S, Barbeyron G, Thomas G, Manzanares-Dauleux MJ. Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(8): 1555–1563. [\[DOI\]](#)
- [18] Li YY, Ma CZ, Fu TD. Construction of a molecular functional map of rapeseed (*Brassica napus* L.) using differentially expressed genes between hybrid and its parents. *Euphytica*, 2006, 152(1): 25–39. [\[DOI\]](#)
- [19] International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 2005, 436(7052): 793–800. [\[DOI\]](#)
- [20] Yu J, Hu SN, Wang J, Wong GKS, Li SG, Liu B, Deng YJ, Dai L, Zhou Y, Zhang XQ, Cao ML, Liu J, Sun JD, Tang JB, Chen YJ, Huang XB, Lin W, Ye C, Tong W, Cong LJ, Geng JN, Han YJ, Li L, Li W, Hu GQ, Huang XQ, Li WJ, Li J, Liu ZW, Li L, Liu JP, Qi QH, Liu JS, Li L, Li T, Wang XG, Lu H, Wu TT, Zhu M, Ni PX, Han H, Dong W, Ren XY, Feng XL, Cui P, Li XR, Wang H, Xu X, Zhai WX, Xu Z, Zhang JS, He SJ, Zhang JG, Xu JC, Zhang KL, Zheng XW, Dong JH, Zeng WY, Tao L, Ye J, Tan J, Ren XD, Chen XW, He J, Liu DF, Tian W, Tian CG, Xia HA, Bao QY, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao WM, Li P, Chen W, Wang XD, Zhang Y, Hu JF, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang GY, Xiong YQ, Li ZJ, Mao L, Zhou CS, Zhu Z,

- Chen RS, Hao BL, Zheng WM, Chen SY, Guo W, Li GJ, Liu SQ, Tao M, Wang J, Zhu LH, Yuan LP, Yang HM. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, 296(5565): 79–92. [\[DOI\]](#)
- [21] Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang RL, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong JP, Miguel T, Paszkowski U, Zhang SP, Colbert M, Sun WL, Chen LL, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalima T, Oliphant A, Briggs S. A draft sequence of the rice genomes (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 2002, 296(5565): 92–100. [\[DOI\]](#)
- [22] Shen YJ, Jiang H, Jin JP, Zhang ZB, Xi B, He YY, Wang G, Wang C, Qian L, Li X, Yu QB, Liu HJ, Chen DH, Gao JH, Huang H, Shi TL, Yang ZN. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol*, 2004, 135(3): 1198–1205. [\[DOI\]](#)
- [23] Feltus FA, Wan J, Schulze SR, Estill JC, Jiang N, Paterson AH. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies *indica* and *japonica* genome alignments. *Genome Res*, 2004, 14(9): 1812–1819. [\[DOI\]](#)
- [24] Wang XS, Zhao XQ, Zhu J, Wu WR. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*, 2005, 12(6): 417–427. [\[DOI\]](#)
- [25] 卢泳全, 汪旭升, 黄伟素, 肖天霞, 郑燕, 吴为人. 基于水稻内含子长度多态性开发禾本科扩增共有序列标记. *中国农业科学*, 2006, 39(3): 433–439.
- [26] 卢泳全, 吴为人. ACGM 标记在小麦属中的通用性. *麦类作物学报*, 2006, 26(5): 16–19.
- [27] Lu YQ, Ye ZH, Wu WR. Analysis of the phylogenetic relationships among several species of *Gramineae* using ACGM markers. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(12): 1127–1131. [\[DOI\]](#)
- [28] 董德臻, 吴立成, 夏善勇, 王红蕾, 卢泳全. ACGM 标记在竹子中的通用性. *东北林业大学学报*, 2007, 35(1): 4–6.
- [29] Giancola S, Marhadour S, Desloire S, Clouet V, Falentin-Guyomarc'h H, Laloui W, Falentin C, Pelletier G, Renard M, Bendahmane A, Delourme R, Buder F. Characterization of a radish introgression carrying the Ogura fertility restorer gene *Rfo* in rapeseed, using the *Arabidopsis* genome sequence and radish genetic mapping. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(8): 1442–1451. [\[DOI\]](#)
- [30] Desloire S, Gherbi H, Laloui W, Marhadour S, Clouet V, Cattolico L, Falentin C, Giancola S, Renaed M, Buder F, Small I, Caboche M, Delourme R, Bendahmane A. Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep*, 2003, 4(6): 588–594. [\[DOI\]](#)
- [31] Brauner S, Murphy RL, Walling JG, Przyborowski J, Weeden NF. STS markers for comparative mapping in legumes. *J Am Hort Sci*, 2002, 127(4): 616–622. [\[DOI\]](#)
- [32] Etienne C, Rothan C, Moing A, Plomion C, Bodénès C, Svanella-Dumas L, Cosson P, Pronier V, Monet R, Dirlwanger E. Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid content in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(1): 145–159. [\[DOI\]](#)
- [33] Sorefan K, Booker J, Haurogné K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, Levyser O. *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev*, 2003, 17(12): 1469–1474.
- [34] Prioul-Gervais S, Deniot G, Receveur EM, Frankewitz A, Fourmann M, Rameau C, Pilet-Nayel ML, Baranger A. Candidate genes for quantitative resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet*, 2007, 114(6): 971–984. [\[DOI\]](#)
- [35] 王泽立, 戴景瑞, 王斌. 植物基因的图位克隆. *生物技术通报*, 2000, 4: 21–27.
- [36] Hawkins JD. A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(21): 9893–9908. [\[DOI\]](#)
- [37] Deutsch M, Long M. Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(15): 3219–3228. [\[DOI\]](#)
- [38] Roy SW, Gilbert W. Rates of intron loss and gain: implications for early eukaryotic evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(16): 5773–5778. [\[DOI\]](#)
- [39] Lin HN, Zhu W, Silva JC, Gu X, Buell CR. Intron gain and loss in segmentally duplicated genes in rice. *Genome Biol*, 2006, 7(5): R41. [\[DOI\]](#)
- [40] Yang L, Jin GL, Zhao XQ, Zheng Y, Xu ZH, Wu WR. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics*, 2007, 23(16): 2174–2177. [\[DOI\]](#)