

RFLP 分析在作物育种上的应用

董秀文 楼寒庭 于恩大

(哈尔滨市农业科学研究所)

在农业发展历史中,培育产量高、品质好的作物品种构成了高度发展、高产量的农业的经济基础。在作物育种工作中,许多农艺性状涉及基因较多,特别是重要农艺性状如产量、品质等是多个基因联合作用的结果,遗传力低,性状表现受环境条件的影响,等位基因隐性或其产物不易检测等,在分离世代群体中难以准确追踪选择,于是利用某些形态、生理或生化标记方法与目标性状相关连来进行间接选择,以提高选择效果,但各种标记方法通用性差,标记的数量有限,且易受环境条件影响,依靠大量的杂交组合群体进行研究,工作量大。所以期望能够进行遗传分析的遗传标记是能够稳定遗传且遗传方式简单,可反映出生物个体或群体的特征。

近年来在分子生物技术的基础上出现了一枝独秀—RFLP 检测技术,在作物遗传育种中具有广泛的前景,RFLP 全称为限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism),可作为一种新型 DNA 分子标记检测技术,人们正在构建许多主要经济作物的 RFLP 连锁图谱,为选择目标基因提供了更为直接的方法,在作物育种中有广泛的应用前景。

1 RFLP 分析的原理

各种限制性核酸内切酶在 DNA 分子上都有其特异性识别顺序和固定切点。在同一物种不同材料的 DNA 基因组内往往会出现各种变异,例如个体间 DNA 的核苷酸顺序因碱基对置换、突变或某一片段的插入、倒位、缺失等都会产生变化,意味着各自 DNA 限制性内切酶的特异性切点分布不同,从而产生的限制性片段大小的不同,在限制图谱上的分布也就会有差异,这种片段大小的差异就称为限制性片段长度多态性(RFLP),对 DNA 进行 RFLP 分析,酶解后产生的片段量多而复杂,在凝胶电泳谱上连续分布成片而不能分辨,因此,需要先制备一系列单拷贝或低拷贝的 DNA 探针,将探针与 DNA 片段杂交,并利用放射自显影在感光底片上成像,可以显示出不同材料对该探针杂交结合的 RFLP 情况。

2 RFLP 标记的优点

- 2.1 标记数目可以是无限的 RFLP 揭示的是 DNA 水平自然变异,其数目几乎是无限的。
- 2.2 大部分标记为其显性 表现 RFLP 的位点一般是单一序列,每个位点通常有两个等位基因(其显性),遵循孟德尔式遗传,因而 RFLP 标记图也可用传流的基因标图方法来构建。
- 2.3 任何生育期都可检测,不受环境影响 DNA 分子水平标记没有发育阶段或器官的特异性,不受环境条件及基因互作的影响。
- 2.4 高度变异性 每一植株都会有大量的多态性,通常只要有一次有性杂交,一个作图群体就能构建一个较丰富的 RFLP 图谱。

3 RFLP 分析在作物育种中应用

3.1 分子水平上选择目的性状

RFLP 图本身对植物育种并没有直接的用处,只有当它与经典标记即原已定位的基因结合起来才有用,当确定哪一个 RFLP 标记与目的性状表现协同分离,即目的基因与 RFLP 的

连锁,使得对期望基因重组型的选择容易进行,在分子水平上选择目的性状,不受环境条件遗传背景的影响,RFLP 连锁图谱为育种者们提供了一种高效选择手段,在马铃薯、玉米、辣椒、棉花、大豆、生菜、甘薯、番茄、麦类作物上已相继出现 RFLP 作图的有关报道。育种者们只要选择了与目的基因紧密连锁的一个或多个 RFLP 标记,也就选择了目的基因,因为与目的基因连锁的 RFLP 标记是易于检测的。这种间接对那些直接选择有困难或过于费时、费力的性状以及在分离群体中隐性性状的选择特别有效。在番茄中已鉴定的与 RFLP 标记连锁的基因有番茄花叶病毒、镰刀菌、细菌斑和根结线虫的抗性基因及控制植株生长习性(SP)和果实成熟特性的主效基因,另外玉米中矮秆花叶病毒抗性基因、莠苣霜霉病抗性基因也都建立了 RFLP 标记。

3.2 RFLP 遗传标记与作物数量性状基因定位

在农作物中有许多经济性状都是由单个基因效应微小的多基因控制且易受环境影响的数量性状,多年来对这类性状的遗传研究主要采用数量遗传学的方法,通过适当的试验设计和统计模型估算出平均数、方差、协方差、遗传力、配合力等遗传参数,用这些参数描述群体的遗传特征,对育种研究起了一定的指导作用,但对控制数量性状的基因数目、数量性状基因座位(Quantitative Trait Loci 简称 QTL)在染色体上的位置,QTL 各基因座位对数量性状的贡献大小及其基因间关系等问题则需 RFLP 检测技术来研究。目前用高密度 RFLP 图谱上的分子标记进行作物重要数量性状如产量、株高、果实及种子成分含量等 QTL 作图,可望推出控制数量性状的多基因数目,确定 QTL 在染色体上的位置,测定单个基因的作用效应。应用分子标记定位 QTL 的过程是首先检测、筛选亲本并构建遗传群体,构建分子标记连锁图,然后根据统计模型及方法与 QTL 的连锁关系及 QTL 在染色体上的区域等,达到定位 QTL 之目的。近年来,应用 RFLP 标记在番茄、玉米、水稻等作物中的 QTL 定位研究取得了可喜的成果,如水稻稻瘟病抗性多基因定位,番茄果重、可溶性固体含量、pH 值 QTL 定位研究,控制玉米成熟性的 QTL 分析等。

3.3 进行品种或品系遗传纯度的测定

对整个基因组中许多连锁位点上 RFLP 图谱的了解,则可对某一品种或纯系进行基因型图解,以代表这一品系具有品种特异性,因此基因组中一些微小变异可以从 RFLP 图谱的改变监测出来,所以 RFLP 图谱技术还可用于种子专利登记中,解决侵权纠纷,在欧洲已为一些商业育种者用来保护自己的品种权益。

3.4 改良回交育种技术

有性杂交育种就是将具目的性状品种与待改良的品种进行杂交,其分离后代的染色体由双亲的染色体片段镶嵌而成,即带有所需的亲本性状,也带有不希望出现的亲本性状。回交育种技术是引入供体基因后用以恢复亲本原有优良基因型的方法,通过多次回交,选择或回交、自交选择(目的基因为隐性),就能得到遗传上与受体亲本相似,但加入了目的基因的植株。回交育种局限性在于时间长,目的基因为主效、易检测,RFLP 技术的出现可望克服回交育种的局限,如欲转移的基因与 RFLP 标记紧密连锁,则在幼苗期,即性状尚未表达之前,就可检测目的基因是否存在,并且利用 RFLP 技术,回交育种也可针对于数量性状基因进行。

3.5 建立不相容的作物间的遗传关系,进行作物间基因组同源性的测定

在分类学上,一些性不相容的作物有一定的亲缘关系,如甘兰、萝卜、白菜都属芸苔属,玉米、高粱都属禾本科,马铃薯、番茄、辣椒等属茄科,但对它们基因染色体组的同源性所知甚少,如果染色体成分和基因顺序在亲缘种间是高度保守的,则有可能通过体细胞杂交或外源 DNA

导入等手段,替换单个染色体或染色体片段,将作物的优良性状及那些在一个种的正常杂交范围内无法得到的基因组合到一起。利用同一套探针进行 RFLP 作图已测定了番茄、马铃薯和辣椒的染色体组成和基因顺序的保守程度,建立三者之间的比较连锁图谱,通过比较番茄和马铃薯间高度连锁保守,染色体有部分同源性,有可能进行染色体或片段交换,而辣椒同源性差。

4 问题与展望

RFLP 技术结合到常规育种程序中,使人们能快速精确地获得、转移和组合基因。由于 RFLP 对育种方法学的直接影响,RFLP 探针的应用将可能作为最先列入商业或政府育种计划的生物技术之一,也将成为对农业生产影响的第一批生物技术,但 RFLP 图谱的可利用程度依赖于其饱和水平,即片段数目和这些片段在染色体组分布水平,和表现出的多态性水平,并且还要求某一多态性特征与某一期望的表现型相连锁。RFLP 作图计划的目标之一是建立“饱和图”,所有染色体每隔 10~20 个交换单位(cM)就有 RFLP 标记,一个饱和图要包含 150 个左右间隔均匀的标记,即必须用数以百计的探针作图才有可能达饱和水平,故而这项技术费用昂贵,及放射性同位素标记存在问题,是目前 RFLP 技术普遍应用的局限性,但将来发展简便方法,用生物素或酶标记的 DNA 探针,费用将会降低。(参考文献略)

国外科技动态

怎样制造一个较好的稻子烘干设备

一个简单的,主要是由竹杆和塑料薄膜制成的太阳能稻子烘干设备帮助农民防止雨季收获所带来的损害。这种烘干设备对玉米、大豆、香蕉、橡胶和鱼等仍然有效。

在雨季里农民的收成损失高达 50%,农民通常在脱粒前后晒干他们的稻子,但是,晒干需要 3~4 天。并且鼠、鸟散落和沾污的损失相当大,所以,利用这烘干设备效果是明显。

烘干设备是由三个部分:顶棚、稻床和太阳能加热物组成的。明亮的塑料顶棚使稻子受到太阳的照射,同时使稻子免受雨淋,早期的烘干设备使用聚氯乙烯做顶棚,但是不多用。现在建议使用聚乙烯膜做顶棚。烘干设备的一个重要特色是,它使用燃烧过的稻草或者黑色的塑料薄膜代替贵重的黑金属板作为太阳能的加热物。烘干设备 4 米长,3.7 米宽,2.9 米高。明亮的聚乙烯薄膜 100 微米厚,42.5 平方米。黑色的聚乙烯薄膜 140 微米厚,18 平方米。框架是竹杠和木杠,要以涂上化学的防腐料。在棚顶上有通气口,通气口上有防雨挡板。棚顶的主要部分是四边形,横断面是不规则四边形。

稻床是一个木头的架子,看上去像一个倒放的桌子,桌子上面有五个矩形盒状框架,间隔一米。桌面做为整个盒子的底部覆盖着细的金属网络,或者其它的带网眼的材料,上面放稻谷,空气容易通过。上面盒子的侧面高 20 厘米,由明亮的塑料薄膜和 4 毫米厚的胶合板制成。倾斜的框架上覆盖着黑色的塑料薄膜,能使太阳加热的热空气通过稻床。在后面有四个拉门,装卸稻谷用。明亮的聚乙烯薄膜钉在太阳能烘干设备上部和下部倾斜部分。下部倾斜部分有两个框架,上面的框架钉着白色透明聚乙烯薄膜,底下的框架上面覆盖着黑色塑料薄膜。

总之,这三个部分,顶棚和稻床要适合。太阳能空气加热部分要适合前面的稻床,朝南。要经常检查塑料薄膜是否完好,门关好以后有没有空气泄漏,然后烘干设备就可以使用了。

(马克俭 摘译自:联合国粮农组织出版物 1992 年 No. 138)