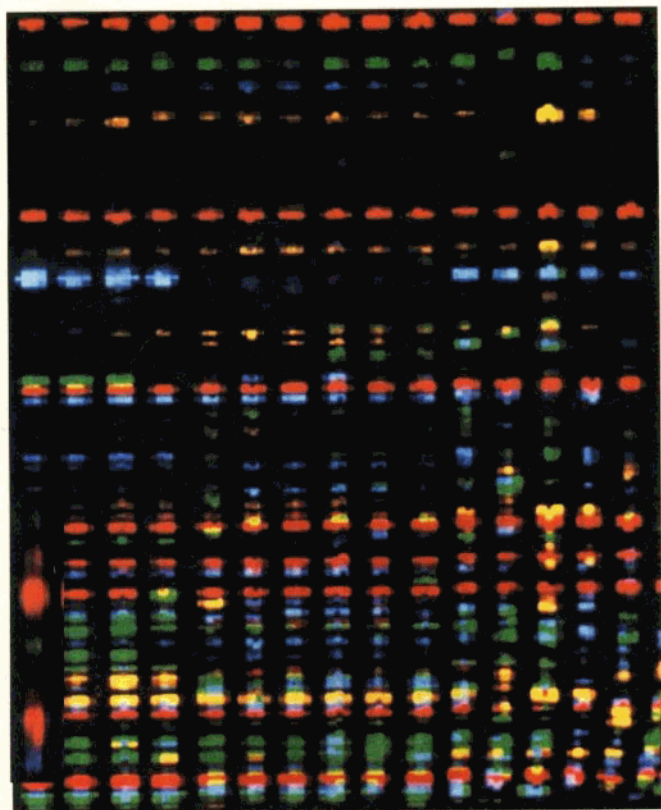


分子技术在植物遗传资源 保存中的应用指南

A. Karp, S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad, T. Hodgkin 著

张宗文 陶梅 译



分子技术在植物遗传资源 保存中的应用指南

A. Karp, S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad, T. Hodgkin 著
张宗文 陶梅 译

国际植物遗传资源研究所(IPGRI)是一个自主的国际科学组织,隶属于国际农业研究磋商小组(CGIAR)。

IPGRI 的国际地位是由其成立协议确定的,截至 1997 年 1 月,在该协议上签字的国家政府包括澳大利亚、比利时、贝宁、玻利维亚、巴西、布基纳法索、喀麦隆、智利、中国、刚果、哥斯达黎加、象牙海岸、塞浦路斯、捷克、丹麦、厄瓜多尔、埃及、希腊、几内亚、匈牙利、印度、印度尼西亚、伊朗、以色列、意大利、约旦、肯尼亚、马来西亚、毛里塔尼亚、摩洛哥、巴基斯坦、巴拿马、秘鲁、波兰、葡萄牙、罗马尼亚、俄罗斯、塞内加尔、斯洛伐克、苏丹、瑞士、叙利亚、突尼斯、土耳其、乌干达和乌克兰。

IPGRI 的使命是促进植物遗传资源的保存和利用,造福当代,利在千秋。IPGRI 与其他组织结成伙伴关系进行工作,从事研究和培训,提供科学技术咨询和信息服务,并且与联合国粮农组织保持着强有力的项目联系。

IPGRI 的研究经费来自以下国家政府的资助,它们是澳大利亚、比利时、加拿大、中国、丹麦、芬兰、法国、德国、印度、意大利、日本、韩国、卢森堡、墨西哥、荷兰、挪威、菲律宾、西班牙、瑞典、瑞士、英国和美国。同时还有亚洲发展银行、荷兰农业和乡村合作技术中心、欧洲联盟、加拿大国际发展研究中心、法国国际农业发展基金会、美洲发展银行、联合国计划发展署和世界银行。

本出版物采用和出现的地理名称并不意味 IPGRI 或 CGIAR 对如何国家的合法地位、领土、城市或地区或它的主权,或有关的边界线的界定表示了任何意见。同样,书中表达的观点属于作者,不代表这些组织的观点。

引用: Karp, A., S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad and T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

封面: 反映荧光 AFLP 带型的凝胶图像。该图像包括 30 个栽培和野生水稻的个体,经 3 个引物组合(Mse-CGA/Eco-ATG, -AAG, 和-ATT)筛选(A. Casa, M. Ferreira, S. Mitchell 和 S. Kresovich 提供)

ISBN 92-9043-323-X

IPGRI
Via delle Sette Chiese 142
00145 Rome
Italy

©International Plant Genetic Resources Institute 1997

丛书介绍

关于编撰“技术丛书”的倡议是由 IPGRI 原种质保存和利用项目组的 J.M.M Engels 博士和 J. Tall 女士于 1996 年提出的。丛书的发行对象是管理遗传资源收集品的科学家和技术工作者。每一册的目的是指导有关人员正确选择保存技术和程序,以及为适合当地条件和目标物种应用这些技术而开展的试验工作。丛书将讨论有关技术,同时对有关实验提出建议。丛书由工作在遗传资源领域的科学家撰写,因此 IPGRI 希望收到出版新分册的题目建议。此外,IPGRI 鼓励并准备支持各基因库和实验室交流研究成果。

Masa Iwanaga 博士

IPGRI 出版委员会主席和项目副所长

目 录

致谢 6

本册介绍 7

1. 引言 9

2. 提高遗传分辨率的需要 11

3. 基本技术的简述 13

3.1 基本的工具 13

3.2 第一类: 非 PCR 方法 17

3.2.1 限制片断长度多态性(RFLP)分析 17

3.2.2 可变数目串联重复(VNTRs) 20

3.3 第二类: 随机或半随机引物技术 21

3.3.1 多重随机引物 PCR(MAAP)技术 21

3.3.2 扩增片断长度多态性(AFLP) 23

3.4 第三类: 特异位点 PCR 25

3.4.1 序列标签微卫星(STMS) 27

3.5 基本技术的变通或组合 28

4. 使用不同技术 29

4.1 基本技术 29

4.2 实验数据分析 30

4.3 技术的应用 32

4.3.1 第一类: 非 PCR 技术 32

4.3.2 第二类: 随机(或半随机)引物或
多位点方法 33

4.3.3 第三类: 特异位点 PCR 序列技术 34

4.4 技术的初选与组合 35

5. 选择合适技术的框架 36

6. 使用决策流程图 41

参考文献 43

缩略词表 46

致 谢

本册作者对参加 IPGRI 于 1995 年 10 月举办的“植物遗传资源与分子遗传技术研讨会”的代表们的支持和建议表示感谢。同时也感谢英国可耕种作物研究所(IACR), 美国农业部农业研究服务署(USAD-ARS), 美国国际发展署(US-AID)以及印度国家植物遗传资源局(NBPGR)。IACR 从英国生物技术和生物科学委员会获得了资助。Angela Karp 还感谢欧洲联盟 DGX II 生物技术“分子鉴定技术”项目(合同号: BIO02-920476; BIO02-920486; BIO02-930373; BIO02-930295)组成人员的有用讨论, 还感谢 IPGRI 遗传资源科学和技术组的 Asha Mulchan 的协助。

本册的译者在翻译过程中得到了中国农业科学院作物品种资源研究所黎裕博士和中国农业科学院生物技术研究所以赵军博士的帮助, 在此表示感谢。

本册介绍

近几年分子遗传学的巨大发展为从事植物遗传资源保存的工作人员提供了新技术,首次具备了在 DNA 水平上分析动植物多样性的技术,能够直接观察和描述基因序列的多样性,达到了以前不可能做到的精确程度。开发出的很多技术已经用来研究物种基因源的变异程度和分布,探索进化和分类问题。这些技术在材料的鉴别研究和有用变异的检测方面也是很有作用的。迄今为止,很多分子技术的发展与利用工作主要集中在发达国家。目前发展中国家也有一些实验室开始了自己的研究计划,但大量的技术人员、设备和能力均在发达国家。发展中国家需要具备大量这样的设备,以便利用分子技术对其丰富的遗传多样性进行研究。

国际植物遗传资源研究所(IPGRI)的目标是加强全世界植物遗传资源的保存和利用,并把重点放在发展中国家。IPGRI 与国家项目、研究所和其它组织合作,开展有关研究和培训,以及提供技术咨询和信息服务。1995 年 10 月,IPGRI 组织召开了关于在植物遗传资源保存中利用分子技术的小型研讨会¹。讨论的主要内容之一是现有各种分子技术及其有效利用途径。在某项特定研究中,确定使用最适合的技术过程是复杂的,将取决于很多不同的因素,其中包括要解决的问题的性质、物种的生物学特性以及人力物力情况。研讨会建议 IPGRI 编写一出版物,用于指导利用者应用现有不同的分子遗传技术,解决植物遗传资源工作者面临的重要问题。

本书全面综述现有的技术,并概述它们的优点和局限

¹ Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources: Proceedings of an IPGRI Workshop, October, 1995 (W.G. Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat and V.R. Rao, eds.), Rome, Italy, 1997.

性。还为利用者在确定哪些技术可能最适合自己的需要提供了指导框架。本书不能作为实验室的技术手册,有关各种不同技术的优缺点的讨论可以在有关参考文献中找到。本书广泛地综述了各种不同技术的重要特点,以及保存工作者在开始分子遗传研究时应切记的一些要素。

分子遗传学是发展极快的领域,以后还可能发展新的技术,也同样具有优点和局限性。希望本书的利用者要能够考虑到这些,本书阐述的原理也能够使他们做到这一点。尽管分子技术为保存工作者提供大量新机会,但它们不能代替农艺形态学和生物化学研究,这些研究对资源的保存工作是非常重要的。当前工作的主要目标之一是把这些不同的研究结合起来,使人们更全面地了解现有多样性及其利用的最好途径,促进农业和林业生产和可持续发展。

1. 引言

植物遗传资源的保存和利用对促进农业和林业生产十分重要,因此对可持续发展和脱贫致富具有重要意义。农业植物遗传资源包括以下通过有性或无性繁殖的材料:(1)现在利用的栽培品种和最新培育的品种;(2)过时的栽培品种;(3)农民传统的栽培品种和地方品种;(4)栽培种的野生和杂草近缘种;(5)特殊遗传材料包括优良和常用的育种品系,非整倍体和突变体(Frankel *et al.* 1995)。林业遗传资源包括树种内和树种间的遗传材料,对人类具有或可能具有经济、科学或社会价值(FAO, 1993)。植物遗传资源保存的目标是,只要科学上和经济上可行,应尽可能多地保存目标物种遗传多样性的样品,包括当前发现的基因、特性和基因型。

植物遗传资源的有效保存需要采用一种互补的途径,即利用原生境和非原生境的保护相结合的方法,使遗传多样性最大限度地为利用服务。非原生境保存的目的在于保持样品不发生遗传结构的变化(见 Frankel *et al.* 1995 关于植物遗传资源保存的详细论述)。采用的方法要最大限度地减少突变、选择、随机遗传漂变或者遗传混杂的可能性。对于很多物种及其野生近缘种而言,可以通过把种子存储在低温和低湿条件下进行长期的非原生境保存。然而,一些无性繁殖物种,如香蕉和马铃薯,不能用这种方法保存。很多物种,特别是热带森林树种生产的种子,也不能用这种方法保存。这些物种只能保存在田间,作为生长的植株收集品,或采用试管苗进行离体保存或超低温保存(Withers, 1992)。无论是以种子保存还是以试管苗或田间的方式保存,非原生境保存都需要保持材料的完整性,并鉴别重复材料。材料的更新是必须的,但要尽可能减少群体的遗传漂变或遗传结构的变化。还需要开展鉴定研究以便确定材料的特征特性。

原生境保存被认为是保存森林物种、作物野生近缘种的

最好选择。利用原生境方法保存作物(农田保存)的兴趣也在增加。原生境保存允许材料继续进化,增加多样性并保存下来,而且还加强了保存工作者与用传统方法保存和利用遗传资源的村社之间的联系。因此,急需发展适合的技术方法来支持原生境保存。至少需要对原生境保存的群体进行定期监测,确定是否发生遗传变化,是否需要改进管理方法。

所有遗传资源保存活动都要求对基因源或基因库中的多样性进行鉴定。首先,对形态性状多样性进行描述,特别是利用者感兴趣的农艺形态性状。形态鉴定有一定的局限性:一些高度遗传的特性通常在研究材料中表现出很小的变异,性状的表现也易受环境变化的影响,检测可能很困难。形态性状提供的遗传信息通常也是有限的。这些局限性导致了生物化学技术如同工酶和蛋白质电泳(Hunter and Markert, 1957)和直接分析DNA水平多态性的分子技术的发展。然而,形态特性的鉴定是不可能被任何分子技术取代的。分子或生物化学的研究结果与形态特性鉴定是互补的。

分子遗传学在保存的各个方面都起着重要的作用,如鉴定遗传多样性和促进收集、保存和利用等。随着聚合酶链式反应(PCR)的发展,特别是大量发展的或正在发展的或已经发展的分子技术,可以用于检测、鉴定和评价遗传多样性。这些技术在揭示遗传多样性的方式上是不同的,在产生的数据类型上、可能适合的分类水平上以及在技术和资金要求上都是不同的。

应用分子标记研究遗传资源保存问题仍然处在初级阶段,需要保存工作者和分子生物学家之间的密切合作。本手册提供了有关可利用技术的索引,目的是帮助基因库管理者和其他保存工作人员选择最适合的技术,开展多样性研究工作,同时也指出了时间、资金或其它方面的限制因素。

2. 提高遗传分辨率的需要

原生境和非原生境保存的基因库管理人员和保存人员都试图保存尽可能多的物种遗传多样性。他们所做工作的有效性在很大程度上取决于获得的种质资源的遗传信息。分子标记能够提供原生境和非原生境保存重要领域的有价值的信息。对于非原生境保存,主要问题是:

- 征集: 现有收集品多样性方面的数据可用于制定收集计划和交换策略。尤其是基于分子数据计算的遗传距离可以用来鉴别特殊的离散的亚群体, 这些种群可能包含了有价值的遗传变异, 但在现有的收集品中没有充分体现。
- 保存: 遗传数据对鉴别重复材料是非常重要的, 去除重复能更有效地利用现有人力物力资源。繁殖材料时产生的遗传结构变化也需要用遗传标记监测。分子标记能提供适合于上述两方面的标记。
- 鉴定: 对收集样品遗传多样性进行评价必须以每一物种现有总遗传多样性为基础。现有的基本资料记录了每一份材料收集点的地理位置方面的数据。然而, 基本资料的记录经常丢失或不正确。分子标记可以扩展和补充基于形态或生物化学描述的特性鉴定, 提供比传统的表现型数据更准确和更详细的信息。
- 分发: 收集品的利用者依靠遗传信息, 能快速确定有价值的特性和类型。分子标记信息可以帮助进一步鉴别收集品内所包含的有用基因。多样性方面的分子数据可以为建立核心收集品提供十分重要的信息 (Hodgkin *et al.* 1995), 使核心收集品更精确地代表整个收集品。

因此, 分子标记可以用于 4 个方面的鉴定, 这些鉴定是进行有效的非原生境保存所必须的, 对解决基因库管理者面临的很多操作、组织管理和生物学方面的问题也是非常有用的 (Kresovich *et al.* 1992)。这 4 个方面包括:

- 身份:确定一份材料或个体是否正确编入目录、是否分类准确、是否保存适当、以及某一材料或群体是否随时间发生遗传变异或侵蚀;
- 相似性:在某一材料内个体之间的相似程度或不同材料之间的相似程度;
- 结构:个体、材料、群体和物种之间多样性的组成。遗传结构受原生境群体统计学因素如群体大小、生殖生物学和迁移的影响;
- 检测:测定某个分类单位、基因库材料、原生境群体、个体、染色体或克隆 DNA 片断的特殊等位基因或核苷酸序列的存在与否。

在原生境保存方面,需要确定出适合的居群,以一种使其存活并继续进化的方法管理。主要工作包括:

- 确定位置:根据遗传多样性的丰富程度及其价值和受到威胁的程度,确定要保存的居群。做到上述的关键是要了解物种群体内遗传多样性的程度和分布,最好包括分子方面的数据;
- 管理:制定监测目标群体随时间而发生变化和确保其继续存活的管理计划。保存在原生境的居群是生态系统的组成部分,其种内和种间遗传多样性须长期保持在这些水平;
- 获取:原生境保存是森林遗传资源和作物野生近缘种保存最常用的方法,而且它对传统栽培品种的农场保存也有重要意义。以这种方法保存遗传资源与以之为生的村社的联系更加紧密。管理人员要确保其它利用者能获取到这些材料,同时提供足够的遗传信息帮助利用者做到这一点。

在原生境保存的方式下,材料的特征特性、相似性、结构和监测也是非常重要的,可以用分子技术进行有用的研究。

3. 基本技术的简述

对分子遗传学的基本原理和程序进行描述的有 Weising *et al* (1995) 和 Hoelzel 和 (1994) (见参考文献)。利用分子标记检测遗传变异的一般介绍也可从 IPGRI 互连网主页(<http://www.cgiar.org/ipgri/training>) 上 IPGRI 培训材料 10.1.4 节中查到。本节将简要介绍与植物遗传资源关系最密切的技术。

3.1 基本的工具

通过利用细胞酶以不同的方式对 DNA 分子产生作用,可以对遗传多样性进行 DNA 水平的检测。在分子遗传学中最重要发现是限制酶,或称限制性核酸内切酶,它能够切割 DNA 双链。每一限制性内切酶只识别一种特定序列,一般长 4-6 对碱基(bp),称之为一个限制位点,酶在该位点切割(或限制)DNA。一般来讲,限制位点在整个基因组都会出现,因而在总基因组 DNA 上采用这种酶(限制 DNA)可使 DNA 变成成千上万个片段。限制位点出现的频率是不同的,取决于限制性内切酶和基因组。作用于某个特定基因组内经常出现的位点(频点)限制酶导致大量小片段产生,而位点不常出现(稀点)的限制酶切割将形成少量的大片段。被特定限制酶切割的 DNA 片段将在末端享有相同的序列(即限制位点,或其一部分,也就是切割产生的部分),但是末端之间的序列组成是不同的。根据它们的长度(和分子量),可以用电泳分离不同的片段。在这个过程中,把 DNA 置于由琼脂或聚丙烯酰胺制成的平板凝胶顶端的孔内。再把凝胶放入一个特殊盒子的缓冲液内,然后使电流通过凝胶板(图 1)。在电泳期间,最小的片段穿过凝胶的速度最快,将被分离到凝胶较低位置,而较大的片段移动缓慢,将被分离在凝胶的顶端。在同一凝胶上可平行跑多个样品,每份样品产生一条由不同长度片段组成的带迹。这些带迹通过用溴化乙锭等对凝胶或样品染色后是可见的,可以在紫外灯下观察到与染料结合的 DNA(图 2)。

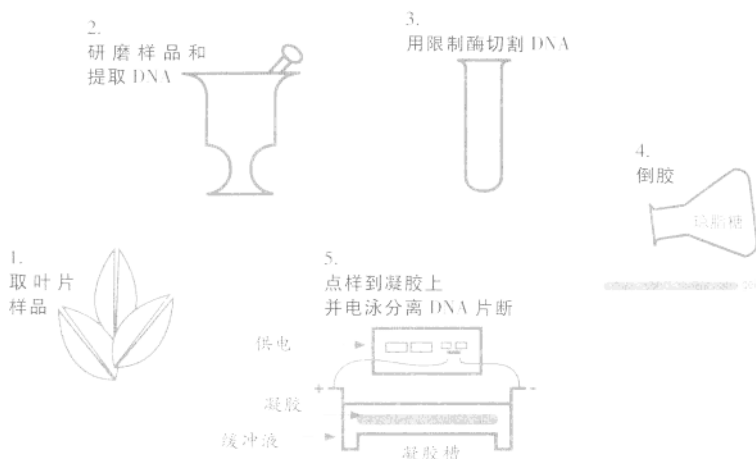


图 1. DNA 切割和电泳分离

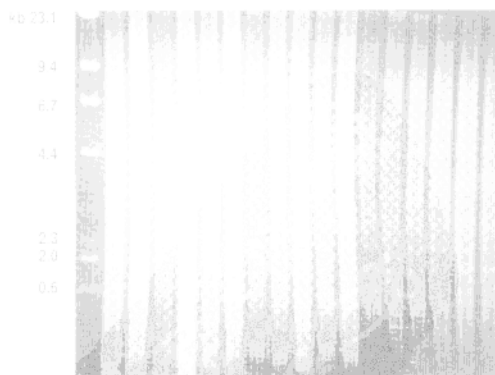


图 2. 电泳分离的大麦限制消化 DNA(来源: A.Karp, IACR-LARS)

高等动植物的基因组中有非常多的 DNA，通过电泳分离后的可见带迹仍弥散一片 (图 2)。因此检测两个不同个体的 DNA 变异需要特定的技术。有很多技术可以用于检测 DNA 的变异 (多态性)。其中一些技术是基于限制酶对 DNA 的功能消化，而其它技术取决于一种不同的酶促反应的利用，即聚合酶链式反应 (PCR)。

聚合酶链式反应(PCR)的发展在基因组分析中是一项技术突破,原因是它能够从总基因组 DNA 中扩增特定的片段。PCR 原理十分简单。它是基于 DNA 聚合酶的复制功能,从 DNA 模板复制 DNA 分子拷贝。原 DNA 模板复制出的产品成为下一轮复制的模板。这样循环复制导致 DNA 产物的大量积累(图 3)。甚至从一个单 DNA 分子开始,在几小时之内,可以产生足够检测的用量。

PCR 的基本概念首先是用 Klenow 聚合酶试验的,但是真正的突破来自耐热 DNA 聚合酶,即 Taq 聚合酶的分离和纯化。它使循环过程实现了自动化,PCR 全过程只需要加酶

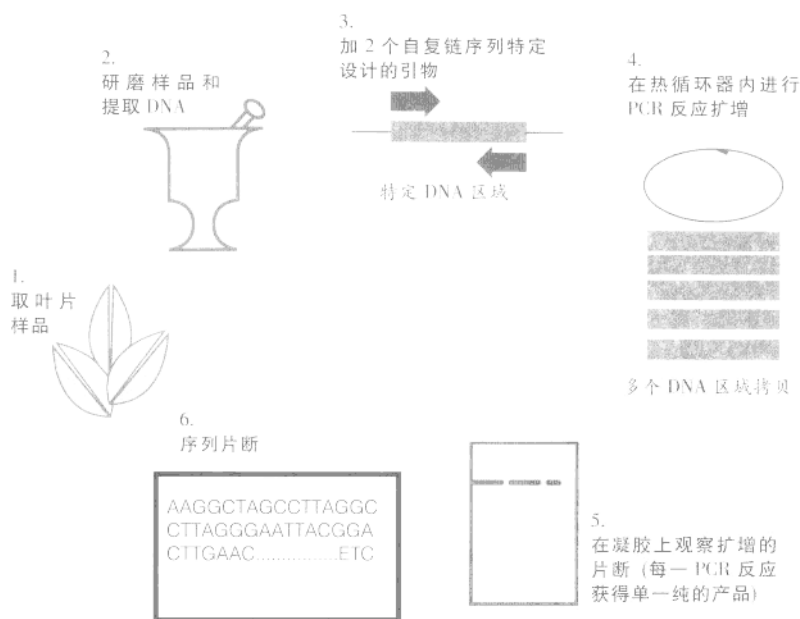


图 3. 聚合酶链式反应(PCR)

一次。

靶 DNA 是由引物退火位点定义的。引物是短链 DNA 序列,与目标序列 DNA 的对应末端互补。它们退火到目标 DNA 的互补序列,从而引导聚合酶进行 DNA 扩增。由于 DNA 分子的两条链沿相反方向运动,因此两条引物的序列方向彼此相向。退水位点之间的通常距离(也就是扩增片段的大小)介于 100bp 和几个 kb 之间,最新的“长距离 PCR”的发展使扩增片段长度增加到了至少 40kb。

通过选择特定的序列做引物可以对一个 DNA 分子的任何区域从两侧进行扩增。做这样的直接靶 PCR,这两条链序列必须是已知的。是否能获得特定的产物,取决于引物的选择,可以根据靶 DNA 两侧的序列设计这样的引物。对于生物表现出极度保守的 DNA 序列,简并引物(引物序列并不完全与目标序列互补)也可以进行目标 DNA 的扩增。除此之外,也许只能根据确切的链序列进行认真的引物设计之后,才可能扩增所期望的特定产物。

PCR 反应也可以用单个引物进行,这样的引物不是根据已知靶 DNA 侧翼序列设计的。在这种情况下,扩增将发生在基因组内任何引物能退火的互补序列位置上。由于扩增产物的本质未知,这种引物被称为随机引物。可以合成,也能从商业供给者手中购买。另外,基于已知目标序列如基因的一部分或微卫星(见下面的 VNTR)设计的单引物也可以用于 PCR 反应。这样的引物被称作半随机引物。

虽然分子生物学家利用很多其它酶,但大多数检测多样性的技术是利用限制酶、PCR,或两者都用。事实上,根据是否基于 PCR 的分析、是否用随机半随机引物、或者是根据已知序列设计的特定引物,可以把有关技术分为三个基本类型,第 1 类:非 PCR 方法;第 2 类:随机或半随机引物技术;第 3 类:靶位点 PCR 技术。现将三个类型的主要技术阐述如下: