

主编 郑 康 乐

分子标记 在作物遗传育种中的 应用



RFLP

Application in Plant Breeding

江苏科学技术出版社

分子标记在作物遗传 育种中的应用

郑康乐 主编

This Publication is Suported by the Rockefeller
Foundation Program on Rice Biotechnology

内 容 提 要

本书介绍了新型分子遗传标记——DNA限制性片段长度多态性(RFLP)的基本概念及其在作物遗传研究和育种中的应用。内容包括利用RFLP构建作物的遗传图谱、进行系统分类研究、在常规育种中对分离群体进行早期筛选、检测外源基因的导入、对重要的数量农艺性状进行遗传分析和改良、以及对产物未知的基因进行克隆、为基因工程提供目的基因。书末附有参考文献以及RFLP研究的基本实验方法和部分专业名词的解释。本书可供分子生物学和作物遗传育种科研、教学工作参考。

分子标记在作物遗传育种中的应用

郑康乐 主编

出版发行：江苏科学技术出版社

印 刷：南京花园印刷厂

开本787×1092毫米 1/16 印张9.75 字数231,000

1991年5月第1版 1991年5月第1次印刷

印数1—2,000册

ISBN 7—5345—1164—X

S·165 定价：5.50元

责任编辑 周兴安

江苏科技版图书如有印装质量问题、可随时向承印厂调换

序

近年来，分子生物学不仅在医学和工业领域有了飞速的发展，而且已渗透到农业科学的很多领域，生物工程特别是基因工程正为愈来愈多的农业科学家所重视。

DNA限制性片段长度多态性（RFLP）是一种分子水平的遗传性标记，它是在人类遗传学研究中发展起来的，目前已在临床广泛应用。80年代后期，对一些重要农作物进行了RFLP的研究，为作物遗传学研究和育种工作开辟了新路。应用这种标记，不仅能提高常规育种工作的选择效率，而且还可以对经典遗传学研究难以深入的一些作物，以及常规方法难以解决的一些问题（如数量性状的遗传）开展研究。RFLP还为有用基因的分离和克隆提供了有效手段。

本所生物工程系的有关同志，在开展水稻RFLP研究的同时，查阅了大量的文献资料，编译了这本书，旨在介绍RFLP的基本概念及其在遗传育种工作中应用的最新进展，还从实际出发，附出了基本实验方法和名词解释等。我认为本书基本上反映了该领域的研究前沿，而且还有相当的实用性。它的出版将有助于广大育种工作者了解RFLP，并进而与生物技术人员相结合，应用RFLP提高作物育种工作的效率，为我国“科技兴农”作出新的贡献。因此，我高兴地向读者推荐这本书。

周绍楷

前 言

限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, 简称RFLP) 是新近发现的分子水平的遗传性标记。植物RFLP的研究还是80年代才发展起来的, 由于它在作物遗传育种中将发挥巨大的作用, 已经引起育种家和分子生物学家们的广泛兴趣, 将成为分子生物学直接应用于作物改良的首项成就之一。目前应用RFLP作为遗传标记, 已经在不少作物上构建了遗传图谱, 如玉米、番茄、水稻、莴苣、马铃薯等, 并已着手建立重要农艺性状 (包括数量性状) 与RFLP标记的联系。

在我国“科技兴农”的有利形势下, 作物RFLP的研究也提到议事日程上来, 最近已列入国家“863”项目。要研究RFLP, 进一步应用和发展RFLP, 必须建立育种家和分子生物学家之间的沟通。为此, 在洛克菲勒基金会国际水稻生物技术项目的赞助下, 我们从1989年开始RFLP的研究, 并获得了一些初步结果。在此基础上, 我们对国内外有关RFLP的文献资料进行了分析整理, 编译了这本书, 以供广大作物育种工作者参考。

本书编译人员有郑康乐、沈波、于飞、杨炜、邹勤、徐星明、范在丰和朱旭东等同志, 其中郑康乐同志对全书作了审校; 于飞和沈波同志做了很多具体细致的工作; 杨炜和徐星明同志承担了本书的大部分绘图工作。

本书所附实验方法系美国Cornell大学Tanksley实验室所用的方法。

由于RFLP是热门, 发展迅猛, 对于有些新发展的内容, 本书已来不及收入, 好在本书的目的是介绍一些RFLP的基本概况, 为进一步开拓奠定一些基础。由于我们在这方面的经验不多, 水平有限, 尽管我们编译这本书付出了很多努力, 但错误之处肯定很多, 尚待读者们批评指正。

在本书编译过程中, 得到了中国水稻研究所领导的关心和支持; 该所生物工程系、育种系和情报系给予了大力协助; 江苏科学技术出版社的同志也给予了大力支持, 我们在此一并表示衷心的感谢。

郑 康 乐

1990年7月于杭州

目 录

RFLP导论	G. Kochert (1)
RFLP与作物育种	S. D. Tanksley等 (13)
RFLP在作物遗传和育种中的应用	郑康乐 (23)
基因组遗传学研究的新工具——寡核苷酸多态性	J. S. Beckmann (30)
用RFLP、同工酶、抗病性及形态标记构建莴苣的遗传图	B. S. Landry等 (34)
玉米RFLP遗传连锁图	T. Helentjaris (41)
水稻染色体的分子作图	S. R. McCouch等 (47)
用番茄的一套克隆构建马铃薯的RFLP图谱	M. W. Bonierbale等 (60)
RFLP在芸苔属分类学上的应用—— <i>B. rapa</i> 和 <i>B. oleracea</i> 亚种内的初步研究	K. M. Song等 (69)
以人类小卫星DNA探针检测栽培稻的DNA指纹	J. F. Dallas (77)
用玉米重组子自交系进行基因作图	B. Burr等 (82)
番茄九号染色体Tm-2a区DNA大片段的脉冲电泳和物理作图	M. W. Ganal等 (91)
大麦高等电点 α -淀粉酶多基因簇的RFLP分析	C. Kiribuchi等 (98)
分子标记在番茄可溶性固体含量育种中的应用	S. D. Tanksley等 (101)
水稻DNA限制性片段长度多态性的研究	郑康乐等 (117)
利用RFLP研究作物亲缘关系的计算机程序设计	于飞等 (122)
附录1 名词解释	(127)
附录2 实验方法	(129)
参考文献	(138)

RFLP 导 论

G. Kochert

前 言

近几年中, 基因克隆技术导致生物学的许多领域取得了重大进展, 其中最激动人心的一个进展是用克隆的染色体DNA片段作为遗传标记, 通常称作“RFLP作图”。这一技术依赖DNA碱基顺序的自然变异。DNA用限制性酶降解, 大小或长度不同的同源DNA限制性片段, 可作为跟踪染色体片段的遗传标记。这一新技术使植物遗传育种学的某些领域可能出现大的突破。本文将简要地讲解RFLP分析及其在作物育种上的某些应用。

什么是RFLP?

组成高等植物基因的遗传信息贮存于核染色体和细胞器基因组的DNA顺序中。DNA分子很大, 比细胞中任何其它分子都要大得多。DNA量通常用每个细胞的绝对量(Pg)或碱基对数目(常用千碱基对kb或百万碱基对mb表示)表示。由于DNA分子都很相似(它们都由A-T或G-C核苷酸对组成), 所以很容易用下面关系式来进行2种计量单位的换算:

$$1\text{Pg} = 0.965 \times 10^9 \text{bp} = 6.1 \times 10^{11} \text{dalton} = 29\text{cm}$$

从这一关系式可知, 人细胞每个单倍体基因组含有 $3 \times 10^9 \text{bp}$, 相当于1m的DNA。植物DNA含量变化很大, 表1列出了几种生物和细胞器的DNA含量。

表1 一些代表性生物和细胞器的DNA含量

生 物	DNA含量(每个基因组)	
	Pg	kb
大 肠 杆 菌	0.0047	4.2×10^3
叶绿体(玉米)	0.0002	1.6×10^2
线粒体(玉米)	0.0007	5.7×10^2
水 稻	0.6	5.8×10^5
玉 米	7.5	7.2×10^6
拟 南 芥	0.07	7.0×10^4
番 茄	0.7	7.1×10^5
人 类	3.2	3.9×10^6

尽管植物能快速、精确地复制自己的DNA, 但有许多机制能引起DNA的变化。可能出现一个碱基的变化, 也可能由于倒位、易位、缺失或转座导致多个碱基对的变化。由于高等

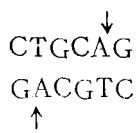
植物细胞的DNA含量很高，因此不大可能有二个生物体DNA的碱基顺序是相同的。在植物的自然群体中存在大量的DNA变异，长期以来，还无直接的方法在植物遗传学中利用这种变异。

有几种方法可发现DNA顺序的自然变异。一种方法是直接测定DNA的顺序，然后进行仔细的比较，遗憾的是该方法太烦琐而且花时间。另一种检测这种变异的方法是用一类特殊的酶（即限制性酶），它们是多种微生物产生的核酸酶。这些酶能识别DNA上的由特定碱基顺序组成的识别位点（即限制性位点）。如果DNA上存在这种碱基顺序，限制性酶就会在识别位点切开DNA。

限制性酶名称的前3个字母通常代表首次发现该酶的生物属或种，随后的字母和数字代表该生物的小种和发现该酶的次序。例如：

- Pst I 是从 *Providencia stuartii* 中发现的第一个限制性酶；
- EcoR II 是从 *Escherichia coli* 的小种 R245 中发现的第二个限制性酶。

各种限制性酶的限制性位点在4~8个碱基对之间，通常都具回纹结构，Pst I 的限制性位点如下：



（箭头表示DNA磷酸二酯键主链被切开的位点）

限制性酶能把很大的DNA分子降解成许多长短不一的小片段，产生片段的数目和每一片段的长度反映了DNA上限制性位点的分布。对每一个DNA/限制性酶组合来说，所产生的片

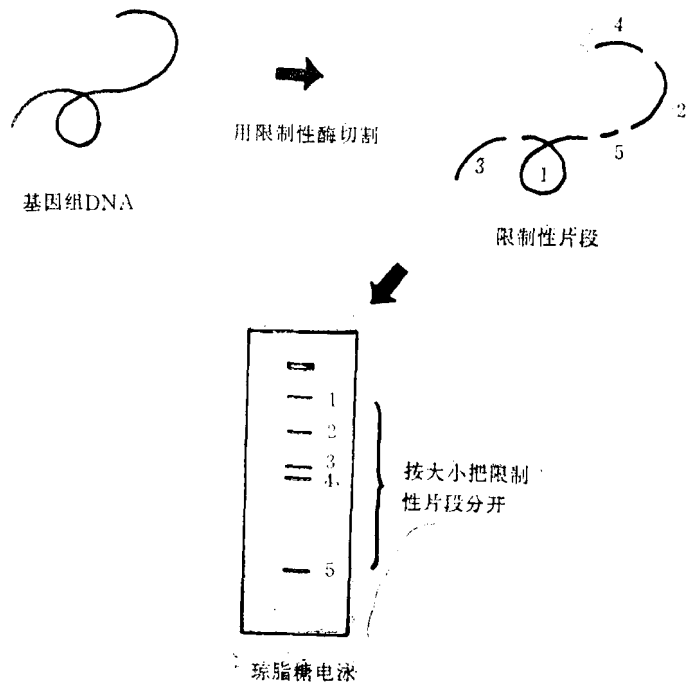


图1 DNA琼脂糖电泳

说明：由于DNA上有大量磷酸基团，它们在中性pH值条件下带负电，所以在电场中向正极移动。所有DNA都存在相同的磷酸二酯键主链，故它们有一个均一电荷密度。因此，如把DNA放到一个多孔的介质中，如琼脂糖或聚丙烯酰胺，它将以一定的速率向正极迁移，迁移速率与其分子量成比例。

段是特异的，它能作为某一DNA（或含这种DNA的生物）特有的“指纹”。

相对较小的DNA分子，如叶绿体DNA，当用一典型的限制性酶（如 $EcoRI$ ）降解时，常能产生40个不同的限制性片段。纯化的叶绿体DNA酶解后所产生的限制性片段经琼脂糖凝胶电泳，根据片段大小能被分开（图1）。凝胶用溴化乙锭染色后，可直接在紫外光下观察或拍照。碱基顺序互不相同的，或已发生插入、缺失、易位的叶绿体DNA都会产生不同大小的限制性片段。这种片段大小的差异称为限制性片段长度多态性（RFLP）。它能用于直接测定遗传性变异。人们已经用叶绿体DNA的RFLP研究了各种植物群落的系统发生和发育过程（图2）。这些研究表明叶绿体DNA RFLP变异的分析对阐明植物系统关系非常有用。然而，在作物育种中叶绿体DNA的利用受到了严格的限制，因为农艺上大多数重要的基因位于核染色体上，很少位于叶绿体DNA上。

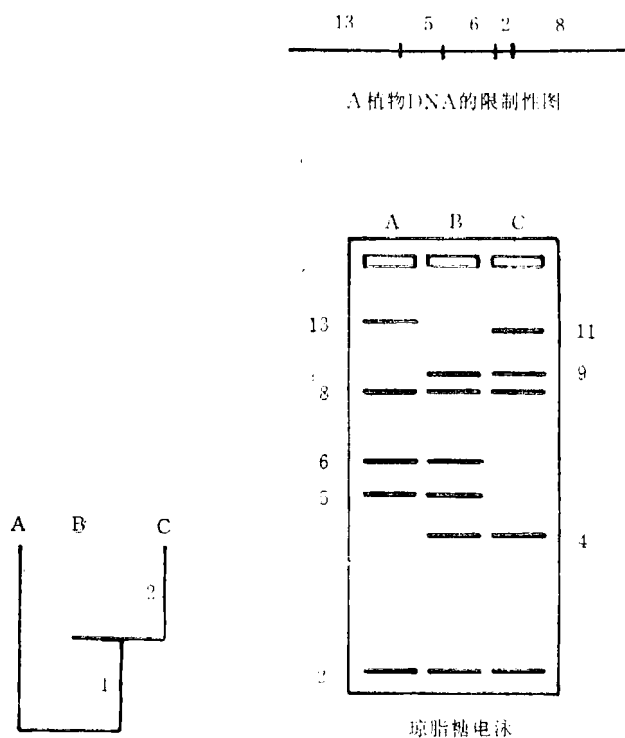


图2 用RFLP进行系统发育的分析

说明：图2右表示了植物A叶绿体基因组小部分DNA的限制图谱以及植物A和另外2个材料(B和C)的RFLP形式。如果植物A与祖先种相比变化很小，那么假定它发生了2个突变。突变1，在13Kb片段上出现一新的限制性位点，产生9Kb和4Kb的片段。突变2，在形成植物C的过程中，一个限制性位点消失，产生11Kb片段，6Kb和5Kb的消失。基于这一系列变化，就可列出系统发育图（图2左）。

RFLP分析也可用于染色体DNA，但要复杂得多，因为核DNA要复杂得多。用典型的限制性酶来酶解高等植物的核DNA会产生数百万个DNA片段，其大小变化是连续的，如把酶解的DNA进行凝胶电泳，用溴化乙锭染色后，不能看到分开的片段，如此之多的片段使DNA成连续的一片。然而，各个限制性片段在凝胶中还是分开的，但不能分辨。RFLP在不同生物的DNA之间还是存在的，只是要用更复杂的技术才能解决这一问题。这些技术包括克隆DNA探针和DNA杂交。

克隆探针的文库

由于核DNA的RFLP不能直接观察，常用的方法是用染色体DNA的小片段作为探针去检测各个限制性片段，用专一性很高的DNA-DNA杂交。这些探针能检测酶解产生的复杂的核DNA片段混合物中各个限制性片段。要用这一技术，先要准备一系列作探针用的染色体DNA片段。这样一系列的探针叫做文库。从所要研究的植物种中提取的DNA，用限制性酶酶解，把较小的片段（通常2~5Kb）用作DNA杂交的探针。每个限制性片段都能用作探针，但提供的各个片段必须是纯的。直接分离各个限制性片段非常困难，然而幸运的是我们不需这样做，我们能利用基因克隆技术和细菌（如大肠杆菌）精确复制DNA的能力。图3说明了如何把植物DNA限制性片段克隆到细菌质粒中。植物DNA先用限制性酶酶解，把各个限制性片段连接到细菌质粒中，然后用该质粒转化细菌细胞。细菌在生长分裂的同时复制了质粒。通过这些细菌的生长培养，然后分离质粒，就能提供大量的单一的植物DNA限制性片段，它们

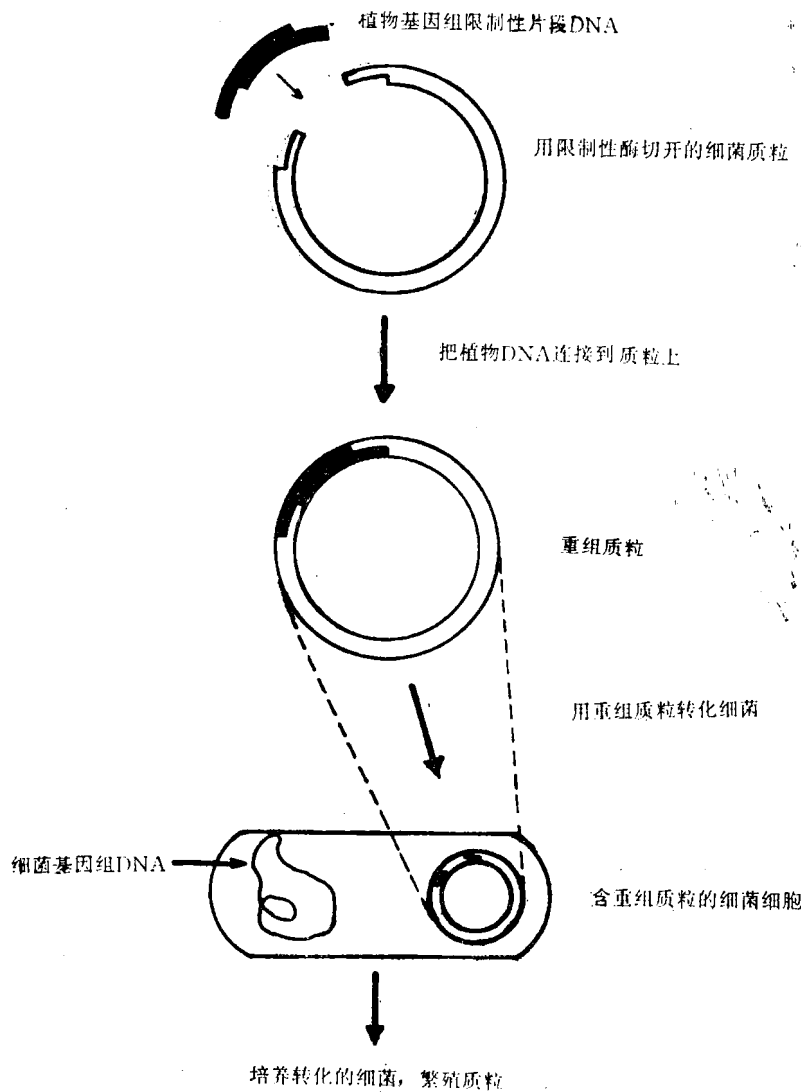


图3 植物DNA的克隆技术

适于用作杂交探针。带有某一片段的菌系能保持很长一段时间，因此，同一探针能反复地使用，或者提供给其它研究者，供他们实验之用。

用克隆探针检测核DNA RFLP的方法如下：从用来比较RFLP差异的植物提取DNA，用限制性酶酶解，然后在琼脂糖电泳上分离。上文已提到，DNA根据分子量大小在凝胶上分成数百万个限制性片段。为了利用DNA-DNA杂交技术检测特定的片段，探针DNA和凝胶上的DNA必须是单链（变性的）。凝胶浸在碱中（如NaOH）使DNA变性。为便于杂交，DNA通过Southern印迹转移的方法从凝胶转移到滤膜上，这一过程的直观图见图4。滤膜切成与凝胶一样大小，直接放在凝胶上。海绵部分浸到某一合适的缓冲液中，当缓冲液通过凝胶被吸水纸吸上来时，DNA也被带出凝胶，并在滤膜上形成带。由于滤膜直接与凝胶接触，所以滤膜上保留了限制性片段在凝胶上的形式。变性的DNA带紧紧地与膜结合。滤膜能重复用于杂交试验。

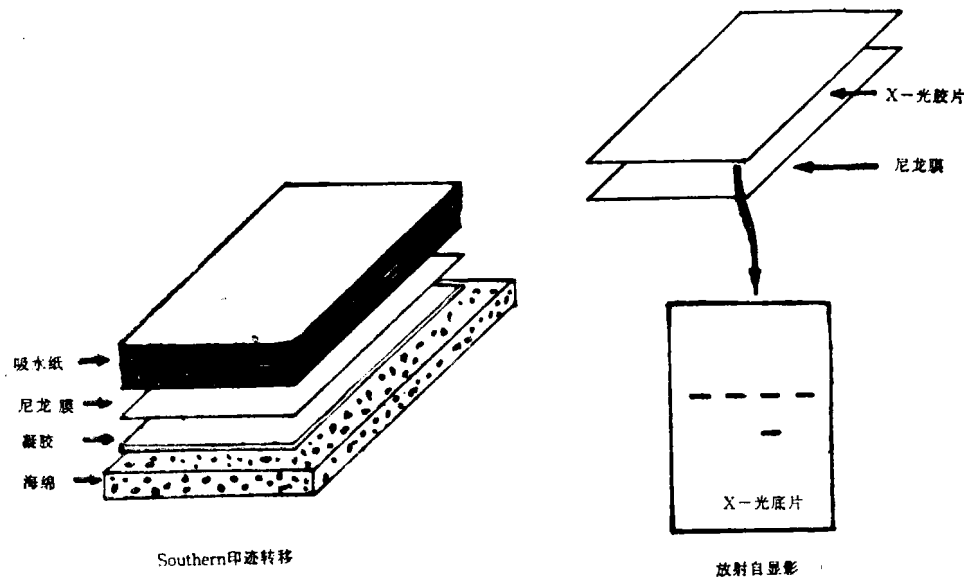


图4 Southern印迹转移和放射自显影图解

用southern 印迹转移准备好滤膜后,就可用文库中某一克隆探针来探测。这一步一般包括克隆探针的变性和使它与膜上的核DNA杂交。在合适的温度和盐浓度条件下,变性的探针与膜上同源的核DNA限制性片段专一地杂交。然而,为观察探针在什么地方发生杂交,就必须用某种方法对探针进行标记。最常用的方法是用³²P标记探针。让标记的探针与含DNA的膜杂交,冲洗掉膜上过量的未杂交探针,滤膜经过放射自显影,就可发现探针在何处与限制性片段发生了杂交。用这一方法能检测高等植物DNA复杂的酶解液中的每一个限制性片段。最近,一种不需用放射性同位素的探针标记技术正在研制之中。

RFLP遗传图谱的构建

为了讨论RFLP标记在遗传作图上的应用,用一稍微不同的形式来考虑遗传作图是有用的。考虑在二倍体生物中,遗传杂交是2个亲本杂交产生F₁, F₁自交产生F₂群体。为便于讨论,我们假定亲本植株已经通过几代自交,所有位点是纯合的。很清楚,来自这2个亲本的

F₁杂种带有每个亲本的一套染色体,每个同源染色体对的2条染色体在一定程度上有差别,因为它们的亲本的DNA碱基序列不同。

当F₁植株进行减数分裂产生配子时,其染色体通过交换发生了重组。这种重组过程形成的配子染色体是一个镶嵌体,它由2个亲本的染色体片段组成,没有2条染色体具有相同的片段序列,图5说明了染色体片段遗传的方式。在F₁自交产生的F₂植株中,同源染色体对是带有不同的亲本染色体片段的镶嵌体。这种重组过程是传统的遗传作图的基础,它依靠两个观察结果:①不同染色体上的染色体片段能进行随机重组。②同一染色体上(同源的)的染色体片段根据其相距的物理距离进行重组,紧挨的染色体片段(紧密连锁)之间的重组通常比相距较远的片段间所进行的重组要少些。因此,遗传距离或图距被定义为发生在配子形成时重组的一个函数。

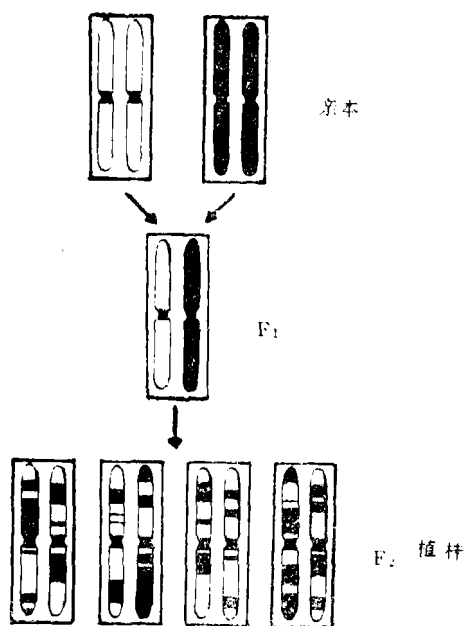


图5 染色体片段的遗传

过去,跟踪染色体片段和观察它们在配子形成时重组的唯一方法是观察发生在该片段上的基因作用所引起的表型变化。通过观察表型,如花色、株高、抗性性或胚乳的特性,我们可以推测在减数分裂和重组期间各个染色体片段的行为。用这种间接的方法跟踪染色体片段已构建了几个植物种相当详细的遗传图,但是该方法烦琐且非常花时间。

幸运的是RFLP标记提供了一个直接跟踪重组期间染色体片段的方法,而且大大地简化了该类遗传图的构建过程。我们只需直接看片段本身的RFLP标记,而不必看染色体片段上基因存在所引起的表现型。因此,我们可以直接看到植物的基因型,而不是间接地通过基因产生的表型来推测。

由于在一个作图群体中可以分析大量RFLP标记,所以能够构建一个分离群体染色体片段图。这些图能表示群体中每一植株的整个基因组中来自母本和父本染色体片段的分布。这使我们能直接选择这样一些植株,它们在遗传上能更快地达到育种计划的目标。例如,在一个回交计划中,目标是导入一个单基因,那么我们要选择的植株应该是:含轮回亲本染色体

片段数目最大，同时要保留目的基因的片段。

当我们考虑RFLP标记的遗传方式时，将会看到它们的分离方式完全与传统基因标记相同，严格地遵循孟德尔定律（见图6）。这就意味着RFLP的分离形式能用传统的孟德尔方法来分析。RFLP标记图可用构建传统标记图的方法来构建。

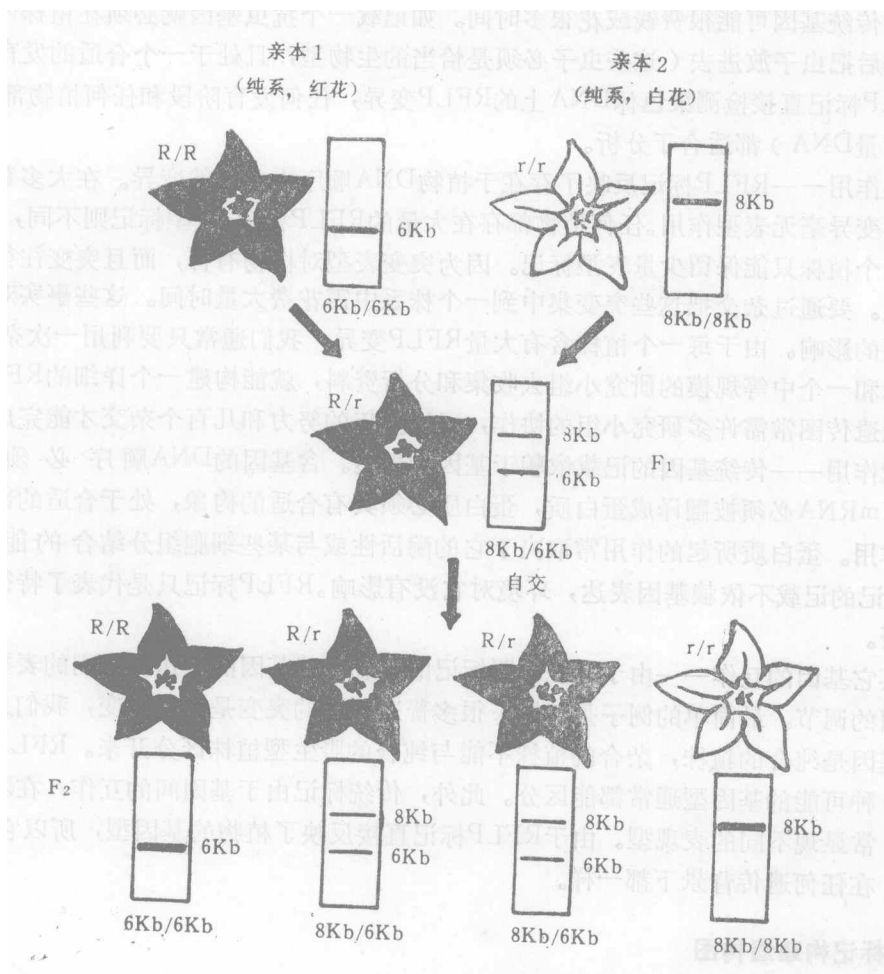


图6 RFLP的遗传方式

说明：假定植株是二倍体，自花授粉种，其所有的位点都是纯合的。

传统遗传标记和RFLP标记的比较

当把传统的基因和RFLP标记进行比较时，很显然RFLP标记对构建遗传图有许多优点，最明显的优点是：

自然的变异——要通过分离来跟踪染色体片段构建一个遗传图，就必须区别片段来自哪个亲本的染色体。如果用传统基因来跟踪染色体片段，那么每个亲本在所研究的位点上必须有不同的等位基因（有时称作野生型和突变体）。通常，我们不能依靠传统标记的自然变异，而变异株只能通过突变产生。相反，RFLP图可以利用DNA顺序上大量的自然变异，不需要

突变。不管是否进行过正规的遗传研究，事实上任何植物种都存在无限的RFLP标记。

发育阶段或植物器官——通过分析传统遗传基因的分离来推测某一染色体片段的分离，需要依赖基因的表达，这就使问题复杂化。例如，基因只能在一定的组织（花色基因通常只在开花时才能记载）或一定的发育阶段，或在一定的环境条件下才能表达。在某些情况下，记载一个传统基因可能很费钱或花很多时间。如记载一个抗虫基因就必须在植株四周做一只笼子，然后把虫子放进去（这些虫子必须是恰当的生物型，且处于一个合适的发育时期）。由于RFLP标记直接检测染色体DNA上的RFLP变异，任何发育阶段和任何植物部分（只要能提取少量DNA）都适合于分析。

表型作用——RFLP标记反映了存在于植物DNA顺序中的自然变异。在大多数情况下，这些自然变异毫无表型作用。任何植物都存在大量的RFLP标记。表型标记则不同，在多数情况下，一个植株只能保留少量表型标记。因为突变表型对植物有害，而且突变往往发生在不同植株上。要通过杂交把这些突变集中到一个株系中需花费大量时间。这些事实对构建遗传图有重要的影响。由于每一个植株含有大量RFLP变异，我们通常只要利用一次杂交、一个建图群体和一个中等规模的研究小组去收集和分析资料，就能构建一个详细的RFLP图。然而，传统遗传图常需许多研究小组的协作，通过多年的努力和几百个杂交才能完成。

环境作用——传统基因的记载依赖于基因的表达。含基因的DNA顺序必须被转录成mRNA，mRNA必须被翻译成蛋白质，蛋白质必须具有合适的构象，处于合适的部位才能发挥它的作用。蛋白质所起的作用常取决于它的酶活性或与某些细胞组分结合的能力。由于RFLP标记的记载不依赖基因表达，环境对它没有影响。RFLP标记只是代表了特征碱基序列存在与否。

与其它基因的互作——由于传统基因标记的记载依赖基因的表达，它们的表型效应常受其它基因的调节。最简单的例子是显性。很多普通基因的突变是隐性突变，我们只能记载突变等位基因是纯合的植株，杂合的植株不能与纯合的野生型植株区分开来。RFLP标记是共显性，3种可能的基因型通常都能区分。此外，传统标记由于基因间的互作，在不同的遗传背景下，常显现不同的表现型。由于RFLP标记直接反映了植物的基因型，所以它们互相是独立的，在任何遗传背景下都一样。

用RFLP标记构建遗传图

下面介绍构建RFLP图的一套固定格式。

1. 亲本的选择

当选择构建RFLP图的杂交组合亲本时，既要遗传差异性大，能表现足够的RFLP，但又不能相差太大以致引起子代不育。如能选择一个某些理想的农艺性状能分离的杂交，更为有利，但这通常不太可能。在迄今已建图的大多数植物中，一个种的品种之间能找到足够的变异。例如，在洛克菲勒基金会的水稻RFLP建图项目中，就用了籼稻和爪哇稻之间的杂交，而番茄栽培种的遗传基础太窄，为得到一定数量的多态性，某一品种必须与野生种进行杂交。

由于我们不能事先知道在某一作物中有多少RFLP变异，所以只能随机选择一些克隆探针进行测定。这样一个测定必须包括那些代表分类变异谱的品种或植物材料，也应包括能与品种进行杂交的有关野生种。我们可以利用现有的各种资料来选择进行测定的植物，现有的

系统或进化研究可作参考，同工酶的测定也可利用。

选择好进行测定的一系列植物后，从每一材料的各个植物中提取DNA，用限制性酶酶解，按常规方法进行多态性测定（见图7）。记录每一材料RFLP的等位基因，然后选择表现一定量多态性的2个材料进行杂交。

2. 构图群体的产生

被选择的亲本植株进行杂交产生的 F_1 植株，在自花授粉植物中，如水稻，所有 F_1 植株是相同的，双亲间所有的RFLP在 F_1 是杂合的，构图群体来自 F_1 自交产生的 F_2 群体，记载 F_2 代RFLP的分离。构图群体也可通过 F_1 与某一亲本回交产生，然后观察回交一代中的分离。有可能的话，用 F_2 群体比较好，因为对大小相近的群体来说， F_2 群体比回交群体可以获得更多的信息。约50株 F_2 或回交植株的构图群体已足够用于构建一个相当详细的图。对正在进行植物育种研究的材料来说，用过去杂交的剩余种子也许已经能得到一个合适的作图群体。如果作图不需做任何杂交，这将大大缩短作图过程。

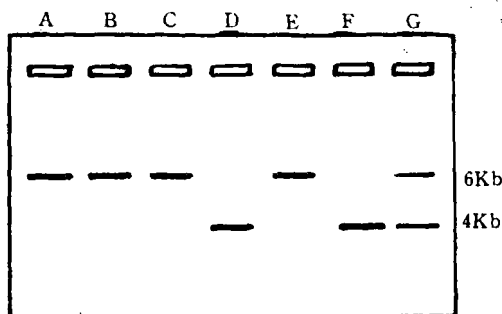


图7 DNA多态性测定

说明：此图表示用一克隆探针与一个植物中的几个材料的DNA进行杂交可能得到的结果。材料A、B、C和E的6Kb等位基因是纯合的，材料D、F的4Kb等位基因是纯合的，材料G的这2个等位基因是杂合的

3. 作图群体中RFLP的测定

一旦得到作图群体，就可取群体中每个植株提取DNA。必须认识到作图群体中每一植株的染色体只含有亲本染色体片段一种特定的排列，要得到一个RFLP图就必须确定作图群体中每一植株含有哪个亲本的染色体片段。如果 F_2 或回交植株能够进行有性繁殖，那么重组将会破坏染色体片段的特定组合。因此我们必须想尽办法使作图群体中的每个植株都生长旺盛，这样就能重复提取，得到大量DNA。然后我们可按下面一系列步骤，通过记载作图群体中各个植株的RFLP进行作图。

（1）多态性测定。从文库中逐一选取探针，对亲本进行测试，以确定哪个限制性酶能在亲本之间观察到多态性。所需酶的个数取决于亲本植株存在的变异量。多态性很丰富的植物，如玉米的近交系，通常只需1种或2种酶就能用大多数探针检测到多态性。在水稻中用了11种酶，约有75%的探针用这些酶能检测到多态性。

（2）记载。当找到能发现多态性的探针/酶组合后，我们就能对作图群体进行测定。要完成该项工作，就必须准备许多琼脂糖凝胶，接着再从凝胶准备DNA杂交用的滤膜。作图

计划中的每一个限制性酶必须有一套滤膜。每一套滤膜必须含有作图群体中每一植株的酶解DNA。因此,一套作图滤膜可能含用EcoR I 酶解的每一个F₂植株的DNA,另一套也许含用Pst I 酶解的每一个F₂植株DNA。如果用一已知的探针/酶组合能检测亲本植株之间的多态性,那么该探针将用于相应的一套作图滤膜上。例如,用36号探针能发现经Pst I 酶解的亲本间的多态性,我们就可用该探针与一套Pst I 的作图滤膜杂交。在F₂群体中,如只分析一个RFLP,那么只可能出现3种类型的植株,即2种纯合体(与2个亲本中的一个相同)和一种杂合体。所以,用文库中的每个探针进行测试时,作图群体中的每个植株要么记作一个杂合体,要么记作2种可能的纯合体中的一个。

(3) 连锁分析。用文库中的探针测试作图群体,不断积累资料,这些资料就可用来构建连锁图。连锁分析建立在探针趋于协同分离的程度上。当然,用于作图研究的第一个探针不可能对连锁提供任何资料,但从第二个探针开始,我们就能确定是否有连锁。如果第二个探针与第一个探针有连锁,它们会趋于协同分离(对第一个探针来说,F₂是杂合的植株,对第二探针也可能是杂合;用第一个探针发现某一亲本的等位基因是纯合的植株,用第二个探针也是纯合的)。如未发现连锁,那么对2个探针来说,纯合和杂合的分布是随机的。简单的统计分析,如方差分析,就可测定分离是随机的、还是连锁的。开始几个探针由于是随机选择的,不可能有连锁,也不会出现协同分离。但是,随着探针数的增加,总会发现连锁。开始时连锁群的数目会比染色体多,但随标记增加,2个数目将趋接近。测定每一探针后,可以分析它与以前已作图的其它所有标记是否有连锁。因此,当测定第100号探针时,我们可以测定它与以前已研究过的其它99个探针是否有连锁,这就必须做100个正交测定。显然,当一个RFLP作图计划的大量资料迅速积累起来时,就需要用计算机来有效地贮存和分析这些数据。当一新探针被测试后,如与资料中的一个或多个标记有连锁,用某种算法(如最大似然法)通过计算机分析就可确定图距,用任何一种常用的作图函数就可把重组资料转换成图距。

RFLP图与经典图

RFLP作图计划的目标之一是构建一个“饱和”图。该图中,所有染色体每隔10~20交换单位(cM)就有RFLP标记,而且任何经典基因都包含在几个cM的RFLP标记内。由于经典的植物遗传图约为1500cM,故约150个间隔均匀的标记就足够构建一个饱和图。由于探针是随机选择的(代表了染色体位点的随机性),所以必须用几百个探针作图才能达到这个饱和度。

RFLP图与经典图的关系——建成一个饱和或接近饱和的RFLP图以后,如有可能,下一步一般是把RFLP标记的连锁群与经典遗传图联系起来。根据具体情况,有几种方法可供选用。如果有植物的非整倍体材料,这对研究RFLP和经典遗传图之间的关系非常有用。事实根据是我们通常能按照杂交标记的强弱确定RFLP位点的数目。因此,如某一RFLP标记在1号染色体上,那么只有1条1号染色体的植株与具有2条1号染色体的正常植株相比,前者的标记强度大约只有后者的一半。如全套单体都有,就可把每个RFLP连锁群定位到染色体上。按同样的方法,也可用三体来定位。

把经典基因放到RFLP图上——一旦RFLP图建成后,就可把经典基因定位到RFLP图上。要做这项工作,就必须有一个传统基因和RFLP标记都进行分离的作图群体。通过确定哪一个RFLP标记与经典标记表现协同分离,我们就能把经典标记定位到RFLP图上。

RFLP在植物育种上的应用

构建一个RFLP图是非常有意思的,在构图过程中我们还可收集一些对系统和进化研究非常有用的资料。然而,RFLP图本身对植物育种没有用处。只有当它与经典标记分析结合起来,它才有用。间接选择是RFLP图用来补充常规育种程序的一个手段。当直接选择某经典基因花钱、花时间且困难重重时,间接选择法就显得很有用了。间接选择法不是选择目的基因,而是选择一个或多个紧密连锁的RFLP标记。如果RFLP标记确是连锁的,它们在分离时与目的基因仍保持连锁,这使我们相信在选择RFLP的同时,也选择了经典基因,因为使二者分开的重组机率太小。例如,某一经典基因的二侧10cM处各有一个标记,那么2个标记中至少有一个与该经典基因保持连锁的概率为99%。

间接选择某一RFLP标记而不直接选择某一基因对几个植物育种方案特别有利,如对隐性基因的选择。假如我们要把某一隐性基因通过回交育种方法转入某一品种,回交程序包括回交和选择的交替进行,要选择含目的基因的子代就必须在回交循环的某些环节上进行选择。如该基因是显性的,我们就能直接选择。但是隐性基因在任何回交植物中不能表达,这就需要做子代测试(通过回交植物的自交来测定隐性基因的存在)。然而用连锁的RFLP标记,我们可以间接选择隐性等位基因,不需做子代测定,整个过程可大大缩短。在某些情况下,间接选择显性基因对回交程序也是有益的。连锁的RFLP标记能在植株苗期进行测定记录,因为只需提取少量的DNA,故不必毁坏植株。不带目的基因的植株能在早期被剔除,节省了空间和费用。

间接选择的另一大用途是在育种计划中要选择带2个或多个表现型相同的独立基因的植株。例如,作物抗虫育种中,希望一个新育成的品种包含一个以上的抗性基因,用间接选择也许很有利。当作物对某一种昆虫的抗性基因不止一个时,要选择它就很困难,因为不管有1个、2个或更多个抗性基因,它们的表现型相同。其次,虽然某些子代测定很有用,但当子代试验包含几个基因时,它也无能为力了。然而,一旦我们完成了各个抗虫基因与RFLP标记的连锁,通过杂交就能容易地跟踪任何数目的基因,不需子代测定,就可鉴定每个植株有1个、2个、3个或多个抗性基因。

数量性状——非常遗憾,植物中大部分重要的农艺性状不是独立的单基因,而是受分散在染色体组上的多个基因控制。这样一个多基因体系中的每个基因对目的性状只有少量的正作用或负作用,没有明显的显性。表型受环境影响很大。所有这些特点使数量性状很难进行分析。适用于单基因性状的传统的孟德尔分析方法不能用于数量性状的分析,我们只能用生物统计学方法,在不同年份、不同环境下进行大量试验来努力获得一个理想的结果。在RFLP作图技术出现前,植物育种的这一领域似乎不可能有十分重大的进展。由于我们在某个杂交中,用RFLP标记的同时,能跟踪所有染色体片段的分离。所以基本的做法是寻找被研究的数量性状与RFLP标记的特定染色体片段之间的相关性。如这种相关性存在,则该染色体片段一定含有该数量性状(即由一个或多个基因决定的性状一定在这个染色体片段上)。该方法最困难的部分是建立性状和特定染色体片段之间的联系。RFLP标记容易记载,但数量性状必须用经典方式记载。然而,这一费时的过程一旦完成,特定的染色体片段就暗示了性状。对数量性状有正作用的特定染色体片段能从植物群体中被选出来,高效地转到某一株系中去,这是可行的,因为用一不受环境影响和基因互作影响的方法能同时在一个植株中测定几