

RAPD 技术在植物遗传育种上的应用

刘雄伦¹ 李

(1 湖南农业大学杂交小麦研究中心, 长沙 410128)

(2 湖南农业大学农学系, 长沙 410128)

摘要 RAPD 技术以其快速、简便、高效等优点,已广泛应用于多学科、领域。本文综述了 RAPD 技术在植物遗传育种上的应用,如遗传多样性研究、分子标记辅助育种、品种(杂种)真实性鉴定、基因定位、构建遗传图谱等。

关键词 RAPD 应用 植物遗传育种

RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)是 Williams 和 Welsh 两个研究小组同时(1990)创建的一种运用随机引物扩增基因组寻找多态性 DNA 片段作为分子标记的新技术^[1,2]。RAPD 技术建立在 PCR(Polymerase Chain Reaction)技术基础之上,它是利用一系列不同的寡聚核苷酸为引物,对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物通过 PAGE 或琼脂糖凝胶电泳分离,经 EB 染色或放射自显影来检测扩增产物 DNA 片段的多态性。这些扩增产物 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。由于 RAPD 技术具有快速、简便、高效等优点,这一技术已得到广泛应用。在植物遗传育种方面, RAPD 技术主要应用于以下几个方面。

1 遗传多样性研究

基因型不同的品种,或不同亲缘关系的物种,基因组内核苷酸序列存在差异。当使用同一随机引物对不同基因组体外扩增时,基因组上与引物互补的 DNA 片段(模板)的数目、位点是不同的,因而其扩增产物(DNA 片段)的大小、数目也不同,亦即扩增产物表现出多态性。当使用一系列不同的随机引物扩增时,这种多态性更加丰富。这种扩增产物的多态性反映了被测材料的遗传多样性。进一步通过相关分析、聚类分析等数量遗传分析手段,还可以对不同亲缘物种间的分类、遗传距离、系统发育、亲缘关系等进行研究。RAPD 技术已应用于多种植物的遗传多样性研究,如大豆^[3,4]、玉米^[5,6]、旱麦草属^[7]、棉花^[8,9]、桑属^[10]、茶^[11]、芭蕉^[12]等。

刘新芝等(1997)^[5]利用 RAPD 技术,对我国目

前推广的 15 个主要玉米亲本自交系作了类群划分。从 105 个随机引物中筛选出的 6 个引物使 15 个不同基因型的玉米自交系扩增产物具有多态性。依据 6 个引物扩增谱带建立 0、1 型数据,计算 15 个自交系间遗传距离,并进行聚类分析,将 15 个自交系共划分为 6 个类群。

张继益等(1999)^[7]用 31 个随机引物对我国新疆和中东地区的 11 份旱麦草属种质资源、2 个普通小麦亲本和 1 个普通小麦与东方旱麦草远缘杂种后代作了 RAPD 分析。对扩增出的 321 条谱带的研究发现,该属植物在新疆地区具有较丰富的遗传多样性。同时将一个根据形态性状定名为光穗旱麦草的样品修正为东方旱麦草,还揭示出旱麦草与普通小麦之间有明显的遗传分化,并发现四倍体光穗旱麦草的两个基因组分别来自二倍体光穗旱麦草和毛穗旱麦草。他们还结合前人的研究结果,建议将光穗旱麦草的两种细胞类型分别划分为两个独立物种,将 3 个二倍体物种(光穗旱麦草、毛穗旱麦草、旱麦草)的基因组符号分别定为 F、F^d 和 F^t,同时提出了三者的起源关系。

2 分子标记辅助育种

通过 RAPD 分析可以筛选出与目标基因(性状)连锁的 DNA 片段,作为辅助育种的分子标记。很多植物的目标基因(性状)已经找到与其连锁的 RAPD 分子标记,这些标记在植物育种中发挥了重要作用。目标基因(性状)有小麦抗白粉病基因^[13]、水稻光敏核不育基因^[14]、水稻温敏核不育基因^[15]、大麻雄性性状^[16]、硬粒小麦镉吸收调控基因^[17]、燕麦日长钝感基因^[18],等等。

由于 RAPD 标记不受栽培水平、气候条件、发育阶段等因素影响,因而较其它遗传标记(如形态学标记,同工酶标记)而言,RAPD 标记具有更高的稳定性和可靠性。

李松涛等(1995)^[13]用 RAPD 技术对小麦抗白粉病基因 pm4a 的近等基因系进行分析,在 100 个随机引物中找到了 3 个引物在这对抗病近等基因系中所扩增出的带型出现差异。并根据理论计算找到的差异与抗性基因连锁的概率是 0.7,可知 3 个差异中有 2 个标记与抗性基因连锁。王京兆等(1995)^[14]分别以农垦 58S 与 FL₂ 杂种 F₂ 分离群体中不育和可育群体核 DNA 为模板,通过 RAPD 分析,从 300 个引物中发现 2 个引物在不育群体和可育群体中扩增多态性产物。就其中一个引物(OPX-07)对杂交亲本和 F₂ 个体的 RAPD 分析进一步证明这种多态的可靠性(农垦 58S 和 F₂ 不育群体扩增产物中都出现了一条长度约为 0.8kb 的 DNA 片段,而可育亲本 FL₂ 和 F₂ 可育群体的扩增产物均没有该片段)。Southern 杂交试验表明这个多态性产物是一种重复序列。Mandoline 等(1999)^[18]用 20 个 10 核苷酸引物对 14 个大麻种质作 RAPD 分析,其中一个引物(OPA8)扩增出一个与雄性性别相关的 RAPD 标记。用该分子标记检测 167 种不同基因型,发现表现型为雄性的基因型全部含有该标记,表现型为雌性的基因型只有 3 个含有该标记。

3 品种(杂种)真实性鉴定

通过检测远缘杂种或体细胞杂种中特异性 RAPD 标记的有无,可以鉴定杂种的真实性。也可以通过建立品种(组合)的 RAPD 指纹档案,用来鉴定品种(组合)纯度,为种子质量提供可靠资料,或用来保护品种(组合)专利。鲍晓明等(1993)^[19]用 RAPD 技术鉴定了两个小冰麦易位系。肖顺元等(1995)^[20]用此法鉴定了柑桔体细胞杂种的真实性。李文彬等(1996)^[21]用 RAPD 技术对栽培稻和野生稻原生质体融合的体细胞杂种进行了鉴定,证实它们包含双亲的基因组成分,但来自双亲的基因组成份不是对等的。马文宾等(1998)^[22]通过三系杂交稻亲本的 RAPD 分析,指出运用 RAPD 鉴定稻种具有简便、灵敏、高效的优点,在鉴定杂交稻种的实践中有良好的应用前景。周群初等(1999)^[23]利用 RAPD 技术鉴定辣椒杂种纯度,他们在 39 个随机引物中找到了 2 个可用于鉴定湘研 5 号、4 个可用于鉴定湘研 10 号的引物。

4 基因定位

利用 RAPD 进行基因定位,根据基因组 DNA 样品来源可有如下两种方法。

4.1 利用近等基因系进行基因定位

近等基因系是由提供目标基因的亲本同轮回亲本杂交,并连续回交,经每代对目标基因(性状)选择而获得。近等基因系也可以由自然突变或诱发突变产生。利用 RAPD 对这两种基因组 DNA(近等基因系与轮回亲本或野生型)进行多态性检测,找出两种基因组扩增产物的差异,并以这些差异产物为探针,经 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphisms)分析即可定位此基因。

Martin 等(1991)^[24]对番茄近等基因系(带细菌病抗性基因 Pto)与其轮回亲本作 RAPD 分析,筛选出 7 个多态性 DNA 片段,从中随机挑选 4 个进行 Pto 连锁分析,其中 3 个标记(S41、R110 和 RS120)同 Pto 基因连锁,并经 RFLP 遗传分析,把这 3 个标记定位于 RFLP 连锁图上(第 5 染色体上)。

4.2 利用目标基因有分离的 F₂ 群体或 DH(Doubled Haploid)群体进行基因定位

Michelmore 等^[25]首先提出利用 F₂ 群体进行基因定位的方法,即 BSA 法(Bulked Segregants Analysis)。其原理是根据 F₂ 代个体中目标基因的分离构成两个群体(一个含有目标基因,另一个不含目标基因),每个群体随机取 10–20 株,提取 DNA 并等量混合,这样就构建了两个 DNA 库。由于这两个 DNA 库对目标基因而言是经选择的,而基因组其余部分是随机组成的,因此这两个 DNA 库在目标基因区域完全不同,而其余区域则近似相同,也就是说,这两个 DNA 库相当于一对近等基因池。Michelmore 等用莠苣对 Dm5/8(棉疫病)抗性基因有分离的 F₂ 群体为材料,将 F₂ 群体分成对棉疫病抗性纯合子和敏感纯合子两组(经 F₃ 代鉴定),分别构建两个 DNA 库,用 300 个引物对这两个 DNA 库进行 RAPD 分析,找到 3 个多态性标记与 Dm 5/8 基因连锁,并经 RFLP 分析,把该基因定位于莠苣 RFLP 连锁图上。

朱立煌等(1994)^[26]用抗稻瘟病的籼稻品种“窄叶青 8 号”与感稻瘟病的粳稻品种“京系 17”的 DH 群体建立抗病池和感病池,通过对两池的 RAPD 分析,发现一个与稻瘟病抗性共分离的长度约 0.6kb 的分子标记(BP127),并测出 BP127 在水稻基因组中有两个同源序列,一个定位在第 8 染色体上(称为

BP127A), 另一个定位在第 1 染色体上(称为 BP127B)。进一步的 RFLP 分析表明抗稻瘟病基因(Pirzh)与 BP127A 连锁,与 BP127A 间的遗传图距为 14.9cM。

Park 等(1999)^[27]对 Common bean 杂交组合 PG-50× Chichara F₂ 作 RAPD 分析,结果发现 6 个 RAPD 标记与抗锈基因 U_r-9 连锁,其中标记 OA4•1050 与 U_r-9 连锁最密切,相距 8.6cM; 28 个 RAPD 标记与无限生长习性(indeterminate growth habit)基因 Fin 连锁,其中 OQ3•450 和 OA17•600 与 Fin 等位基因连锁最密切,分别相距 1.2cM 和 3.8cM。

5 构建遗传图谱

通过 RAPD 分析,可以快速找出同某一区域连锁的 DNA 标记,用来为 RFLP 连锁间隔区提供新的 DNA 标记,增加 RFLP 连锁图中某一特定区域 DNA 标记的密度。寻找某一 RFLP 间隔区新 DNA 标记的方法与用 BSA 法基因定位的过程相似。不同的是 DNA 库的构建不是根据目标基因的分离情况,而是利用 RFLP 作图群中的 RFLP 分析情况构成,也就是根据某一区域两端 DNA 标记的多态性差异构成。^[28] Giovannoni 等(1991)^[29]对番茄 RFLP 连锁图间隔区进行了新标记的寻找。用 200 个引物对番茄作图群体构建的 4 个 DNA 库进行多态性分析,找到了 3 个 DNA 标记 307N、38J、148J。其中 307N 位于所需添补的 17.2cM 的间隔,38J 在所需添补区附近,而 148J 远离间隔区。

由于 RAPD 能对整个基因组进行多态性检测,因而也可以直接利用 RAPD 进行基因组作图。它同 RFLP 作图、重复序列作图相比,不需预先克隆标记或进行序列分析,而是直接完成多态性 DNA 标记的寻找,并同时完成对这些多态性标记的遗传作图。RAPD 标记也可以结合其它标记共同作图。Xiaofeng Yang 等(1995)^[30]构建的芹菜遗传图谱包括 100 个 RAPD 标记、29 个 RFLP 标记、4 个同工酶标记、1 个抗病性标记和 1 个生长习性标记,整个图谱包括 11 个大群、9 个小群,共 803cM,相邻两标记间平均遗传距离为 6.4cM。

综上所述, RAPD 技术以其快速、简便、高效等优点,在植物遗传育种诸方面得到广泛应用。但 RAPD 技术建立在 PCR 基础上,因而也继承了 PCR 的一些缺点,其中最主要的不足之处是可重复性差。随着遗传育种理论和实践的不断深入,这一技术将在更广阔的研究和应用领域作出新的贡献,技术本

身也将在反复实践中不断完善。

参考文献

- [1] Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J. et al. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531– 6535
- [2] John Welsh and Michael McClelland. Nucl Acids Res, 1990, 18: 7213– 7218
- [3] 惠东威, 庄炳昌, 陈受宜. 遗传学报, 1996, 23(6): 460– 468
- [4] 邱丽娟, Randall L. Nelson, Lila O. Vodkin. 作物学报, 1997, 23(4): 408– 417
- [5] 刘新芝, 彭泽斌, 傅骏骅等. 中国农业科学, 1997, 30(3): 44– 51
- [6] 孙致良, 张超良, 金德敏等. 遗传学报, 1999, 26(1): 61– 68
- [7] 张继益, 董玉琛, 贾继增等. 遗传学报, 1999, 26(1): 54– 60
- [8] 王心宇, 郭旺珍, 张天真等. 作物学报, 1997, 23(6): 669– 676
- [9] D. S. Mukan and B. R. Lyon. Genome, 1995, 38: 1005– 1008
- [10] 冯丽春, 杨光伟, 余茂德等. 中国农业科学, 1997, 30(1): 52– 56
- [11] F. N. Wachira, R. Waugh, C. A. Hackett et al. Genome, 1995, 38: 201– 210
- [12] Elaine C. Howell, H. John Newbury, Rony L. Swennen et al. Genome, 1994, 37: 328– 332
- [13] 李松涛, 张忠廷, 王斌等. 遗传学报, 1995, 22(2): 103– 108
- [14] 王京兆, 王斌, 徐琼芳等. 遗传学报, 1995, 22(1): 53– 58
- [15] 张忠廷, 李松涛, 王斌等. 遗传学报, 1994, 21(5): 373– 378
- [16] Mandoline G, Carboni A, Forapani S et al. Theor Appl Genet, 1999, 98(1): 86– 92
- [17] Greg A. Penner, John Clarke, Leslie J. Bezte et al. Genome, 1995, 38: 543– 547
- [18] Charlene P. Wight, Greg A. Penner, Louise S. ó Donoughue et al. Genome, 1994, 37: 910– 914
- [19] 鲍晓明, 黄百渠, 李松涛等. 遗传学报, 1993, 20(1): 81– 87
- [20] 肖顺元, Frederick G. Gmitter, Jr., Jude W. Grosser 等. 遗传, 1995, 17(4): 40– 42
- [21] 李文彬, 梁红健, 孙勇如等. 生物工程学报, 1996, 12(4): 390– 393
- [22] 马文宾, 庄杰云, 彭应财等. 遗传, 1998, 20(2): 1– 4
- [23] 周群初, 马艳青, 张竹青等. 湖南农业大学学报, 1999, 25(2): 95– 98
- [24] Martin G. B., Williams J. G. K, Tanksley S. D. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 2236– 2240
- [25] Michelmores R. W., Paran I., Kesseli R. V. . Proc Natl Acad (in press)
- [26] 朱立煌, 徐吉臣, 陈英等. 中国科学(B 辑), 1994, 24(10): 1048– 1052
- [27] S. O. Park, D. P. Coyne, J. M. Bokosi et al. Euphytica, 1999, 105(2): 133– 141
- [28] 惠东威, 陈受宜. 生物工程进展, 1992, 12(6): 1– 5
- [29] Giovannoni J. J., Wing R. A., Ganai M. W. et al. Nucl Acids Res, 1991, 19: 6553– 6558
- [30] Xiaofeng Yang and Carlos F. Quiros. Genome, 1995, 38: 36– 44

Abstract The technique of RAPD has been applied in many disciplines and fields, due to such advantages as quickness, simplicity and effectiveness. Applications of RAPD in plant genetics and breeding are summarized in this paper. They are mainly as follows: studies of genetic diversity, RAPD-marker based assistant breeding, identification of cultivars or hybrids, gene location, and construction of genetic linkage maps.

Key words RAPD Application Plant genetics and breeding

快速有效的 GATEWAYTM 克隆技术

目前, 国外生命科学界正兴起一种新型的克隆技术——GATEWAYTM 克隆技术(注: 由 LIFE TECHNOLOGIES 公司创始并专利化)。这是一种新的通用型克隆系统, 它整合了各种载体的技术平台, 可大大加快达到最终研究目标的速度。通过位点特异性的重组整合, 确实可称得上是现阶段基因功能分析、蛋白表达、DNA 片段克隆(亚克隆)最有效和快速的途径。

GATEWAYTM 克隆技术克服了两种传统惯用方法(酶切和连接、PCR 产品克隆)的许多制约因素。可实现:

- * 平行地将 DNA 片段转移至多个克隆载体, 从而加速蛋白表达的实验
- * 简单快速的反应(室温 60 分钟后即可转化 E. coli)
- * 在单克隆的实验中转移多个 DNA 片段或族群
- * 可平行地进行多个 PCR 产物的快速直接克隆
- * 高效率: > 90% 甚至 > 99% 的克隆是目标克隆
- * 整合了各种载体交叉的技术平台
- * 特异性反应: 保持阅读框架和基因定位

工作原理

GATEWAYTM 克隆技术乃基于已被详尽研究的 λ 噬菌体位点特异性重组系统。它使得在不同的克隆载体之间转移 DNA 片段、保持基因定位和阅读框架、及有效地取代使用内切酶和连接酶进行克隆和亚克隆的方法成为可能。同时, 也是一种用于高效地直接克隆 PCR 产物的便利方法。

置于重组位点(att 位点)的目标 DNA 片段与适当的 GATEWAYTM 载体和 GATEWAY CLONASETM 酶混合。在 att 位点之间的位点特异性重组过程中产生了一个“共整合”分子, 它可以随即分解成两个分子, 其中一个在新的载体骨架中含有目标 DNA 片段(产物)。通过阴性和阳性筛选, 只有目标克隆被高效(> 90%)回收。

另外, GATEWAYTM 技术可以快速直接地克隆 PCR 产品。通过在 PCR 引物中引入 attB 重组位点, 将产物与含有 attP 位点和 GATEWAY BP CLONASETM 酶混合, 然后转化 E. coli。在得到的克隆“入门载体”中目标基因位于重组位点之间。含有目标基因的“入门载体”也可通过使用内切酶和连接酶的方法得到或者通过在 GATEWAYTM 兼容的载体中获得的文库中重组而来。

“入门载体”还可用于将 DNA 片段自动地转移到任何数量的期望的目标载体, 从而使得启动子、融合位点(N-端或C-端)和目标载体的骨架与转移的目标 DNA 片段连接。这种转移是高效的并且保持了基因定位和阅读框架。相应的“表达克隆”可通过进一步通过和含有 attP 位点的载体反应而生成“入门载体”。

(朱延文 供稿)