

# RFLP標誌在果樹育種與品系鑑別的應用

## The application of RFLP markers in fruit tree breeding and variety identification

劉邦基  
Pan-Chi Liou

台灣省農業試驗所園藝系

關 鍵 字：果樹、育種、品系鑑定、RFLP

Key words : Fruit trees, breeding, variety identification, RFLP

### 摘 要

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 是『限制段的長度多形性』的英文簡稱，它是一種直接利用生物核酸分子序列變異性來探討生物遺傳現象的方法，同時也是一種分子標誌 (molecular marker)。此一技術首次建立於1980年，隨即應用在人類的遺傳研究，目前其應用範圍已遍及多種動植物、真菌和細菌之遺傳研究上。RFLP具有多項特性，咸認可用來克服木本植物之遺傳研究的某些瓶頸與困難，因而在果樹育種和遺傳研究上極具應用潛力，其主要用途包括：縮短育種時間、保障育種家的權益、和有助於基因轉移之進行等。

### Summary

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) is a relatively new category of genetic marker which allows direct detection of variation at the DNA level. This technology was first developed in 1980 for human genetic study, and has been applied in animal, plant, fungus, and bacteria genetics. RFLP shows some advantages when used in genetic studies, such as co-dominant, simple Mendelian genetic fashion, not tissue or developmental stage specific, and no epistatic interaction. Based on these advantages, it is believed being very useful in woody plant research, and being a powerful tool for en-

hancing the breeding efficiency in fruit trees. The purpose of this article is to describe some basic techniques in RFLP studies. The potential of using this powerful tool in fruit breeding and some other application have also been discussed.

## 一、前言

生物的變異性又稱為多形性 (polymorphism)，它是探討遺傳知識的入手處；可作為研究依據的變異性一般則稱為遺傳標誌 (genetic marker)。多年來遺傳學家與育種家不停地找尋理想的遺傳標誌，作為遺傳研究和品種改良之需。最初係使用形態標誌 (morphological marker)，例如：植物的株高、花色、和其他可供辨認的外觀上之差異等皆屬之。後來進而使用生化標誌 (biochemical marker)，同功酶分析即為最佳的例子。晚近更由於科技的進步，發展到分子標誌 (molecular marker) 的階段。所謂分子標誌即是直接以核酸分子的變異性作為遺傳研究的依據。由於核酸分子層面的變異是遺傳變異的直接源頭，因此所用之標誌若越接近核酸分子層面，則越靈敏而精確 (圖一)。RFLP即是一種直接在核酸層面上測得的變異，以它作為遺傳標誌，將大有助於遺傳研究和育種工作。本文旨在介紹RFLP分析的基本方法與原理，並探討此一新的遺傳標誌對於果樹品種、品系的鑑別，果樹的遺傳研究，以及提高果樹育種效率等各方面的應用潛力。

## 二、何謂RFLP

RFLP是英文Restriction Fragment Length Polymorphism 一詞的簡稱<sup>(3)</sup>。此一技術發展於1980年以後，它是重組DNA(recombinant DNA)和基因選殖 (gene cloning) 等遺傳工程技術應用於生物遺傳研究和育種工作，以補傳統方法之不足的極佳例證。生物之核酸被限制酶(restriction enzyme)完全分解後，會形成無數特稱為「限制段」(restriction fragments)的核酸碎片；相同的染色體部位所產生的限制段在不同的染色體組 (genome) 或生物個體之間可因核酸序列的變異而造成長度上的差異，因而可經由適當的方法加以辨認，此即 RFLP 現象<sup>(3)</sup>。明乎此，RFLP的中文名稱應可稱為：(生物核酸的) 限制段之長度多形性。

## 三、RFLP的基本原理

進行RFLP研究時，須先建立生物的基因庫 (gene library，或稱gene bank)。所謂基因庫是一組含有重組載體的大腸菌菌株(colony)的總稱，其菌株內之重組載體則是由載體核酸 (vector DNA, 可為質體或病毒核酸) 和外來之基因組核酸片段 (genomic DNA fragment) 或互補核酸 (complementary DNA，簡稱cDNA) 所嫁接而成<sup>(9)</sup>。重組載體藉著轉形作用 (transformation) 或轉移作用 (transfection) 便將外來核酸或基因選殖到細菌中<sup>(10)</sup>。藉此，重組載體可藉細菌大量增殖，以達到大量複製外來核酸之目的 (圖二)。由於核酸的不同，基因庫一般可分為基因組庫 (genomic library) 和互補核酸庫 (complementary DNA Library，簡稱cDNA library) 等兩種

。有了基因庫，便可從中篩選所需的核酸探針(probe)，再利用南方氏轉漬法(Southern blotting)去偵測生物的變異性(圖三)。此時核酸探針須經適當方法標示(例如可用放射性元素標示)，以利偵測。進行南方氏分析時，如果帶有探針序列的生物染色體部位在梅解後產生不同長度的限制段，經過一系列的實驗程序後，便會顯現不同的條帶樣式(banding pattern)，形成可供辨認的遺傳標誌。此種多型性意謂著：在生物個體或族群中，其基因組的某一位置存在著核酸序列的差異；其差異可能肇因於染色體之倒位(inversion)、插入(insertion)、缺失(deletion)、或鹵基對替換(base pair substitution)等<sup>4)</sup>。可見探針之目的是用來偵測某一生物的基因組中在它相同或十分近似的核酸序列之兩近側是否有序列上的變異。一般而言，凡能偵測到生物基因組中的單套序列(single copy sequences)或單套基因(single copy genes)的探針，最有利於結果的判讀，因此是最理想的探針。

簡要言之，RFLP之主要分析步驟包括：一、應用基因選殖技術建立作物的基因庫，並從基因庫中篩選所需的核酸探針；二、抽取植物核酸，並以適當的內切酶分解植物核酸，再利用電泳方法將分解後之核酸片段分離開來，以備南方氏分析之需。三、採用南方氏分析法，使標示後之核酸探針得以偵測到植物核酸中與探針相同或相似的序列之位置(以電泳條帶的形式顯現出來)，若其位置在不同植株間具有差異，即為RFLP現象。

#### 四、RFLP技術的特色

由於RFLP的研究是直接以核酸分子結構的變異性為基礎，可不必涉及生物表型的改變，因此具有許多優點，例如：高靈敏度、共顯性現象(co-dominant)<sup>4)</sup>、分析效果穩定、以及絕無上位基因之交互感應現象(no epistatic interaction)<sup>1)</sup>等。但其最重要的優點則是：生物界具有極眾多的RFLP標誌<sup>4)</sup>，包括許多微細變異，以及不影響任何細胞功能的沉默突變(silent mutations)在內，這些都很容易利用RFLP技術加以探討<sup>(1,3,11)</sup>。

#### 五、在果樹育種與品系鑑別上的應用價值

RFLP於1983年首次應用於植物遺傳研究上；至今為止，它已在多種項目中受到肯定，包括：1)、探討植物性狀間的連鎖關係，並可進而建立詳盡的植物基因圖；2)、有助於植物分類及演化關係的研究；3)、協助農作物品種品系鑑定<sup>1)</sup>。近年來已有許多作物累積了大量的RFLP資料，包括玉米<sup>(4,5)</sup>、小麥<sup>(6)</sup>、番茄<sup>(5)</sup>、萵苣<sup>(7)</sup>、馬鈴薯<sup>(2)</sup>和水稻<sup>(8)</sup>等。由於RFLP技術的發展與資料的累積，使得農作物的品種改良獲得顯著的助益<sup>1)</sup>。吾人可以預言，若能加強果樹的RFLP研究，則對其育種工作將極有助益，以下將舉三點加以討論。

##### (一)縮短育種時間

有了詳細的RFLP資料後，育種家對作物遺傳性狀的了解與掌握將更為精確，有助於雜交後代的篩選<sup>(3,4,17)</sup>。假設某一單基因性狀和某一RFLP標誌緊密地連鎖著，則根據其距離可

估算其染色體交換 (cross over) 的機率。假如兩者相距0.5 分摩, 則表示交換機率僅為百分之五; 如此則以該RFLP作為選拔之替代標誌, 以明瞭該有用性狀的導入情形, 將具有99.5%的準確性, 且其篩選在苗期即可實施。可見若有詳細而可靠的RFLP連鎖資料, 育種時便可以有效地「監視」某些基因的導入, 以及子代基因型在選種過程中的變化, 藉以縮短育種期限。RFLP分析尚可用來監視數量性狀的基因族 (gene family) 在育種過程中的累積情形。假設某一性狀之基因主要分布在基因組內之某兩個區域, 則可在該兩個區域選用適當的RFLP標誌 (需在父母本間具有多形性者), 以偵測該數量性狀的「基因成分」。例如在每個區域各選兩個RFLP標誌, 則在F<sub>2</sub>族群中, 每一標誌所揭示而代表該數量性狀之同質結合狀態者 (即在每一微效因子皆為AA) 將佔四分之一之機率; 而每個RFLP標誌所涵蓋的區域皆為同質結合之機率為1/256, 意即在理論上每分析 256株F<sub>2</sub>植株即可發現一株。此法將可大量提高子代篩選的效率, 以一般大型的電泳來篩選 (含40個跑道, 分析38個樣品, 其餘兩跑道則用來測試父母本, 以供比較) 則分析 256株之樣品 7片膠體; 若使用特製之膠模 (含 100個跑道, 可實際容納98個樣品) 則僅需 3片膠體便可分析 294株樣品, 因而在技術上仍甚可行。此外, 尚可採用一組逢機的RFLP標誌來測試子代植株的基因組與父母本基因組間的相似程度, 作為進一步選拔之參考。以此方法作為篩選的依據, 將可使有用的數量性狀在選拔族群中迅速地累積起來, 以助於優異植株的獲得, 或理想親本的建立。此種方法已成功地應用於玉米品種改良上, 使新品種的育成時間從八年減為四年, 節省一半的時間。對於木本的果樹而言, 本法之價值將是顯而易見的。

### (二) 保障育種家的權益

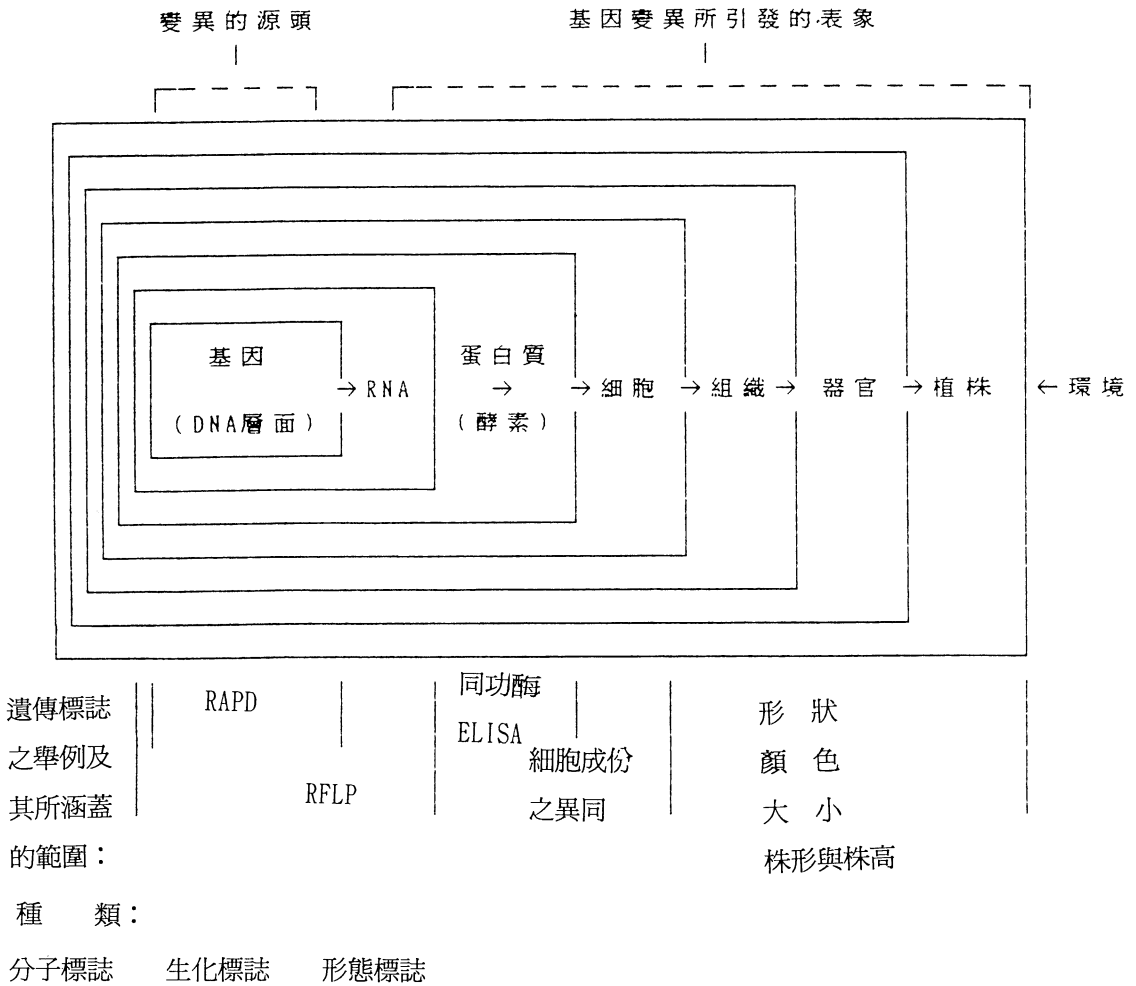
由於RFLP在品種與品系之鑑定具有十分靈敏可靠的效果, 將來若能建立適當的法律, 則可用來保障育種者的權益。假設鑑定時使用十個各具有兩種形態 (即各含兩種RFLP之等位基因) 的RFLP基因座作為標誌, 以測試兩個品種或品系之相似性, 若每一基因座的兩個等位基因具有相同的發生頻率 (即機率皆為50%), 則此兩品種或品系得到完全一致的測試結果之機率將低於千分之一; 若使用二十個RFLP標誌以行測試, 其相同結果之機率更低於百萬分之一, 可見其靈敏性之一般, 此種特性深受植物遺傳學家和育種家的重視。對於無性繁殖的果樹而言, 以RFLP作為鑑定的依據, 將益能顯現其精確性。

### (三) 有助於遺傳工程的基因轉移工作

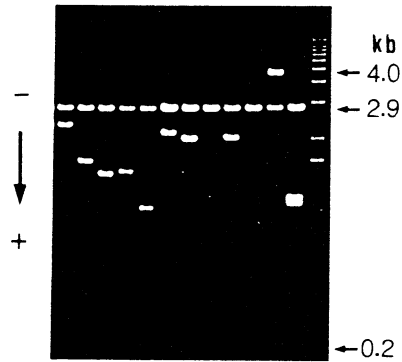
有了詳細的基因圖, 則可能發現與園藝性狀極緊密連鎖的RFLP標誌, 該RFLP標誌便可作為探針, 用來探索涵蓋該有用性狀的染色體片段, 以找尋該基因, 作為選殖和轉移之需。如此則可不必建立基因的更詳細資料, 甚至不必知曉該基因的生化產物, 便能進行基因轉移工作以達到育種目標<sup>11</sup>。

## 參 考 文 獻

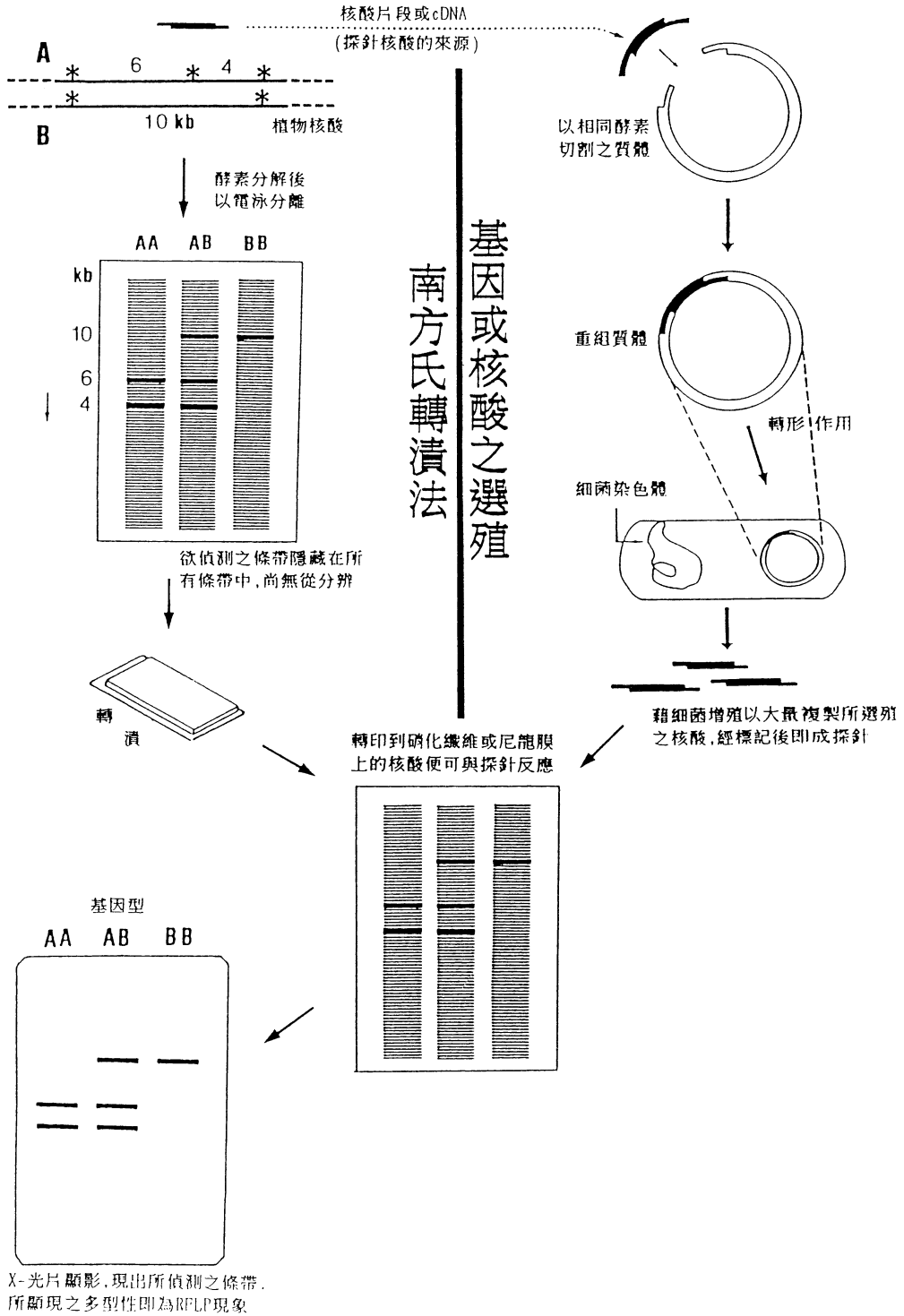
1. Beckmann, J.S. and M. Soller. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35:111-124.
2. Bonierbale, M.W., R.L. Plaisted, and S.D. Tanksley. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-1103.
3. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
4. Helentjaris, T. 1987. A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends in genetics* 3(8) : 217-221.
5. Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Schaefer, and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72:761-769.
6. Kam-Morgan, L.N.W. and B.S. Gill. 1989. DNA restriction fragment length polymorphisms: A strategy for genetic mapping of D genome of wheat. *Genome* 32: 724-732.
7. Landry, B.S., R.V. Kesskli, B. Farrara, and R.W. Michelmore. 1987. Genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116: 331-337.
8. McCouch, S.R., G. Kochert, Z.H. Yu, Z.Y. Wang, G.S. Khush, W.R. Coffman, and S.D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76: 815-829.
9. Old, R.W. and S.B. Primrose. 1985. Principles of gene manipulation : an introduction to genetic engineering, 3rd ed. Blackwell Sci. Pub., Boston, Massachusetts. 409 pp.
10. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. pp. 1.1-18.88.
11. Tanksley, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson, and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-264.



圖一：各種不同層次的遺傳標誌所涵蓋的生命物質之組成範圍及其標誌之實例。一般言之，變異的表象若離開變異的源頭越遠，則其表現所受的影響因素越多。RAPD和 ELISA分別為Random Amplified Polymorphic DNA和Enzyme-Linked Immunosorbent Assay之簡稱；前者為最近研發的新技術，為應用PCR 技術所偵測出來的分子標誌。



圖二：柑桔的核酸選殖。最右邊跑道為核酸之分子量標誌；其餘各跑道分別來自基因組庫之不同菌株，其重組質體經萃取並以酵素切割，形成質體（所用者為pTZ18R，分子量為2.9kb）和所選殖之核酸（分子量從0.2至4kb不等）等兩部份。從圖中可看到部份重組質體含有兩段柑桔核酸。所選殖之柑桔核酸萃取自Temple桔橙之幼葉。圖中的瓊脂膠之電泳方向為自上而下。



圖三：核酸或基因選殖，以及南方氏分析之簡要流程圖示。A和B分別代表不同的植物基因組，圖中之星號表示限制酵素 (restriction enzyme) 之切位。