

RFLP和 RAPD在大豆遗传育种中的应用现状^{*}

吴俊江

(黑龙江省农科院大豆所)

80年代末 90年代初兴起的 RFLP RAPD技术给各种生物,特别大豆这样经典遗传学研究进展相对缓慢的作物带来极大的方便。目前,RFLP RAPD技术已成为大豆遗传学研究中重要的分子生物学方法。本文旨在综述大豆遗传育种方面 RFLP RAPD研究的最新进展,为研究者在这方面开展工作提供理论参考。

所谓 RFLP(Restriction, Fragment length polymorphism,限制性片段长度多态性)始建于1980年。它是指用限制性内切酶降解从生物中提取的总DNA,经凝胶电泳分离这些降解的小片段,再通过 Southern印迹法转移到滤膜上,然后用放射性标记的探针与滤膜上的DNA杂交,洗去多余的杂交探针,永久性滤膜经放射性自显影就可发现与探针杂交的DNA限制性片段。不同的限制性内切酶,不同来源的DNA及标记的探针就会有不同的组合结果,利用这些不同的组合结果就可以构建 RFLP分子标记图谱^[4]。

所谓 RAPD(Random Amplified polymorphic DNA,随机扩增多态性DNA)始建于1990年。它是利用一系列(通常数百个)不同的随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单键(通常为十聚体)为引物对所研究基因组DNA进行扩增。扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离,分析带型,不同生物个体的DNA序列差异都会引起DNA引物结合点的变化,因而导致带型变化,我们从带型上得知遗传变异^[12]。

RFLP RAPD在大豆遗传育种方面应用主要表现在抗病育种、品质育种、大豆种质资源、大豆育种程序、大豆形态性状育种等几个方面。

1 在大豆抗病育种方面应用

RFLP RAPD在抗病育种中有着独特作用。第一,不需制备病原菌种,克服接菌的不一致性。第二,可以对外来或作为检疫对象的病原菌进行筛选。第三,克服环境效应。第四,抗病性可早期选择,对栽培周期长,成本高的植物更有益^[2]。

由于对大豆孢囊线虫抗性筛选鉴定难度大,并且该性状遗传相对简单,用分子标记方法筛选抗源便成为较为简单、便利的方法。Weisman(1992)研究结果表明 PBLT₂₄ PBLT₆₅ 两个分子标记选择大豆对孢囊线虫的抗性将是有效的。Baltazar 和 Mansur(1992)对抗孢囊线虫的所有生理小种与 BSR101杂交后代的 RFLP分析表明,限制性内切酶 HindIII和 EcoI 是最适宜的酶,该群体可用于抗大豆孢囊线虫基因的分子制图^[3]。Concibido等(1993, 1994)用 RFLP和 RAPD研究试验结果表明 PB₃₂ 和 PB₅ 与抗性密切相关^[6]。Rao- Arelli 等(1994)利用 RFLP技术进行的大豆孢囊线虫基因指纹分析表明在所研究的 22个探针中 60%能在 29个抗

感基因型中检测出变异,探针多态性频率是 1.7;许多不同来源的抗性基因在分子水平上也表现出差异。由这些试验结论可看出对于选择抗大豆孢囊线虫病基因来说,RFLP RAPD分子标记是很有效的研究方法

对于大豆花叶病毒的抗性遗传研究始于 70年代。多年来,尽管人们以形态、生理生化、细胞遗传等方面对其进行了大量的研究,但其遗传研究进展十分缓慢,进入 80年代,RFLP RAPD技术使这一遗传研究有了质的飞跃。Yu等(1994)对大豆花叶病毒基因的研究表明,抗 SMV 基因 RSv 与两个 RFLP 分子标记位点 PA₁₈₆ PK_{644a} 相连锁

Diers等(1992)用 141个 RFLP 标记将几个抗疫腐病害的基因 RSP₁ RSP₂ RSP₃ 分别定位于 K L E 组之中^[11]。

另外,在抗大豆根结线虫病方面,Tamulonis 等报道,大豆 PI₂₃₀₉₇₇ 对根结线虫的抗性与两个数量性状基因位点有关。利用 82个 RFLP 分子标记研究表明,其中有 8个标记与抗性高度相关,8个标记分属两个连锁群^[10]。

2 在大豆品质育种方面应用

随着科学的发展,人们生活水平的提高,对大豆的品质要求越来越高。所以,提高大豆蛋白质含量和油分含量的品质育种显得尤为重要,以往只利用常规方法进行筛选,创造优质大豆,而 RFLP RAPD 技术的出现,加快了大豆品质育种的进程。Lark(1992)将大豆含油量定位于第三连锁群;Diers 等发现了大豆蛋白质含量和油分含量均与 RFLP 分子标记显著相关^[7]。这些研究为选育高蛋白、高油分的大豆品种提供了快捷、有效的方法。

3 在大豆种质资源方面应用

利用 RAPD 标记对群体间变异进行分析可以明确群体间的 DNA 进化速度变异有多大及遗传距离的大小。通过对多个材料间遗传距离阵进行聚类分析,可以明确这些材料在分子水平上的亲缘关系的远近。K. G. Lark(1992)等人用 23个随机引物对 11个栽培大豆品种,9个野生大豆材料和 5个多年生野生大豆进行了系统进化及亲缘关系方面的分析。结果表明,多年生野生大豆和野生大豆二者与栽培大豆是截然分开的。而起源于日本的 3个栽培大豆材料聚合在一起,与地理上的分布表现一致。具有相同遗传背景的 3个栽培大豆及形态学上极度相似的两个品种都各自聚合在一起,这有力证实了 RAPD 方法在种质资源的分析方面应用是可行的。后来 K. G. Lark(1993) L. Terry(1995)得到了类似结果^[8 9]。另外,陈绍江等(1995)作试验证明,用 RAPD 方法可以研究育种后代品系与亲本之间的遗传关系,进而从分子水平上明确亲本的遗传特征在经过重组交换和多代选择后在不同子代中的分布。了解优良品种选育的内在因素,继而为优良亲本的选择与利用以及子代的选择提供直接而有价值的参考依据^[1]。

RFLP RAPD 技术还在评价种质资源变异方面是十分有效的。Smeller等(1994),Nelson 等(1994)都作试验结果证明了这方面的应用。

4 在大豆形态性状育种方面应用

大豆 RFLP 图谱的构建为一些重要的农艺性状,特别为数量性状的遗传研究开创了新的途径。Keim 等(1990)将茎粗、叶宽分别定位于 R 组与 E 组上,目前为止,叶长、茎高、株高、叶面积及许多生育期性状也都相继定位。

5 其它

一些学者还对大豆胞质 DNA 进行 RFLP 分析,如 Close 等(1989)、Grabun(1989)等。还有研究者,如 Keim 等(1994)应用 RFLP 标记对大豆育种程序的有效性进行研究,这些方面的研究都直接或间接地为大豆育种开展更高层次的探索提供了借鉴。

综上所述,大豆的许多性状抗病性、形态性状、品质性状等都与 RFLP RAPD标记有关,但是由于大豆遗传基础狭窄,多态性贫乏,因此分子标记的进展还是较为缓慢的,遗传图谱的饱和度较低。另外,对发展中国家而言,RFLP技术虽可靠性高,但是费用昂贵,所以我们可以大力开展 RAPD技术利用近等位基因系及目标基因有分离的 F_2 群体对一些基因,特别是一些遗传相对简单的性状基因进行定位,使 RFLP RAPD分子标记技术在大豆遗传育种中发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

- 1 陈沼江,杨庆凯等.大豆育种过程中亲子遗传关系的 RAPD研究初报.东北农业大学学报,1996,27(2): 137~ 141
- 2 沈法富等.分子标记在植物遗传育种中的应用.山东农业大学学报,1997,28(1): 83~ 91
- 3 Baltzar B M & Mansur L. Identifi cation of restriction fragment length polymorphisms (RFLP S) to map soybean Cyst nematode resistance genes in soybean. Soybean Genetics Newsletter, 1992 120~ 122
- 4 Bernatzky R & Yankley. SD. Restriction fragments as molecular markers for germplasm evaluation and utilisation. In brown, A. H. D., D. R. Marshall, O. H. frankel & J. T. Williams (eds), The ues of plant Genetic Resources. Cambridge university Press; 1989 353~ 362
- 5 Close P. S., Shoemaker R. C. Keim P., 1989, Distribution of restriction site polymorphisms within the Chloroplast genomes of genus Glycine subgenus Soja. Theor APPL Genet. 77 768~ 776
- 6 Concibido V. C., Denny R. L. Boutin, S R Haulea R. Orf JH & Young ND. RFLP mapping of Cyst nematode resistance genes in soybeans. soybean Genetics Newsletter, 1993, (20): 136~ 139
- 7 Diers B W, Gianzo S R & Shoemaker R C Possible identification of quantitative trait loci affecting iron efficiency in soybean. J. plant Nutr, 1992, 15(10): 2127~ 2136
- 8 Diers D. W., mansur L., Imsunde J. Shoemaker R. C. mapping phy to phthers resistance loci in soybean with RFLP markers. Crop Sci. 1992, 32 377~ 380
- 9 Lark, K. G., J. Evans, F. Basha, R. Bopeland, R. Ellison, D. Homne K. Lee, K. Mcdonald, J. Personald, J. Pierson, W. Schuster, P. Wilhelm Y. Yu. 1992, Molecular phylogeny as a tool for soybean breeding. Soybean Genetics Newsletter, 19 174~ 181
- 10 Terry, I. et al., 1995, Molecular phylogeny as a tool for soybean breeding IV, soybean Genetics Newsletter, Vol. 22 251~ 259
- 11 Tamulonis J P. Luzzi, B. M. Hussey, R S. Parrott W A & Boema HR RFLP markers linked to genes offecting resistance to Javanese root- knot nema tode in soybean. Agronomy Abstracts., 1994, 107
- 12 Wilims, JGK., Hanafey M K. Rafalski J A & Tingey S V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Ir wu, Ray(ed) Meth- ods in Enzymology, 1993, 218 704~ 740
- Diers D. W., mansur L. Imsunde J. Shoemaker R. C. mapping phy to phthers resistance loci in soybean with RFLP markers. Crop Sci. 1992, 32 377~ 380