

大豆分子标记研究进展*

I. 大豆的 RFLP 研究

陈绍江**

(东北农业大学大豆所)

提 要

本文详细介绍了近年来有关大豆 RFLP 研究的最新进展,对大豆 RFLP 的研究方法及其在遗传育种中的应用进行了评述。

关键词 大豆;RFLP;DNA;遗传育种

大豆是人类最重要的植物蛋白来源。多年来,尽管人们从形态、生理生化,细胞遗传等方面对其进行了大量研究,但与其它作物如玉米、水稻等相比,其遗传研究进展十分缓慢。据 Palmer(1990)统计,经典遗传学构建的大豆遗传图谱只有 17 个连锁群,覆盖 530cM。而玉米在 1935 年时的遗传图谱即涉及全部连锁群,覆盖 700cM。显然依靠经典方法是难以在短时间内对大豆遗传进行全面深入了解的。

近 20 多年来兴起的分子生物学技术,尤其是 80 年代初产生的 RFLP 技术给各种生物,特别是象大豆这样难以用传统方法深入进行遗传研究的作物带来了极大的方便。在不到 10 年的时间里已使大豆遗传研究有了质的飞跃。目前 RFLP 方法已成为大豆遗传学研究中最重要的一种分子生物学方法,RFLP 标记也就成了大豆的十分理想的分子标记。国内虽已开始这方面的研究工作,但尚鲜见报导。本文旨在综述大豆 RFLP 研究的最新发展及其方法,为国内更好地开展这方面的研究提供参考。

一、RFLP 原理概要

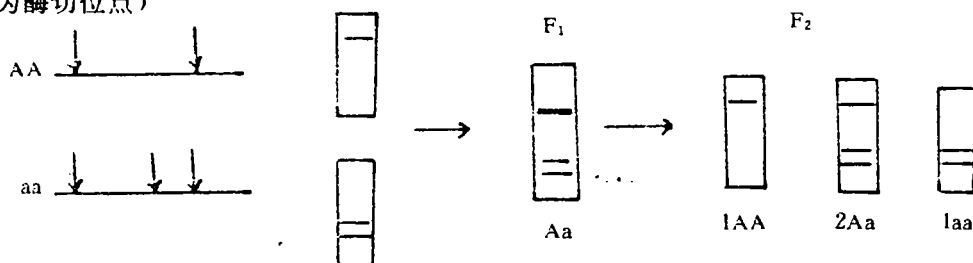
RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)是 Bostein(1980)首先提出的一种分子遗传标记。它是指 DNA 经限制性内切酶消化后,通过与探针进行杂交而检测到的 DNA 片段长度多态性。这种多态性与限制性内切酶在 DNA 上识别切点的分布有关,DNA 来源不同,其切点分布亦不同,酶切后检测到的多态性也就不一样。据此就可对所测

* 本文于 1995 年 3 月 27 日收到。 This paper was received on March 27, 1995.

** 现在北京农业大学作物遗传育种系博士后流动站。

生物材料遗传上的差异作出判断。研究表明, DNA 的这种限制性片段多态性普遍存在, 但其丰富性有很大差异, 玉米、果蝇等均存在着丰富的 RFLP 变异, 而大豆等的 RFLP 则相对贫乏。

RFLP 反映了 DNA 水平上的变异, 任何 DNA 序列的改变如插入、重排、缺失等都会改变原有酶切位点所在位量, 从而使两酶切点间的 DNA 片段长度发生变化, 这种变化经酶切, 杂交及放射自显影就会使 RFLP 带的特征有所改变, 由此即可对生物的变异进行分析。由于不同的限制性内切酶具有不同的识别切点, 它们所反映的变异也不相同, 众多限制性内切酶的应用, 可以探明 DNA 上所存在的大多数变异。其分析原理如下图(箭头所指为酶切位点)



RFLP 标记在遗传上是共显性的, 按孟德尔规律传递(见上图)。这一特点使得它可以在没有任何形态、生化等标记的情况下, 通过直接识别 DNA 上的变异构建遗传图谱。并可由此对一些农艺上较为重要性状的基因进行定位。这种方法显然对大豆这样遗传背景知之甚少的作物尤为合适。这种方法的优点在于 RFLP 的多少取决于探针×酶的组合数。限制性内切酶已知有 200 多种, 而探针数目几乎不可限量。因而即便大豆 RFLP 相对贫乏, 通过调节酶与探针就可得到足够的 RFLP 标记。另外 RFLP 不受环境影响, 同一个体内不同组织的 DNA RFLP 是一致的, 这就保证了结果的稳定可靠性。同时其对 DNA 非编码区的变异也可进行检测, 这就突破了传统方法依表型性状研究变异的局限。

二、大豆 RFLP 研究现状

自 80 年代初提出 RFLP 可以用作分子标记之后, RFLP 便被成功地用于许多生物学的分子生物学研究。大豆起步较晚, 至 1988 年才有 Apuga 等系统地报导了大豆 RFLP 研究结果。指出 *G. max* 种内遗传多态性较贫乏, 但有些酶及探针可揭示一些多态性。之后 Keim 等(1993)以 17 个 RFLP 标记对 58 个大豆材料进行了分析, 证明 *G. max* 种内 RFLP 较低, 平均多态性只有 16%, 但个别品种如 X_{25AF} 与吉林 3 号具有较高的多态性。而 *G. max* 与 *G. soja* 两种间遗传多态性较高, 平均为 35%。以上结果表明, 大豆特别是栽培大豆的遗传基础是十分狭窄的。

尽管大豆的遗传多态性较差, 但通过对亲本的选择以及使用足够多的探针标记可以大大克服这一困难。1990 年 Keim 等以 *G. max* × *G. soja* 种间杂交后代构建第一个大豆 RFLP 图谱时用了 150 个 RFLP 标记。结果构建了一个涉及 26 个连锁群, 覆盖 1200cM 的遗传图谱。这显然比经典的图谱更进了一步, 从而把大豆遗传研究推到了更高水平。1993 年 Lark 等又以一个具有较高遗传多态性的栽培大豆组合 Noir × Minsoy 为材料构建了一个更具利用价值的遗传图谱。该图包括 132 个 RFLP 标记, 1550cM, 31 个连锁群。其中 7 个与 Keim 等构建的一致, 而其余则有一定差异。这种差异表明一个给定的探针在不同组

合中所鉴别的片段有一定差异。目前大豆 RFLP 遗传图谱构建工作正在世界范围内展开,我国也已开始这项研究,预期不久将会有更详细更准确的 RFLP 图谱问世。

表 1 用 RFLP 定位的农艺性状基因

Table 1 Genes of Agronomic Traits Localized by RFLP

性状	Traits	RFLP 标记	RFLP Marker	连锁群	Linkage group
R ₁		A 397—BLT29		2	
		A 584—R79		15	
		A 385—G173		16	
R ₅		A 397—BLT29		2	
		A 385—G173		16	
R ₉		A 584—R179		15	
		PK—472		unk	
		PR—136		H	
		PK—365		M	
		PK—474a		M	
		PK—474b		M	
R ₉ —R ₁		A 397—BLT29		2	
		A 584—R79		15	
叶面积		A 397—BLT29		2	
		A 584—R79		16	
株高(cm)		A 385—G173		16	
倒伏		A 385—G173		16	
冠高		A 584—R79		15	
含油量(%)		T 153a—A 111		3	
		HC1—A 315		9	
种子产量(kg/ha)		A 109a—A 397		2	
		A 584—R79		9	
叶宽		PA—111		A	
		PK—390		E	
		PK—411		unk	
叶长		PR—136		H	
		PK—478a		H	
茎粗		PG—17.3a		R	
		PK—385		R	
茎高		PR—201		R	
		PK—18		unk	
初花		PK—365		M	
		PK—474a		M	
		PK—474b		M	
鼓粒—成熟		PG—8.15		L	
Rsp ₁				K	
Rsp ₂				L	
Rsp ₃				E	
Rsp ₄				unk	
Rjz		A 233, A 724, A 375		L	
Rmd		A 233, A 724, A 375		L	
Rsv		PA—186			
		PK—644a			
nts		PA—36		E	
		PA—132		E	

unk=unlinked

大豆 RFLP 图谱的构建为一些重要的农艺性状,特别是数量性状的遗传研究开辟了一条全新的途径。目前已经定位的性状遍及形态、发育、生殖以及品质等方面。如茎粗、叶宽已分别定位于 R 组与 E 组上(Keim et al. 1990),含油量被定位于第 3 连锁群上(Lark, 1992)。对质量性状的基因定位研究亦有多篇报导。Yu 等(1994)对大豆抗花叶病毒基因的研究表明,抗 SMV 基因 Rsv 与两个 RFLP 位点(pA186, pK644a)相连锁,Diers 等(1992)用 141 个 RFLP 标记将几个抗疫腐病害(Phytophthora)的基因 Rsp₁、Rsp₂、Rsp₃ 分别定位于 K、L、E 组之中,另外其它一些质量性状的基因也已定位(Polzin et al., 1994)。表 1 列出了到目前为止经由 RFLP 标记定位的数量性状与质量性状基因。

Keim 等(1994)还应用 RFLP 标记对大豆育种程序的有效性进行了研究。他们以优系×优系和优系×劣系两类组合后代群体各 261 个株系为材料,用 100 个 RFLP 探针对一粒传法(SSD)和多粒传(MSD)法进行了分析。结果表明,不论哪种群体,哪种方法单一亲本对后代群体的影响均不超过 75%,SSD 法所得各系遗传上各有特点,而 MSD 法所得各系有 18%为遗传上重复的选系。显然单粒传法更准确些。这一研究为 RFLP 在大豆育种中开展更高层次的探索提供了借鉴。

在对大豆核 DNA RFLP 进行大量研究的同时,一些学者还对大豆胞质 DNA RFLP 多态性进行了分析。据 Close 等(1989)对美国大豆叶绿体 DNA(ctDNA)的 RFLP 研究,ctDNA 具有一定的多态性,据此他们将美国大豆胞质来源分为 6 组。Grabau 等(1989)首先对大豆线粒体 DNA(mtDNA)RFLP 的多态性进行了研究,之后对美国 138 个栽培大豆的 mtDNA 进行了更详细的分析。结果表明,这些品种的胞质来源分为 4 组,其中 Lincoln 型 27 个,Arksoy 型 2 个,Bedford 型 72 个,soja-forage(饲用)型 7 个。由此可见美国大豆胞质来源也是相当单一的,多集中在 Bedford 和 Lincoln 两型之内。另外 ctDNA 的分类与 mtDNA 的分类结果有一定差异,其原因尚不清楚。

三、大豆 RFLP 研究方法

虽然各生物的 RFLP 原理是相同的,但要有效地对大豆 RFLP 开展研究则需要注意它的特殊性。其一,由于大豆遗传基础狭窄,多态性贫乏,因此在进行遗传作图时,就要首先筛选多态性足够的亲本。在利用栽培品种时更是如此。目前美国在 RFLP 研究中应用最多的种间杂交为 *G. max* × *G. soja*,即同一亚属内的两个种。应用最多的栽培品种组合为 Noir I × Minsoy。

其二,进行大豆 RFLP 研究还需选择适当的群体。目前各作物用于 RFLP 研究的群体有回交群体,分离世代群体,近等基因系(NIL),重组近交系(RIL)双单倍体群体(DH)等。对大豆而言,由于其杂交与组培上的困难影响了一些群体的利用。已用于大豆 RFLP 研究的群体有重组近交系(RIL)(Mansur et al., 1993a),F₂, F₃ 分离群体(Lark et al., 1993)近等基因系(NIL)(Muchlbauer, 1992; Diers et al., 1992; Polzin et al., 1994)或高代近交系如 F₅ 代(Mansur, 1993b)。这些群体各有优缺点,一般分离世代群体和 RIL 用于 RFLP 图谱构建较合适, NIL 则有利于个别基因的定位。另外分离群体不能重复利用,而 RIL 和 NIL 则可重复利用。

其三,由于以往对大豆遗传的了解不深,因而在构建 RFLP 图谱或基因定位时,难以将分子水平的 RFLP 标记与具体的形态或品质等性状完整地联系起来,目前所定位的只

是个别性状,而且结果也不完全统一,这就影响了 RFLP 研究与当代育种的结合。故研究中要使用是有可比性的方法、材料如酶、探针等,以建立一个有通用性的遗传图谱。

四、大豆 RFLP 研究的发展趋势

尽管大豆 RFLP 研究有许多困难,影响了这项工作的进展,但与以前经典遗传学研究相比已大大前进了一步。预计今后大豆 RFLP 研究将进一步深化与实践逐步结合。具体可分为以下几方面。

(一)构建饱和的 RFLP 图谱与基因定位

目前所构建的 RFLP 图谱密度还远远不够。因而今后这项工作仍会继续进行,最终达到构建饱和 RFLP 图谱的目的。因为只有这样,才能使两 RFLP 标记间距离足够小,使一些农艺性状基因得以借助于高密度的标记进行准确定位,从而有可能克隆这些基因或在育种中对其进行跟踪选择。

(二)对大豆种质资源进行评价

大豆 RFLP 的特征是区别不同大豆材料的有效手段,由之可以从遗传上对各大豆种质进行分析,评价它们的利用价值,确定各种间的进化关系,同时也可对栽培大豆品种的鉴别与利用提供有意义的结果。

(三)指导育种研究

在杂交育种工作中,恰当地选配亲本以及应用合适的选择方法是育种成功的关键。首先选配亲本的原则之一就是遗传差异大的优良材料。过去衡量遗传差异的大小除据系谱外,还要观察后代的优势表现。这种表型上评价与选择亲本的方法因受环境等因素的影响而无法准确地对遗传差异进行评价,而用 RFLP 则可直观地从遗传上反映其差异程度,继而预测后代优势,这样在组配前即可对一些差异小的材料进行淘汰,提高选配亲本的效率。所以今后有关 RFLP 差异与后代优势间关系的研究将会加强。

其次,在后代选择时,现在对材料的决选多依表型优劣为准。由于受个人经验与环境的影响,使这种选择具有较大的偶然性,而借助于 RFLP 标记不仅可以了解材料间的差异,而且还可以追溯后代遗传物质来源,因此,用这些标记,特别是那些与重要农艺性状基因连锁的 RFLP 标记对选择过程进行追踪,淘汰一些优良性状少的材料,提高选种准确率。另外也可对一些育种方法的效果进行分析。Keim 等(1994)对 SSD 和 MSD 法的研究就给这方面的研究提供了启迪,显然这是今后值得重视的研究方向。

参考文献

- [1] Apuya N., Frazier B., Keim P., Roth E. J., Lark K. G., 1988. Restriction length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merr Theor Appl Genet 75:89—901
- [2] Bostein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314—331
- [3] Close P. S., Shoemaker R. C., Keim P., 1989. Distribution of restriction site polymorphisms within the chloroplast genome of genus *Glycine* subgenus *soja*. Theor Appl Genet. 77:768—776
- [4] Doyle J. J., Beachy R. N., 1989. Ribosomal gene variation in soybean (*Glycine*) and its relatives. Theor Appl

Genet 70:369—376

- [5] Doyle J. J. , Doyle J. L. , Brown A. H. D. , 1990. A chloroplast DNA phylogeny of wild perennials relatives of soybean (*Glycine subgenus glycine*). *Evolution* 44(2):371—389
- [6] Diers D. W. , Mansur L. , Imsunde J. , Shoemaker R. C. , 1992. Mapping phytophthora resistance loci in soybean with RFLP markers. *Crop Sci.* 32:377—380
- [7] Grabau, Davis W. H. , Phelps N. D. , Gengenbach B. G. , 1992. Classification of soybean cultivars based on mitochondrial DNA. *Crop Sci.* 32:371—275
- [8] Grabau, Davis W. H. , Gengenbach B. G. , 1989. Restriction fragment polymorphisms in a subclass of the mandarin cytoplasms. *Crop Sci.* 29:1554—1559
- [9] Keim P. , Diers B. W. , 1990. Genetic analysis of soybean hard seedness with molecular markers. *Theor Appl Genet* 79(4):465—469
- [10] Keim P. , Shoemaker R. C. , Palmer R. G. , 1989. Restriction fragment length polymorphisms diversity in soybean *Theor Appl Genet* 77:786—792
- [11] Keim P. , Heavis W. D. , Schupp J. M. , Baltazar B. M. , Mansur L. , Freestone R. E. , Vanedjian M. , Webb D. M. , 1994. RFLP analysis of soybean breeding population: I. Genetic structure difference due to inbreeding methods. *Crop Sci* 34:55—61
- [12] Keim P. , Diers B. W. , Olson T. C. , Shoemaker R. C. , 1990. RFLP mapping in soybean; Association between marker loci and variation in Quantitative Traits Genetics 126:735—742
- [13] Landau E. D. , Angermuller, Shoemaker R. , 1991. The Genetic locus controlling supernodulation in soybean (*Glycine max* L.) Co-segregates tightly with a cloned molecular marker. *Molecular and General Genetics* 228 (1—2):221—226
- [14] Lark K. G. , Weisemann B. F. , Matthew B. F. , 1993. A genetic map of soybean (*Glycine max* L.) using an intraspecific cross of two cultivar; Minoy and Noir 1. *Theor Appl Genet* 86:901—906
- [15] Mansur L. M. , Lark K. G. , Oliveira A. , 1993. Interval mapping of quantitative trait loci for reproduction morphological and seed traits of soybean (*Glycine max* L.) *Theor Appl Genet* 86:907—913
- [16] Mansur L. M. , Lark K. G. , Oliveira A. , 1993. Determining the linkage of quantitative traits loci to RFLP markers using extreme phenotypes of recombinant inbred of soybean (*Glycine max* L. Merr) *Theor Appl Genet* 86:914—918
- [17] Menancio D. I. , Hepburn A. G. , Hymowitz T. , 1990. Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of wild perennials relatives of soybean. *Theor Appl Genet.* 79(2):235—240
- [18] Muhlbauer G. J. , Staswick P. E. , 1991. RFLP mapping using near-isogenic lines in the soybean. *Theor Appl Genet* 181(2):189—198
- [19] Poliyin K. M. , Lohnes D. G. , Nickell, Shoemaker R. C. , 1994. Integration of Rps2, Rmd and Rjz into linkage group J of the soybean molecular map J of *Heredity* 85:300—302
- [20] Shoemaker R. C. , Hatfield P. M. , Palmer R. G. , Atherly A. G. , 1986. Chloroplast DNA Variation in the genus *Glycine subgenus soja* J. of *Heredity* 77:26—30
- [21] Yu Y. G. , Maroof MAS , Huss G. R. , Mangham P. J. , 1994. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology* 84(1):60—64

STATUS ON SOYBEAN MOLECULAR MARKER

I. RFLP STUDIES OF SOYBEAN

Chen Shaojiang

(Northeast Agricultural University, Harbin, 150030)

Abstract

Recent results of soybean RFLP studies were reviewed. The methods of soybean RFLP studies and RFLP application in soybean genetics and breeding were (also) discussed.

Key words Soybean; RFLP; DNA; Genetics and breeding

欢迎订阅《北方园艺》

《北方园艺》为黑龙江省园艺学会和黑龙江省农业科学院园艺所联合主办的,是我国北方地区唯一的一份科学研究与技术普及相结合的综合性大型期刊。刊登国内、外园艺新成果、新技术、新信息。普及生产知识、解答疑难问题。本刊包括果树、蔬菜、瓜类、花卉、植保、贮藏与加工等方面内容。读者对象为园艺科技人员、政府部门领导干部、农、林、师范、大中专院校师生和农村科技户、专业户、城乡离退休人员以及园艺爱好者。双月刊,16开本,64页,每期定价6.00元,全年6期共36.00元。也可以通过编辑部直接订阅,您只要将款汇到编辑部,把您的地址、姓名写清楚即可,如需挂号邮寄另加3.00元。