

RAPD在大豆种质资源及遗传 连锁研究中的应用^{*}

张志永 盖钧镒

(南京农业大学大豆所 南京 210095)

摘 要

RAPD已在人类、动物、植物、真菌和细菌中得到了广泛的应用。在大豆上也已用于连锁图构建、基因定位、大豆起源进化及资源研究中。

关键词 RAPD;大豆种质资源;遗传连锁

一、引言

1990年, J. G. K. Williams等人提出了以DNA多聚酶连式反应(PCR)为基础的RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术。其原理是用随机排列的寡聚脱氧核苷酸单链引物(长度多为10个核苷酸)去扩增染色体组中的DNA。若染色体组中的某一区域恰好与一对相同的引物侧连,则会产生扩增产物,其长度一般在5kb以内,通过电泳可以对扩增产物进行分析。来自不同个体的DNA常常产生不同的扩增片段类型。某一特定的DNA片段可能会在一个个体中扩增出来,而在另一个个体中扩增不出来,从而表现出多态性。RAPD的特点是:①无需专门设计合成扩增反应的特异性引物,使引物具有极大的探测性。②每个RAPD反应中,只需加入一个引物,通过一种引物在两条DNA互补链上随机互补配对实现扩增反应。③为了保证退火反应时双链的稳定性,引物中的G+C含量应保持在40%以上。在最初的反应周期中,退火温度较低,一般为36℃。这样一方面保证了核苷酸链引物与模板的稳定配对,另一方面因引物中碱基随机排列而又允许适当的错配,从而扩大引物在基因组DNA中配对的随机性,提高对基因组DNA分析的效率。与RFLP分析相比,RAPD方法的优点在于操作程序简单、迅速,无需同位素或非同位素标记,只需要极少量的DNA作模板,而且对DNA制备的质量要求不高,RAPD标记为显隐性标记,遵循孟德尔遗传规律,RAPD在植物基因定位和制作连锁图谱研究方面,已在人类、动物、植物、真菌和细菌中得到了广泛的应用。在大豆上也已广泛用于连锁图构建、基因定位、大豆起源进化及资源研究中。

二、RAPD在构建大豆连锁图方面的应用

最初Williams等人提出RAPD的时候,以栽培大豆品种Bonus和野生大豆PI81762

^{*} 本文于1996年6月24日收到。

This paper was received on June 24, 1996.

为亲本配制了杂交组合,用不同的引物检测到了 11 个多态性标记。用 66 株 F_2 代单株作为分析的群体与 430 个大豆的 RFLP 标记同时进行分析,结果表明,在分离群体中对于 RAPD 标记多态性可以进行可靠的度量,并能定位到 RFLP 连锁图谱相应的连锁群上。这些 RAPD 标记能够填充到一些连锁豁口处,在端粒方向扩展,从而增加了大豆遗传连锁图的饱和度。通过拷贝数测定(利用 southern 杂交进行),这 11 个 RAPD 标记,有 6 个为单拷贝,3 个为中等重复序列,2 个为高度重复序列。结果显示, RAPD 标记中重复序列的存在,提供了 RFLP 分析时不能接近的染色体组区域的分子标记。

Choi. I. S 和 H. T. Skorupska(1995)利用 Essex 和 PI1437654 为亲本配制杂交组合,用 160 个 RAPD 标记构建了 27 个连锁群,其中有 8 个连锁群与已公开的 RFLP 分子标记连锁图整合到了一起。1995 年中科院遗传所董伟等人,利用以长农 4 号和新宾 6 号为亲本的 F_2 代群体,构建了含有 RAPD 标记和 RFLP 标记的大豆分子标记连锁框架图,现在此工作仍在继续进行(个人交流)。

三、利用 RAPD 进行基因定位

利用 RAPD 技术进行基因定位,样品来源两种,一是利用近等基因系(Near-isogenic lines NIL),另一种利用分离群体制作的近等基因池(isogenic pools)

1. 利用近等基因系进行基因定位

利用近等基因系进行连锁分析的原理是:通过回交将供体亲本(Donor Parent, DP)中的目的基因转育到轮回亲本(Recurrent Parent, RP)的过程中,得到的材料与 RP 除了所转育的基因以外,遗传基础基本相同,所以称为近等基因系。但在 NIL 的染色体组上也保留有少量的 DP 带来的分子标记,而这少量的分子标记中的大多数是与转育的目的基因连锁的。通过分析 RP/NIL/DP 的分子标记,若 NIL 中具有与 DP 相同而与 RP 不同的分子标记,则可以初步认定此分子标记与转育的目的基因连锁。Muchlbauer 等(1988)提出一个假设,一个具有 20 条长为 50cM 的染色体的物种,随机选择 100 个分子标记,将有 4 个保留在 $BC_5 F_1$ 衍生出的 NIL 中,而其中 2-3 个位于转育基因所在的染色体上,剩余的随机散布于其它染色体中。用带有不同基因的 NIL 相互杂交或将 NIL 与 RP 杂交,据 F_2 代群体或 F_3 株系群的分离数据,可以确证这种连锁。Barua 等(1993)利用一对大麦的近等基因系,鉴定出了一个 RAPD 标记与 Rh 基因连锁(Rh 是抗 *Rhynchosporium secalis* 的一个抗性基因)。Michelmore 等(1991)利用近等基因系鉴定出了与莠苣霜霉病抗性基因连锁的 10 个 RAPD 标记和 4 个 RFLP 标记。J. R. Byrum(1994)利用大豆品种 Williams 和其衍生出的 6 个 NIL,找到了一个与根疫腐病抗性基因连锁的 RAPD 标记 OPB-11₈₆₁,其遗传连锁距离为 8.9 ± 4.6 cM。

2. 利用分离群体制作的近等基因池进行基因定位

R. W. Michelmore 等(1991)提出了集合分离体分析方法(Bulked Segregants Analysis 即 BSA)。其原理是,根据后代个体中目标基因的分离构建 DNA 库(DNA pool),即将 F_2 代分为两组(如抗病组与感病组),然后分别在这两组中各随机取 10-20 株,并分别单株提取 DNA,每组内各株 DNA 等量混合,构建两个组的 DNA 库。由于这两个库对目的基因而言是指定选择的,其余部分则是随机选择的,因此它们除目的基因区域完全不同外,其余非目的基因区域则近似相同。从而把这两个池叫做近等基因池(isogenic DNA

pools)。然后再经 RAPD 扩增,选出抗感池间有多态性的标记,经与亲本对照,并在 F-2 代群体中验证,可以找到与目的基因连锁的分子标记。Michelmores, R. W. 等 (1990) 利用此法找到了与莠苣霜霉病抗性基因 (Dm5/8) 连锁的 3 个标记,朱立煌等 (1994) 运用此法在 DH 群体 (Dihaploid population) 中,定位了一个未知的稻瘟病抗性基因 (Pi-zh)。

R. Mahalingam (1995) 以大豆品种 Peking 和 Essex 为亲本配制杂交组合,利用 BS A 法找到了与大豆孢囊线虫抗性基因紧密连锁的种皮色基因 i (黑种皮) 连锁距离分别为 17cM, 39cM, 37cM 和 36cM 的 S-07, K-07, T-12 和 W-03 四个 RAPD 标记

四、RAPD 在大豆分类及资源方面的应用

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。供试材料适于用不同物种,不同亚种或动植物育种中的品种及品系等不同群体。如前所述 RAPD 最大的特点是所用引物的碱基排列是随机的,所用引物数也多达几百种,所探测的范围能涉及到整个基因组,同时一套引物可用于多个物种或群体。这一特点使 RAPD 在用于系统进化研究中具有更大的优越性,所探测的结果因为随机性和所探测的范围涉及到整个基因组而具有更为可靠的统计性。设 N_x 为在材料 X 中某一引物扩增出的条带数, N_y 为在材料 Y 中同一引物扩增出的条带数, N_{xy} 为在 X 和 Y 中扩增出的片段长度相同的条带数,则这两个材料之间的遗传相似性可以表示为 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 两个材料间的遗传距离可以表示为 $GD = 1 - S_{xy}$ 。通过对多个材料间的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 (*Glycine max*) 品种, 9 个野生大豆 (*Glycine soja*) 材料和 5 个多年生野生大豆 (其中 3 份是 *G. clandestina*, 2 份是 *G. tomentella*) 进行了系统进化及亲缘关系方面的分析。结果表明, *G. clandestina*, *G. tomentella*, *G. soja* 和 *G. max* 是截然分开的。而起源于日本的 3 个 *G. soja* 材料聚合到了一起,与地理上的分布表现一致。而具有相同遗传背景的 3 个栽培大豆 Essex Braxton 和 Bedford 聚合到一起,形态学上极度相似的两个品种 Arksoy 和 Midwest 聚合到了一起,从而证实了 RAPD 方法在这方面应用的可行性。后来 K. G. Lark (1993), I. Terry (1995) 得到了类似的结果。

五、讨论

在植物遗传学研究及育种实践过程中,人们很早以前就开始利用易于鉴别的遗传标记,对一些基因进行鉴定、分类和定位。但是 80 年代以前,植物遗传和育种所用的标记大多数是形态学标记。在豌豆和蕃茄中鉴定出的有上百个,而大多数作物中鉴定出的形态学标记不超过 50 个。这类标记不仅数量有限,对表现型的影响也很大,从而不利于直接进行选择,要找到与目标性状相关的此类标记是很困难的。同工酶 (Isozymes) 作为一种近乎中性的遗传标记在过去二十多年中得到了广泛的发展与应用。但与形态学标记相似,已鉴定出的具有多态性的同工酶位点最多约为 80 个,大多数作物不足 30 个 (N. F. Weeden 等, 1995 个人交流),其提供的遗传标记的数目不能满足植物遗传育种多方面的要求,所以,即使用同工酶作为遗传标记,遗传图谱在植物遗传育种中的全部潜力迄今也很有限。与形态标记及同工酶标记相比,分子标记具有无与伦比的优越性,它们对表现型无影响,大多数是共显性的。基因组 DNA 的变异极其丰富,分子标记的数量几乎是无限的。在不同发

育阶段,同一个体的任何体细胞所得的带型(指纹)都一样,且符合孟德尔遗传规律,因而分子标记一经出现就引起了遗传学家和育种家们的兴趣。分子标记在植物中应用的发展势头已超过了动物,因为植物世代时间短,多数植物既能杂交又能自交,用植物容易建立和维持大的分离群体。在植物中,用分子标记进行遗传变异的分析、进化及系统分类和亲缘关系的分析,育种中用于辅助选择,基因定位及克隆等多方面。随着分子生物学技术的发展,遗传研究中使用的分子标记有多种,如 RFLR SSR AFLP RAPD等等。与其它分子标记相比,RAPD方法的优点在于操作程序简单、迅速,无需同位素或非同位素标记,只需要极少量的DNA作模板,而且对DNA制备的质量要求不高,所以RAPD在植物基因定位的制作连锁图谱研究方面,已在人类、动物、植物、真菌和细菌中得到了广泛的应用。

在原理上与RAPD相似的还有AP-PCR(arbitrarily primed polymerase chain reaction),DAF(DNA amplification fingerprinting)。DAF反应引物长度为5~8个核苷酸,引物浓度高,退火温度高达70℃。DAF扩增产物在银染的聚丙烯酰胺凝胶上检测。AP-PCR所用的引物较长(20个核苷酸),并应用放射性标记,扩增出的产物在聚丙烯酰胺凝胶上分离,然后放射自显影。

RAPD标记具有高度的多态性,而且容易使用,数目丰富。但是RAPD技术很敏感,反应体系及条件稍有变化,便会对其结果产生影响。所以应保持DNA模板浓度,引物浓度, Mg^{2+} 浓度,热循环反应条件相同,Taq DNA聚合酶来源一致。一般应进行2~3次重复,重复性若好,则结果是可靠的。

参 考 文 献

- [1] 陈洪、朱立煌、徐吉臣、陈美玲,1995,RAPD标记构建水稻分子连锁图,植物学报,37(9): 677~684
- [2] 陆朝福、朱立煌,1995,植物育种中的分子标记辅助选择,生物工程进展,15(4): 11~17
- [3] 单卫星、陈受宜、吴立人、李振歧,1995中国小麦条锈菌流行小种的RAPD分析,28(5): 1~7
- [4] 王京兆、王斌等,1995,用RAPD方法分析水稻光敏核不育基因,遗传学报,22(1): 53~58
- [5] 漆小泉、朱德蔚等,1995,大白菜和紫菜薹自交系染色体组DNA的RAPD分析,园艺学报,22(3): 256~262
- [6] Akkaya, M. S., Bhagwant, A. A., and Cregan P. B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics 132 1131~1139
- [7] Clark, A. C. and C. M. S. Lanigan. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. Mol. Biol. Evol. 10 1096~1111
- [8] Foolad MR, Jones RA, Rodriguez RL. 1993, RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. Plant Cell Rep 12 293~297
- [9] Giovannoni, J. J. and R. A. Wing. 1991. Isolation of molecular markers for specific chromosomal intervals using DNA pools for existing population. Nucleic Acids Res. 19 6553~6558
- [10] Hu, J., and C. F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports. 10 505~511
- [11] Klein, Lankhorst R, Vermunt A, Weide R, Liharska T, Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor Appl Genet 83 108~114
- [12] Lark, K. G., J. Evans, F. Basha, R. Bogden, R. Copeland, R. Ellison, D. Horne K. Lee, K. McDonald, J. Piersonald, J. Pierson, W. Schuster, P. Wilhelm and Y. Yu. 1992. Molecular Phylogeny as a tool for soybean breeding. Soybean Genetics Newsletter. 19 174~181
- [13] Lark, K. G., J. Evans, P. Wilhelm, S. Atkinson, M. Christensen, B. Crockett, B. Dunford, C. Jones, S.

- Mendenhall, T. Messick, C. Prout, P. E. Solomon, M. Stevens, I. Terry, C. Walker, C. L. Wong R. Ellison. 1993, Molecular Phylogeny as a tool for soybean breeding II. Soybean Genetics Newsletter 20 197- 201
- [14] Martin, G. B., J. G. Williams, and S. D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 2330- 2340
- [15] M. Gupta et al, 1995, Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats, Theor. Appl. Genet. 89 998- 1006
- [16] Michelmore, R. W., I. Paran, and R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. PNAS 88 828- 9832
- [17] Morgante, M. and Olivieri, A. M. 1993, PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics, Plant J. 3 175- 182
- [18] Paran, I., R. Kscesli, and R. Michelmore. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. Genome 34 1021- 1027
- [19] Reiter, R. S., J. G. K. Williams, K. A. Feldman, J. A. Rafalski, S. V. Tingey, and P. A. Scolnik. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using RIL and RAPD. Proc. Natl. Acad. Sci. 89 1477- 1481
- [20] R. Mahalingam and H. T. Skorupska, 1995, Bulk segregant analysis for identification of RAPD markers associated with resistance to *Heterodera glycines* I. on linkage group A in Peking cultivar. Soybean Genetics Newsletter, Vol. 22 237- 241
- [21] Skorupska, H. T., I. S. Choi, A. P. Rao-Arelli, and W. C. Bridges. 1994. Resistance to SCN and molecular polymorphism in various sources of Peking soybean. Euphytica. 75 63- 70
- [22] Shoemaker, R. C. and Specht, J. E. 1995. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups, Crop Science 35 436- 446
- [23] Shoemaker, R. C. et al, 1992, Molecular genetic mapping of soybean map utilization. Crop Science 32 1091- 1098
- [24] Terry, I., K. G. Lark, L. Allphin, M. Stevens, A. J. Angilau, M. Gay, L. Harrison, B. Huff, P. Magasich, G. Miller, G. Nishimoto, C. Rhead, Q. Sahatian and J. Whitehead, J. A. Whitehead. 1994. Molecular Phylogeny as a tool for soybean breeding III. Soybean Genetics Newsletter. 21 245- 256
- [25] Terry, I. et al, 1995, Molecular phylogeny as a tool for soybean breeding IV, Soybean Genetics Newsletter, Vol. 22 251- 259
- [26] T. Milan et al, 1996, Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*, Theor. Appl. Genet. 92: 273- 277
- [27] T. Ohmori et al, 1995, Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in tomato, Theor. Appl. Genet. 90 307- 311
- [28] Uphoff, H. and G. Wricke. 1992. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.): Mapping the genes for nematode resistance and hypocotyl colors. Plant Breeding 109 171
- [29] Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18 7213- 7218
- [30] Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Res. 18 6531- 6535

UTILIZATION OF RAPD IN SOYBEAN GERMPLASM RESOURCES AND GENETIC LINKAGE STUDIES

Zhang Zhiyong Gai Junyi

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, 210095)

Abstract

RAPD owns great potential as genetic markers for genome mapping, gene tagging, genetic diversity measurement, phylogenesis and evolution studies in soybean, and have been widely used in humans, animals, plants, fungi and bacteria.

Key words RAPD; Soybean germplasm resources; Genetic linkage

利用 Ri 质粒向大豆导入抗虫抗花叶病基因的研究通过省级鉴定

由于大豆花叶病毒病 (SMV) 和大豆食心虫的危害, 致使大豆的产量和质量严重下降, 这是常规育种难以在短期内解决的。哈尔滨师范大学生物系在该项目的研究 (1991–1996) 中, 利用 Ri 和 Ti 质粒为载体, 将抗大豆花叶病的大豆花叶病外壳蛋白基因 (SMV–CP, PVY–CP 基因) 和抗鳞翅目昆虫的抗虫基因 (Bt, δ -内毒素毒蛋白基因) 导入大豆中, 经组织培养获得再生植株。通过对再生植株进行冠瘿碱检测, PCR 扩增检测和分子杂交检测, 证明成功地获得抗目的基因性状的转基因大豆植株。同时建立了以 Ri–Ti 质粒作载体向大豆转化有经济价值目的基因的转化技术体系, 首次在大豆抗花叶病、抗食心虫基因的质粒作载体的基因转化中实现了分子育种的成功实践, 表明该项技术已可用于大豆抗病虫育种和特异资源的创新工作, 对实现大豆育种现代化、生物技术实用化具有明显推动作用。

专家们认为, 该项研究方法先进, 技术正确成熟, 研究资料齐备, 结果可信。在转化目的基因植株的建立和研究上居国内先进水平, 在大豆转基因的研究上达国际先进水平。

崔文馥

(大豆科学编辑部)