

DNA 分子标记及其在大豆抗病育种中的应用^{*}

张阿英 胡宝忠 姜述君 胡国富 陈晓红 王亚玲

(东北农业大学基础部植物学教研室, 哈尔滨 150030)

APPLIED OF DNA MOLECULA TAGGING IN RESISTANT BREEDING OF SOYBEAN

Zhang Aying Hu Baozhong Jiang Shujun Ha Guofu Chen Xiaohong Wang Yaling

(Department of fundation, Northeast Agriacultural University 150030)

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2002)-01-0062-06

近年来,分子生物学发展异常迅速,其中与作物遗传育种密切相关的分子标记更是令人瞩目。在70和80年代,科学家们对同功酶作为分子标记给予很大希望,投入了大量研究,结果证明同功酶分析虽简单经济,但由于其基因位点数目少,且多态性水平低,实际应用受到限制。80年代末,90年代初,作物RFLP和RAPD研究异军突起,短短几年,不少作物,如大豆、玉米、番茄、水稻等都已建立了具有一定规模的分子标记遗传连锁图谱。

DNA分子标记是DNA水平遗传变异的直接反映,与表型标记相比,DNA标记具有如下特点:(1)能对各发育时期的个体、各个组织、器官甚至细胞作检测,既不受环境的影响,也不受基因表达与否的限制。(2)标记数量丰富,其数目可达108~1010。(3)遗传稳定。(4)对生物体的影响表现“中性”。(5)操作简便。DNA分子标记的所有特性,奠定了它具有广泛应用性的基础。在短短二十多年,特别是近十年,DNA分子标记的研究十分活跃,相继有数十种分子标记技术问世。

1 主要的分子标记

1.1 限制性酶切片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism RFLPs)

RFLP标记是80年代初发展起来的第一代分

子标记技术。所谓RFLP,是指用限制性内切酶酶解不同个体基因组DNA后产生的酶切片段在长度和数量上的差异。它的分子基础是核苷酸序列出现碱基替换、插入、缺失及倒位等分子重排事件,而导致限制性酶切位点的丢失或获得。

RFLP具有如下优点:(1)RFLP标记无表型效应,其检测不受外界条件、性别及发育阶段的影响;(2)RFLP标记等位基因间是共显性的,非等位基因间不存在上位效应,互不干扰;(3)RFLP起源于基因组DNA的自然变异,这些变异在数量上几乎不受限制,可以选取足够数量能代表整个基因组的RFLP标记。但RFLP标记也有不足,它与内切酶的选用密切相关,只有选用一定的内切酶,某个位点才可能表现出多态性;而且它不能检测出酶切后相同长度DNA片段内的碱基变异。另外,该方法实验所需DNA的量较大,实验流程长,耗资大及放射性同位素为主的标记等。虽然如此,但因为这是最早在动植物基因作图、连锁分析、系统发育等方面得到了广泛应用。目前主要用于遗传图谱的构建和目标基因的标记。

1.2 随机引物扩增多态性(RAPD)标记

随机引物扩增多态性(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)标记,是1990年Willian和Welsh领导的两个研究小组同时提出的。该标记是以一系列随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链为引

^{*} 收稿日期:2001-06-06

作者简介:张阿英,女,(1976-),东北农业大学植物学专业在读研究生。

物,对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,当某一引物同模板 DNA 有互补的结合位点,同时,这些结合位点在基因组某些区域内的分布符合 PCR 扩增条件,即引物在模板的两条链上有互补位置,且引物的两端相距在一定长度范围内(200—4000bp),就可以扩增出 PCR 片段。如果基因组 DNA 在这些区域发生变异就会使引物—模板 DNA 的结合位点发生变化,从而导致 PCR 扩增片段的有无及片段大小发生改变。通过 PCR 扩增产物的检测,即可检测出基因组 DNA 在这些区域的多态性。

RAPD 标记与其他标记相比,具有如下特点:

(1) RAPD 技术可以在对研究物种缺乏分子生物学研究资料的情况下,对其进行 DNA 多态性分析;(2) RAPD 引物可用于不同生物基因组多态性的研究。因此,引物可以规模生产形成商品,这大大降低了研究费用;(3) RAPD 操作简单,且所需 DNA 模板量小,灵敏度高。但 RAPD 标记为显性标记,不能判断检测到的多态 DNA 片段为纯合子还是杂合子,不能提供完整的信息;同时,由于 RAPD 所用引物序列是随机的,因此,检测到的基因组位点也不清。加之 RAPD 标记因为退火温度较低,重复性和稳定性差,这些不足,都大大限制了它的应用。

目前, RAPD 标记在生物学的许多领域都得到了广泛应用,如遗传图谱构建、基因定位和克隆、外源导入基因的跟踪、物种亲缘关系和进化关系研究、品种鉴定等。

1.3 微卫星标记

微卫星(Microsatellite)是指以少数几个核苷酸(多数为 2—4 个)为单位多次串联重复的 DNA 序列,也称为简单序列重复(simple sequence repeats)^[31]。微卫星大小约为 50bp,在真核生物基因组中广泛分布,大约每隔 10—50kb 就存在一个微卫星,它们主要以两个核苷酸为重复单位,也有一些微卫星重复单位为 3 个核苷酸,极少数为 4 个核苷酸或更多。人和动物中的微卫星重复单位主要为(TG)_n,小麦、水稻等主要为(GA)_n和(AC)_n,大豆中主要为(AT)_n和(ATT)_n^[4]。

微卫星标记是目前发展最快的一类分子标记。与其他分子标记相比,它具有以下突出特点:(1)共显性的遗传标记;(2)丰富的多态性;(3)重复性和稳定性好;(4)操作简单。微卫星标记的一个缺点是得到有用的简单序列重复引物花费较高,筛选到阳性克隆后要进行测序,然后再合成特异性引物。然而,一旦座位确定,引物序列公开后,这些标记就可以广

泛交流使同行受益。

微卫星已广泛应用于人类、小鼠和其它哺乳动物基因组分析。首先在人类和小鼠中构建了分子连锁图谱,在植物中这一技术应用相对较晚,但目前已在多种植物中发展了微卫星标记并用于遗传作图、种质鉴定、家系分析、基因定位和标记辅助育种等。

1.4 扩增酶切片段多态性(Amplified Fragments Length Polymorphism, AFLP)标记

AFLP 技术是有 Zabeau 和 Vos 等在 PCR 和 RFLP 技术的基础上新发展起来的一种 DNA 标记,该标记同 RAPD 一样,对基因组多态性的检测不需要预先知道基因组的序列特征,易于标准化,所检出的多态位点可覆盖整个基因组;同时, AFLP 标记具有与 RFLP 标记同样的稳定性和可靠性。另一方面, AFLP 标记克服了 RAPD 标记不稳定性和 RFLP 标记受探针来源的制约,因而有着广泛的应用。

AFLP 标记的基本原理是对基因组 DNA 限制性酶切片段的选择性扩增,使用双链人工接头与基因组 DNA 的酶切片段相连接作为扩增反应的模板。如果不同的样品 DNA 碱基发生插入、缺失或酶切位点的改变等,通过内切酶的切割就会产生不同大小的片段。这些不同大小的片段再通过与接头的连接,经 PCR 扩增,从而可以表现出扩增片段的长度多态性。

2 几种分子标记在大豆抗病育种中的应用

大豆是重要的油料作物和粮食作物,是世界上食用油和植物蛋白的主要来源。大豆病害是严重威胁大豆生产的自然灾害之一。在世界范围内危害大豆的病原菌有 100 多种,其中 35 种能引起不同程度的经济损失。中国东北大豆区常见的大豆病害有十几种,其中以大豆花叶病毒病(Soybena Mosaic Virus, SMV)、灰斑病(*Cercospora Sojina* Hara, FLS)和孢囊线虫病(*Heterodera Glycines* Ichinohe, SCN)三大病害发生普遍,危害严重。此外,大豆霜酶病(*Peronospora Manschurica*)、根腐病(*Fusarium Rhizoctonia Phthium*)、菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)、和细菌性斑点病(*Pseudomonas glycines*)等每年各地都有不同程度的发生和危害。培育优良抗病品种一直是国内外大豆育种工作者的

重要目标。现代分子生物学技术的发展为大豆抗病遗传育种工作者提供了有力的辅助工具。

进行分子标记的植物抗病基因主要集中在农作物。因为如果可以找到与农作物抗病基因紧密连锁的分子标记,就有助于克隆抗病基因。这对于农业生产有重要的意义会带来巨大的经济效益和社会效益。目前,农作物上已进行了部分抗病基因的分子标记:如水稻^[24,33]、小麦^[16,17]、玉米^[30,35]、大麦^[8,22]、马铃薯^[25]。

大豆中已标记的抗病基因有:大豆花叶病毒病(Rsv1; Rsv2)、大豆灰斑病(Rsc1; Rsc2)、大豆霜霉病(Rpm)、白粉病(Rmd)、大豆疫霉根腐病(Rps1—10)、大豆锈病(Rpp1; Rpp2; Rpp3)、细菌性斑点病(Rpg1)、细菌性斑疹病(Rxp)、大豆孢囊线虫病(Rhg1; Rhg2; Rhg3; Rhg4)等等。

2.1 大豆疫霉根腐病

大豆疫霉根腐病(*Phytophthora megasperma*)是毁灭性病害之一,在我国近年有逐年加重趋势。美国已投入大量资金对此病进行了系统、全面和深入的了解。通过遗传研究,已定名了一系列抗病基因,如 Rps1、Rps2、Rps3、Rps4、Rps5、Rps6、Rps7 等。Diers 等(1992)利用 7 个 Williams 的近等基因系和 141 个 RFLP 探针对 5 个抗病基因 Rps1、Rps2、Rps3、Rps4、Rps5 进行遗传分析。结果表明,Rps1 与分子标记 pK—395、pK—418、pA—71、pA—280 连锁;Rps2 与分子标记 pA—199、pA—233 连锁;Rps3 与分子标记 pA—186 和 pR—45 连锁;Rps4 与分子标记 pT—5 和 pA—586 连锁;Rps5 与分子标记 pT—5 连锁,Rps4 与 Rps5 也相连锁。Polzin 等(1994)进一步分析表明,与 Rps1 连锁的 RFLP 标记 A071—1(pA71)在疫霉根腐病抗感种质资源间有很高的多态性。Bhattacharyya 等(1997)用 Williams 和 William82 组成的一对近等基因系筛选了 178 个 RAPD 引物,得到的连锁标记 OPRK15 在 54 株 Elgin 和 E420 的感病 F₂ 个体中与 Rps1K 共分离,在 163 株 E300 和 OX717 的感病 F₂ 个体中只有一株与 Rps1K 发生重组。Lohnes 等(1997)利用作图群体 Clark(S)×Harosoy(R)找到与 Rps7 连锁的 RFLP 标记 K022—1,并将 Rps7 定位在第 N 连锁群。Hegstad 等(1998)利用已报道的与疫霉根腐病抗病基因连锁标记分析了 18 个大豆 PI(Plant Introduction)材料,根据结果推断 1 个 PI 具有 Rps1,5PI 个具有 Rps2,7 个 PI 具有 Rps3,4 个 PI 具有 Rps4,8 个 PI 同时具有多个抗病基因。

2.2 大豆花叶病毒病

大豆花叶病毒病(Soybean mosaic virus, SMV)也是一种世界性病害,在世界各大豆产区均有不同程度发生。Yu 等(1994)通过 PI96983(R)×Lee68(S)的 107 株 F₂ 个体,利用 RFLP 和 SSR 标记将 G1 株系的抗病基因 Rsv1 定位在 E 连锁群上。他们的结果还表明,RFLP 标记 pA186、Pk644 及 SSR 标记 SM176 与 Rsv 紧密连锁,遗传距离分别为 0.5、1.5 和 2.1cM。同时,他们以 Williams 极其近等基因系对得到的结果进行了验证。Cregan 等(1999)对 USDA/ARS/ISV 群体进行 RFLP 和 SSR 标记,将 Rsv4 定位在 D1b 连锁群上,且 RFLP 标记 K19, B122, A808 和 SSR 标记 Satt095, Satt157, Satt558, Satt542 和 Satt266 与 Rsv4 连锁。Hates 等(2000)利用 AFLP 标记对 PI96983(Rsv1)×Lee68(rsv1) F₂ 进行标记,在 960 个条带中有 33 个具有多态性,其中 4 个标记 R11(518bp), R12(171bp), R13(261bp)和 R14(312bp)与 Rsv1 连锁,遗传距离都在 3.5cM 以内,其中 2 个(R11, R14)在 0.6cM 以内。Alev J. Hayes 等(2000)用 AFLP 和 SSR 对 LR2×Lee68 和 VT1—370×PI407162F₂ 个体进行标记,用 BSA 法分析表明在 141 个多态性条带中有两个(R4—1, r4—2)与 Rsv4 连锁。R4—1 与 Rsv4 相距 4.8cM。R4—2 大小为 120bp, R4—2 与 R4—1 同侧距离 Rsv4 为 18 cM。进一步用 RFLP(K19, B122, A808)和 SSR(Satt095, Satt157, Satt558, Satt542 和 Satt266)对 LL 群体进行标记,将 Rsv4 定位在 D1b 连锁群上,并与 Satt542 在 4.7cM 和 Satt5587.8cM 处连锁。邱丽娟等对“95—5383(抗 SMV)×HB—1(感 SMV)”F₂ 分离群体人工接种东北 3 号株系,根据鉴定结果选取抗、感单株分别提取基因组 DNA 并等量混合,用 BSA 法筛选出一个与抗 SMV 基因有关的分子标记。

2.3 大豆孢囊线虫

大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines*, SCN)是大豆生产上毁灭性病害之一,在美国、巴西、阿根廷和中国等主要大豆生产国均有发生。就世界范围而言,大豆孢囊线虫的危害和蔓延有日趋加重的趋势,有关孢囊线虫的研究越来越受到重视。Mahalingam 和 Skorupska(1995)以 Excess×Peking 的 F₂ 代为材料,利用 3 个形态标记、108 个 RFLP 标记和 400 个 RAPD 标记对大豆孢囊线虫 3 号小种抗性进行研究。结果表明,控制颜色(黑色)的 I 位点与 3 号小种的抗性基因 Rhg4 紧密连锁,相距仅 0.6cM;另两

个 RFLP 标记 pA85a(连锁群 A)、pA136(连锁群 C)和三个 RAPD 标记 E01(连锁群 A)、G15d(连锁群 F)和 S07a(连锁群 A)也不同程度的与抗病基因连锁。他们由此推断, SCN3 号小种的抗性受多个基因控制,而且每个基因位点的作用程度均不相同。Concibido 等(1994)以 PI209332 为抗源材料,却发现 I 位点与 3 号小种的抗性连锁较弱,这表明不同材料间可能具有不同的抗病基因。Concibido 等(1996a, 1997)通过对 4 个最广泛使用抗源 PI209332、PI90763、PI88788 和 Peking 的分析,找到了 4 个与 SCN 抗性有关的 QRL。这些 QRL 分别位于连锁群 G 的 C006V 附近、连锁群 G 的 A378H 附近、连锁群 J 的 B032V-1 附近和连锁群 N 的 A280Hae-1 附近。其中,连锁群 G 上 C006V 附近的 QRL 最为重要,因为它不但在 4 个抗源材料中都可检测到,而且具有非小种抗性,最多可解释总变异的 50%。此位点对 SCN 抗病育种和抗病基因的最终克隆具有特殊意义(Concibido 等, 1996a, b)。Mudge 等(1997)以 PI437654、PI90763、PI209322、PI88788 和 Peking 为抗源材料,发现有 2 个 SSR 座位(BARC-Satt038, BARC-Satt130)与 rhg1 连锁, BARC-Satt038 距离 rhg13cM, BARC-Satt130 距离 rhg1120cM。在此基础上, Cregan 等(1999)用 2 个 SSR 标记(Satt309, Sat-168)进一步分析表明,进行分子标记辅助选择时, Satt309 只能区分来源于 Peking, PI90763, PI209332, PI88788 和 PI437645 的抗源与大部分感病材料,不能区分 US 南方感病材料与 PI209332, PI88788。Sat-168 能区分 PI209332, PI88788 与 US 南方感病材料'Lee', 'Bragg' 和 'Essex'。Satt309, Sat-168 同时应用可区分在 rhg1 座位表现感、抗 SCN 的材料。Qiu 等(1999)用'Peking'×'Essex'的 F_{2,3}群体筛选出 5 个 RFLP: A598、T005(位于连锁群 B), A018(连锁群 E), K014、B072(连锁群 H)与 1 号小种抗性座位连锁,可解释表型变异的 57.7%; B072, K014 和 T005 与 3 号小种抗性座位连锁,可解释 21.4%; K011(连锁群 I), A963(连锁群 E)与 5 号小种抗性座位连锁,可解释 14%。

2.4 大豆灰斑病

大豆灰斑病作为世界性病害,在 1915 年由 Hara 首先在日本发现,此后相继在许多国家均有该病的发生。在我国大豆灰斑病的发生也很普遍,尤以黑龙江最为严重,60 年代和 70 年代东北大豆产区曾严重发生该病害,80 年代以来该病连年发生,

已呈扩大蔓延之势,造成大豆严重减产和质量变劣,影响大豆出口创汇。国内外病理学家与遗传育种家已对大豆灰斑病开展了大量研究,取得了不少有意义的结果。目前,抗大豆灰斑病的育种都采用常规传统的方法进行,有一定的局限性。近年来,分子生物学技术,尤其是分子标记技术的不断发展,为大豆灰斑病的抗病育种拓展了新的思路。目前已进行了许多大豆 RFLP、RAPD 等的研究,邹继军等(1998)对杂交组合东农 91212(感 7 号小种)×东农 9674(抗所有小种)的抗性分析表明,大豆对 7 号小种的抗性受单显性基因控制。运用 BSA 法筛选到 3 个与抗病基因连锁的 RAPD 标记。其中引物 OPS03 扩增的 2 个标记 OPS03₆₂₀和 OPS03₅₈₀具有共显性的分离特点, OPS03₆₂₀与抗病基因的遗传距离为 8.7cM,根据该标记选择基因型纯合和杂合的抗病植株,其符合率分别达到 100%和 97.6%。董伟等(1999)以高抗品种东农 9674 为父本,以高感品种东农 87-104 为母本,杂交得到 F₂代群体。该群体经人工接种灰斑病 1 号生理小种后,分别从抗、感材料中取 15 株的叶片提取 DNA 组成抗、感池,用 820 个 10mer 随机引物进行 RAPD 多态性分析,其中 3 个引物在抗、感池间出现稳定的多态性标记 OPK03₈₄₀, OPM17₁₇₀₀, OPO10₉₅₀,并在 F₂代个体中表现出抗性与多态性标记协同分离的趋势,这三个标记与抗性基因 Rf1 的连锁顺序为 OPK03840-Rf1-OPM17₁₇₀₀-OPO10₉₅₀,连锁距离分别为 10.4cM-Rf1-13.8cM-26.1cM。邹继军等(1999)进一步对 OPS03₆₂₀和 OPS03₅₈₀进行全序列分析,结果表明,共显性分离的主要原因在于引物扩增区域内 30bp 的插入或缺失。Southern 杂交显示, OPS03₆₂₀来源于大豆基因组中的单拷贝或低拷贝序列,可用作 RFLP 探针。并将 RAPD 标记转化为共显性的 SCAR 标记 SCS3₆₂₀&580。用 SCS3₆₂₀&580 检测 93 株 F₂群体所得结果与 RAPD 标记检测到的相同,对 62 份大豆灰斑病抗感种质资源的测试显示,在绝大部分抗感种质之间存在明显多态性,此标记兼具 RFLP 和 RAPD 的优点,在大豆灰斑病抗病育种中具有广泛的应用价值。Rouf Mian 等(1999)以 Blackhawk(S)×Davis(R)的 F₂群体及 F_{2,3}, Wright 和 Wright6-Rcs3 的近等基因系接种 3 号小种,从 Blackhawk(S)×Davis(R)的 F₂群体分别取 15 株感抗单株 DNA 混合,形成感抗池,用 SSR 标记对感抗池及 Wright 和 Wright6-Rcs3 的近等基因系进行筛选,发现 Satt244, Satt547 与 Rcs3 紧密连锁,这将

为大豆抗灰斑病标记辅助选择提供可能。

陈庆山对 94 份大豆灰斑病种质资源进行了 10 个生理小种的抗性鉴定, 并进行了 RAPD 和 SSR 的分析, 得到了许多与各生理小种专化抗性有关的分子标记。相似度大于 0.7, Fisher 准确性检测达到显著相关的 RAPD 引物有 C07-2、F02-3、Q12-3 和 SSR 引物 Sat108-b、Sat121-b、Satt049-c、Satt199-b、Satt239-c、Satt303-b、Satt247-d、Satt371-a、Satt453-a、Satt516-c、Satt543-b、Sat587-a、Sct186-e、Sct186-f、Sct189-b、SOYPRP1-a。

3 抗病基因的群聚分布

随着连锁图谱日趋饱和和越来越多抗病基因的定位, 人们发现一些质量抗病基因和数量抗病基因关系紧密, 往往聚集在某几条连锁群上, 并且位于这些连锁群的一定距离以内。在大豆上, 几个作图群体的 F、G 和 J 连锁群上紧密聚集着抗病基因、抗病基因类似物及一些与数量抗病基因位点有关的分子标记。如 Imsande 等 (1998)、Concibido 等 (1997) 和 Ashfield 等 (1998) 报道, 大豆 F 连锁群上有大豆疫霉根腐病抗病基因 (Rps3) 及与大豆孢囊线虫 (SCN)、大豆花叶病毒病 (SMV)、细菌性斑点病抗性等连锁的分子标记。连锁群 G 上带有大豆疫霉根腐病抗病基因 (Rps4) 及与大豆孢囊线虫连锁的标记。在连锁群 J 上有 Rj2、Rps2、Rmd、7 个抗病基因类似物及与大豆孢囊线虫抗性有关的标记。抗病基因的聚集分布现象在番茄、莴苣、亚麻和玉米上也曾有过报道。这些抗病基因在基因组中的群聚分布为进一步定位其它抗病基因和比较抗病基因的进化关系提供了新思路。

4 小结

利用分子标记进行群体后代选择时, 由于分子标记本身通常不是决定选择性的基因, 只是与决定选择性的基因相连锁, 这种连锁的紧密程度就很重要。理想的情形是分子标记与选择位点紧密连锁, 或者两个分子标记位于选择位点的两侧。

随着分子标记技术的发展和连锁图谱的日趋饱和, 大豆上一些重要病害的抗病基因得以精细定位, 这不但为标记辅助选择提供了可能, 而且为抗病基

因的分离和克隆奠定了基础。到目前为止, 尚未从大豆上克隆到抗病基因。但根据烟草、拟南芥和亚麻的 NBS-LRR 类型抗病基因保守区设计的引物已从大豆上扩增到相关系列^[21, 34], 几个分离到的克隆已定位到某些大豆抗病基因的附近。这可能会成为最终克隆到大豆抗病基因的有效途径。

参 考 文 献

- 1 邱丽娟, 常汝镇, 许占有. 利用分子标记评价大豆种质的研究进展[J]. 大豆科学, 1999, 18(4): 347-349.
- 2 邹继军. 大豆对灰斑病菌 7 号生理小种抗性的遗传分析及抗病基因的 RAPD 标记[J]. 科学通报, 1998, 43(21): 2302-2307.
- 3 邹继军. 大豆灰斑病抗病基因 RAPD 标记的分子特征及抗、感种质的 SCAR 标记鉴定[J]. 科学通报, 1999, 44(23): 2544-2550.
- 4 Akkaya. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in Soybean[J]. Genetics, 1992, 132: 1131-1139.
- 5 Alev, J. Hayes Guorong Ma. Molecular marker mapping of Rsv4, a gene conferring resistance to all known strains of Soybean Mosaic Virus[J]. Crop Science, 2000, 40(5): 1434-1437.
- 6 Ashfield, J., Danzer, J. R., Held D. et al. Rpg1, a soybean gene effective against races of bacterial blight, maps to a cluster of previously identified disease resistance genes[J]. Theor. Appl. Genet., 1998, 96: 1013-1021.
- 7 Bhattacharyya M. K., Gonzales R. A., Kraft, M. et al. A copia-like retrotransposon Tgm1 closely linked to the Rps1-k allele that confers race-specific resistance of soybean to *Phytophthora sojae* [J]. Plant Molecular biology, 1997, 24: 255-264.
- 8 Borovkova I. G., Steffenson B. J., Jin Y., Rasmussen J. B. et al. Identification of molecular markers linked to the stem rust resistance gene rpg4 in barley[J]. Phytopathology, 1995, 85: 181-185.
- 9 B. X. Qiu, D. R. Arelli, D. A. Sleper. RFLP markers associated with soybean cyst nematode resistance and seed composition in a 'Peking × Essex' population[J]. Theor. Appl. Genet., 1999, 98: 356.
- 10 Concibido V. C., Denny, R. L., Boutin, S. R. et al. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe)[J]. Crop Sci. 1994, 34: 240-246.
- 11 Concibido V. C., Denny, R. L., Lange D. A. et al. RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI209332[J]. Crop Sci. 1996a 36: 1643-1650.
- 12 Concibido, V. C., Young, N. D., Lange, D. A. et al. Targeted comparative genome analysis and qualitative mapping of a major partial resistance gene to soybean cyst nematode[J]. Theor. Appl. Genet., 1996b, 93: 234-241.
- 13 Concibido V. C., Lange, D. M., Denny, R. L. et al. Genome mapping of soybean cyst nematode gene in 'Peking', PI90763 and PI88788 using DNA markers[J]. Crop Sci., 1997, 37: 258-264.
- 14 Cregan, P. B., Jarvik, A. A., L. Bush, R. C. et al. An integrated genetic map of the soybean[J]. Crop Science, 1999, 39: 1464-1490.
- 15 Diers, B. W., Mansur, I. Imsande, J., Shoemaker, R. C. Mapping of phytophthora resistance loci in soybean with restriction fragment

- length polymorphism markers[J]. Crop Sci. 1992, 32: 377—383.
- 16 Eastwood R. F., Lagudah E. S., Appels R. A directed search for DNA sequences tightly linked to cereal cyst nematode resistance gene in *Triticum tauschii*[J]. Genome 1994, 37: 311—319.
- 17 Hartl L., Weiss H., Stephan U. et al. Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat[J]. Theor. Appl. Genet., 1995, 90: 601—606.
- 18 Hayes A. J., Saghai Maroof M. A Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs[J]. Theor Appl Genet. 2000, 100 (8): 1279—1283.
- 19 Hegstad J. M., Nickell C. D., Voldin L. O. Identifying resistance to *Phytophthora sojae* in selected soybean accessions using RFLP techniques[J]. Crop Sci. 1998, 38: 50—55.
- 20 Imsand M., Grant D., Shoemaker, R. QTL in soybean: A new perspective[J]. Soybean Genetics Newsletter. 1998, 25: 146—148.
- 21 Kanazin V., Marek, L. F., Shoemaker, P. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybeans[J]. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1996, 93: 11746—11750.
- 22 Kilian A., Steffenson B. J., Saghai Maroof M. A et al. RFLP markers linked to the durable stem rust resistance gene Rpg1 in barley[J]. Mol Plant—Microbe Interact 1994, 7: 298—301.
- 23 Lohnes D. G. and Schmitthenner, A. F. Position of the *Phytophthora* resistance gene Rps7 on the soybean molecular map[J]. Crop Sci. , 1997, 37: 555—556.
- 24 Nair S., Kumar A., Srivastava M. N., Mohan M. PCR—based DNA markers linked to a gall midge resistance gene Gm4t, has potential for marker—aided selection in rice[J]. Theor. Appl. Genet, 1996, 92: 660—665.
- 25 Nienhuis J., Helentjaris T., Slocum M. et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato[J]. Crop Sci., 1987, 27: 797—803.
- 26 P. B. Cregan, J. Mudge et al. Two simple sequence repeat markers to select for Soybean cyst nematode resistance conditioned by the rhg1 locus[J]. Theor. Appl. Genet, 1999, 99: 811—818.
- 27 Polzin K. M., Lohnes D. G., Nickell C. D. et al. Rps2, Rmd, and Rj2 are integrated into linkage group J of the soybean molecular map[J]. Journal of Heredity. 1994, 85: 300—303.
- 28 R. Mahalingam, H. T. Skonupska. Bulk segregant analysis for identification of RAPD markers associated with resistance to *Heterodera glycines* I on linkage group A in Peking cultivar[J]. Soybean Genetics Newsletter. 1995, 22: 237—241.
- 29 Sarfatti M., Abu—Abied, M., Katan, J. et al. RFLP mapping of I1, a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* sp. lycopersici race I[J]. Theor. Appl. Genet. 1991, 82: 22—26.
- 30 Simcox K. D., Bennetzen J. L. The use of molecular markers to study *Setosphaeria turcica* resistance in maize[J]. Phytopathology, 1993, 83: 1326—1330.
- 31 Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. 1989, Nucleic Acid Research, 17: 6463—6471.
- 32 Van der Beek, I. G., Verkerk R., Zabel, p., Lindhout, P. Mapping strategy for resistance genes in tomato based on RFLPs between cultivars; Cf9 (resistance to *Cladosium fulvum*) on chromosome I[J]. Theor. Appl. Genet. 1992, 84: 106—112.
- 33 Yoshimura S., Yoshimura A., Iwata N. et al. Tagging and combining bacterial blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP markers[J]. Mol. Breed, 1995, 1: 375—387.
- 34 Yu Y. G., Saghai—Maroof, A., Buss G. R. et al. RFLP and microsatellite mapping. If a gene for soybean mosaic virus resistance[J]. Phytopathology. 1994, 84: 60—64.
- 35 Zaitlin D., dEmARS s., Ma Y. Linkage of rhm, a recessive gene for resistance to southern corn leaf blight to RFLP marker loci in maize (*Zea mays*) seedlings[J]. Genome 1993, 36: 555—564.