科 学 通 报
第 42 卷 第 12 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 6 月

【研究简报】

用栽培大豆与半野生大豆间的杂种 F_2 群体构建基因组分子标记连锁框架图

张德水① 董 伟① 惠东威① 陈受宜①* 庄炳昌②

(①中国科学院遗传研究所植物生物技术开放实验室,北京 100101;
②吉林省农业科学院大豆研究所,公主岭 136100. *联系人)

关键词 大豆 分子标记连锁图 F_2 群体

遗传图谱的构建,是基因组研究中的重要环节,可为基因定位与克隆及基因组结构与功能等研究打下基础. 大豆是主要的油料作物,也是植物蛋白的来源之一,然而其细胞遗传学研究

(ⅱ) PAI-1 在人和恒河猴胎盘基盘中的定位. 图 1(c)为 PAI-1 在人胎盘基盘中免疫荧光定位用激光共聚焦扫描显微镜观察下的照片. PAI-1 分泌部位也像 tPA 一样临近子宫肌蜕膜(m)的蜕膜细胞. 图 1(d)、(e)和(f)表示恒河猴胎盘基盘 PAI-1 的分泌部位. 像人的基盘一样,PAI-1 也是由靠近子宫肌蜕膜层(m)的蜕膜细胞(图 1(e)-a 和(f)-a). 在深层的蜕膜细胞(图 1(e)-a)和对照组(图 1(e)-b)无明显的荧光反应. 激光共聚焦 Nomarski 扫描对比观察表明,实验组(图 1(e)-c)和对照组(图 1(e)-d)胎盘基盘切片在形态和结构上无异. 有趣的是,在蜕膜血管周围的蜕膜细胞中也发现有很强的荧光反应(图 1(d)). PAI-1 在这些细胞中的表达可能对防止 PA 对血管的破坏中起重要作用.

本文首次报道了 tPA 和 PAI-1 在人和恒河猴胎盘基盘中的定位,并首次提出证据说明 PA-PAI-1 系统在分娩过程中可能对母体子宫蜕膜组织的分离机制起重要作用.

致谢 本工作为中国科学院和英国皇家学会联合支持的研究项目.

参 考 文 献

1 Liu Y X, Peng X R, Ny T. Tissue-specific and time-coordinated hormone regulation of plasminogen-activator-inhibitor type-1 and tissue type plasminogen activator in the rat ovary during gonadotropin-induced ovulation. Eur J Biochem, 1991, 195: 549～555
2 Liu Y X, Chen Y X, Shi F W, et al. Studies on the role of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type-1 in rat corpus luteum of pregnancy. Biology of Reproduction, 1995, 53: 1 131～1 138
3 Liu Y X, Liu K, Zhou H M, et al. Hormonal regulation of tissue type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured monkey Sertoli cells. Mol Human Reproduction, 1995, 10: 719～729
4 Liu Y X, Feng Qiang. Tissue type plasminogen activator in rat oocytes and preimplantation embryos. Chinese J Physiol Sci, 1992, 8: 158～166
5 Fazleabas A T, Everly S L, Lottenberg R. Immunological and molecular characterization of plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in baboon placental tissues. Biology of Reproduction, 1991, 45: 49～56
6 Shimada H, Takashima E, Soma M, et al. Source of increased plasminogen activators during pregnancy and puerperium. Thromb Res, 1989, 54: 91～98
7 Ockleford C D, Malak T, Hubbard A, et al. Confocal and conventional immunofluorescence and ultrastructural localization of intracellular strength-giving components of human amniochorion. J Anat, 1993, 183: 483～505

(1997-01-11 收稿, 1997-03-23 收修改稿)

与水稻、小麦等相比较为落后，经典遗传图谱仅由 63 个颜色、形态及同工酶标记组成 20 个连锁群，这些连锁群尚未定位到染色体上[1]. 其主要原因是大豆的遗传变异程度低[2, 3]，单一分离群体中蕴含的常规标记数目少；大豆的基因组较大而且复杂[4]，染色体都较小，且难以分辨，因此进行细胞遗传学研究难度较大.

限制性片段长度多态性(RFLP)和其他分子标记的发展，使得有可能在分子水平上构建遗传连锁图. 分子标记连锁图可以直观地反映个体的基因型及每条染色体的遗传组成，因此广泛应用于植物基因组研究. 1990 年 Keim 等构建了第一个大豆 RFLP 图谱[5]，之后 Shoemaker 等又对其作了进一步的扩展，成为有 20 个连锁群包含 490 个以 RFLP 标记为主的遗传图[6]. 我们对 8 个大豆栽培品种，1 个半野生大豆间的 RFLP 多态性进行了分析(待发表)，在此基础上选择栽培品种长农 4 与半野生大豆新民 6 的杂种 F_2 群体构建了以 RFLP 标记为主，包含 RAPD 标记在内的分子连锁框架图. 此图与 Shoemaker 发表的图有较大的可比性，为今后的深入研究奠定了基础.

1　材料与方法

1.1　材料

本文所用的包括 84 个单株的杂种 F_2 群体，是以栽培品种长农 4 为母本，半野生种新民 6 为父本杂交，杂种 F_1 再经自交得到的.

1.2　方法

RFLP 标记　由美国 Iowa 大学 Shoemaker 博士提供.

RFLP 分析　基本按 Keim 等(1989)描述的方法进行[3]. 从长农 4 和新民 6 叶片中提取总 DNA，再分别用 Dra Ⅰ，EcoR Ⅰ，EcoRV，Hind Ⅲ和 Taq Ⅰ完全酶解，经琼脂糖凝胶电泳后，Southern 转移至滤膜上，将探针与滤膜杂交，选择亲本间有多态性的内切酶-探针组合，再对 F_2 群体的各单株进行多态性测定.

RAPD 分析　RAPD 引物和 PCR 扩增仪分别为美国 Operon 公司和 Perkin Elmer 公司产品，Taq-G 聚合酶由本实验室制备. 反应体系(25 μL)包括 200 μmol/L dNTP，200 nmol/L 引物(10-mer)，2.5 μL 10 × Buffer，5 ng 基因组 DNA，1 单位 Taq-G 酶. 反应条件为 94℃，1 min；35℃，2 min；72℃，2 min；5 个循环后继续 40 个循环，94℃，30 s；35℃，1 min；72℃，1 min 30 s；最后 72℃，10 min；扩增产物于 1.5% 琼脂糖中进行电泳分析.

数据的收集　对于共显性的 RFLP 标记，将 F_2 群体中与长农 4 和新民 6 具有相同带型的个体分别赋值为 1(代表 aa)和 2(代表 bb)，具有杂种带型的赋值为 3(代表 ab)；对于显性的 RAPD 及少数的 RFLP 标记，不能对 ab 和 bb 加以区分的 F_2 个体赋值为 4，不能对 ab 和 aa 加以区分的 F_2 个体赋值为 5；带型不能确定或缺失的个体赋值为 0.

分子图谱的构建　采用 MAPMAKER Version 2.0 软件[7]，在 Macintosh Ⅱ型计算机上进行. 首先采用“Group”命令进行两点分析(LOD = 3.0，r = 0.4)获得连锁群，然后对各群内的标记作多点分析直至绘出连锁图，并采用 Kosambi 函数，将重组率转换成图距单位(cM).

2　结果与讨论

2.1　亲本间的遗传多态性

表 1 总结了亲本长农 4 和新民 6 的 10 个表型性状的有关资料和数据，结果表明它们在植

物学性状和农艺性状方面都有极为显著的差异.

表 1 亲本长农 4 和新民 6 的表型性状比较

亲本	生长习性	结荚习性	泥膜	花色	粒色	生育期/d	单株结荚数	百粒重/g	蛋白含量/%	脂肪含量/%
长农 4	直立	亚有限	无	白	黄	130	70～80	19.0	40.1	19.8
新民 6	攀缘	无限	有	紫	黑	145	300～400	4.1	44.31	15.4

采用 110 个 RFLP 标记与 Dra Ⅰ, EcoR Ⅰ, EcoR Ⅴ, Hind Ⅲ和 Taq Ⅰ等 5 种限制性内切酶组合,对亲本长农 4 及新民 6 进行 RFLP 分析,表明有 64 个 RFLP 标记在至少与 1 种内切酶组合时揭示了亲本间的多态性,频率为 58.2%,超过了 Keim 等用以构建图谱的一对栽培与野生大豆亲本间 40%的多态性[5]. 此外,应用 280 个 RAPD 引物对亲本进行多态性筛选扩增,其中 77 个引物揭示出了多态性,频率为 27.9%. 这与前人的研究结果相比也是较高的. 图谱构建的关键是选择有足够多态性的亲本. 大豆的遗传多态性一般较低[2,3],这是导致其基因组标记图谱构建困难和进展缓慢的主要原因. 本研究所用亲本的遗传多态性大于国际上应用的亲本,这是一个明显的优点. 另外,亲本长农 4 是北方春大豆优良品种,具有突出的优良农艺性状;新民 6 作为半野生大豆,也具有结荚多、抗逆性强的优点,这些特点将使建成的遗传图谱能直接用于大豆农艺性状的基因定位与遗传育种.

2.2 分子图谱的构建

根据亲本间分子标记多态性分析的结果,用能显示多态性的 RFLP 标记及 RAPD 标记分别对 F_2 群体各单株进行分析(图 1). 用于作图分析的 RFLP 标记共 64 个,其中 6 个标记揭示了 2 个或 2 个以上的独立分离的位点,因此 RFLP 标记位点总计为 75 个. 在这些位点中,表现共显性分离的有 58 个,表现显性分离的有 17 个. 用于作图分析的 RAPD 引物共 13 个,提供的标记位点数达 18 个.

利用 MAPMAKER 软件对所有标记位点在 F_2 群体中的分离资料进行分析,构建了如图 2 所示的大豆基因组分子标记框架图. 该图包括 20 个连锁群,覆盖大豆基因组的长度为 1 446.8 cM,在图上可明确定位的有 71 个标记位点,其中 RFLP 位点 63 个,RAPD 位点 8 个,标记间的平均图距为 20.4 cM. 另外 22 个标记位点独立于连锁群之外,其中 RFLP 位点 12 个,RAPD 位点 10 个,其原因可能是分析的总标记数偏少,难以确定未定位标记与定位标记间的连锁关系. 由于定位到图谱上的分离标记数与总分离标记数呈指数函数关系[6],因此可以预期,这些不连锁标记的数量会随着总标记数的增加而减少.

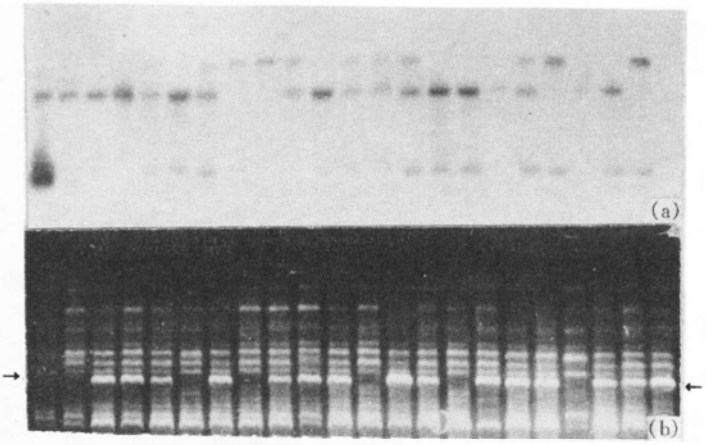


图 1 RFLP 标记 A148 (a)和引物 OPAS5 的 RAPD 片段(b)在大豆 F_2 群体(长农 4/新民 6)中的分离

左右泳道分别为亲本长农 4 和新民 6,其他为不同的 F_2 个体

由于本图谱所用的 RFLP 标记均来自 Shoemaker 实验室,其中 56%的标记在两个构图群体中是由相同的限

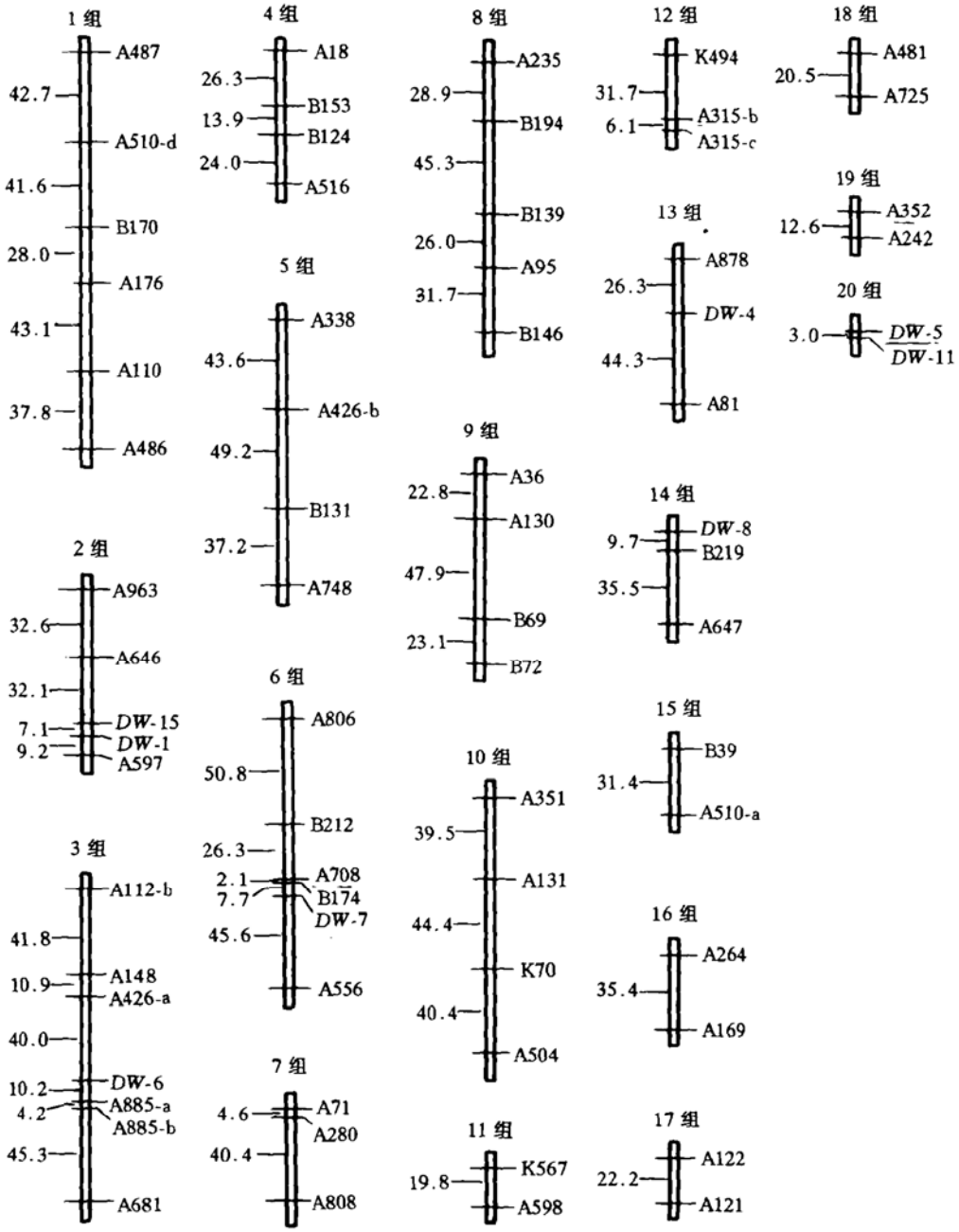


图 2　大豆分子连锁框架图

连锁群左右分别为图距(cM)和分子标记，斜体为 RAPD 标记，其他为 RFLP 标记．独立于连锁群之外的 RFLP 标记：A262, A112-a, A112-c, A584, A315-a, K375, A426-c, A83-a, A83-b, A510-b, A510-c, A398；独立于连锁群之外的 RAPD 标记：*DW*-2, *DW*-3, *DW*-9, *DW*-10, *DW*-12, *DW*-13, *DW*-14, *DW*-16, *DW*-17, *DW*-18

制性内切酶揭示的(Shoemaker, 1991, 私人通讯)，因此为两个图谱的比较分析提供了基础．两个图谱上 RFLP 标记间的连锁关系及排列关系基本一致，相同标记间的图距有差异，但不同标记间的连锁紧密程度在两个图谱上表现相似，因此有较好的可比性．然而两个图谱也存在一些明显差异，例如 B174 标记所属的连锁群在两个图谱上截然不同，在 Shoemaker 图谱上它

科 学 通 报
第 42 卷 第 12 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 6 月

【研究简报】

人工调节轮虫 *n*-3HUFA 对黑鲷仔鱼生长、存活的影响

刘镜恪① 雷霁霖②

(①中国科学院海洋研究所，青岛 266071；②黄海水产研究所，青岛 266003)

关键词 轮虫 高度不饱和脂肪酸 黑鲷仔鱼 生长与存活

仔稚鱼营养研究，国外已取得一定进展，但我国在该领域的研究，尚未见报道．近年来，国

属于连锁群 E，而在本图中却属于对应于 Shoemaker 图谱中的连锁群 G[5]．另一明显的不同是相同标记在两个群体中揭示的基因座位数目的差异造成的，如 RFLP 标记 A112，A315 和 A885 在 Shoemaker 的构图群体中只呈现单一基因座位的分离，而在本研究群体中却揭示了 2～3 个基因座位的分离；RFLP 标记 A510 和 A426 在两群体中都揭示了 1 个以上的基因座位，但在我们用的群体中数目更多．这说明了我们用的亲本具有更高的多态性，可以揭示在大豆基因组中含同源序列的多个座位．此外，一些 RFLP 标记能揭示 2 个或 2 个以上独立分离的基因座位的现象也暗示了大豆基因组的复杂性，这可能与一些研究表明的大豆为四倍体起源这一问题有关[2,4]．

在本研究目前所建的分子图谱上，标记数还相对较少，但作图亲本间丰富的 RFLP 多态性使之具有很大的发展潜力．与其他重要的农作物相比，即使在国际上大豆的遗传作图也是相对滞后的，其瓶颈因素是没有理想的作图群体．我们已用来自同一对亲本的 F_2 代群体通过“一粒传”建立了重组自交系(RI)群体，发展高密度饱和遗传图的工作正在进行之中．

致谢 本工作为中国科学院重大资助项目．

参 考 文 献

1 Palmer R G, Hedges B R. Linkage map of soybean (*Glycine max* L. Merr.). In: Brien S J O ed. Genetic Maps Locus: Maps of Complex Genomes. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 6 139～6 148

2 Hymowitz T, Singh R J. Taxonomy and speciation. In: Wilcox J R ed. Soybeans: Improvment, Production and Uses, 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy Monograph, 1987. 23～48

3 Keim P, Shoemaker R C, Palmer R G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. Theor Appl Genet, 1989, 77:786～792

4 Tong Zhu, Schupp J M, Oliphant A, et al. Hypomethylated sequences: characterization of the duplicate soybean genome. Mol Gen Genet, 1994, 244:638～645

5 Keim P., Diers B W, Olson T C, et al. RFLP mapping in soybean: Association between marker loci and variation in quantitative traits. Genetics, 1990, 126:735～742

6 Shoemaker R C, Specht J E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. Crop Science, 1995, 35:436～446

7 Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. Mapmaker: an interactive computer pakage for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics, 1987, 1:174～181

(1997-01-10 收稿，1997-04-08 收修改稿)