

# 对大豆食心虫抗性不同的大豆品种的 RFLP 的初步分析(简报)

庄炳昌\* 顾京\*\* 惠东威\*\*  
陈受宜\*\* 徐豹\* 王玉民\* 岳德荣\*

限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism -RFLP)是一种新类型的分子遗传标记。由于它是在 DNA 水平上进行的研究,因此 RFLP 的分析不受环境条件和发育时期的影响。用于 RFLP 分析的克隆探针,可用 cDNA 克隆,也可用基因组克隆,不受数目的限制。RFLP 还具有遗传性稳定等特点。因此,RFLP 的研究已引起广泛的重视,是近年来研究的十分活跃的领域之一。现在已被广泛应用于基因定位、基因诊断、遗传图谱的构建和遗传育种等领域。在国内有关的研究也有报道。但是,有关大豆 RFLP 的研究还未见报道。

大豆食心虫(*Leguminivora glycinivorella* (Mats.))是大豆生产区的主要害虫,虫食率一般在 10%~20%,严重时达 40%以上。有关大豆食心虫方面的研究,过去虽然有些报道,但多数研究集中于抗源的筛选与鉴定等方面,有关机制方面的研究甚少。为了给大豆抗食心虫基因的定位与分离创造条件,我们对抗性不同的两个大豆基因型进行了 RFLP 的初步分析,简要报道如下。

## 材料与方 法

供试材料为抗虫品种毛茛豆和感虫品种吉林 27。选择子粒饱满的种子,在恒温培养箱中黑暗条件下发芽,发芽采用发芽巾,温度为 30℃,5 天后取芽贮存于-20℃冰箱中备用。

**DNA 的提取:**取冰冻豆芽,加入液氮研磨成细粉,然后迅速加入预热至 65℃的 DNA 提取液中,65℃保温 30 分钟。6000rpm 离心 10 分钟,取上清,加入氯仿:异戊醇及复萃取 3 次,取水相加入二倍体积预冷的乙醇沉淀 DNA,沉淀的 DNA 用 RNase 酶解 15 分钟,再用乙醇沉淀 DNA,70%乙醇清洗,干燥,最终用 TE 溶解。

**DNA 的酶切:**采用了 4 种限制性内切酶,Eco RI、Eco RV、Hind III 和 Taq I,采用厂商推荐的缓冲液,在相应的温度下酶切过夜。

**琼脂糖凝胶电泳:**凝胶浓度为 0.7%,缓冲液为 TBE,指示剂为溴酚蓝,分子量标记为经 Eco RI 和 Hind III 酶切的入 DNA,上样量 10μgDNA/孔。

**Southern 吸印:**电泳完毕,凝胶板用 0.25mol/L HCl 处理 10 分钟(溴酚蓝变黄后 2~3 分钟),然后用蒸馏水清洗。采用碱法(0.4N NaOH)将 DNA 转移至尼龙膜上。吸印完毕,将

\* 吉林省农业科学院

\*\* 中国科学院遗传研究所

尼龙膜用 2 X SSC 溶液漂洗 10 分钟,用吸水纸吸去膜表面水分,贮于 4℃ 以备杂交用。

**分子杂交:**本试验中采用的 3 个探针(A264,A494,A681)均由衣阿华大学的 Randy C. Shoemaker 惠赠。预杂交和杂交温度均为 65℃,预杂交 3 小时,杂交 16 小时。杂交后滤膜分别用 2 X SSC、1 X SSC 和 0.5 X SSC 各清洗 20 分钟,然后进行放射自显影。

## 结果与分析

本研究共采用 4 种限制性内切酶,3 个探针,共 12 个探针/内切酶组合,杂交后 DNA 带清晰,易于区别,表明所采用的探针为单拷贝顺序(图)。

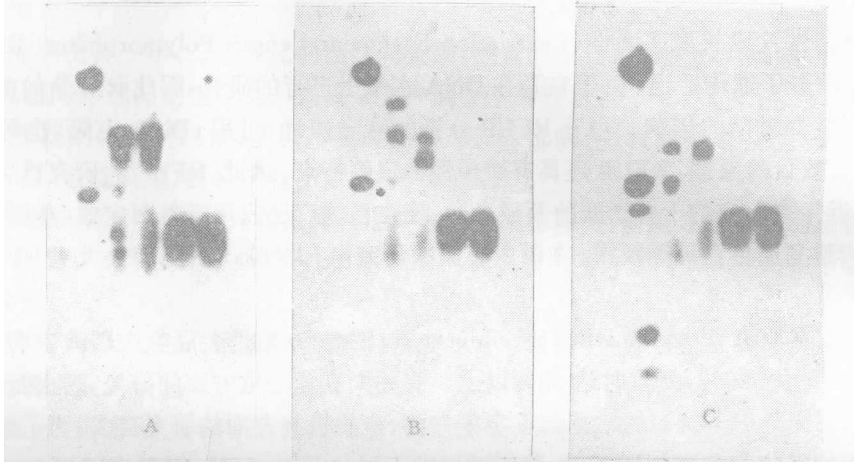


图 吉林 27 和毛荚豆的部分 RFLP 图谱

A 为探针 A264,B 为探针 K494,C 为探针 A681;

每对电泳带中前边为吉林 27,后边为毛荚豆;

所用的内切酶为 EcoRI 和 Hind III。

表 吉林 27 和毛荚豆间的 RFLP

RFLP 探针	限制性内切酶			
	Eco RI	Hind III	Eco RV	Taq I
A264	+			
K494	+		+	+
A681	+	+	+	

+表示具有多态性的探针/内切酶组合。

从左表结果看到,在本实验的 12 个探针/内切酶组合中,有 7 个具有多态性,说明这一对抗、感虫基因型间的多态性是极为丰富的。其中 EcoRI 在与探针的 3 个组合中均表现出了多态性,Hind III 在 2 个组合中具有多态性,可能是由于这类 RFLP 的形成涉及的变异范围较大,如 DNA 片段的插入、缺失、

易位、倒位等,这样的多态性可被多种酶检测到。而 BamHI 和 Taq I 只在一种组合中表现出多态性,可能是由于个别碱基的突变所致,因此在只有当采用的限制性内切酶的认识位点与突变位点相一致时才能检测到多态性,而其它的内切酶则检测不到。

上述结果可以看出,本研究中所采用的一对抗、感大豆食心虫的基因型之间确实具有极为丰富的多态性。但这些多态性与抗性水平是否有直接关系,由于采用的试材较少,还不足以说明。但本研究为大豆抗食心虫机制研究提供了研究线索。