

大豆抗感 SCN 基因的一个 RAPD 标记

王永军¹ 盖钧镒^{1*} 邢 邯² 张志永³ 陈受宜³

(1. 南京农业大学大豆研究所, 农业部国家大豆改良中心, 南京, 210095;

2. 山东省农业科学院, 济南, 250100; 3. 中国科学院遗传研究所, 北京, 100101)

摘要 对组合 RN9(抗)×7705(感)的 P_1 、 P_2 、 F_1 、 F_2 、 BC_1F_1 和 BC_1F_2 分离群体进行抗病性鉴定, 遗传分析的结果表明, 大豆对 SCN1 号小种的抗性由 4 对相互独立的主基因、包括一对显性基因和三对重叠的隐性基因决定。用 BSA 法筛选在五个 BC_1F_2 分离家系内具有多态性的 RAPD 标记, 发现 RAPD 标记 OPA019₁₂₀₀ 在亲本间及 BC_1F_2 分离群体内具有多态性, 只能在感亲、 BC_1F_2 家系 11 和 43 的感病单株中扩增出来, 表明和这两个家系独有的感病基因有关。

关键词 大豆孢囊线虫 (*Heterodera glycine*; Ichinohe); 抗性遗传; RAPD 标记

大豆孢囊线虫 (*Heterodera glycine*, Ichinohe, SCN) 是我国大豆的主要全国性病害之一, 研究大豆抗孢囊线虫的遗传规律对大豆孢囊线虫抗性育种具有重要的意义。近年来, 利用分子标记进行大豆抗孢囊线虫的遗传研究已经取得了很大的进展。Michelmore 等 (1991) 提出了一种快速寻找与目的基因连锁的分子标记的 BSA 法 (Bulked Segregates Analysis)^[1]。Choi 和 Skorupska (1995) 用多个抗或感大豆孢囊线虫的品种做抗感池, 找到一些在抗感品种有特异性的 RAPD 标记^[2]。张志永等 (1998) 用 F_2 分离群体制作近等基因池, 获得了与大豆花叶病毒抗性基因 R_{sa} 连锁的一个 RAPD 标记 (OPAS-06₁₈₀₀) 和一个 RFLP 标记 (pK644H)^[3]。本实验以经过抗性遗传分析的 BC_1F_2 分离群体为材料, 采用 BSA 法对大豆抗感孢囊线虫 (SCN) 1 号生理小种的 RAPD 标记作了初步研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本实验使用 P_1 、 P_2 、 F_1 、 F_2 、 BC_1F_1 、 BC_1F_2 六个世代进行抗性遗传分析, 亲本为 RN9 (抗) 和 7605 (感), 其中 RN9 (抗) 为轮回亲本。抗病性鉴定采用田间病圃和盆栽抗性鉴定相结合的方法。抗感分界点根据 BC_1F_2 世代分离分析的结果而定^[4]。整个 BC_1F_2 分离群体共 104 个家系, 选用其中五个具有不同分离比的家系做 RAPD 标记研究。

1.2 RAPD 分析

* 联系作者 Author for correspondence
收稿日期 2000-02-14
Received on Feb. 14, 2000

用 CTAB 法从单株叶片中分别提取 DNA。每单株取等量 DNA 制作近等基因池,所有抗株制作抗池,剩余的感株按家系不同分别制作感池,筛选在抗感池之间具有多态性的引物,并用于进一步扩增亲本及 BC₁F₂ 分离群体单株的 DNA。

RAPD 反应在 25μl 体积中进行,其中模板 DNA 2μl(5ng/μl),随机引物 2μl(50μmol/L),2.5mM dNTPs 2μl,10xbuffer 2.5μl,Taq DNA 聚合酶 1u,超纯水 16.5μl。热循环条件为:94℃变性 1 分钟,35℃退火 2 分钟,72℃延伸 2 分钟,5 个循环,;接着 94℃0.5 分钟,35℃1 分钟,72℃1.5 分钟,35 个循环,然后 72℃延伸 10 分钟。扩增产物在 1.4%琼脂糖凝胶、1×TAE 缓冲中电泳,经 EB 染色,在紫外灯下观察结果并照相。

2 结果与分析

2.1 大豆对 SCN1 号小种的抗性遗传分析

对组合 RN9(抗)×7605(感)的亲本、F₁、F₂、BC₁F₁ 和 BC₁F₂ 分离群体进行了抗病性鉴定,遗传分析的结果(表 1)表明:大豆对 SCN1 号小种的抗性是由四对相互独立的主基因、包括一对显性基因和三对重叠的隐性基因决定的。对进行 RAPD 分析的五个 BC₁F₂ 家系的抗感分离比进行卡方测验的结果见表 2,由表 2 中可以看出,BC₁F₂ 家系 10 的抗感分离比符合 1:3 的比例,抗性受一对隐性基因控制;BC₁F₂ 家系 1 和 98 的抗感分离比符合 1:15 的比例,抗性受两对隐性基因控制;BC₁F₂ 家系 11 抗感分离比符合 1:63 的比例,抗性受三对隐性基因控制。BC₁F₂ 家系 43 的抗感分离比符合 3:63 的比例,抗性受一对显性基因和两对隐性基因控制。

表 1 SCN1 号小种抗性的分离分析

Table 1 The segregation analysis of resistance to SCN race 1

世代 Generation	单株或家系数 No. of plants or families	实际抗感分离比 Observed segregation R : S	理论分离比 Theoretical segregation	X ²	P
P ₁	40	40 : 0	1 : 0		
P ₂	40	0 : 40	0 : 1		
F ₁	70	0 : 70	0 : 1		
F ₂	870	10 : 860	3 : 253	0.015	0.90—1
BC ₁ F ₁	186	22 : 164	1 : 7	0.016	0.90—1
BC ₁ F ₂	104	6 : 8 : 17 : 21 : 19 : 21 : 8 : 4*	1 : 1 : 3 : 3 : 3 : 3 : 1 : 1	2.26	0.90—0.95

* 各相应家系内抗感植株的理论分离比分别为:1 : 0,3 : 1,1 : 3,3 : 13,1 : 15,3 : 61,1 : 63,3 : 253。

The theoretical segregation ratios within the families are:1 : 0,3 : 1,1 : 3,3 : 13,1 : 15,3 : 61,1 : 63,3 : 253。

2.2 BC₁F₂ 分离群体抗感 SCN1 号小种的 RAPD 标记分析

在抗池和 BC₁F₂ 家系 11 的感池之间共筛选引物 320 个,其中 OPAO—19 的扩增产物在两池之间有差异,且重复性好,感池比抗池多一条带,约 1.2kb,记为 OPAO19₁₂₀₀。OPAO—19 在六个池及抗亲和感亲中的扩增结果如图 1。由图中可以看出,在感亲和 BC₁F₂ 家系 11、43 的感池中都能扩增出 OPAO19₁₂₀₀,而在抗亲、抗池以及家系 1、10、98 的

感池的扩增产物中却没有, BC_1F_2 家系 11 和 43 在抗感方面的遗传背景比其它家系复杂, 具有一对或两对其它家系没有的感病基因。

表 2 BC_1F_2 分离群体的抗感分离比及适合性测验

Table 2 Segregation ratio and χ^2 test of each BC_1F_2 derived BC_1F_2 family

BC_1F_2 家系 Code of BC_1F_2 family	抗株 No. of resistant plants	感株 No. of susceptible plants	理论分离比 Theoretical segregation	χ^2	P
1	6	67	1:15	0.48	0.25—0.50
10	21	47	1:3	1.25	0.25—0.50
11	2	86	1:63	0.28	0.50—0.75
43	2	64	3:61	0.41	0.50—0.75
98	5	58	1:15	0.26	0.50—0.75

进行 RAPD 分析的 BC_1F_2 代群体共有 5 个家系 64 株, 其中 52 株为感株, 12 株为抗株。以引物 OPAO19 扩增 BC_1F_2 家系的单株, 结果如图(2)、(3)、(4)、(5)、(6)。从图中可

表 3 BC_1F_2 家系中的抗感单株与 OPAO19₁₂₀₀ 有的无及推测的 BC_1F_1 基因型

Table 3 The existence of OPAO19₁₂₀₀ in plants of BC_1F_2 families and the respective conjectured BC_1F_1 genotypes

BC_1F_2 家系 Code of BC_1F_2 family	理论分离比 Theoretical segregation	RAPD 分析单株数 No. of plants sampled	* 有无 OPAO19 ₁₂₀₀ OPA019 ₁₂₀₀ existence	推测 BC_1F_1 基因型 Conjectured BC_1F_1 genotypes
1	1:15	13	3R(-)+10S(-)	AABbBbb ₃ b ₃
10	1:3	12	5R(-)+7S(-)	AABbbb b ₃ b ₃
11	1:63	13	1R(-)+12S(+)	AABbBbB ₃ b ₃
43	3:61	13	1R(-)1S(-)+11S(+)	AaBbbbB ₃ b ₃
98	1:15	13	2R(-)+11S(-)	AABbBb b ₃ b ₃

* R 和 S 分别代表抗与感, 前面的数字为单株数, 括弧中的 + 和 - 表示有无 OPAO19₁₂₀₀。

R and S represent resistant and susceptible, respectively; the figure before them are the numbers of plants; + and - in the parenthesis represent the existence and absence of OPAO19₁₂₀₀, respectively.

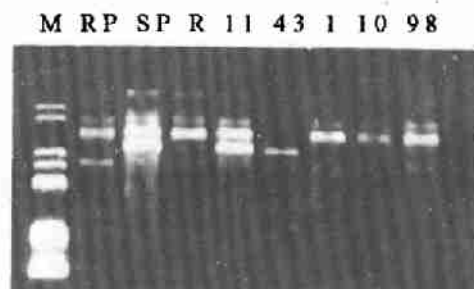


图 1 OPAO-19 在抗亲、感亲和六个池中的扩增结果

Fig. 1 PCR products of resistant and susceptible parents, as well as six bulks by using primer OPAO-19

以看出, BC_1F_2 家系 1 的所有单株的扩增产物都没有 OPAO19₁₂₀₀; 家系 10 的所有单株的扩增产物都没有 OPAO19₁₂₀₀; 家系 11 的所有感病单株的扩增产物都有 OPAO19₁₂₀₀, 1 个抗病单株则没有; 家系 43 的 11 个感病单株的扩增产物的 OPAO19₁₂₀₀, 1 个感病单株和 1 个抗病单株则没有; 家系 98 的所有的单株的扩增产物都没有 OPAO19₁₂₀₀。所以 OPAO19₁₂₀₀ 只在抗感分离比为 1:63 和 3:61 的两个家系的感病植株的扩增产物中才有, 和这两个家系中特有的显性感病基因有关。由此可推论出各家系相应的 BC_1F_1 基因型(见表 3)。从表 3 中可以看出, RAPD 分析结果和理论推理相互一致, OPAO19₁₂₀₀ 与家系 11 和 43 中特有的感病基因有关, 本文假定为 B_3 。

M S S S S S S S S S S R R R



图 2 OPAO-19 在 BC_1F_2 家系 1 中的扩增结果

Fig. 2 PCR products of BC_1F_2 family1 by using primer OPAO-19

M S S S S S S S R R R R R



图 3 OPAO-19 在 BC_1F_2 家系 10 中的扩增结果

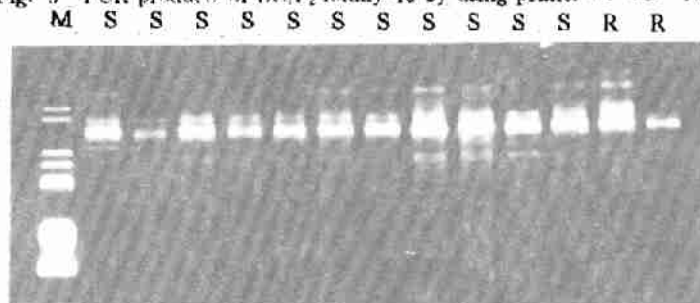
Fig. 3 PCR products of BC_1F_2 family10 by using primer OPAO-19

M S S S S S S S S S S S S R



图 4 OPAO-19 在 BC_1F_2 家系 11 中的扩增结果

Fig. 4 PCR products of BC_1F_2 family11 by using primer OPAO-19

图 5 OPAO-19 在 BC_1F_2 家系 43 中的扩增结果Fig. 5 PCR products of BC_1F_2 family 43 by using primer OPAO-19图 6 OPAO-19 在 BC_1F_2 家系 98 中的扩增结果Fig. 6 PCR products of BC_1F_2 family 98 by using primer OPAO-19

3 讨论

大豆抗 SCN 的遗传机制比较复杂,生理小种的多样性也使得抗性遗传及育种研究非常困难。目前这方面的研究主要集中在对 3 号小种的抗性上,并且得出了比较一致的结论,抗性由一对显性和三对隐性基因控制。大豆对其它小种的抗性研究的报道比较少,而且不同的人得出的结论并不相同。至于 1 号小种,只有 Caldwell(1960)的报道,认为抗性由相互独立的三对隐性基因控制^[5]。本实验用 P_1 、 P_2 、 F_1 、 F_2 、 BC_1F_1 和 BC_1F_2 六个世代进行抗性遗传分析,实际使用的材料包括四组正反交组合,结果表明,大豆对 SCN1 号小种的抗性由 4 对相互独立的主基因、包括一对显性基因和三对重叠的隐性基因决定,各组合的遗传分析结果相互一致^[3]。抗性遗传规律和对 3 号小种的抗性相似,但并不一定是同一套基因。

大豆对 SCN 的抗性遗传受多对基因控制,抗感亲本的杂交后代如 F_2 、 F_3 等多种分离比。由于杂交结实率低,使得分离群体规模较小,某些家系的分离比容易被掩盖,在表型上,大豆对 SCN 的抗性表现为一定的数量性状特征。因此也有人认为大豆抗 SCN 是由多基因决定的,并且应用分子标记技术和 QTL 作图的方法对大豆抗 SCN 基因分子标记进行了研究。

本文认为,大豆对 SCN 的抗性由多对主基因控制,且有微效多基因的修饰。利用回交可以纯合部分主基因,并用 BSA 法对单个主基因的分子标记进行研究。通过对部分 BC_1F_2 分离家系进行 RAPD 分析,初步找到了和大豆的一个感 SCN1 号小种的主基因有

关的 RAPD 标记 OPAO19₁₂₀₀。由于使用的群体规模较小,因此结果还有待进一步验证。但是本研究为这类多对基因控制的性状的分子标记研究提供了一种方法,用回交方法纯合部分主基因,用 BSA 法对分离群体按家系、特别是分离比例为 1:3、1:15、3:61 和 1:63 的家系进行研究,根据结果推测基因型,从而找到和主基因有关的分子标记,每一个家系最好是随机样本,样本容量要比较大。

参 考 文 献

- 1 Michelmore R W, Paran I, and Kesseli R V. 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. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991, 88:9828—9832
- 2 Choi I S, and Skoruska H T. RAPD markers selection using bulk of cultivars for differential responses to soybean cyst nematode race 3, 5 and 14. Soybean Genet. Newsl. 1995, 22:245—250
- 3 张志永等,大豆花叶病毒抗性基因 Rsa 分子标记,科学通报,1998, 43:2197—2201
- 4 邢邯,大豆对胞囊线虫 1 号生理小种抗性的鉴定遗传与选育研究,博士论文,1998
- 5 Caldwell B E, Brim C A and Ross J P. Inheritance of resistance of soybeans to the cyst nematode, *Heterodera glycines*. Agron. J., 1960, 52:633—636

A RAPD MARKER RELATED TO RESISTANCE VS. SUSCEPTIBILITY TO SCN RACE 1 IN SOYBEANS

Wang Yongjun¹ Gai Junyi¹ Xing Han² Zhang Zhiyong³ Chen Shouyi³

(1. National Soybean Improvement Center, Soybean Research Institute, Nanjiang Agricultural University, Nanjiang, 210095; 2. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, 250100; 3. Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing, 100101)

Abstract According to the appraisal of resistance to SCN Race 1 in P₁、P₂、F₁、F₂、BC₁F₁ and BC₁F₂ segregative populations derived from RN—9(resistant)×7605(susceptible), the genetic pattern that the inheritance of resistance was controlled by four pairs of major genes, including one pair of dominant genes and three pairs of recessive genes, was verified RAPD markers were screened between susceptible bulks of five different BC₁F₂ families and the resistant bulk. Primer OPAO19 was found to produce a 1.2kb polymorphic band, named as OPAO19₁₂₀₀, and OPAO19₁₂₀₀ could be produced only in 7605, all susceptible plants of BC₁F₂ family 11(R:S=1:63) and 11 of 12 susceptible plants of BC₁F₂ family 43(R:S=3:61), while it could not be produced in RN—9, all resistant plants and other susceptible plants of BC₁F₂ populations. This indicated that the families of 11 and 43 might have one susceptible gene which did not exist in other families, and OPAO19₁₂₀₀ could be related to that gene.

Key words Soybean cyst nematode (*Heterodera glycine*, Ichinohe); Inheritance of resistance; RAPD markers