

中国大豆种质抗 SCN 基因 *rhg1* 位点 SSR 标记 等位变异特点分析*

王文辉^{1,2} 邱丽娟¹ 常汝镇¹ 马凤鸣² 谢 华¹ 林凡云^{1,3}

(1. 中国农科院作物品种资源研究所, 农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081;
2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 3. 西北农林科技大学, 杨凌 712100)

摘要 利用与抗大豆胞囊线虫病主效基因 *rhg1* 紧密连锁的 SSR 标记 Satt309 分析 634 份中国大豆种质, 以 21 份美国种质为对照, 目的是明确我国抗大豆胞囊线虫病种质资源的特点, 为大豆抗胞囊线虫病种质资源鉴定及抗线育种提供依据。149 份免疫或高抗种质和 495 份感病种质共鉴定出 6 个等位变异, 其中介于 134bp 和 149bp 之间的 Satt309-5 为新等位变异, 具有该等位变异的陕西三股条黑豆和山西忻县小黑豆分别免疫和中抗 1 号生理小种。对不同等位变异、不同抗性等级和抗不同生理小种种质的分析表明: 92.13% 的感病种质具有 125bp、131bp 或 149bp 等位变异, 抗病种质在各等位变异都有分布但以 128bp 和 134bp 为主, 在具有这两个等位变异的种质中, 有 72.46% 表现为抗病, 且 77.27% 的免疫种质、87.69% 的双抗种质和 100% 的三抗种质都具有这两个等位变异。16 份具有 128bp 等位变异的种质中有 14 份来自山西省, 另有 2 份是黑龙江省和河北省的育成品种, 推测山西省可能是 Satt309 位点 128bp 等位变异种质的起源地。本研究结果可为大豆抗胞囊线虫病育种的抗源选择提供一定的参考依据。

关键词 中国; 大豆 (*G. Max*); 胞囊线虫 (SCN); *rhg1* 基因; 等位变异分布特点; Satt309

中图分类号 S 565.103.53 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)04-0246-05

大豆胞囊线虫病是世界大豆生产上的毁灭性病害之一, 对该病最为经济有效的防治方法就是种植抗病品种^[1], 因此, 发掘大豆胞囊线虫病的新抗源成为研究的热点问题。在抗性种质筛选和抗线育种工作中, 抗性鉴定工作相对比较费时费力, 而且鉴定结果受环境条件影响较大^[2], 急需一种更为准确、高效的鉴定方法。近年来, 分子生物学的发展深化了人们对大豆胞囊线虫病抗性的认识与理解, 同时也使分子标记辅助抗性鉴定成为可能。目前, 除 D1b+w 和 O 以外的 18 个连锁群上都已鉴定出与抗性相关的分子标记^[3], 包括 RAPD、RFLP、SCAR、SSR、ISSR、AFLP 和 SNP 等类型。在众多的分子标记中, SSR 标记以其多态性丰富、检测技术简便快捷、统计分析方法日趋完善、共显性等特点^[4] 而得到广泛应用。一些与抗大豆胞囊线虫病基因紧密连锁的 SSR 标记

在某些杂交组合后代和部分品种的分子标记辅助抗性鉴定中取得了很好的效果^[5,6]。

Cregan 等 (1999)^[6] 利用与抗大豆胞囊线虫病主效基因 *rhg1* 紧密连锁的 SSR 标记 Satt309 (0.4cM) 分析不同的大豆基因型, 共鉴定出 5 个等位变异, 其中 128bp 等位变异为韩国品种所特有, 其余 4 个等位变异为美国大豆品种所特有。研究结果表明, 具有 128bp 或 134bp 等位变异的种质表现为抗病, 具有 131bp 等位变异或 149bp 等位变异的种质表现为感病, 而 125bp 等位变异在抗感病种质中都有分布。他们还利用 Satt309 分析了三个杂交组合的后代群体材料, 所得结果与抗性符合程度很好。然而, 上述研究只用了 56 份品种材料, 所得规律尚待进一步验证。

本研究利用 Satt309 对 149 份免疫或高抗种质

* 收稿日期: 2003-02-23

基金项目: 国家“973”项目 (G1998010203) 资助。

作者简介: 王文辉 (1978-), 女, 硕士, 主要从事大豆抗胞囊线虫病种质研究。

联系作者: 邱丽娟 qiu_lujuan@263.net

和来自我国6个主要生态区的495份感病种质以及21份美国种质(共665份)进行了分析,以明确我国抗大豆胞囊线虫病种质资源的特点,并检测 Satt309 辅助抗线鉴定的效率,为大豆抗胞囊线虫病种质资源鉴定及抗线育种提供依据。

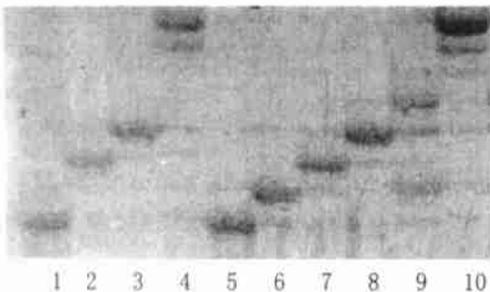
1 材料与方 法

1.1 实验材料

根据中国栽培大豆种质资源数据库中提供的抗性等级数据,本研究共选取材料665份,其中免疫或高抗种质149份,感病种质495份,美国种质21份(其中包括抗病品系6份,在美国大豆生产中广泛使用的抗源种质10份及感病对照5份)。

1.2 实验方法

PCR 反应体系为 20 μ L, 其中含有 100ngDNA, 2.



0 μ L 10 \times 反应缓冲液, 1.5 μ L 2mM dNTP, 1.5 μ L 25mM Mg²⁺, 1.5 μ L 12mM 引物 Satt309, ddH₂O。PCR 反应在 PCR 扩增仪 MJ PTC-200 Peltier Thermal Cycler 上进行, 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5min 后进行 38 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 46 $^{\circ}$ C 退火 40s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 经 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min 后于 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 银染显色观察。

2 结果与分析

2.1 抗感病种质等位变异分布情况

利用 Satt309 分析中国大豆种质资源中的 495 份感病种质和 149 份免疫或高抗种质, 共鉴定出 6 个等位变异, 其中介于 134bp 和 149bp 之间的 Satt309-5 为新等位变异(图 1)。

图 1 Satt309 等位变异分布

Fig. 1 Distribution of Satt309 alleles

1. Lee 2. Mandarin 3. Peking 4. Williams
5. ZDD08639 红脐青皮豆 6. ZDD02315 灰皮支黑豆
7. ZDD16590 杂豆子-2
8. ZDD08510 大黑豆 9. ZDD10254 三股条黑豆
10. ZDD18518 金杖子黑豆

在 495 份感病种质中, 具有等位变异 1(125bp) 和 3(131bp) 的种质最多, 分别为 46.06% 和 41.01%; 5.25% 的种质具有等位变异 6(149bp), 其余 7.88% 的种质具有等位变异 2(128bp)、4(134bp) 或 5(约 138bp)。149 份免疫或高抗种质鉴定出 6 个等位变

异, 具有 134bp 等位变异的抗病种质占 53.69%, 具有 131bp、128bp 和 125bp 等位变异的种质分别为 17.45%、13.42% 和 12.75%, 具有等位变异 5 和 6 的种质分别有 1 份和 3 份(表 1)。

从(表 1)中可以看出, 92.13% 的感病种质具有

表 1 抗感病种质 Satt309 等位变异分布及抗性等级

Table 1 Distribution of Satt309 alleles in susceptible and resistant accessions

等位变异 Alleles	免疫或高抗种质 Accessions of IM or HR			感病种质 Susceptible accessions			
	总份数 Total No.	抗性等级 Resistant rank		总份数 Total No.	抗性等级 Resistant rank		
		0	1		3	5	7
Satt309-1 (125bp)	19	5	14	228	116	89	23
Satt309-2 (128bp)	20	16	4	2	2	0	0
Satt309-3 (131bp)	26	8	18	203	99	90	14
Satt309-4 (134bp)	80	29	51	36	23	10	3
Satt309-5 (约 138bp)	1	1	0	1	1	0	0
Satt309-6 (149bp)	3	1	2	26	15	10	1

125bp、131bp 或 149bp 等位变异, 抗病种质在各等位变异都有分布, 但以 128bp 和 134bp 为主, 具有这两个等位变异的种质中有 72.46% 表现为抗病。

21 份美国种质共鉴定出 1、3、4、6 四个等位变异, 与 Cregan 的结果稍有差异, 相同点是具有 125bp、

131bp 或 149bp 等位变异的种质表现为感病, 不同点是抗病种质在 4 个等位变异都有分布。

2.2 抗病种质的等位变异分布规律及特点

中国栽培大豆种质资源数据库中共有来自 17 个省、自治区的 425 份免疫或高抗种质, 本研究

选取的 149 份免疫或高抗种质来自除甘肃外的其余 16 个省份。从(表 1)中可以看出,具有 125bp 等位变异的抗病种质多为中国北方的中晚熟品种;16 份具有 128bp 等位变异种质的分布有极显著的地域性,其中 14 份来自山西省,其余 2 份则是黑龙江省和河北省的育成品种;具有 131bp 等位变异的抗病种质主要分布在中国南方;具有 134bp 等位变异的抗病

种质最多,以中国北方尤其是河北、山西、山东三省分布较多,主要抗 1 号和 3 号生理小种;具有新等位变异 Satt309—5 的抗病种质是对 1 号生理小种免疫的陕西三股条黑豆;具有 149bp 等位变异的抗病种质有三份,河北金杖子黑豆对 3 号生理小种免疫,山西黑豆和山西汾抗线 1 号分别对 2 号和 5 号生理小种高抗。

表 2 抗性种质各等位变异分布特点

Table 2 Characteristic of alleles in resistant accessions

材料数 No.	品种类型 Type				来源省份 Original Province	小种抗性 Resistant No. to each races				
	地方种		育成种			1	2	3	4	5
	0	1	Landrace	Cultivar						
1(125bp)	5	14	14	6	晋、皖、冀、黑、辽、吉、鄂、鲁、蒙	10	6 [#]	5 [#]	2 [#]	1 [*]
2(128bp)	16	4	5	15	晋(18)、黑(1,育成)、鲁(1,育成)	6 [#]	1 [*]	15 [*]	7 [#]	8 [*]
3(131bp)	8	18	19	6	晋、皖、苏、鄂、吉、贵、湘、赣、冀、黑	8	12 [#]	5	1 [#]	3
4(134bp)	29	51	73	7	冀、晋、鲁、陕、豫、辽、蒙、黑、京、皖	49 [#]	9 [#]	64 [#]	2 [#]	6 [#]
5(约 138bp)	1	0	1	0	陕	1 [*]	0	0	0	0
6(149bp)	1	2	2	1	晋(2)、冀(1)	0	1 [#]	1 [*]	0	1 [#]

注:标有“*”表示抗性等级以免疫为主,标有“#”表示抗性等级以高抗为主,不标表示二者比例相似。

2.3 抗不同生理小种种质分布规律及特点

中国有丰富的抗大豆胞囊线虫病种质资源,对 1—5 号生理小种都有免疫或高抗种质。抗 3 号和 1 号生理小种的种质较多,分别占抗病种质总体的 71.06%和 32.94%;地方品种中没有对 2 号和 5 号生

理小种免疫的种质,但育成品种中分别有 2 份和 12 份;目前我国还没有对毒性最强的 4 号生理小种免疫的种质,但有 15 份高抗种质。本研究选取的材料包括免疫和高抗种质资源总体的 92.96%和 36.41%。

表 3 抗不同生理小种种质分布特点

Table 3 Distribution of accessions resistant to each races

生理小种 Races	材料数 No.	品种类型 Type		等位变异 Alleles						主要来源省份 Original Province	
		地方 Landrace	育成 Cultivar	125bp	128bp	131bp	134bp	约 138bp	149bp		
1	免疫	14	12	2	4	2	4	3	1	0	晋(9)、冀、贵、陕 4 省
	高抗	60	54	6	6	4	4	46	0	0	冀(24)、晋、鲁陕等 11 省
2	免疫	2	0	2	0	1	0	1	0	0	晋、黑 2 省
	高抗	27	24	3	6	0	12	8	0	1	冀(9)、皖(6)苏、鄂等 9 省
3	免疫	38	28	10	0	12	2	23	0	1	晋(24)、冀(7)、鲁、陕、皖 5 省
	高抗	52	48	4	5	3	3	41	0	0	冀(25)、晋(10)、鲁(5)、陕等 9 省
4	高抗	12	5	7	2	7	1	2	0	0	晋(9)、皖、冀 3 省
5	免疫	12	0	12	1	7	2	2	0	0	晋(6)、鲁、吉 3 省
	高抗	7	0	7	0	1	1	4	0	1	晋、鲁、黑 3 省
T	免疫	66	40	26	5	22	8	29	1	1	贵、冀、晋、鲁、陕、黑、皖 7 省
	高抗	151	282	27	19	15	21	101	0	2	冀、晋、鲁、陕、皖、苏、蒙等 15 省

从表 3 可以看出,对 1 号生理小种免疫或高抗的种质主要是地方品种,高抗种质以 134bp 等位变异为主,免疫种质在各等位变异都有分布;高抗 2 号生理小种的种质以地方品种为主,主要具有 131bp、134bp 或 125bp 等位变异,仅有的两份免疫种质都为育成品种,分别为 125bp 和 131bp;高抗 3 号生理小种的种质主要为地方品种,在等位变异 1~4 都有分布,免疫种质以 128bp 和 134bp 等位变异为主;高抗 4 号生理小种的地方品种来自山西、安徽、河北三省,

而育成品种全部来自山西省,且以 128bp 等位变异为主;我国地方品种中没有对 5 号生理小种免疫或高抗的种质,但吉林、山西、山东等省育成了免疫或高抗品种 19 份,免疫种质多具有 128bp 等位变异,而高抗种质多具有 134bp 等位变异。

从抗不同生理小种种质的来源看,抗 4 号和 5 号生理小种种质的等位变异分布与生理小种分布的符合性很好,而抗 1 号、2 号和 3 号生理小种种质的分布较为广泛。

2.4 不同抗性等级种质等位变异分布规律及特点

抗性等级与等位变异分布之间也表现一定的相关性, 从表 1 可以发现, 高感(7)和中感(5)种质多具有 125bp 或 131bp 等位变异, 中感种质在 149bp 也有分布; 中抗种质(3)在 125bp、131bp、134bp 和 149bp 四个等位变异都有分布, 但以前二者较多; 免疫(0)和高抗(1)种质在各等位变异都有分布, 高抗种质以

125bp、131bp 和 134bp 等位变异为主, 而免疫种质以 128bp 和 134bp 等位变异为主。77.27% 的免疫种质、87.69% 的双抗种质和 100% 的三抗种质都具有 128bp 或 134bp 等位变异(表 4)。可见, 抗病种质虽然在各个等位变异都有分布, 但免疫、多抗或抗性较好的种质往往具有 128bp 或 134bp 等位变异, 这与 Cregan 等人的研究结果比较一致。

表 4 不同抗性等级种质等位变异分布特点

Table 4 Distribution of accessions with different resistance rank

种质 Accessions	种质总数 No. of accessions	128bp 等位变异种质数 No. of 128bp alleles	134bp 等位变异种质数 No. of 134bp alleles	其它等位变异种质数 No. of other alleles
双抗种质 Two resistance	65	10	47	125bp(5)、131bp(3)
三抗种质 Three resistance	4	3	1	0

2.5 Satt309 辅助鉴定效率分析

Cregan (1999) 用 Satt309 分析大豆种质对胞囊线虫病的抗性表明, 感病种质具有等位变异 1、3 和 6, 抗病种质具有等位变异 1、2 和 4。以上述研究结果为依据, 128bp、149bp 和 131bp 等位变异的鉴定效率

较高, 可以达到 88% 以上, 而 134bp 等位变异和等位变异 Satt309-5 的鉴定效率稍差(表 5)。从总体上分析, Satt309 对感病种质的鉴定效率可达 92.32%, 对抗病种质的鉴定效率为 80.54%。

用 Satt309 分析 21 份美国大豆种质, 感病种质

表 5 Satt309 辅助鉴定效率分析

Table 5 Efficiency of Satt309 in SCN phenotype identify

等位变异 Alleles	R			S			材料总数 Total No.	鉴定效率(%) Efficiency
	T	0	1	T	3	5		
Satt309-1(125bp)	19	5	14	228	116	89	247	—
Satt309-2(128bp)	20	16	4	2	2	0	22	90.91
Satt309-3(131bp)	26	8	18	203	99	90	229	88.65
Satt309-4(134bp)	80	29	51	36	23	10	116	68.96
Satt309-5(约 138bp)	1	1	0	1	1	0	2	50
Satt309-6(149bp)	3	1	2	26	15	10	29	89.66

的鉴定效率为 100%, 抗病种质的鉴定效率为 68.75%。

中美两国大豆种质的鉴定效率都以感病种质为高, 这可能是由于感病种质的抗性鉴定受环境条件影响较小, 鉴定准确率相对较高, 而抗病种质由于环境等条件的影响, 准确率相对较低。

3 讨论

本研究鉴定出两份种质陕西三股条黑豆和山西忻县小黑豆具有新的等位变异, 这两份种质分别免疫和中抗 1 号生理小种, 推测该等位变异可能与 1 号生理小种的抗性连锁, 也可能这两份种质含有新的抗性基因。新的等位变异的发现对 SCN 的抗性基因累加, 扩大抗谱和稳定抗性具有重要作用。

我国抗 SCN 种质资源的分布与生理小种的分布, 尤其是抗 4 号和 5 号生理小种种质资源的分布比较吻合, 这说明我国丰富的抗 SCN 种质资源是在不同生理小种的长期选择下经过进化形成的。在抗病种质资源中, 山西省有对 1~5 号生理小种免疫或高抗的种质资源, 并且分布于 Satt309 位点的各个等位变异。此外, 16 份具有 128bp 等位变异的种质资源中有 14 份来自山西省, 另有 2 份则是黑龙江省和河北省的育成品种。可见, 具有丰富抗源的山西省, 既是我国抗 SCN 种质资源的重要来源地, 也可能是 Satt309 位点 128bp 等位变异种质的起源地。

中国大豆种质资源在 Satt309 位点的等位变异分析结果表明, 抗性与等位变异之间有一定的连锁关系。92.13% 的感病种质具有 125bp、131bp 或 149bp 等位变异; 抗病种质在各等位变异都有分布,

但以 128bp 和 134bp 为主,具有这两个等位变异种质的种质中有 72.46% 表现为抗病,且 77.27% 的免疫种质、87.69% 的双抗种质和 100% 的三抗种质都具有这两个等位变异。抗病种质在各个等位变异都有分布,说明除抗 SCN 的主效基因 *rhg1* 外,可能还存在其它抗性基因。另外,本研究结果与 Cregan (1999) 等的报道有一定差异,原因可能有四点:首先,虽然 Satt309 是与 *rhg1* 距离最近的 SSR 标记,但距抗性基因还有一定距离(0.4 cM)。其次,美国抗线种质的遗传基础比较狭窄,主要来自 Peking 和 PI88788^[7],相比之下,大豆起源于中国,在长期进化和线虫的选择作用下,形成了丰富多样的抗性类型,且抗病种质多为地方品种,所以中国品种的变异类型较美国品种丰富。第三,美国 Mudge 和 Cregan 等人研究该标记时所选用的品种数较少,仅为 21 份和 56 份^[5,6],可能会使所得规律有一定偏差。第四,本研究的抗性等级数据来源于中国栽培大豆种质资源数据库,仅是初步筛选和鉴定的结果,其数据可能会受环境或其它因素影响而略有偏差,进而可能造成分子标记结果与田间抗性鉴定结果不太一致。此外,大豆对胞囊线虫病的抗性遗传复杂,往往都是由多对基因控制,属于数量性状遗传^[8,9],本研究结果可为大豆抗胞囊线虫病育种的抗源选择提供一定的参考依

据。

参 考 文 献

- 1 崔文馥. 我国大豆胞囊线虫病抗源筛选及抗病育种研究进展[J]. 大豆科学. 1998, 17(1): 79-82.
- 2 齐军山, 李长松, 李林. 大豆胞囊线虫生理小种及其鉴定技术[J]. 中国油料作物学报. 2000, 22(4): 71-74.
- 3 邹继军, 李庆凯. 大豆抗病基因定位的分子标记研究进展[J]. 中国油料作物学报. 2000, 22(1): 73-75.
- 4 黎裕, 黄继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. 生物技术通报. 1999, 15(4): 19-22.
- 5 Mudge, J. P. B. Cregan, J. P. Kenworthy et al. Two Microsatellite Markers That Flank the Major Soybean Cyst Nematode Resistance Locus[J]. Crop Sci. 1997, 37: 1611-1615.
- 6 Cregan, P. B. J. Mudge, E. W. Fidus 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.
- 7 Brian Diers, Prakash Arelli. Genetics of Resistance to Cyst Nematode Resistance[A]. Proceedings of China & International Soybean Conference & Exhibition. 2002: 36-37.
- 8 Concibido, V. C. D. A. Lange, R. Denny et al. Genome Mapping of Soybean Cyst Nematode Resistance Genes in 'Peking', PI90763, and PI88788 Using DNA Markers[J]. Crop Sci. 1997, 37: 258-264.
- 9 吴明才, 肖昌珍. 世界大豆线虫病研究概述[J]. 湖北农业科学. 1999 (1): 38-40.

CHARACTERISTICS OF ALLELES AT SATT 309 LOCUS ASSOCIATED WITH *rhg1* GENE RESISTANT TO SCN OF CHINESE SOYBEAN GERmplasm

Wang Wenhui^{1,2} Qiu Lijuan¹ Chang Ruzhen¹ Ma Fengming² Xie Hua¹ Lin Fanyun^{1,3}

(1. Key Lab of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 2. Northeast Agriculture University, Harbin, 150030; 3. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forest, Yangling, 712100)

Abstract 149 immune or high resistant accessions, 495 susceptible accessions and 21 accessions from U. S. A were analyzed using SSR marker Satt309 which was closely linked to *rhg1*, the most important gene resistant to SCN. A total of 6 alleles were identified and the allele 5th between 134bp and 149bp was new, the two accessions with allele 5th were immune and medium resistant to Race1 separately. The results indicated that 92.13% susceptible accessions had one of 125bp, 134bp and 149bp alleles; while resistant accessions distributed at each allele, but most immune or multi-resistant accessions were identified with 128bp or 134bp allele. 14 of 16 accessions with 128bp allele came from Shanxi Province, which suggested that Shanxi Province maybe was the original of accessions with 128bp allele. Results of the paper can be references for the identification of resistant germplasm and breeding resistant to SCN.

Key words China; Soybean (*G. Max*); SCN; *rhg1* gene; characteristic of alleles; Satt309