

大豆灰斑病 1 号生理小种抗性 基因的 SSR 标记分析^{*}

张文慧 陈庆山 杨庆凯 李文滨 王文辉 刘春燕
陈立君 刘海燕 单继勋

(东北农业大学, 哈尔滨市 150030)

摘要 针对中国大豆灰斑病 1 号生理小种, 以抗所有生理小种的品系东农 40566 为母本, 以感 1 号生理小种的品种东农 410 为父本配制杂交组合, 杂交得到 F₂ 代后连续自交 3 代得到 F₅ 代群体。该群体经人工接种灰斑病 1 号生理小种后, 利用 BSA 法对 500 个 SSR 标记进行筛选, 其中 3 个标记 Satt565、SOYGPATR 和 Satt396 在抗、感池间表现出稳定的多态性, 并且在 F₂ 代个体中表现出抗性与多态性协同分离的趋势。这 3 个标记与抗性基因的连锁顺序为 Satt565—SOYGPATR—Hrcs1—Satt396, 它们与抗性基因的连锁距离分别为 12.7cM、6.5cM、14.7cM。推测抗大豆灰斑病 1 号生理小种的基因可能位于 C1 连锁群上。

关键词 大豆 (*G. max*); 灰斑病 (*Cercospora sojina* Hara); 抗性基因; SSR 标记

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2004)03—0169—05

大豆灰斑病 (*Cercospora sojina* Hara) 是我国大豆生产中的主要病害之一, 主要为害黑龙江、吉林、辽宁、山东、河北等省, 其中以黑龙江省最为严重。一旦发生, 可以使产量降低 30%—50%, 严重者甚至造成绝产, 并使大豆品质变劣(刘忠堂, 1985)。大豆灰斑病病原分化能力很强, 巴西现已鉴别出 20 多个生理小种(Yorinori, 1978)。我国东北地区也已鉴别出 11 个生理小种(霍虹, 1988), 其中 1 号、7 号和 10 号是优势小种, 但以 1 号小种出现频率最高, 约为 50%(黄桂潮, 1984)。

对大豆灰斑病最为经济有效的防治方法就是种植抗病品种, 但由于传统育种方法所需时间长、对一些不良农艺性状的改变比较缓慢, 因而迫切需要更加有效的育种或辅助育种方法。随着分子生物学的发展, RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等分子标记技术为寻找大豆抗病基因提供了有利的工具, 利用分子手段寻找抗病基因是辅助抗病育种的快捷而有效的途径。本实验旨在利用 SSR 标记技术, 对抗感亲本杂交后代群体进行分析, 以期找到与抗病基因紧密连

锁的分子标记, 进而应用于分子标记辅助抗病育种, 尽快培育出优良抗病品种, 减少灰斑病对大豆生产造成的经济损失。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验以抗灰斑病所有生理小种的东农 40566 (紫花) 为母本, 感灰斑病 1 号生理小种的东农 410 (白花) 为父本配制杂交组合, 自 F₂ 代开始连续自交, 目前已获得 F₅ 代群体, 共 451 个株系。本实验结合 2002 年和 2003 年两年的抗性鉴定结果选择高抗、高感的株系 186 个作为实验材料。

大豆灰斑病菌 1 号生理小种引自黑龙江省农科院合江农科所。

1.2 实验方法

1.2.1 灰斑病菌的培养、接种及抗性鉴定

PDA 培养基的制备: 取 200g 马铃薯切成小块,

^{*} 收稿日期: 2003—11—27

基金项目: 国家“863”项目资助

联系作者: 陈庆山 E-mail: qshchen@sohu.com 李文滨 E-mail: wenbinli@yahoo.com

作者简介: 张文慧(1976—), 女, 东北农业大学硕士研究生, 主要从事大豆抗灰斑病育种研究。

加 1500ml 蒸馏水煮沸 30 分钟,用砂布过滤后定容至 1000ml。放回锅中,加入 20g 琼脂、20g 蔗糖,待琼脂完全溶化即可。用砂布过滤到试管中,每管加 5 ml。用牛皮纸包上,灭菌 20 分钟。

将灰斑病菌 1 号生理小种接种于含有 PDA 培养基的试管中,放在 20℃恒温箱中培养 20 天左右。将病菌接种于平板 PDA 培养基上,20℃继续培养 30 天。最后将 1 号小种转接在高压灭菌的高粱培养基上扩大培养。待孢子萌发后,用蒸馏水清洗成孢子悬浮液,孢子浓度为每毫升 5×10^3 个孢子,于 6 月 10 日、20 日分两次在傍晚或日落后进行喷雾接种。14 天后待完全显症后调查,凡小型病斑(病斑平均直径小于 0.4mm)不超过 3 个的记为抗病,小型病斑数 3 个以上或染有大型病斑的记为感病。

五月上旬盆栽群体,设 2 次重复。

1.2.2 DNA 的提取及抗感池的建立

采用 SDS 法提取总 DNA:取种子 2 粒,去种皮,研成粉末,装入 1.5ml 离心管中。加入 700 μ l 65℃预缓冲液 SDS (100mM Tris-HCl pH 8.5 100mM NaCl 50mM EDTA 2% SDS)和蛋白酶 K (0.05mg/ml)混匀 65℃水浴 1 小时。加入等体积酚-氯仿 (1:1)溶液混匀 10000rpm 离心 15 分钟。取上清液移入另一离心管中,加入等体积氯仿 10000rpm 离心 15 分钟。取上清液加入 0.6 \times 体积预冷的异丙醇 (-20℃)轻轻混匀,静置,勾出 DNA。70%乙醇浸洗,干燥后溶于 1 \times TE 中。加入 0.2 μ l RNA 酶 (10ng/ μ l)溶液 37℃保温 1 小时。加入等体积酚-氯仿 (1:1)溶液混匀 6000rpm 离心 15 分钟。取上清液加等体积氯仿 3000rpm 离心 15 分钟。取上清液加 1/10 体积 3M NaAc 混匀,加 2 \times 体积预冷的无水醇 (-20℃)混匀后静置 5 分钟,勾出 DNA,用 70%乙醇浸洗 2-3 次,室温晾干至无酒精味。加 1 \times TE 溶解 DNA,将样品放入 -20℃冰箱中保存备用。

抗感池的建立:在抗性鉴定的基础上分别从 10 株抗病的单株和 10 株感病的单株中提取 DNA,等量混合成抗病池和感病池。

1.2.3 SSR 分析

SSR 引物来源:根据 Soybase 网址提供的 SSR 引物序列,由上海生物工程公司合成。

PCR 反应体系:25 μ l 反应体系中含有基因组 DNA 0.8 μ l (30ng), 1.5mM Mg^{2+} 1.5 μ l, 0.4 μ M 引物 2 μ l, 0.2mM dNTPs 0.2 μ l, 1 \times PCR buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl, 0.1% 8mol/L Triton^RX-100) 2.5 μ l, 1U Taq 酶 0.2 μ l (5U/ μ l),

ddH₂O 17.8 μ l。

PCR 反应程序:95℃预变性 2min, 92℃变性 25s, 47℃退火 25s, 68℃延伸 25s, 循环 35 次后 68℃延伸 10min, 然后于 4℃下保存。

聚丙烯酰胺凝胶电泳:PCR 产物用标准测序胶分离,凝胶成份包括 6%聚丙烯酰胺、8mol/L 脲素, 0.04%过硫酸铵、0.1%TEMED,电泳缓冲液为 1 \times TBE, 100W 电泳 2 小时。

用快速银染法对凝胶进行染色,统计带型并照相。

1.2.4 数据统计

先用抗感亲本和抗感池一起进行扩增反应,找到扩增时抗亲与感亲、抗池与感池之间存在差异,同时抗亲与抗池、感亲与感池之间又完全一致所用的引物,再用这些引物与整个群体中的个体进行 PCR 反应,看是否与抗性鉴定结果一致,并记录谱带位置。

1.2.5 连锁分析

用 MapMaker 软件进行数据处理。每个 SSR 位点以 1 和 0 记录等位基因的有无,计算标记与目标基因之间的遗传距离。

2 结果与分析

2.1 抗性鉴定结果分析

把 2003 年 F₅ 代群体抗性鉴定结果分为五个等级,分别为:高抗、抗、中间型、感、高感,分别用 R⁺、R、I、S、S⁺ 表示,如(图 1)所示:451 个株系中有 209 个表现抗病,其中 83 个表现高抗,126 个表现中抗;211 个株系表现感病,其中 59 个表现高感,152 个表现中感,另外还有 31 个株系属于中间类型。

经 X² 测验如(表 1)所示:从以下数据可以看出抗病株系和感病株系符合 1:1 分离规律,这与张小刚(1991)等人得出的大豆对灰斑病 1 号生理小种的抗性是由单一显性基因控制的结论是一致的。

2.2 引物筛选

首先,用 BSA 法寻找抗池与感池之间具有多态性的 SSR 引物,本实验共筛选了 500 个 SSR 引物,在抗感池间存在差异的引物共 4 个。然后,将筛选出的 4 个引物经小群体检测,有 3 个引物 Satt565、SOYGPATR 和 Satt396 扩增出的多态性条带在抗病亲本与抗病小群体、感病亲本与感病小群体之间表现基本一致,并且这 3 个引物在 F₅ 代个体中表现出抗性与多态性条带协同分离的趋势,这 3 个引物

的序列如(表 2)所示。

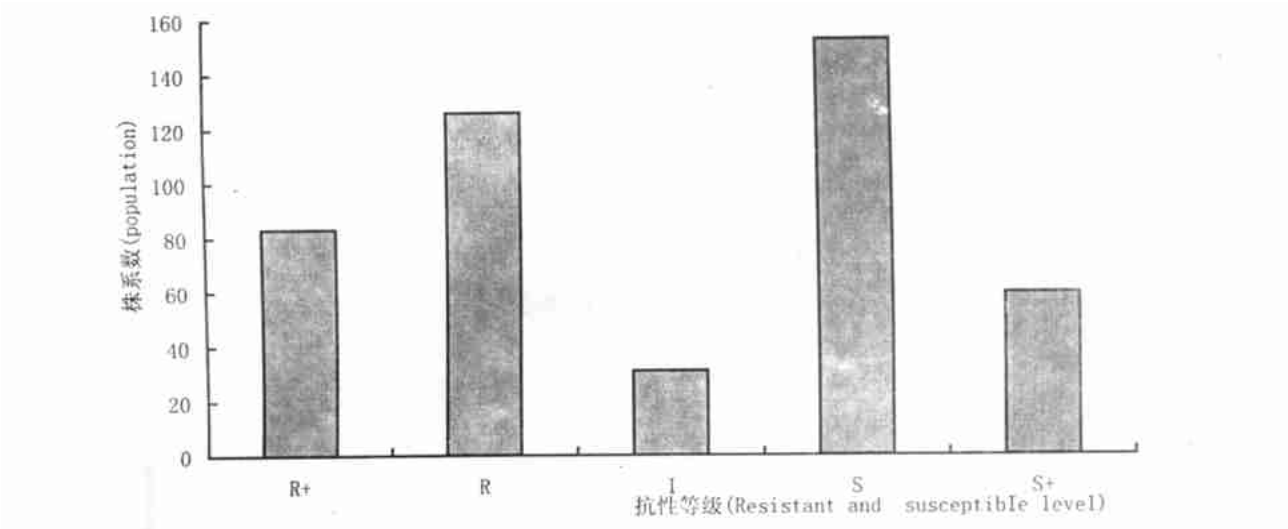


图 1 F₅ 代株系抗性分布图

Fig. 1 The distribution of resistant/ susceptible line in F₅ population

表 1 抗性分布的 X² 测验

抗性级别	抗病	感病	中间型	总数
实际株数(O)	209	211	31	451
理论株数(E)	211	211	29	451
O-E	-2	0	2	0

注: 查附表 4, $\nu=2$, $X_{0.05}^2=5.99$, $X^2=0.1570 < X_{0.05}^2$

图 2 所示为标记 SOYGPATR 在小群体上的多态性表现,泳道 1 和 2 分别为抗亲和感亲的带型,3—12 为建抗池的 10 个株系的谱带,13—22 为建感池的 10 个株系的谱带。从图中可以看出,10 个感病株系的带型与感亲带型完全一致,而抗病株系中

有 9 个与抗亲带型一致,有一个株系的带型与抗性鉴定结果不符。

表 2 抗、感池间呈稳定多态性的引物序列
Table 2 Sequence of primers polymorphic between resistant and susceptible pool

引物名称	引物序列
Satt565	Forward GCGCCCGGAAGCTTGTAATAACCTAAT
	Reverse GCGCTCTCTTATGATGTTCAATAAA
SOYGPATR	Forward GGA AGA AAGTATTGGTCTGT
	Reverse AGGAGAGAGTGGAGAGATTA
Satt396	Forward GCGAAAAGGGATAAGTTTAAAAAT
	Reverse GCGGCGCTGTAAAGGGATTC



图 2 SOYGPATR 在小群体上的多态性表现

Fig. 2 The polymorphism of SOYGPATR on sub- population

表 3 引物 SOYGPATR, Satt565 和 Satt396 在 186 个株系中的多态性表现

引物名称	抗病株系(71)				感病株系(115)			
	抗亲带型	感亲带型	杂合型	无扩增反应	抗亲带型	感亲带型	杂合型	无扩增反应
SOYGPATR	64	6	1	0	6	108	1	0
Satt565	57	11	3	0	10	87	1	17
Satt396	52	14	4	2	19	41	0	10

2.3 连锁分析

选用在两年抗性鉴定中表现一致的株系 186 个进行连锁分析, 结果如(表 3)所示。

标记 SOYGPATR 与抗性鉴定结果符合程度最好, 71 个抗病植株中有 64 株扩增出的多态性条带与抗病亲本一致, 另外 6 株扩增出的条带与感病亲本一致, 1 株为杂合型; 115 株感病植株中有 108 株表现与感病亲本一致, 6 株表现与抗病亲本一致, 1 株为杂合型。用标记 Satt565 分析, 71 株抗病植株中有 57 株扩增出的多态性条带与抗病亲本一致, 另外 11 株扩增出的条带与感病亲本一致, 3 株为杂合型; 115 株感病植株中有 87 株扩增出的条带与感病亲本

一致, 10 株与抗病亲本一致, 1 株为杂合型; 另有 17 株无扩增反应。用标记 Satt396 分析, 71 株抗病植株中有 52 株扩增出的多态性条带与抗病亲本一致, 另外 14 株扩增出的条带与感病亲本一致, 2 株无扩增反应; 115 株感病植株中有 94 株扩增出的条带与感病亲本一致, 11 株与抗病亲本一致, 另有 10 株无扩增反应。依据以上数据进行连锁分析, 结果这 3 个标记与抗性基因的连锁顺序为 Satt565—SOYGPATR—*Hrcs* 1—Satt396, 连锁距离分别为 6.2cM—6.5cM—*Hrcs* 1—14.7cM。(图 3)为标记 Satt565 对部分株系的扩增结果。

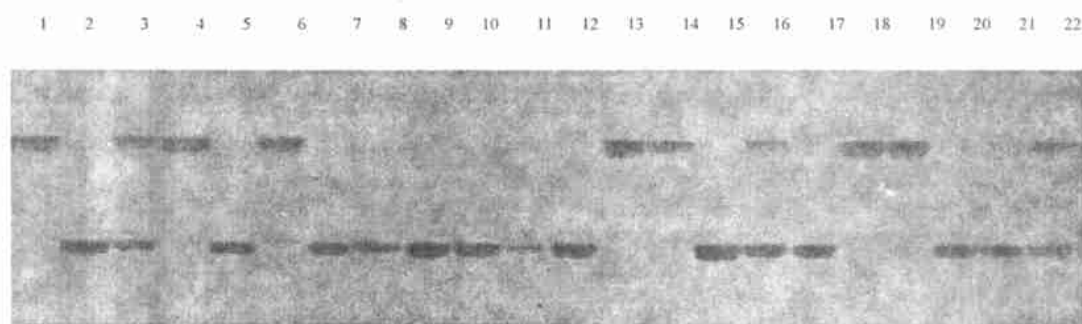


图 3 标记 Satt565 在抗感病株系中的分布

Fig. 3 Distribution of Satt565 in resistant and susceptible population

3 讨论

本实验用 BSA 法筛选引物得到 4 个多态性标记, 但是用小群体检测时其中的一个标记的多态性条带只在数株系中存在, 其余株系的条带都不具有多态性, 这可能是由于建池时个别株系 DNA 量过大, 导致扩增出的条带只能代表个别株系而不是代表整个 DNA 池。由于这种 DNA 的不等量混合还可能使有多态性的引物在筛选的过程中被漏掉。所以, 用 BSA 法筛选具有多态性的引物时, 首先, 要保证用于建池的 20 个株系除了目标性状不同外其它性状表现要均匀一致, 这样才能保证在抗、感池间出现多态性的引物与抗性相关; 其次, 用于建池的 10 个株系 DNA 一定要等量混合, 否则用 BSA 法筛选引物的准确性和有效性都会大大降低。

从连锁分析的数据中可以看出有些株系扩增出杂合型条带(既有抗亲条带又有感亲条带), 这是由于经过 3 代自交后株系的 DNA 并没有达到完全纯合。在扩增出杂合型条带的株系中有 8 个在抗性鉴定中表现为抗病, 只有 2 个表现感病, 说明与标记位

点连锁的抗性基因是显性基因。表现感病的株系中出现的杂合型条带可能是由于抗性鉴定的误差造成的, 可能的原因有两点: 首先, 抗性鉴定是靠人工接种, 在接菌过程中不能保证叶片上的孢子浓度完全均匀一致; 其次, 叶片的发病情况受温度、湿度等环境条件影响较大; 此外, 大豆灰斑病在田间抗性鉴定中, 叶片的发病情况表现为数量性状分布, 但在抗性分级时是以质量性状来衡量的, 所以在某些株系的抗感界定中可能会略有偏差。

目前我国对大豆灰斑病的研究较少, 本研究首次利用 SSR 标记技术对中国大豆灰斑病 1 号生理小种进行了标记分析, 本研究鉴定出的三个具有多态性的标记都位于 C1 (Cregan, 1999) 连锁群上, 故推测抗大豆灰斑病 1 号生理小种的基因可能位于 C1 连锁群上, 本研究结果可进一步应用于抗大豆灰斑病标记辅助育种中。

参 考 文 献

- 1 刘忠堂. 解决黑龙江省东部地区大豆灰斑病的途径[J]. 黑龙江农业科学, 1985, (1): 20-23
- 2 霍虹. 黑龙江省大豆灰斑病菌生理小种的研究[J]. 大豆科学

1988, 4: 315-320

3 张小刚. 大豆对灰斑病(*Cercospora sojina* Hara) 的抗性遗传研究 [D]. 东北农学院博士学位论文, 1991

4 黄桂潮. 黑龙江大豆灰斑病生理小种鉴定结果初报[J]. 大豆科学, 1984, 3(3): 231-235

5 Yoninori J. T., Homechin M. Races of *Cercospora sojina* in parame Brazil[J]. International congress of plant pathology, 1978, 3: 16-23

6 Cregan PB, Jarvik T, Bush AL. An integrated genetic linkage map of the soybean genom[J]. Crop Sci , 1999, 39: 1464-1490

ANALYSIS OF RESISTANT GENE AGAINST *CERCOSPORA SOJINA*
RACE 1 IN SOYBEAN WITH SSR MARKERS

Zhang Wenhui Chen Qingshan Yang Qingkai Li Wenbin Wang Wenhui
Liu Chunyan Chen Lijun Liu Haiyan Shan Jixun

(Northeast Agriculture University, Harbin, 150030)

Abstract In aim to find the SSR markers linked to resistance gene against frogeye leaf spot in Chinese soybean, bulked segregant analysis was applied to F₅ populations derived from cross between the resistant line Dongnong40566 and the susceptible line Dongnong410, self-crossing for three generations after F₂. Three SSR markers including Satt565, SOYGPATR and Satt396 were identified from 500 SSR markers, the linkage order is Satt565—SOYGPATR— *Hrcs* 1—Satt396, and the distance to the resistance locus is 12.7, 6.5, 14.7cM respectively. These three markers and the resistance locus were mapped to soybean linkage group C1.

Key words Soybean (*G. max*); Frogeye Leaf Spot (*Cercospora sojina* Hara); Resistant gene; SSR marker

欢迎订阅 2005 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主办的学术性期刊。国内外公开发行, 季刊, 16 开本, 每期 12 万字左右。国内每期订价: 7. 00 元, 全年 28. 00 元, 邮发代号: 14—95。国外每期订价: 10. 00 美元(包括邮资), 全年 40 美元。国外总发行由中国国际图书贸易总公司, 北京 399 信箱。国外代号: Q5587。

《大豆科学》是中国自然科学核心期刊, 中国科学引文数据库来源期刊。主要刊登有关大豆遗传育种, 品种资源, 生理生态, 耕作栽培、病、虫、杂草防治, 营养施肥, 生物技术及食品加工等方面的科研报告, 学术论文, 国内外研究进展评述, 研究简报, 学术活动简讯、新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者, 农业院校师生、国营农场、各级农业技术推广部门的技术人员和民营企业科技人员。

本刊热忱欢迎广大科研单位及有关企业在我刊刊登广告, 广告经营许可证号: 2301004010071。

订阅办法: 全国各地邮局, 如在邮局漏订, 可到编辑部补订。通过邮局汇款至哈尔滨市学府路 368 号《大豆科学》编辑部。邮政编码: 150086, 联系电话: (0451)86668735。

网址: <http://ddkx.chinajournal.net.cn> E. mail: dadoukx@sina.com