

# 大豆花叶病毒遗传的三体标记<sup>\*</sup>

刘丽君

(黑龙江省农业科学院大豆研究所, 哈尔滨 150086)

**摘要** 从大豆花叶病毒的形态抗性遗传标记、分子生物学特点、生化遗传、分子标记四个方面阐述了大豆研究所在大豆花叶病毒病方面所做的研究工作,以病毒病侵染大豆品种后的蛋白亚基变化、防卫系统细胞保护酶—过氧化物酶、苹果酸脱氢酶同工酶的酶蛋白分子表达特征,大豆叶肉细胞膜保护酶(超氧化物歧化酶,过氧化氢酶等)体系的变化特征;大豆细胞膜质过氧化有毒代谢产物的积累和变化,以及 SMV 蛋白酶的分析结果,阐明了大豆病毒病的分子生物学特点;通过杂交和回交后代代表型遗传特征鉴定和分析,证实大豆花叶病毒 SMV 的成株抗性的遗传基因表达特点,并利用过氧化物酶和酯酶同工酶标记不同抗性品种和杂种后代的抗性遗传,发现大豆病毒的生化遗传标记特征与成株抗性的表型特征相一致,可利用同工酶表达的遗传特征,筛选抗病毒杂交后代的一种技术。同时利用 PCR 技术,对杂种后代的 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 代群体的抗性和遗传进行分析,证明大豆对 SMV 1 号株系的抗性是由一对显性基因控制的,通过 RAPD 技术研究证实,其显性 RAPD 标记是 OPN<sub>1400/1300</sub> 与黑农 39 的抗病基因的遗传距离为 8.2cm,它为抗大豆花叶病遗传育种提供依据。

**关键词** 大豆;花叶病毒;三体标记

中图分类号 S 565.103.2 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2005)04—0310—04

植物的遗传标记主要分为四大类:即形态学遗传标记、细胞学遗传标记、生化遗传标记及分子遗传标记。形态学遗传标记:主要是指可以观察到的一些性状,如抗病性、株高、产量性状等。细胞学遗传标记:主要包括染色体核型分析、染色体分带技术及染色体原位杂交技术;生化遗传标记:主要包括用同工酶和种子贮藏蛋白标记遗传性状;分子遗传标记:指在 DNA 分子水平上的标记。它是目前发展最为迅速的一类遗传标记,主要包括限制性内切酶酶切片长度多态性(RFLP)及 90 年代发展起来的建立在 DNA 聚合酶链式反应基础上的随机扩增多态 DNA 即 RAPD 技术;扩增片段长度多态性(也称 AFLP)、微卫星(或称简单序列重复的多态性序列靶位<STS>技术)。随着遗传标记学的发展,开拓了遗传学的新领域,我国学术界在追踪世界同行的科学研究上开展了大量的工作。现将我们关于病毒病的研究动向做如下介绍。

## 1 大豆花叶病毒的形态抗性遗传标记

大豆花叶病毒的抗性遗传研究始于 70 年代,研

究表明:大豆花叶病的抗性由核基因控制,由显性单基因控制。但也有人指出,抗性为复等位基因或隐性单基因控制。1982 年利姆从 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、和 F<sub>3</sub> 的表型分离结果发现该抗性由一对显性基因控制,抗病基因命名为 R<sub>SV</sub>。多数研究结果支持这一结论,但也有不同结果。1980 年夸思(S. H. Kwon)证明大豆对大豆花叶病坏死株系的抗性由一对隐性基因支配。奥登发现对 R<sub>SV</sub> 为隐性的等位基因定名为 rsv<sup>+</sup>,两个等位基因对感病等位基因是显性。鲁思(C. W. Koane, 1983)研究提出抗大豆花叶病基因和抗花生花叶病基因间存在连锁,其重组率为 3.7%±8%。

胡蕴珠(1985 年)等应用杂交的三代遗传型和回交一代的遗传表型特征证实:对大豆花叶病毒 SMV 的两个本地株系 SA、SC 的抗性呈现一对显性基因控制的遗传。

黑龙江省农科院利用 4 个抗病毒种质配制抗×感 4 个组合,其 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 群体对 SMV 1 号株系的抗性进行了鉴定和分析。实验结果证实:4 个抗病种质的 F<sub>1</sub> 代,其成株抗性和种粒斑驳均表现为显性;成

\* 收稿日期:2005—05—12

基金项目:国家 863 项目(2002AA211051—2; 2002AA207007);黑龙江省自然科学基金、国家“948”项目

作者简介:刘丽君(1958—),女,研究员,研究方向大豆遗传育种。

株抗性受两对互补显性基因控制, 抗、感分离比例为 9: 7; 对种粒斑驳的抗性均受一对显性基因控制, 其抗、感分离比例为 3: 1 (陈怡、1994)。

## 2 大豆病毒病的分子生物学特点

关于大豆抗病和感病、病原物毒性和无毒性的生化机制从 60 年代起就进行了大量的研究。但自 80 年代起, 由于分子生物学理论和方法与大豆病理学交叉、渗透后取得了明显进展, 从而形成了分子病理学的新分支, 这一学科的发展对大豆抗(或感)病性基因和病原物的无毒或毒性基因的特征、表达、调控和相互作用的研究起到了重要的推动作用。从我们的研究结果可以看到, 大豆抗病毒物的分子表型特征为:

### 2.1 病毒病(SMV1 号)侵染大豆品种后蛋白亚基的变化

病毒病(SMV1 号)侵染大豆品种后, 高抗病毒病大豆的叶肉细胞内蛋白亚基的表达与 CK 相比增加 1~2 条蛋白亚基, 用于增强对病毒病的抗性, 同时又保持原有基因表达的不改变, 使植株在 SMV 病毒侵染下能够正常生长。如哈 88—7704, 增加了一条分子量为 76KD 的蛋白亚基; 哈 88—2501 增加了二条分子量为 45.4KD、44.5KD 的谱带蛋白亚基, 正常工作的蛋白亚基没有缺失。而感病品种, SMV1 号侵染后, 叶肉细胞内蛋白亚基增加了。但也伴随着一些正常表达和工作的蛋白亚基消失, 虽然产生许多新蛋白用于克服病原菌的侵染, 但由于 SMV 病毒的作用, 使其正常工作的蛋白亚基的转录、表达等过程受到影响, 使其合成减少或者不能完全表达, 因而表现出病症。如合丰 25, 幼苗接种 SMV1 号后, 叶肉细胞内蛋白亚基增加了三个分子量为 93KD、58KD、47KD, 但正常表达和工作的蛋白亚基一分子量为 72KD, 在接种条件下, 没有表达。

### 2.2 防卫系统细胞保护酶分子表达的特征

研究结果也证实抗病与感病品种过氧化物酶、苹果酸脱氢酶同工酶的酶蛋白表达存在着明显的差异。感病品种, 在病毒侵染条件下, 酶活性增强, 产生了一些大的酶分子蛋白, 这表明 SMV1 号侵入确实能引起酶分子表达的变化, 导致寄主本身某些代谢过程及组织结构的异常。感灰斑病品种叶绿素含量均低于 CK, 叶绿素 a/b 内的过氧化物酶同工酶的表达没有改变, 只是酶活性有所增强, 苹果酸脱氢

酶是植物抗病性鉴定中的一种重要酶, 不同抗病类型的大豆品种, 在病毒的侵染条件下, 苹果酸脱氢酶同工酶的表达类型差别不大, 但酶活性变化较大, 感灰斑病品种如黑农 34、合丰 25 的苹果酶脱氢酶活性明显增强。而抗病品种如合丰 33、黑农 39 的酶活性变化不大。

### 2.3 细胞膜保护酶体系的变化

参试品种在 SMV1 号株系诱导后, 感病品种超氧化物歧化酶活性变化较大 这说明病毒侵染下, 首先使细胞膜受到破坏, 防御体系受到严重的影响, 因而使感病品种细胞膜免受过氧化的两个保护酶受到影响, 酶活性增强, 用于增加对病毒的防御。这种由“活性过高”而产生对自身有害的变态反应, 在免疫缺陷的个体上是非常突出的。病原侵染胁迫细胞积累了一种抑制过氧化氢酶的低分子物质, 当过氧化物膜受到损伤, 过氧化酶外漏之后就受到这种物质的抑制。过氧化氢酶活性的增强, 标志着病毒的胁迫强度。抗病品种体内产生抑制过氧化氢酶的物质很少, 而感病品种则相反, 病毒易使感病品种的细胞膜受到损害。

### 2.4 SMV 对大豆脂质过氧化水平的调节

叶肉细胞丙二醛含量的变化标志着细胞膜脂质过氧化的有毒代谢产物的积累程度。从我们的研究结果看到: 大豆品种经 SMV1 号株系诱导后, 感病品种黑农 34、合丰 25 的丙二醛含量增加较多, 达 11.0% 左右, 而抗病品种, 体内丙二醛含量积累较少, 有的高抗材料, 如黑农 39、合丰 33, 病毒病作用下, 体内产生的丙二醛含量比无病条件下还要低, 说明高抗材料对膜脂的过氧化调节能力是很强的。

### 2.5 SMV 蛋白酶的分析

1990 年 Ghabrial 等用 Amersham 系统合成 DNA 的方法来合成 SMV 的 cDNA, 然后制作成含有 cDNA 的质粒, 并用 P32—SMV cDNA 的探针进行杂交分析, 表明 SMV—NLa 蛋白酶的开放阅读框的核苷酸序列是一个 17.54bp 的 SMV—DNA 片断, 发现 SMV—NLa 蛋白酶的长度为 433 个氨基酸, 并明确 3NLa 蛋白酶的作用位点。

## 3 大豆病毒的生化遗传

我们应用过氧化物酶和酯酶同工酶标记不同抗病品种及杂种后代的抗性遗传特点表明: 抗病与感病亲本及其 F<sub>1</sub> 代接种后的同工酶谱带存在着明显的差异。感病亲本及 F<sub>1</sub> 代酶的活性增强, 酶带数较

多,而且部分酶带变宽,颜色变深,抗病亲本则不发生变化。不同抗性品种杂交组合后代的 $F_1$ 代酶谱表型与双亲有关。抗病 $\times$ 抗病 $F_1$ 代酶谱与双系完全相同,抗病 $\times$ 感病的 $F_1$ 代产生了一个双亲所不具备的小分子新杂种酶带。未接种的感病亲本酶谱与抗病亲本相同、植株内部同工酶的变化与成株抗性相一致。

从不同抗性亲本有 $F_1$ 代过氧化物酶同工酶的表达特性证实:SMV1号浸染后,抗性亲本Marshall和D82—198过氧化物酶同工酶呈现了三条酶带。感病亲本黑农16和合丰25均表现10条酶带。感病亲本接种后比不接种的ck多7条谱带。感病品种接种的也较抗病品种多7条谱带,其迁移率与上述7条相同,而且感病品种的0.32、0.46和0.66这三条酶带较宽、颜色较深,酶的活性明显增强。抗病 $\times$ 抗病D82—98 $\times$ Marshall的 $F_1$ 代,成株表现为抗病,它的酶带与双亲完全相同,显示出了三条酶带。抗病 $\times$ 感病的合丰25 $\times$ 黑农16的 $F_1$ 代产生双亲所不具备的新杂种酶带,其迁移率为0.72。抗病 $\times$ 感病的6个 $F_1$ 代酶谱倾向抗性亲本。在成株抗性上均表现为抗病,但由于不同抗感亲本间基因互作。在内部生化症状上略有差异, $F_1$ 代酶谱的表现类型与亲本的抗性遗传多样性表达有关。

同工酶是生物体中分子表达的天然标记。对不同抗性的大豆品种接种SMV1号株系后,过氧化物酶、酯酶同工酶表现出明显的变化,同工酶谱型具有高度的特异性。我们的研究认为:抗病 $\times$ 抗病的 $F_1$ 代酶谱完全同于双亲,感病 $\times$ 感病的 $F_1$ 代则产生新的杂种酶带;抗病 $\times$ 感病的 $F_1$ 代酶谱基本倾向抗性亲本;正反交 $F_1$ 代酶谱表现一致,表明无母体效应。因此,可利用同工酶表达的遗传特性,作为筛选抗病毒杂交后代的一种技术。

## 4 大豆病毒病分子标记

几年来,尽管人们从形态、生理生化细胞遗传等方面对其进行了大量的研究,但其遗传研究进展十分缓慢,80年代初,产生了RFLP技术(限制性内切酶酶切片长度多态性,简称:RFLP),它给各种生物,特别是大豆这样难以用传统方法深入进行遗传研究的作物带来了极大的方便,并使大豆的遗传研究有了一个质的飞跃。

RFLP反映了DNA水平上的变异,任何DNA序列的改变与插入、重排、缺失等都会改变原有酶切

位点所在位置,从而使两酶切点的DNA片段长度发生变化,这种变化经酶切、杂交及放射性自显影后,就会使RFLP带的特征有所改变,由此即可对生物的变异进行分析。

大豆RFLP图谱的构建为一些重要的农艺性状,特别是数量性状的遗传研究开辟了一条全新的途径。目前已经定位的性状遍及形态、发育、生殖以及品质等方面。如茎粗、叶宽已分别定位于R组与E组上,含油量被定位于第3连锁群上(1992),对质量性状的基因定位研究亦有多篇报导。Yu等(1994)对大豆抗花叶病基因的研究表明:抗SMV基因Rsv与两个RFLP位点(pal86, pK644a)相连锁。由于限制性核酸内切酶种类有限,一些生物的DNA序列抗限制性酶的内切作用以及RFLP方法在操作技术和分析上的复杂性,限制了RFLP在植物上大规模改良研究上的应用。故90年代后,又出现了新的分子标记技术,这就是我们目前所谈的RAPD技术(即:随机扩增多态性DNA random amplified polymorphic DNA)。由于RAPD方法,以近等基因为试材,即可先进特定基因的定位研究。RAPD分析过程简单、快速,仅通过PCR反应就可完成,不使用Southern杂交。因此,这个方法近年来得到了广泛的应用。

我们以黑农39为母本,以合丰25为父本建立遗传群体,通过对 $F_1$ 、 $F_2$ 代接种SMV1进行田间抗性鉴定和抗病性遗传分析,证明对SMV号株系的抗性是由一对亚性基因决定的,并利用RAPD技术在抗感池间寻找多态性标记,通过筛选引物,获得重复性最好的随机引物OPN<sub>11</sub>。并采用BSA法在黑农39和抗病池扩增出OPN<sub>1400</sub>片段,在合丰25和感病池扩增出OPN<sub>1300</sub>片段,在 $F_1$ 同时扩增出OPN<sub>1400</sub>和OPN<sub>1300</sub>,用该引物分析黑农39和合丰25的 $F_2$ 扩增个体,其显性RAPD标记,OPN<sub>1400/1300</sub>与黑农39抗病基因的遗传距离为8.2cm,大豆花叶病毒病基因的定位工作还没有开始,它将是今后一个时期的工作。

## 参 考 文 献

- 1 H.B.Krishnan. Genetic engineering of soybean for improved nutritive value[D]. IV International Soybean Processing and Utilization Conference, 2004, 388
- 2 M. F. Grossi-de-Sá. Biotechnological potential of genetically modified plants for nematode resistance[D]. 《IV International Soybean Processing and Utilization Conference》, 2004, 2A,

378

3 邹继军, 杨庆凯. 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, 2002, 22(4): 75—78

4 刘丽君, 陈怡, 高明杰, 等. 大豆 SMV 病源相关蛋白的诱导与抗病性获得[ J ]. 大豆科学, 1994, (4): 345—348

5 陈怡, 栾晓燕, 黄承运, 等. 病毒病抗性不同的大豆品种及其 F<sub>1</sub> 代过氧化物酶酯酶同工酶分析[ J ]. 大豆科学, 1993, (1): 30—36

6 刘丽君, 高明杰, 郑蔚红. SMV1 号对大豆膜质过氧化及保护酶体

系的影响[ J ]. 大豆科学, 1996, (3)248—253.

7 刘丽君, 吴俊江, 高明杰, 等. 转 ipt 基因大豆感染 SMV1 号的生理特性变化[ J ]. 大豆科学, 1999, (3)214—218.

8 刘丽君, 吴俊江, 高明杰, 等. 大豆对 SMV1 株系抗性基因的分子标记研究[ J ]. 大豆科学, 2002, (2): 93—95

9 郑翠明. 大豆对 SMV3 号株系的抗性遗传分析及抗病基因的 RAPD 标记研究[ J ]. 中国农业科学, 2002, 34(1): 14—15

THREE TYPES OF GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO SOYBEAN SMV

Liu Lijun

(Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin, 150086)

**Abstract** The paper summarized that Soybean Research Institute Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences had done some research on SMV from the aspects of morphology genetic marker, molecular biology characters, biochemical genetic and molecular genetic marker of SMV. It illustrated the molecular biology characters of SMV through analyzing the change of soybean protein ethyl of soybean cultivars inoculated with SMV1, the molecule expression characters of protective enzyme of defense system cell — peroxidase, malic dehydrogenase isoenzyme, the changeable characters of soybean protective enzymes system to mesophyll cells membrane, the deposition and change of soybean memeberanous peroxidatic toxiferous metabolite, and the results analyzing to SMV protein enzyme. Through appraising and analyzing inheritance phenotype of hybridization and phenotype of backcross mating, it testified that the genetic expressional characters of SMV adult plant resistance. It used peroxidase and malic dehydrogenase isoenzyme in labeling resistance inheritance character of different resistant cultivars and their hybridization progenies and found that SMV biochemical genetic markers were in concordance with phenotype characters of adult plant resistance, and used isoenzyme expressional characters to filtrate the progenies resisting to virus. Using PCR to analyze the F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> group resistance and resistance inheritance, it testified that the resistance to SMV was decided by a couple of hypomorph. Through applying RAPD, it testified that the dominant RAPD labeling is OPN<sup>1400/1300</sup> and Heinong 39 resistant gene is 8.2cm, it will provide reference for this research in the future.

**Key words** Soybean; SMV; Three types of genetic markers