

大豆抗疫霉根腐病基因 SSR 标记

刘丽君, 孙欣, 薛永国, 杨喆

(黑龙江省农业科学院大豆研究所 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 选用感病大豆品种合丰 25 和抗病大豆品种抗线 2 号作为亲本配制杂交组合, 获得 F_2 种子。种植 F_2 代种子获得 $F_{2,3}$ 家系, 作为分子标记分离群体, 进行大豆抗疫霉根腐病基因 SSR 标记。共筛选覆盖大豆全基因组的 350 对 SSR 引物, 其中 52 对引物在亲本间具有多态性, 在 F_2 群体中通过 BSA 法筛选出与抗疫霉病基因相关的多态性差异引物 1 对, 为 Scaa003, 位于大豆公共遗传图谱的 J 连锁群。同时该引物在其他 10 个抗病品种及 4 个感病品种中抗、感病谱带检出率均为 100%, 具有一定的检测通用性, 可以为大豆疫霉根腐菌 1 号生理小种抗性材料的辅助选择提供理论依据。

关键词: 大豆; 疫霉根腐病; SSR; BSA

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2008)03-0379-04

Tagging SSR Markers for Resistant Gene to *Phytophthora* Root Rot in Soybean

LIU Li-jun, SUN Xin, XUE Yong-guo, YANG Zhe

(Soybean Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: *Phytophthora* root rot is an important soybean disease, which can influence the yield. To map SSR makers link with resistant genes to soybean *Phytophthora* root rot, Hefeng 25 and Kangxian 2 were crossed and the F_2 seperation population was obtained. 350 pair of SSR primers were screened and 52 pairs have polymorphism. BSA (Bulked segregation analysis) method was used to screen the polymorphic and diverge primers, one pair of polymorphic primer, Scaa003, located on LG J was tagged. The examination rate of Scaa003 between 10 sensitive soybean cultivars and 4 resistant soybean cultivars reached 100%. Result shows that the primer has the common characteristic for the examination, it can provide the theoretic base for selecting the soybean materials which have the resistance to the soybean *Phytophthora sojae* Race 1.

Key words: Soybean *Phytophthora* root rot; SSR; BSA

大豆疫霉根腐病 (*Phytophthora* Root Rot) 是一种由大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae* MJ. Kaufmann & J. W. Gerdemann, 异名 *P. megasperma* Drechs. f. sp. *glycinea* T. Kuan & D. C. Erwin) 引起的世界性大豆毁灭性病害^[1]。1948 年于美国印第安那州首次发现大豆疫霉根腐病, 而后相继在澳大利亚、加拿大、巴西、阿根廷、日本、意大利、新加坡、俄罗斯、白俄罗斯、乌克兰、哈萨克斯坦、匈牙利、德国、英国、法国、瑞士、新西兰、埃及、尼日利亚、印度、中国等国家都发现了该病^[1-4]。1989 年沈崇尧等在我国东北大豆主产区分离到大豆疫霉菌, 证实了大豆疫霉根腐病在我国的存在^[1]。选育和利用抗病品种是最经济有效的防治措施, 而传统的育种方法, 费时费力。随着 DNA 分子标记技术的发展, 将分子辅助育种与传统育种相结合, 可以缩短育种年限、加快育种的进

程。简单序列重复或微卫星 (Simple sequence repeat, SSR) 标记技术是一类由几个核苷酸 (一般为 1~5 个) 为重复单位组成的长达几十个 (一般为 10~50) 核苷酸的串联重复序列^[5]。采用杂交 F_2 代分离群体, 利用 SSR 技术对大豆疫霉根腐病性状进行分子标记, 期望获得与抗病性基因相关的连锁的 SSR 分子标记, 并且验证获得标记在其他抗、感病品种中的通用性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试品种 分子标记分离群体: 选取我国东北地区广泛种植的感病品种合丰 25 为母本, 抗病品种抗线 2 号为父本, 配制杂交组合得 F_2 种子, 种植 F_2 代种子获得 $F_{2,3}$ 家系, 作为试验的分离群体。

收稿日期: 2007-07-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”计划资助项目(2006AA10Z1F9)。

作者简介: 刘丽君(1958-)女, 研究员, 研究方向为分子植物育种。E-mail: nkyssbd@126.com。

分子标记验证材料:

抗病品种:海布、奥原 1 号、绥农 10、Strong、MN1401、MN1302、MN1801、合丰 34、梅里特、Kottman。

感病品种:绥农 14、黑河 19、黑农 35、黑农 37。

1.1.2 供试菌种 大豆疫霉根腐病菌 1 号生理小种。

1.1.3 PCR 引物 根据 soybase 大豆数据库(<http://129.186.26.94/>)和发表的文献^[6-7]查询,随机平均获得覆盖大豆全基因组的 SSR 引物序列 350 对,由上海生物工程公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 种植及接种方法 采用盆栽方式种植分离群体,同时种植合丰 25 和抗线 2 号两亲本,在第二对复叶展开后采用伤口涂抹接种法接种大豆疫霉菌 1 号生理小种,接种后套袋保湿并放置于阴凉处,发病后进行单株抗、感病鉴定。

1.2.2 DNA 的提取 大豆籽粒总 DNA 采用改良 SDS 法提取^[8];大豆叶片总 DNA 采用改良 CTAB 法提取^[9]。

1.2.3 PCR 扩增及产物电泳检测 PCR 扩增及产物电泳检测参照标准 SSR 引物扩增和银染检测程序^[10]。

2 结果与分析

2.1 亲本间 SSR 引物的筛选

根据对大豆公共遗传连锁图谱^[6]的分析,选择基本覆盖大豆的全基因组的 350 对 SSR 引物,用于在杂交亲本抗线 2 号及合丰 25 提取的 DNA 间进行引物多态性筛选。对这 350 对 SSR 引物进行 PCR 扩增,所有引物均扩增出稳定的产物,其中有 52 对引物在亲本 DNA 间具有多态性,多态性引物频率为 14.86% (图 1)。

satt164 satt168 satt181 satt183 satt186 satt195 satt197 satt302 satt309 satt316 satt336 satt358 satt371 satt434 satt580 satt584



图 1 亲本间部分 SSR 引物多态性筛选

Fig. 1 Polymorphic SSR primers screened between parents

2.2 抗、感池间 SSR 引物的筛选

在 F_2 群体提取 DNA 的中分别选取抗病个体 DNA 及感病个体 DNA,采用 BSA 混合建立抗、感池。对筛选出的 52 对亲本差异引物进行抗、感池筛选。所有引物均扩增出稳定的产物,产物电泳后,经银染检测,其中 1 对引物在抗、感池间具有多态性,该引物为 Scaa003 (图 2),位于大豆遗传图谱的 J 连锁群。

2.3 Scaa003 在 F_2 群体中扩增电泳

用在抗、感池间具有多态性的引物 Scaa003 对 F_2 群体中进行扩增,得到扩增产物电泳后,经银染

M Scaa003 Satt076 Satt127 Satt485 Satt143

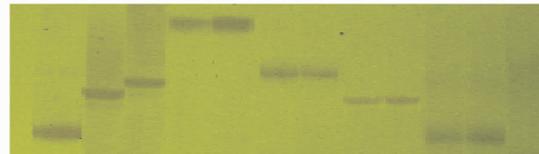


图 2 抗、感池间部分 SSR 引物多态性筛选

Fig. 2 Polymorphic SSR primers screened between BSA pools

检测,统计条带类型 (图 3),记录数据。统计分析表明,在鉴定的 F_2 群体抗病个体中 77.55% 的个体检测出抗病谱带。

1 2 3 5 6 8 9 10 12 14 15 16 17 18 20 21 22 24 26 27 28 30 34 38 40 48 52 57



图 3 Scaa003 在部分 F_2 群体中扩增结果

Fig. 3 Result of the amplification of Scaa003 in some plants of F_2 population

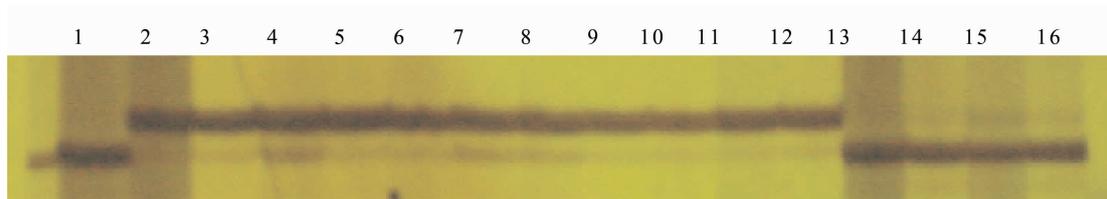
2.4 Scaa003 在其他验证品种中扩增电泳

将 Scaa003 在海布、奥原 1 号、绥农 10、Strong、

MN1401、MN1302、MN1801、合丰 34、梅里特、Kottman 10 个抗病品种及绥农 14、黑河 19、黑农 35、黑

农 37 4 个感病品种中进行扩增,得到扩增产物电泳后,经银染检测,统计条带类型(图 4),记录数据。在 10 个抗病品种中,全部检测出抗病谱带,检测符

合度为 100%,在 4 个感病品种中,也全部检测出感病谱带,检测符合度也为 100%。



1. 合丰 25, 2. 抗线 2, 3. 海布, 4. 奥原 1, 5. 绥农 10, 6. Strong, 7. MN1401, 8. MN1302, 9. MN1801, 10. 合丰 34, 11. 梅里特, 12. Kottman, 13. 绥农 14, 14. 黑河 19, 15. 黑农 35, 16. 黑农 37。
1. Hefeng 25, 2. Kangxian 2, 3. Haibu, 4. Aoyuan 1, 5. Suinong 10, 6. Strong, 7. MN1401, 8. MN1302, 9. MN1801, 10. Hefeng 34, 11. Meilite, 12. Kottman, 13. Suinong 14, 14. Heihe 19, 15. Heinong 35, 16. Heinong 37。

图 4 Scaa003 在其他抗、感病品种中扩增结果

Fig. 4 Result of the amplification of Scaa003 in other resistant or sensitive cultivars

3 讨论

不同的遗传标记具有不同的特点,选择合适的遗传标记准确评估群体遗传结构的重要环节,SSR 分子标记具有大量的等位差异,多态性十分丰富,在对亲本检测的 350 对引物中共有 53 对引物表现出良好多态性,多态性频率为 15.14%,具有较高的检测效率,同时该分子标记呈现共显性遗传,可以清楚的反映群体在某座位的分离情况,而不会产生多座位造成的干扰,SSR-PCR 扩增的准确性和重现性较高,而且采用高分辨率凝胶,错误检测位点的概率极低,所以检测出的与抗疫霉根腐病基因连锁引物 Scaa003 在本群体中是稳定可靠的。

一些研究者采用不同的群体进行 SSR、RFLP 等分子标记,找到部分与疫霉根腐病基因连锁的标记(或标记确定的 QTL 位点),分别为 Satt530、Satt159、Satt152、Satt009、Satt125^[11]; pK-395、pK-418、pA-71、pA-280、pA-199、pA-233、pA-186、pA-586、pR-45、pT-5^[12]; Satt547^[13]、Satt334、Satt114^[14]; Satt472、Satt191、Sat-064^[9]; K022-1^[15]; Satt514、Satt313^[4],这些标记分别位于大豆遗传图谱的 N、J、F、G、D₂、L 连锁群上。由于采用的标记群体不同,具有不同的遗传组成,同时群体对疫霉菌小种的抗性不同,因而获得的连锁标记也有所不同,呈现多样性^[16]。

试验筛选引物用的是基于性状表现型的 BSA 法,根据目标性状的表现型在 F₂ 群体中随机抽取抗病个体和感病个体的 DNA 等量混合,建成抗病池和感病池,在这两个池之间,除了在目标性状基因座所在的染色体区域的 DNA 组成上存在差异之外,来自

基因组其他部分的 DNA 组成基本上是一样的,因此在这两个 DNA 池间表现出多态性的 DNA 标记,有可能与疫霉根腐病相连锁。进行两池之间多态性引物筛选时以亲本谱带为对照,筛选出一个与大豆抗疫霉根腐病相关的多态性引物。

基于性状表现型的 BSA 法,在对性状的表现型判断要求很高,由于疫霉菌的发病情况受到环境条件的影响较大,高温、低温及环境中湿度的大小都直接影响植株的发病,也直接影响病害的调查,容易误判抗、感病个体,给 BSA 法筛选带来了极大的不便,影响判断结果,也造成筛选效率较低。同时用做病原的疫霉菌具有很强的小种专业化性,采用的小种不同,群体的表型鉴定也会有差别,基于此的 BSA 法筛选出的连锁引物也有可能不同。

为了能够精确定位与大豆抗疫霉根腐病基因连锁的分子标记,在目前研究的基础上使用准确度更高的分子标记技术如 SNPs 等先进技术,以期定位与抗病基因连锁更加紧密的分子标记,从而能够准确克隆出大豆抗疫霉根腐病基因,为实现抗病基因的遗传转化奠定基础,为缩短育成抗病大豆品种的时间提供技术支持。

参考文献

- [1] 沈崇尧,苏彦纯. 中国大豆疫霉病菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报,1991,21(4):289. (Shen C R, Su Y C. Initial research and discovery for *Phytophthora sojae* in china[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(4):289.)
- [2] 苏彦纯,沈崇尧. 大豆疫霉病菌在中国的发现及其生物学特性的研究[J]. 植物病理学报,1993,23(4):341-347. (Su Y C, Shen C R. Research and discovery of biological characters for *Phytophthora sojae* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1993, 23

- (4);341-347.)
- [3] 徐永华,何志鸿.大豆疫霉病早熟抗源[J].大豆通报,1999(3):23-25.(Xu Y H,He Z H. Early mature resistant materials for soybean Phytophthora Root Rot[J]. Soybean Bulletin,1999(3):23-25.)
- [4] 霍云龙,朱振东,李向华,等.抗大豆疫霉根腐病野生大豆资源的初步筛选[J].植物遗传资源学报,2005,6(2):182-185.(Huo Y L,Zhu Z D,Li X H,et al. Preliminary screening for phytophthora root rot resistance in wild soybean[J]. Journal of Plant Genetic Resources,2005,6(2):182-185.)
- [5] 刘柱,胡新文.分子标记及其在遗传育种中的应用[J].华南热带农业大学学报,2001,7(1):21-25.(Liu Z,Hu X W. Application in genetic breeding by using molecular markers[J]. Journal of South China University of Tropical Agriculture,2001,7(1):21-25.)
- [6] Cregan P B,Jarvik T,Bush A L,et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome[J]. Crop Science,1999,35(5):1464-1490.
- [7] Jee H J,Kim W G,Cho W D. Occurrence of Phytophthora root rot on soybean and identification of the causal fungal[J]. RAD Journal of Crop Protection,1998,40(1):16-22.
- [8] 关荣霞,常汝镇,邱丽娟.用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取[J].大豆科学,2003,21(1):73-74.(Guan R X,Chang R Z,Qiu L J. Rapid isolation of soybean DNA for SSR analysis[J]. Soybean Science,2003,21(1):73-74.)
- [9] Rogers O S,Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh,herbarium and mummified plant tissues[J]. Plant Molecular Biology,1985,5(2):69-76.
- [10] 宛煜嵩.大豆遗传图谱的构建及若干农艺性状的 QTL 定位分析[D].北京:中国农业科学院,2002.(Wan Y S. Construction of soybean genetic map and QTL analysis of some agronomic traits [D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences,2002.)
- [11] Byrum J R,Kimbirauskas P M,Shoemaker R C. Identification of a RAPD marker introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers[J]. Soybean Genetic Newsletter,1993,20:112-117.
- [12] Lohnes D G,Schmitthenner A F. Position of the Phytophthora resistance gene *Rps7* on the soybean molecular map[J]. Crop Science,1997,37:555-556.
- [13] Kilen T C,Hartwig E E,Keeling B L. Inheritance of a second major gene for resistance to Phytophthora root rot in soybeans[J]. Crop Science,1974,14:260-262.
- [14] Buzzell R I,Anderson T R. Another major gene for resistance to Phytophthora introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers [J]. Plant Disease,1981,66:1146-1149.
- [15] Weng C,Yu K,Anderson T R,et al. Mapping Genes Conferring Resistance to Phytophthora Root Rot of Soybean,*Rps1a* and *Rps7* [J]. The Journal of Heredity,2001,92(5):442-446.
- [16] Diers B W,Skorupska H T,Rao-Arelli A P,et al. Genetic relationships among soybean plant introductions with resistance to soybean cyst nematodes[J]. Crop Science,1997,37:1966-1972.

学术交流的平台 科技致富的帮手 欢迎订阅《北方园艺》(月刊)

邮发代号 14-150 单月刊 每册定价 6.00 元 全年 72.00 元

《北方园艺》是由黑龙江省农业科学院主管、黑龙江省园艺学会和黑龙江省农业科学院主办的以科学研究和技术普及相结合的园艺类综合性科技期刊。于 1977 年创刊,30 多年来形成了自己的办刊特色,受到了全国农业科研、教学、生产第一线人员和广大读者的热情支持和欢迎,既是科技人员技术交流和发布佳篇新作的信息平台,也是园艺种植户的致富帮手和秘籍锦囊。

《北方园艺》是全国中文核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊和黑龙江省优秀科技期刊。本刊内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。主要栏目:试验研究、专题综述、设施园艺、栽培技术(菜园、果园、瓜园)、园林花卉、生物技术、植物保护、食用菌、贮藏与加工等。信息涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究的新技术、新品种、新经验。

国内外公开发售,单月刊,每月 15 日出版,大 16 开本,200 页内文,平订,彩四封及内插彩页印刷精美,每册定价 6.00 元,全年 72.00 元(页码增加,质量提高,定价没变)。全国各地邮局均可订阅,邮发代号 14-150,或直接向编辑部汇款订阅,竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生,各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅,订阅者请在汇款单附言栏内写清订购份数,收件人姓名及详细地址、邮编。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号,黑龙江省农业科学院《北方园艺》编辑部
邮编:150086;电话:0451-86674276;E-mail:bfybjb@163.com