

## 与耐大豆疫霉根腐病相关的 QTL 分析

李修平<sup>1</sup>, 韩英鹏<sup>1</sup>, 丁俊杰<sup>2</sup>, 张淑珍<sup>1</sup>, 马文东<sup>3</sup>, 李文滨<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学大豆研究所, 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨, 150030; <sup>2</sup>黑龙江省农科院佳木斯分院, 黑龙江 佳木斯, 150040; <sup>3</sup>黑龙江省农科院水稻研究所, 黑龙江 佳木斯, 154026)

**摘 要:** 疫霉根腐病是世界范围内的大豆生产上的毁灭性病害。利用 470 对 SSR 引物对由耐病品种 Conrad × 合丰 25 获得的 140 个 F<sub>2:5</sub> 重组自交系 (RIL) 群体的耐大豆疫霉根腐病基因进行 QTL 分析, 为将耐病基因聚合的分子辅助育种提供理论依据。田间耐病性鉴定于 2007 年在中国黑龙江省佳木斯和加拿大 Woodslee 两点进行, 并分别采用来自两地的混合菌种进行温室鉴定。经过 WinQTL 2.0 复合区间法计算, 共有 4 个分子标记 (Satt428、Satt600、Satt325 和 Satt233) 与大豆疫霉根腐病显著相关。这些分子标记对病害损失率贡献率从 5.47% 到 27.89% 不等。Satt428 和 Satt600 定位在 MLG D1b + W 上, 遗传距离相距 10.9 cM; Satt325 和 Satt233 分别定位在 MLG F 和 MLG A2 上。通过大环境试验在我国大豆品种合丰 25 找到与耐大豆疫霉根腐病显著相关的 QTL, 并定位在 MLG A2 上。

**关键词:** 大豆; 疫霉根腐病; QTL; 耐病性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)04-0572-04

## Mapping Quantitative Trait Loci Underlining Tolerance to *Phytophthora* Root Rot in Soybean

LI Xiu-ping<sup>1</sup>, HAN Ying-peng<sup>1</sup>, DING Jun-jie<sup>2</sup>, ZHANG Shu-zhen<sup>1</sup>, MA Wen-dong<sup>3</sup>, LI Wen-bin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; <sup>2</sup>Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences;

<sup>3</sup>Rice Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences; Jiamusi 154026, Heilongjiang, China)

**Abstract:** *Phytophthora* root rot (PRR) caused by *Phytophthora sojae* M. J. Kaufmann & J. W. Gerdemann is a serious disease of soybean world wide. The objective of this study was to identify the location of quantitative trait loci (QTL) in ‘Conrad’, a soybean cultivar with broad tolerance to many races of *P. sojae*, and ‘Hefeng 25’, a soybean cultivar tolerant to *P. sojae* in China. The 140 individual of F<sub>2:5</sub> RIL population derived from Conrad × Hefeng 25 were adopted, and field and green house identification were conducted at Woodslee, Canada and Jiamusi, China in 2007 year, respectively. 470 pair of SSR markers were used and 88 of them showed polymorphism. The genetic map was constructed with Mapmaker/EXP3.0b and QTLs analysis was done by CIM method of WinQTL 2.0. Four markers Satt428, Satt600, Satt325, Satt233, from three linkage group MLG D1b + W, MLG F and MLG A2, were significantly associated with PRR. Each marker explained 5.47% to 27.89% of phenotypic variance. Satt428 and Satt600 were mapped to MLG D1b + W, the genetic distance was 10.9 cM; Satt325 and Satt233 were mapped to MLG F and MLG A2 respectively. Quantitative trait loci on the linkage groups which are associated with PRR was discovered firstly from Hefeng 25, and was mapped to MLG A2. The identified QTLs would be beneficial for marker assistant selection of PRR tolerance varieties against China *P. sojae* races.

**Key words:** *Phytophthora* root rot; QTLs; Tolerance

由大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann) 引起的大豆疫霉根腐病是严重影响大豆生产的毁灭性病害之一<sup>[1]</sup>。该病自 1948 年首次在美国的印第安纳州发现以来, 迅速蔓延, 被列为美

国大豆的毁灭性病害之一, 在发病的条件下, 可造成大豆绝产, 严重危害大豆生产。由于其土居特性, 只要条件适宜, 大豆疫霉菌在大豆整个生育期都能侵染大豆并造成危害, 导致早期大豆烂种、猝倒和中后

收稿日期: 2008-01-24

基金项目: 国家国际合作重点资助项目 (2005DFA30340); 国家高技术研究发展计划“863 计划”资助项目 (2006AA10Z1F1, 2006AA100104-4)。

作者简介: 李修平 (1981-), 女, 博士研究生, 研究方向作物遗传育种及生物技术。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

期根、茎腐。虽然一些杀菌剂对大豆疫霉菌有较好的抑制作用,但其药效期有限,不能有效控制该病害的发生<sup>[2]</sup>。沈崇尧等<sup>[3]</sup>首次在我国东北发现了大豆疫霉根腐病。该病害作为一种顽固的土传病害,其对我省大豆生产具有巨大的威胁。迄今,国外已在大豆基因组的 8 个位点鉴定了 14 个抗疫霉根腐病基因(*Rps*)<sup>[4-5]</sup>。朱振东等<sup>[6]</sup>利用微卫星标记技术在大豆品种诱变 30 中鉴定和定位了遗传图谱 L 连锁群上第一个抗疫霉根腐病基因-*RpsYB30*。Burnham 用 52 对 SSR 引物对从韩国、日本和中国引进的 93 份大豆品种和 15 个基因型的美国大豆品种进行鉴定,结果表明可能在 MLGA2 存在一个主效抗病基因<sup>[7]</sup>。由于大豆疫霉菌在与寄主抗病性互作中,毒力在演变和快速进化,新的生理小种不断出现,培育垂直抗性品种并不是克服疫霉病的长期有效的方法,因此选育耐病性大豆新品种更具实际应用价值。

利用加拿大经多年验证的耐疫霉品种 Conrad 与黑龙江的耐疫霉品种合丰 25 杂交的  $F_{2.5}$  重组自交系进行耐大豆疫霉根腐病的 QTL 定位,从中国品种中寻找耐病性 QTL,为将耐病基因聚合的分子辅助育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

采用双耐病品种 Conrad 与合丰 25 的杂交 140 份  $F_5$  代重组自交系。Conrad 是经过多年实践证明的耐大豆疫霉根腐病的品种。合丰 25 是黑龙江长期主栽的品种,其高产,稳产,适应性广,并经试验证明为耐大豆疫霉根腐病品种。

### 1.2 菌种来源

利用来自两个不同地域的混合菌种,一是采集于佳木斯的混合菌种,一是采集于加拿大 Woodslee 的混合菌种。

### 1.3 耐病性鉴定

耐病性鉴定于 2007 年在加拿大 Woodslee 和佳木斯桦川县两个地点进行,并在两地进行盆栽菌种接种鉴定。Woodslee 试验点从 1975 年就用来对大豆品种(品系)的疫霉根腐病耐病性进行鉴定的自然发病地块。佳木斯桦川县的试验地是疫霉根腐病多年自然发病地块。

耐病性调查在出苗到 R3 时期进行,并且以表

现出大豆疫霉根腐病发病特征的植株和发病后倒下的植株为准。具有特征性褐色枯斑枝叶的(死亡的、即将死亡的、枯萎的)植株(这些植株从根部延伸到茎部较低的节位)即被认为感疫霉根腐病。损失率 = [(出苗的植株数 - 站立的植株数) / 出苗的植株数]  $\times 100\%$  <sup>[8]</sup>。

田间试验采取完全随机区组设计,3 m 行长,6 cm 株距,2 次重复。

盆栽接菌鉴定,每盆 5 株,两个处理,3 次重复。接菌方式为:将长有病原菌菌丝体的琼脂接种到营养钵中,然后在菌丝体上方播种,接种 21 d 后调查病害损失率,并与疫区田间自然状态下的发病情况进行比较。

### 1.4 PCR 扩增与检测

采用 470 对 SSR 引物,由上海生工生物技术有限公司合成。每个株行随机收获足够叶片,采用 CTAB 法提取基因组 DNA,方法参照 Yu K 等<sup>[9]</sup>。

SSR 扩增采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系,包括模板 DNA ( $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 9.9  $\mu\text{L}$ , 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , MgCl<sub>2</sub> ( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 引物 ( $2 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , dNTP ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 ( $10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ 。SSR 反应在 PTC-100PCR 仪中进行,在 94℃ 预变性 5 min,然后进入循环:94℃ 变性 30 s, 47℃ 复性 30 s; 72℃ 延伸 30 s; 循环 35 次后在 72℃ 延伸 5 min,置于 4℃ 下保存。PCR 产物加上 8  $\mu\text{L}$  甲酰胺双色缓冲液 ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溴酚兰,  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  二甲苯青,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 95% 去离子甲酰胺),置于 PTC-100PCR 仪中变性 5 min,迅速放入冰水混合物中冷却。PCR 产物在 POWERPAC3000 电泳仪中 100 W 恒功率下,以 6% 聚丙烯酰胺标准测序胶为介质,以 1  $\times$  TBE 为缓冲液,电泳分离<sup>[10-11]</sup>,快速银染后检测。

### 1.5 遗传图谱的构建和 QTL 分析

利用 Mapmaker/EXP3.0b 和 Mapchart2.1 作图软件,构建分子标记连锁图谱,将来源于亲本合丰 25 带型记为 A,来源于 Conrad 带型记为 B,双亲杂合带型记为 H,缺失记为“-”,利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传图距(cM),以最大图距 30cM 作为划分连锁群和排列分子标记的基准距离。利用 Windows QTL Carter 2.0 软件复合区间法进行 QTL 检测,LOD 大于 2.0 作为 QTL 存在的阈值。

2 结果与分析

2.1 与耐大豆疫霉根腐病相关的 QTL 分析

用 470 个 SSR 引物分析合丰 25 和 Conrad 间的多态性,其中 88 个 SSR 标记在父母本间存在多态性,将这 88 个多态性 SSR 标记在重组自交系上扩增。

当 LOD 阈值为 2.0 时,共有 88 个分子标记用于连锁和 QTL 分析。经过 WinQTL 2.0 复合区间法计算,共有 4 个分子标记 (Satt428、Satt600、Satt325 和 Satt233) 与大豆疫霉根腐病相关(表 1)。这些分子标记对病害损失率贡献率从 5.47% 到 27.89% 不等。Satt428 和 Satt600 定位在连锁群 MLG D1b + W 上,遗

传距离相距 10.9 cM;Satt325 和 Satt233 定位在连锁群 MLG F 和 MLG A2 上。Satt428 与桦川和加拿大 Woodslee 田间鉴定的病害损失率显著相关,对病害损失率贡献率分别为 6.78% 和 11.28%;Satt600 与桦川和加拿大 Woodslee 田间鉴定及与两地的温室接种鉴定的病害损失率显著相关,对病害损失率贡献率分别为 27.89%、5.47%、19.28% 和 7.57%;Satt325 与 Woodslee 田间鉴定和 Woodslee 温室接种鉴定的病害损失率显著相关,对病害损失率贡献率分别为 6.78% 和 7.21%;Satt233 与加拿大 Woodslee 和桦川田间鉴定的病害损失率显著相关,对病害损失率贡献率分别为 4.98% 和 14.1%(表 1)。

表 1 与大豆疫霉根腐病相关的分子标记

Table 1 Markers associated with phytophthora root rot tolerance

| 连锁群<br>Linkage | 分子标记<br>Marker | QTLs   | 区间<br>Intervals  | 地点<br>Location | 鉴定方法<br>Identification | R <sup>2</sup> / % | LOD    |
|----------------|----------------|--------|------------------|----------------|------------------------|--------------------|--------|
| D1b + W        | Satt428        | QPRR-1 | Satt428- Satt005 | 桦川 Huachuan    | 田间鉴定 FI                | 6.78               | 2.7401 |
| D1b + W        | Satt428        | QPRR-1 | Satt428- Satt005 | Woodslee       | 田间鉴定 FI                | 11.28              | 2.5686 |
| D1b + W        | Satt600        | QPRR-2 | Satt600- Sat089  | 桦川 Huachuan    | 田间鉴定 FI                | 27.89              | 3.2111 |
| D1b + W        | Satt600        | QPRR-2 | Satt600- Sat089  | Woodslee       | 田间鉴定 FI                | 5.47               | 4.5756 |
| D1b + W        | Satt600        | QPRR-2 | Satt600- Sat089  | Woodslee       | 接种鉴定 II                | 19.28              | 3.4565 |
| D1b + W        | Satt600        | QPRR-2 | Satt600- Sat089  | 佳木斯 Huachuan   | 接种鉴定 II                | 7.57               | 2.9876 |
| F              | Satt325        | QPRR-3 | Satt325- Satt554 | Woodslee       | 田间鉴定 FI                | 6.78               | 3.3129 |
| F              | Satt325        | QPRR-3 | Satt325- Satt554 | Woodslee       | 接种鉴定 II                | 9.21               | 4.0186 |
| A2             | Satt233        | QPRR-4 | Satt424- Satt437 | 桦川 Huachuan    | 田间鉴定 FI                | 14.1               | 9.8575 |
| A2             | Satt233        | QPRR-4 | Satt424- Satt437 | Woodslee       | 田间鉴定 FI                | 4.98               | 5.3837 |

FI: field identification, II: inoculation identification.

2.2 与耐大豆疫霉根腐病相关 QTL 应用潜力的分析

在 MLG D1b + W, MLG F 和 MLG A2 连锁群上定位了 4 个 QTL, QPRR-1 (Satt428, 区间为 Satt428-Satt005), QPRR-2 (Satt600, 区间为 Satt600-Sat089), QPRR-3 (Satt325, 区间为 Satt325-Satt554), QPRR-4 (Satt233, 区间为 Satt424-Satt437) (见图 1)。其中定位于 MLG D1b + W 染色体的 QPRR-2 (Satt600, 区间为 Satt600- Sat089) 与韩英鹏等<sup>[7]</sup>定位的 Satt579 只有 0.53cM, 并且 QPRR-2 在桦川田间鉴定, Woodslee 田间鉴定, Woodslee 接种鉴定, 在佳木斯 2007 年接种鉴定都出现, 具有较高的应用价值; 定位于 MLG A2 染色体的 QPRR-4 (Satt233, 区间为 Satt424-Satt437) 在桦川田间鉴定, Woodslee 田间鉴定中出现, 具有较高的应用潜力。

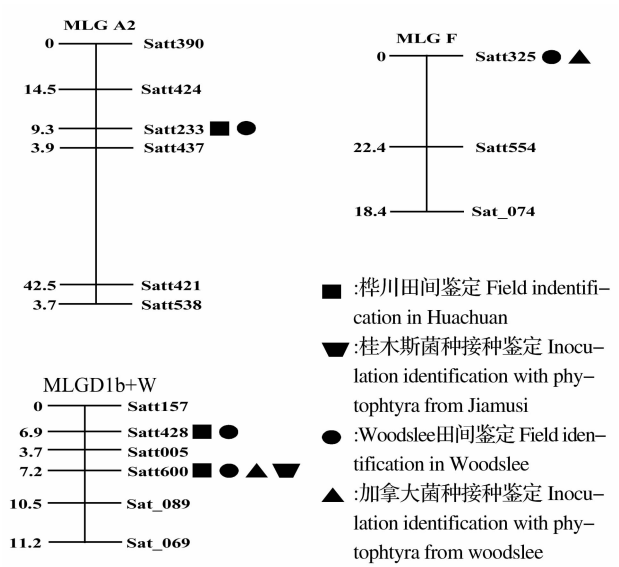


图 1 与耐大豆疫霉根腐病相关的 QTL 分析

Fig. 1 The analysis of QTLs associated with the tolerance to phytophthora root rot disease in soybean

### 3 讨论

Burnham 等以 Conrad 为母本的 3 个 RIL 群体中,利用 SSR 引物进行 QTL 分析,在 MLG D1b + w 和 F 连锁群上,找到了与耐疫霉根腐病相关的 QTLs<sup>[13]</sup>。通过 Conrad 与合丰 25 杂交的重组自交系分析,并与前人的研究结果对比可得:在 MLG D1b + w 连锁群上的 Satt600 和 MLG F 连锁群上的 Satt325 附近存在着比较稳定与耐病损失率相关的数量遗传位点,这些遗传位点通过带型分析初步断定由 Conrad 遗传获得,经多年前人研究鉴定验证<sup>[4,7,13]</sup>,这些遗传位点能够被稳定的检测出来。

Deiers 等报道抗大豆疫霉的抗性基因 *Rps8* 位于 A<sub>2</sub> 连锁群上<sup>[14]</sup>。在 A<sub>2</sub> 连锁群上的 Satt233 位于 Satt424 与 Satt427 之间,桦川 2007 年田间鉴定中, R<sup>2</sup> 为 14.1, LOD 值 9.8575; Woodslee 2007 年田间鉴定中 R<sup>2</sup> 为 4.98, LOD 值 5.3837,在其附近存在比较稳定与耐病损失率相关的数量遗传位点,这些遗传位点通过带型分析初步断定由合丰 25 遗传获得,这些遗传位点能否被稳定的检测出来,还需进一步的验证。

对 470 对 SSR 引物进行筛选,其中并未对位于 MLG A<sub>2</sub> 连锁群上的 64 个引物全部进行分析,对 MLG A<sub>2</sub> 连锁群上其他的引物及其他染色体引物还需进一步筛选,试图在 MLG A<sub>2</sub> 连锁群寻找其他的与疫霉根腐病相关的标记,以缩短位点间的遗传距离。对公布的 600 对引物要进一步的补充筛选,以寻找更多的与疫霉根腐病相关的 QTL。

### 参考文献

[1] Wrather J A, Anderson T R, Arsyad D M, et al. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998 [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2001, 23: 115-121.

[2] 朱振东, 王晓鸣, 田玉兰, 等. 防治大豆疫霉根腐病的药剂筛选[J]. 农药学报, 1999(1): 39-44. (Zhu Z D, Wang X M, Tian Y L, et al. Screening of fungicides for controlling phytophthora root rot of soybean[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 1999(1): 39-44. )

[3] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉根腐病的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 298. (Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary studies of phytophthora megasporperma on soybean in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(4): 298. )

[4] Burnham K D, Dorrance A E, Francis D M, et al. Rps 8, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*[J]. Crop Science, 2003, 43: 101-105.

[5] Gordon S G, St. Martin S K, Dorrance A E. Rps8 maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage Group F[J]. Crop Science, 2006, 46: 168-173.

[6] 朱振东, 霍云龙, 王晓鸣, 等. 一个抗大豆疫霉根腐病新基因的分子鉴定[J]. 作物学报, 2007, 33(1): 154-157. (Zhu Z D, Huo Y L, Wang X M, et al. Molecular identification of a novel Phytophthora resistance gene in soybean[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(1): 154-157. )

[7] Burnham K D, Francis D, Dorrance M, et al. Genetic Diversity patterns among phytophthora resistant soybean plant introductions based on SSR markers[J]. Crop Science, 2002, 42: 338-343.

[8] 韩英鹏, 李文滨, Terry R. Anderson, 等. 耐大豆疫霉根腐病 QTL 定位的研究[J]. 大豆科学, 2006, 25(1): 23-27. (Han Y P, Li W B, Anderson T R, et al. Mapping quantitative trait loci influencing tolerance to phytophthora root rot in soybean[J]. Soybean Science, 2006, 25(1): 23-27. )

[9] Yu K, Park S J, Poysa V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*) [J]. Genome, 1999, 42: 27-34.

[10] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196: 80-83.

[11] Trigiano R N, Caetano-Anolles G. Laboratory exercises on DNA amplification fingerprinting for evaluating the molecular diversity of horticultural species [J]. Hort Technology, 1998, 8: 413-423.

[12] Lander E S, Abrahamson G J, Barlow A. MapMaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. Genomics, 1987, 1: 174-181.

[13] Burnham K D, Dorrance A E, VanToai TT, et al. Quantitative trait loci for partial resistance to *phytophthora sojae* in soybean[J]. Crop Science, 2003, 43: 1610-1617.

[14] Diers B W, Mansur L, Imsande J, et al. Mapping phytophthora resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers[J]. Crop Science, 1992, 41: 1220-1227.