

# 大豆花叶病毒病和疫霉根腐病抗性的 SSR 标记辅助鉴定

韩英鹏,程 章,赵 雪,滕卫丽,李文滨

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室,东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**采用抗花叶病毒病品种东农 93046、抗疫霉根腐病品种 Conrad、耐疫霉根腐病品种合丰 25 和高产品种东农 L-5 两两杂交后再复交衍生的 146 个  $F_{2,5}$  重组自交系,利用与大豆花叶病毒病抗性基因相关的 SSR 标记 Satt114,与大豆疫霉根腐病抗性相关的分子标记 Satt325、Satt343、Satt428、Satt005、Satt600、Satt611、Satt689、Satt579、Satt252、Satt274 进行分子辅助鉴定,进而分别通过摩擦接种法和菌土法来验证分子辅助鉴定的准确性。结果表明:通过 Satt114 分子辅助鉴定共发现 32 个抗大豆花叶病毒病家系,经摩擦接种法表型验证其中 28 个家系表现为抗病,即分子辅助鉴定的准确性为 87.5%。通过与大豆疫霉根腐病相关的 10 个 SSR 标记的分子辅助鉴定,共发现 23 个家系含有 4~8 个抗性位点,经菌土法表型验证其中含有 4、5、6、7、8 个抗病位点家系的病害损失率分别可达 61.11%、47.08%、32.92%、26.11%、18.34%,即后代家系聚合越多的 QTL 则抗大豆疫霉根腐病能力越强。另外,本研究得到了 4 份既高抗大豆花叶病毒病又高抗大豆疫霉根腐病的新种质。

**关键词:**大豆花叶病毒病;大豆疫霉根腐病;抗病性;SSR 标记鉴定

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)06-0740-04

## SSR Identification of Soybean Line with Resistance to Both Soybean Mosaic Virus and Phytophthora Root Rot

HAN Ying-peng, CHENG Zhang, ZHAO Xue, TENG Wei-li, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Soybean mosaic virus (SMV) and phytophthora root rot (PRR) are both worldwide soybean diseases, which seriously affect the yield and quality of soybean. Selecting resistance varieties is one of the most effective measures to control these two diseases. Traditional program for varieties with resistance to disease is time-consuming, laborious and inefficient. SSR marker and molecular-assisted breeding make effective selection of varieties with resistance to disease possible. A recombinant inter-cross line population including 146  $F_{2,5}$  line was derived from a cross between  $F_1$  (Dongnong93046  $\times$  Hefeng25)  $\times$   $F_1$  (Congrad  $\times$  DongnongL-5). SSR marker Satt114, identified by Teng et al (2005), and Satt325, Satt343, Satt428, Satt005, Satt600, Satt611, Satt689, Satt579, Satt252, Satt274 identified by Li et al (2010) were used to analyze these RI line with resistance to SMV and PRR. Moreover, phenotypic analysis for SMV and PRR was used to evaluate SSR identification. A total of 32 lines are resistance to SMV, 28 of which are verified through friction inoculation test. The accuracy of molecular assisted breeding is 87.5%. A total of 23 lines have 4-8 resistance loci to PRR, loss rate of which are 61.11%, 47.08%, 32.92%, 26.11%, 18.34%, respectively. In this study, four lines are highly resistant to both SMV and PRR.

**Key words:** Soybean mosaic virus; Phytophthora root rot; Resistance; SSR identification

大豆花叶病毒病 (soybean mosaic virus, SMV) 和 大豆疫霉根腐病 (phytophthora root rot, PRR) 均是 世界性大豆病害,在我国大豆主产区均有发生,严 重影响大豆的产量和品质。种植抗病品种是控制 以上两种病害最有效的措施之一。传统抗病育种 仅靠经验和表型性状选择,费时、费力、效率低,随 着分子标记技术的应用及分子标记辅助育种理论 的提出,抗病育种效率不断提高<sup>[1]</sup>。SSR 标记因其 具有简便、易操作、费用低等特点,在大豆育种中被

广泛应用。

对于大豆花叶病毒病已经鉴定了 3 个抗性位 点,即 *Rsv1*、*Rsv3* 和 *Rsv4*,分别位于 F、B2 和 D1b 连 锁群<sup>[1]</sup>。李文福等利用 6 个与花叶病毒病抗性相 关的 SSR 分子标记对部分大豆种质资源进行分 析<sup>[2]</sup>。对于大豆疫霉根腐病已在 8 个位点鉴定了 14 个抗疫霉根腐病基因 (*Rps*)<sup>[1]</sup>。由于大豆疫霉菌 在与寄主抗病性互作中,毒力不断演变和快速进 化,新的生理小种不断出现,培育垂直抗性品种并

收稿日期:2013-10-14

**基金项目:**国家重点基础研究发展计划“973 计划”前期项目(2012CB126311);国家自然科学基金(31201227);国家“十二五”科技支撑计 划(2011BAD35B06-1);现代农业产业技术体系(CARS-04-PS04);中国博士后项目(20110491024);黑龙江省博士后项目 (LBH1220, LBH-TZ1210);黑龙江省教育厅骨干教师资助项目(1252G014);黑龙江省教育厅新世纪项目优秀人才的资助项目 (1253-NCET-005);教育部博士点项目(20122325120012);东北农业大学博士后启动金项目(2012RCB11)。

**第一作者简介:**韩英鹏(1978-),男,博士,副教授,主要从事分子辅助育种研究。E-mail: hyp234286@aliyun.com。

**通讯作者:**李文滨(1958-),男,博士生导师,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

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。Li 等<sup>[3]</sup>在耐病品种 Conrad 和合丰 25 上发现了 10 个耐病 QTL。目前,利用分子标记同时对大豆花叶病毒病和大豆疫霉根腐病进行分子辅助鉴定,还鲜见报道。

本研究利用与大豆花叶病毒病和大豆疫霉根腐病抗病基因位点紧密连锁的 SSR 标记,进行分子辅助筛选抗病后代,并对其花叶病毒病和疫霉根腐病抗病性进行鉴定;为培育抗病新品种奠定基础,以期减少大豆花叶病毒病和大豆疫霉根腐病对大豆生产造成的经济损失。

表 1 PCR 抗性位点标记  
Table 1 PCR primers used in present study

	引物 Primer	引物 1 Primer 1 5'-3'	引物 2 Primer 2 5'-3'	所在连锁群 Linkage group
耐大豆疫霉根腐病 Tolerant to PRR	Satt325	GCGGGGTATTAAGGGAACAAAA	GCGTAAACGAACAATCACITTCATA	F
	Satt343	CATGCGCGAAAGCGAAAG	TCCCAATTCACCTCTTCA	F
	Satt428	GCGCAGGAAAAAAACGCTTTTATT	GCGCAATCCACTAGGTGTTAAT	D1b
	Satt005	TATCCTAGAGAAGAACTAAAAAA	GTCGATTAGGCTTGAAATA	D1b
	Satt600	GCGATTGCTTATCTGATTAAAT	GCGGTTACGAAAATCGTAAATTGATG	D1b
	Satt611	GCGGGGAATAATAAGAATATGGAC	GCGCTTTCACTATGTGACCTGAATTA	D1b
	Satt689	AATTTTTTCTGTTGTCAGTGT	TGGAATGTAAATGTATGG	D1b
	Satt579	GCGAATTGGATTAATTAATTTATG	GCGCTCGGTCCTCTCAAATAAGGTCTC	D1b
	Satt252	GCGTTGTGCTTAACGTGTGATTT	GCGGACCAGCTAGTTTTTAATGTG	D1b
	Satt274	GCGGGGTCAATTAGTTTTCGTCAGTT	GCGCACGGTATATAATCGAACCTAT	D1b
抗大豆花叶病毒 Resistant to SMV	Satt114	GGGTTATCCTCCCAATA	ATATGGGATGATAAGGTGAAA	F

1.3 抗病性鉴定

对于大豆花叶病毒病,在温室采用摩擦接种法鉴定亲本和 146 个 F<sub>2:5</sub> 重组自交系的抗病性。病毒株系为东北 N1 株系,每次接种 10 株,接种 2 次,接种后 15~30 d,每隔 3 d 观察发病情况,待症状稳定后,记载供试材料的成株抗病反应类型。具体鉴定和统计参照滕卫丽等<sup>[4]</sup>的方法。

对于大豆疫霉根腐病,在温室采用菌土法盆栽接菌鉴定亲本和 146 个 F<sub>2:5</sub> 重组自交系群体的耐病性,其菌种于 2008 年采自黑龙江省佳木斯市自然发病的地块,每盆 5 株,每次 2 盆,2 次处理,3 次重复,具体鉴定和统计参照 Li 等<sup>[3]</sup>的方法。

2 结果与分析

2.1 重组自交系群体大豆花叶病毒病抗性评价及其 SSR 标记鉴定

利用与大豆花叶病毒病抗病基因位点紧密连

1 材料与方法

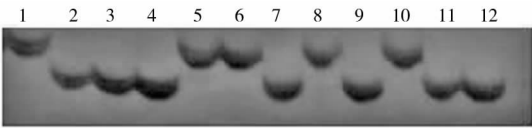
1.1 供试材料

抗花叶病毒病品种东农 93046 和耐疫霉根腐病品种 Conrad、耐疫霉根腐病品种合丰 25 和高产品种东农 L-5 两两杂交后再复交,衍生的 146 个 F<sub>2:5</sub> 重组自交系。

1.2 DNA 提取、检测及 SSR 标记辅助鉴定

亲本及重组自交系后代叶片总 DNA 提取与检测、PCR 反应体系、PCR 扩增条件及聚丙烯酰胺凝胶电泳等参照滕卫丽等<sup>[4]</sup>的方法。PCR 引物参照滕卫丽等<sup>[4]</sup>和 Li 等<sup>[3]</sup>的引物序列(表 1)。

锁的 SSR 标记 Satt114,对 146 个 F<sub>2:5</sub> 重组自交系进行分子辅助鉴定(图 1 为亲本及部分家系的基因型分型)。结果 32 个 F<sub>2:5</sub> 家系表现为抗病类型,114 个 F<sub>2:5</sub> 家系表现为感病。利用摩擦接种法对 146 个 F<sub>2:5</sub> 重组自交系进行接种验证,结果 32 个 F<sub>2:5</sub> 家系



1~12 分别代表东农 93046, Conrad, 东农 L-5, 家系 K0014, 家系 K0031, 家系 K0205, 家系 K0155, 家系 K0127, 家系 K0372, 家系 K0001, 家系 K0140 和家系 K0031。

1-12 represents Dongnong 93046, Conrad, Dongnong L-5, line K0014, line K0031, line K0205, line K0155, line K0127, line K0372, line K0001, line K0140 and line K0031, respectively.

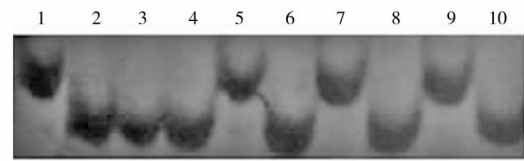
图 1 利用 Satt114 对亲本及部分家系基因型进行分型  
Fig. 1 Genotyping of parents and some recombinant intercross line through Satt114 marker

中的28个家系表现为抗病,即分子辅助鉴定的准确性为87.5%。

## 2.2 重组自交系群体大豆疫霉根腐病抗性评价及其SSR标记鉴定

利用与大豆疫霉根腐病抗病QTL紧密连锁的SSR标记Satt325、Satt343、Satt005、Satt428、Satt600、Satt611、Satt252和Satt274对146个F<sub>2:5</sub>家系进行分子辅助鉴定(图2为亲本及部分家系的基因型分型),并且在温室采用菌土法盆栽接菌鉴定亲本和146个F<sub>2:5</sub>家系对疫霉根腐病的抗病性。结果表明后代家系聚合越多的QTL,其抗大豆疫霉根腐病能力越强(表1)。如家系K0046、K0145、K0256聚合了4个抗病QTL,其病害损失率分别为61.67%、58.33%和63.33%;K0033、K0043、K0276、K0366聚合了5个抗病QTL,其家系平均损失率为47.08%;K0016、K0170、K0205、K0042、K0068、K0142、K0376、K0359聚合了6个抗病QTL,其家系平均损失率为

32.92%;K0014、K0031、K0038、K0102、K0326、K0045聚合了7个抗病QTL,其家系平均损失率为26.11%;K0080、K0372聚合了8个大豆疫霉抗病QTL,其家系平均损失率为18.34%。



1~10 分别代表 Conrad,东农 93046,东农 L-5,合丰 25,家系 K0042,家系 K0100,家系 K0127,家系 K0044,家系 K0326 和家系 K0018。

1-10 represents Conrad, Dongnong 93046, Dongnong L-5, Hefeng 25, line K0042, line K0100, line K0127, line K0044, line K0326 and line K0018, respectively.

图2 利用 Satt325 对亲本及部分家系基因型进行分型

Fig.2 Genotyping of parents and some recombinant intercross line through Satt325 marker

表1 重组自交系群体的疫霉根腐病抗病鉴定结果

Table 1 Evaluation of RIL with resistance to phytophthora root rot

家系编号 Line No.	Satt325	Satt343	Satt005	Satt428	Satt600	Satt611	Satt579	Satt689	Satt252	Satt274	标记数量 Marker number	损失率 Loss ratio/%
K0046			✓	✓			✓	✓			4	61.67
K0145					✓	✓	✓	✓			4	58.33
K0256	✓	✓					✓	✓			4	63.33
平均 Mean												61.11
K0033				✓	✓	✓	✓	✓			5	43.33
K0043	✓	✓			✓	✓			✓		5	48.33
K0276	✓	✓			✓	✓		✓			5	50.00
K0366			✓		✓	✓	✓			✓	5	46.67
平均 Mean												47.08
K0016	✓	✓		✓	✓	✓				✓	6	28.33
K0170	✓	✓			✓	✓	✓	✓			6	33.33
K0205		✓	✓	✓			✓	✓		✓	6	41.67
K0042	✓	✓			✓	✓	✓	✓			6	28.33
K0068	✓	✓	✓	✓			✓	✓			6	38.33
K0142	✓	✓	✓	✓					✓	✓	6	41.67
K0376	✓	✓			✓	✓	✓	✓			6	31.67
K0359	✓	✓			✓	✓	✓	✓			6	20.00
平均 Mean												32.92
K0014	✓	✓			✓	✓	✓	✓		✓	7	31.67
K0031	✓	✓		✓			✓	✓	✓	✓	7	33.33
K0038	✓	✓		✓		✓	✓	✓		✓	7	20.00
K0102	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓			7	25.00
K0326	✓	✓			✓	✓	✓	✓		✓	7	18.33
K0045	✓	✓			✓	✓	✓	✓		✓	7	28.33
平均 Mean												26.11
K0080	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	8	21.67
K0372	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	8	15.00
平均 Mean												18.34

对照亲本损失率:合丰 25(A)=10%,东农 L-5(B)=100%,东农 93-046(C)=100%,Conrad(D)=0。

Loss ratio of control parents:Hefeng25(A)=10%,Dongnong L-5(B)=100%,Dongnong 93-046(C)=100%,Conrad(D)=0。

### 2.3 大豆花叶病毒病和大豆疫霉根腐病抗病性的分子聚合

在本研究中,后代品系 K0014、K0031、K0326、K0372 聚合了 7 或 8 个大豆疫霉根腐病抗病 QTL,且含有大豆花叶病毒病抗病基因位点 Satt114;其大豆疫霉根腐病病害损失率分别为 31.67%、33.33%、18.33%、15.00%,且高抗大豆花叶病毒病 N1 株系,这些品系均具有较高的抗病育种利用价值。

### 3 结论与讨论

由单基因控制的质量性状标记辅助选择的效果,主要取决于分子标记与目的基因的连锁距离,标记与目的基因的距离越近,同源重组的机会越小,选择的可靠性就越大。本研究利用与大豆花叶病毒病抗病基因位点相关的分子标记 Satt114,进行抗性后代品系的筛选,其与抗性基因遗传距离相对较近,其鉴定准确性可达 87.5%。可见,应用该分子标记可以提高抗病材料选择的可靠性,揭示了在分子水平上直接对目标性状进行选择的可能性。

与单基因控制的质量性状相比,对于数量性状的家系分子鉴定技术难度还很大。考虑到研究成本和工作量而产生的作图群体大小和结构、环境重复、标记数目等因素的限制,分子鉴定的准确性和精确度目前尚达不到育种需求<sup>[1,5]</sup>。另外,已经定位的大豆重要性状的主效 QTL/基因不是很多,可用于分子鉴定的主效 QTL/基因更有限。在大豆抗病分子鉴定方面,除大豆胞囊线虫病的抗性分子鉴定外,其他病害抗性分子鉴定应用较少<sup>[1,6-7]</sup>。Li 等<sup>[3]</sup>在合丰 25 和 Conrad 上发现 10 个主效 QTL,其能够解释 7.2%~17.6% 的表型变异。

基因聚合就是将分散在不同品种中的有用基因聚合到同一个基因组中,基因聚合育种就是通过传统杂交、回交、复交技术将有利基因聚合到同一个基因组,在分离世代中通过分子标记选择含有多个目标基因的家系,从中再选出农艺性状优良的家系,实现有利基因的聚合<sup>[8-10]</sup>。本研究利用抗花叶病毒病品种东农 93046 和耐疫霉根腐病品种 Conrad 及耐疫霉根腐病品种合丰 25 和高产品种东农 L-5 两两杂交后再复交,衍生 146 个 F<sub>2:5</sub> 重组自交系;并且通过分子辅助鉴定发现 4 个后代家系聚合了 7 个

以上大豆疫霉抗病 QTL 且含有大豆花叶病毒病抗病基因。借助分子标记辅助鉴定可以有效地对多个抗性基因同时进行选择,将来自不同抗源的抗性基因聚合到一个品种之中,以提高抗性、拓宽抗谱,达到持久抗性的目的。

### 参考文献

- [1] 李文滨,韩英鹏.大豆分子标记及辅助选择育种技术的发展[J].大豆科学,2009,28(15):917-925. (Li W B, Han Y P. Development of soybean molecular markers and molecular marker assistant breeding[J]. Soybean Science, 2009, 28(15): 917-925.)
- [2] 李文福,刘春燕,于妍,等.大豆种质资源对东北 SMV1 号和 3 号株系的抗性鉴定[J].中国油料作物学报,2009,31(1):94-96. (Li W F, Liu C Y, Yu Y, et al. Identification of the resistance of soybean germplasm to SMV1 and SMV3 strain in northeastern China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2009, 31(1): 94-96.)
- [3] Li X P, Han Y P, Teng W L, et al. Pyramided QTL underlying tolerance to *Phytophthora* root rot in mega-environments from soybean cultivars 'Conrad' and 'Hefeng 25' [J]. Theory and Applied Genetics, 2010, 121: 651-658.
- [4] 滕卫丽,李文滨,邱丽娟,等.大豆 SMV3 号株系抗病基因的 SSR 标记[J].大豆科学,2005,24(3):245-249. (Teng W L, Li W B, Qiu L J, et al. Identification of SSR marker linked to the resistance gene of SMV3 in soybean[J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 245-249.)
- [5] Allen F L. Usefulness of plant genome mapping to plant breeding [M]// Gresshoff P. Plant Genome Analysis, Boca Raton: CRC Press, 1994: 11-18.
- [6] Chang W, Dong L M, Wang Z Z, et al. QTL underlying resistance to two HG types of *Heterodera glycines* found in soybean cultivar 'L-10' [J]. BMC Genomics, 2011, 13: 12.
- [7] Concibido V C, Lange D A, Denny R L, et al. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in 'Peking', PI 90763, and PI 88788 using DNA markers [J]. Crop Science, 1997, 37: 258-264.
- [8] Ishii T, Brar D S, Multani D S, et al. Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice, *O. sativa* [J]. Genome, 1994, 37: 217-221.
- [9] Nair S, Kumar A, Srivastava M N, et al. PCR based DNA markers linked to a gall midge resistance gene, *Gm4t*, has potential for marker-aided selection in rice [J]. Theory and Applied Genetics, 1996, 92: 660-665.
- [10] Narvel J M, Walker D R, Rector B G, et al. A retrospective DNA marker assessment of the development of insect resistant soybean [J]. Crop Science, 2001, 41: 1931-1939.