

大豆花叶病毒病 N1 株系抗性基因定位分析

韩英鹏 赵 雪 高赛男 李海燕 李文滨

(东北农业大学 农学院 大豆生物学教育部重点实验室 农业部北方大豆生物学与遗传育种区域重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 对大豆花叶病毒病 N1 株系不同抗性材料东农 93046(抗)与品 1246(感)所衍生的 $F_{8:9}$ 代群体进行成株抗性鉴定,同时利用分子标记对其抗性基因进行确认并获得用于分子辅助选择的分子标记。结果表明: $F_{8:9}$ 代抗病家系数与感病家系数基本符合 1:1 的比例,说明东农 93-046 对 N1 株系的成株抗性表现为质量性状,其抗性受一对等位基因控制。同时,根据前人研究结果利用 76 个 SSR 分子标记对父母本进行筛选,构建了一个包括 13 个 SSR 分子标记的 F 连锁群的遗传连锁图谱,并且单标记分析法和复合区间分析法的结果均表明东农 93-046 抗性基因位点位于 SSR 分子标记 Satt114 附近,对后代群体中抗病和感病株系各 60 份进行分子标记准确性评价,结果表明 Satt114 选择准确率可达 80.00%,这为分子标记辅助选择奠定了良好的基础。

关键词: 大豆;大豆花叶病毒病;抗性基因定位;分子辅助选择

中图分类号: S511 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.03.0408

Mapping of Gene with Resistance to Soybean Mosaic Virus Strain N1

HAN Ying-peng, ZHAO Xue, GAO Sai-nan, LI Hai-yan, LI Wen-bin

(Agronomy College, Northeast Agricultural University/Chinese Education Ministry's Key Laboratory of Soybean Biology/Key Laboratory of Northeastern Soybean Biology and Breeding (Genetics) of Chinese Agriculture Ministry, Harbin 150030, China)

Abstract: Soybean mosaic virus (SMV) is one of the most widely distributed viral disease in soybean producing areas, which seriously impact on soybean yield and quality. Molecular marker assisted breeding was one of the most effective methods to select a resistance line. The aim of this study is to confirm the resistance gene of Dongnong 93-046 through a $F_{8:9}$ populations from a cross between Dongnong 93-046 and Pin1246, to map the resistance gene, and to develop associated markers. The results showed resistance line number: susceptible line number is 1:1 in the $F_{8:9}$ generation, which showed that the resistance of Dongnong 93-046 was controlled by a pair of alleles. A total of 76 SSR molecular markers were screened between parents. A total of 13 SSR markers in linkage group F were used to construct a genetic map. The single marker analysis and composite interval analysis results show that a Dongnong 93046 resistance gene was located near the SSR marker Satt114. A total of 60 susceptible lines and 60 resistance lines were used to evaluate accuracy of the marker, the accuracy rate of this marker was 80%. It offered a good foundation for molecular marker assisted selection.

Keywords: Soybean; Soybean mosaic virus; Mapping of resistance gene; Molecular assistant selection

大豆花叶病毒病(soybean mosaic virus, SMV)是世界性大豆病害之一,严重影响大豆的产量和品质。针对不同大豆产区优势 SMV 株系进行抗性品种的培育是降低产量损失和保证大豆品质的有效措施。迄今为止,除了对大豆种质资源进行不同 SMV 株系的抗性评价和抗病资源的筛选研究以外,对大豆花叶病毒病抗病遗传控制方面的研究多有报道,并获得抗性位点和连锁分子标记,同时在分子辅助选择育种实践中得到应用。目前已鉴定出 3 个 SMV 抗性基因位点 *Rsv1*、*Rsv3* 和 *Rsv4*。这 3 个

抗性基因位点均存在着多个等位基因^[1],其分别位于 13 号染色体(LG F)、2 号染色体(LG B2)和 4 号染色体(LG D1b)上^[2-3]。目前,SMV 抗性基因定位不断取得新的进展,多项研究表明,国内的抗性材料主要携带 *Rsv1* 和 *Rsv4* 基因^[4-8]。大豆花叶病毒病 N1 抗性品系东农 93-046 已在一个遗传背景条件下证明了其抗性,并开发了相应的分子标记,尚未在其它遗传背景条件下证明其抗性,并开发了相应的分子标记^[8]。本研究将利用抗源东农 93-046 与品 1246 进行杂交,并对其 $F_{8:9}$ 代群体进行成株抗性鉴

收稿日期: 2015-12-15

基金项目: 黑龙江省普通高等院校新世纪优秀人才培养计划(1253-NCET-005)。

第一作者简介: 韩英鹏(1978-),男,教授,博导,主要从事大豆遗传育种工作。E-mail: hyp234286@aliyun.com。

通讯作者: 李文滨(1958-),男,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究和分子生物技术研究。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

定,同时利用分子标记对其抗性基因进行确认并开发相应的分子标记,旨在为大豆抗花叶病毒病育种奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 材料

抗源东农 93-046 对东北地区花叶病毒病优势株系 N1 具有较强抗性,品 1246 对东北地区花叶病毒病优势株系 N1 表现为强感病,二者杂交形成的 $F_{8;9}$ 代群体材料,均由东北农业大学大豆研究所保存。

1.2 方法

将亲本及 $F_{8;9}$ 代群体材料种植于东北农业大学香坊实验实习基地,随机区组试验设计,行长 3 m,行距 0.6 m,株距 0.05 m,3 次重复,常规田间管理。采用摩擦接种法对每个家系接种 10 株,3 次重复;表型鉴定及基因型鉴定参照卢双勇等^[8]的方法进行。

1.3 数据分析

图谱构建采用 Mapmaker/EXP Version 3.0b^[9] 软件构建,抗性基因定位参照卢双勇等^[8]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 群体后代家系对大豆花叶病毒病 N1 株系的抗病表现分析

对东农 93046 × 品 1246 组合的 $F_{8;9}$ 代群体进行成株抗性鉴定, $F_{8;9}$ 代群体抗病性表现为明显的抗病和感病,本研究将用于基因定位的表型数据分为抗、感两种级别,结果如表 1 所示。统计作图群体对大豆花叶病毒病 N1 株系的成株抗病性,抗病家系数与感病家系数基本符合 1:1 的比例,说明东农 93-046 对 SMV N1 株系的成株抗性表现为质量性状,其抗性受一对等位基因控制。

表 1 作图群体对 SMV N1 和 N3 株系成株抗性和表现

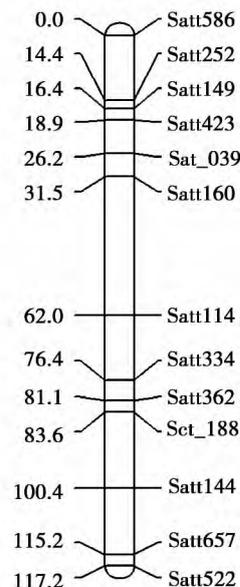
Table 1 The distribution of plant resistance to N1 strains in mapping population

组合 Cross	SMV 株系 SMV strain	株系数 Number of plants			实际比率 Actual ratio	期望比率 Expected ratio
		群体大小 Population size	抗 Resistant	感 Susceptible		
东农 93-046 × 品 1246	N1	152	82	70	1.17:1	1:1

2.2 作图群体后代家系对大豆花叶病毒病 N1 株系的抗病表现分析

根据滕卫丽等^[10]利用东农 93-046 × 合丰 25 组合的 F_2 抗感池小群体定位结果,抗病品系东农 93-046 对 SMV N1 株系的抗病基因位点位于大豆 F 连锁群。据此本研究进一步利用东农 93-046 × 品 1246 组合后代群体针对 F 连锁群进行遗传连锁图谱的构建及抗病基因的定位,验证前人结果同时开发在此遗传背景条件下的实用化分子标记。

利用来自大豆整合遗传图谱 composite2003 (www.soybase.org) F 连锁群(13 号染色体)中 76 个 SSR 标记对东农 93-046 × 品 1246 组合进行差异引物筛选,在父母本间共发现 34 个 SSR 分子标记具有显著的差异性,利用筛选得到的差异引物对作图群体进行 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,共有 13 个 SSR 标记在作图群体上具有显著的多态性,通过 Mapmaker 3.0 软件进行连锁分析获得作图群体 F 连锁群遗传图谱(图 1),该连锁群全长 117.5 cM,标记平均距离 9.00 cM。



图中左侧数据为遗传距离,单位为 cM。

The number displayed on the left is genetic distance with unit cM.

图 1 作图群体 F 连锁群遗传图谱

Fig. 1 Linkage group F of two mapping population

2.3 单标记法定位 N1 株系抗性基因位点

利用单标记分析和复合区间作图两种方法对作图群体进行 SMV N1 抗性进行基因定位。单标记分析结果如表 2 所示,东农 93-046 × 品 1246 对 N1 株系的成株抗性基因定位结果表明 SSR 分子标记 Satt362、Satt114 和 Satt334 与 N1 株系的成株抗性显著相关,遗传贡献率分别为 19.39%、44.97% 和 29.63%。

2.4 复合区间作图法定位 N1 株系抗性基因位点

利用复合区间作图法对抗病基因进行初步定位,东农 93-046 × 品 1246 对 N1 株系的成株抗性基

因定位结果表明 SSR 分子标记 Satt114 和 Satt334 与 N1 株系的成株抗性显著相关,遗传贡献率分别为 79.96% 和 79.48%。

表 2 单标记分析法定位 SMV 抗性基因位点

Table 2 Markers linked with SMV resistant genetic loci mapped by single marker analysis

SMV 株系	标记	LOD 值	贡献率	效应值
SMV strain	Marker	LOD value	R ² /%	EstA
N1	Satt362	7.89	19.39	-0.23
	Satt114	19.02	44.97	-0.31
	Satt334	10.09	29.63	-0.28

表 3 复合区间作图法定位 SMV 抗性基因位点

Table 3 SMV resistant genetic loci mapped by composite interval mapping

性状	作图群体	SMV 株系	QTL	左标记	右标记	LOD 值	贡献率	效应值
Trait	Population	SMV strain	QTL	Left marker	Right marker	LOD value	R ² /%	EstA
SMV 抗性	pop2	N1	Rspn1-2	Satt114	Satt334	22.7	79.96	-0.47
SMV resistance								

2.5 N1 株系连锁分子标记的分子辅助效果评价

综合分析利用单标记分析及复合区间作图法的定位结果,可以发现分子标记 Satt114、Satt510、Satt362 和 Satt334 与抗病位点紧密连锁,可作为分子辅助选择育种的候选标记。进一步从群体中选取抗病和感病株系各 60 份(分别为 N1 抗和感病家系)统计单标记及复合区间定位分析获得的连锁分子标记基因型与表型的符合程度,评价各标记分子辅助选择抗性材料的准确率(表 4),其中 Satt114 选择准确率最高为 80.00%,可作为分子辅助选择的首选标记,同时可结合其它标记进行辅助选择可进一步提高选择的准确性。

表 4 抗病基因位点侧翼标记基因型与表型符合程度统计

Table 4 The accordance ratio between phenotypes of progenies and genotypes of resistant loci linked markers

标记	pop2(120 株系)		表型与标记符合程度
	抗 R	感 S	
Marker			CR /%
Satt114	96	24	80.00
Satt362	78	42	65.00
Satt334	85	35	70.83
平均值 Mean	86.33	33.67	71.11

3 结论与讨论

迄今为止针对大豆花叶病毒病,已有 3 个主要抗病基因位点被报道,包括 *Rsv1*、*Rsv3* 和 *Rsv4*,分别定位在大豆的不同连锁群(染色体)上^[2-3],国内外对大豆花叶病毒病不同株系抗性研究及抗病位点

挖掘均围绕这 3 个位点展开。*Rsv1* 是第一个被报道大豆花叶病的抗病位点,并在多数大豆种质资源中普遍存在,被定位在大豆 13 号染色体(F 连锁群)上^[11]。Gore 等^[12]利用 24 个分子标记建立了 *Rsv1* 位点高密度图谱,SOYHSP176 (2.9 cM) 和 Satt510 (2.4 cM) 为 *Rsv1* 的侧翼标记。在大豆品种 J05 中 *Rsv1* 基因被定位在 13 号染色体的 Sat_154 和 Satt510 之间,遗传距离为 0.5 和 2.3 cM^[13]。本研究涉及的抗病品系东农 93-046,其抗病位点初步定位在 F 连锁群的 SSR 标记 Satt114 附近,说明东农 93-046 所携带的抗病基因可能为 *Rsv1* 位点的一个等位基因。

根据现有文献报道,目前在 *Rsv1* 位点内共发现 8 个不同等位基因,分别为 *Rsv1-h* (Suweon 97), *Rsv1-k* (Kwanggyo), *Rsv1-m* (Marshall), *Rsv1-n* (PI 507389), *Rsv1-r* (Raiden), *Rsv1-s* (LR1), *Rsv1-t* (Ogden) 和 *Rsv1-y* (York), 并且研究表明这些 *Rsv1* 等位基因通常对低毒力大豆花叶病毒病株系具有抗性,但对高毒力大豆花叶病毒病株系会产生感病反应或致死效应。而本研究表明东农 93-046 对大豆花叶病毒病 N1 株系的抗性表现为全生育期免疫,即不论在生育前期还是生育后期其抗性一直存在,这与 *Rsv4* 位点不同生育时期抗病反应表现不同;而 SMV N1 株系群是主要流行株系但为低毒株系,即东农 93-046 抗病机制与前人研究报道的 *Rsv1* 位点的抗病机制也相类似。

参考文献

- [1] Cho E K, Goodman R M. Strain of soybean mosaic virus: Classification based on virulence in resistant soybean cultivars [J]. *Phytopathology*, 1979, 69: 467-470.
- [2] Buss G R, Ma G, Chen P, et al. Registration of V94-5152 soybean germplasm resistance to soybean mosaic virus potyvirus [J]. *Crop Science*, 1997, 37: 1987-1988.
- [3] Kiihl R, Hartwig E. Heritance of reaction to soybean mosaic virus in soybean [J]. *Crop Science*, 1979, 19: 372-375.
- [4] 李文福, 刘纯燕, 高运来, 等. 大豆种粒斑驳抗性的遗传分析及基因定位 [J]. *作物学报*, 2008, 34(9): 1544-1548. (Li W F, Liu C Y, Gao Y L, et al. Genetic Analysis and mapping of resistance gene to seed coat mottle in soybean [J]. *Crop Journal*, 2008, 34(9): 1544-1548.)
- [5] Fu S X, Zhan Y, Zhi H J, et al. Mapping of SMV resistance gene *Rsc-7* by SSR markers in soybean [J]. *Genetica*, 2006, 128: 63-69.
- [6] Li H C, Zhi H J, Gai J Y. Inheritance and gene mapping of resistance to soybean mosaic virus strain SC14 in soybean [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48(12): 1466-1472.
- [7] 郑翠明, 常汝镇, 邱丽娟. 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*, 2001, 34(1): 1-4. (Zheng C M, Chang R Z, Qiu L J. RAPD analysis of resistance gene to soybean mosaic virus [J]. *Chinese Agricultural Science* 2001, 34(1): 1-4.)
- [8] 卢双勇, 滕卫丽, 韩英鹏, 等. 大豆抗花叶病毒及耐疫霉根腐病的 SSR 分析 [J]. *大豆科学*, 2008, 27(5): 746-750. (Lu S Y, Teng W L, Han Y P, et al. SSR analysis of soybean mosaic virus and phytophthora root rot [J]. *Soybean Science*, 2008, 27(5): 746-750.)
- [9] Lander E S, Green P, Abrahamson J. MapMaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural population [J]. *Genomics*, 1987, 1: 174-181.
- [10] 滕卫丽. 大豆抗花叶病遗传、细胞超微结构分析及基因定位 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006. (Teng W L. Inheritance of resistance to SMV cellular ultrastructure analysis and resistance gene mapping in soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006.)
- [11] Yu Y. GRFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance [J]. *Phytopathology*, 1994, 84(1): 60-6479.
- [12] Gore M A, Hayes A J, Jeong S C, et al. Mapping tightly linked genes controlling potyvirus infection at the *Rsv1* and *Rpv1* region in soybean [J]. *Genome* 2002 45: 592-599.
- [13] Shi A, Chen P Y, Li X, et al. Genetic confirmation of 2 independent genes for resistance to soybean mosaic virus in J05 soybean using SSR markers [J]. *Journal of Heredity*, 2008, 99(6): 598-603.

大豆异黄酮、B 族维生素、蛋白质—腐乳让三大营养升级

腐乳色泽鲜亮、风味独特,是我国自创的一种调味品,也是很多人家中必不可少的小菜。腐乳因口感与奶酪类似,同样经过发酵,富含蛋白质和钙,被外国人称为“中国奶酪”。

1. 腐乳家族成员多

要了解腐乳,得先知道它是怎么制作的。腐乳的基本做法是将豆腐切成小块后接种经过筛选的毛霉菌,毛霉菌发酵后,豆腐表面长出一层毛茸茸的菌丝。然后,再加一定量的盐,以及香辛料、糖、红曲、醪糟等调味后,装罐闷几个月就是腐乳了。

因为配料不一样,工艺细节不同,腐乳家族的成员可不少。白腐乳不加任何辅料,就是呈本色的腐乳;红腐乳则是由腌坯加红曲、白酒、面曲和蛋白酶等发酵而成,红曲中含有洛伐他丁,具有降血压、降血脂等作用;青腐乳就是臭豆腐,腌制中加入了苦浆水、盐水而呈豆青色,比其他品种发酵得更彻底,其中含硫的氨基酸因被分解成硫化氢和氨而有臭味;花腐乳一般会添加辣椒、芝麻、香油、火腿、白菜、香菇等,其营养素最全。

2. 腐乳营养“出于蓝而胜于蓝”

腐乳有“大豆奶酪”、“中国奶酪”的美誉。不过,无论是与奶酪还是其原材料大豆相比,腐乳在营养上都具有独特的优势。

大豆异黄酮活性增加,防癌抗氧化。大豆经发酵成腐乳后,其中的大豆异黄酮活性增加,具有较强的抗氧化作用,有利于清除体内的自由基和防止脂质过氧化,对心血管疾病和某些肿瘤也有一定预防作用。

B 族维生素增加。由于微生物的作用,腐乳中产生的维生素 B2、维生素 B12、烟酸等 B 族维生素含量有所提升,尤其是维生素 B2 含量是豆腐的 3 倍,维生素 B12 含量仅次于动物肝脏,而发酵之前的大豆中几乎不含维生素 B12,所以腐乳可是素食者补充维生素 B12 的良好来源。

蛋白质利用率提高。大豆所含的蛋白质经微生物的酶水解后,产生很多小分子肽及游离氨基酸,容易消化吸收,使得腐乳中蛋白质的利用率从整粒熟大豆的 65.3% 升高到 96%,而且部分小分子肽有控血压作用。

3. 高盐是最大短板

腐乳营养价值与豆腐相比有过之而无不及,但在制作过程中为了终止毛霉菌的活性,会放入大量盐,这就注定腐乳是一种高盐食品,这也是它最大的短板,其含盐量约占 5%~10%。因此,吃腐乳时不仅要控制量,而且要适当限制其他形式盐的摄入,尤其是高血压、心脑血管病、肾病患者等更要少吃。

建议大家除了将腐乳当咸菜搭配主食吃,还可做成腐乳花卷,风味独特。将腐乳入菜也是别有滋味,而且不需要额外放盐,腐乳爆肉、腐乳空心菜、腐乳排骨等都是经典做法。把腐乳当作火锅调料或在烤鱼时作为腌制调料也是不错的选择。

转自人《生命时报》