

基因拷贝数变异分析法研究大豆胞囊线虫病抗性位点 *qSCN3-3* 抗性相关基因

朱治佳, 赵 雪, 罗 健, 臧紫薇, 韩英鹏, 李文滨

(东北农业大学 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: 基因拷贝数变异 (CNVs) 是引起大豆品种对胞囊线虫抗性差异的因素之一, 以抗大豆胞囊线虫病种质东农 L-10 以及感病种质黑农 37、绥农 10 和绥农 14 为试验材料, 利用实时荧光定量 PCR 法对大豆胞囊线虫抗性 QTL 位点 *qscn3-3* 内 27 个编码基因进行拷贝数变异分析, *F* 测验表明 15 个目的基因在不同品种间存在拷贝数变异; 抗感病品种 PCR 产物丰度相对值分析结果表明 9 个目的基因拷贝数在抗感病种质间存在显著的差异, 推测其功能是通过编码抗病蛋白和富亮氨酸蛋白来实现大豆对大豆胞囊线虫相关抗性。
关键词: 大豆; 胞囊线虫抗性; 荧光定量 PCR; 拷贝数变异
中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2017.02.0199

Research on the Resistance Genes Related to Soybean Cyst Nematode Resistance Loci *qSCN3-3* with the Copy Number Variation Analysis

ZHU Zhi-jia, ZHAO Xue, LUO Jian, ZANG Zi-wei, HAN Ying-peng, LI Wen-bin

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

Abstract: Gene copy number variants (CNVs) can cause the difference in soybean resistance to soybean cyst nematode (SCN). In this study, four soybean germplasms including Dongnong L-10 (resistant to SCN), Heinong 37, Suinong 10 and Suinong 14 (susceptible to SCN) were selected to analyze the CNVs of 27 genes in the genomic region of SCN resistance related quantitative trait loci (QTL) '*qscn3-3*' using the method of real-time quantitative PCR. The result of *F* test showed that the copy number of 15 genes were different among four soybean germplasms. A total of 9 genes showed significant difference in copy number between Dongnong L-10 and the other three susceptible germplasms. It was speculated that its function was accomplished by coding disease-resistant protein and leucine rich protein for SCN resistance.
Keywords: Soybean; Cyst nematode resistance; Copy number variation; Real-time quantitative PCR

大豆胞囊线虫病是一种严重危害大豆生产的毁灭性病害^[1], 一般情况下其可使产量损失达 5%~10%, 严重地块可达 30% 以上^[2]。黑龙江省每年受害面积高达 66.7 万 hm^2 ^[3]。抗病基因位点的挖掘及利用是分子辅助选育抗大豆胞囊线虫病品种的最有效手段之一。目前, 已报道的主效抗病基因位点有 *rhg1*、*rhg2*、*rhg3*、*rhg4*、*Cqscn003* 等^[4], 其中 *rhg1* 和 *rhg4* 是大豆胞囊线虫病 3 号生理小种的主效抗性位点, 其抗病机制也研究最为深入。*rhg1* 抗病机制是由一段长约 31 kb 的基因组区域上的 3 个基因共同控制的^[5]。*rhg4* 抗病机制是通过编码丝氨酸羟甲基转移酶来控制丝氨酸和甘氨酸的互变从而实现的^[6]。

基因拷贝数变异 (CNVs) 是一种大小为 1 kb~3

Mb 的 DNA 片段的缺失、重复、倒位和易位, 其广泛存在于基因组中^[7]。Cook 等^[5]利用纤维荧光原位杂交技术对感病材料 Williams 82 和抗病材料 Peking、Fayette 进行 *rhg1* 位点检测, 结果检测到一段 31 kb 重复序列的拷贝数变异; Maydan 等^[8]利用阵列比较基因组杂交方法对 12 个自然分离的秀丽云杆线虫小种进行基因组拷贝数检测, 结果检测到 510 个缺失, 其可影响 1 136 个基因的表达; LEE 等^[9]利用荧光定量 PCR 和全基因组鸟枪法测序方法对 106 份抗病种质进行检测, 结果证实了 *rhg1* 位点一段 31.2 kb 重复序列的 4 种不同单倍型。前人对于 *rhg1* 区段的拷贝数变异进行了详尽的分析, 证明拷贝数变异是大豆对胞囊线虫产生抗性的重要机制, 为其它位点的作用机制解析提供了新思路。

收稿日期: 2017-01-11
基金项目: 省自然科学基金面上项目 (C2015011); 国家自然科学基金 (31301339, 31671717); 黑龙江东北农业大学学术骨干计划项目 (15XG04); 东北农业大学青年才俊计划项目 (14QC27)。
第一作者简介: 朱治佳 (1990 -), 男, 硕士, 主要从事分子辅助育种研究。E-mail: m15546077313@163.com。
通讯作者: 韩英鹏 (1978 -), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究和分子生物技术。E-mail: hyp234286@aliyun.com;
李文滨 (1958 -), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究和分子生物技术。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

本研究前期报道 SCN 抗性相关 QTL 位点 *qscn3-3*,该位点内存在多个抗病基因簇,可能参与大豆对 SCN 的抗性^[10],本研究以抗大豆胞囊线虫病种质东农 L-10 以及感病种质黑农 37、绥农 10 和绥农 14 植株根部为研究材料,利用实时荧光定量 PCR 方法对 *qscn3-3* 内基因拷贝数变异进行分析,以期对 *qscn3-3* 位点内抗病候选基因的确定和作用机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆胞囊线虫多小种抗性大豆种质东农 L-10 植株根部为抗病位点供体材料,其平均雌虫指数为

1.46^[11];感病大豆品种黑农 37,绥农 10 和绥农 14 植株根部为参照材料,其平均雌虫指数分别为 79.3,70.07 和 72.55^[11]。试验材料由东北农业大学大豆研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采取 SDS 小量法提取大豆基因组 DNA^[12],采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和 NanoDrop® Lite 紫外分光光度计联合检测 DNA 浓度并通过稀释实现浓度均一化,−20℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成 利用 Primer Express 软件设计大豆内参基因 β -actin 及抗病位点内候选基因引物(表 2),引物由华大生物科技有限公司合成。

表 1 基因及 PCR 引物信息
Table 1 The information of genes and primers

基因 ID 号 Gene ID	引物 Name	CNV 引物序列(5′-3′) Primer sequence(5′-3′)	退火温度 Tm/℃	扩增片段 Amplicon size/bp	GC 含量 GC content/%
Glyma. 16G175000	CNV1-F	TCAATCACCTTTGCCTTTCTG	51.3	280	40.0
	CNV1-R	ATCCGAAACATTATGAACCC	51.3		40.0
Glyma. 16G190000	CNV2-F	AGTCCTCTGCCACAGCGTCAC	61.5	114	61.9
	CNV2-R	TCCACCAAAGCTCCATCTCC	57.4		55.0
Glyma. 16G190200	CNV3-F	ATGGGTATCAAGTATGTGGA	51.3	149	40.0
	CNV3-R	GGTTCATTATAGTGAGGGAGT	53.7		42.9
Glyma. 16G190400	CNV4-F	GGGACAGGATCACTGAGTTA	55.4	370	50.0
	CNV4-R	AAATAGAAGAGGGAACACCAA	52.1		36.4
Glyma. 16G190500	CNV5-F	TGACCTCCTTGACTCACCTC	57.4	158	55.0
	CNV5-R	CCACATACTTGATACCCATTC	53.7		42.9
Glyma. 16G191300	CNV6-F	TGGTGCATCAGGGAACAATT	53.4	106	45.0
	CNV6-R	GAAAGCTGGGACCTAACTGC	57.4		55.0
Glyma. 16G191400	CNV7-F	ATTCTCAAAGACAGGGATGA	51.3	123	40.0
	CNV7-R	TAGAAATTGAACGTGCCAGA	51.3		40.0
Glyma. 16G191500	CNV8-F	ATGGGTATCAAGTATGTGGA	51.3	150	40.0
	CNV8-R	GGTTCATTATAGTGAGGGAGT	53.7		42.9
Glyma. 16G192300	CNV9-F	TCATGGCGGTATGCCTATTT	53.4	107	45.0
	CNV9-R	ACATCGGTGTATTCTAAGCAAC	53.9		40.9
Glyma. 16G192600	CNV10-F	CACTGCTCTAACGAGGCACA	57.4	218	55.0
	CNV10-R	GCACAATTTGGGAAGAAACA	51.3		40.0
Glyma. 16G192800	CNV11-F	AGAAGGTATTGGTAATATGGGATC	54.4	226	37.5
	CNV11-R	GCAGTTTATGGGCAGTGGTG	57.4		55.0
Glyma. 16G193100	CNV12-F	GAATGGGTATCAAGTATGTGG	53.7	111	42.9
	CNV12-R	GTGGGTCAAAGAAGGAAGAG	55.4		50.0
Glyma. 16G193200	CNV13-F	GCCTGGTGATGAAGACAGG	57.3	173	57.9
	CNV13-R	TTCCCAGTATTCTTTGATGTTTC	52.1		36.4

续表 1

基因 ID 号 Gene ID	引物 Name	CNV 引物序列(5′-3′) Primer sequence(5′-3′)	退火温度 Tm/℃	扩增片段 Amplicon size/bp	GC 含量 GC content/%
Glyma. 16G193300	CNV14-F	AAACAGGCAGGGCAGCAGTA	57.4	301	55.0
	CNV14-R	AGTGACGTTGTGGCAGAGGA	57.4		55.0
Glyma. 16G193400	CNV15-F	CCATGAAGGCCAACAAGAAG	55.4	104	50.0
	CNV15-R	AGAAGGGAGACCAACAGCAA	55.4		50.0
Glyma. 16G193600	CNV16-F	TTTATCGGCAACAATCTATG	49.2	160	35.0
	CNV16-R	AAGGAGCAATCACTATCCAG	53.4		45.0
Glyma. 16G193700	CNV17-F	AATGGATAAGAGTTGTACCCTG	53.9	310	40.9
	CNV17-R	GCAAATTGCTGTACCTTAGG	53.4		45.0
Glyma. 16G194800	CNV18-F	CCCATTCCCATTTGCTTATA	51.3	135	40.0
	CNV18-R	AACTGTCTGTCCATTACCCC	55.4		50.0
Glyma. 16G171700	CNV19-F	CTCTTATCAGAGTTTATAGCATAT	51.0	240	29.2
	CNV19-R	TTTGTTACTGTCATCATCCC	51.3		40.0
Glyma. 16G172400	CNV20-F	AAGGAGGTTCACAAACGCAAAG	55.6	308	47.6
	CNV20-R	GCTCAGATATGAATGATACCCAAA	54.4		37.5
Glyma. 16G174900	CNV21-F	GCTGGCAACCATGACAGAAG	57.4	147	55.0
	CNV21-R	ACAGGTCGATAAGCCGCAGT	57.4		55.0
Glyma. 16G190600	CNV22-F	TATGGCTGAAAGGAAGAGGA	53.4	175	45.0
	CNV22-R	ATGCCTTGTTGGAATATGACC	53.4		45.0
Glyma. 16G190800	CNV23-F	TTGGACACGGTGATGGTAAT	53.4	155	45.0
	CNV23-R	TCTCGCAAGTGGTCAAGATAA	53.7		42.9
Glyma. 16G191800	CNV24-F	TGTTGCTTAGAATACACCGAT	51.7	123	38.1
	CNV24-R	CTTTACATCCCAAAACAGAA	49.2		35.0
Glyma. 16G192100	CNV25-F	GTGAAGAAAGCGAGGTAGA	55.4	205	50.0
	CNV25-R	CCCTTGAATTCTGGAGGA	53.0		47.4
Glyma. 16G192400	CNV26-F	GTCTGCCACCACTCTATTA	55.4	291	50.0
	CNV26-R	AGGGTTTGTATCTGAAGAGTTTA	52.4		34.8
Glyma. 16G195000	CNV27-F	AACCCTCCATTCTCAACCTC	55.4	201	50.0
	CNV27-R	CAAAGGTCAGGTGTAATCCC	55.4		50.0

1.2.3 引物特异性检测 普通 PCR 反应体系为 20 μL:DNA 模板 2 μL,PCR Primer 3 μL, *Taq* 酶 0.2 μL,dNTP 0.3 μL,10 × buffer 1 μL,灭菌蒸馏水 13.5 μL,PCR 程序包括:预变性 95℃ 10 min,95℃ 30 s,Tm 30 s,72℃ 30 s,35 个循环,72℃ ,5 min,4℃ 保存,本研究设置 Tm 为 50,51,52,53,54 和 56℃ 共 6 个温度梯度。

1.2.4 荧光定量 PCR 反应体系和程序 荧光定量 PCR 检测方法反应体系为 20 μL,包括:SuperReal PreMix Plus(2 ×) 10.0 μL,PCR Forwrd Primer(10

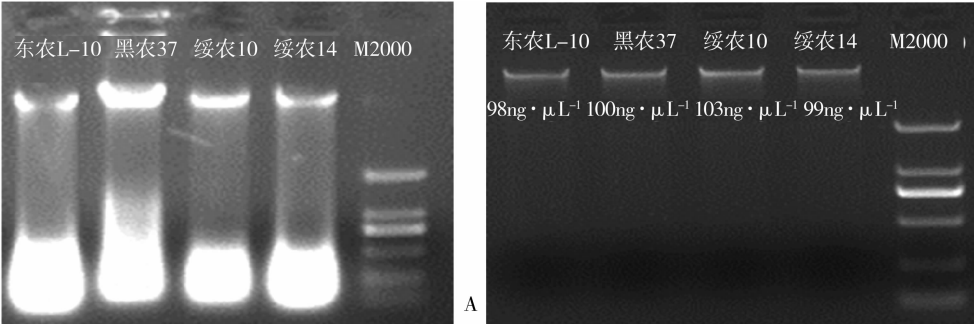
μmol·L⁻¹)0.6 μL,PCR Reverse Primer(10 μmol·L⁻¹) 0.6 μL,DNA 模板 2 μL,灭菌蒸馏水 6.8 μL。本试验采用三步法 PCR 扩增程序,PCR 程序包括:预变性 95℃ 15 min,95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 20 s,40 个循环。

1.2.5 数据处理 采用 SPSS 数据处理系统进行统计分析。采用内参基因法测定被测基因 PCR 产物相对丰度,3 次试验重复取平均 CT 值,采用相对定量法^[13] 计算相对拷贝数 2^{-ΔΔCT},ΔΔCT = CT_{目的基因} - CT_{内参基因}。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 浓度均一化

DNA 提取后于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA



A:DNA 提取浓度检测;B:RNA 酶消化后 DNA 浓度检测。
A: The concentration detection of the extracted DNA; B: Concentration detection of the DNA digested by RNA enzyme.

图 1 模板 DNA 浓度均一化

Fig. 1 The homogenization of template DNA concentration

2.2 候选基因

本研究前期利用以抗病种质东农 L-10 和感病种质黑农 37 为亲本的重组自交系群体,于大豆 Chr16 染色体上定位到多小种抗性 QTL^[10],本研究

通过分析 QTL 区段内编码序列结合亲本重测序,发现潜在的拷贝数变异区,选取区域内 27 个编码序列为候选基因,进行基因拷贝数变异定性分析(表 2)。

表 2 抗感亲本 *qscn3-3* 位点所在基因组区段拷贝数预测

Table 2 The prediction of CNV for *qscn3-3* locus between resistant and susceptible parents

品种 Variety	染色体 Chr	起始位置 Start site/bp	终止位置 Termination site/bp	拷贝数 Copy number	拷贝数变异类型 CNV type
黑农 37 Heinong 37	Chr16	34550000	35650000	1	减少
东农 L-10 Dongnong L-10	Chr16	33200000	33300000	4	增加
	Chr16	33550000	33600000	6	增加
	Chr16	35250000	35600000	4	增加
	Chr16	35600000	35650000	3	增加

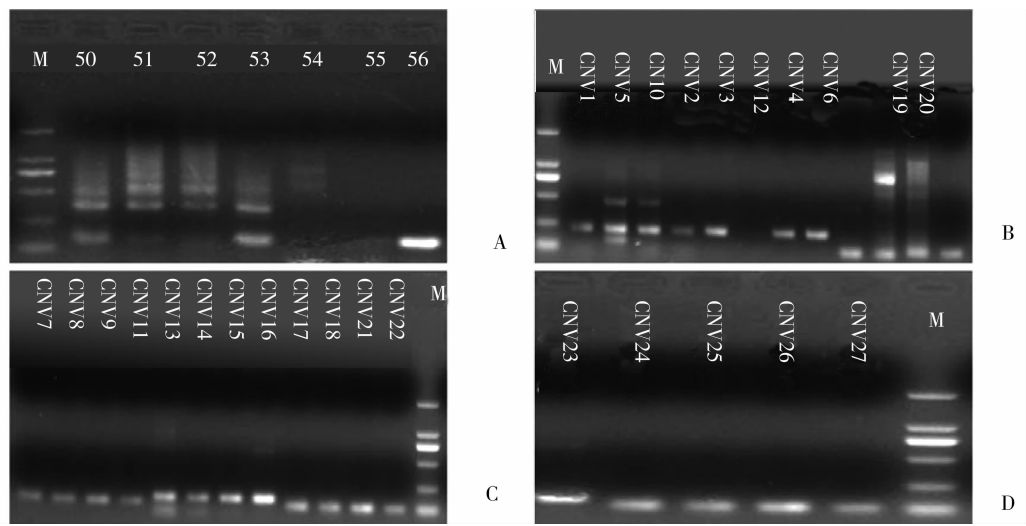
2.3 目标基因引物特异性分析

本试验选取目标 QTL 区段内 27 个候选基因,根据其 CDS 序列进行基因特异性引物设计,以东农 L-10 为模板,通过设定 7 个温度梯度 PCR 来确定最适退火温度(图 2A),其中 56℃ 引物和模板结合较好,产物特异性较好,确定为最适退火温度;设置退火温度为 56℃,对 27 对基因特异性引物进行 4 个模板 DNA 的 PCR 分析,经琼脂糖凝胶电泳检测,除 CNV5、CNV10、CNV12、CNV19、CNV20 产物特异性较差外,其余 22 个基因均得到较好的产物,可用于拷贝数变异定性分析(图 2B,图 2C,图 2D)。

2.4 对照基因与目标基因的 CT 值分析

本研究以大豆看家基因 β -actin 为内参基因,CT 值与被测基因的 PCR 产物丰度成反比,即 CT 值越

大^[14],PCR 产物丰度越小,反之亦然。qRT-PCR 的结果表明 4 个品种内参基因的 CT 值为 26.03 ~ 29.68,其中东农 L-10 的 CT 值为 26.07 ~ 29.62,其平均 CT 值为 26.64;黑农 37 的 CT 值为 26.03 ~ 28.94,平均 CT 值为 27.07;绥农 10 的 CT 值为 26.04 ~ 29.68,平均 CT 值为 27.68;绥农 14 的 CT 值为 26.18 ~ 28.47,平均 CT 值为 27.01;4 个品种内参基因 CT 值方差分析结果表明在 $P=0.05$ 水平和 $P=0.01$ 水平上均无显著差异(表 3)。由此可见,内参基因 β -actin 在 4 个品种模板 DNA 浓度均一化后 PCR 产物丰度一致性较好,说明不同品种之间内参基因 β -actin 在基因组模板 DNA 的初始含量一致,间接说明该基因在被测的不同品种间无拷贝数的差异,可以作为被测目标基因的对照。



A:温度梯度 PCR 检测;B,C,D:引物特异性检测
A: The temperature gradient PCR detection;B,C,D: The detection of primers specificity.

图2 目标基因引物特异性检测

Figure 2 Detection of primer specificity of the target genes

表3 内参基因 *β-actin* CT 值方差分析

Table 3 The variance analysis of CT values of the reference gene *β-actin*

品种 Variety	最大 CT 值 Max CT value	最小 CT 值 Min CT value	平均 CT 值 Average CT value	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>F</i> _{crit0.05}	<i>F</i> _{crit0.01}
东农 L-10 Dongnong L-10	29.62	26.07	26.64	0.08	3.14	4.96
黑农 37 Heinong 37	28.94	26.03	27.07	0.31		
绥农 10 Suinong 10	29.68	26.04	27.68	0.56		
绥农 14 Suinong 14	28.47	26.18	27.01	0.13		

qRT-PCR 的结果表明,22 个目的基因在 4 个品种中的 CT 值差异较大,整体为 13 ~ 32, 其中东农 L-10 的 CT 值为 13.46 ~ 31.78, 其平均 CT 值为 17.74;黑农 37 的 CT 值为 15.47 ~ 32.85, 平均 CT 值为 19.47;绥农 10 的 CT 值为 14.86 ~ 28.88, 平均 CT 值为 20.79;绥农 14 的 CT 值为 15.19 ~ 28.17,

平均 CT 值为 19.58(表 4)。以上结果说明在 4 个品种模板 DNA 浓度均一化后不同基因在特定品种当中的 PCR 产物丰度存在较大差异,间接说明不同基因在基因组 DNA 中初始含量不同,PCR 产物丰度差异可以通过 qRT-PCR 方法检测。

表4 目的基因 CT 值分析

Table 4 The CT values analysis of target genes

品种 Variety	最大值 Max.	最小值 Min.	平均值 Average
东农 L-10 Dongnong L-10	31.78	13.46	17.74
黑农 37 Heinong 37	32.85	15.47	19.47
绥农 10 Suinong 10	28.88	14.86	20.79
绥农 14 Suinong 14	28.17	15.19	19.58

通过 F 测验,对同一品种不同基因以及同一基因不同品种进行差异显著性分析,结果表明目的基因 18、21 在抗病品种东农 L-10 与感病品种绥农 14 的中 PCR 产物丰度差异不显著,目的基因 17 在东农 L-10 与黑农 37 中的 PCR 产物丰度差异不显著,目的基因 1、2、23 在东农 L-10 与黑农 37 中的 PCR

产物丰度差异达到显著水平,目的基因 22 在东农 L-10 与绥农 10 中的 PCR 产物丰度差异达到显著水平,其它的 15 个目的基因的 PCR 产物丰度在抗病品种与感病品种间均呈极显著差异,由此可以推断这 15 个目的基因在抗感品种基因组中可能存在拷贝数变异(表 5)。

表 5 PCR 产物丰度 F 测验

Table 5 F -test for the abundance of PCR products

基因编号 Genetic code	F (东农 L-10 <i>vs</i> 黑农 37) F (Dongnong L-10 <i>vs</i> Heinong 37)	F (东农 L-10 <i>vs</i> 绥农 10) F (Dongnong L-10 <i>vs</i> Suinong 10)	F (东农 L-10 <i>vs</i> 绥农 14) F (Dongnong L-10 <i>vs</i> Suinong 14)
1	17.62	191.01	6782.46
2	12.20	406.02	48.84
3	67.84	52.32	176.08
4	198.08	60.10	605.16
6	721.32	3606.26	1289.13
7	1431.70	1914.17	1796.56
8	915.37	2699.29	2580.84
9	335.81	363.19	307.71
11	1513.30	2552.92	2021.30
13	256.66	256.66	1638.31
14	762.01	916.52	464.10
15	118.31	19650.28	2230.12
16	88.57	90.02	51.95
17	2.85	1031.11	117.27
18	773.91	96.25	0.35
21	940.28	2151.29	5.11
22	1699.59	11.49	1252.82
23	11.00	892.39	307.66
24	7955.13	1149.20	67.17
25	293.50	14020.57	9942.50
26	223.24	451.21	487.37
27	3255.06	133.65	1379.59

$F_{\text{crit}0.05} = 7.71$; $F_{\text{crit}0.01} = 21.20$ 。

2.5 目的基因相对丰度分析

在 22 个基因中,对 PCR 产物丰度在抗感病品种间存在极显著差异的 15 个基因进行 PCR 产物丰度相对值的估算(表 6),目的基因 4 在东农 L-10 中

的 PCR 产物丰度相对值比在绥农 14、绥农 10 和黑农 37 中的低,说明目的基因 4 在东农 L-10 中拷贝数低于绥农 14、绥农 10、黑农 37 的拷贝数,所以目的基因 4 在 4 个抗感病品种间可能存在拷贝数变

异,但不足以证明目的基因 4 属于与 *qSCN3-3* 位点相关的基因;目的基因 15 在东农 L-10 中的 PCR 产物丰度相对值比在黑农 37 中的低,高于在绥农 10 和绥农 14 的 PCR 产物丰度相对值,说明目的基因 15 在东农 L-10 的拷贝数低于在黑农 37 中的拷贝数,高于在绥农 10,绥农 14 中的拷贝数,所以目的基因 15 在 4 个抗感品种间可能存在拷贝数变异,但不足以证明目的基因 15 属于与 *qSCN3-3* 位点相关的基因;目的基因 27 在东农 L-10 中的 PCR 产物丰度相对值比在绥农 14 中的低,高于在黑农 37 和绥农 10 的 PCR 产物丰度相对值,说明目的基因 27 在东农 L-10 中的拷贝数低于在绥农 14 中的拷贝数,高于在黑农 37 和绥农 10 中的拷贝数,所以目的基因 27 在 4 个抗感病品种中可能存在拷贝数变异,但不足以证明目的基因 27 属于与位点 *qSCN3-3* 相关的基因;剩下的 12 个目的基因在东农 L-10 中的 PCR 产物丰度相对值均高于在黑农 37,绥农 10 和绥农 14 中的 PCR 产物丰度相对值,说明这 12 个目

的基因在东农 L-10 中的拷贝数均高于在黑农 37、绥农 10 和绥农 14 中的拷贝数,所以这 12 个目的基因在 4 个抗感品种中可能存在拷贝数变异,并可以证明这 12 个目的基因属于与 *Qscn3-3* 位点相关的基因。

通过对抗病品种东农 L-10 和其它 3 个感病品种的 PCR 产物丰度相对值进行比较(表 7),其中目的基因 8 和 11 在东农 L-10 和黑农 37 的 PCR 产物丰度相对值比较值与目的基因 24 在东农 L-10 和绥农 10 的 PCR 产物丰度相对值比较值均小于 2.5,不足以定性说明目的基因 8、11、24 在 4 个抗感病品种间存在拷贝数变异,其余剩下的个目的基因在东农 L-10 和黑农 37,东农 L-10 和绥农 10,东农 L-10 和绥农 14 中的 PCR 产物丰度相对值比较值较高,均大于 2.5,说明这 9 个目的基因在东农 L-10 中的拷贝数高于在黑农 37,绥农 10,绥农 14 中的拷贝数,可定性为这 9 个目的基因在这 4 个抗感品种间存在拷贝数变异(表 7)。

表 6 PCR 产物丰度相对值
Table 6 The relative abundance of PCR products

基因编号 Genetic code	东农 L-10 Dongnong L-10	黑农 37 Heinong 37	绥农 10 Suinong 10	绥农 14 Suinong 14
3	3734. 42	1144. 10	744. 43	487. 75
4	0. 80	19. 93	3. 72	29. 18
6	2288. 20	225. 97	99. 73	75. 93
7	2267. 15	131. 90	62. 54	46. 10
8	1867. 21	901. 80	311. 55	493. 42
9	749. 61	148. 40	62. 97	69. 39
11	2298. 80	1052. 79	442. 64	348. 90
13	3061. 45	1189. 93	109. 14	398. 01
14	14800. 24	2298. 80	1534. 27	1344. 95
15	959. 85	1195. 45	611. 69	352. 14
16	7332. 05	2452. 44	1706. 31	1573. 76
24	58. 22	3. 29	50. 21	47. 61
25	865. 07	90. 30	1. 19	0. 79
26	123. 64	0	0. 01	5. 19
27	238. 31	105. 18	95. 23	290. 02

表 7 抗感品种间基因相对丰度对比

Table 7 Relative abundance of genes between resistant and susceptible cultivars

基因编号 Genetic code	东农 L-10 <i>vs</i> 黑农 37 Dongnong L-10 <i>vs</i> Heinong 37	东农 L-10 <i>vs</i> 绥农 10 Dongnong L-10 <i>vs</i> Suinong 10	东农 L-10 <i>vs</i> 绥农 14 Dongnong L-10 <i>vs</i> Suinong 14
3	3. 26	5. 02	7. 66
4	0. 04	0. 22	0. 03
6	10. 13	22. 94	30. 13
7	17. 19	36. 25	49. 18
8	2. 07	5. 99	3. 78
9	5. 05	11. 90	10. 80
11	2. 18	5. 19	6. 59
13	2. 57	28. 05	7. 69
14	6. 44	9. 65	11. 00
15	0. 80	1. 57	2. 73
16	2. 99	4. 30	4. 66
24	17. 71	1. 16	1. 22
25	9. 58	727. 43	1092. 44
26	26371. 04	21321. 19	23. 81
27	2. 27	2. 50	0. 82

通过拷贝数变异定性分析,本研究发现 *qscn3-3* 位点内 9 个基因在抗病品种东农 L-10 和感病品种黑农 37、绥农 10、绥农 14 间存在拷贝数变异,其中目的基因 3、6、14、16、25、26 编码抗病家族蛋白/LRR 家族蛋白;目的基因 7 编码双功能抑制剂/脂质转移蛋白/种子贮藏 2S 白蛋白超家族蛋白;目的基因 9 编码未知功能的蛋白;目的基因 13 编码富亮氨酸重复域蛋白激酶家族蛋白。

3 结论与讨论

目前现有的拷贝数变异分析方法包括 CGH 芯片法、Southern 杂交法、荧光原位杂交法、荧光定量 PCR 法等。CGH 法是将标记不同荧光素的的试验样品和对照样品与点制在芯片上的 BAC 文库进行杂交,利用不同荧光素的信号强度比值,来对基因组中特定染色体拷贝数的变化进行检测,其优点是检测的准确性好,这种方法覆盖了基因组中的绝大部分序列,但缺点是费用昂贵、耗时耗力,所使用的 BAC 探针决定了这种方法分辨率较低^[15];Southern 杂交法是通过标记的核酸探针与固定在固相载体 DNA 样品进行杂交判断被检测的 DNA 样品中是否有与探针同源的片段,但该技术的操作比较烦琐、

费时^[16]。荧光原位杂交(FISH)法的基本原理是将 DNA 探针用特殊的核苷酸分子标记,然后将探针直接杂交到染色体或 DNA 纤维切片上,再通过荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异性结合从而将特定的 DNA 序列在染色体或 DNA 纤维切片上的进行定性、定位、相对定量分析。FISH 具有安全、快速、灵敏度高、探针能长期保存、能同时显示多种颜色等优点,但是 FISH 成本高,技术要求高、通量小,时间长^[17]。与这 3 种拷贝数变异分析方法相比,本研究采用的实时定量 PCR 方法是目前最准确、重现性最好和国际公认的核酸分子定量定性检测标准方法,被广泛用于转基因研究、基因表达研究、药物疗效考核、病原体检测等诸多领域^[18],荧光定量 PCR 技术利用相对定量实时 PCR 系统,对检测样本的目标基因(具有拷贝数多态)以及参照基因(无拷贝数多态,只有 2 个拷贝),利用 2^{-ΔΔCT} 相对定量分析法进行拷贝数的分析,该方法具备其它 3 种方法所没有的优点:简单易于操作,敏感性高,重复性好,速度快和污染少,但其缺点是不适合大样本的高通量检测^[19]。

本研究成功筛选出 15 个基因在抗病品种,东农 L-10 和感病品种黑农 37、绥农 10、绥农 14 中存在着

拷贝数变异,并进一步对抗病品种东农 L-10 和其它 3 个感病品种的 PCR 产物丰度相对值进行比较,最终可定性 9 个基因在抗感品种中存在拷贝数变异,通过对其功能结构域预测分析,推测 *qscn3-3* 位点其可能通过编码抗病蛋白和富亮氨酸蛋白来赋予大豆对 SCN 的抗性,抗感品种的差异可能由抗病品种东农 L-10 中基因拷贝数的增加引起,这 9 个基因可作为 MAS 潜在的候选基因,为大豆抗胞囊线虫品种的遗传改良提供理论依据。

参考文献

[1] 宋美静,朱晓峰,王东,等. 我国大豆主产区大豆胞囊线虫群体分布及致病性分化研究[J]. 大豆科学, 2016, 35(4): 630-636. (Song M J, Zhu X F, Wang D, et al. Major soybean producing areas in our country soybean cyst nematode community distribution and pathogenicity differentiation research [J]. Journal of soybean science, 2016, 35(4): 630-636.)

[2] 潘凤娟,许艳丽,孙玉秋,等. 我国大豆胞囊线虫生防真菌研究现状[J]. 大豆通报, 2006, 83(4): 15-17. (Pan F J, Xu Y L, Sun Y Q, et al. Advance on biological control to soybean cyst nematode by fungi in China [J]. Soybean Bulletin, 2006, 83(4): 15-17.)

[3] 刘维志,段玉玺. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. (Liu W Z, Duan Y X. Plant pathogenic nematology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.)

[4] 吴海燕,远方,陈立杰,等. 大豆胞囊线虫病与大豆抗胞囊线虫机制的研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(4): 285-289. (Wu H Y, Yuan F, Chen L J, et al. Advances in soybean cyst nematode and mechanism of soybean resistance to *Heterodera glycines* [J]. Soybean Science, 2001, 20(4): 285-280.)

[5] Cook D E, Lee T G, Guo X L, et al. Copy number variation of multiple genes at *Rhg1* mediates nematode resistance in soybean [J]. Science, 2012, 338: 1206-1209.

[6] Liu S, Kandoth P K, Warren S D, et al. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens[J]. Nature, 2012, 492: 256-260.

[7] Sharp A J, Cheng Z, Eichler E E. Structural variation of the human genome[J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2006, 7(1): 407-442.

[8] Maydan J S, Lorch A, Edgley M L, et al. Copy number variation in the genomes of twelve natural isolates of *Caenorhabditis elegans* [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 62.

[9] Lee T G, Kumar I, Diers B W, et al. Evolution and selection of *Rhg1*, a copy - number variant nematode - resistance locus[J].

Molecular Ecology, 2015, 24(8): 1774-1991.

[10] 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]. Molecular Ecology, 2011, 12(1): 233.

[11] 吴德鹏,赵月,盛碧涵. 东农 L-10 对大豆胞囊线虫 3 号生理小种的遗传模型分析[J]. 大豆科学, 2016, 35(3): 367-372. (Wu D P, Zhao Y, Cheng B H. The genetic model analysis of Dongnong L-10 of soybean cyst nematode race 3 [J]. Soybean Science, 2016, 35(3): 367-372.)

[12] 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, 22(1): 73-74. (Guan R X, Chang R Z, Qiu L J. The DNA of the soybean extract used for SSR analysis [J]. Soybean Science, 2003, 22(1): 73-74.)

[13] Rieu L, Powers S J, Hertfordshire H. Real-time quantitative RT-PCR: Design, calculations, and statistics [J]. The Plant Cell, 2009, 21(4): 1031-1033.

[14] 马月萍,戴思兰,马艳蓉. 荧光定量 PCR 技术在植物研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2011, 27(7): 37-45. (Ma Y P, Dai S L, Ma Y R. The application of fluorescence quantitative PCR technology in plant research [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 27(7): 37-45.)

[15] 张开立. 比较基因组杂交新进展-Array-based CGH [J]. 国外医学(遗传学分册), 2003(1): 17-19. (Zhang K L. New progress in comparative genomic hybridization-Array-based CGH [J]. Foreign Medical (Genetics pathol), 2003(1): 17-19.)

[16] 代军. Southern 杂交技术在农作物遗传转化研究中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(1): 20-23. (Dai J. Southern hybridization technique in the application of genetic transformation of crops [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(1): 20-23.)

[17] 何世斌,柴连琴,谭昭隽,等. 荧光原位杂交技术的研究进展 [J]. 植物科学学报, 2014, 32(2): 199-204. (He S B, Chai L Q, Tan J J, et al. The research progress of fluorescence in situ hybridization technique [J]. Journal of Plant Science, 2014, 32(2): 199-204.)

[18] Bertolini E, Olmos A, Lopez M, et al. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees [J]. Phytopathology, 2003, 93(3): 286-292.

[19] 王继英,郭建凤,张大龙,等. 拷贝数变异的研究方法及其在畜禽中的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(4): 464-474. (Wang J Y, Guo J F, Zhang D L, et al. Copy number variation research methods and its research progress in livestock and poultry [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(4): 464-474.)