

利用 RAPD 技术寻找大豆抗 孢囊线虫 4 号小种标记初报*

颜清上 王 岚 李 莹^① 王连铮 陈品三^②

摘 要

以高抗大豆孢囊线虫 4 号生理小种的 2 个大豆品系 1259 系(黄色)和 1259 系(双色)及其抗感亲本灰皮支黑豆和晋遗 9 号,以及另外两个高抗品种 PI437654 和元钵黑豆,两个高感品种鲁豆 1 号和鲁豆 7 号为试验材料,进行大豆抗孢囊线虫的 RAPD 分析。在所用的 33 个引物中,引物 OPG04 的扩增产物中有一条谱带系抗病品系、抗病品种(包括抗病亲本)特有。

关键词 大豆;大豆孢囊线虫;RAPD 技术

大豆孢囊线虫病(SCN)是影响大豆生产的毁灭性病害之一。利用新近发展的生物技术寻找、鉴定以及定位抗大豆孢囊线虫的分子标记已成为受人关注的热门课题。美国 13 家从事大豆分子作图的单位中,有 9 家在进行抗大豆孢囊线虫分子标记的研究(张国栋, 1994)。Concibido 等(1993, 1994)、Weisemann 等(1992)已分别找到了控制大豆抗 SCN3 号小种和与 Rhg4 紧密连锁的 RFLP 标记,Skorupska 等(1994)、Mahalingam 等(1995a, 1995b)、Choi 等(1995)利用 RAPD 技术对 Peking、PI437654 和 PI88788 等抗源及其来源的抗病品种抗大豆孢囊线虫 1、3、5、14 号小种的多态性进行分析,获得了一些抗大豆孢囊线虫的 RAPD 标记。但有关抗大豆孢囊线虫 4 号生理小种的分子标记的研究尚未见报道。

材料和方法

1. 供试植物材料

供试大豆材料为高抗大豆孢囊线虫 4 号生理小种的大豆品系 1259 系(黄色)和 1259 系(双色)及其抗感亲本灰皮支黑豆和晋遗 9 号,以及另外两个高抗品种 PI437654 和元钵黑豆、两个高感品种鲁豆 1 号和鲁豆 7 号。将这 8 份材料种于温室,出苗后 3 周左右,取第一片真叶,放入 -70℃ 冰箱保存备用。

* 本试验得到本院品种资源研究所贾继增副研究员的帮助,谨致谢意。

① 李莹的工作单位是山西省农业科学院品资所。

② 陈品三的工作单位是中国农科院植保所,北京 100094。

本文于 1996 年 1 月 13 日收到。

This paper was received on Jan. 13, 1996.

2. 模板 DNA 的提取

参照 Tai 和 Tanksley (1990) 的方法提取 DNA。提取缓冲液为 100mM Tris-HCl (pH 8.0)、50mM EDTA (pH 8.0)、500mM NaCl、1.25% SDS (W/V)。提取步骤:取低温保存的叶片 2g 左右,液 N 冷冻下迅速研磨成粉末,在一个 50ml 的聚丙烯管内加入 16ml DNA 提取缓冲液,预热到 65℃,加入 0.5ml 巯基乙醇,迅速加入研磨好的材料,65℃保温 15 分钟或以上。然后,取出试管加入 5ml 5M 的 KAc (pH 7.0) 充分混匀、冰水浴 20 分钟。取出试管 8000rpm 离心 10 分钟,将上清液转至一新的离心管,加入 1:1 体积的氯仿:异戊醇 (24:1),混匀后离心,1000rpm 10 分钟,上清液移入另一新的离心管,加入等体积 -20℃ 预冷的异丙醇, -20℃ 放置 30 分钟。用玻璃棒挑出沉淀的 DNA,转移到 1.5ml Eppendorf 管,用 70% 乙醇洗两遍,室温干燥。干燥的 DNA 沉淀用 500ul TE 缓冲液溶解,加入 0.5ul RNase A (10 ug/ul), 37℃ 保温 30 分钟,酚:氯仿,氯仿:异戊醇各抽提一次,上清液加入 2 倍体积的乙醇,5000rpm 离心 10 分钟,回收 DNA,沉淀用 70% 乙醇洗两遍,干燥后加入 400ul TE 溶解 DNA。

在 Pharmacia LKB Ultrospec III 紫外分光光度计上,波长 260nm 及 280nm 处测定光吸收值,根据光吸收值计算 DNA 的纯度和浓度。

3. RAPD 扩增

引物为 Operon 公司生产的随机引物, OPE01-20 以及 A 盒、G 盒、K 盒、Z 盒、I 盒、V 盒、X 盒中的 13 个随机引物。

反应体系: 2.5ul 10XPCR buffer, 200umol/L dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2umol/L 引物, 0.8 单位的 Tag DNA 聚合酶, 20ng 模板 DNA, 最后加超纯水至 25ul。

DNA 扩增: 样品加入 0.5ml Eppendorf 管, 充分混匀, 加入 30ul 石蜡油覆盖, DNA 热循环仪 (PTC™ Programmable Thermal Controller) 上扩增, 扩增程序为: 94℃ 15 秒, 36℃ 30 秒, 72℃ 45 秒, 45 个循环, 72℃ 保持 5 分钟, 最后 4℃ 下 10 分钟。

4. 扩增产物检测

反应结束后, 每个反应管加入 3ul 溴酚兰指示剂, 混匀、离心, 然后在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 电压为 50 伏。电泳结束后, 取出凝胶在 0.01% 的 EB 溶液中染色 20 分钟, 在水溶液中褪色 10 分钟, UVP White/UV Transilluminator 紫外检测仪下检测谱带并拍照。

结果和讨论

1. 测定提取 DNA 的光吸收值, OD260/OD280 在 1.8—2.0 之间, 浓度在 0.51—0.85 mg/ml 之间。DNA 纯度满足 RAPD 实验的要求, 最后稀释 DNA 至终浓度为 10ng/ul。

2. 在所用的 33 个随机引物中, 只有 OPE13 和 OPI08 没有产生任何谱带, 其余引物都产生了较多的谱带, 而且有 20 个引物在 8 个材料间表现完全一致, 11 个有差异的引物中, 仅 OPG04 扩增的谱带中, 有一条谱带为 2 个抗病品系和 3 个抗病品种特有, 而 3 个感病品种没有的 (图 1)。经重复得到了相同的结果。

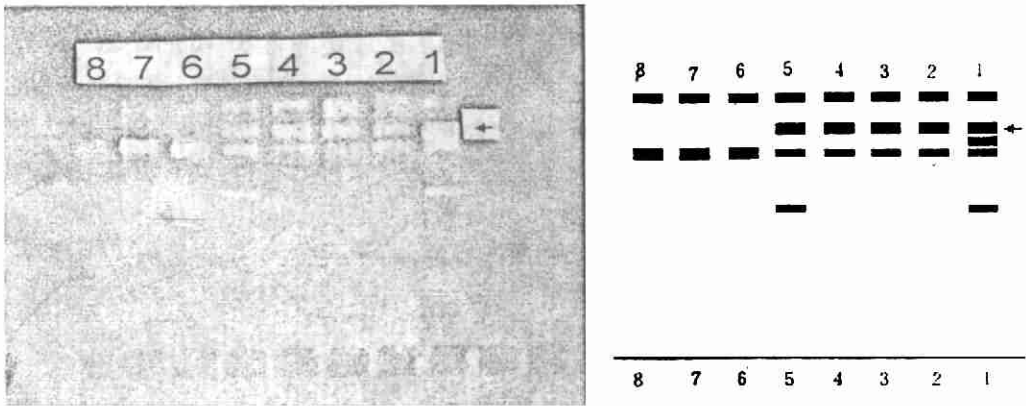


图 1 引物 OPG04 扩增产物

Fig. 1 RAPD products amplified by primer OPG04

1-8 依次为 PI437654、元钵黑豆、灰皮支黑豆、1259(黄色)、1259(双色)、晋选 9 号、鲁豆 7 号和鲁豆 1 号所指的谱带为抗病品种(系)特有谱带

From 1 to 8 are the RAPD products of PI437654, Yuanboheidou, Huipizhiheidou, 1259 (Yellow color seed coat), 1259 (Bicolor seed coat), Jinyi No. 9, Ludou No. 7 and Ludou No. 1. Indicated the fragments specifically amplified in resistant cultivars or lines.

找寻与目标性状紧密连锁的 RAPD 遗传标记,最好通过分离个体分组分析(Bulked segregant Analysis)或近等基因系的方法。采用这两种方法,RAPD 具有同工酶或 RFLP 无法比拟的优越性,因为在短时间内就可以筛选大量的随机引物。分离个体分组分析最初由 Michmore 等(1991)在筛选抗白粉病基因的遗传标记时采用。其方法是将 F_2 分离群体中抗病的个体分成一组,感病的个体分成一组,每组 20 株为宜,然后以这两组群体作为两个样品,提取 DNA 进行 RAPD 分析。理论上讲,这两个样品中除抗病性差异外,其余背景基本相同,因此扩增出的 DNA 分子片断的差异应与抗病性紧密连锁。近等基因系作为 RAPD 分析的材料当然具有明显的优点,但因其培育需多代回交、鉴定,费力又耗时。因而,混合样品分析受到多数研究者的喜爱。鉴于此,我们在进行抗大豆孢囊线虫分子标记研究中采用分离个体分组分析法。本文是其中的一部分,对 2 个抗病品系、抗感亲本和几个抗感品种扩增的 RAPD 产物进行分析,寻找特异引物,进一步的工作正在进行中。从本文的结果看,引物 OPG04 对抗病材料,无论具黑种皮,还是黄种皮或双色种皮,经 RAPD 扩增,均产生一段感病品种(亲本)所没有的特异 DNA,这段 DNA 可能与大豆对 SCN 的抗性有关。

参 考 文 献

- [1] 张国栋, 1994. 美国大豆孢囊线虫生理小种及抗病育种研究进展, 大豆科学, 13(3): 252-260
- [2] Choi, I. S., and H. T. Skorupka. 1995. RAPD marker selection using bulk of cultivars for differential response to soybean cyst nematode race 3, 5 and 14. Soybean Genetics Newsletter 22: 245-250
- [3] Concibido, V. C., et al. 1993. RFLP mapping of cyst nematode resistance genes in soybeans. Soybean Genet.

News1. 20,136-139

- [4] Concibido, V. C., et al. 1994. DNA maker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines Ichinohe*). Crop Sci. 34:240-246
- [5] Mahalingam, R., and H. T. Skorupska. 1995a. RAPD analysis using backcrossing-derived line in mapping gene for resistance to *Heterodera glycines* 1. Race 3 in Peking cultivar. Soybean Genetics Newsletter 22,232-236
- [6] Mahalingam, R., and H. T. Skorupska. 1995b. Bulk segregant analysis for identification of RAPD markers associated with resistance to *Heterodera glycines* 1. on Linkage group A in Peking cultivar. Soybean Genetics Newsletter 22,237-242
- [7] Michelmore, P. W., et al. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis; a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88,9828-9832
- [8] Skorupska, H. T., and I. S. Choi. 1994. Resistance to SCN and Molecular polymorphism in various source of Peking soybean. Euphytica 75:63-70
- [9] Tai, T. H., and S. D. Tanksley. 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. Plant Molecular Biology Report. 8(4):297-303
- [10] Weibmann, J. M., B. E. Matthews, & T. E. Devine. 1992. Molecular markers located proximal to the soybean cyst nematode resistance gene, Rhg4. Theor. Appl. Genet. 85:136-138

PRILIMINARY STUDY ON IDENTIFICATION OF RAPD MARKER ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO RACE 4 OF *HETERODERA GLYCINES*

Yan Qingshang Wang Lan Li Ying Wang Lianzheng Chen Pinshan

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Beijing 100081)

Abstract

(
Applicating the randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technique, we analysed eight soybean cultivars(lines), which included two resistant lines, 1259Y with yellow seed coat and 1259B with bicolor seed coat, and their resistant parent, Huipizhiheidou, susceptible parent, Jinyi 9, other two resistant varieties, Yuanboheidou and P1437054, other two susceptible cultivars, Ludou 1 and Ludou 7, to race 4 of *Heterodera glycines* for their amplified products. Among 33 primers, one primer, OPG04, amplified a DNA fragment which specifically existed in the products of all five resistant varieties and lines, and not found in these of three susceptible cultivars (including susceptible parent).

Key words Soybean; *Heterodera glycines*; RAPD technique