

大豆对 SMV₁ 株系抗性基因的分子标记研究^{*}

刘丽君 吴俊江 高明杰 蒲国峰 张淑珍^{**} 邱丽娟^{**}
郑翠明^{**} 谢华^{**} 郝连林^{**} 李玉征^{**}

(黑龙江省农业科学院大豆研究所 150086)

摘要 大豆花叶病毒病是世界大豆产区危害较重的主要病害,本实验高抗 SMV₁ 株系黑农 39 为母本,高感 SMV₁ 株系品种合丰 25 为父本配置杂交组合,对 F₁、F₂ 代接种 SMV₁ 进行田间抗性鉴定和抗病性遗传学分析,通过接种鉴定亲本 F₁、F₂ 并代的抗性表现,证明,对 SMV₁ 号株系的抗性是由一对显性基因决定的。利用 RAPD 技术在抗感池间寻找多态性标记,通过筛选引物,获得重复性最好的随机引物 OPN₁。并采用 BSA 法在黑农 39 和抗病池扩增出 OPN₁₄₀₀ 片段,在合丰 25 和感病池扩增出 OPN₁₃₀₀ 片段,在 F₁ 同时扩增出 OPN₁₄₀₀ 和 OPN₁₃₀₀。用该引物分析黑农 39×合丰 25 的 F₂ 扩增个体,共显性的 RAPD 标记 OPN_{1400/1300} 与黑农 39 抗病基因的遗传距离为 8.2cM。

关键词 大豆;大豆 SMV₁; RAPD 技术

中图分类号 S 565.035.3 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2002)02-0093-03

大豆花叶病毒(SMV)病是世界性病害,并在全国范围内普遍发生。东北尤其是黑龙江省为我国大豆主产区,SMV 是产区的主要病害,对大豆生产危害严重,因此选育抗病品种就显得尤为重要。近些年国内外学者对选育抗病品种的有效方法进行了大量的研究,尤其是利用新近发展的生物学技术寻找鉴定以及定位与抗 SMV 基因有关的分子标记成为受人关注的热点。国内外已报道和命名的大豆对 SMV 抗性的显性单基因位点有 Rsv₁、Rsv₂、Rsv₃、Ra、Rc、Rg 和 Rh 七个^[1],此外,也有两对互补显性基因或由一至两对独立的隐性基因控制的抗性遗传类型。自从 1991 年 Michelmores 创造了 BSA 法鉴定与抗病基因紧密连锁的 RAPD 标记以来,利用 BSA 法已鉴定出菜豆炭疽病^[3]、菜豆锈病^[4]、大麦叶锈病^[5] 等抗病基因的 RAPD 标记。

本文以高抗 SMV₁ 的材料黑农 39 为母本,以高感材料合丰 25 为父本进行抗性遗传规律及抗病基因的分子标记研究。利用 BSA 法,鉴定与抗病基因连锁的 RAPD 标记。为分子标记辅助育种、抗性基

因累加奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

以高抗 SMV₁ 和高感 SMV₁ 的大豆品种黑农 39、合丰 25 为亲本材料,1999 年配置杂交组合,把杂交种子的一部分保留,另一部分南繁加代。2000 年在黑龙江省农科院大豆所盆栽场防蚜虫网室播种亲本及 F₁、F₂ 代,在对生真叶期采用人工汁液摩擦法接种 SMV₁(毒源由东北农业大学提供),10 天后重复接种一次,接种二周后开始调查症状。按五个标准进行调查:0 级为免疫,1 级为高抗,2 级为中抗,3 级以上为感病。

1.2 实验方法

1.2.1 叶片采摘及 DNA 提取

从 F₂ 选择 12 株感病(花叶)单株和 12 株抗病单株分别提取叶片总 DNA。将抗、感病株 DNA 分别以等量混合形成抗、感池。用于筛选与 SMV₁ 抗

* 收稿日期:2001-07-04

基金项目:黑龙江省杰出青年基金资助项目

** 张淑珍,东北农业大学大豆研究所博士研究生;邱丽娟;郑翠明;谢华,在中国农科院品种资源所;郝连林,现在黑龙江省林甸县花园乡农业站工作。李玉征在明水县种子分公司。

作者简介:刘丽君(1958-),女,研究员,从事大豆遗传育种工作。

性基因连锁的 RAPD 标记。参照 Tai 和 Tanksley (1990)^[6] 的方法提取 DNA。

1.2.2 RAPD 分析

RAPD 引物为 Operon 公司生产的随机引物 (OPA01—OPA20~OPZ01—OPZ20)。

反应体系: 2.5μl10x PCR buffer, 2mM dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP), 15ng/μl 引物, 1 单位的 Tag DNA 聚合酶, 20ng/μl 模板 DNA, 最后加超纯水至 25μl。

DNA 扩增: 样品加入 0.5mlEppendorf 管充分混匀, 加入 30μl 石蜡油覆盖, DNA PCR 仪上扩增, 扩增程序为: 94℃预变性 3 分钟, 94℃15 秒、36℃30 秒、72℃1 分钟 45 个循环, 72℃7 分钟, 最后 4℃下保存。

1.2.3 扩增产物检测

反应结束后, 每个反应管加入 3μl 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, 紫外检测仪下检测谱带并拍照。

1.2.4 连锁分析

应用 MAPMAKER3.0 软件^[2] 计算连锁距离, 临界 LOD 值取 3.0, 并用 KOSambi 函数将重组率转换成图距单位厘摩(cM)。

2 结果与分析

高抗 SMV 的大豆品种黑农 39 与合丰 25 的杂交组合的 F₁ 代接种后表现为抗病, F₂ 代群体接种后发生抗感分离, 经 X² 适合性测验, 所得的 X² = 1.769, 均小于 X_{0.05}² = 3.84, 分离比例符合 3(抗): 1 表 1 RAPD 标记在黑农 39×合丰 25 的 F₂ 群体的分离

Table 1 Separation of RAPD markers in F₂ population of the cross from Heinong 39×Hefeng 25

田间鉴定	抗病	感病	总数
抗病亲本纯合标记 OPN ₁₄₀₀	86	0	86
感病亲本纯合标记 OPN ₁₃₀₀	0	41	41
杂合标记 OPN _{1400/1300}	8	5	13
总数	94	46	140

(感)。说明黑农 39 对 SMV₁ 株系的抗性受一对显性基因控制。

利用 BSA 法对黑农 39×合丰 25 的 140 个 F₂ 植株进行了 RAPD 标记的鉴定, 共筛选了 520 个

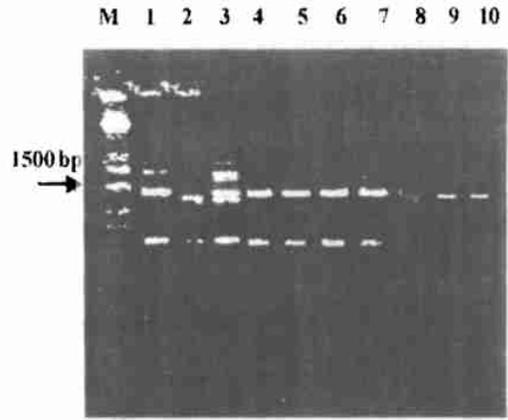


图 1 引物 OPN₁₁ 对黑农 39×合丰 25 的亲本、F₁ 和 F₂ 代基因组 DNA 的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR products amplified with OPN₁₁ in parents,

F₁ and F₂ plants of "Heinong 39×Hefeng 25"

M:1.1kb Marker 1. 黑农 39 2. 合丰 25 3. F₁

4-7 为 F₂ 抗病植株 8-10 为 F₂ 感病植株

RAPD 引物, 筛选出一个 RAPD 引物 OPN₁₁ (序列为 5'-TCGCCGCAA-3') 在抗病池间扩增出的差异片段。用该引物对抗病亲本黑农 39 和抗病池扩增出相同的特征片段 OPN₁₄₀₀、在感病亲本合丰 25 和感病池中扩增出相同特征片段 OPN₁₃₀₀, F₁ 代中同时扩增出抗病亲本和感病亲本的两条特征片段 OPN_{1400/1300}。用该引物对该组合 F₂ 群体的所有植株分别扩增(表 1), 共有三种带型, 抗病亲本带型 OPN₁₄₀₀、感病亲本带型 OPN₁₃₀₀ 和杂合带型 OPN_{1400/1300}。在田间接种鉴定中表现为抗病的 86 株单株中, 有 78 株扩增出抗病亲本标记 OPN₁₄₀₀, 8 株扩增出杂合标记 OPN_{11 1400/1300}。在田间接种鉴定中表现为感病的 46 株中, 41 株扩增出感病亲本标记 OPN₁₃₀₀, 5 株扩增出杂合标记 OPN_{11 1400/1300}。应用 Mapmaker3.0 软件计算得出, 共显性的 RAPD 标记 OPN_{11 1400/1300} 与抗病基因的遗传距离为 8.2cM。

3 讨论

本实验为达到分离个体分组分析的实验目的, 已于前两年(1998 年 1999 年)做了杂交组合配制、抗病鉴定、引物筛选等大量准备工作, 以确保实验结果的准确性。从试验结果来看引物 OPN₁₁ 重复性好, 抗感亲本及抗感池中差异明显, 该引物的 RAPD 标记 OPN_{11 1400/1300} 可用于抗 SMV 分子标记辅助育种, 不仅准确, 而且能够加速育种进程。

本实验中所用 RAPD 标记引物 OPN₁₁ 与郑翠明⁷⁾ 研究的大豆抗 SMV₃ 株系的抗病基因标记引物相同, 但扩增出的 OPN₁₁ 片段分子量不同, 这说明 SMV₁ 株系的抗性基因与 SMV₃ 的抗性基因很可能位于相同的染色体上, 并可能是以抗性基因簇的方式存在。

参 考 文 献

- 1 Buzzell R. I., Tu J. C. Inheritance of a soybean stem-tip necrosis reaction to soybean mosaic virus[J]. Journal of Heredity 1989, 80 (5): 400-401.
- 2 Lander, E. S. An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics, 1987, 1: 174-181.
- 3 Michelmore, P. W. 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[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1991, USA 88: 9828-9832.
- 4 Miklas, P. N. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean[J]. Theor Appl. Genetics 1993, 85: 745-749.
- 5 Poulsen D. M. E. The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley 1995[J]. Theor. Appl. Genet. 1995, 91: 270-273.
- 6 Tai, T. H., S. D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue[J]. Plant Molecular Biology Report, 1990, 8(4): 293-303.
- 7 郑翠明. 大豆对 SMV₃ 号株系的抗性遗传及分子标记研究[D]. 博士学位论文, 2000, 49-50.

PRELIMINARY STUDY ON IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKER ASSOCIATED WITH RESISTANCE GENE TO SMV₁

Liu Lijun Wu Junjiang Gao Mingjie Pu Guofeng Zhang Shuzhen Qiu Lijuan
Zheng Cuiming Xie Hua Hao Lianlin LiYuzheng

(Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract Soybean mosaic virus occurs worldwide and it is a major soybean disease in China. Applying the randomly amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique, we have analysed two soybean varieties which were resistant and susceptible to SMV₁ respectively. We have demonstrated the inheritance of resistance of Heinnong 39 by studying the progenies of the cross of Heinnong 39 X Hefeng 25. We have identified one RAPD marker, which was OPN_{1400/1300}, closely linked to SMV resistance gene by BSA in F₂ progenies of the cross with genetic distance of 8.2cM.

Key words Soybean; SMV₁; RAPD