

大豆对斜纹夜蛾抗生性基因的微卫星标记(SSR)的研究^{*}

王 慧 喻德跃^{*} 吴巧娟 盖钧镒^{**}

(南京农业大学大豆研究所, 国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要 以皖 82—178(抗)×通山薄皮黄豆甲(感)组合衍生的重组近交系群体为材料,以幼虫重为抗性鉴定指标,对大豆抗斜纹夜蛾的基因(QTL)进行 SSR 分子标记研究。从大豆公共连锁图谱(Cregan et al., 1999)7 个与抗性可能有关的连锁群上选取了 103 对 SSR 引物,鉴定亲本和 RIL 家系 DNA,其中 18 对引物在 RIL 家系间表现出多态性。应用 t 测验和方差分析法分析 SSR 标记与性状的连锁,并以 R^2 表示标记对性状变异的解释率。结果在 D2、C2、H 连锁群上分别找到一个与大豆对斜纹夜蛾抗性有关的 SSR 标记,即 Satt135、Satt363、Satt442,单个标记对抗性变异的解释率分别为 5.57%、2.89%、8.7%。

关键词 大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill); 斜纹夜蛾 (*Prodenia litura* (L.) Fabricius); 抗生性; SSR

中图分类号 S 565.103.4 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2004)02—0091—05

国际上大豆抗食叶性害虫标记的研究开展较早,主要围绕着 3 个 PI 资源(PI227687, PI171451, PI229358)展开的。与大豆对玉米穗螟抗性有关的基因(QTL)已经通过限制性片段多态性标记(RFLP)和微卫星标记(SSR)初步定位在大豆公共连锁图谱上^[1-5]。我国对大豆抗食叶性害虫的研究开始于 80 年代,已明确了南京地区大豆食叶性害虫主要来自 21 个科的 49 个种,其中斜纹夜蛾等是最重要的虫种;提出了一套以植株叶片受损程度为依据的抗性指标目测法和标准品种分级法;筛选出了一批对食叶性害虫具有综合抗性的种质;发现抗性机制突出表现为抗生性;利用单个世代和多个世代联合分析初步揭示出,分别以叶片受损程度和斜纹夜蛾幼虫重为指标的遗传机制,均表明大豆对斜纹夜蛾的抗性为两对主基因+多基因的混合遗传^[6-12]。

随着分子标记技术的发展,分子标记辅助选择逐步成为抗虫育种的重要手段。大豆抗虫性的许多方面的难点也有待于分子水平上的理解和验证,但

除了抗玉米穗螟基因的分子标记外国际上还没有大豆抗食叶性害虫基因的分子标记的报道。本研究应用抗×感虫大豆材料构建的 RIL 群体,对南方主要害虫斜纹夜蛾养虫鉴定,筛选与大豆对斜纹夜蛾抗性基因的相关 SSR 标记。

1 材料与方法

1.1 供试材料

皖 82—178×通山薄皮黄豆甲的 $F_{7:9}$ (139 个家系),由国家大豆改良中心种质资源研究室提供。2002 年,在南京农业大学江浦农场试验网室内采用完全随机试验设计,行播,7 月份播种,每家系一行,2m 行长,行距 0.4m。试验地四周种一行保护行。播前撒呋喃丹杀死地下害虫及上年虫蛹。播种后试验地在大豆整个生长期不内不使用任何杀虫剂。

1.2 室内养虫鉴定

田间斜纹夜蛾孵化高峰期采集初孵的幼虫,用软毛刷将幼虫轻轻拨入大号塑料杯中(口直径:8.5

^{*} 收稿日期:2003—12—03

基金项目:973 课题(G1998010206)和 863 课题(2002AA211052)

^{**} 联系作者:dyu@njau.edu.cn, sli@njau.edu.cn

作者简介:王慧(1977—),硕士,主要研究方向:植物分子遗传学。

cm 左右), 每杯 4 头, 分别用同一部位的不同家系大豆叶片喂养, 重复 2 次, 每天更换新鲜叶片, 喂养至第 10 天时称量幼虫重。

1.3 DNA 的提取

苗期从家系行内每株采摘嫩叶, 采下的叶片放入-70℃冰箱中速冻保存待用。CTAB 法提取 DNA^[13]。溶液配制参照《分子克隆实验指南》(第二

版)^[14]。

1.4 SSR 分析

引物筛选参考 Narvel 等 (2001), Rector 等 (1998, 1999, 2000), Terry 等 (2000) 的研究结果, 来自与抗虫性有关的 7 个连锁群, 共 103 对 (表 1)。引物序列来自 Soybase (<http://129.186.26.94/ssr.html>), 由上海申友和上海申能博彩合成。

表 1 所用引物名称及其所在的连锁群
Table 1 SSR markers and Linkage groups

C2		D1a+Q		D2		E		H	M	J
Satt363	Satt202	Satt136	Satt179	Satt461	Sct-008	Satt389	<u>Satt575</u>	<u>Satt353</u>	Satt404	Satt405
Satt-076	Satt170	Satt321	Satt203	Satt311	Satt135	Satt528	<u>Satt112</u>	Satt442	Satt201	Satt287
Satt286	Satt281	Satt254	Satt077	Satt226	Satt458	Satt514	Satt384	<u>Satt302</u>	Satt150	Sct-046
Satt277	Satt202	Satt370	Satt129	Satt464	Satt014	Satt488	Satt411	<u>Satt192</u>	Satt567	Satt406
<u>Satt365</u>		<u>Satt507</u>	Satt071	Satt543	Satt498	Satt082	Satt185	Satt052	Satt540	Sct-001
Satt489		Satt-106	Satt129	Satt574	Satt486	Satt-001	Satt204	Satt142	Satt463	Satt183
Satt134		Satt198	Satt147	Satt-022	Satt372	Satt301	Satt045	Satt181	Satt245	Satt249
Satt100		Satt436		Satt031	Satt582	Satt310	Satt117	Satt434	Satt323	Satt414
Satt079		Satt468		Satt386	Satt443	Satt413	Satt151	Satt253	Satt-003	Satt132
Sct-028		Satt-036		Satt397	Satt256		Satt268		Satt590	
Satt433		Satt032		Satt447	Sct-137				Satt175	

注: C2、D1a+Q、D2、E、H、J、M 为大豆公共图谱^[15]上的连锁群; 下划线标出 Terry et al (2000) 鉴定的与玉米穗螟抗性相关的 SSR 标记。
C2、D1a+Q、D2、E、H、J、M are linkage groups on the integrated genetic linkage map of soybean^[15]; SSR markers related to the soybean resistance to corn earworm were underlined (Terry et al., 2000).

SSR 扩增分析 PCR 反应总体积 20μl, 其中 Mg-Cl 21.5mM; dNTP (N=A, C, G, T) (上海申能博彩) 160μM, 1× 扩增反应缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl pH8.0; 500mmol/L KCl; 0.1% gelatin; 上海申能博彩); 1.2U Taq 酶 (上海申能博彩); 引物各 8pmol; 模板 DNA 50ng; 无菌超纯水加至 20μl。PCR 反应在 PE 热循环仪 (2400 型或 MJPTC-200 型) 上进行, 温度循环是 94℃ 3min, 一个循环; 95℃ 1min, 47℃ 1.5min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 8min, 4℃ 保温。扩增产物在 6% 非变性聚丙烯酰胺胶上电泳, 1× TBE 作为电泳缓冲液, 80V 电泳 2 个小时左右。

染色 固定液, 渗透液, 显色液和终止液的配置及染色步骤参考张军等^[16]。

1.5 统计分析方法

方差分析采用 SAS 统计软件分析。根据分子标记结果将数据分组, 利用方差相同的 t 测验检验组间平均数的差异, 确定标记与性状的连锁关系^[17]; 采用方差分析法估计标记与性状间的重组率^[18]; 而把性状与标记的回归方程中的决定系数

R² 作为标记能够解释的性状的比例^[19]。

2 结果与分析

2.1 群体的初步鉴定

幼虫重方差分析结果表明家系间差异显著, 重复间不显著, 可以对家系进行分析。2002 年夏季调查群体的花色分离情况, 开白花的家系有 74 株, 开紫花的家系有 65 株, 卡方值为 0.46, 小于 $\chi^2_{0.01}$ (3.84), 说明群体分布较好, 无明显偏分离。

2.2 标记的筛选

对特定引物对应的 SSR 位点, 母本带型赋值为 1, 父本带型赋值为 2, 群体对应引物的 SSR 带型与母本相同者记为 1, 与父本相同者记为 2, 杂异带型 (杂合型、异常型等) 记为 3, 数据缺失记为 0。

首先用所有的 103 对引物筛选亲本, 找出亲本间有多态的引物 28 个 (图 1), 然后用这些引物逐一筛选 RIL 家系, 得到家系间有多态的引物 18 对。对各个标记检验其在重组近交系群体中的分离比

例, 剔除 χ^2 测验不符合 1:1 分离的标记 6 个。再与幼虫重性状作 t 测验(表 2)。t 测验共检测出 3 个与抗虫性有关的 SSR 标记 Satt442(图 2), Satt135(图 3)和 Satt363, 分别位于 H、D2 和 C2 连锁群上。

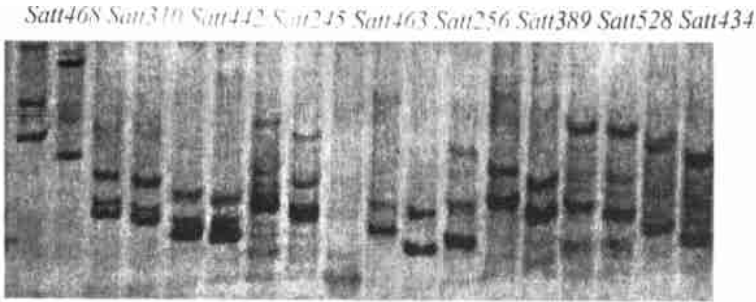


图 1 亲本间部分 SSR 引物多态性筛选

Fig. 1 Polymorphism selection between parents with SSR primers

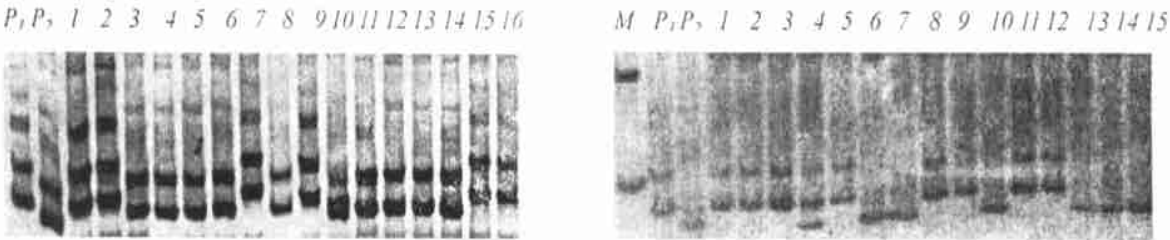


图 2 部分 RIL 家系的 Satt442 多态性

Fig. 2 Polymorphism among part of RIL lines with Satt442

图 3 部分 RIL 家系的 Satt135 多态性

Fig. 3 Polymorphism among part of RIL lines with Satt135

P₁: 皖 82—178, P₂: 通山薄皮黄豆甲

P₁: 皖 82—178 P₂: 通山薄皮黄豆甲

P₁: Wan82—178 P₂: Tongshanbopihuangdoujia

P₁: Wan82—178, P₂: Tongshanbopihuangdoujia

1—16: part of RIL(F₇ ♀) lines

1—15: part of RIL(F₇ ♀) lines

表 2 幼虫重与标记相关的 t 测验

Table 2 t-test between larval weight and markers

标记 Markers	df_1	\bar{x}	s_1^2	df_2	\bar{x}	s_2^2	s_e^2	$ t $
Satt281	74	0.35	0.0122	61	0.35	0.0133	0.0127	0.358
Satt 311	76	0.33	0.0140	52	0.37	0.0126	0.0134	1.723
Satt 574	77	0.34	0.0158	59	0.36	0.0102	0.0134	1.302
Satt—022	74	0.34	0.0138	58	0.35	0.0133	0.0136	0.235
Satt135	70	0.33	0.0097	64	0.38	0.0148	0.0122	2.630 **
Satt181	54	0.35	0.0098	82	0.35	0.0160	0.0136	0.127
Satt 436	73	0.34	0.0138	62	0.35	0.0134	0.0136	0.531
Satt 468	73	0.34	0.0138	62	0.35	0.0134	0.0136	0.531
Satt 363	67	0.33	0.0130	68	0.37	0.0136	0.0133	1.966 *
Satt 434	61	0.35	0.0116	71	0.34	0.0148	0.0133	0.267
Satt442	78	0.33	0.0109	56	0.39	0.0145	0.0124	3.526 **
Satt433	71	0.34	0.0112	64	0.36	0.0160	0.0135	1.287

注: *: 0.05 显著水平; **: 0.01 显著水平。
*: significant at 0.05 level; **: significant at 0.01 level.

2.3 幼虫重和标记的重组率估计

计算出亚组内方差 σ_W^2 、亚组间方差 σ_B^2 和统计量 $T = \sigma_B^2 / (\sigma_W^2 + \sigma_B^2)$, 及重组率的估计值 $\hat{r} = 1/2[(1 - \sqrt{T}) / (1 + \sqrt{T})]$ [18], 结果列于表 3。

连锁分析表明 Satt135, Satt363, Satt442 与幼虫

重的重组率估计值分别为 0.318、0.357、0.272。经 Koscombi 作图函数 $m = 1/4 \ln[(1 + 2r) / (1 - 2r)]$, 将重组率 r 转换成图距 m (表 3), 遗传距离分别为 37.7cM、44.8 cM、30.5 cM。单个标记对性状的变异解释率分别为 5.57%、2.89%和 8.7%(表 3)。

表 3 幼虫重与标记的重组率估算
Table 3 Recombinant—value estimated between larval weight and markers

标记 Markers	图谱上的位置 * Location on the map	σ^2_W	σ^2_B	T	\hat{r}	$m(cM)$	$R^2(\%)$
Satt135	D2	0.0122	0.0006	0.0492	0.318	37.7	5.57
Satt363	H	0.0133	0.0004	0.0278	0.357	44.8	2.89
Satt442	C2	0.0124	0.0012	0.0871	0.272	30.5	8.7

注: * Cregan et al., 1999

3 讨论

3.1 抗虫性 QTL

Terry 等在 7 个连锁群上已检测出了与玉米穗螟抗性有关的 QTL。利用这些抗玉米穗螟的标记筛选本试验中的作图群体皖 82—178×通山薄皮黄豆甲(F₇₋₉)，希望通过找到大豆抗斜纹夜蛾的 QTL

相关标记, 从而进一步找到大豆对田间综合虫种抗性的 QTL 相关标记。但从表 3 中可以看出, 本试验在相同的连锁群上都没有找到与前人相同的标记, 而且距离较远, 这说明, 对于一种害虫具有抗性的 QTL 并不一定兼抗其它虫种, 其抗性机制可能存在差异。因此在大豆抗虫育种中, 应首先针对不同虫种研究, 寻找大豆对各种虫种抗性的 QTL, 然后进行基因整合, 培育综合抗性的品种。

表 4 大豆抗玉米穗螟 QTL 与大豆抗斜纹夜蛾部分 QTL 标记的比较(C2, D2 和 H 连锁群)

连锁群 * Linkage groups	大豆抗玉米穗螟 QTL 标记 QTLs related to soybean resistance to com earworm	大豆抗斜纹夜蛾部分 QTL 标记 QTLs related to soybean resistance to cotton worm
C2	A132T—1(Rector et al., 1999) Satt365(Terry et al., 2000)	Satt363
D2	L204—2(Terry et al., 2000) R249(Rector et al., 1998, 1999); Sat—122(Narvel et al., 2001); Satt192, Satt302, Satt353 (Terry et al., 2000)	Satt135
H		Satt442

注: * Cregan et al., 1999。

3.2 分离分析与标记分析

分离分析与标记分析具有一致性^[19, 20], 即分离分析检测到主基因, 在分子标记分析中也能找到主效的 QTL。本试验中大豆对斜纹夜蛾抗性的分离分析表明为两对主基因+多基因的混合遗传模式, 但在标记分析中, 未能找到主效的 QTL(单个 QTL 的效应小于 10%)。一方面, 试验中筛选的 SSR 标记较少, 7 个连锁群 103 对引物, 不能用于构建整个该作图群体的连锁图谱, 而且这些标记是针对大豆抗玉米穗螟筛选的, 与本实验中的虫种不同(斜纹夜蛾); 另一方面, 亲本间多态性水平较低, 103 对引物, 仅有 18 对引物在群体中分离, 没能构建出任何一条连锁群。因此在 QTL 搜索时, 即不能在整个连锁图谱上搜索, 也不能在任何一个连锁群上搜索, 只能作单个标记与性状的分析, 而单标记遗传分析本身有误差, 控制抗性的 QTL 不止一个, 而单标记分析仅

检测出与其相连锁一个 QTL, 则其它 QTL 的效应就如环境效应一样影响连锁测验, 从而降低了检测 QTL 的效率。要弥补以上不足, 首先要增加 SSR 标记的数目; 其次, 增加标记的种类, 如 RFLP、RAPD 等, 构建出该作图群体的完整的连锁图谱, 使对大豆斜纹夜蛾抗性 QTL 的搜索能在整个连锁图谱上检测。另外应用分子生物学研究的新成果及其发展的新技术, 如表达序列(EST)数据库、反向遗传学分析、基因组序列的测定分析及 DNA 芯片技术等, 对大量的基因的功能及互作关系进行研究分析的结果, 开发出一些功能性标记, 加密大豆连锁图谱, 从而对抗虫 QTL 进行精细定位, 这是今后应该探索的内容。

参考文献

1. Rector, B. C., J. N. All, W. A. Parrott, et al. Identification of

molecular markers linked to quantitative trait loci for soybean resistance to corn earworm[J]. Theor. Appl. Genet., 1998, 96: 786—790.

2 Rector, B. G., J. N. All W. A. Parrott, et al Quantitative trait loci for antixenosis resistance to corn earworm in soybean[J]. Crop Sci., 1999, 39: 531—538.

3 Rector, B. G., J. N. All W. A. Parrott, et al Quantitative trait loci for antibiosis resistance to corn earworm in soybean[J]. Crop Sci., 2000, 40: 233—238.

4 Terry, L. L., K. Chase T. Jarvik, J. Orf, et al. Soybean quantitative trait loci for resistance to insects[J]. Crop Sci., 2000, 40: 375—382.

5 Narvel, J. M., David R. Walker, Brian G. Rector, et al. A Retrospective DNA marker assessment of the development of insect resistant soybean[J]. Crop Sci., 2001, 41: 1931—1939.

6 崔章林, 盖钧镒. 大豆抗食叶性害虫的研究进展[J]. 大豆科学, 1996, 15(2): 149—158.

7 崔章林, 盖钧镒. 大豆种质资源对食叶性害虫抗性的鉴定[J]. 大豆科学, 1997, 16(2): 93—102.

8 崔章林, 盖钧镒, 吉东风, 等. 南京地区大豆食叶性害虫调查与分析[J]. 大豆科学, 1997, 16(1): 12—20.

9 盖钧镒, 崔章林. 大豆抗食叶性害虫育种鉴定方法与指标[J]. 作物科学, 1997, 23(4): 400—407.

10 孙祖东, 盖钧镒. 大豆抗斜纹夜蛾幼虫的遗传研究[J]. 作物学报, 2000, 26(3): 341—346.

11 詹秋文, 盖钧镒, 章元明, 等. 大豆对斜纹夜蛾幼虫抗性遗传的发展表达过程[J]. 遗传学报, 2001, 28(10): 956—963.

12 王慧. 大豆对食叶性害虫抗性的遗传及其相关基因的 SSR 标记和定位的研究[D]. 硕士学位论文, 南京农业大学, 2003.

13 黄方. 大豆株型性状的遗传分析和 RAPD 标记研究[D]. 硕士学位论文, 南京农业大学, 2002.

14 金冬雁, 李蒙枫译. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1996.

15 Cregan P. B., T. Jarvik, A. L. Bush, et al An integrated genetic linkage map of the soybean genome[J]. Crop Sci., 1999, 39: 1464—1490.

16 张军, 武耀廷, 郭旺珍, 等. 棉花微卫星标记的 PAGE/ 银染检测[J]. 棉花学报, 2000, 12(5): 267—269.

17 翟虎渠. 应用数量遗传学[M]. 北京, 中国农业出版社, 2001.

18 胡中立, 何瑞峰, 张学富. 分子标记与 QTL 间连锁检测与估计的方差分析法及其应用[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1997, 43(4): 537—542.

19 徐吉臣, 邹亮星. 利用相关性鉴定与水稻根部性状表达相关的分子标记[J]. 遗传学报, 2002, 29(3): 245—249.

20 王永军. 大豆重组自交家系群体的构建与调整及其在遗传作图、抗花叶病毒基因定位和农艺及品质性状 QTL 分析中的应用[D]. 博士学位论文, 南京农业大学, 2001.

CHARACTENRIZATION OF RESISTANCE GENES TO COTTON WORM WITH SSR MARKERS IN SOYBEAN

Wang Hui Yu Deyue * Wu Qiaojuan Gai Junyi

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, National Center for Soybean Improvement; National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing, 210095,)

Abstract There have been few reports about molecular marker analysis of resistance to insect in soybean. This study was to determine quantitative trait loci (QTLs) associated with the soybean resistance to insect (Cotton Worm) by estimating linkage to simple sequence repeat (SSR) markers. Recombinant inbred lines (RILs) constructed through a cross between Wan82—178 and Tongshanbopihuangdoujia was used. Larval weight was examined in as index of resistance. Using the intergrated genetic linkage map of soybean (Cregan et al. 1999), we chose 103 SSR markers scattering on 7 linkage groups (LGs) that had the potential to map resistant QTL to screen polymorphic markers between Wan82—178 and Tongshanbopihuangdoujia. It was found that 18 SSR primers showed polymorphic DNA bands among these RIL lines. With t—test analysis and analysis of variance, three markers (Satt135, Satt363, Satt434) were found linked with the resistance genes, situating on three LGs i.e. D2, C2, and H. The individual effect of each marker was reported as R² value, i.e 5.57%, 2.89%, and 8.7% respectively.

Key words Soybean(*Glycine max* (L.) Merrill); Cotton Worm(*Prodenia litura* (L.)Fabricius); Antibiosis to insect ; SSR