

大豆疫霉根腐病分子生物学研究进展^{*}

肖淑芹¹ 胡远富² 薛春生¹ 段玉玺¹ 王斌斌²

(1. 沈阳农业大学植保学院, 农业部北方免疫重点开放实验室, 沈阳 110161;

2. 黑龙江省八五五农场, 密山市 158327)

摘要 大豆疫霉根腐病是严重威胁世界大豆生产的重要病害, 选育和利用抗病品种是防治大豆疫霉根腐病最有效的措施。本文就和品种合理布局密切相关大豆疫霉根腐病菌遗传多样性、无毒基因标记及克隆、抗病基因的的定位和抗性资源的分子鉴定等最近研究进展作一综述。

关键词 大豆疫霉根腐病; 分子生物学; 研究进展

中图分类号 S 435. 651 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2005)02—0139—05

由大豆疫霉菌 (*Phytophthora soja* M. J. Kaufmann & J. W. Gerdemann) 侵染引起的大豆疫霉根腐病 (*Phytophthora* Root Rot) 是严重危害大豆主要生产国的重要病害^[1], 1989 年, 中国东北地区首次发现大豆疫霉根腐病^[2], 现已在中国大豆的主产区黑龙江省和安徽省、内蒙古自治区、福建省及北京市、山东省等地发现大豆疫霉根腐病^[3-7]。目前大豆疫霉根腐病广泛发生于美国、阿根廷、巴西和中国等二十几个国家^[8, 9]。美国仅 1994 年和 1998 年分别损失 5.6×10^7 和 1.149×10^9 kg 大豆^[1], 1999 年, 黑龙江省大豆疫霉根腐病发病面积高达 2×10^4 hm²^[10], 大豆疫霉根腐病的发生将严重威胁我国的大豆生产。国内外研究证明利用抗、耐病大豆品种是防治大豆疫霉根腐病最有效的措施之一, 大豆疫霉菌生理小种的分布及抗病基因的的定位等方面研究是选育和利用抗病品种及合理布局的关键, 因此本文就国内外对大豆疫霉菌生理小种分子监测及抗大豆疫霉根腐病基因定位的研究进展进行综述。

1 大豆疫霉菌生理小种产生机制和遗传多样性

自鉴定出大豆疫霉菌的 1 号生理小种以来, 到目前为止, 美国已发现了 55 个生理小种, 其它的生理小种均是在种植含有 Rps 基因的大豆品种后被鉴定, 因此在大豆抗疫霉菌基因选择压力下产生突变是大豆疫霉菌产生新的生理小种的重要机制。另

外, Forster 等 1994 年的研究结果还表明大豆疫霉菌分离物之间具有很大的遗传变异, 认为除了无性繁殖进化外, 偶尔的异型杂交也是大豆疫霉菌新小种产生的重要机制^[11]。

Foster 等 (1994) 利用核 DNA 和线粒体 DNA 的 RFLP 标记方法, 分析 48 个 *P. sojae* 菌株后指出种内存在中度变异, 绝大数的变异都可在 P1658、P7064、P7074 和 P70764 等 4 个基因型中找到, 有证据表明其它菌株是由这 4 个基因型突变产生的, 而另外一些生理小种或致病型之间具有很大的遗传变异^[11]。Meng 等 (1999) 应用 RAPD 技术分析美国来自 4 个州的 55 个菌株后指出, 3、4、25 号小种为 I 群, 1、8、13 号小种为 II 群, 5 号小种为 III 群, 7 号小种为 IV 群^[9], 以上两种分子标记方法得出种内存在中度变异的相似结论, 但 RAPD 或 RFLP 图谱十分相似的菌株未必是属于同一小种, 而同一小种的图谱有时也存在很大的差异, 虽然 RAPD 和 RFLP 两种不同分子标记技术都将所鉴定的菌株分为 4 组, 但分类结果存在差异, 如 RFLP 标记方法中有 1 个 8 号小种的谱带与 1 号、13 号小种不同, 但用 RAPD 标记方法得到的结果却是 8 号小种谱带与 9 个 1 号小种和 2 个 13 号小种谱带相同。Drenth 等 (1996) 利用 RFLP 技术对澳大利亚大豆疫霉菌的 5 个生理小种的进化进行研究, 发现所有小种产生相同 RFLP 模式, 认为新小种是从一个共同遗传背景通过突变而产生^[12]。

^{*} 收稿日期: 2004—10—29

作者简介: 肖淑芹 (1971—), 女, 在读博士生, 助理研究员, 主要从事植物病理学教学与科研工作。

2 大豆疫霉菌无毒基因的标记及图位克隆

通过原生质体融合、营养缺陷性菌株的混合培养和抗药性突变体的混合培养已经证明大豆疫霉菌存在异核现象。由于存在异核株系, Bhat (1991) 发现从田间分离的 1 号和 4 号大豆疫霉菌生理小种单卵孢子分离物的自交一代(S₁)产生多个小种, 其中在 1 号小种的 S₁ 代中 1 号小种和无毒基因的分离表现为 3 : 1 的孟德尔单基因分离^[13]。另外, 已有研究证明在混合培养的同宗株系中可以发生低频率但能检测得到的异型杂交。杂种系可以利用双倍抑制剂培养基从带有不同抗药性突变体的亲本中筛选并利用分子标记方法进行鉴定。用获得的杂交 F₁ 代自交产生 F₂ 群体进行遗传分析, 发现无毒基因和分子标记按孟德尔规律分离, 与 7 个抗性基因 Rps1a、1b、1c、1d、1k、3a、6 相对应的无毒基因 Avr1a、1b、1c、1d、1k、3a、6 为显性单基因^[14、15], 与 Rps3b、3c、4 相对应的 Avr3b、3c、4 为半显性, 其中 Avr4 和 Avr6、Avr1b 和 Avr1k、Avr3a 和 Avr5 绝对连锁, Avr1b 和 Avr1k 的物理距离只有 60kb^[16], 存在于同一个 BAC 克隆 3E—16 中, Avr3a 和 Avr5 的遗传距离为 4. 5cM^[17、18]。

MacGregor(2002)确定了与 Avr1a 连锁的 7 个

RAPD 或 AFLP 遗传标记, 利用 F₂ 群体中 90 个体对所有标记遗传分析表明, 有 1 个标记与 Avr1a 共分离, 用此标记筛选 *P. sojae* 的 BAC 文库, 构建了 170kb 的物理图谱, 又获得了新的遗传标记, 与 Avr1a 的物理距离为 114kb, 在此区域遗传距离与物理距离的比为 391kb/cM, 此项工作为利用图位克隆的方法获得 Avr1a 基因奠定了良好的基础^[19]。Shan(2004)用图位克隆的方法获得了 Avr1b—1cDNA 全长, 其编码 138 个氨基酸的不含二硫桥的小疏水分泌蛋白, 其中有一个 21 个氨基酸的分泌前导信号肽, 富含 α 螺旋, 与 RAN 结合蛋白、细胞色素 c 有较高的同源性。核酸序列经与 GenBank 比对后发现, 除了与来源于 *P. infestons* 的 3 个与分泌蛋白的 EST 有同源性外, 与其它序列无明显同源性^[16]。

3 抗大豆疫霉根腐病基因定位及图位克隆

大豆对疫霉根腐病的抗性由两类基因所决定, 一类是由单基因或寡基因控制的质量性状抗病性(即符合基因对基因假说), 此类抗性可抵御病害的扩展, 自 Bernard^[20] (1957)等鉴定出了第一个大豆疫霉根腐病的抗病基因 Rps1 以来, 到目前为止, 已经鉴定了 14 个抗病基因分布于 8 个不同的位点上,

表 1 抗大豆疫霉根腐病基因

Table 1 Resistant genes to phytophthora root rot of soybean

抗病基因 (R gene)	无毒基因 (Avr gene)	连锁群 (MLG)	代表品种 (Cultivar)	参考文献 (Ref.)
Rps1a	Avr1a	N	Harlon	Bernard et al. 1957 ^[20]
Rps1b	Avr1b	N	Harosoy13XY	Bernard et al. 1957 ^[20]
Rps1c	Avr1c	N	Williams 79	Bernard et al. 1957 ^[20]
Rps1d	Avr1d	N	PI103091	Bernard et al. 1957 ^[20]
Rps1k	Avr1k	N	Williams 82	Bernard et al. 1957 ^[20]
Rps2	Avr2	J	L76—1988	Kilen et al. 1974 ^[27]
Rps3a	Avr3a	F	Chapman	Mueller et al. 1978 ^[28]
Rps3b	Avr3b	F	PRX146—36	Mueller et al. 1978 ^[28]
Rps3c	Avr3c	F	PRX145—48	Mueller et al. 1978 ^[28]
Rps4	Avr4	G	L85—2352	Athow et al. 1980 ^[29]
Rps5	Avr5		L85—3059	Buzzelland Anderson, 1981 ^[30]
Rps6	Avr6	G	Harosoy62XX	Athow and Laviolette, 1982 ^[31]
Rps7		N	Hamosoy	Anderson and Buzzell, 1992 ^[32]
Rps8		A2	PI399073	Burnham, et al. 2003 ^[23]

利用 AFLP、RAPD 和 SSR 等标记将 14 个抗病基因定位于大豆的不同连锁群 (molecular linkage groups, MLGs) 上 (见表 1), Rps4 和 Rps6、Rps1 和 Rps7 分别位于同一连锁群^[21, 22], Rps8 来源于韩国引进品种 PI399037。Burnham (2002) 利用 SSR 标记鉴定引进种资源的抗病性时发现与抗病性相关的 6 个标记中有 3 个位于同一连锁群, 推测该连锁群存在一个主效抗病单基因, 2003 年, Burnham 在抗病性鉴定的基础上, 利用 RFLP、SSR 和同功酶标记对 PI399037× "Williams" PI399037× "S19-90" F₂ 群体进行分析, 鉴定了一个新的抗病基因 Rps8 位于 MLG A₂ 连锁群^[23], Gardner (2001) 利用三体杂交的方法将 Rps1k 和其所在的连锁群 N 定位于 3 号染色体上, 将遗传图谱转成了物理图谱^[24], Bhattacharya 克隆了抗病基因 Rps1k, 其编码亮氨酸拉链 (LZ)、亮氨酸重复序列 (LRR) 和核苷酸结合位点 (NBS) 结构域 (私人通讯), Shan 推测 Rps1b 也编码胞内 NBS-LRR 结构域的蛋白^[16]。

另外一类抗性由多基因控制的数量性状抗病性, 主要表现为减少病害造成的损失^[25], 症状上主要表现为降低根部腐烂的损失程度, 对已发现的疫霉菌所有生理小种都具有相同的抗性。用具有部分抗性品种 "Conrad" 分别与 "Sloan"、"Harosoy" 和 "Williams" 三个具有不同抗病基因的品种杂交, 获得三个标记群体, 用温室接种观察根部病斑扩展速度结合 SSR 引物标记抗疫霉根腐病的 QTL 的方法, 将控制数量性状抗病性的 QTL 定位于大豆连锁群 (molecular linkage groups, MLGs) F 和 D1b+W 中, 其中 MLG F 连锁群的 QTL 可以分别解释 "Conrad" × "Sloan" 群体变异的 32.4%、"Conrad" × "Harosoy" 群体变异的 35.0% 和 "Conrad" × "Williams" 群体变异的 21.4%, MLG D1b+W 连锁群的 QTL 可以解释同样三个群体变异的 10.6、15.9 和 20.7%。MLG F 连锁群的 QTL 对遗传变异的解释显得更有价值^[26]。

4 抗大豆疫霉根腐病种质资源的分子鉴定

美国 1947—1988 年育出的大豆品种中 80% 的基因主要来自 13 个品系。目前, 北美生产上应用的大豆品种超过 500 份, 但绝大多数属于两个不同的基因池, 即南方池和北方池, 池内遗传基础狭窄^[33, 34], 因此, 美国大豆种质资源一直存在的遗传基

础狭窄的问题没有得到很好的解决^[35]。为拓宽大豆抗疫霉根腐病的种质资源, 美国从外国大量引进大豆品种, 其中 93% 的大豆引进种质资源来自于韩国、中国和日本。对于种质资源的抗病性鉴定过去一直采用温室接种的传统方法, 但易受环境 (温度、光照) 及其它因素 (接种技术和接种浓度) 的影响, 尤其当一个品种中存在着两个或更多的抗病基因时, 用常规接种方法是检测不出来的, 如果想检测全部基因, 必须接全部的生理小种进行鉴定, 因此工作的强度较大。随着分子标记技术的发展, 现已利用分子标记方法中的 RFLP、RAPD^[36-38] 以及 SSR^[39] 方法分析大豆种质的遗传多样性以及分析引进种质资源对大豆疫霉根腐病抗性情况, 3 种分子标记方法中以 SSR 方法最为方便, 可以检测单位点遗传也可以检测到多个基因。Burnham (2002) 用 52 对 SSR 引物对从韩国、日本和中国引进的 93 份大豆品种和 15 个基因型的美国大豆品种进行鉴定, 来源于韩国的品种中有 32 份抗性资源, 49 份部分抗性资源, 7 份为感病品种, 试验结果表明可以用 SSR 标记的方法鉴定韩国大豆品种对大豆疫霉菌的抗病性, 所采用的 SSR 标记中有 6 个引物 (Satt216, Satt228, Satt409, Satt458, Satt534 和 Satt589) 与韩国大豆品种抗疫霉菌相关, 其中 3 个标记 (Satt228, Satt409 和 Satt589) 位于连锁群 MLG A₂, 表明可能在 MLG A₂ 存在一个主效抗病基因。用遗传距离分析软件 NTSYSpc (2.00) 分析, 表明韩国可能存在着与美国不同的抗疫霉根腐病的种质资源, 中国和美国的大豆亲缘关系较近可划分为一组, 而韩国和日本的关系较近可划分为另一组^[41]。Hegstad (1998) 利用 RFLP 标记结合温室接种的方法, 采用 1、3、5、8、12、13 和 25 号生理小种进行接种鉴定了 500 份来自中国的大豆品种, 其中 1 个品种具有 Rps1a、5 个品种具有 Rps2、7 个品种具有 Rps3、4 个品种具有 Rps4, 另外 8 个品种中存在多个抗病基因, 而 PI567343, 567530, 567572A, 567574A, 567583A, 567764 和 567766 等品种可能存在新的抗病基因^[42]。

2002 年, 美国全国科学基金会、农业部和能源部宣布, 将共同出资 400 万美元支持对农作物疫霉菌基因组的研究, 这笔资金将主要用于测定两种疫霉菌的基因组序列, 其中一种即是大豆疫霉菌^[43]。由此可见, 利用分子生物学的理论与方法一方面从植物源挖掘大豆抗疫霉根腐病基因, 另一方面以疫霉菌的全基因组序列为基础的进行致病基因识别与功能分析, 将有效的解决大豆疫霉根腐病对全世界大

豆生产所造成的难题。

参 考 文 献

- Wrather J A, Anderson T R, Arsyad D M, et al. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998[J]. Can. J. Plant Pathol. 2001, 23: 115—121.
- 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫病的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 298
- 王佐魁, 陈申宽, 闫任沛, 等. 呼盟农区大豆新病害—大豆疫病[J]. 内蒙古农业科技, 2000(3): 43—44
- 黄振刚, 靳相成, 马玉华, 等. 呼伦贝尔盟大豆疫病病原菌鉴定[J]. 内蒙古农业科技, 1999(4): 21
- 李宝英, 马淑梅. 大豆疫霉病研究初报[J]. 大豆科学, 1996, 15(2): 164—165.
- 朱振东, 王化波, 王晓鸣, 等. 中国大豆疫霉菌分布及毒力多样性研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(7): 793—799
- 陈庆河, 翁启勇, 王源超, 等. 福建省大豆疫病病原鉴定及其核糖体 DNA—ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2004(34) 2: 112—116.
- Schmitthenner A F. Phytophthora rot[A]. Compendium of Soybean Diseases, 3rd ed[M]. APS Press, The American Phytopathological Society, 198
- Meng X Q, Shoemaker R C, Yang X B. Analysis of pathogenicity and genetic variation among *Phytophthora sojae* isolates using RAPD[J]. Mycol. Res., 1999, 103(2): 17—178.
- 马淑梅, 李宝英. 大豆疫霉根腐病菌生理小种鉴定结果初报[J]. 大豆科学, 1999, 18(2): 151—153.
- Forster H, Tyler B M, Coffey M D. *Phytophthora sojae* have arisen by clone evolution & rare out cross[J]. Molecular Plant—Microbe Interactions, 1994, 7: 780—791.
- Drenth A, Whisson S C, Maclean D J, et al. Phytopathology, 1996, 86: 163—169.
- Bhat R G. Genetics of virulence in *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [D]. Ph. D. Dissertation, The Ohio State University, Columbus, OH, 1991.
- Whisson S C, Drenth A, Maclean D J, et al. Evidence for outcrossing in *Phytophthora sojae* and linkage of DNA marker to two avirulence genes[J]. Curr. Genet. 1994, 27: 77—82.
- Whisson S C, Drenth A, Maclean D J, et al. *Phytophthora sojae* avirulence genes. RAPD and RFLP markers used to construct a detailed genetic linkage map. Mol. Plant Microbe Interact. 1995, 8: 988—995.
- Shan W X, Cao M B, Leung D, et al. The Avr1b Locus of *Phytophthora sojae* Encodes an Elicitor and a Regulator Required for Avirulence on Soybean Plants Carrying Resistance Gene Rps1bMolecular plant—Microbe Interactions, 2004, 17(4): 394—403
- Tyler B M, Forster H, Coffey M D. Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism. markers in outcrosses of the oomycete *Phytophthora sojae*[J]. Mol. Plant—Microbe Interact. 1995, 8: 515—523.
- Gijzen M, Forster H, Coffey M D, et al. Cosegregation of Avr4 and Avr6 in *Phytophthora sojae* [J]. Can. J. Bot., 1996b, 74: 800—802.
- MacGregor T, Bhattacharyya M, Tyler B, et al. Genetic and Physical Mapping of Avr1a in *Phytophthora sojae* [J]. Genetics 2002, 160: 949—959
- Bernard R L, Smith P E, Kaufmann M J, et al. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean[J]. Agron J. 49: 391.
- Cregan P B, Jarvik T, Bush A. L et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome[J]. Crop Sci. 1999, 39: 1464—1490.
- Anderson T R, Buzzell R I. Inheritance and linkage of the Rps7 gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean[J]. Plant Dis. 1992, 76: 958—959.
- Burnham K D, Dorrance A E, Francis D M. Rps8, A New Locus in Soybean for Resistance to *Phytophthora sojae* [J]. Crop Sci., 2003, 43: 101—105.
- Gardner M E, Hymowitz Xu S J, et al. Physical Map Location of the Rps1—k Allele in Soybean[J]. Crop Sci. 2001, 41: 1435—1438.
- Schmitthenner A F. 1985. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean[J]. Plant Dis. 69: 362—368.
- Burnham K D, Dorrance A E, Van Toai T T. Quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean[J]. 2003, 43(5): 1610—1617.
- Kilen T C, Hartwig E E, Keeling B L. Inheritance of a second major gene for resistance to *Phytophthora* root rot in soybeans[J]. Crop Sci., 1974, 14: 260—262.
- Mueller E H, Athow K L, Laviolette F A. Inheritance of resistance to four physiologic races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Phytopathology., 1978, 68: 1318—1322.
- Athow K L, Laviolette F A, Mueller E H, et al. A new major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean[J]. Phytopathology, 1980 70: 977—980.
- Buzzell R I, Anderson T R. Another major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybeans[J]. Soybean Genet. Newsl., 1981, 8: 30—33.
- Athow K L, Laviolette F A. Rps6, a major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean[J]. Phytopathology, 1982, 72: 1564—1567.
- Anderson T R, Buzzell R I. Inheritance and linkage of the Rps7 gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean. Plant Dis., 1992, 76: 958—959.
- Kisha T J, Diers B W, Hoyt J M. Genetic diversity among soybean plant introductions and north American germplasm. Crop Sci., 1998, 38: 1669—1680.
- Gizlice Z, Carter T E, Burton J W. Genetic diversity in North American soybean: I. multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage[J]. Crop Sci., 1993, 33: 614—620.
- Delaney X, Rodgers D M, Palmer R G. Relative contribution a

- among ancestral lines to North American soybean cultivars[J] . Crop Sci., 1983, 23: 944—949.
- 36 Hegstad J M, Nickell C D, Vodkin L O. Identifying Resistance to *Phytophthora sojae* in Selected Soybean Accessions Using RFLP Techniques[J] . Crop Sci., 1998, 38: 50—55
- 37 Diers B W, Mansur L, Imsande J. Mapping phytophthora resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. Crop Sci., 1992, 32: 377—383.
- 38 Byrum J R, Kimbirauskas P M, Shoemaker R C. Identification of a RAPD marker linked to the Rps4 gene in soybean[*Glycine max* (L.) Merr.] . Soybean Genet. Newsl., 1993, 20: 112—117.
- 39 Brown Guedira G L, Hompson J A, Nelson R L. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. Crop Sci., 2000, 40: 815—823.
- 40 Dorrance A E, Schmitthenner A F. New sources of resistance to *Phytophthora sojae* in the soybean plant introductions. Plant Dis., 2000, 84: 1303—1308.
- 41 Burnham K D, Francis D, Dorrance M, et al. Genetic Diversity patterns among phytophthora resistant soybean plant introductions based on SSR markers. Crop Sci., 2002, 42: 338—343.
- 42 Hegstad J M, Nickell C D, Vodkin L O. Identifying resistance to *Phytophthora sojae* in selected soybean accessions using RFLP techniques. Crop Sci., 1998, 38: 50—55.
- 43 中外科技信息. 科技发展动态. 2002, 11: 68.

RECENT ADVANCES ON *PHYTOPHTHORA* ROOT ROT OF SOYBEAN IN MOLECULAR BIOLOGY

Xiao Shuqin¹ Hu Yuanfu² Xue Chunsheng¹ Duan Yuxi¹ Wang Binbin²

(1 *Shen yang Agricultural University, Shenyang, 110161*; 2 *Heilongjiang Bawuwu Farm, Mishan, 158327*)

Abstract *Phytophthora* root rot, caused by *Phytophthora sojae*, is a key disease on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) that affect Seriously damages soybean yields in the world. Resistant cultivars are the one of effective methods to control *Phytophthora* root rot of soybean. This review focused on the genetic diversity, A vr gene marked and cloned of *Phytophthora sojae*, R gene located and resistant resources molecular identified of soybean. Heavy selective pressures of Rps were major mechanism of new races happening. *P. sojae* appearance showed a moderate degree of diversity by RFLP markers. Avr1a, —1b, —1d, —1k, —3a, —4, and —6 were single dominant genes. Full length Avr1b—1 cDNA was isolated from P7064 by reverse transcriptase—PCR (RT—PCR) and sequenced. There were 14 single dominant resistance genes at 8 different loci to control the identified *Phytophthora*, Rpslk had been cloned and encodes an intracellular coiled—coil class NBS—LRR protein. Resistance of germplasm could be evaluated by simple sequence repeat (SSR), RFLP and RAPD markers. Partial resistance to *Phytophthora sojae* was expressed as a reduced level of root rot and was effective against all populations of the pathogen.

Key words *Phytophthora* root rot; Molecular biology