

大豆孢囊线虫抗性基因的分子标记研究进展^{*}

王彩洁¹ 徐冉¹ 张礼凤¹ 王凤月²

(1. 山东省农业科学院作物研究所, 济南 250100; 2. 巨野县农业局农技站, 菏泽 274000)

THE STUDIES OF MOLECULAR MARKER OF RESISTANT GENES ON SOYBEAN CYST NEMATODE

Wang Caijie¹ Xu Ran¹ Zhang Lifeng¹ Wang Fengyue²

(1. Crop Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, 250100;
2. Agricultural Office of Juye County, Heze, 274000)

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)03-0216-04

大豆孢囊线虫 (*Heterodera Glycines Ichinohe*, SCN) 是世界大豆生产的一种毁灭性病害, 主要分布于中国、美国、巴西、日本等国家, 对大豆生产危害极大。大豆孢囊线虫每年给全世界造成的粮食损失为 900 万吨, 在我国已成为东北、黄淮大豆产区最重要的大豆病害, 发病区域占种植区域的 90% 以上, 受害地块减产 10%—90% 不等。抵抗这种病害最有效的方法是选育抗性品种。但利用传统方法选育抗性品种, 进展较缓慢。近年来分子生物学发展异常迅速, 其中与作物遗传育种密切相关的分子标记更是令人瞩目。DNA 分子标记是 DNA 水平遗传变异的直接反映, 它具有不受发育时期和环境影响、数量丰富、遗传稳定等优点, 因此得到了育种家们的普遍欢迎。近十年来, 国内外研究学者尤其是美国的研究者们, 围绕大豆对孢囊线虫的抗性, 应用新兴的分子生物学技术, 展开了大量的研究, 他们在抗性遗传研究、目标基因的标记及标记辅助选择、遗传图谱建立与基因克隆等方面作了大量工作, 下面将分别简述之。

1 抗性遗传研究

1.1 抗性位点的确定

大豆对孢囊线虫抗性位点的确定, 由于选用的亲本遗传背景、针对的生理小种各异, 研究结果不一致, 但也得出了一些规律性的结论, 研究表明, 对 1 号生理小种的抗病性由 3 对独立的隐性基因控制; PI90763 对 2 号生理小种的抗病性在 1 号生理小种的抗源 Peking 遗传背景下, 由一对独立的显性基因控制; 对 3 号生理小种的抗病性至少需要 3 对独立的隐性和 1 对显性基因控制, 非等位基因之间存在互作; 对 4、5、14 号生理小种的抗病性, 各研究结果间不一致, 由多对独立的隐性或显性基因控制。到目前为止, 已经命名的基因有 rhg1、rhg2、rhg3、Rhg4、rhg5。近年来, 各国的研究者应用分子标记技术作了进一步的研究。Yue 认为对 SCN 的抗性由多位点控制, 在 PI438489B 和 PI89772 品系中对 1、2、3、5 和 14 号小种的抗性由 2—6 个位点控制, 有的位点对多个生理小种有抗性, 而有的位点具有小种特异性, 位于连锁群 G 上的一个位点对 1、2、3、5 号小种都具有抗性, 而位于连锁群 B1 上的一个位点只对 1、2、5 号小种有抗性, 在 PI438489B 的遗传背景下, 对 14 号生理小种的抗性似乎有些不同。第二年又采用 PI89772 与 Hamilton 杂交的 F₂ 群体, 用已发现的 39 个 RFLP 标记与 54 个 SSR 标记来检验对各小种的抗性位点, 发现对每一小种的抗

^{*} 收稿日期: 2004-12-13

作者简介: 王彩洁 (1972—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事大豆遗传育种工作。

性一般有 2—3 个位点控制,在连锁群 G 上,不同小种的抗性位点集中在一个区域,连锁群 B1 上的一个区域,也集中拥有 1、2、5 号小种的抗性位点,研究结果发现,对任一小种没有单一位点能够提供完整抗性,主要位点组合在一起将提供高水平抗性。随后又在 PI438489B 的遗传背景下,利用与 Hamilton 杂交的 F_2 群体,研究对多个孢囊线虫小种的遗传,发现对不同小种的抗性基因是相似的,一些位点具有小种特异性,对 14 号小种的抗性与其他小种不同。Antonio Orlando 等利用 BR90—4722 与 FT—Cristalina 杂交的 F_2 群体分析了大豆对孢囊线虫 3 号生理小种的遗传,结果显示,在该群体中对孢囊线虫的抗性为质量性状,由三个基因控制,一个为显性,两个为隐性,遗传率为 0.96。综上所述,尽管前人对孢囊线虫抗性遗传的研究结果不尽一致,但多数人的研究却认为位于连锁群 G 上的基因 rhg1 及位于连锁群 A2 上的 Rhg4 基因对任何抗性品种都是必需的。

1.2 QTL 的定位

如果将大豆抗大豆孢囊线虫作为数量性状对待,通过分子标记进行遗传作图,可以寻找和抗大豆孢囊线虫有关的 QTL。Concibido 等通过对 4 个最广泛使用的抗源 PI209332、PI90673、PI88788 和 Peking 的分析,找到了 4 个与 SCN 抗性有关的 QTL。这些 QTL 分别位于连锁群 G 的 C006V 附近、A378H 附近、连锁群 J 的 B032V—1 附近和连锁群 N 的 A280Hae—1 附近。其中,连锁群 G 上的 C006V 附近的 QTL 最为重要,因为它不但在 4 个抗源材料中都可检测到,而且具有非小种抗性,最多可解释总变异的 50%。此位点对 SCN 抗病育种和抗病基因的最终克隆具有特殊意义。Wang D 等用 PI468916 与 A81—356022 杂交得到的 57 个 F_2 个体,采用复合区间作图法,寻找抗 3 号小种的 QTL,发现了 3 个 QTL,能够解释遗传变异的 5%—27%,同时用 F_2 群体中含有两个 QTL 的单株同 A81—356022 回交,在 100 个 BC_1F_2 个体中进行检测,结果显示这两个 QTL 效应显著,认为这些 QTL 的发现丰富了孢囊线虫抗性基因库。K. D. Glover 等定位与验证在栽培品种 Bell 的遗传背景下,与 SCN 抗性有关的 QTL,用 3 个 NILs 群体,得到了对 3 号小种有抗性的 QTL,位于连锁群 J 上。D. M. Webb 等利用 PI437654 与 BSR101 的 296 个重组自交系群体和 RFLP 标记定位了 3 个 QTL 抗性位点,发现具有 3 个抗性位点中的任何 2 个位点的品系,比

具有 1 个位点的品系根部着生的孢囊少得多,而只具有 1 个抗性位点的品系比不具有任何抗性位点的品系,根部着生的孢囊相近。Vergel C 总结了 10 年来大豆孢囊线虫抗性 QTL 的定位情况,认为有一些连续性的结果,尽管大部分的研究,都应用了不同的抗源,但效应最大的 QTL 都定位到了包含 rhg1 的连锁群 G 上,主要的 QTL 定位到了包含 Rhg4 的连锁群 A2 上,来自不同抗源的 QTL 定位到了相同区域,说明它们具有相同的抗性基因,这使人们认为大豆孢囊线虫的抗性可能依赖于少数几个基因。

2 目标基因的标记及辅助选择

2.1 目标基因的标记

寻找与目标基因连锁的分子标记可为遗传育种的早期辅助选择提供不受环境影响的遗传标记,可为分离、克隆目的基因提供必需的探针。Mahalingam 和 Skorupska 以 Excess×Peking 的 F_2 代作为材料,利用 3 个形态标记、108 个 RFLP 标记和 400 个 RAPD 标记对大豆孢囊线虫 3 号小种抗性进行研究。结果表明,控制颜色(黑色)的 1 位点与 3 号小种的抗性基因 Rhg4 紧密连锁,相距仅 0.6cM,另两个 RFLP 标记 pA85a(连锁群 A)、pA136(连锁群 C)和 3 个 RAPD 标记 E01、S07a(连锁群 A)和 G15d(连锁群 F)也不同程度地与抗病基因连锁。由此推断,3 号小种的抗性受多个基因控制,且每个基因位点的作用程度均不相同。Qiu 等用 Peking×Essex 的 $F_{2,3}$ 群体筛选出 5 个 RFLP: A598、T005(位于连锁群 B)、A108(连锁群 E)、K014、B072(连锁群 H)与 1 号小种抗性座位连锁;B072、K014 和 T005 与 3 号小种抗性座位连锁;K011(连锁群 I)、A963(连锁群 E)与 5 号小种抗性座位连锁。Ude 等用 64 个 AFLP 引物组合、93 个 F_4 重组自交系(RIL)个体鉴定与抗孢囊线虫 3 号生理小种 QTL 连锁的分子标记,发现 AFLP8、AFLP16 和 AFLP17 与之相连锁,其中 AFLP8、AFLP16 位于 QTL 一侧,距离分别为 26.5cM、6.6cM、AFLP17 位于另一侧,距离为 16.7cM,位于连锁群 G 上的 SSR 标记 Satt309 与该 QTL 连锁,距离为 7.1cM,表明该 QTL 位于连锁群 G 上,并且认为这些标记的取得可使抗孢囊线虫育种的标记辅助选择更容易。颜清上等利用 RAPD 标记技术初步找到抗大豆孢囊线虫 4 号生理小种的标记。

2.2 标记辅助选择

传统育种是通过表现型间接对基因型进行选择,这种选择方法对简单的质量性状而言一般是有效的,但对数量性状来说,效率很低,而利用与目标基因紧密连锁的分子标记进行选择则可以解决这一困难。Won—Gyeong 用同 rhg1 基因连锁的 Satt309 标记与同 Rhg4 基因连锁的 Primer548/563 标记,筛选了 44 个韩国大豆种质,发现基于 Satt309 标记有 7 个栽培种对孢囊线虫是敏感的,基于 Primer548/563 标记所有的品种都不抗孢囊线虫,在 Rhg4 位点上都为隐性,认为目前在韩国不存在抗孢囊线虫群体。同时又用这两个标记对 4 个 F₂ 群体基因型进行辅助选择研究,发现 Primer548/563 标记在 F₂ 群体中符合 3:1 的分离比例, Satt309 符合 1:2:1 的分离比例,在这 4 个群体中,有 272 个基因型含有 Primer548/563 标记,70 个 F₂ 基因型含有 Satt309 标记,共有 40 个 F₂ 个体同时含有这两个标记,这些个体同时被证明含有 rhg1 基因与 Rhg4 基因。Mudge 等以 PI437654, PI90763、PI209322、PI88788 和 Peking 为抗源材料,发现有 2 个 SSR 座位(BARC—Satt038, BARC—Satt130)与 rhg1 连锁, BARC—Satt038 距离 rhg1 3cM, BARC—Satt130 距离 rhg1 120cM。在此基础上, Cregan 等用 2 个 SSR 标记(Satt309, Sat—168)进一步分析表明,进行分子标记辅助选择时, Satt309 只能区分来源于 PI437654, PI90763、PI209322、PI88788 和 Peking 抗源和大部分感病材料,不能区分 US 南方感病材料与 PI209332、PI88788。Sat—168 能区分 PI209332、PI88788 与 US 南方感病材料 Lee、Bragg 和 Esses。Satt309, Sat—168 同时应用可区分在 rhg1 座位表现感、抗 SCN 的材料。

3 分子作图及基因克隆

构建分子标记的遗传连锁图,可以了解不同分子标记及基因在染色体上的相对位置或排列情况,以便于更有效的利用分子标记提供的有效信息。而对目的基因进行克隆,可以更清楚地了解基因的结构与功能,以便于进行遗传转化。Benjamin 认为 3 号小种为美国中部的优势小种,而 Rhg4 基因为 3 号小种的抗性基因。该研究室发现两个 DNAR—FLO 探针非常紧密地与控制种皮颜色的 I 位点和 Rhg4 位点连锁,从而为绘制该区域的连锁图和克隆

抗性基因提供了条件。并且以 Peking 与 Kent 的 1150 个 F₂ 群体,围绕 Rhg4 基因构建了详细的连锁图。Khalid 发现在大豆栽培种 Forrest 中,有两个染色体区域,一个在 IgG 上,另一个在 IgA2 上,这两个区域构成了 3 号小种抗性的主要区域,围绕 rhg1、Rhg4 位点构建了物理图谱,从 Forrest 的 BAC 文库中,筛选了 rhg1、Rhg4 的候选基因系列,鸟枪法基因测序,CDNA 杂交和引物扩增证明每个基因包括 3 个功能部分,一个细胞外的富含亮氨酸的重复序列,一个跨膜延伸区域,一个激酶区域,显示了与水稻抗病基因 Xa21 高度的同源性, rhg1、Rhg4 相近的功能同源暗示 rhg 基因功能二聚化,这可以解释自然界中宿主与病原体的变化以及抗性的双基因模式。Vergel 报道了两个独立的研究组最近开始克隆 rhg1 与 Rhg4 的一些情况,尽管取得了一些可喜的成就,但还有一些令人担心的情况,那就是,在使用 rhg1 与 Rhg4 的遗传图谱与克隆信息的时候,不得不考虑知识产权的问题。

4 展望

将他们的研究结果进行一下小结,得出如下结论:1)对任一小种没有单一位点能够提供完整抗性,每一小种的抗性一般有 2—6 个位点控制;2)不同的小种之间在抗性位点上具有一些共性,尽管不同的小种有不同的位点控制,但其中有一些位点对每一小种的抗性都是必需的。目前比较公认的是 rhg1 与 Rhg4 位点,已分别被定位到连锁群 G 与 A2 上,并且分离到了紧密连锁的分子标记,其中与 rhg1 紧密连锁的分子标记 Satt309 已开始用于标记辅助选择。美国有的研究组甚至已经开始了部分克隆工作,这两个位点的分离对孢囊线虫抗性育种的意义将是非常远大的,是否还存在其他的同类位点还有待进一步研究;3)大部分位点具有小种特异性,这是不同小种之间的个性差异。针对该研究目前存在的不足,提出以下几点建议:1)大部分研究集中在 3 号生理小种上,对其他生理小种的研究却涉及甚少,希望在今后的研究中加大对其它生理小种的研究力度;2)把目前已取得的标记加以整合,汇聚到一张连锁图上,做到资源共享。

参考文献

- 1 Won Gyeong Park, Myung Sik Kim, Mi Suk Ko, et al. Selection of

- F₂ genotype resistant to soybean cyst nematode using molecular markers[J]. Korean Journal of Breeding, 2003, 35, 154—158.
- 2 Park Won Gyeong, Park Min Jung, Chung Jong, et al. Molecular marker analysis for resistance of soybean cultivars to soybean cyst nematode[J]. Korean Journal of Crop Science, 2002, 47, 319—322.
- 3 G. N. Ude, J. M. Costa, W. J. Costa, et al. AFLP markers associated with a QTL for resistance to soybean cyst nematode—3 [J]. Journal of Genetics & Breeding, 2002, 56, 213—220.
- 4 Yuan J, Njiti VN, Meksem K, et al. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance[J]. Crop Science, 2002, 42, 271—277.
- 5 Lewers K, Heinz R, Beard H, et al. A physical map of a gene—dense region in soybean linkage group A2 near the black seed coat and Rhg(4) loci[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104, 254—260.
- 6 Wang D, Arelli PR, Shoemaker RC, et al. Loci underlying resistance to Race 3 of soybean cyst nematode in Glycine soja plant introduction PI468916 [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103, 561—566.
- 7 Meksem K, Pantazopoulos P, Njiti VN, et al. 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic, saturation mapping of the Rhg1 and Rhg4 loci[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103, 710—717.
- 8 Lewers KS, Nilmalgoda SD, Warner AL, et al. Physical mapping of resistant and susceptible soybean genomes near the soybean cyst nematode resistance gene Rhg(4) [J]. Genome. 2001, 44, 1057—1064.
- 9 Yue P, Sleper DA, Arelli PR. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI438489B[J]. Theoretical and Applied Genetics. 2001, 102, 921—928.
- 10 Yue, Pin. Genetics of resistance to *Heterodera glycines* races in two soybean plant introductions[C]. University of Missouri—Columbia. 2000, 1—146.
- 11 Prakash R, Arelli, David A. Sleper, Pin Yue. Soybean reaction to races 1 and 2 of *Heterodera glycines*[J]. Crop Science. 2000, 40, 824—826.
- 12 Pin Yue, David A. Sleper, Prakash R, Arelli. Mapping resistance to multiple races of *Heterodera glycines* in soybean PI89772[J]. Crop Science. 2001, 41, 1589—1595.
- 13 Naoma S, Nelsen, Zhigang Li, April L. Genomic polymorphism identifies a subtilisin—like protease near the Rhg4 locus in soybean[J]. Crop Science. 2004, 44, 265—273.
- 14 K.D. Glover, D. Wang, P. R. Arelli, et al. Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI8788 on linkage group J[J]. Crop Science. 2004, 44, 936—941.
- 15 邢邯. 大豆对胞囊线虫 1 号生理小种抗性的鉴定、遗传与选育研究[J]. 博士学位论文, 南京农业大学 1998.
- 16 顾清上, 王岚, 李莹, 等. 利用 RAPD 技术寻找大豆胞囊线虫 4 号生理小种标记初报[J]. 大豆科学, 1996, 17(2), 126—129.

欢迎订阅 2006 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的全国性学术刊物。主要刊登农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、生态、种质资源、谷物化学、贮藏加工以及与农作物有关的生物技术、生物数学、生物物理、农业气象等领域以第一手资料撰写的学术论文、研究报告、简报以及专题综述、评述等。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》从 1999 年起连续 3 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助, 是我国连续 3 次获得资助的 15 种期刊之一。从 1997 年起连续 8 年获得中国科协“择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助经费”的资助。从 2002 年起连续 3 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览(2004 年版)》登载,《作物学报》被列在“农学、农作物类核心期刊表”的第一名。2005 年 2 月获“第三届国家期刊奖提名奖”, 这是我国期刊界的最高奖项。

《作物学报》为月刊, 2006 年 160 页/期, 定价: 30 元/册, 全年 360 元。可通过全国各地邮局订阅, 刊号: ISSN 0496—3490, CN 11—1809/S, 邮发代号: 82—336。也可向编辑部直接订购。

编辑部地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农科院作物所《作物学报》编辑部(邮编 100081)

联系电话: 010—68918548; 传真: 010—68918747

银行汇款: 交通银行北京分行农科院分理处, 户名: 中国作物学会, 帐号: 060435018001069607

网址: <http://www.chinacrops.org>; <http://xbzw.chinajournal.net.cn>; <http://zuowxb.periodicals.net.cn>

E-mail: xbzw@chinajournal.net.cn; zwxb301@mail.caas.net.cn