

# 耐大豆疫霉根腐病 QTL 定位的研究<sup>\*</sup>

韩英鹏<sup>1</sup> 李文滨<sup>1</sup> Kangfu Yu<sup>2</sup> Terry R. Anderson<sup>2</sup>  
Vaino Poyso<sup>2</sup> 文景芝<sup>3</sup> 高继国<sup>4</sup>

(1. 东北农业大学大豆研究所, 哈尔滨 150030; 2. 加拿大农业部温室与加工研究所 加拿大;  
3. 东北农业大学农学院植保系, 哈尔滨 150030; 4. 东北农业大学生命科学院, 哈尔滨 150030)

**摘要** 利用 1200 个 RAPD 随机引物和 341 对 SSR 引物对 Conrad × OX760 的重组自交系 (RIL) F<sub>2:6</sub> 群体的耐大豆疫霉根腐病基因进行 QTL 定位。试验设两个地点、两个年限, 在 MLG D1b+W 和 MLG M 连锁群上检测到 3 个 QTL, 即 QP-1 (OPL18-800bp)、QP-2 (OPN03-600bp) 和 QP-3 (Satt536 和 Satt463)。每个 QTL 对病害损失率的贡献率从 13.34% 到 22.31% 不等。QP-1 和 QP-2 经多重 QTL 分析 (Mapmaker/ QTL1.1) 对两年 (2000 年和 2001 年) 两点 (Woodslee 和 Werver) 平均病害损失率的贡献率合计达 44.5%, QP-3 对 2001 年 Woodslee 试验点的病害损失率的贡献率为 15.2%, QP-1 对 2000 年 Woodslee 试验点的病害损失率的贡献率为 21.55%, 对 2000 年 Werver 试验点的病害损失率的贡献率 16.71%, 及对两年两点平均病害损失率的贡献率为 22.31%。在大多数生态环境下能稳定的、再次被检测出的 QTL, 可以作为育种工作中的重点选择指标, 用以指导耐大豆疫霉根腐病品种的分子辅助选育。

**关键词** 大豆; 疫霉根腐病; QTL; 抗病性

中图分类号 S 565.108 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)01-0023-05

大豆疫霉根腐病是一种由大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 引起的危害大豆生产的世界性病害。虽然它的起源相对较晚, 但由于其危害面积大、毁灭性强, 使其成为危害大豆的唯一的疫霉病害 (Schmitthenner, 1985)。大豆疫霉菌是具有寄主专化性的致病菌, 前人研究表明大豆疫霉菌与大豆品种之间互作具有基因对基因的特性。据有关报道, 已在 7 个位点发现 13 个具有抗病作用 Rps 基因。据此, 世界上绝大多数国家选育具有垂直抗性的品种, 但到目前为止, 还没有发现抗所有生理小种的大豆品种 (Ward 1990, Anderson 和 Buzzell, 1992)。由于大豆疫霉菌在与寄主抗病性互作中, 其毒力也在演变和快速进化, 新的生理小种不断出现, 目前国际上已报道了 63 个大豆疫霉菌生理小种 (Morgan, 1965; Leitz 和 Hartman, 2000)。更为严重的是新出现的生理小种具有更强的致病性。因此选育抗病型大豆新品种, 减轻新生理小种不断出

现的压力, 已是亟待解决的问题 (Shafer 1971, Thomison 等, 1988)。利用水平抗性培育抗病性品种, 目前得到国际上越来越多的重视。利用抗病品种和感病品系杂交的重组自交系, 发掘与抗病相关的 QTL 报道甚少, 尤其在未见报道。本研究采用了 RAPD 和 SSR 两种分子标记来研究与耐大豆疫霉根腐病相关的、在大多数生态环境下能稳定的、再次被检测出的 QTLs, 可以作为育种工作中的重点选择指标, 用以指导耐大豆疫霉根腐病品种的分子辅助选育。

## 1 材料与方法

### 1.1 品种材料

本研究材料采用感病品系 OX760 和抗病品种 Conrad 的杂交 F<sub>6</sub> 代重组自交系。OX760 是由加拿

\* 收稿日期: 2005-04-14

项目来源: 本研究是 863 项目《大豆优质多抗基因分子标记辅助育种及聚合育种技术》的部分内容 (项目编号: 2003AA207060-4)。

作者简介: 韩英鹏 (1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向大豆生物技术。

通讯作者: 李文滨, E-mail: wenbinli@yahoo.com, 高继国

大 Harrow 温室与加工作物研究所选育的极易感大豆疫霉根腐病的品系, Conrad ( Fether 等, 1989) 是经过多年实践证明耐大豆疫霉根腐病的品种。

## 1.2 耐病性鉴定

本研究耐病性于 2000 年在加拿大两个地点 ( Woodslee 和 Weaver) 进行鉴定, 于 2001 年在一个地点 ( Woodslee) 进行鉴定。本研究两次耐病性鉴定在 Woodslee 试验点进行, 该地是自从 1975 年就用来对大豆品种和大豆品系的疫霉根腐病耐病性进行鉴定的自然发病地块。在过去的调查中 Weaver 试验点是大豆疫霉根腐病自然发病率较高的地区 ( Anderson 和 Buzzel, 1992) 。耐病性调查期主要在出苗到 R<sub>3</sub> 时期, 并且以表现出大豆疫霉根腐病发病特征的植株和发病后倒下的植株为准。这些植株在过去的调查中显著地与植株的耐病性相关 ( Buzzel 和 Anderson, 1982) 。具有特征性褐色枯斑枝叶的 ( 死亡的、即将死亡的、枯萎的) 植株 ( 这些植株的枯斑从根部延伸到茎部较低的节位) 即被认为有疫霉根腐病, 然而植株带有褐斑虽表示该植株被大豆疫霉根腐病感染, 但并不被列为感疫霉根腐病之列。本研究采取完全随机区组设计, 3m 行长, 每行 50 粒种子, 两次重复。损失率 = [ ( 出苗的植株数 - 站立的植株数) / 出苗的植株数] × 100 %。

## 1.3 PCR 扩增与检测

本研究采用 RAPD 和 SSR 两种标记技术, 其中 RAPD 引物 1200 个, SSR 引物 341 对, 均由上海博亚生物技术有限公司合成。

F<sub>2</sub> 重组自交系在温室种植, 在每个株行随机收获足够叶片, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 方法参照 Yu K, S. J. ( 1999) 。

RAPD 扩增采用 20 μL 反应体系, 包括模板 DNA ( 20ng / μL) 2 μL, 超纯水 11. 5 μL, 缓冲液 2 μL, 氯化镁 ( 25 mM ) 2 μL, 引物 ( 10ng / μL) 2 μL, dNTP ( 10mM ) 0. 3 μL, Taq 酶 ( 10U / μL) 0. 2 μL。RAPD 扩增反应在 PTC - 100 TM peltiter thermal cycler 中进行, 94 °C 预变性 2min, 然后进入循环: 94 °C 变性 1min; 36 °C 复性 1min; 72 °C 延伸 1 min; 循环 41 次后在 72 °C 延伸 10min, 置于 4 °C 下保存。PCR 产物在 1. 5 % 琼脂糖上电泳分离后, 检测照相。

SSR 扩增采用 20 μL 反应体系, 包括模板 DNA ( 50ng / μL) 2 μL, 超纯水 11. 5 μL, 缓冲液 2 μL, 氯化镁 ( 25 mM ) 2 μL, 引物 ( 2 pM ) 2 μL, dNTP ( 10mM ) 0. 3 μL, Taq 酶 ( 10U / μL) 0. 2 μL。SSR 反应在 PTC - 100 TM peltiter thermal cycler 中进行, 在

94 °C 预变性 5min, 然后进入循环: 94 °C 变性 30 sec; 47 °C 复性 30 sec; 72 °C 延伸 30 sec; 循环 35 次后在 72 °C 延伸 5 min, 置于 4 °C 下保存。PCR 产物加上 8 μL 甲酰胺双色缓冲液 ( 2. 5mg / mL 溴酚兰, 2. 5 mg / mL 二甲苯青, 10mM EDTA , 95 % 去离子甲酰胺), 置于 PTC - 100 TM peltiter thermal cycler 中变性 5min, 迅速放入冰水混合物中冷却。PCR 产物在 POWER PAC 3000 电泳仪中 100W 恒功率下, 以 6 % 聚丙烯酰胺标准测序胶为介质, 以 1 × TBE 为缓冲液, 电泳分离 ( Bassam 等, 1991; Trigi-zano 等, 1998) , 快速银染后检测。

## 1.4 遗传作图和 QTL 分析及基因型记载

本研究利用 Mapmaker / EXP3. 0b ( Lander 等, 1987) 构建分子标记连锁图谱, 利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传图距 ( cM) , 以最大图距 30 cM 作为划分连锁群和排列分子标记的基准距离。利用 WinQTL2. 0 软件复合区间法进行 QTL 检测, LOD 大于 2. 0 作为 QTL 存在的阈值, 将来源于亲本 OX760 带型记为 A, 来源于 Conrad 带型记为 B, 双亲杂合带型记为 H, 缺失记为 “ - ”。大豆分子遗传图谱由 Mapchart2. 1 来制作。

# 2 结果与分析

## 2.1 连锁分析

用 341 个 SSR 引物分析父母本 ( OX760 和 Conrad) 间存在的多态性, 其中 89 个 SSR 标记在父母本间存在多态性, 这 89 个多态性 SSR 标记在重组自交系上扩增, 有 49 个 SSR 标记在重组自交系上表现出良好的多态性, 占 14. 37 %。这 49 个 SSR 标记汇总加拿大 Harrow 温室与作物加工研究所已经验证的在重组自交系上具有多态性的 85 个 SSR 标记, 共有 134 个 SSR 标记用于连锁分析。用 1200 个 RAPD 引物分析父母本 ( OX760 和 Conrad) 间存在的多态性, 其中 202 个 RAPD 标记在父母本间存在多态性, 这 202 个 RAPD 标记在重组自交系上扩增, 有 39 个 RAPD 标记表现出良好的可重复的多态性, 占 3. 25 %。因此共有 173 个 SSR 和 RAPD 标记用于连锁分析。其中有 101 个 SSR 和 RAPD 标记被分配到 1999 年 Cregan 定义的 20 条染色体中的 17 条染色体上, 其中有两染色体 ( MLG D1b + W 和 MLGM) 和大豆疫霉根腐病显著相关 ( 图 1) 。这 101 个 SSR 和 RAPD 分子标记总长约为 3000 cM, 分子标记间的平均距离为 29. 7cM, 几乎覆

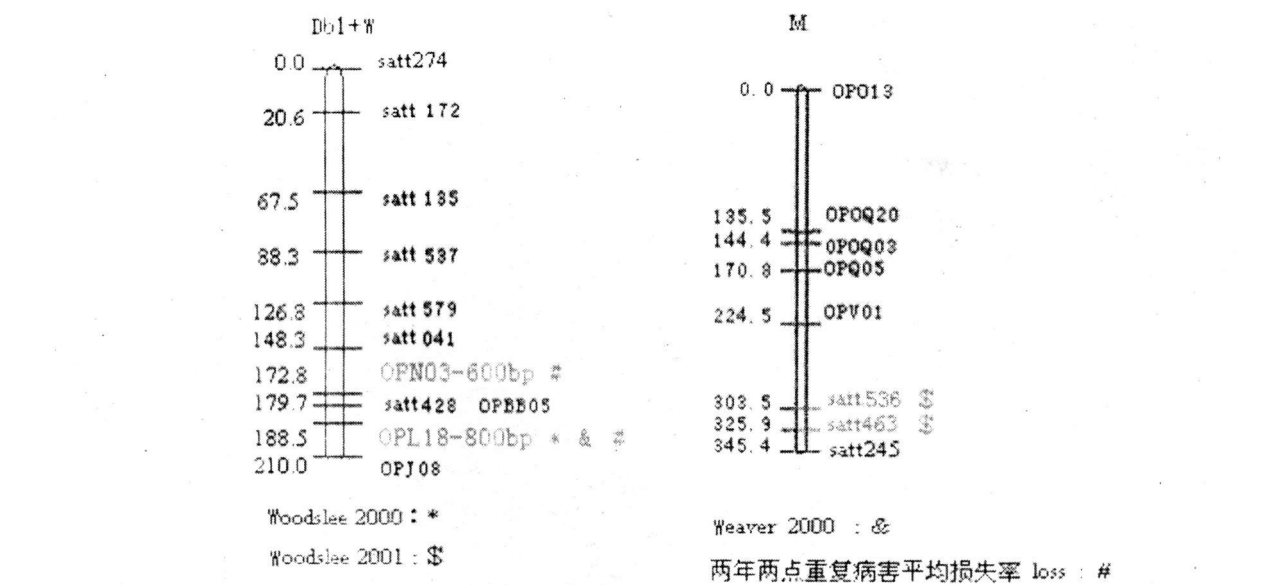


图1 大豆分子遗传图谱

Fig. 1 Soybean molecular genetic map based on RAPD markers and SSR markers

盖整个染色体组。

2.2 耐大豆疫霉根腐病 QTL 分析

当 LOD 阈值为 2.0 时, 共有 67 个分子标记用于连锁分析和 QTL 定位。经过 WinQTL 2.0 复合区间法计算, 共有 4 个分子标记( OPL18 – 800bp、OPN03 – 600bp、Satt463 和 Satt536)与大豆疫霉根腐病显著相关(表 1)。这些分子标记对病害损失率贡献率从 13.34% 到 22.31% 不等。OPL18 – 800bp 和 OPN03 – 600bp 定位在连锁群 MLG D1b + W 上, 遗传距离相距 13.74cM; Satt463 和 Satt536 定位在 MLG M 上, 遗传距离相距 23.37 cM, 2000 年的 Woodslee 试验点和 Wever 试验点及两年(2000 年和 2001 年)两点( Woodslee 和 Wever) 平均病害损失率与 OPL18 – 800bp 显著相关, 对病害损失率贡献率分别为 21.55%、16.71% 和 22.31%。OPN03 – 600bp 与两年两点平均病害损

表 1 与大豆疫霉根腐病相关的分子标记

Table 1 Markers associated with PRR

连锁群 Linkage	分子标记 Marker	年份 Year	地点 Location	R <sup>2</sup> (%)	LOD
D1b+W	OPL18-800bp	2000	Woodslee	21.55	3.7367
D1b+W	OPL18-800bp	2000	Wever	16.71	2.5737
M	Satt536	2001	Woodslee	15.57	2.3083
M	Satt463	2001	Woodslee	14.71	2.3025
D1b+W	OPL18-800bp	2000+2001	Woodslee+Wever	22.31	5.9764
D1b+W	OPN03-600bp	2000+2001	Woodslee+Wever	13.34	3.3910

注: R<sup>2</sup> 表示该分子标记对变异贡献率的大小, LOD 表示最大似然值。

Note: R<sup>2</sup> is R-square or the proportion of the phenotypic data explained by the marker locus; and LOD is log of odd score.

失率显著相关, 且两年两点平均病害损失率的贡献率为 13.34%。Satt463 和 Satt536 与 2001 年的 Woodslee 试验点显著相关, 且病害损失率的贡献率分别为 15.57%和 14.71%。

多重 QTL 分析(Mapmaker / QTL1.1)表明 QP – 1 (OPL18 – 800bp)和 QP – 2 (OPN03 – 600bp)对两年两点平均病害损失率的贡献率为 44.5%, QP – 3 (Satt536 和 Satt463)对 2001 年 Woodslee 试验点的变异贡献率为 15.2% (表 2)。

表 2 多重 QTL 分析所得的大豆疫霉根腐病相关的遗传位点

Table 2 Multiple genetic loci jointly associated with PRR

年份 Year	连锁群 Linkage	分子标记 Marker	R <sup>2</sup> (%)
2001	MLG M	Satt536+Satt463	15.2%
2000+2001	MLG D1b+W	OPL18-800bp +OPN03-600bp	44.5%

注: R<sup>2</sup> 表示该分子标记对变异贡献率的大小。

Note: R<sup>2</sup> is R-square or the proportion of the phenotypic data explained by the marker locus.

OPL18 – 800bp 与 QP – 1 相距 10. 37cM, OPN03 – 600bp 与 QP – 2 相距 5. 11cM; QP – 1 对 2000 年 Woodslee 试验点的病害损失率的贡献率为 21. 55%, 对 2000 年 Wever 试验点的病害损失率的贡献率 16. 71%, 对两年两点平均病害损失率的变

异贡献率为 22. 31%; QP – 3 在 Satt536 和 Satt463 之间, 分别与二者相距 16. 48 cM 和 6. 88 cM (图 1)。经 Chi – test 测验 ( $P < 0. 05$ ), OPL18 – 800bp、OPN03 – 600bp、Satt463 和 Satt536 的 AA: BB 符合 1: 1 的分离比例(如表 3)。

表 3 Conrad× OX760 杂交所衍生 F<sub>6</sub> 代个体与大豆疫霉根腐病相关位点分离情况的  $\chi^2$  测验  
Table 3 Segregation of the marker loci associated with PRR in the F<sub>6</sub> population (Conrad/OX760) consisting of 62 lines and tests for distortion using Chi – square tests

分子标记 Marker	连锁群 Linkage	分子标记位点分离 Marker genotype			$\chi^2$	Df	P
		AA	BB	N			
OPL18 – 800bp	D1b+ W	33	29	62	0. 258	1	0. 61143
OPN03 – 600bp	D1b+ W	30	29	59	0. 161	1	0. 896417
Satt536	M	29	31	60	0. 129	1	0. 796253
Satt463	M	34	28	62	0. 580	1	0. 44606

注: 基因型 AA 是与 Conrad 同源的等位基因, 基因型 BB 是与 OX760 同源的等位基因。N 是有效记数的非缺失的群体数,  $\chi^2$  是 Chi – square 测验, Df 代表  $\chi^2$  的自由度, P 代表犯第一类错误的概率, 在每个位点期望分离的 AA: BB 比率为 1 : 1。  
Note: Genotype AA is homozygous for Conrad allele, and genotype BB is homozygous for OX760 allele. N is the total number of plants that have valid scores.  $\chi^2$  is the Chi – square. Df is the degree of freedom for Chi – square test. P represents the Type I errors rate for Chi – square test. The expected ratio of AA: BB for each loci is 1 : 1.

### 3 讨论

本研究采用 341 对 SSR 引物, 其中 45 个 SSR 引物表现出明显的多态性, 具有较高的检测效率。RAPD 引物只有 10 个碱基, 引物和模板之间发生错配率极高, 并且是一种显性标记, 很容易将非同源扩增片段误认为是一个位点, 导致错误检测。而 SSR 引物大多有 20 个碱基左右, 因此错误检测位点概率较低。本研究检测到的 OPBB05 – 1000bp 和 Satt428 同属相同的位点, 出现该种情况可能是因为两种标记方式不同而检测到相同的位点, 也有可能是由于 RAPD 标记的上述弱点而造成的错误检测位点。验证 OPBB05 – 1000bp 和 Satt428 是否在同一个个位点的最直接的方法是将二者的 PCR 产物回收测序, 并进行序列比较。在 QTL 定位过程中, 可采取适当扩大群体的方式来尽量避免出现该情况。

大豆疫霉根腐病的生理小种众多, 目前国际上已报道了 63 个( Morgan, 1965; Leitz 和 Hartman, 2000), 其发生、流行又受环境影响极大, 且本研究的抗病性分析是在自然发病的地块进行的, 因而对抗病性鉴定产生了一定影响, 这又直接影响 QTL 分析。故本研究采取两年( 2000 年和 2001 年) 两点( Woodslee 和 Werwer) 平均病害损失率和各年各个地点分别分析的方法, 并且进行了对数转换以使其符合正态分布。但只有 OPL18 – 800bp 在 2000 年

Woodslee 和 Wever 两个试验点, 以及两年两点平均病害损失率显著相关; OPN03 – 600bp 只与两年两点平均病害损失率显著相关; Satt536 和 Satt463 只与 2001 年 Woodslee 试验点显著相关。由于对大豆病害抗病性研究较少且目前所报道的 QTL 对病害的贡献率大多都很低, 例如 Arahana 等( 2001 年) 所报道的白僵病 QTLs 对病害损失率的贡献率只有 10% 左右, 而本研究检测出的 QTLs 对大豆疫霉根腐病病害损失率的贡献率接近 50%, 这是过去未见报道的。

本研究材料选自加拿大的抗病品种 Conrad 和感病品系 OX760 及二者杂交所得重组自交系 F<sub>2:6</sub>。较小群体样本可能会降低检测的效率, 但是主效 QTL 仍然可以被检测出来。例如 OPL18 – 800bp 在 2000 年与 Woodslee 试验点、Wever 试验点和两年两点平均病害损失率显著相关, 对病害损失率的贡献率分别为 21. 55%、16. 71% 和 22. 31% ; Satt463 和 Satt536 与 2001 年 Woodslee 试验点的显著相关, 对当年的病害损失率的贡献率分别为 15. 57% 和 14. 71%。本研究发现与耐大豆疫霉根腐病相关的、在大多数生态环境下能稳定的、再次被检测出的 QTLs, 可以作为育种工作中的重点选择指标, 用以指导耐大豆疫霉根腐病品种的分子辅助选育。

### 参 考 文 献

1 Schmitthenner, A. F. Promblems and progress in control of Phy

- trophthora root rot of soybean[ J ]. Plant Dis, 1985, 69: 362 – 368.
- 2 Fairs M. A., and F. E. Sabo. The systematics of *Phytophthora sojae* and *P. megasperma* [ J ]. Can. J. Bot. 1989, 67: 1442.
- 3 Ward E. W. B., The interaction of soya beans with *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea*; pathogenicity . Biological control of soilborne plant pathogens[ M ]. Edit by Hornby B. CAB International, Wallingford, England. 1990, 3111 – 327.
- 4 Anderson T. R. R. I. Buzzell Diversity and frequency of races of *Phytophthora sojae* f. sp. *glycinea* in soybean field in Essex County, Ontario 1980 ~ 1989[ J ]. Plant Disease 1992, 67: 587 – 589.
- 5 Morgan F. L. New Physiologic race of *Phytophthora megasperma* Var. *sojae* [ J ]. Phytopathology, 1965, 55: 1277 – 1279.
- 6 Leiz R. A., Harman G. L. Races of *Phytophthora sojae* on Soybean in Illinois[ J ]. Plant Disease, 2000, 84: 487.
- 7 Drenth A, Whisson S. C., MacLean D. J., et al. The evolution of *Phytophthora sojae* in Australia[ J ]. Phytopathology, 1996, 86 (2): 163 – 169.
- 8 Schafer J. F. Tolerant to plant disease. Annual Rev[ J ]. Phytopathology, 1971, 9: 235 – 252.
- 9 Thomison P. R., Thomas, W. J. Kenworth. Evidence of pathogen specificity in tolerance of soybean cultivars to phytophthora rot[ J ]. Crop Sci., 1988, 28: 714 – 715.
- 10 Fehr, W. R., S. R., et al. Registration of Conrad soybean[ J ]. Crop Sci., 1989, 29: 830.
- 11 Buzzell R. L., T. R. Anderson. Plant loss response of soybean cultivars to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* under field conditions[ J ]. Plant Disease 1982, 66: 1146 – 1148.
- 12 Yu K. S. J., Park, V. Poysa. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (Phaseolus and Vigna)[ J ]. Genome, 1999, 42: 27 – 34.
- 13 Bassam, B. J., G. Caetano – Anolles, P. M. Gresshoff Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[ J ]. Anal Biochem, 1991, 196: 80 – 83.
- 14 Tringano, R. N., G. Caetano – Anolles Laboratory exercises on DNA amplification fingerprinting for evaluating the molecular diversity of horticultural species[ J ]. Hort Technol. 1998, 8: 413 – 423.
- 15 Lander E. S., Green, J. Abrahamson, A. Barlow, et al. MapMaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations[ J ]. Genomics, 1987, 1: 174 – 181.
- 16 Cregan P. B., T. Jarvik An integrated genetic linkage map of the soybean genome[ J ]. Crop Sci., 1999, 39: 1464 – 1490.
- 17 Arachana V. S., G. L. Graef, J. E. Specht, et al. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean[ J ]. Crop Sci., 2001, 41: 180 – 188.

## MAPPING QUANTITATIVE TRAIT LOCI INFLUENCING TOLERANCE TO PHYTOPHTHORA ROOT ROT IN SOYBEAN

Han Yingpeng<sup>1</sup> Li Wenbin<sup>1</sup> Kangfu Yu<sup>2</sup> Terry R. Anderson<sup>2</sup> Vaino Poysa<sup>2</sup>  
Wen Jingzhi<sup>3</sup> Gao Jiguo<sup>4</sup>

(1. Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Agriculture and Agri food Canada, Greenhouse and Processing Crop Research Center, Canada; 3. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 4. Department of Plant Protection, Agricultural college, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

**Abstract** The purpose of this research is to identify quantitative trait loci (QTLs) on the linkage groups which are associated with Soybean phytophthora root rot (PRR), in a population from a cross between Conrad, a soybean cultivar tolerance to PRR in the field, and OX760, a breeding lines susceptible to phythora. DNA amplified via polymerase chain reaction using simple sequence repeat (SSR) marker and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) marker. Based on the data of PRR at two locations, Woodslee (2000 and 2001), Weaver (2000), and the two locations, two years average loss, four markers OPL18 – 800bp, OPN03 – 600bp; Satt536, Satt463, from two linkage groups, MLGD1b+W, MLGM, were significantly associated with PRR. Each marker explained 13.34% to 22.31% of phenotypic variance. Three putative QTLs: QP – 1(OPL18 – 800bp) QP – 2(OPN03 – 600bp), QP – 3(Satt536 and Satt463) corresponding to these four markers, were designed. Multiple QTL analysis( Mapmaker / QTL1.1) showed QP1 and QP – 2 jointly explained 44.5% of the phenotypic variance for the two locations, two years average loss. QP – 3 explained 15.2% of the phenotypic variance in Woodslee for 2001. QP – 1 explained 21.55% of that in Woodslee for 2000, 16.71% of that in Weaver for 2000, 22.31% of that for the two locations, two years average loss. Few QTLs were detected to be stable across most environments, which was useful for marker assisted breeding.

**Key words** Soybean; Phytophthora root rot; QTLs; Tolerance