大豆胞囊线虫抗性基因的SSR标记研究

王 惠,于佰双[2],段玉玺[3],陈立杰[3]

(1.沈阳农业大学生物科学技术学院,沈阳 110161;2.黑龙江省农业科学院大豆研究所,哈尔滨 150086;3.沈阳农业大学植物保护学院,沈阳 110161)

摘要 大豆胞囊线虫病是世界大豆产区危害最重的病害之一。本文以高抗大豆胞囊线虫3号生理小种的黑豆品种小粒黑豆为父本,以高感大豆胞囊线虫3号生理小种的品种辽豆10号为母本配制杂交组合。利用分离群体分组分析法(BSA)对辽豆10号×小粒黑豆杂交组合的F_2代大豆材料的基因组DNA进行了SSR分析,供试的204对SSR引物有15对具有多态性,从中筛选到一个与大豆胞囊线虫抗性基因相关的分子标记Satt187,其片段大小为172 bp和176 bp,为共显性标记,在F_2代分离群体中的分离比为1:2:1,呈孟德尔式遗传。应用该标记对辽豆10×小粒黑豆F_2代分离群体进行分子标记鉴定和辅助选择,在抗病单株中均检测到标记带Satt187-176 bp的存在,而在感病单株中检测到有Satt187-176 bp和Satt187-172 bp两种标记带或仅有Satt187-172 bp的标记带存在,分析表明该标记具有抗胞囊线虫分子标记辅助选择应用的前景。

关键词 大豆;大豆胞囊线虫;BSA;抗性基因;SSR标记

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0204-04

A SENSITIVE MOLECULAR MARKER SSR ASSOCIATED WITH RESISTANT GENE TO HETERODERA GLYCINES

WANG Hui[1], YU Bai-shuang[2], DUAN Yu-xi[3], CHEN Li-jie[3]

(1. *Department of Biological Science and Technology*, *Shenyang Agricultural University*, *Shenyang* 110161; 2. *Soybean Research Institute*, *Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences*, *Harbin* 150086; 3. *Department of Plant Protection*, *Shenyang Agricultural University*, *Shenyang* 110161)

Abstract Soybean cyst nematode is one of the most serious diseases in the world soybean areas. The cross combination was made by the resistant soybean cultivar Xiaoliheidou as male parent and the susceptible Liaodou 10 as female parent. In the F_2 population the resistance was identified to Heterodera glycines Race 3 for every plant and separated the DNA from each plant. F_2 populations of Liaodou 10×Xiaoliheidou were analyzed with 204 pairs of SSR. There were 15 pairs of SSR primer with polymorphism. A 172 bp or a 176 bp SSR band was obtained which correlated with resistant gene to Heterodera glycines race 3 by primer Satt187 for the populations. They were codominance markers. The ratio of separation between F_2 population was 1:2:1. Satt187 was applied to identify and select F_2 population of Liaodou 10

收稿日期:2007-01-22
基金项目:沈阳农业大学青年教师科研基金资助
作者简介:王惠(1972-),女,讲师,博士,主要从事大豆抗病、抗逆机制和分子生物学研究。E-mail:wanghuisynd@yahoo.com.cn
通讯作者:段玉玺教授,博士生导师。Tel:024-88454528;Fax:024-88492630;E-mail:duanyx@syau.edu.cn

and Xiaoliheidou. Satt187 – 176 bp appeared in resistant plants, and Satt187 – 176 bp and Satt187 – 172 bp could be both tested in susceptible plants, which indicated this marker was good for breeding in molecular markers.

Key words　Soybean; *Heterodera glycines*; BSA; Resistant Gene; SSR Molecular marker

大豆胞囊线虫(*Hederodera glycines* Ichinohe, SCN)病是威胁世界大豆生产的重要病害之一[1~3]。国内外的研究和实践证明,利用优良的抗病品种控制大豆胞囊线虫病是最经济、安全和有效的途径。我国已筛选和鉴定了一批高抗大豆胞囊线虫病的种质资源,但这些资源多为小黑豆,农艺性状与栽培大豆相距甚远,依靠常规的表型选择和传统的大豆胞囊线虫病抗性鉴定方法,将小黑豆抗源的抗大豆胞囊线虫病基因转育到栽培大豆中,培育农艺性状优良的抗病品种,需要花费大量的人力物力,并且育种周期长、效率很低。近年来,随着分子生物学技术的不断发展,出现了越来越多新型的分子标记技术,为分子辅助抗线虫育种拓宽了新的思路。

SSR(Simple Sequence Repeat)是简单重复序列,也称微卫星 DNA(Microsatellite DNA),是一类由 1 ~6 个核苷酸为重复单位组成的串联重复序列。在基因组中,每个 SSR 序列的基本单元重复次数在不同基因型间差异很大,形成其座位的多态性。在遗传上,SSR 呈孟德尔式遗传,为共显性标记。其多态性、稳定性、重复性和可信度远高于 RAPD。SSR 广泛的应用于大豆遗传研究中。目前,大豆上已定名的 SSR 分子标记就有 900 多个,其中约有 450 个已定位于大豆连锁群上[4]。因此 SSR 可以成为在大豆抗病育种研究的一种较好的分子标记。

本研究以高抗大豆胞囊线虫 3 号生理小种的黑豆品种小粒黑豆为父本,以高感 3 号生理小种但农艺性状优良的大豆品种辽豆 10 为母本,配制杂交组合,以 F_2代分离群体为试验材料,根据抗性鉴定结果,利用 BSA 法筛选与大豆胞囊线虫 3 号生理小种抗性基因连锁的 SSR 分子标记,以期为大豆抗大豆胞囊线虫分子标记辅助育种提供准确、快速的鉴定标记。

1　材料和方法

1.1　供试材料

以对大豆胞囊线虫 3 号生理小种表现为抗性的小粒黑豆(品种编号为 ZDD1412)作为父本,对大豆胞囊线虫 3 号生理小种感病的辽豆 10 作为母本,配制杂交组合,杂种 F_1经自交得 F_2群体。亲本、F_1、F_2在沈阳农业大学实验地种植,进行抗性鉴定。

1.2　基因组 DNA 的提取

采用 SDS 法[5]提取大豆基因组 DNA,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,选择质量好的 DNA,测 OD 值,稀释至 20 ng · μL^{-1},于 20 ℃下保存备用。

1.3　SSR 扩增及电泳

SSR 引物、dNTP、Taq 酶、SSR DNA Marker Ⅱ均为北京奥科生物技术有限公司生产。

SSR 扩增反应体系为 20 μL,反应体系中含 10 × PCR buffer 2.0 μL; Mg^{2+} (25 mM) 2.0 μL; dNTP (2 μM)1.6 μL;Primer(2 μM) 1.0 μL;Taq 酶(2.5 U · μL^{-1}) 0.2 μL;DNA 模板(20 ng · μL^{-1})2.0 μL;灭菌重蒸水 11.2 μL。

PCR 反应程序:预变性 95 ℃、5 min;35 个循环为变性 94 ℃、30 s,退火 46 ℃、30 s,延伸 72 ℃、30 s;延伸 72 ℃、5 min。

扩增后的样品电泳检测前,加入 7 ~9 μL Loading buffer 混匀,95 ℃变性 5 ~8 min 后,迅速转移到冰水中冷却,于 4 ℃保存待用。采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,100 W 恒功率电泳 60 ~90 min(视 SSR 分子量大小及差异带型的可辨程度调整时间)后,胶板用硝酸银染色[6],采用凝胶分析软件对图像进行分析。

1.4　微卫星标记分析

采用分离群体分组分析法[7](Bulked Segregant Analysis, BSA)鉴定与抗病基因连锁的微卫星标记。在 F_2代分离群体中,分别选取 10 个高抗单株 DNA 和 10 个高感单株 DNA 等量混合,分别组成 DNA 抗病池(P_R)、感病池(P_S),用亲本和抗病池、感病池对微卫星引物进行筛选。筛选在抗、感池间出现稳定差异的引物,进而比较其在两亲本及 F_2代个体中表现出的多态性,验证 SSR 标记与胞囊线虫抗性基因的连锁关系。

2 结果与分析

2.1 大豆抗胞囊线虫 SSR 引物的筛选

本研究利用 204 对 SSR 引物，对辽豆 10、小粒黑豆、抗病池、感病池总 DNA 进行 SSR 扩增，筛选出 15 对扩增多态性好且稳定的 SSR 引物（序列如表 1 所示）。

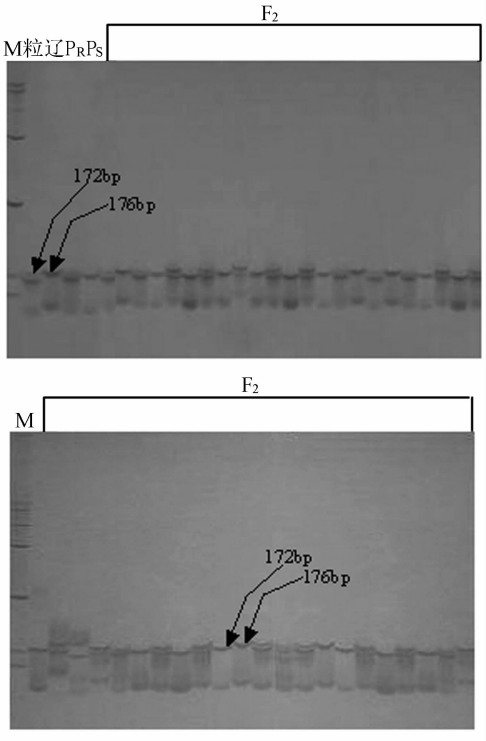
表 1 产生扩增产物的 15 对 SSR 引物

Table 1 15 Pairs SSR primers with amplified product

序号 Number	SSR 引物 SSR Primers	引物序列(5'-3') Sequence of primer sets(5'-3')
1	Sat_141	CGC AAT CAA AGA CCT GTT GCC TTG GCT ATT TCC TTA
2	Sat_157	GCG GTT TTG CAA GAT GTG ATG AGT GCG CGT ACG CAA AAT TTA TAT TCA
3	Satt315	GCG CGA CAA CTC TAA TGA AAA TCT GCG GAG TTT GAT TTT TCA AAA GT
4	Sat_163	GCG GTA TAT ATG TTT GCA AGA CAT ATT GCG GAA TCT CGC CCA GGA GGA ACT T
5	Satt586	GCG GCC TCC AAA CTC CAA GTA T GCG CCC AAA TGA TTA ATC ACT CA
6	Satt596	TCC CTT CGT CCA CCA AAT CCG TCG ATT CCG TAC AA
7	Satt038	GGG AAT CTT TTT TTC TTT CTA TTA AGT T GGG CAT TGA AAT GGT TTT AGT CA
8	Satt610	CCC TCC GCA AGC AAT AAT TAA TCT GCG GAA TGC TTC CAT TTT AT
9	Satt173	TGC GCC ATT TAT TCT TCA AAG CGA AAT CAC CTC CTC T
10	Satt632	GGG CTA TGA AGG GAA TGG AAA GGA CCC ATA TTG AAG ATT TGA AGT AAT
11	Satt187	GCG TTT TAA TTT ATG ATA TAA CCA A GCG TTT TAT CTC TTT TTC CAC AAC
12	Satt268	TCA GGG GTG GAC CTA TAT AAA ATA CAG TGG TGG CAG ATG TAG AA
13	Satt338	GCG CCC AAG TAT TAT GAG ATA TTT GAT GCG ATA ATT TTA AAA CTG GAC CA
14	Satt453	GCG GAA AAA AAA CAA TAA ACA ACA TAG TGG GGA AGG GAA GTT ACC
15	Satt530	CAT GCA TAT TGA CTT CAT TAT T CCA AGC GGG TGA AGA GGT TTT T

2.2 抗大豆胞囊线虫 SSR 标记的获得

利用上述 15 对 SSR 引物，对辽豆 10 与小粒黑豆杂交获得的 F_2 代抗病池、感病池进行 SSR 分析，同时以抗病及感病亲本作对照（图 1）。结果表明，引物 Satt187 在亲本间的扩增产物具有多态性，在抗、感病亲本及抗、感池间扩增出明显不同的 SSR 标记带，抗病亲本标记带为 Satt187 – 176 bp，抗病池为 Satt187 – 176 bp、感病池为 Satt187 – 172 bp 和 Satt187 – 176 bp 两种标记带、感病亲本为 Satt187 – 172 bp，初步表明 Satt187 与大豆胞囊线虫病抗性基因相关。



M：SSR DNA Marker Ⅱ，辽：辽豆 10，粒：小粒黑豆，P_R：抗病池，P_S：感病池，F_2：F_2 单株

M：SSR DNA Narker Ⅱ；Liao：Liaodou 10；Li：Xiaoliheidou；PR：Resistant pool；R_S：Susceptible pool；F_2：F_2 individuals

图 1 （辽豆 10 × 小粒黑豆）F_2 代群体部分单株的 Satt187 的扩增结果

Fig. 1 SSR products amplified by the primer Satt 187 among several individuasl of F_2 population (Liaodou 10 × Xiaoliheidou)

2.3 SSR 标记 Satt187 在 F_2 代群体中的分离

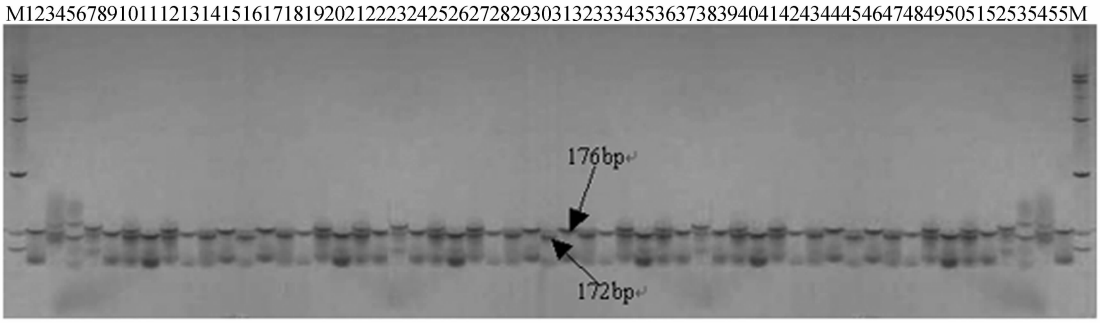
用引物 Satt187 对辽豆 10、小粒黑豆以及辽豆 10 与小粒黑豆杂交获得的 F_2 代抗、感单株进行 SSR 分析。共分析 85 个单株，其中抗病单株 19 个（具有 AA 带）均扩增出片段 Satt187 – 176 bp，而在 66 个感病单株中，45 个感病单株（AB 带）扩增出标记条带 Satt187 – 176 bp 和 Satt187 – 172 bp，21 个感病单株（BB 带）扩增出标记条带 Satt187 – 172 bp（表 2，

图 2)。AA: AB: BB = 19: 45: 21, $x_c^2 = 0.24 < x_{0.05,2}^2 = 5.99$,经 x_c^2 检验(表 3),Satt187 扩增结果在 F_2代群体中分离符合 1: 2: 1 的分离比,呈孟德尔式遗传,为共显性标记。并且采用不同批次的 Taq 酶对引物 Satt187 的扩增结果没有影响,在重复试验中,Satt187 扩增结果重复性好,可以证实标记 Satt187 准确可靠,具有抗大豆胞囊线虫分子标记辅助选择应用的前景。

表 2　F_2代群体中 SCN 3 号生理小种抗性和 SSR 标记 Satt187 的分离

Table 2　Segregation between the resistance to race 3 of SCN and the SSR marker(Satt187) in the F_2 population

SSR 标记 SSR marker	抗病株 Resistant plant			感病株 Susceptible plant		
	感病带 Resistent band AA	抗病感病带 Intermediate bard AB	感病带 Susceptible band BB	抗病带 Resistent band AA	抗病感病带 Intermediate bard AB	感病带 Susceptible band BB
Satt187	19	0	0	0	45	21



M:SSR DNA Marker Ⅱ,1 ~ 55:F_2 单株;1 ~ 55:individuals of F_2 population

图 2　(辽豆 10 × 小粒黑豆)F_2 代群体部分单株的 Satt187 的扩增结果

Fig. 2　SSR products amplified by the primer Satt187 among several individuals of F_2 population(Liaodou 10 × Xiaoliheidou)

表 3　抗性分布的 x_c^2 测验

Table 3　x_c^2 test of resistant/susceptible distribution

	抗病带 Resistant band	中间型 Intermediate band	感病带 Susceptible band
实际株数(O)	19	45	21
理论株数(E)	21.25	42.5	21.25
O - E	-2.25	2.5	-0.25

3　结论与讨论

大豆对胞囊线虫的抗性是由寡基因控制的[8],克隆抗病基因和寻找与大豆胞囊线虫抗性基因紧密连锁的分子标记技术是培育抗胞囊线虫病大豆品种的关键。对大豆胞囊线虫 3 号生理小种的分子标记应用,受本研究的选材所限,还需要拓宽抗、感病亲本的抗性遗传基础,进一步挖掘种质资源中既存的抗性基因,避免因连年种植单一抗病品种导致的线虫群体基因频率改变。随着 SSR 标记技术的不断发展完善及更多 SSR 位点的发现,可筛选出与抗大豆胞囊线虫基因紧密连锁的 SSR 标记,可以为大豆抗胞囊线虫遗传育种工作提供有利的辅助工具,加速分子辅助选育抗大豆胞囊线虫育种的进程。

目前,分子标记已开始应用于育种实践,并表现出独特的优越性。寻找与重要的农艺性状紧密连锁的分子标记,是进行分子标记辅助选择的基础。分子标记除 SSR 外,还有 RFLP、RAPD 等属于中性的遗传标记,它们的表现不受环境条件的影响,结果准确可靠,在抗病基因的标记辅助选择和抗病基因累加中具有广阔的应用潜力。PCR 标记由于快速、简便、可靠,只需要极少的 DNA 样品,而成为首选的检测方法,因而更有利于在育种实践中应用。但由于分子标记育种技术目前尚不成熟和完善,尚不能作为一种育种方法单独使用。我国传统育种经验丰富,因此,应注意将分子标记这一先进技术与育种家的丰富经验相结合,使分子标记辅助选择发挥其更大的作用。

(下转 212 页)

与本试验结果一致。

参 考 文 献

[1] 吴明才,肖昌珍. 世界大豆线虫病研究概述[J]. 湖北农业科学, 1999,1: 38 -40.

[2] 许艳丽,温广月. 大豆主要病虫害研究概况— I 大豆线虫病[J]. 大豆通报,2005,1: 5 -7.

[3] 宛煜嵩,王珍. 中国大豆孢囊线虫抗性研究进展[J]. 分子植物育种,2004,2(5): 609 -619.

[4] 刘增柱,周玉芝,韩静淑. 大豆连、轮作土壤微生物生态分布与大豆胞囊线虫群体动态的研究[J]. 大豆科学,1990. 9(3): 206 -212.

[5] 段玉玺,吴刚. 植物线虫病害防治[M]. 北京:中国农业科技出版社,2002:125 -126.

[6] 吴海燕,段玉玺,陈立杰,等. 不同抗性的大豆品种对田间大豆胞囊线虫群体动态的影响[J]. 大豆科学,2002,21(2):109 -112.

[7] 刘维志. 植物线虫学研究技术[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1995:71 -72.

[8] 王克安,马芳,刘晓英. 不同轮作方式对大豆胞囊线虫消长的影响试验初报[J]. 大豆通报,2000. 3: 12.

[9] 刘晓帆,范彦英,郭凤英. 包衣种子在重茬大豆田中的应用效果试验[J]. 大豆通报,2003. 2:9.

[10] 王玉生,姜乃文,李国忠. 大豆种衣剂的应用效果及发展前景[J]. 大豆通报,1998,2:8 -9.

(上接 207 页)

参 考 文 献

[1] 刘维志,段玉玺. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:281 -294.

[2] Sciumbato G I, Turnage D L. Southern United States soybean disease loss estimate for 1992[C]. Proceeding of the Southern Soybean Disease Workers, 1993:31 -37.

[3] Wang J, Donald P A, Lniblack T L, et al, Soybean cyst nematode reproduction in the North Central United States [J]. Plant Disease, 2000, 84:77 -82.

[4] Cregan P B. Mudge J, Tickus EW, et al. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg*1 locus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 811 -818.

[5] 关荣霞,常汝镇,邱丽娟,等. 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取[J]. 大豆科学,2003,22(1):73 -74.

[6] Sanguinetti C J, Neto E D, Simpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylaamide gels [J]. Biologic Techniques. 1994, 17:915 -919.

[7] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by using segregating analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Science USA, 1991, 88:9828 -9832.

[8] Skorupska H T, Choi I S, Rao Arelli A P, et al. Resistance to soybean cyst nematode and molecular polymorphism in various sources of Peking soybean[J]. Euphytica, 1994, 75:63 -70.