

大豆抗花叶病毒及耐疫霉根腐病的 SSR 标记分析

卢双勇, 韩英鹏, 滕卫丽, 李文滨

(东北农业大学大豆研究所, 国家教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 抗大豆花叶病毒而感大豆疫霉根腐病亲本东农 93-046 与感大豆花叶病毒耐大豆疫霉根腐病亲本 Conrad 及其杂交所得的 160 个 F_5 RIL 群体分别接种 SMV N_1 、SMV N_3 株系及从佳木斯田间分离得到的疫霉根腐病混合菌种, 结果表明: 东农 93-046 对花叶病毒表现为抗病而对疫霉根腐病表现为感病, Conrad 则相对应的表现为感病和耐病; RIL 群体中对花叶病毒 SMV N_1 、SMV N_3 的抗感表现都按 1:1 分离 ($\chi^2 = 0.64^*$, $\chi^2 = 0.43^*$), 疫霉根腐病病害损失率基本符合正态分布 ($skew = 0.93$, $kurtosis = 0.86$)。利用 SSR 分子标记技术对该群体进行花叶病毒抗性基因定位和疫霉根腐病的耐性 QTL 分析, 分别将花叶病毒抗性基因 RN1、RN3 定位于 F 连锁群, 其与 Satt114 的距离分别为 5.2 cM 和 4.9 cM, 同时在该连锁群检测到一个与疫霉根腐病耐病性相关的 QTL 即 QPR_1, 其与 Satt252 的距离为 4.5 cM, 在 D1b + W 连锁群上检测到两个与疫霉根腐病耐病性相关的 QTL 即是 QPR_2、QPR_3, 其与 Satt428 (Satt579)、Satt274 的距离分别为 1.05 cM、2.00 cM。

关键词: 大豆花叶病毒; 大豆疫霉根腐病; SSR 标记

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841 (2008) 05-0746-05

Molecular Markers Associated with Soybean Mosaic Virus Resistance and Phytophthora Root Rot Tolerance in Soybean

LU Shuang-yong, HANG Ying-peng, TENG Wei-li, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The purpose of this study is to identify molecular loci resistance to soybean mosaic virus and to identify quantitative trait loci (QTLs) associated with the tolerance to soybean phytophthora root rot (PRR) using 160 F_5 derived RI lines from a combination between Dongnong 93-046 (a soybean cultivar resistant to SMV but susceptible to PRR) and Conrad (a breeding line susceptible to SMV but tolerance to PRR). The results showed that the resistant and susceptible segregation in RIL population was fitted to ratio 1:1 for SMV, and the loss rate from PRR inoculation fit to normal distribution. Two SMV resistant loci and three QTLs associated with PRR tolerance were identified using SSR technique. SMV Resistant loci, RN1 and RN3 was located in MLGF and tightly linked with SSR makers Satt114 and Satt362. QTL QPR_1 associated with PRR tolerance was also be located in MLG F. QTLs QPR_2 and QPR_3 was located in MLGD1b + W. The phenotypic contribution of the three QTLs were 9.38%, 19.4% and 7.02%, respectively.

Key words: Soybean mosaic virus (SMV); Soybean phytophthora root rot (PRR); SSR marker

近年来,大豆花叶病毒病(SMV)在东北地区发生越来越严重,一般流行年份可造成 25%~60% 产量损失,大流行年甚至可造成绝产;SMV 不但影响大豆的产量,还使大豆籽粒产生褐斑,严重降低大豆的商品价值。国内外学者对 SMV 进行的抗性遗传进行了深入研究^[1~10],并已利用不同类型的分子标记检测和命名了多个大豆花叶病毒抗性位点^[11]。

上述研究多限于显性分子标记或以国外种质资源为研究材料,在黑龙江省大豆主产区难以直接利用。

大豆疫霉根腐病(SPRR)也广泛分布于世界各主要大豆生产区,并在一些大豆主要生产国造成严重危害^[12]。在我国,SPRR 于 1989 年在东北大豆生产区首先被发现,之后相继在其他大豆主要产区有发生和危害的报道,在局部地区造成较大产量损

收稿日期: 2008-04-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA10Z1F1)。

作者简介: 卢双勇(1982-),男,硕士研究生,研究方向大豆生物技术、大豆抗病育种。

通讯作者: 李文滨,教授,博士生导师。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

失^[13-14]。迄今国内外学者已经在大豆基因组的 9 个座位上鉴定了 15 个抗疫霉根腐病基因(*Rps* 基因)^[15]。据此,世界绝大多数国家采用选育具有垂直抗性的品种,但目前为止还没有发现抗所有生理小种的大豆品种,且大豆疫霉菌在与寄主抗病性互动中,其毒力也在演变和快速进化,新的生理小种不断出现。更为严重的是新出现的生理小种具有更强的致病性。因此选育耐病型大豆新品种,减轻新生理小种不断出现的压力,是唯一有效的解决途径^[16-17]。

由于我国东北地区在同一年份或不同的年份经常会遭受不同病害的侵袭,使具有单一抗性的品种难以满足生产需求,已成为东北地区大豆高产和稳产的限制因子。因此,通过选育具有抗多种病害大豆新品种,来增加品种的持久抗病性和地区适应性,已成为亟待解决的问题^[16-17]。

利用 480 个 SSR 分子标记对东农 93-046 × Conrad 杂交后所衍生的 160 个 F₅ RIL 群体进行分析(东农 93-046 抗大豆花叶病毒东北 N1、N3 株系而感大豆疫霉根腐病,Conrad 耐大豆疫霉根腐病而感大豆花叶病毒),结合抗病性鉴定结果,挖掘与抗病基因紧密连锁的 SSR 标记,为分子聚合育种奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料选自东农 93-046 和引自加拿大的耐病品种 Conrad 及二者杂交所衍生的 160 个 F₅ RIL 群体。东农 93-046 是由东北农业大学大豆研究所选育的高抗大豆花叶病毒病和极易感大豆疫霉根腐病的品系,Conrad 是经过多年实践证明的耐大豆疫霉根腐病品种但其极易感大豆花叶病毒病。在东北农业大学试验地播种亲本和 F₅ 群体,随机排列,行长 2 m,行株距 70 cm × 5 cm。

1.2 试验方法

1.2.1 SMV 抗病性鉴定 在对生真叶期,采用人工摩擦法接种 SMVN1、SMVN3 株系,10 d 后重复接种一次,接种后 14 d 开始调查症状。大豆 SMV 3 号株系的抗病与感病采用相对属性划分标准,凡先后两次汁液摩擦接种后一个月内不发病或只在接种叶上出现局部枯斑而上位叶无症状者为抗病;凡接种后出现系统花叶或系统坏死症状者,不论轻重或皱缩花叶还是黄斑或叶脉坏死及顶枯者均属感病

类型^[18]。

1.2.2 对疫霉根腐病的耐病性鉴定 采用菌土接种法^[19]在东北农业大学试验地接种池播种亲本及 F₅ 群体,随机排列,3 次重复。先在塑料钵内装入半钵松润土,然后将前期培养的采自黑龙江省佳木斯地区的混合菌种培养基铺于钵内,向培养基上薄覆一层土,在土上播种,再覆土。播种后在池内灌水,使钵内土壤保持湿润,在池上覆盖一层塑料膜,保持池内温湿度。出土后每钵保苗 5 株。在出苗到 R3 期进行调查,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。苗期调查 3 次,记录并计算损失率,损失率 = [(出苗的植株数 - 站立的植株数) / 出苗的植株数] × 100%。

1.3 大豆 DNA 的提取及 SSR-PCR 扩增

以东农 93-046 × Conrad P₁、P₂ 及 F₅ 160 个 RIL 群体苗期幼嫩叶片为材料,采用 CTAB 法提取叶片 DNA^[20]。

SSR 引物根据 Soybase 网址(<http://129.186.26.94/>)提供的 SSR 引物序列,由上海博亚生物技术有限公司合成。

PCR 反应总体积为 20 μL,反应液包括 2 μL 模板 DNA(25 ng · μL⁻¹),2 μL 10 × PCR buffer,2 μL MgCl₂(25 mmol · L⁻¹),2.0 μL SSR primer(10 ng · μL⁻¹),0.3 μL dNTP(10 mmol · L⁻¹),0.2 μL Taq 酶,ddH₂O 补至 20 μL,矿物油覆盖。PCR 扩增条件:SSR 反应在 95℃ 预变性 5 min,然后进入循环:94℃ 变性 30 s;47℃ 复性 30 s;72℃ 延伸 30 s;循环 34 次后在 72℃ 延伸 5 min,降温至 4℃ 保存。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳:PCR 产物加入 8 μL 甲酰胺双色 Loading Buffer,置于 PCR 仪中 94℃ 变性 5 min,放入冰水混合物中冷却。用 6% 的聚丙烯酰胺标准测序胶分离,凝胶成分包括 6% 的聚丙烯酰胺、8 mol · L⁻¹ 脲素、0.04% 过硫酸铵、0.1% TEMED,电泳缓冲液 1 × TBE,在 100 W 恒功率下电泳约 2 h,用快速银染法对凝胶进行染色,统计带型并照相。

1.5 数据分析

利用 Mapmaker/EXP3.0b^[21] 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。分子遗传图谱由 Mapchart 2.1 来制作。利用 Win QTL Cartographer Version 2.5 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,双亲杂合带型为 H,缺失记为“-”。

2 结果与分析

2.1 SMV 抗病性鉴定

F₅ 代重组自交系群体抗大豆花叶病毒鉴定结果分为抗、感两级 (图 1)。160 个株行群体中抗花叶病毒 N1 株系的有 83 个,另外 77 个表现感病;经 χ^2 测验 $\chi^2 = 0.64 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$ 其抗、感株系分离符合 1:1 的理论比例;抗花叶病毒 N3 株系的有 85 个株行表现抗病,75 个表现为感病,其抗、感分离比率为 1:1,经 χ^2 测验达到了显著水平 ($\chi^2 = 0.43 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$)。说明东农 93-046 对大豆花叶病毒 N1、N3 株系的成株抗性分别受一对基因控制,这与多数学者的研究结果相类似^[1-3,22]。

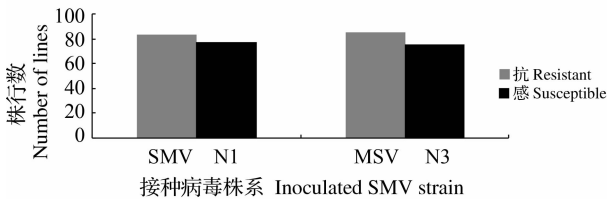


图 1 RIL 群体分别对大豆花叶病毒 N1、N3 株系的抗性分析
Fig. 1 Resistance analysis to SMV N1, N3 in RIL populations

2.2 疫霉根腐病耐病鉴定

F₅ 代群体接种采自黑龙江省佳木斯地区的混合菌种后, F₅ 代群体病害损失率从 0 到 100% 都有分布,即 F₅ 代群体的耐病性表现分离明显 (如图 2), 经正态性测验表明该群体基本符合正态分布 (skew = 0.93, kurtosis = 0.86)。

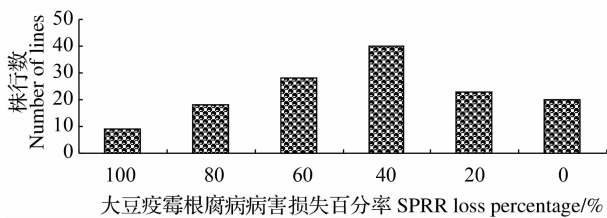


图 2 RIL 群体对疫霉根腐病的损失率分布
Fig. 2 Distribution of loss rate in RIL populations associated with PRR

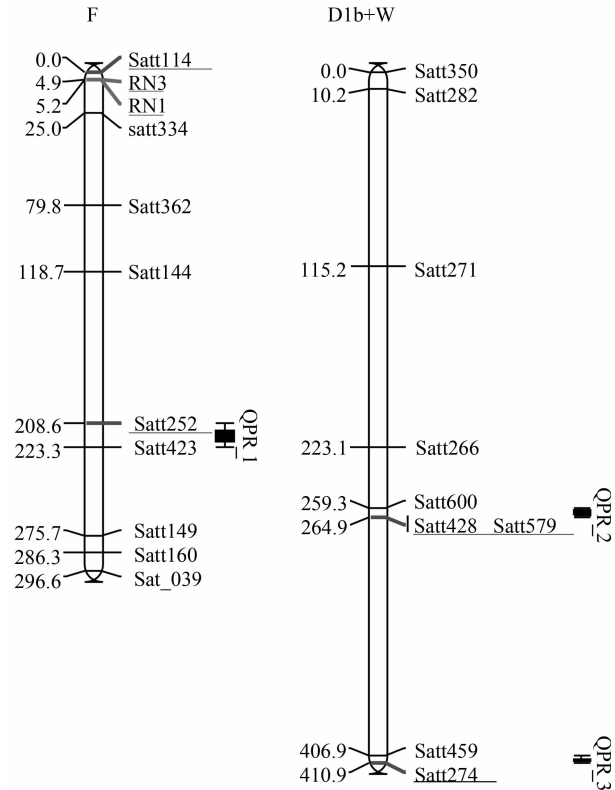
2.3 连锁分析

480 个 SSR 分子标记用来分析父母本 (东农 93-046 和 Conrad) 间存在的多态性,其中 140 对分子标记 (Marker) 存在多态性,这些标记在重组自交系上

检测,共有 99 个表现出良好的多态性,占总标记的 20.83%,分别分布在 19 个大豆连锁群上。

2.4 抗大豆花叶病毒病的基因定位

将亲本间多态性良好的 140 对 SSR 标记在抗感花叶病毒病 F₅ 群体中进行检测,筛选到 2 个与抗 SMV 相关的分子标记 Satt114 和 Satt362,其中 Satt 114 标记距 RN1 抗性位点的距离为 5.2 cM,距 RN3 抗性位点的距离为 4.9 cM (图 3)。



RN1, RN3 为抗大豆花叶病毒病基因; QPR1, QPR2, QPR3 为耐疫霉根腐病 QTL。

RN1 and RN3 are resistant gene to SMV; QPR1, QPR2, and QPR3 are tolerant QTL to PRR

图 3 抗 SMV 基因及耐 PRR QTL 在大豆连锁群上的定位
Fig. 3 Location of resistance or tolerance genes and QTLs in soybean linkage map

2.5 抗疫霉根腐病的 QTL 定位

经过 WinQTL2.0 计算共有 3 个分子标记 Satt252、Satt274、Satt428 与耐大豆疫霉根腐病显著相关,因此得出 3 的 QTL,即: QPR₁, QPR₂ 和 QPR₃,解释表型变异分别为 9.38%、19.4% 和 7.02% (表 1)。Satt252 被定位在 MLG F 上,距离 QPR₁ 为 14.5cM; Satt428 和 Satt274 同时定位在连锁群 MLG D1b + w 上,其中 Satt428 距离 QPR₂ 位点 1.05 cM, Satt274 距离 QPR₃ 位点 2 cM。

表 1 与耐大豆疫霉根腐病相关的 QTL
Table 1 Markers associated with PRR

连锁群 Linkage	QTL	区间 Intervals	距离 Distance	R ² /%	LOD
F	QPR1	Satt252 – QPR_1 – Satt423	4.5 – 10.2	9.38	3.02
D1b + W	QPR2	Satt600 – QPR_2 – Satt428 (579)	4.45 – 1.05	19.40	3.90
D1b + W	QPR3	Satt459 – QPR_3 – Satt274	2.06 – 2.00	7.02	2.10

R²表示该分子标记对变异贡献率的大小,LOD 表示最大似然值。
R² is R – square or the proportion of the phenotypic data explained by the marker locus; and LOD is log of odd score.

2.6 抗(耐)病基因标记的模拟分子辅助选择

利用得到的与抗大豆花叶病毒(Satt114) 和耐大豆疫霉根腐病(Satt252、Satt274、Satt428、Satt579) 的分子标记在后代群体中进行适合性检验,与大豆花叶病毒相关的 Satt114 标记准确率达到了 80%,而与耐大豆疫霉根腐病相关标记(Satt274、Satt428、Satt579) 分别达到了 80%、75%、70% 选择效果明显(图 4、5)。

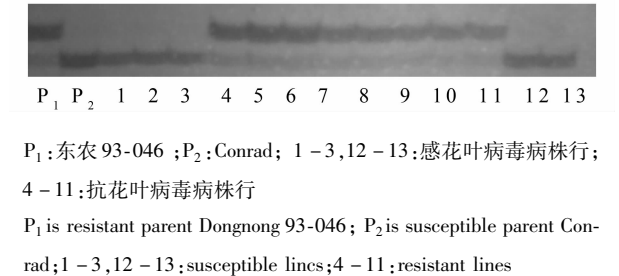


图 4 Satt114 在大豆花叶病毒抗病性鉴定群体中扩增带型
Fig. 4 Banding pattern of Satt114 marker in the identifying population

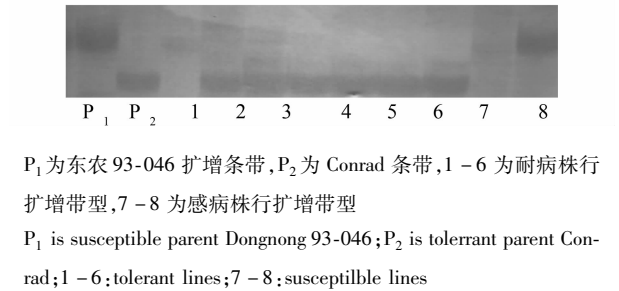


图 5 Satt428 在疫霉根腐耐病性鉴定群体中扩增带型
Fig. 5 Banding pattern of Satt428 marker in the identifying population

3 讨论

SMV 抗病性鉴定结果表明抗大豆花叶病毒病的遗传规律是受一对显性等位基因控制的,前人的研究也得到过相同的结果。在抗大豆花叶病毒病的

基因定位研究中,将抗东北 N1、N3 病毒株系的基因分开研究并定位,得到的定位结果表明 N1、N3 抗病基因间的距离较小,定位到 F 连锁群上距离为 0.3cM,但并不能依此断定抗这两个病毒株系的基因为同一个基因,暂且将该抗花叶病毒病基因分开标识,虽然未能对此结果进行验证,但鉴定的与抗病毒病相关的分子标记在实际应用中不影响选择效果。

另外,得到的两个 SMV 抗病基因被定位于 F 染色体上,同时在该染色体上也检测到一个与耐大豆疫霉根腐病相关的 QTL,前人推测在 F 染色体上的抗病基因是成簇存在的^[23],研究结果也证实了这一点;此外也有研究结果表明在大豆的 D1b + W 连锁群上有抗病基因的存在^[24],研究结果也验证了这一点,可见大豆的 F、D1b + W 是与大豆的抗病性相关的主要的两条染色体。

分子标记辅助选择育种,既是从分子生物学出发的基础性研究,同时又具有很大应用潜力,它不仅为大豆育种提供了一套全新的技术和方法,而且可以在分子水平上解决常规大豆育种中的许多问题,并能提高选择效率,最理想的方法是直接对基因型进行选择,分子标记为实现对基因型的直接选择提供了可能。通过分子标记,对抗病基因进行精细定位,可作为前景选择(foreground selection)的手段,克服一个品种中多个抗性基因难以准确鉴别和检测的困难,可以加速含有多个有效抗病基因的聚合大豆品种培育过程。前人的研究多是针对于单一抗性的抗原配制杂交组合研究某一抗病性,而应用分别抗(耐)两种不同病的亲本配制杂交组合,应用同一套亲本组合标记多个抗(耐)病基因位点,并将最终应用于分子标记辅助育种的生产上,这对选育优质、多抗聚合品种具有十分重要意义。

参考文献

- [1] Kiihl R A S, Hartwig E E. Inheritance of reaction to soybean mosaic-virus in soybeans[J]. Crop Science, 1979, 19: 372-375.
- [2] Buzzell R I, Tu J C. Inheritance of soybean resistance to soybean mosaic virus[J]. Heredity, 1984, 75 (1): 82.
- [3] Buzzell R I, Tu J C. Inheritance of a soybean stem-tip necrosis reaction to soybean mosaic virus [J]. Heredity, 1989, 80 (5): 400-401.
- [4] Ma G, Chen P, Buss G R, et al. Genetic characteristics of two genes for resistance to soybean mosaic virus in PI486355 soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(6): 907-914.
- [5] 盖钧镒. 我国大豆遗传改良和种质研究[M]//宋健. 中国科学技术前沿, 第五卷, 北京: 高等教育出版社, 2002: 629-691. (Gai J Y. Genetic improvement and germplasm study of soybean in China[M]//Song J. Science and Technology at the Frontier in China, Vol. 5, Beijing: Higher Education Press, 2002: 629-691.)
- [6] 张玉东, 盖钧镒, 马育华, 等. 大豆对两个大豆花叶病毒本地株系抗性的遗传研究[J]. 作物学报, 1989, 15(3): 213-220. (Zhang Y D, Gai J Y, Ma Y H, et al. Inheritance of resistance to two local soybean mosaic virus strains S_A and S_C in soybeans [J]. Acta Agronomica Sinica, 1989, 15(3): 213-220.)
- [7] 向远道, 盖钧镒, 马育华, 等. 大豆对四个大豆花叶病毒株系的抗性及其连锁遗传研究[J]. 遗传学报, 1991, 18(1): 51-58. (Xiang Y D, Gai J Y, Ma Y H, et al. A study of the inheritance and linkage of resistance to four strains of soybean mosaic virus in soybeans[J]. Acta Genetica Sinica, 1991, 18(1): 51-58.)
- [8] 孙志强, 刘玉芝, 孙大敏, 等. 大豆对大豆花叶病毒 1、2、3 号毒系抗性的遗传[J]. 中国油料作物学报, 1990(2): 20-24. (Sun Z Q, Liu Y Z, Sun D M, et al. Inheritance of resistance to SMV strain 1. 2. 3 in soybeans [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1990(2): 20-24.)
- [9] 廖林, 刘玉芝, 孙大敏, 等. 大豆花叶病的抗性遗传 I. 几个引用抗原对东北大豆花叶病毒二号株系的抗性遗传[J]. 遗传学报, 1994, 21(5): 403-408. (Liao L, Liu Y Z, Sun D M, et al. Inheritance of soybean resistant to soybean mosaic virus I. Inheritance of several resistant varieties introduced resistant to No. II strain of SMV[J]. Acta Genetica Sinica, 1994, 21(5): 403-408.)
- [10] 栾晓燕. 大豆对 SMV3 号株系成株抗性遗传的研究[J]. 大豆科学, 1997, 16(3): 223-226. (Luan X Y. Inheritance of soybean plant resistant to No. 3 (173) strain of soybean mosaic virus[J]. Soybean Science, 1997, 16(3): 223-226.)
- [11] 智海剑, 盖钧镒. 大豆花叶病毒及抗性遗传的研究进展[J]. 大豆科学, 2006, 25(2): 174-180. (Zhi H J, Gai J Y. Advance in the study on soybean mosaic virus[J]. Soybean Science, 2006, 25(2): 174-180.)
- [12] 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]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2001, 23: 115-121.
- [13] 韩晓增, 何志鸿, 张增敏. 大豆主要病虫害防治技术[J]. 大豆通报, 1998, 6: 5-6. (Han X Z, He Z H, Zhang Z M. Main plant diseases and insects pests prevention and cure technique in soybean[J]. Soybean Bulletin, 1998(6): 5-6.)
- [14] 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: 793-799. (Zhu Z D, Wang H B, Wang X M, et al. Distribution and virulence diversity of *Phytophthora sojae* in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36: 793-799.)
- [15] Gordona S G, Martin S K St, Dorrance A E. Rps8 maps to resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F [J]. Crop Science, 2006, 46: 168-173.
- [16] Schafer J F. Tolerance to plant disease. [J]. Annual Review of Phytopathology, 1971, 9: 235-252.
- [17] Thomson P R, Thomas W J Kenworth. Evidence of pathogen specificity in tolerance of soybean cultivars to phytophthora rot [J]. Crop Science, 1988, 28: 714-715.
- [18] 滕卫丽, 李文滨, 邱丽娟, 等. 大豆 SMV 3 号株系抗病基因的 SSR 标记[J]. 大豆科学, 2005(3): 244-249. (Teng W L, Li W B, Qiu L J, et al. Identification of SSR marker linked to the resistance gene of SMV3 in soybean [J]. Soybean Science, 2005(3): 244-249.)
- [19] Han Y P, Teng W L, Yu K F, et al. Mapping QTL tolerance to Phytophthora root rot in soybean using microsatellite and RAPD/SCAR derived markers[J]. Euphytica, 2008, 162: 231-239.
- [20] 王珍, 方宣钧. 植物 DNA 分离[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 281-288. (Wang Z, Fang X J. Plant DNA isolation [J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(2): 281-288.)
- [21] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. Genomics, 1987, 1: 174-181.
- [22] Koshimizu S, Lizuka T. Studies on soybean virus diseases in Japan [C]. Natl. Agric. Exp. Stn. Bull. 1963, 27, 1-103.
- [23] Hayes A J, Ma G, Buss G R, et al. Molecular marker mapping of Rsv4, a gene conferring resistance to all known strains of soybean mosaic virus [J]. Crop Science, 2000, 40: 1434-1437.
- [24] 王永军, 东方阳, 王修强, 等. 大豆 5 个大豆花叶病毒株系抗性基因的定位, 遗传学报, 2004, 31(1): 87-90. (Wang Y J, Dongfang Y, Wang X Q, et al. Mapping of five genes resistant to SMV strains in soybean [J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(1): 87-90.)