

应用关联分析鉴定大豆对腐霉菌的抗性基因

魏 峡^{1,4}, 薛永国¹, 王伟威², 刘丽君¹, 李文滨³, 喻德跃⁴, 南 迪¹, 梁会欣¹, 楼兵干⁵

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 农产品质量安全研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 东北农业大学 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030; 4. 南京农业大学 大豆研究所, 江苏 南京 210095; 5. 浙江大学 生物技术研究, 浙江 杭州 310029)

摘要:以 150 个不同生态类型的大豆品种(系)为试材, 分别用 4 种腐霉菌进行接种鉴定, 筛选抗病性, 并用 256 个 SSR(simple sequence repeat)标记对不同抗性类型大豆品种进行基因组扫描, 分析群体结构和连锁不平衡, 同时用 TASSEL 软件中的 GLM 方法对大豆 4 种腐霉菌的抗性进行关联分析, T 测验检测差异显著位点, 进而发掘各关联位点的优异等位基因。结果表明:①参试大豆品种与 256 个 SSR 位点存在广泛的连锁不平衡, 而且共线位点 D' 衰退较快, 适合于连锁不平衡分析。SSR 数据结构和亲缘分析表明参试品种分为 7 个亚群。②用关联分析方法得到与 4 种腐霉菌抗性关联的引物 25 个, T 测验和抗性验证找到差异显著的关联等位变异位点 12 个, 它们在参试品种中都有较大的效应值。③关联分析鉴定差异显著的等位变异位点与实际品种抗病性结果高度吻合。其关联分析中可信度高的等位变异位点和 T 测验中显著的等位变异位点相吻合。即与 *P. aphanidermatum* 抗性关联的位点为 Satt191-1、Satt584-1 和 Satt584-2; 与 *P. irregulare* 抗性关联的位点为 Satt602-1 和 Satt042-4。

关键词:大豆; 腐霉菌; SSR 标记; 关联分析

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)03-0295-07

Identification of Resistance Genes to Pythium Species in Soybeans by Association Analysis

WEI Lai^{1,4}, XUE Yong-guo¹, WANG Wei-wei², LIU Li-jun¹, LI Wen-bin³, YU De-yue⁴, NAN Di¹, LIANG Hui-xin¹, LOU Bing-gan⁵

(1. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Agricultural Products Quality and Safety Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 4. Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 5. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: By using 150 soybean varieties with different ecotype as materials, and 4 Pythium species as inoculation pathogens, the cultivars resistance were identified through measuring the root rot level. 256 SSR markers were used to analysis the population structure and linkage disequilibrium. A soybean resistance association analysis to 4 Pythium species was run with GLM procedure from software TASSEL, and a T test on associated markers with significant difference was carried on, to uncover associated loci conferring effects. The result showed: there was a comprehensive linkage disequilibrium; the collinear locus D' declined quickly, which made it fit for LD analysis; tested cultivars were divided into seven subgroups by the structural analysis of SSR data. There were 25 markers obtained by association analysis, which were connected with the resistance to 4 Pythium species, respectively; 12 association loci with significant difference, were found conferring major effect values to the tested cultivars through T test and resistance identifying. The loci with significant difference highly matched the cultivars' resistant testing results; especially the ones with high reliability in association analysis showed the same on T test, such as the loci associated with *P. aphanidermatum* resistance, Satt191-1, Satt584-1, Satt584-2, and those with *P. irregulare* resistance, Satt602-1, Satt042-4.

Key words: Soybean; Pythium; SSR marker; Association analysis

大豆腐霉菌是引起大豆猝倒和根腐病及种子腐烂的主要病原菌, 是大豆主产区主要病害之一。多年来, 相关学者已在不同主产区的土壤中分离到病原菌, 并进行了腐霉菌的分类和致病性研究。而目前有关大豆腐霉菌抗性遗传与其分子标记研究还鲜有报道。大豆资源中对几种腐霉菌的抗性资

源比较少, 且前人研究表明对几种腐霉菌的抗性由不同抗性基因控制, 抗性机制比较复杂^[1-2]。因此, 挖掘优异的种质提高大豆的抗病性, 一直是大豆遗传育种的主要研究方向。

相关研究证实: 腐霉菌主要侵染萌发的种子和幼苗, 并能够在不产生与侵染相关的典型症状的情况

收稿日期: 2012-11-05

基金项目: 国家转基因重大专项(2011ZX08004-002); 国家大豆产业技术体系(CARS-04-PS05); 国家“十一五”科技支撑计划(2009BAD8B02, 2011DFR30840); 黑龙江省留学基金(LC2012C37/C0601)。

第一作者简介: 魏峡(1985-)女, 博士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: adalwei@126.com。薛永国为同等贡献作者。

通讯作者: 刘丽君(1958-), 女, 研究员, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: nkyssbd@126.com。

下,侵染根部并明显导致生长减退和产量减少^[3-5]。

关联分析是利用自然变异,在多个遗传背景下鉴定动植物相关的 QTL (quantitative trait locus),所发掘出的 QTL 具有代表性和广泛的适应性。此种方法最先在人类基因组和动物研究中得到应用,但近几年关联分析方法已在植物研究中得到广泛应用^[6]。2008 年,文自翔等对大豆品质性状和 SSR (simple sequence repeat) 标记进行关联分析,鉴定一批农艺性状优异位点和携带优异等位变异的材料^[7-8];张军等对大豆 11 个农艺性状的 QTL 和 SSR 标记进行关联分析,得到 136 个位点与 11 个农艺性状 QTL 相关联^[9],但目前应用关联分析方法定位抗腐霉菌相关 QTL 的研究还鲜见报道。

本研究从不同生态类型大豆品种中选取代表性的品种 150 份,分别用 4 种腐霉菌进行接种鉴定、筛选抗源,利用覆盖全基因组的 256 个 SSR 标记分析该群体的结构和连锁不平衡,以腐霉菌对大豆侵染的种子腐烂率作为抗性的表型值,采用 TASSEL 软件中的 GLM 方法对大豆 4 种腐霉菌的抗性进行关联分析,进而发掘各关联位点的优异等位基因及代表性载体材料,为大豆抗病育种和分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆材料 试验材料为不同生态类型无直接血缘关系且具有广泛代表性的 150 个大豆品种(系),其中国外材料 13 份,东北各省提供的材料 137 份。

1.1.2 腐霉菌 选用 4 种对大豆致病的腐霉菌 *P. aphanidermatum*、*P. sylvaticum*、*P. irregulare* 和 *P. ultimum*。其中,*P. aphanidermatum* 和 *P. sylvaticum* 由黑龙江省农业科学院大豆研究所提供,*P. irregulare* 和 *P. ultimum* 由浙江大学生物技术研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 品种的抗病性鉴定 采用国际上应用的种子腐烂率测试法^[1]。将大豆种子用 10% 的次氯酸钠进行表面消毒 1 min,然后在去离子水中浸泡 12 h。

从培养腐霉菌的 V8 培养基(V8 原汁经过 2 层纱布过滤,取过滤液 140 mL,与 20 g 琼脂粉,0.6 g CaCO₃,定容至 1 000 mL)上取一个 5 mm² 的小块,放在直径 9 cm 的包含 20 mL WA(20 g 琼脂粉,定容至 1 000 mL)培养基的平皿中心。3 d 后,将 10 粒大豆种子均匀放在距离边缘 2 cm 左右的位置。然后将平皿放置于生长箱(25℃,12 h 光照)中,7 d

后记录每平皿中腐烂的种子数。每个大豆品种有 4 盘接种灭菌的 V8 培养基块的平皿作为对照。

种子腐烂的百分比(SR)的计算公式为:

$$SR(\%) = (\text{供试种子总数} - \text{存活种子}) / \text{供试种子总数} \times 100$$

数据包括在每次试验中每个大豆品种每个分离群体分布 4 次重复平皿中的 40 粒大豆种子。这个试验为双因素设计,即菌种和大豆品种,其中菌种还包括不同分离群体的因素。分离群体造成的不同致病性的标准为种子腐烂率。

用供试 4 种对大豆致病的腐霉菌分别对 150 个大豆品种(系)进行抗性测定;每个品种设为一个处理,每处理 4 次重复,整体试验重复 2 次。

1.2.2 SSR 标记 试验材料的 DNA 提取采用 CTAB 法^[10]。从覆盖大豆全基因组的 500 多个 SSR 引物中筛出质量好、多态性好的 256 个 SSR 引物对群体进行 PCR 扩增。在 20 μL 反应体系中含有 50~100 ng 基因组 DNA 模板,1 × PCR 缓冲液、1.25 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol·L⁻¹ dNTP、0.4 μmol·L⁻¹ SSR 引物和 1U Tag DNA 聚合酶。SSR 反应程序:95℃ 5 min 预变性后,95℃ 30 s,47℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环,72℃ 10 min 后,于 4℃ 保存。PCR 扩增产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,银染显色。

1.2.3 群体结构分析 应用 PowerMarker 3.25 对等位变异和多态性信息含量进行分析。应用 STRUCTURE 2.2 对试验群体进行结构分析,根据 ΔK ($\Delta K = m/L(k+1) - 2L(k) + L(k)/s/L(k)$) 变化规律确定合适的 K 值(分群数)。K 值即将样本中各材料归到第 K 个亚群,使得该亚群内位点频率都遵循同一个 Hardy-weinberg 平衡,并得到基于模型的遗传结构,计算材料相应的 Q 值。从 256 个 SSR 引物中选取遗传距离大于 50 cM 的 40 个引物,让其分布于 20 个连锁群上,每个连锁群 2 个引物。应用 STRUCTURE 2.2 软件进行分析。

1.2.4 连锁不平衡(LD)分析 应用 TASSEL 2.1 软件(<http://www.maizegenetics.net/bioinformatics>)计算 LD 配对检测的矩阵图,根据相应色差大小观察共线和非共线 SSR 位点之间的 LD 排列。

1.2.5 关联分析 使用 TASSEL 软件的 GLM (general linear model) 程序,以群体结构分析中计算的各个体 Q 值作为协变量对群体进行矫正,将 4 个腐霉菌菌种在每个品种中的表型数据分别对标记变异逐一进行回归分析,确认性状关联位点并计算位点对表型变异的解释率。

1.2.6 优异位点及优异等位变异的确认 优异位点及优异等位变异根据 Bresnahan 提出的计算方

法进行分析确定^[11]。 $a_i = \sum x_{ij}/n_i - \sum N_k/n_k$ 。式中 a_i 代表第 i 个等位变异的表型效应值, x_{ij} 为携带第 i 个等位变异的第 j 材料性状表型测定值, n_i 为具有第 i 等位变异的材料数。 N_k 为携带无效等位变异的第 k 个材料的表型测定值, n_k 为具有无效等位变异的材料数。若 a_i 值为正, 则认为该等位变异为增效等位变异, 反之为减效等位变异。

2 结果与分析

2.1 大豆群体等位变异与结构特点

利用 256 个 SSR 标记分析了对每一种腐霉菌具有不同抗性的 40 份大豆材料。共检测到 1 076 个等位变异, 平均每个标记有 4.2 个等位变异, 变化范围 2~8 个。等位变异最多的标记为 Satt152, 检测到 8 个等位变异; 其次是 Satt300 和 Satt206, 都检测到 7 个等位变异位点。供试材料的 PIC 变化范

围为 0.032~0.860, 平均为 0.58。

选择平均分布于 20 个连锁群的 40 个引物, 运用 STUCTURE2.2 软件分析得出品种的结构。根据 ΔK 的变化规律, 由 STUCTURE2.2 软件可计算得到 K 值的最佳值为 7, 即试验材料分为 7 个亚群时, 亚群内位点频率都遵循同一个 Hardy-weinberg 平衡, 并基于此模型得出品种的群体结构(图 1), 在遗传距离 0.614 0 处将材料划分为 7 类群, 各类群间渗透较少, 并计算出各品种材料相应的 Q 值。

在 256 对 SSR 引物位点的 32 640 种两两位点组合中, 无论是同连锁群上引物组合, 还是异连锁群上引物组合, 都存在一定程度的连锁不平衡(LD)。计算获得不平衡成对位点占位点组合的 23.6%, 由同连锁群 SSR 位点的 D' 值随遗传距离变化速度得出, SSR 位点 D' 值衰减相当快, 表明连锁不平衡程度高, 适合进一步做关键分析。

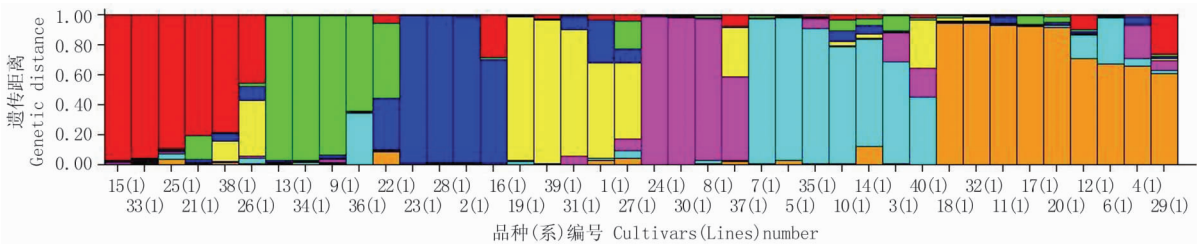


图 1 群体结构图

Fig. 1 The structure of the groups sorted

2.2 大豆抗腐霉病性状与 SSR 标记的关联分析

根据群体结构特点, 在进行 SSR 的多态性位点和 4 种腐霉菌种的抗性进行关联分析时, 要把各个体相应的 Q 值作为协变量。当 $P < 0.01$ 时, 共检出

关联引物为 25 个(表 1), 其中与 *P. aphanidermatum* 抗性关联的有 15 个, 与 *P. irregulare* 抗性关联的有 7 个, 与 *P. sylvaticum* 抗性关联的有 3 个。

表 1 大豆对 4 种腐霉菌的抗(感)性与 SSR 引物关联分析

Table 1 Association analysis on resistance/susceptibility of soybean cultivars to 4 Pythium species and SSR primers

腐霉菌种 Pythium species	引物名称 Primer	连锁群 Linkage group	连锁群位置 Linkage group location	P 值 P value	R ² R ² value
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt191	G	89.372	4.38E-05	0.3984
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt584	N	29.37	8.00E-04	0.2663
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt369	E	85.199	0.0024	0.1833
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt385	A1	58.472	0.0036	0.2201
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt117	E	76.848	0.0037	0.3059
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt505	G	60.527	0.0038	0.2183
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt135	D2	25.483	0.0039	0.2364
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt511	A1	—	0.004	0.2459
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt557	C2	102.229	0.0045	0.2276
<i>P. aphanidermatum</i>	Sat_109	O	115.991	0.0049	0.2105
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt361	C1	51.138	0.0049	0.1609
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt209	A2	—	0.0051	0.2145
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt230	E	—	0.0062	0.2022
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt602	E	75.196	0.0076	0.1468
<i>P. aphanidermatum</i>	Satt510	F	55.596	0.0149	0.2086

续表 1

腐霉菌种 Pythium species	引物名称 Primer	连锁群 Linkage group	连锁群位置 Linkage group location	P 值 P value	R ² R ² value
<i>P. sylvaticum</i>	Satt245	M	49.031	0.0059	0.2224
<i>P. sylvaticum</i>	Satt292	I	74.778	0.0076	0.324
<i>P. sylvaticum</i>	Satt008	D2	—	0.0083	0.1579
<i>P. irregulare</i>	Satt255	N	61.644	0.0011	0.3764
<i>P. irregulare</i>	Satt602	E	75.196	0.0015	0.2491
<i>P. irregulare</i>	Satt268	E	78.491	0.0017	0.3542
<i>P. irregulare</i>	Satt117	E	76.848	0.0033	0.3725
<i>P. irregulare</i>	Satt135	D2	25.483	0.0052	0.2793
<i>P. irregulare</i>	Satt042	A1	—	0.0091	0.3216
<i>P. irregulare</i>	Satt114	F	43.898	0.0235	0.2431

根据关联分析获得的等位变异位点和不同品种抗病性差异的表型数据进行 T 测验。共检出差异显著的 ($P < 0.05$) 等位变异位点 12 个。与 *P. aphanidermatum* 关联的位点有 7 个 (Satt191-3、Satt584-1、Satt584-2、Satt602-1、Satt117-3、Satt505-1 和 Satt511-2); 与 *P. sylvaticum* 关联的位点有 2 个 (Satt602-1 和 Satt557-2); 与 *P. irregulare* 关联的位点有 2 个 (Satt602-1 和 Satt042-4); 与 *P. ultimum* 关联的位点有 1 个 (Satt114-2)。其中与 *P. aphanidermatum* 关联的 7 个等位变异位点, 全部为上述关联分析中与 *P. aphanidermatum* 抗性关联的 SSR 引物, 且都是相关性大的关联引物; 与 *P. irregulare* 有关的 2 个等位变异位点均为上述关联分析中与 *P. irregulare* 抗性关联的 SSR 引物 (表 2)。

与 *P. aphanidermatum* 相关联的 Satt191-3、Satt584-1、Satt584-2、Satt602-1、Satt117-3、Satt511-2 为增效等位变异位点, 平均增效值达 31.7% 以上, 增效效应达到 49.4%; Satt505-1 为减效等位变异位点, 减效值平均为 -26.7%, 减效效应达 41.6%。其中, 增效最大值为 Satt602-1 对应的黑农 55, 增效值为 62.83%。减效最大值为 Satt505-1 对应的绥农 25、绥农 22 和龙品 03-142, 减效值为 35.57%。

但其中 Satt602-1 对应的 7 个品种中有 1 个品种为减效; Satt511-2 对应的 17 个品种中有 3 个品种为减效; Satt505-1 对应 6 个品种中有 1 个品种为增效; 这些情况可能是与标记连锁的相关基因发生突变或连锁被打破所致。

表 2 腐霉菌 *P. aphanidermatum* 与抗病性显著关联的位点及其表型效应

Table 2 Loci significantly associated with resistance to *P. aphanidermatum* and their phenotypic effect

等位变异位点 Allelic variation	对应品种的表型值 Phenotypic value of cultivars corresponded with allelic variation/%	效应值 Effect value/%	对应的品种 Cultivars corresponded with allelic variation
Satt191-3	10.0	54.13	嫩 06-8790 (N 06-8790)
	30.0	34.13	绥 06-8794 (S 06-8794)
	47.5	16.63	合丰 52 (HF 52)
	46.3	17.83	绥 07-361 (S 07-361)
	3.8	60.33	绥 04-5147 (S 04-5147)
	1.3	62.83	黑农 55 (HN 55)
Satt584-1	16.3	47.83	Dekafast (Dekafast)
	10.0	54.13	嫩 06-8790 (N 06-8790)
	16.3	47.83	MN1902 (MN1902)
	12.5	51.63	嫩丰 16 (NF 16)
	37.5	26.63	沈农 101 (SN 101)
Satt584-2	13.8	50.33	意大利 2 号 (Italy 2)
	13.8	50.33	意大利 2-1 (Italy 2-1)
	16.3	47.83	M101 (M101)
	13.8	50.33	Hbz (Hbz)

续表 2

等位变异位点 Allelic variation	对应品种的表型值 Phenotypic value of cultivars corresponded with allelic variation/%	效应值 Effect value/%	对应的品种 Cultivars corresponded with allelic variation
Satt602-1	80.0	- 15.87	垦丰 9 号 (KF 9)
	16.3	47.83	Dekafast (Dekafast)
	16.3	47.83	M101 (M101)
	3.8	60.33	绥 04-5147 (S 04-5147)
	1.3	62.83	黑农 55 (HN 55)
	16.3	47.83	MN1902 (MN1902)
	13.8	50.33	Hbz (Hbz)
Satt117-3	10.0	54.13	嫩 06-8790 (N 06-8790)
	3.8	60.33	绥 04-5147 (S 04-5147)
	1.3	62.83	黑农 55 (HN 55)
Satt505-1	100.0	- 35.87	绥农 25 (SN 25)
	53.8	10.33	绥 07-405 (S 07-405)
	97.5	- 33.37	绥农 18 (SN 18)
	100.0	- 35.87	龙品 03-142 (LP 03-142)
	93.8	- 29.67	垦丰 13 (KF 13)
	100.0	- 35.87	绥农 22 (SN 22)
Satt511-2	17.5	46.63	绥 08BCIF5227S 08BCIF5227
	16.3	47.83	Dekafast (Dekafast)
	10.0	54.13	嫩 06-8790 (N 06-8790)
	30.0	34.13	绥 06-8794 (S 06-8794)
	100.0	- 35.87	绥 06-8210 (S 06-8210)
	11.3	52.83	绥农 23 (SN 23)
	100.0	- 35.87	龙品 03-142 (LP 03-142)
	13.8	50.33	意大利 2 号 (Italy 2)
	58.8	5.33	绥 05-6022 (S 05-6022)
	13.8	50.33	意大利 2-1 (Italy 2-1)
	6.3	57.83	绥 05-7418 (S 05-7418)
	3.8	60.33	绥 04-5147 (S 04-5147)
	100.0	- 35.87	嫩丰 20 (NF 20)
	1.3	62.83	黑农 55 (HN 55)
	16.3	47.83	MN1902 (MN1902)
	37.5	26.63	沈农 101 (SN 101)
	13.8	50.33	Hbz (Hbz)

2.3 大豆与 *P. aphanidermatum* 关联的位点标记

检出的优异等位变异位点与对应大豆品种的抗感性相同。对腐霉菌 *P. aphanidermatum* 表现为抗性的品种有 15 个(表 3), Satt191-1、Satt584-1、Satt584-2 等位变异位点涵盖了所有的抗病品种 73% 以上,且相互之间无交叉;对抗性起减效作用的等位变异位点 Satt505-1 在所有的抗性品种中均未检出。有的抗性品种同时含有 2 个以上优异等位变异位点。

对腐霉菌种 *P. aphanidermatum* 感病的 17 个品种中,均未检出增效的优异等位变异位点 Satt191-1、Satt584-1、Satt584-2,在垦丰 9 号中检测到增效等位变异位点 Satt602-1,在绥 06-8210 和龙品 03-142 中检出增效等位变异位点 Satt511-2;有垦丰 13、绥农 18、绥农 25、龙品 03-142 和绥农 22 共 5 个品种在 Satt505-1 处检测到减效等位变异位点(表 4)。

表 3 对 *P. aphanidermatum* 抗性大豆品种优异等位变异位点的表达Table 3 Expression of genes in elite allelic variation loci in soybean cultivars resistant to *P. aphanidermatum*

品种 Resistant cultivars	发病率 Resistance value (Morbidity)/%	Satt191-1 (增效) Satt191-1 (Synergy)	Satt584-1 (增效) Satt584-1 (Synergy)	Satt584-2 (增效) Satt584-2 (Synergy)	Satt602-1 (增效) Satt602-1 (Synergy)	Satt117-3 (增效) Satt117-3 (Synergy)	Satt511-2 (增效) Satt511-2 (Synergy)	Satt505-1 (减效) Satt505-1 (Minus effect)
Dekafast	16.3	-	+	-	+	-	+	-
M101	16.3	-		+	+	-	-	-
MN1922	16.3	-	+	-	+	-	+	-
黑农 55 HN55	1.3	+	-	-	+	+	+	-
Hbz	13.8	-	-	+	+	-	+	-
嫩 06-8790 N 06-8790	10.0	+	+	-	-	+	+	-
嫩丰 16 NF 16	12.5	-	+	-	-	-	-	-
绥 04-5147 S 04-5147	3.8	+	-	-	+	+	+	-
绥 05-7418 S 05-7418	6.3	-	-	-	-	-	+	-
绥 06-8794 S 06-8794	30.0	+	-	-	-	-	+	-
绥 08BCIF5227 S08BCIF5227	17.5	-	-	-	-	-	+	-
绥农 23 SN 23	11.3	-	-	-	-	-	+	-
绥农 31 SN 31	18.8	-	-	-	-	-	-	-
意大利 2-1 Italy 2-1	13.8	-	-	+	-	-	+	-
意大利 2 号 Italy 2	13.8	-	-	+	-	-	+	-

“+”代表有相应的扩增条带;“-”非相应的扩增条带。下同。

‘+’ had relevant amplification strip; ‘-’ had no relevant amplification strip. The same below.

表 4 对腐霉 *P. aphanidermatum* 感病大豆品种的优异等位变异位点表达Table 4 Expression of genes in elite allelic variation loci in soybean cultivars susceptible to *P. aphanidermatum*

品种 Resistant cultivars	发病率 Morbidity/%	Satt191-1 (增效) Satt191-1 (Synergy)	Satt584-1 (增效) Satt584-1 (Synergy)	Satt584-2 (增效) Satt584-2 (Synergy)	Satt602-1 (增效) Satt602-1 (Synergy)	Satt117-3 (增效) Satt117-3 (Synergy)	Satt511-2 (增效) Satt511-2 (Synergy)	Satt505-1 (减效) Satt505-1 (Minus effect)
绥 08BC2F5350 S08BC2F5350	77.5	-	-	-	-	-	-	-
垦丰 9 号 KF 9	80.0	-	-	-	+	-	-	-
绥 SP064068 SSP064068	82.5	-	-	-	-	-	-	-
安 06-51 A 06-51	82.5	-	-	-	-	-	-	-
绥 06-8113 S 06-8113	86.3	-	-	-	-	-	-	-
垦丰 13 KF 13	93.8	-	-	-	-	-	-	+
绥农 18 SN 18	97.5	-	-	-	-	-	-	+
绥农 25 SN 25	100	-	-	-	-	-	-	+
垦丰 16 KF 16	100	-	-	-	-	-	-	-
绥 07-856 S 07-856	100	-	-	-	-	-	-	-
绥 06-8210 S 06-8210	100	-	-	-	-	-	+	-
垦丰 7 号 KF 7	100	-	-	-	-	-	-	-
龙品 03-142 LP 03-142	100	-	-	-	-	-	+	+
绥农 22 SN 22	100	-	-	-	-	-	-	+
绥 08BC1F5405 S08BC1F5405	100	-	-	-	-	-	-	-
东农 47 DN 47	100		-	-	-	-	-	-
嫩丰 20 NF 20	100		-	-	-	-	+	-

2.4 大豆与 *P. irregulare* 关联位点的标记

对腐霉菌 *P. irregulare* 表现为抗病的 10 个大豆品种中,优异等位变异位点 Satt602-1 和 Satt042-4 覆盖了 8 个品种;Hbz 等 4 个品种同时含有 2 个抗性

位点,MN1902 等 4 个品种有 1 个单独抗性位点(表 5)。对腐霉菌 *P. irregulare* 感病的 12 个品种中,均未检测出优异等位变异位点 Satt602-1 和 Satt042-4(表 6),与品种抗性鉴定结果相一致。

表 5 对 *P. irregulare* 抗病大豆品种的
优异等位变异位点的表达
Table 5 Expression of genes in elite allelic variation
loci in soybean cultivars resistant to *P. irregulare*

品种名称 Cultivars	发病率 Morbidity/%	Satt602-1	Satt042-4
Hbz	0	+	+
绥 04-5147 S 04-5147	10.0	+	+
MN1902	12.5	+	-
垦丰 9 号 KF 9	13.8	+	+
垦丰 13 KF 13	18.8	-	+
黑农 55 HN 55	20.0	+	+
绥 08BC1F5058 S08BC1F5058	22.5	-	-
绥农 22 SN 22	22.5	-	-
嫩丰 16 NF 15	26.3	-	+
绥 07-405 S 07-405	27.5	-	+

表 6 对腐霉 *P. irregulare* 感病大豆品种
优异等位变异位点的表达
Table 6 Expression of genes in elite allelic variation
loci in soybean cultivars susceptible to *P. irregulare*

品种名称 Cultivars	发病率 Morbidity/%	Satt602-1	Satt042-4
绥 07-856 S 07-856	70.0	-	-
绥农 18 S 18	70.0	-	-
东农 47 DN 47	70.0	-	-
意大利 2 号 Italy 2	73.8	-	-
沈农 101 SN 101	76.3	-	-
安 06-51 A 06-51	78.8	-	-
绥 07-1389 S 07-1389	82.5	-	-
龙品 03-142 LP 03-142	85.0	-	-
绥 08BC1F5405(S 08BC1F5405)	86.3	-	-
嫩丰 20(NF 20)	91.3	-	-
绥 05-6022(S 05-6022)	92.5	-	-
绥 06-8210(S 06-8210)	100.0	-	-

优异等位变异位点 Satt602-1 在抗腐霉 *P. aphanidermatum* 和 *P. irregulare* 品种中均属于增效的等位变异,在抗 *P. aphanidermatum* 和 *P. irregulare* 的品种都被检测到,例如品种 Hbz、MN1922、黑农 55、嫩丰 16 和绥 04-5147。这几个品种的水平抗性正好说明等位变异位点 Satt602-1 与水平抗性连锁。

3 讨 论

关联分析为大豆抗病基因的定位提供很好的初选方法,定位的 SSR 标记用于资源材料的筛选具有重要的意义。利用重组自交系群体,采用连锁分析得到的抗病基因位点较少,而关联分析找到的基因位点较多,为进一步挖掘优良基因提供了重要途径。本研究用 4 种腐霉菌对 150 个大豆品种进行抗性筛选,获得了对每个小种具有不同抗性的大豆材料。关联分析表明,在抗腐霉菌种 *P. aphanidermatum* 的大豆材料中,70% 的品种都具有 Satt191-3、Satt584-1、Satt584-2 等位变异位点,而且 Satt191、Satt584 在关联分析中 P 值最大,其等位变异位点分别位于 G、N 连锁群上。这与前人的研究结果一致,

如抗大豆疫霉根腐病基因(*RPS7*)定位在 N 连锁群上^[12],又将 *RPS4* 定位在 G 连锁群上^[13],因此利用大豆等位变异位点作为抗病标记筛选,可方便、快捷地获得更多的抗性资源,在大豆分子育种设计中通过基因聚合创制抗腐霉菌多个小种的新品种,培育具有广谱抗性的品种。

参考文献

[1] 魏嵘,李文滨,韩英鹏,等. 大豆品种对四种腐霉菌的抗性研究[J]. 大豆科学,2010,29(6):971-975. (Wei L, Li W B, Han Y P, et al. Identification of resistance to four *Pythium* species in soybean cultivars[J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 971-975.)

[2] Kirkpatrick M T, Rupe J C, Rothrock C S. Soybean response to flooded soil conditions and the association with soil borne plant pathogenic genera[J]. Plant Disease, 2006, 90(5):592-596.

[3] Hendrix F F, Campbell W A. *Pythium* as plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1973, 11:78-98.

[4] Rosso M L, Rupe J C, Chen P, et al. Inheritance and genetic mapping of resistance to *Pythium* damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* in ‘Archer’ soybean[J]. Crop Science, 2008, 48:2215-2222.

[5] Schmitthenne A F. *Pythium* damping-off and root rot[M]. 4th ed. Compendium of Soybean Diseases. APS Press, St. Paul, M N, 1999:42-44.

[6] Thornsberry J M, Goodman M M, Doebley J, et al. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time[J]. Nature Genetics, 2001, 28:286-289.

[7] 文自翔,赵团结,郑永战,等. 中国栽培和野生大豆农艺品质性状与 SSR 标记的关联分析 I. 群体结构及关联标记[J]. 作物学报, 2008, 34(7):1169-1178. (Wen Z X, Zhao T J, Zheng Y Z, et al. Association analysis of agronomic and quality traits with SSR markers in *Glycine max* and *Glycine soja* in China: I. Population structure and associated markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(7):1169-1178.)

[8] 文自翔,赵团结,郑永战,等. 中国栽培和野生大豆农艺及品质性状与 SSR 标记的关联分析 II. 优异等位变异的发掘[J]. 作物学报, 2008, 34(12):1339-1349. (Wen Z X, Zhao T J, Zheng Y Z, et al. Association analysis of agronomic and quality traits with SSR markers in *Glycine max* and *Glycine soja* in China: II. Exploration of elite alleles[J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(12):1339-1349.)

[9] 张军,赵团结,盖钧镒. 大豆育成品种农艺性状 QTL 与 SSR 标记的关联分析[J]. 作物学报, 2008, 34(12):2059-2069. (Zhang J, Zhao T J, Gai J Y. Association analysis of agronomic trait QTLs with SSR markers in released soybean cultivars[J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(12):2059-2069.)

[10] 王关林,方洪筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2002:744-745. (Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002:744-745.)

[11] Breseghello F, Sorrells M E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars[J]. Genetics, 2006, 172:1165-1177.

[12] Lohnes D G, Schmitthenner A F. Position of the *Phytophthora* resistance gene *Rps7* on the soybean molecular map[J]. Crop Science, 1997, 37:555-556.

[13] Rosso M L, Rupe J C, Chen P, et al. Inheritance and genetic mapping of resistance to *pythium* damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* in ‘Archer’ soybean[J]. Crop Science, 2008, 48:2215-2222.