

## 大豆种质资源耐疫霉根腐病优异等位变异挖掘

赵雪<sup>1</sup>, 孙明明<sup>2</sup>, 韩英鹏<sup>1</sup>, 李修平<sup>3</sup>, 张洪建<sup>4</sup>, 滕卫丽<sup>1</sup>, 李文滨<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室, 农业部北方大豆生物学与遗传育种区域重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院信息中心, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 4. 黑龙江省红星农场, 黑龙江 北安 164022)

**摘要:** 利用片层接种法对全国 54 份大豆种质资源的大豆疫霉根腐病耐病性进行评价, 获得耐疫霉根腐病大豆种质 4 份, 中度耐病种质 12 份, 进一步通过 Solexa 测序获得 5 000 个高质量 SNP 标记, 并通过关联分析的方法对耐病优异等位位点的挖掘进行初步探索, 挖掘到与大豆疫霉根腐病相关联的 SNP 标记 34 个, 通过等位基因评价, 获得 31 个优异等位变异, 本研究结果将为大豆耐疫霉根腐病分子育种提供理论依据和基础材料。

**关键词:** 大豆; 疫霉根腐病; 耐病性; 关联分析

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0488

## Identification of Loci Underlying Tolerance to *Phytophthora* Root Rot in Soybean Germplasm

ZHAO Xue<sup>1</sup>, SUN Ming-ming<sup>2</sup>, HAN Ying-peng<sup>1</sup>, LI Xiu-ping<sup>3</sup>, ZHANG Hong-jian<sup>4</sup>, TENG Wei-li<sup>1</sup>, LI Wen-bin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Information Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. College of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 4. Hongxing Farm of Heilongjiang Province, Beian 164022, China)

**Abstract:** A total of 54 soybean varieties (lines) were used to evaluate the tolerance to PRR and was sequenced by solexa for genotyping. For evaluation of tolerance to PRR, four tolerant accessions and twelve moderate tolerant accessions were identified. Five thousand SNP markers were generated from 54 soybean accessions and a total of 34 association signal related to tolerance to PRR were detected under GLM model. Of them, 31 beneficial alleles were obtained. These results will facilitate soybean molecular breeding in PRR tolerance.

**Key words:** Soybean; *Phytophthora* root rot; Tolerance to disease; Association analysis

大豆疫霉根腐病由大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae* M. J. Kaufmann & J. W. Gerdemann) 引起, 危害大豆生产的一种毁灭性土传病害。自 1948 年在美国东北部的印第安那州发现以来, 相继在澳大利亚、加拿大、巴西、匈牙利、日本、阿根廷、印度、中国等 21 个国家都有报道<sup>[1-3]</sup>。1991 年沈崇尧和苏彦纯首次报道在我国东北发现该病, 之后相继在北京、山东等地分离出该病原菌<sup>[1]</sup>。该病在美国流行面积最大, 危害最严重, 1996~2002 年, 美国因大豆疫霉根腐病造成的产量损失每年高达 2 亿元之多<sup>[4-5]</sup>。我国各大豆生产区均发现大豆疫霉根腐病, 田间发病率一般为 3%~5%, 严重地块可达 75%, 甚至绝产<sup>[6]</sup>。

国内外学者对大豆疫霉根腐病进行了大量研究, 多集中在抗病机理的研究、抗病资源的筛选、抗病基因的定位方面。大豆疫霉根腐病的生理小种

众多, 新小种出现较快, 截至 2000 年就已经鉴定出 55 个生理小种, 而培育的大豆抗疫霉根腐病品种的抗病性一般只能维持 8~10 年, 随着小种变化, 抗性品种的抗性很快消失, 抗病品种成为感病品种<sup>[7]</sup>。且国内外培育的抗性品种多为垂直抗性, 可以兼抗多生理小种的抗性基因尚未在生产中应用。培育耐大豆疫霉根腐病品种是缓解大豆疫霉根腐病危害的有效方法, 然而国内外对大豆疫霉根腐病的耐病性研究报道较少, 耐病资源的挖掘及耐病性遗传控制方面的研究进展缓慢。大豆疫霉根腐病耐病资源的筛选, 耐病位点的挖掘及耐病分子设计育种体系的建立是目前大豆疫霉根腐病耐病性研究中亟待解决的问题。本研究拟对大豆种质资源的耐病性进行评价, 并通过关联分析的方法对耐病优异等位位点的挖掘进行初步探索, 旨在为耐大豆疫霉根腐病分子育种提供理论指导。

收稿日期: 2013-11-26

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划“973 计划”前期项目 (2012CB126311); 国家自然科学基金 (31201227, 31301339); 国家“十二五”科技支撑计划 (2011BAD35B06-1); 现代农业产业技术体系项目 (CARS-04-PS04); 中国博士后项目 (20110491024); 黑龙江省博士后项目 (LBH11220, LBH-TZ1210); 黑龙江省教育厅骨干教师资助项目 (1252G014); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12541049); 黑龙江省教育厅新世纪项目优秀人才项目 (1253-NCET-005); 教育部博士点项目 (20122325120012); 东北农业大学博士后启动金项目 (2012RCB11)。

**第一作者简介:** 赵雪 (1981-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事分子辅助育种研究。E-mail: zhaoxue\_s@163.com。

**通讯作者:** 李文滨 (1958-), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

以来自全国的 54 份大豆种质资源为材料进行大豆疫霉根腐病抗病性鉴定(表 1)。大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)为采集于黑龙江省佳木斯地区未分离的混合菌种。

1.2 方法

1.2.1 疫霉菌扩繁 菌种于胡萝卜琼脂培养基中扩繁。具体操作如下:将新鲜的胡萝卜洗净,称取 200 g,切成小块放入植物组织绞碎机中搅成匀浆,加入 1 000 mL 蒸馏水煮沸 30 min 过滤出去残渣,将 20 g 琼脂加入滤液中搅拌均匀后定容至 1 000 mL,灭菌(121℃,18 min),将 15 mL 融化的固体培养基倒入直径为 9 cm 的培养皿,尽量保持水平,冷却后制成 CA 固体平板培养基,将活化的病原菌接种与平板中央,接种第 2 天开始倒置于 25℃ 恒温培养箱中培养 7 d,备用。

1.2.2 抗病性鉴定方法 采用片层接种法进行大豆种质资源的耐疫霉根腐病鉴定<sup>[8]</sup>。将长有病原菌菌丝体的琼脂片接种到营养钵中,然后在菌丝体

上方覆土播种,每营养钵播种 14~15 株,3 次重复,28 d 后调查病害损失率,损失率(%)=[(出苗的植株数-站立的植株数)/出苗的植株数]×100<sup>[9]</sup>。

1.2.3 SNP 标记基因分型及关联分析 利用 Sol-exa 测序技术结合基因组酶切对 54 个大豆种质资源进行基因分型,筛选次要基因型频率大于 5% 的 SNP 位点<sup>[10]</sup>。采用 Excel 2010 分析耐病表型值分布,利用 TASSEL3.0 软件包的一般线性模型(GLM)进行耐病关联位点的挖掘,以 1×10<sup>-5</sup>为显著性关联位点临界值<sup>[11]</sup>。

2 结果与分析

2.1 耐大豆疫霉根腐病种质资源鉴定

参照 Han 等<sup>[9]</sup>的评定标准,供试的 54 份大豆种质资源大豆疫霉根腐病抗病性鉴定分为 4 种类型,其中 4 份材料具有抗病性(损失率≤30%),中耐类型 12 份(30% < 损失率≤50%),中感类型 6 份(50% < 损失率≤70%),感病类型(损失率 > 70%)29 份(表 1)。4 份耐病品种(系)及损失率分别为合丰 25(16.25%),郑 97196(23.2%),合丰 47(25%)以及周豆 02-281(15.5%)。

表 1 大豆疫霉根腐病抗病性资源鉴定  
Table 1 Identification of soybean germplasm with tolerance to *P. sojae*

序号	品种(系)	损失率	序号	品种(系)	损失率
Number	Variety( line)	Loss rate/%	Number	Variety( line)	Loss rate/%
1	V111-4	76.50	28	齐黄 31	100.00
2	东农 163	79.22	29	齐黄 32	100.00
3	东农 42	73.33	30	齐黄 33	64.50
4	桂春豆 1 号	100.00	31	绥 03-3046	71.40
5	桂夏豆 2 号	90.00	32	绥 03-3952	100.00
6	合豆 3 号	100.00	33	绥 05-7304	77.40
7	合丰 25	16.25	34	绥农 10	38.46
8	合丰 35	75.00	35	绥农 14	77.08
9	合丰 45	52.08	36	绥农 25	100.00
10	合丰 47	25.00	37	绥农 28	39.48
11	黑农 44	65.00	38	绥农 4	84.52
12	呼交 03-286	33.30	39	皖豆 16	67.50
13	呼交 04-528	100.00	40	皖豆 24	46.70
14	呼交 423	50.00	41	油春 05-4	66.70
15	华夏 3 号	100.00	42	油春 05-8	50.00
16	吉育 94	100.00	43	郑 97196	23.20
17	冀豆 17	34.56	44	郑 9805	35.40
18	冀豆 18	100.00	45	中豆 35	100.00
19	垦丰 15	100.00	46	中黄 30	50.00
20	垦丰 18	100.00	47	中黄 37	66.70
21	垦鉴 23	51.67	48	中作 00-683	100.00
22	蒙 9449	45.20	49	中作 05-15	90.00
23	蒙 9793-1	93.80	50	中作 J4032	100.00
24	蒙豆 19	50.00	51	中作 J4133	100.00
25	蒙豆 21	46.50	52	周豆 02-281	15.50
26	南农 30	66.70	53	周豆 11	64.30
27	齐黄 30	100.00	54	周豆 17	100.00

## 2.2 耐大豆疫霉根腐病关联位点挖掘

利用酶切位点双端测序获得的 5 000 个 SNP 标记在 TASSEL 软件包的一般线性模型下,检测到与大豆疫霉根腐病耐病性显著关联的位点有 34 个,覆盖大豆的 12 个染色体(表 2),在大豆的 20 号染色体上共检测到的关联位点数最多,为 18 个,其他 11 条染色体上分别检测到 1~3 个关联位点。这些位点可解释的表型变异范围为 19.9%~39.6%。

## 2.3 耐大豆疫霉根腐病优异基因型评价

如表 2 所示,检测到的 34 个耐大豆疫霉根腐病关联位点对应 34 个 SNP 标记,每个标记包含 2 个等位变异,本研究通过分析不同等位变异在耐病、中度耐病、中度感病以及感病基因型大豆中的分布频率,发现在上述耐病关联 SNP 标记中,大部分存在于耐病和中度耐病材料的等位变异频率高于其中度感病及感病材料中的频率,根据每个 SNP 标记的 2 个等位变异在不同耐感性大豆品种中的频率分布特点,可将等位变异分为 3 种类型,第一种类型

的等位变异仅存在于耐病组中,在其他 3 组材料中频率均为 0,如 qRP14-1\_T;第二种类型的等位变异仅存在于耐病和中耐品种中,且在耐病组中高频出现,在中耐组中低频出现,而在中感和感病组中频率为 0,如 qRP20-1\_C 和 qRP20-2\_C;第三种类型等位变异在 4 组耐感品种中均存在,从耐病到感病组,等位基因频率逐渐降低,且在耐病和中耐品种中频率均显著高于其中度和感病组中的频率,如 qRP11-1\_T 和 qRP13-1\_G;第四种类型的等位变异在 4 组大豆种质中的频率均较高,在耐病组中频率较感病组中频率没有明显的差别,如 qRP6-1\_G 和 qRP6-2\_T。从本研究结果可以看出,4 种类型的等位变异中,前 3 种均可作为标记进行耐病材料的辅助选择,而第四种类型对辅助筛选耐感材料意义不大。综上分析,34 个耐病关联 SNP 中,有 31 个等位基因被鉴定为优异等位,可作为候选标记用于后续实验验证和育种利用。

表 2 耐大豆疫霉根腐病单核苷酸位点

Table 2 Single nucleotide loci associated with tolerance to PRR

位点 Locus	染色体 Chromosome	-Log(p)	等位 基因 1 Allele 1	等位 基因 2 Allele 2	次要基因 型频率 Minor allele frequency	等位基因 1 频率 Frequency of allele 1				等位基因 2 频率 Frequency of allele 2			
						耐病 T	中耐 MT	中感 MS	感病 S	耐病 T	中耐 MT	中感 MS	感病 S
qRP6-1	Gm06	5.06	G	A	0.23	100.0	100.0	77.8	65.5	0	0	22.2	34.5
qRP6-2	Gm06	5.07	T	C	0.29	100.0	100.0	66.7	58.6	0	0	33.3	41.4
qRP7-1	Gm07	5.04	T	C	0.06	25.0	91.6	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP8-1	Gm08	5.17	G	A	0.43	0	36.3	66.7	65.5	100.0	63.6	33.3	34.5
qRP8-2	Gm08	5.50	T	C	0.43	0	33.3	77.8	68.9	100.0	66.7	22.2	31.0
qRP9-1	Gm09	5.50	C	T	0.07	25.0	90.0	100.0	100.0	75.0	10.0	0	0
qRP11-1	Gm11	5.52	A	T	0.48	0	10.0	66.7	72.4	100.0	90.0	33.3	27.6
qRP13-1	Gm13	5.74	T	G	0.38	0	33.3	77.8	72.4	100.0	66.7	22.2	27.6
qRP14-1	Gm14	5.50	G	T	0.04	0	100.0	100.0	100.0	100.0	0	0	0
qRP15-1	Gm15	5.85	T	G	0.24	0	66.7	66.7	96.6	100.0	33.3	33.3	3.5
qRP17-1	Gm17	5.28	A	G	0.12	25.0	75.0	88.9	100.0	75.0	25.0	11.1	0
qRP17-2	Gm17	5.28	A	C	0.12	25.0	75.0	88.9	100.0	75.0	25.0	11.1	0
qRP17-3	Gm17	5.29	C	A	0.08	25.0	83.3	100.0	100.0	75.0	16.7	0.0	0
qRP18-1	Gm18	5.48	T	C	0.08	25.0	83.3	100.0	100.0	75.0	16.7	0.0	0
qRP18-2	Gm18	5.55	A	T	0.21	0	58.3	88.9	93.1	100.0	41.7	11.1	6.9
qRP19-1	Gm19	5.27	A	T	0.21	100.0	100.0	100.0	51.7	0	0	0	48.3
qRP20-1	Gm20	5.04	A	C	0.06	0	91.7	100.0	100.0	100.0	8.3	0	0
qRP20-2	Gm20	5.04	T	C	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-3	Gm20	5.04	G	A	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-4	Gm20	5.04	A	G	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-5	Gm20	5.04	A	T	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-6	Gm20	5.04	C	T	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-7	Gm20	5.04	G	T	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-8	Gm20	5.04	C	T	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-9	Gm20	5.04	A	G	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-10	Gm20	5.12	G	A	0.06	25.0	90.9	100.0	100.0	75.0	9.1	0	0
qRP20-11	Gm20	5.04	C	T	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-12	Gm20	5.04	A	T	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-13	Gm20	5.04	G	A	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0

续表 2

位点 Locus	染色体 Chromosome	-Log(p)	等位 基因 1 Allele 1	等位 基因 2 Allele 2	次要基因 型频率 Minorallele frequency	等位基因 1 频率 Frequency of allele 1				等位基因 2 频率 Frequency of allele 2			
						耐病 T	中耐 MT	中感 MS	感病 S	耐病 T	中耐 MT	中感 MS	感病 S
qRP20-14	Gm20	5.04	A	G	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-15	Gm20	5.04	G	A	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-16	Gm20	5.04	G	A	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-17	Gm20	5.04	G	A	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0
qRP20-18	Gm20	5.04	G	A	0.06	25.0	91.7	100.0	100.0	75.0	8.3	0	0

3 结论与讨论

自 1995 年 Suhovecky 等鉴定了第一个生理小种后,到 2000 年已报道了 55 个生理小种<sup>[12]</sup>。在大豆抗疫霉菌基因选择压力下产生突变是大豆疫霉菌产生新的生理小种的重要原因,目前,对大豆疫霉根腐病抗病基因的报道多数为单一小种抗性,由于大豆疫霉菌生理小种变化较快,已鉴定出 16 个 Rps 基因<sup>[8]</sup>中仅少数携带多小种抗性,尚不能化解抗性品种的抗性丧失与小种迅速变化的矛盾,挖掘大豆对疫霉菌的耐病性,培育具有水平抗性大豆品种是解决该问题的有效途径之一。本研究对 54 份来自全国的大豆品种(系)进行耐大豆疫霉根腐病鉴定,初步获得耐病种质资源 4 份,为大豆耐疫霉根腐病育种提供优良亲本和优异基因载体。

大豆疫霉根腐病耐病位点挖掘已有报道,Han 等和李修平等利用双耐病大豆种质的杂交后代,通过连锁分析获得 7 个与耐病性有关的 QTL,分别位于大豆的 2,7,8 和 13 号染色体上<sup>[9,13]</sup>。本研究利用 5 000 个 SNP 标记的单体图谱结合关联分析获得与耐大豆疫霉根腐病相关联的 34 个 SNP 标记,这些标记覆盖大豆的 12 个染色体,其中 3 条染色体与前人研究存在重叠。由此可见,基于种质资源的关联定位可以获得较连锁分析更多的位点。然而,有限的样本容量可能导致本研究在评价优异等位变异过程的偏差,因此,本研究所获得的关联位点及 31 个优异等位变异需要在更多种质资源中进行单倍型鉴定,进一步确认关联位点的真实性和可信度。

参考文献

[1] 沈崇尧,苏彦纯. 中国大豆疫霉病菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报,1991,21(3):298. (Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary studies of *phytophthora megasperma* on soybean in China[J]. Plant Physiology Journal,1991,21(23):298. )

[2] Jee Hyeongjin. Occurance of *phytophthora* root rot on soybean(*Glycine max*) and identification of the causal fungus [J]. Journal of Crop Protection,1998,40(1):16-22.

[3] 徐永华,何志鸿,马淑梅. 大豆疫霉病早熟抗源[J]. 大豆通报,

1999(3):23-25. (Xu Y H,He Z H,Ma S M. Early-maturing soybean varieties with resistance to *phytophthora megasperma* [J]. Soybean Bulletin,1999(3):23-25. )

[4] Wrather J A,Stienstra W C,Koenning S R. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998 [J]. Canadian Journal of Plant Pathology,2001,23(2):122-131.

[5] Wrather J A,Koenning S R,Anderson T R. Effect of diseases on soybean yields in the United States and Ontario(1999-2002) [J]. Online. Plant Health Progress,2003,doi: 10. 1094/PHP-2003-0325-01-RV.

[6] 李宝英,马淑梅,丁俊杰. 大豆疫霉的发生危害及影响其发生因素的探讨[J]. 植物保护,1999,25(5):8-11. (Li B Y, Ma S M, Ding J J. Investigations of soybean *phytophthora* root rot disease and its determinant factors [J]. Plant Protection, 1999, 25 ( 5 ) : 8-11. )

[7] 朱振东,霍云龙,王晓鸣,等. 一个抗大豆疫霉根腐病新基因的分 子鉴定[J]. 作物学报,2007,33(1):154-157. (Zhu Z D, Huo Y L, Wang X M, et al. Molecular identification of a novel *phytophthora* resistance gene in soybean [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007,33(1):154-157. )

[8] Schmitthenner. A problems and progress in control of *phytophthora* root rot of soybean [J]. Plant Disease,1985,69:362-368.

[9] 韩英鹏,李文滨,Terry R A,等. 耐大豆疫霉根腐病 QTL 定位的研究[J]. 大豆科学,2006,25(1):23-27. (Han Y P, Li W B, Anderson T R, et al. Mapping quantitative trait loci influencing tolerance to *phytophthora* root rot in soybean [J]. Soybean Science, 2006,25(1):23-27. )

[10] Sun X, Liu D, Zhang X, et al. SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing [J]. Plos One,2013,doi:10. 1371/journal. pone. 0058700.

[11] Bradbury P J, Zhang Z, Kroon D E, et al. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples [J]. Bioinformatics,2007,23:2633-2635.

[12] Leitz R A, Hartman G L, Pedersen W L, et al. Races of *phytophthora sojae* on soybean in Illinois [J]. Plant Disease, 2000, 84 (4):487.

[13] Li X P, Han Y P, Teng W L, et al. Pyramided QTL underlying tolerance to *phytophthora* root rot in mega-environments from soybean cultivars ‘Conrad’ and ‘Hefeng 25’ [J]. Theoretical and Applied Genetics,2010,121:651-658.

[14] 李修平,韩英鹏,丁俊杰,等. 与耐大豆疫霉根腐病相关的 QTL 分析[J]. 大豆科学,2008,27(4):572-575. (Li X P, Han Y P, Ding J J, et al. Mapping quantitative trait loci underlining tolerance to *phytophthora* root rot in soybean [J]. Soybean Science,2008,27 (4):572-575. )