

大豆胞囊线虫病 3 号生理小种的抗性候选基因 *GmRSCN3-2* 的初步鉴定

谭云夫,宋 伟,徐玲秀,孙秋霞,赵 雪,韩英鹏

(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)

摘 要:大豆胞囊线虫病 3 号生理小种 (SCN3)是我国东北大豆产区的优势生理小种,危害较为严重,目前我国大豆生产上缺少抗病品种;然而常规育种方法培育抗性品种存在准确性差、遗传进程慢的缺点,因此分子辅助育种已成为培育抗性品种的有效途径之一。本研究根据前人的研究结果以抗大豆胞囊线虫病种质东农 L-10 为试验材料,克隆了抗病候选基因 *GmRSCN3-2* 的全长序列并构建了植物表达载体 pCXSN-HA/*GmRSCN3-2*,进而利用发根农杆菌转化大豆材料来验证该候选基因的抗病性。结果表明:候选基因 *GmRSCN3-2* 在转基因植株阳性根内的平均雌虫数与空白对照植株根内的平均雌虫数存在显著差异,即 *GmRSCN3-2* 对大豆胞囊线虫病具有明显的抗性。

关键词:大豆;胞囊线虫病抗性;基因功能鉴定

中图分类号:S565.1;S435.651 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.06.0862

Primary Identification of Candidate Gene *GmRSCN3-2* in Soybean Cyst Nematode Race 3 Resistance

TAN Yun-fu, SONG Wei, XU Ling-xiu, SUN Qiu-xia, ZHAO Xue, HAN Ying-peng

(Northeast Agricultural University, Chinese Education Ministry's Key Laboratory of Soybean Biology, Key Laboratory of Northeastern Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Harbin 150030, China)

Abstract: The soybean cyst nematode (SCN) Race 3 was the prevalent race in Northeast China, which caused the serious yield loss. Presently, it is short of resistance cultivar in the soybean production, however, the traditional method was inefficient and time-consuming in selecting resistance cultivar. Molecular assistance breeding was an effective method for selecting resistance cultivar. *GmRSCN3-2*, a candidate gene, was cloned from the resistance cultivar ‘Dongnong L-10’ according to the previous study, which was verified its function of candidate gene based on pCXSN-HA and *Agrobacterium tumefaciens*. The average number of females in the positive roots of the transgenic plants was significantly different from the average number of females in the blank control plants, which demonstrate the candidate gene was effective to control SCN Race 3.

Keywords: Soybean; Soybean cyst nematode resistance; Functional identification of gene

大豆是重要的油料作物^[1],大豆胞囊线虫病 (soybean cyst nematode, SCN)是限制大豆高产和稳产的最重要的因素之一,在我国主要分布在东北和黄淮海两大大豆主产区一般可造成减产 20% ~ 30%,严重时可造成减产 70% ~ 80%^[2-5]。大豆胞囊线虫的胞囊有很强的抗逆性、生活力和广泛的适应性,在极端不良的环境下能进入休眠或隐生状态,生理上维持极低代谢活动,乃至停滞状态,这些生理特征可以避免线虫死亡,推迟衰老,含有大量活力卵的胞囊寿命较长,所以土壤一旦被大豆胞囊线虫污染则很难再根除^[6]。

大豆胞囊线虫的种群拥有丰富的遗传多样性,因其不同种群存在致病力差异被分为不同的生理小种。目前,全球已发现 14 个 SCN 生理小种,而根据分级,理论上的 16 个生理小种中,还有 11 和 13 号未被发现^[7]。在我国已发现大豆胞囊线虫的 8 个生理小种(1、2、3、5、6、7、9 和 14),其中 3 号小种是东北地区(包括黑龙江、吉林、辽宁和内蒙古)的优势小种。目前,控制该病害最经济有效的措施之一是选育抗病品种,然而常规育种方法培育抗性品种存在准确性差、遗传进程慢的缺点,因此以抗病基因为基础的分子辅助育种越来越受到大豆育种

收稿日期:2017-08-09
基金项目:黑龙江省自然科学基金面上项目(C2015011);国家自然科学基金(31671717);东北农业大学学术骨干计划项目(15XG04);黑龙江省博士后项目(LBH-Z15017)。
第一作者简介:谭云夫(1992-),男,硕士,主要从事分子辅助育种研究。E-mail:2440787266@qq.com。
通讯作者:韩英鹏(1978-),男,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究和分子生物技术。E-mail: hyp234286@aliyun.com。

家的重视。

迄今为止,已发现3个隐性基因 *rhg1*、*rhg2* 和 *rhg3*^[8] 和1个显性基因 *Rhg4* 控制大豆胞囊病线虫抗性,其中 *rhg1* 基因贡献大豆抗胞囊线虫3号生理小种50%以上的抗性并对其它生理小种也具有部分抗性,其由一段长约31 kb的基因组区域上的3个基因共同控制的^[9],*rhg4* 基因抗病机制是通过编码丝氨酸羟甲基转移酶来控制丝氨酸和甘氨酸的互变从而实现的^[10]。尽管大豆胞囊线虫病部分抗病基因已被克隆,但仍然满足不了大豆分子辅助育种的需求。

本研究根据前人的研究结果以抗大豆胞囊线虫病种质东农 L-10 为试验材料,克隆了抗病候选基因 *GmRSCN3-2* 的全长序列并构建了植物表达载体 pCXS_N-HA/*GmRSCN3-2*,进而利用发根农杆菌介导快速转化技术进行功能鉴定,以期分子辅助育种提供有用的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

选用抗大豆胞囊线虫3号生理小种品种东农 L-10^[11] 与感病品种东农 50^[12] 为亲本材料,以上材料均由东北农业大学大豆研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 大豆根部总 RNA 的提取 在培养条件为 28℃光照 16 h,28℃黑暗 8 h 的培养箱中,将东农 L-10种在蛭石里面,保持水分充足,20 d 后取其根部,利用 Trizol 法提取大豆根部的总 RNA,保存在 -80℃冰箱备用。

1.2.2 大豆 *GmRSCN3-2* 基因的克隆 根据 GenBank 中的 *GmRSCN3-2* 的核苷酸序列,运用 Primer 5 软件设计,由生工公司合成。其中,上游引物 5'-CTAATACATCATGGCAGACGAG-3';下游引物 5'-CTTAAATATCAATGAGCACCCTC-3'。以东农 L-10 根部 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:DNA 2 μL,5×SF buffer (含 10 mmol·L⁻¹ MgSO₄) 4 μL,dNTP Mix (10 mmol·L⁻¹) 0.4 μL,引物 1 (10 mmol·L⁻¹) 0.8 μL,引物 2 (10 mmol·L⁻¹) 0.8 μL,PhantaTM Super-Fidelity DNA Polymerase 0.4 μL,ddH₂O 11.6 μL。反应程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,共 35 个循环,72℃延伸 10 min,4℃保存。PCR 产物经过胶回收后连接至 pCXS_N-HA 载体,进行序列

测定。

1.2.3 大豆 *GmRSCN3-2* 基因的表达载体构建 将 *GmRSCN3-2* 基因连接在本实验室前期构建的载体 pCXS_N-HA 中,以草丁膦抗性基因 *Bar* 为筛选标记,构建成植物过量表达载体。将其转化至发根农杆菌 K599 中。

1.2.4 发根农杆菌的侵染 选择长势一致 4 d 苗龄的大豆幼苗,用 1 mL 的注射器吸取用无菌去离子水重悬的菌体,在子叶节处注射。沾有菌液的针头在伤口处来回几次,使菌液在伤口处分布均匀。用无菌滤纸吸干多余的菌液,将侵染后的植株置于培养箱中培养。在侵染后 7 d,将子叶节处有根状物突起的植株从蛭石中取出,在蒸馏水中沿突起下部约 1 cm 处剪断,将地上部分插入装有无菌水中继续培养,诱导生根^[13]。

1.2.5 候选基因的功能验证 提取发根植株的根部 DNA,使用 *Bar* 基因引物 PCR 检测转基因阳性根,接种 pCXS_N-HA 空载体的植株 DNA、含有目的基因的 pCXS_N-HA 载体的质粒 DNA 为阳性对照,ddH₂O 为阴性对照,反应体系、程序如下:DNA 2 μL,5×SF buffer(含 10 mmol·L⁻¹ MgSO₄) 4 μL,dNTP Mix (10 mmol·L⁻¹) 0.4 μL,引物 1 (10 mmol·L⁻¹) 0.8 μL,引物 2 (10 mmol·L⁻¹) 0.8 μL,PhantaTM Super-Fidelity DNA Polymerase 0.4 μL,ddH₂O 11.6 μL;94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环,72℃延伸 10 min,4℃保存。

选择 PCR 反应呈阳性的根,以含有 pCXS_N-HA 空载体的根的植株为空白对照,进行大豆胞囊线虫的抗性鉴定,鉴定方法采用品红染色法^[14]。

1.2.6 转基因阳性根的表型鉴定 把检测带有转基因阳性根的植株及其对照进行接种鉴定,15 d 后取根洗净,经漂白、染色后在 20×光学显微镜下计数,每株取 10 个根进行重复,计算出每株雌虫的平均数。

1.3 数据分析

采用 Excel 2013 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 抗病候选基因 *GmRSCN3-2* 的克隆和转化

2.1.1 L-10 根部总 RNA 提取 取接种线虫后 12 h 的东农 L-10 根部组织,提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测,18S 和 28S RNA 带型清晰可辨(图 1),紫外分光光度计检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.91,介于 1.9~2.0,说明 RNA 完整性好、纯度高。

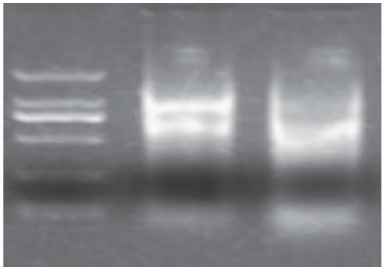


图 1 东农 L-10 根部总 RNA 提取

Fig. 1 Total RNA extraction from roots of Dongnong L-10

2. 1. 2 大豆抗胞囊线虫候选基因克隆 以东农 L-10根部总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板,经 PCR 扩增后得到产物的长度大致在 500 ~ 750 bp 的特异性目的片段,与预期片段 663 bp 吻合(图 2)。

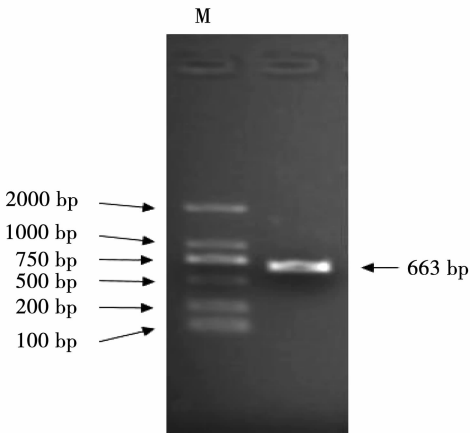
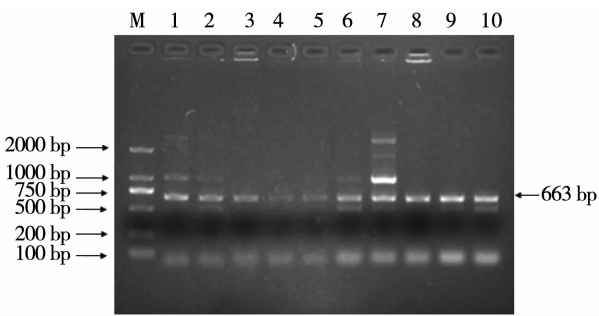


图 2 基因扩增产物电泳结果

Fig. 2 Gene amplification products electrophoresis

2. 1. 3 发根农杆菌阳性克隆鉴定 以含有 pCXSN-HA-*GmRSCN3-2* 的重组质粒的发根农杆菌菌液为目标,使用含有酶切位点的引物进行 PCR,对发根农杆菌进行阳性克隆鉴定。10 个不同单克隆菌液的 PCR 产物均表现为阳性(图 3)。



M:2000 Marker;1 ~ 10:10 个不同单克隆菌液。
M:2000 Marker; 1-10:Ten different monoclonal solution.
图 3 含 pCXSN-HA- *GmRSCN3-2* 重组质粒的发根农杆菌菌液 PCR 检测结果
Fig. 3 PCR results of *Agrobacterium rhizogenes* bacteria containing the recombinant plasmid pCXSN-HA- *GmRSCN3-2*

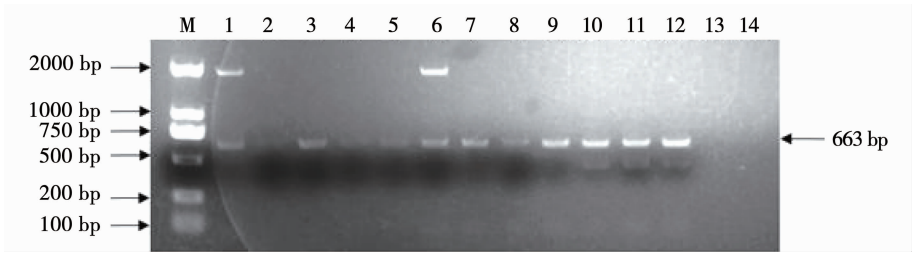
2. 2 转基因阳性根的鉴定

接种完毕后,用含有通风孔的透明塑料盖子覆盖保湿,在光照模式为 16 h(光):8 h(暗),温度模式为 28℃(光):25℃(暗)条件下进行毛状根的诱导。图 4 为 21 d 后,接种部位长出毛状根。对选取的 12 株发根植株进行 PCR 鉴定所示,均表现为阳性(图 5)。



图 4 东农 50 侵染后的发根情况

Fig. 4 The roots of transgenic Dongnong 50



M:2000 Marker;1 ~ 12:选取的 12 株发根植株;13:含有 pCXSN-HA 空载体的东农 50 发根植株对照;14:ddH₂O 阴性对照。
M:2000 Marker;1-12:Twelve root plants;13:Dongnong 50 root plant with pCXSN-HA empty vector as control; 14: ddH₂O as negative control.

图 5 东农 50 发根植株的阳性根 PCR 检测结果

Fig. 5 Positive root PCR results of Dongnong 50 root plant

2.3 转基因阳性根的表型鉴定

把检测 10 株带有转基因阳性根的植株及其对照进行接种鉴定,15 d 后取根洗净,经漂白、染色后在 20 × 光学显微镜下计数,每株取 10 个根进行重复,计算出每株雌虫的平均数(表 1),结果表明转基因阳性根中的胞囊数显著低于对照中的胞囊数。

表 1 植株根部雌虫平均数

Table 1 The average number of female plant (个·cm ⁻¹)										
处理 Treatment	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
转基因阳性根										
Positive	4.1	3.7	3.5	4.3	3.6	2.9	3.4	3.2	4.0	3.3
transgenic root										
对照 CK	8.6	7.7	7.4	8.9	7.8	7.0	7.7	7.1	9.1	6.7

3 结论与讨论

抗大豆胞囊线虫病候选基因的功能鉴定通常采用永久转化的方法,该方法验证抗病候选基因所需时间长、步骤繁琐,因此极大地阻碍了大豆胞囊线虫病候选基因的鉴定进程。本实验室前期开发了一种利用发根农杆菌快速鉴定大豆胞囊线虫病的方法^[15]。本研究利用该方法快速鉴定了 *GmR-SCN3-2* 基因的抗病性,证明了该方法的有效性。

目前,大豆胞囊线虫病 3 号生理小种的主效基因 *rhg1* 的抗病机制已被揭示^[7],其主要由一段 31 kb 重复序列的拷贝数变异所引起,如抗病材料 Peking、Fayette 的拷贝数显著地高于感病材料 Williams 82 的拷贝数,而另一个抗病基因 *rhg4* 基因抗病机制是通过编码丝氨酸羟甲基转移酶来控制丝氨酸和甘氨酸的互变来实现的。尽管本研究获得抗病候选基因 *GmRSCN3-2* 已经初步证明了其具有抗大豆胞囊线虫病 3 号生理小种的功能,其具体的抗病机制仍需进一步探讨。

本研究成功地从抗性品种品种东农 L-10 中获得了抗病候选基因 *GmRSCN3-2*,并通过发根农杆菌法对其进行了快速转化,转基因阳性植株内的雌虫数量极显著下降,初步验证抗性候选基因 *GmRSCN3-2* 具有抗大豆胞囊线虫病的功能,为进一步开展大豆胞囊线虫病的分子辅助育种提供了基因基础。

参考文献

[1] 宋启建,盖钧镒,马育华. 大豆品种蛋白质、油份含量的遗传特点[J]. 中国农业科学,1989,22(6): 24-29. (Song Q J,Gai J Y, Ma Y H. A study on genetic property of protein and oil content in soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica,1989,22(6): 24-29.)

[2] 李盛有,宋书宏. 不同遗传背景大豆杂交 F₂ 代脂肪含量遗传分析[J]. 大豆科学, 2011,30(6): 916-919. (Li S Y,Song S H. Genetic analysis for fat content in F₂ generation of crosses with different genetic background soybeans [J]. Soybean Science,

2011,30(6):916-919.)

[3] 王新风,富健 孟凡刚,等. 高蛋白大豆杂交 F₂ 代与亲本蛋白质含量的相关分析[J]. 河南农业科学,2008 (2): 42-44 . (Wang X F, Fu J, Meng F G, et al. Correlation analysis of protein content between high protein soybean parents and their F₂ hybrids[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences,2008 (2): 42-44.)

[4] 彭玉华,邱丽娟,高凤兰,等. 大豆不同组合 F₂ 代蛋白质含量的遗传变异分析[J]. 东北农学院学报,1988,19 (4): 348-353. (Peng Y H,Qiu L J,Gao F L,et al. Genetic study on soybean protein content of different F₂ hybridized combination [J]. Journal of Northeast Agricultural College,1988,19(4): 348-353.)

[5] 宋启建,盖钧镒,马育华. 大豆品种蛋白质、油分含量在杂种后代的优势表现及分离变异[J]. 作物学报,1994,20(5): 542-547. (Song Q J,Gai J Y, Ma Y H. Studies on heterosis and genetic variability of protein content and oil content in soybean [J]. Acta Agronomica Sinica,1994,20(5): 542-547.)

[6] 王险峰,关成宏,辛明运. 新编植保实用技术[M]. 北京:中国农业出版社,1998:2-3. (Wang X F, Guang C H, Xin M Y. New practical technology for plant protection[M]. Beijing:China Agriculture Press,1998:2-3.)

[7] 吴海燕,远方,陈立杰,等. 大豆胞囊线虫病与大豆抗胞囊线虫机制的研究[J]. 大豆科学,2001,20(4): 287-289. (Wu H Y, Yuan F, Chen L J, et al. Advances in soybean cyst nematode and mechanism of soybean resistance to *Heterodera glycines* [J]. Soybean Science,2001,20(4): 287-289.)

[8] 陈恒鹤,尹丽华,王大秋,等. 大豆蛋白质及脂肪含量的遗传和选择效果研究-III. 早期世代的变异与遗传进度[J]. 大豆科学,1991,10(1): 1-9. (Chen H H, Yin L H, Wang D Q, et al. Studies on inheritance and selection effect of protein and oil content in soybean III. Variability and genetic advance in early generations[J]. Soybean Science,1991,10(1): 1-9.)

[9] Cook D E, Lee T G, Guo X L, et al. Copy number variation of multiple genes at Rhg1 mediates nematode resistance in soybean[J]. Science,2012,338: 1206-1209.

[10] Liu S, Kandath P K, Warren S D, et al. A soybean cyst nemato de-resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens[J]. Nature,2012,492: 256-260.

[11] 毛婷婷,姜振峰,李文滨. 不同遗传背景和环境条件下大豆油分含量与产量性状的相关性和通径分析[J]. 大豆科学, 2012,31(5): 744-748. (Mao T T, Jiang Z F,Li W B. Path and correlation analysis between oil content and yield related traits of soybean in multi-genetic backgrounds and multi-environments[J]. Soybean Science,2012,31(5): 744-748.)

[12] 关荣霞. 大豆重要农艺性状的 QTL 定位及中国大豆与日本大豆的遗传多样性分析[D]. 北京: 中国农业科学院,2004. (Guan R X. QTL mapping of soybean agronomic characters and genetic diversity analysis of soybean cultivars from China and Japan [D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Sciences,2004.)

[13] 郑永战. 我国大豆种质资源脂肪性状的变异、遗传与基因定位的研究[D]. 南京: 南京农业大学,2006. (Zheng Y Z. Variability,inheritance, and QTL mapping of fatty traits in Chinese germplasm of soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006.)

[14] 张海军,王英,张艳,等. 东北地区大豆种质资源脂肪与蛋白质含量分析[J]. 大豆科学,2011,30(2): 215-218. (Zhang H J,Wang Y,Zhang Y, et al. Analysis of oil and protein content of soybean germplasm grown in northeast China [J]. Soybean Science,2011,30(2): 215-218.)

[15] 常玮. 大豆胞囊线虫抗性基因挖掘及功能验证[D]. 哈尔滨: 东北农业大学,2011. (Chang W. Mining and functional analysis of the soybean cyst nematode resistarte gene [D]. Harbin:North-east Agricultural university, 2011.)