

大豆种质对花叶病毒病和疫霉根腐病抗病性的 SSR 标记辅助鉴定

韩英鹏, 赵雪, 李修平, 滕卫丽, 李文滨

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室, 东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:通过与花叶病毒病 (soybean mosaic virus, SMV) 抗性相关的 SSR 标记 Satt114 对 30 份大豆种质进行分子辅助鉴定, 共发现 10 个抗 SMV 的种质, 经摩擦接种法表型验证其中 9 个种质表现为抗病, 即分子辅助鉴定的准确性为 90%。另外, 利用与疫霉根腐病 (phytophthora root rot, PRR) 相关的 SSR 标记 Satt325、Satt343、Satt428、Satt005、Satt600、Satt611、Satt689、Satt579、Satt252、Satt274 对相同的 30 份大豆种质进行分子辅助鉴定, 共在 2、3、5、6、12、2 份大豆种质上分别检测到 0、1、2、3、4、5 个抗 PRR 的 QTL, 并利用菌土法盆栽验证种质的抗病性, 结果表明拥有 0~1 个抗 PRR 的 QTL 大豆种质的病害损失率平均为 94%, 拥有 2~3 个抗 PRR 的 QTL 大豆种质的病害损失率平均为 77.82%, 拥有 4~5 个抗 PRR 的 QTL 大豆种质的病害损失率平均为 36.70%。通过本研究筛选获得了 1 份既高抗 SMV 又高抗 PRR 的种质合 05-31。

关键词:大豆花叶病毒病; 大豆疫霉根腐病; 抗病性; SSR 标记鉴定

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2014)01-0027-04

SSR Identification of Soybean Cultivar with Resistance to Soybean Mosaic Virus and Phytophthora Root Rot

HAN Ying-peng, ZHAO Xue, LI Xiu-ping, TENG Wei-li, LI Wen-bin

(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)

Abstract: One SSR (Satt114), associated with soybean mosaic virus (SMV), ten SSR markers (Satt325, Satt343, Satt428, Satt005, Satt600, Satt611, Satt689, Satt579, Satt252, Satt274), associated with phytophthora root rot (PRR), were used in this study. Ten cultivars resistance to SMV were identified through SSR marker Satt114, 9 of which were validated by phenotypic evaluation, and the accurate rate of its marker assistant selection was 90%. In addition, 2, 3, 5, 6, 12, and 2 cultivars with resistance to PRR was identified, which had 0, 1, 2, 3, 4, 5 resistance locus, respectively. The disease loss rate of cultivar with 0-1, 2-3, and 4-5 QTLs, was 94%, 77.82% and 36.70%, respectively. H05-31 was a cultivar with resistance to both SMV and PRR.

Key words: Soybean mosaic virus; Phytophthora root rot; Resistance; SSR identification

我国是大豆的起源地, 拥有丰富的大豆种质资源, 但是兼抗大豆花叶病毒病 (soybean mosaic virus, SMV) 和大豆疫霉根腐病 (phytophthora root rot, PRR) 的种质相对较少, SMV 和 PRR 是我国大豆主产区危害较重的两种病害, 种植抗病品种是防治 SMV 和 PRR 最经济有效措施之一。

目前, 对于东北地区种质抗 SMV 成株抗性^[1-2]和 PRR 抗病性仅有少数报道^[3]。因此, 筛选抗病资源并利用抗病相关分子标记进行辅助选择育种显得尤为重要。对于 SMV, 国外已经命名了 3 个抗 SMV 的位点, 即 *Rsv1*、*Rsv3* 和 *Rsv4*, 其分别位于 F、

B2 和 D1b 连锁群上^[4]; 对于 PRR, 已在 9 个位点发现 16 个具有抗病作用的 *Rps* 基因^[5]。另外, Li 等^[3]在抗病品种 Conrad 和合丰 25 上发现了 10 个抗病 QTL。在分子标记辅助鉴定方面, 李文福等^[1]利用 6 个与 SMV 抗性相关的 SSR 分子标记对部分大豆种质进行分析。

本研究利用与 SMV N1 株系和 PRR 抗病性相关的 SSR 标记, 对收集到的 30 份大豆种质进行分子辅助鉴定, 然后用摩擦接种法和菌土法对筛选得到的种质进行验证, 旨在为培育抗病新品种奠定基础, 减少这两种病害对生产造成的经济损失。

收稿日期: 2013-10-14

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); 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项目 (1252G014); 黑龙江省教育厅新世纪项目 (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: 韩英鹏 (1978-), 男, 副教授, 主要从事分子辅助育种研究工作。E-mail: hyp234286@aliyun.com。

通讯作者: 李文滨 (1958-), 男, 教授, 主要从事大豆遗传育种和作物生物技术研究工作。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

30份大豆种质均由东北农业大学大豆研究所保存。其中省外品种(系)6份,省内各生态区的品种(系)22份,国外引进品种2份。东农93046作为SMV抗性对照,合丰25和Conrad作为PRR抗病对照。

1.2 DNA提取、检测

采用CTAB法提取叶片总DNA^[1],用紫外分光光度计测定DNA纯度,用琼脂糖凝胶电泳测定DNA浓度。

1.3 SSR引物的来源及PCR反应

SSR引物选用滕卫丽等^[2]发现的与SMV N1株系抗性相关的SSR标记Satt114, Li等^[3]挖掘到与PRR相关的SSR标记Satt325、Satt343、Satt428、Satt005、Satt600、Satt611、Satt689、Satt579、Satt252、Satt274,根据Soybase网址(<http://129.186.26.94/>)提供的引物序列,由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR反应体系和反应程序参照滕卫丽等^[2]的方法。

1.4 抗病性鉴定

对于SMV,在温室采用摩擦接种法鉴定种质的抗病性,病毒株系为东北N1株系,每次10株,2次接种,接种15~30d,每隔3d观察1次发病情况,待症状稳定后,记载供试材料的成株抗病反应类型,具体鉴定和统计方法参照滕卫丽等^[2]的方法。

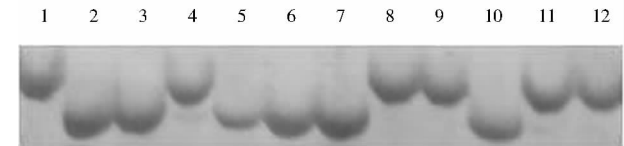
对于PRR,在温室采用菌土法盆栽鉴定种质的抗病性,其菌种于2008年采自黑龙江省佳木斯市自然发病的地块,每盆5株,每次2盆,2次处理,3次重复,具体鉴定和统计方法参照Li等^[3]的方法。

2 结果与分析

2.1 大豆种质资源的抗SMV评价及其SSR标记辅助鉴定

以与SMV N1株系抗性相关的SSR标记Satt114对30份大豆种质资源进行了分析,共鉴定得到与抗性对照东农93046的特征条带相同的种质10份。进而通过摩擦接种法对这10份种质进行表

型鉴定,结果表明这10份种质中,辽鲜1号、中黄37、中豆25、中豆32、中品03-5355、齐黄25、中品03-5179、中作J4032、合05-31表现为抗病类型,选择的准确性为90%。由于选取的种质与东农93046遗传背景相似的种质较少,因此,与其特征条带相同的种质则更少(图1)。



1~12 分别代表东农93046,合丰25,Conrad,辽鲜1号,粗豆,NOVa,齐黄25,中黄37,中作J4032,矮脚早,中豆25,中黄37。

1-12 present Dongnong 93046, Hefeng 25, Conrad, Liaoxian 1, Cudou, NOVa, Qihuang 25, Zhonghuang 37, Zhongzuo J4032, Aijiao, Zhongdou 25, and Zhonghuang 37, respectively.

图1 Satt114的电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis detection of Satt114

2.2 重组自交系群体大豆疫霉根腐病抗性评价及其SSR标记鉴定

以与PRR相关的SSR标记Satt325、Satt343、Satt428、Satt005、Satt600、Satt611、Satt689、Satt579、Satt252、Satt274对30份大豆种质进行了分子辅助鉴定,并且在温室采用菌土法盆栽接菌鉴定这些种质的抗病性。结果表明,30份大豆种质中,抗病类型中仅有2份(黑壳乌豆和合05-31)、感病类型有16份(中品03-5355和合05-31)、高感病类型有12份,可见本研究的试材普遍缺乏抗PRR的QTL。

另外,这30份种质抗PRR的能力与其拥有抗病QTL数目呈现一定的相关性,即种质含有的抗病QTL越多,其抗病能力越强,如中品03-5355和合05-31含有5个抗病QTL,其病害损失率仅为18.33%和20.00%;而中豆25、中豆32、粗豆、合丰47、周豆02-281没有或仅有1个抗病QTL,其病害损失率高达100%、100%、90%、90%、94%。

2.3 兼抗SMV和PRR大豆种质的筛选

本研究筛选获得的合05-31聚合了Satt325、Satt343、Satt611、Satt689、Satt274共5个抗PRR的QTL,其病害损失率仅为18.33%,且其高抗SMV的N1株系,即该品系具有较高的抗病育种利用价值。

表 1 大豆种质的疫霉根腐病抗病鉴定结果

Table 1 Evaluation of cultivar with resistance to phytophthora root rot

编号 No.	Satt428	Satt600	Satt579	Satt325	Satt343	Satt005	Satt611	Satt689	Satt252	Satt274	位点数 Locis	损失率 Loss rate/%
中豆 25 Zhongdou 25											0	100.00
中豆 32 Zhongdou 32											0	100.00
粗豆 Cudou					√						1	90.00
合丰 47 Hefeng 47								√			1	90.00
周豆 02-281 Zhoudou 02-281					√						1	90.00
平均 Average												94.00
辽鲜 1 号 Liaoxian 1				√				√			2	90.00
鲁豆 4 号 Ludou 4					√		√				2	84.67
中黄 37 Zhonghuang 37								√	√		2	80.33
Nova		√						√			2	63.67
艾卡 166 Aika 166	√						√		√		2	86.67
合丰 47 Hefeng 47				√				√		√	3	83.33
东农 594 Dongnong 594				√	√					√	3	90.00
哈 04-1824 Ha 04-1824				√			√			√	3	63.33
黑河 22 Heihe 22				√	√	√					3	63.67
垦鉴 21 Kenjian 21						√		√		√	3	63.67
九农 20 Jiunong 20						√	√		√		3	86.67
平均 Average												77.82
黑壳乌豆 Heikewudou					√		√	√		√	4	43.33
齐黄 25 Qihuang 25				√	√		√		√		4	48.33
中品 03-5179 Zhongpin 03-5179				√	√		√	√			4	50.00
DY2004-5				√		√	√			√	4	46.67
中作 J4032 Zhongzuo J4032			√		√	√		√			4	47.08
跃进 5 号 Yuejin 5				√	√		√	√	√		4	38.33
黑农 35 Heinong 35				√	√	√			√	√	4	41.67
长沙泥豆 Changshanidou				√	√		√	√		√	4	31.67
中作 05-15 Zhongzuo 05-15			√		√		√			√	4	28.33
齐黄 32 Qihuang 32		√		√		√			√		4	33.33
鲁豆 11 Ludou 11				√		√		√		√	4	33.33
矮脚早 Aijiaozao				√	√			√		√	4	33.33
中品 03-5355 Zhongpin 03-5355				√		√		√	√	√	5	18.33
合 05-31 He 05-31				√	√		√	√		√	5	20.00
平均 Average												36.70

对照亲本损失率:合丰 25(A) = 10%, Conrad(D) = 0。

Loss rate of control:Hefeng 25(A) = 10%, Conrad(D) = 0.

3 结论与讨论

本研究分别利用 1 和 10 个 SSR 分子标记辅助鉴定了 30 份大豆种质对 SMV 和 PRR 抗病性,结果表明在 30 份大豆种质中有 9 份抗 SMV 的种质和 2 份抗 PRR 的种质,仅有 1 份种质合 05-31 为兼抗 SMV 和 PRR 类型,即在本研究筛选的种质中兼抗 SMV 和 PRR 的种质极少,这与前人研究结果类

似^[6-7]。为进一步控制 SMV 和 PRR 对大豆生产造成的危害,一方面需要广泛收集和鉴定可能携带不同抗病基因的大豆新种质,另一方面可应用分子标记辅助育种技术聚合不同来源的抗病基因,实现基因的累加,从而育成持久抗性的品种,拓宽大豆抗病种质的遗传基础和创制新种质。

本研究共在 30 份种质上检测到与合丰 25 和 Conrad 相同的抗病特征条带,共在 3,5,6,12 和 2 份大豆种质上,检测到 1,2,3,4 和 5 个抗病特征条带,

其中 28 份大豆种质中均含有与抗性对照合丰 25 相同的抗病特征条带, 而仅 Nova、艾卡 166、中作 J4032、中作 05-15、齐黄 32 这 5 个品种(系)含有与 Conrad 相同的抗病特征条带, 可见中外大豆种质所含有的抗病 QTL 不同, 因此, 可综合运用分子标记辅助将外国种质中的抗病 QTL 导入到中国大豆种质中, 这与分子辅助创制大豆胞囊线虫病的抗性种质的过程类似^[8-9]。

参考文献

- [1] 李文福, 刘春燕, 于妍, 等. 大豆种质资源对东北 SMV1 号和 3 号株系的抗性鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(1): 94-96. (Li W F, Liu C Y, Yu Y, et al. Identification of the resistance of soybean germplasm to SMV1 and SMV3 strain in Northeastern China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2009, 31(1): 94-96.)
- [2] 滕卫丽, 李文滨, 韩英鹏, 等. 大豆种质对 SMV 抗性鉴定的 SSR 辅助选择[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(2): 224-232. (Teng W L, Li W B, Han Y P, et al. Identification of the SMV resistance assessment and assisted selection SSR markers in soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(2): 224-232.)
- [3] 徐鹏飞, 姜良宇, 李文滨, 等. 黑龙江省大豆品种对大豆疫霉根腐病抗性评价及抗性基因推导[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(5): 521-526. (Xu P F, Jiang L Y, Li W B, et al. Screening on soybean cultivars resistance to *Phytophthora sojae* and genes postulation in Heilongjiang province [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(5): 521-526.)
- [4] 李文滨, 韩英鹏. 大豆分子标记及辅助选择育种技术的发展[J]. 大豆科学, 2009, 28(5): 917-925. (Li W B, Han Y P. Development of soybean molecular markers and molecular marker assistant breeding [J]. Soybean Science, 2009, 28(5): 917-925.)
- [5] Burnham K D, Dorrance A E, Francis D M. Rps8, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae* [J]. Crop Science, 2003, 43: 101-110.
- [6] Li X, 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.
- [7] 滕卫丽, 李文滨, 邱丽娟, 等. 大豆 SMV3 号株系抗病基因的 SSR 标记[J]. 大豆科学, 2005, 24(3): 245-249. (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, 24(3): 245-249.)
- [8] Chang W, Dong L, Wang Z, et al. QTL underlying resistance to two HG types of *Heterodera glycines* found in soybean cultivar 'L-10' [J]. BMC Genomics, 2011, 13: 12.
- [9] Narvel J M, Walker D R, Rector B G, et al. A retrospective DNA marker assessment of the development of insect resistant soybean [J]. Crop Science, 2001, 41: 1931-1939.
- (上接第 26 页)
- [10] 李泽福, 周彤, 郑天清, 等. 水稻抽穗期 QTL 与环境互作分析[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 771-776. (Li Z F, Zhou T, Zheng T Q, et al. Analysis of QTL × environment interactions for heading date of rice [J]. Acta Agronomica Sinica, 2002, 28(6): 771-776.)
- [11] 高用明, 朱军, 宋佑胜, 等. 水稻永久 F₂ 群体抽穗期 QTL 的上位性及其与环境互作效应的分析[J]. 作物学报, 2004, 30(9): 849-854. (Gao Y M, Zhu J, Song Y S, et al. Use of permanent F₂ population to analyze epistasis and their interaction effects with environments for QTLs controlling heading date in rice [J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(9): 849-854.)
- [12] 张焦平, 江良荣, 黄建勋, 等. 水稻抽穗期上位效应和 QE 互作效应的分析[J]. 分子植物育种, 2006, 4(3): 351-357. (Zhang J P, Jiang L R, Huang J X, et al. Analysis of epistasis and QE interaction effects of QTL controlling heading date in rice [J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(3): 351-357.)
- [13] 单大鹏, 齐照明, 陈庆山, 等. 大豆油分含量相关的 QTL 间的上位效应和 QE 互作效应[J]. 作物学报, 2008, 34(6): 952-957. (Shan D P, Qi Z M, Chen Q S, et al. Epistatic effects of QTLs and QE interaction effects on oil content in soybean [J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(6): 952-957.)
- [14] 单大鹏, 朱荣胜, 陈庆山, 等. 大豆蛋白质含量相关的 QTL 间的上位效应和 QE 互作效应[J]. 作物学报, 2009, 35(1): 41-47. (Shan D P, Zhu R S, Chen Q S, et al. Epistatic effects and QE interaction effects of QTLs for protein content in soybean [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(1): 41-47.)
- [15] 苗兴芬, 朱命喜, 徐文平, 等. 大豆脂肪酸含量的 QTL 分析[J]. 作物学报, 2010, 36(9): 1498-1505. (Miao X F, Zhu M X, Xu W P, et al. QTL analysis of fatty acids contents in soybean [J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(9): 1498-1505.)
- [16] 王道龙, 朱军, 黎志康. QTLMapper1. 6. <http://ibi.zju.edu.cn/software/qtlmapper/index.htm>. (Wang D L, Zhu J, Li Z K. QTLMapper1. 6. <http://ibi.zju.edu.cn/software/qtlmapper/index.htm>.)
- [17] 苗兴芬, 徐文平, 陈庆山. 大豆脂肪酸组分的快速气相色谱分析[J]. 大豆科学, 2010, 29(2): 358-360. (Miao X F, Xu W P, Chen Q S. Rapid determination on fatty acids content by gas chromatography in soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(2): 358-360.)
- [18] 陈庆山, 张忠臣, 刘春燕, 等. 应用 Charleston × 东农 594 重组自交系群体构建 SSR 大豆遗传图谱[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1312-1316. (Chen Q S, Zhang Z C, Liu C Y, et al. Construction and analysis of soybean genetic map using recombinant inbred line of Charleston × Dongnong 594 [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(7): 1312-1316.)
- [19] Cregan P B, Jarvik T, Bush A L, et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome [J]. Crop Science, 1999, 39: 1464-1490.
- [20] Fan C C, Yu X Q, Xing X Y, et al. The main effects, epistatic effects and environmental interactions of QTLs on the cooking and eating quality of rice in a double-haploid line population [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110: 1445-1452.