

大豆胞囊线虫病 3 号生理小种抗性 QTL 定位的研究

杨 柳, 师 臣, 田中艳, 周长军, 李建英, 吴耀坤, 杜志强

(黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316)

摘 要:利用感大豆胞囊线虫病品种合丰 25 与抗病品种抗线 2 号杂交获 210 个 F₂ 代群体, 利用 150 对 SSR 引物, 并采用 Windows QTL Cartographer V2.1 复合区间法对抗大豆胞囊线虫病的基因进行定位。结果表明: 其中有多态性 SSR 标记为 67 个, 占 44.67%; 以 LOD 值大于 2.0 作为 QTL 存在的阈值, 检测到 2 个抗大豆胞囊线虫 3 号生理小种基因相关的 QTL: Qscn-1 (Satt163 ~ Satt309), Qscn-2 (Sat440 ~ Satt148), 分别定位在 MLG G 和 MLG I 上, 且遗传贡献率分别为 10.1% 和 7.6%, 与 SSR 标记 Satt309 和 Satt148 的遗传距离分别为 7.2 cM 和 5.6 cM。

关键词:大豆; 抗胞囊线虫病; QTL

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)02-0215-03

Mapping QTL Associated with Resistance to Soybean Cyst Nematode Race 3 in Cultivar Kangxian 2

YANG Liu, SHI Chen, TIAN Zhong-yan, ZHOU Chang-jun, LI Jian-ying, WU Yao-kun, DU Zhi-qiang

(Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, Heilongjiang, China)

Abstract: Soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe; SCN) is the primary disease responsible for yield loss of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. The objectives of this research were to identify quantitative trait loci (QTLs) associated with SCN resistance using the SSR marker technology. In the study, 210 F₂ progeny segregating from a cross between Hefeng 25, a soybean cultivar susceptible to cyst nematode race 3, and Kangxian 2, a soybean cultivar resistance to cyst nematode race 3, were used to screen over 150 SSR markers. A total of 67 SSR markers were distributed in twenty linkage groups. Two QTLs Qscn-1 (Satt163 ~ Satt309) and Qscn-2 (Sat440-Satt148) relevant to SCN resistance, were detected on MLG G and MLG I when LOD was set as 2.0, and they accounted for 10.1% and 7.6% of the total phenotypic variation, respectively.

Key words: Soybean; Resistance to cyst nematode; QTLs

大豆胞囊线虫病是影响大豆产量的重要病害, 3 号生理小种是我国大豆主产区黑龙江省的主要生理小种^[1], 其为害面积广, 对产量造成的损失极大。目前防治大豆胞囊线虫病最有效的方法是选育抗性品种, 但利用传统方法选育抗性品种, 进展较缓慢, 而分子标记辅助选择能够有效提高育种效率^[2]。近年来, 已有关于大豆胞囊线虫抗性基因定位报道。由于选用的亲本遗传背景、针对的生理小种各异, 研究结果不尽一致^[3-4], 但定位在连锁群 G 上的 *rhg1* 与连锁群 A2 上的 *rhg4* 位点被认为与各个生理小种的抗性有关。寻找可靠的分子标记来选择抗大豆胞囊线虫的品种是有效的育种方法^[5], 但直接利用分子标记选育抗线大豆种质在国内少有报道。该文采用感大豆胞囊线虫病品种合丰 25 与抗病品种抗线 2 号杂交获 210 个 F₂ 代群体, 利用 SSR 分子标记技术对抗大豆胞囊线虫病的基因进行

定位, 为应用分子标记辅助选育抗大豆胞囊线虫病品种(系)提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

选用高抗大豆胞囊线虫病 3 号小种的抗线 2 号与主栽高产的感病亲本合丰 25 进行杂交, 所衍生的 210 个 F₂ 代群体做为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 抗大豆胞囊线虫病鉴定及叶片总 DNA 提取

2007 年将父母本(抗线 2 号和合丰 25)和 F₂ 群体种植于黑龙江省农业科学院大庆分院安达试验基地内, 6 月末取叶片提取 DNA, 同年秋季收获种子并进行室内考种。次年种植 F₂ 代种子, 获得 F₃ 代株系, 每个株系取 10 株进行抗病鉴定。

收稿日期: 2009-06-16

基金项目: 黑龙江省农业科学院重点研究资助项目。

第一作者简介: 杨柳(1981-), 女, 硕士, 研究方向为大豆遗传育种。E-mail: yangliu226180@sina.com。

叶片总 DNA 提取采用改进的 CTAB 法^[6]。

1.2.2 SSR 分析 SSR 引物来源: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 反应体系:反应总体积为 20 μL ,反应液包括 2 μL 模板 DNA (25 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 2 μL 10 \times PCR 缓冲液, 1.5 μL MgCl_2 (25mM), 2.0 μL SSR 引物 (10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 0.2 μL dNTP (10 mM), 0.2 μL Taq 酶 (5units $\cdot \mu\text{L}^{-1}$), ddH_2O 补至 20 μL , 液体石蜡覆盖。

PCR 扩增条件:SSR 反应在 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后进入循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 47 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s; 循环 36 次后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\cdot \text{L}$ 尿素、0.04% 过硫酸铵、0.1% TEMED,

电泳缓冲液 1 \times TBE, 在 100W 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。

1.3 数据分析

利用 Mapmaker/EXP3.0b^[7] 进行连锁分析, 用 Mapchart2.1 构建分子标记连锁图谱。用 Kosambi 函数将重组率转换成遗传距离 (centimorgan, cM)。QTL 分析采用 WinQTLCart2.1 完成。

2 结果与分析

2.1 大豆胞囊线虫胞囊密度的测定

取安达试验田的多点土壤进行胞囊密度测定。结果表明, 胞囊密度变幅为 35.8 ~ 40.4, 试验区内平均胞囊密度为 39, 胞囊密度较均匀, 不会对分析结果造成明显影响。

2.2 大豆胞囊线虫生理小种鉴定

根据 Golden 等采用的鉴别寄主 Pickett、Peking、PI90763、PI88788、Lee68 进行鉴定, 结果显示, 安达地区主要为 3 号生理小种 (表 1)。

表 1 安达地区大豆胞囊线虫生理小种鉴定结果

Table 1 Determination of physiological races of soybean cyst nematode in some areas of Anda

土样来源 Sample place	Pickett		Peking		PI88788		PI90763		Lee68		生理小种 Race
	雌虫指数 FI	反应 Response	雌虫指数 FI	反应 Response	雌虫指数 FI	反应 Response	雌虫指数 FI	反应 Response	雌虫指数 FI	反应 Response	
安达 Anda	1.3	-	1.7	-	1.7	-	1.0	-	39.3	+	3

2.3 引物筛选和标记分析

2.3.1 SSR 引物的筛选 根据对大豆公共遗传连锁图谱的分析^[8], 选择基本覆盖大豆全基因组且前人报道与抗大豆胞囊线虫病相关的 150 对 SSR 引物, 用于在父母本间进行多态性筛选。结果所有引物均扩增出稳定的产物, 有 67 对引物具有多态性, 多态性引物频率为 44.67% (图 1)。

2.3.2 SSR PCR 产物分析 将 67 对多态性引物在 F_2 分离群体中进行扩增, 所得产物经电泳后进行银染检测 (图 2), 其中有 57 个 SSR 标记在群体中呈 1:2:1 的分离比例, 占 85.07%, 符合共显性标记的

遗传特征。

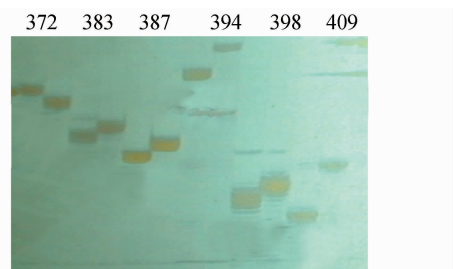


图 1 部分 SSR 引物多态性筛选

Fig. 1 Screening SSR primers with polymorphism between parents

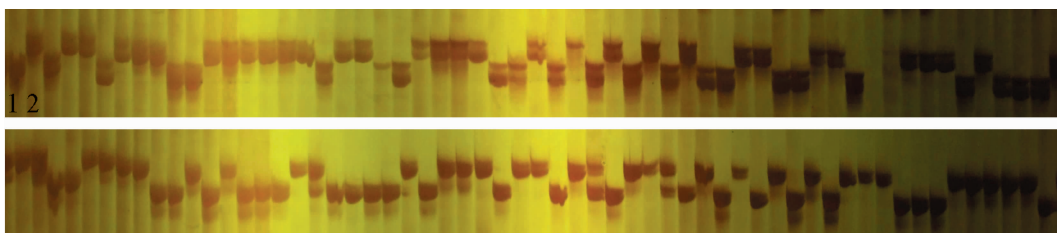


图 2 Satt717 在 F_2 群体部分株系中扩增产物的电泳

Fig. 2 Satt717 amplification in some plants of F_2 population

2.4 抗大豆胞囊线虫病的 QTL 分析

利用复合区间法检测与抗大豆胞囊线虫病基因

有关的 QTL, 当 LOD 值大于 2.0 时, 经过 WinQTL-Cart2.1 计算共鉴定出 2 个抗大豆胞囊线虫 3 号生理

小种相关的 QTL, Qscn-1 位于 G 连锁群上, 与 SSR 标记 Satt309 的遗传距离是 7.2 cM, 遗传贡献率为 10.1%; Qscn-2 位于 I 连锁群上, 与 SSR 标记 Satt148 的遗传距离为 5.6cM, 遗传贡献率为 7.6% (表 3)。

表 3 与抗大豆胞囊线虫病相关的 QTLs

Table 3 QTLs associated with partial resistance to soybean cyst nematode

QTL	连锁群 MLG	区间 Intervals	长度 Length/cM	QTL 位置 QTL POS	LOD 值 LOD Score	贡献率 R ² /%
Qscn-1	G	Satt163-Satt309	22.8	15.6	2.46	10.1
Qscn-2	I	Satt440-Satt148	18.3	12.7	2.58	7.6

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

3 讨 论

大豆胞囊线虫胞囊密度的大小, 可以作为大豆胞囊线虫发病的指标。胞囊密度较大地区, 较容易发生严重的病害, 而胞囊密度较小地区, 发生严重病害的几率较小。在黑龙江省农科院大庆分院安达试验基地内采集的土样中, 试验区胞囊密度较均匀, 不会对结果造成过大的影响。经过对生理小种的鉴定, 表明安达地区的优势生理小种仍为 3 号生理小种, 同时在其它年份还曾经发现个别地块也存在 4、14 号生理小种^[9]。

目前报道的用 DNA 分子标记技术研究大豆对胞囊线虫的抗性基因, 比较公认的是 *rhg1* 与 *rhg4* 位点, 已经被定位在连锁群 G 和 A2 上, 并且分离到了紧密连锁的分子标记, 其中与 *rhg1* 紧密连锁的分子标记 Satt309 已开始用于标记辅助选择^[4]。该试验共鉴定出 2 个抗大豆胞囊线虫 3 号生理小种相关的 QTL, 其中 Qscn-1 位于 G 连锁群上, 标记区间为 Satt163 ~ Satt309, 与 SSR 标记 Satt309 的遗传距离是 7.2cM, 遗传贡献率为 10.1%; 而 Qscn-2 被定位在连锁群 I 上, 解释 7.6% 的遗传变异, 进一步拓展了大豆胞囊线虫基因的遗传位点。

该研究只进行了 F₂ 群体的抗 3 号生理小种的 QTL 研究, 待群体稳定后, 进行多年多点试验, 研究环境互作对大豆胞囊线虫病的影响, 以期获得高抗品种(系); 并将利用分子标记追踪抗线 2 号的抗性位点, 将该抗性位点转移到其它品种中去。

参考文献

[1] 刘汉起, 商绍刚, 甄鸿杰, 等. 黑龙江省大豆胞囊线虫 (*Hetero-*

dera glycines) 生理小种分布研究[J]. 大豆科学, 1995, 14(4): 330-333. (Liu H Q, Shang S G, Zheng H J, et al. The distribution of Soybean Cyst Nematode race 3 in Heilongjiang Prinvince[J]. soybean science, ,1995, 14(4):330-333.)

[2] 王惠, 邱丽娟, 陈立杰, 等. SSR 标记技术及其在大豆抗胞囊线虫研究中的应用[J]. 杂粮作物, 2004, 24(4):230-232. (Wang H, Qiu L J, Chen L J, et al. Research on soybean resistance to *Heterodera glycines* applying with the method of SSR Markers[J]. Rain Fed Crop, 2004, 24(4):230-232.)

[3] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟. 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, Chang R Z, Qiu L J. Mapping QTL of main agronomic traits in soybean and analysis of genetic diversity between Chinese and Japanese soybean[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2004.)

[4] 王彩洁, 徐冉, 张礼凤, 等. 大豆胞囊线虫抗性基因的分子标记研究进展[J]. 大豆科学, 2005, 24(3):216-219. (Wang C J, Xu R, Zhang L F, et al. The studies of molecular marker of resisitant genes on soybean cyst nematode [J]. Soybean Science, 2005, 24(3):216-219.)

[5] 陈品三, 齐军山, 王寿华, 等. 我国大豆胞囊线虫生理分化动态的鉴定和监测研究[J]. 植物病理学报, 2001, 3(14):336-341. (Chen P S, Qi J S, Wang S H, et al. Studies on identification and monitoring of physiologic variation of *Heterodera glycines* in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 3(14):336-341.)

[6] Keim P, T C Olson, R C Shoemaker. A rapid protocol for isolating soybean DNA [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1988, 15: 150-152.

[7] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. Mapmaker: An interactive computer package for constructing genetic linkage maps of experimental and natural population [J]. Genomics, 1987, (1): 174-181.

[8] 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.

[9] 田中艳, 高国金, 周长军, 等. 大豆胞囊线虫生理小种变异的研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(2):290-292. (Tian Z Y, Gao G J, Zhou C J, et al. Study on the variation of soybean cyst nematode [J]. Soybean Science, 2007, 26(2):290-292.)