

# 大豆抗胞囊线虫的分子标记研究

安咏梅,王家军,李进荣,于佰双

(黑龙江省农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为了在分子水平验证大豆材料的抗病性,以对大豆胞囊线虫3号生理小种表现为抗性和感性的大豆为试材,利用已经报道的与SCN抗病基因连锁的SSR标记引物,对供试的大豆材料进行指纹图谱鉴定。结果表明:引物Satt130无扩增结果,Satt301没有多态性,Satt309和Satt082表现出多态性。聚类分析结果表明,所有供试材料被分成3大类,其中在合丰25×抗线4号正反交组合中,抗病亲本抗线4号与(抗线4号×合丰25)F<sub>2</sub>、(合丰25×抗线4号)F<sub>3</sub>抗病后代抗-221、抗-131聚为一类;感病亲本合丰25与感病材料(合丰25×抗线4号)F<sub>2</sub>感-121被聚为一类,在这个区域将感病材料分开。而其它后代材料则聚为一类,并没有将抗感材料区分开。

**关键词:**大豆;大豆胞囊线虫;分子标记

**中图分类号:**S435.651

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)07-0015-03

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)是世界大豆生产上的重要病害之一,抗病品种选育是大豆胞囊线虫(SCN)多种防治措施中经济、有效和环境友好的方法。目前,SCN抗病育种中常用的温室鉴定或田间鉴定费时、费力,受环境因素影响较大。分子标记技术给难以用传统方法深入进行的大豆遗传研究带来极大的方便,近年来,研究者不断探索分子标记与大豆品种对大豆胞囊线虫抗性的关系,对大豆胞囊线虫抗性基因进行分子标记、定位及应用。分子标记辅助选择是提高抗病育种效率的有效方法。随着经典遗传学和分子遗传学对大豆胞囊线虫研究的深入,陆续发现了SCN的抗性位点,并把主抗性基因已经定位到经典连锁群和分子连锁群上,这为寻找与之连锁的分子标记提供了方便<sup>[1]</sup>。近年来,随着分子生物学技术的不断发展,一些新的技术已经应用到大豆抗胞囊线虫研究中。SSR(Simple Sequence Repeats)简单重复序列,也称微卫星DNA(Microsatellite DNA),是一类有几个(2~5)核苷酸为重复单位组成的串联重复序列,一般长达几十个到几百个核苷酸<sup>[2]</sup>。在遗传上SSR呈孟德尔式遗传,为共显性标记。其多态性、稳定性、重复性和可信度远高于RAPD。SSR广泛应

用于大豆遗传研究中,目前,大豆上已定名的SSR分子标记就有900多个,其中约有450个已定位于大豆连锁群上。因此SSR可以成为大豆抗病育种研究中一种较好的分子标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以对大豆胞囊线虫3号生理小种表现为抗性和感性的大豆品种,即抗线4号(高抗)、哈98-4598(抗病品系)、合丰25(高感)以及3个亲本的杂交后代为供试材料(见表1)。于田间采集供试材料的新鲜叶片,放在冰壶内保存。

表1 提取DNA的编号及材料详情

Table 1 The serial number of extracted DNA and materials

DNA 编号 DNA code	材料名称 Names	备注 Note
1	合丰25	感病亲本
2	抗线4号	抗病亲本
3	(合丰25×抗线4号)F <sub>2</sub>	感-121
4	哈98-4598	抗病品系
5	(合丰25×抗线4号)F <sub>2</sub>	感-120
6	(合丰25×哈98-4598)F <sub>2</sub>	抗-321
7	(抗线4号×合丰25)F <sub>2</sub>	抗-221
8	(合丰25×抗线4号)F <sub>3</sub>	抗-131
9	(合丰25×哈98-4598)F <sub>2</sub>	抗-322
10	(合丰25×抗线4号)F <sub>2</sub>	感-122
11	(哈98-4598×合丰25)F <sub>2</sub>	抗-421
12	(合丰25×抗线4号)F <sub>3</sub>	感-131

**收稿日期:**2014-05-26

**第一作者简介:**安咏梅(1965-),女,黑龙江省哈尔滨市人,学士,高级农艺师,从事植物保护研究。E-mail: anyongmei1965@sina.com。

**通讯作者:**于佰双(1963-),男,黑龙江省巴彦县人,博士,研究员,从事大豆病理研究。E-mail: bsyu100@163.com。

利用已经报道的与 SCN 有关的 SSR 引物: Satt301、Satt130、Satt309 和 Satt082 作为引物对供试材料进行扩增(见表 2)。

表 2 SSR 引物名称及序列

Table 2 Name and sequence of SSR primers

SSR 引物 SSR Primers	引物序列 Sequence of primer
Satt130	5'-TAAACGAAATTTAGTTTAAAGACT-3' 3'-TGAATGGCTAAAAACGTGATT-5'
Satt301	5'-GCGAAACACTCCTAGTTGATTACAAA-3' 3'-GCGATATAATGCACAAAGAAATTAAGA-5'
Satt309	5'-GCGCCTTCAAATGGCGTCTT-3' 3'-GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT-5'
Satt082	5'-AATTCATTTAGGGAGTTGAT-3' 3'-CTAGCCAATGTCATATGACT-5'

1.2 方法

试验于 2013 年在黑龙江省农业科学院大豆研究所进行。

1.2.1 基因组 DNA 的提取 利用改良的 SDS 法提取供试材料的基因组 DNA, PCR 扩增用 Taq DNA 聚合酶、10 × PCR buffer、MgCl<sub>2</sub>、dNTP, 这些试剂均购自上海生工生物工程有限公司。SSR 引物由北京奥科生物技术有限公司合成。SSR 扩增反应体系为 20 μL (见表 3)。PCR 反应在 PCR 扩增仪 PTC-225 (Peltier Thermal Cycles) 上进行。

表 3 SSR 扩增体系

Table 3 Amplified action system of SSR

试剂名称及浓度 Reagents and concentration	每个反应加入体积/μL Volume per reaction
10×PCR buffer	2.0
Mg <sup>2+</sup> (25 mmol·L <sup>-1</sup> )	1.5
dNTP(2 mmol·L <sup>-1</sup> )	1.5
Primer(2 μmol·L <sup>-1</sup> )	1.5
Taq(2.5 U·μL <sup>-1</sup> )	0.2
DNA 模板(20 ng·μL <sup>-1</sup> )	2.0
ddH <sub>2</sub> O	11.3

1.2.2 数据统计 SSR 扩增结果按 0/1 系统, 即有带记为 1, 无带记为 0, 进行统计。利用 NT-sys 聚类软件计算遗传距离, 以非加权类平均法(UPGMA)进行聚类分析, 建立树状聚类图。遗传相似性系数(Similarity)的计算公式为  $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ,  $N_x$  代表在材料 x 中某一引物扩增的条带数,  $N_y$  代表在材料 y 中同一引物扩增出

的条带数,  $N_{xy}$  代表在 x 和 y 中扩增出片段长度相同的条带数。遗传距离 GD(genetic distance): 遗传距离 =  $1 - S_{xy}$ 。当  $D=0, S_{xy}=1$  时, 物种 x 和物种 y 的扩增片段完全相同, 二者有高度同一的 DNA 序列; 当  $D=1, S_{xy}=0$  时, 二者扩增片段完全不同, 具有高度相异的遗传性  $S_{xy}$  和 GD 可定量地反映各种群的遗传分化程度。

2 结果与分析

2.1 利用与大豆胞囊线虫有关的 SSR 引物对供试材料进行抗病性验证

SSR 引物对供试材料的扩增结果表明, Satt130 无扩增结果, Satt301 没有多态性, Satt309 和 Satt082 表现出多态性(见图 1、图 2)。其中 Satt082 存在 3 个等位变异, 供试材料 2、3、5、7、8、10 在第一个等位变异上有扩增条带, 4、5、6、9、11、12 在第二个等位变异上有扩增条带, 1、3、12 在第三个等位变异上有扩增条带。在两个等位变异上均有扩增条带的供试材料有 3、5、12。其中 3 号等位变异全部为感病材料, 推测该等位变异与感病基因相关, 3、5、12 为杂合基因型, 后代抗病性会产生分离, 2 号等位变异纯合基因型的 4 份材料全部为抗病表型, 推测该等位变异与抗病基因相关。

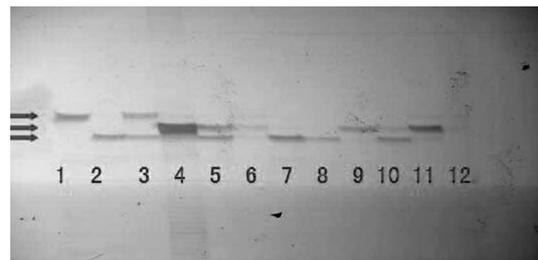


图 1 Satt082 扩增结果

Fig. 1 Amplified results of Satt082

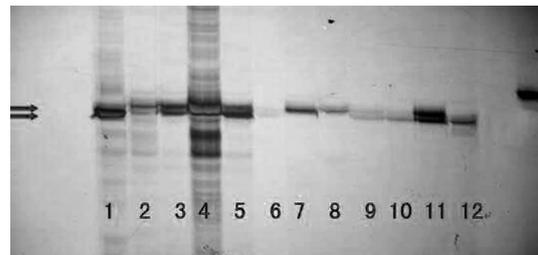


图 2 Satt309 扩增结果

Fig. 2 Amplified results of Satt309

Satt309 有两个等位变异, 1、3、5、9、10、11 和 12 在第一个等位变异上有扩增条带, 2、3、4、7、8、11 在第二个等位变异上有扩增条带, 3 和 11 号材

料在两个等位变异上均有扩增条带。6号材料未出现扩增条带。其中1号等位变异纯合基因型除9号材料外全部为感病材料,推测该等位变异与感病基因相关,2号等位变异纯合基因型全部为抗病材料,推测该等位变异与抗病基因相关。

## 2.2 聚类分析

利用 NTsys 对供试材料进行聚类分析,结果见图 3。

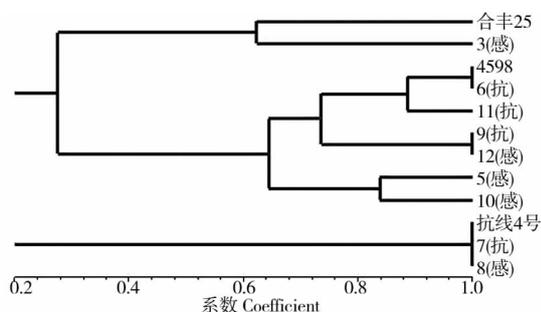


图 3 参试大豆抗性相关位点聚类树状图

Fig. 3 Dendrograms of soybean based on loci related to resistance

从聚类图可以看出,所有供试材料被分成 3 大类,其中抗病亲本抗线 4 号与材料 7 和材料 8 被聚为一类,并且 7、8 号材料田间鉴定表现均为抗病。感病亲本合丰 25 与感病材料 3 被聚为一类,抗病品系哈 98-4598 与其余的抗感杂交后代材料 6、11、9、12、5、10 被聚为一类。

## 3 结论与讨论

以揭示 DNA 等位区域遗传多态性为基础的分子标记技术已逐渐成为作物遗传育种中对目的基因进行早期辅助选择的重要手段,它对提高育种选择效率具有重要的作用。SSR 分子标记技术为大豆胞囊线虫抗病育种提供了有利条

件。寻找与抗 SCN 基因紧密连锁的分子标记,是进行分子标记辅助选择的基础。该研究利用已报道的与 SCN 相关的 SSR 引物 Satt301、Satt130、Satt309 和 Satt082 对不同大豆材料进行验证,其中在合丰 25×抗线 4 号正反交组合中,抗病亲本抗线 4 号与(抗线 4 号×合丰 25)F<sub>2</sub>、(合丰 25×抗线 4 号)F<sub>3</sub> 抗病后代抗-221、抗-131 聚为一类,存在相似的变异位点。感病亲本合丰 25 与感病材料 3 被聚为一类,在这个区域将感病材料分开。而其它后代材料则聚为一类,并没有将抗感材料区分开,分析原因可能由于该研究采用的引物较少,未能充分揭示供试材料间的遗传变异,也有可能是这些杂交后代仍存在对大豆胞囊线虫 3 号生理小种的抗性分离,导致后代个体有来自亲本抗感基因的混杂。还有待于在今后的工作中加大引物数量,进行验证,用以寻找与抗性紧密连锁的遗传标记,进而利用标记进行育种辅助选择以及控制抗性基因的定位和分离。

随着一些具有更高信息量的分子标记技术的发展和运用,大豆基因组内缺乏大量遗传多态性的限制将被克服,分子标记技术在大豆种质遗传多样性、系统发育、品种鉴别、遗传图谱构建及目的基因定位等方面研究将发挥越来越重要的作用,从而为拓宽今后育成品种的遗传基础,进一步为加速大豆的遗传改良打下更坚实的基础。

### 参考文献:

- [1] Matson A L, Willams L F. Evidence of genes for resistance to the soybean cyst nematode [J]. *Crop Sci.*, 1965, 22: 581-590.
- [2] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17: 6463-6471.

## Molecular Marker Assisted Selection on Soybean Resistant to Soybean Cyst Nematode

AN Yong-mei, WANG Jia-jun, LI Jin-rong, YU Bai-shuang

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** In order to verify the soybean resistance to SCN at the molecular level, taking resistance soybean and susceptible soybean to SCN as materials, and SSR markers linked to the resistance genes to SCN were used to identify the fingerprint of the selected material of soybean. The results indicated that there was no amplification result on Satt130 and no polymorphism on Satt301, but polymorphism showed on Satt309 and Satt082. The clustering analysis showed that materials were separated into 3 classes, the Hefeng 25×Kangxian 4 reciprocal cross, Kangxian 4 and resistant offspring 7, 8 were in the same class, susceptible parent Hefeng 25 and susceptible material 3 were in another class, so the materials could be separated into resistance and susceptible. Other materials in the progeny were clustered in one class and did not separate the susceptible and resistant materials.

**Key words:** soybean; soybean cyst nematode; molecular marker