

大豆胞囊线虫病抗性基因 rhg1 和 Rhg4 的 基因型鉴定技术规程

（征求意见稿）

起草单位：东北农业大学

联系人：韩英鹏

电 话：13836171745

邮 箱：hyp234286@aliyun.com

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

黑龙江省市场监督管理局 发布

前 言

本文件依据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由黑龙江省农业农村厅提出。

本文件起草单位：东北农业大学。

本文件主要起草人：韩英鹏、战宇航、赵雪、姜海鹏、滕卫丽、李永光、李海燕。

大豆胞囊线虫病抗性基因 rhg1 和 Rhg4 的基因型鉴定技术规程

1 范围

本标准规定了大豆抗胞囊线虫病基因 rhg1 和 Rhg4 的优异等位基因型的分子检测标准技术规程。本标准适用于鉴定大豆是否携带抗病基因 rhg1 和 Rhg4 的优异等位基因型。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

NY/T 1788 大豆品种纯度鉴定技术规程 SSR分子标记法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

竞争性等位基因特异性 PCR

竞争性等位基因特异性 PCR（kompetitive allele-specific PCR, KASP）是一种基于荧光的同质基因分型技术。

3.2

rhg1 点位

rhg1 是大豆胞囊线虫病重要抗性位点之一，其 3 个关键基因已通过图位克隆获得。

3.3

Rhg4 位点

Rhg4 是大豆胞囊线虫病重要抗性位点之一，其关键基因 (GmSHMT) 已通过图位克隆获得。

4 鉴定的基本原则

KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR) 分子标记技术基于终端荧光信号的读取判断，每孔反应都是采用双色荧光检测一个 SNP 位点的两种基因型，不同的 SNP 对应着不同的荧光信号。KASP 反应包括 Primer Mix 和 Master Mix 两种主要成分。Primer Mix 由两条末端碱基不同的等位基因正向引物与一条反向引物构成，两条正向引物 5' 端分别连有不同序列的检测引物序列。Master Mix 包含两条带有不同荧光的检测引物。变性模板与 Primer Mix 中相匹配的引物结合并退火，延伸后序列被加上了检测引物的序列。等位基因特异性的末端序列的互补链合成。带有不同荧光的两条检测引物与互补链结合，特异序列对应的检测引物随 PCR 反应指数性扩增，相应荧光信号被检测。利用 rhg1 和 Rhg4 关键基因内的抗病关键突变对应序列设计 KASP 标记引物，通过基因分型结果判断被测大豆是否携带两个抗病基因优异等位型的大豆品种，从而判断被测品种对大豆胞囊线虫病的抗性。

5 rhg1 和 Rhg4 的基因型鉴定的步骤

5.1 样品采集

大豆苗期幼嫩叶片或种子用于基因组DNA的提取。

5.2 大豆基因组 DNA 提取

若以幼苗为DNA提取样品，需称取50 mg叶片放入2 ml离心管中，加液氮用玻璃棒研末至粉末状；若以干种子为共检测样品，需脱去种皮研磨成粉，称取50 mg豆粉放入2 ml离心管中。以上样品DNA提取，按NY/T 1788执行。

5.3 rhg1 和 Rhg4 位点标记引物的确定

提取rhg1和Rhg4关键基因内的抗病关键突变对应序列，设计KASP引物，针对rhg1和Rhg4序列，设计突变等位引物和公共引物（表1）。

表1 rhg1 基因 KASP 分型引物

位点	Primer 1	Primer 2	Primer3
rhg1	CAGCATTGTGAAGCTTGAACCTACCA	CAGCATTGTGAAGCTTGAACCTACCC	TATATCAGCAAAATCCCTGCAACAA
Rhg4	GTGAGGTGGCCGCCGAGC	GGTGAGGTGGCCGCCGAGG	TCCTCAACCCCCACGACCGCAT

5.4 rhg1 和 Rhg4 位点标记分型体系

利用ABI7500荧光定量PCR仪进行PCR扩增，扩增的反应体系见表2，反应程序见表3。

表2 PCR 反应体系

PCR 反应组分	10ul 体系
HiGeno 2X Probe mix	5
Primer mix (5X)	1 (3种引物体积比 1: 1: 2)
DNA	1
ddH2O	3

表3 PCR 扩增程序

步骤	温度	时间	循环数
1	95°C	10 min	
2	95°C	20 s	10 cycles (步骤 2-3)
3	61°C-55°C (-0.6°C/cycles)	45 s	
4	95°C	20 s	40 cycles (步骤 4-5)

5.5 基因型的判定方法

利用ABI7500荧光定量PCR仪进行PCR产物的荧光信号采集，程序为35℃，1m。将检测得到的原始数据文件导入到分析软件中进行分析。本标准rhg1位点的抗病基因型为TT，感病基因型为GG(图1)，Rhg4位点的抗病基因型为GG，感病基因型为CC(图2)。

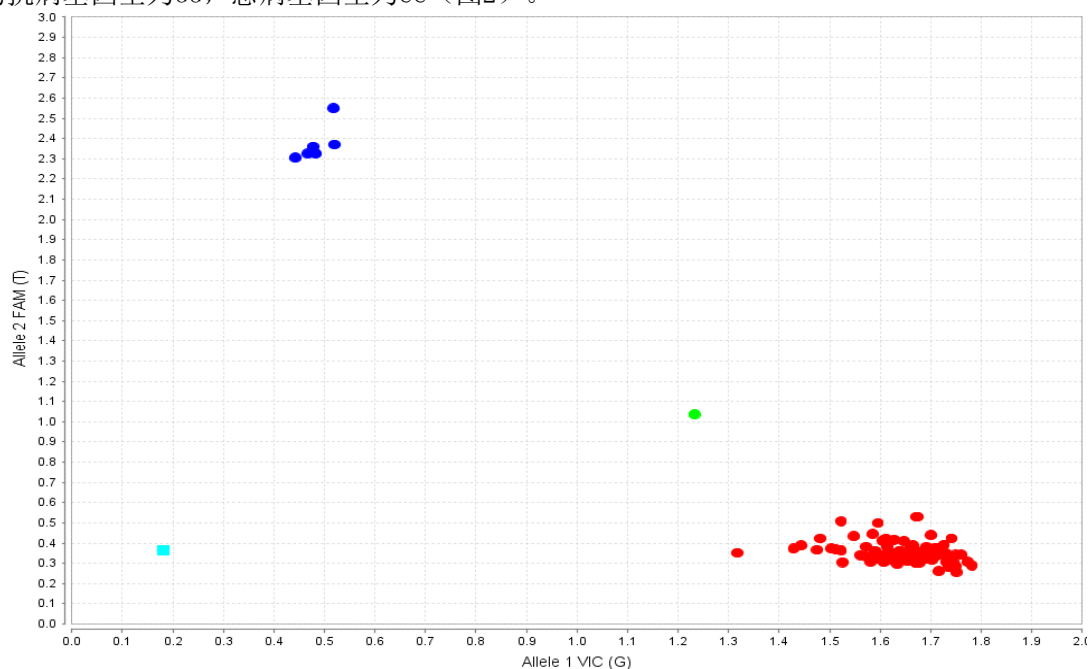


图 1 rhg1 基因的 KASP 分型结果示例

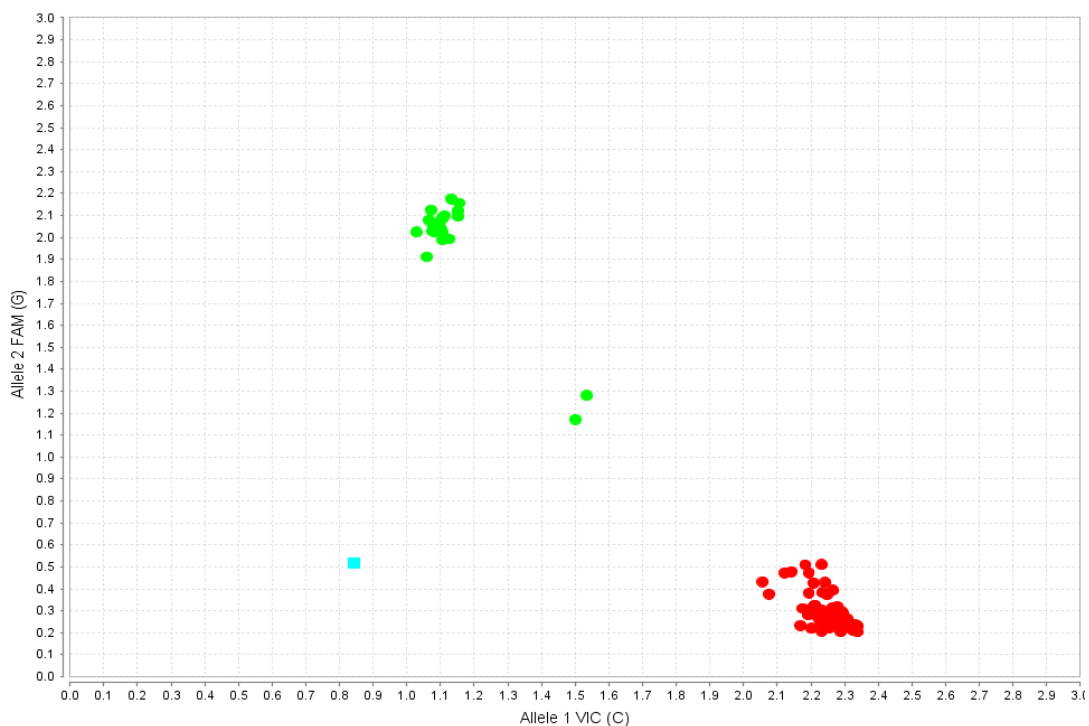


图 2 Rhg4 基因的 KASP 分型结果