

抗胞囊线虫 2 号生理小种大豆种质的评价和利用

魏 荷, 练 云, 李金英, 李海朝, 周 扬, 雷晨芳, 张 辉, 武永康, 王仕伟, 王金社, 卢为国
(河南省作物分子育种研究院 / 国家生物育种产业创新中心 / 国家大豆改良中心郑州分中心 / 农业农村部黄淮海油料作物重点实验室 /
河南省油料作物遗传改良重点实验室, 郑州 450002)

摘要: 大豆胞囊线虫 (SCN, soybean cyst nematode) 2 号生理小种是黄淮海地区的优势小种。自 2017 年起对 333 份大豆种质进行 2 号生理小种的抗性鉴定, 筛选出抗性资源 19 份, 其中表现抗病 5 份、中抗 14 份。通过 KASP 标记对调控大豆抗胞囊线虫病主效位点 rhg1 和 Rhg4 检测, 19 份抗性种质均含有抗性位点; 仅圆黑豆的主效位点 rhg1 和 Rhg4 连锁的 KASP 标记的基因型和抗病对照品种 PI437654 一致, 其余均和抗病对照品种 PI90763 一致。以其中 1 份抗性材料灰皮支黑豆为父本, 创制出的 2 份抗性种质郑 12915 和郑 12929, 均含有抗性位点 rhg1 和 Rhg4, 农艺性状优于灰皮支黑豆。本研究结果为大豆抗胞囊线虫育种提供依据和材料。

关键词: 大豆种质; 胞囊线虫; 2 号生理小种; 抗性评价; KASP 标记

Evaluation and Utilization of Soybean Germplasm Resistant to Race 2 of Soybean Cyst Nematode

WEI He, LIAN Yun, LI Jin-ying, LI Hai-chao, ZHOU Yang, LEI Chen-fang,
ZHANG Hui, WU Yong-kang, WANG Shi-wei, WANG Jin-she, LU Wei-guo

(Henan Academy of Crop Molecular Breeding / National Centre for Plant Breeding / Zhengzhou Subcenter of National Soybean Improvement Center/Key Laboratory of Oil Crops in Huanghuaihai Plains, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Henan Provincial Key Laboratory for Oil Crops Improvement, Zhengzhou 450002)

Abstract: Soybean cyst nematode (SCN) race 2 is predominant in the Huang-huai Rivers valley. Out of 333 soybean accessions that have been tested for the resistance to SCN race 2 (SCN 2) since 2017, 19 resistant accessions including 5 resistant and 14 moderately resistant have been identified. Genotyping using KASP markers showed that all the 19 resistant accessions harbored two resistant loci rhg1 and Rhg4. The genotypes of KASP markers linked to rhg1 and Rhg4 for 18 accessions were the same as PI90763, while Yuanheidou was consistent with PI437654. Moreover, resistant genotype Zheng 12915 and Zheng 12929, which were developed from resistant germplasm Huipizhiheidou showed agronomic performance better than the parental line. Collectively, these results provided a basis for SCN breeding in soybean.

Key words: soybean germplasm; cyst nematode; race 2; evaluation of resistance; KASP marker

大豆胞囊线虫 (SCN, soybean cyst nematode) 是一种世界性大豆病害^[1], 培育优良的抗性品种是防治大豆胞囊线虫最经济有效的解决途径。在我国

黄淮海地区大豆胞囊线虫优势小种已由 1 号生理小种^[2]演变为 2 号生理小种^[3-4], 因此筛选抗大豆胞囊线虫 2 号生理小种种质对黄淮地区大豆抗胞囊线

收稿日期: 2021-07-21 修回日期: 2021-09-12 网络出版日期: 2021-10-15

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210721003>

第一作者研究方向为大豆遗传育种, E-mail: weihezi123@126.com

通信作者: 王金社, 研究方向为大豆遗传育种, E-mail: wjs33314@126.com

卢为国, 研究方向为大豆遗传育种, E-mail: 123bean@163.com

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2016YFD0100201); 国家自然科学基金 (31901501, 31371652); 河南省农业科学院科研项目 (2021JC11)

Foundation projects: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0100201), National Natural Science Foundation of China (31901501, 31371652), Project from Henan Academy of Agricultural Sciences (2021JC11)

虫病育种具有重要的意义。

目前我国大豆抗胞囊线虫病品种选育主要通过常规育种的方式进行,如果在大豆抗胞囊线虫病育种过程中每个世代均对抗性进行鉴定,费时费工,且抗性鉴定结果易受环境影响;如果仅在高世代进行抗性鉴定,往往容易丢失抗性基因,选育不出抗性品系。分子标记辅助育种可以通过分子标记鉴定,抗性鉴定结果不受环境的影响,在早代淘汰感病家系,减少工作量,提高鉴定的准确性和选择效率。目前,在 20 条染色体上均检测到大豆胞囊线虫病抗性相关的 QTL^[5-8],其中 rhg1 和 Rhg4 为大豆种质抗胞囊线虫病的主效位点, Cook 等^[9]研究表明 rhg1 位点 31 kb 区段内拷贝数变异与大豆胞囊线虫的抗性有关。Liu 等^[10]的研究结果表明 Rhg4 位点关键基因 *GmSHMT* 调控大豆种质胞囊线虫病的抗性,两个位点相关基因的功能验证均是对试验材料接种 SCN 3(分别为 HG Type 7 和 HG Type 0)。根据大豆胞囊线虫病抗性相关 QTL 的研究,国内外研究者开发了一些与大豆胞囊线虫病抗性相关的 SSR 标记并进行了相关验证^[11-13],但由于 SSR 标记的等位变异较多,抗性资源筛选存在漏检现象^[14]。随着科技的发展,高通量 SNP 检测成本越来越低,科研工作者开发的与大豆胞囊线虫病抗性相关的 KASP 标记,能够进行高通量的检测。练云等^[15]对 487 份材料进行筛选,其中 22 份材料中含有抗性位点 rhg1 或 Rhg4;对含有抗性位点的材料接种鉴定,仅获得对 2 号生理小种表现

抗病的材料 1 份、表现中抗的材料 4 份,通过源自于 rhg1 和 Rhg4 位点开发的 KASP 标记检测分析,上述 5 份材料的 KASP 标记基因型均和 Peking 相同,说明抗性同时受到 rhg1 和 Rhg4 位点的调控,为 Peking 抗病类型。Patil 等^[16]对 106 份材料进行分析,发现 2 号生理小种的抗性不仅与 rhg1 和 Rhg4 位点相关,还与拷贝数及基因之间的互作有一定关系。因此,开展抗大豆胞囊线虫病 2 号生理小种分子标记辅助育种时,需要分子标记和抗性鉴定相结合。

本研究旨在以表型鉴定筛选抗大豆胞囊线虫病 2 号生理小种优异种质的同时,通过与 rhg1 和 Rhg4 位点连锁的 KASP 标记对抗性材料进行基因型检测,提供育种家抗性资源的表型和基因型信息,为黄淮海地区大豆抗胞囊线虫分子标记辅助育种提供材料和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验鉴定材料共计 333 份(表 1),其中来自国外的材料 57 份,东北大豆产区 86 份,黄淮大豆产区 76 份,南方大豆产区 114 份,均来自于中国农业科学院作物科学研究所。国际通用的大豆胞囊线虫病生理小种鉴别寄主 Pickett、Peking、PI88788、PI90763、PI437654 和 Lee,均来源于河南省作物分子育种研究院大豆研究团队,用于监测生理小种和抗性种质的抗病类型分析。

表 1 333 份大豆种质信息

Table 1 333 soybean accessions

编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name
WDD00017	L65-763	WDD00916	SRE-D-14A	WDD01607	Delsoy4900	WDD02225	L72-920
WDD00273	T171	WDD00989	Ohio	WDD01608	Flyer	WDD02262	Titan
WDD00286	T218	WDD01052	BC-14-1-3	WDD01619	Cordell	WDD02263	TN4-94
WDD00410	Chustnut	WDD01111	Soja 277180	WDD01622	Epps	WDD02282	丹丽
WDD00481	Altona	WDD01130	Soja 398180	WDD01707	T307	WDD02286	关东 102
WDD00511	Dunn	WDD01215	Saikai 20	WDD01709	T309	WDD02292	中特 1 号
WDD00602	Franklin	WDD01252	十胜长叶	WDD01960	Chiquita	WDD02302	Dekabig
WDD00623	PI80828-1	WDD01482	C1640	WDD01974	Flint	WDD02322	BRS 155
WDD00681	AGS162	WDD01506	L83-570	WDD02075	L84-2157	WDD02323	BRS 156
WDD00787	尼日利亚 4 号	WDD01579	Jack	WDD02076	L88-8153	WDD02350	KPS292 (AGS292)
WDD00803	日本 54 号 (爱知县)	WDD01583	Newton	WDD02107	MN1301	WDD02599	C Ⅱ 691
		WDD01594	GR8836	WDD02148	Chohckuzan		

表 1(续)

编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name
WDD02625	C Ⅱ 1271	ZDD01818	薄地翠黑豆	ZDD06195	豆青	ZDD09197	小黑豆
WDD02643	G.max-46	ZDD01841	黑荚黑豆	ZDD06217	青皮青仁	ZDD09735	黄黑豆
WDD02675	G.maxN136	ZDD01898	黑豆	ZDD06233	九月拔	ZDD09832	青豆
WDD02848	PSB543	ZDD01982	天鹅蛋	ZDD06270	黑大豆	ZDD09882	鲁豆二号
WDD02880	CHESTNUT	ZDD02125	大白豆	ZDD06271	乌大豆	ZDD09895	跃进五号
WDD02913	Ⅱ B 2846	ZDD02176	绿大豆	ZDD06347	田埂豆	ZDD10057	茶豆
WDD02914	Ⅱ B 2849	ZDD02228	小黑豆	ZDD06375	大青仁	ZDD10167	八月炸
WDD02995	PI 468903	ZDD02241	小黑豆	ZDD06410	诏安秋大豆	ZDD10254	三股条黑豆
WDD03019	Bolivar	ZDD02252	黑豆	ZDD06418	宁化红花青	ZDD10572	牛皮黄豆
WDD03116	LS94-3207	ZDD02315	灰皮支黑豆	ZDD06426	长汀高脚红花青	ZDD10665	八月炸
WDD03156	CA26	ZDD02435	小黑豆	ZDD06461	上饶八月白	ZDD10734	黑豆
ZDD00003	黑衣 2 号	ZDD02481	圆黑豆	ZDD06475	严田青皮豆	ZDD10801	红皮大豆
ZDD00375	小金黄 1 号	ZDD02529	麦子豆	ZDD06558	小黄豆	ZDD10812	酱黄豆
ZDD00377	丰地黄	ZDD02581	齐黄 10 号	ZDD06562	白毛豆	ZDD10866	红黄豆
ZDD00378	紫花 1 号	ZDD02675	黄四粒	ZDD06646	七船豆	ZDD10901	虎皮豆
ZDD00381	元宝金	ZDD02764	四粒圆	ZDD06763	柳城十月黄	ZDD11038	黑豆
ZDD00383	金元 1 号	ZDD03106	茶豆	ZDD06815	黑河 4 号	ZDD11085	麻黑豆
ZDD00393	哈 1 号	ZDD03174	郑州小籽黄豆	ZDD06819	嫩丰 11 号	ZDD11091	火黄豆
ZDD00485	嘟噜梅	ZDD03257	宁陵天鹅蛋	ZDD06834	绥农 4	ZDD11092	油黄豆
ZDD00532	小白脐	ZDD03279	伊阳人头豆	ZDD06974	蓑衣领	ZDD11235	宿迁大堵豆
ZDD00539	大白眉	ZDD03297	沁阳水豆	ZDD07359	双阳早黄豆	ZDD11340	亳县千斤豆
ZDD00548	琿春豆	ZDD03458	商丘滚龙珠	ZDD07517	前郭褐毛	ZDD11343	太和圆滚珠
ZDD00554	蛟河紫花 1 号	ZDD03515	巩县黑豆	ZDD07540	农安酱色豆	ZDD11453	新六青
ZDD00569	蓝脐	ZDD03538	获嘉红黑豆	ZDD07541	永吉枣豆	ZDD11461	蒙 81104
ZDD00604	舒兰满仓金	ZDD03555	潢川茶色豆	ZDD07580	白城秣食豆	ZDD11569	红皮黄豆
ZDD00605	伊通满仓金	ZDD03638	大颗黄豆	ZDD07685	金元豆	ZDD11588	74-424
ZDD00686	黑豆	ZDD03684	八月炸	ZDD07727	青二黑	ZDD11638	荆豆 26
ZDD00717	黑秣豆	ZDD03755	东海白花糙甲	ZDD07809	铁荚青	ZDD11703	曙光黄豆
ZDD00740	铁丰 18	ZDD03969	邳县拉秧黄	ZDD08120	倪丁花眉豆	ZDD11753	泥豆子
ZDD00772	四粒黄	ZDD04189	涟水天鹅蛋	ZDD08129	黄豆	ZDD12330	田坝豆
ZDD00862	大白眉	ZDD04429	泰兴黑豆	ZDD08214	一窝猴黄豆	ZDD12331	小白毛
ZDD01009	大豆 -2	ZDD05494	洪湖六月爆	ZDD08230	杜士大青豆	ZDD12353	黄毛毛
ZDD01279	白黑豆	ZDD05502	泥豆	ZDD08257	许庄大黑豆	ZDD12395	八月黄
ZDD01521	密云黑豆	ZDD05879	猴子毛	ZDD08321	张营大黑豆	ZDD12403	黄白壳
ZDD01668	状元青黑豆	ZDD06039	香珠豆	ZDD08502	原黑豆	ZDD12436	巴中田坎豆②
ZDD01735	牛毛黄	ZDD06116	六月白	ZDD08505	四角齐黑豆	ZDD12453	渠县八月黄
ZDD01785	小粒青豆	ZDD06194	青豆	ZDD08705	大黄豆 <1>	ZDD12463	邻水冬豆

表 1(续)

编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name	编号 Code	名称 Name
ZDD12529	郟县大三角豆	ZDD16521	青皮黄豆	ZDD20001	本地黄	ZDD23732	吉育 67
ZDD12575	宝兴经得荒	ZDD16611	粽子豆 -5	ZDD20635	乌黄豆	ZDD23737	吉育 72
ZDD12668	青神黄壳子②	ZDD16617	黄豆子 -4	ZDD20642	泥巴豆	ZDD23828	铁丰 30
ZDD12688	长寿十月黄	ZDD16623	粽子豆	ZDD20754	小白豆	ZDD23829	铁丰 31
ZDD12753	蓬溪六月黄	ZDD16628	青黄杂豆 -15	ZDD21237	江西豆	ZDD23867	科丰 14
ZDD12862	新都黄毛豆②	ZDD16682	龙川黄牛毛	ZDD21298	小青豆	ZDD23877	中黄 14
ZDD12896	彭县绿豆	ZDD16771	清远大青豆	ZDD21347	大粒豆	ZDD23883	中黄 20
ZDD12903	眉山绿皮豆	ZDD16783	黑鼻青	ZDD21366	兰溪山豆	ZDD23910	冀豆 15
ZDD13030	红毛豆	ZDD16820	黑豆仔	ZDD21387	庙下大豆	ZDD24002	晋豆 25
ZDD13947	吾古毛豆	ZDD16828	信宜黑豆	ZDD21431	兰溪南大青豆	ZDD24022	齐黄 31
ZDD14026	青皮豆	ZDD16840	崖州黑豆	ZDD21464	黄村青豆	ZDD24063	徐豆 9 号
ZDD14192	屏南城关山豆	ZDD16859	崖县黄豆	ZDD21472	壶镇黑豆	ZDD24078	泗豆 288
ZDD14240	都昌乌豆	ZDD16866	化州大黄豆	ZDD21528	白花黄皮	ZDD24101	皖豆 16
ZDD14397	泥豆	ZDD16954	柏枝豆	ZDD21672	八月黄 -1	ZDD24194	湘春豆 10
ZDD14407	高安八月黄	ZDD17000	小黑豆	ZDD21692	下冬豆	ZDD24320	黑河 38
ZDD14520	湘 7163	ZDD17640	西藏大豆 5	ZDD21781	黑皮大豆	ZDD24321	黑河 39
ZDD14653	吉首黄豆	ZDD17668	黑河 5 号	ZDD21846	黑豆	ZDD24336	华疆 4 号
ZDD14663	绥宁八月黄<乙>	ZDD17669	黑河 6 号	ZDD21855	黄田洋豆	ZDD24344	垦丰 16
ZDD14709	琪坪青豆	ZDD17882	吉林小粒 1 号	ZDD21920	吉水大粒茶豆	ZDD24374	合丰 50
ZDD14729	龙山黑皮豆	ZDD18271	阿旗满仓金	ZDD22079	桥市八月黄	ZDD24376	合丰 52
ZDD14731	新晃黑豆	ZDD18439	六十天还仓	ZDD22104	新桥黑豆	ZDD24399	绥农 26
ZDD14742	保靖茶黄豆	ZDD18470	金杖子黄豆	ZDD22118	建财乡黑豆	ZDD24420	东大 2 号
ZDD14750	沙市河南豆	ZDD18524	下台子磨石豆	ZDD22191	恩平青豆	ZDD24424	东农 50
ZDD14782	长沙泥豆	ZDD18527	牛皮黄	ZDD22234	大粒青皮豆 -1	ZDD24531	铁丰 29
ZDD14783	矮生泥豆①	ZDD18630	冀豆 4 号	ZDD22640	黑农 39	ZDD24626	科新 3 号
ZDD14835	矮脚黄豆 -1	ZDD18847	晋豆 15 号	ZDD22660	黑河 10 号	ZDD24636	中黄 35
ZDD14920	二季早豆 -2	ZDD18856	晋品 19 号	ZDD22663	黑河 13	ZDD24638	中黄 37
ZDD15357	大黄豆 -1	ZDD18989	鸡腰白豆	ZDD22796	九农 21	ZDD24646	中黄 45
ZDD15674	早黄豆 -7	ZDD19085	猫眼	ZDD23242	豫豆 25	ZDD24656	中黄 57
ZDD15708	六月黄 -3	ZDD19131	毛豆	ZDD23602	合丰 40	ZDD24685	冀豆 17
ZDD15733	白豆子	ZDD19144	气死洼	ZDD23625	黑河 23	ZDD24724	晋大 78
ZDD15737	黄皮大豆	ZDD19368	烟黄四号	ZDD23628	黑河 26	ZDD24759	濮豆 206
ZDD16052	六月忙	ZDD19381	高作选 1 号	ZDD23633	黑河 31	ZDD24800	南农 99-10
ZDD16390	六蓝子	ZDD19418	郑 85558	ZDD23636	黑农 43	ZDD25146	赣豆 2 号
ZDD16436	绿皮豆 -2	ZDD19954	皖豆 20	ZDD23704	吉林 30		

郑 12915 和郑 12929 为 2012 年以邯豆 10 为母本、灰皮支黑豆为父本,由河南农业科学院在新乡原阳基地进行杂交,经过 6 代选育而成的抗性稳定、农艺性状相对好的品系,用于评价灰皮支黑豆的改良效果。

1.2 鉴定方法

病土鉴定: 试验于 2017 年 5 月中旬至 9 月中下旬,在河南省农业科学院现代农业科技试验示范基地大豆胞囊线虫培养专用塑料大棚里进行试验。鉴定材料种植在统一规格的塑料杯(直径 × 高为 6 cm × 12 cm)中,每 60 个杯子放在一个塑料筐(长 × 宽为 70 cm × 40 cm)中。在塑料杯中装入混匀的病土,每 100 g 风干土的平均胞囊含量约 50 个,病土来自于河南省分子育种研究院大豆团队保存的 2 号病土,取自于河南荥阳。将鉴定材料在蛭石中发芽,待幼苗长 4~5 cm 时移栽到塑料杯中。鉴定材料每个塑料杯中移栽 2 株,3 次重复。每筐 Lee 作为对照,3 次重复,每个塑料杯中移栽 2 株。培养在自然光温条件下,每天浇水 2 次,干湿交替,浇水后土壤湿度 15%~18%,空气湿度为自然湿度。

人工接种鉴定: 试验于河南省农业科学院人工气候室中进行,光照长度为 12 h/d,光照条件下温度为 28 ℃,黑暗条件下温度为 25 ℃。(1)线虫繁殖。大豆胞囊线虫群体来自于河南省分子育种研究院大豆团队保存的 2 号病土,取自于河南荥阳,利用感病品种 Lee 扩繁大豆胞囊线虫。土样根据土壤粘性不同掺入一定比例沙子混匀后装入 6 cm × 12 cm 的塑料杯中。将感病品种在蛭石中发芽,3~5 d 后待幼苗高 5 cm 左右移栽到装有病土的塑料杯中,每杯 2 株,30 d 左右收集胞囊,参照刘维志^[17]的方法配制成接种用的卵液。(2)人工接种。将壤土和沙子以 2:1 混合,在 150 ℃ 条件下烘 4 h,冷却至常温后装在 6 cm × 12 cm 的塑料杯中,每 60 个杯子放在一个 70 cm × 40 cm 的塑料筐中。将鉴定材料在蛭石中发芽,待幼苗高 4~5 cm 时移栽到塑料杯中。每个塑料杯中移栽 2 株,3 次重复。每筐 Lee 作为对照,3 次重复,每个塑料杯中移栽 2 株。3~5 d 后接种,每杯接种约 4000 个卵。

1.3 抗性评价

鉴定材料接种 30 d 左右即可观察到胞囊,从根系上冲洗胞囊并搜集、拍照,通过 PDS 计数软件^[18]统计胞囊数。按照 Riggs 等^[19]提出的标准,根据胞囊指数(FI)大小对鉴定材料进行抗性分级:免疫

(FI=0)、抗(0<FI≤10)、中抗(10<FI≤30)、中感(30<FI≤60)、感(FI>60)。计算各鉴定材料的胞囊指数。胞囊指数(FI)=(鉴定材料根系上的平均胞囊数/Lee 根系上的平均胞囊数)×100。

1.4 KASP 标记的分析

利用 CTAB 法从抗性材料的叶片中提取 DNA,用 nanodrop2000 测定 DNA 浓度和质量。rhg1-2、rhg1-5、Rhg4-3 和 Rhg4-5 引物合成参照 Kadam 等^[20]报道的 KASP 标记。PCR 反应体系根据 KBioscience(Herts, UK)试剂盒说明进行,反应程序为:94 ℃ 15 min;94 ℃ 20 s,65~67 ℃ 60 s,每个循环降低 0.6 ℃,10 个循环;94 ℃ 20 s,57 ℃ 60 s,3~23 个循环。将 PCR 扩增产物用 Pherastar SNP 分型检测仪读板,并根据荧光信号比值进行 SNP 分型。根据前人的报道^[21,16],以抗大豆胞囊线虫病 2 号生理小种品种 PI90763、PI437654 和感病品种 Lee 的 KASP 基因型做参照,确定筛选出的抗性种质是否是 Peking 抗病类型。

1.5 新种质的抗性分析和农艺性状调查

2018-2019 年连续 3 年对郑 12915 和郑 12929 在河南省农业科学院人工气候室进行大豆胞囊线虫病 2 号生理小种抗性鉴定,人工接种鉴定同 1.2。2020 年在河南省农业科学院新乡原阳基地田间种植郑 12915、郑 12929 和灰皮支黑豆,每个材料种植 4 行,行距 0.4 m,行长 4 m,2 次重复。参照邱丽娟等^[22]调查生长习性、生育期、百粒重等。

2 结果与分析

2.1 抗性评价

对 333 份种质进行大豆胞囊线虫 2 号生理小种的抗性鉴定,筛选出 5 份抗病种质(占 1.50%)(表 2),胞囊指数为 0.2%~8.8%,其中中黄 57 籽粒黄色(图 1),其余均为黑色籽粒;筛选出 14 份中抗种质(占 4.20%)(表 2),胞囊指数为 10.8%~25.8%,其中 4 份为黄色籽粒;其余种质表现中感(占 20.12%)或感病(占 74.17%)(图 2)。

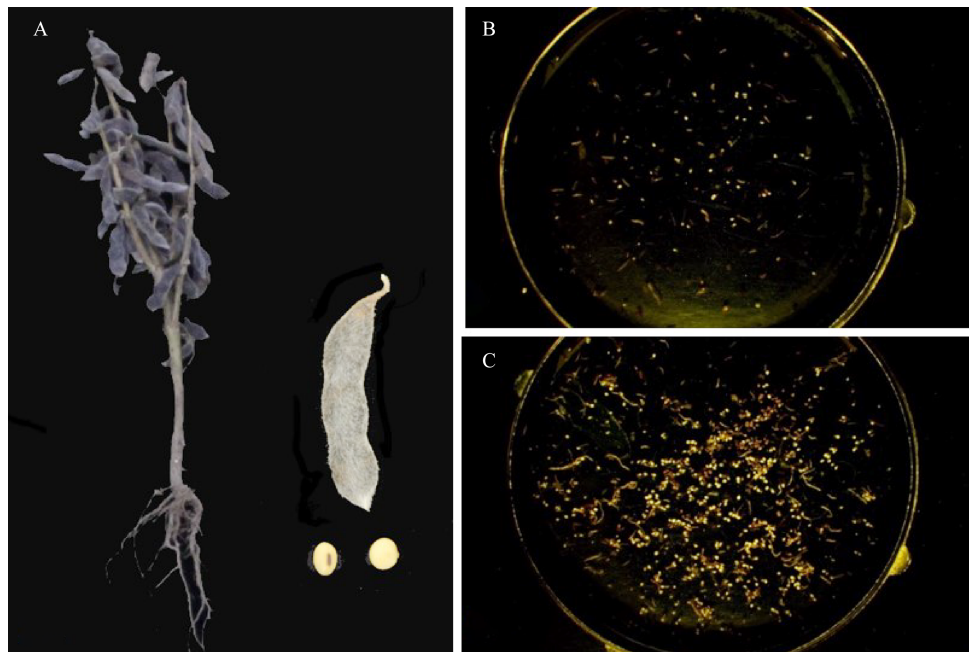
2.2 抗性位点的分析

利用 KASP 标记,对 5 份抗病种质和 14 份中抗种质进行检测(表 3)。18 份材料的 KASP 标记(rhg1-2、rhg1-5、Rhg4-3 和 Rhg4-5)基因型均与抗性材料 PI90763 一致,只有圆黑豆的基因型与抗病对照品种 PI437654 一致。这说明 19 份材料在 rhg1 和 Rhg4 位点有 SCN 抗性位点且均为 Peking 类型。

表 2 筛选出的抗(中抗)大豆胞囊线虫病 2 号生理小种的种质

Table 2 The germplasm with resistance (or moderately resistance) to SCN 2

编号 Code	名称 Name	来源地 Origin	粒色 Seed color	胞囊指数(%) Female index	抗性 Rating
ZDD02315	灰皮支黑豆	中国山西	黑	0.2	抗
ZDD02481	圆黑豆	中国山西	黑	3.7	抗
ZDD10254	三股条黑豆	中国陕西	黑	7.7	抗
ZDD24656	中黄 57	中国北京	黄	8.7	抗
ZDD02252	黑豆	中国山西	黑	8.8	抗
ZDD02228	小黑豆	中国山西	黑	10.8	中抗
ZDD01818	薄地翠黑豆	中国河北	黑	11.9	中抗
ZDD01521	密云黑豆	中国吉林	黑	12.9	中抗
ZDD02529	麦子豆	中国山西	褐	13.6	中抗
ZDD10734	黑豆	中国陕西	黑	14.8	中抗
ZDD08502	原黑豆	中国河北	黑	15.6	中抗
ZDD19381	高作选 1 号	中国山东	黄	16.8	中抗
ZDD08505	四角齐黑豆	中国河北	黑	17.3	中抗
ZDD08257	许庄大黑豆	中国河北	黑	18.5	中抗
WDD01619	Cordell	美国	黄	19.5	中抗
ZDD24022	齐黄 31	中国山东	黄	21.1	中抗
ZDD11461	蒙 81104	中国安徽	黑	21.5	中抗
ZDD01898	黑豆	中国河北	黑	23.5	中抗
WDD03019	Bolivar	美国	黄	25.8	中抗



A: 中黄 57 收获后植株特征; B: 抗病品种中黄 57 的胞囊; C: 感病品种 Lee 的胞囊; 黄色圆形为胞囊

A: The characteristics of Zhonghuang 57, B: Cysts from resistant variety Zhonghuang 57,

C: Cysts from susceptible variety Lee, yellow dots indicate cysts

图 1 接种 30 d 后根部冲洗收集的胞囊

Fig. 1 Cyst collected from the roots after 30 days inoculation

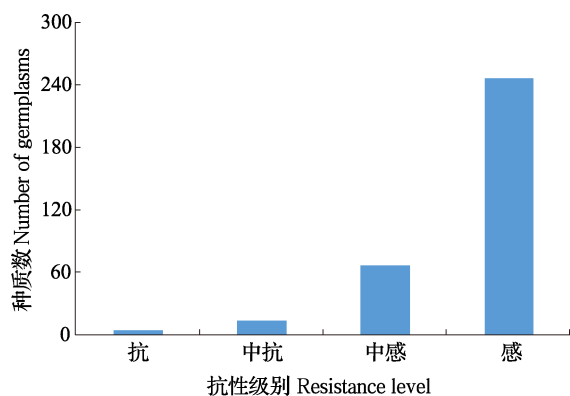


图 2 333 份大豆种质 2 号生理小种抗性级别分布图

Fig. 2 The distribution of SCN resistance level to race 2 for 333 accessions

2.3 新种质的创制

通过 2018-2020 年连续 3 年对郑 12915 和郑 12929 进行大豆胞囊线虫病 2 号生理小种的抗性鉴定,这两个材料均表现稳定抗性(表 4)。通过 rhg1 和 Rhg4 位点相关的 KASP 标记对郑 12915 和郑 12929 进行检测,结果表明这两个品系的 KASP 标记基因型和亲本灰皮支黑豆一致,说明其含有 rhg1 和 Rhg4 抗性位点。

田间调查表明,郑 12915 和郑 12929 相比灰皮支黑豆早熟,植株均为直立,结荚习性为亚有限,而灰皮支黑豆为蔓生,无限结荚(表 5、图 3)。

表 3 大豆胞囊线虫抗性主效位点 rhg1 和 Rhg4 连锁的 KASP 标记对 19 份大豆种质检测分析

Table 3 Detection and analysis of 19 soybean germplasm by KASP markers linked to major loci rhg1 and Rhg4 of soybean cyst nematode resistance

编号 Code	名称 Name	rhg1 位点连锁的 KASP 标记 KASP markers linked to rhg1 locus		Rhg4 位点连锁 KASP 标记 KASP markers linked to Rhg4 locus	
		rhg1-2 ⁺	rhg1-5 ⁺	Rhg4-3 ⁺	Rhg4-5 ⁺
ZDD02315	灰皮支黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD02481	圆黑豆	GG	CC	AA	GG
ZDD10254	三股条黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD24656	中黄 57	GG	CC	TT	GG
ZDD02252	黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD02228	小黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD01818	薄地翠黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD01521	密云黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD02529	麦子豆	GG	CC	TT	GG
ZDD10734	黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD08502	原黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD19381	高作选 1 号	GG	CC	TT	GG
ZDD08505	四角齐黑豆	GG	CC	TT	GG
ZDD08257	许庄大黑豆	GG	CC	TT	GG
WDD01619	Cordell	GG	CC	TT	GG
ZDD24022	齐黄 31	GG	CC	TT	GG
ZDD11461	蒙 81104	GG	CC	TT	GG
ZDD01898	黑豆	GG	CC	TT	GG
WDD03019	Bolivar	GG	CC	TT	GG
WDD00741	Lee (感病对照)	CC	GG	AA	CC
WDD02102	PI90763 (抗病对照)	GG	CC	TT	GG
WDD00643	PI437654 (抗病对照)	GG	CC	AA	GG

⁺ 表示为正向链基因型

⁺ showed genotype from positive strand

表 4 新种质对大豆胞囊线虫病 2 号生理小种抗性鉴定和 KASP 标记检测

Table 4 Identification of resistance to SCN2 and KASP markers detection of new germplasm

名称 Name	胞囊指数 (%) Female index			抗性 Rating	rhg1 位点连锁的 KASP 标记 KASP markers linked to rhg1 locus		Rhg4 位点连锁 KASP 标记 KASP markers linked to Rhg4 locus	
	2018 年 In 2018	2019 年 In 2019	2020 年 In 2020		rhg1-2 ⁺	rhg1-5 ⁺	Rhg4-3 ⁺	Rhg4-5 ⁺
	郑 12915 Zheng 12915	0.98	2.19		2.33	抗病	GG	CC
郑 12929 Zheng 12929	3.04	2.47	3.06	抗病	GG	CC	TT	GG

表 5 灰皮支黑豆和新种质农艺性状

Table 5 Agronomics traits of ZDD02315 and new germplasm

名称 Name	花色 Flower color	粒色 Seed color	生长习性 Growth habit	结荚习性 Podding habit	茸毛色 Pubescence color	百粒重 (g)* 100-seed weight	生育期 (d) Growth period
灰皮支黑豆 Huipizhiheidou	紫	黑	蔓生	无限	棕	10.87 ± 0.18	135
郑 12915 Zheng 12915	紫	黑	直立	亚有限	棕	11.51 ± 0.36	96
郑 12929 Zheng 12929	紫	褐	直立	亚有限	棕	14.34 ± 0.25	93

*: 平均值 ± 标准差

*: Mean ± Standard deviation

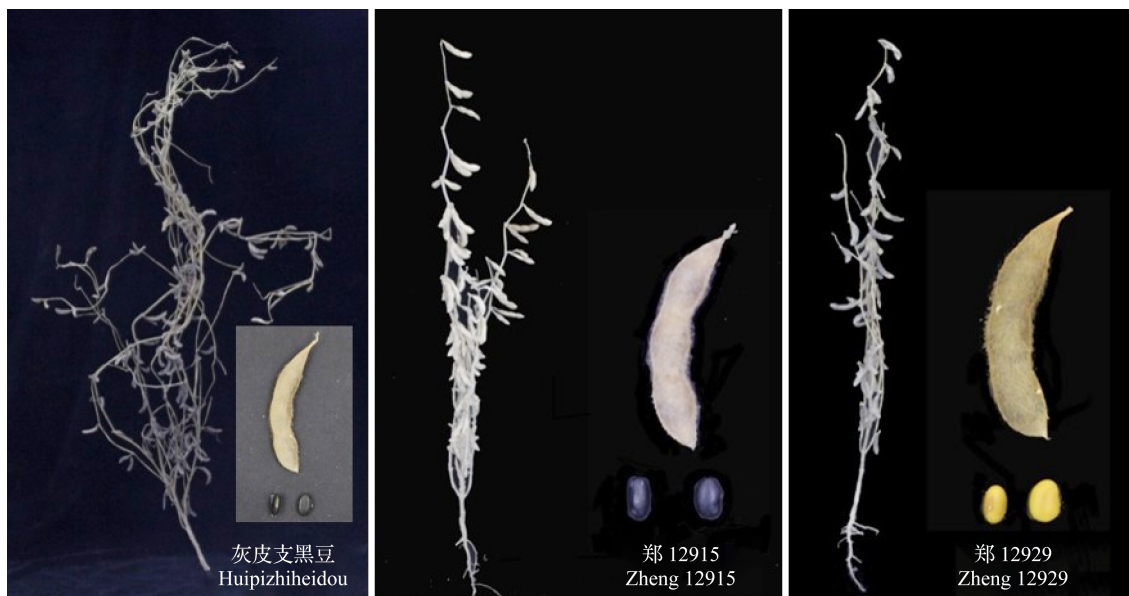


图 3 抗性亲本灰皮支黑豆和新种质的植株特征

Fig. 3 Plant Characteristics of resistant parent ZDD02315 and new germplasm

3 讨论

3.1 大豆抗胞囊线虫 2 号生理小种种质资源的筛选

本研究筛选的抗性种质来自于中国东北(6 份)、黄淮(11 份)和国外(2 份),未筛选出来自于中国南方的抗性种质,这和前人的研究结果一

致^[23],可能因为南方地区大豆胞囊线虫发生较少,田间不存在大豆胞囊线虫病的选择压力,因此培育的种质大部分不含有主效抗性位点。笔者选择了 50 份南方材料进行 rhg1 和 Rhg4 连锁的 KSAP 检测,基因型均和感病对照 Lee 一致(未发表)。筛选出高抗种质作为大豆胞囊线虫抗病育种的亲本固

然好,但是大豆胞囊线虫生理小种较多,种植单一来源抗性种质很容易造成小种致病力增强,种质抗性丧失。抗感品种轮作能够减轻抗病基因选择的压力^[24],中抗品种相比高抗品种根系上的胞囊数多,种植中抗品种可能也会延缓抗病基因的选择压力,培育高产中抗2号生理小种的品种是黄淮大豆育种的一个方向。

已有研究筛选出的抗性资源大部分是地方资源,农艺性状和生态适应性差,一次杂交很难选育出优良的品系。本研究中,郑12915和郑12929遗传了灰皮支黑豆高抗SCN 2的特性,克服了其蔓生缺点。2021年农业农村部产量监督检验测试中心(郑州)测定,郑12915蛋白和油分含量分别是37.39%和21.83%,郑12929蛋白和油分含量分别是37.91%和22.49%,这两份材料均是高油材料。但是,2020年郑12915和郑12929在河南省农业科学院新乡原阳基地种植,小区产量折算667 m²产量分别是88.55 kg和104.17 kg,相比生产上推广的品种有差距,需要继续改良。这两份材料均利用传统的育种方法进行创制,如果在F₂进行分子标记选择,可及早淘汰不含有抗病位点的植株,缩小田间种植规模,减少抗性鉴定工作量。

3.2 重视大豆胞囊线虫2号生理小种的监控

由于大豆胞囊线虫2号小种和其他小种杂交可能会产生超强致病力的小种,因此,在进行2号小种抗性鉴定过程中要重视鉴别寄主的监控,避免致病力的增强。据报道,人工合成的群体LY1是由雌性2号(HG Type 1.2.5-)线虫和雄性5号(HG Type 1.2-)线虫杂交而成,Hartwig(胞囊指数155%,下同)、PI437654(260%)、Peking(83%)、PI90763(92%)等抗原材料均表现高感^[25];在我国山西古交市发现的具有超强致病力的X12小种,经调查推测可能是由2号和4号小种杂交形成的^[4],目前发现的所有抗源均表现感病^[15]。由于2号生理小种为黄淮大豆主产区的优势小种^[3],如何避免2号小种致病力增强给生产上带来的危害可能是黄淮大豆育种急需提前考虑的。

3.3 大豆抗胞囊线虫分子标记在抗性资源筛选中的利用

抗大豆胞囊线虫的资源多数农艺性状差,以表型选择为主的常规育种应用有困难,而抗胞囊线虫育种主要是将抗病基因导入高产的感病品种,因此,抗病资源的基因分型对抗病育种很重要。本研究在表型鉴定的基础上,对抗性资源进行基因分型,为这

些抗性材料的利用提供依据。通过主效位点rhg1和Rhg4连锁的分子标记选择抗性材料虽然能够提高选择的效率,但是选择出的材料抗性水平可能不同,且部分材料表现感病,甚至高感^[15-16],因此仍需进行表型的精准鉴定。本课题曾通过rhg1和Rhg4连锁的KASP标记对487份大豆材料进行鉴定,筛选出20份材料含有rhg1和Rhg4两个主效位点,表型鉴定结果仅1份表现抗病,4份表现中抗,其余表现感病,仅含有Rhg4位点的2份材料表现感病^[15]。本研究仅对抗性材料的主效位点进行了KASP标记检测,但仅通过主效位点rhg1和Rhg4连锁的分子标记进行选择会造成遗传基础狭窄,需要挖掘新的抗性位点,研究不同种质对2号小种的抗性机制,开发可用于抗大豆胞囊线虫病2号生理小种的新标记,拓宽遗传基础。

参考文献

- [1] Kim K K, Vuong T D, Qiu D, Robbins R T, Shannon G J, Zenglu Li Z L, Nguyen H T. Advancements in breeding, genetics, and genomics for resistance to three nematode species in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(12): 2295-2311
- [2] 卢为国,盖钧镒,李卫东. 黄淮地区大豆胞囊线虫生理小种的抽样调查与研究. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 306-312
Lu W G, Gai J Y, Li W D. Sampling survey and identification of races of soybean cyst nematode (*Heterodem glycines* Ichinohe) in Huang-Huai valleys. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(2): 306-312
- [3] 练云,王金社,李海朝,魏荷,李金英,武永康,雷晨芳,张辉,王树峰,郭建秋,李月霞,李志辉,靳巧玲,徐淑霞,张志民,杨彩云,于会勇,耿臻,舒文涛,卢为国. 黄淮大豆主产区大豆胞囊线虫生理小种分布调查. *作物学报*, 2016, 42(10): 1479-1486
Lian Y, Wang J S, Li H C, Wei H, Li J Y, Wu Y K, Lei C F, Zhang H, Wang S F, Guo J Q, Li Y X, Li Z H, Jin Q L, Xu S X, Zhang Z M, Yang C Y, Yu H Y, Geng Z, Shu W T, Lu W G. Race distribution of soybean cyst nematode in the main soybean producing area of Huang-Huai Rivers Valley. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(10): 1479-1486
- [4] 练云,王金社,魏荷,李金英,弓贵明,王树峰,张晶鹏,李茂林,郭建秋,卢为国. 山西省古交市大豆胞囊线虫新小种X12分布调查. *作物学报*, 2021, 47(2): 237-244
Lian Y, Wang J S, Wei H, Li J Y, Gong G M, Wang S F, Zhang J P, Li M L, Guo J Q, Lu W G. Distribution survey of soybean cyst nematode of new race X12 in Gujiao city, Shanxi province. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(2): 237-244
- [5] Vuong T, Slepner D A, Shannon J G, Nguyen H T. Novel quantitative trait loci for broad-based resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) in soybean PI 567516C. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 121: 1253-1266
- [6] Abdelmajid K M, Ramos L, Hyten D, Bond J, Bendahmane

- A, Arelli P R, Njiti V N, Cianzio S, Kantartzi S K, Meksem K. Quantitative trait loci (QTL) that underlie SCN resistance in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] PI438489B by 'Hamilton' recombinant inbred line (RIL) population. *Atlas Journal of Plant Biology*, 2014, 1 (3): 29-38
- [7] Chang H X, Lipka A E, Domier L L, Hartman G L. Characterization of disease resistance loci in the USDA soybean germplasm collection using genome-wide association studies. *Phytopathology*, 2016, 106 (10): 1139-1151
- [8] Vuong T D, Sonah H, Meinhardt C G, Deshmukh R S, Kadam S, Nelson R L, Shannon J G, Nguyen H T. Genetic architecture of cyst nematode resistance revealed by genome-wide association study in soybean. *BMC Genomics*, 2015, 16 (593): 1-13
- [9] Cook D E, Lee T G, Guo X L, Melito S, Wang K, Bayless A M, Wang J P, Hughes T J, Willis D K, Clemente T E, Brian W, Diers B W, Jiang J M, Hudson M E, Bent A F. Copy number variation of multiple genes at *rhg1* mediates nematode resistance in soybean. *Science*, 2012, 338 (6111): 1206-1209
- [10] Liu S, Kandath P K, Warren S D, Yeckel G, Heinz R, Alden J, Yang C, Jamai A, El-Mellouki T, Juvala P S, Hill J, Baum T J, Cianzio S, Whitham S A, Korkin D, Mitchum M G, Meksem K. Soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature*, 2012, 492 (7428): 256-260
- [11] Mudge J, Cregan P B, Kenworthy J P, Orf J H, Young N D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. *Crop Science*, 1997, 37 (5): 1611-1615
- [12] Cregan P B, Mudge J, Fickus E W, Danesh D, Denny R, Young N D. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99: 811-818
- [13] 王文辉, 邱丽娟, 常汝镇, 马凤鸣, 谢华, 林凡云. 中国大豆种质抗 SCN 基因 *rhg1* 位点 SSR 标记等位变异特点分析. *大豆科学*, 2003, 22 (4): 246-250
Wang W H, Qiu L J, Chang R Z, Ma F M, Xie H, Lin F Y. Characteristics of alleles at Satt309 locus associated with *rhg1* gene resistant to SCN of Chinese soybean germplasm. *Soybean Science*, 2003, 22 (4): 246-250
- [14] 盛碧涵, 刘兵, 陈秀兰, 朱治佳, 谭云夫, 李文滨, 赵雪, 韩英鹏. 抗 SCN 位点 *rhg1* 与 *Rhg4* 在种质资源中的单倍型分析及分子标记开发. *大豆科学*, 2017, 36 (3): 345-350
Sheng B H, Liu B, Chen X L, Zhu Z J, Tan Y F, Li W B, Zhao X, Han Y P. Haplotype analysis and molecular marker development of soybean nematode cyst resistance loci *rhg1* and *Rhg4* in soybean germplasm. *Soybean Science*, 2017, 36 (3): 345-350
- [15] 练云, 李海朝, 李金英, 周扬, 王仕伟, 张辉, 雷晨芳, 武永康, 张晶鹏, 卢为国. 利用 KASP 标记筛选含有 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点的大豆抗病资源. *植物遗传资源学报*, 2021, 22 (2): 399-406
Lian Y, Li H C, Li J Y, Zhou Y, Wang S W, Zhang H, Lei C F, Wu Y K, Zhang J P, Lu W G. Marker-assisted screening of soybean cyst nematode germplasm harboring resistance loci *rhg1* and *Rhg4*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22 (2): 399-406
- [16] Patil G B, Lakhssassi N, Jinrong W, Song L, Zhou Z, Klepadlo M, Vuong T D, Stec A O, Kahil S S, Colantonio V, Valliyodan B, Rice J H, Sarbottam Piya S, Hewezi T, Stupar R M, Meksem K, Nguyen H T. Whole-genome re-sequencing reveals the impact of the interaction of copy number variants of the *rhg1* and *Rhg4* genes on broad-based resistance to soybean cyst nematode. *Plant Biotechnol Journal*, 2019, 17 (8): 1595-1611
- [17] 刘维志. 植物病原线虫学. 北京: 中国农业出版社, 2000: 415
Liu W Z. *Plant pathogen nematology*. Beijing: China Agricultural Press, 2000: 415
- [18] 王金社, 卢为国, 李金英, 练云, 魏荷, 李海朝, 雷晨芳. 植物病虫害表型数据采集系统: 中国, 2014SR060158, 2014-05-14
Wang J S, Lu W G, Li J Y, Lian Y, Wei H, Li H C, Lei C F. The data acquisition system on the phenotype of plant diseases and insect pests: China, 2014SR060158, 2014-05-14
- [19] Riggs R D, Schmitt D P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 1988, 20 (3): 392-395
- [20] Kadam S, Vuong T D, Qiu D, Clinton G, Meinhardt C G, Song L, Deshmukha R, Patil G, Wana J, Valliyodana B, Scaboo A M, Shannon J G, Nguyen H T. Genomic-assisted phylogenetic analysis and marker development for next generation soybean cyst nematode resistance breeding. *Plant Science*, 2016, 242: 342-350
- [21] Kim K S, Vuong T D, Qiu D, Robbins R T, Shannon J G, Li Z, Nguyen H T. Advancements in breeding, genetics, and genomics for resistance to three nematode species in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129: 2295-2311
- [22] 邱丽娟, 常汝镇. 大豆种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2006: 13-63
Qiu L J, Chang R Z. Descriptor criteria and data standard for soybean germplasm resources. Beijing: China Agricultural Press, 2006: 13-63
- [23] 马书君, 张玉华, 薛庆喜, 姚远, 刘爱群, 黄承运, 李云辉, 李志学, 王福录, 高国金, 田中艳, 尤青山. 中国大豆种质资源对大豆胞囊线虫 3 号生理小种抗性鉴定研究. *大豆科学*, 1996, 15 (2): 97-102
Ma S J, Zhang Y H, Xue Q X, Yao Y, Liu A Q, Huang C Y, Li Y H, Li Z X, Wang F L, Gao G J, Tian Z Y, You Q S. Evaluation of resistance of soybean germplasm of China to race 3 of soybean cyst nematode. *Soybean Science*, 1996, 15 (2): 97-102
- [24] 陈井生, 李肖白, 李泽宇, 周长军, 罗璇, 王东, 段玉玺, 陈立杰. 连作条件下大庆和安达地区大豆胞囊线虫毒力类型鉴定研究. *大豆科学*, 2015, 34 (4): 675-678
Chen J S, Li X B, Li Z Y, Zhou C J, Luo X, Wang D, Duan Y X, Chen L J. Identification of the virulence type of soybean cyst nematode under continuous cropping in Daqing and Anda. *Soybean Science*, 2015, 34 (4): 675-678
- [25] Arelli P R, Young L D, Concibido V C. Inheritance of resistance in soybean PI 567516C to LY1 nematode population infecting cv. Hartwig. *Euphytica*, 2009, 165: 1-4