

# 大豆胞囊线虫抗性位点 *Rhg1* 和 *Rhg4* 优异等位变异 在黄淮育成品种中的分布

练云, 李海朝, 李金英, 王金社, 魏荷, 雷晨芳, 武永康, 卢为国

(河南省农业科学院经济作物研究所/国家大豆改良中心郑州分中心/农业部黄淮海油料作物重点实验室, 郑州 450002)

**摘要:** 【目的】大豆胞囊线虫 (soybean cyst nematode, SCN) 病是一种重要的世界性大豆病害, 种植抗病品种是防治 SCN 最经济有效的措施。黄淮地区 SCN 发生普遍, 通过对该地区育成大豆品种中抗 SCN 的基因型分析, 为指导抗病品种的合理有效利用提供依据。【方法】利用针对抗 SCN 主效位点 *Rhg1* 和 *Rhg4* 开发的 4 个 KASP 标记, 先对已知抗性表型的 ZDD2315、中黄 57、山西小黑豆等 16 份抗病材料和 Williams、Lee 等 3 份感病材料进行基因分型, 验证所选用 KASP 标记的有效性; 然后对黄淮海育成的豫豆系列、商豆系列、周豆系列等 170 份大豆品种进行基因型鉴定; 选择含有多个优异等位变异的品种, 通过温室接种黄淮地区分布较广的 2 号、4 号、5 号以及强致病力小种 X12, 对这些品种进一步进行表型抗性鉴定。【结果】含 *Rhg1*-2(CC) 和 *Rhg1*-5(CC) 优异等位变异的品种分别有 5 份和 6 份, 含 *Rhg4*-3(TT) 和 *Rhg4*-5(CC) 优异等位变异的品种分别有 6 份和 7 份。同时含 2 个优异等位变异的品种有 6 份, 分别为: 开豆 4 号、商豆 1201、鲁 0305-2、漯 4903、潍豆 12 和潍豆 91861, 占所检测品种的 3.53%。通过接种鉴定, 发现这 6 个品种对 2 号、4 号、X12 号小种均表现不同程度的感病, 而鲁 0305-2 和潍豆 91861 对 5 号小种表现高抗 (FI 分别为  $(10.00 \pm 0.48)$  和  $(7.00 \pm 0.63)$ ), 商豆 1201 对 5 号小种表现抗病 (FI =  $(26.20 \pm 0.91)$ ), 开豆 4 号、漯 4903 和潍豆 12 对 5 号小种表现感病或高感 (FI 分别为  $(35.00 \pm 2.48)$ 、 $(64.80 \pm 3.91)$  和  $(58.20 \pm 2.19)$ )。【结论】黄淮育成品种中, 含 *Rhg1* 或 *Rhg4* 优异等位变异的品种偏少, 育种中应注重优异等位变异位点的引入, 结合黄淮地区大豆胞囊线虫发生情况, 培育兼抗多个生理小种的大豆品种; 这些 KASP 标记可用于中国大豆资源表型鉴定、抗源快速筛选。

**关键词:** 大豆; 大豆胞囊线虫; 优异等位变异; 黄淮; 抗源筛选

## Distribution of Soybean Cyst Nematode Resistance Allele *Rhg1* and *Rhg4* in Huang-Huai Soybean Varieties

LIAN Yun, LI HaiChao, LI JinYing, WANG JinShe, WEI He, LEI ChenFang, WU YongKang, LU WeiGuo

(Institute of Industrial Crops, Henan Academy of Agricultural Sciences/Zhengzhou Subcenter of National Soybean Improvement Center/Key Laboratory of Oil Crops in Huanghuaihai Plains of Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** 【Objective】The disease caused by soybean cyst nematode (SCN, *Heterodera glycines*) is an important worldwide soybean disease. Planting SCN-resistant cultivars has formed the primary basis for controlling SCN. SCN spread widely and infect heavily in the Huang-Huai Valleys almost wherever soybean is grown. This study genotyped the SCN resistance alleles distributed in Huang-Huai soybean varieties and the results will provide scientific basis for guiding the rational and effective utilization of resistant varieties. 【Method】In this study, four KASP developed from *Rhg1* and *Rhg4* loci were selected. The validity of selected KASP marker were verified by genotyping 16 known resistant varieties such as ZDD2315, Zhonghuang 57 and ShanxiXiaoheidou together with 3 known susceptible varieties such as Williams and Lee. Then, 170 soybean varieties cultivated from Huang-Huai Valleys, such

收稿日期: 2019-01-16; 接受日期: 2019-04-30

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0201000)、国家重点研发计划子课题 (2016YFD0100201-20)、中原千人计划-中原科技创新领军人才 (194200510003)

联系方式: 练云, E-mail: lianyun262@126.com. 通信作者卢为国, E-mail: 123bean@163.com

as Yudou series, Shangdou series and Zhoudou series were genotyped. The resistance level of the varieties harboring more than two resistance alleles were tested by inoculating race 2, race 4, race 5 and new race X12 in greenhouse, respectively. These races are distributed widely Huang Huai Valley. 【Result】 There were 5 and 6 varieties harboring *Rhg1*-2(CC) and *Rhg1*-5(CC) resistance alleles, respectively. There were 6 and 7 varieties harboring *Rhg4*-3(TT) and *Rhg4*-5(CC) resistance alleles, respectively. There were 6 varieties names Kaidou 4, Shangdou 1201, Lu 0305-2, Luo 4903, Weidou12 and Weidou 91861 which harboring 2 or more resistance alleles and accounted 3.53% in tested varieties. By inoculation, the 6 varieties showed different sensitive degree to race 2, race 4 or race X12. Lu 0305-2 and Weidou 91861 showed high resistance to race 5 with FI ( $10.00 \pm 0.48$ ) and ( $7.00 \pm 0.63$ ), respectively. Shangdou 1201 showed resistance to race 5 with FI ( $26.20 \pm 0.91$ ). Kaidou 4, Luo 4903 and Weidou12 showed sensitive or high sensitive to race 5 with FI ( $35.00 \pm 2.48$ ), ( $64.80 \pm 3.91$ ) and ( $58.20 \pm 2.19$ ), respectively. 【Conclusion】 The results showed that SCN-resistant alleles in *Rhg1* or *Rhg4* were rare in the released Huang Huai Valleys varieties. More attention should be paid to introduce SCN-resistant alleles in cultivating varieties. Combined with the dominant race of SCN distributed in Huang Huai Valley, the varieties that resistant to multiple races should be given priority in breeding. The four KASP used in this study could be used to phenotype and screen the resistant sources.

**Key words:** soybean; soybean cyst nematode; resistance alleles; Huang-Huai Valleys; screen resistant sources

## 0 引言

【研究意义】大豆胞囊线虫(soybean cyst nematode, SCN)病是一种世界性大豆病害,给大豆生产造成严重经济损失<sup>[1-2]</sup>。种植抗病品种是抵御 SCN 病最经济有效的措施。但是多年来有限抗源 PI88788、Peking、PI437654 的过度使用,加之 SCN 是混居群体,极易产生基因突变和重新组合,已经导致越来越多的 SCN 个体克服有限抗病品种的抗性,致使部分大豆主产区优势生理小种毒性升级<sup>[3-4]</sup>,甚至有新生理小种出现<sup>[5]</sup>。因此,有必要明确大豆胞囊线虫优异等位变异在大豆主产区育成品种中的分布,以有效指导抗病品种的合理应用;同时加速抗性资源筛选,挖掘新的抗病基因,以拓宽抗病品种的遗传基础,培育新的抗病品种。【前人研究进展】抗性资源的筛选及合理利用,可以加速抗病品种培育,但传统的 SCN 抗性鉴定方法,在计数方法上经过多次改进<sup>[6]</sup>,仍然耗时费力,因为鉴定一个品种抗性水平的依据就是寄生在根上的胞囊数目,而胞囊繁殖一代需要 25—30 d,周期较长,且繁殖极易受环境温度和湿度影响。因此,目前抗病资源筛选进展缓慢。2012—2015 年调查研究发现,在黄淮海地区采集的土样约有 70%感染了 SCN,且与 2001—2003 调查研究相比<sup>[7]</sup>,大豆胞囊线虫生理小种组成及分布均有一定的改变,优势生理小种由 1 号小种演变为 2 号小种<sup>[4]</sup>;此次调查还发现了新的生理小种 X12<sup>[5]</sup>;据报道,美国密苏里州 2005 年调查研究发现,在采集的土样中,约有 50%的样本感染了 SCN<sup>[8]</sup>,而在 2015—2016 年的调查中,88%的样本感染了 SCN,且在最广泛使用的 2 个抗源 PI88788 和 Peking

上能够成功寄生的胞囊数目显著增加<sup>[9]</sup>,以上研究结果表明,SCN 分布范围有扩大趋势且致病性有增强趋势。大豆胞囊线虫的抗性是受多个位点控制的数量性状且抗性位点之间相互作用,目前已鉴定出 *rhg1*、*rhg2*、*rhg3*、*rhg4* 等多个抗性位点<sup>[10-11]</sup>。其中, *rhg1* 和 *rhg4* 是 SCN 病最重要的抗性位点, *rhg1* 位于 G 连锁群上,控制着大豆对多个 SCN 生理小种的抗性,该位点与抗病基因紧密连锁,能够解释 50%以上的 SCN 抗性变异<sup>[12-13]</sup>。*rhg4* 位于 A 连锁群上,对 3 号生理小种和 14 号生理小种有抗性作用<sup>[14-15]</sup>。位于 *rhg4* 位点的丝氨酸羟甲基转移酶基因和位于 *rhg1* 位点的氨基酸转运体  $\alpha$ -SNAP 和 *WT12* 参与植物对 SCN 产生抗性,但抗性机制不同<sup>[12,14,16]</sup>。20 世纪 90 年代以来,不同学者研究、定位了 SCN 抗性相关 QTL,这些 QTL 分布在除第 2、7、12 和 13 染色体之外的其他 16 条染色体上<sup>[10]</sup>。在抗大豆胞囊线虫研究方面,已初步明确抗 SCN 的主效基因位点 *rhg1* 和 *rhg4* 的作用机理<sup>[14,16-18]</sup>,发现了微效基因 *GmSNAP11*<sup>[19]</sup>。大豆基因组测序的完成促进了抗病、耐逆分子标记的鉴定。KADAMA 等<sup>[20]</sup>利用基因组信息发掘了 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点的 SNP,并开发成 KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR) 标记。田宇等<sup>[21]</sup>针对与 SCN3 抗性显著关联的 SNP 位点,开发了 KASP 标记,该位点对抗病材料的选择效率达到 92%。史学晖等<sup>[22]</sup>针对 *Rhg4* 位点开发了 CAPS 和 dCAPS 标记,其中 *Rhg4*-389 鉴定的抗性位点变异对抗病种质的选择效率为 97.1%。【本研究切入点】黄淮地区是中国两大大豆主产区之一,SCN 发生普遍,但对该地区育成大豆品种中抗 SCN 的基因型分析尚未见报道,明确该地区育

成大豆品种中所含的主要 SCN 抗性位点, 用于有目的地指导大豆生产、减缓由 SCN 危害带来的经济损失。

【拟解决的关键问题】本研究以黄淮地区育成的 170 份大豆品种为材料, 研究大豆胞囊线虫抗性位点 *Rhg1* 和 *Rhg4* 优异等位变异在黄淮育成品种中的分布, 并对含有多个优异等位变异的品种进行表型抗性鉴定, 为抗病品种在育种中的合理应用提供依据。

## 1 材料与方法

试验于 2018 年 3 月—8 月在河南农业科学院经济作物研究所完成。

### 1.1 试验材料

试验材料共 189 份。源自河南省农业科学院经济作物研究所种质库的黄淮地区育成品种 170 份 (电子附表 1), 其中, 111 份来自河南, 13 份来自北京, 19 份来自山东, 6 份来自江苏, 9 份来自河北, 3 份来自山西, 6 份来自安徽, 其他 3 份; Riggs 鉴别模式和 HG type 鉴别寄主、兴县灰皮支 (ZDD2315)、邯 6192、沧豆 6 号、中黄 57 (ZDD24656)、PI567516C、科丰 1 号、山西小黑豆等已知抗性的优异抗源 16 份; 感病材料 Williams82、Essex 和 Lee68 共 3 份。SCN 2 号、4 号、5 号和 X12 号小种由河南省农业科学院经济作物研究所 SCN 生理小种库保存。

### 1.2 大豆基因组 DNA 的提取及检测

将参试品种每份播种 4—6 粒, 在蛭石中培养, 收集新鲜叶片。采用生工生物工程 (上海) 股份有限公司的植物基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 从大豆叶片中提取基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 确定 DNA 的完整性, 用 NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度, -20℃ 条件下保存 DNA。

### 1.3 标记的选择与反应程序

参照 KADAMA 等<sup>[20]</sup>报道的 KASP 标记, 选择其开发的 *Rhg1* 位点的 *Rhg1-2* (特异性等位位点 1: 5'-TCTAATGCATTGGTTATAGCAACAACG-3'; 特异性等位位点 2: 5'-TCTAATGCATTGGTTATAGCAACAACC-3'; 通用引物: 5'-TGCTGGCATCTGCCAACTCTGTAAA-3') 和 *Rhg1-5* (特异性等位位点 1: 5'-GAAAGCCAAAGAACTTGAGGAGC-3'; 特异性等位位点 2: 5'-GAAAGCCAAAGAACTTGAGGAGG-3'; 通用引物: 5'-CCAACCACAGGAATATTAAAGGTACAAT-3'); *Rhg4* 位点的 *Rhg4-3* (特异性等位位点 1: 5'-TCGTTGTGTGATTGTTTTGCAGGGA-3'; 特异性等位位点 2: 5'-TCGTTGTGTGATTGTTTTGCAGGGT

-3'; 通用引物: 5'-CAGAGATCACAGAGTTTCTCCACCTT-3') 和 *Rhg4-5* (特异性等位位点 1: 5'-GAGGTGGCCGCCGGAGG-3'; 特异性等位位点 2: 5'-GAGGTGGCCGCCGGAGC-3'; 通用引物: 5'-CGACCGCATCATGGGGCTAGAT-3') 共 4 个标记。PCR 反应体系按照 KBiosciences (Herts, UK) (<http://www.ksre.ksu.edu/igenomics>) 操作说明进行。反应程序为 94℃ 15 min; 94℃ 20 s, 65℃—67℃ 60 s, 10 个循环, 每循环降低 0.8℃; 94℃ 20 s, 57℃ 60 s, 23 个循环。使用 Roche LightCycler (LC) 荧光阅读仪读取荧光信号, 进行样品 SNP 分型。

### 1.4 SCN 抗性鉴定

不同生理小种的繁殖、接种方法及胞囊计数方法参考练云等<sup>[4]</sup>报道。简述之, 将 Lee68 播种在病土中并在适当的环境下繁殖, 1 株/杯, 5 个重复, 约 25 d 后, 采用淘洗-过筛法从根系中分离胞囊, 并将胞囊接种至刚萌发出新根的待鉴定材料中, 每杯按不同处理接种虫卵 (2 000 虫卵或 6 000 虫卵), 待胞囊处于显囊盛期时, 将植株拔出, 利用河南省农业科学院大豆课题组自主研发的 PDS 软件<sup>[9]</sup>, 计数根部胞囊数目。

## 2 结果

### 2.1 *Rhg1* 和 *Rhg4* 位点的优异等位变异在已知抗性资源中的频率分布

依据抗 SCN 的 *Rhg1* 和 *Rhg4* 位点开发的 4 个 KASP 标记, 选用 16 份已知的抗性资源和 3 份感病材料进行基因分型, 以验证开发位点的有效性。在抗病材料中, 优异等位变异在 *Rhg1-2* (CC)、*Rhg1-5* (CC) 的分布比例分别为 87.5% 和 100%; 在 *Rhg4-3* (TT)、*Rhg4-5* (CC) 的分布比例均是 81.25%; 在感病材料中, 优异等位变异在这 4 个位点中的分布比例均是 0 (图 1); 且 2 种纯合基因型呈明显的簇状分离, 此结果验证了所选择 4 个 KASP 的有效性, 这些位点为功能性优异等位变异, 可以用作优异等位变异在资源中分布检测的依据。

### 2.2 *Rhg1* 和 *Rhg4* 位点的优异等位变异在黄淮育成品种中的频率分析

鉴于所选用 KASP 的有效性, 选取了黄淮地区 170 份育成品种, 系统检测了抗 SCN 的优异等位变异在黄淮育成品种中的频率分布。结果表明, 功能标记 *Rhg1-2*、*Rhg1-5*、*Rhg4-3*、*Rhg4-5* 的优异等位变异在黄淮育成品种中的分布频率分别为 2.94% (5 份)、3.53% (6 份)、3.53% (6 份) 和 4.12% (7 份) (图 1), 鉴定出同时

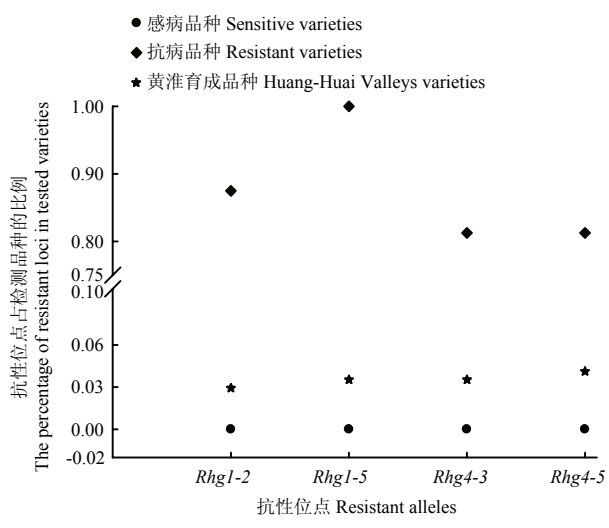


图 1 抗 SCN 优异等位变异在待检测品种中的分布

Fig. 1 The distribution of SCN resistance loci in tested varieties (%)

表 1 携带优异等位变异的种质对不同 SCN 生理小种的抗性鉴定（接种 2 000 虫卵/杯）

Table 1 Resistance identification of soybean varieties carrying SCN resistance alleles to different races (Inoculating 2 000 eggs/cup)

品种 Varieties	2 号小种 Race 2		4 号小种 Race 4		5 号小种 Race 5		X12 号小种 Race X 12	
	胞囊数目 No. of Cysts	胞囊指数 FI	胞囊数目 No. of Cysts	胞囊指数 FI	胞囊数目 No. of Cysts	胞囊指数 FI	胞囊数目 No. of Cysts	胞囊指数 FI
Lee68	179.40±9.57	—	195.40±6.36	—	111.40±8.08	—	380.00±18.99	—
开豆 4 号 Kaidou 4	299.67±23.19	167.04	234.00±14.06	119.75	35.00±2.48	31.42	263.80±6.75	69.42
商豆 1201 Shangdou 1201	264.25±48.70	147.30	210.40±16.65	107.68	26.20±0.91	23.52	231.50±21.00	60.92
鲁 0305-2 Lu 0305-2	311.40±38.23	173.58	185.80±7.88	95.09	10.00±0.48	8.98	186.75±20.03	49.14
漯 4903 Luo 4903	223.60±19.52	124.64	237.20±17.80	121.39	64.80±3.91	58.17	231.80±20.74	61.00
潍豆 12 Weidou 12	134.80±14.95	75.14	228.40±12.90	116.89	58.20±2.19	52.24	321.80±13.89	84.68
潍豆 91861 Weidou 91861	192.00±12.96	107.02	108.60±7.72	55.58	7.00±0.63	6.28	206.80±18.57	54.42

FI: 胞囊指数 Female index。下同 The same as below

综合以上结果，借助 KASP 标记分型辅助分析，在参与鉴定的 6 份材料中，快速筛选到了 3 份抗 5 号小种的资源。其中，商豆 1201 表现抗病，鲁 0305-2 和潍豆 91861 表现高抗。

通过提高接种浓度进一步进行抗性鉴定，在 2 次接种虫卵浓度均提升至 6 000 虫卵/杯的情况下，潍豆 91861 对 5 号小种均表现为中抗（FI=22.29 和 FI=18.09），商豆 1201（FI=59.13）和鲁 0305-2（FI=37.04）表现为感病（表 2）。这三个品种的抗性

携带 2 个或 2 个以上优异等位变异的种质 6 份，占受检测品种的 3.53%。说明在黄淮地区育成的大豆品种中，引入 SCN 优异等位变异的品种偏少。

2.3 含优异等位变异种质的抗性评价

根据基因分型结果，选择携带优异等位变异的开豆 4 号、商豆 1201、鲁 0305-2、漯 4903、潍豆 12 和潍豆 91861，其中，漯 4903 含 *Rhg4* 的 2 个优异等位变异，另外 5 个品种含 *Rhgl* 和 *Rhg4* 2 个位点的 4 个优异等位变异。利用黄淮地区常见的 2 号、4 号、5 号和新发现的具有较强侵染力的 X12 号小种，进行 SCN 抗性鉴定。在接种 2 000 个虫卵/杯的浓度结合接种不同的生理小种，Lee68 根系上的平均胞囊数目均大于 100 个。这 6 个品种对 2 号小种均表现高感，对 4 号小种有 1 个表现感病、5 个表现高感，对 5 号小种有 2 个表现感病，1 个表现抗病（商豆 1201，FI=23.52），2 个表现高抗（鲁 0305-2，FI=8.98 和潍豆 91861，FI=6.28），对 X12 有 2 个表现感病，4 个表现高感（表 1）。

表 2 接种高浓度 SCN 虫卵的抗性鉴定（接种 6 000 虫卵/杯）

Table 2 Resistance identification under inoculated high density SCN eggs (Inoculating 6 000 eggs/cup)

重复	品种 Varieties	胞囊数目 No. of Cysts	胞囊指数 FI
I	Lee68	487.25±28.59	—
	商豆 1201 Shangdou 1201	288.13±11.18	59.13
	鲁 0305-2 Lu0305-2	180.50±11.88	37.04
II	潍豆 91861 Weidou 91861	64.38±2.82	22.29
	Lee68	288.86±11.78	—
	潍豆 91861 Weidou 91861	52.25±1.89	18.09

受接种浓度影响，当接种浓度由 2 000 虫卵/杯提升到 6 000 虫卵/杯时，商豆 1201 由抗病表型转变为感病表型；鲁 0305-2 由高抗表型转变为感病表型；潍豆 91861 由高抗表型转变为中抗表型。

试验结果表明，用 2 号小种接种中黄 57，当接

种浓度为 2 000 虫卵/杯或 6 000 虫卵/杯，抗性表型均表现高抗；用 4 号小种接种中黄 57，当接种浓度为 2 000 虫卵/杯时，抗性表型表现为抗病，当接种浓度提升至 6 000 虫卵/杯时，抗性表型表现为高感（表 3）。

表 3 中黄 57 接种不同浓度虫卵和不同生理小种的抗性鉴定

Table 3 Resistance identification of Zhonghuang 57 under inoculated different density eggs and different races

生理小种	接种量（虫卵/杯）	Lee68	中黄 57	胞囊指数
Race	Inoculation density (Eggs/cup)		Zhonghuang57	FI
2 号小种	2000	108.00±59.87	20.20±0.80	9.44
Race 2	6000	194.20±41.90	2.40±0.51	1.24
	6000	281.60±69.90	20.60±2.40	7.32
4 号小种	2000	182.60±36.40	22.20±3.31	12.16
Race 4	6000	242.14±44.82	331.80±45.45	137.03
	6000	278.13±30.62	250.57±55.28	90.09

3 讨论

大豆的抗病性是 与大豆产量、品质相关的重要性状，加速抗性资源筛选可为加速抗病品种培育提供材料支撑。目前，对大豆种质进行传统的 SCN 抗性鉴定，主要依靠田间表型鉴定或室内表型鉴定，但该鉴定易受环境影响、且费时费力，鉴定的准确性和时效性也较难保证。与传统抗性鉴定方法相比，分子标记技术具有周期短、可进行高通量分析、不受环境条件影响等优点，该技术已经在大豆、水稻、小麦、玉米、马铃薯等<sup>[23-27]</sup>抗性资源筛选及品种鉴定方面得到了一定范围的应用。目前，已有关于利用 SSR 标记鉴定 *Rgh1* 的报道，比如 Satt309 标记已被应用于育种程序<sup>[28-29]</sup>。然而，Satt309 标记仅能检测到含 3 个拷贝的 *Rgh1*。在已有的分子标记技术中，SNP 较其他遗传标记相比，SNP 技术分析系统具有自动化程度高、通量大、速度快、适合大规模操作的特点，已有利用 SNP 标记鉴定 *Rhg1* 和 *Rhg4* 的报道<sup>[30-32]</sup>。

而近几年发展起来的新一代 KASP 技术，具有高通量、低错误率和成本低廉的特点，为加速优异种质资源筛选，提高种质利用效率创造了条件。本研究用到的 4 个 KASP 标记是利用 SoySNP50K iSelect BeadChip 对 19 652 份大豆种质（来自 USDA 种质库）进行基因分型<sup>[33]</sup>，结合对大豆胞囊线虫 *Rhg1* 和 *Rhg4* 位点进行遗传多样性评价而开发的多态性 SNP 分子标记。利用这些标记在 95 份大豆种质和 3 个重组自交

系群体进行基因型鉴定，结果表明，来自 *Rhg1* 位点的 2 个标记（*Rhg1-2* 和 *Rhg1-5*）可以区分多拷贝型（PI88788-type）、低拷贝型（Peking-type）和单拷贝型（Williams 82）3 种拷贝数的变异；来自 *Rhg4* 位点的标记能够检测到 Peking-type 的抗病基因型<sup>[20]</sup>。在大豆更多研究方面：2018 年，叶俊华等<sup>[19]</sup>利用 KASP 技术对中国引进的 1 489 份大豆种质的多个性状（包括大豆胞囊线虫病、大豆花叶病毒病、耐盐性等）进行了基因型鉴定，发现携带 2 个或 2 个以上优异等位变异的种质有 36 份，标记的有效性在所用已知抗源中得到了验证，但该研究未对新发现的抗源做进一步的抗性鉴定；田宇等<sup>[21]</sup>利用抗大豆胞囊线虫 SCN3-11 位点开发的 KASP 标记 GmSNAP11-5149，鉴定了来自 8 个国家的 202 份大豆资源；PATIL 等<sup>[23]</sup>建立了基于耐盐基因 GmCHX1 的高通量 SNP marker，并开发了与该基因结构变异相关的 6 个 KASP 标记，对耐盐性状的表型鉴定效率达 91%。

目前未见对田间虫卵浓度进行调查的报道，但在实际生产中，田间虫卵密度达不到室内试验接种浓度，理由：一是在前期的取样调查中，约有 2/3 的地块感染了 SCN 病，但是没有繁殖到足够用于对病土进行生理小种鉴定的胞囊；二是依据经验，即便是接种 2 000 虫卵/杯，也已超过田间实际的虫卵浓度。所以，推测本次用于鉴定的商豆 1201 和鲁 0305-2 是抗病品种。前期研究数据也表明，有些品种的抗性不受接种浓度的影响，比如中黄 57 对 2 号小种：在接种浓度 2 000

虫卵/杯或 6 000 虫卵/杯情况下, 胞囊指数均小于 10, 表现高抗(表 3), 兴县灰皮支(ZDD2315)也稳定高抗 1—6 号小种<sup>[5]</sup>; 还有一些品种的抗性表型受接种浓度的影响, 比如中黄 57 对 4 号小种: 在接种浓度为 2 000 虫卵/杯情况下, 胞囊指数为 12.16, 表现抗病, 但是当接种浓度提升至 6 000 虫卵/杯情况下, 胞囊指数大于 60, 对 4 号小种表现为高感(表 3)。目前抗性鉴定标准一般是依据对照品种 Lee68 上的胞囊数目  $\geq 30$  个/株, 即认为本次试验结果有效, 但在实际应用中, 部分种质的抗性水平确实受接种浓度影响<sup>[34]</sup>, 因此, 抗性鉴定依据有待进一步探讨。考虑到田间感染 SCN 地块的实际虫卵浓度达不到 2 000 虫卵/杯这样的接种浓度, 因此建议接种 2 000—2 500 虫卵/杯, 且 Lee68 上的胞囊数目  $\geq 30$  个/株, 暂可作为鉴定抗性依据。根据这个标记, 本试验所用材料已验证表型的共有 25 份, 其中 22 份标记基因型跟表型结果一致, 正确率达到 88.0%。

从对黄淮地区育成品种的鉴定结果看, 黄海地区育成品种中, 含有大豆胞囊线虫优异等位变异的品种偏少, 常年种植感病品种导致不仅影响大豆产量, 而且 SCN 群体内异交机率增加, 这可能是导致优势生理小种发生变化及新生理小种出现的一个潜在原因。鉴于 SCN 生理小种毒性在黄淮地区有增加趋势, 5 号小种是仅次于 2 号小种的优势生理小种, 建议在抗 SCN 育种中, 利用筛选出来的抗源, 通过基因聚合培育兼抗 2 号和 5 号小种的大豆品种。

## 4 结 论

黄淮育成品种中含 *Rhg1* 或 *Rhg4* 优异等位变异的品种偏少, 应加大抗病品种培育力度。利用文中的 KASP 标记可以进行大豆胞囊线虫抗性资源的快速筛选, 提升抗性资源筛选效率。

## References

- [1] WRATHER J A, KOENNING S R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *Journal of Nematology*, 2006, 38: 173-180.
- [2] NIBLACK T L, TYLKA G L, RIGGS R D. Nematode pathogens of soybean.//Wilcox J R. *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 2004: 821-851.
- [3] MITCHUM M G. Soybean resistance to the soybean cyst nematode

*Heterodera glycines*: An update. *Phytopathology*, 2016, 106(12): 1444-1450.

- [4] 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. (in Chinese)
- [5] LIAN Y, GUO J Q, LI H C, WU Y K, WEI H, WANG J S, LI J Y, LU W G. A new race (X12) of soybean cyst nematode in China. *Journal of Nematology*, 2017, 49(3): 321-326.
- [6] 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, 2014-5-14.  
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, 2014-5-14 (in Chinese)
- [7] 卢为国, 盖钧镒, 李卫东. 黄淮地区大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)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 (*Heterodera glycines* Ichinohe) in Huang-Huai Valleys. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(2): 306-312. (in Chinese)
- [8] MITCHUM M G, WRATHER J A, HEINZ R D, SHANNON J G, DANEKAS G. Variability in distribution and virulence phenotypes of *Heterodera glycines* in Missouri during 2005. *Plant Disease*, 2007, 91: 1473-1476.
- [9] HOWLAND A, MONNIG N, MATHESIUS J, NATHAN M, MITCHUM M G. Survey of *Heterodera glycines* population densities and virulence phenotypes during 2015-2016 in Missouri. *Plant Disease*, 2018, 102(12): 2407-2410.
- [10] KIM K S, VOUNG T D, QIU D, ROBBINS R T, SHANNON J G, LI Z L, NGUYEN H T. Advancements in breeding, genetics, and genomics for resistance to three nematode species in soybean. *Theoretical Applied Genetics*, 2016, 129: 2295-2311.
- [11] RUBEN E, JAMAI A, AFZAL J, NJITI V N, TRIWITAYAKORN K, LGBAL M J, YAEQASHI S, BASHIR R, KAZI S, ARELLI P, TOWN C D, ISHIHARA H, MEKSEM K, LIGHTFOOT D A. Genomic analysis of the *rhg1* locus: Candidate genes that underlie soybean

- resistance to the cyst nematode. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, 276(6): 503-516.
- [12] LEE T G, KUMAR I, DIERS B W, HUDSON M E. Evolution and selection of *Rhg1*, a copy-number variant nematode-resistance locus. *Molecular Ecology*, 2015, 24: 1774-1791.
- [13] AFZAL A J, NATARAJAN A, SAINI N, IQBAL M J, GEISLER M, EI SHEMA H A, MUNGUR R, WILLMITZER L, LIGHTFOOT D A. The nematode resistance allele at the *rhg1* locus alters the proteome and primary metabolism of soybean roots. *Plant Physiology*, 2009, 151(3): 1264-1280.
- [14] LIU S M, KANDOTH P K, WARREN S D, YECKEL G, HEINZ R, ALDEN J, YANG C, JAMAI A, EI-MELLOUKI T, JUVALE P S, HILL J, BAUM T J, CIANZIO S, WHITHAM S A, KORKIN D, MITCHUM M G, MEKSEM K. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature*, 2012, 492: 256-260.
- [15] CONCIBIDO V C, LANGE D A, DENNY R L. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in 'Peking', PI 90763 and PI 88788 using DNA markers. *Crop Science*, 1997, 37: 258-264.
- [16] COOK D E, LEE T G, GUO X, MELITO S, WANG K, BAYLESS A M, WANG J, HUGHES T J, WILLIS D K, CLEMENTE T E, DIERS B W, JIANG J, 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.
- [17] LIU S, KANDOTH P K, LAKHSSASSI N, KANG J, COLANTONIO V, HEINZ R, YECKEL G, ZHOU Z, BEKAL S, DAPPRICH J, ROTTER B, CIANZIO S, MITCHUM M G, MEKSEM K. The soybean *GmSNAP18* gene underlies two types of resistance to soybean cyst nematode. *Nature Communications*, 2017, 8: 14822.
- [18] KANDOTH P K, LIU S, PRENGER E, LUDWIG A, LAKHSSASSI N, HEINZ R, ZHOU Z, HOWLAND A, GUNTHER J, EIDSON S, DHROSO A, LAFAYETTE P, TUCKER D, JOHNSON S, ANDERSON J, ALASWAD A, CIANZIO S R, PARROTT W A, KORKIN D, MEKSEM K, MITCHUM M G. Systematic mutagenesis of serine *Hydroxy methyltransferase* reveals an essential role in nematode resistance. *Plant Physiology*, 2017, 175(3): 1370-1380.
- [19] 叶俊华, 杨启台, 刘章雄, 郭勇, 李英慧, 关荣霞, 邱丽娟. 大豆引进种质抗胞囊线虫病、抗花叶病毒病和耐盐基因型鉴定及优异等位基因聚合种质筛选. 作物学报, 2018, 44(9): 1263-1273.
- YE J H, YANG Q T, LIU Z X, GUO Y, LI Y H, GUAN R X, QIU L J. Genotyping of SCN, SMV resistance, salinity tolerance and screening of pyramiding favorable alleles in introduced soybean accessions. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(9): 1263-1273. (in Chinese)
- [20] KADAMA S, VUONG T D, QIU D, MEINHARDT C G, SONG L, DESHMUKHA R, PATIL G, WAN J R, 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] 田宇, 杨蕾, 李英慧, 邱丽娟. 抗大豆胞囊线虫 SCN3-11 位点的 KASP 标记开发和利用. 作物学报, 2018, 44(11): 1600-1611.
- TIAN Y, YANG L, LI Y H, QIU L J. Development and utilization of KASP marker for SCN3-11 locus resistant to soybean cyst nematode. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(11): 1600-1611. (in Chinese)
- [22] 史学晖, 李英慧, 于佰双, 郭勇, 王家军, 邱丽娟. 大豆胞囊线虫主效抗病基因 *Rhg4* (*GmSHMT*) 的 CAPS/dCAPS 标记开发和利用. 作物学报, 2015, 41(10): 1463-1471.
- SHI X H, LI Y H, YU B S, GUO Y, WANG J J, QIU L J. Development and utilization of CAPS/dCAPS markers based on the SNPs lying in soybean cyst nematode resistant genes *Rhg4*. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(10): 1463-1471. (in Chinese)
- [23] PATIL G, DO T, VUONG T D, VALLIYODAN B, LEE J D, CHAUDHARY J, SHANNON J G, NGUYEN H T. Genomic-assisted haplotype analysis and the development of high-throughput SNP markers for salinity tolerance in soybean. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19199.
- [24] STEELE K A, QUINTON-TULLOCH M J, AMGAI R B, DHAKAL R, KHATIWADA S P, VYAS D, HEINE M, WITCOMBE J R. Accelerating public sector rice breeding with high-density KASP markers derived from whole genome sequencing of *indica* rice. *Molecular Breeding*, 2018, 38(4): 38.
- [25] UR REHMAN S, WANG J, CHANG X, ZHANG X, MAO X, JING R. A wheat protein kinase gene *TaSnRK2.9-5A* associated with yield contributing traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 2019, 132(4): 907-919.
- [26] ERTIRO B T, OGUGO V, WORKU M, DAS B, OLSEN M, LABUSCHAGNE M, SEMAGN K. Comparison of Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) and genotyping by sequencing (GBS) for quality control analysis in maize. *BMC Genomics*, 2015, 16: 908.
- [27] 刘勋, 郑克邪, 张娇, 徐茜, 张蜀敏, 赵勇, 沈昱辰, 谢德斌, 唐道彬, 吕长文, 张凯, 任茂智, 王季春. 马铃薯晚疫病抗性基因分子标记检测及抗性评价. 植物遗传资源学报, 2019, 20(3): 538-549.

- LIU X, ZHENG K Y, ZHANG J, XU Q, ZHANG S M, ZHAO Y, SHEN Y C, XIE D B, TANG D B, LÜ C W, ZHANG K, REN M Z, WANG J C. Molecular marker screening of resistant genes and evaluation of resistance to late blight from 218 potato genotypes. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(3): 538-549. (in Chinese)
- [28] CREGAN P, MUDGE J, FICKUS E, DANESH D, DENNY R, YOUNG N. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus. *Theoretical Applied Genetics*, 1999, 99: 811-818.
- [29] SILVA M F D, SCHUSTER I, SILVA J F V D, FERREIRA A, BARROS E G D, MOREIRA M A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2007, 42: 1143-1150.
- [30] YUAN C P, LI Y H, LIU Z X, GUAN R X, CHANG R Z, QIU L J. DNA sequence polymorphism of the *Rhg4* candidate gene conferring resistance to soybean cyst nematode in Chinese domesticated and wild soybeans. *Molecular Breeding*, 2012, 30: 1155-1162.
- [31] BAO Y, VUONG T, MEINHARDT C, TIFFIN P, DENNY R, CHEN S, NGUYEN H T, ORF J H, YOUNG N D. Potential of association mapping and genomic selection to explore PI88788 derived soybean cyst nematode resistance. *Plant Genome*, 2014, 7: 1-13.
- [32] SHI Z, LIU S, NOE J, ARELLI P, MEKSEM K, LI Z. SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. *BMC Genomics*, 2015, 16: 314
- [33] SONG Q, HYTEN D L, JIA G, QUIGLEY C V, FICKUKS E W, NELSON R L, CREGAN P B. Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e54985.
- [34] 练云, 魏荷, 王金社, 雷晨芳, 李海朝, 武永康, 卢为国. 影响大豆胞囊线虫生理小种鉴定因素探讨. *分子植物育种*, 2015, 13(6): 1259-1264.
- LIAN Y, WEI H, WANG J S, LEI C F, LI H C, WU Y K, LU W G. A Study on the factors that influence the race-identification of soybean cyst nematode. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(6): 1259-1264. (in Chinese)

(责任编辑 李莉)