

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04105

河南大豆新品系抗大豆疫霉根腐病基因鉴定

张雪翠^{1,**} 孙素丽^{1,**} 卢为国² 李海朝² 贾岩岩¹ 段灿星¹
朱振东^{1,*}

¹ 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ² 河南省农业科学院经济作物研究所, 河南郑州 450002

摘要: 大豆疫霉根腐病作为影响大豆生产的毁灭性病害之一, 对大豆生产威胁很大。种植抗疫霉根腐病的大豆品种是控制该病害最有效的途径。河南省位于我国黄淮海大豆产区的腹地, 具有大豆疫霉根腐病发生的潜在威胁。本研究的目的是对河南省新育成的大豆品系进行抗性鉴定和抗病基因分子标记检测, 以明确大豆新品系对大豆疫霉根腐病的抗性水平和抗病基因。采用下胚轴创伤接种法对 64 个河南省培育的大豆新品系进行接种, 鉴定其对 2 个具有不同毒力的大豆疫霉分离物 PsJS2 和 Ps41-1 的抗性。结果显示, 对分离物 Ps41-1 和 PsJS2 抗病的分别有 35 个和 16 个品系, 对 Ps41-1 和 PsJS2 为中间反应型的分别有 16 个和 10 个品系, 其中对 2 个分离物均抗病的有 16 个品系, 占鉴定品系的 25%。使用抗疫霉病基因 *RpsZheng* 共分离标记 WZInDel11 进行新品系的基因型鉴定发现, 对 2 个大豆疫霉分离物均抗病的 16 个品系中有 13 个含有标记 WZInDel11, 对 1 个或 2 个大豆疫霉分离物表现为中间反应型的 5 个大豆品系, 分子检测结果表明, 其为杂合基因型, 这些品系中的纯合抗病单株可直接选育成纯合抗病品系用于抗病育种。综合系谱分析结果推测, 有 2 个品系可能含抗疫霉根腐病基因 *RpsZheng*, 2 个品系可能含 *RpsYD29*, 14 个品系可能含有 *RpsZheng* 或其等位基因。表明河南省培育的大豆新品系中含有优异的大豆疫霉根腐病抗源, 该研究结果将为病害防控和抗病品种的选育提供参考。

关键词: 大豆; 大豆疫霉根腐病; 品系; 抗病性; 分子标记

Identification of resistance gene against phytophthora root rot in new soybean lines bred in Henan province

ZHANG Xue-Cui^{1,**}, SUN Su-Li^{1,**}, LU Wei-Guo², LI Hai-Chao², JIA Yan-Yan¹, DUAN Can-Xing¹, and ZHU Zhen-Dong^{1,*}

¹ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Institute of Economic Crops, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: Phytophthora root rot is one of the destructive diseases affecting soybean production, which is a great threat to soybean production. Planting resistant soybean cultivars is the most effective way to control this disease. Henan province was located in the hinterland area of the summer-sowing soybean production region of Huang-Huai in China, which had the potential threat region of phytophthora root rot. The objective of this study was to screen effective resistance cultivars for disease control and resistance breeding by phenotypic identification and molecular detection of resistance gene. Sixty-four new soybean lines bred in Henan were evaluated for their resistance responses to two *Phytophthora sojae* isolates PsJS2 and Ps41-1 using the hypocotyls inoculation technique. The result showed that 35 lines and 16 lines were resistance to Ps41-1 and PsJS2, respectively. Sixteen

本研究由“十三五”国家重点研发计划项目(2016YFD0100201), 国家公益性行业(农业)科研专项(201303018), 农作物种质资源保护与利用专项(2019NWB036-12)和中国农业科学院科技创新工程项目资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0100201), the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303018), the Program of Protection of Crop Germplasm Resources (2019NWB036-12), and the Scientific Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences.

* 通信作者(Corresponding author): 朱振东, E-mail: zhuzhendong@caas.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 张雪翠, E-mail: 553870151@qq.com; 孙素丽, E-mail: sunsuli@caas.cn

Received (收稿日期): 2020-05-12; Accepted (接受日期): 2020-09-13; Published online (网络出版日期): 2020-09-28.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200928.0917.002.html>

lines and 10 lines were intermediate to Ps41-1 and PsJS2, respectively. And there were 16 lines resistance to both Ps41-1 and PsJS2, accounting for 25% of tested lines. Sixty-four lines was detected for *Phytophthora* resistance gene by using molecular marker WZInDel11 co-segregating with a resistance gene *RpsZheng*. The results showed that, 13 of 16 lines resistant to both PsJS2 and Ps41-1 contain target band of WZInDel11, while 5 lines resistant to one of two *P. sojae* isolates show segregating to *P. sojae* produced heterozygous bands. The homozygous resistant plants of these lines segregating for resistance could be accurately detected by marker WZInDel11, and further were directly developed into homozygous resistant lines. Combining the results of pedigree analysis, it was speculated that two lines might contain the resistance gene *RpsZheng*, two lines might contain *RpsYD29*, and 14 lines might contain *RpsZheng* or its allele. In conclusion, the results indicated that the new soybean lines cultivated in Henan Province had excellent resistance sources to *P. sojae*. This study provides important information for disease control and resistance breeding.

Keywords: *Glycine max*; phytophthora root rot; lines; resistance; molecular marker

大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 含有丰富的蛋白质、油脂和人体所需要的多种微量元素, 是世界上重要的粮食作物和经济作物。我国是大豆主要生产国, 目前生产规模居世界第 5 位^[1]。在生产中, 病害是制约大豆产量的重要因素, 其中由大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 引起的大豆疫霉根腐病是破坏性的大豆病害之一, 广泛发生于世界各主要大豆产区, 严重影响大豆的产量和品质^[2]。在中国, 大豆疫霉根腐病首先于 1989 年在东北被发现^[3], 随后该病害的发病区域不断扩大, 成为影响我国大豆生产的主要病害^[4-5]。

大豆疫霉是一种土传性病原菌, 通过土壤、水流等进行传播和蔓延, 其卵孢子可以在土壤中存活数年, 在高湿度条件下卵孢子萌发形成孢子囊, 遇水释放游动孢子侵染植株。大豆疫霉在大豆的整个生育时期都能侵染, 导致出苗前和出苗后死亡、苗期猝倒或成株期根茎腐。目前, 培育和种植抗病品种是控制大豆疫霉根腐病最为有效、经济和环境友好的方法^[2,6]。大豆对大豆疫霉的抗性包括由单个显性基因控制的质量抗性和由多个微效基因控制的数量抗性, 其中质量抗性为研究的重点^[7]。目前, 国内外已在大豆 2 号、3 号、7 号、10 号、13 号、14 号、16~19 号染色体上鉴定了 30 多个抗大豆疫霉根腐病基因^[2,8-10]。大豆与大豆疫霉的互作符合基因对基因的关系, 在抗病品种选择压力下, 大豆疫霉容易产生新的毒力型, 从而导致抗病品种的抗性丧失^[11-13]。因此, 需要不断培育和利用新的抗病品种。

河南省近年来大豆种植面积约 57.33 万公顷, 位居全国第 4 位^[14], 在悠久的大豆栽培过程中, 通过与病原菌的相互作用及人为选择, 河南大豆蕴藏了丰富的抗病性资源。国内外研究表明, 河南大豆品种及资源普遍存在对大豆疫霉根腐病的抗性^[15-16], 其中许多品种具有广谱的抗病性。目前,

部分河南大豆品种所含的优异抗大豆疫霉根腐病基因已被鉴定^[17-19]。大豆品种郑 97196 是国内筛选到的大豆疫霉根腐病优异抗源之一^[17,20]。张海鹏等^[19]将郑 97196 抗大豆疫霉根腐病基因初步定位在大豆 3 号染色体上, 定名为 *RpsZheng*。最近, 我们对郑 97196 抗大豆疫霉根腐病基因 *RpsZheng* 进行了精细定位, 并开发了一个能够有效检测该基因的共分离 InDel 标记 WZInDel11^[21]。

虽然河南省尚未有大豆疫霉根腐病严重发生的报道, 但有研究证明该地区存在大豆疫霉及致病型多样性, 并且与其临近的山东省、安徽省均有大豆疫病发生的报道, 表明具有大豆疫霉根腐病发生的潜在威胁^[4,22]。目前, 河南省有目的抗大豆疫霉根腐病的大豆育种尚未开展, 新育成的品系对大豆疫霉根腐病的抗性及其基因型不明确, 因此, 在生产上推广利用存在大豆疫霉病发生的风险。本研究对 64 个河南省新育成的大豆品系进行大豆抗大豆疫霉根腐病鉴定, 并利用 *RpsZheng* 的共分离标记进行抗病基因检测, 旨在为这些品系的推广利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

64 个河南大豆新品系、感病对照品种 Williams 和抗病品种郑 97196 分别由河南省农业科学院经济作物所和中国农业科学院作物科学研究所提供 (表 1)。

1.2 大豆疫霉

大豆疫霉分离物 Ps41-1 由本实验室分离保存, PsJS2 由南京农业大学王源超教授提供 (表 1)。Ps41-1 为我国东北地区大豆优势毒力分离物 (毒力型: 1a, 1b, 1d, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8), PsJS2 为强毒力分离物 (毒力型: 1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8), 所有的大豆疫霉分离物使用时均在 V₈ 汁琼脂培养基上活化^[23], 在 24℃ 培养 8~10 d, 用于接种。

1.3 抗病性鉴定

分别选取抗病对照郑 97196、感病对照 Williams 以及 64 个河南大豆新品系 15 粒种子, 播种在以蛭石为基质的 1000 mL 的纸杯中, 播种后在 25℃ 温室培养; 每个品系播种 2 杯, 分别用于接种大豆疫霉分离物 Ps41-1 和 PsJS2。待植株第 1 对真叶展开后, 采用下胚轴创伤接种法进行抗性鉴定^[18], 接种时, 先用注射器针头在大豆植株子叶下方 1 cm 处下胚轴划一道长约 1 cm 的伤口, 再用注射器在伤口处注射约 0.2 mL 的接种体。接种后的植株置于温度为 23~25℃、湿度为 100% 的保湿间内保湿 48 h, 然后转入 25℃ 温室内继续培养 3 d 后进行表型调查^[24-25]。抗性评价参照钟超等^[26]的标准, 每个品种的死亡率小于或等于 30%, 记为抗病(resistant, R); 植株死亡率在 30%~70% 之间, 记为中间类型(intermediate, I); 植株死亡率大于或等于 70%, 记为感病(susceptible, S)。试验重复 2 次。

1.4 大豆基因组 DNA 的提取

分别等量采集每个大豆品系 10 株健康幼嫩叶片, 混合于 2 mL 试管中用于大豆基因组 DNA 的提取。采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱)(天根生物科技有限公司, 中国北京)提取大豆基因组 DNA, 具体步骤参照试剂盒的使用说明。

1.5 标记鉴定

用郑 97196 大豆抗疫霉根腐病基因 *RpsZheng* 的共分离标记 WZInDel11 进行大豆品系分子标记检测^[21]。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成 InDel 标记。PCR 反应体系为 10 μL, 包含上下游引物各 0.2 μL、2 × Taq PCR MasterMix (天根生物科技有限公司) 4 μL、模板 DNA 2 μL (20 ng), dd H₂O 补足至 10 μL。反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物检测^[21]。

2 结果与分析

2.1 抗病性鉴定

抗病性鉴定结果表明, 感病对照品种 Williams 对 2 个大豆疫霉分离物均表现为感病, 抗病对照品种郑 97196 对 2 个大豆疫霉分离物均表现为抗病。图 1 显示了鉴定的 64 个大豆新品系对 2 个分离物的抗、感反应比例。表 1 列出了每个品系对 2 个大豆疫霉分离物的抗性反应型。64 个新品系中, 对大豆

疫霉分离物 Ps41-1 和 PsJS2 表现为抗病的分别有 35 个和 16 个, 分别占 54.7% 和 25.0%, 对 Ps41-1 和 PsJS2 表现为中间反应的分别有 16 个和 10 个品系, 分别占 25% 和 15.6%; 对 Ps41-1 和 PsJS2 表现为感病的分别有 13 个和 38 个品系, 分别占 20.3% 和 59.4%。洛豆 16106、开豆 1106、郑豆 1304、洛豆 16095、周豆 47、郑豆 1526、周豆 43、周豆 45、郑 1307、周豆 38、安豆 5919、安豆 6223、周豆 37、安豆 1498、郑 1807、漯 8826 共 16 个品系同时抗 2 个大豆疫霉分离物 Ps41-1 和 PsJS2, 占鉴定品系的 25% (表 1)。

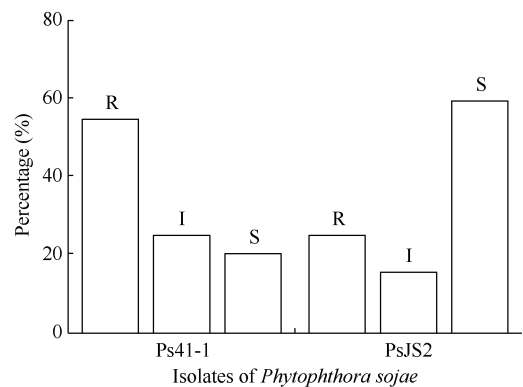


图 1 大豆品系对大豆疫霉分离物 Ps41-1 和 PsJS2 的抗性反应型的比例

Fig. 1 Percentage of soybean lines resistance to two isolates of *Phytophthora sojae*, Ps41-1 and PsJS2

R: 抗病; I: 中间型; S: 感病。

R: resistant; I: intermediate; S: susceptible.

2.2 标记基因型鉴定

张雪翠等^[21]开发了一个广谱抗大豆疫霉根腐病基因 *RpsZheng* 的共分离标记 WZInDel11, 本研究利用该标记对 64 个品系进行 *RpsZheng* 基因检测(表 1 和图 2)发现, 洛豆 16106、郑豆 1304、洛豆 16095、周豆 47、郑豆 1526、周豆 43、周豆 45、郑 1307、安豆 5919、安豆 6223、周豆 37、郑 1807、周豆 38、漯 8825、驻豆 37、泛豆 22、郑 15234、漯豆 8816 共 18 个大豆品系含有 WZInDel11 标记, 占检测总数的 28.1% (表 1)。其中有 5 个对 1 个或 2 个分离物表现为抗感分离的中间型品系(郑 15234、漯 8825、漯豆 8816、驻豆 37 和泛豆 22)出现了杂合基因型(表 1 和图 2), 表明基因型与表型结果相一致, 也表现为抗感分离。

本研究进一步利用标记 WZInDel11 对出现杂合基因型的漯豆 8816 的 6 个感病单株和 4 个抗病单株进行分子检测表明, 6 个感病单株均扩增出了

表 1 大豆新品系对 2 个大豆疫霉分离物 Ps41-1 和 PsJS2 的抗性及其分子标记 WZInDel11 的鉴定结果
Table 1 Phenotypic reaction of new soybean lines against two *Phytophthora sojae* isolates and their results of detection using marker WZInDel11 co-segregated with *RpsZheng*

品系 Line	系谱 Pedigree	大豆疫霉分离物 Ps41-1				大豆疫霉分离物 PsJS2				分子标记 WZInDel11	抗性基因 Rps gene
		Ps41-1 isolated from <i>Phytophthora sojae</i>		反应型		PsJS2 isolated from <i>Phytophthora sojae</i>		反应型			
		死亡率	死亡率 (%)	Reaction	Death rate (%)	死亡率	死亡率 (%)	Reaction	Death rate (%)		
周 11019 Zhou 11019	周豆 23 号×科 20-3 Zhoudou 23×Ke 20-3	30		R	100	S		B			
周豆 38 Zhoudou 38	周豆 23 号×菏豆 20 Zhoudou 23×Hedou 20	0		R	0	R		A			RpsZheng ?
周豆 37 Zhoudou 37	周豆 23 号×菏 01-7-2 Zhoudou 23×He 01-7-2	0		R	0	R		A			RpsZheng ?
郑 1807 Zheng 1807	周豆 23 号×中作 X8100 Zhoudou 23×Zhongzuo X8100	0		R	0	R		A			RpsZheng ?
周豆 39 Zhoudou 39	周豆 13×临豆 10 号 Zhoudou 13×Lindou 10	78.95		S	100	S		B			
周豆 43 Zhoudou 43	周 04012-6-9-3×菏豆 20 Zhou 04012-6-9-3×Hedou 20	0		R	0	R		A			RpsZheng ?
周豆 45 Zhoudou 45	周 04012-6-9-3×菏 01-7-2(菏豆 20) Zhou 04012-6-9-3×He 01-7-2 (Hedou 20)	0		R	0	R		A			RpsZheng ?
洛豆 1420 Luodou 1420	中作 50365×豫豆 23 Zhongzuo 50365×Yudou 23	95		S	100	S		B			
周豆 41 Zhoudou 41	中黄 37×郑 97196 Zhonghuang 37×Zheng 97196	44.44		I	100	S		B			
郑 15234 Zheng 15234	中黄 13×豫豆 29 Zhonghuang 13×Yudou 29	0		R	66.67	I		AB			RpsYD29
开豆 1106 Kaidou 1106	中黄 13×豫豆 19 号 Zhonghuang 13×Yudou 19	10		R	19.05	R		B			
宛黄 6 号 Wanhuang 6	中 35×嫩丰 17 Zhong 35×Neifeng 17	46.67		I	100	S		B			
郑豆 1526 Zhengdou 1526	郑 9805×周豆 23 Zheng 9805×Zhoudou 23	0		R	5	R		A			RpsZheng ?
郑豆 1304 Zhengdou 1304	郑 9805×周豆 23 Zheng 9805×Zhoudou 23	0		R	0	R		A			RpsZheng ?
郑 1307 Zheng 1307	郑 9805×周豆 23 Zheng 9805×Zhoudou 23	0		R	0	R		A			RpsZheng ?
郑 1801 Zheng 1801	郑 9805×中黄 301 Zheng 9805×Zhonghuang 301	68.42		I	55.56	I		B			
洛 1304 Luo 1304	郑 9805×鲁宁 1 号 Zheng 9805×Luning 1	44.44		I	100	S		B			
商豆 191 Shangdou 191	郑 94059×商 200315 Zheng 94059×Shang 200315	85.71		S	100	S		B			
郑豆 1503 Zhengdou 1503	郑 94059×漯 8C01 Zheng 94059×Luo 8C01	14.29		R	95.45	S		B			
郑 1440 Zheng 1440	郑 94059×漯 8C01 Zheng 94059×Luo 8C01	44.44		I	100	S		B			
郑豆 1186 Zhengdou 1186	郑 94059×漯 8C01 Zheng 94059×Luo 8C01	14.29		R	100	S		B			
郑 1659 Zheng 1659	郑 94059×漯 8C01 Zheng 94059 ×Luo 8C01	27.78		R	66.67	I		B			
郑 1609 Zheng 1609	郑 94059/漯 8C01 Zheng 94059/Luo 8C01	77.78		S	100	S		B			
漯 8825 Luo 8825	郑 59×郑 97196 Zheng 59×Zheng 97196	0		R	47.62	I		AB			RpsZheng

(续表 1)

品系 Line	系谱 Pedigree	大豆疫霉分离物 Ps41-1				大豆疫霉分离物 PsJS2				分子标记 WZInDel11	抗性基因 Rps gene
		Phytophthora sojae		Phytophthora sojae		Phytophthora sojae		Phytophthora sojae			
		死亡率 Death rate (%)	反应型 Reaction	死亡率 Death rate (%)	反应型 Reaction	死亡率 Death rate (%)	反应型 Reaction	死亡率 Death rate (%)	反应型 Reaction		
洛豆 16106 Luodou 16106	豫豆 29×滑豆 20 Yudou 29×Huadou 20	0	R	6.25	R					A	RpsYD29
驻豆 38 Zhudou 38	豫豆 22×濮豆 129 Yudou 22×Pudou 129	15.79	R	85.71	S					B	
许 1211 Xu 1211	许豆 3 号×中黄 41 Xudou 3×Zhonghuang 41	9.52	R	100	S					B	
漯豆 8826 Luodou 8826	许 99016×农丰 12 Xu 99016×Nongfeng 12	0	R	26.09	R					B	
许 1123 Xu 1123	徐豆 16×中黄 39 Xudou 16×Zhonghuang 39	50.00	I	100	S					B	
周豆 47 Zhoudou 47	皖宿 2156×远育 6 号 Wansu 2156×Xuanyu 6	0	R	0	R					A	RpsZheng ?
商豆 192 Shangdou 192	商豆 151×商豆 1201 Shangdou 151×Shangdou 1201	62.50	I	100	S					B	
商豆 193 Shangdou 193	商豆 1201 系选 Shangdou 1201 xixuan	72.22	S	100	S					B	
商豆 158 Shangdou 158	商豆 1201×科 9302 Shangdou 1201×Ke 9302	44.44	I	100	S					B	
漯 8811 Luo 8811	齐黄 34×开豆 41 Qihuang 34×Kaidou 41	13.33	R	100	S					B	
濮豆 103 Pudou 103	濮豆 6018×濮海 10 号 Pudou 6018×Puhai 10	94.44	S	100	S					B	
濮豆 793 Pudou 793	濮豆 6018×科丰 6 号 Pudou 6018×Kefeng 6	60.00	I	100	S					B	
驻豆 27 Zhudou 27	濮豆 129×山宁 11 Pudou 129×Shanning 11	46.67	I	100	S					B	
驻豆 30 Zhudou 30	农丰 18×驻豆 4 号 Nongfeng 18×Zhudou 4	60.00	I	100	S					B	
漯豆 8816 Luodou 8816	农丰 12×郑 97196 Nongfeng 12×Zheng 196	23.53	R	56.52	I					AB	RpsZheng
开豆 1107 Kaidou 1107	开豆 4 号×豫豆 16 Kaidou 4×Yudou 16	27.78	R	83.33	S					B	
宛黄 5 号 Wanhuang 5	开豆 46×安豆 5246 Kaidou 46×Andou 5246	94.44	S	100	S					B	
安豆 123 Andou 123	菏豆 13×安豆 12-5270 Hedou 13×Andou 12-5270	82.35	S	100	S					B	
郑 1827 Zheng 1827	菏豆 12×郑 0532 Hedou 12×Zheng 0532	83.33	S	100	S					B	
驻豆 37 Zhudou 37	菏豆 12×晋豆 12 Hedou 12×Jindou 12	8.33	R	30.77	I					AB	RpsZheng ?
泛豆 13 Fandou 13	泛 10C8×豫豆 10 号 Fan 10C8×Yudou 10	36.84	I	100	S					B	
泛豆 21 Fandou 21	泛 09B3×中黄 13 Fan 09B3×Zhonghuang 13	86.67	S	100	S					B	
安豆 305 Andou 305	安豆 12-1414×安豆 11-51203 Andou 12-1414×Andou 11-51203	18.75	R	100	S					B	
安豆 6223 Andou 6223	安豆 11-5161×安豆 11-7036 Andou 11-5161×Andou 11-7036	0	R	0	R					A	RpsZheng ?

(续表 1)

品系 Line	系谱 Pedigree	大豆疫霉分离物 Ps41-1				大豆疫霉分离物 PsJS2				分子标记 WZInDel11	抗性基因 <i>Rps</i> gene
		Ps41-1 isolated from <i>Phytophthora sojae</i>		PsJS2 isolated from <i>Phytophthora sojae</i>		Ps41-1 isolated from <i>Phytophthora sojae</i>		PsJS2 isolated from <i>Phytophthora sojae</i>			
		死亡率 (%)	反应型	死亡率 (%)	反应型	死亡率 (%)	反应型	死亡率 (%)	反应型		
安豆 6263 Andou 6263	安豆 11-5161×安豆 11-5228 Andou 11-5161×Andou 11-5228	35.29	I	100	S					B	
安豆 5919 Andou 5919	安豆 11-5161×安豆 11-5228 Andou 11-5161×Andou 11-5228	5.56	R	4.76	R					A	<i>RpsZheng</i> ?
安豆 115 Andou 115	安 11-5176×安 11-5225 An 11-5176×An 11-5225	93.33	S	100	S					B	
泛豆 22 Fandou 22	C03×原泛豆 9 号 C03×Yuanfandou 9	5.26	R	30.43	I					AB	<i>RpsZheng</i> ?
宛黄 7 号 Wanhuang 7	8110×嫩丰 17 8110×Ncifeng 17	0	R	42.11	I					B	
宛黄 1 号 Wanhuang 1	8110×早 107 8110×Han 107	28.57	R	100	S					B	
泛豆 G98 Fandou G98	09C8×中黄 42 09C8×Zhonghuang 42	66.67	I	100	S					B	
洛豆 16095 Luodou 16095		0	R	10	R					A	<i>RpsZheng</i> ?
安豆 1498 Andou 1498		0	R	0	R					B	
宛黄 2 号 Wanhuang 2		68.42	I	100	S					B	
郑豆 1227 Zhengdou 1227		0	R	56.25	I					B	
濮豆 639 Pudou 639		58.82	I	100	S					B	
郑豆 1205 Zhengdou 1205		0	R	33.33	I					B	
濮豆 691 Pudou 691		81.25	S	100	S					B	
濮豆 561 Pudou 561		18.75	R	90	S					B	
濮豆 868 Pudou 868		78.95	S	100	S					B	
郑 97196 Zheng 97196		0	R	0	R					A	<i>RpsZheng</i>
Williams		95.83	S	100	S					B	

R: 抗病; I: 中间型; S: 感病; A: 含有抗病基因 WZInDel11 目标片段; B: 含有感病基因 WZInDel11 目标片段; AB: WZInDel11 杂合带型; *RpsZheng* ? : *RpsZheng* 或等位基因。
R: disease resistant; I: intermediate; S: disease susceptible; A: containing resistance gene WZInDel11 target fragment; B: containing susceptibility gene WZInDel11 target fragment; AB: WZInDel11 heterozygous band; *RpsZheng* ? : *RpsZheng* or allele.

WZInDel11 的感病目标片段, 而 4 个抗病单株有 2 个单株扩增出了 WZInDel11 的抗病目标片段, 另外 2 个抗病单株扩增出了抗病和感病目标片段, 其基

因型表现为抗、感分离的杂合基因型(图 3)。表明表型为抗病的单株基因型存在纯合抗病及抗感分离杂合基因型。

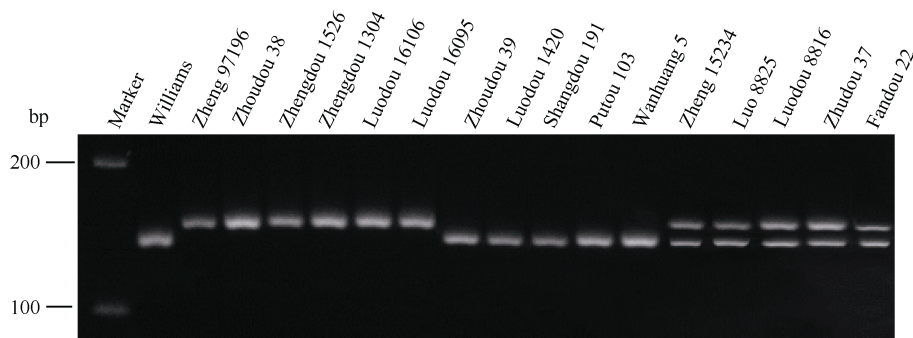


图 2 标记 WZInDel11 在部分大豆品系上的分子检测结果

Fig. 2 Detection of some soybean lines using marker WZInDel11

Williams 和郑 97196 分别为感病和抗病品种对照。洛豆 16106、郑豆 1304、洛豆 16095、周豆 47 和郑豆 1526 为 5 个抗病品系。周豆 39、洛豆 1420、商豆 191、濮豆 103 和宛黄 5 号为 5 个感病品系。郑 15234、漯 8825、漯豆 8816、驻豆 37 和泛豆 22 为 5 个存在抗性分离的品系。

Williams and Zheng 97196 are the controls of susceptible and resistant varieties, respectively. Luodou 16106, Zhengdou 1304, Luodou 16095, Zhoudou 47, and Zhengdou 1526 are all the resistant lines. Zhoudou 39, Luodou 1420, Shangdou 191, Pudou 103, and Wanhuan 5 are all the susceptible lines. Zheng 15234, Luo 8825, Luodou 8816, Zhoudou 37, and Fandou 22 are the lines segregated to *Phytophthora sojae*.

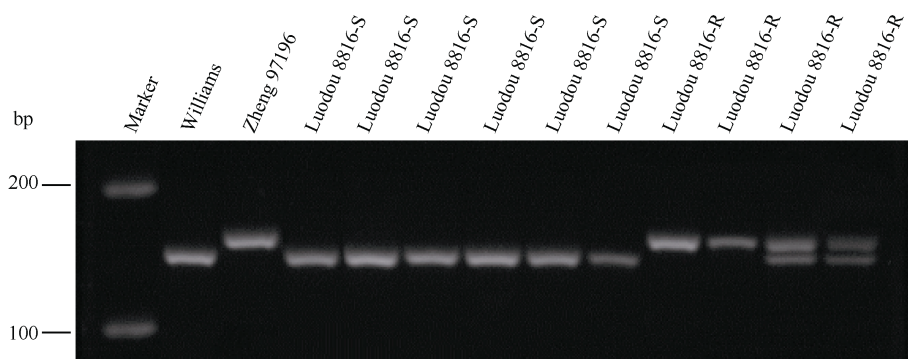


图 3 标记 WZInDel11 在大豆品系漯豆 8816 的 10 个单株上的分子检测结果

Fig. 3 Detection of marker WZInDel11 in ten plants of soybean line Luodou 8816

Williams 和郑 97196 分别为感病和抗病品种对照, 漯豆 8816-S 为 6 个感病单株, 漯豆 8816-R 为 4 个抗病单株。

Williams and Zheng 97196 are the controls of susceptible and resistant varieties, respectively. Luodou 8816-S indicates plant susceptible to *Phytophthora sojae*. Luodou 8816-R indicates plant resistance to *P. sojae*.

3 讨论

本研究对河南省近年来新培育的 64 个大豆品系进行对 2 个大豆疫霉分离物的抗性鉴定发现, 有 51 个品系对 1 个或 2 个大豆疫霉分离物表现为抗病或中间反应, 将中间反应型归为抗病反应^[18,26], 抗病品系占鉴定品系的 79.7%, 这表明河南省近期育成的大豆新品系继续保持对大豆疫霉根腐病高水平的抗性^[20]。

采用对大豆疫霉根腐病具有广谱抗性基因 *RpsZheng* 的共分离标记 WZInDel11 对 64 个品系进行抗病基因的分子检测发现, 周豆 37、周豆 38、周

豆 43、周豆 45、周豆 47、郑豆 1304、郑 1307、郑豆 1526、郑 15234、郑 1807、漯 8825、漯豆 8816、洛豆 16095、洛豆 16106、安豆 5919、安豆 6223、驻豆 37、泛豆 22 共 18 个大豆品系中检测到 WZInDel11 的抗病目标片段。WZInDel11 为 *RpsZheng* 基因的共分离标记, 我们的前期研究表明, 携带 *Rps1c*、*RpsYD25* 和 *RpsYD29* 基因的大豆品种也含有该标记^[21], 因此 WZInDel11 标记可以作为 *Rps1* 基因座部分等位基因或紧密连锁基因的检测标记^[18] (钟超, 未发表数据), 通过抗性反应型和系谱分析推测出含有 WZInDel11 标记的大豆品种(系)的抗疫霉根腐病基因。本研究发现, 所有含有

WZInDel11 标记的品系对 2 个大豆疫霉分离物均表现为抗病型,表明一些品系含有相同的抗疫霉根腐病基因。漯 8816 和漯 8825 的父本均为郑 97196,抗病基因应该来源于郑 97196,表明 2 个品系所含基因为 *RpsZheng*^[21]。豫豆 29 为洛豆 16106 和郑 15234 的亲本之一,2 个品系的抗性应该起源于豫豆 29,因此含有 *RpsYD29*^[18]。郑豆 1526、郑豆 1304 和郑 1307 的亲本之一为郑 9805,郑 9805 由豫豆 23 和豫豆 22 杂交育成,推测这 3 个品系的抗病基因来源于豫豆 23,含有 *RpsZheng* 或其等位基因^[21,28];周豆 47 的亲本之一为皖宿 2156,而皖宿 2156 由中作 975 和豫豆 23 (郑交 8739-47)杂交育成,因此,周豆 47 的抗病基因应该来源于豫豆 23,推测其含有 *RpsZheng* 或等位基因^[21,29]。周豆 37、周豆 38、郑 1807、周豆 43 和周豆 45 亲本之一为周豆 23 或荷豆 20,这 2 个品种与郑 97196、豫豆 23 和豫豆 25 具有共同祖先,推测这些品系含有 *RpsZheng*、*RpsYD25*、*RpsYD29* 或新的等位基因^[21,27,30],安豆 6223 和安豆 5919 的一个亲本为安豆 5156,安豆 5156 以周 9521-3-4 为母本、获黄三选-3 为父本杂交育成^[31],周 9521-3-4 与郑 97196、豫豆 29 具有相同的抗大豆疫霉谱和相同的 *Rps1* 基因座单倍型^[32],因此,我们推测,安豆 6223 和安豆 5919 可能含有 *RpsZheng* 或 *RpsYD29*。驻豆 37、洛豆 10695 和泛豆 22 的亲本与郑 97196、豫豆 23、豫豆 25、豫豆 29 的亲缘关系不明确,推测含有新 *RpsZheng* 等位基因。

大豆疫霉分离物 PsJS2 为江苏省分离到的强毒力分离物,能够克服除 *Rps9*、*RpsQ*、*RpsHCl8*、*RpsX*、*RpsZheng* 以外的其他已知抗疫霉根腐病基因,因此,对 PsJS2 表现抗病的大豆品种(系)很可能含有新的基因。本研究抗性鉴定结果表明,开豆 1106、郑 1659、漯豆 8826、宛黄 7 号、郑 1227、郑 1205、安豆 1498 对 2 个大豆疫霉分离物 Ps41-1 和 PsJS2 都表现为抗病反应或中间反应型,但分子检测这些品系中不含有 WZInDel11 抗病目标片段,表明这些品系可能含有新的广谱抗疫霉根腐病基因。最近,张志民等^[33]鉴定 77 份大豆品种(系)对 8 个大豆疫霉菌株的抗性反应发现,安豆 1498 是唯一一个对 8 个分离物表现为抗病的品系,推测其可能携带新的抗病基因或新的抗病基因组合。本研究也发现,安豆 1498 是唯一一个对 2 个大豆疫霉分离物 Ps41-1 和 PsJS2 均表现为纯合抗病反应(植株死亡率为 0)但不携带 WZInDel11 抗病目标片段的品系,同样,我们也推测,安豆 1498 可能含有新的抗病基因或新的抗

病基因组合。根据朱振东等^[17]的研究结果,本研究中开豆 1106 的父本豫豆 19 与郑 97196 对 10 个具有不同毒力的大豆疫霉菌菌株具有相同的反应型,而 SSR 分析表明,豫豆 19 与本研究安豆 5156 的父本周 9521-3-4 具有很近的遗传关系^[31],周 9521-3-4 与郑 97196、豫豆 29 具有相同的抗大豆疫霉谱和相同的 *Rps1* 基因座单倍型^[31-32],表明开豆 1106 可能含有 *RpsZheng* 座位的新等位基因。

大豆对大豆疫霉根腐病的抗性存在由显性单基因控制的质量抗性和由多基因控制的数量抗性 2 种类型。由于质量抗性表现为完全抗性、容易利用和检测,国外大豆抗疫霉根腐病育种主要利用质量抗性^[34]。下胚轴创伤接种是鉴定大豆对大豆疫霉根腐病质量抗性的主要方法^[24-25]。抗性纯合的大豆品种理论上接种非亲和大豆疫霉分离物后的死亡率为 0,但在实际中大豆品种特别是大豆资源,可能存在混杂或抗性分离而导致部分植株死亡,因此绝大多数研究中将植株死亡率小于或等于 30%的品种或资源划分为抗病,死亡率在 31%~69%的归为中间类型。由于中间类型品种中存在大量的抗性植株,因此,对大豆疫霉特别是对其强毒力分离物表现为中间类型的优异大豆品种或资源同样具有重要的利用价值。

河南省具有丰富的抗大豆疫霉根腐病资源,大多数骨干亲本都具有对大豆疫霉的广谱抗性^[20]。因此,河南育成的大豆品种大多对大豆疫霉具有高水平的抗性,然而由于大豆疫霉根腐病抗性不是大豆育种的目标性状,育成的大豆品种或多或少出现抗性分离。在本研究中,分别有 16 个和 10 个品系分别对大豆疫霉分离物 Ps41-1 和 PsJS2 表现为中间反应类型,其中郑 1801 对 2 个分离物均表现为中间类型,表明这些品系存在抗性分离。本研究发现对 1 个或 2 个大豆疫霉分离物表现为中间反应型的 5 个的大豆品系,分别为漯 8825、驻豆 37、泛豆 22、郑 15234 和漯豆 8816,分子检测结果表明其为杂合基因型,进一步从分子水平证明了这 5 个品系存在抗性分离(图 2)。抗性分离品系的单株分子标记检测结果表明,表型为抗病的植株基因型表现为纯合抗病和抗感杂合的 2 种类型(图 3)。这些抗性分离的品系通过 1~2 轮抗性植株的接种选择,便可选育成纯合抗病品系,或利用抗病基因连锁的共显性分子标记 WZInDel11 直接鉴定纯合抗性植株,从而快速选育成纯合抗病品系推广利用。

4 结论

通过对河南省新培育的 64 个大豆品系进行抗大豆疫霉根腐病鉴定发现, 有 51 个抗病品系, 占鉴定品系的 79.7%, 利用抗疫霉根腐病基因 *RpsZheng* 的共分离标记 WZInDel11 进行分子检测, 鉴定了 18 个含有 *RpsZheng* 或等位基因的大豆品系, 研究结果可为近期培育的大豆新品系的推广和利用提供参考。

References

- [1] 查霖, 钟宣伯, 周启政, 何梦迪, 汪桂凤, 尤金华, 汪自强, 唐桂香. 我国大豆产业发展现状及振兴策略. *大豆科学*, 2018, 37: 458–463.
Zha T, Zhong X B, Zhou Q Z, He M D, Wang G F, You J H, Wang Z Q, Tang G X. Development status of China's soybean industry and strategies of revitalizing. *Soybean Sci*, 2018, 37: 458–463 (in Chinese with English abstract).
- [2] Dorrance A E. Management of *Phytophthora sojae* of soybean: a review and future perspectives. *Can J Plant Pathol*, 2018, 40: 210–219.
- [3] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉菌的发现及初步研究. *植物病理学报*, 1991, 21: 298.
Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary study of *Phytophthora sojae* in China. *Acta Phytopathol Sin*, 1991, 21: 298 (in Chinese with English abstract).
- [4] Zhu Z, Wang H, Wang X, Chang R, Wu X. Distribution and virulence diversity of *Phytophthora sojae* in China. *Agric Sci China*, 2003, 3: 793–799.
- [5] Chen X R, Wang Y C. *Phytophthora sojae*. In: Wan F H, Jiang M X, Zhan A B, eds. *Biological Invasions and Its Management in China*. Germany: Springer, 2017. pp 199–223.
- [6] Tian M, Zhao L, Li S, Huang J, Sui Z, Wen J, Li Y. Pathotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora sojae* and their distribution in Heilongjiang, China 2011–2015. *J Gen Plant Pathol*, 2016, 82: 132–141.
- [7] Sugimoto T, Kato M, Yoshida S, Matsumoto I, Kobayashi T, Kaga A, Hajika M, Yamamoto R, Watanabe K, Aino M, Matoh T, Walker D R, Biggs A R, Ishimoto M. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* and breeding strategies to develop *Phytophthora*-resistant soybeans. *Breed Sci*, 2012, 61: 511–522.
- [8] Zhong C, Sun S, Li Y, Duan C, Zhu Z. Next-generation sequencing to identify candidate genes and develop diagnostic markers for a novel *Phytophthora* resistance gene, *RpsHC18*, in soybean. *Theor Appl Genet*, 2018, 131: 525–538.
- [9] Zhong C, Sun S, Yao L, Ding J, Duan C, Zhu Z. Fine mapping and identification of a novel *Phytophthora* root rot resistance locus *RpsZS18* on chromosome 2 in soybean. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 44.
- [10] Zhong C, Li Y, Sun S, Duan C, Zhu Z. Genetic mapping and molecular characterization of a broad-spectrum *Phytophthora sojae* resistance gene in Chinese soybean. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1809.
- [11] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis*, 1985, 69: 362–368.
- [12] Yang B, Wang Q Q, Jing M F, Guo B D, Wu J W, Wang H N, Wang Y, Lin L, Wang Y, Ye W W, Dong S M, Wang Y C. Distinct regions of the *Phytophthora* essential effector Avh238 determine its function in cell death activation and plant immunity suppression. *New Phytol*, 2017, 214: 361–375.
- [13] Lee S, Mian M A R, Sneller C H, Wang H, Dorrance A E, McHale L K. Joint linkage QTL analyses for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean using six nested inbred populations with heterogeneous conditions. *Theor Appl Genet*, 2014, 127: 429–444.
- [14] 冯艳萍. 河南省大豆生产概况及发展建议. *河南农业*, 2018, (10): 49–50.
Feng Y P. Overview of soybean production in Henan province and development suggestions. *J Henan Agric*, 2018, (10): 49–50 (in Chinese).
- [15] Lohnes D G, Nickell C D, Schmitthenner A F. Origin of soybean alleles for *Phytophthora* resistance in China. *Crop Sci*, 1996, 36: 1689–1692.
- [16] 王晓鸣, 朱振东, 王化波, 武小菲. 中国大豆疫霉根腐病和大豆种质抗病性研究. *植物病理学报*, 2001, 31: 324–329.
Wang X M, Zhu Z D, Wang H B, Wu X F. Occurrence of soybean *Phytophthora* root rot and evaluation of germplasm resistance in China. *Acta Phytopathol Sin*, 2001, 31: 324–329 (in Chinese with English abstract).
- [17] 朱振东, 霍云龙, 王晓鸣, 黄俊斌, 武小菲. 大豆疫霉根腐病抗源筛选. *植物遗传资源学报*, 2006, 7: 24–30.
Zhu Z D, Huo Y L, Wang X M, Huang J B, Wu X F. Screening for resistance sources to *Phytophthora* root rot in soybean. *J Plant Genet Resour*, 2006, 7: 24–30 (in Chinese with English abstract).
- [18] Zhang J, Xia C, Wang X, Duan C, Sun S, Wu X, Zhu Z. Genetic characterization and fine mapping of the novel *Phytophthora* resistance gene in a Chinese soybean cultivar. *Theor Appl Genet*, 2013, 126: 1555–1561.
- [19] 张海鹏, 郭娜, 牛景萍, 黄婧, 彭洋, 王海棠, 赵晋铭, 邢邯. 大豆品种郑 97196 对疫霉根腐病的抗性遗传分析及基因定位. *大豆科学*, 2016, 35: 373–379.
Zhang H P, Guo N, Niu J P, Huang J, Peng Y, Wang H T, Zhao J M, Xing H. Genetic analysis of resistance to *Phytophthora sojae* and mapping of resistance gene in soybean cultivar Zheng 97196. *Soybean Sci*, 2016, 35: 373–379 (in Chinese with English abstract).
- [20] Zhang J, Sun S, Wang G, Duan C, Wang X, Wu X, Zhu Z. Characterization of *Phytophthora* resistance in soybean cultivars/lines bred in Henan province. *Euphytica*, 2014, 196: 375–384.
- [21] 张雪翠, 钟超, 段灿星, 孙素丽, 朱振东. 大豆品种郑 97196 中抗病基因 *RpsZheng* 精细定位. *作物学报*, 2020, 46: 997–1005.
Zhang X C, Zhong C, Duan C X, Sun S L, Zhu Z D. Fine mapping of *Phytophthora* resistance gene *RpsZheng* in soybean cultivar Zheng 97196. *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 997–1005 (in Chinese with English abstract).
- [22] 叶晨晨. 河南省大豆疫霉的分离及鉴定. 安徽农业大学硕士学位论文, 安徽合肥, 2011.
Ye C C. Isolation and Identification of *Phytophthora sojae* from

- Henan Province. MS Thesis of Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [23] Dorrance A E, Berry S A, Anderson T R, Meharg C. Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean. *Plant Health Prog*, 2008. doi: 10.1094/PHP-2008-0118-01-DG.
- [24] Li Y, Sun S, Zhong C, Wang X, Wu X, Zhu Z. Genetic mapping and development of co-segregating markers of *RpsQ*, which provides resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Theor Appl Genet*, 2017, 130: 1223–1233.
- [25] Zhang J, Xia C, Duan C, Sun S, Wang X, Wu X, Zhu Z. Identification and candidate gene analysis of a novel *Phytophthora* resistance gene *Rps10* in a Chinese soybean cultivar. *PLoS One*, 2013, 8: e69799.
- [26] 钟超, 李银萍, 孙素丽, 刘章雄, 邱丽娟, 朱振东. 野生大豆资源对大豆疫病抗病性和耐病性鉴定. 植物遗传资源学报, 2015, 16: 684–690.
- Zhong C, Li Y P, Sun S L, Liu Z X, Qiu L J, Zhu Z D. Identification of resistance and tolerance to *Phytophthora sojae* in wild soybean germplasm. *J Plant Genet Resour*, 2015, 16: 684–690 (in Chinese with English abstract).
- [27] Kyle D E, Nickell C D, Nelson R L, Pedersen W L. Response of soybean accessions from provinces in southern China to *Phytophthora sojae*. *Plant Dis*, 2007, 82:555–559.
- [28] 李海朝, 马莹, 张辉, 文自翔, 李金英, 武永康, 卢为国. 优异大豆组合郑州 135×泗豆 2 号的育种贡献. 植物遗传资源学报, 2012, 13: 1101–1107.
- Li H C, Ma Y, Zhang H, Wen Z X, Li J Y, Wu Y K, Lu W G. Contribution of elite combination Zhengzhou 135 × Sidou 2 in soybean breeding. *J Plant Genet Resour*, 2012, 13: 1101–1107 (in Chinese with English abstract).
- [29] 赵开兵, 沈维良, 王路路, 姜磊. 大豆新品种皖宿 2156 的选育及栽培技术要点. 大豆科技, 2013, (6): 48–49.
- Zhao K B, Shen W L, Wang L L, Jiang L. Breeding and cultivation techniques of new soybean cultivar Wansu 2156. *Soybean Sci Technol*, 2013, (6): 48–49 (in Chinese).
- [30] 李金花, 耿臻, 杨青春, 舒文涛, 李琼. 大豆新品种周豆 23 号. 中国种业, 2016, (11): 52.
- Li J H, Geng Z, Yang Q C, Shu W T, Li Q. New soybean cultivar Zhoudou 23. *China Seed Ind*, 2016, (11): 52 (in Chinese).
- [31] 张志民, 徐淑霞, 周青, 郑丽敏, 杨慧风, 王凤菊, 陈亚光. 大豆新品种安豆 5156 的综合性状分析. 中国种业, 2017, (11): 66–67.
- Zhang Z M, Xu S X, Zhou Q, Zheng L M, Yang H F, Wang F J, Chen Y G. Comprehensive character analysis of a new soybean cultivar Andou 5156. *China Seed Ind*, 2017, (11): 66–67 (in Chinese).
- [32] 陈晓玲, 朱振东, 杜青, 王晓鸣, 肖炎农, 武小菲. 大豆品种(系)抗疫霉根腐病基因的连锁 SSR 标记分析. 植物病理学报, 2008, 38: 75–82.
- Chen X L, Zhu Z D, Du Q, Wang X M, Xiao Y N, Wu X F. Analysis of *Phytophthora* resistance loci *Rps1* and *Rps4* in soybean cultivars or lines using linkage SSR markers. *Acta Phytopathol Sin*, 2008, 38: 75–82 (in Chinese with English abstract).
- [33] 张志民, 陈亚光, 周青, 杨慧风, 王凤菊, 郑丽敏, 郭海芳, 李明军, 徐淑霞. 安豆 1498——疫霉根腐病抗性新种质. 中国油料作物学报, 2017, 39: 855–860.
- Zhang Z M, Chen Y G, Zhou Q, Yang H F, Wang F J, Zheng L M, Guo H F, Li M J, Xu S X. Resistance identification of a new soybean germplasm Andou 1498 to *Phytophthora* root rot. *Chin J Oil Crop Sci*, 2017, 39: 855–860 (in Chinese with English abstract).
- [34] Slaminko T L, Bowen C R, Hartman G L. Multi-year evaluation of commercial soybean cultivars for resistance to *Phytophthora sojae*. *Plant Dis*, 2010, 94: 368–371.