



大豆抗花叶病毒 SC3 株系的分子标记筛选及种质抗性鉴定

蔡 晗¹, 赵 琳², 沈 颖¹, 陈圆圆¹, 智海剑¹, 李 凯¹

(1. 南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095; 2. 杭州市农业科学研究院 农作物(生态)研究所, 浙江 杭州 310024)

摘 要:为进一步寻找与大豆花叶病毒(Soybean Mosaic Virus, SMV)流行株系 SC3 抗病基因(*Rsc3*)紧密连锁的分子标记,以促进 SMV 抗病基因挖掘及抗病品种的选育,本研究利用 96 份品种(系)对 SMV 抗性位点 *Rsc3* 附近新设计的 30 个 SSR 标记和 50 个已知与 *Rsc3* 连锁的 SSR 标记进行初筛,然后采用基因型与表型和血清学鉴定相结合的方法,对 288 份 2016—2019 年中国新育成的大豆品种(系)进行了大豆花叶病毒 SC3 株系的抗性鉴定。结果表明:筛选到 1 个新开发的 SSR 标记 CH0211,与大豆品种抗性表型选择的符合率为 87.8%;进一步利用该标记对 288 份大豆品种(系)进行检测和分析,结合人工接种表型和血清学联合鉴定,抗病表型与基因型符合率为 80.56%。288 份大豆品种(系)中共鉴定出 158 份对 SC3 表现抗病的大豆品种(系),占参试材料总数的 54.86%。鉴定出与抗病品种带型一致的材料 144 份,PI96983、齐黄 34、汾豆 104、山宁 28 等 116 份品种(系)的抗性表型与抗病分子带型一致。本研究开发和鉴定了 1 个与 *Rsc3* 紧密连锁的分子标记 CH0211,该标记可有效用于大豆品种抗 SMV SC3 的种质资源筛选,加速大豆抗 SMV 育种进程。

关键词:大豆花叶病毒;分子标记;SSR;CH0211;抗性鉴定;抗病表型符合率

Molecular Marker Screening and Resistance Identification of Soybean Germplasm to SMV Strain SC3

CAI Han¹, ZHAO Lin², SHEN Ying¹, CHEN Yuan-yuan¹, ZHI Hai-jian¹, LI Kai¹

(1. Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Crops and Ecology, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China)

Abstract: To further search for molecular markers closely linked to the resistance genes (*Rsc3*) of soybean mosaic virus (SMV) prevalent strain SC3, providing an accurate and rapid method for breeding resistant cultivars and promoting the SMV resistance genes mining. In the present study, 30 SSR markers newly designed near the SMV resistance site and 50 SSR markers known to be linked to *Rsc3* were preliminary screened via 96 soybean cultivars (lines), and the resistance of 288 newly bred soybean varieties (lines) from 2016 to 2019 in China were identified combining with genotype, phenotype and serological identification. The result showed that, one newly developed SSR marker CH0211 was initially screened, and the coincidence rate with the resistance phenotypic selection of soybean varieties was 87.8%. Then, 288 soybean cultivars (lines) were further detected and analyzed by using this marker. With the combination of artificial inoculation phenotype and serological identification, the coincidence rate of disease resistance phenotype and genotype was 80.56%. In this study, 158 soybean cultivars with disease resistance to SC3 were identified from 288 soybean cultivars (lines), accounting for 54.86% of the total tested materials, and the molecular bands of 144 soybean cultivars (lines) were identified that were consistent with the type of disease-resistant cultivars (lines). Totally, the phenotypes of 116 cultivars (lines) were consistent with the resistance molecular bands, including PI96983, Qihuang 34, Fendou 104, and Shanning 28. All in all, we developed and identified a molecular marker CH0211 closely linked to *Rsc3*. This marker can be effectively used in germplasm selection of soybean cultivars resistant to SMV SC3 and accelerate the breeding process of soybean resistance to SMV.

Keywords: Soybean mosaic virus; Molecular markers; SSR; CH0211; Resistance identification; Coincidence rate of disease resistance phenotypic

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]起源于中国,是食性蛋白质的重要来源^[1]。大豆的生长发育受到中国乃至世界重要的粮油饲兼用作物,也是人类植多种病虫害的严重制约,据报道可以侵染大豆的病

收稿日期:2020-08-26

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0101504);国家自然科学基金(31671718);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04);江苏省现代作物生产协同创新(JCIC-MCP);现代作物生产省部共建协同创新中心(CIC-MCP)。

第一作者:蔡晗(1995—),男,在读硕士,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail:352493639@qq.com。

通讯作者:李凯(1979—),男,博士,副教授,硕导,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail:kail@njau.edu.cn。

害高达 120 余种,其中大豆花叶病毒(Soybean Mosaic Virus, SMV)病是大豆生产中主要的病毒病害之一,严重影响大豆的产量与品质^[2]。培育和种植抗病品种是控制该病害最经济、绿色、有效的方法。目前,中国学者利用 10 个不同抗性的大豆品种作为一套鉴别寄主,将 SMV 划分为 22 个株系(SC1 ~ SC22)^[3-8],且对这 22 个 SMV 株系的部分抗病基因进行了鉴定,已鉴定到的抗病基因位点主要有 *Rsc3*、*Rsc7*、*Rsc8*、*Rsc10*、*Rsc12*、*Rsc14Q*、*Rsc15* 和 *Rsc20* 等^[9-17]。其中黄淮海和长江流域的流行株系 SC3 的抗病基因位点 *Rsc3* 被定位在大豆 2 号和 13 号染色体上^[9-10]。

传统抗病育种需要人工接种鉴定每个后代家系的抗病性进行选择,耗时费力且易受到环境(尤其是温度)等条件的限制,从而影响抗性材料表型的选择。分子标记辅助选择(Molecular Marker Assisted Selection, MAS)是利用与目标性状基因型紧密连锁的分子标记进行的目标性状基因辅助选择^[18]。水稻品质相关基因的分子标记辅助选择均已得到有效的运用,已经改良选育出多个品质优良的水稻新品系^[19-21]。在前人的研究中,也有大量与大豆花叶病毒抗性相关的 RFLP、AFLP、RAPD、SCAR、SSR、InDel 等多种分子标记应用于 SMV 抗性辅助选择^[22]。滕卫丽等^[23]利用与 SMV1 抗性相关的 SSR 标记 Satt114、Satt362、HSP176、Satt510、Satt334、Sct033 和与 SMV3 抗性相关的 SSR 标记 Satt114、Satt362,分别对 70 份大豆种质资源接种东北株系(SMV1 和 SMV3)进行抗性鉴定,验证结果表明 SSR 标记鉴定准确率分别为 70.7% 和 75.6%^[24-25]。韩英鹏等^[26]利用 SSR 标记 Satt114 对 146 个 $F_{2:5}$ 重组自交家系进行鉴定,得出分子辅助选择的符合率为 87.5%。李文福等^[27]用 6 个与大豆花叶病毒抗性相关的 SSR 标记 Sat_229、Sat_317、Satt335、Satt160、Satt516 和 Sat_309 对 186 份种质资源进行检测,6 个标记中 Sat_317、Satt335、Satt516 对抗病资源筛选的准确率达 70% 以上。栾晓燕等^[28]利用分离群体分组分析法(Bulked Segregant Analysis, BSA)建立的 F_2 群体 DNA 抗感池中鉴定出与抗性表型紧密相关的 SSR 标记 Satt296,该标记位于 D1b 连锁群,有望用于大豆抗 SMV3 株系的分子标记辅助选择^[29]。近年来,分子标记对大豆抗 SMV 基因的鉴定在实际生产实践的应用中也日益广泛^[30-32],如 MAS 育种鉴定到了一批能进入安徽省区域试验和

生产试验的抗 SMV SC7 的新品系阜 Y31 和阜豆 169 等^[31]。

SC3 为我国黄淮海和长江流域的优势 SMV 株系,也是国家大豆品种审定抗病鉴定的必检株系,大豆新品种对该株系感病则会因抗病性不达标而遭“一票否决”。抗病基因位点的鉴定为发掘大豆的抗病基因和培育高抗品种提供了依据,因此采用与 *Rsc3* 抗病位点紧密连锁的标记对大豆品种进行分子检测,分析大豆品系对 SMV 优势株系 SC3 的抗病水平及其所含的重要抗病基因,了解品种抗性动态及找到切实有效的抗病基因分子标记显得尤为迫切。本研究利用已报道的和新开发的 *Rsc3* 抗性基因附近的分子标记^[9-10],对 288 份新育成大豆品种(系)的 *Rsc3* 抗性基因进行分子标记鉴定,结合人工接种表型鉴定和血清学鉴定结果,筛选出与表型鉴定抗病符合率大于 80% 的分子标记,明确其在抗病育种中的利用价值,以推动抗 SMV 的分子标记辅助育种进程。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆为收集自中国 17 个省市 2016—2019 年新育成的 288 份品种(系)。供试 SC3 株系在感病品种南农 1138-2 上繁殖保存。以上材料均由南京农业大学国家大豆改良中心提供。

1.2 试验设计

为保证试验所用 SMV 株系为纯化的 SC3 株系,在南京农业大学牌楼试验站防虫网室种植 SMV 株系,鉴别寄主南农 1138-2、诱变 30、8101、铁丰 25、Davis、Buffalo、早熟 18、Kwanggyo、齐黄 1 号、科丰 1 号,待真叶展开时人工接种该株系进行验证。

288 份大豆品种(系)盆栽于南京农业大学牌楼试验站防虫网室内,每盆 15 株,当真叶完全展开时摩擦接种 SC3 株系。接种 10 d 后调查第一出复叶发病情况,并对未发病的植株进行复接。距第一次接种 30 d 观察材料的表型^[3-7]。为防止人工肉眼对抗感表型误判,本研究进一步利用血清学方法对表型进行确认验证^[33]。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取和检测 取每份大豆品种的新鲜叶片 80 ~ 100 mg 于 2 mL 离心管中,液氮冷冻,用研棒研磨成干粉状,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒(康为, CW0531M)操作指南提取基因组 DNA,加 80 μ L GE buffer 溶解,紫外分光光度计(美国贝克

曼, DU800) 测定 DNA 浓度, -20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.3.2 引物合成、PCR 扩增及电泳 根据公布的 SSR 标记引物序列 (<http://www.soybase.org/>), 选取 50 个已报道的^[9-10]与 SMV 抗病基因连锁的简单重复序列分子标记 (Simple Sequence Repeat, SSR), 用 SSR Hunter 1.3 对大豆 13 号染色体的区段进行微卫星 DNA 位点查找, 利用 Primer Premier 5 设计 30 对 SSR 引物。引物在通用生物系统(安徽)有限公司合成。

PCR 扩增采用 10 μL 反应体系, 包括 5 μL 2 × PCR Buffer Mix, 10 μmol · L⁻¹ 上下游 SSR 引物各 1 μL, 1 μL 10 ng · μL⁻¹ 模板 DNA, 2 μL ddH₂O。反应程序: 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 20 s, 55 ℃ 退火 20 s (不同引物的最适退火温度有所差异), 72 ℃ 延伸 30 s, 循环 32 次; 最后 72 ℃ 延伸 2 min。PCR 产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染技术检测, 银染后的凝胶扫描保存。

1.3.3 抗病表型鉴定 根据 SMV 在单株上的症状, 将不同大豆材料划分为抗病 (无症状) 和感病 (系统花叶、系统坏死、皱缩、卷曲等症状)^[34]。

1.3.4 血清学鉴定 待接种 SC3 株系 30 d 后对 288 份抗感材料进行取样, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法 (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay, DAS-ELISA) 进行血清学验证^[33]。试验 3 次重复, 最终根据 OD 值均值确定每个品种的抗性。

1.4 数据分析

将典型抗病品种 PI96983 的分子带型标记为抗病带型, 赋值为 1; 其余带型均标记为感病带型, 赋值为 2。结合标记带型与表型抗性结果, 基因型为 1 型的抗病品种判定为符合抗病性标记。使用 Adobe Photoshop CC 2018 对电泳图片进行带型标注编辑, 使用 Excel 2016 对品种抗感数目、各分子带型数目以及抗 (感) 病符合率进行汇总计算。

分子标记选择符合率计算方法如下:

抗病选择符合率 (%) =

$$\frac{\text{抗性为抗病且带型为 1 型的材料数目}}{\text{带型为 1 型的材料数目}} \times 100$$

感病选择符合率 (%) =

$$\frac{\text{抗性为感病且带型为 2 型的材料数目}}{\text{带型为 2 型的材料数目}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 分离物接种验证

利用人工接种表型鉴定和血清学鉴定相结合的方法对试验所用 SMV 分离物在鉴别寄主南农 1138-2、诱变 30、8101、铁丰 25、Davis、Buffalo、早熟 18、Kwanggyo、齐黄 1 号和科丰 1 号上的症状进行验证。结果显示: 该分离物在 10 个大豆鉴别寄主上的症状反应与我国黄淮海和长江流域的流行 SMV 株系 SC3 完全一致 (表 1), 证实其为 SC3 株系^[3], 可用于下一步接种鉴定试验。

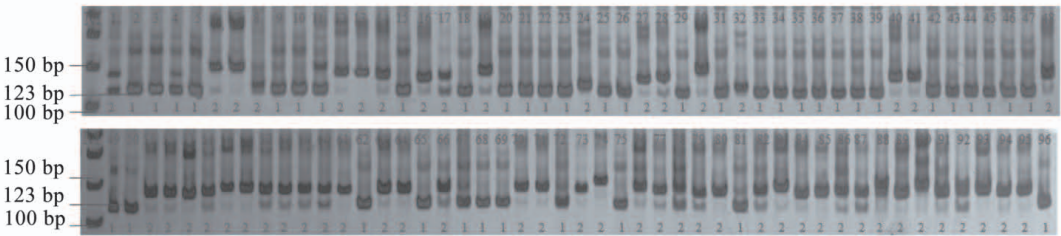
表 1 分离物在 10 个鉴别寄主上的验证
Table 1 Identification of isolate on 10 soybean differentials

	南农 1138-2 Nannong 1138-2	诱变 30 Youbian 30	8101	铁丰 25 Tiefeng 25	Davis	Buffalo	早熟 18 Zaoshu 18	Kwanggyo	齐黄 1 号 Qihuang 1	科丰 1 号 Kefeng 1
症状 Symptom	- / M	- / M	- / M	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

接种叶/上位叶; M: 花叶。
Inoculated leaf / Upside leaf; M: Mosaic.

2.2 大豆抗大豆花叶病毒 SC3 株系分子标记初筛 利用 50 个已知与抗 SMV 基因连锁的 SSR 标记和 30 个 SMV 抗性位点附近新设计的 SSR 标记对 96 份大豆品种 (系) 进行检测和分析, 发现多个差异明显的带型, 经过分析发现带型较为一致的大多数为抗病材料, 感病品种的带型并无规律 (图 1)。据此将带型分为两种: 第一种为大多数抗病材料表现

一致的带型 (如 PI96983、齐黄 34、汾豆 104 和山宁 28), 判定为抗病带型, 赋值为 1; 第二种为除第一种带型之外的其它带型, 判定为感病带型, 赋值为 2。通过初步筛选, 找到 1 对符合率较高的引物, 为新开发的 SSR 标记 CH0211 (图 1), 抗病带型与表型符合率达 87.80% (表 2)。



1:抗病带型; 2:感病带型; M:Maker; 1~96:大豆编号。
1: Resistant allele; 2: Susceptible allele; M:Maker; 1-96:Soybean accession number.

图1 SSR标记CH0211在96份大豆品种(系)上的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis of CH0211 in 96 soybean cultivars (lines)

2.3 288份大豆品种的抗性鉴定结果

利用人工接种表型鉴定和血清学鉴定,对288份新育成大豆品种(系)进行抗病性评价。共鉴定到

商豆1310、中黄106等158份抗病品种(系),占总鉴定品种的54.86%,其余130份材料为感病品种,占总鉴定品种的45.14%(表2)。

表2 288份大豆品种(系)对SC3株系的抗性鉴定和CH0211标记结果

Table 2 Identification of 288 soybean cultivars (lines) resistant to SC3 and the result of CH0211 marker

序号 No.	品种(系) Cultivars(lines)	OD	抗性 Resistance	标记 Marker	序号 No.	品种(系) Cultivars(lines)	OD	抗性 Resistance	标记 Marker
1	商豆1310	0.0907	R	2	29	华豆21	0.0897	R	1
2	齐黄34	0.0909	R	1	30	陇中黄608	0.0895	R	2
3	汾豆104	0.0950	R	1	31	永民6号	0.0903	R	1
4	洛豆1330	1.6125	S	1	32	周11017-18	1.8038	S	2
5	山大2号	0.0941	R	1	33	鲁0540-6	0.0924	R	1
6	冀1702	0.0907	R	2	34	道秋37	0.0889	R	1
7	中作J15017	0.0902	R	2	35	华豆35	0.0922	R	1
8	中豆1753	0.0906	R	2	36	圣育5号	0.0926	R	1
9	陇中黄606	0.0912	R	1	37	道秋6号	0.0924	R	1
10	中黄106	0.0886	R	1	38	石387	0.0903	R	1
11	天益科豆18	0.0931	R	1	39	永民3号	1.8056	S	1
12	冀1701	1.7799	S	2	40	郑15283	0.0929	R	2
13	中品16610	1.7155	S	2	41	中品16456	0.0923	R	2
14	鲁0540-7	0.1057	R	2	42	丰豆3号	0.0925	R	1
15	汾豆105	0.0896	R	1	43	中作10-24	0.0884	R	1
16	冠豆8号	1.7949	S	2	44	丰黑1号	0.0904	R	1
17	临豆9号	0.0917	R	2	45	郟豆10号	0.0905	R	1
18	邯15-685	0.0900	R	1	46	山宁29	0.0872	R	1
19	石788	0.0913	R	2	47	鲁LH284	0.0989	R	1
20	沧豆1123	0.0978	R	1	48	齐黄42-1	1.6226	S	2
21	洛豆1419	1.6805	S	1	49	兴农5号	0.0993	R	1
22	山宁28	0.0905	R	1	50	聊大豆1号	0.0952	R	1
23	中作12-1251	0.0946	R	1	51	漯豆8852	1.5039	S	2
24	洛豆1408	1.6630	S	2	52	驻豆31	1.9060	S	2
25	中作11-11	0.0923	R	1	53	B03	1.9028	S	2
26	周2015W4	0.0886	R	1	54	津选1016	1.8219	S	2
27	川豆1720	1.7972	S	2	55	潍豆9号	1.9211	S	2
28	安豆4号	1.7304	S	2	56	B08	1.8419	S	2

续表 2

序号 No.	品种(系) Cultivars(lines)	OD	抗性 Resistance	标记 Marker	序号 No.	品种(系) Cultivars(lines)	OD	抗性 Resistance	标记 Marker
57	徐 17-49	1. 8123	S	2	98	安豆 5919	1. 7393	S	2
58	商豆 188	1. 7419	S	2	99	荷豆 23	0. 0955	R	1
59	南农 1405	1. 8464	S	2	100	石 1554	0. 0965	R	1
60	柳豆 108	1. 7525	S	2	101	诱处 4 号	0. 0960	R	1
61	周豆 41	1. 6596	S	2	102	HB04	0. 1028	R	1
62	郑 1705	0. 0953	R	1	103	HB24	0. 0979	R	1
63	商豆 158	1. 8349	S	2	104	徐 0118-9	1. 8121	S	2
64	徐豆 13	1. 8584	S	2	105	HB05	0. 0995	R	1
65	皖宿 01-15	0. 0893	R	1	106	B10	0. 0993	R	2
66	机豆 1 号	1. 7818	S	2	107	HB25	0. 1071	R	2
67	皖豆 701	0. 0970	R	1	108	HB29	0. 0986	R	1
68	廊鲜 1 号	0. 0906	R	1	109	HB40	1. 8441	S	2
69	荷豆 35 号	0. 0913	R	1	110	HB10	0. 0983	R	1
70	苏夏 17-S5	1. 7575	S	2	111	周豆 26 号	0. 1001	R	1
71	皖宿 0922	1. 7461	S	2	112	HB38	0. 0980	R	2
72	华育 2 号	1. 6666	S	1	113	HB03	0. 0975	R	1
73	周 12102-4	1. 7374	S	2	114	HB02	0. 0994	R	2
74	S18HA08	1. 8066	S	2	115	B07	0. 0976	R	2
75	沧豆 073	0. 0966	R	1	116	潍科 20	0. 0979	R	1
76	秦豆 220	1. 7271	S	2	117	周豆 28 号	1. 6557	S	1
77	华豆 14	1. 8206	S	2	118	周豆 33 号	1. 7665	S	2
78	齐黄 41-1	1. 8309	S	2	119	S18HA04	0. 0982	R	1
79	南农 J7-9	1. 8821	S	2	120	HB06	0. 0996	R	1
80	洛 16019	1. 8165	S	2	121	中黄 605	0. 0993	R	1
81	东海 10-6	0. 0949	R	1	122	HB17	0. 1001	R	1
82	郑 15234	1. 7014	S	2	123	华育 3 号	1. 7602	S	2
83	淮 15-09	1. 7371	S	2	124	汾豆 106	0. 0971	R	1
84	黄淮 1518	1. 6542	S	2	125	中黄 103	0. 0975	R	1
85	苏夏 17-H23	1. 9136	S	2	126	86573-6 褐	0. 0978	R	1
86	邯黑豆 2 号	1. 8126	S	2	127	圣育 6 号	0. 0988	R	1
87	苏源 1 号	1. 6796	S	2	128	荷豆 33	0. 0975	R	2
88	沧黑豆 2 号	1. 8027	S	2	129	华育 10 号	1. 6962	S	2
89	驻豆 30	1. 9318	S	2	130	8HK07	0. 1000	R	1
90	冀 1708	1. 8539	S	2	131	8HK16	0. 0998	R	1
91	商豆 189	1. 4607	S	2	132	衢春豆 1 号	1. 7463	S	1
92	周豆 39	1. 7573	S	2	133	8HK39	0. 0974	R	2
93	石 107	1. 7269	S	2	134	HB30	0. 0997	R	1
94	潜 4210	1. 7382	S	2	135	8HK14	0. 0992	R	1
95	石 163379	1. 7189	S	2	136	新 3 号	0. 0966	R	2
96	许豆 101	1. 7043	S	1	137	HN0902	0. 0992	R	1
97	宛黄 2 号	0. 0938	R	1	138	阜 1306	0. 1049	R	1

续表 2

序号 No.	品种(系) Cultivars(lines)	OD	抗性 Resistance	标记 Marker	序号 No.	品种(系) Cultivars(lines)	OD	抗性 Resistance	标记 Marker
139	中豆 5501	0. 0983	R	2	180	华豆 36	1. 5018	S	1
140	HB16	0. 0993	R	1	181	嘉豆 3 号	0. 1015	R	2
141	皖宿 031	0. 1011	R	2	182	8HK22	1. 8611	S	1
142	石 1179	0. 1032	R	1	183	浙秋 5 号	1. 8340	S	2
143	HB15	0. 0995	R	1	184	皖宿 132	0. 1023	R	1
144	中黄 203	0. 0989	R	1	185	鄂 4155	1. 7679	S	1
145	濮豆 820	1. 7642	S	2	186	洛豆 1407	0. 1008	R	2
146	B11	0. 1015	R	2	187	HB31	0. 1040	R	2
147	科豆 23 号	1. 7989	S	2	188	南农 G701	1. 9231	S	1
148	8HK26	0. 1005	R	2	189	S18HA02	1. 8674	S	2
149	科豆 31 号	1. 8257	S	2	190	平安豆 1 号	0. 1121	R	2
150	郑双青豆	0. 1013	R	1	191	科源 11	0. 1019	R	2
151	A8	0. 0988	R	1	192	潜 4204	1. 8793	S	2
152	安豆 6223	1. 6909	S	2	193	周豆 1105-3	1. 6400	S	2
153	周豆 11019 号	1. 7839	S	2	194	华豆 28	1. 8218	S	2
154	郑 1311	0. 1342	R	2	195	皖豆 0820	0. 1144	R	1
155	徐 0212-42	1. 8655	S	2	196	开科源 8 号	0. 1137	R	1
156	安豆 5246	0. 0998	R	1	197	津选豆 100	0. 1154	R	1
157	驻豆 26	1. 8059	S	1	198	中豆 5701	0. 1472	R	2
158	道秋 8 号	0. 0995	R	1	199	绿秋 88	0. 1195	R	2
159	驻豆 32	1. 8136	S	1	200	南农 J8-30	1. 5688	S	2
160	连 0901	0. 0971	R	2	201	南农 99-6	1. 4907	S	2
161	皖宿 1208	0. 2586	S	1	202	南农 J8-32	1. 6709	S	2
162	南农 S5-3	1. 7464	S	2	203	红运 2 号	0. 1073	R	1
163	皖豆 38	0. 1014	R	2	204	圣育 16	1. 5656	S	2
164	龙豆 1 号	1. 7391	S	1	205	驻豆 33	1. 6859	S	2
165	冀豆 27	1. 8416	S	2	206	中黄 313	2. 0697	S	2
166	山宁 23	0. 1027	R	1	207	开科源 64	1. 5477	S	2
167	圣豆 103	1. 7161	S	1	208	开科源 18 号	1. 2933	S	2
168	南农 51	1. 7030	S	1	209	南农 1805	1. 8225	S	2
169	淮豆 9 号	1. 8838	S	2	210	中黄 332	1. 7906	S	2
170	天益科豆 1717	1. 6909	S	2	211	皖豆 0102	1. 5698	S	1
171	皖宿 0934	1. 7550	S	1	212	天益科豆 19	1. 9723	S	2
172	郑药黑豆	1. 7641	S	1	213	阜豆 17	0. 1259	R	1
173	齐黄 39	1. 6796	S	2	214	S18HA13	0. 1108	R	1
174	濮豆 1651	1. 6982	S	2	215	8HK34	0. 1018	R	1
175	苍黑豆 1 号	1. 7117	S	2	216	漯 7901	1. 7912	S	2
176	陕垦豆 4 号	1. 5956	S	2	217	交大 19	1. 7435	S	2
177	郑 1637	0. 1093	R	2	218	赣豆 10 号	0. 1091	R	2
178	开豆 46 号	0. 1028	R	2	219	HB39	0. 0960	R	1
179	8HK41	1. 5121	S	1	220	苏春 18-18	0. 1025	R	1

续表 2

序号 No.	品种(系) Cultivars (lines)	OD	抗性 Resistance	标记 Marker	序号 No.	品种(系) Cultivars (lines)	OD	抗性 Resistance	标记 Marker
221	淮鲜 17-08	0. 0982	R	1	255	圣豆 10 号	0. 1042	R	1
222	河农鲜豆 2 号	0. 1138	R	2	256	pd33	1. 7792	S	2
223	通豆 07-195	0. 0989	R	1	257	pd97	0. 1107	R	1
224	华育 23	0. 1046	R	1	258	pd75	0. 1128	R	1
225	中黄 73	0. 1077	R	1	259	pd56	0. 1096	R	1
226	浙农 8 号	0. 1035	R	1	260	pd50	1. 7184	S	2
227	京辐 2 号	0. 1038	R	1	261	pd51	0. 1121	R	1
228	详育 3 号	0. 1010	R	1	262	pd40	0. 1085	R	1
229	淮 16-21	0. 1003	R	1	263	pd62	1. 8368	S	2
230	华育 25	0. 1155	R	1	264	pd77	1. 5130	S	2
231	科豆 10 号	0. 1134	R	1	265	pd98	0. 1078	R	1
232	中黄 207	0. 1097	R	1	266	苏豆 13	0. 1151	R	1
233	绿宝青	0. 1114	R	1	267	冀豆 20	0. 0944	R	1
234	pd88	0. 1067	R	1	268	油 2076	0. 1105	R	1
235	pd48	0. 1048	R	2	269	油春 13-2	0. 1102	R	1
236	pd58	1. 5614	S	1	270	鄂 2066	1. 9324	S	1
237	pd72	1. 8365	S	1	271	早熟 1 号	1. 8855	S	2
238	pd83	0. 1075	R	1	272	油春 13-10	1. 6233	S	2
239	pd36	0. 1362	R	2	273	C1	1. 8887	S	2
240	pd89	1. 7629	S	1	274	华豆 39	1. 8036	S	2
241	pd53	0. 1124	R	2	275	俊豆 7	0. 0881	R	2
242	pd27	0. 1024	R	1	276	C9	1. 4524	S	1
243	pd73	0. 1121	R	1	277	A1	1. 6614	S	2
244	DK12	0. 1049	R	2	278	A4	1. 5123	S	2
245	DK02	1. 5549	S	1	279	A6	1. 6040	S	2
246	DK11	0. 1145	R	1	280	鄂 2068	1. 6214	S	2
247	DK33	0. 1159	R	1	281	鄂豆 10 号	1. 6464	S	2
248	DK21	0. 1082	R	1	282	鄂豆 8 号	1. 9826	S	2
249	DK03	0. 1075	R	1	283	长鲜 1 号	1. 6214	S	2
250	圣豆 105	1. 5439	S	2	284	DK38	0. 1097	R	2
251	南圣 109	1. 7478	S	1	285	龙泉 2 号	0. 0982	R	1
252	圣豆 22	0. 1119	R	1	286	K 丰 82-1	1. 8092	S	2
253	圣豆 32	1. 9075	S	2	287	俊豆 12	1. 8692	S	2
254	圣豆 101	0. 1050	R	1	288	邯豆 15	0. 0881	R	1

R:抗病; S:感病; 1:抗病带型; 2:感病带型。
R: Resistant; S: Susceptible; 1: Resistant allele; 2: Susceptible allele.

2.4 SSR 标记 CH0211 在 288 份大豆品种(系)上的验证

新开发的 SSR 标记 CH0211 位于大豆 13 号染色体,上游引物序列为:5'-CAGGTCGATAAGTCTATGT-3';下游引物序列为:5'-ATATGAACTCGGTCTGTTG-3'。将此标记用于 288 份大豆品种的 PCR 扩增以及电泳分析,所得产物为 123 bp。联合表型鉴定、血清学鉴定和带型分析,共检出具有抗病带型的材料 144 份,其中抗病材料 116 份,抗病表型与带型符合率为 80.56%;具有感病带型的材料 144 份,其中感病材料 112 份,感病带型与表型符合率为 77.78%(表 3)。初步说明该标记可以用作大豆抗 SMV SC3 株系的分子辅助选择。

表 3 288 份大豆品种对 SMV 株系 SC3 抗性标记辅助选择
Table 3 Marker-assisted selection of 288 soybean cultivars resistant to SMV SC3

	抗性		带型		抗性 & 带型	
	Resistance		Allele		Resistance & Allele	
	R	S	1	2	R1	S2
数量 Number	158	130	144	144	116	112

R:抗病;S:感病;1:抗病带型;2:感病带型;R1:抗病且带型为 1;S2:感病且带型为 2。
R: Resistant; S: Susceptible; 1: Resistant allele; 2: Susceptible allele; R1: Resistant & Resistant allele; S2: Susceptible & Susceptible allele.

3 讨论

本研究利用我国黄淮海和长江流域流行 SMV 株系 SC3 接种鉴定 288 份 2016—2019 年新育成大豆品种(系),结果表明在 288 份材料中有 158 份材料表现高抗,占 54.86%,说明我国针对 SC3 的抗源较为丰富。但 158 份抗性材料中仍有 42 份抗性材料不符合分子标记 CH0211 的结果,带型明显区别于一般的抗病带型,与其它感病材料带型没有显著差异,说明这 42 份材料所携带的 *Rsc3* 基因可能与其它 116 份材料不同。116 份抗病材料带型与 PI96983 一致,说明大豆品种所携带的对 SC3 株系的抗病基因位点 *Rsc3* 主要分布在大豆 13 号染色体,且可能为同一抗性位点,该位点在中国大豆抗大豆花叶病毒 SC3 株系育种中的运用较为广泛,具有更大的实际意义,这将为大豆 *Rsc3* 的挖掘及抗病机理研究提供线索。

由于不同材料的抗源亲本不同,这会产生不同的遗传方式。故单纯选择单个标记可能会有所不足,那如何选择合适的标记来对大豆材料进行分子标记辅助选择育种将是抗 SMV 育种面临的一大问题。近年来也有很多研究利用分子标记对大豆花

叶病毒抗性基因 *Rsc3* 进行了定位和克隆。王大刚等^[9]利用皖豆 33 × 南农 1138-2 的 F₂群体将皖豆 33 携带的 *Rsc3* 定位在 2 号染色体 BARCSOYSSR_02_0610 和 ZL-52 之间,且该基因与科丰 1 号携带的抗性基因紧密连锁或具有等位性关系,但与齐黄 1 号的抗性基因不等位。Ma 等^[13]对 SC3 抗性遗传与抗病基因进行等位分析,通过配制齐黄 1 号 × 早熟 18、PI96983 × 广吉等抗抗杂交组合,初步证明齐黄 1 号与 PI96983 的抗性基因是等位的或紧密连锁的。Yang 等^[10]利用 PI96983 × 南农 1138-2 进行 *Rsc3* 定位,将其定位到 13 号染色体 BARCSOYSSR_13_1009 和 BARCSOYSSR_13_1136 之间。Che 等^[35]通过全基因组关联分析了 355K 的大豆 SNP 标记数据,鉴定出 24 个与 SC3 抗性显著相关的 SNPs,发现许多位于已知的 SMV 抗性位点 *Rsv1*、*Rsv4* 和 *Rsv5* 的标记,以及 8 号染色体和 20 号染色体上的 5 个全新 SNP 标记都可作为大豆分子标记辅助选择育种新的遗传资源。在本研究中,所用抗病品种如科丰 1 号、齐黄 1 号、皖豆 33 都和 PI96983 带型不同,说明不同大豆材料中 *Rsc3* 的位置确实存在差异,这与前人结论一致。因此,要提高鉴定符合率,需要将不同品种抗性位点所连锁的标记组合使用^[36-38]。

本研究中,分子标记 CH0211 抗性符合率较高,可为大豆抗病育种提供参考,提高苗期选择的效率,节约大量的人力物力。该方法经济效益高,可以应用于大豆育种材料后代的抗病性筛选,可提高育种效率和大豆花叶病毒抗性水平,加快大豆抗病育种进程。

4 结论

本研究以 288 份 2016—2019 年中国新育成的大豆品种(系)为材料,利用人工接种表型鉴定、血清学鉴定和分子标记鉴定相结合的方法,开发了可用于鉴定大豆品系对我国黄淮海和长江流域优势大豆花叶病毒株系 SC3 抗性的分子标记 CH0211,其抗病选择符合率达到 80.56%,感病选择符合率达到 77.78%。因此,该标记可用于大豆抗 SMV SC3 株系的分子标记辅助选择,初步明确我国大豆品种对 SC3 株系的抗病基因多位于 13 号染色体,且可能为同一抗性位点。

参考文献

[1] 王娟,刘森,王志坤,等. 大豆抗病、虫转基因研究进展[J]. 大豆科学,2011,30(5):865-868,873. (Wang J, Liu M, Wang Z K, et al. Advances in transgenic soybean resistant to disease and pest[J]. Soybean Science, 2011, 30(5): 865-868, 873.)

- [2] 王连铮, 王金陵. 大豆遗传育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1992. (Wang L Z, Wang J L. Soybean genetic breeding[M]. Beijing: Science Press, 1992.)
- [3] 王修强, 盖钧镒, 濮祖芹, 等. 黄淮和长江中下游地区大豆花叶病毒株系鉴定与分布[J]. 大豆科学, 2003, 22(2): 102-107. (Wang X Q, Gai J Y, Pu Z Q, et al. Classification and distribution of strain groups of soybean mosaic virus in middle and lower HuangHuai and Changjiang valleys[J]. Soybean Science, 2003, 22(2): 102-107.)
- [4] 王延伟, 智海剑, 郭东全, 等. 中国北方春大豆区大豆花叶病毒株系的鉴定与分布[J]. 大豆科学, 2005, 24(4): 263-268. (Wang Y W, Zhi H J, Guo D Q, et al. Classification and distribution of strain groups of soybean mosaic virus in northern China spring planting soybean region [J]. Soybean Science, 2005, 24(4): 263-268.)
- [5] Guo D Q, Zhi H J, Wang Y W, et al. Identification and distribution of soybean mosaic virus strains in Middle and Northern Huang Huai Region of China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(2): 64-68.
- [6] 战勇. 黄淮地区大豆花叶病毒的生物学检测、株系鉴定及大豆抗性的遗传与基因定位[D]. 南京: 南京农业大学, 2003. (Zhan Y. Biological detection and strain identification of soybean mosaic virus as well as mapping resistance gene of soybeans in Huang-Huai region [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003.)
- [7] Li K, Yang Q H, Zhi H J, et al. Identification and distribution of soybean mosaic virus strains in southern China[J]. Plant Disease, 2010, 94(3): 351-357.
- [8] 王大刚, 田震, 李凯, 等. 鲁豫皖大豆产区大豆花叶病毒株系的鉴定及动态变化分析[J]. 大豆科学, 2013, 32(6): 806-809. (Wang D G, Tian Z, Li K, et al. Identification and variation analysis of soybean mosaic virus strains in Shandong, Henan and Anhui Provinces of China[J]. Soybean Science, 2013, 32(6): 806-809.)
- [9] 王大刚, 陈圣男, 黄志平, 等. 皖豆 33 对 SMV 株系 SC3 的抗性遗传分析及分子标记定位[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(4): 531-536. (Wang D G, Chen S N, Huang Z P, et al. Inheritance and gene mapping of resistance to soybean mosaic virus strain SC3 in soybean cultivar Wandou 33[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(4): 531-536.)
- [10] Yang Y Q, Zheng G J, Lu H, et al. Genetic analysis and mapping of genes for resistance to multiple strains of soybean mosaic virus in a single resistant soybean accession PI96983[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126: 1783-1791.
- [11] Fu S X, Zhan Y, Zhi H J, et al. Mapping of SMV resistance gene *Rsc-7* by SSR markers in soybean[J]. Genetica, 2006, 128(1-3): 63-69.
- [12] Li H C, Zhi H J, Gai J Y, et al. Inheritance and gene mapping of resistance to soybean mosaic virus strain SC14 in soybean[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(12): 1466-1472.
- [13] Ma Y, Li H C, Wang D G, et al. Molecular mapping and marker assisted selection of soybean mosaic virus resistance gene *RSC12* in soybean[J]. Legume Genomics and Genetics, 2010, 1(8): 41-46.
- [14] Ma Y, Wang D G, Li H C, et al. Fine mapping of the *RSC14Q* locus for resistance to soybean mosaic virus in soybean[J]. Euphytica, 2011, 181(1): 127-135.
- [15] Wang D G, Ma Y, Yang Y Q, et al. Fine mapping and analyses of *RSC8* resistance candidate genes to soybean mosaic virus in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(3): 555-565.
- [16] Ren R, Liu S C, Adhimoolam K, et al. Fine-mapping and identification of a novel locus *Rsc15* underlying soybean resistance to soybean mosaic virus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2017, 130(11): 2395-2410.
- [17] Adhimoolam K, Li K, Li C, et al. Fine-mapping and identifying candidate genes conferring resistance to soybean mosaic virus strain SC20 in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131(2): 461-476.
- [18] 夏兰芹, 郭三堆, 蒋尤泉. 分子标记技术及其在苜蓿遗传育种研究中的作用[J]. 中国草地, 2000(3): 66-69. (Xia L Q, Guo S D, Jiang Y Q. Molecular marking technique and its application to alfalfa genetics and breeding[J]. Grassland of China, 2000(3): 66-69.)
- [19] 王才林, 张亚东, 朱镇, 等. 通过分子标记辅助选择培育优良食味水稻新品种南粳 46[J]. 分子植物育种, 2009, 7(6): 1070-1076. (Wang C L, Zhang Y D, Zhu Z, et al. Development of a new japonica rice variety Nanjing 46 with good eating quality by marker assisted selection[J]. Molecular Plant Breeding, 2009, 7(6): 1070-1076.)
- [20] 王岩, 付新民, 高冠军, 等. 分子标记辅助选择改良优质水稻恢复系明恢 63 的稻米品质[J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 661-665. (Wang Y, Fu X M, Gao G J, et al. Improving the grain quality of Minghui 63, a restorer line of rice, with good quality through marker-assisted selection[J]. Molecular Plant Breeding, 2009, 7(4): 661-665.)
- [21] 沈雨民, 陈明亮, 熊焕金, 等. 优质抗稻瘟病水稻三系不育系“赣莲 A”的选育[J]. 分子植物育种, 2018, 16(3): 924-930. (Shen Y M, Chen M L, Xiong H J, et al. Breeding of CMS line "Ganlian A" with good quality and blast resistance in rice[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(3): 924-930.)
- [22] 张海平, 王志, 李原萍, 等. 灰皮支黑豆抗大豆胞囊线虫 4 号生理小种的生化机制研究[J]. 大豆科学, 2012, 31(5): 796-800. (Zhang H P, Wang Z, Li Y P, et al. Biochemical mechanism of Huipizhi Heidou resistant to race 4 of soybean cyst nematode[J]. Soybean Science, 2012, 31(5): 796-800.)
- [23] 滕卫丽, 李文滨, 韩英鹏, 等. 大豆种质对 SMV 抗性鉴定的 SSR 辅助选择[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(2): 224-228. (Teng W L, Li W B, Han Y P, et al. Identification of the SMV resistance assessment and assisted selection SSR markers in soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(2): 224-228.)
- [24] 滕卫丽, 李文滨, 韩英鹏, 等. 大豆 SMV3 号株系抗病基因的 SSR 标记[J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 244-249. (Teng W L, Li W B, Han Y P, et al. SSR markers of disease resistance genes in soybean SMV3 strain [J]. Soybean Science, 2006, 25(3): 244-249.)
- [25] 滕卫丽. 大豆抗花叶病遗传、细胞超微结构分析及基因定位[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006. (Teng W L. Inheritance of resistance to SMV, cellular ultrastructure analysis and resistance

gene mapping soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006.)

[26] 韩英鹏, 程章, 赵雪, 等. 大豆花叶病毒病和疫霉根腐病抗性的 SSR 标记辅助鉴定[J]. 大豆科学, 2013, 32(6):740-743. (Han Y P, Cheng Z, Zhao X, et al. SSR Identification of soybean line with resistance to both soybean mosaic virus and phytophthra root rot[J]. Soybean Science, 2013, 32(6):740-743.)

[27] 李文福, 朱晓双, 王晓锋, 等. 大豆种质对 SMV 成株和种粒斑驳抗性的 SSR 标记辅助鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(2): 239-243. (Li W F, Zhu X S, Wang X F, et al. Identification of the SMV adult-plant and seed coat mottling resistance in soybean germplasms using SSR markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(2):239-243.)

[28] 栾晓燕, 李宗飞, 满为群, 等. 与大豆 SMV3 号株系抗性相关的分子标记的鉴定[J]. 分子植物育种, 2006(6):841-845. (Luan X Y, Li Z F, Man W Q , et al. Identification of molecular markers linked to resistance for SMV3 in soybean[J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(6):841-845.)

[29] 李扬眉. 我国抗大豆花叶病毒 SC3 相关 QTL 的分子标记研究进展[J]. 大豆科技, 2016(3):21-24. (Li Y M. Research progress on QTLs relevant to soybean mosaic virus strain SC3[J]. Soybean Science & Technology, 2016.)

[30] Ma Y. Molecular mapping and marker assisted selection of soybean mosaic virus resistance gene RSC12 in soybean [J]. Legume Genomics and Genetics, 2010, 1(8): 1-6.

[31] 王传之, 李志, 王敏, 等. 利用 MAS 进行大豆花叶病毒 SC7 抗性鉴定及分子育种初探[J]. 大豆科技, 2019(5):10-14. (Wang C Z, Li Z, Wang M, et al. Preliminary study on resistance identification and molecular breeding to soybean mosaic virus SC7 by MAS[J]. Soybean Science & Technology, 2019 (5):10-14.)

[32] 王大刚, 陈圣男, 黄志平, 等. 193 份大豆品系对 SMV 抗性鉴定与分子标记检测[J]. 分子植物育种, 2019, 17(24): 8138-8151. (Wang D G, Chen S N, Huang Z P, et al. Identification and molecular detection of soybean mosaic virus resistance of 193 soybean lines [J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(24): 8138-8151.)

[33] Gao L, Ding X N, Li K, et al. Characterization of soybean mosaic virus resistance derived from inverted repeat-SMV-*HC-Pro* genes in multiple soybean cultivars[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 128(8):1489-1505.

[34] 李凯, 夏迎春, 王大刚, 等. 黑龙江省大豆花叶病毒(SMV)株系的动态变化分析[J]. 大豆科学, 2014, 33(6): 880-884. (Li K, Xia Y C, Wang D G, et al. Analysis of dynamic change of soybean mosaic virus strains in Heilongjiang Province of China [J]. Soybean Science, 2014, 33(6):880-884.)

[35] Che Z J, Yan H L, Liu H L, et al. Genome-wide association study for soybean mosaic virus SC3 resistance in soybean [J]. Molecular Breeding, 2020, 40(7): 459-479.

[36] Liu S M, Kandoth P K, Warren S D E, et al. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens[J]. Nature, 2012, 492(7428): 256-260.

[37] Cregan P B, Mudge J, Fickus E W, et al. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus[J]. Theoretical & Applied Genetics, 1999, 99: 811-818.

[38] 王文辉, 邱丽娟, 常汝镇, 等. 中国大豆种质抗 SCN 基因 *rhg1* 位点 SSR 标记等位变异特点分析[J]. 大豆科学, 2003, 22(4): 246-250. (Wang W H, Qiu L J, Chang R Z, et al. Characteristics of alleles at Satt309 locus associated with *rhg1* gene resistant to SCN of chinese soybean germplasm [J]. Soybean Science, 2003, 22(4): 246-250.)

协 办 单 位

中国作物学会大豆专业委员会
黑龙江省农业科学院大豆研究所
东北农业大学大豆研究所
吉林省农业科学院大豆研究所
南京农业大学大豆研究所
辽宁省农业科学院作物研究所
河北省农林科学院粮油作物研究所