大豆的孢囊线虫抗性研究新进展

刘世名^{①②}, 彭德良^①

① 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193;

② 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128

E-mail: smliuhn@yahoo.com

收稿日期: 2016-02-05; 接受日期: 2016-04-20; 网络版发表日期: 2016-05-25

中国农业科学院“青年英才计划”和中国农业科学院植物保护研究所所长基金(批准号: 1610142015004)资助

摘要 大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe, soybean cyst nematode, SCN)病害是大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)生产上危害最严重的病害, 每年造成巨大的经济损失. 种植抗性大豆品种是防治 SCN 最经济、有效且对环境友好的措施. 大豆对 SCN 的抗性受多基因位点控制. 近年来, 大豆的 SCN 抗性基因研究取得了突破性进展, 几乎同时鉴定出了大豆的 2 个主要 SCN 抗性位点基因 *rhg1* 和 *Rhg4*, 并揭示了 2 种完全不同的植物抗病机制. *rhg1* 采取的是一种由一段约 31 kb 长的基因组序列上的 3 个基因共同控制的多拷贝抗病机制, 而 *Rhg4* 采取的是一种由丝氨酸羟甲基转移酶控制、可能由一碳代谢参与的抗病新机制. 本文就近年来(2003 年 7 月以来)在大豆的抗 SCN 位点的鉴定及新抗性种质资源挖掘、*rhg1* 和 *Rhg4* 基因克隆与功能鉴定以及特异性分子标记开发与对 SCN 抗性的大豆资源品种的高通量筛选等研究方面取得的一些最新进展进行综述.

关键词 大豆, 大豆孢囊线虫, 抗性位点基因, *rhg1*, *Rhg4*, 抗性种质资源, 分子标记, 高通量筛选

大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)是一种重要的粮食作物, 约提供人类膳食 69%的蛋白质和 30%的食用油, 除用于食品、食用油、饲料、微生物工业发酵等生产外, 近年来大豆用于生物燃油生产也得到了广泛关注. 大豆生长发育过程中受寄生线虫的危害严重, 主要的大豆线虫有 3 类, 大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines*; soybean cyst nematode, SCN)、根结线虫(*Meloidogyne* spp.; root knot nematode, RKN)及肾形线虫(*Rotylenchulus reniformis*; reniform nematode, RN). 其中, SCN 危害最严重, 可引起大豆产量平均下降约 10%~30%, 严重时达 60%~70%, 甚

至颗粒无收, 每年造成全世界大豆生产约 30 亿美元的损失. SCN 在中国分布广, 时有大面积发生, 危害严重. 防治 SCN 的措施主要包括种植抗 SCN 的大豆品种、轮作及使用化学农药等, 目前生物防治逐步受到关注, 其中, 种植抗 SCN 的大豆品种是最经济、有效且对环境友好的防治措施.

SCN 有不同的生理小种, 已鉴定出 16 种, 发生危害大豆最严重的主要是 3 和 4 号生理小种^[1]. SCN 以孵化的 2 龄幼虫(J2)侵染大豆根, 刺穿大豆根部细胞进入到维管束附近, 在取食位点附近的多个寄主细胞融合形成特异的、代谢非常活跃的合胞体

引用格式: 刘世名, 彭德良. 大豆的孢囊线虫抗性研究新进展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 535-547

Liu S M, Peng D L. Recent progresses on soybean resistance to soybean cyst nematode. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 535-547, doi: 10.1360/N052016-00162

(syncytia)以提供 SCN 生长发育所需营养与环境. 大豆与 SCN 之间的相互作用主要表现有 2 大类型: 一类是抗性大豆与 SCN 间的非亲和性相互作用(incompatible interaction), SCN 在寄主大豆上的生长发育受到抑制, 抑或在不同生育阶段死亡, 不能完成生活周期, 对大豆的正常生长发育影响较小或不影响; 另一类是易感大豆与 SCN 间的亲和性相互作用(compatible interaction), SCN 能在寄主大豆上完成其生活周期, 引起寄主大豆致病, 影响大豆的生长发育. 其中, 非亲和性相互作用又分 Peking 型和 PI 88788 型大豆与 SCN 相互作用 2 类. SCN 侵染大豆根时, Peking 型抗性大豆作出快速、强烈的防御反应, SCN 一般在 J2 阶段就死亡; PI 88788 型抗性大豆则表现出另外一种慢性但持久的防御反应, SCN 一般要发育到 J3, J4 阶段才死亡^[2]. SCN 在与大豆的互作过程中分泌多种蛋白效应子(effectors), 使多个细胞融合形成合胞体, 并引起合胞体细胞在不同水平上发生很大变化. 迄今, 已从线虫体内鉴定到一系列蛋白效应子^[3~10]. 但是, 大豆与 SCN 的相互作用机制还很不清楚.

在大豆对 SCN 的抗性研究方面, (i) 自从 20 世纪 60 年代鉴定出第一个抗 SCN 位点基因 *Rhg*(resistance to *Heterodera glycines*)以来, 利用不同抗性大豆及不同 SCN 生理小种不断鉴定出新的数量性状位点(quantitative trait loci, QTL). 至今, 已在大豆 20 条染色体的 19 条染色体(第 2 条染色体(LG D1b)除外)上定位、鉴定了 160 多个抗 SCN 的 QTL^[11](<http://www.soybase.org>), 其中, 很多 QTL 没有得到重复验证, 不同实验条件下定位、鉴定的结果甚至不一致. (ii) 克隆、功能鉴定了 2 个主要的大豆 SCN 抗性基因 *rhg1* 和 *Rhg4*, 并揭示出了新的植物抗病机制^[12,13], 取得了突破性进展. (iii) 在鉴定的 SCN 抗性基因基础上开发了特异的分子标记, 用于准确、高通量、高效筛选与鉴定大豆抗性资源和品种, 并可用于分子育种^[14]. (iv) 研究了 SCN 侵染前后大豆在基因转录、蛋白质及 DNA 甲基化水平上的应答反应. 利用激光捕获切割(laser capture microdissection)方法分离出合胞体细胞, 用 Affymetrix Soybean GeneChip 对合胞体细胞进行全基因组水平上基因表达 Microarray 分析, 较详细地分析了 SCN 侵染后大豆的基因转录水平和蛋白质水平变化. 无论是在基因转录水平还是蛋白质水平上, 大豆被 SCN 侵染前后及抗性与易感品种间都存在显著差异. 不同类型抗性

大豆(Peking 型与 PI 88788 型)对 SCN 的反应也不一样, 一系列与抗病、细胞壁合成、蛋白质降解、激素(如乙烯、水杨酸)信号转导、苯丙氨酸代谢途径及转录调控因子等关联的基因被诱导表达或表达水平显著升高或降低. 最近有报道表明, 许多基因启动子序列中富含 GC 的元件似乎也参与大豆与 SCN 相互作用的调控, 同时, 许多与系统获得性抗性(systemic acquired resistance)关联的代谢途径发生了显著变化^[2,15~22]. 另外, Rambani 等人^[23]分析 SCN 侵染易感大豆 Williams 82 后的大豆 DNA 甲基化组(methylome), 共从合胞体中鉴定到 278 个与表观遗传学调控、植物激素信号、细胞壁结构、信号转导及泛素化等有关的特异甲基化基因. DNA 甲基化是 SCN 侵染大豆根形成合胞体的基因表达调控的一个重要部分. 从 RNA Microarray 分析的结果中挑选了很多 SCN 抗性候选基因, 或将它们转化到易感品种中, 或对抗性品种的这些基因进行沉默(如 VIGS(virus induced gene silencing)), 许多表达酶或蛋白(如水杨酸甲基转移酶(salicylic acid methyltransferase), 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase), 查耳酮合酶(chalcone synthase), 热激蛋白(heat shock proteins, HSPs), 抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase), β -1,4-糖苷酶(β -1,4-glucanase), 短链脱氢酶(short chain dehydrogenase), 脂肪酶(lipase), DREPP 膜蛋白(DREPP membrane protein)及钙调素(calmodulin))的基因在易感品种中过量表达后, 转化株的 SCN 抗性显著增强, 或在抗性品种中基因沉默后, 对 SCN 的抗性明显降低^[24~29]; 另外, 将一些已知的、与抗病关联的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因, 如 *AtPAD4*, *AtNPR1*, *AtTAG2* 及 *AtPR-5*, 转化到易感大豆中也可提高大豆对 SCN 的抗性^[30,31].

本文主要对近年来(2003 年 7 月以来)大豆的 SCN 抗性研究在 QTL 定位与鉴定及抗性种质资源挖掘、*rhg1* 和 *Rhg4* 基因的克隆与功能鉴定以及特异性分子标记开发与 SCN 抗性资源/品种的高通量筛选等方面所取得的最新进展作一综述.

1 大豆抗 SCN QTL 的定位与鉴定及抗性种质资源挖掘

由于大豆对 SCN 的抗性受多基因控制, 是 QTL; 且 SCN 分多个生理小种, 每个生理小种的致病性存

在很大差异; 加上 SCN 很容易克服寄主大豆的抗性, 导致大豆的 SCN 抗性非常复杂. Concibido 等人^[11]总结了 2003 年 7 月以前大豆抗 SCN QTL 的定位与鉴定概况. 当时 QTL *rhg1*(*cqSCN-001*)和 *Rhg4*(*cqSCN-002*), 尤其 *rhg1*, 就已在多个大豆寄主上被多次重复鉴定, 是公认的 2 个主要的大豆抗 SCN 的 QTL; 而且这 2 个 QTL 上的 2 个 *LRR-RLK*(*Xa21*-like receptor kinase)直到完成功能鉴定^[32,33]之前, 一直都被默认为各自 QTL 上的 SCN 抗性基因. 迄今, QTL 的定位与鉴定主要还是以抗性资源/品种与易感品种杂交组合及其衍生的 RILs 和 NILs 为遗传材料, 用分子标记建立遗传图谱(genetic map)来完成. 目前部分用关联图谱(association mapping)或 GWAS(genome-wide association study)等分析较多资源品种定位、鉴定 SCN QTL^[34,35], 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分子标记密度高, 关联度与准确性更高. 现就 2003 年以来大豆抗 SCN 的 QTL 鉴定及抗性资源挖掘等方面的进展概述如下.

(1) 鉴定或精细定位了一些新的和重要的 SCN 抗性位点(表 1), 如 *cqSCN-003*^[34,37-39]及第 10 条染色体上的新抗性位点^[35,47]. 从 SCN 抗性大豆品种 Bell(PI88788 型)与易感品种 Colfax 杂交组合衍生的 F₄代及其 NILs 鉴定并验证了一个位于第 16 条染色体上的新 QTL *cqSCN-003*, 它对 Bell 的 SCN 抗性同样起着重要的作用^[37]. 利用 92 个 Flyer×Hartwig 杂交组合 F₅代 RILs 及其 NILs, 用 114 个分子标记建立遗传图谱, 鉴定了一个新的 Hartwig QTL(*cqSCN-005*), 位于第 17 条染色体上的分子标记 Satt574 区域, 对 SCN 2 号生理小种表现抗性^[38]. Kim 和 Diers^[39]精细定位了来源于野生大豆 PI 468916 的 2 个抗 SCN QTL: *cqSCN-006*和 *cqSCN-007*, 它们分别被定位在第 15 条染色体上的一段 803.4 kb 区域和第 18 条染色体上的一段 146.5 kb 区域, 第 18 条染色体上的 *cqSCN-007*不同于 *rhg1*, 二者相隔 61 cM. 这 2 个 QTL 可分别解释 23%及 27%的 SCN 抗性^[51]. 这 2 个 QTL 首先是用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)分子标记分别被定位在一段 13.2 cM 和一段 18.5 cM 的区域^[52], 而且来自 PI 468916 抗性的 *cqSCN-006*和 *cqSCN-007*可以与 PI 437654 的 *rhg1*和 *Rhg4*及 PI 88788 的 *rhg1-b*叠加提高大豆的 SCN 抗性^[40]. Vuong 等人^[47]用 927 个简单序

列重复(simple sequence repeat, SSR)和 SNP 分子标记构建遗传图谱, 从 250 个 Magellan (易感)×PI 567516C (抗性)杂交组合衍生的 F₂代及其 250 个 F₇代 RILs 鉴定了 2 个新的抗 SCN QTL, 分别位于第 10 及 18 条染色体上. 这 2 个 QTL 都对 SCN1, 3, 5 及 14 号生理小种及 LY1 表现高抗性, 其中, 第 10 条染色体上的 QTL 位于分子标记 Sat_038 至 Satt592 区间, 而第 18 条染色体上的 QTL 位于分子标记 Satt191 至 Satt612 区间, 不同于该条染色体上的 *rhg1*. 最近, 这个第 10 条染色体上的 QTL 用 553 个 PIs(plant introductions)通过 GWAS 鉴定与 SCN 抗性关联的 SNPs 得到了验证^[35]. Bao 等人^[34]将关联遗传图谱和基因组选择(genomic selection)应用于大豆的 SCN 抗性研究. 他们用含 1536 个 SNPs 的 Illumina GoldenGate Gene Chip 测定了 282 个有代表性的资源品种的基因型, 建立的关联遗传图谱检测到了 2 个主要 QTL(均在第 18 条染色体上): *rhg1*和新的 *FGAM1*, 基因组选择的正确率达 0.59~0.67, 表明关联遗传图谱是一种有效的鉴定性状位点基因的基因组学研究工具, 同时, 关联遗传图谱和基因组选择可提高 SCN 抗性育种效率.

(2) 对 *rhg1* 位点进行了进一步的遗传学与基因组学等分析. Brucker 等人^[41]根据分别来自 PI 437654(Peking 型)和 Bell(PI 88788 型)的 *rhg1*对 SCN 产生不同反应将 *rhg1*分为 2 种类型, 分别为 *rhg1-a*和 *rhg1-b*(表 1). Kim 等人^[46]利用 4 个不同的 RILs 群体筛选重组体将 *rhg1-b*的抗性区域精细定位在一段 67 kb 长的序列上(表 1), 奠定了鉴定 *rhg1-b*基因^[12]的遗传基础. Ruben 等人^[53]利用 9 个分子标记分析 4 个 NILs 群体的重组发生事件, 对位于第 18 条染色体上的抗性位点 *rhg1-a*进行了基因组学分析. 他们利用 Peking 型抗性大豆 Forrest BAC 文库构建了 *rhg1-a*位点的物理图谱, 并克隆出了这个位点的一个抗 SCN 3 号生理小种的候选基因 *LRR-RLK*, 该基因含 2 个外显子, 1 个内含子, cDNA 长 2568 bp. 将这个 Peking 型 *rhg1-a* *LRR-RLK*的完整基因转化进 SCN 易感大豆, 可显著提高大豆的 SCN 抗性^[54]. 这个 *LRR-RLK*基因与在它附近的其他 2 个基因(分别表达漆酶(laccase)及 H⁺-Na⁺转运蛋白(hydrogen sodium ion antiporter))总是连锁, 之间不会发生任何重组事件^[55], 预测它们可能参与调控这个位点对其他 SCN

生理小种的抗性.

(3) 对一些优良抗性资源及栽培品种的 SCN 生理小种特异性抗性位点进行了定位(表 1). Guo 等人^[42]利用 Hamilton×PI 90763 杂交 F₂ 代群体鉴定了 6

表 1 已鉴定和/或验证的部分大豆 SCN 抗性 QTL 及挖掘的大豆 SCN 抗性新资源

大豆抗性资源	遗传材料	QTL 所在染色体	生理小种抗性	参考文献
Forrest	Forrest×Essex	18(<i>cqSCN-001</i> , <i>rhg1</i>)	3	[36]
Forrest	Forrest×Essex	8(<i>cqSCN-002</i> , <i>Rhg4</i>)	3	[36]
Bell	Colfax×Bell	16(<i>cqSCN-003</i>)	3, 14	[37]
Hartwig	Flyer×Hartwig	17(<i>cqSCN-005</i>)	2	[38]
PI 468916	LD00-2817P×LDX01-1-65	15(<i>cqSCN-006</i>) 18(<i>cqSCN-007</i>)	5	[39,40]
PI 437654	Bell×PI 437654	<i>rhg1-a</i>	3, TN14	[41]
Bell		<i>rhg1-b</i>		
PI 97603	Hamilton×PI 97603	8	3	[42]
		11	2, 5	
		15	5	
		16	2, 3	
		18	2, 3, 5	
		19	3	
PI 404198A	Magellan×PI 404198A	3	5	[43]
		8	1	
		11	2, 5	
		18	1, 2, 5	
PI 464925B	S08-80×PI 464925B	9	Chatham	[44]
		10	Ruthven	
		20		
PI 437654	Essex×PI 437654	8	1, 3	[45]
		11	1, 3, 5	
		18	1, 2, 3, 5	
		20	3, 5, 14	
		1	2, 3	
		4	3	
		9	1	
		12	1	
	LD02-5320×99805	<i>rhg1-b</i>	3	[46]
	LD02-5025×LG03-1672			
	LD02-5025×LG00-3372			
	IA3023×LD01-7323			
PI 567516C	Magellan×PI 567516C	10	1, 3, 5, 14, LY1	[35,47]
		18	1, 3, 5, 14, LY1	
L-10	Hengrong 37×L-10	15(Qscn3-1)	3	[48]
		18(Qscn3-2)		
		16(Qscn3-3)		
		10(Qscn14-1)	14	
		10(Qscn14-2)		
		17(Qscn14-3)		
		16(Qscn14-4)		
PI 437655	Williams 82×PI 437655	18	2, 3, 14	[49]
		20	14, LY2	
		18(<i>FGAM1</i>)	3	[34]
PI 512322D	PI 512322D		2, 3	[50]
PI 522186	PI 522186			
PI 567488B	PI 567488B			

个 PI 90763 QTL, 分别位于第 8(*Rhg4*), 11, 15, 16, 18(*rhg1*)及 19 条染色体上. 其中, 第 18 条染色体上的 QTL 对 SCN 2, 3 及 5 号生理小种的抗性, 第 8 及 19 条染色体上的 QTL 对 3 号生理小种的抗性, 第 11 条染色体上的 QTL 对 2 及 5 号生理小种的抗性, 第 15 条染色体上的 QTL 对 5 号生理小种的抗性, 以及第 16 条染色体上的 QTL 对 2 及 3 号生理小种的抗性关联. 利用 RILs 鉴定了野生大豆 PI 464925B 的 3 个 QTL, 分别位于第 9, 10 及 20 条染色体上^[44]. Wu 等人^[45]用 276 个 SSR 与 AFLP 分子标记建立遗传图谱, 用 205 个 Essex(易感)×PI 437654 杂交组合的 F₇ 代 RILs 为材料鉴定了 PI 437654 的 SCN QTL, 确证了位于第 8(*Rhg4*), 11 及 18(*rhg1*)条染色体上的 QTL, 分别对 SCN 1 和 3 号生理小种, 1, 3, 5 号生理小种, 及 1, 2, 3 和 5 号生理小种表现抗性; 同时, 鉴定了一个新的 QTL, 位于第 20 条染色体上分子标记 Sat_299 至 Sat_189 区间, 对 SCN3, 5 及 14 号生理小种表现抗性; 此外, 还鉴定了 4 个作用小的 QTL, 分别位于第 1, 4, 9 及 12 条染色体上. Chang 等人^[48]对一个 Hengnong 37×L-10 RILs 群体连续 2 年进行了基因型与表型测定, 鉴定了 L-10 上的 7 个抗 SCN QTL, 其中 3 个 QTL 抗 SCN 3 号生理小种, 分别位于第 15, 18 及 16 染色体上(Qscn3-1, Qscn3-2 与 Qscn3-3), 4 个 QTL 抗 14 号生理小种, 分别位于第 10, 17 及 16 染色体上(Qscn14-1, Qscn14-2, Qscn14-3 与 Qscn14-4). 并从 Qscn3-3 鉴定了一个候选基因 Glyma16g30760.1, 在抗性品种 L-10 中能检测到较高水平的转录子, 而在易感品种 Hengrong 37 中检测不到转录子.

(4) 挖掘了一批优良的广谱抗性新资源, 并对其的一些资源的 SCN 生理小种特异性抗性位点进行了定位(表 1). Guo 等人^[43]鉴定了广谱抗性新资源 PI 404198A 的 4 个 QTL, 分别位于第 3, 8(*Rhg4*), 11 及 18(*rhg1*)条染色体上, 其中第 18 条染色体上的 QTL 对 SCN 1, 2 及 5 号生理小种, 第 8 条染色体上的 QTL 对 1 号生理小种, 第 11 条染色体上的 QTL 对 2 及 5 号生理小种, 第 3 条染色体上的 QTL 对 5 号生理小种的 SCN 抗性关联. Jiao 等人^[49]从 850 个大豆 PIs 中筛选到了一个比 PI 88788 的 SCN 抗性更加广谱的 PI 437655, 并且 PI 437655 还中抗 SCN LY2(迄今报道的唯一一个对 LY2 表现抗性的 PI), 是一种非常优良的广谱抗性资源. 随后开发了 2 个 RILs 群体(Williams 82×PI 437655 及 Hutcheson×PI 437655), 并利用含

1536 个 SNPs 的 Illumina Golden Gate Gene Chip 构建了这 2 个群体 RILs 的遗传图谱, 鉴定到 2 个共同的 QTL: 一个位于第 18 条染色体上的 QTL(*rhg1*), 对 SCN 2 号、3 号及 14 号生理小种和 LY2 都表现抗性, 另一个位于第 20 条染色体上, 但只对 SCN14 号生理小种及 LY2 表现抗性. Arelli 等人^[50]从 100 个新大豆资源中筛选到 67 个资源品种对 SCN 2 号和/或 3 号生理小种具有抗性, 其中 17 个资源品种是黄种皮, 包括 PI 512322D, PI 522186 及 PI 567488B, 这 3 个资源品种既抗 SCN2 号生理小种又抗 SCN3 号生理小种, 是培育抗性大豆栽培品种的理想资源.

另外, 一些 SCN 抗性资源还抗南方根结线虫 SRKN 和/或肾形线虫(RN), 如 PI 437654 和 PI 567516C. 利用 BSR101×PI 437654 的 RILs 鉴定出 PI 437654 含有 3 个抗 RN QTL, 分别位于第 11, 18 和 19 条染色体上, 其中第 11 和 18 条染色体上的 2 个抗 RN QTL 在 Richard×Anand 的 NILs 上得到了验证^[56]. Jiao 等人^[57]利用 Megellan×PI 567516C 的 F₅ 代 NILs 鉴定了 PI 567516C 含有 3 个抗 SRKN QTL, 分别位于第 10, 13 及 17 条染色体上, 且 PI 567516C 也含有之前报道的分别位于第 11 及 18 染色体上的 2 个抗 RN QTL^[56].

2 大豆抗 SCN 位点 *rhg1* 基因的克隆与功能鉴定

抗性位点 *rhg1* 位于大豆的第 18 条染色体上, *rhg1* 可以是隐性、共显性也可以是显性基因. 该位点为绝大多数大豆品种表现 SCN 抗性所必需的, 对大豆 SCN 抗性贡献最大, 有 *rhg1-a*(Peking 型大豆)和 *rhg1-b*(PI 88788 型大豆)2 种, 二者并不完全相同^[41].

利用 4 个分别由 SCN 抗性(PI 88788 型)与易感品种杂交产生的 RILs 将 *rhg1-b* 的抗 SCN 基因精细定位在一段长 67 kb、包含 11 个基因的序列区域^[46]. 经全基因组测序发现该区域一段约 31 kb 的序列在 PI 88788 型大豆 Fayette 中存在多拷贝现象, 并用 Fiber-FISH 的方法证实这段序列在 PI 88788 型抗性大豆及 Peking 型抗性大豆中分别含有 10 个和 3 个拷贝, 而易感大豆 Williams 82 为单拷贝. 这段 31 kb 序列包含 5 个基因, 其中 3 个基因(*Glyma-18g02580*(amino acid transporter), *Glyma18g02590*

(soluble NSF attachment protein, α -SNAP)及 *Glyma18g02610* (wound-induced protein WI12))与 SCN 抗性关联, 当这 3 个基因同时过量表达时, 转基因发状根的 SCN 侵染表型则会发生显著变化。但这 3 个基因中的任何一个基因单独过量表达后均不能引起大豆转基因发状根的 SCN 侵染表型发生显著变化, 表明 *rhg1-b* 是采取的一种多基因序列的多拷贝 SCN 抗性机制, 由 3 个基因共同控制这个位点的 SCN 抗性^[12]。最近, 通过分析 41 个大豆品种, 根据这段 31 kb 序列的拷贝数、基因组转录水平、脱氧核苷酸序列多态性及 DNA 甲基化区域的不同, 可将抗性大豆分成 2 大类: 一类是 PI 88788 型抗性大豆, 包括 PI 88788, 这段 31 kb 序列呈高拷贝数(7~10 个); 另一类为 Peking 型抗性大豆, 包括 Peking 和 PI 437654, 这段 31 kb 序列为低拷贝数(3 个), 这 2 种类型抗性大豆可能起源于同一祖先, 最后分开进化^[58]。而且, 这段 31 kb 序列共含有 4 种截然不同的序列, 有的一个品种的 *rhg1* 位点含有其中的 3 种序列, 如 PI 88788^[12,58,59]。

在 SCN 易感与抗性品种当中, 上述 3 个 *rhg1* 基因中的 *Glyma18g02580* 和 *Glyma18g02610* 编码的蛋白质序列没有差别^[14]。但 α -SNAP 基因特别是其 3' 末端, 表现丰富的脱氧核苷酸序列多态性, 并导致几个氨基酸变化, 且在 PI 88788 型大豆 10 个拷贝中存在 3 种类型^[12,14,58,59]。通过比较表现不同防御反应的 2 种抗性大豆 Peking 和 PI 88788 在 SCN 侵染过程中的基因转录水平, 上述 2 个基因(amino acid transporter 和 α -SNAP)在大豆防御 SCN 反应中特异表达^[20]。比较 SCN 感病品种 Evans 和 SCN 抗性品种 PI 209332(PI 88788 型)杂交群体得到的 2 个近等基因系 NIL-S 和 NIL-R(NIL-S 和 NIL-R 分别对 SCN 3 号生理小种感病和抗性; 且二者在基因组水平上只存在 *rhg1* 位点差异)的基因组转录水平时, 在 NIL-S 和 NIL-R 之间有 1447 个基因的表达水平有差异, 其中 241 个基因, 包括上述氨基酸转运载体(amino acid transporter)和 α -SNAP, 在 SCN 侵染过程中表达水平提高, 与抗逆和防御关联, 说明 *rhg1* 调控着一系列非常复杂的大豆防御 SCN 反应^[18]。Matsye 等人^[21]报道一个比一般 α -SNAP 较短的大豆 α -SNAP 在 Williams 82 中过量表达后能引起大豆 SCN 侵染表型发生显著变化。综上所述, α -SNAP 可能在 *rhg1* 抗 SCN 中起较重要的作用。另外, 以往鉴定出来的抗病基因大多属于 NBS-LRR

大家族, 但有的可能不是完整的 NBS-LRR。例如, 第一个抗孢囊线虫基因 *Hs1^{pro1}* 是从甜菜(*Beta vulgaris*)中克隆出来的, 它编码 282 个氨基酸, 但不是完整 LRR^[60]。位点 *rhg1* 也含有一个 LRR-RLK 基因 (*Glyma18g02680*)^[61,62]。用 amiRNA(artificial micro-RNA)方法基因沉默该基因, 但 SCN 侵染表型并没有显著变化, *rhg1* LRR-RLK 似乎并没有 SCN 抗性功能^[32]。

从 Peking 型大豆 Forrest BAC 文库中筛选到一个 BAC 克隆 B73P06(约 82 kb), 包含 *rhg1-a/Rfs-2* 位点^[55,63], 与易感大豆基因组比较, 该 BAC 克隆含有约 800 个 SNPs, 其中 *rhg1-a* LRR-RLK 的基因组 DNA 与蛋白质序列表现最多的多态性^[54]。将从 BAC B73P06 中亚克隆出的一段长 9.772 kb、包含 *rhg1-a* LRR-RLK 基因的序列转化进大豆 SCN 易感品种 X5 或 Westag97, 转化植株的幼苗根发育受到抑制, 且 SCN 和 SDS(sudden death syndrome)的侵染表型都发生了明显变化, 缺乏 *Rhg4* 时能恢复部分 SCN 抗性(FI 降低 30%~50%); 当存在 *Rhg4* 时, 则能基本完全恢复 SCN 抗性(FI=11%), *rhg1-a* LRR-RLK 似乎就是 *rhg1-a* 基因^[54]。

Melito 等人^[32]研究的是 *rhg1-b*(PI 88788 型), 结果与 Kim 等人^[46]的遗传分析结果相符; 而 Srouf 等人^[54]研究的是 *rhg1-a*(Peking 型), 与上述 2 个报道相矛盾。这些结果表明, *rhg1* 的 SCN 抗性似乎非常复杂, *rhg1-b* 采取的是一种多基因序列的多拷贝抗性机制^[12], *rhg1-a* 是否也采取同样的抗性机制, 或者由 LRR-RLK 控制^[54], 具体有待更深入的研究。

3 大豆 SCN 抗性位点 *Rhg4* 基因的克隆与功能鉴定

Rhg4 是公认的另一个主要大豆 SCN 抗性位点(显性), 位于大豆第 8 条染色体上, 是 Peking 型大豆除 *rhg1* 外的另外一个表现 SCN 抗性的必需位点。*Rhg4* 抗性位点上也含有一个 LRR-RLK 基因 (*Glyma08g11350*)^[33,61,62]。该基因表现很丰富的遗传多样性, 从 104 个中国栽培大豆品种与野生大豆品种中检测到了 59 个 SNPs 和 8 个 InDels, 其中 9 个位于基因蛋白结构域上且引起氨基酸变化^[64]。在未克隆出 *Rhg4* 基因之前, *Rhg4* LRR-RLK 一直被默认为 *Rhg4*

基因.

Liu 等人^[33]开发了一个较大规模的 EMS(ethyl methanesulfonate)化学诱变大豆 SCN 抗性栽培品种 Forrest 的突变群体^[65], 然后高通量筛选 *Rhg4* LRR-RLK 基因的 TILLING(targeting induced local lesions IN genomes)突变体^[33,65,66], 筛选到一株 Nonsense 的 *Rhg4* LRR-RLK 突变体(Q263*, 突变位于第 4 个 LRR 结构域上). 这株 Q263*突变体的 *Rhg4* LRR-RLK 翻译时会提前终止, 不能表达成完整的 *Rhg4* LRR-RLK, 但这株突变体在 *rhg1* 抗性位点仍为野生型 Forrest 基因型. 在这样的遗传背景下, 如果 *Rhg4* LRR-RLK 具备 SCN 抗性功能, 这株 Q263*突变体应该丧失(或至少部分丧失)SCN 抗性. 然而 Q263*突变体 M3 代植株中, 不管是突变纯合子还是杂合子都和野生型一样仍表现 SCN 高抗性, 所以 *Rhg4* LRR-RLK 不是 *Rhg4* 基因.

利用 EcoTILLING 技术从 SCN 易感大豆品种 Essex 与抗性品种 Forrest 杂交产生的 F₂ RILs(ExF, 共 98 个 RILs)中检测到一株 RIL ExF74 的 *Rhg4* LRR-RLK 基因型为 SCN 易感的 Essex 基因型, 但其表型为 SCN 抗性型^[33]. 另一方面, 建立了上述大豆 ExF RILs F₂ 代重组体的发状根基因转化系统, 将一个从 100B10 Forrest BAC 克隆到的含有 *Rhg4* LRR-RLK 完整基因(除基因组 DNA 序列外, 还包含 5 kb 5'-非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)和 2.4 kb 3'-UTR 的亚克隆 11F 转化到重组体 ExF63 (ExF63 的基因型为 *Rhg4*⁻*Rhg4*⁻*rhg1*⁺*rhg1*⁺, 表型为 SCN 易感)的发状根中, 自然表达抗性基因型 Forrest *Rhg4* LRR-RLK, 但遗传互补转化体仍表现和 ExF63 基本一致的 SCN 易感表型^[33]. 所有这些结果从不同层面证实 *Rhg4* LRR-RLK 不具有 SCN 抗性功能.

近年, 建立了一套包括分子遗传学、基因组学、大规模化学诱变群体开发与高通量突变体筛选、基因沉默与遗传互补转化及蛋白质结构模拟等方法整合在一起的研究体系高效定位、克隆与功能鉴定大豆的 *Rhg4* 基因, 取得了重大突破. 本实验室利用 EcoTILLING 分子标记建立了大豆 *Rhg4* 位点的高密度遗传图谱(约 300 kb); 同时, 以 SCN 易感大豆品种 Essex 或 Williams 82 与 SCN 抗性大豆品种 Forrest 杂交开发了 3 个大规模 RILs 群体, 共 3913 株 RILs. 从这些 RILs 中筛选到了 2 株重要的 *Rhg4* 重组体(ExF74

与 FxW5093), 这 2 株重组体都对 SCN 高抗, 且在 *rhg1* 位点都为 SCN 抗性的 Forrest 基因型. 根据它们的高密度遗传图谱与染色体断点分析结果确切地定位了 SCN 抗性区域位于一段由 3 个 DNA 分子标记组成(SHMT, 8K.GA 和 SUB1)、长约 8 kb 的序列上, 这个区域包含 2 个基因: 丝氨酸羟甲基转移酶 *GmSHMT*(serine hydroxymethyltransferase)和 *GmSUB1*. 在 SCN 易感与抗性品种之间, 基因 *GmSUB1* 的启动子序列(1766 bp)完全一致, 尽管基因组 DNA 与 cDNA 序列存在脱氧核苷酸差别, 但并没有引起蛋白质序列发生变化, 说明 *GmSUB1* 与 SCN 抗性无关; 然而, *GmSHMT* 不单在启动子序列存在 3 个脱氧核苷酸差别, 而且基因组 DNA 序列存在 5 个脱氧核苷酸的序列多态性, 2 个发生在外显子序列上导致 2 个氨基酸变化(R130P 及 Y358N). 因此, *GmSHMT* 是 *Rhg4* 位点唯一的 SCN 抗性候选基因^[13].

进一步, 笔者等人对 *GmSHMT* 的 SCN 抗性功能进行了不同层面的鉴定. (i) 较大规模高通量筛选到了 2 株错义突变(missense mutation)的 TILLING 突变体(F6266(E61K)及 F6756(M125I)), 它们的 SCN 侵染表型都发生了较明显的变化, 由高抗变得中感. 其次, 构建的 *GmSHMT* VIGS 及 RNAi 表达质粒分别侵染 RIL ExF67(基因型为 *Rhg4*⁺*Rhg4*⁺*rhg1*⁺*rhg1*⁺, 对 SCN 高抗)的幼苗叶片与发状根后, *GmSHMT* 的表达量显著降低, SCN 侵染表型发生较显著变化, 变得中感; 而且用 Forrest 的 *GmSHMT* 遗传互补 RIL ExF63(基因型为 *Rhg4*⁻*Rhg4*⁻*rhg1*⁺*rhg1*⁺, 对 SCN 易感), 转化株能部分恢复对 SCN 的抗性. (ii) 对 81 个大豆资源/品种的 SCN 侵染表型进行了测定, 分析其中 28 个品种在 *Rhg4* 与 *rhg1* 位点的基因型及 *GmSHMT* 的单体型(Haplotype), 可将大豆 *GmSHMT* 分为 8 个类型的单体型, 其中, Peking 型大豆 *GmSHMT* 的单体型均为 SCN 抗性基因型, 且在 *rhg1* 位点也为 SCN 抗性基因型, 与 Meksem 等人^[36]的遗传分析结果完全一致. 上述研究结果均表明, *GmSHMT* 具有 SCN 抗性功能, 就是 *Rhg4* 基因^[13].

以 SCN 易感型大豆 Essex 的 SHMT 蛋白质结构为模型对 SCN 抗性大豆 Forrest 及 TILLING 突变体(F6266 与 F6756)的 SHMT 进行模拟分析, Forrest 的 2 个序列多态性(P130R 和 N358Y)都处在 THF/MTHF/FTHF 结合位点, 并与 PLP-PLS 和 PLG 位点及 2 个甘

氨酸结合位点中的一个结合位点非常接近, 而 TILLING 突变 E61K 与 PLS 和 THF/MTHF/FTHF 结合位点重叠, 这些氨基酸残基的改变可能直接影响了 GmSHMT 转化丝氨酸和 THF 成甘氨酸和 MTHF 的活性; M125I 突变则发生在蛋白质结构里面的 β -sheet 上, 该突变可能通过影响蛋白结构的稳定性而改变 GmSHMT 的抗 SCN 功能^[13]。另一方面, 在大肠杆菌 GS245(DE3)pLysS 诱导表达后, SCN 易感型大豆 Essex、抗性型大豆 Forrest 及突变体 F6266 或 F6756 的 GmSHMT 酶动力学完全不同, 易感型 GmSHMT 维持在相对高水平活性, 抗性型 GmSHMT 维持在相对较高水平活性, 而突变型的 GmSHMT 活性始终非常低, 不管底物浓度有多高/低; 另一方面, 易感型 GmSHMT 首先随着底物四氢乙酸浓度提高而酶活性提高, 达到顶点后又随四氢乙酸浓度提高而活性下降; 然而, 抗性型 GmSHMT 首先随着底物四氢乙酸浓度提高酶活性迅速提高, 随即达到顶点后一直维持在这样的高活性水平, 并不再随四氢乙酸浓度提高而活性下降或上升, 说明 SCN 易感型和抗性型 GmSHMT 采取不同的机制对侵染的 SCN 产生作用(易感或抗性)^[13]。已有报道 SHMT 突变及乙酸缺乏与人类多种疾病有关^[67~71]。SHMT 是一种在整个生物界普遍存在且保守的酶, 主要转化丝氨酸为甘氨酸, 并提供一碳单位, 在 DNA 合成及细胞甲基化反应等方面起着重要作用。一般而言, 主要抗病基因基本都属于 NBS-LRR 大家族, 而 GmSHMT 并不属于 NBS-LRR 大家族。由此, *Rhg4* 基因 GmSHMT 的鉴定揭示了一种可能由一碳代谢参与的植物抗病新机制^[13]。

4 特异性分子标记开发与高通量、准确筛选和鉴定大豆资源品种的 SCN 抗性

大豆的 SCN 抗性资源/品种的鉴定及分子育种等都需要开发准确性高的特异性分子标记以及高通量的筛选方法。Shi 等人^[14]分析并比较了大豆 SCN 易感品种 Williams 82 与抗性资源 PI88788 和/或 Peking 的 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点上控制 SCN 抗性的 4 个基因 (*Glyma18g02580*, *Glyma18g02590*, *Glyma18g02610* 与 *Glyma08g11490*)^[12,13]的基因组序列, 其中 2 个基因 (*Glyma18g02580* 和 *Glyma18g02610*)的 DNA 序列多态性(各 3 个 SNPs)都发生在内含子、5'-UTR, 3'-UTR

或外显子, 但没有引起氨基酸变化, 而基因 *Glyma18g02590*(α -SNAP)则检测到引起氨基酸变化的 7 个 SNPs/InDels, 其中 5 个在第 6 个外显子、2 个在最后一个(第 9 个)外显子上。基因 *Glyma08g11490* (*GmSHMT*)上可检测到发生在外显子上且引起氨基酸变化的 2 个 SNPs。利用高通量、高效检测基因型的 KASP(kompetitive allele specific PCR)技术, 将这些 SNPs/InDels 应用于 27 个大豆资源/品种上进行 KASP 测试, 开发了 3 个特异的 KASP SNP 分子标记, 分别为 GSM191(*Glyma08g11490* 的第 1 个外显子)、GSM381(*Glyma18g02590* 的第 9 个外显子)及 GSM383(*Glyma18g02590* 的第 6 个外显子), 用这 3 个特异的 SNPs 分子标记测得的基因型与 SoySNP50K Illumina Infinium Bead Chip 的数据结果一致: 在 *rhg1* 位点, Peking 型大豆在很大区域具有 Peking 同样的单体型, 如 Woodruff 可达 3.8 Mbp, Forrest, Gordon 及 Bryan 可达 5.9 Mbp, 而 PI88788 型大豆, 如 G00-3880, Prichard, Bedford, Carver, PI 548316, PI 209332, PI 603372 及 PI 603587A, 有 1.6~4.3 Mbp 的区域与 PI 88788 的单体型一致; 在 *Rhg4* 位点, Forrest 有 2.6 Mbp 长的区域与 Peking 的 Haplotype 一致。进一步对 153 个大豆品种测定, 有 145 个品种用这 3 个特异 SNPs 分子标记检测的基因型与它们对 SCN 的反应匹配, 准确率为 93%。因此, 这 3 个特异的 SNPs 可以非常准确地筛选与鉴定 SCN 抗性资源与品种, 可用于大豆的 SCN 抗性分子育种, 同时, 借助 KASP 技术可实现高通量、高效检测。

5 结论与展望

大豆的 SCN 抗性受多基因控制, 是 QTL, SCN 生理小种的多型性及其不同致病性等使得大豆对 SCN 的抗性非常复杂。近年来, 大豆对 SCN 抗性的研究得到了快速发展, 在新 QTL 鉴定、抗性资源挖掘、抗性基因克隆与功能鉴定及特异性分子标记开发与高通量抗性筛选等方面取得了许多成果。

尽管已鉴定了 2 个主要的大豆抗 SCN 基因 *rhg1* 和 *Rhg4*, 但它们的作用机制完全不同^[12,13]。这 2 个基因各自具体的作用机理目前还不清楚, 在抗 SCN 方面, 二者到底存在一种怎样的关系? 是独立还是相互作用? 如果相互作用, 又是一种怎样的互作模式? 大豆与 SCN 复杂的相互作用过程中, 各种代谢、信

号网络, 尤其, 以 *rhg1* 及 *Rhg4* 为中心的代谢通路与信号转导等的研究, 以及小 RNA(miRNAs 和 siRNAs) 是否在大豆抗孢囊线虫中起重要调控作用^[72], 都是当前迫切需要研究、解决的问题, 都需要大量的基因组学、分子、代谢组学、生物化学、蛋白质组学及表观遗传组学等方面的研究支持, 非常具有挑战性. 另外, 如上所述, 不断鉴定出新的、对大豆的 SCN 抗性同样起到重要作用的 QTL, 以及开发特异性 SNPs 分子标记并应用于大豆抗性资源/品种的筛选与鉴定存在特例^[14], 说明大豆还有其他重要抗 SCN 基因; 目前, 绝大多数栽培品种对 SCN 的抗性仍主要来自 PI 88788(约占 80%)、PI 437654 与 Peking. SCN 在不断的适应过程当中, 很容易克服大豆寄主的单一抗性, 所以需要鉴定出新的 SCN 抗性位点基因, 并阐明其抗性机制, 以应用于新的 SCN 抗性资源与品种选育.

随着 2010 年大豆栽培品种 Williams 82 的基因组公布^[73], 以及新一代测序(next generation sequencing, NGS)技术的快速发展与广泛应用, 大豆的基因组学研究获得了长足的发展. 以往主要以开发 AFLP, 随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD), 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)及 SSR 等分子标记的方法构建遗传图谱以定位、鉴定 SCN 抗性位点, 非常耗时, 成本高, 且准确性低. 近年, 从含 1536 个 SNPs 的 Illumina GoldenGate Gene Chip、SoySNP6K Bead Chip、含超过 50000 个 SNPs 的 SoySNP50K Bead Chip^[35,74]及其他 GWAS 方法如 SLAF-seq(specific locus amplified fragment sequencing)^[75], 到以 NGS 为基础开发的 WGS(whole genome sequencing)等技术鉴定 SNPs, 在全基因组水平上构建遗传图谱, 不仅覆盖面广, 而且分子标记密度越来越高, 大大推动了大豆的 SCN 抗性位点与基因的精准鉴定及抗性资源的鉴定与筛选. 随着 NGS 技术的不断发展, 测序成本越来越低, NGS 技术在大豆的基因组学、表观遗传组学及其对 SCN 抗性研究等方面的应用必然越来越广泛.

大豆 Microarray 基因芯片及 NGS 等的应用已帮助鉴定出了许多在抗性与感病品种之间及 SCN 侵染前后大豆合胞体基因转录水平有显著差异的候选基因, 这些基因对 SCN 的抗性功能需要鉴定. 然而, 大豆研究, 包括其对 SCN 的抗性研究, 面临着一个很重要的问题就是基因功能的鉴定. 大豆基因组约 1.01 Gb 大小, 预测约含 45000 多个基因, 基因组较复杂, 绝大多数基因都是多拷贝的, 同时, 大豆还是难于遗传转化的作物, 导致大豆基因功能的鉴定更加复杂、困难. 目前, 大豆遗传转化鉴定 SCN 抗性基因的功能主要有 2 个转化技术体系, 一个是大豆发状根(hairy roots)转化体系, 该技术体系已日渐成熟, 尤其在能用根做表型鉴定的研究方面得到了较广泛应用, 非常适合大豆对 SCN 抗性基因的功能鉴定, 利用这个体系, 进行 RNAi 基因沉默、过量表达及遗传互补转化分析等已鉴定了不少与大豆的 SCN 抗性关联的基因; 另外一个系统是近年发展的 VIGS 体系, 该技术体系已在 SCN 抗性基因研究方面得到了开发与应用^[13,76~78]. 另外, 大豆的 CRISPR/Cas9 技术体系已有报道^[79~81], 相信很快会在大豆对 SCN 抗性基因的功能鉴定以及抗性育种方面得到应用. 但仍需一个稳定、高效的整株大豆遗传转化系统.

为了克服商业化栽培大豆品种导致 SCN 抗性单一及抗性易丧失的瓶颈, 需要寻找更多新的、SCN 抗性广谱的遗传资源与品种, 以及更直接、有效的鉴定大豆基因功能的技术体系, 开发大规模的大豆突变群体也许可达到目的. 通过化学、物理诱变, 如 EMS 化学诱变, 可快速开发大规模的作物诱变群体, 这些诱变群体是各种各样表型的复合突变群体, 即可用于反向遗传学研究. 借助于 TILLING 及 NGS 技术可实现高通量基因突变体筛选, 对基因的功能进行直接鉴定, 尤其适合难于遗传转化的作物, 如大豆. 大豆已开发出多个较大规模的化学、物理诱变群体, 并已成功应用于大豆对 SCN 的抗性基因的功能鉴定^[13]; 同时, 还可用于正向遗传学研究, 进行突变育种, 直接选育出性状优良的资源与品种.

参考文献

- 1 Niblack T L, Arelli P R, Noel G R, et al. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. *J Nematol*, 2002, 34: 279–288
- 2 Klink V P, Hosseini P, Matsye P, et al. A gene expression analysis of syncytia laser microdissected from the roots of the *Glycine max* (soybean) genotype PI 548402 (Peking) undergoing a resistant reaction after infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode).

- Plant Mol Biol, 2009, 71: 525–567
- 3 Davis E L, Hussey R S, Mitchum M G, et al. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11: 360–366
- 4 Mitchum M G, Wang X, Wang J, et al. Role of nematode peptides and other small molecules in plant parasitism. *Annu Rev Phytopathol*, 2012, 50: 175–195
- 5 Mitchum M G, Hussey R S, Baum T J, et al. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytol*, 2013, 199: 879–894
- 6 Kandoth P K, Mitchum M G. War of the worms: how plants fight underground attacks. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16: 457–463
- 7 Replogle A, Wang J, Paolillo V, et al. Synergistic interaction of CLAVATA1, CLAVATA2, and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 in cyst nematode parasitism of *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2013, 26: 87–96
- 8 Chen S, Lang P, Chronis D, et al. In planta processing and glycosylation of a nematode CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION-like effector and its interaction with a host CLAVATA2-like receptor to promote parasitism. *Plant Physiol*, 2015, 167: 262–272
- 9 Hewezi T, Juvalle P S, Piya S, et al. The cyst nematode effector protein 10A07 targets and recruits host posttranslational machinery to mediate its nuclear trafficking and to promote parasitism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 891–907
- 10 Noon J B, Hewezi T A, Maier T R, et al. Eighteen new candidate effectors of the phytonematode *Heterodera glycines* produced specifically in the secretory esophageal gland cells during parasitism. *Phytopathol*, 2015, 105: 1362–1372
- 11 Concibido V C, Diers B W, Arelli P R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. *Crop Sci*, 2004, 44: 1121–1131
- 12 Cook D E, Lee T G, Guo X, et al. Copy number variation of multiple genes at *Rhg1* mediates nematode resistance in soybean. *Science*, 2012, 338: 1206–1209
- 13 Liu S, Kandoth P K, Warren S D, et al. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature*, 2012, 492: 256–260
- 14 Shi Z, Liu S, Noe J, et al. SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. *BMC Genomics*, 2015, 16: 314
- 15 Klink V P, Overall C C, Alkharouf N W, et al. Laser capture microdissection (LCM) and comparative microarray expression analysis of syncytial cells isolated from incompatible and compatible soybean (*Glycine max*) roots infected by the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Planta*, 2007, 226: 1389–1409
- 16 Klink V P, Overall C C, Alkharouf N W, et al. A time-course comparative microarray analysis of an incompatible and compatible response by *Glycine max* (soybean) to *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode) infection. *Planta*, 2007, 226: 1423–1447
- 17 Afzal A J, Natarajan A, Saini N, et al. The nematode resistance allele at the *rhg1* locus alters the proteome and primary metabolism of soybean roots. *Plant Physiol*, 2009, 151: 1264–1280
- 18 Kandoth P K, Ithal N, Recknor J, et al. The soybean *Rhg1* locus for resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* regulates the expression of a large number of stress- and defense-related genes in degenerating feeding cells. *Plant Physiol*, 2011, 155: 1960–1975
- 19 Klink V P, Hosseini P, Matsye P D, et al. Differences in gene expression amplitude overlie a conserved transcriptomic program occurring between the rapid and potent localized resistant reaction at the syncytium of the *Glycine max* genotype Peking (PI 548402) as compared to the prolonged and potent resistant reaction of PI 88788. *Plant Mol Biol*, 2011, 75: 141–165
- 20 Matsye P D, Kumar R, Hosseini P, et al. Mapping cell fate decisions that occur during soybean defense responses. *Plant Mol Biol*, 2011, 77: 513–528
- 21 Matsye P D, Lawrence G W, Youssef R M, et al. The expression of a naturally occurring, truncated allele of an α -SNAP gene suppresses plant parasitic nematode infection. *Plant Mol Biol*, 2012, 80: 131–155
- 22 Wan J, Vuong T D, Jiao Y, et al. Whole-genome gene expression profiling revealed genes and pathways potentially involved in regulating interactions of soybean with cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). *BMC Genomics*, 2015, 16: 148
- 23 Rambani A, Rice J H, Liu J, et al. The methylome of soybean roots during the compatible interaction with the soybean cyst nematode. *Plant Physiol*, 2015, 168: 1364–1377
- 24 Lin J, Mazarei M, Zhao N, et al. Overexpression of a soybean salicylic acid methyltransferase gene confers resistance to soybean cyst nematode. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11: 1135–1145
- 25 Matthews B F, Beard H, MacDonald M H, et al. Engineered resistance and hypersusceptibility through functional metabolic studies of 100 genes in soybean to its major pathogen, the soybean cyst nematode. *Planta*, 2013, 237: 1337–1357
- 26 Woo M O, Beard H, MacDonald M H, et al. Manipulation of two α -endo- β -1, 4-glucanase genes, *AtCel6* and *GmCel7*, reduces

- susceptibility to *Heterodera glycines* in soybean roots. *Mol Plant Pathol*, 2014, 15: 927–939
- 27 Pant S R, Matsye P D, McNeece B T, et al. Syntaxin 31 functions in *Glycine max* resistance to the plant parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Plant Mol Biol*, 2014, 85: 107–121
 - 28 Pant S R, Krishnavajhala A, McNeece B T, et al. The syntaxin 31-induced gene, LESION SIMULATING DISEASE1 (LSD1), functions in *Glycine max* defense to the root parasite *Heterodera glycines*. *Plant Signal Behav*, 2015, 10: e977737
 - 29 Guo X, Chronis D, De La Torre C M, et al. Enhanced resistance to soybean cyst nematode *Heterodera glycines* in transgenic soybean by silencing putative CLE receptors. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 801–810
 - 30 Youssef R M, MacDonald M H, Brewer E P, et al. Ectopic expression of *AtPAD4* broadens resistance of soybean to soybean cyst and root-knot nematodes. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 67
 - 31 Matthews B F, Beard H, Brewer E, et al. *Arabidopsis* genes, *AtNPRI*, *AtTGA2* and *AtPR-5*, confer partial resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) when overexpressed in transgenic soybean roots. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 96
 - 32 Melito S, Heuberger A L, Cook D, et al. A nematode demographics assay in transgenic roots reveals no significant impacts of the *Rhg1* locus LRR-Kinase on soybean cyst nematode resistance. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 104
 - 33 Liu X, Liu S, Jamai A, et al. Soybean cyst nematode resistance in soybean is independent of the *Rhg4* locus *LRR-RLK* gene. *Funct Integr Genomics*, 2011, 11: 539–549
 - 34 Bao Y, Vuong T, Meinhardt C, et al. Potential of association mapping and genomic selection to explore PI 88788 derived soybean cyst nematode resistance. *Plant Genome*, 2014, 7: 1–13
 - 35 Vuong T D, Sonah H, Meinhardt C G, et al. Genetic architecture of cyst nematode resistance revealed by genome-wide association study in soybean. *BMC Genomics*, 2015, 16: 593
 - 36 Meksem K, Pantazopoulos P, Njiti V N, et al. “Forrest” resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 710–717
 - 37 Glover K D, Wang D, Arelli P R, et al. Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI 88788 on linkage group J. *Crop Sci*, 2004, 44: 936–941
 - 38 Kazi S, Shultz J, Afzal J, et al. Iso-lines and inbred-lines confirmed loci that underlie resistance from cultivar “Hartwig” to three soybean cyst nematode populations. *Theor Appl Genet*, 2010, 120: 633–644
 - 39 Kim M, Diers B W. Fine mapping of the SCN resistance QTL *cqSCN-006* and *cqSCN-007* from *Glycine soja* PI 468916. *Crop Sci*, 2013, 53: 775–785
 - 40 Kim M, Hyten D L, Niblack T L, et al. Stacking resistance alleles from wild and domestic soybean sources improves soybean cyst nematode resistance. *Crop Sci*, 2011, 51: 934–943
 - 41 Brucker E, Carlson S, Wright E, et al. *Rhg1* alleles from soybean PI 437654 and PI 88788 respond differentially to isolates of *Heterodera glycines* in the greenhouse. *Theor Appl Genet*, 2005, 11: 44–49
 - 42 Guo B, Slepser D A, Arelli P R, et al. Identification of QTLs associated with resistance to soybean cyst nematode races 2, 3 and 5 in soybean PI 90763. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 965–971
 - 43 Guo B, Slepser D A, Nguyen H T, et al. Quantitative trait loci underlying resistance to three soybean cyst nematode populations in soybean PI 404198A. *Crop Sci*, 2006, 46: 224–233
 - 44 Winter S M, Shelp B J, Anderson T R, et al. QTL associated with horizontal resistance to soybean cyst nematode in *Glycine soja* PI 464925B. *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 461–472
 - 45 Wu X, Blake S, Slepser D A, et al. QTL, additive and epistatic effects for SCN resistance in PI 437654. *Theor Appl Genet*, 2009, 118: 1093–1105
 - 46 Kim M, Hyten D L, Bent A F, et al. Fine mapping of the SCN resistance locus *rhg1-b* from PI88788. *Plant Genome*, 2010, 3: 81–89
 - 47 Vuong T D, Slepser D A, Shannon J G, et al. Novel quantitative trait loci for broad-based resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) in soybean PI 567516C. *Theor Appl Genet*, 2010, 121: 1253–1266
 - 48 Chang W, Dong L, Wang Z, et al. QTL underlying resistance to two HG types of *Heterodera glycines* found in soybean cultivar “L-10”. *BMC Genomics*, 2011, 12: 233
 - 49 Jiao Y, Vuong T D, Liu Y, et al. Identification and evaluation of quantitative trait loci underlying resistance to multiple HG types of soybean cyst nematode in soybean PI 437655. *Theor Appl Genet*, 2014, 128: 15–23
 - 50 Arelli P R, Mengistu A, Nelson R L, et al. New soybean accessions evaluated for reaction to *Heterodera glycines* populations. *Crop Sci*, 2015, 55: 1236–1242
 - 51 Wang D, Arelli P R, Shoemaker R C, et al. Loci underlying resistance to Race 3 of soybean cyst nematode in *Glycine soja* plant

- introduction 468916. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 561–566
- 52 Kabelka E A, Carlson S R, Diers B W. Localization of two loci that confer resistance to soybean cyst nematode from *Glycine soja* PI 468916. *Crop Sci*, 2005, 45: 2473–2481
- 53 Ruben E, Jamaï A, Afzal J, et al. Genomic analysis of the *rhg1* locus: candidate genes that underlie soybean resistance to the cyst nematode. *Mol Genet Genomics*, 2006, 276: 503–516
- 54 Srour A, Afzal A J, Blahut-Beatty L, et al. The receptor like kinase at *Rhg1-a/Rfs2* caused pleiotropic resistance to sudden death syndrome and soybean cyst nematode as a transgene by altering signaling responses. *BMC Genomics*, 2012, 13: 368
- 55 Afzal A J, Srour A, Saini N, et al. Recombination suppression at the dominant *Rhg1/Rfs2* locus underlying soybean resistance to the cyst nematode. *Theor Appl Genet*, 2012, 124: 1027–1039
- 56 Ha B K, Robbins R T, Han F, et al. SSR mapping and confirmation of soybean QTL from PI 437654 conditioning resistance to reniform nematode. *Crop Sci*, 2007 47: 1336–1343
- 57 Jiao Y, Vuong T D, Liu Y, et al. Identification of quantitative trait loci underlying resistance to southern root-knot and reniform nematodes in soybean accession PI 567516C. *Mol Breed*, 2015, 35: 131
- 58 Lee T G, Kumar I, Diers B W, et al. Evolution and selection of *Rhg1*, a copy-number variant nematode-resistance locus. *Mol Ecol*, 2015, 24: 1774–1791
- 59 Cook D E, Bayless A M, Wang K, et al. Distinct copy number, coding sequence, and locus methylation patterns underlie *Rhg1*-mediated soybean resistance to soybean cyst nematode. *Plant Physiol*, 2014, 165: 630–647
- 60 Cai D, Kleine M, Kifle S, et al. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, 1997, 275: 832–834
- 61 Hauge B M, Wang M L, Parsons J D, et al. Nucleic acid molecules and other molecules associated with soybean cyst nematode resistance. US Patent, 20030005491, 2001
- 62 Lightfoot D A, Meksem K. Isolated polynucleotides and polypeptides relating to loci underlying resistance to soybean cyst nematode and soybean sudden death syndrome and methods employing same. US Patent, 2002144310, 2002
- 63 Afzal A J, Srour A, Goil A, et al. Homo-dimerization and ligand binding by the leucine-rich repeat domain at RHG1/RFS2 underlying resistance to two soybean pathogens. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 43
- 64 Yuan C, Li Y, Liu Z, et al. DNA sequence polymorphism of the *Rhg4* candidate gene conferring resistance to soybean cyst nematode in Chinese domesticated and wild soybeans. *Mol Breed*, 2012, 302: 1155–1162
- 65 Cooper J L, Till B J, Laport R G, et al. TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 9
- 66 Meksem K, Liu S, Liu X, et al. TILLING: a reverse genetics and a functional genomics tool in soybean. In: Kahl G, Meksem K, eds. *The Handbook of Plant Functional Genomics: Concepts and Protocols*. Wiley: Weinheim, 2008. 251–265
- 67 Heil S G, Van der Put N M, Waas E D, et al. Is mutated serine hydroxymethyltransferase (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects? *Mol Genet Metab*, 2001, 73: 164–172
- 68 Skibola C F, Smith M T, Hubbard A, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002, 99: 3786–3791
- 69 Kim Y I. Role of folate in colon cancer development and progression. 2003, *J Nutr*, 133: 3731S–3739S
- 70 Lim U, Peng K, Shane B, et al. Polymorphisms in cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase and methylenetetrahydrofolate reductase affect the risk of cardiovascular disease in men. *J Nutr*, 2005, 135: 1989–9994
- 71 Wernimont S M, Raizadeh F, Stover P J, et al. Polymorphisms in serine hydroxymethyltransferase 1 and methylenetetrahydrofolate reductase interact to increase cardiovascular disease risk in humans. *J Nutr*, 2011, 141: 255–260
- 72 Li X, Wang X, Zhang S, et al. Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. *PLoS One*, 2012, 7: E39650
- 73 Schmutz, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 2010, 462: 178–183
- 74 Song Q, Hyten D L, Jia G, et al. Development and evaluation of SoySNP50K, a high density genotyping array for soybean. *PLoS One*, 2013, 8: e54985
- 75 Han Y, Zhao X, Cao G, et al. Genetic characteristics of soybean resistance to HG type 0 and HG type 1.2.3.5.7 of the cyst nematode analyzed by genome-wide association mapping. *BMC Genomics*, 2015, 16: 598
- 76 Juvalle P S, Hewezi T, Zhang C, et al. Temporal and spatial Bean pod mottle virus-induced gene silencing in soybean. *Mol Plant Pathol*, 2012, 13: 1140–1148
- 77 Kandath P K, Heinz R, Yeckel G, et al. A virus-induced gene silencing method to study soybean cyst nematode parasitism in *Glycine max*. *BMC Res Notes*, 2013, 6: 255
- 78 Liu J, Graham M A, Pedley K F, et al. Gaining insight into soybean defense responses using functional genomics approaches. *Brief Funct*

Genomics, 2015, 14: 283–290

79 Cai Y, Chen L, Liu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. PLoS One, 2015, 10: e0136064

80 Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. BMC Biotech, 2015, 15: 16

81 Sun X, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. Sci Rep, 2015, 5: 10342

Recent Progresses on Soybean Resistance to Soybean Cyst Nematode

LIU ShiMing^{1,2} & PENG DeLiang¹

¹ Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

² College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Soybean cyst nematode (SCN, *Heterodera glycines* Ichinohe) is the most devastating pest in production of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), causing huge losses annually. Cultivation of SCN-resistant soybean is the most economical, effective and environmentally friendly means for controlling SCN. The resistance of soybean to SCN is controlled by multigenes. Recently, some breakthroughs have been made in the study of soybean genes conferring SCN resistance. Almost at the same time, the SCN-resistant genes of the two main QTL, *rhg1* and *Rhg4*, harboring SCN resistance in soybean were cloned and functionally identified, and two completely different mechanisms of plant resistance to pathogens were revealed. The resistance of *rhg1* is mediated by the copy number variation of three genes on one genomic segment (~31 kb), while the resistance of *Rhg4* is controlled by a serine hydroxymethyltransferase with a possible involvement of the one carbon metabolism. This mini review focuses on the identification of soybean QTL controlling SCN resistance and new resistant germplasm sources, cloning and functional identification of *rhg1* and *Rhg4*, development of specific molecular markers, and high throughput screening of soybean genetic germplasm sources and cultivars encompassing the resistance to SCN since July 2003.

soybean, soybean cyst nematode, resistant quantitative trait loci and genes, *rhg1*, *Rhg4*, resistant germplasm sources, molecular markers, high throughput screening

doi: 10.1360/N052016-00162