

# 大豆抗孢囊线虫病鉴定方法研究进展\*

颜清上 王连铮

(中国农业科学院)

ADVENCES IN THE METHODS OF IDENTIFICATION FOR RESISTANCE  
TO HETERODERA GLYCINES IN SOYBEAN

Yan Qingshang Wang Lianzheng

(Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100081)

## 摘 要

大豆抗大豆孢囊线虫病的鉴定标准, 主要根据植株根部着生的孢囊数来决定。因而在鉴定过程中, 充分满足大豆孢囊线虫在寄主植株上最适发育所需要的条件, 是鉴定方法准确、可靠的前提。本文综述了抗病性鉴定期间大豆植株的生长环境、接种物的制备、接种技术及抗病性评价等环节中所采用的各种方法和技术。寄主和寄生物生长条件最佳化, 均匀一致有强感染力的同质接种物的制备方法和简便、快速、定量的接种技术是目前提倡应用的鉴定方法的技术关键。

**关键词** 大豆孢囊线虫; 抗病性; 鉴定方法; 寄主植株的生长环境; 抗病性评价

大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)属异皮科孢囊线虫属, 是引起大豆黄萎病的病原线虫。其特点: 分布广、危害重、寄主范围宽、传播途径多、存活时间久, 是一种极难防治的土传性病害。已有的文献报道大豆孢囊线虫在主要大豆生产国美国、巴西、中国、日本都有大面积发生。目前, 防治该病最经济有效的途径是培育抗病品种, 并已为各国科学家广泛接受和采用。培育抗病品种离不开抗源筛选和杂交后代的抗病性鉴定, 为能客观反映测试材料的抗病性, 线虫学家和育种学家探索并利用了多种鉴定方法。从鉴定程序上

\* 本院植物保护研究所陈品三研究员审阅并修改此文, 谨致谢意。

本文于1994年11月22日收到。 This paper was received on Nov. 22, 1994.

看,抗病性鉴定包括寄主植株的生长环境,接种物的制备,接种技术和抗病性评价等环节。本文综述了抗病性鉴定过程中,每个环节所采用的各种方法和技术。

## 一、大豆植株的生长环境

### 1. 田间种植鉴定

#### 1) 病地双行法

病地种植测试材料进行抗病性鉴定,优点是简便、省事,缺点是不能保证每个测试材料附近土壤线虫密度的均匀一致。为克服这一缺陷,Ross 和 Brim(1957)在进行抗源筛选时,采用了双行法。即在每行测试品系约 6 英寸的地方种植一行感病对照,相邻的高感对照可作为测试品系附近土壤线虫群体的指示,从而消除田间线虫密度不均匀的缺陷。

#### 2) 病圃种植法

在进行大量种质的抗病性筛选和杂交后代抗病性鉴定时多采用此法。我国育种学家在“七·五”期间对 10000 多份大豆种质抗病性初步筛选时就采用了病圃法(大豆种质抗孢囊线虫鉴定研究协作组,1993)。病圃的特点是经多年培植,土壤内孢囊的分布均匀,线虫密度大,能满足大豆孢囊线虫感染的需要。一个好的病圃,线虫密度应大于 40 个孢囊/100g 土。鉴定时将测试材料与感病对照种于病圃,同时种植一套鉴别寄主以监测生理小种。

#### 3) 病土盆栽法

将采自病圃或田间重病地的病土,掺入部分无菌的细砂,经对孢囊的密度检查后,充分混匀,装入瓦盆或塑料盆中。每盆种植 1—2 株测试材料进行抗病性鉴定。优点是便于管理和控制试验条件的一致。可使孢囊分布均匀;假如孢囊量不够,还可添加漂浮出的孢囊,增加其密度。盆栽还易于控制水分,使线虫容易侵入,而且倒盆鉴定不损伤根系,观察根上孢囊量准确可靠(吴和礼等,1984)。鉴定用盆的大小不尽一致,我国多采用直径 15cm 的瓦盆,美国则采用直径 8cm 的塑料盆。武天龙等(1992)研究了瓦盆大小对鉴定材料根系重量和孢囊数的影响。结果表明,在直径 10cm 的小盆中生长的大豆比在直径 13cm 或 20cm 大盆中生长的大豆,单株根系集中,白色孢囊随着根系在盆的边缘明显裸露,抗感表现极易区别,且直观性强,工作量小。

### 2. 可控制光温的温室鉴定

田间种植鉴定,由于光照、温度等生长条件不易人为控制,大大影响了鉴定的准确性和重复性,而且因受季节限制,也影响了鉴定效率。因而,利用可控光温的温室鉴定,不仅能保证鉴定的准确性,还能提高鉴定效率。

#### 1) 病土盆栽法

该法基本与田间盆栽法一致,不同的是将花盆放在温室的工作台架上,以利于光温控制。Anand 等(1984,1988)在进行抗源筛选时,采用这种方法。温室温度为  $26.5 \pm 2^\circ\text{C}$  或  $24 \pm 4^\circ\text{C}$ ,病土中孢囊含量 20—30 个/100g 土。

#### 2) 塑料钵柱法

中国农业科学院植物保护研究所线虫室首创并使用(陈品三,未发表资料)。具体做法是:将重病土拌匀装入  $20 \times 4.5\text{cm}$  的塑料筒中,制成透明的塑料钵柱。测试材料首先在蛭

石中萌发,当子叶露出变绿但还未展开时,连根完整取出,用清水洗净,移栽到制好的钵柱中,每钵 1 苗或 2—3 苗,放置于温室的玻璃钢池中,控制温度在 26℃ 左右。移栽后 30—35 天,在白色搪瓷盘内抽掉封缝大头针,拆开并撤除塑料布,用解剖针剖开土柱,露出完整的根系,检查上面的孢囊数。这种方法比盆栽法更节省空间和成本,管理也更方便、更直观,并且不用倒盆,易保护根系不受损伤,结果更可靠。

### 3) 盆栽接种法

Caldwell 等(1960)在进行抗病遗传研究时,采用人工接种盆栽大豆对各世代材料进行抗病性鉴定。 $F_1$  植株在装有消毒土的盆中生长 2 周,然后连根取出,冲净根上的土,移栽到直径 3 英寸的盆中,移栽过程中,将挤碎的孢囊接种在根区周围,并将盆放置在装满砂子的工作台上,以防止失水干燥。Thomas 等(1975)在评价亲本、 $F_1$ 、 $F_2$  及回交世代材料对大豆孢囊线虫的反应时也采用了盆栽接种法。其做法是将种子在蛭石中萌发,2—3 天后根长 4cm 时,将幼苗移植到装满消毒土的瓦盆,当第一片三出复叶的叶子完全展开时,用孢囊线虫的卵和幼虫接种。Riggs 等(1991)将消毒的壤土与细砂混匀,装于直径 7.5cm 的瓦盆,在每个盆的中央做一个直径 1.3cm 的小坑,然后,将接种物倾倒入小坑中,再将幼苗放置其中,用土将四周封严,最后将盆放于生长箱中控制温度为 28℃,16 小时光照。人工接种可以人为控制根系周围的线虫数量,使其更集中一致,有利于线虫的侵染。

### 4) 微盆水浴法

Luedders 等(1985)在研究大豆孢囊线虫在大豆上的选择和自交作用时,将幼苗生长在 15×2.5cm 的塑料管中,塑料管放在 27℃ 水浴中恒温生长。Anand 等(1985)对筛选出的 10 个抗病 PI 系的抗病性重复鉴定时,采用了微盆水浴法:将消毒的细砂土装于 20×2.5cm 的塑料微盆中,在蛭石中萌发大豆,胚根长 1.5—2cm 时,单个幼苗移栽于微盆,然后用卵和幼虫接种,28℃ 水浴保温。Rao—Arelli 等(1988)在此基础上又做了小小的改进:先将已移苗的微盆置于 27℃ 水浴,5 天后接种。好处是植株建成良好的根系,增加线虫的侵入位点。目前,美国许多育种家采用此法进行种质筛选和杂交后代抗性鉴定(Anand 等,1989;Myers 等,1991;Rao—Arelli 等,1992)。

### 5) 改良切顶法

为了进一步节省抗性鉴定时的劳力及空间,Halbrandt 等(1987)描述了一种改良的温室法:在含有 128 个生长室的 Todd 种植盘中装满干净的河沙,用移液管吸取 1ml 含有 1200 个卵的水溶液接种于每个生长室的 5cm 深处,萌发 3 天的幼苗移栽于每个小室,种植盘上放一层蛭石,并用水轻轻洗一下,放置在温室的工作台上,保温 27℃,第一片叶展开后,剪掉子叶节以上的茎叶,以后若子叶节上再长出新叶也剪掉。接种 33—37 天后检查根上的孢囊数,确定抗病性。

## 3. 实验室鉴定法

对植株的抗病性鉴定主要根据其感染线虫后根部着生的孢囊数来决定。这似乎表明植株对线虫的抗性反应可能是根部的一个特征。Chambers 等(1967)研究了根尖、茎段产生的不定根对大豆孢囊线虫的抗性反应。结果表明不定根与整株对孢囊线虫的抗感反应一致。大豆叶片切段的不定根对大豆孢囊线虫的反应也与整株的反应一致(Halbrandt 等,

1987)。Chambers等(1967)通过嫁接试验表明植株的抗病性是整个植株的遗传本质,抗病性的表达主要通过根侵染点的组织反应来体现。基于这些基础研究,美国的线虫学家研究了一些利用植株根部特性鉴定抗病性的方法。

### 1)单根系培养鉴定

Lauritis等(1982)认为在实验室条件下,利用单根外植体研究大豆—大豆孢囊线虫互作是可行的,并且利用单株根系培养物筛选大豆对大豆孢囊线虫的抗病性。大豆单根系培养的做法:培养皿内装有1.3%的琼脂,表面消毒的大豆种子放于其上,25±1℃培养三天,然后剪取2—3cm长的根尖,转移到改良的STW的琼脂培养基上,当侧根发育时,每个根培物接种200个2龄幼虫的水悬浮液,用封口膜将培养皿封严,25±1℃暗培养3周,检查每个品种根外植体上雌成虫及雄成虫数。经邓肯氏复方测验,抗感品种差异显著。

### 2)切顶水培法

Halbrandt和Dropkin(1986)描述了一项利用幼苗切顶快速检测大豆—大豆孢囊线虫关系的技术。改技术的要点是:将接种的幼苗5—10株用纱布束紧成一束,放入20×3cm的试管中,水培。试管固定在一个架上,部分沉浸在27℃水浴中,白天给予16小时的光照,隔天向试管中充气。为控制根的生长,水培时,从顶端切去幼苗的茎。切顶分两种水平:一种是在子叶下面切去下胚轴;一种是将每个子叶切去75%,留下完整的顶端分生组织,当胚轴伸长时,再从子叶节处切顶。15天后检查根表面的孢囊数。这种方法的优点是持续时间短,省时、省工、省空间,不受土壤干扰,数据可靠。

## 二、接种物的制备

### 1. 接种物的类型

接种物一般有孢囊、卵、二龄幼虫及卵和二龄幼虫的混合物等几种类型。其中,卵和二龄幼虫混合物较为常用,它们常与砂质土壤混在一起,密度1000个/cm<sup>3</sup>或制成1200个/ml的悬浮液。接种数量由700—几千个不等。以密苏里州立大学农学系Anand为首的育种家,在抗源筛选、抗性遗传研究中多采用每亩1000个卵和幼虫;而以阿肯色州立大学植病系Riggs等为代表的线虫学家,在生理小种测定时多采用4000个卵和幼虫接种。Triantaphyllou(1975)、Halbrandt等(1986)、Riggs等(1991)在对线虫繁殖、发育及生理小种鉴定等特殊研究中,还采用了二龄幼虫作接种物,接种量500—2000个。Riggs和Schmitt(1991)认为在测定生理小种时,每盆接种40个丰满的孢囊或4000个卵效果最好。Rao—Arelli等(1987)建议在进行抗性遗传研究时,用完全由白色孢囊挤破释放的卵接种,可得到二龄幼虫的同步孵化,使侵染同时进行。

### 2. 接种物的制备方法

#### 1)直接分离法

Caldwell等(1960)直接将病土过60目筛子,收集筛子上的孢囊并用镊子挤碎,显微镜下检查没有完整的孢囊,用破碎的孢囊接种于植株的根际。Thomas等(1975)将感病植株和砂子放在水中搅拌,通过磨擦作用将孢囊从根上分离下来,悬浮液过20和60目的筛子,保留在60目筛子上的孢囊强行通过200目的细筛,去除碎片,将卵和幼虫收集在400目筛子上,即可得到接种物。Acedo等(1982)采用蔗糖密度梯度离心获取更加纯净的卵和

二龄幼虫。具体做法为:从土中分离孢囊收集于 60 目的筛子,用橡胶瓶塞轻轻磨碎孢囊,释放卵和幼虫,800g 离心 5 分钟,用吸管慢慢吸去上清,剩余 2ml 左右与沉淀搅匀。在一个 50ml 离心管里依次加入 50%、40%、20% 的蔗糖溶液各 10ml,制成蔗糖密度梯度,冰箱放置 5 分钟,加入卵混合液,800g 离心 5 分钟,卵和幼虫聚集在 40% 的梯度中成一带,孢囊碎片和杂物沉淀在 50% 的梯度里,而细菌孢子等较轻的东西则漂浮在 20% 的梯度中。这些方法得到的接种物尽管可以控制接种数量,但它本身是一个群体,因而,很难保证线虫种类的均一性。

## 2) 原种培养物法

原种培养就是将从典型病地、病株或其它途径收集到的线虫,通过合适的方法繁殖保存,需要时随用随取。Halbrandt 等(1987)将 5 个大豆孢囊线虫群体,通过种植感病品种在  $52 \times 52 \times 31$ cm 的洗衣盆中进行原种培养。制备接种物时,收集根上的孢囊,磨碎,过 100 目筛子,冲洗物用蔗糖梯度离心,分离出卵,27℃ 下培养 1—2 天,即可作为接种物。Riggs 和 Schmitt(1991)将原种培养物保存在感病品种 Lee 和 Pickett 上,制备接种物时,先用水在根球处浸泡土壤,取出完整的根系,高压水喷射,分检过筛去除碎片,在玻璃混匀器中破碎孢囊,释放卵和幼虫,过 100 $\mu$ m 孔径的筛子,冲洗物即为卵和幼虫的悬浮物,显微镜下计数即可得到接种物。

## 3) 多代选择繁殖法

Anand 等(1982)将 7 个抗病品系和一个感病对照盆栽种植在 3、4 号生理小种感染的土壤。每隔 30 天,拔出植株,挑取 50 个白色孢囊,接种于另一盆种植相同品系的消毒土中。如此反复选择、繁殖 10 个轮次。Rao—Arelli 等(1987)提出,鉴定种质对 4 号生理小种抗性遗传时,接种物的制备应在抗病品系 PI90763 上选择、繁殖 30 代以上,以减少群体内所存在的遗传变异。Anand 和 Rao—Arelli(1988)描述了获得 5 号生理小种遗传同质群体的步骤:a. 从种植在 5 号生理小种感染田的 PI88788 植株上收集白色孢囊;b. 破碎孢囊得到卵和幼虫;c. 在消毒土里生长 PI88788 幼苗,接种上述卵和幼虫;d. 30—35 天从接种的 PI88788 根上收集白色孢囊,接种。重复 10 次。

## 4) 单孢囊繁殖法

得到遗传同质的接种物,最好的途径是来自同一个孢囊繁殖的群体,但随之而来的问题是多代自交造成线虫的感染力丧失或降低。Luedders (1985)首次报道,以 PI209332 和 PI89772 为选择寄主,通过单孢囊转移,自交 9 代,获得了有功能的新鲜卵的接种物。这些接种物在选择寄主上繁殖扩大群体后可作为原种培养物以供利用。Halbrandt 等(1987)用选择寄主 PI209332 和 PI89772 繁殖单孢囊群体,获得了卵和二龄幼虫的接种物。

## 5) 单根系无菌培养物法

Lauritis 等(1981)在大豆品种 Kent 上建立了大豆孢囊线虫的单根系无菌培养物:从感病植株根上的卵块和孢囊里提取幼虫,用 50ppm 的硫酸链霉素和 20ppm 的 8—巯酸唑啉混合水溶液对幼虫表面消毒,无菌水冲洗 3 次,离心(1500rpm, 5 分钟)浓缩,然后,用 1000ppm 的硫酸链霉素水溶液悬浮 1 小时,过滤,幼虫收集在滤纸上。大豆单株根系切段无菌生长在琼脂培养基上,用幼虫的水悬浮液接种,26℃ 培养,21 天即可完成一个生活

史。随后继续转移卵块或二龄幼虫于大豆单根系培养物上,建成原种培养物。1982年 Lauritis 等从单根系培养物获取二龄幼虫作接种物,筛选了大豆对孢囊线虫的抗病性。

### 三、接种方法的改进

#### 1. 接种技术的提高

Caldwell 等(1960)在幼苗移栽的同时,将挤碎的孢囊放置于幼苗的根际,这是最初的接种方法。Thomas 等(1975)利用自动注射器将接种物等量接种于消毒砂中,每次为 2.3ml 的等份,每盆接种 3 次。Luedders(1985)用磁力搅拌器混匀接种物,用临床注射器吸取 1000 个左右的卵注入到塑料管的细砂中完成接种。Rao-Arelli 等(1987)提出用水族充气泵不断向悬浮物吹气,保持接种物的均匀一致,并且将卵悬浮物紧挨着寄主根系接种,以使卵尽快孵化,从尽可能多的侵染位点侵入。在大量接种时通常采用嘴吸—移液管法接种,即一人用手保持接种物中卵和幼虫的均匀悬浮,另一人用嘴和移液管吸取 5ml 的等量悬浮液,接种于根区周围 4—5cm 深的开口内,然后封上开口即可(Rao-Arelli 等, 1991)。这些方法都要花费较多的人力、工时,且速度慢。对大量的测试材料来说,极难满足同时接种的需要。Rao-Arelli 等(1991)发展了一种快速接种大量幼苗的技术——自动加样器法。该法实际上是利用一套自动分液装置。一边由水族充气泵悬浮混匀接种物,一边用自动分液器每隔 2.5 秒吸取 5ml 接种物接种于微盆中。据报道,这种方法可提高效率近 20 倍。

#### 2. 接种时期

接种时期主要有以下几种:a. 由蛭石向消毒土移苗的同时,进行接种(Caldwell 等, 1960);b. 第一片三出复叶完全展开时接种(Thomas 等, 1975);c. 移栽后 2 天或 5 天,待产生新的根系时接种,其好处是可以为线虫的侵染提供更多的有效位点(Hancock 等, 1987; Rao-Arelli 等, 1988, 1989)。

### 四、抗病性评价

#### 1. 抗病性的鉴定标准

大豆对孢囊线虫抗病的鉴定标准主要根据大豆植株根部着生的孢囊数来决定。划分抗病性的标准有两套体系:一是直接以根上孢囊的绝对数目来判断,另一则根据寄生指数来判断。寄生指数(IP, Index of Parasitism)指测试植株根上着生的孢囊数占感病对照的百分比(Triantaphyllou, 1975),有时也称雌成虫指数(Hancock, 1987)。由于大豆抗病性划分标准的人为性,所以,不同时期、不同作者对抗病性的判定标准差异很大。Ross 和 Brim (1957)把每个根系上少于 10 个孢囊,并且低于邻近对照行根上孢囊数的材料定为抗病材料。Caldwell 等(1960)则只把仅着生 0 或 1 个孢囊的材料定为抗病,多于 1 个孢囊就为感病。Thomas 等(1975)的划分标准为:高抗,0—7 个;抗,8—23 个;中抗,24—39 个;中感,40—55 个;高感,55 个以上。目前,在美国采用孢囊数判定抗病性的划分指标多为:高抗,0—5 个;中抗,6—10 个;高感,30 个以上。直接以孢囊的绝对数判定抗病性,常常因土壤质地及土壤中线虫密度的不同或其它条件的不一致,造成鉴定结果的差异。Golden 等(1970)在生理小种鉴定中,把寄主植株上繁殖的雌成虫与对照品种 Lee 上繁殖的雌成虫的比值作为评价抗病性的标准。小于 10% 为(—)反应即抗病,大于 10% (+)反应即感病。

后来,这种划分标准(即  $IP < 10\%$  为抗病,  $IP \geq 10\%$  为感病)被广泛应用于种质及品系的抗病性鉴定(Anand 等, 1985, 1989; Hancock 等, 1987; Rao—Arelli 等, 1988, 1989, 1992; Myers 等, 1991; Riggs 等, 1988)。这种两级分法把  $IP = 10\%$  硬性作为一个阈值, 跨过它即为感病, 这显然不能真实反映植株的抗病程度。鉴于此, Anand 等(1988)采用  $IP$  的四级分法的标准: 高抗,  $IP < 10\%$ ; 中抗,  $10\% \leq IP < 25\%$ ; 中感,  $25\% \leq IP < 50\%$ ; 感病,  $IP \geq 50\%$ 。Schmitt 和 Shannon(1992)总结了多数育种家的意见后, 提出鉴定大豆抗病性的  $IP$  标准为: 高抗,  $0-9\%$ ; 中抗,  $10-30\%$ ; 中感,  $31-60\%$ ; 大于  $60\%$  为感病。

我国经十几年的研究, 鉴定标准已经统一。基本上与美国的标准一致。按根上孢囊数分为五级: 免疫, 0; 高抗,  $0.1-3.0$ ; 中抗,  $3.1-10$ ; 中感,  $10.1-30$ ; 高感, 30 以上。按孢囊指数分为二级:  $IP < 10\%$  为抗病;  $IP \geq 10\%$  为感病。而且这两种标准必须在感病对照根上的孢囊数在 30 个/株以上才可靠。

## 2. 抗病性的鉴定时期

抗病性鉴定一般在第一代显囊盛期。此时, 第一代雌虫刚刚成熟, 容易识别。从时间上说, 美国多在种植或接种后一个月左右。我国田间种植条件下, 东北是出苗后 30—40 天(马书君等, 1991, 刘维志等, 1991), 山西为出苗后 30—35 天(李莹等, 1991), 安徽在播种后 28—30 天(张磊等, 1991)。吴和礼等(1984)比较了春播、夏播、和冬季温室播种的鉴定效果后认为, 东北地区以春播为最好。以哈尔滨为例, 5 月 10 日播种, 25 日出苗, 35—45 天后地上部展开四片复叶时, 正是第一代雌虫突破根部表皮, 形成肉眼可见的白色柠檬状孢囊, 个体大, 又极少脱落, 是鉴定的最适宜时期。

## 3. 孢囊的收集和计数

一般只收集根部的孢囊进行计数。基本方法大体一致, 具体操作有些不同。Anand 和 Gallo(1984)拔出植株, 摇去根上的土粒, 直接统计根上的孢囊。Caldwell 等(1960)先从根上洗下土粒, 60 目筛子过筛, 对残留在根部和保持在筛子上的孢囊计数。Thomas 等(1975)和 Hancock 等(1987)用砂子将根上的孢囊磨擦到水中, 悬浮, 过筛, 收集孢囊于 60 目筛子上, 然后冲洗到带格的培养皿内, 低倍镜下统计孢囊数。Anand 等(1983, 1985)逐步完善了一套步骤: 先将塑料微盆浸泡在水中, 然后轻轻拔出植株, 用高压水喷射根部, 分离出白色孢囊, 过 20 目和 60 目筛子, 并用放大镜检查根部, 确信所有的孢囊被取出, 最后转移到带格的培养皿中镜检计数。

## 五、抗病性鉴定方法发展前瞻

常规的鉴定方法依赖于根上的孢囊数, 其发展的原则是准确、快速。鉴定环节最佳化, 包括鉴定期间寄主和寄生物生长环境最适化, 均匀一致有强感染力的同质接种物的制备方法和简便、快速、定量的接种技术是当前提倡应用的技术关键。常规的鉴定方法在目前和今后一段时间内仍是最主要的鉴定方法。随着抗大豆孢囊线虫基础研究的进一步深入, 以生化标记和分子标记辅助的鉴定方法将会得到发展。Pavlova(1989)根据对抗感品种根部过氧化物酶和超氧化物歧化酶酶活性研究结果, 认为呼吸酶的差异可作为抗线虫品种选择的一个因子。Kim 等(1990)报道了过氧化物同工酶酶谱与抗孢囊线虫的关系, 抗病品种的第五条谱带较厚而感病品种则较薄。这表明与抗性相关的酶的活性及同工酶谱的

变化,有可能作为抗性筛选的生化标记。同样,分子生物学的发展,尤其是 RFLP 和 RAPD 技术的出现,为分子标记辅助的抗性鉴定方法提供了更广阔的前景。Weismann 等(1992)报道,pBLT 24 和 pBLT 65 两个 RFLP 标记与 Rhg4 基因座位连锁。Concibido 等(1993, 1994)报道,两个 RFLP 标记,pA 85 和 pB32 与大豆对大豆孢囊线虫的抗性紧密度相关。可以相信,分子标记辅助的鉴定方法不久就可以应用于抗病种质筛选和抗病育种实践。

### 参考文献

- [1] 大豆种质抗孢囊线虫鉴定研究协作组,1993,大豆种质资源对大豆孢囊线虫 1、3 和 4 号生理小种的抗性鉴定,大豆科学 12(2),91—99
- [2] 吴和礼等,1984,大豆孢囊线虫病抗病性鉴定技术的研究,大豆科学 3(1)1—6
- [3] 武天龙等,1992,大豆抗孢囊线虫鉴定方法及对 3 号生理小种的抗性遗传分析,东北农学院学报,23(4):322—327
- [4] Acedo, J. A. and V. H. Dropkin. Technique for obtaining eggs and juveniles of *Heterodera glycines*. J. of Nematol. 14(3):418—420
- [5] Anand, S. C., 1982. New soybean strain resistant to soybean cyst nematode; PI416762. Plant Disease 66:933—934
- [6] Anand, S. C., and K. M. Gallo. 1984. Identification of additional soybean germplasm with resistance to race 3 of the soybean cyst nematode. Plant Disease Repr. 68:593—595
- [7] Anand, S. C., J. A. Wrather & C. R. Shumway. 1985. Soybean genotypes with resistance to races of soybean cyst nematode. Crop Sci. 25:1073—1075
- [8] Anand, S. C. et al. 1988. Soybean plant introductions with resistance to race 4 or race 5 of soybean cyst nematode. Crop Sci. 28:563—564
- [9] Anand, S. C. & A. P. Rao—Arelli. 1989. Genetic analysis of soybean genotypes resistant to soybean cyst nematode race 5. Crop Sci. 29:1181—1184
- [10] Caldwell, B. E., C. A. Brim & J. P. Ross. 1960. Inheritance of resistance of soybeans to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. Agronomy J. 52:635—636
- [11] Chambers, A. Y. & J. M. Epps. 1967. The nature of resistance to nematode. Plant Disease Repr. 51(9):771—774
- [12] Concibido, V. C., et al. 1993. RFLP mapping of cyst nematode resistance genes in soybeans. Soybean Genet Newsl. 20:136—139
- [13] Concibido, V. C., et al. 1994. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). Crop Sci. 34:240—246
- [14] Golden, A. M. et al. 1970. Terminology and identity of infraspecific forms of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). Plant Disease Repr. 54:544—546
- [15] Hancock, J. A. et al. Genetics of resistance in soybean to "race x" of soybean cyst nematode. 1987. Crop Sci. 27:704—707
- [16] Halbrandt, J. M. & V. H. Dropkin. 1986. *Heterodera glycines*—soybean association; a rapid assay using pruned seedling. J. of Nematol. 18(3):370—374
- [17] Halbrandt, J. M. et al. 1987. A modified screening test for determining *Heterodera glycines* resistance in soybean. Annuals of Applied Nematol. 18(3):74—77
- [18] Kim, Y. H., F. H. Huang and R. D. Riggs. 1992. Resistance of soybean to *Heterodera glycines* and isozyme pat-

terns of peroxidase of soybean roots. *Nematol. Abstr.* 4;177

- [19] Laurits, J. A. R. V. Rebois and B. Y. Endo. 1981. Monoxenic cultures of *Heterodera glycines* propagated on root cultures of susceptible soybean. *J. of Nematol.* 13;447
- [20] Laurits, J. A. , R. V. Rebois, L. S. Graney. 1982. Technique for genotobiotic cultivation of *Heterodera glycines* Ichinohe on *Glycine max.* (L. )Merr. *J. of Nematol.* 14(3), 422—424
- [21] Laurits, J. A. et al. 1982. Screening soybean for resistance to *Heterodera glycines* Ichinohe using monoxenic cultures. *J. of Nematol.* 14(4), 593—594
- [22] Luedders, V. D. . 1985. Selection and in breeding of *Heterodera glycines* on *Glycine max.* *J. of Nematol.* 17(4), 400—404
- [23] Myers, G. O. & S. C. Anand. 1991. Inheretance of resistance and genetic relationship among soybean plant introduction to races of soybean cyst nematode. *Euphytica* 55; 197—201
- [24] Pavlova, L. M. . 1992. The role of oxidizing processes in the resistance of soybean to *Heterodera glycines*. *Nematol. Abstr.* 5; 166
- [25] Rao—Arelli, A. P. et al. 1987. An improved method of evaluation of resistance to race 4 of soybean cyst nematode. *Soybean Genet. Newsl.* 24; 237—239
- [26] Rao—Arelli, A. P. & S. C. Anand. 1988. Genetic relationship among soybean plant introductions for resistance to race 3 of soybean cyst nematode. *Crop Sci.* 28; 650—652
- [27] Rao—Arelli, A. P. et al. 1991. A rapid method for inoculating soybean seedlings with *Heterodera glycines*. *Plant Disease* 75(6), 594—595
- [28] Rao—Arelli, A. P. et al. 1992. Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene. *Crop Sci.* 32; 862—864
- [29] Riggs, R. D. , M. L. Hamblen & L. Rakes. 1988. Resistance in commercial soybean cultivar to six races of *Heterodera glycines* and to *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Nematol.* 2; 70—76
- [30] Riggs, R. D. & D. P. Schmitt. 1991. Optimization of the *Heterodera glycines*. *J. of Nematol.* 23(2), 159—154
- [31] Ross, J. P. & C. A. Brim. 1957. Resistance of soybeans to the soybean cyst nematode as determined by a double—row method. *Plant Disease Reprtr.* 41; 923—924
- [32] Schmitt, D. P. & J. G. Shannon. 1992. Differentiating soybean responses to *Heterodera glycines* races. *Crop Sci.* 32; 275—277
- [33] Thomas, J. D. , C. E. Cavines, R. D. Riggs & E. E. Hartwig. 1975. Inheretance of reaction to race 4 of soybean cyst nematode. *Crop Sci.* 15(2), 208—210
- [34] Triantaphyllou, A. C. . 1975. Genetic structure of races of *Heterodera glycines* and inheretance of ability to reproduce on resistant soybean. *J. of Nematol.* 7(4), 356—364
- [35] Weisemann, J. M. , B. E. Matthews. & T. E. Devine. 1992. Molecular markers located proximal to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. *Ther. Appl. Genet.* 85; 136—138