

抗 SCN 位点 *rhg1* 与 *Rhg4* 在种质资源中的单倍型分析及分子标记开发

盛碧涵,刘 兵,陈秀兰,朱治佳,谭云夫,李文滨,赵 雪,韩英鹏

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室/东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:*rhg1* 和 *Rhg4* 是抗大豆胞囊线虫病种质所具有的主要的抗性基因,利用与 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点紧密连锁的 SSR 标记和 SNP 标记对 15 份抗感病大豆种质进行基因分型。结果表明:*rhg1* 位点连锁 SSR 标记 Satt309 对抗病种质的检出率为 55.56%,*Rhg4* 位点连锁 SSR 标记 Sat_162 对抗病种质的检出率为 66.67%;*rhg1* 位点序列引物 PCR 产物 630 bp 位置存在腺嘌呤与胞嘧啶(A/C)突变,感病等位为 A 碱基,抗病等位为 C 碱基,在 *Rhg4* 位点标记引物 SHMT 的 PCR 产物上 2 749 bp 位置存在胞嘧啶和鸟嘌呤(C/G)突变,感病等位为 C 碱基,抗病等位为 G 碱基。*rhg1* 和 *Rhg4* 位点内 SNP 对抗病种质的检出率分别为 77.78% 和 100%。利用高分辨率溶解曲线法设计 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点 SNP 标记,在扫描温度为 65℃ 起始,60℃ 保持,94℃ 终止时可得到理想的分型结果。

关键词:大豆胞囊线虫病;*rhg1*;*Rhg4*;微卫星标记;单核苷酸多态性
中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.03.0345

Haplotype Analysis and Molecular Marker Development of Soybean Nematode Cyst Resistance Loci *rhg1* and *Rhg4* in Soybean Germplasm

SHENG Bi-han, LIU Bing, CHEN Xiu-lan, ZHU Zhi-jia, TAN Yun-fu, LI Wen-bin, ZHAO Xue, HAN Ying-peng
(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding (Genetics) of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Soybean cyst nematode (SCN), also named verticillium wilt, is a kind of soil spread parasitic disease. SCN disease is caused by soybean cyst nematode infection on soybean roots and seriously threatens to the soybean production. *rhg1* and *Rhg4* were the main loci for resistance to soybean cyst nematode (SCN). SSR and SNP markers tightly linked with *rhg1* and *Rhg4* loci were used to genotype fifteen soybean germplasm. The positive rates of resistance germplasm for Satt309 which was linked with *rhg1* loci was 55.56% and that for Sat_162 which was linked with *Rhg4* loci was 66.67%. The sequencing result showed that the adenine/cytosine (A/C) mutation existed at 630 bp location of the key fragment at *rhg1* loci. The disease-susceptible allele was base ‘A’ while the disease-resistant allele was ‘C’. The cytosine and guanine (C/A) mutation existed at 2 749 bp location of the key gene SHMT of *Rhg4* loci. The disease-susceptible allele was base ‘C’ while the disease-resistant allele was ‘G’. The positive rates of resistance germplasm for SNP markers in *rhg1* and *Rhg4* loci were 77.78% and 100%, respectively. The genotyping method based on high resolution melting curve (HRM) for SNP markers of *rhg1* and *Rhg4* loci was established. The ideal genotyping results were obtained when the condition of scanning was starting at 65℃, holding at 60℃ and ending at 94℃.

Keywords: Soybean cyst nematode; *rhg1*; *Rhg4*; SSR; SNP

大豆是世界应用最广泛的豆科作物^[1],是人类重要的蛋白质和油质来源^[2]。大豆胞囊线虫病又叫黄萎病,俗称“火龙秧子”,是由大豆胞囊线虫感染大豆植株根部引起的一种典型的土传病害^[3-4]。全世界每年仅由大豆胞囊线虫病引起的经济损失可达 150 亿美元^[5]。在生产上大豆胞囊线虫病的预防措施主要包括 3 类,即进行作物轮作、利用抗病品种和使用杀线虫剂^[6],但是种植抗性品种被认为是最为经济 and 有效且对环境最为友好的防治方法^[7]。

经典遗传分析表明,大豆对 SCN 的抗性遗传

受寡基因包括 *rhg1*、*rhg2*、*rhg3* 和 *Rhg4* 控制。其中,隐性基因 *rhg1* 和显性基因 *Rhg4* 是抗性种质所具有的主要的抗性基因^[8]。大豆 18 号染色体上的 *rhg1* 数量性状基因座在对 SCN 抗性上所起的作用要比其它的已知位点大很多,*rhg1* 基因会破坏线虫潜在的取食位点的构造^[2]。在美国中部大约 90% 的商业栽培大豆品种都是以来自大豆品种 PI88788 的 *rhg1-b* 等位基因作为主要的抗病位点。该基因在很多抗病种质中存在,是抗 SCN 的主效基因位点^[2]。抗 SCN 主效基因 *rhg1* 和 *Rhg4* 紧密连锁的 SSR 标

收稿日期:2016-10-20
基金项目:黑龙江省自然科学基金面上项目(C2015011);国家自然科学基金(31671717);东北农业大学学术骨干计划项目(15XG04);黑龙江省博士后项目(LBH-Z15017)。
第一作者简介:盛碧涵(1990-),女,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: 1138272108@qq.com。
通讯作者:赵 雪(1983-),女,博士,副研究员,主要从事大豆遗传育种与基因组学研究。E-mail: xuezhaoh@neau.edu.cn。
韩英鹏(1978-),男,博士,教授,主要从事大豆遗传育种和分子生物技术研究。E-mail: hyp234286@aliyun.com。

记 Satt309 和 Sat_162 在辅助选择上述位点优异等位研究中发挥一定的作用^[10]。Cook 等^[2]发现 *rhg1* 位点对 SCN 的抗性源于 31 kb 区段拷贝数变异,并发现在抗感品种间存在 SNP 的差异。Liu 等^[1]对 *Rhg4* 位点的关键基因和作用机制进行深入研究,通过图位克隆获得 *Rhg4* 位点关键基因 *GmSHMT*,并通过突变体分析、基因沉默、转基因互补等试验已证实了该基因的抗性。*Rhg4* 基因编码一种丝氨酸羟甲基转移酶 (SHMT),负责调控丝氨酸和甘氨酸的相互转化,是细胞一碳代谢中所必不可少的要素,存在于 *GmSHMT* 基因上的 SNP 可实现对抗感品种区分^[1,9]。

国内抗大豆胞囊线虫病品种选育主要依靠常规杂交方式,上述两个位点和基因的明确为抗大豆胞囊线虫病的分子育种提供依据。国内大豆种质资源在两个位点的单倍型分析、分子标记的开发和利用对分子育种实践具有重要意义。因此,本研究评价抗病、感病共 15 个大豆种质资源在 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点的单倍型,利用与抗 SCN 主效基因 *rhg1*、*Rhg4* 紧密连锁的 SSR 标记 Satt309^[10]、Sat162^[1],以及 *rhg1* 和 *Rhg4* 对不同大豆品种进行分析,评价上述标记对抗感大豆种质的辅助筛选效果,进一步针对 *rhg1* 和 *Rhg4* 的 SNP 建立基于高分辨率溶解曲线 (HRM) 的分型体系,为实现国内大豆抗线虫新品种分子辅助选育提供基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

大豆种质资源 15 份,其中抗病对照品种为 Forrest,感病对照品种为 Lee^[1],被测大豆种质包括东农 L-10、Peking、灰皮支、PI90763,东农 L-204,黑农 37、Pickett,东农 L-197、东农 L-210、东农 L-195、ZDD10270、ZDD10252。材料由东北农业大学大豆研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 大豆胞囊线虫抗性鉴定 采用酸性品红染色法鉴定大豆对胞囊线虫 3 号生理小种的抗性^[11],具体操作如下:1) 鉴定植株的种植:将所有供试材料在一个塑料盒子里间距 5 cm 种植,每个株系播种 5 粒,并在每盒种植对照品种 Lee。待出苗后挂牌,保留生长状态一致的 3 棵植株。播种后 15 d 左右将植株整株取出,注意对根的保护;2) 根部脱色:将根部的残土重新处理干净,浸泡于浓度为 3% 的安替福民 (NaClO) 水溶液中 4 min,期间搅拌 2 次;3) 根部染色:先用流水冲洗根部 30 ~ 45 s,并在蒸馏水中浸泡 15 min,然后将根浸泡于酸性品红染色液中 (3.5 g 品红,250 mL 冰乙酸,750 mL 蒸馏水),将漂白后的根系煮沸 45 ~ 60 s,冷却至室温;4) 压片

镜检:将根组织压片,在 20 × 的光学显微镜下计数。采用 Schmitt 和 Shannon^[12] 提出鉴定大豆抗病性的寄生指数 IP (index of parasitism) 标准,寄生指数也称雌成虫指数,即测试植株根系上着生的胞囊量占感病对照根系胞囊量的百分比。(寄生指数 = 测试植株的胞囊平均数 / Lee 胞囊平均数) × 100,IP 标准将抗性级别分为 4 级:高抗,0 ~ 9% (VR);中抗,10% ~ 30% (MR);中感,31% ~ 60% (MS);大于 60% 为感病 (VS)。

1.2.2 DNA 提取 每个品种两粒种子于温室育苗,取其新鲜的三出复叶,液氮研磨后用改良 SDS 法提取 DNA。

1.2.3 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点 SSR 标记分析 *rhg1* 位点 SSR 标记引物 Satt309 (顺序为 5' - 3',下同):GCGCCT-TCAAATTGGCGTCTT, GCGCCTTAAATAAAACCCGAA-ACT、*Rhg4* 位点 SSR 标记引物 Satt162: GCGTG-GTTTTTCGCTGGATATA, GCGCATTTTCGTAACATATTT-TTCAC^[1],SSR-PCR 扩增体系 20 μL:模板 DNA 2 μL (DNA 50 ng · μL⁻¹),引物 3 μL,buffer 2 μL, *Taq* 酶 0.2 μL,dNTP 0.2 μL,ddH₂O 12.6 μL。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 8 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环,72℃ 终延伸 10 min。

PCR 扩增产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测,银染显色观察。

1.2.4 关键基因单倍型分析 根据 Liu 等^[1]对 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点报道,*rhg1* 位点多态性引物 570 (ACCCTTTTTCAGTATTTATGC, CTAGGTAAGTCT-TTTTAGCCGTGA), *Rhg4* 位点多态性引物 SHMT (ACAACACTCTCTCTTCTCGC, CAGATTATGAGTTT-TGGCCTG),PCR 扩增体系 20 μL:模板 DNA 2 μL (DNA 50 ng · μL⁻¹),引物 1.6 μL,buffer 4 μL,Phanta™ Super-Fidelity DNA Polymerase 酶 0.4 μL,dNTP 0.4 μL,ddH₂O 11.6 μL。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 8 min,94℃ 变性 30 s,55℃ / 60℃ (引物 570 对应的温度为 55℃,引物 SHMT 对应温度为 60℃) 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s / 30 s (引物 570 对应的延伸时间为 40 s,引物 SHMT 对应的延伸时间为 30 s),35 个循环,72℃ 终延伸 10 min。

PCR 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测,并用 OMEGA 胶回收试剂盒 (E. Z. N. A.® Gel Extraction Kit) 对目的片段进行胶回收,测序。

1.2.5 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点分子标记开发 基于高分辨率溶解曲线 (high resolution melting curve, HRM) 的 SNP 分型原理,依据 *rhg1* 和 *Rhg4* 关键 SNP 位点侧翼序列进行小扩增子 PCR 引物设计,*rhg1* 位点引物序列: TTGTCAGGCTATGGAATCAT, GTCTTCAAT-AGCCATCCAAC, *Rhg4* 位点引物序列: CTACAC-CGCCGTCTCAAC, CGGTGGTGGAGTTTACCTTGT。

引物由华大基因科技股份有限公司合成,并稀释至 $10\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, -20°C 保存备用。HRM分型PCR反应体系:LC Green 1 μL ,DNA模板 1 μL (25 ng),引物 0.6 μL ($10\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),dNTP 0.2 μL ,*Taq*酶 0.2 μL ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),Buffer 1 μL ,去离子水 6 μL 。PCR反应程序: 95°C 5 min; 94°C 30 s, $50\sim 56^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72°C 30 s,35个循环; 72°C 5 min。PCR产物于LightScanner 96 (Idaho Technology Inc., USA)仪器上扫描。

表 1 被测大豆种质对大豆胞囊线虫 3 号生理小种的抗性鉴定

Table 1 Evaluation for the resistance of tested soybean germplasms to SCN race 3							
种质编号 Code	种质名称 Germplasm	雌虫指数 Female index/%	抗感性 R/S	种质编号 Code	种质名称 Germplasm	雌虫指数 Female index/%	抗感性 R/S
1	黑农 37 Heinong 37	84.75	S	9	ZDD10252	9.55	R
2	东农 L-197 Dongnong L-197	8.01	R	10	东农 L-204 Dongnong L-204	7.18	R
3	东农 L-10 Dongnong L-10	1.06	R	11	东农 L-210 Dongnog L-210	91.26	S
4	ZDD10270	5.14	R	12	东农 L-28 Dongnong L-28	106.23	S
5	Peking	3.95	R	13	Pickeett	84.15	S
6	灰皮支 Huipizhi	1.25	R	14	Lee	100.00	S
7	Forrest	3.55	R	15	PI90763	8.52	R
8	东农 L-195 Dongnong L-195	108.20	S				

2.2 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点 SSR 标记分析

rhg1 位点 SSR 标记 Satt309 在被测大豆种质中的分型结果见图 1,东农 L-197、东农 L-10、Peking、灰皮支、东农 L-195 和东农 L-204 与抗病对照品种 Forrest 带型一致,ZDD10270、ZDD10252、东农 L-28、Pickett 与 Forrest 存在差异,同时与感病对照品种 Lee 带型存在差异,黑农 37 和东农 L-210 与感病对照品种 Lee 带型一致,该标记对抗病种质的筛选效

2 结果与分析

2.1 被测大豆种质对大豆胞囊线虫 3 号生理小种的抗性分析

抗感病对照大豆品种及被测大豆种质对 SCN 3 号生理小种的抗性鉴定结果如表 1 所示,抗病品种对大豆胞囊线虫 3 号生理小种雌虫指数范围 1.06%~9.55%,被测感病品种对大豆胞囊线虫 3 号生理小种雌虫指数范围 84.15%~108.20%。

率为 55.56%;*Rhg4* 位点 SSR 标记 Satt_162 在被测大豆种质中的分型结果显示,东农 L-197、东农 L-10、Peking、灰皮支、ZDD10252 及 PI90763 与抗病对照品种 Forrest 带型一致,黑农 37、东农 L-195、东农 L-28 和 Pickeett 与感病对照品种 Lee 带型一致,其余种质带型区别于抗感对照品种,该标记对抗病种质的筛选效率为 66.67%。



图 1 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点 SSR 标记电泳检测结果

Fig. 1 The results of polyacrylamide gel electrophoresis of the PCR products for *rhg1* and *Rhg4* loci

2.3 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点单核苷酸多态性分析

根据 Liu 等^[1]的报道,利用 *rhg1* 基因标记引物

570 和 *Rhg4* 基因标记引物 SHMT 对被测大豆种质进行 PCR 和序列分析,15 个被测品种在引物 570 和

引物 SHMT 的扩增均获得预期产物(图 2 和 3)。其中引物 570 产物长度 1 112 bp,引物 SHMT 产物长

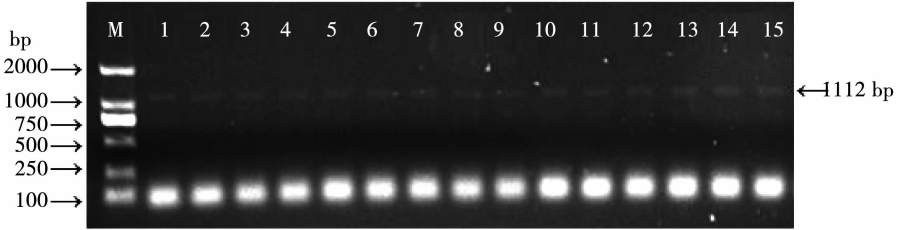


图 2 标记 - 570 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 2 The results of agarose gel electrophoresis of the marker-570 PCR products

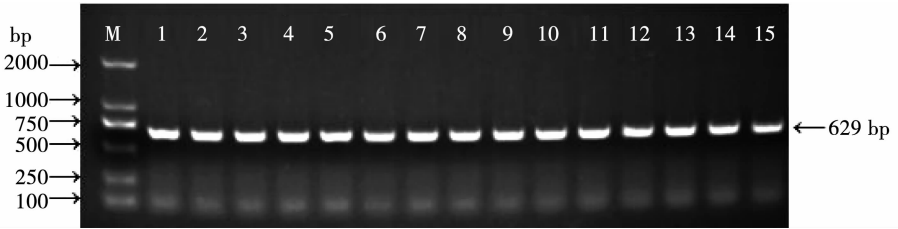


图 3 标记 - SHMT PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 3 The results of agarose gel electrophoresis of the marker-SHMT PCR products

进一步对以上产物进行纯化和测序,序列分析结果(图 4)表明,在 *rhg1* 位点标记引物 570 PCR 产物的 630 bp 位置存在着腺嘌呤与胞嘧啶(A/C)的突变。其中,抗病对照品种 Forrest 在该位置的碱基为腺嘌呤(A),感病对照品种 Lee 在该位置的碱基为胞嘧啶(C),鉴定结果为抗病的种质包括东农 L-10、Peking、灰皮支、PI90763、东农 L-197、ZDD10270、

ZDD10252 和东农 L-204 在该位置碱基均为腺嘌呤(A),鉴定结果为感病的种质包括黑农 37、东农 L-195、东农 L-210、东农 L-28 和 Pickeett 在该位置的碱基为胞嘧啶(C)。该位点基因型与抗感种质表型具有高度一致性,该 SNP 对抗感病种质的检出率均为 100%。

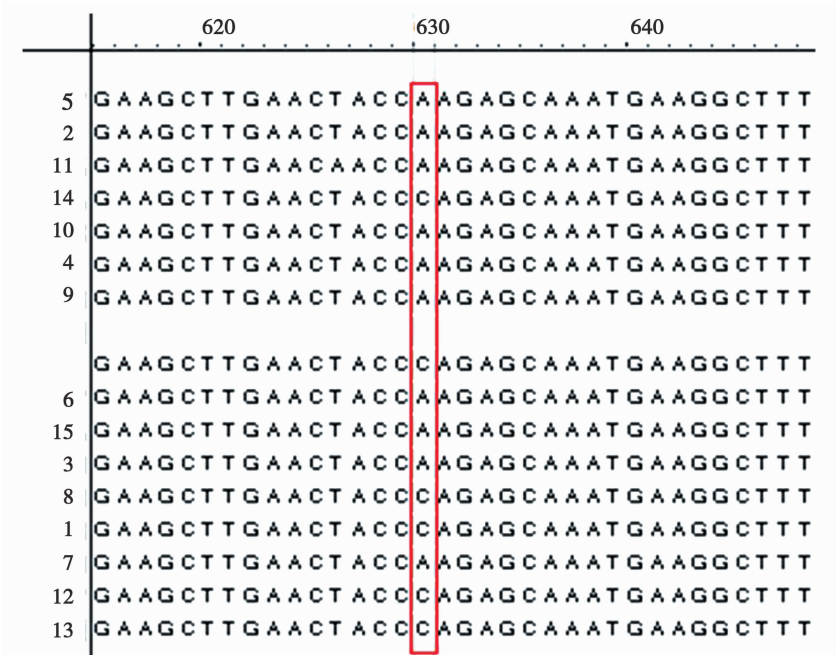


图 4 被测大豆种质在 *rhg1* 位点基因标记分型结果

Fig. 4 Genotyping of the tested soybean germplasm for *rhg1* locus

由图 5 可以看出,在 *Rhg4* 位点标记引物 SHMT 的 PCR 产物上 2 749 bp 位置存在着胞嘧啶和鸟嘌呤(C/G)的突变。其中,抗病对照品种 Forrest 在该位置的碱基为鸟嘌呤(G),感病对照品种 Lee 在该

位置的碱基为胞嘧啶(C),鉴定结果为抗病的种质包括东农 L-10、Peking、灰皮支、PI90763、东农 L-197 和 ZDD10252,在该位置碱基均为鸟嘌呤(G),鉴定结果为感病的种质包括黑农 37、东农 L-195、东农 L-

210、东农 L-28 和 Pickeett 在该位置的碱基为胞嘧啶 (C),除抗病种质 ZDD10270 和东农 L-204 在该位置的碱基为胞嘧啶 (C) 以外,其它种质在该位点的基因型与抗感种质表型具有高度一致性,利用该 SNP

对抗病种质的检出率为 77. 78%,对感病种质的检出率为 100%。因此,对于大多数种质而言,利用 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点 SNP 标记进行基因分型可高效地选择 SCN 抗性种质。

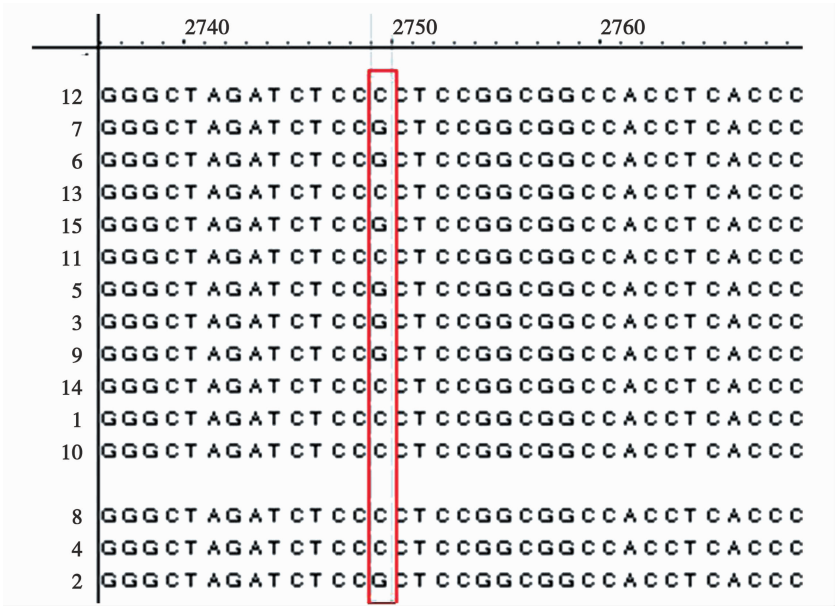


图 5 被测大豆种质在 *Rhg4* 位点基因标记分型结果
Fig. 5 Genotyping of the tested soybean germplasms for *Rhg4* locus

2. 4 *rhg1* 和 *Rhg4* SNP 标记开发和基于 HRM 的分型体系建立

高分辨率溶解曲线是基于 PCR 的 SNP 突变检测分析技术,本研究针对 *rhg1* 和 *Rhg4* 等位变异设计引

物,建立上述位点 SNP 的 HRM 技术的分型体系。经梯度 PCR 分析,针对 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点内抗病关联 SNP 设计的 PCR 产物长度分别为预期的 158 和 311 bp,最佳的退火温度分别为 56℃ 和 53℃ (图 6)。

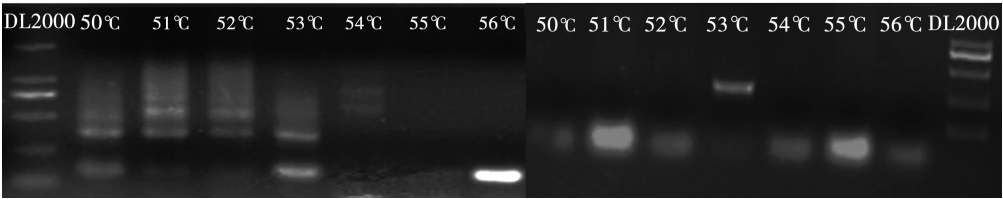


图 6 *rhg1* (左) 和 *Rhg4* (右) 位点 SNP 标记引物梯度 PCR 测试
Fig. 6 Gradient PCR for primers of SNP in *rhg1* (left) and *Rhg4* (right) loci

利用参试的 15 份大豆种质进行 PCR 分析和 HRM 扫描,当扫描温度为 65℃ 起始,60℃ 保持,94℃ 终止时,本研究设计的 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点 SNP

标记均可获得较为理想的溶解曲线且抗感等位区分效果明显 (图 7)。

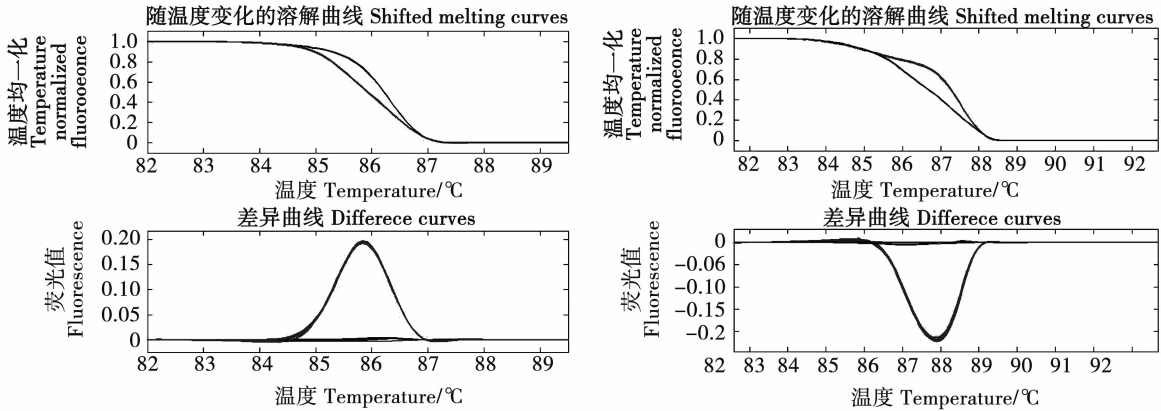


图 7 *rhg1* (左) 和 *Rhg4* (右) 位点 SNP 标记高分辨率溶解曲线扫描结果
Fig. 7 The results of melting curve of SNP markers for *rhg1* (left) and *Rhg4* (right) loci

3 结论与讨论

本研究评价大豆胞囊线虫抗病位点 *rhg1* 和 *Rhg4* 紧密连锁 SSR 标记对种质资源的辅助筛选效率,发现 Satt309 对抗病种质的检出率为 55.56%,这一结果与马岩松等^[13]利用该标记对分离群体的分子辅助选择效率(50%)基本一致。本研究发现 Sat_162 对抗病种质资源的检出率为 66.67%,这与马岩松等的研究结果存在一定差异。由于 SSR 标记的多等位性,导致标记在种质资源中存在较多种类的等位变异,虽然在筛选抗病种质方面具有一定的准确性,仍存在很大比例的漏检情况,因此开发二等位的 SNP 标记对于辅助选择大豆胞囊线虫抗性种质非常有必要。

Cook 等^[1]和 Liu 等^[2]分别报道了 *rhg1* 与 *Rhg4* 位点的关键基因,本研究利用其研究结果评价了国内部分大豆种质在上述位点内的等位变异情况,相比 SSR 标记,SNP 标记辅助筛选抗病种质可以获得更高的选择准确性。

参考文献

[1] Liu S, Kandoth P K, Warren S D, et al. Soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens[J]. Nature, 2012, 492:256-260.

[2] Cook D E, Lee T G, Guo X, et al. Copy number variation of multiple genes at *Rhg1* mediates nematode resistance in soybean[J]. Science, 2012, 338: 1206-1209.

[3] 魏利,李英慧,邱丽娟.大豆胞囊线虫(SCN)抗病候选基因研究进展[J].大豆科学,2010,29(6):1059-1064. (Wei L, Li Y H, Qiu L J. Identification efficiency about resistance to soybean cyst nematode with relative molecular markers in hybrid progeny[J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 1059-1064.)

[4] 田丰,陈立杰,王媛媛,等.根瘤菌 Sneb183 对大豆胞囊线虫二龄幼虫的作用方式研究[J].中国生物防治学报,2014(4):540-545. (Tian F, Chen L J, Wang Y Y, et al. Action mode of *Sinorhizobium fredii* Sneb183 on the activity of soybean Cyst Nematode[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014(4): 540-545.)

[5] 王雪,段玉玺,陈立杰,等.大豆胞囊线虫胁迫下大豆根部蛋白质差异表达分析[J].中国油料作物学报,2015,37(1):96-101. (Wang X, Duan Y X, Chen L J, et al. Proteins different expression in soybean roots after infected by *Heterodera glycines*

Ichinohe [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2015, 37(1):96-101.)

[6] 练云,卢为国.大豆抗 SCN 机制及抗病相关基因研究进展[J].中国油料作物学报,2013,35(6):727-732. (Lian Y, Lu W G. Advances on resistance mechanism and gene to SCN in soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35(6): 727-732.)

[7] 袁翠平,赵洪锬,王玉民,等.野生大豆抗胞囊线虫基因 SHMT 的序列多样性[J].中国油料作物学报,2014,36(6):755-760. (Yuan C P, Zhao H K, Wang Y M, et al. Sequence diversity of resistance gene SHMT to soybean cyst nematode among wild soybeans [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2014, 36(6):755-760.)

[8] 邱丽娟,常汝镇,王文辉,等.大豆抗胞囊线虫病种质 *rhg_1* 和 *Rhg_4* 位点的单核苷酸多态性(SNPs)[J].植物遗传资源学报,2003,4(2):89-93. (Qiu L J, Chang R Z, Wang W H. Single Nucleotide Polymorphism(SNPs) at both loci of *rhg1* and *Rhg4* in soybean resistant germplasm [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2003, 4(2):89-93.)

[9] 史学晖,李英慧,于佰双,等.大豆胞囊线虫主效抗病基因 *Rhg4*(*GmSHMT*)的 CAPS/dCAPS 标记开发和利用[J].作物学报,2015(10):1463-1471. (Shi X H, Li Y H, Yu B S, et al. Development and utilization of CAPS/dCAPS markers based on the SNPs lying in soybean cyst nematode resistant genes *Rhg4* [J]. Acta Agronomica Sinica, 2015(10):1463-1471.)

[10] 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. Characteristics of alleles at Satt309 locus associated with *rhg1* gene resistant to SCN of Chinese soybean [J]. Soybean Science, 2003, 22(4): 246-250.)

[11] 高源,常玮,韩英鹏,等.2种大豆胞囊线虫鉴定方法比较及分析[J].大豆科学,2012,31(2):274-277. (Gao Y, Chang W, Han Y P, et al. Comparisons and analysis on the two methods of evaluating resistance to soybean cyst nematode [J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 274-277.)

[12] Schmitt D R, Shannon J G. Differentiating soybean responses to *Heterodera* soybean cyst nematode race[J]. Crop Science, 1992, 5(8):288-294.

[13] 马岩松,刘鑫磊,栾晓燕,等.大豆胞囊线虫病抗性基因相关分子标记对杂交后代抗性的鉴定效率[J].大豆科学,2014,33(2):174-178. (Ma Y S, Liu X L, Luan X Y, et al. Identification efficiency about resistance to soybean cyst nematode with relative molecular markers in hybrid progeny [J]. Soybean Science, 2014, 33(2):174-178.)