

大豆抗胞囊线虫 (*Heterodera glycines* Ichinohe) 基因定位研究进展

卢为国¹, 李卫东¹, 梁惠珍¹, 王树峰¹, 孙 慎²

(1. 河南省农业科学院棉花油料作物研究所, 河南 郑州 450002; 2. 开封市农业局, 河南 开封 475000)

摘要: 大豆胞囊线虫 (soybean cyst nematode, SCN) 是一种世界性病害。文中就大豆抗胞囊线虫基因定位方面的研究进展进行了综述。遗传研究表明: 大豆对胞囊线虫的抗性遗传受少数几对基因控制, 但是作用机制非常复杂。借助分子遗传图谱, 采用不同的抗源共计筛选到 60 个与抗病基因有关的标记, 其中的一些位于相同的位点。其中, 位于 G 连锁群上的 *rhg1* 位点和 A 连锁群上的 *Rhg4* 位点在多个群体中得到验证, 并且对多个生理小种有抗性作用。由于采用的抗源和作图群体不同, 接种的线虫群体在遗传上的异质性和分子标记本身的局限性, 许多研究结果差异很大, 同时也表明大豆对胞囊线虫的抗性遗传机制的复杂性。鉴于目前定位方法的原因, 基因的精细定位需要借助于作图定位软件的改进, 分子遗传图谱的加密和表型鉴定准确性的提高。

关键词: 大豆; 胞囊线虫; QTL

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2005)11-0013-05

大豆胞囊线虫 (soybean cyst nematode, SCN) 是一种存在于土壤中的微生物, 以雌虫寄生在大豆根部, 危害大豆生长, 是大豆生产上的一种重要病害。据估计, 1998 年, 由于大豆胞囊线虫危害, 造成全球大豆产量损失约 900 万 t^[1], 相当于中国全年大豆总产量的 60% 左右。研究人员在抗性遗传方面做了大量的研究工作, 但是, 由于抗性鉴定需要计数根部胞囊数目, 鉴定结束后, 大豆材料一般很难存活, 是遗传研究的一个限制因素。近年来, 由于分子标记技术的发展, 使线虫学家和育种学家可以通过基因定位来研究抗病基因的效应, 筛选可以用于标记辅助选择 (marker assistant selection, MAS) 的分子标记, 以便能够代替常规抗病鉴定而应用于育种实践, 我们就这方面的研究进展作以综述。

1 用于定位的遗传图谱和标记类型

在大豆上, Keim 于 1990 年采用 RFLP 标记构建了第 1 个相对完整的遗传图谱^[2]。1993 年, Shoemaker 等用栽培大豆和野生大豆杂交衍生的作图群体构建了一个密度更大的遗传图谱^[3], 包含

365 个 RFLP 标记, 11 个 RAPD 标记, 4 个同工酶标记, 3 个形态标记, 共计 25 个连锁群。1999 年之前的 QTL 定位多数是依据这个图谱, 以下简称 Shoemaker 图谱。Keim 于 1997 年用 AFLP 标记构建了另外一个分子标记遗传图谱^[4]。1999 年, Cregan 等用 3 个图谱整合起来构建目前公认的公共遗传图谱^[5], 共计 1 423 个遗传标记, 606 个 SSR 标记, 689 个 RFLP 标记, 79 个 RAPD 标记, 11 个 AFLP 标记, 10 个同工酶标记, 26 个经典遗传学标记。截至目前, 该谱的 SSR 标记数目已经达到 1 016 个, 标记总数 1 833 个, 包含 20 个连锁群, 与大豆的染色体对数相等, 是目前密度最大, 引用频率最高的遗传图谱。

目前, 用于大豆抗胞囊线虫基因定位的分子标记有 RFLP、AFLP、RAPD、SSR、SNPs 等。其中, RAPD 标记由于重复性差已经很少采用; RFLP、AFLP 为共显性标记, 多态性高、稳定性好, 但是实验方法繁琐, SSR 标记为共显性标记, 在大豆上多态性高、稳定性好, 实验简便, 成本低, 容易应用于育种实践, 因此, 目前被广泛采用。

收稿日期: 2005-06-18

作者简介: 卢为国 (1971-), 男, 河南伊川人, 副研究员, 在读博士, 主要从事大豆遗传育种研究。

2 抗 SCN 基因定位研究进展

从 1990 年至今,研究人员采用不同的抗源共计筛选到 60 个与 SCN 有关的 QTL (Quantitative trait loci), 其中的一些位于相同的位点。这 60 个 QTL 分布于以下连锁群上: A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1a、D2、E、F、G、H、I、J、L、M 和 N。G 连锁群上发现有 4 个抗 SCN QTL 位点, B1、C2、和 D2 连锁群上有 3 个抗 SCN QTL 位点, A1、B2、D1a、E 和 M 连锁群上有 2 个抗 SCN QTL 位点, 其他连锁群上发现了 1 个抗 SCN QTL 位点^[6]。由于各个研究者采用的作图群体大小不同, 遗传结构各异, 采用的标记类型也不一样, 因此, 研究报道中 QTL 位点在遗传图谱上的位置只能认为是探索性的, 局限于特定的群体。目前筛选到的抗源中, 从 Peking 中发现的抗病基因最多, 不同的研究者在 Peking 中发现了 9 个不同的染色体区段存在 QTL 位点, PI438489B 中有 8 个 QTL 位点, PI437654 中有 6 个 QTL 位点^[9]。这些位点可以解释的表型变异差别很大, 在 1%~91% 之间。Peking 也是研究最为深入的抗源之一, 第 1 个抗胞囊线虫的品种 Pickett 就是用 Peking 为抗源选育而成的, Genbank 中许多 SCN 抗性基因相关片段克隆也是以 Peking 为材料得到的。

最早采用分子标记来定位 SCN 抗病基因的研究报道在 1992 年, Weismann^[7] 等发现在 2 个紧密连锁的 RFLP 标记 pBLT24 和 pBLT65 之间存在抗病基因 *Rhg4*, 但是该研究并未直接进行抗病鉴定, 而是根据连锁图上这 2 个标记与控制种皮色基因 *i* 连锁, 而 1965 年 Matson 和 Williams 发现 *i* 基因与抗病基因 *Rhg4* 紧密连锁^[8], 因此, Weismann 推测这 2 个 RFLP 标记可能与抗病基因 *Rhg4* 紧密连锁。

Concibido 等(1994)最早采用分离群体的表现型和基因型数据来定位 SCN 抗病基因^[9]。以 PI209332 为抗源, 在 F₂ 分离世代检测到 2 个 RFLP 标记 A085 和 B032 与一个抗病基因紧密连锁, 这个抗病基因对来自明尼苏达州的 3 号生理小种表现较强的抗性。2 个标记位点合起来可以解释 51.7% 的表型变异。标记 A085 位于 A2 连锁群上(Shoemaker 图谱), 与控制种皮色的 *i* 基因相距 10.9cM。这个结果进一步验证了 Weismann 等 1992 年的研究结果。后来的研究者采用 Peking^[10-11]、PI437654^[12] 和 J87-233^[5] (含有 Peking、PI 88788 和 PI90763 血统)等抗源确认在 A2 连锁群上的 *i* 位

点附近确实存在抗 3 号生理小种的抗病基因。

第 2 个标记 B032 初步定位在 K 连锁群上(Shoemaker 图谱), 在 PI209332 的后代群体中表现出与抗病基因显著的相关性, 可以解释 38% 的表型变异。依据更多的分子标记数据的定位结果, Concibido 发现 B032 正确的定位应该是在 J 连锁群上^[13], 1997 年他又发现在 PI90763 中有一个抗病基因位于 J 连锁群上的 B032 附近^[14]。

1994 年, Concibido 等还发现另一个含有抗性 QTL 位点的区域^[9], 与 RFLP 标记 K069 紧密连锁。而在此之前, Boutin 等用近等基因系研究证明, K069 位于 G 连锁群上(Shoemaker 图谱), 与抗病基因紧密连锁^[15]。之后, 更多的与 K069 连锁的分子标记被定位在 G 连锁群上的这个区段, 与早期的经典遗传研究结果相结合, 这个 QTL 位点被命名为 *rhgl*。

后来的研究结果表明: 在 Peking、PI88788、PI90763 和 PI209332 中 *rhgl* 附近均存在 QTL 位点抗 3 号生理小种^[14, 16]。Webb 等发现, 在 PI437654 中存在抗 3 号小种的 QTL 位点位于 G 连锁群上相同的区段^[13]。其他研究者用 PI88788^[17]、Peking^[11]、J87-233^[18] 进一步证实了这个 QTL 位点的存在。后来, Concibido 等在 *rhgl* 位点附近构建了一个高密度分子图谱^[19], 将这个 QTL 位点定位于 RFLP 标记 B053 和 Bng30 之间, 距 B053 约 4.6 cM, 距 Bng30 约 2.8 cM。最近, 许多更近的 SSR 标记被定位在 *rhgl* 附近, Satt309 与 *rhgl* 相距 0.4 cM^[20]。

3 QTL 定位结果的不一致性

尽管许多在 *rhgl* 和 *Rhg4* 位点附近的定位研究结果得到相互验证, 仍然有许多研究结果表现出较大的差异。Webb 等(1995)在 PI437654 中发现了 3 个 QTL 位点抗 3 号生理小种^[12], 分别位于 A2、G 和 M 连锁群上。其中, 位于 G 连锁群上的位点(*rhgl*)比 A2 连锁群上的位点(*Rhg4*)具有更大的效应, 任何一个单个的位点都不能解释很大的表型变异。但是, Vierling 等^[21]在 PI437654 中却发现了另外一些 QTL 位点与抗 3 号生理小种的基因有关。采用 Williams 82 和 Hartwig (以 PI437654 为抗源育成的品种)杂交得到的群体, Vierling 等分别在 A2、B1、F 和 S 连锁群上发现了抗性 QTL 位点^[21]。其中, RFLP 标记 A567 位于 S 连锁群上, 而依据 Cregan 1999 年的图谱, 该标记位于 B1 连锁群上^[5]。

Hartwig 是将 PI437654 中的抗病基因通过回交转入 Forrest 而育成的抗病品种, 而 Forrest 中含有 Peking 中的抗病基因, 因此, Hartwig 兼有 PI437654 和 Peking 的抗病基因。Vierling 等发现的 A567 位点可以解释 91% 的表现型变异, 是目前发现的效应最大的 QTL 位点。而一般情况下, QTL 位点属于多基因体系中的一个基因, 只能解释部分的表型变异, 而 A567 位点表现出质量性状的特征, 与 Webb 等的研究结果相互矛盾^[12]。

对于这种情况有很多解释。首先, 他们采用的病原物可能是不同的。尽管按照 Riggs 的模式均属于 3 号生理小种, 但是来自不同地区的线虫群体可能含有不同的致病基因与 PI437654 中不同的抗病基因发生相互作用^[22]。其次, 基因复制可能是另外一种解释, 即 Vierling 在 PI437654 中检测到了一个 *rhg1* 的复制位点从而产生了不同的效应。Shoemaker 等曾经在野生大豆中发现这种现象^[23]。另外, Hartwig 中有来自 Peking 的抗病基因, Vierling 检测到的基因可能是来自 Peking 的新的抗病基因位点。第 4 种解释可能是抗病基因之间的上位性互作, 即在不同的遗传背景下, 抗病基因之间产生上位性互作, 共同控制对某个生理小种的抗性, 因此, 在不同的杂交组合中抗病基因的作用方式是不同的。这在经典的遗传试验中也是存在的^[24]。

在 PI437654 中还发现了另外一些抗病基因, Schuster 等用 BSA (Bulk segregant analysis, BSA) 法检测到在 D2 连锁群上有一个 QTL 控制大豆对 14 号生理小种的抗性^[23]。Webb 等 (2003) 以 PI437654 为抗源, 检测到在 C1、L25、L26 连锁群上存在较小效应的 QTL^[26]。其中, L25 上的标记来自 Cregan 1999 年图谱中的 B1、B2 连锁群, L26 与 Cregan 1999 年图谱中的 J 连锁群对应^[5]。Webb (2003) 等发现这些 QTL 位点对多个生理小种具有抗性^[26]。由于 PI437654 抗所有已知的生理小种^[27~29], 因此, 在这个抗源中检测到多个抗病基因也是可以理解的。

QTL 位点的不一致性同样也存在于 Peking 这个应用最广泛的抗源中。不同的研究者在 Peking 中发现了不同的抗 3 号生理小种的抗病基因。Mahalingam 和 Skorupska 在控制种皮色的基因 *i* 附近找到了一个 QTL 位点^[19], 结合以前的研究结果推测可能是 *Rhg4*, 另外, 还在 F 和 C1 连锁群上各发现了一个 QTL 位点。Concibido 等 (1997) 发现位于 G 连锁群上的 *rhg1* 位点是 Peking 中主要的抗性

基因位点^[14]。后来, Qiu 等 (1999) 在 Peking 中定位了 3 个 QTL 分别位于 B2、H 和 I 连锁群上^[30]。同时发现, Concibido (1997)^[14] 和 Mahalingam (1995)^[10] 研究中发现的 QTL 在自己的群体中并未表现出显著的抗性。但 Meksem 等 (2001) 以 Forrest 为抗源的研究结果再次证明了 *rhg1* 和 *Rhg4* 两个位点在抗病性中的作用^[31], 同时提出了 2 对基因遗传模型, 这与 Arelli^[32]、Caldwell^[33]、Matson^[8] 等经典遗传试验的结果是互相矛盾的。但是由于 Forrest 是用 Peking 作亲本培育而成的, 可能 Forrest 只保留了 Peking 中的 2 个抗病基因, 从而导致了 2 对基因遗传模型的产生。

有关 Peking 的研究结果的不一致有许多种解释。首先, 各个研究者采用的抗源可能是不同的, 尽管这些抗源都以 Peking 来命名。Skorupska (1994) 收集了不同研究者采用的 Peking, 发现它们在 SCN 抗性表现不尽相同, 分子标记分析结果也表明它们在遗传上也是异质的^[34]。其次, 各个研究者采用的分子标记并未覆盖整个基因组, 不同的研究者搜索了基因组的不同区段, 因而找到的 QTL 也不相同。其他的原因包括: 采用的线虫群体包含不同的致病基因, 抗病基因的复制以及基因之间的复杂的相互作用等。

4 寻找新抗源、发掘新的抗病基因的研究进展

目前, 研究的热点在探索已经定位的 2 个主要的抗性基因位点 *rhg1* 和 *Rhg4* 的作用机制。另外的一些研究者致力于寻找新的抗源, 发掘新的抗病基因。Yue 等 (2001) 在研究 PI89772 的抗病遗传机制中发现了位于 *rhg1* 附近的一个重要的 QTL^[35], 同时在 B1、D1a、D2 连锁群上发现了控制有关抗 1 号、2 号和 5 号生理小种的 QTL, 没有哪一个 QTL 可以对某个特定的生理小种产生完全的抗性, 但是 QTL 位点之间的相互作用可以对某个生理小种产生理想的抑制效果。这与 Concibido^[14, 36] 和 Webb^[12] 的结论相一致。Yue^[37] 等在另一项研究中发现, 在 PI438489B 中存在新的 QTL 位于 A1、B1、B2、C1、C2、D1a、E 和 G 连锁群上。PI438489B 原产地在中国, 可以抗 1、2、3、5 和 14 号生理小种^[38]。在 PI438489B 中位于 G 连锁群上的 QTL 并不在 *rhg1* 位点, 因此, PI438489B 是宝贵的新抗源, 含有新的抗性基因, 在抗线虫育种工作中对拓宽抗病品种的遗传基础有着重要的意义。Diers 等^[38] 筛选出了一批新的抗源, 包含目前育种家普遍采用的抗病基

因如 *rhg1* 和 *Rhg4*, 包括 PI 92720、PI 22897 (Columbia)、PI 438503A、PI 404166 等, 这些种质大大丰富了抗病基因库, 为育种家提供了更多的选择。

在野生大豆 (*G. soja*) 中寻找抗病基因的工作也在进行。野生大豆广泛分布于中国、日本、韩国和俄罗斯东部, 被认为是栽培大豆的祖先。Wang 等^[39]于 2001 年首次在野生大豆中检测到了 SCN 抗性 QTL。他们采用的群体就是 Shoemaker 等用栽培大豆 (A81—356022) 和野生大豆 PI 468916 杂交得到的。在这个群体中检测到了 2 个 QTL, 一个位于 G 连锁群上 SSR 标记 Satt288 和 Satt472 之间, 不同于以前发现的 *rhg1* 的位点, 另一个位于 E 连锁群上。位于 E 连锁群上的 QTL 并非是野生大豆所特有的, 因为 Yue 等 (2001) 在 PI 438489B 中同一个区域曾经发现了 QTL^[37]。

5 抗 SCN 基因定位研究方法探讨

借助分子标记构建遗传图谱来定位抗病基因是目前普遍采用的手段, 在抗 SCN 基因定位方面也取得了很大的进展。2 个重要的基因位点 *rhg1* 和 *Rhg4* 的定位已经在多个群体中得到验证, 被多数研究者所承认, 这是经典遗传试验所难以达到的水平。然而, 许多不一致的研究结果也使研究者感到困惑, 表明大豆中存在复杂的抗病遗传机制, 目前只是在这个研究方向上取得了初步的结果。我们认为, 试验方法手段方面有待进一步完善。①目前普遍采用的作图定位软件是 Mapmaker 和 Win QTL Cartographer。Mapmaker 在构建连锁图时是依据标记之间的重组率来计算的, 但是由于重组率并不等于图距, 二者是一种函数关系, 研究者建立了许多作图函数, 如 Morgan 函数、Haldane 函数和 Kosambi 函数, 这些方法的前提是一些假设, 如不考虑双交换, 但是在生物体内是存在的。用 Win QTL Cartographer 中的复合区间作图法 (Composite Interval Mapping) 在检测 QTL 时需要附近的分子标记来矫正, 如果 QTL 附近的分子标记数目较少, 而且 QTL 的效应较大的情况下, 则可能出现所谓的“幻影 QTL”。另外, 目前, 上位性效应和环境互作效应的检测方法仍不完善, 而在有些情况下, 上位性效应有很大的作用, 上文中已经有表述。②大豆上分子遗传图谱还有待加以完善。尤其是大豆细胞遗传学研究滞后, 不能将连锁图与染色体结合起来。一般来说, 着丝粒附近的交换较少, 而端粒附近发生交换的频率高一些, 目前的作图软件在这 2 个区域的图距计算与

实际情况不太符合。③表型鉴定存在很大的试验误差, 如大豆胞囊线虫表型鉴定方法还是 20 世纪 80 年代 S. C. Anand 的方法, 鉴定工作量大, 数据的可重复性差。

基于上述原因, 基因定位要想取得突破性进展, 需要在以下几方面有所改进: ①完善统计方法, 使统计假设更接近于生物体本身。朱军等以混合线性模型为基础, 开发出 QTL Mapper 和 QTL Network, 可以检测上位性效应和环境互作效应^[40], 在这方面进行了有益的探索。②高密度分子图谱的构建。美国正在计划启动大豆基因组计划, 测定大豆基因组序列。南京农业大学国家大豆改良中心正在与中科院遗传与发育生物学研究所合作构建高密度的分子遗传图谱。这些研究的结果将为 QTL 精细定位提供有益的帮助。③线虫学家对抗性机制的深入研究。这方面的研究结果将有助于我们采用合理的抗性指标, 减少环境对试验结果的影响。

参考文献:

- [1] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 281—282.
- [2] Keim P, B W Diers, T C Olson, *et al.* RFLP mapping in soybean: Association between marker loci and variation in quantitative trait [J]. *Genetics*, 1990, 126: 735—742.
- [3] Shoemaker R C, T C Olson. Molecular linkage map of soybean (*Glycine max* L Merr.) [A]. S J O' Brien (ed.) *Genetic maps: Locus maps of complex genomes* [M]. Cold Spring Harbor, New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 131—138.
- [4] Keim P, J M Schupp, S E Travis, *et al.* A high-density soybean genetic map based on AFLP markers [J]. *Crop Sci*, 1997, 37: 537—543.
- [5] Cregan P B, T Jarvik, A L Bush, *et al.* An integrated genetic linkage map of the soybean genome [J]. *Crop Sci*, 1999, 39: 1464—1490.
- [6] Concibido V C, B W Diers, P R Arelli. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean [J]. *Crop Sci*, 2004, 44: 1121—1132.
- [7] Weismann J M, B F Matthews, T E Devine. Molecular markers located proximal to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4* [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 85: 136—138.
- [8] Matson A L, L F Williams. Evidence of a fourth gene for resistance to the soybean cyst nematode [J]. *Crop Sci*, 1965, 5: 477.
- [9] Concibido V C, R L Denny, S R Boutin, *et al.* DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) [J]. *Crop Sci*, 1994, 34: 240—246.
- [10] Mahalingam R, H T Skorupska. DNA markers for re-

- sistance to *Heterodera glycines* race-3 in soybean cultivar 'Peking' [J]. *Breed Sci*, 1995, 45: 435-443.
- [11] Chang S J C, T W Doubler, V Y Kilo, *et al.* Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) race 3 [J]. *Crop Sci*, 1997, 37: 965-971.
 - [12] Webb D M, B M Baltazar, A P Rao-Arelli, *et al.* Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in soybean PI437. 654 [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 574-581.
 - [13] Concibido V C. Identification and characterization of soybean cyst nematode resistance genes using DNA markers [D]. Univ of Minnesota, St Paul, 1995.
 - [14] Concibido V C, R Denny, D Lange, *et al.* Genome mapping on soybean cyst nematode resistance genes in 'Peking', PI90763, and PI88788 using DNA markers [J]. *Crop Sci*, 1997, 37: 258-264.
 - [15] Boutin S, H Ansari, V C Concibido, *et al.* RFLP analysis of cyst nematode resistance in soybeans [J]. *Soybean Genet Newsl*, 1992, 19: 123-127.
 - [16] Concibido V C, R Denny, D Lange, *et al.* The soybean cyst nematode resistance gene on linkage group G is common among sources of resistance [J]. *Soybean Genet Newsl*, 1995, 22: 269-272.
 - [17] Diers B W, A P Rao-Arelli, T Kisha. Genetic mapping of soybean cyst nematode resistance genes from PI 88788 [J]. *Soybean Genet Newsl*, 1997, 24: 194-195.
 - [18] Heer J A, H T Knap, R Mahalingam, *et al.* Molecular markers for resistance to *Heterodera glycines* in advanced soybean germplasm [J]. *Mol Breed*, 1998, 4: 359-367.
 - [19] Concibido V C, R L Denny, D A Lange, *et al.* Targeted comparative genome analysis and qualitative mapping of a major partial resistance gene to soybean cyst nematode [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 234-241.
 - [20] Cregan P B, J Mudge, E W Fickus, *et al.* Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the rhg1 locus [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 811-818.
 - [21] Vierling R A, J Faghihi, V R Ferris, *et al.* Association of RFLP markers conferring broad-based resistance to the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 83-86.
 - [22] Niblack T L, P R Arelli, G R Noel, *et al.* A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines* Race 3 [J]. *Nematol*, 2002, 34: 279-288.
 - [23] Shoemaker R C, K Polzin, J Labate, *et al.* Genome duplication in soybean (*Glycine soja*) [J]. *Genetics*, 1996, 144: 329-338.
 - [24] 卢为国, 盖钧镒. 大豆对胞囊线虫抗性遗传与分子标记研究进展 [J]. *大豆科学*, 2004, 23(1): 59-65.
 - [25] Schuster L, R V Abdelnoor, S R R Marin, *et al.* Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 91-96.
 - [26] Webb D M. Quantitative trait loci associated with cyst nematode resistance and uses thereof [P]. US: Patent 6, 538, 175. Date issued 25 Mar. 2003.
 - [27] Anand S C, K M Gallo, I A Baker, *et al.* Soybean plant introductions with resistance to races 4 or 5 of soybean cyst nematode [J]. *Crop Sci*, 1988, 28: 563-564.
 - [28] Anand S C, K M Gallo. Identification of additional soybean germplasm with resistance to race 3 of the soybean cyst nematode [J]. *Plant Dis*, 1984, 68: 593-595.
 - [29] Anand S C. Sources of resistance to *Heterodera glycines* in soybean cultivars [A]. P T Colyer. Proc Southern Soybean Disease Workers 18th Ann. Meet [C]. Lexington KY: Kentucky Univ Press, 1991. 112-118.
 - [30] Qiu B X, P R Arelli, D A Sleper. RFLP markers associated with soybean cyst nematode resistance and seed composition in a 'Peking' \times 'Essex' population [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 356-364.
 - [31] Meksem K, P Pangiotis, D Hyten, *et al.* Forrest resistance to soybean cyst nematode is bigenic: Saturation mapping of the rhg1 and Rhg4 loci [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 710-717.
 - [32] Rao-Arelli A P, S C Anand, J A Wrather. Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene [J]. *Crop Sci*, 1992, 32: 862-864.
 - [33] Caldwell B E, C A Brim, J P Ross. Inheritance of resistance of soybeans to the cyst nematode *Heterodera glycines* [J]. *Agron J*, 1960, 52: 635-636.
 - [34] Skonupska H T, I S Choi, A P Rao-Arelli, *et al.* Resistance to soybean cyst nematode and molecular polymorphism in various sources of Peking' soybean [J]. *Euphytica*, 1994, 75: 63-70.
 - [35] Yue P, D A Sleper, P R Arelli. Mapping resistance to multiple races of *Heterodera glycines* in soybean PI 89772 [J]. *Crop Sci*, 2001, 41: 1589-1595.
 - [36] Concibido V C, N D Young, D A Lange, *et al.* RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332 [J]. *Crop Sci*, 1996, 36: 1643-1650.
 - [37] Yue P, P R Arelli, D A Sleper. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI 438489B [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 921-928.
 - [38] Diers B W, H T Skonupska, A P Rao-Arelli, *et al.* Genetic relationships among soybean plant introductions with resistance to soybean cyst nematode [J]. *Crop Sci*, 1997, 37: 1966-1972.
 - [39] Wang D, P R Arelli, R C Shoemaker, *et al.* Loci underlying resistance to race 3 of soybean cyst nematode in *Glycine soja* plant introduction 468916 [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 561-566.
 - [40] D L Wang, J Zhu, Z K Li, *et al.* Mapping QTLs with epistatic effects and QTL \times environment interactions by mixed linear model approaches [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 1255-1264.