

大豆疫霉根腐病抗性研究进展

刘世名^{1,2}, 李 魏¹, 戴良英¹

(1. 湖南农业大学 植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2. 中国农业科学院 植物保护研究所, 北京 100193)

摘要:大豆疫霉根腐病由卵菌大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)侵染引起,是一种大豆生产上危害非常严重的病害。大豆对疫霉菌的抗性表现有2种,一种是由单位点显性基因 *Rps* 控制的完全抗性,对大豆疫霉菌小种具有特异性,另一种为多基因控制的部分抗性,由数量性状位点控制,对所有大豆疫霉菌小种具有广谱抗性。迄今已定位、鉴定了26个单位点 *Rps* 基因,分别分布在第2(1个)、3(12个)、10(1个)、13(4个)、16(2个)、17(1个)、18(4个)及19(1个)条染色体上。其中,*Rps1k* 提供了最稳定的 PRR 抗性。尽管在 *Rps2* 等位点区域检测到了抗病基因簇,但至今仅从 *Rps1k* 位点分离出了功能基因 *Rps1k-1* 和 *Rps1k-2*,二者均为 *CC-NBS-LRR* 类型基因,且在细胞内可重组形成 *Rps1k-3*。单位点基因的 PRR 抗性一般能维持8~15年左右,QTL 控制的 PRR 抗性则较稳定、持久。有待不断发现新的 PRR 抗性资源和鉴定新的抗性基因,以及阐明大豆抗 PRR 的遗传与分子机制以长期、有效地防治大豆 PRR。本文主要针对大豆的 PRR 抗性研究,尤其是近年在多个新 *Rps* 基因的鉴定、相关基因组学(转录组学)、小 RNA 及蛋白质组学上的研究,以及影响大豆 PRR 抗性的基因功能鉴定等方面所取得的进展进行了综述。

关键词:大豆; *Phytophthora sojae*; 疫霉根腐病; 抗病性; 抗性位点基因

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.02.0320

Progresses in Research on the Resistance of Soybean to *Phytophthora* Root Rot Caused by *Phytophthora sojae*

LIU Shi-ming^{1,2}, LI Wei¹, DAI Liang-ying¹

(1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: *Phytophthora* root rot caused by *Oomycete Phytophthora sojae*, is a devastating pest in production of soybean (*Glycine max* L. Merr.). There are two types of soybean resistance to PRR: One is controlled by single gene (locus) with complete resistance to specific races, and the other one is controlled by multigenes, which are quantitative trait loci, with broad but partial resistance to all races of *Phytophthora sojae*. To date, totally, 26 single genes underlying complete resistance to PRR (resistance to *Phytophthora sojae*, *Rps*) have been identified, which distribute on Chromosomes 2 (1 gene), 3 (12 genes), 10 (1 gene), 13 (4 genes), 16 (2 genes), 17 (1 gene), 18 (4 genes) and 19 (1 gene), respectively. Among them, *Rps1k* provides the most stable resistance to PRR. Some clusters of disease-resistant genes were detected around the *Rps* genes regions, but so far, only *Rps1k-1* and *Rps1k-2* in *Rps1k* locus were isolated among all the identified *Rps* genes loci. Moreover, these 2 genes can further form *Rps1k-3* through recombination. Generally, the resistance of single gene can maintain about 8-15 years, whereas the resistance of QTL can remain much longer as well as stable. To long-term and effectively control PRR, screening more PRR-resistant soybean germplasm resources and identifying more new PRR-resistant genes are required, and finally the genetic and molecular mechanisms of soybean resistance to PRR would be elucidated. Here, this review focuses on the recent progresses in identification of novel *Rps* genes, research on genomics (transcriptome), small RNA and proteomics related with soybean resistance to PRR, and functional identification of the genes influencing the resistance to PRR.

Keywords: Soybean; *Phytophthora sojae*; *Phytophthora* root rot; Resistance; Resistant loci and genes

大豆疫霉根腐病(*Phytophthora* root rot, PRR)是由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)引起的一种大豆(*Glycine max* L. Merr.)生产上危害很严重的病害。该病最早于1948年在美国印地安纳州东北部发现,我国最先在黑龙江省发现,是一种典型的土传病害,尤其易在排水不良的黏性土壤及积水与洪涝田发生。大豆疫霉菌是一种卵菌,有多种不同生理小

种^[1],当条件适宜时残留在大豆中的卵孢子萌发形成孢子囊,继而产生大量游动孢子附着在种子和幼苗根部并萌发侵染大豆。该菌可侵染生长发育各阶段的大豆,尤其是种子和幼苗阶段,会导致种子腐烂,幼苗根、茎基部腐烂或出现水浸状或立枯并变红褐色,最终引起植株萎蔫、死亡。大豆受侵染的组织产生大量游动孢子以开始新一轮侵染,卵孢

收稿日期: 2015-10-21

基金项目: 湖南农业大学“神农学者”计划; 湖南农业大学青年科学基金(14QN19)。

第一作者简介: 刘世名(1970-),男,博士,教授,主要从事大豆抗病基因克隆与基因功能研究。E-mail: smluahn@yahoo.com。

子可在土壤里单独存活很多年,条件适宜即萌发,造成连年危害,从而使发生地的 PRR 很难清除。目前,主要采取栽培抗性大豆品种、喷施真菌杀菌剂、改良土壤排水状况、更改耕作栽培方式及使用含钙化合物等措施防治 PRR^[2],其中,栽培抗性大豆品种是最有效、环保的防治 PRR 措施。

大豆对 PRR 的抗性主要有单位点显性基因和多位点基因控制 2 种抗性,前者属完全抗性,对大豆疫霉菌的抗性具有小种特异性;而后者是数量性状位点,表现部分抗性,对大豆疫霉菌小种表现出广谱抗性^[3]。抗性资源品种可能同时带有一个或多个抗病基因^[46]。迄今,已从携带单位点抗性基因的大豆资源品种中分离鉴定出 26 个大豆疫霉菌抗性基因(resistant to *Phytophthora sojae*, *Rps*): *Rps1* (*Rps1a*、*Rps1b*、*Rps1c*、*Rps1d* 及 *Rps1k*)、*Rps2*、*Rps3* (*Rps3a*、*Rps3b* 及 *Rps3c*)、*Rps4*、*Rps5*、*Rps6*、*Rps7*、*Rps8*、*Rps9*、*Rps10*、*RpsYu25*、*RpsYD29*、*RpsUN1*、*RpsUN2*、*RpsJS*、*RpsAH*、*RpsSu*、*RpsYB30*、*RpsZS18* 及一个未命名的基因,分别分布在第 2(1 个)、3(12 个)、10(1 个)、13(4 个)、16(2 个)、17(1 个)、18(4 个)及 19(1 个)条染色体上^[3,7-17]。但至今仅从 *Rps1k* 位点分离出 *Rps1k-1* 和 *Rps1k-2* 两个功能基因,且二者又可重组形成 *Rps1k-3*^[18-19]。

大豆与疫霉菌之间的相互作用为“基因对基因(gene for gene)”模式,大豆的每个根腐病抗性基因在疫霉菌中有其对应的无毒基因(*avirulence gene*, *Avr*),它们相互作用共同调控大豆的疫霉根腐病抗性^[20]。*Avr* 基因被寄主大豆的抗病基因识别后产生蛋白效应子激发的免疫反应(effectors-triggered immunity, ETI)。通过建立不同疫霉菌间的杂交 F₂ 代的遗传图谱以及利用 BAC 克隆建立位点物理图谱等方法已陆续从大豆疫霉菌中定位、鉴定出一系列与大豆抗 PRR 基因对应的 *Avr* 基因^[21]。如, *Rps1a* 对应的 *Avr1a* 被定位在一段 114 kb 的区域^[22]; *Rps1b* 则对应 *Avr1b-1* 和 *Avr1b-2* 两个基因,其中 *Avr1b-1* 是一个小分泌蛋白基因,控制 *Rps1b* 介导的寄主植物过敏反应,而 *Avr1b-1* 的 mRNA 积累则需要有 *Avr1b-2* 的参与^[23]。还有几对 *Avr* 基因紧密连锁,如 *Avr1k* 与 *Avr1b-1* 相隔仅 5 kb,二者紧密连锁^[24];同样, *Avr3a* 与 *Avr5* 及 *Avr4* 与 *Avr6*^[25-28] 也是紧密连锁的。若沉默或敲除 *Avr* 基因,如 *Avr3a*^[29] 及 *Avr1d*^[30],疫霉菌侵染携带相应 *Rps* 基因的大豆则表现出致病性,使大豆感病。

定位、鉴定大豆的 PRR 抗性位点和基因及对应的疫霉菌 *Avr* 无毒基因有助于快速、准确分子辅助选育抗性大豆品种、揭示大豆的 PRR 抗性机制以及

与疫霉菌的相互作用机理。大豆的 PRR 抗性研究在其它方面也开展了很多工作,并已取得一定进展。本文着重对最近几年有关新 *Rps* 位点基因和 QTL 的定位,与疫霉菌抗性有关的大豆基因组学(转录组学)、小 RNA (small RNA) 及蛋白质组学研究,以及一些影响疫霉菌抗性的大豆基因功能的鉴定等所取得的进展进行综述。

1 大豆的 PRR 抗性遗传分析及抗性位点基因的鉴定与分离

1.1 单位点显性抗性基因

迄今,人们已定位、鉴定了 26 个单位点 *Rps* 抗性基因,其中 12 个抗性位点基因分布在第 3 条染色体上,其它位点分别分布在第 2、10、13、16、17、18 及 19 条染色体上(表 1)。这些 *Rps* 基因都是显性基因,对大豆疫霉菌的抗性具有生理小种特异性,单位点 *Rps* 基因可对一个或多个生理小种表现完全抗性。人们主要利用抗性资源品种与易感品种的杂交组合群体,以及 SSR、SNPs 等分子标记建立遗传图谱完成 *Rps* 位点抗性基因的定位与鉴定。它们的定位与鉴定拓展了抗性资源的挖掘以及加速了 PRR 抗性机制研究与分子育种。

最早定位的是第 3 条染色体上的 *Rps1* 基因^[31]。该位点含有 *Rps1a*、*Rps1b*、*Rps1c*、*Rps1d* 及 *Rps1k* 5 个等位基因^[31-35]。之后 *Rps7* 位点也被定位在这条染色体上^[35-36],该位点与 *Rps1* 连锁。第 13 条染色体上定位了 *Rps3* 位点,包含 *Rps3a*、*Rps3b* 和 *Rps3c* 3 个等位基因^[33-34],以及另外一个与 *Rps3* 连锁的位点 *Rps8*^[37-38]。第 16 条染色体上定位了 *Rps2*^[39],该位点区域富含多个 TIR-NBS-LRR 类型的基因,含有一个由 3 个功能基因(*Rmd-c*、*Rj2* 及 *Rps2*)组成的基因簇,其中 *Rps2* 可能属于 TIR-NBS-LRR 结构类型的基因^[38,40]。在第 18 条染色体上,定位了 *Rps4*^[41]、*Rps5*^[42] 和 *Rps6*^[43] 3 个 *Rps* 基因, *Rps4* 和 *Rps5* 均与 *Rps6* 连锁。

近年来,在第 2、3、10、16、17、18 及 19 条染色体上陆续定位、鉴定了 12 个新的 *Rps* 基因:*Rps9*^[11]、*RpsYu25*^[9]、*RpsYD29* 和 *Rps10*^[12-13]、*RpsUN1* 和 *RpsUN2*^[7]、*RpsJS*^[10]、*RpsAH*^[14]、*RpsSu*^[15]、*RpsZS18*^[16]、*RpsYB30*^[17] 及一个未命名基因^[8](表 1)。

利用 932 对 SSR 分子标记建立的 Ludou 4(抗性) × Youchan 4(易感) F₂ 代及 Cangdou 5(抗性) × Williams(易感) F₂ 代遗传图谱,在第 3 条染色体上鉴定出 Ludou 4 和 Cangdou 5 都含有一个相同的、新的 *Rps9* 基因,该基因不同于这条染色体上的其它 *Rps* 基因^[11]。利用 227 个 Yudou 25(抗性) × NG

6255(易感)F₂代及59个 Zeng 92116(抗性) × NH 5(易感)F₂代的遗传图谱,在第3条染色体上鉴定到 Yudou 25 和 Zeng 92116 都含有一个相同的、新的 *Rps* 基因 *RpsYu25*^[9]。Zhang 等^[12]开发了214个 Jikedou 2(易感) × Yudou 29(抗性)杂交组合衍生的 F₂代家系,利用已有的及开发的 SSR 分子标记建立遗传图谱,在第3条染色体上还鉴定到另外一个新的 *Rps* 位点基因 *RpsYD29*。从245个 PI567139B(抗性) × Williams(易感)F₂代的遗传图谱则鉴定出 PI567139B 含有2个 *Rps* 基因,分别命名为 *RpsUN1* 和 *RpsUN2*,*RpsUN1* 位于第3条染色体分子标记 Satt159 至 BARCOSOYSSR_03_0250 区域(6.5 cM),*RpsUN2* 位于第16条染色体分子标记 BARCOSOYSSR_16_1275 至 Sat_144 区域(3.0 ~ 3.4 cM),这2个区域均富含 *NBS-LRR* 基因^[7]。Zhang 等^[44]利用 SSR 和开发的 SNPs 建立了240个 E00003(抗性) × PI567543C(易感)F₄代的遗传图谱,鉴定出 E00003 的 PRR 抗性位点也位于第3条染色体上,是 *Rps1k* 的等位基因或与 *Rps1k* 紧密连锁。第3条染色体上新的 *RpsAH* 抗性基因的鉴定则是利用“大方六月早”(抗性) × “矮脚早”(易感)杂交组合衍生的 F₂代遗传材料完成^[14]。Sugimoto 等^[8]利用 Tanbakuro × Waseshiroge 杂交 F₂子代和 F₇子代在 Waseshiroge 的第3条染色体上鉴定了一个新的 PRR 抗性位点(未命名),该位点或者与 *Rps1* 等位或者与一个抗性基因簇紧密连锁。

另外,姚海燕等^[16]利用 Williams × 早熟 18 杂交分离群体鉴定了早熟 18 第2条染色体上一个新的 PRR 抗性位点 *RpsZS18*,位于微卫星分子标记 Sat_069 和 Sat_183 之间,与它们分别相距 10.0 和 8.3 cM。武晓玲等^[15]利用苏 88-M21 × 新沂小黑豆衍生的 F₂代 RILs 群体定位了一个抗大豆疫霉菌株 Pm14 的位点 *RpsSu*,位于第10条染色体上 Satt358 和 Sat_242 之间,与这2个微卫星分子标记分别相距 3.5 和 7.4 cM。在第17条染色体上迄今还只鉴定到一个 *Rps* 位点基因 *Rps10*,该基因是在利用 SSR 分子标记建立的102个 Wandou 15(抗性) × Williams(易感)杂交组合衍生的 F₂代家系遗传图谱的基础上定位的,*Rps10* 位点含8个基因,从中筛选到 Glyma17g28950.1 与 Glyma17g28970.1 两个候选基因,分别命名为 *Rps10-1* 和 *Rps10-2*^[13]。Sun 等^[10]利用 SSR 分子标记建立了231个 Nannong 10-1(抗性) × 06-070583(易感)F₂代的遗传图谱,在第18条染色体上鉴定到一个新的 *Rps* 基因 *RpsJS*。该基因位于第18条染色体上的分子标记 BARCOSOYSSR_18_1859 至 SSRG60752K 区间,全长约 138.9 kb,含14个基因,其中3个是 *NBS-LRR* 基因,即 Glyma18g51930、Glyma18g51950 和 Glyma18g51960。朱振东等^[17]则在大豆品种诱变 30 第19条染色体上鉴定了一个 PRR 抗性位点 *RpsYB30*,分别与微卫星分子标记 Satt497 和 Satt313 相距 4.4 和 3.3 cM。

表1 *Rps* 位点、遗传材料及其候选功能基因

Table 1 *Rps* loci, genetic sources and candidate functional genes

染色体 Chromosome	抗性位点 Resistant locus	抗性遗传资源 Genetic resistant resource	遗传材料 Genetic source	候选功能基因 Candidate functional gene	参考文献 Reference		
2	<i>RpsZS18</i>	早熟 18	Williams × 早熟 18		[16]		
		Zaoshu 18	Williams × Zaoshu 18				
3	<i>Rps1</i>	Blackhawk Mukden	OX 281 × Mukden		[31]		
		Illini Harly					
		<i>Rps1a</i>				Mukden	[33]
						Mukden	[35]
		<i>Rps1b</i>				PI84637	[33]
						PI172901	[34]
		<i>Rps1c</i>				PI54615-1	[33]
<i>Rps1d</i>	Harosoy	[32]					
	PI103091						
<i>Rps1k</i>	Kingwa	[31]					
	Elgin 87		Elgin × Elgin 87	<i>Rps1k-1</i> <i>Rps1k-2</i> <i>Rps1k-3</i>	[18-19]		

续表 1

染色体 Chromosome	抗性位点 Resistant locus	抗性遗传资源 Genetic resistant resource	遗传材料 Genetic source	候选功能基因 Candidate functional gene	参考文献 Reference
	<i>Rps7</i>	Harosoy			[36]
		OX281	OX281 × Mukden		[35]
	<i>Rps9</i>	Ludou 4	Ludou 4 × Youchan 4		[11]
		Cangdou 5	Cangdou 5 × Williams		
	<i>RpsYu25</i>	Yudou 25	Yudou 25 × NG 6255		[9]
		Zeng 92116	Zeng 92116 × NH 5		
	<i>RpsYD29</i>	Yudou 29	Jikedou 2 × Yudou 29	<i>Glyma03g04030.1</i> <i>Glyma03g04080.1</i>	[12]
	<i>RpsUN1</i>	PI567139B	PI567139B × Williams		[7]
	<i>RpsAH</i>	大方六月早	方六月早 × 矮脚早		[14]
		Dafangliuyuehao	Fangliuyuehao × Aijiaozao		
	Unnamed	Waseshiroge	Tanbakuro × Waseshiroge		[8]
10	<i>RpsSu</i>	苏 88-M21	苏 88-M21 × 新沂小黑豆		[15]
		Su88-M21	Su88-M21 × Xinyixiaohaidou		
13	<i>Rps3a</i>	PI171442			[33-34]
	<i>Rps3b</i>	PI172901			
	<i>Rps3c</i>	PI300046			
	<i>Rps8</i>	PI399073	PI399073 × A95-684043 PI399073 × IA2008R Williams × PI399073		[38] [36]
16	<i>Rps2</i>	CNS			[39]
	<i>RpsUN2</i>	PI567139B	PI567139B × Williams		[7]
17	<i>Rps10</i>	Wandou 15	Wandou 15 × Williams	<i>Glyma17g28950.1</i> <i>Glyma17g28970.1</i>	[6]
18	<i>Rps4</i>	PI86050			[41]
	<i>Rps5</i>	PI91160			[42]
	<i>Rps6</i>	Altona			[43]
	<i>RpsJS</i>	Nannong 10-1	Nannong 10-1 × 06-070583	<i>Glyma18g51930</i> <i>Glyma18g51950</i> <i>Glyma18g51960</i>	[10]
19	<i>RpsYB30</i>	诱变 30 Youbian30			[17]

1.2 多基因控制的 QTL

有的大豆资源品种的 PRR 抗性由多基因控制,即 QTL,对大豆疫霉菌所有小种都表现抗性,但只是部分抗性(通常也称“耐病性”),这种抗性表现持久、稳定。携带完全抗性 *Rps* 基因的大豆对疫霉菌其它小种可能也表现部分抗性,如 *Rps2*^[45]。目前已鉴定许多 QTL 控制的大豆 PRR 抗性资源以及一系列大豆 PRR 抗性 QTL^[3]。

利用北美栽培品种 Conrad 鉴定大豆 PRR 部分抗性 QTL 的报道最多,已从中鉴定了 15 个 QTL,包括之前分别在第 2、13 及 16 条染色体上定位的 2、3 及 1 个 QTL^[46-48]。Li 等^[49]将耐大豆疫霉菌的 Conrad 和中国耐病栽培品种合丰 25 杂交,并进一步获得 140 个 F₂ 代重组自交系(recombinant inbred lines, RILs),用 164 个 SSR 分子标记建立它们的遗传图谱,经过温室大豆疫霉菌侵染表型测定与连续 2 年

在加拿大和中国大田栽培调查幼苗死亡率,共鉴定了8个PRR耐病性QTL,分布在5条染色体上(第2、6、8、11和13),每个QTL的耐病性贡献率在4.24%~27.98%,其中3个QTL来自Conrad,5个来自合丰25,7个QTL的耐病性至少在3种不同生长环境条件下均可叠加。Wang等用Microarray及基因组学方法分析了Conrad × Sloan杂交组合群体的基因表达差异,在第12、13、14、17、18及19条染色体上鉴定了6个QTL^[50-51]。Tucker等^[53]利用298个V71-370 × PI407162杂交组合F₁₁代鉴定了3个QTL,分别位于第16(Satt529-Satt414)、20(Sat_105-Satt239)和18(Satt235-Satt163)条染色体上^[52]。利用176个Su88-M21 × Xinyixiaoheidou杂交F₂代在第15、10和6条染色体上鉴定了3个QTL,分别为*qPR-15-1*、*qPR-10-2*和*qPR-6-3*。

Lee等^[54-56]将大豆品种XO20-8与6个对PRR表现高抗性的PIs(plant introductions,即PI398841、PI407861A、PI427106、PI427105B、PI398297和PI417178)分别杂交,获得6个嵌套(nested)RILs群体,然后建立XO20-8 × PI398841与XO20-8 × PI407861A的遗传图谱以及这6个RILs群体的联合连锁图谱(Joint linkage mapping),共鉴定了16个抗PRR的QTL,其中4个新的QTL分布在第4、9、12及16条染色体上;另外,在第18条染色体上鉴定的QTL是PI427106或者PI427105B的主要QTL,贡献了10%~45%的抗性。Sun等^[57]还将关联图谱(association mapping)应用于PRR抗性QTL的定位,用138个SSR分子标记筛选175个大豆资源品种,鉴定了730个SSR位点,其中4个SSR位点(Satt634-133、Satt634-149、Sat_222-168和Satt301-190)与PRR抗性关联。

上述QTL的定位与鉴定很大程度上补充了大豆的PRR抗性基因,它们产生的PRR抗性更稳定、持久,因此,将QTL与单位点抗性位点结合起来选育PRR抗性大豆品种将是未来大豆抗病分子育种的一个重要策略。

1.3 PRR抗性位点功能基因的分离

目前,已鉴定的大多数抗病基因都属于NBS-LRR基因大家族或与之关联。而所有已定位的*Rps*位点所在基因组区域基本上都富含NBS-LRR基因。所以,大都预测这些*Rps*位点的NBS-LRR基因与抗PRR有关。但是,从*Rps*位点分离出来的功能基因仅有*Rps1k*。携带*Rps1k*但对乙烯非常不敏感的*etr1-1*突变株丧失对大豆疫霉菌4号和7号小种的抗性,但仍保持对1号小种的抗性,表明*Rps1k*位点含有1个以上抗PRR基因^[58]。后来人们从*Rps1k*

位点分离出*Rps1k-1*和*Rps1k-2*两个CC-NBS-LRR型功能基因,且二者又可重组形成*Rps1k-3*^[18-19]。*Rps2*位点富含9个NBS-LRR基因,与另外2个基因(*Rmd-c*和*Rj2*)组成基因簇,预测*Rps2*为TIR-NBS-LRR型基因^[40,59]。*Rps4*可能也是与*Rps1k*相似的CC-NBS-LRR型基因^[60]。最近定位的*RpsYD29*位点(Gm03:3857715.:4062474)含有2个全长的NBS-LRR基因,即Glyma03g04030.1和Glyma03g04080.1,二者与*Rps1k-1*和*Rps1k-2*的DNA序列相似度高达62%~75%^[12]。另外,上文所述在*Rps10*位点预测的2个候选抗性基因*Rps10-1*和*Rps10-2*都为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinase)^[13]。但是,上述所有分离或预测的*Rps*基因都需要进一步充分的功能验证。

2 大豆PRR抗性的基因组学、小RNA及蛋白质组学分析

近年来,大豆PRR抗性的基因组学,特别是转录组学研究已取得一些进展,如在全基因组水平上鉴定SNPs,建立高密度的遗传图谱以鉴定抗PRR的QTL,并进一步鉴定特异的、显著差异表达的基因以推测抗性调控网络,并且近年开始了小RNA的调控与蛋白质组学研究,为大豆抗PRR的作用机制研究等提供了大量参考信息。

在基因组学方面,Gajendran等^[61]建立了大豆疫霉菌与植物相互作用的功能基因组学数据库PF-GD(*Phytophthora* functional Genomics Database, <http://www.pfgd.org>),包括*Phytophthora infestans*和*Phytophthora sojae*的基因组、基因转录、基因表达及功能测定等公共资源。Narayanan等^[62]利用cDNA文库分析疫霉菌侵染前后抗性大豆的ESTs(expressed sequence tags)表达差异,从携带*Rps1-k*基因的大豆Williams 82鉴定到疫霉菌侵染后204个特异表达的基因,进一步的Microarray分析鉴定到15个表达水平显著提高、与信号转导有关的基因和8个表达水平显著下降的基因。后来,人们应用Soybean Affymetrix Gene Chip(约含37 500个大豆转录子、15 800个大豆疫霉菌转录子和7 500个大豆胞囊线虫转录子)测定抗性与易感大豆及RILs在疫霉菌侵染前后的基因表达水平变化,以及对显著变化的基因进行测序,并根据序列比对鉴定SNPs,建立遗传图谱,定位QTL^[63-64]。Wang等^[50]经Soybean Affymetrix Gene Chip Microarray分析,根据186个Conrad(部分抗性) × Sloan(易感)RILs经疫霉菌侵染后的基因表达变化,鉴定了5个分别位于第12、13、14、17及19条染色体上的QTL,每个QTL贡献

约 4% ~ 7% 的抗性。比较 Conrad 和 Sloan, 在这 5 个 QTL 基因组区域含有 55 个显著差异表达的基因。通过比较 Conrad 与 Sloan 在第 19 条染色体上的 2 个 QTL 的基因组序列与基因 (153 个) 表达水平比较, 从 87 个基因中鉴定了 1 025 个 SNPs, 其中 54 个基因中的 304 个 SNPs 来自 Conrad, 11 个基因是 Conrad 特有的, 这些基因所表达的蛋白主要与大豆体内的信号转导、激素调控、细胞结构、泛素化及基础抗性有关, 这说明疫霉菌抗性 QTL 存在一个非常复杂的防御网络^[51]。

Lin 等^[65]对大豆疫霉菌感染易感品种 Williams 及其 10 个近等基因系 (near isogenic lines, NILs, 每个 NIL 含一个 *Rps* 位点基因) 后的转录组进行了比较分析。从 Williams 中鉴定出 4 330 个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 而从 10 个 NILs 中分别鉴定出 2 014 ~ 5 499 个 DEGs。特别是很多参与乙烯、茉莉酸、活性氧及 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号转导的 DEGs 可能与大豆对疫霉菌的防御有关。根据 DEGs 的差异, 可以将 NILs 分成 3 组: 第 1 组为带有 *Rps1-a* 的 NIL, 第 2 组包含带有 *Rps1-b*、*Rps1-c* 和 *Rps1-k* 的 NILs, 第 3 组包含带有 *Rps3-a*、*Rps3-b*、*Rps3-c*、*Rps4*、*Rps5* 和 *Rps6* 的 NILs。这些 DEGs 为筛选抗 PRR 候选基因提供了靶标。

小 RNA 包括 microRNAs (miRNAs) 和 small interferingRNAs (siRNAs), 是很普遍的真核生物基因表达抑制因子, 在大豆防御疫霉菌感染中起重要调控作用。Wong 等^[66]鉴定了一系列在疫霉菌感染的大豆根中积累的小 RNA, 其中, miR393 和 miR166 由热失活的疫霉菌诱导产生, 表明二者参与大豆基础防御反应。Wong 等^[66]还发现敲掉部分 miR393 后, 异黄酮合成基因的表达会大幅度下降, 大豆对疫霉菌感病, 所以疫霉菌感染大豆根后诱导 miR393 积累以提高大豆对疫霉菌的防御性; 同时他们还检测到了疫霉菌感染大豆后一些特异 siRNAs 的积累。此外, 还有其它一些诸如 Microarray、深度序列分析的报道也表明 miRNAs 与大豆的 PRR 抗性和孢囊线虫抗性关联^[67-68]。上述研究结果说明小 RNA 在大豆抗病中起重要作用, 鉴定并利用小 RNA 为大豆 PRR 抗性育种提供了一个新方向。

Zhao 等^[69]对大豆品种新沂小黑豆幼苗根进行大豆疫霉菌、水杨酸、茉莉酸甲酯、过氧化氢及 V_{BI} 等处理, 然后比较不同处理的蛋白质组, 发现这些处理之间的大豆蛋白质组几乎没有区别, 大豆疫霉菌和其它处理一样可激活植物免疫信号、激素信号及相关代谢等, 并从中鉴定了 21 个蛋白, 其中 62%

的蛋白与能量代谢包括光合作用与光呼吸有关。这些信息有助于探讨大豆与疫霉菌相互作用过程中大豆应答疫霉菌感染的分子机理。

3 影响 PRR 抗性的大豆基因、启动子及其它抗性基因的利用

揭示大豆的 PRR 抗性机制以及防治 PRR 不仅需要鉴定抗性位点及其功能基因, 还需要鉴定大豆复杂的抗性调控网络中影响 PRR 抗性的基因、调控序列以及加强其它物种抗性基因在大豆上的应用。目前, 主要采用基因沉默 (RNAi) 与过量表达的方法鉴定影响大豆 PRR 抗性的基因。在基因沉默法功能鉴定方面, 异黄酮能诱导大豆抗性^[70], 5-脱氧异黄酮的积累对大豆的 PRR 抗性起重要作用, 基因沉默该产物生物合成途径中的异黄酮合酶 (isoflavone synthase) 或查尔酮还原酶 (chalcone reductase) 及释放细胞壁葡聚糖激发子 (elicitor) 的内切葡聚糖酶 (endoglucanase) PR-2 后, 含 *Rps1c* 或 *Rps1k* 的抗性大豆被疫霉菌感染则表现出过敏性细胞死亡以及过氧化物酶活性与过氧化物生成都受到抑制, 丧失原有的疫霉菌抗性^[71]。*GmSTG1* 对大豆的疫霉菌抗性也有一定作用, 但对携带不同抗性基因大豆中的疫霉菌抗性影响不一样。疫霉菌感染大豆诱导 *GmSTG1* 表达, 当沉默该基因后, 携带 *Rps1a*、*Rps1c*、*Rps1d*、*Rps1k* 或 *Rps8* 基因的大豆对疫霉菌的抗性降低, 而携带 *Rps2* 或 *Rps3a* 基因的大豆对疫霉菌抗性则不受影响^[72]。在基因过量表达法功能鉴定方面, Xu 等^[73]和 Jiang 等^[74]分别克隆了与致病性相关的基因 *GmPR10* 和 *GmPRP*, Dong 等^[75]克隆了一个大豆乙烯响应因子 (ethylene response factor, ERF) *GmERF5*。其中, *GmPR10* 和 *GmPRP* 都显著抑制大豆疫霉菌菌丝生长, *GmPR10* 表现 RNase 活性, *GmPRP* 表现核糖核酸酶活性, 而 *GmERF5* 能促进 *PR10*、*PR1-1* 和 *PR10-1* 的表达; 过量表达 *GmPR10*、*GmPRP* 或 *GmERF5* 的转基因大豆植株的疫霉菌抗性增强, 表明 *GmPR10*、*GmPRP* 及 *GmERF5* 在大豆防御疫霉菌中起重要作用。Borkowska 等^[76]发现表达大豆内切葡聚糖酶 (1, 3-endoglucanase) 的转基因土豆植株的疫霉菌抗性得到提高。将表达凝集素 (lectin) 的大豆 *lec-s* 基因转化到烟草中, 转基因植株对 *Phytophthora nictotianae* 表现抗性, 说明凝集素可能参与大豆的 PRR 抗性^[77]。另外, 两个必需的疫霉菌致病性蛋白效应子 psCRN63 和 psCRN115 与过氧化氢酶 (catalase) 直接相互作用调控细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 及过氧化氢的动态平衡, 从而克服寄主大豆的疫霉菌抗性^[78]。

在调控序列方面,人们找到了一个较强的启动子序列。Chai 等克隆了大豆基因 *GmaPPO12* 的启动子,该启动子在疫霉菌侵染大豆后被迅速诱导并强烈表达,比 *GmaPR1a* 启动子的表达更强烈^[79]。另外,其它物种的抗病基因也能提高大豆的 PRR 抗性。如拟南芥中非寄主抗性(nonhost resistance)基因 *PSS1* (*Phytophthora sojaesusceptible1*) 表现大豆疫霉菌抗性^[80];将一个 *Sclerotinia sclerotiorum* 蛋白激酶子 ScCut 转化到大豆中,可显著提高大豆的 PRR 抗性^[81]。这些启动子与其它抗性基因都可望应用于大豆的基因转化、增强转基因大豆植株的疫霉菌抗性。

4 结论与展望

大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)有很多生理小种,侵染大豆引起的 PRR 严重影响大豆的生长发育,每年造成巨大的经济损失。栽培抗性大豆是最有效、环保的防治 PRR 措施。有关大豆的 PRR 抗性人们已做了大量的遗传学分析,定位、鉴定了 26 个 PRR 抗性位点基因。同时,用生化与分子的方法鉴定了一系列影响 PRR 抗性的大豆基因,如 *Gm-STG1*、*GmPR10*、*GmPRP* 及 *GmERF5*。并且开始了有关大豆 PRR 抗性的基因组学、小 RNA 及蛋白质组学等方面的研究。

然而,大豆研究,包括其 PRR 抗性研究,面临着一个很重要的问题就是基因功能鉴定。大豆基因组约 1.01 Gb 大小,预测约含 45 000 多个基因,基因组较复杂,绝大多数基因都是多拷贝的,且大豆是难于遗传转化的作物,使大豆基因功能的鉴定复杂、困难。至今,仅从 *Rps1k* 位点分离出 PRR 抗性功能基因 *Rps1k-1* 和 *Rps1k-2*,二者可重组形成 *Rps1k-3*^[18-19],实际上,这些基因还未进行充分的功能鉴定。然而,在其它抗性位点,仅从个别 PRR 抗性位点推测了几个候选抗性基因^[12-13,40,60]。目前大豆遗传转化鉴定基因功能主要有两个转化技术体系:一个是大豆须根转化体系,该体系已日渐成熟,尤其在能用根做表型鉴定的研究方面得到了较广泛应用。该体系适合大豆 PRR 抗性基因的功能鉴定,利用该体系进行 RNAi 基因沉默、过量表达及遗传互补转化分析等可鉴定与大豆 PRR 抗性关联的基因;另外一个近年发展的 VIGS 体系,该体系已在大豆胞囊线虫(SCN)抗性基因研究方面得到了开发与应用^[82-85]。最近,大豆的 CRISPR/Cas9 技术体系已有报道^[86-87],相信很快会在大豆 PRR 抗性基因的功能鉴定以及抗性育种方面得到应用。但是基因功能鉴定仍需一个稳定、高效的整株大豆遗传转

化系统。迄今,鉴定出的绝大多数抗病基因属于 *NBS-LRR* 家族或与之关联。但最近克隆并经过功能鉴定出的 2 个主要的大豆抗胞囊线虫位点 *rhg1* 和 *Rhg4* 基因都不属于 *NBS-LRR* 家族,也与之无任何关联,表现出完全不同的作用机制^[84,88]。大豆的 PRR 抗性研究迫切需要从这些鉴定的 *Rps* 抗性位点分离、功能鉴定出具有抗 PRR 的功能基因。这需要大量的基因组学、遗传学、分子生物学、代谢组学、蛋白质组学、小 RNA 及表观遗传组学等方面的研究支持,非常具有挑战性。

自 2010 年大豆栽培品种 Williams 82 的基因组公布以及下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术的快速发展与广泛应用,大豆基因组学的研究获得了长足发展^[89]。以往主要以开发 AFLP、RAPD、RFLP 及 SSR 等分子标记的方法构建遗传图谱以定位、鉴定 PRR 抗性位点,非常耗时且成本高。近年,相继开发了 Illumina GoldenGate Gene Chip、SoySNP6K Bead Chip、SoySNP50K Bead Chip、GWAS 以及 WGS(whole genome sequencing)等技术鉴定大豆 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,精确性大大提高^[90-91]。这些技术如能应用于 PRR 抗性研究势必大大推动大豆 PRR 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 PRR 抗性研究等方面的应用必然越来越广泛。

如前所述,单位点 *Rps* 基因一般仅能维持 8 ~ 15 年左右的大豆 PRR 抗性,大豆疫霉菌在不断的适应过程当中很容易克服大豆寄主的抗性。所以,不但需要鉴定出 PRR 抗性位点的功能基因并阐明其抗性机制以及应用于 PRR 抗性资源与品种选育,还迫切需要不断地鉴定更多新的 PRR 抗性基因以及能调控大豆 PRR 抗性的小 RNA。为了克服栽培大豆品种的 PRR 抗性易丧失的瓶颈,需要寻找更多新的、PRR 抗性广谱的遗传资源与品种以及更有效、直接地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。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 SCN 抗性基因的功能鉴定^[84]。这些突变群体还可用于大豆正向遗传学研究,进行突变育种以直接选育出性状优良的大豆资源与品种。

参考文献

- [1] Grau C R, Dorrance A E, Bond J, et al. Fungal diseases[M]// Boerma H R, Specht J E. Soybeans: Improvement, production and

- uses. 3rd ed. Madison: American Society of Agronomy, 2004: 679-763.
- [2] Sugimoto T, Watanabe K, Yoshida S, et al. Field application of calcium to reduce *Phytophthora* stem rot of soybean, and calcium distribution in plants[J]. Plant Disease, 2010, 94: 812-819.
- [3] Sugimoto T, Kato M, Yoshida S, et al. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* and breeding strategies to develop *Phytophthora*-resistant soybeans[J]. Breeding Science, 2012, 61: 511-522.
- [4] Gordon S G, Berry S A, St Martin S K, et al. Genetic analysis of soybean plant introductions with resistance to *Phytophthora sojae* [J]. Phytopathology, 2007, 97: 106-112.
- [5] Gordon S G, Kowitwanich K, Pipatpongpinoy W, et al. Molecular marker analysis of soybean plant introductions with resistance to *Phytophthora sojae*[J]. Phytopathology, 2007, 97: 113-118.
- [6] Zhang J, Sun S, Wang G, et al. Characterization of *Phytophthora* resistance in soybean cultivars/lines bred in Henan province[J]. Euphytica, 2014, 196: 375-384.
- [7] Lin F, Zhao M, Ping J, et al. Molecular mapping of two genes conferring resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean landrace PI 567139B[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126: 2177-2185.
- [8] Sugimoto T, Yoshida S, Kaga A, et al. Genetic analysis and identification of DNA markers linked to a novel *Phytophthora sojae* resistance gene in the Japanese soybean cultivar Waseshiroe[J]. Euphytica, 2011, 182: 133-145.
- [9] Sun S, Zhao S L, Wang J M, et al. Characterization and mapping of *RpsYu25*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae* [J]. Plant Breeding, 2011, 130: 139-143.
- [10] Sun J, Li L H, Zhao J, et al. Genetic analysis and fine mapping of *RpsJS*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2014, 127: 913-919.
- [11] Wu X, Zhang B, Sun S, et al. Identification, genetic analysis and mapping of resistance to *Phytophthora sojae* of Pm28 in soybean [J]. Agricultura Scientia China, 2011, 10: 1506-1511.
- [12] Zhang J, Xia C, Wang X, et al. Genetic characterization and fine mapping of the novel *Phytophthora* resistance gene in a Chinese soybean cultivar [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126: 1555-1561.
- [13] Zhang J, Xia C, Duan C, et al. Identification and candidate gene analysis of a novel *Phytophthora* resistance gene *Rps10* in a Chinese soybean cultivar[J]. PLoS ONE, 2014, 8: e69799.
- [14] 郭娜, 胡冠军, 赵晋铭, 等. 一对单显性大豆抗疫霉根腐病基因的遗传分析及定位[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(4): 532-537. (Guo N, Hu G J, Zhao J M, et al. Genetic analysis and mapping of a single dominant *Phytophthora sojae* resistance gene in soybean[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(4): 532-537.)
- [15] 武晓玲, 周斌, 孙石, 等. 大豆对大豆疫霉菌株 *Pm14* 抗性的遗传分析及基因定位[J]. 中国农业科学, 2011, 44(3): 456-460. (Wu X L, Zhou B, Sun S, et al. Genetic analysis and mapping of resistance to *Phytophthora sojae* of *Pm14* in soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(3): 456-460.)
- [16] 姚海燕, 王晓鸣, 武小菲, 等. 大豆品种早熟 18 抗疫霉根腐病基因的 SSR 分子标记[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(2): 213-217. (Yao H Y, Wang X M, Wu X F, et al. Molecular mapping of *Phytophthora* resistance gene in soybean cultivar Zaoshu 18 [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(2): 213-217.)
- [17] 朱振东, 霍云龙, 王晓鸣, 等. 一个抗大豆疫霉根腐病新基因的分子鉴定[J]. 作物学报, 2007, 33(1): 154-157. (Zhu Z D, Huo Y L, Wang X M, et al. Molecular identification of a novel *Phytophthora* resistance gene in soybean[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(1): 154-157.)
- [18] Bhattacharyya M K, Narayanan N N, Gao H, et al. Identification of a large cluster of coiled coil-nucleotide binding site-leucine rich repeat-type genes from the *Rps1* region containing *Phytophthora* resistance genes in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111: 75-86.
- [19] Gao H, Narayanan N N, Ellison L, et al. Two classes of highly similar coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat genes isolated from the *Rps1-k* locus encode *Phytophthora* resistance in soybean [J]. Molecular Plant Microbe and Interaction, 2005, 18: 1035-1045.
- [20] Tyler B M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts[J]. Annual Review of Phytopathology, 2002, 40: 137-167.
- [21] Schneider D S. Plant immunity and film noir: What gumshoe detectives can teach us about plant-pathogen interactions[J]. Cell, 2002, 109: 537-540.
- [22] MacGregor T, Bhattacharyya M, Tyler B, et al. Genetic and physical mapping of *Avr1a* in *Phytophthora sojae*[J]. Genetics, 2002, 160: 949-959.
- [23] Shan W, Cao M, Dan L, et al. The *Avr1b* locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene *Rps1b*[J]. Molecular Plant Microbe and Interaction, 2004, 17: 394-403.
- [24] Song T, Kale S, Arredondo F, et al. Two *RxLR* avirulence genes in *Phytophthora sojae* determine soybean *Rps1k*-mediated disease resistance[J]. Molecular Plant Microbe and Interaction, 2013, 26: 711-720.
- [25] Gijzen M, Förster H, Coffey M D, et al. Cosegregation of *Avr4* and *Avr6* in *Phytophthora sojae* [J]. Canadian Journal of Botany, 1996, 74: 800-802.
- [26] Whisson S C, Drenth A, Maclean D J, et al. *Phytophthora sojae* avirulence genes, RAPD and RFLP markers used to construct a detailed genetic linkage map[J]. Molecular Plant Microbe and Interaction, 1995, 8: 988-995.
- [27] Whisson S C, Basnayake S, Maclean D J, et al. *Phytophthora sojae* avirulence genes χ^2 and *Avr6* are located in a 24 kb, recombination-rich region of genomic DNA[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41: 62-74.
- [28] Dou D, Kale S, Liu T, et al. Different domains of *Phytophthora sojae* effector *Avr4/6* are recognized by soybean resistance genes *Rps4* and *Rps6* [J]. Molecular Plant Microbe and Interaction, 2010, 23: 425-435.
- [29] Qutob D, Chapman B P, Gijzen M. Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen[J]. Nature Communications, 2013, 4: 1349.
- [30] Na R, Yu D, Qutob D, et al. Deletion of the *Phytophthora sojae*

- avirulence gene *Avr1d* causes gain of virulence on *Rps1d*[J]. Molecular Plant Microbe and Interaction, 2013, 26: 969-976.
- [31] Bernard R L, Smith P E, Kaufmann M J, et al. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean[J]. Agronomy Journal, 1957, 49: 391.
- [32] Buzzell R I, Anderson T R. Inheritance and race reaction of a new soybean *Rps1* allele[J]. Plant Disease, 1992, 76: 600-601.
- [33] Mueller E H, Athow K L, Laviolette F A. Inheritance of resistance to four physiologic races of *Phytophthora megasperma var sojae* [J]. Phytopathology, 1978, 68: 1318-1322.
- [34] Ploper L D, Athow K L, Laviolette F A. A new allele at *Rps3* locus for resistance to *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* in soybean[J]. Phytopathology, 1985, 75: 690-694.
- [35] Weng C, Yu K, Anderson T R, et al. Mapping genes conferring resistance to *Phytophthora* root rot of soybean, *Rps1a* and *Rps7* [J]. Journal of Heredity, 2001, 92: 442-446.
- [36] Anderson T R, Buzzell R I. Inheritance and linkage of the *Rps7* gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean[J]. Plant Disease, 1992, 76: 958-959.
- [37] Gordon S G, St. Martin S K, Dorrance A E. *Rps8* maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group[J]. Food Crop Science, 2006, 46: 168-173.
- [38] Sandhu D, Schallock K G, Rivera-Velez N, et al. Soybean *Phytophthora* resistance gene *Rps8* maps closely to the *Rps3* region[J]. Journal of Heredity, 2005, 96: 536-541.
- [39] Kilen T C, Hartwig E E, Keeling B L. Inheritance of a second major gene for resistance to *Phytophthora* root rot in soybeans[J]. Crop Science, 1974, 14: 260-262.
- [40] Graham M A, Marek L F, Shoemaker R C. PCR sampling of disease resistance-like sequences from a disease resistance gene cluster in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105: 50-57.
- [41] Athow K L, Laviolette F A, Mueller E H, et al. A new major gene for resistance to *Phytophthora megasperma var. sojae* in soybean[J]. Phytopathology, 1980, 70: 977-980.
- [42] Buzzell R I, Anderson T R. Another major gene for resistance to *Phytophthora megasperma var. sojae* in soybean[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1981, 18: 30-33.
- [43] Athow K L, Laviolette F A. *Rps6*, a major gene for resistance to *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* in soybean[J]. Phytopathology, 1982, 72: 1564-1567.
- [44] Zhang Z, Hao J, Yuan J, et al. *Phytophthora* root rot resistance in soybean E00003[J]. Crop Science, 2014, 54: 492-499.
- [45] Mideros S, Nita M, Dorrance A E. Characterization of components of partial resistance, *Rps2*, and root resistance to *Phytophthora sojae* in soybean[J]. Phytopathology, 2007, 97: 655-662.
- [46] Burnham K D, Dorrance A E, van Toai T T, et al. Quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean [J]. Crop Science, 2003, 43: 1610-1617.
- [47] Han Y, Teng W, Yu K, et al. Mapping QTL tolerance to *Phytophthora* root rot in soybean using microsatellite and RAPD/SCAR derived markers[J]. Euphytica, 2008, 162: 231-239.
- [48] Weng C, Yu K, Anderson T R, et al. A quantitative trait locus influencing tolerance to *Phytophthora* root rot in the soybean cultivar Conrad[J]. Euphytica, 2007, 158: 81-86.
- [49] Li X, Han Y, Teng W, et al. Pyramided QTL underlying tolerance to *Phytophthora* root rot in mega-environments from soybean cultivars 'Conrad' and 'Hefeng 25' [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121: 651-658.
- [50] Wang H, Waller L, Tripathy S, et al. Analysis of genes underlying soybean quantitative trait loci conferring partial resistance to *Phytophthora sojae*[J]. Plant Genome, 2010, 3: 23-40.
- [51] Wang H, Wijeratne A, Wijeratne S, et al. Dissection of two soybean QTL conferring partial resistance to *Phytophthora sojae* through sequence and gene expression analysis[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 428.
- [52] Tucker D M, Saghai Maroof M A, Mideros S, et al. Mapping quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean interspecific cross [J]. Crop Science, 2010, 50: 628-635.
- [53] Wu X, Zhou B, Zhao J, et al. Identification of quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean [J]. Plant Breeding, 2011, 130: 144-149.
- [54] Lee S, Mian M A R, McHale L K, et al. Identification of quantitative trait loci conditioning partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean PI 407861A [J]. Crop Science, 2013, 53: 1022-1031.
- [55] Lee S, Mian M A, McHale L K, et al. Novel quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean PI 398841 [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126: 1121-1132.
- [56] Lee S, Mian M A R, Sneller C H, et al. Joint linkage QTL analyses for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean using six nested inbred populations with heterogeneous conditions [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2014, 127: 429-444.
- [57] Sun J, Guo N, Lei J, et al. Association mapping for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) [J]. Journal of Genetics, 2014, 932: 355-63.
- [58] Hoffman T, Schmidt J S, Zheng X Y, et al. Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance [J]. Plant Physiology, 1999, 119: 935-949.
- [59] Yu Y G, Buss G R, Maroof M A S. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site [J]. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 1996, 93: 11751-11756.
- [60] Sandhu D, Gao H, Cianzio S, et al. Deletion of a disease resistance nucleotide-binding-site leucine-rich-repeat-like sequence is associated with the loss of the *Phytophthora* resistance gene *Rps4* in soybean [J]. Genetics, 2004, 168: 2157-2167.
- [61] Gajendran K, Gonzales M D, Farmer A, et al. *Phytophthora* functional genomics database (PFGD): Functional genomics of *phytophthora*-plant interactions [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: 465-470.
- [62] Narayanan N N, Grosic S, Tasma I M, et al. Identification of candidate signaling genes including regulators of chromosome condensation I protein family differentially expressed in the soybean-*Phytophthora sojae* interaction [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118: 399-412.
- [63] Tyler B M, Jiang R H Y, Zhou L C, et al. Functional genomics and bioinformatics of the *Phytophthora sojae*-soybean interaction

- [M]//Gustafson J P, Taylor J, Stacey G. Genomics of disease. New York:Springer, 2007: 67-78.
- [64] Zhou L, Mideros S X, Bao L, et al. Infection and genotype remodel the entire soybean transcriptome [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 49.
- [65] Lin F, Zhao M, Baumann D D, et al. Molecular response to the pathogen *Phytophthora sojae* among ten soybean near isogenic lines revealed by comparative transcriptomics [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 18.
- [66] Wong J, Gao L, Yang Y, et al. Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection [J]. Plant Journal, 2014, 79: 928-940.
- [67] Guo N, Ye W, Wu X, et al. Microarray profiling reveals microRNAs involving soybean resistance to *Phytophthora sojae* [J]. Genome, 2011, 54: 954-958.
- [68] Li X, Wang X, Zhang S, et al. Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing [J]. PLoS One, 2012, 7: E39650.
- [69] Zhao J, Zhang Y, Bian X, et al. A comparative proteomics analysis of soybean leaves under biotic and abiotic treatments [J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40: 1553-1562.
- [70] Parniske M, Ahlborn B, Werner D. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173: 3432-3439.
- [71] Graham T L, Graham M Y, Subramanian S, et al. RNAi silencing of genes for elicitation or biosynthesis of 5-deoxyisoflavonoids suppresses race-specific resistance and hypersensitive cell death in *Phytophthora sojae* infected tissues [J]. Plant Physiology, 2007, 144: 728-740.
- [72] Yan Q, Cui X, Su L, et al. GmSGT1 is differently required for soybean *Rps* genes-mediated and basal resistance to *Phytophthora sojae* [J]. Plant Cell Reports, 2014, 33: 1275-1288.
- [73] Xu P, Jiang L, Wu J, et al. Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 10 gene (*GmPR10*) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae* [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41: 4899-4909.
- [74] Jiang L, Wu J, Fan S, et al. Isolation and characterization of a novel pathogenesis-related protein gene (*GmPRP*) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae* [J]. PLoS One, 2015, 10: e0129932.
- [75] Dong L, Cheng Y, Wu J, et al. Overexpression of *GmERF5*, a new member of the soybean EAR motif-containing ERF transcription factor, enhances resistance to *Phytophthora sojae* in soybean [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66: 2635-2647.
- [76] Borkowska M, Krzymowska M, Talarezyk A, et al. Transgenic potato plants expressing soybean beta-1,3-endoglucanase gene exhibit an increased resistance to *Phytophthora infestans* [J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 1998, 53: 1012-1016.
- [77] Guo P, Wang Y, Zhou X, et al. Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests [J]. Plant Science, 2013, 211: 17-22.
- [78] Liu T, Ye W, Ru Y, et al. Two host cytoplasmic effectors are required for pathogens is of *Phytophthora sojae* by suppression of host defenses [J]. Plant Physiology, 2011, 155: 490-501.
- [79] Chai C, Lin Y, Shen D, et al. Identification and functional characterization of the soybean *GmaPPO12* promoter conferring *Phytophthora sojae* induced expression [J]. PLoS One, 2013, 8: e67670.
- [80] Sumit R, Sahu B B, Xu M, et al. *Arabidopsis* nonhost resistance gene *PSSI* confers immunity against an oomycete and a fungal pathogen but not a bacterial pathogen that cause diseases in soybean [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 87.
- [81] Zhang H, Wu Q, Cao S, et al. A novel protein elicitor (SsCut) from *Sclerotinia sclerotiorum* induces multiple defense responses in plants [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 86: 495-511.
- [82] Juvalle P S, Hewezi T, Zhang C, et al. Temporal and spatial bean pod mottle virus-induced gene silencing in soybean [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13: 1140-1148.
- [83] Kandoth P K, Heinz R, Yeckel G, et al. A virus-induced gene silencing method to study soybean cyst nematode parasitism in *Glycine max* [J]. BMC Research Notes, 2013, 6: 255.
- [84] 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 [J]. Nature, 2012, 492: 256-260.
- [85] Liu J, Graham M A, Pedley K F, et al. Gaining insight into soybean defense responses using functional genomics approaches [J]. Briefings Functional Genomics, 2015, 14: 283-290.
- [86] Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 [J]. BMC Biotechnology, 2015, 15: 16.
- [87] Sun X, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10342.
- [88] 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.
- [89] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 462: 178-183.
- [90] Song Q, Hyten D L, Jia G, et al. Development and evaluation of SoySNP50K, a high density genotyping array for soybean [J]. PLoS One, 2013, 8: e54985.
- [91] 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 [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 598.