

大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)无毒基因 *Avr1a*、*Avr1k* 及 *Avr3a* 的分子鉴定

孙龙 文景芝*

(东北农业大学 农学院植保系 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】为大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)无毒基因 *Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 快速分子检测提供方法,也为 *P. sojae* 其它无毒基因的快速分子检测研究提供依据。【方法】依据 GenBank 中公布的 *P. sojae* 无毒基因 *Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 的序列设计引物,分别筛选出特异性引物,在 PCR 反应体系和扩增条件优化基础上,对已经接种鉴定过无毒基因 *Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 的 86 株 *P. sojae* 进行 PCR 检测,建立一套 *P. sojae* 无毒基因 *Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 的特异性检测体系。将分子鉴定和接种鉴定结果进行比对,将扩增出的真阳性条带和假阳性条带分别进行胶回收和克隆测序,测序结果分别与 3 个无毒基因的原序列比对,判定分子标记方法是否适于 *Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 的快速检测。【结果】筛选出的特异性引物均能从含有对应无毒基因的菌株中扩增出约 550 bp 的条带。*Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 的分子鉴定及接种鉴定结果符合率依次为 45.3%、84.9%和 97.7%。3 个无毒基因的真阳性条带序列与原序列一致性均达 97%以上, *Avr1a* 的假阳性条带与原序列一致性在 80%左右,其余 2 个基因的都在 30%以下。【结论】利用 *Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 基因序列分别设计引物建立的检测体系可以用于 *Avr3a* 的快速检测,不适于 *Avr1a* 的快速检测,是否适合 *Avr1k* 的快速检测尚不清楚。

关键词: 大豆疫霉菌, 无毒基因, *Avr1a*, *Avr1k*, *Avr3a*, 分子鉴定

基金项目: 公益性行业科研专项项目(No. 201303018)

*通讯作者: Tel: 86-451-55191045; 信箱: jzhwen2000@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-01-30; 接受日期: 2012-03-19

Molecular identification of avirulent genes of *Avr1a*, *Avr1k* and *Avr3a* in *Phytophthora sojae*

SUN Long WEN Jing-Zhi*

(Department of Plant Protection, College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] To provide method for rapid molecular detection of *Avr1a*, *Avr1k* and *Avr3a*, avirulent genes of *Phytophthora sojae*, and also to provide some references for rapid molecular detection of other avirulent genes of *P. sojae*. **[Methods]** According to GenBank sequence table of *Avr1a*, *Avr1k* and *Avr3a*, avirulent genes of *P. sojae*, specific primers were filtered out respectively for the three genes by using primer design method. 86 strains of *P. sojae* which have been identified virulence on the three differential soybean varieties were detected by PCR on the basis of optimized reaction system and amplification conditions. A specific detection system was established for detecting *Avr1a*, *Avr1k* and *Avr3a*, avirulent genes of *P. sojae*. The results of molecular identification and inoculation identification were compared and analyzed. And then amplified true and false positive bands were recovered respectively and cloning sequenced and compared with the original sequences of the three avirulent genes, to verify if *Avr1a*, *Avr1k* and *Avr3a* were suitable to be detected by the method of molecular markers. **[Results]** All the specific primers screened out could amplify a band with length of about 550 bp. The coincidence rate of molecular and inoculation identification for the three avirulent genes were *Avr1a*-45.3%, *Avr1k*-84.9% and *Avr3a*-97.7%. The true positive bands of three avirulent genes had over 97 percent of consistency in sequence with the original one. The false positive bands of *Avr1a* were about 80 percent, and *Avr1k* and *Avr3a* were less than 30 percent of consistency with their original sequences. **[Conclusion]** The detection system established by using the primers filtered out by utilizing the gene sequence of *Avr1a*, *Avr1k* and *Avr3a* can be used to detect *Avr3a* rapidly, but not be suitable for detection of *Avr1a*, whether fit for detection of *Avr1k* needed further study.

Keywords: *Phytophthora sojae*, Avirulence genes, *Avr1a*, *Avr1k* and *Avr3a*, Molecular identification

由 *Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann 引起的大豆疫霉根腐病是严重影响大豆生产的危险性、毁灭性病害,该病目前已成为严重影响大豆生产的主要病害之一^[1]。生产实践证明种植抗病品种是控制该病的最有效措施。由于大豆疫霉菌与大豆之间的互作方式属于基因对基因类型^[2],目前已鉴定出 16 个大豆疫霉根腐病的

抗病基因^[3],依据基因对基因原理,大豆疫霉菌中也应该存在 16 个对应的无毒基因,但是目前只有 12 个被发现并证实^[3]。常规鉴定大豆疫霉菌无毒基因的方法,是依据菌株对一系列含单个抗病基因鉴别寄主的接种反应,不能感染的,即含有与抗病基因对应的无毒基因。实践证明该方法操作简单,便于推广应用,但同时也存在不足,

如工作量大、浪费时间和空间,尤其是鉴定结果会受温度、湿度等接种条件和接种技术差异的影响^[4]。因此,开发一种快速、简便而准确的方法来检测大豆疫霉菌无毒基因非常必要。本实验室前期研究结果表明,东北三省大豆疫霉菌中无毒基因 *Avr1k* 和 *Avr3a* 分离频率较高,分别为 80.3% 和 73.0%,而 *Avr1a* 分离频率较低,为 29.0%。因此本试验针对这 3 个无毒基因开展快速检测方法研究,为 3 个无毒基因的快速检测提供方法,也为大豆疫霉菌其它无毒基因的快速分子检测研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

黑龙江省大豆疫霉根腐病发病植株和土壤中分离鉴定出的 86 株大豆疫霉菌。

1.2 大豆疫霉菌基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

1.2.1 基因组 DNA 的提取: 参考 Panabieres 等的方法^[5],并稍加改进。

1.2.2 引物设计及 PCR: 依据 GenBank 中公布的无毒基因 *Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 的序列,利用 Primer Premier 5.0 软件对 *Avr1a*、*Avr1k* 和 *Avr3a* 进行引物设计。每个无毒基因设计 2 对引物,共 6 对引物,再从中筛选出扩增效果较好的 3 对引物进行试验,其中 *Avr1a* 的引物为 F: 5'-ATTCTGCGTTTCTCCTTCCAGTTAT-3'和 R: 5'-CAAGGTGAAAAGATTGTCTGCATTT-3'; *Avr1k* 的引物为 F: 5'-ATACAGTTCGCCGCCGTCTTC-3'和 R: 5'-GTAGTTATCGTCCTTAGTAGGCTTC-3'; *Avr3a* 的引物为 F: 5'-ACTTTGGAATTTCTTCTCAGCTC-3'和 R: 5'-GATCGTGGGATAGACGTTTATTTT-3'。3 对引物的退火温度为 50℃-60℃,扩增产物长度为 550 bp 左右。引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应体系和程序参照王子迎等的方法^[6],并稍加改进。

1.3 供试大豆疫霉菌无毒基因的接种验证

1.3.1 鉴别品种: 分别含有单抗基因 *Rps1a*、*Rps1k* 和 *Rps3a* 的大豆疫霉菌毒性鉴别品种(系) Harlon、Williams82 和 L83-570,感病对照为不含任何已知抗病基因的大豆品种 Sloan (*rps*),以上 4 个鉴别品种(系)用于鉴定供试大豆疫霉菌的无毒基因。

1.3.2 菌种的扩繁及接种验证: 菌种扩繁参照黄静等的方法^[7]。病情调查参照朱振东等的标准^[8]。抗病和中间类型均进行 2-3 次重复鉴定,以保证结果的准确性。鉴别品种表现抗病的,则菌株含有相对应的无毒基因,反之则不含有。

1.4 分子鉴定结果与接种鉴定结果符合率的计算

将分子鉴定结果为阳性和接种鉴定结果为抗病的记为“+”;阴性的和感病的记为“-”。同一菌株鉴定结果同号的为符合,记为“o”,鉴定结果异号的为不符合,记为“x”。计算 86 个供试菌株中符合菌株的百分率之和,为符合百分率;再分别计算符合的菌株中接种鉴定和分子鉴定均为“+”与接种鉴定和分子鉴定均为“-”的百分率;然后再分别计算不符合菌株中接种鉴定为“+”分子鉴定为“-”和接种鉴定为“-”分子鉴定为“+”的百分率。

1.5 PCR 产物阳性片段的克隆及测序分析

接种鉴定结果为“+”同时分子鉴定也表现为“+”的记为真阳性;接种鉴定结果为“-”但分子鉴定结果为“+”的记为假阳性。取 PCR 真阳性和假阳性条带各 8 个经胶回收纯化后,按照 pMD18-T 克隆试剂盒的说明书进行连接反应。载体转化按照 DH5 α 感受态细胞使用说明书进行。最后用无菌牙签挑取 LB 固体培养基上的单个菌落放于 1.0 mL LB 液体培养基中,150 r/min、37℃ 培养 12 h,吸取 1.0 μ L 菌液作为反应模板,引物、反应体系和 PCR 循环参数与 1.2.2 中一致。扩增产物电泳后根据条带大小确定是否为目的片段的阳性克隆。检测后确定为目的片段的,将菌液送往

上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果与对应的无毒基因原序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 供试菌株的 DNA 提取

对 86 株大豆疫霉菌进行 DNA 提取, 经检测 DNA 纯度较高, 可以进行 PCR 检测。

2.2 供试菌株 PCR 扩增

3 对引物对 86 株大豆疫霉菌的 PCR 扩增产

物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。结果表明, 扩增出的条带单一清晰, 片段均在 550 bp 左右, 无杂带, 为所需目的片段。

2.3 接种鉴定结果及其与分子鉴定结果的符合率分析

供试的 86 株大豆疫霉菌对分别含有 *Rps1a*、*Rps1k* 和 *Rps3a* 的 3 个大豆疫霉菌毒性鉴别品种(系)下胚轴接种结果及 3 个无毒基因分子鉴定结果见表 1。

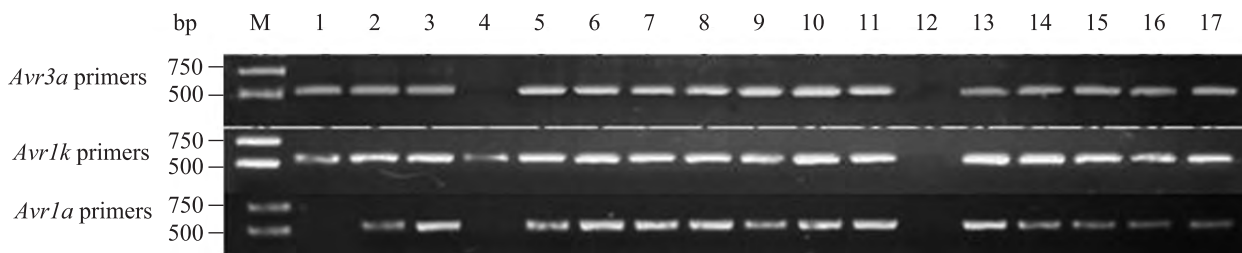


图 1 3 对引物对 17 个供试菌株的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification results of 17 strains by three pairs of primers

表 1 分子鉴定和接种鉴定结果及二者的符合率																			
Table 1 The results of molecular and inoculation identification for avirulent genes and their coincidence rates																			
J*	Avr1a			Avr1k			Avr3a			J*	Avr1a			Avr1k			Avr3a		
	A*	B*	C*	A*	B*	C*	A*	B*	C*		A*	B*	C*	A*	B*	C*	A*	B*	C*
1	—	—	○	—	+	×	+	+	○	44	—	+	×	+	+	○	+	+	○
2	—	+	×	+	+	○	+	+	○	45	+	—	×	+	+	○	+	+	○
3	—	+	×	—	+	×	+	+	○	46	—	+	×	+	+	○	+	+	○
4	+	—	×	+	+	○	—	—	○	47	—	+	×	+	+	○	+	+	○
5	+	+	○	+	+	○	+	+	○	48	—	—	○	+	+	○	+	+	○
6	—	+	×	—	+	×	+	+	○	49	—	—	○	+	+	○	+	+	○
7	+	+	○	+	+	○	+	+	○	50	+	—	×	+	+	○	+	+	○
8	—	+	×	+	+	○	+	+	○	51	+	+	○	+	+	○	+	+	○
9	—	+	×	+	+	○	+	+	○	52	+	—	×	+	+	○	+	+	○
10	+	+	○	+	+	○	—	+	×	53	—	—	○	+	+	○	+	+	○
11	—	+	×	—	+	×	+	+	○	54	—	—	○	+	+	○	+	+	○
12	—	—	○	—	—	○	—	—	○	55	—	—	○	+	+	○	+	+	○
13	—	+	×	+	+	○	+	+	○	56	+	+	○	+	+	○	+	+	○
14	—	+	×	+	+	○	+	+	○	57	—	—	○	+	+	○	+	+	○
15	+	+	○	+	+	○	+	+	○	58	—	—	○	+	+	○	+	+	○
16	—	+	×	—	+	×	—	+	×	59	+	—	×	+	+	○	+	+	○
17	—	+	×	+	+	○	+	+	○	60	+	+	○	+	+	○	—	—	○
(待续)																			

															(续表 1)									
18	-	+	×	+	-	×	+	+	○	61	+	+	○	-	+	×	-	-	○					
19	-	-	○	-	-	○	+	+	○	62	+	+	○	+	+	○	+	+	○					
20	-	-	○	-	-	○	+	+	○	63	+	+	○	-	-	○	+	+	○					
21	+	+	○	+	+	○	+	+	○	64	-	-	○	+	+	○	+	+	○					
22	-	+	×	+	+	○	+	+	○	65	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
23	-	+	×	+	+	○	+	+	○	66	+	+	○	+	+	○	-	-	○					
24	+	-	×	+	-	×	+	+	○	67	-	-	○	-	-	○	-	-	○					
25	+	+	○	+	+	○	+	+	○	68	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
26	-	+	×	+	+	○	+	+	○	69	+	+	○	+	+	○	+	+	○					
27	+	+	○	+	+	○	+	+	○	70	-	-	○	+	+	○	+	+	○					
28	-	-	○	+	+	○	+	+	○	71	+	+	○	+	+	○	+	+	○					
29	-	-	○	+	-	×	+	+	○	72	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
30	-	+	×	+	+	○	+	+	○	73	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
31	-	-	○	+	+	○	+	+	○	74	+	+	○	+	+	○	+	+	○					
32	-	+	×	+	+	○	+	+	○	75	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
33	-	+	×	-	+	×	+	+	○	76	-	+	×	-	+	×	-	-	○					
34	-	+	×	+	+	○	+	+	○	77	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
35	+	+	○	+	+	○	+	+	○	78	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
36	+	+	○	+	+	○	+	+	○	79	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
37	-	+	×	+	+	○	+	+	○	80	+	+	○	+	+	○	+	+	○					
38	-	+	×	+	+	○	+	+	○	81	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
39	-	+	×	+	+	○	+	+	○	82	+	+	○	-	+	×	-	-	○					
40	-	+	×	+	+	○	+	+	○	83	-	+	×	+	+	○	-	-	○					
41	-	+	×	+	+	○	+	+	○	84	+	-	×	+	-	×	+	+	○					
42	-	+	×	+	+	○	+	+	○	85	-	+	×	+	+	○	+	+	○					
43	-	+	×	+	+	○	+	+	○	86	+	+	○	+	+	○	+	+	○					
分子鉴定结果与接种鉴定结果的符合率										Avr1a					Avr1k					Avr3a				
Coincidence rate of molecular and inoculation identification for the avirulent genes (%)										45.3					84.9					97.7				

Note: J*: Represents strain No.; A*: Represents inoculation results; B*: Represents amplified bands; C*: Represents whether inoculation results accord with amplified bands.

结果表明, *Avr1a* 分子鉴定结果与接种鉴定结果的符合率为 45.3%, 其中真阳性占 27.9%, 其余不相符的 62 个菌株中假阳性比率达 88.7%; *Avr1k* 分子鉴定结果与接种鉴定结果的符合率为 84.9%, 其中真阳性占 79.1%, 其余不相符的 13 个菌株中假阳性比率达 69.2%; *Avr3a* 分子鉴定结果与接种鉴定结果的符合率为 97.7%, 其中真阳性占 90.5%; 其余 2 株均表现为假阳性。

2.4 目的片段克隆测序分析

试验共选取 48 个阳性条带(PCR 真阳性和假

阳性条带各 8 个)进行克隆测序分析。最后有 40 条得到测序结果。将分子鉴定结果为阳性的 40 条(真阳性: *Avr3a*: 8 条, *Avr1k*: 6 条, *Avr1a*: 8 条; 假阳性: *Avr3a*: 8 条, *Avr1k*: 4 条, *Avr1a*: 6 条) PCR 片段克隆测序, 结果表明, 真阳性克隆与原序列符合率均达 97% 以上, 而假阳性克隆, 对于 *Avr1k* 和 *Avr3a* 而言与原序列符合率不足 30%; 而对于 *Avr1a*, 与原序列符合率却能达到 80% 以上。目的片段克隆测序结果与原序列符合率见表 2。

表 2 40 个目的片段克隆测序结果与原序列的一致性
Table 2 Consistency of sequences of 40 clones with the original sequences

克隆 Clone	与原序列符合率 Consistency with the original sequence (%)
<i>Avr3a</i> -1 真阳性 <i>Avr3a</i> -1 True positive	99.28
<i>Avr3a</i> -2 真阳性 <i>Avr3a</i> -2 True positive	97.69
<i>Avr3a</i> -3 真阳性 <i>Avr3a</i> -3 True positive	98.85
<i>Avr3a</i> -4 真阳性 <i>Avr3a</i> -4 True positive	99.88
<i>Avr3a</i> -5 真阳性 <i>Avr3a</i> -5 True positive	97.73
<i>Avr3a</i> -6 真阳性 <i>Avr3a</i> -6 True positive	97.99
<i>Avr3a</i> -7 真阳性 <i>Avr3a</i> -7 True positive	99.53
<i>Avr3a</i> -8 真阳性 <i>Avr3a</i> -8 True positive	99.67
<i>Avr3a</i> -1 假阳性 <i>Avr3a</i> -1 False positive	21.38
<i>Avr3a</i> -2 假阳性 <i>Avr3a</i> -2 False positive	25.36
<i>Avr3a</i> -3 假阳性 <i>Avr3a</i> -3 False positive	22.54
<i>Avr3a</i> -4 假阳性 <i>Avr3a</i> -4 False positive	29.75
<i>Avr3a</i> -5 假阳性 <i>Avr3a</i> -5 False positive	19.95
<i>Avr3a</i> -6 假阳性 <i>Avr3a</i> -6 False positive	28.46
<i>Avr3a</i> -7 假阳性 <i>Avr3a</i> -7 False positive	22.12
<i>Avr3a</i> -8 假阳性 <i>Avr3a</i> -8 False positive	18.89
<i>Avr1k</i> -1 真阳性 <i>Avr1k</i> -1 True positive	97.86
<i>Avr1k</i> -2 真阳性 <i>Avr1k</i> -2 True positive	97.56
<i>Avr1k</i> -3 真阳性 <i>Avr1k</i> -3 True positive	98.25
<i>Avr1k</i> -4 真阳性 <i>Avr1k</i> -4 True positive	98.32
<i>Avr1k</i> -5 真阳性 <i>Avr1k</i> -5 True positive	97.75
<i>Avr1k</i> -6 真阳性 <i>Avr1k</i> -6 True positive	97.33
<i>Avr1k</i> -1 假阳性 <i>Avr1k</i> -1 False positive	19.16
<i>Avr1k</i> -2 假阳性 <i>Avr1k</i> -2 False positive	15.36
<i>Avr1k</i> -3 假阳性 <i>Avr1k</i> -3 False positive	28.88
<i>Avr1k</i> -4 假阳性 <i>Avr1k</i> -4 False positive	27.35
<i>Avr1a</i> -1 真阳性 <i>Avr1a</i> -1 True positive	98.38
<i>Avr1a</i> -2 真阳性 <i>Avr1a</i> -2 True positive	99.86
<i>Avr1a</i> -3 真阳性 <i>Avr1a</i> -3 True positive	97.53
<i>Avr1a</i> -4 真阳性 <i>Avr1a</i> -4 True positive	99.33
<i>Avr1a</i> -5 真阳性 <i>Avr1a</i> -5 True positive	97.39
<i>Avr1a</i> -6 真阳性 <i>Avr1a</i> -6 True positive	99.86
<i>Avr1a</i> -7 真阳性 <i>Avr1a</i> -7 True positive	99.55
<i>Avr1a</i> -8 真阳性 <i>Avr1a</i> -8 True positive	99.28
<i>Avr1a</i> -1 假阳性 <i>Avr1a</i> -1 False positive	88.85
<i>Avr1a</i> -2 假阳性 <i>Avr1a</i> -2 False positive	82.30
<i>Avr1a</i> -3 假阳性 <i>Avr1a</i> -3 False positive	88.74
<i>Avr1a</i> -4 假阳性 <i>Avr1a</i> -4 False positive	86.33
<i>Avr1a</i> -5 假阳性 <i>Avr1a</i> -5 False positive	92.55
<i>Avr1a</i> -6 假阳性 <i>Avr1a</i> -6 False positive	92.69

3 结论与讨论

本试验依据已经在 GenBank 中提交的无毒基因 *Avr3a*、*Avr1k* 和 *Avr1a* 的序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件, 分别设计了对应于 3 个无毒基因的引物, 并且扩增谱带清晰。然后利用这 3 个引物分别扩增供试的 86 株大豆疫霉菌, 再对比 86 个菌株的接种鉴定结果, 得出 *Avr3a* 的分子鉴定结果与接种鉴定结果符合率为 97.7%, *Avr1k* 为 84.9%, *Avr1a* 为 45.3%。这个结果对于 *Avr3a* 和 *Avr1k* 均在误差范围内, 而对于 *Avr1a* 则与理论结果有一定的差距。

一个无毒基因中存在多种多态性, 是导致扩增结果出现假阳性的原因。对于 *Avr1a* 而言, 在无毒菌株中 *Avr1a* 区域有 3 种序列, 分别为 PsAvr1a、PsAvh72 和 PsAvh275c, 其中 PsAvh72 为一个假基因, Avh275c 为一个无功能的 *Avr1a* 同源序列, 与其他 2 个基因有很高的相似性; 在毒性菌株中 PsAvr1a 是缺失的, 因此仅含 PsAvh72 和 PsAvh275c 两种序列^[9]。由于毒性菌株中也含有无功能的 *Avr1a* 同源序列 Avh275c, 扩增出的条带有可能是 Avh275c, 所以导致 *Avr1a* 菌株假阳性扩增比率达 88.7%。基于 *Avr1a* 基因内部的复杂性, 所以认为本试验方法不适用于 *Avr1a* 的分子鉴定, 需要寻找其它快速方法。

对于 *Avr3a* 而言, PsAvr3a 在所有的菌株中均存在 3 种多态性, 分别为 PsAvr3a-1、PsAvr3a-2 和 PsAvr3a-3。PsAvr3a-1 和 PsAvr3a-3 来自于无毒小种(有例外: 2 个毒性小种也有 PsAvr3a-1, 但该基因不表达), 两者相差几个核苷酸^[9], 这也是本试验中阳性克隆测序结果与原序列比对无法达到 100% 的原因。由于个别毒性小种中也含有 PsAvr3a-1, 所以导致扩增出了极少数假阳性条带。PsAvr3a-2 仅来源于毒性小种, 序列与 PsAvr3a-1 和 PsAvr3a-3 相差比较大, 存在着大量的突变和缺失, 说明毒性小种中除了个别的 2 个

毒性小种以外均应扩增不出目的条带, 所以本试验建立的方法适用于 *Avr3a* 的分子鉴定(极少数菌株需接种验证)。

Avr1k 尚未被克隆出来, 所以其情况尚不明确, 但根据本试验中对 *Avr1k* 的接种鉴定和分子鉴定结果推测, 它可能与 *Avr3a* 相似, 但暂时无法确定。

综上所述, 本试验建立的快速分子鉴定方法适用于 *Avr3a*, 而 *Avr1a* 由于内部比较复杂, 不适用于此方法, 需要继续探索其它的快速检测方法。*Avr1k* 则尚不明确, 有待继续研究。

参考文献

- [1] Sohmitthenner AF. Problems and progress in control *Phytophthora* root rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69: 362–368.
- [2] 朱振东, 王晓鸣, 田玉兰, 等. 防治大豆疫霉根腐病的药剂筛选[J]. 农药学报, 1999, 1(3): 39–44.
- [3] 邱红梅, 曹海峰, 刘春燕, 等. 大豆抗疫霉根腐病的分子机制[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(4): 121–126.
- [4] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 298.
- [5] Panabieries A, Marais A, Trentin F, et al. Repetitive DNA polymorphism analysis as a tool for identifying *Phytophthora* species [J]. Phytopathology, 1989, 79(10): 1105–1109.
- [6] 王子迎, 王源超, 张正光, 等. 中国和美国大豆疫霉群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. 生物多样性, 2007, 15(3): 215–223.
- [7] 隋喆, 黄静, 马振川, 等. 吉林、辽宁大豆品种(系)对大豆疫病的抗病基因鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(1): 94–98.
- [8] 朱振东, 王晓鸣, 常汝镇, 等. 黑龙江省大豆疫霉菌生理小种鉴定及大豆种质的抗性评价[J]. 中国农业科学, 2000, 33(1): 62–67.
- [9] 董莎萌. 大豆疫霉无毒基因基因组结构特征发现及其应用[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2008.