

植物抗病基因工程育种策略及其在大豆上的应用

韩 阳^{1,2,3}, 曹永强², 赖冰冰³

(1. 沈阳农业大学 农学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁省农业科学院 作物研究所, 辽宁 沈阳 110161; 3. 辽宁大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要:概述了植物抗真菌病害、细菌病害和病毒病害基因工程育种的主要策略,重点介绍了大豆转基因抗病育种的主要成果。植物抗病害转基因育种策略主要包括基于寄主-病原菌相互识别和信号传导体系的基因工程和基于抗菌蛋白的基因工程;植物抗病毒病害基因工程育种策略还包括病毒外壳蛋白基因介导的抗性、复制酶介导的抗性、运动蛋白介导的抗性、卫星 RNA 介导的抗性、RNA 介导的抗性等。

关键词:大豆;基因工程;抗病育种

中图分类号:S565. 103. 53

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)06-1103-05

Strategies of Genetic Engineering Breeding for Plant Disease Resistance and Its Application in Soybean

HAN Yang^{1,2,3}, CAO Yong-qiang², LAI Bing-bing³

(1. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning; 2. Liaoning Academy of Agricultural Science, Shenyang 110161, Liaoning; 3. School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, Liaoning, China)

Abstract: This paper reviewed strategies in disease resistance breeding by genetic engineering. Then the research progress on disease-resistant breeding of soybean by transgenic technology was summarized. The breeding strategies for disease resistance with genetic engineering can be grouped into two general categories: (1) The expression of genes that participate in the host-virus interaction or signal transduction of the hypersensitive response. (2) The expression of gene products that are directly toxic to pathogens or that reduce their growth. These include pathogenesis-related proteins (PR proteins), antifungal proteins, antimicrobial peptides, ribosome inactivating proteins (RIP), and phytoalexins. Moreover, virus-resistant transgenics can be developed by introducing either viral coat protein (CP) or replicase gene encoding sequences. RNA-mediated resistance, known as post-transcriptional gene silencing, is a successful strategy. Other approaches for achieving viral resistance described in the article, include the use of satellite RNA and viral movement protein.

Key words: Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]; Genetic engineering; Disease resistant breeding.

大豆病害包括真菌病害、细菌病害和病毒病害,是造成大豆产量和品种下降的主要原因。由于病害影响面积大,产量损失重,且农药防治效果差,培育抗病品种一直是大豆育种的重要目标之一。然而常规的育种手段周期长,效率低;而且抗性资源有限,抗性容易退化,难以满足生产的需要。生物技术与传统育种手段的结合为抗病新品种的培育及种质资源的更新开辟了新途径,经过近 30 a 的研究,转基因抗病育种已经成为抗性育种重要手段之一。现就植物抗病基因工程育种策略及其在大豆上的应用作

以综述。

1 抗真菌和细菌病害基因工程育种策略

1.1 基于寄主-病原菌相互识别和信号传导体系的基因工程育种策略

1.1.1 利用植物的抗病基因 根据 Flor 的“基因对基因”假说,寄主植物的每一个抗性基因(resistance gene, *R* 基因),在病原菌中就存在相应的无毒基因(avirulence gene, *avr* 基因),与 *avr* 基因相对应的是病原菌的毒性基因(virulence gene, *VIR* 基

收稿日期:2009-06-05

基金项目:国家科技攻关资助项目(2003ba538e)。

第一作者简介:韩阳(1962-),女,博士,研究方向为植物分子生物学。E-mail: hanyang_0802@163.com

因)^[1]。研究表明,抗病基因产物是一种直接或间接的受体,本身无直接杀(抑)菌作用,它与病原菌无毒基因直接或间接编码的产物——激发子相互识别和作用后,激活寄主植物一系列防卫基因的表达,寄主植物则表现为抗病或耐病。寄主植物抗病性表现的典型特征是过敏反应(hypersensitive response, HR)。自1992年第一个植物抗病基因成功克隆^[2]至今,已有众多植物抗病基因和病原菌无毒基因被克隆,部分基因的结构、功能和作用机制已经明确,有的抗病基因已在分子育种中得到应用。EST(expressed sequence tag)分析表明,拟南芥和大豆可表达数百个潜在的R基因^[3]。采用分子作图技术已将许多基因定位到拟南芥、马铃薯、大豆、莴苣、玉米和小麦等作物的基因图谱上^[4]。

植物R基因可导入到其它敏感的同种植物或远缘材料中,转基因植株已表现出一定程度的抗病性。遗憾的是,多数R基因的抗性是十分专化的,不仅抗病谱窄,而且随着病菌群体组成的变化和快速进化,抗性会很快丧失;只有少数R基因赋予植物持久和广谱的抗病性。一个具广谱和持久抗病性R基因的例子是从辣椒基因组中分离到的抗细菌性斑点病基因Bs2^[5],它不仅能识别感染辣椒的几乎所有Xanthomonas campestris菌系的无毒基因产物,而且还能识别感染番茄、油菜和柑橘植物的X.campestris菌系的无毒基因产物。转基因Bs2的番茄植株对X.campestris pv. vesicatoria引起的细菌性斑点病害的抗性明显提高^[6]。

1.1.2 “双组分系统”理论 1992年Wit根据“基因对基因”学说提出了获得非专化抗性的转基因植物的“双组分系统”理论。它是指在一定的寄主-病原菌互作系统中,将病菌的无毒基因或无毒基因及寄主抗病基因与一个特殊的启动子相连,组成“双组分系统”并导入含或不含相应R基因的植物中。当病原真菌侵染时,其中的启动子能及时做出反应,启动avr基因或avr-R基因的表达,二者的产物互作后诱发植物的HR反应,从而使植物抗病^[7]。由于启动子受各种非专化病原菌及其激发子所诱导,而且植物的防卫反应不是专化性的,因而可获得广谱抗性的转基因植物。

1.1.3 对HR和SAR中信号传导的调控 提高植物广谱抗病性的又一途径是对HR和系统获得性抗性(SAR)中信号传导的调控,鉴定和克隆HR和

SAR中的重要基因是该策略的关键。某些基因可显著增强激活植物抗病反应的信号传导,因此在培育广谱抗病性转基因植物上具有较大的应用价值。如Myb1基因,它编码一种可与PR-1a基因的启动子元件相结合的转录因子。Myb1能被烟草花叶病毒(TMV)所诱导^[8]。转Myb1基因的烟草植株对TMV和真菌病害(Rhizoctonia solani)抗性均明显提高^[9]。

NPR1基因(nonexpresser of PR基因),也被称为NIM1(noninducible immunity)基因,是从拟南芥植物中克隆得到的。它是导致系统获得性抗性反应发生中的一个重要调节因子。NPR1基因的突变使植物即使在SAR诱导因子预处理后也失去对毒性病原真菌和细菌的抗性。Cao^[10]等用作图克隆法获得了拟南芥的NPR1基因,并通过表达NPR1蛋白的策略获得了广谱抗病的拟南芥植株。

水杨酸(SA)、乙烯、茉莉酸是植物防卫反应的激活子。对SA在防卫反应中的作用已有大量的研究,也利用转基因的方法对的作用进行了进一步的证实。表达烟草SA结合蛋白的马铃薯,可产生系统获得性抗性反应,对Phytophthora infestans的耐病性增加^[11]。乙烯和茉莉酸可能在植物与腐生病原互作中作为信号分子,并且与介导的防卫反应相互独立,也可能存在相互拮抗^[12-13]。

1.2 基于抗真菌蛋白的基因工程策略

基于抗真菌蛋白的基因工程策略使用的目的基因包括:病程相关蛋白(PR)基因、核糖体失活蛋白(RIP)基因、钝化病原菌致病酶或毒素的蛋白质基因、溶菌酶基因、草酸氧化酶基因、抗菌肽基因等。

1.2.1 病程相关蛋白(PR)基因 病程相关蛋白是植物在病理或病理相关条件下产生的植物蛋白。PR首先在被TMV侵染的烟草叶片中检测到,它与HR相关。在以后的研究中,PR对植物抗性表达的影响,与植物诱导抗性的关系,尤其是它与HR以及系统获得性抗性的关系,以及对病原物的作用等引起人们的关注。在转基因中应用最多的PR是渗透素和类甜味蛋白及几丁质酶和葡聚糖酶。渗透素和类甜味蛋白可能通过与质膜的特异作用造成膜穿孔,从而诱导真菌细胞膜的渗漏。几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶能水解真菌细胞壁的构成成分——几丁质和β-1,3-葡聚糖,细胞壁水解后真菌细胞死亡或生长受抑。

在表达几丁质酶和 β -1,3- 葡聚糖酶的基因工程上已有大量的研究结果^[14]。徐香玲等^[15]以根癌农杆菌的 Ti 质粒为介导,将几丁质酶基因导入大豆东农 37 等 14 个品种,从子叶节和下胚轴诱导出丛生芽,并再生植株,经 PCR 和 Southern 杂交检测,确认为转化植株。用花粉管通道导入法,直接导入几丁质酶基因,共获 223 粒种子,经检测证明几丁质酶基因已导入并整合到大豆的基因组中。Li 等^[16]采用农杆菌介导法和基因枪法将菜豆几丁质酶和大麦核糖体失活蛋白基因转入大豆,获得同时整合双价基因的转基因植株。对双价转基因大豆 T₂ 代的 5 个株系进行了大豆疫霉根腐病抗病性检测^[17],结果表明,有 4 个转基因株系对大豆疫霉根腐病的抗性与非转基因对照组相比有明显提高,另外 1 个株系与对照组相比没有明显差异。

1.2.2 核糖体失活蛋白基因 一些植物能产生核糖体失活蛋白,它可以损伤原核生物的核糖体,将 28r RNA 切开,并使核糖体不能和延长因子结合,从而阻止蛋白质的合成。如果核糖体失活蛋白基因与几丁质酶基因一同导入植物,几丁质酶降解真菌细胞壁而使核糖体失活蛋白更易进入真菌细胞,可产生更强烈的抑菌作用^[18]。

郭玉双^[19]通过农杆菌介导法,对大豆进行几丁质酶基因和核糖体失活蛋白基因遗传转化,获得了同时整合双价基因的 T₀ 代转基因大豆植株。将 T₀ 代转基因大豆植株扩繁至 T₂ 代,并对其进行大豆疫霉根腐病和大豆灰斑病的抗性检测,结果表明 4 个株系的抗性均比对照有明显提高。

1.2.3 溶菌酶基因 许多植物的溶菌酶对病原菌表现出很强的裂解活性,用转基因技术将外源溶菌酶基因导入植物可提高植物对细菌及部分真菌的抗性。

1.2.4 草酸氧化酶基因 草酸氧化酶(oxalate oxidase)是具有酶活性的抗菌蛋白,它能在降解核盘菌重要的致病因子——草酸的同时催化 H₂O₂ 分子生成,进而抑制菌核病的发生。许多研究表明,H₂O₂ 的积累在植物防卫系统中具有重要作用,它既可直接杀菌或抑菌,又可行使信号分子作用激活其它防卫反应。利用导入草酸氧化酶基因策略已使大豆成功地获得了对菌核病的抗性^[20-21]。

1.2.5 抗菌肽基因 人们已从昆虫、动物、细菌、真菌中分离到许多抗菌蛋白,将其笼统称为“抗菌

肽”。抗菌肽(antibacterial peptides)是生物体产生的对抗外源性病原体侵袭的防御性肽类活性物质,一般由 10 ~ 50 个氨基酸组成,含有 2 ~ 3 个带正电荷的氨基酸,分子量一般在几千个道尔顿(Da)之间,具有水溶性好,不易被酶水解,热稳定性高等特点^[22]。迄今为止,已发现 500 多种抗菌肽,一般的抗菌肽对病毒、真菌、细菌等都具有广谱的抗菌性,对原生生物也能起一定的抵抗作用。由于抗菌肽抗菌谱广,分子量小,基因操作容易,转抗菌肽基因工程研究已经成为植物抗病育种的重要途径。但是,大豆转抗菌肽基因工程还未见报道。

2 抗病毒病害基因工程育种策略

基于寄主-病原菌相互识别和信号传导体系及抗菌蛋白的基因工程也广泛应用于植物抗病毒育种工作中^[23],除此之外,科技工作者还提出了多种获得抗病毒转基因植物策略,这些策略包括病毒外壳蛋白基因介导的抗性、病毒复制酶介导的抗性、病毒运动蛋白介导的抗性、利用病毒反义 RNA 介导病毒抗性、利用缺陷干扰性分子介导病毒抗性、RNA 介导的抗性及利用病毒弱毒株完整基因组介导病毒抗性等。

2.1 病毒外壳蛋白基因介导的抗性

外壳蛋白(Coat Protein, CP)是形成病毒颗粒的结构蛋白,其功能是包被病毒基因组核酸,保护核酸;参与与宿主的相互识别过程;参与病毒的长距离运输等。由 CP 基因介导的抗性机理主要是利用无毒的病毒外壳蛋白抑制病毒的复制或激发宿主的抗性反应,包括:(1)在蛋白质水平上抑制病毒脱衣壳;(2)RNA 水平上干扰病毒的复制转录;(3)阻断病毒的长距离运输。

外壳蛋白基因介导的抗性是抗病毒基因工程中的应用最多、最成功的策略。自 1986 年首次获得抗 TMV 的烟草植株以来,这一策略已成功地使用在玉米等重要作物上。

转入外壳蛋白基因获得对病毒的抗性是成功地应用于大豆的抗病毒策略之一。Di 等^[24]将豆荚斑点病毒(BPMV)外壳蛋白前导(BPMV-cp-p)基因转入大豆子叶节,部分转基因植株后代表现对 BPMV 抗性。Wang 等^[25]报道了将大豆花叶病毒外壳蛋白基因导入大豆,部分转基因株系对 SMV 的高抗性稳

定遗传至 T_3 代。Srinivasa 等^[26] 采用基因枪法将豆荚斑点病毒外壳蛋白前导基因转化大豆体细胞胚, 转基因植株对 BPMV 表现抗性, 并且抗性稳定遗传至 T_2 代。Furutani 等^[27] 将大豆花叶病毒减毒株的外壳蛋白基因转入大豆体细胞胚, 获得 3 个对 SMV 高抗性株系。

2.2 病毒复制酶基因介导的抗性

向植物体内转入缺损的病毒复制酶基因, 表达出的无功能的缺损的复制酶可以与有功能的复制酶相互竞争, 从而干扰病毒的正常复制。所转的复制酶基因有全长的复制酶基因, 也有完整的复制酶亚基基因, 还有突变或缺失的复制酶基因, 任何一种类型都有获得高抗性的例子, 但是在该策略在大豆上还未见应用。

2.3 病毒运动蛋白基因介导的抗性

病毒在细胞间的移动是一主动的过程, 需要病毒编码的蛋白参与, 这种蛋白称为运动蛋白。运动蛋白基因介导的抗性机理主要是利用编码失去活性的病毒移动蛋白的基因干扰病毒的移动, 进而达到抑制病毒扩散的目的。

2.4 卫星 RNA 介导的病毒抗性

卫星 RNA (satelliteRNA, sRNA) 是一种必须依赖于辅助病毒才能进行复制的小分子 RNA, 其与病毒 RNA 没有同源性, 单独并不能用来侵染植株。sRNA 与其辅助病毒在植物中往往有 2 种完全不同的作用: 在一些植物中, 可以促进病毒的复制, 从而加重病毒的症状和危害; 而在另外一些植物中, sRNA 却能干扰病毒的复制, 从而减轻症状达到防治病毒的作用。sRNA 介导的病毒抗性就是利用干扰病毒的复制这一特性来设计的。

2.5 利用 RNA 沉默获得病毒病抗性

利用基因沉默来获得病毒抗性逐渐成为研究植物对病毒抗性的一种全新策略, 将这种由 RNA 沉默或者说是转录后基因沉默所引起的植物对病毒的抗性称之为 RNA 介导的病毒抗性。这种抗性机制在于那些具有同源序列的转基因 RNA 和外源病毒 RNA 都被降解, 如果转基因中包含了病毒的序列, 则那些基因组中含有这些序列的病毒就不能在转基因植株中复制和传播。

RNA 介导的抗性是应用于大豆抗病毒的另一成功策略。Furutani 等^[28] 等对获得的高 SMV 抗性转基因大豆做进一步研究, 认为其中 1 个株系的

SMV 抗性来源于 RNA 沉默介导的抗性。Tougou 等^[29-30] 采用基因枪法先后将 1 对颠倒重复序列大豆矮化病毒外壳蛋白 (SbDV-CP) 基因和正义 SbDV-CP 基因导入大豆体细胞胚, 均获得了稳定遗传的大豆矮化病毒 (SbDV) 高抗性转基因株系, 后代分析表明植株对 SbDV 的抗性源于 RNA 沉默介导的过程。

2.6 其它抗病毒策略

除了上述抗病毒策略外, 研究中还发现了一些转基因抗病毒的方法, 包括利用核酶 (Ribozyme) 基因的抗病毒策略、植物抗体抗病毒策略、反义 RNA 介导的抗性、缺陷 RNA 介导的抗性等, 但是还未见这些方法在大豆上的应用。

3 结语

大豆是较早用于商品化生产的转基因作物之一, 转基因技术为大豆生产带来了极大的经济效益, 但是大豆抗病害转基因育种还多处于研究阶段。与玉米、马铃薯等作物相比, 大豆基因工程抗病害育种的研究也相对滞后, 这与大豆的再生系统建立难度大、遗传转化效率低及转基因抗性资源易丢失等有直接的关系, 大豆抗病基因工程育种仍然面临着巨大的挑战, 通过转基因技术培育出商品化的抗病大豆品种还需要在优化受体系统、提高转化率、培育稳定遗传的种质、生物技术与常规育种手段相结合等方面做大量的工作。

参考文献

[1] Flor H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. Annual Review of Phytopathology, 1971, 9: 275-296.

[2] Martin G B, Brommonschenkel S H, Chunwongse J, et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato [J]. Science, 1993, 262: 1432-1436.

[3] Botella M A, Coleman M J, Hughes D E, et al. Map positions of 47 Arabidopsis sequences with sequence similarity to disease resistance genes [J]. Plant, 1997, 12: 1197-1211.

[4] Speelman E, Bouchez D, Holub E B, et al. Disease resistance gene homologs correlates with disease resistance loci of Arabidopsis thaliana [J]. Plant, 1998, 14: 467-474.

[5] Kearney B, Staskawicz B J. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene avrBs2 [J]. Nature, 1990, 346: 385-386.

[6] Tai T H, Dahlbeck D, Clark E F, et al. Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato [J]. Proceeding of National Academy of Sciences, 1999, 96: 14153-

- 14158.
- [7] Wit PJGM. Molecular characterization of gene-for-gene system s in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens [J]. Annual Review of Phytopathology, 1992,30:391-418.
- [8] Yang Y, Klessing D F. Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible *myb* oncogene homolog from tobacco [J]. Proceeding of National Academy of Sciences, 1996, 93: 14972-14977.
- [9] Klessig D F, Yang Y. Genes associated with enhanced disease resistance in plants [J]. US Patent, 1999, 593-601.
- [10] Cao H, Bowling S A, Gordon S. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance [J]. Plant Cell, 1998, 6:1583-1592.
- [11] Yu D, Xie Z, Chen C, et al. Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and in associated with disease resistance in transgenic potato plants [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 39:477-488.
- [12] Pieterse C M J, Ton J, Van Loon L C. Cross-talk between plant defense signaling pathways: boost or burden [J]. AgBiotechNet, 2001, 3:1-8.
- [13] Lee M V, Qi M, Yang Y. A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14:527-535.
- [14] 王华, 周鹏, 郭安平. 几丁质酶基因与抗真菌蛋白基因、葡聚糖酶基因双价表达载体的构建及农杆菌工程菌株的重组 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(2):250-256. (Wang H, Zhou P, Guo A P. Recombination of Agrobacterium strains with hivalent - expression vectors containing chitinase/antifungal protein or chitinase/ β -1,3- glucanase genes [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2002, 22(2):250-256.)
- [15] 徐香玲, 邹联沛, 刘伟华. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究 [J]. 大豆科学, 1999, 18(2):101-107. (Xu X L, Zou L P, Liu W H. A preliminary study on transferring chitinase gene into soybeans [J]. Soybean Science, 1999, 18(2):101-107.)
- [16] Li H Y, Zhu Y M, Chen Q. Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via Agrobacterium and particle bombardment [J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(3):367-374.
- [17] 郭玉双, 张艳菊, 朱延明, 等. 抗真菌转基因大豆对大豆疫霉根腐病抗病性鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(6):733-738. (Guo Y S, Zhang Y J, Zhu Y M, et al. Resistance identification of fungi-resistant genes transformed soybean to *Phytophthora sojae* [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2006, 37(6):733-738.)
- [18] 侯丙凯, 夏光敏, 陈正华. 植物基因工程表达载体的改进和优化策略 [J]. 遗传, 2001, 23(5):492-497. (Hou B K, Xia G M, Chen Z H. Strategies for optimizing expression vectors used in plant genetic engineering [J]. Hereditas, 2001, 23(5):492-497.)
- [19] 郭玉双, 张艳菊, 朱延明, 等. 转几丁质酶和核糖体失活蛋白双价基因大豆的获得与抗病性鉴定 [J]. 作物学报, 2006, 32(12):1841-1847. (Guo Y S, Zhang Y J, Zhu Y M, et al. Obtainment of transgenic soybean plants with chitinase and ribosome inactivating protein genes and their resistance identification [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(12):1841-1847.)
- [20] Donaldson P A, Anderson T, Lane B G, et al. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant responses to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2001, 59:297-307.
- [21] Cober E R, Rioux S, Rajcan I, et al. Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line [J]. Crop Science, 2003, 43:92-95.
- [22] 张继南, 陈红霞. 抗菌肽及其应用研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2006, 17(4):669-672. (Zhang J N, Chen H X. The advance on investigation of antibacterial peptides and their application [J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(4):669-672.)
- [23] Dasgupta I, Malathi V G, Mukherjee S K. Genetic engineering for virus resistance [J]. Current Science, 2003, 84:431-354.
- [24] Di R, Purcell V, Collins G B. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15:746-750.
- [25] Wang X Y, Eggenberger A L, Nutter J R, et al. Pathogen-derived transgenic resistance to soybean mosaic virus in soybean [J]. Molecular Breeding, 2001, 8:119-127.
- [26] Srinivasa R M S, Ghabrial S A, Redmond C T, et al. Resistance to bean pod mottle virus in transgenic soybean lines expressing the capsid polypeptide [J]. Phytopathology, 2001, 91(9):831-838.
- [27] Furutani N, Hidaka S, Kosaka Y, et al. Coat protein gene-mediated resistance to soybean mosaic virus in transgenic soybean [J]. Breeding Science, 2006, 56:119-124.
- [28] Furutani N, Yamagishi N, Hidaka S, et al. Soybean mosaic virus resistance in soybean caused by post-transcriptional gene silencing [J]. Breeding Science, 2007, 57:123-128.
- [29] Tougou M, Furutani N, Yamagishi N, et al. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25:1213-1218.
- [30] Tougou M, Yamagishi N, Furutani N, et al. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26:1967-1975.