

利用 VIGS 技术对抗 SMV 候选基因 *GmZ15* 的功能分析

黄赛花, 郑桂杰, 杨永庆, 智海剑

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要:大豆花叶病毒(SMV)是我国大豆田间主要病毒性病害,阐明大豆对 SMV 的抗性机制对抗性的利用具有重要意义。利用 VIGS 技术对抗性基因 *RSC3Q* 的候选基因 *GmZ15* 进行功能分析,结果表明:*GmZ15* 在 SMV 的诱导后表达量发生明显变化,在接种后 24 h 表达量达到最高。沉默 *GmZ15* 后的表达量分别为缓冲液对照和 pGG7R2 空载体对照组的 0.3 和 0.2 倍,差异极显著,表明 *GmZ15* 被有效沉默。沉默后接种 SMV 结果显示,沉默后 48 h SMV 的浓度约是未沉默处理的 6 倍,说明沉默 *GmZ15* 有助于 SMV 的积累,但在其上位叶中均检测到少量 SMV 且差异未达到显著水平,由此推测 *GmZ15* 介导着一种大豆对 SMV 的防御反应,齐黄 1 号对 SC3 株系的抗性另有其它基因参与。

关键词:大豆花叶病毒;病毒诱导的基因沉默;抗病基因;功能验证

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.04.0582

Analysis on the Candidate Resistance Gene *GmZ15* to Soybean Mosaic Virus by VIGS

HUANG Sai-hua, ZHENG Gui-jie, YANG Yong-qing, ZHI Hai-jian

(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: Soybean mosaic virus (SMV) is one of the most prevalent pathogens in soybean production in China. To clarify the mechanism for SMV resistance would be great significant. VIGS (virus induced gene silencing) was used to analyze the functions of candidate gene *GmZ15* for resistance locus *RSC3Q*. The results showed the expression of *GmZ15* changed greatly after inoculated with SMV, and reached a peak 24 hours later. After *GmZ15* was silenced, the expression of *GmZ15* dropped to 0.3 compared with the control inoculated with buffer and 0.2 compared with the control inoculated with empty vector pGG7R2. The silencing of *GmZ15* contributes to the accumulation of SMV in soybean. The accumulation of SMV was 6 times more in soybean which *GmZ15* was silenced than in the control. While, there was no significant difference in the upper leaf. So we speculated that *GmZ15* did induce a kind of defense reaction. There may be other gene(s) involved in the resistance process in Qihuang 1.

Keywords: Soybean mosaic virus(SMV); Virus induced gene silencing; Resistance gene; Function analysis

大豆花叶病毒病(*soybean mosaic virus*, SMV)是我国各大豆产区重要的病毒病害之一,能导致大豆产量和品质的下降。抗病育种是最经济有效防控 SMV 病害的方法。

国外学者在不同的抗性种质中分别发现了 *Rsv1*、*Rsv3* 和 *Rsv4* 三个抗病基因位点,分别位于 F₂、B₂ 和 D₁b 三个连锁群上,各基因位点存在着多个等位基因;国内针对不同 SMV 株系定位出了 *R3*、*Ra*、*Rc*、*Rsa*、*Rn1*、*Rn3*、*R_{SC8}*、*R_{SC9}*、*R_{SC7}*、*R_{SC13}*、*R_{SC3Q}*、*R_{SC14}*、*Rsc-ps* 和 *Rsc-pm* 等多个抗病基因,这些基因分布在 F₂、B₂ 和 D₁b 三个连锁群上^[1-10]。

克隆 R 基因并研究它的结构和功能有利于了

解植物的抗病机制。目前,已经从拟南芥^[11-13]、烟草^[14]、水稻^[15-16]等不同物种中克隆出几十个抗不同病原物的 R 基因。这些 R 基因编码的蛋白通常拥有特殊的保守结构,如亮氨酸拉链结构(LZs)、亮氨酸富集重复结构(LRR)、核苷酸结合位点(NBS)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域(STK)和 toll 蛋白/白细胞介素-1 受体类似结构域(TIR)等。

到目前为止,尚未分离到功能性大豆抗 SMV 基因,但已有一些抗病基因同源片段和几个抗病相关基因被分离。如根据烟草抗花叶病毒 *N* 基因和拟南芥 *RPS2* 基因的 NBS 同源序列设计简并引物,从大豆中分离出 11 类含 NBS 序列的基因,5 类定位于

收稿日期:2014-09-12
基金项目:国家自然科学基金(31171574, 31371646);国家现代农业产业技术体系(CARS-004);转基因生物新品种培育专项(2008ZX08004-004)。

第一作者简介:黄赛花(1988-),女,硕士,主要从事大豆抗病育种研究。E-mail: 2011101023@njau.edu.cn。

通讯作者:智海剑(1957-),男,教授,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: zhj@njau.edu.cn。

已知大豆抗病基因所在的区段,其中 *NBS5* 和 *NBS6* 定位在大豆 F 连锁群抗病基因 *Rpv1* 和 *Rsv1* 附近^[17]。以 *NBS5* 为探针^[18],筛选 cDNA 文库,获得了一个具有 TIR-NBS-LRR 保守结构的抗病候选基因 *L20a*^[19]。Hayes 等^[20]从 PI96983 中克隆到具有 NBS-LRR 结构的抗病候选基因 3gG2,全长 3 390 bp,包含一个完整的编码框。国内学者在精细定位基础上,对齐黄 1 号、大白麻和科丰等抗性材料携带的抗病候选基因进行 RT-PCR 分析,发现了多个对 SMV 具有积极响应的基因,推测这些基因可能参与对 SMV 的抗病反应当中^[6,9]。

基因功能分析除了结构和组织表达、亚细胞定位、诱导表达等方法外最有效的方法是转基因,但目前转基因验证存在成功率低、耗时长、成本高等诸多问题,因此不能用于大规模的基因功能研究。病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是在病毒介导下,利用携带目标基因片段的载体诱导植物内源目标基因沉默,进而根据表型变异推断目标基因的功能,它是近期发展起来的用于研究基因功能的新技术,与传统的基因功能分析方法相比,VIGS 能够在侵染植物当代对目标基因进行沉默和功能分析,一定程度上解决了转基因技术在效率、时间等方面的局限,在拟南芥、烟草等一些模式作物上已经得到广泛应用,国外已利用该技术在大豆基因功能分析上开展相关研究^[21],国内在大豆上还没有应用的报道。

本研究在前人定位的基础上,在定位区段内搜索到一个具有锌指结构的抗病候选基因 *Glyma13g26150*(在此命名 *GmZ15*),进一步对其进行了诱导表达分析,并利用基于 BPMV 的 VIGS 技术分析了该基因沉默后的抗性变化,为明确其功能奠定了基础。

表 1 载体构建和实时定量的引物

Table 1 Primer sequences used for constructing vectors and QRT-PCR

引物名称 Primer name	上游引物(5'→3') Forward primers (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primers (5'→3')
<i>GmZ15</i>	CGCGGATCCCGGAAGCCTCTTACTTCAA	TGTGTTGCCCAACATTCGAAGTAATGGCAG
<i>ygGmZ15</i>	CCTTGATCCCTTCCCTTT	GCGGTTGACTTTCTTGCCC
<i>ygSMV</i>	TTATGGGGAAAAAGGAGTGT	ATTTCTCTTCCAACCCACCA
<i>Tubulin</i> ^a	GGAGTTCACAGAGGCAGAG	CACTTACGCATCACATAGCA

^a:基因的登录号为 AY907703。

^a:Genbank accession No. AY907703.

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种齐黄 1 号和南农 1138-2 由南京农业大学国家大豆改良中心保存和提供,黄淮海 SMV 流行株系 SC3 由本课题组保存。VIGS 相关载体 pGG7R1、pGG7R2 和 pGG7R2-*GmPDS* 由美国肯塔基大学提供。

1.2 方法

1.2.1 抗病基因的定位 利用携带 *R_{SC3Q}* 抗病基因品种齐黄 1 号和南农 1138-2 配置杂交组合,采用 BSA 方法对携带的抗病基因进行初步连锁分析,再根据初步连锁分析结果,利用 F₂ 群体对抗病基因 *R_{SC3Q}* 进行遗传连锁图谱的构建,详细步骤见郑桂杰^[6]的方法。

1.2.2 荧光定量 齐黄 1 号在第一片复叶完全展开时接种 SMV 和缓冲液,将缓冲液处理的样品作为基准样品,观察接种 SMV 后 *GmZ15* 在 0,1,2,4,8,12,24 和 48 h 各时间点的表达量。*GmZ15* 沉默后,SMV 浓度检测取样为接种叶或上位叶,缓冲液和 pGG7R2 处理分别为空白对照和阴性对照。在进行荧光定量时,每个样品和内参均设置 3 个平行试验。目的基因表达水平的差异是通过比较 Ct 值的不同,ΔCt 归一化持家基因,以消除不同样本间模板量的不同,ΔΔCt 归一化基准品(如正常样品 vs 处理样品,其中正常样品是基准品),数据分析用 LightCycler® 96 Application Software (graph error ± SD =0.1) normalized expression^{ΔΔCt} C_T = (C_{T,Target} - C_{T,tubulin}) Time_x - (C_{T,Target} - C_{T,tubulin}) Time₀。

1.2.3 载体构建和体外转录 载体构建和体外转录均参照文献 Gu and Ghabrial^[23],试验中载体构建和荧光定量用到的引物见表 1。

1.2.4 体外侵染和培养 以 BPMV 为病毒载体,而 BPMV 是一种 RNA 病毒,通过摩擦接种方式将得到的体外转录产物导入大豆叶片中。体外侵染完成后,将植株放在温度为 24 ~ 28℃、湿度为 60% ~ 80% 的光照培养箱中生长,在侵染 14 ~ 21 d 后观察症状。

1.2.5 *GmZ15* 与 SMV 抗性相关性分析 一般沉默发生在第二和第三片复叶上,以空载和沉默大豆 *PDS* 基因后为对照,在沉默后的叶片上接种 SMV,以缓冲液和空载处理的叶片作为对照,测定接种后 SMV 在叶片中含量的变化。

2 结果与分析

2.1 抗性基因 *R_{sc3Q}* 的定位

利用可覆盖大豆全基因组的 954 对 SSR 引物在抗感亲本间进行多态性筛选。在齐黄 1 号和南农 1138-2 间获得多态性引物 341 对,用这 341 对引物在抗感池间进行筛选,4 个位于 13 号染色体(以前称 F 连锁群)上的 SSR 标记 Sat_234、Satt114、Satt334 和 Sct_033 在抗感池间具有多态性,连同 13 号染色体上在两亲本间有差异的另外 12 对 SSR 标记引物,利用 JoinMap3.0 对齐黄 1 号 × 南农 1138-2 的 F₂ 群体(203 个单株)进行连锁分析和作图,把抗性基因 *R_{sc3Q}* 定位在第 13 号染色体上,最近的 2 个标记 Satt334 和 Sct_033 与抗性基因的遗传距离分别为 6.517 和 3.169(图 1)。

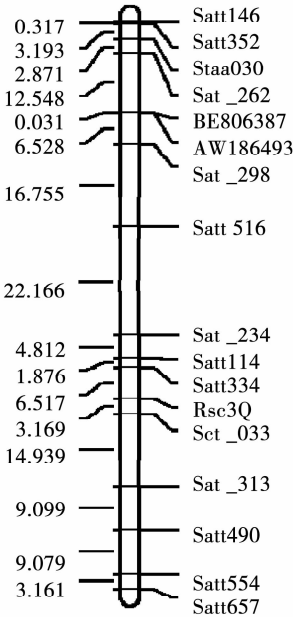
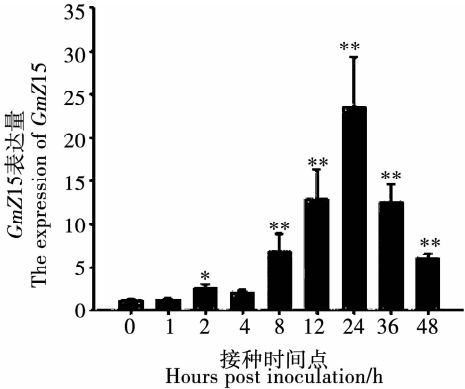


图 1 抗病基因 *R_{sc3Q}* 在大豆 F 连锁群上的遗传连锁图谱
Fig. 1 Chromosome F genetic linkage map of the *R_{sc3Q}* locus

利用生物分析软件和公共网站 <http://phytozome.net> 对该区段内候选基因进行分析,结果发现该区间内的候选基因存在多种跟抗病相关的结构域,例如 *Glyma13g25920* 和 *Glyma13g26000* 等候选基因具有 NBS-LRR 结构,*Glyma13g26150* 具有锌指结构等。

2.2 *GmZ15* 诱导表达分析

经 SMV 诱导处理后抗病候选基因 *GmZ15* 在 0, 1, 2, 4 h 时间点表达量变化较小,从第 8 小时开始, *GmZ15* 表达量开始上调,与 0 h 相比,在 8, 12, 24, 36 和 48 h 5 个时间点表达量均达到极显著水平,其中在 24 h 表达量达到峰值,为基准样品表达量的 23 倍左右。表明 *GmZ15* 对 SMV 的诱导处理具有积极响应,并且介导着一种大豆对 SMV 的防御反应,但不同于 *R_{sc3Q}* 介导的抗病反应机制。



“: *GmZ15* 表达量是经过基准化的表达量; * 表示差异显著; ** 表示差异极显著。

The expression of *GmZ15* was benchmarked; * indicated significant difference; ** indicated extremely significant difference.

图 2 *GmZ15* 在 SMV 诱导后不同时间点的表达量
Fig. 2 Expression of *GmZ15* after SMV induced

2.3 *GmZ15* 沉默后大豆对 SMV 抗性的变化

利用分别在 5' 端和 3' 端加有 *Bam*H I 和 *Msc* I 酶切位点的特异引物(表 1)对目的基因 *GmZ15* 进行沉默片段扩增,利用 *Bam*H I 和 *Msc* I 分别对产物和 pGG7R2 进行双酶切,酶切产物在 T4 连接酶的作用下构建成重组载体 pGG7R2-*GmZ15*。构建好的载体测序后与 *GmZ15* 比对(图 3),结果显示载体上的目的片段与目的基因的碱基完全匹配,表明载体构建成功。对 pGG7R1 和 pGG7R2-*GmZ15* 分别进行线性化后转录,转录结果显示(图 4)分别获得一条亮度很好的 RNA 条带,表明转录成功。将 pGG7R2-*GmZ15* 和 pGG7R1 转录产物等体积混合对南农 1138-2 进行侵染,侵染 14 ~ 21 d 后在第三片复叶上观察到典型花叶症状(图 5),提取具有典型症状叶片的 RNA 利用病毒载体上的特异引物进行检测,结果均呈现阳性,表明体外侵染成功。

取体外转录和侵染后的大豆第三片复叶对 *GmZ15* 的表达量进行分析,结果显示(图 6),*GmZ15* 在 pGG7R2(空载)处理组中表达约为缓冲液处理组的 1.6 倍左右,达到显著水平,可能是 *GmZ15* 对

BPMV 侵染响应,这种响应属于持续性响应。沉默 *GmZ15* 后的表达量分别为缓冲液和 pGG7R2 处理对照组中的 0.3 和 0.2 倍左右,显著性分析表明达到极显著水平,表明 *GmZ15* 被有效沉默。

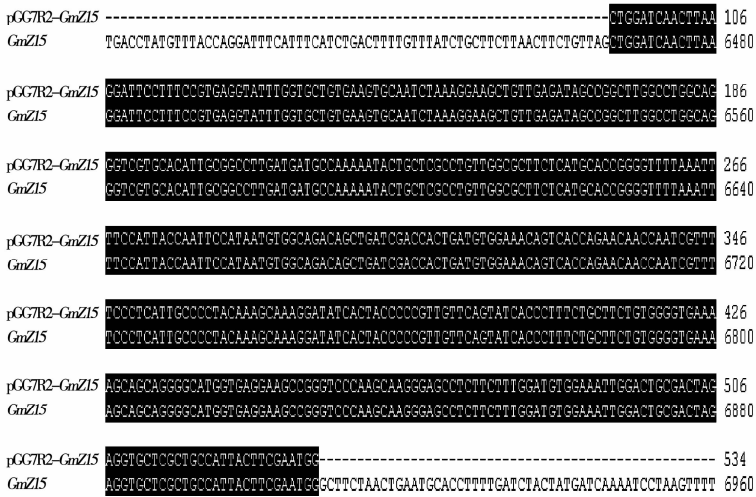


图 3 重组病毒载体的 *GmZ15* 基因核苷酸序列比对

Fig. 3 The alignment of *GmZ15* gene of vector nucleotide sequences

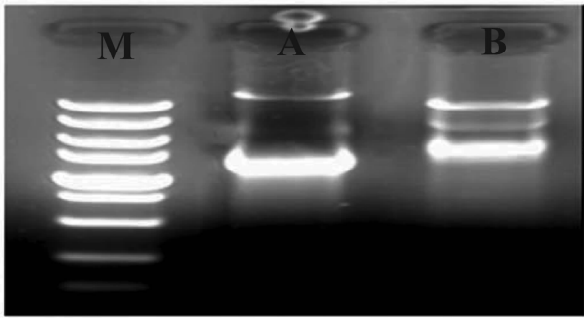
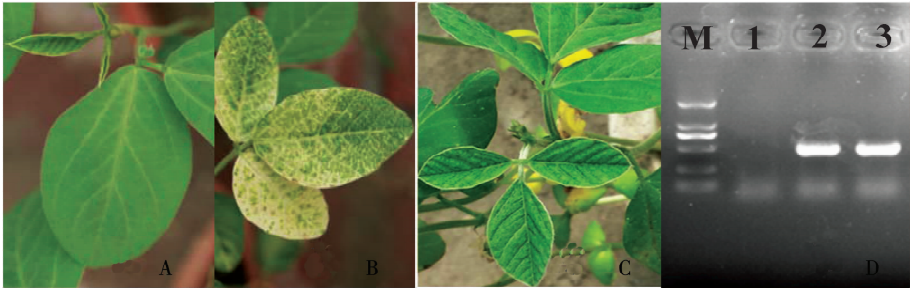


图 4 重组载体 pGG7R2-*GmZ15* (A) 和 pGG7R1 (B) 的转录产物

Fig. 4 The transcription products of pGG7R2-*GmZ15* (A) and pGG7R1 (B) electrophoresis



A、B、C 分别为正常叶片、沉默 *GmPDS* 基因对照和沉默 *GmZ15* 基因表型;D 图中泳道 1、2、3 分别对应是 A、B、C 三种类型叶片的检查。

A indicated normal leaf; B indicated the picture of silencing *GmPDS*; C indicated the picture of silencing *GmZ15*; The lanes 1, 2, 3 of D respectively checked to the three blades' types of A, B and C.

图 5 大豆植株不同表型及其相对应的 PCR 检测

Fig. 5 The phenotype of soybean plants and PCR detection

将对照中 SMV 初始浓度设定为 1, 分别选取 24, 48 h 及 6 d 3 个时间点观察 SMV 浓度,结果显示(图 7),缓冲液处理后的 24 和 48 h 的 SMV 浓度比

起始浓度呈现持续下降趋势,之后在其上位叶上仅测到极少量 SMV。在 24 和 48 h pGG7R2-*GmZ15* 处理组的 SMV 浓度呈现显著或极显著上升趋势。3

组试验处理中均在上位叶中检测到极少量的 SMV 且差异未达到显著水平。结果表明,沉默 *GmZ15* 基因有助于 SMV 在接种叶上的积累,但齐黄 1 号对 SC3 的抗性没有丧失,由此推测 *GmZ15* 基因可能介导着一种大豆对 SMV 的防御反应,它在 SMV 侵染时发挥作用。

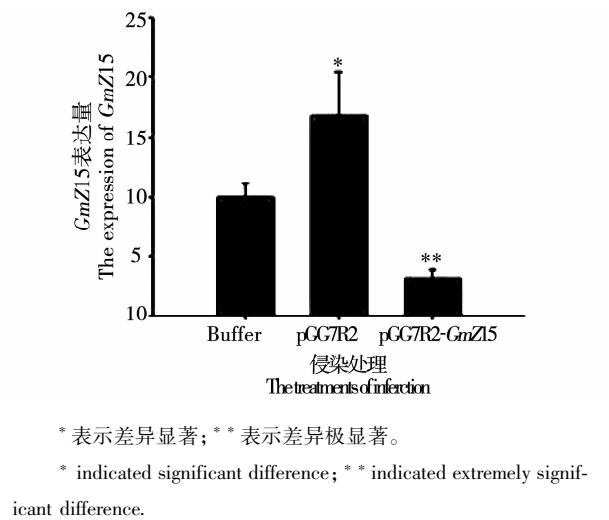
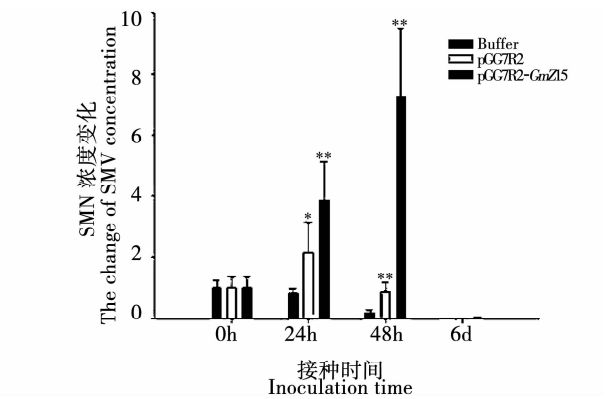


图 6 植株不同处理后 *GmZ15* 的表达分析
Fig. 6 The expression analysis of *GmZ15*



0, 24 和 48 h 时间点取样均为接种叶, 6 d 取样为上位叶。
The samples of 0, 24, 48 hours were inoculated leaves, and 6 days were upper leaves.

图 7 在不同处理下大豆体内 SMV 浓度
Fig. 7 The expression variation of SMV titer in different treatments

3 讨论

转录因子在调控基因的表达、控制细胞的分化以及植物的抗性等方面均有参与^[22]。研究发现在拟南芥中存在多种锌指蛋白基因,而且均有抗胁迫的功能。在大豆中也发现了多种锌指蛋白基因,但对其功能的研究还鲜有报道。本研究中的 *GmZ15* 是具有锌指结构的转录因子,其在 SMV 诱导后表达量在病毒侵染中后期有明显的上升趋势,并在 24 h 达到峰值。沉默齐黄 1 号的 *GmZ15* 基因后,接种叶

上 SMV 的浓度明显上升,说明 *GmZ15* 基因参与了对 SMV 的防御反应。然而在其上位叶中并未检测到 SMV,说明齐黄 1 号对 SMV 的抗性并未丧失,推测 *GmZ15* 参与了对 SMV 的防御反应,这种防御反应主要作用是减少 SMV 在侵染过程中的繁殖和积累,在齐黄 1 号中可能存在其它阻止 SMV 运动的基因,它使得 SMV 不能系统侵染齐黄 1 号,这个推测需进一步研究验证。

VIGS 的是病毒介导的基因沉默,只有植物本身能感染病毒,靶基因才可能会被沉默。本文利用能够侵染大豆的菜豆荚斑驳病毒(BPMV)作为基础病毒载体,将目的基因 *GmZ15* 构建到病毒载体中,从而引起 *GmZ15* 的沉默,研究该基因沉默后的抗性变化,从而推测其在大豆抗 SMV 过程中的作用。试验中发现经 BPMV 诱导后 *GmZ15* 基因较缓冲液对照处理也会略微上调,而且这种上调是持续性的,与 SMV 诱导后的反应基本一致。这可能是由于 BPMV 与 SMV 都属于 RNA 病毒,它也在一定程度上诱导了 *GmZ15* 参与防御反应,其作用机制有待进一步研究。

4 结论

大豆受 SMV 诱导后,*GmZ15* 基因从第 8 小时开始对 SMV 积极响应,并在 24 h 达到峰值。大豆品种齐黄 1 号的 *GmZ15* 基因被沉默后,接种叶上 SMV 的浓度积累明显增加,表明 *GmZ15* 基因参与了大豆对 SMV 的防御反应,但上位叶上都仅检测到极少量 SMV,与对照相比没有显著差异,推测齐黄 1 号对 SC3 株系的抗性另有其它基因参与。

参考文献

[1] 东方阳. 大豆对 SMV 株系抗性遗传分析和 RAPD 标记研究 [D]. 南京:南京农业大学,1999. (Dong F Y. Genetic analysis and RAPD markers of genes resistance to SMV strain in the soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 1999.)
[2] 郭东全,王延伟,智海剑,等. 大豆对 SMV SC13 株系群的抗性遗传及基因定位的研究 [J]. 大豆科学, 2007, 26 (1) : 21-24. (Guo D Q, Wang Y W, Zhi H J, et al. Inheritance and gene mapping of resistance to SMV strain group SC13 in soybean [J]. Soybean Science, 2007, 26 (1) : 21-24.)
[3] 王永军,东方阳,王修强,等. 大豆 5 个花叶病毒株系抗性基因的定位 [J]. 遗传学报, 2004, 31 (1) : 87-90. (Wang Y J, Dong F Y, Wang X Q, et al. Mapping of five genes resistant to SMV strains in China [J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31 (1) : 87-90.)
[4] 张志永,陈受宜,盖钧镒. 大豆花叶病毒抗性基因 *Rsa* 的分子标记 [J]. 科学通报, 1998, 43 (20) : 2197-2202. (Zhang Z Y, Chen S Y, Gai J Y. The molecular markers of soybean resistance

- gene *Rsa* [J]. Chinese Science Bulletin, 1998, 43 (20): 2197-2202.)
- [5] 郑翠明,常汝镇,邱丽娟. 大豆对 SMV3 号株系的抗性遗传分析及抗病基因的 RAPD 标记研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34 (1): 14-18. (Zheng C M, Chang R Z, Qiu L J. Inheritance of resistance to SMV3 and identification of RAPD marker linked to the resistance gene in soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2001, 34(1): 14-18.)
- [6] 郑桂杰. 齐黄 1 号对大豆花叶病毒抗性基因的精细定位、育种应用及候选基因表达分析[D]. 南京:南京农业大学, 2012. (Zheng G J. Fine mapping, expression analysis and breeding application of resistance genes to soybean mosaic in Qihuang No. 1 [D]. Nanjing; Nanjing Agricultural University, 2012.)
- [7] Fu S X, Zhan Y, Zhi H J, et al. Mapping of SMV resistance gene *Rsc-7* by SSR markers in soybean [J]. Genetica, 2006, 128 (1): 63-69.
- [8] Li H C, Zhi H J, Gai J Y, et al. Inheritance and gene mapping of resistance to soybean mosaic virus strain SC14 in soybean [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(12): 1466-1472.
- [9] Wang D G, Ma Y, Yang Y Q, et al. Fine mapping and analyses of RSC8 resistance candidate genes to soybean mosaic virus in soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122: 555-565.
- [10] Yang Y Q, Zheng G J, Han L, et al. Genetic analysis and mapping of genes for resistance to multiple strains of soybean mosaic virus in a single resistant soybean accession PI 96983 [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, DOI 10.1007/s00122-013-2092-y.
- [11] Andrew F B, Barbara N K, Douglas D, et al. Rps2 of Arabidopsis thaliana; A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J]. Science, 1994, 265(23): 1856-1860.
- [12] Murray R G, Laurence G, Esther S, et al. Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance[J]. Science, 1995, 269(11): 843-846.
- [13] Jane E P, Mark J C, Veronique S, et al. The Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with N and L6 [J]. Plant Cell, 1997, 9: 879-894.
- [14] Dinesh-Kumar S P, Whitham S, Choi D, et al. Transposon tagging of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Its possible role in TMV-N mediated signal transduction pathway [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92: 4175-4180.
- [15] Satomi Y, Utako Y, Yuichi K, et al. Expression of *Xa1*, a bacterial blight -resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95: 1663-1668.
- [16] Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21* [J]. Science, 1995, 270(15): 1804-1806.
- [17] Yu Y G, Maroof M S A, Buss G R, et al. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance [J]. Phytopathology, 1994, 84(1): 60-64.
- [18] Hayes A J, Ma G R, Buss G R, et al. Molecular marker mapping of *Rsv4*, a gene conferring resistance to all known strains of soybean mosaic virus [J]. Crop Science, 2000, 40(5): 1434-1437.
- [19] Jeong S C, Kristipati S, Hayes A J, et al. Genetic and sequence analysis of markers tightly linked to the soybean mosaic virus resistance gene, *Rsv3* [J]. Crop Science, 2002, 42(1): 265-270.
- [20] Hayes A J, Jeong S C, Gore M A, et al. Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans [J]. Genetics, 2004, 166(1): 493-503.
- [21] Liu S M, Pramod K K, Samantha D W, et al. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens [J]. Nature, 2012, 492: 256-262.
- [22] Ajay K P, Yang C L, Zhang C Q, et al. Functional analysis of the Asian soybean rust resistance pathway mediated by Rpp2 [J]. Molecular Plant-microbe Interaction. 2011, 24(2): 194-206.
- [23] Gu H, Ghabrial S A. The *Bean pod mottle virus* proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants [J]. Virology, 2005, 333(2): 271-283.