



转 $hrpZ_{Psta}$ 大豆株系的分子检测和抗性分析

冀采凤,邵瑞超,仇 祺,周靖萱,刘添祎,郭轩麟,张 靓,王丕武

(吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118)

摘 要:为考察转基因大豆株系 JN27-119-21 后代中 $hrpZ_{Psta}$ 外源基因的遗传稳定性、检测 JN27-119-21 后代的抗病能力,从而为培育抗疫霉根腐病的大豆新品种提供理论参考,以转 $hrpZ_{Psta}$ 基因大豆株系 JN27-119-21 的 T_7 、 T_8 代为供试材料,通过 PCR 和 Southern Blot 分子生物学检测方法和下胚轴侵染法鉴定转基因株系后代抗疫霉菌能力。研究结果表明:外源 $hrpZ_{Psta}$ 基因在高世代转基因株系中能够稳定遗传, $hrpZ_{Psta}$ 基因已被成功整合到大豆受体吉农 27 的基因组中,且整合方式为单拷贝,整合位点不同。 $hrpZ_{Psta}$ 基因在转化株系的根、茎、叶中均有表达, T_7 代平均相对表达量分别为 2.877、1.336 和 7.734, T_8 代平均相对表达量分别为 3.612、1.746 和 8.627,2 个世代相对表达量水平均为叶 > 根 > 茎。转基因株系后代对疫霉根腐病的抗病级别为抗性,而受体株系为中抗,抗病能力明显提高。

关键词:大豆;JN27-119-21;疫霉根腐病; $hrpZ_{Psta}$ 基因;抗病性

Molecular Detection and Resistance Analysis of Soybean-lines with $HrpZ_{Psta}$

Ji Cai-feng, SHAO Rui-chao, ZHANG Qi, ZHOU Jing-xuan, LIU Tian-yi, GUO Xuan-lin, ZHANG Liang, WANG Pi-wu

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to verify the genetic stability of $hrpZ_{Psta}$ gene in transgenic line JN27-119-21 and detect the disease resistance of the progenies of JN27-119-21, so as to provide a theoretical reference for breeding new soybean varieties resistant to Phytophthora root rot, in this experiment, T_7 and T_8 generation of soybean-lines JN27-119-21 with $hrpZ_{Psta}$ gene were used as test materials for identifying the disease resistance ability by PCR and Southern Blot molecular biological detection and hypocotyl infection to identify the resistance to Phytophthora of the offspring of JN27-119-21. The results showed: The exogenous $hrpZ_{Psta}$ gene can be stably inherited in high-generation transgenic lines, the $hrpZ_{Psta}$ gene was successfully integrated into the genome of soybean receptor Jinong 27 with single copy, and the integration sites were different. The $hrpZ_{Psta}$ gene was expressed in the roots, stems and leaves of the transformed lines, the average relative expression of the T_7 was 2.877, 1.336 and 7.734, the average relative expression of T_8 was 3.612, 1.746 and 8.627, and the relative expression level the T_7 and T_8 were both leaf > root > stem. The offspring of the transgenic lines were resistant to the disease resistance level of Phytophthora root rot, while the recipient strain was medium resistant and the disease resistance was significantly improved.

Keywords: Soybean; JN27-119-21; Phytophthora root rot; $hrpZ_{Psta}$ Gene; Disease resistance

大豆是人类脂肪和植物蛋白的主要来源,蛋白质含量约为 40%,脂肪含量约为 20%^[1-2]。在大豆生产过程中通常会遭受各种病害的侵染,严重降低其产量和品质^[3]。已被证实的大豆主要病害有 30 多种,每年对大豆生产造成的损失约占总产量的 10% 以上^[4]。大豆疫霉根腐病便是最具毁灭性病害之一。该病由大豆疫霉菌引发,是一种世界范围内的土传性病害,传播快速^[5-6],在大豆各个生育期都能引起多次侵染,造成危害。因此培育抗性持久、抗谱广泛的新品种成为育种工作的首要目标。

利用传统育种方法培育抗性品种,存在选育周期长,效率低等弊端,满足不了现代育种的需求。生物技术与常规育种的结合,既可以高效快速的提高品种抗性,也能保证植株农艺性状的良好品性,为抗病种质资源的丰富开辟了新途径。

目前,在植物基因工程育种中应用最广泛的抗病基因有 3-葡聚糖酶基因,几丁质酶基因、 hrp 基因等。 hrp 基因在植物防卫诱导及植物病原细菌定殖方面产生重要影响^[7]。 $hrpZ$ 基因来源于丁香假单胞菌,研究表明丁香假单胞菌需要 Hrp (III 型蛋白

收稿日期:2019-09-27

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08004-004)。

第一作者简介:冀采凤(1993-),女,硕士,主要从事生物技术与作物遗传育种研究。E-mail:1902590890@qq.com。

通讯作者:王丕武(1958-),男,博士,教授,主要从事生物技术与作物遗传育种研究。E-mail:peiwwu@yahoo.com.cn。

分泌)系统,该系统由 *hrp* 和 *hrc* 基因的 25 kb 簇编码。*hrpZ* 基因可通过编码非特异性激发, harpin 蛋白诱导植物自身发生过敏反应 (hypersensitive response, HR)^[8-11]。而 harpin 蛋白可刺激植物形成自然免疫机制而使受感染部位细胞坏死,进而封锁病原菌,避免破坏其它组织,达到对后继侵染的广谱抗性^[12-13]。在近年来的研究中发现,*hrp* 基因家族既能够诱导植物自身获得抗性,又能够诱导系统发生其它有益反应^[14]。据报道,来源于 HR 反应中的过敏素蛋白能够帮助植物吸取养分,提高叶片光合作用,促进植株发育,提高产量^[15]。而 HR 反应本身能够提高水果、蔬菜的抗霉变、抗腐烂的能力,具有抵抗和趋避虫害的功能^[16]。目前,编码 harpin 蛋白的 *hrp* 基因家族主要包括 *hrpN*、*hrpM*、*hrpZ* 和 *popA* 等^[17-19]。烟草野火病原菌中分离的 *hrpZ_{Psta}* 基因是 *hrpZ* 中的一员。在小麦、水稻、黄瓜等作物中也有研究发现 *hrpZ_{Psta}* 基因成功提高了植物机体抵抗病原菌的能力^[20-21]。例如,利用根瘤农杆菌介导法转 *HarpinEa* 基因的马铃薯明显提高了晚疫病抗性^[22]。将含 *hrpZPsg12* 基因的分泌表达载体通过电转化法转入枯草芽孢杆菌 JN209 中,结果显示其对烟草野火病有良好的生物防效^[23]。通过对转 *hrpZ_{Psta}* 基因的大豆后代进行病原菌接种试验,显著提高了抗灰斑病的能力^[24]。因此,*hrpZ_{Psta}* 基因在大豆抗性品种培育工作中有一定利用前景。

本研究对转基因株系 JN27-119-21 后代进行分子检测和疫霉根腐病病原菌接种鉴定,分析转化基因 *hrpZ_{Psta}* 的遗传稳定性,鉴定其抗疫霉根腐病能力,进一步确定该基因在大豆抗病中的应用潜力,为选育抗疫霉根腐病的大豆材料提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 吉农 27 转基因受体大豆、转 *hrpZ_{Psta}* 基因 JN27-119-21 株系 T₇ 和 T₈ 代,由吉林农业大学植物生物技术中心提供。

1.1.2 质粒 质粒 pCambia1301-*hrpZ_{Psta}*,由吉林农业大学植物生物技术中心提供和保存。

1.1.3 病原菌 大豆疫霉根腐病菌株 PmC-1,由吉林农业大学农学院病理教研室提供。

1.1.4 主要仪器 台式高速离心机 (Eppendorf, 5810R)、PCR 仪 (东胜龙, ETC811)、电泳仪 (LIUYI, DYY-12C)、孵育器 (杭州米欧, DTC-100)、凝胶成像

仪 (东胜龙, Bio-Imaging Systems910)、杂交炉 (Hybaid Limited, HBMOVCSY220)、qRT-PCR 仪 (ThermoFisher, QuantStudio 3 RT PCR 96-well 0.2 mL) 等。

1.2 方法

1.2.1 转基因株系的 PCR 检测 采集 JN27-119-21 株系 T₇ 和 T₈ 植株幼嫩叶片,利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (康为, CW0531M) 提取基因组 DNA。

使用 Primer 5.0 软件设计 *hrpZ_{Psta}* 基因、启动子 35 S、终止子 *Nos*、筛选标记 *Badh* 的特异性引物。*hrpZ_{Psta}*-S: 5'-ATGCAGAGTCTCAGTCTTAAC-3'; *hrpZ_{Psta}*-AS: 5'-TCACCATTGGAATTGCTGTTG-3'。35S-S: 5'-TAGACGACCTAACAGAAC-3'; 35S-AS: 5'-CCGTGTTCTCTCCAAATG-3'。*Nos*-S: 5'-GAATCCTGTTGCCGCTCTTG-3'; *Nos*-AS: 5'-TTATCCTAGTTTGC GCGCTA-3'。*Badh*-S: 5'-TCAAACTCGGTGACGGGC-3'; *Badh*-AS: 5'-CGGTCTGCACCATCGTCAA-3'。

以 pCambia1301-*hrpZ_{Psta}* 质粒为阳性对照,水和受体植株基因组 DNA 为阴性对照,对目标基因 *hrpZ_{Psta}*、筛选标记 *Badh*、启动子 *CAMV35S*、终止子 *Nos* 进行 PCR 检测。

hrpZ_{Psta} 基因扩增程序为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s; 54℃ 退火 40 s; 72℃ 延伸 40 s, 40 个循环; 72℃ 延伸 8 min。其 PCR 反应体系为: *hrpZ_{Psta}*-S 1 μL, *hrpZ_{Psta}*-AS 1 μL, 模板 2 μL, 无菌水 8.5 μL, Mix 12.5 μL。

启动子 35 S 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s; 55℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环; 72℃ 延伸 8 min。其 PCR 反应体系为: 35S-S 1 μL, 35S-AS 1 μL, 模板 2 μL, 无菌水 8.5 μL, Mix 12.5 μL。

终止子 *Nos* 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s; 48℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环; 72℃ 延伸 8 min。其 PCR 反应体系为: *Nos*-S 1 μL, *Nos*-AS 1 μL, 模板 2 μL, 无菌水 8.5 μL, Mix 12.5 μL。

筛选标记 *Ba* 基因扩增程序为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s; 58℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环; 72℃ 延伸 8 min。其 PCR 反应体系为: *Badh*-S 1 μL, *Badh*-AS 1 μL, 模板 2 μL, 无菌水 8.5 μL, Mix 12.5 μL。

最后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测各扩增产物。

1.2.2 转基因株系的 Southern 杂交分析 用 CTAB 法^[25] 大量提取 PCR 检测呈阳性的 T₇、T₈ 代转化植株基因组,以 *hrpZ_{Psta}* 基因初步 PCR 产物制取探针, *hrpZ_{Psta}* 重组表达载体质粒作为阳性对照,受体 CK 作为阴性对照,使用 DIG DNA Labeling and Detection Kit(Roche) 试剂盒进行 Southern 杂交,验证目的基因 *hrpZ_{Psta}* 在转化植株核基因组中的整合情况。

1.2.3 转基因株系的 qRT-PCR 检测 对于 Southern 杂交试验已检测到杂交信号的转基因植株和受体植株,利用 RNAisoPlus 试剂盒(Thermo Fisher, AM7020) 分别提取根、茎、叶的 RNA,并使用 Prime-Script™ RT Master Mix(Takara Bio, RR036A) 反转录成 cDNA。

设计 qRT-PCR 检测特异性引物 *qhrpZ_{Psta}*-S:5'-CGTTCTGATCCGTCCTGAAA-3'; *qhrpZ_{Psta}*-AS: 5'-TCTCGTCCAGTTGACCATTG-3'; *β-action*-S: 5'-ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC-3'; *β-action*-AS: 5'-GCTGGTCCTGGCTGTCTCC-3'。

使用 SYBR Premix Ex Taq™ 对 *hrpZ_{Pst}* 和 *β-action* 基因进行 qRT-PCR 检测。扩增程序为:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 40 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环。*hrpZ_{Pst}* 基因 qRT-PCR 检测反应体系:2×ALL-in-One qPCR Mix 10 μL,无菌水 3.9 μL, *qhrpZ_{Psta}*-S 2 μS, *qhrpZ_{Psta}*-AS 2 μL, Ro×Reference Dye 0.1 μL, cDNA 样品 2 μL。*β-action* 基因 qRT-PCR 反应体系:2 应 ALL-in-One qPCR Mix 10 μL,无菌水 3.9 μL, *β-action*-S 2 μL, *β-action*-AS 2 μL,

Roaction-ece Dye 0.1 μL, cDNA 样品 2 μL。设内参基因 *β-action* 表达量为 1,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算相对表达量。

1.2.4 转基因株系的抗病性鉴定 在人工接菌棚内,盆栽种植 3 个 T₇ 代和 3 个 T₈ 代转基因株系和受体株系,每盆种植基因株系和受体株系各 3 株,每个株系种植 3 盆。保持温度 25℃ 左右,相对湿度 90% 左右。待大豆疫霉菌菌丝均匀蔓延整个胡萝卜培养基时,采用下胚轴侵染法接种。统计接种病菌 7 d 的转基因植株和受体植株的死亡率,具体抗病性评价标准为:植株死亡率≤30% 为抗病(R);植株死亡率 30%~70% 为中抗(MR);植株死亡率≥70% 为感病(S)。

1.3 数据分析

利用 Excel 2010 处理数据和作图。qRT-PCR 结果分析采用 $-2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,其中, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{靶基因}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{试验组}} - (Ct_{\text{靶基因}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{对照组}}$ 。抗病性死亡率计算公式为:植株死亡率(%) = (死亡植株数/植株总数) × 100。

2 结果与分析

2.1 转基因株系的 PCR 检测

如图 1 所示,扩增条带的片段大小分别为 423, 1 506, 500 和 192 bp,符合 *HrpZ_{Psta}*、T₇*BADH*、35S 和 *NOS* 基因片段预期扩增长度,转 *hrpZ_{Psta}* 基因 T₇ 和 T₈ 株系均出现与目标片段位置一致的特异性条带。

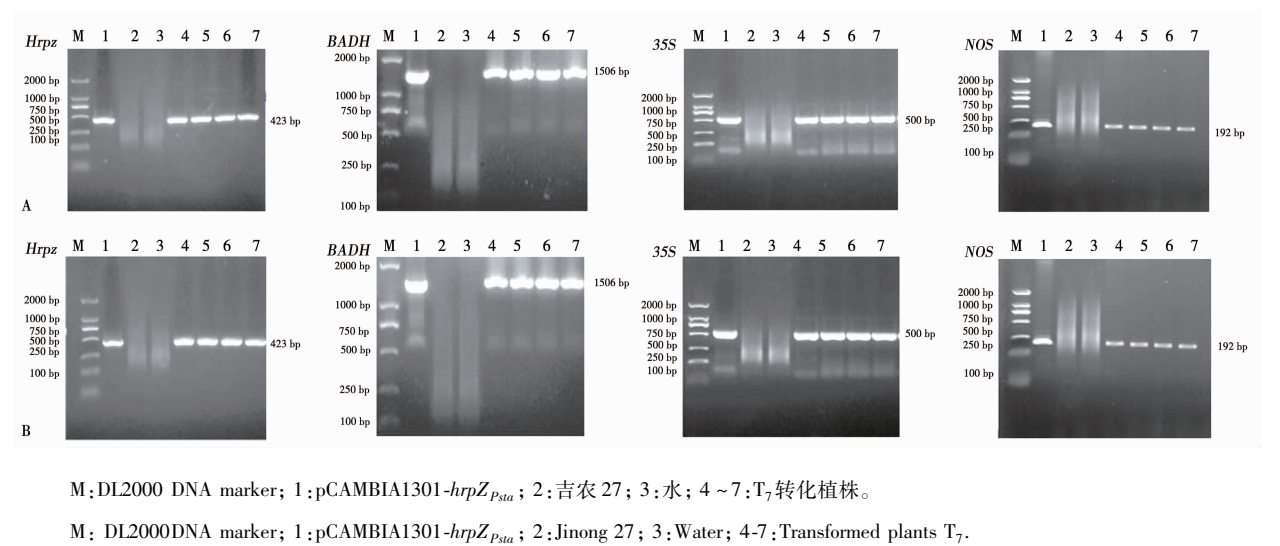


图 1 T₇ (A) 和 T₈ (B) 转化植株 PCR 检测

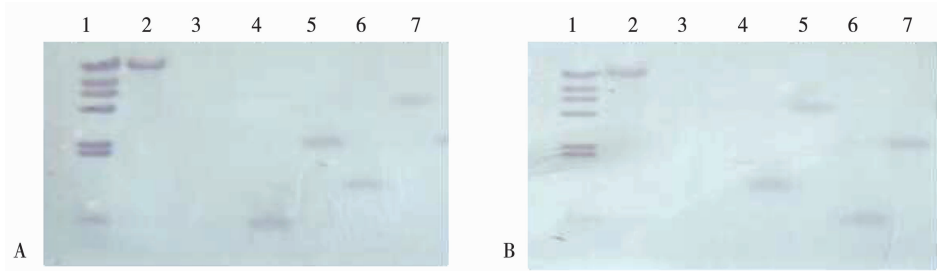
Fig. 1 PCR detection of T₇ (A) and T₈ (B) transformation plants

2.2 转基因株系的 Southern 杂交检测结果

8 个 T₇ 和 T₈ 转基因株系的 Southern 杂交检测结

果与 PCR 检测结果一致,转基因植株均有杂交信号产生,而受体对照无杂交条带形成(图 2)。证明

hrpZ_{Psta} 基因已被成功整合在大豆受体吉农 27 基因组中并在 T₇、T₈ 代稳定遗传。杂交条带位置不同，说明外源基因整合位点不同且整合方式为单拷贝。



1:Southern DNA marker; 2:pCAMBIA1301-*hrpZ_{Psta}*; 3:吉农 27; 4~7:T₇转化植株。
1:Southern DNA marker; 2:pCAMBIA1301-*hrpZ_{Psta}*; 3:Jinong 27; 4-7: Transformed plants of T₇.

图 2 T₇ (A) 和 T₈ (B) 代转基因植株 Southern 杂交检测结果

Fig. 2 Southern blot analysis of T₇ (A) and T₈ (B) transgenic plants

2.3 转基因株系的 qRT-PCR 检测

由表 1 可知, *hrpZ_{Psta}* 基因在转基因株系 JN27-119-21 后代的叶、根、茎中均有表达, 叶中表达量最高, 其中, T₇ 代表达量最高为 9. 293, 最低为 5. 772, 平均为 7. 734; T₈ 表达量最高为 9. 871, 最低为 7. 432, 平均为 8. 627。表达量在根中次之, 其中, T₇ 表达量最高为 3. 687, 最低为 2. 241, 平均为 2. 887; T₈ 表达量最高为 4. 646, 最低为 2. 987, 平均

为 3. 612。表达量在茎中最低, 其中, T₇ 表达量最高为 1. 817, 最低为 0. 974, 平均为 1. 336; T₈ 表达量最高为 1. 996, 最低为 1. 443, 平均为 1. 746。由于 *hrpZ_{Psta}* 基因是外源基因, 所以在受体吉农 27 自身没有表达, 表明目的基因 *hrpZ_{Psta}* 已成功整合到大豆吉农 27 基因组并在不同世代中得到稳定遗传, 且 *hrpZ_{Psta}* 基因在不同组织中表达量存在明显差异。

表 1 JN27-119-21 株系 T₇、T₈ 代 *hrpZ_{Psta}* 基因相对表达量

Table 1 Relative expression of *hrpZ_{Psta}* gene in T₇ and T₈ of JN27-119-21

世代 Generation	根 Root				茎 Sterm			叶 Leaf	
T ₇	3. 687	2. 703	2. 241	1. 817	1. 217	0. 974	9. 293	8. 137	5. 772
T ₈	4. 646	1. 659	2. 987	1. 996	1. 799	1. 443	9. 871	8. 578	7. 432

2.4 转基因株系的抗病性鉴定

对转基因株系 JN27-119-21 后代和受体材料吉农 27 进行抗疫霉根腐病鉴定。接菌 3 d 后, 被接菌植株开始发病, 部分叶片褪绿变黄, 近地面下胚轴伤口处呈水渍状, 植株出现萎蔫现象, 但转基因株

系比受体材料发病程度轻。接菌 7 d 后, 受体材料植株发病明显, 叶片呈黄枯状, 主茎从伤口处折断, 整株萎蔫致死, 但转基因株系的死亡率明显低于吉农 27 (图 3)。



A: T₇ 接菌 3 d; B: T₈ 接菌 3 d; C: T₇ 接菌 7 d; D: T₈ 接菌 7 d。
A: T₇ inoculated for 3 d; B: T₈ inoculated for 3 d; C: T₇ inoculated for 7 d; D: T₈ inoculated for 7 d.

图 3 转化植株接种疫霉菌鉴定结果

Fig. 3 Identification of transformed plants inoculated with *Phytophthora*

转基因株系 T₇代疫酶根腐病菌死亡率调查中,受体材料吉农 27 平均死亡率为 51.85%,而转 JN27-119-21 基因株系后代平均死亡率为 18.51%,死亡率从 51.85%降低到 18.51%;转基因株系 T₈代调查中,受体材料吉农 27 平均死亡率为 59.25%,而转 JN27-119-21 基因株系后代平均死亡率为

11.11%,死亡率从 59.25%降低到 11.11%(表 2)。T₇和 T₈代转化株系接菌疫酶根腐病后的死亡率均明显低于受体材料吉农 27,抗病能力均有所提高,JN27-119-21 株系 T₇和 T₈都从中抗提高到抗病,表明 *hrpZ_{Psta}* 基因能明显提高大豆品种吉农 27 的抗病能力。

表 2 T₇、T₈代转基因大豆接种疫霉菌后死亡率测验

Table 2 Mortality rate of T₇ and T₈ transgenic plants after *Phytophthora* inoculation

	株系	株数	存活株数	死亡株数	死亡率	抗性评价
	Strain	Number of strains	No. of surviving plants	No. of dead plants	Mortality rate/%	Resistance evaluation
T7	吉农 27	27	13	14	51.85	MR
	Jinong 27					
	JN27-119-21	27	22	5	18.51	R
T8	吉农 27	27	11	16	59.25	MR
	Jinong 27					
	JN27-119-21	27	24	3	11.11	R

3 讨 论

随着转基因技术的不断成熟,大量外源抗性基因被整合到受体基因组 DNA 中^[19,26-27],通过诱导植物合成抗性相关蛋白,赋予植物抵抗各类病原菌的能力^[20]。李琦等^[28]通过转化含 *hrpZ_{Psta}* 基因表达载体到大豆,验证受体材料提高了对疫霉根腐病的抗性。尹俊琪等^[29]在转 *hrpZ_{Psta}* 基因到大豆吉农 17 和吉农 29 中发现,两个品种后代对大豆灰斑病的抗性均有提高。谷晓娜等^[30]在研究不同转化株系中 *hrpZ_{Psta}* 基因表达情况,结果表明外源 *hrpZ_{Psta}* 基因的表达量与受体植株对灰斑病和疫霉根腐的抗性存在相关性。本研究通过检测整合 *hrpZ_{Psta}* 基因 JN27-119-21 大豆株系 T₇、T₈代的抗病情况,发现转化株系的抗病能力明显提高,抗病级别从中抗提高到抗性。与前人研究结果相同,证明 *hrpZ_{Psta}* 基因在抗病育种方面具有良好的应用前景。

外源基因可以通过单位点和多位点两种方式导入受体且存在单拷贝和多拷贝两种形式。唐微^[31]在研究转基因水稻拷贝数对农艺性状的影响时发现拷贝数越多,农艺性状改变越大,目标基因越容易受抑制而不表达。Yang 等^[32]研究发现当目的基因以多拷贝形式整合到转番茄斑萎病毒核衣壳蛋白基因的花生宿主基因组时,能导致基因沉默现象。华志华等^[33]以低拷贝数转基因水稻为材料,经过单株连续种植、跟踪分析研究表明被转入基因 *bar* 和 *cecropin B* 在受体基因组中紧密连锁且能稳定

遗传和表达。本研究尝试研究转基因大豆中被整合外源基因的方式与其在后续加代过程中的遗传稳定性关系,发现单拷贝的整合方式更易于稳定遗传和表达。与前人的研究结果一致,为今后研究高世代遗传稳定的转基因材料提供参考依据。

刘娜等^[34]通过研究转基因棉花中外源基因透明颤菌血红蛋白(*vgb*)的相对表达水平,建立了快速检测转基因产品中基因表达量的方法,但只局限于测定目标基因的表达量,未能验证目标基因的功能。本研究利用荧光定量 PCR 检测目标基因在大豆各个组织中的相对表达量,同时对大豆疫霉根腐病进行抗病性鉴定分析,证明了外源 *hrpZ_{Psta}* 基因的定量表达可以提高转化大豆对常见病害的抗性。该结果可为今后其它外源抗病基因的研究提供借鉴。

4 结 论

本研究在前期已获得的阳性大豆转基因材料的基础上,对 JN27-119-21 株系 T₇、T₈代材料进行的 PCR 检测、Southern 杂交和荧光定量检测,结果表明转化的 *hrpZ_{Psta}* 基因在各转基因后代中均能够被检测到,证明该阳性转基因材料能够稳定遗传和表达 *hrpZ_{Psta}* 基因。接种疫酶菌试验验证了转化的 *hrpZ_{Psta}* 基因能够增强受体材料对大豆疫霉根腐病的抗病能力,T₇代转基因株系较受体材料吉农 27 死亡率降低 33.34%,T₈代转基因株系较受体材料吉农 27 死亡率降低 48.14%。因此,全部转基因株系后代已

成为抗病能力强、遗传稳定性持久的改良新种质,该研究结果为选育新的抗疫酶根腐病的种质资源提供了基础材料。

参考文献

[1] 张君,王丕武,关淑艳,等. 高产高油中晚熟广适性春大豆新品种吉农 27 号的选育[J]. 种子, 2010,29(4): 106-107. (Zhang J, Wang P W, Guan S Y. Breeding of a new spring soybean variety Jinong 27 with high yield and high oil in late maturity [J]. Seed,2010,29(4):106-107.)

[2] 周恩远,刘丽君,祖伟,等. 春大豆农艺性状与品质相关关系的研究[J]. 东北农业大学学报,2008,39(2):145-149. (Zhou E Y, Liu L J, Zu W, et al. Study on the relationship between agromonic traits and quality of spring soybean[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008,39(2):145-149.)

[3] Pace P F, Weaver D B. Additional genes for resistance to frogeye leaf spot race 5 in soybean [J]. Crop Science, 1993, 33 (6): 1144-1145.

[4] 许丽,李玥莹,林凤. 植物抗病的分子基础与研究进展[J]. 杂粮作物,2006, 26(6): 428-432. (Xu L, Li M Y, Lin F. Molecular basis and research progress of plant disease resistance [J]. Rain Fed Crop, 2006, 26(6):428-432.)

[5] Canaday C H, Schmitthenner A F. Effects of chloride and ammonium salts on the incidence of phytophthora root and stem rot of soybean[J]. Plant Disease,2010,94(6):758-765.

[6] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of phytophthora root rot of soybean[J]. Plant Disease,1985,69: 362-368.

[7] 姜兆远,高洁,张佳环. 烟草野火病原菌 *hrpZpsta* 基因的克隆与表达[C]//第四届中国植物细菌病害学术研讨会论文集. 杭州:中国植物病理学会植物病原细菌专业委员会,2008:68-72. (Jiang Z Y, Gao J, Zhang J H. Clone and expression of *hrpZpsta* genes form *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [C]//The 4th China National Symposium on Phytobacteriology. Hangzhou: Professional Committee of Plant Pathogenic Bacteria, Plant Pathology, 2008: 68-72.)

[8] He S Y, Huang C H, Collmer A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{ps}; Protein that is secreted *via* the *hrp* pathway and elicits the hypersensitive response in plant [J]. Cell, 1993, 73: 1255-1266.

[9] Taguchi F, Tanaka R, Kinoshita S, et al. Harpin_{psta} from *pseudomonas syringae* pv. *tabaci* is defective and deficient in its expression and HR-inducing activity[J]. Journal of General Plant Pathology, 2001, 67: 116-123.

[10] Lin H J, Cheng H Y, Chen C H. Plant amphipathic proteins delay the hypersensitive response caused by harpin_{ps} and *pseudomonas syringae* pv. *syringae* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1997, 51: 367-375.

[11] Strobel N E, Ji C, Goplan S, et al. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrpZpss* protein[J]. The Plant Journal,1996,9:431-439.

[12] Lindgren P B. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions[J]. Annual Review of Phytopathology,1997, 35:129-152.

[13] Wei Z M, Beer S V. Harpin from *erwinia amylovora* induces plant resistance[J]. Acta Horticulture,1996, 411: 223-225.

[14] 余榕捷,洪岸,庞义,等. SZZ-Harpin 融合蛋白在苏云金芽孢杆菌中的表达及活性测定[J]. 微生物学通报,2003,30(2):11-15. (Yu R J, Hong A, Pang Y, et al. Expression and biological assay of SZZ-Harpin fusion protein in *bacillus thuringiensis* [J]. Microbiology,2003,30(2):11-15.)

[15] 傅华欣,陆青梅,毛华方,等. 康壮素在塑料大棚草莓上的应用效果[J]. 安徽农业科学,1999,27(6):596. (Fu H X, Lu Y M, Mao H F, et al. Studies on the technique of applying Harpin for the diseases control of strawberry grown in greenhouse [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,1999,27(6):596.)

[16] 高正良,马国胜,周本国,等. 康壮素对烟叶产质量及综合抗病虫能力的影响[J]. 烟草科技,1999(5):43-44. (Gao Z L, Ma G S, Zhou B G, et al. Effect of Harpin on yield, quality and disease, insect resistance of flue-cured tobacco [J]. Tobacco Science and Technology,1999(5):43-44.)

[17] Cooper B. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multipeviruss whereas the functional analog increases susceptibility[J]. Virology,1995,206: 307-313.

[18] 王春艳,关淑艳,王丕武,等. 农杆菌介导的 BADH—CMO 基因转化玉米愈伤组织的初步研究[J]. 吉林农业大学学报, 2012,34(5): 503-507, 510. (Wang C Y, Guan S Y, Wang P W, et al. Preliminary studies on transforming bivalent salt-tolerant gene into maize callus by *agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Jilin Agricultural University,2012,34(5): 503-507, 510.)

[19] 张林. 新抗虫基因 *Cry1AB13-2* 的克隆及其在大豆中的遗传转化和功能鉴定[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018:9. (Zhang L. Cloning of new insect resistant gene *CryAB13-2* and its genetic transformation and functional identification in soybean [D]. Changchun: Jilin Agricultural University,2018: 9.)

[20] 魏桂芳. 大豆转 Harpin (Xooc) 蛋白编码基因 (*hrf2*) 及其在后代中的遗传表达研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014. (Wei G F. The inheritance and expression of *HRF2* gene encoding harpin_{xooc} in subsequent generations of transgenic soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.)

[21] 袁瑞玲,孟小林,徐进平,等. HrpZ 激发对几种植物防御相关酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (32): 13951-13953,14066. (Yuan R L, Meng X L, Xu J P, et al. Effects of *hrpZ* excitation on activity of defense-related enzymes in several plant [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36 (32): 13951-13953, 14066.)

[22] 张佳环,李娟,高洁. 大豆细菌性斑点病菌 *hrpZ_{P_{sg12}}* 基因增强病原菌对大豆的致病性并引起烟草过敏反应[J]. 安徽农业科学,2011,39(15):9009-9012. (Zhang J H, Li J, Gao J. *hrpZ_{P_{sg12}}* gene of *pseudomonas syringae* pv. *glycinea* can enhance pathogenicity of the pathogenon soybean and cause the hypersensitive response of tobacco [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39 (15): 9009-9012.)

[23] 任秀艳. Harpins 蛋白在黄瓜上的研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(22):11714-11716. (Ren X Y. Progress research on cucumber by harpin [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38 (22):11714-11716.)

[24] 韩青梅,孟颖光,曹丽华. 过敏素类蛋白研究进展[J]. 河南农业大学学报,2004, 38(3):319-322. (Han Q M, Meng H G, Cao L H. Progress of studies on harpins[J]. Journal of Henan Agricultural University,2004, 38(3):319-322.)

[25] 廖俊杰. 采用 CTAB 法快速提取植物 DNA[J]. 天津农业科学, 1993(3):26. (Liao C J. Rapid extraction of plant DNA by CTAB method[J]. Tianjin Agricultural Science,1993(3):26.)

[26] 魏洪波,王丕武,张卓,等. 大豆查尔酮还原酶 *GmCHR* 基因的克隆及其在烟草中的表达[J]. 吉林农业大学学报,2014,36(5): 546-553. (Wei H B, Wang P W, Zhang Z, et al. Cloning of chalcone reductase *GmCHR* gene and its expression in tobacco [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2014, 36 (5): 546-553.)

[27] 王春艳,关淑艳,王丕武,等. 农杆菌介导的 BADH—CMO 基因转化玉米愈伤组织的初步研究[J]. 吉林农业大学学报,2012, 34(5):503-507,510. (Wang C Y, Guan S Y, Wang P W, et al. Preliminary studies on transforming bivalent salt-tolerant gene into maize callus by agrobacterium tumefaciens[J]. Journal of Jilin Agricultural University,2012,34(5):503-507,510.)

[28] 李琦,宋阳,于淼,等. 转 *hrpZ_{psta}* 和 *chi* 双价广谱抗病基因大豆对疫霉根腐病的抗性分析[J]. 吉林农业大学学报,2019,41(1):11-16. (Li Q, Song Y, Yu M, et al. Resistance analysis of *hrpZ_{psta}* and *chi* bivalent broad-spectrum disease resistance soybean to *Phytophthora* root rot[J]. Journal of Jilin Agricultural University,2019,41(1):11-16.)

[29] 尹俊琦,王楠,周莹,等. 两个大豆品种转 *hrpZ_{psta}* 基因后代对大豆灰斑病的抗性分析[J]. 大豆科学, 2013,32(2): 238-241. (Yin J Q, Wang N, Zhou Y, et al. Analysis on resistance to frog-eye leaf spot between two species of transgenic soybean progenies with *hrpZ_{psta}* gene [J]. Soybean Science, 2013, 32 (2): 238-241.)

[30] 谷晓娜,刘振库,王丕武,等. *hrpZ_{psta}* 在转基因大豆中定量表达与疫霉根腐病和灰斑病抗性相关研究[J]. 中国油料作物学报,2015,37(1):35-40. (Gu X N, Liu Z K, Wang P W, et al. Gene expression and disease resistance of transformed *hrpZ_{psta}* gene in transgenic soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2015, 37(1): 35-40.)

[31] 唐微. 转基因拷贝数对农艺性状的影响[J]. 安徽农业科学, 2008,36(32):13991-13992. (Tang W. Effect of transgenic copy number on agronomic traits[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2008,36(32):13991-13992.)

[32] Yang H, Singsit C, Wang A, et al. Transgenic peanut plants containing a nucleocapsid protein gene of tomato spotted wilt virus show divergent levels of gene expression[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(9): 693-699.

[33] 华志华,朱雪峰,吴明国,等. 水稻转基因整合模式中外源基因的遗传规律[J]. 作物学报,2003,29(1):44-48. (Hua Z H, Zhu X F, Wu M G, et al. Inheritance of exo-genes integrated into the rice genomes [J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29 (1): 44-48.)

[34] 刘娜,张锐,罗淑萍,等. 荧光定量 PCR 技术检测 *vgb* 基因在棉花中的表达[J]. 新疆农业大学学报, 2007, 30(3): 6-9. (Liu N, Zhang R, Luo S P, et al. Expression level of detecting *vgb* gene by fluorescence real-time quantitative PCR in cotton [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2007, 30(3): 6-9.)