



南方大豆品种炭疽病抗性鉴定及抗病相关基因表达分析

李月^{1,2}, 林剑浩¹, 年海³, 饶军华², 周而勋¹

(1. 华南农业大学 植物保护学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642; 2. 广东科学院 动物研究所/广东省动物保护与资源利用重点实验室/广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广东 广州 510260; 3. 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要:为明确南方大豆品种对炭疽病抗性的差异,并分析其抗病相关基因的表达规律,在温室内种植华南农业大学近年来育成和收集到的 100 份南方春大豆品种,苗期喷洒平头炭疽菌孢子悬浮液,根据叶片病斑面积计算病斑率并划分为 6 个抗病级别。利用 qRT-PCR 技术检测典型抗病和感病品种接种平头炭疽菌不同时间后,病程相关蛋白基因、水杨酸途径基因、茉莉酸/乙烯途径基因和多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因等抗病相关基因的相对表达量变化情况。结果表明:共鉴定到 6 份抗病品种、32 份中抗品种、57 份中感品种和 5 份感病品种。抗性品种桂 1701 和感病品种横线早熟豆被平头炭疽菌侵染后抗病基因的表达规律存在很大差异。*GmPR2*、*GmPR4*、*GmNPR1*、*GmPAL2-1* 和 *GmPAL4* 在抗病品种的表达量整体较高,*GmPR3*、*GmPR12*、*GmPAL1-1* 和 *GmPAL3-1* 在感病品种中的表达量整体较高。*GmPAL2-1* 和 *GmPAL3-1* 基因在抗病品种中的相对表达量分别在接种后 12 和 6 h 极显著升高,而在感病品种中则分别在接种后 24 和 48 h 才显著升高。*GmPAL2-3* 在抗病品种中不表达,而在感病品种中表达;*GmPGIP2* 在抗病品种中表达,而在感病品种中不表达。抗病品种中 *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 基因的表达量是感病品种中的 400 ~ 1 000 倍。接种平头炭疽菌后 48 h, *GmPR2*、*GmPR4*、*GmPR5*、*GmPR10*、*GmNPR1*、*GmNAC4* 和 *GmPGIP3* 基因在抗病品种中的相对表达量显著升高,而在感病品种中显著降低。结果显示,桂 1701、桂夏 1 号、南夏豆 25、桂夏 3 号、华夏 5 和天长小青豆为抗炭疽病大豆品种。不同大豆品种受到平头炭疽菌侵染后,抗感品种间抗病相关基因的表达情况存在较大差异,抗病品种对该病菌侵染的反应更快,推测大豆炭疽菌侵染后 48 h 是大豆抗病基因响应侵染的关键时间点。

关键词:南方大豆;炭疽病;平头炭疽菌;抗病性鉴定;抗病相关基因;表达分析

Resistance Identification of Southern Soybean Varieties to Anthracnose and Expression Analysis of Resistance-Related Genes

LI Yue^{1,2}, LIN Jian-hao¹, NIAN Hai³, RAO Jun-hua², ZHOU Er-xun¹

(1. College of Plant Protection, South China Agricultural University/Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences/Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization/Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangzhou 510260, China; 3. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to clarify the difference of resistance in southern soybean varieties to anthracnose, and analyze the expression rule of disease resistance related genes, we planted 100 southern spring soybean varieties bred and collected by South China Agricultural University in recent years in the greenhouse, and sprayed flat ended anthracnose spore suspension at seedling stage. We calculated the disease spot rate according to the leaf spot area and divided them into 6 disease resistance levels. We used qRT-PCR to detect the relative expression changes of disease resistance related genes, such as pathogenesis-related protein genes, salicylic acid pathway genes, jasmonic acid/ethylene pathway genes and polygalacturonase inhibitor protein genes, in typical resistant and susceptible varieties inoculated with *Colletotrichum truncatum* at different times. The results showed that 6 resistant varieties, 32 moderate resistant varieties, 57 moderate susceptible varieties and 5 susceptible varieties were identified. There were significant differences in the expression of disease resistance genes between resistant variety Gui 1701 and susceptible variety Hengxianzaoshudou after being infected by *C. truncatum*. The expression of *GmPR2*, *GmPR4*, *GmNPR1*, *GmPAL2-1* and *GmPAL4* were higher in resistant varieties, and *GmPR3*, *GmPR12*, *GmPAL1-1* and *GmPAL3-1* were higher in susceptible varieties. The relative expression of *GmPAL2-1* and *GmPAL3-1* genes in resistant varieties increased significantly at 12 and 6 hours after inoculation, respectively, while in susceptible varieties, it increased significantly at 24 and 48 hours after inoculation, respectively. *GmPAL2-3* was not expressed in resistant varieties, but expressed in susceptible varieties. *GmPGIP2* was expressed in resistant varieties, but not in susceptible varieties. The expression of *GmLOX7* and *GmLOX8* genes in resistant varieties was 400-1 000 times higher than that in susceptible varieties. At 48 hours, the relative expression levels of *GmPR2*, *GmPR4*, *GmPR5*, *GmPR10*, *GmNPR1*, *GmNAC4* and *GmPGIP3* genes were significantly increased in resistant variety Gui 1701, while those were significantly reduced in susceptible variety Hengxianzaoshudou. The results showed that Gui 1701, Guixia 1, Nanxiadou 25, Guixia 3, Huaxia 5 and Tianchangxiaqingdou were resistant to

收稿日期:2022-06-16

基金项目:广东省重点领域研发计划(2020B020220008)。

第一作者:李月(1996—),女,硕士研究生,主要从事植物病理学研究。E-mail:1426162837@qq.com。

通讯作者:周而勋(1963—),男,博士,教授,博导,主要从事植物病理学研究。E-mail:exzhou@scau.edu.cn;

饶军华(1968—),男,硕士,副研究员,硕导,主要从事微生物学研究。E-mail:Junhua919@163.com。

anthrax. There were significant differences in the expression of disease resistance related genes among resistant and susceptible soybean varieties after infection by *C. truncatum*, and the resistant soybean varieties responded more quickly to the infection of the pathogen. It was speculated that 48 hours after infection by *C. truncatum* was the key time point for soybean disease resistance genes to respond to infection.

Keywords: southern soybean; anthracnose; *Colletotrichum truncatum*; disease resistance identification; disease resistance-related gene; expression analysis

大豆炭疽病由炭疽菌属(*Colletotrichum*)的一些种引起,是大豆生产上的一种重要真菌病害。在我国华南、华东、华北、东北和西北各大豆产区均有发生,且发生的严重程度与降雨量和温度呈正相关^[1]。南方高温多雨的气候环境为大豆炭疽病提供了适宜的发生流行条件,因而在南方地区大豆炭疽病发病严重^[2]。平头炭疽菌(*C. truncatum*)是引起我国大豆炭疽病的主要病原菌,主要危害叶片、豆荚、豆秆和幼苗,造成叶片干枯、幼苗死亡、秆枯死以及豆荚干枯不结粒^[3-5]。现阶段,对大豆炭疽病的防治主要是使用化学药剂,不仅会污染环境,而且会使病原菌产生抗药性,从而导致防治效果逐渐下降^[6]。生物防治虽然有较好的效果,但是存在效果不稳定问题,暂时无法大面积采用。众所周知,选育和利用抗病品种是防治大豆炭疽病最经济有效的措施之一,但由于抗性资源有限以及长期种植同一大豆抗病品种,容易导致大豆抗病品种的抗病能力下降^[7]。

近年来,已开展了大量大豆种质资源炭疽病抗性的鉴定和研究工作,也获得了一些抗性表现良好的大豆种质资源^[8]。石姐姐等^[9]采用人工接种法鉴定了 590 份大豆品种(系)对炭疽病的抗病性,抗病和中抗品种占 36.10%。冯乐乐等^[10]采用离体喷雾接种法,对 51 份大豆品种进行抗炭疽病性鉴定,筛选到 3 份高抗品种 Nannong 86-4、Luo1305 和 Hedou 40。

目前已预测到 438 个大豆的相关抗病基因,并且已公布于大豆基因组数据库(SGDB)中^[11],但尚没有大豆抗炭疽病基因的相关研究报道。现已发现的大豆病程相关(Pathogenesis Related, PR)蛋白有 5 个,分别为 PR-1、PR-2、PR-5、PR-6 和 PR-10 蛋白^[12]。Wang 等^[13]利用隐马尔可夫模型应用程序包(HMMER)和 BLAST 方法预测了大豆中可能存在的 PR 蛋白序列。这些 PR 蛋白的表达与植物的防卫反应密切相关,在抗病反应中具有重要意义。陈华涛等^[14]研究表明,大豆被 SMV 侵染后,叶片中 *GmPR10* 的表达量显著增加,能够强烈响应 SMV 的侵染,推测与植物(寄主)的系统抗性有关。Yang 等^[15]研究发现,大豆接种核盘菌后,*GmPR1*、*GmPR3* 和 *GmPR12* 防御基因的表达量都显著上调,表明防御相关基因增强了大豆对核盘菌侵染的抗性,也证

实 PR 编码基因的表达水平与抗病性相关。

另外,病程相关基因非表达子 1(Nonexpressor of Pathogenesis Related genes 1, NPR1)是植物免疫的关键蛋白,也是水杨酸和茉莉酸信号通路的调控基因,参与植物的系统获得性抗性(Systemic Acquired Resistance, SAR),是 SAR 途径中的关键调控因子^[16-17];通过 *NPR1* 基因的过量表达可以诱导 PR 相关基因的表达,从而诱导植物产生对多种病原菌的广谱抗病性^[18-19]。朱婷婷等^[20]通过聚合双价抗病基因,利用 *NPR1* 基因的广谱抗病性优势,使大豆植株的抗病能力提升,发病率大幅下降,为培育优质高产且抗病的大豆新品种提供新的种质资源。

植物激素茉莉酸(Jasmonic Acid, JA)、乙烯(Ethylene, ET)和水杨酸(Salicylic Acid, SA)信号通路在植物抗病过程中起重要作用^[21-22]。SA 作为植物抗病信号途径的重要内源信号分子,参与生物胁迫并调控植物抵御活体营养型病原菌的侵染,通过激活植物中防御基因的表达,植物表现出对生物胁迫的防御能力^[23]。NAC 转录因子也可以通过调节 SA 信号参与非生物和生物胁迫反应。JA/ET 则主要介导植物抵御死体营养型病原菌的侵染,丙二烯氧化物合酶(Allene Oxide Synthase, AOS)、脱氧合酶(Lipoxygenase, LOX)也参与茉莉酸的合成,在植物应对真菌、细菌、线虫及昆虫等生物胁迫方面发挥着重要作用^[24]。多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(Polygalacturonase Inhibiting Proteins, PGIPs)是一种富含亮氨酸的重复序列蛋白,可以抑制病原物侵染初期分泌的内切半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)^[25]。

目前,抗炭疽病鉴定的接种方法主要有喷雾接种、点滴接种、涂抹接种、胚芽接种、胚根接种和注射接种^[26];接种体可选择活体(胚芽、胚根、叶片、豆荚)或离体(叶片、豆荚);接种时期可选择子叶期、幼苗期(两叶一心期)、始荚期、豆荚鼓粒初期^[9-10, 26-27]。

本研究以农业农村部国家大豆改良中心广东分中心(依托华南农业大学农学院)育成和收集的 100 份大豆品种为研究材料,在大豆苗期对其喷雾,接种大豆炭疽病菌孢子悬浮液,对这些大豆品种进行抗炭疽病鉴定和评价,为上述大豆品种的推广应用提供抗病性依据;在此基础上,以本研究筛选出的抗病品种桂 1701 和感病品种横线早熟豆为研究材料,采用 qRT-PCR 技术,检测抗病品种和感病品

种受大豆炭疽病菌侵染后,多种抗病相关基因的表达量,旨在为大豆炭疽病的有效防治和抗病育种工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 100 份南方春大豆品种由农业农村部国家大豆改良中心广东分中心(依托华南农业大学农学院)年海教授提供。供试大豆炭疽病菌为平头炭疽菌(*C. truncatum*),由安徽省农业科学院植物保护研究所赵伟副研究员提供。

1.2 试验设计

大豆炭疽病抗性鉴定:采用苗期喷洒孢子悬浮液的接种方法^[9],在温室下对 100 份大豆品种进行炭疽病抗性鉴定。将浓度为 1.0×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的平头炭疽菌孢子悬浮液均匀喷施到两叶一心期(第一对真叶完全展开)大豆叶片的正反面。接种后在幼苗上方覆盖塑料薄膜,温室内使用加湿器,使塑料薄膜内有水雾形成,湿度 80% ~ 100%,室温 25 ~ 30 ℃。接种 2 d 后揭开两端的塑料薄膜,保持通风,5 d 后再把塑料薄膜全部揭开,接种后 7 d 取第一对

真叶调查发病情况并用相机(佳能 M6)拍大豆叶片正面。每个品种 3 个技术重复和 3 个生物学重复。

抗病相关基因表达分析:以筛选到的抗病品种桂 1701 和感病品种横线早熟豆为试验材料,接种平头炭疽菌后,置于 28 ℃ 人工气候植物培养箱中,8 h/26 ℃ 黑暗处理,16 h/28 ℃ 光照处理。于接种后的 0,6,12,24,48,72 h,分别取两个品种大豆相同叶位的叶片 1 g,用锡箔纸收集样品,密封包好样品后,先投入液氮中速冻 5 min,再放进 -80 ℃ 冰箱中保存。采用实时荧光定量 PCR 技术检测接种大豆炭疽病菌不同时间后病程相关蛋白基因、水杨酸途径基因、茉莉酸/乙烯途径基因和多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因等抗病相关基因的相对表达量。每个样品 3 个技术重复和 3 个生物学重复。

1.3 方法

1.3.1 大豆炭疽病抗性鉴定 利用 Photoshop 软件快速测量大豆叶片面积与叶片上病斑面积的像素值^[28],计算叶片上病斑面积像素值占叶面总面积像素值的比例,即叶片病斑率($\%$) = (叶片病斑面积/叶片总面积) $\times 100$,将不同大豆品种划分为 6 个病情级别:0 级、1 级、3 级、5 级、7 级、9 级(图 1 和表 1)。

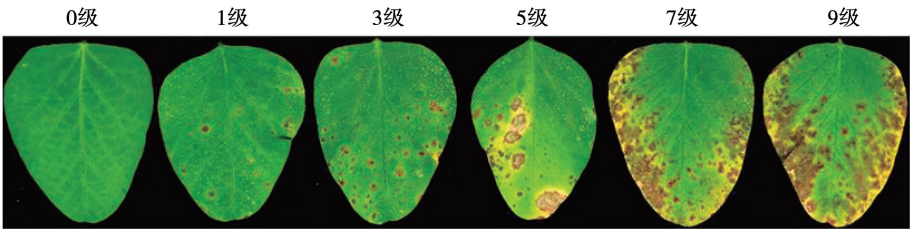


图 1 根据苗期叶片病斑率划分大豆炭疽病病情级别

Fig. 1 Classification of soybean anthracnose disease grades according to leaf spot rate at seedling stage

表 1 大豆炭疽病症状鉴定及病情分级标准

Table 1 Symptom identification and disease spot grading standards of soybean anthracnose resistance

病情级别 Disease level	症状鉴定及分级标准 Symptom identification and grading standards
0	叶片上无病斑
1	叶片上有少量零星点状病斑
3	叶片上有点状病斑,病斑褐色近圆形,叶片上病斑占叶面总面积 30% 以下
5	叶片上病斑小范围扩展,伴有小面积的黄色晕圈,叶片上病斑占叶面总面积 30% ~ 50%
7	叶片上病斑大范围扩展,伴有大面积的黄色晕圈,叶片上病斑占叶面总面积 50% ~ 70%
9	叶片上病斑大范围扩展,伴有大面积的黄色晕圈,叶片上病斑占叶面总面积 70% 以上

计算不同大豆品种的病情指数(Disease Index, DI), $DI = \sum (\text{大豆叶片数} \times \text{病情级别数}) / (\text{大豆总叶片数} \times \text{病情最高级数}) \times 100$,将大豆对炭疽病的抗性反应分为 6 个级别:高抗(HR), $DI = 0$;抗病

(R), $0 < DI < 10$; 中抗(MR), $10 \leq DI < 20$; 中感(MS), $20 \leq DI < 40$; 感病(S), $40 \leq DI < 60$; 高感(HS), $DI \geq 60$ 。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 在 NCBI 数据库下载大豆的抗病基因序列,根据抗病基因 CDS 序列,使用 SnapGene 软件设计特异性引物(表 2),委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物,以大豆的 *Actin* 基因作为内参基因。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物及序列
Table 2 Primers for real-time PCR and sequences

引物名称 Primer name	上游引物 Forward primer(5'-3')	下游引物 Reverse primer(5'-3')
GmActin	GCGGGAAATTGTAAGGGATGT	TCGCCAATAGTGATGACCTG
GmPR1	AGAGTGCCTGCACTACACAC	AACAAAGTTGCCAGGGGGAT
GmPR2	CACAGATCAAGCTCCAGGGG	TGGCAGCACCATACCTCTTG
GmPR3	AATCAACGGTGGCCTCGAAT	CTCCGGGGCTTATTTCCCATC
GmPR4	CCAATACGGTTGGTGTGGGA	ATAAGCACTCACGGCGTTCA
GmPR5	GCGAATCGTGGAACATCAGC	CCAACGTGTTGGGAGGTGTA
GmPR9	GCACCGTTTGTAACCCAGAGA	CCACGGTCGTTTCTCACGTA
GmPR10	CCCAAGGAAATGTTGGTCTCT	GCAGTGCCTCAGTTATGCT
GmPR12	GGGAAGGCACTGTGAGTCAA	TGGTGCAGAAACAGCGTCTA
GmNPR1	CACATTGCTGCCATGCGTAA	TCCTTTGGCCTTGTC AACCT
GmAOS2	CCCGTCCTCTTCGACAACCTC	TGTTTGAGGAGGGCGTGTTT
GmLOX-7	CACCACCTAAAGTGATGCAG	TGGGAACCTCTCAAGAATCTTAATG
GmLOX-8	AGTGCGCAAACTCTATGAAG	CGACCTGCATCACTTTAGG
GmPAL1-1	TCCAATCTGTTGATTTACTA	TATAATAGAACCAAAGCTCCG
GmPAL2-1	CATGGATAATACACGTTTG	CAGAACAATAAGATGCCA
GmPAL2-3	CAATACTTGGCGAACCCG	TGGCAAAGTGCAATGAGG
GmPAL3-1	TGGCGGGGAGACACTAACTA	TTTTGGGTGATCCAGTCGCA
GmNAC4	CTTGATGACTGGGTTCGTG	TTGCTGTATTGAGTGTGCTCG
GmPGIP-1	CCAGACTTGTTTCGCTTCC	GACCCAAACAACACCGACG
GmPGIP-2	TGTCTCGTAACAAGCTTGAGG	GAGTCCAAGACCTTTGGCAC
GmPGIP-3	GTGTGTTTGGGACGGAGA	TGAGGTAGCGTCCCATAAATACG
GmPGIP-4	CAACAACCAGACATGCCG	ATTGCGCCGAAGAAGTTT

采用 Trizol 法^[29]提取大豆叶片 RNA,用反转录试剂盒 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA SynthesieSuperMix AT311(中国金全式生物公司)反转录获得 cDNA。使用 ChamQ Universal SYBR Qpcr Master MIX-Q711(中国诺唯赞生物公司)试剂,利用荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)进行荧光定量 PCR 反应,反应程序为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 15 s,退火 20 s,72 ℃ 延伸 30 s,45 个循环;95 ℃ 延伸 1 min,对 55 ~ 95 ℃ 溶解曲线进行分析。

1.4 数据分析

利用 Photoshop 2020 软件扫描大豆叶片面积和病斑面积像素值,利用 Excel 2003 软件计算病斑率和病情指数。

利用 Bio-Rad Primer PCR 软件和 Excel 2003 软

件统计分析试验数据,以平均值 ± 标准误(n = 3)表示,并采用 GraphPad 9 软件中 one-way ANOVA Tukey’s test 进行差异显著分析和制图。

2 结果与分析

2.1 大豆品种抗病性鉴定结果

如表 3 所示,共鉴定出 6 份抗病品种(桂 1701、桂夏 1 号、南夏豆 25、桂夏 3 号、华夏 5 和天长小青豆),32 份中抗品种,57 份中感品种和 5 份感病品种(HMC206、HMC201、华夏 22、豫豆 25、横线早熟豆)。其中,抗病性最强的桂 1701 比感病性最强的横线早熟豆高两个抗病等级,且横线早熟豆的病情指数(43.52)是桂 1701 病情指数(0.46)的 94 倍,说明不同大豆品种对大豆炭疽病的抗感病程度差异很大。

表 3 供试大豆品种苗期炭疽病抗性鉴定结果

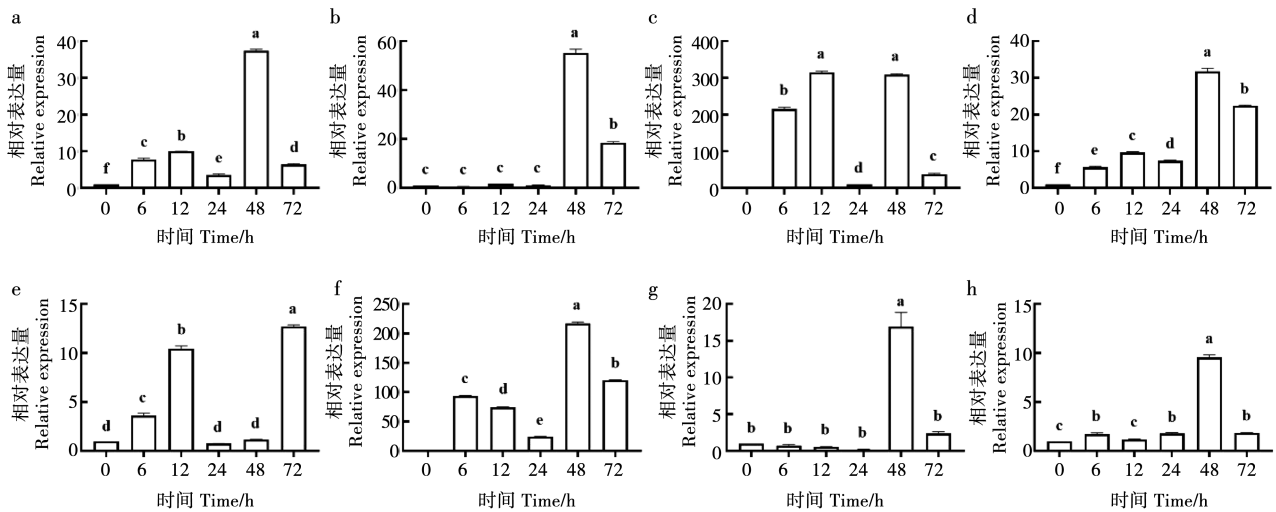
Table 3 Identification results of resistance to anthracnose at seedling stage in tested soybean varieties

序号	大豆品种	病情指数	抗性	序号	大豆品种	病情指数	抗性	序号	大豆品种	病情指数	抗性
Number	Soybean variety	DI	Resistance	Number	Soybean variety	DI	Resistance	Number	Soybean variety	DI	Resistance
1	桂 1701	0.46	抗病	35	龙州小中早	18.52	中抗	69	中豆 39	29.63	中感
2	桂夏 1 号	3.70	抗病	36	桐庐牛吃豆	18.98	中抗	70	龙川民键豆	29.63	中感
3	南夏豆 25	7.41	抗病	37	平江大鹏豆	18.98	中抗	71	651-2 茅草豆	29.63	中感
4	桂夏 3 号	7.41	抗病	38	天等隆安豆	19.44	中抗	72	八月青豆	29.63	中感
5	华夏 5	8.80	抗病	39	黑脐大豆	21.30	中感	73	八月黄	30.56	中感
6	天长小青豆	9.72	抗病	40	夏邑太平紫花角	21.30	中感	74	天隆一号	30.56	中感
7	柳城八月黄	10.65	中抗	41	粤春 2015-2	21.30	中感	75	南农 99-10	30.56	中感
8	晋大 70	11.11	中抗	42	武宣八月黄	22.22	中感	76	六月豆	30.56	中感
9	阳春小粒黑豆	11.57	中抗	43	681 杂交混选	22.22	中感	77	鸡窝豆	30.56	中感
10	上饶黄豆	12.04	中抗	44	湘春豆 26	23.15	中感	78	丰城当地黄豆	30.56	中感
11	溧水中子黄豆	12.04	中抗	45	SC15	23.61	中感	79	潘阳黑豆	30.56	中感
12	粤春 2012-2	12.96	中抗	46	拉线黄豆	24.07	中感	80	都昌乌豆	30.56	中感
13	中黄 40	13.89	中抗	47	桂春豆 8 号	24.07	中感	81	平乐五月黄	31.48	中感
14	徐豆 14	13.89	中抗	48	SD3	24.54	中感	82	赣豆 10 号	31.48	中感
15	粤春 2013-2	13.89	中抗	49	辰溪大黄豆	24.54	中感	83	鸡蛋黄	31.48	中感
16	赣豆 3 号	13.89	中抗	50	桂春 11 号	25.00	中感	84	黑大豆	31.48	中感
17	泉豆 7 号	14.35	中抗	51	尖星黄	25.00	中感	85	八月爆	31.48	中感
18	余杭六月豆	14.81	中抗	52	华夏 24	25.46	中感	86	向阳黄豆	32.41	中感
19	人潮溪黄豆 3	14.81	中抗	53	玉林大黄豆	25.93	中感	87	南丹二早黄豆	32.41	中感
20	华夏 9	14.81	中抗	54	临豆 9 号	25.93	中感	88	夏邑大粒早黄豆	33.33	中感
21	南夏豆 40	15.28	中抗	55	扶绥青黄豆	25.93	中感	89	高州黑豆	33.33	中感
22	桂春豆 103	15.74	中抗	56	桂夏 119	26.85	中感	90	KOKO	34.26	中感
23	圳上黄豆	15.74	中抗	57	田东黄豆	26.85	中感	91	田林西平早黄豆	34.26	中感
24	岳阳八月爆	15.74	中抗	58	贞丰六月黄豆	26.85	中感	92	六月黄	35.19	中感
25	华夏 21	16.20	中抗	59	坡黄	26.85	中感	93	华夏 3	37.04	中感
26	桂夏 7 号	16.67	中抗	60	南农 493-1	26.85	中感	94	白毛豆	37.04	中感
27	三秋豆	16.67	中抗	61	623 茅草豆	26.85	中感	95	华春 8	37.96	中感
28	南农 1138-2	17.59	中抗	62	隆林蛇场林豆	26.85	中感	96	HMC206	40.28	感病
29	百花东黄豆	17.59	中抗	63	华夏 1	27.78	中感	97	HMC201	40.74	感病
30	埂青 82	18.06	中抗	64	沅陵早黄豆	27.78	中感	98	华夏 22	41.67	感病
31	粤春 2013-1	18.06	中抗	65	阜豆 1 号	27.78	中感	99	豫豆 25	41.67	感病
32	粤夏 2016-5	18.52	中抗	66	南豆 18	27.78	中感	100	横线早熟豆	43.52	感病
33	宾阳大粒早黄豆 2	18.52	中抗	67	石门小白花豆	28.24	中感				
34	珠仔红	18.52	中抗	68	沙市八月黄	28.70	中感				

2.2 大豆抗病基因相对表达量变化分析

2.2.1 病程相关蛋白 (PRs) 基因 如图 2 所示,抗病品种桂 1701 被平头炭疽菌侵染后, *GmPR1* 基因不表达。不同 *GmPRs* 在大豆炭疽病菌侵染后不同时间出现响应。侵染后 6 h, *GmPR2*、*GmPR4*、*GmPR5*、*GmPR9*、*GmPR10* 和 *GmNPR1* 基因的相对表达量均较侵染 0 h 极显著升高,说明这 6 个抗病基

因可能都在抗病前期起关键作用。*GmPR3* 和 *GmPR12* 基因的相对表达量均在侵染后 48 h 极显著升高, *GmPR2*、*GmPR3*、*GmPR4*、*GmPR5*、*GmPR10*、*GmPR12* 和 *GmNPR1* 基因的相对表达量在侵染后 48 h 出现峰值,说明侵染后 48 h 可能是 *GmPR* 基因抵御大豆炭疽菌的关键时间点。



注:a. *GmPR2*; b. *GmPR3*; c. *GmPR4*; d. *GmPR5*; e. *GmPR9*; f. *GmPR10*; g. *GmPR12*; h. *GmNPR1*。不同小写字母表示数值间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

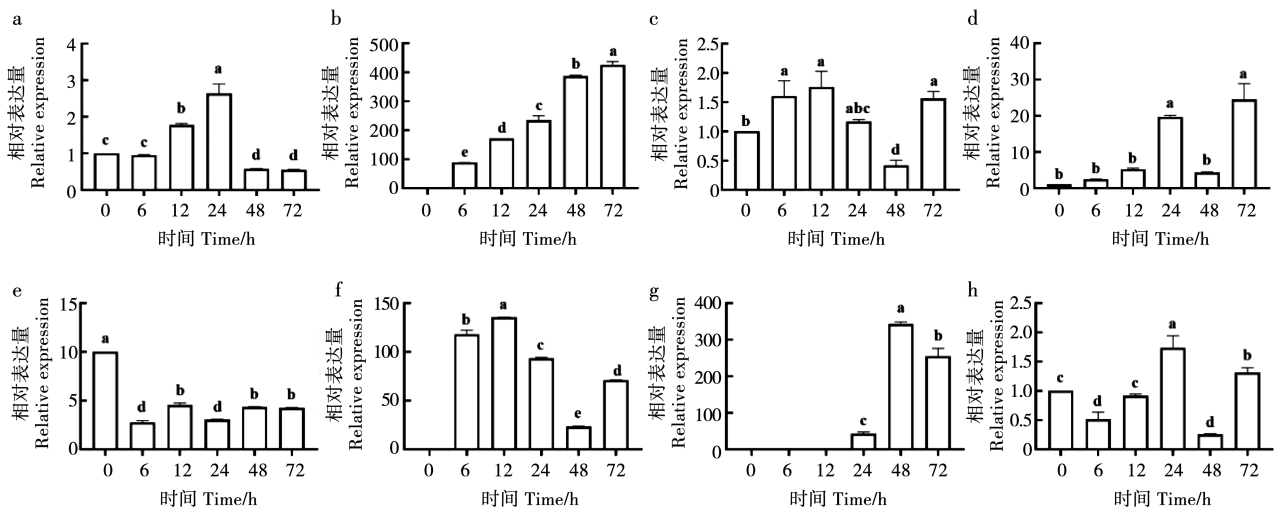
Note: a. *GmPR2*; b. *GmPR3*; c. *GmPR4*; d. *GmPR5*; e. *GmPR9*; f. *GmPR10*; g. *GmPR12*; h. *GmNPR1*. Different lowercase indicate significant difference between values ($P < 0.05$), the same below.

图2 抗病品种桂 1701 被侵染后不同时间 PR 基因表达分析

Fig. 2 Analysis on PR gene expression of resistant variety Gui 1701 at different times after infection

如图 3 所示,感病品种横线早熟豆被平头炭疽菌侵染后, *GmPR1* 基因不表达。 *GmPR3*、*GmPR4*、*GmPR10* 和 *GmPR12* 基因的相对表达量极显著升高,而 *GmPR9* 和 *GmNPR1* 基因的相对表达量极显著降低,表明感病品种接种大豆炭疽菌后 *GmPR9* 和 *GmNPR1* 基因的表达受到抑制。 *GmPR3*、*GmPR4* 和 *GmPR10* 基因的相对表达量在侵染后 6 h 极显著升高; *GmPR2* 基因的相对表达量在侵染后 12 h 极显著升高; *GmPR5*、*GmPR12* 和 *GmNPR1* 基因的相对表达量在侵染后 24 h 极显著升高。 *GmPR4* 和

GmPR10 基因的相对表达量在侵染后 12 h 出现峰值; *GmPR2* 和 *GmNPR1* 基因的相对表达量在侵染后 24 h 出现峰值; *GmPR12* 基因的相对表达量在侵染后 48 h 出现峰值; *GmPR3* 和 *GmPR5* 基因的相对表达量则在侵染后 72 h 才出现峰值。 *GmPR3* 基因的相对表达量在侵染后逐渐增加,并且增长幅度较大。结果表明不同 *GmPRs* 发挥作用的时间及作用时间长短存在差异,在大豆响应平头炭疽菌的分子调控过程中各自发挥不同的作用。



注:a. *GmPR2*; b. *GmPR3*; c. *GmPR4*; d. *GmPR5*; e. *GmPR9*; f. *GmPR10*; g. *GmPR12*; h. *GmNPR1*。

Note: a. *GmPR2*; b. *GmPR3*; c. *GmPR4*; d. *GmPR5*; e. *GmPR9*; f. *GmPR10*; g. *GmPR12*; h. *GmNPR1*.

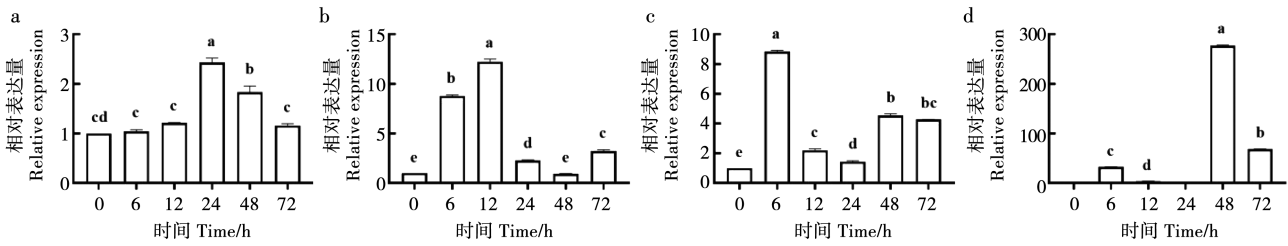
图3 感病品种横线早熟豆被侵染后不同时间 PR 基因表达分析

Fig. 3 Analysis on PR gene expression of susceptible variety Hengxianzaoshudou at different times after infection

抗病品种桂 1701 和感病品种横线早熟豆中病程相关蛋白编码基因表达量对比分析表明, *GmPR2*、*GmPR4* 和 *GmNPR1* 在抗性品种的表表达量整体较高, *GmPR3* 和 *GmPR12* 在感性品种的表表达量整体较高。接种平头炭疽菌 48 h 后, *GmPR2*、*GmPR4*、*GmPR5*、*GmPR10* 和 *GmNPR1* 基因在抗病品种中的相对表表达量显著升高, 而在感病品种中显著降低; 接种后 72 h 时, *GmPR9* 基因在抗病品种中的相对表表达量极显著

升高, 而在感病品种中极显著降低(图 2 和图 3)。

2.2.2 水杨酸(SA)途径基因 如图 4 所示, 抗病品种桂 1701 被平头炭疽菌侵染后, *GmPAL3-1*、*GmPAL2-1* 和 *GmPAL1-1* 基因的相对表表达量升高, 分别在侵染后 6, 12 和 24 h 出现峰值, *GmPAL1-1* 基因的相对表表达量随着时间延长呈现先升高后降低的规律。 *GmNAC4* 基因在侵染后 6, 48 和 72 h 的相对表表达量较高, 在 48 h 时出现峰值。



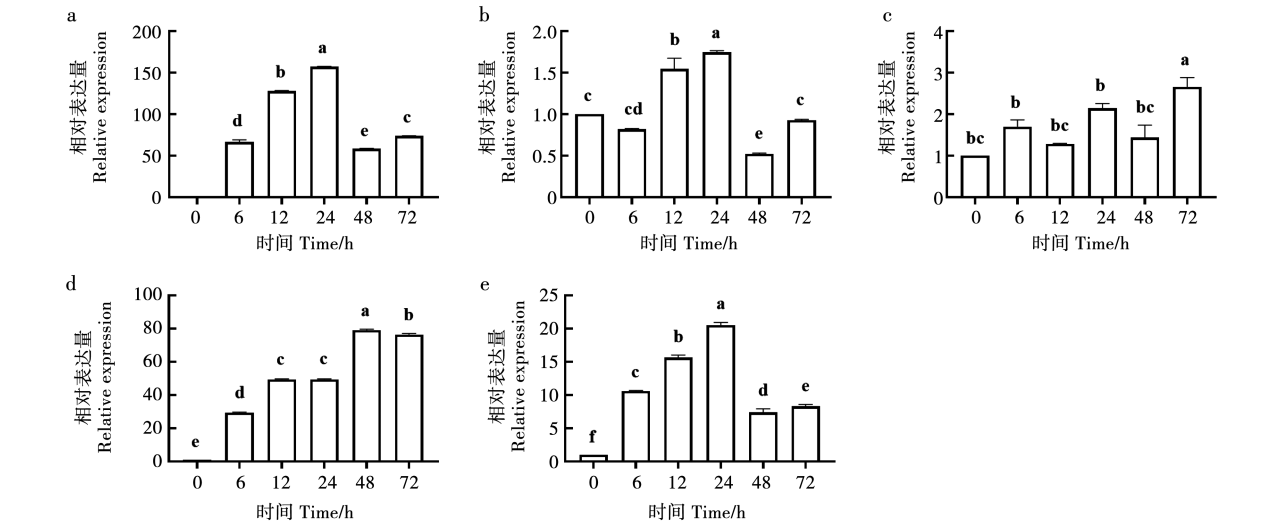
注: a. *GmPAL1-1*; b. *GmPAL2-1*; c. *GmPAL3-1*; d. *GmNAC4*。
Note: a. *GmPAL1-1*; b. *GmPAL2-1*; c. *GmPAL3-1*; d. *GmNAC4*。

图 4 抗病品种桂 1701 被侵染后不同时间 SA 途径基因表达分析

Fig.4 Analysis on SA pathway gene expression of resistant variety Gui 1701 at different times after infection

如图 5 所示, 感病品种横线早熟豆被平头炭疽菌侵染后 6, 12, 24, 48 和 72 h, *GmPAL1-1*、*GmPAL3-1* 和 *GmNAC4* 基因的相对表表达量较侵染 0 h 均极显著

升高; *GmPAL1-1* 和 *GmPAL2-1* 和 *GmNAC4* 基因的相对表表达量峰值均出现在侵染后 24 h; *GmPAL3-1* 和 *GmPAL2-3* 表表达量峰值分别出现在侵染后 48 和 72 h。



注: a. *GmPAL1-1*; b. *GmPAL2-1*; c. *GmPAL2-3*; d. *GmPAL3-1*; e. *GmNAC4*。
Note: a. *GmPAL1-1*; b. *GmPAL2-1*; c. *GmPAL2-3*; d. *GmPAL3-1*; e. *GmNAC4*。

图 5 感病品种横线早熟豆被侵染后不同时间 SA 途径基因表达分析

Fig.5 Analysis on SA pathway gene expression of susceptible variety Hengxianzaoshudou at different times after infection

抗病品种桂 1701 和感病品种横线早熟豆中水杨酸途径基因表表达量对比分析表明, *GmPAL2-3* 在抗病品种中不表表达, 而在感病品种中表表达。 *GmPAL2-1* 和 *GmPAL4* 在抗病品种的表表达量整体较高, *GmPAL1-1* 和 *GmPAL3-1* 在感病品种的表表达量整体较高。 *GmPAL2-1* 和 *GmPAL3-1* 基因在抗病品种

中的相对表表达量分别在接种后 12 和 6 h 极显著升高, 而在感病品种中则分别在接种后 24 和 48 h 才显著升高(图 4 和图 5)。

2.2.3 茉莉酸/乙烯(JA/ET)途径基因 如图 6 所示, 抗病品种桂 1701 被平头炭疽菌侵染后, *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 基因表表达, *GmAOS2* 基因不表表达。侵染

后 6 h, *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 表达量表现极显著升高;侵染后 72 h, *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 基因的表达量出现表达峰值。结果表明在抗病品种中 *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 基因受大豆炭疽病菌侵染诱导(图 6)。

如图 7 所示,感病品种横线早熟豆被平头炭疽病菌侵染后, *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 基因表达, *GmAOS2* 基因不表达。且 *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 基因的表达量在侵染后明显降低。

抗病品种桂 1701 和感病品种横线早熟豆中茱

莉酸/乙烯途径基因表达量对比分析表明,抗病品种中 *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 基因的表达量是感病品种中的 400 ~ 1 000 倍(图 6 和图 7)。

2.2.4 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(PGIPs)基因

抗病品种桂 1701 中只有 *GmPGIP2*、*GmPGIP3* 表达,而 *GmPGIP1* 和 *GmPGIP4* 不表达。*GmPGIP2* 的表达量极显著降低;而 *GmPGIP3* 的表达量在侵染后 6 和 48 h 较高(图 8)。

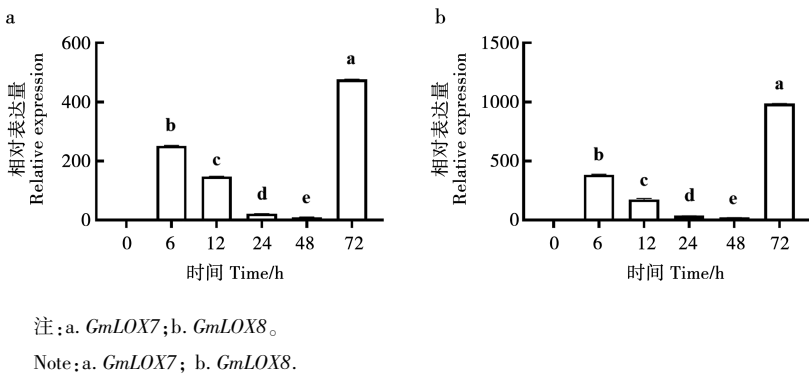


图 6 抗病品种桂 1701 被侵染后不同时间 JA/ET 途径基因表达分析

Fig. 6 Analysis on JA/ET pathway gene expression of resistant variety Gui 1701 at different times after infection

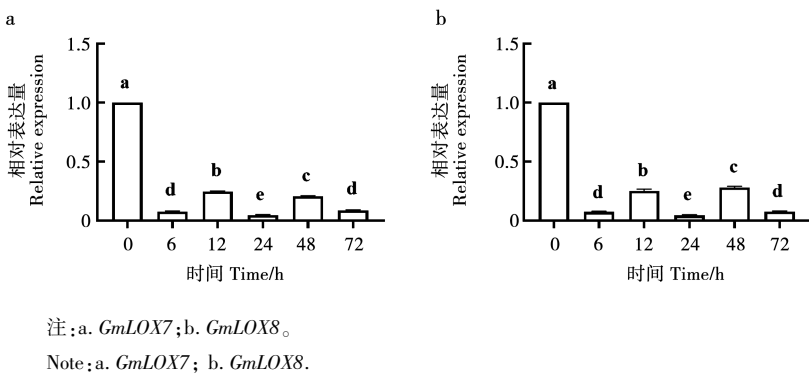


图 7 感病品种横线早熟豆被侵染后不同时间 JA/ET 途径基因表达分析

Fig. 7 Analysis on JA/ET pathway gene expression of susceptible variety Hengxianzaoshudou at different times after infection

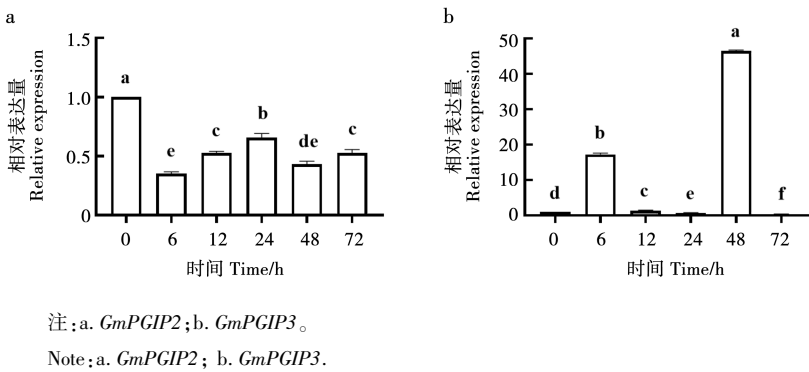


图 8 抗病品种桂 1701 被侵染后不同时间 PGIP 相关基因表达分析

Fig. 8 Analysis on PGIP-related gene expression of resistant variety Gui 1701 at different times after infection

如图9所示,感病品种横线早熟豆被平头炭疽菌侵染后,*GmPGIP* 基因家族中只有 *GmPGIP3* 基因表达。侵染后 6,12,24 和 72 h,*GmPGIP3* 基因的表达量较高,侵染后 48 h 表达量较低。

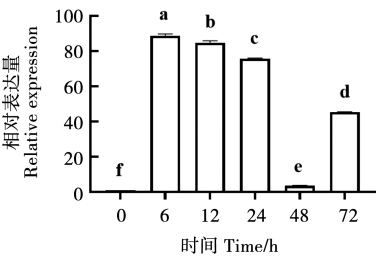


图9 感病品种横线早熟豆被侵染后不同时间 *PGIP* 相关基因 (*GmPGIP3*) 表达分析

Fig.9 Analysis on *PGIP*-related gene (*GmPGIP3*) expression of susceptible variety Hengxianzaoshudou at different times after infection

抗病品种桂 1701 和感病品种横线早熟豆中多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因表达量对比分析表明,平头炭疽菌侵染后,*GmPGIP2* 在抗病品种中表达,而在感病品种中不表达。侵染后 48 h,抗性品种中 *GmPGIP3* 基因的表达量较其他时间高,而感性品种中 *GmPGIP3* 基因的表达量较其他时间低,表明 48 h 可能是 *GmPGIP3* 基因抵御大豆炭疽菌侵染的关键时间点(图 8 和图 9)。

3 讨论

本研究共鉴定出 6 个抗炭疽病病大豆品种(桂 1701、桂夏 1 号、南夏豆 25、桂夏 3 号、华夏 5、天长小青豆),32 个中抗品种,57 个中感品种和 5 个感病品种(HMC206、HMC201、华夏 22、豫豆 25、横线早熟豆),筛选出的抗炭疽病品种可为我国南方地区优质抗病大豆品种选育提供资源。

PRs 蛋白通常不会在健康植物中积累,而是受病原菌侵染或相关胁迫诱导的。因此,它们在提高植物的防御能力方面发挥着重要作用^[30]。本研究抗病品种中部分 PR 蛋白编码基因的基础相对表达量(侵染 0 h)高于感病品种,受大豆平头炭疽菌侵染后响应较快。*GmPR2*、*GmPR4*、*GmPR5*、*GmPR9*、*GmPR10* 和 *GmNPR1* 基因侵染后 6 h 表达量较 0 h 显著升高。而抗病品种中 *GmPR3* 和 *GmPR12* 基因的基础相对表达量低于感病品种,却在受侵染后 48 h 跃升至峰值,而感病品种 *GmPR3* 和 *GmPR12* 基因的表达峰值分别出现在 72 和 48 h。表明不同 PRs 基因对大豆炭疽病菌侵染的响应时间存在差异,PRs 蛋白在抗病前期起关键作用,受大豆炭疽病

菌侵染后 PRs 蛋白基因的表达量对于抗性蛋白前期积累起到关键作用。

已有研究表明,接种炭疽菌后,抗病柱花草品种 *PAL* 基因的表达量明显高于感病品种,推测 *PAL* 基因在柱花草抗炭疽病过程中起重要作用^[31]。苍耳单囊白粉菌(*Podosphaera xanthii*)侵染美洲南瓜后,抗病品种 *PAL* 基因相对表达量显著增加,且出现表达峰值的时间早于感病品种^[32]。本研究中,抗病品种和感病品种受大豆平头炭疽菌侵染后,SA 途径基因 *GmPAL1-1*、*GmPAL2-1*、*GmPAL2-3* 和 *GmPAL3-1* 的相对表达量均随时间变化而表现出明显的增减规律,且抗病品种的响应快于感病品种。另外,抗病品种 *GmNAC4* 基因的表达量是感病品种的 12 倍左右。

接种炭疽菌后,抗病品种中 JA/ET 途径基因 *GmLOX7* 和 *GmLOX8* 的相对表达量均极显著升高,而感病品种中则降低。

菌核病菌侵染大豆下胚轴后, *GmPGIP3*、*GmPGIP5* 和 *GmPGIP7* 被诱导表达,且 *GmPGIP3* 表达量较高^[33]。本研究中,接种平头炭疽菌后,抗病大豆品种 *GmPGIP2* 的相对表达量极显著降低,而感病品种中没有检测到 *GmPGIP2*;抗病品种和感病品种中 *GmPGIP3* 基因的表达量升高;在 48 h 抗病品种出现 *GmPGIP3* 的表达峰值,而感病品种则出现该基因表达量的最低值。徐晶等^[4]研究表明,炭疽菌侵染大豆 48 h,感病大豆叶片内形成侵染菌丝,而在抗病大豆被侵染的叶片细胞内出现类似 HR (Hypersensitive Response) 的细胞坏死反应,猜测这时防卫基因表达等防卫方式发挥作用。本研究推测 *GmPGIP3* 基因在 48 h 抵御炭疽病菌侵染时起到了关键性作用。

接种平头炭疽菌 48 h 后, *GmPR2*、*GmPR4*、*GmPR5*、*GmPR10*、*GmNPR1*、*GmNAC4* 和 *GmPGIP3* 基因在抗病品种桂 1701 中的相对表达量显著升高,而在感病品种横线早熟豆中显著降低;接种后 72 h 时, *GmPR9*、*GmLOX7* 和 *GmLOX8* 基因在抗病品种桂 1701 中的相对表达量极显著升高,而在感病品种横线早熟豆中极显著降低。*GmPAL2-1* 和 *GmPAL3-1* 基因在抗病品种桂 1701 中的相对表达量分别在接种后 12 和 6 h 极显著升高,而在感病品种横线早熟豆中则分别在接种后 24 和 48 h 才显著升高。推测大豆炭疽菌侵染后 48 h 是大豆抗病基因响应侵染的关键时间点。

4 结论

参试的 100 份供试南方春大豆品种中,6 份为抗病品种、32 份为中抗品种、57 份为中感品种、5 份为感病品种。抗病品种分别为桂 1701、桂夏 1 号、南夏豆 25、桂夏 3 号、华夏 5 和天长小青豆。qRT-PCR 检测结果表明,抗病品种桂 1701 和感病品种横线早熟豆接种大豆炭疽菌后,抗病相关基因的表达情况存在较大差异,抗病品种对病菌侵染响应更快,大豆炭疽菌侵染后 48 h 可能是大豆抗病基因响应侵染的关键时间点。研究结果为抗炭疽病大豆育种和进一步阐明大豆抗炭疽病的分子机制奠定了基础。

致谢:供试的 100 份南方春大豆品种由农业农村部国家大豆改良中心广东分中心年海教授提供,供试的平头炭疽菌(*Colletotrichum truncatum*)由安徽省农业科学院植物保护研究所赵伟副研究员提供,在此一并表示感谢!

参考文献

[1] 何永梅, 罗光耀. 大豆炭疽病的识别与防治[J]. 农药市场信息, 2012(19): 44. (HE Y M, LUO G Y. Identification and control of soybean anthracnose[J]. Pesticide Market Information, 2012(19): 44.)

[2] 孙志峰. 大豆豆荚炭疽病的发病因子及其防治研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008. (SUN Z F. Study on disease factors of soybean pod anthracnose and its control[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.)

[3] 林敬州, 姜聪, 汪自强, 等. 大豆种质资源对大豆豆荚炭疽病的抗性评价[J]. 浙江农业科学, 2013(2): 166-168. (LIN J Z, JIANG C, WANG Z Q, et al. Resistance evaluation of soybean resources to soybean pod anthracnose[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2013, 54(2): 166-168.)

[4] 徐晶. 平头炭疽菌对大豆抗感品种的致病差异及其 MAPK 基因 *CtPMK1* 的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013. (XU J. Disease differences of *Colletotrichum truncatum* on resistant and susceptible soybean lines and characterization of a MAPK gene *CtPMK1* in the pathogen[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.)

[5] 连金番, 杜宜新, 赵志刚, 等. 宁夏春大豆炭疽病病原菌形态学分类鉴定研究[J]. 宁夏农林科技, 2019, 60(7): 25-26. (LIAN J P, DU Y X, ZHAO Z G, et al. Morphological classification and identification of spring soybean anthrax pathogens in Ningxia[J]. Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science & Technology, 2019, 60(7): 25-26.)

[6] POTI T, MAHAWAN K, CHEEWANGKON R, et al. Detection and molecular characterization of carbendazim-resistant *Colletotrichum truncatum* isolates causing anthracnose of soybean in

Thailand[J]. Journal of Phytopathology, 2020, 168(5): 267-278.

[7] 张雪翠, 孙素丽, 卢为国, 等. 河南大豆新品系抗大豆疫霉根腐病基因鉴定[J]. 作物学报, 2021, 47(2): 275-284. (ZHANG X C, SUN S L, LU W G, et al. Identification of resistance gene against phytophthora root rot in new soybean lines bred in Henan province[J]. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47(2): 275-284.)

[8] NATARAJ V, MARANNA S, KUMAWAT G, et al. Genetic inheritance and identification of germplasm sources for anthracnose resistance in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.][J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2020, 67(6): 1449-1456.

[9] 石姐姐, 杜宜新, 何艳琴, 等. 中国 590 份大豆种质资源对炭疽病的抗性鉴定及评价[J]. 福建农业学报, 2021, 36(1): 41-52. (SHI N N, DU Y X, HE Y Q, et al. Resistant identification and evaluation of 590 soybean varieties to anthracnose[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2021, 36(1): 41-52.)

[10] 冯乐乐, 竹龙鸣, 谢华, 等. 浙江省鲜食大豆炭疽病病原分离及抗性鉴定[J]. 植物病理学报. 2021, 51(6): 840-849. (FENG L L, ZHU L M, XIE H, et al. Identification of the pathogen of vegetable soybean anthracnose in Zhejiang province and evaluation of soybean cultivars for resistance to *Colletotrichum truncatum*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2021, 51(6): 840-849.)

[11] 练云, 卢为国. 大豆抗 SCN 机制及抗病相关基因研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(6): 727-732. (LIAN Y, LU W G. Advances on resistance mechanism and gene to SCN in soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35(6): 727-732.)

[12] 李宝柱, 段玉玺, 陈立杰. 大豆抗病相关蛋白研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006(9): 1762-1763. (LI B Z, DUAN Y X, CHEN L J. Research progress of soybean disease resistance-related proteins[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006(9): 1762-1763.)

[13] WANG J, ZHANG L W, LIU C Y, et al. Pathogenesis related protein (PR protein) in soybean predicted through HMMER and BLAST resources[J]. Computational Molecular Biology, 2011, 30(6): 649-656.

[14] 陈华涛, 陈新, 顾和平, 等. 大豆 *GmPR10* 基因克隆与植物表达载体的构建[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(3): 494-499. (CHEN H T, CHEN X, GU H P, et al. Cloning and plant expression vector construction of *GmPR10* in soybean[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2011, 27(3): 494-499.)

[15] YANG X D, YANG J, LI H Y, et al. Overexpression of the chitinase gene *CmCHI* from *Coniothyriumminitans* renders enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean[J]. Transgenic Research, 2020, 29(2): 187-198.

[16] HUANG P X, DONG Z, GUO P R, et al. Salicylic acid suppresses apical hook formation via NPR1-mediated repression of EIN3 and EIL1 in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2020, 32(3): 612-629.

- [17] 韩晓斌. 水稻斑点叶突变体 *spl101* 和 *spl102* 的筛选及候选基因鉴定 [D]. 海口:海南大学, 2017. (HAN X B. Genetic analysis and identification of candidate genes for two spotted-leaf mutants (*spl101* and *spl102*) in rice [D]. Haikou: Hainan University 2017.)
- [18] SARISOY U, DINLER B S, TASCI E. The effects of *NPR1* dependent salicylic acid change in increasing salt tolerance of soybean leaves by acclimation [J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2018, 46(2): 356-364.
- [19] ROBERT-SEILANIANITZ A, GRANT M, JONES J D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 49: 317-343.
- [20] 朱婷婷, 王春生, 孙珊珊, 等. 转 *NPR1* 和 *CHR3* 抗病基因提高大豆对疫霉根腐病抗性研究 [J]. *大豆科学*, 2021, 40(2): 168-176. (ZHU T T, WANG C S, SUN S S, et al. Improving the resistance to phytophthora root rot of soybean by transforming broad-spectrum disease resistance gene *NPR1* and *CHR3* [J]. *Soybean Science*, 2021, 40(2): 168-176.)
- [21] 冯志明, 王广达, 赵剑华, 等. 水稻富含半胱氨酸类受体激酶家族基因对纹枯病菌和植物激素的响应特征分析 [J]. *中国水稻科学*, 2021, 35(5): 439-448. (FENG Z M, WANG G D, ZHAO J H, et al. Response characteristics of rice cysteine-rich receptor-like kinases family genes to *Rhizoctonia solani* and Plant Hormones [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2021, 35(5): 439-448.)
- [22] DERKSEN H, RAMPITSCH C, DAAYF F. Signaling cross-talk in plant disease resistance [J]. *Plant Science*, 2013, 207: 79-87.
- [23] TRAN N T, TRAN T T H, DO N D, et al. The accumulation of SA-and JA-signaling pathways in the response of *Glycine max* cv. “Nam Dan” to infestation by *Aphis craccivora* [J]. *Journal of Plant Protection Research*, 2018, 57(4): 321-330.
- [24] LEFEVERE H, BAUTERS L, GHEYSEN G. Salicylic acid biosynthesis in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 338.
- [25] RATHINAM M, RAO U, SREEVATHSA R. Novel biotechnological strategies to combat biotic stresses: Polygalacturonase inhibitor (PGIP) proteins as a promising comprehensive option [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(6): 2333-2342.
- [26] 李梅, 郭建华, 刘学东, 等. 菜豆苗期抗炭疽病接种方法比较 [J]. *天津农业科学*. 2009, 15(1): 31-32. (LI M, GUO J H, LIU X D, et al. Comparison of inoculation method for anthracnose resistance in bean seedling [J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2009, 15(1): 31-32.)
- [27] 韩启厚, 古瑜, 于海龙, 等. 菜豆抗炭疽病苗期鉴定条件优化及种质资源抗性鉴定 [J]. *中国蔬菜*. 2013(8): 86-90. (HAN Q H, GU Y, YU H L, et al. Optimization of conditions for identifying anthracnose in *Phaseolus vulgaris* L. seedling stage and resistance assessment of its germplasm resources [J]. *China Vegetables*, 2013(8): 86-90.)
- [28] 崔华威, 杨艳丽, 黎敬涛, 等. 一种基于 Photoshop 的叶片相对病斑面积快速测定方法 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(22): 10760-10762. (CU H W, YANG Y L, LI J T, et al. A faster method for measuring relative lesion area on leaves based on software photoshop [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(22): 10760-10762.)
- [29] 姚娜, 庞天德, 邓素媛, 等. 不同豆科植物组织 RNA 提取方法的比较分析 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15(4): 1441-1444. (YAO N, PANG T D, DENG S Y, et al. Comparison and analysis of RNA extracting method form different leguminous plants tissues [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(4): 1441-1444.)
- [30] XU P F, JIANG L Y, WU J J, et al. Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 10 gene (*GmPRI10*) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(8): 4899-4909.
- [31] 赵英, 付海天, 田维敏, 等. 接种后柱花草防御酶活性变化及 *PAL* 基因表达分析 [J]. *草地学报*, 2008, 16(6): 585-589. (ZHAO Y, FU H T, TIAN W M, et al. Changes in defendant enzyme activity and expression of *PAL* gene of stylosanthes after the vaccination with anthracnose [J]. *Acta Agrestir Sinica*, 2008, 16(6): 585-589.)
- [32] 张树武, 徐秉良, 刘佳, 等. 白粉病菌侵染对美洲南瓜不同抗性品种 *PAL* 基因表达量的影响 [J]. *核农学报*, 2015, 29(10): 1876-1883. (ZHANG S W, XU B L, LIU J, et al. Effects of *Podosphaera axanthii* infection on expression of *PAL* gene in different resistant varieties of *Cucurbita pepo* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(10): 1876-1883.)
- [33] KALUNKE R M, CENCI A, VOLPI C, et al. The pgip family in soybean and three other legume species: Evidence for a birth-and-death model of evolution [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 1-11.