

大豆疫霉菌的 EMS 化学诱变

哈霞 胡中慧 王蕾 权军利 单卫星*

西北农林科技大学植物保护学院 陕西省农业分子生物学重点实验室 杨凌 712100

摘要: 以甲基磺酸乙酯 (ethylmethane sulfonate, EMS) 为诱变剂, 通过其对大豆疫霉菌 *Phytophthora sojae* 休止孢萌发的影响, 确定化学诱变条件。通过收集单卵孢子, 建立了包含 640 个单卵孢子系的突变体库, 其中约有 50% 的诱变菌系在培养性状和菌落形态方面发生了明显变化, 菌落形态多样, 表现出较紧密或松散, 近圆形或不规则; 气生菌丝减少, 生长速度较慢或快; 在卵孢子产量方面, 8.13% 的菌系有增加, 20.41% 的菌系减少, 27.82% 的菌系极少或者没有卵孢子产生, 43.64% 的菌系卵孢子产量类似野生型。以质膜氢离子泵蛋白基因 *PsPMA1* (plasma membrane H⁺-ATPase 1) 为对象, 通过 TILLING 技术, 从 320 个大豆疫霉菌突变体中获得 9 个突变体, 进一步确认了 EMS 对大豆疫霉菌的诱变效果, 并且估算 EMS 对大豆疫霉菌的诱变频率至多每 115kb 发生一个核苷酸变异。新构建的突变体库为开展大豆疫霉菌的功能基因组研究奠定了遗传材料基础。

关键词: 卵菌, 卵孢子, 化学诱变, 突变体库

EMS mutagenesis analysis of *Phytophthora sojae*

HA Xia HU Zhong-Hui WANG Lei QUAN Jun-Li SHAN Wei-Xing*

College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: The commonly used chemical mutagen EMS (ethylmethane sulfonate) was employed to create a mutant collection by treating the encysted zoospores of *Phytophthora sojae* and the spore germination was used to optimize the mutagenesis condition. A total of 640 single-oospore mutant lines were acquired, among which 50% of them showed a wide range of morphological changes. As to the production of oospores, 8.13% mutants produced more, 20.41% less, and 27.82% very few or no oospores as compared with the wild type, respectively, and 43.64% were similar to the wild type. The quality of the mutant collection was further confirmed by successful identification of 9 mutations in *PsPMA1* (Plasma Membrane H⁺-ATPase 1) gene from 320 *P. sojae* mutants. Thus, the estimated maximum frequency of EMS induced mutation is 1 per 115kb of sequence. The created *P. sojae* mutant collection will be useful for functional genomic analysis of *P. sojae*.

Key words: Oomycota, oospore, chemical mutagenesis, mutant collection

基金项目: 国家 863 计划专题课题 (No. 2008AA02Z110); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-05-0856)

*Corresponding author. E-mail: wxshan@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2009-04-16, 接受日期: 2009-06-08

由大豆疫霉菌 *Phytophthora sojae* 引致的大豆疫霉根腐病是危害严重的毁灭性大豆病害之一, 在环境条件有利于病害发生的情况下可导致大豆绝收, 是我国重要的检疫性病害。近年大豆疫霉根腐病在我国有逐渐扩展和加重的趋势, 已经对大豆生产构成了严重的威胁 (沈崇尧和苏彦纯 1991; 朱振东等 1999; 王晓鸣等 2001)。由于大豆疫霉菌的经济重要性, 对其遗传变异、生理分化、基因组学以及全基因组测序 (Tyler *et al.* 2006) 等相关研究已经开展很多, 逐渐成为卵菌遗传学和生物学研究的一个模式种。以突变体为材料进行基因功能的研究, 是当前认识其基因功能的重要方法。大豆疫霉菌全基因组测序的完成, 使得利用基因组定向诱变检测技术 (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, TILLING) 通过鉴定目标基因的突变类型、开展反向遗传学研究成为可能。

各种诱变技术广泛用于新种质资源的创制和植物与微生物育种, 其中以甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变剂为代表的化学诱变由于其具有比较明确的诱变机理及饱和诱变等特点, 在每个突变体中能产生许多变异, 而被广泛用于植物和微生物的研究中 (Henikoff & Comai 2003; McCallum *et al.* 2000)。EMS 是常用的烷化类诱变剂, 其诱导的突变随机分布于基因组中, 能引起基因产生高频率的突变 (Lightner & Caspar 1998)。基因组学和全基因组测序的迅速发展, 提供了大量的基因和核酸序列信息, 推动了从基因序列到功能研究的反向遗传学的发展。以诱变和高通量突变基因检测为基础的 TILLING 技术逐渐成为模式生物功能基因组研究的重要方法之一 (Colbert *et al.* 2001; McCallum *et al.* 2000)。

本文以 EMS 为诱变剂对大豆疫霉菌休止孢进行诱变处理, 通过分析 EMS 对大豆疫霉菌休止孢萌发及其他生物学效应的影响, 确定 EMS 对大豆疫霉菌的有效诱变条件, 进一步建立高质量的大豆疫霉菌突变体库, 为利用反向遗传学原理分析大豆疫霉菌的基因功能提供了材料保障。

1 材料与方 法

1.1 大豆疫霉菌及其培养方法

大豆疫霉菌 P6497 菌系是大豆疫霉菌全基因组

测序用的标准菌系 (Tyler *et al.* 2006), 也是本研究采用的模式菌系; 采用 5% 的胡萝卜汁培养基 [CA: carrot agar, 5% 胡萝卜汁, 0.002% (w/v) β -谷甾醇, 0.01% (w/v) CaCO_3 , 1% (w/v) 琼脂, 用 10mol/L NaOH 调 pH 值至 6.5], 在 25℃ 黑暗条件下培养大豆疫霉菌; 采用常规的矿物油覆盖方法在 16℃ 条件下黑暗保存。EMS、磷酸钠以及其他化学试剂购自 Sigma 公司 (Sigma-Aldrich Inc., USA) 和 Amresco 公司 (Amresco Inc., USA)。

1.2 游动孢子制备

将 P6497 菌系在 CA 培养基上培养 5—6d 后, 转移菌落边缘的新鲜菌丝块于胡萝卜汁液体培养基中, 在 25℃ 黑暗条件下培养 2—3d, 用 4℃ 无菌水漂洗 2—3 次, 再将水换成盐溶液 (溶液 A: 2mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1mol/L KNO_3 ; 溶液 B: 0.8mol/L MgSO_4 ; 螯合液: 0.01mol/L Na_2EDTA , 0.01mol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 搅拌 24h, 过滤除菌, 4℃ 保存。盐溶液: 每升水中加 2mL 螯合液, 5mL 盐溶液 A, 5mL 盐溶液 B), 继续在 25℃ 下恒温黑暗培养, 3—8h 换一次盐溶液, 当镜检到有大量孢子囊产生时, 将溶液换成 4℃ 无菌水, 25℃ 条件下恒温黑暗 5—6h 可获得游动孢子悬液。

1.3 化学诱变

取 900 μL P6497 菌系的游动孢子悬浮液 (>50 孢子/ μL) 置于 2mL 离心管中, 2,200r/min 涡旋振荡 10—15s, 以使游动孢子完全休止。加入 100 μL 浓度为 1mol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 使磷酸盐的终浓度为 0.1mol/L, 混匀后加入 10 μL EMS 原液, 400 μL 的 0.1mol/L EMS 溶液, 100 μL 的 0.1mol/L EMS 溶液, 使其工作浓度分别为 0.1mol/L、0.04mol/L、0.01mol/L。EMS 处理 20min 后, 1,000 $\times g$ 离心 3min, 弃去上清液 [含有 EMS 的上清液用 8% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 处理后丢弃], 加入适当的无菌水漂洗 2—3 次后加入 500 μL 的无菌水, 振荡充分悬浮。将经过诱变处理的休止孢悬液与胡萝卜汁液体培养基等量混合 (胡萝卜汁的终浓度为 2.5%), 混匀后滴 100 μL 于载玻片上, 置于培养皿中保湿培养, 2—5h 后观察孢子萌发数量。以确定化学诱变剂对大豆疫霉菌休止孢萌发的影响。每个处理有 5 个重复, 每个重复取 5 个视野统计萌发数, 以无菌

水处理为对照, 计算各处理的孢子萌发率及孢子萌发抑制率, 校正后的孢子萌发率= (处理的孢子萌发率/相应对照孢子平均萌发率) × 100%。

1.4 化学突变体的制备

将经 EMS 处理的大豆疫霉菌休止孢悬液涂板于 CA 培养基上, 25℃ 黑暗培养 35d 后收集卵孢子, 参照已报道的方法 (Shan *et al.* 2004)。将培养了 35d 左右的固体培养物划成小块置于研钵中, 加适量无菌水研磨至糊状, 用 200 目纱布过滤, 得到卵孢子粗提液。将滤液经 800 × g 离心 15min, 弃去上清, 加入 5mL 无菌水。充分悬浮后, 加入 1% KMnO₄ 使得 KMnO₄ 终浓度为 0.4%, 室温下静置 20min 后, 800×g 离心 15min, 弃去上清, 用无菌水反复悬浮并漂洗沉淀, 直到洗脱 KMnO₄ 的颜色, 得到处理后的卵孢子悬浮液。将卵孢子悬浮液置于 25℃, 光暗交替培养 3—5d 后观察卵孢子萌发。如有萌发, 则调整卵孢子悬浮液浓度, 确定 1μL 有 2—4 个, 在 1/2 CA 培养基上点样 (约 1 个液滴有 1—2 个卵孢子), 镜检其是否为单孢。标记单卵孢子后, 继续培养 3—5d, 待菌落形成转移至 CA 培养平板上。培养一周后, 记载突变体菌落形态变化特征, 两周后镜检观察卵孢子产生情况。将培养好的单卵孢子突变体菌系转至 CA 菌种瓶中, 待菌落覆盖培养基表面后, 用石蜡油封存, 16℃ 保存备用。

1.5 目的基因选择与突变体筛选

为检测 EMS 诱变效率, 评价突变体库质量, 我们以疫霉菌中结构独特的一个 PMA(质膜氢离子泵蛋白) 基因 (Shan *et al.* 2006) 中的一段 540bp 的保守序列为检测对象 (宝生物工程(大连)有限公司) 合成荧光标记引物: F, 5'-(6-FAM)-AGCACGG GCGTGGAGAAC-3'; R, 5'-(6-FAM)-AGCACACCC TCCTTGCGC-3', 通过 TILLING 技术确定 EMS 诱变频率。用 96 孔板微量快速提取突变体基因组 DNA, 每 8 个突变体混合组成一个 DNA 池, 在 PCR 过程中可以得到野生型与突变型所形成的异源双链核酸分子, 用特异性识别并切割错配碱基的核酸内切酶 CELI 剪切异源双链 DNA 分子 (Oleykowski *et al.* 1998)。由于 PCR 扩增引物标记有荧光 (FAM), 通过荧光扫描 (荧光影像检测仪 FLA7000, FUJIFILM, Fuji Photo Film Co. Ltd.) 酶切产物, 检测特异酶切条带, 高效率地确定突变体。

2 结果与分析

2.1 EMS 对大豆疫霉菌休止孢萌发的影响

研究表明 (表 1), EMS 浓度为 0.1mol/L 时, 休止孢校正后的萌发率约为 20%, 死亡率较高; 浓度为 0.04mol/L 与 0.01mol/L 时, EMS 的致死效应逐步降低。考虑到突变体库应涵盖较多的突变类型, 我们采用致死效果不同的 3 个浓度的 EMS 进行诱变处理, 以期获得诱变效果不同的突变体, 建立涵盖诱变效果和类型比较全面的突变体库。

表 1 EMS 处理对大豆疫霉菌休止孢萌发的影响

Table 1 Effect of ethylmethane sulfonate (EMS) on the germination of encysted zoospores of *Phytophthora sojae*

EMS 浓度 (mol/L)	校正后的孢子萌发率 (%)
Concentration of EMS (mol/L)	Corrected germinating rate of zoospores (%)
0.10	18.68
0.04	56.58
0.01	75.90
0.00	100.00

注: 采用大豆疫霉菌 P6497 菌系, EMS 处理休止孢时间为 20min。

Note: The mutagenesis was done by treating the encysted zoospores of *Phytophthora sojae* P6497 with EMS for 20min.

2.2 EMS 诱变获得形态变异多样的突变体

通过收集单卵孢子系, 成功获得大豆疫霉菌 P6497 菌系的 640 个单卵孢子系, 其中约有 50% 的诱变菌系与野生型对比在培养性状和菌落形态方面发生了明显的变化 (图 1)。野生型 P6497 菌系在 CA 上生长良好, 5—7d 即可长满 90mm 培养皿, 菌落形态近圆形, 白色, 边缘整齐或不整齐, 绒毡状 (图 1-A, 图 2-B)。突变体菌落形态多样, 近圆形或不规则, 菌丝表现较紧密或松散; 气生菌丝比野生型的短或不发达, 生长速度较慢或快。如 10-57 菌系菌落生长较慢, 菌落厚密, 气生菌丝不发达, 贴于培养基生长, 菌落边缘整齐近圆形 (图 1-B); 10-53 生长速度较慢, 气生菌丝较短, 菌丝松散, 边缘不整齐 (图 1-C); 4-121 生长速度正常, 菌丝蓬松, 中心菌丝发达 (图 1-D)。在卵孢子产量 (表 2) 和着生方式方面, 许多突变体也表现出明显的变化 (图 2), 约有 8.13% 的菌系卵孢子产量增加,

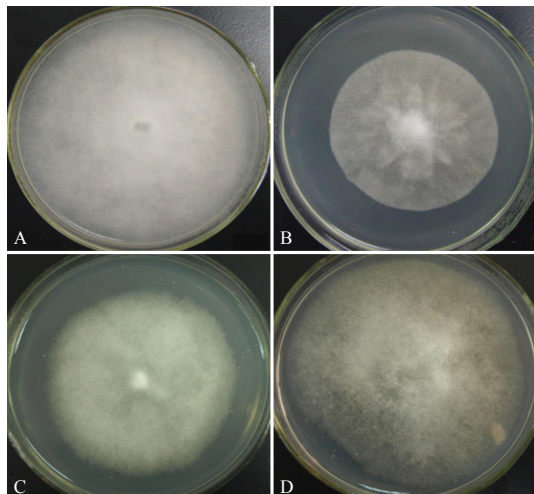


图1 大豆疫霉菌突变体菌落形态的变异情况 A: 大豆疫霉菌野生型 (P6497); B-D: 菌落形态发生变异的突变体: 10-57 (B), 10-53 (C), and 4-121 (D). 所有菌系在 CA 培养基上 25℃ 条件下黑暗培养 7d.

Fig. 1 *Phytophthora sojae* mutants with colony morphological changes.

A: The wild type (P6497); B-D: Colony morphological changes of different mutants, B for mutated isolate 10-57, C for 10-53 and D for 4-121. All cultures were grown on carrot agar (CA) plates at 25℃ in the dark for 7d.

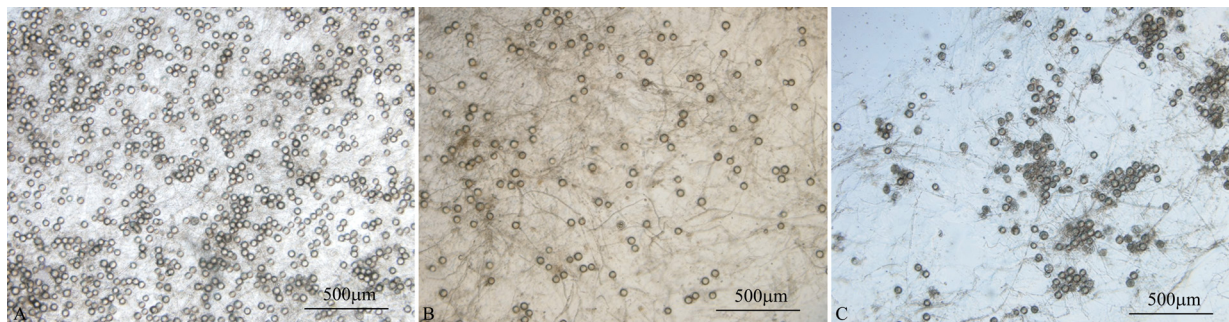


图2 大豆疫霉菌突变体卵孢子产生的变异情况 A: 卵孢子产量增加的突变体 (4-158); B: 野生型大豆疫霉菌 (P6497); C: 卵孢子簇生的突变体 (4-121). 所有菌系在 CA 培养基上 25℃ 条件下黑暗培养 20d.

Fig. 2 *Phytophthora sojae* mutants altered with oospore production. A: Mutant 4-158 with increased amount of oospores; B: Wild type (P6497); C: Mutant 4-121 with aggregated distribution of oospores. All cultures were grown on carrot agar (CA) plates at 25℃ in the dark for 20d.

20.41%的菌系减少, 27.82%的菌系极少或者没有卵孢子产生, 有 43.64%的菌系卵孢子产量类似野生型。部分突变体产生较多的卵孢子, 而且分布均匀 (图 2-A); 有的突变体卵孢子较大, 而且成簇产生 (图 2-C)。

2.3 大豆疫霉菌质膜氢离子泵基因 *PsPMA1* 突变体的检测

PsPMA1 基因编码一个结构独特的质膜氢离子泵蛋白 (PMA), 其中在靠近碳端包含一个约 155 个氨基酸残基、在真菌和植物的 PMA 蛋白中缺失

表2 大豆疫霉菌突变体菌系的卵孢子产量变化情况

Table 2 Variation in oospores production among *Phytophthora sojae* mutants

EMS 浓度 (mol/L) EMS concentration (mol/L)	卵孢子产量变异的突变体菌系比例 (%) Proportion of mutants altered with the production of oospores (%)			
	增多型 Increased	类似野生型 Unchanged	减少型 Decreased	极少型 Few
	0.10	5.62	37.08	25.84
0.04	10.21	49.41	14.01	26.37
0.01	8.55	44.44	21.37	25.64
总计 Total	8.13	43.64	20.41	27.82

注: 通过 SPSS 进行方差分析表明, EMS 处理后类似野生型大豆疫霉菌显著 ($P=0.05$) 减少。

Note: ANOVA analysis by SPSS indicated that the number of mutants similar to the wild type of *Phytophthora sojae* decreased significantly ($P=0.05$). EMS, ethylmethane sulfonate.

的结构域, 并且分布在质膜的细胞质一侧 (Shan *et al.* 2006)。我们以包括这 155 个氨基酸残基的 540bp 的 DNA 序列为检测对象, 通过 TILLING 技术, 从 320 个大豆疫霉菌突变体中检测到 9 个突变体。基因组分析表明, *PsPMA1* 在大豆疫霉菌基因组中存在 3 个高度同源的拷贝, 其中 2 个簇集在一起 (Shan *et al.* 2006), 此外 EMS 诱变主要造成单核苷酸的变异, 加之大豆疫霉菌是二倍体微生物, 我们估算 EMS 对大豆疫霉菌的诱变频率至多每 115kb 发生一个核苷酸变异。

2.4 部分突变体的进一步分析

选择卵孢子产量较大的突变体 4-158 与菌落生长速度较慢的突变体 10-57 进行进一步分析, 以确定突变体变异性状的稳定性及可能的性状决定因子的遗传特征。4-158 突变体可产生较多的卵孢子, 从其自交后代中分离得到 27 个单卵孢子。黑暗培养 20d 后检查卵孢子产生情况, 发现与野生型 P6497 菌系卵孢子产量相似的有 17 个, 与 4-158 突变体一致且卵孢子产量较多的有 8 个, 而卵孢子量减少的有 2 个, 卵孢子产量性状表现出明显的分离, 表明多个基因参与卵孢子产量性状。

突变体 10-57, 从其自交后代中分离得到 10 个单卵孢子系。5d 后观察到菌落生长速度与突变体 10-57 相似或稍慢, 菌落直径与 10-57 和野生型的 P6497 相比较可分为四类: 小于 10-57、类似 10-57、大于 10-57 而小于 P6497 和类似 P6497, 菌落生长速度性状也表现出明显的分离, 表明多个基因参与大豆疫霉菌的生长性状。

3 结论与讨论

大豆疫霉菌由于其完善的遗传分析方法、高质量的全基因组测序以及系统的与大豆互作的遗传学研究, 已成为卵菌遗传学和分子生物学研究的模式种。除了完成模式菌株 P6497 的全基因组测序 (Tyler *et al.* 2006), 最近还完成了代表另外一个基因型的 P7064 菌株的全基因组测序, 这使利用 TILLING 技术通过鉴定目标基因的突变类型开展反向遗传学研究成为可能。Lamour *et al.* (2006) 利用诱变剂乙酰基亚硝基脲 (Ethyl nitrosourea, ENU), 通过处理游动孢子制备了大豆疫霉菌的第一个化学突变体库, 并且利用高通量的 TILLING 技术, 筛选得到疫霉菌特异的磷脂酶 D (phospholipase D) 基因 *PsPXTM-PLD* (Meijer *et al.* 2005) 以及细胞坏死诱导蛋白 (necrosis-inducing protein) 基因 *PsojNIP* (Qutob *et al.* 2002) 的突变体, 证实了通过化学诱变开展疫霉菌反向遗传学研究是可行的。

本研究以生物诱变技术中广泛使用的 EMS 为诱变剂, 制备了大豆疫霉菌突变体库。大豆疫霉菌在其生活史循环中存在多种形态差异明显的繁殖

体, 其中只有无性阶段的游动孢子、休止孢和有性阶段的卵孢子是单核的, 其他繁殖体均为多核的。卵孢子萌发率很低, 很难获得高频率的同步萌发; 游动孢子需要经过短暂的休止孢阶段才能萌发, 直接以游动孢子进行萌发实验, 也很难获得高频率的同步萌发; 而经过诱导休止的游动孢子在实验条件下可达到近 100% 的萌发率。因此, 在突变体制备过程中, 我们以休止孢为诱变材料, 通过测试 EMS 对大豆疫霉菌休止孢萌发率的影响, 分析 EMS 对休止孢萌发的生物学效应, 确定有效的化学诱变条件。通过收集诱变后代的单卵孢子系, 分析单卵孢系的生物学形态, 进一步确认 EMS 化学诱变效果。

大豆疫霉菌是二倍体微生物, 休止孢经过 EMS 处理后, 由于变异多为隐性, 诱变位点多为杂合, 直接在 CA 培养基上单孢培养难以观察到形态上发生变异的突变体。大豆疫霉菌有性生殖为同宗配合, 休止孢经过 EMS 处理后, 于 CA 培养基上黑暗培养, 经有性生殖产生的卵孢子中, 有些变异位点是纯合的, 可直接表现变异的性状。通过收集单卵孢子, 一方面可以直接获得表型发生变异的突变体, 另一方面也可通过表型变异发生的情况, 确认 EMS 的诱变效果。EMS 为饱和诱变剂, 可大量诱导基因组中的隐性突变, 在所获得的突变体中, 多达 50% 的突变株表现形态上的变异, 表明有较高度度的诱变效果。

以 *PsPMAI* 基因中的 540bp 的 DNA 序列为检测对象, 通过 TILLING 技术, 从 320 个大豆疫霉菌突变体中检测到 9 个突变体, 进一步确认了 EMS 对大豆疫霉菌的诱变效果和突变体库的质量, 并且估算 EMS 对大豆疫霉菌的诱变频率至多每 115kb 发生一个核苷酸变异。对大豆疫霉菌的 EMS 诱变频率与 ENU 相近, 后者约为每 104kb (*PsPXTM-PLD*) 或 181kb (*PsojNIP*) 发生一个核苷酸变异 (Lamour *et al.* 2006)。对培养性状和卵孢子发生变异的突变体的进一步分析表明, 这些性状在自交后代中表现分离。本研究构建的大豆疫霉菌 EMS 化学突变体为开展疫霉菌的反向遗传学研究奠定了遗传材料基础。

[REFERENCES]

Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum

- CM, Comai L, Henikoff S, 2001. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology*, 126(2): 480-484
- Henikoff S, Comai L, 2003. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 375-401
- Lamour KH, Finley L, Hurtado-Gonzales O, Gobena D, Tierney M, Meijer HJG, 2006. Targeted gene mutation in *Phytophthora* spp. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 19(12): 1359-1367
- Lightner J, Caspar T, 1998. Seed mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology*, 82: 91-103
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S, 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology*, 18: 455-457
- Meijer HJG, Latijnhouwers M, Ligterink W, Govers F, 2005. A transmembrane phospholipase D in *Phytophthora*: a novel PLD sub-family. *Gene*, 350(2): 173-182
- Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, Yeung AT, 1998. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 26(20): 4597-4602
- Qutob D, Kamoun S, Gijzen M, 2002. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant Journal*, 32(3): 361-373
- Shan WX, Liu J, Hardham AR, 2006. *Phytophthora nicotianae* *PnPMA1* encodes an atypical plasma membrane H⁺-ATPase that is functional in yeast and developmentally regulated. *Fungal Genetics and Biology*, 43(8): 583-592
- Shen CY, Su YC, 1991. Discovery and preliminary studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 21(4): 298 (in Chinese)
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RHY, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CMB, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW, Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee M, McDonald WH, Medina M, Meijer HJG, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JKC, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BWS, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL, 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 313(5791): 1261-1266
- Wang XM, Zhu ZD, Wang HB, Wu XF, 2001. Occurrence of soybean phytophthora root rot and evaluation of germplasm resistance in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 31(4): 324-329 (in Chinese)
- Zhu ZD, Wang XM, Dai FC, 1999. Occurrence status and controlling measures of soybean phytophthora root rot in China. *Plant Protection*, 25(3): 47-49 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 沈崇尧, 苏彦纯, 1991. 中国大豆疫霉病菌的发现及初步研究. 植物病理学报, 21(4): 298
- 王晓鸣, 朱振东, 王化波, 武小菲, 2001. 中国大豆疫霉根腐病和大豆种质抗病性研究. 植物病理学报, 31(4): 324-329
- 朱振东, 王晓鸣, 戴法超, 1999. 大豆疫霉根腐病在我国的发生及防治对策. 植物保护, 25(3): 47-49