



导入 *nodVW* 基因对费氏中华根瘤菌 HH103 共生固氮的影响

安琦^{1,2}, 吴皓琼^{1,2}, 殷博^{1,2}, 原韬^{1,2}, 袁明³, 曹亚彬^{1,2}, 牛彦波^{1,2}, 马银鹏¹

(1. 黑龙江省科学院微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150010; 2. 黑龙江省科学院高技术研究院, 黑龙江 哈尔滨 150020; 3. 黑龙江省农业科学院齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:本研究以慢生型根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110 为出发菌株, 扩增慢生型根瘤菌中双组份调控基因 *nodVW*, 并将其导入快生型根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*) HH103 及 HH103 *nodDI* 失活突变株中, 研究重组根瘤菌株对大豆嫩丰 16 共生固氮的影响。结果表明: 慢生型大豆根瘤菌双组份调控系统 *NodVW* 的导入使大豆植株的株高和鲜重显著降低, 大豆植株根部结瘤数量明显减少, *NodVW* 的导入阻碍了快生型根瘤菌的结瘤固氮途径, 从而抑制了快生型根瘤菌与大豆结瘤。

关键词: 双组份调控系统; *nodVW*; 重组根瘤菌; 结瘤固氮

Effect of *nodVW* Genes on Symbiotic Nitrogen Fixation of *Sinorhizobium fredii* HH103

AN Qi^{1,2}, WU Hao-qiong^{1,2}, YIN Bo^{1,2}, YUAN Tao^{1,2}, YUAN Ming³, CAO Ya-bin^{1,2}, NIU Yan-bo^{1,2}, MA Yin-peng¹

(1. Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010, China; 2. Institute of Advanced Technology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150020, China; 3. Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161006, China)

Abstract: In this study, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 was used as the starting strain. The two component regulatory genes *nodVW* from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 were amplified and introduced to *Sinorhizobium fredii* HH103 and HH103 *nodDI* mutant strains in order to study the effect of *nodVW* on symbiotic nitrogen fixation of the recombinant strains to soybean genotype NF-16. The results showed that the introduction of the two-component control system *NodVW* from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 exert negative effect on soybean plants, which significantly reduced the height and fresh weight of soybean plants. In the meanwhile, the number of nodules at soybean roots decreased significantly. The results indicated that the introduction of *NodVW* hindered the pathway and inhibits the nodulation and nitrogen fixation of *Sinorhizobium fredii* HH103 accordingly.

Keywords: Two component regulatory system; *nodVW*; Recombinant rhizobium; Nodulation and nitrogen fixation

空气中约 80% 的氮气无法被植物直接利用, 根瘤菌通过与豆科植物共生固氮作用, 能够把空气中的分子态氮转变为氨态氮, 供给植株使用, 一个小根瘤就是一座微型氮肥厂。根瘤菌剂的使用有利于提高豆科植物根瘤的数量、质量及固氮量, 能有效减少化肥的使用, 改善土壤和生态环境质量, 提高农作物产量和品质^[1]。根瘤菌固氮作用具有重大的农业应用价值以及环保价值。

大豆作为重要的食用油、蛋白食品和饲料蛋白原料, 在国家粮食安全中占有重要地位。中国是大豆的原产地, 素有“大豆王国”的美誉。然而, 近年来国内大豆产业的形势越来越严峻, 国内大豆供应增量仍远小于需求增量, 大豆自给率处于下降趋势, 国内大豆供应严重依赖进口, 中国已成为全球

头号大豆购买国^[2]。要破解日益增加的大豆需求与有限的耕地面积之间的矛盾, 最主要的途径之一是提高国产大豆的亩产与品质。黑龙江省大豆资源丰富, 与慢生型根瘤菌具有较好的匹配性, 固氮效率高, 但其平均生长代时较长, 繁殖速度慢, 生产成本低, 对其广泛应用也产生了一定的制约作用。费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*) HH103 是世界上被发现较早的一株快生型根瘤菌。其平均生长代时为 2~5 h, 繁殖速度快, 耐盐度高, 抗逆性强, 碳源利用广泛, 它以结瘤率高、宿主广谱等特点成为快生型根瘤菌的模式菌株, 在工业化生产和与环境中其它微生物竞争性结瘤中具有较大优势^[3]。

根瘤菌与宿主植物之间可以巧妙地进行分子对话, 从而诱导根部细胞有关根瘤形成的基因表

收稿日期: 2018-08-03

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-004-CES04); 国家现代农业产业技术体系子课题(CARS-210301); 黑龙江省科学院学部委员指导专项(XB2015SW01); 黑龙江省院所基本应用技术研究专项(ZNBZ2016SW01); 黑龙江省科学院青年创新基金面上项目(CXMS2017SW02)。

第一作者简介: 安琦(1988-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事微生物学研究。E-mail: anqi2011stu@126.com。

通讯作者: 曹亚彬(1964-), 男, 学士, 研究员, 主要从事农业微生物研究。E-mail: caoyabin642050@sina.com。

达。根瘤菌正调控结瘤基因 *nodD*,能够启动其它结瘤基因的转录。只有当这类基因的产物与植物根部分泌的诱导物特异性结合后才能引发结瘤基因的转录。研究发现,在慢生型根瘤菌 USDA110 (*Bradyrhizobium japonicum*) 中存在一种以上的调控基因,除 *nodD1* 外,双组份调控系统 NodVW 在激活结瘤基因表达方面也发挥着重要作用^[4]。NodVW 作为第二调控组分,在植物分泌的异黄酮作用下可参与激活结瘤基因的转录。通过一系列磷酸化作用,NodVW 可激活 *nod* 基因的转录^[5]。因此,本研究将慢生型根瘤菌 USDA110 (*Bradyrhizobium japonicum*) 中激活结瘤基因转录的双组份调控系统 *nodVW* 基因导入快生型根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) HH103 及 HH103 *nodD1* 失活突变株中,构建新的基因工程菌株,研究其对大豆嫩丰 16 共生结瘤的影响。期望为根瘤菌的基因工程改造提供有益借鉴,为根瘤菌的工业化生产与进一步应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

快生型大豆根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) HH103、HH103 *nodD1* 突变株、质粒 pBBR 由西班牙塞维利亚大学 Jose 教授惠赠,大豆嫩丰 16 和慢生型大豆根瘤菌 USDA110 由黑龙江省科学院微生物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 慢生型根瘤菌 USDA110 基因组的提取
将慢生型根瘤菌 USDA110 菌株接种于 YMA 液体培养基中,置于 28℃、200 r·min⁻¹ 恒温恒湿摇床中培养 5 d,采用 Invitrogen 公司的基因组提取试剂盒对菌株基因组进行提取,经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后保存于 -20℃ 备用。

1.2.2 慢生型根瘤菌 USDA110 中 *nodVW* 基因的克隆
根据 Gen Bank 中的 *nodVW* 基因的保守核苷酸序列,运用 Primer 5 软件设计,由上海生工公司合成含有 *Kpn* I 和 *Bam* HI 酶切位点的特异性引物,引物序列如下:

上游引物 *Kpn* I-F: 5' ATTGGTACCCTATCAT-GCGGACCCAAGTG;

下游引物 *Bam* HI-R:5' AAAGGATCCGCACAT-CAGTTATGATGACGCAG。

以慢生型根瘤菌 USDA110 基因组为模板进行 *nodVW* 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系 (20 μL): NEB 10 × Buffer 2 μL,dNTP (10 mmol·L⁻¹) 0.4 μL,

模板 DNA 2 μL,引物 F (10 mmol·L⁻¹) 0.4 μL,引物 R (10 mmol·L⁻¹) 0.4 μL, *Taq* DNA Polymerase 0.1 μL, ddH₂O 14.7 μL。反应程序:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 3 min 40 s,共 38 个循环,72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。将 *nodVW* 基因产物回收纯化后进行凝胶电泳检测,选取条带大小正确的阳性样品送往 Invitrogen 公司测序验证。

1.2.3 pBBR-*nodVW* 重组质粒的构建
对 *nodVW* 基因的 PCR 产物进行胶回收纯化,采用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam* HI 对 *nodVW* 片段和载体 pBBR 进行酶切、连接、连接产物转化 *DH5α* 感受态细胞,筛选含有 *nodVW* 基因的重组质粒 pBBR-*nodVW*,对重组质粒进行 PCR 验证。

1.2.4 根瘤菌重组菌株 HH103 (*nodVW*) 和 HH103 *nodD1* (*nodVW*) 的构建
通过三亲本接合实验^[6]将 *nodVW* 基因导入快生型根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) HH103 和 HH103 *nodD1* 突变株中,筛选阳性接合子,获得两株根瘤菌重组菌株 HH103 (*nodVW*) 和 HH103 *nodD1* (*nodVW*),对重组菌株进行验证。

1.2.5 盆栽试验
利用获得的根瘤菌重组菌株进行盆栽试验,以大豆嫩丰 16 为试验植株,进行种子发芽,根瘤菌处理分别为 A:HH103;B:HH103 (*nodVW*);C:HH103 *nodD1* (*nodVW*);D: 阴性对照;E: USDA110。定期观察接种不同根瘤菌后植株的结瘤固氮情况,称取植株鲜重,根瘤数量,比较分析不同处理对植株结瘤固氮的影响。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 统计软件对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 *nodVW* 基因的克隆

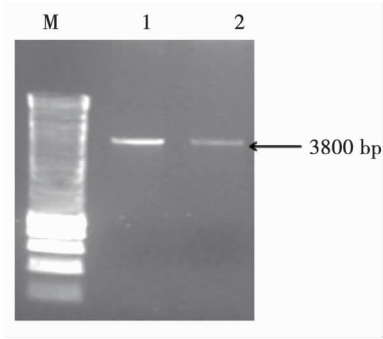
经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,约 3 800 bp 处可见明亮条带,与目的基因 *nodVW* 大小相符。

2.2 pBBR-*nodVW* 表达载体的构建

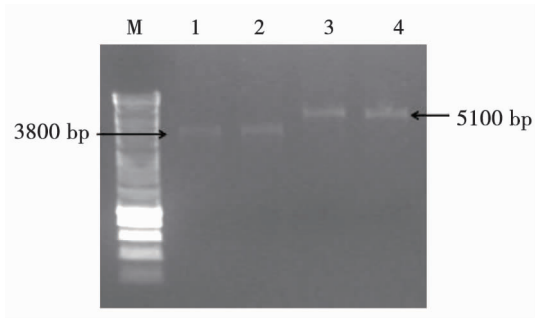
如图 2 所示,采用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam* HI 对目的片段 *nodVW* 和载体 pBBR 进行酶切后分别获得 5 100 bp 的 pBBR-2 载体和约 3 800 bp 的 *nodVW* 片段,与预期相符。对获得的重组质粒 pBBR-*nodVW* 进行筛选,阳性重组子在 3 800 bp 出现目的条带,成功获得重组质粒 pBBR-*nodVW* (图 3)。

2.3 根瘤菌重组菌株 HH103 (*nodVW*) 和 HH103 *nodD1* (*nodVW*) 的构建

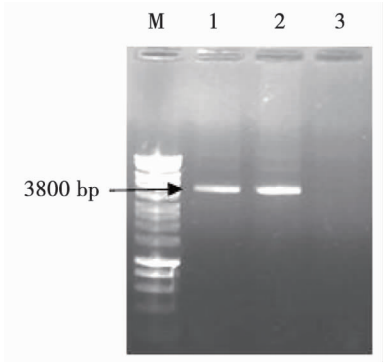
通过三亲本接合实验将 *nodVW* 基因导入快生



M: Marker 10000; 1 - 2: *nodVW*.
图 1 *nodVW* 基因的 PCR 结果
Fig. 1 PCR result of *nodVW*



M: Marker 10000; 1 - 2: *nodVW*; 3 - 4: pBBR.
图 2 *nodVW* 和 pBBR 酶切结果
Fig. 2 Digestion result of *nodVW* and pBBR



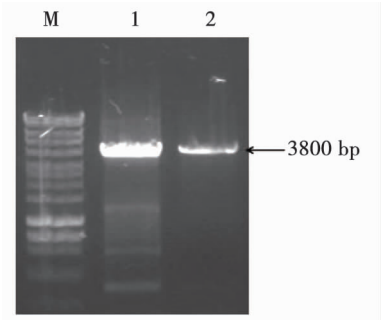
M: Marker 10000; 1 ~ 3: pBBR - *nodVW* 候选载体。
M: Marker 10000; 1 - 3: pBBR - *nodVW* candidates.

图 3 pBBR - *nodVW* 的 PCR 筛选结果
Fig. 3 PCR results of pBBR - *nodVW* candidates

型根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) HH103 和 HH103 *nodD1* 突变株中,对重组菌株进行 PCR 验证,两株根瘤菌重组菌株 HH103 (*nodVW*) 和 HH103 *nodD1* (*nodVW*) 与 3 800 bp 处均出现 *nodVW* 目的条带,根瘤菌重组菌株构建成功(图 4)。

2.4 盆栽试验

大豆种子发芽后分别接种根瘤菌试验菌株,结果显示:慢生型根瘤菌 USDA 110 与快生型根瘤菌 HH03 均可与大豆进行结瘤固氮,且接种慢生型根瘤菌 USDA 110 的大豆植株的结瘤固氮效果最佳,其大豆植株的鲜重、株高以及根瘤数量显著高于接



M: marker 10000; 1: HH103 (*nodVW*) ; 2: HH103 *nodD1* (*nodVW*).
图 4 重组菌株的 PCR 验证
Fig. 4 PCR results of recombinant strains.

种快生型根瘤菌 HH03 和其它试验组,对照试验组与 HH103 *nodD1* (*nodVW*) 试验组大豆植株叶片发黄,植株弱小,无法结瘤固氮(图 5)。

与 HH103 试验组相比,导入 *nodVW* 的 HH103 (*nodVW*) 试验组结瘤固氮效果反而显著降低,表明 *NodVW* 双组份调控系统的导入在一定程度上阻碍了快生型根瘤菌 HH03 中原有的结瘤固氮途径。而将快生型根瘤菌 HH03 中 *NodD1* 突变后,破坏其原有的固氮途径,导入慢生型根瘤菌中 *NodVW* 双组份调控系统,HH103 *nodD1* (*nodVW*) 试验组无法与大豆进行结瘤固氮,可见慢生型中 *NodVW* 双组份调控系统在快生型根瘤菌中并无法发挥结瘤固氮作用(图 6)。

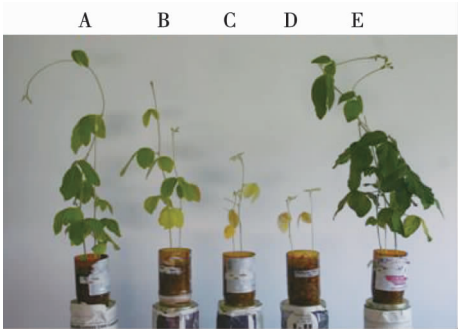


图 5 盆栽试验结果
Fig. 5 Results of plant test



图 6 植株根部结瘤结果
Fig. 6 Nodulation results of the plants

表1 重组根瘤菌对大豆植株结瘤的影响
Table 1 The nodulation effect of *B. Japonicum* to recombinant strains

处理 Treatment	平均根瘤数 Mean nodules	平均根瘤重 Mean weight of nodules/mg	平均地上部分鲜重 Mean weight of upper part/mg
A	52 ± 4 b	761.67 ± 83.55 b	1631.48 ± 178.62 b
B	45 ± 3 c	585 ± 69.37 c	1044.43 ± 112.35 c
C	0 d	0 d	269.98 ± 34.07 d
D	0 d	0 d	247.95 ± 35.11 d
E	99 ± 7 a	1230 ± 146.08 a	3197.65 ± 325.22 a

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase mean there is significant difference at $P < 0.05$ level.

3 讨论

根瘤菌的固氮效率既受宿主植物光合效率的影响,又与其自身的基因调控作用有关,有效共生起始于植物与根瘤菌精妙的分子对话,它代表着复杂和顺序性的信号传递和交换,也是有关基因表达的过程。根瘤菌的相关研究一直是国内外学者们关注的热点,主要集中于结瘤固氮机理、共生信号传导、基因挖掘、共生匹配性、菌剂应用等方面^[7-8],也有关于根瘤菌基因工程菌株构建的研究。

慢生型根瘤菌与快生型根瘤菌除了生长速度的差异外,其研究手段和结瘤固氮关键基因的定位也不同。研究表明,苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)和豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*,包括3个生物型)等大多数快生型根瘤菌的共生固氮基因定位在称为共生质粒的大质粒上,而慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)和田菁根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*)的共生固氮基因则定位在染色体上^[9-11]。关于慢生型根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)双组份调控系统 NodVW 的相关研究在国内并未见到相关报道。豆科植物分泌类黄酮化合物首先激活 *nodD1* 基因, NodD1 蛋白与位于可诱导的结瘤基因操纵子上游的 *nod box* 保守区结合,从而激活结瘤基因的转录,由此可见 NodD1 对于诱导节瘤基因的表达至关重要^[12-15]。然而, Göttert 等^[16]研究发现,在慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)中, *NodD1* 突变株依然可以与大豆进行结瘤, NodVW 双组份调控系统作为备选途径,也可参与激活结瘤基因的转录^[17]。 NodV 和 NodW 的氨基酸顺序表明它们是属于双组份调控系统的蛋白,推测 *nodV* 基因的产物肯是感受子蛋白,与植物信号分子发生反应^[18-19]。而 *nodW* 基因的产物可能

是激活子蛋白,调控结瘤过程中的1个或几个基因^[20]。通过一系列磷酸化作用, NodVW 可激活 *nod* 基因的转录^[21]。本研究中,与快生型根瘤菌 HH03 相比较,虽然慢生型根瘤菌与大豆的结瘤固氮效果更佳,但将慢生型根瘤菌中 NodVW 双组份调控系统导入到快生型根瘤菌 HH03 中后,并没有增强其结瘤固氮能力,反而在一定程度上阻碍了快生型根瘤菌 HH03 中原有的结瘤固氮途径。根瘤菌与宿主植株的分子对话是非常复杂的生理、生化过程。一个有效固氮共生体系的形成必须有根瘤菌结瘤基因(*nod*、*nol* 和 *noe*) 和固氮基因(*nif*) 的参与。

4 结论

导入慢生型根瘤菌双组份调控系统 *nodVW* 基因后,抑制了快生型根瘤菌与大豆的共生固氮效果,使大豆植株的株高,鲜重显著降低,同时大豆根部有效结瘤数量和根瘤重量明显减少, *nodVW* 基因的导入阻碍了快生型根瘤菌的结瘤固氮途径,从而抑制了快生型根瘤菌与大豆结瘤。推测与慢生型根瘤菌中双组份调控系统 NodVW 阻遏了快生型根瘤菌的固氮代谢途径有关。而将 *nodVW* 基因导入快生型大豆根瘤菌 HH103 *nodD1* 突变株中,重组根瘤菌仍然无法与大豆进行结瘤固氮,表明慢生型根瘤菌双组份调控系统 NodVW 无法替代快生型根瘤菌的固氮系统发挥结瘤固氮作用。本研究对于慢生型根瘤菌共生代谢途径的研究提供了有益借鉴,对于慢生型根瘤菌双组份调控系统 NodVW 在根瘤菌共生固氮系统中的作用机制值得进一步深入研究。

参考文献

[1] 李欣欣, 许锐能, 廖红. 大豆共生固氮在农业减肥增效中的贡献及应用潜力[J]. 大豆科学, 2016, 35(4): 532-534. (Li X X, Xu R N, Liao H. Contributions of symbiotic nitrogen fixation in soybean to reducing fertilization while increasing efficiency in agriculture[J]. Soybean Science, 2016, 35(4): 532-534.)

[2] 蒲艳艳, 宫永超, 李娜娜, 等. 中国大豆种质资源遗传多样性研究进展[J]. 大豆科学, 2018, 3(37): 315-318. (Pu Y Y, Gong Y C, Li N N, et al. The progress in genetic diversity of the soybean germplasm in China[J]. Soybean Science, 2018, 3(37): 315-318.)

[3] 赵叶舟, 王浩铭, 汪自强. 豆科植物和根瘤菌在生态环境中的地位和作用[J]. 农业环境与发展, 2013, 30(4): 7-12. (Zhao Y Z, Wang H M, Wang Z Q. The role of leguminous plants and rhizobium in ecological environment[J]. Agro-Environment & Development, 2013, 30(4): 7-12.)

[4] Sachs J L, Russell J E, Hollowell A C. Evolutionary instability of symbiotic function in *Bradyrhizobium japonicum*[J]. PLoS One,

2011, 6(11): 2637-2640.

[5] Takakazu K, Nakamura Y, Sato S, et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110[J]. DNA Research, 2002, 9, 189-197.

[6] 缪礼鸿,周俊初. 费氏中华根瘤菌内源质粒的不相容性及其在质粒消除中的应[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 433-435. (Miao L H, Zhou J C. Incompatibility among indigenous plasmids of *Sinorhizobium fredii* strains and its application for plasmid curing [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(4): 433-435.)

[7] 张武,杨琳,王紫娟. 生物固氮的研究进展及发展趋势[J]. 云南农业大学学报, 2015, 30(5): 810-821. (Zhang W, Yang L, Wang Z J. Advance and development trend of biological nitrogen fixation research[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2015, 30(5): 810-821.)

[8] 陈文峰. 根瘤菌系统学研究进展与展望[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 1095-1100. (Chen W F. Progress and perspective of systematics of rhizobia[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 1095-1100.)

[9] 苗淑杰,刘晓冰. 大豆根瘤固氮的分子生理研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(2): 319-324. (Miao S J, Liu X B. Molecular physiology of nodulation and nitrogen fixation in soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(2): 319-324.)

[10] Lamrabet Y, Bellog A, Cubo T, et al. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans[J]. Molecular Plant-Microbe Interact, 2009, 12(3): 207-217.

[11] Chou M X, Wei X Y. Review of research advancements on the molecular basis and regulation of symbiotic nodulation of legumes [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2010, 34(7): 876-888.

[12] Michael U, Philip S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses [J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 4(18): 1560-1566.

[13] Loh J, Gary S. Feedback regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(6): 1357-1364.

[14] Göttfert M, Holzhauser D, Hennecke H. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110[J]. Molecular Plant Microbe Interact, 1992, 5(3): 257-265.

[15] Sachs J L, Russell J E, Hollowell A C. Evolutionary instability of symbiotic function in *Bradyrhizobium japonicum* [J]. PLoS One, 2011, 6(11): 2637-2640.

[16] Göttfert M, Grob P, Hennecke H. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(7): 2680-2684.

[17] Loh J, Garcia M, Stacey G. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* [J]. Journal of Bacteriol, 1997, 179(9): 3013-3020.

[18] Loh J, Dasharath P, Andersen B, et al. A two-component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes [J]. 2002, 184(6): 1759-1766.

[19] Takakazu K, Nakamura Y, Sato S, et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110[J]. DNA Research, 2002, 9(6), 189-197.

[20] Fisher R F, Long S R. Rhizobium-plant signal exchange[J]. Nature, 1992, 357(6380): 655-660.

[21] Huang Y. The strategies and application of bacterial gene mutation [J]. Microbiology Bulletin, 2007, 34(1): 169-172.

(上接第 853 页)

[16] Li R, Yu C, Lam T W, et al. SOAP2: An improved ultrafast tool for short read alignment [J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1966-1967.

[17] Barret J C, Fry B, Maller J, et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps [J]. Bioinformatics, 2005, 21(2): 263-265.

[18] The International Hap Map Consortium. A haplotype map of the human genome[J]. Nature, 2005, 437: 1299-1320.

[19] Tamara K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGAS: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.

[20] Saiton N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4: 406-425.

[21] Tamara K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(30): 11030-11035.

[22] Tamara K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGAS: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.

[23] Turlapati P V, Kim K W, Davin L B, et al. The laccase multi-gene family in *Arabidopsis thaliana* towards addressing the mystery of their gene function(s) [J]. Planta, 2011, 233(3): 439-70.

[24] Chang W, Han Y P, Hu H B, et al. Mining candidate genes for resistance to soybean cyst nematode based on meta-analysis and domains annotations [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(23): 4787-4795.

[25] Zhang S S, Li Y H, Li J Y, et al. Genetic dissection of elite line Zhongpin 03-5373 pedigree and identification of candidate markers related to resistance to soybean cyst nematode[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(10): 1746-1753.