

# 大豆种子 *Em* 基因(*LEA* 1)启动子的克隆与序列分析

刘国宝,郑易之

(深圳大学生命科学学院,深圳 518060)

**摘要** 根据已公布的大豆种子 *Em* 基因(*LEA*1)的 5' 末端序列设计二个基因特异反向引物(*Em*S1,*Em*S2)。以大豆基因组 DNA 为模版,利用染色体步行(Chromosome Walking)法,获得了 *Em* 基因起始密码子上游 836bp 的特异 DNA 片段。进行序列测定和生物信息学分析。结果表明,这段 DNA 序列为一尚未在基因数据库登录的 DNA 片段。该序列含有启动子的基本元件 TATA-box 和 CAAT-box,因此可能具有启动子活性。含有 1 个 DRE1 和 2 个 ABRE,该启动子可能受到 ABA 和干旱等条件的诱导。含有 1 个 AG-motif 和 1 个 ELRE-motif,该启动子可能参与创伤和诱导子等胁迫因素的应答。含有 2 个 RY-repeat 和 1 个 TGTCACA-Motif,该启动子片段可能具有种子特异性。结果表明,所克隆到的片段可能为基因 *Em* 的诱导型启动子,并且很可能是种子特异性启动子。

**关键词** 大豆;*Em* 基因;*LEA* 基因;诱导型启动子;染色体步行法

**中图分类号** S565.1,Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)04-0454-06

## CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF PROMOTER OF SEED *Em* GENE(*LEA*1) IN SOYBEAN

LIU Guo-bao,ZHENG Yi-zhi

(College of Life Sciences,Shenzhen University,Shenzhen 518060)

**Abstract** According to the sequence of soybean seed *Em* gene from Genebank,two reverse primer was designed and synthesized. A DNA fragment of 836bp upstream of the coding sequence of *Em* gene was amplified by chromosome walking with the genomic DNA of *Glycine max* as the template. Sequence analysis showed that the fragment was a novel DNA sequence. Using Bio-Informatics software,it was found the fragment contained the core elements of promoter including TA-TA-box and CAAT-box,so that it could be possibly the promoter sequence of *Em* gene. In addition,the fragment contained some putative cis-elements,such as a DRE1-motif,two ABRE-motifs,an AG-motif and an ELRE-motif etc, constituting the drought-/salt-induced promoter activity. Then,it is found that the fragment contained two RY-repeat motifs and a TGTCACA-Motif,indicating the potential seed-specific promoter activity. Based on above preliminary analysis,it is suggested that the fragment might be the promoter of *Em* gene with induced promoter activity and seed-specific promoter activity.

收稿日期:2007-02-12

基金项目:国家自然科学基金(30670180 和 30470107)项目资助

作者简介:刘国宝(1981-),男,硕士研究生,研究方向植物分子生物学;E-mail:liuguobao@sina.com.cn

通讯作者:郑易之教授,博士生导师。Tel:0755-26558941;E-mail:yzzheng@szu.edu.cn

**Key words** *Glycine max*; *Em* gene; *LEA* gene; Induced promoter; Chromosome walking

干旱、高盐胁迫是限制农业发展和破坏生态的重要环境因素。随着分子育种技术的成熟,获得抗旱耐盐转基因植物新品种,成为解决上述问题的关键。迄今为止,已经克隆到许多重要的抗旱耐盐相关基因<sup>[1~3]</sup>,如 *LEA* 蛋白(late embryogenesis abundant protein, 胚胎发育晚期丰富蛋白)基因、*BADH* 基因(植物甜菜合成酶基因)、*DREB* 基因(*Dehydration Responsive Element Binding*)等。并通过转化技术,证明了这些基因在转基因水稻和烟草中的抗逆生物学效应。

目前在转基因实验中广泛使用的是组成型启动子。如花椰菜花叶病毒的 CaMV35S 启动子可用于绝大多数转基因植物的转化。水稻 Actin 启动子多用于单子叶植物的转化。组成型启动子的驱动效率高,在双/单子叶植物的转化均可达到较为满意的效果。但在组成型启动子驱动下表达的异源蛋白,可在植物细胞内大量积累。这不仅可能造成对细胞的毒害,而且将消耗过多养分,抑制植物正常生长,甚至导致植物死亡<sup>[4]</sup>。近年来 Koli 等<sup>[5]</sup>发现 CaMV35S 启动子还是一个重组热区。此外,重复使用同一种启动子驱动两个以上的外源基因可能引起基因的沉默<sup>[6]</sup>。因此,在抗逆分子育种工作中,寻找更为有效的诱导型启动子及组织特异性启动子来替代组成型启动子,以胁迫诱导启动子驱动抗逆基因的表达,可使抗逆转基因植物更好地适应逆境,从而解决干旱农业问题。

Yamaguchi-Shinozaki 等<sup>[7]</sup>在拟南芥中报告了抗旱耐盐相关基因 *Rd29A* 的存在。并第一次发现了 *Rd29A* 基因上游的顺式作用元件 DRE(*Dehydration Responsive Element*)可受低温、干旱和高盐胁迫的诱导。*Rd29A* 基因启动子缺乏组织特异性。Li 等<sup>[8]</sup>将干旱应答元件 DRE 与保卫细胞元件 GCSE 相连,构建了一种新型启动子 DGP1。并进一步进行了 DGP1—报告基因 GUS 的活性分析。结果表明,报告基因 GUS 可被干旱胁迫特异性的诱导表达,并定位在植物保卫细胞中。显示出干旱诱导型启动子在农业生产实践中广阔的应用前景。

*LEA* 蛋白是一类具有抗旱耐盐功能的重要基因。它不仅可在发育晚期的种子中大量表达,也可受干旱、低温胁迫和脱落酸的诱导,在植物营养组织中表达<sup>[9]</sup>。Xu<sup>[10]</sup>将大麦 *HVA1* 基因(*LEA3*)转化

水稻,使转基因水稻的抗旱耐盐能力增强。根据 *LEA* 蛋白的表达模式和耐盐耐旱功能推测,*LEA* 蛋白基因的启动子可能多是受胁迫诱导的启动子。

近年来,本课题组从大豆未成熟种子中获得多个 *LEA* 基因。并将其中的 *Em* 基因(*LEA1*)转化烟草,证明了 *Em* 基因的导入可提高转基因烟草的耐盐性<sup>[11,12]</sup>。本实验利用染色体步行技术克隆了大豆 *Em* 基因的上游启动子序列,并对其顺式作用元件进行了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料和菌种 大豆(*Glycine max* L)白农 6 号种子由吉林省白城农业科学研究所提供。*E. coli* TOP10 为本实验室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Sau*3A、pMD18T—simple vector 克隆载体(TA 克隆载体)、ExTaq Premix、TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit 和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自 Takara 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 大豆基因组 DNA 的提取 摘取生长两周的大豆幼苗叶片。采用 CTAB 法提取叶片总 DNA。

1.2.2 大豆 *Em* 基因上游 DNA 序列的扩增 根据基因数据库公布的大豆 *Em* 基因的 mRNA 序列(AF004805),设计两条反向引物 EmS1(5'-CTT GCT TGT TTT GAC GAG ATG CCA TGT-3')和 EmS2(5'-AAC TTA GGA CGG TTA TTA TGC GAT TTG TAA-3)。引物由上海生物工程有限公司合成。

以大豆基因组 DNA 为模板,利用染色体步行法(TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit)扩增 *Em* 基因上游 DNA 序列。即先用内切酶 *Sau*3A I 对基因组 DNA 进行酶切。乙醇沉淀法回收 DNA。将回收的 DNA 与试剂盒中的 *Sau*3A I Cassette 连接。再以连接产物为模板,利用引物 EmS1 和试剂盒中的引物 C1 进行第一轮 PCR 反应。PCR 反应条件为:94℃,30 s;55℃,2 min;72℃,1 min。共 30 个循环。72℃,10 min。以 PCR 反应产物为模板,利用引物 EmS2 和试剂盒中的引物 C2 进行第二轮 PCR

反应。PCR 反应条件同上。

### 1.2.3 PCR 产物的回收、连接及重组质粒的鉴定

利用 Takara 公司的凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。将回收产物连接至 pMD18T-simple vector (Takara 公司)。将构建的重组载体转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞。经抗生素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素)筛选获得重组菌。采用碱裂解法从重组菌中提取质粒。将重组质粒命名为 pEm。

### 1.2.4 序列测定及其分析

重组质粒测序(上海生工生物有限公司)。将测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行 BLAST 比对。经 Softberry (<http://www.softberry.com>) 的 tssp (Prediction of start of transcription sequences) 分析。寻找 DNA 序列可能的转录起始位点和 TATA-box。在 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/database/>) 上进行对比。寻找其可能存在的顺式作用元件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *Em* 基因上游多核苷酸片段的扩增与克隆

参考在 Genbank 公布的大豆 *Em* 基因的 mRNA 序列,设计反向引物,以大豆基因组 DNA 为模板进行扩增。经琼脂糖电泳,得到了一条约 800bp 的特异性条带。将扩增片段回收后,连接到载体 pMD18-simple vector,转化大肠杆菌。

### 2.2 *Em* 基因上游多核苷酸片段的顺式元件分析

筛选出阳性重组子,测序。将测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 Blast 比对。结果表明,扩增产物长度为 794 个碱基。3' 端的 48 个碱基与已公布的大豆 *Em* 基因的 5' 非编码区(5'UTR)完全相同。由此可知,扩增所获得的多核苷酸序列是 *Em* 基因上游序列。而其余的 746 个碱基,未找到与之高度同源的序列。可以认为这是一尚未报道的新序列。

采用 Softberry (<http://www.Softberry.com>) 的 tssp 对 *Em* 基因翻译起始位点上游的多核苷酸片段进行分析。可能的转录起始位点在图 1 序列中的 +1 处标出。-33bp 处为 TATA-box。-104bp 处为 CAAT-box。这段 DNA 存在长度不等的 A/T 重复序列,A/T 总含量达到 66% 以上。Stalberg 等<sup>[13]</sup>认为,富含 AT 的区段大多是转录因子的结合部位,可调控下游基因的高效表达。本实验扩增出 *Em* 基因上游序列含 TATA-box 和

CAAT-box,且富含 AT。表明该 DNA 片段很可能具有启动子活性,初步认定其为大豆 *Em* 基因的启动子。

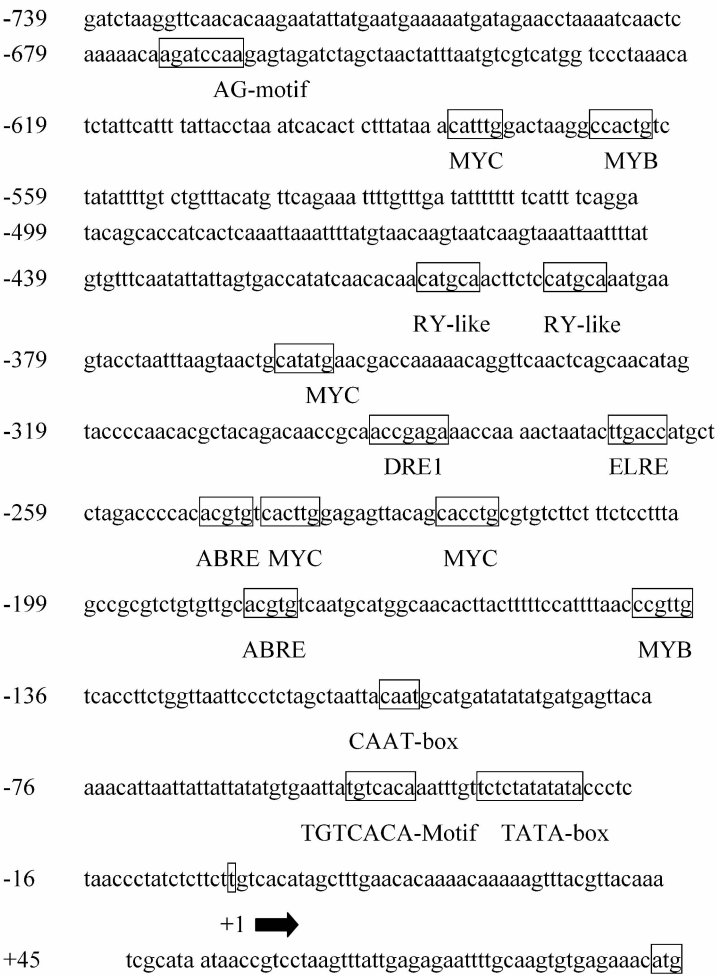
利用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/database/>) 对 *Em* 基因上游启动子序列进行对比,寻找可能存在的顺式作用元件。结果显示,在 *Em* 基因上游启动子序列中发现了 14 个基序(图 1)。将其分为三类:

#### 2.2.1 与干旱、高盐、低温等胁迫诱导相关的顺式作用元件

1 个 DRE1 基序、2 个 ABRE 基序、4 个 MYC 基序和 2 个 MYB 基序。

DRE1 和 ABRE 基序是与抗逆基因表达调控有关的两个顺式作用元件。其中 DRE1 核心序列为 ACCGAGA,最早在玉米(*Zea mays*) *rab17* 基因启动子发现。*rab17* 基因可受干旱胁迫和 ABA 的诱导表达。*rab17* 基因启动子中的 DRE1 元件,在植物胚胎发育过程中受到 ABA 的调节,而在植物营养组织中受干旱胁迫的调节<sup>[14]</sup>。ABRE 基序为 ACGTG,存在于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *erd1* 基因启动子中。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *erd1* 蛋白在干旱早期应答中起作用,并受到 ABA 的调控<sup>[15]</sup>。MYC 基序为 CANNTG,MYB 基序为 CC-NNTG,它们在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 的多个基因的启动子中都存在(如干旱应答基因 *rd22*)。

Yamaguchi<sup>[16]</sup>总结了 ABA 依赖型和非 ABA 依赖型途径的交叉网络模式,并阐述了 DRE 及 ABRE 在其中的作用。ABA 依赖型信号系统主要通过两种途径起作用:一是通过 ABRE 结合 bZIP 蛋白。二是通过 MYC 和 MYB 转录因子的合成,激活下游抗逆基因的表达<sup>[17]</sup>。在不依赖于 ABA 的途径中,胁迫信号通过传感蛋白传递到 DREB 转录因子。其后,这些转录因子特异性地结合于 DRE 反应元件,从而启动下游抗逆基因的表达<sup>[18]</sup>。ABA 依赖型和非 ABA 依赖型途径之间存在重叠和交叉,从而形成一个网络<sup>[16]</sup>。如,Yoshihiro<sup>[19]</sup>等研究了 Rd29A 启动子中 DRE 与 ABRE 之间的关系,证明了 DRE 对 ABRE 的协同作用。单独的 ABRE 不足以赋予启动子诱导性,需要形成 ABRE-complex 才能起作用。DREB 和 ABF (ABRE binding factor) 可以与多个抗逆基因上游启动子结合,实现对抗逆基因的驱动表达。Wang<sup>[20]</sup>和 Kang 等<sup>[21]</sup>分别将 DREB 基因和 ABF3 基因转化小麦和拟南芥,转基因植株的抗旱性都得到提高。



箭头所示为转录起始位点和方向

图 1 大豆 *Em* 基因上游启动子序列

Fig. 1 The promoter sequence of the *Em* gene The arrowhead indicates the transcriptional start site and orientation

在本文中,大豆 *Em* 基因的启动子中存在 ABRE、MYC 和 MYB 序列。推测大豆 *Em* 基因的表达可能受 ABA 依赖型信号系统的两种途径的调控。如 *Em* 基因的启动子中 ABRE—complex 的形成需要 ABRE 附近的 MYC 或 MYB 序列的参与。DRE1 核心序列的存在说明 *Em* 基因的表达也可能受到非 ABA 依赖型途径的调控,并且可能存在 ABA 依赖型和非 ABA 依赖型途径的交叉网络。

2.2.2 与植物保卫机制相关的基序,1 个 AG—motif 和 1 个 ELRE—motif。

Sugimoto<sup>[22]</sup> 在烟草 (*Nicotiana tabacum*) *Nt-Myb2* 基因启动子中发现了 AG—motif,其核心序列为 AGATCCAA。他认为 *NtMyb2* 蛋白可参与创伤和诱导子等胁迫应答基因的转录调控<sup>[22]</sup>。EL—RE 核心序列,是欧芹 (*Petroselinum crispum*) *PR1*

基因启动子中的诱导子应答元件 (EIRE, Elicitor Responsive Element) 的核心序列: TGTACC。WRKY 类转录因子通过结合 EIRE 元件将诱导子 (Elicitor) 的信号传导给 *PR1* 基因。在所有研究过的可能受 WRKY 蛋白调节的基因启动子中,WRKY 蛋白特异的 DNA 结合区,其中 TGAC 是核心,固定不变。由于大豆 *Em* 基因上游启动子序列中存在 AG—motif 和 ELRE—motif,表明 *Em* 基因的表达也存在着受创伤和诱导子等胁迫诱导的可能性。

2.2.3 在种子中特异性表达相关的基序,2 个 RY 重复序列和 1 个 TGTACA—Motif。

RY 重复序列为油菜 (*Brassica napus*) *napA* 基因启动子中的基序: CATGCA。RY 重复序列是种子特异性表达所必须的。该序列在单双子叶植物的

种子特异启动子中广泛存在,且以 RY 复合体(RY-complex)形式控制基因在种子中的特异性表达<sup>[24]</sup>。TGTCACA-Motif, TGTCACA-Motif 为种子中特异性表达的增强子,存在于甜瓜(*Cucumis melo*)*cucumisin* 基因的启动子中<sup>[25]</sup>。

在大豆 *Em* 基因的启动子中,2 个 RY 重复序列可能与其附近的 MYC 序列形成 RY-complex,控制基因在种子中特异性表达。而 TGTCACA-Motif 的存在可能提高 *Em* 基因在种子中的表达水平。

生物信息学分析结果表明,大豆 *Em* 基因的启动子中可能含有丰富的顺式作用元件。它们可能为种子特异性启动子,且具有干旱诱导型启动子的特性。*Em* 基因启动子中的 DRE、ABRE、EIRE 等顺式作用元件可能通过与多种转录因子相结合,指导 *Em* 蛋白的多样性和准确性表达。关于大豆 *Em* 基因的启动子活性和组织特异性需要下一步的实验来证明。

## 参 考 文 献

- [1] Babu R C, Zhang J, Blum A, et al. HVA1, a *LEA* gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection [J]. *Plant Science*, 2004, 166: 855—862.
- [2] 刘君, 韩烈保, 陈其军, 等. CMO 与 BADH 双基因表达载体构建及在烟草中的表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26: 5—9.
- [3] Gao S Q, Xu H J, Cheng X G, et al. Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress-inducible transcription factor GmDREB of soybean (*Glycine max*) [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50: 2617—2625.
- [4] Romero C, Belles J M, Vaya J L, et al. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants; pleiotropic phenotypes include drought tolerance [J]. *Planta*, 1997, 201: 293—297.
- [5] Koli A, Griffiths S, Palacios N, et al. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination[J]. *Plant Journal*, 1999, 17: 591—601.
- [6] Kumpatla S P, Chandrasekharan M B, Lyer L M, et al. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing[J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 3: 97—104.
- [7] Shinozaki K. A novel cis-acting elements in Arabidopsis Gene involved in responsiveness to drought, low-temperature, and high-salt stress[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 251—264.
- [8] Li J, Gong X M, Lin H Q, et al. DGP1, a drought-induced guard cell-specific promoter and its function analysis in tobacco plants[J]. *Science in China Ser. C Life Sciences*, 2005, 48: 181—186.
- [9] Dure L 3<sup>rd</sup>, Greenway S C, Galau G A. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination; changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and protein synthesis[J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 4162—4168.
- [10] Xu D P, Duan X L, Wang B Y, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. *Plant Physiology*, 1996, 110: 249—257.
- [11] Lan Y, Cai D, Zheng Y Z. Expression of three different group soybean *lea* genes enhanced stress tolerance in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47: 613—621.
- [12] 蔡丹, 郑易之, 兰英. 大豆 *LEA* 蛋白 *Em* 的表达可提高大肠杆菌和烟草耐盐性[J]. *深圳大学学报理工版*, 2006, 23: 230—235.
- [13] Stalberg K, Ellerstrom M, Ezcurra I, et al. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds[J]. *Planta*, 1996, 199: 515—519.
- [14] Kizis D, Pages M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway [J]. *Plant Journal*, 2002, 30: 679—689.
- [15] Simpson S D, Nakashima K, Narusaka Y, et al. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence [J]. *Plant Journal*, 2003, 33: 259—270.
- [16] Shinozaki K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10: 88—94.
- [17] Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 225—236.
- [18] Shinozaki K, Yamaguchi S K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3: 217—223.
- [19] Narusaka Y. Interaction between two cis-acting elements ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis *Rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses[J]. *Plant Journal*, 2003, 34: 137—148.
- [20] Wang J W, Yang F P, Chen X Q, et al. Induced expression of DREB transcriptional factor and study on its physiological effects of drought tolerance in transgenic wheat[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33: 468—476.
- [21] Kang J, Choi H, Im M, et al. Arabidopsis basic leucine zipper

proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 343—357.

- [22] Sugimoto K, Takeda S, Hirochika H. Transcriptional activation mediated by binding of a plant GATA-type zinc finger protein AGP1 to the AG-motif (AGATCCAA) of the wound-inducible *Myb* gene *NtMyb2* [J]. *Plant Journal*, 2003, 36: 550—564.
- [23] Rushton P J, Torres J T, Parniske M, et al. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes [J]. *Journal of European Molecular Biology Organization*, 1996, 15: 5690—5700.
- [24] Ezcurra I, Ellerstrom M, Wycliffe P, et al. Interaction between composite elements in the *napA* promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 699—709.
- [25] [25] Yamagata H, Yonesu K, Hirata A, et al. TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the cucumis gene [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 11582—11590.
- 
- (上接 453 页)
- [14] 卫波, 景蕊莲, 王成社, 等. 用等位基因特异 PCR 检测普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的单核苷酸多态性 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(7): 1313—1320.
- [15] Chiapparino E, Lee D, Donini P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR [J]. *Genome*, 2004, 47: 414—420.
- [16] 管峰, 艾君涛, 杨利国. 一种 SNP 检测新方法: 四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术 [J]. *生命的化学*, 2004, 24(6): 514—516.
- [17] 黄代新, 杨庆恩, 赵贵森. 片段长度差异等位基因特异性 PCR——一种改良的 SNP 分型新方法 [J]. *法医学杂志*, 2005, 21(1): 11—14.
- [18] 彭翠英, 胡卫民, 周翠兰, 等. 单核苷酸多态性敏感分子开关在基因组单核苷酸多态性检测中的特异性分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 279—281.
- [19] 汪维鹏, 倪坤仪, 周国华. 一种基于适配器连接介导的等位基因特异性扩增法测定多重 SNP [J]. *遗传*, 2006, 28(2): 219—226.
- [20] Van K, Hwang E Y, Kim M Y, et al. Discovery of SNPs in soybean genotypes frequently used as the parents of mapping populations in the United States and Korea [J]. *J of Heredity*, 2005, 96(5): 529—535.
- [21] Kim M Y, Ha B K, Jun T H, et al. Single nucleotide polymorphism discovery and linkage mapping of lipoxygenase-2 gene (*Lx<sub>2</sub>*) in soybean [J]. *Euphytica*, 2004, 135: 169—177.
- [22] Jang S Y, Van K, Kim M Y, et al. SNP discovery and mapping of a major gene *Rhg4* conferring resistance to soybean cyst nematode [J]. *Korean J Breed*, 2004, 36(2): 76—80.
- [23] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟. 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取 [J]. *大豆科学*, 2003, 22, (1): 73—74.
- [24] 关荣霞, 刘秀敏, 常汝镇, 等. 辽宁新宾县原位保护区野生大豆 (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) 遗传多样性分析 [J]. *高技术通讯*, 2006, 6(1): 67—72.
- [25] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素 [J]. *遗传*, 2003, 25(1): 65—68.
- [26] 颜志强, 杨胜利, 龚毅. PCR 及其衍生技术在基因突变检测中的应用 [J]. *遗传*, 2003, 25(2): 198—200.