

抑制差减杂交技术在大豆研究中的应用

李 亮, 侯文胜

(中国农业科学院 作物科学研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 100081 北京)

摘 要:作为一种高效分离差异表达基因的方法,抑制差减杂交(SSH)技术已被广泛应用于医学研究领域,其低假阳性、高灵敏度和高效性的优点,在植物研究领域中也越来越受到重视。虽然抑制差减杂交技术在大豆研究中的应用起步较晚,但近年来相关研究呈现增加的趋势,研究领域涉及到大豆花叶病毒病、大豆疫霉病、大豆光温互作和逆境胁迫等方面。该文介绍了抑制差减杂交技术的原理、特点和进一步改良的方向,并综述了该技术在大豆研究中的应用。

关键词:抑制差减杂交;差异表达;大豆

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0702-05

Application of Suppression Subtractive Hybridization in Soybean Research

LI Liang, HOU Wen-sheng

(National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement(NFCRI), Institute of Crop Sciences, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Suppression subtractive hybridization (SSH), which has been widely used in medical research, is an effective approach to identify genes that vary in expression levels, SSH was also applied in plant research widely because of its low false positives, high sensibility and high efficiency. In recent years, SSH was used in soybean researches relating to soybean mosaic virus, phytophthora, photoperiodism, abiotic stresses, etc. In this review, the principle, characteristics, improvement of SSH and the application of SSH was introduced and summarized in soybean researches.

Key words: Suppression subtractive hybridization (SSH); Differential expression; Soybean

许多基因的表达都具有时间、空间及表达量上的差别,这些差别在生物体的生命活动中起着重要的调节作用,基因表达的变化是调控细胞生命活动过程的核心机制之一^[1]。高等生物生长发育过程中有大约1.5万个基因存在差异表达^[2]。通过分析基因表达情况的变化和差异,可以更好地了解动植物生命活动过程不同生命现象、生理反应的机制,并为进一步克隆重要功能基因奠定基础。

利用基因表达的差别克隆基因的技术称为差异显示技术,目前已经发展出了多种差异显示技术。研究基因差异表达的最早期技术是Liang等^[2]在1992年建立的mRNA差异显示技术(DDRT-PCR)。该技术简便、灵敏、RNA用量少,并可对多种状态细胞内的mRNA样品同时进行比较,在植物胚胎发育、形态发生、信号传导和植物逆境胁迫相关基因的比较分析和克隆研究中发挥了一定的作用。但该技术存在假阳性高、凝胶中单条带可能由一种以上cDNA片段构成、所获得的cDNA可能仅

代表3'-端的非翻译序列、扩增产物受mRNA丰度限制较大等缺点和不足,目前已很少应用。Hubank等^[3]于1994年建立的mRNA差别显示反转录PCR技术(cDNA-RDA)则是一种比较完善的差异表达分析技术,它兼具了RDA和cDNA差减杂交法的优点,并在一定程度上降低了假阳性率、减小了扩增产物对mRNA丰度的依赖性、可在多组样品中进行比对和检测基因的上调、下调表达。但该方法仍然存在一些明显的不足:利用该技术不易检出低丰度的差异基因,而低丰度差异基因中常含有相对重要的基因;利用该方法常得到一些与目的性状无关的基因,导致后续的鉴定工作量加大;该方法对检测样品和对照样品的纯度要求很高,两组材料之间的差异越大,利用此方法鉴定差别表达基因的难度也就越大。

在DDRT-PCR和cDNA-RDA的基础上,Diatchenko等^[4]在1996年建立的抑制差减杂交(SSH)技术,则是目前最为完善的差异显示技术,以该技术

收稿日期:2010-03-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771358)。

第一作者简介:李亮(1984-),男,在读硕士,研究方向为大豆基因克隆和功能验证。E-mail: dongming116@163.com。

通讯作者:侯文胜,研究员。E-mail: houwsh@caas.net.cn。

为基础改良优化形成的衍生技术,已成为当前基因差异表达研究中的重要技术手段。SSH 通过 2 次特异性杂交和 2 次 PCR 特异性扩增,使得假阳性率大大降低,特异性更高、操作更简便、研究周期更短,目的序列富集程度较高,且丰度相对一致,最大限度的弥补了上述 2 种技术的不足。该技术自问世以来,已在肿瘤发生发展、机体重要细胞发育分化等医学研究领域取得了重要成果,在植物研究中的应用也越来越多,在植物器官发育、形态发生、信号传导和逆境胁迫反应等研究领域取得了重要进展。

作为重要的经济作物,大豆的基础研究越来越受到重视,其基因组测序工作已基本完成,为深入研究其基因构成和表达特点提供了更为坚实的基础,各种先进的实验技术也将在研究中得到广泛的利用。作为目前基因差异表达研究和基因克隆有效的手段之一,SSH 技术在大豆中的应用也日趋广泛,并在抗病虫、非生物逆境胁迫和生长发育等研究中取得了一定进展,显示出了广阔的应用前景。

1 SSH 的基本流程和原理

SSH 技术是依据抑制 PCR 和差减杂交原理建立起来的,其基本流程是:首先,从 2 种要比较的材料(Tester 与 Driver)中提取 mRNA,并分别反转录为 TcDNA 和 DcDNA,利用限制性内切酶把它们酶切成具有平末端的小片段,将酶切后的 TcDNA 等分为 2 份,分别加上接头 1 和接头 2。然后,用过量的 DcDNA 与连有不同接头的 2 种 T 样品分别杂交,完成第 1 轮不完全杂交,每一杂交体系中均产生 4 种类型分子。其中大多数形成异源杂交分子,少部分自我复性形成同源杂交分子。对于 TcDNA 中特有的序列(目的序列)则只能以自我变性形成的同源杂交分子或单链形式存在分子群体中。根据分子杂交的二级动力学原理,经过第 1 轮杂交,原本存在丰度差异的 cDNA 含量趋于一致,并富集了 TcDNA 中差异表达的基因。接下来合并上述得到的 2 份杂交产物,再加入新的 DcDNA 进行第 2 轮杂交,将产生 5 种类型的分子。以同源杂交分子或单链形式存在的片段在第 1 次不完全杂交时不能正常配对,而在第 2 次杂交时能自我配对,形成具有 2 种接头的双链 cDNA 片段,它们正是差异表达的目的片段。补平接头的分子粘性末端,根据两端的接头外侧序列设计引物进行 PCR 扩增,富集这种双链分子。以第 1 次 PCR 扩增的 cDNA 产物为模板,进行第 2 次巢式 PCR 扩增,引物为与接头内侧序列互补的 1 对片段,这进一步降低了背景、富集了差异表达 cDNAs。2 次扩增的 PCR 产物既可直接用于

构建抑制差减 cDNA 文库,又能被标记成杂交探针进行文库差示筛选。

2 SSH 的特点

和传统 cDNA 差减杂交,DD-PCR 和 RDA 等传统的差异显示技术相比,SSH 技术具有自己独特的优点。首先,它具有高效性和灵敏性。该技术在反应中将 cDNA 进行 RsaI 等酶消化处理,生成多个片段,并均一化丰度不同单链分子的含量和富集目的片段,保证能够检测出低丰度 mRNA。在一次 SSH 反应中,数百个差异表达的基因能同时被检测出来,极大的提高了检测效率^[5],在基因克隆方面优于 DDRT-PCR 和 cDNA-RDA^[6],并且 Tester 和 Driver 之间的表达差异越大,获得目的基因的可能性也就越大^[7]。其次,SSH 假阳性率较低。它利用 2 次特异性杂交和 2 次特异性 PCR,保证了差异表达的 cDNA 片段具有较高的特异性,从而使假阳性率大大降低,SSH 在检测 2 种胰腺肿瘤细胞差异表达基因时,阳性率可高达 94%^[6]。另外,SSH 需要的样品较少[1-2 μg poly(A) + RNA],并且整个过程操作简单快速、背景低、重复性高;而传统的差减技术需要超过 20 μg 的 poly(A) + RNA,并且步骤繁琐,耗时费力。

3 SSH 的改良和应用

3.1 SSH 的不足

随着应用范围和深度的不断拓展,SSH 技术也表现出一些不足和局限性,主要包括:(1)虽然所需材料的起始量只有 1~2 μg poly(A) + RNA,但对于一些稀有材料而言还是很大,应用此方法还是存在一些困难;(2)差减库中 cDNA 经过酶切后,不再是全长 cDNA,不能直接得到全长的目的基因,只有通过从全长 cDNA 文库中筛选目的基因全长,或者利用 RACE 等技术获得目标 EST 的全长;(3)SSH 不能同时进行数种平行材料之间的比较,一般只能有 2 种材料,材料之间的许多小差异不能被检测出来等。

3.2 SSH 的改良

为了克服 SSH 存在的不足和局限性,更充分的发挥其优势。科研人员利用分子生物学实验新技术、生物信息学技术和基因组序列新知识等,对 SSH 技术及其数据分析方法进行了有针对性的改良和完善,并在以下方面取得了进展。

在解决一些稀有材料 RNA 起始量不足的问题上,分子生物学实验新技术发挥了重要作用。如先运

用 SMART-PCR 从微量的 RNA 中扩增得到 cDNA 片段,再利用 SSH-PCR 扩增富集目的转录本,接下来利用这些片段构成抑制差减文库或制成探针进行筛选差减 cDNA、全长 cDNA 和基因组 DNA 文库的方法,实现了 SSH 和 SMART-PCR 的有机结合,形成了一种更高效、更灵敏、更易操作的技术,并在 RNA 较难获得的超纯血细胞中获得了成功应用^[7]。将第一次正向抑制差减杂交产物更换新接头后作为 Tester,把第一次反向抑制差减杂交产物更换新接头后作为 Driver,再进行一次抑制差减杂交的循环,形成的双差减杂交技术,进一步提高了抑制差减杂交效率,并在 DNA 很难分离的细菌性植物病原体中获得了高纯度样品,进行了基因表达差异分析^[8]。

为了进一步降低 SSH 技术的背景、提高阳性率、更好地分析基因表达差异和克隆基因,Li 等^[9]在微分差减链(DSC)的基础上,通过重新设计接头获取阴性差减链(NSC),发展出一种新的 SSH/NSC 技术,大大降低了背景、提高了阳性率,实现了高等复杂真核细胞中差异表达基因的高效分离。SSH 技术与 DNA 芯片技术的结合则更为普遍,不但实现了特异 DNA 探针的高效获取和鉴别^[10],而且可以更快、更准确的分析和克隆特定条件下差异表达的基因^[11]。同样,SSH 技术与 AFLP、dot blot、northern blot 和 Cluster 分析等方法的结合使用,也大大提高了特定条件下植物转录组变化的分析和检测效率。

3.3 SSH 在植物中的应用

SSH 技术在医学和动物研究领域已发挥了重要作用,特别是在药物靶向基因的分离、人类癌症等疾病研究中成果显著^[12-13]。近年来,SSH 技术在植物差异表达基因分析和克隆研究中的应用也越来越多,已涉及水稻^[14]、小麦^[15]、菜豆^[16]、苜蓿^[17]、牡丹^[18]、碱蓬^[19]等多种植物。

Laurence 等^[20]以苜蓿与草木犀共生的不同生长阶段为研究对象,利用 SSH 技术建立了 7 个差减文库,系统分析了共生早期基因的表达情况。Jong-Sug 等^[21]通过构建莴苣不同颜色叶片的抑制差减文库,分析了红色莴苣和绿色莴苣叶片中的基因表达差异。这类研究为阐明植物生长变化、形态差异等的基因表达基础提供了证据。

Anna 等^[22]利用 SSH 技术,在马铃薯受 *Phytophthora infestans* 侵染过程中发现了一个新的无蛋白编码的特异基因家族,并通过表达研究明确了该家族基因可能与马铃薯抗病相关。Haiguang 等^[23]利用 SSH 与 cDNA 微阵列相结合,比较分析了水稻在不同水压力下基因的表达差异,从而进一步揭示了水稻对生长环境水压力适应性的分子机理。这

类研究为解析植物抗病性、生态适应性等的分子机理提供了证据。

利用 SSH 技术,Kede 等^[24]从辣椒中分离得到一条新 GH3-like 基因,并证明该基因是植物生长激素和果实成熟乙烯调控中的一种重要因子,可能是植物生长激素和乙烯调控过程中信号传导的交叉点。Dietmar 等^[25]在甜菜中分离克隆了甜菜碱基因启动子,该启动子的表达可以调控叶片中抗病基因,从而改善植物对叶疾病的抗性。Bahn 等^[26]从大麦中克隆了依赖于 ABA 调节的低温诱导表达基因 *LTI2*。Dong 等^[27]在圣柳中筛选得到了一条与植物水通道蛋白高度相关的 cDNA 并获得了该基因的全长序列,它具有质膜内嵌蛋白的保守序列,并与拟南芥的 MIP-C 有 95% 的同源性。这类研究不但为明确植物耐逆性机理等提供了新的视角,而且为克隆有重要应用价值的基因奠定了基础。

4 SSH 在大豆中的应用

尽管目前 SSH 技术在大豆研究中的应用还相对较少,但在大豆抗病虫害性、光温互作特性、逆境胁迫反应等方面也取得了一定的进展,在大豆耐逆性研究中显现出广阔的应用前景。

4.1 SSH 在大豆抗病虫害研究中的应用

抗病虫害是培育大豆新品种的重要目标性状,也是大豆基因研究的重要领域。水稻、玉米、棉花、小麦等其它重要作物的抗病虫害研究相对比较深入,通过生物工程手段已获得了一些抗病虫害材料,利用 Bt 基因获得的转基因棉花、玉米已经实现了大面积商业化种植。在大豆中,该领域的研究则较少,大豆重要病虫害的胁迫机制目前尚不清楚。对大豆在病虫害胁迫下基因差异表达的分析研究,有利于更好的了解大豆抗病虫害的分子机理。SSH 因其技术特点和优势,非常适合探讨这方面的问题,近年来也在大豆病虫害胁迫条件下特异基因表达差异和分离研究中得到了较好的应用。

为了分析大豆抗锈病基因的表达模式,Choi 等^[28]构建了大豆锈病相关的抑制差减文库,利用微阵列分析了正向和反向文库中 1728 个差异表达的克隆,并对获得的相关基因进行了功能推导、注释和分类,发现一些可能在大豆抗锈病过程中发挥重要作用的基因。Wang 等^[29]通过构建抑制差减文库,分析了不同毒性大豆疫霉菌侵染大豆早期的基因表达差异,探讨了不同毒性大豆疫霉菌致病力差异的分子机制。Bingli 等^[30]则通过构建大豆胞囊线虫食道腺分泌蛋白基因抑制差减文库,获得了 21 个可能与大豆胞囊线虫病相关的基因,从病原菌角

度入手,为大豆相关抗性基因的发掘提供了新思路。张淑珍等^[31]利用疫霉菌诱导的大豆抗病品种绥农 10,构建抑制差减文库,分析研究了大豆对疫霉根腐病抗性的基因表达特点。Zeng 等^[32]采用 SSH 技术,从野生大豆中筛选到了一个在疫霉菌感染早期上调表达的 cDNA 片段,并进一步克隆了该基因的全长,该基因编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶,被命名为 *PsGAPDH*,在大豆抗病育种中具有一定的应用前景。

4.2 SSH 在大豆非生物压力相关研究中的应用

干旱、涝害、盐碱、冷害和热害等非生物逆境,是抑制大豆生长,影响大豆品质、产量的重要因素。全面了解和揭示大豆对非生物压力胁迫反应的分子机制,不但对阐明大豆对胁迫的应答反应机理、获得相关基因信息具有重要意义,而且对进一步克隆重要基因、指导抗性品种的培育具有重要价值。SSH 在植物非生物逆境胁迫研究中应用最为广泛,在大豆中也取得了较大进展。

Mathilde 等^[33]为了解析干旱胁迫影响大豆固氮能力的分子基础,利用缺水 5 d 和正常生长的大豆植株根瘤为材料,构建抑制差减文库,筛选分析获得了 56 个在干旱条件下上调表达的 EST 序列;其中的铁蛋白和金属硫相关基因,可能与大豆根瘤抗旱密切相关。Hong 等^[34]利用 SSH 技术,从盐诱导的大豆植株中分离到的磷酸酯酶基因 *GmPAP3*,在大豆叶片和根中受盐、氧化压力等诱导表达,可能通过参与活性氧(ROS)的合成、清除,或者通过参与盐胁迫反应信号的传导调控大豆耐盐性。Chang-Woo 等^[35]以低温处理 3、6、12、24、48 h 后的大豆叶片混合样品为 Tester,未经处理的叶片作 Driver,构建抑制差减文库,分离得到了 1 个与大豆耐盐性相关的天冬酰胺酶(*L-Asparaginase*)基因,该基因受 ABA、低温和氯化钠诱导表达,但对热高温和干旱胁迫反应钝感。Kee-Young^[36]等则采用低温诱导,从大豆中分离到了 3 个核糖体蛋白基因 *GmRPS13*、*GmRPS6* 和 *GmRPS37*。这些研究和重要基因的克隆,进一步加深了对大豆耐逆性的理解,并为改良大豆品种耐逆性提供新的标记和基因。

4.3 SSH 在大豆生长发育研究中的应用

大豆生长发育各阶段的分子机制十分复杂,目前由于受技术、材料的限制,获得的信息还非常有限,高效、灵敏的 SSH 技术为该领域研究提供了一种有效的手段,特别是在种子形成、光周期反应等研究中已发挥了重要作用。

为了获得大豆种子发育过程中可靠的遗传信息,Vadim 等^[37]以大豆开花后 7 d 和 21 d 的种子为

材料,构建抑制差减文库,分析了大豆种子形成过程中不同发育发展阶段基因表达的差异,同时引入 Mirror Orientation Selection (MOS) 技术进一步的降低假阳性率,为阐明大豆种子发育的分子基础提供了依据。Wen-Hui 等^[38]以高油和低油 2 个大豆品种为材料,利用 SSH 技术分析了其开花后 22 d 和 43 d 2 个成熟阶段之间的基因表达差异,发现了一些种子特异性表达基因,这些基因随着种子不断发育表达量发生变化,且与种子油份含量的变化密切相关,它们可能与种子中的油脂合成相关。为了在细胞分子水平上研究光周期诱导开花、衰老过程中基因转录物丰度的变化,探索大豆叶片感受日长变化诱导开花、衰老的复杂机制,Zhao 等^[39]以光周期敏感大豆品种的叶片为材料,构建了短日照诱导的抑制差减文库,筛选到了一些差异表达基因,并利用 RACE 技术克隆了 *GmRAV* 基因的全长。在大豆叶片中,*GmRAV* 基因受 ABA 诱导上调表达,受 BR 诱导下调表达,短日照可以增加其表达量,并在转基因烟草中过量表达该基因,可对植株形态和光和反应特征产生不良的影响,表明该基因可能是大豆光周期反应过程中的一个负调控因子^[40]。

5 展望

抑制差减杂交(SSH)技术自问世以来,已在动植物研究中取得了明显的进展,相关研究成果不断涌现、技术水平日趋提升,在生理反应机理、重要基因克隆、基因功能解析、基因诊断等领域发挥了重要的作用。也在加深对大豆抗病虫、耐逆、生长发育等特性的理解中显现出广阔的应用前景。虽然 SSH 技术还存在着一些缺点,但在大量的应用实践中,该技术不断得到了改良和完善,进一步提高了阳性率、增强了扑捉低含量 mRNA 的能力,同时操作也更加简单快捷。近年来,随着生物信息学的发展和基因组测序研究的深入,GenBank、EMBL、DD-BJ、dbEST、GSDB 等核酸数据库和 RIR、SWISS-PROT、TrEMBL、NRL-3D 等蛋白质数据库日益丰富,BLAST、Cn3D、Splign、Phylip 软件包等比对分析工具日趋完善,BioMak、SAMS 等新型分析软件不断推出^[41],实现了 EST 序列的批量自动化分析注释,使得原来繁杂的分析工作也变得越来越简捷高效,大大提高了 SSH 技术的分析效率和可靠性。虽然目前 SSH 技术在大豆研究中的应用还相对较少,但随着大豆基因组测序工作的完成和该技术的日臻完善,必将被大豆科研工作者们不断认识和应用,推进大豆相关研究的深入。

参考文献

- [1] 吴乃虎. 基因工程原理[M] (第二版). 北京: 科学出版社, 2000:356-364. (Wu N H. Principle of gene engineering[M]. Beijing: Science Press, 2000: 356-364.)
- [2] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257: 967-971.
- [3] Hubank M, Schatz D G. Identifying difference in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(25):5640-5648.
- [4] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries[J]. Proceedings of the National Academy Sciences, USA, 1996, 93 (12):6025-6030.
- [5] Bahn S C, Bae M S, Park Y B, et al. Molecular cloning and characterization of a novel low temperature-induced gene, bti2, from barley[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1522 (2): 134-137.
- [6] Von S O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(13):2598-2602.
- [7] Bugert P, Status I, Availability L. DNA and RNA profiling in human blood: methods and protocols[M]. Humana Press, 2009:496.
- [8] Agnès C, Guillaume A, Xavier F. Stolbur Phytoplasma genome survey achieved using a suppression subtractive hybridization approach with high specificity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5):3274-3283.
- [9] Li L, Techel D, Gretz N, et al. A novel transcriptome subtraction method for the detection of differentially expressed genes in highly complex eukaryotes [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33 (16):136.
- [10] Xu B Y, Su W, Liu J H, et al. Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray[J]. Planta, 2007, 226:529-539.
- [11] Ouyang B, Ting Y, Hanxia L, et al. Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(3):507-520.
- [12] Xinkang W, Giro Z F. Suppression subtractive hybridization: application in the discovery of novel pharmacological targets[J]. Pharmacogenomics, 2000, 1(1):101-108.
- [13] Dong X Y, Pang X W, Yu S T, et al. Identification of genes differentially expressed in human hepatocellular carcinoma by a modified suppression subtractive hybridization method[J]. International Journal of Cancer, 2004, 112(2):239-248.
- [14] Wang X, Wu P, Xia M, et al. Identification of genes enriched in rice roots of the local nitrate treatment and their expression patterns in split-root treatment[J]. Gene, 2002, 297(1-2):93-102.
- [15] Jin Y F, Bian T F. Isolation and partial characterization of a novel pollen-specific cDNA with multiple polyadenylation sites from wheat[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2004, 36(7): 467-476.
- [16] Jiang T, Perumal V, Hong L, et al. Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Planta, 2007, 227:151-165.
- [17] Sophie B, Laure V, Eric L, et al. A gene encoding a protein with a proline-rich domain (MtPPRD1), revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH), is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(413):825-832.
- [18] Huang X, Zheng G S, Dai S L, et al. Identification of differentially expressed genes associated with bud dormancy release in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) by suppression subtractive hybridization[J]. Frontiers of Forestry in China, 2008, 10(2):88-94.
- [19] Binod B S, Birendra P S. Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9:69.
- [20] Laurence G, Andreas N, Fabienne M, et al. Identification of new potential regulators of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis using a Large-scale suppression subtractive hybridization approach [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(3):321-332.
- [21] Jong-Sug P, Myoung-Gun C, Jung-Bong K, et al. Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves[J]. Plant Cell Report, 2007, 26:507-516.
- [22] Anna O A, Stephen C W, Leighton P, et al. A novel non-protein-coding infection-specific gene family is clustered throughout the genome of *Phytophthora infestans*[J]. Microbiology, 2007, 153: 747-759.
- [23] Wang H G, Zhang H L, Gao F H, et al. Comparison of gene expression between upland and lowland rice cultivars under water stress using cDNA microarray[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115:1109-1126.
- [24] Kede L, Byoung-Cheorl K, Jiang H, et al. A GH3-like gene, CeGH3, isolated from *Capsicum chinense* L. fruit is regulated by auxin and ethylene[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58:447-464.
- [25] Dietmar J S, Dorothee U K, Reinhard H. A sugar beet chlorophyll a/b binding protein promoter void of G-box like elements confers strong and leaf specific reporter gene expression in transgenic sugar beet[J]. BMC Biotechnology, 2004, 4:31.
- [26] Bahn S C, Bae M S, Park Y B, et al. Molecular cloning and characterization of a novel low temperature-induced gene, bti2, from barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1522(2):134-137.
- [27] Dong Y Z, Yang C P, Zhang D Y, et al. Cloning and sequence analysis of gene encoding plasma aquaporin of *Tamarix albiflorum* [J]. Frontiers of Forestry in China, 2007, 2(2):217-221.
- [28] Choi J J, Alkharouf N W, Schneider K T, et al. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases[J]. Functional Integrative Genomics, 2008, 8:341-359.

- [7] 于伟,李磊,李智,等.大豆质核互作不育系杂交种制种技术研究 I.不育系繁种技术研究[J].中国油料作物学报,2001,23(2):11-13. (Yu W, Li L, Li Z, et al. Studies on hybrid seed production of cytoplasmic male sterile lines in soybean I. Seed production of male sterile lines[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2001,23(2):11-13.)
- [8] Erickson E H. Soybean pollination and honey production a research progress report[J]. American Bee Journal, 1984, 124(1):775-779.
- [9] Erickson E H. The soybean for bees and beekeeping[J]. Apiacta, 1983, XVIII:1-7.
- [10] Severson D W, Erickson E H. Quantitative and qualitative variation in floral nectar of soybean cultivars in southeastern Missouri [J]. Environmental Entomology, 1984,13:1091-1096.
- [11] Erickson E H. Variability of floral characteristics influences honey bee visitation to soybean blossoms[J]. Crop Science, 1976, 15:767-771.
- [12] Erickson E H. Soybean pollination and honey production; A research progress report[J]. American Bee Journal,1984,14:775-779.
- [13] Erickson E H. Soybean floral ecology and insect pollination [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1984,11:152-162.
- [14] Elbert R J. Ecological relationships between honey bees and soybeans[J]. American Bee Journal,1970,8:306-307.
- [15] Robert I A, Edwards C R, Harris T. Yield and cross-pollination of soybeans as affected by honey bees and alfalfa leafcutting bees [J]. American Bee Journal,1978,8:555-558.
- [16] Richard W R, Charles E M, Eric H E. Wild bees on soybeans [J]. Environmental Entomology, 1980,9:230-232.
- [17] 李建平,李茂海,杨桂华,等.大豆不育系传粉昆虫及传粉技术研究[J].吉林农业科学,2002,27(增刊):4-6. (Li J P, Li M H, Yang G H, et al. Study of pollinating insects and pollinating technical of soybean male sterile plants[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2002,27 (Supplement):4-6.)
- [18] Koelling P D, Kenworthy W J, Caron D M. Pollination of male-sterile soybean in caged plots[J]. Crop Science, 1981, 21:559-551.
- [19] 赵丽梅,孙寰,马春森,等.大豆昆虫传粉研究初讨[J].大豆科学,1999,18(1):73-76. (Zhao L M, Sun H, Ma C S, et al. Preliminary study of soybean pollination by bees [J]. Soybean Science, 1999, 18(1):73-76.)
- [20] 王跃强,王曙明,赵丽梅,等.杂交大豆昆虫传粉及制种技术研究进展[J].吉林农业科学 2008,33(3):5-8. (Wang Y Q, Wang S M, Zhao L M, et al. Progress in studies of insect pollinators and seed producing techniques of soybean hybrids [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2008,33(3):5-8.)
- [21] Currie R W, Winston M L, Slessor K N. Effect of synthetic queen mandibular pheromone sprays on honeybees (*Hymenoptera: Apidae*) pollination of berry crops [J]. Journal of Economic Entomology, 1992; 85:1300-1306.
- [22] Sheppard W S, Jaycox E R, Parise S G. Selection and management of honeybees for pollination of soybeans [R]. Proc. IVth International Symp. On Pollination, Maryland Agr. Expt. Sta. Spec. Misc. Publ. 1, 1979:123-130.
- (上接第 706 页)
- [29] Wang Z Y, Wang Y C, Chen X R, et al. Differential screening reveals genes differentially expressed in low-and high-virulence near-isogenic *Phytophthora sojae* lines [J]. Fungal Genetics and Biology, 2006, 43:826-83.
- [30] Gao B L, Allen R, Maier T, et al. Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14 (10):1247-1254.
- [31] 张淑珍,徐鹏飞,吴俊江,等.大豆疫霉根腐病菌诱导下 SSH 文库构建及初步分析[J].大豆科学,2008,27(3):543-545. (Zhang S Z, Xu P F, Wu J J, et al. Construction and analysis of a SSH library of soybean upon infection with *Phytophthora sojae* [J]. Soybean Science, 2008, 27(3):543-545.)
- [32] Zeng J, Wang Y C, Shen G, et al. A *Phytophthora sojae* gene of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) induced in host infection and its anti-oxidative function in yeast[J]. Chinese Science Bulletin, 2006, 51(11):1316-1323.
- [33] Mathilde C, Annie L, Didier H, et al. Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules [J]. Gene, 2008, 426:5-22.
- [34] Liao H, Wong F L, Phang T H, et al. GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency[J]. Gene, 2003, 318:103-111.
- [35] Cho C, Lee H, Chung E, et al. Molecular characterization of the soybean L-asparaginase gene induced by low temperature stress [J]. Molecules and Cells, 2007, 23(3):280-286.
- [36] Kim K Y, Park S W, Chung Y S, et al. Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean [J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55:1153-1155.
- [37] Beilinson V, Moskalenko O V, Ritchie R D, et al. Differentially expressed genes during seed development in soybean [J]. Physiologia Plantarum, 2005, 123:321-330.
- [38] Wei W H, Chen B, Yan X H, et al. Identification of differentially expressed genes in soybean seeds differing in oil content [J]. Plant Science, 2008, 175:663-673.
- [39] 赵琳,罗秋兰,杨春亮,等.大豆在暗诱导条件下差异表达 cDNA 文库的构建及分析[J].大豆科学,2007,26(2):134-139. (Zhao L, Luo Q L, Yang C L, et al. Construction and analysis of differentially expressed cDNA library from soybean induced by darkness [J]. Soybean Science, 2007, 26(2):134-139.)
- [40] Zhao L, Luo Q L, Yang C L, et al. A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean [J]. Planta, 2008, 227:1389-1399.
- [41] Helge K, Anke B, Christian F, et al. Development of bioinformatic tools to support EST-sequencing, *in silico*-and microarray-based transcriptome profiling in mycorrhizal symbioses [J]. Phytochemistry, 2007, 68:19-32.