

抗性候选基因 *GmMIOX4* 的表达分析、克隆及过表达载体的构建

刘 婷<sup>1</sup>,杨若巍<sup>1</sup>,王学敏<sup>1</sup>,于佰双<sup>2</sup>,王 惠<sup>1</sup>,段玉玺<sup>3</sup>

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院,辽宁 沈阳 110866; 2. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所,黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 沈阳农业大学 植物保护学院,辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:**将两个不同抗性大豆品种灰皮支黑豆和辽豆 15 人工接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种(SCN3),利用实时荧光定量 PCR 技术,对 SCN3 侵染后的早期和线虫完成一个整个生活史时的 *GmMIOX4* 基因相对表达量变化进行分析。结果表明:在 SCN3 侵染下,辽豆 15 根内的 *GmMIOX4* 基因在 25 dpi 时,相对表达量升高,而灰皮支黑豆根内的 *GmMIOX4* 基因在 10 dpi 时被诱导表达,相对表达量达到最高值,表明该基因在此时期发挥一定作用。线虫侵入大豆根内 10 d 是其通过合胞体吸取寄主营养从而维持正常生长发育的时期,在 10 dpi 该基因被诱导表达,使其合胞体结构发生改变,从而抑制线虫发育,最终导致死亡或使灰皮支黑豆根内成虫数量减少,起到抗病效果。随后以抗性品种灰皮支黑豆根系总 RNA 为模板,利用 RT-PCR 技术获得了 939 bp 的 *GmMIOX4* 基因的 CDS 序列,克隆得到质粒 pGEM-MIOX4,再以得到的 *GmMIOX4* 序列为材料构建过表达载体 pCAM-MIOX4,为进一步研究 *GmMIOX4* 基因功能奠定了基础。

**关键词:***GmMIOX4* 基因;大豆胞囊线虫;实时荧光定量 PCR;克隆;过表达载体  
**中图分类号:**Q78;S565. 1      **文献标识码:**A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 05. 0730

Resistance Candidate Genes *GmMIOX4* Gene Expression Analysis, Cloning and Over Expression Vector Constructing

LIU Ting<sup>1</sup>, YANG Ruo-wei<sup>1</sup>, WANG Xue-min<sup>1</sup>, YU Bai-shuang<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, DUAN Yu-xi<sup>3</sup>

(1. Shenyang Agricultural University, College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang 110866, China; 2. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. Shenyang Agricultural University, College of Plant Protection, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** Two kinds of different resistance soybean (Huipizhiheidou and Liaodou 15) were inoculated with SCN3 in the research. By real-time quantitative PCR method, *GmMIOX4* gene expression changes were identified in early period and complete life cycle of SCN3. Real-time quantitative PCR results showed that: Under SCN3 infection, the relative expression of *GmMIOX4* gene in roots of Liaodou 15 increased until 25 dpi after inoculation, the relative expression of *GmMIOX4* gene in roots of Huipizhiheidou reached the highest level in 10 dpi, *GmMIOX4* gene was induced and played an important role. Host's nutrients was absorbed by SCN through syncytial to maintain normal growth and development period at 10 dpi, and this gene expression is induced, the gene can changes syncytial structure, inhibit nematode development, and thus played a disease-resistant effect. Total RNA of Huipizhi Heidou was used as template, 939 bp CDS of *GmMIOX4* genezone was obtained by RT-PCR. According to sequencing result, pGEM-MIOX4 over expression vector was cloned, it laid the foundation for further study of *GmMIOX4* gene function.

**Keywords:** *GmMIOX4* gene; Soybean cyst nematode; Real-time quantitative PCR; Clone; Over expression vector

大豆 (*Glycine max*) 是我国重要的粮食作物之一,也是我国重要的油料作物,但其产量长期受大豆胞囊线虫 (soybean cyst nematode, SCN) 病害影响,且危害日趋加重<sup>[1-3]</sup>。现在,由于农业防治和化学防治方法存在诸多不足以及分子生物学相关技术的飞速发展,抗线基因工程越来越受到重视<sup>[4-7]</sup>。有研究通过过表达或基因敲除试验获得了一些对胞囊线虫具有抗性的基因,这些抗病基因的发现为进一步剖析大豆对大豆胞囊线虫抗性机制,以及大豆胞囊线虫抗性改良提供了重要依据<sup>[8-11]</sup>。通过转录组测序结果发现了一批在抗、感大豆品种中出现

差异表达的基因,推测这些基因可能与大豆胞囊线虫抗性相关,肌醇加氧酶基因 (myo-Inositol Oxygenase, MIOX) 就是其中之一。

肌醇加氧酶是单加氧酶,在氧分子存在下是促进肌醇转化成 UDP-葡萄糖醛酸的关键酶,而 UDP-葡萄糖醛酸可以转化成木糖和阿拉伯糖等,这些都是植物细胞壁的主要合成成分;肌醇加氧酶也是植物抗坏血酸 (AsA) 生物合成反应的关键酶<sup>[12-13]</sup>。植物中对 MIOX 基因的相关报道较少,且说法不一。王海光等<sup>[14-15]</sup>在水稻中研究发现,水稻 MIOX 基因是水分胁迫应答基因,水分胁迫下该基因在旱稻中

收稿日期:2016-05-13  
基金项目:国家自然科学基金重点项目(31330063)。  
第一作者简介:刘婷(1990-),女,硕士,主要从事大豆胞囊线虫抗性基因相关研究。E-mail:360594542@qq.com。  
通讯作者:王惠(1972-),女,博士,副教授,主要从事大豆抗病、抗逆机制和分子生物学研究。E-mail:wanghuisyau@sina.com。  
段玉玺(1964-),男,教授,博导,主要从事植物线虫学研究。E-mail:duanyx6407@sina.com。

上调表达,在旱稻中表达量显著高于水稻,且其主要在根中表达,受干旱、冷害、过氧化氢、盐和脱落酸的诱导,它通过降低氧化损伤,在提高植株抗旱胁迫方面发挥重要作用。但使番茄受高温和 PEG 胁迫时,发现 *MIOX* 基因高温时上调表达,在 PEG 胁迫下却没有表达,而在番茄中,若过量表达 *MIOX* 基因,则能使番茄植株内抗坏血酸含量升高,在叶片中可增高 38%,果实中增高 61%,同时也使番茄的果实和叶片内 VC 含量提高,说明 *MIOX* 基因在不同胁迫下,有不同的响应机制<sup>[16]</sup>。在拟南芥根系中,过量表达拟南芥的 *MIOX4* 基因能使叶片中抗坏血酸含量增高 3 倍,增强植物本身对逆境的抗性<sup>[17]</sup>。且在拟南芥中,在胞囊线虫的诱导下,该基因上调表达最显著,合胞体明显变小,雌虫数量明显减少<sup>[18]</sup>。

在大豆基因组中,肌醇加氧酶基因家族有 *MIOX1*、*MIOX2*、*MIOX4*,半定量 PCR 结果显示,*MIOX4* 基因在灰皮支黑豆和辽豆 15 中接种与未接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种 (SCN3) 不同时间点表达差异变化明显,推测该基因对大豆胞囊线虫具有抗性作用,将其命名为 *GmMIOX4*。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术,进一步细致研究不同抗感品种接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种 (SCN3) 早期和线虫完成整个生活史时 *MIOX4* 基因的相对表达量,验证其抗性,克隆并构建该基因的过表达载体为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 选用灰皮支黑豆 (ZDD2315) 和辽豆 15 为大豆胞囊线虫受体材料。

大豆胞囊线虫为沈阳农业大学北方线虫所 (Nematology Institute of Northern China, NINC) 试验地繁殖圃内感染的 SCN3。

1.1.2 质粒和菌种 植物双元表达载体 pCAM-BIA1303 由本实验室保存;大肠杆菌感受态细胞 JM109、DH5 $\alpha$  购自 TaKaRa 公司;克隆载体 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司。

1.1.3 主要试剂 Ultrapure RNA Kit 和 2  $\times$  Taq PCR MasterMix 购自康为世纪生物科技有限公司, PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix、SYBR Green PCR master mix、DNA Ligation Kit、*Nco* I、*Spe* I 购自 TaKaRa 公司,PCR 产物纯化试剂盒、DNA 柱式凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,卡那霉素、Amp、IPTG、X-Gal、固相 RNase 清除剂购自 Solarbio 公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆胞囊线虫接种 在感染了 SCN3 的试验地繁殖圃取土样进行筛土,在显微镜下挑取胞囊,用 NaClO 和无菌水冲洗胞囊后,在硫酸锌溶液中孵化出二龄幼虫 (J2),同时将两个大豆品种放入 29℃ 恒温培养箱中催芽,当种子催芽长至 2 cm 时,选择长势相同的移栽至 16 cm  $\times$  16 cm 的黑色塑料钵中,钵中沙与土的比例为 2:1,当豆苗长出两片真叶后,人工接种 J2 于根部 (每株 2 000 条左右)。在接种后 0 ~ 25 d 取样 (对照组 C 与处理组 T 设置 3 次重复),冲洗干净后于 -80℃ 保存。

1.2.2 大豆根系总 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成 使用康为世纪生物科技有限公司的 Ultrapure RNA Kit 提取样品根系总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计检测 RNA 的质量、纯度和浓度,然后合成 cDNA 第一条链。

1.2.3 目的基因的实时荧光定量 PCR 检测 以 *Actin11* 为内参基因,用 TaKaRa 公司的 SYBR Green PCR master mix 对 *GmMIOX4* 基因进行实时荧光定量 PCR 检测。反应体系 (20  $\mu$ L): SYBR Green PCR master mix 10  $\mu$ L,正向引物 1  $\mu$ L,反向引物 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应条件: 95℃ 10 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环。PCR 反应后温度从 60℃ 上升到 95℃ 后绘制溶解曲线来判断扩增产物的正确性。根据 NCBI 上 *GmMIOX4* (NM\_001255706.1) 序列设计引物,由上海生工生物工程有限公司合成。*GmMIOX4*-f: 5'-CAAC-CCGCCCTTGAGTTACA-3'; *GmMIOX4*-r: 5'-TTCCTC-CACACCTTTTTGCCT-3'; *Actin11*-f: 5'-CGGTGGTTC-TATCTTGGCATC-3'; *Actin11*-r: 5'-GTCTTTTCGCT-TCAATAACCCTA-3'。

1.2.4 *GmMIOX4* 基因的克隆 通过温度梯度 PCR 确定扩增 *GmMIOX4* 基因 CDS 区全长的最适退火温度,设置退火温度为 52.5 ~ 59.0℃,确定最适退火温度后,用康为世纪生物科技有限公司的 2  $\times$  Taq PCR MasterMix,以灰皮支黑豆 cDNA 第一条链为模板,扩增 *GmMIOX4* 基因 CDS 片段,引物序列为: *GmMIOX4*-F: 5'-CATGCCCATGGGGATGACCATCCT-CATTGAGCA-3' (*Nco* I 酶切位点), *GmMIOX4*-R: 5'-CGGACTAGTTTCACCATCTAACCTTGGCAG-3' (*Spe* I 酶切位点)。反应体系 (25  $\mu$ L): 2  $\times$  Taq PCR MasterMix 12.5  $\mu$ L,正向引物 1  $\mu$ L,反向引物 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。反应条件: 95℃ 2 min; 94℃ 30 s, 52.5 ~ 59.0℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 5 min。将扩增产物回收纯化,连接到 pGEM-T Easy 载体上,转化大肠杆菌 JM109 感受态

细胞,通过蓝白斑筛选白色单菌落摇菌,再使用上海生工的质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒,通过 PCR 与双酶切检测,将阳性克隆命名为 pGEM-*MIOX4*,并测序和分析验证。

1.2.5 *GmMIOX4* 基因过表达载体的构建 用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Spe* I 分别对 pGEM-*MIOX4* 和 pCambia1303 载体进行双酶切,再分别回收目的片段,使用 TaKaRa 公司的 DNA Ligation Kit 将其按8:1 比例连接,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,在含有 Kanamycin 的 LB 固体培养基上过夜培养,挑取单个菌落于含有 Kanamycin 的液体 LB 培养基中,振荡培养,采用 PCR、酶切、测序的检测方法进行鉴定,构建成功的载体命名为 pCAM-*MIOX4*。

1.3 数据分析

对实时荧光定量 PCR 结果进行分析时用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量,用 GraphPad Prism 5 专业作图软件进行表达量变化柱状图的绘制;应用生物信息学软件 MEGA,构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 大豆根系总 RNA 的提取

使用康为世纪生物科技有限公司的 Ultrapure RNA Kit 提取灰皮支黑豆和辽豆 15 两个大豆品种根部的总 RNA,用超微量分光光度计及凝胶电泳分别检测样品的浓度及完整性。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,如图 1 所示,在 18S 和 28S rRNA 区域条带清晰完整,无拖尾,表明所提取的样品 RNA 的较完整,且未发生降解;经超微量分光光度计检测,试验样品的总 RNA 浓度、OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 的比值、OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>230</sub> 的比值较好,可以进行下步试验。

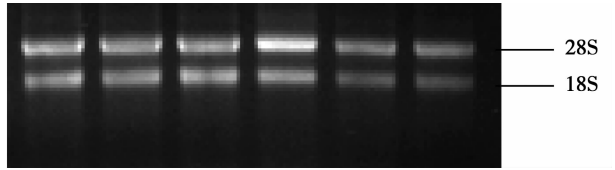


图 1 部分样品 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of partial samples RNA

2.2 *GmMIOX4* 基因的相对表达量分析

将 qRT-PCR 扩增得到的结果,经数据分析后得出两个大豆品种在受 SCN3 侵染下 *GmMIOX4* 基因的相对表达量变化(图 2 和图 3)。两个大豆品种在 SCN3 侵染 0 ~ 5 dpi, *GmMIOX4* 基因表达量均低于未处理的对照组;在侵染 7 dpi 时,灰皮支黑豆根内的 *GmMIOX4* 基因表达量开始升高,在 10 dpi 时,辽豆 15 处理组根内 *GmMIOX4* 基因表达量开始略高于对照组,但并不明显,而此时灰皮支黑豆处理组

根内 *GmMIOX4* 基因表达量达到最高值,约是对照组相对表达量的 1.5 倍;在 15 和 20 dpi 时,灰皮支黑豆处理组和对照组相对变化不大;在线虫完成 1 个生活史,约 25 dpi 时,辽豆 15 处理组 *GmMIOX4* 基因表达量达到最高值,约是对照组的 6 倍,而灰皮支黑豆处理组根内 *GmMIOX4* 基因的表达量下降,基本不表达。在辽豆 15 根内,对照组 *GmMIOX4* 基因的相对表达量为 0 ~ 25 dpi,呈逐渐下调趋势,处理组 *GmMIOX4* 基因相对表达量呈逐渐上升趋势;在灰皮支黑豆根内,对照组 *GmMIOX4* 基因的相对表达量在 0 dpi 时最高,在 15 dpi 出现较高值,处理组 *GmMIOX4* 基因的相对表达量在 10 dpi 前很低,10 dpi 突然出现最高值,10 dpi 后表达量逐渐降低。说明 *GmMIOX4* 基因对决定大豆对 SCN3 的抗性起着非常重要的作用,线虫侵入植物 10 d 时,是其形成依靠合胞体吸收寄主营养的时期,此时 *GmMIOX4* 基因在灰皮支黑豆根内被诱导表达很可能使合胞体结构发生改变,让线虫不能依靠合胞体吸取足够生长、发育的营养,从而抑制线虫发育,最终导致死亡或使灰皮支黑豆根内成虫数量减少,起到抗病效果。

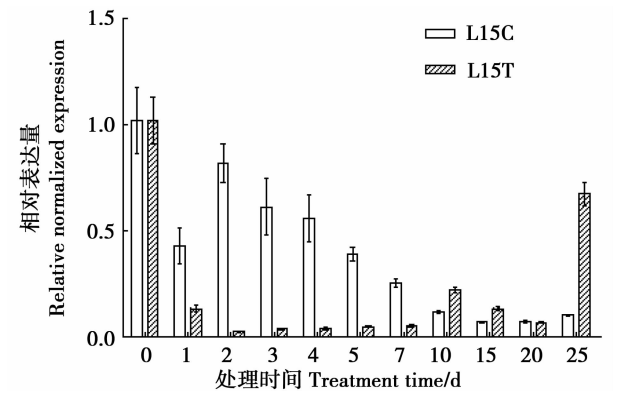


图 2 辽豆 15 中 *GmMIOX4* 基因的相对表达量  
Fig.2 The relative expression level of *GmMIOX4* gene in Liaodou 15

2.3 *GmMIOX4* 基因的克隆

以灰皮支黑豆根部 cDNA 为模板,通过温度梯度 PCR 确定扩增 *GmMIOX4* 基因 CDS 区全长的最适退火温度,设置 PCR 反应条件的温度为 52.5 ~ 59 $^{\circ}$ C,将 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,如图 4,发现在温度为 52.5 $^{\circ}$ C 时效果最好,故扩增 *GmMIOX4* 基因时,选择退火温度为 52.5 $^{\circ}$ C。

设置退火温度为 52.5 $^{\circ}$ C,利用特异引物 *GmMIOX4*-F 和 *GmMIOX4*-R 扩增 *GmMIOX4* 基因 CDS 片段,NCBI 网站的大豆 *GmMIOX4* 基因 CDS 区为 939 bp,电泳结果显示经 PCR 扩增后得到的片段大小在 900 bp 左右(图 5),与之相符。

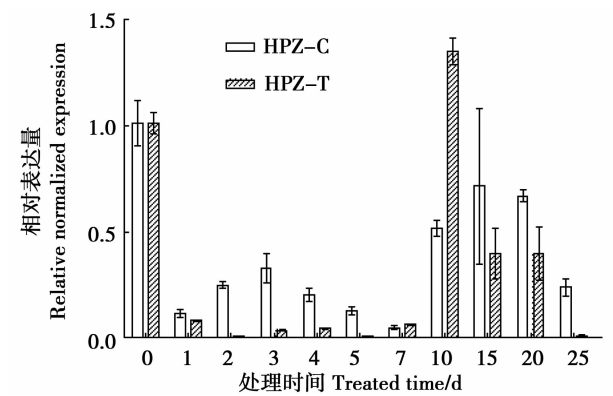
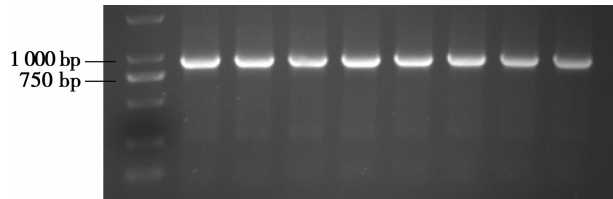


图3  灰皮支黑豆中 *GmMIOX4* 基因的相对表达量

Fig. 3  The relative expression level of *GmMIOX4* gene in Huipizhiheidou

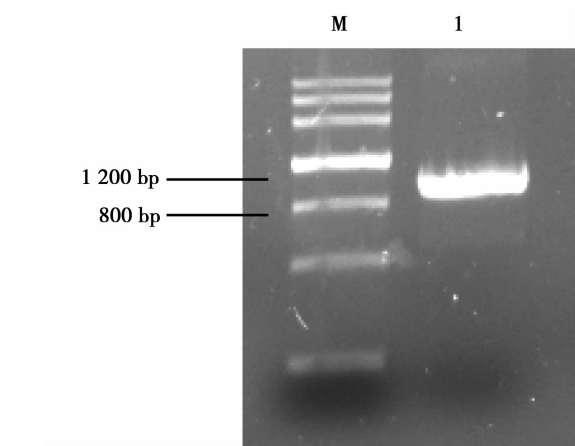


M: DNA 标准分子量(2000 bp)

M: DNA ladder marker(2000 bp)

图4  *GmMIOX4* 基因的温度梯度 PCR 产物

Fig. 4  Temperature gradient PCR products of *GmMIOX4* gene



M: DNA 标准分子量(4 500 bp); 1: RT-PCR 产物.

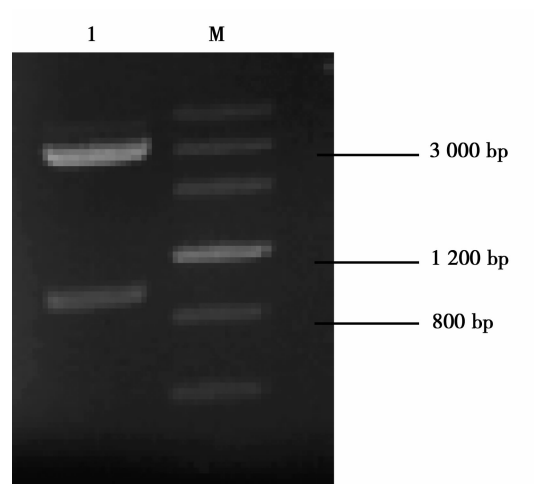
M: DNA ladder marker(4 500 bp); 1: RT-PCR product.

图5  *GmMIOX4* 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 5  RT-PCR of *GmMIOX4*

纯化、回收 PCR 产物, 连接到 pGEM-T Easy 载体上, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选与酶切检测, 得到了阳性克隆载体 pGEM-MIOX4, 并测序进行分析验证。如图 6, 质粒 pGEM-MIOX4 经过酶切后, 切下 pGEM-T Easy (3 015 bp) 和 *GmMIOX4* (939 bp), 电泳结果与预期一致(图 6)。

利用测序结果, 构建系统发育树(图 7), *GmMIOX4* 基因与甜橙肌醇加氧酶(*CsiMIOX2*) 基因的同



M: DNA 标准分子量(4 500 bp); 1: pGEM-MIOX4 的酶切产物.

M: DNA ladder marker (4 500 bp); 1: Product of pGEM-MIOX4 by enzyme digested.

图6  重组质粒 pGEM-MIOX4 的酶切鉴定

Fig. 6  Identification of recombinant plasmid pGEM-MIOX4 by enzyme digestion

源性较高, 与其同一家族的 *GmMIOX1* 基因与豆科模式植物蒺藜状苜蓿肌醇加氧酶(*MtMIOX*) 基因的同源性较高。

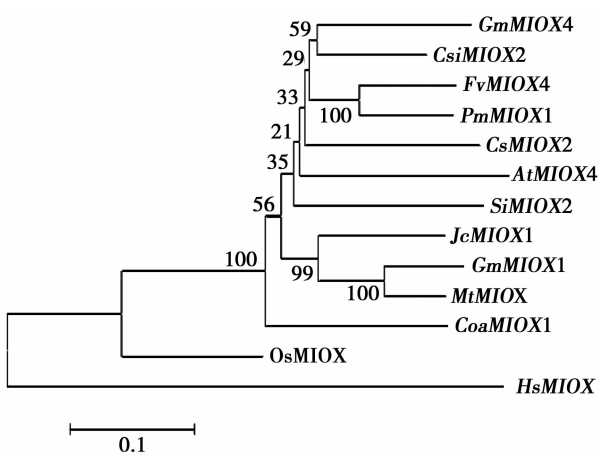


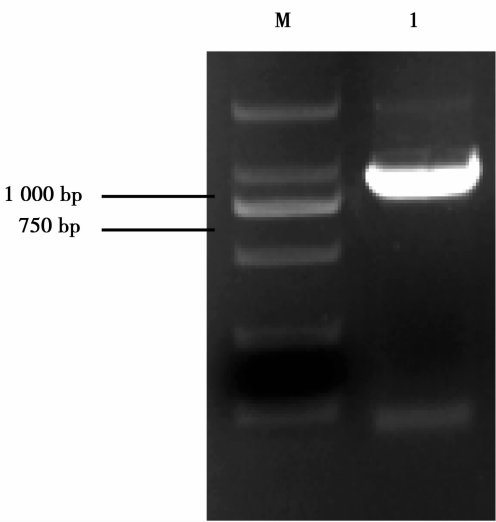
图7  系统发育树的构建

Fig. 7  Construction of phylogenetic tree

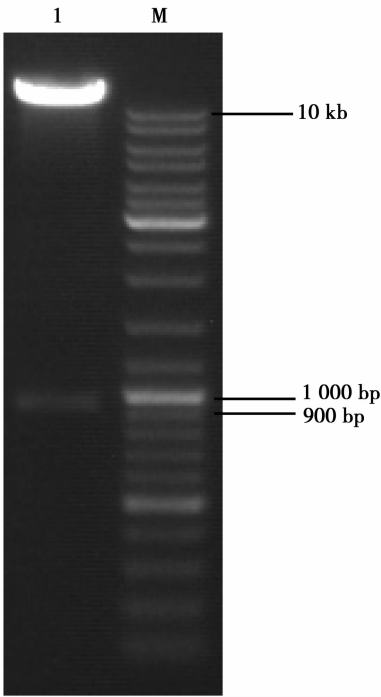
2.4 *GmMIOX4* 基因过表达载体的构建

利用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Spe* I 分别对 pGEM-MIOX4 和 pCAMBIA1303 载体进行双酶切, 再分别回收目的片段, 使用 TaKaRa 公司的 DNA 连接 Kit 进行连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 经含有 Kanamycin 的 LB 培养基培养、筛选后, 通过 PCR、酶切、测序的检测方法进行鉴定, 确定成功构建植物过表达载体 pCAM-MIOX4。图 8 所示电泳结果是以 *GmMIOX4*-F 和 *GmMIOX4*-R 为引物, pCAM-MIOX4 质粒为模板扩增的目的基因, 与预期结果一致, 说明 *GmMIOX4* 基因已经成功连接到 pCAM-BIA1303 质粒载体上; 图 9 所示电泳结果是用 *Nco* I

和 *Spe* I 双酶切 pCAM-*MIOX4* 载体质粒,得到两条条带,其中一条条带约为 1 200 bp,另一条条带约为 950 bp,与预期结果一致,证明获得了 *GmMIOX4* 基因的过表达载体 pCAM-*MIOX4*。



M: DNA 标准分子量(2000 bp); 1: PCR 产物。  
M: DNA ladder marker(2000 bp); 1: PCR product.  
图 8 重组质粒 pCAM-*MIOX4* 的 PCR 鉴定  
Fig. 8 Identification of recombinant plasmid pCAM-*MIOX4* by PCR



M: DNA 标准分子量(10 kb); 1: pCAM-*MIOX4* 的酶切产物。  
M: DNA ladder marker (10 kb); 1: Product of pCAM-*MIOX4* digested by enzyme.

图 9 重组质粒 pCAM-*MIOX4* 的双酶切鉴定  
Fig. 9 Identification of recombinant plasmid pCAM-*MIOX4* by enzyme digestion

3 结论与讨论

目前,抗线虫基因工程的研究越来越受到重视,许多抗线基因已经被确定,并被克隆,如甜菜 *Hs1<sup>pro1</sup>* 和番茄 *Mi* 等,还有许多具有抗性的基因是人工合成的<sup>[10,19]</sup>,但仍有一些抗线基因有待发掘。

大豆中的肌醇加氧酶基因,通过高通量转录组测序发现在灰皮支黑豆中,受大豆胞囊线虫侵染后有差异表达,且该基因在拟南芥中,对胞囊线虫形成的合胞体大小与雌虫数量有影响,但目前没有大豆肌醇加氧酶对 *SCN3* 是否起作用的相关报道,为了深入了解其对于大豆胞囊线虫病是否存在抗性,本研究先通过半定量 PCR 技术初步筛选出肌醇加氧酶基因家族中差异表达明显的 1 个基因 *GmMIOX4* 基因作为研究对象。

利用实时荧光定量 PCR 技术,对两个大豆品种在 *SCN3* 侵染后的 *GmMIOX4* 基因的早期和线虫完成一个整个生活史时的相对表达量变化情况进行分析,以明确该基因在大豆抗 *SCN3* 机制中的作用。发现其在灰皮支黑豆和辽豆 15 中表达量的变化相差很大,说明 *GmMIOX4* 基因对 *SCN3* 的抗性确实起着非常重要的作用。在 10 dpi 时,灰皮支黑豆中 *GmMIOX4* 基因的相对表达量达到最高,线虫侵入植物 10 d 时,是其形成依靠合胞体吸收寄主营养的时期,此时 *GmMIOX4* 基因被诱导表达,很可能使合胞体结构发生改变,使线虫不能依靠合胞体吸取足够生长、发育的营养,从而使灰皮支黑豆达到抑制线虫发育的作用,最终导致死亡或使灰皮支黑豆根内成虫数量减少,起到抗病效果。与此同时,本研究对 *GmMIOX4* 基因进行克隆,并构建过表达载体,为下一步研究其具体功能奠定了分子基础。

参考文献

[1] 吴明才,肖昌珍. 世界大豆线虫病研究概述[J]. 湖北农业科学, 1999(1): 38-40. (Wu M C, Xiao C Z. Overview of soybean N. ematode in the world[J]. HuiBei Agricultural Sciences, 1999 (1):38-40. )  
[2] 宛煜嵩,王珍. 中国大豆胞囊线虫抗性研究进展[J]. 分子植物育种, 2004(5): 609-619. (Wan Y S, Wang Z. Progress of-soybean cyst nematode resistance in China[J]. Molecular Plant Breeding, 2004, (5):609-619. )  
[3] 李琬,李炜,肖佳雷,等. 黑龙江省西部地区大豆胞囊线虫病物理防治技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2014(3):56-59. (Li W, Li W, Xiao J L, et al. Physical control techniques of soy-bean cyst nematode in west of Heilongjiang province [J]. Hei-longjiang Agricultural Sciences, 2014(3): 56-59. )  
[4] 于宝泉,高林. 大豆胞囊线虫病发生和防治研究进展[J]. 大豆科技, 2012(3): 29-33. (Yu B Q, Gao L. Soybean cyst nema-

tode occurrence and prevention progress[J]. Soybean Science and Technology, 2012, (3): 29-33. )

[5] Kaloshian I, Yaghoobi J, Liharska T, et al. Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus mi in tomato [J]. Molecular and General Genetics Mgg, 1998, 257(3): 376-385.

[6] 权德水, 宋晓慧, 张代平. 大豆主要病害防治技术[J]. 科技致富向导, 2014(21):50-51. (Quan D S, Song H X, Zhang D P. Soybean disease control technology[J]. Technology Rich Wizard, 2014(21):50-51. )

[7] 刁琢, 许艳丽. 中国大豆胞囊线虫抗源筛选及抗病育种研究进展[J]. 大豆科技, 2008(5):14-16. (Diao Z, Xu Y L. Progress of soybean cyst nematode resistant sources screening and breeding for disease resistance in China[J]. Soybean Science and Technology, 2008(5):14-16. )

[8] Geon L T, Indrajit K, Diers B W, et al. Evolution and selection of Rhg1, a copy-number variant nematode-resistance locus [J]. Molecular Ecology, 1998, 80(2): 134-140.

[9] Cook D E, Bayless A M, Wang K, et al. Distinct copy number, coding sequence, and locus methylation patterns underlie rhg-mediated soybean resistance to soybean cyst nematode [J]. Plant Physiology, 2014, 165(2): 630-647.

[10] Cai D, Kleine M, Kifle S, et al. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet [J]. Science, 1997, 275 (5301): 832-834.

[11] Kinnison M T, Hendry A P. The pace of modern life II: From rates of contemporary microevolution to pattern and process [J]. Genetica, 2001, 8(112-113):145-164.

[12] Kanter U, Usadel B, Guerineau F, et al. The inositol oxygenase gene family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides [J]. Planta, 2005, 221(2): 243-254.

[13] Smirnoff N, Wheeler G L. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function[J]. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2000, 35: 291-314.

[14] 王海光, 张洪亮, 段俊枝, 等. 水稻肌醇加氧酶基因的表达分析及植物表达载体的构建[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(4): 1-6. (Wang H G, Zhang H L, Duan J Z, et al. Construction of plant expression vectors and expression analysis of rice myo-inositol oxygenase gene[J]. Journal of China Agricultural University, 2007, 12(4): 1-6. )

[15] Duan J, Zhang M, Zhang H, et al. *OsMIOX*, a myo-inositol oxygenase gene, improves drought tolerance through scavenging of reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Science, 2012,196: 143-151.

[16] 刘军霞. 番茄抗坏血酸生物合成酶 *GME* 和 *MIOX* 的功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009. (Liu J X. Functional analysis of tomato ascorbic acid biosynthetic enzymes *GME* and *MIOX* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009. )

[17] Lorence A, Chevone B I, Mendes P, et al. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2004, 134(3): 1200-1205.

[18] Siddique S, Endres S, Atkins J M, et al. Myo-inositol oxygenase genes are involved in the development of syncytia induced by *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots[J]. New Phytologist, 2009, 184(2): 457-472.

[19] 邓洪新, 余懋群. 植物基因克隆的策略和方法 [J]. 昆明: 西南农学报, 2001, 14(3): 78-82. (Deng H X, Yu M Q. Strategies and methods for cloning plant genes [J]. Kunming: Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2001, 14(3): 78-82. )

欢迎订阅 2017 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

《大豆科学》为双月刊,16 开本,国内外公开发行,国内每期定价:20.00 元,全年 120.00 元,邮发代号:14-95。国外每期定价:20.00 美元(含邮资),全年 120.00 美元,国外代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)

电话: 0451-86668735

网址: www.haasep.cn

E-mail: ddkxbjb@126.com