

文章编号: 1003-8701(2015)03-0018-05

玉米 *ZmSUT4-J* 基因的克隆与植物表达载体构建

贺红霞¹, 陈亮¹, 康爽^{1,2}, 林春晶¹, 李楠¹,
柳青¹, 刘丹^{1,3}, 薛晶^{1,2}, 孙瑞聪^{1,2}, 赵慧敏^{1,3}

(1. 吉林省农业科学院农业生物技术研究, 长春 130033; 2. 吉林农业大学园艺学院, 长春 130118;
3. 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150025)

摘要: 植物蔗糖转运蛋白负责蔗糖的跨膜运输, 在韧皮部介导的源-库蔗糖运输以及库组织的蔗糖供给中起关键作用。本研究利用 RT-PCR 方法, 从玉米自交系吉 853 中获得位于 3 号染色体上蔗糖转运蛋白 (*SUT4*) 的基因, 命名为 *ZmSUT4-J*, 测序结果表明开放阅读框 (ORF) 1506 bp, 编码 501 个氨基酸, 利用生物信息学软件对其编码蛋白的理化性质、结构和功能进行了分析和预测; 并借助荧光定量 RT-PCR 方法对 *ZmSUT4* 的组织表达特异性进行了分析。同时为了验证其生物学功能, 构建了适合玉米遗传转化的表达载体, 为进一步利用 *ZmSUT4* 基因开展玉米高产转基因育种的研究工作奠定了基础。

关键词: 玉米; 蔗糖转运蛋白基因; 组织特异性表达; 植物表达载体

中图分类号: S513

文献标识码: A

DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.03.005

Cloning of Sucrose Transporter *ZmSUT4-J* from *Zea mays* and Construction of Plant Expression Vector

HE Hong-xia¹, CHEN Liang¹, KANG Shuang^{1,2}, LIN Chun-jing¹, LI Nan¹, LIU Qing¹,
LIU Dan^{1,3}, XUE Jing^{1,2}, SUN Rui-cong^{1,2}, ZHAO Hui-min^{1,3}

(1. *Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033*;
2. *College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118*;
3. *Harbin Normal University, Harbin 150025, China*)

Abstract: Sucrose transporters are responsible for trans-membrane translocation of sucrose, and play important roles on phloem-mediated source-sink sucrose transportation and supply sucrose to sink tissues. The *ZmSUT4* gene was subcloned from *Zea mays* inbred line Ji 853, termed *ZmSUT4-J*. The sequence analysis revealed that *ZmSUT4-J* has an open reading frame (ORF) of 1506bp and encodes 501 amino acids residues. The predicted protein has 12 transmembrane domains according to the bioinformatics analysis. Using tissue expression pattern analysis, this gene was proved to be specifically expressed in young leaf. To elucidate biological functions of *ZmSUT4*, the expression vector for transformation to monocot plants was constructed.

Keywords: Maize; Sucrose transporter; Tissue-specific expression; Plant expression vector

玉米 (*Zea mays*) 为 C4 禾本科植物, 是我国重要的粮食作物和饲料作物。蔗糖是玉米光合作用产物之一, 从合成部位运输到生长器官, 以满足

玉米生长发育的需要。蔗糖转运蛋白 (Sucrose transporter, SUT) 是植物中一类重要的跨膜蛋白, 属于 MFS 家族 (Major facilitator superfamily) 的蔗糖转运子 (Sucrose transporter) 亚族, 在调节蔗糖的韧皮部装载或卸载和向库组织运输过程中起到无可替代的作用, 其活性直接影响玉米等作物的生长和产量, 因此弄清关键性膜蛋白的运输机制对提高作物产量至关重要^[1]。目前植物体的蔗糖转运蛋白共分为 5 个亚族: SUT1、SUT2、SUT3、SUT4 和 SUT5 亚族, 其中 SUT1 亚族是在双子叶植

收稿日期: 2014-12-22

基金项目: 吉林省人力资源与社会保障厅博士后基金项目 (吉人社办 (2011) 274 号); 吉林省人力资源与社会保障厅留学启动项目 (吉人社办 (2012) 130 号); 吉林省科技发展计划项目 (20130101043JC)

作者简介: 贺红霞 (1977-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事农业生物技术和玉米蔗糖转运蛋白及启动子的功能及应用研究。

物中特有其功能研究比较透彻,单双子叶植物中都有的SUT2亚族和SUT4亚族的功能仍有待于进一步阐明,SUT3亚族和SUT5亚族是单子叶植物特有的^[1]。根据玉米基因组序列信息,迄今为止发现有6个蔗糖转运蛋白基因,其编码不同的蔗

糖转运蛋白,最新分类表明它们分别属于SUT2(*ZmSUT2*)、SUT3(*ZmSUT1*和*ZmSUT3*)、SUT4(*ZmSUT4*)和SUT5亚族(*ZmSUT5*和*ZmSUT6*)^[1],位于不同的染色体上(如表1),在不同组织及发育阶段中起到不同的生理作用。

表1 玉米蔗糖转运蛋白基因序列信息及染色体位置

基因	序列号	碱基数(bp)	CDS区	氨基酸长度(aa)	染色体位置	序列位置
<i>ZmSUT1</i>	AB008464	1834	168-1733	523	1号	15,020,569-15,025,421
<i>ZmSUT2</i>	AY581895	2166	36-1814	592	5号	152,346,349-152,350,485
<i>ZmSUT3</i>	BT041648	1822	44-1570	508	1号	242,483,558-242,486,929
<i>ZmSUT4</i>	AY639018	1649	120-1625	501	3号	100,367,838-100,372,383
<i>ZmSUT5</i>	BT040279	1912	54-1646	530	5号	175,755,805-175,758,927
<i>ZmSUT6</i>	BT040668	1836	11-1603	530	4号	123,779,045-123,782,111

由于这6个蔗糖转运蛋白生理功能的重叠性和复杂性,对于特定成员或全部成员的生理功能的确定具有极大挑战性。其中*ZmSUT4*属于SUT4亚族,在单子叶和双子叶植物中广泛存在,根据已知报道推测SUT4亚族与作物产量的形成直接相关,有研究表明在水稻、杨树和马铃薯中下调SUT4表达产生不同的影响^[2-4],目前SUT4亚族成员的生理功能尚不明确。本研究从吉853中克隆玉米蔗糖转运蛋白基因*ZmSUT4-J*序列,对其进行了生物信息学分析预测,并成功构建了适合单子叶植物转化的植物表达载体,为进一步验证*ZmSUT4*基因功能奠定了基础。由于吉853是吉林省主要骨干亲本材料,具有抗病性强、品种优良等优点^[5-7],研究其中蔗糖转运蛋白基因的功能有利于吉林省乃至北方春玉米产区产量和品质的提高。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

玉米自交系吉853由吉林省农业科学院姜昱研究员提供,将玉米播种于吉林省农业科学院长

春院区试验田,在生长5~7叶龄时取幼叶,用于RNA的提取进行克隆基因。

1.2 菌株、试剂和质粒

克隆载体pEASY-T1 simple和大肠杆菌感受态Trans 5α购自北京全式金生物有限公司,基因克隆所用植物基因组提取和总RNA提取试剂盒购自Promega公司,RT-PCR试剂盒,Taq酶,限制性内切酶均购自TakaRa公司。适合单子叶植物遗传转化的植物表达载体pCAM-UPN为本实验室自主构建^[8]。

1.3 方 法

1.3.1 引物设计

根据B73玉米的基因组序列中*ZmSUT4*(Genbank 登录号AY639018)序列设计克隆引物。为方便基因克隆,在上下游引物上分别引入*Bam*H I和*Sac* I位点。在RT-PCR扩增目的基因时所用引物(见表2),由上海捷瑞生物工程有限公司合成。Real-time RT-PCR引物利用Primer3 (Version4.0)在线设计,引物序列具有特异性。所用的引物及内参照β-actin引物如表2所示。定量引物委托鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。

表2 研究中使用的引物序列

序列名称	引物名称	引物序列 5'-3'	PCR反应条件(预变性,时间;变性,时间,退火,时间,延伸,时间,循环数)
<i>ZmSUT4</i>	ZmS4 Bamfw	CGGGATCCCGATGCCGCCGCGCACGGCTC	98℃, 2min; 98℃, 10s, 55℃, 15s, 72℃, 2min, 35 cycles
	ZmS4 SacRev	CGAGCTCGTAAATGAGCAGACTTATCGGTG	
<i>ZmSUT4</i>	RT ZmS4fw	GCTGGACTTGTATGGGGTGT	94℃, 2min; 94℃, 30s, 56℃, 30s, 72℃, 30s, 35cycles
	RT ZmS4rev	CGACTAGCAGCCATTGCATA	
β-actin	RT ACTIN-fw	GTGACAATGGCACTGGAATG	94℃, 2min; 94℃, 30s, 50℃, 30s, 72℃, 30s, 35 cycles
	RT ACTIN-rev	CCATGCTCAATCGGGTACTT	

1.3.2 RT-PCR 克隆与序列分析

吉 853 玉米幼叶总 RNA 提取参考 Promega RNA 提取试剂盒说明书,以总 RNA (约 1 μ g) 反转录合成 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增,PCR 引物和反应程序见表 2,扩增得到与预期大小相近的 1.5kb 左右片段,凝胶回收后连接到克隆载体 pEASY-T1 simple,转化 *E.coli* Trans1-T1 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司),经菌落 PCR 及酶切双重检测后,选取阳性克隆进行测序分析(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。

1.3.3 植物表达载体的构建

将上一步骤获得的 pEASY-T1-SUT4J 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切,凝胶回收目的片段;同时用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切 pCAM-UPN,回收载体片段。将目的片段和载体片段进行连接,并热击转化大肠杆菌 Trans1-T1。提取阳性单菌落质粒 DNA 经 PCR 及酶切双重检测后,命名为 pCAM-BIA3300-ubi::SUT4J。利用冻融法转入农杆菌感受态 EHA105(自制),转化玉米进行功能验证。

1.3.4 定量 RT-PCR 分析

以吉 853 苗期新叶、老叶、茎和根第一链 cDNA 为模板,按照鼎国公司的 2XPCR mix 说明书进行,荧光标记为 SYBR Green I (Genview),仪器为 ABI PRISM 7700 实时定量 PCR 仪。每个样品 3 个生物学重复,每个反应 3 个重复,*ZmSUT4* 和内参 *Actin* 的引物序列及 PCR 程序见表 2;熔解曲线通过定量 PCR 仪自带的分析软件获取,程序结束后用标准曲线法计算 *ZmSUT4-J* 基因在不同组织中的相对表达量。

1.3.5 *ZmSUT4-J* 编码蛋白的理化性质和生物信息学分析

在瑞士生物信息学研究所网站 (<http://us.expasy.org/>) 用 ProtScale 软件对编码蛋白疏水性进行分析,用 ProtParam 对编码蛋白质的等电点、分子量进行预测,用 TMpred 预测跨膜结构;用 SignalP 4.1 server 进行信号肽分析,采用 PSORT II 蛋白质亚细胞定位服务器 (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 定位。采用 ScanProsite 服务器进行蛋白质功能域预测。利用 NCBI 以及 Maizesequence 数据库对基因进行序列比对分析,利用 BioEdit 软件中的 ClustalW 对来源于不同植物的蔗糖转运蛋白进行序列比对和聚类分析,应用进化树构建软件 MEGA6.0.5,采用邻近法构建进化树。

2 结果与分析

2.1 *ZmSUT4-J* 全长序列的获得

以玉米幼叶总 RNA 为模板,反转录获得 cDNA,通过 PCR 扩增获得与预期片段大小一致的特异性产物(图 1),连接到 pEASY-T1-simple 载体中得到重组载体命名为 pEASY-T1-SUTJ。测序结果证实获得含有 *ZmSUT4* 基因全长 CDS (1546 bp), ORF 1506bp (22-1527),与甘蔗中的 *ShSUT4* (GQ485583) 具有 95% 同源性。命名为 *ZmSUT4-J*, Genbank 序列号为 KF418543。

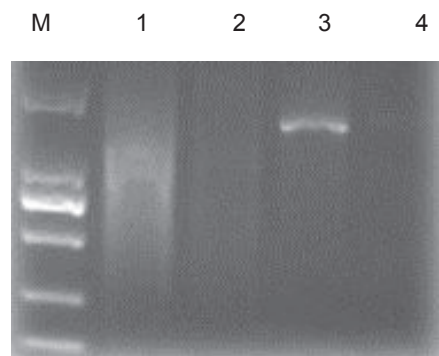


图 1 *ZmSUT4* 基因的 PCR 扩增

注: M. DL2000, 1. RNA 未经过 DNase 处理,

2. RNA 经过 DNase 处理, 3. cDNA 1 μ L, 4. cDNA 0.1 μ L。

2.2 *ZmSUT4-J* 基因编码蛋白的理化性质

对氨基酸序列分析表明:*ZmSUT4-J* 基因编码蛋白的等电点为 8.84, 预测分子量为 53.45 kDa。根据 NCBI CDS (conserved domain search) 分析发现,它具有典型的糖转运蛋白结构域,属于 GPH_sucrose 即 sucrose/H⁺ symporter。蛋白结构域预测发现,*ZmSUT4-J* 含有一个 60 氨基酸 (25-84) 的 MFS_1 功能域,一个 473 氨基酸的蔗糖转运子 (17-489)。信号肽分析预测显示,该蛋白无信号肽。亚细胞定位预测显示,该蛋白定位于质膜、

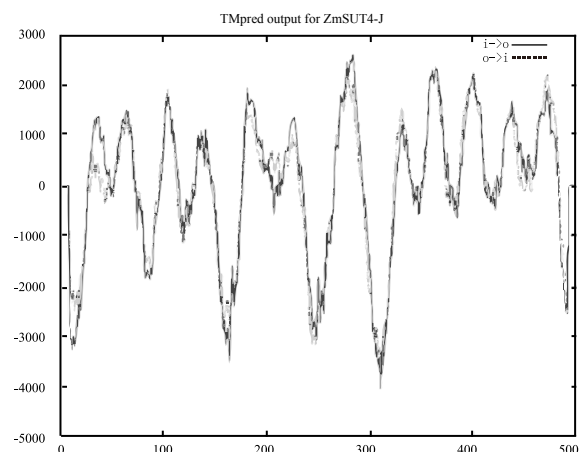


图 2 吉 853 SUT4-J 蛋白跨膜结构预测

叶绿体类囊体膜、高尔基体和内质网膜的可能性分别是 60%、45.3%、40% 和 30%。应用在线工具 (http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form.html) 预测 *ZmSUT4-J* 蛋白含有 12 次跨膜区^[9] (图 2)。

2.3 *ZmSUT4-J* 基因编码蛋白的系统进化分析

将 *ZmSUT4-J* 基因编码的蛋白序列利用 Clust-

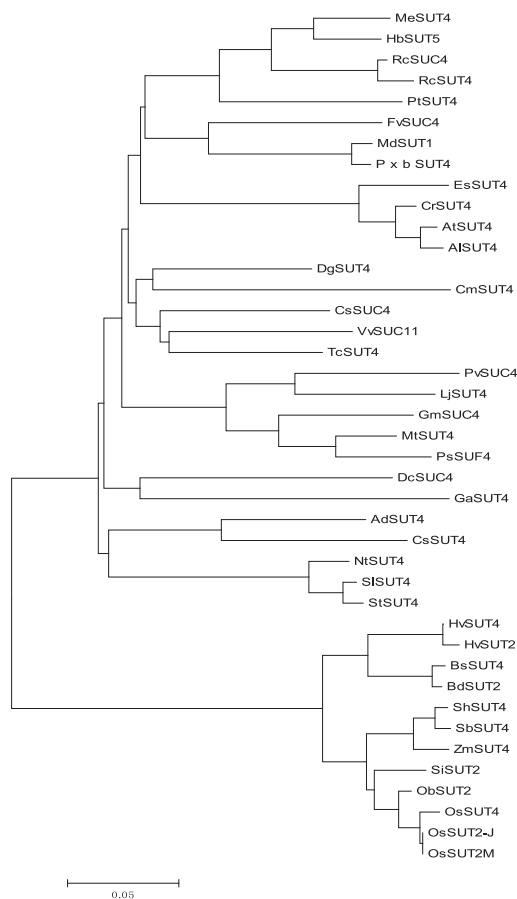


图 3 *ZmSUT4-J* 编码蛋白 *ZmSUT4* 与其他植物 SUT 蛋白的系统进化分析

注:所选的 SUTs 的蛋白序列经过 Clustal W 比对,利用相邻连接 (Neighbor-joining, NJ) 分析构建系统进化树 (MEGA6.0.5)。构建进化树所选用的蔗糖转运蛋白登录号 (NCBI) 见附表:图标长度代表 0.05 个氨基酸差别

alW 与其他 35 种植物中的 40 个蔗糖转运蛋白 (相似度大于 50%) 进行多序列比对,根据对比结果构建进化树 (图 3)。结果表明:*ZmSUT4* 与其他序列氨基酸同源性非常高,与甘蔗 (*Saccharum hybrid*) 的 *ShSUT4* 和高粱 (*Sorghum bicolor*) 的 *SbSUT4* 同源性最高分别为 96.4% 和 96%,与水稻中的 *OsSUT2M* 的同源性是 88.3%,与双子叶植物中 *StSUT4* 的同源性是 60.1%。有研究表明马铃薯 *StSUT4* 基因的表达量与蔗糖运输能力、产量增加呈负相关^[2],而 *OsSUT2* 的表达量与蔗糖运输能力

和植株生长及根和籽粒的发育呈正相关^[3],甘蔗 *ShSUT4* 表达量与茎节中锤度高低呈正相关^[10]。*ZmSUT4* 与上述蔗糖转运蛋白属于同一个分支,一方面说明 *ZmSUT4-J* 编码的蛋白在高等植物中相对保守,与单子叶植物亲缘关系较近,而且在双子叶植物中也广泛存在同源序列,另一方面说明 *ZmSUT4* 具有与上述蔗糖转运蛋白相似的功能,对产量的形成十分重要。

2.4 *ZmSUT4* 基因的组织表达分析

取吉 853 苗期不同组织部位 (根、茎、幼叶、新叶) 的总 RNA 进行 *ZmSUT4* 基因的表达分析。结果表明, *ZmSUT4* 的表达量以新叶中最高,其次为根、茎,最低的为老叶,以老叶中表达量为对照,新叶、根和茎中的表达量分别是老叶中的 7.95 倍、2.13 倍和 1.81 倍 (图 4),说明 *ZmSUT4* 参与蔗糖在库器官的吸收和利用,为库器官提供碳水化合物。

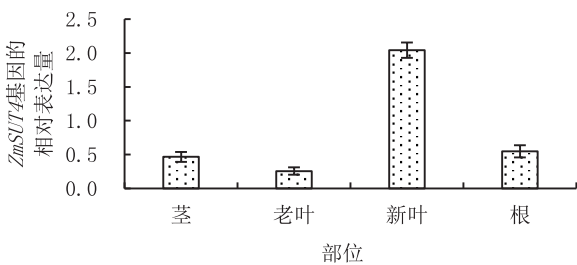


图 4 玉米 *ZmSUT4* 基因的组织特异表达特异性分析 (平均值±标准差)

注:内参基因为玉米的 β -actin, 目的基因 *ZmSUT4*

2.5 *ZmSUT4-J* 基因过表达载体的构建

为了验证 *ZmSUT4-J* 的生物学功能,笔者构建了适合单子叶植物转化的植物表达载体。经 *BamH* I 和 *Sac* I 双酶切后的 *ZmSUT4-J* 片段与 pCAM-UPN 片段重组连接,得到重组克隆经 PCR

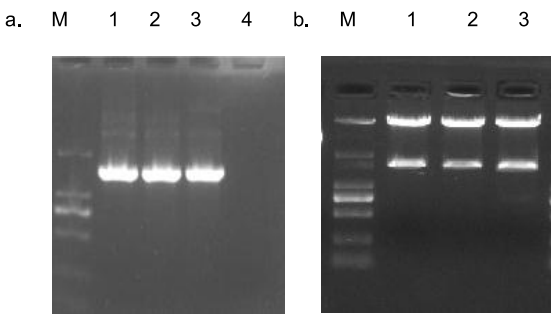


图 5 重组载体 pCAM3300-ubi::SUT4J 的 PCR 及酶切鉴定

注:a 为重组质粒 PCR 鉴定图, M: DL2000, 1、2、3 分别为 3 个不同克隆, 4 为阴性对照; b 为酶切鉴定图, M: DL10000, 1、2、3 克隆同 PCR 鉴定图

和酶切双重鉴定(图5),所得扩增片段和酶切片段约为1.5kb,与目的片段一致,得到重组载体命名为pCAM3300-ubi::SUT4J。这个植物表达载体可用于烟草模式植物中功能验证,更适用于玉米的遗传转化。

3 讨 论

蔗糖转运蛋白主要负责绿色植物光合产物蔗糖的吸收和运输,玉米中至少有6个蔗糖转运蛋白基因,各自具有不同的功能,并在不同的部位表达。其中功能较为明确的是ZmSUT1,属于单子叶植物特异的SUT3亚族蔗糖转运蛋白,定位在韧皮部并参与质子共转运,介导蔗糖在蔗糖梯度和质子压控制下流出^[11]。此外ZmSUT1还在蔗糖的韧皮部(玉米叶片中)装载中起作用^[12-13]。在茄科植物中SUT1是一个在成熟叶片中蔗糖输出的主要转运蛋白,在烟草中过表达马铃薯的*StSUT1*引起植株早花现象,这与*StSUT4*受抑制植株表现一致^[2,14]。说明*StSUT4*可作为*StSUT1*的一个抑制子,这可以用*StSUT4*受抑制植株中*StSUT4*介导的对*StSUT1*抑制作用缺失引起转基因植株叶片中蔗糖流量增加来解释^[2]。关于玉米蔗糖转运蛋白启动子和该家族基因表达特性的研究报道很少。马小龙等在玉米中发现*ZmERD6*基因的两个转录本*ZmERD6-S*和*ZmERD6-L*,含有MFS结构域,属于MFS家族的蔗糖转运子(sugar transporter)亚族,但与ZmSUT1-ZmSUT6的蛋白序列同源性非常低^[15]。本研究所得的ZmSUT4-J与马铃薯中*StSUT4*具有60.1%同源性,*StSUT4*在马铃薯中对蔗糖的源库分配有负效应,对*StSUT1*有负调节作用,RNA抑制的转基因马铃薯植株表现蔗糖的运输能力增强,块茎产量有所增加^[2,16]。水稻的*OsSUT2M*基因编码蛋白与ZmSUT4属于同一个分支,其在源叶中表达量高于其他营养器官,而*OsSUT5Z*在营养器官表达很少。在生殖器官中,两种转录物在孕穗期至花后7d的圆锥花序中表达高^[17]。转*OsSUT2M*马铃薯中的糖分和淀粉含量没有明显改变;而转水稻的*OsSUT5Z*的马铃薯块茎中果糖含量显著增加,块茎的平均产量比对照增加1.9倍,结果表明*OsSUT5Z*可以通过转基因应用于高淀粉含量的玉米、大麦、水稻、土豆、甜薯及木薯的育种中^[18]。推测ZmSUT4-J也可通过转基因应用于高淀粉玉米的育种中,笔者已经开展了烟草和玉米的遗传转化工作,相关结果将另文发表。

生物信息学分析表明,本试验克隆的Zm-

*SUT4-J*基因与单子叶植物相关蔗糖转运蛋白同源性极高,同时与双子叶植物中的SUT4亚族成员同源性也很高,说明这一蔗糖转运蛋白功能比较保守。本研究所得到的ZmSUT4基因是组织特异性表达,在库器官(新叶和根)中表达量较高,推测其在库器官蔗糖卸载过程中起到重要调节作用。进一步对基因上游5'调控元件分析发现,启动子区域具有根、花粉和胚乳特异性表达的调控元件,还具有受光诱导、逆境胁迫、茉莉酸和赤霉素调节等多种诱导应答的调控元件(数据另文发表),预测该启动子可用于提高外源基因在根和胚乳中的表达量,同时可能在植物基因功能验证方面起到积极作用,对于阐明ZmSUT4的基因功能、发掘其对玉米产量和品质提高等方面的作用也很有帮助。

参考文献:

- [1] Kühn C, Grof C P. Sucrose transporters of higher plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2010(13): 288-298.
- [2] Chincinska I A, Liesche J, Krügel U, et al. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance[J]. Plant Physiology, 2008(146): 515-528.
- [3] Eom J S, Cho J I, Reinders A, et al. Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, OsSUT2, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth[J]. Plant Physiology, 2011, 157(1): 109-111.
- [4] Payyavula R S, Tay K H, Tsai C J, et al. The sucrose transporter family in populus: the importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning[J]. Plant Journal, 2011(65): 757-770.
- [5] 才卓,柳迎春,许明学,等.玉米自交系吉853的选育与应用研究[J].玉米科学,2010,18(3):1-5.
- [6] 路明,王敏,张洪艳,等.玉米骨干自交系吉853的遗传结构初探[J].农业工程,2011,1(1):105-108.
- [7] 刘兴武,孙发明,焦仁海,等.玉米自交系吉853的应用和改良[J].吉林农业科学,2005,30(5):13-16.
- [8] 贺红霞,郝东云,刘相国,等.一种适合单子叶植物转化的中间表达载体及其构建方法:中国,201310113281.7[P]. 2013-07-17.
- [9] Hofmann K, Stoffei W. Tmbase-A database of membrane spanning proteins segments[J]. Biol. Chem. Hoppe-seyler, 1993 (374): 160.
- [10] 赵婷婷,王俊刚,冯翠莲,等.甘蔗蔗糖转运蛋白ShSUT4基因克隆与表达分析[J].热带作物学报,2012,33(2):310-315.
- [11] Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, et al. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005(280): 21437-21443.

(下转第72页)

析^[1,5]。目前,多数研究者都是根据前人所描述的田间苗期症状特点及自己的接种方法出现的症状表现制定相应的病害分级标准,但由于接种不同,调查时间也不同,特别是田间是混合侵染,而盆栽则是单一菌株侵染,导致温室内盆栽接种症状与田间症状有差别,进而病害分级标准也有较大差别,如:魏巍等^[3]、周克琴等^[11]、马淑梅^[2]。这些分级标准的调查时间均为接种后 30 d 至 40 d,由于分级标准存在较大差异,导致不同研究者之间的数据缺乏可比性和共享性。

为寻找一种快速、准确,且研究者之间可以共同参考的一种鉴定方法,本研究模拟田间病害发生特点,针对大豆镰孢根腐病的优势种尖镰孢采用根部接种法以蛭石为载体,恒定条件下培养 10 d 后的结果;本检测方法仅需要 10 d,比以往的调查时间少 20 d 至 30 d,节省了大量时间;10 d 的苗较小,培养钵(钵口直径 8 cm)就可以种植 10 株,所占空间小,劳动量小,可以大批量进行尖镰孢致病性测定或是抗源筛选。同时,细化的病害分级标准,调查结果准确性更高而误差更小。

本鉴定方法是基于尖镰孢侵染大豆所引起根腐病所设计的,采用高粱粒接种法,明确接种量、接种方法、培养条件和调查时间。本方法保证了该鉴定方法的稳定性和可重复性;其次,通过对症状的观察和描述,确定侵染后所引起的各种症状特点及危害等级;再次,通过对不同症状的分析及结合实际发病特点,确立了病情指数的分级标准,将该分级标准确定为 5 个级别。通过实际应用该鉴定方法,验证其可行性,可以快速、大批量和准确地进行尖镰孢侵染大豆引起根腐病的鉴

定工作。本研究将对今后大豆尖镰孢致病力的测定、抗源的筛选和抗病品种选育具有较好的指导和参考作用。

参考文献:

- [1] Li Y G, Ma F M. Antagonistic mechanism of *Fusarium oxysporum* of soybean root rot by *Bacillus subtilis*[J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2012(108): 127-131.
- [2] 马淑梅. 黑龙江省大豆根腐病致病病原种类分布及抗病种质鉴定[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(27): 230-235.
- [3] 魏 巍, 许艳丽, 张思佳, 等. 大豆根腐病原镰孢菌种群多样性 DGGE 分析及其致病性研究[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(5): 500-508.
- [4] Li Y G, Zhang L, Wang C L, et al. Antagonistic mechanism and control effect of *Bacillus subtilis* Y2 against *Fusarium oxysporum* causing soybean root rot[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7(8): 652-656.
- [5] 王晓艳, 文景芝. 东北三省大豆根腐镰孢菌种类及其致病力分析[J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(4): 391-395.
- [6] 邢 安, 文景芝, 吕国忠, 等. 黑龙江省大豆根腐病株上镰孢菌的分离与鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(8): 5-9.
- [7] 白丽艳, 张全党, 李 斌, 等. 新疆阿勒泰地区大豆镰刀菌根腐病原鉴定及致病性测定[J]. *新疆农业科学*, 2009, 46(3): 543-548.
- [8] 李本金, 陈庆河, 兰成忠, 等. 福建省大豆根腐病原菌的鉴定[J]. *福建农业学报*, 2011, 26(5): 798-803.
- [9] 杨 帅, 王健生, 马振川, 等. 引致大豆根腐病的层出镰孢菌分离鉴定及其特性[J]. *植物保护学报*, 2012, 39(2): 187-188.
- [10] Burpee L L. Pathogenicity of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi representing five anasomosis groups[J]. *Phytopathology*, 1980, 70(9): 843-846.
- [11] 周克琴, 韩秉进, 张秋英, 等. 生防菌 BRF-1 和 BRF-2 对大豆根腐病和产量的影响[J]. *大豆科学*, 2012, 31(5): 801-803.

(上接第 22 页)

- [12] Slewinski T L, Garg A, Johal G S, et al. Maize SUT1 functions in phloem loading[J]. *Plant Signal Behavior*, 2010(5): 687-690.
- [13] Slewinski T L, Meeley R, Braun D M. Sucrose transporter functions in phloem loading in maize leaves[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009(60): 881-892.
- [14] Riesmeier J W, Frommer W B. Einfluß der Überexpression von Saccharosetransportern auf das Blühverhalten von Pflanzen: German, 4439 748.8[P]. 1994.
- [15] 马小龙, 刘颖慧, 袁祖丽, 等. 玉米蔗糖转运蛋白基因 ZmERD6 cDNAs 的克隆与逆境条件下的表达[J]. *作物学报*, 2009, 35(8): 1410-1417.
- [16] Chincinska I, Gier K, Krügel U, et al. Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4(26): 1-11.
- [17] Sun A, Xu H, Gong W K, et al. Cloning and expression analysis of rice sucrose transporter genes OsSUT2M and OsSUT5Z[J]. *J. Integr. Plant Biology*, 2008(50): 62-75.
- [18] Sun A, Dai Y, Zhang X, et al. A transgenic study on affecting potato tuber yield by expressing the rice sucrose transporter genes OsSUT5Z and OsSUT2M[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(7): 586-595.