

Hg-rps-23 基因 RNAi 转基因大豆对大豆胞囊线虫的抗性研究

仲晓芳¹, 杨向东¹, 张金花², 杨静¹, 邢国杰¹, 郭东全¹, 牛陆¹, 董英山¹

(1. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 吉林 公主岭 136100)

摘要:大豆胞囊线虫(Soybean Cyst Nematode, SCN)是一种极具破坏性的大豆寄生虫,一般可造成大豆减产 10%~20%。利用植物介导 RNAi 是培育抗虫转基因植物新品种的有效手段之一。本研究从大豆胞囊线虫中获得了编码参与线虫 mRNA 代谢的关键基因-核糖体蛋白基因 *Hg-rps-23*。采用农杆菌介导法将 *Hg-rps-23* RNA 干扰片段导入 Williams82 中。PCR 和 Southern 杂交检测结果表明,外源 RNAi 片段已导入受体大豆品种。病土接种鉴定结果表明,转基因大豆对大豆胞囊线虫 3 号生理小种抗性水平显著提高,表明利用植物介导 RNAi 可以有效提高大豆抗胞囊线虫水平。本研究为大豆抗胞囊线虫新材料的创制及新品种培育提供了一条新的途径。

关键词: *Hg-rps-23*; 大豆胞囊线虫; RNAi

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)00-

Generation of Transgenic RNAi Soybean Using Soybean Cyst Nematode *Hg-rps-23* Gene and Its Resistance to Soybean Cyst Nematode

ZHONG Xiaofang¹, YANG Xiangdong¹, ZHANG Jinhua², YANG Jing¹, XING Guojie¹, GUO Dongquan¹, NIU Lu¹, DONG Yingshan¹

(1. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Soybean cyst nematode is devastating pathogens that infect soybean and can cause 10-20% loss of yield. Plant-host mediated RNAi is one of effective strategy to breeding new insect-resistant transgenic plants. *Hg-rps-23*, which encodes ribosome protein of SCN was cloned into RNAi vector. Then, RNAi construct were transformed into Williams82 by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Analysis of transgenic plants using PCR and Southern blot method has proved that the *Hg-rps-23* RNAi fragments have inserted into the soybean genome. T2 transgenic plants were grown in soil with cysts and the results showed that the transgenic plants' resistance to SCN3 was significantly higher than that of receptor soybean. Our study suggested that plant-mediated RNAi could enhance the resistance of soybean to SCN. It also provides a new approach to generate SCN-resistant soybean materials and new cultivars.

Key words: *Hg-rps-23*; Soybean cyst nematode; RNAi

大豆胞囊线虫(Soybean Cyst Nematode, SCN)是一种土传定居性内寄生线虫,通常导致大豆根系短粗,叶片变黄。一般可造成大豆减产 10%~20%,严重地块可达 50%,甚至绝产。同时,由于

SCN 分布广,传播途径多,在土壤中长期存活,在生产上防治较为困难^[1]。尽管目前生产上利用抗胞囊线虫大豆如 Peking PI88788、PI90763、PI437654 和 PI438489 等培育了一批抗胞囊线虫大豆新品种,但由于抗性遗传基础非常狭窄,在一定条件下可能导致大豆生产中抗病品种的抗性快速丧失和其他非流行生理小种爆发,进而造成大豆大面积、大幅度减产。目前多个胞囊线虫生理小种均可以侵染和危害具有 PI88788 血缘的抗线虫品种^[2]。因此,如何进一步拓宽大豆胞囊线虫抗性遗传基础,创制和挖掘新型抗线虫种质资源

收稿日期: 2016-01-10

基金项目: 中国博士后基金项目(2013M531004); 吉林省科技厅项目(2014010126JC); 农业部转基因专项(2014ZX08004-004)

作者简介: 仲晓芳(1978-),女,助理研究员,博士,主要从事大豆分子生物学研究。

通讯作者: 董英山,男,博士,研究员, E-mail: ysdong@cjaas.com

将是目前及将来一段时间内大豆抗胞囊线虫育种工作的研究重点。

RNAi, 即 RNA 干扰 (RNA interference), 外源双链 RNA 导入到细胞后, 经切割与识别, 与其同源的 mRNA 结合并导致其降解, 从而使得内源基因沉默^[3]。在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中第一次发现了 RNAi 现象^[4], 随后经 Fire 等^[5]证实, 如今已在多种动物、植物和真菌中发现了 RNAi 现象。由于 RNAi 具有多种优点如特异性、高效性、可在细胞间传播以及遗传性等^[6-10], 成为新的研究基因功能的有效手段, 近年来在植物抗线虫研究方面得到了广泛的应用^[11-15]。近年来, 利用病原线虫 (*H. glycines*) 基因进行大豆抗性改良方面的研究有了一些新的突破。Steeves 等于 2006 年首次将带有大豆胞囊线虫主要精子蛋白 (Major Sperm Protein Gene, MSP) 基因的一段反向重复序列构建到 RNAi 表达载体上并转化大豆。接种鉴定结果表明, 转基因大豆植株胞囊数比对照降低 68%, 而且抗性性状能够稳定遗传至后代^[16]。Marra 等通过发根农杆菌介导法转化将 *hgcp* (大豆胞囊线虫半胱氨酸蛋白酶编码基因) 转入到大豆中, 接种二龄期线虫鉴定结果表明, 转基因植株根部寄生的雌虫及胞囊的数目都有显著的降低^[17]。Li 等利用 RNAi 技术, 通过抑制 *H. glycines* 3 个内源基因的表达, 获得了抗性明显提高的转基因大豆植株^[18]。可见, 通过 RNAi 技术抑制 SCN 内源关键基因的表达是控制 SCN 的一种有效方法, 这也为大豆胞囊线虫抗性研究与应用提供了一个新的技术思路。

Hg-rps-23 是大豆胞囊线虫中编码核糖体蛋白的基因, 该基因的沉默能够导致线虫死亡。Alkharouf 等将该基因与其他两个基因构建到干扰载体中, 转录 dsRNA 后饲喂 J2 龄线虫。经过 5 d 的培养, 与对照相比, >95% 的线虫致死^[19]。本研究取该基因为干扰的目的基因, 构建 RNAi 载体, 利用农杆菌介导法将该基因的干扰片段转到大豆中, 以期获得抗大豆胞囊线虫大豆新材料。

1 材料和方法

1.1 材料和目的基因

本文所用的大豆受体材料 Williams82 和农杆菌菌株 EHA101, 为本实验室保存, pCambia3301 载体由东北师范大学提供。该载体携带大豆根特异性启动子 *Gm-root7* 和拟南芥 *pdk* 内含子。

目的基因 *Hg-rps-23* cDNA 序列 (GeneBank

accession No. BF014259) 根据 Alkharouf 等 2007 年发表的文章由华大基因合成, 全长 374 bp^[19]。

1.2 植物 RNAi 载体的构建

根据 Alkharouf 等^[19]设计的引物, 从 SCN 中获得 *Hg-rps-23* 基因片段 (表 1, Rps-F 和 Rps-R)。采用常规分子操作技术, 将该片段的正向和反向序列分别连接到中间载体 pHANNIBAL-pRBCS2 上 *pdk* 内含子的两端, 载体图谱由 Vector NTI 软件绘制。构建植物表达载体 pC3301-rps23 RNAi 载体, 采用电激转化法, 将载体质粒导入农杆菌 EHA105。

表 1 引物列表

引物名称	序列 (5'-3')
Rps-F	GTGACCAGCTGAACGAGAGTGT
Rps-R	GTCCGGGACCAAGAATACGAG
Root7-F	ATCGATGCCTTCTCGAGAAAAAACC
Root7-R	AAGCTTATATATTATACGCAATTTT
Rps23C-F	GCAAGGAAAGCGTGCTAG
Rps23C-R	GTGGCTGAAATCTTGAAACA

1.3 农杆菌介导的遗传转化

挑取携带 pC3301-rps23 RNAi 质粒的农杆菌菌落, 置于 YEP 培养基 (卡那霉素 50 mg/L, 利福平 25 mg/L)。培养至对数生长期 ($OD_{600}=0.6 \sim 0.8$) 后, 离心收集菌体, 并用重悬培养液 (表 2) 重悬至 $OD_{600}=0.5$ 备用。大豆遗传转化过程如图 1 所示, 各种培养基组成见表 2^[20]。

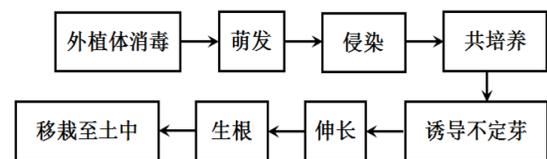


图 1 大豆遗传转化流程图

选取成熟饱满的 Williams82 种子, 用氯气消毒 24 h (50 mL NaClO+2 mL HCl) 后, 接种在萌发培养基上。萌发后的种子去除叶芽后置于重悬培养液中进行侵染, 然后共培养 3 d, 转入诱导培养基中, 培养 14 d。之后转移到含有草丁膦 (5 mg·L⁻¹) 的诱导培养基中继续培养 14 d; 转入不定芽伸长培养基中, 14 d 继代一次至芽伸长至 3~5 cm, 从基部切下, 转入生根培养基中, 待根系发育好, 移栽至盆土中^[20]。

1.4 转基因大豆 PCR 检测

T₁ 代转基因大豆种植于温室中, 待单叶完全张开时取单叶用于 PCR 检测。DNA 提取采用高盐 CTAB 法^[21], 引物见表 1 (Rps23C-F 和 Rps25C-

R)。质粒的提取采用质粒小提试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,EM101)。2×PCR mix购自北京全式金生物技术有限公司(货号:AS111),PCR

扩增程序:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环,最后72℃延伸10 min。扩增产物于1%琼脂糖凝胶电泳检测。

表2 各种培养基组成^[20]

培养基名称	组成成分
萌发培养基	B5无机,B5有机,2%蔗糖,1 mg·L ⁻¹ 6-BA,0.2%凝胶,pH=5.8
重悬培养液	1/10 B5无机,B5有机,3%蔗糖,20 μmol·L ⁻¹ MES,0.25 mg·L ⁻¹ GA ₃ ,1.67 mg·L ⁻¹ 6-BAP,200 μmol·L ⁻¹ AS,1 mmol·L ⁻¹ DTT,pH=5.2
共培养培养基	B5无机,B5有机,3%蔗糖,20 μmol·L ⁻¹ MES,0.25 mg·L ⁻¹ GA ₃ ,1.67 mg·L ⁻¹ 6-BAP,200 μmol·L ⁻¹ AS,400 mg·L ⁻¹ Cys,1 mmol·L ⁻¹ DTT,0.5%琼脂pH=5.2
诱导培养基	B5无机,B5有机,3%蔗糖,3 mmol·L ⁻¹ MES,1.67 mg·L ⁻¹ 6-BAP,250 mg·L ⁻¹ 头孢噻肟钠,100 mg·L ⁻¹ 阿莫西林,0.2%凝胶pH=5.7
伸长培养基	MS无机,B5有机,3%蔗糖,3 mmol·L ⁻¹ MES,50 mg·L ⁻¹ 天冬氨酸,100 mg·L ⁻¹ L-焦谷氨酸,0.1 mg·L ⁻¹ IAA,0.25 mg·L ⁻¹ GA ₃ ,1 mg·L ⁻¹ 玉米素核苷,250 mg·L ⁻¹ 头孢噻肟钠,100 mg·L ⁻¹ 阿莫西林,0.2%凝胶,pH=5.7
生根培养基	MS无机,B5有机,2%蔗糖,3 mmol·L ⁻¹ MES,0.7%琼脂,pH=5.6

1.5 转基因大豆总DNA提取和Southern杂交

采用高盐CTAB法提取大豆总DNA^[21]。取纯化后的DNA 30 μg,用EcoRI(NEB)过夜酶切,经电泳检测酶切完全后进行转膜。杂交试剂盒为罗氏杂交与检测试剂盒I(货号:11745830912)。Hg-rps-23探针的标记量为1 μg,质粒标记量为5 ng,标记时间20 h。杂交完毕后洗脱强度分别为0.5×SSC和0.1% SDS、2×SSC和0.1% SDS各2次,每次15 min。显色反应于室温避光条件下6 h完成,最后用蒸馏水中和显色液。其余过程与说明书相同。

1.6 胞囊线虫抗性鉴定

采用病土盆栽法(病土采自吉林省洮南地区,大豆胞囊线虫优势生理小种为3号小种)对T₂代植株进行胞囊线虫抗性鉴定。将病土(每百克风干土胞囊含量为30~60个)充分混匀后,装入直径15 cm的花盆,每株系播5盆,每盆留苗3株,35 d后调查胞囊数量,计算IP值和评估抗级。同时,播种感病品种Lee68作为计算标准,受体材料Williams82作为对照。寄生指数IP(Index of parasitism)值计算公式如下:IP=(N_x/N_s)×100%^[22],其中N_x为待测植株的平均胞囊数,N_s为标准高感品种Lee68的平均胞囊数。抗性分级分别为:0~9%为高抗(VR),10%~30%为中抗(MR),31%~60%为中感(MS),61%及以上为感病(VR)^[23-24]。

2 结果与分析

2.1 目的基因的获得与表达载体构建

本文根据Alkharouf等的研究结果,人工合成

Hg-rps-23 mRNA的cDNA序列,(全长见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/BF014259>, GeneBank accession No. BF014259)。根据该序列,扩增Hg-rps-23干扰片段,正向和反向序列之间由pdk内含子连接。本研究采用的植物表达载体为pCAMBIA3301,载体中携带大豆根部特异性启动子Gm-root7,驱动外源RNAi片段在大豆根中的特异性表达。构建载体命名为pC3301-rps23 RNAi,如图2所示,插入片段全长3 022 bp。为便于筛选,将Bar基因作为筛选标记,启动子为CaMV35S。

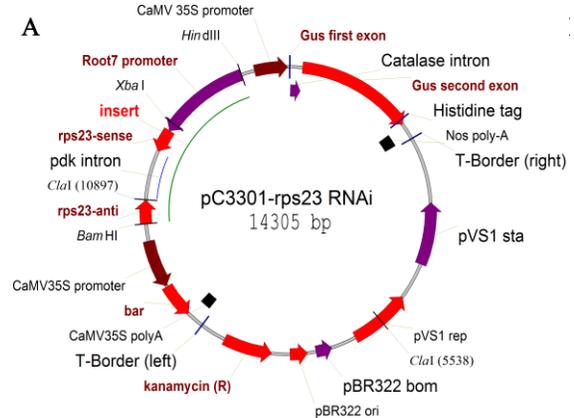


图2 Hg-rps-23 RNAi载体的构建

2.2 转基因植株的获得

利用农杆菌侵染大豆子叶节,约2 330个Williams82外植体经侵染后获得了大约1 100个具有草丁膦抗性的外植体,经培养和筛选,最后获得抗性再生植株19株,部分植株和Bar试纸条检测结果如图3。炼苗后,取叶片做Bar试纸条检测,显示阳性的植株移栽至盆土中生长、结实。

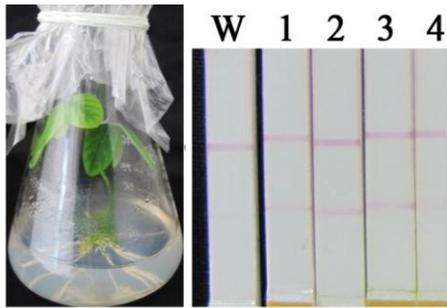


图3 获得的转基因植株以及 Bar 试纸条检测结果
W: william882; 1~4: 阳性植株

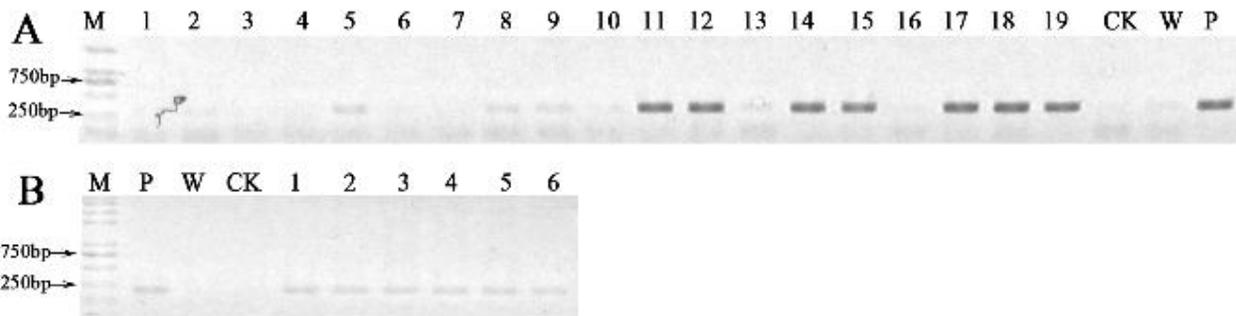


图4 转基因植株的 PCR 检测

A: T₁代转 *Hg-rps-23* 基因大豆的 PCR 检测 B: T₂代部分转基因植株的 PCR 检测
M: Trans2K DNA marker; 1~19: 转基因植株; CK: Williams82; W: water; P: 阳性质粒

2.4 Southern 杂交

从 PCR 检测阳性的植株中,选取目的条带明显的 7 株,提取叶片总 DNA,经酶切后做 Southern 杂交检测,结果如图 5 所示。7 个植株中,只有编号 11 的植株 *Hg-rps-23* 是以单拷贝的形式插入到基因组中,编号 12 为 4 个拷贝,其余均为双拷贝。Southern 杂交结果证明, *Hg-rps-23* 基因的 RNAi 片段已经整合到大豆的基因组中。

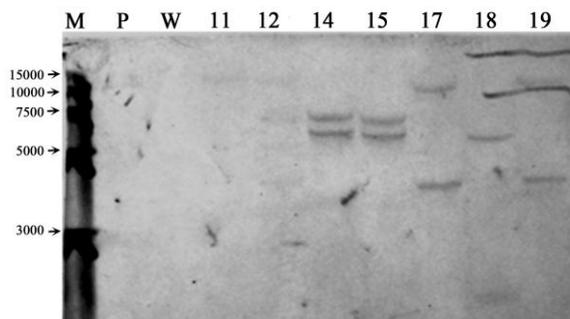


图5 *Hg-rps-23* 转基因大豆 Southern 杂交检测
M: Trans15K DNA marker; P: 阳性质粒; W: Williams82;
11~19: 转基因植株

2.5 胞囊线虫抗性鉴定

采用病土接种法(大豆胞囊线虫优势生理小种为 3 号小种)对 T₂代转基因大豆进行胞囊线虫抗性鉴定,根据盆栽胞囊数量的统计结果来看,

2.3 PCR 检测

T₀代种子于温室中扩繁,其中 PCR 检测阳性的植株于温室加代繁殖。本文所检测的为 19 个 T₁代转基因植株(图 4A)及部分 T₂代植株(图 4B)。取待检测植株的叶片,提取总 DNA,经 PCR 检测,阳性植株为 10 株,其中编号 5、8 和 9 的植株,目的条带较弱,不做进一步检测(图 4)。PCR 检测证明,经过两代繁殖, *Hg-rps-23* 基因能够稳定地遗传给后代。

这 7 个株系中,与受体材料 Williams82 以及高感品种 Lee68 相比较,共获得了 2 个高抗的材料,即 12 和 17 号株系,1 个中抗材料,即 12 号株系,两个中感(15 和 19)和两个感病材料(14 和 18)(表 3)。表明利用植物介导 RNAi 可以有效提高大豆抗胞囊线虫水平。

表 3 T₂代转基因植株的胞囊线虫抗性统计

材料	平均胞囊数量	IP 值	抗性评价
11	9.20	9.26	MR
12	1.50	1.51	VR
14	62.9	63.34	VS
15	47.8	48.13	MS
17	5.67	5.71	VR
18	60.9	61.33	VS
19	56.3	56.70	MS
W82	120.82	121.67	VS
Lee68	99.3	-	-

4 讨论

RNAi 技术在植物线虫防治方面的应用越来越广泛,显微注射 dsRNA、浸泡、通过植物介导 RNAi、病毒诱导线虫 RNAi 等。由于 RNAi 能够在

植物中表达线虫的靶 dsRNA,从而抑制其生长发育或导致线虫死亡,所以成为防治线虫的有效方法之一。近年来,通过体外 RNAi 以及植物介导的 RNAi 等策略^[15, 25-26],已经挖掘出一批有效的基因,作为 RNA 干扰的靶标基因,这些基因包括线虫寄生所需基因、线虫生长发育以及 mRNA 代谢相关等基因^[25-26]。例如大豆胞囊线虫生长发育必需基因和 mRNA 代谢相关的除了上文中提到的 *MSP*^[16]、*Cpn-1*^[18]、*Prp-17*^[18]、*Y25*^[18] 以及本研究中所用到的 *Hg-rps-23* 基因外,还有 *Hg-rps-3a*、*Hg-spk-1*、*Hg-rps-4*、*Hg-snb-1*^[27]、*Hg-eng1*^[28] 等也被证实具有不同程度的胞囊线虫抗性。*Prp-17*, 编码 mRNA 剪接因子,在线虫侵染的 RNAi 转基因大豆中,每克根部组织胞囊和卵量数量都显著减少(53%和 79%),*Cpn-1* 和 *Y25* RNAi 转基因大豆每个根中胞囊的数量与对照相比,分别减少 95%和 81%^[18]。*Hg-rps-3a*、*Hg-rps-4*、*Hg-spk-1* 及 *Hg-snb-1* 四个基因的串联反向重复序列的干扰片段在大豆根中表达,能够使大豆胞囊线虫的胞囊数量减少 81%~93%^[27]; *Hg-eng1* 蛋白,由 β -1-4 纤维素内切酶编码,其作用是降解植物组织,利于线虫入侵及在寄主内迁移,经干扰后能够显著地降低线虫在植物中的寄生^[28]。mRNA 代谢相关基因的证实,表明与 mRNA 代谢相关的基因可能对 RNAi 更敏感,因而可成为寄生线虫控制的靶基因。

本研究所用基因 *Hg-rps-23*,是经过 dsRNA 浸泡实验验证具有 RNAi 效果且能够有效减少大豆根部胞囊数量的基因^[19]。实验中,通过农杆菌介导,将该基因的干扰片段导入受体大豆中。 T_1 和 T_2 代转基因植株通过 PCR 检测,证实 *Hg-rps-23* 基因的干扰片段已经转入大豆中。 T_1 代植株的 Southern 杂交检测,该基因的干扰片段已经整合到大豆基因组中,有的植株中是以单拷贝形式插入到基因组中,而且能够稳定地遗传给后代。通过盆栽抗病性鉴定,已经筛选出胞囊线虫抗级为高抗和中抗的转基因大豆材料,为今后培育抗病新品种提供了材料来源。本研究证明利用植物介导 RNAi 可为大豆抗胞囊线虫新材料的创制及新品种培育提供一条新的途径。

参考文献:

- [1] 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(2): 609-619.
- [2] 陈观水,陆熙园,吴 杨,等. 大豆抗胞囊线虫育种研究进展[J]. 福建农林大学学报, 2003, 35(2): 156-161.
- [3] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001, 409(6818): 363-366.
- [4] Guo S, Kempthues K. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed[J]. Cell, 1995, 81(4): 611-620.
- [5] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [6] Kawasaki H, Taira K. Short hairpin type of dsRNA that are controlled by tRNA (Val) promoter significantly induce RNAi mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(2): 7002-7007.
- [7] 石 智,符立梧. RNAi 及其在肿瘤研究中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 7(31): 492-499.
- [8] Caplen N J, Fleenor J, Fire A, et al. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells[J]. Gene, 2000, 252(1-2): 95-105.
- [9] Zamore P D, Tuschli T, Sharp P A, et al. RNAi: dsRNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J]. Cell, 1999, 101(1): 25-33.
- [10] Jones L, Ratcliff F, Baulcombe D C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance[J]. Current Biology, 2001, 11(10): 747-757.
- [11] Papolu P K, Gantasala N P, Kamaraju D, et al. Utility of host delivered RNAi of two FMRF amide like peptides, flp-14 and flp-18, for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*[J]. Plos One, 2013, 8(11): e80603.
- [12] Sindhu A S, Maier T R, Mitchum M G, et al. Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(1): 315-324.
- [13] Rosso M N, Jones J T, Abad P. RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes[J]. Annual Review of Phytopathology, 2009(47): 207-232.
- [14] Dinh P T, Knoblauch M, Elling A A. Non-Destructive Imaging of Plant-Parasitic Nematode Development and Host Response to Nematode Pathogenesis[J]. Phytopathology, 2014, 104(5): 497-506.
- [15] 杨 巧,刘 倩,简 恒. RNAi 技术在抗大豆胞囊线虫基因工程研究中的应用[J]. 大豆科学, 2013, 32(4): 548-554.
- [16] Steeves R M, Todd T C, Essig J S, et al. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction[J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(11): 991-999.
- [17] Marra B M, Souza D S, Aguiar J N, et al. Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots[J]. Peptides, 2009, 30(5): 825-831.
- [18] Li J, Todd T C, Oakley T R, et al. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe[J]. Planta, 2010, 232(3): 775-785.

- [19] Alkharouf N W, Klink V P, Matthews B F. Identification of *Heterodera glycines*(soybean cyst nematode [SCN]) cDNA sequences with high identity to those of *Caenorhabditis elegans* having lethal mutant or RNAi phenotypes[J]. *Experimental Parasitology*, 2007, 115(3): 247-258.
- [20] 于志晶,蔡勤安,刘艳芝,等.拟南芥抗逆基因 *DREB2A* 转化大豆的研究[J]. *大豆科学*, 2013, 32(5): 606-608.
- [21] Tel-Zur N, Abbo S, Myslabodski D, et al. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hyllocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae)[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 17(3): 249-254.
- [22] Schmitt D P, Shannon J P. Differentiating soybean responses to *Heterodera glycines* races[J]. *Crop Science*, 1992, 32(1): 275-277.
- [23] 颜清上,王连铮.大豆抗孢囊线虫病鉴定方法研究进展[J]. *大豆科学*, 1995, 14(2): 151-159.
- [24] 王梓贞,韩英鹏,滕卫丽,等.大豆孢囊线虫非小种特异性品种的抗性评价与农艺性状相关分析[J]. *大豆科学*, 2009, 28(4): 647-650.
- [25] 仲晓芳,刘晓冬,杨向东,等.RNAi在植物寄生线虫抗性研究中靶基因的选择策略[J]. *大豆科学*, 2014, 33(4): 599-602.
- [26] Li J R, Todd T, Lee J, et al. Biotechnological application of functional genomics towards plant-parasitic nematode control [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(9): 936-944.
- [27] Klink V, Kim K, Martins V, et al. A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*[J]. *Planta*, 2009, 230(1): 53-71.
- [28] Bakheta M, Urwin P, Atkinson H J. qPCR analysis and RNAi define pharyngeal gland cell expressed genes of *Heterodera glycines* required for initial interactions with the host[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(3): 306-312.

(责任编辑:范杰英)