

大豆胞囊线虫相关基因 *GmSBPC* 的 克隆及表达模式分析

宋庚晨, 曲 硕, 胡世豪, 刘 芳, 孙浩文, 赵 雪, 韩英鹏
(东北农业大学农学院/农业农村部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要: 以黑农37(感)和东农L10(抗)大豆胞囊线虫3号生理小种胁迫RNA-seq数据, 筛选出差异表达基因 *GmSBPC*, 对该基因编码蛋白的空间结构、蛋白理化性质、亲疏水性等进行生物信息学分析。利用抗病东农L10根系cDNA克隆 *GmSBPC*。将含有pCAMBIA1302-*GmSBPC*重组载体转化至大肠杆菌 *DH5α*、农杆菌GV3101 (*psoup-p19*)进行亚细胞定位分析。重组pCAMBIA3300-*GmSBPC*转至根癌农杆菌K599进行大豆毛状根侵染。线虫土种植东农L10(抗)、东农50(感), 大豆胞囊线虫胁迫处理0 d、3 d、6 d、9 d、12 d、15 d分别取根、茎、叶进行qRT-PCR分析基因表达模式。结果表明, *GmSBPC*蛋白编码146个氨基酸, 为不溶性蛋白, α 螺旋区占28.08%、延伸结构占15.75%、无规则卷曲占56.16%。亚细胞定位结果表明基因定位在细胞核中。过表达毛状根相比野生型大豆单位面积内线虫数目减少。大豆胞囊线虫胁迫下该基因在东农50和东农L10根系的表达模式为先升高后降低, 整体表达水平东农L10根系 > 东农50根系, 东农L10根系中12 d表达量最高, 该时期为线虫侵染大豆的二龄幼虫时期, 因此判定该基因对线虫胁迫存在响应应答反应, 推测该基因参与大豆胞囊线虫的胁迫反应。这些研究结果有助于进一步探讨 *SBPC* 基因在大豆抗胞囊线虫过程中的生理功能。

关键词: 大豆; *GmSBPC*; qRT-PCR; 亚细胞

Cloning and Expression Pattern Analysis of *GmSBPC* Associated with Soybean Cyst Nematodes

SONG Gengchen, QU Shuo, HU Shihao, LIU Fang, SUN Haowen, ZHAO Xue, HAN Yingpeng
(College of Agriculture, Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Northeast Soybean Biology and
Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150030)

Abstract: This study used RNA-seq data from physiological race 3 of soybean cyst nematode, Heinong 37 (susceptible) and Dongnong L10 (resistant), to screen for the differentially expressed gene *GmSBPC*. Bioinformatics analysis was conducted on the spatial structure, protein physicochemical properties, hydrophilicity, and hydrophobicity of the protein encoded by this gene. Cloning *GmSBPC* using cDNA from the root system of disease resistant Dongnong L10. Transform the recombinant vector containing pCAMBIA1302-*GmSBPC* into *Escherichia coli DH5α*, *Agrobacterium GV3101 (psoup-p19)* for subcellular localization analysis. Recombinant pCAMBIA3300-*GmSBPC* was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* K599 for soybean hairy root infection. Planting Dongnong L10 (resistant) and Dongnong 50 (susceptible) in nematode soil, soybean cyst nematode stress treatment was performed on roots, stems, and leaves at 0, 3, 6, 9, 12, and 15 days for qRT-PCR analysis of gene expression patterns. The results indicate that the *GmSBPC* protein encodes 146 amino

收稿日期: 2023-12-11 网络出版日期: 2024-01-12

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231211003>

第一作者研究方向为大豆基因组学和基因工程在作物育种上的应用, E-mail: sgc1218@163.com; 曲硕为共同第一作者

通信作者: 韩英鹏, 研究方向为大豆基因组学和基因工程在作物育种上的应用, E-mail: hyp234286@aliyun.com

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U22A20473); 黑龙江省重点基金项目 (ZD2022C002); 黑龙江省重点研发项目 (JD22A015); 国家现代农业岗位体系项目 (CARS-04-PS07); 东北农业大学科研项目 (NEAU2023QNLJ-003)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (U22A20473); Heilongjiang Provincial Key Fund Projects (ZD2022C002); Heilongjiang Provincial Key Research and Development Projects (JD22A015); National Modern Agricultural Position System Projects (CARS-04-PS07); Northeast Agricultural University Scientific Research Projects (NEAU2023QNLJ-003)

acids and is an insoluble protein, α spiral zone accounts for 28.08%, extended structure accounts for 15.75%, and irregular curl accounts for 56.16%. The subcellular localization results indicate that the gene is located in the nucleus. Overexpression of hairy roots reduces the number of nematodes per unit area compared to wild-type soybeans. The gene expression pattern of the roots of Dongnong 50 and Dongnong L10 under soybean cyst nematode stress was initially increased and then decreased, with the overall expression level being higher in Dongnong L10 roots than in Dongnong 50 roots. The highest expression level was observed in Dongnong L10 roots after 12 days, which is the second instar larval stage of soybean infection by nematodes. Therefore, it is determined that this gene has a response to nematode stress, and it is speculated that this gene is involved in the stress response of soybean cyst nematodes. These research results contribute to further exploring the physiological function of *SBPC* gene in soybean resistance to cyst nematodes.

Key words: soybean; *GmSBPC*; qRT-PCR; subcellular

大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)古称菽,籽粒富含蛋白质和油。大豆原产于中国,作为我国重要粮食作物,已有 5000 多年栽培历史^[1-2]。大豆胞囊线虫病 *Heterodera glycines Ichinohe* 是全球范围流行的土传性病害。大豆胞囊线虫病发病地上部分植株矮化、子叶发黄、花期延迟、坐荚率低、籽粒不实^[3],可导致大豆减产 30%~50%,甚至颗粒无收^[4]。大豆胞囊线虫生活史可分为卵期(J_1)、4 个幼虫龄期(J_2)和成虫期(J_3),幼虫龄期是大豆侵害较为严重的时期^[5]。大豆胞囊线虫通过自身蠕动以及农耕、水流、种子等传播媒介侵入大豆幼苗根系,寄生于根皮层,利用口器刺入细胞壁,分泌消化酶,破坏根部相邻薄壁细胞建立合胞体,以此获得稳定的养分来源^[6]。大豆胞囊线虫经 4 次蜕皮发育为成虫,待雌雄虫成熟、交尾、雌虫产卵、合胞体退化、胞囊分泌虫卵、脱落进入土壤,胞囊黄色变为褐色^[7],即一个世代(约 30 d)侵染结束。根据不同群体对大豆致病力差异,将大豆胞囊线虫病划分为 16 个生理小种,目前造成我国大豆经济损失较为严重的致病小种以 1 号、3 号、4 号为主,其中 3 号生理小种为优势种^[8],主要分布于东北地区;具有强侵染能力的 4 号生理小种大多遍布在黄淮海地区^[9]。李沐慧等^[10]对东北地区大豆胞囊线虫病展开调查,结果显示大豆胞囊线虫病发病率高达 82.67%。黑龙江省是大豆主产区,产量居全国首位,大豆胞囊线虫病发生频繁。伴随大豆种植面积扩大、连作等因素导致生理小种变异加速,选育抗病品种^[11]、挖掘新的位点和基因^[12]是防治该病最经济有效的方法。目前,通过发掘与大豆重要农艺性状相关的转录因子,研究其在植物对病原体的免疫应答激活过程中的转录重编程所发挥的作用,可为大豆遗传改良提供候选基因,有利于培育出具有优良性状的大豆新品种。

转录因子(TF, transcription factor)又称反式作用因子,通过与目标基因启动子区域中的顺式作用元件发生相互作用来调节基因特异性表达^[13-14]。SQUAMOSA 启动子结合蛋白(SBP, SQUAMOSA promoter binding protein)转录因子是目前仅在绿色植物中所特有的一类重要转录因子,其编码的 DNA 结合结构域均含有一段保守的核苷酸序列(SBP-box),通常由 79 个氨基酸残基高度保守的 SBP 结构域组成。Yamasaki 等^[15]采用核磁共振法测定该结构域含有 2 个锌指结构,即由 2 个 Zn^{2+} 通过 8 个 Cys 或 His 残基结合而成的 $Cys_3HisCys_2HisCys$ 或 $Cys_6HisCys$ 序列结构,其中前后 4 个残基分别与 1 个 Zn^{2+} 配位,以维持构象的稳定,并且锌指结构 C 末端有一段与 $Cys_2HisCys$ 序列部分重叠的双向核定位信号,可引导 SBP 蛋白进入核内行使功能。SBP 蛋白最早由 Klein 等^[16]从金鱼草(*Antirrhinum majus*)的花分生组织中发现,能够特异性结合基因 *MADS-box* 的 *SQUAMOSA* 启动子区域,指导该基因转录表达,从而调控花的形态发育。经鉴定 SBP 基因存在于拟南芥^[17]、大豆^[18]、玉米^[19]、水稻^[20]等物种中,主要参与植物的生长发育^[21]、激素信号的介导^[22]、逆境胁迫应答^[23-24]等诸多方面,如 AtSPL8 蛋白通过调节赤霉素介导发育过程来影响拟南芥花药的发生^[25],SBP 转录因子中的 *lg1* 基因突变会导致玉米不能形成叶耳和舌叶^[26],耐盐基因 *OsSPL10* 调控水稻表皮毛的发育^[27],但是多数 SBP 基因在调控植物生长发育时也会受到植物中 miRNAs 的调控。miRNAs 的结构是一条长度约 20~24 个核苷酸的 RNA 碱基链,其结合位点往往是相对于 mRNA 的 3'UTR 区域,通过与靶向信使 RNA 作用降解或抑制翻译的进行来实现对目的基因的表达调控^[28]。研究发现,拟南芥从幼体到成熟的转变受体内上游

调控因子 miR156 介导^[29], miR156 与 *SBP* 基因互作能够影响水稻开花进程及顶端优势等^[30]。从这些研究中可以看出, *SBP* 家族基因对植物生长发育和响应逆境胁迫至关重要。

转录组测序技术(RNA-Seq)成功应用于大豆胞囊线虫抗性相关基因的挖掘筛选^[31]。利用转录组测序可以高通量地获取物种在单核苷酸水平表达的基因信息,分析未知转录本间差异表达的基因^[32]。前人研究集中证明 *SBP* 家族在多个物种中发挥重要功能,然而,针对该家族成员与大豆胞囊线虫抗性相关机制研究尚处于空白。本研究拟以抗大豆胞囊线虫病 3 号生理小种胁迫品种东农 L10 (抗)和黑农 37 (感)为实验材料,采用 Illumina HiSeqTM 2500 测序技术对大豆胞囊线虫 3 号生理小种胁迫下的 *GmSBPC* 转录因子差异表达进行转录组分析,旨在为挖掘大豆胞囊线虫相关转录因子,也为后续抗大豆胞囊线虫种质资源的创制奠定重要的基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料 东农 L10(抗)和东农 50(感)、黑农 37(感)选自东北农业大学阿城基地(北纬 45.32°, 东经 126.58°)。选择无病斑、大小一致大豆种子用于后续试验研究。根据 Riggs 等^[33]的鉴别方法均已

鉴定其具备抗、感病特性,其中东农 50 为毛状根转化受体材料,东农 L10 和黑农 37 为转录组测序材料。

1.1.2 病土材料 大豆胞囊线虫 3 号生理小种采集于黑龙江省科学院大庆分院育种基地(北纬 46.39°, 东经 125.36°)。繁殖病圃病土为大豆连作 10 年。

1.1.3 试验样品 利用无菌蛭石将 10 株东农 50 和东农 L10 催苗至第 2 个三小叶时期,设置生物学重复为 5 次,将幼苗移栽至大豆胞囊线虫病土中,线虫胁迫处理 0~15 d,每隔 3 d 分别取东农 L10 和东农 50 大豆的根、茎、第一轮三出复叶组织样品,剪取 2 g 组织放于编好号的 1.5 mL 离心管中,并立即速冻于液氮罐中以达到保鲜作用,其余样品冻存于 -80℃ 冰箱保存备用^[34]。本氏烟草由东北农业大学大豆生物重点实验室提供。

1.1.4 质粒与菌种 过表达载体 pCAMBIA3300、亚细胞定位载体 pCAMBIA1302、大肠杆菌感受态 (*Escherichia coli*) DH5a、异源蛋白表达农杆菌 *Agrobacterium* GV3101 (*psoup-p19*)、根癌农杆菌 K599 均来自 Coolaber。

1.2 试验方法

1.2.1 生物信息学分析 利用生物信息学在线软件对 *GmSBPC* 转录因子的功能进行预测和分析(表 1)。同时对 4 个差异表达基因上游 2000 bp 基序特异性结合位点进行预测分析,筛选临界阈值 $P \leq 10^{-5}$ 。

表 1 生物信息学在线工具及软件分析

Table 1 Bioinformatics online tools and software analysis

| 在线工具 | 网址/软件 | 功能 |
|------------------|---|-----------|
| Online software | Websites/Software | Function |
| Phytozome v13 | https://Phytozome-next.jgi.doe.gov | 检索基因序列 |
| DNAMAN Version 8 | 软件 | 比对基因序列 |
| Prot-Param | https://web.expasy.org/protparam/ | 理化性质 |
| ProtScale | https://web.expasy.org/protscale/ | 亲/疏水性 |
| NetPhos-3.1 | https://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/ | 磷酸化位点 |
| SignalP-5.0 | https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/ | 预测信号肽 |
| PSORT II | https://psort.hgc.jp/form2.html | 亚细胞定位 |
| TMHMM-2.0 | https://services.healthtech.dtu.dk/services.php | 跨膜结构 |
| SOP-MA | https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl | 二级结构 |
| SWISS-MODEL | https://swissmodel.expasy.org/interactive | 三级结构 |
| NCBI | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ | 结构域预测 |
| MEGA X | 软件 | 系统发育树分析 |
| Plant TFDB | PlantTFDB - Plant Transcription Factor Database | 转录因子调控靶基因 |
| Chiplot | https://www.chiplot.online/tvbot.html | 美化系统发育树 |
| Gephi | 软件 | 特异性结合位点预测 |

1.2.2 GmSBPC蛋白系统进化树分析 利用MEGA X软件,将GmSBPC基因在大豆、玉米、拟南芥等植物中同源比对蛋白整理成Fasta格式,进行同源蛋白比对。采用邻接法(N-J, neighbour joining)进行比对,Bootstrap次数为1200次,完成进化树的构建及美化。

1.2.3 克隆CDS序列 当大豆东农L10长出第1个三小叶时,取一株根部组织样品(约1g),RNA的提取利用Baypure磁珠法总RNA提取试剂盒(Bayzol),cDNA的合成则采用反转录试剂盒(TOYOBO)。反转录体系设置20 μL:RNA 4 μL(65℃ 5 min使mRNA二级结构打开,迅速插入冰中

防止复性)、4×DNA Master Mix 4μL、Nuclease water 8 μL、5×RT Master MixII 4μL;反转录条件为:37℃ 15 min,50℃ 5 min,98℃ 5 min,4℃保存。以反转录得到的cDNA作为克隆模板,使用phyzome V₁₃设计特异引物扩增基因序列(表2),体系设置20 μL:GmSBPC-F 1 μL、GmSBPC-R 1 μL、cDNA 1 μL、KOD One™ PCR Master Mix (TOYOBO) 10 μL、ddH₂O 7 μL。PCR程序为:98℃预变性3 min;98℃变性10 s,55℃退火5 s,68℃延伸6 s,36次循环;68℃再延伸10 min,4℃保存。凝胶成像仪获得目标条带,利用Gel Extraction Kit(Omega)试剂盒切胶纯化回收。

表2 引物信息

Table 2 Primer information

| 引物名称 Primer name | 序列(5'-3') Sequence(5'-3') | 酶切位点 Restriction sites | 目的片段大小 (bp) Target fragment size | 用途 Use |
|---------------------|--|---------------------------|--|-----------|
| T-GmSBPC-F | <u>TCGAGCTCCGTCGACAAGCTTATGGACACAAGCAGGTATGA</u> | Hind III | 441 | 克隆引物 |
| T-GmSBPC-R | GCCCTTGCTCACCATAAGCTTTCATTCTCCATGGTAGTCAA | Hind III | 441 | |
| subGmSBPC-F | <u>ACGGGGGACTCTTGACCATGGATGATGCCAAAGGCCACAAT</u> | Nco I | 441 | 亚细胞定位引物 |
| subGmSBPC-R | <u>TACTAGTCAGATCTACCATGGTCTTAAACCACCAGCAATAT</u> | Nco I | 441 | |
| Fq-GmSBPC-F | GGAAAGAGATCAGGGTCCAAAG | | 98 | 荧光定量引物 |
| Fq-GmSBPC-R | CCTTGIGTCTTCTGTGGTACTG | | | |
| GmActin 4-F | GTTTCAAGCTCTTGCTCGTAATCA | | | 内参引物 |
| GmActin 4-R | GTGTCAGCCATACTGTCCCCATT | | | |

波浪线:载体臂序列;双下划线:酶切位点;粗下划线:特异性扩增序列引物

Wavy line: Carrier arm sequence; Double underline: Enzyme cutting site; Thick underline: Specific amplification sequence primer

1.2.4 GmSBPC基因过表达载体的构建 利用Hind III分别单酶切表达载体pCAMBIA3300质粒和GmSBPC目的片段,反应体系50 μL:GmSBPC目的片段10 μL(150 ng/μL)、Hind III酶5 μL、Buffer 5 μL、ddH₂O 30 μL。酶切条件:37℃ 6 h。目的片段凝胶纯化同1.2.3。

使用同源重组试剂盒(Vazyme)将pCAMBIA3300线性化载体与目的基因片段进行连接,同源重组体系为20 μL:载体片段1.5 μL、目的片段0.5 μL、同源重组酶2 μL、5×CE Buffer 4 μL、ddH₂O 12 μL。重组条件为:37℃ 30 min。随后将构建好的pCAMBIA3300-GmSBPC质粒分别转入DH5α感受态细胞和农杆菌K599感受态细胞中,-80℃保存。

1.2.5 GmSBPC菌液PCR验证和测序 将上述大肠杆菌和农杆菌转化产物分别对应涂布在LB固体培养基(硫酸卡那霉素,硫酸卡那霉素+利福平抗生素)上并倒置在37℃和28℃恒温培养箱中过夜培

养,分别挑取单一菌落于对应的LB培养液中,将大肠杆菌置于37℃恒温摇床振荡培养12 h,农杆菌于28℃震荡培养22 h,待菌体浑浊进行菌液PCR验证。利用Plasmid Mini Kit I试剂盒(Omega)提取扩大培养菌液中质粒并将质粒DNA送往睿博生物技术公司进行测序,后利用DANMAN Version 8与CDS序列比对。

1.2.6 GmSBPC基因亚细胞定位 利用NcoI分别单酶切亚细胞定位载体pCAMBIA1302和GmSBPC目的片段,处理方法同1.2.4。将线性化处理后的载体pCAMBIA1302与目的片段同源重组构建pCAMBIA1302-GmSBPC,转化至大肠杆菌中,摇菌,用Plasmid Mini KitI(Omega)试剂盒提取质粒用于后续GV3101转化(psoup-p19)。

将pCAMBIA1302-GmSBPC质粒转入农杆菌GV3101(psoup-p19),其菌液与LB液体培养基(硫酸卡那霉素和利福平抗生素)混合,28℃恒温摇床

过夜培养至 OD_{600} 值为 1.0。离心富集,用烟草转化液(1ml 500mM MES+1ml 500mM $MgCl_2$ +10 μ L 1M As, ddH₂O 定容至 50ml)重悬白色菌体,经过清洗、离心、弃上清,再加入烟草转化液重悬,调节 OD_{600} 值至 0.8,室温静置 4 h。将带有 pCAMBIA1302-*GmSBPC* 的 GV3101 (*psoup-p19*) 农杆菌侵染液注射到预先暗处理 24 h 的 3~4 周龄的烟草后,黑暗培养 12 h,正常光照 48 h,即可使用。利用镊子将 3 株烟草相同注射部位叶片下表皮撕下并放置于载玻片上,利用移液器吸取少量 ddH₂O 水放置载玻片中,激光共聚焦显微镜观察并拍摄存片。

1.2.7 发根农杆菌介导大豆毛状根鉴定 首先从大豆胞囊线虫病土中取接种 15 d 的东农 50 大豆幼苗,用清水将根部冲洗干净,再用 3%~5% 次氯酸钠水溶液浸没根部进行脱色,然后加入 ddH₂O 静置 15 min,用预先煮沸已稀释 30 倍的酸性品红溶液煮 45~120 s,取出根部用吸水纸擦干。对根部进行压片镜检,在 20 \times 体式显微镜下观察大豆胞囊线虫数目。

1.2.8 大豆胞囊线虫 3 号生理小种胁迫鉴定 对照组为未转化的东农 50 大豆根系,试验组为含有 *GmSBPC* 的东农 50 根系。大豆东农 50 生长第一个三出复叶(V₁期),利用含有 *GmSBPC* 基因的农杆菌 K599 菌液(详见 1.2.4)针刺大豆生长点,并将大豆移植于大豆胞囊线虫 3 号生理小种的病土。14 d 后,用清水将大豆根部冲洗干净,获取大豆毛状根组织于电子天平中称量 0.2 g,将组织放置于 1.5 mL EP 管中,加入 100 μ L 无菌水,Bar 试纸条插入 1.5 mL EP 管中进行转基因验证,将验证后的东农 50 幼苗移栽到大豆胞囊线虫 3 号生理小种的土壤中。对照组处理方式与试验组相同,针刺生长点用无菌水进行。利用 Excel 2010 和 SPSS 软件对单位面积内大豆胞囊线虫数目进行统计分析。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 检测 0~15 d 的东农 50 和东农 L10,每隔 3 d 取根、茎、叶组织液氮冷冻,使用 RNA ios plus Trizol (KOIZEE) 提取不同组织部位 RNA,并利用反转录试剂盒 (ToYoBo) 提取 cDNA 用于后续基因表达模式分析研究(反转录同 1.2.3)。

以 *GmActin4* 为内参基因,应用在线工具 PrimerQuest™ 设计荧光定量引物(表 2),引物委托睿博生物技术公司合成。反应体系 20 μ L: SYBR Green PCR master mix (Vazyme) 10 μ L、ddH₂O 6 μ L、*Fq-GmSBPC-F* 1 μ L、*Fq-GmSBPC-R* 1 μ L、*cDNA* 2 μ L。

反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。各组织部位取样点设 3 次生物学重复,依据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式^[35]来计算基因相对表达量(CT 值取 3 次重复的平均值)。

2 结果与分析

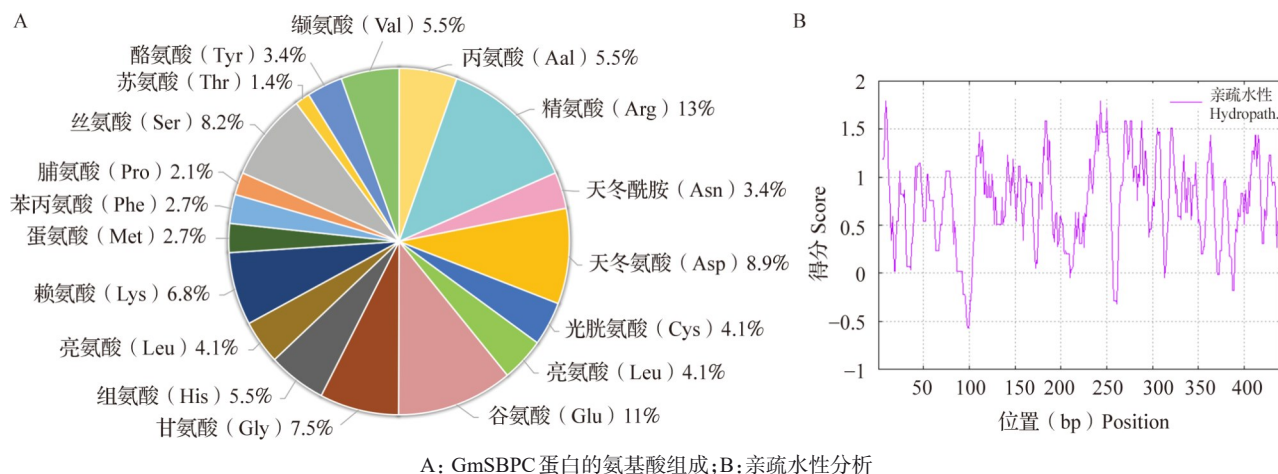
2.1 生物信息学分析

2.1.1 *GmSBPC* 蛋白理化性质分析 Prot-Param 在线软件预测结果可知(图 1A), *GmSBPC* 蛋白编码 146 个氨基酸,其中占比最大的是精氨酸(Arg),约为 13%,苏氨酸(Thr)所占比例最少,为 1.4%,而异亮氨酸(Ile)、色氨酸(Trp)、吡咯赖氨酸(Py1)和硒代半胱氨酸(Sec)4 种氨基酸不参与该蛋白生物合成。*GmSBPC* 蛋白具有 29 个正电荷残基数(Arg+Lys)和 29 个负电荷残基数(Asp+Glu),分子结构式为 C₇₀₄H₁₁₁₄N₂₄₀O₂₃₅S₁₀, 相对分子质量为 17020.66,理论等电点为 7.08,原子总数为 2303,预估该蛋白半衰期约 30 h,脂肪族指数为 37.40,平均亲水指数为 -1.453,不稳定系数达到 84.69,属于不稳定蛋白。从蛋白亲疏水性(图 1B)中发现 *GmSBPC* 整条多肽链上疏水性氨基酸居多,总体呈现疏水性,即为不溶性蛋白,其对应的基因在第 9 和 243 bp(3aa, 81aa)位置上均出现了明显的高峰(同为 1.78),而第 98 和 99 bp(32aa, 33aa)位置处亲水性最低(同为 -0.567)。

GmSBPC 蛋白含有 10 个潜在磷酸化位点(图 2A),其中 8 个为丝氨酸磷酸化位点,2 个为苏氨酸磷酸化位点,无酪氨酸位点。利用 SignalP5.0 预测到 *GmSBPC* 蛋白不具有信号肽结构,即属于非分泌型蛋白(图 2B)。没有信号肽的蛋白不易被糖基化,经 SignalP5.0 软件预测该蛋白无 N-糖基化位点(图 2C)。

使用在线工具 TMHMM-2.0 预测到 *GmSBPC* 蛋白的跨膜结构域, *GmSBPC* 编码 146 个氨基酸,跨膜螺旋氨基酸数量的期望值高于 18(29.85307),由此可预测该蛋白为跨膜类蛋白且在细胞膜内侧发生迁移。此外 *GmSBPC* 蛋白包含 4 个跨膜螺旋,峰值分别出现在第 21(0.40067)、47(0.29619)、78(0.28903)和 118(0.18236)氨基酸残基(图 2D)。

GmSBPC 蛋白的亚细胞定位预测结果显示该蛋白分布在细胞质居多,约占 43.5%,而在过氧化物酶体和高尔基体上的分布较少,仅为 4.3%,推测该蛋白主要在细胞质内发挥转录调控作用。

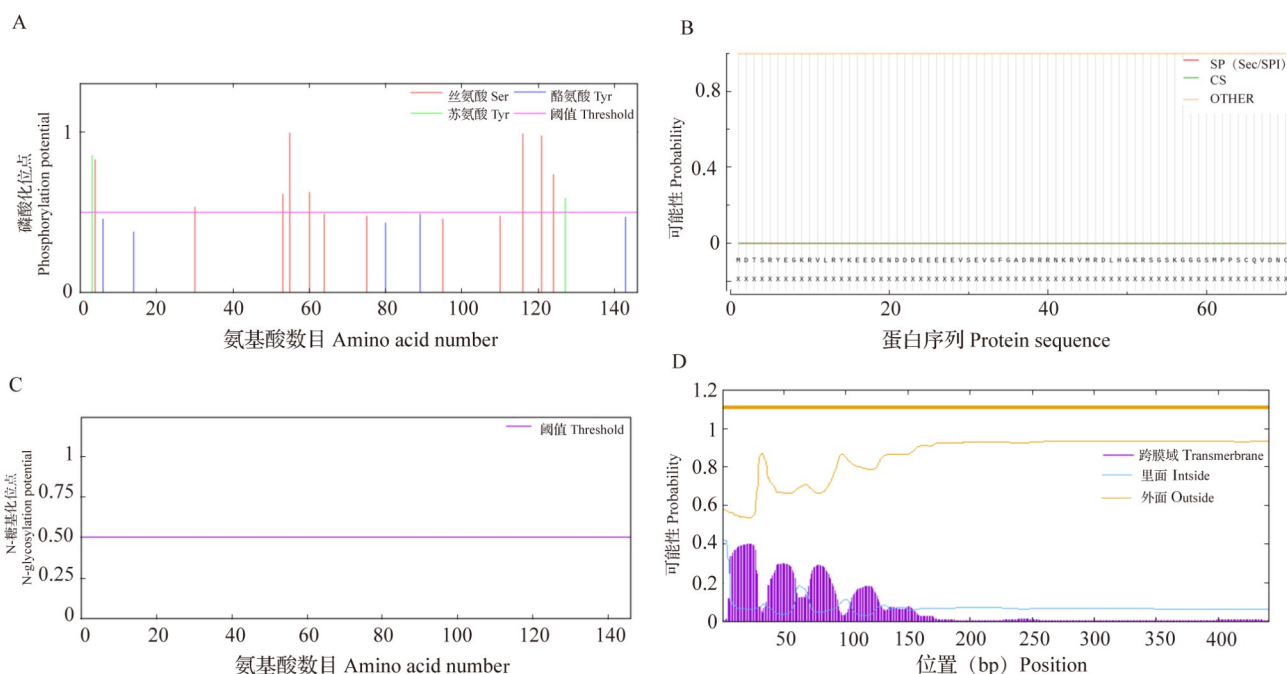


A: GmSBPC蛋白的氨基酸组成; B: 亲疏水性分析

A: Amino acid composition of GmSBPC protein; B: Hydrophilicity analysis

图1 GmSBPC蛋白的氨基酸组成及比例和亲疏水性分析

Fig 1 Amino acid composition and ratio and hydrophobicity analysis of GmSBPC proteins



A: 磷酸化位点分析; B: 信号肽分析; C: 糖基化位点分析; D: 跨膜结构域分析

A: Phosphorylation site analysis; B: Signal peptide analysis; C: Glycosylation site analysis; D: Transmembrane structural domain analysis

图2 GmSBPC蛋白理化性质分析

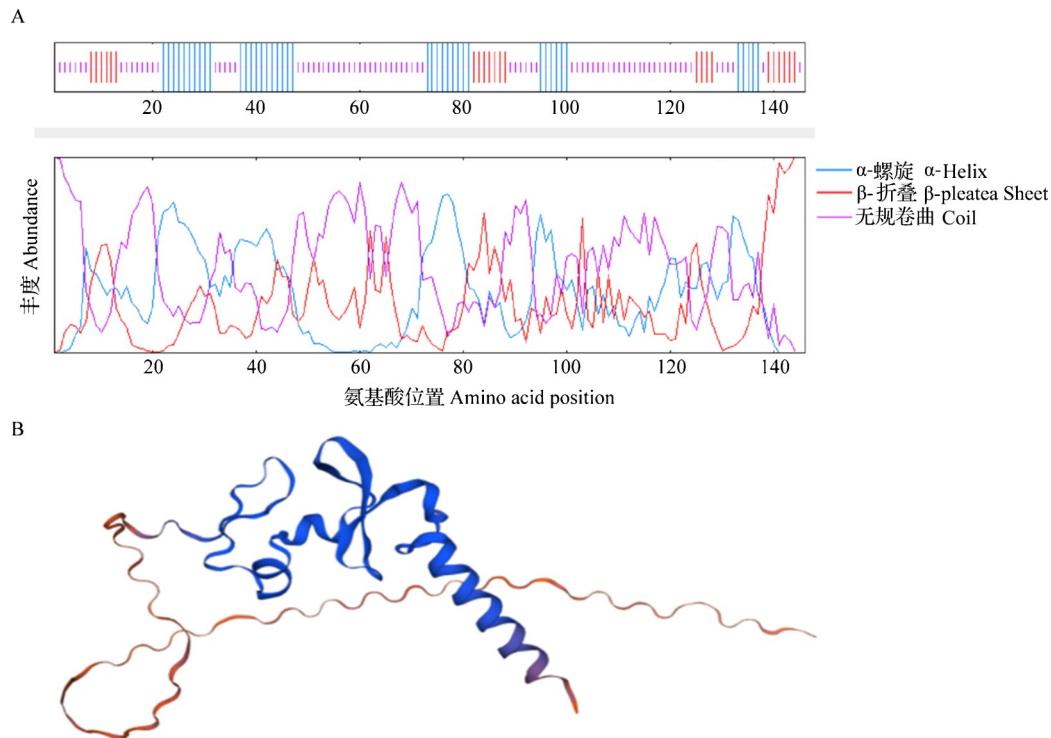
Fig. 2 Physicochemical properties analysis of GmSBPC protein

2.1.2 GmSBPC蛋白结构与保守结构域预测

GmSBPC蛋白的146个氨基酸由3种结构组成,其中82个氨基酸处于无规则卷曲状态,占56.16%;21个氨基酸处于 α 螺旋区,占28.08%;23个氨基酸处于延伸结构,占15.75%(图3A)。GmSBPC蛋白三级结构以无规则卷曲为主(图3B),同二级结构预测的结果高度一致。通过NCBI在线软件预测发现1个超家族保守结构域与GmSBPC蛋白较为相似,即在第193~417 bp处的SBP super family

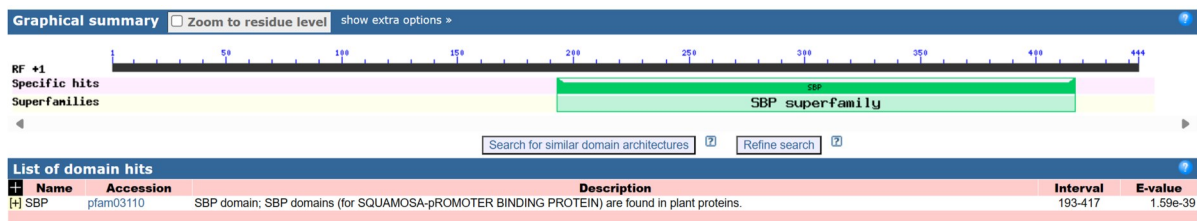
(图4)。

2.1.3 SBPC转录因子系统进化树分析 将大豆、玉米、拟南芥等30个SBPC同源基因进行分析,结果表明30个SBPC同源基因的亲缘关系归为4类:I、II、III、IV(图5),相同分枝基因亲缘关系近,不同分枝之间基因亲缘关系较远。其中大豆*Glyma.07G199000*基因与拟南芥*AT5G18830*、*AT2G33810*亲缘关系最为接近。证明不同作物中SBPC基因亲缘关系存在一定的相似性。



A: 蛋白横向二级结构, B: 蛋白三级结构

A: Protein transverse secondary structure, B: Protein tertiary structure

图3 *GmSBPC* 蛋白二级、三级结构预测Fig. 3 Prediction of *GmSBPC* protein secondary and tertiary structure图4 *GmSBPC* 蛋白的保守结构域Fig. 4 Physicochemical properties analysis of *GmSBPC* protein

2.1.4 大豆 *SBPC* 转录因子调控靶基因预测 为进一步确定转录因子调控靶基因数目和调控的成员,对4个 *SBPC* 转录因子家族基因进行预测,结果表明4个 *SBPC* 转录因子家族基因 *Glyma.12G226000*、*Glyma.06G168600*、*Glyma.04G027400*、*Glyma.07G199000* 分别调控45、154、33、46个基因(图6)。调控各成员的靶基因之间重合较少,大多数都是受到一个成员的调控。对靶基因的进一步研究和分析发现,很多靶基因参与大豆的干旱胁迫、盐胁迫、金属盐离子胁迫、生物和非生物胁迫等。

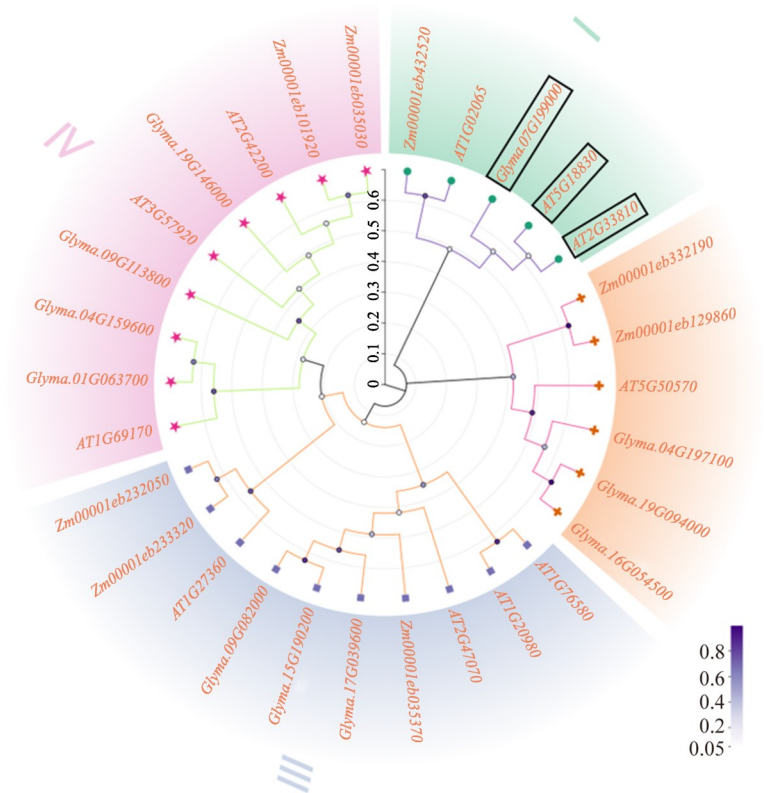
2.2 *GmSBPC* 基因克隆

以东农L10根系cDNA为克隆模版特异性扩增 *GmSBPC* 基因,结果显示该基因片段大小在441 bp左右(图7B)。利用凝胶纯化试剂盒对目标基因进

行纯化后送至哈尔滨睿博生物公司进行测序,测序后结果利用DNAMAN Version 8 比对,结果表明目标基因 *GmSBPC* 成功克隆。

2.3 *GmSBPC* 亚细胞定位

将含有 *GmSBPC* 质粒转化到农杆菌感受态细胞GV3101(*psoup-p19*),探究 *GmSBPC* 基因亚细胞定位情况。含有 *GmSBPC* 基因的农杆菌注射到三出复叶烟草叶片下表皮中,未进行基因重组的pCAMBIA1302-GFP农杆菌为空白对照。激光共聚焦显微镜下观察,从结果中可知(图9),pCAMBIA1302-GFP空载体在细胞膜、细胞核、细胞质中均存在一定的表达,而pCAMBIA1302-*GmSBPC*在细胞核最亮,由此表明 *GmSBPC* 编码蛋白质主要在细胞核中表达,属于核定位蛋白,与预测结果高度一致。



Zm: 玉米; AT: 拟南芥; Glyma: 大豆; 黑色空心圆-黑色实心圆: 自展值; 自展值越大颜色越深代表亲缘关系越近
 Zm: Maize; AT: *Arabidopsis thaliana*; Glyma: Soybean; Black hollow circle-black solid circle: Self unfolding value; The larger the self display value, the darker the color, indicating closer kinship

图5 SBPC基因家族系统发育树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of the SBPC gene family

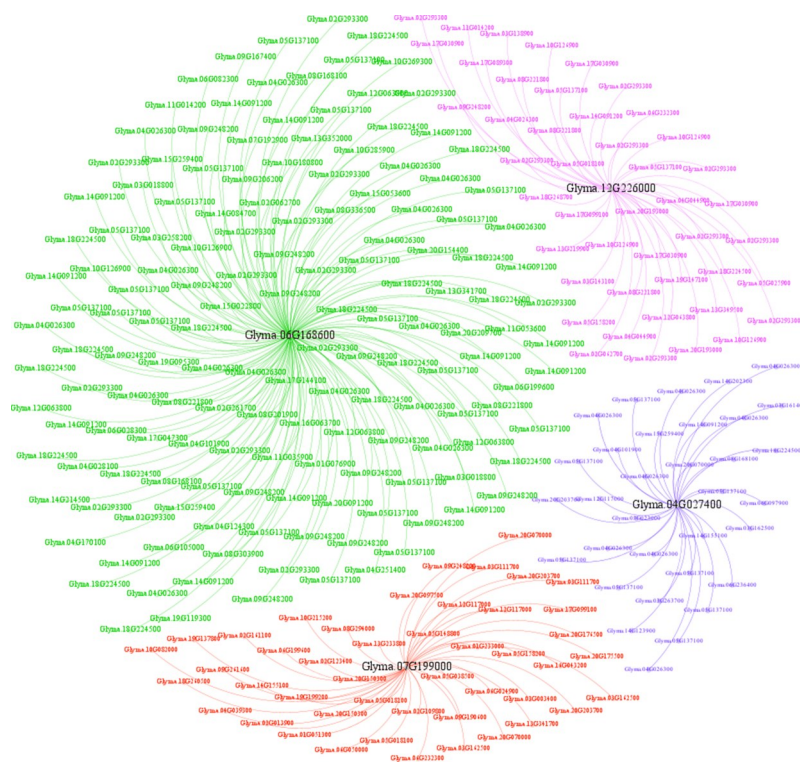
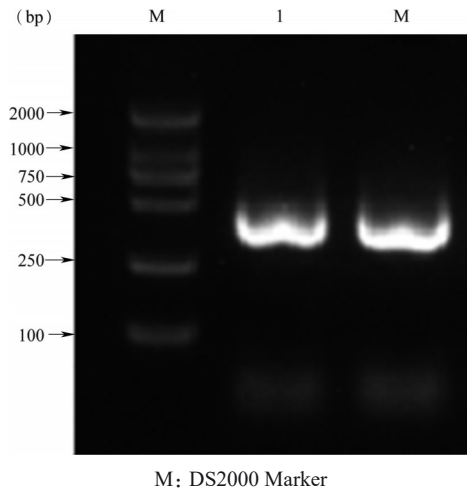


图6 SBPC转录因子与靶基因调控网络表达图

Fig. 6 Expression map of the regulatory network of SBPC transcription factors and target genes



M: DS2000 Marker

图7 *GmSBPC*基因克隆

Fig. 7 *GmSBPC* gene cloning

2.4 大豆根部大豆胞囊线虫3号生理小种的鉴定

将转 *GmSBPC* 基因根系和野生型根系通过 SCN3 病土进行鉴定,通过对单位面积内大豆胞囊线虫数目统计分析,可知过表达毛状根大豆侧根线虫数目平均为 2 个/cm²,野生型大豆侧根线虫数目平均值为 5 个/cm²(图 10A、B)。试纸条对农杆菌 K599 侵染大豆毛状根系的组织检测显示,侵染后的大豆转基因毛状根呈现为阳性,未进行农杆菌转化的野生型在检测中为阴性(图 10C)。将野生型东农 50 幼苗和转基因毛状根幼苗移栽到大豆胞囊线虫 3 号生理小种病土中,*GmSBPC* 基因过表达阳性毛状根植株相较对照组线虫数目存在一定的差异,初步证实 *GmSBPC* 对大豆胞囊线虫 3 号生理小种有明显抗性。使用 SPSS V25 软件对 *GmSBPC* 基

因过表达组和对照组单位面积胞囊线虫平均数量进行 *t* 检验(表 3),结果显示,两组均值分别为 2.747 和 5.193,标准差分别为 0.439 和 0.755,检验结果 *t* 值为 10.846,均值 *P* 值(双尾)为 0,说明过表达组与对照组的单位面积胞囊线虫平均数量存在极显著差异,*GmSBPC* 影响大豆对胞囊线虫的抗性。

2.5 *GmSBPC* 基因表达模式分析

通过 qRT-PCR 方法,分别对大豆胞囊线虫 3 号生理小种胁迫下东农 50(感)和东农 L10(抗)的 *GmSBPC* 基因进行基因表达模式分析(图 11),结果显示,东农 50 根部相对表达量 0→3 d 上调,3→6 d 略微下调、6→9 d 发生上调、9→15 d 明显下调。大豆胞囊线虫 3 号生理小种胁迫下的东农 L10 根部相对表达量 0→3 d 略微上调,其中 3→9 d 明显上调、9→12 d 略微上调、12→15 d 下调。结果表明东农 L10(抗)根部同东农 50(感)根部相比基因表达抗性水平更为明显。

植物的地下部分受到大豆胞囊线虫 3 号生理小种胁迫,同样会导致地上部分产生应答反应。东农 50 和东农 L10 的 *GmSBPC* 基因在茎中的表达为先升高后下降的趋势,其中东农 50 茎在 9 d 中上调量最为明显(图 10A、B)。东农 50 和东农 L10 的 *GmSBPC* 基因表达整体呈现出先上调后下调的表达趋势,东农 50 和东农 L10 在 0 d 未接种大豆胞囊线虫,该基因未受到线虫胁迫,所以在根、茎、叶中相对表达量均存在较低的表达水平。针对大豆根系而言大豆胞囊线虫胁迫下东农 50 和东农 L10 的根系的表达模式为先升高后降低,相对表达水平东农 L10 根系 >

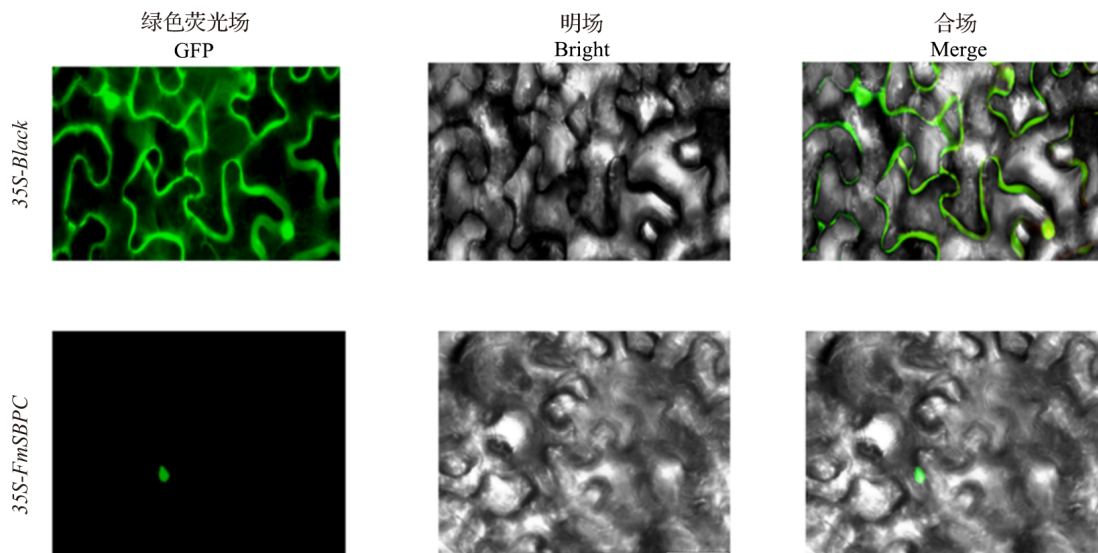
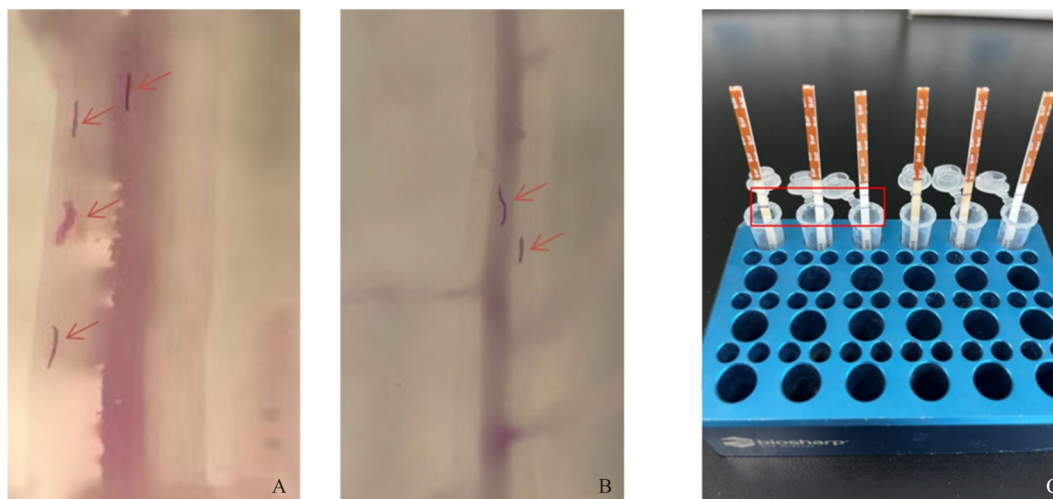


图9 *GmSBPC*基因的亚细胞定位分析

Fig. 9 Subcellular localization analysis of *GmSBPC* gene

东农 50 根系,根系中东农 L10 在 12 d 表达量最高,相对表达量为 3.87(图 11B)。茎中相对表达水平东农 50 根系 > L10 根系,在第 9 天东农 50 的相对表达量达 4.56。由于线虫侵染大豆根系在 12 d 左右达到

高峰,因此判定该基因对线虫胁迫存在响应应答反应,并且在东农 L10(抗)与东农 50(感)根系中,抗病相对表达水平更高,推测该基因参与大豆胞囊线虫的胁迫反应。



A: 未转化东农 50; B: *GmSBPC* 过表达载体; C: Bar 试纸条检测毛状根; 红色方框: 双杠代表阳性植株; 红色箭头: 幼虫时期
A: Not converted to Dongnong 50; B: *GmSBPC* overexpression vector; C: Bar strip for detecting hairy roots; Red box: Parallel bars represent positive plants; Red arrow: Larval stage

图 10 *GmSBPC* 基因遗传转化植株的大豆胞囊线虫鉴定

Fig. 10 Identification of soybean cyst nematodes in plants genetically transformed with the *GmSBPC* gene

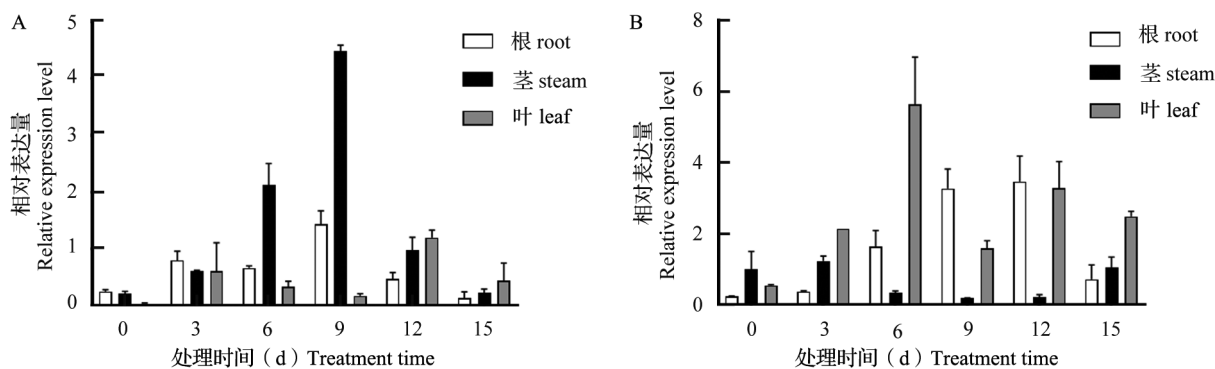
表 3 *t* 检验差异分析

Table 3 *t*-test analysis of variance

| 试验组 Experimental group | 均值 Average value | 标准差 Standard deviation | <i>t</i> 值 <i>t</i> -value | 均值 <i>P</i> 值(双尾) Mean <i>P</i> -value (two-tailed) |
|---------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|---|
| <i>GmSBPC</i> -OX | 2.747 | 0.439 | 10.846 | 0 |
| CK-DN50 | 5.193 | 0.755 | | |

GmSBPC-OX: 过表达 *GmSBPC* 基因的转基因大豆毛状根系; CK-DN50: 对照大豆东农 50

GmSBPC-OX: Transgenic soybean hairy root system overexpressing *GmSBPC* gene; CK-DN50: Control soybean dongnong 50



A: 东农 50; B: 东农 L10

A: Dongnong50; B: Dongnong L10

图 11 *GmSBPC* 基因表达模式

Fig. 11 Analysis of *GmSBPC* gene expression pattern

3 讨论

大豆是世界范围内种植最多的经济油料作物,但在其种植过程中极易受到大豆胞囊线虫胁迫影响^[36]。大豆胞囊线虫完成一个完整生活史为30 d左右,其幼虫时期对大豆的影响最为严重^[37-38]。大豆胞囊线虫最早起源于北美洲,后传播到亚洲、非洲,是一种以胞囊在土壤中越冬或粘染胞囊的土粒混杂在种子间随种子贮藏越冬的植物寄生线虫。大豆胞囊线虫在大田生产过程中存在小种专化现象,即随着土壤微生物活动和环境复杂化,虽存在多个生理小种,但大多是某一致病小种处于优势地位^[39]。

GmSBPC 基因是一种广泛存在于植物中参与抵抗逆境胁迫反应的转录因子,赵奇等^[40]在研究蓖麻 *SBP* 基因家族响应非生物胁迫中发现, *RcSBP* 基因不仅参与生殖器官的发育与调控,还能在激素调控和逆境胁迫中发挥重要功能。潘建英等^[41]已鉴定三七 *PnSBP* 启动子结合蛋白有许多响应激素的元件,摘其花蕾会导致主根和芦头中的6个 *PnSBP* 基因表达量升高,推测该转录因子可能参与皂苷生物合成的调控。前人主要集中于研究全基因组 *SBP* 家族在植物生长发育、生物胁迫、厌氧诱导、激素调控等方面, *SBPC* 转录因子在大豆中的相关功能尚未明晰。

本研究以黑农37(感)和东农L10(抗)大豆胞囊线虫3号生理小种胁迫转录组数据,筛选出与大豆胞囊线虫相关的差异表达基因 *GmSBPC*, 利用生物信息技术分析该蛋白参与编码146个氨基酸,相对分子质量为17020.66,不稳定系数可达84.69,为不稳定蛋白;不具有N-糖基化位点及信号肽结构,属胞内蛋白;跨膜结构域多在细胞内侧发生;蛋白质二级结构多以无规则卷曲状态呈现,其余均以 α -螺旋和延伸结构为主;等电点为7.08,含有碱性氨基酸,可能在酸性亚细胞环境发挥重要作用,与李月颖等^[42]在蒺藜苜蓿 *SBP-box* 基因家族的蛋白性质研究高度一致。*GmSBPC* 转录因子含1种超家族保守结构域即 *SBP super family*; 据靶基因调控结果推断其可能参与大豆干旱、盐、金属离子、生物或非生物胁迫反应。此外,根据亚细胞定位结果推测该蛋白主要在细胞核调控大豆胞囊线虫3号致病小种相关抗性作用。通过构建系统进化树,发现大豆 *SBPC* 同拟南芥 *AT5G18830*、*AT2G33810* 亲缘关系最为接近,可能参与盐胁迫、热胁迫的响应过程^[43]。本试

验将大豆胞囊线虫胁迫下的东农L10和东农50采用qRT-PCR鉴定,发现该转录因子在根、茎、叶中均有所表达。韦德兰等^[44]对杜仲 *EuSBP-box06* 基因进行非生物胁迫处理,发现根、茎部组织表达量较高,这表明 *SBP-box* 基因家族参与抵御非生物胁迫的复杂过程。从整体上看, *GmSBPC* 基因在东农L10根系中的表达量整体高于东农50,相对表达水平随着处理时间的延长呈现先上调后下调的现象。结合大豆胞囊线虫侵染过程、生活周期与 *GmSBPC* 基因高表达时段,推测该转录因子可响应线虫入侵防控,且同东农50相比, *GmSBPC* 在东农L10根部限制线虫移动效果更为显著。以上结果初步表明 *GmSBPC* 转录因子中含有参与调控细胞分化、生物生长、抗逆胁迫等相关的激素应答软件。

参考文献

- [1] 胡海波,李峰,丁素荣,刘迎春,魏云山,李文,周学超.大豆胞囊线虫3号生理小种对大豆植株生长发育的影响.大豆科技,2022(4):6
Hu H B, Li F, Ding S R, Liu Y C, Wei Y S, Li W, Zhou X C. The effect of physiological race 3 of soybean cyst nematode on the growth and development of soybean plants. Soybean Science and Technology, 2022 (4): 6
- [2] Qu S, Cai Q, Cui H. Bioinformatics and functional analysis of high oleic acid-related gene *GmSAM22* in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Phyton-International Journal of Experimental Botany, 2022, 92(2), 501-519.
- [3] 周雅,张祥,赵权,孙建强,王晓波,邱丽娟.大豆 *DMP* 基因的生物信息学及基因多样性分析.植物遗传资源学报,2023,24(6):1744-1754
Zhou Y, Zhang X, Zhao Q, Sun J Q, Wang X B, Qiu L J. Bioinformatics and gene diversity analysis of soybean *DMP* gene. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(6): 1744-1754
- [4] 袁翠平,齐广勋,李玉秋,刘晓冬,王英男,王玉民,赵洪锬,董英山.野生大豆抗胞囊线虫QTL定位.中国油料作物学报,2019,41(6):887-893
Yuan C P, Qi G X, Li Y Q, Liu X D, Wang Y N, Wang Y M, Zhao H K, Dong Y S. QTL localization of resistance to cyst nematode in wild soybeans. Journal of Chinese Oil Crops, 2019, 41(6): 887-893
- [5] 王明祖.中国植物线虫研究.武汉:湖北科学技术出版社,1998,10:209
Wang M Z. Research on plant nematodes in China. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1998, 10: 209
- [6] Schmitt D P, Riggs R D. Influence of selected plant species on hatching of eggs and development of juveniles of heterodera glyncines. Journal of nematology, 1991, 23(1): 1-6
- [7] 石红利.大豆胞囊线虫的生物学特性及诱导抗性研究.杭州:

- 浙江大学, 2013
- Shi H L. Dividend biological characteristics and induced resistance of soybean cyst nematode. Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [8] 陈品三, 齐军山, 王寿华, 胡起宇. 我国大豆胞囊线虫生理分化动态的鉴定和监测研究. 植物病理学报, 2001, 31(4): 336-341
- Chen P S, Qi J S, Wang S H, Hu Q Y. Identification and monitoring of physiological differentiation dynamics of soybean cyst nematodes in China. Journal of Plant Pathology, 2001, 31(4): 336-341
- [9] Peng D, Peng H, Wu D Q. First report of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) on soybean from Gansu and Ningxia China. Plant Disease, 2016, 100(1): 229
- [10] 李沐慧, 王媛媛, 陈井生, 颜秀娟, 刘晓宇, 段玉玺. 2015年东北地区大豆田病害种类与危害程度调查研究. 大豆科学, 2016, 35(4): 7
- Li M H, Wang Y Y, Chen J S, Yan X J, Liu X Y, Duan Y X. A survey on the types and severity of soybean field diseases in Northeast China in 2015. Soybean Science, 2016, 35(4): 7
- [11] 练云, 卢为国. 大豆抗胞囊线虫机制及抗病相关基因研究进展. 中国油料作物学报, 2013, 35(6): 727
- Lian Y, Lu W G. Research progress on the mechanism of soybean resistance to soybean cyst nematode and disease related genes. Chinese Journal of Oil Crops, 2013, 35(6): 727
- [12] Ma Y S, Wang W H, Wang L X. Genetic diversity of soybean and the establishment of a core collection focused on resistance to soybean cyst nematode. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(6): 722-731
- [13] Cawley S, Bekiranov S, Ng H H, Hoffman C S, Shibata T, Ohta K. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. Cell, 2004, 116(4): 499-509
- [14] 朱命喜, 刘洋, 吴琼, 刘春燕, 徐晶, 陈庆山. 大豆SBP转录因子家族的预测分析. 大豆科学, 2011, 30(2): 177-183
- Zhu M X, Liu Y, Wu Q, Liu C Y, Xu J, Chen Q S. Predictive analysis of soybean SBP transcription factor family. Soybean Science, 2011, 30(2): 177-183
- [15] Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors. Journal of Molecular Biology, 2004, 337(1): 49-63
- [16] Klein J, Saedler H, Huijser P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. Molecular and General Genetics MGG, 1996, 250(1): 7-16
- [17] Cardon G H, Hhmann S, Nettesheim K. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: A novel gene involved in the floral transition. The Plant Journal, 1997, 12(2): 367
- [18] 朱红霞, 胡利宗, 邓小莉, 蔺芳. 大豆SBP基因家族序列特征, 表达及进化分析. 东北农业大学学报, 2012, 43(7): 26-33
- Zhu H X, Hu L Z, Deng X L, Lin F. Sequence characteristics, expression, and evolutionary analysis of soybean SBP gene family. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 43(7): 26-33
- [19] Zhang W, Li B, Yu B. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the SBP-box gene family in maize (*Zea mays*). Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(1): 29
- [20] Agarwal P R, Lahiri A. Comparative study of the SBP-box gene family in rice siblings. J Biosci, 2020, 45: 83
- [21] Manning K, Tor M, Poole M. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. Nature Genetics, 2006, 38(8): 948-952
- [22] 刘更森, 慕茜, 戴洪义, 上官凌飞, 张玉刚. 苹果SBP基因家族生物信息学分析. 江西农业学报, 2011, 23(12): 23-27
- Liu G S, Mu Q, Dai H Y, Shangguan L F, Zhang Y G. Bioinformatics analysis of apple SBP gene family. Jiangxi Agricultural Journal, 2011, 23(12): 23-27
- [23] 吴艳, 侯智红, 程群, 董利东, 芦思佳, 南海洋, 甘卓然, 刘宝辉. SPL转录因子的研究进展. 大豆科学, 2019, 38(2): 304-310
- Wu Y, Hou Z H, Cheng Q, Dong L D, Lu S J, Nan H Y, Gan Z R, Liu B H. Research progress on SPL transcription factors. Soybean science, 2019, 38(2): 304-310
- [24] 陈婉冰, 周波. SPL调控因子在植物生长调控的研究进展. 分子植物育种, 2020, 18(5): 1505-1512
- Chen W B, Zhou B. Research progress on SPL regulatory factors in plant growth regulation. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(5): 1505-1512
- [25] Birkenbihl R P, Jach G, Saedler H. Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: Overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. Journal of Molecular Biology, 2005, 352(3): 585-596
- [26] Moreno M A, Harper L C, Krueger R W. *Liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. Genes & Development, 1997, 11(5): 616
- [27] Zhong Z, Zhong L, Zhu X. Transcription factor *OsSPL10* interacts with OsJAMYB to regulate blast resistance in rice. The Crop Journal, 2024, 12(1): 301-307
- [28] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. Cell, 2004, 116: 281-297
- [29] Wu G, Poethig RS. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. Development, 2006, 133(18): 3539-3547
- [30] Xie B K, Wu Q C, Xiong Z L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA

- promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiology*, 2006, 142(1):280-93
- [31] Jain S, Chittam K, Brueggeman R. Comparative transcriptome analysis of resistant and susceptible common bean genotypes in response to soybean cyst nematode infection. *PLoS ONE*, 2016, 11(7):12-23
- [32] Cheng H, Wang Y, Sun M A. Comparison of gene expression profiles in nonmodel eukaryotic organisms with RNA-Seq. *Methods in Molecular Biology*, 1751: 3-16
- [33] Riggs R D, Schmitt D P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 1988, 20(3): 392-395
- [34] Zhai Y, Sa H S L, Sha W. Overexpression of soybean *GmERF9* enhances the tolerance to drought and cold in the transgenic tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 128(3):607-618
- [35] 庾蕾, 刘建平, 庄志雄, 杨淋清, 张仁利, 叶小明, 程锦泉. 实时 RT-PCR 基因表达相对定量软件分析与 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法比较. *热带医学杂志*, 2007, (10):956-958
Yu L, Liu J P, Zhuang Z X, Yang L Q, Zhang R L, Ye X M, Cheng J Q. Real-time RT-PCR and $2^{-\Delta\Delta CT}$ methods were used to analyze the gene expression. *Journal of Tropical Medicine*, 2007, (10): 956-958
- [36] 张海平, 陈妍, 闫凯. 大豆抗胞囊线虫 4 号生理小种 SSR 标记筛选及优异种质鉴定. *大豆科学*, 2020, 39(1): 1-11
Zhang H P, Chen Y, Yan K. Screening of SSR markers and identification of excellent germplasm for soybean resistance to cyst nematode race 4. *Soybean Science*, 2020, 39(1): 1-11
- [37] Yan G, Baidoo R. Current status of soybean cyst nematode resistance research and its implications for soybean breeding. *Engineering*, 2018, 4(4): 226-242
- [38] Dong J, Hudson M E. W112Rhg1 interacts with DELLAs and mediates soybean cyst nematode resistance through hormone pathways. *Plant Biotechnol*, 2022, 20(2): 283-296
- [39] 李海燕, 蔡德利, 段玉玺, 陈立杰. 五寨黑豆对大豆胞囊线虫 3 号生理小种的抗性遗传分析. *大豆科学*, 2017, 36(1): 12-16
Li H Y, Cai D L, Duan Y X, Chen L J. Genetic analysis of resistance of Wuzhai black beans to physiological race 3 of soybean cyst nematode. *Soybean Science*, 2017, 36 (1): 12-16
- [40] 赵奇, 茹京娜, 李宜统, 王超, 徐兆师, 王睿辉. 小麦 Lhc 基因家族鉴定与表达模式分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(6): 1766-1781
Zhao Q, Ru J N, Li Y T, Wang C, Xu Z S, Wang R H. Identification of wheat Lhc gene family and analysis of expression pattern. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(6):1766-1781
- [41] 潘建英, 张诗焉, 郭宜欣, 唐诗成, 邓伟, 张子龙. 三七 SBP 转录因子基因家族鉴定与生物信息学分析. *中成药*, 2023, 45(6): 2073-2079
Pan J Y, Zhang S Y, Guo Y X, Tang S C, Deng W, Zhang Z L. Identification and bioinformatics analysis of the transcription factor gene family of Sanqi SBP. *Traditional Chinese Medicine Patent Prescription*, 2023, 45(6): 2073-2079
- [42] 李月颖, 李菁, 刘长宁. 蕹菜苜蓿 SBP-box 转录因子基因家族全基因组分析. *湖南师范大学自然科学学报*, 2017, 40(6): 10
Li Y Y, Li J, Liu C N. Whole genome analysis of the SBP-box transcription factor gene family in *Medicago truncata*. *Journal of Natural Sciences, Hunan Normal University*, 2017, 40(6): 10
- [43] 荣誉磊, 周志林, 赵冬兰, 唐君. 甘薯, 番茄, 拟南芥中 SPL 转录因子的生物信息学分析. *江苏农业科学*, 2021, 49(20): 10
Rong Y L, Zhou Z L, Zhao D L, Tang J. Bioinformatics analysis of SPL transcription factors in sweet potatoes, tomatoes, and Arabidopsis. *Jiangsu Agricultural Science*, 2021, 49(20): 10
- [44] 韦德兰, 张宝会, 姚新转, 刘洋, 吕立堂. 杜仲 SBP-box 基因家族鉴定及非生物胁迫下表达分析. *分子植物育种*, 2022, 20(5): 1505-1513
Wei D L, Zhang B H, Yao X Z, Liu Y, Lv L T. Identification of SBP box gene family in *Eucommia ulmoides* and expression analysis under abiotic stress. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(5): 1505-1513