

玉米响应盐胁迫的差异表达基因分离

王婧泽^{1,2}, 高树仁¹, 于洋³, 孙丽芳¹, 王霞¹

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 贵州省农业科学院油菜研究所, 贵阳 550008;

3. 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所, 哈尔滨 150086)

摘要: 以耐盐玉米自交系“M-2导入系”为试验材料, 采用224对引物组合利用cDNA-AFLP(complementary DNA-amplified fragment length polymorphism)技术, 分析玉米在4个不同浓度的盐胁迫诱导下的基因表达差异, 对其差异片段回收测序。结果表明, 成功回收测序其中的71条TDFs(transcript-derived fragments)。用NCBI BlastX对测序结果进行比对分析, 49条TDFs与已知蛋白功能基因有较高的同源性, 涉及光合作用、细胞信号转导、胁迫响应、细胞代谢等多种途径, 此外还有20个假设蛋白、未知蛋白和2个没有匹配的基因片段。利用qRT-PCR对TDF98、TDF3进行表达特征分析, 结果表明, 这2个TDFs代表的基因在抵御玉米盐胁迫过程中起到不同程度的调控作用。

关键词: 玉米; 盐胁迫; cDNA-AFLP

中图分类号: S513.034

文献标识码: A

Isolation of Salt Stress Related Genes in Maize

WANG Jing-ze^{1,2}, GAO Shu-ren¹, YU Yang³, SUN Li-fang¹, WANG Xia¹

(1. Agronomy of College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319;

2. Guizhu Rape Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550008;

3. Institute of Crop Tillage and Cultivation, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: cDNA-AFLP approach with 224 primer pairs was employed to analyze genes differentially expressed in normal and four stress maize inbred lines offspring induced by introducing suaeda salsa DNA into the ‘M-2 maize’. TDFs were successfully sequenced. According to the NCBI BlastX the comparative analysis of the sequencing results, 49 TDFs were homologous to genes involved in photosynthesis, cell signal transduction, stress response, cell metabolism, and so on. The remaining 2 TDFs had no signal, 20 TDFs highly homology genes were unknown protein. Two TDFs(TDF3, TDF98) were selected for further study by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) that the expression of the defense genes responsive to play varying degrees of regulation roles in adapting to salt stress environment for maize.

Key words: Maize; Salt stress; cDNA-AFLP

世界各地的土壤盐渍化程度在逐年不断地恶化, 其中, 2.3亿hm²的灌溉地中有4500万hm²受到盐碱化的影响, 占灌溉面积的19.5%左右^[1]。重度盐碱地上的植被, 由于土壤中盐分的过度积累, 造成植物的渗透势降低而影响水分的吸收, 还会改变核酸

代谢相关酶的活性及蛋白质代谢、扰乱激素平衡, 限制了植被的产量^[2]。玉米是中度盐敏感型作物, 盐碱地限制玉米的产量, 因此研究玉米的耐盐分子机理以及选育耐盐性较强的玉米优良品种成为解决盐碱地玉米产量和品质的重要手段。cDNA-AFLP技术可用于分析任何生物全基因组范围内基因的差异表达分析, 具有灵敏度高、重复性好等特点, 已成为反映差异基因表达的有效分离工具。近年来, cDNA-AFLP技术常用于研究植物对外界环境胁迫响应方面, 分离与逆境胁迫相关的TDFs, 涉及信号转导、蛋白相互作用等与逆境胁迫相关的蛋白, 如茉莉酸诱导蛋白、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶等。茉莉酸诱导蛋白是环境胁迫下促使植物防御基因表达过程中

录用日期: 2018-10-13

基金项目: 黑龙江省科技厅重点研发项目(GA18B101)、2019-2021年总局重点科研项目课题“耐密、抗病、高产适于机收的玉米种质资源创新及新品种选育”

作者简介: 王婧泽(1989-), 女, 硕士, 研究方向作物遗传育种。

E-mail: hi_chak@163.com

高树仁为本文通讯作者。

信号传递的必要组成蛋白,在抗逆过程中起到调节的作用^[3]。S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶是参与多胺合成过程中的关键酶,目前已从甜瓜^[4]、大豆^[5]等植物中分离出此基因,并发现其参与盐胁迫。因此,植物可以通过逆境蛋白的调节作用来避免低温、盐、水分等胁迫对自身造成的损伤。

孙瑞芬等^[6]利用 cDNA-AFLP 技术分析盐胁迫下向日葵的基因表达谱。刘章伟等^[7]利用该技术分离和鉴定陆地棉苗期盐胁迫应答基因。严定平等^[8]也利用 cDNA-AFLP 技术分离了不同胁迫时间下玉米根系的盐响应基因。但利用该技术研究不同浓度盐胁迫下玉米的耐盐性相关基因的报道比较少见。碱蓬是盐碱地常见的一种植物,将碱蓬的总 DNA 通过花粉管导入到自交系“M-2”中,并经过多年自交遗传获得“M-2 导入系”,前期试验验证“M-2 导入系”的耐盐性较强。本研究以“M-2 导入系”为试验材料,利用 cDNA-AFLP 技术分离不同浓度盐胁迫下玉米相关的耐盐基因,为玉米耐盐品种改良的分子育种寻找优良基因资源提供理论依据,进一步揭示玉米耐盐机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料 with 处理

试验以“M-2 导入系”为试验材料,在植物生长室内进行试验。培养条件为:昼夜温度分别为 25℃/18℃,光照 12 h,光强为 1 000 μmol/(m²·s),相对湿度维持在 60%~80%。将种子表面消毒后播在装有等量蛭石的塑料盆内(直径 20 cm、高 22 cm),每盆 5 株,每个处理 3 盆,浇灌等量的 1/2 Hoagland 营养液。待幼苗长至 3 叶 1 心时,分别以 0、100、200、250 mmol/L 浓度的 NaCl 溶液进行盐胁迫处理,处理 7 d 后,选取第 2 片完全展开叶功能相同的叶片进行样品采集。

1.2 总 RNA 的提取与双链 cDNA 的合成

采用 Takara 公司 RNAiso Reagent 提取 4 个不同浓度盐胁迫下玉米叶片的总 RNA,用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳来检测 4 个样品总 RNA 的完整性,并用 NanoDrop2000 检测 RNA 的浓度和纯度,并将各处理的 RNA 稀释至相同浓度(1 000 ng/μL)。采用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)合成双链 cDNA。

1.3 cDNA-AFLP 分析

本实验采用限制性内切酶 MseI/PstI 对双链 cDNA 进限制性双酶切,然后对酶切产物加上相应的人工接头,作为预扩增的模板。预扩增产物稀释 20 倍进行选择性的扩增。选择性扩增产物经 6% 的变性聚丙烯酰胺电泳于 70 w 功率电泳下分离约 2.5 h,银染显影后分析,每个处理均重复 3 次。MseI 预扩增和选择性扩增引物分别为 5'-GATGAGTCCT-GAGTAA-3',5'-GATGAGTCCTGAGTAANN-3'; PstI 预扩增和选择性扩增引物 5'-GACTGCGTA-CATGCAG-3',5'-GACTGCGTACATGCAG NN-3'(其中,N 为任一碱基)。

1.4 差异表达 TDFs 的克隆测序与分析

用刀片将 PAGE 胶上的目的条带切下,加入 ddH₂O,用移液枪枪头将凝胶捣碎,37℃水浴过夜,沸水水浴 20 min。取 5 μL 作为模板,用相应的选扩引物来进行再次扩增。PCR 产物经琼脂糖胶回收试剂盒(OMEGA 生物科技公司)回收后与 pMD20-T 载体连接、转化至大肠杆菌感受态细胞 E.coli DH5α 内,选择阳性克隆送至测序。

1.5 序列分析与功能预测

测序结果除去 pMD-20T 载体后在 NCBI 数据库进行同源性比对在 Gene Ontology(GO)上对 TDFs 进行蛋白质功能的预测,并按照功能将其进行分类。

1.6 TDFs 的 qRT-PCR 分析

表 1 荧光定量引物
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

TDF	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
TDF3	5'-CTCGATTGCCTTCTCCTACG-3'	5'-TGAGGCTTGTGACGAACCTG-3'
TDF98	5'-GCTATGAGAAGCGCCTTGAG-3'	5'-CGTGCAAGATCCAGAACAGA-3'
Actin	5'-CGATGGTCGTACAACCTGGTAT-3'	5'-ATCCTCCAATCCAGACACTGT-3'

为验证 TDFs 的 cDNA-AFLP 表达谱,根据基因的功能注释和功能分类,选取与胁迫响应相关的 2 个差异基因进行 qRT-PCR 验证。用 Premier 5.0 软件进行引物设计,引物尽量使目的基因的大小控制

在 150~250 bp,以玉米 Actin 为内参,特异引物设计见表 1。实时定量 PCR(RT-PCR)采用两步法,步骤参考 SYBRPremix Ex Taq™(Takara)说明书进行。PCR 总反应体系为 20 μL,上下游引物各 0.4 μL,

cDNA 模板 2 μ L, SYBR Premix Ex Taq™ 10 μ L, Rnase Free ddH₂O 7.2 μ L。PCR 反应条件为,95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共进行 40 个循环。每个反应均设有 3 次重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各基因的相对表达量。

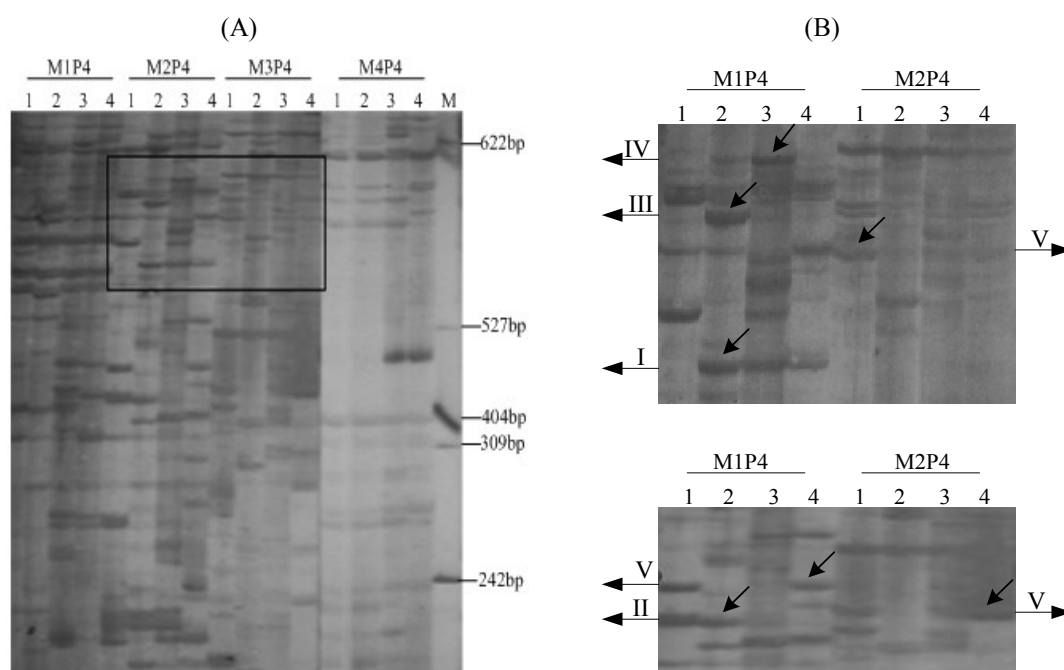
2 结果与分析

2.1 cDNA-AFLP 分析

利用 224 对引物组合, MseI/PstI (14×16) 引物组合, 对不同浓度盐胁迫下玉米样品进行选择扩增, 片段大小从 60 ~ 600 bp(图 1), 根据 TDFs 的有无及条带扩增的强弱, 大体分为 4 类: 上调型(图 1 中 I 类), 随着盐浓度的增加的表达量上调, 正常时不表达, 盐胁迫诱导其逐渐表达或者正常时和盐处理均表达, 但随着盐胁迫浓度的增加表达量增强; 下调型(图 1 中 II 类)随着盐浓度的增加的表达量下调, 盐胁迫抑

制表达或者随着盐胁迫浓度的增加表达量逐渐减弱; 特定浓度瞬时诱导型(图 1 中 III 类), 这种类型的 TDFs 仅在个别浓度表达, 可能与一些短暂表达的基因有关, 低于或高于某一特定的盐浓度范围, 基因瞬间就会沉默; 其他表达类型(图 1 中 V 类), 这种类型表达可能调控方式比较复杂, 如先上调再下调型、先下调再上调型。

cDNA-AFLP 的结果分析表明, 盐处理会诱导许多与盐胁迫相关的基因, 随着浓度的变化, 基因的表达还是存在一定差异, 可能与基因对于盐胁迫的敏感程度不同, 只有达到一定盐浓度, 一些基因才会被诱导参与耐盐调控。大多数 TDFs 不会随着盐浓度的提高而发生变化, 可能这些基因是玉米正常生长发育过程中所必需的, 像与呼吸作用和新陈代谢等相关的基因。



注: (A) 图为盐浓度为 0、100、200、250 mmol/L 胁迫的玉米叶片组织。4 个泳道为一组, 泳道 1~4 盐浓度分别为 0、100、200、250 mmol/L, 每组为不同 AFLP 引物组合的扩增, 依次为, I 为 M1/P4、II 为 M2/P4、III 为 M3/P4、V 为 M4/P4、M 为 DNA Marker pBR322 DNA/MspI。(B) 图为图(1)部分区域的放大。

Note: (A), Leaf tissues of maize were stressed with salt of 0, 100, 200, 250 mmol/L, Lanes are in groups of four, lane 1-4: 0, 100, 200, 250 mmol/L; each group was amplified with a different pair of selective AFLP primers. I, M1/P4, II, M2/P4, III, M3/P4, IV, M4/P4, M: DNA Marker pBR322 DNA/MspI. (B), Enlarged partial view of the boxed area in (1).

图 1 玉米不同盐胁迫处理基因表达的 cDNA-AFLP 分析

Fig.1 cDNA-AFLP display of gene expression at different salt stress treatment stages

2.2 TDFs 的分析及功能预测

了解玉米盐胁迫的分子调控机制, 从 TDFs 中挑选 80 条差异表达 TDFs 进行二次扩增、回收克隆及测序, 最终共获得 71 条有效序列。进一步了解这

些 TDFs 与植物耐盐性及植物生长发育等的关系, 将这 71 条 TDFs 序列在 NCBI 上进行 Blastx 比对, 有 49 条 TDFs 序列与已知功能基因同源性较高; 20 条 TDFs 与未知功能蛋白或者假设蛋白的同源性较高,

这类基因的功能还有待于研究;还有 2 条 TDFs 序列没有 型 14 条(占 28.6%),特定浓度瞬时诱导型 9 条(占 18.4%),其他表达类型 5 条(占 10.2%)。

出,49 条 TDFs 序列中上调型 21 条(占 42.9%),下调

表 2 盐胁迫下玉米差异表达 TDF 的同源性分析

Table 2 Homologous analysis of transcript-derived fragments(TDFs) expressed during the salt stress in maize

序列编号	长度(bp)	编码可能的蛋白质	物种	E 值	登录号	条带分类
Code	Length	Putative encoded protein	Species	E-value	GenBank No.	Band type
光合作用(8)						
16	235	叶绿素 a/b 结合蛋白	水稻	1.00E-46	AF058796.1	III
105	192	光合系统 I PsaN	玉米	3.00E-91	AF052429.1	III
93	299	完整叶绿素基因组	玉米	7.00E-110	X86563.2	III
2	289	光敏色素脱辅基蛋白 B1	玉米	5.00E-146	DQ307579.1	III
19	295	完整的叶绿素基因组	玉米	6.00E-150	X86563.2	II
21	296	自交系 b37 叶绿体	玉米	4.00E-152	KP966117.1	II
150	305	ABC1 蛋白	玉米	3.00E-140	GU228508.1	I
65	123	自交系 b37 叶绿体全基因组	玉米	3.00E-38	AY928077.1	II
细胞信号转导(9)						
155	266	细胞壁连接类受体激酶	玉米	2.00E-116	KR080530.1	II
17	246	钙依赖蛋白激酶 5	谷子	2.00E-94	XM_004958282.1	I
62	211	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 EDR1	谷子	1.00E-29	XM_004969455.2	I
116	350	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 WNK2	玉米	9.00E-174	XM_008650432.1	V
133	246	钙依赖蛋白激酶	玉米	4.00E-106	XM_008677970.1	I
11	397	丝氨酸/苏氨酸磷酸酶	谷子	2.00E-72	XM_004976791.3	II
159	185	β-类适应蛋白 C	玉米	1.00E-86	XM_008657559.1	I
22	226	NAD 激酶 2, 叶绿素	玉米	2.00E-110	XM_008681429.1	I
77	221	泛素结合酶 E2(玉米)	玉米	6.00E-109	EU963040.1	I
细胞代谢(9)						
23	275	反式 4-羟基肉桂酸	玉米	2.00E-99	XM_008658905.1	III
160	170	甘氨酸脱氢(羧)酶	玉米	2.00E-99	XM_008658905.1	II
161	151	二氧异戊酸脱氢酶 α 亚基	谷子	3.00E-80	NM_001305815.1	I
14	279	柠檬酸合成酶	玉米	1.00E-29	XM_004977137.3	V
145	175	淀粉合成酶 I	玉米	5.00E-141	NM_001152570.1	II
26	207	NADP-苹果酸酶	玉米	6.00E-83	NM_001111422.1	II
31	293	β-己糖胺酶 3	玉米	1.00E-35	AF466202.2	III
110	297	甲硫氨酸氨基肽酶 1A	玉米	3.00E-135	XM_008651424.1	III
135	190	组氨酸脱羧酶	玉米	2.00E-88	XM_008647544.1	I
转录(6)						
1	179	核糖核酸聚合酶 II 转录亚基 25	玉米	1.00E-34	XM_008671902.1	V
87	211	调控转录相关因子 1	玉米	6.00E-38	XM_008674998.1	III
74	295	转录延伸因子 1	玉米	2.00E-123	EU960568.1	II
8	231	转录激活因子	玉米	2.00E-104	AY078063.2	I
10	203	锌指结构域蛋白	玉米	3.00E-82	XM_008661521.1	II
132	235	NAC 结构域蛋白 68	玉米	8.00E-109	NM_001157802.1	I
胁迫响应(6)						
98	191	S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶	玉米	3.00E-72	EU968400.1	I
5	192	类金属硫蛋白	玉米	9.00E-87	S57628.1	II
15	287	单脱氢抗坏血酸还原酶	谷子	9.00E-64	XM_004956144.2	V
3	235	茉莉酸诱导蛋白	玉米	4.00E-76	NM_001154976.1	I
59	154	多胺氧化酶	谷子	2.00E-78	XM_006663051.1	I
66	220	RNA 解旋酶	谷子	1.00E-91	XM_012848313.2	I

续表2 Continued 2

序列编号	长度(bp)	编码可能的蛋白质	物种	E值	登录号	条带分类
Code	Length	Putative encoded protein	Species	E-value	GenBank No.	Band type
细胞转运(5)						
28	236	阳离子氨基酸转运蛋白	玉米	4.00E-78	EU970567.1	II
143	166	乙酰半乳糖胺转运体	玉米	3.00E-72	XM_014895646.1	I
114	210	金属耐受蛋白C4	玉米	1.00E-70	FJ444997.1	II
137	367	自噬体	玉米	9.00E-49	XM_008660607.1	V
61	162	膜蛋白	玉米	9.00E-114	EU963040.1	II
遗传信息处理(5)						
106	216	核酸结合蛋白	玉米	8.00E-103	NM_001153067.1	I
56	220	减数分裂蛋白	长穗偃麦草	5.00E-98	AF277246.1	I
111	211	核酸结合蛋白	玉米	5.00E-105	NM_001153558.1	III
6	327	折叠蛋白	玉米	5.00E-166	NM_001157707.1	I
142	269	DBF1 关联蛋白	玉米	1.00E-126	NM_001112401.2	I
氧化还原(1)						
149	115	硒结合蛋白1	玉米	4.00E-43	XM_008659164.1	I

通过GO注释对49条TDFs序列进行分类,根据蛋白的不同功能将其分成8类。表2显示,其中有8条TDFs的功能与光合作用相关,占16.33%;9条TDFs细胞信号转导相关,占18.37%;9条TDFs与细胞代谢相关,参与初级代谢、次级代谢以及氨基酸代谢等进程,占18.37%;与细胞转运功能相关的有5条,占10.20%;与转录相关的有6条,占12.24%;与胁迫响应的相关有6条,占12.24%;与遗传信息处理相关有5条,各占10.20%;与氧化还原相关的有1条,占2.04%。在玉米受到盐胁迫时会调动许多相关基因参与到生长调控及耐盐调节过程中,所以玉

米的盐胁迫的适应机制十分庞大和复杂,需要各类基因综合作用来缓解逆境胁迫。

2.3 部分TDFs qRT-PCR 分析

根据cDNA-AFLP图谱差异表达的趋势,从71条差异条带中选择2个与胁迫响应相关的TDFs,功能注释分别为茉莉酸诱导蛋白(TDF3)和S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(TDF98),进行qRT-PCR验证,由荧光定量的检测结果可知(图2),2个TDFs的荧光定量检测结果的表达趋势和cDNA-AFLP的表达谱基本一致。

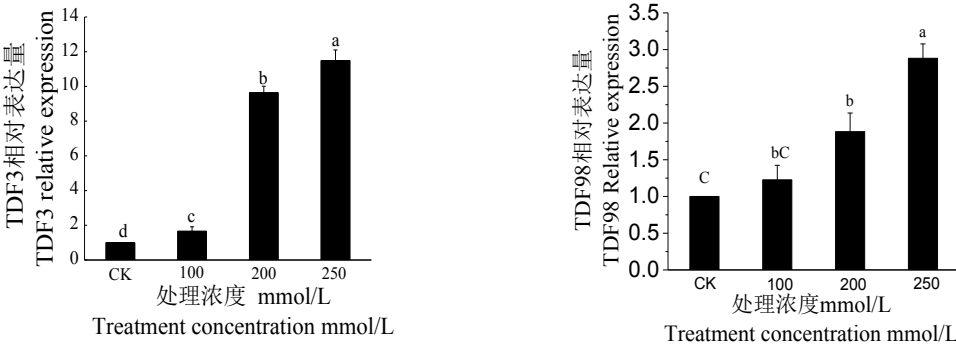


图2 差异表达基因的qRT-PCR分析

Fig.2 qRT-PCR analysis of the differentially expressed genes

3 结论与讨论

盐处理会诱导许多与盐胁迫相关的基因,随着盐浓度的变化,基因的表达还是存在一定差异。大多数TDFs不会随着盐浓度的提高而发生变化,可能

这些基因是玉米正常生长发育过程中所必需的。但仍有一些TDFs随着盐胁迫浓度的变化呈现上调、下调等表达方式。实验中发现的参与细胞信号转导和胁迫响应的相关基因大多以上调表达为主,表明玉米能够主动地通过自身的代谢调控来抵抗盐胁迫造

成的威胁,而非被动的耐受。

信号传导路径中都伴随着蛋白质磷酸化的进行,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(TDF116)作为催化各种蛋白磷酸化重要的蛋白激酶,参与植物逆境信号转导并诱导抗逆功能基因的表达^[9]。本实验中,TDF116在盐胁迫中呈先下调再上调的表达,可能是某个通路在低盐浓度被抑制,随着盐离子的增加,刺激信号转导,表达量上调,与薛飞^[10]对盐藻进行高盐浓度(3 mol/L)的盐胁迫试验结果相类似。钙依赖蛋白激酶(TDF17、TDF133)在植物受到盐碱、干旱、冷等非生物胁迫时,会刺激钙依赖蛋白激酶参与信号转导,并通过其来调节植物代谢变化以抵抗逆境,其相应激酶的过表达可以有效增强植物的耐受能力^[11,12]。本实验中TDF17和TDF133均表现为上调表达,此类基因可以增强玉米抵御盐胁迫的能力。泛素结合酶E2(TDF77)广泛参与植物激素信号转导,进而调控植物抵抗各种非生物胁迫。有人对大豆泛素结合酶E2基因*GmUBC2*进行研究,并发现其在拟南芥中过表达,可显著提高拟南芥对干旱和盐渍的抵御能力^[13],说明玉米通过分泌泛素结合酶E2来抵御盐胁迫造成的伤害。

在胁迫响应方面,茉莉酸类物质(TDF3)在植物的非生物和生物胁迫中起到防御的作用^[14,15]。王飞等^[16]对小麦的耐热胁迫中发现,与茉莉酸诱导蛋白相关的基因*TaJIP*可以提高小麦的抗高温能力。本实验获得的与茉莉酸诱导蛋白相关的条带(TDF3)呈上调表达,在盐浓度增加至250 mmol/L时,其表达量为对照的11.54倍,说明盐胁迫可以诱导茉莉酸诱导蛋白的产生,并参与到盐胁迫的调节过程中。多胺氧化酶(TDF59)可以降解植物细胞中过量的多胺,从而提高植物抵抗和适应逆境的能力。徐呈祥等^[17]研究表明,盐胁迫下的枣树植株内多胺氧化酶活性明显升高,本实验得出相似结论。有研究表明,S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶参与多胺合成过程,并且此过程可以有效提高植物对盐的抵抗能力^[18,19]。本实验中分离的TDF98推测为S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶,其表达量随着盐浓度的增加呈上调表达,与李昌澎等^[20]的研究相类似。金属硫蛋白(TDF5)广泛存在于植物中,研究报道,对水稻的根部进行盐胁迫后发现,金属硫蛋白呈下调表达,本试验中TDF5也呈下调表达。但也有研究报道,在盐胁迫下,金属硫蛋白基因在枣中呈上调表达^[21,22]。金属硫蛋白的表达与盐胁迫的应答关系还需要进一步研究。

本研究发现的差异表达的TDFs编码多种类型的蛋白,其中,一些蛋白与植物应答盐胁迫密切相

关,涉及光合作用、细胞信号转导、胁迫响应等。根据qRT-PCR技术对差异片段验证的结果,盐胁迫下TDF3和TDF98表达量的变化方式可能与耐盐相关,即TDF3和TDF98可能是来自玉米与耐盐性有关的基因。

参考文献:

- [1] Schwabe K A, Kan I, Knapp K C. Drain water management for salinity mitigation in irrigated agriculture[J]. American Journal of Agricultural Economics, 2006, 88(1): 133-149.
- [2] Khodarahmpour Z. Effects of NaCl salinity on maize(*Zea mays* L.) at germination and early seedling stage[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 11(2): 298-304.
- [3] Mullet C J E. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(10): 4114-4119.
- [4] 刘长命,张显,王永琦. 转甜瓜*CmSAMDC*基因拟南芥的获得及其耐盐性研究[J]. 西北植物学报, 2018, 38(7): 1179-1186.
Liu C M, Zhang X, Wang Y Q. Regeneration of transgenic *Arabidopsis thaliana* over-expressing melon *CmSAMDC* gene and its salt tolerance[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(7): 1179-1186. (in Chinese)
- [5] 任锐,杨凤玺,王涛,等. 大豆耐盐胁迫相关蛋白编码基因*GmSAMDC1*的克隆及表达分析[J]. 大豆科学, 2018, 37(5): 672-680.
Ren R, Yang F X, Wang T, et al. Cloning and expression analysis of soybean *GmSAMDC1*-encoding gene[J]. Soybean Science, 2018, 37(5): 672-680. (in Chinese)
- [6] 孙瑞芬,张艳芳,郭树春,等. 向日葵盐胁迫相关基因的cDNA-AFLP差异表达[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(1): 34-40.
Sun R F, Zhang Y F, Guo S C, et al. Differentially expressed analysis on the responsive genes to salt stress in sunflower by cDNA-AFLP[J]. China Biotechnology, 2015, 35(1): 34-40. (in Chinese)
- [7] 刘章伟,徐鹏,张香桂,等. 盐胁迫下陆地棉苗期差异表达基因的cDNA-AFLP分析[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(4): 903-905.
Liu Z W, Xu P, Zhang X G, et al. cDNA-AFLP analysis of differentially expressed genes in upland cotton seedling under salt stress[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2011, 27(4): 903-905. (in Chinese)
- [8] 严定平. 玉米盐胁迫差异基因的分离[D]. 海南大学, 2009.
- [9] Pereira S, Goss L, Dworkin J. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria[J]. Microbiol Mol Biol Rev., 2011, 75: 192-212.
- [10] 薛飞. 盐藻丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因*DsSTPK*的克隆和表达分析[D]. 大连:大连海洋大学, 2013.
- [11] Marie B, Jen S. CDPKs in immune and stress signaling[J]. Trends in Plant Science, 2013, 18(1): 607-609.
- [12] 刘亚茹,吕丽莎,程瑾,等. CDPKs在植物适应非生物胁迫过程中的调节作用[J]. 植物生理学报, 2015(51): 1387-1394.
Liu Y R, Lü L S, Cheng J, et al. Mechanism of CDPKs in plant adaptation to abiotic stress[J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(9): 1387-1394. (in Chinese)

- [13] Zhou G A, Chang R Z, Qiu L J. Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72: 357-367.
- [14] 冯孟杰,徐恒,张华,等.茉莉素调控植物生长发育的研究进展.植物生理学[J]. 2015,51(4):407-412.
Feng M J, Xu H, Zhang H, et al. Recent progress in jasmonates regulation of plant growth and development[J]. *Plant Physiol J*, 2015, 51(4): 407-412. (in Chinese)
- [15] Nathan D G, Azra G, Sofie G, et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism[J]. *Trends Plant Sci.*, 2012, 17: 349-359.
- [16] 王飞,田雪军,赵月,等.小麦茉莉酸诱导蛋白基因 *TaJIP* 的克隆和功能鉴定[J]. 中国农业大学学报,2015(2):50-57.
Wang F, Tian X J, Zhao Y, et al. Isolation and characterization of Jasmonate induced protein *TaJIP* in wheat(*Triticum aestivum*) [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(2): 50-57. (in Chinese)
- [17] 徐呈祥,马艳萍,徐锡增.盐胁迫对不同耐盐性枣树品种根系和叶片中多胺含量及多胺氧化酶活性的影响[J]. 热带亚热带植物学报,2013(21):297-304.
Xu C X, Ma Y P, Xu X Z. Polyamine contents and polyamine Oxidase activities in roots and leaves of two jujube(*Ziziphus jujuba* Mill.) cultivars with contrary salt tolerance under salt stress[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2013, 21(4): 297-304. (in Chinese)
- [18] Tanou G, Ziogas V, Belghazi M, et al. Polyamines reprogram oxidative and nitrosamine status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress[J]. *Plant Cell Environ*, 2013, 37: 864-885.
- [19] 孟德云. S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因在钙依赖的花生盐胁迫响应中的功能研究[D]. 山东大学, 2015.
- [20] 李昌澎,周琳璘,陈亮,等. S-腺苷甲硫氨酸代谢途径相关基因在小麦水分胁迫中的表达[J]. 西北植物学报, 2011, 31(6): 1120-1126.
Li C P, Zhou L L, Chen L, et al. Expression of genes related to the S-adenosyl-L-methionine metabolic pathways during water stress in wheat[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(6): 1120-1126. (in Chinese)
- [21] Yuan J, Chen D, Ren Y. Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, OsMT2b, down-regulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice[J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1637-1650.
- [22] Yang M, Zhang F, Wang F, et al. Characterization of a type 1 metallothionein gene from the stresses-tolerant Plant *Ziziphus jujuba*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16: 16750-16762.

(责任编辑:朴红梅)

(上接第44页)

- [14] 吕丁丁,李增智,王成树. 虫生真菌分子致病机理及基因工程改造研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3):443-449.
Lü D D, Li Z Z, Wang C S. Advances in molecular pathogenesis and genetic engineering of Entomopathogenic fungi[J]. *Microbiology*, 2008, 35(3): 443-449. (in Chinese)
- [15] 孙召朋,张正坤,徐文静,等. 白僵菌培养基继代培养对蛋白酶(cdep1),几丁质酶(chit1)基因表达的影响[J]. 植物保护, 2012, 38(2):66-70.
Sun Z P, Zhang Z K, Xu W J, et al. Effects of *Beauveria bassiana* during subculturing on virulence and expression level of cdep1 and chit1 genes[J]. *Plant Protection*, 2012, 38(2): 66-70. (in Chinese)
- [16] 张军,谢翎,孟慧敏,等. 球孢白僵菌蛋白酶成熟因子基因片段的克隆及其表达分析[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(5): 783-787.
Zhang J, Xie L, Meng H M, et al. Cloning and expression analysis of a protease maturation factor gene fragment from *Beauveria bassiana*[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2012, 39(5): 783-787. (in Chinese)
- [17] Liao X G, Fang W G, Zhang Y J, et al. Characterization of a highly active promoter, PBgpd, in *Beauveria bassiana*[J]. *Curr Microbiol*, 2008, 57: 121-126.
- [18] Ying S H, Fen M G. Novel blastospore-based transformation system for integration of phosphinothricin resistance and green fluorescence protein genes into *Beauveria bassiana*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 206-210.
- [19] Barelli L, Padilla-Guerrero I E, Bidochka M. J. Differential expression of insect and plant specific adhesion genes, Mad1 and Mad2, in *Metarhizium robertsii*[J]. *Fungal Biology*, 2011, 115(11): 1174-1185.
- [20] Wyrebek M, Bidochka M. J. Variability in the insect and plant adhesions, Mad1 and Mad2, within the fungal genus *Metarhizium* suggest plant adaptation as an evolutionary force[J]. *Plos One*, 2013, 8(3): 1-7.

(责任编辑:姜媛媛)