

柽柳 *rd22* 基因的序列分析及耐盐性研究

李慧玉¹, 林士杰², 王 珊¹, 刘菲菲¹, 姜 静¹

(1 东北林业大学 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2 吉林省林业科学研究院, 吉林 长春 130033)

[摘要] 【目的】验证从抗逆植物柽柳中克隆得到的 *rd22* 基因的耐盐能力。【方法】采用根癌农杆菌介导法, 对烟草进行 *rd22* 基因的遗传转化, 将分子检测为阳性的 6 个转基因烟草株系和非转基因对照烟草的组培苗进行盐胁迫(NaCl 浓度分别设为 0(CK), 110, 220 和 330 mmol/L) 试验, 通过观察相对电导率、SOD 活性和相对生长量的变化, 研究 *rd22* 基因的耐盐能力。【结果】生物信息学分析表明, 来自柽柳的 *rd22* 基因属于 BURP 蛋白家族。分子检测证明, 该 *rd22* 基因已整合到烟草基因组中, 并在 mRNA 水平上有不同程度的表达。相对电导率和 SOD 活性分析表明, 随着盐胁迫浓度的增加, 各转基因烟草株系的相对电导率均呈上升趋势, 且均小于对照烟草, 在盐胁迫浓度达到 330 mmol/L 时, 非转基因对照烟草的相对电导率高达 16.49%, 而各转基因烟草的相对电导率最大为 14.91%。各转基因烟草株系的 SOD 活性也随着盐胁迫浓度的增加均呈上升趋势, 且均大于对照烟草, 在盐胁迫浓度达到 330 mmol/L 时, 转基因烟草 SOD 活性是对照烟草的 1.10~1.39 倍。相对生长量分析表明, 盐胁迫浓度达到 110, 220, 330 mmol/L 时, 各转基因烟草株系相对生长量均高于对照株系, 非转基因烟草的相对生长量分别为 59.92%, 36.99% 和 12.72%, 转基因烟草的相对生长量平均为 67.00%, 44.05% 和 17.47%。【结论】*rd22* 基因的导入, 提高了转基因烟草的耐盐性。

[关键词] 柽柳; *rd22* 基因; 生物信息学; 遗传转化; 耐盐性

[中图分类号] S793.501; Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)06-0095-07

Sequence analysis and salt tolerance of *rd22* gene from *Tamarix androssowii*

LI Hui-yu¹, LIN Shi-jie², WANG Shan¹, LIU Fei-fei¹, JIANG Jing¹

(1 Key Laboratory of Forest Tree Genetics Improvement and Biotechnology of Ministry of Education; Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2 Jilin Provincial Academy of Forestry Science, Changchun, Jilin 130033, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to observe tolerant extent of transgenic tobacco with *rd22* gene from *Tamarix androssowii* towards salt stress. 【Method】Using Agrobacterium-mediated transformation systems, *rd22* gene was integrated into tobacco genome, and was detected with RT-PCR, then six transgenic tobaccos and control plants were treated with salt stress(0(CK), 110, 220, 330 mmol/L NaCl) to measure the relative growth and relative electrical conductivity and SOD-like activity in order to investigate the salt tolerance of *rd22* gene. 【Result】The *rd22* gene is a member of BURP family according to bioinformatics analysis. By realtime quantitative RT-PCR, *rd22* gene was integrated into tobacco genome and expressed diversely in mRNA level. The results of the electrical conductivity and SOD-like activity showed: the relative electrical conductivity of the transformed tobacco lines was lower than that of the control line, and the conductivity increased along with the increase of the salt stress. Under 330 mmol/L NaCl, the highest of conductivity of the transgenic tobacco lines was 14.91% and the control line was 16.49%; The SOD-

* [收稿日期] 2009-12-10

[基金项目] 科技部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-098B); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(DL09BA22)

[作者简介] 李慧玉(1978-), 女, 吉林长春人, 讲师, 主要从事林木抗性育种研究。

[通信作者] 姜 静(1960-), 女, 辽宁雄岳人, 教授, 主要从事林木遗传育种研究。

like activity of the transformed tobacco lines was higher than that of the control line, and the contents increased along with the tobacco lines 1.10—1.39 times more than the control line. The results of the relative growth showed; under 110, 220, 330 mmol/L NaCl, the relative growth of transgenic tobacco lines was higher than that of the control line, and the relative growth of control line was respectively 59.92%, 36.99%, 12.72%, and the transgenic tobacco lines respectively 67.00%, 44.05%, 17.47%. **【Conclusion】** The results show that *rd22* gene transferred into the tobacco enhances the resistance of the tobacco towards salt stress.

Key words: *Tamarix* sp.; *rd22* gene; bioinformatics; genetic transformation; salt tolerance

干旱、寒冷和盐害等环境胁迫是影响植物生长发育的主要因素,植物在受到环境胁迫信号刺激后,可以表达多种响应蛋白,如转录因子、蛋白激酶、渗透调节物质合成酶、自由基清除酶、水分通道蛋白和脱水蛋白(dehydrin)等。这些基因的表达及其产物的相互作用,提高了植物适应不良环境的能力^[1]。脱水诱导基因 *rd22* 最初由 Yamaguchi-Shinozaki 等^[2]从脱水处理的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆得到,通过 Northern 杂交对其在脱水、低温、高盐等胁迫条件下的表达进行分析后证明,*rd22* 基因的表达是由盐和水分胁迫诱导产生的,而与冷和热胁迫无关^[3]。这说明 *rd22* 基因对提高植物耐盐性可能有一定的作用。怪柳为灌木或小乔木,具有抗盐、碱、旱胁迫,耐高温和沙埋等卓越的抗逆性能,是自然界中少有的兼具众多优良抗逆性状的植物。本研究将从怪柳中克隆得到的 *rd22* 基因通过农杆菌介导法转化烟草,在抗性筛选及分子检测的基础上,对获得的 6 株转基因烟草进行盐胁迫下相对电导率和 SOD 活性变化分析,研究 *rd22* 基因的导入对提高烟草耐盐性的作用,以期为 *rd22* 基因应用于转基因研究、培育优良的耐盐作物与林木提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草(*Nicotiana tabacum*)品种“龙江 911”由本实验室保存并繁殖;植物表达载体为 pROK II,由山东师范大学张慧博士惠赠;*rd22* 基因由本实验室构建的紫杆怪柳(*Tamarix androssowii*) cDNA 文库

中获得,专利号为 ZL 0010916416。

1.2 *rd22* 基因的序列分析

利用 NCBI 网站的 Blast P 预测 *rd22* 基因的保守区;用 ProtParam 软件(<http://www.expasy.org/tools/s-protaram.html>)计算蛋白质的分子质量和理论等电点;应用 SignalP3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测;用 Blast 程序寻找相似性序列后,选择与其相似性高的不同植物的同一蛋白的氨基酸序列,用多序列联配程序 Clustalx(1.83)进行多序列比对和分子进化分析。

1.3 转基因烟草的 PCR 检测

采用叶盘法转化烟草“龙江 911”。以 *rd22* 基因两端序列为引物,进行转基因植株的 PCR 扩增,上游引物为:5' GAATCCGGATCCATGGAGTTGCGTC 3';下游引物为:5' GCGGCGAGCTCGTAAATGCGGCACCC 3'。以 pRD 质粒(携带 *rd22* 基因的重组植物表达载体质粒)上的目的基因片段为阳性对照,以非转基因烟草为阴性对照,对待测转基因烟草进行 PCR 扩增,扩增产物于 8 g/L 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.4 外源基因转录水平的检测

用 SDS 法提取转基因和非转基因烟草总 RNA^[4],经 DNase I 消化处理后进行反转录,以 cDNA 作为定量 PCR 模板,选择看家基因甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,在 NCBI 上检索烟草 GAPDH 的核酸序列。根据外源基因(*rd22*)序列和内标基因(GAPDH)序列,运用 primer 5.0 软件设计外源基因的特异性引物和内标引物(表 1)。

表 1 转基因烟草定量 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Gene-specific primers used in the real-time RT-PCR experiments

基因 Gene	引物 Code	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	扩增片段/bp PCR product
<i>rd22</i>	WY1	AGCCCGTCGTTGTGGGAGTA	212
	WY2	GAACGGGATCGATTCTGCCT	
GAPDH	NB1	GGAAAGTCTACCAGCATTG	222
	NB2	ATCTATTGTCTCCACGAAG	

用于实时荧光定量 RT-PCR 反应的试剂盒是 DyNAmo™ SYBR Green qPCR Kit (购自 FINNZYMES 公司),反应体系(20 μL)为:2×DyNAmo Master Mix 10 μL,*rd22* 基因和内参基因的上、下游引物各 2 μL(50 pmol/L),cDNA 2 μL。同时设置阴性对照。*rd22* 基因、*GAPDH* 基因和阴性对照均设 3 次重复。使用实时数据采集模式,循环反应参数为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 40 次。分别在 76 和 85 °C 读板,收集荧光,绘制溶解曲线,温度由 58 °C 开始至 95 °C 止。利用 OpticonMonitor 2.02 软件保存和分析定量数据,并根据公式 $X=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (X 表示相对表达量, Ct 表示每个反应管内的荧光信号达到设定域值时所经历的循环数)进行外源基因的相对定量分析^[5]。

1.5 转 *rd22* 基因烟草的抗盐性分析

随机挑选分子检测为阳性的 6 个转基因烟草株系(命名为 TR1、TR3、TR5、TR6、TR9、TR10)和非转基因对照烟草(CK)的组培苗进行盐胁迫试验。将各转基因株系和对照株系的无根组培苗,分别移入 NaCl 浓度分别为 0 (CK),110,220 和 330

mmol/L 的 MS 生根培养基中,进行组培苗盐胁迫试验,每个处理重复 3 次,每个重复 5 株。于胁迫处理的第 4 天取部位相同的组培苗叶片,进行质膜相对电导率^[6]、超氧化物歧化酶(SOD)活性^[6]检测,并计算相对生长量。

相对生长量 = ((终值 - 基值) / 基值) × 100% (基值为盐胁迫前各株系的鲜质量,终值为盐胁迫第 4 天各株系的鲜质量)。

试验数据利用 SPSS 软件进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 *rd22* 基因的序列分析

获得的 *rd22* 基因的编码区长 1 191 bp,编码 377 个氨基酸。ProtParam 预测 *rd22* 基因编码的蛋白质相对分子质量为 45.8 ku,理论等电点为 5.85。用 BlastP 预测保守区,结果(图 1)显示,该基因有 BURP 蛋白的保守序列,位于第 186~415 位氨基酸。并含有 RD22 家族的特有保守序列:TxVx-VGxGGVxxxxxKGx。通过 SignalP 分析发现,该基因的氨基酸序列在 N 端含有信号肽,剪切位点为:SHA-AA,说明该基因为分泌性蛋白。

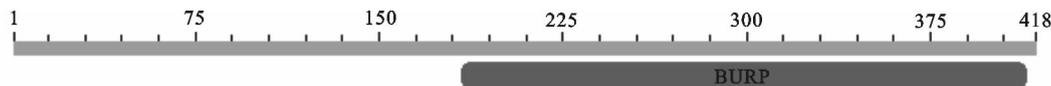


图 1 *rd22* 蛋白保守区的预测

Fig. 1 Prediction of the conserved domain of *rd22* protein

利用 BlastX 进行相似性搜索,从中选取了与柾柳 *rd22* 基因氨基酸序列相似性高的 5 个物种,通过 Clustalx 软件对上述 6 个物种的氨基酸序列进行多序列比对分析,结果(图 2)显示,柾柳 *rd22* 基因的氨基酸序列与其他物种 *rd22* 基因的氨基酸序列一致性在 59%~66%,其中与树棉(*Gossypium arhro-eum*)的一致性最高,与陆地棉(*Gossypium hirsutum*)的一致性最低(图 3)。由此可见,在不同植物中,*rd22* 基因序列在进化上并不保守。

2.2 转基因烟草的获得

分别提取各转基因烟草及对照烟草叶片的总 DNA,用特异引物进行 PCR 扩增,扩增产物于 8 g/L 琼脂糖凝胶中电泳检测,结果见图 4。由图 4 可以看出,阳性对照(pRD 质粒 DNA)及转基因烟草均扩增出了 1 191 bp 的特异条带,而非转基因的对照烟草则未出现扩增条带,初步证实 *rd22* 基因已经整合到烟草的基因组中。

选取 PCR 扩增结果为阳性的 6 个转基因烟草株系,进行实时荧光定量 PCR 分析,结果(图 5)显示,各转基因烟草株系的外源基因,相对于 *GAPDH* 的表达水平为 17.12~154.23,说明外源基因在 mRNA 水平上均得到不同程度的表达,各株系表达量由大到小依次为 TR9、TR3、TR6、TR5、TR10、TR1。

2.3 转 *rd22* 基因烟草的耐盐性分析

2.3.1 细胞膜相对电导率的变化 在盐胁迫条件下,植物细胞膜受损,膜透性增大,细胞内的电解质外渗。电解质渗出率的变化可直接反映细胞膜透性的改变和细胞被破坏的情况,是细胞膜在逆境胁迫下是否具有生理活性的重要生理指标之一^[7]。本研究对 6 个转基因烟草株系进行盐胁迫的结果见图 6。由图 6 可以看出,随着盐胁迫浓度的提高,各烟草株系相对电导率呈上升趋势,但是各转基因烟草株系的相对电导率均低于非转基因对照烟草。在 3

种 NaCl 浓度胁迫下,大部分转基因烟草株系(除 TR5、TR6 2 个株系外)与对照烟草间相对电导率的差异达到极显著水平。在 330 mmol/L NaCl 胁迫下,非转基因对照烟草的相对电导率提高到 16.49%,是非胁迫下的 1.62 倍,而各转基因烟草的相对电导率仅提高到 12.48%~14.91%,是非胁迫

下的 1.22~1.44 倍;与对照烟草相比,此时的转基因烟草株系中,相对电导率最低的 TR3 株系为 12.48%,比对照低 24.32%。上述结果表明,各转基因烟草细胞膜受到盐胁迫的伤害程度要比对照株系轻,说明转入的 *rd22* 基因的表达,对烟草具有一定的保护作用。

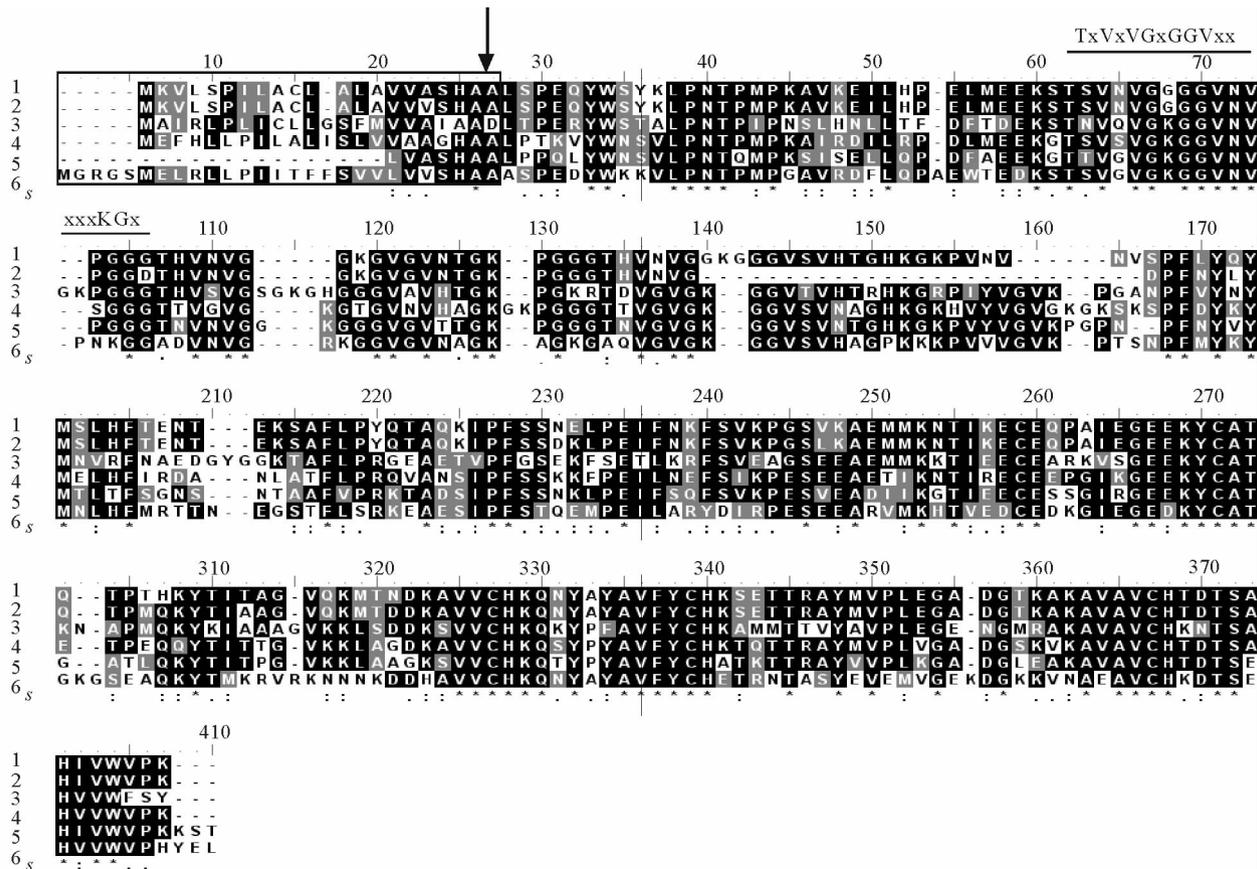


图 2 6 种植物 *rd22* 基因编码的氨基酸序列的比对

□中部分为输水区;下划线部分为 *rd22* 特有序列;↓所指为信号肽剪切位点

1. 树棉(AAT66913);
2. 陆地棉(AAL67991);
3. 拟南芥(NP197943);
4. 葡萄(AAV36561);
5. 桃(AAL26909);
6. 紫杆桧柳

Fig. 2 Multiple-sequence alignment of the deduced amino acid sequence of *rd22* gene

Hydrophobic region and specific sequence of *rd22* are present in square frame and underlined;

Signal peptide cutting site is present in arrowhead

1. *Gossypium arthroem* (AAT66913);
2. *Gossypium hirsutum* (AAL67991);
3. *Arabidopsis thaliana* (NP197943);
4. *Vitis vinifera* (AAV36561);
5. *Prunus persica* (AAL26909);
6. *Tamarix androssowii*

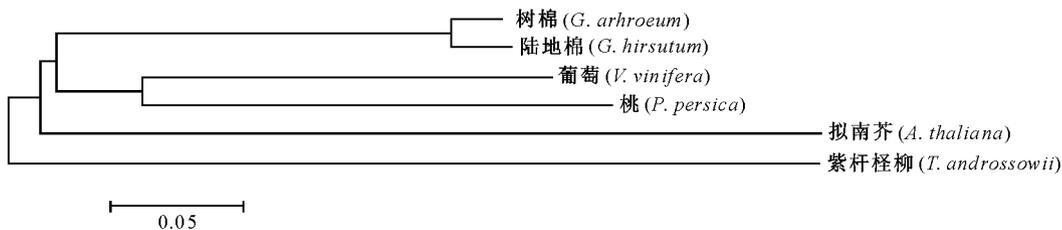


图 3 6 种植物 BURP 蛋白家族的分子进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of BURP family in 6 plants

2.3.2 SOD 活性的变化 SOD 是植物体内极为重要的保护酶,在其催化作用下,超氧阴离子 O_2^{-2} 可被歧化为 H_2O_2 , H_2O_2 经过氧化氢酶(CAT)或抗坏血酸过氧化物酶(ASP)的催化形成 O_2 ,从而清除超氧阴离子自由基,减少其对膜结构和功能的破坏。大量的研究表明,SOD 的活性与植物的抗逆性密切相关^[8]。由图 7 可以看出,在非盐胁迫下,转基因烟草株系与对照烟草 SOD 活性差异不显著。当受到 NaCl 胁迫后,各转基因烟草和对照烟草的 SOD 活性均随着 NaCl 浓度的增加而升高;在相同浓度的 NaCl 胁迫下,各转基因烟草的 SOD 活性均高于

对照烟草。在 220 和 330 mmol/L NaCl 胁迫下,TR1、TR3、TR9 和 TR10 4 个转基因烟草株系与对照烟草的 SOD 活性差异达到极显著水平。在 330 mmol/L NaCl 胁迫下,对照烟草 SOD 活性是非盐胁迫下的 2.32 倍,而转基因烟草 SOD 活性是非盐胁迫下的 2.56~3.22 倍;与对照烟草相比,转基因烟草株系中 SOD 活性最低的 TR5 株系也较对照高 14.79%。说明 *rd22* 基因的转入,使各转基因烟草株系 SOD 活性超量表达,从而对烟草起到了更好的保护作用。



图 4 转基因烟草的 PCR 扩增电泳图谱
1~12. 转基因株系;13. 阴性对照;14. 阳性对照;
15. 水对照;M. DNA Marker DL2000

Fig. 4 PCR product of the transgenic tobacco
1-12. Transformed tobacco lines;13. Negative control;
14. Contrast control;15. Blank control;
M. DNA Marker DL2000

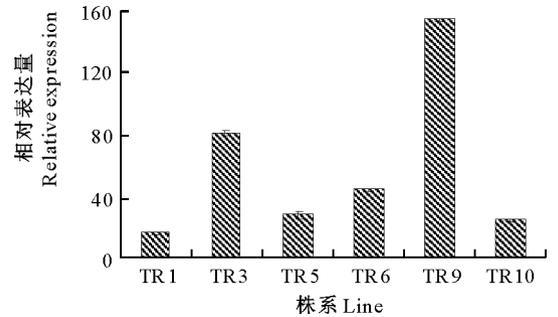


图 5 各转基因烟草 mRNA 表达水平的相对定量
Fig. 5 Expression level of mRNA in different
transgenic tobaccos

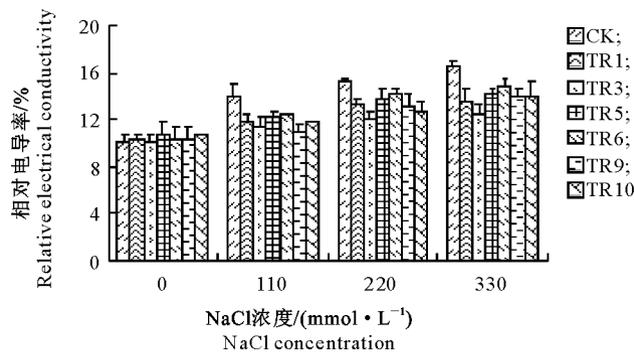


图 6 不同浓度 NaCl 胁迫下转基因烟草
相对电导率的变化

Fig. 6 Changes of the electrical conductivity of transgenic tobacco under different NaCl concentrations

2.4 盐胁迫下转 *rd22* 基因烟草相对生长量的变化 植物在受到盐胁迫时,相对生长量能够直接体现植物抵抗逆境的能力。由图 8 可见,盐胁迫浓度达到 110 mmol/L 时,各转基因烟草株系相对生长量在 63.47%~72.98%,均高于对照烟草,相对生

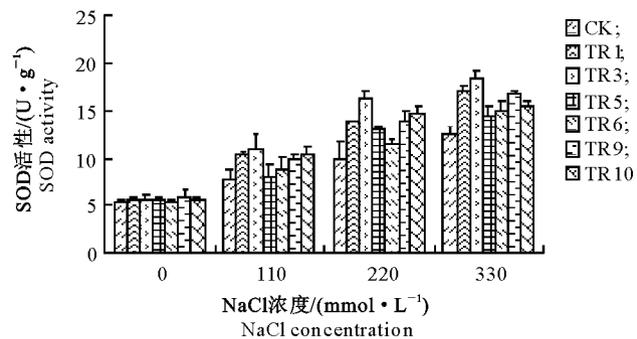


图 7 不同浓度 NaCl 胁迫下转基因烟草
SOD 活性的变化

Fig. 7 Changes of SOD-like activity of transgenic tobacco under different NaCl concentrations

长量较大的是 TR1 和 TR3;在盐胁迫浓度达到 220 mmol/L 时,各转基因烟草株系相对生长量在 40.37%~46.34%,均高于对照烟草,相对生长量较大的仍是 TR1 和 TR3;在盐胁迫浓度达到 330 mmol/L 时,TR1 和 TR3 的相对生长量分别为对照

的 1.56 和 1.53 倍, 较低的 TR5 和 TR6 也分别是对照的 1.26 和 1.28 倍。从相对生长量的分析结果可知, *rd22* 基因的导入提高了转基因烟草的耐盐能力。

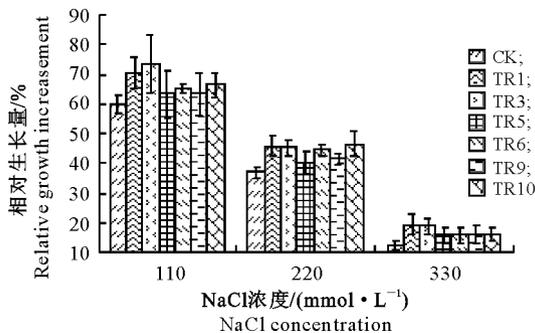


图 8 不同盐浓度胁迫下转 *rd22* 基因烟草相对生长量的比较

Fig. 8 Comparison of relative growth of *rd22* transgenic tobacco under different NaCl concentrations

3 讨论

脱水蛋白最初在种子中被发现, 随后的研究表明, 脱水蛋白广泛存在于细菌、藻类和高等植物的各个组织和器官中, 干旱、低温和高盐等引起脱水的环境因素以及 ABA, 均能诱导其在绿色组织中表达, 推测脱水蛋白在植物受到干旱胁迫失水时, 能够部分替代水分子, 保持细胞液处于溶解状态, 从而避免细胞结构的塌陷, 稳定细胞结构, 尤其是膜结构, 起分子伴侣和亲水性溶质的作用, 并在水分胁迫时稳定和蛋白质的结构及功能^[9]。目前, 多种脱水蛋白基因在植物中已被克隆, 并在原核表达系统中获得表达^[10]; 还有学者利用免疫杂交技术和转基因技术, 对脱水蛋白的功能和表达调控进行广泛的研究, 揭示出了脱水蛋白具有金属离子结合特性和抗氧化活性^[11]。本研究主要对转脱水诱导 *rd22* 基因烟草的耐盐性进行了分析, 以期揭示 *rd22* 基因的功能。

生物信息学分析结果表明, 来自怪柳的 *rd22* 基因具有一个 BURP 蛋白的保守序列, 位于第 186~415 位氨基酸。进化分析表明, 在不同植物中, *rd22* 基因氨基酸序列在进化上并不保守。将该基因转化到烟草基因组中, 并进行转 *rd22* 基因烟草的耐盐性分析。从生物膜伤害角度来看, 盐胁迫后各转基因烟草株系的相对电导率均显著低于对照, 在盐胁迫浓度达到 330 mmol/L 时, 非转基因对照烟草的相对电导率由非胁迫前的 10.18% 升高至 16.49%, 而各转基因烟草株系的相对电导率升高至 12.48%~

14.91%, 这说明盐胁迫对转基因烟草生物膜的伤害程度远低于非转基因烟草。从 SOD 活性变化上来看, 各转基因烟草和对照烟草的 SOD 活性, 均随着盐胁迫浓度的增加而升高, 但在相同浓度盐胁迫下, 各转基因烟草的 SOD 活性均高于对照烟草。在盐胁迫浓度为 330 mmol/L 时, 转基因烟草 SOD 活性是对照烟草的 1.10~1.39 倍, 说明盐胁迫条件下, 转基因烟草的 SOD 表达量远远高于非转基因烟草。由相对生长量分析结果可知, 随着盐胁迫浓度的增加, 转基因烟草鲜质量的生长优势表现也愈加明显, 盐胁迫浓度分别为 110, 220 和 330 mmol/L 时, 各转基因烟草株系的相对生长量均高于对照株系, 非转基因烟草的相对生长量分别为 59.92%, 36.99% 和 12.72%, 转基因烟草的相对生长量平均为 67.00%, 44.05% 和 17.47%, 说明盐胁迫对转基因烟草生长的影响低于非转基因烟草。综合分析本研究结果可知, 各转基因烟草株系中, TR5 和 TR6 2 个株系的耐盐性表现较差。这说明由于受到目的基因在转入植株基因组中整合位点和整合数的影响, 以及目的基因在转化植株中是否能够正常表达的影响, 转化植株的抗逆能力也会表现出差异。但总体而言, *rd22* 基因的导入在一定程度上提高了烟草的耐盐性。

干旱、冷冻和盐害等环境胁迫, 均能导致植物脱水, 造成细胞中离子浓度增加。rd22 类 BURP 蛋白家族在植物体多种营养器官中表达, 在环境条件一植物生长发育的反应环节中起作用, 其可与金属离子结合, 减少细胞脱水过程中盐分沉淀和结晶的可能性, 从而降低离子毒性^[9]。这可能与 BURP 蛋白家族成员 N 端多含有疏水的信号肽序列, 而 C 端均含有保守的 BURP 结构域有关^[12-13]。rd22 类 BURP 蛋白具有一定的组织特异性和不同的表达模式, 在功能上或与特定组织、细胞的发育有关, 或参与植物的逆境胁迫响应。本研究将 *rd22* 基因导入烟草, 由于该基因在烟草组织细胞中的组成型表达, 为细胞提供了大量的脱水蛋白, 脱水蛋白参与细胞的渗透调节过程, 并与其他蛋白相互作用, 从而避免了盐分胁迫导致的胞质水分减少时蛋白质间的聚集, 维持了细胞的正常结构。

[参考文献]

- [1] Houde M, Daniel C, Lachapelle M, et al. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated protein in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues [J]. Plant J, 1995, 8(4):

- 583-593.
- [2] Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, et al. Molecular-cloning and characterization of 9 cDNA for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*; sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein [J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33(3):217-224.
- [3] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 238(1/2):17-25.
- [4] 王玉成, 杨传平, 姜 静. 紫丁香、糖槭总 RNA 的快速提取方法 [J]. *东北林业大学学报*, 2001, 29(6):90-91.
Wang Y C, Yang C P, Jiang J. Method of extracting RNA quickly from *Syringa oblata* and *Acer negundo* [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2001, 29(6):90-91. (in Chinese)
- [5] Keenth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25:402-408.
- [6] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学指导 [M]. 广州:华南理工大学出版社, 2002:119-120.
Chen J X, Wang X F. Handbook of botanical biology [M]. Guangzhou: South China University Technology Press, 2002:119-120. (in Chinese)
- [7] 李合生, 孙 群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京:高等教育出版社, 2000:261-262.
Li H S, Sun Q, Zhao S J, et al. The theory and technology of plant physiology and biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000:261-262. (in Chinese)
- [8] 郝再彬, 苍 晶, 徐 仲. 植物生理实验 [M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社, 2004:110-113.
- Hao Z B, Cang J, Xu Z. Botanical biology experiments [M]. Harbin: Harbin Institute of Technology Press, 2004:110-113. (in Chinese)
- [9] 张玉秀, 王 梓. 脱水蛋白在逆境下的分子作用机制研究进展 [J]. *自然科学进展*, 2007, 17(1):1-10.
Zhang Y X, Wang Z. Progress of dehydrin in response to stress research [J]. *Progress in Natural Science*, 2007, 17(1):1-10. (in Chinese)
- [10] 刘金仙, 阙友雄, 郭晋隆, 等. 甘蔗胚胎晚期丰富蛋白基因 (LEA)cDNA 全长克隆及表达特性 [J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(5):836-842.
Liu J X, Que Y X, Guo J L, et al. Molecular cloning of sugarcane late embryogenesis abundant protein gene (LEA) and its expression character [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, 17(5):836-842. (in Chinese)
- [11] 张玉秀, 徐 进, 王 校, 等. 植物抗旱和耐重金属基因工程研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2007, 18(7):1631-1639.
Zhang Y X, Xu J, Wang X, et al. Research advances in drought resistance and heavy metals tolerance of transgenic plant [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(7):1631-1639. (in Chinese)
- [12] 唐玉林, 王亚静, 蔡雪梅, 等. 植物 BURP-蛋白家族 [J]. *自然科学进展*, 2009, 19(3):241-247.
Tang Y L, Wang Y J, Cai X M, et al. The plant BURP family [J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(3):241-247. (in Chinese)
- [13] Ding X P, Hou X, Xie K B, et al. Genome-wide identification of BURP domain-containing genes in rice reveals a gene family with diverse structures and responses to abiotic stresses [J]. *Plant*, 2009, 230:149-163.