

陆玉建, 张韩杰, 刘南南. 大肠杆菌 *otsA* 基因的克隆和转化本生烟草[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 32-38.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.005

## 大肠杆菌 *otsA* 基因的克隆和转化本生烟草

陆玉建<sup>1,2</sup>, 张韩杰<sup>1</sup>, 刘南南<sup>1</sup>

(1. 滨州学院生命科学系/山东省黄河三角洲野生植物资源开发利用工程技术研究中心, 山东 滨州 256603; 2. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600)

**摘要:** 海藻糖是一类重要的渗透调节剂, 可以提高植物抵抗多种非生物胁迫的能力。6-磷酸海藻糖合成酶(TPS)是海藻糖生物合成的关键酶, 在大肠杆菌中, *otsA* 基因编码 TPS。本试验通过 PCR 技术克隆 *otsA* 基因, 构建 p2300-*otsA*-GFP 表达载体, 用农杆菌介导的方法将 *otsA* 基因导入到本生烟草中。对筛选获得的转基因植株进行检测表明, *otsA* 基因已成功整合到本生烟草的基因组中, 并能进行有效转录。而且研究发现, 转基因幼苗在含有 150 mmol/L NaCl 的培养基中能够生长, 具有一定的抗盐胁迫能力。

**关键词:** 海藻糖; 大肠杆菌; *otsA* 基因; 本生烟草; 根癌农杆菌

**中图分类号:** Q785; S572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)01-0032-07

## Cloning of *otsA* gene in *Escherichia coli* and its transformation into *Nicotiana benthamiana*

LU Yu-jian<sup>1,2</sup>, ZHANG Han-jie<sup>1</sup>, LIU Nan-nan<sup>1</sup>

(1. Department of Life Sciences, Binzhou University/Shandong Provincial Engineering and Technology Research Center for Wild Plant Resources Development and Application in Yellow River Delta, Binzhou 256603, China; 2. Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy of Shandong Province, Binzhou 256600, China)

**Abstract:** Trehalose, as an important osmotic regulator, improves plant tolerance to multiple abiotic stress. In *Escherichia coli*, TPS is a key enzyme for the biosynthesis of trehalose encoded by *otsA* gene. In this experiment, *otsA* gene was cloned and transferred into the genome of *Nicotiana benthamiana* by *Agrobacterium*-mediated method. The transgenic seedlings in the medium containing 150 mmol/L NaCl grew much better than wild-type seedlings, indicative of the salt tolerance of *otsA*-transgenic seedlings.

**Key words:** trehalose; *Escherichia coli*; *otsA* gene; *Nicotiana benthamiana*; *Agrobacterium tumefaciens*

环境胁迫是影响植物生长发育的主要因素, 其中又以干旱和盐胁迫对植物的影响最为严重<sup>[1-3]</sup>。土壤中盐分过高, 会降低植物的渗透势, 导致植物失水, 此外, 过多的盐分还可对植物产生离子毒害作

用, 造成细胞膜损伤, 膜透性增强, 酶活性降低, 叶绿体降解, 呼吸作用受阻, 气孔关闭, 光合作用受到抑制等, 最终导致植物正常的生长发育受阻<sup>[1,4]</sup>。植物为了消除盐胁迫所造成的伤害, 除了将盐积累到液泡或排出细胞外, 还可以通过在细胞中积累一些小分子有机化合物来维持细胞质的高渗透压, 从而有利于植物在高盐条件下对水分的吸收<sup>[1-2,5]</sup>。海藻糖就是其中一类重要的渗透调节剂, 广泛存在于生物界, 是一种由 2 分子葡萄糖缩合而成的非还原性双糖<sup>[6]</sup>。在非生物胁迫的条件下, 海藻糖可以避

收稿日期: 2014-06-30

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2012CL14); 滨州学院博士基金项目(2010Y08)

作者简介: 陆玉建(1979-), 男, 河南南阳人, 博士, 讲师, 主要从事细胞工程及分子生物学研究。(Tel)0543-3190096; (E-mail) luyujian79@163.com

免细胞失水而损失养分,保护细胞免受自由基的伤害,还可增加膜的流动性和酶的稳定性<sup>[1,7-10]</sup>。在细菌和酵母中,海藻糖的合成包括 2 个过程:首先,UDP-葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖在 6-磷酸海藻糖合成酶(*TPS*)的催化下形成 6-磷酸海藻糖;然后,6-磷酸海藻糖在 6-磷酸海藻糖磷酸化酶(*TPP*)的作用下转变为海藻糖<sup>[10-12]</sup>。在大肠杆菌中,*otsA* 和 *otsB* 基因分别编码 *TPS* 和 *TPP*,在逆境胁迫下,海藻糖合成相关酶类能显著提高细胞中海藻糖的含量,从而增强大肠杆菌适应不良环境的能力<sup>[11,13]</sup>。在水稻中,大肠杆菌 *otsA-otsB* 融合基因过表达可明显提高水稻抗胁迫能力<sup>[10,13]</sup>。在拟南芥中,*AtTPS1* 插入突变将使胚胎发育受到抑制,*tps1* 突变体胚胎的细胞壁变厚,细胞分裂明显减少;而 *AtTPS1* 过表达则可增强拟南芥的耐旱能力<sup>[14-15]</sup>。

海藻糖与生物抗逆能力之间具有密切的关系,但海藻糖在植物细胞中含量很低<sup>[11,14]</sup>,其作用的相关机制还不十分清楚,因此有必要进行深入的研究。本试验拟通过根癌农杆菌介导的叶盘法将克隆的大肠杆菌 *otsA* 导入到本生烟草中,从而初步建立起本生烟草遗传转化体系,并筛选出具有一定抗胁迫能

力的转基因植株,以期为今后通过基因工程手段增强植物的耐盐能力提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 植物材料 供试材料为本生烟草(*Nicotiana benthamiana*)种子,由本实验室保存。
- 1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3103 由本实验室保存,p2300-*GFP* 质粒由兰州大学细胞研究所提供,pTZ57R/T 载体购自兰州鹏程生物技术有限公司。
- 1.1.3 常用试剂及酶类 *Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自兰州鹏程生物技术有限公司,限制性内切核酸酶和 Primer ST-AR<sup>TM</sup> HS DNA ploymerase 购自大连宝生物工程有限公司。
- 1.1.4 培养基和培养条件 试验各阶段所用的最佳培养基组成见表 1,各培养基中均含 3% 蔗糖和 0.8% 琼脂,pH 为 5.8,培养条件:每天 16 h 光照、8 h 黑暗,湿度约 80%,温度 25 ℃ 左右,光照度为 2 000 lx<sup>[16]</sup>。

表 1 本生烟草遗传转化所用培养基的组成及编号  
Table 1 The composition and coding of the media for *Nicotiana benthamiana*

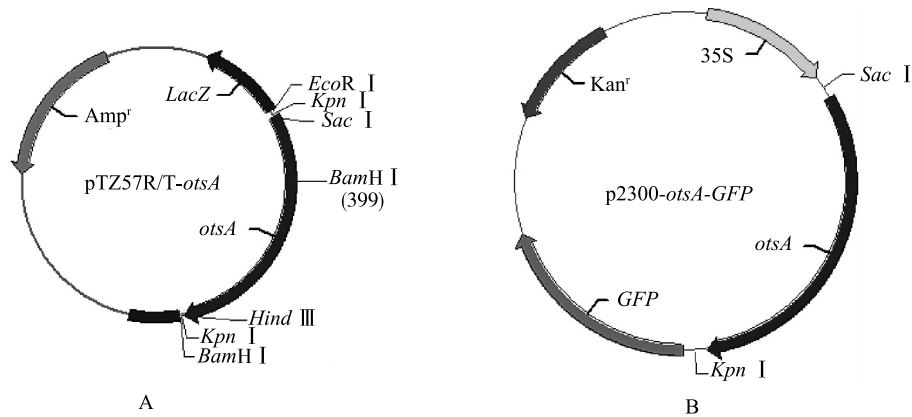
编号	培养基用途	培养基组成成分
Y1	农杆菌侵染培养基	MS 液体培养基
Y2	农杆菌和叶片共培养培养基	MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L
Y3	不定芽分化培养基(含筛选剂和除菌剂)	MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+羧苄青霉素 500.0 mg/L+卡那霉素 50.0 mg/L
Y4	增殖培养基(含筛选剂和除菌剂)	MS+羧苄青霉素 500.0 mg/L+卡那霉素 50.0 mg/L
Y5	生根培养基(含筛选剂和除菌剂)	MS+NAA 0.1 mg/L+羧苄青霉素 250.0 mg/L+卡那霉素 50.0 mg/L

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 *otsA* 基因的克隆 根据 NCBI 数据库提供的 *otsA* 基因(Accession: X69160)序列设计引物 *otsA*-F: 5'-GAGGAGCTCATGACTCGTTTACTCGTAGT-3'(下划线为 *Sac* I 酶切位点)和 *otsA*-R:5'-ATAGGTACCCGCAAGCTTTGGAAAGGTAG-3'(下划线为 *Kpn* I 酶切位点),用于克隆 *otsA* 基因完整的 CDS 序列,所用引物由大连宝生物工程有限公司进行合成。以大肠杆菌基因组 DNA 为模板,高保真 PCR 扩增 *otsA*,将回收产物连入 pTZ57R/T 载体(图 1A)。转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,并对重组克隆进行 PCR

和酶切鉴定。PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 1 min 30 s,35 个循环;最后 72 ℃ 再延伸 10 min。将含有目的基因的阳性克隆进行测序(由上海生工生物工程有限公司完成)。

1.2.2 植物表达载体的构建 用限制性核酸内切酶 *Sac* I-*Kpn* I 分别酶切质粒 p2300-*GFP* 和 pTZ57R/T-*otsA*,回收目的片段,用 T4 DNA 连接酶进行连接,从而构建 p2300-*otsA-GFP* 载体(图 1B)。将含目的基因的 p2300-*otsA-GFP* 质粒转入农杆菌 GV3101 中。



A: pTZ57R-T-*otsA* 克隆载体; B: p2300-*otsA*-GFP 表达载体。

图 1 大肠杆菌 *otsA* 基因表达载体的构建

Fig. 1 Construction of *otsA* expression vectors

1.2.3 农杆菌介导本生烟草的遗传转化 将含有 p2300-*otsA*-GFP 质粒的农杆菌接种于 LB 液体培养基中进行培养,待其  $OD_{600}$  约为 0.5 时离心,加入等体积的 Y1 培养基悬浮菌体;切取本生烟草的叶片,置于菌液中侵染 3 ~ 5 min;然后接种到 Y2 培养基中,共培养 2 d;将叶片转入到 Y3 培养基中选择培养,诱导叶片分化,产生不定芽;转移至 Y4 中进行增殖培养,切取生长良好的不定芽,在 Y5 中诱导生根;获得转基因试管苗,驯化移栽,筛选鉴定。

1.2.4 转基因植株的分子检测 用 CTAB 法提取野生型和转化植株叶片 DNA,PCR 检测大肠杆菌 *otsA* 整合到本生烟草染色体上的情况;Trizol 法提取野生型和转化植株的总 RNA,RT-PCR 检测大肠杆

菌 *otsA* 在转基因植株中的转录水平。

## 2 结果

### 2.1 大肠杆菌 *otsA* 基因编码产物的保守结构域分析

大肠杆菌 *otsA* 基因全长 1 425 bp,其编码的蛋白由 474 个氨基酸构成,预测其分子量大小约 54 000。利用 NCBI 数据库中 Conserved Domain Search 工具对 *otsA* 蛋白的结构进行分析表明(图 2),在该蛋白的内部存在 1 个 GT1\_TPS 保守结构域。该结构域是糖基转移酶 GTB 类家族(Glycosyltransferase GTB\_type)的成员,由 460 个氨基酸组成,属于 TPS 的催化结构域,参与 6-磷酸葡萄糖形成 6-磷酸海藻糖的催化过程。

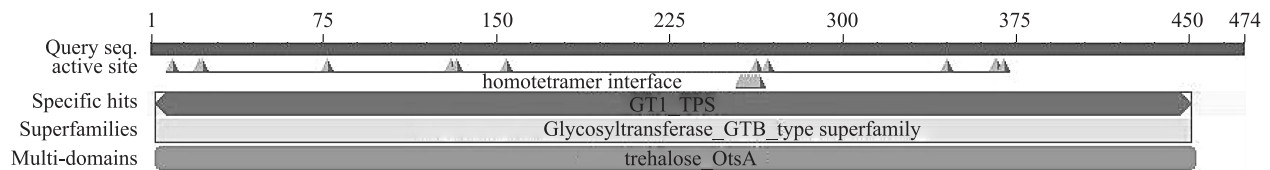


图 2 大肠杆菌 *otsA* 基因编码蛋白保守结构域分析

Fig. 2 The analysis of conserved domain of *otsA* encoded protein

### 2.2 大肠杆菌 *otsA* 蛋白序列比对与保守性分析

在逆境胁迫下,*otsA* 能显著提高大肠杆菌细胞中海藻糖的含量,从而增强其适应不良环境的能力;在酵母和拟南芥中,海藻糖合成的关键酶分别为 *ScTPS1* 和 *AtTPS1*,它们分别由 495 和 942 个氨基酸组成。运用 clustalW 软件对 *otsA*、*ScTPS1* 和 *AtTPS1*

蛋白的全长氨基酸序列进行比对<sup>[17]</sup>,结果显示(图 3),*otsA* 和 *ScTPS1* 一致的氨基酸有 158 个,相似的氨基酸有 70 个,序列相似性为 45.1%;*otsA* 和 *AtTPS1* 一致的氨基酸有 167 个,相似的氨基酸有 81 个,序列相似性为 26.2%;*ScTPS1* 和 *AtTPS1* 一致的氨基酸有 243 个,相似的氨基酸有 68 个,序列相似

otsA	-----M-----	1
ScTPS1	-----MTT DNA	6
AtTPS1	MPGNKYNCSSSHIPLSRTERLLRDRELREKRKSNRARNPNDVAGSSSENSENDLRLEGDSRRQYVEQYLEGAAAAAHDDA	80
otsA	-----SRLVVVSNRFA-----PPDEHAASAGGLAVGILGALKAAAGGLWFGWSGETGNEDQPLKKVKK--G	59
ScTPS1	--KAQLTSSSSGGNIIVVSNRFPVTITKNSSTGQYAYAMSSGGLVTALEGLKKTYYTFKWFGBGLEIFDDEKDVVRKDLLE	84
AtTPS1	CERQEVPRPYNRQRLLVVANRFPVSAVRGE-DSWSLEISAGGLVSAALLGV-KEFEARWIGWAGVNVNPDVVGQKALSALA	158
otsA	NITWASFNLSSEQDLDEYYNQFSNAVLWPAFHY-----RLDLVQFQRPANWGYLRVNALLADKLLPLLQDDDIWIHDY	132
ScTPS1	KFNAPVIFLSDEIADLHYNGESNSILWPLFHY-----HPGEINFDENAWLAYNEANQTFINEIAKTMNHNDLIWHVDY	157
AtTPS1	EKRCPVFLDEEIVHQYYNGYCNILWPLFHYLGLPQEDRLATRSFQSQFAAYKKANQMFADVNEHYEEDVWVCHDY	238
otsA	HLLPFAHELRL-----KRGVNNRIGFFLHIFPFTPEIFNALPTYDTLLEQLCDYDLGFGQTENDRLAFLDCLSNLTRVTTR	207
ScTPS1	HLMLVPEMLRVKIHEKQLQNVKVGWFLHTPFPSSEIYIRLPVRQEILKGVLSCLDVGFGHTYDYARHFLSSVQVRLNVNLT	237
AtTPS1	HLMLFLPKLRL-----EYNSKMKVGWFLHTPFPSSEIHRITLPSRSELLRSVLAADLVGFGHTYDYARHFWVSACTRILGLEGT	313
otsA	SAKSHTAWGKAFRTEVYPIGIEPKKEIAKQAAGP-LPPKLAQLKAEKKNVQNIFSVERLDYSKGLPEFLAYEALKEKYPQ	286
ScTPS1	PNGVEYQ-GRFVNVAEPFIDVDKFTDGLKKESVQKRIQQLKETFKGCKIIVGVDRLDYIKGVPOKLHAMEVFLNEHPE	316
AtTPS1	PEGVEDQ-GRLTRVAAPFIDSDRFIRALEVEPIQHKELKERFAGRKVMLGVDRLDMLKGIPOKLALFAEFLEENAN	392
otsA	HHGKTRYTQTAPTSRGDVQAYQDIRHQEENEAGRINKYVGLGWTPLYYLNQHFDRKLLMKTFEYSDVGLVTPTRDGMNL	366
ScTPS1	WRGKVVVLQVAVPSRGDVVEEYQYLRVNVNVLGRINGQFGTVEFVPIHFMHKSIPFEELISLYAVSDVCLVSSSTRDGMNL	396
AtTPS1	WRDKVVLQLAVPTTSDVPEYQKLTQVHEIVGRINGREGTITAVPIHHLDRSLDFHALCALYAVTDVALVTSIRDGMNL	472
otsA	VAKEVYVAAQDPANPGLVLSQFAGAAEELT-SALIVNPNVDRDEVAALDRALTMSLAERISRHAEMLDVIVKNDINHWQE	445
ScTPS1	VSYEYIACQE-EKKGSLILSEFTGAAQSLN-GAIVNPNWNTDLSDAINEALTLPDVKKKEVNWEKLYKISKYTSAFWGE	474
AtTPS1	VSYEFVACQE-AKKGVLLSEFAGAAQSLGAGAILVNPWNITEVAASIGQALNMTAEEREKRRHRHNFHHVKHTAQEWAE	551
otsA	CFISDLKQIVPRS-----AESQQRDKVATFPK-----	472
ScTPS1	NFVHELYSTSSSS-----TSSSATKN-----	495
AtTPS1	TFVSELNDTVIEAQLRISKVPPELPQHDIAIQRYSKSNRLLILGFNATLTPEVDNQGRRGDQIKEMDLNLHPELKGPLKA	631

黑色表示相同的氨基酸;灰色表示相似的氨基酸。

图3 大肠杆菌 *otsA*、ScTPS1 和 AtTPS1 蛋白全长氨基酸序列比对结果 (其中 AtTPS1 C 端部分氨基酸序列没有显示)

Fig. 3 Sequence alignment between proteins *otsA*, ScTPS1 and AtTPS1 (C-terminal amino acid sequence of AtTPS1 were not shown)

性为 32.8%。通过分析比对结果发现, *otsA* 和 ScTPS1 存在较高的相似性, 而与 AtTPS1 存在一定的差异, 但它们一致或相似的氨基酸数量较多, 因此, 可以推测, 这三种蛋白至少在部分功能上应该是相似的。

### 2.3 大肠杆菌 *otsA* 蛋白系统进化分析

用 clustalW 软件对大肠杆菌和其他 12 种生物的 TPS 氨基酸序列进行比对, 通过 MEGA 软件进行系统进化分析。结果显示 (图 4), 在所构建的系统进化树中, 大肠杆菌和果蝇聚类在一起, 表明它们之间有更近的亲缘关系和更相似的蛋白质序列特征。大肠杆菌、啤酒酵母和拟南芥处于不同的进化分支, 但大肠杆菌与啤酒酵母之间的距离较近, 而与拟南芥之间的距离较远, 所以可以推测, 大肠杆菌 *otsA* 的功能很可能与酵母相似, 但与拟南芥中的 TPS 存在较大的差异。

### 2.4 大肠杆菌 *otsA* 的克隆与表达载体的构建

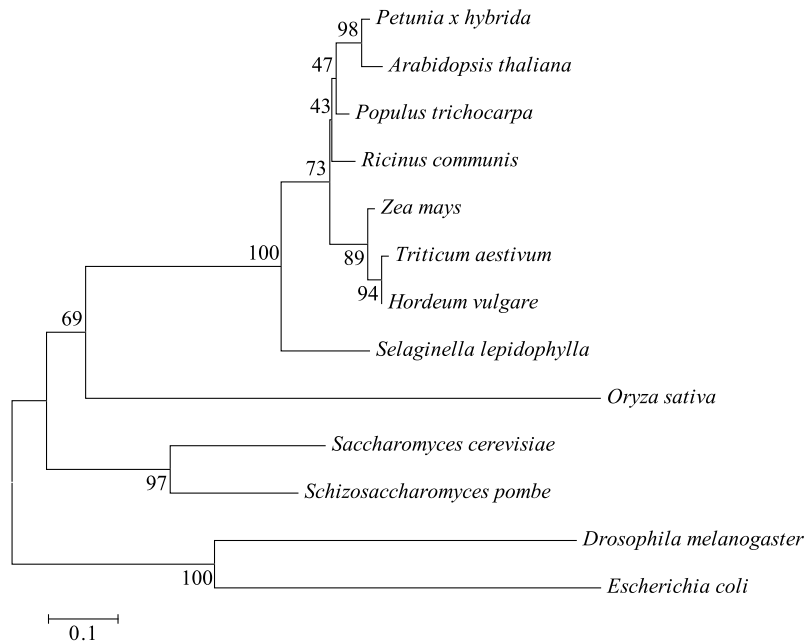
以大肠杆菌 DH5 $\alpha$  基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *otsA* 基因。将回收的 PCR 克隆片段与 pTZ57R/T

载体进行连接, 转化大肠杆菌, 提质粒, PCR 和酶切鉴定。试验结果显示, 质粒 PCR 和双酶切都可得到大小介于 1 200 ~ 2 000 bp 的条带, 表明目的片段已连入 pTZ57R/T (图 5A 和图 5B)。对 pTZ57R/T-*otsA* 和 p2300-*GFP* 质粒进行酶切, 将回收的目的片段进行连接。PCR 和酶切鉴定重组质粒, 结果表明, 目的片段已连入 p2300-*GFP*, 从而实现 p2300-*otsA-GFP* 表达载体的构建 (图 5C 和图 5D)。将 p2300-*otsA-GFP* 质粒转入根癌农杆菌中。

### 2.5 本生烟草遗传转化体系的建立

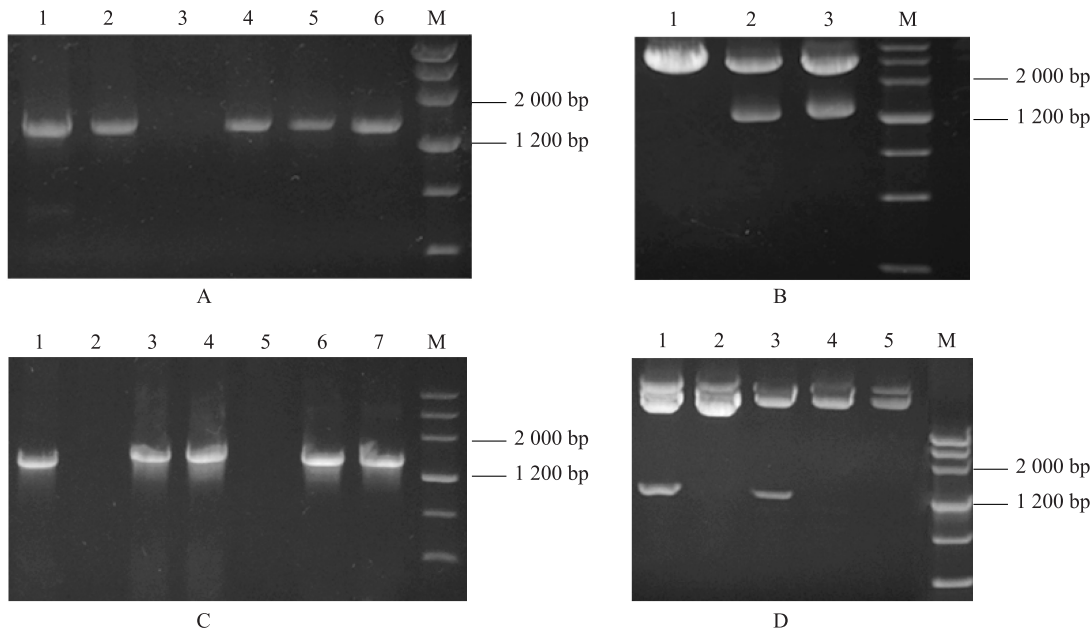
活化含目的基因的根癌农杆菌, 叶盘法转化本生烟草。将叶片浸入农杆菌液中, 然后取出接入不定芽诱导培养基中 (图 6A)。将共培养 2 d 的外植体接种到筛选培养基中进行不定芽的诱导。经过 20 d 的培养, 可以观察到本生烟草卷曲的叶片上面分布着大量的芽点 (图 6B)。到了第 35 d, 叶片上产生大量明显的不定芽 (图 6C)。选择生长情况较好的抗性芽, 切取后转入生根培养基中进行生根培养。6 周后, 不定芽基部已产生大量的根, 试管苗生长健





矮牵牛(*Petunia x hybrida*, ADO16162.1); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AEE36123.1); 毛果杨(*Populus trichocarpa*, XP\_002331300.1); 蓖麻(*Ricinus communis*, XP\_002531237.1); 玉米(*Zea mays*, NP\_001123593.2); 小麦(*Triticum aestivum*, ACII6353.1); 大麦(*Hordeum vulgare*, BAK02059.1); 鳞叶卷柏(*Selaginella lepidophylla*, AAD00829.1); 水稻(*Oryza sativa*, CBV06069.1); 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, CAA85083.1); 裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*, NP\_594205.1); 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, AAF51020.1); 大肠杆菌(*Escherichia coli*, ABU24467.1)。

图 4 基于不同生物海藻糖合成酶氨基酸序列构建的系统进化树  
Fig.4 Phylogenetic tree based on the biological amino acid sequences of the trehalose synthesis enzymes

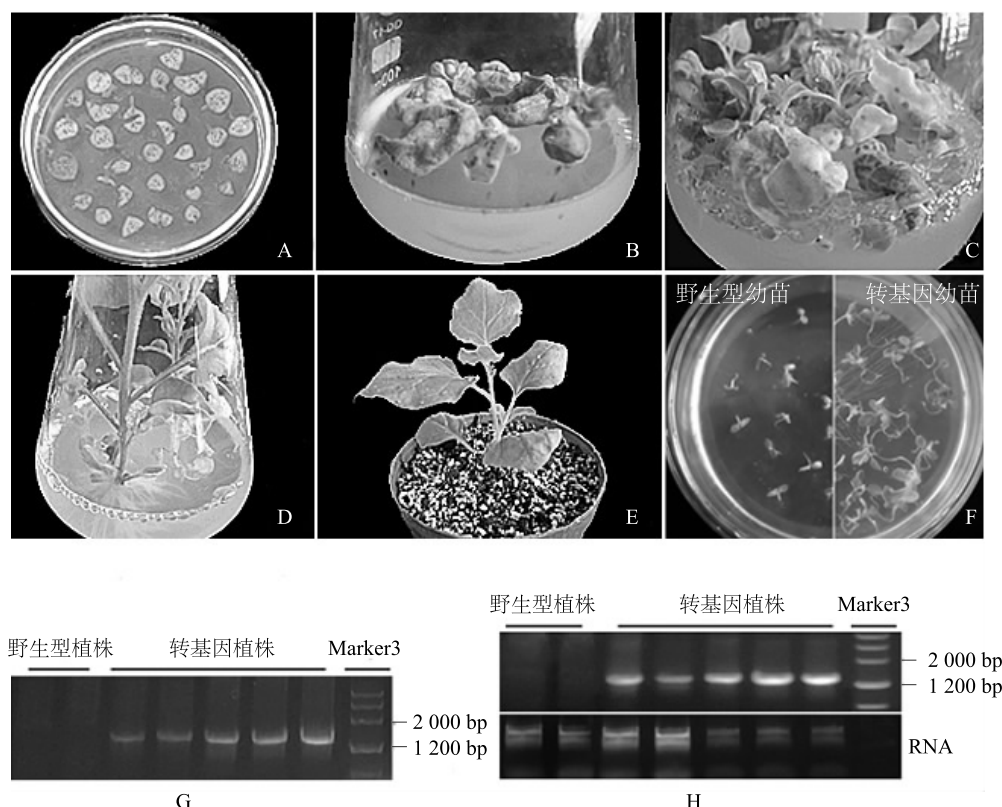


A:pTZ57R/T-otsA 质粒 PCR 的结果;B:pTZ57R/T-otsA 质粒酶切的结果;C:p2300-otsA-GFP 质粒 PCR 的结果;D:p2300-otsA-GFP 质粒酶切的结果。M:Marker。

图 5 载体的构建与鉴定  
Fig.5 Construction and identification of the vectors

壮(图 6D)。当根布满培养基底部,幼苗高 8 ~ 10 cm 时,便可进行驯化和移栽。图 6E 显示的是培养室中生长 2 周的转基因本生烟草。对筛选出的转基因植株进行 PCR 检测,结果表明,大肠杆菌 *otsA* 基因已成功的整合到本生烟草的基因组中(图 6G)。RT-PCR 检测大肠杆菌 *otsA* 基因表达情况,显示该

基因在本生烟草中可以有效的进行转录(图 6H)。将生长 2 周的野生型和转基因幼苗转移到含 150 mmol/L NaCl 培养基,1 周后发现,野生型幼苗叶片变黄,生长受到强烈的抑制;而转基因幼苗则对 NaCl 具有明显抗性(图 6F)。



A: 根癌农杆菌感染的本生烟草叶片; B: 培养 20 d 的本生烟草叶片; C: 培养 35 d 的本生烟草叶片; D: 生根培养 6 周的试管苗; E: 培养室中生长 2 周的转基因本生烟草; F: 在含 150 mmol/L NaCl 培养基中的野生型和转基因幼苗; G: PCR 检测转基因植株的结果; H: RT-PCR 检测转基因植株的结果。

图 6 本生烟草的遗传转化与鉴定

Fig. 6 Genetic transformation and identification of *Nicotiana benthamiana*

### 3 讨论

海藻糖是一种重要的渗透调节剂,可以使生物具有抗环境胁迫的能力<sup>[1,6]</sup>。在恶劣环境下,低等生物中海藻糖含量较丰富,但是在植物中含量却很少<sup>[11,15]</sup>。*TPS* 是海藻糖生物合成的关键酶,在大肠杆菌中,*otsA* 基因编码 *TPS*<sup>[9,12-13]</sup>。通过利用 Conserved Domain Search 工具对 *otsA* 蛋白保守结构进行分析显示,在该蛋白的内部存在一个 GT1-TPS 保守结构域,这与 *otsA* 的功能一致。序列比对结果表

明,*otsA* 和 ScTPS1 分享 45.1% 的相似性,而与 At-TPS1 序列相似性只有 26.2%;系统进化分析发现,大肠杆菌、啤酒酵母和拟南芥处于不同的进化分支,但大肠杆菌与啤酒酵母之间的距离较近,而与拟南芥之间的距离较远,所以可以推测,*otsA* 的功能很可能与酵母相似,而与拟南芥存在较大的差异,但它们在保守区域存在一致或相似的氨基酸序列,因此,这三种蛋白至少在部分功能上应该是相似的。根据生物信息学分析的结果可以预测,在植物中异源表达 *otsA* 基因有可能像在大肠杆菌中一样,能够增强其

抗胁迫能力。

本试验克隆了大肠杆菌的 *otsA* 基因,并构建了 p2300-*otsA-GFP* 表达载体。为了研究大肠杆菌 6-磷酸海藻糖合成酶对提高植物抗逆性的作用,通过农杆菌介导的方法将 *otsA* 导入到本生烟草中。对筛选得到的抗性植株进行检测表明,*otsA* 已整合到本生烟草的基因组中并能进行有效的转录。此外,与野生型相比,转基因幼苗耐盐能力明显提高。本试验成功的建立起本生烟草的转化体系,对于今后通过基因工程技术提高植物抵抗多种非生物胁迫的能力,促进粮食增产以及培育出更优良的农作物都具有非常重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 林栖凤. 耐盐植物研究[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [2] 刘国花. 植物抗旱耐盐机制概述[J]. 安徽农业科学, 2008,36(17):7084-7085,7092.
- [3] 张 科,田长彦,李春俭. 一年生盐生植物耐盐机制研究进展[J]. 植物生态学报,2009,33(6):1220-1231.
- [4] 李娅娜,江可珍,别之龙. 植物盐胁迫及耐盐机制研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2009(3):153-155.
- [5] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53: 247-273.
- [6] 傅琳琳,傅开科. 海藻糖的研究现状及其应用前景[J]. 江西科学,2000,18(3):182-186.
- [7] 孙兰菊,岳国峰,王金霞,等. 植物耐盐机制的研究进展[J]. 海洋科学, 2001,25(4):28-31.
- [8] CROWE J H, HOEKSTRA F A, CROWE L M. Anhydrobiosis[J]. Annu Rev Physiol, 1992,54: 579-599.
- [9] FILLINGER S, CHAVEROCHE M K, VAN DIJCK P, et al. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*[J]. Microbiology, 2001,147: 1851-1862.
- [10] GARG A K, KIM J K, OWENS T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(25): 15898-15903.
- [11] GODDIJN, O J M, VAN DUN K. Trehalose metabolism in plants[J]. Trends Plant Sci, 1999, 4:315-319.
- [12] AVONCE N, MENDOZA-VARGAS A, MORETT E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis [J]. BMC Evol Biol, 2006, 6: 109
- [13] KAASEN I, FALKENBERG P, STYRVOLD O B, et al. Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by KatF (AppR) [J]. J Bacteriol, 1992, 174: 889-898.
- [14] EASTMOND P J, GRAHAM I A. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate [J]. Curr Opin Plant Biol, 2003, 6: 231-235.
- [15] AVONCE N, LEYMAN B, MASCORRO-GALLARDO J O. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling [J]. Plant Physiol, 2004, 136: 3649-3659.
- [16] 陆玉建,刘俊华,王书平,等. 本生烟草愈伤组织的诱导和再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):52-54.
- [17] 陆玉建,刘 恒,李玉玺,等. AtZW10 蛋白亚细胞定位的初步研究[J]. 植物研究,2013,33(2):174-180.

(责任编辑:陈海霞)