

赖晓辉, 李 群. 高山离子芥耐冷基因的挖掘[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 768-774.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.007

高山离子芥耐冷基因的挖掘

赖晓辉^{1,2}, 李 群¹

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046; 2. 伊犁师范学院生物与地理科学学院, 新疆 伊宁 835000)

摘要: 冰缘植物高山离子芥具有极强的抗寒能力, 具葶离子芥为其同属近缘种, 但抗寒性远不及高山离子芥。本试验以高山离子芥和具葶离子芥植株为材料, 对这 2 种离子芥进行低温处理, 并采用 cDNA 扩增片段长度多态性 (cDNA-AFLP) 技术对其进行耐冷相关基因筛选, 共获得与耐冷相关的 28 条差异表达片段, 其中 7 条来自具葶离子芥, 21 条来自高山离子芥, 并对这 28 条差异表达的片段进行生物信息学分析。选取高山离子芥特有的 5 条差异表达片段 (TDFs), 采用 Realtime RT-PCR 进行低温诱导表达验证, 结果表明确实是低温诱导的特异表达片段。本试验结果为高山离子芥特有耐冷基因的功能研究及其应用提供了依据。

关键词: 高山离子芥; 具葶离子芥; 耐冷基因; 耐冷性

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0768-07

Digging of cold tolerant genes in two species of *Chorispora*

LAI Xiao-hui^{1,2}, LI Qun¹

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. College of Biology and Geography Sciences, Yili Normal University, Yining 835000, China)

Abstract: *Chorispora bungeana* Fisch. et Mey is a kind of periglacial plant which exhibits cold tolerance, while *Chorispora greigii* Regel, a closely related species, shows weak cold tolerance. In this study, the gene expressions between the two kinds of *Chorispora* at low temperature were compared by cDNA amplified fragment length polymorphism technique. Twenty-eight transcript-derived fragments (TDFs) were identified, in which seven TDFs and 21 TDFs belong to *C. greigii* and *C. bungeana*, respectively. Realtime RT-PCR confirmed that five TDFs from *C. bungeana* were specifically expressed at low temperature. These results provided the basis for function analysis and utilization of cold related genes in *C. bungeana* Fisch. et Mey.

Key words: *Chorispora bungeana* Fisch. et Mey; *C. greigii* Regel; cold tolerant gene; cold tolerance

收稿日期: 2016-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160051, C020407); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (200840102-40)

作者简介: 赖晓辉 (1989-), 女, 新疆乌鲁木齐人, 硕士, 助教, 主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。 (Tel) 18009992201; (E-mail) 327060649@qq.com

通讯作者: 李 群, (E-mail) liqun_007@126.com

高山离子芥 (*Chorispora bungeana* Fisch. et Mey) 是一种多年生草本植物, 属于十字花科离子芥属, 主要分布在新疆, 位于海拔 3 600~3 900 m 亚高山草甸和草原砾石质山坡上, 其生长环境恶劣, 常受到干旱和低温胁迫^[1], 而其本身却缺乏形态学上的特化结构, 无表皮毛和黏液细胞等保护

结构^[1],故推测其存在耐受低温的机制。具葶离子芥(*Chorispora greigii* Regel)为一年生草本植物,与高山离子芥为同属近缘物种,生长形态相似,但具葶离子芥的抗寒性远不如高山离子芥。因此,高山离子芥可作为植物抗低温分子机制研究的试验材料。

近年来,对高山离子芥的研究主要集中在抗性生理生化和分子机制方面。在生理生化方面的研究主要包括对高山离子芥细胞内钙离子水平的检测,对高山离子芥在不同胁迫条件(低温4℃、水分胁迫、渗透胁迫)下内源脱落酸(ABA)的积累和相关生理指标(细胞活力、质膜透性、膜脂过氧化性、脯氨酸含量)的测定,发现在不同胁迫条件下各项生理指标存在不同的变化趋势,说明高山离子芥除了具有很强的抗寒能力外,还有一定的抗高温、抗渗透胁迫能力,在不同胁迫条件下其抗性和信号转导机制也不同^[2]。对高山离子芥线粒体进行研究后发现,其有特殊的能量耗散体系^[3]。在冷胁迫下,高山离子芥谷胱甘肽的变化也与其抗寒性相关^[4]。对高山离子芥悬浮培养细胞进行研究,发现一氧化氮也是其抗寒机制中的一个重要因素,主要是通过对活性氧进行清除并作为信号分子参与抗寒^[5]。

在分子机制方面的研究主要包括对高山离子芥抗性相关基因的克隆及功能验证。多年来,人们陆续从高山离子芥中克隆得到许多与抗逆相关的基因,如铁蛋白基因 *CbFer*^[6-7]、甜菜碱醛脱氢酶基因 *CbBADH*^[8]、胚胎发生晚期丰富蛋白基因 *CbLEA*^[8]、铁转运蛋白基因 *CbIRT*^[9]、抗性蛋白基因 *CbP-GIP1*^[10]、谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *CbγECS*^[11]、MAPK 基因 *CbMAPK3*^[12]、冷调节基因 *CbCOR15*^[13]、脱水应答元件结合因子基因 *CBF/DREB1*^[14]、多聚半乳糖醛酸酶基因 *CbPGIP1*^[15]、*CbCBF4* 基因^[16]等,并对高山离子芥 MAPK 基因 *CbMAPK3* 进行原核表达,发现 *CbMAPK3* 在响应环境胁迫的过程中可能通过蛋白质表达量的变化对酶活性强弱进行调控^[17-18]。

高山离子芥抗性分子机制方面的研究主要是针对一些常见的已知功能基因,可能并非高山离子芥所特有的抗寒性基因,关于信号转导和基因诱导表达调控机制的研究较少。本研究拟以高山离子芥和具葶离子芥为试验材料,采用 cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)技术筛选耐冷差异表达基因,

结合 Realtime RT-PCR 技术对这 2 种离子芥属植物耐受低温能力的差异性机制进行初步分析,以期全面揭示高山离子芥的抗寒机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

高山离子芥和具葶离子芥植株取自新疆伊犁,将 2 种离子芥植株均分成 2 组进行处理,对照组(21℃ 黑暗培养 12 h)和处理组(4℃ 黑暗培养 12 h)均重复 3 次。

所用试剂有 RNA 提取试剂盒(百泰克公司产品)、双链 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa 公司产品)、限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Mse* I(NEB 公司产品)、T4 DNA Ligase(NEB 公司产品)、PCR 试剂(TaKaRa 公司产品)、寡核苷酸接头序列(生工公司产品)、寡核苷酸预扩增引物序列(生工公司产品)、寡核苷酸选择扩增引物序列(生工公司产品)、双丙烯酰胺 19:1(生工公司产品)、pMD18-T 载体(TaKaRa 公司产品)、DH5α 感受态细胞(全式金公司产品)、SuperRT cDNA Kit 试剂盒(康为公司产品)以及带有 ROX 的 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 试剂盒(Invitrogen 公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及双链 cDNA 的合成 采用试剂盒法分别提取处理组和对照组离子芥叶片的总 RNA,并检测其浓度和纯度,对合格的总 RNA 进行反转录,获得双链 cDNA,对内参基因 *EF1a* 进行检测。

1.2.2 cDNA-AFLP 差异条带筛选 用限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Mse* I 对反转录所得双链 cDNA 进行双酶切后连接双链接头,参照 Bachem^[19]所述方法进行预扩增和选择性扩增,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳对选择性扩增产物进行分离,分别查找对照和处理组的通过选择性扩增引物扩增所得的 2 种离子芥属植物的差异条带,仅对高山离子芥和具葶离子芥在 4℃ 低温下诱导表达的差异条带进行标记,标记后用干净刀片抠取差异条带并置于干净的 EP 管中。采用冻融法提取胶中的 DNA 片段,用 200 μl ddH₂O 洗涤凝胶条带 2 次,最后加 30 μl ddH₂O 置于 -20℃ 冰箱中过夜。将过夜冷冻的凝胶用干净的吸头捣碎,4℃ 静置 10 min,15 000 r/min 离心 20 min,取 2 μl 上清液作为模板,用预扩增引物进行二次 PCR

扩增(扩增程序同第一次预扩增),扩增后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,用琼脂糖凝胶回收试剂盒对二次 PCR 产物进行回收,并连接载体送至华大公司进行测序。接头、预扩增引物和选择扩增引物的序列如表 1 显示。

表 1 接头、预扩增引物和选择扩增引物序列

Table 1 Sequence of the primers used in this study

接头/引物	编号	碱基序列
Eco R I 接头		5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
		3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
预扩增引物	E ₀₀	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
选择扩增引物	E ₁	E ₀₀ +AC
	E ₂	E ₀₀ +AG
	E ₃	E ₀₀ +CA
	E ₄	E ₀₀ +CT
	E ₅	E ₀₀ +CC
Mse I 接头		5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
		3'-TACTCAGGACTCAT-5'
预扩增引物	M ₀₀	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
选择扩增引物	M ₁	M ₀₀ +AA
	M ₂	M ₀₀ +AC
	M ₃	M ₀₀ +AG
	M ₄	M ₀₀ +AT
	M ₅	M ₀₀ +TA

1.2.3 差异表达片段(TDFs)测序及功能分析 将测得的差异表达基因片段序列提交至 NCBI 数据库,采用 Blastx 比对方法进行同源性分析,并提交至 TAIR、GO 和 ClustalW2 等蛋白质数据库中进行比对,对 TDFs 进行功能预测分析。

1.2.4 差异表达序列的表达验证分析

1.2.4.1 TDFs 内参基因表达稳定性验证 以处理组和对照组的 2 种离子芥属植株叶片总 RNA 反转录所得单链 cDNA 为模板,以 GenBank 公布拟南芥内参基因 *EF1a* 设计正、反向引物 *EF1a* S (5'-ACACCTCCTTCACGATTT-3') 和 *EF1a* A (5'-TCT-TCTTGCTTTCACCCT-3'),对内参基因 *EF1a* 进行 PCR 扩增,检测其不同物种和不同处理中表达的稳定性。扩增体系与程序为:10×PCR buffer 2.0 μl,

正、反向引物各 1.0 μl,dNTP 2.0 μl,Taq 酶 0.3 μl,MgCl₂ 1.7 μl,单链 cDNA 模板 2.0 μl,加 ddH₂O 至 20.0 μl,94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 40 s,72 ℃ 50 s,扩增 20 个循环,72 ℃ 延伸 7 min。用 1% 琼脂糖电泳进行检测,并将内参基因 *EF1a* 的 PCR 产物送至华大基因公司进行测序。

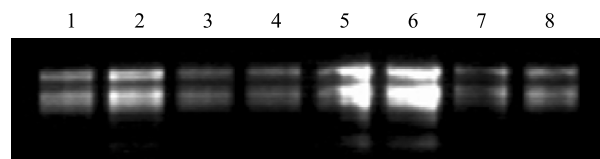
1.2.4.2 TDFs 实时荧光定量 PCR 检测 选取高山离子芥低温差异表达的目标 TDFs 进行差异表达验证,使用 Primer5 软件设计引物。

进行实时荧光定量 PCR,反应体系为:cDNA 1.0 μl,SYBR Mix 12.5 μl,加 ddH₂O 至 25.0 μl,反应程序为:95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃ 变性 15 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。对荧光定量数据处理使用 2^{-ΔΔCt} 法进行处理:ΔCt_{对照} = 对照组目的基因 Ct 值 - 内参基因 *EF1a* Ct 值,ΔCt_{处理} = 处理组目的基因 Ct 值 - 内参基因 *EF1a* Ct 值,ΔΔCt = ΔCt_{处理} - ΔCt_{对照},2^{-ΔΔCt} = 2^{-(ΔCt_{处理}-ΔCt_{对照})}。每组包含 3 个生物学重复和 2 个技术重复,并利用 Prism5.0 软件进行 Oneway ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 浓度及纯度测定

图 1 显示,在不同处理下提取的 2 种离子芥叶片总 RNA 条带清晰,无降解且浓度均较高,1~8 泳道总 RNA 浓度分别为 0.636 μg/μl、0.712 μg/μl、0.252 μg/μl、0.342 μg/μl、1.000 μg/μl、1.160 μg/μl、0.370 μg/μl、0.390 μg/μl,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值均在 2.0 左右,满足后续试验要求。



1~2:21 ℃ 下具萼离子芥总 RNA;3~4:4 ℃ 下具萼离子芥总 RNA;5~6:21 ℃ 下高山离子芥总 RNA;7~8:4 ℃ 下高山离子芥总 RNA。

图 1 叶片总 RNA 电泳图

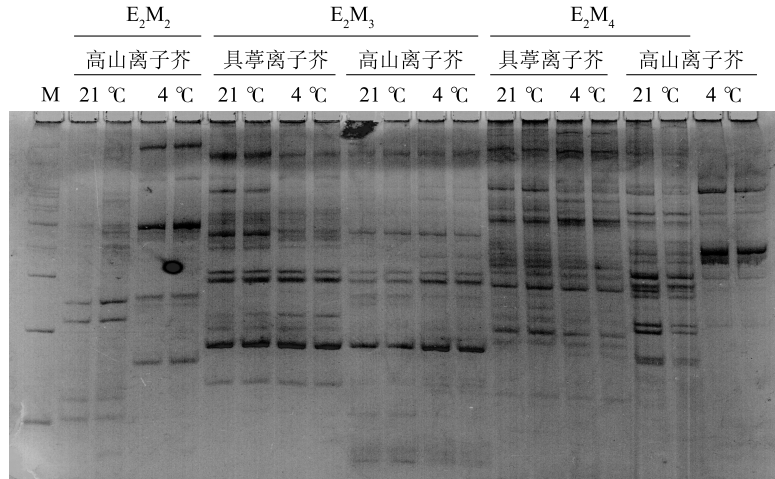
Fig.1 Detection of total RNA extracted from two *Chorispora* species at different temperatures

2.2 低温处理下高山离子芥基因的差异表达

高山离子芥和具萼离子芥在处理 and 对照中部分

选择扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果(图2)显示,与对照相比,在4℃处理组中2种离子芥属植株都存差异表达基因,在处理组中有些基因表达上调,

有些基因表达下调,还有些基因呈冷诱导表达或冷诱导沉默。



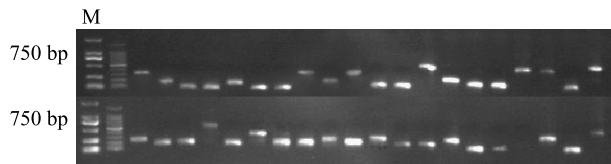
E_2 、 M_2 、 M_3 、 M_4 见表1。

图2 部分选择扩增产物电泳结果

Fig.2 Polyacrylamide gel electrophoresis profiles of some selectively amplified products

2.3 差异片段二次PCR及琼脂糖回收

选取高山离子芥和具萼离子芥在4℃低温下诱导表达的差异条带作为低温差异表达基因序列条带进行测序。以割胶回收的差异条带为模板,进行二次PCR,琼脂糖电泳后回收,电泳检测回收产物均为单一条带(图3),回收效率较高,可用于后续试验。



M: DNA marker 2000。

图3 二次PCR产物琼脂糖回收后的电泳检测结果

Fig.3 Detection of recovered products of secondary polymerase chain reaction (PCR) by agarose gel electrophoresis

2.4 差异条带测序结果的同源性及功能预测分析

成功获得35条差异条带序列,去掉载体序列、接头序列和引物序列后进行核酸序列的同源性比对,其中有7条差异条带在NCBI中没有同源序列,比对结果见表2,共获得与耐冷相关的28个差异表

达序列,其中7个属于具萼离子芥,21个属于高山离子芥。

2.5 差异表达序列的表达验证分析

2.5.1 内参基因 *EF1a* 的验证 图4显示,对所得具萼离子芥和高山离子芥内参基因 *EF1a* 测序序列进行同源性比对,发现2种离子芥属植物的 *EF1a* 基因均与拟南芥属胡菜的 *EF1a* 基因有很高的同源性,均高达95%。

EF1a 基因在2种离子芥属植物的处理组和对照组中的PCR扩增结果(图5)显示,不同物种和不同处理间 *EF1a* 基因的表达相对稳定,可以作为实时荧光定量PCR研究差异基因表达分析中的内参基因。

2.5.2 高山离子芥低温差异表达序列荧光定量PCR分析 与具萼离子芥相比,选取高山离子芥在4℃低温下特异表达的5条TDFs进行实时定量PCR检测,引物序列见表3。

图6显示,低温处理下,除TDF 5#10.2外,其余4条TDFs相对表达量均显著高于21℃下对照的表达量,其中差异序列TDF 4#10.1的相对表达量比对照约高6倍,差异序列TDF 3#10.2、TDF 3#10.1和TDF 6#10.2的相对表达量也比对照约高2倍。

表 2 差异表达序列同源性及功能预测分析

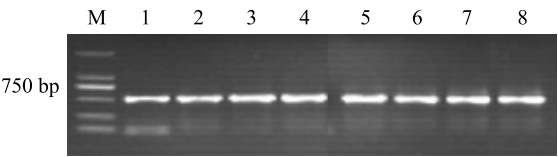
Table 2 Homology analysis of transcript-derived fragments (TDFs)

序号	TDF 编号	大小(bp)	注 释	E 值	同源性(%)	同源物种
1	1#10.6	85	3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶	3.000×10 ⁻¹¹	97	圆叶牵牛
2	2#10.2	87	假定蛋白 EUTSA	1.000×10 ⁻⁷	77	山嵛猪毛菜
3	3#10.1	163	1-氨基环丙烷-1-羧酸盐氧化类似蛋白 7	2.000×10 ⁻¹⁶	71	鼠耳芥
4	3#10.2	88	假定蛋白 EUTSA	1.000×10 ⁻⁷	77	山嵛猪毛菜
5	4#10.1	111	防御相关蛋白	2.000×10 ⁻¹¹	76	埃塞俄比亚芥
6	5#10.1	480	DNA 错配修复蛋白	0.008	74	短花药野生稻
7	5#10.2	231	假定表达蛋白	2.000×10 ⁻³⁹	87	鼠耳芥
8	6#10.1	168	假定蛋白 VITISV	1.000×10 ⁻²⁹	96	葡萄
9	6#10.2	169	肌动蛋白解聚因子 2 亚基 1	0.001	83	黄瓜
10	7#10.1	457	Octicosapeptide/Phox/Bem1p 家族蛋白	1.000×10 ⁻⁶¹	78	鼠耳芥
11	7#10.2-1	420	40S 核糖体蛋白 S24-1	7.000×10 ⁻⁷⁹	95	鼠耳芥
12	7#10.2-2	118	吸收同源蛋白	4.000×10 ⁻⁷	71	鼠耳芥
13	7#10.3-1	457	Octicosapeptide/Phox/Bem1p 家族蛋白	1.000×10 ⁻⁶¹	79	鼠耳芥
14	7#10.3-2	236	假定蛋白 VITISV	6.700	45	鼠耳芥
15	7#10.5	118	吸收蛋白同源物	3.000×10 ⁻⁸	74	鼠耳芥
16	8#10.1-1	309	核酸结合蛋白	4.000×10 ⁻³⁹	84	鼠耳芥
17	10#6.1	98	核糖体蛋白 S7	2.000×10 ⁻⁴	100	狭叶大叶藻
18	12#6.1	90	未命名蛋白产物	7.000×10 ⁻⁸	68	小盐芥
19	15#10.1	213	推测的 Mutator 转座酶	3.800	48	梗稻
20	23#6.1	366	未知蛋白	1.000×10 ⁻⁵⁵	72	鼠耳芥
21	4#6.1-1a	329	未命名蛋白产物	6.000×10 ⁻⁷³	99	小盐芥
22	4#6.1-1b	285	受体类似蛋白激酶	0.025	28	短花药野生稻
23	4#6.2-1	179	半乳糖激酶	7.000×10 ⁻³²	88	鼠耳芥
24	4#6.3	121	假定蛋白 EUTSA	2.000×10 ⁻¹³	83	山嵛猪毛菜
25	7#10.4	119	吸收蛋白同源物	1.000×10 ⁻⁸	77	鼠耳芥
26	7#10.6-1	457	Octicosapeptide/Phox/Bem1p 家族蛋白	5.000×10 ⁻⁶⁷	79	鼠耳芥
27	7#10.6-2	119	吸收蛋白同源物	8.000×10 ⁻¹⁰	80	鼠耳芥
28	21#10.2	65	受体类似蛋白激酶 1	0.005	75	鼠耳芥

TDF 编号为试验过程中不同处理和样品管号的标记, #号之前数字为 25 对引物组合号, #号后数字为不同种、处理和生物学重复植株编号, 小数点后数字为同一模板和选择扩增引物下的多个扩增产物序列条带号。



图 4 2 种离子芥属植物与拟南芥内参基因 *EF1a* 序列的比对
Fig.4 Sequence alignment of the reference gene *EF1a* between two *Chorispora* species and *Arabidopsis lyrata*



M: DNA marker 2000; 1, 2: 21 °C 下具萼离子芥的内参基因 *EF1a*; 3, 4: 4 °C 下具萼离子芥的内参基因 *EF1a*; 5, 6: 21 °C 下高山离子芥内参基因 *EF1a*; 7, 8: 4 °C 下高山离子芥的内参基因 *EF1a*。

图 5 2 种离子芥属植物不同处理组间 *EF1a* 基因的表达

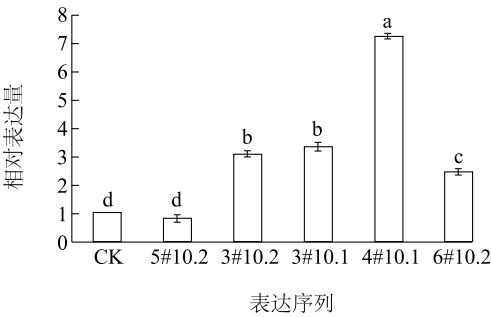
Fig.5 Expression of the reference *EF1a* gene in two *Chorispora* species

表 3 引物序列

Table 3 Primers sequence

引物编号	引物序列(5'→3')
5#10.2	GCGTAACTATTATGGAATGCAGC CCACAATGTGTCTCTGATGC
3#10.1	AATTCAACGATTTACGGACCAA CGCGTTCAAGTGTTCATATC
3#10.2	AATTCAACGACATGGACGG GAATCGTAGTAGCCGGCG
4#10.1	TAACATAGCCGATTTGGTTGT ACGTTATCTTCTGGATTTCCTTG
6#10.2	AATTCAAGTAGAGCTTCAGGCAAC ACAGTCACAGGAACTGTAAAGAGG

引物编号见表 2 注。



不同小写字母表示差异显著 $P<0.05$ 。CK: 对照 (21 °C 黑暗培养 12 h 的高山离子芥表达序列); 5#10.2、3#10.2、3#10.1、4#10.1、6#10.2 见表 2。

图 6 高山离子芥差异表达序列 Realtime-PCR 表达分析

Fig.6 Realtime RT-PCR expression analysis of differentially expressed sequences in *C. bungeana*

3 讨论

多年研究结果表明,低温下植物细胞内会产生

过多的氧自由基,对细胞膜和细胞器造成过氧化伤害,具有氧化还原酶活性的蛋白可以直接参与清除氧自由基的过程,并且植物细胞骨架解聚与重组是低温信号感知并进行低温信号转导以及增强细胞低温耐受性的一个关键过程。Realtime-PCR 验证的 5 条高山离子芥 TDFs 生物信息学分析结果显示,TDF 3#10.1 编码的蛋白具有氧化还原酶活性,TDF 6#10.2 所属基因编码肌动蛋白解聚因子 2 的 1 个亚型,肌动蛋白解聚因子参与细胞骨架的解聚与重组。但 TDF 3#10.1 编码的蛋白具体为何种氧化还原酶? TDF 6#10.2 编码的肌动蛋白解聚因子是如何参与高山离子芥低温信号转导响应的? 高山离子芥低温特异表达编码未知功能蛋白基因片段 TDF 3#10.2 具体编码何种蛋白? 编码的具有甲基化转移酶活性蛋白的 *CJSI* 基因片段 TDF 4#10.1 与高山离子芥抗寒性关系如何? 这些问题都有待深入研究。

近年来,对高山离子芥的研究主要集中在功能已知的逆境胁迫相关基因 (*COR*、*CBF4*、*BADH*、*LEA*、*MAPK3*、*FER* 等) 的克隆方面。本试验为高山离子芥特殊的抗寒性分子机制的深入研究以及响应基因的深入挖掘等方面提供了依据,同时可为棉花、番茄及林果类等新疆重要经济作物抗寒性品种的改造提供转基因资源。

参考文献:

[1] 阿依吐尔汗, 谭敦炎, 李志军, 等. 高山离子芥营养器官的结构与环境的关系研究[J]. 新疆农业大学学报, 1998, 21(4): 273-277.

[2] 李文宣. 高山离子芥 *NCED* 基因的表达和 ABA 积累对逆境条件的响应[D]. 兰州: 兰州大学, 2006.

[3] 常建锋. 高山离子芥线粒体交替途径介导的抗寒特征研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.

[4] WU J, ZHAO Z, AN L, et al. Inhibition of glutathione synthesis decreases chilling tolerance in *Chorispora bungeana* callus [J]. Cryobiology, 2008, 57(1): 9-17.

[5] LIU Y, JIANG H, ZHAO Z, et al. Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling-induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 936-944.

[6] 张丽静. 高山离子芥铁蛋白基因 *CbFer* 的克隆、表达及其抗氧化功能分析[D]. 兰州: 兰州大学, 2006.

[7] ZHANG L, SI J, ZENG F, et al. Molecular cloning and characterization of a ferritin gene upregulated by cold stress in *Chorispora bungeana* [J]. Biological Trace Element Research, 2009, 128

- (3): 269-283.
- [8] 张 华. 高山离子芥 *BADH* 基因和 *LEA* 基因的克隆、表达及功能分析[D]. 兰州:兰州大学,2007.
- [9] 韩 艳,李争艳,岳修乐,等. 高山离子芥铁转运蛋白基因编码序列的克隆及其抗逆性表达的实时定量分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2008,24(6):549-555.
- [10] 狄翠霞,安黎哲. 拟南芥 *AtPGIP1* 蛋白组织定位和植物抗病性的研究[C]. 兰州:兰州大学出版社,2008.
- [11] WU J, QU T, CHEN S, et al. Molecular cloning and characterization of a γ -glutamylcysteine synthetase gene from *Chorispora bungeana*[J]. Protoplasma, 2009, 235(1/4): 27-36.
- [12] ZHANG T, LIU Y, XUE L, et al. Molecular cloning and characterization of a novel MAP kinase gene in *Chorispora bungeana*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(1): 78-84.
- [13] 司 婧. 高山离子芥冷调节基因 *CbCOR15* 提高转基因烟草抗寒性的研究[D]. 兰州:兰州大学,2009.
- [14] 杨同文,王红星,刘天学,等. 高山离子芥 CBF/DREB1 转录因子基因的分离与表达[J]. 西北植物学报,2009, 29(8):1507-1513.
- [15] DI C, LI M, LONG F, et al. Molecular cloning, functional analysis and localization of a novel gene encoding polygalacturonase-inhibiting protein in *Chorispora bungeana*[J]. Planta, 2009, 231(1): 169-178.
- [16] 贺洞杰. 高寒冰缘植物高山离子芥 *CbCBF4* 基因功能的研究[D]. 兰州:兰州大学,2012.
- [17] 张腾国,刘玉冰,孙 坤,等. 高山离子芥 *CbMAPK3* 基因克隆与原核表达[J]. 植物研究, 2009, 29(6):692-695.
- [18] 张腾国,张 艳,王 娟,等. 高山离子芥 MAP 激酶基因 *CbMAPK3* 的克隆[J]. 植物生理学通讯,2010(4):335-340.
- [19] BACHEM C W B, HOEVEN R S, BRUIJN S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development[J]. The Plant Journal, 1996, 9(5): 745-753.

(责任编辑:王 妮)